



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Síntesi d'anàlegs de la biotina i lligands divalents. Estudi de la interacció amb avidina i estreptavidina

Jordi González García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Doctorat en Química Orgànica de la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral per optar al grau de Doctor

**Síntesi d'anàlegs de la biotina i lligands divalents.
Estudi de la interacció amb avidina i estreptavidina.**

Memòria presentada per

Jordi González García

Barcelona, 30 de setembre de 2016

Dirigida i revisada per:

Dr. Joan Anton Farrera Piñol

Dr. Ernesto Nicolás Galindo

(Professor Titular, Universitat de Barcelona) (Professor Titular, Universitat de Barcelona)

Departament de Química Inorgànica i Orgànica

Secció de Química Orgànica

Facultat de Química de la Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Agraïments

En primer lloc vull agrair als directors de la present Tesi Doctoral per haver-me guiat durant tot aquest camí: al Dr. Joan Anton Farrera li agraeixo especialment el fet d'haver-me donat la oportunitat de desenvolupar la Tesi Doctoral al seu grup i dirigir el present treball, i al Dr. Ernesto Nicolás per compartir la direcció de la Tesi i donar-me l'espai necessari per permetre desenvolupar part del treball.

En segon lloc, vull fer un agraïment especial a tots els professors que han participat de la meva formació i m'han encoratjat a seguir el camí del coneixement, des de l'escola a la llicenciatura. Vull agrair molt especialment a la Marisa per descobrir-me l'apassionant món de la química i a en Luís Pueyo per haver-me transmès aquesta passió per la ciència.

També vull agrair a tots els companys d'aventura que han esdevingut amics i gairebé família. Per un costat a l'Ivan, per ser el meu primer company de laboratori i ensenyar-me moltes coses durant les primeres etapes de l'estada al laboratori, així com a la Marina per tot l'ajut i bones estones passades al laboratori (i per la *gosadera*). Per un altre, al grup 'adoptiu' on he pogut compartir hores de feina i on he rigut i he après molt, gràcies Caro (per ensenyar-me tant i tant), David (per fer-me sempre riure, *¿i pero cómo!?*), Blanca (perquè mai saps per on pot sortir -literalment-), Marta Font (*Verge Santa de la Trinitat!*), Nerea (*però... Aleeeeeeeix!*), Roser (ha estat genial que tornessis), Javi (la rata en cap), Aleix (porta al·lè!), Andrea (o *Andresi*), Ruth (o *Ruther*, o...), Elvira (*pues me voy, y te vas*), així com a la resta que han passat més o menys temps al laboratori, però molt especialment a la meva estimada Ester (gràcies *cari* per tots els divendres i moltíssimes coses més). Òbviament vull agrair als JVs perquè són els companys que han esdevingut família; a la Laura per haver compartit tantes històries boniques des d'aquella síntesi de l'aspirina, a l'Hèctor per ser el més *molongui* del món, al Jokin perquè des del primer dia va esdevenir un company per sempre, al Dani per haver compartit tants bons moments dins i fora del *campus*, a l'Eleno perquè sense els seus crits això seria molt avorrit, al Cristian per ser el meu nou millor amic del *gym*, a la Maria del Mar (-emoto) per ser la millor especialista en mots

Tesi Doctoral

encreuats (i deixar-me dibuixar-te amb totes les teves actualitzacions), al Lluís perquè he après molt d'ell (*NA*), a l'*Alejandro*, a la *Mire*, a la *Lady Gago*, així com a la resta amb qui he pogut compartir més o menys temps (*HelenaMoraRadó*, *Esther*, *Anna*, *Kike*, etc.). No vull oblidar-me dels altres companys de departament/secció que han fet aquesta etapa més alegre i molts dels quals ja han marxat; gràcies *Albert* (per tots els riures i divendres), *Guillem*, *Omar*, *Javi*, *Alejandro*, *Carlos*, *Alexis*, *Laia*, *Toni* i *Aida* i *Albert* (per ser els millors veïns), *Ignasi*, etc.

No em puc oblidar de la *Lariza*, a qui admiro per la motivació i l'energia que transmet.

Finalment vull agrair a aquelles persones externes a tot aquest món que m'han acompanyat durant tot aquest temps, en especial a la meva família que sempre m'ha deixat escollir el meu camí i m'ha recolzat sense dubtar, així com a aquelles persones que son amics i companys de vida que m'han fet costat: a en *Cristian*, als *olesanos (i adjunts)*, a les *senyores amb Gràcia*, als companys de llicenciatura (en especial a la *Sílvia*, ja que sóc qui sóc gràcies, en gran part, a ella), als amics que em vaig emportar de l'*Erasmus* a *Nijmegen* (en especial a la *Sílvia* i al *Jose Ángel* per ser els millors companys d'*Esfera* i comprendre el que és portar una Tesi), a la *Blanca* pels dijous, al *Manu (maravilloso)* a l'*Eli*, a la *Maria* i a moltíssimes persones més.

Gràcies a tots.

“El món és el meu país i la ciència, la meva religió.” - Christiaan Huygens

Índex

1 Introducció	1
1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR I RECONeixEMENT BIOLÒGIC.....	1
1.2 LES PROTEÏNES AVIDINA I ESTREPTAVIDINA.....	2
1.3 BIOTINA.....	4
1.4 ELS COMPLEXOS AVIDINA-BIOTINA I ESTREPTAVIDINA-BIOTINA.....	5
1.5 ALTRES LLIGANDS DE L'AVIDINA I L'ESTREPTAVIDINA	7
1.5.1 Contribució dels diferents trets estructurals de la biotina en l'afinitat.....	7
1.5.2 Altres compostos d'interès que s'uneixen a l'avidina i l'estreptavidina	10
1.5.3 L'àcid 2-(4'-hidroxifenil)azobenzoic (2).....	11
1.5.4 Glicolurils i propandiurees.....	14
1.5.4.1 Glicolurils i derivats	14
1.5.4.2 Propandiurees, dimetilpropandiurees i derivats	16
1.6 MULTIVALÈNCIA.....	18
1.6.1 Concentració efectiva i molaritat efectiva.....	19
1.6.2 Consideracions termodinàmiques del procés. Influència de l'espaiador.....	21
1.6.3 Lligands divalents d'avidina i estreptavidina.....	22
2 Objectius	27
3 Lligands divalents semi-rígid	29
3.1 ESTRUCTURA DELS LLIGANDS DIVALENTS	29
3.2 PLANTEJAMENT SINTÈTIC.....	30
3.3 SÍNTESI DELS LLIGANDS DIVALENTS SEMI-RÍGIDS.....	34
3.3.1 Síntesi lineal des dels extrems cap al nucli rígid (Aproximació I)	34
3.3.1.1 Síntesi del lligand divalent 24.....	35
3.3.1.2 Síntesi del lligand divalent 25.....	41
3.3.2 Síntesi convergent del lligand divalent 25 (Aproximació II)	43
3.4 DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS D'ASSOCIACIÓ DELS LLIGANDS 24 I 25 A AV I SAV	46
3.4.1 Mètode de la valoració espectrofotomètrica competitiva	46
3.4.1.1 Model d'unió d'una valoració espectrofotomètrica competitiva d'Av o SAV amb un lligand divalent.....	47
3.4.2 Resultats de les valoracions d'Av i SAV amb lligands divalents 24 i 25.....	50
3.5 CONCLUSIONS.....	55
4 Lligands monovalents quirals	57
4.1 DISSENY DELS LLIGANDS MONOVALENTS	57

4.2 APROXIMACIÓ SINTÈTICA ENANTIOSELECTIVA.....	58
4.2.1 Anàlisi retrosintètic enantioselectiu.....	58
4.2.2 Proves de dessimetrització via una reacció organocatalítica.....	59
4.2.2.1 Dessimetrització de ciclohexanones 4-substituïdes.....	59
4.2.2.2 Aminoxilació selectiva en α a ciclohexanones 4-substituïdes amb nitrogen.....	62
4.2.2.2.1 Proves d'aminoxilació sobre el compost 36 (acetamida).....	62
4.2.2.2.2 Proves d'aminoxilació sobre el compost 35 (tosilurea).....	63
4.2.3 Proves de ciclació intramolecular.....	65
4.3 APROXIMACIÓ NO ENANTIOSELECTIVA.....	66
4.3.1 Anàlisi retrosintètic no enantioselectiu.....	67
4.3.2 Obtenció de l'intermedi bicíclic 45	67
4.3.2.1 Bromació en α al carbonil.....	67
4.3.2.2 Ciclació intramolecular.....	71
4.3.2.3 Proves d'eliminació del grup tosil de la urea.....	73
4.3.3 Estudis sobre la construcció de la cadena lateral.....	74
4.3.3.1 Proves d'olefinació del carbonil.....	74
4.3.3.1.1 Formació de l'enllaç C-C per atac d'un organometàl·lic sobre el carbonil.....	74
4.3.3.1.2 Olefinació de tipus Wittig de la cetona.....	77
4.3.3.1.3 Generació del tercer estereocentre.....	78
4.3.4 Síntesi d'anàlegs amb diferents longituds de la cadena lateral.....	82
4.3.4.1 Obtenció del lligand monovalent amb 1 metilè a la cadena lateral.....	82
4.3.4.2 Obtenció del lligand monovalent amb 3 metilens a la cadena lateral.....	83
4.3.4.2.1 Reducció de l'ester 66 a l'aldehid 69	83
4.3.4.2.2 Transformacions per obtenir el lligand amb 3 metilens a la cadena lateral.....	85
4.3.4.3 Obtenció del lligand monovalent amb 4 metilens a la cadena lateral.....	86
4.3.4.3.1 Estudis de l'olefinació de l'aldehid 69A amb un fragment amb 3 metilens.....	86
4.3.4.3.2 Síntesi final del lligand monovalent amb 4 metilens a la cadena lateral.....	89
4.3.4.4 Separació dels enantiòmers per HPLC amb fase estacionària quiral.....	91
4.4 DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS D'ASSOCIACIÓ DELS LLIGANDS MONOVALENTS A AV I SAV..	92
4.4.1 Mètode de la valoració espectrofotomètrica competitiva.....	92
4.4.1.1 Model d'unió d'una valoració espectrofotomètrica competitiva d'Av o SAV amb un lligand monovalent únic.....	92
4.4.1.2 Model d'unió d'una valoració espectrofotomètrica competitiva d'Av o SAV amb un lligand racèmic.....	94
4.4.2 Mètode de la valoració espectrofluorimètrica.....	96
4.4.2.1 Model d'unió d'una valoració espectrofluorimètrica d'Av o SAV amb lligands monovalents....	99
4.4.3 Determinació de les K_a dels lligands monovalents a l'avidina.....	102
4.4.4 Determinació de les K_a dels lligands monovalents a l'estreptavidina.....	108
4.5 CONCLUSIONS.....	113
5 Part experimental.....	115

5.1 MATERIALS I MÈTODES	115
5.2 LLIGANDS DIVALENTS SEMI-RÍGIDS	116
5.3 PROCEDIMENT GENERAL DE LES VALORACIONS ESPECTROFOTOMÈTRIQUES COMPETITIVES DELS LLIGANDS DIVALENTS.....	134
5.4 LLIGANDS MONOVALENTS QUIRALS	134
5.5 PROCEDIMENT GENERAL DE LES VALORACIONS ESPECTROFOTOMÈTRIQUES COMPETITIVES DELS LLIGANDS MONOVALENTS	180
5.6 PROCEDIMENT GENERAL DE LES VALORACIONS ESPECTROFLUORIMÈTRIQUES DELS LLIGANDS MONOVALENTS.....	180
6 Acrònims	183
7 Índex de compostos	185
8 Bibliografia.....	193

1 Introducció

Gràcies a certes propietats d'alguns sistemes biològics com el reconeixement molecular, l'autoensamblatge i la capacitat de dur a terme processos fisicoquímics a nivell supramolecular s'han pogut desenvolupar durant els últims anys noves tècniques biomèdiques, nous materials o nous mètodes de detecció, entre d'altres.¹⁻³ Un dels sistemes més estudiat en aquest camp és el format per les proteïnes avidina i estreptavidina amb el seu lligand natural, la biotina (vitamina H o B₇).^{4,5}

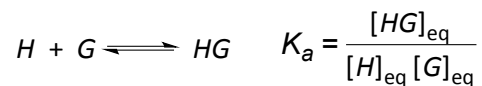
1.1 Química supramolecular i reconeixement biològic

La química supramolecular estudia les interaccions no covalents entre diferents espècies discretes per formar estructures més grans o complexes; com per exemple els acoblaments que donen lloc a les estructures quaternàries de les proteïnes o la doble hèlix d'ADN, els complexos lligand-proteïna i les arquitectures moleculars mecànicament entrelaçades, entre d'altres.^{2,3,6}

El reconeixement molecular és la base de molts processos biològics (química enzimàtica, anticossos-antígens, transport de membrana, etc.), així com la base del desenvolupament de molts nous materials i avenços en nanotecnologia.⁶ Les interaccions implicades en tots aquests processos són de caràcter no covalent (interaccions hidrofòbiques, electrostàtiques, de dipol induït, π - π i per pont d'hidrogen),³ on juga també un paper molt important la complementaritat de formes dels compostos implicats, que poden patir canvis conformacionals en la unió.²

Aquests compostos implicats en el reconeixement molecular es poden classificar en *hosts* —o receptors— (aquelles unitat que 'acullen') i *guests* —o lligands— (aquelles unitats —generalment més petites que els *hosts*— que s'inclouen dins aquests últims).

La interacció *host-guest* dona lloc a un *complex*. La formació d'aquest tindrà lloc si és un procés termodinàmicament favorable ($\Delta G^{\circ} < 0$). Per tant, es pot determinar una constant d'afinitat (K_a) associada al procés d'equilibri; així com els paràmetres de ΔH° i ΔS° relacionats (Equació 1).



Equació 1

El balanç energètic del procés global comprèn la contribució energètica de cadascuna de les etapes que el componen (solvatació/desolvatació, establiment/trencament d'interaccions, canvis conformationals, etc.).^{3,7,8}

Moltes aplicacions s'han derivat de la recerca en el camp de la química supramolecular, com és per exemple el cas de mètodes analítics de separació d'enantiòmers,^{9,10} materials moleculars,¹¹⁻¹³ catàlisi,¹⁴ dispositius òptics,¹⁵ interruptors moleculars,^{16,17} biomedicina,¹⁸ informàtica,¹⁹ administració de fàrmacs^{20,21} i sensors,^{22,23} entre d'altres.^{2,24}

1.2 Les proteïnes avidina i estreptavidina

L'avidina (Av) i l'estreptavidina (SAv) són proteïnes tetramèriques (formades per quatre subunitats idèntiques) de 67 i 60 kDa respectivament.^{4,25,26} L'avidina és una proteïna glicosilada d'origen animal (és abundant en la clara d'ou); en canvi, l'estreptavidina és d'origen bacterià (expressada per l'espècie *Streptomyces Avidinii*).²⁷ Totes dues es consideren els *hosts* natural de la biotina i es creu que tenen la funció d'inhibir el creixement bacterià.⁴

Tot i ser molt similars en la seva estructura quaternària, les dues proteïnes presenten diferències en les seves seqüències d'aminoàcids; tot i això, comparteixen trets estructurals als llocs d'unió que fa que tinguin en comú la capacitat de complexar biotina.^{4,27}

L'estructura bàsica de cada subunitat en ambdues proteïnes és un barril β format per vuit fulls β antiparal·lels (Figura 1), la major part de les diferències en la seqüència d'aminoàcids que presenten són als bucles que connecten els fulls β .²⁸⁻³⁰

Els monòmers interaccionen entre sí per donar lloc a l'estructura quaternària (Figura 2). L'anomenada interacció 1-4 (entre els monòmers 1 i 4) és la més forta, això és degut a la gran superfície d'interacció entre els dos barrils β gràcies a interaccions de

Van der Waals i ponts d'hidrogen. De fet es considera que el tetràmer és el resultat de la interacció de dos d'aquests dímers.^{28,29,31-34}

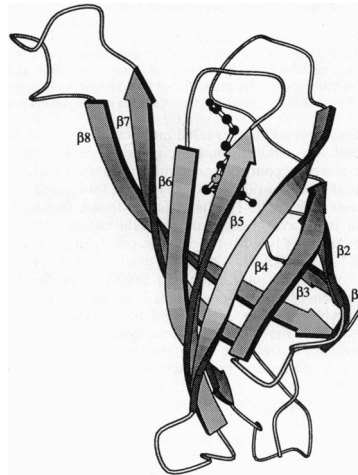


Figura 1. Subunitat de l'avidina on s'indiquen els fulls β , els bucles i la biotina al lloc d'unió.²⁸

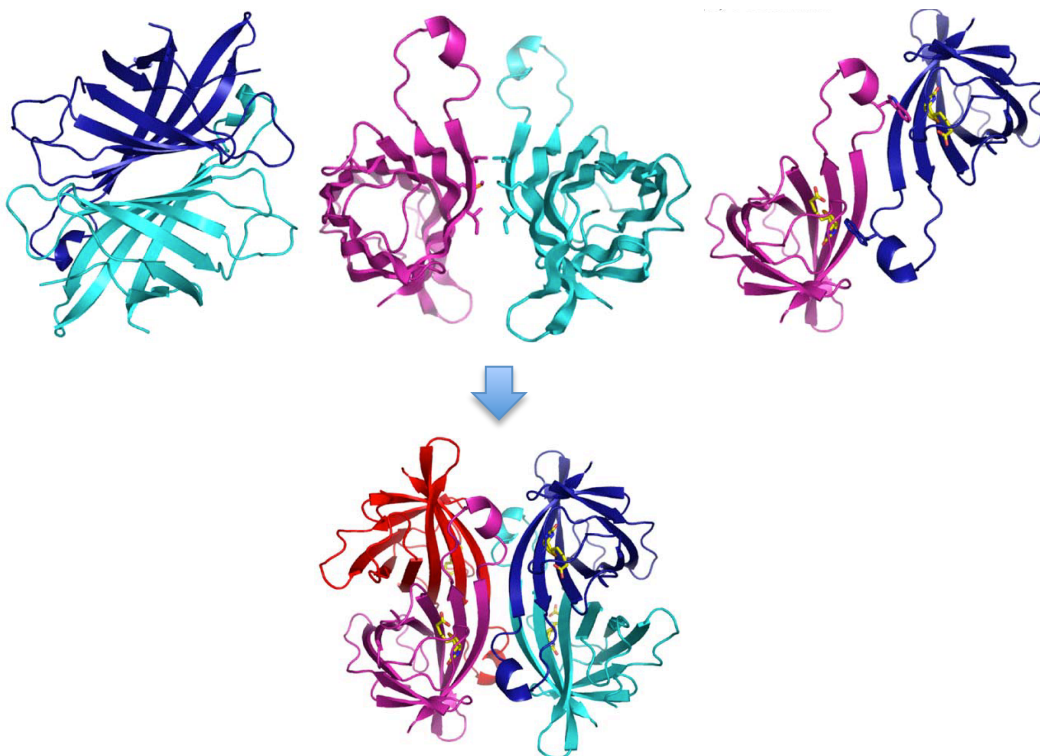


Figura 2. Estructura quaternària de l'avidina, la biotina es representa en groc als llocs d'unió. Interaccions entre monòmers (a dalt i d'esquerra a dreta): interacció 1-4, interacció 1-3 i interacció 1-2. Donen com a resultat l'estructura quaternària de l'avidina (a baix).²⁹

D'altra banda, la interacció 1-3 és producte només d'interaccions hidrofòbiques en l'avidina, però en l'estreptavidina intervé una interacció hidrofòbica i diverses de polars. Finalment, la interacció 1-2 ve donada principalment pel triptòfan del bucle

L7,8. Aquesta augmenta quan la biotina s'hi uneix, ja que desplaça el bucle i augmenta la interacció.^{28,35}

Les estructures quaternàries resultants deixen els quatre llocs d'unió disposats dos a dos en cares oposades de la proteïna (Figura 2, Figura 3).

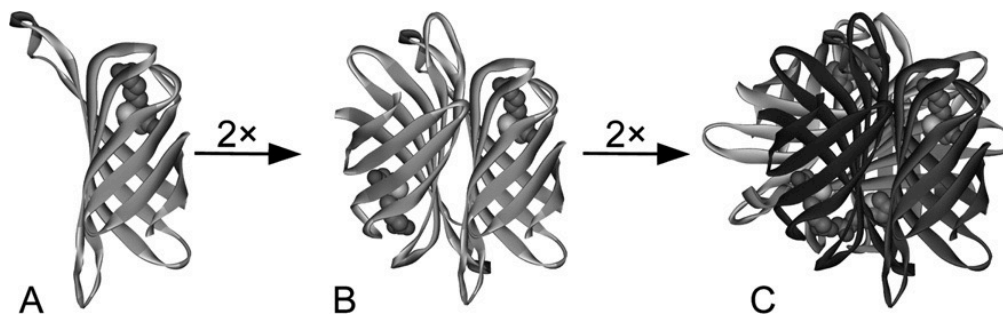
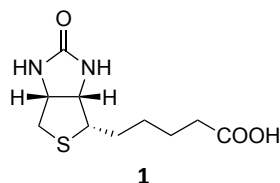


Figura 3. Estructura quaternària de l'estreptavidina on es veu la biotina al lloc d'unió al monòmer (A), el dímer 1-4 (B) i el tetràmer resultant de la unió dels dos dímers (C).³⁰

1.3 Biotina



La biotina (**1**) és una vitamina hidrosoluble (B₇ o H), també coneguda com a coenzim R. L'estructura es va determinar per Raigs X al 1966 per *Trotter* i *Hamilton*.³⁶ Està composta per una estructura tipus biciclo[3.3.0], té un grup urea a un dels cicles i un sofre en l'altre. A més, disposa d'una cadena lateral de valerat unida al carboni adjacent a l'àtom de sofre. Cal destacar la presència de 3 centres estereogènics a l'estructura (els 2 carbonis cap de pont i el que està unit a la cadena de valerat), fet que provoca que puguin existir diferents estereoisòmers. La forma natural és la corresponent a la D-(+)-biotina, on els dos anells fusionats es troben en *cis*, així com la cadena lateral, també en *cis* a l'anell d'imidazolidona.

La funció biològica de la biotina és la de ser un transportador de CO₂, per tant es tracta d'un coenzim per diferents carboxilases.³⁷ Aquestes estan implicades en la síntesi i metabolisme d'àcids grassos així com de diferents aminoàcids. Quan una carboxilasa es *biotinila* el transport de CO₂ es fa mitjançant l'extrem 1'-N de la biotina.³⁸⁻⁴⁰

A més, s'ha descobert que també juga un paper important en la regulació en l'expressió de gens (epigenètica), donant estructura a la cromatina via *biotinilització* d'histones i en diversos processos de comunicació cel·lular.⁴¹⁻⁴³

1.4 Els complexos avidina-biotina i estreptavidina-biotina

Les unions que formen aquestes proteïnes amb la biotina es consideren de les més fortes que es coneixen en les quals intervingui algun compost de baix pes molecular. Les constant d'associació (K_a) són aproximadament d' $1,6 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$ en el cas de l'avidina i de $2,5 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$ en el cas de l'estreptavidina,^{4,27} de manera que es consideren complexacions gairebé irreversibles. La forta unió que presenten és deguda principalment a tres tipus d'interaccions no covalents: hidrofòbiques, de van der Waals i ponts d'hidrogen, que es formen entre la biotina i els residus del lloc d'unió de les proteïnes.

El lloc d'unió en l'avidina i l'estreptavidina es troba en l'obertura del barril β , que té una mida adequada per acollir el lligand (293 \AA^3 del lloc d'unió per 242 \AA^3 per la biotina).⁴⁴ La biotina es disposa de manera que el sistema bicíclic queda a la part més profunda de la cavitat, en canvi, la cadena lateral està més exposada a la superfície, sent el carboxilat la part més accessible.⁴⁴ És per això que es poden derivatitzar molècules de biotina per l'extrem del carboxilat que mantinguin una afinitat molt elevada per l'avidina i l'estreptavidina.

Les interaccions entre la biotina i els aminoàcids del lloc d'unió són múltiples. D'una banda, hi ha diverses interaccions hidrofòbiques entre el lligand i diferents residus apolars, sobretot els triptòfans, del lloc d'unió. En el cas de l'avidina és l'anell de tetrahidrotiofè el que fa interaccions amb els residus aromàtics Trp70, Phe79, Trp97, Trp110.⁴⁴ En canvi, en el cas de l'estreptavidina, aquest interacciona amb el Trp70, Trp92, Trp108 i Trp120 (Figura 4).⁴⁵ La complexació provoca un canvi en l'entorn dels triptòfans, que implica un descens en la fluorescència d'aquests, fet que es pot aprofitar per fer determinacions quantitatives de proteïna.²⁷

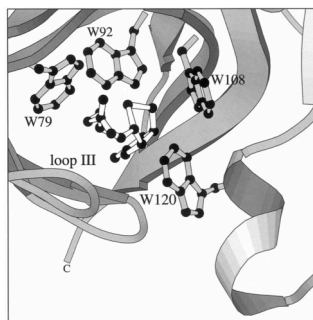


Figura 4. Representació del lloc d'unió de l'estreptavidina on es mostren els triptòfans que estableixen interaccions hidrofòbiques amb la biotina.⁴⁵

D'altra banda, s'observen moltes interaccions per pont d'hidrogen entre la biotina i alguns residus del lloc d'unió. Per un extrem, el fragment *ureido* en fa cinc i el sofre una en ambdues proteïnes. Per l'altre extrem, el carboxilat n'estableix cinc en el cas de l'avidina i només dues en el cas de l'estreptavidina (Figura 5).⁴⁴⁻⁴⁸

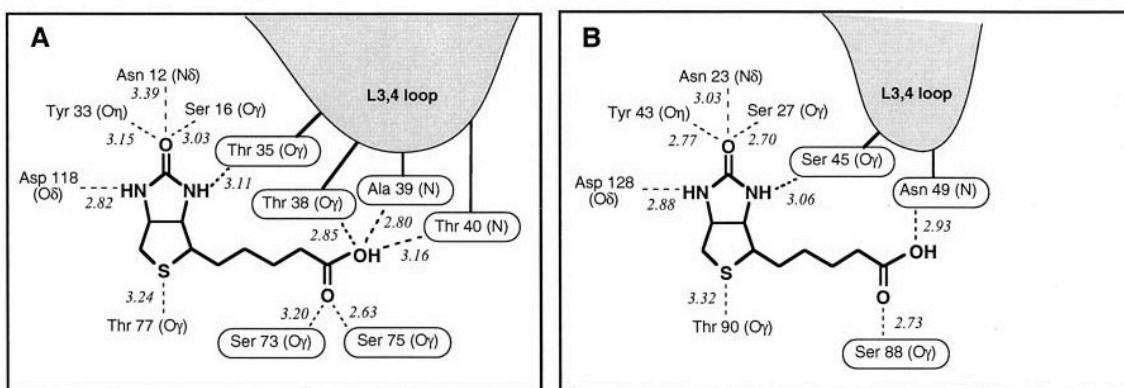


Figura 5. Esquema que representa les interaccions per pont d'hidrogen entre: (A) l'avidina i la biotina i (B) l'estreptavidina i la biotina. S'indiquen els residus responsables d'aquestes.⁴⁶

Cal destacar que diversos d'aquests ponts d'hidrogen s'estableixen amb aminoàcids del bucle que uneix els fulls 3 i 4 (L3,4). Quan això té lloc (en produir-se la complexació), el bucle passa d'estar desordenat a adoptar una conformació fixada que tanca la biotina en el lloc d'unió, fent la unió més forta (Figura 6). L'avidina té un bucle de 12 aminoàcids (del 36 al 44), tres aminoàcids més llarg que el de l'estreptavidina (del 45 al 52), fet que permet les interaccions extra, que bloquegen més efectivament la biotina.^{44,45,49}

El nombre d'interaccions no covalents en el cas de l'avidina és superior a les de l'estreptavidina, fet que unit a la millor protecció que ofereix el bucle de l'avidina, justifica, en part, la major afinitat de la biotina per a aquesta.⁴⁴

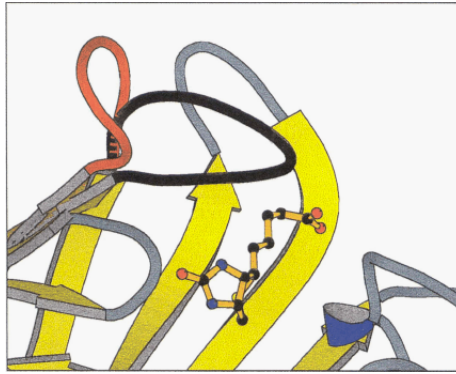


Figura 6. Representació de la complexació estrepavidina-biotina, on es veu el bucle L3,4 en la conformació oberta (en vermell, en absència de biotina) i en la conformació tancada (en negre, en presència de biotina al lloc d'unió).⁴⁹

El sistema (estrep)avidina-biotina ha donat lloc a nombroses aplicacions en camps com la catàlisi,^{50,51} sistemes de detecció,⁵² administració de fàrmacs,^{53,54} biotecnologia,⁵⁵ assajos immunològics,⁵⁶ o bioanàlisi,⁵⁷ entre d'altres.

1.5 Altres lligands de l'avidina i l'estrepavidina

1.5.1 Contribució dels diferents trets estructurals de la biotina en l'afinitat

Tal com s'ha descrit a l'apartat 1.4, les nombroses interaccions que presenta la biotina amb els residus dels llocs d'unió de l'avidina i l'estrepavidina fa que la unió sigui molt forta. És per això que s'ha estudiat l'efecte que tenen els diferents trets estructurals, grups funcionals, etc. de la biotina en l'afinitat.

Alguns exemples a la literatura ens permeten avaluar aquests efectes segons les constants d'afinitat trobades per a aquests derivats amb l'avidina (Figura 7) —els valors de les constants d'afinitat d'aquests compostos es van determinar mitjançant una valoració espectrofotomètrica directa—:^{4,7,58}

- L'efecte d'intercanviar l'oxigen del grup *ureido* per un àtom de sofre fa disminuir l'afinitat (tiobiotina, $K_a \approx 2,0 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$, pH = 9,0), però encara més si se substitueix per un grup *imino* (iminobiotina, $K_a \approx 2,0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, base lliure).
- S'obtenen afinitats també inferiors en treure l'àtom de sofre del cicle (destiobiotina, $K_a \approx 2,0 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$, pH = 7,0). L'ester metílic d'aquesta destiobiotina té una afinitat una mica inferior ($K_a \approx 2,5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$, pH = 7,0), així com el destiobiotinol ($K_a \approx 2,0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, pH = 7,0).

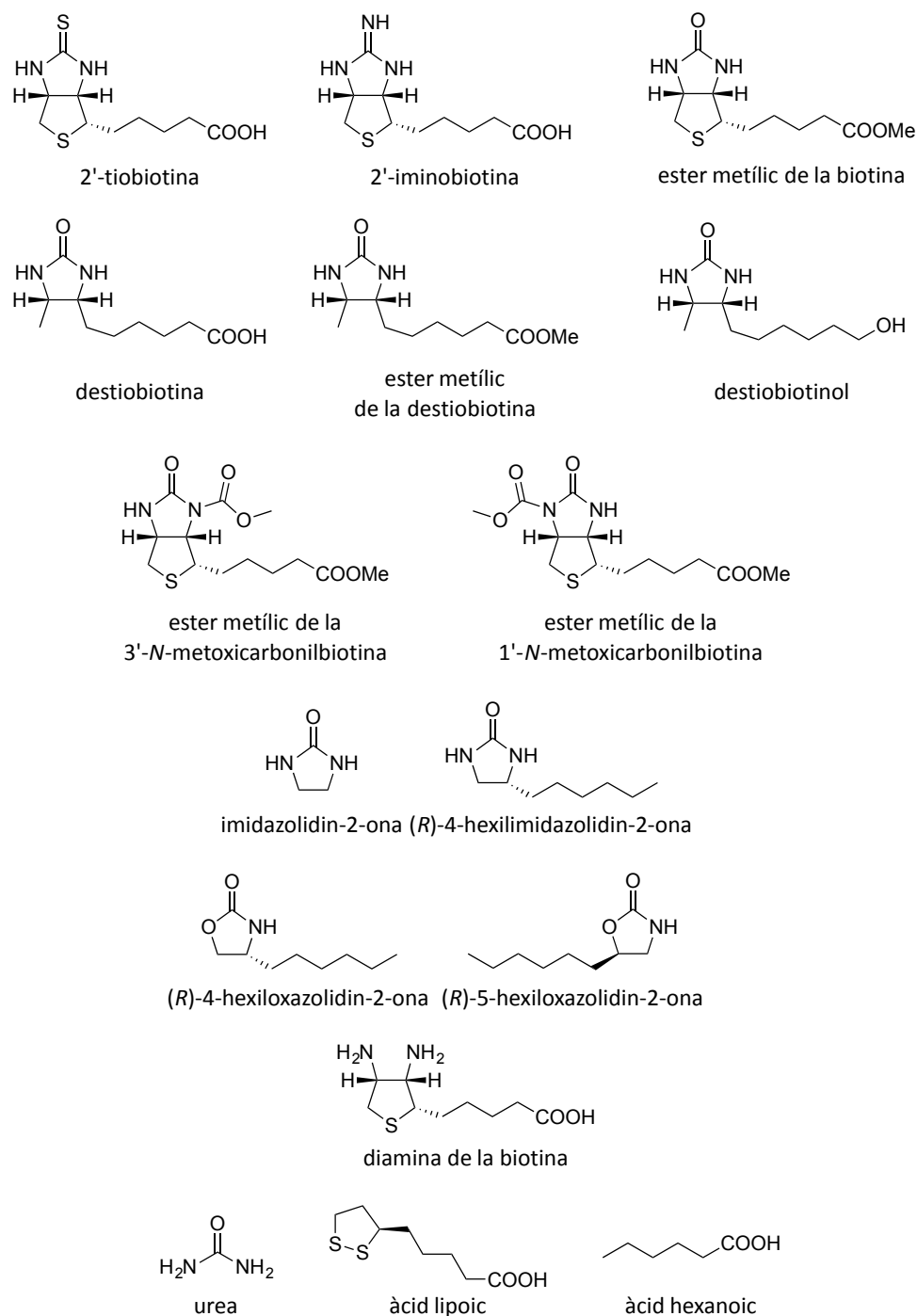


Figura 7. Diferents lligands d'avidina relacionats estructuralment amb la biotina.^{4,7,58}

- Esterificar la biotina (ester metílic) provoca una disminució de l'afinitat molt acusada en el cas de l'estreptavidina ($K_a \approx 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, pH = 7,0), però no tant en el cas de l'avidina ($K_a \approx 10^{14} \text{ M}^{-1}$, pH = 7,0) —en aquest cas la determinació de l'afinitat es va dur a terme mitjançant espectroscòpia *Raman*—. ^{59,60}
- Posar un substituent (en aquest cas un *metoxycarbonil*) sobre un dels nitrògens del grup *ureido* fa disminuir molt l'afinitat ($K_a \approx 2,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, pH = 6,8) en el cas

- de fer la substitució en el nitrogen 3' i no tant ($K_a \approx 1,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, pH = 6,8) en el cas de fer-ho al nitrogen 1'.
- L'afinitat per la molècula d'imidazolidin-2-ona és molt baixa ($K_a \approx 2,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, pH = 6,8), però millora en afegir-hi una cadena d'hexil ($K_a \approx 2,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, pH = 7,0).
 - Derivats d'oxazolidin-2-ona tenen afinitats molt més baixes que els corresponents derivats d'imidazolidin-2-ona. La (R)-4-hexiloxazolidin-2-ona té una $K_a \approx 4,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 i la (R)-5-hexiloxazolidin-2-ona té una $K_a \approx 2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0.
 - Treure en grup C=O de l'*ureido* de la biotina afecta greument a l'afinitat, ja que la diamina resultant s'uneix a l'avidina molt dèbilment ($K_a \approx 2,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, pH = 4,6).
 - Altres molècules que recorden certes parts de l'estructura de la biotina tenen encara afinitat per l'avidina, com és el cas de la urea ($K_a \approx 2,8 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}$, pH = 6,8), l'àcid lipoic ($K_a \approx 1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, pH = 6,8) o l'àcid hexanoic ($K_a \approx 3,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, pH = 6,8).

A partir d'aquestes dades es pot observar que, d'una banda el grup *ureido* és molt important, ja que si es modifica l'afinitat disminueix considerablement. De l'altra, l'àtom de sofre de l'anell de tetrahidrotiofè no és tan important, ja que la destiobiotina té una afinitat lleugerament inferior a la de la biotina. Aquests fets són fàcilment justificables si es tenen en compte el nombre d'interaccions que fan aquests grups amb els aminoàcids del lloc d'unió (Figura 5), on es pot veure que el grup *ureido* en fa més que el sofre.

El fet de modificar la longitud de la cadena lateral pot provocar un canvi en les interaccions que estableix el grup carboxilat. Així, s'han dissenyat un altre parell d'anàlegs de la biotina amb diferent longitud de la cadena lateral d'àcid carboxílic per estudiar les interaccions que es guanyen o es perden en fer aquestes modificacions. Aquests compostos són l'homobiotina (cadena lateral de cinc metilens) i la norbiotina (cadena lateral de tres metilens). Els estudis cristal·logràfics dels complexos d'aquests anàlegs amb l'avidina i l'estreptavidina han permès d'identificar les interaccions per pont d'hidrogen que s'estableixen en cada cas (Figura 8).⁴⁶

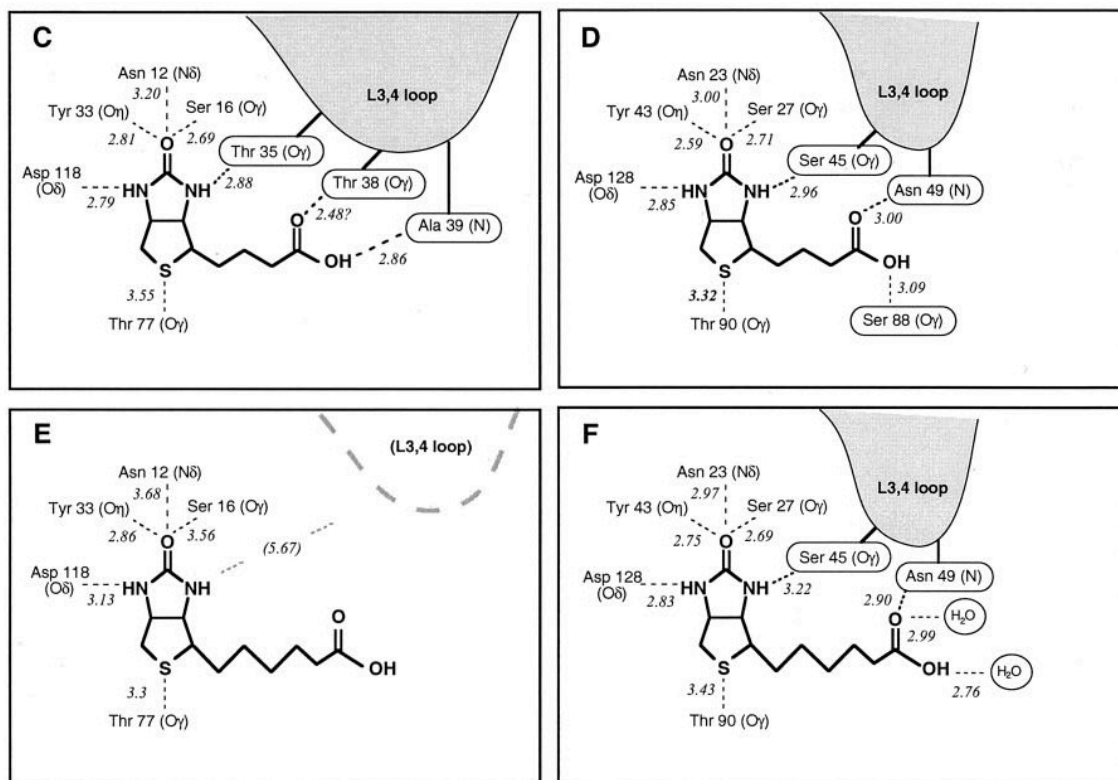


Figura 8. Esquema que representa els ponts d'hidrogen entre: (C) l'avidina i la norbiotina, (D) l'estreptavidina i la norbiotina, (E) l'avidina i l'homobiotina i (F) l'estreptavidina i l'homobiotina.⁴⁶

La diferència entre les interaccions d'aquestes molècules amb l'avidina i l'estreptavidina rau en el fet que el bucle (L3,4), que es tanca en interaccionar majoritàriament amb el grup carboxilat de la biotina, forma unes interaccions diferents. En el cas de l'estreptavidina tots dos anàlegs en poden seguir formant (Figura 8 D i F). En canvi, en el cas de l'avidina, l'homobiotina no en fa, de manera que el bucle no queda en la conformació tan tancada com en el cas de la biotina.

1.5.2 Altres compostos d'interès que s'uneixen a l'avidina i l'estreptavidina

Hi ha altres compostos naturals o d'interès que són capaços d'unir-se a l'avidina i l'estreptavidina al lloc d'unió de la biotina però amb una menor afinitat, com per exemple certs medicaments o compostos naturals, que poden tenir repercussió en el camp de la biomedicina. És el cas de la (\pm)-talidomida ($K_a(\text{aparent}) = 2,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, pH = 7,4), el (\pm)-ketoprofè ($K_a(\text{aparent}) = 2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, pH = 7,4), l'oxaprozina ($K_a = 3,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, pH = 7,4) o la bilirubina ($K_a = 1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, pH = 7,4), entre d'altres.⁶¹ També s'han desenvolupat oligonucleòtids que tenen

afinitats elevades per l'estreptavidina (de 10^8 M^{-1} o més elevades),⁶²⁻⁶⁵ així com pèptids capaços d'unir-se a l'estreptavidina també amb afinitats elevades.⁶⁶⁻⁷¹ De fet, aquests tipus de lligands es van començar a desenvolupar quan, buscant a llibreries de compostos, es va descobrir que hi havia certs pèptids que podien unir-se a l'estreptavidina. *Schmidt* i *Skerra* van descobrir que un pèptid de 8 unitats anomenat 'Strep-tag' podia complexar l'estreptavidina així com la posterior versió optimitzada 'Strep-tag II' per complexar el mutant *estrep-tactina*.^{68,72}

Aquests pèptids s'uneixen a l'estreptavidina i l'*estrep-tactina* al mateix lloc d'unió on ho fa la biotina, però més a la superfície de la proteïna, ja que els residus impedeixen l'entrada total del lligand a la cavitat.⁶⁸ Ho fan amb una K_a de $2,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ en el cas del 'Strep-tag' i de $1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ en el cas del 'Strep-tag II' amb l'estreptavidina i amb una K_a d' $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ en el cas del 'Strep-tag II' amb l'*estrep-tactina*.^{30,68} Aquests sistemes s'han emprat en els últims anys, i amb un interès creixent, en diverses aplicacions, com per exemple la purificació de proteïnes en el camp de la proteòmica,^{69,71,73} així com en biomedicina,^{74,75} o estudis d'interacció proteïna-proteïna, entre d'altres.⁷⁶

1.5.3 L'àcid 2-(4'-hidroxifenil)azobenzoic (2)

És conegut des de fa temps que l'àcid 2-(4'-hidroxifenil)azobenzoic (o HABA per les seves sigles en anglès, **2**), un colorant azoic, és capaç d'unir-se a l'avidina -així com a l'estreptavidina—. ⁷⁷⁻⁷⁹ Aquest colorant ja havia estat emprat des de la dècada dels 50 per determinar l'albumina en sang.^{80,81} L'afinitat d'aquest colorant per a aquestes proteïnes és més baixa que la de la biotina: una K_a d' $1,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ a $\text{pH} = 7,0$ per l'avidina, i un K_a d' $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ a $\text{pH} = 7,0$ per l'estreptavidina.²⁷

Aquest compost presenta tautomeria *azo-hidrazona* (Figura 9). Quan s'uneix a la proteïna ho fa mitjançant el tautòmer *hidrazona*. En canvi, quan està lliure en aigua a pH neutre, predomina la forma *azo*.^{77,82}

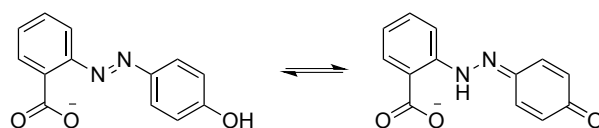


Figura 9. Tautomeria azo (a l'esquerra) i hidrazona (a la dreta) del monoanió de l'HABA.

Cadascuna de les formes presenta un màxim d'absorció a diferents longituds d'ona de l'espectre visible ($\lambda_{\text{màx}} = 345 \text{ nm}$ per a la forma *azo* i $\lambda_{\text{màx}} = 500 \text{ nm}$ per a la forma *hidrazona*), fet que comporta un canvi observable en el color de la dissolució (grogüenc quan predomina la forma *azo* i vermellós quan ho fa la forma *hidrazona*). Aquest fet s'aprofita per fer determinacions quantitatives de l'activitat de l'avidina i l'estreptavidina: una primera complexació d'aquestes amb HABA forma el complex proteïna-HABA, una posterior addició de biotina provoca l'alliberació del colorant (degut a la seva menor K_a) en formar-se el complex proteïna-biotina. Això dóna com a resultat una disminució de la banda a 500 nm, que es pot emprar per determinar quantitativament l'activitat de les proteïnes.^{77,82}

La unió de l'HABA a l'avidina i l'estreptavidina segueix un patró d'interaccions similar al que dóna lloc la unió de la biotina. En aquest cas és la part del carboxilat de l'HABA la que queda més endins de la cavitat en ambdós casos. En el cas de l'avidina els dos oxígens del carboxilat formen interaccions per pont d'hidrogen gairebé amb els mateixos residus que ho fa el grup *ureido* de la biotina (Asn12, Ser16, Tyr33 i Thr35) a part de l'enllaç intramolecular del carboxilat amb el nitrogen de la *hidrazona*. A més, l'anell de tipus benzoic de l'HABA també forma interaccions hidrofòbiques amb els residus Phe79, Trp97 i Trp110 (aquest últim és un residu d'un monòmer adjacent que queda a prop). L'anell de tipus fenòlic de l'HABA pot establir menys ponts d'hidrogen que el carboxilat de la biotina (només en fa un, amb la Ser73), però conserva la interacció hidrofòbica amb el Trp70, a més d'una que forma amb la Phe72 (Figura 10).

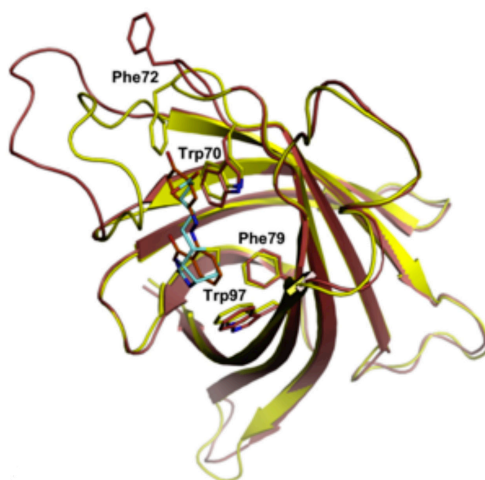


Figura 10. Vista del lloc d'unió de l'avidina on hi ha representades la biotina (en blau cel), l'HABA (en vermell) i els residus apolars amb els quals formen interaccions hidrofòbiques.⁸³

De fet, la interacció amb el Trp70 es produeix entre l'anell aromàtic de l'aminoàcid i l'anell de tipus fenòlic de l'HABA, de manera que s'estableix un complex de transferència de càrrega (on el triptòfan és el donador i l'anell de tipus *quinona* l'acceptor), que a la vegada és el responsable de que la forma *hidrazona* pateixi un desplaçament cap al vermell tot i ser una espècie menys conjugada (no és plana) que l'*azo*.^{83,84}

Quant al complex estreptavidina-HABA, s'observa que les interaccions per pont d'hidrogen són similars (Figura 11): l'anell de tipus benzoic de l'HABA en forma amb els residus Asn23, Tyr43, Ser27 i Ser45, però no en fa cap l'anell de tipus *quinona*. També s'observa que les interaccions hidrofòbiques es formen amb els aminoàcids Trp92, Trp108, Trp120 i Trp79 (aquest últim essent el responsable de la formació del complex de transferència de càrrega).⁷⁹

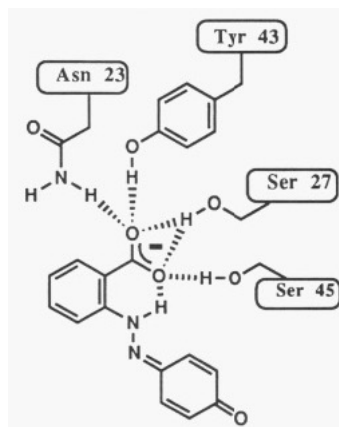


Figura 11. Representació de les interaccions per pont d'hidrogen que estableix l'HABA amb els aminoàcids del lloc d'unió de l'estreptavidina.

Les diferències entre les interaccions que estableix l'HABA amb les dues proteïnes rauen en les que té la part de l'anell de tipus *quinona*, ja que en el complex amb SAV manquen el pont d'hidrogen i la interacció hidrofòbica que fan els residus Ser73 i Phe72, respectivament, de l'avidina amb l'HABA. Això té lloc perquè els aminoàcids corresponents en el cas de l'estreptavidina estan allotjats en un bucle que és més llarg que en el de l'avidina, que no fa contacte amb el lligand. Es creu que aquest és el motiu principal de la menor afinitat de l'HABA per l'estreptavidina. Això també succeeix en la unió de la biotina i reflecteix una similar tendència d'afinitat. En tots dos casos, el nombre d'interaccions que forma l'HABA amb el bucle L3,4 de la proteïna són

menors que els que en fa la biotina; com a conseqüència, el bucle té més llibertat conformacional i el lligand no queda tan tancat al lloc d'unió, fet que justifica, en part, la diferència d'afinitats observada entre la biotina i l'HABA per l'avidina i l'estreptavidina.^{79,84}

Per últim, s'ha observat que en la unió de l'HABA amb aquestes proteïnes predomina el terme entròpic. Això suggereix una major contribució de les interaccions hidrofòbiques a l'afinitat. Això contrasta amb el cas de la unió de la biotina, on el terme entàlpic, i per tant, les interaccions per pont d'hidrogen són la contribució majoritària a la variació de l'energia lliure del procés.⁷⁹

Diferents derivats o anàlegs d'azobenzens com l'HABA permeten d'obtenir una afinitat diferent per l'avidina i l'estreptavidina, així com un ajust del desplaçament de l'equilibri tautomèric *azo-hidrazona* per a potencials aplicacions.^{85,86}

1.5.4 Glicolurils i propandiurees

És conegut que compostos amb estructura bicíclica similar a la de la biotina també tenen capacitat d'unir-se a l'avidina i l'estreptavidina.

1.5.4.1 Glicolurils i derivats

El glicoluril (**3**, Figura 12) és un compost, conegut ja des de principis del segle XX,⁸⁷ amb una estructura de tipus biciclo[3.3.0] amb un grup *ureido* en cadascun dels cicles. El glicoluril també s'uneix a l'avidina i l'estreptavidina, però amb afinitats bastant inferiors a les de la biotina (K_a de $2,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 per l'avidina i K_a de $4,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 per l'estreptavidina).⁸⁸

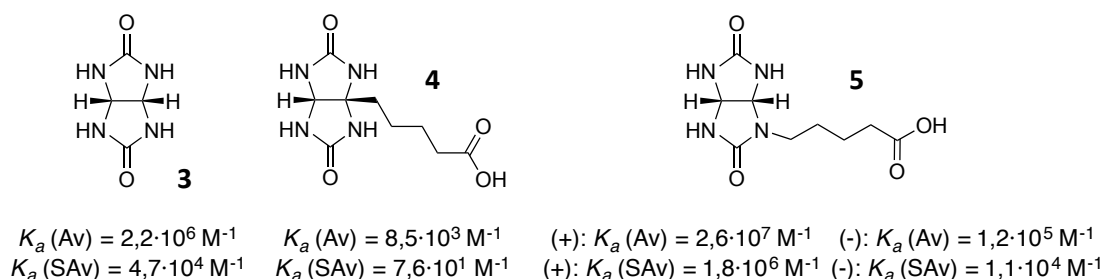


Figura 12. Glicoluril i alguns derivats amb les seves constants d'associació amb avidina i estreptavidina. Valors de K_a determinats per valoració espectrofotomètrica competitiva.⁸⁸

Comparant les estructures de raigs X dels complexos glicoluril-SAv i biotina-SAv s'observa que un dels grups *ureido* del glicoluril forma interaccions per pont d'hidrogen molt similars a les que forma el grup *ureido* de la biotina, amb els mateixos cinc residus de l'SAv (Tyr43, Ser27, Asn23, Asp128 i Ser45). D'altra banda, l'àtom d'oxigen de l'altre grup *ureido* del glicoluril forma una interacció per pont d'hidrogen amb el residu Thr90 de l'SAv, de manera anàloga a com ho fa l'àtom de sofre de la biotina.⁸⁹

Tot i conservar aquestes interaccions, el fet que el sistema bicíclic sigui més llarg en el glicoluril i la manca de cadena lateral (fet que fa perdre les interaccions per pont d'hidrogen i apolars que en forma en la biotina), justifiquen en part la menor afinitat d'aquest compost per l'avidina i l'estreptavidina.⁸⁹ Com en el cas de la biotina, la constant d'associació del glicoluril amb l'Av és aproximadament 2 ordres de magnitud superior a la del glicoluril amb l'SAv.

Per tal d'intentar augmentar l'afinitat del glicoluril per l'Av i l'SAv, en el nostre grup es van sintetitzar derivats del glicoluril amb una cadena lateral d'àcid carboxílic. Es va observar que l'afinitat depenia molt del punt d'unió de la cadena lateral al sistema bicíclic (carboni cap de pont o àtom de nitrogen) i de l'estereoquímica. Així, quan s'hi uneix una cadena lateral de valerat al carboni cap de pont (**4**) del glicoluril la seva afinitat per l'avidina i l'estreptavidina baixa considerablement (260 vegades amb avidina i 620 amb estreptavidina). D'altra banda, si la cadena lateral de valerat s'uneix a l'àtom de nitrogen, s'obtenen compostos quirals i s'observen afinitats diferents per a cada enantiòmer (és el cas del compost **5**). En el cas de l'enantiòmer-(+) l'afinitat augmenta respecte la del glicoluril (12 vegades més amb avidina i 38 vegades més amb estreptavidina). En canvi, per a l'enantiòmer-(-) l'afinitat disminueix respecte el glicoluril (18 vegades inferior amb avidina i 4 vegades inferior amb estreptavidina). Això indica que la cadena lateral és útil a l'hora de formar noves interaccions, però només si està unida amb l'estereoquímica adequada. Allargar de 4 a 5 metilens la cadena lateral sobre el nitrogen provoca un petit augment (2 vegades) de l'afinitat en l'enantiòmer de major afinitat i una petita disminució en l'enantiòmer de menor afinitat, tant per a l'Av com per a l'SAv.⁸⁸

1.5.4.2 Propandiurees, dimetilpropandiurees i derivats

Un grup de compostos amb una estructura similar als glicolurils són les anomenades propandiurees (PDUs). Aquests presenten una estructura del tipus biciclo[3.3.1] i tenen dues urees, una a cada cicle (**6**). Derivats d'aquests compostos poden complexar diferents espècies químiques segons la seva estructura i tenen diverses aplicacions en el camp de la química supramolecular (Figura 13).⁹⁰⁻⁹²

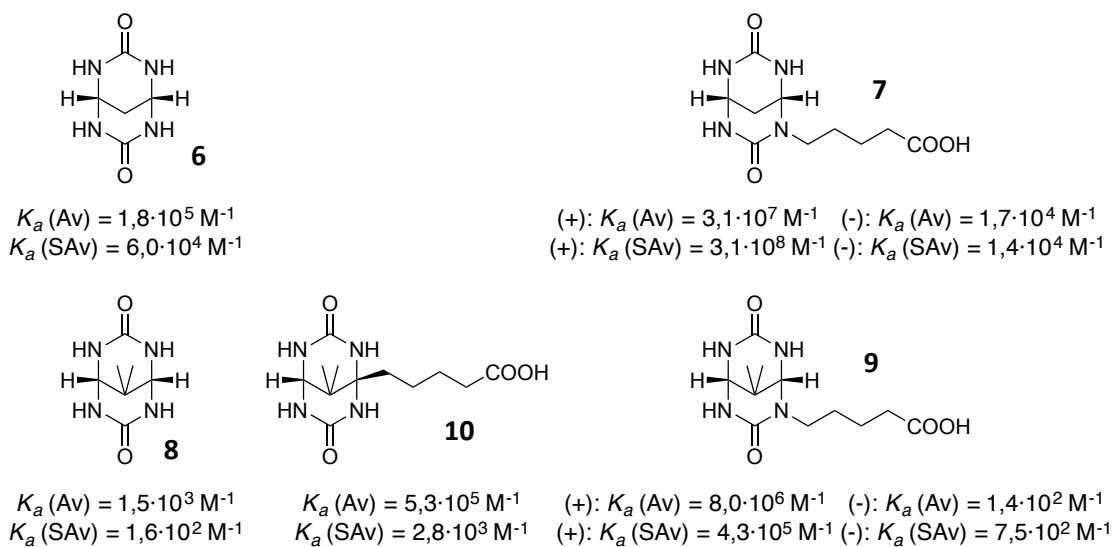


Figura 13. Propandiurees, dimetilpropandiurees i els seus derivats amb les seves constants d'associació a avidina i estreptavidina. Valors de K_a determinats per valoració espectrofotomètrica competitiva i valoració espectrofluorimètrica.^{93,94}

Aquests compostos també tenen la capacitat d'unir-se a l'avidina i l'estreptavidina. La propandiurea té una constant d'afinitat de $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ a $\text{pH} = 7,0$ per l'avidina i de $6,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ a $\text{pH} = 7,0$ per l'estreptavidina.⁹⁴ De la mateixa manera que amb el glicoluril, en el nostre grup també s'han sintetitzat diferents anàlegs de la propandiurea amb una cadena lateral d'àcid carboxílic unida a un àtom de nitrogen amb la intenció d'augmentar la seva afinitat per l'Av i l'SAv. Quan s'introdueix una cadena lateral de valerat (de 4 metilens, com en la biotina) (**7**), s'observa un gran augment de l'afinitat (de 550 vegades en el cas de l'avidina i de 5200 vegades en el cas de l'estreptavidina) si l'estereoquímica del lligand és l'adequada (enantiòmer-(+)). En canvi, per l'altre enantiòmer, la introducció de la cadena de valerat provoca una disminució d'afinitat de més de 10 vegades per l'avidina i de 13 vegades per l'estreptavidina. Com en el cas dels glicolurils, allargar la cadena lateral de quatre a cinc metilens provoca petits canvis en l'afinitat (Figura 13).⁹⁴

Les dimetilpropandiurees (DMPDUs) són propandiurees que tenen un grup isopropil en pont més curt (**8**, Figura 13). Les DMPDUs amb cadena de valerat unida a l'àtom de nitrogen presenten menor afinitat que els corresponents glicolurils o PDUs (**9**). Però, en canvi, la DMPDU amb la cadena de valerat unida al carboni cap de pont (**10**) presenta major afinitat que el corresponent glicoluril (**4**). Això, junt amb el fet que el compost **10** és aquiral i fàcil de sintetitzar, fa que s'hagi emprat com a entitat monovalent en la síntesi de lligands divalents.^{93,94}

En resum, les diverses diurees bicíclics de tipus [3.3.0] (glicoluril) i de tipus [3.3.1] (PDU i DMPDU) s'uneixen a Av i SAV amb afinitats moderades. Tot i això, es pot incrementar considerablement les seves afinitats per a ambdues proteïnes si se les hi incorpora una cadena lateral d'àcid carboxílic de 4 o 5 metilens unida a un àtom de nitrogen amb l'estereoquímica adequada (enantiòmer-(+)).

Comparant els lligands de major afinitat de cada tipus de sistema bicíclic (glicoluril, DMPDU i PDU) es va observar que el de major afinitat és la PDU amb cadena lateral de valerat unida al nitrogen ((+)-**7**), seguit del corresponent derivat de glicoluril ((+)-**5**) i, finalment, el corresponent derivat de la DMPDU ((+)-**9**). El fet que entre les diurees bicíclics amb cadena lateral d'àcid carboxílic, la de tipus [3.3.1] (PDU) tingui major afinitat per Av i SAV que la de tipus [3.3.0] (glicoluril), sembla indicar que el lloc d'unió d'aquestes dues proteïnes pot incorporar més favorablement lligands bicíclics lleugerament més voluminosos (de tipus [3.3.1]) que els menys voluminosos (de tipus [3.3.0]). No obstant, les afinitats d'aquestes diurees bicíclics amb cadena lateral d'àcid carboxílic per l'Av i l'SAv encara són bastants ordres de magnitud inferiors a les que presenta la biotina per a aquestes proteïnes. Aquesta diferència s'hauria d'atribuir a la presència del segon grup *ureido* en lloc de l'anell de tetrahidrotiofè de la biotina. Per tant, si es vol augmentar significativament l'afinitat dels lligands bicíclics per l'Av i l'SAv, sembla que s'hauria de passar de diurees bicíclics a monourees bicíclics amb una cadena lateral d'àcid carboxílic a la posició equivalent a la que aquesta cadena té en la biotina.

Així, un dels objectius del nostre grup és el de sintetitzar nous lligands bicíclics de tipus [3.3.1] amb una única urea en un dels cicles, un àtom de sofre a l'altre cicle i una cadena lateral d'àcid carboxílic de diferents longituds (diferent nombre de metilens)

unida al sistema bicíclic en una posició anàloga a la que aquesta cadena té en la biotina i amb la mateixa estereoquímica.

Un altre objectiu (que s'ha abordat en aquesta Tesi) és el de sintetitzar lligands bicíclics de tipus [3.3.1] amb una urea en un dels cicles, només metilens en l'altre cicle, i finalment, la corresponent cadena lateral d'àcid carboxílic.

1.6 Multivalència

Una unió multivalent està representada per diverses interaccions simultànies, independents i de la mateixa naturalesa, entre dues (o més) espècies complementàries; donen lloc, així, a estructures supramoleculares, formades per un receptor o *host* i un lligand o *guest*. La valència és el nombre de diferents connexions del mateix tipus que s'estableixen.⁹⁵

El fenomen de multivalència és freqüent en les interaccions biològiques. També s'ha emprat recentment en diverses aplicacions en el camp de la química supramolecular, ja que permet obtenir estructures funcionals ben definides.⁹⁶⁻⁹⁹

Els lligands amb capacitat de complexació multivalent estan formats per vàries entitats monovalents unides per un espaiador (espaiador).

Degut al fet que les interaccions que s'estableixen entre *host* i *guest* són múltiples, hi ha la possibilitat d'obtenir diferents estructures segons l'arquitectura de la unió; és a dir, una vegada s'uneix una entitat monovalent a un receptor del *host*, la segona ho pot fer a un altre receptor del mateix *host* (unió intramolecular) o al d'un nou *host* (unió intermolecular). Si ho fa intramolecularment, s'obtindrà una estructura (complex multivalent) ben definida, en canvi si ho fa intermolecularment, s'obtindran agregats i polímers d'estructura no ben definida (Figura 14).⁹⁵

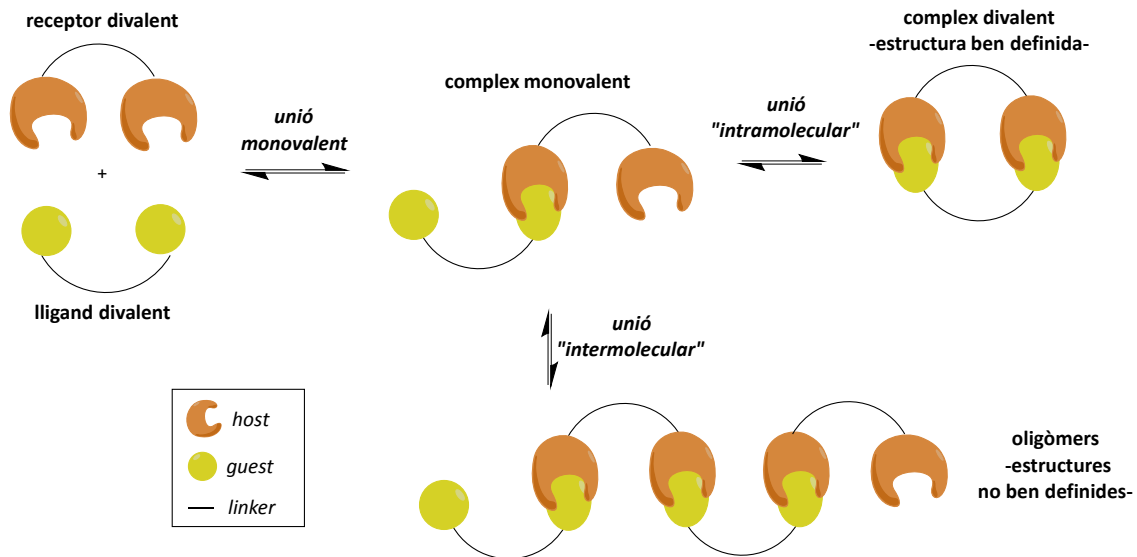


Figura 14. Representació dels diferents tipus d'unions que es poden establir entre un receptor divalent i un lligand divalent.

1.6.1 Concentració efectiva i molaritat efectiva

El concepte de concentració efectiva (C_{eff}) representa la probabilitat d'interacció de dues entitats interconnectades, és per tant la concentració "físicament real" que experimenta una d'aquestes entitats respecte l'altra. Aquest concepte es va començar a emprar en l'estudi de polímers,¹⁰⁰ i posteriorment en la formació de macrocicles.¹⁰¹

En el camp de la química supramolecular es pot veure que després d'una primera unió del lligand multivalent al receptor multivalent s'altera la concentració de lligand que experimenta el segon lloc d'unió del receptor multivalent.

Una vegada un lligand multivalent (per exemple un divalent) s'ha unit a un lloc d'unió del receptor, el segon lligand (unit a l'extrem de l'espaiador) es pot trobar en punts situats com a màxim al límit d'una esfera de radi r , que correspon a la màxima extensió de l'espaiador. Per tant, la concentració efectiva en aquest volum es pot expressar com la concentració d'una "molècula" en un volum d'una esfera de radi r (Equació 2).

$$C_{eff} = \frac{\left(\frac{1}{N_A}\right)}{\left(\frac{4}{3}\pi r^3\right)} = \frac{3}{4 N_A \pi r^3} \xrightarrow{\text{si es considera que el host ocupa la meitat del volum accessible pel guest}} \frac{3}{2 N_A \pi r^3}$$

Equació 2

Considerant que en una superfície no tot el volum és accessible ja que el receptor “exclou” el lligand en la meitat del volum de l’esfera, la C_{eff} es duplicarà (Equació 2).¹⁰²

La distribució del segon lligand després de la primera unió en realitat és probabilística, de manera que la distribució de probabilitat és gaussiana si s’entén que l’espaiador segueix un model de camí aleatori (com en el cas dels polímers). Aquest model té en consideració les diferents rotacions dels enllaços que el formen, així com la longitud i el nombre d’aquests. S’obté doncs, una concentració efectiva per a cada punt d’aquesta esfera que depèn de la probabilitat de que aquest lligand estigui situat a una distància d del primer lloc d’unió.^{103,104} El que és clar és que la concentració efectiva és inversament proporcional al cub de la longitud de l’espaiador.

Si la C_{eff} és major que la concentració de lligand lliure la unió serà intramolecular en canvi, si és més petita, la unió intermolecular estarà afavorida.⁹⁵ Per tant, l’associació “intramolecular” està afavorida a concentracions baixes i la “intermolecular” a concentracions elevades.

La molaritat efectiva (EM) és un concepte empíric, similar a la concentració efectiva (teòric). Aquesta té en consideració la relació entre l’associació intramolecular i la intermolecular. Per tant, dóna una idea de cap a on estarà desplaçat aquest equilibri. Per a un procés multivalent, la molaritat efectiva es pot calcular a partir de la constant d’afinitat n -valent (K_n) i la constant d’afinitat de la unió monovalent (K_i), on b és un terme estadístic que té en consideració els diferents camins d’associació possibles.

$$EM = \frac{K_{intra}}{K_{inter}} = \left(\frac{K_n}{b \cdot K_i^n} \right)^{1/(n-1)}$$

Equació 3

La cooperativitat es considera com la capacitat d’efectuar un canvi en el receptor, en unir-se el primer lligand, que provoca que la unió del segon sigui més (cooperativitat positiva) o menys (negativa) forta que la del primer. El fenomen de cooperativitat està molt estès en el camp biològic, ja que molts enzims o cadenes de processos biològics funcionen d’aquesta manera.¹⁰⁵ És, per tant, important considerar la possibilitat de l’existència d’aquest fenomen en sistemes supramoleculares, tot i que normalment no són freqüents.⁹⁵

1.6.2 Consideracions termodinàmiques del procés. Influència de l'espaiador

En una unió multivalent es pot considerar que la variació d'energia lliure està formada per la variació d'energia lliure dels n processos monovalents més un terme que considera les variacions energètiques degut a la interacció multivalent.¹⁰⁶

Les unions multivalents són més fortes que les monovalents perquè en produir-se la primera unió, el segon *quest* estarà més a prop del segon lloc d'unió, de manera que el cost entròpic d'apropar un lligand que es troba en el si de la solució al lloc d'unió ja està pagat (efecte quelat).¹⁰⁷

Considerant que l'espaiador i el receptor no interaccionen, que no hi ha efectes cooperatius i que tots els llocs d'unió estan ocupats, el terme esmentat corresponent a la interacció multivalent conté la variació d'entropia conformacional de l'espaiador del lligand multivalent en produir-se la unió multivalent (un procés generalment desfavorable). Aquest terme, a més, està relacionat amb la C_{eff} i, per tant, amb la distribució de probabilitat $P(r)$ del lligand a l'entorn del lloc d'unió.¹⁰⁸

Per tant, la unió serà més favorable com menys cost entròpic es pagui en produir-se la unió multivalent. És sabut que si la restricció conformacional de l'espaiador en tenir lloc la unió multivalent és alta (és a dir, de tots els estats conformacionals, de rotació i de translació que té la cadena lliure en dissolució només uns pocs o un són els que adopta en fer una unió multivalent) el cost entròpic de la unió serà molt alt.¹⁰⁹ Tot i això, estudis recents mostren que no sempre és així, ja que en molt casos aquesta cadena conserva una gran mobilitat després de la complexació i, per tant, el cost entròpic no és tan gran.¹⁰⁸

Aquests fets venen a dir que la EM serà la més elevada si la longitud de l'espaiador coincideix amb la distància entre els llocs d'unió. Si és més petita, la unió intramolecular estarà enormement desavaforida i si és més gran disminuirà amb l'augment de la llargada d'aquest, però en una proporció més baixa de l'esperada.¹⁰⁴

L'altre factor que afecta a la EM és la rigidesa de l'espaiador. Tot i que el cost entròpic en emprar lligands no rígids no és tan extrem com es podria pensar, una preorganització del lligand multivalent fa augmentar les afinitats si la longitud d'aquest és l'adequada. Això és degut al fet que el segon lligand ja quedaria confinat en un espai

més petit prop del lloc d'unió que si estigués unit a un espaiador amb més llibertat conformacional.^{107,110} Si la longitud de l'espaiador no fos l'adequada i la rigidesa fos elevada els bloquejos per impediments estèrics serien massa grans perquè es pogués dur a terme la unió.

1.6.3 Lligands divalents d'avidina i estreptavidina

El fet que les proteïnes avidina i estreptavidina tinguin els quatre llocs d'unió disposats dos a dos en cares oposades (Pàgina 2) permet l'ús de lligands divalents per formar estructures d'arquitectura supramolecular ben definida. Aquesta estratègia permet l'ús d'aquest sistema per a diferents camps com, per exemple, en la formació d'estructures bidimensionals sobre monocapes autoensamblades (SAMs) que té potencials aplicacions en materials, biosensors, reconeixement biològic, etc.^{111,112}

Aprofitant aquests fets s'han sintetitzat, ja des de fa temps, diferents lligands divalents basats en la biotina i amb espaiadors de diferent naturalesa. Utilitzant tècniques com la microscòpia electrònica o la cromatografia d'exclusió molecular, s'observa que per a espaiadors curts la unió amb l'avidina i l'estreptavidina és bàsicament "intramolecular", però que amb espaiadors llargs hi predomina la "intermolecular" (oligomerització).^{113,114} Degut al fet que la biotina s'uneix tan fort a aquestes proteïnes, no s'ha pogut determinar les constants d'afinitat d'aquests complexos, fet que dificulta l'optimització de l'espaiador per tal d'afavorir la formació del complex divalent (unió "intramolecular") i minimitzar l'oligomerització (unió "intermolecular"). Això es pot solucionar emprant lligands amb una menor afinitat de manera que aquesta sigui fàcil de determinar.⁹³

Elucidar quin és l'espaiador òptim per a aquests tipus d'unions divalents és possible comparant les constant d'afinitat de lligands divalents basats en la mateixa entitat monovalent però amb diferents espaiadors. Si l'entitat monovalent presenta una afinitat moderada per Av i SAv l'afinitat dels corresponents lligands divalents es podria determinar fàcilment, de manera que aquesta afinitat ens guiaria en l'optimització de l'espaiador. Per tant, l'espaiador òptim serà aquell que, una vegada incorporat a un lligand divalent, faci que la seva afinitat sigui la més elevada de tota la sèrie de lligands divalents.

Aquesta aproximació ha estat utilitzada en el grup per tal d'optimitzar l'espaiador dels lligands divalents d'Av i SAv.^{93,94} Així, es va sintetitzar tota una sèrie de lligands divalents (Figura 15) amb diferents espaiadors però sempre amb la mateixa entitat monovalent en els extrems, concretament el compost de tipus DMPDU **10** ($K_a = 5,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 amb l'avidina i $K_a = 2,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 amb l'estreptavidina).^{93,94}

Es coneix que la distància entre carboxilats quan dues biotines lliures s'uneixen a dos llocs d'unió propers (d'un mateix costat de la proteïna) en el cas de l'avidina és de 25 Å i de 20 Å en el cas de l'estreptavidina.^{27,34} Per tant, tots els lligands divalents haurien de tenir un espaiador que, en la seva conformació totalment estesa, tingués una longitud superior als 25 Å.

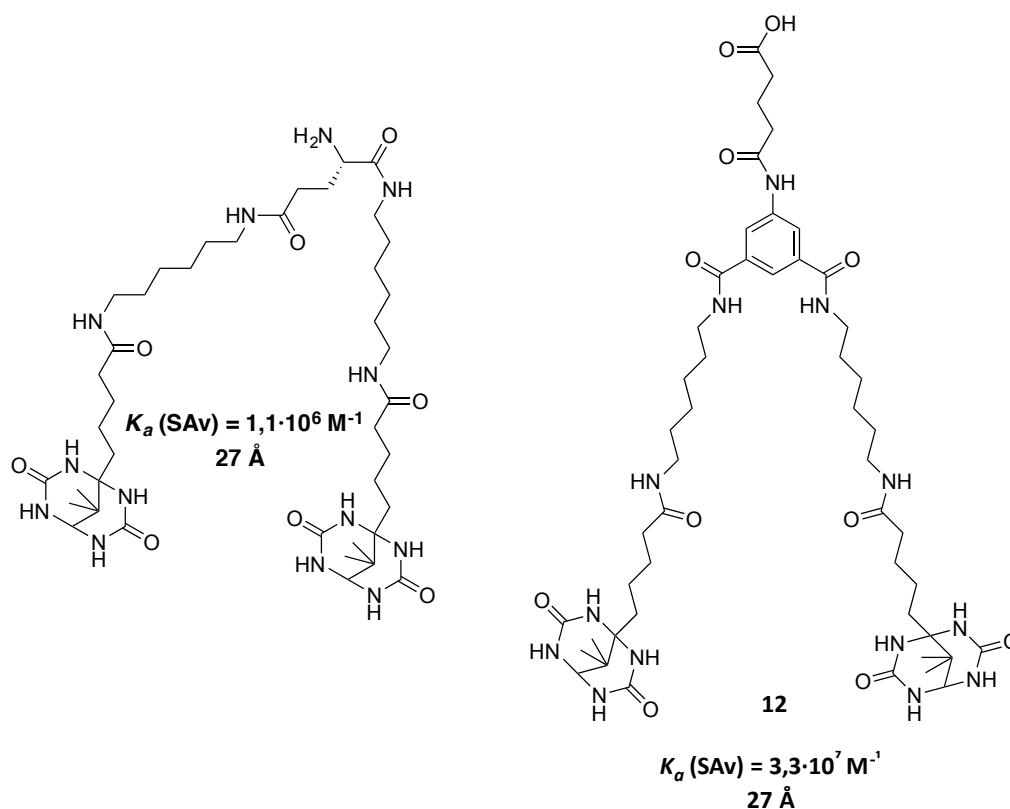
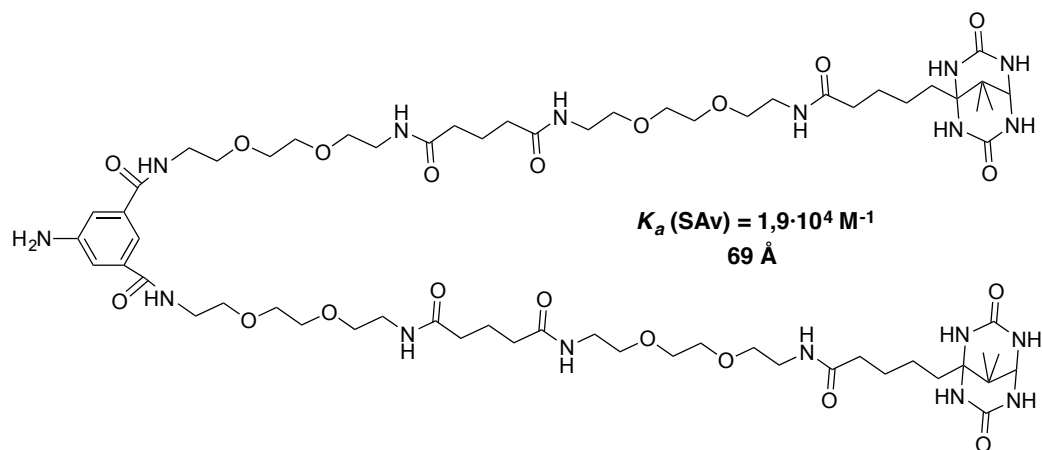
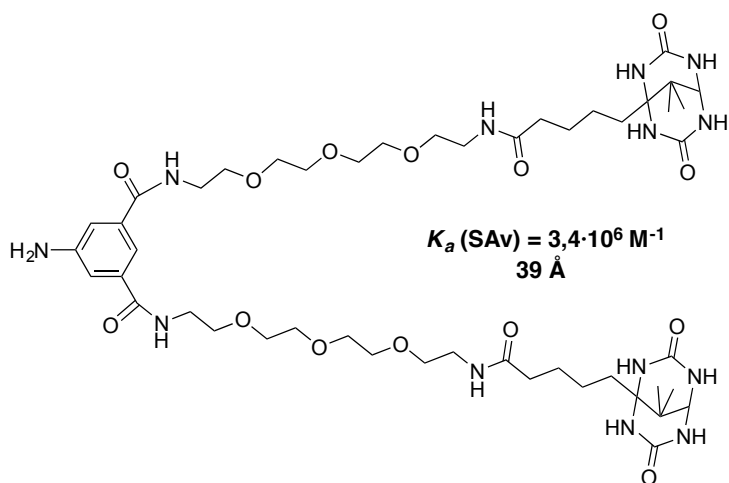
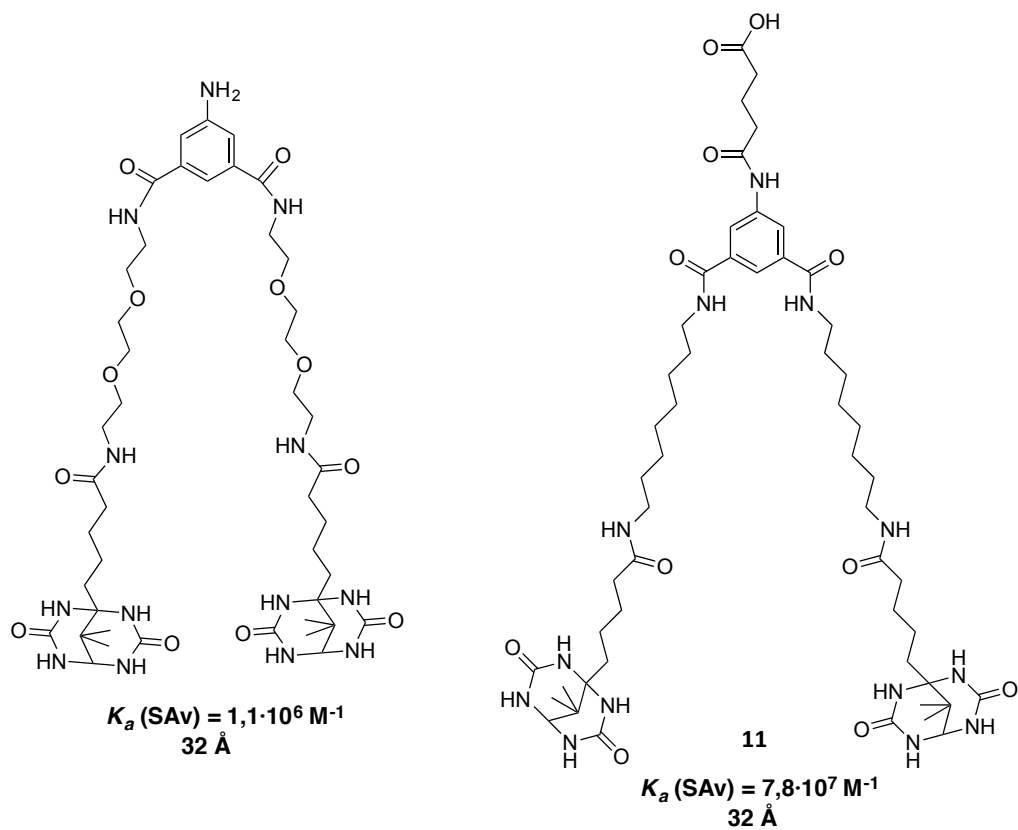


Figura 15. Lligands divalents basats en l'entitat monovalent de tipus DMPDU (**10**) ordenats de menor a major longitud de l'espaiador. S'indica la constant d'afinitat d'aquests per l'estreptavidina a pH = 7,0, així com la distància entre els carbonils de l'enllaç amida entre l'entitat monovalent i l'espaiador en una conformació totalment estesa.^{93,94} (Continua a la pàgina següent)



Comparant les afinitats d'aquests lligands divalents s'observen variacions segons tres propietats de l'espaiador. En primer lloc, comparant lligands amb la mateixa longitud de l'espaiador, per exemple els de 27 Å de llarg, s'observa que a major rigidesa, major és l'afinitat. En segon lloc, en lligands amb una rigidesa similar i amb el mateix tipus d'espaiador, com ara el que té grups etilenglicol, s'observa que en anar augmentant la longitud de l'espaiador, la K_a primer augmenta però a longituds més grans aquesta disminueix. Finalment, la naturalesa de l'espaiador també influeix, ja que les interaccions amb el solvent i/o el cost entròpic de fixar de manera parcial la conformació varien segons la naturalesa química de l'espaiador. En la sèrie de lligands de la Figura 15 s'observa que entre lligands de similar rigidesa i longitud, el que té com a espaiador una cadena *hidrocarbonada* (**11** i **12**) té major afinitat per l'SAv que el que té grups derivats de l'etilenglicol.

De tota aquesta sèrie de lligands basats en l'entitat monovalent DMPDU, el que va presentar major afinitat per l'SAv va resultar ser el que tenia un espaiador semi-rígid, amb un anell benzènic *meta*-disubstituit unit, mitjançant enllaços amida, a dues cadenes alquíliques de 8 metilens amb un total de 26 enllaços entre els carbonils de les dues unitats de DMPDU (**11**).

Amb l'objectiu d'obtenir lligands divalents amb afinitats més elevades, es va pensar en augmentar la rigidesa de l'espaiador. Eva Ayet durant la seva Tesi Doctoral va començar a explorar la síntesi de lligands amb un espaiador basat en un anell aromàtic amb acetilens en posició relativa *meta*. La primera aproximació va ser la de lligands amb una unitat central rígida derivada de l'àcid 3,5-bis(butadiïnil)benzoic, però tots els intents que es van dur a terme per obtenir lligands divalents basats en aquest tipus d'espaiador no van donar bons resultats, degut principalment a la inestabilitat d'aquest tipus d'estructures.^{94,115}

A continuació es va començar a abordar la síntesi de lligands divalents amb una unitat central menys rígida, derivada de l'àcid 3,5-dietinilbenzoic (Figura 16).¹¹⁵ La ruta sintètica que es va seguir va consistir en unir en primer lloc, mitjançant un enllaç amida, l'entitat monovalent DMPDU (**10**) a la part no rígida de l'espaiador. A continuació es va acoblar l'àcid 4-pentinoic a l'altre extrem de l'espaiador no rígid (Figura 17), restant només la unió de l'alquí terminal a l'àcid 3,5-diiodobenzoic.¹¹⁵

Per tant, el primer objectiu d'aquesta Tesi va consistir en continuar i optimitzar amb una nova aproximació sintètica la preparació d'aquest tipus de lligands divalents semi-rígid.

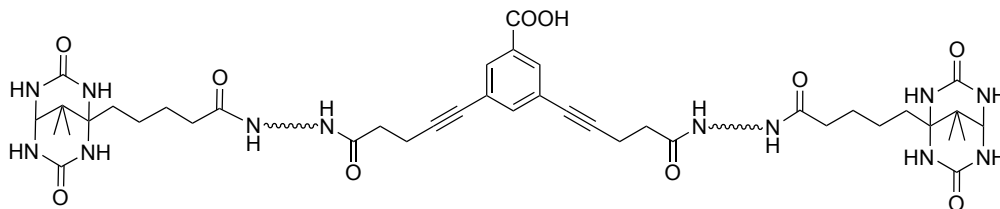


Figura 16. Estructura general dels lligands divalents semi-rígid basats en una unitat central derivada de l'àcid 3,5-dietinilbenzoic.

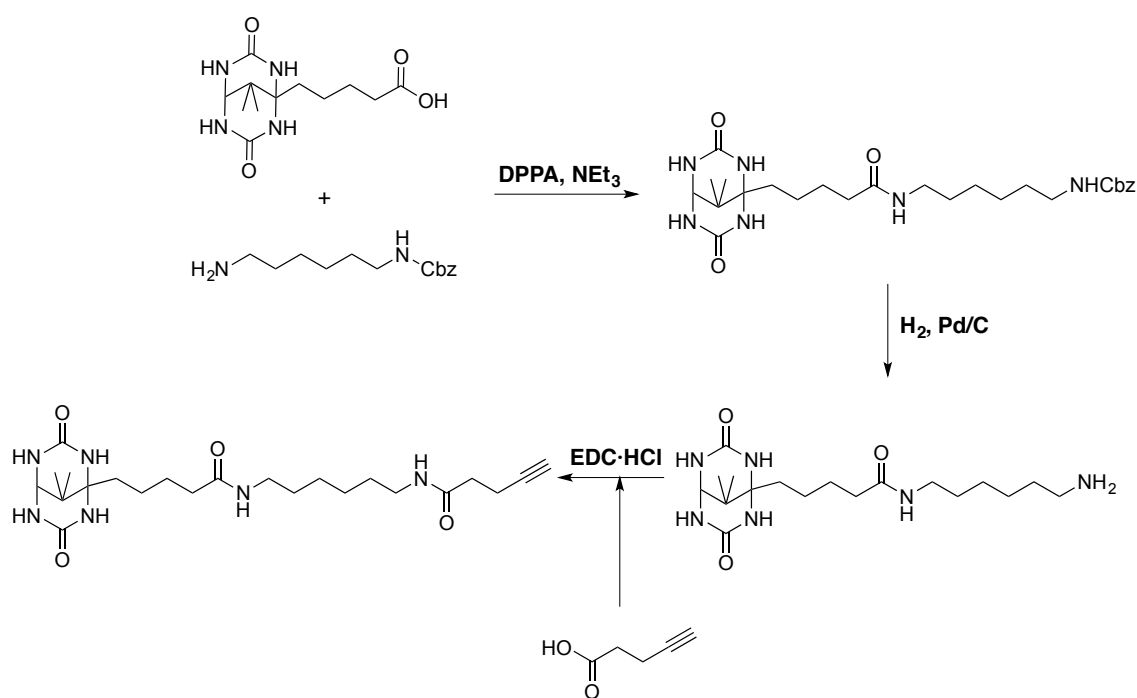


Figura 17. Aproximació sintètica seguida per a la preparació dels intermedis amb un grup alquí terminal.

2 Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball consisteix en desenvolupar nous lligands per a les proteïnes avidina i estreptavidina amb diferents trets estructurals que, segons les nostres hipòtesis, provoquin un augment en l'afinitat d'aquests lligands per a aquestes proteïnes. És a dir:

- Continuar i optimitzar la síntesi de lligands divalents semi-rígid per a les proteïnes avidina i estreptavidina on la part rígida de l'espaiador contingui el grup àcid 3,5-dietinilbenzoic.
- Sintetitzar lligands monovalents de tipus biciclo[3.3.1] amb un únic grup ureido en un dels cicles i cadenes laterals d'àcid carboxílic de diferent longitud en l'altre cicle.
- Mesurar les constants d'afinitat de tots els lligands sintetitzats (monovalents i divalents) per a les proteïnes avidina i estreptavidina.

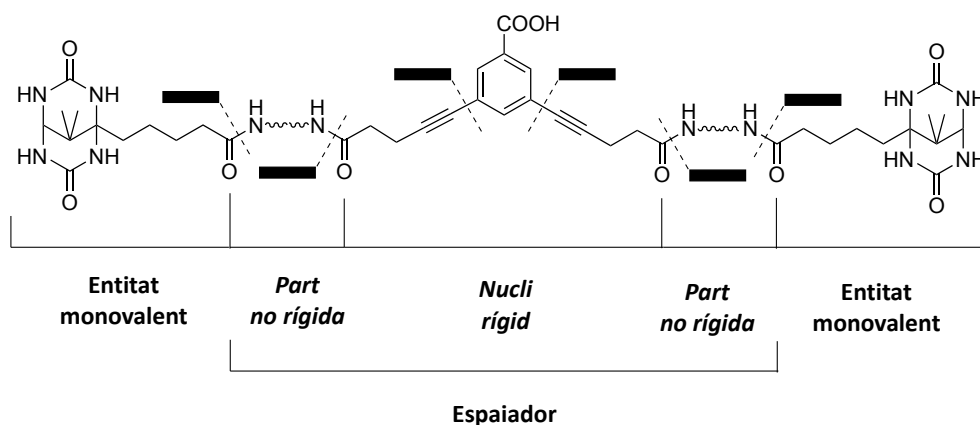
3 Lligands divalents semi-rígid

3.1 Estructura dels lligands divalents

L'objectiu d'aquest capítol consisteix en sintetitzar lligands divalents semi-rígid per l'avidina i l'estreptavidina, determinar les constants d'afinitat per a aquestes proteïnes i analitzar l'efecte de la rigidesa d'aquest espaiador sobre l'afinitat i la molaritat efectiva (*EM*) dels lligands divalents.

Com s'ha exposat en la introducció, l'ús de lligands divalents és una estratègia útil per tal d'augmentar l'afinitat en sistemes multivalents. Per tal d'optimitzar l'espaiador dels lligands divalents d'Av i SAv ja s'havia iniciat la síntesi de lligands amb un espaiador semi-rígid, amb una estructura genèrica que s'indica a l'Esquema 1.

Per tant, els lligands objectiu, haurien de tenir un espaiador format per un nucli rígid al centre i unes parts no rígid als extrems per on s'unirien les entitats monovalents.



Esquema 1. Estructura general dels lligands divalents objectius i les possibles desconexions retrosintètiques.

L'entitat monovalent d'aquests lligands es va escollir que fos la DMPDU (**10**) ja que la seva moderada afinitat permetria que les afinitats dels corresponents lligands divalents no fossin molt elevades, facilitant així la seva determinació. A més, en ser la mateixa entitat monovalent que en altres lligands divalents anteriors, ens permetria atribuir les diferències en les afinitats obtingudes a les propietats de l'espaiador.

La part rígida de l'espaiador es va escollir que fos derivada de l'àcid 3,5-dietinilbenzoic. Així, en ser més rígida que la dels lligands divalents sintetitzats prèviament en el grup, esperaríem que la K_a a Av i/o SAv també fos major que la dels lligands menys rígids (menys preorganitzats).

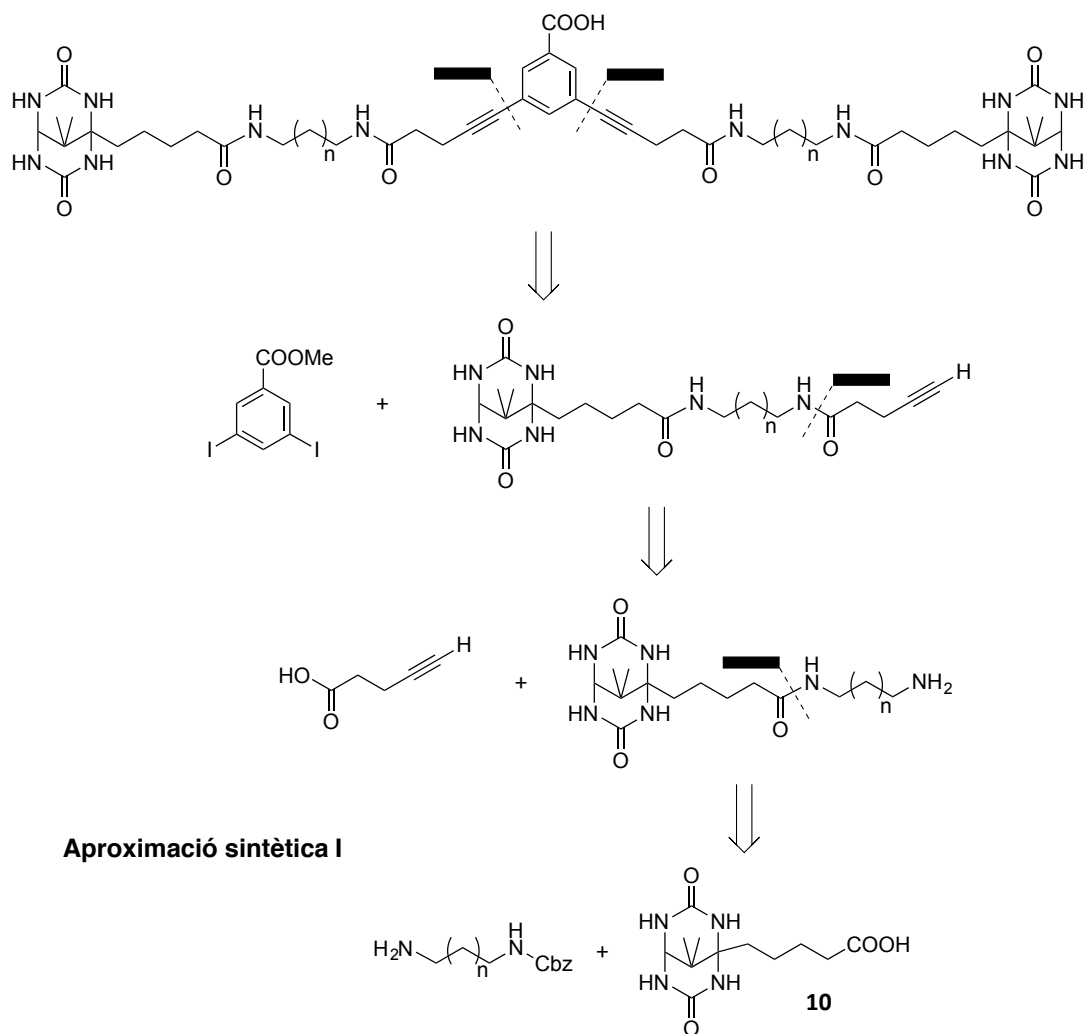
Per tal d'assolir una longitud propera a l'òptima, el nombre d'enllaços entre els carbonils de les dues entitats monovalents hauria de ser d'aproximadament 26 (Figura 15). Per poder optimitzar la longitud de l'espaiador en aquests nous lligands es va decidir d'emprar dos espaiadors no rígids de diferent longitud: de 6 i de 4 metilens.

3.2 Plantejament sintètic

A l'hora de procedir sintèticament es van haver de plantejar les diferents aproximacions sintètiques possibles, ja que hi havia diferents maneres de dur a terme la formació de l'esquelet carbonat (Esquema 1).

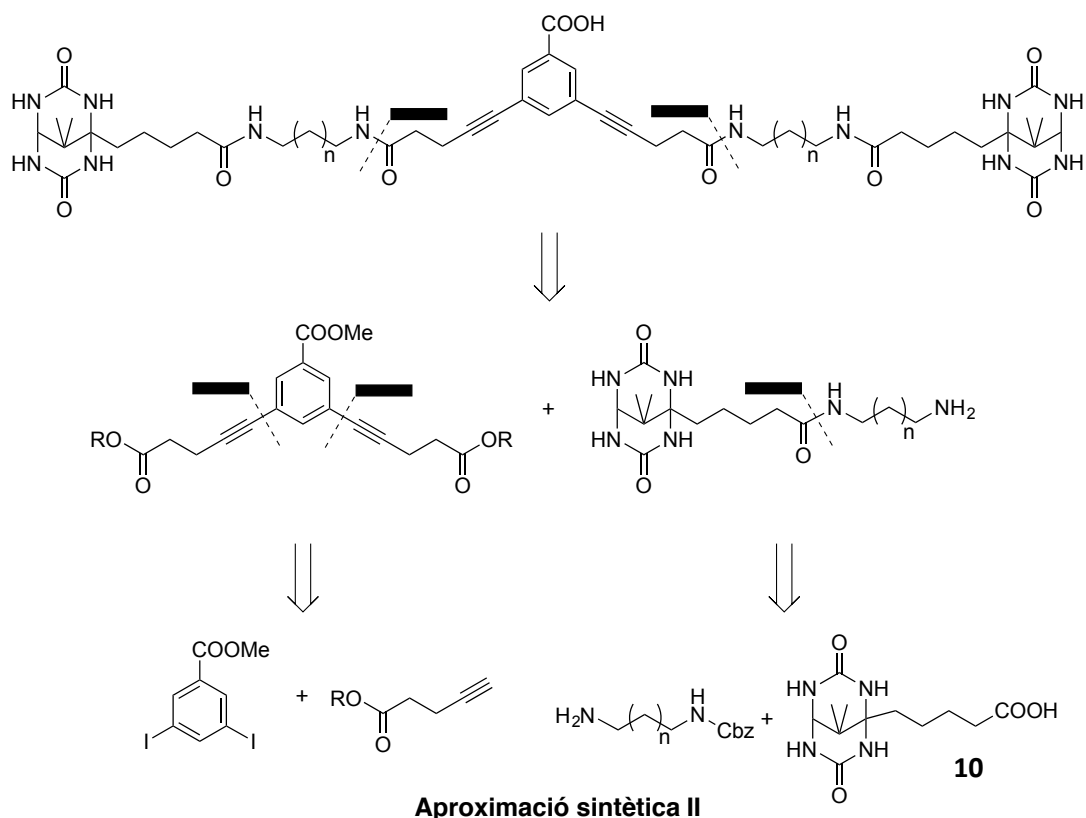
Per exemple, es podria començar des del nucli rígid i anar allargant l'esquelet carbonat per dues bandes fins als extrems; o també es podria construir al revés, començant per les entitats monovalents, a les quals s'anirien unint els diferents elements estructurals (part no rígida de l'espaiador, l'alquí terminal, etc.) fins a l'acoblament a l'anell aromàtic; o dur a terme una síntesi convergent formant diferents fragments que s'unirien en etapes finals. Totes aquestes aproximacions sintètiques tenen els seus avantatges i els seus inconvenients (versatilitat, rendiments, etc.).

Es van plantejar, finalment, dues aproximacions on una etapa clau és l'acoblament entre un carboni aromàtic (sp^2) i un de tipus acetilènic (sp). D'una banda, es va plantejar partir de l'entitat monovalent (**10**), unir-hi l'espaiador no rígid, unir-hi el fragment amb l'alquí terminal i finalment acoblar aquest fragment al nucli aromàtic (Aproximació I, que ja s'havia començat a explorar en treballs previs, com s'ha dit a la introducció) (Esquema 2).¹¹⁵



Esquema 2

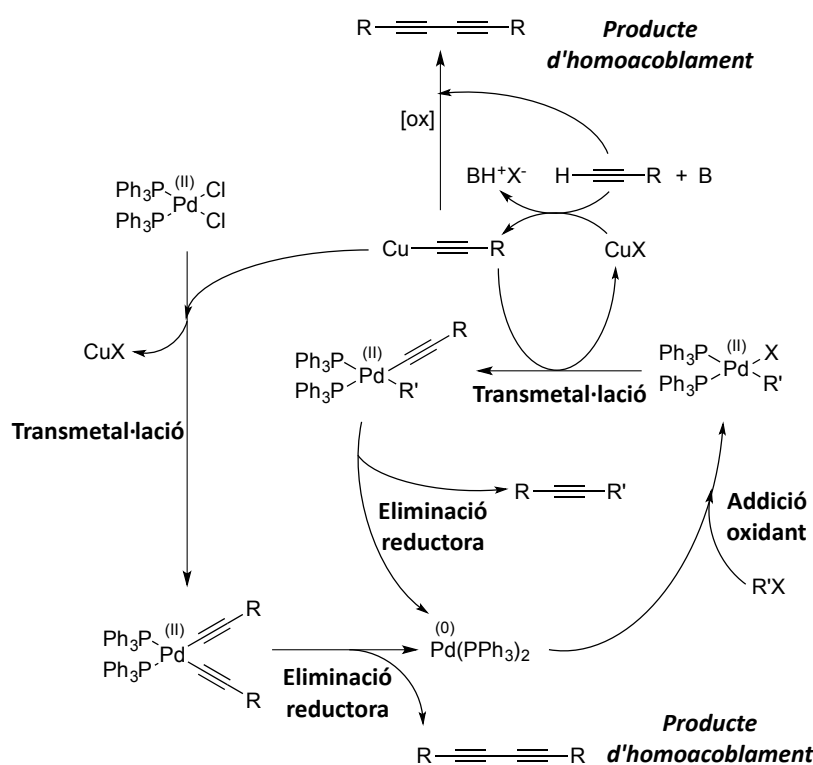
De l'altra, es va pensar en dur a terme una síntesi convergent on, d'una banda, s'uniria l'entitat monovalent (**10**) a l'espaiador no rígid, de l'altra, s'uniria l'anell aromàtic a l'alquí terminal i, finalment, s'unirien els dos fragments per formar el lligand divalent (Aproximació II) (Esquema 3).



Esquema 3

Ambdues aproximacions inclouen una etapa de formació d'un enllaç C-C entre l'alquí terminal i l'anell aromàtic.

Al 1975, i gairebé simultàniament, tres grups de recerca van demostrar que és possible acoblar halurs de vinil o aril amb alquins terminals emprant pal·ladi com a catalitzador, ampliant l'abast de la reacció de *Heck*.¹¹⁶⁻¹¹⁸ D'aquests tres mètodes, la reacció de *Sonogashira* en concret permet dur a terme aquest acoblament emprant un halur de Cu(I) com a cocatalitzador, fet que suavitza les condicions de reacció.¹¹⁹ El mecanisme proposat més àmpliament acceptat per a aquesta reacció segueix l'esquema clàssic dels acoblaments catalitzats per pal·ladi, però amb certes modificacions degut a la presència del Cu(I) (Esquema 4).



Esquema 4. Mecanisme proposat per la reacció de Sonogashira catalitzada per $[PdCl_2(PPh_3)_2]$ i emprant $Cu(I)$ com a cocatalitzador, s'indica la reacció secundària d'homoacoblament que té lloc tant inevitablement per generar l'espècie de Pd activa, com la produïda per la reacció secundària de Hay-Glaser.¹¹⁹

El primer pas és la formació de l'espècie activa de pal·ladi, $Pd(0)L_2$. Aquesta pot provenir d'un catalitzador com el $[Pd(PPh_3)_4]$ que perd dos lligands per donar lloc a l'espècie activa de 14 electrons. En canvi, si es parteix d'un catalitzador de Pd(II) com el $[PdCl_2(PPh_3)_2]$, la formació de l'espècie activa seria diferent: primer es formaria un alquínil de coure per coordinació d'aquest metall amb l'alquí terminal de partida, amb una posterior desprotonació per part de la base. Seguidament dues d'aquestes unitats patirien una transmetal·lació amb el catalitzador $[PdCl_2(PPh_3)_2]$ per donar una espècie doblement coordinada que, finalment i via una eliminació reductora, forniria l'espècie activa de Pd(II) i un equivalent del producte no desitjat d'homoacoblament (Esquema 4).^{119,120}

Una vegada aquesta espècie activa està formada, entra al primer cicle catalític, que segueix l'esquema clàssic dels acoblaments creuats. Primer es produeix una addició oxidant de l'halur d'aril o vinil, que s'ha demostrat que és l'etapa limitant. En paral·lel, el coure(I) dóna lloc a l'espècie d'alquínil de coure de la mateixa manera que s'ha explicat abans per a la formació de l'espècie activa de Pd(II) si es parteix de

[PdCl₂(PPh₃)₂]. Aquesta espècie pateix una transmetal·lació amb el complex que havia coordinat l'halur de vinil o aril. Una eliminació reductora forneix el producte d'acoblament creuat, així com la recuperació de l'espècie activa de catalitzador.^{119,120}

Com s'ha vist, l'ús d'un catalitzador del tipus [PdCl₂(PPh₃)₂] forma inevitablement un equivalent del producte d'homoacoblament. Tot i aquest desavantatge, aquest catalitzador té els avantatges de ser més estable i més econòmic que el [Pd(PPh₃)₄]. La formació del producte d'homoacoblament pot augmentar degut a la presència del coure, ja que quan hi ha algun oxidant al medi, com per exemple l'oxigen, pot tenir la formació d'aquest producte secundari via una reacció de *Hay-Glaser*.^{121,122}

Un altre aspecte a considerar és la reactivitat relativa dels halurs d'aril, ja que l'addició oxidant d'aquests és l'etapa limitant de la velocitat de la reacció. Els més reactius són els iodurs d'aril, seguits dels bromurs, essent els clorurs els menys reactius. Els iodurs d'aril reaccionen en condicions suaus, en canvi els bromurs i clorurs necessiten temperatures elevades. Els substituents de l'anell també fan la seva contribució ja que els halurs d'aril més deficients d'electrons reaccionen més ràpidament.^{123,124}

Aquesta reacció també es pot dur a terme en absència de coure. El mecanisme proposat és lleugerament diferent, ja que després de l'addició oxidant de l'halur, té lloc la coordinació de l'alquí al pal·ladi (i no al coure), que és qui augmenta l'acidesa del protó alquínic. La resta del cicle transcorre d'una manera similar.¹²⁰

3.3 Síntesi dels lligands divalents semi-rígid

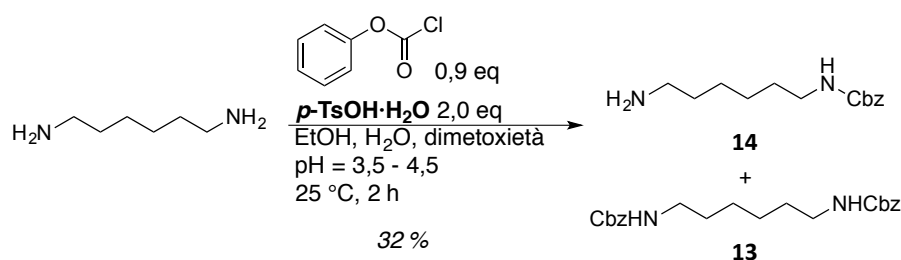
3.3.1 Síntesi lineal des dels extrems cap al nucli rígid (Aproximació I)

En aquesta aproximació es van unir seqüencialment, mitjançant enllaços amida, l'entitat monovalent (DMPDU, **10**) a l'espaiador no rígid i, després de desprotegir l'amina, el producte resultant s'uneix a l'àcid 4-pentinoic. Finalment, l'acoblament de *Sonogashira* de l'alquí terminal amb el 3,5-diiodobenzoat de metil, seguit de la saponificació de l'ester metílic, proporciona el lligand divalent (Esquema 2).

3.3.1.1 Síntesi del lligand divalent 24

Seguint aquesta aproximació es va començar per la monoprotecció amb el grup *benziloxicarbonil* (Cbz o Z) de la 1,6-hexandiamina (la part no rígida de l'espaiador), per tal de poder acoblar-la al lligand monovalent **10**. Es va escollir aquest grup protector per la gran facilitat de desprotecció (hidrogenació benzílica) i perquè aquesta deixa l'amina en forma neutra.

Aquesta protecció és complicada ja que s'ha d'emprar una quantitat adequada de cloroformat de benzil per tal d'evitar la formació excessiva del subproducte de doble protecció; això s'aconsegueix emprant un excés de diamina i una addició lenta del cloroformat de benzil. També és important controlar el pH del medi ja que la protecció va generant HCl que, si fa baixar prou el pH (per sota de 3,5) protona les amines i n'impedeix la protecció. Tanmateix el pH es pot controlar amb l'addició d'acetat de sodi al medi.¹²⁵ Tot i això sempre s'aïlla una certa quantitat de producte de doble protecció **13**. Es va obtenir el producte desitjat (**14**) amb un 32 % de rendiment, baix però similar al descrit per a diamines similars.

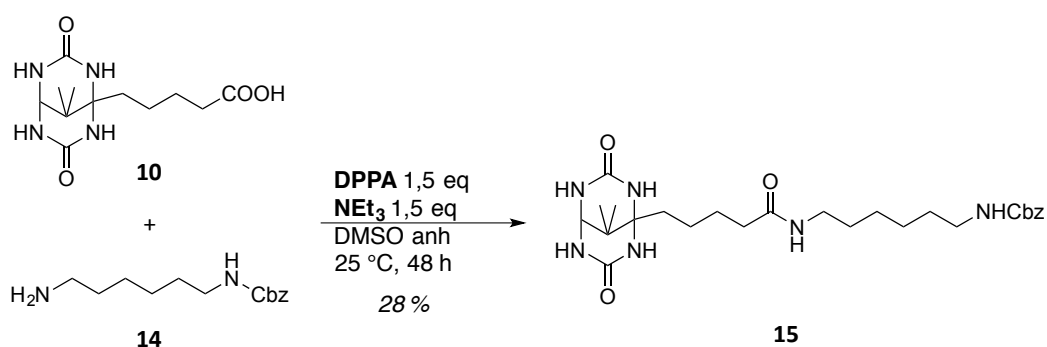


Esquema 5

El següent pas va ser l'acoblament d'aquesta amina al lligand monovalent **10** que ja teníem preparat al laboratori.⁹³ Aquests tipus de compostos, que presenten diurees a la seva estructura (com el compost **10** o els derivats de PDU i glicolurils), són normalment poc solubles en la majoria de dissolvents orgànics convencionals, ja que la gran capacitat que tenen per formar enllaços per pont d'hidrogen fa que siguin necessaris solvents molt polars capaços de trencar-los i aconseguir solubilitzar-los. Per tant, els millors dissolvents per a aquest propòsit són el DMSO, el metanol, etc.

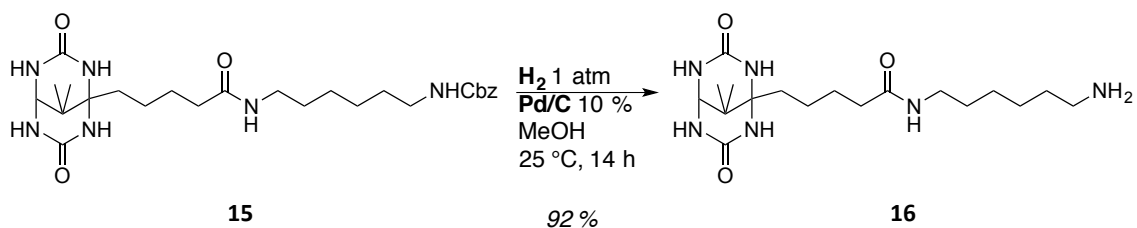
És per això que aquesta reacció es va dur a terme emprant DPPA com a agent d'acoblament i NEt₃ com a base, fent servir DMSO anhidre com a dissolvent. La DPPA

forma un ester activat de l'àcid que pot rebre fàcilment l'atac nucleofilic de l'amina. La purificació d'aquests compostos també és complicada ja que moltes vegades no es poden purificar mitjançant cromatografies en columna *flash* o s'ha de fer emprant mescles de dissolvents molt polars que arrosseguen inevitablement certa quantitat de sílice en el procés. En aquest cas es va poder fer la purificació per recristal·lització en aigua, de manera que es va aïllar el producte pur (**15**) amb un modest 28 % de rendiment (Esquema 6).



Esquema 6

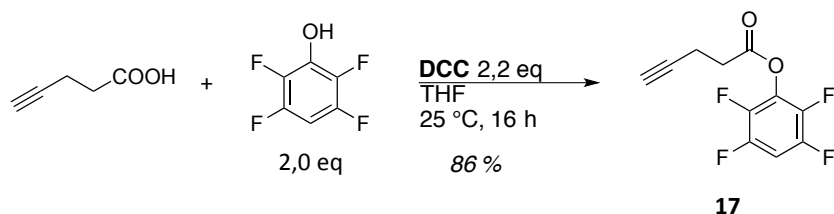
El següent pas va ser la desprotecció de l'amina del compost **15**. Es va aconseguir mitjançant un hidrogenòlisi benzílica emprant H_2 i Pd/C. Aquesta reacció va ser molt neta ja que la conversió va ser total i només es va detectar el producte desitjat **16**, aïllat amb un 92 % de rendiment (Esquema 7).



Esquema 7

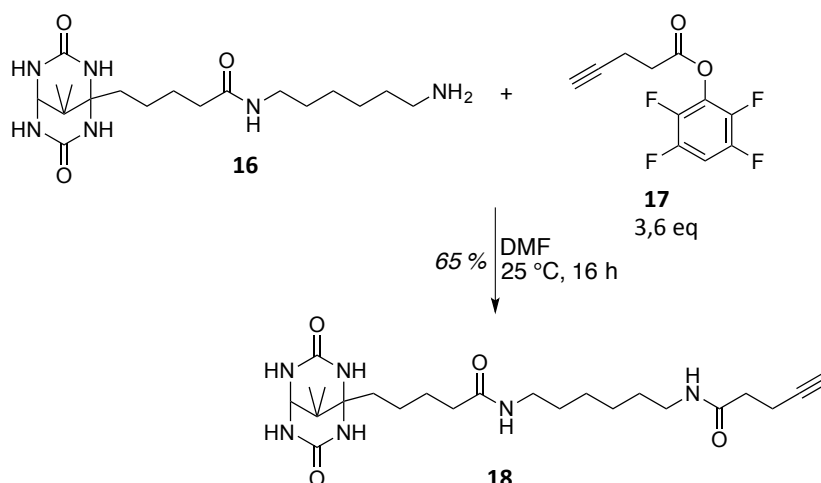
El següent pas va ser l'acoblament de l'àcid 4-pentinoic mitjançant la formació d'un enllaç amida. Com s'ha exposat (Apartat 1.6.3) ja s'havien fet estudis sobre aquests tipus d'unions. L'ús de carbodiimides com a agents d'acoblament (com l'EDC·HCl) donava lloc al producte amb molt baix rendiment.¹¹⁵ És per això que es va decidir formar un ester activat d'aquest àcid. Es va formar l'ester activat de

2,3,5,6-tetrafluorofenol de l'àcid 4-pentinoic seguint un procediment descrit.¹²⁶ Es va aïllar **17** amb un 86 % de rendiment (Esquema 8).



Esquema 8

Llavors, es va sintetitzar l'alquí **18** per reacció de l'amina **16** amb l'èster activat **17**. Es va dur a terme en DMF emprant un excés d'èster activat. El producte es va haver de purificar per HPLC semi-preparatiu. Mitjançant aquest acoblament es van millorar els rendiments previs fins al 65 % (Esquema 9).

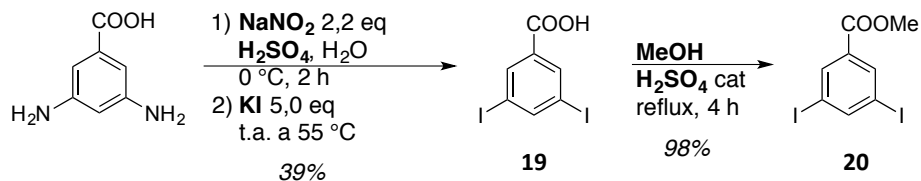


Esquema 9

Una vegada es va tenir l'alquí **18** el següent pas va ser acoblar-lo doblement al 3,5-diiodobenzoat de metil via una reacció de *Sonogashira* per tenir així format l'esquelet carbonat del lligand divalent. Es va plantejar d'emprar el derivat diiodat ja que és conegut que els Csp^2-I són més reactius que els Csp^2-Br i els Csp^2-Cl en reaccions d'acoblament de *Sonogashira*.¹²⁰

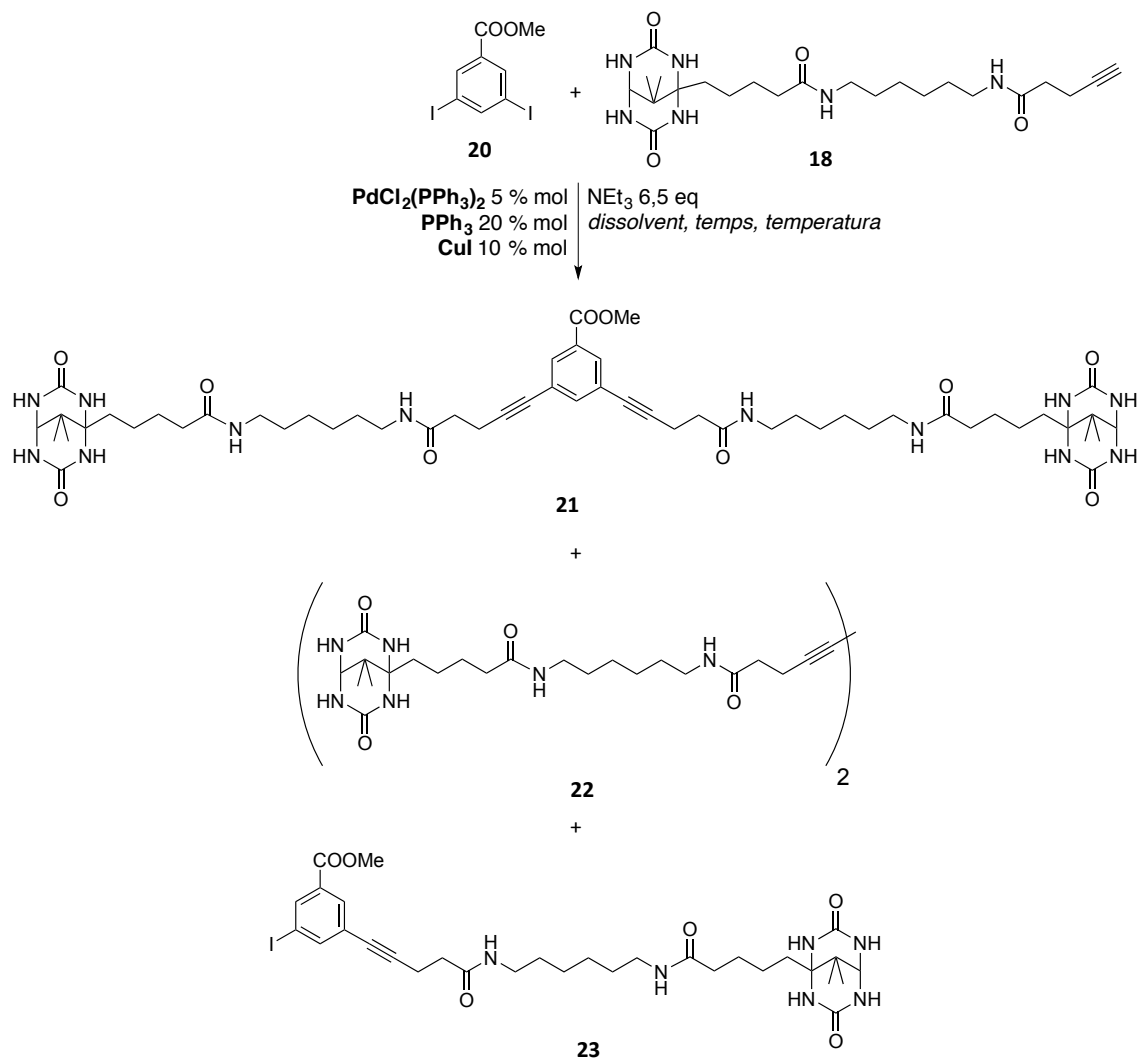
Per tal d'obtenir el corresponent compost diiodat es va partir de l'àcid 3,5-diaminobenzoic. Aquest es va transformar en la sal de diazoni corresponent emprant $NaNO_2$ en medi àcid. Seguidament, mitjançant una reacció de *Sandmeyer* es va substituir el grup diazoni amb iodur de potassi per donar lloc al compost **19**. El

rendiment global va ser del 39 %. A continuació, l'esterificació en medi àcid i MeOH va proporcionar l'ester metílic desitjat (**20**) amb un 98 % de rendiment (Esquema 10).¹²⁷



Esquema 10

Una vegada obtinguts els compostos **20** i **18** es va procedir a la seva unió mitjançant la reacció de *Sonogashira*. Es van investigar diferents condicions de reacció i dissolvents per tal d'optimitzar la reacció, sempre emprant $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ com a catalitzador, CuI com a cocatalitzador, PPh_3 i NEt_3 com a base (Esquema 11).



Esquema 11

A la Taula 1 es recullen els resultats d'aquestes proves. Primer es va emprar DMF com a dissolvent, tant amb escalfament extern (Entrada 1) com emprant el reactor de microones (Entrada 2). A més, es va decidir utilitzar un petit defecte de l'alquí **18** ja que era el compost sintèticament més avançat (1,9 equivalents). En tots dos casos es van detectar només traces del producte de doble acoblament **21** i, com a producte majoritari, el subproducte d'homoacoblament **22** i. Sabem que el producte d'homoacoblament s'ha de formar en una quantitat com a mínim igual a la de catalitzador, però en veure que era tan majoritari era clar que s'estava produint per altres factors, com per exemple, via la reacció secundària de *Hay-Glaser*, ja que és conegut que la presència d'oxigen afavoreix aquesta reacció.^{120,121} També és possible que el dissolvent contribuís a la formació del producte d'homoacoblament **22**, ja que la solubilitat del material de partida **18** en DMF no és molt elevada, degut a la tendència a formar agregats intermolecular mitjançant enllaços per pont d'hidrogen. En aquests agregats, la major proximitat dels grups alquí terminal podria facilitar la unió entre aquests dos fragments per donar el subproducte **22**.

	20 (mmol)	18 (mmol)	Dissolvent	Temperatura i Temps	21	22	23	18
1	0,023	0,044	DMF	t.a. 16 h i 60 °C 3,5 h	traces	majoritari	-	-
2	0,028	0,084	DMF	120°C (MW) 40 min	traces	majoritari	-	traces
3	0,026	0,052	DMSO ^(c)	t.a. 48 h	10 %	39 %	traces	traces ^(b)
4	0,026	0,052	DMSO ^(d)	t.a. 48 h	15 /	15 /	35 /	35 ^(a)
5	0,026	0,052	DMSO ^(d)	55 °C 4 dies	26 %	14 %	-	- ^(b)
6	0,108	0,052	DMSO ^(d)	55 °C 5 dies	28 %	14 %	-	- ^(b)

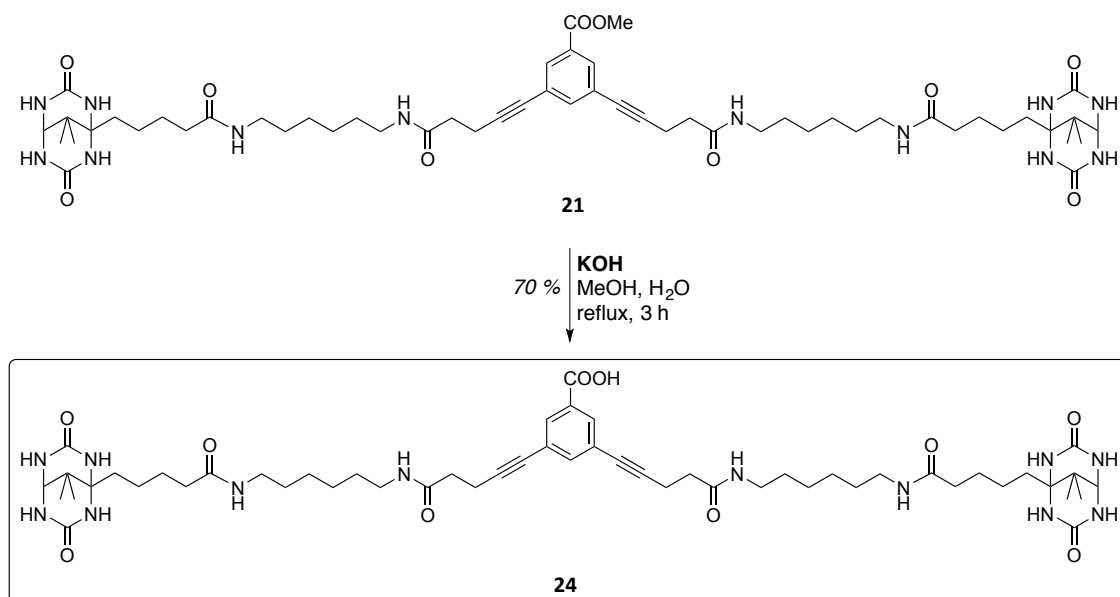
*Taula 1. Condicions i resultats per les proves d'acoblament de Sonogashira entre **20** i **18**.
^(a) Proporció determinada per ¹H-RMN. ^(b) Rendiment de productes aïllats. ^(c) Eliminació de l'oxigen molecular mitjançant bombolleig d'argó al medi de reacció. ^(d) Eliminació de l'oxigen molecular mitjançant cicles de buit i purga amb argó.*

Per tal d'evitar aquestes complicacions es va procedir a intentar treure la major part de l'oxigen del medi i dur a terme la reacció escalfant en bany extern i no en microones per tal que les condicions fossin més suaus i poder seguir-ne l'evolució. En primer lloc es va utilitzar DMSO, com a dissolvent ja que permetia una millor solubilització dels reactius, i es va bombollejar argó per la dissolució (Entrada 3). En aquest cas es va obtenir un 10 % del producte desitjat (**21**), juntament amb producte d'homoacoblament **22** (39 %) i traces de material de partida **18** i producte de monoacoblament **23**. Possiblement el mètode per desgasar no era prou efectiu ja que

encara s'observaven grans quantitats del producte **22**, així que es va provar un mètode que consisteix en fer diferents cicles de purga amb argó combinats amb buit per extreure la major quantitat d'oxigen possible. Seguint aquest mètode, i després de 48 h a temperatura ambient, es va aconseguir augmentar el rendiment del producte desitjat (**21**) fins al 15 %, però es va obtenir també un 15 % del producte d'homoacoblament (**22**), un 35 % del producte de monoacoblament (**23**) i es va recuperar un 35 % del reactiu inicial (**18**) (Entrada 4).

A continuació, es va decidir escalfar a 55 °C i allargar el temps de reacció per veure si evolucionava més ràpidament i la conversió final era més alta. En aquest cas, es va aïllar un 26 % del producte desitjat (**21**) i un 14 % del producte d'homoacoblament **22**, sense detectar materials de partida ni producte de monoacoblament. Tot i això, els dos productes obtinguts **21** i **22** es van haver de separar per HPLC semi-preparatiu (Entrada 5). Un escalat d'aquesta reacció va permetre d'obtenir el producte desitjat (**21**) amb un 28 % de rendiment, el millor que es va poder aconseguir (Entrada 6).

Una vegada aïllat l'èster **21**, es va saponificar per obtenir el lligand divalent **24** en forma d'àcid carboxílic (Esquema 12). Per tant, ja s'havia sintetitzat un dels dos lligands divalents objectiu.

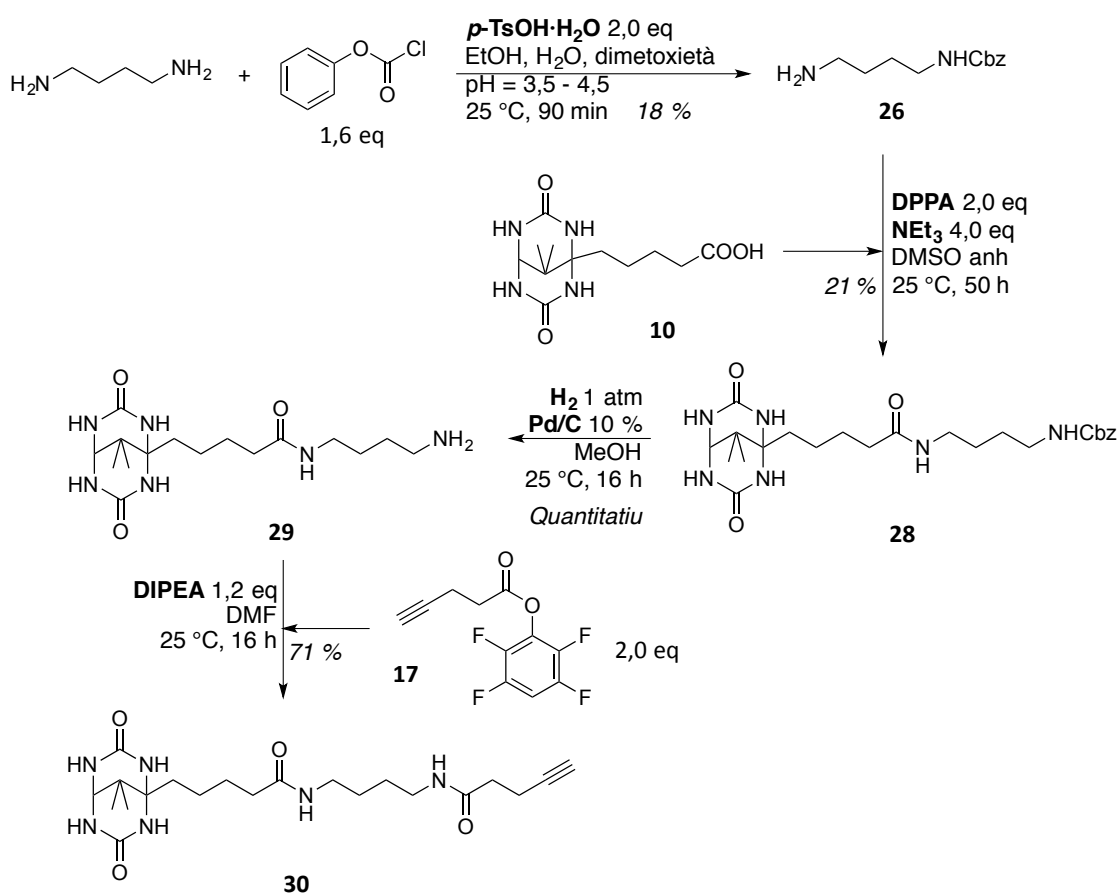


Esquema 12

3.3.1.2 Síntesi del lligand divalent 25

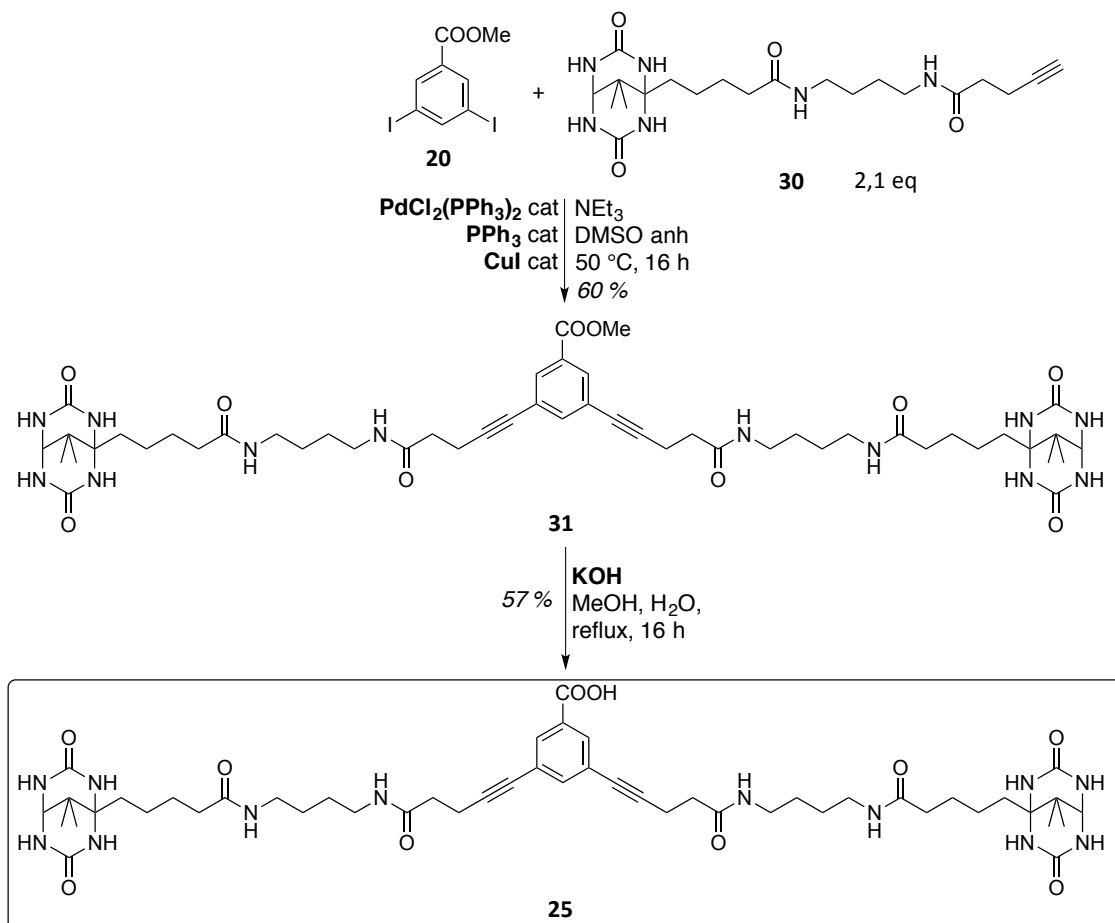
Amb la síntesi total del compost **24** s'havia establert una ruta sintètica que es podia utilitzar per preparar altres lligands divalents amb diferent longitud de la part no rígida de l'espaiador. Per tant, i seguint les mateixes desconexions, es va abordar la síntesi del lligand **25** (amb un espaiador més curt).

Primer, es va començar una altra vegada per la monoprotecció de la diamina, en aquest cas de l'1,4-diaminobutà, amb el grup Cbz (**26**), on també va formar-se producte de doble protecció (**27**). Seguidament, es va acoblar l'amina **26** al compost **10** amb DPPA i NEt₃ per obtenir el compost **28**. La desprotecció del grup Cbz per hidrogenòlisi de la posició benzílica va furnir el producte **29**. Seguidament aquest va acoblar-se a l'èster activat **17**, emprant DIPEA, per obtenir l'alquí terminal **30**. Els rendiments d'aquestes etapes van resultar ser similars als obtinguts a la síntesi de l'anàleg d'espaiador no rígida de sis metilens (Esquema 13).



Esquema 13

El doble acoblament de l'alquí **30** al 3,5-diiodobenzoat de metil **20** es va dur a terme sota les condicions que millor resultat van donar en la síntesi de l'anàleg **21** (Taula 1). En aquest cas, i després de la purificació per HPLC semi-preparatiu es va obtenir el compost **31** amb un 60 % de rendiment, es va detectar presència de producte d'homoacoblament, però no de monoacoblament. Finalment es va saponificar l'èster **31**, es va obtenir l'àcid carboxílic **25** amb un rendiment de 57 % (Esquema 14).



Esquema 14

Arribats a aquest punt, i fent una valoració d'aquesta aproximació sintètica per obtenir aquest tipus de lligands divalents, es pot concloure que, per un costat, els rendiments són, en general, baixos, fet preocupant sobretot en l'etapa d'acoblament doble de *Sonogashira*. A més, i pensant sobretot en aquesta etapa de doble acoblament, es formen molts subproductes no desitjats de reactius molt avançats sintèticament. També, la purificació dels compostos és costosa i s'ha de fer per HPLC ja que la diurea bicíclica forma agregats, que fa que no es pugin separar els productes per cromatografia *flash* en fase normal. Finalment, cal tenir en compte que aquesta

aproximació no és gaire versàtil ja que el lligand divalent es construeix a partir d'un intermedi que conté l'alquí terminal, l'espaiador no rígid i l'entitat monovalent, de manera que qualsevol canvi que es vulgui introduir en l'espaiador no rígid o en l'entitat monovalent implica que s'ha de fer la síntesi *de novo*.

3.3.2 Síntesi convergent del lligand divalent 25 (Aproximació II)

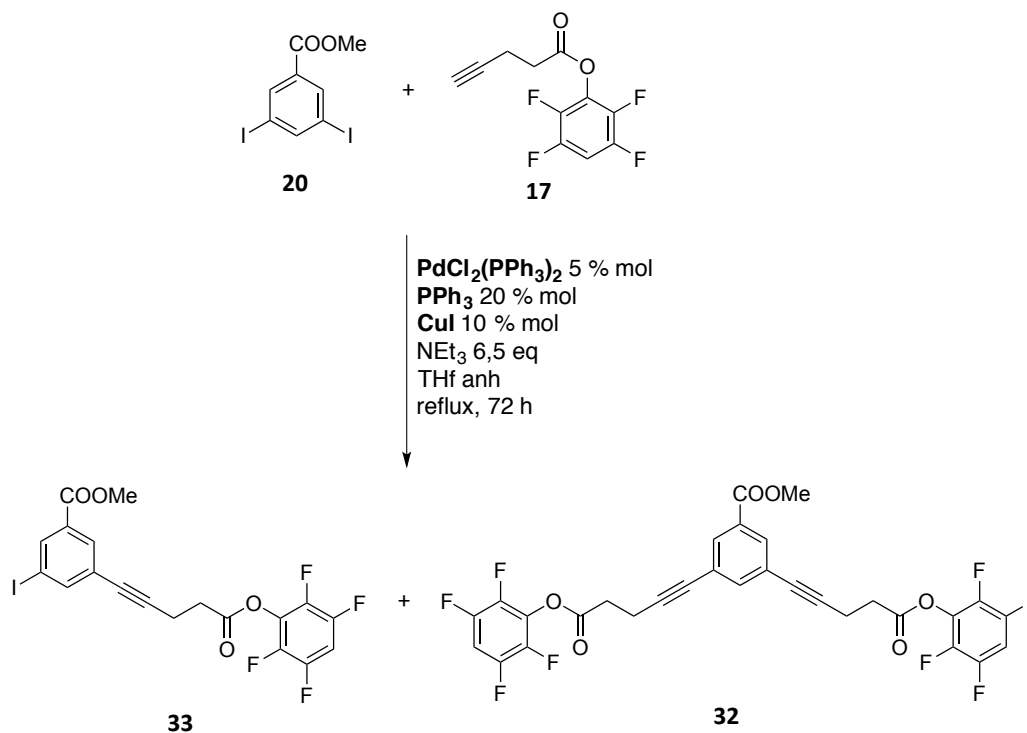
Després de l'aproximació lineal que s'havia dut a terme, es va abordar la segona aproximació plantejada (més convergent), esperant millorant d'aquesta manera la versatilitat i el rendiment global de la síntesi (Esquema 3).

En aquesta aproximació, en primer lloc, es formaria el nucli rígid de l'espaiador per l'acoblament de *Sonogashira* d'un derivat de l'àcid 4-pentinoic al 3,5-diiodobenzoat de metil (**20**). Per un altre costat, s'uniria l'entitat monovalent DMPDU (**10**) a la diamina monoprotegida **26** mitjançant un enllaç amida. A continuació, s'unirien els dos intermedis mitjançant enllaços amida. Finalment, la saponificació de l'ester metílic proporcionaria el lligand divalent desitjat.

Aquesta aproximació tindria certs avantatges. Per un costat seria més versàtil ja que a partir d'un nucli rígid comú es podrien sintetitzar diferents lligands divalents amb espaiadors no rígid*s* i entitats monovalents diferents. A més, en fer un acoblament de *Sonogashira* amb un material menys avançat sintèticament, els possibles subproductes que es formessin no suposarien una pèrdua tan greu. També, la síntesi esdevindria més convergent i, per tant, el rendiment global podria ser més elevat. Així mateix, la introducció de fragments que contenen les diurees més tard a la síntesi permetria que hi hagués menys etapes amb purificacions costoses. Per últim, cal observar que per als lligands divalents objectiu d'aquest treball (**24** i **25**) es podrien aprofitar productes ja sintetitzats comuns a les dues aproximacions. Aquesta nova aproximació s'ha seguit per tornar a preparar el lligand **25**.

Es va començar per la síntesi del nucli rígid de l'espaiador, el qual es va preparar per acoblament de *Sonogashira* del 3,5-diiodobenzoat de metil (**20**) amb un ester activat de l'àcid 4-pentinoic. Així teníem el grup carboxilat protegit i a la vegada activat per a l'atac nucleòfil de l'amina, ja que la unió a la part no rígid*a* de l'espaiador es faria mitjançant un enllaç amida.

A l'apartat 3.3.1.1 ja s'ha descrit la síntesi de l'ester activat de 2,3,5,6-tetrafluorofenol de l'àcid 4-pentinoic (**17**) (Esquema 8, Pàgina 37), i es va decidir aprofitar-lo per a aquesta nova aproximació. Així, el primer pas va ser l'acoblament doble de *Sonogashira* de l'alquí **17** amb el 3,5-diiodobenzoat de metil (**20**) (Esquema 15).



Esquema 15

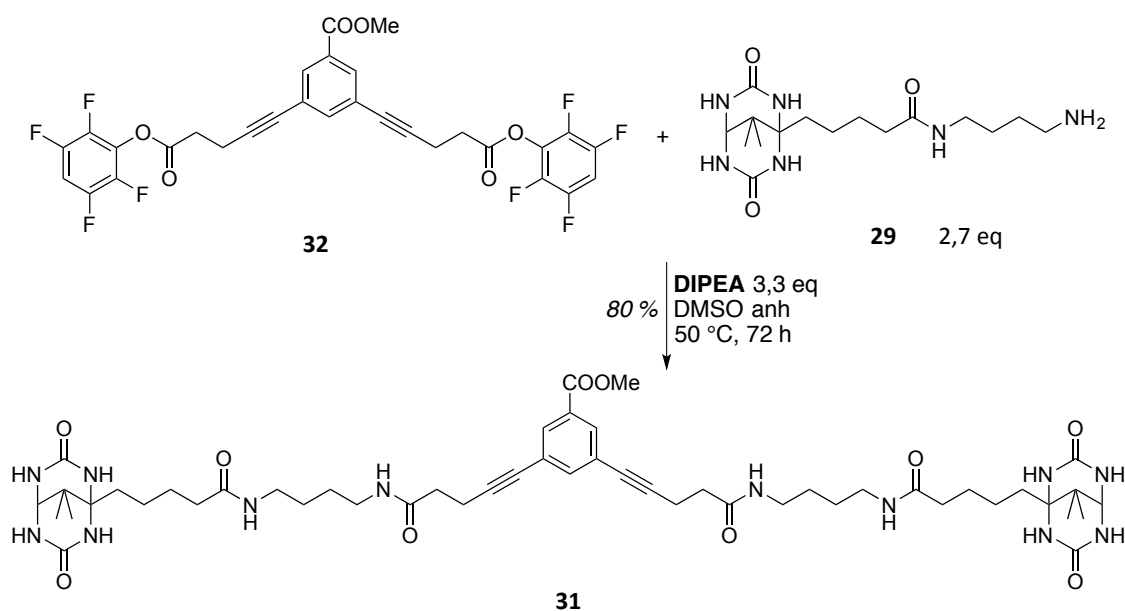
Primer es va provar de sintetitzar-lo en les condicions d'acoblament de *Sonogashira* que s'havien optimitzat per a l'acoblament dels alquins **18** i **30** al dihaloarè **20**, però no eren adequades per aquest substrat i no es va obtenir producte (Taula 2, Entrada 1). Així que es va provar de canviar el dissolvent a THF. En aquest cas i després de 20 h a reflux es va obtenir el producte **32** amb un pobre 11 % de rendiment, però acompanyat d'un 44 % de producte de monoacoblament (**33**), tot i haver emprat un excés de l'alquí **17** (Entrada 2).

	20 (mmol)	17 (mmol)	Dissolvent	Temperatura	Temps	32	33
1	0,515	1,62	DMSO	50 °C	5 dies	-	-
2	0,134	0,402	THF	reflux	20 h	11 %	44 %
3	2,07	5,18	THF	reflux	72 h	31 %	traces

Taula 2. Condicions i resultats obtinguts per les proves d'acoblament de *Sonogashira* de **20** i **17**.

En escalar aquesta reacció, en les condicions anteriors i allargant el temps de reacció a 72 h, es va poder aïllar el producte desitjat (**32**) amb un millorable 31 % de rendiment (Entrada 3).

Aquest nucli rígid amb doble ester activat (**32**) es va unir a l'amina **29** que ja s'havia sintetitzat en l'aproximació I (Apartat 3.3.1.2, Pàgina 41), i així es va obtenir el producte **31** amb un 80 % de rendiment (Esquema 16). Finalment, i de la mateixa manera que en l'aproximació anterior (Esquema 14, Pàgina 42) es va saponificar l'ester **31** per obtenir l'àcid carboxílic **25** amb un 57 % de rendiment.



Esquema 16

3.4 Determinació de les constants d'associació dels lligands 24 i 25 a Av i SAv

Una vegada es va disposar dels compostos **24** i **25** es va procedir a determinar si s'unien a les proteïnes avidina i estreptavidina i amb quina afinitat. Hi ha diversos mètodes descrits per determinar les constants d'afinitat de lligands per a proteïnes o altres receptors (espectrofotometria, fluorimetria, espectroscòpia d'RMN, potenciometria, etc.).¹²⁸

3.4.1 Mètode de la valoració espectrofotomètrica competitiva

Una metodologia que ha estat emprada amb èxit prèviament per la determinació de l'afinitat d'anàlegs de la biotina per l'Av i l'SAv és la valoració espectrofotomètrica competitiva.^{88,94} Quan la complexació no produeix un canvi espectral significatiu la constant d'afinitat no es pot determinar directament ja que l'error seria molt gran.

Aquest mètode de competició consisteix en la formació d'un complex amb un lligand que presenta canvis espectrals significatius quan s'uneix a la proteïna. A continuació se'l desplaça per valoració amb el lligand d'interès.

Com s'ha comentat a l'apartat 1.5.3 (pàgina 11), l'àcid 2-(4'-hidroxifenil)azobenzoic (HABA, **2**) és capaç d'unir-se a l'Av i l'SAv però molt més feblement que la biotina (**1**) (K_a d' $1,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 per l'avidina, i un K_a d' $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH = 7,0 per l'estreptavidina).²⁷ A més, presenta un equilibri tautomèric entre la forma *azo* i la forma *hidrazona* (Figura 9) amb màxims d'absorció d'aquests dos tautòmers a 345 nm i 500 nm respectivament. Quan s'uneix a l'Av i l'SAv ho fa mitjançant la forma *hidrazona*, fet que comporta un augment en l'absorció de la dissolució a 500 nm —solució de color vermell—; en canvi, quan està lliure en dissolució predomina la forma *azo* i, per tant, s'observa un augment a la banda de 345 nm —solució de color groguenc—. Aquest fet fa que sigui un indicador adient i es puguin dur a terme valoracions espectrofotomètriques competitives per competició amb un altre lligand.

És a dir, si es té una dissolució formada per Av o SAv i HABA (**2**) i sobre aquesta es van fent addicions d'un lligand que desplaci l'indicador (HABA), s'observà un canvi progressiu a l'espectre d'UV-Vis: la banda a 500 nm anirà disminuint (i la de 345 nm

anirà augmentant) a mesura que el nou lligand vagi desplaçant l'indicador. Com que les K_d de l'HABA amb l'avidina i l'estreptavidina són conegudes, es poden determinar les del lligand d'interès (Figura 18).

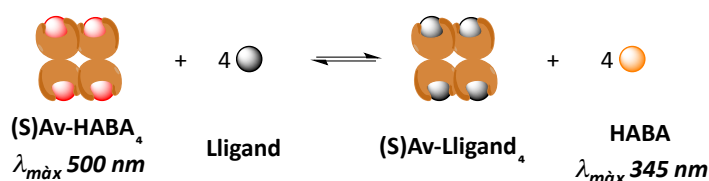


Figura 18. Representació de l'equilibri que té lloc durant la valoració espectrofotomètrica competitiva de l'Av i l'SAv amb un lligand emprant HABA com a indicador.

3.4.1.1 Model d'unió d'una valoració espectrofotomètrica competitiva d'Av o SAV amb un lligand divalent

Com que l'Av i l'SAv són proteïnes tetramèriques amb els llocs d'unió col·locats dos a dos en cares oposades, es pot representar la unió d'un lligand divalent com es mostra a la Figura 19.

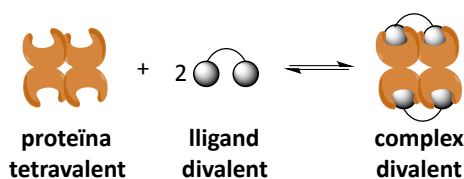


Figura 19. Representació de la unió d'un lligand divalent a un receptor tetraivalent donant lloc a un complex divalent d'estequiometria 1:2.

Aquest model es pot simplificar si suposem que no hi ha efectes cooperatius, és a dir, les dues *subunitats* properes són independents de les altres dues i, per tant, les podem considerar per separat a efectes de la complexació, com si es tractessin de *bis-subunitats* independents. Això dóna lloc a un model en el que es considera que es forma un complex d'estequiometria 1:1 (Figura 20).

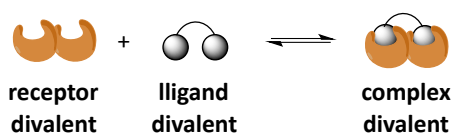


Figura 20. Model per a la unió d'un receptor divalent amb un lligand divalent.

Els lligands divalents també, en principi, podrien formar complexos diferents al representat a la Figura 20. Aquests podrien tenir estequiometries diferents o fins i tot

presentar una complexació de tipus “intermolecular” (oligomerització). La formació de diferents complexos donaria lloc a un sistema amb múltiples espècies, fet que a més, complicaria l’anàlisi matemàtic que permet deduir les constants d’afinitat a partir dels valors d’absorbància observats a l’UV-Vis (Figura 21).

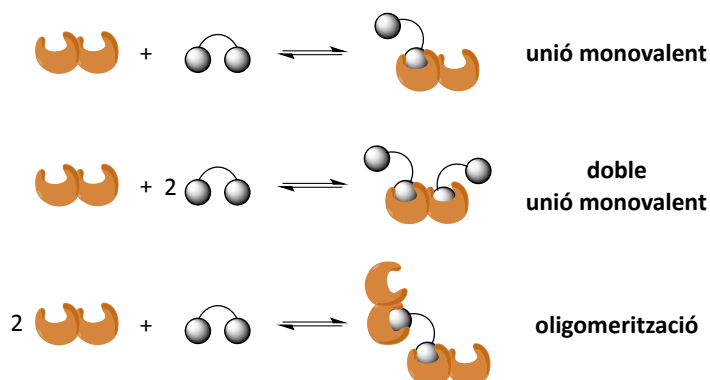


Figura 21. Representació dels altres complexos que pot formar un lligand divalent amb un receptor divalent.

Un dels avantatges d’emprar lligands divalents amb un espaiador rígid és que, si estan ben dissenyats, es facilita la unió divalent intramolecular, ja que la concentració efectiva de la segona entitat monovalent una vegada s’ha produït la primera unió és més elevada, degut a la preorganització que presenta. Per tant, cal esperar que la unió sigui gairebé completament divalent.

El procés de valoració competitiva, doncs, consisteix en complexar la proteïna amb un excés d’indicador (HABA, **2**). Aquesta solució tindrà un espectre d’UV-Vis amb una determinada absorbància a 500 nm (màxim de la forma *hidrazona*, que es forma en complexar-se a la proteïna). Posteriors addicions consecutives del lligand produiran un descens en el valor d’absorbància a aquesta longitud d’ona ja que el lligand desplaça l’HABA, que passa a estar en la forma *azo* en estar lliure en dissolució (Figura 22).

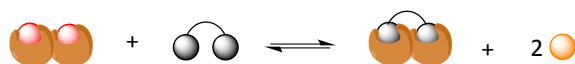


Figura 22. Model representatiu de l’equilibri que té lloc en una valoració espectrofotomètrica competitiva d’Av o SAv emprant HABA com a indicador i valorant amb un lligand divalent.

Els equilibris que es poden establir durant la valoració competitiva són els mostrats a la Figura 23 on (i a partir d’ara): I_t és la concentració total d’indicador, S_t és la concentració total de bis-subunitats de proteïna, L_t és la concentració total de lligand,

[I] és la concentració d'indicador lliure, [S] és la concentració de bis-subunitats de proteïna lliures, [L] és la concentració de lligand lliure, [SI] és la concentració de complex SI, [SI₂] és la concentració de complex SI₂, [S=L] és la concentració del complex S=L, K_{SI} és la constant d'associació de l'indicador i K_{S=L} és la constant d'associació del lligand.

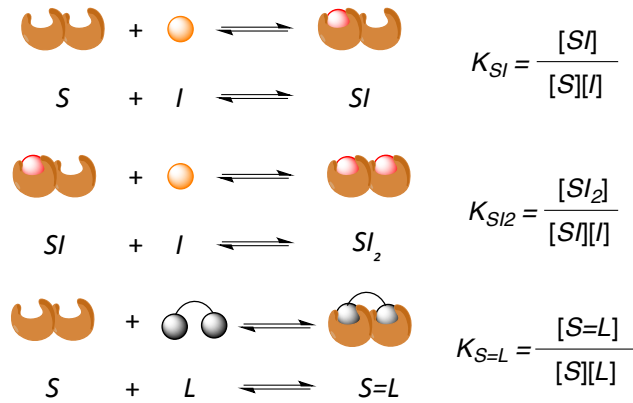


Figura 23. Model del equilibris presents en la valoració.

El valor de l'absorbància a 500 nm ve donat per l'Equació 4, on $\epsilon_{I(500)}$ és l'absortivitat molar de l'indicador lliure a 500 nm i $\epsilon_{SI(500)}$ és l'absortivitat molar del complex SI a 500 nm. El complex SI₂ té una absorbància el doble que la del complex SI.

$$A_{500} = \epsilon_{I(500)}[I] + \epsilon_{SI(500)}[SI] + 2\epsilon_{SI(500)}[SI_2]$$

Equació 4

Els balanços de matèria són:

$$S_{tot} = [S] + [SI] + [SI_2] + [S=L] \quad I_{tot} = [I] + [SI] + 2[SI_2] \quad L_{tot} = [L] + [S=L]$$

Per tant:

$$[S] = \frac{S_{tot}}{1 + K_{SI}[I] + K_{S=L}[L] + K_{SI}K_{SI_2}[I]^2}$$

$$[I] = \frac{I_{tot}}{1 + K_{SI}[S](1+2K_{SI_2}[I])} \quad [L] = \frac{L_{tot}}{1 + K_{S=L}[S]}$$

$$[SI] = K_{SI}[S][I] \quad [SI_2] = K_{SI_2}[I][SI] \quad [S=L] = K_{S=L}[S][L]$$

L'ajust dels valors de l'absorbància a 500 nm calculada respecte els valors experimentals es fa per mínims quadrats. Aquest ajust proporciona, llavors, un valor

de K_a que es donarà per bo si les corbes s'ajusten bé. En cas contrari pot ser que estiguin tenint lloc altres equilibris fora de la complexació divalent intramolecular (Figura 23) i/o efectes cooperatius.⁹³

3.4.2 Resultats de les valoracions d'Av i SA_v amb lligands divalents 24 i 25

En dur a terme els experiments de competició es va comprovar com els compostos **24** i **25** provocaven una disminució de la banda de 500 nm en afegir-los a la solució del complex proteïna-HABA; això és el que caldria esperar degut al fet que l'entitat monovalent és la DMPDU (**10**), que s'uneix a les proteïnes avidina i estreptavidina al mateix lloc d'unió que ho fan la biotina (**1**) i l'HABA (**2**) (Figura 24).

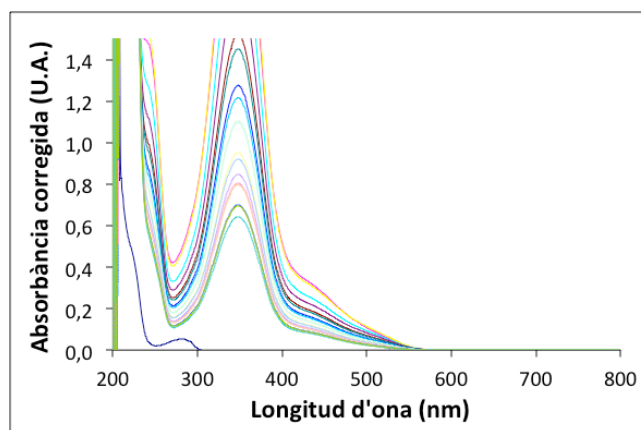


Figura 24. Variació de l'espectre d'absorció UV-Vis a mesura que es fan addicions del lligand divalent **25** a una solució d'estreptavidina i HABA en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0.

Aquests lligands estan proveïts d'un grup àcid carboxílic per facilitar la seva dissolució en medi aquós a pH = 7, però tot i això no són completament solubles. Això és degut, segurament, al ponts d'hidrogen intermoleculars que es poden formar molt efectivament entre els grups *ureido*; és per això que es va haver d'addicionar DMSO (1 % en volum) per poder solubilitzar-los completament. Estudis previs al grup de recerca han demostrat que l'activitat de la proteïna no es veu afectada en presència d'un baix percentatge (menys del 5 %) de DMSO.⁹⁴

Els ajustos al model matemàtic d'unió divalent en els experiments de valoració espectrofotomètrica competitiva van ser bons i, per tant, es poden excloure l'existència d'efectes cooperatius, interaccions no específiques i/o formació d'oligòmers (Figura 25, Figura 27, Figura 26, Figura 28).

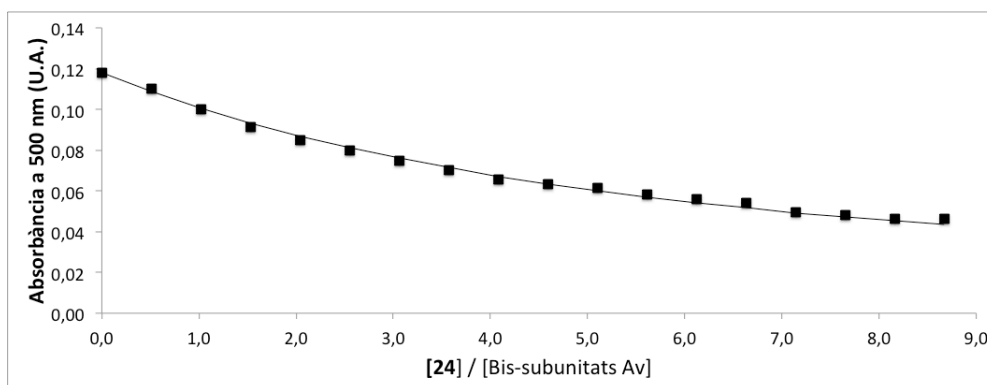


Figura 25. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina ($0,76 \mu\text{M}$ en bis-subunitats) i HABA ($112 \mu\text{M}$) en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH} = 7,0$ amb el lligand divalent **24** en tampó fosfats $0,1 \text{ M} + 1 \%$ de DMSO a $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

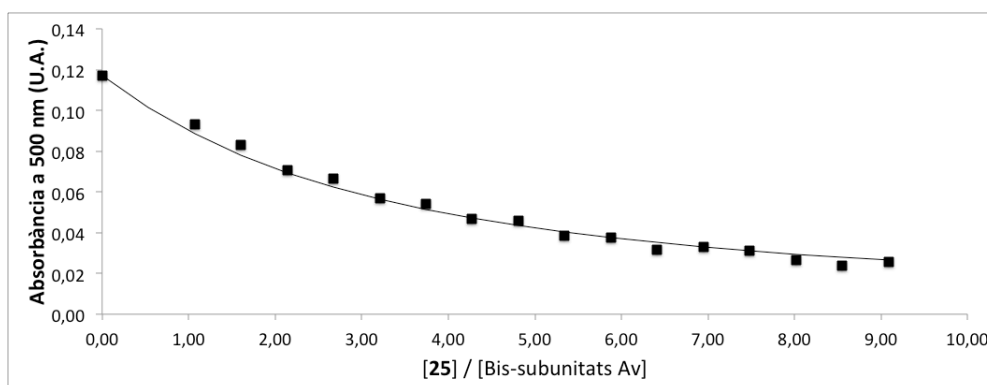


Figura 26. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina ($0,75 \mu\text{M}$ en bis-subunitats) i HABA ($112 \mu\text{M}$) en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH} = 7,0$ amb el lligand divalent **25** en tampó fosfats $0,1 \text{ M} + 1 \%$ de DMSO a $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

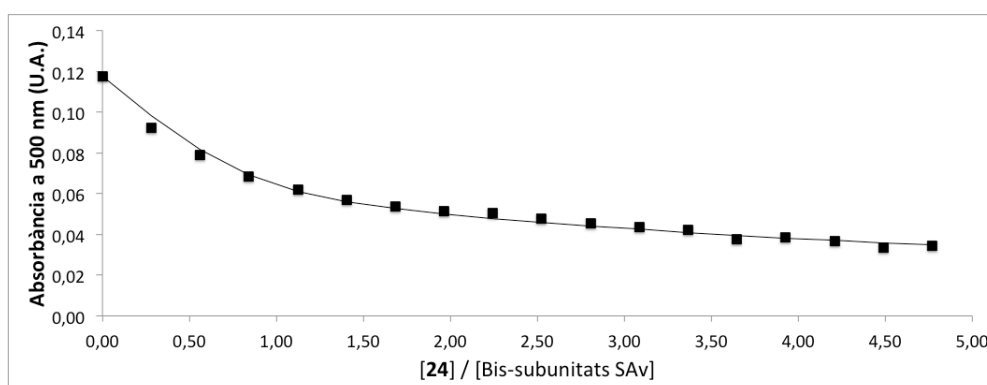


Figura 27. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina ($1,39 \mu\text{M}$ en bis-subunitats) i HABA ($112 \mu\text{M}$) en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH} = 7,0$ amb el lligand divalent **24** en tampó fosfats $0,1 \text{ M} + 1 \%$ de DMSO a $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

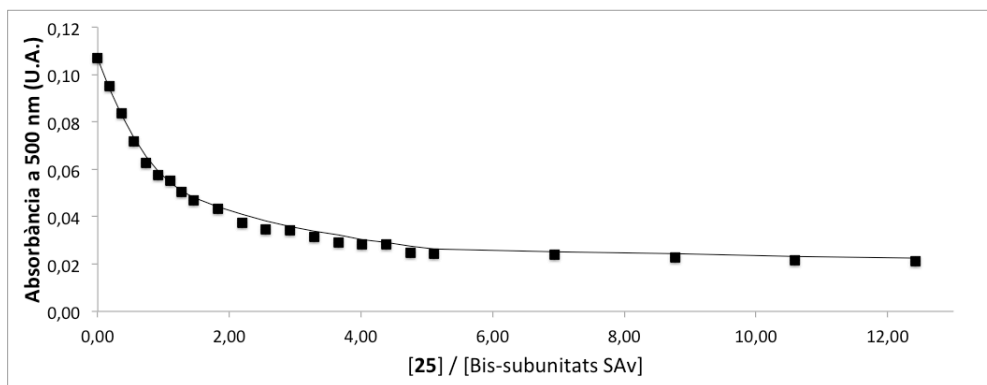


Figura 28. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina ($1,09 \mu\text{M}$ en bis-subunitats) i HABA ($112 \mu\text{M}$) en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH} = 7,0$ amb el lligand divalent **25** en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ + 1% de DMSO a $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

Segons els valors de K_a obtinguts per la Dra. Ayet per a altres lligands divalents amb una part rígida de l'espaiador no tan extensa, es va deduir que la distància òptima de l'espaiador (tal com s'ha definit a l'Esquema 1, Pàgina 29) era de 26 enllaços per a l'SAv (Figura 15; Apartat 1.6.3; Pàgina 23), que corresponen a uns 32 \AA si tingués una conformació totalment estesa. Per a l'Av, en canvi, l'afinitat és més alta en el cas del lligand amb un espaiador amb 22 enllaços.

Quant als lligands divalents sintetitzats en el present treball, s'observa que en el cas del lligand divalent amb l'espaiador més curt (**25**) s'observen afinitats per a l'Av i l'SAv lleugerament superiors a les del lligand divalent d'espaiador més llarg (**24**) (Taula 3).

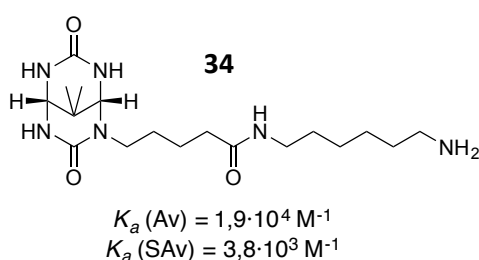
Lligand	Nombre d'enllaços de l'espaiador ^(a)	$K_a \text{ Av (M}^{-1}\text{)}$	$EM \text{ (M)}$	$K_a \text{ SAv (M}^{-1}\text{)}$	$EM \text{ (M)}$
24	30	$(6,8 \pm 0,3) \cdot 10^7$	0,094	$(6,1 \pm 0,3) \cdot 10^7$	2,1
25	26	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^8$	0,139	$\geq 1,0 \cdot 10^8$	$\geq 6,2$
11 ⁹⁴	26	$1,3 \cdot 10^7$	0,018	$7,8 \cdot 10^7$	2,7
12 ⁹⁴	22	$2,5 \cdot 10^7$	0,035	$3,3 \cdot 10^7$	1,1

Taula 3. Valors de les constants d'afinitat dels lligands **24** i **25**, així com dels lligands **11** i **12** amb avidina i estreptavidina, determinades per valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA a $\text{pH} = 7,0$.^(a) Entre els dos carbonils de la cadena lateral de valerat de les entitats monovalents tal i com s'ha definit a l'Esquema 1.

Per tant, en el cas d'aquests lligands amb un espaiador més rígid observem que l'espaiador de 26 enllaços (ligand **25**) és més adient que el de 30 enllaços (ligand **24**).

La menor afinitat del lligand **24** podria ser deguda al fet que té les entitats monovalents més allunyades, fet que implica una menor concentració efectiva (C_{eff}) de la segona entitat monovalent una vegada s'ha unit la primera entitat monovalent.

Les molaritats efectives dels lligands divalents en la complexació amb l'avidina i l'estreptavidina posen de manifest el caràcter divalent de la unió (Taula 3). Aquestes s'han calculat prenent com a lligand monovalent de referència el compost **34** i emprant l'Equació 3.



En el cas de l'SAv les molaritats efectives són més elevades que en el cas de l'Av. De fet són tan altes (2,1 M per al lligand **24** i 6,2 M per al **25**) que es pot considerar que la unió és divalent en tot el rang de concentracions assolibles experimentalment en aquest medi. En canvi, en el cas de l'avidina són més baixes (0,094 M per al lligand **24** i 0,139 M per al **25**), però tot i això encara prou elevades com perquè es consideri que la unió serà divalent en tot el rang de concentracions assolibles experimentalment en aquest medi.

En el cas de l'avidina, comparant el millor lligand divalent sintetitzat en aquest treball (**25**) amb el lligand **11** descrit prèviament⁹⁴ (tots dos amb DMPDUs com a entitats monovalents i espaiador de 26 enllaços de longitud), s'observa que en augmentar la rigidesa de l'espaiador l'afinitat augmenta gairebé 8 vegades. Aquest augment es podria atribuir a la major preorganització del lligand **25**. Tot i això, entre els lligands amb nucli central de tipus benzènic descrits prèviament,⁹⁴ el que presenta major afinitat per a l'Av és el lligand **12**, que té un espaiador de 22 enllaços de longitud.⁹⁴ Per tant, si se sintetitzés un lligand divalent amb un nucli central rígid de tipus 3,5-dietinilbenzoic, però amb un espaiador més curt que el de **25**, podria ser que l'afinitat per a l'avidina fos major que la del lligand **25**.

Si ara es compara l'afinitat dels lligands **25** i **11** per a l'estreptavidina també s'observa que augmenta en augmentar la rigidesa de l'espaiador. En aquest cas, l'augment

d'afinitat és de com a mínim 1,7 vegades, ja que l'afinitat del lligand **25** és major que el límit superior que permet determinar el mètode emprat. En aquest cas, el lligand de tipus benzènic de major afinitat per l'SAv (**11**) sí que té el mateix nombre d'enllaços en l'espaiador que el lligand **25**.

Com s'ha vist, el valor de K_a obtingut pel lligand **25** amb estreptavidina, mitjançant una valoració espectrofotomètrica competitiva, correspon a un límit inferior. És a dir, el valor és com a mínim de $1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, però aquest mètode no és adequat per poder determinar constants d'afinitat tan elevades amb l'SAv.

Normalment, el mètode alternatiu que permet determinar constants d'afinitat més elevades és una valoració espectrofluorimètrica, ja que aquesta tècnica és més sensible i permet treballar en condicions de més alta dilució. Aquest mètode aprofita la fluorescència dels triptòfans dels llocs d'unió de la proteïna i el canvi que experimenta quan s'uneix un lligand. L'avantatge és que no es necessita un competidor, és a dir, la valoració es directa (el lligand sobre la proteïna). El problema és que cal excitar a una longitud d'ona en la qual es va comprovar que els lligands divalents **24** i **25** també s'exciten i emeten a longituds d'ona que interfereixen amb les dels triptòfans, fet que impossibilita la determinació de la K_a per aquest mètode. Per exemple, el lligand divalent **24** emet intensament a 350 nm (amb màxim a 330 nm) quan s'excita a 290 nm (la longitud d'ona de treball per l'avidina i l'estreptavidina), de manera que interferiria en la valoració.

3.5 Conclusions sobre els lligands divalents

S'han sintetitzat dos lligands divalents semi-rígids (**24** i **25**) que difereixen en la longitud de la part no rígida de l'espaiador. Ambdós lligands segueixen l'estructura general de l'Esquema 1, amb un nucli aromàtic directament unit a dos alquins en posició relativa *meta*, els quals estan units a l'entitat monovalent **10** a través d'un espaiador no rígid.

El lligand divalent **25** s'ha sintetitzat seguint dues aproximacions diferents. L'aproximació II (convergent) és millor que l'aproximació I, tant en rendiment global com en versatilitat, facilitat de purificació dels intermedis i valor dels subproductes.

S'han determinat les constants d'afinitat dels lligands divalents **24** i **25** per a les proteïnes Av i SAV i s'ha observat que el que té l'espaiador més curt (**25**, 26 enllaços) és el que presenta major afinitat per a ambdues proteïnes ($1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ amb Av i $\geq 1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ amb SAV).

Les K_a (i en conseqüència les molaritats efectives) del lligand divalent **25** per a ambdues proteïnes també són superiors a les dels millors lligands divalents menys rígids descrits prèviament.

4 Lligands monovalents quirals

L'objectiu d'aquest capítol consisteix en sintetitzar lligands monovalents quirals per a l'avidina i l'estreptavidina i determinar les constants d'afinitat per a aquestes proteïnes.

4.1 Disseny dels lligands monovalents

Treballs previs en el nostre grup indiquen que, en el cas de les diurees bicícliques amb una cadena lateral d'àcid carboxílic unida a un àtom de nitrogen, les que tenen un sistema bicíclic de tipus [3.3.1] presenten majors afinitats per l'avidina i l'estreptavidina que les que el tenen de tipus [3.3.0].⁹⁴ Tot i això, les seves afinitats amb l'Av i l'SAv són encara bastant inferiors a les de la biotina (**1**), fet que s'atribueix a la presència d'un segon grup *ureido* en l'anell que conté la cadena lateral.

Fins al moment el lligand monovalent de tipus urea bicíclica amb major afinitat per l'avidina i l'estreptavidina ha estat el compost (+)-**7** (K_a d' $1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ per l'avidina a $\text{pH} = 7,0$ i de $3,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ per l'estreptavidina a $\text{pH} = 7,0$), amb afinitats encara bastants ordres de magnitud inferiors a la biotina (**1**). És aquest rang, entre 10^8 M^{-1} i els valors amb la biotina ($K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$ amb avidina i $K_a \approx 10^{13} \text{ M}^{-1}$ amb estreptavidina) el que ens interessa explorar amb nous lligands.

Per aquest motiu, el segon objectiu d'aquesta Tesi va ser la síntesi i mesures d'afinitat de nous lligands amb estructura de tipus biciclo[3.3.1] amb un únic grup *ureido* en un dels cicles i una cadena lateral d'àcid carboxílic en l'altre cicle. El lloc d'unió de la cadena lateral al sistema bicíclic hauria de ser en α respecte el carboni cap de pont (posició anàloga a la de la biotina), ja que cal esperar que tinguin una afinitat més alta aquells lligands amb una configuració que els permeti adoptar una estructura tridimensional (configuració i confirmació) el més similar a la de la biotina. Així, l'estructura general que es va proposar és la de la Figura 29, que recull tots els trets estructurals esmentats, ja que és de tipus biciclo[3.3.1], té un grup *ureido* a un dels cicles i una cadena lateral d'àcid carboxílic de longitud variable en l'altre cicle.

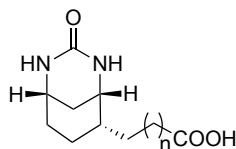


Figura 29. Esquema general dels lligands monovalents objectiu.

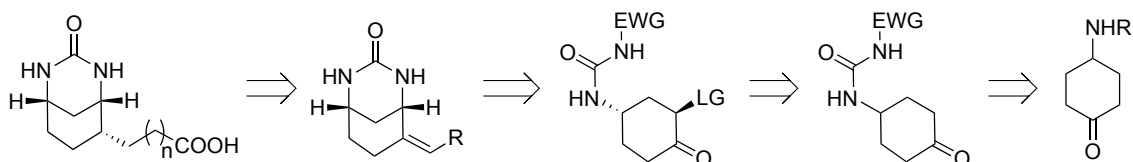
Aquesta cadena lateral és de 4 metilens en el cas de la biotina (**1**), és a dir un valerat. Com s'ha vist, la longitud d'aquesta cadena afecta a l'afinitat degut a les diferents interaccions (en nombre i en efectivitat) que pot establir al lloc d'unió de les proteïnes. En el cas dels nous lligands la longitud òptima pot variar lleugerament ja que l'estructura no és la mateixa que la de la biotina i, per tant, creiem que és interessant explorar-ho.

Per últim, l'estereoquímica escollida tant d'aquesta cadena com del sistema bicíclic és un factor molt important, ja que afecta l'afinitat. Es va optar per una configuració anàloga a la de la biotina. Cal remarcar que, dels dos enantiòmers amb aquesta configuració relativa entre cadena i cicle, un d'ells tindrà una afinitat major que l'altre. Per tant es va creure que la configuració absoluta més adequada era la indicada a la Figura 29.

4.2 Aproximació sintètica enantioselectiva

Una vegada decidida l'estructura objectiu es va haver de plantejar com se sintetitzaria. Va ser clar que calia abordar una síntesi estereoselectiva on el control estereoquímic havia de ser clau.

4.2.1 Anàlisi retrosintètic enantioselectiu



Esquema 17. Anàlisi retrosintètic enantioselectiu proposat on s'indiquen les etapes clau en la formació dels estereocentres, on EWG es refereix a un grup atractiu de densitat electrònica.

A l'Esquema 17 s'indica l'anàlisi retrosintètic que es va proposar inicialment. Primer es formaria una urea d'una ciclohexanona substituïda a la posició 4. Llavors, la

dessimetrització d'aquesta tindria lloc gràcies a una reacció de funcionalització en α al carbonil mitjançant una reacció estereoselectiva. Seguidament, una ciclació intramolecular per part de l'àtom de nitrogen de la urea sobre la posició en α donaria lloc a l'important intermedi bicíclic que, a més, forniria dos dels estereocentres necessaris. Per tal que aquesta ciclació sigui efectiva, cal que la urea introduïda tingui un grup atraient d'electrons sobre l'àtom de nitrogen terminal per tal que l'acidesa del protó corresponent augmenti i, així, emprant una base adient, doni lloc a l'intermedi bicíclic mitjançant una substitució nucleòfila per desplaçament del grup sortint de la posició α .

El tercer estereocentre es formaria gràcies a una hidrogenació d'una olefina formada a partir de la cetona, aquesta reducció caldria esperar que tingués lloc per la cara menys impedida de l'estructura bicíclica i que, per tant, donés lloc al tercer estereocentre (el de la cadena lateral) per efecte del mateix substrat.

Aquesta aproximació té els avantatges de formar dos dels estereocentres en una sola etapa i el tercer induït pel mateix substrat, però l'inconvenient rau en aconseguir una dessimetrització de la ciclohexanona 4-substituïda de manera selectiva i amb bons rendiments.

4.2.2 Proves de dessimetrització via una reacció organocatalítica

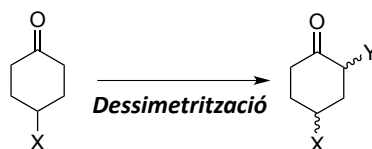
El primer pas a l'hora d'abordar la síntesi va ser estudiar les possibilitats que hi ha per dessimetritzar cetones 4-substituïdes. El substrat de partida havia de tenir un grup nitrogenat a la posició 4, ja que d'aquí s'havia de poder formar la urea necessària per a la ciclació intramolecular.

4.2.2.1 Dessimetrització de ciclohexanones 4-substituïdes

A la literatura hi ha descrites múltiples metodologies per funcionalitzar de manera enantioselectiva cetones a la posició α .^{129,130} Tot i això s'han descrit poques reaccions que permetin dessimetritzar ciclohexanones 4-substituïdes amb èxit (Esquema 18).

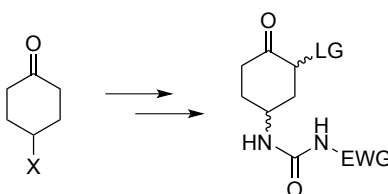
Aquestes reaccions han de proporcionar el producte desitjat preferiblement amb una alta diastereoselectivitat (*syn/anti*), enantioselectivitat i bon rendiment. El control de la selectivitat en les funcionalitzacions en α a carbonils es fa normalment amb

catalitzadors quirals (normalment per catàlisi amb metalls de transició o organocatàlisi).



Esquema 18. Esquema general de les reaccions de dessimetrització de ciclohexanones 4-substituïdes on X i Y són àtoms o grups diferents d'H.

Els mètodes descrits a la literatura que permeten fer aquest tipus de transformació complint aquests requisits són bàsicament aldòliques o arilacions (és a dir, formen enllaços C-C).¹³¹⁻¹³⁴ Aquestes metodologies no ens servien ja que el nostre objectiu era introduir un grup que es pogués transformar en un bon grup sortint en la ciclació intramolecular (Esquema 19).



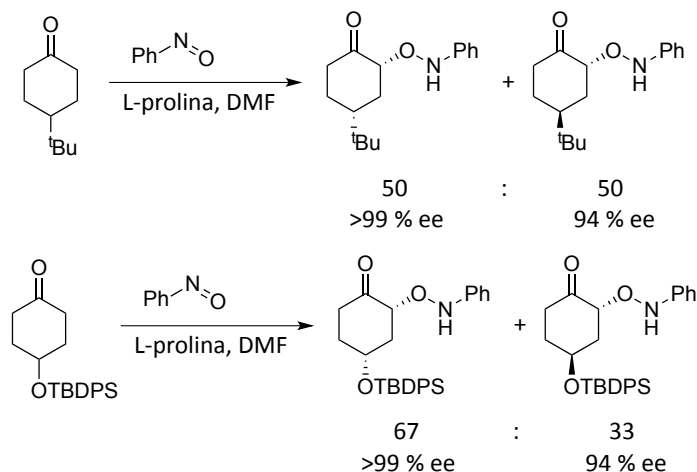
Esquema 19. Transformacions necessàries sobre el material de partida per poder dur a terme la ciclació intramolecular on X és un grup nitrogenat, LG un bon grup sortint i EWG un grup atraient de d'electrons.

En el nostre cas era necessària la introducció d'un heteroàtom. Existeixen diverses maneres de fer aquesta transformació, però els mètodes en general no són del tot adequats perquè, o bé les diastereoselectivitats són elevades però no hi ha control sobre l'enantioselectivitat, o bé l'enantioselectivitat és bona però la diastereoselectivitat no ho és.¹³⁵⁻¹³⁷

Cal observar que dels dos diastereòmers que es poden formar (*syn* i *anti*) el desitjat és l'*anti*, ja que la ciclació intramolecular via S_N2 ha de fer-se necessàriament partint d'aquesta disposició relativa, ja que d'altra manera seria impossible degut al fet que l'orientació relativa dels dos grups no ho permetria.

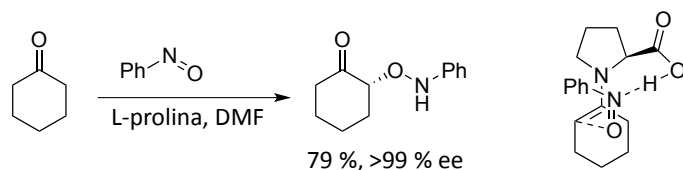
La reacció d'*aminoxilació* en α a carbonils catalitzada per prolina (o derivats) o metalls ha estat àmpliament estudiada tant per a aldehids com per a cetones, amb l'obtenció de productes amb elevada enantioselectivitat.^{135,138,139} Hayashi i col·laboradors han

descriu la dessimetrització d'algunes d'aquestes cetones amb excel·lents enantioselectivitats i rendiments, tot i que amb pobres o nul·les diastereoselectivitats, emprant nitrosobenzè com a electròfil i prolina com a catalitzador (Esquema 20).¹⁴⁰



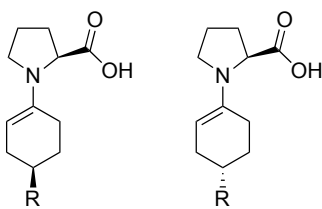
Esquema 20. Proves de dessimetrització de ciclohexanones 4-substituídes per aminoxilació en α emprant nitrosobenzè i catàlisi d'L-prolina descrites per Hayashi et. al.¹⁴⁰

El mecanisme proposat indica que es forma l'enamina de la cetona amb la prolina (el nucleòfil) i que aquesta ataca el nitrosobenzè (l'electròfil). Aquest atac està dirigit pel carboxilat de la prolina ja que el nitrosobenzè s'hi coordina i, per tant, l'electròfil entra per aquella cara gairebé exclusivament (Esquema 21). El producte majoritari és el d'aminoxilació i no el d'hidroxiaminació perquè el nitrogen, en ser més bàsic que l'oxigen, es coordina més efectivament al hidrogen del grup carboxílic i, per tant, l'oxigen és qui rep l'atac del nucleòfil.¹⁴⁰



Esquema 21. Reacció d'aminoxilació en α a la ciclohexanona amb nitrosobenzè catalitzada per L-prolina on s'indica el model d'estat de transició segons el mecanisme proposat.¹⁴⁰

En el cas de les ciclohexanones 4-substituídes també cal tenir en compte la diastereoselectivitat (*sin/anti*). El control d'aquesta és més complicat ja que depèn de la naturalesa del grup de la posició 4, que determina quina és l'enamina formada majoritàriament (Esquema 22).

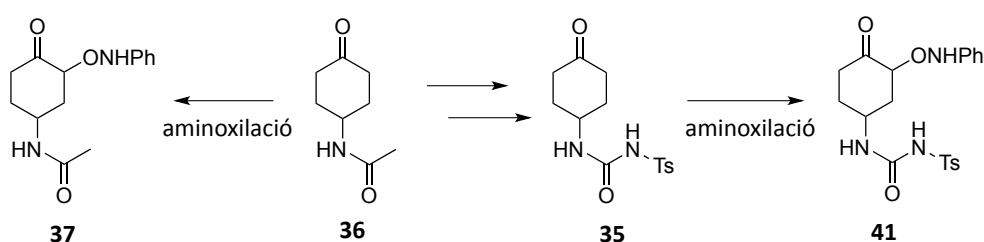


Esquema 22. Representació de les dues possibles enamines formades entre una ciclohexanona 4-substituída i L-prolina.

El resultat és difícil de predir, però en general les selectivitats són nul·les o baixes a favor del producte *sin* (Esquema 20). Tot i això és probable que els dos diastereòmers formats siguin separables i, per tant, es pugui continuar la síntesi amb el producte amb la configuració adequada.

4.2.2.2 Aminoxilació selectiva en α a ciclohexanones 4-substituídes amb nitrogen

Com s'ha vist, en el nostre cas s'havia de partir d'una ciclohexanona amb un grup nitrogenat a la posició 4, ja que és necessària la presència de la urea per tal de produir la ciclació intramolecular (Esquema 19, Pàgina 60). Com que la naturalesa del grup a la posició 4 és el fet que determina la diastereoselectivitat, es va decidir explorar la reactivitat sobre dos substrats nitrogenats diferents. D'una banda amb la urea ja formada a la posició 4 (**35**) i, de l'altra, amb una acetamida a la posició 4 (**36**), de manera que la urea es formés posteriorment a l'etapa de dessimetrització (Esquema 23).



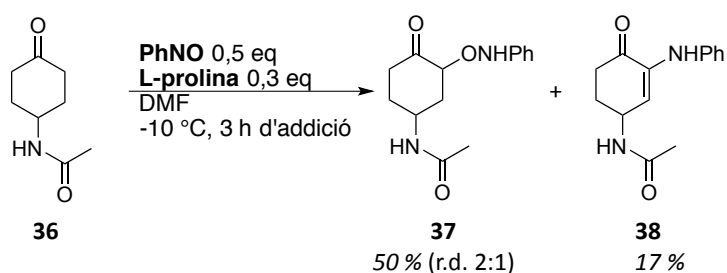
Esquema 23

4.2.2.2.1 Proves d'aminoxilació sobre el compost **36** (acetamida)

Primer es va prendre com a model la ciclohexanona **36** per assajar la reacció. Per tal de dur a terme aquesta transformació normalment es requereix que hi hagi un excés de cetona ja que si el nitrosobenzè no és el reactiu limitant existeix el risc que es produeixi doble aminoxilació de manera abundant. Això s'evita amb una addició lenta

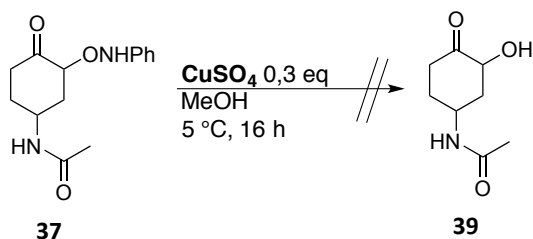
de l'electròfil i a baixa temperatura. Cal, també, un dissolvent adequat (generalment DMF o DMSO) que pugui dissoldre totes les espècies.

Sota les condicions indicades a l'Esquema 24, es va formar el producte desitjat **37** amb un 50 % de rendiment i una relació diastereomèrica de 2 a 1 (determinada per $^1\text{H-RMN}$ degut al diferent desplaçament químic que presenten els protons adjacents al grup ONHPh) essent tots dos isòmers separables. A més, es va observar la formació d'un subproducte, que en altres proves similars es va aïllar amb fins un 17 % de rendiment. Aquest subproducte creiem que és el compost **38** que provindria de la reacció secundària d'*hidroxiaminació* seguida d'una eliminació.



Esquema 24

El següent pas de la síntesi va ser la reducció de l'enllaç O-N per tal d'obtenir l'alcohol lliure. S'ha descrit aquesta transformació emprant CuSO_4 ,¹⁴⁰ però en intentar-ho sobre el nostre substrat, es va obtenir una mescla complexa on no es va detectar producte (**39**) ni material de partida (Esquema 25). Es va optar, doncs, per assajar aquest procediment amb la urea **35**.



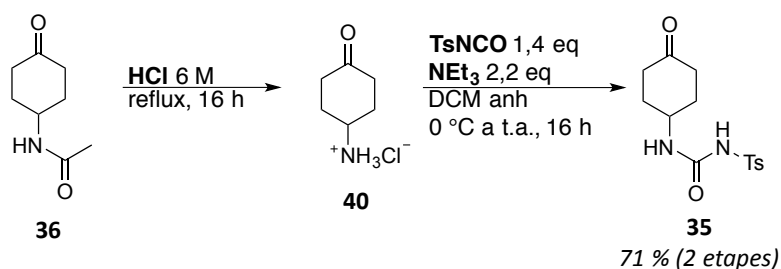
Esquema 25

4.2.2.2 Proves d'aminoxilació sobre el compost **35** (tosilurea)

Es va decidir provar amb la cetona **35** ja que es va pensar que oferia dos avantatges. Primer, el grup de la posició 4 és més voluminós i, per tant, caldria esperar una diastereoselectivitat major; segon, aquest material de partida ja té la urea formada, en

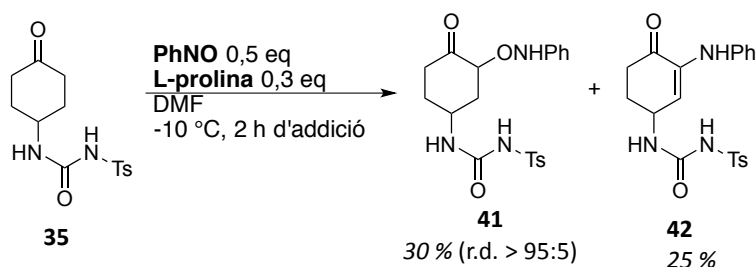
canvi, a altres cetones com la **36** s'hauria d'introduir posteriorment la urea, transformació que podria ser problemàtica en etapes més avançades de la síntesi.

Primer de tot es va haver de preparar aquesta cetona. Es va partir de la cetona **36** que, per hidròlisi de l'amida en medi àcid, va donar lloc al corresponent hidrocloïr d'amoni (**40**).¹⁴¹ Seguidament, la reacció d'aquest amb isocianat de *tosil* va furnir la urea desitjada **35** amb un 71 % de rendiment global (Esquema 26).



Esquema 26

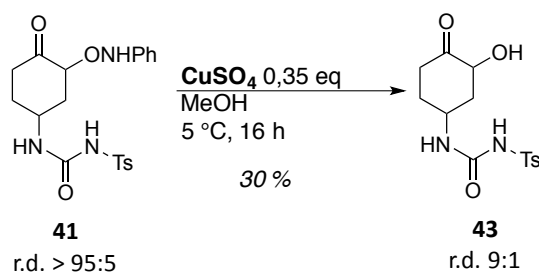
En dur a terme la reacció d'aminoxilació sobre la cetona **35** sota les condicions emprades per a la cetona **36**, es va obtenir el producte d'aminoxilació **41** amb un 30 % de rendiment i una diastereoselectivitat elevada (> 95:5). També es va observar en aquest cas la formació del subproducte corresponent **42** (Esquema 27).¹⁴⁰



Esquema 27

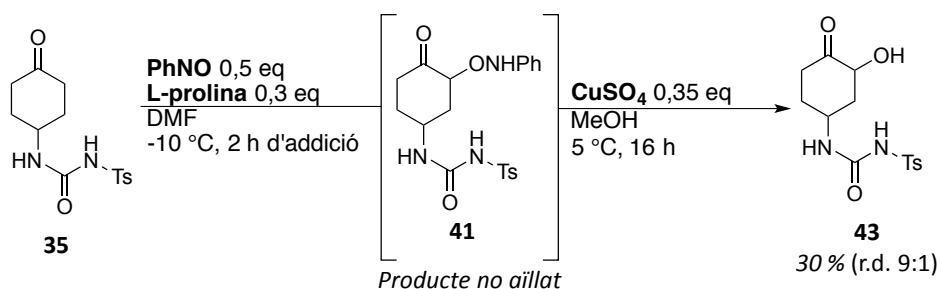
Ja que el resultat va ser prometedori però lluny d'ideal, es va decidir d'optimitzar la reacció. Una mescla equimolar de cetona i nitrosobenzè va millorar el rendiment al 45 % mantenint l'excel·lent diastereoselectivitat tot i que encara es va observar presència del subproducte **42**.

La reducció de l'enllaç O-N en aquest cas segons les condicions descrites sí que va funcionar (producte **43**), tot i que amb rendiments baixos (propers al 30 %), i amb una lleugera disminució de la diastereoselectivitat (r.d. 9:1) (Esquema 28).



Esquema 28

Ja que els rendiments van ser moderats, es va intentar dur a terme la reacció de reducció de l'enllaç O-N sense aïllar el producte, per tal d'evitar etapes de purificació que poguessin degradar el producte d'aminoxilació. Així doncs es va dur a terme la reacció sota les mateixes condicions i es va intentar reduir el producte contingut al cru obtingut (Esquema 29). Es va obtenir el producte desitjat amb un 30 % de rendiment global per les dues etapes conservant el bon excés diastereomèric, una millora significativa.



Esquema 29

Per tal d'obtenir un millor resultat es va decidir dur a terme les dues reaccions *one-pot*, però no es va obtenir producte en cap dels intents tot i haver provat diferents dissolvents i combinacions d'ells (DMF, DMSO, NMP i MeOH).

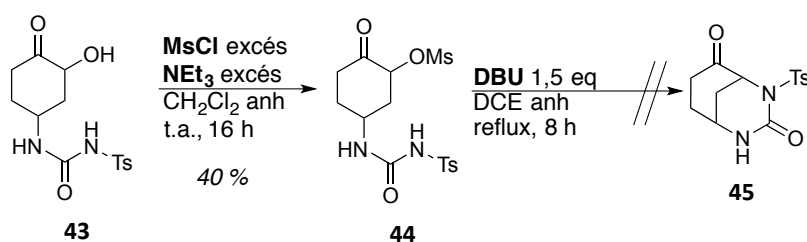
4.2.3 Proves de ciclació intramolecular

Tot i no haver obtingut uns resultats excel·lents amb aquestes proves, es va voler assajar la reacció de ciclació intramolecular per tal de veure si realment està afavorida i sota quines condicions.

Aquesta reacció es va esperar que es produís via una S_N2 com s'ha discutit a l'apartat 4.2.2.1 (Pàgina 59), així que la formació del producte seria una confirmació del fet que l'isòmer *anti* és el que es forma majoritàriament, ja que només aquest pot patir

aquesta transformació; a més, és la configuració relativa desitjada segons l'estructura objectiu proposada (Esquema 17, Pàgina 58).

Es van seguir dues estratègies per aconseguir aquesta ciclació. Primer es va provar de formar un ester sulfònic de l'alcohol. Aquest producte (**44**) es va obtenir emprant clorur de mesil i NEt_3 amb un rendiment del 40 %, tanmateix, en intentar que es produís la ciclació intramolecular emprant DBU, es va detectar traces del producte desitjat **45** en un cru complex (Esquema 30).



Esquema 30

En intentar la ciclació *one-pot* es van obtenir resultats similars. També es va provar de dur a terme la ciclació mitjançant una reacció de *Mitsunobu*. Per a tal fi es van emprar DIAD i DEAD com a azacarboxilats. En aquest cas, també es van detectar traces de producte de ciclació **45** en un cru molt complex, tant a 0 °C com a reflux de CH_2Cl_2 .

En resum, l'aproximació enantioselectiva explorada no va donar prou bons resultats per començar la síntesi d'aquests lligands, ja que els rendiments van ser massa baixos per ser acceptables per a etapes inicials d'una síntesi. Es va plantejar-nos, doncs, canviar l'estratègia sintètica.

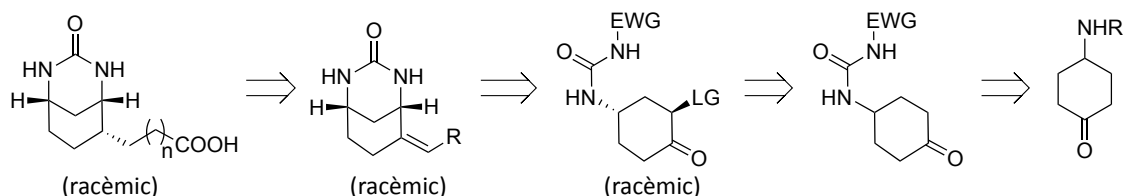
4.3 Aproximació no enantioselectiva

En vista dels resultats obtinguts en les proves d'aminoxilació enantioselectiva de les ciclohexanones **36** i **35**, es va decidir abordar la síntesi dels lligands d'una manera no enantioselectiva per diverses raons. Primer, cal esperar rendiments més elevats, ja que es coneixen moltes maneres de funcionalitzar cetones en α no enantioselectivament. A més, els reactius i materials són més econòmics i accessibles seguint aquesta ruta. Per últim, sintetitzar els lligands d'una manera no enantioselectiva permetria

obtenir-los en forma racèmica i poder fer proves preliminars d'afinitat, per després decidir si val la pena separa-los o abordar una nova síntesi enantioselectiva.

4.3.1 Anàlisi retrosintètic no enantioselectiu

A l'Esquema 31 s'indica l'anàlisi retrosintètic no enantioselectiu proposat. Cal veure, tot i això, que sí es diastereoselectiu, ja que es controla la configuració relativa dels estereocentres.



Esquema 31. Anàlisi retrosintètic no enantioselectiu proposat on s'indiquen les etapes clau en la formació dels estereocentres, on EWG es refereix a un grup atractiu de densitat electrònica.

La retrosíntesi és molt similar, doncs, a la proposada amb anterioritat (Apartat 4.2.1, Pàgina 58). Primer es formaria, de la mateixa manera, una urea d'una ciclohexanona substituïda a la posició 4 (el compost **35**). Llavors, aquesta cetona es funcionalitzaria en α al carbonil mitjançant una reacció no enantioselectiva. Seguidament, una ciclació intramolecular per part del nitrogen nucleòfil de la urea (degut al grup atractiu de càrrega) donaria lloc a l'important intermediari bicíclic que, a més, forniria dos dels estereocentres necessaris. El tercer es formaria gràcies a una hidrogenació d'una olefina formada a partir de la cetona, aquesta reducció caldria esperar que tingués lloc per la cara menys impedida de l'estructura bicíclica, i que per tant, donés lloc al tercer estereocentre (el de la cadena lateral) per efecte del mateix substrat.

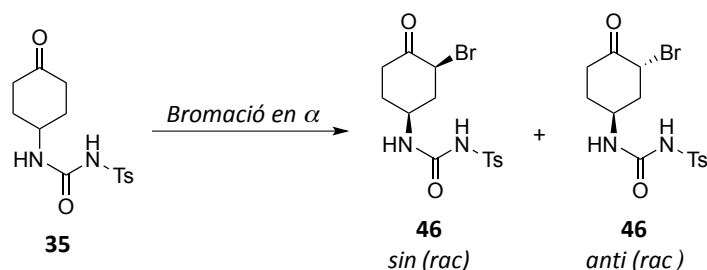
Aquesta aproximació també té els avantatges de formar dos dels estereocentres en una sola etapa i el tercer induït pel mateix substrat, però l'inconvenient rau en el fet que s'obté una mescla racèmica dels productes.

4.3.2 Obtenció de l'intermediari bicíclic 45

4.3.2.1 Bromació en α al carbonil

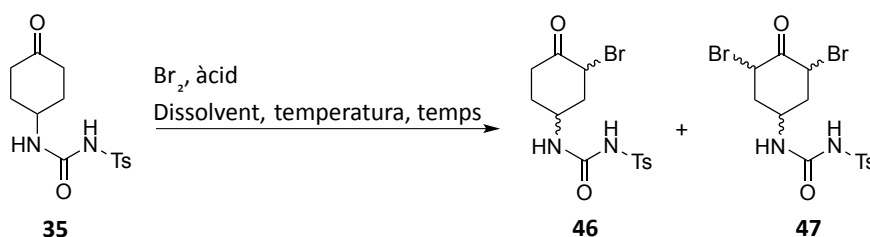
La reacció que va substituir l'aminoxilació en aquesta aproximació va ser una bromació en α al carbonil de la cetona. És una reacció clàssica que es pot fer de diverses

maneres amb, generalment, bones regioselectivitats i rendiments.¹⁴² Com ja s'ha comentat, l'inconvenient és que s'obtenen els dos possibles isòmers configuracionals. En el nostre cas, ja que partim d'una ciclohexanona 4-substituída, es poden formar fins a quatre estereoisòmers diferents, enantiòmers entre ells dos a dos (Esquema 32).



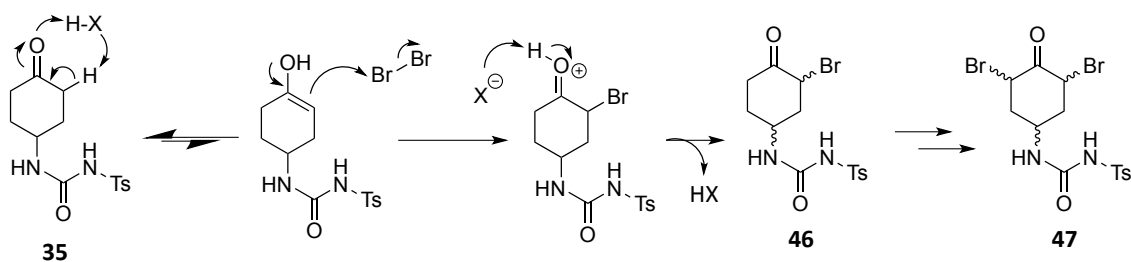
Esquema 32

Es va voler partir de la cetona **35** per tal d'obtenir l'halocetona **46**. L'halogenació amb NBS i *p*-TsOH no va funcionar, així que es va decidir fer-ho amb Br₂ (Esquema 33).



Esquema 33

L'avantatge d'aquesta la reacció és la regioselectivitat a la posició α de la cetona, però l'inconvenient rau en la possible formació del subproducte de doble bromació (producte **47**). Això és perquè l'halogenació en medi àcid transcorre a través de l'enol de la cetona, llavors aquest ataca l'electròfil (Br₂), amb una recuperació final del carbonil, de manera que si hi ha un excés d'electròfil, aquest pot continuar reaccionant sempre i quan tingui àtoms d'H en α per seguir formant enols (Esquema 34).



Esquema 34

Es van assajar diferents condicions de reacció (dissolvents, additius, temps, concentracions i temperatura), que es resumeixen a la Taula 4.

	35 (mmol)	Dissolvent [35]	Br₂ (eq)	Temps add. Br₂ (h)	Temps i Temperatura	Relació 35/46_A/46_B/47/45
1	0,64	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 0,10 M	1,0	-	0 °C 1 h t.a. 16 h	44/37/15/-/-(^a)
2	0,32	AcOH, HBr _{aq} 0,13 M	1,0	-	t.a. 16 h	31/31/31/6/-(^a)
3	4,80	AcOH, HBr _{aq} 0,20 M	1,0	-	t.a. 16 h	21/15/20/ 37 /-(^a)
4	2,00	AcOH, HBr _{aq} 0,02 M	0,80	-	t.a. 16 h	32/36/32/-/-(^b) 25/33/33/-/ 7 (^a)
5	4,40	CH ₂ Cl ₂ , HBr _{aq} 0,02 M	0,85	1,5 h (en CH ₂ Cl ₂)	0 °C 1 h t.a. 2 h	22/44/30/4/-(^a)
6	10,9	CH ₂ Cl ₂ , HBr _{aq} 0,035 M (suspensió)	0,90	8 h (en CH ₂ Cl ₂)	0 °C (addició) t.a. 1 h	36/20/15/30/-(^a)
7	3,40	CH ₂ Cl ₂ , HBr _{aq} 0,02 M	0,50	2 h (en CH ₂ Cl ₂)	0 °C (addició) t.a. 16 h	53/24/19/4/-(^a)
8	1,83	CH ₂ Cl ₂ 0,02 M	0,85	6 h (en CH ₂ Cl ₂)	0 °C (addició) t.a. 16 h	Recuperació 35 (^b)
9	5,81	CH ₂ Cl ₂ , HBr _{aq} 0,02 M	0,85	1,5 h (en CH ₂ Cl ₂)	0 °C (addició) t.a. 1 h	32/36/28/5/-(^a) -/33/57/7/ 3 (^c) (rendiment 55 %)
10	4,02	CH ₂ Cl ₂ , HBr _{aq} 0,012 M	0,80	1,5 h (en CH ₂ Cl ₂)	0 °C (addició) t.a. 16 h	34/35/27/4/-(^a) -/42/35/6/ 17 (^c) (rendiment 55 %)
11	1,00	AcOH, HBr _{aq} 0,20 M	1,0 1,5 2,0	-	t.a.	20/37/37/6/-(^b) -/30/30/ 42 /-(^b) 47 quantitatiu (^b)

Taula 4. Relació dels resultats més destacats de la bromació de la cetona **35** amb Br₂. A l'última columna de cada entrada s'indica la relació dels productes obtinguts on **46_A** i **46_B** representen la relació entre els dos diastereòmers (sin i anti sense assignar) del producte **46** que s'obtenen. (^a) Relació determinada per RMN de protó del cru de reacció una vegada s'ha aturat la reacció amb solució aquosa tamponada a pH = 5 i extrets els components orgànics amb CH₂Cl₂. (^b) Relació determinada per RMN de protó del cru de reacció. (^c) Fracció aïllada per cromatografia flash.

Va ser necessari optimitzar aquesta reacció ja que com es pot veure es forma molt fàcilment el producte de doble bromació (**47**). Sempre s'obté una barreja, en diferents proporcions, de material de partida no transformat (**35**), producte de bromació -els 2 diastereòmers— (**46_A** i **46_B**) i producte de doble bromació (**47**) (Figura 30).

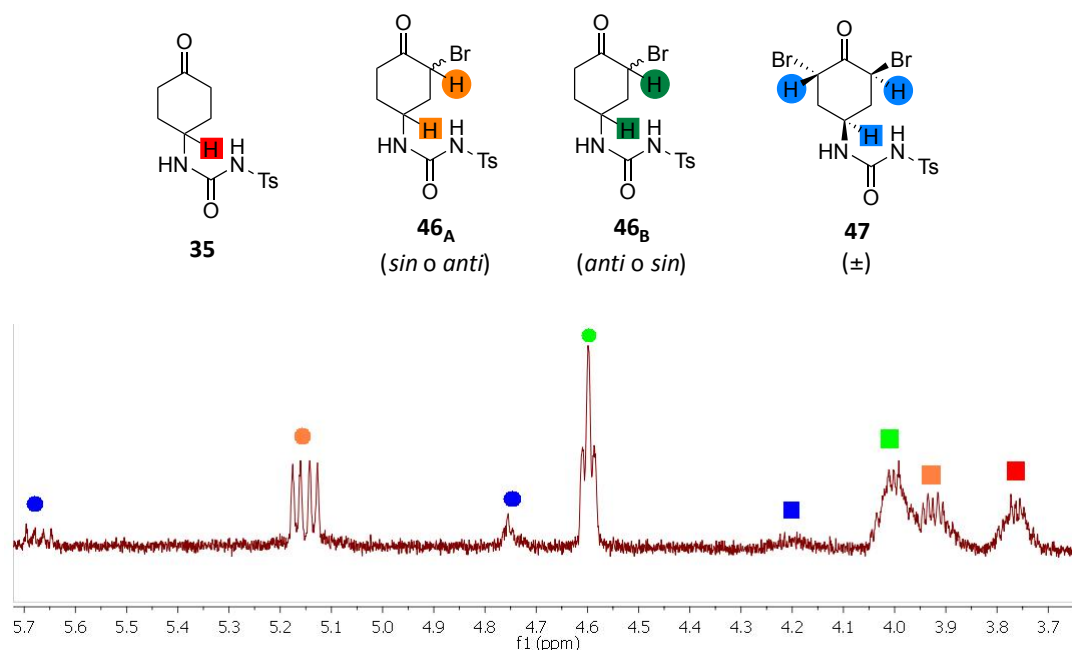


Figura 30. Fragment del RMN de protó d'un cru d'una reacció de bromació on s'assignen els diferents senyals observats als H de les diferents espècies del medi.

Cal treballar en condicions diluïdes per evitar la formació de **47** (comparar entrades 2 i 3), però no és tant important el temps de reacció ja que sembla que aquesta és molt ràpida (comparar entrades 9 i 10). La naturalesa del dissolvent determina la solubilitat de la cetona **35**; així, tant l'AcOH com el CH₂Cl₂ van ser dissolvents adequats per dur a terme la reacció (entrades 2 i 5). Tot i que el material de partida és molt més soluble en el primer que en el segon, és més fàcil treballar amb CH₂Cl₂ que amb AcOH. La doble bromació es minimitza quan la concentració és menor de 0,20 M en el cas de l'AcOH (entrades 2 i 3) i menor de 0,02 M en el cas de CH₂Cl₂ (entrades 5 i 6).

L'ús d'un equivalent o menys de Br₂ és l'ideal ja que un excés afavoreix enormement la doble bromació (entrada 11); tot i això, si se n'empra poc, el rendiment és molt baix (entrada 7). La quantitat òptima trobada va ser entre 0,8 i 0,9 equivalents de Br₂. A més, és imprescindible la presència d'un àcid, clàssicament HBr, si el dissolvent és apròtic (entrada 1), però no si és pròtic (entrada 8).¹⁴¹

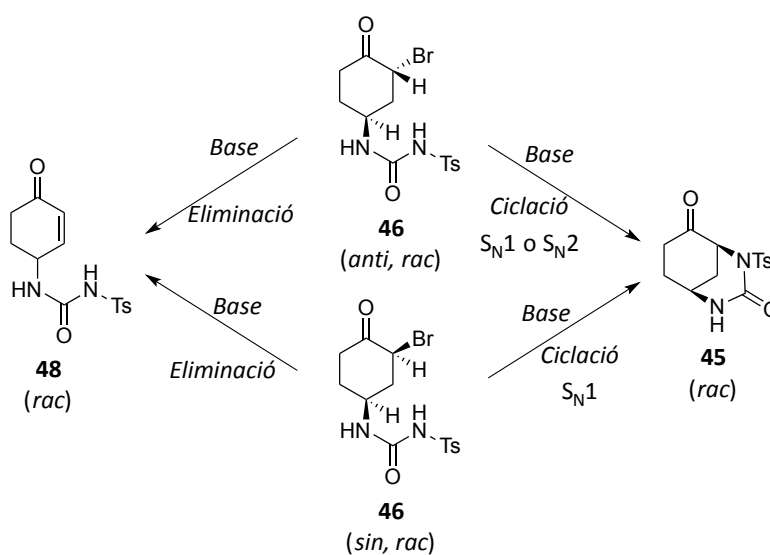
Com es pot veure, a vegades, el tractament aquós del cru (entrada 4) i, sobretot, la purificació per columna *flash*, provoquen que part del producte pateixi la reacció de ciclació intramolecular espontàniament (entrades 9 i 10). Aquest producte (**45**, Esquema 35) s'aïlla juntament amb el producte de bromació (**46**). De fet, per columna *flash* només es pot separar el material de partida (**35**) que queda sense

reaccionar -que es recupera- de la resta (producte de bromació **46** més producte de doble bromació **47** més producte de ciclació **45**). Aquesta última barreja és la que es va emprar com a material de partida per a la reacció de ciclació intramolecular.

4.3.2.2 *Ciclació intramolecular*

Una vegada s'havia obtingut el producte de bromació, es va abordar la ciclació intramolecular per tal d'obtenir l'important intermedi **45**.

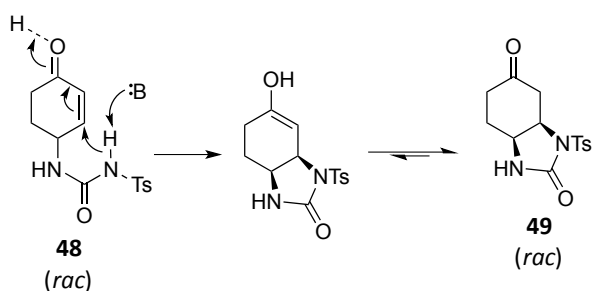
És important considerar, en aquest punt, els efectes de l'obtenció dels dos diastereòmers de **46** en la ciclació. La substitució nucleòfila intramolecular del brom pel nitrogen de la urea pot tenir lloc via un mecanisme tipus S_N2 o S_N1 . Si la ciclació funciona per un mecanisme tipus S_N2 exclusivament, cal esperar només la formació del bicicle que provingués de l'isòmer *anti*; en canvi, si els dos mecanismes competeixen, tots dos isòmers forniran el compost desitjat (Esquema 35). Cal esperar, però, que la ciclació tingui lloc fàcilment, ja que s'ha observat la formació espontània del bicicle en la purificació del compost bromat.



Esquema 35

Aquesta reacció s'ha de dur a terme en medi bàsic per tal d'accentuar la nucleofília del nitrogen de la urea. Això té com a inconvenient que es pugui produir la reacció no desitjada d'eliminació del bromur, per donar la corresponent cetona conjugada **48** (Esquema 35).

Per tal de decidir quina base era l'adequada, a una escala petita de treball (aprox. 0,15 mmol de producte bromat **46**) i fent un escombratge de diverses d'aquestes, es va poder observar la formació del producte desitjat **45**. D'una banda, el Cs_2CO_3 va donar com a únic producte el de ciclació, així com el pivaloat de cesi. De l'altra, la NEt_3 també va formar el producte (que es va aïllar amb un 75 % de rendiment) però també va formar un subproducte no desitjat (25 %). Per últim, amb DBU es va formar també tant el producte desitjat com el subproducte, però en aquest cas amb una proporció de 85 a 15. Aquest subproducte va resultar ser el compost bicíclic **49** que, creiem, es va formar a partir del producte d'eliminació **48** seguida d'un atac conjugat del nitrogen nucleòfil de la urea (Esquema 36). És un subproducte que té la mateixa massa que el producte esperat, però el desplaçament químic dels protons i carbonis adjacents al carbonil indicaven la diferent connectivitat d'aquest respecte el producte esperat (**45**).

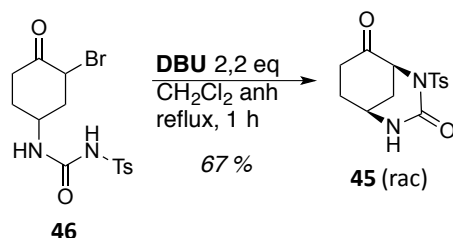


Esquema 36

Es va escollir, doncs, el Cs_2CO_3 com a base per treballar a escala preparativa ja que aquesta no generava el subproducte **49**. Així, en escalar la reacció a 0,5 mmol aproximadament es va observar, però, que el rendiment era molt baix (aproximadament del 25 %) tot i haver emprat 2,2 equivalents de base.

Es van voler tornar a explorar les bases que s'havien descartat en fer les proves a petita escala perquè formaven el subproducte **49** per veure si els rendiments a més gran escala milloraven respecte els obtinguts amb Cs_2CO_3 . D'aquesta manera, emprant 2,2 equivalents de NEt_3 es va aïllar el producte **45** amb un 54 % de rendiment i el subproducte **49** amb un 29 % i la DBU va furnir el producte **45** amb un 57 % de rendiment amb menys del 10 % de formació del subproducte **49**.

En vista de la millora de resultats en emprar la DBU es va escollir aquesta base com a l'òptima per dur a terme aquesta ciclació (Esquema 37). Així, en augmentar l'escala fins a 4 mmol es van assolir rendiments propers al 70 %.



Esquema 37

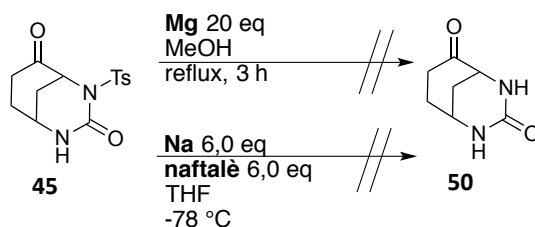
Com que en cap cas es va detectar el compost bromat **46** en el cru de reacció i els rendiments obtinguts pel compost **45** superaven el 50 %, es pot concloure que tots dos diastereòmers van patir la ciclació intramolecular, fet que confirma les hipòtesis mecanístiques exposades a l'Esquema 35, és a dir, l'isòmer *sin* cicla via un mecanisme tipus S_N1 i l'*anti* ho fa via S_N1 i/o S_N2 . Es tracta, per tant, d'una reacció estereoconvergent, on les dues parelles de diastereòmers (4 estereoisòmers en total) van fornir un producte de forma racèmica (2 estereoisòmers en total).

Es va poder d'aquesta manera sintetitzar l'important intermedi bicíclic **45** de forma diastereoselectiva mitjançant l'estratègia de bromació en α seguit de ciclació amb bons rendiments, obrint una ruta sintètica cap a la formació dels lligands objectiu.

4.3.2.3 Proves d'eliminació del grup tosil de la urea

Una vegada es va formar l'estructura bicíclica, el grup auxiliar *tosil* d'aquesta ja no era necessari i, de fet, necessitàvem eliminar-lo en algun punt de la síntesi ja que al producte final no està present. Aquest grup s'ha emprat extensament com a protector de grups nitrogenats (típicament amines i amides). Els mètodes de desprotecció són diversos,¹⁴³ però els més comuns impliquen reduccions radicalàries, com és el cas de la metodologia més emprada, la reducció de l'enllaç N-S emprant naftaleniur de sodi o liti. Hi ha una gran quantitat de casos a la literatura on s'ha fet servir aquesta metodologia per desprotegir amines i amides tosilades,¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ però en canvi, en el cas d'urees es troben molt poques desproteccions d'aquest tipus, i a més, es duen a terme per reducció amb Mg en MeOH.¹⁴⁷

Es va assajar l'eliminació del grup *tosil* de la urea **45** emprant tant naftaleniur de sodi com Mg en MeOH.¹⁴⁷ Malauradament cap de les dues metodologies va funcionar, ja que en ambdós casos es va obtenir una mescla complexa amb degradació del material de partida, sense que es detectés en cap dels dos casos el producte desitjat **50** (Esquema 38).



Esquema 38

Es va decidir, per tant, intentar treure el grup *tosil* en una etapa més avançada de la síntesi, ja que és possible que les condicions no foren compatibles amb el grup funcional cetona al sistema bicíclic.

4.3.3 Estudis sobre la construcció de la cadena lateral

Arribats a aquest punt es va abordar la construcció de la cadena lateral generant, a la vegada, el tercer estereocentre.

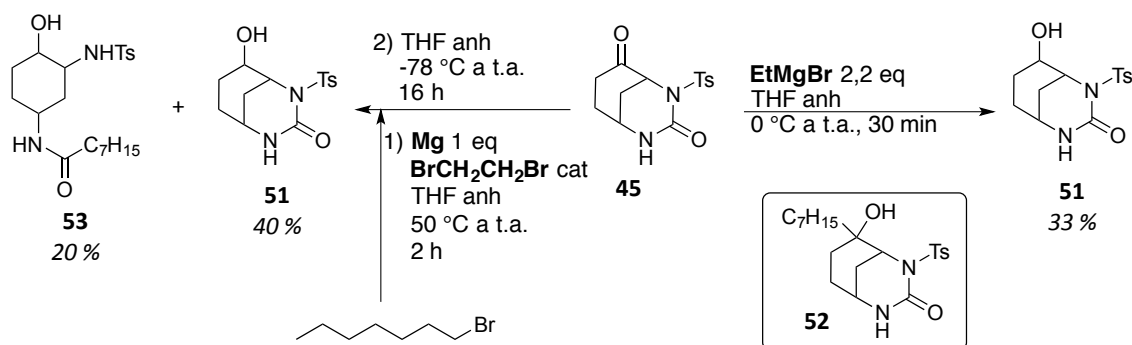
4.3.3.1 Proves d'olefinació del carbonil

Com s'indica a l'anàlisi retrosintètic, es va decidir formar el tercer estereocentre per hidrogenació de la olefina exocíclica derivada del carbonil del compost **45**. Per tant, es va pensar en formar aquesta olefina de dues maneres: d'un costat, emprant un reactiu organometàl·lic per formar l'enllaç C-C amb una posterior deshidratació per obtenir el doble enllaç; de l'altre, mitjançant una olefinació directa via una reacció de tipus *Wittig*.

4.3.3.1.1 Formació de l'enllaç C-C per atac d'un organometàl·lic sobre el carbonil

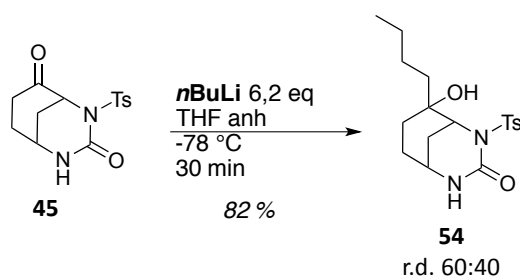
La primera aproximació va ser emprant reactius de *Grignard* comercials per estudiar la seva reactivitat. El bromur d'etilmagnesi no es va addicionar al carbonil sinó que va formar l'alcohol **51** degut al caràcter reductor d'aquest reactiu (Esquema 39). D'altra banda, l'ús d'un gran excés del reactiu de *Grignard* format *in situ* a partir del bromur

d'*n*-heptil no va proporcionar el producte d'addició (**52**), sinó que va donar lloc a una mescla del producte de reducció **51** més producte d'addició —i posterior eliminació— del reactiu de *Grignard* sobre el carbonil de la urea (**53**). Creiem que aquest fet està afavorit degut a l'efecte electroatracent del grup *tosil* sobre el nitrogen, que el fa molt bon grup sortint (Esquema 39). A la vista d'aquests resultats es va decidir abandonar aquesta aproximació.



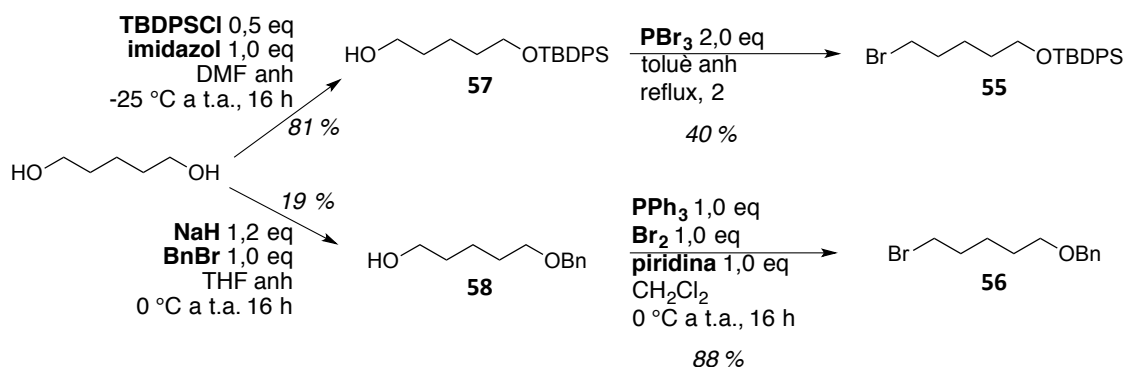
Esquema 39

L'altra aproximació va consistir en emprar reactius organolítics. L'addició d'*n*BuLi sobre el carbonil de **45** va ser exitosa, ja que es van obtenir els dos diastereòmers de l'alcohol **54**, separables per cromatografia *flash*, amb bon rendiment i en proporció 60 a 40 (Esquema 40).



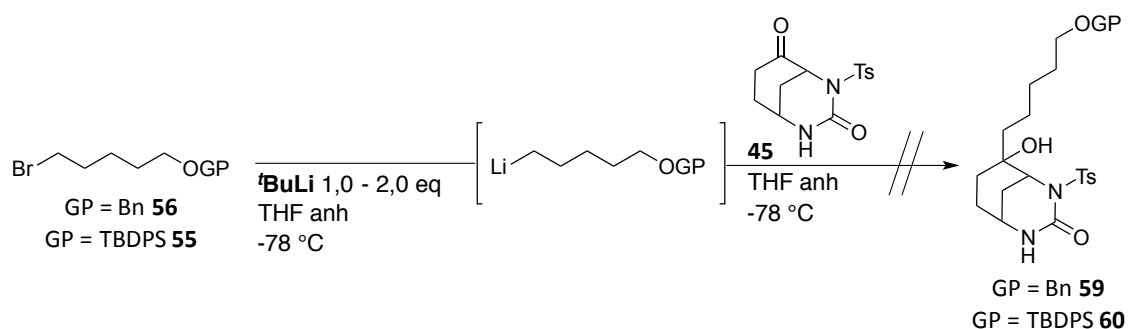
Esquema 40

En vista de l'èxit obtingut emprant l'*n*BuLi com a model, es va decidir emprar un reactiu organolític que tingués el nombre de carbonis i la funcionalitat adequades al nostre objectiu sintètic. Per exemple, aquest fragment podria estar format per una cadena de cinc metilens, essent l'últim d'ells funcionalitzat de manera que posteriorment es pogués transformar en l'àcid carboxílic desitjat. Així, es va decidir sintetitzar els compostos **55** i **56** a partir de l'1,5-pentandiòl, via els intermedis **57** i **58** respectivament (Esquema 41).^{148–151}



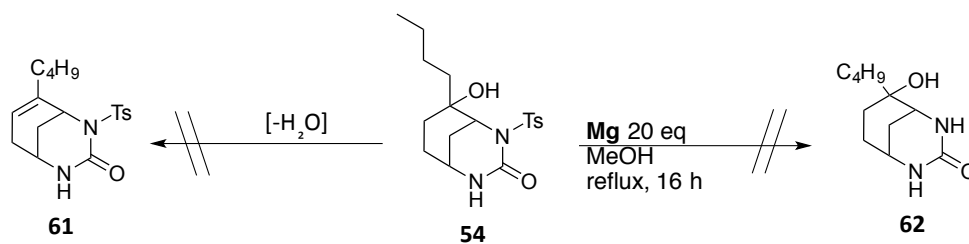
Esquema 41

D'aquests bromurs es va formar els organolítics, que es van afegir sobre la cetona **45** sense haver-los aïllat. En aquests casos, no es van detectar els alcohols corresponents **59** i **60**, només degradació del material de partida (Esquema 42).



Esquema 42

Paral·lelament, els nombrosos intents de deshidratació de l'alcohol **54** format van provocar també la degradació del material de partida sense que detectéssim en cap cas l'olefina **61** (Esquema 43). Aquestes proves van consistir en l'ús d'àcids (com H_2SO_4 , H_3PO_4 o BF_3),^{152,153} agents deshidratants (com POCl_3)¹⁵⁴ o eliminacions activant el grup hidroxil (formació d'un ester sulfònic o substitució per un halogen).^{155,156} Tampoc va funcionar l'eliminació del grup *tosil* a aquest nivell per obtenir **62** (Esquema 43).

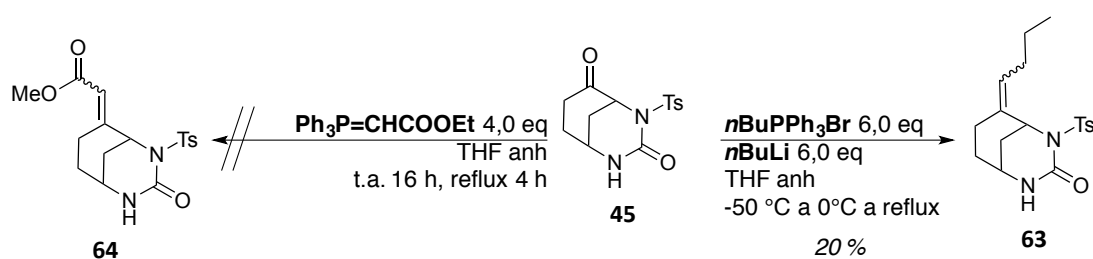


Esquema 43

A conseqüència dels mals resultats d'aquesta via, es va optar per una altra aproximació.

4.3.3.1.2 *Olefinació de tipus Wittig de la cetona*

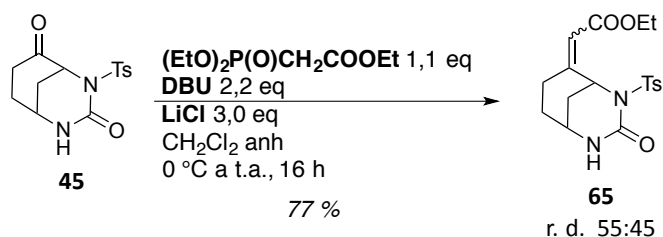
Es va provar de formar l'enllaç C=C mitjançant una olefinació. La primera aproximació va consistir en emprar un ilur no estabilitzat per obtenir l'olefina via una reacció de *Wittig* clàssica. El model emprat va ser el *n*BuPPh₃Br, del qual es va intentar formar l'ilur amb *n*BuLi i LiHMDS. Només en el cas de la primera base es va poder detectar el producte **63** (20 %) amb degradació de la resta del material de partida (Esquema 44).



Esquema 44

En emprar un ilur estabilitzat no es va degradar el material de partida, però no es va observar el producte **64** (Esquema 44). De fet, és conegut que els ilurs estabilitzats no reaccionen fàcilment amb carbonils impedits estèricament.¹⁵⁷

L'última de les aproximacions va consistir en fer l'olefinació mitjançant una modificació de la reacció de *Wittig* de tipus *Horner-Wadsworth-Emmons* en condicions de *Masamune*,¹⁵⁸ ja que volíem evitar al màxim la degradació de la cetona. Els resultats van ser satisfactoris i es va obtenir el producte **65**. Després d'una optimització de la quantitat de reactius, es va poder aïllar amb un 77 % de rendiment (Esquema 45).



Esquema 45

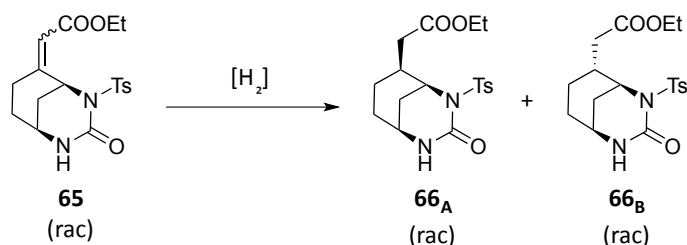
Aquesta reacció genera dos estereoisòmers deguts al doble enllaç (*E* i *Z*). En el nostre cas es va obtenir una mescla gairebé equimolar de tots dos. Aquests dos isòmers no

són fàcilment separables, però tot això no va suposar cap problema ja que un pas proper en la síntesi seria la hidrogenació d'aquest doble enllaç.

4.3.3.1.3 Generació del tercer estereocentre

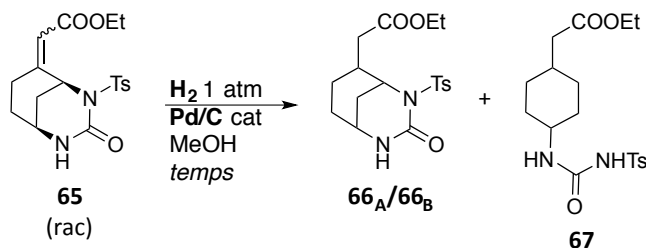
Tal i com s'havia plantejat la síntesi, la formació de l'estereocentre corresponent a l'orientació de la cadena lateral l'hauríem de fer per hidrogenació del doble enllaç d'un compost com el **65**. Aquesta hidrogenació tindria lloc més favorablement per una cara de l'olefina degut a l'impediment que genera l'estructura bicíclica.

El compost **65** ens va permetre d'estudiar aquesta reacció i comprovar si aquesta hipòtesi es complia (Esquema 46).



Esquema 46. Representació dels possibles isòmers resultants de dur a terme la hidrogenació de l'olefina **65**.

Sota condicions clàssiques d'hidrogenació amb catàlisi heterogènia es va observar la formació del producte **66** (Esquema 57), on un dels dos diastereòmers possibles es va formar majoritàriament. La conversió del material de partida va ser completa, però es van detectar quantitats importants d'un subproducte (**67**). Aquest va correspondre al producte d'hidrogenació amb una posterior obertura del cicle de la urea per trencament de l'enllaç C-NTs. Això té lloc, creiem, degut al caràcter relativament làbil de l'esmentat enllaç per l'efecte electroatraient del grup *tosil* (Esquema 47).



Esquema 47

Disminuint la càrrega de catalitzador i el temps de reacció es va aconseguir minimitzar la formació del subproducte **67**. A més, es va poder escalar la reacció a quantitats de grams tot mantenint els bons rendiments i selectivitats (Taula 5).

	65 (mmol)	% en pes Pd/C	Temps (h)	Relació 66/67	Rendiment 66 (r.d.)
1	0,40	10	16	66/33	56 % (90:10)
2	0,53	6,5	7	70/30	70 % (82:18)
3	0,53	6,5	6	68/32	68 % (86:14)
4	4,2	6,5	4	76/24	71 % (90:10)

Taula 5. Relació dels resultats de la reacció d'hidrogenació de **65**.

La purificació dels crus obtinguts va ser difícil per dos motius. Primer, la formació del subproducte **67** té una polaritat similar al producte **66**, de manera que la separació d'aquests per cromatografia en columna *flash* va ser possible però difícil. Segon, volíem separar els dos diastereòmers del producte (**66_A** i **66_B**) per poder determinar la configuració relativa de cadascun d'ells i així poder confirmar la hipòtesi sobre la generació del tercer estereocentre.

Finalment i, mitjançant HPLC, es va poder obtenir una mostra pura de cadascun dels diastereòmers per tal d'enregistrar els corresponents espectres de NOESY-2D.

Tal i com s'indica a la Figura 31, es va pensar que la hidrogenació tindria lloc per la banda de l'olefina menys impedida, és a dir, oposada al cicle de la urea. Una hidrogenació del doble enllaç per aquesta cara donaria lloc al producte **66_A**, on la cadena lateral quedaria orientada cap a la urea. En canvi, una hidrogenació per l'altra banda, forniria l'altre diastereòmer (**66_B**).

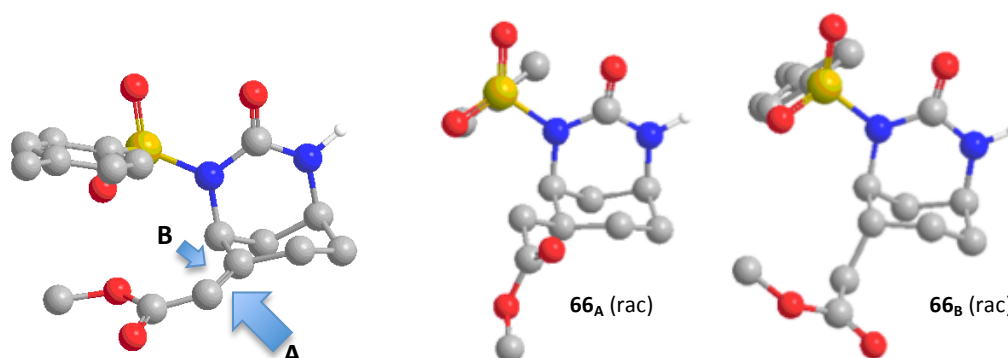


Figura 31. A l'esquerra, estructura tridimensional d'un dels enantiòmers (isòmer Z) del compost **65** on es mostra una de les conformacions més estables. Les fletxes indiquen les dues cares de l'olefina, per les quals pot tenir lloc la hidrogenació. A la dreta els dos possibles estereoisòmers productes de la reducció del doble enllaç.

Els espectres bidimensionals de correlació en l'espai de NOESY-2D van confirmar que l'isòmer majoritari (**66_A**) (Figura 32) era el producte amb la configuració relativa esperada i el minoritari (**66_B**) (Figura 33) va correspondre a l'altre.

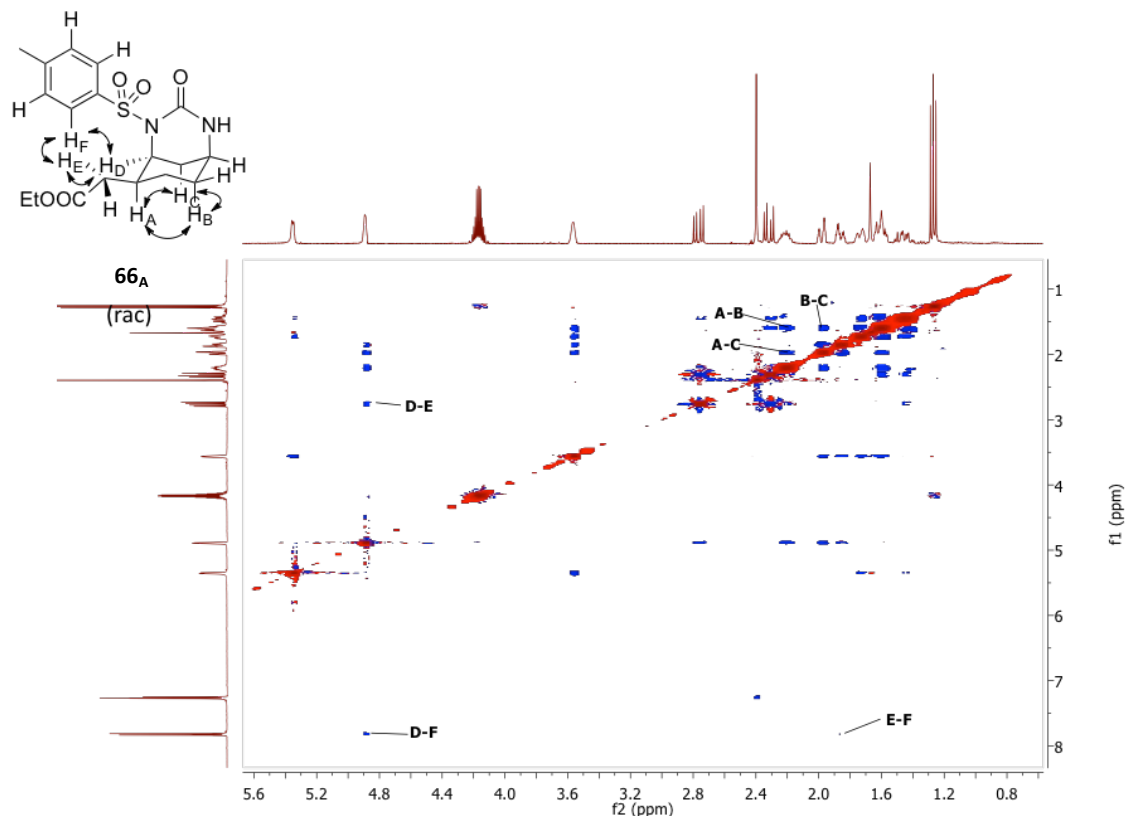


Figura 32. Espectre de RMN NOESY-2D del compost **66_A** on s'indiquen les diferents interaccions en l'espai observades per als nuclis indicats amb les etiquetes A-F. Els punts clau en l'assignació són la interacció entre A i B i C i l'absència d'interacció entre A i F, ja que el protó H_A és el que té orientació diferent segons l'estereoisòmer (veure Figura 33).

Com s'indica a les figures, l'hidrogen del carboni on s'uneix la cadena lateral (H_A) quedarà orientat cap a una cara del sistema bicíclic o l'altra segons el diastereòmer. La presència o no d'interaccions d'aquest nucli amb els aromàtics del grup *tosil* (H_F) i/o els axials de la cadira de ciclohexà (H_B i H_C) ens va permetre fer l'assignació.

El diastereòmer majoritari presenta interacció entre el nucli H_A i els nuclis H_B i H_C , i no amb l'aromàtic H_F , de manera que es confirma que aquest és el diastereòmer amb la disposició relativa desitjada. En canvi, l'altre diastereòmer presenta interaccions oposades, és a dir, el nucli H_A no presenta interaccions amb els axials de la cadira (H_B i H_C). D'aquesta manera es va confirmar que el diastereòmer majoritari era el desitjat i, que per tant, el plantejament sintètic que s'havia fet era encertat.

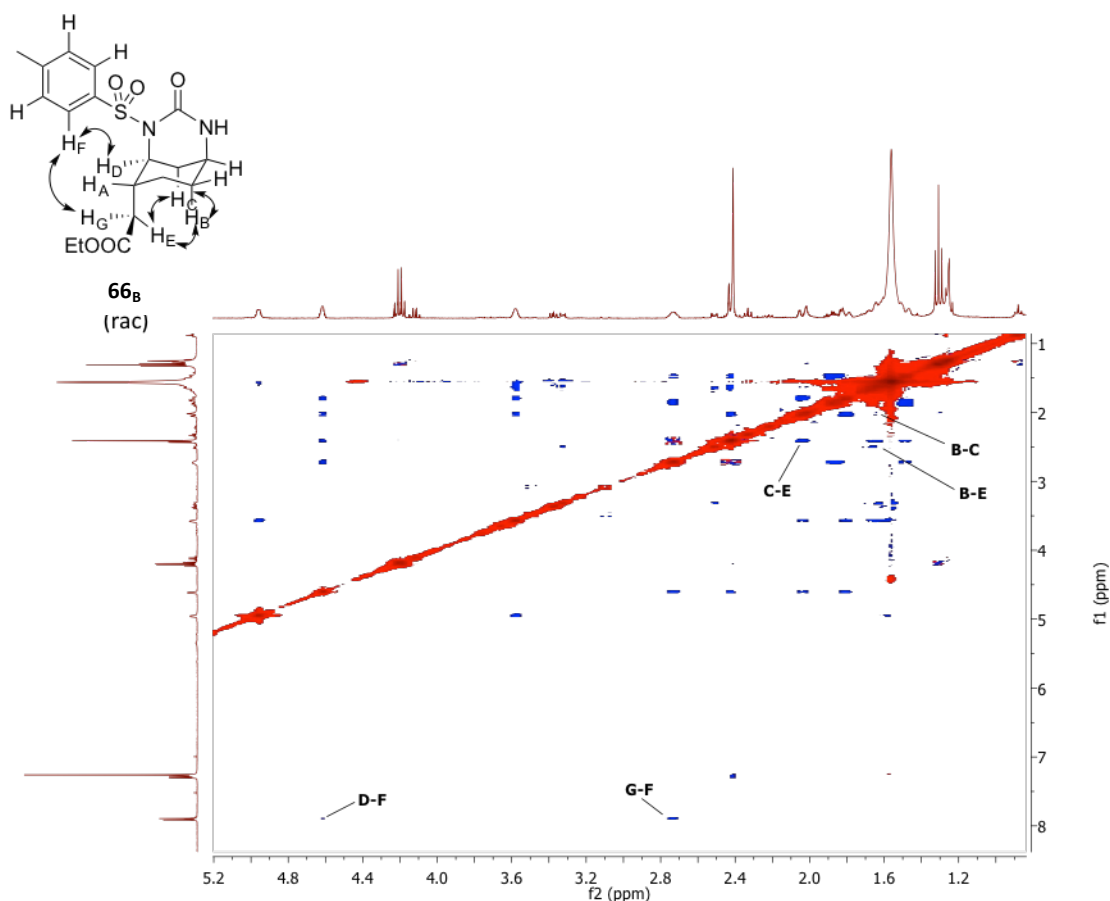
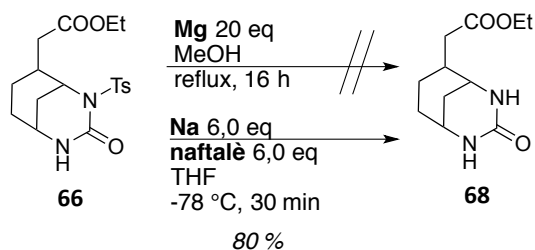


Figura 33. Espectre de RMN NOESY-2D del compost **66_B** on s'indiquen les diferents interaccions en l'espai observades per als nuclis indicats amb les etiquetes A-G. Els punts clau en l'assignació són la interacció C-E i l'absència d'interacció A-C, ja que el protó H_A és el que té orientació diferent segons l'estereoisòmer (veure Figura 32).

A continuació es va intentar l'eliminació del grup *tosil*, en aquest cas amb èxit emprant naftaleniur de sodi, al contrari al que va succeir emprant Mg i MeOH.^{143,147} Sembla que aquest sistema amb el grup funcional ester etílic sí suporta bé aquestes condicions de reducció. Es va obtenir el producte **68** amb un 80 % de rendiment (Esquema 48).



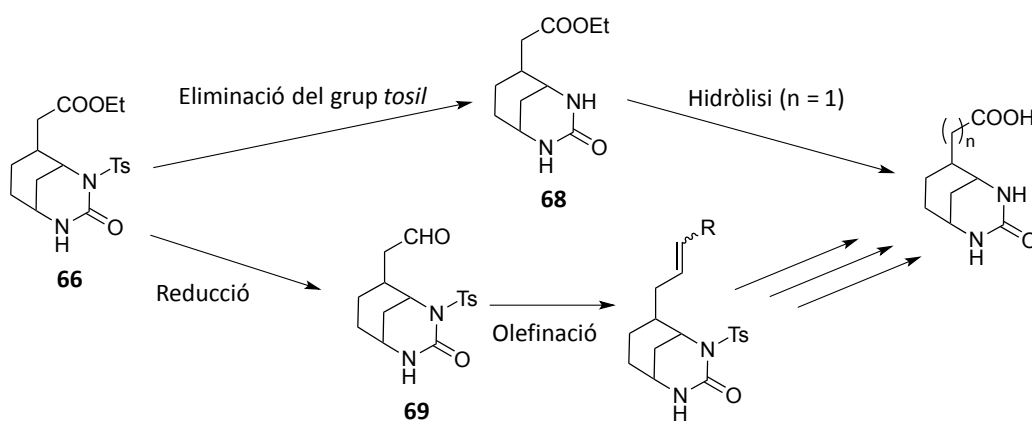
Esquema 48

Finalment, doncs, es va poder formar l'esquelet de la molècula amb la configuració relativa adequada, així com establir un mètode efectiu per eliminar el *tosil*.

4.3.4 Síntesi d'anèlegs amb diferents longituds de la cadena lateral

El fet d'haver obtingut el compost **66** ens va obrir les portes a la síntesi de més lligands que diferissin en la longitud de la cadena lateral, ja que a partir de l'esmentat compost **66** es podria allargar la cadena. Aquesta estratègia seria més versàtil ja que no s'introduiria el fragment de la cadena lateral en un pas. Per tant, l'èster **66** va esdevenir un precursor comú als diferents anèlegs que es van plantejar sintetitzar.

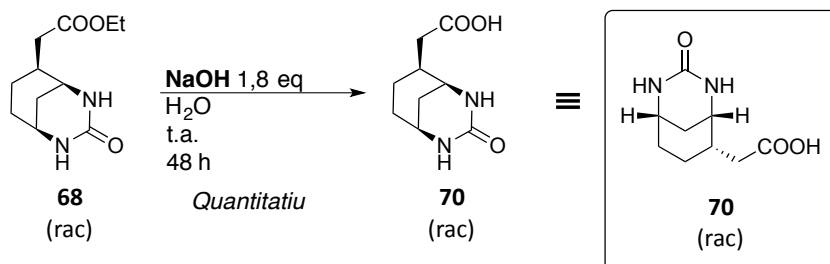
D'una banda, una hidròlisi de l'èster del compost **68** donaria lloc a un anèleg amb una cadena lateral d'un metilè de longitud. De l'altra, l'aldehid producte de la reducció de l'èster (**69**) permetria allargar la cadena mitjançant una nova olefinació, per obtenir anèlegs de diferents longituds de cadena lateral (Esquema 49).



Esquema 49

4.3.4.1 Obtenció del lligand monovalent amb 1 metilè a la cadena lateral

L'èster etílic del compost **68** es va hidrolitzar quantitativament en medi bàsic aquós. Aquesta saponificació va proporcionar l'àcid carboxílic **70**, un dels compostos objectiu (Esquema 50), que es va aïllar i caracteritzar després de purificar-lo per HPLC semi-preparatiu.



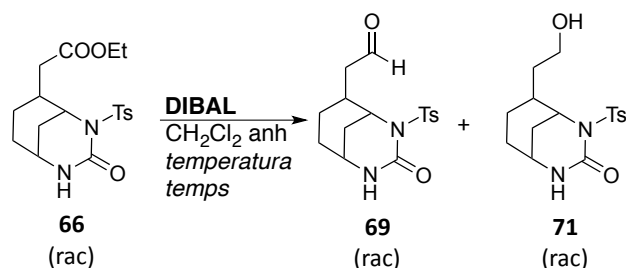
Esquema 50

4.3.4.2 Obtenció del lligand monovalent amb 3 metilens a la cadena lateral

Seguint la via plantejada a l'Esquema 49, la resta de lligands amb longituds superiors de cadena lateral, es va obtenir a partir d'un precursor comú a aquest grup de productes, derivats del compost **69**.

4.3.4.2.1 Reducció de l'ester **66** a l'aldehyd **69**

Es va decidir dur a terme la transformació de l'ester **66** a l'aldehyd corresponent (**69**) emprant DIBAL com a reductor. Aquesta va resultar ser complicada degut a la formació del subproducte de *sobrerreducció* **71**. En molts casos es va obtenir l'alcohol en quantitats elevades, de manera que va ser necessària l'optimització de les condicions d'aquesta reacció (Esquema 51). Així, va ser clau el control de la temperatura, del temps i sobretot, dels equivalents de reductor emprats (Taula 7).



Esquema 51

	66 (mmol)	Eq DIBAL	Condicions	Relació 66/69/71	
Escala "petita"	1	0,063	-78 °C (addició) → -50 °C 4 h	85/15/-	
	2	0,063	-78 °C (1a addició) → 0 °C 16 h → -78 °C (2a addició) → 0 °C	33/66/-	
	3	0,063	-50 °C 2,5 h → 0 °C 1,5 h	-/95/5	
Escala "gran"	4	0,363	-50 °C 2,5 h → 0 °C 2 h	-/40/60	
	5	0,342	-50 °C 2,5 h → 0 °C 2 h	-/30/70	
	6	0,395	-50 °C 2 h → t.a. 16 h	58/23/13 ^(a)	
	7	0,189	1,60 + 0,40	-78 °C 1,5 h	12/72/14 ^(b)
	8	0,526	1,80	-78 °C 1 h	34/63/2
	9	0,526	2,10	-78 °C 1 h	15/83/3
	10	0,476	2,20	-78 °C 1 h	7/93/-
	11	0,374 – 0,389	2,25	-78 °C 1 h	69 quantitatiu

Taula 6. Resultats obtinguts en l'optimització de les condicions de la reducció de l'ester **66** amb DIBAL. La relació de productes va ser determinada per ¹H-RMN. Tots els productes van ser aïllats cromatogràficament. ^(a) No s'observa la presència de **71** per CCP abans d'eleva la temperatura. ^(b) No s'observa presència de **71** per CCP abans de la segona addició de DIBAL.

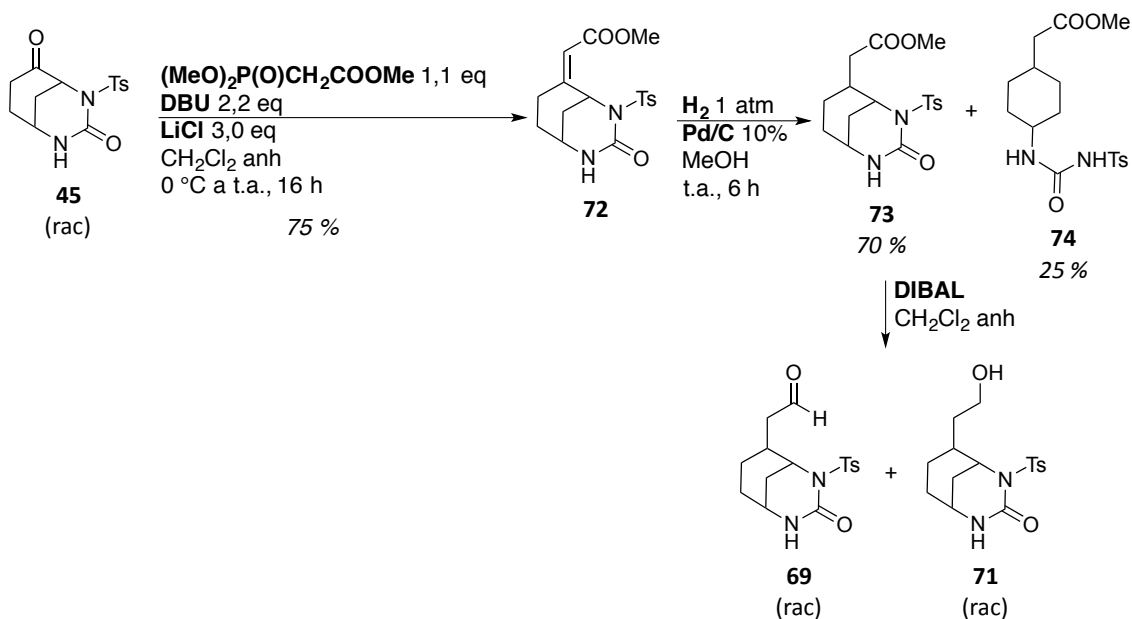
Afortunadament, en aquest cas, quan partíem d'una mescla de diastereòmers de l'ester **66**, els diastereòmers de l'aldehid corresponent (**69**) sí es podien separar fàcilment, de manera que es va poder continuar amb la síntesi amb només el diastereòmer desitjat. La relació diastereomèrica del material de partida es va conservar en dur a terme la reacció, de manera que no es va produir epimerització en el centre estereogènic de la cadena lateral, com era d'esperar.

Es va començar fent proves a escala petita (entrades 1 a 3 de la Taula 6). Es va observar que era necessari més d'un equivalent de DIBAL (fins a 6) per obtenir una conversió completa del material de partida. A més, un augment de la temperatura de treball fins a 0 °C, així com fer addicions consecutives de DIBAL no generaven l'alcohol **71**.

En passar a treballar a escales més grans, aquest excés de DIBAL sí va provocar la *sobrerreducció* del producte i es va observar una gran formació de l'alcohol **71** (entrades 4 i 5). En disminuir la quantitat d'hidrur es va observar una disminució d'aquest fenomen, però la conversió també va disminuir (entrada 6). Addicions consecutives de DIBAL van afavorir la formació de l'alcohol (entrada 7), així com elevar la temperatura per sobre de -78 °C (entrada 6). Finalment es va optimitzar la quantitat de DIBAL a 2,25 equivalents a -78 °C, condicions que van donar com a únic producte l'aldehid **69**, amb una conversió completa del material de partida.

En paral·lel i, ja que la reacció d'hidrogenació de **65** i la posterior reducció a l'aldehid **69** donaven lloc freqüentment a subproductes no desitjats, es van explorar les mateixes reaccions amb l'ester metílic **72** en comptes de l'etílic, per si oferia la mateixa reactivitat.

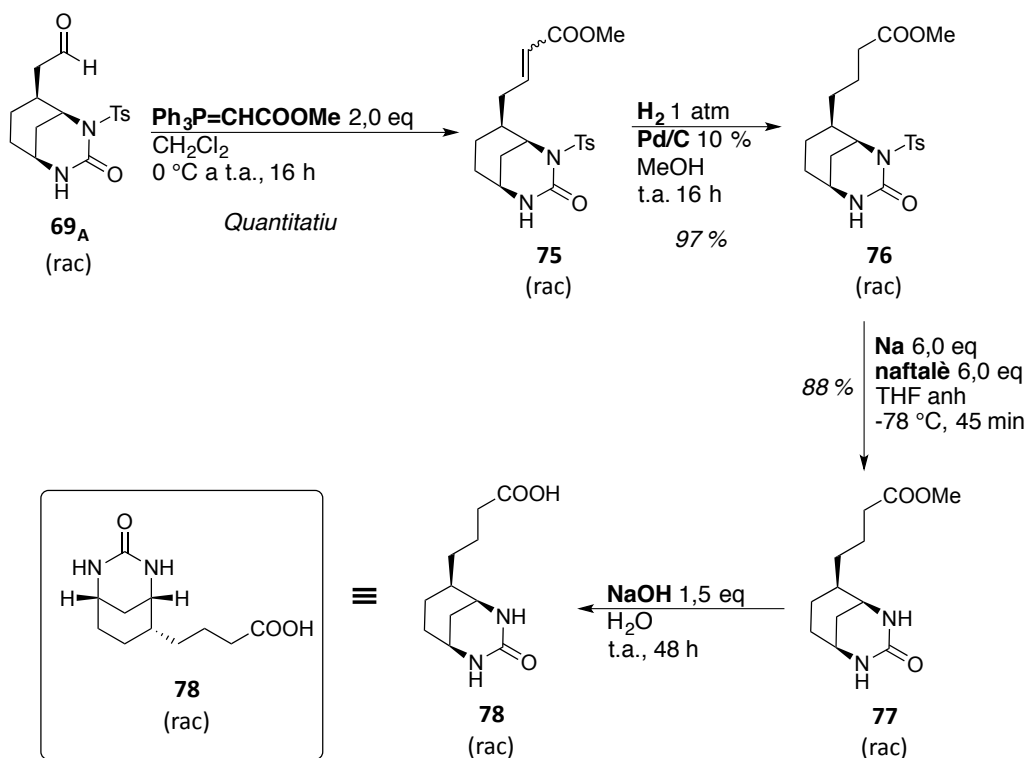
Aquest es va sintetitzar de la mateixa manera que el compost **66**, és a dir, mitjançant una reacció d'olefinació de tipus *Horner-Wadsworth-Emmons* en condicions de *Masamune*. La hidrogenació d'aquest va donar lloc al compost **73** i al producte d'obertura del cicle (**74**) en quantitats similars a les obtingudes per a l'ester etílic. La reducció de l'ester va formar també l'aldehid **69**, així com el subproducte **71**. Per tant, l'ús de l'ester metílic no va solucionar els problemes que donava l'etílic (Esquema 52).



Esquema 52

4.3.4.2.2 Transformacions per obtenir el lligand amb 3 metilens a la cadena lateral

Partint de l'aldehid **69_A**, es va allargar la cadena lateral mitjançant una nova olefinació (Esquema 53). En aquest cas es va fer mitjançant un ilur de *Wittig* estabilitzat que sí va formar quantitativament el producte desitjat amb un únic diastereòmer (**75**).



Esquema 53

Posteriorment es va hidrogenar el doble enllaç format per obtenir el producte **76** amb un 97 % de rendiment. L'eliminació del *tosil* també va donar el producte **77** amb un rendiment excel·lent (88 %).¹⁴³ Finalment la saponificació de l'èster va generar l'àcid **78** —amb una conversió total del material de partida— que va ser purificat per HPLC semi-preparatiu.

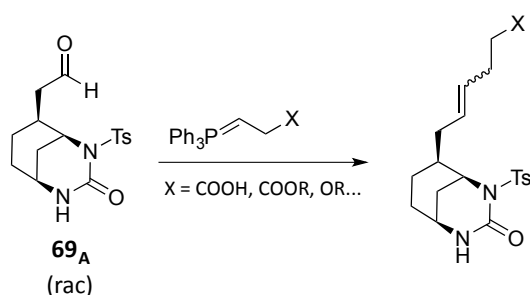
4.3.4.3 Obtenció del lligand monovalent amb 4 metilens a la cadena lateral

L'anàleg amb quatre metilens és el compost més similar a la biotina, ja que tenen en comú la longitud de la cadena lateral. La síntesi d'aquest va partir també de l'aldehid **69_A**.

4.3.4.3.1 Estudis de l'olefinació de l'aldehid **69_A** amb un fragment amb 3 metilens

En aquest cas es va voler allargar la cadena lateral amb tres carbonis més en total (dos metilens i el carboxilat final) per tal d'obtenir la cadena de valerat (com la de la biotina). Per tant, necessitàvem un ilur no estabilitzat per dur a terme la reacció de *Wittig* un metilè més llarg del que es va emprar per l'anàleg de tres metilens (Esquema 54).

Hi ha pocs casos descrits a la literatura on es facin servir aquests tipus d'ilurs, de manera que es va haver de sintetitzar aquest fragment i fer proves de reactivitat amb ilurs amb diferents grups funcionals (Esquema 54).^{159,160}

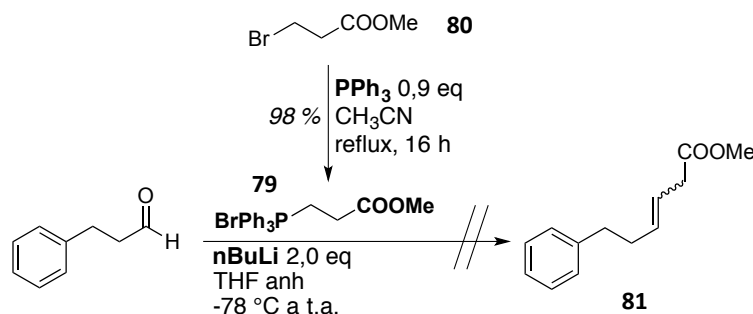


Esquema 54

Es va decidir fer aquestes proves amb un aldehid model (el dihidrocinamaldehid) per tal d'assajar la seva reactivitat.

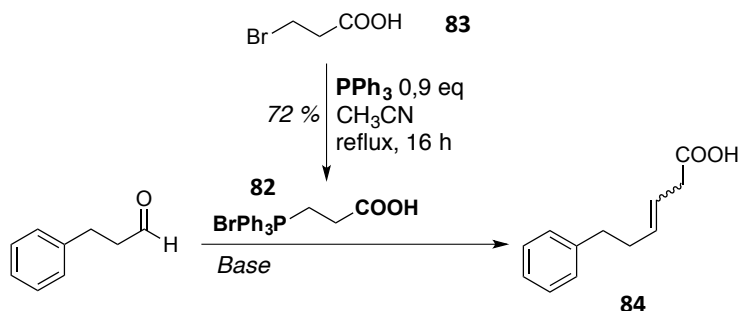
Primer de tot i, per similitud amb l'ilur emprat per l'altre lligand, es va començar emprant un ilur amb un grup ester metílic terminal, el compost **79** (Esquema 55).

Aquest es va sintetitzar a partir del 3-bromopropionat de metil (**80**),¹⁶¹ però en fer-lo reaccionar amb l'aldehid model usant *n*BuLi com a base, es va degradar el material de partida sense veure formació del producte desitjat (**81**) (Esquema 55).



Esquema 55

Es va provar, doncs, l'ús amb el grup àcid lliure terminal (**82**), ja que es va trobar l'ús d'aquest en alguns casos a la literatura.^{159,162–165} Es va sintetitzar fàcilment a partir de l'àcid 3-bromopropiònic (**83**) (Esquema 56).¹⁶⁶ En fer-lo reaccionar amb el dihidrocinnamaldehid emprant diferents bases i condicions, es va aïllar el producte **84**, però amb rendiments molt baixos (< 31 %) o degradació del material de partida (Taula 7) per donar PPh₃, degut principalment a la reacció secundària d'eliminació d'aquest grup que genera un doble enllaç conjugat a l'àcid carboxílic.

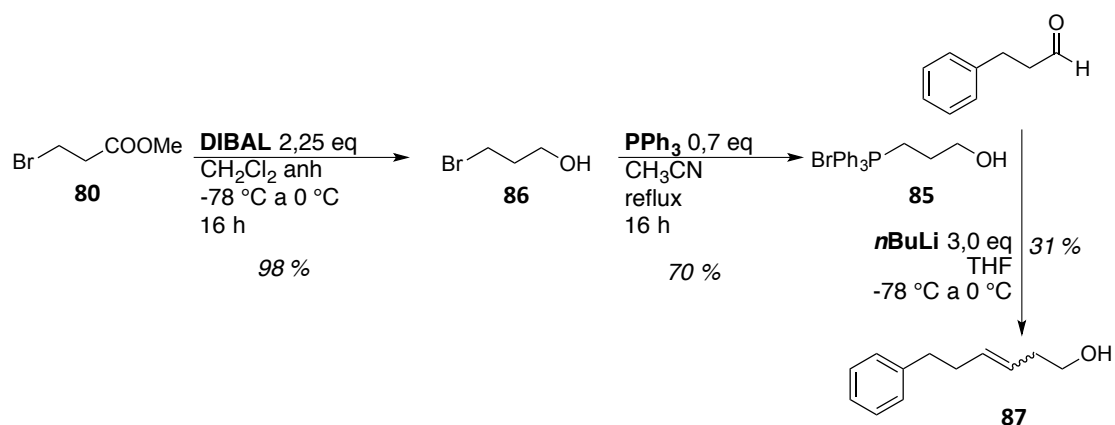


Esquema 56

	82 (eq)	Base (eq)	Condicions	Rendiment
1 ¹⁶²	3,0	LiHMDS (5,0)	THF -10 °C	31 %
2 ¹⁶³	1,0	NaH (3,8)	THF/DMSO 1:10 0°C	Degradació
3 ¹⁵⁹	1,0	<i>n</i> BuLi (3,9)	THF/DMSO 4:1 -10 °C	15 %
4 ¹⁶⁴	2,0	^t BuOK (3,7)	THF 0 °C	Degradació
5 ¹⁶⁵	1,1	<i>n</i> BuLi (2,2)	THF -25 °C	25 %
6	2,1	<i>n</i> BuLi (4,2)	THF -78 °C	Degradació

Taula 7. Relació dels resultats obtinguts en dur a terme l'olefinació de Wittig (Esquema 56).

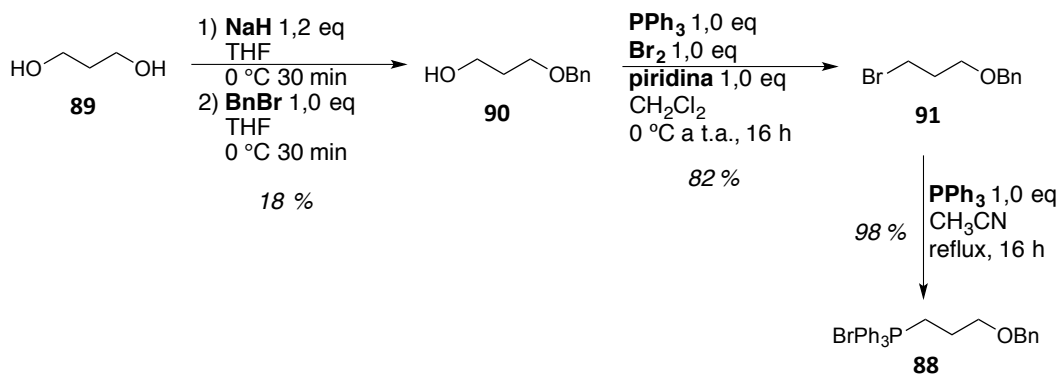
A continuació es va voler fer la reacció amb un iur amb un grup alcohol a l'extrem, ja que el podríem oxidar posteriorment. Primer es va provar de fer-ho amb l'alcohol lliure,¹⁶⁰ a tal efecte es va sintetitzar el producte **85** (Esquema 57) mitjançant la reducció gairebé quantitativa del 3-bromopropionat de metil (**80**) i la posterior formació de la sal de fosfoni (70 %) de l'alcohol **86** resultant.¹⁶⁷ La reacció de *Wittig* amb el dihidrocinaldehid, emprant *n*BuLi com a base, va proporcionar el producte **87** amb un 31 % de rendiment.



Esquema 57

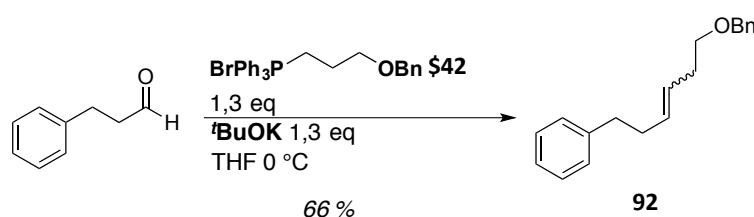
En obtenir un rendiment baix, es va pensar en protegir l'alcohol. Es va optar pel grup benzil ja que es podria eliminar sota les condicions de reacció de les etapes posteriors. Així, aquesta eliminació podria tenir lloc en l'etapa d'hydrogenació del doble enllaç per hydrogenòlisi de la posició benzílica, o durant l'eliminació del grup *tosil*, ja que sota les condicions de reducció de l'enllaç N-S també es pot desprotegir l'alcohol benzílic.¹⁶⁸

Per tal d'obtenir la sal de fosfoni **88** (Esquema 58), es va partir de l'1,3-propandioli (**89**).



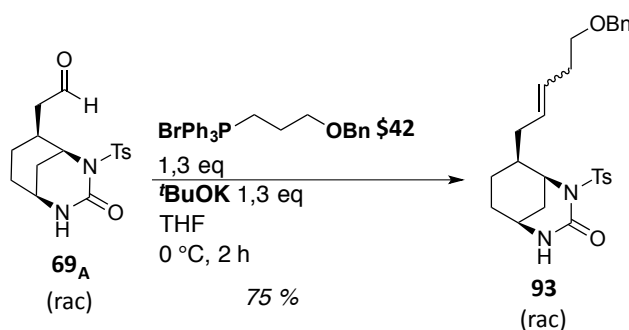
Esquema 58

Es va protegir un dels alcohols emprant hidrur de sodi i bromur de benzil per obtenir el compost monoprotegit **90** (18 % de rendiment). Seguidament es va intercanviar l'hidroxil per un brom amb un 82 % de rendiment via la formació de la sal d'alcofosfoni,¹⁶⁹ (**91**) i a continuació es va obtenir la corresponent sal de trifenilfosfoni **88** amb rendiments molt elevats.^{149,170,171} Per últim, es va formar l'ilur d'aquesta sal i el es va fer reaccionar amb l'aldehid model emprant ^tBuOK per obtenir l'olefina **92** amb un 66 % de rendiment (Esquema 59).¹⁷²



Esquema 59

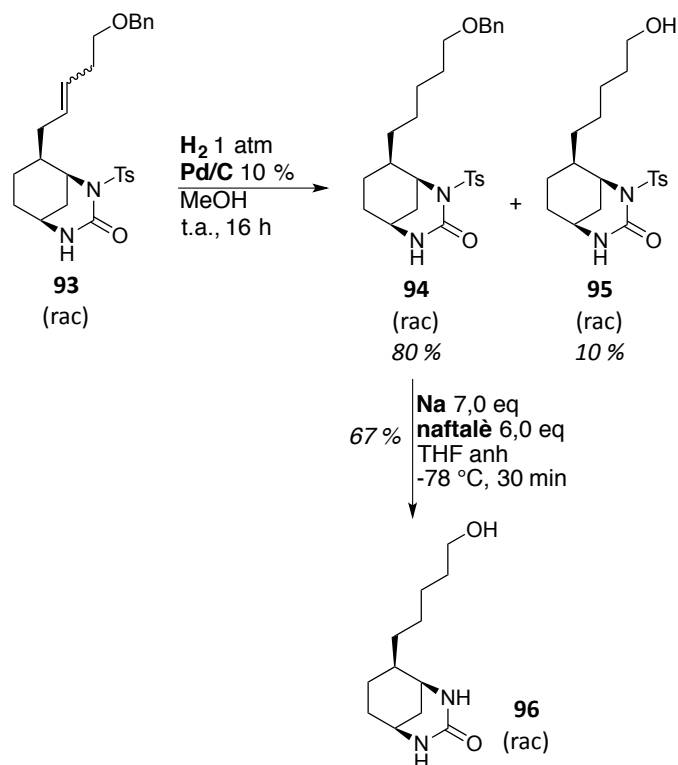
Es va decidir provar aquesta metodologia amb l'aldehid **69_A**. L'olefinació de *Wittig* va resultar amb un 75 % de rendiment partint d'una gran quantitat d'aldehid (escala de treball de més d'1 mmol), on es va aïllar el producte **93** amb un 75 % de rendiment i la formació d'un únic diastereòmer (*E* o *Z*, que no es van assignar) (Esquema 60).



Esquema 60

4.3.4.3.2 *Síntesi final del lligand monovalent amb 4 metilens a la cadena lateral*

En aquest punt l'estructura carbonada del lligand estava formada, de manera que la següent etapa va ser la hidrogenació del doble enllaç. Aquesta va tenir lloc sota condicions típiques d'hidrogenació en catàlisi heterogènia. Va furnir un 80 % del producte d'hidrogenació **94** sense eliminació del benzil i un 10 % del producte d'hidrogenació i amb l'alcohol desprotegit **95** (Esquema 61).

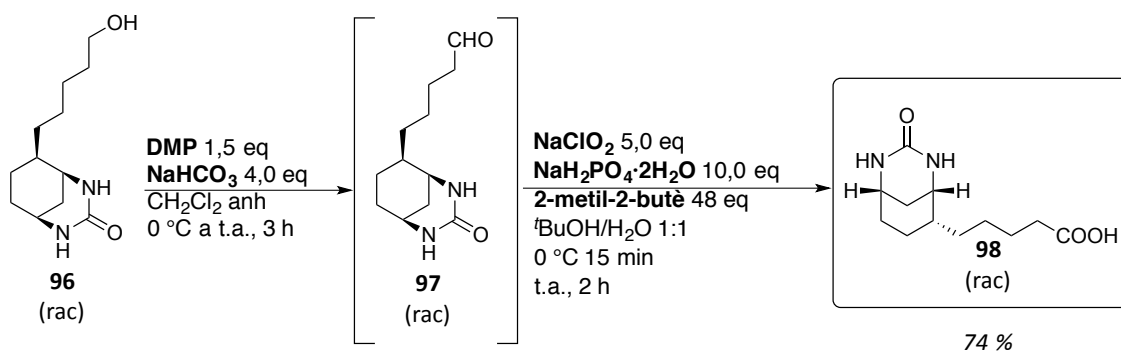


Esquema 61

Va ser sota condicions de reducció de l'enllaç N-S amb Na i naftalè quan també va reduir-se l'enllaç O-Bn, de manera que es van obtenir l'alcohol i la urea lliures en un sol pas (**96**) amb un 67 % de rendiment (Esquema 61).

La petita part d'alcohol que es va formar en la hidrogenació (**95**) es va poder separar fàcilment del producte no desprotegit (**94**). Sobre aquest substrat es va intentar l'eliminació del grup *tosil*, però aquesta va donar lloc al producte **96** amb molt baix rendiment.

Finalment, es va voler oxidar l'alcohol **96** per tal d'obtenir el corresponent àcid carboxílic. Una primera prova d'oxidació amb reactiu de *Jones* en acetona va donar lloc a l'àcid en molt petites quantitats en una mescla complexa on no va quedar material de partida. Es va voler dur a terme la transformació sota condicions més suaus, oxidant primer amb periodinà de *Dess-Martin* (DMP) per obtenir l'aldehid **97** (Esquema 62). Aquesta reacció va funcionar i es va aïllar l'aldehid que, ràpidament, es va transformar en l'àcid carboxílic **98** via una oxidació de *Pinnick*.¹⁷³ El rendiment global va ser del 74 % després de purificar-lo per HPLC semi-preparatiu.



Esquema 62

4.3.4.4 Separació dels enantiòmers per HPLC amb fase estacionària quiral

La síntesi d'aquests tres compostos, com que s'ha fet per una ruta sintètica no enantioselectiva, condueix als corresponents racèmics. Per tal de determinar les seves afinitats amb les proteïnes es va procedir a separar els dos enantiòmers ja que cal esperar afinitats diferents per a cadascun d'ells. A aquest efecte, es va provar la separació per HPLC emprant una columna amb fase estacionària quiral. Es va escollir una columna amb un suport quiral basat en un glicopèptid amfòter unit a gel de sílice. Aquest suport permet la separació mitjançant interaccions per pont d'hidrogen així com interaccions entre sistemes aromàtics. A més de variar la composició de la fase mòbil, aquesta columna va permetre treballar a diferents temperatures per aconseguir millors separacions.

Es van aconseguir separar els dos enantiòmers del lligand **78** i del **98**, però no es va aconseguir separar els dos enantiòmers del lligand de cadena lateral més curta (**70**) amb aquesta columna. Per tant, es van poder determinar les constants d'afinitat dels dos enantiòmers per separat de **78** i **98**, però es van haver de determinar l'afinitat dels enantiòmers de **70** a partir de la mescla racèmica.

4.4 Determinació de les constants d'associació dels lligands monovalents a Av i SA_v

Per tal de determinar les constants d'afinitat dels lligands monovalents sintetitzats (70, 78 i 98), es va procedir de manera similar a com es va fer amb els divalents.

4.4.1 Mètode de la valoració espectrofotomètrica competitiva

La tècnica emprada va ser la mateixa que per als lligands divalents (Apartat 3.4.1, Pàgina 46), però per als lligands monovalents el model d'unió varia.

4.4.1.1 Model d'unió d'una valoració espectrofotomètrica competitiva d'Av o SA_v amb un lligand monovalent únic

La unió d'un lligand monovalent a l'avidina o l'estreptavidina es pot representar com (Figura 34):

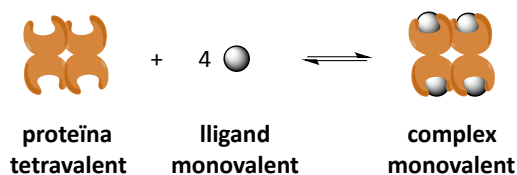


Figura 34. Representació de la unió d'un lligand monovalent a un receptor tetraivalent donant lloc a un complex d'estequiometria 1:4.

Si suposem que no hi ha efectes cooperatius positius ni negatius, podem tractar cada subunitat de la proteïna independentment, de manera que s'obté el representat a la Figura 35.

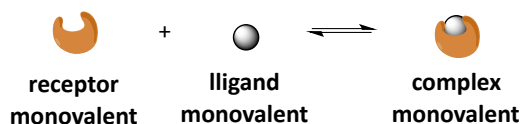


Figura 35. Model per a la unió d'un receptor monovalent amb un lligand monovalent.

El procés de valoració consisteix en el mateix procediment que es va dur a terme pels lligands divalents, és a dir, primer es complexa la proteïna amb un excés d'indicador (HABA, 2), de manera que aquesta solució tindrà un espectre d'UV-Vis amb una determinada absorbància inicial a 500 nm (màxim d'absorció de la forma *hidrazona*, majoritària en complexar-se a la proteïna); a continuació, addicions consecutives del

lligand produiran un descens en el valor d'absorbància a 500 nm ja que aquest desplaça l'HABA, que passa a estar en la forma *azo* en passar a estar lliure en solució.

En el cas dels lligands monovalents que s'han aïllat enantiomèricament purs, és a dir, el (+)-**78**, el (-)-**78**, el (+)-**98** i el (-)-**98**, el model matemàtic de la unió està basat en els equilibris mostrats a la Figura 36.

A les equacions i balanços següents es defineix el model on (i a partir d'ara): I_t és la concentració total d'indicador, S_t és la concentració total de subunitats de proteïna, L_t és la concentració total de lligand, $[I]$ és la concentració d'indicador lliure, $[S]$ és la concentració total de subunitats de proteïna lliures, $[L]$ és la concentració de lligand lliure, $[SI]$ és la concentració de complex SI, $[SL]$ és la concentració del complex SL, K_{SI} és la constant d'associació de l'indicador i K_{SL} és la constant d'associació del lligand monovalent.

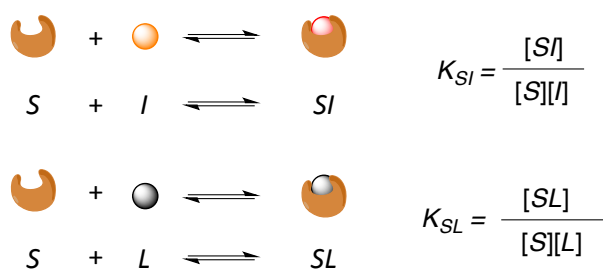


Figura 36. Model dels equilibris presents en la valoració.

El valor de l'absorbància a 500 nm a cada moment ve donat per l'Equació 5, on $\epsilon_{I(500)}$ és l'absortivitat molar de l'indicador lliure a 500 nm i $\epsilon_{SI(500)}$ és l'absortivitat molar del complex SI a 500 nm.

$$A_{500} = \epsilon_{I(500)}[I] + \epsilon_{SI(500)}[SI]$$

Equació 5

Els balanços de matèria són, llavors:

$$S_{tot} = [S] + [SI] + [SL] \quad I_{tot} = [I] + [SI] \quad L_{tot} = [L] + [SL]$$

Per tant:

$$[SI] = K_{SI}[S][I] \quad [SL] = K_{SL}[S][L]$$

$$[S] = \frac{S_{tot}}{1 + K_{SI}[I] + K_{SL}[L]} \quad [I] = \frac{I_{tot}}{1 + K_{SI}[S]} \quad [L] = \frac{L_{tot}}{1 + K_{SL}[S]}$$

De la mateixa manera que es fa pels lligands divalents, l'ajust dels valors de l'absorbància a 500 nm calculada respecte els valors experimentals es fa per mínims quadrats. Aquest ajust proporciona un valor de K_a que es donarà per bo si les corbes s'ajusten bé (i per tant no hi ha efectes cooperatius o altres interaccions no específiques).

4.4.1.2 Model d'unió d'una valoració espectrofotomètrica competitiva d'Av o SAV amb un lligand racèmic

Quan s'obté un lligand en forma de racèmic i ambdós enantiòmers es poden unir, encara que amb diferents afinitats, al mateix receptor enantiomèricament pur (com ara una proteïna), també és possible obtenir simultàniament els valors de les constants d'afinitat d'ambdós enantiòmers per a la proteïna. Això s'aconsegueix duent a terme una valoració de la proteïna amb el lligand en forma de racèmic i processant els resultats utilitzant un model que contempli la formació de dos complexos diastereomèrics.^{88,174} Òbviament, aquesta metodologia no permet assignar a quin enantiòmer li correspon cada valor de K_a obtingut, però dona una estimació dels valors.

Aquest mètode s'ha utilitzat amb els lligands **78**, ja que al no poder separar els dos enantiòmers, es va haver de dur a terme la valoració amb la mescla racèmica (Figura 37).

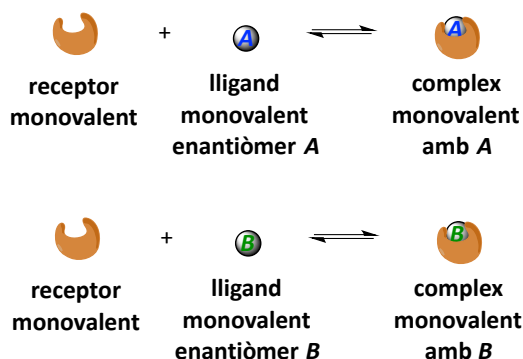


Figura 37. Model dels equilibris presents en la valoració d'una receptor enantiomèricament pur amb un lligand en forma de racèmic.

El model matemàtic és molt similar al del lligand monovalent únic, però cal tenir en consideració els equilibris mostrats a la Figura 38.

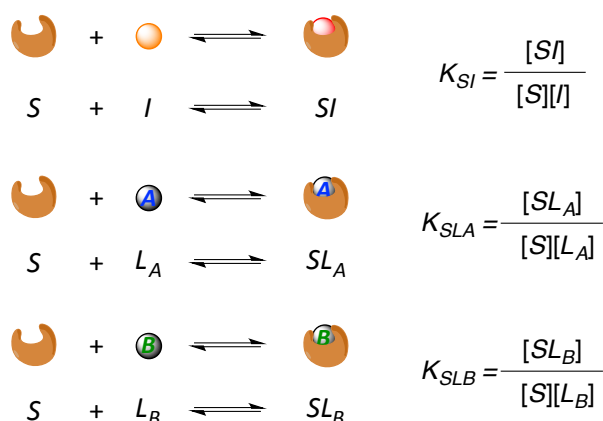


Figura 38. Model dels equilibris presents en la valoració.

En aquest cas s'ha de considerar la formació dels complexos SL_A i SL_B que tenen una afinitat per la proteïna de K_{SLA} i K_{SLB} respectivament.

De la mateixa manera que tenia lloc amb el lligand monovalent únic, el valor de l'absorbància a 500 nm ve donat per l'Equació 6, on $\varepsilon_{I(500)}$ és l'absortivitat molar de l'indicador lliure a 500 nm i $\varepsilon_{SI(500)}$ és l'absortivitat molar del complex SI a 500 nm.

$$A_{500} = \varepsilon_{I(500)}[I] + \varepsilon_{SI(500)}[SI]$$

Equació 6

Però en aquest cas els balanços de matèria són:

$$S_{tot} = [S] + [SI] + [SL_A] + [SL_B] \quad I_{tot} = [I] + [SI] \quad L_{A,tot} = [L_A] + [SL_A] \quad L_{B,tot} = [L_B] + [SL_B]$$

Per tant:

$$[S] = \frac{S_{tot}}{1 + K_S[I] + K_{SLA}[L_A] + K_{SLB}[L_B]} \quad [I] = \frac{I_{tot}}{1 + K_S[S]}$$

$$[L_A] = \frac{L_{A,tot}}{1 + K_{SLA}[S]} \quad [L_B] = \frac{L_{B,tot}}{1 + K_{SLB}[S]}$$

$$[SI] = K_S[S][I] \quad [SL_A] = K_{SLA}[S][L_A] \quad [SL_B] = K_{SLB}[S][L_B]$$

L'ajust dels valors de l'absorbància a 500 nm calculada respecte els valors experimentals es fa per mínims quadrats. Aquest ajust proporciona dos valors de K_a

que es donaran per bons si les corbes s'ajusten bé (i per tant no hi ha efectes cooperatius o altres interaccions no específiques).

4.4.2 Mètode de la valoració espectrofluorimètrica

Una altra tècnica que permet obtenir les constants d'afinitat d'un lligand amb una proteïna mitjançant una valoració és la fluorimetria.

La luminiscència consisteix en l'emissió de llum per part d'una molècula a partir d'un estat excitat. Aquesta engloba els fenòmens de fluorescència i fosforescència. L'excitació és deguda a l'absorció de llum.^{175,176}

Quan l'estat excitat és singlet (l'electró a l'estat excitat està aparellat —té espín oposat— a l'electró de l'estat fonamental) el retorn a l'estat basal està permès per l'espín i té lloc ràpidament amb l'emissió d'un fotó (temps de vida mitja aprox. 10^{-8} s); aquest és el fenomen de fluorescència.

En canvi, quan l'estat excitat és triplet (l'electró a l'estat excitat té el mateix espín que l'electró de l'estat fonamental) el retorn a l'estat basal no està permès quànticament i, per tant, l'emissió és lenta (aprox. $10^3 - 10^0$ s o fins i tot més); aquest és el fenomen de fosforescència.

Els fluoròfors són aquells compostos, àtoms, complexos, etc. que poden donar lloc a aquests fenòmens de luminiscència. Dins de les molècules orgàniques, normalment ho són les aromàtiques.

A la Figura 39 es representa un diagrama de *Jablonski*. Aquest és una representació resumida de les transicions electròniques que poden tenir lloc durant els fenòmens de luminiscència.

A tots els estats (S_0 , S_1 , S_2 , etc.) el fluoròfor pot estar en diferents estats vibracionals (0,1,2...) d'energia poc diferent entre ells. En absorbir llum, s'excita des de l'estat fonamental (S_0) cap a un estat excitat (S_1 , S_2 , etc.). En aquest punt, es produeix una relaxació tèrmica molt ràpida (aprox. 10^{-12} s) a estats vibracionals de baixa energia de l'estat excitat S_1 , fenomen que es coneix com a conversió interna. Llavors té lloc la relaxació des d'aquest nivell excitat fins a un dels nivells vibracionals de l'estat basal (S_0), que s'acompanya de l'emissió d'un fotó, és a dir, el fenomen de fluorescència.

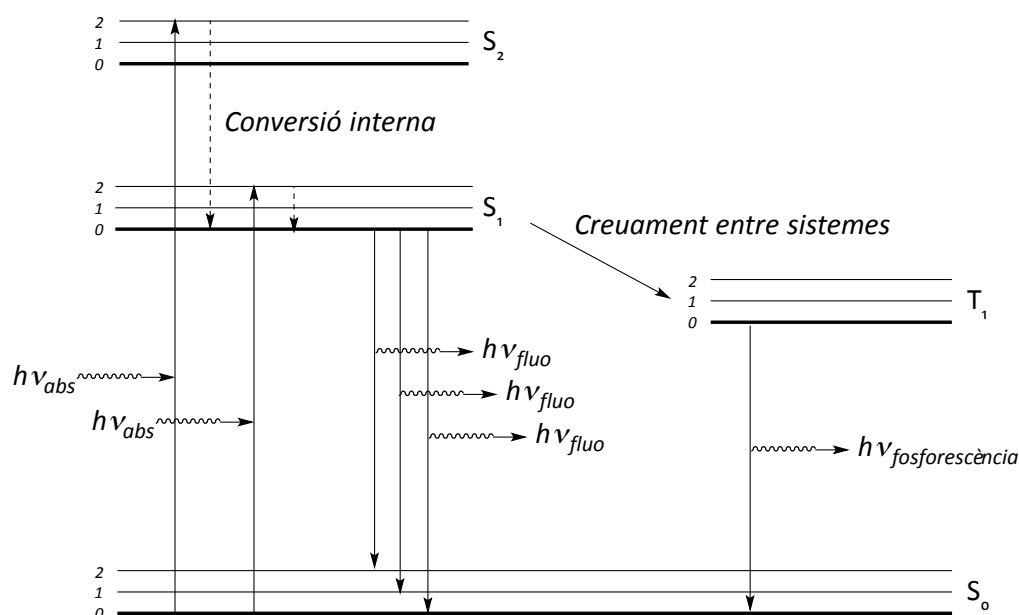


Figura 39. Diagrama de Jablonski on es representen les principals transicions que donen lloc als fenòmens de luminiscència.¹⁷⁵

Cal tenir en compte que des de l'estat excitat pot tenir lloc un creuament entre sistemes que fa que es passi de l'estat excitat singlet (S_1) a un estat excitat triplet (T_1). L'emissió de llum des d'aquest estat triplet fins al fonamental és el fenomen de fosforescència. Aquest dona lloc a longituds d'ona d'emissió encara més elevades (menys energètiques).

A més dels fenòmens de luminiscència, poden tenir lloc altres mecanismes de relaxació (tèrmics, de transferència electrònica, etc.). El rendiment quàntic (Q) d'un fenomen de fluorescència és la relació entre els fotons emesos mitjançant aquest fenomen respecte el nombre de fotons absorbits.

El fenomen conegut com a *quenching* es defineix com la disminució de la intensitat de fluorescència degut a diverses causes. Normalment té lloc per col·lisió, és a dir, té lloc quan un estat excitat es desactiva per contacte del fluoròfor amb una altra molècula en la solució (*quencher*). Aquest torna a l'estat no excitat per un mecanisme de difusió per contacte, un procés que no modifica químicament els compostos. Aquest fenomen depèn molt de la naturalesa del fluoròfor, del *quencher*, del dissolvent, etc.

A les proteïnes es troben tres aminoàcids que poden donar lloc a fluorescència: la fenilalanina (Phe, F), la tirosina (Tyr, Y) i el triptòfan (Trp, W). Cadascun d'ells té una zona d'absorció i d'excitació diferents (Figura 40).

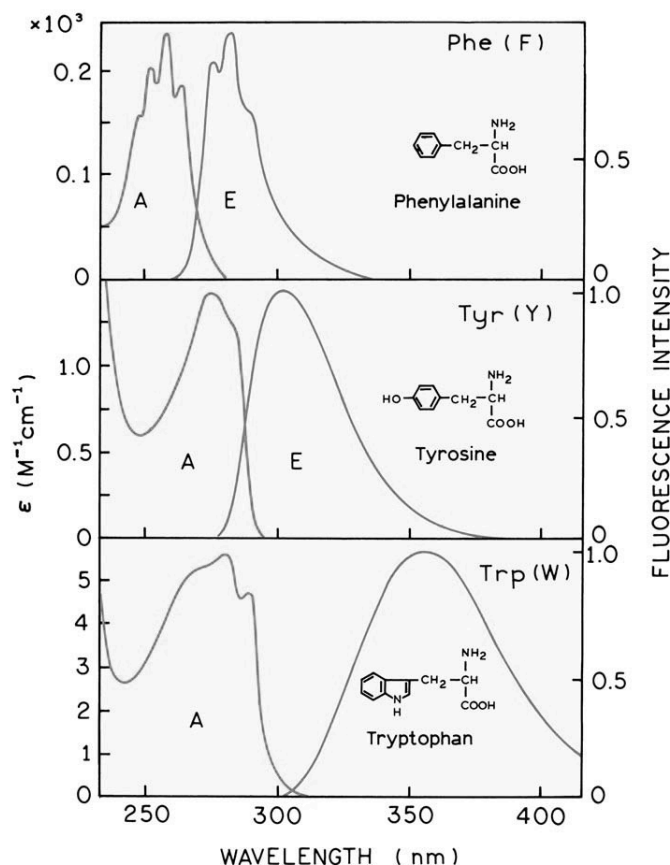


Figura 40. Espectres d'absorció (A) i d'emissió (E) dels aminoàcids fluorescents a pH = 7.¹⁷⁵

La fenilalanina té el màxim d'emissió a 282 nm (emet entre 260 nm i 330 nm aproximadament) i l'absorció té lloc per sota dels 270 nm, però el seu rendiment quàntic de fluorescència és molt baix i, per tant, difícilment s'observa en proteïnes.

La tirosina presenta un màxim d'emissió a 303 nm (emet entre 280 nm i 370 nm aprox.) i l'absorció té lloc fins a 290 nm. Tot i tenir un rendiment quàntic de fluorescència més elevat, no acostuma a ser útil en els estudis amb proteïnes ja que pateix un *quenching* molt ràpid.

En canvi, el triptòfan presenta un màxim d'emissió a 350 nm (emet de 300 nm a més de 400 nm) i la seva absorció té lloc fins als 310 nm. Aquest és l'aminoàcid per excel·lència en estudis amb proteïnes ja que és molt poc abundant, té un rendiment quàntic de fluorescència elevat i la seva emissió depèn molt de l'entorn, ja que es veu molt afectat pel dissolvent i pel *quenching* per altres residus o molècules del medi, entre d'altres. Els triptòfans que es trobin a la superfície de les proteïnes es veuran

més afectats per aquests fenòmens que els que estiguin a l'interior o als llocs d'unió, per tant, la fluorescència observada és una mitjana de la fluorescència de cada residu.

L'associació d'un lligand al lloc d'unió d'una proteïna amb triptòfans provoca un *quenching* de la fluorescència d'aquests, de manera que es pot enregistrar la variació de l'espectre d'emissió del complex, ja que es produeix una disminució del rendiment quàntic de fluorescència i un canvi de la longitud d'ona del màxim d'emissió.^{128,175,176}

4.4.2.1 Model d'unió d'una valoració espectrofluorimètrica d'Av o SAV amb lligands monovalents

L'avidina i l'estreptavidina presenten diversos triptòfans als llocs d'unió. En conseqüència, la unió de la biotina a aquestes proteïnes provoca una disminució de la intensitat de fluorescència degut a la modificació dels entorns d'aquests aminoàcids (*quenching*).¹⁷⁷

És possible, per tant, determinar la quantitat de proteïna activa en una dissolució¹⁷⁸ afegint petits volums d'una dissolució de biotina de concentració coneguda sobre la proteïna i mesurar la fluorescència després de cada addició (Figura 41). La mostra s'excita a 290 nm (on s'excita el triptòfan majoritàriament i en menor mesura la tirosina) i s'enregistra l'emissió a 350 nm (on emet el triptòfan en màxims i molt residualment la tirosina).

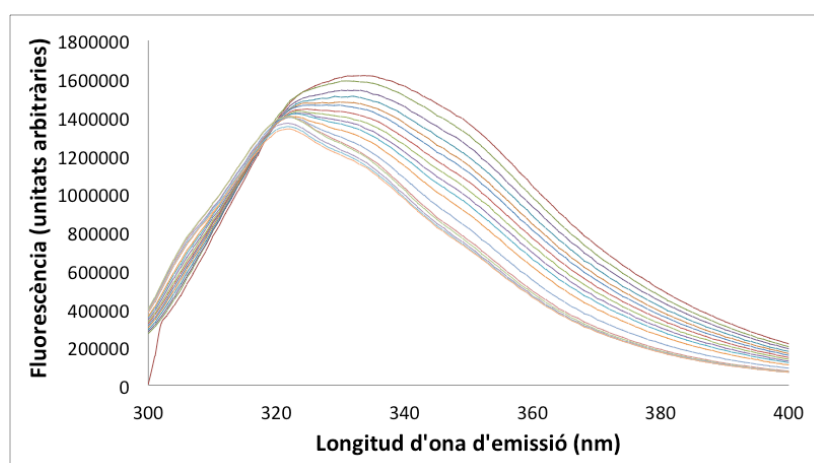


Figura 41. Variació de l'espectre de fluorescència de l'avidina (amb excitació a 290 nm) a mesura que es va afegint biotina.

D'aquest experiment s'obté una disminució lineal de la fluorescència a 350 nm *versus* la quantitat de biotina afegida, fins a arribar al punt d'equivalència en el qual tota la

proteïna està complexada i la relació molar entre la biotina i les subunitats de proteïna és 1 (Figura 42).

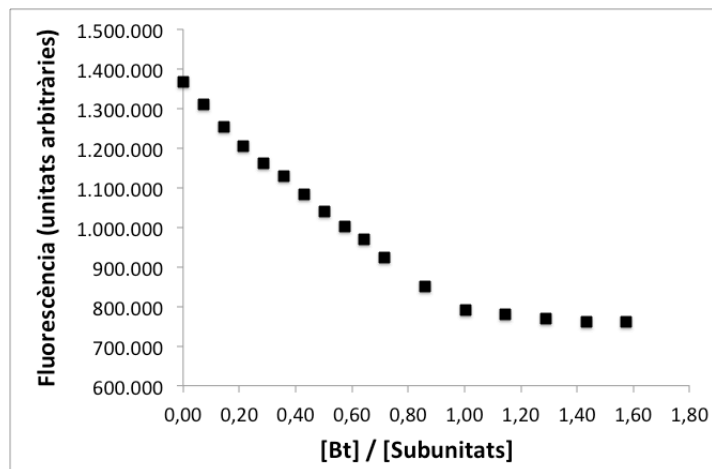


Figura 42. Variació de la fluorescència a 350 nm corregida per dilució en addicionar una solució de biotina 40 μM (1) en tampó fosfats 50 mM a pH = 7,0 a una dissolució d'avidina 1,87 μM en subunitats en tampó fosfats 50 mM a pH = 7,0. Longitud d'ona d'excitació: 290 nm.

De la mateixa manera que ho fa la biotina, altres lligands també poden provocar una disminució de la fluorescència. Si s'uneixen amb afinitats inferiors la representació donarà lloc a una corba (unió més feble). A partir de l'ajust de la corba teòrica (deduïda a partir del model d'unió) a la corba experimental, es pot determinar la constant d'afinitat (K_d) d'aquests lligands per a l'avidina i l'estreptavidina.

L'avantatge principal d'aquesta tècnica respecte d'altres (com la espectrofotomètrica competitiva) rau en l'elevada selectivitat i sensibilitat que presenta, ja que és necessària menys quantitat de mostra i, per tant, es poden arribar a determinar K_d més elevades en treballar a dilucions més altes.

Si suposem que no hi ha efectes cooperatius, podem tractar cada subunitat de la proteïna independentment, i això ens permet tractar l'equilibri com si fos el de formació d'un complex d'estequiometria 1:1 (Figura 43).

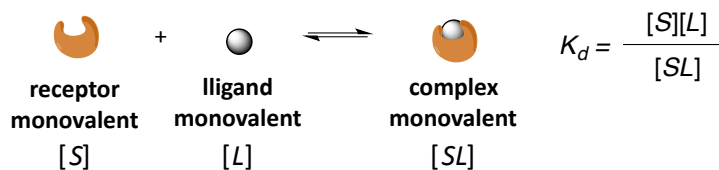


Figura 43. Model d'unió dels lligands monovalents a avidina i estreptavidina.

En qualsevol punt de la valoració, la intensitat de fluorescència ve donada per l'Equació 7, essent F_i la intensitat de fluorescència a cada mesura (i), la qual és la suma de les contribucions de la fluorescència de la proteïna lliure (F_S) i la del complex (F_{SL}). On $[S]$ és la concentració de proteïna lliure, $[SL]$ és la concentració de complex i f_S i f_{SL} són les constants de proporcionalitat.¹²⁸

$$F_i = F_S + F_{SL} = f_S[S] + f_{SL}[SL]$$

Equació 7

A partir dels balanços de matèria, on L_{tot} i S_{tot} representen les concentracions totals d'L i S respectivament,

$$[S] = S_{tot} - [SL] \quad [L] = L_{tot} - [SL]$$

podem expressar el valor de la intensitat de fluorescència (F_i) com (Equació 8):

$$F_i = f_S(S_{tot} - [SL]) + f_{SL}[SL] = f_S S_{tot} + (f_{SL} - f_S)[SL]$$

Equació 8

Que, a partir de l'equació de l'equilibri, es pot expressar com (Equació 9):

$$[SL] = \frac{[S][L]}{K_d} = \frac{(S_{tot} - [SL])(L_{tot} - [SL])}{K_d} = \frac{S_{tot}L_{tot} - S_{tot}[SL] - L_{tot}[SL] + [SL]^2}{K_d}$$

Equació 9

Escrivint aquesta equació com una de segon grau (Equació 10):

$$0 = S_{tot}L_{tot} - (S_{tot} + L_{tot} + K_d)[SL] + [SL]^2$$

Equació 10

Que té una solució d'equació de segon grau per a la incògnita $[SL]$, de manera que si unim aquesta solució a l'Equació 8, obtenim (Equació 11):

$$F_i = f_S S_{tot} + \frac{(f_{SL} - f_S)}{2} [(L_{tot} + S_{tot} + K_d) - ((L_{tot} + S_{tot} + K_d)^2 - 4L_{tot}S_{tot})^{-1/2}]$$

Equació 11

La constant de proporcionalitat f_S es calcula a partir de la fluorescència en el punt just abans de començar a afegir lligand (Equació 12):

$$f_S = \frac{F_o}{S_{tot}}$$

Equació 12

El valor de f_{SL} s'obté a partir del valor final de la fluorescència (F_{final}), suposant que la proteïna es troba completament complexada i, per tant, la concentració de complex equival a la concentració de subunitats de proteïna (Equació 13):

$$f_{SL} = \frac{F_{final}}{S_{tot}}$$

Equació 13

Com que la tirosina té una emissió petita però no negligible a 350 nm, es va utilitzar el valor de la intensitat de fluorescència a 370 nm per tal d'assegurar que la contribució a la fluorescència fos només deguda als triptòfans. L'ajust dels valors de la fluorescència a 370 nm, calculats respecte els experimentals es fa per mínims quadrats. Aquest ajust dóna un valor de K_d (l'invers de la K_a) que es donarà per bo si les corbes s'ajusten bé (i per tant no tenen lloc efectes cooperatius o altres interaccions no específiques).

4.4.3 Determinació de les K_a dels lligands monovalents a l'avidina

Primer de tot es van dur a terme els experiments de competició. Es va fer per als compostos (+)-**78**, (-)-**78**, (+)-**98** i (-)-**98**, així com per a la mescla racèmica de **70** (Figura 44).

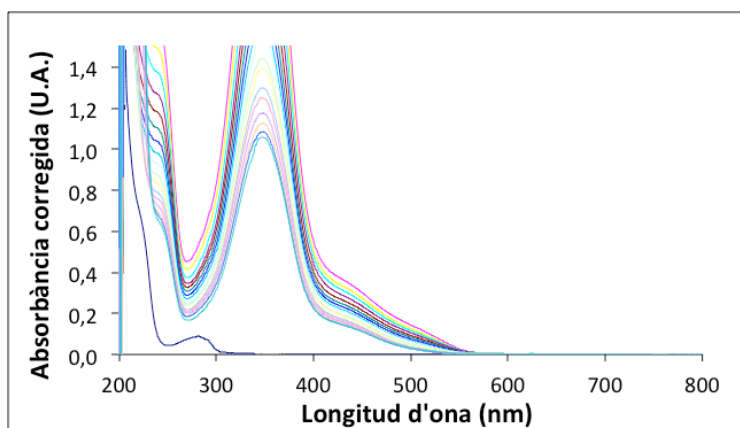
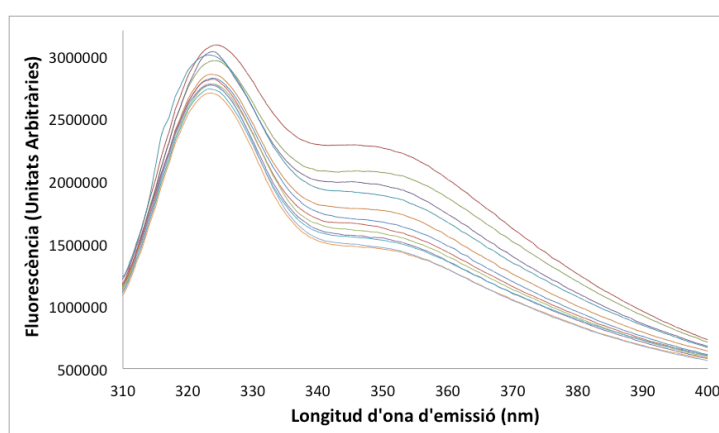


Figura 44. Variació de l'espectre d'absorció UV-Vis a mesura que es fan addicions del lligand monovalent (-)-**98** a una solució d'avidina i HABA en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0.

Es va comprovar com tots aquests provocaven una disminució de la banda de 500 nm en afegir-los a la solució del complex proteïna-HABA; per tant es va confirmar que aquests compostos són, efectivament, lligands per l'avidina i, a més, s'uneixen al mateix lloc d'unió en el que ho fan la biotina (**1**) i l'HABA (**2**).

Es va observar però que pel mètode de competició espectrofotomètrica UV-Vis els compostos (+)-**98** i (+)-**78** s'unien a l'avidina amb una afinitat més gran del límit superior que aquest mètode ens permetia obtenir. És per això que les K_a d'aquests dos lligands amb l'avidina es van haver de determinar pel mètode de fluorescència (Figura 45).



*Figura 45. Variació de l'espectre de fluorescència de l'avidina (0,020 μM en subunitats) a $\text{pH} = 7,0$ a mesura que es fan addicions successives del lligand (+)-**98**. Longitud d'ona d'excitació: 290 nm.*

En el cas de la valoració espectrofotomètrica competitiva, el límit superior del valor de la constant d'afinitat a avidina que aquesta tècnica ens va permetre determinar per a aquest sistema va ser aproximadament de 10^9 M^{-1} ; és a dir, no es va poder distingir entre constants superiors a aquest valor. En el cas de la fluorescència, degut a la major sensibilitat de la tècnica, es van aconseguir determinar constants d'afinitat de fins a 10^{11} M^{-1} amb fiabilitat.

Els ajustos al model matemàtic d'unió monovalent per als diferents experiments de valoració van ser bons en tots els casos i, per tant, podem excloure l'existència d'efectes cooperatius, interaccions no específiques i/o formació d'oligòmers (de la Figura 46 a la Figura 50 per a les valoracions competitives amb avidina i Figura 51 i Figura 52 per a les valoracions fluorimètriques amb avidina).

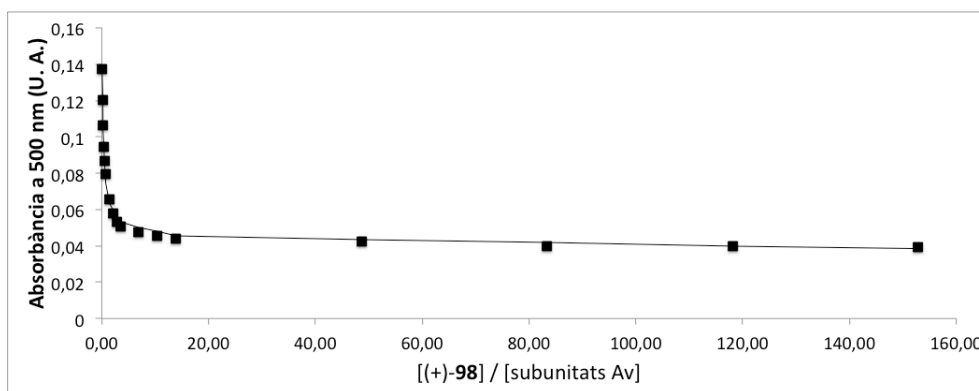


Figura 46. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina (1,01 μM en subunitats) i HABA (172 μM) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (+)-98 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

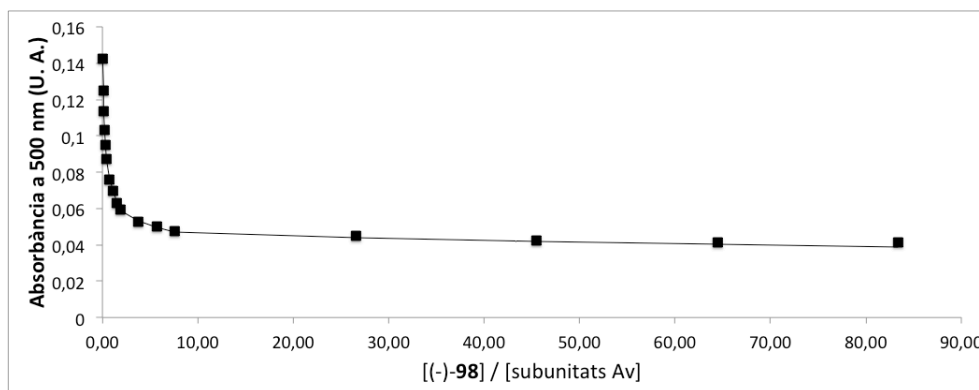


Figura 47. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina (1,16 μM en subunitats) i HABA (172 μM) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (-)-98 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

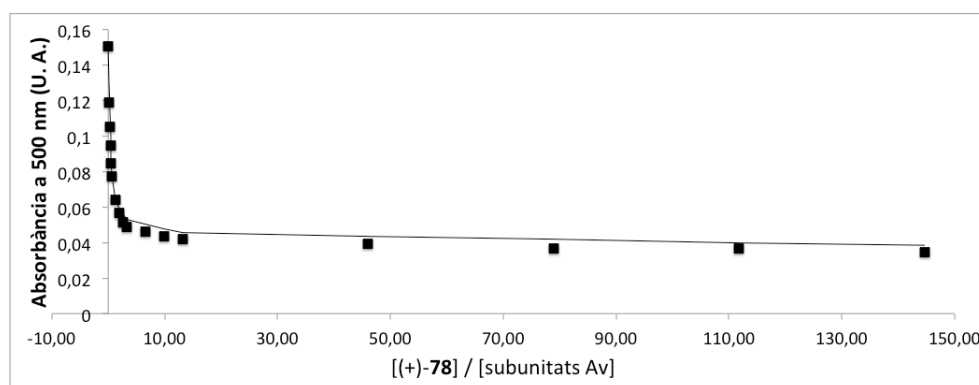


Figura 48. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina (1,40 μM en subunitats) i HABA (172 μM) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (+)-78 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

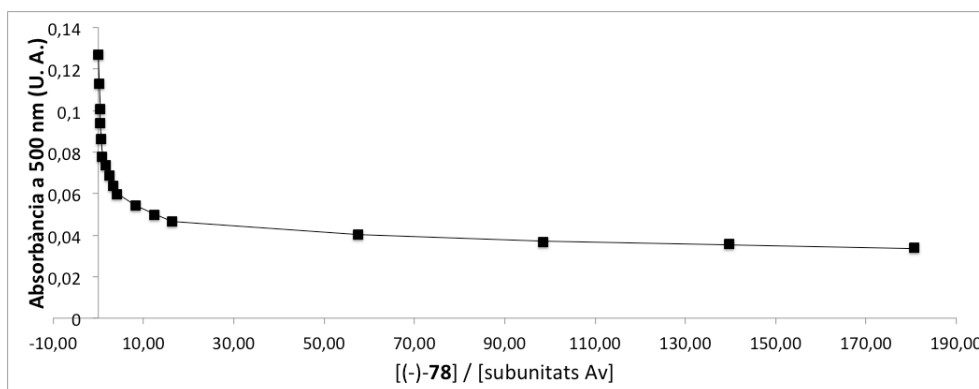


Figura 49. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina ($1,15 \mu\text{M}$ en subunitats) i HABA ($147 \mu\text{M}$) en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH} = 7,0$ amb el lligand monovalent $(-)\text{-78}$ en tampó fosfats $0,1 \text{ M} + 1 \%$ de DMSO a $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

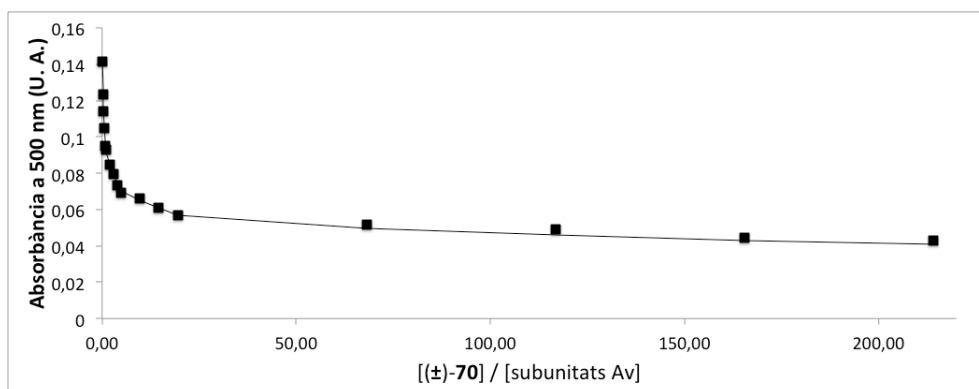


Figura 50. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'avidina ($1,13 \mu\text{M}$ en subunitats) i HABA ($172 \mu\text{M}$) en tampó fosfats $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH} = 7,0$ amb el lligand monovalent $(\pm)\text{-70}$ en tampó fosfats $0,1 \text{ M} + 1 \%$ de DMSO a $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

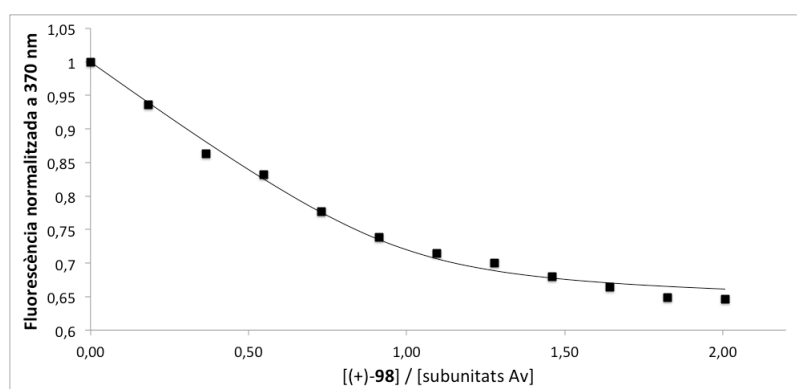


Figura 51. Canvi de la fluorescència a 370 nm en la valoració d'avidina ($0,020 \mu\text{M}$ en subunitats) amb el lligand monovalent $(+)\text{-98}$ $\text{pH} = 7,0$. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

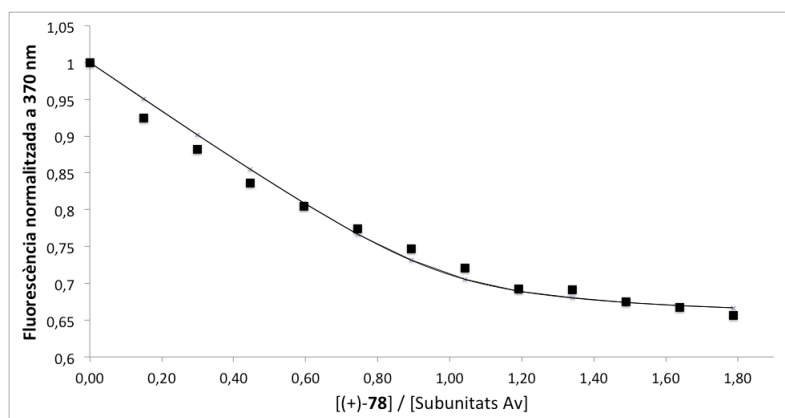


Figura 52. Canvi de la fluorescència a 370 nm en la valoració d'avidina (0,019 μ M en subunitats) amb el lligand monovalent (+)-78 pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts representen els valors experimentals.

A la Taula 8 s'indiquen els valors obtinguts per a les K_a dels lligands amb l'avidina.

Lligand ^(a)	Enantiòmer	K_a Avidina (M^{-1})	ΔG ($kJ \cdot mol^{-1}$)	ES
	(+)-98	$\geq 1,0 \cdot 10^9$ ^(b) $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^9$ ^(c)	$\leq -50,3$ $-50,7 \pm 0,2$	18
	(-)-98	$(6,0 \pm 1,6) \cdot 10^7$ ^(b)	$-43,3 \pm 0,7$	
	(+)-78	$\geq 1,0 \cdot 10^9$ ^(b) $(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^9$ ^(c)	$\leq -50,3$ $-52,2 \pm 0,2$	1800
	(-)-78	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^6$ ^(b)	$-34,0 \pm 0,3$	
	70 (rac)	$(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^6$ i $\leq 1,0 \cdot 10^4$ ^(b)	$\geq -22,3$ i $(-33,9 \pm 0,9)$	≥ 130
	(+)-7	$3,1 \cdot 10^7$ ^(c)	$-42,7 \pm 0,1$	6250

Taula 8. Valors de les constants d'afinitat obtingudes pels lligands monovalents amb avidina a pH = 7,0. L'última entrada correspon al lligand monovalent de referència.^{94 (a)} Configuració relativa. ^(b) Pel mètode de valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA a pH = 7,0. ^(c) Pel mètode de valoració espectrofluorimètrica a pH = 7,0.

Dels valors obtinguts es poden treure diverses conclusions.

Primer, en aquells casos en els quals s'ha aconseguit separar els dos enantiòmers s'observa que els enantiòmers (+) tenen una K_a més gran que els enantiòmers (-).

Aquest fenomen també s'havia observat amb els lligands de tipus PDU (**7**) i DMPDU (**9**).

Segon, l'augment d'afinitat tan gran que té lloc en passar de **70** (considerant l'enantiòmer de major afinitat) a (+)-**78** (1700 vegades) i (+)-**98** (850 vegades) sembla indicar que la presència d'una cadena lateral de determinada longitud és clau en l'afinitat. En **70** la cadena lateral probablement no és prou llarga com perquè el carboxilat de l'extrem pugui formar interaccions per pont d'hidrogen amb els mateixos residus amb els que ho fa la biotina amb l'avidina, mentre que en el cas de (+)-**78** i (+)-**98** sí que seria prou llarga com per formar-les. Per a l'avidina, la petita disminució de la K_a en passar de (+)-**78** a (+)-**98** indica que la longitud òptima de la cadena lateral d'aquest tipus de lligands és de 3 metilens.

L'enantioselectivitat (ES , entesa com el quocient entre la K_a major i la K_a menor d'una parella d'enantiòmers) arriba a ser de 1800 en el cas del lligand **78**, mentre que en el cas del lligand **98** és només de 18. Si se suposa que aquests lligands s'uneixen al lloc d'unió de l'avidina amb la mateixa disposició que ho fa la biotina es pot veure que, com en el cas de la norbiotina (Figura 8, Pàgina 10), una cadena lateral amb tres metilens és prou llarga com perquè el carboxilat pugui establir interaccions per pont d'hidrogen amb els mateixos residus amb els que ho fa la biotina. Probablement, en el cas del lligand **78**, només el carboxilat de l'enantiòmer-(+) pot formar interaccions per pont d'hidrogen amb els residus de l'avidina, i per això té una enantioselectivitat tant elevada. Aleshores, un petit augment de només un metilè en la longitud de l'espaiador, ja fa que l'enantioselectivitat baixi molt, degut probablement al fet que els carboxilats d'ambdós enantiòmers ja poden formar interaccions per pont d'hidrogen amb els residus de l'avidina.

Tercer, el fet de passar d'un lligand amb un grup *ureido* a cada cicle (ligand (+)-**7**) a un lligand amb únic grup *ureido* en un dels cicles (ligands (+)-**78** i (+)-**98**) ha provocat un augment en l'afinitat d'entre 35 i 70 vegades. Aquest augment important en l'afinitat per al lligand (+)-**78** confirma les hipòtesis que es van fer a l'hora de dissenyar aquests nous lligands amb un únic grup *ureido* per al cas de la seva complexació amb avidina.

4.4.4 Determinació de les K_d dels lligands monovalents a l'estreptavidina

De la mateixa manera que es va procedir per al cas de l'avidina, es van dur a terme els experiments de competició per determinar les K_d dels lligands monovalents a l'SAv (Figura 53). Es va fer per als compostos (+)-**78**, (-)-**78**, (+)-**98** i (-)-**98**, així com per a la mescla racèmica de **70**. Es va comprovar com tots aquests provocaven una disminució de la banda de 500 nm en afegir-los a la solució del complex SAv-HABA; per tant es va confirmar que aquests compostos són, efectivament, lligands per l'avidina i, a més, s'uneixen al mateix lloc d'unió en el que ho fan la biotina (**1**) i l'HABA (**2**).

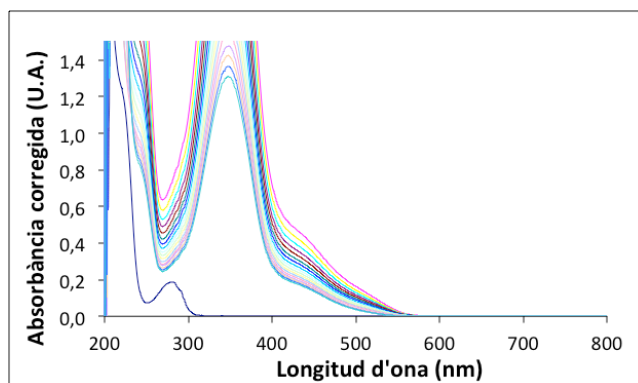


Figura 53. Variació de l'espectre d'absorció UV-Vis a mesura que es fan addicions del lligand monovalent (-)-**98** a una solució d'estreptavidina i HABA en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0.

Els ajustos al model matemàtic d'unió monovalent per als diferents experiments de valoració van ser bons en tots els casos (des de la Figura 54 a la Figura 58) i, per tant, podem excloure l'existència d'efectes cooperatius, interaccions no específiques i/o formació de complexos oligomèrics.

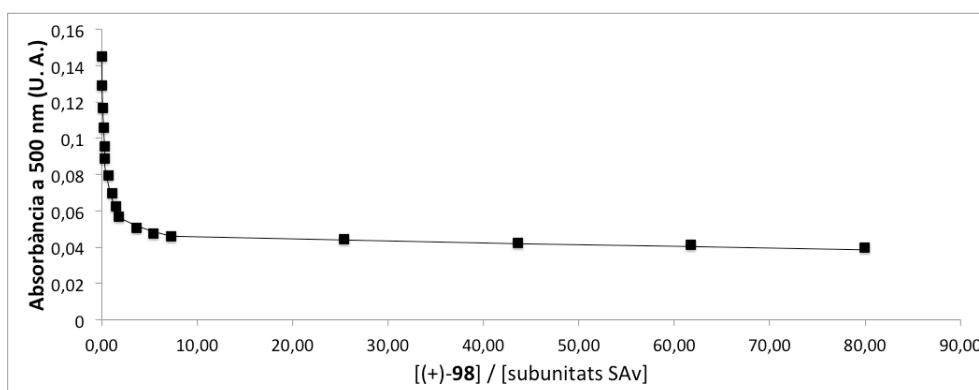


Figura 54. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina (1,93 μ M en subunitats) i HABA (172 μ M) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (+)-**98** en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts els valors experimentals.

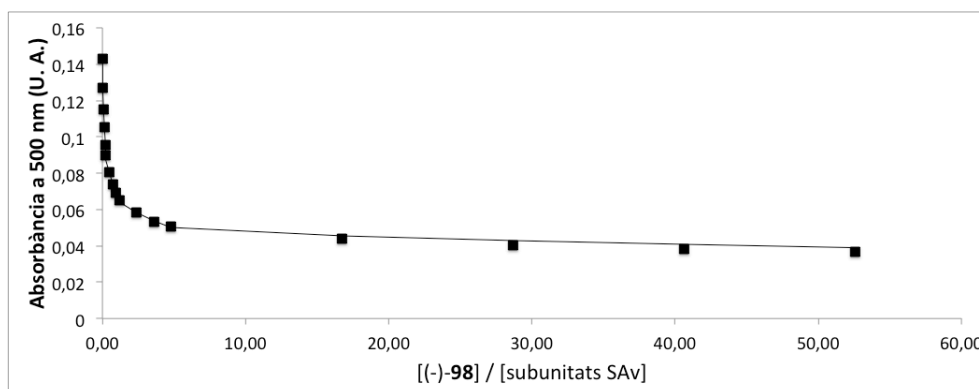


Figura 55. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina (1,83 μM en subunitats) i HABA (172 μM) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (-)-98 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts els valors experimentals.

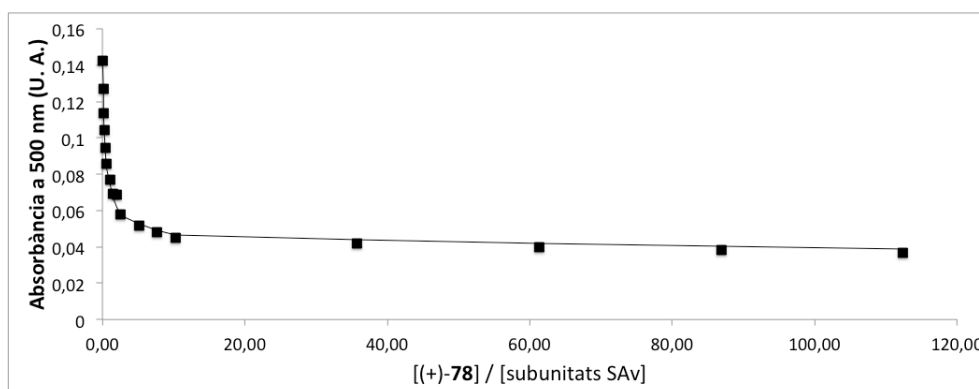


Figura 56. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina (1,80 μM en subunitats) i HABA (172 μM) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (+)-78 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts els valors experimentals.

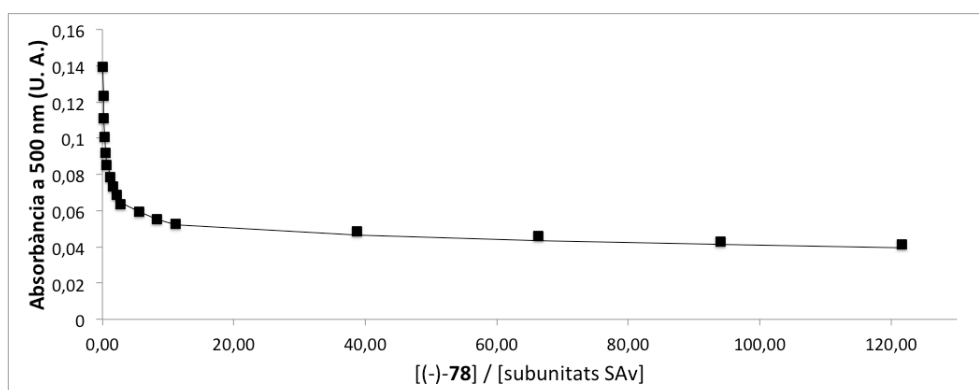


Figura 57. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina (1,67 μM en subunitats) i HABA (172 μM) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monovalent (+)-78 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts els valors experimentals.

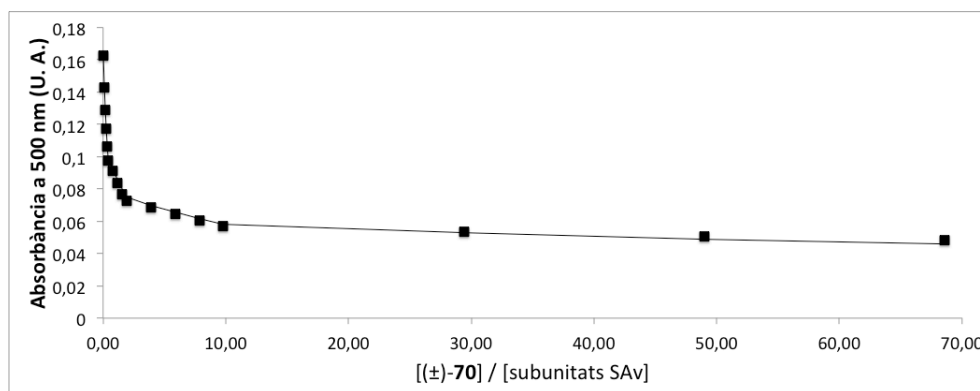


Figura 58. Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració d'estreptavidina (2,74 μ M en subunitats) i HABA (172 μ M) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0 amb el lligand monoivalent (\pm)-70 en tampó fosfats 0,1 M + 1 % de DMSO a pH = 7,0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 i els punts els valors experimentals.

A la Taula 9 s'indiquen els valors de K_a obtinguts per als lligands amb l'estreptavidina.

Lligand ^(a)	Enantiòmer	K_a Streptavidina (M^{-1})	ΔG ($kJ \cdot mol^{-1}$)	ES
	(+)-98	$(8,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$ ^(b)	$-38,6 \pm 0,1$	9
	(-)-98	$(8,6 \pm 0,4) \cdot 10^5$ ^(b)	$-33,2 \pm 0,2$	
	(+)-78	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$ ^(b)	$-35,9 \pm 0,2$	210
	(-)-78	$(1,0 \pm 0,8) \cdot 10^4$ ^(b)	$-21,1 \pm 2,7$	
	70 (rac)	$(3,0 \pm 0,9) \cdot 10^4$ i $\leq 1,0 \cdot 10^3$ ^(b)	$\geq -16,8$ i $(-24,9 \pm 0,8)$	≥ 30
	(+)-7	$3,1 \cdot 10^8$ ^(c)	$-48,4 \pm 0,2$	22100

Taula 9. Valors de les constants d'afinitat obtingudes pels lligands monoivalents amb estreptavidina a pH = 7,0. L'última entrada correspon al lligand monoivalent de referència.⁹⁴
^(a)Configuració relativa. ^(b)Pel mètode de valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA a pH = 7,0. ^(c)Pel mètode de valoració espectrofluorimètrica a pH = 7,0.

Dels valors obtinguts es poden treure diverses conclusions.

Primer, en aquells casos en els quals s'ha aconseguit separar els dos enantiòmers s'observa que els enantiòmers (+) tenen una K_a més gran que els enantiòmers (-). Aquesta tendència és anàloga a l'observada en el cas de l'avidina.

També, en aquest cas, té lloc un augment de l'afinitat en passar de **70** (considerant l'enantiòmer de major afinitat) a (+)-**78** (90 vegades) i a (+)-**98** (270 vegades). Tot i això, l'augment no és tan gran com en el cas de l'avidina. Això podria ser degut al nombre d'interaccions per pont d'hidrogen que pot formar la cadena lateral amb l'estreptavidina, que podria ser menor que les que formés amb l'avidina. En el cas dels complexos de la biotina s'ha vist que la cadena lateral forma cinc interaccions per pont d'hidrogen amb l'avidina i només dues amb l'estreptavidina (Figura 5, Pàgina 6). De fet, aquest últim ((+)-**98**) és el lligand amb major afinitat per a l'SAv, de manera que no es pot descartar que un lligand amb un metilè de més a la cadena lateral tingui una afinitat encara major per a l'SAv.

D'altra banda, les enantioselectivitats de **78**, **98** i **70** en la seva complexació a SAv (de 210 en el millor dels casos) són inferiors a les observades en els complexos amb Av (de 1800 en el millor dels casos) i això podria ser degut també al fet que el nombre d'interaccions per pont d'hidrogen que podria formar el carboxilat del lligand amb l'Av fos major que les que podria formar amb la SAv.

Igual que en el cas de l'Av, el lligand amb cadena lateral de tres metilens (**78**) també és el que presenta major enantioselectivitat amb l'SAv, i la justificació també podria ser similar. És a dir, una cadena lateral amb tres metilens probablement ja és prou llarga com perquè el carboxilat pugui establir interaccions per pont d'hidrogen amb els mateixos residus amb els que ho fa la biotina, però només si l'estereoquímica és l'adequada (enantiòmer-(+)). Aleshores, un petit augment de només un metilè en la longitud de l'espaiador, ja fa que l'enantioselectivitat baixi molt, degut probablement al fet que els carboxilats d'ambdós enantiòmers ja poden formar interaccions per pont d'hidrogen amb els residus de l'estreptavidina.

Finalment, en el cas de l'estreptavidina, el fet de passar d'un lligand amb dos grups *ureido* a cada cicle (lligand (+)-**7**) a un lligand amb un únic grup *ureido* en un dels cicles (lligands (+)-**78** i (+)-**98**) ha provocat una disminució en l'afinitat, de manera que les interaccions que s'estableixen entre aquests últims i l'estreptavidina no són tan bones

com en el cas dels lligands de tipus diurea bicíclica [3.3.1]. No obstant, s'haurien de determinar les K_d de (+)-**78** i (+)-**98** pel mètode de fluorescència de manera que la comparació amb la K_d de (+)-**7** fos més significativa.

4.5 Conclusions sobre els lligands monovalents

S'han sintetitzat tres nous lligands monovalents (**78**, **98**, **70**) amb una estructura de tipus biciclo[3.3.1] amb una urea en un dels cicles i una cadena lateral d'àcid carboxílic de diferents longituds en l'altre cicle.

S'han determinat les constants d'afinitat dels lligands monovalents **78**, **98** i **70** per a les proteïnes Av i SAV i s'ha observat que, en tots els casos en els que s'han pogut separar els enantiòmers, el (+) presenta una major afinitat que el (-), tant per a l'Av com per a l'SAv.

En el cas de l'Av el lligand de major afinitat és el (+)-**78** ($K_a = 2,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, lligand amb cadena lateral de 3 metilens), però per a l'SAv és el (+)-**98** ($K_a = 8,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, lligand amb cadena lateral de 4 metilens). Aquestes afinitats son superiors a les que presentaven les diurees bicíclics de tipus [3.3.1], només en el cas de l'avidina. Per a ambdues proteïnes, el lligand que presenta majors enantioselectivitats (*ES*) es el lligand **78** (cadena lateral de tres metilens).

5 Part experimental

5.1 Materials i mètodes

Els dissolvents usats com a medi de reacció han estat purificats i assecats, si calia, segons els mètodes estàndard.¹⁷⁹ Els dissolvents emprats en cromatografia (clorur de metilè, acetat d'etil, metanol) es van purificar per destil·lació, excepte l'hexà.

L'avidina emprada era en forma de pols liofilitzat sense sals de la marca *Invitrogen*. L'estreptavidina emprada s'ha adquirit de *Sigma-Aldrich*. La resta de reactius i dissolvents es van utilitzar directament a no ser que s'especifiqui el contrari.

Les reaccions sota atmosfera inert es van dur a terme sota N₂ o Ar.

Les cromatografies en capa prima (CCP) es van fer utilitzant una fase estacionària de gel de sílice sobre suport d'alumini de 0,25 mm de gruix (F254). La fase mòbil és la indicada en cada cas. Es van revelar amb llum UV (254 nm) / activitat de fluorescència (365 nm) o solució de permanganat o immersió en atmosfera de Cl₂ i revelat amb solució de 4,4'-metilenbis(N,N-dimetilanilina) (TDM) o revelador d'ansaldehid.

Per a les cromatografies en columna o flash es va utilitzar gel de sílice 60 (0,040- 0,063 mm) de la marca *Merck*.

Els espectres de ressonància magnètica nuclear (RMN) de ¹H (400 MHz) i ¹³C (100,6 MHz) van ser registrats en un aparell *Varian Mercury-400*. Els dissolvents deuterats emprats van ser els comercials. Els acoblaments es descriuen amb s (singlet), d (doblet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) i ampla.

Els espectres d'infraroig (IR) es van enregistrar en un aparell *Nicolet FT-IR 6700* en mode *ATR* i en alguns casos en solució de cloroform.

Els espectres UV-Visible es van realitzar amb un espectrofotòmetre *CARY 500 Scan / UV-Vis-NIR*.

Els punts de fusió es van determinar mitjançant un aparell *Kofler Reichert Thermovar* amb llum polaritzada.

Els espectres de masses s'han realitzat en un aparell *Hewlett-Packard 5890*, utilitzant la tècnica d'electrospray d'alta resolució.

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) es va dur a terme utilitzant un aparell *Shimadzu* amb bombes LC9A i LC10A i detector de *diode-array*. Les columnes utilitzades van ser una *Kromaphase C18* (30 x 0,46 cm Ø) i *Kromasil C18* (15 x 4,5 cm Ø). La columna amb fase estacionària quiral va ser una *Chirobiotic T* (30 x 0,21 cm Ø).

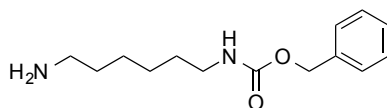
Les mesures de pH es van dur a terme mitjançant un pH-metre *Cyberscan 510*.

Quant a les reaccions en microones, s'ha treballat amb l'aparell monomode MW *Biotage* amb capacitat per a un reactor amb volum de 0,5-10 mL, el qual pot treballar a un màxim de 20 bars i a 250 °C.

Els valor de rotació òptica van ser mesurats a temperatura ambient (25 °C) en un polarímetre *Perkin Elmer 241 MC*. Les mesures van ser preses a 589 nm (línia D del sodi) en una cel·la de 1 dm de longitud i 1 mL de capacitat.

5.2 Lligands divalents semi-rígid

Síntesi del compost 14¹²⁵



Es dissolen 5,85 g d'1,6-hexandiamina (50,3 mmol) en 15 mL d'aigua i s'afegeixen 19,05 g d'àcid p-toluensulfònic (100,1 mmol) dissolts en 10 mL d'aigua obtenint-se pH = 3. S'addicionen 50 mL d'etanol i s'agita a 25 °C durant 10 minuts. Seguidament s'addiciona durant 15 minuts una solució de 6,3 mL de cloroformiat de benzil (45 mmol) en 15 mL de dimetoxietà, d'aquesta manera s'evita al màxim la possible diprotecció. Finalitzada l'addició, es controla el que el pH es mantingui entre 3,5 i 4,5 afegint solució d'acetat de sodi al 25 % (p/v) si baixa molt, per neutralitzar el HCl que es genera. Al cap de 60 minuts el pH és constant i es deixa 1 hora més. Passat aquest temps s'evapora el dissolvent i el cru es redissol en aigua. Es filtra al buit obtenint-se un sòlid (producte diprotegit) (555 mg). El filtrat es basifica amb solució aquosa de NaOH al 40 % i s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 75 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄,

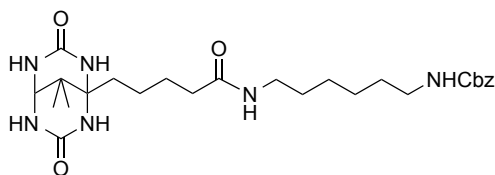
es filtra i evapora. S'observa que encara queda producte diprotegit (**13**) que en fer més rentats no marxa. S'obté així el producte (3,568 g, 14,25 mmol) amb un rendiment del 32 %, lleugerament impurificat amb diprotegit.

Cera blanca

CCP (SiO₂; MeOH/NH₃(35 % aq) 9:1) R_f = 0,30

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1,31-1,51 (8H, m, CH₂), 2,65 (2H, t, J = 6,6 Hz, CH₂NH₂), 3,17 (2H, dt, J_d = 6,6 Hz, J_t = 6,6 Hz, CH₂NHCbz), 4,65 (1H, s, ampla, NH), 5,08 (2H, s, CH₂Ar), 7,33 (5H, m, Ar-H)

Síntesi del compost **15**⁹⁴



Es dissol el compost **10** (604 mg, 2,00 mmol) en 50 mL de DMSO anhidre i s'addiciona DPPA (844 mg, 3,01 mmol) i NEt₃ (0,4 mL, 3 mmol). En un altre matràs es dissol el 6-aminohexilcarbammat de benzil (**14**) (840 mg, 1,68 mmol) en 10 mL de DMSO anhidre i s'addiciona sobre la mescla anterior a través de cànula. La barreja s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de N₂ durant 2 dies. Aleshores s'evapora el DMSO a pressió reduïda. El cru de reacció es redissol en CH₂Cl₂ i s'extreu amb HCl 2 M (2 x 50 mL) i NaOH aquós al 40 % (2 x 50 mL) per tal d'eliminar sals de trietilamoni i de DPPA. La fase orgànica s'asseca amb Na₂SO₄, es filtra i s'evapora a sequedat i el cru resultant es purifica per cromatografia *flash* (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH, des de 100 % CH₂Cl₂ fins a 3:2). S'obté el producte desitjat impurificat amb DPPA ja que tots dos compostos tenen una polaritat molt similar. La purificació es pot dur a terme amb èxit per cristal·lització en aigua: s'addicionen 20 mL d'aigua obtenint-se una suspensió blanca que se centrifuga a 1500 rpm durant 10 minuts. Seguidament es dissol el sòlid en 600 mL d'aigua a 80 °C, es filtra en calent i es deixa cristal·litzar durant 14h a 4 °C, es

decanta i la suspensió del fons se centrifuga. Les aigües de la centrifugació es poden reconcentrar per provocar més cristal·lització. Finalment s'obtenen 291 mg de producte (0,563 mmol) que representen un rendiment del 28 %.

Sòlid blanc

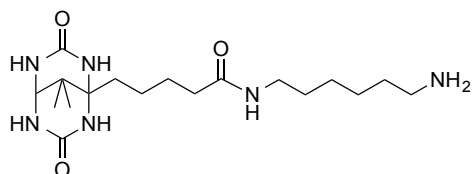
CCP (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH 2:1) R_f = 0,30

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) 1,24 (6H, s, CH₃), 1,37 (4H, m, CH₂), 1,53 (6H, m, CH₂), 1,67 (2H, m, CH₂), 1,77 (2H, m, CH₂), 2,65 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH₂CO), 3,14 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH₂NHCbz), 3,19 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH₂NH), 4,09 (1H, s, CH), 5,09 (2H, s, CH₂Ar), 7,36 (5H, m, Ar-H)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1129, 1254, 1455, 1538, 1651 (C=O), 1697 (C=O), 1857, 1930, 3079, 3240, 3310

HPLC (Kromasil C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 35:65) t_r = 13,7 min

Síntesi del compost 16



Es dissolen 62 mg (0,12 mmol) del compost **15** en 15 mL de MeOH i es purga la solució amb N₂. S'addicionen 6 mg de Pd/C i es purga amb més N₂. Es bombolleja H₂ durant 1 h amb forta agitació. Després es deixa en atmosfera d'hidrogen durant 14 h. Llavors, es comprova perquè no queda reactiu de partida per CCP. Es filtra el cru sobre *Celite* i s'evapora el dissolvent, s'obtenen 42 mg (0,11 mmol) de producte, que suposen un 92 % de rendiment.

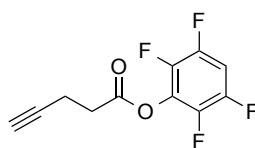
Film transparent

CCP (SiO₂; MeOH/NH₃(35 % aq) 9:1) R_f = 0,35

¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) 1,24 (6H, s, CH₃), 1,37 (4H, m, CH₂), 1,53 (6H, m, CH₂), 1,67 (2H, m, CH₂), 1,77 (2H, m, CH₂), 2,27 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CO), 2,71 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂-NH₂), 3,21 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂-NH), 4,10 (1H, s, CH)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1129, 1204, 1309, 1530, 1640 (C=O), 1692 (C=O), 2860, 2933, 3075, 3232 (ampla)

Síntesi del compost 17¹²⁶



Sobre una suspensió de DCC (6,126 g, 29,41 mmol) i àcid 4-pentinoic (1,375 g, 13,63 mmol) en 25 mL de THF anhidre s'addicionen 4,588 g (27,61 mmol) de 2,3,5,6-tetrafluorofenol dissolts en 10 mL de THF anhidre. La mescla s'agita a temperatura ambient i sota atmosfera de N₂ durant 16 h. Passat aquest temps s'afegeix a la barreja solució aquosa 0,1 M d'àcid acètic per formar la DCU (que precipita en el medi) corresponent a l'excés de DCC. La suspensió es filtra, i es renta el precipitat amb més THF. El dissolvent del filtrat s'evapora a sequedat i es redissol en hexà, on s'observa un nou precipitat (més DCU), que es torna a filtrar i rentar amb més hexà. El filtrat es renta amb H₂O (40 mL) i la fase orgànica s'asseca amb MgSO₄, es filtra i s'evapora a sequedat. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt 99:1). S'aïllen 2,875 g de producte (11,72 mmol) que representen un 86 % de rendiment.

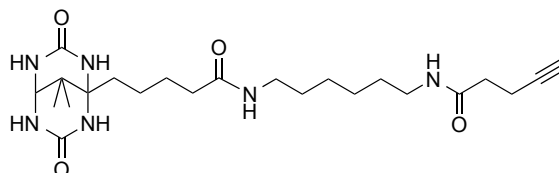
Sòlid blanc

CCP (SiO₂; hexà/AcOEt 95:5) R_f = 0,45

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 2,56 (2H, td, *J*_t = 6,9 Hz, *J*_d = 2,7 Hz, HC≡CCH₂CH₂), 2,90 (1H, t, *J*_t = 2,7 Hz, HC≡C), 3,00 (2H, t, *J*_t = 6,9 Hz, CH₂CH₂COOAr), 7,94 (1H, tt, *J*_t = 10,9 Hz, *J*_t = 7,4 Hz, Ar-H)

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1098, 1185, 1268, 1280, 1379, 1410, 1437, 1485, 1512, 1525, 1788 (C=O), 2943 3091, 3301

Síntesi del compost 18



Es dissolen 170 mg (0,444 mmol) de l'amina **16** en 100 mL de DMF anhidra, cal *sonicar* i escalfar lleugerament per acabar de dissoldre-la. D'altra banda es dissolen 175 mg (1,60 mmol) de l'ester activat **17** en uns altres 50 mL de DMF anhidra. S'addiciona la segona solució sobre la primera durant 15 min i es deixa agitant sota atmosfera de N_2 durant 16 h. Passat aquest temps s'evapora el dissolvent i el cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO_2 ; AcOEt/EtOH, des de 3:7 fins a 100 % EtOH). S'obté una fracció que conté el producte impurificat. Aquesta es purifica per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; $f = 4$ mL/min; $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 50:50, $t_r = 9$ min). Finalment s'obtenen 132 mg (0,285 mmol) que representen un 65 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO_2 ; AcOEt/MeOH 1:1) $R_f = 0,40$

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 1,06 (6H, s, CH_3), 1,15-1,60 (14H, m, CH_2), 2,04 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, CH_2CONH), 2,24 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, CH_2CONH), 2,34 (2H, td, $J_t = 6,9$ Hz, $J_d = 2,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,74 (1H, t, $J_t = 2,6$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3,07-3,25 (4H, m, CH_2NHCO), 3,79 (1H, t, $J_t = 4,5$ Hz, CH), 6,53 (2H, d, $J_d = 1,9$ Hz, HNCONH), 7,01 (2H, d, $J_d = 1,9$ Hz, HNCONH), 7,72 (1H, t, $J_t = 5,5$ Hz, CONH), 7,83 (1H, t, $J_t = 5,5$ Hz, CONH)

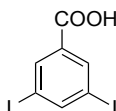
$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 100,6 MHz) δ (ppm) 14,3, 21,2, 21,6, 25,9, 26,0, 26,1, 29,1, 29,2, 33,3, 33,8, 34,2, 35,2, 38,3, 38,4, 65,8, 69,6, 71,2, 83,8, 154,5, 170,0, 171,8

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1132, 1433, 1530, 1546, 1645 (C=O), 2872, 2934, 3082, 3245, 3408

LRMS (ESI+) m/z 485,09 corresponent a $[M+Na]^+$, 947,38 corresponent a $[2M+Na]^+$

HPLC (Kromasil C18 analítica, $f = 0,8$ mL/min, $H_2O/MeOH$; 55:45) $t_r = 7,0$ min

Síntesi del compost 19¹²⁷

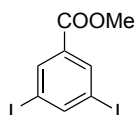


En un matràs erlenmeyer es pesen 3,001 g (19,74 mmol) d'àcid 3,5-diaminobenzoic i s'addicionen en agitació 30 mL d' H_2SO_4 concentrat. A aquesta solució gris fosca s'afegeixen 35 mL d'aigua i es posa en un bany de gel i sal a -5 °C. D'altra banda es pesen 2,932 g (42,51 mmol) de $NaNO_2$ i es dissolen en 15 mL d'aigua que es refreda en un bany de gel. Gota a gota s'addiciona la solució de nitrit a la solució sulfúrica obtenint-se una solució ataronjada. Llavors es deixa al bany a 0 °C durant 2 h. Passat aquest temps s'afegeixen 0,52 g (8,3 mmol) d'urea per destruir el nitrit sobrant. En aquest punt s'addiciona gota a gota una solució de KI (16,46 g, 99,16 mmol), moment en el qual s'observa la formació d'un precipitat marró fosc molt dens, s'afegeix més aigua freda si cal; es deixa 1,5 h més al bany sota agitació i després a temperatura ambient durant 15 h. Passat aquest temps la mescla s'escalfa a 55 °C i s'aboca sobre 200 mL d'aigua freda. La suspensió resultant es filtra, el sòlid es renta amb més aigua freda i es deixa assecar. Llavors es redissol en Et_2O i es renta amb una solució aquosa de metabisulfit de sodi al 20 % (p/v) fins que la fase aquosa sigui transparent (4 x 100 mL). La fase orgànica s'evapora i asseca i es recristal·litza en toluè. S'obté així el producte desitjat lleugerament impurificat (2,884 g, 7,712 mmol, 39 %) però prou pur per continuar amb la síntesi.

Sòlid marró

CCP (THF) $R_f = 0,70$

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1280, 1396, 1439, 1691 (C=O), 2523, 2638, 2821 (ampla)

Síntesi del compost 20

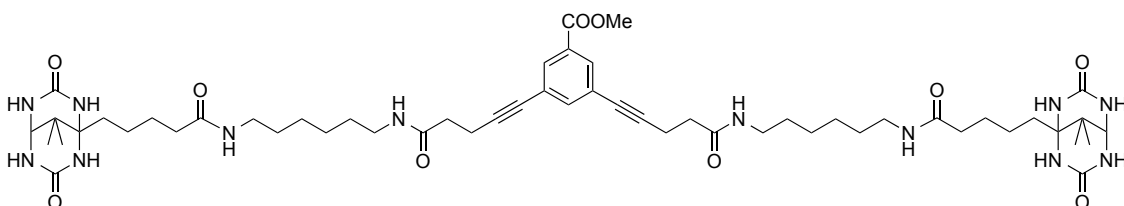
En 10 mL de MeOH es dissolen 1,034 mg (2,771 mmol) d'àcid 3,5-diiodobenzoic **19**. S'addicionen 1,2 mL (21 mmol) d'àcid sulfúric concentrat gota a gota i la mescla es porta a reflux protegit de la humitat durant 4 hores. A continuació la mescla es neutralitza amb solució saturada de NaHCO₃ i s'extreu amb CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent, s'obté el producte (1,05 g, 2,71 mmol) amb un rendiment del 98 %.

Sòlid marró

CCP (SiO₂; AcOEt) R_f = 0,75

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 3,92 (3H, s, CH₃), 8,23 (1H, t, J = 1,6 Hz, Ar-H), 8,32 (1H, d, J = 1,6 Hz, Ar-H)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1262, 1412, 1431, 1542, 1710 (C=O), 2104, 2950, 3061

Síntesi del compost 21**Purgant amb argó**

Es dissolen 10,36 mg (0,02671 mmol) de 3,5-diiodobenzoat de metil (**20**), 25,46 mg (0,05503 mmol) de l'alquí **18**, 0,95 mg (0,0014 mmol) de PdCl₂(PPh₃), 1,36 mg de PPh₃ (0,0052 mmol) i 0,48 mg de CuI (0,0025 mmol) en 3 mL de DMSO. La solució es bombolleja amb argó durant 25 minuts, llavors s'addicionen 24 μL de NEt₃ (0,17 mmol) i la mescla s'agita sota atmosfera d'argó a temperatura ambient. Se segueix l'evolució

per ^1H -RMN i s'observa que a les 48 h ja no queda material de partida. El dissolvent s'evapora i el cru es purifica per columna *flash* (SiO_2 ; AcOEt/MeOH, des de 1:1 fins a 100 % MeOH). S'obté una fracció mescla de producte més subproducte d'homoacoblament (**22**). Aquests se separen per HPL semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; $f = 4 \text{ mL/min}$; $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 35:65, $t_{r(22)} = 3,9 - 7,3 \text{ min}$, $t_{r(21)} = 7,8 - 10,9 \text{ min}$). S'aïllen així 2,7 mg de producte (0,0026 mmol, 10 % rendiment) i 9,9 mg de subproducte **22** (0,011 mmol, 39 % de rendiment).

Desgasant la solució

En un matràs tipus *Schlenk* es dissolen 42,4 mg (0,109 mmol) de 3,5-diiodobenzoat de metil (**20**), 100 mg (0,216 mmol) de l'alquí **18**, 3,8 mg (0,0054 mmol) de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)$, 6,0 mg de PPh_3 (0,023 mmol) i 2,0 mg de CuI (0,011 mmol) en 4 mL de $\text{DMSO-}d_6$. El matràs es tanca i es fa el buit per tal de treure l' O_2 de la solució i es purga amb argó, tot repetint aquest cicle diverses vegades per tal d'assegurar que no queda aire dissolt a la mescla. Finalment s'afegeix la NEt_3 a través del sèptum (100 μL , 0,714 mmol) i la mescla s'agita a 55 °C sota atmosfera d'argó. La reacció se segueix per ^1H -RMN, passats 4 dies ja no s'observa la presència de material de partida i s'evapora el dissolvent. El cru es purifica per columna *flash* (SiO_2 ; AcOEt/MeOH/DMSO, de 2:1:0 a 1:2:0,1 a 0:1:1 fins a 100 % DMSO) i s'obté una fracció que conté el producte desitjat i el subproducte d'homoacoblament **22**. El producte es purifica per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; $f = 4 \text{ mL/min}$; $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{DMSO}$, 35:65:2, $t_r = 10,5 \text{ min}$). S'obtenen 32,1 mg (0,0304 mmol) que suposen un 28 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO_2 ; AcOEt/MeOH 1:2) $R_f = 0,20$

^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 1,05 (12H, s, CH_3), 1,15-1,60 (28H, m, CH_2), 2,04 (4H, t, $J = 6,9 \text{ Hz}$, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2,35 (4H, t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 2,63 (4H, t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 2,96 (4H, m, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 3,04 (4H, m, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3,80 (1H, t, $J = 4,5 \text{ Hz}$, CH), 3,85 (3H, s, COOCH_3), 6,53 (4H, s,

NHCONHCCH₂), 7,05 (4H, d, $J = 4,5$ Hz, NHCONHCH), 7,54 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,70 (2H, t, $J = 5,5$ Hz, CH₂CH₂CH₂CONH), 7,80 (2H, d, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,93 (2H, t, $J = 5,4$ Hz, C≡CCH₂CH₂NHCO)

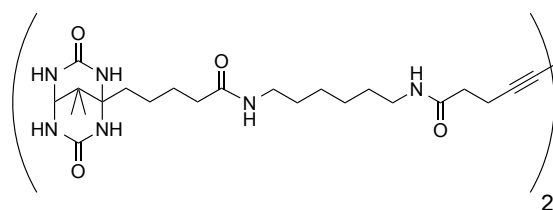
¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 15,4, 21,2, 21,6, 26,0, 26,1, 26,1, 29,1, 29,2, 33,3, 33,8, 34,2, 35,2, 38,3, 38,5, 52,6, 65,8, 69,6, 78,8, 92,1, 124,2, 130,6, 131,0, 137,5, 154,6, 164,9, 170,0, 171,9

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1015, 1125, 1233, 1631 (C=O), 1642 (C=O), 1649 (C=O), 1657 (C=O), 1692 (C=O), 2853, 2942, 3248

MALDI-MS m/z 1079,6 corresponent a $[M+Na]^+$

HPLC (Kromasil C18 analítica, $f = 0,8$ mL/min, H₂O/MeOH; 40:60) $t_r = 9,8$ min

UV-Vis ($\lambda_{\text{màx}}$ (nm), MeOH) 240 ($\epsilon = 38553$ cm⁻¹M⁻¹), 254 ($\epsilon = 22029$ cm⁻¹M⁻¹)



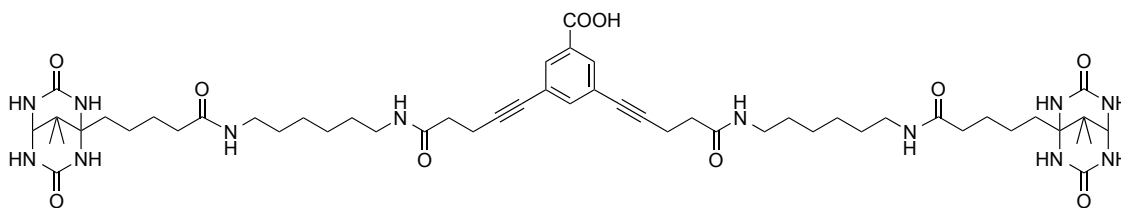
Subproducte 22:

Sòlid blanc

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,06 (12H, s, CH₃), 1,15-1,60 (28H, m CH₂), 2,05 (4H, t, $J = 6,5$ Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CONH), 2,25 (4H, t, $J = 7,2$ Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,47 (4H, m, CH₂CH₂C≡C), 3,01 (8H, m, CH₂NHCO), 3,80 (1H, t, $J_t = 4,5$ Hz, CH), 6,54 (2H, s, HNCONH), 7,05 (2H, s, HNCONH), 7,77 (1H, m, CONH), 7,90 (1H, m, CONH)

MALDI-MS m/z 945,6 corresponent a $[M+Na]^+$

Síntesi del compost 24



Es dissolen 37,4 mg (0,0354 mmol) de l'èster **21** en una dissolució de 45 mg de KOH (0,80 mmol) en 20 mL de MeOH i 5 mL d'H₂O. La solució es porta a reflux suau. Al cap de 3 h l'anàlisi de la mescla per CCP i HPLC analític no mostra presència de material de partida. El dissolvent s'evapora i s'acidifica el cru amb HCl 1 M (aprox. 10 mL) fins que s'observi una terbolesa persistent. La suspensió es recristal·litza afegint més aigua (40 mL) i MeOH si cal (400 µL en total), escalfant a 95 °C. Després de deixar precipitar el producte durant 16 h la barreja se centrifuga i s'obté així un sòlid corresponent al producte, que es liofilitza i s'asseca. Les aigües mares s'evaporen i es tornen a recristal·litzar, aquest procés es repeteix diverses vegades fins que no s'indueix més precipitació. S'obtenen, combinant els diversos productes de les recristal·litzacions, 28,0 mg de producte (0,0245 mmol) que representen un 70 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂; AcOEt/MeOH 1:2) R_f = 0,35

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,05 (12H, s, CH₃), 1,15-1,60 (28H, m, CH₂), 2,04 (4H, t, *J* = 6,8 Hz, CH₂CONHCH₂CH₂CH₂), 2,34 (4H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,63 (4H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,98 (4H, dd, *J*_d = 12,6 Hz, *J*_d = 6,6 Hz, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂DMPDU), 3,04 (4H, dd, *J*_d = 12,6 Hz, *J*_d = 6,6 Hz, CH₂NHCOCH₂CH₂C≡C), 3,80 (1H, t, *J* = 4,5 Hz, CH), 6,56 (4H, s, NHCONHCCH₂), 7,05 (4H, d, *J*_d = 4,5 Hz, NHCONHCH), 7,51 (1H, t, *J* = 1,5 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, t, *J* = 5,5 Hz, CH₂CH₂CH₂CONH) 7,78 (2H, d, *J* = 1,5 Hz, Ar-H), 7,92 (2H, t, *J* = 5,5 Hz, C≡CCH₂CH₂CONH)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 15,4, 21,2, 21,6, 26,0, 26,1, 26,1, 29,1, 29,2, 33,3, 33,8, 34,3, 35,2, 38,3, 38,5, 65,8, 69,7, 79,0, 91,8, 124,0, 130,2, 131,8, 137,1, 154,6, 166,0, 170,1, 171,9

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1129, 1204, 1437, 1539, 1652 (C=O), 1698 (C=O), 2857, 2932, 3080, 3246 (ampla)

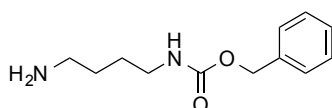
HRMS (ESI+) m/z Calculada per $\text{C}_{53}\text{H}_{77}\text{N}_{12}\text{O}_{10}^-$ [M-H]⁻ 1041,5891, trobada 1041,5862

UV-Vis ($\lambda_{\text{màx}}$ (nm), MeOH) 240 ($\epsilon = 44600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), 254 ($\epsilon = 25800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

P_f (°C) 191-192

Anàlisi elemental $\text{C}_{53}\text{H}_{78}\text{N}_{12}\text{O}_{10} \cdot 2\text{MeOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 3 \%$ matèria inert calculat (%): 56,09 C, 7,70 H, 14,27 N. Trobat (%): 56,30 C, 7,68 H, 14,23 N

Síntesi del compost 26¹²⁵



Es prepara una dissolució de 43,045 g de *p*-TsOH (220,66 mmol) en 25 mL d'H₂O. D'altra banda es dissolen 10,026 g (113,73 mmol) d'1,4-butandiamina en 35 mL més d'H₂O. S'aboca la primera solució sobre la segona i a la barreja se li afegeixen 110 mL d'EtOH i indicador de verd de bromocresol (solució de color groc). Es dissolen 26 mL de cloroformiat de benzil (180 mmol) en 60 mL de dimetoxietà i s'afegeixen a la solució de l'amina gota a gota durant 45 min mitjançant un embut d'addició. Durant el temps que dura l'addició i durant 45 min més es va controlant que el pH es mantingui entre 3,5 i 4 afegint, si cal, solució d'acetat de sodi al 25 % (p/v). Una vegada el pH roman estable la suspensió formada es filtra, s'obté un sòlid (producte de diprotecció) i el filtrat es basifica amb NaOH al 40 % (p/v) fins pH aproximadament 9. Aquesta fase aquosa s'extreu amb toluè (3 x 100 mL), les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. S'aïllen 4,425 g (19,91 mmol) de producte (18 % de rendiment)

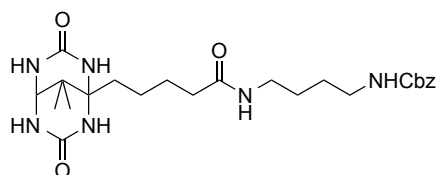
Cera blanca

CCP (SiO₂; EtOH/NH₃(35 % aq) 9:1) R_f = 0,40

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,31-1,50 (4H, m, CH₂), 2,54 (2H, m, CH₂NH₂), 2,99 (2H, dd, *J*_d = 6,6 Hz, *J*_d = 12,8 Hz, CH₂NHCbz), 4,59 (1H, s, ampla, NH), 5,0 (2H, s, CH₂Ar), 7,31 (5H, m, Ar-H)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1136, 1237, 1452, 1529, 1685 (C=O), 2857, 2935, 3328

Síntesi del compost 28



Es dissolen 4,408 g de 4-aminobutilcarbamat de benzil (**26**) (19,83 mmol) i 4,289 g (14,16 mmol) del lligand **10** en 200 mL de DMSO anhidre. Seguidament s'addicionen 6,5 mL de DPPA (28 mmol) i 6,0 mL de NEt₃ (42 mmol). La mescla s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de N₂. Se segueix l'evolució de la reacció mitjançant ¹H-RMN d'alíquotes i es comprova que passades 65 h no queda material de partida. Llavors, el dissolvent s'evapora i el cru resultant s'asseca a baixa pressió per assegurar que no quedi DMSO. La barreja resultant es recristal·litza en H₂O acidificada amb AcOH a 95 °C. Després de deixar refredar la solució s'obté un precipitat que se separa per centrifugació. Aquest sòlid correspon al producte (1,449 g, 2,966 mmol, 21 % de rendiment).

Sòlid blanc

CCP (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH 3:1) R_f = 0,40

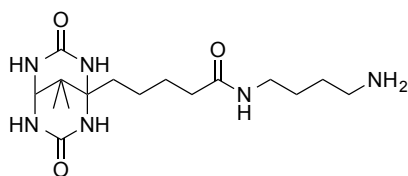
¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,05 (6H, s, CH₃), 1,43 (10H, m, CH₂), 2,04 (2H, t, *J* = 6,7 Hz, CH₂CONH), 2,99 (4H, m, CH₂NH), 3,79 (1H, t, *J* = 4,4, CH), 5,00 (2H, s, CH₂Ph), 6,51 (2H, s, NHCONHCH), 7,00 (2H, d, *J* = 4,4 Hz, NHCONHCH), 7,24 (1H, t, *J* = 5,4 Hz, NHCOOBn), 7,34 (5H, m, Ar-H), 7,73 (1H, t, *J* = 5,4 Hz, NHCOCH₂)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,2, 21,6, 26,0, 26,6, 26,9, 33,3, 33,8, 35,2, 38,1, 39,2, 65,1, 65,8, 69,6, 127,7, 128,3, 137,3, 154,5, 156,1, 171,9

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1124, 1244, 1454, 1526, 1635 (C=O), 1660 (C=O) 1732 (C=O), 2939, 3064, 3238, 3361

LRMS (ESI+) m/z 511,15 corresponent a $[M+\text{Na}]^+$, 999,44 corresponent a $[2M+\text{Na}]^+$

Síntesi del compost 29



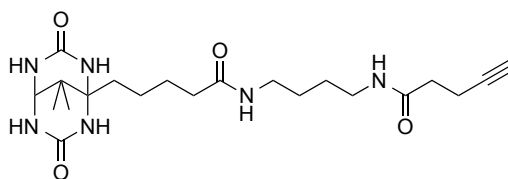
Es dissolen 104 mg (0,213 mmol) del compost **28** en 15 mL de MeOH i es purga la solució amb N_2 . S'addicionen 10 mg de Pd/C i es purga amb més N_2 . Es bombolleja H_2 durant 1 h amb forta agitació. Després es deixa en atmosfera d'hidrogen durant 16 h. Llavors, es comprova perquè no queda reactiu de partida per CCP. Es filtra el cru sobre *Celite* i s'evapora el dissolvent, s'obtenen 85 mg (0,24 mmol) de producte lleugerament impurificat, però prou pur per continuar endavant amb la síntesi.

Film transparent

CCP (SiO_2 ; MeOH/ NH_3 (35 % aq) 9:1) $R_f = 0,15$

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 1,06 (6H, s, CH_3), 1,3-1,6 (10H, m, CH_2), 2,04 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_2CONH), 2,47 (2H, m, CH_2NH_2) 3,01 (2H, dt, $J_d = 6,5$, $J_t = 6,4$ Hz, CONHCH_2), 3,79 (1H, t, $J_t = 4,5$ Hz, CH), 6,52 (2H, m, NHCONH), 7,01 (2H, m, NHCONH), 7,76 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, CONHCH_2)

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1127, 1199, 1456, 1520, 1644 (C=O), 1683 (C=O), 2930, 3067, 3226

Síntesi del compost 30

Es dissolen 65 mg (0,18 mmol) de l'amina **29** en 35 mL de DMF anhidra, *sonicant* i escalfant. D'altra banda, es prepara una dissolució de l'èster activat **17** (69 mg, 0,28 mmol) en 7 mL de DMF anhidra. S'addiciona la segona solució sobre la primera via cànula i la mescla s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de N₂. Passades 16 h es comprova que la reacció encara no és complerta i s'afegeixen 22 mg (0,089 mmol) més d'èster activat i s'escalfa la mescla a 40 °C, al cap de 2 h es comprova per CCP que no avança més. S'addicionen 39 µL de DIPEA (0,22 mmol) i es deixa reaccionar durant 16 h. Passat aquest temps ja no s'observa material de partida, llavors s'evapora la DMF i el cru es purifica per columna *flash* (SiO₂; AcOEt/EtOH, des de 1:1 fins a 100 % EtOH). S'obté una fracció que conté el producte impurificat amb gel de sílice, aquest es purifica per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 60:40, t_r = 8,5 min). S'obtenen 38 mg (0,087 mmol) de producte (71 % de rendiment).

Sòlid blanc

CCP (SiO₂; AcOEt/EtOH 1:1) R_f = 0,25

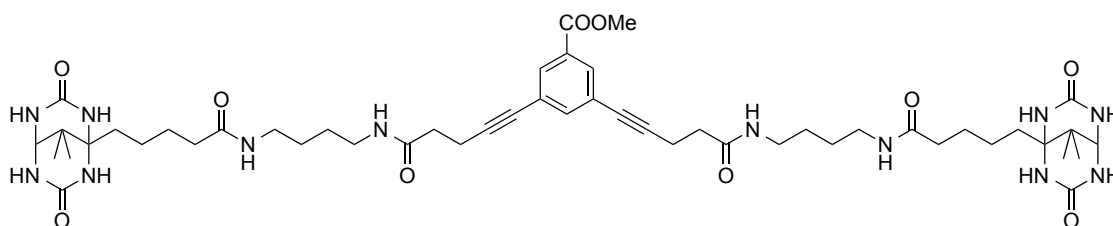
¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,06 (6H, s, CH₃), 1,30-1,60 (10H, m, CH₂), 2,04 (2H, t, J = 6,9 Hz, CCH₂CH₂CH₂CH₂CONH), 2,24 (2H, t, J = 6,9 Hz, CH₂CH₂C≡CH), 2,34 (2H, td, J_t = 6,9 Hz, J_d = 2,6 Hz, CH₂CH₂C≡CH), 2,73 (1H, t, J = 2,6 Hz, CH₂CH₂C≡CH) 3,02 (2H, m, CONHCH₂), 3,80 (1H, t, J = 4,5 Hz, CH), 6,58 (2H, s, NHCONH), 7,06 (2H, s, NHCONH), 7,76 (1H, t, J = 5,5 Hz, CONH), 7,87 (1H, t, J = 5,5 Hz, CONH)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 14,3, 21,2, 21,6, 26,0, 26,6, 26,7, 33,3, 33,8, 34,2, 35,2, 38,1, 38,3, 65,8, 69,7, 71,3, 83,8, 154,7, 170,1, 172,0

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1025, 1130, 1436, 1523, 1641 (C=O, ampla), 2255, 2930, 3070, 3323

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₂₁H₃₄N₆NaO₄ [M+Na]⁺ 457,2534, trobada 457,2551

HPLC (*Kromasil* C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 60:40) t_r = 7,3 min

Síntesi del compost 31**Via reacció de Sonogashira**

En un matràs Schlenk es dissolen 42,6 mg (0,110 mmol) de 3,5-diiodobenzoat de metil, 100 mg de l'alquí **30** (0,230 mmol), 2,2 mg de CuI (0,012 mmol), 4,0 mg de PdCl₂(PPh₃)₂ (0,057 mmol) i 6,0 mg de PPh₃ (0,023 mmol) en 3,5 mL de DMSO-*d*₆. El matràs es tanca i es fa el buit per tal de treure l'O₂ de la solució i es purga amb argó. Llavors s'addiciona la NEt₃ (97 µL, 0,69 mmol) i s'agita la mescla a 50 °C. L'avenç de la reacció se segueix per ¹H-RMN i es comprova que passades 16 h ja no s'observa presència de material de partida. S'evapora el dissolvent i el cru es purifica directament per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 41:59, t_r = 10,6 min). S'obtenen així 65,5 mg de producte (0,0654 mmol) que representen un rendiment del 60 %.

Via acoblament amb l'ester activat

Es dissolen 101 mg (0,162 mmol) del producte **32** i 158 mg de l'amina **29** (0,446 mmol) en 17 mL de DMSO anhidre i seguidament s'addicionen 75 µL de DIPEA anhidra (0,43 mmol). S'agita la mescla a 50 °C sota atmosfera inert de N₂. Al cap de 16 h un control per CCP indica que encara no ha acabat la reacció i s'afegeixen 20 µL de DIPEA més (0,11 mmol). Passades 72 h en total s'evapora el dissolvent i la mescla es dissol en una barreja de MeOH/H₂O 6:4 (23,8 mL). S'observa que part no és soluble i se separen sobrenedant de precipitat. Es torna a repetir l'operació amb aquest precipitat obtingut i els sobrenedant s'ajunten i s'evaporen a sequedat. De la mescla resultant s'aïlla el producte per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 41:59, t_r = 10,6 min). S'obtenen 129 mg (0,129 mmol), que representen un 80 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂; AcOEt/MeOH 1:2) R_f = 0,15

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,05 (12H, s, CH₃), 1,15-1,60 (20H, m, CH₂), 2,02 (4H, t, *J* = 6,7 Hz, CCH₂CH₂CH₂CH₂CONH), 2,34 (4H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,61 (4H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,97 (4H, m, CCH₂CH₂CH₂CH₂CONHCH₂), 3,04 (4H, m, CH₂NHCOCH₂CH₂C≡C), 3,78 (1H, t, *J* = 4,5 Hz, CH), 3,85 (3H, s, COOCH₃), 6,58 (4H, s, NHCONHCCH₂), 7,05 (4H, m, NHCONHCH), 7,53 (1H, t, *J* = 1,6 Hz, Ar-*H*), 7,71 (2H, t, *J* = 5,6 Hz, CH₂CH₂CH₂CONH), 7,77 (2H, d, *J* = 1,6 Hz, Ar-*H*), 7,93 (2H, t, *J* = 5,6 Hz, C≡CCH₂CH₂NHCO)

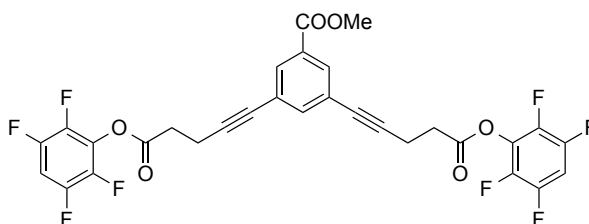
¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 15,4, 21,2, 21,6, 26,0, 26,7, 26,7, 33,3, 33,8, 34,2, 35,2, 38,1, 38,3, 52,6, 65,8, 69,6, 78,7, 92,2, 124,2, 130,6, 130,9, 137,5, 154,7, 164,9, 170,1, 171,9

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1121, 1236, 1435, 1515, 1643 (C=O, ampla), 1726, 2324, 1931, 3246

MALDI-MS *m/z* 1023,6 corresponent a [M+Na]⁺

HPLC (Kromasil C18 analítica, *f* = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 41:59) *t_r* = 7,3 min

UV-Vis (λ_{màx} (nm), MeOH) 240 (ε = 48400 cm⁻¹M⁻¹), 254 (ε = 27000 cm⁻¹M⁻¹)

Síntesi del compost 32

En un baló de tres boques es pesen 803 mg (2,07 mmol) del 3,5-diiodobenzoat de metil (**20**), 1274 mg (5,175 mmol) de l'ester activat (**17**), 72 mg (0,10 mmol) de PdCl₂(PPh₃)₂, 39 mg (0,20 mmol) de CuI i 107 mg (0,195 mmol) de PPh₃. El sistema es proveeix d'un refrigerant tipus *Liebig* i es purga amb argó. S'addicionen seguidament, 60 mL de THF anhidre i 1,88 mL (13,4 mmol) de NEt₃. La mescla s'agita a temperatura

de reflux. L'evolució se segueix per CCP i al cap de 16 h s'observa que encara queda material de partida. S'afegeix 1 mL de NEt_3 més (7 mmol). Passades 72 h s'observa que no queda material de partida, però es detecten traces del subproducte de monosubstitució (**33**). El cru es filtra sobre *Celite* i es renta amb Et_2O . La barreja es purifica per cromatografia *flash* (SiO_2 ; hexà/ AcOEt , de 98:2 fins a 9:1). S'obté el producte amb un millorable 31 % de rendiment (405 mg, 0,649 mmol).

Sòlid blanc

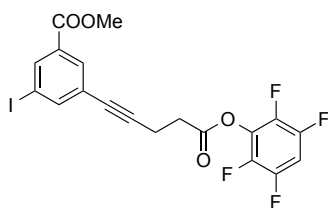
CCP (SiO_2 ; hexà/ AcOEt 8:2) $R_f = 0,40$

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 2,86 (4H, t, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COAr}$), 3,13 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, CH_2COAr), 3,85 (3H, s, CH_3), 7,57 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,84 (2H, d, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,93 (1H, tt, $J_t = 10,9$ Hz, $J_t = 7,4$ Hz, TFP-H)

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100,6 MHz) δ (ppm) 14,7, 32,1, 52,5, 79,2, 90,4, 104,5, 123,9, 130,7, 131,2, 137,5, 139,9, 145,6, 164,7, 168,2

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1107, 1236, 1487, 1521, 1717, 1780, 2841, 2923, 2955, 3063

LRMS (ESI+) m/z 642,12 Corresponent a $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$



Subproducte **33**:

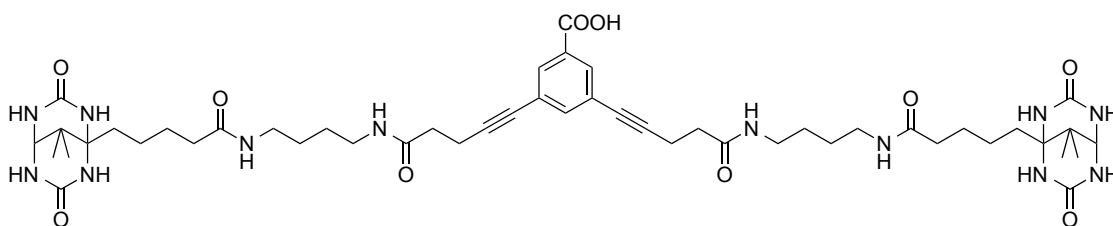
Oli groc

CCP (SiO_2 ; hexà/ AcOEt 9:1) $R_f = 0,30$

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 2,88 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, CH_2), 3,01 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, CH_2), 3,70 (3H, s, CH_3), 7,01 (1H, m, TFP-H), 7,91 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,02 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,28 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H)

LRMS (ESI+) m/z 528,96 corresponent a $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Síntesi del compost 25



Es dissolen 115,8 mg de l'èster **31** (0,1157 mmol) en 15 mL de MeOH i una dissolució de 115 mg de KOH (2,05 mmol) en 3 mL d'aigua. La mescla s'agita a reflux. Després de 16 h s'observa, mitjançant un anàlisi d'una alíquota de la barreja de reacció per HPLC, que no queda material de partida. El dissolvent s'evapora i es redissol en HCl 0,2 M fins pH entre 1 i 2 (25 mL) però no s'observa cap precipitat. S'evapora el dissolvent un altre cop i el cru es recristal·litza en H₂O, en refredar s'observa l'aparició d'un sòlid que precipita. Les aigües mares se separen del sòlid i s'evaporen i assequen. El sòlid es torna a recristal·litzar, precipitar i centrifugar. S'obtenen, després de liofilitzar-lo, 65 mg de producte (0,066 mmol), que representen un 57 % de rendiment (sense recuperar més producte de les aigües mares)

Sòlid blanc

CCP (SiO₂; AcOEt/MeOH 1:2) R_f = 0,20

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,05 (12H, s, CH₃), 1,20-1,60 (20H, m, CH₂), 2,02 (4H, t, *J* = 6,9 Hz, CCH₂CH₂CH₂CH₂CONH), 2,34 (4H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,61 (4H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂C≡C), 2,97 (4H, m, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂DMPDU), 3,02 (4H, m, CH₂NHCOCH₂CH₂C≡C), 3,78 (1H, t, *J* = 4,5 Hz, CH), 6,54 (4H, d, *J* = 2,1 Hz, NHCONHCH₂), 7,03 (4H, dd, *J*_d = 4,4 Hz, *J* = 2,1 Hz, NHCONHCH), 7,50 (1H, t, *J* = 1,6 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂CH₂CH₂CONH) 7,77 (2H, d, *J* = 1,6 Hz, Ar-H), 7,92 (2H, t, *J* = 5,4 Hz, C≡CCH₂CH₂CONH)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 15,4, 21,2, 21,6, 26,0, 26,7, 26,7, 33,3, 33,8, 34,2, 35,2, 38,1, 38,3, 65,8, 69,6, 78,8, 91,8, 124,0, 131,1, 131,8, 137,1, 154,6, 165,0, 170,1, 171,9

IR v (ATR, cm⁻¹) 1124, 1200, 1439, 1522, 1645 (C=O, ampla), 2944, 3255

HRMS (ESI+) m/z Calculada per $C_{49}H_{69}N_{12}O_{10}$ $[M+Na]^+$ 985,5265, trobada 985,5278

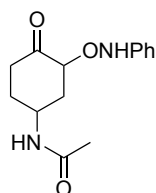
HPLC (Kromasil C18 analítica, $f = 0,8$ mL/min, $H_2O/MeOH$; 41:59) $t_r = 5,0$ min

5.3 Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques competitives dels lligands divalents

Les valoracions espectrofotomètriques competitives es van dur a terme en una cel·la de petit volum inicial (aprox. 80 μ L) i d'1 cm de pas de llum. Es van addicionar alíquotes de dissolucions de lligand (entre 0,7 i 1,8 μ M) en tampó fosfats 0,1 M de pH = 7,0 amb un 1 % de DMSO sobre una dissolució de proteïna (entre 0,7 i 1,4 μ M en bis-subunitats) i HABA 112 μ M en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0. Es va enregistrar l'espectre d'absorció entre 200 i 800 nm després de cada addició i homogeneïtzació de la barreja. Els valors de l'absorbància a 500 nm després de cada addició es van ajustar per mínims quadrats als valors calculats segons el model d'unió divalent 1:1 (Apartat 3.4.1.1, Pàgina 47) i, d'aquí es van obtenir els valors de les constants d'afinitat.

5.4 Lligands monovalents quirals

Síntesi del compost **37**¹⁴⁰



Es dissolen 192 mg (1,20 mmol) de 4-acetamidociclohexanona (**36**) i 10,4 mg (0,0910 mmol) d'L-prolina en 2,7 mL de DMF. La solució es refreda en un bany de gel-aigua-sal a -10 °C. D'altra banda es prepara una dissolució de 67 mg de nitrosobenzè (0,610 mmol) en 1 mL de DMF. Aquesta última s'addiciona sobre la primera sota agitació constant durant 3 h mantenint la baixa temperatura. Passat aquest temps la barreja es deixa agitant 1 h fins que arriba a 0 °C. Llavors, s'addiciona solució aquosa saturada de NH_4Cl i s'extreu amb AcOEt (3 x 10 mL) Les fases orgàniques combinades s'assequen amb $MgSO_4$, es filtren i s'evaporen. El cru obtingut

es purifica per columna flash (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3). S'obtenen dues fraccions corresponents a cada un dels diastereòmers (A i B sense assignar) del producte desitjat **37** (una de 54 mg, 0,204 mmol, 33 % de rendiment i una altra de 29 mg, 0,112 mmol, 18 % de rendiment), així com una fracció corresponent al subproducte **38**.

Diastereòmer A:

Oli groguenc

CCP (SiO_2 , AcOEt) $R_f = 0,20$

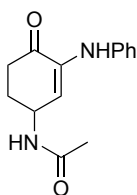
$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 1,50 - 1,70 (1H, m, CHH), 1,82 (1H, m, CHH), 1,99 (3H, s, CH_3), 2,27 (1H, m, CHH), 2,49 (1H + 1H, m, CHH + CHH), 2,65 (1H, m, CHH), 4,42 (1H, m, CHNHCOCH_3), 4,49 (1H, dd, $J_d = 12,2$ Hz, $J_d = 6,2$ Hz, CHONHPh), 5,53 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, CHNHCOCH_3), 6,90 - 7,30 (5H, m, Ar-H), 7,77 (1H, s, ONHPh)

Diastereòmer B:

Oli groguenc

CCP (SiO_2 , AcOEt) $R_f = 0,20$

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 1,90 - 2,00 (1H, m, CHH), 2,04 (3H, s, CH_3), 2,13 (1H, m, CHH), 2,29 (1H + 1H, m, CHH + CHH), 2,44 (1H, m, CHH), 2,67 (1H, m, CHH), 4,38 (1H, dd, $J_d = 8,7$ Hz, $J_d = 5,5$ Hz, CHONHPh), 4,52 (1H, m, CHNHCOCH_3), 5,59 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, CHNHCOCH_3), 6,80 - 7,30 (5H, m, Ar-H), 7,60 (1H, s, ONHPh)



Subproducte **38**:

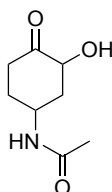
Oli groguenc

CCP (SiO₂, AcOEt) R_f = 0,30

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,90 (1H, m, CHH), 2,00 (2H, m, CH₃), 2,33 (1H, m, CHH), 2,55 (1H, m, CHH), 2,70 (1H, m, CHH), 4,96 (1H, m, CHNHCOCH₃), 5,65 (1H, d, *J* = 7,4 Hz, NHCOCH₃), 6,26 (1H, d, *J*_d = 3,8 Hz, C=CH), 6,44 (1H, ampla, NHPH), 6,80 - 7,30 (5H, m, Ar-H)

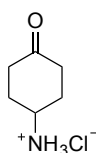
LRMS (ESI+) *m/z* 267,12 corresponent a [M+Na]⁺

Intents de síntesi del compost 39¹⁴⁰



Es dissolen 15 mg (0,057 mmol) del compost **37** (mescla dels dos diastereòmers) en 1 mL de MeOH i es porta la barreja a 0 °C. A part, es prepara una suspensió de CuSO₄ (3,0 mg, 0,019 mmol) en 0,4 mL de MeOH. Aquesta última s'addiciona sobre la primera. La barreja resultant s'agita durant 16 h a 5 °C. Passat aquest temps, s'addiciona solució aquosa saturada de NH₄Cl i s'extreu amb CH₂Cl₂ (1 x 15 mL) i AcOEt (3 x 15 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evaporen. S'obté una mescla complexa on no es detecta ni material de partida ni producte esperat.

Síntesi del compost 40¹⁴¹



Es dissolen 8,568 g (55,2 mmol) de 4-acetamidociclohexanona en 400 mL d'una dissolució 6 M de HCl. Aquesta solució es porta a reflux i es manté així durant 16 h.

Seguidament s'evapora el dissolvent i el sòlid resultant s'asseca al buit. L'anàlisi d'aquest cru per $^1\text{H-RMN}$ revela una conversió quantitativa del material de partida en producte i cap altra impuresa orgànica. S'obté així el producte en forma de sòlid marró (10,920 g, puresa del 75 %, 55,77 mmol).

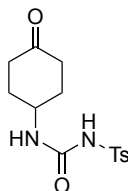
Sòlid marró

CCP (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (35 % aq) 8:2:0,2) $R_f = 0,70$

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 1,80 (2H, m, $\text{CHHCHNH}_3\text{CHH}$), 2,20 (2H, m, $\text{CHHCHNH}_3\text{CHH}$), 2,29 (2H, m, CHHCOCHH), 2,44 (2H, m, CHHCOCHH), 3,49 (1H, m, CHNH_3), 8,38 (3H, ampla, NH_3)

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1146, 1483, 1707 (C=O), 2049, 1949 (ampla)

Síntesi del compost 35



Una dissolució de 3,000 g (15,0 mmol) del compost **40** en 100 mL CH_2Cl_2 anhidre es refreda a 0 °C en un bany de gel. Seguidament se li afegeix isocianat de *p*-toluensulfonil (3,4 mL, 21,0 mmol) i NEt_3 anhidra (4,6 mL, 33,0 mmol). La reacció s'agita a temperatura ambient durant 16 h sota atmosfera de N_2 . Llavors la reacció s'atura mitjançant l'addició d'una dissolució tampó de pH = 5. La barreja s'extreu amb més CH_2Cl_2 (5 x 100 mL), les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na_2SO_4 , es filtren i s'evaporen. El cru resultant es purifica per cromatografia en columna *flash* (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2). S'obtenen 3,294 g (10,62 mmol) del producte desitjat en forma de sòlid blanc, que representen un 71 % del rendiment. S'aïlla com a subproducte (traces) el corresponent cetil dimetilic que es forma a la columna.

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

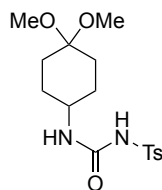
¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,64 (2H, m, CHHCHNH₃CHH), 1,92 (2H, m, CHHCHNH₃CHH), 2,18 (2H, m, CHHCOCHH), 2,39 + 2,40 (2H + 3H, m + s, CHHCOCHH + Ar-CH₃), 3,78 (1H, m, CHNHCONH), 6,54 (1H, d, *J* = 7,4 Hz, NHCONHSO₂Ar), 7,40 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,80 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 10,38 (1H, ampla, NHCONHSO₂Ar)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,0, 31,0, 38,4, 46,2, 127,3, 129,2, 137,4, 143,6, 150,8, 209,3

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1089, 1157, 1343, 1453, 1536, 1651 (C=O), 1709 (C=O), 2887, 2951, 3080, 3334

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₁₄H₁₉N₂O₄S [M+H]⁺ 311,1060, trobada 311,1063

P_f (°C) 167-169



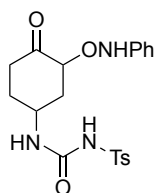
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,45

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,30 (4H, m, CH₂), 1,55 (2H, m, CH₂), 1,75 (2H, m, CH₂), 2,38 (3H, s, Ar-CH₃), 3,04 (6H, s, OCH₃), 3,55 (1H, m, CHNH), 6,37 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, NHCONHSO₂Ar), 7,40 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,76 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 10,26 (1H, ampla, NHCONHSO₂Ar)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,0, 28,1, 29,7, 46,8, 47,1, 98,6, 127,3, 129,2, 137,4, 143,6, 150,6

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1050, 1164, 1444, 1535, 1664 (C=O), 2829, 2950, 3349

LRMS (ESI+) *m/z* 379,13 corresponent a [M+Na]⁺

Síntesi del compost 41¹⁴⁰

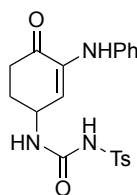
Es dissolen 158 mg (0,510 mmol) de la cetona **35** i 5,0 mg (0,043 mmol) d'L-prolina en 4 mL de DMF. La solució es refreda en un bany de gel-aigua-sal a -10 °C. D'altra banda es prepara una dissolució de 28 mg de nitrosobenzè (0,25 mmol) en 1 mL de DMF. Aquesta última s'addiciona sobre la primera sota agitació constant durant 2 h mantenint la baixa temperatura. Passat aquest temps la barreja es deixa agitant 1 h fins que arriba a 3 °C. Llavors, s'addiciona solució aquosa saturada de NH₄Cl i s'extreu amb AcOEt (3 x 15 mL) Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evaporen. El cru obtingut es purifica per columna flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1). S'obté una fracció corresponent al producte **41** (27 mg, 0,065 mmol, r.d. > 95:5, 30 % de rendiment) i una altra corresponent al subproducte **42** (23 mg, 0,057 mmol, r.d. > 95:5, 25 % de rendiment).

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,40

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,59 (1H, m, CHH), 1,74 (1H, m, CHH), 1,94 (1H, m, CHH), 2,19 (1H, m, CHH), 2,39 (3H + 1H + 1H, m, CH₃ + CHH + CHH), 3,99 (1H, m, CHNHCONHTs), 4,49 (1H, dd, *J*_d = 12,4 Hz, *J*_d = 6,0 Hz, CHONHPh), 6,59 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NHCONHTs), 6,80 - 7,30 (5H, m, Ar-H), 7,41 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,78 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 7,95 (1H, s, ONHPh), 10,53 (1H, ampla, NHCONHTs)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,0, 30,8, 31,7, 35,8, 36,9, 36,9, 45,6, 83,0, 113,5, 120,5, 127,3, 128,5, 129,4, 137,4, 143,6, 149,2, 150,8, 162,3, 207,3



Subproducte 42:

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,45

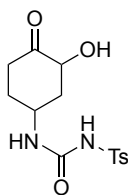
¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 2,39 (3H + 2H, m, CH₃ + CH₂), 2,60 (2H, m, CH₂), 3,99 (1H, m, CHNHCONHTs), 6,31 (1H, dd, *J*_d = 5,4 Hz, *J*_d = 4,2 Hz, C=CH), 6,70 - 7,30 (5H + 1H, m, Ar-H + NHCONHTs), 7,40 (2H, d, *J* = 7,8 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,78 (2H, d, *J* = 7,8 Hz, Ar-*H*_{metaMe})

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,0, 30,2, 43,3, 45,7, 115,2, 118,0, 120,0, 125,6, 127,3, 128,8, 128,9, 129,3, 129,4, 136,0, 137,3, 142,4, 143,7, 150,8, 193,2

IR v (ATR, cm⁻¹) 1160, 1301, 1519, 1668 (C=O), 2919, 3050, 3349

LRMS (ESI+) *m/z* 400,13 corresponent a [M+H]⁺

Síntesi del compost 43¹⁴⁰



Es dissolen 50 mg (0,12 mmol) del compost **41** en 30 mL de MeOH. Aquesta barreja es refreda a 0 °C amb un bany de gel i aigua. Paral·lelament, es forma una suspensió de CuSO₄ (7,0 mg, 0,044 mmol) en 1 mL més de MeOH que s'addiciona sobre la primera dissolució. La barreja s'agita durant 16 h a 5 °C. Passat aquest temps, s'evapora el dissolvent i el cru es redissol en solució aquosa saturada de NaCl, que s'extreu amb AcOEt (4 x 20 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evaporen. El cru obtingut es purifica per columna flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 97:3).

S'aïlla el producte (12 mg, 0,037 mmol) amb un 30 % de rendiment i una relació diastereomèrica de 9 a 1,

Diastereòmer majoritari:

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 97:3) R_f = 0,10

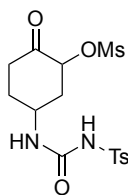
¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,49 (1H + 1H, m, CHH + CHH), 1,92 (1H, m, CHH), 2,14 (1H + 1H, m, CHH + CHH), 2,39 (3H + 1H, m, Ar-CH₃ + CHH), 3,88 (1H, m, CHNHCONHTs), 4,11 (1H, m, CHOH), 5,08 (1H, ampla, CHOH), 6,58 (1H, d, *J* = 6,6 Hz, NHCONHTs), 7,40 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,78 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 10,50 (1H, ampla, NHCONHTs)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,0, 31,9, 36,3, 40,8, 45,7, 72,0, 127,3, 129,3, 137,4, 143,6, 150,8, 209,7

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1155, 1336, 1537, 1651 (C=O), 1714 (C=O), 2889, 3078, 3330

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₁₄H₁₉N₂O₄S⁺ [*M*+H]⁺ 327,1009, trobada 327,1011

Síntesi del compost 44



Es dissolen 45 mg (0,14 mmol) de l'alcohol **43** en 10 mL de CH₂Cl₂ anhidre. Aquesta solució es porta a 0 °C mitjançant un bany de gel i aigua. Mantenint aquesta temperatura s'addicionen 48 µL de clorur de mesil (0,61 mmol) i 87 µL de NEt₃ (0,61 mmol). La barreja s'agita durant 16 h a temperatura ambient sota atmosfera de N₂. Passat aquest temps s'addiciona dissolució tamponada de pH = 5 i s'extreu amb CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren

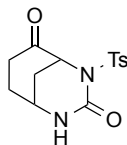
i s'evaporen. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). S'aïlla el producte (23 mg, 0,057 mmol) amb un 41 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 97:3) R_f = 0,30

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,5 - 2,5 (9H en total, m, CH₃ + 3 x CH₂), 4,23 (1H, m, CHNHCONHTs), 5,12 (1H, dd, J_d = 12,2 Hz, J_d = 6,4 Hz, CHOMs), 6,61 (1H, d, J = 6,0 Hz, NHCONHTs), 7,40 (2H, d, J = 8,3 Hz, Ar-H_{ortoMe}), 7,77 (2H, d, J = 8,3 Hz, Ar-H_{metaMe})

Intents de síntesi del compost 45



A partir del compost mesilat

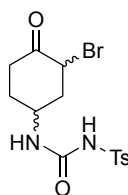
Es dissolen 9,0 mg (0,022 mmol) del compost **44** en 10 mL d'1,2-dicloroetà anhidre. A aquesta dissolució se li addicionen 5 µL (0,03 mmol) de DBU en 1 mL del mateix dissolvent. La mescla s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de N₂ durant 4 h sense que s'observi evolució. Llavors, s'escalfa a reflux durant 8 h. Passat aquest temps es deixa refredar a temperatura ambient i se li addiciona dissolució tamponada de pH = 5 i s'extreu amb CH₂Cl₂. La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄, es filtra i s'evapora. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). S'obté una fracció que pesa menys d'1 mg on es detecta presència del producte, molt impur.

Via una reacció de Mitsunobu

Es dissolen 36 mg (0,11 mmol) de l'alcohol **43** i 35 mg (0,13 mmol) de PPh₃ en 6 mL de CH₂Cl₂ anhidre. La solució es refreda en un bany de gel i aigua a 0 °C. Seguidament

s'addicionen 28 μL de DIAD (0,13 mmol) i la barreja resultant s'agita a 0 $^{\circ}\text{C}$ durant 1 h. Després es deixa arribar a temperatura ambient i es porta a reflux durant 1 h més. Un anàlisi de cru complex indica que no hi ha material de partida, però tampoc es detecta producte.

Síntesi del compost 46



Es dissolen 1,852 g (5,813 mmol) de la cetona **35** en 300 mL de CH_2Cl_2 , sonicant i escalfant. Seguidament s'afegeixen 1,4 mL de HBr (solució aquosa al 48 %, 12 mmol) i es porta la dissolució a 0 $^{\circ}\text{C}$ en un bany de gel. Paral·lelament es prepara una dissolució de Br_2 (250 μL , 4,93 mmol) en 4,1 mL de CH_2Cl_2 . S'afegeix aquesta última sobre la primera, mantenint el bany de gel, durant 1,5 h. Acabada l'addició es porta a temperatura ambient i es deixa reaccionar durant 1 h. Seguidament s'atura la reacció mitjançant l'addició d'una dissolució tamponada de pH = 5. La barreja s'extreu amb CH_2Cl_2 (4 x 100 mL), les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO_4 , es filtren i s'evapora el dissolvent. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1). S'obté una fracció de 1153 mg formada per un 91 % del producte desitjat (2,7 mmol, 55 % de rendiment) amb una relació diastereomèrica A/B de 45:55, un 6 % de producte de doble bromació (**47**) i un 3 % de producte de ciclació intramolecular **45**.

Sòlid blanc

CCP (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) Rf = 0,40

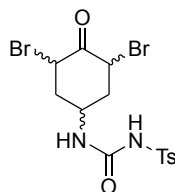
$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica sense assignar (**46_A**/**46_B**, 45:55) 1,60 – 1,85 (1H + 1H, m, COCH_2CHH **46_A** + COCH_2CHH **46_B**), 1,90 – 2,00 (1H + 1H, m, COCH_2CHH **46_A** + COCH_2CHH **46_B**), 2,04 (1H, m, CHBrCHH **46_B**), 2,21 (1H, m,

CHBrCHH **46_A**), 2,30 – 2,37 (1H + 1H, m, COCHH **46_A** + CHBrCHH **46_A**), 2,40 (1H + 3H + 3H, m + s, COCHH **46_B** + Ar-CH₃ **46_A** + Ar-CH₃ **46_B**), 2,50 (1H, m, CHBrCHH **46_B**), 2,60 (1H, m, COCHH **46_B**), 2,89 (1H, m, COCHH **46_A**), 3,96 (1H, m, CHNH **46_B**), 4,03 (1H, m, CHNH **46_A**), 4,64 (1H, dd, $J_d = 4,1$ Hz, $J_d = 4,1$ Hz, CHBr **46_A**), 5,16 (1H, dd, $J_d = 13,5$ Hz, $J_d = 6,3$ Hz, CHBr **46_B**), 6,58 (1H, m, NHCONHSO₂Ar **46_B**), 6,75 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, NHCONHSO₂Ar **46_A**), 7,42 (2H + 2H, m, Ar-*H*_{ortoMe} **46_A** + **46_B**), 7,80 (2H + 2H, m, Ar-*H*_{metaMe} **46_A** + **46_B**), 10,47 (1H, s, NHCONHSO₂Ar), 10,54 (1H, s, NHCONHSO₂Ar)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,1, 30,5 (A), 31,1 (B), 34,3 (A), 37,0 (B), 39,7 (A), 43,2 (B), 43,9 (A), 47,1 (B), 51,1 (A), 53,8 (B), 127,3, 129,4, 137,3, 143,7, 150,8, 200,5 (A), 201,9 (B)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1339, 1450, 1531, 1652 (C=O), 1687, 1716 (C=O), 2898, 3151, 3324

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₁₄H₁₈BrN₂O₄S⁺ [M+H]⁺ 389,0165, trobada 389,0163



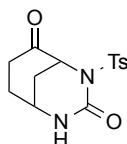
Subproducte **47**:

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,40

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) Senyals característics 3,96 (1H, m, CH_{sin2}NH), 4,04 (1H, m, CH_{sin1}NH), 4,23 (1H, m, CH_{anti}NH), 4,77 (1H, m, CH_{anti}Br), 5,15 (2H, m, CH_{sin2}Br), 5,20 (2H, m, CH_{sin1}Br), 5,68 (1H, m, CH_{anti}Br)

LRMS (ESI+) *m/z* 465,9 corresponent a [M+Na]⁺

Síntesi del compost **45**



Es dissolen 200 mg del compost bromat **46** del 91 % de puresa (0,468 mmol) en 8 mL de CH₂Cl₂ anhidre en un matràs equipat amb un refrigerant, sota atmosfera de N₂. Seguidament s'afegeixen 175 µL (1,14 mmol) de DBU i la solució es porta a reflux. Passada 1 h s'observa la presència de producte i no es detecta material de partida per ¹H-RMN, tot i que sí s'observa un 10 % de subproducte **49**. Llavors, la reacció s'atura addicionant solució tamponada de pH = 7. La fase aquosa s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 30 mL), les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1). S'aïlla el producte (82 mg, 0,27 mmol) amb un 57 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

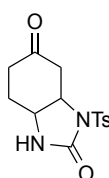
¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,85 – 2,00 (2H, m, CH₂CHNH), 2,10 – 2,25 (2H + 1H, m, CHNTsCH₂CHNH + CHHCO), 2,37 (1H, m, CHHCO), 2,38 (3H, s, CH₃), 3,58 (1H, m, CHNH), 4,75 (1H, m, CHNTs), 7,38 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,70 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 7,77 (1H, d, *J* = 4,7 Hz, NHCONTs)

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,0, 30,6, 32,8, 33,6, 44,0, 60,4, 127,9, 129,2, 136,9, 144,1, 150,1, 205,6

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1159, 1338, 1434, 1682 (C=O, ampla), 2924, 3345

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₁₄H₁₇N₂O₄S⁺ [M+H]⁺ 309,0904, trobada 309,0901

P_f (°C) 193-195



Subproducte 49:

Sòlid blanc

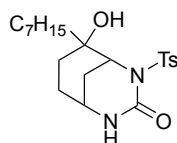
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,30

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,90 – 2,25 (5H, m, 2 x CH₂ + CHH), 2,35 (3H, s, CH₃), 2,39 (1H, m, CHH), 3,78 (1H, m, CHNH), 4,62 (1H, m, CHNTs), 7,29 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, Ar-*H*_{orthoMe}), 7,62 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 9,16 (1H, d, *J* = 4,5 Hz, NHCONTs)

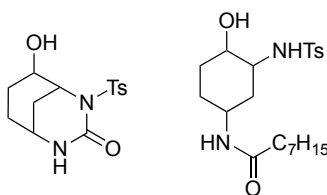
¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ (ppm) 20,9, 27,8, 31,7, 32,7, 42,9, 79,7, 126,1, 128,0, 140,8, 141,5, 155,8, 202,5

LRMS (ESI+) *m/z* 309,1 corresponent a [M+H]⁺

Intent de síntesi del compost 52



En un baló de dos boques es disposen 50 mg (2,1 mmol) de magnesi en pols i s'escalfa el baló al buit. Seguidament s'afegeixen 2 mL de THF anhidre i 1 gota de dibromoetà per activar el magnesi. S'escalfa la mescla a 50 °C i al cap de 20 minuts se li addiciona, gota a gota, una solució d'1-bromoheptà (330 µL, 2,08 mmol) en 2 mL més de THF anhidre. Acabada l'addició es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 2 h més. D'altra banda, es dissolen 25 mg de la cetona **45** (0,081 mmol) en 2 mL de THF anhidre i es porta la mescla a -78 °C. Es prenen 1,7 mL de la primera solució (aprox. un 40 %) i s'addicionen sobre la segona a -78 °C. S'agita a aquesta temperatura durant 1 h més i després es deixa arribar a temperatura ambient durant 16 h. Passat aquest temps s'addiciona HCl 2M i la fase aquosa s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 10 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, de 98:2 a 97:3). S'aïlla una fracció majoritària que correspon a una mescla dels subproductes **51** (dos diastereòmers) i **53** amb una relació aproximada de 2 a 1, que corresponen conjuntament aproximadament a un 60 % de rendiment.



Subproductes 51 i 53:

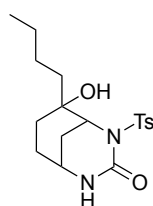
Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) Rf = 0,35

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Senyals de 51 i característics dels diastereòmers 53_A i 53_B 0,88 (3H, m, CH₂CH₃ 53_A + 53_B), 1,26 (8H, m, CH₂ 53_A + 53_B), 1,30 - 2,10 (CH₂ 51 + 53_A + 53_B), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃ 51 + 53_A + 53_B), 3,01 (1H, m, OH 51), 3,11 (1H, m, CHNHCO 53_B), 3,52 (1H, m, CHNHCO 51 + 53_A), 3,65 (1H, m, CHNHTs 53_A + 53_B), 3,81 (1H, m, CHNTs 51), 4,88 (1H, m, CHOH 51), 5,66 (1H, m, NHCO 53_A), 5,76 (1H, m, NHCO 51), 5,86 (1H, m, NHCO 53_B), 7,26 (2H, m, Ar-H 51), 7,72 (2H, m, Ar-H 53_B), 7,84 (2H, m, Ar-H 53_A), 7,97 (2H, m, Ar-H 51)

LRMS (ESI+) *m/z* 311,1 corresponent a [M+H]⁺ (51), 411,2 corresponent a [M+H]⁺ (53)

Síntesi del compost 54



Es un baló a -78 °C s'addiciona 1 mL de THF anhidre i 450 µL (2,5 M en hexà, 1,13 mmol) d'*n*BuLi. D'altra banda es dissolen 55 mg de la cetona 45 (0,181 mmol) en 4 mL de THF anhidre més. S'addiciona la segona solució sobre la primera via cànula tot mantenint la temperatura a -78 °C. La barreja s'agita durant 16 h deixant-la arribar a temperatura ambient durant aquest temps. Seguidament, s'addiciona solució aquosa tamponada a pH = 5 i la fase aquosa s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 15 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. El

cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) i s'aïllen dues fraccions corresponents als dos possibles diastereòmers del producte esperat: 22 mg (0,060 mmol) d'un d'ells (diastereòmer A) i 31 mg (0,085 mmol) de l'altre (diastereòmer B), que representen un rendiment combinat del 82 %.

Diastereòmer A:

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 0,94 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₃), 1,20 – 2,10 (12H, m, CH₂), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 2,57 (1H, m, OH), 3,53 (1H, m, CHNHCO), 4,64 (1H, m, CHNTs), 5,69 (1H, m, NHCO), 7,26 (2H, d, *J* = 7,7 Hz, Ar-H), 7,92 (2H, d, *J* = 7,7 Hz, Ar-H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 13,8, 21,4, 23,0, 24,6, 27,6, 29,9, 36,6, 45,3, 58,7, 73,5, 129,0, 130,2, 138,1, 144,5, 153,5

LRMS (ESI+) *m/z* 384,2 corresponent a [M+NH₄]⁺

Diastereòmer B:

Sòlid blanc

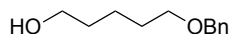
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,30

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 0,84 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₃), 1,20 – 2,35 (12H, m, CH₂), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 3,23 (1H, m, CHNHCO), 3,48 (1H, m, CHNTs), 6,60 (1H, m, NHCO), 6,81 (1H, m, OH), 7,26 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, Ar-H), 7,76 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, Ar-H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 14,0, 21,6, 23,1, 24,7, 25,9, 29,4, 37,3, 38,1, 45,8, 54,7, 85,1, 126,9, 129,8, 139,3, 143,2, 157,9

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1157, 1324, 1435, 1678 (C=O), 2929, 3359

LRMS (ESI+) *m/z* 384,2 corresponent a [M+NH₄]⁺

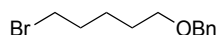
Síntesi del compost 58¹⁴⁸

Es forma una suspensió d'NaH (4,578 g, 60 % en oli mineral, 114,4 mmol) en 90 mL de THF anhidre. D'altra banda es prepara una dissolució de 10,936 g d'1,5-pentandiol (95,822 mmol) en 10 mL de THF anhidre. S'addiciona el diol sobre la suspensió d'hidrur via cànula a temperatura ambient durant 20 minuts. Acabada l'addició la mescla s'agita durant 45 minuts més. Seguidament es refreda a 0 °C i s'addiciona bromur de benzil (11,9 mL, 95,8 mmol) durant 1 h mantenint el bany a 0 °C. La barreja es deixa agitant que arribi a temperatura ambient durant 16 h. Passat aquest temps s'addiciona H₂O poc a poc i la fase aquosa s'extreu amb Et₂O (3 x 100 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. El cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1). S'obté el producte (3,414 g, 17,57 mmol) amb un 19 % de rendiment.

Oli transparent

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1) Rf = 0,30

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,40 – 1,60 (6H, m, CH₂), 3,48 (2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂OBn), 3,65 (2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂OH), 4,50 (2H, s, OCH₂Ph), 7,33 (5H, m, Ar-H)

Síntesi del compost 56¹⁴⁹

Es dissolen 4,723 g de PPh₃ (17,99 mmol) en 20 mL de CH₂Cl₂ i es porta a 0 °C. D'altra banda es dissolen 900 µL (17,6 mmol) de Br₂ en 15 mL de CH₂Cl₂ més. S'addiciona la segona solució sobre la primera via cànula, mantenint el bany a 0 °C i s'observa que es forma una suspensió groguenca. En un altre matràs es barregen 1,5 mL (18 mmol) de piridina, 3,414 g de l'alcohol **58** i 25 mL de CH₂Cl₂. Aquesta mescla s'addiciona via cànula sobre la primera durant 15 min i mantenint la temperatura a 0 °C. S'observa com gradualment es va desfent la suspensió i s'obté una solució translúcida. Es deixa la

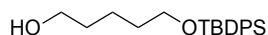
mescla en agitació arribar a temperatura ambient durant 16 h. Passat aquest temps s'observa l'aparició d'un precipitat blanc d'òxid de trifenilfosfina. El cru s'evapora a sequedat i se'n fa una suspensió afegint-hi hexà. El sòlid es filtra i es renta amb abundant hexà. El filtrat s'evapora i l'oli resultant es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt des de 99:1 fins a 98:2). S'aïlla el producte (3,966 g, 15,42 mmol) amb un 88 % de rendiment.

Oli transparent

CCP (SiO₂, hexà/AcOEt 1:1) R_f = 0,40

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,40 – 1,90 (6H, m, CH₂), 3,41 (2H, t, J = 6,8 Hz, CH₂Br), 3,48 (2H, t, J = 6,4 Hz, CH₂OBn), 4,50 (2H, s, OCH₂Ph), 7,34 (5H, m, Ar-H)

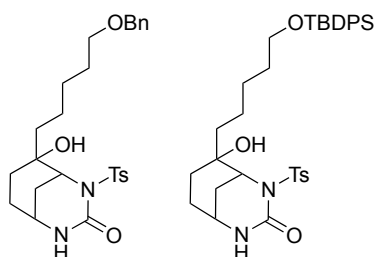
Síntesi del compost 57¹⁵⁰



Es dissolen 1,360 g (12,51 mmol) d'1,5-pentandiòl i 679 mg d'imidazol (10,0 mmol) en 5 mL de DMF anhidra. La barreja es porta a -25 °C i se li addiciona clorur de *tert*-butildifenilsilil (1,4 mL, 5,0 mmol) gota a gota durant 1 h mantenint la temperatura baixa. Acabada l'addició es deixa arribar la barreja sota agitació fins a temperatura ambient durant 16 h. Seguidament, la mescla es dilueix amb Et₂O (50 mL) i la solució orgànica resultant es renta amb H₂O (6 x 25 mL). La fase orgànica s'asseca amb Na₂SO₄, es filtra i s'evapora. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt des de 8:2 fins a 7:3). S'obté una fracció que correspon al producte (1,387 g, 4,051 mmol) amb un 81 % de rendiment i una altra corresponent al subproducte de diprotecció (254 mg, 0,437 mmol) que representa un 17 % de rendiment.

Oli transparent

CCP (SiO₂, hexà/AcOEt 8:2) R_f = 0,30

Intents de síntesi dels productes d'addició sobre el carbonil (59 i 60)***Procediment general***

Es dissol en THF anhidre el corresponent bromoderivat i es porta a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seguidament s'addiciona el $t\text{BuLi}$ gota a gota mantenint la temperatura. D'altra banda es prepara una solució de la cetona **45** en més THF anhidre i s'addiciona aquesta sobre la primera solució via cànula a baixa temperatura. La barreja es deixa arribar a temperatura ambient. Passat un temps s'addiciona solució aquosa tamponada a $\text{pH} = 5$ i la fase aquosa s'extreu amb CH_2Cl_2 (5 vegades). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO_4 , es filtren i s'evaporen. El cru resultant es purifica per columna *flash*.

A partir del compost 56:

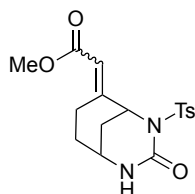
Es parteix de 130 mg del bromoderivat **56** (0,501 mmol) en 1 mL de THF. S'empren 300 μL de $t\text{BuLi}$ (1,7 M en pentà, 0,50 mmol) i 25 mg de la cetona **45** (0,081 mmol) dissolta en 4 mL de THF. Després de l'addició a baixa temperatura, es deixa arribar la barreja a temperatura ambient sota agitació i atmosfera de N_2 durant 16 h. Després de la purificació s'obté una mescla complexa on no s'observa presència del producte **59** ni de materials de partida, només producte d'hidròlisi del compost organolític generat.

A partir del compost 55:

Es parteix de 110 mg del bromoderivat **55** (0,203 mmol) en 1 mL de THF. S'empren 430 μL de $t\text{BuLi}$ (1,7 M en pentà, 0,406 mmol) i 10 mg de la cetona **45** (0,034 mmol) dissolta en 2 mL de THF. Després de l'addició a baixa temperatura, es deixa arribar la barreja a temperatura ambient sota agitació i atmosfera de N_2 durant 16 h. Després de

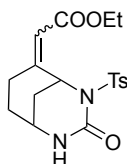
la purificació s'obté una mescla complexa on no s'observa presència del producte **60** ni de materials de partida, només producte d'hidròlisi del compost organolític generat.

Intent de síntesi del compost **64**



Es forma una suspensió de 25 mg (0,081 mmol) de la cetona **45** i 119 mg (0,340 mmol) de $\text{PPh}_3\text{CHCOOEt}$ en 3 mL de THF anhidre. La mescla s'agita fortament a temperatura ambient durant 16 h i a reflux durant 4 hores més. Passat aquest temps, s'afegeix solució tamponada de $\text{pH} = 7$ i la fase aquosa s'extreu amb CH_2Cl_2 (4 x 15 mL). S'obté un cru on no es detecta producte, només material de partida.

Síntesi del compost **65**¹⁵⁸



Es dissolen 828 mg (2,69 mmol) del compost **45** i 354 mg (8,35 mmol) de LiCl, assecat prèviament a la flama, en 53 mL de CH_2Cl_2 anhidre. La barreja es refreda a 0 °C i seguidament s'afegeix el fosfonoacetat de trietil (600 μL , 3,09 mmol). Finalment i mantenint la temperatura, s'addicionen 830 μL (5,89 mmol) de DBU gota a gota durant 20 minuts. La barreja s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de N_2 durant 16 h. Passat aquest temps s'addiciona solució aquosa tamponada a $\text{pH} = 7$. La fase aquosa s'extreu amb CH_2Cl_2 (5 x 50 mL) i les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na_2SO_4 , es filtren i s'evapora el dissolvent. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2). S'aïlla el producte (785 mg, 2,03 mmol) com a mescla

dels diastereòmers *E/Z* amb una relació 55:45 (sense assignar), que representa un rendiment del 77 %.

Sòlid blanc

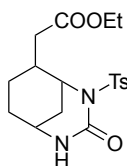
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,40

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica *E/Z* sense assignar (65_A/65_B 55:45) 1,34 (3H + 3H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₃ 65_A + 65_B), 1,55 – 2,25 (CH₂ 65_A + 65_B), 2,40 (3H + 3H, s, Ar-CH₃ 65_A + 65_B), 2,43 (2H + 2H, m, CH₂C=CHCOOEt 65_A + 65_B), 3,65 (1H + 1H, m, CHNH 65_A + 65_B), 4,15 – 4,30 (2H + 2H, m, CH₂CH₃ 65_A + 65_B), 5,07 (1H, m, CHNTs 65_B), 5,43 (1H + 1H, m, CHNH 65_A + 65_B), 5,84 (1H, m, CHCOOEt 65_A), 6,07 (1H, m, CHCOOEt 65_B), 6,55 (1H, m, CHNTs 65_A), 7,24 (2H + 2H, m, Ar-H 65_A + 65_B), 7,82 (2H + 2H, m, Ar-H 65_A + 65_B)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1211, 1345, 1684 (C=O), 1710 (C=O), 2922, 3215

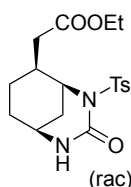
LRMS (ESI+) *m/z* 379,1 corresponent a [M+H]⁺

Síntesi del compost 66



Es dissolen 1602 mg (4,233 mmol) de l'olefina **65** en 160 mL de MeOH. Seguidament, s'addicionen 104 mg de Pd/C i es purga el sistema amb H₂. La barreja s'agita sota atmosfera d'H₂ durant 4 hores i 15 minuts a temperatura ambient. En aquest punt es filtra la suspensió sobre *Celite* i el filtrat s'evapora a sequedat. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1). S'obté una fracció formada pel producte desitjat amb una relació diastereomèrica *A/B* de 82:12 (659 mg, 1,94 mmol), una altra formada pel subproducte **67** (297 mg, 0,777 mmol), i una tercera formada per una barreja de diastereòmer majoritari (*A*) del producte desitjat (**66**) i subproducte

67. Aquesta fracció mescla es torna a purificar per cromatografia *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1) i s'obtenen dues fraccions més: una formada únicament pel diastereòmer majoritari (A) del producte **66** (411 mg, 1,08 mmol) i una altra pel subproducte **67** (140 mg, 0,366 mmol). En total, 1070 mg (3,015 mmol) del producte es van obtenir, amb una diastereoselectivitat global A/B de 90:10 i un rendiment total del 71 %. El diastereòmer minoritari (B) es va aïllar de la fracció mescla mitjançant HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 38:62, t_r = 11,9 min). La configuració relativa de cada un dels diastereòmers es va determinar per RMN mitjançant un experiment NOESY-2D.



Diastereòmer A:

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,25 (3H, t, *J* = 7,1 Hz CH₂CH₃), 1,45 (1H, m, CHHCHCH₂COOEt), 1,60 (2H, m, CHHCHCH₂COOEt + CHHCHNH), 1,74 (1H, m, CHHCHNH), 1,86 (1H, m, CHHCHNTs), 1,98 (1H, CHHCHNTs), 2,21 (1H, m, CHCH₂COOEt), 2,32 (1H, dd, *J*_d = 17,0 Hz, *J*_d = 6,8 Hz, CHHCOOEt), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 2,77 (1H, dd, *J*_d = 17,0 Hz, *J*_d = 7,5 Hz, CHHCOOEt), 3,57 (1H, m, CHNH), 4,17 (2H, m, CH₂CH₃), 4,89 (1H, m, CHNTs), 5,36 (1H, d, *J*_d = 3,9 Hz, NH), 7,27 (2H, d, *J*_d = 8,1 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,81 (2H, d, *J*_d = 8,1 Hz, Ar-*H*_{metaMe})

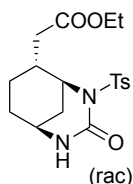
¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 14,3, 21,7, 22,4, 30,8, 32,0, 37,8, 38,4, 45,9, 54,8, 60,5, 128,5, 129,2, 137,3, 144,1, 153,3, 172,6

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1163, 1264, 1298, 1436, 1655 (C=O), 1699, 1719 (C=O), 2939, 3335

LRMS (ESI+) *m/z* 381,2 corresponent a [M+H]⁺

HPLC (*Kromasil* C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 30:70) t_r = 7,0 min

P_f (°C) 235-236



Diastereòmer B:

Sòlid blanc

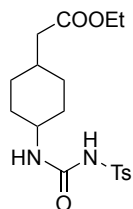
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,31 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₃), 1,40 – 2,1 (7H, m, CHCH₂COOEt + 3 x CH₂), 2,41 (3H, s, Ar-CH₃), 2,43 (1H, m, CHHCOOEt), 2,72 (1H, m, CHHCOOEt), 3,58 (1H, m, CHNH), 4,19 (2H, m, CH₂CH₃), 4,62 (1H, m, CHNTs), 4,96 (1H, m, NH), 7,30 (2H, d, *J_d* = 8,3 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,89 (2H, d, *J_d* = 8,3 Hz, Ar-*H*_{metaMe})

IR v (ATR, cm⁻¹) 1163, 1264, 1298, 1436, 1655 (C=O), 1699, 1719 (C=O), 2939, 3335

LRMS (ESI+) *m/z* 381,2 corresponent a [M+H]⁺

HPLC (Kromasil C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 30:60) t_r = 12,3 min



Subproducte 67:

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,40

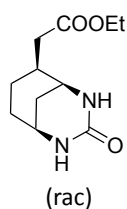
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica A/B sense assignar (67_A/67_B 60:40) 1,0 – 2,0 (24H en total, m, CH₂CH₃ (67_A + 67_B) + CHCH₂COOEt (67_A + 67_B) + 4 x CH₂ 67_A + 4 x CH₂ 67_B), 2,17 (2H, d, *J* = 6,7 Hz, CH₂COOEt 67_A), 2,25 (2H, d, *J* = 7,2 Hz, CH₂COOEt 67_B), 2,43 (3H + 3H, s, Ar-CH₃ 67_A + 67_B), 3,54 (1H, m, CHNH 67_A), 3,89 (1H, m, CHNH 67_B), 4,13 (2H + 2H, m, CH₂CH₃ 67_A + 67_B), 6,38 (1H, d, *J* = 7,9 Hz,

NHCONHTs **67_A**), 6,73 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, NHCONHTs **67_B**), 7,32 (2H + 2H, m, Ar-H **67_A** + **67_B**), 7,78 (2H + 2H, m, Ar-H **67_A** + **67_B**)

IR v (ATR, cm^{-1}) 1158, 1232, 1335, 1446, 1530, 1666 (C=O), 1727 (C=O), 2926, 3350

LRMS (ESI+) m/z 383,2 corresponent a $[M+H]^+$

Síntesi del compost 68



Emprant Mg en MeOH¹⁴⁷

En un baló de dues boques s'assequen a la flama 13 mg (0,526 mmol) de Mg en pols. D'altra banda, es dissolen 10 mg de l'èster **66** (0,026 mmol) en 3 mL de MeOH anhidre. S'addiciona la solució sobre el Mg i s'escalfa la mescla a reflux sota atmosfera d'argó. Al cap de 3 h s'observa per CCP que no queda ester de partida. Es refreda la mescla a temperatura ambient i s'evapora el dissolvent. Llavors s'addiciona al cru solució aquosa de pH = 5 i la fase aquosa resultant s'extreu amb CH_2Cl_2 (5 x 10 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO_4 , es filtren i s'evapora el dissolvent. S'obté una mescla complexa on no s'observa ni material de partida ni producte.

Emprant Na i naftalè¹⁴³

Es un matràs es pesen 23 mg de Na a trossos petits (1,0 mmol) i 128 mg de naftalè (1,0 mmol). S'addicionen 11 mL de THF anhidre i la solució s'agita a temperatura ambient. Passada 1 h s'observa com s'ha tornat de color verd fosc i es porta a -78 °C. Paral·lelament, es dissolen 63 mg (0,17 mmol) de l'èster **66** (100 % del diastereòmer A) en 11 mL de THF anhidre. S'addiciona aquesta solució sobre la primer via cànula a baixa temperatura durant 10 min. Acabada l'addició es deixa 30 min sota agitació i atmosfera de N_2 . Passat aquest temps s'observa per CCP que no queda material de

partida. La reacció s'atura addicionant a poc a poc solució aquosa de pH = 7 en fred i es deixa arribar a temperatura ambient. En aquest punt s'evapora el THF i la fase aquosa resultant s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 15 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, de 99:1 a 95:5). S'obté, així, el producte (30 mg, 0,13 mmol) amb un 80 % de rendiment.

Oli transparent

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,20

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,23 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₃), 1,40 – 1,60 (2H + 1H, m, CH₂CHCH₂COOEt + CHHCH₂CHCH₂COOEt), 1,65 – 1,80 (1H + 1H, CHHCH₂CHCH₂COOEt + CHNHCHHCHNH), 1,90 – 2,10 (1H + 1H, m, CHNHCHHCHNH + CHCH₂COOEt), 2,21 (1H, dd, *J*_d = 15,1 Hz, *J*_d = 6,6 Hz, CHHCOOEt), 2,29 (1H, dd, *J*_d = 15,1 Hz, *J*_d = 8,2 Hz, CHHCOOEt), 3,44 (1H, m, CHCHCH₂COOEt), 3,59 (1H, m, CH₂CH₂CHNH), 4,10 (2H, q, *J* = 7,1 Hz, CH₂CH₃), 5,60 (1H, m, CHCHNH), 5,75 (1H, m, CH₂CH₂CHNH)

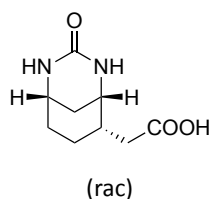
¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 14,4, 22,9, 30,2, 33,2, 38,4, 39,6, 45,3, 48,8, 60,6, 158,3, 172,6

IR v (ATR, cm⁻¹) 1152, 1175, 1449, 1518, 1676 (C=O), 1721 (C=O), 2927, 3227

LRMS (ESI+) *m/z* 227,1 corresponent a [M+H]⁺

P_f (°C) 120-122

Síntesi del compost 70



Es dissolen 28 mg (0,12 mmol) de l'ester **68** en 20 mL d'aigua i s'afegeixen 3,5 mL d'una solució aquosa d'NaOH 0,053 M (0,19 mmol). S'agita la mescla a temperatura ambient durant 3 h. Un control per CCP indica que encara queda material de partida, per tant s'afegeixen 0,7 mL de la solució d'NaOH més (0,04 mmol). Passades 16 h ja no s'observa presència de material de partida. Llavors la solució s'acidifica amb solució aquosa de HCl 2 M fins pH aproximadament 2. S'evapora l'aigua i el sòlid obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 7:3). S'obté una fracció composta pel producte impurificada amb sílice. El sòlid obtingut s'acaba de purificar mitjançant HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 85:15, t_r = 12,5 min). S'aïllen, així, 18,9 mg del producte (0,0953 mmol), que representen un 80 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 8:2) R_f = 0,15

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) 1,20 -1,90 (6H en total, m, 3 x CH₂), 2,01 (1H, m, CHCH₂COOH), 2,16 (1H, dd, J_d = 15,7 Hz, J_d = 6,9 Hz, CHHCOOH), 2,33 (1H, dd, J_d = 15,7 Hz, J_d = 7,5 Hz, CHHCOOH), 3,49 (1H, m, CHNH), 3,58 (1H, m, CHNH)

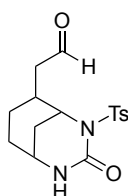
¹³C-RMN (CD₃OD, 100,6 MHz) δ (ppm) 24,0, 30,8, 34,0, 38,9, 40,7, 46,4, 49,9, 160,7, 176,3

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1228, 1401, 1536, 1633 (C=O), 1693 (C=O), 2923, 3246 (ampla)

HRMS (ESI-) m/z Calculada per C₉H₁₃N₂O₃⁻ [M-H]⁻ 197,0932, trobada 197,0930

HPLC (*Kromaphase* C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 85:15) t_r = 10,0 min

Síntesi del compost 69

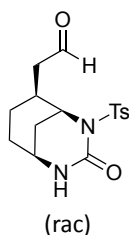


A partir de l'ester de metil 73

Es dissolen 58 mg (0,158 mmol) de l'ester **73** (un únic diastereòmer, sense assignar) en 3,8 mL de CH₂Cl₂ anhidre. La solució es porta a -78 °C i s'addiciona DIBAL (1 M en hexà) gota a gota durant 3 h (560 µL, 0,560 mmol). Seguidament, s'agita la mescla sota atmosfera de N₂ mantenint la baixa temperatura. S'addiciona en fred i poc a poc solució saturada de tartrat de sodi i potassi i es deixa arribar a temperatura ambient. La fase aquosa s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 25 mL) i les fases combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, de 98:2 a 97:3). S'aïlla el producte (25 mg, 0,074 mmol) amb un 47 % de rendiment. A més, s'obté el subproducte de *sobrerreducció* **71** (18 mg, 0,053 mmol) amb un 34 % de rendiment.

A partir de l'ester d'etil 66

Es preparen en paral·lel tres dissolucions de l'ester **66** (mescla de diastereòmers A/B 75:25) en 13 mL de CH₂Cl₂ anhidre cadascuna (142 mg, 0,374 mmol; 144 mg, 0,379 mmol; 148 mg, 0,389 mmol). Es porten a -78 °C i se les addiciona DIBAL (1 M en hexà) gota a gota (0,84 mL; 0,85 mL; 0,87 mL) durant 15 minuts. S'agiten a baixa temperatura i sota atmosfera de N₂ durant 1 h. Passat aquest temps s'addiciona MeOH (3 mL), encara en fred, i es deixen arribar a 0 °C. Llavors s'addiciona solució saturada de tartrat de sodi i potassi i es deixen agitant durant 16 h que arribin a temperatura ambient. La fase aquosa formada s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 15 mL) i les fases orgàniques combinades de totes s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. El cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, de 98:2 a 97:3). S'obté una fracció corresponent al producte derivat del diastereòmer A (257 mg, 0,764 mmol) que representa un 70 % de rendiment. D'altra banda s'obté una fracció de l'aldehid esperat provinent de l'altre diastereòmer (B) (82 mg, 0,244 mmol) que representa un 21 % de rendiment.

Diastereòmer A:**Sòlid blanc**

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

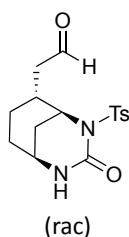
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,45 – 2,10 (6H, m, 3 x CH₂), 2,30 – 2,50 (3H + 1H + 1H, s + m, Ar-CH₃ + CHCH₂CHO + CHHCHO), 3,12 (1H, dd, J_d = 18,5 Hz, J_d = 7,8 Hz, CHHCHO), 3,58 (1H, m, CHNH), 4,78 (1H, m, CHNTs), 4,99 (1H, m, NH), 7,28 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H_{orto}Me), 7,80 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H_{meta}Me), 9,84 (1H, s, CHO)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,8, 22,5, 30,9, 32,1, 35,9, 46,2, 47,2, 54,8, 128,5, 129,3, 137,1, 144,4, 153,1, 201,0

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1165, 1440, 1650 (C=O), 1692 (C=O), 2923, 3344

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₁₆H₂₁N₂O₄S⁺ [M+H]⁺ 337,1217, trobada 337,1217

P_f (°C) 193-195 (descomposa)

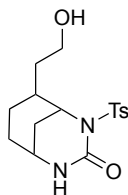
Diastereòmer B:**Sòlid blanc**

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,35

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,38 (1H, m, CHHCHCH₂CHO), 1,57 (2H, m, CH₂CH₂CHCH₂CHO), 1,76 (1H, m, CHHCHNTs), 1,87 (1H, m, CHHCHCH₂CHO), 1,97 (1H, m, CHHCHNTs), 2,41 (3H, s, Ar-CH₃), 2,53 (2H, dd, J_d = 7,3 Hz, J_d = 2,0 Hz, CH₂CHO), 2,83

(1H, m, CHCH₂CHO), 3,54 (1H, m, CHNH), 4,52 (1H, m, CHNTs), 5,81 (1H, d, *J* = 4,3 Hz, NH), 7,29 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,85 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{metaMe}), 9,79 (1H, t, *J* = 2,0 Hz, CHO)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 19,1, 21,7, 25,8, 27,1, 33,5, 44,8, 45,6, 55,0, 128,5, 129,3, 137,4, 144,3, 152,9, 200,5



Subproducte 71:

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,30

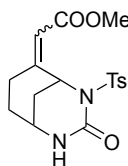
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,35 – 1,80 (5H en total, m, CH₂), 1,80 – 2,10 (4H en total, m, CH₂ + CHCH₂CH₂OH), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 3,55 (1H, m, CHNH), 3,74 (1H, m, CHHOH), 3,84 (1H, m, CHHOH), 4,83 (1H, m, CHNTs), 5,44 (1H, m, NH), 7,27 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{ortoMe}), 7,80 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{metaMe})

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,6, 22,6, 31,0, 32,3, 36,0, 38,8, 46,3, 55,7, 60,5, 128,5, 129,2, 137,4, 144,1, 153,2

IR v (ATR, cm⁻¹) 1159, 1297, 1337, 1436, 1652 (C=O), 2924, 3357

LRMS (ESI+) *m/z* 339,1 corresponent a [M+H]⁺

Síntesi del compost 72¹⁵⁸



Es dissolen 62 mg (0,19 mmol) del compost **45** i 25 mg (0,58 mmol) de LiCl, assecat prèviament a la flama, en 4 mL de CH₂Cl₂ anhidre. La barreja es refreda a 0 °C i seguidament s'afegeix el fosfonoacetat de trimetil (31 μL, 0,21 mmol). Finalment i mantenint la temperatura, s'addicionen 60 μL (0,43 mmol) de DBU gota a gota durant 10 minuts. La barreja s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de N₂ durant 16 h. Passat aquest temps s'addiciona solució aquosa tamponada a pH = 7. La fase aquosa s'extreu amb CH₂Cl₂ (4 x 15 mL) i les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. S'obté un cru que es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1). S'aïlla el producte (52 mg, 0,14 mmol) com a mescla dels diastereòmers *E/Z* amb una relació 2:1 (sense assignar), que representa un rendiment del 75 %.

Sòlid blanc

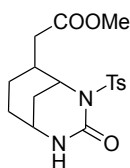
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,40

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica *E/Z* sense assignar (**72_A**/**72_B** 65:35) 1,50 – 2,30 (12H en total, m, 4 x CH₂ **72_A** + 4 x CH₂ **72_B**), 2,39 (3H + 3H, s, Ar-CH₃ **72_A** + **72_B**), 3,67 (1H + 1H, m, CHNH **72_A** + **72_B**), 3,76 (3H, s, COOCH₃ **72_A**), 3,79 (3H, s, COOCH₃ **72_B**), 5,06 (1H, m, CHNTs **72_A**), 5,85 (1H, m, CHCOOMe **72_B**), 6,06 (1H, m, CHCOOMe **72_A**), 6,12 (1H + 1H, NH **72_A** + **72_B**), 6,52 (1H, m, CHNTs **72_B**), 7,25 (2H + 2H, m, Ar-H **72_A** + **72_B**), 7,78 (2H + 2H, m, Ar-H **72_A** + **72_B**)

IR v (ATR, cm⁻¹) 1159, 1233, 1339, 1433, 1681 (ampla, C=O), 2927, 3341

LRMS (ESI+) *m/z* 387,1 corresponent a [M+Na]⁺

Síntesi del compost **73**



Es dissolen 51 mg (0,14 mmol) de l'olefina **72** en 5 mL de MeOH. Seguidament, s'addicionen 5 mg de Pd/C i es purga el sistema amb H₂. La barreja s'agita sota atmosfera d'H₂ durant 16 h a temperatura ambient. En aquest punt es filtra la suspensió sobre *Celite* i el filtrat s'evapora a sequedat. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1). S'obté una fracció formada pel producte desitjat on només s'observa un únic diastereòmer (34 mg, 0,093 mmol) que representa un 70 % de rendiment. D'altra banda s'obté una altra fracció formada pel subproducte **74** (13 mg, 0,035 mmol) que representa un 25 % de rendiment.

Sòlid blanc

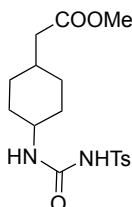
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,50

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Únic diastereòmer 1,44 (1H, m, CHHCHCH₂COOMe), 1,59 (1H, m, CHHCHCH₂COOMe), 1,70 – 2,00 (2H + 2H, m, CH₂CH₂CHCH₂COOMe + CH₂CHNTs), 2,20 (1H, m, CHCH₂COOMe), 2,30 (1H, dd, J_d = 17,2 Hz, J_d = 6,5 Hz, CHHCOOMe), 2,75 (1H, dd, J = 17,2 Hz, J_d = 7,8 Hz, CHHCOOMe), 3,55 (1H, m, CHNH), 3,69 (3H, s, COOCH₃), 4,87 (1H, m, CHNTs), 5,69 (1H, m, NH), 7,25 (2H, d, J = 8,1 Hz, Ar-H_{orto}Me), 7,81 (2H, d, J = 8,1 Hz, Ar-H_{meta}Me)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,7, 22,3, 30,8, 32,0, 37,6, 38,4, 46,0, 51,7, 54,7, 128,5, 129,2, 137,2, 144,2, 153,3, 173,1

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1159, 1337, 1425, 1685 (C=O), 1727 (C=O), 29219, 3088

LRMS (ESI+) m/z 367,1 corresponent a [M+H]⁺



Subproducte **74**:

Sòlid blanc

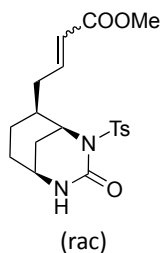
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,55

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica A/B sense assignar (74_A/74_B 60:40) 1,0 – 2,0 (18H en total, m, CHCH₂COOMe (74_A + 74_B) + 4 x CH₂ 74_A + 4 x CH₂ 74_B), 2,20 (2H, d, J = 6,8 Hz, CH₂COOMe 74_A), 2,27 (2H, d, J = 7,2 Hz, CH₂COOMe 74_B), 2,44 (3H + 3H, s, Ar-CH₃ 74_A + 74_B), 3,54 (1H, m, CHNH 74_A), 3,67 (3H, s, COOCH₃ 74_A), 3,69 (3H, s, COOCH₃ 74_B), 3,90 (1H, m, CHNH 74_B), 6,38 (1H, d, J = 7,8 Hz, NHCONHTs 74_A), 6,73 (1H, d, J = 7,2 Hz, NHCONHTs 74_B), 7,32 (2H + 2H, m, Ar-H 74_A + 74_B), 7,77 (2H + 2H, m, Ar-H 74_A + 74_B)

IR v (ATR, cm⁻¹) 1160, 1444, 1536, 1665 (C=O), 1721 (C=O), 2844, 3350

LRMS (ESI+) m/z 391,1 corresponent a [M+Na]⁺

Síntesi del producte 75



Es dissolen 444 mg (1,32 mmol) de l'aldehyd **69_A** i 888 mg (2,66 mmol) de Ph₃CHCOOMe en 44 mL de CH₂Cl₂ anhidre en fred (0 °C) i sota atmosfera de N₂. La barreja s'agita deixant-la arribar a temperatura ambient durant 16 h. Passat aquest temps s'addiciona solució aquosa tamponada de pH = 7. La fase aquosa formada s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 30 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. El cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt 1:1). S'obté el producte (531 mg, 1,32 mmol) amb una relació diastereomèrica *E/Z* 95:5 sense determinar que representa un rendiment quantitatiu.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, AcOEt) R_f = 0,35

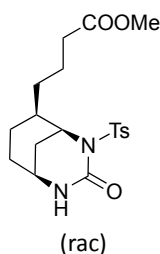
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica E/Z sense assignar (75_A/75_B 95:5). Senyals del component majoritari 1,30 – 1,70 (2H + 1H, m, CH₂ + CHH), 1,70 - 1,80 (1H + 1H, m, CHH + CHCH₂CH=CHCOOMe), 1,90 (2H, m, CH₂CHNTs), 2,25 (1H, m, CHHCH=CHCOOMe), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 2,68 (1H, m, CHHCH=CHCOOMe), 3,56 (1H, m, CHNH), 3,73 (3H, s, COOCH₃), 4,83 (1H, m, CHNTs), 5,73 (1H, m, NH), 5,90 (1H, d, J_d = Hz, CHCOOMe), 6,98 (1H, m, CH=CHCOOMe), 7,26 (2H, d, J = 8,2 Hz, Ar-H_{ortoMe}), 7,80 (2H, d, J = 8,2 Hz, Ar-H_{metaMe})

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) Mescla diastereomèrica E/Z sense assignar (75_A/75_B 95:5). Senyals del component majoritari 21,4, 21,8, 30,7, 31,7, 36,1, 41,6, 45,9, 51,4, 55,3, 123,1, 128,8, 129,5, 137,7, 144,6, 147,6, 153,6, 167,6

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1153, 1301, 1440, 1655, 1693 (C=O), 1725 (C=O), 2850, 2922, 3385

LRMS (ESI+) m/z 415,1 corresponent a [M+Na]⁺

Síntesi del compost 76



Es dissolen 531 mg (1,29 mmol) de l'olefina **75** en 75 mL de MeOH. Seguidament, s'addicionen 50 mg de Pd/C i es purga el sistema amb H₂. La barreja s'agita sota atmosfera d'H₂ durant 16 h a temperatura ambient. En aquest punt es filtra la suspensió sobre *Celite* i el filtrat s'evapora a sequedat. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt 1:1). Es va aïllar el producte desitjat (490 mg, 1,24 mmol) amb un 97 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, hexà/AcOEt 1:1) R_f = 0,05

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,25 - 1,90 (11H, m, 5 x CH₂ + CHCH₂CH₂CH₂COOMe), 2,35 (2H, m, CH₂COOMe), 2,40 (3H, s, Ar-CH₃), 3,55 (1H, m, CHNH), 4,79 (1H, m, CHNTs), 5,44 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, NH), 7,27 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{orthoMe}), 7,81 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*_{metaMe})

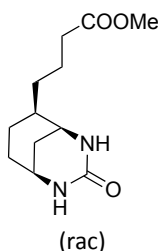
¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 21,7, 22,4, 22,6, 31,1, 32,3, 32,7, 34,2, 42,4, 46,4, 51,6, 55,3, 128,5, 129,2, 137,6, 144,1, 153,2, 174,3

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1155, 1298, 1436, 1654, 1698 (C=O), 1730 (C=O), 2873, 2928, 3332

LRMS (ESI+) *m/z* 417,1 corresponent a [M+Na]⁺

P_f (°C) 163-165

Síntesi del compost **77**¹⁴³



Es un matràs es pesen 38 mg de Na a trossos petits (1,7 mmol) i 214 mg de naftalè (1,67 mmol). S'addicionen 19 mL de THF anhidre i la solució s'agita a temperatura ambient. Passats 45 min s'observa com s'ha tornat de color verd fosc i es porta a -78 °C. Paral·lelament, es dissolen 110 mg de l'ester **76** (0,279 mmol) en 19 mL de THF anhidre. S'addiciona aquesta solució sobre la primer via cànula a baixa temperatura durant 10 min. Acabada l'addició es deixa 50 min sota agitació i atmosfera de N₂. Passat aquest temps s'observa per CCP que no queda material de partida. La reacció s'atura addicionant a poc a poc solució aquosa de pH = 7 en fred i es deixa arribar a temperatura ambient. En aquest punt s'evapora el THF i la fase aquosa resultant s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 15 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evapora el dissolvent. Seguint el mateix procediment es prepara la mateixa reacció amb una altra alíquota de l'ester **76** (118 mg, 0,299 mmol) i emprant 40 mg (1,7 mmol) de Na i 195 mg (1,5 mmol) de naftalè. Els dos crus

obtinguts després de les extraccions es purifiquen de forma conjunta mitjançant cromatografia *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). S'obtenen així 123 mg (0,512 mmol) del producte esperat, que representa un 88 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,15

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,20 – 1,80 (10H en total, m, 4 x CH₂ + CHCHNH + NHCHCHHCHNH), 1,98 (1H, m, NHCHCHHCHNH), 2,30 (2H, td, J_t = 7,2 Hz, J_d = 1,0 Hz, CH₂COOMe), 3,44 (1H, m, CHCHNH), 3,60 (1H, m, CH₂CHNHCH₂), 5,23 (1H, m, CH₂CHNHCH₂), 5,28 (1H, m, CHCHNH)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 22,0, 23,0, 30,5, 32,7, 33,5, 34,1, 42,3, 45,8, 49,0, 51,7, 158,1, 174,1

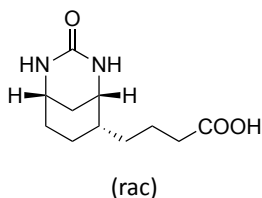
IR ν (ATR, cm⁻¹) 1201, 1430, 1522, 1671 (C=O), 1728 (C=O), 2851, 2920, 3055, 3201

HRMS (ESI+) *m/z* Calculada per C₁₂H₂₁N₂O₃⁺ [M+H]⁺ 241,1547, trobada 241,1546

HPLC (*Kromaphase* C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 35:65) t_r = 5,6 min

Pf (°C) 203 – 205 (descomposa)

Síntesi del compost 78



Es dissolen 66 mg (0,28 mmol) de l'ester **77** en 50 mL d'H₂O. Seguidament s'addicionen 8,0 mL d'una solució aquosa de NaOH 0,05 M (0,42 mmol). S'agita la mescla a temperatura ambient durant 24 h. Passat aquest temps no s'observa presència de material de partida **77** per HPLC i només un pic nou que podria correspondre al producte desitjat. Llavors, s'acidifica la barreja amb HCl aquós 2 M fins pH = 3 i

s'evapora el dissolvent. El cru resultant es recristal·litza en H₂O filtrant en calent abans de deixar cristal·litzar. Després de deixar la solució refredar a temperatura ambient durant 16 h i d'estar a 4 °C durant 24 h més, es decanten les aigües mares del sòlid precipitat després d'una centrifugació. El sòlid s'asseca i s'acaba purificant per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 37:43, t_r = 11,0 min). S'obtenen 19,9 mg (0,0880 mmol) de producte desitjat que representen un rendiment del 31 % sense haver recuperat la part que ha quedat a les aigües mares.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 8:2) R_f = 0,15

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) 1,15 – 1,90 (11H en total, m, 5 x CH₂ + CH₂CHCHNH), 2,29 (2H, t, J = 7,3 Hz, CH₂COOH), 3,43 (1H, m, CHNH), 3,56 (1H, m, CHNH)

¹³C-RMN (CD₃OD, 100,6 MHz) δ (ppm) 24,3, 31,0, 34,0, 34,3, 35,2, 43,6, 46,7, 49,7, 160,8, 177,9

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1218, 1307, 1315, 1514, 1633 (C=O), 1689 (C=O), 2838, 2940, 3241 (ampla)

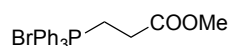
HRMS (ESI-) m/z Calculada per C₁₁H₁₇N₂O₃⁻ [M-H]⁻ 225,1245, trobada 225,1242

HPLC (*Kromaphase* C18 analítica, f = 0,8 mL/min, H₂O/MeOH; 50:50) t_r = 6,8 min

La resolució del racèmic d'aquest àcid ((±)-**78**) s'aconsegueix mitjançant HPLC emprant una columna quiral (*Chirobiotic*[®] T, *ASTEC Inc, U.S.A.*, f = 0,3 mL/min, H₂O/MeOH; 60:40, temperatura = 40 °C). S'obtenen els dos enantiòmers: el (+)-**78** entre 4,1 i 7,1 min i el (-)-**78** entre 11,5 i 18,0 min.

(+)-**78**: [α]_D^{25°C} = +41 (c = 1,40 mg/mL, MeOH)

(-)-**78**: [α]_D^{25°C} = -48 (c = 0,90 mg/mL, MeOH)

Síntesi del compost 79¹⁶¹

Es dissolen 500 mg (2,99 mmol) de 3-bromopropionat de metil i 692 mg de PPh₃ (2,64 mmol) en 2,6 mL de CH₃CN. La barreja es porta a reflux i s'agita sota atmosfera de N₂ durant 16 h. Passat aquest temps es deixa arribar a temperatura ambient i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5). S'obté el producte desitjat (1118 mg, 2,587 mmol) amb un 98 % de rendiment.

Sòlid blanc

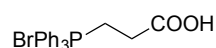
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,20

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 2,90 (2H, dt, $J_d = 18,6$ Hz, $J_t = 6,8$ Hz, CH₂CH₂COOMe), 3,37 (3H, s, COOMe), 4,11 (2H, dt, $J_d = 12,4$ Hz, $J_t = 6,8$ Hz, CH₂CH₂COOMe), 7,60 – 7,90 (15H, m, Ar-H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 18,2, 27,1, 52,3, 118,0, 130,5, 133,7, 135,3, 170,6

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1111, 1214, 1359, 1436, 1731 (C=O), 2916, 3444

LRMS (ESI+) m/z 349,1 corresponent a [M-Br]⁺

Síntesi del compost 82¹⁶⁶

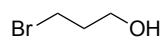
Es dissolen 1017 mg (6,45 mmol) d'àcid 3-bromopropiònic i 1662 mg (6,27 mmol) de PPh₃ en 10 mL de CH₃CN. La barreja es porta a reflux i s'agita sota atmosfera de N₂ durant 16 h. Passat aquest temps es deixa arribar a temperatura ambient i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, de 97:3 a 9:1). S'obté el producte desitjat (1880 mg, 4,514 mmol) amb un 72 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,15

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 3,05 (2H, m, CH₂), 3,74 (2H, m, CH₂), 7,60 – 7,90 (15H, m, Ar-H)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1105, 1229, 1319, 1382, 1435, 1745 (C=O), 2916, 2857

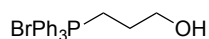
Síntesi del compost 86

Es dissolen 500 μL (4,44 mmol) de 3-bromopropionat de metil en 30 mL de CH₂Cl₂ anhidre i es porta la mescla a -78 °C. Seguidament s'addiciona DIBAL (10 mL, 1 M en hexà, 10 mmol) gota a gota durant 40 min. Llavors s'agita la barreja mantenint la baixa temperatura i sota atmosfera de N₂ durant 1 h i a 0 °C durant 1 h més. Passat aquest temps s'addiciona MeOH a la mescla i solució saturada de tartrat de sodi i potassi i s'agita durant 4 h. La fase aquosa formada s'extreu amb CH₂Cl₂ (2 x 30 mL) i les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evaporen. S'obté el producte amb un rendiment quantitatiu (616 mg, 4,44 mmol).

Oli transparent

CCP (SiO₂, hexà/AcOEt 9:1) R_f = 0,10

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,44 (1H, t, J = 5,1 Hz, OH), 2,10 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,55 (2H, t, J = 6,4 Hz, CH₂Br), 3,82 (2H, dt, J_d = 5,7 Hz, J_t = 5,4 Hz, CH₂OH)

Síntesi del compost 85¹⁶⁷

Es dissolen 616 mg (4,44 mmol) de l'alcohol **86** i 844 mg (3,19 mmol) de PPh₃ en 7 mL de CH₃CN. La barreja s'escalfa reflux i s'agita sota atmosfera de N₂ durant 16 h. Passat aquest temps es deixa arribar a temperatura ambient i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5). S'obté el producte desitjat (899 mg, 2,24 mmol) amb un 70 % de rendiment.

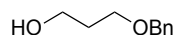
Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) Rf = 0,15

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,84 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 3,70 – 3,90 (2H + 2H, m, CH₂Br + CH₂P), 4,96 (1H, t, J = 7,0 Hz, OH), 7,60 – 7,90 (15H, m, Ar-H)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1109, 1229, 1319, 1435, 1745 (C=O), 2887

Síntesi del compost **90**¹⁷⁰



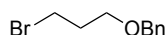
Es dissolen 4177 mg d'NaH al 60 % en pes en oli mineral (104 mmol) en 120 mL de THF anhidre a 0 °C. A la solució se li addiciona gota a gota una solució d'1,3-propandiòl (6,5 mL, 88 mmol) en 10 mL de THF anhidre. La mescla resultant s'agita en fred 30 min més sota atmosfera de N₂ i després se li afegixen 11 mL de bromur de benzil (90 mmol) durant 30 min. La barreja es deixa arribar a temperatura ambient. En aquest punt s'addiciona aigua poc a poc fins que no s'observi bombolleig. Seguidament s'afegix AcOEt i la fase aquosa resultant s'extreu amb més AcOEt (6 x 60 mL en total). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evaporen. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt 6:4). S'obté el producte (2,696 g, 16,22 mmol) amb un 18 % de rendiment.

Oli transparent

CCP (SiO₂, hexà/AcOEt 6:4) Rf = 0,25

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,88 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 2,24 (1H, t, *J* = 5,4 Hz, OH), 3,67 (2H, t, *J* = 5,8 Hz, CH₂OBn), 3,79 (2H, dt, *J_d* = 5,5 Hz, *J_t* = 5,4 Hz, CH₂OH), 4,53 (2H, s, CH₂Ar), 7,34 (5H, m, Ar-H)

Síntesi del compost 91¹⁴⁹



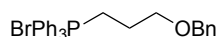
A 0 °C es dissolen 4255 mg (16,22 mmol) de PPh₃ en 15 mL de CH₂Cl₂. D'altra banda es dissolen 830 μL de Br₂ (16,26 mmol) en 12,5 mL de CH₂Cl₂. La segona solució s'addiciona sobre la primera en fred via cànula. Es prepara una tercera solució composta per 2696 mg (16,22 mmol) de l'alcohol **90** i 1,3 mL (16,07 mmol) de piridina en 24 mL de CH₂Cl₂). Aquesta última s'afegeix sobre la barreja anterior en fred via cànula. La mescla resultant es deixa sota agitació arribar a temperatura ambient durant 16 h. Passat aquest temps s'evapora el dissolvent i es cru es redissol en hexà. Es filtra i el sòlid es renta amb més hexà. El filtrat s'evapora i es purifica per columna *flash* (SiO₂, hexà/AcOEt 99:1). S'aïlla el producte (3047 mg, 13,30 mmol) amb un 82 % de rendiment.

Oli transparent

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂) R_f = 0,65

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 2,14 (2H, tt, *J_t* = 6,6 Hz, *J_t* = 5,9 Hz, CH₂CH₂CH₂), 3,54 (1H, t, *J* = 6,6 Hz, CH₂Br), 3,61 (2H, t, *J* = 5,9 Hz, CH₂OBn), 4,52 (2H, s, CH₂Ar), 7,34 (5H, m, CH₂Ar-H)

Síntesi del compost 88¹⁷¹



Es dissolen 266 mg (1,16 mmol) del producte **91** i 609 mg (2,32 mmol) de PPh₃ en 2 mL de CH₃CN. La barreja s'escalfa reflux i s'agita sota atmosfera de N₂ durant 16 h. Passat aquest temps es deixa arribar a temperatura ambient i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5). S'obté el producte desitjat (558 mg, 1,14 mmol) amb un 98 % de rendiment.

Sòlid blanc

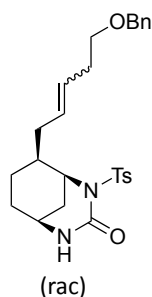
CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,15

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 2,00 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 3,86 (2H, t, J = 5,8 Hz, CH₂OBn), 4,04 (2H, m, CH₂P), 4,50 (2H, s, CH₂Ar), 7,30 (5H, m, CH₂Ar-H), 7,60 – 7,90 (15H, m, Ar-H)

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1099, 1112, 1359, 1411, 1437, 2860

P_f (°C) 144-145 (literatura 152)

Síntesi del compost 93



Es dissolen 1161 mg de la sal **88** (2,36 mmol) en 16 mL de THF anhidre. La solució es refreda a 0 °C i s'afegeix poc a poc ^tBuOK (1 M en THF, 2,4 mL, 2,4 mmol) mantenint la temperatura baixa, la solució adquireix una coloració ataronjada. Passat aquest temps es deixa a temperatura ambient durant 10 min. D'altra banda es forma una suspensió de l'aldehid **69_A** (400 mg, 1,99 mmol) en 35 mL de THF anhidre. S'afegeix la segona solució sobre la primer via cànula a 0 °C. Acabada l'addició s'observa que el color de la suspensió formada es groc. S'agita la mescla a 0 °C durant 2 h més i passat aquest

temps s'afegeix solució aquosa saturada de NH_4Cl . La fase aquosa formada s'extreu amb CH_2Cl_2 (5 x 60 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na_2SO_4 , es filtren i s'evaporen. El cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1). S'obté el producte (únic diastereòmer *E* o *Z* sense assignar) amb un 75 % de rendiment (416 mg, 0,888 mmol).

Sòlid blanc

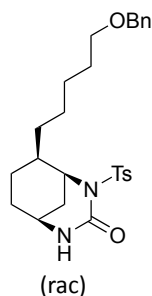
CCP (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) $R_f = 0,65$

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) Únic diastereòmer *E/Z* sense assignar 1,25 – 1,90 (7H en total, m, 3 x CH_2 + CHCHNTs), 2,19 (1H, m, $\text{CHCHHCH}=\text{CH}$), 2,35 – 2,45 (3H + 2H + 1H, m, Ar-CH_3 + $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$ + $\text{CHCHHCH}=\text{CH}$), 3,45 – 3,65 (2H + 1H, t + m, $J = 6,7$ Hz, CH_2OBn + CHNH), 4,52 (2H, s, CH_2Ar), 4,83 (1H, m, CHNTs), 5,29 (1H, d, $J = 4,1$ Hz, NH), 5,55 (2H, m, $\text{CH}=\text{CH}$), 7,20 – 7,40 (2H + 5H, d + m, $J = 8,4$ Hz, $\text{Ar-H}_{\text{ortoMe}}$ + $\text{CH}_2\text{Ar-H}$), 7,84 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, $\text{Ar-H}_{\text{metaMe}}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ (ppm) 21,7, 22,0, 28,2, 31,1, 31,6, 32,3, 43,0, 46,4, 55,7, 70,0, 72,9, 127,6, 127,8, 127,8, 128,4, 128,6, 129,2, 137,6, 138,8, 144,1, 153,2

HRMS (ESI+) m/z Calculada per $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$ $[M+\text{H}]^+$ 469,2156, trobada 469,2156

Síntesi del compost 94



Es dissolen 31 mg (0,066 mmol) de l'olefina **93** en 3 mL de MeOH. Seguidament, s'addicionen 3,1 mg de Pd/C i es purga el sistema amb H_2 . La barreja s'agita sota atmosfera d' H_2 durant 16 h a temperatura ambient. En aquest punt es filtra la

suspensió sobre *Celite* i el filtrat s'evapora a sequedat. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, de 98:2 a 97:3). Es va aïllar el producte desitjat (20 mg, 0,042 mmol) amb un 80 % de rendiment. També s'aïlla un 10 % del corresponent producte de desprotecció de l'alcohol (**95**).

Sòlid blanc

CCP (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) $R_f = 0,45$

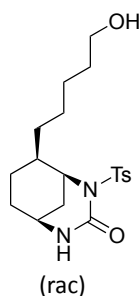
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 1,25 – 1,70 (13H en total, m, 6 x CH_2 + CHCHNTs), 1,88 (2H, m, CH_2CHNTs), 2,40 (3H, s, Ar-CH_3), 3,45 – 3,65 (2H + 1H, t + m, $J = 6,6$ Hz, CH_2OBn + CHNH), 4,51 (2H, s, CH_2Ar), 4,79 (1H, m, CHNTs), 5,41 (1H, d, $J = 4,3$ Hz, NH), 7,20 – 7,40 (2H + 5H, d + m, $J = 8,3$ Hz, $\text{Ar-H}_{\text{ortoMe}}$ + $\text{CH}_2\text{Ar-H}$), 7,82 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, $\text{Ar-H}_{\text{metaMe}}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ (ppm) 21,7, 22,4, 26,4, 26,9, 29,9, 31,1, 32,4, 33,2, 42,3, 46,4, 55,6, 70,6, 73,0, 127,6, 127,8, 128,4, 128,6, 129,1, 137,7, 138,9, 144,0, 153,3

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1159, 1334, 1452, 1650 (C=O), 1686, 2851, 2927, 3327

LRMS (ESI+) m/z 471,2 corresponent a $[M+H]^+$

P_f ($^\circ\text{C}$) 119-120



Subproducte 95:

Sòlid blanc

CCP (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) $R_f = 0,20$

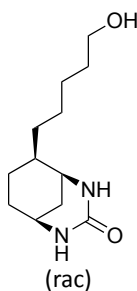
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 1,25 – 1,70 (13H en total, m, 6 x CH_2 + CHCHNTs), 1,88 (2H, m, CH_2CHNTs), 2,40 (3H, s, Ar-CH_3), 3,55 (1H, m, CHNH), 3,64 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, CH_2OH), 4,79 (1H, m, CHNTs), 5,51 (1H, m, NH), 7,24 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, $\text{Ar-H}_{\text{ortoMe}}$), 7,80 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, $\text{Ar-H}_{\text{metaMe}}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ (ppm) 21,7, 22,5, 25,9, 26,7, 31,0, 32,3, 32,7, 33,2, 42,4, 46,4, 55,5, 63,0, 128,5, 129,1, 137,6, 144,0, 153,3

IR ν (ATR, cm^{-1}) 1161, 1337, 1438, 1677 (C=O), 2856, 2926, 3341 (ampla)

LRMS (ESI+) m/z 381,2 corresponent a $[\text{M}+\text{H}]^+$

Síntesi del compost **96**¹⁴³



Es un matràs es pesen 7 mg de Na a trossos petits (0,3 mmol) i 34 mg de naftalè (0,27 mmol). S'addicionen 3 mL de THF anhidre i la solució s'agita a temperatura ambient. Passats 60 min s'observa com s'ha tornat de color verd fosc i es porta a -78 °C. Paral·lelament, es dissolen 20 mg de l'ester **94** (0,043 mmol) en 3 mL de THF anhidre. S'addiciona aquesta solució sobre la primer via cànula a baixa temperatura durant 10 min. Acabada l'addició es deixa 2,5 h sota agitació i atmosfera de N_2 . Passat aquest temps s'observa per CCP que no queda material de partida i la solució té un color vermell intens. La reacció s'atura addicionant a poc a poc solució aquosa de $\text{pH} = 7$ en fred i es deixa arribar a temperatura ambient. La fase aquosa resultant s'extreu amb CH_2Cl_2 (5 x 10 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb Na_2SO_4 , es filtren i s'evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica mitjançant cromatografia *flash* (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. De 95:5 a 9:1). S'obtenen així 6,1 mg (0,027 mmol) del producte esperat, que representa un 67 % de rendiment.

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) R_f = 0,10

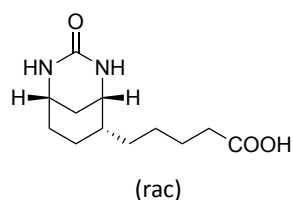
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 1,15 – 1,80 (14H en total, m, 6 x CH₂ + CHCHNH + CHNHCHHCHNH), 1,94 (1H, m, CHNHCHHCHNH), 3,22 (1H, m, OH), 3,44 (1H, m, CHCHNH), 3,55 – 3,75 (2H + 1H, m, CH₂OH + CH₂CHNHCH₂), 5,40 (1H, m, + CH₂CHNHCH₂), 6,47 (1H, m, CHCHNH)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz) δ (ppm) 23,6, 25,7, 25,9, 30,3, 32,2, 33,5, 33,5, 42,5, 45,8, 48,2, 62,0, 159,0

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1192, 1306, 1416, 1520, 1651 (C=O), 1665, 2849, 2921, 3211 (ampla)

LRMS (ESI+) m/z 227,2 corresponent a [M+H]⁺

Síntesi del compost 98



Intent de síntesi en una etapa emprant oxidants de crom

Es dissolen 5 mg (0,02 mmol) de l'alcohol **96** en 3 mL d'acetona i es porta la solució a 0 °C. Seguidament s'addicionen 10 µL de solució de reactiu de Jones (excés). Passats 20 min encara s'observa gran quantitat de material de partida per CCP. S'addicionen més alíquotes de 10 µL de la solució de reactiu de Jones fins que no s'observa més evolució per CCP (4 en total). Llavors el cru es dilueix en CH₂Cl₂ i s'addiciona solució aquosa saturada d'NaHSO₃ i solució aquosa de HCl 1 M fins pH aproximadament 2. La fase aquosa s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 10 mL). Les fases orgàniques combinades s'assequen amb MgSO₄, es filtren i s'evaporen. Un anàlisi per espectrometria de masses indica la presència de producte al cru. Aquest es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, de 97:3 a 8:2) de només 0,3 mg corresponent al producte impurificat amb sílice (menys d'un 6 % de rendiment).

En dues etapes¹⁷³

Es dissolen 19 mg (0,084 mmol) de l'alcohol **96** en 2 mL de CH₂Cl₂ anhidre. La solució es porta a 0 °C i seguidament s'addicionen 55 mg (0,13 mmol) de perdiodinà de Dess-Martin i 28 mg (0,34 mmol) de NaHCO₃. La suspensió resultant s'agita a 0 °C sota atmosfera d'Ar i es deixa arribar a temperatura ambient durant 3 h. Passat aquest temps es comprova per CCP que no queda material de partida i s'afegeix solució aquosa saturada de Na₂S₂O₃. La fase aquosa resultant s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 15 mL). Les fases aquoses combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evaporen. El cru resultant es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5). S'obté una fracció corresponent a l'aldehid esperat **97** (14 mg). Aquesta fracció ràpidament es dissol en una mescla de ^tBuOH/H₂O 1:1 (6 mL) a 0 °C. Mantenint la temperatura s'afegeixen en el següent ordre: 350 µL (2,98 mmol) de 2-metil-2-butè, 96 mg (0,63 mmol) de NaH₂PO₄·2H₂O i 35 mg (0,31 mmol) de NaClO₂. S'agita la barreja a 0 °C durant 15 min i després es deixa arribar a temperatura ambient durant 30 min i 2 h més a aquesta temperatura. Seguidament s'addiciona solució aquosa de HCl 1 M. La fase aquosa resultant s'extreu amb CH₂Cl₂ (5 x 15 mL). Les fases aquoses combinades s'assequen amb Na₂SO₄, es filtren i s'evaporen. El cru obtingut es purifica per columna *flash* (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 8:2). S'aïlla el producte (14 mg, 0,058 mmol) amb un rendiment global de les dues etapes del 70 %. El sòlid obtingut s'acaba de purificar per treure traces de sílice que s'hagin pogut arrossegar per HPLC semipreparatiu (*Kromasil* C18, columna semipreparativa; f = 4 mL/min; H₂O/MeOH, 50:50, t_r = 8,8 min).

Sòlid blanc

CCP (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 8:2) R_f = 0,35

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) 1,20 – 1,90 (13H en total, m, 6 x CH₂ + CH₂CHCHNH), 2,30 (2H, t, J = 7,4 Hz, CH₂COOH), 3,41 (1H, m, CHNH), 3,56 (1H, m, CHNH)

¹³C-RMN (CD₃OD, 100,6 MHz) δ (ppm) 31,0, 34,2, 34,3, 35,0, 43,6, 46,8, 49,9, 160,8, 177,9

IR ν (ATR, cm⁻¹) 1308, 1515, 1635 (C=O), 1688 (C=O), 2941, 3250 (ampla)

HRMS (ESI-) m/z Calculada per C₁₂H₁₉N₂O₃⁻ [M-H]⁻ 239,1401, trobada 239,1397

HPLC (*Kromaphase* C18 analítica, $f = 0,8$ mL/min, H₂O/MeOH; 50:50) $t_r = 7,6$ min

La resolució del racèmic d'aquest àcid ((±)-**98**) s'aconsegueix mitjançant HPLC emprant una columna quiral (*Chirobiotic*[®] T, *ASTEC Inc, U.S.A.*, $f = 0,3$ mL/min, H₂O/MeOH; 90:10, temperatura = 40 °C). S'obtenen els dos enantiòmers: el (+)-**98** entre 5,5 i 9,5 min i el (-)-**98** entre 10,5 i 16,0 min.

(+)-**98**: $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = +44$ ($c = 1,30$ mg/mL, MeOH)

(-)-**98**: $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = -49$ ($c = 1,05$ mg/mL, MeOH)

5.5 Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques competitives dels lligands monovalents

Les valoracions espectrofotomètriques competitives es van dur a terme en una cel·la de petit volum inicial (aprox. 80 µL) i d'1 cm de pas de llum. Es van addicionar alíquotes de dissolucions de lligand (entre 0,83 i 438 µM) en tampó fosfats 0,1 M de pH = 7,0 amb 1 % de DMSO sobre una dissolució de proteïna (entre 1,1 i 1,8 µM en subunitats) i HABA 142 µM en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7,0. Es va enregistrar l'espectre d'absorció entre 200 i 800 nm després de cada addició i homogeneïtzació de la barreja. Els valors de l'absorbància a 500 nm després de cada addició es van ajustar per mínims quadrats als valors calculats segons els models d'unió monovalent 1:1 (Apartat 4.4.1.1, Pàgina 92 i Apartat 4.4.1.2, Pàgina 94) i d'aquí es van obtenir els valors de les constants d'afinitat.

5.6 Procediment general de les valoracions espectrofluorimètriques dels lligands monovalents

Les valoracions espectrofluorimètriques es van dur a terme en una cel·la de quars d'1 cm per 1 cm de base. Es van addicionar alíquotes de dissolucions de lligand (entre 1,7 i 2,2 µM) en un tampó a pH = 7,0 (100 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA) sobre 3,0 mL d'una dissolució de proteïna (0,02 µM en subunitats) en aquest mateix

tampó. Es va enregistrar l'espectre d'emissió de fluorescència entre 300 i 400 nm amb longitud d'ona d'excitació de 290 nm després de cada addició i homogeneïtzació de la barreja. Els valors de la fluorescència a 370 nm després de cada addició es van ajustar per mínims quadrats als valors calculats segons el model d'unió monovalent 1:1 (Apartat 4.4.2, Pàgina 96) i d'aquí es van obtenir els valors de les constants d'afinitat.

6 Acrònims

ΔG Variació de l'energia lliure

δ Desplaçament químic

ϵ Coeficient d'extinció

λ Longitud d'ona

AcOEt Acetat d'etil

AcOH Àcid acètic

anh Anhidre

aq Aquós/a

Ar *Aril*, aromàtic

ATR Attenuated Total Reflectance

Av Avidina

Boc tert-butoxicarbonil

C_{eff} Concentració efectiva

cat Catalític/a

Cbz *benziloxicarbonil*

CCP Cromatografia en Capa Prima

DBU 1,8-diazabicycloundec-7-è

DCC Diciclohexilcarbodiimida

DCM Diclorometà

DCE Dicloroetà

DCU Diciclohexilurea

DEAD Azadicarboxilat de dietil

DIAD Azadicarboxilat de disiopropil

DIBAL Hidrur de diisobutialumini

DIPEA N,N-diisopropiletilamina

DMPDU Dimetilpropandiurea

DMF Dimetilformamida

DMP Periodinà de *Dess-Martin*

DMSO Dimetilsulfòxid

DPPA Difenilfosforilazida

ee Excés enantiomèric

EM Molaritat efectiva

EDC·HCl Hidroclorur de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA Àcid etilendiaminotetraacètic

Eq Equivalents

ES Enantioselectivitat

ESI Ionització per electrospray

EWG Grup atraient d'electrons

f_s Constant de proporcionalitat inicial (fluorescència)

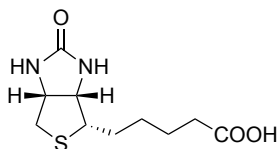
f_{sl} Constant de proporcionalitat final (fluorescència)

HABA Àcid 2-(4-fenilazohidroxil)benzoic

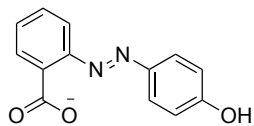
HPLC Cromatografia líquida d'alta resolució

HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució	R_f	Factor de retenció
I	Indicador	RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
IR	Infra-roig	SAM	Monocapa autoensablada
J	Constant d'acoblament	SAv	Estreptavidina
K_a	Constant d'afinitat/associació	S	Subunitat o bis-subunitat de proteïna
K_n	Constant d'afinitat <i>n</i> -valent	t.a.	Temperatura ambient
L	Lligand	TBAF	Fluorur de tetrabutilamoni
LG	Grup sortint	^tBuOK	tert-butòxid de potassi
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amidur de liti	TDBPS	<i>tert-butildifenilsilil</i>
LRMS	Espectrometria de masses de baixa resolució	TDM	4,4'-metilenbis(N,N-dimetilanilina)
MAOS	<i>Microwave-Assisted Organic Synthesis</i>	TESA	Trietilsililacetilè
MeOH	Metanol	TFP	<i>tetrafluorofenil</i>
MW	Microones	THF	Tetrahidrofurà
NBS	N-bromosuccinimida	U.A.	Unitats d'absorbància
NHS	N-hidroxisuccinimida	UV	Ultraviolat
NMP	N-metil-2-pirrolidona	vis	visible
NOESY	Espectroscòpia d'efecte nuclear <i>Overhauser</i>	Z	<i>benziloxicarbonil</i>
PDU	Propandiurea		
P_f	Punt de fusió		
ppm	parts per milió		
r.d.	relació diastereomèrica		
rac	Racèmic		

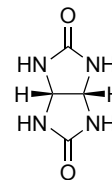
7 Índex de compostos



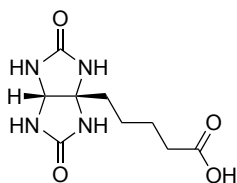
1



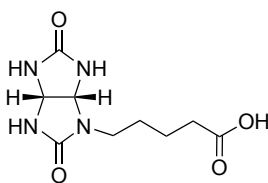
2



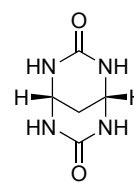
3



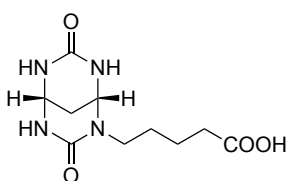
4



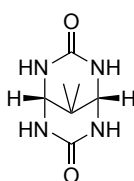
5



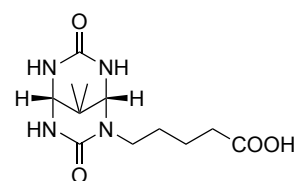
6



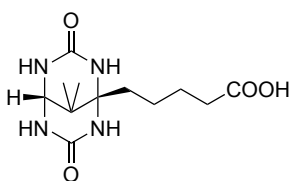
7



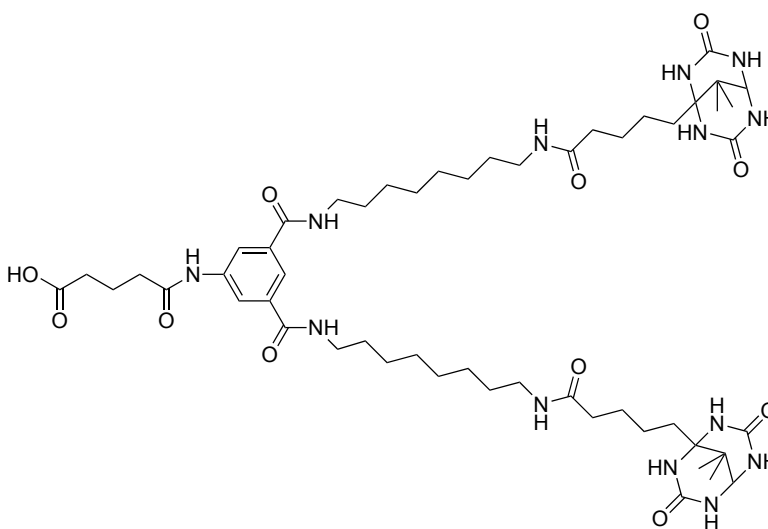
8



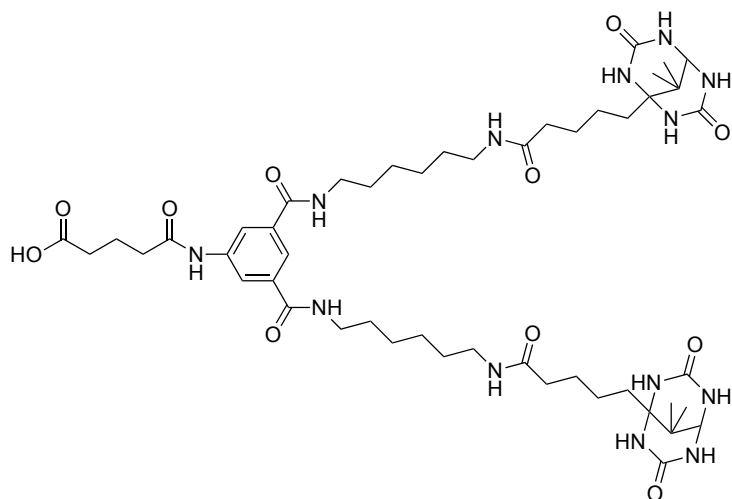
9



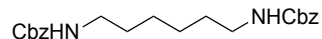
10



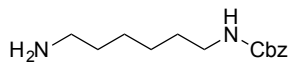
11



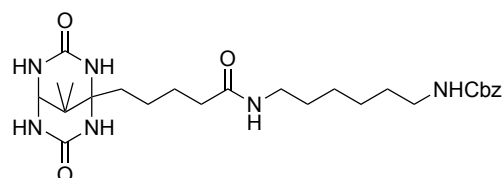
12



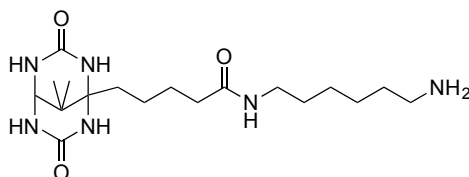
13



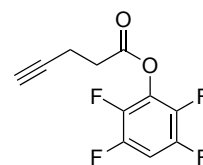
14



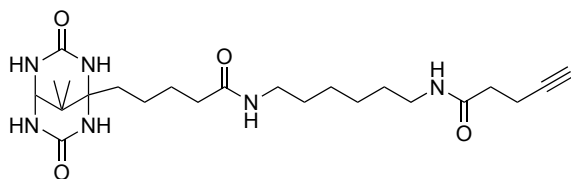
15



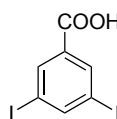
16



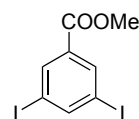
17



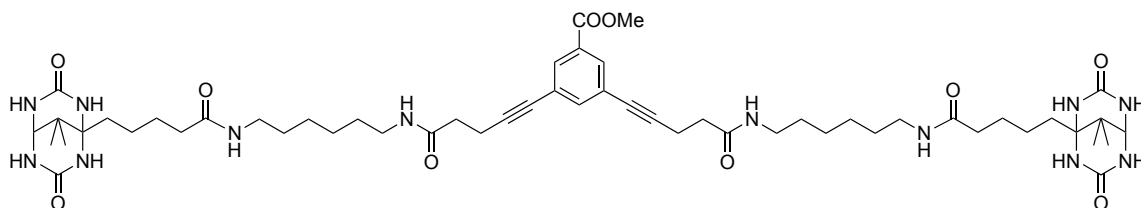
18



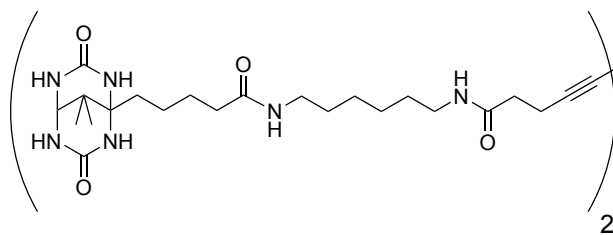
19



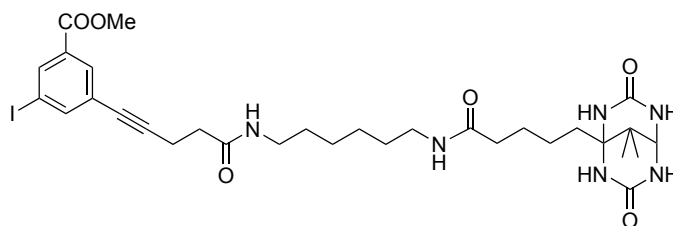
20



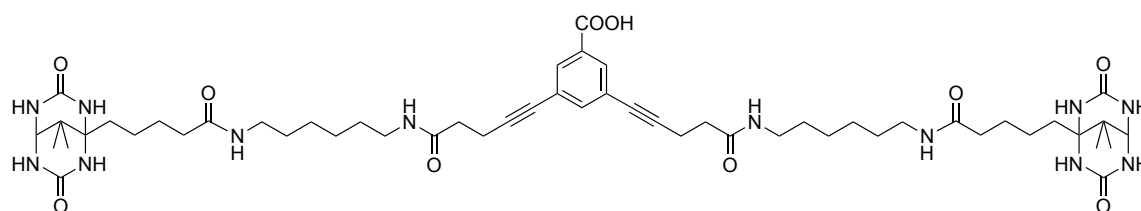
21



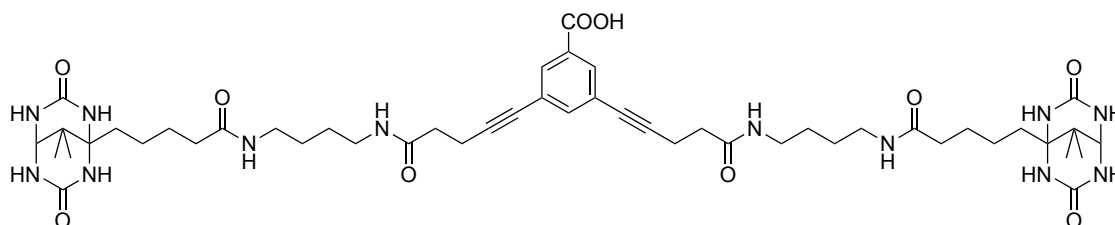
22



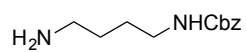
23



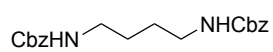
24



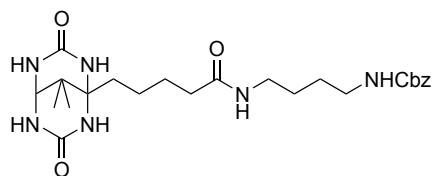
25



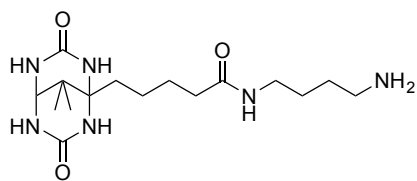
26



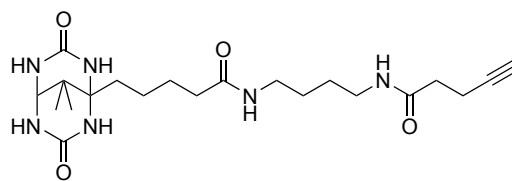
27



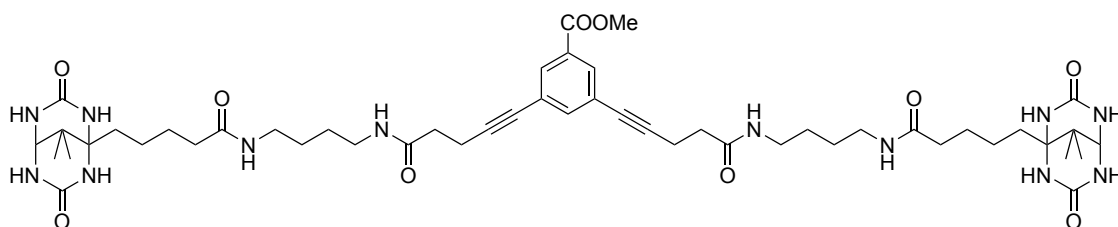
28



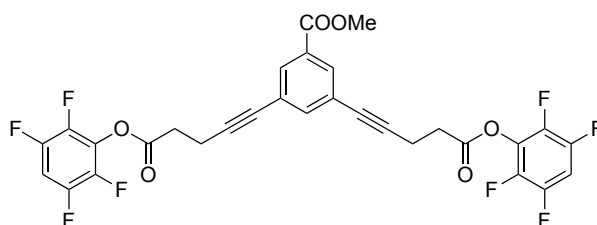
29



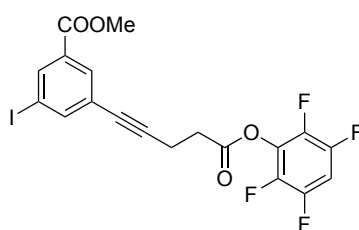
30



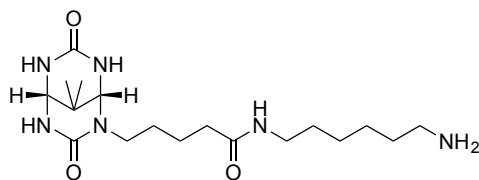
31



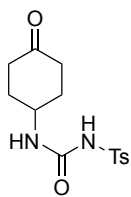
32



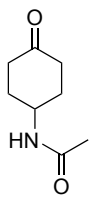
33



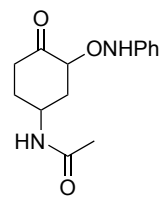
34



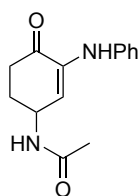
35



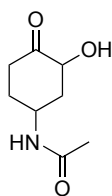
36



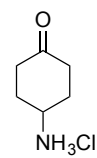
37



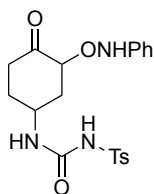
38



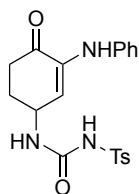
39



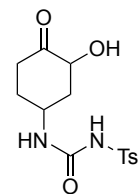
40



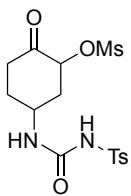
41



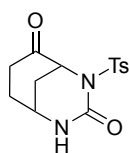
42



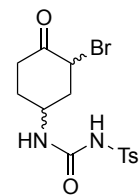
43



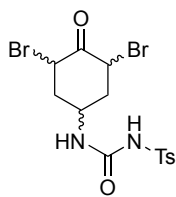
44



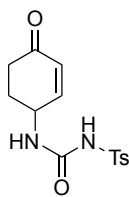
45



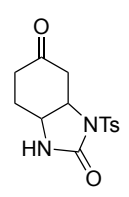
46



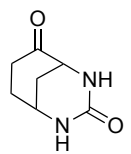
47



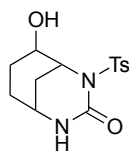
48



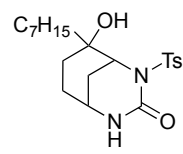
49



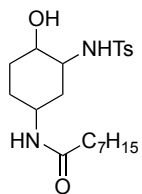
50



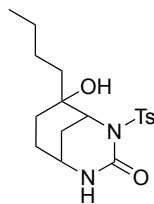
51



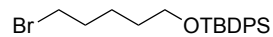
52



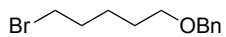
53



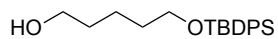
54



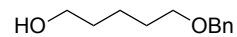
55



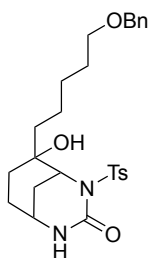
56



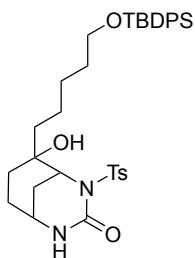
57



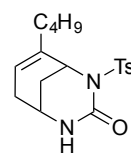
58



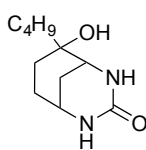
59



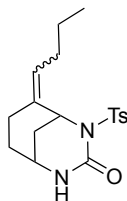
60



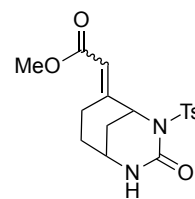
61



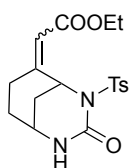
62



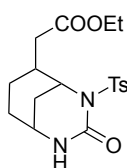
63



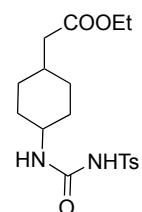
64



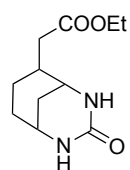
65



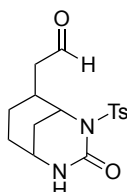
66



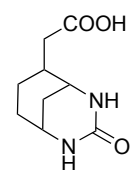
67



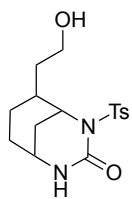
68



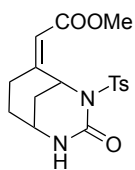
69



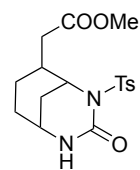
70



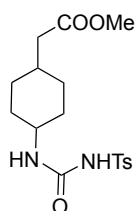
71



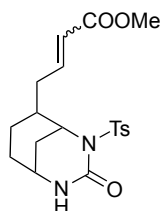
72



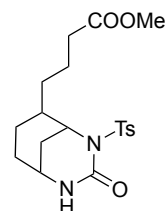
73



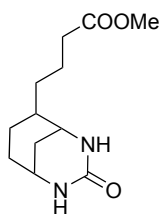
74



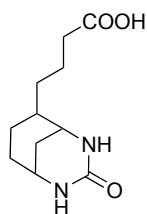
75



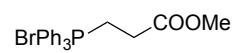
76



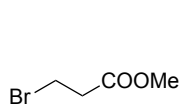
77



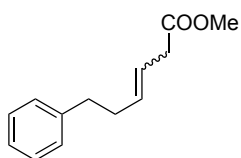
78



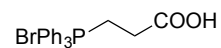
79



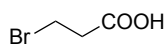
80



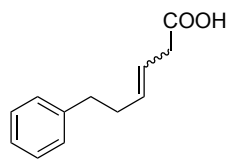
81



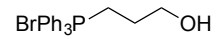
82



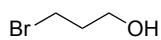
83



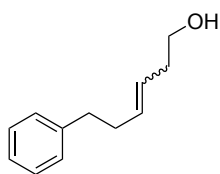
84



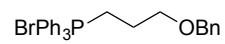
85



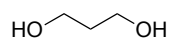
86



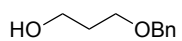
87



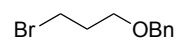
88



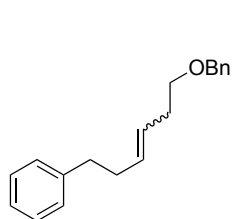
89



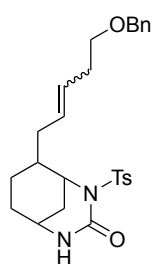
90



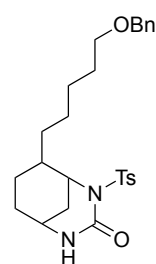
91



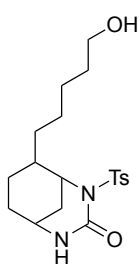
92



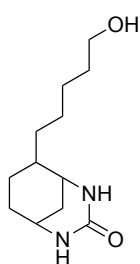
93



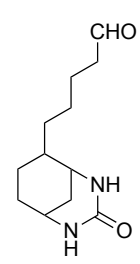
94



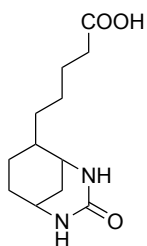
95



96



97



98

8 Bibliografia

- (1) Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *Adv. Supramol. Chem.* **2000**, *6*, 41–156.
- (2) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Principles and methods in supramolecular chemistry*, 1st ed.; Wiley, 2000.
- (3) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; Wiley, 2009.
- (4) Green, N. M. In *Advances in Protein Chemistry*; 1975; pp 85–133.
- (5) Wilchek, M.; Bayer, E. A. In *Methods in Enzymology*; 1990; Vol. 184, pp 5–13.
- (6) Lehn, J.-M. *Science (80-.)*. **2002**, *295* (5564), 2400–2403.
- (7) Green, N. M. *Biochem. J.* **1966**, *101* (3), 774–780.
- (8) Rekharsky, M. V; Mori, T.; Yang, C.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, H.; Sobransingh, D.; Kaifer, A. E.; Liu, S.; Isaacs, L.; Chen, W.; Moghaddam, S.; Gilson, M. K.; Kim, K.; Inoue, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (52), 20737–20742.
- (9) Zhou, J.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Yang, S.; Tang, J.; Liu, W.; Tang, W. *Nanoscale* **2016**.
- (10) Bazanova, O. B.; Bredikhina, Z. A.; Babaev, V. M.; Sharafutdinova, D. R.; Fayzullin, R. R.; Bredikhin, A. A. *Russ. J. Org. Chem.* **2015**, *51* (11), 1642–1648.
- (11) Nakano, H.; Takahashi, T.; Kadota, T.; Shirota, Y. *Adv. Mater.* **2002**, *14* (16), 1157–1160.
- (12) Tong, H.; Ouyang, S.; Bi, Y.; Umezawa, N.; Oshikiri, M.; Ye, J. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (2), 229–251.
- (13) Hernández-Navarro, S.; Tierno, P.; Farrera, J. A.; Ignés-Mullol, J.; Sagués, F. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (40), 10696–10700.
- (14) Alkordi, M. H.; Liu, Y.; Larsen, R. W.; Eubank, J. F.; Eddaoudi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (38), 12639–12641.
- (15) Wigglesworth, T. J.; Sud, D.; Norsten, T. B.; Lekhi, V. S.; Branda, N. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7272–7273.

- (16) Russew, M.-M.; Hecht, S. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (31), 3348–3360.
- (17) Feringa, B. L. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34* (6), 504–513.
- (18) Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (5), 2826–2885.
- (19) Benenson, Y. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (7), 675–685.
- (20) Li, J.; Loh, X. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (9), 1000–1017.
- (21) Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. *ACS Nano* **2007**, *1* (1), 50–56.
- (22) Esipenko, N. A.; Koutnik, P.; Minami, T.; Mosca, L.; Lynch, V. M.; Zyryanov, G. V.; Anzenbacher, P. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (9), 3617.
- (23) Pinalli, R.; Nachtigall, F. F.; Ugozzoli, F.; Dalcanale, E. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (16), 2377–2380.
- (24) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (10), 5161–5214.
- (25) Green, N. M. *Biochem. J.* **1964**, *92* (2), 16C–17C.
- (26) Chalet, L.; Miller, R. W.; Tausig, F.; Wolf, F. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1963**, *3*, 28.
- (27) Green, N. M. In *Methods in Enzymology*; 1990; Vol. 184, pp 51–67.
- (28) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (11), 5076–5080.
- (29) Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Livnah, O. *Immunol. Lett.* **2006**, *103* (1), 27–32.
- (30) Grunwald, C. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **2008**, *222* (5–6), 789–821.
- (31) Kurzban, G. P.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Horowitz, P. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (22), 14470–14477.
- (32) Eisenberg-Domovich, Y.; Hytönen, V. P.; Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Kulomaa, M. S.; Livnah, O. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61* (5), 528–538.
- (33) Weber, P.; Ohlendorf, D.; Wendoloski, J.; Salemme, F. *Science (80-.)*. **1989**, *243* (4887), 85–88.
- (34) Hendrickson, W. A.; Pahler, A.; Smith, J. L.; Satow, Y.; Merritt, E. A.; Phizackerley, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86* (7), 2190–2194.

- (35) Chilkoti, A.; Tan, P. H.; Stayton, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (5), 1754–1758.
- (36) Trotter, J.; Hamilton, J. A. *Biochemistry* **1966**, *5* (2), 713–714.
- (37) Lynen, F. *Biochem. J.* **1967**, *102* (2), 381–400.
- (38) Knowles, J. R. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58* (1), 195–221.
- (39) Kim, K.-H. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, *17* (1), 77–99.
- (40) Zempleni, J.; Wijeratne, S. S. K.; Hassan, Y. I. *BioFactors* **2009**, *35* (1), 36–46.
- (41) Kothapalli, N.; Camporeale, G.; Kueh, A.; Chew, Y. C.; Oommen, A. M.; Griffin, J. B.; Zempleni, J. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16* (7), 446–448.
- (42) Dakshinamurti, K.; Cheah-Tan, C. *Can. J. Biochem.* **1968**, *46* (1), 75–80.
- (43) Zempleni, J. *Annu. Rev. Nutr.* **2005**, *25* (1), 175–196.
- (44) Rosano, C.; Arosio, P.; Bolognesi, M. *Biomol. Eng.* **1999**, *16* (1–4), 5–12.
- (45) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L. A.; Chu, V.; Chilkoti, A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Biomol. Eng.* **1999**, *16* (1–4), 13–19.
- (46) Pazy, Y.; Kulik, T.; Bayer, E. a; Wilchek, M.; Livnah, O. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (34), 30892–30900.
- (47) Huberman, T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (34), 32031–32039.
- (48) Taninaka, A.; Takeuchi, O.; Shigekawa, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (39), 12578.
- (49) Stenkamp, R. E.; Trong, I. Le; Klumb, L. A.; Stayton, P. S.; Freitag, S. *Protein Sci.* **1997**, *6* (6), 1157–1166.
- (50) Hyster, T. K.; Knorr, L.; Ward, T. R.; Rovis, T. *Science (80-.)*. **2012**, *338* (6106), 500–503.
- (51) Ward, T. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (1), 47–57.
- (52) Karhunen, U.; Rosenberg, J.; Lamminmäki, U.; Soukka, T. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (23), 9011–9016.
- (53) Lesch, H. P.; Kaikkonen, M. U.; Pikkarainen, J. T.; Ylä-Herttuala, S. *Expert Opin.*

- Drug Deliv.* **2010**, 7 (5), 551–564.
- (54) Yang, W.; Cheng, Y.; Xu, T.; Wang, X.; Wen, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44 (2), 862–868.
- (55) Song, C.-X.; Szulwach, K. E.; Fu, Y.; Dai, Q.; Yi, C.; Li, X.; Li, Y.; Chen, C.-H.; Zhang, W.; Jian, X.; Wang, J.; Zhang, L.; Looney, T. J.; Zhang, B.; Godley, L. a; Hicks, L. M.; Lahn, B. T.; Jin, P.; He, C. *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29 (1), 68–72.
- (56) Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. *Clin. Chem.* **1991**, 37 (5), 625–636.
- (57) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Anal. Biochem.* **1988**, 171 (1), 1–32.
- (58) Green, N. M. *Biochem. J.* **1963**, 89 (3), 599–609.
- (59) Torreggiani, A.; Fini, G. *Biospectroscopy* **1998**, 4 (3), 197–208.
- (60) Torreggiani, A.; Fini, G. *J. Raman Spectrosc.* **1998**, 29 (3), 229–236.
- (61) Zsila, F. *J. Mol. Recognit.* **2011**, 24 (6), 995–1006.
- (62) Tahiri-Alaoui, A. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30 (10), 45e–45.
- (63) Wilson, D. S.; Keefe, A. D.; Szostak, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98 (7), 3750–3755.
- (64) Bittker, J. a; Le, B. V; Liu, D. R. *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20 (10), 1024–1029.
- (65) Bing, T.; Yang, X.; Mei, H.; Cao, Z.; Shangguan, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (5), 1798–1805.
- (66) Devlin, J.; Panganiban, L.; Devlin, P. *Science (80-)*. **1990**, 249 (4967), 404–406.
- (67) Lamla, T.; Erdmann, V. A. *J. Mol. Biol.* **2003**, 329 (2), 381–388.
- (68) Schmidt, T. G. M.; Koepke, J.; Frank, R.; Skerra, A. *J. Mol. Biol.* **1996**, 255 (5), 753–766.
- (69) Skerra, A.; Schmidt, T. G. M. *Biomol. Eng.* **1999**, 16 (1–4), 79–86.
- (70) Xu Zang; Zhiguang Yu; Yen-Ho Chu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8 (17), 2327–2332.
- (71) Keefe, A. D.; Wilson, D. S.; Seelig, B.; Szostak, J. W. *Protein Expr. Purif.* **2001**, 23 (3), 440–446.

- (72) Schmidt, T. G. M.; Skerra, A. *Protein Eng. Des. Sel.* **1993**, *6* (1), 109–122.
- (73) Skerra, A.; Schmidt, T. G. M. In *Methods in enzymology*; 2000; Vol. 326, pp 271–304.
- (74) Li, Y.; Frederick, K. M.; Haverland, N. A.; Ciborowski, P.; Belshan, M. *Proteomics Clin. Appl.* **2016**, *10* (2), 156–163.
- (75) Liu, L.; Sommermeyer, D.; Cabanov, A.; Kosasih, P.; Hill, T.; Riddell, S. R. *Nat. Biotechnol.* **2016**, No. February.
- (76) Terpe, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72* (2), 211–222.
- (77) Green, N. M. *Biochem. J.* **1965**, *94* (10), 23C–24C.
- (78) Green, N. M. *Biochem. J.* **1967**, *104* (3), 35P–71P.
- (79) Weber, P. C.; Wendoloski, J. J.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (9), 3197–3200.
- (80) Rutstein, D. D.; Ingenito, E. F.; Reynolds, W. E.; Burke, J. M. *J. Clin. Invest.* **1954**, *33* (2), 211–221.
- (81) Markus, G.; Karush, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (1), 89–94.
- (82) Baxter, J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *108* (3), 375–383.
- (83) Strzelczyk, P.; Bujacz, G. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1109*, 232–238.
- (84) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *FEBS Lett.* **1993**, *328* (1–2), 165–168.
- (85) Farrera, J.-A.; Canal, I.; Hidalgo-Fernández, P.; Pérez-García, M. L.; Huertas, O.; Luque, F. J. *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14* (7), 2277–2285.
- (86) Repo, S.; Paldanius, T. A.; Hytönen, V. P.; Nyholm, T. K. M.; Halling, K. K.; Huuskonen, J.; Pentikäinen, O. T.; Rissanen, K.; Slotte, J. P.; Airene, T. T.; Salminen, T. A.; Kulomaa, M. S.; Johnson, M. S. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (10), 1029–1039.
- (87) Behrend, R.; Meyer, E.; Rusche, F. *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **1905**, *339* (1), 1–37.

- (88) Hidalgo-Fernández, P.; Ayet, E.; Canal, I.; Farrera, J.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (16), 3147.
- (89) Katz, B. A.; Liu, B.; Cass, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (34), 7914–7920.
- (90) Jansen, R. J.; de Gelder, R.; Rowan, A. E.; Scheeren, H. W.; Nolte, R. J. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (8), 2643–2653.
- (91) Jansen, R. J.; Rowan, A. E.; Scheeren, H. W.; Nolte, R. J. M.; Jansen, R. J.; de Gelder, R. *Chem. Commun.* **1998**, No. 1, 121–122.
- (92) Ustrnul, L.; Kulhanek, P.; Lizal, T.; Sindelar, V. *Org. Lett.* **2015**, *17* (4), 1022–1025.
- (93) Farrera, J.-A.; Hidalgo-Fernández, P.; Hannink, J. M.; Huskens, J.; Rowan, A. E.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Nolte, R. J. M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (13), 2393.
- (94) Ayet, E. Tesi Doctoral: Síntesi de lligands monovalents i divalents semi-rígidis d'avidina i estreptavidina i estudi de la seva interacció, 2007.
- (95) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (23), 3409.
- (96) Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (21), 6627–6636.
- (97) Gillies, E.; Frechet, J. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (1), 35–43.
- (98) Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; De Castro, C.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K.-E.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Marradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhof, H.; Imberty, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4709–4727.
- (99) Dhande, Y. K.; Wagh, B. S.; Hall, B. C.; Sprouse, D.; Hackett, P. B.; Reineke, T. M. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (3), 830–840.
- (100) Jacobson, H.; Stockmayer, W. H. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18* (12), 1600.
- (101) Mandolini, L. In *Advances in Physical Organic Chemistry*; 1987; Vol. 22, pp 1–111.

- (102) Kramer, R. H.; Karpen, J. W. *Nature* **1998**, *395* (6703), 710–713.
- (103) Gargano, J. M.; Ngo, T.; Kim, J. Y.; Acheson, D. W. K.; Lees, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12909–12910.
- (104) Krishnamurthy, V. M.; Semetey, V.; Bracher, P. J.; Shen, N.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (5), 1312–1320.
- (105) Ercolani, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (51), 16097–16103.
- (106) Kitov, P. I.; Bundle, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (52), 16271–16284.
- (107) Cloninger, M. J.; Bilgiçer, B.; Li, L.; Mangold, S. L.; Phillips, S. T.; Wolfenden, M. L. In *Multivalency. Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; Wiley, 2012; pp 1–21.
- (108) Kane, R. S. *Langmuir* **2010**, *26* (11), 8636–8640.
- (109) Mammen, M.; Shakhnovich, E. I.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (10), 3168–3175.
- (110) Beletskaya, I.; Tyurin, V. S.; Tsivadze, A. Y.; Guillard, R.; Stern, C. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (5), 1659–1713.
- (111) Müller, W.; Ringsdorf, H.; Rump, E.; Wildburg, G.; Zhang, X.; Angermaier, L.; Knoll, W.; Liley, M.; Spinke, J. *Science* (80-.). **1993**, *262* (5140), 1706–1708.
- (112) Hannink, J. M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Farrera, J. A.; Foubert, P.; De Schryver, F. C.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Nolte, R. J. M. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40* (24), 4732–4734.
- (113) Taylor, D. M.; Fukushima, H.; Morgan, H. *Supramol. Sci.* **1995**, *2* (2), 75–87.
- (114) Green, N. M.; Konieczny, L.; Toms, E. J.; Valentine, R. C. *Biochem. J.* **1971**, *125* (3), 781–791.
- (115) González, J. Preparació i caracterització de monocapes autoensamblades d'avidina i aproximacions sintètiques a la síntesi de nous lligands . Preparació i caracterització de complexos metàl·lics amfifílics, 2011.
- (116) Cassar, L. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93* (2), 253–257.
- (117) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16* (50), 4467–

4470.

- (118) Dieck, H. A.; Heck, F. R. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93* (2), 259–263.
- (119) Sonogashira, K. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653* (1–2), 46–49.
- (120) Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (10), 5084.
- (121) Glaser, C. *Ann. der Chemie und Pharm.* **1868**, *147* (1), 78–107.
- (122) Evano, G.; Blanchard, N.; Toumi, M. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 3054–3131.
- (123) Singh, R.; Just, G. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (18), 4453–4457.
- (124) Gottardo, C.; Kraft, T. M.; Hossain, M. S.; Zawada, P. V; Muchall, H. M. *Can. J. Chem.* **2008**, *86* (5), 410–415.
- (125) Atwell, G. J.; Denny, W. A. *Synthesis (Stuttg.)* **1984**, No. 12, 1032–1033.
- (126) Wilbur, D. S.; Chyan, M.-K.; Hamlin, D. K.; Kegley, B. B.; Risler, R.; Pathare, P. M.; Quinn, J.; Vessella, R. L.; Foulon, C.; Zalutsky, M.; Wedge, T. J.; Hawthorne, M. F. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (1), 203–223.
- (127) Endres, A.; Maas, G. *Tetrahedron* **2002**, *58* (20), 3999–4005.
- (128) Connors, K. A. *Binding constants: the measurement of molecular complex stability*; Wiley: New York, 1987.
- (129) Smith, A. M. R.; Hii, K. K. (Mimi). *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 1637–1656.
- (130) Marigo, M.; Jørgensen, K. A. *Chem. Commun.* **2006**, No. 19, 2001–2011.
- (131) Aggarwal, V. K.; Olofsson, B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (34), 5516–5519.
- (132) Jiang, J.; He, L.; Luo, S.-W.; Cun, L.-F.; Gong, L.-Z. *Chem. Commun.* **2007**, No. 7, 736–738.
- (133) Luo, S.; Xu, H.; Li, J.; Zhang, L.; Mi, X.; Zheng, X.; Cheng, J.-P. *Tetrahedron* **2007**, *63* (46), 11307–11314.
- (134) Zhang, L.; Cui, L.; Li, X.; Li, J.; Luo, S.; Cheng, J. P. *European J. Org. Chem.* **2010**, No. 25, 4876–4885.
- (135) Fan, X.; Alza, E.; Pericàs, M. a. *RSC Adv.* **2012**, *2* (15), 6164.

- (136) Poladura, B.; Martínez-Castañeda, Á.; Rodríguez-Solla, H.; Concellón, C.; del Amo, V. *Tetrahedron* **2012**, *68* (32), 6438–6446.
- (137) Majewski, M.; Irvine, N. M.; MacKinnon, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6* (8), 1837–1840.
- (138) Córdova, A.; Sundén, H.; Bøgevig, A.; Johansson, M.; Himo, F. *Chem. - A Eur. J.* **2004**, *10* (15), 3673–3684.
- (139) Momiyama, N.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (20), 6038–6039.
- (140) Hayashi, Y.; Yamaguchi, J.; Sumiya, T.; Hibino, K.; Shoji, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (18), 5966–5973.
- (141) Kranjc, A.; Peterlin-Mašič, L.; Ilaš, J.; Preželj, A.; Stegnar, M.; Kikelj, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (12), 3251–3256.
- (142) Vekariya, R. H.; Patel, H. D. *Tetrahedron* **2014**, *70* (26), 3949–3961.
- (143) Alonso, D. A.; Najera, C. N. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009; Vol. 72, pp 367–656.
- (144) Bergmeier, S. C.; Seth, P. P. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (34), 6181–6184.
- (145) Hesp, K. D.; Bergman, R. G.; Ellman, J. A. *Org. Lett.* **2012**, *14* (9), 2304–2307.
- (146) Kovacs, J.; Ghatak, U. R. *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (1), 119–121.
- (147) Morgen, M.; Bretzke, S.; Li, P.; Menche, D. *Org. Lett.* **2010**, *12* (20), 4494–4497.
- (148) Sudhakar, C.; Reddy, P. P.; Kumar, C. G.; Sujitha, P.; Das, B. *European J. Org. Chem.* **2012**, No. 6, 1253–1258.
- (149) Chowdhury, R.; Ghosh, S. K. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3270–3273.
- (150) Denton, R. M.; An, J.; Adeniran, B.; Blake, A. J.; Lewis, W.; Poulton, A. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (16), 6749–6767.
- (151) Ren, W.-M.; Liu, Z.-W.; Wen, Y.-Q.; Zhang, R.; Lu, X.-B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (32), 11509–11518.
- (152) Brown, H. C.; Vander Jagt, D. L.; Rothberg, I.; Hammar, W. J.; Kawakami, J. H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (12), 2179–2188.

- (153) Hua, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (13), 3835–3837.
- (154) Sauers, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (18), 4873–4876.
- (155) Ding, R.; Fu, J.-G.; Xu, G.-Q.; Sun, B.-F.; Lin, G.-Q. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (1), 240–250.
- (156) Montana, A. M.; Nicholas, K. M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (5), 1569–1578.
- (157) Tadano, K.; Idogaki, Y.; Yamada, H.; Suami, T. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (7), 1201–1210.
- (158) Blanchette, M. A.; Choy, W.; Davis, J. T.; Essenfeld, A. P.; Masamune, S.; Roush, W. R.; Sakai, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (21), 2183–2186.
- (159) Baker, S. R.; Clissold, D. W.; McKillop, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29* (9), 991–994.
- (160) Cryle, M. J.; Ortiz de Montellano, P. R.; de Voss, J. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (7), 2455–2469.
- (161) Trost, B. M.; Stivala, C. E.; Hull, K. L.; Huang, A.; Fandrick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (1), 88–91.
- (162) Ponpandian, T.; Muthusubramanian, S. *Tetrahedron* **2013**, *69* (2), 527–536.
- (163) Corey, H. S.; McCormick, J. R. D.; Swensen, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (9), 1884–1885.
- (164) Sankaranarayanan, S.; Chattopadhyay, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9* (8), 1345–1350.
- (165) Habel, A.; Sperling, P.; Bartram, S.; Heinz, E.; Boland, W. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (15), 4975–4982.
- (166) Findlay, J. A.; Kwan, D. *Can. J. Chem.* **1973**, *51* (19), 3299–3301.
- (167) Würtenberger, I.; Angermaier, B.; Kircher, B.; Gust, R. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (20), 7951–7964.
- (168) Alonso, E.; Ramón, D. J.; Yus, M. *Tetrahedron* **1997**, *53* (42), 14355–14368.
- (169) Guillonneau, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38* (1), 1–11.

- (170) Calogero, F.; Allegrini, P.; Attolino, E.; Passarella, D. *European J. Org. Chem.* **2015**, No. 27, 6011–6016.
- (171) Ziegler, F. E.; Klein, S. I.; Pati, U. K.; Wang, T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (9), 2730–2737.
- (172) Subba Reddy, B. V.; Jalal, S.; Borkar, P.; Yadav, J. S.; Reddy, P. P.; Kunwar, a. C.; Sridhar, B. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (32), 6562.
- (173) Bal, B. S.; Childers, W. E.; Pinnick, H. W. *Tetrahedron* **1981**, *37* (11), 2091–2096.
- (174) Bürgisser, E.; Lefkowitz, R. J.; DeLean, A. *Mol. Pharmacol.* **1981**, *19* (3), 509–512.
- (175) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer US, 2006.
- (176) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*, 1st ed.; University Science Books, 2006.
- (177) Green, N. M. *Biochem. J.* **1964**, *90* (3), 564–568.
- (178) Lin, H. J.; Kirsch, J. F. In *Methods in Enzymology*; 1979; Vol. 62, pp 287–289.
- (179) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed.; Technical, L. S. & Ed.; 1989.
- (180) Suzuki, S.; Matsuura, K.; Nakazono, K.; Takata, T. *Polym. J.* **2014**, *46* (6), 355–365.