



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Bioconjugació de poliols i tiols amb agents antivírics

Elena Petit Roig

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.

Bioconjugació de poliols i tiols amb agents antivírics

Elena Petit Roig

Secció de Química Orgànica
Departament de Química Inorgànica i Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Memòria presentada per tal d'accedir al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona per na

Elena Petit Roig

i que duu per títol:

Bioconjugació de poliols i tiols amb agents antivírics

Programa de Doctorat en Química Orgànica
de la Universitat de Barcelona

Dirigida i revisada per:

Dr. Jaume Vilarrasa i Llorens

Dra. Anna Maria Costa i Arnau

Secció de Química Orgànica
Departament de Química Inorgànica i Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

Barcelona, setembre de 2019

*“Two things are infinite:
the universe and human stupidity,
but I’m not sure about the universe”*

Albert Einstein

El treball experimental de la present Tesi ha estat tot dut a terme al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona entre l'octubre de 2015 i el juny de 2019, llevat d'una petita estada al laboratori d'Immunobiologia Molecular de l'Hospital General Universitario Gregorio Marañón a Madrid.

En primer lloc, voldria agrair als meus directors de Tesi, Jaume Vilarrasa i Anna M^a Costa, no només el temps invertit en la meva formació, tant química com personal, i la independència amb què he pogut desenvolupar la meva Tesi Doctoral, sinó també la consecució dels corresponents ajuts per tal de realitzar-la. En segon lloc, també voldria agrair a la Fundació Privada Cellex per la seva subvenció des del febrer de 2017 fins a mitjans de 2019. En tercer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández per obrir-me les portes del seu laboratori i deixar-me experimentar un nou camí. També a TAURUS R&D en què vaig col·laborar (frec a frec amb el Dr. Lluís Bosch) entre octubre i desembre de 2018, en un tema que no té cap relació amb el que s'exposa en aquesta Tesi.

D'altra banda, ha estat molta la gent amb qui he compartit moments al llarg d'aquests anys al laboratori i als que m'agradaria donar les gràcies per aguantar-me. Al Dr. Lluís Bosch, perquè sempre hi ets, per ajudar, per ensenyar, per riure, per jugar, per criticar, etc. A la ja Dra. Laura Mola, perquè sempre serem les que parlen raro de "Lleide" i perquè hem viscut grans moments al laboratori i fora d'ell. A la doctoranda Mar Saladrigas, o Maremoto, perquè sempre saps com arrencar el somriure i l'alegria de la gent. Amb vosaltres tres m'agradaria fer un recull d'aquestes frases "anònimes" que hem anat guardant a la llibreta del lab: "La mòmia", "El braçu", "D'aquí dos mesos ja no estaré aquí", "Un fill no és un regal", "A l'aigua hi ha molta aigua", "És tant groc que és vermell", "Podríem fer un trio", "Últimament tinc relacions amb un gos", "No tinc turmell", "Cuqui", "Joder", "Que bé si va de nit al matí", "Ets un cuc", "Dear boy, are you silly or what?", "Etheeeer", "Hasta mañana", "Aha", "Ah, vale vale", "Bé", "Pfff". A tots els companys que han passat pel laboratori de baix, moltes gràcies per haver compartit grans moments: l'Anna M., la Laura D., l'Anna R., l'Ares M., el Víctor A., el Javixus, l'Itzel B., el Guillem V., el Crrrrristian (que et vas passar al lab de dalt), la Beatrice, la Ionela C. i a tots als que em pugui haver deixat.

Tampoc vull oblidar-me dels companys del laboratori de dalt, del gim, dels dinars de tupper i de molts riures compartits: a l'Héctor, perquè hem gaudit, i també patit, els últims moments de la Tesi amb cafès, pitis i riures, al Dani, per compartir els pexotes, al Jokin, per deixar caure les mandarines i fer el huevo (he rigut molt amb tu!), al Jordi, perquè tu i jo mai farem trampotes, a l'Alejandro C., a la Fernanda A., i al Víctor C..

A l'Azu i la Mar, perquè entre nosaltres sempre hi haurà química. Us aïlofiu. També a tots els amics i amigues de Bellpuig (Ju, gràcies per ser com ets!).

I, per suposat, vull donar les gràcies als de casa, als qui he d'agrair que tot això hagi estat possible, la mama i el papa, per la seva ajuda i suport incondicionals, perquè sempre han vist quelcom més en mi i sempre m'han empès endavant, a la tata, perquè sempre ens tindrem, a la yaya, per la força que desprens, al yayo, perquè sé que estàs aquí amb mi, al Black, al Buck, a la Suti i a la Mixi.

Rafi, simplement gràcies! Gràcies per ser com ets i acompanyar-me i recolzar-me sempre. "Por ser mi bastón al caminar!"

ÍNDEX GENERAL

PART TEÒRICA	13
INTRODUCCIÓ GENERAL I OBJECTIUS	15
I.1. La síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA)	19
I.2. Microbicides	30
I.3. Objectius	36
I.4. Organització	37
CAPÍTOL 1. SÍNTESE DE DERIVATS DEL BMS806	39
1.1. Introducció	43
1.2. Síntesi de derivats del BMS806	44
1.3. Conclusions	62
CAPÍTOL 2. REACCIÓ DE CICLOADDICIÓ [3+2] ENTRE UNA AZIDA I UN ALQUÍ TERMINAL CATALITZADA PER Cu(I)	65
2.1. Introducció	69
2.2. Síntesi de derivats de BMS. Reaccions <i>click</i>	73
2.3. Síntesi de lligands	74
2.4. Optimització de la cicloaddició [3+2] amb la β -ciclodextrina	79
2.5. Conclusions	82
CAPÍTOL 3. ADDICIÓ CONJUGADA DE TIOLS A TRIPLES ENLLAÇOS TERMINALS ACTIVATS	85
3.1. Introducció	89
3.2. Assaigs preliminars	92
3.3. Optimització de la reacció d'addició conjugada de tiols a propinamides	93
3.4. Estudi cinètic	96
3.5. Addicions conjugades de tiols al derivat del BMS 91	100
3.6. Conclusions	105
CAPÍTOL 4. PREPARACIÓ I CONJUGACIÓ DE POLÍMERS	107
4.1. Introducció	111
4.2. β -Ciclodextrina (β CD)	112
4.3. Poliglicerol hiperramificat (HPG)	120
4.4. Conclusions	129
CAPÍTOL 5. ASSAIGS <i>IN VITRO</i> DE PREVENCIÓ D'INFECCIÓ PER VIH	133
5.1. Procediment seguit	137
5.2. Relació de compostos avaluats	141
5.3. Resultats de citotoxicitat	142
5.4. Resultats d'inhibició del VIH	146
5.5. Conclusions	147
RESUM I CONCLUSIONS	149
SUMMARY AND CONCLUSIONS	153
EXPERIMENTAL SECTION	157
BIBLIOGRAFIA	241
ACRÒNIMS I ABREVIACIONS	249
ÍNDIX DE COMPOSTOS	253

PART TEÒRICA

**INTRODUCCIÓ GENERAL
I OBJECTIUS**

INTRODUCCIÓ GENERAL I OBJECTIUS

I.1. La síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA)	19
I.1.1. Història i curiositats del VIH	20
I.1.2. Classificació i estructura del VIH	22
I.1.3. El cicle replicatiu del VIH	23
I.1.3.1. Inhibidors d'entrada (ENIs)	25
I.1.4. Teràpia antiretroviral	26
I.1.4.1. Curs natural de la infecció del VIH	26
I.1.4.2. Fàrmacs contra el VIH	28
I.2. Microbicides	30
I.2.1. Història i classificació dels microbicides més rellevants	31
I.2.1.1. Microbicides de primera generació	32
I.2.1.1.1. <i>Nonoxynol-9</i>	32
I.2.1.1.2. <i>Savvy gel®</i>	33
I.2.1.1.3. <i>Invisible Condom</i>	33
I.2.1.2. Microbicides de segona generació	33
I.2.1.2.1. <i>Carraguard®</i>	33
I.2.1.2.2. <i>PRO 2000</i>	34
I.2.1.3. Microbicides potenciadors de les defenses naturals de la vagina	34
I.2.1.3.1. <i>Buffer Gel®</i>	34
I.2.1.4. Microbicides de tercera generació	35
I.2.1.4.1. <i>Maraviroc</i>	35
I.2.1.4.2. <i>Tenofovir</i>	35
I.2.1.4.3. <i>Dapivirine</i>	36
I.3. Objectius	36
I.4. Organització	37

INTRODUCCIÓ GENERAL I OBJECTIUS

I.1. La síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA)

El virus de la immunodeficiència humana (VIH) segueix essent un dels problemes més greus de la sanitat pública mundial. La fase més avançada de la infecció pel VIH és la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA), que en funció de la persona, pot tardar de 2 a 15 anys a manifestar-se. Segons la OMS, el 2016 van morir un milió de persones per causes relacionades amb aquest virus. A finals de 2016 hi havia aproximadament 36,7 milions de persones infectades pel VIH en el món, havent-se produït 1,8 milions de noves infeccions durant l'últim any.¹

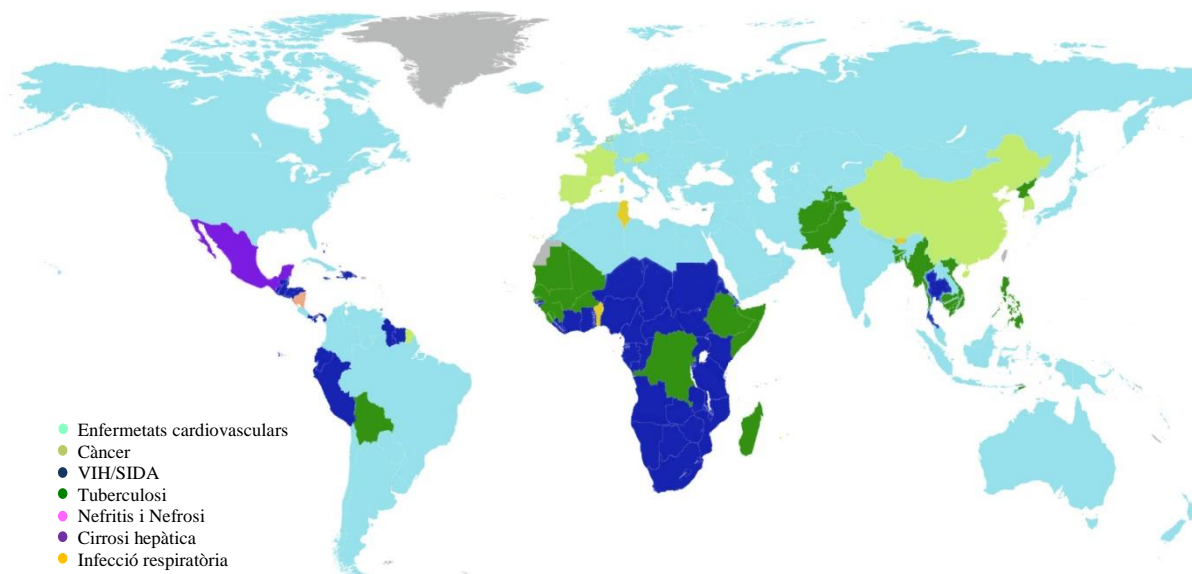


Figura I.1: Malalties més letals a cada estat o país.

La regió de l'Àfrica subsahariana, amb 25,6 milions de persones infectades, és la més afectada de tot el món, registrant quasi dos terços de les noves infeccions per VIH. Les últimes estadístiques de l'ONU sobre l'estat de l'epidèmia de la SIDA constaten que 34,5 milions d'adults (majors de 15 anys) viuen infectats amb el VIH, dels quals 17,8 milions són dones. A més, 2,1 milions de nens (menors de 15 anys) estan infectats. L'any 2016, només 19,5 milions d'afectats van tenir accés a la teràpia antiretrovívica, aproximadament un 54% dels adults i un 43% dels nens. Pel que fa a les inversions mundials, a finals de l'any 2016 hi havia 19100 milions de dòlars nord-americans disponibles per a la resposta a la SIDA en els països del tercer món. Els recursos nacionals van representar el 57% del total dels recursos destinats al VIH en aquests països. L'ONU estima que es necessitaran 26200 milions de dòlars per poder fer front a la SIDA l'any 2020 als països tercermundistes i 23900 milions l'any 2030.²

El VIH infecta les cèl·lules del sistema immunitari, alterant o anul·lant la seva funció de lluitar contra les infeccions i malalties. Això condueix a un deteriorament progressiu del sistema immunitari,

fet que provoca que es desenvolupin nombroses infeccions oportunistes i alguns tumors en els pacients amb SIDA, que a la llarga solen causar la mort del malalt. Malgrat els grans avenços en els darrers 30 anys, no es disposa d'un tractament eficaç per a la seva cura ja que el virus muta molt ràpid: quan les defenses han après a reconèixer una variant del virus i l'ataquen, es troben que s'han d'enfrontar a una nova variant, i així successivament fins que el sistema immunitari s'esgota. Tot i això, amb l'ajuda de fàrmacs antiretrovirals es pot evitar el deteriorament del sistema immunològic del pacient infectat, mantenint controlat el virus i fent que puguin gaudir d'una vida relativament saludable i productiva. El VIH es pot transmetre per via sexual, via parental (una transfusió de sang contaminada o l'ús compartit d'agulles, xeringues o altres instruments punxants) o per transmissió vertical (de mare a fill durant l'embaràs, el part o la lactància). Per aquest motiu, les mesures profilàctiques són fonamentals perquè el VIH no passi d'una persona a l'altra.²

I.1.1. Història i curiositats del VIH

S. XX: La infecció per VIH-1 es comença a propagar per l'Àfrica central i occidental a causa de la transmissió del virus de la immunodeficiència en simis (VIS) d'una subespècie de ximpanzés als humans.

1981: El centre per la prevenció i control de malalties de E.E.U.U. (CDC) descriu 5 casos de pneumònia en homosexuals a Los Àngeles i diversos casos de Sarcoma de Kaposi en la població gai de San Francisco i Nova York. Aquestes malalties es relacionen amb una disminució dràstica del nivell de limfòcits T CD4⁺ dels pacients. Als pocs mesos apareixen casos a Europa. El primer pacient a Espanya es diagnostica a l'Hospital Vall d'Hebron.

1982: Es comença a utilitzar l'expressió SIDA (Síndrome d'ImmunoDeficiència Adquirida) per referir-se a aquests casos i es defineixen 3 vies de contagi: sexual, sanguínia i de mare a fill.

1983: Els viròlegs francesos Luc Montagnier i Françoise Barré-Sinoussi, de l'institut Pasteur, aïllen i purifiquen el VIH com agent etiològic de la SIDA. Montagnier i Barré-Sinoussi envien les mostres al científic nord-americà Robert Gallo, que ajuda a concloure que el VIH és el causant de la SIDA.

1985: Mort l'actor Rock Hudson, la primera figura pública que havia manifestat que tenia SIDA.

Aquest mateix any es comença a utilitzar el test ELISA, la primera prova de detecció del virus.

1987: Es comença a subministrar el primer antiretroviral, l'AZT, un inhibidor de transcriptasa inversa del VIH. Tot i que té un bon efecte, es comprova que no té activitat suficient per controlar el VIH a llarg termini i que presenta efectes tòxics amb el temps.

1988: L'1 de desembre es celebra el Dia Mundial de la lluita contra la SIDA per primera vegada.

1991: Mort Freddie Mercury, cantant de Queen, a causa de la SIDA.



Durant aquest any el llaç roig es converteix en el símbol internacional de la lluita contra la malaltia.

1996: Es crea el Programa Conjunt de les Nacions Unides sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA).

El mateix any es presenta la teràpia combinada altament activa (TARGA/HAART), que redueix dràsticament la morbiditat i mortalitat per SIDA. En els països desenvolupats la malaltia passa de ser mortal a ser crònica.

1997: El CDC anuncia que les morts per SIDA comencen a disminuir per primera vegada gràcies a l'èxit de la teràpia combinada.

2000: L'ONU inclou, dins dels 8 objectius del mil·lenni, l'accés universal als tractaments antiretrovirals amb l'objectiu d'aturar la pandèmia al tercer món.

2008: Els científics francesos Luc Montagnier i Françoise Barré-Sinoussi reben el Premi Nobel de Medicina pel descobriment del virus de la immunodeficiència humana.

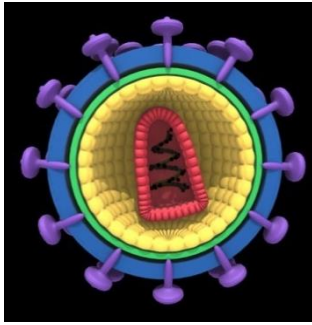
Aquest mateix any es publica el cas del "Pacient de Berlín", un portador del VIH que es va sotmetre a un transplantament de cèl·lules mare amb una mutació resistent al VIH per tractar la leucèmia que patia. Avui en dia no pren tractament antiretroviral i es considera l'única persona del món que s'ha curat de la infecció.

2012: La FDA (Food and Drug Administration) aprova l'ús de l'antiretroviral Truvada® com a profilaxis de preexposició (PrEP) per a persones amb un alt risc de contagi.

2015: L'estudi START (Strategic Timing of AntiRetroviral Treatment) demostra que començar el tractament antiretroviral en pic es diagnostica la malaltia redueix la morbiditat i mortalitat per SIDA. L'OMS canvia les seves directrius per recomanar el tractament immediat a tot el món.

2017: Investigadors de l'IrsiCaixa presenten els resultats preliminars d'un assaig clínic de vacuna terapèutica combinada amb un reactivador de latència a la Conferència sobre Retrovirus i Infeccions Oportunistes (CROI) celebrada a Seattle (USA). Per primera vegada, s'aconsegueix que 5 persones infectades controlin el VIH amb el seu sistema immunitari durant un període llarg de temps sense prendre cap tractament.

I.1.2. Classificació i estructura del VIH



El VIH forma part del gènere *Lentivirus*, que són retrovirus exògens no oncogènics que provoquen principalment depressions del sistema immunitari i/o alteracions al sistema nerviós central. A més, es caracteritzen per tenir un període d'incubació molt llarg. La família *Retroviridae* té un genoma en forma d'ARN i es replica a través de la formació d'un ADN provisional per transcripció d'un enzim també propi de la família, la transcriptasa inversa. Els lentivirus són capaços d'infectar cèl·lules que estan en contacte amb la que ells ocupen mitjançant la formació de sincicis (cèl·lula amb diversos nuclis) sense necessitat de formar partícules extracel·lulars (virions).

El virió del VIH és esfèric, d'un diàmetre aproximat de 80-150 nm, i està constituït per tres capes. La capa exterior és una bicapa lipídica que posseeix 72 prolongacions formades per les glicoproteïnes gp120 (cap extern) i gp41 (integrat a la membrana), unides no-covalentment, que actuen en el moment de la unió del virus a la cèl·lula hoste. La capa intermèdia és una nucleocàpsida icosaèdrica i està constituïda per l'antigen p24. Per últim, la capa interior té forma de con truncat i està constituïda per dues cadenes idèntiques d'ARN unides per la proteïna p9, còpies de l'enzim de transcriptasa inversa i nucleoproteïnes.

Existeixen dos tipus de VIH, anomenats VIH-1 i VIH-2. El primer correspon al virus descobert originalment, més virulent i infeccios que el VIH-2 i causant de la majoria d'infeccions per VIH al món. El VIH-2 és menys infeccios i es troba gairebé exclusivament als països de l'Àfrica occidental. Del VIH-1 n'estan descrits dos grups: el grup M (major o principal) amb onze subtipus (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J i K), i el grup O (*outlier*). Del VIH-2 n'estan identificats 7 subtipus (A, B, C, D, E, F i G).³

Els genomes del VIH-1 i el VIH-2 són molt similars. Els dos extrems es troben protegits per seqüències repetitives conegudes amb el nom de *Long Term Repeats* (LTRs). En la part central del genoma hi ha 9 gens. Els encarregats de codificar les proteïnes relativament més grans que intervenen en la reproducció del virus són 3 gens bàsics de la família dels retrovirus: Gag, Pol i Env. Els altres 6 gens codifiquen proteïnes més petites que intervenen en diferents moments del cicle vital del VIH-1: Vpu, Vpr, Vif, Tat, Rev i Nef.⁴

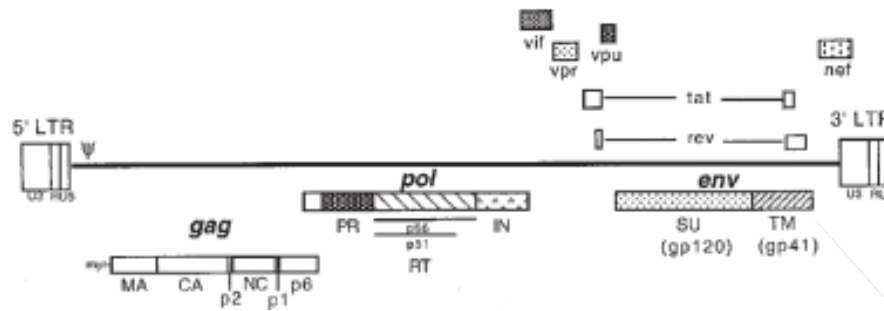


Figura I.2: Genoma del VIH-1.⁵

I.1.3. El cicle replicatiu del VIH

Entendre les interaccions que es produeixen entre les proteïnes virals i la maquinària cel·lular proporciona la base biològica per poder controlar aquesta pandèmia. Per tant, l'estudi del seu cicle vital proporciona noves dianes terapèutiques contra aquest virus.

El cicle de vida del VIH-1 consisteix de diverses etapes, que depenen de les interaccions seqüencials entre la cèl·lula viral i l'amfitrió cel·lular. Hi ha molts treballs publicats sobre les diferents etapes del cicle vital del VIH-1, presentant-lo i dividint-lo de diferents maneres. Simplificant una mica el complex procés d'interaccions i reaccions químiques que hi tenen lloc, hem optat per la que divideix el procés en 4 etapes:

1. **Entrada del virus:** El virus s'uneix als receptors CD4 de la superfície dels limfòcits T CD4⁺, macròfags, monòcits o cèl·lules dendrítiques a través de la glicoproteïna gp120 del virus. En aquest procés de reconeixement hi intervenen els coreceptors CCR5 i CXCR4. Després d'un seguit de canvis conformacionals, la proximitat entre la membrana cel·lular i viral permet la fusió de la cèl·lula a la glicoproteïna gp41 i la inevitable entrada de la càpsida del VIH a la cèl·lula hoste. Els fàrmacs que dificulten o eviten aquest procés d'apropament i fusió de les dues membranes són els anomenats **ENIs** (*entry inhibitors*), explicats amb més detall en el següent apartat (I.2.4.).
2. **Transcripció inversa:** Les proteïnes de la nucleocàpsida del virus es dissocien i tot el contingut viral (ARN, enzims i proteïnes) s'escampa pel citoplasma de la cèl·lula envaïda. L'enzim RT (*reverse transcriptase*) catalitza la formació de l'ADN viral de doble cadena (*double-stranded DNA*) utilitzant l'ARN viral com a plantilla. Aquest nou ADN sintetitzat és el substrat que intervé en el procés d'integració. Aquelles molècules que són capaces de pertorbar el funcionament de l'enzim RT s'anomenen **NRTIs** (*nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*) o **NNRTIs** (*non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*). Aquests darrers interaccionen en un altre lloc de l'enzim i exerceixen un efecte al·lostèric: modifiquen la conformació de l'enzim i redueixen l'afinitat del substrat al centre actiu.⁶

3. **Integració:** L'ADN viral de doble cadena travessa la membrana del nucli on l'enzim I (*integrase*) catalitza la seva incorporació a l'ADN de la cèl·lula hoste. En aquest punt, l'ADN viral integrat pot romandre reversiblement latent o experimentar la producció de virus actius. Les molècules que inhibeixen aquesta etapa són els **INIs** (*integrase inhibitors*).
4. **Transcripció i traducció:** L'ADN integrat es transcriu en ARN viral i es tradueix en un polipèptid de cadena llarga. La proteasa escapça aquest polipèptid llarg en proteïnes individuals més petites, que després reagrupa per tal de generar els virus fills i cloure'ls dins de les corresponents càpsides. Els inhibidors de proteasa (**PIs**) actuen en aquest nivell, impedit aquestes etapes finals del cicle.

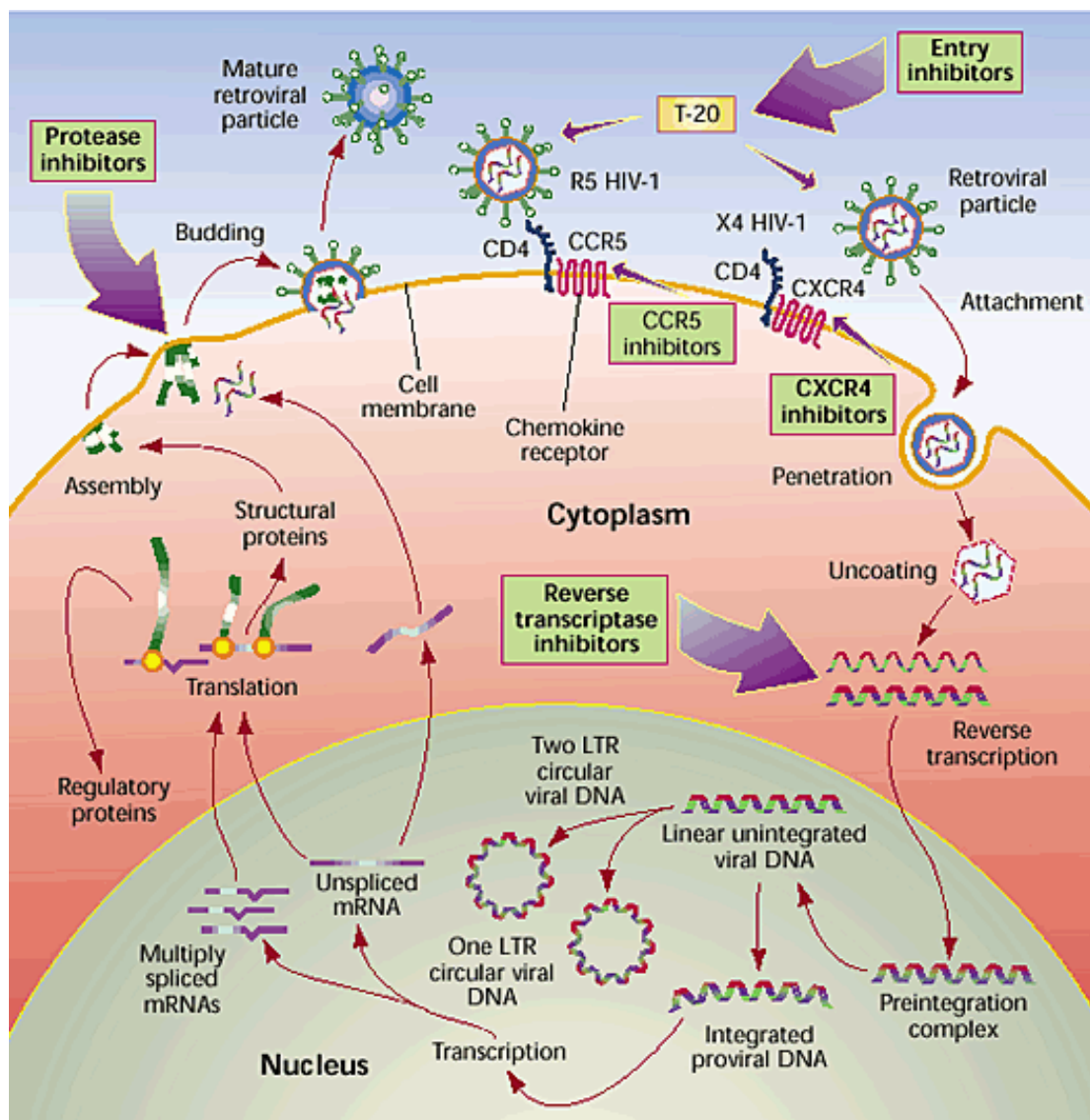


Figura I.3: Cicle replicatiu del VIH i diagrama d'acció dels diferents inhibidors.⁷

I.1.3.1. Inhibidors d'entrada (ENIs)

El receptor CD4 és el primer implicat en l'entrada del virus a la cèl·lula, essent el primer pas la seva interacció amb la glicoproteïna gp120 del virus.⁸ El CD4 és una immunoglobulina d'uns 55 kDa, localitzada principalment en la membrana dels limfòcits T CD4⁺ i, en menor mesura, en altres tipus de cèl·lules. La glicoproteïna gp120 del VIH-1, de 120 kDa, està formada per dos dominis units per ponts disulfur. En la cavitat formada entre ambdós dominis és on té lloc la interacció CD4-gp120, majoritàriament de tipus electrostàtic.⁹ El fet de ser el primer pas del procés d'infecció i que el lloc d'interacció estigui resguardat, protegit i ben conservat estructuralment, ha portat a estudiar aquesta unió com a possible diana terapèutica per evitar l'entrada del VIH, buscant fàrmacs que s'hi puguin unir específicament i en bloquegin la unió.

Després de la unió CD4-gp120, el nucli de gp120 pateix canvis conformacionals, passant d'un estat flexible a un estat rígid, cosa que permet la posterior interacció amb els coreceptors de quimiocines (CCR5 i/o CXCR4).¹⁰

La capacitat que té el VIH-1 d'infectar diferents tipus de cèl·lules i de variar segons la soca viral és l'anomenat tropisme viral, un concepte important a tenir en compte. Al llarg dels últims anys s'han descrit diverses maneres de classificar aquest tropisme. En l'actualitat es classifiquen segons el coreceptor que usa per infectar la cèl·lula diana. Així, les soques virals que s'uneixen al coreceptor CCR5 s'anomenen soques R5, les que ho fan via el coreceptor CXCR4 són soques X4, mentre que les soques que són capaces d'infectar cèl·lules utilitzant els dos tipus de coreceptor amb eficiències semblants s'anomenen R5X4 o de tropisme dual.¹¹

En els últims anys s'ha relacionat el tropisme viral amb l'estadi de la infecció i amb la progressió de la malaltia. Quan la malaltia és primerenca es detecten únicament variants de la soca R5, mentre que en els estadis més avançats s'observa la X4, que s'associa a una disminució dels limfòcits CD4, amb un augment de RNA del VIH i una progressió més ràpida cap a la SIDA.¹² Aquests coreceptors presenten una estructura de α -hèlix de quatre dominis transmembrana: 3 bucles extracel·lulars i un domini N-terminal (Nt). La consideració d'aquests dos coreceptors com a possibles dianes terapèutiques ha promogut la investigació de nous fàrmacs: els antagonistes de CCR5 i de CXCR4, que actuen inhibint la unió de la gp120 amb aquests coreceptors.¹³

Per últim, en l'entrada del virus a la cèl·lula, es fusionen la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste i l'embolcall lipídic viral. La glicoproteïna gp41 és la principal implicada en aquest procés. El seu caràcter hidrofòbic en l'extrem N-terminal és el que permet la seva inserció en la membrana cel·lular.¹⁴ Durant el procés de fusió es produeix una reorganització estructural de la gp41 i provoca la formació d'una estructura termostable de 6 hèlixs. El canvi d'energia lliure associada a la formació d'aquesta estructura tan estable és el que permet formar un porus de fusió i, en conseqüència, l'entrada de la càpsida del virus a l'interior de la cèl·lula.¹⁵ Aquest model de fusió ja s'havia descrit prèviament per al virus de la grip. Aquest últim pas, de fusió de les membranes, també és una bona diana terapèutica a estudiar per evitar la infecció.

En resum, l'entrada del VIH té 3 punts claus que són susceptibles de ser considerats dianes terapèutiques:

- La unió de la gp120 al receptor cel·lular CD4. El BMS806 s'anuncià com la primera molècula petita que era capaç d'inhibir la interacció de la glicoproteïna gp120 amb el receptor CD4 en el procés d'entrada del virus a la cèl·lula hoste.¹⁶
- La unió del complex gp120-CD4 als coreceptors CCR5 o CXCR4 (Maraviroc®).
- La fusió de les membranes cel·lular i viral (Fuzeon®).

I.1.4. Teràpia Antiretroviral^{1,17}

I.1.4.1. Curs natural de la infecció del VIH

El curs natural de la infecció pel VIH-1, sense tractament, consta de tres estadis diferenciats: la fase aguda, la fase crònica i la SIDA.

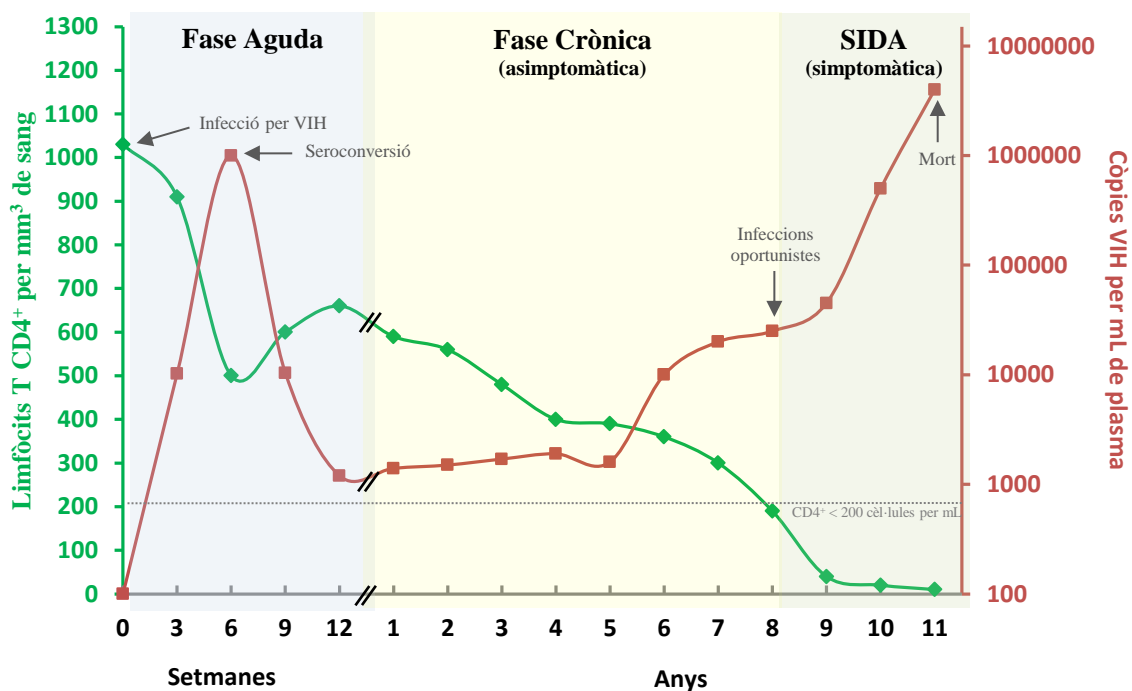


Figura I.4: Curs de la infecció per VIH.

Fase aguda

Durant la primera etapa de la infecció per VIH es dona una fase d'infecció aguda que comença quan el virus s'instal·la per primera vegada en el cos. Aquesta fase es caracteritza per un increment de la càrrega viral en sang i un descens dràstic dels nivells de limfòcits T CD4⁺. Sol durar entre 6 i 12 setmanes i és una fase d'alta contagiositat.

El virus arriba als ganglis limfàtics on es replica i allibera partícules virals noves al corrent sanguini abans que es desenvolupi una resposta immune a la infecció. Aquest procés sol durar entre 2 i 4 setmanes i en aquest període no es pot detectar la infecció mitjançant un test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), ja que el cos tarda aproximadament entre un i tres mesos per produir anticossos anti-VIH. A més, la majoria de persones recentment infectades presenten un quadre clínic similar a una mononucleosi o grip. Després de 2 o 3 setmanes, aquests símptomes desapareixen degut a una gran producció d'anticossos contra el virus que condueixen a la conversió serològica (seroconversió) del pacient. Aquesta resposta immune provoca una disminució significativa de la càrrega viral en sang i un augment del nombre de cèl·lules T CD4⁺ que, dissortadament, no és capaç d'eradicar el virus però sí mantenir-lo en equilibri fins a donar pas a la següent fase de la infecció.

Fase crònica

Després de l'etapa aguda de la infecció, l'afectat passa a un estat de portador asimptomàtic del virus en el qual no pateix la malaltia però sí que la pot transmetre. En aquest punt ja es pot detectar la infecció per VIH mitjançant la prova d'anticossos ELISA.

La fase crònica es caracteritza per una resposta cel·lular i humoral intensa que permet assolir un equilibri més o menys constant durant molt de temps (entre 3 i 10 anys amb una velocitat de progressió variable) entre la replicació del virus i la resposta immune. Amb el temps, hi ha una reducció progressiva de les cèl·lules CD4 que provoca que el sistema immunitari es vagi deteriorant, de manera que la capacitat de mantenir l'equilibri viral va disminuint, fins que s'arriba a l'etapa final de SIDA.

SIDA

En aquesta fase l'increment de l'activitat replicativa del virus produeix un descens marcat del nombre de limfòcits T CD4⁺ (per sota de 200 cèl·lules per mL de plasma). Com a conseqüència de l'esgotament del sistema immunològic aquest esdevé incapaç de combatre el virus i el pacient passa a un estat simptomàtic. En aquest estadi solen aparèixer infeccions oportunistes (s'anomenen oportunistes ja que són infeccions causades per bacteris, virus, fongs o paràsits que normalment no produeixen cap malaltia en individus amb un sistema immunològic sa) i alguns tumors com el sarcoma de Kaposi, el càncer de cèrvix i càncers del sistema immunitari coneguts com limfomes. A més, els pacients de SIDA solen manifestar un agreujament de l'estat general com ara febre, suors, dolors musculars, etc. En aquest moment s'experimenta un retrocés immunològic que condueix irreversiblement a la mort.

En funció del nombre de limfòcits T CD4⁺ i el % de CD4 respecte al total de limfòcits, els pacients es classifiquen en una de les següents categories, les quals aporten informació sobre el pronòstic i l'evolució de la malaltia.

Categories segons la xifra de limfòcits T CD4+	Categories clíniques		
	A	B	C
> 500/mm ³ (≥ 29%)	A1	B1	C1
200-499/mm ³ (14-28%)	A2	B2	C2
< 200/mm ³ (< 14%)	A3	B3	C3

Taula I.1: Classificació del pacient amb infecció VIH proposada pels Centres for Disease Control (CDC). La **categoria A** s'aplica a la primoinfecció (o fase aguda) i als pacients asimptomàtics. La **categoria B** s'aplica als pacients que presenten símptomes o malalties no pertanyents a la categoria C però que indiquen cert grau d'afectació immunològica. Per últim, la **categoria C** s'aplica a pacients que presenten malalties definidores de SIDA. Els pacients de les categories on l'àrea està ombrejada es consideren malalts de SIDA.

Actualment, no es possible eradicar el VIH-1 amb els tractaments antiretrovirals existents però, gràcies a les noves teràpies de tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA o HAART, *highly active antiretroviral therapy*), s'ha aconseguit prolongar la fase asimptomàtica i alentir la progressió cap a la SIDA de molts pacients.

I.1.4.2. Fàrmacs contra el VIH ^{17,18}

Com hem vist, el VIH ataca i destrueix les cèl·lules CD4 que són les encarregades de combatre les infeccions. La pèrdua d'aquestes cèl·lules fa que el cos no sigui capaç de combatre altres infeccions (infeccions oportunistes) i càncers. Els medicaments contra el VIH impedeixen que el virus es repliqui, fet que redueix la concentració del virus en la sang (càrrega viral). En haver-hi una menor concentració del virus a la sang, el sistema immunitari es recupera més ràpid i pot combatre les malalties colaterals que s'han esmentat.

Es recomana a totes les persones infectades pel VIH començar quan abans millor el tractament. Aquests medicaments ni curen ni maten el virus, però poden prevenir o alentir la seva replicació. A la vegada, aquests tractaments ajuden a disminuir el risc de contagi del VIH.

Fàrmacs inhibidors del VIH				
ENIs (entry inhibitors)				
Antagonistes de CCR5				
Maraviroc	MVC	Selzentry® Celsentri®	Pfizer & ViiV Healthcare	Agost 2007
Inhibidors de Fusió				
Enfuvirtida	T-20	Fuzeon®	Roche & Trimeris. Inc.	Març 2003
NRTIs (nucleosidic reverse transcriptase inhibitors)				
Abacavir	ABC	Ziagen®	Glaxo Smith Kline	Desembre 1998
Emtricitabina	FTC	Emtriva®	GILEAD Sciences	Juliol 2003
Lamivudina	3TC	Epivir®	Glaxo Smith Kline	Novembre 1995
Tenofovir Alafenamida	TAF			
Tenofovir disoproxil	TDF	Viread®	Gilead Sciences	Octubre 2001
Zidovudina	AZT, ZDV	Retrovir®	Glaxo Smith Kline	Març 1987
NNRTIs (non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors)				
Efavirenz	EFV	Sustiva® Stocrin®	Bristol-Myers Squibb & Merck & Co	Setembre 1998
Etravirina	ETR	Intelence®	Janssen	Gener 2008
Nevirapina	NVP	Viramune®	Boehringer-Ingelheim	Juny 1996
Nevirapina XR	NVP XR	Viramune XR®		Març 2011
Rilpivirina	RPV	Edurant®	Janssen	Maig 2011
INIs (integrase inhibitors)				
Dolutegravir	DTG	Tivicay®	ViiV Healthcare	Agost 2013
Raltegravir	RAL	Isentress®	Merck & CO. Inc.	Octubre 2007
Raltegravir HD	RAL HD	Isentress HD®		Maig 2017
PIs (protease inhibitors)				
Atazanavir	ATV	Reyataz®	Bristol-Myers Squibb	Juny 2003
Darunavir	DRV	Prezista®	Tibotec & Janssen	Juny 2006
Fosamprenavir	FOS-APV, FPV	Lexiva® Telzir®	Glaxo Smith Kline	Octubre 2003
Ritonavir	RTV	Norvir®	Laboratorios Abbott	Març 1996
Saquinavir	SQV	Invirase®	Roche	Desembre 1995
Tipranavir	TPV	Aptivus®	Boehringer-Ingelheim	Juny 2005
Potenciador Farmacèutic				
Cobicistat	COBI	Tybost®		

Cocktails (Combinacions de fàrmacs)				
Abacavir/Lamivudina	ABC/3TC	Epzicom® Kivexa®	Glaxo Smith Kline	Agost 2004
Abacavir/Dolutegravir/Lamivudina	ABC/DTG/3TC	Triumeq®	ViiV Healthcare	Agost 2014
Abacavir/Lamivudina/Zidovudina	ABC/3TC/AZT	Trizivir®	Glaxo Smith Kline	Novembre 2000
Atazanavir/Cobicistat	ATV/COBI	Evotaz®	Bristol-Myers Squibb	Gener 2015
Bictegravir/Emtricitabina/Tenofovir	BIC/FTC/TAF	Biktarvy®		Febrer 2018
Darunavir/Cobicistat	DRV/COBI	Prezcobix® Rezolsta®	Tibotec	Gener 2015
Darunavir/Cobicistat/Emtricitabine/Tenofovir	DRV/COBI/FTC/TAF	Symtuza®		Juliol 2018
Efavirenz/Emtricitabina/Tenofovir	EFV/FTC/TDF	Atripla®	Bristol-Myers Squibb & GILEAD Sciences	Juliol 2006
Efavirenz/Lamivudina/Tenofovir	EFV/3TC/TDF	Symfi Lo® Symfi®		Febrer 2018 Març 2018
Elvitegravir/Cobicistat/Emtricitabina/Tenofovir	EVG/COBI/FTC/TAF	Genvoya®	GILEAD Sciences	Novembre 2015
	EVG/COBI/FTC/TDF	Stribild®	GILEAD Sciences	Agost 2012
Emtricitabina/Rilpivirina/Tenofovir	FTC/RPV/TAF	Odefsey®		Març 2016
	FTC/RPV/TDF	Complera® Eviplera®)	GILEAD Sciences & Janssen Therapeutics	Agost 2011
Emtricitabina/Tenofovir	FTC/TAF	Descovy®		Abril 2016
	FTC/TDF	Truvada®	GILEAD Sciences	Agost 2004
Lamivudina/Tenofovir	3TC/TDF	Cimduo®		Febrer 2018
Lamivudina/Zidovudina	3TC/AZT	Combivir®	Glaxo Smith Kline	Setembre 1997
Lopinavir/Ritonavir	LPV/RTV	Kaletra®	Laboratorios Abbott	Setembre 2000

Taula I.2: Fàrmacs inhibidors del VIH. Dades de juliol de 2018.

I.2. Microbicides

Els microbicides són substàncies químiques o agents farmacològics que, aplicats a nivell vaginal o anal, són capaços de reduir o evitar la infecció pel VIH i/o altres patògens de transmissió sexual. Es poden administrar en diferents formats: gel, loció, crema, aerosol, supositori, esponja o anell vaginal. Tot i que el preservatiu ha mostrat una gran efectivitat per a la prevenció d'infeccions de transmissió sexual (ITS), ha estat insuficient per aturar-ne la propagació. A més, existeixen situacions difícils on l'ús del preservatiu pot no ser una opció, com en les dones que volen tenir fills o que tenen dificultats per negociar-ne el seu ús o que estan en risc de patir violència sexual. En el primer cas, un agent microbicida reduiria el risc d'infecció pel VIH durant la pràctica sexual en parelles discordants (on només un dels dos està infectat). En els altres escenaris, l'ús d'un microbicida pot oferir una primera protecció, en absència del preservatiu, i una protecció secundària, en el cas del trencament o lliscament del preservatiu durant el coit.

És molt important recalcar que en països poc desenvolupats, d'on provenen la majoria de persones infectades amb el VIH, l'ús d'agents microbicides ajudaria a aturar la pandèmia d'una manera significativa. En aquests països, les normes socials i culturals no permeten que les dones

estiguin en igualtat de drets que els homes. Per això en aquests països és més necessària una actuació urgent i eficaç per tal de oferir-les-hi un mecanisme per poder-se protegir.

Els primers microbicides estudiats pretenien proporcionar una àmplia cobertura contra diverses malalties de transmissió sexual. Posteriorment, es van investigar microbicides concrets contra la infecció pel VIH, formulats a partir de fàrmacs antiretrovirals (ARV), esperant que fossin capaços de bloquejar la infecció. Fins ara tots els microbicides estudiats estan lluny de ser més eficaços que el preservatiu.¹⁹

Un microbicida pot actuar de diverses maneres:

- Acabant amb els patògens sense perjudicar la flora vaginal.
- Creant una barrera entre el virus i les cèl·lules sanes per bloquejar la infecció.
- Inhibint la rèplica del virus amb fàrmacs ARVs en el cas que ja hagi infectat la cèl·lula.

I.2.1. Història i classificació dels microbicides més rellevants

Durant els últims anys s'han estudiat diferents mecanismes per prevenir la transmissió sexual del VIH. Segons el mecanisme d'acció, podem diferenciar els microbicides en dos grans grups:

- **Microbicides de 1a i 2a generació**, sense fàrmacs antiretrovirals, amb composicions diverses com ara tensioactius, polianions, acidificants o anticossos. Aquesta família de microbicides actuen mentre el virus es troba en l'entorn vaginal.
- **Microbicides de 3a generació**, que contenen fàrmacs utilitzats pel tractament del VIH. Aquest conjunt actua un cop el virus ha travessat l'epiteli vaginal prevenint l'interiorització del virus a les cèl·lules T CD4⁺ amb inhibidors d'entrada (ENIs) o prevenint la replicació viral amb inhibidors de transcriptasa inversa (RTIs).²⁰

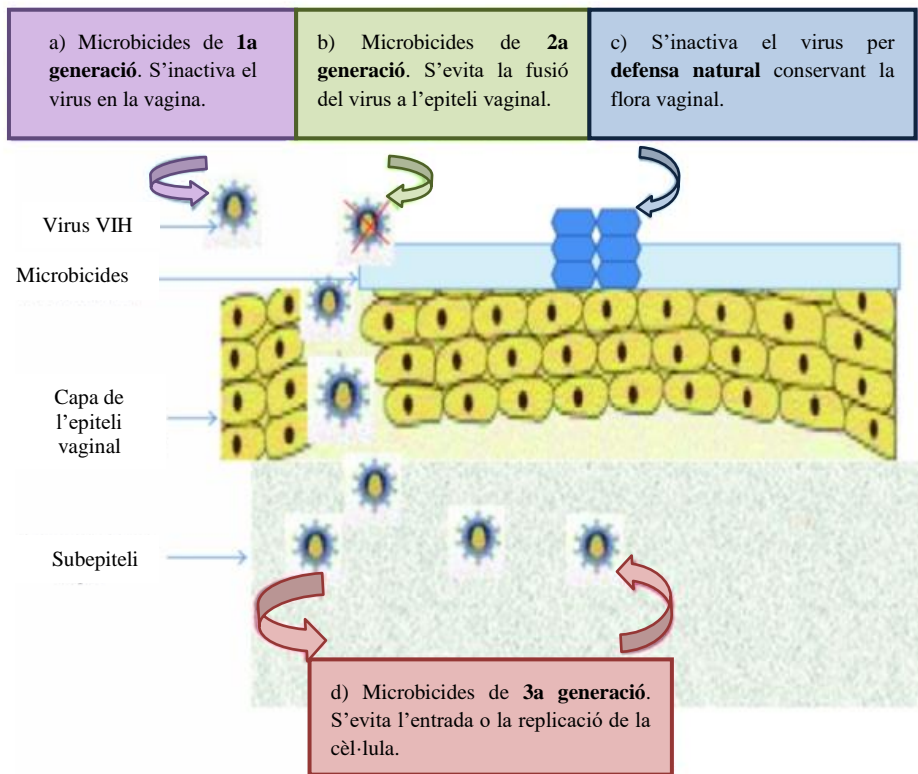


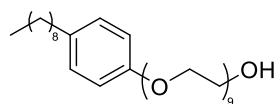
Figura I.5: Diagrama d'acció dels diferents tipus de microbicides.²¹

I.2.1.1. Microbicides de primera generació

Els microbicides de primera generació són agents surfactants o tensioactius que tenen com a objectiu inactivar el virus en la vagina, abans que traspassi l'epiteli vaginal. L'objectiu és pertorbar o modificar l'estructura de la membrana viral fent-la més porosa i menys susceptible a possibles irrupcions.

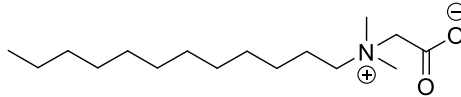
I.2.1.1.1. Nonoxynol-9 (N-9)

El N-9 està disponible en diferents formulacions com ara gels, supositoris i pel·lícules. Va ser el primer espermicida que es va avaluar com a microbicida contra la transmissió del VIH. Els tensioactius actuen com a virucides, reduint la tensió superficial del patogen i provocant la inactivació del microorganisme abans de posar-se en contacte amb la mucosa vaginal. Després de diversos estudis es va concloure que no oferia suficient protecció contra el VIH. Fins i tot es va arribar a determinar que augmentava la incidència de lesions genitals incrementant alhora el risc d'infecció per altres malalties de transmissió sexual.²²



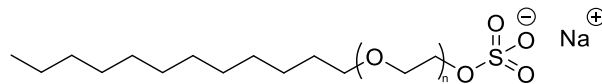
I.2.1.1.2. Savvy gel® (C31G)

És un agent antimicrobià i espermicida que es va provar com agent anti-VIH. El seu mecanisme d'acció és similar al del N-9, però es dissemina més ràpidament a través de la mucosa genital i és menys tòxic. Tot i així, diversos estudis en assaigs clínics en la fase III van demostrar que no oferia cap protecció contra la infecció pel VIH.²³



I.2.1.1.3. Invisible Condom (Sodium Lauryl Sulfate i derivats)

El conegut agent $C_{12}H_{25}OSO_3^-Na^+$ (SLS) i alguns derivats seus com el que es representa dessota es van promocionar com a “preservatiu invisible”. A més, es va demostrar que interferien amb diferents tipus de virus. A temperatura ambient és un líquid que, un cop s’aplica sobre la paret vaginal es transforma en gel gràcies a la temperatura corporal. No obstant això, la seva ineficàcia contra la transmissió del VIH es va demostrar en la fase II dels assaigs clínics duts a terme.²⁴

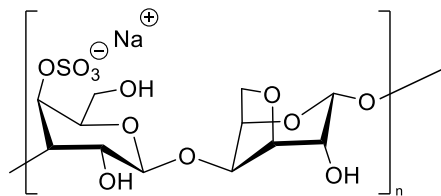


I.2.1.2. Microbicides de segona generació (polianions)

Després del fracàs dels agents surfactants com a microbicides, les investigacions es van orientar cap al desenvolupament de microbicides que evitessin l’acoblament i la fusió del virus en el tracte genital. L’objectiu era bloquejar l’entrada viral a la cèl·lula a través de formulacions senzilles que simplement evitessin el contacte entre la superfície de la mucosa genital i els patògens. Molts d’aquests productes no són bloquejadors específics sinó que actuen contra diversos microorganismes.

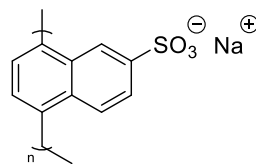
I.2.1.2.1. Carraguard® (PC-515)

És un gel microbicida on el principi actiu és el carragenà, un polisacàrid lineal en forma de sulfat extret d’algues marines. El carragenà s’utilitza habitualment en productes de cosmètica, dentífrics i aliments. És un producte segur i no és tòxic. Es va formular com un gel que s’unia amb èxit als virus (VIH, herpes simple i el del papil·loma humà) i que s’havia d’aplicar a la vagina una hora abans de mantenir relacions sexuals. Els estudis van demostrar que el gel era segur i els efectes secundaris associats eren lleus i poc freqüents, però en la fase II dels assaigs clínics es va comprovar que no era efectiu en la prevenció de la transmissió del VIH. No obstant això, es va demostrar la seva capacitat per reduir el risc de transmissió sexual del virus del papil·loma humà.²⁵



I.2.1.2.2. PRO 2000 (Polynaphthalene Sulfonate)

És un gel microbicida on el principi actiu és un polímer sintètic del sulfonat de naftalè. Es tracta d'un polianió que és capaç d'interaccionar amb les càrregues positives de la gp120 del virus bloquejant així l'entrada del virus a la cèl·lula. Ha demostrat una activitat anti-VIH *in vitro* i en models animals. En els assaigs clínics ha donat bons resultats en seguretat i acceptabilitat en la fase I i II. Ara bé, en la fase III no va prevenir el contagi del VIH.²⁶

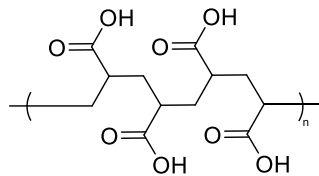


I.2.1.3. Microbicides potenciadors de les defenses naturals de la vagina

Els microbicides classificats en aquest apartat haviem de complementar o millorar les defenses immunes naturals de la vagina. La vagina té un pH massa àcid perquè els espermatozoides i diferents patògens, com el VIH, hi puguin sobreviure. Una característica important de l'entorn vaginal és la capacitat dels lactobacils (bacteris residents a la vagina) per mantenir el pH àcid adequat alliberant compostos antimicrobians com l'àcid làctic, peròxid d'hidrogen, bactericides i biosurfactants. Durant les relacions sexuals, l'esperma, amb un pH alcalí, neutralitza l'acidesa de la vagina afavorint la supervivència dels espermatozoides i dels patògens de diferents virus. Així, els microbicides classificats en aquest grup estan pensats perquè mantinguin un pH àcid o que substitueixin els lactobacils absents.

I.2.1.3.1. Buffer Gel®

És un gel spermicida basat en un polímer de carbopol® (policarboxílic). Aquest gel actua com acidificant, tamponant el medi, i és capaç de mantenir el pH àcid vaginal normal en presència d'esperma. A més, després de la seva aplicació crea una barrera física que pot aturar o alentir el pas dels patògens a les parets vaginals. Tanmateix, tot i que els estudis fets han demostrat que és segur, no evita la transmissió del VIH.²⁷

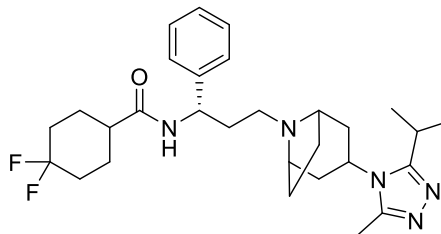


I.2.1.4. Microbicides de tercera generació

Aquesta última generació de microbicides inclou les formulacions que combinen productes de les anteriors generacions o noves formulacions de gels amb fàrmacs antiretrovirals (**Taula I.2**). Aquests microbicides actuen en alguna etapa específica del cicle replicatiu del VIH, depenent del fàrmac afegit. Així, poden inhibir l'entrada del virus a la cèl·lula hoste si el fàrmac és un ENI o la seva replicació si el fàrmac és un RTI.

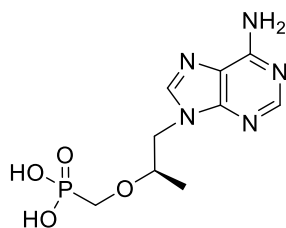
I.2.1.4.1. Maraviroc (MVC)

El MVC és un inhibidor d'entrada antagonista del receptor CCR5. S'han realitzat diversos estudis que demostren una bona eficàcia dels microbicides que contenen MVC, àdhuc en presència d'esperma. A més, s'ha vist que té una gran tendència a concentrar-se en el teixit vaginal. Assaigs realitzats amb ratolins i macacos han conclòs que diferents formulacions amb concentracions variables de MVC proporcionen seguretat i protecció contra la transmissió del VIH. Tot i això, resulta vital el temps transcorregut entre l'aplicació i el contacte amb el virus. Els estudis posteriors s'han centrat a modificar la formulació del gel amb diferents concentracions de MVC per millorar-ne l'efectivitat.²⁸



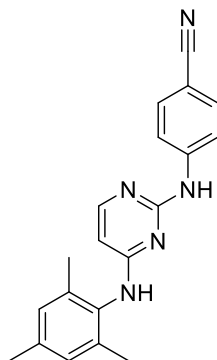
I.2.1.4.2. Tenofovir (TFV, (R)-PMPA)

L'estudi CAPRISA 004 va avaluar la seguretat i eficàcia per prevenir el contagi amb el VIH d'un gel vaginal que contenia un 1% de TFV en dones subsaharianes. Es va trobar que el gel reduïa la infecció pel VIH des d'un 39% i fins a un 54% en els millors dels casos. Amb aquests resultats inicials, força prometedors, es van iniciar diferents assaigs clínics per analitzar diversos paràmetres com el factor d'adherència a la mucosa vaginal, el temps transcorregut entre l'aplicació i la relació sexual i un factor, que ha demostrat ser molt important, que és l'activació innata del nostre sistema immune abans d'adquirir una infecció.²⁹



1.2.1.4.3. Dapivirine (DPV)

El DPV s'ha sotmès a molts assaigs clínics perquè semblava un dels fàrmacs més prometedors d'acabar essent un microbicida potent en la prevenció de la transmissió del VIH. Diferents assaigs *in vitro* han demostrat la seva activitat anti-VIH, alhora que amb models animals s'ha comprovat que diferents formulacions de gels a diferents concentracions de DPV no irriteren la vagina.³⁰ No obstant això, l'eficàcia d'aquest fàrmac s'ha d'avaluar més a fons, especialment en el seu ús profilàctic continu, ja que s'ha observat que el VIH desenvolupa resistència a aquest fàrmac molt ràpidament.³¹



1.3. Objectius

És sabut que la bioconjugació d'agents terapèutics amb altres molècules és una via factible per a millorar la forma d'administració d'un fàrmac. Amb aquesta finalitat, la unió covalent de diferents derivats del fàrmac BMS806 a estructures polimèriques de tipus gel podria convertir el fàrmac en un agent tòpic amb una absorció més controlada i esdevindria una nova generació de microbicides (**4a generació**).

En primer lloc, aquest treball s'ha enfocat cap a la síntesi de derivats de BMS, un fàrmac que s'uneix específicament i reversiblement a la gp120 del virus i bloqueja els canvis conformacionals quan s'uneix al receptor CD4, actuant doncs com a inhibidor d'entrada (ENIs). La majoria dels derivats de BMS806 sintetitzats fins ara no han arribat a fases clíniques avançades a causa de la seva alta toxicitat i baixa biodisponibilitat. La via oral no és recomanable però poden ser útils per via tòpica. Per tant, es va pensar en ells com a potencials microbicides.

En aquest context, necessitàvem mètodes de bioconjugació de tipus *click*, és a dir, reaccions simples, ràpides, selectives i quantitatives. De bon principi es va pensar en la cicloadició [3+2] entre

una azida i un triple enllaç, catalitzada per Cu(I), una reacció àmpliament usada i ben coneguda al nostre grup. A més, es va voler idear un nou mètode de bioconjugació, aprofitant el coneixement en el nostre laboratori de diferents reaccions d'addició conjugada a triples enllaços activats. Es va estudiar i optimitzar la reacció d'addició de tiols a triples enllaços activats (propinamides) amb l'objectiu final d'aplicar aquest mètode *click* en la conjugació de les nostres molècules.

El primer pas va ser la síntesi de diferents derivats del BMS806, mantenint l'esquelet intacte i unint-hi diferents tipus de cadenes espaciadores en diferents posicions de l'anell benzílic de l'indol. Després, aquestes cadenes ens servirien de punt d'unió entre el fàrmac i un polímer concret, per aconseguir el nostre microbicides final.

La idea era trobar el derivat de BMS806 més actiu biològicament per conjugarlo al nostre polímer, prèviament preparat al laboratori, mitjançant diferents mètodes de bioconjugació. Enviàrem mostres dels microbicides sintetitzats a laboratoris especialitzats en microbicides (Hospital Universitario Gregorio Marañón, HUGM, de Madrid) a fi d'avaluar la seva citotoxicitat i activitat anti-VIH.

I.4. Organització

En el **Capítol 1** d'aquesta Tesi es descriu la preparació de diversos derivats de BMS806 units als diferents *linkers* per les diferents posicions del grup benzo de la molècula.

En el **Capítol 2** s'estudia i s'optimitza, per a substrats polars, la reacció de cicloaddició [3+2] entre una azida i un triple enllaç terminal catalitzada per Cu(I). També se sintetitzen diferents lligands per ajudar a disminuir la citotoxicitat d'aquesta reacció.

En el **Capítol 3** es posa a punt la reacció d'addició conjugada de tiols a triples enllaços terminals activats desenvolupada al nostre grup.

En el **Capítol 4** es preparen les diferents estructures polimèriques i s'uneixen als diferents derivats escollits aplicant els diferents mètodes de bioconjugació suara esmentats.

Finalment, en el **Capítol 5**, es descriu l'avaluació de la citotoxicitat i l'activitat anti-VIH, que fou portada a terme per mi mateixa en el laboratori d'immunobiologia molecular de l'HUGM.

CAPÍTOL 1
SÍNTESI DE DERIVATS DEL BMS806

CAPÍTOL 1. SÍNTESE DE DERIVATS DEL BMS806

1.1. Introducció	43
1.2. Síntesi de derivats del BMS806	44
1.2.1. Substitucions en la posició N1	45
1.2.2. Substitucions en la posició C4	47
1.2.2.1. Derivats azaindòlics	47
1.2.2.2. Derivats indòlics	56
1.2.3. Substitucions en la posició C5	58
1.2.4. Substitucions en la posició C7	60
1.3. Conclusions	62

1.1. Introducció

Fins l'any 2000,³² la majoria d'ENIs dirigits al bloqueig de la unió de la glicoproteïna viral gp120 amb el receptor CD4 eren molècules amb elevat pes molecular (pèptids, derivats de CD4 solubles i anticossos). Certs tipus de polímers sulfatats també es van estudiar per blocar aquesta unió però s'unien menys específicament a la gp120. L'any 1998, les estructures cristal·logràfiques de raigs X de la gp120 associada amb el receptor CD4 van proporcionar detalls moleculars del lloc actiu vinculat a la unió CD4-gp120. Això va significar un gran avenç a l'hora de desenvolupar inhibidors d'entrada petits per interrompre la seva interacció.³³ L'any 2003, científics de la companyia nord-americana Bristol-Myers Squibb van descriure per primer cop una molècula de baix pes molecular, el BMS-378806 (**1**, BMS806), capaç d'unir-se específicament i reversible a la gp120, inhibint així la interacció gp120-CD4 i evitant la infecció pel VIH-1.^{16,34} Aquesta molècula semblava adequada per avançar en el desenvolupament clínic ja que els estudis farmacocinètics i farmacològics inicials donaven suport a una formulació d'administració per via oral.³⁵ Estudis posteriors van demostrar que presentava una sèrie de propietats desitjables, com el baix grau d'unió a proteïnes i un baix potencial d'interacció amb altres medicaments. Malgrat això, durant la fase clínic es va comprovar que no tenia una bona absorció oral i que la vida mitjana per una dosificació diària no era l'adequada.³⁶ Tanmateix, es va poder demostrar l'eficàcia d'aquest compost en el bloqueig de la infecció quan s'utilitzava com a microbicida tòpic.³⁷

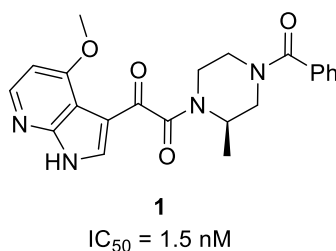


Figura 1.1: BMS-378806 (BMS806).

Durant la fase clínic, el compost **1** va ser substituït pel compost BMS-488043 (**2**, BMS403), però a l'agost de l'any 2004, en la fase II dels assaigs clínics, el desenvolupament d'aquest candidat va ser interromput pel propi fabricant per problemes de caire farmacocinètic. En aquest punt, la companyia nord-americana es va centrar a introduir tot tipus de substituents (halur, alquil, alcòxi, etc.) en totes les posicions de l'anell (aza)indòlic del BMS per estudiar els seus efectes en la inhibició de la interacció gp120-CD4. Van concloure que la substitució en les posicions C4 i C7 incrementava notablement la potència antiviral.³⁸ Després d'anys d'investigació i analitzant tot tipus de substituents,³⁹ van trobar un conjunt d'inhibidors de nova generació amb biodisponibilitats i toxicitats millorades com el BMS-663068 (**3**, Fostemsavir®), el qual es troba actualment en la fase III de desenvolupament clínic (Clinical Trials ID: NCT02362503).⁴⁰⁻⁴²

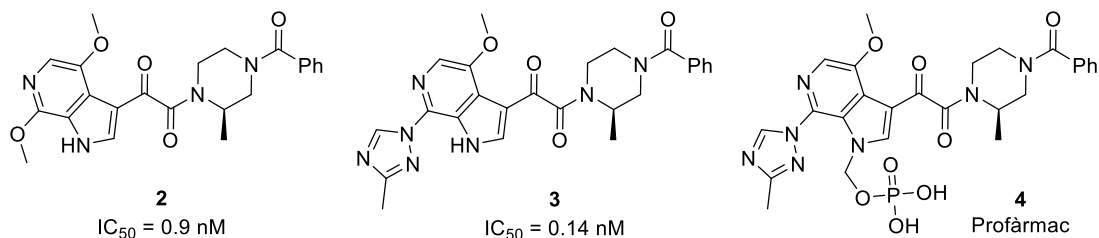
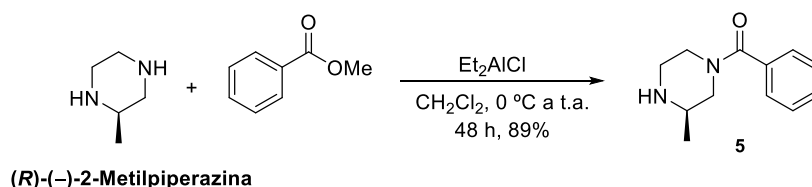


Figura 1.2: BMS403 (2), Fostemsavir® (3) i Temsavir® (4).

1.2. Síntesi de derivats del BMS806

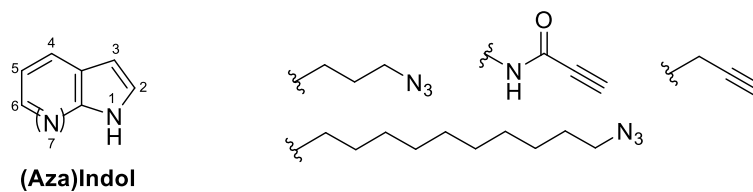
Com s'ha esmentat anteriorment, l'objectiu d'aquesta Tesi Doctoral és dissenyar un microbicida on el fàrmac sigui un derivat d'estructura tipus BMS. Analitzant l'activitat anti-VIH del BMS806, Joaquim Caner durant la seva Tesi Doctoral,⁴³ va comprovar que el metil en la posició C2 de l'anell de piperazina del BMS806 no era essencial, però sí que era contraindicada la configuració *S* d'aquest centre estereogènic. També va arribar a la conclusió que el grup benzoïl era important, ja que en sintetitzar i avaluar biològicament derivats amb substituents diferents a la posició N4 de la piperazina, la seva activitat antiviral decreixia.

Així doncs, per tal d'afrontar la síntesi de tots els derivats indòlics, el primer pas que es va realitzar fou la preparació de la (*R*)-2-metilpiperazina benzoïlada **5**,³⁴ que s'obtingué amb bon rendiment gràcies a una reacció d'acilació regioselectiva de la (*R*)-(-)-2-metilpiperazina comercial.



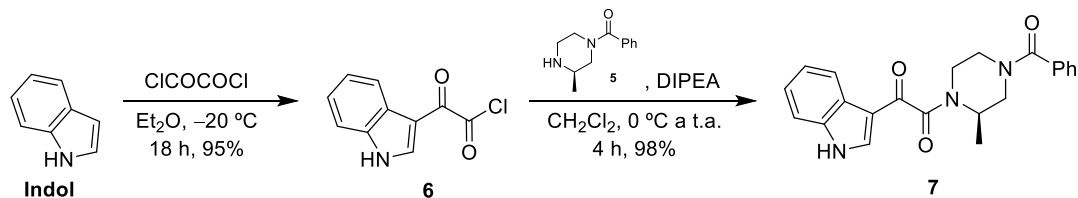
Esquema 1.1

A partir d'aquí es va continuar amb la síntesi de derivats de BMS substituïts en diferents posicions de l'anell (aza)indòlic (C4, C5, C6 i C7) per avaluar biològicament quin tipus de substitució donava millors activitats a l'hora de prevenir la infecció per VIH (explicat en el **Capítol 5** d'aquesta Tesi). En cadascuna d'aquestes posicions es volien unir diferents *linkers* o espaiadors funcionalitzats en un extrem per a la posterior conjugació al gel (de tipus polisacàrid). Com s'ha presentat en els objectius, els mètodes escollits per dur a terme les conjugacions són la cicloadició [3+2] catalitzada per Cu(I) entre una azida i un triple enllaç i l'addició conjugada de tiols a propinamides (triple enllaç activat). Per tant, es va decidir de funcionalitzar l'extrem del *linker* de diferents maneres amb un grup azido, un grup propargil (2-propin-1-il) i un grup propinamido.


 Figura 1.3: Posicions de l'(aza)indol i diferents *pre-linkers*.

1.2.1. Substitucions en la posició N1

Per a la síntesi dels derivats indòlics funcionalitzats en la posició N1 amb els diferents *linkers* es va partir de l'indol comercial. Com ja és sabut,⁴⁴ en les reaccions de substitució electròfila aromàtica (S_{EAr}) la posició més reactiva de l'indol és la C3 degut al seu caràcter parcial d'enamina. L'acilació de Friedel-Crafts de l'indol amb clorur d'oxalil ens va permetre d'obtenir el clorur d'àcid **6**, que seguidament es va acoblar amb la piperazina benzoilada **5** tot fent la diamida **7**.



Esquema 1.2

A continuació, es va fer reaccionar **7** amb dos dibromoalcans diferents (**a** i **b**), unint-se per la posició N1 de l'indol.

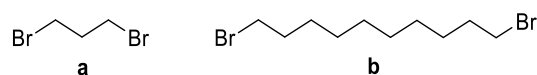
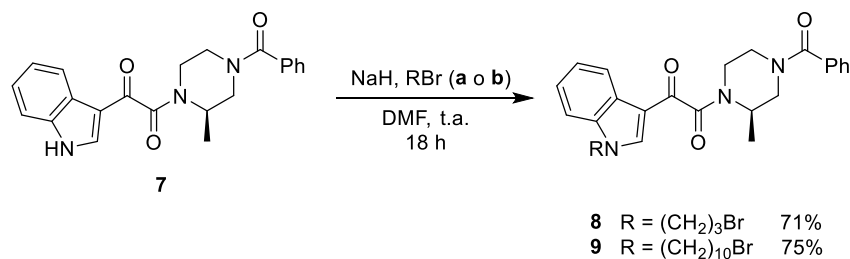
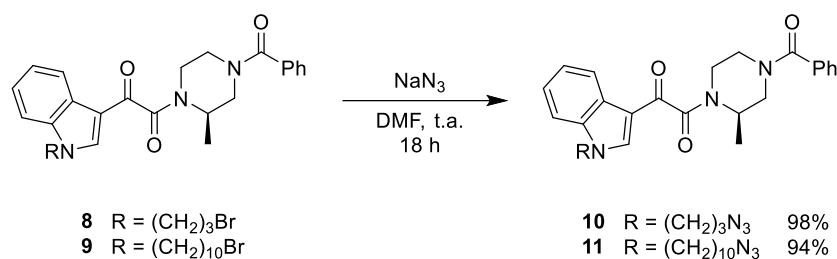


Figura 1.4: Dibromoalcans emprats.



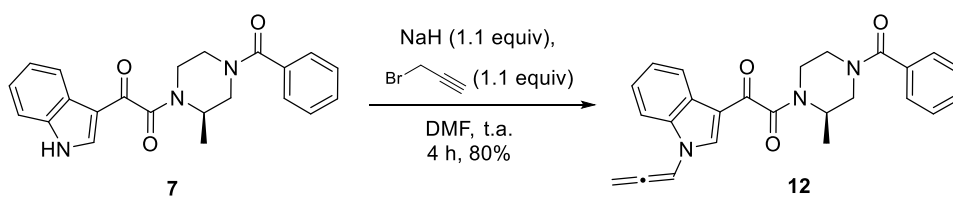
Esquema 1.3

Amb els productes **8** i **9** a les nostres mans, es va substituir el brom per un grup azida per reacció amb azida de sodi.



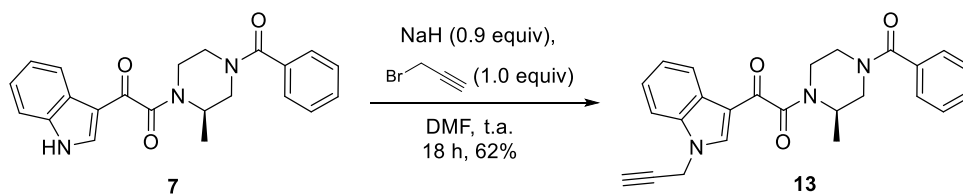
Esquema 1.4

Es va intentar de preparar un derivat de BMS substituït amb un grup propargil a la posició N1. Però, tot i seguir les condicions experimentals emprades per a l'obtenció de **8** i **9**, no es va obtenir el producte desitjat. Per RMN es va determinar que el producte format era un al·lè. Tot sembla indicar que el petit excés de base que s'afegia en el medi per assegurar que la reacció finalitzés catalitza la isomerització del grup propargilamina a l'al·lenilamina.⁴⁵



Esquema 1.5

Per solventar aquest problema es va reduir la quantitat de NaH en el medi de reacció, de manera que el bromur de propargil (3-bromopropí) i el compost **7** estiguessin en excés en tot moment. En aquestes condicions, es va obtenir el producte desitjat **13** amb un rendiment del 62%.



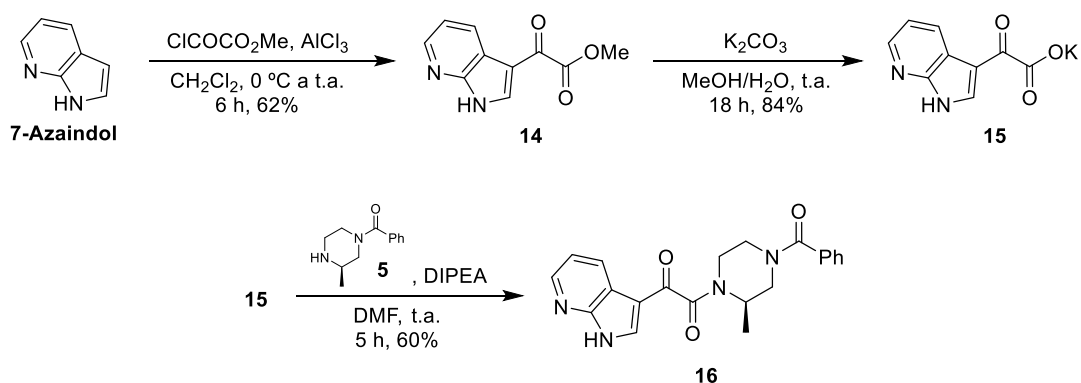
Esquema 1.6

1.2.2. Substitucions en la posició C4

1.2.2.1. Derivats azaindòlics

Per a la preparació dels derivats substituïts a la posició C4 vàrem començar per sintetitzar el BMS806 però modificant l'última etapa de la seva síntesi. Es va canviar el grup metoxi per una altra cadena que ens permetés, després, d'unir-lo al suport escollit. Així doncs, seguint la ruta sintètica patentada del BMS806,⁴⁶ es va arribar al compost nitrat on, en lloc d'introduir el grup metoxi descrit, s'introduí la cadena 2-(2-azidoetoxi)etanol.

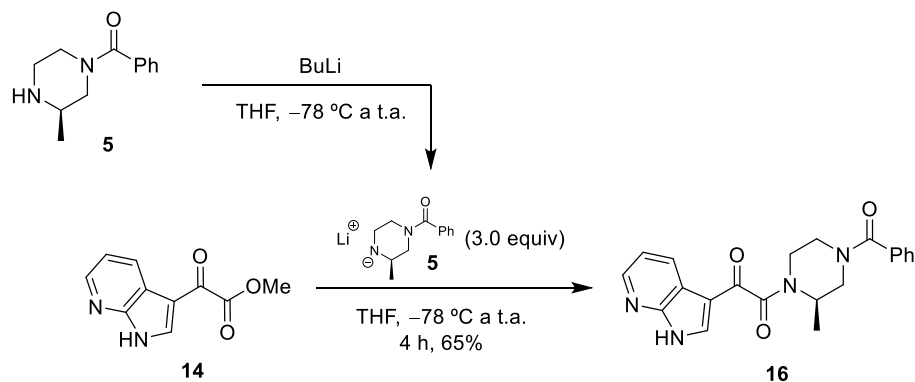
Es va partir del 7-azaindol o 7-azaindole comercial que es va acilar amb cloroacetat de metil a la posició C3. La hidròlisi de l'èster o èster resultant **14** i l'acoblament de l'àcid **15** amb la piperazina **5** donà el producte **16**.



Esquema 1.7

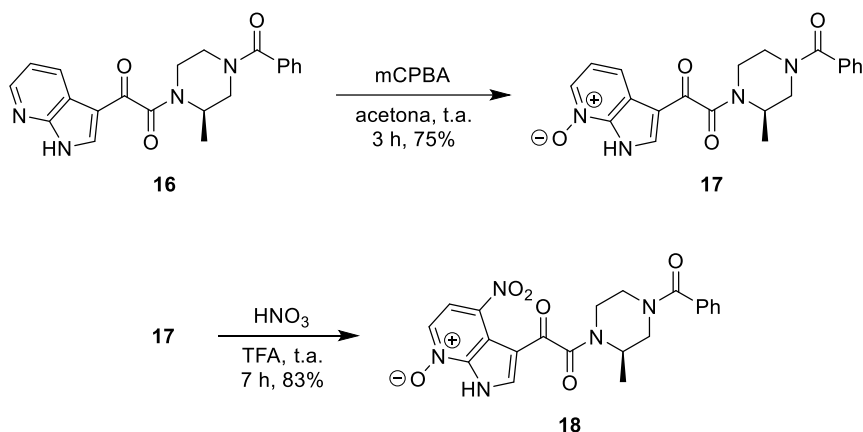
Donat que el rendiment global d'aquestes 3 etapes era només d'un 31%, ens vàrem plantejar una ruta alternativa. La idea era generar l'anió de la piperazina **5** i fer-lo reaccionar directament amb l'èster de metil **14** amb l'objectiu de millorar el rendiment i escurçar la ruta a dues etapes.

En un primer intent es va generar l'anió de **5** amb ^tBuLi, a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, i s'hi va afegir el compost **14**. Després de deixar evolucionar i temperar la reacció només es va recuperar el producte **14**. Això ens va fer pensar que l'anió de la piperazina **5** generat amb ^tBuLi era massa reactiu i reaccionava amb ell mateix. Vàrem repetir el procés generant l'anió amb BuLi, que no és tant bàsic, i vàrem observar el producte **16**. Abans d'optimitzar la reacció, vàrem comprovar l'estabilitat de l'anió de **5**. Després de generar l'anió amb BuLi a baixa temperatura es va constatar que una petita quantitat reaccionava donant (*R*)-2-metilpiperazina i 1-fenilpentan-1-ona. Un cop sabut que necessitàvem un petit excés d'anió per obtenir un bon rendiment, es va assajar la reacció de **14** amb 3.0 equiv de l'anió de **5**. El producte desitjat **16**, es va obtenir amb un 65% de rendiment global.



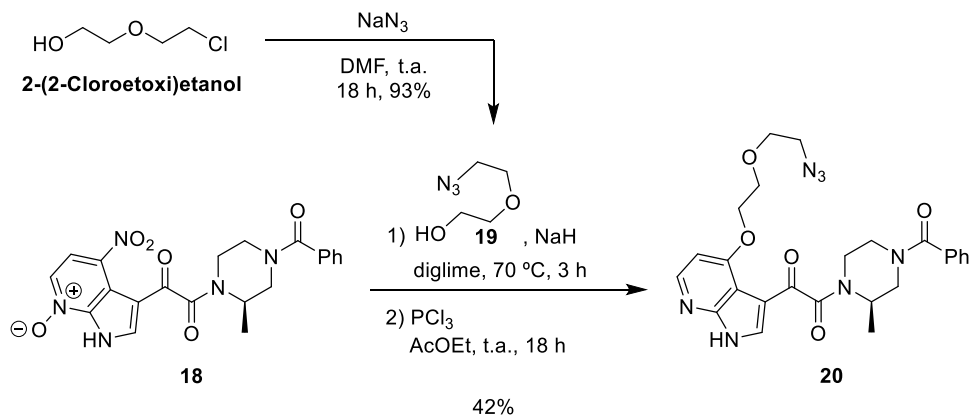
Esquema 1.8

Tot seguit es va modificar l'anell azaindòlic del producte **16** a fi d'introduir la cadena d'interès en la posició C4. Primer es va formar l'*N*-òxid per tal d'activar la posició C4 de l'indol. Així, es va fer reaccionar **16** amb l'àcid *m*-cloroperoxi benzoic. Després del tractament de l'*N*-òxid obtingut amb una mescla de TFA i HNO₃ es va obtenir el corresponent producte nitrat **18**.



Esquema 1.9

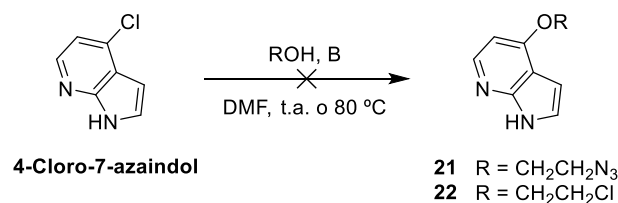
A continuació es va intercanviar el grup nitro del compost obtingut pel grup 2-(2-azido-etoxi)etanol **19**, preparat al laboratori per intercanvi del clor per un grup azida partint del producte comercial 2-(2-cloroetoxi)etanol. Un cop obtingut l'azidoderivat desitjat, el tractament amb triclorur de fòsfor va donar el producte final **20** (Esquema 1.11).⁴⁷



Esquema 1.10

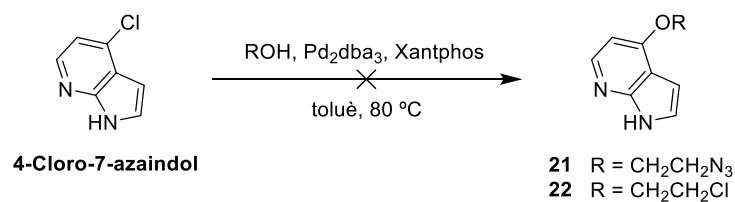
Veient que la ruta sintètica patentada no donava gaire bons rendiments i que l'última etapa, on s'introdueixen diferents cadenes espaiadores, no era fàcil, vàrem pensar una ruta alternativa partint del 4-cloro-7-azaindol.

D'entrada vam centrar els nostres esforços a comprovar diferents vies per a la substitució del clor. La primera via que es va intentar va ser la més senzilla: substituir el clor per un alcòxi. Tant a temperatura ambient com augmentant la temperatura per forçar la substitució de l'halogen no es va obtenir el producte de substitució. Cal dir que quan es va emprar 2-cloroetanol el producte obtingut va ser l'indol o indole substituït en la posició N1.



Esquema 1.11

En aquest punt ens vam plantejar la substitució del clor via catàlisi amb pal·ladi. En un primer intent, amb el combinat Pd₂dba₃ i Xantphos, no es va observar reacció i es va recuperar l'indol de partida.



Esquema 1.12

Buchwald i col. han descirt un conjunt de complexos de pal·ladi molt adients per canviar halurs per alcòxids en substrats aromàtics. El complex *RockPhos* és ara com ara el catalitzador més apropiat per a la nostra reacció de substitució en aquest tipus de substrats aromàtics.^{48,49}

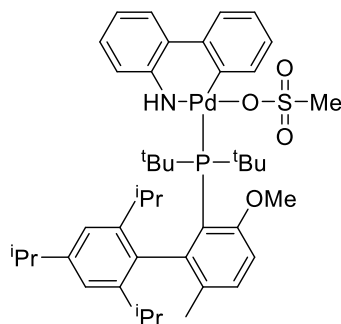
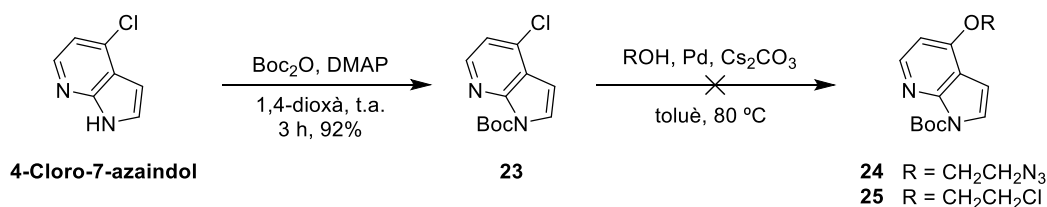


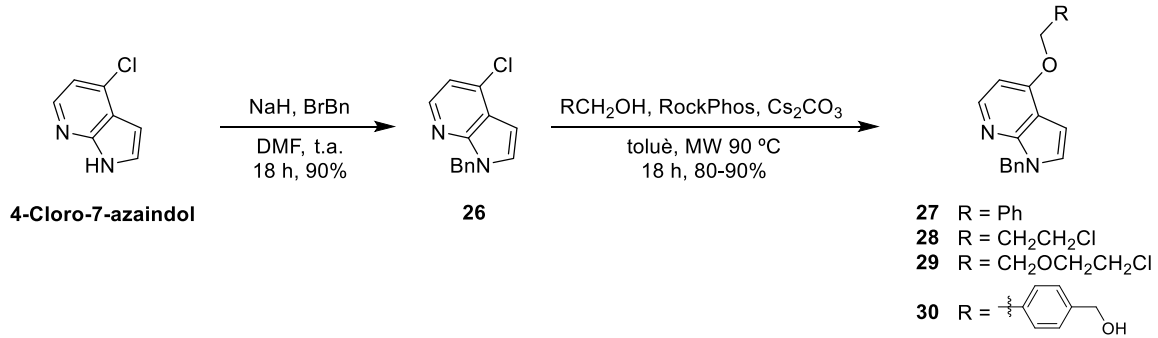
Figura 1.5: RockPhos Pd G3.

És sabut que en les reaccions d'acoblament creuat del derivat azaindòlic amb l'NH lliure sempre reacciona primer el grup NH. Per tant, es va decidir de protegir-lo. En un primer intent es va protegir el 4-cloro-7-azaindol amb el grup *tert*-butoxicarbonil (Boc), un grup protector molt emprat en aquests sistemes aromàtics.⁵⁰ Després d'haver obtingut el producte protegit amb molt bon rendiment es va decidir de substituir el clor via pal·ladi, tant amb el complex *RockPhos Pd G3* com amb la mescla de Pd₂dba₃ i Xantphos. Malauradament, aquest grup protector no va resultar prou estable en les condicions de reacció i es va recuperar el 4-cloro-7-azaindol de partida.

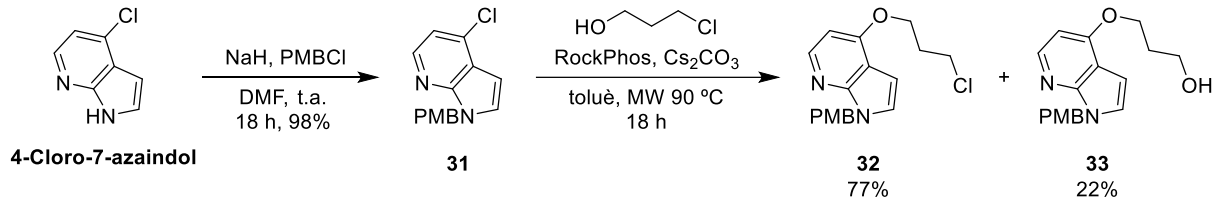


Esquema 1.13

En segon lloc, es van escollir el grup benzil (Bn) i *p*-metoxibenzil (PMB), dos grups protectors àmpliament estudiats.⁵¹ Un cop obtinguts **26** i **31**, es va assajar la reacció de substitució del clor per diferents cadenes hidroxíliques via Pd (*RockPhos Pd G3*) i es van obtenir els productes desitjats **27**, **28**, **29** i **30** amb bons rendiments. En el segon cas, amb el producte protegit amb PMB, es va obtenir el producte desitjat **32** i el subproducte **33**.

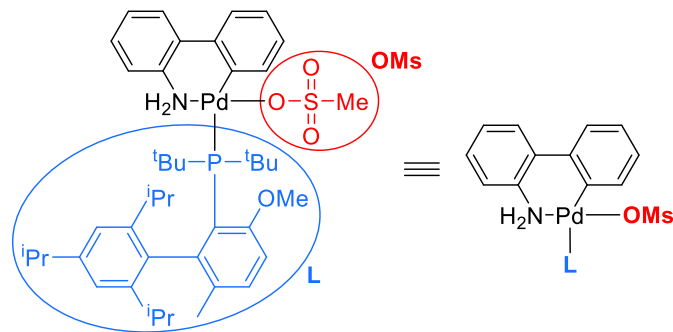


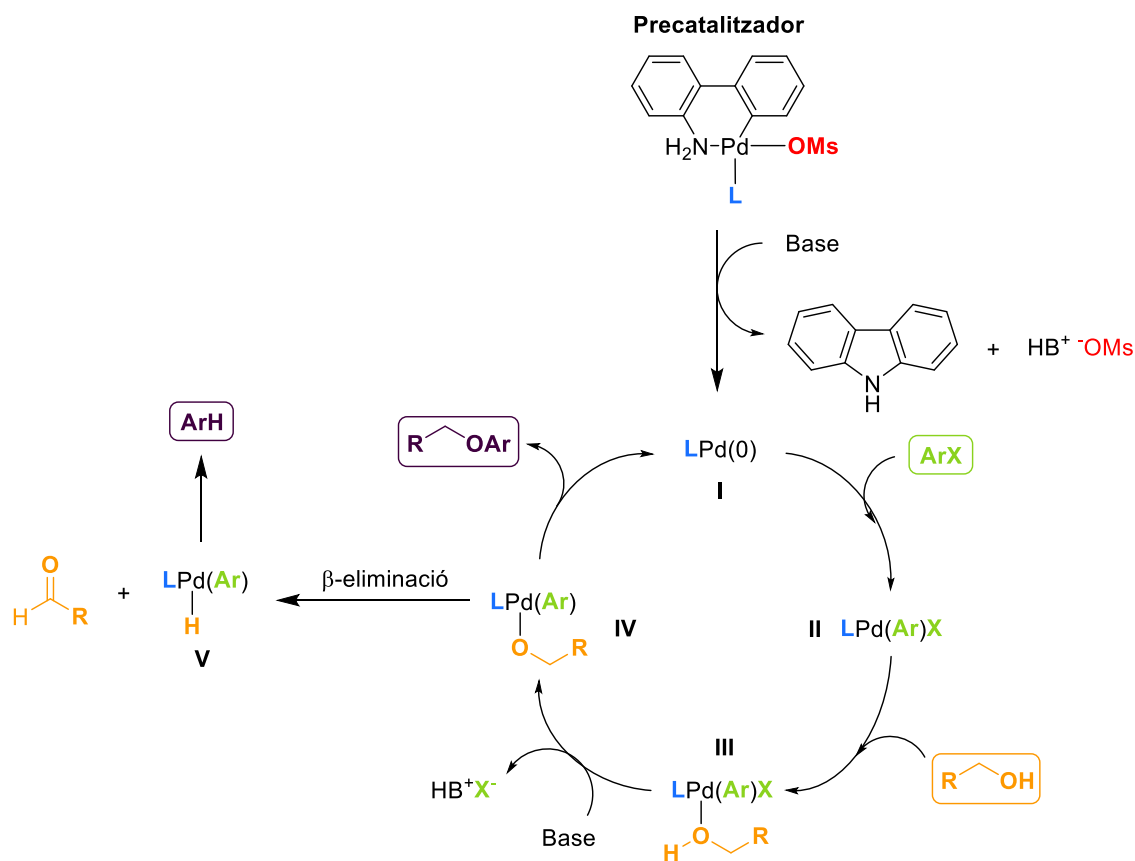
Esquema 1.14



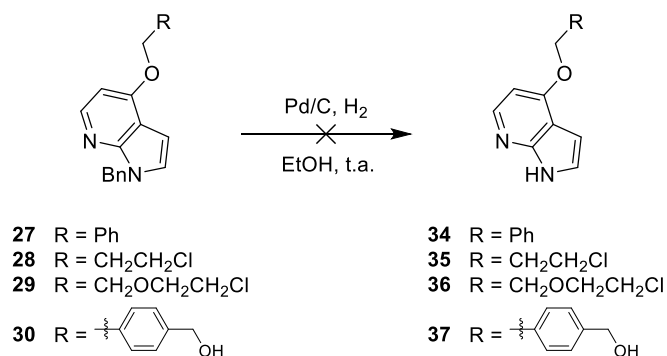
Esquema 1.15

El cicle catalític acceptat per a les reaccions d'acoblament catalitzades per Pd es mostra en el següent esquema. Convé ressaltar que la reacció de β -eliminació de l'intermedi **IV** és una etapa lenta en comparació amb el procés desitjat. Malgrat això, sempre es busca eliminar o minimitzar la formació del subproducte de β -eliminació. Per això, s'estudien lligands nous més eficaços per a la reacció de formació d'enllaços C-O catalitzada per Pd. Els lligands dels complexos de Buchwald aporten una rigidesa conformacional al complex **IV** del cicle catalític que provoca una millora en el rendiment de la reacció d'eliminació reductiva de la darrera etapa.

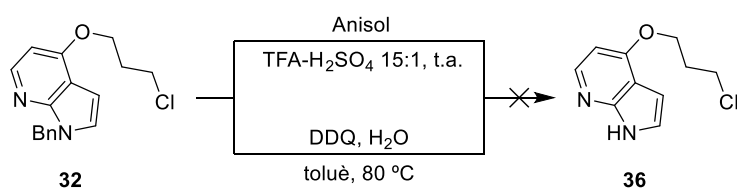

 Figura 1.6: Simplificació de l'estructura del *RockPhos Pd G3*.



Malgrat haver obtingut els productes substituïts en la posició C4, el següent pas de desprotecció, tant del grup Bn com del PMB en diferents condicions, no va ser possible.⁵²

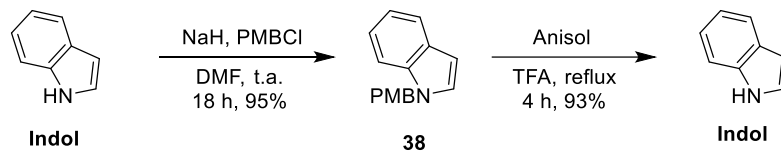


Esquema 1.16

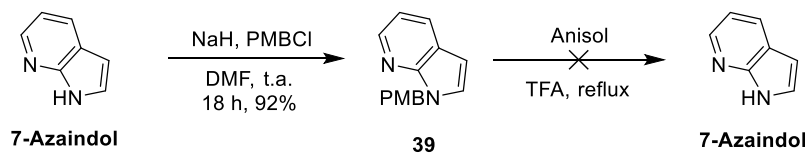


Esquema 1.17

A fi de comprovar la viabilitat del grup PMB vàrem protegir amb aquest grup l'indol i el 7-azaindol i es va assajar la desprotecció dels dos compostos. Vam verificar que, amb el grup aza a la posició 7, el TFA no és capaç de portar a terme la desprotecció desitjada, tot i mantenir el reflux durant una nit.

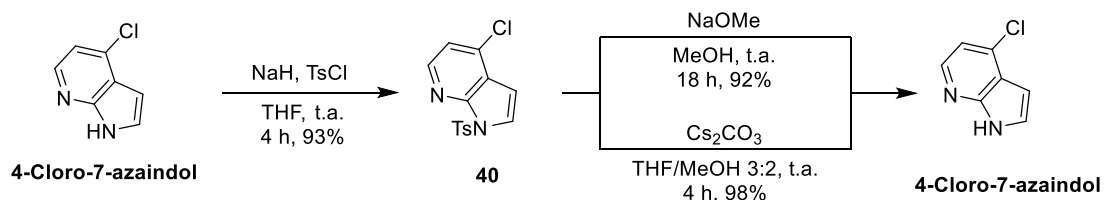


Esquema 1.18



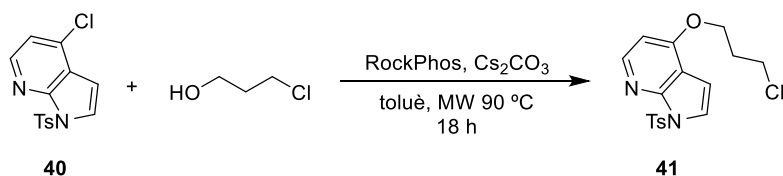
Esquema 1.19

En darrer terme, s'assajà el grup *p*-toluensulfonyl (Ts) com a protector de l'NH indòlic. Així vam obtenir **40**.⁵³ Abans de continuar endavant amb la reacció de substitució del clor, es va voler comprovar que la desprotecció del grup Ts funcionava correctament. En aquest cas es van obtenir bons resultats, sota diferents condicions de reacció.⁵⁴



Esquema 1.20

Un cop havíem palesat que la desprotecció no seria un impediment, es va optimitzar la reacció de substitució del clor via pal·ladi amb el complex *RockPhos Pd G3* i 3-cloropropanol. Es va començar per fer un blanc, per comprovar que la reacció sense pal·ladi no funcionava. Després, es va assajar la reacció amb una quantitat catalítica (10 mol%) de RockPhos, tot obtenint el producte de substitució amb un rendiment bo. Degut a l'elevat cost del catalitzador, es va creure convenient provar diferents combinacions amb la finalitat de reduir-ne la quantitat. Finalment es va decidir de treballar amb un 2 mol% ja que el rendiment era només moderadament inferior a quan n'utilitzàvem 5 mol% (vegeu **Taula 1.1**).

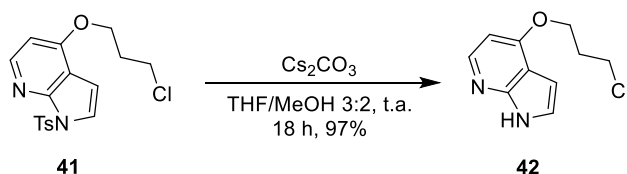


Esquema 1.21

Entrada	RockPhos Pd G3	Cs ₂ CO ₃	Rdt.
	(mol%)	(equiv)	(%)
1	-	1.1	-
2	10	1.1	85
3	5	1.1	70
4	5	1.5	71
5	2	1.1	69
6	2	1.5	70

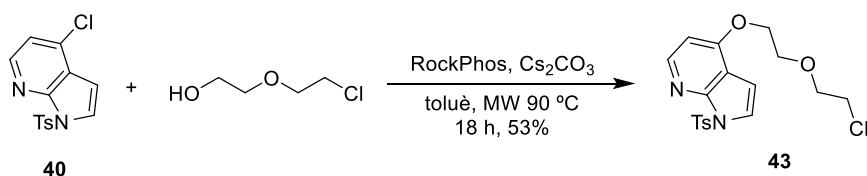
Taula 1.1: Optimització de la reacció de substitució del clor.

A continuació es va desprotegir el grup Ts, emprant un excés de base. Vam obtenir el producte de substitució **42** amb un bon rendiment.

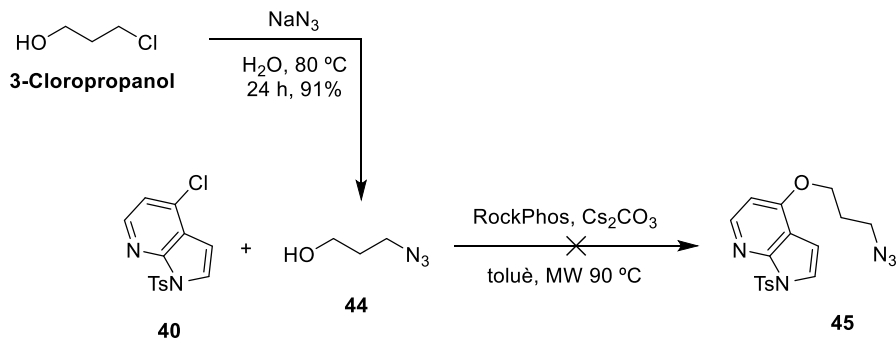


Esquema 1.22

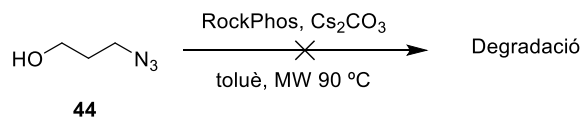
En aquest punt es va voler substituir el clor de la posició 4 de l'indol per altres cadenes, emprant les condicions optimitzades anteriorment. En tractar **40** amb 2-(2-cloroetoxi)etanol, el producte **43** es va obtenir amb un rendiment moderat, però en utilitzar 3-azidopropanol (**44**), preparat al laboratori, la reacció no va tenir lloc. Es va verificar que sota les condicions de reacció, sense addicionar el compost **40**, l'azida **44** descomponia.



Esquema 1.23

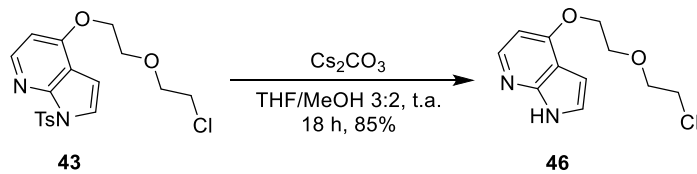


Esquema 1.24



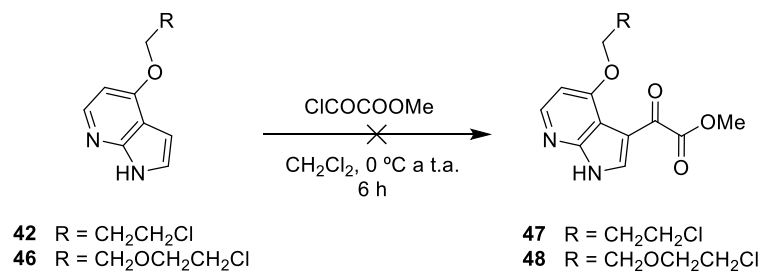
Esquema 1.25

Es va desprotegir el grup Ts del compost **43**. Així es va obtenir el compost **46**.



Esquema 1.26

Tot seguit, es va voler acilar tant **42** com **46** emprant clorooxoacetat de metil i triclorur d'alumini però no s'obtingué l'èster en cap dels casos. Tan sols s'observava material de partida.



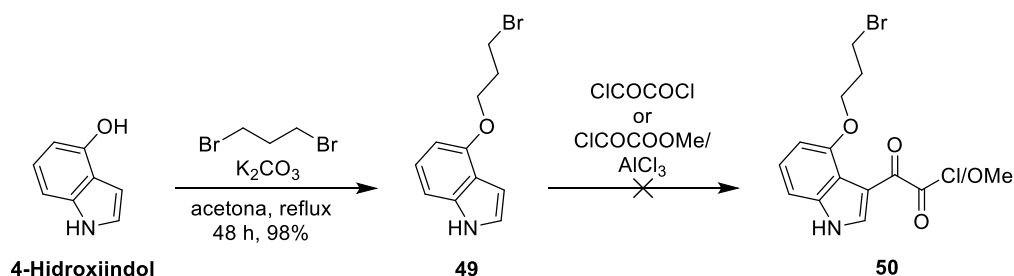
Esquema 1.27

Cal subratllar que es van provar altres vies sense èxit: (a) es van fer reaccionar els compostos **42** i **46** amb clorur d'oxalil; (b) es van protegir els N7 en forma de *N*-òxids per després assajar la reacció

d'acilació tant amb clorooxoacetat de metil i triclorur d'alumini com amb clorur d'oxalil; (c) també es va provar la reacció d'acilació havent substituït l'àtom de clor dels compostos **42** i **46** per un grup azido.

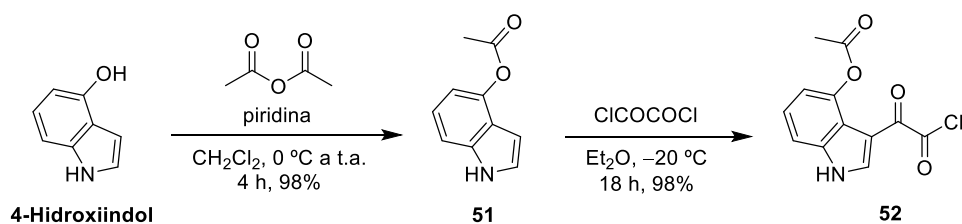
1.2.2.2. Derivats indòlics

A la vista que el derivat azaindòlic substituït amb diferents cadenes en la posició C4 costava d'obtenir, es va decidir de preparar derivats indòlics substituïts a la posició C4. Per això, es va partir del 4-hidroxiindol que es va fer reaccionar amb 1,3-dibromopropà tot obtenint **49**, el qual s'havia d'acilar i acoblar amb la piperazina **5**. Es va assajar la reacció d'acilació, tant amb clorur d'oxalil com amb clorooxoacetat de metil en presència de triclorur d'alumini, però en tots dos casos es van obtenir hidroxindols poliacilats, probablement degut a l'accentuada densitat electrònica π de l'anell.



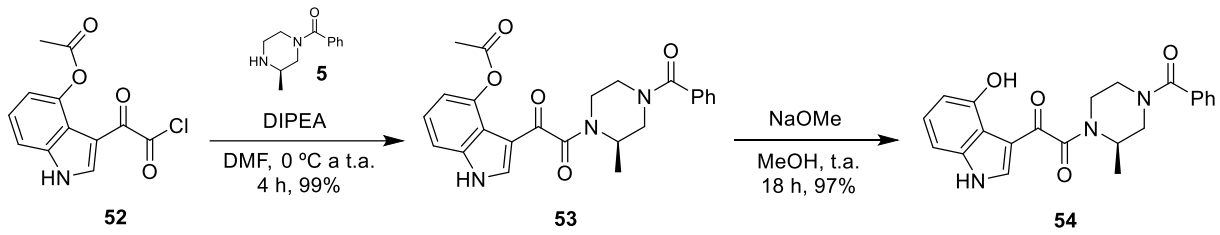
Esquema 1.28

Està descrit⁵⁵ que aquest problema es podia resoldre acilant el fenol, amb què es desactiva l'anell aromàtic. Així, el compost acilat **51**, tractat amb clorur d'oxalil obtenint, ara sí, el clorur d'àcid **52** amb un rendiment excel·lent.



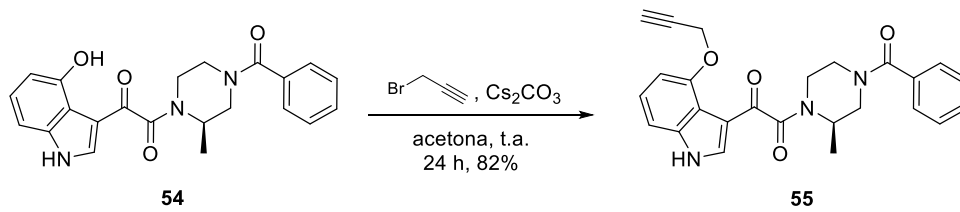
Esquema 1.29

La reacció de **52** amb la piperazina benzoïlada **5** va portar a la diamida **53**. Finalment, es va obtenir l'hidroxiindol **54** després de tractar **53** amb metòxid de sodi.



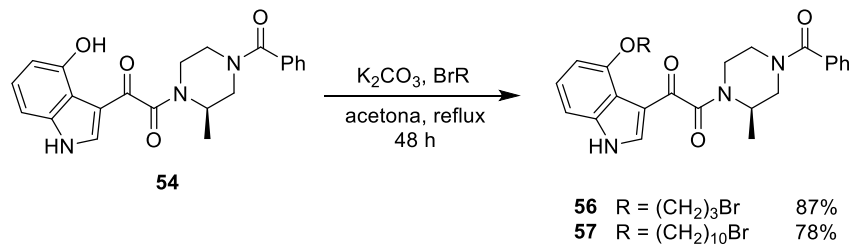
Esquema 1.30

En aquest punt, es va fer reaccionar **54** amb bromur de propargil. Es va obtenir així el primer derivat indòlic substituït a la posició C4, amb un bon rendiment.



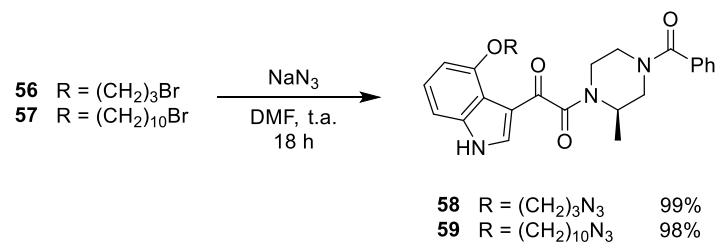
Esquema 1.31

També es va tractar **54** amb 1,3-dibromopropà (**a**) i 1,10-dibromodecà (**b**), reactius ja emprats en l'apartat de substitució sobre l'N1, tot generant els derivats **56** i **57**.



Esquema 1.32

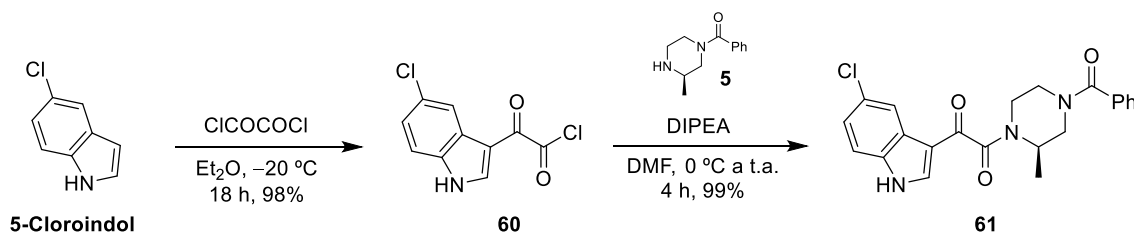
Posteriorment es van reemplaçar els broms per grups azido, obtenint tots els derivats indòlics desitjats substituïts en la posició C4.



Esquema 1.33

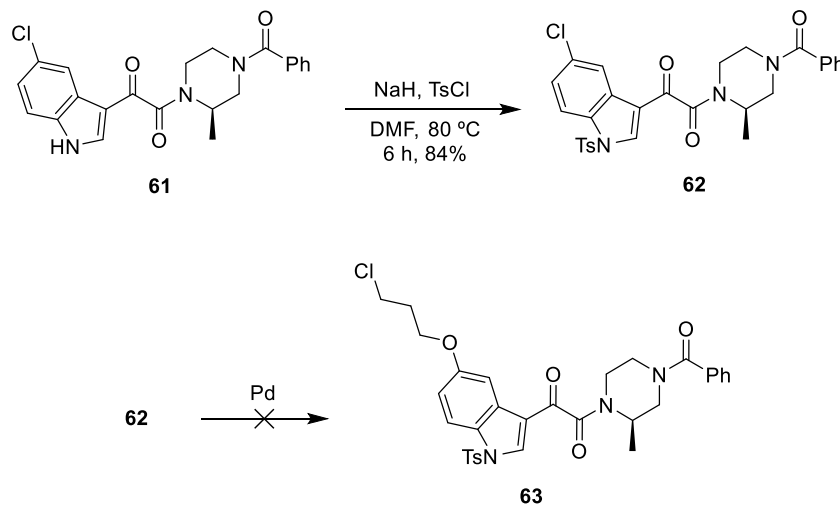
1.2.3. Substitucions en la posició C5

Per a la preparació dels derivats de BMS substituïts a la posició C5 es va partir del producte comercial 5-cloroindol. Es va tractar amb clorur d'oxalil a fi d'obtenir el clorur d'àcid **60**. Aquest es va acoblar amb la piperazina benzoilada **5**. Així s'arribà al derivat cloroindòlic **61**.



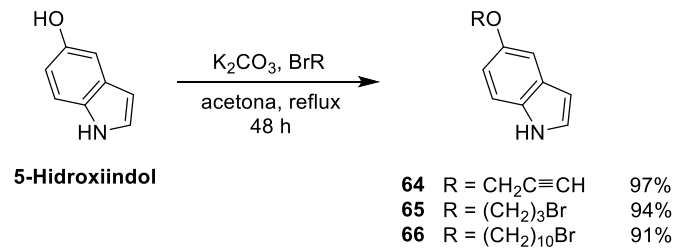
Esquema 1.34

A partir d'aquí, vam aprofitar l'experiència assolida en les reaccions de substitució catalitzades per Pd. Així doncs, es va protegir l'NH de l'indol ja que, si no, podria predominar el producte substituït en aquesta posició (N1). Es va tractar **61** amb clorur de tosíl (TsCl) i es procedí a assajar la reacció de substitució del clor per 3-cloropropanol amb diferents fonts de Pd com ara els complexos *RockPhos Pd G3*, *XPhos Pd G2* i la mescla de Pd₂dba₃ i Xantphos. En tots els casos, però, es va recuperar únicament material de partida.



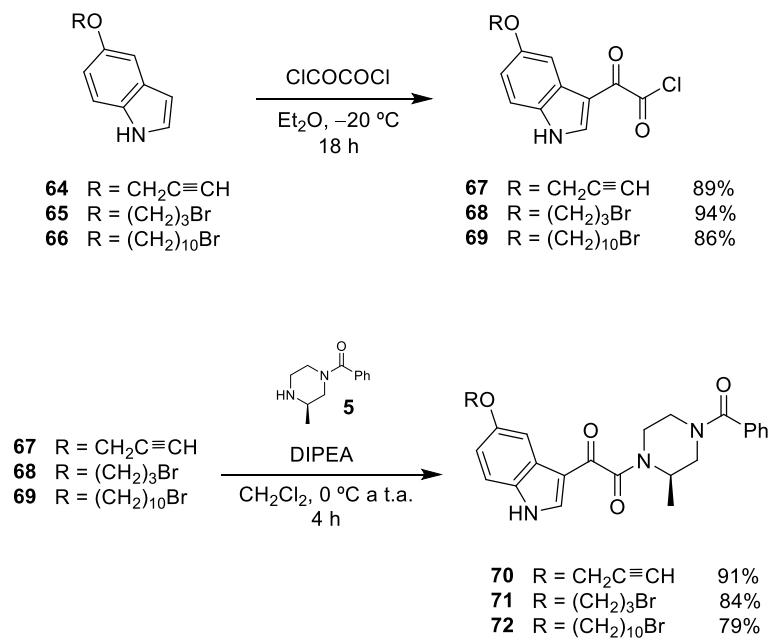
Esquema 1.35

Atès que no es va aconseguir de substituir el clor provant vies conegudes, vàrem canviar de tàctica abans de perdre temps i diners per obtenir un derivat indòlic substituït a la posició C5. Vam decidir d'emprar 5-hidroxiindol com a material de partida, que es va fer reaccionar amb les diferents cadenes utilitzades fins ara (**a**, **b** i bromur de propargil).



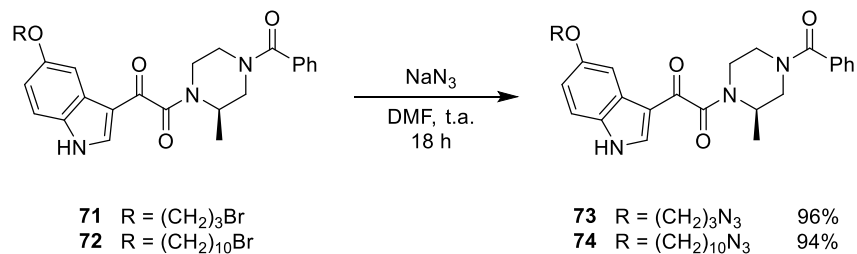
Esquema 1.36

La reacció de **64**, **65** i **66** amb clorur d'oxalil va furnir els corresponents clorurs d'àcid (**67**, **68** i **69**), que es van acoblar a la piperazina **5** sense cap problema.



Esquema 1.37

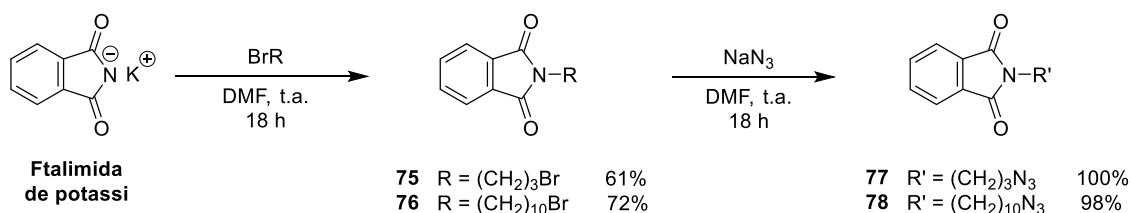
Els compostos **71** i **72** es van fer reaccionar amb NaN₃ per obtenir els derivats desitjats.



Esquema 1.38

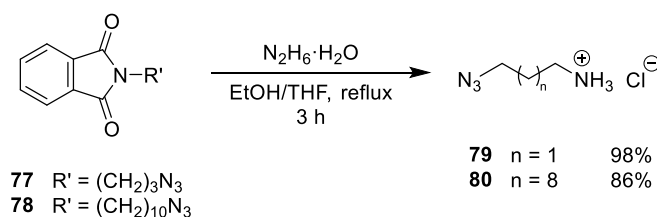
1.2.4. Substitucions en la posició C7

El material de partida per a la preparació dels derivats substituïts en el C7 va ser l'àcid indol-7-carboxílic, que és comercial. En primer lloc es van haver de modificar les cadenes per tal de poder-les unir a l'àcid carboxílic de partida. Es van preparar cadenes amb un grup azido en un extrem i un grup amino en l'altre, per poder formar una amida amb l'àcid carboxílic de l'indol. Per a la seva modificació, es va partir dels compostos **a** i **b** que van ser tractats amb ftalimida de potassi i, posteriorment, se substituï l'ió bromur per l'anió azida, amb NaN_3 .



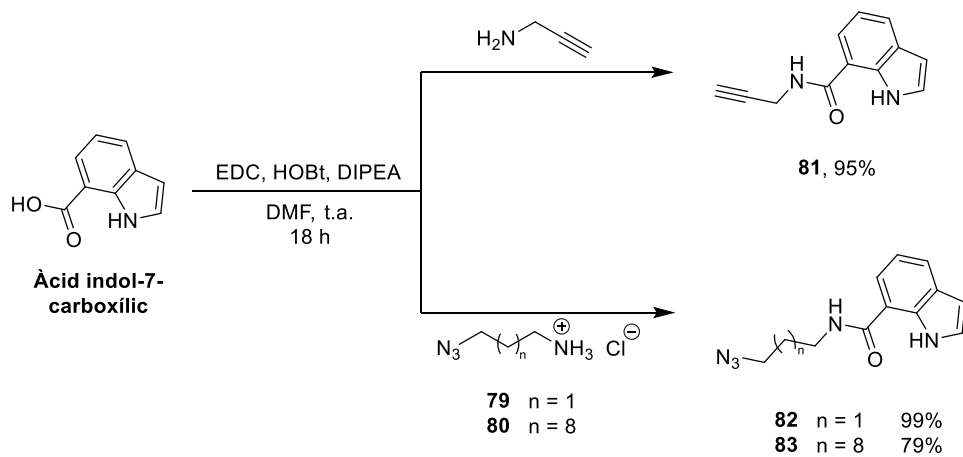
Esquema 1.39

L'eliminació del grup ftalimida amb hidrazina ens va permetre d'obtenir l'amina corresponent amb bons rendiments. Es van aïllar les amines en forma d'hidroclorur ja que així són més fàcils de manipular i conservar.⁵⁶



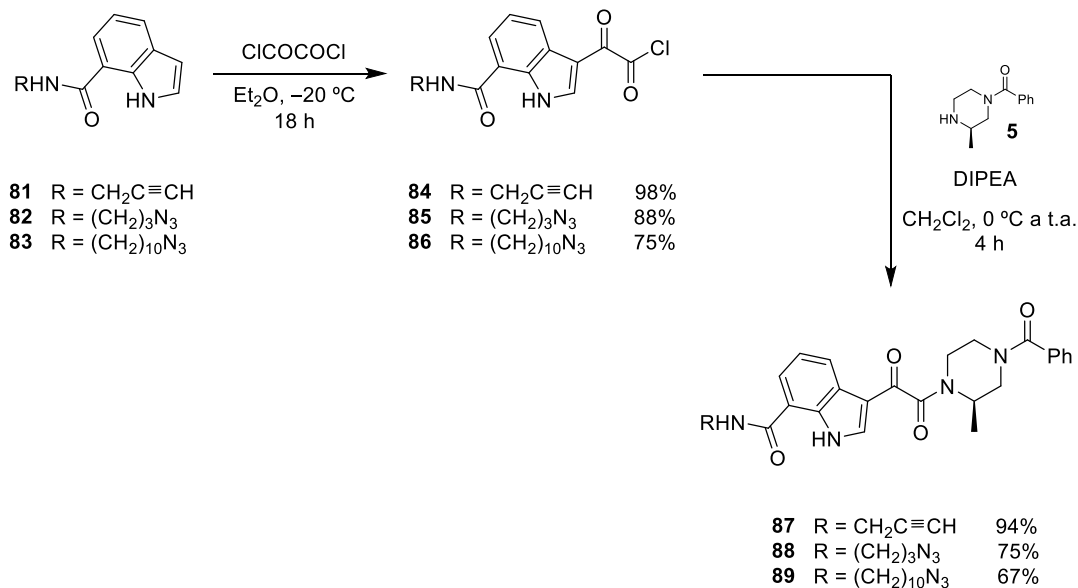
Esquema 1.40

A partir de la condensació de l'àcid indol-7-carboxílic amb la propargilamina comercial i les amines **79** i **80** es van obtenir les amides corresponents, **81**, **82** i **83**.



Esquema 1.41

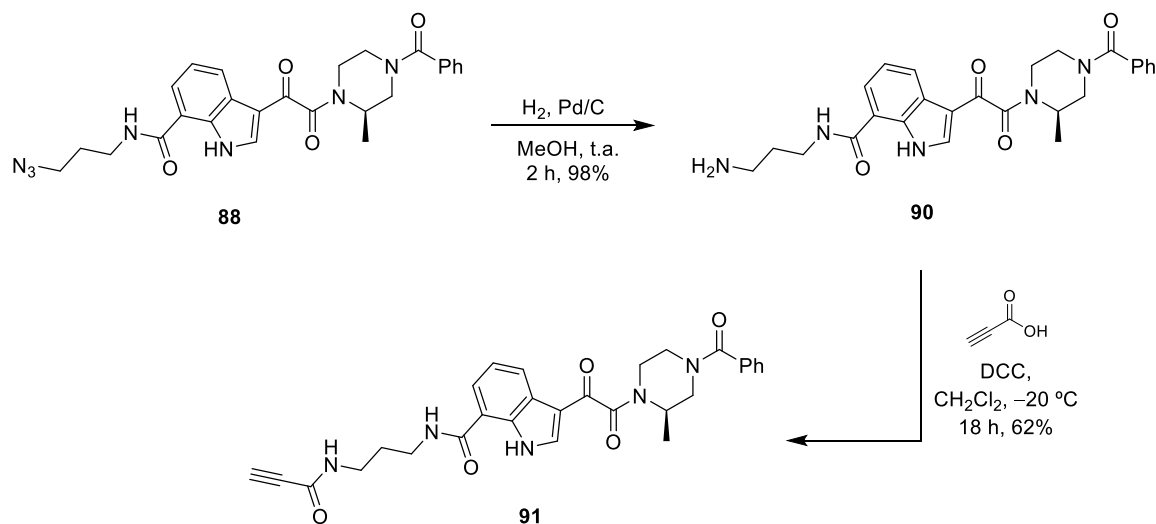
Seguint la mateixa ruta sintètica que en casos anteriors, els compostos **81**, **82** i **83** es van tractar amb clorur d'oxalil fornint els corresponents clorurs d'àcid amb bons rendiments. Aquests es van acoblar amb la piperazina benzoilada **5**. Es van obtenir així els tres derivats indòlics de BMSs substituïts en la posició C7.



Esquema 1.42

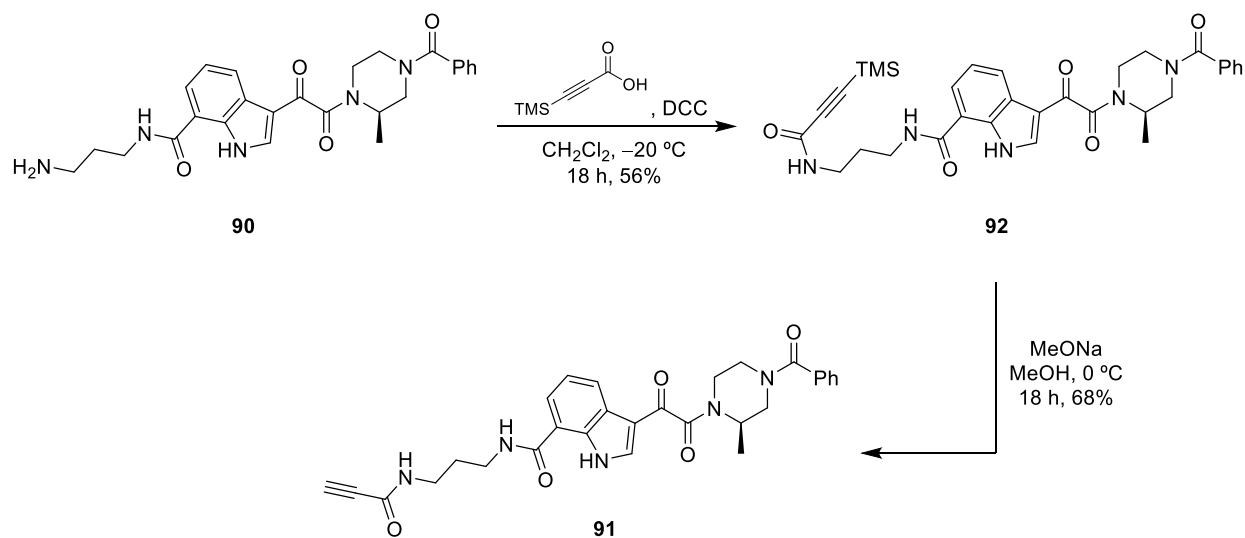
Pensant en la reacció d'addició conjugada de tiol a una propinamida que es vol desenvolupar durant aquesta Tesi Doctoral, també es va preparar un derivat de BMS amb un triple enllaç activat terminal.

Per no començar una ruta nova per obtenir aquest derivat, es va aprofitar l'azida **88** ja sintetitzada, que es va reduir mitjançant una hidrogenació. La condensació de l'amina **90** amb l'àcid propiòlic o propinoic amb DCC va fornir la propinamida **91**.



Esquema 1.43

En vistes que el rendiment de la reacció de formació de la propinamida **91** rondava en tots els casos el 65%, vàrem assajar la reacció de condensació de l'amina amb l'àcid propiòlic però amb el triple enllaç silitat. Buscàvem evitar possibles reaccions secundàries amb la propinamida formada ja que és un triple enllaç activat. Tot seguit, es va desprotegir el triple enllaç silitat en medi bàsic.

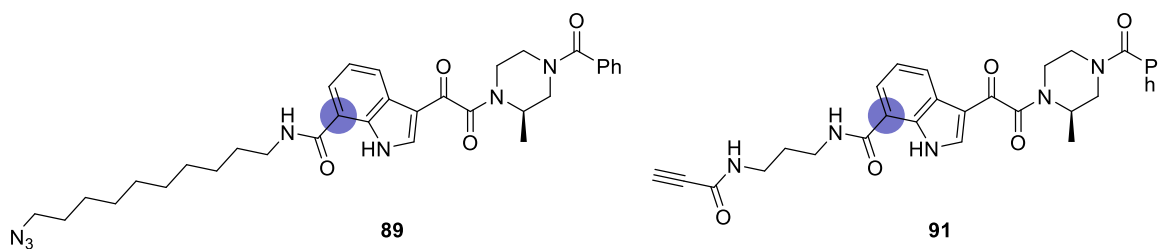
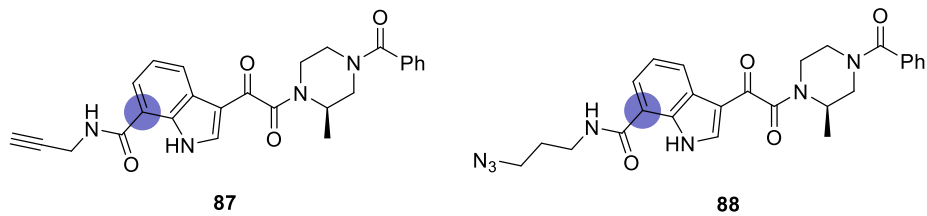
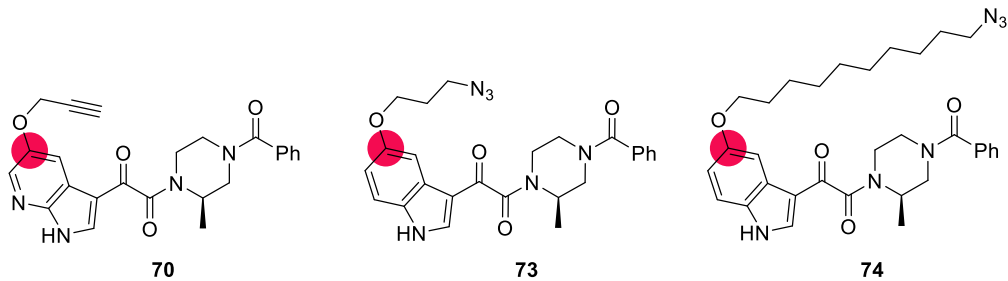
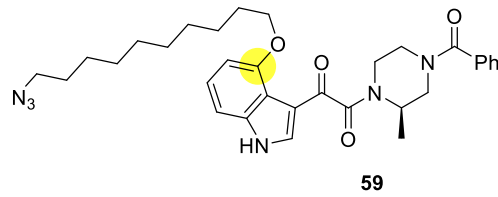
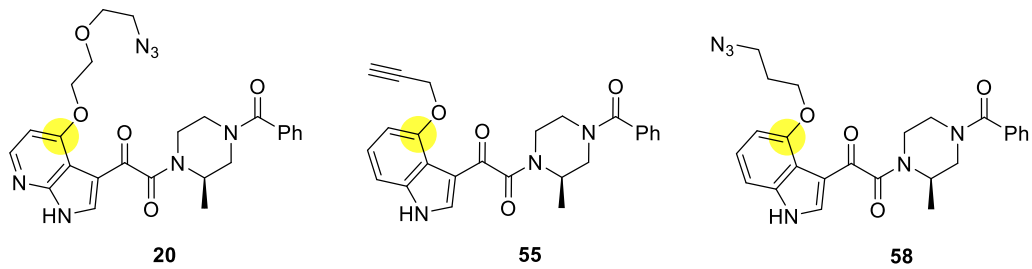
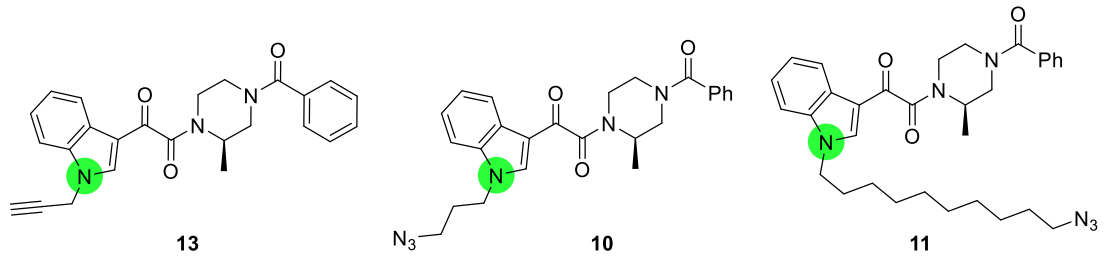


Esquema 1.44

1.3. Conclusions

En resum, seguint el procediment descrit per a la síntesi del BMS806, amb les pertinents modificacions, s'han sintetitzat 14 derivats de BMS substituïts a les posicions N1 (**13**, **10** i **11**), C4 (**20**, **55**, **58** i **59**), C5 (**70**, **73** i **74**) i C7 (**87**, **88**, **89** i **91**) amb diferents *pre-linkers*.

En el **Capítol 5** d'aquesta Tesi es presenta l'activitat biològica per prevenir la infecció per VIH de cada un dels derivats. Cal avançar que els derivats més actius contra la infecció per VIH són els substituïts en la posició 7 de l'indol. Per aquest motiu, d'ara endavant en alguns casos ja només s'usaran aquests derivats.



CAPÍTOL 2
REACCIÓ DE CICLOADDICIÓ [3+2]
ENTRE UNA AZIDA I UN ALQUÍ TERMINAL
CATALITZADA PER Cu(I)

CAPÍTOL 2. REACCIÓ DE CICLOADDICIÓ [3+2] ENTRE UNA AZIDA I UN ALQUÍ TERMINAL CATALITZADA PER Cu(I)

2.1. Introducció	69
2.1.1. Reacció de cicloaddició 1,3-dipolar	69
2.1.1.1. Concepte <i>click</i> . Reacció de cicloaddició [3+2] entre una azida i un triple enllaç catalitzada per Cu(I) (CuAAC)	70
2.1.1.1.1. <i>Mecanisme de reacció</i>	71
2.1.1.1.2. <i>Fonts de Cu(I)</i>	72
2.1.1.1.3. <i>Ús de lligands</i>	72
2.2. Síntesi de derivats de BMS. Reaccions <i>click</i>	73
2.3. Síntesi de lligands	74
2.4. Optimització de la cicloaddició [3+2] amb la β-ciclodextrina	79
2.5. Conclusions	82

2.1 Introducció

Una reacció de cicloaddició és una reacció en què dues o més molècules insaturades (o parts) es combinen formant un adducte cíclic en el qual s'han perdut enllaços de tipus π i s'han format enllaços de tipus σ . Aquestes transformacions poden ser pericícliques o reaccions esglaonades.⁵⁷ Les reaccions de cicloaddició s'anomenen segons la mida de l'esquelet de cada un dels participants. Així, una reacció de Diels-Alder és una cicloaddició [4+2] i una cicloaddició 1,3-dipolar és una cicloaddició [3+2].

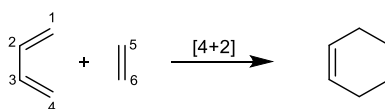


Figura 2.1: Exemple d'una reacció de cicloaddició.

2.1.1. Reacció de cicloaddició 1,3-dipolar

La reacció de cicloaddició 1,3-dipolar o [3+2] per a l'obtenció d'heterocicles de 5 membres va ser descrita per primera vegada l'any 1960 pel professor Rolf Huisgen i és un procés àmpliament usat i estudiat en els últims 100 anys.⁵⁸ És una reacció concertada [$\pi 4_s + \pi 2_s$] tèrmicament permesa per les regles sobre la conservació de la simetria dels orbitals descrites per Woodward i Hoffmann i la teoria d'orbitals de Fukui.^{59,60} Al reactiu que aporta 4 electrons π se l'anomena 1,3-dipol i està format per 3 àtoms (a, b i c), essent almenys el central un heteroàtom, mentre que el reactiu que aporta 2 electrons π és conegut com a dipolaròfil, i generalment és un alquè o un alquí.

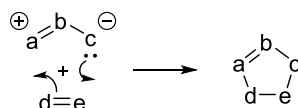


Figura 2.2: Equació general de la reacció 1,3-dipolar.

Els 1,3-dipols són espècies isoelectròniques amb l'anió al·lil i tenen almenys una forma ressonant amb càrregues oposades en una relació 1,3 característica que explica el seu nom. Els 1,3-dipols es poden classificar en dos grups:

- Tipus al·lil: presenten una geometria angular. L'àtom central (b) pot ser un element del grup V (N o P) o bé del grup VI (O o S).
- Tipus propargil/al·lenil: tenen geometria lineal. L'àtom central (b) només pot ser un element del grup V (N).

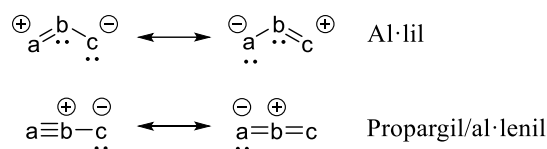


Figura 2.3: Classificació dels 1,3-dipols.

2.1.1.1. Concepte *click*. Reacció de cicloaddició [3+2] entre una azida i un triple enllaç catalitzada per salts de Cu(I) (CuAAC)

L'any 2001, el professor Karl Barry Sharpless va introduir, per primer cop, el concepte de reacció *click*.⁶¹ Va proposar una sèrie de criteris per tal que un procés es pogués considerar d'aquest grup:

- Des del punt de vista experimental, ha de ser una reacció simple (fàcil de posar a punt)
- Ha de tolerar una àmplia varietat de grups funcionals i condicions de reacció
- Ha de ser altament selectiva i regioespecífica
- S'ha d'obtenir el producte desitjat quantitativament
- Ha de ser insensible a l'oxigen i a l'aigua
- S'ha de poder aïllar el producte final de manera ràpida, sense la necessitat d'una purificació per columna cromatogràfica

D'entre totes les classes de reaccions que entren en aquesta classificació, la reacció de cicloaddició 1,3-dipolar entre una azida (1,3-dipol) i un triple enllaç terminal (dipolaròfil) es considera la reacció prototip.

La cicloaddició 1,3-dipolar descrita per primera vegada l'any 1960 per Huisgen transcorria a temperatures altes (reflux de toluè o CCl₄) i temps llargs de reacció (entre 12 i 60 hores) i generava mescles dels dos regioisòmers possibles (l'1,2,3-triazol disubstituit en les posicions 1 i 4 o 1,2,3-triazole 1,4-disubstituit i l'1,2,3-triazol 1,5-disubstituit). Amb l'objectiu de controlar aquesta regioselectivitat, es van començar a estudiar diferents mètodes emprant metalls de transició.

No va ser fins l'any 2002 quan els grups de Meldal (Dinamarca)⁶² i Sharpless i Fokin (USA)⁶³ van publicar, de manera independent, que l'addició de quantitats catalítiques de sals de Cu(I) produïa un augment considerable de la velocitat de reacció permetent efectuar la reacció fins i tot a temperatura ambient. A més a més, degut al fet que la reacció evoluciona a partir de l'acetilur de coure format *in situ*, van aconseguir un control absolut de la regioselectivitat, obtenint tan sols l'isòmer 1,4-disubstituit. Aquesta reacció s'identifica com a CuAAC (*Cu-accelerated azide-alkyne cycloaddition*). És una reacció molt robusta, insensible a les condicions de reacció mentre estigui present el Cu(I) en el medi i es poden emprar tant dissolvents apròtics com pròtics (fins i tot aigua).

D'altra banda, després del gran èxit de la reacció CuAAC en els camps de la química, biologia i ciència dels materials, es va fer evident la necessitat d'aconseguir l'altre regioisòmer de manera selectiva. L'any 2005,⁶⁴ Sharpless i Fokin van publicar l'obtenció dels 1,2,3-triazols 1,5-disubstituïts, igualment partint d'una azida i un alquí, afegint un catalitzador de Ru(II). L'any 2010, cinc anys més tard, Fokin va descriure l'obtenció d'1,5-diaril-1,2,3-triazols addicionant una quantitat catalítica d'una base forta.⁶⁵

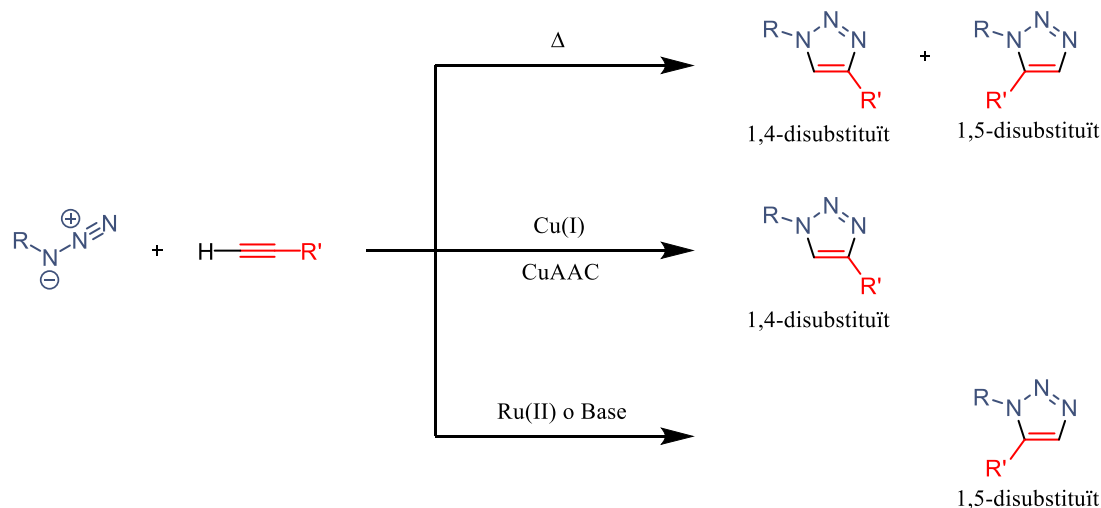


Figura 2.4: Regioselectivitat de la cicloadició 1,3-dipolar entre una azida i un alquí terminal.

2.1.1.1.1. Mecanisme de reacció

Sharpless i Fokin van proposar un mecanisme per a aquesta reacció.⁶⁶ En primer lloc, la formació de l'intermedi **III**, de tipus acetilur de coure, limita l'ús d'aquesta metodologia a triples enllaços terminals. A continuació l'azida, que es comporta com un lligand σ -donador, es coordina amb el complex de Cu(I), que evoluciona amb l'addició nucleòfila del nitrogen terminal de l'azida al carboni substituït de l'acetilè formant el metal·lacicle **V** que experimenta un procés de contracció de l'anell. El següent intermedi de coure, **VI**, s'ha pogut aïllar quan R_1 i R_2 són grups voluminosos que impedeixen l'evolució de l'intermedi.⁶⁷ Finalment, en una etapa de protonació s'allibera l'1,2,3-triazol 1,4-disubstituït i es regenera el catalitzador.

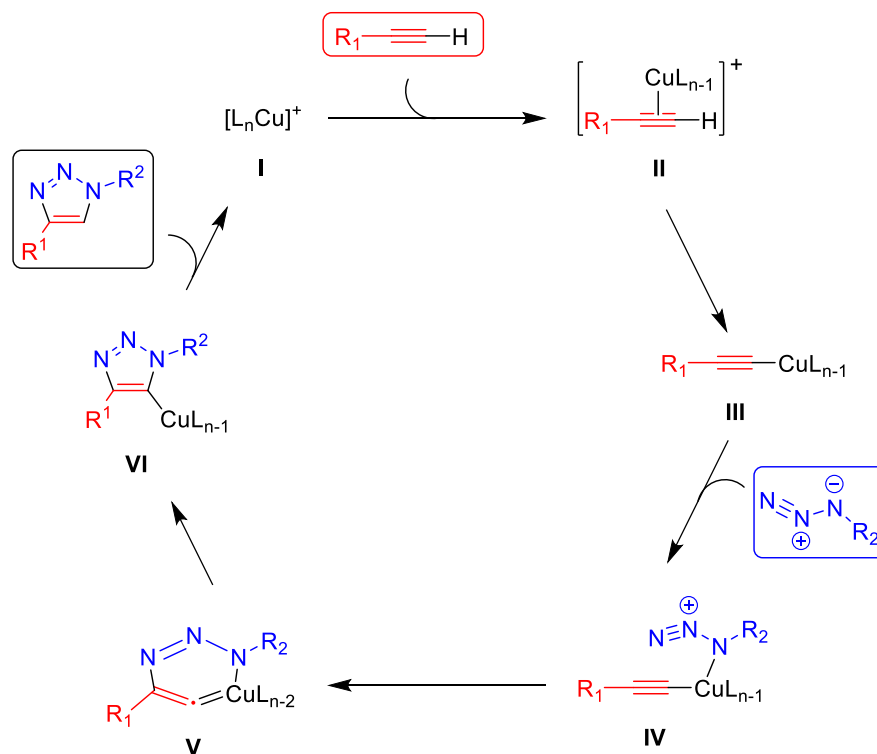


Figura 2.5: Mecanisme proposat per a les CuAAC.

2.1.1.1.2. Fonts de Cu(I)

La reacció s'accelera amb espècies de Cu(I). Dels tres estats d'oxidació del coure (0, +I i +II), l'ió Cu^+ és el menys estable, ja que s'oxida molt fàcilment a Cu(II) o desproporciona donant Cu metàl·lic i Cu(II). No obstant això, reduir l'ió Cu(II) a Cu(I) o oxidar el Cu metàl·lic a Cu(I) és senzill. Arran d'això, s'han descrit diverses estratègies per assegurar la presència de Cu(I) en el medi de reacció. Alguns exemples habituals són:

- L'addició d'una sal de Cu(I) directament, com per exemple CuI o $Cu_2(OTf)_2 \cdot C_6H_6$
- La reducció *in situ* d'una sal de Cu(II). Tradicionalment s'utilitza $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ combinat amb un excés d'ascorbat de sodi (la sal de sodi de la vitamina C) com a reductor
- L'oxidació de Cu metàl·lic en presència de Cu(II)

2.1.1.1.3. Ús de lligands

Tot i que l'addició de lligands no és imprescindible perquè la reacció tingui lloc, s'ha observat que és beneficiós. Per un costat, els lligands estabilitzen l'ió Cu^+ en front de l'oxidació i desproporció, cosa que fa que hi hagi més espècie activa en el medi i en conseqüència que augmenti la velocitat de reacció. D'altra banda, els ions Cu^{2+} són citotòxics, cosa que exclou d'emprar sals de coure en els sistemes vius. Per això, els lligands capaços d'estabilitzar els ions de Cu(I) són molt importants, ja que permeten reduir la quantitat de coure total en el medi.

A continuació es mostren diferents exemples de lligands típics utilitzats en la CuAAC. De tots aquests, els lligands que s'han utilitzat més i han resultat més efectius aquests últims anys contenen una amina terciària central substituïda amb heterocicles nitrogenats.⁶⁸

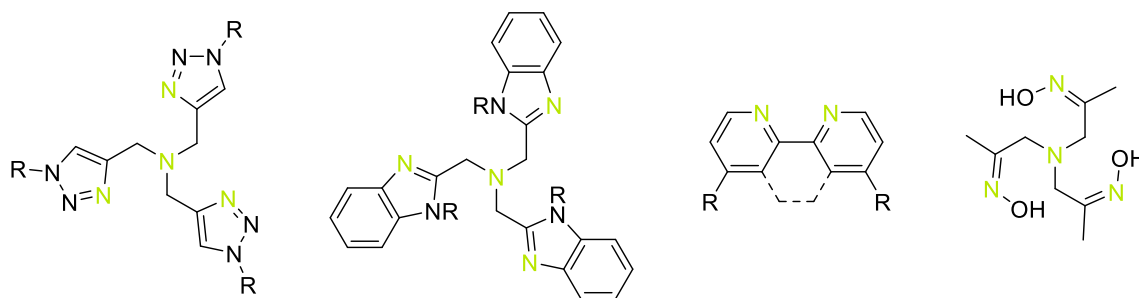


Figura 2.6: Exemples de lligands *N*-donadors.^{68,69}

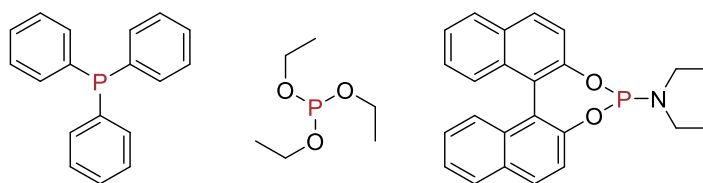


Figura 2.7: Exemples de lligands *P*-donadors.^{70,71}

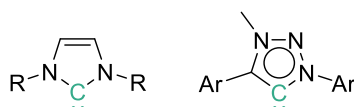
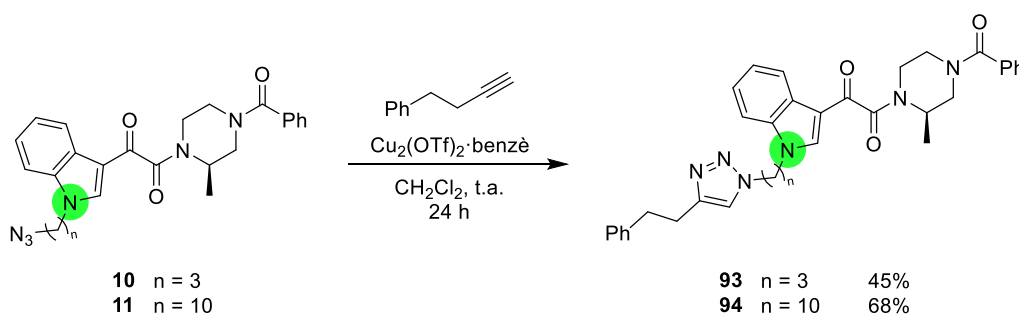
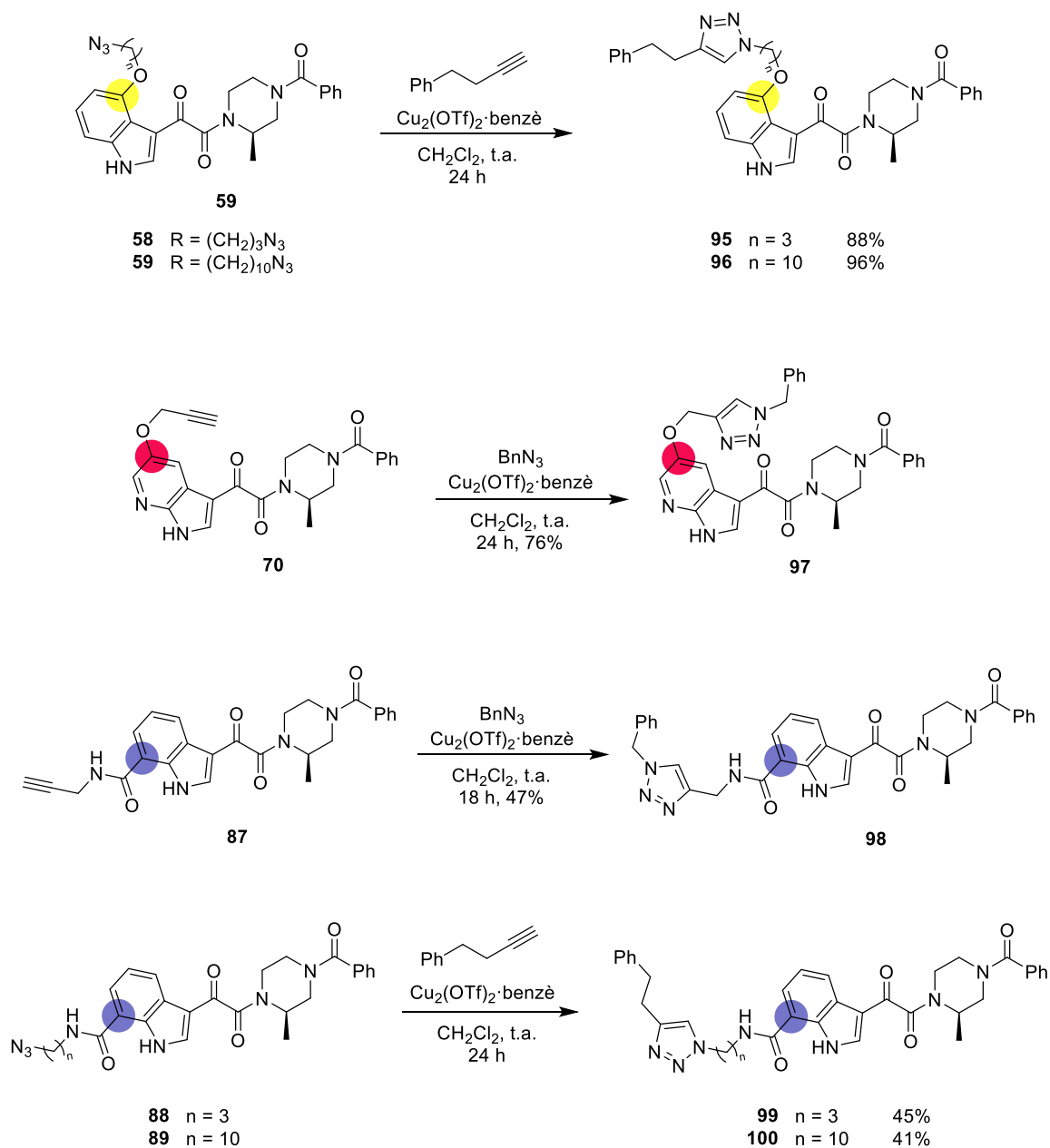


Figura 2.8: Exemples de lligands de tipus carbè.^{72,73}

2.2. Síntesi de derivats de BMS. Reaccions *click*

Una vegada obtinguts tots els azido- i propargil-derivats (descrits en el **Capítol 1**), es va dur a terme una reacció de CuAAC entre els azidoderivats **10**, **11**, **58**, **59**, **88** i **89** amb el 4-fenil-1-butí i dels propargil-derivats **70** i **87** amb benzil azida (azida de benzil). Els resultats obtinguts es resumeixen a l'Esquema 2.1. L'objectiu de sintetitzar aquests productes era observar si el triazol interfereix en l'activitat anti-VIH o no (resultats descrits en el **Capítol 5**).



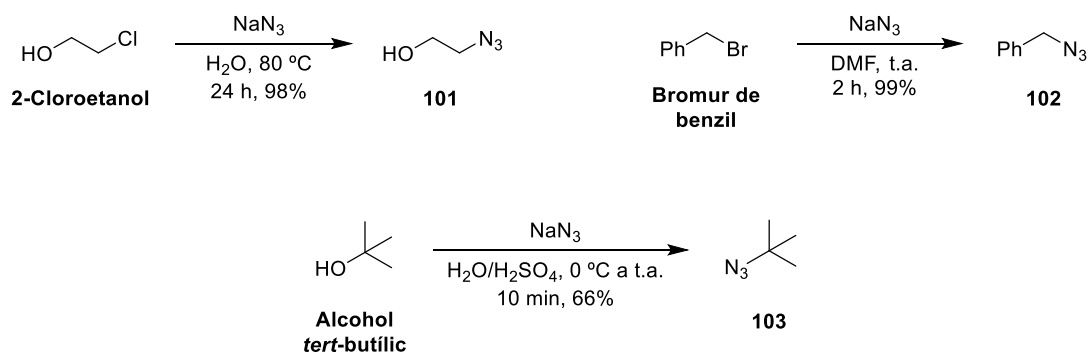


Esquema 2.1

2.3. Síntesi de lligands

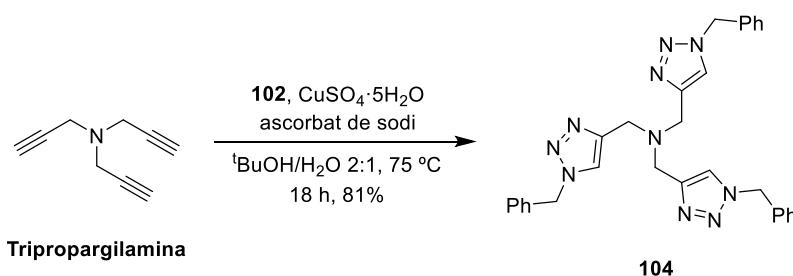
Pel que fa als lligands que ajuden a la complexació de l'ió Cu⁺, vàrem preparar-ne uns quants per tal de comparar quin ens funcionava millor amb els nostres substrats i condicions de reacció. A continuació es mostren els 5 lligands de tipus trialkilamina, sintetitzats seguint els mètodes descrits a la literatura.

Per començar, vam obtenir alguns materials de partida senzills necessaris per a les posteriors reaccions (Esquema 2.2).



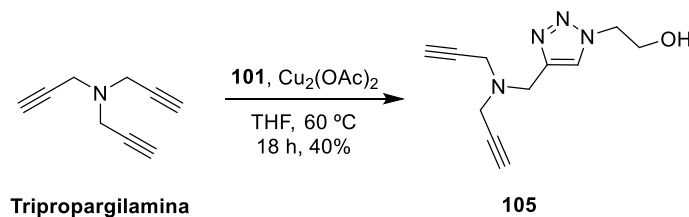
Esquema 2.2

TBTA (104),⁷⁴ el lligand més senzill, es va preparar per reacció de la tripropargilamina amb un excés de benzil azida, catalitzada per Cu(I).



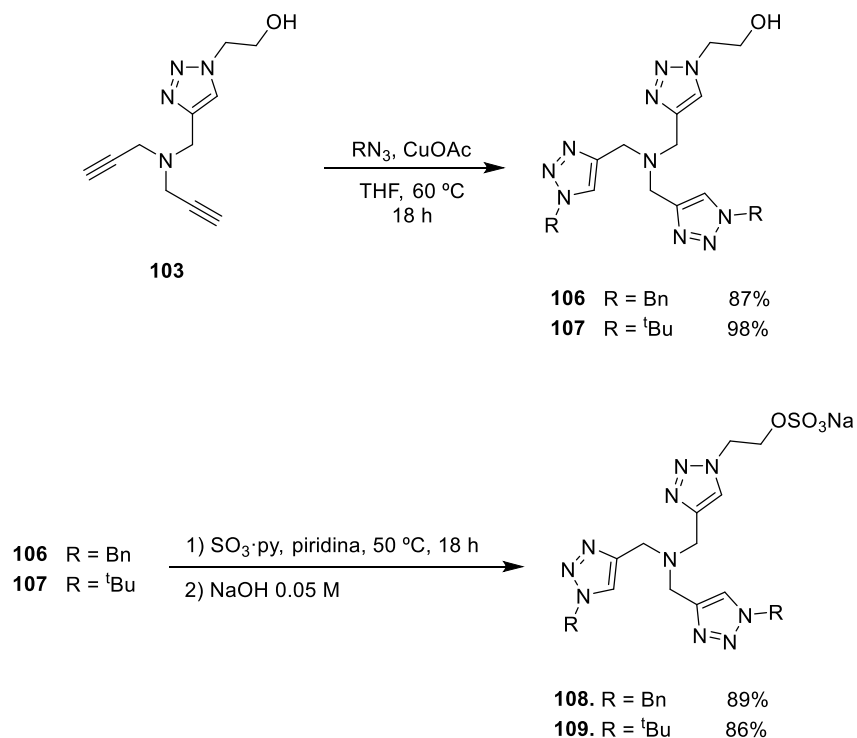
Esquema 2.3

Per a la síntesi dels dos següents derivats del **TBTA**, de tipus trialquilamina i amb grups triazols, es va partir, igualment, de la tripropargilamina,⁷⁵ que es va fer reaccionar amb 1 equivalent de 2-azidoetanol en presència de Cu(I), tot obtenint l'alcohol **105**.



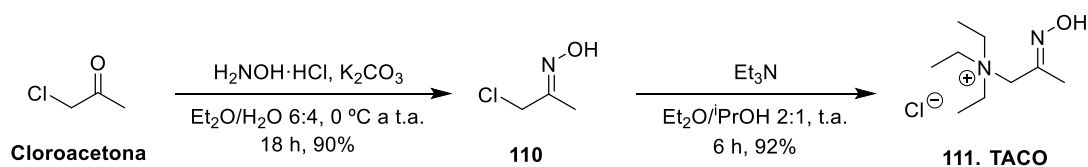
Esquema 2.4

A continuació, **105** es va fer reaccionar amb 2 equivalents, per una banda de benzil azida (azida de benzil, **102**) i per l'altra de *tert*-butil azida (azida de *terc*-butil, **103**), en presència de Cu(I), obtenint així els derivats “tristriazolamino” **106** i **107**. Finalment, **106** i **107** es van fer reaccionar amb triòxid de sofre. El tractament bàsic posterior va permetre d'obtenir els sulfats de sodi corresponents **108** (**DBSNa**) i **109** (**DTBSNa**).



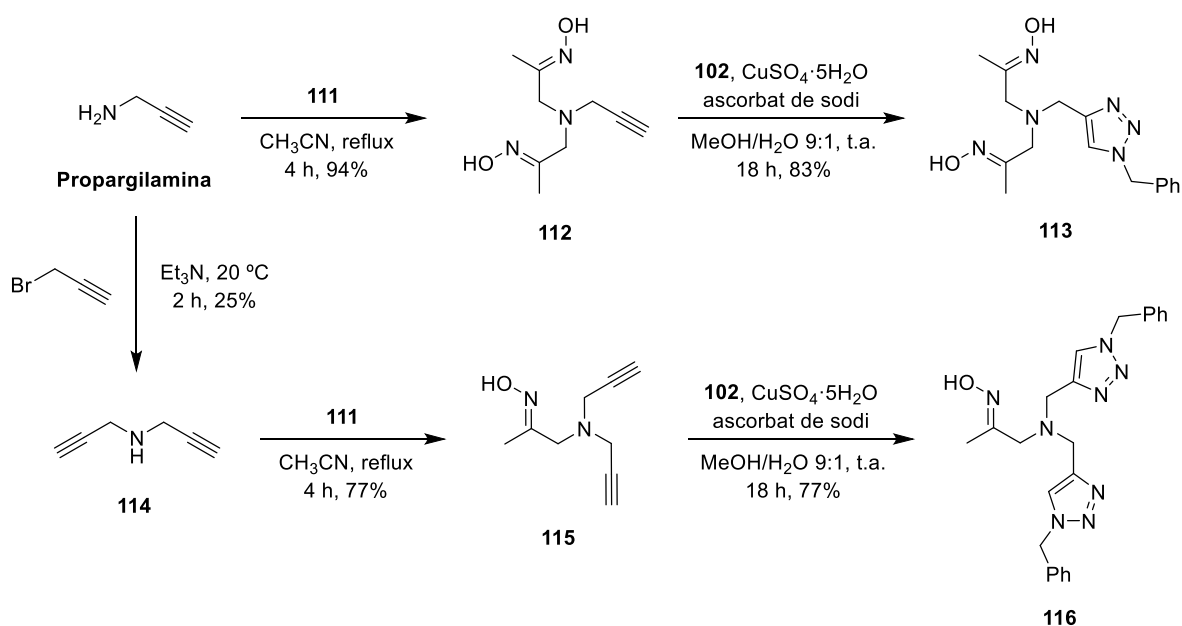
Esquema 2.5

A més, vàrem sintetitzar un altre tipus de lligands de tipus trialquilamina.⁷⁶ Es partí de la cloroacetona i es va fer reaccionar amb hidroxilamina, la qual cosa va donar l'oxima **110**. Amb la mescla del cru de reacció de **110** i trietilamina es va obtenir la sal **111** [TACO = *N,N,N*-triethyl-*N*-[(2-hydroxyimino)propyl]ammonium chloride] amb molt bon rendiment.



Esquema 2.6

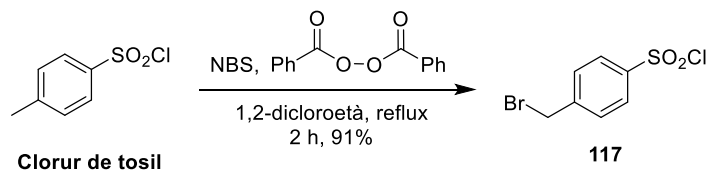
A continuació, es van preparar els derivats mono- i bis-triazolamina amb dos o un grup oxima respectivament (**113** i **116**) seguint el mètode descrit a la literatura.⁶⁹ Es partí de la propargilamina, en la qual s'introduí un grup propargil, per obtenir la dipropargilamina **114**. A continuació, per reacció de la propargilamina i de **114** amb la sal TACO s'obtingueren les trialquilamines amb grups oxima **112** i **115** que, seguidament, es van fer reaccionar amb BnN₃ en presència de Cu(I). Així es van obtenir els lligands **113** (DTaMB) i **116** (MTaDB).



Esquema 2.7

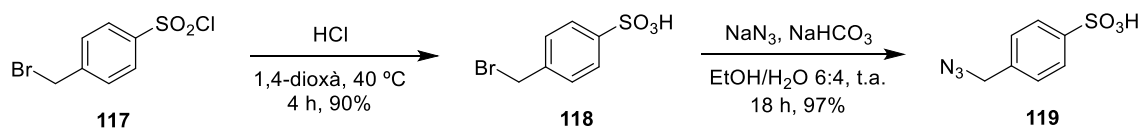
En aquest punt, es va pensar de sintetitzar un lligand alternatiu que combinés els dos tipus que hem descrit anteriorment, una trialkilamina combinada amb un grup oxima i un grup sulfat.

Es va començar per preparar el derivat bromat **117** mitjançant una bromació al·lílica del clorur de tosil.⁷⁷



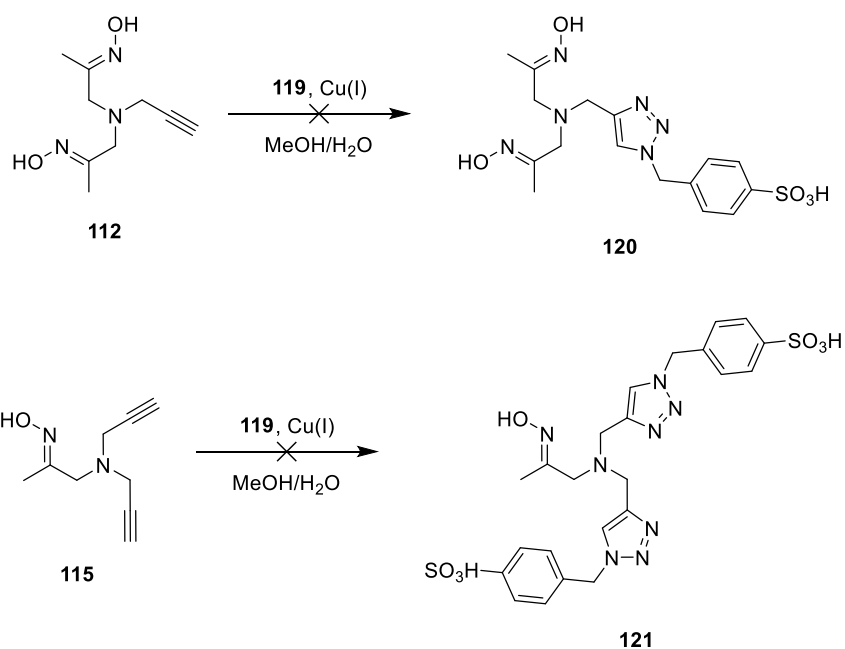
Esquema 2.8

Després d'un tractament àcid, es va substituir el brom per un grup azido, tot obtenint **119** amb bon rendiment.



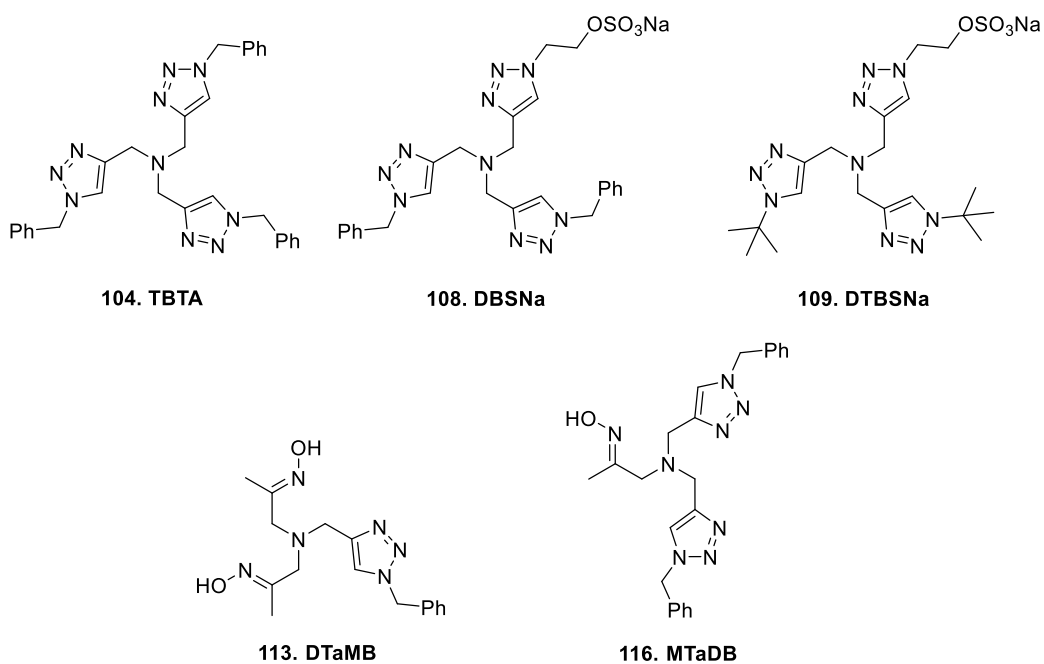
Esquema 2.9

Malgrat que es va intentar acoblar l'azida **119** amb els alquins terminals **112** i **115** no es va obtenir en cap cas el triazol esperat.



Esquema 2.10

Així doncs, s'usaran els següents lligands, abreviats de la següent manera:



Esquema 2.11

2.4. Optimització de la cicloadició [3+2] amb la β -ciclodextrina

El substrat escollit per començar les reaccions de conjugació amb el nostre fàrmac va ser la β -ciclodextrina (β CD), compost format per 7 unitats de α -D-glucopiranoses unides entre elles formant un anell (oligosacàrid cíclic). Les ciclodextrines són una família de compostos àmpliament utilitzats en la indústria alimentària, farmacèutica i agrícola així com en enginyeria ambiental, que seran tractades més extensament en el **Capítol 4** de la present Tesi.

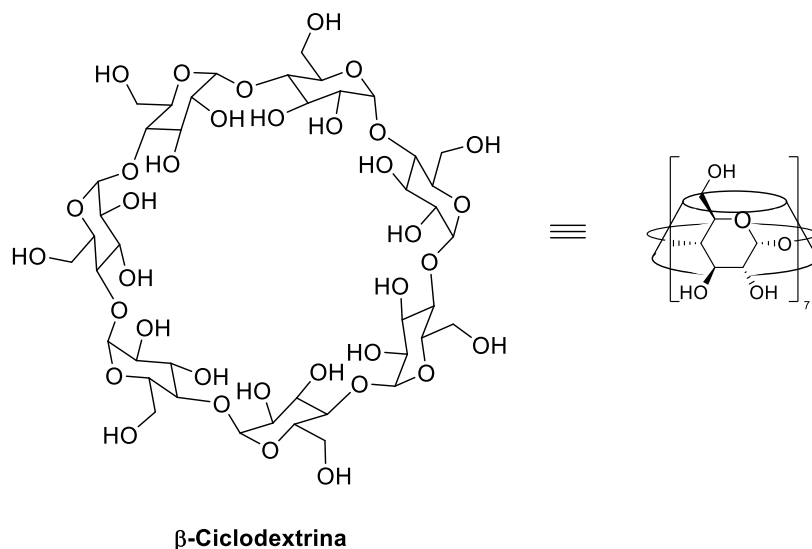
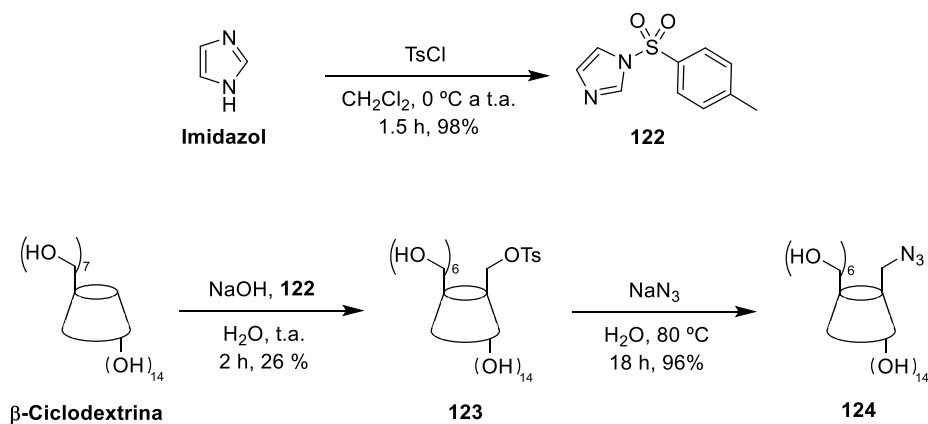
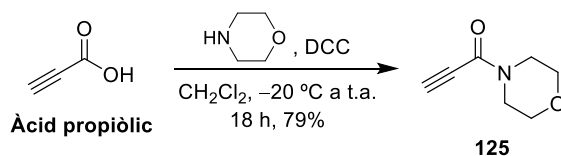


Figura 2.9: Representació de la β -ciclodextrina

Per funcionalitzar la β CD, es va començar per tosilar un grup hidroxil que, després, es va intercanviar per un grup azido.⁷⁸ En les condicions d'aquesta publicació,⁷⁸ és possible controlar la monotosilació. Una "oligosulfonació" dels hidroxils primaris, amb un excés de TsCl i piridina, no va avançar. Es podrien fer servir agents més actius (com el clorur de *o*-nitrobenzen-sulfonil, *o*-NsCl, o altres amb què tenim prou experiència) però no s'han assajat per ara.

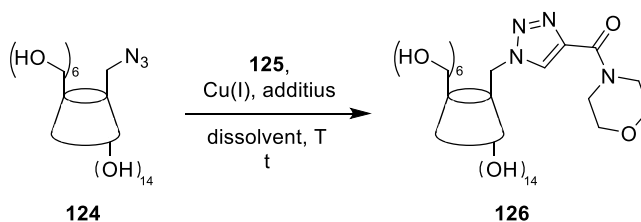


Com a model de triple enllaç s'ha preparat una amida de l'àcid propiòic o propinoic.



Esquema 2.13

Un cop obtinguda l'azida **124** i la propinamida **125**, es va assajar la cicloadició [3+2] canviant diferents paràmetres per trobar les millors condicions.



Esquema 2.14

Entrada	Cu(I) (mol%)	Lligand (mol%)	Dissolvent [M]	t (h)	T (°C)	Conv ^{**} (Rdt.) (%)
1	CuSO ₄ ·5H ₂ O (5%)*	-	H ₂ O [0.05]	18	80	100 (70)
2	CuSO ₄ ·5H ₂ O (5%)*	104 (5%)	H ₂ O [0.05]	8	80	100 (85)
3	Cu ₂ (OAc) ₂ (2.5%)	-	H ₂ O [0.05]	3	t.a.	50
4	Cu ₂ (OAc) ₂ (2.5%)	109 (5%)	H ₂ O [0.05]	3	t.a.	100 (95)
5	Cu ₂ (OAc) ₂ (2.5%)	108 (5%)	H ₂ O [0.05]	3	t.a.	100 (91)
6	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	104 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	50
7	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	106 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	90
8	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	108 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	80
9	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	107 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	100 (92)
10	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	109 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	100 (94)
11	CuSO ₄ ·5H ₂ O (10%)*	104 (10%)	H ₂ O [0.05]	3	t.a.	50
12	CuSO ₄ ·5H ₂ O (10%)*	113 (10%)	H ₂ O [0.05]	3	t.a.	100 (89)
13	CuSO ₄ ·5H ₂ O (10%)*	116 (10%)	H ₂ O [0.05]	3	t.a.	80
14	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	-	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	30
15	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	104 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	50
16	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	109 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	100 (94)
17	Cu ₂ (OAc) ₂ (1%)	113 (2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	t.a.	90
18	Cu ₂ (OAc) ₂ (0.1%)	109 (0.2%)	H ₂ O/ ^t BuOH [0.05]	18	50	40

* Sempre que s'ha utilitzat CuSO₄·H₂O, s'ha afegit ascorbat de sodi (x3).

** La conversió s'ha determinat per RMN.

Taula 2.1: Optimització de la reacció model d'obtenció de **126**.

Es va començar per estudiar la reacció sense cap lligand, un blanc, i amb **104-TBTA**, el lligand més popular a la literatura (entrades 1 i 2). Es va comprovar que, en presència del lligand, la reacció anava més ràpida. Tot i això, calia escalfar en ambdós casos perquè la reacció acabés. L'objectiu d'estudiar diferents lligands era trobar unes condicions suaus per evitar descomposicions tant del fàrmac com de la macromolècula.

Es van estudiar les dues famílies de lligands diferents (entrades 3-11 i 12-14) per trobar el millor de cadascuna per a la posterior comparació entre ells. En tots els casos es van posar com a referència una reacció sense **104-TBTA** (blanc) i/o una amb **104-TBTA**.

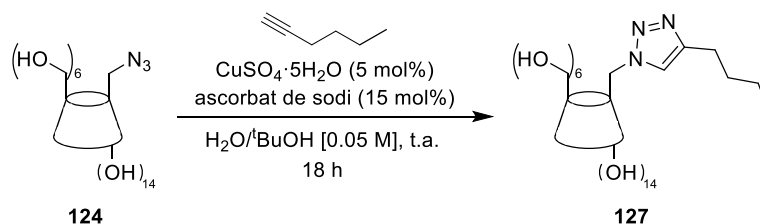
En el cas dels lligands de tipus sulfat (**108-DBSNa** i **109-DTBSNa**), totalment solubles en medi aquós, els dos van donar bons rendiments (entrades 4 i 5) però el lligand **109** fou lleugerament superior. Dins de la mateixa família de lligands, també vam estudiar els alcohols precursors dels sulfats. Emprant un 2% de Cu i canviant el dissolvent a H₂O/^tBuOH (entrades 8–11) es va observar que els lligands substituïts amb el grup *tert*-butil donaven una conversió del 100% amb bons rendiments. Per tant, el lligand emprat fins al moment amb millors resultats va ser el **109-DTBSNa**.

Per a l'altre grup de lligands, de tipus oxima (entrades 13 i 14), es va observar que afegint un 10% de Cu a la reacció s'obtenia una conversió del 100% per al lligand amb dos grups oxima (**113-DTaMB**), mentre que la conversió era només del 80% del lligand monoxima (**116-MTaDB**).

Així doncs, un cop identificats els dos millors lligands, es van comparar entre ells (entrades 17 i 18). Afegint un 2% de Cu, amb una mescla H₂O/^tBuOH com a dissolvent, a una concentració 0.05 M i a temperatura ambient, es va observar que amb el lligand sulfat (**109-DTBSNa**) la conversió era total i el rendiment molt bo. Es va intentar de baixar la quantitat de coure a 0.2% (entrada 19) però es va comprovar que la reacció era massa lenta. No sembla recomanable disminuir la quantitat catalítica de coure per sota del 2%.

Així vam arribar a les condicions definitives (entrada 18) que necessitaríem per realitzar els nostres assajos per a unir-hi un fàrmac.

Per últim, es va voler comprovar si aquestes condicions funcionaven en el cas d'emprar un alquí terminal alifàtic.



Esquema 2.15

Entrada	Lligand	Conv* (Rdt.)
	(mol%)	(%)
1	-	10
2	104 (10%)	90 (85)
3	109 (10%)	100 (96)

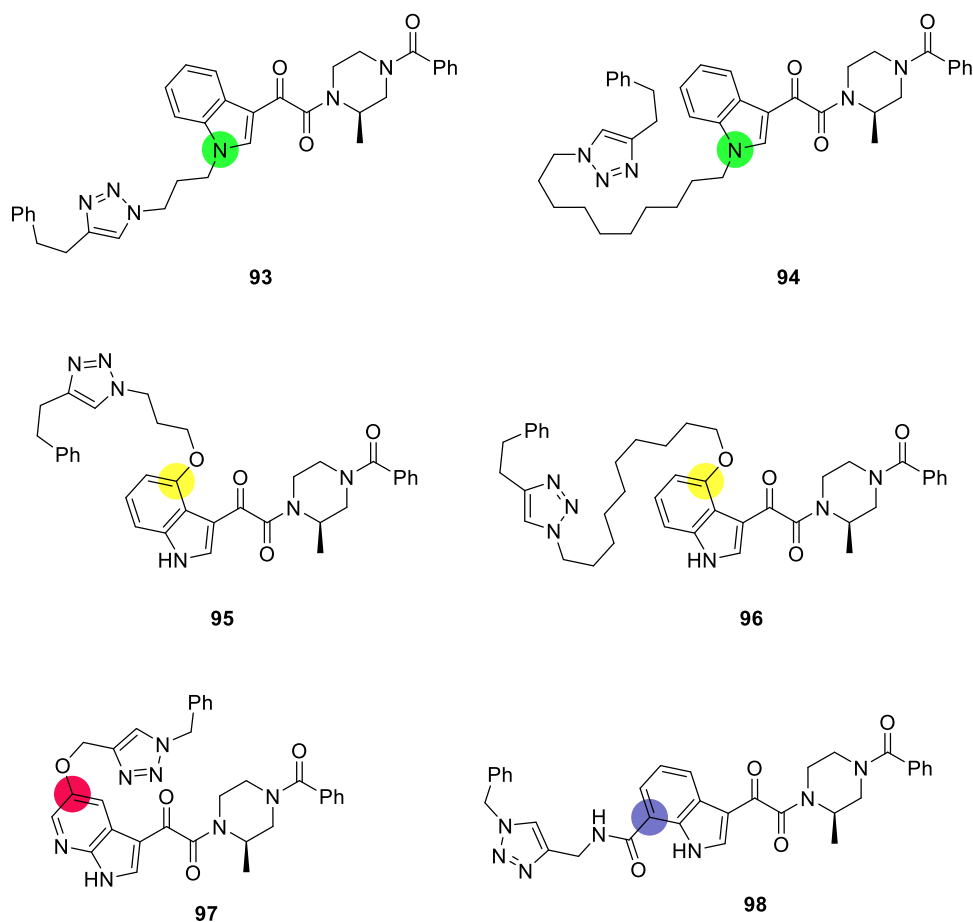
* La conversió s'ha determinat per RMN.

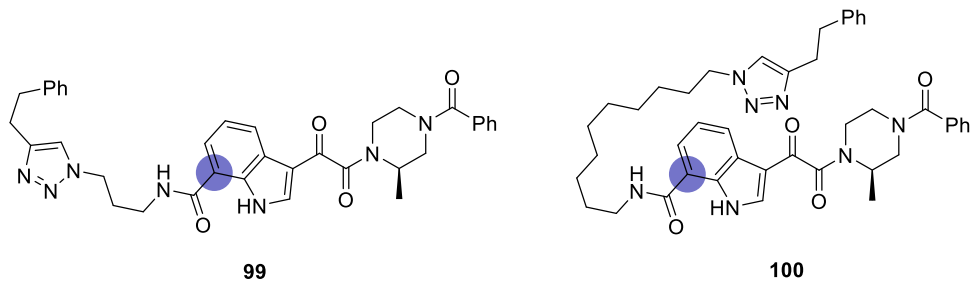
Taula 2.2: Cicloaddició [3+2] entre **124** i l'1-hexí.

Després de comparar un blanc, el lligand **104-TBTA** i el **109-DTBSNa** (entrades 1, 2 i 3) es va fer palès que el lligand de tipus sulfat seguia essent la millor opció, donant el producte desitjat amb molt bon rendiment.

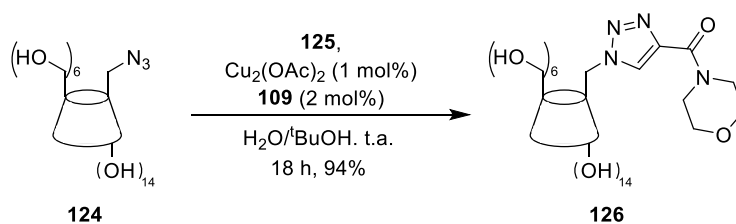
2.5 Conclusions

Recapitulant, s'ha assajat la reacció de tipus *click* dels azidoderivats sintetitzats en el **Capítol 1** de la present Tesi, que ens ha permès d'obtenir una mostra dels productes **93, 94, 95, 96, 97, 98, 99** i **100**. En el **Capítol 5** d'aquesta Tesi es presenta l'activitat biològica per prevenir la infecció per VIH de cadascun d'aquests derivats.





S'han optimitzat les condicions per dur a terme la reacció de cicloaddició [3+2] per a substrats tan polars com la β CD en medis aquosos. S'han preparat diferents lligands que estableixen l'ió Cu^+ , i també es va intentar preparar un lligand nou, tot i que sense èxit. Ara com ara, les condicions òptimes són les següents:



CAPÍTOL 3
ADDICIÓ CONJUGADA DE TIOLS A
TRIPLES ENLLAÇOS TERMINALS ACTIVATS

CAPÍTOL 3. ADDICIÓ CONJUGADA DE TIOLS A TRIPLES ENLLAÇOS TERMINALS ACTIVATS

3.1. Introducció	89
3.1.1. Reacció d'addició de tia-Michael	89
3.1.1.1. Mecanisme de reacció sota catàlisi bàsica	90
3.1.1.2. pK_a dels tiols	90
3.1.1.3. Grup electroatraient de l'electròfil	91
3.1.2. Precedents i objectius	91
3.2. Assaigs preliminars	92
3.3. Optimització de la reacció d'addició conjugada de tiols a propinamides en condicions fisiològiques	93
3.4. Estudi cinètic	96
3.4.1. Addició d'L-cisteïna a propiolat d'etil	97
3.4.2. Addició d'L-cisteïna a la propinamida 129	99
3.5. Addicions conjugades de tiols al derivat del BMS 91	100
3.6. Conclusions	105

3.1 Introducció

Com ja he comentat en l'anterior capítol de la present Tesi, l'any 2001, el professor Barry Sharpless va conceptualitzar el concepte de reacció *click*,⁶¹ un terme que defineix un tipus de reaccions simples i versàtils. Des de llavors, el conjunt de reaccions pertanyents a aquest grup s'ha expandit considerablement. En els últims anys, les addicions nucleòfiles dels tiols a diversos grups funcionals estan centrant un gran interès, donat que són eficients amb quantitats mínimes de catalitzador i en general no s'obtenen subproductes a temperatura ambient. Només per això ja es poden considerar reaccions de tipus *click*.^{79,80}

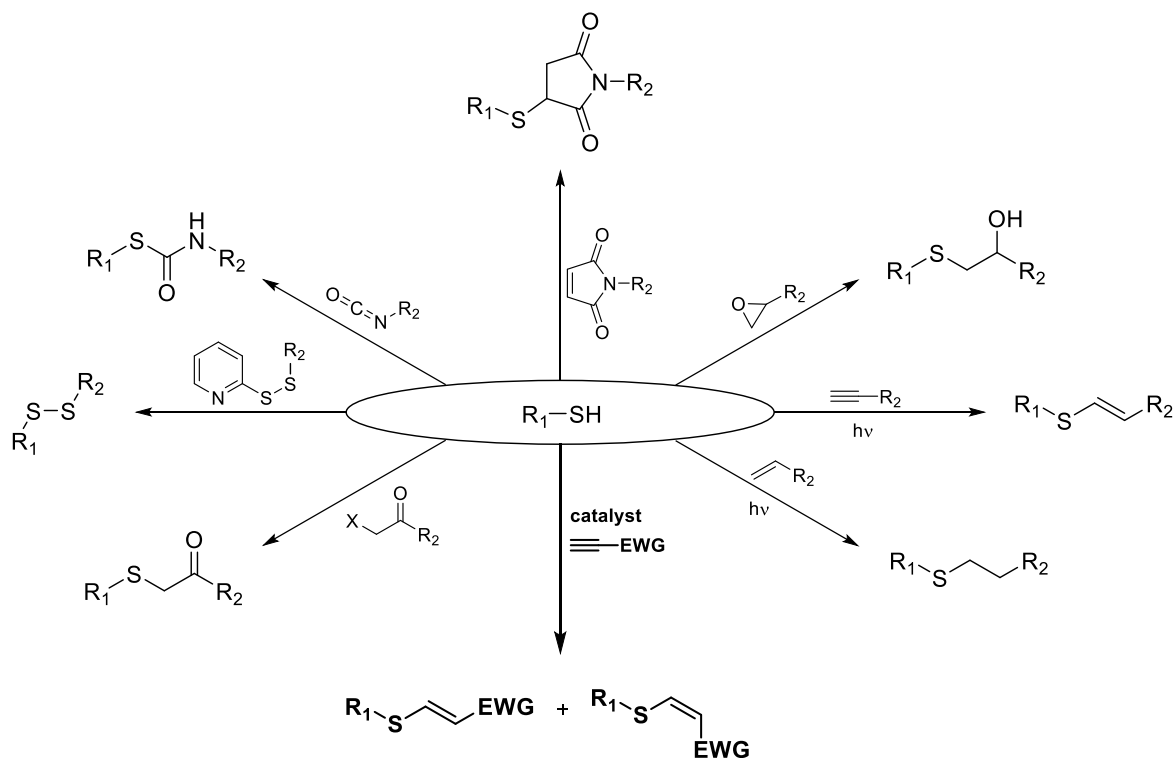


Figura 3.1: Reaccions de tipus *click* dels tiols.

3.1.1. Reacció d'addició de tia-Michael

L'addició de tia-Michael és una reacció de tipus *click* molt popular en els camps de la química dels materials i la síntesi orgànica.⁸¹ El conjugat de tia-Michael o conjugat de tiols a dobles o triples enllaços s'està estudiant des de fa gairebé 100 anys i avui en dia el desenvolupament de nous sistemes catalítics per aconseguir síntesis més fàcils i verdes continua rebent atenció.

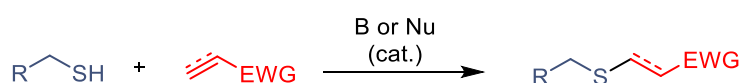


Figura 3.2: Addició de tia-Michael.

3.1.1.1. Mecanisme de reacció sota catàlisi bàsica

En general, la reacció de tia-Michael (o hidrotiolació d'un doble/triple enllaç activat) té lloc fàcilment sota catàlisi bàsica o nucleòfila. El mecanisme de catàlisi bàsica acceptat es dona en el següent esquema (Figura 3.3) on primer la base arrenca el protó del tiol. Aquest anió tiolat, que és un nucleòfil potent, ataca el carboni- β de l'electròfil (un doble o triple enllaç activat) donant un intermedi amb la càrrega negativa situada al carboni- α , que a continuació es protona, donant el producte d'addició conjugada i regenerant la base. Després de la iniciació, tot el procés és molt ràpid i es produeix sense interferències d'altres fonts de protons (com podria ser l'aigua o algun alcohol). Cal esmentar que el rendiment d'aquesta reacció es pot veure afectat per diferents factors com la força de la base, el pK_a del tiol i la naturalesa del grup electroatraient o atractor d'electrons de l'electròfil, entre d'altres.⁸²

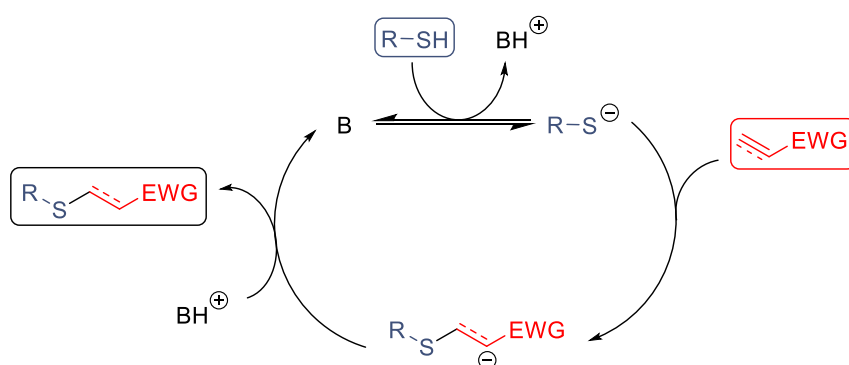


Figura 3.3: Mecanisme de l'addició tia-Michael catalitzada per una base.

3.1.1.2. pK_a dels tiols

Com ja s'ha esmentat, el pK_a dels tiols és un factor important en el rendiment de la reacció. Essencialment, es podrien classificar els tiols en quatre grups: tiols alifàtics (principalment, alcantiols), 3-mercaptopropanoats, mercaptoacetats i tiols aromàtics (tiofenols). En la següent figura es mostra la variació del seu pK_a i la nucleofília dels corresponents tiolats.

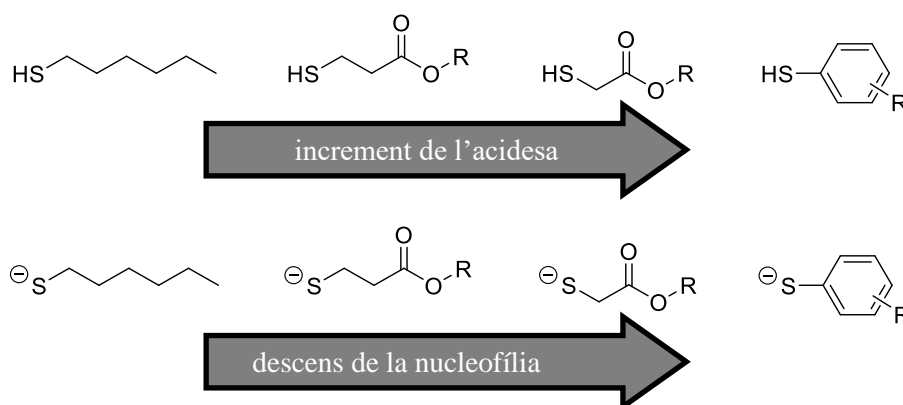


Figura 3.4: Variació del pK_a i la nucleofília de diferents tipus de tiols.

3.1.1.3. Grup electrotraient de l'electròfil

Un altre factor a tenir en compte és l'estructura de l'alquè o alquí terminal activat, ja que juga un paper important en la cinètica de la reacció. Com més electrotraient sigui el grup, més susceptible serà l'alquè o l'alquí a una reacció d'addició de tia-Michael.

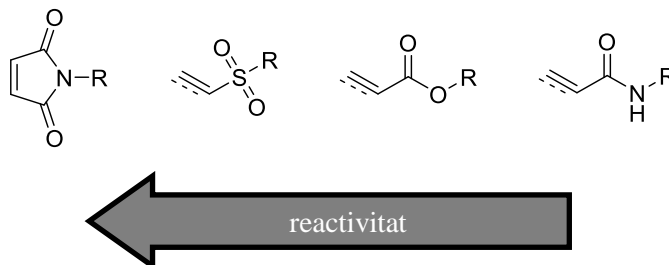


Figura 3.5: Reactivitat de diferents grups vinil i etinils.

3.1.2. Precedents i objectius

En el nostre grup de treball hi ha experiència en l'addició conjugada de diversos nucleòfils a triples enllaços activats.⁸³⁻⁸⁸ Tot continuant la feina feta al nostre laboratori i pel grup d'Odón Arjona i Joaquín Plumet,⁸⁹⁻⁹¹ sabem que els triples enllaços terminals, activats amb grups electrotraients forts (EWG) com ara una sulfona (SO_2R), són capaços de reaccionar a temperatura ambient fins i tot amb nucleòfils molt dèbils, emprant el catalitzador adequat.

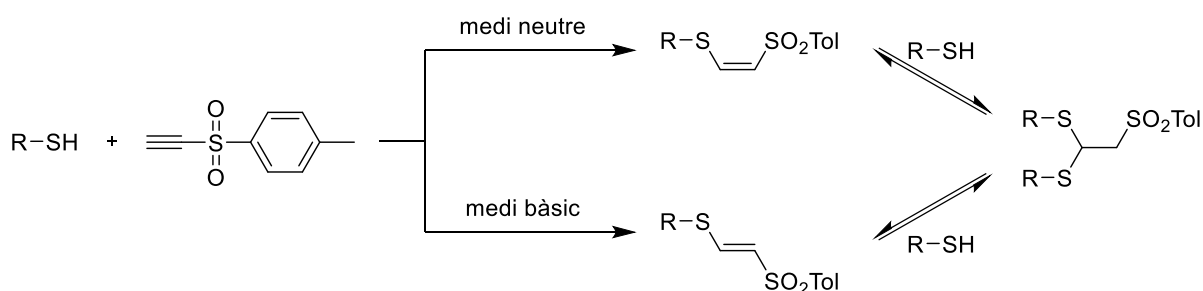


Figura 3.6: Addició conjugada de tiols al *p*-toluenesulfonilacetilè (etil 4-metiltoluenesulfonat).

En el present capítol, l'objectiu és examinar la possibilitat que en condicions fisiològiques reals, les propinamides serveixin per unir o enllaçar tiols i amines. Les amides (CONHR i CONR_2), tot i ser grups electrotraients dèbils, són molt més resistents a la hidròlisi química que els grups ester, per la qual cosa podrien ser una bona opció dins del camp de la bioconjugació.

Per això, el desenvolupament de reaccions fàcils, suaus i quimioselectives per a la conjugació covalent de molècules actives amb biomolècules i/o macromolècules està captant molt d'interès. A

més, es busquen mètodes bioortogonals en condicions fisiològiques per a la unió selectiva de les molècules dins dels complicats entorns biològics.⁹²

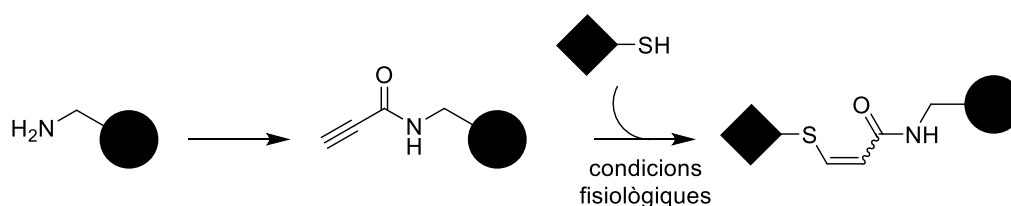
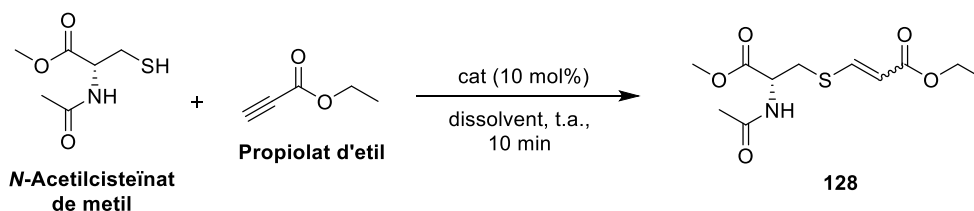


Figura 3.7: Estratègia per unir tiols i amines.

3.2. Assaigs preliminars

Es va començar per avaluar l'efecte del medi de reacció. També es va fer una tria de diferents bases i nucleòfils en quantitats catalítiques, amb l'objectiu de trobar les millors condicions. Es va pensar que el model més simple i adequat als nostres objectius era l'ús d'un aminoàcid que contingués el grup tiol, com és la cisteïna.

Així doncs, la reacció a estudiar va ser l'addició conjugada de l'èster metílic de l'*N*-acetil-L-cisteïna al propiolat d'etil (propinoat d'etil). Es va començar per comparar un medi orgànic (CH₃CN) i un medi aquós. En cada medi es va examinar l'efecte de diferents tipus d'additius en quantitats catalítiques.



Esquema 3.1

Entrada	CH ₃ CN			H ₂ O (pH 7.4)		
	Additiu	Rdt. (%)	<i>E/Z</i> *	Additiu	Rdt. (%)	<i>Z/E</i> *
1	-	0	-	-	100	94:6
2	DMAP	98	69:31	DMAP	88	72:28
3	DABCO	100	93:7	DABCO	96	93:7
4	Et ₃ N	100	71:29	Et ₃ N	93	89:11
5	DIPEA	97	69:31	DIPEA	83	92:8
6	Me ₃ P	99	69:31	Me ₃ P	99	95:5
7	NaH	75	68:32			

* La relació *Z/E* s'ha determinat per RMN de ¹H abans de la purificació del producte.

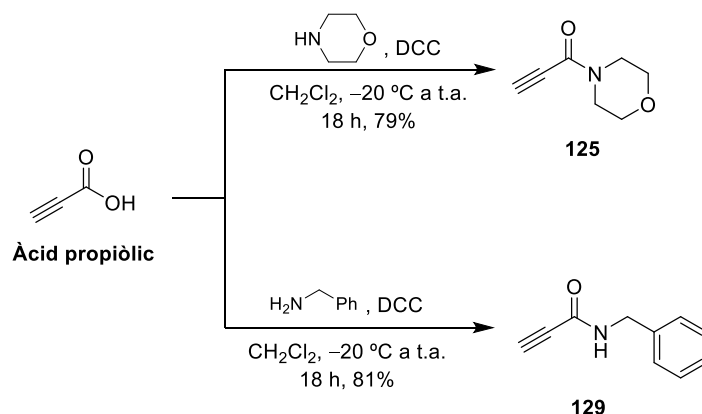
Taula 3.1: Condicions de reacció per a l'obtenció de l'adducte conjugat **128**.

D'una banda, es va observar que en medi orgànic el producte majoritari era l'isòmer *E*, el termodinàmicament més estable, i que la DABCO és l'amina que dona millors relacions *E/Z* amb un rendiment quantitatiu. En medi aquós a pH 7.4, contràriament, el producte majoritari va ser l'isòmer *Z*, el producte cinètic. A més a més, es va observar que sense cap tipus d'additiu s'obtenia el producte conjugat amb una bona relació *Z/E* i amb un rendiment excel·lent, fet interessant de cara a la futura aplicació d'aquesta reacció en un entorn biològic.

3.3. Optimització de la reacció d'addició conjugada de tiols a propinamides en condicions fisiològiques

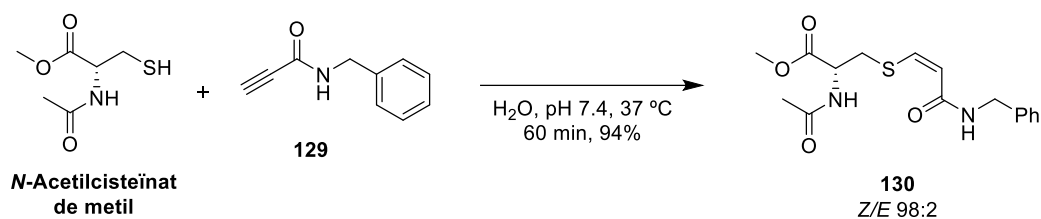
En aquest projecte, es volia treballar amb propinamides (és a dir, amides de l'àcid propiòic o propiòic, relacionat amb l'alcohol propargílic). Tot i ser un triple enllaç menys activat, el seu enllaç amida és prou estable en condicions biològiques en comparació amb enllaços de tipus ester (en absència de carboxipeptidases).

A fi d'assajar la reacció amb l'aminoàcid cisteïna, es van preparar dues propinamides diferents, una amida *N,N*-disubstituïda (una amida "terciària") i l'altra *N*-substituïda (una amida "secundària"), com a models inicials.

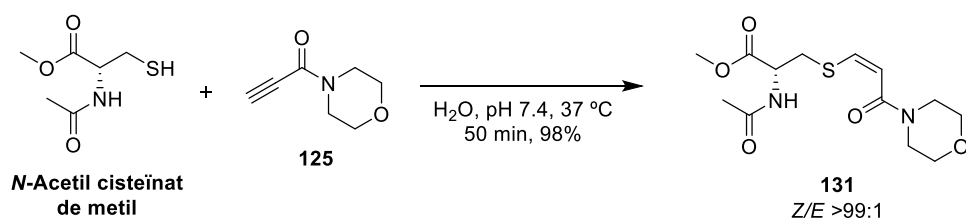


Esquema 3.2

Després d'assajar la reacció d'addició conjugada de l'ester metílic de l'*N*-acetil-*L*-cisteïna a les propinamides sintetitzades, en condicions fisiològiques, es va observar que la reacció avançava una mica més lenta que no pas amb el propiolat d'etil, però que seguia donant una bona relació *Z/E* i un excel·lent rendiment global.

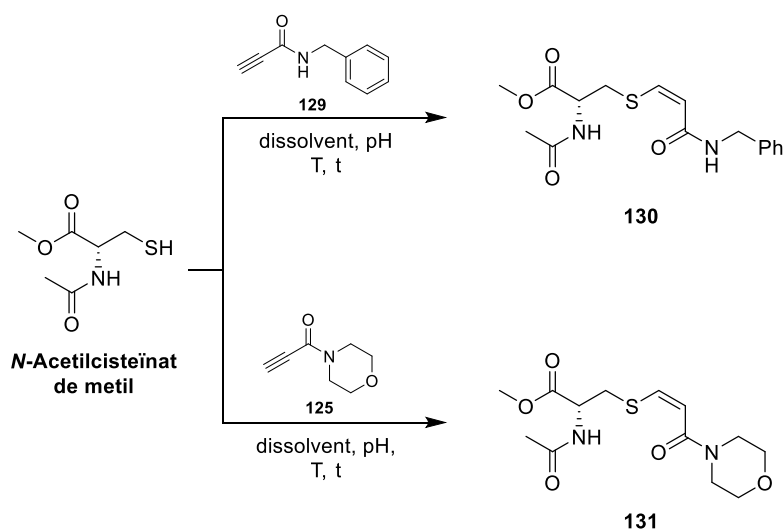


Esquema 3.3



Esquema 3.4

Continuant amb aquest treball, es varen escollir l'L-cisteïna i l'L-glutatió (en la seva forma reduïda) com a models de tiols biològics i es van assajar diferents reaccions d'addició conjugada en condicions fisiològiques (37 °C i pH 7.4). Paral·lelament, s'han estudiat diferents medis aquosos i diferents casos a pH 10-12, amb la intenció d'esbrinar si l'amina, a aquests pH, competia o no amb el tiol.



Esquema 3.5

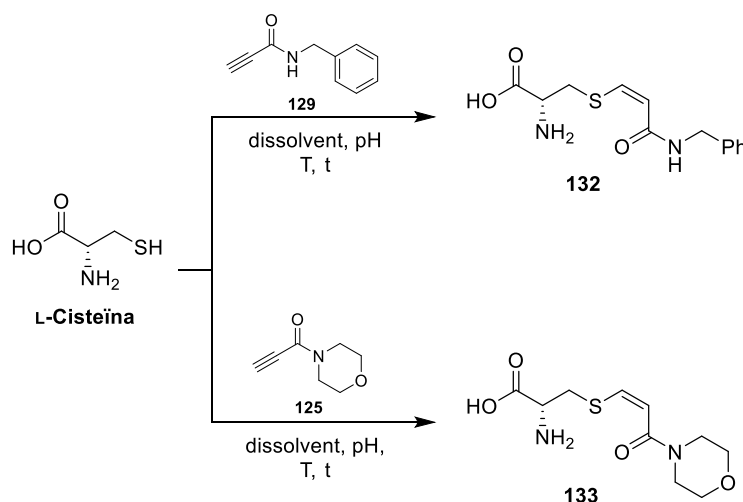
Entrada	Propinamida (1.1 equiv)	Dissolvent [0.1 M]	pH	T (°C)	t (min)	Rdt. (%)	Z/E*
1	129	H ₂ O	6.0	t.a.	1,000	5	50:50
2	129	H ₂ O	7.4	t.a.	70	93	98:2
3	129	EtOH/H ₂ O 1:1	7.4	37	50	98	93:7
4	125	^t BuOH/H ₂ O 1:1	7.4	37	40	98	>99:1**

* La relació Z/E s'ha determinat per RMN de ¹H abans de la purificació del producte.

** L'isòmer minoritari no s'ha detectat ni durant ni després de la reacció.

Taula 3.2: Addició conjugada entre l'èster de metil de l'*N*-acetil-L-cisteïna i les propinamides **129** i **125**.

D'una banda, vàrem observar que a pH 6.0 la reacció pràcticament no tenia lloc, pel fet que a aquest pH la concentració de tiolat en el medi és negligible. D'altra banda, es va comprovar que a temperatura ambient, la reacció va una mica més lenta. A més a més, es va veure que amb la mescla 1:1 d'alcohol *tert*-butílic/aigua la reacció era més homogènia i es disminuïa el temps de reacció.



Esquema 3.6

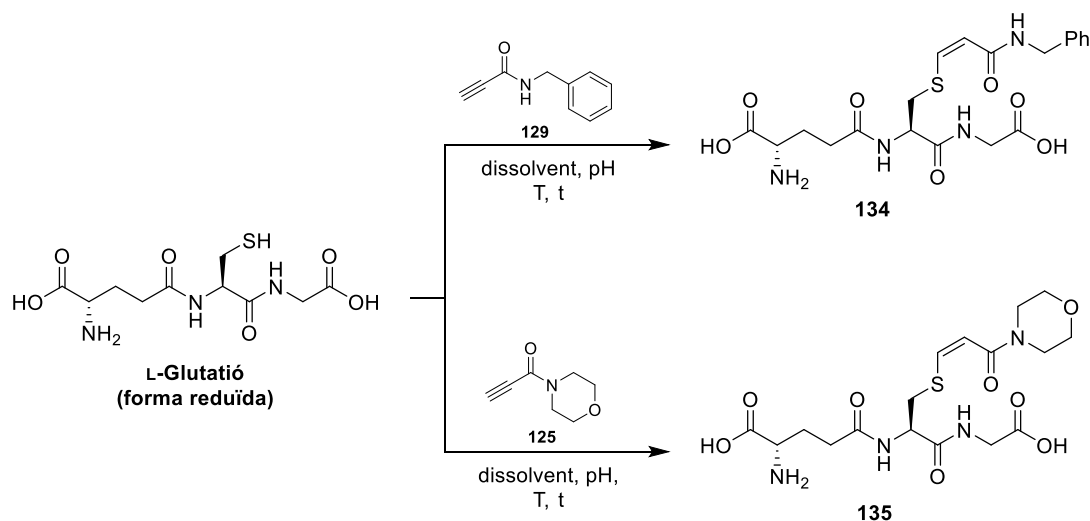
Entrada	Alquí (1.1 equiv)	Dissolvent [0.1 M]	pH	T (°C)	t (min)	Rdt. (%)	Z/E*
1	129	H ₂ O	7.4	t.a.	70	92	98:2
2	129	^t BuOH/H ₂ O 1:1	7.4	37	60	96	>99:1**
3	129	THF/H ₂ O 1:1	7.4	37	60	92	85:15
4	129	^t BuOH/H ₂ O 1:1	10.0	37	30	96	>99:1**
5	129	H ₂ O	12.0	37	30	92	88:12
6	125	H ₂ O	7.4	37	40	99	95:5
7	125	^t BuOH/H ₂ O 1:1	7.4	37	40	97	>99:1**
8	125	THF/H ₂ O 1:1	7.4	37	40	96	65:35

* La relació Z/E s'ha determinat per RMN de ¹H abans de la purificació del producte.

** L'isòmer minoritari no s'ha detectat ni durant ni després de la reacció.

Taula 3.3: Addició conjugada entre l'L-cisteïna i les propinamides **129** i **125**.

En aquest cas, es va confirmar que el dissolvent que donava millors resultats era la mescla ^tBuOH/H₂O 1:1. A més, tal com s'ha dit, es van estudiar reaccions a pH 10.0 (entrada 4) i pH 12.0 (entrada 5) sense observar cap subproducte d'addició del grup amino al triple enllaç.



Entrada	Alquí (1.1 equiv)	Dissolvent [0.1 M]	pH	T (°C)	t (min)	Rdt. (%)	Z/E*
1	129	^t BuOH/H ₂ O 1:1	7.4	37	60	93	>99:1**
2	125	H ₂ O	7.4	37	40	95	95:5
3	125	^t BuOH/H ₂ O 1:1	7.4	37	40	98	>99:1**

* La relació Z/E s'ha determinat per RMN de ¹H abans de la purificació del producte.

** L'isòmer minoritari no s'ha detectat ni durant ni després de la reacció.

Taula 3.4: Addició conjugada entre l'L-glutatió reduït i les propinamides **129** i **125**.

Per últim, l'addició conjugada de la forma reduïda de l'L-glutatió amb les propinamides **129** i **125** va donar l'isòmer esperat amb rendiments excel·lents.

Tal com es fa palès en les tres Taules (**3.2**, **3.3** i **3.4**) l'isòmer majoritari és l'olefina Z. En resum, s'han obtingut els millors resultats en la mescla ^tBuOH/H₂O, fornint un únic isòmer de cadascun dels diferents productes d'addició.

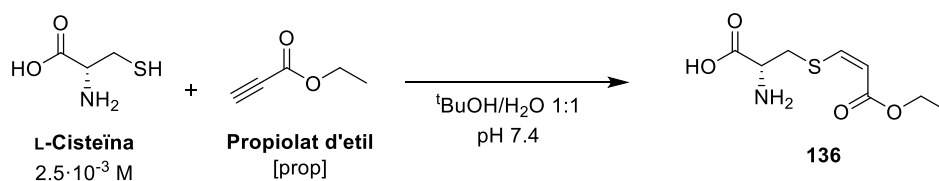
3.4 Estudi cinètic

Es va dur a terme un estudi cinètic per tal d'obtenir la constant de velocitat de reacció de l'addició d'L-cisteïna a 2 substrats diferents: propiolat d'etil (propinoat d'etil) i N-benzilpropinamida (**129**). Els experiments es van realitzar amb un espectrofotòmetre UV-Vis, registrant els valors

d'absorbància respecte al temps de reacció. Seguint la literatura,⁹³ es va treballar en condicions de pseudo-primer ordre, és a dir, amb un excés d'L-cisteïna d'entre 8 i 25 vegades més concentrada respecte a l'acceptor de Michael i, com sempre, emprant com a dissolvent una mescla de ^tBuOH/H₂O 1:1 a un pH 7.4. Tots els experiments cinètics es van dur a terme per triplicat. Després de la recopilació de dades, es van ajustar a una equació exponencial per obtenir les constants observades de pseudo-primer ordre (k_{obs}) per a cada concentració inicial de triple enllaç terminal activat.

$$\ln[A] = \ln[A_0] - kt$$

3.4.1. Addició d'L-cisteïna a propiolat d'etil



Esquema 3.8

Es va seguir la reacció amb un espectrofotòmetre UV-Vis, per l'evolució de la λ_{max} del producte d'addició **136** (280 nm).

Es van preparar dissolucions de propiolat d'etil de diferents concentracions: $1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $2.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ i $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. A continuació es mostren les gràfiques on es representen les absorbàncies obtingudes respecte al temps des de l'addició del propiolat d'etil (de diferents concentracions inicials) a l'L-cisteïna.

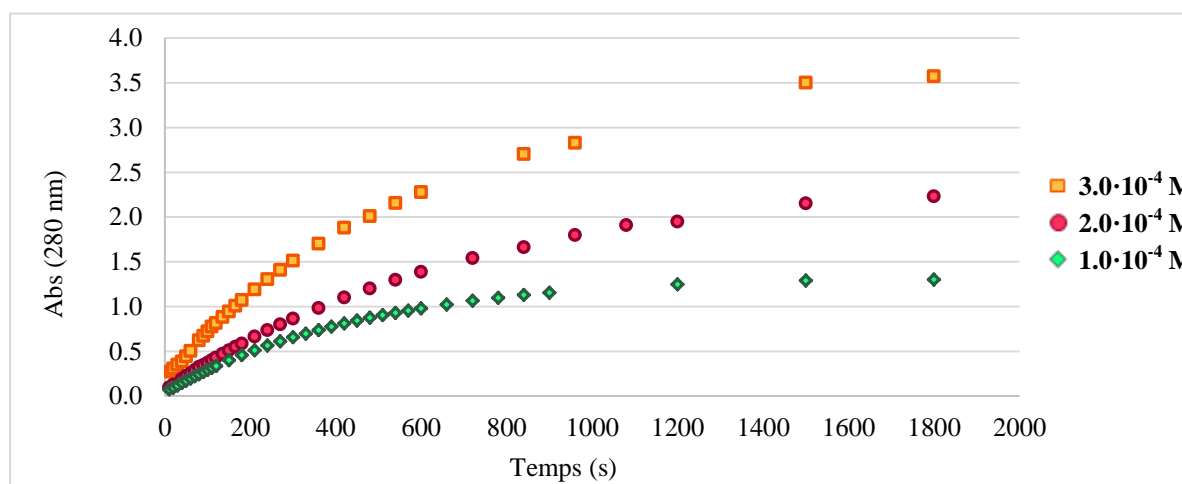


Figura 3.8: Gràfica d'absorbàncies vs. temps.

Representant el logaritme neperià de la concentració del propiolat d'etil vs. el temps es van obtenir les k_{obs} a les diferents concentracions ($k_{obs1} = 0.0011 \text{ s}^{-1}$, $k_{obs2} = 0.0016 \text{ s}^{-1}$ i $k_{obs3} = 0.0023 \text{ s}^{-1}$).

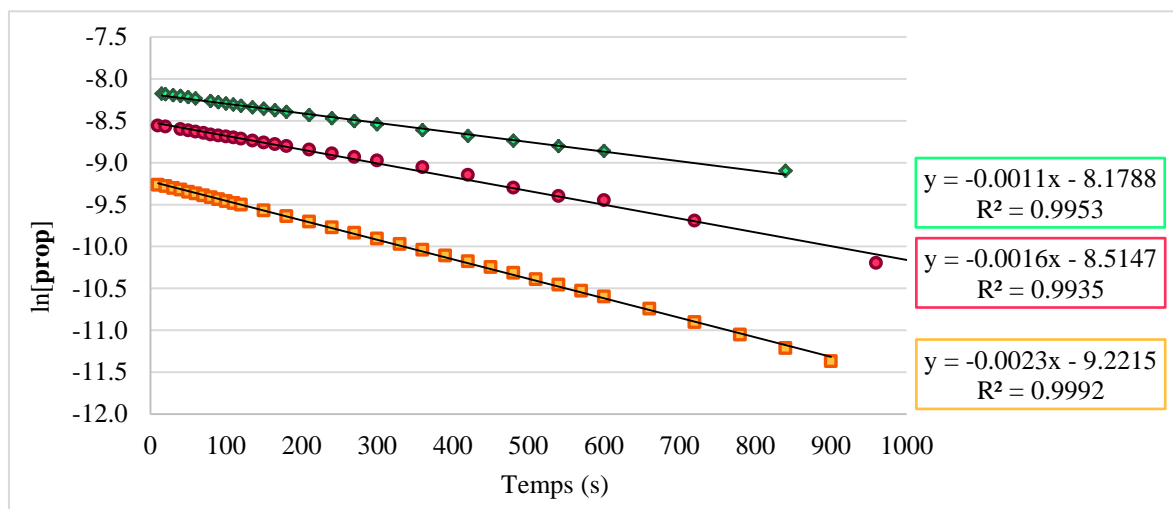


Figura 3.9: Gràfica del $\ln[\text{prop}]$ vs. temps.

A continuació es mostra la representació de cada k_{obs} vs. la concentració de propiolat d'etil inicial, per tal de determinar la constant de velocitat de la reacció (k_2).

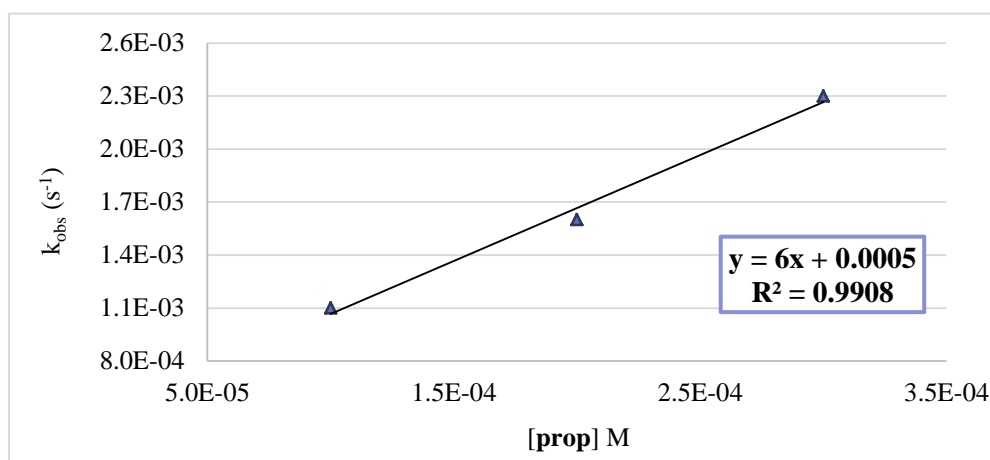
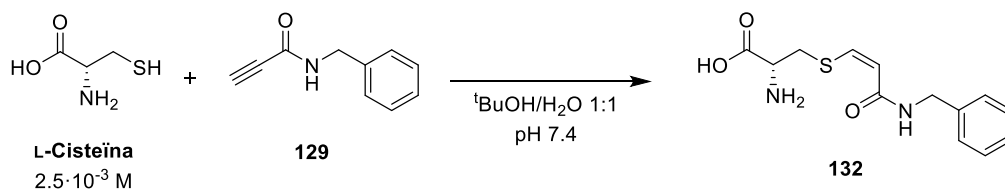


Figura 3.10: Gràfica de k_{obs} vs. $[\text{prop}]$.

Finalment, s'obté una constant de velocitat de la reacció per a l'obtenció de **136** de $6.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.4.2. Addició d'L-cisteïna a la propinamida **129**

Esquema 3.9

S'ha emprat exactament el mateix procediment de l'apartat **3.4.1.** per al seguiment d'aquesta reacció. A continuació es mostren les gràfiques on s'indiquen les absorbàncies, respecte al temps de reacció, partint de les 3 concentracions inicials de **129** amb les quals s'ha treballat.

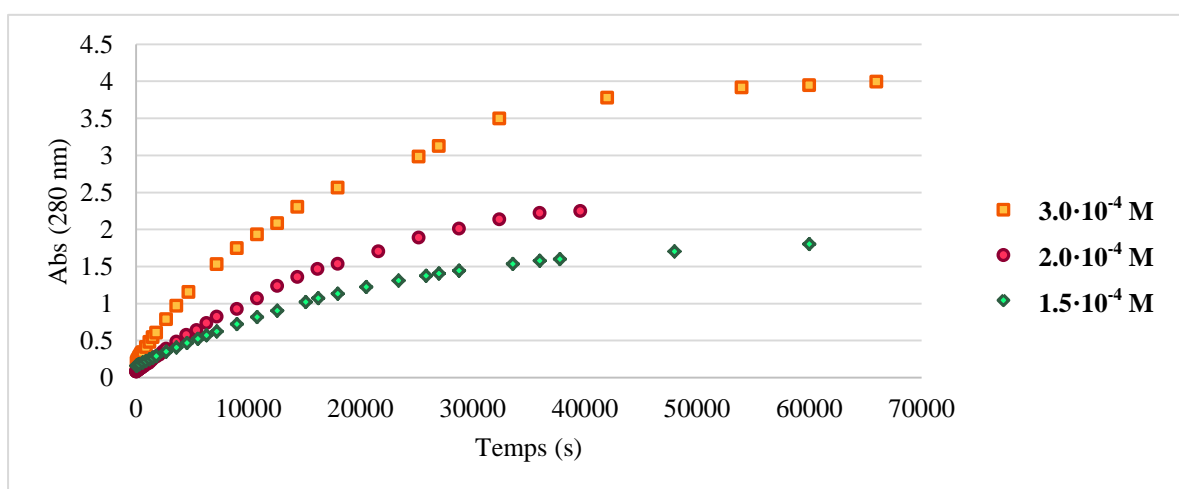


Figura 3.11: Gràfica d'absorbàncies vs. temps.

Representant el logaritme neperià de la concentració inicial de la propinamida **129** vs. el temps s'obtenen les diferents k_{obs} a cada concentració ($k_{\text{obs}1} = 4.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{obs}2} = 4.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ i $k_{\text{obs}3} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

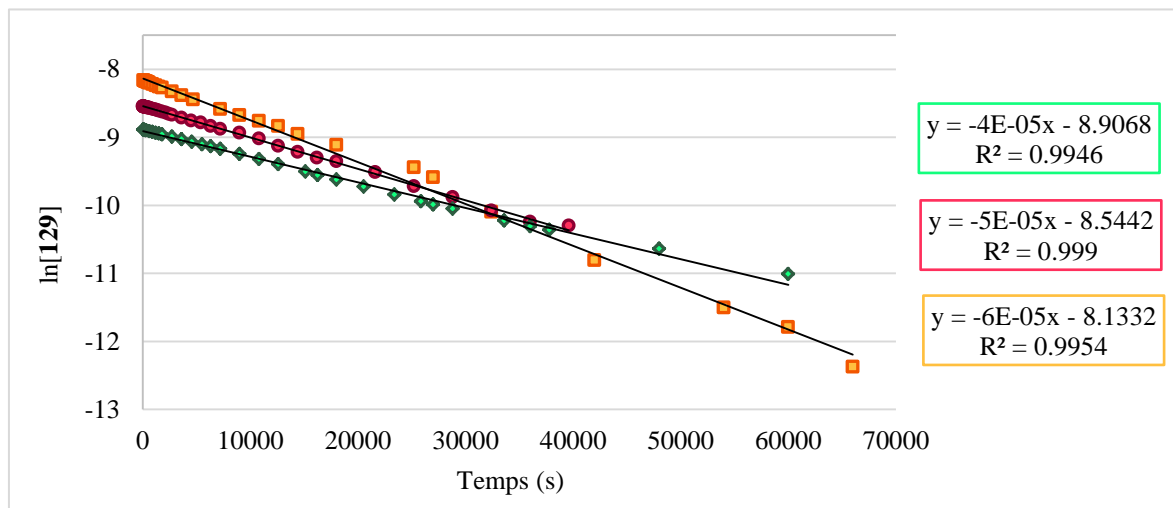


Figura 3.12: Gràfica del $\ln[129]$ vs. temps.

A continuació, es mostra la representació de cada k_{obs} respecte a la concentració de **129** per obtenir la constant de velocitat de reacció (k_2).

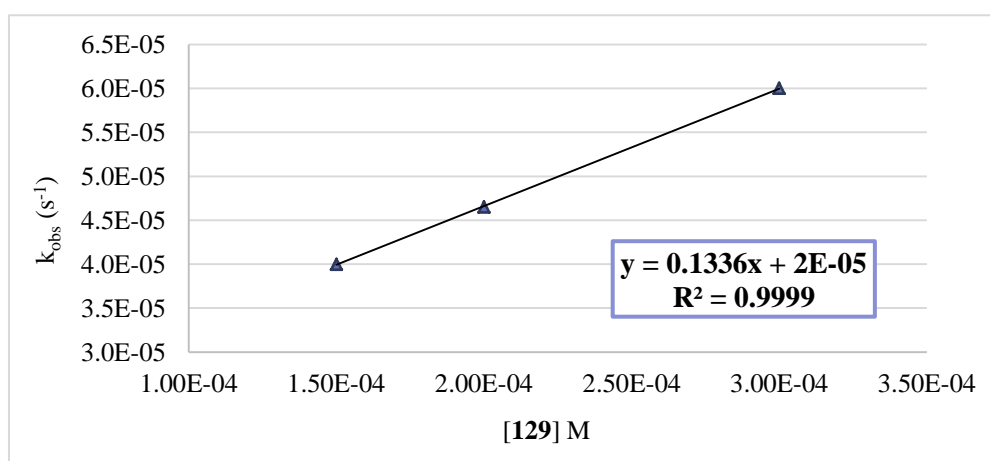


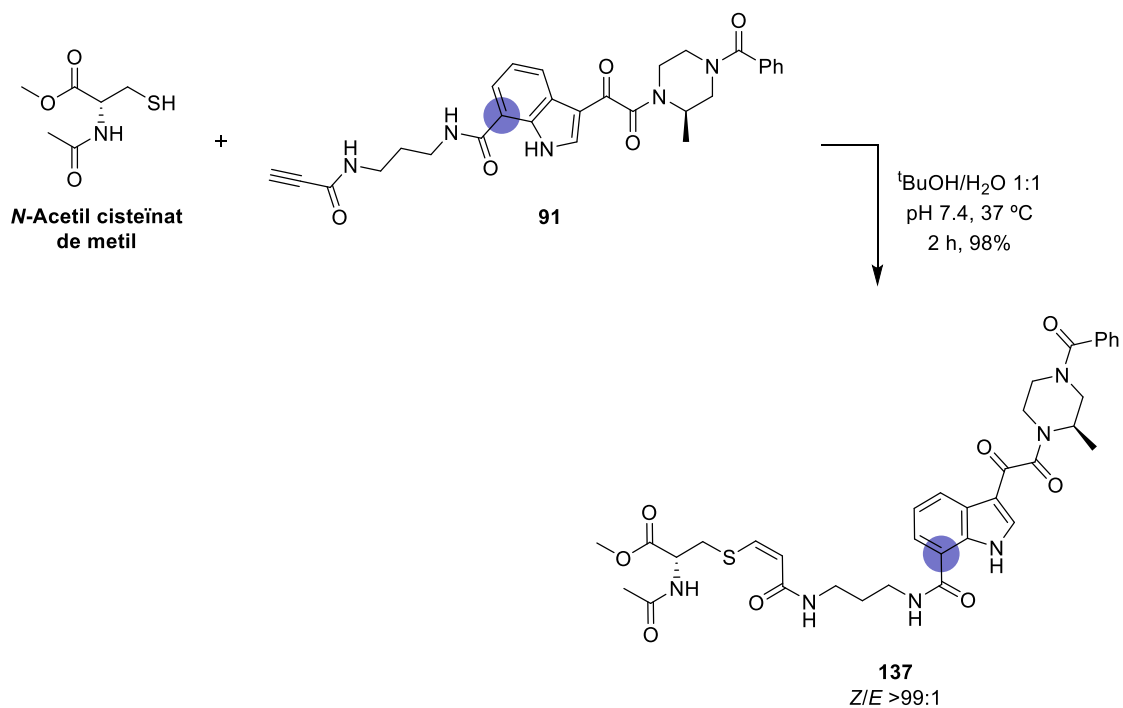
Figura 3.13: Gràfica de k_{obs} vs. [129].

Així doncs, s'ha determinat una constant de velocitat de reacció, per a l'obtenció de **132**, de $0.13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. S'observa, doncs, que aquesta reacció té una constant de velocitat de pseudo-primer ordre unes 50 vegades més petita que la del propiolat d'etil. És un resultat raonable perquè un grup COOEt és més electroatraient que un CONHBn.

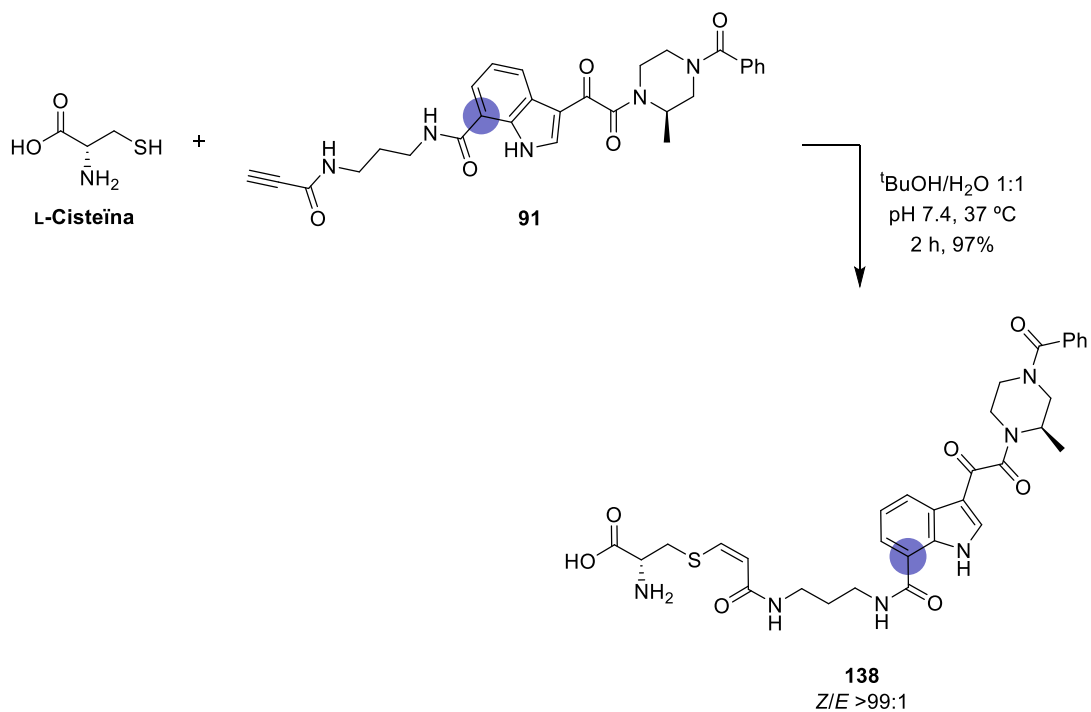
3.5. Addicions conjugades de tiols al derivat del BMS 91

Les addicions conjugades de l'ester metílic de l'*N*-acetil-L-cisteïna, l'L-cisteïna i l'L-glutació (en la seva forma reduïda) a la propinamida **91** derivada del BMS (sintetitzada en el **Capítol 1** de la

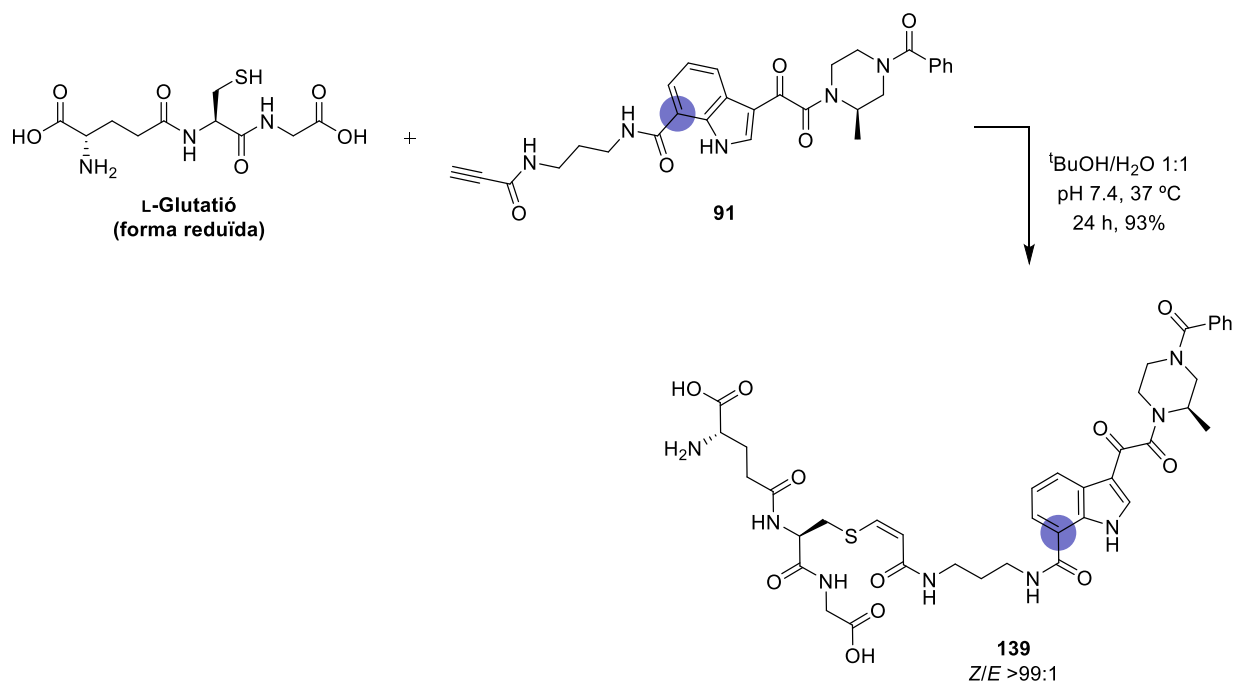
present Tesi) s'han dut a terme sota les millors condicions aconseguides en l'apartat 3.2 d'aquest capítol (^tBuOH/H₂O 1:1, 37 °C i pH 7.4) a fi d'obtenir els productes conjugats **137**, **138** i **139**.



Esquema 3.10



Esquema 3.11



Esquema 3.12

A més a més, es va estudiar la reacció de conjugació entre els dos grups tiols que conté l'oxitocina (un cop reduït l'enllaç disulfur amb TCEP·HCl, hidrocloreur de tris(carboxietil)fosfina) i les propinamides **129** i **91**.

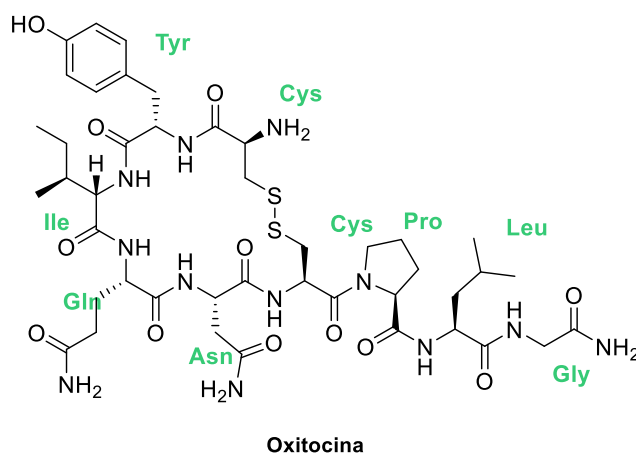
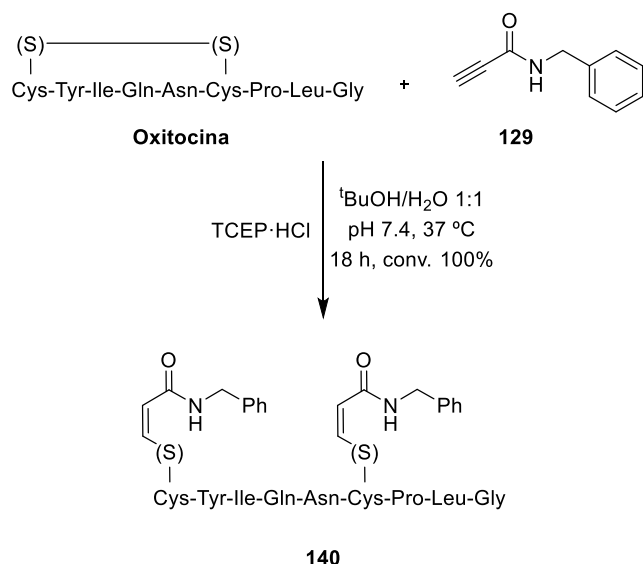


Figura 3.14: Representació de la oxitocina.

En els dos casos la reacció es va seguir per HPLC i MS per observar la mono i disubstitució de cada un dels tiols de la oxitocina reduïda. Cal dir que van caldre 1.5 equiv de TCEP·HCl per reduir l'enllaç disulfur, aproximadament 7.5 equiv de K_3PO_4 per arribar a un pH = 7.4 i entre 3 i 4 equiv de la propinamida en ambdós casos.



Esquema 3.13

En aquest cas, es va obtenir l'oxitocina disubstituída amb una conversió del 100% i l'isòmer de configuració Z, com s'ha pogut comprovar per RMN de ^1H (δ 7.06 (d, $J = 10.1$, 1H), 6.96 (d, $J = 10.1$, 1H), 6.00 (d, $J = 10.0$, 1H), 5.96 (d, $J = 10.0$, 1H)).

Paral·lelament, es va estudiar la mateixa reacció amb la propinamida derivada del BMS **91** sota les mateixes condicions emprades en el cas anterior. Després de 18 h de reacció, per HPLC es va observar que quedava oxitocina monosubstituída, així que es van addicionar 0.5 equiv més de propinamida **91** i de TCEP·HCl (per si quedava enllaç disulfur). Al cap de 5 h es va repetir l'HPLC i es va comprovar que la reacció no avançava més, tot obtenint un 73% del producte disubstituíd **141** ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 2063.8925) i un 27% del producte monosubstituíd **142** ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 1536.6759). Finalment, es va aïllar l'oxitocina disubstituída **141** i es va comprovar per RMN de ^1H que l'isòmer obtingut era el de configuració Z: δ 6.98 – 6.91 (m, 3H), 5.89 (d, $J = 10.1$, 1H), 5.86 (d, $J = 10.0$, 1H).

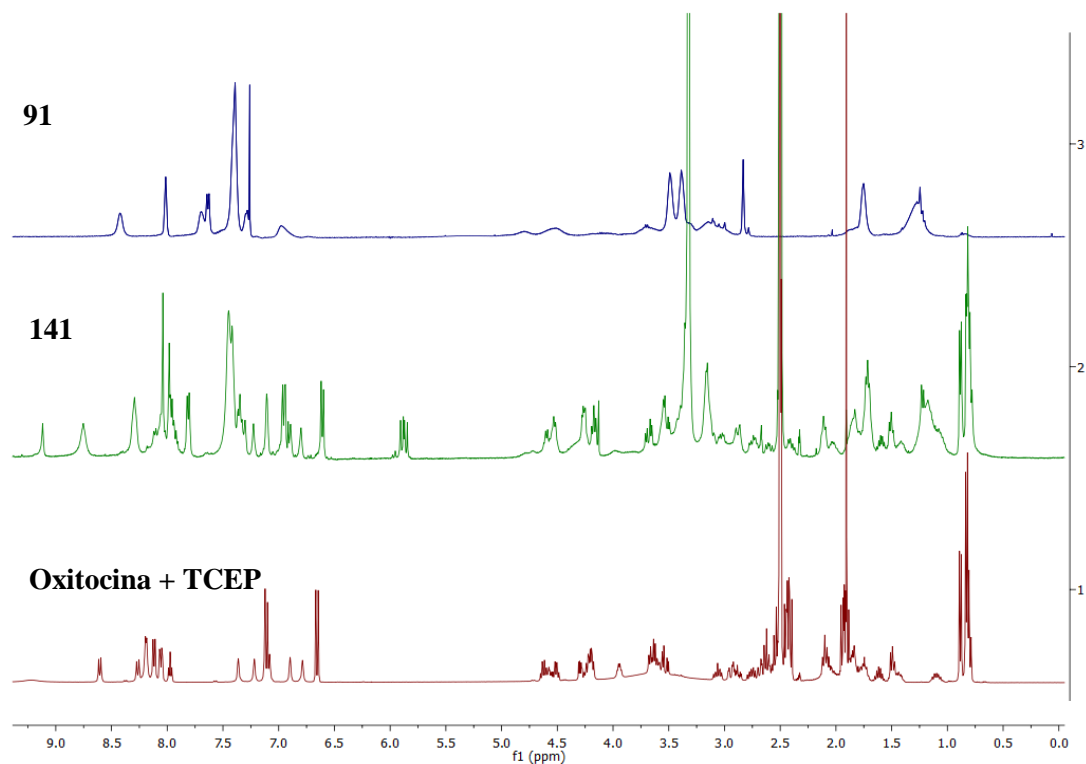
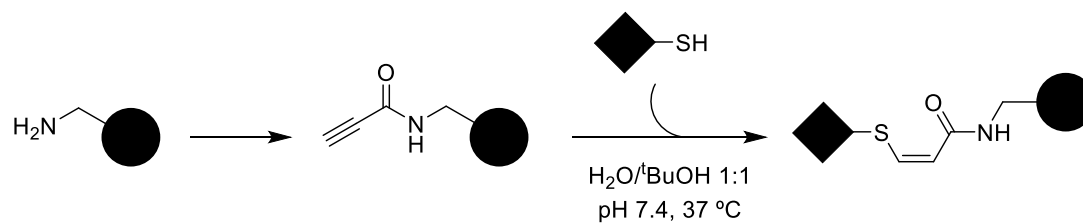


Figura 3.16: RMN de ^1H de **91**, **141** i la oxitocina.

3.6. Conclusions

En conclusió, s'ha desenvolupat un mètode basat en addicions conjugades simples de tiols a propinamides per a la conjugació bioortogonal de derivats de la cisteïna en condicions fisiològiques i sense additius.



Juntament amb estudis complementaris de reactivitat i estabilitat s'ha publicat un article en forma de *Note* a la revista *Journal of Organic Chemistry*.⁹⁴

CAPÍTOL 4
PREPARACIÓ i CONJUGACIÓ
DE POLÍMERS

CAPÍTOL 4. PREPARACIÓ i CONJUGACIÓ DE POLÍMERS

4.1. Introducció	111
4.2. β-Ciclodextrina (βCD)	112
4.2.1. Síntesi de conjugats entre la β CD i derivats del BMS	113
4.3. Poliglicerol hiperramificat (HPG)	120
4.3.1. Síntesi de conjugats entre el HPG i derivats del BMS	122
4.4. Conclusions	129

4.1 Introducció

El terme de bioconjugació s'utilitza per descriure l'estratègia de formació d'un nou enllaç covalent estable entre dos molècules, de les quals com a mínim una ha de ser una biomolècula. En els darrers anys, la conjugació o unió de fàrmacs amb anticossos, hormones i altres biomolècules està esdevenint una estratègia d'especial interès en l'àmbit biomèdic, sia en processos de seguiment cel·lular, biodistribució de proteïnes, administració de fàrmacs, etc. L'objectiu és trobar conjugats biocompatibles i cada cop més eficaços davant les possibilitats d'administrar i dirigir el fàrmac a les seves dianes terapèutiques, de poder crear noves formulacions, de controlar processos cel·lulars, d'estudiar la funció dels enzims, de determinar la biodistribució de proteïnes, etc.⁹⁵ A més, en casos on el fàrmac té toxicitats molt elevades, la bioconjugació d'aquests principis actius amb altres molècules ens permet baixar la toxicitat i, fins i tot canviar la ruta d'administració del fàrmac, ampliant així el ventall de possibilitats.

El terme polímer terapèutic es va començar a utilitzar per a la descripció de fàrmacs polimèrics: proteïnes, anticossos i fàrmacs conjugats a polímers, micel·les o dendrímers mitjançant enllaços covalents. L'any 1953 el Premi Nobel Hermann Staudinger va ser el primer guardonat per a la química del "polímer". Staudinger va introduir el concepte de macromolècula i va preveure el gran potencial del seu ús en aplicacions biomèdiques.⁹⁶ La última dècada ha estat testimoni d'avenços notables en la química dels materials enfocades cap a aplicacions mèdiques.

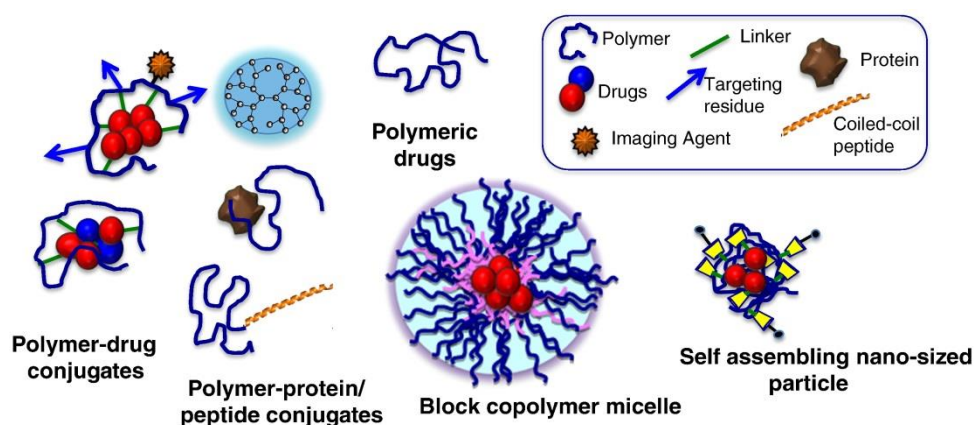


Figura 4.1: Representació de diferents estructures polimèriques.⁹⁷

Dins el camp de la bioconjugació, el desenvolupament de mètodes bioortogonals s'ha convertit en un punt molt important a l'hora d'unir selectivament els fàrmacs dins dels complicats entorns biològics. El concepte de química bioortogonal va ser introduït per Bertozzi i col·laboradors.⁹⁸ Tracta de dissenyar o redissenyar reaccions selectives que es puguin realitzar de manera fiable dins d'entorns biològics. Aquestes reaccions han de procedir de manera eficient en presència de diversos grups funcionals i evidentment s'han de dur a terme en medi aquós. A més, han de tenir lloc amb un mínim impacte en el propi entorn biològic.

Dins d'aquest capítol, es presentarà la conjugació dels fàrmacs derivats de BMSs (sintetitzats en el **Capítol 1**) amb diferents macromolècules. Les estratègies utilitzades per a la unió covalent d'aquests fàrmacs amb les estructures polimèriques inclouen les conegudes cicloaddicions [3+2] entre una azida i un derivat propargilat catalitzades per salts de Cu(I)⁶³ (el mètode s'ha posat a punt en el **Capítol 2** de la present Tesi) i la reacció d'addició conjugada de tiols a triples enllaços terminals activats (estudiada i presentada en el **Capítol 3** d'aquesta Tesi).⁹⁴ Es va pensar en aquestes dues opcions ja que condueixen a alts rendiments i una perfecta regioselectivitat, a part que són molt conegudes en el nostre grup i ben estudiades en general.

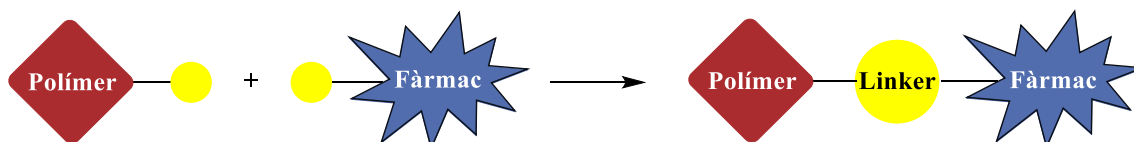


Figura 4.2: Estratègia per obtenir el microbicida.

L'ús de macromolècules com a portadores de fàrmacs requereix una optimització d'un gran nombre de paràmetres. En primer lloc, cal la seva nul·la toxicitat i absència d'immunogenicitat. També han de ser fàcilment assequibles i, per descomptat, han de ser capaços de portar una càrrega de fàrmac suficient per assegurar la potència desitjada. En aquest cas, treballarem amb la β -ciclodextrina (β CD), ja presentada en el **Capítol 2**, i el poliglicèrol hiperramificat (HPG).

4.2. β -Ciclodextrina (β CD)

Les ciclodextrines (CD) són un conjunt d'oligosacàrids cíclics constituïts per unitats repetitives de α -D-glucopiranoses unides per enllaços glicosídics α -1,4. Les CD més convencionals són l' α , la β i la γ que inclouen 6, 7 i 8 unitats de D-glucosa respectivament. L'estructura molecular 3D de les CD s'assembla a un con truncat amb una superfície exterior hidròfila i una cavitat interna més hidròfoba. La seva funcionalització és flexible i senzilla, ja que contenen nombrosos grups hidroxil que es poden modificar mitjançant reaccions químiques orgàniques comunes.

Les CD naturals i els seus derivats són àmpliament usades en camps com la química analítica, la indústria agrícola, la tecnologia alimentària, catàlisi, la cosmètica, la indústria farmacèutica i en enginyeria mediambiental.

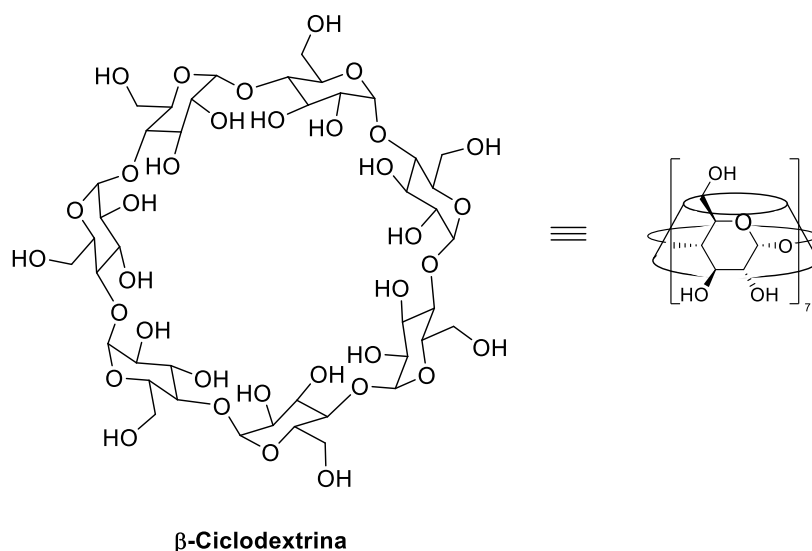


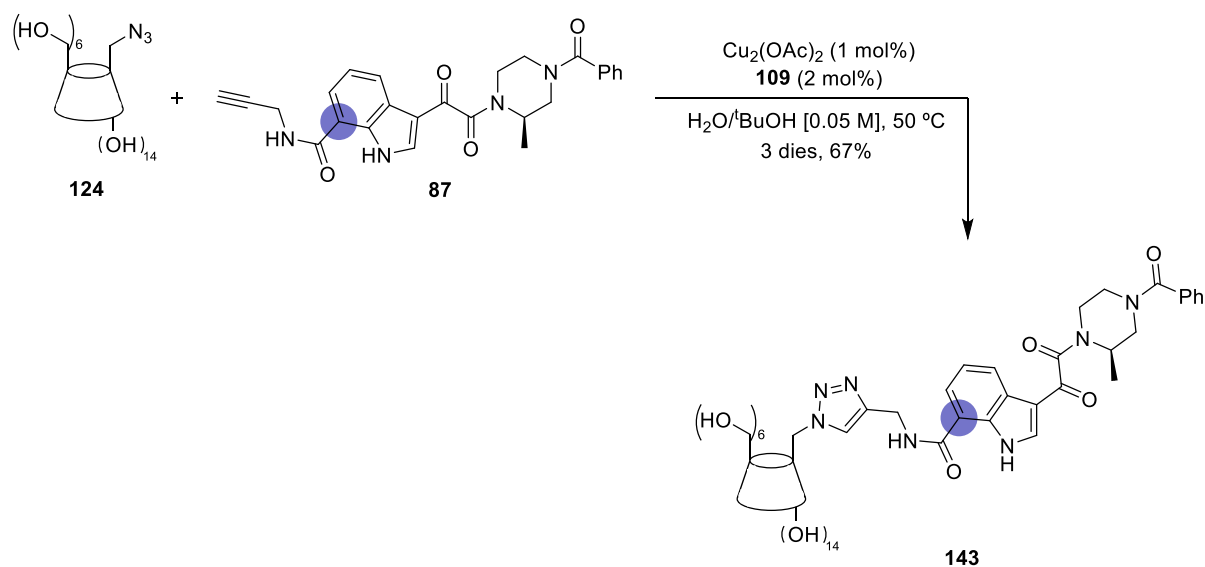
Figura 4.3: Representació gràfica de la β CD.

Concretament, en la indústria farmacèutica, les CD s'han integrat en nombroses formulacions de medicaments a nivell mundial i es poden administrar per via oral, nasal, sublingual, dèrmica, parental i ocular. S'utilitzen, principalment, per millorar la solubilitat d'alguns fàrmacs en aigua i per transportar el principi actiu, alliberant-lo uniformement durant un temps raonable. A més, a causa de les seves propietats fisicoquímiques i biològiques, les CD (i els seus derivats) també s'empren per fabricar hidrogels supramoleculars per a aplicacions biomèdiques.⁹⁹

No es coneixen efectes tòxics i, en el cas concret de la β CD, s'ha pogut demostrar la seva innocuïtat. Només en cas d'injecció intravenosa forma complexos amb el colesterol, que precipiten a la sang i poden col·lapsar el sistema cardiovascular.

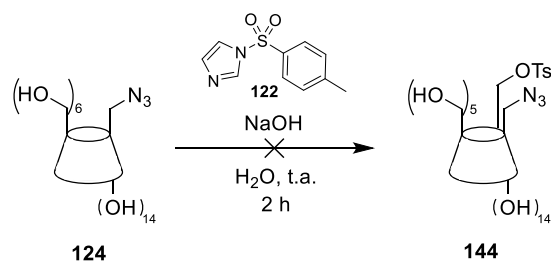
4.2.1. Síntesi de conjugats entre la β CD i derivats del BMS

Partint de la β CD amb un grup azido (**124**) es va assajar la reacció de cicloaddició [3+2] amb el derivat de BMS **87** substituït a la posició 7 de l'indol. Amb les condicions optimitzades recollides en el **Capítol 2**, emprant 2 mol% de Cu i 2 mol% de lligand, es va obtenir el producte desitjat (**143**) amb un rendiment del 67%.



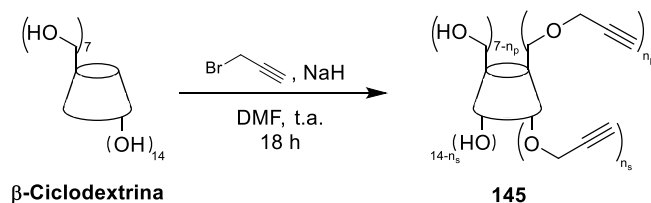
Esquema 4.1

Per poder disposar de més grups azido i incrementar la càrrega de fàrmac unit a la βCD , es va intentar “tossilar” més grups hidroxils per, després, intercanviar-los per grups azido. Seguint el mateix procediment emprat anteriorment,⁷⁸ es va fer reaccionar **124** amb el compost **122** per “tossilar” un altre grup hidroxil però, dissortadament, es va recuperar tot el material de partida.



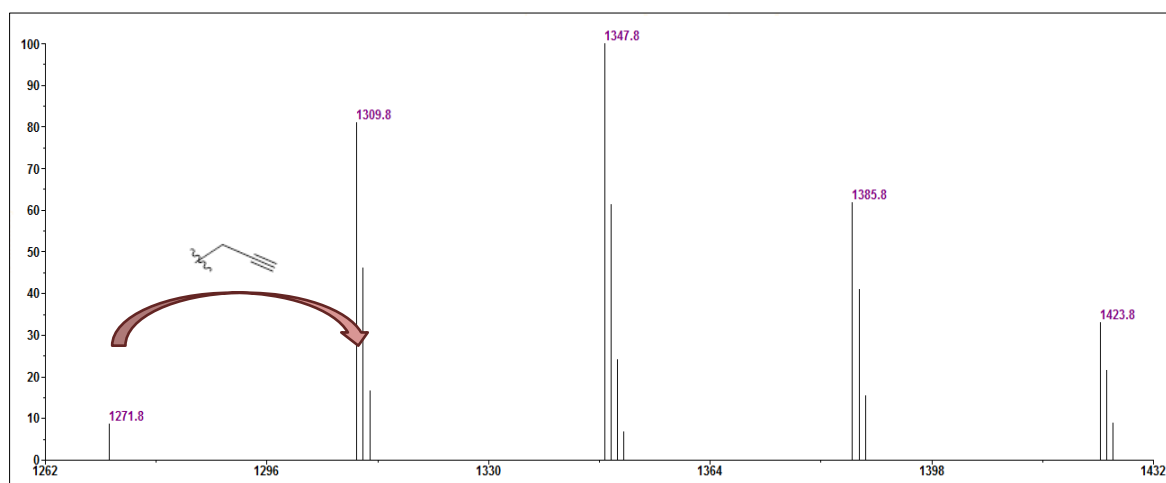
Esquema 4.2

Amb el mateix objectiu, es va decidir de bescanviar els grups funcionals. Es va fer reaccionar la βCD amb NaH i bromur de propargil fornint una mescla homogènia de productes de propargilació. Aquesta reacció es va assajar diverses vegades modificant tant els equivalents d'hidrur de sodi com els de bromur de propargil, tot obtenint sempre una mescla controlada de βCD propargilada, en relació a la quantitat emprada de reactius (**Taula 4.1**). L'objectiu no era arribar a tenir tots els alcohols substituïts amb el triple enllaç, sinó que simplement volíem disposar d'entre 4 i 6 triples enllaços per tal de poder-hi unir de 4 a 6 derivats de BMS.



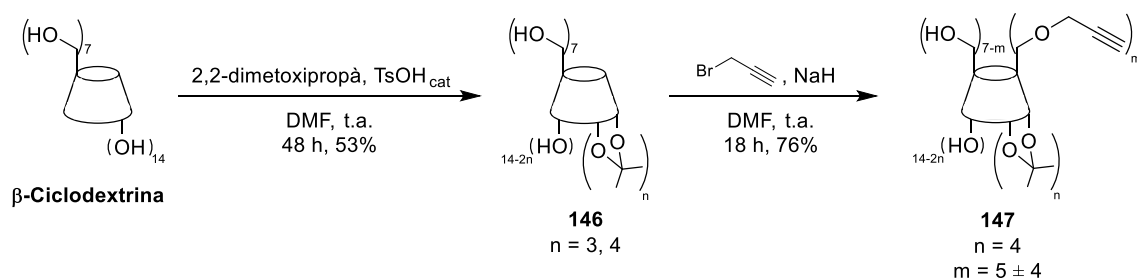
Esquema 4.3

Entrada	NaH	Br-CH ₂ -C≡CH	n (n _p + n _s)	Rdt. (%)
	(equiv)	(equiv)		
1	2.0	2.0	2 ± 2	63
2	3.0	3.0	3 ± 2	70
3	3.5	3.0	3 ± 2	76
4	4.0	3.0	3 ± 2	83
5	5.0	4.0	5 ± 2	85
6	7.0	6.0	5 ± 3	81
7	8.0	7.0	6 ± 3	77

Taula 4.1: Optimització de la reacció per obtenir la βCD propargilada **145**.

Figura 4.4: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **145** (Taula 4.1, Entrada 5).

Tot i que els alcohols més accessibles per impediment estèric són els alcohols primaris, no s'ha demostrat quins són els que reaccionen. Amb l'objectiu de substituir només els alcohols primaris, vàrem protegir els alcohols secundaris de la βCD en forma de dioxolà, amb 2,2-dimetoxipropà i una quantitat catalítica de TsOH. No es va obtenir el producte amb tots els alcohols secundaris protegits, sinó majoritàriament la protecció de 3-4 parells d'alcohols secundaris (n). De totes maneres, vam fer reaccionar **146** amb NaH i bromur de propargil. El resultat va ser una mescla homogènia d'alcohols protegits en forma de dioxolà i alcohols units a grups propargils. L'inconvenient va ser que no podíem assegurar que només s'havien propargilat els alcohols primaris ja que en posar 7 equivalents

de bromur de propargil es van obtenir mesclades de $m = 5 \pm 4$ substitucions, cosa que indicava que hi havien alcohols secundaris lliures i que aquests podien reaccionar.

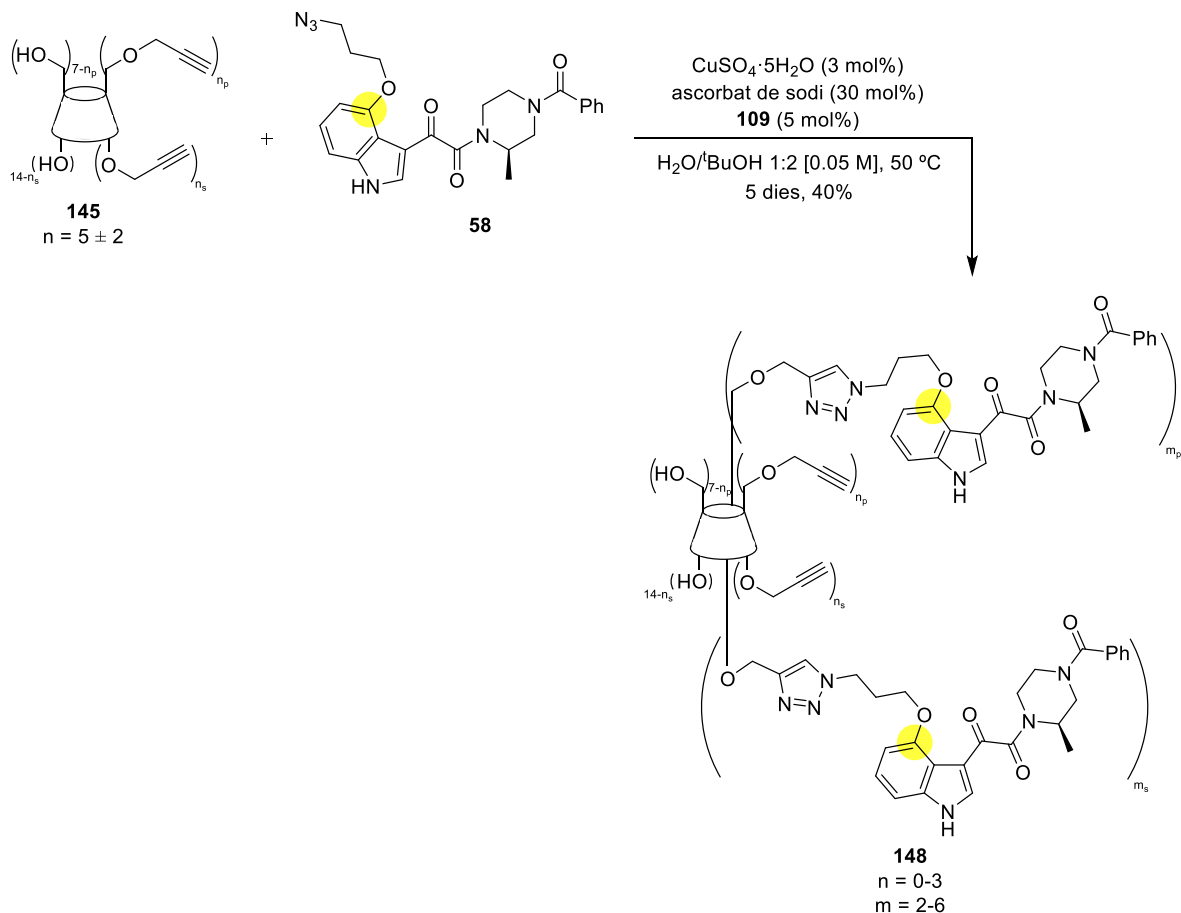


Esquema 4.4

Aquesta ruta alternativa no ens va donar un únic producte, tal com esperàvem. A més a més, encara havíem de desprotegir els alcohols secundaris, cosa que podria fer molt més complexa la mescla. Per tot això, es va decidir de no seguir per aquest camí i continuar amb la dextrina funcionalitzada **145**.

Per a la síntesi dels conjugats de β CD-BMS es va partir de la β CD **145** amb grups propargil i es va dur a terme la cicloaddició [3+2] entre una azida i un triple enllaç terminals presentada en el **Capítol 2** de la present Tesi. Degut al fet que el derivat de BMS substituït a la posició 4 era el més fàcil de preparar i, a més, ens permetia unir la cadena espaciadora a l'últim moment, primer es va provar la reacció amb els derivats **58** i **59** i després, un cop optimitzada la reacció, s'assajà amb els derivats **88** i **89**.

Després de “jugar” amb diferents quantitats catalítiques de Cu(I) a diverses temperatures es va trobar que afegint 3 equivalents del derivat de BMS **58**, un 3% de Cu(II), en presència d'ascorbat de sodi, a una concentració 0.05 M i a 50 °C en presència de l'agent quelatant (**109**) la reacció s'acabava en 5 dies. El producte obtingut va ser una mescla homogènia de conjugats on restaven grups propargils sense reaccionar i on el pic màxim corresponia a la β CD unida a 5 derivats de BMS (MW = 3720.4). La reacció es va seguir per cromatografia de capa fina i per espectrometria de masses (MALDI-TOF/TOF), ja que la seva complexitat no permetia seguir-les per RMN de ^1H .



Esquema 4.5

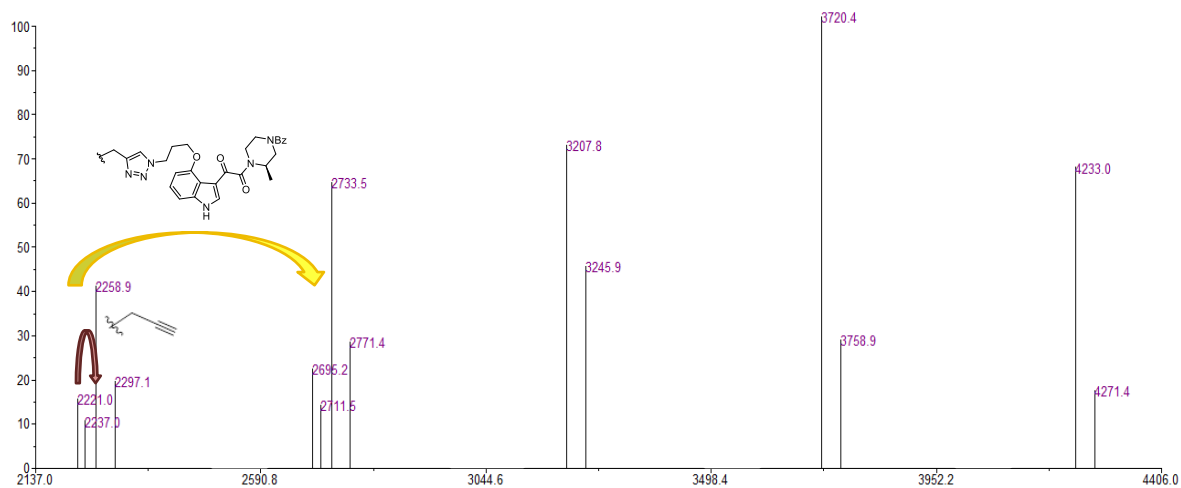
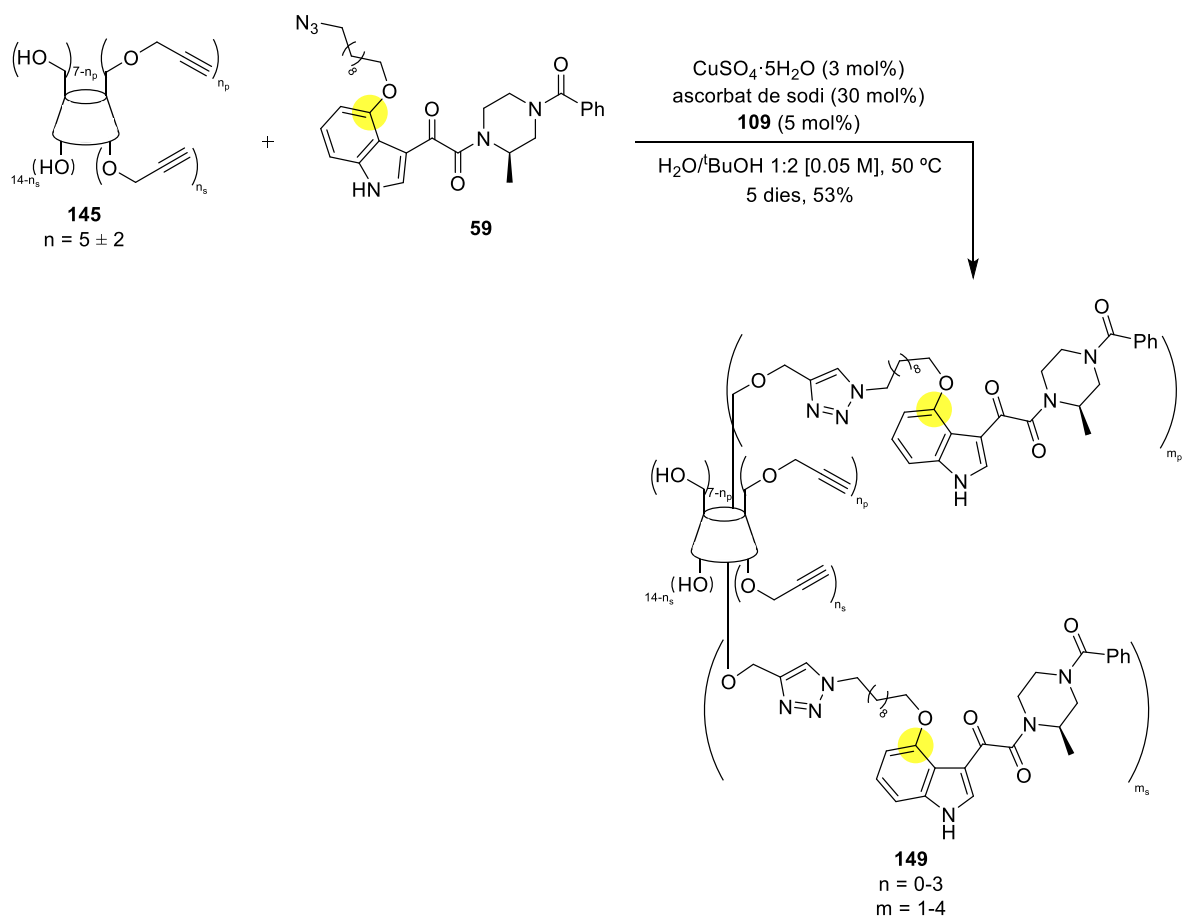


Figura 4.5: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **148**.

Així doncs, es va assajar la reacció, sota les mateixes condicions, amb el derivat de BMS substituït a la posició 4 de l'indol amb l'espaiador de cadena més llarga (**59**) fornint una mescla del producte amb el fàrmac, amb bon rendiment. Els pics màxims corresponen a la β CD unida a 3 i 4 derivats de BMS

respectivament (MW = 2989.4 i MW = 3600.6). Com en el cas anterior, la reacció es va seguir per cromatografia de capa fina i espectrometria de masses (MALDI-TOF/TOF).



Esquema 4.6

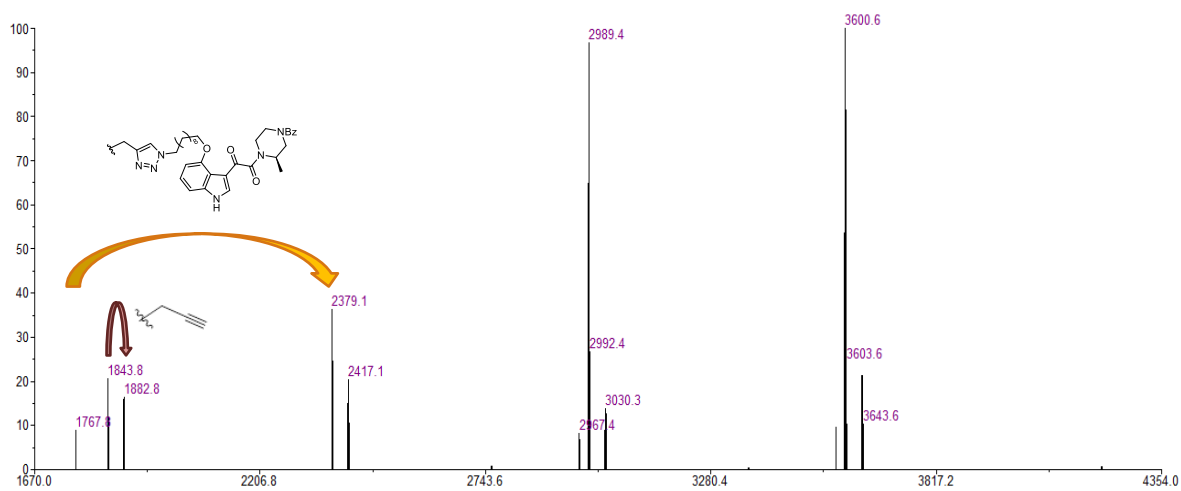
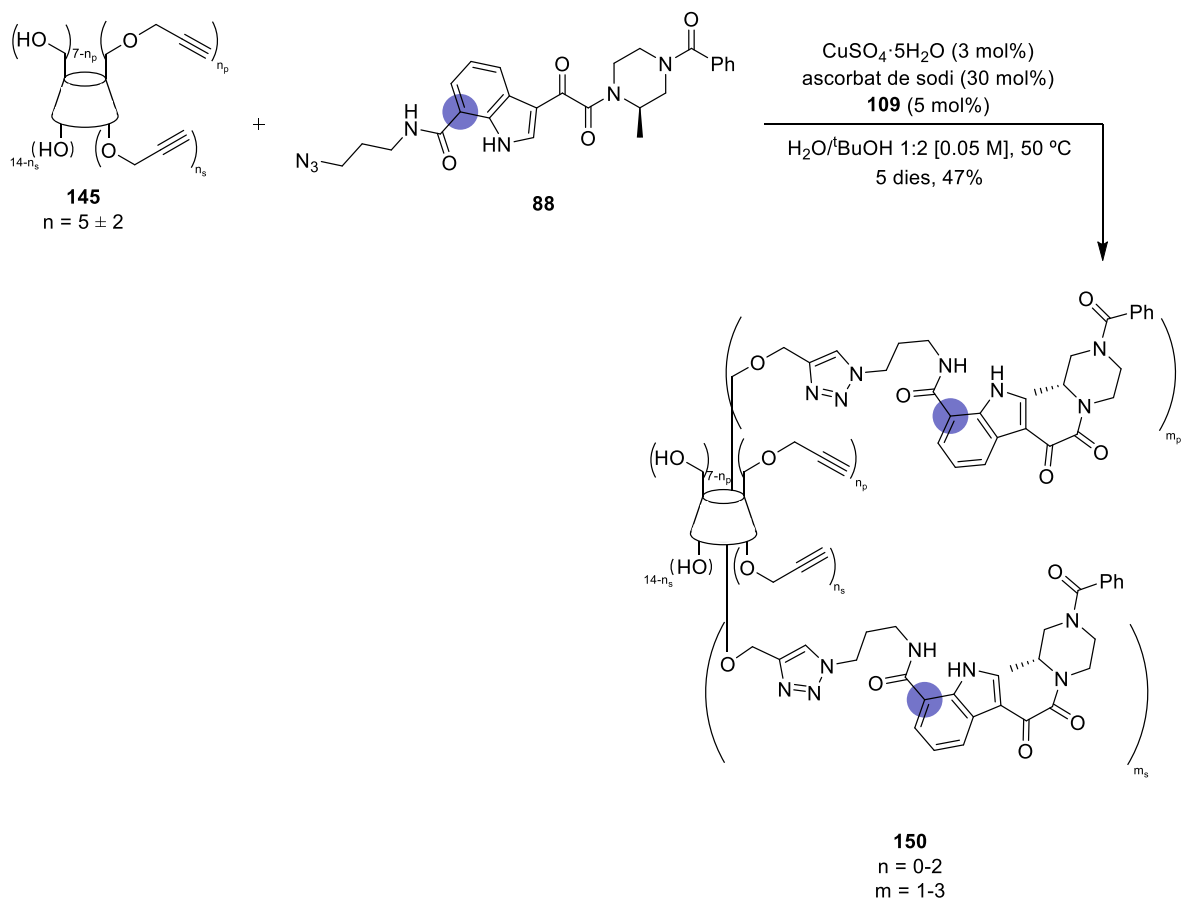


Figura 4.6: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **149**.

Amb la reacció per la mà, es va fer reaccionar la β CD amb els derivats de BMS d'interès (**88** i **89**), aplicant les condicions anteriors i seguint les reaccions tal com s'ha esmentat en els dos altres casos. Es van obtenir mescles homogènies dels productes desitjats **150** i **151**.



Esquema 4.7

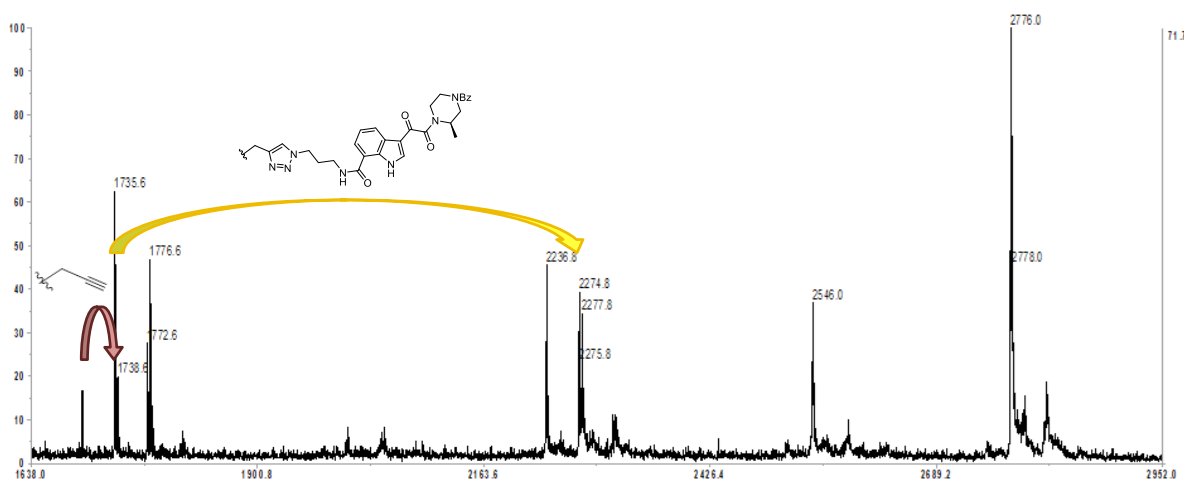
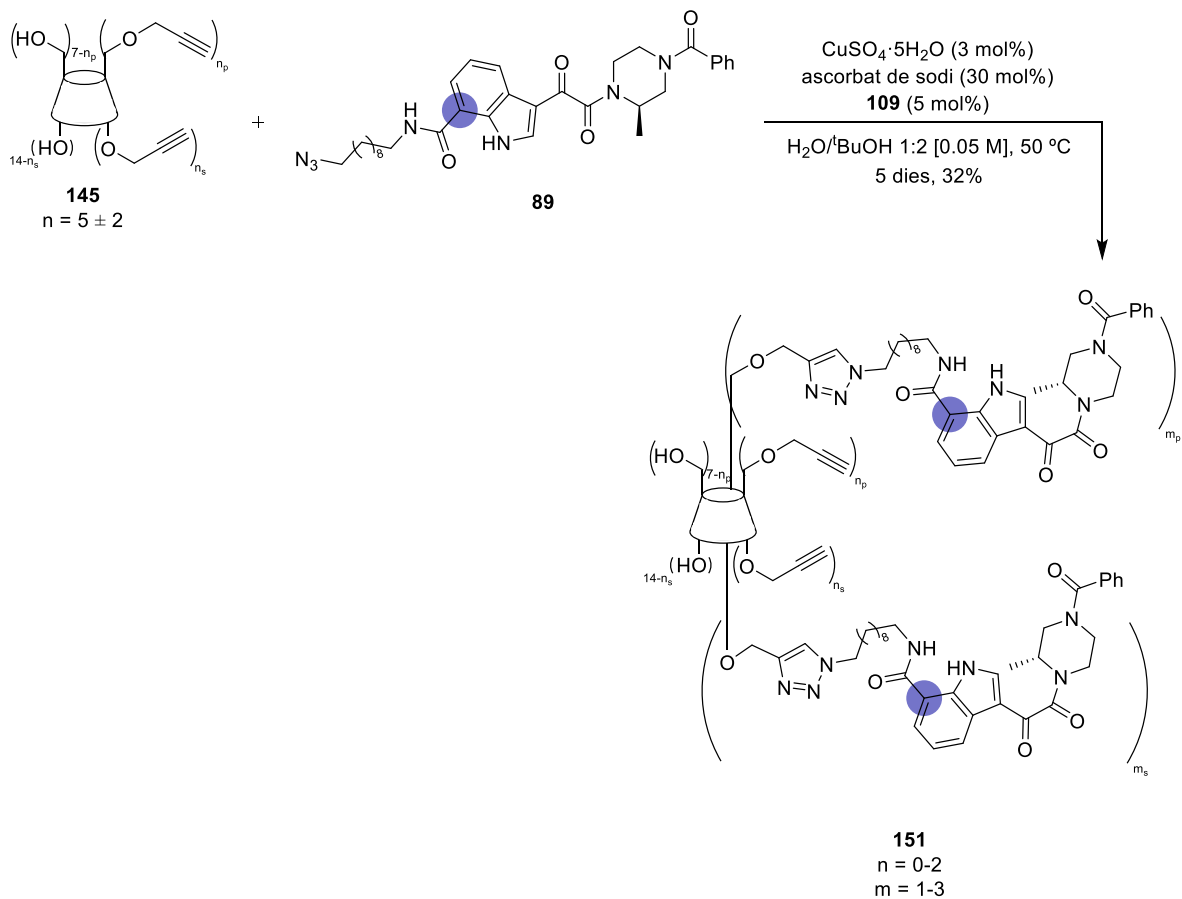


Figura 4.7: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **150**.



Esquema 4.8

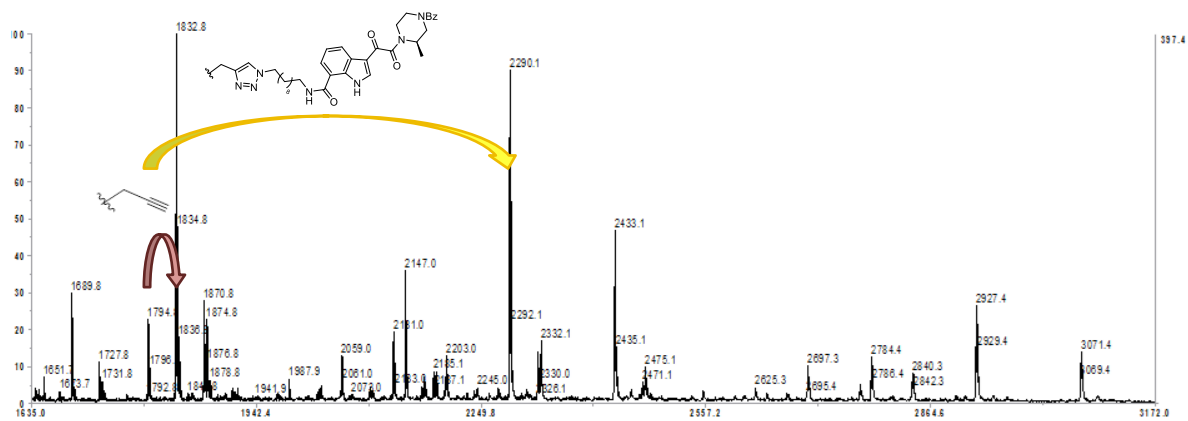


Figura 4.8: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **151**.

4.3. Poliglicerol hiperramificat (HPG)

En el món dels materials, els polímers han adquirit un paper molt important, aplicant-se en àrees que van des de materials sintètics amb propietats físiques ajustables a materials biocompatibles per a aplicacions mèdiques. En concret, un creixent nombre d'articles en la bibliografia suggereixen la

importància en el desenvolupament de polímers per a aplicacions biomèdiques, com ara polímers terapèutics, sistemes d'alliberament de fàrmacs, inhibidors i en medicina regenerativa.¹⁰⁰

Els polímers es podrien dividir en quatre grans categories segons la seva geometria: geometria lineal, reticulada, ramificada i dendrítica. En aquesta Tesi, ens hem centrat en un polímer de geometria ramificada com és el poliglicerol hiperramificat (HPG), ja que és una bona alternativa al dendrímer, més difícil de sintetitzar. Aquests polímers ramificats contenen una combinació d'unitats lineals, terminals i dendrítiques, formant una estructura compacta en els quals les proporcions relatives de cada unitat en defineixen les propietats dels sistemes. A més, ofereixen una bona solubilitat en aigua, estabilitat química, excel·lent biocompatibilitat, baixa toxicitat, baixa viscositat intrínseca, són fàcils de sintetitzar i existeix la opció de modificar fàcilment els seus grups hidroxils.¹⁰¹

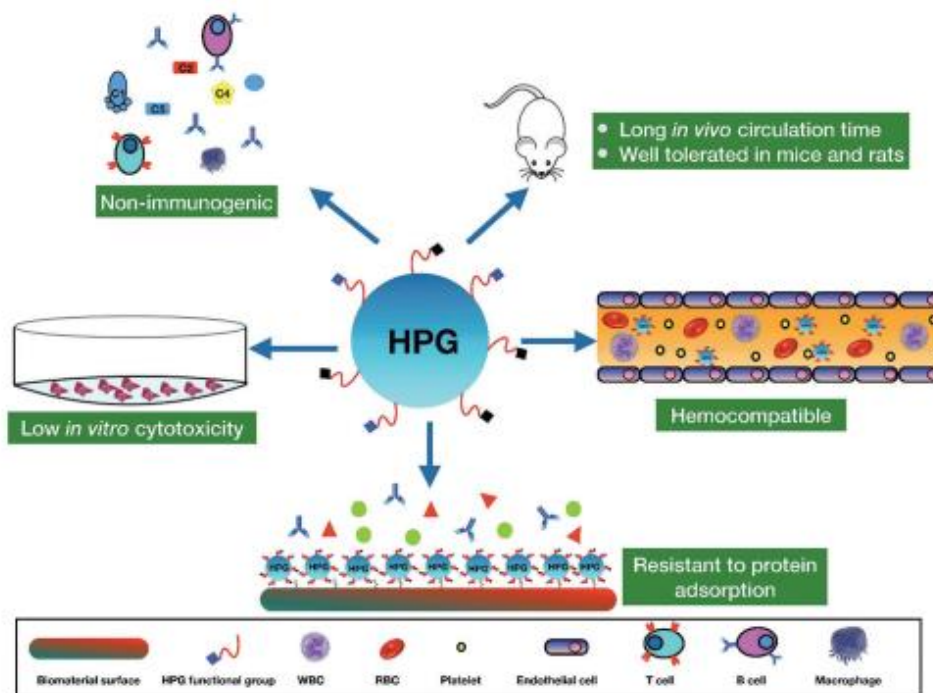


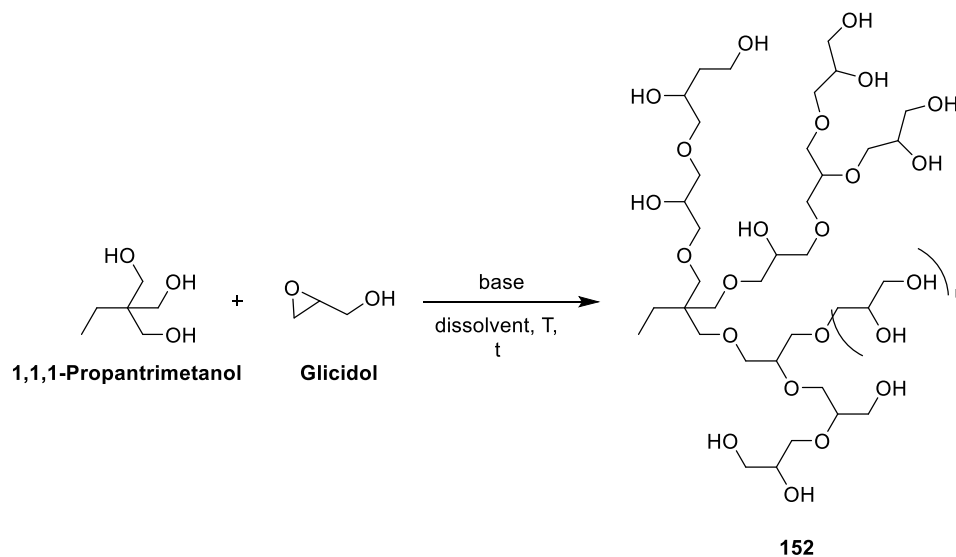
Figura 4.9: Visió general del perfil de biocompatibilitat del HPG.¹⁰²

En els darrers anys, el HPG ha aparegut com una de les estructures ramificades més prometedores i versàtils. Per als polímers destinats a aplicacions biomèdiques, és essencial que es demostrï la compatibilitat cel·lular, sanguínia i la tolerància animal per al seu ús clínic. La similitud estructural del HPG amb el PEG (polietilenglicol, conegut polímer aprovat per la FDA) va fer pensar que seria un bon candidat a investigar. S'han realitzat nombrosos estudis que han conclòs que el HPG és compatible amb la sang, no immunogen i no tòxic, i que té un perfil de biocompatibilitat igual o millor que el PEG.¹⁰³

Utilitzant un ampli ventall d'eines químiques, els grups hidroxil del HPG s'han convertit en àcids carboxílics, sulfats, àcids sulfònics, aldehids, azides, amines, etc., per acabar aplicant-los com polímers terapèutics, preservació d'òrgans, sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs, inhibidors, agents antimicrobians, enginyeria de teixits, aplicacions teranòstiques i aplicacions per a la imatge.

4.3.1. Síntesi de conjugats entre el HPG i derivats del BMS

Es va començar per buscar les condicions òptimes per a la seva síntesi. Cal remarcar que no sempre s'obté el mateix producte emprant les mateixes condicions. A continuació es mostra un resum de les diferents condicions d'obtenció de **152**.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Es va comprovar que l'ús de CH₃OK en metanol va donar una estructura globular més gran i compacta i que l'addició molt lenta del glicidol és crucial.



Esquema 4.9

Entrada	Base (equiv)	Glicidol (equiv)	Dissolvent [M]	T °C	t d'addició h	t h	n
1	KHMDS (0.1)	20	-	95	18	5	1-12
2	KHMDS (0.3)	50	diglime [10]	95	18	5	2-12
3	^t BuOK (0.3)	50	dioxane [0.5]	90	12	10	2-9
4	CsOH (1.5)	50	diglime [2]	90	24	18	5-17
5	NaH (0.1)	40	diglime [1.8]	100	16	5	1-5
6	NaH (1.5)	40	THF [2]	90	16	16	2-10
7	CH ₃ OK (1.5)	80	MeOH [2]	90	24	16	10-70
8	CH ₃ OK (1.5)	80	MeOH/diglime 1:1 [2]	90	24	16	6-50
9	CH ₃ OK (1.5)	80	diglime [2]	90	24	24	5-45

Taula 4.2: Optimització de la reacció d'obtenció de **152**.

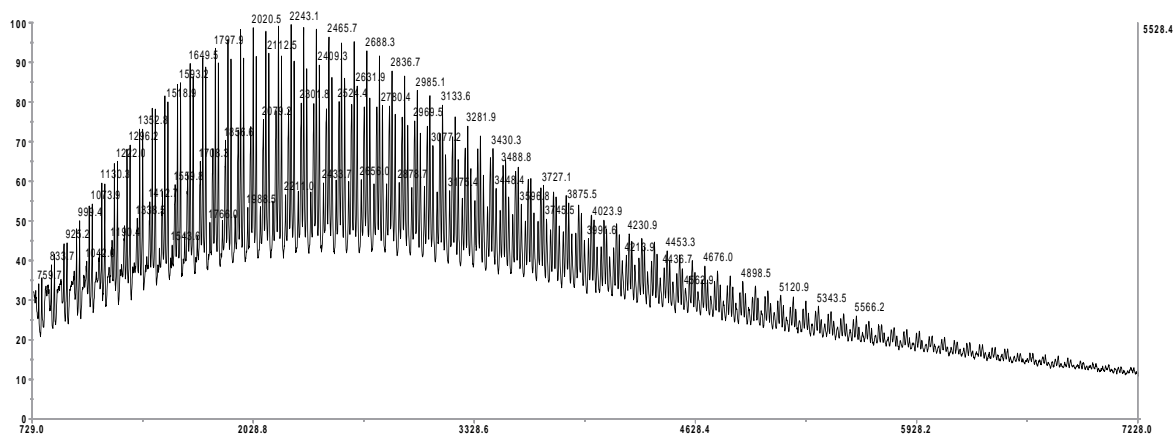
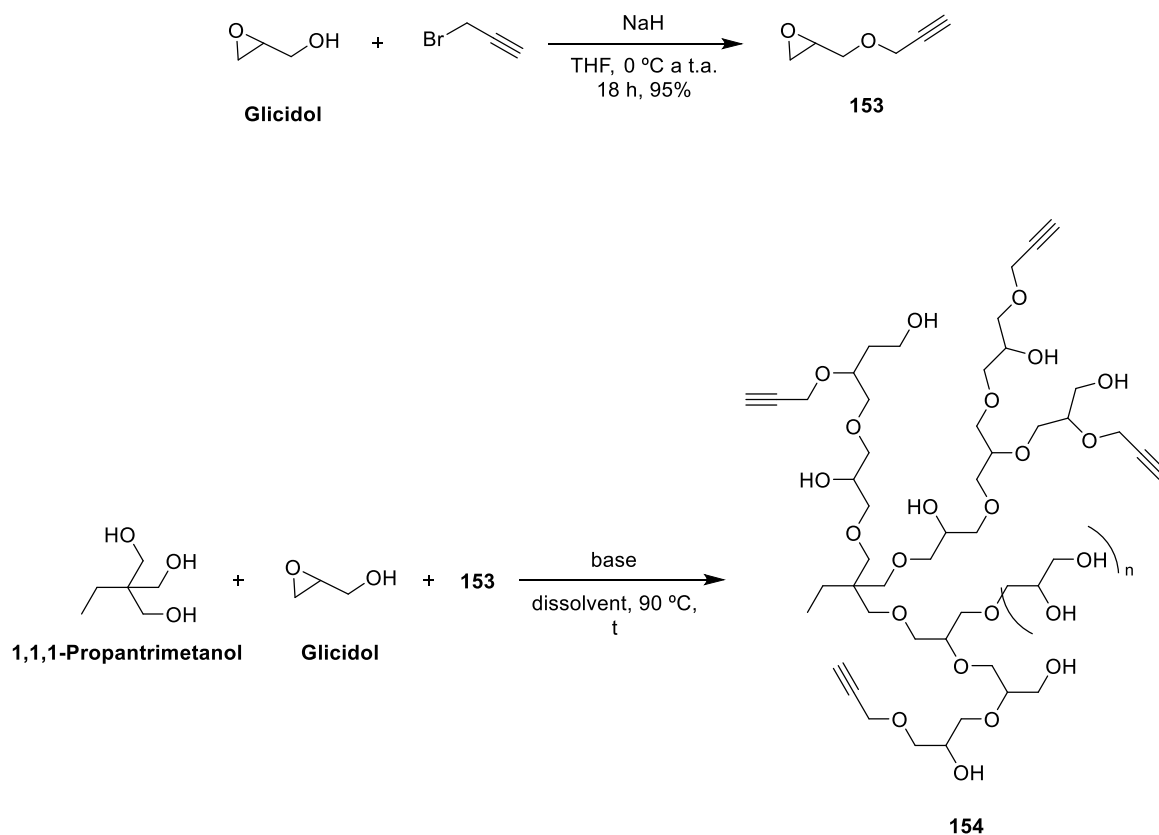


Figura 4.10: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **152** (entrada 7, Taula 4.2).

Una vegada capaços de formar estructures de tipus HPG degudament ramificades, vam voler sintetitzar el HPG modificat amb triples enllaços terminals que, posteriorment, podríem conjuguar amb el BMS mitjançant la cicloadició [3+2].

Així doncs, es va fer reaccionar el glicidol amb NaH i bromur de propargil per tal d'obtenir el glicidol propargilat **153**, que s'usà com a monòmer en la polimerització. Es van reproduir diferents condicions descrites a la literatura^{107,108} i, amb les pertinents modificacions a l'hora de purificar la mostra, es va obtenir el derivat del poliglicerol **154**.



Esquema 4.10

Entrada	Base (equiv)	Glicidol (equiv)	153 (equiv)	Dissolvent [M]	t d'addició h	t h	n
1	KHMDS (1.5)	25	5	diglime [2]	18	24	5-14
2	CsOH (1.5)	25	5	diglime [2]	24	18	5-17
3	NaH (1.5)	-	10	diglime [2]	24	18	2-10
4*	NaH (1.5)	25	5	THF [2]	24	16	6-16
5	CH ₃ OK (1.5)	50	10	diglime [2]	30**	16	6-40
6	CH ₃ OK (2.0)	50	10	diglime [2]	30**	16	5-35

* La reacció s'ha dut a terme en un tub tancat de MW.

** Addició per separat, primer el glicidol i després el compost **153**.

Taula 4.3: Optimització de la reacció d'obtenció de **154**.

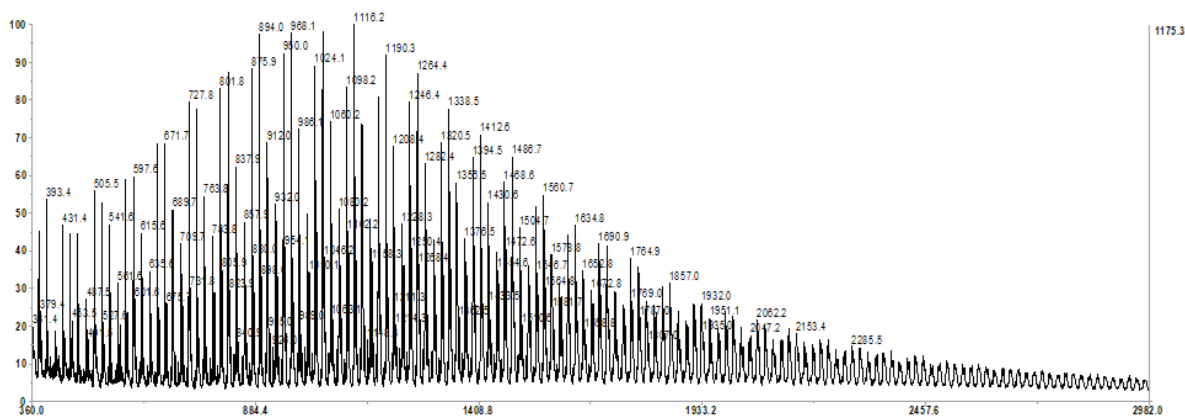
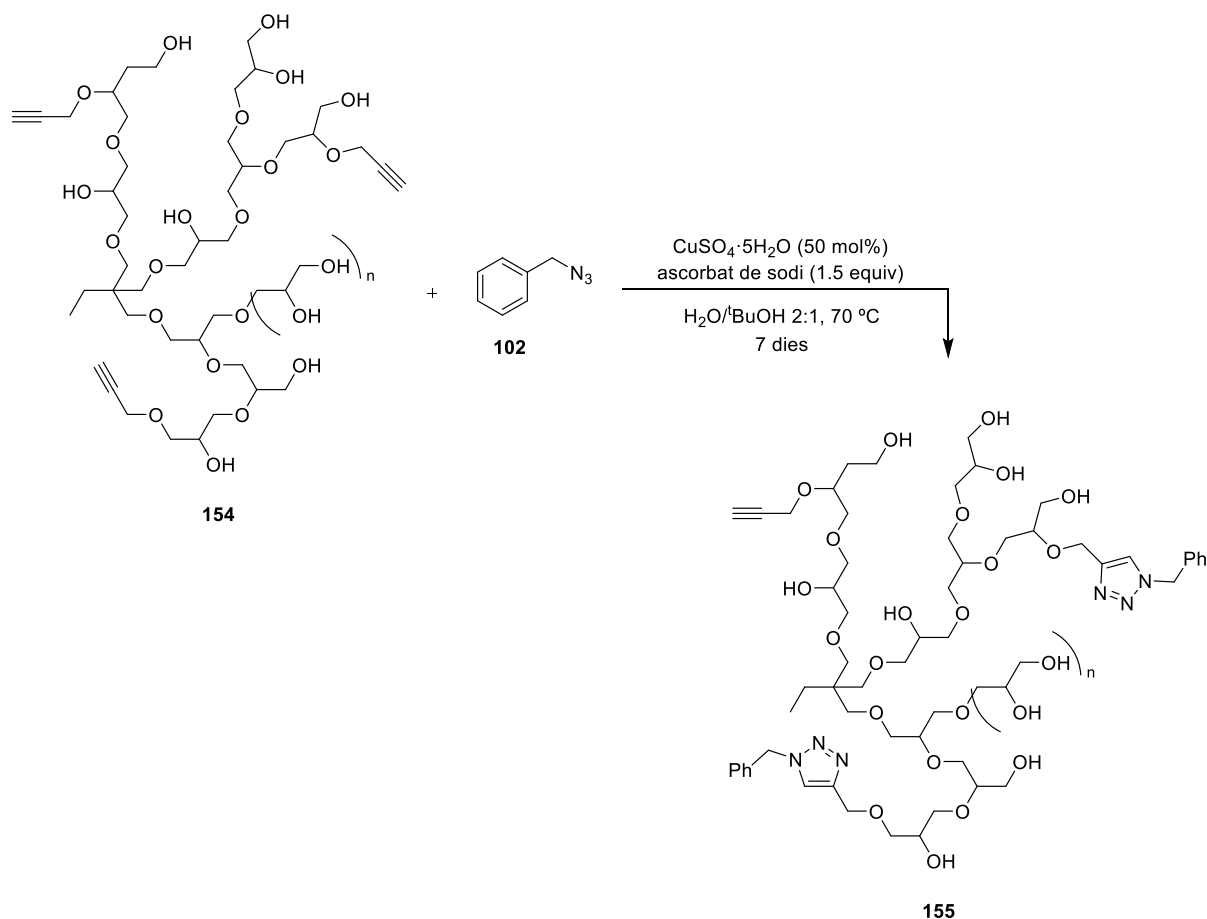


Figura 4.11: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **154** (entrada 5, taula 4.3).

Fins al moment, l'HPG sembla una molt bona opció per tal d'arribar al nostre gel microbicida. La idea, doncs, és unir els derivats de BMS substituïts a la posició 7 de l'indol amb el derivat HPG **154**, mitjançant la cicloadició [3+2]. Per això, primer es va assajar la reacció amb una azida model, la benzil azida (**102**).

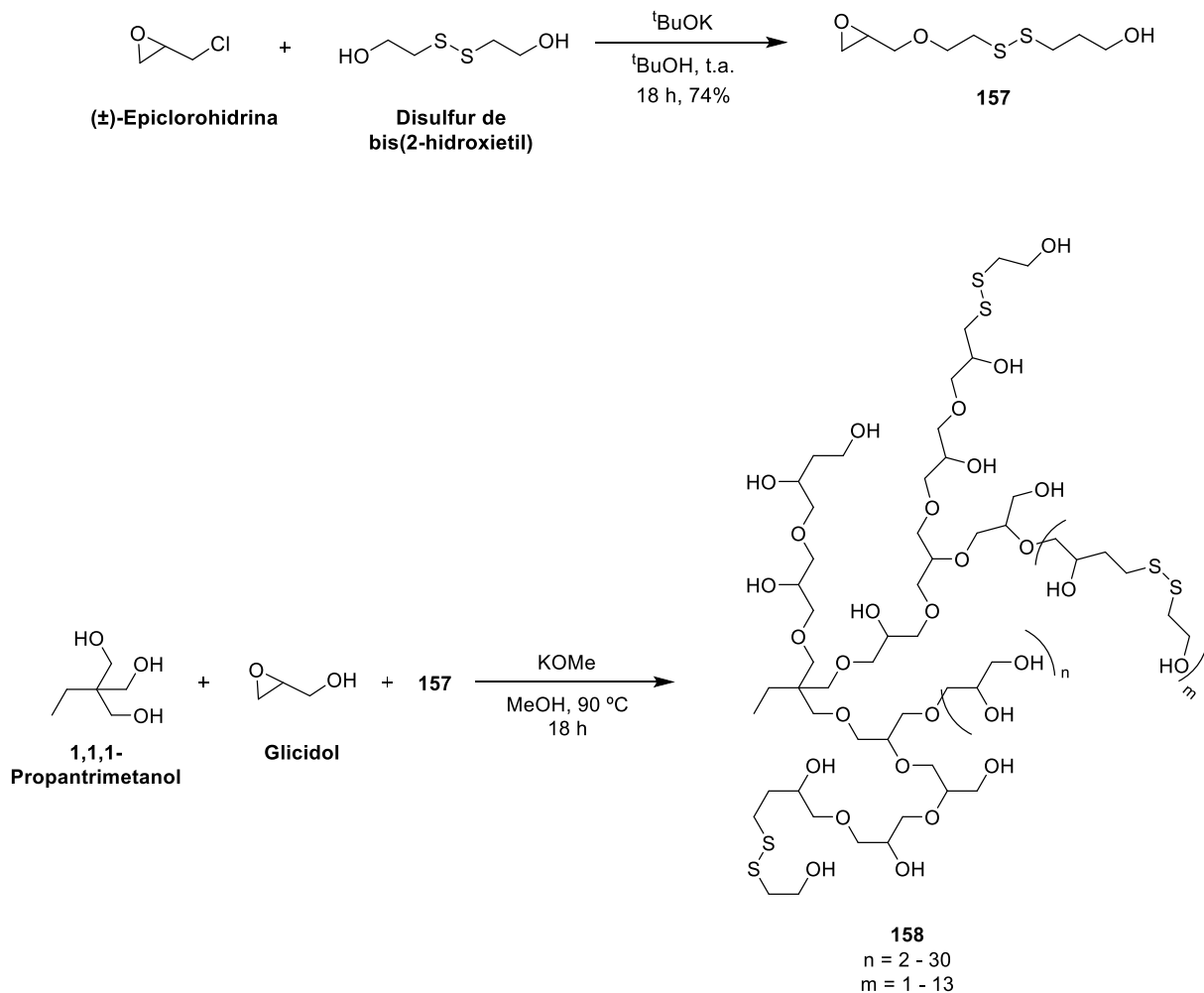


Esquema 4.11

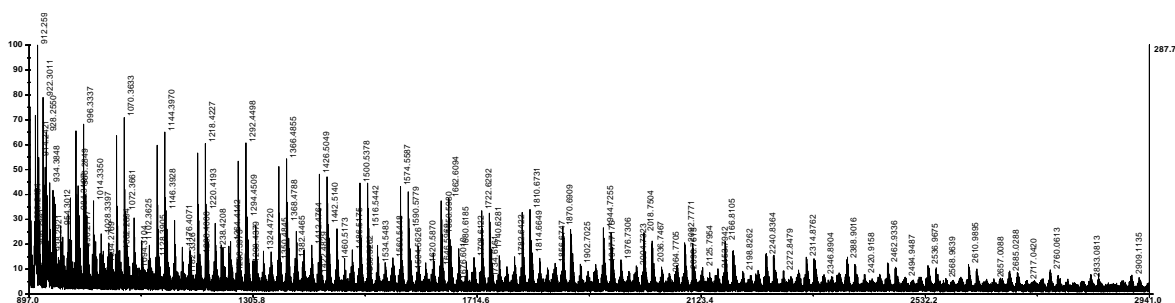
Després de repetir la reacció, canviant alguna condició de reacció, es va observar per MS el producte **155**.

Partint del HPG propargilat **154** es va provar la reacció ja amb el derivat de BMS **88** substituït a la posició 7 de l'indol. Emprant 1 equiv de Cu(I), es va obtenir el producte **156** en forma de líquid viscos.

Així doncs, es va fer reaccionar la (\pm)-epiclorohidrina amb el disulfur de bis(2-hidroxiètil) per tal d'obtenir l'epòxid **157**, que s'usà com a monòmer en la polimerització. Seguint les condicions descrites a la literatura,¹⁰⁰ es va aconseguir el derivat del HPG **158**.

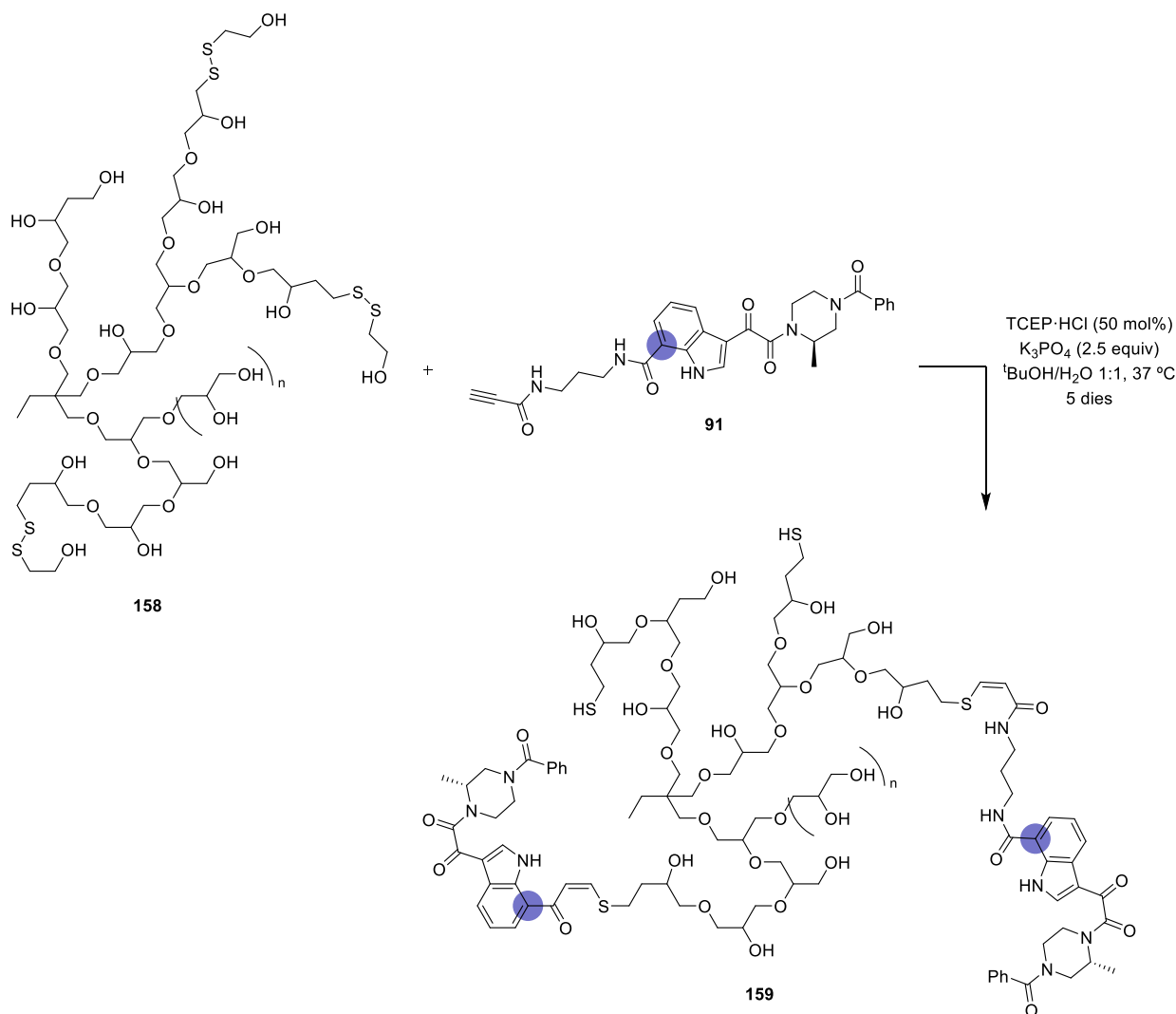


Esquema 4.13



Amb el poliglicerol **158** a les nostres mans, es va assajar la reacció d'addició conjugada amb el derivat de BMS **91**, substituït a la posició 7 de l'indol amb un triple enllaç terminal activat. Emprant

TCEP·HCl per reduir l'enllaç disulfur, i K_3PO_4 per arribar a un $pH = 7.4$, es va aconseguir observar el producte desitjat **159**.



Esquema 4.14

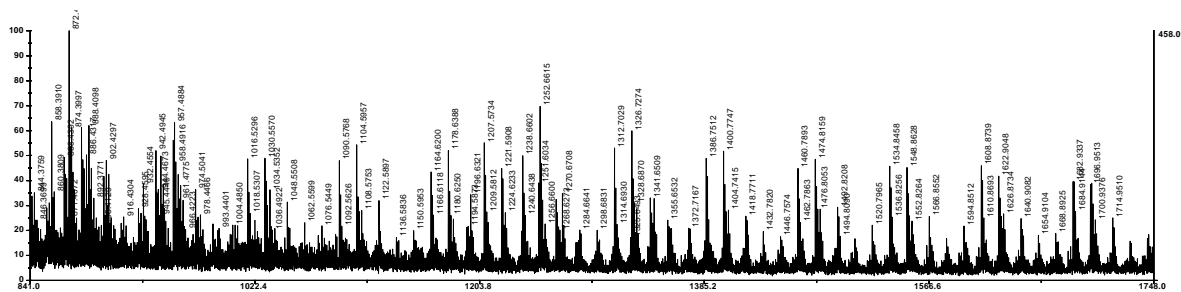
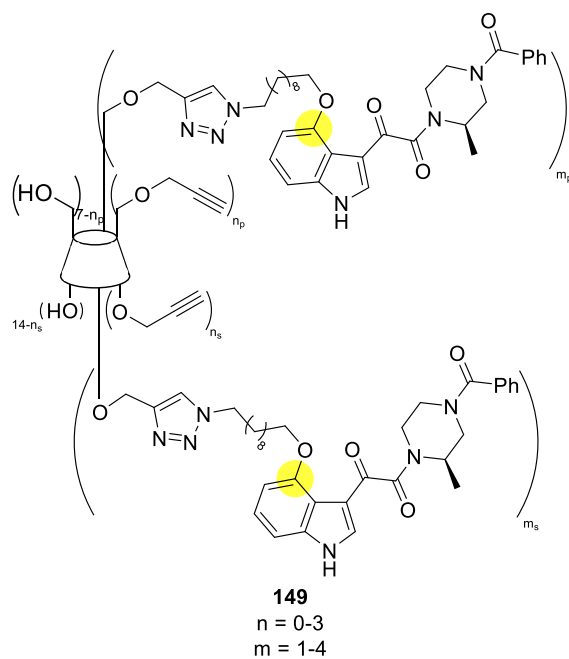
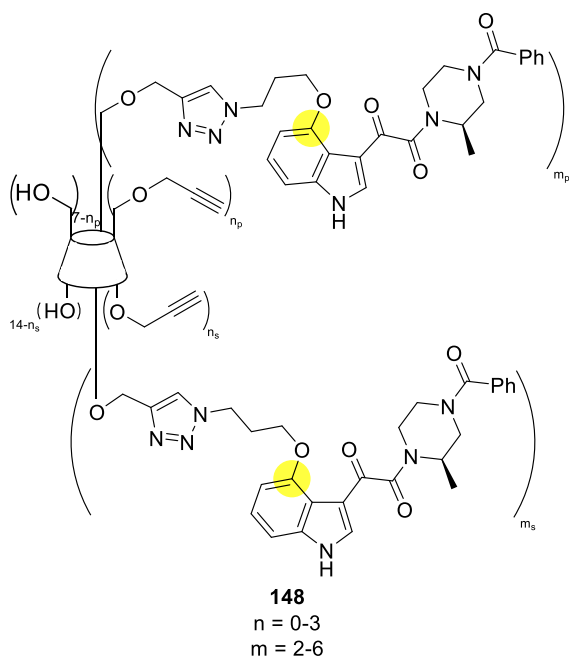
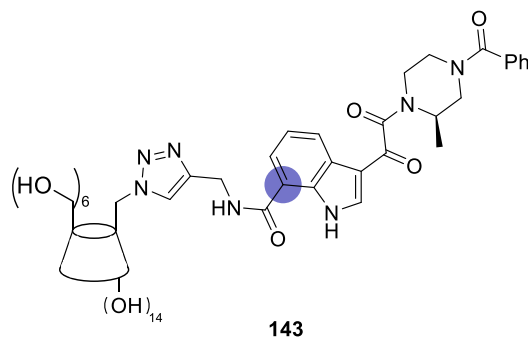
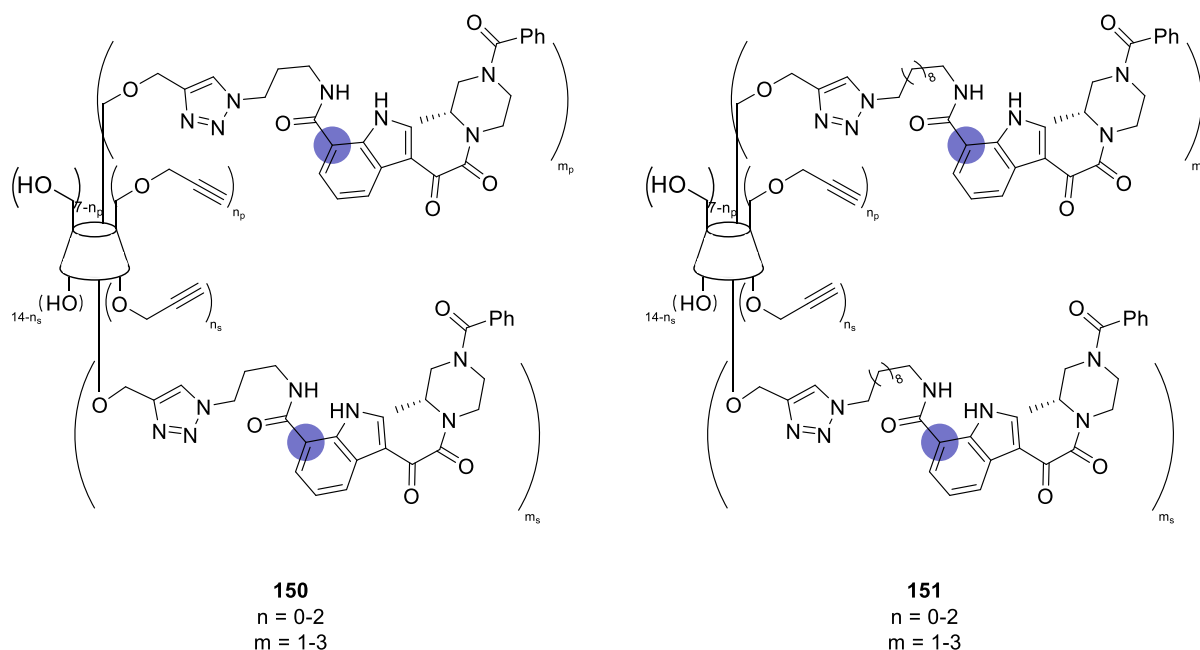


Figura 4.14: Espectre de MS (MALDI-TOF/TOF) del compost **159**.

4.4. Conclusions

A manera de conclusió, s'han aconseguit de sintetitzar diferents conjugats entre la β CD i alguns dels nostres derivats de BMS mitjançant cicloadicions [3+2] catalitzades per Cu(I).

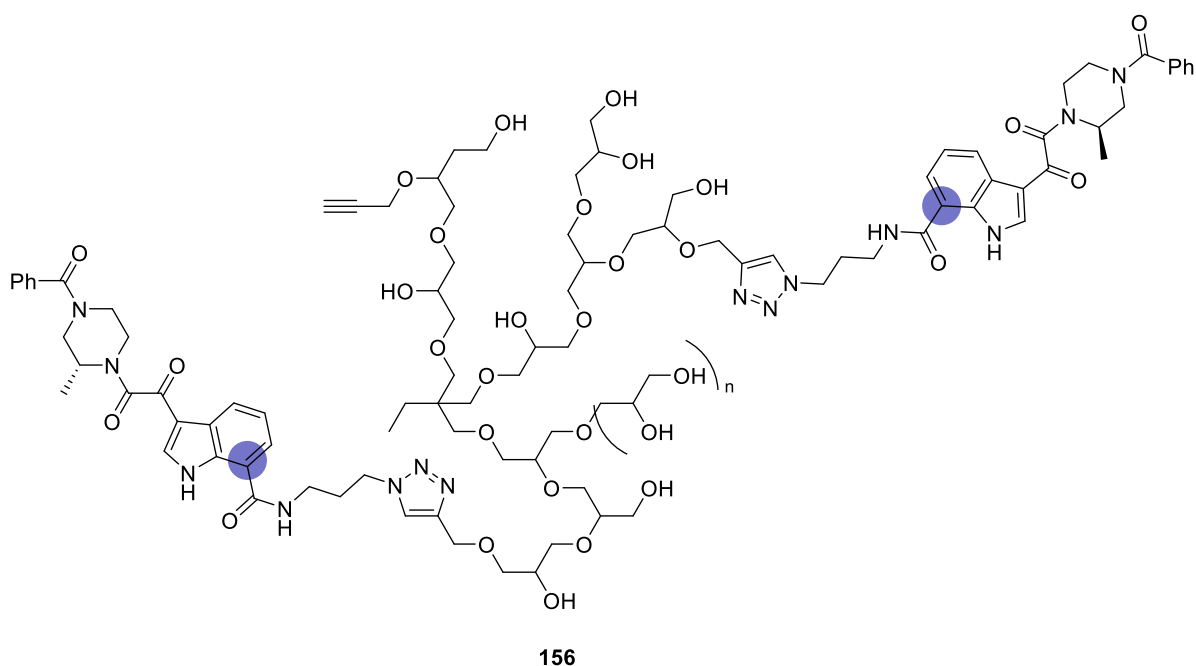


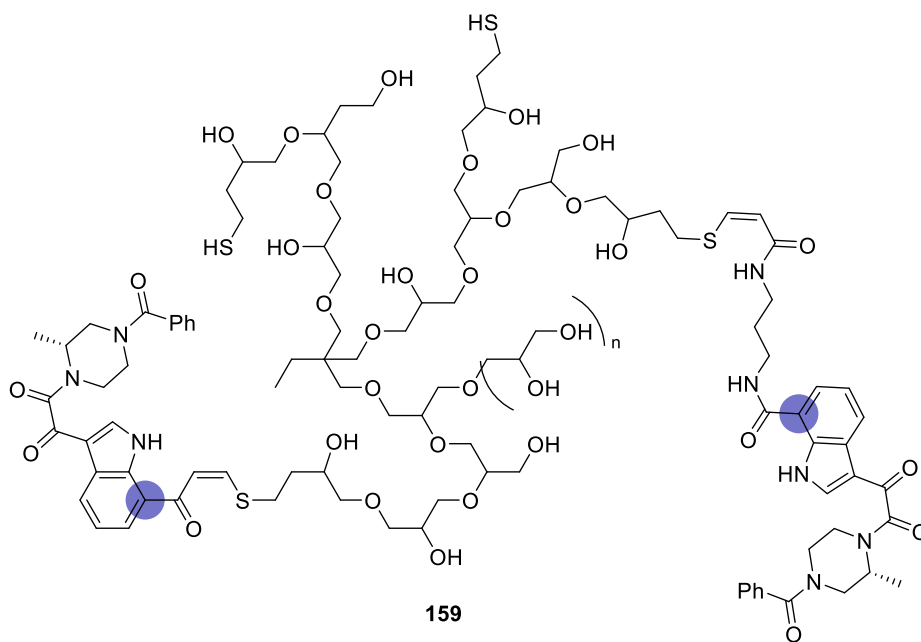


Gràcies a una estada presencial al Laboratori d'Immunobiologia Molecular de l'Hospital Gregorio Marañón (Madrid) s'han pogut assajar biològicament tots els conjugats de la β CD. En el següent capítol de la present Tesi es presenten els resultats dels assaigs biològics per prevenir la infecció per VIH.

A més, s'han optimitzat les condicions per a la síntesi del HPG i derivats, un polímer emergent d'estructura globular gran i compacta i un bon candidat com a suport del fàrmac per aconseguir el microbicida desitjat.

Així mateix, també s'ha conjugat el HPG amb derivats dels BMS mitjançant dues vies, estudiades durant la Tesi, la cicloadicions [3+2] catalitzada per Cu(I) i l'addició conjugada de tiols a triples enllaços terminals activats. En un futur, aquests productes també s'avaluaran com a microbicides.





CAPÍTOL 5
ASSAIGS *IN VITRO* DE PREVENCIÓ
D'INFECCIÓ PER VIH

CAPÍTOL 5. ASSAIGS *IN VITRO* DE PREVENCIÓ D'INFECCIÓ PER VIH

5.1. Procediment seguit	137
5.2. Relació de compostos avaluats	141
5.3. Resultats de citotoxicitat	142
5.4. Resultats d'inhibició del VIH	146
5.5. Conclusions	147

5.1. Procediment seguit

En col·laboració amb el grup de la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández de l'Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM, Madrid) es va poder fer una estada presencial amb l'objectiu d'avaluar la toxicitat i l'activitat anti-VIH-1 dels compostos sintetitzats durant la Present Tesi mitjançant una estratègia preventiva amb un model *in vitro*.

A continuació és mostra l'esquema seguit per l'assaig de toxicitat dels nostres productes.

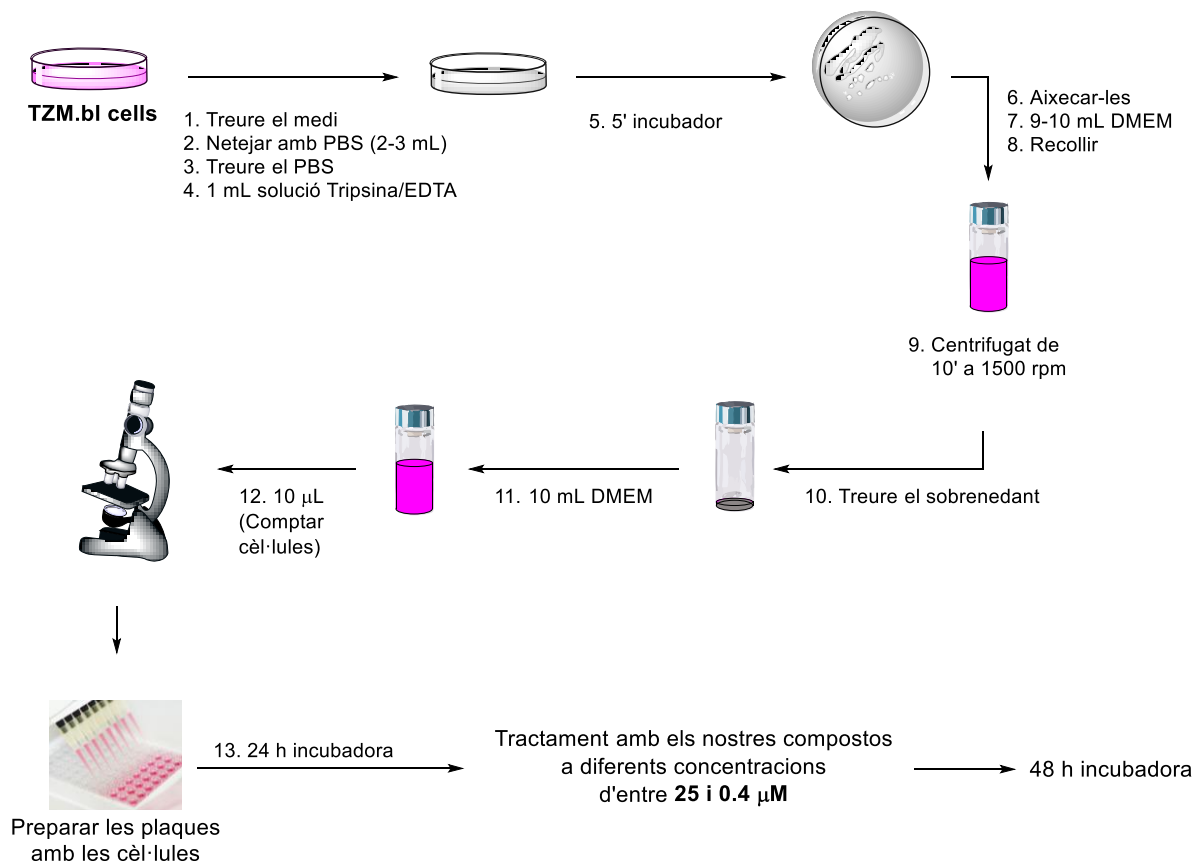


Figura 5.1: Esquema seguit per l'assaig de toxicitat de les mostres analitzades.

TzM.bl: Línia cel·lular HeLa, extremadament sensible a la infecció per VIH

Incubadora: 37 °C, 5% CO₂, 95% O₂ i control d'humitat

DMEM: medi escollit pel tipus de cèl·lules i per experimentació amb VIH

Tripsina: enzim que trenca alguns enllaços peptídics de les proteïnes

Després de 48 h a l'incubadora, s'analitzen les dades de l'assaig de toxicitat en l'espectrofotòmetre a 570 nm i 690 nm.

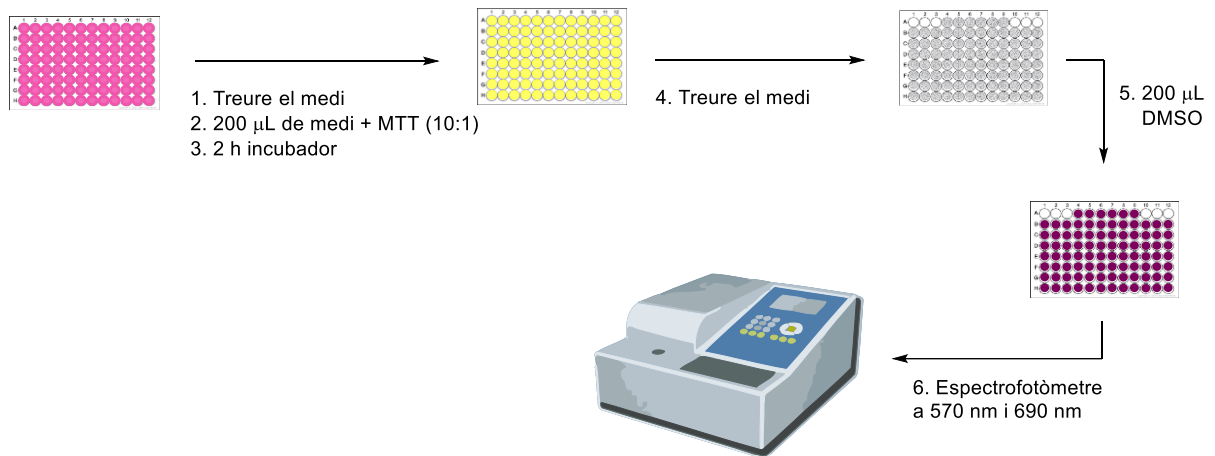
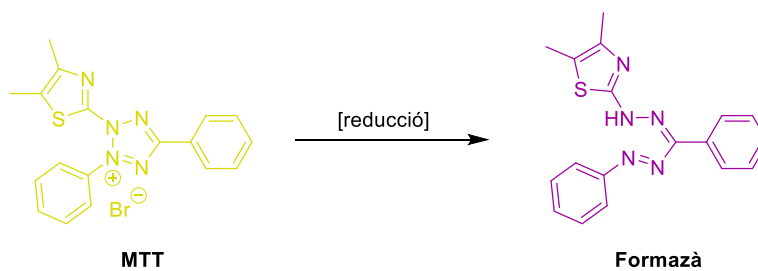


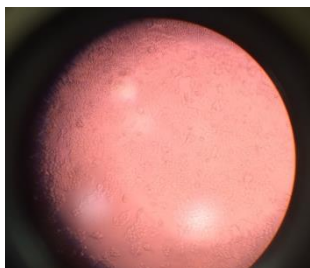
Figura 5.2: Anàlisi de dades de l'assaig de toxicitat de les mostres analitzades.

El test mitocondrial s'empra com a mesura de la viabilitat cel·lular. El MTT (bromur de metiltiazolildifeniltetrazol) és un compost d'un groc llampant que, en ser reduït a formazà en les cèl·lules vives, pren un color lila o violat molt intens. La reducció té lloc quan els enzims de tipus reductasa són actius.



Esquema 5.1

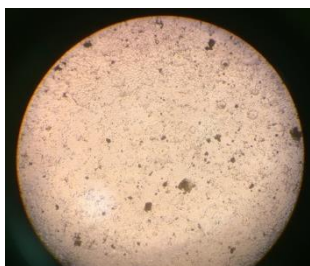
Tot seguit es mostren diferents fotografies de les cèl·lules vistes amb microscopi durant l'assaig de toxicitat:



Mostra de control, sense cap tractament.



Mostra tractada amb un 10% de DMSO que causa la mort de les cèl·lules.



Cèl·lules tractades amb un dels compostos.



Cèl·lules tractades amb un dels compostos després del test mitocondrial.

Després de recopilar totes les dades i analitzar-les adequadament es van obtenir les gràfiques de citotoxicitat dels diferents compostos analitzats a diferents concentracions (recollits a l'apartat 5.2.).

Atès que el nostre compost volem que funcioni com un inhibidor d'entrada, és a dir, que dificulti o eviti el procés d'apropament i fusió de les membranes viral i cel·lular, el procediment a seguir per analitzar l'activitat anti-VIH comença per un tractament de les cèl·lules amb els compostos a analitzar. Posteriorment, s'infectaran les cèl·lules tractades amb el VIH (tant amb la soca X4 com amb la R5). Per poder quantificar el VIH, tant intracel·lular com extracel·lular, que ha infectat les cèl·lules, s'afegirà un tampó de "lisi" a la mostra, que provoca un trencament de la membrana cel·lular i així s'expulsa el virus de la cèl·lula. Després de l'addició de la luciferasa, es podrà mesurar per luminescència el % d'infecció de la cèl·lula per VIH.

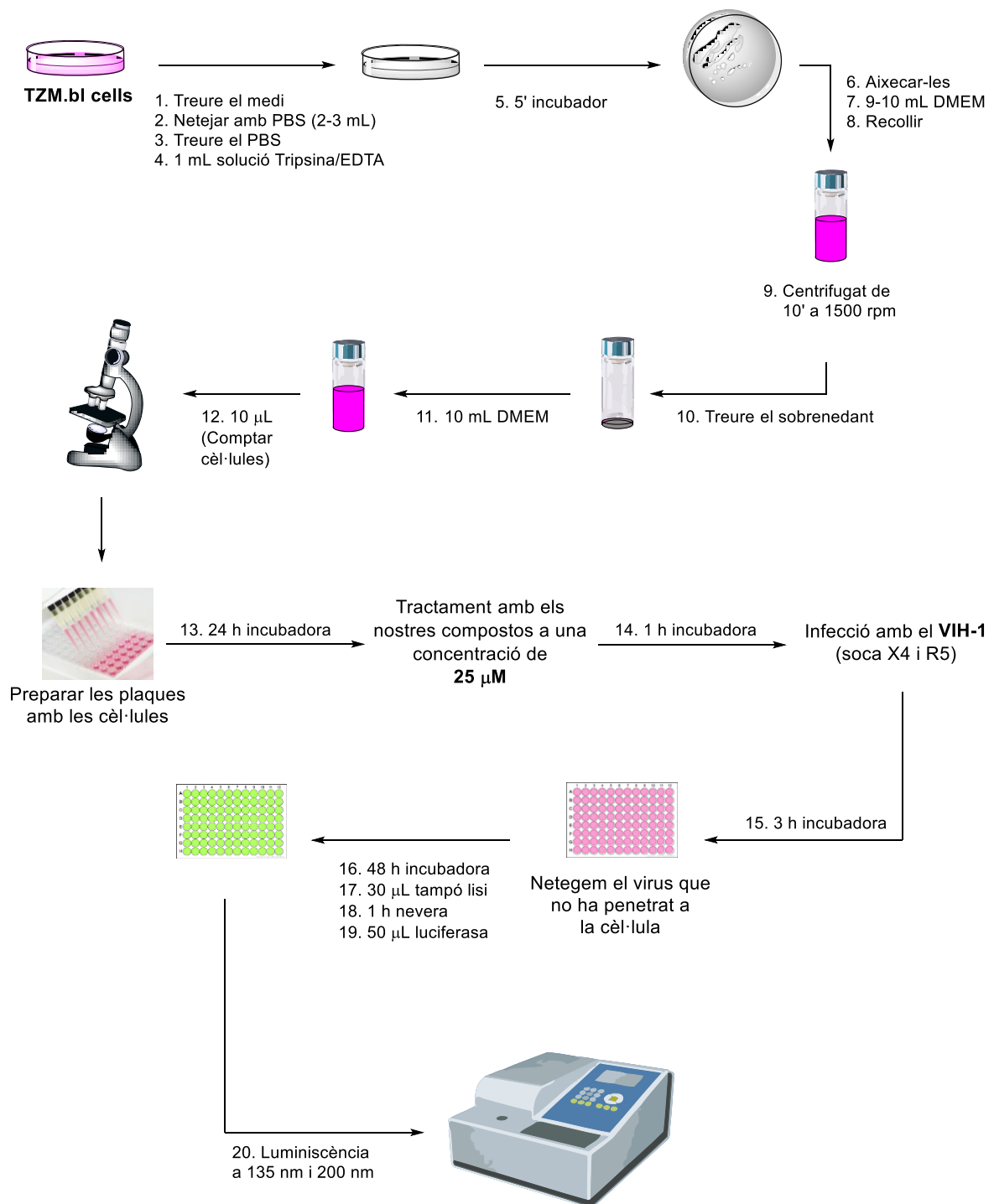
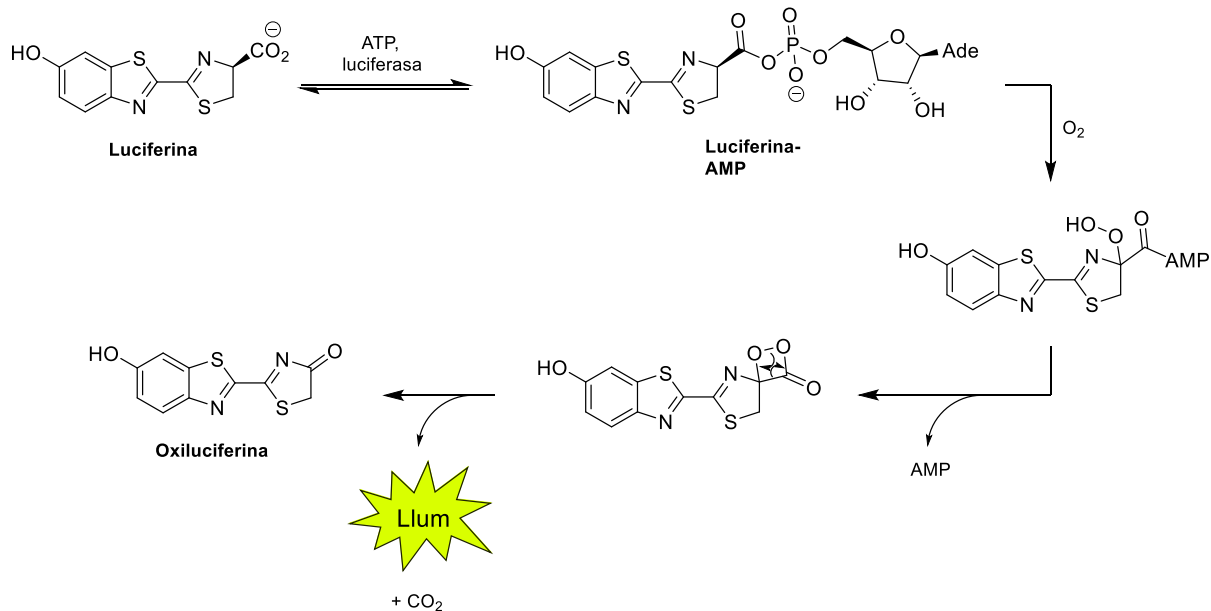


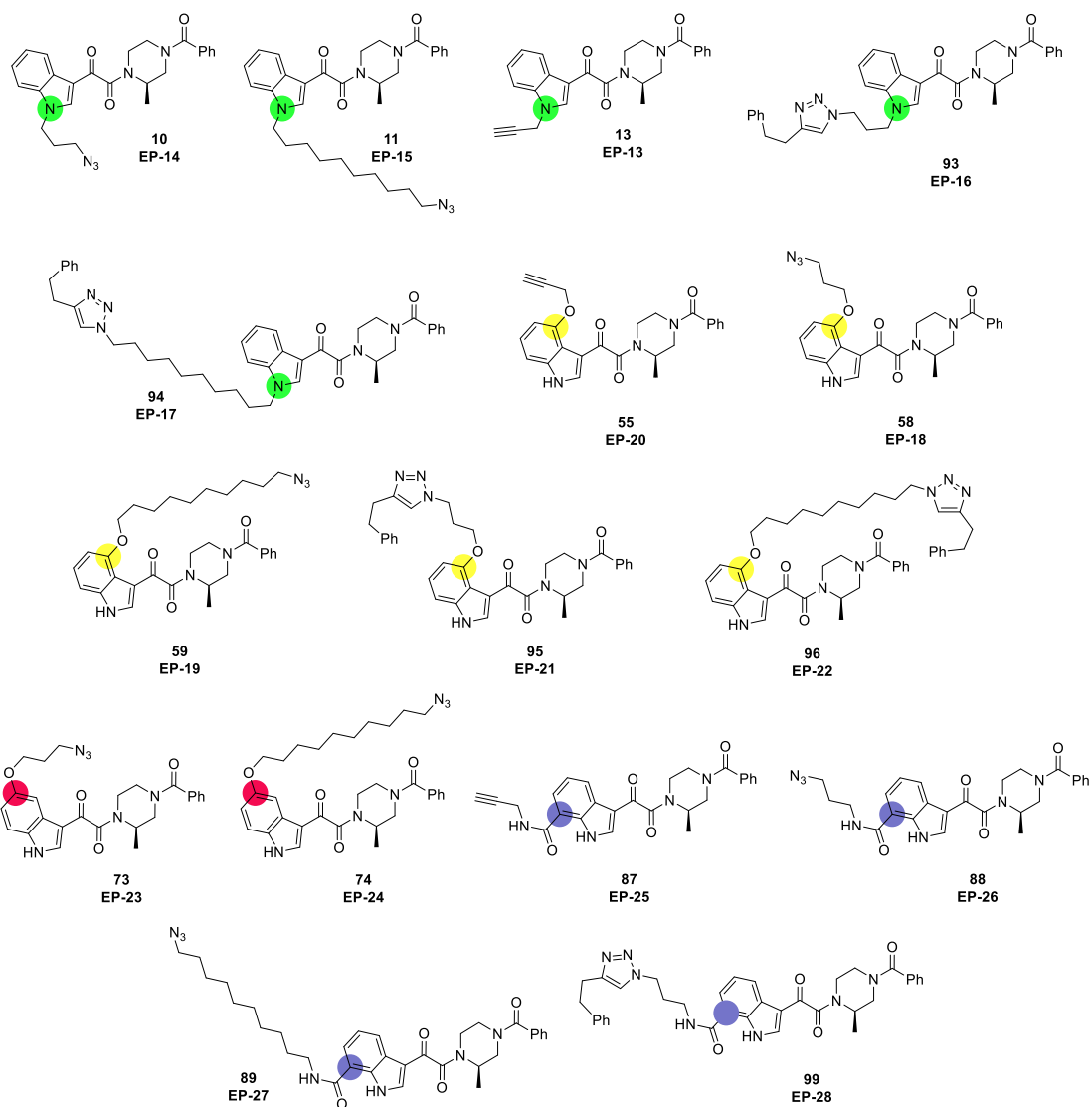
Figura 5.3: Esquema seguit per l'assaig d'infecció per VIH.

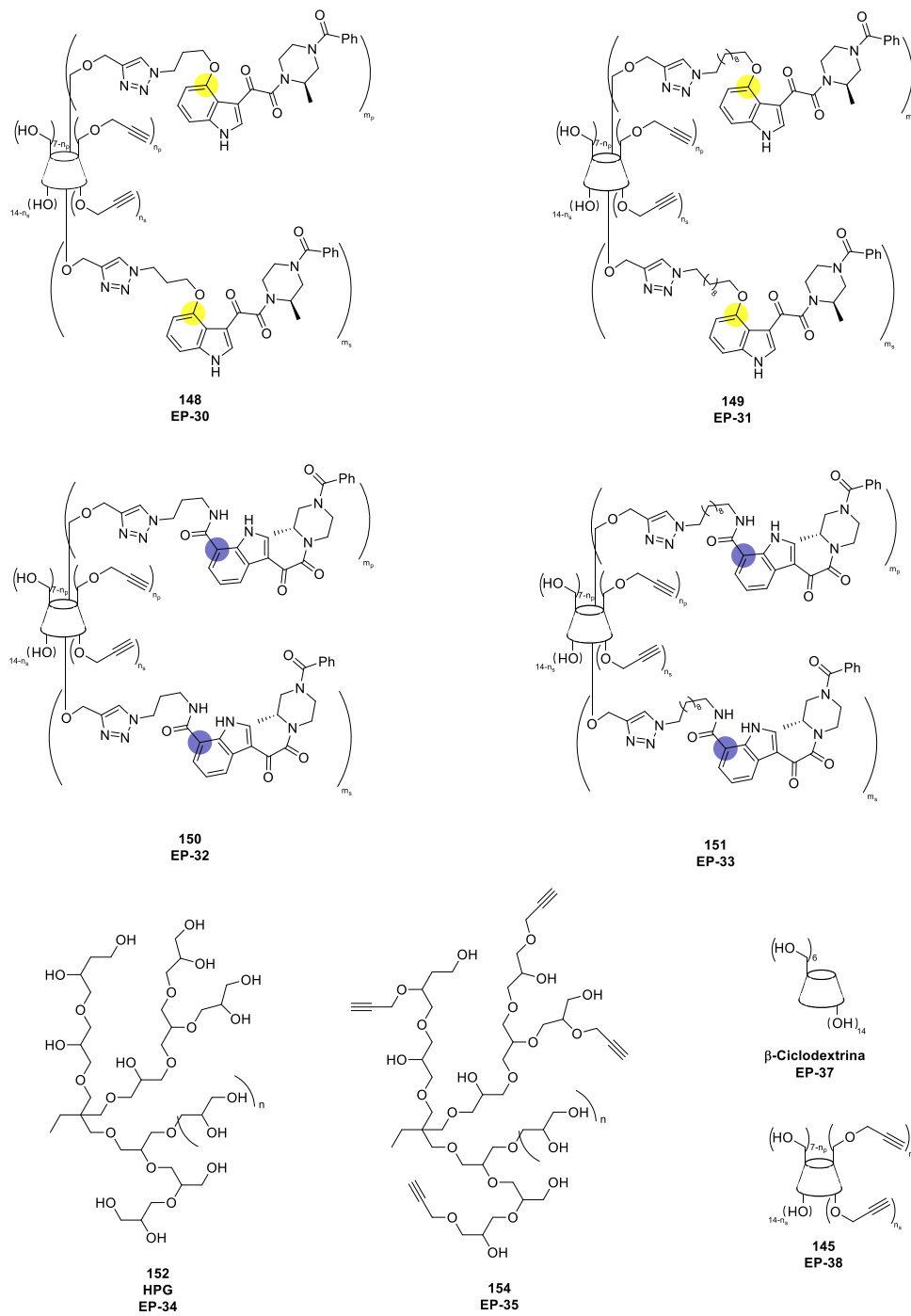
La luciferina, gràcies a l'activitat catalítica de la luciferasa i el consum d'ATP, s'oxida. Aquest intermedi descompon emetent llum i diòxid de carboni. D'aquesta manera, es pot relacionar la quantitat de llum emesa amb la "quantitat" de VIH present a la cèl·lula. Com més llum més infecció i viceversa.



Esquema 5.2

5.2. Relació de compostos avaluats





Esquema 5.3

5.3. Resultats de citotoxicitat

Es va estudiar la biocompatibilitat de tots els compostos anteriors en cèl·lules T2M.bl. Les cèl·lules es van tractar amb concentracions creixents dels compostos, dels quals es consideraren tòxics aquells que van presentar una taxa de supervivència <80%.

Els compostos derivats del BMS substituïts a la posició N1 (**EP-13**, **EP-14**, **EP-15**, **EP-16** i **EP-17**) es van considerar no tòxics a concentracions 1, 5 i 10 μM . Per facilitar una millor comparació dels resultats d'inhibició del VIH, la concentració de treball *in vitro* va ser d'1 μM .

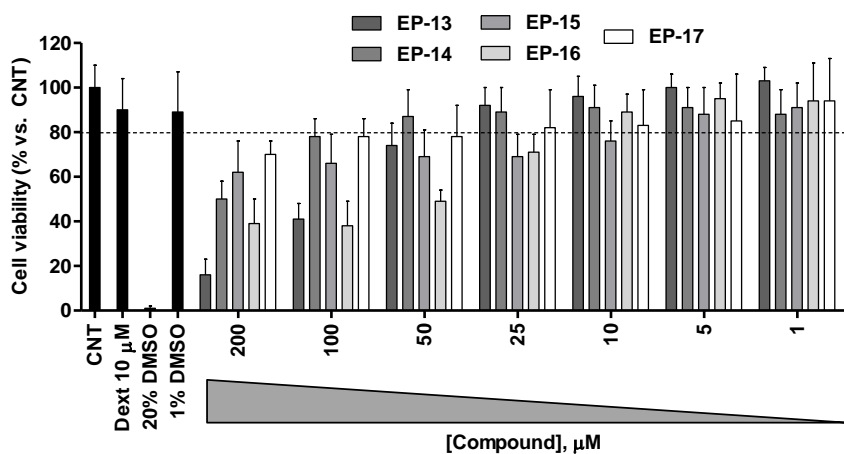


Figura 5.4: Gràfica de toxicitats dels derivats de BMS substituïts a la posició N1.

Pel que fa als derivats a la posició C4 de l'indol (**EP-18**, **EP-19**, **EP-20**, **EP-21** i **EP-22**) es van considerar no tòxics a una concentració 1 μM . La concentració de treball *in vitro* seleccionada com a no tòxica va ser de 0.1 μM .

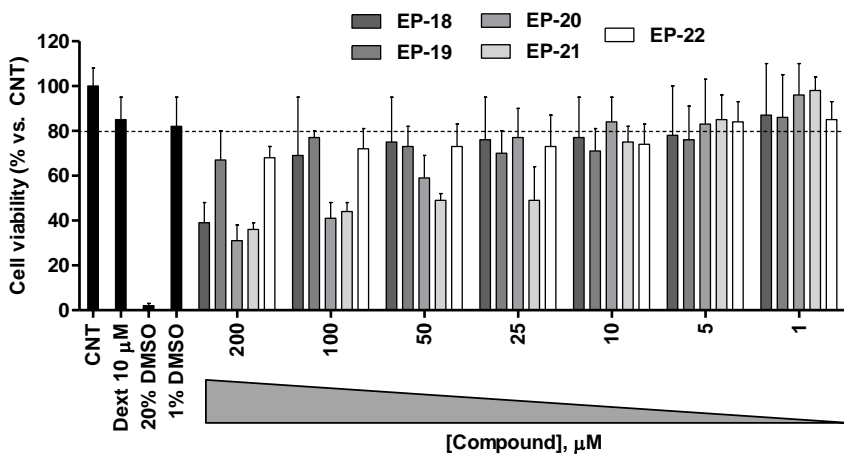


Figura 5.5: Gràfica de toxicitats dels derivats de BMS substituïts a la posició C4.

Els compostos substituïts a la posició C5 de l'indol (**EP-23** i **EP-24**) es van considerar no tòxics a 0.1 μM , concentració de treball *in vitro* escollida per als assaigs d'inhibició.

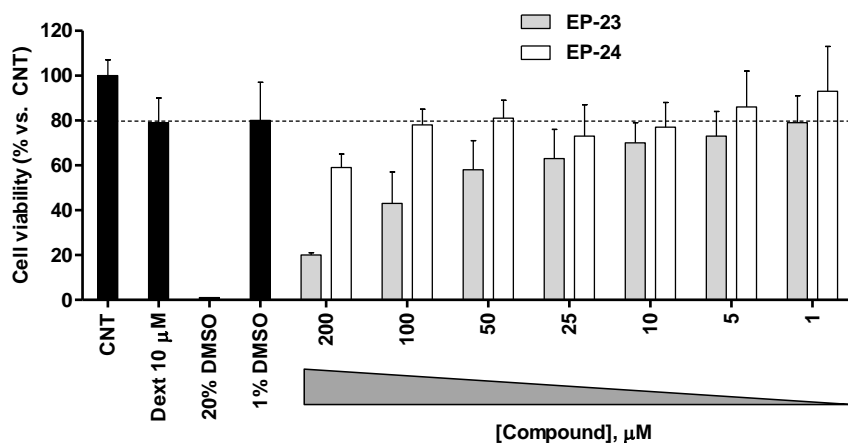


Figura 5.6: Gràfica de toxicitats dels derivats de BMS substituïts a la posició C5.

Dels derivats de BMS substituïts a la posició C7 de l'anell indòlic (**EP-25**, **EP-26**, **EP-27** i **EP-28**) es van considerar no tòxics a 1 i 5 μM . La concentració de treball *in vitro* seleccionada va ser d'1 μM .

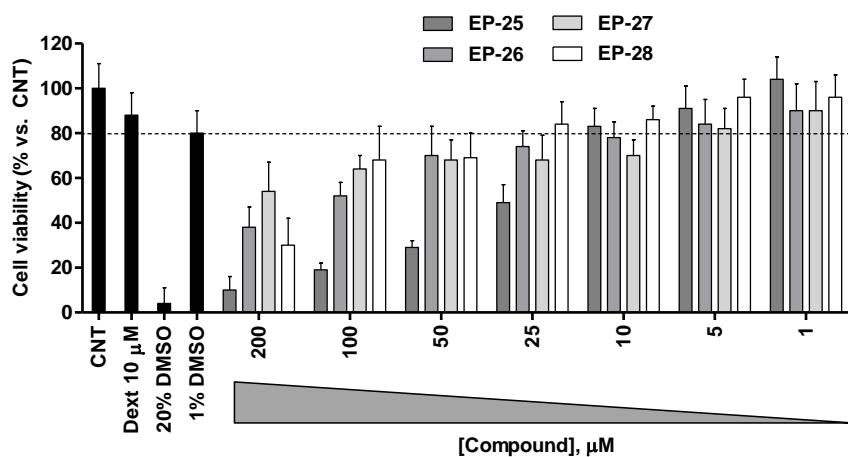


Figura 5.7: Gràfica de toxicitats dels derivats de BMS substituïts a la posició C7.

Pel que fa als conjugats de la βCD amb els derivats de BMS, sintetitzats al **Capítol 4** (**EP-30**, **EP-31**, **EP-32** i **EP-33**), es va observar que cap de les mostres era tòxica a cap concentració; per tant, la concentració no tòxica que s'emprà en els assaigs *in vitro* va ser 25 μM .

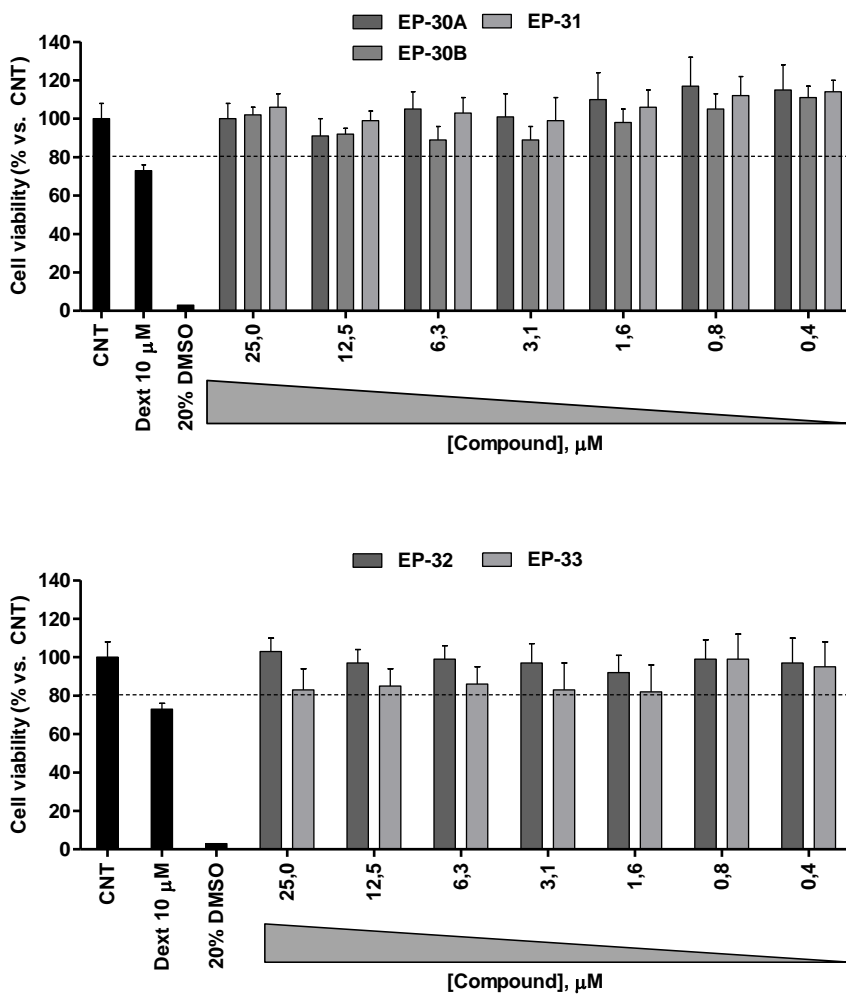


Figura 5.8: Gràfiques de toxicitats dels conjugats entre la βCD i derivats del BMS.

Per últim, es va analitzar la citotoxicitat dels polímers utilitzats com a suport del fàrmac. Es va comprovar que no eren tòxics a cap concentració. La concentració escollida per treballar en els assaigs *in vitro* va ser 25 µM.

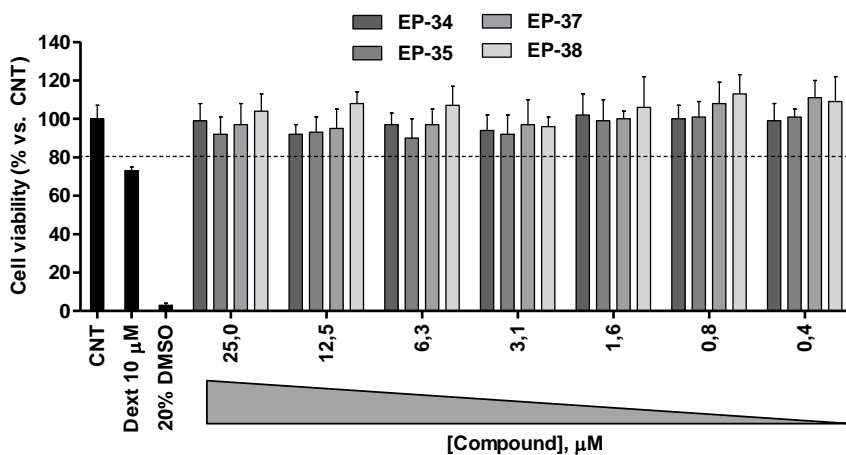


Figura 5.9: Gràfiques de toxicitats dels polímers.

5.4. Resultats d'inhibició del VIH

Després de seguir el procediment descrit més amunt, s'obtenen els percentatges d'infecció que s'ha produït en les cèl·lules. Si comparem tots els derivats de BMS sintetitzats, es fa palès en els següents gràfics, tal com havia avançat en les conclusions del **Capítol 1** de la present Tesi, que els millors candidats són els derivats substituïts en la posició C7 de l'indol (vegeu **EP-24**, **EP-25** i **EP-26**, compostos **87**, **88** i **89**, amb % d'infecció destacats amb asteriscs).

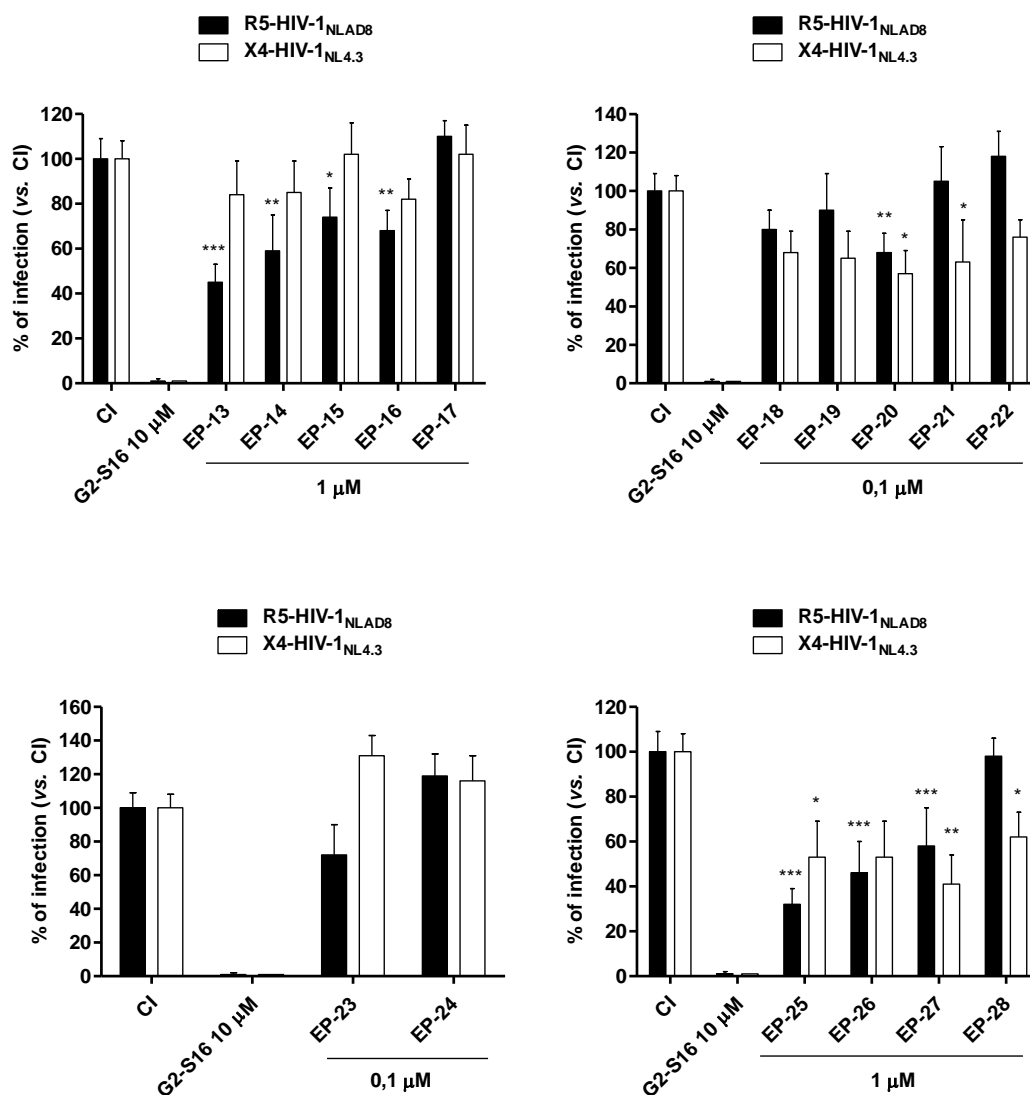


Figura 5.10: Gràfiques d'inhibició del VIH de tots els derivats de BMS sintetitzats.

A continuació es mostren els resultats dels "screenings" cel·lulars que es van dur a terme dels conjugats de βCD i dels polímers que seran el suport del fàrmac.

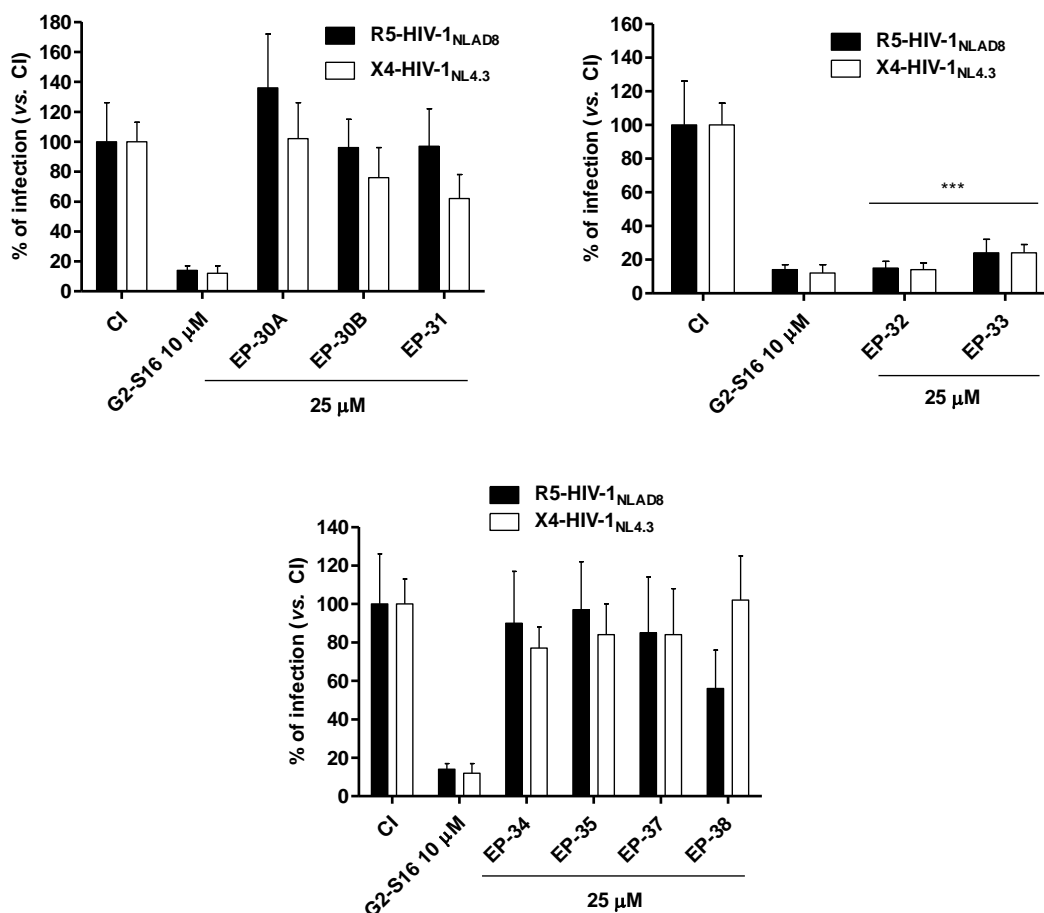
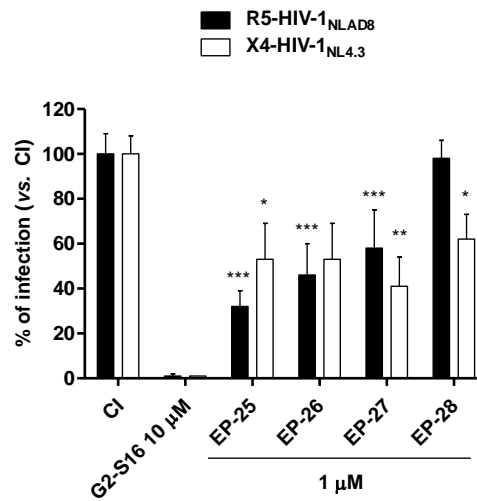


Figura 5.11: Gràfiques d'inhibició del VIH dels conjugats amb la β CD i dels polímers suport.

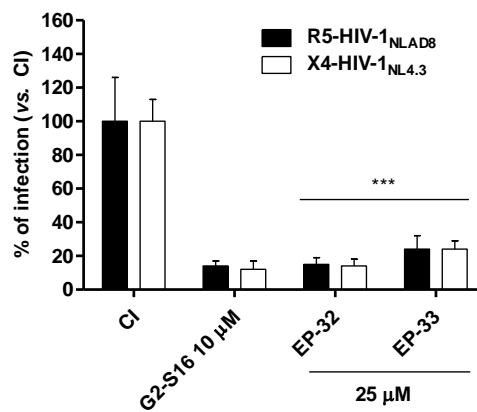
Analitzant els resultats de les mostres, es confirma que el derivat de BMS substituït a la posició C7 de l'anell indòlic és més actiu que el substituït a la posició C4. D'altra banda, s'han fet assaigs d'activitat anti-VIH dels diferents suports on es vol conjuguar el fàrmac (*blancs*), on podem observar que cap d'ells inhibeix el contagi del VIH i, per tant, cap producte obtingut de la conjugació d'aquests amb el nostre fàrmac ens donarà un falç positiu. Finalment, com queda palès en la gràfica de la figura 5.11, els compostos de la β CD conjugada amb els derivats de BMS substituïts a la posició 7 de l'indol (**EP-32** i **EP-33**, compostos **150** i **151**) clarament inhibeixen la infecció del VIH, tant per la soca X4 com per a la R5, donant un % d'infecció tant baix com el producte estrella del grup d'investigació de la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández.

5.5. Conclusions

S'han pogut assajar biològicament tots els derivats de BMS i conjugats de la β CD en col·laboració amb el Laboratori d'Immunobiologia Molecular de l'Hospital General Universitari Gregorio Marañón (Madrid). En primer lloc, es va arribar a la conclusió que els millors candidats eren els derivats de BMS substituïts a la posició C7 de l'indol.



Fianlment, amb els resultats d'inhibició del VIH dels conjugats amb la βCD, es va comprovar que els derivats substituïts a la posició C7 inhibien clarament la infecció per VIH (tant de la soca X4 com de la soca R5), donant uns % d'infecció de les cèl·lules prometedors.



Falta sotmetre a “screening” els darrers productes preparats, és a dir, **156** i **159**, els conjugats de BMS i poliglicerol hiperramificat (HPG).

RESUM I CONCLUSIONS

Resum i conclusions

El VIH-1 segueix essent un dels problemes més greus de la sanitat pública mundial, especialment als països del tercer món. La fase més avançada de la infecció pel VIH és la SIDA (síndrome d'immunodeficiència adquirida).

La present Tesi Doctoral descriu els nostres esforços en la síntesi d'una nova generació de microbicides (**4a generació**), uns conjugats de fàrmacs antivirals a estructures polimèriques o suports per aconseguir un agent tòpic amb una absorció controlada.

Així, després d'una introducció sobre la SIDA i els microbicides, el **Capítol 1** tracta de l'obtenció de 14 anàlegs del BMS806, els quals, gràcies a la col·laboració amb el Laboratori d'Immunobiologia Molecular, es va poder assajar biològicament com inhibidors d'entrada, conclouent que els millors candidats eren els productes obtinguts substituïts a la posició C7 de l'indol o indole.

El **Capítol 2** inclou l'obtenció de més derivats dels BMS806, assajant la cicloadició [3+2] catalitzada per salts de Cu(I) dels azidoderivats del **Capítol 1**. També s'han sintetitzat diferents lligands capaços d'estabilitzar els ions de Cu(I) enfront de l'oxidació i de solubilitzar els complexos de Cu(I) que es formen, per ajudar a disminuir la citotoxicitat d'aquesta reacció. A més a més, es va intentar preparar un lligand nou, tot i que sense èxit. S'han optimitzat les condicions per dur a terme la reacció de cicloadició [3+2] per a substrats tant polars com la β CD en medis aquosos, aconseguint reduir significativament la quantitat de Cu(I) amb l'ajuda d'un lligand.

Dins del tema de reaccions de tipus *click*, en el **Capítol 3** es presenta el desenvolupament d'un mètode bioortogonal basat en addicions conjugades simples de tiols a triples enllaços terminals activats en condicions fisiològiques i sense additius.

La conjugació de fàrmacs amb anticossos, biomolècules i macromolècules està esdevenint, cada vegada més, una estratègia d'especial interès en l'àmbit biomèdic. A més, també és sabut que permet desenvolupar vies menys tòxiques d'administració de medicaments. Amb l'objectiu d'aconseguir un gel microbicida, en el **Capítol 4** s'exposa la síntesi de diferents conjugats entre la β CD i els millors candidats anàlegs del BMS806 mitjançant la reacció de cicloadició [3+2], que s'han pogut assajar biològicament. Satisfactòriament, es va comprovar que els productes substituïts a la posició 7 de l'indol inhibeixen clarament la infecció per VIH-1 (tant de la soca X4 com la R5).

En aquest mateix capítol, també es recullen les millors condicions per a la síntesi del HPG i diferents anàlegs, un polímer amb una excel·lent biocompatibilitat, d'estructura compacta, globular, versàtil pel que fa a la seva funcionalització i, pensem, bon candidat com a suport del fàrmac per aconseguir el microbicida desitjat. També s'ha conjugat el HPG amb derivats del BMS mitjançant les dues vies estudiades durant la Tesi, la cicloadició [3+2] i l'addició conjugada de tiols a propinamides.

Finalment, en el **Capítol 5** de la present Tesi es mostren tots els resultats recollits, en el Laboratori d'Immunobiologia Molecular de l'Hospital General Universitario Gregorio Marañon de Madrid, pel que fa a la citotoxicitat de tots els productes analitzats i a la inhibició del VIH. Hi ha percentatges d'infecció de les cèl·lules, després de l'exposició al virus, que són molt prometedors.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Summary and conclusions

HIV-1 is still one of the most serious problems of global public health, especially in third world countries. The most advanced stage of HIV infection is AIDS (acquired immunodeficiency syndrome).

The present Doctoral Thesis describes our efforts in the synthesis of a new generation of microbicides (4th generation), which are conjugates of antiviral drugs to polymeric structures or scaffolds to achieve a topical agent with controlled absorption.

Thus, after an introduction on AIDS and microbicides, **Chapter 1** deals with the preparation of 14 analogues of BMS806, which could be biologically tested as entry inhibitors, concluding that the best candidates were the products substituted on position 7 of indole.

Chapter 2 includes the preparation of more derivatives of BMS806, testing the Cu(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition of the azides shown in **Chapter 1**. Also, several ligands capable of stabilizing Cu(I) ions versus its oxidation and deproportion and of solubilizing Cu(I) complexes that are formed have been synthesized to reduce the cytotoxicity of this reaction. In addition, we attempted to prepare a new ligand, without success. The conditions for carrying out the [3+2] cycloaddition reaction with polar substrates such as β CD in aqueous media have been optimized.

Within the *click* reactions, **Chapter 3** presents the development of a bioorthogonal method based on the simple conjugate additions of thiols to activated terminal triple bonds under physiological conditions, without additives.

The conjugation of drugs with antibodies, biomolecules and macromolecules is increasingly becoming a strategy of special interest in the biomedical field. In addition, it is also known that it allows the development of less toxic routes for drug administration. In order to achieve a microbicide gel, **Chapter 4** presents the synthesis of different conjugates from β CD and the best analogous candidates of BMS806 by [3+2] cycloaddition, which could be tested biologically. To our delight, it was found that samples substituted at position 7 of the indole clearly inhibit HIV-1 infection (both X4 and R5).

Also **Chapter 4**, we summarize the best conditions for the synthesis of HPG and analogues, a polymer with an excellent biocompatibility, compact, globular, with a versatile structure and, in our opinion, a good candidate as a drug support to achieve the desired microbicide. HPG was also conjugated with BMS derivatives through the two reactions studied during this Thesis, the [3+2] cycloaddition and the conjugated addition of thiols to propynamides.

Finally, in **Chapter 5** all the results obtained in the Laboratory of Molecular Immunobiology at Hospital General Universitario Gregorio Marañón in Madrid were collected. Cytotoxicity and inhibition of HIV of all samples were analyzed. Some products afford percentages of infection of the cells, after exposure to the virus, which are very promising.

EXPERIMENTAL SECTION

6. EXPERIMENTAL SECTION

General experimental methods	161
6.1. Experimental Chapter 1	163
6.1.1. Substitutions at N1	163
6.1.2. Substitutions at C4	167
6.1.3. Substitutions at C5	184
6.1.4. Substitutions at C7	191
6.2. Experimental Chapter 2	200
6.2.1. BMS806 derivatives. <i>Click</i> reactions	200
6.2.2. Ligands	205
6.2.3. β CD derivatives	213
6.3. Experimental Chapter 3	215
6.4. Experimental Chapter 4	224
6.4.1. β CD derivatives	224
6.4.2. HPG derivatives	231
Anti-HIV-1 activity of <i>in vitro</i> model	239

GENERAL EXPERIMENTAL METHODS

Unless specified otherwise, all starting materials and reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. All reactions were conducted in oven-dried glassware, under nitrogen or argon, in anhydrous solvents, which were dried and distilled before use according to standard procedures. Solvents used for isolation of products and chromatography were glass distilled.

Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on 0.25 mm silica gel plates (F₂₅₄). The TLCs were analyzed by UV (254 nm) and stained with *p*-anisaldehyde, KMnO₄ or ninhydrin. Retention factors (R_f) are approximate.

Yields were determined after purification of the desired compound by column chromatography on silica gel. *Flash* column chromatography was performed on silica gel 60 (35–70 μm). The eluent used is indicated for each case.

¹H NMR spectra were recorded on Varian Mercury 400 MHz spectrometers; chemical shifts (δ) are given in ppm, with TMS as internal reference or with the solvent resonance as the internal standard (residual CHCl₃ in CDCl₃, δ 7.26 ppm; residual CD₃SOCHD₂ in DMSO-*d*₆, δ 2.50 ppm; residual CD₃OH in CD₃OD, δ 3.31 ppm; residual DOH in D₂O, δ 4.79 ppm). Data are reported as usual: chemical shift in δ, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet or quadruplet, p = quintet or pentuplet, br = broad, m = multiplet), coupling constants in Hz, and integration. ¹³C NMR spectra were recorded on the above-mentioned spectrometer (100.6 MHz for ¹³C), chemical shifts are reported in ppm (CDCl₃, δ 77.0 ppm, DMSO-*d*₆, δ 39.5 ppm, CD₃OD, δ 49.0 ppm). Where necessary, 2D NMR experiments (HSQC, COSY, NOESY) were carried out to assist in structure elucidation and signal assignments.

HPLC analyses were performed under gradient conditions, which are indicated for each case, using an Agilent Technologies LC-110 apparatus. The column used is phenomenex LUNA 5u C18 column (250 mm x 4.60 mm), 5 μm, 100Å and the eluent gradient, flow and wavelength are specified for each case.

FTIR spectra were registered with an ATR accessory; only the more relevant frequencies (cm⁻¹) are reported.

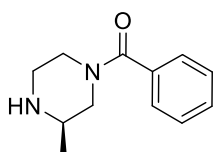
Melting points and decomposition temperatures were obtained with a Gallenkamp apparatus.

HRMS data were obtained by using ESI–TOF techniques and MS were obtained by using 4800 Plus MALDI TOF/TOF (ABSciex-2010) by the *Unitat d'Espectrometria de Masses, Facultat de Química-7th floor, Centres científics i tecnològics UB*.

6.1 Experimental chapter 1

(*R*)-*N*-Benzoyl-3-methylpiperazine (**5**)¹⁰⁹

A 1 M solution of Et₂AlCl in hexanes (25.0 mL, 25.0 mmol, 1.0 equiv) and methyl benzoate (3.10 mL, 25.0 mmol, 1.0 equiv) were slowly added to a solution of (*R*)-(-)-2-methylpiperazine (2.50 g, 25.0 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (125 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred for 48 h at room temperature and was quenched by careful addition of 2 M NaOH (50 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer extracted with EtOAc (3 x 100 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to give 4.56 g (22.3 mmol, 89%) of monoprotected piperazine **5**.



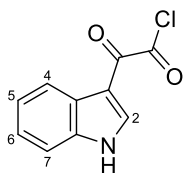
White solid. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.22. **¹H NMR** (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.41 – 7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 4.58 (br s, 1H, H_{pip}), 3.60 (br s, 1H, H_{pip}), 3.08 – 2.48 (m, 5H, H_{pip}), 1.13 – 0.97 (m, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CD₃OD, 100.6 MHz): δ 172.4 (CO), 136.9 (C_q), 131.1 (CH, C_{Ph}), 129.8 (CH, C_{Ph}), 128.0 (CH, C_{Ph}), 54.2 (C_{pip}), 50.7 (C_{pip}), 50.2 (C_{pip}), 48.4 (C_{pip}), 48.1 (C_{pip}), 45.2 (C_{pip}), 44.5 (C_{pip}), 41.8 (C_{pip}), 17.7 (CH₃, Me_{pip}), 17.3 (CH₃, Me_{pip}).

Note: Mix of rotamers (due to the amide bond).

6.1.1. Substitutions at N1

2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetyl chloride (**6**)

Oxalyl chloride (0.54 mL, 6.2 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of indole (500 mg, 4.27 mmol) in anhydrous Et₂O (10 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at –20 °C until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 844 mg (4.07 mmol, 95%) of acid chloride **6**, which was used in the next step without further purification.

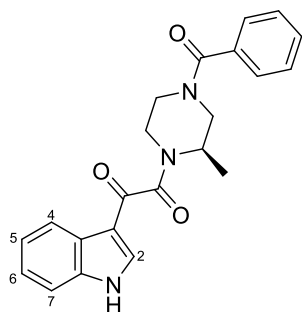


Reddish solid. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.36 (br s, 1H, NH), 8.41 (d, *J* = 3.2, 1H, H₂), 8.19 – 8.15 (m, 1H, H₄), 7.56 – 7.52 (m, 1H, H₇), 7.31 – 7.22 (m, 2H, H₅ + H₆). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ 180.7 (CO), 165.2 (COCl), 138.0 (CH, C₂), 136.7 (C_q), 125.6 (C_q), 123.7 (CH), 122.7 (CH), 121.1 (CH, C₄), 112.7 (CH, C₇), 112.3 (C_q).

(*R*)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1*H*-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (**7**)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 0.93 mL, 5.3 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **6** (553 mg, 2.66 mmol) and piperazine **5** (653 mg, 3.20 mmol, 1.2 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (26 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at

room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 985 mg (2.62 mmol, 98%) of compound **7**.

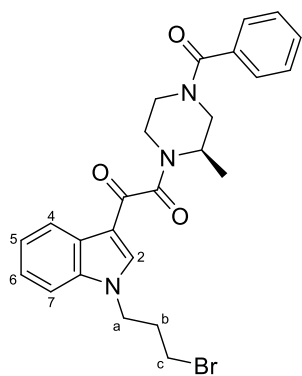


Yellowish oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.32. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.31 (br s, 1H, NH), 8.26 (br s, 1H), 7.78 (m, 1H, H₂), 7.50 – 7.33 (m, 5H, H_{Ph}), 7.32 – 7.19 (m, 3H), 4.97 – 3.00 (br m, 7H, H_{pip}), 1.27 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.5 (CO), 171.7 (NCO), 166.8 (NCO), 137.0 (C_q), 136.1 (C_q), 134.9 (CH, C₂), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 126.9 (CH, C_{Ph}), 125.1 (C_q), 124.2 (CH), 123.3 (CH), 121.6 (CH), 114.0 (C_q), 112.4 (CH), 51.3 (CH₂, C_{pip}), 46.3 (CH, C_{pip}), 41.0 (CH₂, C_{pip}), 35.7 (CH₂, C_{pip}), 15.4 (CH₃, Me_{pip}), 15.1 (CH₃, Me_{pip}).

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1-(3-bromopropyl)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione
(8)

Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 6.00 mg, 0.146 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of compound **7** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (1.3 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. After 30 min, 1,3-dibromopropane (15 μ L, 0.15 mmol, 1.1 equiv) was added with vigorous stirring and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (15 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 47 mg (95 μ mol, 71%) of bromide **8**.

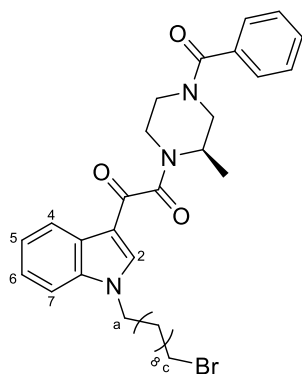


Colorless oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.69. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.34 (br s, 1H), 7.93 (m, 1H, H₂), 7.45 – 7.38 (m, 5H, H_{Ph}), 7.38 – 7.32 (m, 3H), 5.03 – 2.88 (br m, 7H, H_{pip}), 4.40 (t, J = 6.5, 2H, H_a), 3.33 (t, J = 6.1, 2H, H_c), 2.47 – 2.36 (m, 2H, H_b), 1.30 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.0 (CO), 172.3 (NCO), 166.3 (NCO), 138.5 (C_q), 136.9 (C_q), 135.3 (CH, C₂), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.4 (C_q), 124.5 (CH), 123.7 (CH), 122.7 (CH), 113.8 (C_q), 110.3 (CH), 45.3 (CH₂, C_a), 32.1 (CH₂, C_c), 29.7 (CH₂, C_b), 16.5 (CH₃, Me_{pip}), 15.3 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₂₅H₂₇BrN₃O₃⁺ (M+H)⁺: 496.1230 and 498.1210, found: 496.1233 and 498.1219.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1-(10-bromodecyl)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (9)

Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 6.00 mg, 0.146 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of compound **7** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (1.3 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. After 30 min with vigorous stirring 1,10-dibromodecane (44 mg, 0.15 mmol, 1.1 equiv) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (15 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 59 mg (99 μmol, 75%) of bromide **9**.

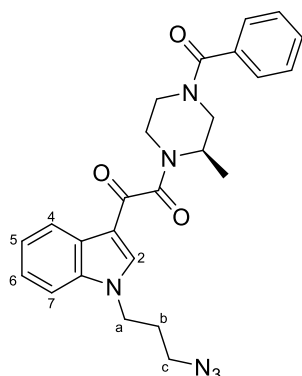


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.69. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.33 (s, 1H), 7.87 (s, 1H, H₂), 7.47 – 7.39 (m, 5H, H_{Ph}), 7.38 – 7.32 (m, 3H), 5.00 – 2.86 (br m, 7H, H_{pip}), 4.15 (t, *J* = 7.3, 2H, H_a), 3.40 (t, *J* = 6.8, 2H, H_c), 1.93 – 1.77 (m, 4H), 1.46 – 1.18 (m, 15H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 184.8 (CO), 171.4 (NCO), 166.4 (NCO), 138.2 (C_q), 137.1 (C_q), 135.3 (CH, C₂), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.4 (C_q), 124.1 (CH), 123.5 (CH), 122.5 (C_q), 113.4 (CH), 110.4 (CH), 49.9 (C_{pip}), 47.6 (CH₂, C_a), 44.8 (CH₂, C_c), 34.1 (C_{pip}), 33.0 (CH₂, C_{pip}), 29.8 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.2 (CH₂, C_{pip}), 27.0 (CH₂), 26.9 (CH₂), 16.5 (CH₃, Me_{pip}), 15.5 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₃₂H₄₁BrN₃O₃⁺ (M+H)⁺: 594.2326 and 596.2305, found: 594.2323 and 596.2315.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(1-(3-Azidopropyl)-1H-indol-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (10)

Sodium azide (53 mg, 0.82 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of bromide **8** (369 mg, 0.743 mmol) in DMF (7.5 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (80 mL) and extracted with Et₂O (3 x 30 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 333 mg (0.726 mmol, 98%) of azide **10**.



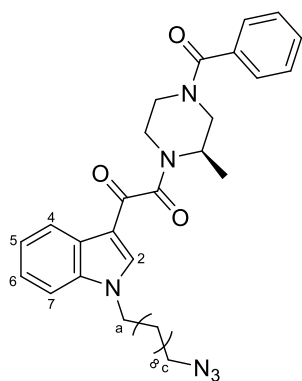
Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.42. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.34 (br s, 1H), 7.89 (m, 1H, H₂), 7.47 – 7.39 (m, 5H, H_{Ph}), 7.38 – 7.33 (m, 3H), 4.85 – 2.91 (br m, 7H, H_{pip}), 4.29 (t, *J* = 6.8, 2H, H_a), 3.33 (t, *J* = 6.5, 2H, H_c), 2.19 – 2.07 (m, 2H, H_b), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 184.9 (CO), 174.2 (NCO), 166.2 (NCO), 138.3 (C_q), 137.0 (C_q), 135.3 (CH, C₂), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.2 (CH, C_{Ph}), 126.4 (C_q), 124.5 (CH), 123.7 (CH),

122.7 (CH), 113.9 (C_q), 110.2 (CH), 48.3 (CH₂, C_a), 44.3 (CH₂, C_c), 29.1 (CH₂, C_b), 16.5 (CH₃, Me_{pip}). **FTIR** 2923, 2850, 2094, 1625, 1438. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₂₅H₂₇N₆O₃⁺ (M+H)⁺: 459.2139, found: 459.2137.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(1-(10-Azidododecyl)-1H-indol-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (11)

Sodium azide (101 mg, 1.55 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of bromide **9** (836 mg, 1.41 mmol) in DMF (14 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (140 mL) and extracted with Et₂O (3 x 50 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 40 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 734 mg (1.32 mmol, 94%) of azide **11**.

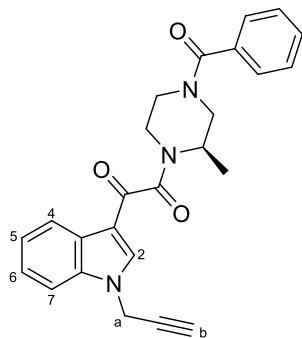


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.51. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.29 (br s, 1H), 7.85 (s, 1H, H₂), 7.44 – 7.34 (m, 5H, H_{Ph}), 7.33 – 7.26 (m, 3H), 4.94 – 2.94 (br m, 7H, H_{pip}), 4.11 (t, *J* = 7.0, 2H, H_a), 3.21 (t, *J* = 6.3, 2H, H_c), 1.84 (br s, 2H), 1.60 – 1.49 (m, 2H), 1.37 – 1.16 (m, 15H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 184.8 (CO), 171.3 (NCO), 166.3 (NCO), 138.1 (CH, C₂), 137.0 (C_q), 135.1 (C_q), 130.0 (CH, C_{Ph}), 128.6 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C_{Ph}), 126.2 (C_q), 124.0 (CH), 123.3 (CH), 122.6 (C_q), 113.2 (CH), 110.3 (CH), 51.4 (CH₂, C_a), 49.8 (C_{pip}), 47.4 (CH₂, C_c), 42.5 (C_{pip}), 40.9 (CH₂, C_{pip}), 35.8 (CH₂, C_{pip}), 29.7 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 26.6 (CH₂), 16.1 (CH₃, Me_{pip}), 15.0 (CH₃, Me_{pip}). **FTIR** 2932, 2853, 2087, 2088, 1675, 1629. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₃₂H₄₁N₆O₃⁺ (M+H)⁺: 557.3235, found: 557.3239.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1-(prop-2-yn-1-yl)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (13)

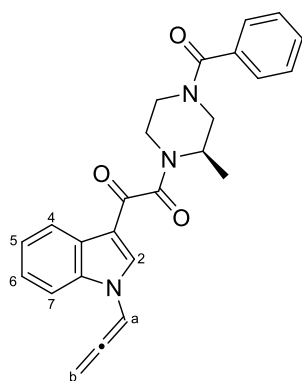
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 5.00 mg, 0.127 mmol, 0.95 equiv) was added to a solution of compound **7** (50 mg, 0.13 mmol) in DMF (1.3 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. After 30 min with vigorous stirring, propargyl bromide (80% in toluene, 30 μL, 0.27 mmol, 2.0 equiv) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (15 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 34 mg (82 μmol, 62%) of compound **13**.



Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.65. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.33 (br s, 1H, H_2), 8.04 – 7.98 (m, 1H), 7.52 – 7.33 (m, 8H), 4.91 (d, $J = 2.5$, 2H, H_a), 4.86 – 3.00 (m, 7H, H_{pip}), 2.50 (d, $J = 2.6$, 1H, H_b), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.0 (CO), 171.5 (NCO), 166.2 (NCO), 137.7 (CH, C_2), 136.7 (C_q), 135.2 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.5 (C_q), 124.6 (CH), 123.9 (CH), 122.6 (CH), 114.1 (C_q), 110.3 (CH), 75.8 (C_q), 75.7 (CH_2 , C_a), 46.9 (C_{pip}), 43.7 (C_{pip}), 41.9 (C_{pip}), 37.0 (CH, C_b), 36.5 (C_{pip}), 16.5 (CH_3 , Me_{pip}), 15.2 (CH_3 , Me_{pip}).

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1-(propa-1,2-dien-1-yl)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (12)



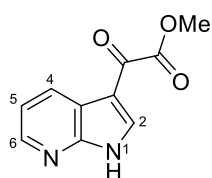
Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.65. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.34 (br s, 1H, H_2), 7.94 (d, $J = 3.6$, 1H), 7.64 – 7.59 (m, 1H), 7.47 – 7.39 (m, 5H, H_{Ph}), 7.39 – 7.34 (m, 2H), 7.17 (t, $J = 6.5$, 1H, H_a), 5.72 (d, $J = 6.5$, 1H, H_b), 4.88 – 3.05 (m, 7H, H_{pip}), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 413.1739, found: 413.1742.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

6.1.2. Substitutions at C4

Methyl 2-oxo-2-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)acetate (14)⁴⁶

7-Azaindole (1.00 g, 8.47 mmol) was added to a suspension of AlCl_3 (5.64 g, 42.3 mmol, 5.0 equiv) in CH_2Cl_2 (200 mL) under a dry N_2 atmosphere. The mixture was stirred for 1 h at room temperature, cooled to 0 °C and methyl chlorooxoacetate (3.6 mL, 42 mmol, 5.0 equiv) was slowly added. The reaction was stirred for 6 h at room temperature. The reaction was quenched by careful addition of MeOH (50 mL) at 0 °C and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) to give 1.15 g (5.27 mmol, 62%) of compound **14**.

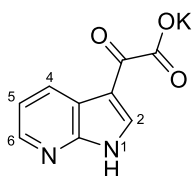


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.21. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 11.66 (br s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, H_2), 8.46 (dd, $J = 7.9$, 1.6, 1H), 8.39 (dd, $J = 4.7$, 1.6, 1H), 7.32 (dd, $J = 7.9$, 4.7, 1H, H_5), 3.90 (s, 3H, COOMe). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 100.6 MHz): δ 179.3 (CO), 164.4 (CO), 147.7 (C_q), 145.6

(CH), 139.0 (CH, C₂), 130.2 (C_q), 119.5 (CH, C₅), 118.9 (CH), 112.1 (C_q), 53.3 (CH₃, Me). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₁₀H₉N₂O₃⁺ (M+H)⁺: 205.0608, found: 205.0610.

Potassium 2-oxo-2-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)acetate (15)⁴⁶

K₂CO₃ (1.06 g, 7.64 mmol, 2.0 equiv) in H₂O (9.5 mL) was added to a solution of compound **14** (780 mg, 3.82 mmol) in MeOH (9.5 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature until all the product was precipitated. The solid was filtered and washed with a cooled mixture of H₂O/MeOH 1:1 to afford 733 mg (3.21 mmol, 84%) of compound **15**.

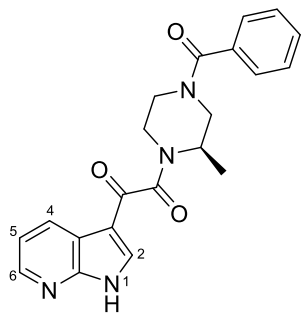


White solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.40 (dd, *J* = 7.8, 1.6, 1H), 8.24 (dd, *J* = 4.7, 1.5, 1H), 8.11 (s, 1H, H₂), 7.14 (dd, *J* = 7.8, 4.7, 1H, H₅). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ 180.7 (CO), 169.8 (CO), 148.3 (C_q), 144.4 (CH), 136.6 (CH, C₂), 130.3 (C_q), 118.9 (CH, C₅), 118.0 (CH), 113.2 (C_q).

(*R*)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)ethane-1,2-dione (16)⁴⁶

Procedure A: *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA, 0.76 mL, 4.4 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of compound **15** (500 mg, 2.19 mmol), piperazine **5** (470 mg, 2.30 mmol, 1.05 equiv) and 3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one (DEPBT, 702 mg, 2.30 mmol, 1.05 equiv) in DMF (20 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The reaction was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ solution (30 mL) and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 493 mg (1.31 mmol, 60%) of desired compound **16**.

Procedure B: Butyllithium (1.6 M in hexanes, 0.46 mL, 0.74 mmol, 3.0 equiv) at -78 °C was slowly added to a solution of piperazine **5** (150 mg, 0.735 mmol, 3.0 equiv) in THF (1.3 mL) under a dry N₂ atmosphere, at -78 °C. The mixture was slowly heated to 0 °C and stirred for 30 min. Then, compound **14** (50 mg, 0.25 mmol) in THF (1.3 mL) at -78 °C was slowly added to the reaction mixture under a dry N₂ atmosphere, at -78 °C. The reaction mixture was slowly heated to room temperature and stirred for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 60 mg (0.16 mmol, 65%) of desired compound **16**.

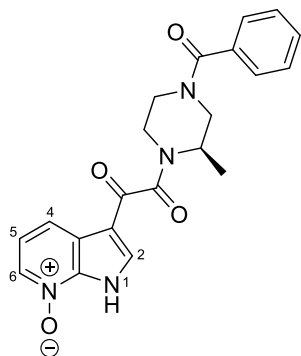


Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.23. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 11.90 (br s, 1H, NH), 8.65 (d, $J = 7.9$, 1H), 8.44 (d, $J = 4.7$, 1H), 8.19 (s, 1H, H_2), 7.47 – 7.38 (m, 5H, H_{Ph}), 7.34 (dd, $J = 7.8$, 4.9, 1H, H_5), 5.17 – 3.00 (br m, 7H, H_{pip}), 1.33 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.3 (CO), 172.0 (NCO), 168.1 (NCO), 148.8 (C_q), 144.9 (CH), 137.3 (CH, C_2), 135.1 (C_q), 130.5 (C_q), 130.1 (CH, C_{Ph}), 128.7 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 118.8 (CH, C_5), 117.9 (CH), 112.9 (C_q), 50.5 (C_{pip}), 45.3 (C_{pip}), 42.6 (C_{pip}), 36.1 (C_{pip}), 14.4 (CH_3 , Me_{pip}), 13.6 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 377.1608, found: 377.1611.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine 7-oxide (17)⁴⁶

3-Chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA, 261 mg, 1.51 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of compound **16** in acetone (10 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature until all the product was precipitated. The solid was filtered and washed with cold acetone to afford 297 mg (0.757 mmol, 75%) of compound **17**.



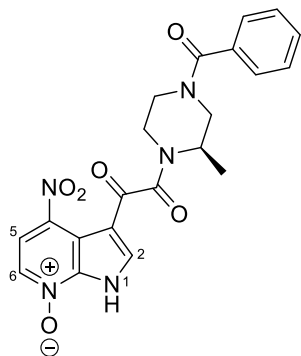
Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.23. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.32 (d, $J = 7.2$, 1H), 8.26 (d, $J = 7.3$, 1H), 8.00 (s, 1H, H_2), 7.48 – 7.38 (m, 5H, H_{Ph}), 7.30 (t, $J = 7.2$, 1H, H_5), 4.88 – 2.99 (br m, 7H, H_{pip}), 1.18 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 186.1 (CO), 171.2 (NCO), 164.8 (NCO), 140.2 (C_q), 137.3 (CH, C_4), 137.1 (CH, C_2), 135.4 (C_q), 133.7 (C_q), 130.0 (CH, C_{Ph}), 128.6 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C_{Ph}), 119.5 (CH, C_5), 118.4 (CH, C_6), 112.7 (C_q), 49.5 (C_{pip}), 45.0 (C_{pip}), 44.8 (C_{pip}), 34.9 (C_{pip}), 15.3 (CH_3 , Me_{pip}), 14.2 (CH_3 , Me_{pip}).

HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 393.1557, found: 393.1562.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-4-nitro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine 7-oxide (18)⁴⁶

N-Oxide **17** was dissolved in a 10:1 mixture of TFA and fuming nitric acid (2 mL) and stirred for 8 h at room temperature. The reaction was quenched by careful addition of MeOH (1.2 mL) and the solvent was removed under reduced pressure to give 78 mg (0.18 mmol, 83%) of nitro compound **18**.



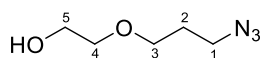
Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.22. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.41 – 8.45 (m, 2H), 7.91 (s, 1H, H_2), 7.51 – 7.47 (m, 5H, H_{Ph}), 4.61 – 3.23 (br m, 7H, H_{pip}), 1.34 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.1 (CO), 171.6 (NCO), 168.2 (NCO), 144.0 (C_q), 143.3 (C_q), 140.9 (C_q), 141.5 (CH, C_6), 138.7 (CH, C_2), 134.6 (C_q), 131.0 (CH, C_{Ph}), 129.3 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 115.8 (CH, C_5), 113.3 (C_q), 50.2 (C_{pip}), 43.3 (C_{pip}), 42.6 (C_{pip}), 15.2 (CH₃, Me_{pip}), 13.8 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_6^+$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺:

438.1408, found: 438.1413.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

2-(2-Azidoethoxy)ethan-1-ol (**19**)

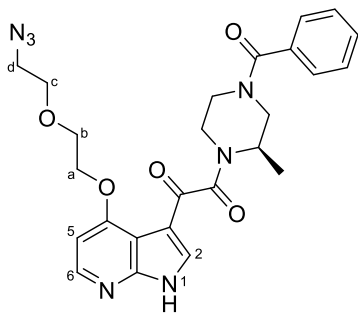
Sodium azide (339 mg, 5.21 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of 2-(2-chloroethoxy)ethanol (0.50 mL, 4.7 mmol) in DMF (47 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H_2O (150 mL) and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layers were collected, washed with H_2O (3 x 40 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 578 mg (4.41 mmol, 93%) of azide **19**.



Colorless oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.36. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.58 – 3.46 (m, 6H), 3.43 – 3.39 (m, 2H), 3.26 – 3.21 (m, 2H, H_2). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 72.1 (CH₂), 72.0 (CH₂), 69.3 (CH₂), 60.9 (CH₂), 50.2 (CH₂, C_2).

(*R*)-1-(4-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (**20**)

Azide **19** (282 mg, 2.15 mmol, 10 equiv) was added to a suspension of sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 86 mg, 2.2 mmol, 10 equiv) in diethylene glycol dimethyl ether (diglyme) (5 mL) under a dry Ar atmosphere. The mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, a solution of compound **18** (94 mg, 0.22 mmol) in diglyme (5 mL) was added. The reaction mixture was heated at 70 °C and stirred overnight. The reaction was quenched by careful addition of MeOH (1.0 mL) and the solvent was removed under reduced pressure to give a brown solid. PCl_3 (0.32 mL, 3.6 mmol, 10 equiv) was added to a suspension of this brown solid in EtOAc (10 mL) under a dry Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then cooled at 0 °C and neutralized to pH 6 by adding a 2 M NaOH solution and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) to give 46 mg (91 μmol , 42%) of desired compound **20**.

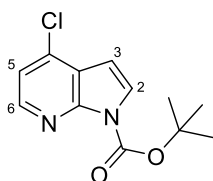


Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.41. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.39 (d, $J = 5.1$, 1H, H_6), 8.02 (s, 1H, H_2), 7.53 – 7.46 (m, 5H, H_{Ph}), 7.22 (d, $J = 5.1$, 1H, H_5), 4.88 – 3.21 (br m, 7H, H_{pip}), 4.23 – 4.19 (m, 2H, H_a), 4.02 – 3.97 (m, 2H, H_b), 3.80 – 3.72 (m, 4H, $\text{H}_c + \text{H}_d$), 1.31 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 184.9 (CO), 171.2 (NCO), 168.2 (NCO), 145.1 (C_q), 143.1 (C_q), 142.5 (CH, C_6), 141.2 (C_q), 138.0 (CH, C_2), 134.6 (C_q), 131.0 (CH, C_{Ph}), 129.3 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 115.8 (CH, C_5), 113.3 (C_q), 69.5 (CH_2 , C_c), 68.6 (CH_2 , C_b), 65.1 (CH_2 , C_a), 50.2 (C_{pip}), 44.8 (CH_2 , C_d), 43.3 (C_{pip}), 42.6 (C_{pip}), 15.2 (CH_3 , Me_{pip}), 13.9 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_5^+$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 506.2146, found: 506.2149.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

***tert*-Butyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-1-carboxylate (**23**)**

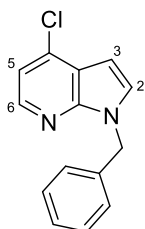
Di-*tert*-butyl dicarbonate (113 μL , 0.492 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous 1,4-dioxane (0.5 mL) followed by 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, 4.0 mg, 33 μmol , 0.1 equiv) in anhydrous 1,4-dioxane (0.5 mL) were added to a solution of 4-chloro-7-azaindole (50 mg, 0.33 mmol) in anhydrous 1,4-dioxane (0.5 mL) under a dry Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was quenched by careful addition of MeOH (0.5 mL) and the solvent was removed under reduced pressure to give 77 mg (0.30 mmol, 92%) of compound **23**, which was used in the next step without further purification.



Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.75. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.23 (d, $J = 5.5$, 1H, H_6), 7.18 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 7.01 (d, $J = 5.6$, 1H, H_5), 6.54 (d, $J = 3.5$, 1H, H_3), 1.62 (s, 9H, $\text{H}_{t\text{Bu}}$). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 151.6 (CO), 159.0 (C_q), 149.7 (C_q), 145.0 (CH, C_6), 125.7 (CH, C_2), 110.8 (C_q), 98.7 (CH, C_5), 97.5 (CH, C_3), 84.8 (C_q), 28.0 (CH_3 , ^tBu).

***tert*-1-Benzyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (**26**)¹¹⁰**

Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 29 mg, 0.72 mmol, 1.1 equiv) followed by benzyl bromide (86 μL , 0.72 mmol, 1.1 equiv) were added to a solution of 4-chloro-7-azaindole (100 mg, 0.655 mmol) in anhydrous DMF (6.5 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was diluted with H_2O (60 mL) and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic layers were collected, washed with H_2O (3 x 10 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) to give 144 mg (0.593 mmol, 90%) of compound **26**.

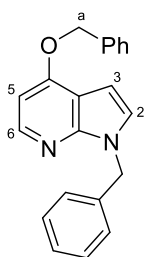


Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.74. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.24 (d, $J = 5.3$, 1H, H_6), 7.34 – 7.25 (m, 3H, $\text{H}_2+\text{H}_{\text{Ph}}$), 7.23 – 7.17 (m, 3H, H_{Ph}), 7.12 (d, $J = 5.2$, 1H, H_5), 6.59 (d, $J = 3.6$, 1H, H_3), 5.50 (s, 2H, CH_2Ph). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.0 (C_q), 149.7 (C_q), 145.0 (CH, C_6), 134.6 (C_q), 131.0 (CH, C_{Ph}), 129.3 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 125.7 (CH, C_2), 110.8 (C_q), 98.7 (CH, C_5), 97.5 (CH, C_3), 47.7 (CH_2 , NCH_2).

General procedure for the obtention of 27, 28, 29 and 30.

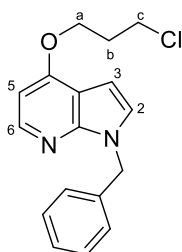
Comercially available primary alcohol (1.5 equiv) was added to a mixture of compound **26**, *RockPhos Pd G3* (2 mol%) and Cs_2CO_3 (2.0 equiv) in anhydrous toluene (0.5 M) under a dry Ar atmosphere. The reaction mixture was heated at 90 °C and stirred overnight (in a mw oven). The mixture was filtered on celite® and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) to give the desired compound.

1-Benzyl-4-(benzyloxy)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (27)

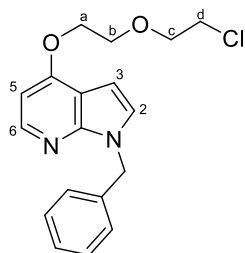


Yield: 81% (21 mg, 67 μmol). Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.52. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.22 (d, $J = 5.6$, 1H, H_6), 7.51 – 7.46 (m, 2H, H_{Ph}), 7.44 – 7.34 (m, 3H, H_{Ph}), 7.31 – 7.24 (m, 3H, H_{Ph}), 7.23 – 7.17 (m, 2H, H_{Ph}), 7.04 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.62 (d, $J = 3.4$, 1H, H_3), 6.61 (d, $J = 5.4$, 1H, H_5), 5.49 (s, 2H, CH_2), 5.29 (s, 2H, CH_2). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 158.8 (C_q), 150.3 (C_q), 145.3 (CH, C_6), 134.5 (C_q), 132.2 (C_q), 131.0 (CH, C_{Ph}), 129.3 (CH, C_{Ph}), 129.1 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 128.7 (CH, C_{Ph}), 125.7 (CH, C_2), 110.8 (C_q), 98.7 (CH, C_5), 97.5 (CH, C_3), 64.6 (CH_2 , C_a), 47.7 (CH_2 , NCH_2). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 315.1492, found: 315.1493.

1-Benzyl-4-(3-chloropropoxy)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (28)

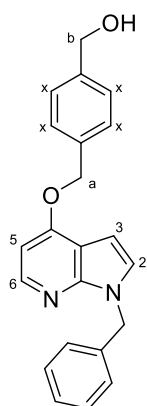


Yield: 89% (22 mg, 73 μmol). Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.59. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.23 (d, $J = 5.5$, 1H, H_6), 7.33 – 7.23 (m, 3H, H_{Ph}), 7.21 – 7.16 (m, 2H, H_{Ph}), 7.04 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.56 (d, $J = 5.7$, 1H, H_5), 6.48 (d, $J = 3.7$, 1H, H_3), 5.48 (s, 2H, CH_2), 4.35 (t, $J = 5.9$, 2H, H_a), 3.80 (t, $J = 6.3$, 2H, H_c), 2.34 (p, $J = 6.1$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.1 (C_q), 149.9 (C_q), 145.2 (CH, C_6), 134.3 (C_q), 131.1 (CH, C_{Ph}), 129.1 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 125.6 (CH, C_2), 110.7 (C_q), 98.6 (CH, C_5), 97.1 (CH, C_3), 64.5 (CH_2 , C_a), 47.8 (CH_2 , NCH_2), 41.4 (CH_2 , C_c), 32.0 (CH_2 , C_b). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 301.1102, found: 301.1105.

1-Benzyl-4-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (29)

Yield: 84% (23 mg, 70 μmol). Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.46. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.22 (d, $J = 5.5$, 1H, H_6), 7.35 – 7.23 (m, 3H, H_{Ph}), 7.21 – 7.14 (m, 2H, H_{Ph}), 7.03 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.58 (d, $J = 3.5$, 1H, H_3), 6.54 (d, $J = 5.5$, 1H, H_5), 5.48 (s, 2H, CH_2), 4.37 (t, $J = 4.7$, 2H, H_a), 3.98 (t, $J = 4.7$, 2H, H_b), 3.88 (t, $J = 5.9$, 2H, H_c), 3.67 (t, $J = 5.9$, 2H, H_d). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_2^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 331.1208,

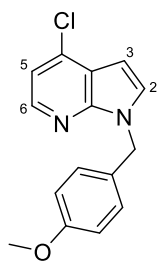
found: 331.1221.

(4-(((1-Benzyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)oxy)methyl)phenyl)methanol (30)

Yield: 93% (26 mg, 77 μmol). Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.48. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.20 (d, $J = 5.5$, 1H, H_6), 7.48 (d, $J = 8.1$, 2H, H_x), 7.41 (d, $J = 8.0$, 2H, H_x), 7.33 – 7.24 (m, 3H, H_{Ph}), 7.21 – 7.16 (m, 2H, H_{Ph}), 7.04 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.61 (d, $J = 3.6$, 1H, H_3), 6.59 (d, $J = 5.6$, 1H, H_5), 5.48 (s, 2H, CH_2), 5.29 (s, 2H, CH_2), 4.72 (s, 2H, CH_2). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 345.1598, found: 345.1605.

4-Chloro-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (31)¹¹¹

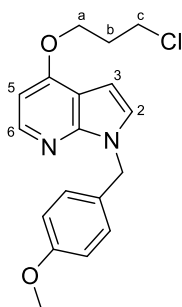
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 58 mg, 1.4 mmol, 1.1 equiv) followed by 4-methoxybenzyl chloride (PMBCl, 146 μL , 1.44 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of 4-chloro-7-azaindole (200 mg, 1.31 mmol) in anhydrous DMF (13 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H_2O (130 mL) and extracted with Et_2O (3 x 50 mL). The organic layers were collected, washed with H_2O (3 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) to give 351 mg (1.29 mmol, 98%) of compound **31**.



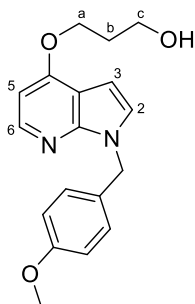
Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.70. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.23 (d, $J = 5.2$, 1H, H_6), 7.19 (d, $J = 3.7$, 1H, H_2), 7.17 (d, $J = 8.8$, 2H, H_{Ph}), 7.10 (d, $J = 5.2$, 1H, H_5), 6.84 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ph}), 6.56 (d, $J = 3.5$, 1H, H_3), 5.40 (s, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 158.8 (C_q), 150.0 (C_q), 149.6 (C_q), 145.2 (CH, C_6), 129.9 (C_q), 129.1 (CH, C_{Ph}), 126.2 (CH, C_2), 114.5 (CH, C_{Ph}), 110.8 (C_q), 98.9 (CH, C_5), 97.6 (CH, C_3), 55.5 (CH_3 , Me), 47.7 (CH_2 , NCH_2).

4-(3-Chloropropoxy)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (32)

3-Chloroethanol (18 μ L, 0.28 mmol, 1.5 equiv) was added to a mixture of compound **31** (50 mg, 0.18 mmol), *RockPhos Pd G3* (3.0 mg, 3.7 μ mol, 0.02 equiv) and Cs_2CO_3 (120 mg, 0.367 mmol, 2.0 equiv) in anhydrous toluene (0.5 mL) under a dry Ar atmosphere. The reaction mixture was heated at 90 °C and stirred overnight (in a mw oven). The mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) to give 47 mg (0.14 mmol, 77%) of compound **32** and 10 mg (0.032 mmol) of byproduct **33**.



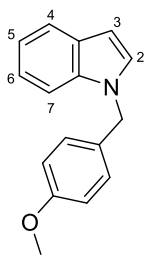
32. Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.60. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.23 (d, $J = 5.5$, 1H, H_6), 7.16 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ph}), 7.01 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.82 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ph}), 6.55 (d, $J = 5.6$, 1H, H_5), 6.53 (d, $J = 3.5$, 1H, H_3), 5.40 (s, 2H, NCH_2), 4.33 (t, $J = 5.9$, 2H, H_a), 3.79 (t, $J = 6.3$, 2H, H_c), 3.76 (s, 3H, Me), 2.33 (p, $J = 6.1$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.0 (C_q), 149.7 (C_q), 149.7 (C_q), 145.0 (CH, C_6), 130.0 (C_q), 129.0 (CH, C_{Ph}), 125.7 (CH, C_2), 114.2 (CH, C_{Ph}), 110.8 (C_q), 98.7 (CH, C_5), 97.5 (CH, C_3), 64.6 (CH_2 , C_a), 55.4 (CH₃, Me), 47.7 (CH_2 , NCH_2), 41.5 (CH_2 , C_c), 32.2 (CH_2 , C_b). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_2^+$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 331.1208, found: 331.1213.



33. Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.24. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.22 (d, $J = 5.5$, 1H, H_6), 7.15 (d, $J = 8.6$, 2H, H_{Ph}), 7.00 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.82 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ph}), 6.55 (d, $J = 5.6$, 1H, H_5), 6.52 (d, $J = 3.5$, 1H, H_3), 5.40 (s, 2H, NCH_2), 4.34 (t, $J = 6.0$, 2H, H_a), 3.91 (t, $J = 5.9$, 2H, H_c), 3.77 (s, 3H, Me), 2.14 (p, $J = 6.0$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.2 (C_q), 159.1 (C_q), 149.7 (C_q), 145.0 (CH, C_6), 130.1 (C_q), 129.0 (CH, C_{Ph}), 125.6 (CH, C_2), 114.2 (CH, C_{Ph}), 110.8 (C_q), 98.7 (CH, C_5), 97.5 (CH, C_3), 65.8 (CH_2 , C_a), 60.3 (CH_2 , C_c), 55.4 (CH₃, Me), 47.7 (CH_2 , NCH_2), 32.1 (CH_2 , C_b). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 313.1547, found: 313.1549.

1-(4-methoxybenzyl)-1H-indole (38)¹¹²

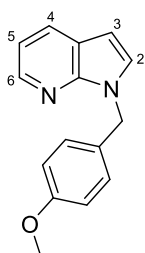
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 38 mg, 0.94 mmol, 1.1 equiv) followed by 4-methoxybenzyl chloride (PMBCl, 95 μ L, 0.94 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of indole (100 mg, 0.854 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H_2O (80 mL) and extracted with Et_2O (3 x 30 mL). The organic layers were collected, washed with H_2O (3 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) to give 192 mg (0.809 mmol, 95%) of protected compound **38**.



Yellowish oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) 0.86. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.68 (d, $J = 3.3$, 1H, H₂), 7.33 (d, $J = 8.2$, 1H), 7.23 – 7.18 (m, 1H), 7.17 – 7.12 (m, 2H), 7.09 (d, $J = 8.6$, 2H, H_{Ph}), 6.85 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ph}), 6.57 (d, $J = 3.2$, 1H, H₃), 5.27 (s, 2H, NCH₂), 3.79 (s, 3H, Me).

1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (39)¹¹³

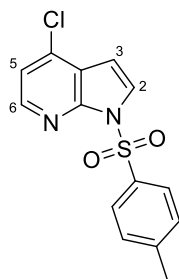
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 37 mg, 0.93 mmol, 1.1 equiv) followed by 4-methoxybenzyl chloride (PMBCl, 94 μL , 0.93 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of 7-azaindole (100 mg, 0.846 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (80 mL) and extracted with Et₂O (3 x 30 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) to give 186 mg (0.781 mmol, 92%) of protected compound **39**.



Yellowish oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) 0.59. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.36 (d, $J = 4.7$, 1H, H₄), 7.92 (d, $J = 7.8$, 1H, H₆), 7.18 (d, $J = 8.5$, 2H, H_{Ph}), 7.16 (d, $J = 3.6$, 1H, H₂), 7.07 (dd, $J = 7.8$, 4.7, 1H, H₅), 6.84 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ph}), 6.46 (d, $J = 3.5$, 1H, H₃), 5.44 (s, 2H, NCH₂), 3.77 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 159.2 (C_q), 147.7 (C_q), 143.1 (CH, C₄), 130.0 (C_q), 129.1 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C₆), 127.9 (CH, C₂), 120.7 (C_q), 115.9 (CH, C₅), 114.2 (CH, C_{Ph}), 100.1 (CH, C₃), 55.4 (CH₃, Me), 47.4 (CH₂, NCH₂).

4-Chloro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (40)¹¹⁴

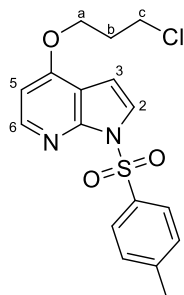
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 79 mg, 2.0 mmol, 1.5 equiv) followed by *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl, 382 mg, 1.97 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of 4-chloro-7-azaindole (200 mg, 1.31 mmol) in anhydrous THF (13 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with NaHCO₃ (40 mL) and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to give 375 mg (1.22 mmol, 93%) of protected compound **40**.



Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.59. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.23 (d, $J = 5.3$, 1H, H_6), 7.98 (d, $J = 8.5$, 2H, H_{Tol}), 7.69 (d, $J = 4.1$, 1H, H_2), 7.20 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Tol}), 7.11 (d, $J = 5.3$, 1H, H_5), 6.61 (d, $J = 4.1$, 1H, H_3), 2.29 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 147.6 (C_q), 145.6 (C_q), 145.4 (CH, C_6), 136.8 (C_q), 135.2 (C_q), 129.8 (CH, C_{Tol}), 128.3 (CH, C_{Tol}), 127.0 (CH, C_2), 122.3 (C_q), 119.1 (CH, C_5), 103.4 (CH, C_3), 21.8 (CH_3 , Me).

4-(3-Chloropropoxy)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (41)

3-Chloroethanol (16 μL , 0.24 mmol, 1.5 equiv) was added to a mixture of compound **40** (50 mg, 0.16 mmol), *RockPhos Pd G3* (14 mg, 16 μmol , 0.1 equiv) and Cs_2CO_3 (58 mg, 0.18 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous toluene (0.4 mL) under a dry Ar atmosphere. The reaction mixture was heated at 90 °C and stirred overnight (in a mw oven). The mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH_2Cl_2) to give 50 mg (0.14 mmol, 85%) of compound **41** (Entry 2, **Table 1.1**).

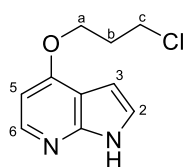


Yellowish oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.30. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.29 (d, $J = 5.6$, 1H, H_6), 8.03 (d, $J = 8.4$, 2H, H_{Tol}), 7.56 (d, $J = 4.0$, 1H, H_2), 7.24 (d, $J = 8.2$, 2H, H_{Tol}), 6.63 (d, $J = 4.0$, 1H, H_3), 6.62 (d, $J = 5.7$, 1H, H_5), 4.26 (t, $J = 5.9$, 2H, H_a), 3.73 (t, $J = 6.2$, 2H, H_c), 2.34 (s, 3H, Me), 2.28 (p, $J = 6.0$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.0 (C_q), 149.0 (C_q), 147.1 (CH, C_6), 145.2 (C_q), 135.6 (C_q), 129.7 (CH, C_{Tol}), 128.1 (CH, C_{Tol}), 124.3 (CH, C_2), 113.1 (C_q), 102.6 (CH, C_3), 101.6 (CH, C_5), 64.8 (CH_2 , C_a), 41.2 (CH_2 , C_c), 31.9 (CH_2 , C_b), 21.7 (CH_3 ,

Me).

4-(3-Chloropropoxy)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (42)

MeOH (26 mL, 1.1 mol, excess) was added to a mixture of compound **41** (245 mg, 0.672 mmol) and Cs_2CO_3 (1.09 g, 3.36 mmol, 5.0 equiv) in THF (40 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with saturated aqueous NH_4Cl solution (60 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 138 mg (0.655 mmol, 97%) of deprotected compound **42**.

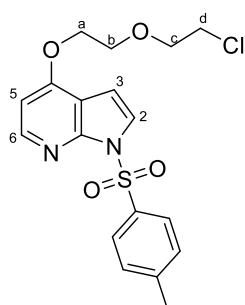


Yellowish oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) 0.21. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.53 (br s, 1H, NH), 8.16 (d, $J = 5.6$, 1H, H_6), 7.19 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.55 (d, $J = 5.5$, 1H, H_5), 6.54 (d, $J = 3.6$, 1H, H_3), 4.35 (t, $J = 5.9$, 2H, H_a), 3.80 (t, $J = 6.2$, 2H, H_c), 2.34 (p, $J = 6.1$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.3

(C_q), 150.3 (C_q), 144.6 (CH, C₆), 122.9 (CH, C₂), 110.7 (C_q), 98.6 (CH, C₃), 98.2 (CH, C₅), 64.7 (CH₂, C_a), 41.5 (CH₂, C_c), 32.2 (CH₂, C_b).

4-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (43)

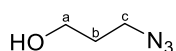
2-(2-Chloroethoxy)ethanol (158 μ L, 1.50 mmol, 1.5 equiv) was added to a mixture of compound **40** (306 mg, 0.998 mmol), *RockPhos Pd G3* (17 mg, 20 μ mol, 0.02 equiv) and Cs₂CO₃ (357 mg, 1.10 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous toluene (2 mL) under a dry Ar atmosphere. The reaction mixture was heated at 90 °C and stirred overnight (in a mw oven). The mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to give 208 mg (0.527 mmol, 53%) of compound **43**.



Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.36. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.27 (d, J = 5.7, 1H, H₆), 8.02 (d, J = 8.4, 2H, H_{Tol}), 7.55 (d, J = 4.0, 1H, H₂), 7.23 (d, J = 8.6, 2H, H_{Tol}), 6.66 (d, J = 4.0, 1H, H₃), 6.60 (d, J = 5.7, 1H, H₅), 4.26 (m, 2H, H_a), 3.91 (m, 2H, H_b), 3.81 (t, J = 5.7, 2H, H_c), 3.62 (t, J = 5.8, 2H, H_d), 2.33 (s, 3H, Me). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 158.9 (C_q), 148.9 (C_q), 146.9 (CH, C₆), 145.0 (C_q), 135.4 (C_q), 129.6 (CH, C_{Tol}), 127.9 (CH, C_{Tol}), 124.2 (CH, C₂), 113.1 (C_q), 102.8 (CH, C₃), 101.6 (CH, C₅), 71.6 (CH₂, C_c), 69.3 (CH₂, C_b), 67.8 (CH₂, C_a), 42.7 (CH₂, C_d), 21.6 (CH₃, Me).

3-Azidopropan-1-ol (44)¹¹⁵

Sodium azide (5.06 g, 77.8 mmol, 1.3 equiv) was added to a solution of 3-chloro-1-propanol (5.0 mL, 60 mmol) in H₂O (14 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated at 80 °C and stirred for 24 h. After cooling, the reaction mixture was diluted with brine (20 mL) and extracted with EtOAc (3 x 25 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 5.49 g (54.3 mmol, 91%) of azide **44**.

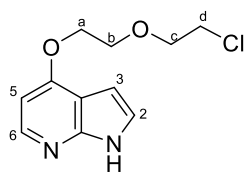


Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.36. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.66 (t, J = 6.1, 2H, H_a), 3.37 (t, J = 6.1, 2H, H_c), 2.88 (br s, 1H, OH), 1.76 (p, J = 6.1, 2H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 59.5 (CH₂, C_a), 48.3 (CH₂, C_c), 31.4 (CH₂, C_b). **FTIR** 3331, 2944, 2880, 2088.

4-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (46)

MeOH (15 mL, 0.63 mol, excess) was added to a mixture of compound **43** (150 mg, 0.380 mmol) and Cs₂CO₃ (619 mg, 1.90 mmol, 5.0 equiv) in THF (25 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with saturated aqueous NH₄Cl solution (40 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The organic layers were collected,

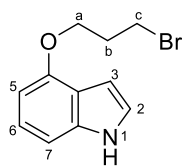
dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 78 mg (0.32 mmol, 85%) of compound **46**.



Yellowish oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.23. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.12 (d, $J = 5.6$, 1H, H_6), 7.17 (d, $J = 3.5$, 1H, H_2), 6.56 (d, $J = 3.5$, 1H, H_3), 6.52 (d, $J = 5.6$, 1H, H_5), 4.37 – 4.28 (m, 2H, H_a), 3.99 – 3.93 (m, 2H, H_b), 3.86 (t, $J = 5.8$, 2H, H_c), 3.65 (t, $J = 5.8$, 2H, H_d). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 159.3 (C_q), 150.2 (C_q), 144.4 (CH, C_6), 122.9 (CH, C_2), 110.8 (C_q), 98.7 (CH, C_3), 98.3 (CH, C_5), 71.8 (CH_2 , C_c), 69.6 (CH_2 , C_b), 67.8 (CH_2 , C_a), 42.9 (CH_2 , C_d).

4-(3-Bromopropoxy)-1H-indole (**49**)

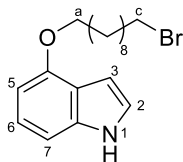
1,3-Dibromopropane (1.93 mL, 18.8 mmol, 5.0 equiv) and K_2CO_3 (2.60 g, 18.8 mmol, 5.0 equiv) were added to a solution of 4-hydroxy-1H-indole (500 mg, 3.76 mmol) in acetone (10.5 mL). The reaction mixture was refluxed for 48 h. After cooling, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (50 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (30 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH_2Cl_2) to furnish 938 mg (3.69 mmol, 98%) of bromide **49**.



Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.66. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.08 (br s, 1H, NH), 7.16 (t, $J = 8.0$, 1H, H_6), 7.11 – 7.08 (m, 1H, H_2), 7.03 (d, $J = 8.2$, 1H, H_5), 6.72 – 6.68 (m, 1H, H_3), 6.59 (d, $J = 7.8$, 1H, H_7), 4.29 (t, $J = 5.8$, 2H, H_a), 3.70 (t, $J = 6.5$, 2H, H_c), 2.43 (p, $J = 6.3$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 152.4 (C_q), 137.4 (C_q), 122.8 (CH), 122.8 (CH), 118.8 (C_q), 104.8 (CH, C_5), 100.8 (CH, C_7), 99.8 (CH, C_3), 65.5 (CH_2 , C_a), 32.7 (CH_2 , C_b), 30.4 (CH_2 , C_c).

4-((10-Bromodecyl)oxy)-1H-indole

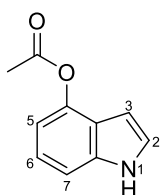
1,10-Dibromodecane (5.63 g, 18.8 mmol, 5.0 equiv) and K_2CO_3 (2.60 g, 18.8 mmol, 5.0 equiv) were added to a solution of 4-hydroxy-1H-indole (500 mg, 3.76 mmol) in acetone (10.5 mL). The reaction mixture was refluxed for 48 h. After cooling, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (50 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (30 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH_2Cl_2) to furnish 1.28 g (3.63 mmol, 95%) of bromide.



Colorless oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.77. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.27 (br s, 1H, NH), 7.15 – 7.07 (m, 2H, H_6 , H_2), 7.01 (d, $J = 8.1$, 1H, H_5), 6.71 – 6.66 (m, 1H, H_3), 6.53 (d, $J = 7.7$, 1H, H_7), 4.13 (t, $J = 6.5$, 2H, H_a), 3.41 (t, $J = 6.9$, 2H, H_c), 1.94 – 1.81 (m, 4H), 1.60 – 1.28 (m, 12H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 153.1 (C_q), 137.4 (C_q), 122.9 (CH), 122.6 (CH), 119.0 (C_q), 104.3 (CH, C_5), 100.7 (CH, C_7), 100.2 (CH, C_3), 68.1 (CH_2 , C_a), 34.2 (CH_2 , C_c), 33.0 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.3 (CH_2).

1*H*-Indol-4-yl acetate (**51**)

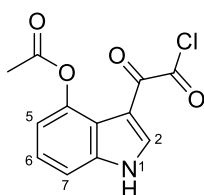
Pyridine (390 μL , 4.88 mmol, 1.3 equiv) and acetic anhydride (0.53 mL, 5.7 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of 4-hydroxy-1*H*-indole (500 mg, 3.76 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (7.5 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction was stirred for 4 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was diluted with H_2O (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (30 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) to give 616 mg (3.52 mmol, 98%) of protected alcohol **51**.



White solid. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.74. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.27 (br s, 1H, NH), 7.27 (d, $J = 7.7$, 1H, H_5), 7.15 (t, $J = 7.9$, 1H, H_6), 7.13 – 7.10 (m, 1H, H_2), 6.87 (d, $J = 7.5$, 1H, H_7), 6.44 – 6.41 (m, 1H, H_3), 2.40 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 169.6 (CO), 143.7 (C_q), 137.8 (C_q), 124.6 (CH, C_2), 122.2 (CH, C_6), 121.3 (C_q), 111.9 (CH, C_7), 109.3 (CH, C_5), 99.3 (CH, C_3), 21.2 (Me).

3-(2-Chloro-2-oxoacetyl)-1*H*-indol-4-yl acetate (**52**)

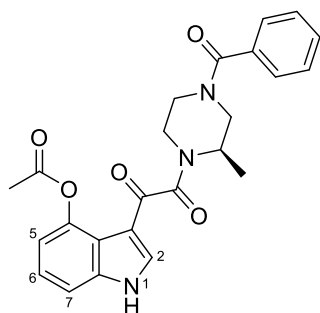
Oxalyl chloride (410 μL , 4.73 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of compound **51** (690 mg, 3.94 mmol) in anhydrous Et_2O (9.3 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction was stirred overnight at -20 $^\circ\text{C}$ until TLC showed the absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 1.02 g (3.85 mmol, 98%) of acid chloride **52**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 12.63 (br s, 1H, NH), 8.34 (d, $J = 3.4$, 1H, H_2), 7.45 (d, $J = 7.5$, 1H, H_5), 7.29 (t, $J = 7.9$, 1H, H_6), 6.91 (d, $J = 7.7$, 1H, H_7), 2.35 (s, 3H, COMe). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 100.6 MHz): δ 180.7 (CO), 169.4 (CO), 166.3 (COCl), 144.1 (C_q), 139.6 (C_q), 139.2 (CH, C_2), 124.3 (CH, C_6), 118.5 (C_q), 115.9 (CH, C_7), 111.9 (C_q), 110.7 (CH, C_5), 21.3 (COMe).

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1H-indol-4-yl acetate (53)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 1.3 mL, 7.7 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **52** (1.02 g, 3.85 mmol) and piperazine **5** (863 mg, 4.22 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (38 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 1.64 g (3.78 mmol, 99%) of compound **53**.

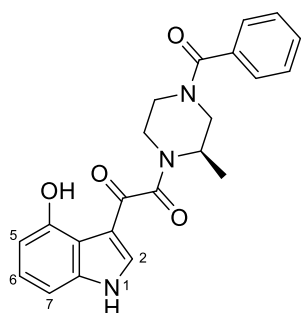


Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.33. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.92 (br s, 1H, NH), 7.52 (br s, 1H, H₂), 7.47 – 7.29 (m, 5H, H_{Ph}), 7.14 – 7.09 (m, 1H, H₆), 6.99 (d, *J* = 7.6, 1H), 6.88 (d, *J* = 6.2, 1H), 4.97 – 2.81 (br m, 7H, H_{pip}), 2.45 (s, 3H, COMe), 1.23 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 184.9 (CO), 171.0 (CO), 170.8 (CO), 167.1 (CO), 144.2 (C_q), 139.3 (C_q), 138.2 (CH, C₂), 134.9 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C_{Ph}), 124.8 (CH, C₆), 118.2 (C_q), 116.0 (CH), 113.4 (C_q), 110.9 (CH), 49.9 (C_{pip}), 41.8 (C_{pip}), 41.0 (C_{pip}), 35.6 (C_{pip}), 21.6 (COMe), 15.1 (CH₃, Me_{pip}), 14.2 (CH₃, Me_{pip}).

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (54)

Sodium methoxide (663 mg, 12.3 mmol, 2.5 equiv) was added to a solution of acetate **53** (2.13 g, 4.91 mmol) in methanol (50 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with H₂O (50 mL) and saturated aqueous NaCl (50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 1.90 g (4.85 mmol, 97%) of alcohol **54**.

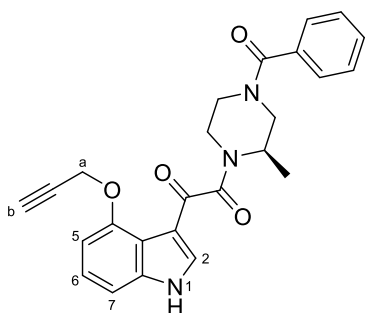


Yellowish solid. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.33. **¹H NMR** (CD₃OD, 400 MHz): δ 8.57 (s, 1H), 8.00 (s, 0.5H), 7.95 (s, 0.5H), 7.51 – 7.30 (m, 5H, H_{Ph}), 7.08 – 6.93 (m, 2H), 6.50 (br s, 1H), 4.82 – 2.95 (br m, 7H, H_{pip}), 1.25 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CD₃OD, 100.6 MHz): δ 182.1 (CO), 170.5 (NCO), 169.2 (NCO), 152.2 (C_q), 149.6 (C_q), 148.6 (CH), 136.2 (C_q), 131.2 (CH, C_{Ph}), 129.8 (CH, C_{Ph}), 128.1 (CH, C_{Ph}), 125.9 (CH), 117.7 (C_q), 115.5 (C_q), 108.7 (CH), 108.0 (CH), 51.5 (C_{pip}), 46.1 (C_{pip}), 41.6 (C_{pip}), 35.8 (C_{pip}), 15.3 (CH₃, Me_{pip}), 14.2 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₂₂H₂₂N₃O₄⁺ (M+H)⁺: 392.1605, found: 392.1609.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (55)

A solution of propargyl bromide (80% in toluene, 32 μL , 0.28 mmol, 1.1 equiv) and Cs_2CO_3 (92 mg, 0.28 mmol, 1.1 equiv) were added to a solution of compound **54** (100 mg, 255 μmol) in acetone (1.3 mL). After stirring for 2 h, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (10 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (10 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH_2Cl_2) to give 76 mg (0.18 mmol, 82%) of compound **55**.

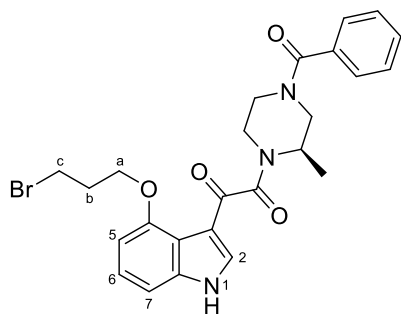


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.82. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.57 (br s, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 3.6$, 1H, H_2), 7.48 – 7.34 (m, 5H, H_{Ph}), 7.27 (t, $J = 7.7$, 1H, H_6), 6.89 (d, $J = 8.2$, 1H), 6.79 (d, $J = 7.2$, 1H), 4.85 (d, $J = 2.3$, 2H, H_a), 4.75 – 2.90 (br m, 7H, H_{pip}), 2.57 (t, $J = 2.1$, 1H, H_b), 1.30 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 186.6 (CO), 171.4 (NCO), 165.2 (NCO), 152.3 (C_q), 138.9 (C_q), 138.6 (CH, C_2), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.3 (CH, C_6), 127.1 (CH, C_{Ph}), 115.4 (C_q), 114.9 (C_q), 109.6 (CH), 101.5 (CH), 76.4 ($\text{C}\equiv\text{H}$), 50.3 (C_{pip}), 46.5 (C_{pip}), 41.3 (C_{pip}), 37.4 (CH_2 , C_a), 36.4 (C_{pip}), 16.5 (CH_3 , Me_{pip}), 15.1 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 430.1761, found: 430.1774.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-(3-bromopropoxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (56)

1,3-Dibromopropane (262 μL , 2.56 mmol, 5.0 equiv) and K_2CO_3 (357 mg, 2.56 mmol, 5.0 equiv) were added to a solution of compound **54** (200 mg, 0.511 mmol) in acetone (2 mL). The reaction mixture was refluxed for 48 h. After cooling, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (25 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (20 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH_2Cl_2) to furnish 165 mg (0.322 mmol, 87%) of compound **56**.

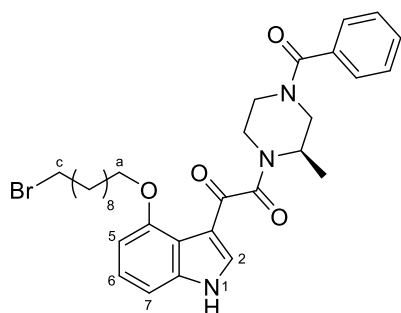


Colorless oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.74. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.57 (br s, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 3.1$, 1H, H₂), 7.50 – 7.30 (m, 5H, H_{Ph}), 7.23 (t, $J = 8.0$, 1H, H₆), 6.85 (d, $J = 8.2$, 1H), 6.75 (br d, $J = 7.8$, 1H), 5.09 – 2.80 (br m, 7H, H_{pip}), 4.32 (t, $J = 6.6$, 2H, H_a), 3.30 (t, $J = 6.0$, 2H, H_c), 2.37 (p, $J = 6.3$, 2H, H_b), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 186.4 (CO), 171.4 (NCO), 165.2 (NCO), 152.4 (C_q), 139.7 (CH, C₂), 139.1 (C_q), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.2 (CH, C₆), 127.1 (CH, C_{Ph}), 115.4 (C_q), 114.5 (C_q), 109.3 (CH, C₇), 101.5 (CH, C₅), 50.2 (C_{pip}), 45.7 (CH₂, C_a), 42.3 (C_{pip}), 41.1 (C_{pip}), 36.2 (C_{pip}), 31.4 (CH₂, C_c), 29.7 (CH₂, C_b), 15.2 (CH₃, Me_{pip}), 14.0 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₂₅H₂₇BrN₃O₄⁺ (M+H)⁺: 512.1179 and 514.1159, found: 512.1229 and 514.1185.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(*R*)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-((10-bromodecyl)oxy)-1*H*-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (**57**)

1,10-Dibromodecane (3.64 g, 12.1 mmol, 5.0 equiv) and K₂CO₃ (1.68 g, 12.1 mmol, 5.0 equiv) were added to a solution of compound **54** (950 mg, 2.43 mmol) in acetone (7 mL). The reaction mixture was refluxed for 48 h. After cooling, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H₂O (70 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to furnish 1.01 g (1.65 mmol, 78%) of bromide **57**.

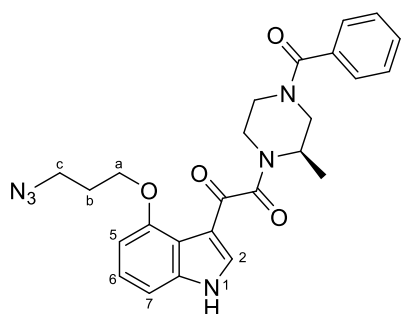


Colorless oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.65. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.64 (br s, 1H, NH), 7.79 (br s, 1H, H₂), 7.48 – 7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 7.28 – 7.20 (m, 1H, H₆), 6.83 (d, $J = 8.2$, 1H), 6.77 (d, $J = 7.8$, 1H), 5.01 – 2.86 (br m, 7H, H_{pip}), 4.09 (t, $J = 7.2$, 2H, H_a), 3.40 (t, $J = 6.8$, 2H, H_c), 1.92 – 1.79 (m, 4H), 1.48 – 1.17 (m, 15H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 186.1 (CO), 171.5 (NCO), 165.5 (NCO), 152.4 (C_q), 139.4 (CH, C₂), 135.1 (C_q), 135.1 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.2 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C₆), 115.5 (C_q), 114.4 (C_q), 109.2 (CH), 101.7 (CH), 50.2 (C_{pip}), 48.1 (CH₂, C_a), 41.3 (C_{pip}), 36.7 (C_{pip}), 34.2 (CH₂, C_c), 32.9 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 26.9 (CH₂), 15.9 (CH₃, Me_{pip}), 13.9 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₃₂H₄₁BrN₃O₄⁺ (M+H)⁺: 610.2275 and 612.2254, found: 610.2321 and 612.2297.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-(3-Azidopropoxy)-1H-indol-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (58)⁴⁷

Sodium azide (102 mg, 1.57 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of bromide **56** (669 mg, 1.31 mmol) in DMF (13 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (130 mL) and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 40 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 580 mg (1.22 mmol, 99%) of azide **58**.

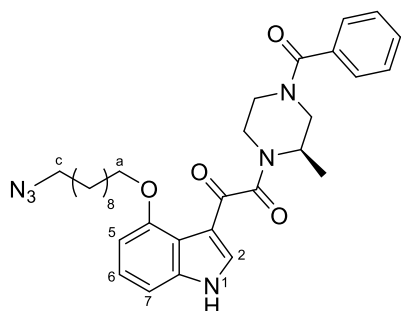


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.63. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.59 (br s, 1H, NH), 7.82 (d, *J* = 4.1, 1H, H₂), 7.48 – 7.36 (m, 5H, H_{Ph}), 7.25 (t, *J* = 8.1, 1H, H₆), 6.84 (d, *J* = 8.2, 1H), 6.78 (br d, *J* = 7.9, 1H), 4.84 – 2.99 (br m, 7H, H_{pip}), 4.23 (t, *J* = 6.9, 2H, H_a), 3.33 (t, *J* = 6.1, 2H, H_c), 2.1 (p, *J* = 6.6, 2H, H_b), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 186.3 (CO), 171.5 (NCO), 165.3 (NCO), 152.5 (C_q), 139.5 (CH, C₂), 139.2 (C_q), 135.2 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.3 (CH, C₆), 127.1 (CH, C_{Ph}), 115.5 (C_q), 114.7 (C_q), 109.4 (CH), 101.5 (CH), 50.2 (C_{pip}), 48.2 (CH₂, C_a), 44.8 (CH₂, C_c), 42.5 (C_{pip}), 36.5 (C_{pip}), 28.7 (CH₂, C_b), 15.5 (CH₃, Me_{pip}), 14.1 (CH₃, Me_{pip}). **FTIR** 3519, 2928, 2851, 2097, 1628, 1591. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₂₅H₂₇N₆O₄⁺ (M+H)⁺: 475.2088, found: 475.2104.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-((10-Azidodecyl)oxy)-1H-indol-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (59)

Sodium azide (128 mg, 1.97 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of bromide **57** (1.00 g, 1.64 mmol) in DMF (17 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (170 mL) and extracted with Et₂O (3 x 60 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 40 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 921 mg (1.61 mmol, 98%) of azide **59**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.65. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.64 (br s, 1H, NH), 7.78 (br s, 1H, H₂), 7.47 – 7.34 (m, 5H, H_{Ph}), 7.23 (t, *J* = 8.0, 1H, H₆), 6.83 (d, *J* = 8.2, 1H), 6.75 (d, *J* = 7.7, 1H), 4.99 – 2.97 (br m, 7H, H_{pip}), 4.08 (t, *J* = 7.4, 2H, H_a), 3.24 (t, *J* = 6.9, 2H, H_c), 1.92 – 1.77 (m, 2H), 1.66 – 1.51 (m, 2H), 1.40 – 1.16 (m, 15H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 186.1 (CO), 171.4 (NCO), 165.4 (NCO), 152.4 (C_q), 139.4 (CH, C₂), 135.1 (C_q), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.9 (CH, C₆), 115.5 (C_q), 114.3 (C_q), 109.1 (CH), 101.7 (CH), 51.5 (CH₂, C_a), 48.1 (CH₂, C_c), 41.4 (C_{pip}),

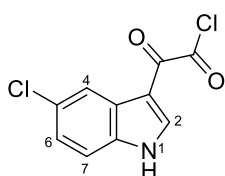
36.2 (C_{pip}), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 26.7 (CH₂), 26.9 (CH₂), 16.5 (CH₃, Me_{pip}), 14.7 (CH₃, Me_{pip}). **FTIR** 3106, 2926, 2856, 2094, 1637, 1592, 1425. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₃₂H₄₁N₆O₄⁺ (M+H)⁺: 573.3184, found: 573.3182.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

6.1.3. Substitutions at C5

2-(5-Chloro-1H-indol-3-yl)2-oxoacetyl chloride (60)

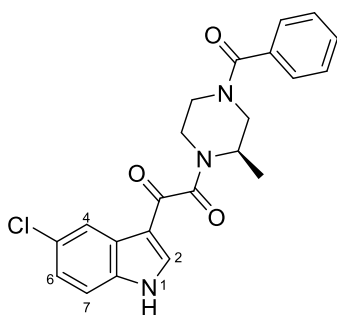
Oxalyl chloride (0.85 mL, 9.6 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of 5-chloroindole (1.22 g, 8.02 mmol) in anhydrous Et₂O (18 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at -20 °C until TLC showed the absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 1.91 g (7.89 mmol, 98%) of acid chloride **60**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.55 (br s, 1H, NH), 8.47 (d, *J* = 3.3, 1H, H₂), 8.12 (d, *J* = 2.2, 1H, H₄), 7.55 (d, *J* = 8.6, 1H, H₇), 7.29 (dd, *J* = 8.6, 2.2, 1H, H₆). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ 180.5 (CO), 164.8 (COCl), 139.1 (CH, C₂), 135.2 (C_q), 127.4 (C_q), 126.8 (C_q), 123.7 (CH, C₆), 120.2 (CH, C₄), 114.4 (CH, C₇), 111.9 (C_q).

(*R*)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(5-chloro-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (61)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 1.7 mL, 9.7 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **60** (1.28 g, 4.87 mmol) and piperazine **5** (1.00 g, 4.92 mmol, 1.05 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (50 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 1.98 g (4.83 mmol, 99%) of compound **61**.

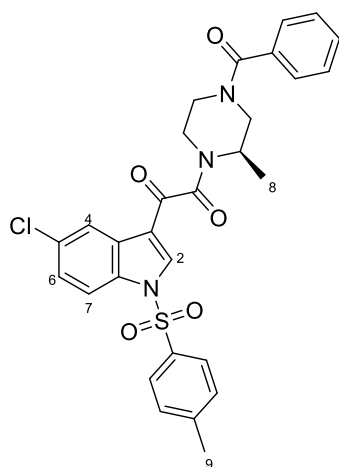


Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.19. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 11.13 (br s, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, H₄), 7.67 (s, 1H, H₂), 7.50 – 7.28 (m, 5H, H_{Ph}), 7.12 – 7.05 (m, 2H, H₆+H₇), 5.02 – 2.83 (br m, 7H, H_{pip}), 1.24 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.1 (CO), 171.8 (NCO), 166.4 (NCO), 136.8 (CH, C₂), 135.3 (C_q), 134.7 (C_q), 130.4 (CH, C_{Ph}), 129.1 (C_q), 128.9 (CH, C_{Ph}), 126.9 (CH, C_{Ph}), 126.2 (C_q), 124.5 (CH), 121.2 (CH, C₄), 113.6 (C_q), 113.4 (CH), 50.0 (C_{pip}), 42.4 (C_{pip}), 40.8 (C_{pip}), 35.9 (C_{pip}), 16.3 (CH₃, Me_{pip}), 14.9 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₂₂H₂₁ClN₃O₃⁺ (M+H)⁺: 410.1266, found: 410.1268.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(5-chloro-1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione
[ref] (62)

Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 10 mg, 0.26 mmol, 1.05 equiv) followed by *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl, 49 mg, 0.26 mmol, 1.05 equiv) was added to a solution of compound **61** (100 mg, 0.244 mmol) in anhydrous DMF (1.0 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 4 h at 70 °C. The mixture was diluted with H₂O (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) to give 103 mg (0.206 mmol, 84%) of protected compound **62**.



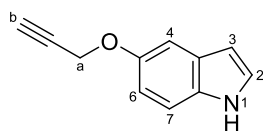
Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) 0.71. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.34 (s, 1H, H₂), 8.02 (d, *J* = 8.3, 2H, H_{Tol}), 7.93 (br s, 1H, H₄), 7.46 – 7.39 (m, 5H, H_{Ph}), 7.23 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.02 – 6.89 m, 2H, H_{6+H7}), 4.94 – 2.89 (br m, 7H, H_{pip}), 2.35 (s, 3H, Me_{Tol}), 1.26 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 184.5 (CO), 171.1 (NCO), 166.7 (NCO), 144.9 (C_q), 137.4 (CH, C₂), 135.6 (C_q), 135.2 (C_q), 134.7 (C_q), 130.1 (CH, C_{Ph}), 129.4 (CH, C_{Tol}), 129.2 (C_q), 129.1 (CH, C_{Ph}), 128.6 (CH, C_{Ph}), 127.6 (CH, C_{Tol}), 127.0 (C_q), 124.7 (CH), 122.0 (CH, C₄), 113.4 (C_q), 112.7 (CH), 49.7 (C_{pip}), 41.4 (C_{pip}), 39.1 (C_{pip}), 36.2 (C_{pip}), 21.3 (CH₃, Me_{Tol}), 16.5 (CH₃, Me_{pip}), 15.1 (CH₃, Me_{pip}).

HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₂₉H₂₇ClN₃O₅S⁺ (M+H)⁺: 564.1354, found: 564.1357.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

5-Prop-2-ynoxy-1H-indole (64)¹¹⁶

A solution of propargyl bromide (80% in toluene, 184 μL, 1.65 mmol, 1.1 equiv) and Cs₂CO₃ (544 mg, 1.65 mmol, 1.1 equiv) were added to a solution of 5-hydroxy-1H-indole (200 mg, 1.50 mmol) in acetone (7.5 mL). After stirring for 2 h, the reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H₂O (40 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to give 249 mg (1.45 mmol, 97%) of compound **64**.

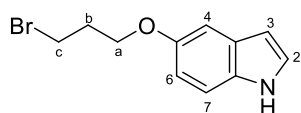


White solid. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.66. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.01 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, *J* = 8.8, 1H, H₇), 7.20 (d, *J* = 2.4, 1H, H₄), 7.13 (t, *J* = 2.8, 1H, H₂), 6.91 (dd, *J* = 8.8, 2.4, 1H, H₆), 6.48 – 6.46 (m, 1H, H₃), 4.71 (d, *J* = 2.4, 2H, H_a), 2.49 (t, *J* = 2.4, 1H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6

MHz): δ 152.2 (C_q), 131.6 (C_q), 128.2 (C_q), 125.3 (CH, C₂), 113.1 (CH, C₆), 111.9 (CH, C₇), 104.6 (CH, C₄), 102.6 (CH, C₃), 79.4 (C_q), 75.3 (CH, C_b), 57.0 (CH₂, C_a). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₁₁H₁₀NO⁺ (M+H)⁺: 172.0757, found: 172.0754.

5-(3-Bromopropoxy)-1H-indole (65)

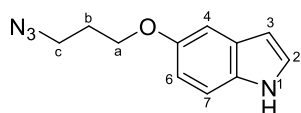
1,3-Dibromopropane (370 μ L, 3.57 mmol, 5.0 equiv) and K₂CO₃ (500 mg, 3.57 mmol, 5.0 equiv) were added to a solution of 5-hydroxy-1H-indole (95 mg, 0.71 mmol) in acetone (2 mL) and the reaction mixture was refluxed for 48 h. After cooling, the solid formed was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H₂O (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to furnish 171 mg (0.673 mmol, 94%) of compound **65**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.64. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.10 (br s, 1H, NH), 7.35 (d, J = 8.8, 1H, H₇), 7.26 – 7.23 (m, 2H, H₂ + H₄), 6.98 (dd, J = 8.8, 2.4, 1H, H₆), 6.62 – 6.55 (m, 1H, H₃), 4.24 (t, J = 5.8, 2H, H_a), 3.74 (t, J = 6.5, 2H, H_c), 2.49 – 2.37 (m, 2H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 153.3 (C_q), 131.2 (C_q), 128.4 (C_q), 125.1 (CH, C₂), 112.9 (CH, C₆), 111.8 (CH, C₇), 103.9 (CH, C₄), 102.5 (CH, C₃), 66.4 (CH₂, C_a), 32.7 (CH₂, C_c), 30.5 (CH₂, C_b). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₁₁H₁₃BrNO⁺ (M+H)⁺: 254.0175 and 256.0155, found: 254.0177 and 256.0162.

5-(3-Azidopropoxy)-1H-indole

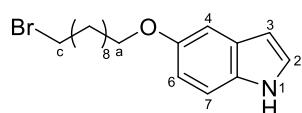
Sodium azide (4.50 mg, 69.3 μ mol, 1.1 equiv) was added to a solution of compound **12** (16 mg, 63 μ mol) in DMF (0.63 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was then diluted with H₂O (7 mL) and extracted with Et₂O (3 x 3 mL). The combined organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 13 mg (60 μ mol, 95%) of azide.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.66. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.13 (br s, 1H, NH), 7.28 (d, J = 8.8, 1H, H₇), 7.20 – 7.17 (m, 1H, H₂), 7.11 (d, J = 2.4, 1H, H₄), 6.86 (dd, J = 8.8, 2.4, 1H, H₆), 6.49 – 6.46 (m, 1H, H₃), 4.09 (t, J = 6.0, 2H, H_a), 3.54 (t, J = 6.7, 2H, H_c), 2.12 – 2.03 (m, 2H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 153.3 (C_q), 131.3 (C_q), 128.4 (C_q), 125.1 (CH, C₂), 112.9 (CH, C₆), 111.8 (CH, C₇), 103.8 (CH, C₄), 102.5 (CH, C₃), 65.5 (CH₂, C_a), 48.6 (CH₂, C_c), 29.1 (CH₂, C_b).

5-((10-Bromodecyl)oxy)-1H-indole (66)

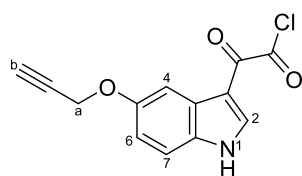
1,10-Dibromodecane (5.63 g, 18.8 mmol, 5.0 equiv) and K_2CO_3 (2.60 g, 18.8 mmol, 5.0 equiv) were added to a solution of 5-hydroxy-1H-indole (500 mg, 3.76 mmol) in acetone (10.5 mL) and the reaction mixture was refluxed for 48 h. After cooling, the solid formed was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (50 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed once with saturated aqueous NaCl (30 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH_2Cl_2) to furnish 1.12 g (3.16 mmol, 86%) of bromide **66**.



Colorless oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.74. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.03 (br s, 1H, NH), 7.27 (d, $J = 8.8$, 1H, H_7), 7.16 – 7.18 (m, 1H, H_2), 7.11 (d, $J = 2.3$, 1H, H_4), 6.87 (dd, $J = 8.8, 2.4$, 1H, H_6), 6.47 – 6.48 (m, 1H, H_3), 4.00 (t, $J = 6.6$, 2H, H_a), 3.41 (t, $J = 6.9$, 2H, H_c), 1.89 – 1.79 (m, 4H), 1.52 – 1.30 (m, 12H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz): δ 153.8 (C_q), 131.1 (C_q), 128.4 (C_q), 124.8 (CH, C_2), 113.1 (CH, C_6), 111.7 (CH, C_7), 103.6 (CH, C_4), 102.5 (CH, C_3), 68.9 (CH_2 , OCH_2), 34.2 (CH_2 , $BrCH_2$), 33.0 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.3 (CH_2).

2-(5-(Prop-2-yn-1-yloxy)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetyl chloride (67)

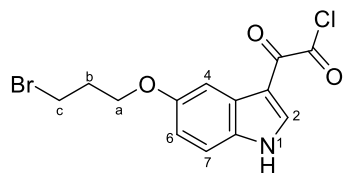
Oxalyl chloride (220 μ L, 1.74 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of compound **64** (248 mg, 1.45 mmol) in anhydrous Et_2O (3.2 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 $^\circ C$. The reaction was stirred overnight at -20 $^\circ C$ until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 338 mg (1.29 mmol, 89%) of oxoacetyl chloride **67**, which was used in the next step without further purification.



Orange solid. 1H NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz): δ 12.36 (br s, 1H, NH), 8.35 (d, $J = 3.3$, 1H, H_2), 7.77 (d, $J = 2.4$, 1H, H_4), 7.46 (d, $J = 8.8$, 1H, H_7), 6.95 (dd, $J = 8.8, 2.5$, 1H, H_6), 4.81 (d, $J = 2.3$, 2H, H_a), 3.54 (t, $J = 2.3$, 2H, H_b). ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 100.6 MHz): δ 180.6 (CO), 165.3 (COCl), 154.0 (C_q), 138.2 (CH, C_2), 131.9 (C_q), 126.4 (C_q), 113.8 (CH, C_6), 113.5 (CH, C_7), 112.2 (C_q), 105.0 (CH, C_4), 79.6 (C_q), 78.1 (CH, C_b), 56.0 (CH_2 , C_a).

2-(5-(3-Bromopropoxy)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetyl chloride (68)

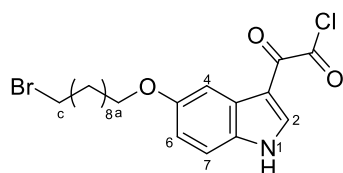
Oxalyl chloride (70 μ L, 0.81 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of bromide **65** (171 mg, 0.673 mmol) in anhydrous Et_2O (1.6 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 $^\circ C$. The reaction was stirred overnight at -20 $^\circ C$ until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 217 mg (0.629 mmol, 94%) of acid chloride **68**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 12.28 (br s, 1H, NH), 8.34 (d, $J = 3.3$, 1H, H₂), 7.69 (d, $J = 2.4$, 1H, H₄), 7.44 (d, $J = 8.8$, 1H, H₇), 6.93 (dd, $J = 8.8$, 2.5, 1H, H₆), 4.11 (t, $J = 6.0$, 2H, H_a), 3.70 (t, $J = 6.6$, 2H, H_c), 2.28 (p, $J = 6.3$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ 180.6 (CO), 165.3 (COCl), 155.1 (C_q), 138.0 (CH, C₂), 132.3 (C_q), 131.6 (C_q), 126.5 (C_q), 113.7 (CH, C₆), 112.2 (CH, C₇), 104.1 (CH, C₄), 65.8 (CH₂, C_a), 32.0 (CH₂, C_c), 31.4 (CH₂, C_b).

2-(5-((10-Bromodecyl)oxy)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetyl chloride (69)

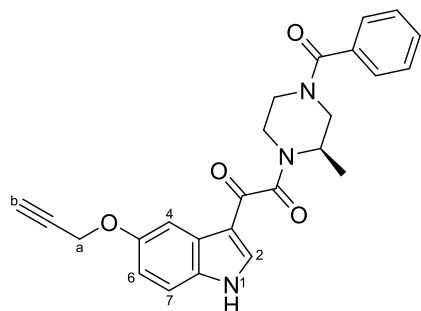
Oxalyl chloride (390 μL , 4.51 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of bromide **66** (1.32 g, 3.76 mmol) in anhydrous Et₂O (8.8 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at -20 °C until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 1.43 g (3.23 mmol, 86%) of acid chloride **69**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 12.12 (br s, 1H, NH), 8.32 (d, $J = 3.1$, 1H, H₂), 7.65 (d, $J = 2.5$, 1H, H₄), 7.42 (d, $J = 8.8$, 1H, H₇), 6.89 (dd, $J = 8.8$, 2.5, H₆), 3.97 (t, $J = 6.5$, 2H, H_a), 3.60 (t, $J = 6.7$, 2H, H_c), 1.82 – 1.65 (m, 2H), 1.51 – 1.22 (m, 10H). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ 180.5 (CO), 165.3 (CO), 155.4 (C_q), 137.8 (CH, C₂), 131.4 (C_q), 126.5 (C_q), 113.7 (CH, C₆), 113.4 (CH, C₇), 112.2 (C_q), 104.0 (CH, C₄), 65.8 (CH₂, C_a), 45.4 (CH₂, C_c), 35.2 (CH₂), 32.3 (CH₂), 32.1 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7, (CH₂) 28.2 (CH₂), 27.5 (CH₂), 26.3 (CH₂).

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(5-(prop-2-yn-1-yloxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (70)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 430 μL , 2.48 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **67** (325 mg, 1.24 mmol) and piperazine **5** (236 mg, 1.24 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (13 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. After stirring for 2 h, the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 469 mg (1.13 mmol, 91%) of bromide **70**.



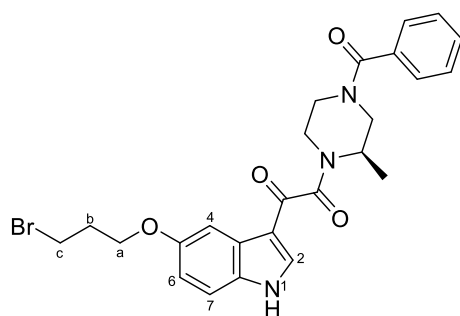
Yellowish solid. **Mp** 63–64 °C. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.35. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.67 (br s, 1H, NH), 7.81 (br s, 1H, H₄), 7.69 (d, $J = 3.3$, 1H, H₂), 7.47 – 7.33 (m, 5H, H_{Ph}), 7.12 (d, $J = 8.9$, 1H, H₇), 6.89 (dd, $J = 8.8$, 2.4, 1H, H₆), 4.71 (d, $J = 1.8$, 2H, H_a), 4.73 – 3.23 (br m, 7H, H_{pip}), 2.50 (t, $J = 2.2$, 1H, H_b), 1.23 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.0 (CO), 171.0 (NCO), 166.6 (NCO), 154.7 (C_q),

136.4 (C_q), 134.8 (CH, C₂), 132.2 (C_q), 130.4 (C_q), 128.9 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C_{Ph}), 126.0 (CH, C_{Ph}), 115.1 (CH, C₆), 114.1 (CH, C₇), 113.2 (C_q), 105.1 (CH, C₄), 78.8 (C_q), 75.6 (CH₂, C_a), 56.6 (CH, C_b), 47.8 (C_{pip}), 46.3 (C_{pip}), 41.6 (C_{pip}), 41.6 (C_{pip}), 15.0 (CH₃, Me_{pip}), 13.6 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₂₅H₂₄N₃O₄⁺ (M+H)⁺: 430.1761, found: 430.1763.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(5-(3-bromopropoxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (71)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 1.10 mL, 6.19 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **68** (1.07 g, 3.10 mmol) and piperazine **5** (696 mg, 3.41 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (31 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and then the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 1.33 g (2.60 mmol, 84%) of bromide **71**.

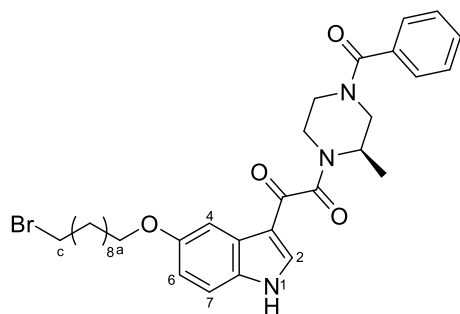


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.65. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.16 (br s, 1H, NH), 7.88 – 7.77 (m, 2H, H₂ + H₄), 7.41 (s, 5H, H_{Ph}), 7.27 (d, *J* = 8.6, 1H, H₇), 6.94 (dd, *J* = 8.8, 2.3, 1H, H₆), 5.02 – 2.84 (br m, 7H, H_{pip}), 4.19 (t, *J* = 5.3, 2H, H_a), 3.63 (t, *J* = 6.5, 2H, H_c), 2.35 (p, *J* = 6.1, 2H, H_b), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.1 (CO), 171.0 (NCO), 166.6 (NCO), 156.1 (C_q), 137.6 (C_q), 136.2 (C_q), 134.9 (CH, C₂), 131.7 (C_q), 130.5 (C_q), 128.9 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.3 (CH, C_{Ph}), 115.0 (CH, C₆), 113.0 (CH, C₇), 104.6 (CH, C₄), 66.0 (CH₂, C_a), 53.6 (C_{pip}), 46.2 (C_{pip}), 41.7 (C_{pip}), 32.6 (CH₂, C_c), 30.3 (CH₂, C_b), 14.2 (CH₃, Me_{pip}), 13.0 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₂₅H₂₇BrN₃O₄⁺ (M+H)⁺: 512.1179 and 514.1159, found: 512.1178 and 514.1161.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(5-((10-bromodecyl)oxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (72)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 0.79 mL, 4.5 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **69** (1.00 g, 2.26 mmol) and piperazine **5** (507 mg, 2.48 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (23 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 1.09 g (1.79 mmol, 79%) of bromide **72**.



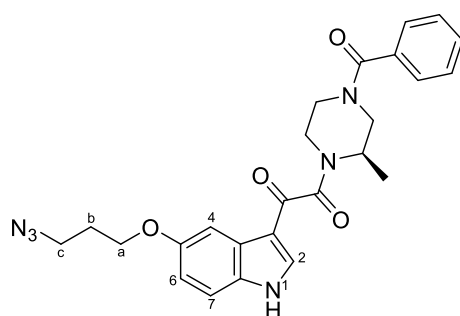
Yellowish oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.48. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.16 (br s, 1H, NH), 7.84 – 7.76 (m, 2H, H_2+H_4), 7.47 – 7.36 (m, 5H, H_{Ph}), 7.26 (d, $J = 8.8$, 1H, H_7), 6.93 (dd, $J = 8.8$, 2.2, 1H, H_6), 4.99 – 2.85 (br m, 7H, H_{pip}), 4.03 (t, $J = 6.2$, 2H, H_a), 3.40 (t, $J = 6.4$, 2H, H_c), 1.90 – 1.77 (m, 4H), 1.51 – 1.23 (m, 15H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.5 (CO), 175.7 (NCO), 167.3 (NCO),

156.6 (C_q), 135.4 (C_q), 135.2 (C_q), 135.2 (CH, C_2), 131.3 (C_q), 131.2 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 127.2 (CH, C_{Ph}), 115.5 (CH, C_6), 112.7 (CH, C_7), 104.4 (CH, C_4), 68.7 (CH_2 , C_a), 34.2 (CH_2 , C_c), 33.0 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.3 (CH_2), 26.2 (CH_2), 15.0 (CH_3 , Me_{pip}) 13.8 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{BrN}_3\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 610.2275 and 612.2254, found: 610.2273 and 612.2246.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(*R*)-1-(5-(3-Azidopropoxy)-1*H*-indol-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (73)

Sodium azide (62 mg, 0.96 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of bromide **71** (445 mg, 0.868 mmol) in DMF (8.7 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with H_2O (90 mL) and extracted with Et_2O (3 x 30 mL). The organic layers were collected, washed with H_2O (3 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 397 mg (0.837 mmol, 96%) of azide **73**.



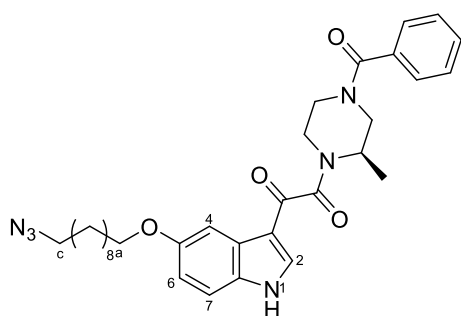
Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.65. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.06 (br s, 1H, NH), 7.76 (br s, 1H, H_2), 7.70 (d, $J = 2.3$, 1H, H_4), 7.46 – 7.39 (m, 5H, H_{Ph}), 7.18 (d, $J = 8.8$, 1H, H_7), 6.88 (dd, $J = 8.8$, 2.2, 1H, H_6), 4.79 – 2.89 (br m, 7H, H_{pip}), 4.10 (t, $J = 5.7$, 2H, H_a), 3.51 (t, $J = 6.6$, 2H, H_c), 2.06 (p, $J = 6.2$, 2H, H_b), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.4

(CO), 171.7 (NCO), 166.6 (NCO), 156.0 (C_q), 135.8 (C_q), 135.1 (CH, C_2), 135.1 (C_q), 131.7 (C_q), 130.3 (C_q), 128.9 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.2 (CH, C_{Ph}), 115.1 (CH, C_6), 113.0 (CH, C_7), 104.5 (CH, C_4), 69.6 (C_{pip}), 65.3 (CH_2 , C_a), 53.2 (C_{pip}), 48.5 (CH_2 , C_c), 42.7 (C_{pip}), 35.9 (C_{pip}), 40.1 (CH_2 , C_b), 16.5 (CH_3 , Me_{pip}), 14.2 (CH_3 , Me_{pip}). **FTIR** 3061, 2909, 2098, 1622, 1425. **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 475.2088, found: 475.2084.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(5-((10-Azidodecyl)oxy)-1H-indol-3-yl)-2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)ethane-1,2-dione (74)

Sodium azide (132 mg, 2.03 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of bromide **72** (1.13 mg, 1.84 mmol) in DMF (18 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was then diluted with H₂O (180 mL) and extracted with Et₂O (3 x 60 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 40 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 991 mg (1.73 mmol, 94%) of azide **74**.

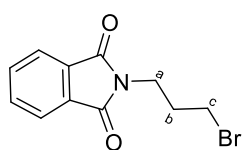


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.40. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.21 (br s, 1H, NH), 7.84 – 7.75 (m, 2H, H₂+H₄), 7.47 – 7.35 (m, 5H, H_{Ph}), 7.25 (d, *J* = 8.7, 1H, H₇), 6.93 (dd, *J* = 8.8, 2.2, 1H, H₆), 4.97 – 3.00 (br m, 7H, H_{pip}), 4.03 (t, *J* = 6.5, 2H, H_a), 3.25 (t, *J* = 6.9, 2H, H_c), 1.86 – 1.75 (m, 2H), 1.65 – 1.54 (m, 2H), 1.53 – 1.23 (m, 15H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.5 (CO), 175.4 (NCO), 166.8 (NCO), 156.6 (C_q), 135.4 (C_q), 135.2 (C_q), 135.2 (CH, C₂), 131.2 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.3 (C_q), 114.8 (CH, C₆), 112.7 (CH, C₇), 104.4 (CH, C₄), 68.7 (CH₂, C_a), 51.6 (CH₂, C_c), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.0 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.2 (CH₂), 15.5 (CH₃, Me_{pip}), 13.9 (CH₃, Me_{pip}). **FTIR** 3205, 2927, 2094, 1667, 1624, 1426. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₃₂H₄₁N₆O₄⁺ (M+H)⁺: 573.3184, found: 573.3188.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

6.1.4. Substitutions at C7**2-(3-Bromopropyl)isoindoline-1,3-dione (75)⁵⁶**

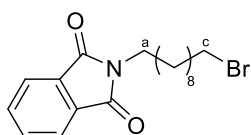
1,3-Dibromopropane (5.5 mL, 54 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of potassium phthalimide (5.0 g, 27 mmol) in DMF (63 mL) under a dry N₂ atmosphere at room temperature. After stirring overnight, the reaction mixture was diluted in H₂O (600 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed twice with water (2 x 100 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to furnish 4.45 g (16.6 mmol, 61%) of bromide **75**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.67. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.87 – 7.80 (m, 2H, H_{Ph}), 7.74 – 7.68 (m, 2H, H_{Ph}), 3.82 (t, *J* = 6.8, 2H, H_a), 3.40 (t, *J* = 6.7, 2H, H_c), 2.25 (p, *J* = 6.8, 2H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 168.3 (CO), 134.2 (CH, C_{Ph}), 132.1 (C_q), 123.4 (CH, C_{Ph}), 36.8 (CH₂, C_a), 31.8 (CH₂, C_c), 29.9 (CH₂, C_b).

2-(10-Bromodecyl)isoindoline-1,3-dione (76)

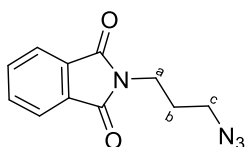
1,10-Dibromodecane (16 g, 54 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of potassium phthalimide (5.0 g, 27 mmol) in DMF (63 mL) under a dry N₂ atmosphere at room temperature. The reaction mixture was stirred overnight and then was diluted in H₂O (600 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed twice with water (100 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂) to furnish 7.15 g (19.5 mmol, 72%) of bromide **76**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂) 0.73. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.85 – 7.80 (m, 2H, H_{Phit}), 7.72 – 7.67 (m, 2H, H_{Phit}), 3.66 (t, *J* = 7.3, 2H, H_a), 3.39 (t, *J* = 6.9, 2H, H_c), 1.83 (p, *J* = 7.5, 2H), 1.66 (p, *J* = 7.2, 2H), 1.45 – 1.35 (m, 2H), 1.34 – 1.24 (m, 10H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 168.6 (CO), 134.0 (CH, C_{Phit}), 132.3 (C_q), 123.3 (CH, C_{Phit}), 38.2 (CH₂, C_a), 34.2 (CH₂, C_c), 33.0 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.3 (CH₂), 26.9 (CH₂).

2-(3-Azidopropyl)isoindoline-1,3-dione (77)⁵⁶

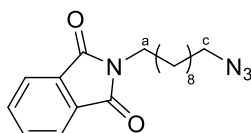
Sodium azide (364 mg, 5.60 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of bromide **75** (1.00 g, 3.73 mmol) in DMF (38 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature and then was diluted with H₂O (400 mL) and extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 858 mg (3.73 mmol, 100%) of azide **77**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.60. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.84 – 7.76 (m, 2H, H_{Phit}), 7.70 – 7.66 (m, 2H, H_{Phit}), 3.74 (t, *J* = 6.8, 2H, H_a), 3.34 (t, *J* = 6.7, 2H, H_c), 1.91 (p, *J* = 6.8, 2H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 168.3 (CO), 134.2 (CH, C_{Phit}), 132.1 (C_q), 123.4 (CH, C_{Phit}), 49.1 (CH₂, C_c), 35.4 (CH₂, C_a), 28.1 (CH₂, C_b). **FTIR** 2936, 2865, 2092, 1774, 1701, 1618.

2-(10-Azidodecyl)isoindoline-1,3-dione (78)

Sodium azide (319 mg, 4.91 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of bromide **76** (1.20 g, 3.28 mmol) in DMF (33 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature and then was diluted with H₂O (350 mL) and extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The organic layers were collected, washed with H₂O (3 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 1.05 g (3.20 mmol, 98%) of azide **78**.

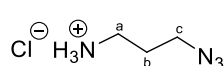


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.77. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.85 – 7.80 (m, 2H, H_{Phit}), 7.72 – 7.67 (m, 2H, H_{Phit}), 3.66 (t, *J* = 7.3, 2H, H_a), 3.23 (t, *J* = 7.0, 2H, H_c), 1.66 (p, *J* = 7.3, 2H), 1.61 – 1.53 (m, 2H),

1.37 – 1.20 (m, 12H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 168.6 (CO), 133.9 (CH, C_{Ph}), 132.3 (C_q), 123.2 (CH, C_{Ph}), 51.6 (CH_2 , C_c), 38.2 (CH_2 , C_a), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.2 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.7 (CH_2), 26.9 (CH_2), 26.8 (CH_2). FTIR 2926, 2853, 2089, 1768, 1707, 1399.

3-Azidopropan-1-ammonium chloride (**79**)⁵⁶

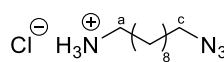
Hydrazine hydrate (0.78 mL, 15 mmol, 4.0 equiv) was added to a solution of compound **77** (859 mg, 3.73 mmol) in EtOH/THF 1:1 (47 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was refluxed for 3 h and after cooling, was acidified with HCl and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (70 mL) and washed with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The aqueous layer was basified and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, acidified with HCl and concentrated to give 498 mg (3.65 mmol, 98%) of amine **79**.



White solid. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 8.19 (br s, 3H, NH), 3.46 (t, J = 6.8, 2H, H_c), 2.85 – 2.74 (m, 2H, H_a), 1.82 (p, J = 6.8, 2H, H_b). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ 47.9 (CH_2 , C_c), 36.4 (CH_2 , C_a), 26.5 (CH_2 , C_b). FTIR 3391, 2932, 2099.

10-Azidodecan-1-ammonium chloride (**80**)

Hydrazine hydrate (1.60 mL, 30.3 mmol, 4.0 equiv) was added to a solution of compound **78** (2.49 g, 7.58 mmol) in EtOH/THF 1:1 (94 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was refluxed for 3 h and after cooling, was acidified with HCl and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in H_2O (100 mL) and washed with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). The aqueous layer was basified and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, acidified with HCl and concentrated to give 1.53 g (6.52 mmol, 86%) of amine **80**.

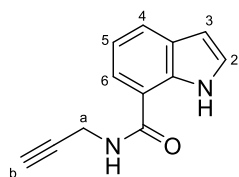


White solid. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 7.89 (br s, 3H, NH), 3.23 (t, J = 6.8, 2H, H_c), 2.96 – 2.88 (m, 2H, H_a), 1.73 – 1.63 (m, 2H), 1.62 – 1.51 (m, 2H), 1.42 – 1.27 (m, 12H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ 52.4 (CH_2 , C_c), 49.8 (CH_2 , C_a), 30.3 (CH_2), 30.2 (CH_2), 30.1 (CH_2), 30.0 (CH_2), 29.8 (CH_2), 27.7 (CH_2), 27.4 (CH_2). FTIR 3386, 2929, 2097.

N-(Prop-2-yn-1-yl)-1*H*-indole-7-carboxamide (**81**)

Propargylamine (50 μL , 0.75 mmol, 1.2 equiv) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 147 μL , 0.807 mmol, 1.3 equiv) were added to a solution of 1*H*-indole-7-carboxylic acid (100 mg, 0.621 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (109 mg, 0.807 mmol, 1.3 equiv) in DMF (9 mL) under a dry N_2 atmosphere at room temperature. The reaction

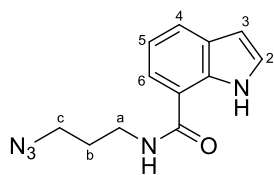
was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with 2M HCl (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The organic layers were collected, washed once with 2M HCl (50 mL) and once with saturated aqueous NaHCO₃ solution (50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 117 mg (0.590 mmol, 95%) of compound **81**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.76. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.27 (br s, 1H, NH), 7.82 (d, *J* = 7.8, 1H, H₆), 7.39 (d, *J* = 7.5, 1H, H₄), 7.33 (t, *J* = 2.6, 1H, H₃), 7.12 (t, *J* = 7.7, 1H, H₅), 6.58 (t, *J* = 2.5, 1H, H₂), 6.52 (br s, 1H, NHCO), 4.30 (dd, *J* = 5.3, 2.5, 2H, H_a), 2.30 (t, *J* = 2.6, 1H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 167.7 (CONH), 135.5 (C_q), 129.7 (C_q), 125.9 (CH, C₃), 125.4 (CH, C₆), 119.2 (CH, C₄), 118.8 (CH, C₅), 115.2 (C_q), 102.2 (CH, C₂), 79.7 (C_q), 72.0 (CH, C_b), 29.6 (CH₂, C_a).

***N*-(3-Azidopropyl)-1*H*-indole-7-carboxamide (**82**)**

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 260 μL, 1.49 mmol, 1.2 equiv) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 300 μL, 1.61 mmol, 1.3 equiv) were added to a solution of 1*H*-indole-7-carboxylic acid (200 mg, 1.24 mmol), compound **79** (204 mg, 1.49 mmol, 1.2 equiv) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (218 mg, 1.61 mmol, 1.3 equiv) in DMF (18 mL) under a dry N₂ atmosphere at room temperature. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with 2M HCl (150 mL) and extracted with EtOAc (3 x 60 mL). The organic layers were collected, washed once with 2M HCl (50 mL) and once with saturated aqueous NaHCO₃ solution (50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 300 mg (1.23 mmol, 99%) of azide **82**.

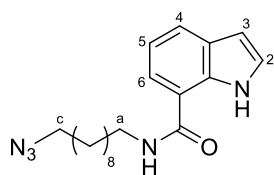


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.76. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.34 (br s, 1H, NH), 7.81 (d, *J* = 7.8, 1H, H₆), 7.37 (d, *J* = 7.5, 1H, H₄), 7.30 (t, *J* = 2.8, 1H, H₂), 7.10 (t, *J* = 7.7, 1H, H₅), 6.73 (br s, 1H, NHCO), 6.58 (dd, *J* = 3.0, 2.4, 1H, H₃), 3.56 (q, *J* = 6.8, 2H, H_a), 3.40 (t, *J* = 6.5, 2H, H_c), 1.88 (p, *J* = 6.8, 2H, H_b). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 168.1 (CONH), 135.4 (C_q), 129.6 (C_q), 125.7 (CH, C₂), 124.9 (CH, C₆), 118.9 (CH, C₄), 118.7 (CH, C₅), 115.8 (C_q), 102.0 (CH, C₃), 49.5 (CH₂, C_c), 37.4 (CH₂, C_a), 28.9 (CH₂, C_b). **FTIR** 3428, 3343, 2928, 2092, 1631, 1585.

***N*-(10-Azidodecyl)-1*H*-indole-7-carboxamide (**83**)**

DIPEA (73 μL, 0.42 mmol, 1.5 equiv) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 66 μL, 0.36 mmol, 1.3 equiv) were added to a solution of 1*H*-indole-7-carboxylic acid (45 mg, 0.28 mmol), compound **80** (98 mg, 0.42 mmol, 1.5 equiv) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (49 mg, 0.36 mmol, 1.3 equiv) in DMF (4 mL). The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with 2M HCl (40 mL) and extracted with

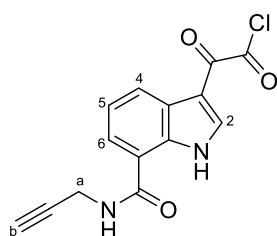
EtOAc (3 x 20 mL). The organic layers were collected, washed once with 2M HCl (25 mL) and once with saturated aqueous NaHCO₃ solution (25 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 75 mg (0.22 mmol, 79%) of azide **83**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.85. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.35 (br s, 1H, NH), 7.79 (d, *J* = 7.8, 1H, H₆), 7.36 (d, *J* = 7.5, 1H, H₄), 7.30 (dd, *J* = 3.1, 2.3, 1H, H₂), 7.09 (t, *J* = 7.7, 1H, H₅), 6.56 (dd, *J* = 3.1, 2.3, 1H, H₃), 6.50 (br s, 1H, NHCO), 3.48 (q, *J* = 7.1, 2H, H_a), 3.23 (t, *J* = 7.0, 2H, H_c), 1.69 – 1.52 (m, 4H), 1.42 – 1.25 (m, 12H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 167.9 (CONH), 135.5 (C_q), 129.6 (C_q), 125.7 (CH, C₂), 124.7 (CH, C₆), 118.8 (CH, C₅), 118.7 (CH, C₄), 116.2 (C_q), 101.9 (CH, C₃), 51.5 (CH₂, C_c), 39.8 (CH₂, C_a), 29.8 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.9 (CH₂), 27.1 (CH₂), 26.8 (CH₂). **FTIR** 3429, 3344, 2923, 2852, 2091, 1629, 1529.

2-Oxo-2-(7-(prop-2-yn-1-ylcarbamoyl)-1H-indol-3-yl)acetyl chloride (**84**)

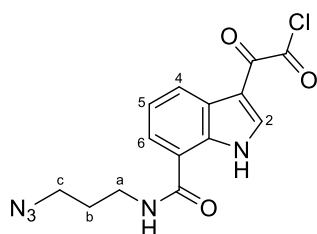
Oxalyl chloride (68 μL, 0.79 mmol, 1.3 equiv) was added to a solution of compound **81** (120 mg, 0.605 mmol) in anhydrous Et₂O (1.5 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at –20 °C until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 186 mg (0.644 mmol, 98%) of acid chloride **84**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.25 (br s, 1H, NH), 9.23 (t, *J* = 5.5, 1H, NHCO), 8.38 (d, *J* = 7.8, 1H, H₄), 8.34 (d, *J* = 3.3, 1H, H₂), 7.86 (d, *J* = 7.6, 1H, H₆), 7.36 (t, *J* = 7.8, 1H, H₅), 3.14 (dd, *J* = 5.5, 2.4, 2H, H_a), 3.15 (t, *J* = 2.5, 2H, H_b). **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ 180.6 (CO), 165.8 (CONH), 164.7 (COCl), 138.8 (CH, C₂), 134.8 (C_q), 127.0 (C_q), 124.9 (CH, C₄), 122.4 (CH, C₅), 122.3 (CH, C₆), 117.6 (C_q), 112.0 (C_q), 81.2 (C_q), 72.9 (CH, C_b), 28.3 (CH₂, C_a).

2-(7-((3-Azidopropyl)carbamoyl)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetyl chloride (**85**)

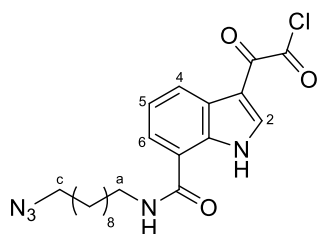
Oxalyl chloride (290 μL, 3.34 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of compound **82** (676 mg, 2.78 mmol) in anhydrous Et₂O (6.5 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at –20 °C until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 813 mg (2.44 mmol, 88%) of acid chloride **85**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 12.21 (br s, 1H, NH), 8.85 (t, $J = 5.6$, 1H, NHCO), 8.35 (d, $J = 7.8$, 1H, H₄), 8.33 (d, $J = 3.3$, 1H, H₂), 7.87 (d, $J = 7.7$, 1H, H₆), 7.35 (t, $J = 7.7$, 1H, H₅), 3.49 – 3.40 (m, 4H, H_a + H_c), 1.85 (p, $J = 6.8$, 2H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ 180.6 (CO), 166.2 (CONH), 164.8 (COCl), 138.8 (CH, C₂), 134.8 (C₄), 127.0 (C_q), 124.5 (CH, C₄), 122.3 (CH, C₅), 122.2 (CH, C₆), 118.3 (C_q), 112.0 (C_q), 48.6 (CH₂, C_c), 36.5 (CH₂, C_a), 28.4 (CH₂, C_b). **FTIR** 3476, 3316, 2917, 2097, 1774, 1631, 1581, 1403.

2-(7-((10-Azidodecyl)carbamoyl)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetyl chloride (86)

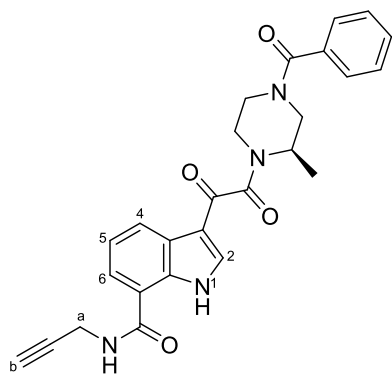
Oxalyl chloride (174 μL , 2.03 mmol, 1.3 equiv) was added to a solution of compound **83** (532 mg, 1.56 mmol) in anhydrous Et₂O (4 mL) under a dry Ar atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at –20 °C until TLC showed absence of starting material. The solvent was removed under reduced pressure to give 505 mg (1.17 mmol, 75%) of acid chloride **86**, which was used in the next step without further purification.



Reddish solid. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 12.55 (br s, 1H, NH), 8.46 (d, $J = 7.9$, 1H, H₄), 8.39 (s, 1H, H₂), 7.51 (d, $J = 7.6$, 1H, H₆), 7.38 (t, $J = 7.7$, 1H, H₅), 3.85 – 3.79 (m, 2H, H_a), 3.28 (t, $J = 6.9$, 2H, H_c), 1.64 – 1.55 (m, 2H), 1.51 – 1.46 (m, 2H), 1.35 – 1.18 (m, 12H). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ 180.6 (CO), 164.5 (CONH), 162.1 (COCl), 139.0 (CH, C₂), 134.1 (C_q), 127.1 (C_q), 125.1 (CH, C₄), 122.3 (CH, C₅), 122.1 (CH, C₆), 118.8 (C_q), 112.5 (C_q), 51.0 (CH₂, C_c), 42.1 (CH₂, C_a), 28.8 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.3 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.8 (CH₂), 26.1 (CH₂), 26.0 (CH₂).

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-N-(prop-2-yn-1-yl)-1H-indole-7-carboxamide (87)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 220 μL , 1.25 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **84** (180 mg, 0.624 mmol) and piperazine **5** (140 mg, 0.686 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (7 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 269 mg (0.589 mmol, 94%) of compound **87**.

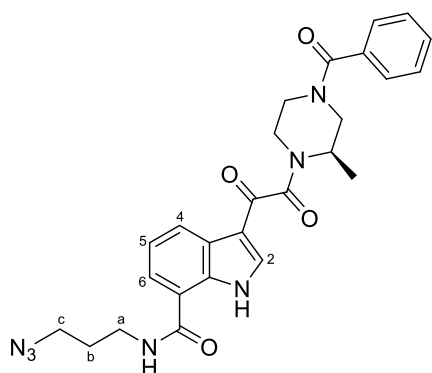


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.32. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 11.30 (br s, 1H, NH), 8.23 (br s, 1H, H_4), 7.96 (d, $J = 3.2$, 1H, H_2), 7.84 (br s, 1H, NHCO), 7.46 (d, $J = 7.5$, 1H, H_6), 7.42 – 7.35 (m, 5H, H_{Ph}), 7.11 (t, $J = 7.4$, 1H, H_5), 4.99 – 2.84 (br m, 7H, H_{pip}), 4.20 (s, 2H, H_a), 2.23 (s, 1H, H_b), 1.28 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.1 (CO), 171.5 (NCO), 167.2 (NCO), 166.4 (NCO), 136.6 (CH, C_2), 135.8 (C_q), 135.0 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C_{Ph}), 126.3 (C_q), 126.2 (CH, C_4), 122.4 (CH, C_5), 122.2 (CH, C_6), 115.9 (C_q), 114.0 (C_q), 80.0 (C_q), 71.4 (CH, C_b), 50.0 (CH, C_{pip}), 40.9 (CH_2 , C_{pip}), 35.9 (CH_2 , C_{pip}), 29.4 (CH_2 , C_a), 15.2 (CH_3 , Me_{pip}), 13.4 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 457.1870, found: 457.1913.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-N-(3-Azidopropyl)-3-(2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1H-indole-7-carboxamide (88)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 3.1 mL, 18 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **85** (2.92 g, 8.75 mmol) and piperazine **5** (1.97 g, 9.62 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH_2Cl_2 (80 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2 to 95:5) to give 3.29 g (6.56 mmol, 75%) of compound **88**.

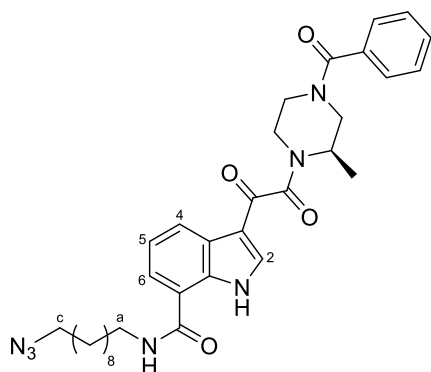


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.35. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 11.31 (br s, 1H, NH), 8.29 (br s, 1H, H_4), 7.94 (t, $J = 3.1$, 1H, H_2), 7.45 (d, $J = 7.5$, 1H, H_6), 7.45 – 7.30 (m, 6H, H_{Ph} + NH), 7.17 (t, $J = 6.8$, 1H, H_5), 5.04 – 2.96 (br m, 7H, H_{pip}), 3.53 (dt, $J = 6.5$, 6.1, 2H, H_a), 3.36 (t, $J = 6.3$, 2H, H_c), 1.88 (p, $J = 6.6$, 2H, H_b), 1.27 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.2 (CO), 171.4 (NCO), 167.5 (NCO), 166.3 (NCO), 136.4 (CH, C_2), 136.0 (C_q), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.0 (CH, C_{Ph}), 126.4 (C_q), 126.1 (CH, C_4), 122.5 (CH, C_5), 121.7 (CH, C_6), 116.5 (C_q), 114.1 (C_q), 50.0 (CH, C_{pip}), 49.4 (CH_2 , C_c), 42.2 (C_{pip}), 37.4 (CH_2 , C_a), 36.0 (C_{pip}), 28.7 (CH_2 , C_b), 15.2 (CH_3 , Me_{pip}), 13.9 (CH_3 , Me_{pip}). **FTIR** 3328, 2929, 2093, 1612, 1587, 1422. **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 502.2197, found: 502.2230.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-N-(10-Azidodecyl)-3-(2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1H-indole-7-carboxamide (89)

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 0.52 mL, 3.0 mmol, 2.0 equiv) was added to a solution of oxoacetyl chloride **86** (643 mg, 1.49 mmol) and piperazine **5** (335 mg, 1.64 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 600 g (1.0 mmol, 67%) of compound **89**.

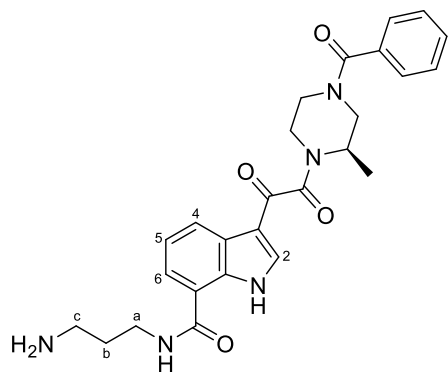


Colorless oil. *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.39. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 11.11 (br s, 1H, NH), 8.45 (br s, 1H, H₄), 8.01 (t, *J* = 3.4, 1H, H₂), 7.47 (d, *J* = 7.5, 1H, H₆), 7.45 – 7.36 (m, 5H, H_{Ph}), 7.30 (t, *J* = 7.6, 1H, H₅), 6.63 (br s, 1H, NHCO), 5.13 – 2.94 (br m, 7H, H_{pip}), 3.47 (q, *J* = 6.9, 2H, H_a), 3.24 (t, *J* = 6.9, 2H, H_c), 1.70 – 1.50 (m, 4H), 1.47 – 1.15 (m, 15H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.6 (CO), 171.6 (NCO), 167.0 (NCO), 166.1 (NCO), 136.3 (CH, C₂), 135.2 (C_q), 135.2 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.8 (C_q), 126.2 (CH, C₄), 122.7 (CH, C₅), 121.1 (CH, C₆), 117.0 (C_q), 114.4 (C_q), 51.6 (CH₂, C_c), 50.0 (CH, C_{pip}), 41.0 (CH₂, C_{pip}), 40.0 (CH₂, C_a), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.9 (CH₂), 27.1 (CH₂), 26.8 (CH₂), 15.2 (CH₃, Me_{pip}), 14.1 (CH₃, Me_{pip}). FTIR 3345, 2923, 2851, 2094, 1619, 1591, 1422. HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₃₃H₄₂N₇O₄⁺ (M+H)⁺: 600.3293, found: 600.3299.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-N-(3-Aminopropyl)-3-(2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1H-indole-7-carboxamide (90)

Pd/C (10% Pd, 53 mg, 50 μmol, 0.1 equiv) was added to a solution of compound **88** (250 mg, 498 μmol) in absolute EtOH (5 mL) under a dry N₂ atmosphere. After purging with hydrogen the suspension was energetically stirred for 2 h. The heterogeneous mixture was filtered under celite[®], washed with EtOH and the solvent was evaporated under vacuum to afford 232 mg (488 μmol, 98%) of compound **90**.

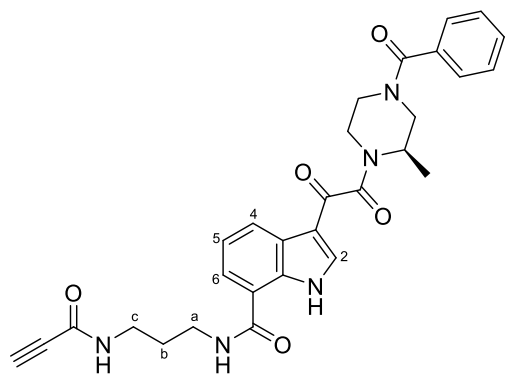


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.10. $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 8.39 (br s, 1H, H_4), 8.11 (s, 1H, H_2), 7.74 (d, $J = 7.4$, 1H, H_6), 7.47 – 7.43 (m, 5H, H_{Ph}), 7.35 (t, $J = 7.3$, 1H, H_5), 4.72 – 2.72 (br m, 7H, H_{pip}), 3.53 (t, $J = 6.8$, 2H, H_a), 2.80 (t, $J = 6.9$, 2H, H_c), 1.84 (p, $J = 6.8$, 2H, H_b), 1.31 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100.6 MHz): δ 187.2 (CO), 173.5 (NCO), 169.3 (NCO), 168.2 (NCO), 139.2 (CH, C_2), 137.4 (C_q), 136.3 (C_q), 131.3 (CH, C_{Ph}), 129.8 (CH, C_{Ph}), 128.1 (CH, C_{Ph}), 128.0 (C_q), 126.3 (CH, C_4), 123.6 (CH, C_5), 123.3 (CH, C_6), 119.4 (C_q), 114.6 (C_q), 51.7 (CH, C_{pip}), 41.7 (CH_2 , C_{pip}), 39.4 (CH_2 , C_c), 37.7 (CH_2 , C_a), 37.3 (CH_2 , C_{pip}), 32.5 (CH_2 , C_b), 16.4 (CH_3 , Me_{pip}), 14.4 (CH_3 , Me_{pip}). **FTIR** 3292, 2874, 1619, 1583, 1423. **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 476.2292, found: 476.2284.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-N-(3-propionamidopropyl)-1H-indole-7-carboxamide (91)

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 299 mg, 1.52 mmol, 1.05 equiv) followed by a solution of compound **90** (689 mg, 1.45 mmol) in CH_2Cl_2 (7 mL) were added to a solution of propionic acid (94 μL , 1.5 mmol, 1.05 equiv) in CH_2Cl_2 (8 mL) under a dry N_2 atmosphere, at -20°C . The reaction was stirred overnight at -20°C . The reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2 to 95:5) to give 474 mg (899 μmol , 62%) of compound **91**.

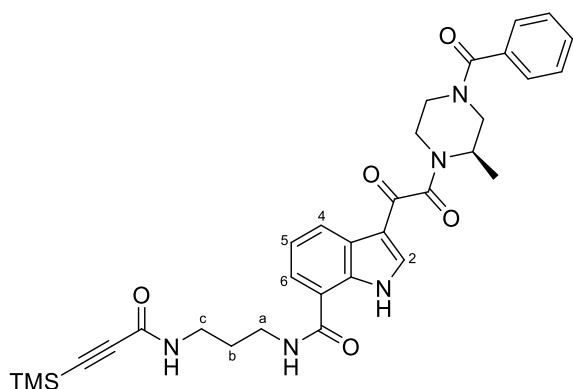


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.47. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 11.42 (br s, 1H, NH), 8.42 (br s, 1H, H_4), 8.01 (s, 1H, H_2), 7.69 (br s, 1H, NH), 7.63 (d, $J = 7.4$, 1H, H_6), 7.40 – 7.38 (m, 5H, H_{Ph}), 7.28 (m, 1H, H_5), 6.97 (br s, 1H, NH), 4.80 – 3.11 (br m, 7H, H_{pip}), 3.49 (br s, 2H), 3.39 (br s, 2H), 2.83 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.77 – 1.73 (m, 2H, H_b), 1.25 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.6 (CO), 171.5 (NCO), 167.5 (NCO), 166.2 (NCO), 153.3 ($\text{NCO}\text{C}\equiv\text{CH}$), 136.4 (CH, C_2), 135.2 (C_q), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 127.0 (C_q), 126.1 (CH, C_4), 122.9 (CH, C_5), 121.8 (CH, C_6), 116.9 (C_q), 114.3 (C_q), 77.4 (C_q), 74.1 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 50.1 (CH_2 , C_{pip}), 45.0 (CH_2 , C_{pip}), 40.1 (CH, C_{pip}), 37.0 (CH_2), 36.0 (CH_2), 29.5 (CH_2 , C_b), 15.3 (CH_3 , Me_{pip}), 13.7 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_5^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 528.2241, found: 528.2242.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-N-(3-(3-(trimethylsilyl)propiolamido)propyl)-1H-indole-7-carboxamide (92)

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 115 mg, 0.552 mmol, 1.05 equiv) followed by a solution of compound **90** (250 mg, 0.526 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) were added to a solution of 3-(trimethylsilyl)propionic acid (76 mg, 0.526 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) under a dry N₂ atmosphere, at -20 °C. The reaction was stirred overnight at -20 °C. The reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 175 mg (292 μmol, 56%) of compound **92**.



Colorless oil. *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.35. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 11.42 (br s, 1H, NH), 8.44 (br s, 1H, H₄), 8.06 (d, *J* = 2.9, 1H, H₂), 7.83 (br s, 1H, NH), 7.69 (d, *J* = 7.6, 1H, H₆), 7.50 – 7.35 (m, 5H, H_{Ph}), 7.32 (t, *J* = 7.5, 1H, H₅), 6.54 (br s, 1H, NH), 4.98 – 3.18 (br m, 7H, H_{pip}), 3.53 – 3.48 (m, 2H), 3.44 – 3.39 (m, 2H), 1.76 (p, *J* = 5.5, 2H, H_b), 1.28 (br s, 3H, Me_{pip}), 0.22 (s, 9H, H_{TMS}). ¹³C NMR (CDCl₃,

100.6 MHz): δ 185.3 (CO), 170.8 (NCO), 167.3 (NCO), 166.1 (NCO), 154.3 (NCOC≡C), 136.5 (CH, C₂), 136.4 (C_q), 135.1 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.2 (CH, C_{Ph}), 126.7 (C_q), 126.1 (CH, C₄), 123.0 (CH, C₅), 121.9 (CH, C₆), 117.0 (C_q), 114.3 (C_q), 97.2 (C_q), 92.9 (C_q), 49.8 (CH₂, C_{pip}), 45.1 (CH₂, C_{pip}), 41.1 (CH, C_{pip}), 36.6 (CH₂), 35.7 (CH₂), 29.6 (CH₂, C_b), 15.4 (CH₃, Me_{pip}), 13.7 (CH₃, Me_{pip}), 0.6 (Me, C_{TMS}). HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₃₂H₃₈N₅O₅Si⁺ (M+H)⁺: 600.2637, found: 600.2635.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

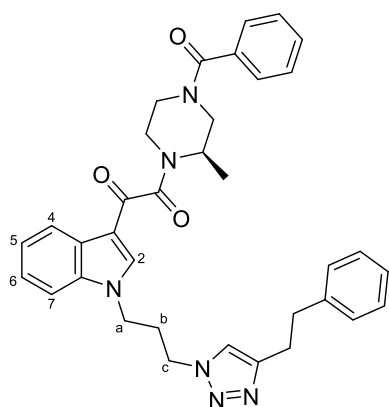
6.2. Experimental chapter 2

6.2.1. BMS derivatives. *Click* reaction

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1-(3-(4-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (93)

4-Phenyl-1-butyne (18 μL, 0.12 mmol, 1.1 equiv) followed by copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex (Cu₂(OTf)₂·C₆H₆, 13 mg, 22 μmol, 0.2 equiv) were added to a solution of compound **10** (50 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ (1.1 mL) under a dry N₂ atmosphere. The mixture was stirred vigorously for 48 h at room temperature. The reaction mixture was filtered on

celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 29 mg (49 μmol, 45%) of compound **93**.

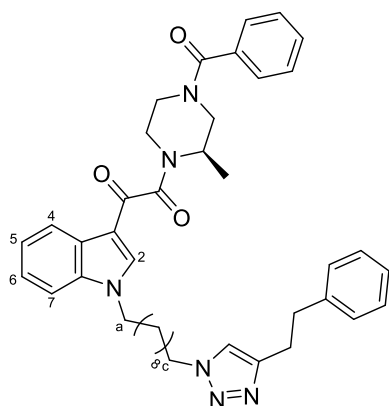


Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.43. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.35 (br s, 1H), 7.91 (m, 1H, H₂), 7.47 (s, 1H, H_{triaz}), 7.46 – 7.36 (m, 5H, H_{Ph}), 7.35 – 7.24 (m, 5H, H_{Ph}), 7.21 – 7.15 (m, 3H), 5.08 – 2.78 (br m, 7H, H_{pip}), 4.24 (t, *J* = 6.9, 2H, H_a), 4.20 – 4.13 (m, 2H), 3.02 (t, *J* = 6.5, 2H, H_c), 2.52 – 2.35 (m, 4H), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.0 (CO), 171.4 (NCO), 166.2 (NCO), 141.1 (C_q), 138.7 (C_q), 136.8 (C_q), 135.3 (CH, C_{triaz}), 135.2 (C_q), 130.1 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 128.6 (CH, C_{Ph}), 128.5 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.5 (C_q), 124.5 (CH, C_{Ph}), 123.7 (CH), 123.4 (CH), 122.7 (CH), 122.6 (CH), 113.8 (C_q), 110.2 (CH), 46.7 (CH₂, C_a), 44.1 (CH₂, C_c), 35.4 (CH₂), 29.8 (CH₂), 27.5 (CH₂), 16.5 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₃₅H₃₇N₆O₃⁺ (M+H)⁺: 589.2922, found: 589.2920.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(1-(10-(4-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)decyl)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (94**)**

4-Phenyl-1-butyne (17 μL, 0.12 mmol, 1.1 equiv) followed by copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex (Cu₂(OTf)₂·C₆H₆, 13 mg, 22 μmol, 0.2 equiv) were added to a solution of compound **11** (60 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ (1.1 mL) under a dry N₂ atmosphere. The mixture was stirred vigorously for 48 h at room temperature. The reaction mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 49 mg (71 μmol, 66%) of compound **94**.



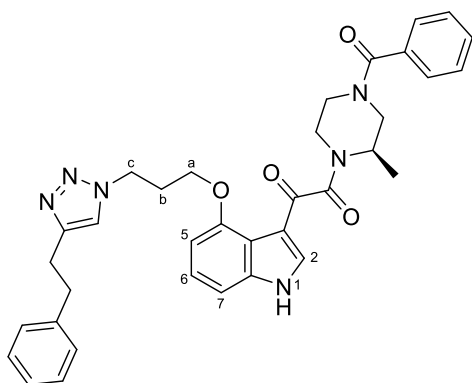
Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.57. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.32 (br s, 1H), 7.87 (s, 1H, H_{triaz}), 7.47 – 7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 7.34 (s, 1H), 7.33 – 7.31 (m, 2H), 7.30 – 7.24 (m, 3H), 7.22 – 7.14 (m, 3H), 5.05 – 2.97 (br m, 7H, H_{pip}), 4.26 (t, *J* = 6.9, 2H, H_a), 4.14 (t, *J* = 7.2, 2H, H_c), 3.02 (br s, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 4H), 1.41 – 1.11 (m, 17H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 184.4 (CO), 171.4 (NCO), 166.4 (NCO), 141.3 (C_q), 138.2 (CH, C_{triaz}), 137.1 (C_q), 135.2 (C_q), 130.2 (C_q), 128.8 (CH, C_{Ph}), 128.6 (CH, C_{Ph}), 128.5 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.4 (C_q), 126.2 (CH, C_{Ph}), 124.2 (C_q), 123.5 (CH), 122.5 (CH), 113.4 (CH), 110.4 (CH), 49.3 (CH₂, C_a), 47.6 (CH₂, C_c), 30.3 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.7 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.5 (CH₂), 16.5 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₄₂H₅₁N₆O₃⁺

(M+H)⁺: 687.4017, found: 687.4036.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-(3-(4-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (95)

4-Phenyl-1-butyne (23 μ L, 0.16 mmol, 1.1 equiv) followed by copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex (Cu₂(OTf)₂·C₆H₆, 41 mg, 74 μ mol, 0.5 equiv) were added to a solution of compound **58** (70 mg, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ (1.5 mL) under a dry N₂ atmosphere. The mixture was stirred vigorously for 48 h. The reaction mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 78 mg (0.13 mmol, 88%) of compound **95**.



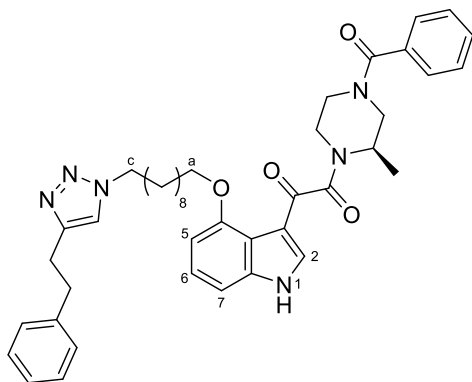
Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.63. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.60 (br s, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, H_{triaz}) 7.48 – 7.35 (m, 5H, H_{COPh}), 7.29 – 7.21 (m, 4H), 7.16 – 7.09 (m, 3H), 6.77 – 6.75 (m, 2H), 5.00 – 2.97 (br m, 7H, H_{pip}), 4.24 (m, 2H, H_a), 4.09 (m, 2H, H_c), 3.03 (m, 2H), 2.41 (br s, 2H), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 186.5 (CO), 171.4 (NCO), 165.2 (NCO), 152.5 (C_q), 141.0 (C_q), 140.3 (CH, C_{triaz}), 138.9 (C_q), 135.2 (C_q), 130.1 (CH, C_{Ph}), 128.7 (CH, C_{Ph}),

128.5 (CH, C_{Ph}), 128.5 (CH), 127.2 (CH), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.3 (CH), 115.5 (C_q), 114.5 (C_q), 109.3 (CH), 109.3 (C_q), 101.4 (CH), 50.3 (C_{pip}), 45.2 (CH₂, C_a), 44.5 (CH₂, C_c), 41.4 (C_{pip}), 36.6 (C_{pip}), 35.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 27.5 (CH₂), 15.2 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₃₅H₃₇N₆O₄⁺ (M+H)⁺: 605.2871, found: 605.2885.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-1-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-((10-(4-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)decyl)oxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (96)

4-Phenyl-1-butyne (22 μ L, 0.15 mmol, 1.1 equiv) followed by copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex (Cu₂(OTf)₂·C₆H₆, 39 mg, 70 μ mol, 0.5 equiv) were added to a solution of compound **59** (80 mg, 0.14 mmol) in CH₂Cl₂ (1.4 mL) under a dry N₂ atmosphere. The mixture was stirred vigorously for 48 h. The reaction mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 94 mg (0.13 mmol, 96%) of compound **96**.

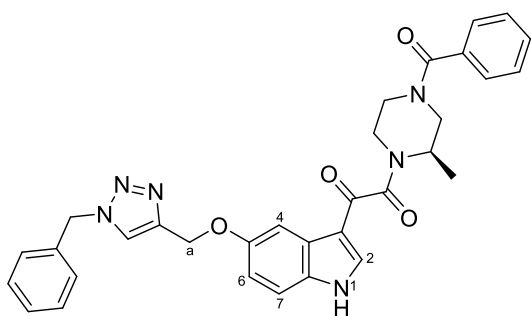


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.50. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.64 (br s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, H_{triaz}), 7.47 – 7.34 (m, 5H, H_{Ph}), 7.28 – 7.14 (m, 7H), 6.83 (d, $J = 8.2$, 1H), 6.75 (d, $J = 7.8$, 1H), 5.05 – 2.88 (br m, 7H, H_{pip}), 4.26 (t, $J = 6.8$, 2H, H_a), 4.08 (t, $J = 7.3$, 2H, H_c), 3.07 – 2.96 (m, 4H), 1.90 – 1.79 (m, 4H), 1.40 – 1.10 (m, 15H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 186.1 (CO), 171.5 (NCO), 165.4 (NCO), 152.3 (C_q), 141.2 (C_q), 139.4 (CH, C_{triaz}), 139.3 (CH), 135.1 (C_q), 135.0 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH), 128.6 (CH, C_{Ph}), 128.4 (CH), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.9 (CH), 126.1 (CH), 115.5 (C_q), 114.3 (C_q), 109.1 (C_q), 109.1 (CH), 101.7 (CH), 50.1 (CH_2 , C_a), 48.1 (CH_2 , C_c), 45.2 (C_{pip}), 41.6 (C_{pip}), 36.2 (C_{pip}), 35.6 (CH_2), 30.3 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.9 (CH_2), 27.6 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.4 (CH_2), 16.4 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 703.3966, found: 703.3966.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

1-(4-Benzoylpiperazin-1-yl)-2-(5-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione (97)

Copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex ($\text{Cu}_2(\text{OTf})_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_6$, 5.0 mg, 11 μmol , 0.1 equiv) was added to a solution of compound **70** (45 mg, 0.11 mmol) and benzyl azide (15 μL , 0.11 mmol, 1.05 equiv) in CH_2Cl_2 (1.1 mL) under a dry N_2 atmosphere. The mixture was stirred vigorously overnight at room temperature. $\text{Tf}_2\text{Cu}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_6$ (3.00 mg, 1.99 μmol , 0.05 equiv) was added and the mixture was stirred again overnight. The reaction mixture was filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) to give 45 mg (82 μmol , 76%) of compound **97**.



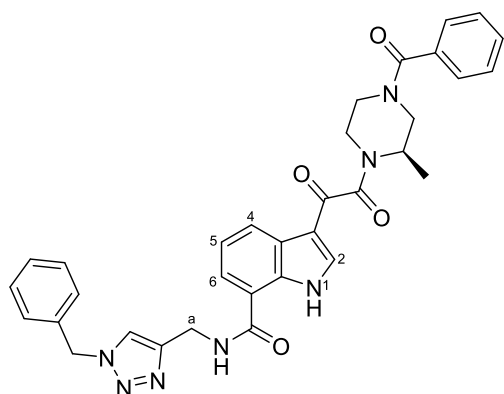
Yellowish oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.56. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.51 (br s, 1H, NH), 7.83 (br s, 1H, H_{triaz}), 7.81 (d, $J = 3.3$, 1H, H_2), 7.59 (s, 1H, H_4), 7.46 – 7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 7.35 – 7.32 (m, 3H, H_{Ph}), 7.26 – 7.23 (m, 2H, H_{Ph}), 7.16 (d, $J = 8.9$, 1H, H_7), 6.84 (dd, $J = 8.8, 2.4$, 1H, H_6), 5.50 (s, 2H, CH_2Ph), 5.18 (s, 2H, H_a), 4.72 – 2.09 (br m, 7H, H_{pip}), 1.25 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.2 (CO), 170.9 (NCO), 166.6 (NCO), 155.4 (C_q), 144.5 (C_q), 136.4 (CH, C_2), 135.0 (CH, C_{triaz}), 134.5 (C_q), 132.1 (C_q), 130.4 (CH, C_{Ph}), 129.3 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 128.9 (CH, C_{Ph}), 128.2 (CH, C_{Ph}), 127.2 (CH, C_{Ph}), 126.2 (C_q), 123.1 (C_q), 115.0 (C_q), 114.3 (CH, C_6), 113.2 (CH, C_7), 105.1 (CH, C_4), 62.6 (CH_2 , C_a), 54.4 (CH_2 , CH_2Ph), 46.3

(C_{pip}), 46.1 (C_{pip}), 41.7 (C_{pip}), 41.5 (C_{pip}), 15.0 (CH₃, Me_{pip}), 13.65 (CH₃, Me_{pip}).

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-N-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indole-7-carboxamide (98)

Benzyl azide (32 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv) followed by copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex (Cu₂(OTf)₂·C₆H₆, 62 mg, 0.11 mmol, 0.5 equiv) were added to a solution of compound **87** (100 mg, 219 μmol) in CH₂Cl₂ (2.2 mL) under a dry N₂ atmosphere. The mixture was stirred vigorously for 48 h and then the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 58 mg (0.10 mmol, 46%) of compound **98**.



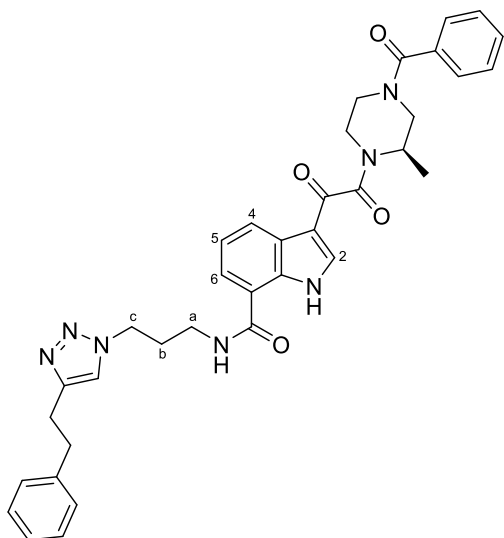
Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.78. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 11.10 (br s, 1H, NH), 8.22 (br s, 1H, H₄), 8.02 (s, 1H, H₂), 7.80 (s, 1H, NHCO), 7.58 – 7.55 (m, 2H, H₆ + H_{triaz}), 7.46 – 7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 7.35 – 7.20 (m, 6H, H_{Ph} + H₅), 5.48 (s, 2H, NCH₂Ph), 4.95 – 3.00 (br m, 7H, H_{pip}), 4.70 (d, *J* = 2.5, 2H, H_a), 1.29 (br s, 3H, Me_{pip}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.5 (CO), 171.7 (NCO), 167.2 (NCO), 166.1 (NCO), 136.4 (CH, C_{triaz}), 136.2 (CH, C₂), 135.2 (C_q),

134.4 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 129.3 (CH, C_{Ph}), 129.0 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 128.3 (CH, C_{Ph}), 127.1 (C_{Ph}), 126.7 (C_q), 126.6 (C_q), 126.3 (CH, C₄), 122.7 (CH, C₅), 121.9 (CH, C₆), 116.6 (C_q), 114.4 (C_q), 54.5 (CH₂, CH₂Ph), 50.0 (CH, C_{pip}), 41.3 (CH₂, C_{pip}), 36.1 (CH₂, C_{pip}), 35.2 (CH₂, C_a), 15.2 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₃₃H₃₂N₇O₄⁺ (M+H)⁺: 590.2510, found: 590.2503.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(R)-3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-N-(3-(4-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-1H-indole-7-carboxamide (99)

4-Phenyl-1-butyne (35 μL, 0.24 mmol, 1.1 equiv) followed by copper(I) trifluoromethanesulfonate benzene complex (Cu₂(OTf)₂·C₆H₆, 62 mg, 0.11 mmol, 0.5 equiv) were added to a solution of compound **88** (111 mg, 221 μmol) in CH₂Cl₂ (2.2 mL) under a dry N₂ atmosphere. The mixture was stirred vigorously for 48 h. The solvent was then removed under reduced pressure and the residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5) to give 63 mg (0.10 mol, 45%) of compound **99**.



Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.50. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 11.13 (br s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, H_{triaz}), 8.01 (t, $J = 3.3$, 1H, H_2), 7.53 (d, $J = 7.4$, 1H, H_4), 7.45 – 7.32 (m, 5H, H_{Ph}), 7.29 – 7.09 (m, 8H, $\text{NHCO} + \text{H}_{\text{Ph}} + \text{H}_6 + \text{H}_5$), 4.97 – 2.83 (br m, 7H, H_{pip}), 4.40 (t, $J = 6.3$, 2H, H_c), 3.46 (q, $J = 6.0$, 2H, H_a), 3.03 – 2.87 (m, 4H), 2.23 – 2.12 (m, 2H, H_b), 1.28 (br s, 3H, Me_{pip}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 185.2 (CO), 171.4 (NCO), 167.5 (NCO), 166.3 (NCO), 141.1 (C_q), 136.3 (CH, C_2), 135.2 (C_q), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 128.6 (C_q), 128.5 (CH, C_{Ph}), 128.5 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.7

(C_q), 126.7 (CH, C_4), 126.2 (CH, C_{triaz}), 122.8 (CH, C_5), 121.7 (CH, C_6), 116.6 (C_q), 114.3 (C_q), 50.0 (CH, C_{pip}), 48.0 (CH_2 , C_c), 41.2 (CH_2 , C_{pip}), 37.0 (CH_2 , C_a), 36.5 (CH_2 , C_{pip}), 35.5 (CH_2), 28.9 (CH_2 , C_b), 27.5 (CH_2), 15.2 (CH_3 , Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 632.2980, found: 632.3035.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

6.2.2. Ligands

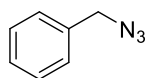
2-Azidoethan-1-ol (101)¹¹⁷

2-Chloroethanol (5.6 mL, 84 mmol) was added to a solution of sodium azide (7.00 g, 108 mmol, 1.3 equiv) in H_2O (20 mL). The mixture was stirred for 24 h at 80 °C. After cooling, the reaction mixture was diluted with brine (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 25 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 7.14 g (82.0 mmol, 98%) of azide **101**.

HOCCN=[N+]=[N-] Colorless oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.23. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.77 – 3.75 (m, 2H, HOCH_2), 3.43 (t, $J = 5.1$, 2H, CH_2N_3), 2.27 (br s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 61.1 (CH_2 , CH_2OH), 53.3 (CH_2 , CH_2N_3). **FTIR** 3357, 2930, 2878, 2093.

Benzyl azide (102)

Benzyl bromide (8.7 mL, 73 mmol) was added to a suspension of sodium azide (5.00 g, 76.9 mmol, 1.05 equiv) in DMF (20 mL) under a dry N_2 atmosphere and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was diluted with H_2O (200 mL) and extracted with Et_2O (3 x 150 mL). The organic layers were collected, washed with H_2O (3 x 100 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 9.72 g (73.0 mmol, 99%) of azide **102**.



Colorless oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.90. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.41 – 7.32 (m, 5H, H_{Ph}), 4.35 (s, 2H, CH_2). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 135.3 (C_q), 128.6 (CH , C_{Ph}), 128.0 (CH , C_{Ph}), 128.0 (CH , C_{Ph}), 54.4 (CH_2 , CH_2N_3).

2-Azido-2-methylpropane (**103**)¹¹⁸

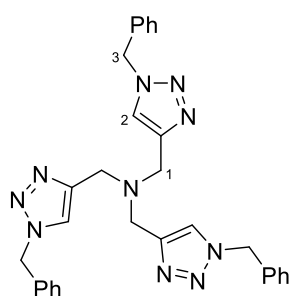
Sodium azide (4.58 g, 70.4 mmol, 1.1 equiv) was added little by little to a solution of $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 1:1 (w/w, 70 g) at 0 °C. When all of the NaN_3 was dissolved, *tert*-butyl alcohol (6.0 mL, 64 mmol) was slowly added and the resulting solution was stirred for 10 min at room temperature and then maintained without stirring for 2 days. The organic layer was separated, washed with 2 M NaOH (5 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 4.195 g (42.32 mmol, 66%) of azide **105**.



Colorless oil. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.23 (s, 18H, $\text{H}_{t\text{Bu}}$). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 58.9 (C_q), 28.0 (CH_3 , $\text{Me}_{t\text{Bu}}$).

Tris((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine (**104**, TBTA)¹¹⁹

Sodium L-ascorbate (50 mg, 0.25 mmol, 0.1equiv) in H_2O (3 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (31 mg, 0.13 mmol, 0.05 equiv) in H_2O (3 mL) were added to a solution of benzyl azide (**102**, 1.00 mL, 8.80 mmol, 1.2 equiv) and tripropargylamine (328 mg, 2.50 mmol) in *tert*-butyl alcohol (8 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was heated to 75 °C and stirred overnight. The reaction was quenched by addition of ammonia (5 mL) and diluted with CH_2Cl_2 (20 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) to give 1.07 g (2.01 mmol, 81%) of compound **104**.

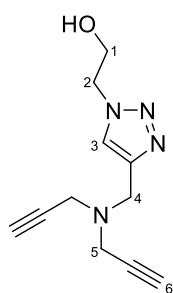


White solid. M_p 137–138 °C (lit.¹¹⁹ 138–139). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.49. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.68 (s, 3H, H_2), 7.35 – 7.27 (m, 9H, H_{Ph}), 7.25 – 7.20 (m, 6H, H_{Ph}), 5.49 (s, 6H, H_3), 3.72 (s, 6H, H_1). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 144.3 (C_q), 134.8 (C_q), 129.1 (CH , C_{Ph}), 128.7 (CH , C_{Ph}), 128.1 (CH , C_{Ph}), 124.0 (CH , C_2), 54.2 (CH_2 , C_3), 47.2 (CH_2 , C_1).

2-(4-((Di(prop-2-yn-1-yl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethan-1-ol (**105**)¹²⁰

Copper(I) acetate (22 mg, 0.18 mmol, 0.05 equiv) was added to a solution of 2-azidoethan-1-ol (**101**, 462 mg, 5.30 mmol, 1.5 equiv) and tripropargylamine (500 μL , 3.53 mmol) in anhydrous THF (35 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was heated to 60 °C and stirred overnight.

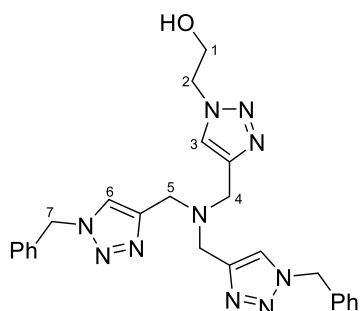
The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 303 mg (1.39 mmol, 40%) of compound **105**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.25. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.66 (s, 1H, H₃), 4.48 (m, 2H, H₁), 4.07 (m, 2H, H₂), 3.86 (s, 2H, H₄), 3.47 (d, *J* = 2.1, 4H, H₅), 2.27 (t, *J* = 2.4, 2H, H₆).

2-(4-((Bis((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethan-1-ol (**106**)

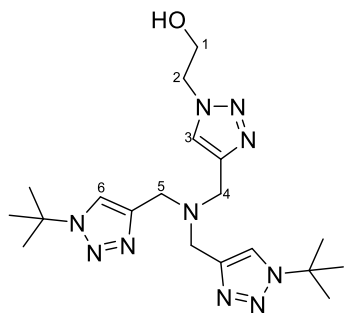
Copper(I) acetate (12 mg, 0.10 mmol, 0.1 equiv) was added to a solution of benzyl azide (**102**, 403 mg, 3.02 mmol, 3.0 equiv) and compound **105** (220 mg, 1.01 mmol) in anhydrous THF (10 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 60 °C and stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 94:6) to give 425 mg (0.877 mmol, 87%) of alcohol **106**.



Colorless oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.38. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.92 (s, 1H, H₃), 7.69 (s, 2H, H₆), 7.43 – 7.18 (m, 10H, H_{Ph}), 5.50 (s, 4H, H₇), 4.46 (t, *J* = 4.7, 2H, H₁), 4.02 (t, *J* = 4.6, 2H, H₂), 3.82 (s, 2H, H₄), 3.79 (s, 4H, H₅).

2-(4-((Bis((1-*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethan-1-ol (**107**)⁷⁵

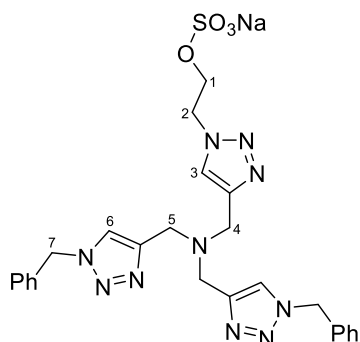
Copper(I) acetate (8.4 mg, 0.069 mmol, 0.1 equiv) was added to a solution of compound **103** (340 mg, 3.44 mmol, 5.0 equiv) and alcohol **105** (150 mg, 0.687 mmol) in anhydrous THF (5 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 60 °C and stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to give 280 mg (0.672 mmol, 98%) of alcohol **107**.



Colorless oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.09. $^1\text{H NMR}$ (D₂O, 400 MHz): δ 7.90 (s, 1H, H₃), 7.84 (s, 2H, H₆), 4.47 (t, $J = 5.0$, 2H, H₁), 4.00 (t, $J = 5.2$, 2H, H₂), 3.72 (s, 2H, H₄), 3.81 (s, 4H, H₅), 1.64 (s, 18H, H_{tBu}). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 143.8 (C_q), 143.1 (C_q), 125.1 (CH, C₃), 121.3 (CH, C₆), 61.0 (CH₂, C₁), 59.5 (C_q), 53.0 (CH₂, C₂), 50.5 (CH₂, C₅), 47.2 (CH₂, C₄), 30.1 (CH₃, C_{tBu}).

Sodium 2-(4-((bis((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl sulfate (**108**)

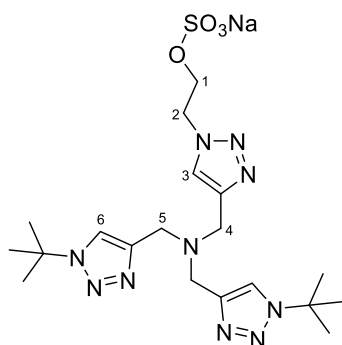
Sulfur trioxide-pyridine complex (SO₃·py, 154 mg, 0.970 mmol, 5.0 equiv) was added to a solution of alcohol **106** (94 mg, 0.19 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous pyridine (5 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was heated to 50 °C and stirred overnight. After cooling, the reaction mixture was quenched with MeOH (2 mL) and stirred for 30 min at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 85:15) to furnish the corresponding acid that was further neutralized with 0.05 M NaOH to obtain 99 mg (0.17 mmol, 89%) of sodium salt **108**.



Colorless oil. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 85:15) 0.27. $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.82 (s, 1H, H₃), 7.68 (s, 2H, H₆), 7.29 – 7.14 (m, 10H, H_{Ph}), 5.42 (s, 4H, H₇), 4.55 (t, $J = 4.9$, 2H), 4.27 (t, $J = 4.6$, 2H), 3.59 (s, 4H, H₅), 3.57 (s, 2H, H₄). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 144.2 (C_q), 143.6 (C_q), 129.0 (CH, C_{Ph}), 128.7 (CH, C_{Ph}), 128.0 (CH, C_{Ph}), 125.1 (CH, C₃), 124.1 (CH, C₆), 65.8 (CH₂), 54.1 (CH₂), 54.1 (CH₂, C₇), 49.7 (CH₂, C₅), 47.3 (CH₂, C₄).

2-(4-((Bis((1-*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl hydrogen sulfate (**109**)⁷⁵

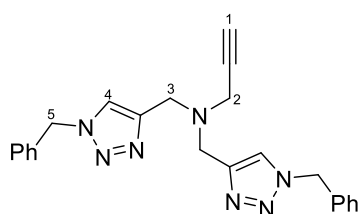
Sulfur trioxide-pyridine complex (SO₃·py, 191 mg, 1.20 mmol, 5.0 equiv) was added to a solution of alcohol **107** (100 mg, 0.240 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous pyridine (5 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction was heated to 50 °C and stirred overnight. After cooling, the reaction mixture was quenched with MeOH (2 mL) and stirred for 30 min at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 85:10:5) and it was stored under vacuum in a desiccator with P₂O₅ until constant weight to furnish the corresponding acid that was further neutralized with 0.05 M NaOH to obtain 107 mg (0.206 mmol, 86%) of sodium salt **109**.



Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TFA}$ 85:10:5) 0.11. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.40 (s, 2H, H_6), 8.31 (s, 1H, H_3), 4.76 (t, $J = 4.8$, 2H, H_1), 4.55 (t, $J = 4.8$, 2H, H_2), 3.36 (s, 2H, H_4), 3.31 (s, 4H, H_5), 1.64 (s, 18H, $\text{H}_{t\text{Bu}}$). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 143.8 (C_q), 143.3 (C_q), 126.2 (CH, C_3), 123.0 (CH, C_6), 67.0 (CH_2 , C_1), 60.6 (C_q), 50.0 (CH_2 , C_2), 48.4 (CH_2 , C_5), 48.2 (CH_2 , C_4), 29.3 (CH_3 , $\text{C}_{t\text{Bu}}$).

N,N-Bis((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine¹²¹

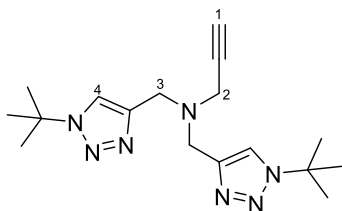
Copper(I) acetate (4.0 mg, 0.035 mmol, 0.02 equiv) in H_2O (50 μL) was added to a solution of benzyl azide (**102**, 470 mg, 3.53 mmol, 2.0 equiv) and tripropargylamine (250 μL , 1.77 mmol) in *tert*-butyl alcohol (7 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was diluted in H_2O (20 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3) to give 220 mg (0.553 mmol, 31%) of compound **110**.



Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3) 0.18. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.57 (s, 2H, H_4), 7.29 – 7.43 (m, 10H, H_{Ph}), 5.49 (s, 4H, H_5), 3.87 (s, 4H, H_3), 3.67 (s, 2H, H_2), 2.27 (s, 1H, H_1). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 137.7 (C_q), 127.8 (C_q), 122.2 (CH, C_{Ph}), 121.8 (CH, C_{Ph}), 121.2 (CH, C_{Ph}), 116.3 (CH, C_4), 78.2 (C_q), 67.0 (CH, C_1), 47.2 (CH_2 , C_5), 40.9 (CH_2 , C_3), 35.2 (CH_2 , C_2).

N,N-Bis((1-*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine⁷⁵

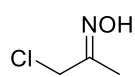
Copper(I) acetate (4.0 mg, 0.035 mmol, 0.02 equiv) in H_2O (50 μL) was added to a solution of azide **103** (351 mg, 3.53 mmol, 2.0 equiv) and tripropargylamine (250 μL , 1.77 mmol) in *tert*-butyl alcohol (7 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was diluted in H_2O (20 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3) to give 257 mg (0.780 mmol, 44%) of compound **111**.



Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3) 0.18. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.67 (s, 2H, H_4), 3.87 (s, 4H, H_3), 3.40 (d, $J = 2.4$, 2H, H_2), 2.28 (t, $J = 2.4$, 1H, H_1), 1.67 (s, 18H, $\text{H}_{t\text{Bu}}$). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 143.6 (C_q), 120.2 (CH, C_4), 78.8 (C_q), 73.5 (CH, C_1), 59.2 (CH_2 , C_2), 47.8 (CH_2 , C_3), 42.2 (C_q), 30.0 (CH_3 , $\text{C}_{t\text{Bu}}$).

1-Chloropropan-2-one oxime (**110**)⁷⁶

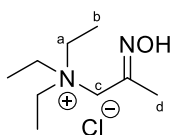
Hydroxylamine hydrochloride (3.84 g, 55.3 mmol, 1.0 equiv) in H_2O (1 mL) followed by a saturated aqueous solution of K_2CO_3 (3 mL) were added to a solution of freshly distilled chloroacetone (4.4 mL, 55 mmol) in Et_2O (6 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was then diluted with H_2O (100 mL) and extracted with Et_2O (50 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 5.35 g (49.7 mmol, 90%) of compound **110**.



Yellowish oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.35. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.09 (s, 2H, ClCH_2), 2.02 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 154.8 (CNOH), 45.5 (CH_2 , ClCH_2), 12.1 (CH_3 , Me).

N,N,N-Triethyl-2-(hydroxyimino)propan-1-aminium chloride (**111**, TACO)¹²²

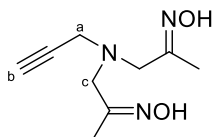
Triethylamine (7.2 mL, 52 mmol, 1.05 equiv) in $^i\text{PrOH}$ (18 mL) was added to a solution of compound **110** (5.30 g, 49.3 mmol) in anhydrous Et_2O (42 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction was stirred overnight at room temperature until all the product precipitated. The solid was filtered and washed with $^i\text{PrOH}$ to afford 9.46 g (45.3 mmol, 92%) of compound **111**.



White solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 11.8 (s, 1H, NOH), 4.04 (s, 2H, CH_2 , H_c), 3.29 (q, $J = 7.2$, 6H, H_a), 1.95 (s, 3H, H_d), 1.23 (t, $J = 7.1$, 9H, H_b). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 100.6 MHz): δ 147.1 (CNOH), 58.9 (CH_2 , C_c), 52.8 (CH_2 , C_a), 15.3 (CH_3 , C_d), 7.4 (CH_3 , C_b).

1-((2-(Hydroxyimino)propyl)(prop-2-yn-1-yl)amino)propan-2-one oxime (**112**)⁶⁹

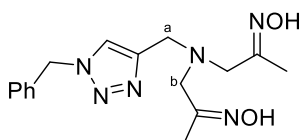
TACO (**111**, 4.07 g, 19.5 mmol, 2.5 equiv) was added to a solution of propargylamine (0.50 mL, 7.8 mmol) in anhydrous CH_3CN (21 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was refluxed for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (EtOAc) to give 1.44 g (7.34 mmol, 94%) of compound **112**.



White solid. R_f (EtOAc) 0.50. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 10.60 (s, 2H, NOH), 3.23 (d, $J = 2.3$, 2H, H_a), 3.11 (t, $J = 2.2$, 1H, C_b), 3.03 (s, 4H, H_c), 1.76 (s, 6H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ 153.3 (CNOH), 78.3 (C_q), 75.9 (CH, C_b), 56.5 (CH_2 , C_c), 41.3 (CH_2 , C_a), 12.1 (CH_3 , Me).

1-(((1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)(2-(hydroxyimino)propyl)amino)propan-2-one oxime (113)⁶⁹

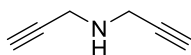
Sodium L-ascorbate (75 mg, 0.38 mmol, 0.15 equiv) in H_2O (2.5 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (32 mg, 0.13 mmol, 0.05equiv) in H_2O (2.5 mL) were added to a solution of benzyl azide (**102**, 310 μL , 2.54 mmol, 1.0 equiv) and compound **112** (500 mg, 2.54 mmol) in methanol (45 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was then removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (EtOAc) to give 695 mg (2.10 mmol, 94%) of compound **113**.



White solid. R_f (EtOAc) 0.23. $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.87 (s, 1H, H_{triaz}), 7.37 – 7.29 (m, 5H, H_{Ph}), 5.59 (s, 2H, CH_2Ph), 3.67 (s, 2H, H_a), 3.00 (s, 4H, H_b), 1.81 (s, 6H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100.6 MHz): δ 156.9 (CNOH), 145.6 (C_q), 136.9 (C_q), 130.0 (CH, C_{Ph}), 129.5 (CH, C_{Ph}), 129.0 (CH, C_{Ph}), 125.4 (CH, C_{triaz}), 58.3 (CH_2 , C_b), 54.9 (CH_2 , CH_2Ph), 49.1 (CH_2 , C_a), 12.4 (CH_3 , Me).

1-(Di(prop-2-yn-1-yl)amine (114)

Propargyl bromide (80% in toluene, 3.50 mL, 31.2 mmol, 1.0 equiv) was added to a solution of triethylamine (4.40 mL, 31.2 mmol, 1.0 equiv) and propargylamine (2.0 mL, 31 mmol) under a dry N_2 atmosphere, at 20 °C. The reaction was stirred 1 h at 20 °C. The reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was distilled to give 720 mg (7.81 mmol, 25%) of amine **114**.

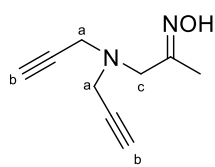


Colorless oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3) 0.40. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.47 (s, 2H, CH_2), 2.26 (s, 1H, CH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 81.0 (C_q), 72.0 (CH), 36.2 (CH_2).

1-(Di(prop-2-yn-1-yl)amino)propan-2-one oxime (115)⁶⁹

TACO (**111**, 1.13 g, 5.42 mmol, 1.3 equiv) was added to a solution of amine **114** (300 mg, 3.25 mmol) in anhydrous CH_3CN (14 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was refluxed

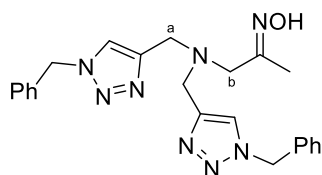
for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (EtOAc) to give 411 mg (2.50 mmol, 77%) of compound **115**.



Colorless oil. R_f (EtOAc) 0.45. $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 3.40 (s, 2H, H_a), 3.39 (s, 2H, H_a), 3.19 (s, 2H, H_b), 3.13 (s, 2H, H_c), 1.87 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100.6 MHz): δ 156.7 (CNOH), 79.3 (C_q), 74.6 (CH, C_b), 57.9 (CH₂, C_c), 42.7 (CH₂, C_a), 12.4 (CH₃, Me).

1-(Bis((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)propan-2-one oxime (**116**)⁶⁹

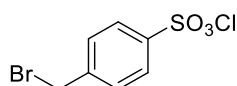
Sodium L-ascorbate (48 mg, 0.24 mmol, 0.15 equiv) in H₂O (1.5 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (20 mg, 0.08 mmol, 0.05 equiv) in H₂O (1.5 mL) were added to a solution of benzyl azide (**102**, 440 μL , 3.55 mmol, 2.2 equiv) and compound **115** (265 mg, 1.61 mmol) in methanol (29 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (EtOAc) to give 535 mg (1.24 mmol, 77%) of compound **116**.



White solid. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) 0.22. Mixture of *E*-**116** and *Z*-**116** in a 2:1 ratio. *E*-**116**: $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.89 (s, 2H, H_{triaz}), 7.37 – 7.29 (m, 10H, H_{Ph}), 5.57 (s, 4H, CH_2Ph), 3.69 (s, 4H, H_a), 3.00 (s, 2H, H_b), 1.81 (s, 3H, Me). $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100.6 MHz): δ 156.9 (CNOH), 145.8 (C_q), 136.9 (C_q), 132.0 (CH, C_{Ph}), 129.5 (CH, C_{Ph}), 129.0 (CH, C_{Ph}), 125.4 (CH, C_{triaz}), 58.3 (CH₂, C_a), 54.9 (CH₂, CH_2Ph), 49.0 (CH₂, C_b), 12.4 (CH₃, Me). *Z*-**116**: $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.87 (s, 2H, H_{triaz}), 7.37 – 7.29 (m, 10H, H_{Ph}), 5.59 (s, 4H, CH_2Ph), 3.67 (s, 4H, H_a), 3.04 (s, 2H, H_b), 1.74 (s, 3H, Me).

4-(Bromomethyl)benzenesulfonyl chloride (**117**)⁷⁷

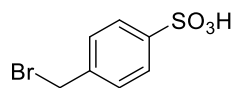
Benzoyl peroxide (635 mg, 2.62 mmol, 0.05 equiv) was added to a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (10.00 g, 52.45 mmol) and *N*-bromosuccinimide (9.43 g, 53.0 mmol, 1.01 equiv) in 1,2-dichloroethane (66 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated at 80 °C and stirred for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by crystallisation from heptane to give 12.87 g (47.73 mmol, 91%) of compound **117**.



White solid. R_f (CH_2Cl_2) 0.74. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.01 (d, J = 8.5, 2H, H_{Ar}), 7.63 (d, J = 8.4, 2H, H_{Ar}), 4.51 (s, 2H, CH_2Br). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 145.6 (C_q), 143.9 (C_q), 130.3 (CH, C_{Ar}), 127.6 (CH, C_{Ar}), 30.9 (CH₂, CH_2Br).

4-(Bromomethyl)benzenesulfonic acid (118)¹²³

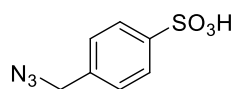
An aqueous HCl solution (10%, 50 mL) was added to a solution of compound **117** (7.62 g, 28.3 mmol) in 1,4-dioxane (55 mL). The reaction mixture was heated at 40 °C and stirred for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by crystallization from chloroform to give 5.99 g (25.4 mmol, 90%) of compound **118**.



White solid. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.05. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.80 (d, J = 8.3, 2H, H_{Ar}), 7.63 (d, J = 8.5, 2H, H_{Ar}), 4.59 (s, 2H, CH₂Br). ¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz): δ 146.7 (C_q), 137.3 (C_q), 129.8 (CH, C_{Ar}), 127.4 (CH, C_{Ar}), 32.8 (CH₂, CH₂Br).

4-(Azidomethyl)benzenesulfonic acid (119)¹²³

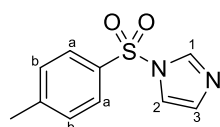
NaHCO₃ (2.14 g, 25.5 mmol, 1.0 equiv) followed by sodium azide (1.66 g, 25.5 mmol, 1.0 equiv) were added to a solution of compound **118** (5.99 g, 25.4 mmol) in EtOH/H₂O 8:2 (50 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 9:1:0.5) to give 5.28 g (24.8 mmol, 97%) of compound **119**.



Orange solid. R_f (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 9:1:0.5) 0.13. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.65 (d, J = 8.0, 2H, H_{Ar}), 7.34 (d, J = 7.9, 2H, H_{Ar}), 4.44 (s, 2H, CH₂N₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ 147.7 (C_q), 136.1 (C_q), 128.0 (CH, C_{Ar}), 126.1 (CH, C_{Ar}), 53.3 (CH₂, CH₂N₃).

6.2.3. βCD**1-Tosyl-1H-imidazole (122)**¹²⁴

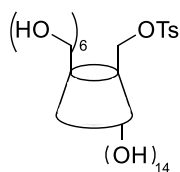
Tosyl chloride (15.00 g, 78.68 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (58 mL) was added dropwise over 1.5 h to a solution of imidazole (12.32 g, 181.0 mmol, 2.3 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (58 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solid was filtered through a pad of celite[®] and washed with CH₂Cl₂. The filtrate is concentrated under reduced pressure and the residue was purified by crystallization from EtOAc/hexanes 1:3 to give 14.13 g (63.57 mmol, 81%) of solid **122**.



White solid. **Mp** 78–80 °C (lit.¹²⁴ 78–79). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.00 (s, 1H, H₁), 7.81 (d, J = 8.0, 2H, H_a), 7.34 (d, J = 8.0, 2H, H_b), 7.28 (br s, 1H), 7.07 (br s, 1H), 2.43 (s, 3H, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 146.5 (C_q), 136.8 (CH, C₁), 135.0 (C_q), 131.5 (CH), 130.6 (CH, C_a), 127.5 (CH, C_b), 117.6 (CH), 21.8 (CH₃, Me).

O-Toluenesulfonyl- β -cyclodextrin (123)¹²⁴

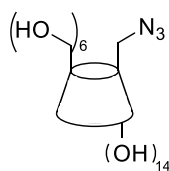
Compound **122** (4.70 g, 21.2 mmol, 4.0 equiv) was added to a solution of β -cyclodextrin (6.00 g, 5.29 mmol) in H₂O (140 mL). The reaction mixture was vigorously stirred for 2 h at room temperature and was quenched by careful addition of 5 M NaOH (10 mL). The mixture was diluted with saturated aqueous NH₄Cl solution (50 mL) and concentrated under reduced pressure to reduce the volume. The precipitate formed was washed several times with acetone to give 1.77 g (1.37 mmol, 26%) of cyclodextrin **123**.



White solid. **Mp** 78–80 °C (lit.¹²⁴ 78–79). **R_f** (ⁱPrOH/H₂O/EtOAc/NH₄OH 5:3:1:1) 0.45. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.75 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Ar}), 7.43 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Ar}), 5.83 – 5.62 (m, 14H), 4.83 (br s, 5H), 4.77 (br s, 2H), 4.53 – 4.41 (m, 5H), 4.38 – 4.29 (m, 2H), 4.19 (dd, *J* = 11.3, 6.5, 1H), 3.74 – 3.42 (m, 30H), 3.41 – 3.19 (m, 10H), 2.43 (s, 3H, Me). **MS** (MALDI-TOF/TOF): *m/z* calcd for C₄₉H₇₇NaO₃₇S⁺ (M-Na)⁺: 1311.2, found: 1311.3.

Azido- β -cyclodextrin (124)

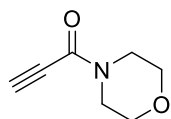
Sodium azide (378 mg, 5.82 mmol, 15 equiv) was added to a solution of compound **123** (500 mg, 0.388 mmol) in H₂O (2 mL). The reaction mixture was heated at 80 °C and stirred overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure to half the volume. The precipitate formed was filtered, redissolved with H₂O and crystallized by addition of acetone to give 439 mg (0.373 mmol, 96%) of azide **124**.



White solid. **R_f** (ⁱPrOH/H₂O/EtOAc/NH₄OH 5:3:1:1) 0.35. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 5.81 – 5.60 (m, 14H), 4.87 (d, *J* = 2.3, 1H), 4.86 – 4.80 (m, 6H), 4.52 (dd, *J* = 12.9, 5.7, 2H), 4.48 – 4.42 (m, 4H), 3.78 – 3.52 (m, 30H), 3.42 – 3.23 (m, 12H). **MS** (MALDI-TOF/TOF): *m/z* calcd for C₄₂H₆₉N₃NaO₃₄⁺ (M-Na)⁺: 1182.4, found: 1182.4.

1-Morpholinoprop-2-yn-1-one (125)

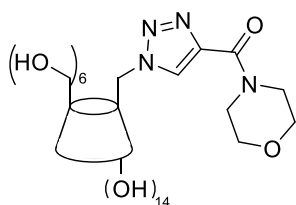
A solution of morpholine (2.9 mL, 33 mmol, 1.05 equiv) in CH₂Cl₂ (20 mL) followed by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 6.93 g, 33.6 mmol, 1.05 equiv) were added to a solution of propiolic acid (2.0 mL, 32 mmol) in CH₂Cl₂ (60 mL) under a dry N₂ atmosphere, at –20 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc, 1:1) to give 3.53 g (25.4 mmol, 79%) of propiolamide **125**.



White solid. **Mp** 70–71 °C (lit.¹²⁵ 70–72). **R_f** (CH₂Cl₂/EtOAc 1:1) 0.47. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.80 – 3.75 (m, 4H, H_{morph}), 3.74 – 3.70 (m, 2H, H_{morph}), 3.70 – 3.63 (m, 2H, H_{morph}), 3.14 (s, 1H, CCH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 151.7 (CO), 79.8 (CH, CCH), 75.2 (C_q), 67.0 (CH₂, C_{morph}), 66.5 (CH₂, C_{morph}), 47.4 (CH₂, C_{morph}), 42.1 (CH₂, C_{morph}). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₇H₁₀NO₂⁺ (M+H)⁺: 140.0706, found: 140.0708.

4-(N-Morpholine-4-carbonyl)-1-β-cyclodextrin-1H-1,2,3-triazole (126)

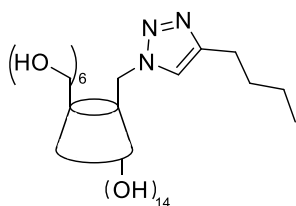
Copper(I) acetate (0.1 mg, 0.9 μmol, 0.02 equiv) in H₂O (0.45 mL) was added to a mixture of compound **124** (50 mg, 0.043 mmol), compound **125** (6.3 mg, 0.045 mmol, 1.05 equiv), and ligand **109** (0.4 mg, 0.9 μmol, 0.02 equiv) in *tert*-butyl alcohol (0.45 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH) and acetone (0.5 mL) was added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P₄O₁₀ until constant weight to give 52 mg (0.041 mmol, 94%) of compound **126** (Entry 16, **Table 2.1**).



White solid. **R_f** (ⁱPrOH/H₂O/EtOAc/NH₄OH 5:3:1:1) 0.31. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.53 (s, 1H, H_{triaz}), 5.92 – 5.60 (m, 14H), 5.07 – 4.91 (br m, 1H), 4.90 – 4.74 (m, 6H), 4.56 – 4.40 (m, 5H), 4.12 – 4.00 (m, 2H), 3.84 – 3.49 (m, 30H), 3.45 – 3.18 (m, 21H). **MS** (MALDI-TOF/TOF): *m/z* calcd for C₅₀H₈₀N₄NaO₃₇⁺ (M-Na)⁺: 1351.4, found: 1351.3.

4-butyl-1-β-cyclodextrin-1H-1,2,3-triazole (127)

Sodium L-ascorbate (1.3 mg, 6.5 μmol, 0.15 equiv) in H₂O (0.2 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (0.5 mg, 2 μmol, 0.05equiv) in H₂O (0.2 mL) were added to a mixture of compound **124** (50 mg, 0.043 mmol), 1-hexyne (5 μL, 0.05 mmol, 1.05 equiv), and ligand **109** (2.0 mg, 4.3 μmol, 0.1 equiv) in *tert*-butyl alcohol (0.45 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH) and acetone (0.5 mL) was added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P₄O₁₀ until constant weight to give 51 mg (0.041 mmol, 96%) of compound **127** (Entry 3, **Table 2.2**).

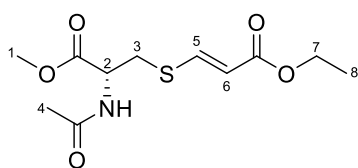


White solid. **R_f** (ⁱPrOH/H₂O/EtOAc/NH₄OH 5:3:1:1) 0.63. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.62 (s, 1H, H_{triaz}), 6.02 – 5.71 (m, 14H), 4.87 – 4.61 (m, 6H), 4.49 – 4.32 (m, 6H), 4.08 – 3.97 (m, 3H), 3.82 – 3.44 (m, 28H), 3.32 – 3.15 (m, 16H), 1.20 – 1.01 (m, 7H). **MS** (MALDI-TOF/TOF): *m/z* calcd for C₄₉H₈₁N₃NaO₃₅⁺ (M-Na)⁺: 1294.5, found: 1293.4.

6.3. Experimental chapter 3

Ethyl (*R,E*)-3-((2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropyl)thio)acrylate (*E*-128)

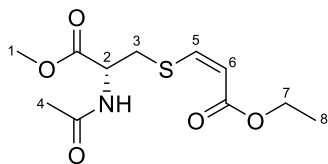
DABCO (2.0 mg, 0.018 mmol, 0.1 equiv) was added to a solution of *N*-acetyl-L-cysteine methyl ester (40 mg, 0.20 mmol) and ethyl propiolate (22 μ L, 0.22 mmol, 1.1 equiv) in CH₃CN (2 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred for 10 min at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to give 55 mg (0.20 mmol, 100%) of compound **E-128** (Entry 3, **Table 3.1**, column CH₃CN).



Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) 0.50. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.51 (d, J = 15.3, 1H, H₅), 6.45 (br s, 1H, NH), 5.83 (d, J = 15.3, 1H, H₆), 4.97 – 4.85 (m, 1H, H₂), 4.15 (q, J = 7.1, 2H, H₇), 3.77 (s, 3H, H₁), 3.44 – 3.15 (m, 2H, H₃), 2.02 (s, 3H, H₄), 1.24 (t, J = 7.0, 3H, H₈). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 170.4 (CO), 170.1 (CO), 165.1 (CO), 145.8 (CH, C₅), 115.8 (CH, C₆), 60.5 (CH₂, C₇), 53.1 (CH₃, C₁), 52.0 (CH, C₂), 34.7 (CH₂, C₃), 23.1 (CH₃, C₄), 14.4 (CH₃, C₈). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₁₁H₁₈NO₅S⁺ (M+H)⁺: 276.0900, found: 276.0903.

Ethyl (*R,Z*)-3-((2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropyl)thio)acrylate (*Z*-128)

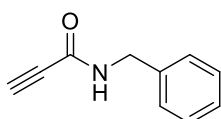
Ethyl propiolate (22 μ L, 0.22 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of *N*-acetyl-L-cysteine methyl ester (40 mg, 0.20 mmol) in phosphate-buffered solutions (2 mL) under a dry N₂ atmosphere, at 0 °C. The reaction was stirred for 10 min at room temperature. The mixture was diluted with H₂O (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give 54 mg (0.20 mmol, 100%) of compound **Z-128** (Entry 1, **Table 3.1**, column H₂O (pH 7.4)).



Yellowish oil. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) 0.33. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.95 (d, J = 10.1, 1H, H₅), 6.47 (br s, 1H, NH), 5.82 (d, J = 10.1, 1H, H₆), 4.88 – 4.81 (m, 1H, H₂), 4.16 (q, J = 7.2, 2H, H₇), 3.75 (s, 3H, H₁), 3.27 (dd, J = 6.3, 4.7, 2H, H₃), 2.01 (s, 3H, H₄), 1.25 (t, J = 7.1, 3H, H₈). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 170.5 (CO), 170.1 (CO), 166.6 (CO), 149.3 (CH, C₅), 114.2 (CH, C₆), 60.3 (CH₂, C₇), 53.0 (CH₃, C₁), 52.7 (CH, C₂), 38.2 (CH₂, C₃), 23.1 (CH₃, C₄), 14.4 (CH₃, C₈). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₁₁H₁₈NO₅S⁺ (M+H)⁺: 276.0900, found: 276.0902.

***N*-Benzylpropynamide (129)**¹²⁶

A solution of benzylamine (1.7 mL, 17 mmol, 1.05 equiv) in CH₂Cl₂ (10 mL) followed by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 3.52 g, 17.1 mmol, 1.05 equiv) were added to a solution of propionic acid or propynoic acid (1.0 mL, 16 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) under a dry N₂ atmosphere, at -20 °C. The reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography (CH₂Cl₂ 1:1) to give 2.10 g (13.2 mmol, 81%) of propynamide **129**.



White solid. **Mp** 88–89 °C (lit.¹²⁷ 89–92). **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) 0.48. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.38 – 7.16 (m, 5H, H_{Ph}), 6.39 (br s, 1H, NH), 4.41 (d, *J* = 5.9, 2H, CH₂Ph), 2.74 (s, 1H, CCH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 152.2 (CO), 137.1 (C_q), 128.9 (CH, C_{Ph}), 128.0 (CH, C_{Ph}), 127.9 (CH, C_{Ph}), 77.3 (CH, CCH), 73.7 (C_q), 43.9 (CH₂, CH₂Ph). **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₁₀H₁₀NO⁺ (M+H)⁺: 160.0757, found: 160.0760.

General Procedure for the Addition of Thiols to Propynamides (Propiolamides) in Aqueous Media. Thiols (in general, 0.20–0.50 mmol) were dissolved in phosphate-buffered solutions (2.5 mL) under N₂; in the cases of L-cysteine and L-glutathione reduced, solid K₂HPO₄ was added until the pH value was 7.40 (pHmeter). These solutions were slowly added, over 10 min, to the propynamides (0.22–0.55 mmol) in 2.5 mL of H₂O, ^tBuOH, EtOH, THF, or buffered water/THF, either at room temperature or 37 °C. The reaction mixtures were stirred until TLC analysis indicated complete consumption of the substrate (usually for a further 10–60 min). The conversion yields were ~100% in all cases, at pH ≥ 7.4.

The reaction mixtures from *N*-acetyl-L-cysteine methyl ester were diluted with H₂O and extracted three times with CH₂Cl₂. The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and concentrated. The residues were usually purified by *flash* column chromatography and the solids were then stored in vacuum desiccators over P₄O₁₀ until the weight was constant.

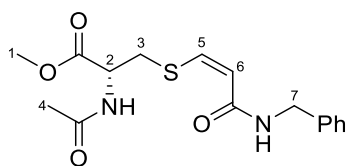
The reaction mixtures from L-cysteine were concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH), and the precipitates that appeared were filtered, rinsed with water, and dried under vacuum over P₄O₁₀. The crude products from most experiments were chromatographically and spectroscopically pure (only the *Z* isomers); no recrystallization was needed.

The reaction mixtures from L-glutathione reduced were acidified to pH 3.5 with NaH₂PO₄ (plus a drop of H₃PO₄), and a similar volume of EtOH was added and separated (three times). The moist EtOH solutions were evaporated to dryness. The residues were treated with a 4:1 ⁱPrOH–H₂O mixture. The solutions were filtered through celite[®] (to remove remaining amounts of the insoluble phosphates) and rinsed with the same mixture (ⁱPrOH–H₂O), evaporated to dryness and stored in the desiccator,

weighted. In the experiments in which a mixture of stereoisomers was formed, the crude products were recrystallized from an ¹PrOH/H₂O mixture (80-85% recovery) to remove the minor *E*-isomers.

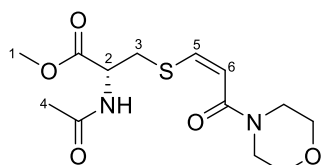
The reaction mixtures from oxytocin were concentrated under vacuum (to remove ¹BuOH), and the resulting precipitate was filtered, washed with EtOAc (to remove the excess of organic compounds), rinsed with water, and dried under vacuum desiccator over P₄O₁₀ until the weight was constant.

Methyl *N*-acetyl-*S*-[(*Z*)-3-phenylmethylamino]-3-oxo-1-propen-1-yl]-L-cysteinate (130)



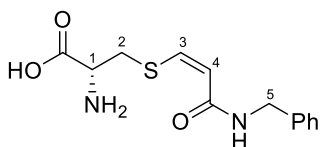
Yield: 94% (91 mg). White solid. **Mp** 123–125 °C. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) 0.30. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.33 – 7.25 (m, 5H, H_{Ph}), 6.76 (d, *J* = 9.9, 1H, H₅), 6.43 (br s, 1H, NH), 5.89 (br s, 1H, NH), 5.78 (d, *J* = 9.9, 1H, H₆), 4.85 (m, 1H, H₂), 4.47 (d, *J* = 5.8, 2H, H₇), 3.76 (s, 3H, H₁), 3.24 (d, *J* = 4.5, 2H, H₃), 2.01 (s, 3H, H₄). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 170.6 (CO), 170.1 (CO), 166.0 (CO), 145.2 (CH, C₅), 138.3 (C_q), 128.8 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.7 (CH, C_{Ph}), 116.0 (CH, C₆), 53.0 (CH₃, C₁), 53.0 (CH, C₂), 43.6 (CH₂, C₇), 38.5 (CH₂, C₃), 23.2 (CH₃, C₄). **FTIR** 3303, 3271, 3069, 2917, 1738, 1660, 1632, 1568, 1538. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₁₆H₂₁N₂O₄S⁺ (M+H)⁺: 337.1217, found: 337.1221.

Methyl *N*-acetyl-*S*-[(*Z*)-3-*N*-morpholino-3-oxo-1-propen-1-yl]-L-cysteinate (131)



Yield: 98% (89 mg). White solid. **Mp** 177–178 °C. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) 0.28. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.90 (d, *J* = 9.9, 1H, H₅), 6.36 (br s, 1H, NH), 6.16 (d, *J* = 9.9, 1H, H₆), 4.88 (m, 1H, H₂), 3.77 (s, 3H, H₁), 3.68 (br s, 6H, H_{morph}), 3.49 (br s, 2H, H_{morph}), 3.25 (d, *J* = 4.5, 2H, H₃), 2.03 (s, 3H, H₄). **¹³C NMR** (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 170.6 (CO), 170.0 (CO), 165.5 (CO), 147.6 (CH, C₅), 111.8 (CH, C₆), 67.0 (CH₂, C_{morph}), 66.8 (CH₂, C_{morph}), 53.0 (CH₃, C₁), 52.7 (CH, C₂), 46.1 (CH₂, C_{morph}), 41.9 (CH₂, C_{morph}), 38.5 (CH₂, C₃), 23.2 (CH₃, C₄). **FTIR** 3278, 3069, 2914, 2850, 1721, 1639, 1625, 1614, 1539. **HRMS** (ESI+) *m/z* calcd for C₁₃H₂₁N₂O₅S⁺ [M+H]⁺ 317.1166, found 317.1171.

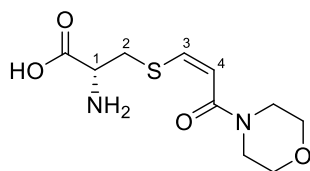
S-[(*Z*)-3-Phenylmethylamino-3-oxo-1-propen-1-yl]-L-cysteine (132)



Yield: 96% (56 mg). White solid. **Dec** 215–217 °C. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 80:15:5) 0.71. **¹H NMR** (D₂O+TFA, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 400 MHz): δ 7.38 – 7.32 (m, 5H, H_{Ph}), 7.01 (d, *J* = 10.0, 1H, H₃), 6.09 (d, *J* = 10.0, 1H, H₄), 4.40 (s, 2H, H₅), 3.43 – 3.38 (m, 3H, H₁+H₂). **¹³C NMR** (D₂O+TFA, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 100.6 MHz): δ 170.4 (CO), 170.0

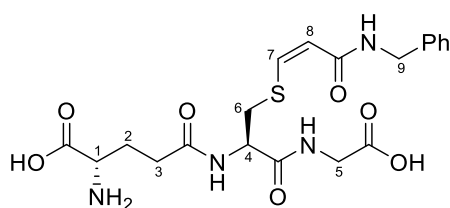
(CO), 143.6 (CH, C₃), 138.3 (C_q), 129.4 (CH, C_{Ph}), 129.0 (CH, C_{Ph}), 127.5 (CH, C_{Ph}), 117.4 (CH, C₄), 53.0 (CH, C₁), 43.0 (CH₂, C₅), 35.5 (CH₂, C₂). **HRMS** (ESI⁻) *m/z* calcd for C₁₃H₁₅N₂O₃S⁻ [M-H]⁻ 279.0809, found 279.0815.

S-[(Z)-3-Morpholino-3-oxo-1-propen-1-yl]-L-cysteine (133)



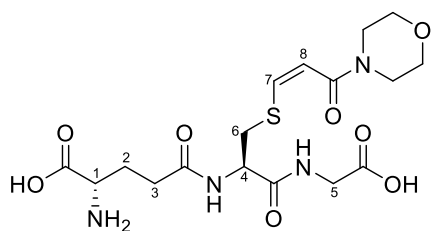
Yield: 97% (65 mg). White solid. **Dec** 198–200 °C. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 80:15:5) 0.62. **¹H NMR** (D₂O+TFA, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 400 MHz): δ 7.37 (d, *J* = 10.1, 1H, H₃), 6.66 (d, *J* = 10.1, 1H, H₄), 4.02 – 3.94 (m, 6H, H_{morph}), 3.83 (m, 2H, H_{morph}), 3.55 (m, 3H, H₁+H₂). **¹³C NMR** (D₂O+TFA, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 100.6 MHz): δ 172.1 (CO), 167.1 (CO), 146.0 (CH, C₃), 113.9 (CH, C₄), 66.6 (CH₂, C_{morph}), 63.8 (CH₂, C_{morph}), 54.3 (CH, C₁), 42.3 (CH₂, C_{morph}), 36.1 (CH₂, C₂), 32.6 (CH₂, C_{morph}). **HRMS** (ESI⁻) *m/z* calcd for C₁₀H₁₅N₂O₄S⁻ [M-H]⁻ 259.0758, found 259.0766.

S-[(Z)-3-Phenylmethylamino-3-oxo-1-propen-1-yl]glutathione (134)



Yield: 93% (152 mg). White solid. **Dec** 236–237 °C. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 80:15:5) 0.55. **¹H NMR** (D₂O, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 400 MHz): δ 7.53 – 7.30 (m, 5H, H_{Ph}), 7.03 (d, *J* = 10.0, 1H, H₇), 6.03 (d, *J* = 10.0, 1H, H₈), 4.70 – 4.62 (m, 1H, H₄), 4.40 (s, 2H, H₉), 3.79 – 3.69 (m, 3H, H₁+H₅), 3.29 (d, *J* = 13.9, 1H, H₆), 3.08 (dd, *J* = 13.8, 9.8, 1H, H₆), 2.50 (t, *J* = 7.1, 2H, H₃), 2.19 – 2.07 (m, 2H, H₂). **¹³C NMR** (D₂O, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 100.6 MHz): δ 176.4 (CO), 175.0 (CO), 174.1 (CO), 171.6 (CO), 168.6 (CO), 145.2 (CH, C₇), 138.5 (C_q), 129.0 (CH, C_{Ph}), 127.6 (CH, C_{Ph}), 127.5 (CH, C_{Ph}), 116.3 (CH, C₈), 54.3 (CH, C₁), 54.0 (CH, C₄), 43.6 (CH₂, C₅), 43.0 (CH₂, C₉), 37.1 (CH₂, C₆), 31.7 (CH₂, C₃), 26.4 (CH₂, C₂). **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₀H₂₇N₄O₇S⁺ [M+H]⁺ 467.1595, found 467.1596; **HRMS** (ESI⁻) *m/z* calcd for C₂₀H₂₅N₄O₇S⁻ [M-H]⁻ 465.1449, found 465.1463.

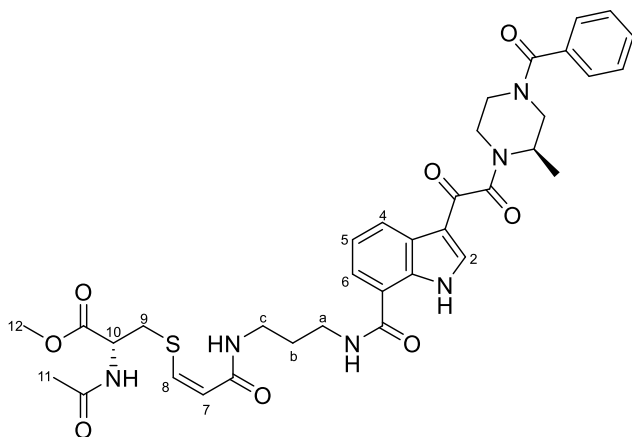
S-[(Z)-3-N-Morpholino-3-oxo-1-propen-1-yl]glutathione (135)



Yield: 95% (146 mg). White solid. **Dec** 220–222 °C. **R_f** (CH₂Cl₂/MeOH/TFA 80:15:5) 0.55. **¹H NMR** (D₂O, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 400 MHz): δ 7.13 (d, *J* = 10.2, 1H, H₇), 6.36 (d, *J* = 10.1, 1H, H₈), 4.63 (dd, *J* = 8.8, 5.0, 1H, H₄), 3.76 – 3.68 (m, 7H, H₁+H₅+H_{morph}), 3.63 – 3.56 (m, 4H, H_{morph}), 3.28 (dd, *J* = 14.3, 5.0, 1H, H₆), 3.07 (dd, *J* = 14.4, 8.8, 1H, H₆), 2.53 – 2.47 (m, 2H, H₃), 2.17

– 2.07 (m, 2H, H₂). ¹³C NMR (D₂O, ref. to 1:1 CHCl₃/CDCl₃, 100.6 MHz): δ 176.2 (CO), 174.8 (CO), 174.0 (CO), 171.4 (CO), 167.0 (CO), 147.0 (CH, C₇), 112.9 (CH, C₈), 66.4 (CH₂, C_{morph}), 54.1 (CH, C₁), 53.8 (CH, C₄), 46.1 (CH₂, C_{morph}), 43.5 (CH₂, C₅), 42.0 (CH₂, C_{morph}), 36.8 (CH₂, C₆), 31.5 (CH₂, C₃), 26.3 (CH₂, C₂). HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₁₇H₂₇N₄O₈S⁺ [M+H]⁺ 447.1544, found 447.1545. HRMS (ESI-) *m/z* calcd for C₁₇H₂₅N₄O₈S⁻ [M-H]⁻ 445.1399, found 445.1413.

Methyl *N*-acetyl-*S*-((*Z*)-3-((3-(3-(2-((*R*)-4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1*H*-indole-7-carboxamido)propyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)-*L*-cysteinate (137)

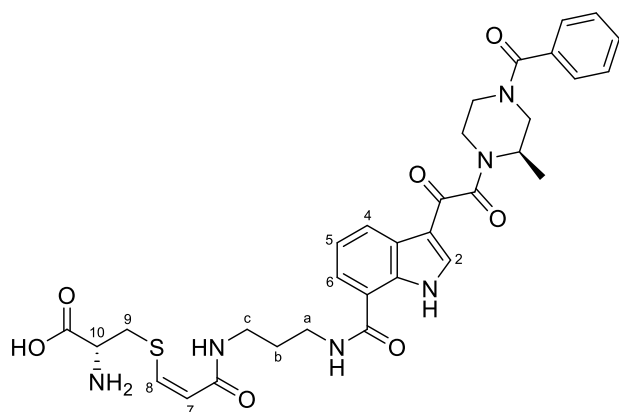


Yield: 98% (80 mg). Yellowish Oil; *R*_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) 0.19. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 11.33 (br s, 1H, NH), 8.42 (br s, 1H, H₄), 8.02 (m, 1H, H₂), 7.92 (br s, 1H, NH), 7.73 (d, *J* = 6.9, 1H, NH), 7.64 (d, *J* = 7.3, 1H, H₆), 7.41 – 7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 7.30 – 7.27 (m, 1H, H₅), 6.72 (d, *J* = 9.7, 1H, H₈), 6.48 (br s, 1H, NH), 5.79 (d, *J* = 9.9, 1H, H₇), 4.84 (br s, 1H, H₁₀), 3.77 (s, 3H, Me₁₂), 3.47 – 2.98 (m, 13H,

H_{pip} + H_a + H_c + H₉), 2.04 (s, 3H, Me₁₁), 1.73 (m, 2H, H_b), 1.28 (br s, 3H, Me_{pip}). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 185.6 (CO), 170.8 (CO), 170.5 (CO), 170.4 (CO), 167.5 (CO), 167.4 (CO), 167.2 (CO), 144.7 (CH, C₈), 136.6 (CH, C₂), 136.2 (C_q), 135.1 (C_q), 130.2 (CH, C_{Ph}), 128.8 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.7 (C_q), 125.9 (CH, C₄), 122.9 (CH, C₅), 122.2 (CH, C₆), 117.4 (C_q), 116.4 (CH, C₇), 114.2 (C_q), 52.9 (CH₃, Me₁₂), 52.7 (CH, C₁₀), 45.0 (C_{pip}), 38.4 (CH₂, C₉), 36.7 (CH₂), 36.4 (CH₂), 36.3 (C_{pip}), 29.8 (C_{pip}), 29.4 (CH₂, C_b), 23.3 (CH₃, Me₁₁), 16.4 (CH₃, Me_{pip}), 15.2 (CH₃, Me_{pip}). HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₃₅H₄₁N₆O₈S⁺ [M+H]⁺ 705.2701, found 705.2699.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

***S*-((*Z*)-3-((3-(3-(2-((*R*)-4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1*H*-indole-7-carboxamido)propyl)-amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)-L-cysteine (138)**

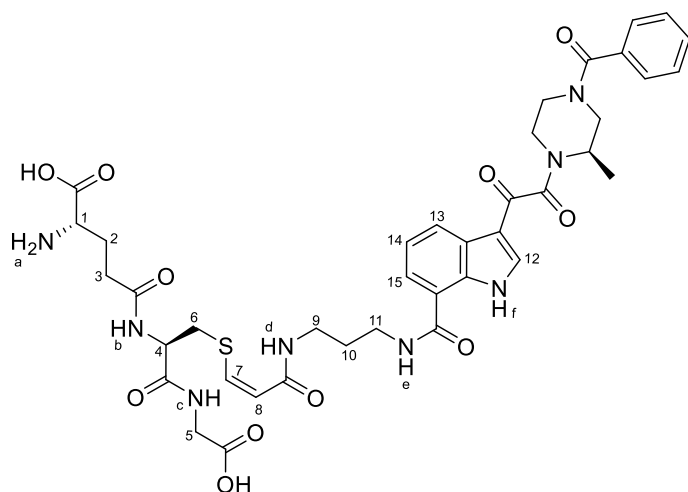


Yield: 97% (103 mg). Yellowish Oil; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TFA}$ 80:15:5) 0.33. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 12.20 (br d, $J = 12.9$, 1H, NH), 8.75 (t, $J = 5.6$, 1H, NH), 8.29 (br s, 1H, H_4), 8.05 (d, $J = 3.3$, 1H, H_2), 7.82 (d, $J = 7.6$, 1H, H_6), 7.42 – 7.38 (m, 6H, $\text{H}_{\text{Ph}} + \text{H}_5$), 6.90 (d, $J = 10.0$, 1H, H_8), 5.95 (d, $J = 9.8$, 1H, H_7), 4.22 (s, 1H, H_{10}), 4.60 – 2.71 (m, 13H, $\text{H}_{\text{pip}} + \text{H}_a + \text{H}_c + \text{H}_9$), 1.72 (p,

$J = 6.9$, 2H, H_b), 1.21 (br s, 3H, Me_{pip}). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100.6 MHz): δ 186.0 (CO), 169.4 (CO), 166.1 (CO), 165.9 (CO), 165.8 (CO), 142.3 (CH, C_8), 138.0 (CH, C_2), 135.6 (C_q), 135.2 (C_q), 129.8 (CH, C_{Ph}), 128.6 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.3 (C_q), 124.4 (CH, C_4), 122.4 (CH, C_5), 122.3 (CH, C_6), 118.5 (C_q), 117.9 (CH, C_7), 112.7 (C_q), 51.4 (CH, C_{10}), 44.3 (C_{pip}), 37.4 (CH_2), 37.0 (CH_2), 36.9 (C_{pip}), 36.8 (CH_2 , C_9), 32.2 (C_{pip}), 29.3 (CH_2 , C_b), 28.8 (C_{pip}), 16.0 (CH_3 , Me_{pip}), 14.9 (CH_3 , Me_{pip}). HRMS (ESI⁻) m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}^-$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻ 647.2293, found 647.2296.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

***S*-[(*Z*)-3-((3-(3-(2-((*R*)-4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1*H*-indole-7-carboxamido)propyl)-amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl]glutathione (139)**



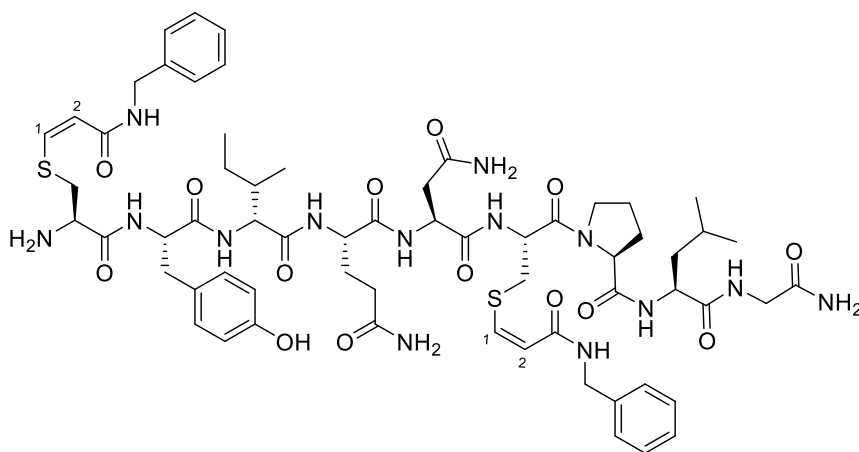
Yield: 93% (32 mg). White wax. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TFA}$ 80:15:5) 0.18. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$ + one drop of TFA, 400 MHz): δ 12.21 (d, $J = 12.6$, 1H, NH_f), 8.75 (t, $J = 5.4$, 1H, NH_d), 8.43 (t, $J = 5.8$, 1H, NH_b), 8.35 (d, $J = 8.3$, 1H, H_{14}), 8.31 – 8.22 (br s, 3H, $\text{NH}_{2(a)} + \text{NH}_c$), 8.02 (dd, $J = 12.3$, 3.4, 1H, H_{12}), 7.96 (t, $J = 5.5$, 1H, NH_e), 7.82 (d, $J = 7.5$, 1H, H_{15}), 7.50 – 7.38 (m, 5H, H_{Ph}), 7.34 (t, $J = 7.6$, 1H, H_{14}),

7.02 (d, $J = 10.1$, 1H, H_7), 5.88 (d, $J = 10.0$, 1H, H_8), 4.86 – 3.02 (br m, 7H, H_{pip}), 4.54 – 4.44 (m, 1H, H_4), 3.94 (dd, $J = 11.2$, 5.7, 1H, H_1), 3.77 (d, $J = 5.8$, 2H, H_5), 3.35 (dd, $J = 12.7$, 5.6, 2H, H_9), 3.16 (dd, $J = 12.5$, 5.7, 2H, H_c), 3.03 (dd, $J = 13.8$, 4.1, 1H, H_6), 2.78 (dd, $J = 13.9$, 9.9, 1H, H_6), 2.39 – 2.30 (m, 2H, H_3), 2.06 – 1.95 (m, 2H, H_2), 1.72 (p, $J = 5.9$, 2H, H_{10}), 1.20 (br s, 3H, Me_{pip}). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$ + one drop of TFA, 100.6 MHz): δ 186.1 (CO), 173.0 (CO), 171.3 (CO), 171.2 (CO),

171.0 (CO), 170.6 (CO), 166.2 (CO), 166.0 (CO), 165.9 (CO), 143.7 (CH, C₇), 138.1 (CH, C₁₂), 135.7 (C_q), 135.3 (C_q), 129.8 (CH, C_{Ph}), 128.7 (CH, C_{Ph}), 127.1 (CH, C_{Ph}), 126.4 (C_q), 124.5 (CH, C₁₃), 122.3 (CH, C₁₅), 122.2 (CH, C₁₄), 118.7 (C_q), 116.2 (CH, C₈), 112.9 (C_q), 53.3 (CH, C₄), 51.8 (CH, C₁), 49.6 (CH₂, C_{pip}), 44.4 (CH₂, C_{pip}), 41.0 (CH, C_{pip}), 40.9 (CH₂, C₅), 37.5 (CH₂, C₆), 37.2 (CH₂, C₉), 36.5 (CH₂, C₁₁), 30.7 (CH₂, C₃), 29.6 (CH₂, C₁₀), 29.2 (CH₂, C_{pip}), 26.0 (CH₂, C₂), 16.0 (CH₃, Me_{pip}), 15.0 (CH₃, Me_{pip}). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₃₉H₄₇N₈O₁₁S⁺ [M+H]⁺ 835.3080, found 835.3084; **HRMS** (ESI-) m/z calcd for C₃₉H₄₅N₈O₁₁S⁻ [M-H]⁻ 833.2934, found 833.2931.

Note: The NMR spectra are complicated because the sample is a mix of rotamers.

(S,S-Bis((Z)-3-benzylamino)-3-oxoprop-1-en-1-ylthio)(Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly(NH₂)) (140)

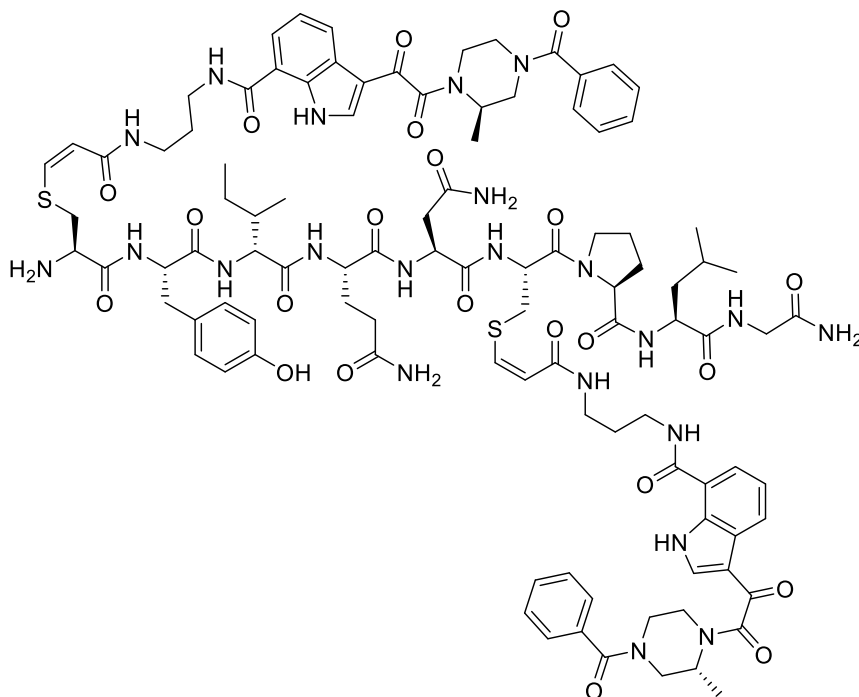


Conversion: 100% (52 mg). White solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.06 (d, J = 10.1, 1H, H₁), 6.96 (d, J = 10.1, 1H, H₁), 6.00 (d, J = 10.0, 1H, H₂), 5.96 (d, J = 10.0, 1H, H₂). ¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz): δ 146.2 (CH, C₁), 146.3 (CH, C₁), 116.4 (CH, C₂), 117.4 (CH, C₂). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for C₆₃H₈₇N₁₄O₁₄S₂⁺ [M+H]⁺ 1327.5962, found 1327.5866. **HPLC** (phenomenex LUNA 5u C18 100A, gradient from 90:10 to 40:60 in 30 min v/v A/B [A: H₂O with 1% H₃PO₄; B: CH₃CN], 1mL/min, λ = 275 nm): t_R = 22.86 min.

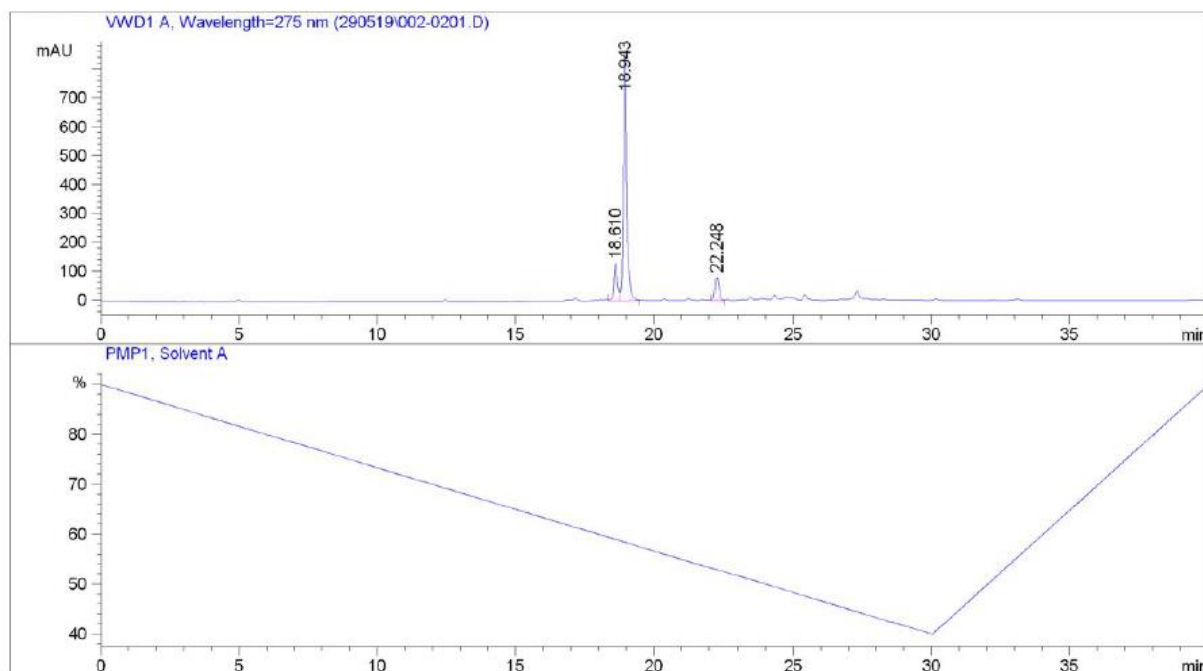
(S,S-Bis(((R,Z)-3-(2-(4-benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-N-(3-acrylamido)propyl)-1H-indole-7-carboxamide)(Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly(NH₂)) (141)

Solid K₃PO₄ (13 mg, 0.076 mmol, 7.5 equiv) was added to a solution of oxytocin (10 mg, 0.010 mmol) and tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP·HCl, 4.0 mg, 0.015 mmol, 1.5 equiv) in H₂O (1.5 mL) under a dry N₂ atmosphere. This solution was slowly added to a solution of propynamide **91** (19 mg, 0.036 mmol, 3.5 equiv) in ¹BuOH (1.5 mL), and the resulting solution was vigorously stirred at 37 °C overnight. The crude mixture was concentrated under vacuum. The organic solvent was removed under vacuum, and the resulting precipitate was filtered, washed with EtOAc (to

recover the excess of propynamide **91**), rinsed with water, and dried in a vacuum desiccator over P_4O_{10} until the weight was constant. HPLC analysis indicated the presence of only the desired disubstituted product.



Yield: 73% (15 mg). White solid. **Dec** 178 °C. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 12.23 (br s, 2H), 9.12 (s, 1H), 8.75 (br s, 3H), 8.29 (br s, 4H), 8.11 (d, $J = 7.7$, 1H), 8.08 – 8.01 (m, 4H), 8.01 – 7.90 (m, 5H), 7.81 (br d, $J = 7.4$, 2H), 7.51 – 7.39 (m, 10H), 7.37 – 7.32 (m, 3H), 7.30 (br s, 1H), 7.23 (br s, 2H), 6.98 – 6.91 (m, 3H), 6.89 (br s, 1H), 6.80 (br s, 1H), 6.61 (d, $J = 8.4$, 2H), 5.89 (d, $J = 10.1$, 1H), 5.86 (d, $J = 10.0$, 1H), 4.84 – 4.68 (m, 2H), 4.63 – 4.48 (m, 4H), 4.38 – 4.24 (m, 5H), 4.17 (t, $J = 7.4$, 3H), 3.70 (d, $J = 6.4$, 1H), 3.66 (d, $J = 6.2$, 1H), 3.59 – 3.48 (m, 5H), 3.21 – 3.10 (m, 7H), 3.03 (dd, $J = 14.1$, 6.5, 2H), 2.93 – 2.85 (m, 3H), 2.79 – 2.70 (m, 2H), 2.67 (t, $J = 1.8$, 1H), 2.60 (dd, $J = 13.7$, 8.5, 1H), 2.43 – 2.37 (m, 1H), 2.33 (p, $J = 1.8$, 1H), 2.11 (t, $J = 7.3$, 2H), 2.06 – 1.95 (m, 1H), 1.88 – 1.80 (m, 4H), 1.75 – 1.70 (m, 6H), 1.64 – 1.56 (m, 1H), 1.51 (t, $J = 7.2$, 2H), 1.45 – 1.37 (m, 2H), 1.22 (d, $J = 7.6$, 2H), 1.19 – 1.02 (m, 9H), 0.88 (d, $J = 6.4$, 3H), 0.84 – 0.77 (m, 9H). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{101}\text{H}_{127}\text{N}_{22}\text{O}_{22}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2063.8931, found 2063.8925. **HPLC** (phenomenex LUNA 5u C18 100A, gradient from 90:10 to 40:60 in 30 min v/v A/B [A: H_2O with 1% H_3PO_4 ; B: CH_3CN], 1mL/min, $\lambda = 275$ nm): $t_R = 18.94$ min.

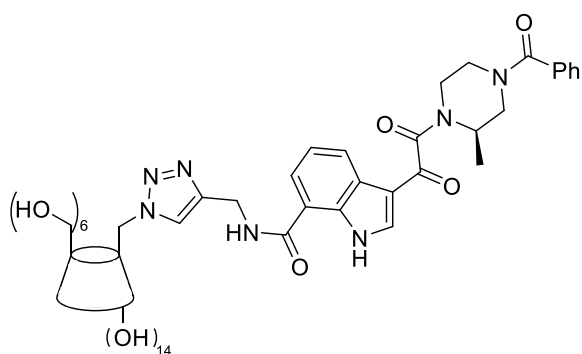


6.4. Experimental chapter 4

6.4.1. β CD derivatives

(*R*)-((4-((3-(2-(4-Benzoyl-2-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoacetyl)-1*H*-indole-7-carboxamido)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1- β -cyclodextrin (**143**))

Copper(I) acetate (0.6 mg, 5 μ mol, 0.05 equiv) in H₂O (1 mL) was added to a mixture of compound **124** (116 mg, 0.100 mmol), compound **87** (50 mg, 0.11 mmol, 1.1 equiv), and ligand **109** (5.0 mg, 10 μ mol, 0.1 equiv) in *tert*-butyl alcohol (1 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum (to remove *t*BuOH) and acetone (3 mL) was added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P₄O₁₀ until constant weight to give 108 mg (67.0 μ mol, 67%) of compound **143**.

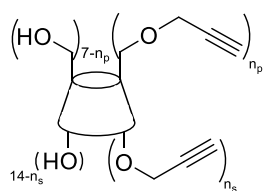


Yellowish solid. R_f (*i*PrOH/H₂O/EtOAc/NH₄OH 5:3:1:1) 0.35. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.26 (br s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H), 8.12 (br s, 1H), 8.04 (d, J = 3.5, 1H, H₂), 7.95 (br s, 1H), 7.66 (d, J = 7.6, 1H), 7.52 – 7.39 (m, 5H, H_{Ph}), 7.36 – 7.30 (m, 1H), 5.87 – 5.66 (m, 14H), 4.83 – 4.77 (m, 20H), 4.67 – 4.40 (m, 9H), 3.78 – 3.49 (m, 30H), 3.45 – 2.80 (m, 3H),

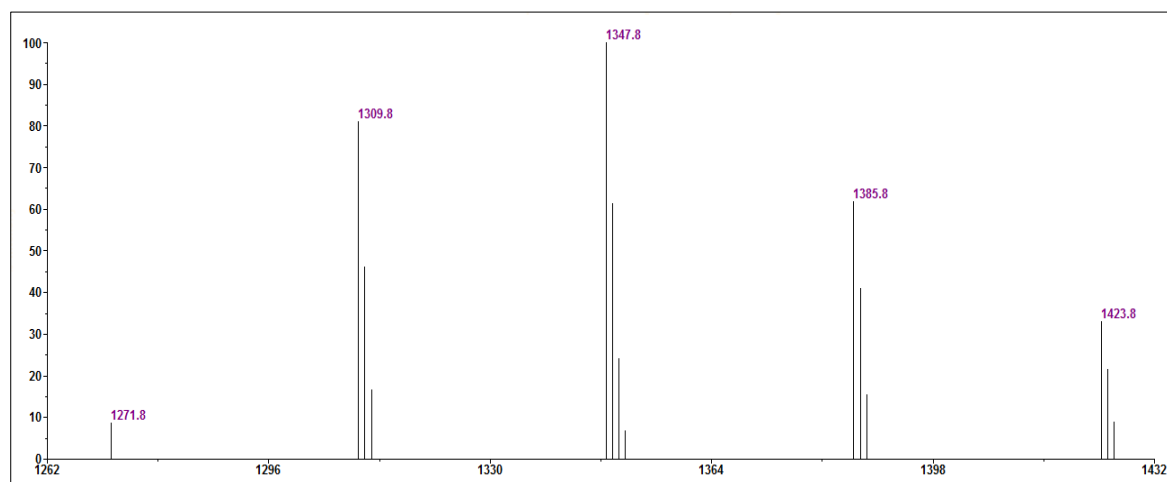
2.97 (br s, 1H, H_b), 1.20 (br s, 3H, Me_{pip}). HRMS (ESI+) m/z calcd for C₆₈H₉₃N₇NaO₃₈⁺ (M+Na)⁺: 1638.5452, found: 1638.5455.

Propargylated β -cyclodextrin (145)

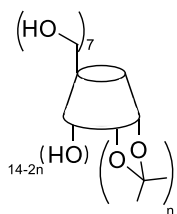
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 352 mg, 8.81 mmol, 5.0 equiv) was added to a solution of β -cyclodextrin (2.00 g, 1.76 mmol) in DMF (25 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. After 30 min with vigorous stirring, propargyl bromide (80% in toluene, 0.80 mL, 7.1 mmol, 4.0 equiv) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum and then the residue was filtered on silica, washed with i PrOH/ H_2O /EtOAc/ NH_4OH 5:3:1:1 and the solvent was removed under reduced pressure to give 1.93 g (1.50 mmol, 85%) as a mixture of a propargylated β -cyclodextrin **145** (Entry 5, **Table 4.1**, $n = 5 \pm 2$).



Yellowish oil. R_f (i PrOH/ H_2O /EtOAc/ NH_4OH 5:3:1:1): $\underline{n = 3}$, 0.33; $\underline{n = 4}$, 0.34; $\underline{n = 5}$, 0.42; $\underline{n = 6}$, 0.45; $\underline{n = 7}$, 0.53. 1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 5.22 – 5.04 (m, 7H), 4.52 – 4.39 (m, 8H), 4.10 – 3.83 (br m, 40H), 3.75 – 3.53 (br m, 20H), 3.03 (s, 2H), 2.96 (s, 2H), 2.87 (s, 1H). **MS** (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $\underline{n = 3}$ $C_{51}H_{76}NaO_{35}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1271.4, found: 1271.8; $\underline{n = 4}$ $C_{54}H_{78}NaO_{35}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1309.4, found: 1309.8; $\underline{n = 5}$ $C_{57}H_{80}NaO_{35}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1347.4, found: 1347.8; $\underline{n = 6}$ $C_{60}H_{82}NaO_{35}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1385.5, found: 1385.8; $\underline{n = 7}$ $C_{63}H_{84}NaO_{35}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1423.5, found: 1423.8.

**Protected β -cyclodextrin (146)**

p-Toluenesulfonic acid monohydrate (2.0 mg, 8.8 μ mol, 0.02 equiv) was added to a solution of β -cyclodextrin (500 mg, 0.441 mmol) in 2,2-dimethoxypropane (4.5 mL) and DMF (4.5 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum and then the residue was filtered on silica, washed with i PrOH/ H_2O /EtOAc/ NH_4OH 5:3:1:1 and the solvent was removed under reduced pressure to give 303 mg (0.234 mmol, 53%) as a mixture of a protected β -cyclodextrin **146** ($n = 3, 4$).

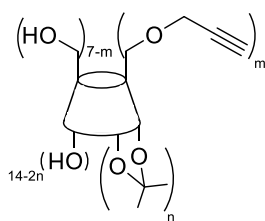


Yellowish oil. R_f ($^i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOAc}/\text{NH}_4\text{OH}$ 5:3:1:1): $\underline{n = 3}$, 0.52; $\underline{n = 4}$, 0.60. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 5.96 – 5.52 (m, 7H), 4.93 – 4.75 (m, 6H), 3.92 – 3.43 (br m, 23H), 3.39 – 3.21 (br m, 11H), 3.12 – 2.98 (m, 15H), 1.44 – 1.31 (m, 8H), 1.24 (br s, 13H). **HRMS** (ESI+) m/z calcd for $\underline{n = 3}$ $\text{C}_{51}\text{H}_{83}\text{O}_{35}^+$ (M+H) $^+$: 1255.4709, found: 1255.4775; $\underline{n = 4}$ $\text{C}_{54}\text{H}_{87}\text{O}_{35}^+$ (M+H) $^+$: 1295.5022, found:

1295.5069.

Propargylated protected β -cyclodextrin (**147**)

Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 157 mg, 3.97 mmol, 9.0 equiv) was added to a solution of β -cyclodextrin (624 mg, 0.441 mmol) in DMF (4.5 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. After 30 min with vigorous stirring, propargyl bromide (80% in toluene, 0.40 mL, 3.5 mmol, 8.0 equiv) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum and then the residue was filtered on silica, washed with $^i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOAc}/\text{NH}_4\text{OH}$ 5:3:1:1 and the solvent was removed under reduced pressure to give 503 mg (0.335 mmol, 76%) as a mixture of a propargylated protected β -cyclodextrin **147** ($n = 4$, $m = 5 \pm 4$).

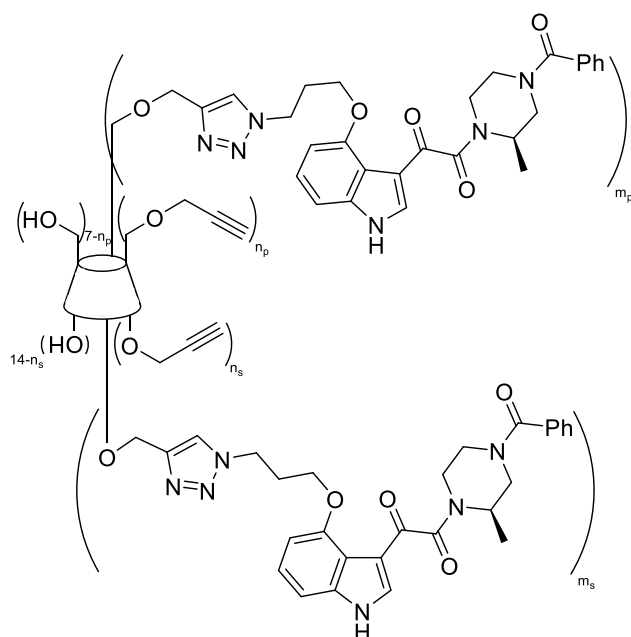


Yellowish oil. R_f ($^i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOAc}/\text{NH}_4\text{OH}$ 5:3:1:1): $\underline{n = 4, m = 1}$, 0.62; $\underline{n = 4, m = 2}$, 0.66; $\underline{n = 4, m = 3}$, 0.69; $\underline{n = 4, m = 4}$, 0.74; $\underline{n = 4, m = 5}$, 0.77; $\underline{n = 4, m = 6}$, 0.80; $\underline{n = 4, m = 7}$, 0.83; $\underline{n = 4, m = 8}$, 0.87; $\underline{n = 4, m = 9}$, 0.91. **MS** (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $\underline{n = 4, m = 1}$, $\text{C}_{57}\text{H}_{88}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1355.5, found: 1347.4; $\underline{n = 4, m = 2}$,

$\text{C}_{60}\text{H}_{90}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1393.5, found: 1385.4; $\underline{n = 4, m = 3}$, $\text{C}_{63}\text{H}_{92}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1431.5, found: 1423.4; $\underline{n = 4, m = 4}$, $\text{C}_{66}\text{H}_{94}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1469.5, found: 1463.5; $\underline{n = 4, m = 5}$, $\text{C}_{69}\text{H}_{96}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1507.6, found: 1501.5; $\underline{n = 4, m = 6}$, $\text{C}_{72}\text{H}_{98}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1545.6, found: 1539.5; $\underline{n = 4, m = 7}$, $\text{C}_{75}\text{H}_{100}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1583.6, found: 1577.5; $\underline{n = 4, m = 8}$, $\text{C}_{78}\text{H}_{102}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1621.6, found: 1615.5; $\underline{n = 4, m = 9}$, $\text{C}_{81}\text{H}_{104}\text{NaO}_{35}^+$ (M+Na) $^+$: 1659.6, found: 1653.5.

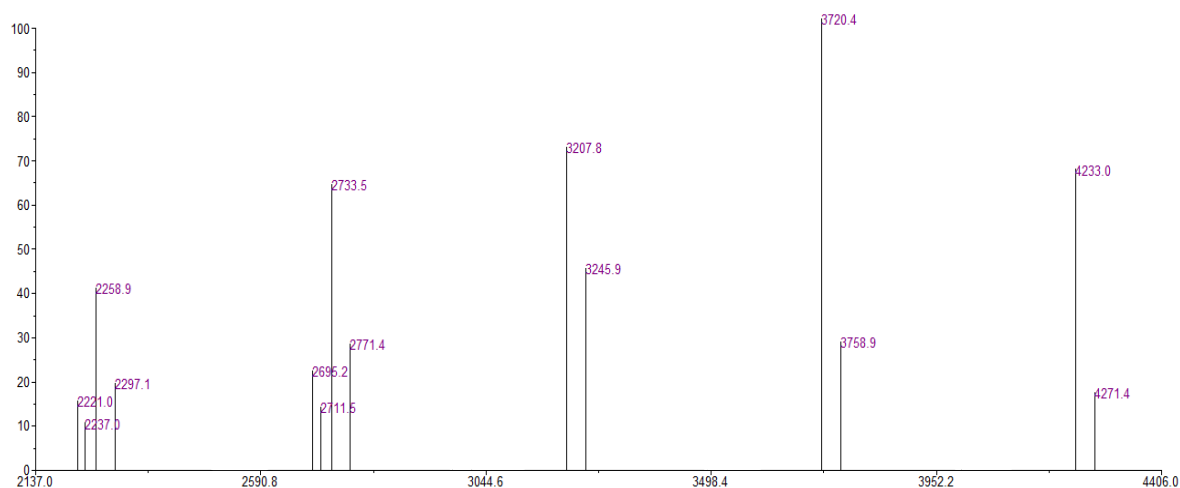
Conjugated β -cyclodextrin (**148**)

Sodium L-ascorbate (4.6 mg, 0.023 mmol, 0.3 equiv) in H_2O (0.3 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (0.6 mg, 2 μmol , 0.03 equiv) in H_2O (0.3 mL) were added to a solution of compound **145** (100 mg, 77.5 μmol) and compound **58** (110 mg, 0.232 mmol, 3.0 equiv) in *tert*-butyl alcohol (1.2 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was heated to 50 °C and stirred for 5 days. The mixture was concentrated under vacuum (to remove $^i\text{BuOH}$) and acetone (3 mL) was added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P_4O_{10} until constant weight to give 115 mg (31.0 μmol , 40%) of compound **148** ($n = 0$ -3, $m = 2$ -6).



Yellowish solid. R_f (i PrOH/ H_2O / $EtOAc/NH_4OH$ 5:3:1:1) 0.76. **MS** (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $n = 1, m = 2$, $C_{101}H_{128}N_{12}NaO_{43}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2219.8, found: 2220.8; $n = 2, m = 2$, $C_{104}H_{130}N_{12}NaO_{43}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2257.8, found: 2258.8; $n = 3, m = 2$, $C_{107}H_{132}N_{12}NaO_{43}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2295.8, found: 2296.8; $n = 0, m = 3$, $C_{126}H_{154}N_{18}NaO_{47}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2694.0, found: 2695.0; $n = 1, m = 3$, $C_{129}H_{156}N_{18}NaO_{47}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2732.0, found: 2733.0; $n = 2, m = 3$, $C_{132}H_{158}N_{18}NaO_{47}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2770.0,

found: 2771.0; $n = 0, m = 4$, $C_{154}H_{182}N_{24}NaO_{51}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3206.2, found: 3207.1; $n = 1, m = 4$, $C_{157}H_{184}N_{24}NaO_{51}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3244.2, found: 3246.2; $n = 0, m = 5$, $C_{182}H_{210}N_{30}NaO_{55}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3718.4, found: 3720.3; $n = 1, m = 5$, $C_{185}H_{212}N_{30}NaO_{55}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3756.5, found: 3758.4; $n = 0, m = 6$, $C_{210}H_{238}N_{36}NaO_{59}^+$ ($M+Na$) $^+$: 4230.7, found: 4232.5; $n = 1, m = 6$, $C_{213}H_{240}N_{36}NaO_{59}^+$ ($M+Na$) $^+$: 4268.7, found: 4271.5.

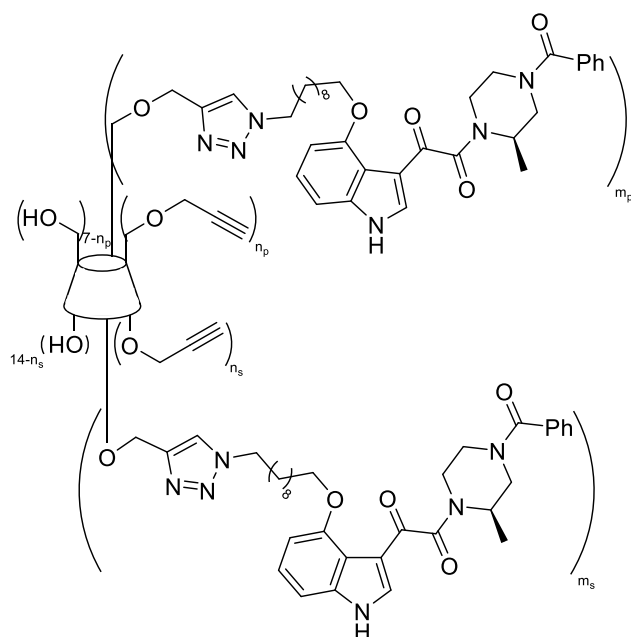


Conjugated β -cyclodextrin (149)

Sodium L-ascorbate (4.6 mg, 0.023 mmol, 0.3 equiv) in H_2O (0.3 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (0.6 mg, 2 μ mol, 0.03 equiv) in H_2O (0.3 mL) were added to a solution of compound **145** (100 mg, 77.5 μ mol) and compound **59** (133 mg, 0.232 mmol, 3.0 equiv) in *tert*-butyl alcohol (1.2 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was heated to 50 $^\circ C$ and stirred for 5 days. The mixture was concentrated under vacuum (to remove t BuOH) and acetone (3 mL) was

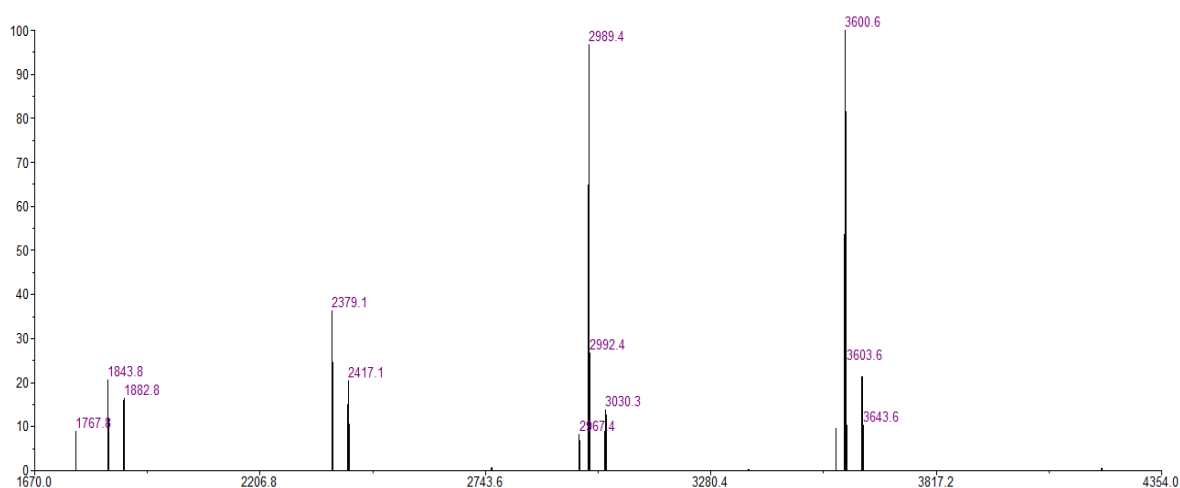


added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P_4O_{10} until constant weight to give 148 mg (41.1 μmol , 53%) of compound **149** ($n = 0-3$, $m = 1-4$).



Yellowish solid. R_f ($^i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOAc}/\text{NH}_4\text{OH}$ 5:3:1:1) 0.80. **MS** (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $\underline{n = 0, m = 1}$, $C_{77}H_{112}N_6NaO_{39}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1767.7, found: 1767.8; $\underline{n = 2, m = 1}$, $C_{83}H_{116}N_6NaO_{39}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1843.7, found: 1844.8; $\underline{n = 3, m = 1}$, $C_{86}H_{118}N_6NaO_{39}^+$ ($M+Na$) $^+$: 1881.7, found: 1881.8; $\underline{n = 0, m = 2}$, $C_{112}H_{154}N_{12}NaO_{43}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2378.0, found: 2379.1; $\underline{n = 1, m = 2}$, $C_{115}H_{156}N_{12}NaO_{43}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2416.0, found: 2417.1; $\underline{n = 0, m = 3}$, $C_{147}H_{196}N_{18}NaO_{47}^+$ ($M+Na$) $^+$: 2988.3, found: 2989.4; $\underline{n = 1, m = 3}$,

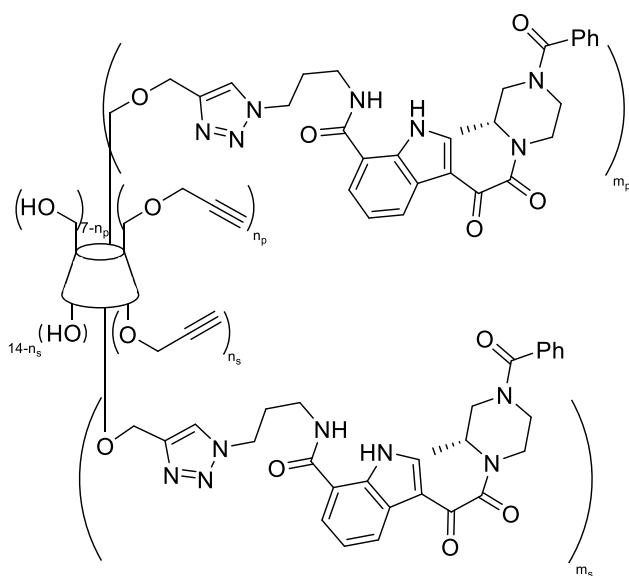
$C_{150}H_{198}N_{18}NaO_{47}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3026.4, found: 3030.3; $\underline{n = 0, m = 4}$, $C_{182}H_{238}N_{24}NaO_{51}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3598.7, found: 3600.6; $\underline{n = 1, m = 4}$, $C_{185}H_{240}N_{24}NaO_{51}^+$ ($M+Na$) $^+$: 3636.7, found: 3641.6.



Conjugated β -cyclodextrin (**150**)

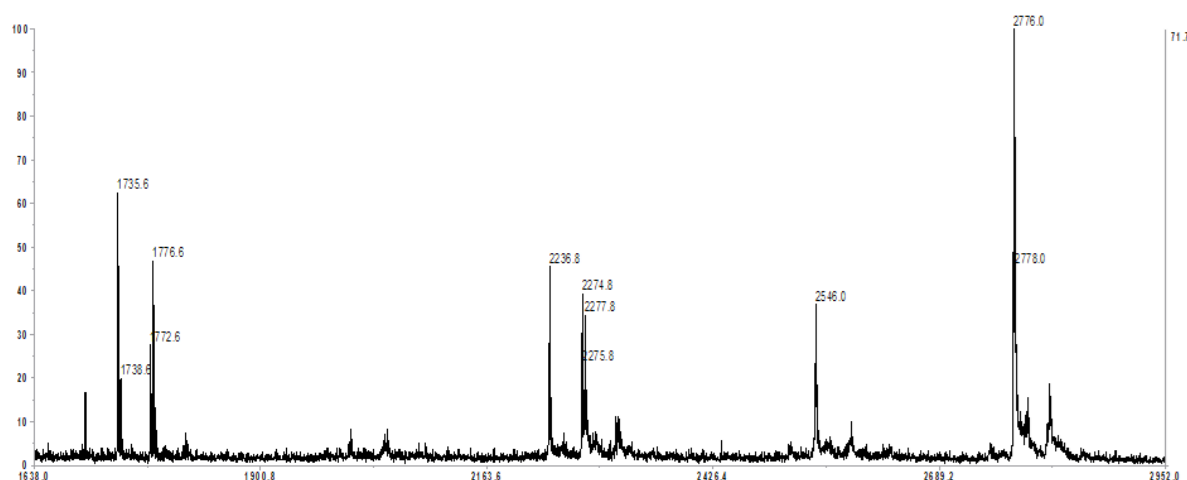
Sodium L-ascorbate (4.6 mg, 0.023 mmol, 0.3 equiv) in H_2O (0.3 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (0.6 mg, 2 μmol , 0.03 equiv) in H_2O (0.3 mL) were added to a solution of compound **145** (100 mg, 77.5 μmol) and compound **88** (116 mg, 0.232 mmol, 3.0 equiv) in *tert*-butyl alcohol (1.2 mL) under a dry N_2 atmosphere. The reaction mixture was heated to 50 $^\circ\text{C}$ and stirred for

5 days. The mixture was concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH) and acetone (3 mL) was added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P₄O₁₀ until constant weight to give 101 mg (36.4 μmol, 40%) of compound **150** (n = 0-2, m = 1-3).



Yellowish solid. **R_f** (^tPrOH/H₂O/EtOAc/NH₄OH 5:3:1:1) 0.77. **MS** (MALDI-TOF/TOF) *m/z* calcd for n = 0, m = 1, C₇₁H₉₉N₇NaO₃₉⁺ (M+Na)⁺: 1696.6, found: 1697.6; n = 1, m = 1, C₇₄H₁₀₁N₇NaO₃₉⁺ (M+Na)⁺: 1734.6, found: 1735.6; n = 2, m = 1, C₇₇H₁₀₃N₇NaO₃₉⁺ (M+Na)⁺: 1772.6, found: 1772.6; n = 0, m = 2, C₁₀₀H₁₂₈N₁₄NaO₄₃⁺ (M+Na)⁺: 2235.8, found: 2236.8; n = 1, m = 2, C₁₀₃H₁₃₀N₁₃NaO₄₃⁺ (M+Na)⁺: 2273.8, found: 2274.8; n = 0, m = 3,

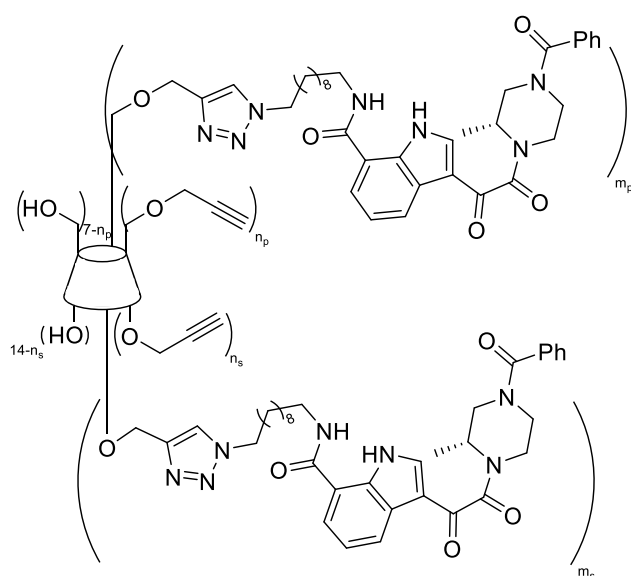
C₁₂₉H₁₅₇N₂₁NaO₄₇⁺ (M+Na)⁺: 2775.0, found: 2776.0.



Conjugated β-cyclodextrin (**151**)

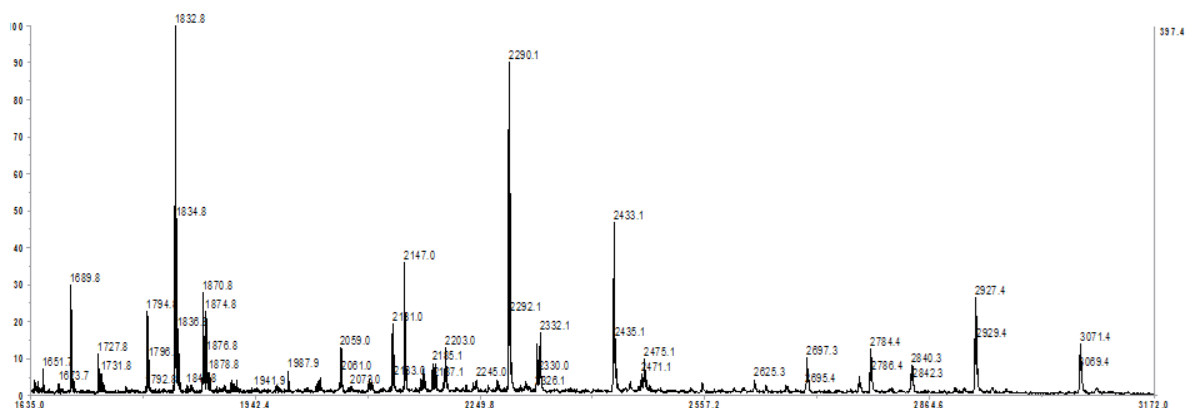
Sodium L-ascorbate (4.6 mg, 0.023 mmol, 0.3 equiv) in H₂O (0.3 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (0.6 mg, 2 μmol, 0.03 equiv) in H₂O (0.3 mL) were added to a solution of compound **145** (100 mg, 77.5 μmol) and compound **89** (139 mg, 0.232 mmol, 3.0 equiv) in *tert*-butyl alcohol (1.2 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 50 °C and stirred for 5 days. The mixture was concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH) and acetone (3 mL) was

added. The precipitates that appeared were filtered, washed with acetone, and dried under vacuum over P_4O_{10} until constant weight to give 45 mg (24.8 μmol , 32%) of compound **151** ($n = 0-2$, $m = 1-3$).



Yellowish solid. R_f ($i\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOAc}/\text{NH}_4\text{OH}$ 5:3:1:1) 0.79. **MS** (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $\underline{n = 0, m = 1}$, $\text{C}_{78}\text{H}_{113}\text{N}_7\text{NaO}_{39}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 1794.7, found: 1794.8; $\underline{n = 1, m = 1}$, $\text{C}_{81}\text{H}_{115}\text{N}_7\text{NaO}_{39}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 1832.7, found: 1932.8; $\underline{n = 2, m = 1}$, $\text{C}_{84}\text{H}_{117}\text{N}_7\text{NaO}_{39}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 1870.7, found: 1870.8; $\underline{n = 0, m = 2}$, $\text{C}_{114}\text{H}_{156}\text{N}_{14}\text{NaO}_{43}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 2432.0, found: 2433.1; $\underline{n = 1, m = 2}$, $\text{C}_{117}\text{H}_{158}\text{N}_{14}\text{NaO}_{43}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 2470.0, found: 2471.1; $\underline{n = 0, m = 3}$,

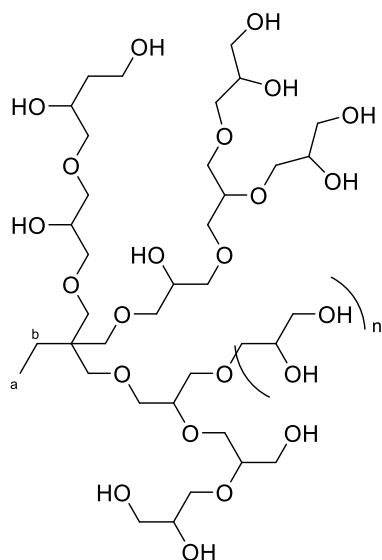
$\text{C}_{150}\text{H}_{199}\text{N}_{21}\text{NaO}_{47}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 3069.4, found: 3071.4.



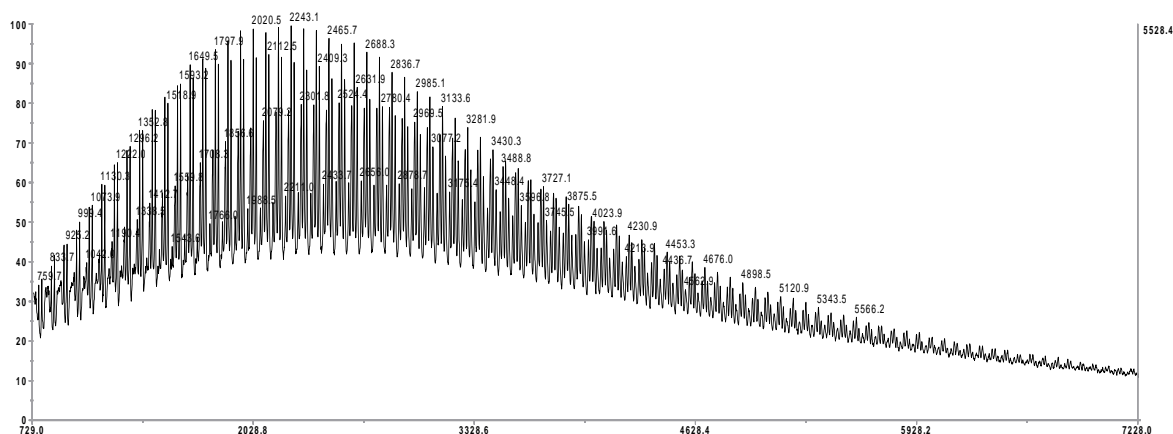
6.4.2. HPG derivatives

Hyperbranched polyglycerol, HPG (152)

Potassium methoxide (111 mg, 1.51 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane (135 mg, 1.01 mmol) in MeOH (0.5 mL) under Ar atmosphere. After 30 min of vigorous stirring, the reaction mixture was heated to 90 °C and (\pm)-glycidol (5.6 mL, 81 mmol, 80 equiv) was added over 24 h. Then, the reaction was stirred overnight at 90 °C. The mixture was cooled, dissolved in methanol and acetone was added. The HPG was isolated by decanting the solvents and the remaining oil was concentrated under vacuum at 60 °C to give 3.27 g of compound **152** (Entry 7, Table 4.2, $n = 10 - 70$).

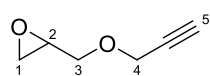


Yellowish viscous liquid. $^1\text{H NMR}$ (D_2O , 400 MHz): δ 4.05 – 3.43 (m, 340H), 1.37 – 1.25 (br s, 2H, H_b), 0.94 – 0.70 (br s, 3H H_a).



2-((Prop)-2-yn-1-yloxy)methylloxirane (**153**)¹²⁸

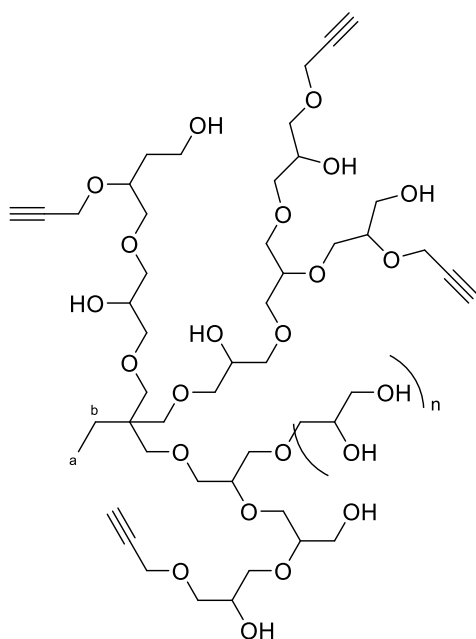
Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 622 mg, 15.6 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of (\pm)-glycidol (1.00 g, 13.0 mmol) in THF (65 mL) under a dry N_2 atmosphere, at 0 °C. After 30 min with vigorous stirring, propargyl bromide (80% in toluene, 1.4 mL, 13 mmol) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with saturated aqueous NH_4Cl solution (60 mL) and extracted with Et_2O (3 x 40 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated to give 1.25 g (12.3 mmol, 95%) of compound **153**.



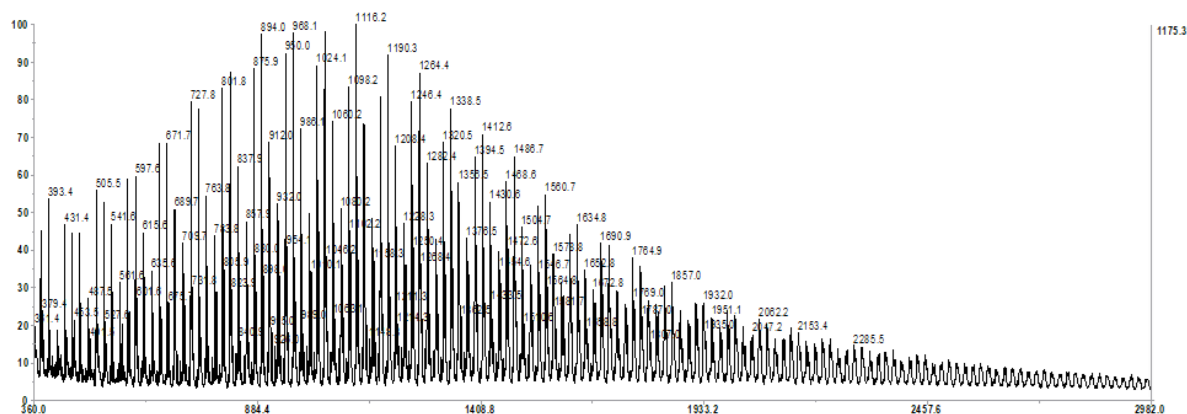
Yellowish oil. R_f (CH_2Cl_2) 0.46. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.22 – 4.09 (m, 2H, H_4), 3.81 – 3.72 (m, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 1H), 3.15 – 3.07 (m, 1H, H_2), 2.78 – 2.72 (m, 1H), 2.60 – 2.56 (m, 1H), 2.42 (t, $J = 2.5$, 1H, H_5). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 79.3 (C_q), 79.9 (CH, C_3), 70.3 (CH_2), 58.4 (CH_2 , C_4), 50.4 (CH, C_2), 44.2 (CH_2).

Propargylated hyperbranched polyglycerol (154)¹⁰⁸

Potassium methoxide (25% in methanol, 0.33 mL, 1.1 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane (100 mg, 0.745 mmol) in MeOH (0.4 mL) under Ar atmosphere. After 30 min of vigorous stirring, the solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in diglyme (0.5 mL) and the mixture was heated to 90 °C. Glycidol (2.6 mL, 37 mmol, 50 equiv) was added over 24 h and then, compound **153** (760 mg, 7.45 mmol, 10 equiv) was added over 6 h. The reaction mixture was stirred overnight at 90 °C. The mixture was cooled, dissolved in methanol and acetone was added. The HPG was isolated by decanting the solvents and the remaining oil was concentrated under vacuum at 60 °C to give 1.73 g of compound **154** (Entry 5, **Table 4.3**, $n = 6 - 40$).



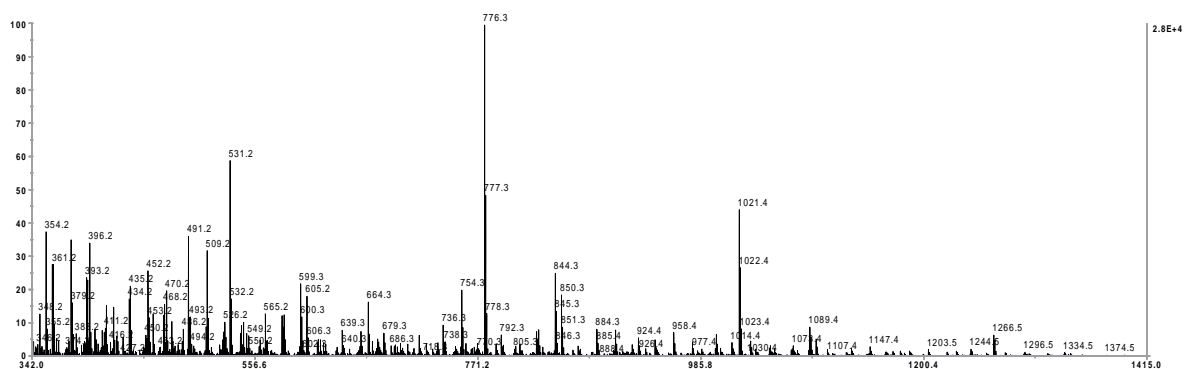
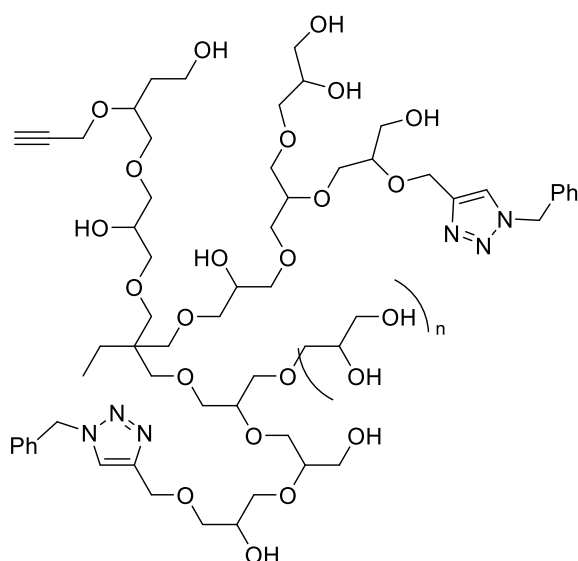
Yellowish viscous liquid. ¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 4.33 (br s, 21H), 4.19 (br s, 33H), 3.89 (br s, 8H), 3.81 – 3.44 (m, 97H), 3.35 (s, 25H), 1.45 – 1.31 (m, 2H, H_b), 0.93 – 0.84 (m, 3H H_a).



Derivative from hyperbranched polyglycerol (155)

Sodium L-ascorbate (27 mg, 0.14 mmol, 1.5 equiv) in H₂O (2 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (11 mg, 0.046 mmol, 0.5 equiv) in H₂O (2 mL) were added to a solution of compound **154** (100 mg, 91.4 μmol) and compound **102** (61 mg, 0.46 mmol, 5.0 equiv) in H₂O/^tBuOH 1:1 (6 mL) under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 70 °C and stirred for a week. Residual copper was removed by stirring the reaction mixture with a cation exchange resin (Amberlite® IR120). The mixture was filtered and concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH). The residue was dissolved in methanol and acetone was added. The HPG was isolated by decanting the solvents and the remaining oil was concentrated under vacuum at 60 °C to give 121 mg of compound **155**.

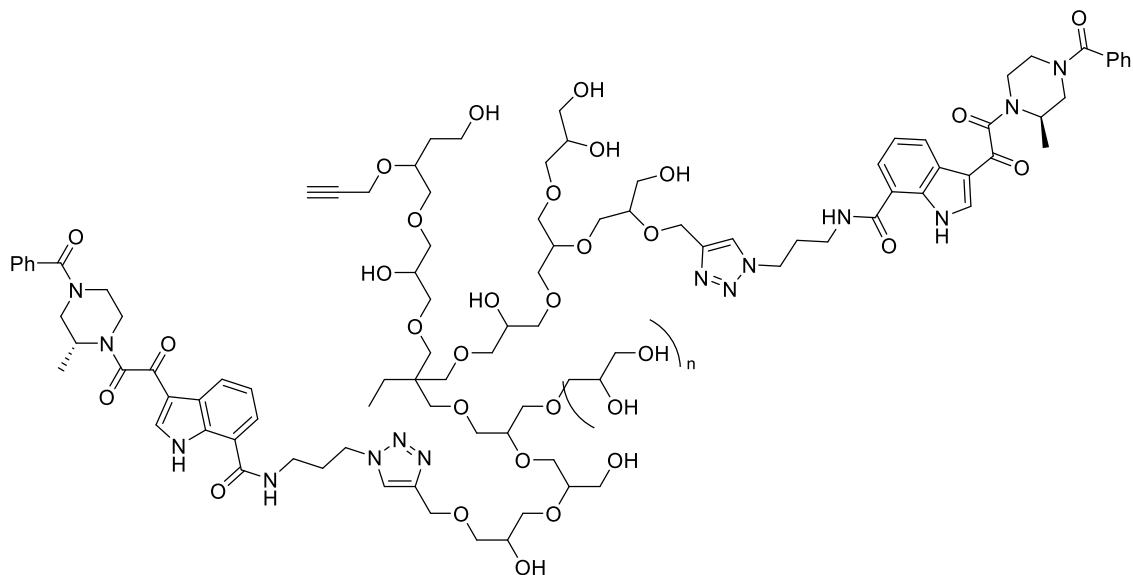
Yellowish viscous liquid.



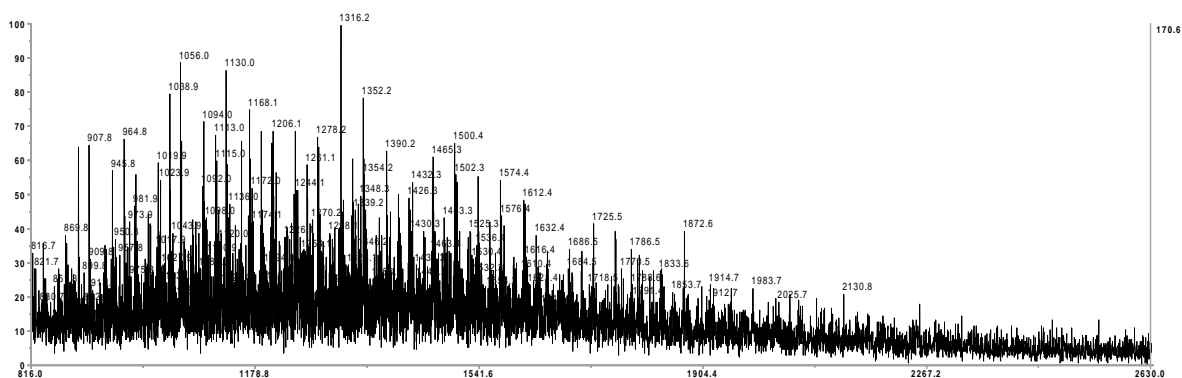
Derivative from hyperbranched polyglycerol (156)

Sodium L-ascorbate (54 mg, 0.27 mmol, 3.0 equiv) in H₂O (2 mL) followed by copper(II) sulfate pentahydrate (23 mg, 0.091 mmol, 1.0 equiv) in H₂O (2 mL) were added to a solution of compound **154** (100 mg, 91.4 μmol) and compound **88** (183 mg, 0.37 mmol, 4.0 equiv) in H₂O/^tBuOH 1:1 (6 mL)

under a dry N₂ atmosphere. The reaction mixture was heated to 70 °C and stirred for a week. Residual copper was removed by stirring the reaction mixture with a cation exchange resin (Amberlite® IR120). The mixture was filtered and concentrated under vacuum (to remove ^tBuOH). After dissolving the mixture in methanol, the polymer was precipitated into excess acetone and washed twice with acetone. The resulting polymer was dried under vacuum at 60 °C for 1 day to give 83 mg of compound **156**.



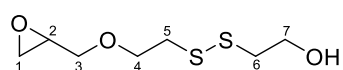
Yellowish viscous liquid.



2-((2-(Oxiran-2-ylmethoxy)ethyl)disulfanyl)ethan-1-ol¹⁰⁰ (**157**)

Potassium *tert*-butoxide (2.75 g, 24.5 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of 2-hydroxyethyl disulfide (3.0 mL, 25 mmol) in ^tBuOH (120 mL) under Ar atmosphere. After 30 min of vigorous stirring, (±)-epichlorohydrin (14.0 mL, 172 mmol, 7.0 equiv) was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The solid formed was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was diluted with H₂O (60 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (40 mL), dried over

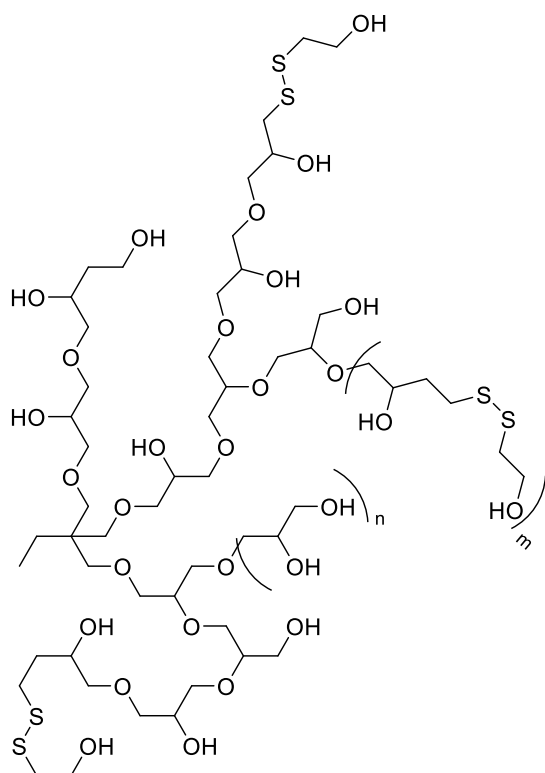
anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by *flash* column chromatography (EtOAc/hexanes 7:3) to furnish 3.82 g (18.2 mmol, 74%) of compound **157**.



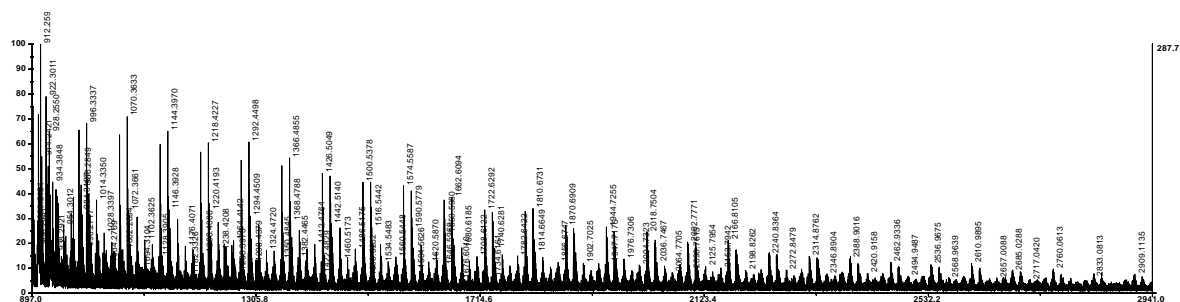
Yellowish oil. R_f (EtOAc/hexanes 7:3) 0.33. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.91 – 3.84 (m, 2H), 3.81 (dd, $J = 11.7, 2.7$, 1H), 3.79 – 3.71 (m, 2H), 3.37 (dd, $J = 11.7, 6.1$, 1H), 3.19 – 3.11 (m, 1H, H_2), 2.90 (t, $J = 6.4$, 2H), 2.88 – 2.84 (m, 2H), 2.80 (t, $J = 4.6$, 1H), 2.61 (dd, $J = 4.9, 2.7$, 1H), 2.44 (br s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 71.7 (CH_2), 69.6 (CH_2), 60.4 (CH_2), 51.0 (CH, C_2), 44.3 (CH_2), 41.3 (CH_2), 38.6 (CH_2).

Thiol from hyperbranched polyglycerol (**158**)

Potassium methoxide (25% in MeOH, 220 μL , 0.745 mmol, 0.5 equiv) was added to a solution of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane (200 mg, 1.49 mmol) in MeOH (0.5 mL) under Ar atmosphere. After 30 min with vigorous stirring, the reaction mixture was heated to 90 $^\circ\text{C}$ and (\pm)-glycidol (8.2 mL, 0.12 mol, 80 equiv) followed by compound **157** (3.14 g, 14.9 mmol, 10 equiv) were added over 30 h. Then, the reaction was stirred overnight at 90 $^\circ\text{C}$. The mixture was cooled and dissolved in methanol. The polymer was precipitated into excess diethyl ether and washed twice with diethyl ether. The resulting polymer was dried under vacuum at 90 $^\circ\text{C}$ for 1 day to give 2.37 g of compound **158** ($n = 2 - 30$, $m = 1 - 13$).

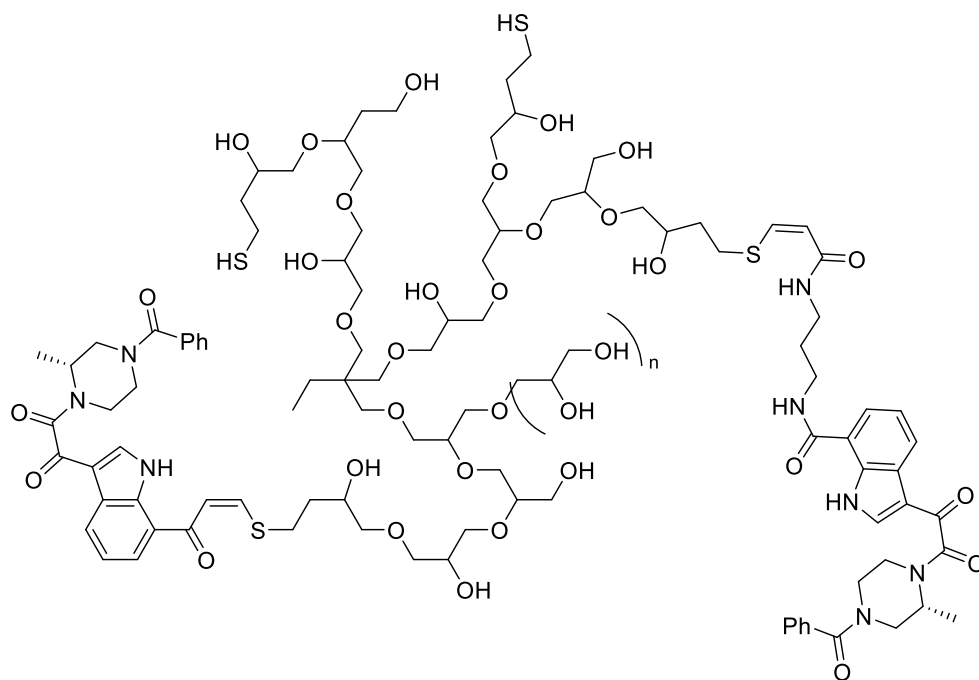


Yellowish viscous liquid. $^1\text{H NMR}$ (D_2O , 400 MHz): δ 4.20 – 3.98 (m, 23H), 3.96 – 3.81 (m, 14H), 3.79 – 3.54 (m, 196H), 3.51 – 3.36 (m, 85H), 3.12 – 2.79 (m, 8H), 1.30 – 1.20 (br s, 2H, H_b), 1.07 – 0.82 (br s, 3H H_a).

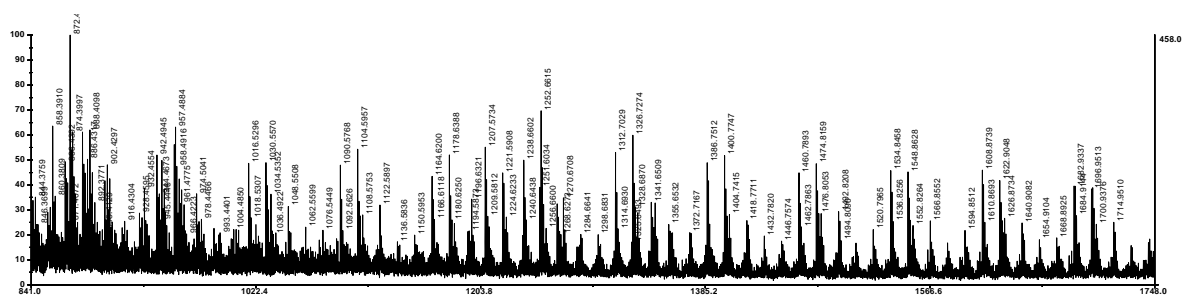


Derivative from hyperbranched polyglycerol (159)

Solid K_3PO_4 (150 mg, 0.711 mmol, 2.5 equiv) was added to a solution of compound **158** (200 mg) and tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP-HCl, 41 mg, 0.14 mmol, 0.5 equiv) in H_2O (3 mL) under a dry N_2 atmosphere. This solution was slowly added to a solution of propynamide **91** (150 mg, 0.284 mmol) in $tBuOH$ (3 mL), and the resulting solution was vigorously stirred at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 days. The mixture was concentrated under vacuum. After dissolving the mixture in methanol, the polymer was precipitated into excess acetone and washed twice with acetone. The resulting polymer was dried under vacuum at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 day to give 180 mg of compound **159**.



Yellowish viscous liquid.



6.5. ANTI-HIV-1 ACTIVITY OF AN *IN VITRO* MODEL

Materials & Methods

Stocks of compounds were prepared from powders as 10 mM solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Serial dilutions using sterile-PBS were completed to obtain a final concentration of DMSO in cells not more than 1%, to avoid toxic effects by the solvent.

Polyanionic carbosilane dendrimer G2-S16 was dissolved at 10 mM in distilled water and was used as an Inhibitor of the entry of HIV into host cells.^{129–131} Subsequent dilutions to obtain a μM concentration were prepared in nuclease-free water (Promega, Madison, WI, USA). Dextran (average Mw: 4.84×10^5 g/mol; Sigma-Aldrich) was used as a harmless control to check and to verify the status of cells.

Cells

TZM.bl cells (Cat# 8129, AIDS Reagent Program, Germantown, MD, USA) are developed from human cervical epithelial carcinoma Hela cells and generated by introducing separate integrated copies of luciferase and β -galactosidase genes under control of the HIV-1 promoter. TZM.bl cells express CD4, CCR5 and CXCR4 and firefly luciferase in response to *tat* expression following the HIV-1 infection. TZM.bl cells were cultured in complete DMEM at 37 °C with 5% CO₂.

HEK-293T/7 cells (ATCC CRL-11268, Teddington, UK). HEK-293T/7 cells are human embryonic kidney packaging cells derived from 293T cells that were inserted a temperature sensitive gene SV40 to obtain a line capable of producing high titers of infectious retrovirus. HEK-293T cells were cultured in complete DMEM at 37 °C with 5% CO₂.

Virus stocks

Infectious CCR5-tropic HIV-1_{NLAD8}, and CXCR4-tropic HIV-1_{NL4.3} stocks were produced by transfection of HEK-293T/7 cells using the calcium phosphate transfection kit (Sigma-Aldrich) with plasmids encoding the respective molecular clones: pNLAD8 (Cat# 11346, AIDS Reagent Program)¹³², and pNL4.3 (Cat# 114, AIDS Reagent Program),¹³³ respectively. Virus production was quantified in cell culture supernatants by HIV p24 antigen ELISA (Innogenetics, Ghent, Belgium) according to manufacturer's instructions. Virus titers and infectivity were determined on TZM.bl cells.

Cell-viability assays

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) assay measures the reduction of tetrazolium components into insoluble formazan products by the mitochondria of viable cells. TZM.bl cells at a cell density of 7.5×10^3 cells/mL were treated with different compounds at 37 °C for 48 h. Forty-eight hours post-treatment, TZM.bl cells were washed with sterile-phosphate-buffer saline (PBS; Lonza, Walkersville, MD, USA). Afterwards, 20 μL of MTT solution (5 mg/mL) and 200 μL of Opti-MEM were added to TZM.bl cells and incubated at 37 °C for 3 h. The medium was removed and formazan crystals were dissolved in 200 μL of DMSO. The

plate was gently placed on a shaker for 10 min to completely dissolve the precipitation. The absorbance was detected at 570 nm (above background of 690 nm) using the Synergy 4 microplate reader. The medium alone and 10% DMSO were used as untreated and cell death controls. Dextran (10 μ M) was used as a harmless control to check and to verify the status of cells. 1% DMSO was used as control to check the absence of toxic effects by the solvent.

Antiviral assays

TZM.bl cells at a cell density of 7.5×10^3 cells/mL were pre-treated with different compounds at 37 °C for 1 h. Cells were then infected with the equivalent to 20 ng capsid protein (p24)/ 10^6 cells of X4-HIV-1_{NL4.3}, or R5-HIV-1_{NLAD8} at 37 °C for 3 h. Following the infection, cells were washed twice with sterile-PBS to remove unbound viruses and compounds, and incubated in fresh medium with no further addition of compounds at 37 °C for 48 h. At 48 h post-infection, the luciferase activity was measured using the Luciferase assay system kit (Promega) according to manufacturer's instructions. The light emission was measured by luminescence using the Synergy 4 microplate reader. The total light units were normalized by the total protein content in the extract.

Statistical analysis

Data are represented as mean values and standard deviations. The statistical significance between a treatment group and untreated control was calculated by an unpaired *T*-test by using the statistical software GraphPadPrism, version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). A non-parametric unpaired *T*-test was conducted to analyze differences between groups considering pure values. A P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- (1) OMS | VIH/SIDA. http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/.
- (2) Naciones Unidas. <http://www.un.org/es/>.
- (3) Taylor, B. S.; Sobieszczyk, M. E.; McCutchan, F. E.; Hammer, S. M. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1590–1602.
- (4) Greene, W. C. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 1084–1091.
- (5) Freed, E. O. *Somat. Cell Mol. Genet.* **2001**, *26*, 13–33.
- (6) Richman, D. D. *Nature* **2001**, *410*, 995–1001.
- (7) Michael, N. L.; Moore, J. P. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 740–742.
- (8) Dalglish, A. G.; Beverley, P. C. L.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F.; Weiss, R. A. *Nature* **1984**, *312*, 763–767.
- (9) Kowalski, M.; Potz, J.; Basiripour, L.; Dorfman, T.; Goh, W. C.; Terwilliger, E.; Dayton, A.; Rosen, C.; Haseltine, W.; Sodroski, J. *Science* **1987**, *237*, 1351–1355.
- (10) Myszka, D. G.; Sweet, R. W.; Hensley, P.; Brigham-Burke, M.; Kwong, P. D.; Hendrickson, W. A.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Doyle, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9026–9031.
- (11) Berger, E. A.; Doms, R. W.; Fenyö, E.-M.; Korber, B. T. M.; Littman, D. R.; Moore, J. P.; Sattentau, Q. J.; Schuitemaker, H.; Sodroski, J.; Weiss, R. A. *Nature* **1998**, *391*, 240–240.
- (12) Connor, R. I.; Sheridan, K. E.; Ceradini, D.; Choe, S.; Landau, N. R. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 621–628.
- (13) Sakaida, H.; Hori, T.; Yonezawa, A.; Sato, A.; Isaka, Y.; Yoshie, O.; Hattori, T.; Uchiyama, T. *J. Virol.* **1998**, *72*, 9763–9770.
- (14) Kilby, J. M.; Eron, J. J. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2228–2238.
- (15) Melikyan, G. B.; Markosyan, R. M.; Hemmati, H.; Delmedico, M. K.; Lambert, D. M.; Cohen, F. S. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 413–423.
- (16) Madani, N.; Perdigoto, A. L.; Srinivasan, K.; Cox, J. M.; Chruma, J. J.; LaLonde, J.; Head, M.; Smith, A. B.; Sodroski, J. G. *J. Virol.* **2004**, *78*, 3742–3752.
- (17) VIH/SIDA <https://infosida.nih.gov>.
- (18) UNAIDS <http://www.unaids.org/en/>.
- (19) Foss, A. M.; Vickerman, P. T.; Heise, L.; Watts, C. H. *Aids* **2003**, *17*, 1227–1237.
- (20) Lederman, M. M.; Offord, R. E.; Hartley, O. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 371–382.
- (21) Singh, O.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A. K. *J. Pharm.* **2014**, *2014*, 1–18.
- (22) Smith-McCune, K.; Chen, J. C.; Greenblatt, R. M.; Shanmugasundaram, U.; Shacklett, B. L.; Hilton, J. F.; Johnson, B.; Irwin, J. C.; Giudice, L. C. *PLoS One* **2015**, No. 10, e0129769.

- (23) Peterson, L.; Nanda, K.; Opoku, B. K.; Ampofo, W. K.; Owusu-Amoaka, M.; Boakye, A. Y.; Rountree, W.; Troxler, A.; Dominik, R.; Roddy, R.; et al. *PLoS One* **2007**, *2*, e1312.
- (24) Mbopi-Keou, F. X.; Trottier, S.; Omar, R. F.; Nkele, N. N.; Fokoua, S.; Mbu, E. R.; Domingo, M. C.; Giguère, J. F.; Piret, J.; Mwatha, A.; et al. *Contraception* **2009**, *80*, 484–492.
- (25) Skoler-Karpoft, S.; Ramjee, G.; Ahmed, K.; Altini, L.; Plagianos, M. G.; Friedland, B.; Govender, S.; De Kock, A.; Cassim, N.; Palanee, T.; et al. *Lancet* **2008**, *372*, 1977–1987.
- (26) McCormack, S.; Ramjee, G.; Kamali, A.; Rees, H.; Crook, A. M.; Gafos, M.; Jentsch, U.; Pool, R.; Chisembele, M.; Kapiga, S.; et al. *Lancet* **2010**, *376*, 1329–1337.
- (27) Tabet, S. R.; Callahan, M. M.; Mauck, C. K.; Gai, F.; Coletti, A. S.; Profy, A. T.; Moench, T. R.; Soto-Torres, L. E.; Poindexter, A. N.; Frezieres, R. G.; et al. *J. Acq. Immune Def. Syndr.* **2003**, *33*, 476–483.
- (28) Forbes, C. J.; McCoy, C. F.; Murphy, D. J.; Woolfson, A. D.; Moore, J. P.; Evans, A.; Shattock, R. J.; Karl Malcolm, R. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 1422–1432.
- (29) Abdool, K. Q.; Abdool Karim, S. S.; Frohlich, J. A.; Grobler, A. C.; Baxter, C.; Mansoor, L. E.; Kharsany, A. B.; Sibeko, S.; Mlisana, K. P.; Omar, Z.; et al. *Science* **2010**, *329*, 1168–1174.
- (30) Dhondt, M. M. M.; Adriaens, E.; Roey, J. V.; Remon, J. P. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *60*, 419–425.
- (31) Sluis-Cremer, N. *Viruses* **2014**, *6*, 2960–2973.
- (32) Haqqani, A. A.; Tilton, J. C. *Antiviral Res.* **2013**, *98*, 158–170.
- (33) Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Robinson, J.; Sweet, R. W.; Sodroski, J.; Hendrickson, W. A. *Nature* **1998**, *393*, 648–659.
- (34) Wang, T.; Zhang, Z.; Wallace, O. B.; Deshpande, M.; Fang, H.; Yang, Z.; Zadjura, L. M.; Tweedie, D. L.; Huang, S.; Zhao, F.; et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4236–4239.
- (35) Lin, P.-F.; Blair, W.; Wang, T.; Spicer, T.; Guo, Q.; Zhou, N.; Gong, Y.-F.; Wang, H.-G. H.; Rose, R.; Yamanaka, G.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 11013–11018.
- (36) Yang, Z.; Zadjura, L.; D'Arienzo, C.; Marino, A.; Santone, K.; Klunk, L.; Greene, D.; Lin, P. F.; Colonno, R.; Wang, T.; et al. *Biopharm. Drug Dispos.* **2005**, *26*, 387–402.
- (37) Veazey, R. S.; Springer, M. S.; Marx, P. A.; Dufour, J.; Klasse, P. J.; Moore, J. P. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1293–1294.
- (38) Meanwell, N. A.; Wallace, O. B.; Fang, H.; Wang, H.; Deshpande, M.; Wang, T.; Yin, Z.; Zhang, Z.; Pearce, B. C.; James, J.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1977–1981.
- (39) Yeung, K. S.; Qiu, Z.; Xue, Q.; Fang, H.; Yang, Z.; Zadjura, L.; D'Arienzo, C. J.; Eggers, B. J.; Riccardi, K.; Shi, P. Y.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 198–202.
- (40) Hanna, G. J.; Lalezari, J.; Hellinger, J. A.; Wohl, D. A.; Nettles, R.; Persson, A.; Krystal, M.; Lin, P.; Colonno, R.; Grasela, D. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 722–728.
- (41) U.S. National Institutes of Health <http://clinicaltrials.gov/>.

- (42) Meanwell, N. A.; Krystal, M. R.; Nowicka-Sans, B.; Langley, D. R.; Conlon, D. A.; Eastgate, M. D.; Grasela, D. M.; Timmins, P.; Wang, T.; Kadow, J. F. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 62–80.
- (43) Caner, J. *Estudis computacionals i síntesi d'inhibidors d'entrada del VIH-1. Síntesi de purines marcades amb ¹⁵N*; **2009**.
- (44) Speeter, M. E.; Anthony, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 6208–6210.
- (45) Wei, L. L.; Mulder, J. A.; Xiong, H.; Zifcsak, C. A.; Douglas, C. J.; Hsung, R. P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 459–466.
- (46) WO03072028A2. 2003.
- (47) Wang, J.; Le, N.; Heredia, A.; Song, H.; Redfield, R.; Wang, L. X. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1781–1786.
- (48) Wu, X.; Fors, B. P.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9943–9947.
- (49) Bruno, N. C.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2876–2879.
- (50) Vanotti, E.; Amici, R.; Bargiotti, A.; Berthelsen, J.; Bosotti, R.; Ciavolella, A.; Cirila, A.; Cristiani, C.; D'Alessio, R.; Forte, B.; et al. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 487–501.
- (51) Khoje, A. D.; Charnock, C.; Wan, B.; Franzblau, S.; Gundersen, L. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3483–3491.
- (52) Miki, Y.; Hachiken, H.; Kashima, Y.; Sugimura, W.; Yanase, N. *Heterocycles* **1998**, *48*, 1–4.
- (53) Aubart, K. M.; Heathcock, C. H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 16–22.
- (54) Gehringer, M.; Forster, M.; Pfaffenrot, E.; Bauer, S. M.; Laufer, S. A. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2516–2527.
- (55) Shirota, O.; Hakamata, W.; Goda, Y. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 885–887.
- (56) Pyta, K.; Klich, K.; Domagalska, J.; Przybylski, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 651–676.
- (57) IUPAC. <https://goldbook.iupac.org/>.
- (58) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565–632.
- (59) Hoffmann, R.; Woodward, R. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 781–932.
- (60) Inagaki, S.; Fujimoto, H.; Fukui, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4693–4701.
- (61) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (62) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- (63) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- (64) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.
- (65) Kwok, S. W.; Fotsing, J. R.; Fraser, R. J.; Rodionov, V. O.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4217–4219.

- (66) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.
- (67) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2101–2103.
- (68) Presolski, S. I.; Hong, V.; Cho, S. H.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570–14576.
- (69) Semakin, A. N.; Agababyan, D. P.; Kim, S.; Lee, S.; Sukhorukov, A. Y.; Fedina, K. G.; Oh, J.; Ioffe, S. L. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6335–6339.
- (70) Pérez-Balderas, F.; Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernández-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asín, J. A.; Isac-García, J.; Santoyo-González, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951–1954.
- (71) Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L. *Chem. Commun.* **2009**, 2139–2141.
- (72) Díez-González, S.; Nolan, S. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8881–8884.
- (73) Nakamura, T.; Terashima, T.; Ogata, K.; Fukuzawa, S. I. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 620–623.
- (74) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- (75) Soriano Del Amo, D.; Wang, W.; Jiang, H.; Besanceney, C.; Yan, A. C.; Levy, M.; Liu, Y.; Marlow, F. L.; Wu, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.
- (76) Pavlishchuk, V. V.; Kolotilov, S. V.; Addison, A. W.; Prushan, M. J.; Butcher, R. J.; Thompson, L. K. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1759–1766.
- (77) WO2006117368A1; **2006**.
- (78) Martina, K.; Trotta, F.; Robaldo, B.; Belliardi, N.; Jicsinszky, L.; Cravotto, G. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 9185–9189.
- (79) Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355–1387.
- (80) Chatani, S.; Sheridan, R. J.; Podgórski, M.; Nair, D. P.; Bowman, C. N. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 2897–3901.
- (81) Tang, W.; Becker, M. L. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013–7039.
- (82) Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E. *Progr. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487–531.
- (83) Faja, M.; Ariza, X.; Gálvez, C.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3261–3264.
- (84) Ariza, X.; Costa, A. M.; Faja, M.; Pineda, O.; Vilarrasa, J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2809–2811.
- (85) Ariza, X.; Pineda, O.; Vilarrasa, J.; Shipps, G. W.; Ma, Y.; Dai, X. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1399–1401.
- (86) Arjona, O.; Medel, R.; Rojas, J.; Costa, A. M.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6369–6373.
- (87) Mola, L.; Font, J.; Bosch, L.; Caner, J.; Costa, A. M.; Etxebarria-Jardí, G.; Pineda, O.; De Vicente, D.; Vilarrasa, J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5832–5842.
- (88) Petit, E.; Bosch, L.; Font, J.; Mola, L.; Costa, A. M.; Vilarrasa, J. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8826–8834.
- (89) Arjona, O.; Iradier, F.; Medel, R.; Plumet, J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6090–6093.
- (90) Medel, R.; Monterde, M. I.; Plumet, J.; Rojas, J. K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 735–738.

- (91) Medel, R.; Plumet, J. *Synthesis* **2006**, 1339–1342.
- (92) Takaoka, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106.
- (93) Raycroft, M. A. R.; Racine, K.; Rowley, C. N.; Keillor, J. W. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11674–11685.
- (94) Petit, E.; Bosch, L.; Costa, A. M.; Vilarrasa, J. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11170–11176.
- (95) Kalia, J.; Raines, R. T. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 118–147.
- (96) Staudinger, H. *Nobel Lecture: Macromolecular Chemistry*; **1953**.
- (97) Duncan, R.; Vicent, M. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 60–70.
- (98) Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 651–653.
- (99) Amin, M. C. I. M.; Ahmad, N.; Pandey, M.; Abeer, M. M.; Mohamad, N. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12*, 1149–1161.
- (100) Son, S.; Shin, E.; Kim, B. S. *Macromolecules* **2015**, *48*, 600–609.
- (101) Frey, H.; Haag, R. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 257–267.
- (102) Abbina, S.; Vappala, S.; Kumar, P.; Siren, E. M. J.; La, C. C.; Abbasi, U.; Brooks, D. E.; Kizhakkedathu, J. N. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 9249–9277.
- (103) Kainthan, R. K.; Janzen, J.; Levin, E.; Devine, D. V.; Brooks, D. E. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 703–709.
- (104) Kumar, P.; Shenoi, R. A.; Lai, B. F. L.; Nguyen, M.; Kizhakkedathu, J. N.; Straus, S. K. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 913–923.
- (105) Kainthan, R. K.; Muliawan, E. B.; Hatzikiriakos, S. G.; Brooks, D. E. *Macromolecules* **2006**, *39*, 7708–7717.
- (106) Moore, E.; Zill, A. T.; Anderson, C. A.; Jochem, A. R.; Zimmerman, S. C.; Bonder, C. S.; Kraus, T.; Thissen, H.; Voelcker, N. H. *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, *217*, 2252–2261.
- (107) Glaffig, M.; Palitzsch, B.; Hartmann, S.; Schüll, C.; Nuhn, L.; Gerlitzki, B.; Schmitt, E.; Frey, H.; Kunz, H. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4232–4236.
- (108) Schüll, C.; Gieshoff, T.; Frey, H. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 4730–4736.
- (109) WO 2002004440, 2002.
- (110) Luo, J. K.; Schneller, S. W. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4045–4048.
- (111) Kannaboina, P.; Kumar, K. A.; Das, P. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 900–903.
- (112) Hiroya, K.; Itoh, S.; Sakamoto, T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1126–1136.
- (113) Méndez, L. M. M.; Deally, A.; O’Shea, D. F.; Tacke, M. *Heteroat. Chem.* **2011**, *22*, 148–157.
- (114) Forster, M.; Chaikuad, A.; Dimitrov, T.; Döring, E.; Holstein, J.; Berger, B. T.; Gehringer, M.; Ghoreschi, K.; Müller, S.; Knapp, S.; et al. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5350–5366.
- (115) Szmuszkovicz, J.; Kane, M. P.; Laurian, L. G.; Chidester, C. G.; Scahill, T. A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3562–3564.

- (116) Karageorge, G. N.; MacOr, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1011–1013.
- (117) Eissa, A. M.; Smith, M. J. P.; Kubilis, A.; Mosely, J. A.; Cameron, N. R. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2013**, *51*, 5184–5193.
- (118) Bottaro, J. C.; Penwell, P. E.; Schmitt, R. J. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 1465–1467.
- (119) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- (120) Semenov, S. N.; Belding, L.; Cafferty, B. J.; Mousavi, M. P. S.; Finogenova, A. M.; Cruz, R. S.; Skorb, E. V.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10221–10232.
- (121) Chan, T. R.; Fokin, V. V. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1274–1279.
- (122) Goldcamp, M. J.; Rosa, D. T.; Landers, N. A.; Mandel, S. M.; Krause Bauer, J. A.; Baldwin, M. J. *Synthesis* **2000**, *14*, 2033–2038.
- (123) WO2009060206A1; **2009**.
- (124) Byun, H.-S.; Zhong, N.; Bittman, R. *Org. Synth.* **2000**, *77*, 225–225.
- (125) Kanner, C. B.; Pandit, U. K. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3597–3604.
- (126) Payne, R. J.; Peyrot, F.; Kerbarh, O.; Abell, A. D.; Abell, C. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1015–1029.
- (127) Katritzky, A. R.; Singh, S. K. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9077–9079.
- (128) Madhushaw, R. J.; Li, C. L.; Shen, K. H.; Hu, C. C.; Liu, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7427–7428.
- (129) Chonco, L.; Pion, M.; Vacas, E.; Rasines, B.; Maly, M.; Serramía, M. J.; López-Fernández, L.; De La Mata, J.; Alvarez, S.; Gómez, R.; et al. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 949–958.
- (130) Rasines, B.; Sánchez-Nieves, J.; Maiolo, M.; Maly, M.; Chonco, L.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. Á.; De La Mata, F. J.; Gómez, R. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 12733–12748.
- (131) Sepúlveda-Crespo, D.; Serramía, M. J.; Tager, A. M.; Vrbanac, V.; Gómez, R.; De La Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. Á. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 1299–1308.
- (132) Freed, E. O.; Englund, G.; Martin, M. A. *J. Virol.* **1995**, *69*, 3949–3954.
- (133) Adachi, A.; Gendelman, H. E.; Koenig, S.; Folks, T.; Willey, R.; Rabson, A.; Martin, M. A. *J. Virol.* **1986**, *59*, 284–291.

ACRÒNIMS I ABREVIACIONS

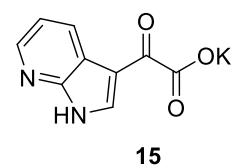
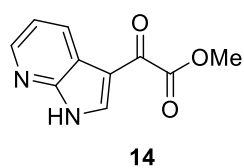
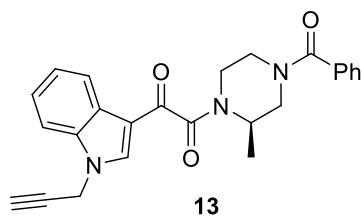
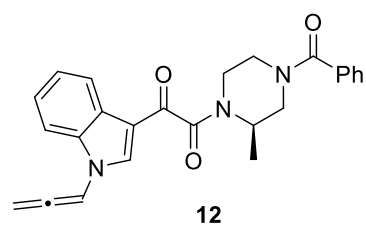
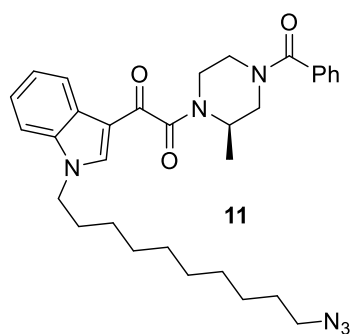
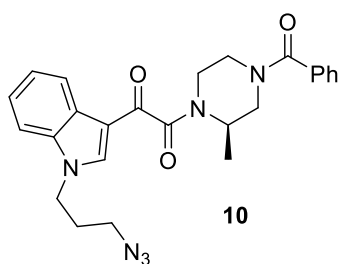
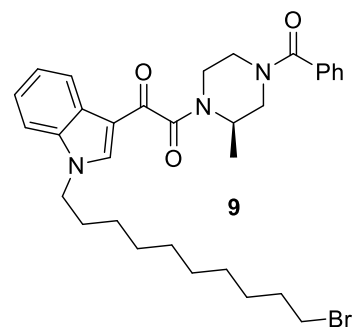
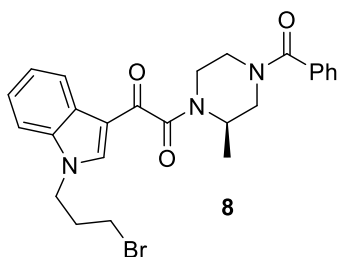
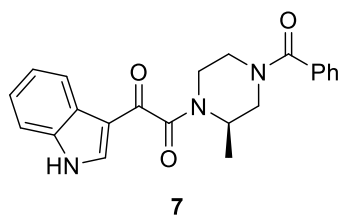
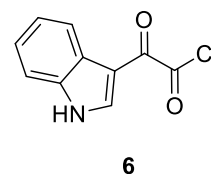
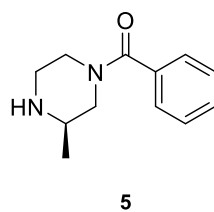
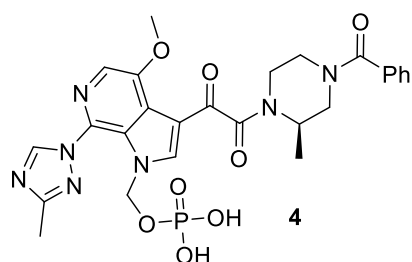
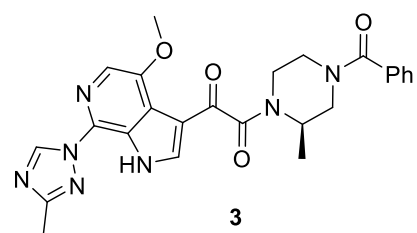
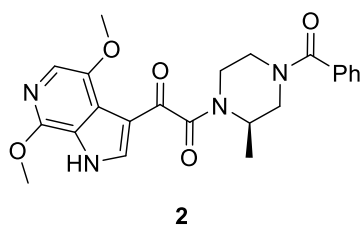
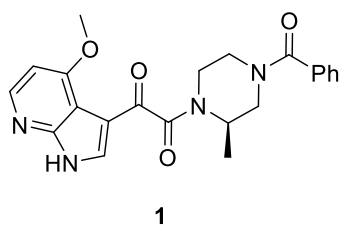
ACRÒNIMS

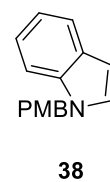
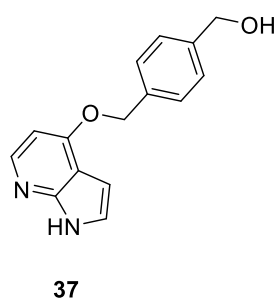
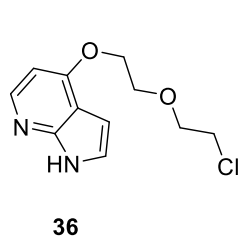
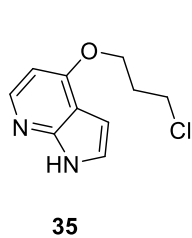
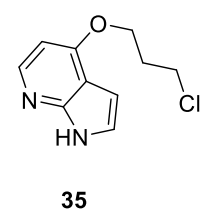
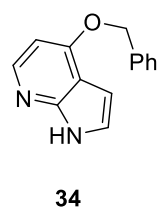
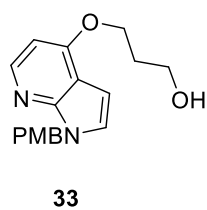
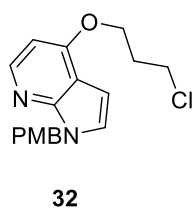
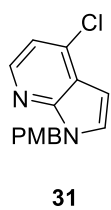
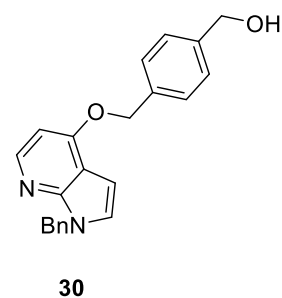
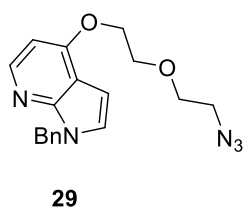
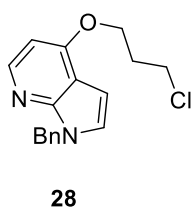
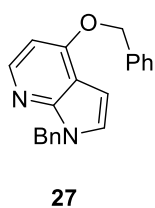
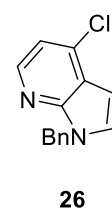
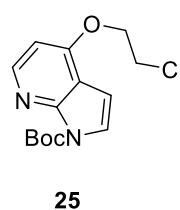
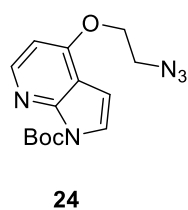
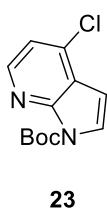
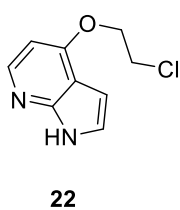
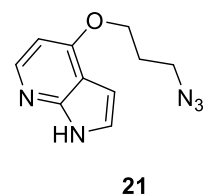
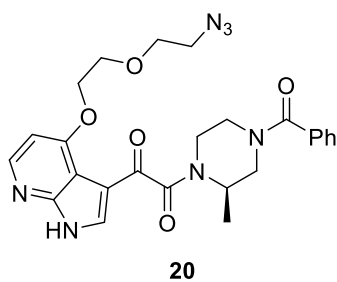
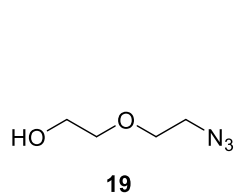
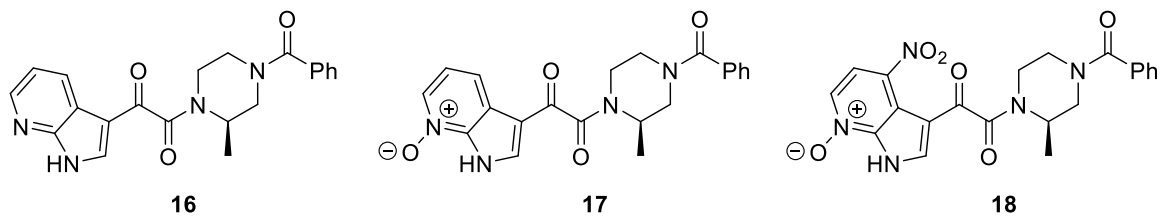
Ac	Acetil
ADN	Àcid desoxiribonucleic (DNA)
anh	Anhidre
aq.	Aquós
Ar	Aromàtic
ARN	Àcid ribonucleic (RNA)
ARV	Antiretroviral
AZT	3'-Azidotimidina
br	Broad
B	Base
β CD	β -Ciclodextrina
Bn	Benzil
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonil
cat.	Catalitzador
CCF	Cromatografia en capa fina
CDC	Centre de prevenció i control de malalties de E.E.U.U.
Conv.	Conversió
COSY	Espectroscòpia de correlació
d	Doblet
dba	Dibenzilidenacetona
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
dd	Doblet de doblats
DDQ	2,3-Diciano-5,6-dicloro-1,4-benzoquinona
DEPBT	3-(Dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-ona
Diglyme	Bis(2-metoxietil) èter
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfòxid o sulfòxid de dimetil
dt	Doblet de triplets
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Àcid 1,2-etandiamino- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacètic
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENI	Inhibidor d'entrada
equiv	Equivalents
ESI	Ionització per electrospray
Et	Etil
EWG	Grup electroattractor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administració d'Aliments i Medicaments
h	Hores
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPG	Poliglicerol hiperramificat
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
HSQC	Coherència heteronuclear quàntica simple o 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ directament units
Hz	Hertz
INI	Inhibidor d'integrasa

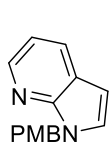
IR	Infraroig
ITS	Infecció de transmissió sexual
KHMDS	Hexametildisililamidur de liti o bis(trimetilsilil)amidur de liti
m	Multiplet
M	Molar
MHz	Megahertz
mCPBA	Àcid <i>m</i> -cloroperbenzoic o àcid 3-cloroperbenzoic
Me	Metil
min	Minuts
M_p	Melting point
MS	Espectroscòpia de masses
MTT	Bromur de metiltiazolildifeniltetrazol
MVC	Maraviroc
MW	<i>Microwave</i> , Microones
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NNRTI	Inhibidor no-nucleosídic de transcriptasa inversa
NRTI	Inhibidor nucleosídic de transcriptasa inversa
OMS	Organització Mundial de la Salut, WHO
ONU	Organització de les Nacions Unides, MNO
p	Pentuplet o quintuplet
PBS	Tampó fosfat salí
Ph	Fenil
PI	Inhibidor de proteasa
PMB	4-Metoxibenzil
q	Quadruplet
Rdt.	Rendiment
R_f	Factor de retenció
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RTI	Inhibidors de la transcriptasa inversa
s	Singlet o segons
sat.	Saturada
SIDA	Síndrome de l'immunodeficiència adquirida
START	Strategic Timing of antiretroviral treatment
t	Temps o triplet
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambient
TACO	Clorur de <i>N,N,N</i> -trietil- <i>N</i> -((2-hidroxiimino)propil)amoni
TARGA	Teràpia combinada altament activa
Tf	Triflat
TFA	Àcid trifluoroacètic
TFV	Tenofovir
THF	Tetrahidrofurà
TLC	Cromatografia de capa fina o CCF
TMS	Trimetilsilil
Ts	Tosil, <i>p</i> -toluensulfonil
UV	Llum ultravioleta
VIH	Virus de la immunodeficiència humana, HIV
VIS	Visible i virus de la immunodeficiència en simis
Xantphos	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxantè

ÍNDICE DE COMPOSTOS

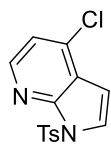
ÍNDIX DE COMPOSTOS



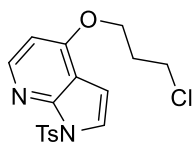




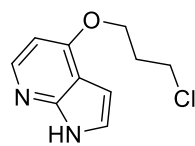
39



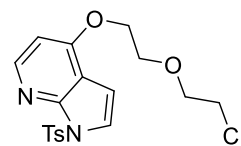
40



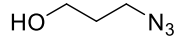
41



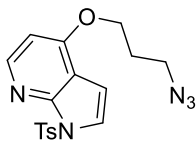
42



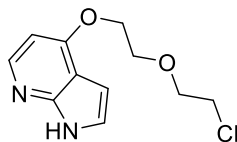
43



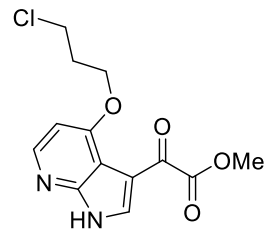
44



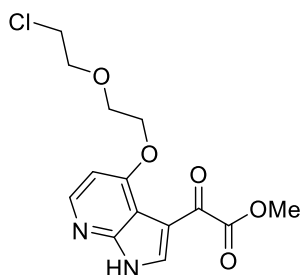
45



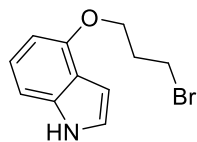
46



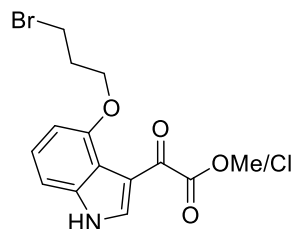
47



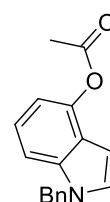
48



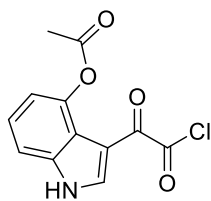
49



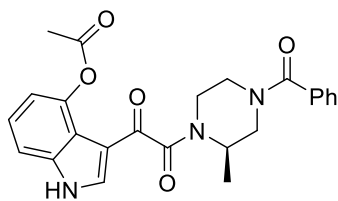
50



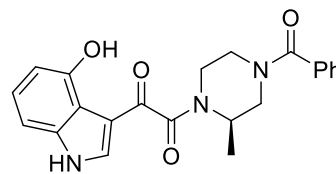
51



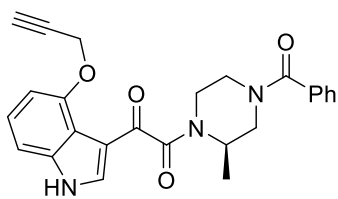
52



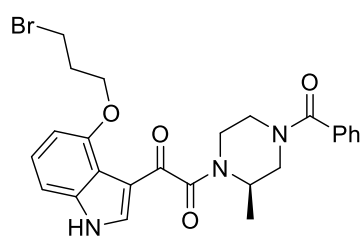
53



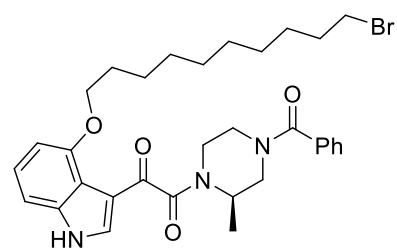
54



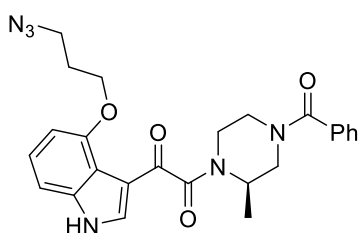
55



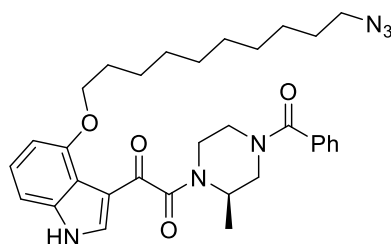
56



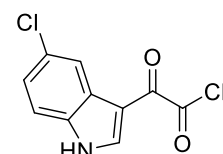
57



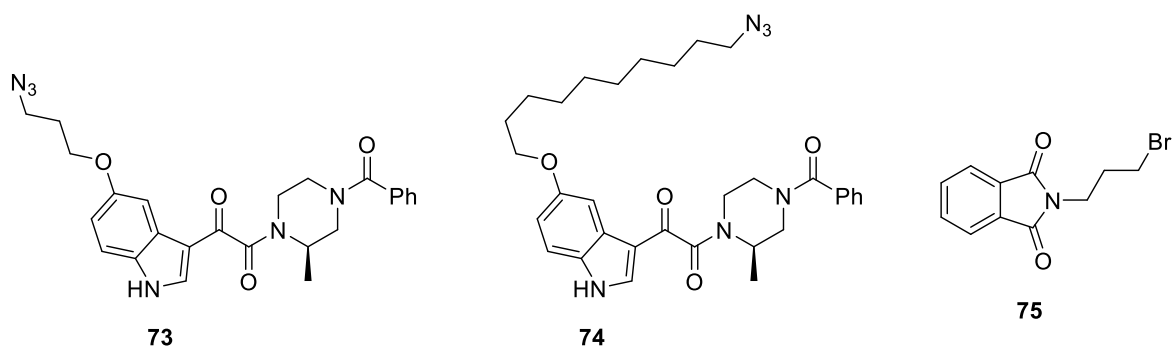
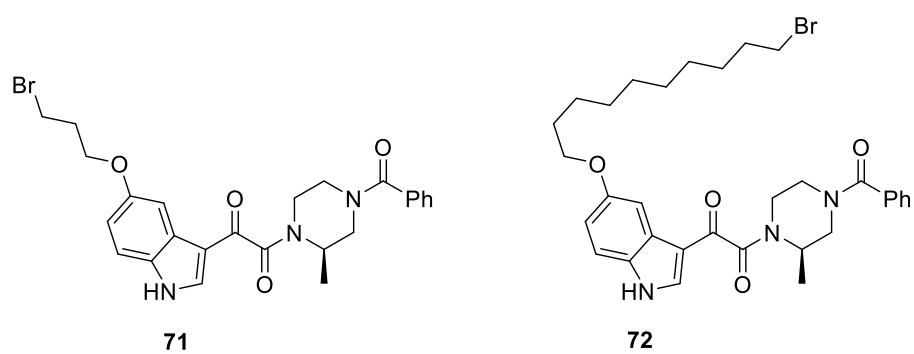
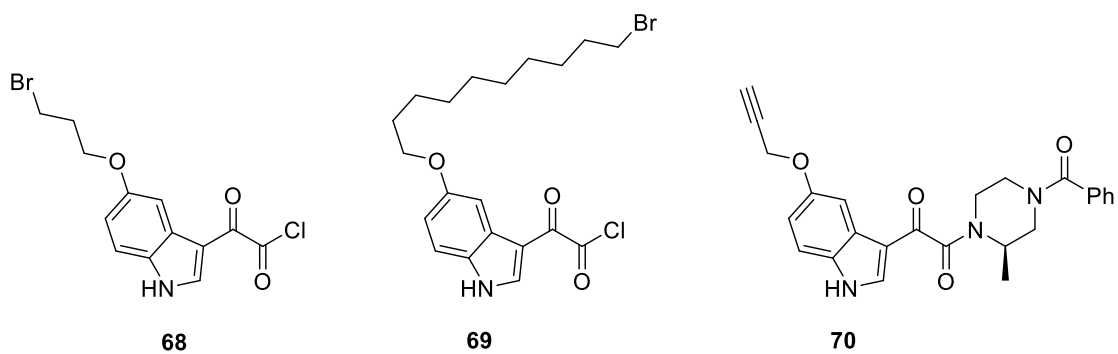
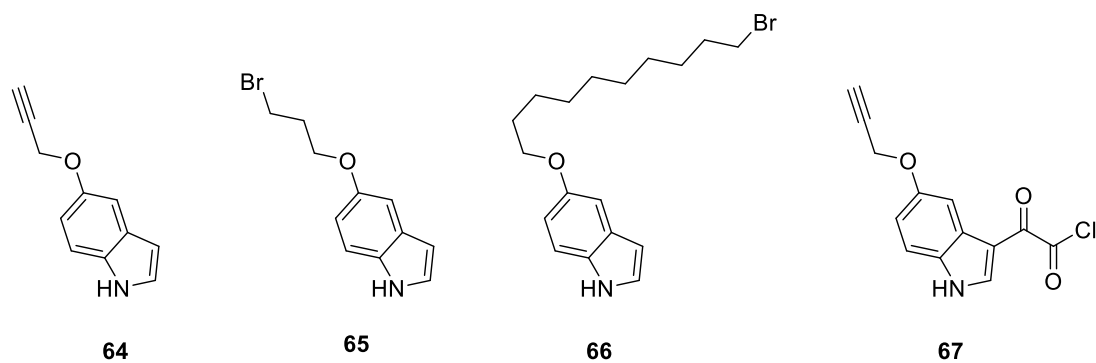
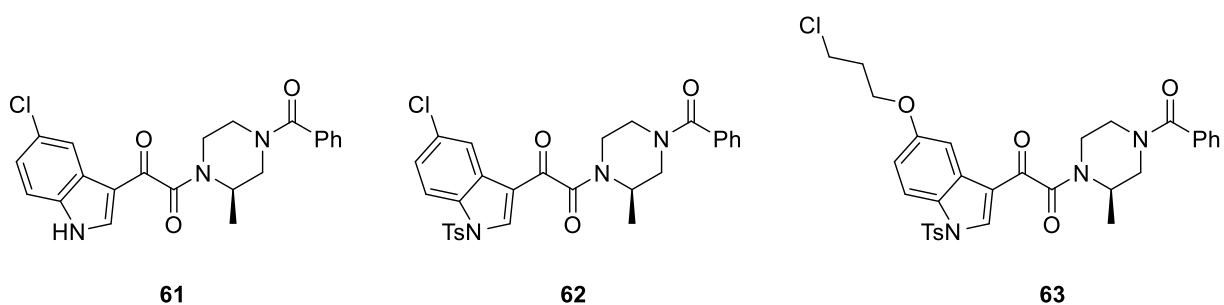
58

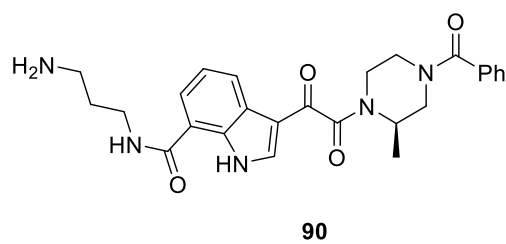
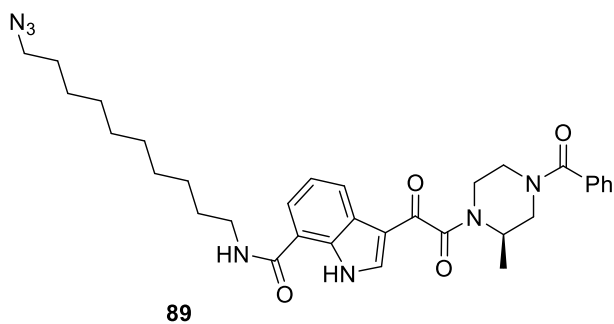
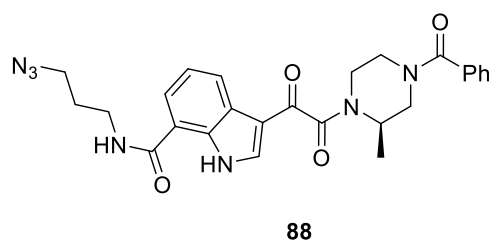
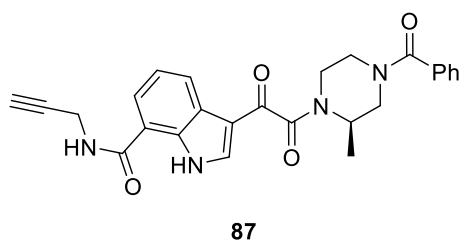
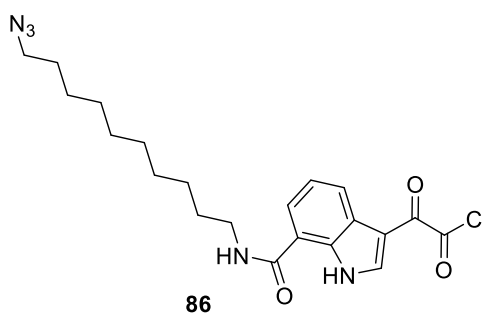
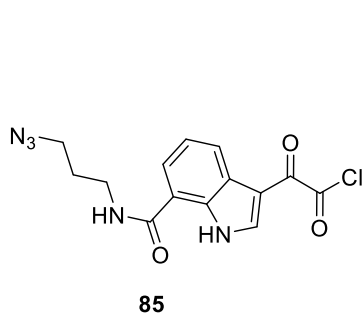
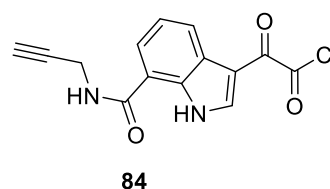
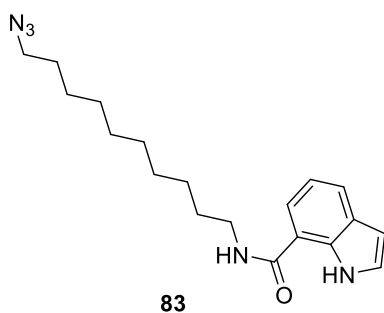
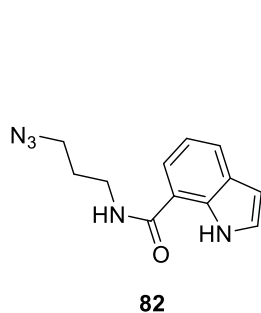
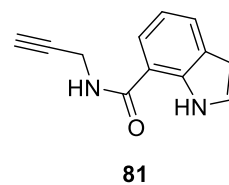
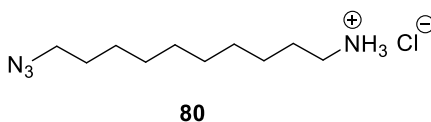
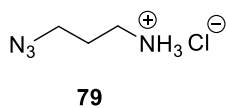
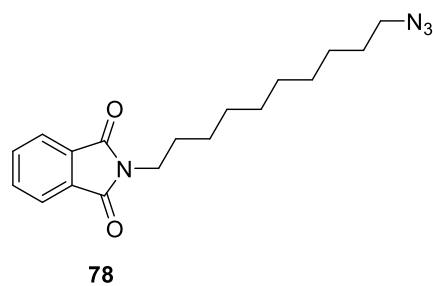
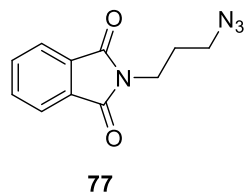
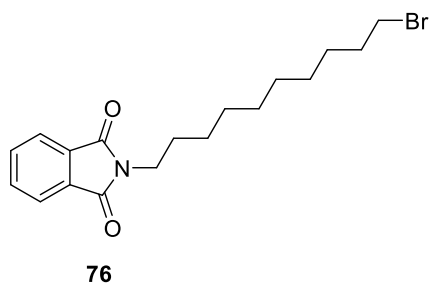


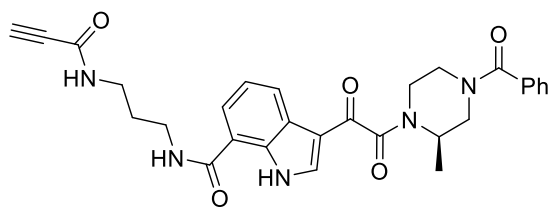
59



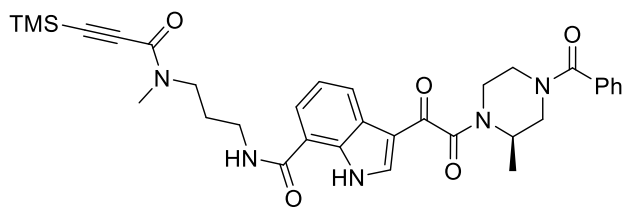
60



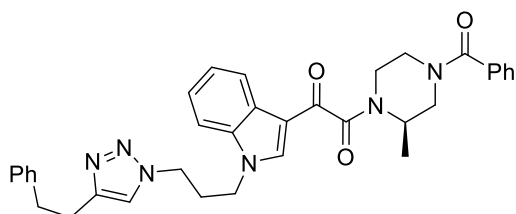




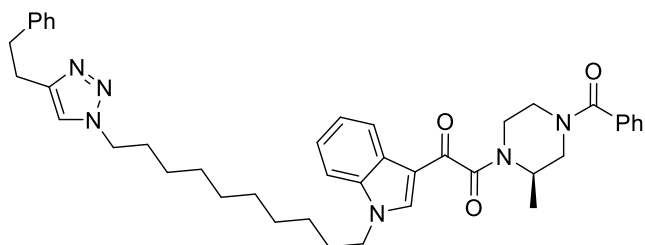
91



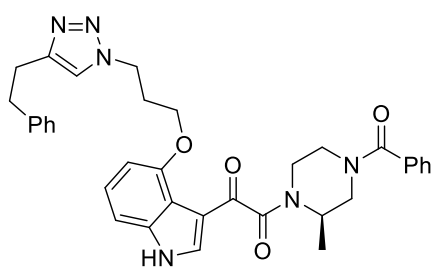
92



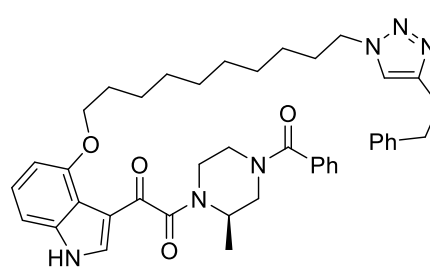
93



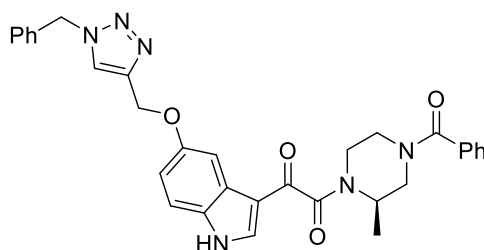
94



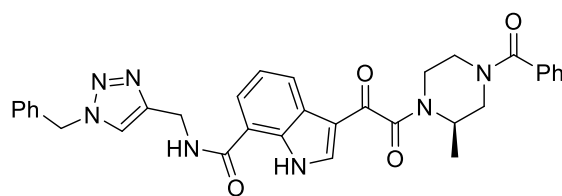
95



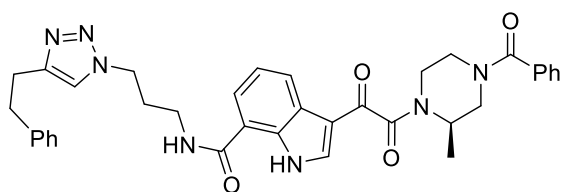
96



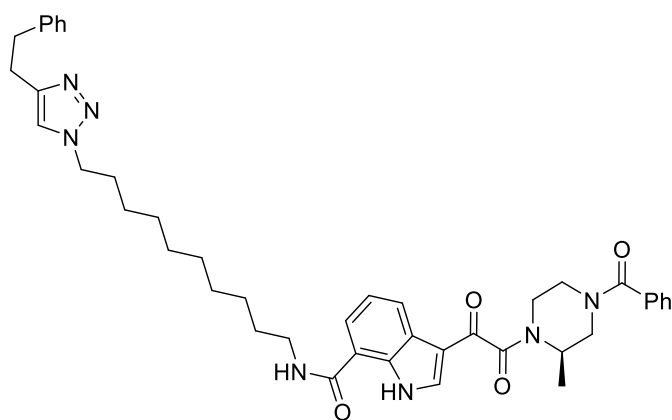
97



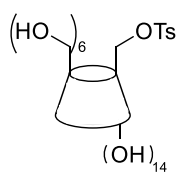
98



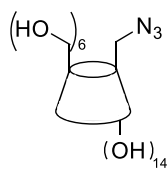
99



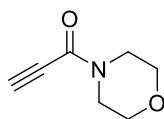
100



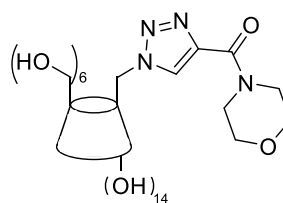
123



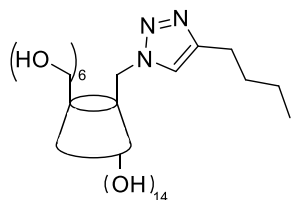
124



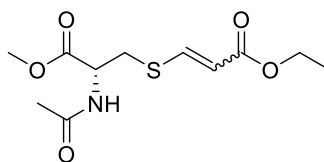
125



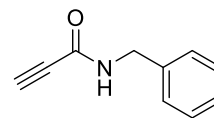
126



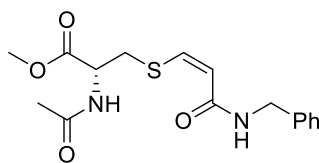
127



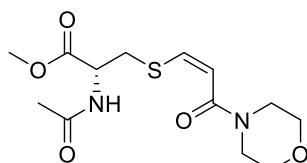
128



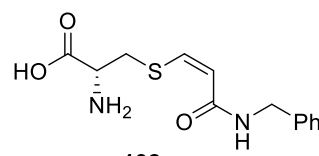
129



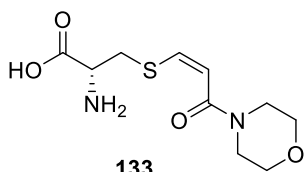
130



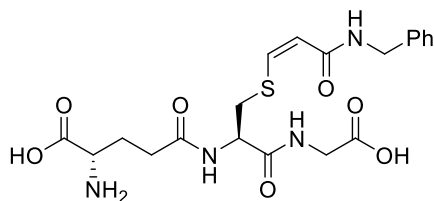
131



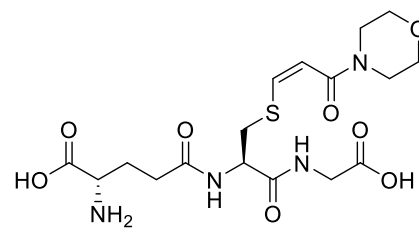
132



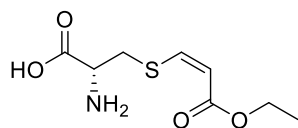
133



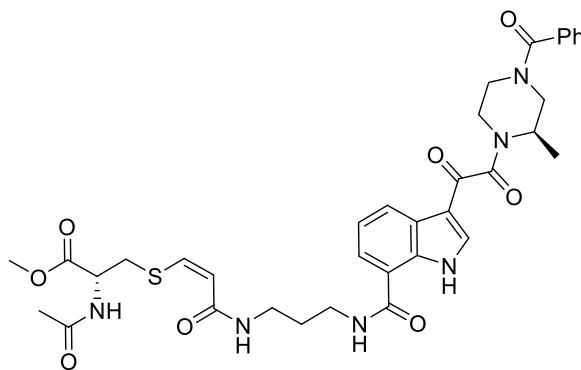
134



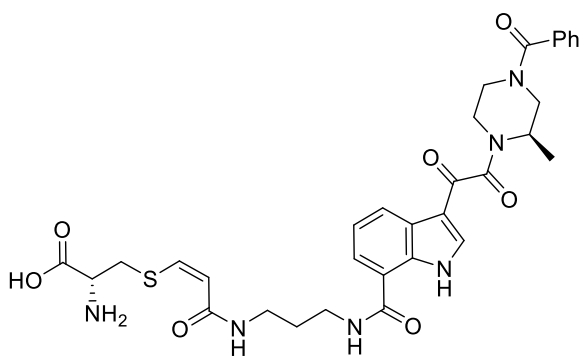
135



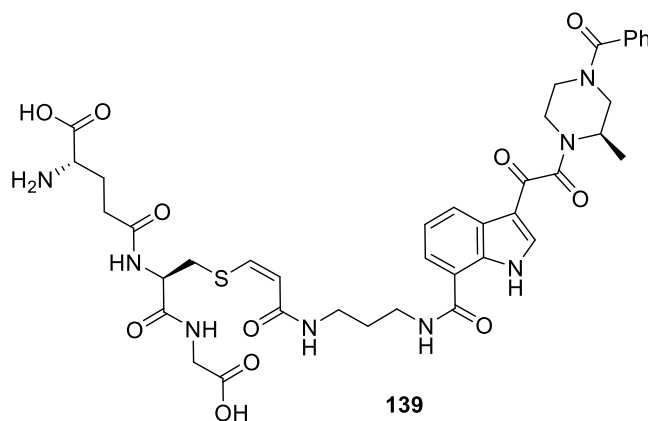
136



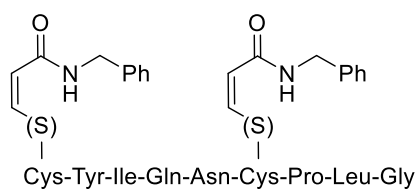
137



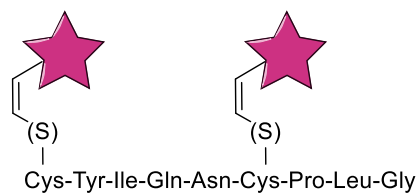
138



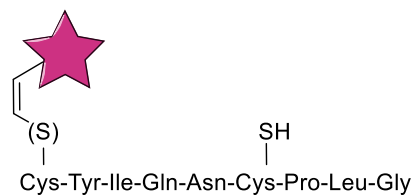
139



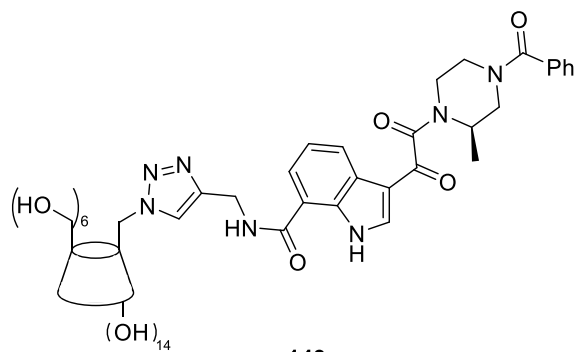
140



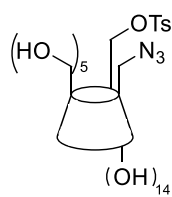
141



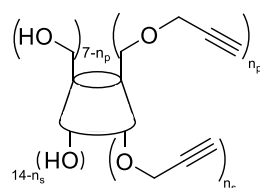
142



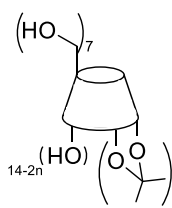
143



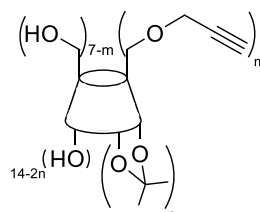
144



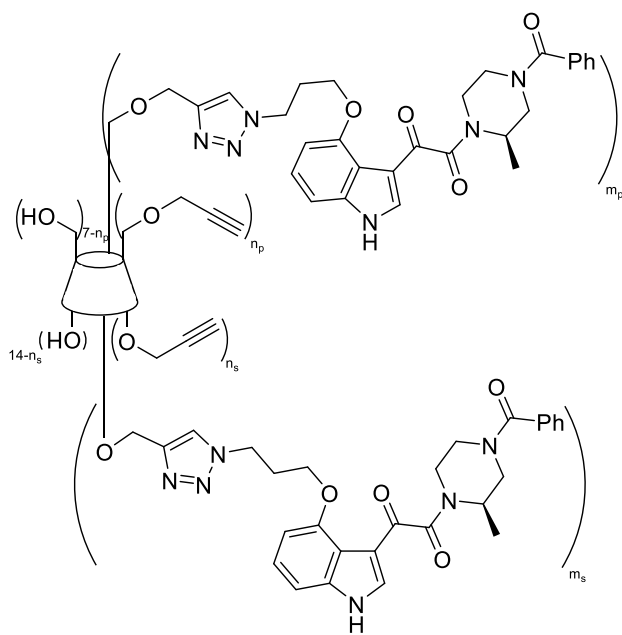
145



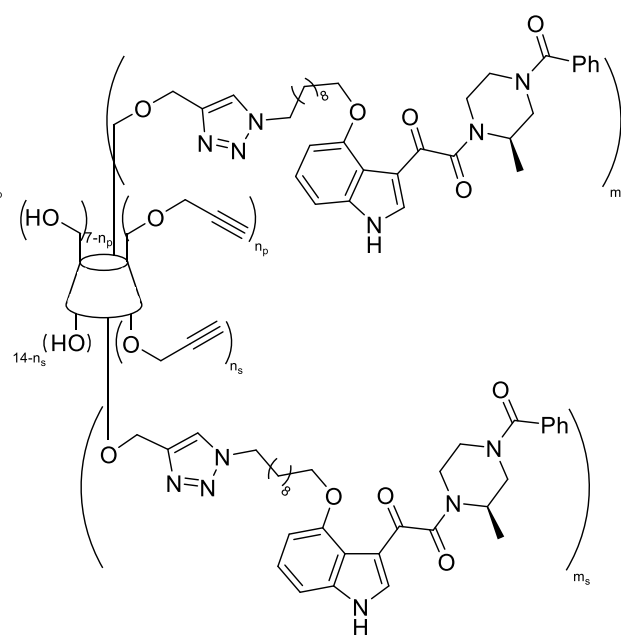
146



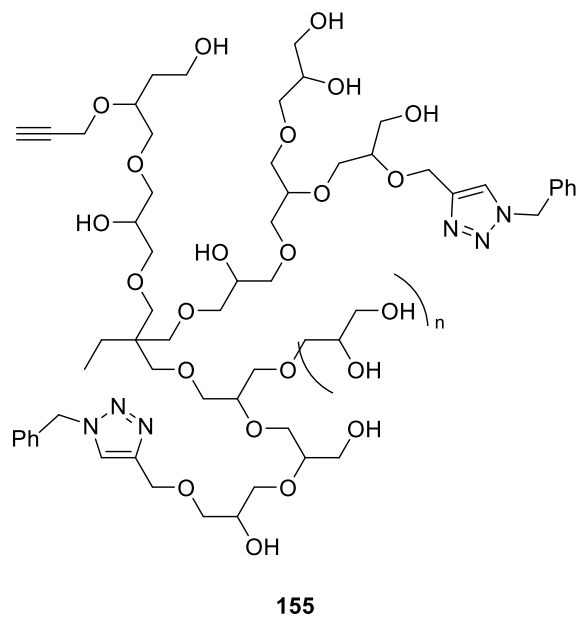
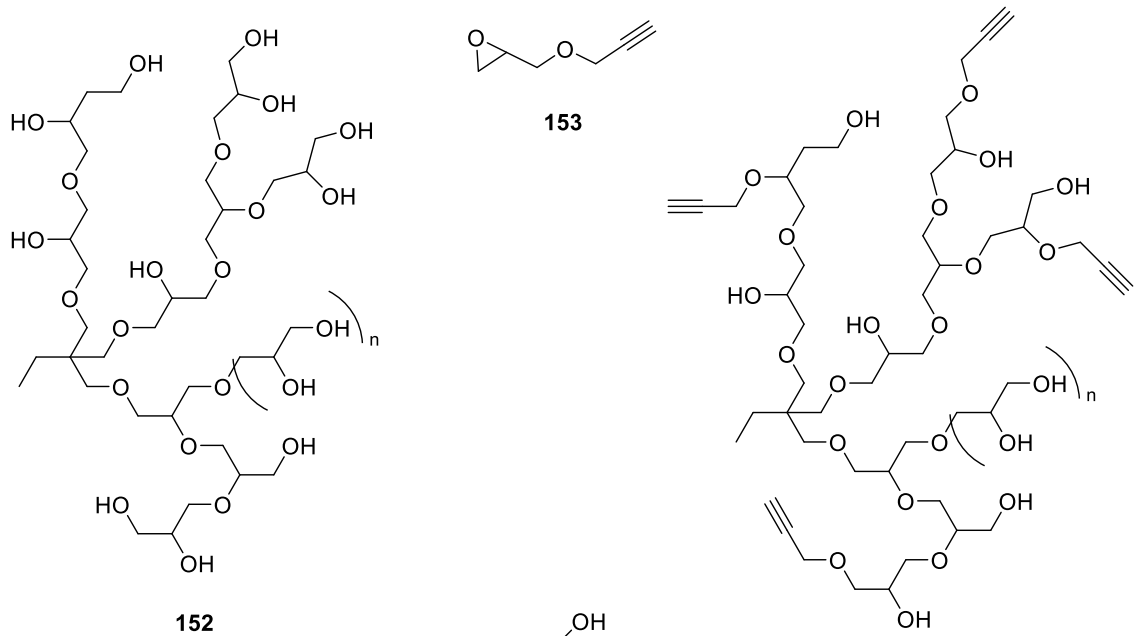
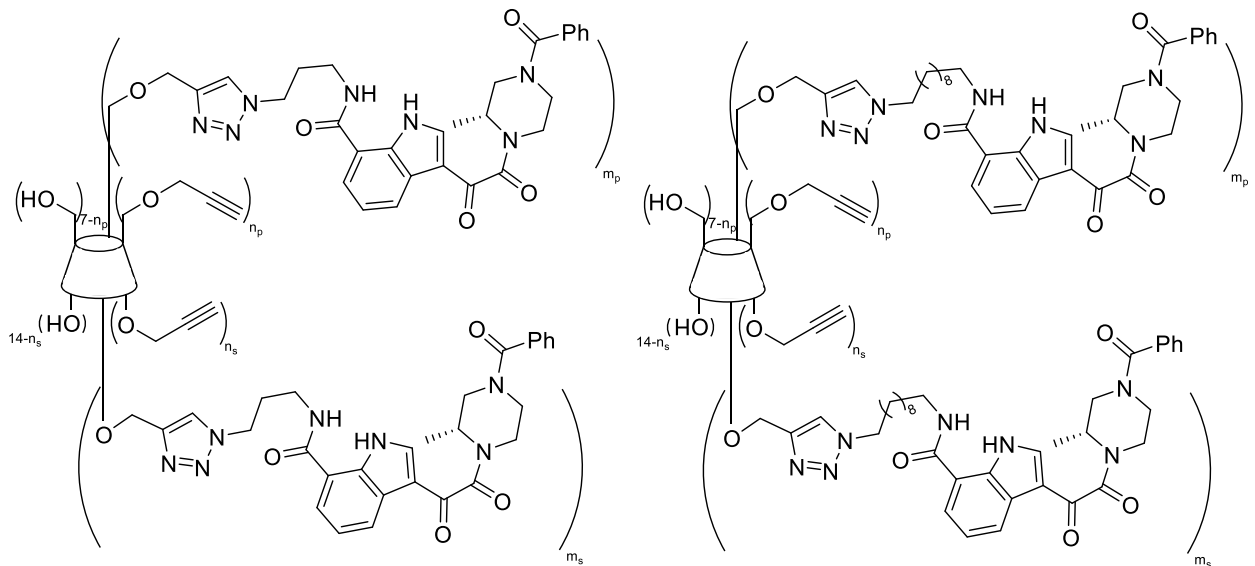
147

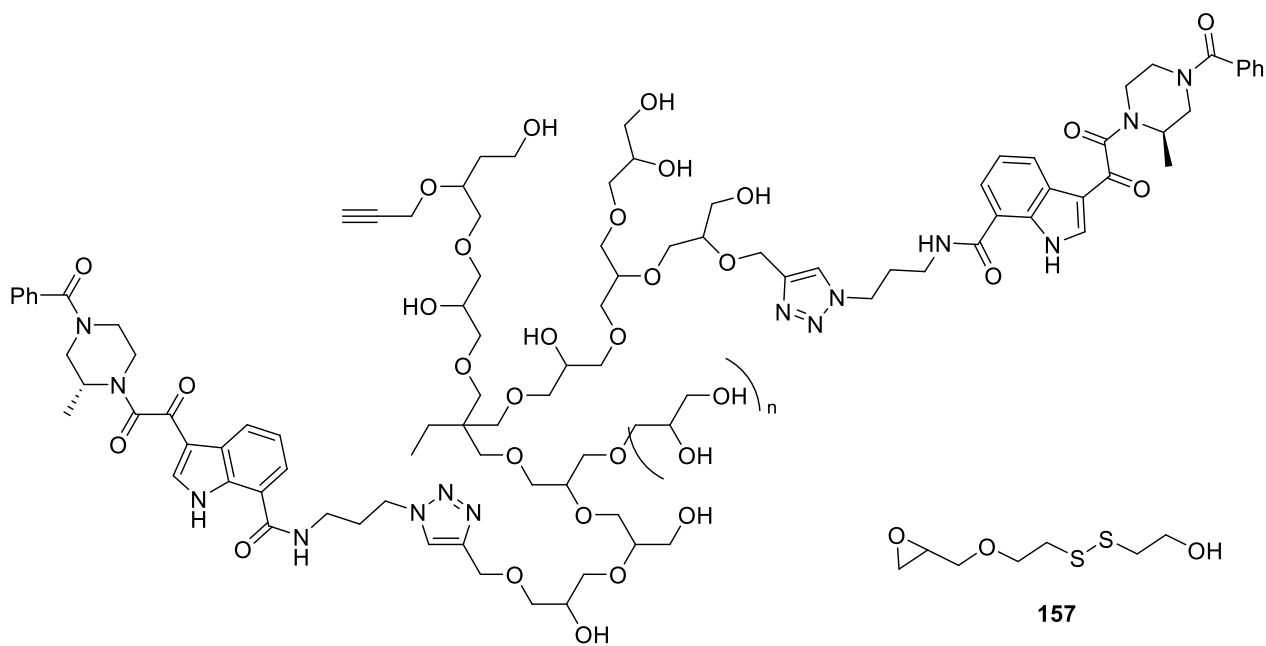


148

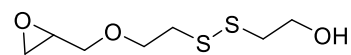


149

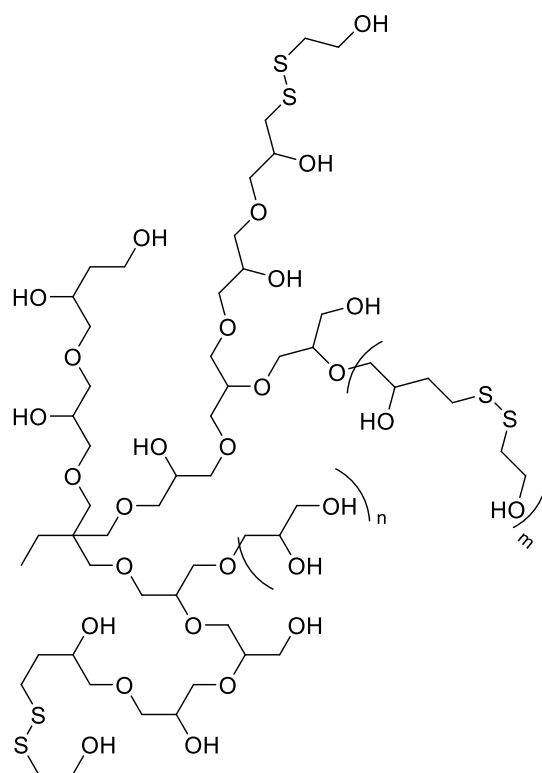




156



157



158

