

Tesi doctoral presentada per En/Na

Eulàlia PIÑOL OLLÉ

amb el títol

**" Disseny, síntesi i avaluació d'inhibidors de
dimerització de la proteasa del VIH-1"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

FARMÀCIA

Barcelona, 20 de juny del 2007.

Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



7.1 EXPERIMENTAL CAPÍTOL 2

7.1.1 Principals dissolvents i reactius

Dissolvents:

- DCM, THF, Hexà, EtOAc SDS (qualitat anàlisi)
- MeOH, Et₂O SDS (qualitat síntesi)
- Toluè, CHCl₃ Panreac (qualitat síntesi)
- Benzè Merck (purís.)

Dissolvents HPLC:

- Acetonitril J.T. Baker, Ultra Gradient HPLC Grade
- H₂O Milli-Q (sistema de filtració de Millipore)
- Metanol Chromanorm fro HPLC Isocratic Grade
- TFA Fluorochem

Sílica SDS (Sílica 60, 35-70 µm)

Cromatofolis de sílica Merck (fulls d'alumini per capa fina, gel de sílice 60 F₂₅₄)

Celite® Fluka

Taula 14: Principals reactius i dissolvents emprats en l'experimental del Capítol 2

Els reactius utilitzats en la present Tesi doctoral provenen de les principals cases comercials com Aldrich, Fluka, Sigma, Acros... En cas necessari, la purificació dels dissolvents i reactius utilitzats es dugué a terme seguint els protocols descrits en la literatura.¹⁸¹ El THF s'anhidritzà sobre Na/benzofenona.

¹⁸¹ Armarego, W.L.F, Perrin, D.D.; Purification of Laboratory Chemicals, Butterworth Heinemann, 2000.

7.1.2 Material i instrumentació

RMN Varian *Mercury*-400 MHz

IR Thermo Nicolet FT-R *Nexus*

Espectròmetre de masses Micromass Platform II

Applied Biosystems Sciex API 150

Cromatògraf de gasos Agilent 5890 Series II acoblat a espectròmetre de masses HP 5989 A (Agilent Technologies) amb sonda d'introducció directa de mostres. Modes d'ionització: impacte electrònic i ionització química

HPLC analític

Waters, constituït per una bomba binària model 1525, un autoinjector model 717 plus, un detector de longitud d'ona dual model 2487 i un programa de control *Breeze* versió 3.2.

Columna: *Symmetry C₁₈*, 4,6 x 150 mm, 5 µm (Waters)

Polarímetre

Perkin Elmer 241 Polarimeter, làmpara de Na (D).

Anàlisi elemental

EA 1108 CHNS-O Carlo Erba Instruments

Taula 15: Principals instruments emprats en l'experimental del Capítol 2

Ressonància magnètica nuclear

Els desplaçaments químics (δ) es donen en parts per milió (ppm) i les constants d'acoblament (J) en Hz. Normalment, s'ha utilitzat CDCl_3 com a dissolvent, fent servir tetrametilsilà com a referència interna en els espectres de ^1H i el propi cloroform deuterat en els espectres de ^{13}C . Les abreviatures més utilitzades en l'assignació dels senyals són: s (singulet), d (doblet), t (triplet), q (quadriplet), dd (doblet de doblets), dt (doblet de triplets), td (triplet de doblets), ddd (doblet de doblet de doblets), m (multiplet) i sa (senyal ample).

Infraroig

En els espectres d'infraroig registrats s'indiquen només les bandes més significatives en cm^{-1} .

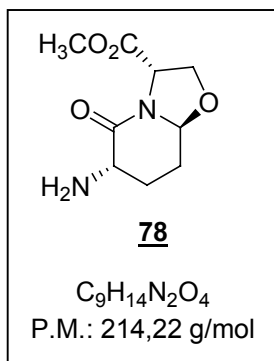
HPLC analític

S'ha utilitzat un flux d'1 ml/min, fent servir com a eluents H_2O (Milli-Q, amb un 0,045% de TFA) i MeCN (qualitat HPLC, amb un 0,036% de TFA). La detecció s'ha fet mitjançant UV a $\lambda = 220 \text{ nm}$ i $\lambda = 254 \text{ nm}$.

7.1.3 Procediments experimentals

A continuació es detallen els procediments experimentals per a l'obtenció dels compostos descrits en la present Tesi doctoral, seguint l'ordre de numeració dels compostos.

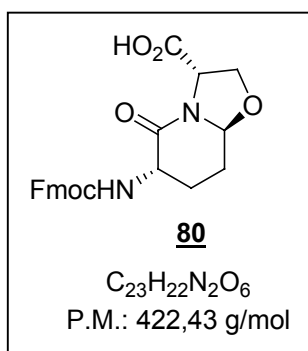
(3S,6S,9S)-3-Amino-2-oxo-7,1-oxazabicyclo[4.3.0]nonan-9-carboxilat de metil (**78**)



A una solució del bicicle **83** (6,48 g, 18,61 mmol, 1 eq.) en CH_3OH (185 ml), s'hi adicionà Pd/C 10% (0,650 g) i s'hidrogenà a pressió atmosfèrica durant 6 h. La mescla de reacció es filtrà i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda, la qual cosa proporcionà directament 3,68 g (92%) de l'amina **78** en forma de sòlid marronós.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,55-1,73 (m, 2H, H-7a i H-8a), 2,21 (sa, 2H, NH_2), 2,25-2,48 (m, 2H, H-7b i H-8b), 3,33 (dd, $J = 10,8$ Hz i $J = 5,6$ Hz, 1H, H-6), 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,85 (dd, $J = 8,8$ Hz i $J = 7,2$ Hz, 1H, H-2a), 4,44 (t, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-2b), 4,70 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-3), 4,92 (dd, $J = 8,8$ Hz i $J = 4,4$ Hz, 1H, H-9).
- **^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 26,6 (C-7), 27,4 (C-8), 52,3 (C-6), 52,9 (CH_3), 56,0 (C-3), 68,7 (C-2), 88,6 (C-9), 170,6 (C-8), 171,1 (CO_2Me).
- **IR (NaCl):** ν 3411, 1739, 1658 cm^{-1} .
- **EM-ES:** m/z 215,2 ($M + H$)⁺.

Àcid (3S,6S,9S)-3-(9-Fluorenilmetoxicarbonilamino)-2-oxo-7,1-oxazabicyclo[4.3.0]nonan-9-carboxílic (**80**)



Es dissolgué el bicicle **91** (1,970 g, 4,51 mmols, 1 eq.) en THF (100 ml) i s'hi adicionà HCl 1,5 N (90 ml, 135 mmol, 30 eq.) a 0 °C. Passades 16 h, s'observà encara la presència de producte de partida, per la qual cosa s'hi afegí més HCl 1,5 N (90 ml). Al cap de 24 h, s'evaporà el THF a pressió reduïda i la solució aquosa resultant es va extreure amb CH_2Cl_2 (3 x 100 ml). Els extreus orgànics s'agruparen, s'assecaren amb Na_2SO_4 i s'evaporaren fins a sequedat, rendint 1,876 g (98 %) d'un sòlid blanc, corresponent a

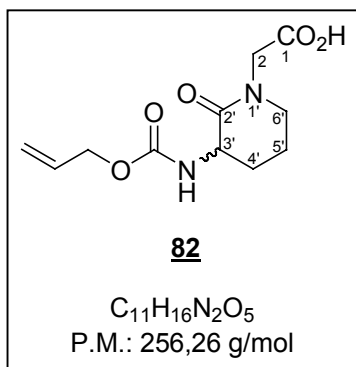
l'àcid **80**.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,68 (sa, 1H, H-8a), 1,84 (sa, 1H, H-7a), 2,27-2,40 (m, 2H, H-7b i H-8b), 4,15 (m, 2H, H-6 i H-2a), 4,22 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H, Fmoc-9), 4,43 (sa, 3H, Fmoc- CH_2 i H-2b), 4,66 (sa, 1H, H-3), 4,86 (sa, 1H, H-9), 5,53 (sa, 1H, NH), 7,30 (td, $J = 7,2$ Hz i $J = 0,8$ Hz, 2H, Fmoc-3 i -6), 7,40 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, Fmoc-2 i -7), 7,59 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Fmoc-4 i -5), 7,76 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, Fmoc-1 i -8).
- **^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 25,0 (C-7), 25,9 (C-8), 47,3 (Fmoc-9), 52,1 (C-6), 56,8 (C-3), 67,4 (Fmoc- CH_2), 68,1 (C-2), 88,3 (C-9), 120,2 (Fmoc-4 i -5), 124,9 (Fmoc-1 i -8),

127,3 (Fmoc-2 i -7), 128,0 (Fmoc-3 i -6), 141,5 (Fmoc -4a i -4b), 144,0 (Fmoc-8a i 9a), 156,7 (N-CO), 163,2 (C-5), 170,7 (CO₂H).

- **IR (NaCl):** ν 3330, 3063, 1722, 1666 cm⁻¹
- **EM-ES:** m/z 445,3 (M + Na)⁺, 423,1 (M + H)⁺, 201,2 (M - Fmoc)⁺.

Àcid *N*-Alloc-3-amino-2-oxopiperidinil acètic (**82**)

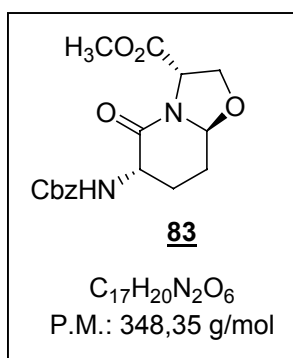


A una dissolució de l'èster **131** (2,92 g, 10,28 mmol, 1 eq.) en una mescla de dioxà:H₂O (1:1) (100 ml), s'hi afegí NaOH 1 M (15,4 ml, 15,42 mmol, 1,5 eq.) i es deixà reaccionar durant 1,5 h a t.a. Seguidament, s'evaporà el dioxà de la mescla de reacció a pressió reduïda i s'acidificà la solució aquosa amb HCl 3 M fins a pH = 3. A continuació, s'extragué 3 vegades amb una mescla de CHCl₃:EtOH. Les fases orgàniques obtingudes s'ajuntaren, s'assecaren amb Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. D'aquesta manera,

s'obtingueren 2,16 g (82%) de l'àcid **82** en forma de sòlid marró clar.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,61-1,82 (m, 1H, H-4'a), 1,90-2,05 (m, 2H, H-5'), 2,37 (m, 1H, H-4'b), 3,34-3,51 (m, 2H, H-6), 3,93 (d, J = 17,6 Hz, 1H, H-2a), 4,18-4,21 (m, 1H, H-3'), 4,25 (d, J = 17,6 Hz, 1H, H-2b), 4,57 (d, J = 4,8 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5,20 (d, J = 10,4 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,30 (dd, J = 17,2 Hz, J = 1,6 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,91 (m, 1H, CH=CH₂), 6,06 (sa, 1H, NH), 9,35 (sa, 1H, COOH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,1 (C-5'), 27,9 (C-4'), 49,3 (C-6'), 49,5 (C-2), 52,1 (C-3'), 66,0 (CH₂CH=CH₂), 117,8 (CH=CH₂), 133,0 (CH=CH₂), 156,7 (C=O carboxil), 171,2 (C-1), 171,7 (C-2').
- **IR (NaCl):** ν 3319, 3092, 2945, 1754, 1737, 1725 cm⁻¹.
- **EM-ES (-):** m/z 255,2 (M - 1), 197,2 (M - OCH₂CH=CH₂)⁻.
- **AE:** Calc. per C₁₁H₁₆N₂O₅: C (51,56%); H (6,29%); N (10,93%); O (31,22%)
Trobada: C (51,91%); H (6,32%); N (10,33%); O (31,44%)

(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benziloxycarbonilamino-2-oxo-7,1-oxazabicyclo[4.3.0]nonan-9-carboxilat de metil (**83**)

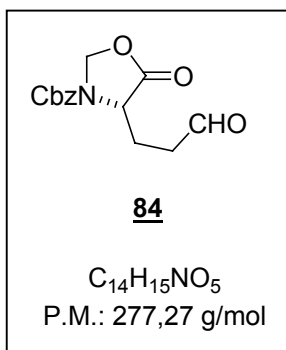


Una solució de l'aldehid **84** (11,270 g, 40,65 mmol, 1 eq.) i de l'hidroclorur de l'èster metílic de serina (6,96 g, 44,7 mmol, 1,1 eq.) en piridina anhidra acabada de destil·lar sobre KOH (400 ml) s'agità durant 6 dies a t.a. en presència de tamís molecular de 4 Å. A continuació la mescla de reacció es filtrà amb paper de filtre i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El residu es redissolgué en CH₃OH (335 ml) anhidre i s'hi addicionà K₂CO₃ (3,932 g, 28,45 mmol, 0,7 eq.). S'agità a t.a. fins a la desaparició del producte

de partida (5 h). Finalment, la mescla de reacció es filtrà, s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda i es purificà per cromatografia en columna (CH₂Cl₂:CH₃OH, 99:1). D'aquesta manera s'obtingueren 6,35 g (45%) del bicicle (3S,6S,9S) **83** com a únic isòmer en forma d'oli marronós.

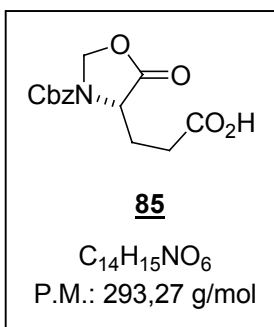
- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,63-1,86 (m, 2H, H-7a i H-8a), 2,32-2,37 (m, 1H, H-8b), 2,51 (sa, 1H, H-7b), 3,77 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,84 (dd, *J* = 9,2 Hz i *J* = 7,2 Hz, 1H, H-2a), 4,12-4,22 (m, 1H, H-6), 4,44 (t, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-2b), 4,68 (dd, *J* = 8,4 Hz i *J* = 7,2 Hz, 1H, H-3), 4,91 (dd, *J* = 9,6 Hz i *J* = 4,4 Hz, 1H, H-9), 5,12 (s, 2H, CH₂-Ph), 5,47 (sa, 1H, NH), 7,34-7,36 (m, 5H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 25,2 (C-7), 26,9 (C-8), 52,2 (C-6), 52,9 (CH₃), 56,1 (C-3), 67,1 (CH₂-Ph), 68,7 (C-2), 88,3 (C-9), 128,3 (C₆H₅-*m* i -*p*), 128,7 (C₆H₅-*o*), 136,6 (C₆H₅-*ipso*), 156,7 (NH-CO), 167,1 (C-5), 170,4 (CO₂Me).
- **IR (NaCl):** ν 3339, 1722, 1666 cm⁻¹.
- **EM-ES:** *m/z* 371 (M + Na)⁺, 349 (M + H)⁺.

(S)-N-Benziloxicarbonil-4-(formiletil)-1,3-oxazolidin-5-ona (**84**)



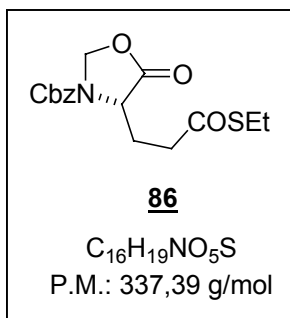
Es dissolgué el tioèster **86** (16,610 g, 49,24 mmol, 1 eq.) en acetona anhidra (90 ml, acabada de destil·lar sobre K₂CO₃) en un matràs amb tamís molecular de 4 Å i sota atmosfera de N₂. A continuació s'hi afegiren Pd/C 10% (1,457 g) i lentament s'hi addicionà el Et₃SiH (23,47 ml, 147,72 mmol, 3 eq.). S'observà un petit bombolleig i un augment de la temperatura (de t.a. a 29 °C). Es deixà agitar durant 2 h fins observar la total desaparició del producte de partida. A continuació, la mescla de reacció es filtrà i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. D'aquesta manera, s'obtingué un oli taronja i un sobrenedant transparent (corresponent a l'excés de Et₃SiH), que se separà mitjançant una pipeta Pasteur, rendint finalment 10,328 g (76%) de l'aldehid **84**, que s'utilitzà en la següent reacció, sense prèvia purificació.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 2,17-2,25 (m, 1H, H-1'a), 2,26-2,36 (sa, 1H, H-1'b), 2,60 (sa, 2H, H-2'), 4,36 (t, *J* = 6 Hz, 1H, H-4), 5,18 (s, 2H, CH₂-Ph), 5,20 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-2a), 5,52 (sa, 1H, H-2b), 7,38-7,39 (m, 5H, C₆H₅), 9,69 (sa, 1H, CHO).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 23,6 (C-1'), 39,0 (C-2'), 54,1 (C-4), 68,4 (CH₂-Ph), 78,0 (C-2), 128,6 (C₆H₅-*p*), 128,8 (C₆H₅-*o*), 129,0 (C₆H₅-*m*), 135,4 (C₆H₅-*ipso*), 153,2 (N-CO), 171,9 (C-5), 200,1 (CHO).
- **IR (NaCl):** ν 2955, 1711 cm⁻¹.
- **EM-ES:** *m/z* 301,2 (M + Na)⁺, 279,2 (M + H)⁺.

(S)-N-Benziloxicarbonil-4-(carboxietil)-1,3-oxazolidin-5-ona (85)

Es dissolgué l'àcid (S)-N-benziloxicarbonilglutàmic (25 g, 88,9 mmol, 1 eq.), el paraformaldehid (5,605 g, 186,6 mmol, 2,10 eq.) i l'àcid *p*-toluensulfònic·H₂O (1,014 g, 5,33 mmol, 0,06 eq.) en benzè (850 ml) i s'escalfà a temperatura de reflux durant 2 h, fent ús d'un sistema Dean-Stark. Es deixà refredar fins a t.a. i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. A continuació, es dissolgué el producte obtingut amb AcOEt i es rentà amb H₂O (3 x 300 ml). Els extrems orgànics obtinguts s'ajuntaren, s'assecaren amb Na₂SO₄ i s'evaporaren a pressió reduïda fins a proporcionar un oli groguenc, corresponent al producte desitjat **85** (26 g, 100%), que s'utilitzà sense posterior purificació en la següent reacció.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 2,16-2,21 (m, 1H, H-1'a), 2,29-2,36 (m, 1H, H-1'b), 2,50 (sa, 2H, H-2'), 4,40 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, H-4), 5,18 (s, 2H, CH₂-Ph), 5,22 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, H-2a), 5,53 (sa, 1H, H-2b), 7,34-7,37 (m, 5H, C₆H₅), 9,55 (sa, 1H, CO₂H).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 26,0 (C-1'), 29,4 (C-2'), 54,1 (C-4), 68,5 (CH₂-Ph), 78,1 (C-2), 128,6 (C₆H₅-*p*), 128,9 (C₆H₅-*o*), 129,0 (C₆H₅-*m*), 135,4 (C₆H₅-*ipso*), 153,3 (N-CO), 171,9 (C-5), 178,0 (CO₂H).
- **IR (NaCl):** ν 3332, 1803, 1713 cm⁻¹.
- **EM-ES:** *m/z* 294 (M + H)⁺.

(S)-N-Benziloxicarbonil-4-(etiltiocarbonilet)l-1,3-oxazolidin-5-ona (86)

A una dissolució de l'àcid **85** (18,34 g, 62,5 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ (75 ml), se li addicionaren a 0 °C DPPA (33,7 ml, 156,4 mmol, 2,5 eq.), EtSH (13,9 ml, 187,6 mmol, 3 eq.) i Et₃N (17,4 ml, 125,1 mmol, 2 eq.). La solució s'agità a t.a. durant 24 h fins la desaparició del producte de partida i a continuació es rentà el cru de reacció amb H₂O (3 x 40 ml). Les fases orgàniques es recol·lectaren, s'assecaren amb Na₂SO₄ i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda.

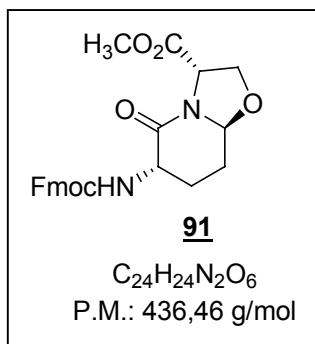
El cru obtingut es purificà mitjançant una columna cromatogràfica (hexà:AcOEt, 9:1) i proporcionà 19,29 g (96%) del producte desitjat **86**, en forma d'oli marronós.

(NOTA: A causa de les olors desagradables provocades per l'ús d'EtSH, aquesta reacció es dugué a terme al laboratori de reaccions especials del Parc Científic de Barcelona).

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,23 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 2,23-2,26 (m, 1H, H-1'a), 2,33-2,42 (m, 1H, H-1'b), 2,67 (sa, 2H, H-2'), 2,86 (q, *J* = 7,5 Hz, S-CH₂), 4,36 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, H-4), 5,19 (s, 2H, CH₂-Ph), 5,23 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-2a), 5,52 (sa, 1H, H-2b), 7,38 (sa, 5H, C₆H₅).

- **^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 14,9 (CH_3), 23,6 (C-1'), 26,4 (C-2'), 39,0 (S- CH_2), 54,2 (C-4), 68,4 (CH_2 -Ph), 77,6 (C-2), 128,6 (C_6H_5 -*p*), 128,9 (C_6H_5 -*o*), 129,0 (C_6H_5 -*m*), 135,5 (C_6H_5 -*ipso*), 153,1 (N-CO), 171,8 (C-5), 198,0 (COS).
- **IR (NaCl):** ν 2967, 1716, 1412 cm^{-1} .
- **EM-ES:** m/z 338 (M + H)⁺.

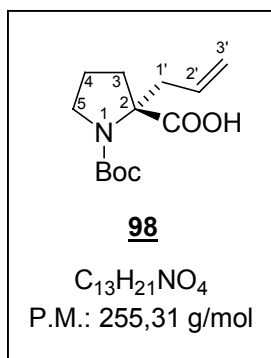
(3S,6S,9S)-3-(9-Fluorenilmetoxycarbonilamino)-2-oxo-7,1-oxazabicciclo[4.3.0]-nonan-9-carboxilat de metil (91)



Es dissolgué l'amina **78** (3,4 g, 15,9 mmol, 1 eq.) en una mescla de H_2O :dioxà (1:1) (30 ml) i es basificà fins a pH = 8-9 amb una solució de Na_2CO_3 (5%). A continuació, s'hi addicionà el Fmoc-OSu (5,89 g, 1,47 mmol, 1,1 eq.) i s'agità a t.a. durant 2 dies. La mescla de reacció es rentà amb MTBE i en la fase aquosa s'observa la presència d'un precipitat blanc, que es filtrà, obtenint-se d'aquesta manera 6,10 g (88 %) del producte desitjat.

- **^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 1,58-1,74 (m, 2H, H-7a i H-8a), 2,36 (sa, 1H, H-8b), 2,57 (sa, 1H, H-7b), 3,79 (s, 3H, CH_3), 3,85 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-2a), 4,18 (sa, 1H, Fmoc-9), 4,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, H-6), 4,40 (sa, 2H, Fmoc- CH_2), 4,46 (t, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-2b), 4,70 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-3), 4,92 (sa, 1H, H-9), 5,50 (sa, 1H, NH), 7,31 (td, $J = 7,2$ Hz i $J = 1,2$ Hz, 2H, Fmoc-3 i -6), 7,40 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, Fmoc-2 i -7), 7,60 (dd, $J = 7,2$ Hz i $J = 4$ Hz, 2H, Fmoc-4 i -5), 7,76 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, Fmoc-1 i -8).
- **^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 25,3 (C-7), 26,8 (C-8), 47,4 (Fmoc-9), 52,4 (C-6), 53,0 (CH_3), 56,1 (C-3), 67,3 (Fmoc- CH_2), 68,7 (C-2), 88,3 (C-9), 120,2 (Fmoc-4 i -5), 125,4 (Fmoc-1 i -8), 127,3 (Fmoc-2 i -7), 127,9 (Fmoc-3 i -6), 141,5 (Fmoc-4a i -4b), 144,0 (Fmoc-8a i -9a), 156,8 (N-CO), 166,9 (C-5), 170,4 (CO_2Me).
- **IR (NaCl):** ν 3336, 1723, 1665 cm^{-1} .
- **EM-ES:** m/z 437 (M + H)⁺, 215 (M - Fmoc)⁺.

Àcid (R)-2-al·lil-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidin-2-carboxílic (98)

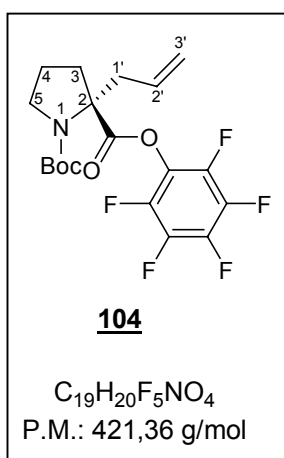


A una suspensió de l'al·lilprolina **108** (0,650 g, 4,19 mmol, 1 eq.) en MeCN (35 ml), s'hi afegí TMAH·5 H_2O (0,759 g, 4,19 mmol, 1 eq.). Passats 30 min, la suspensió esdevingué una solució clara i s'hi addicionà Boc_2O (1,828 g, 8,38 mmol, 2 eq.). Es deixà agitar a t.a. durant la nit. Com que encara s'observà la presència de producte de partida, s'hi afegí novament Boc_2O (0,457 g, 2,09 mmol, 0,5 eq.) i es deixà agitar durant 17 h més. A continuació, s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda i el residu obtingut es dissolgué en H_2O i Et_2O . Se separaren les fases i la fase aquosa s'acidificà amb àcid cítric 1 M fins a pH = 3-4. S'observà la

formació d'un precipitat, el qual s'extragué amb EtOAc (3 x 20 ml). Seguidament, s'agruparen les fases orgàniques, s'assecaren sobre Na₂SO₄ i s'evaporaren a sequedat, fins a obtenir 1,005 g (94%) de l'àcid **98** en forma de cristalls groguencs.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃, rotàmer 1), 1,49 (s, 9H, C(CH₃)₃, rotàmer 2), 1,73-1,87 (m, 2H, H-4), 1,88-1,99 (m, 1H, H-3a, rotàmer 1), 2,16 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-3a, rotàmer 2), 2,58 (dt, *J* = 13,2 Hz, *J* = 4,7 Hz, 1H, H-3b), 2,71 (dd, *J* = 13,8 Hz, *J* = 7,4 Hz, 1H, H-1'a), 2,93 (dd, *J* = 14,0 Hz, *J* = 7,2 Hz, 1H, H-1'b), 3,29 (dt, *J* = 10,0 Hz, *J* = 8,1 Hz, 1H, H-5a, rotàmer 1), 3,38 (dt, *J* = 10,4 Hz, *J* = 7,2 Hz, 1H, H-5a, rotàmer 2), 3,52 (ddd, *J* = 10,5 Hz, *J* = 5,3 Hz, *J* = 5,3 Hz, 1H, H-5b, rotàmer 1), 3,71 (ddd, *J* = 10,6 Hz, *J* = 7,4 Hz, *J* = 5,4 Hz, 1H, H-5b, rotàmer 2), 5,12 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, H-3', rotàmer 2), 5,16 (sa, 1H, H-3'a, rotàmer 1), 5,19 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-3'b, rotàmer 1), 5,59-5,72 (m, 1H, H-2', rotàmer 1), 5,72-5,81 (m, 1H, H-2', rotàmer 2).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 22,8 (C-4), 28,6 (C(CH₃)₃), 34,8 i 37,3 (C-3), 38,4 i 39,4 (C-1'), 48,7 i 49,6 (C-5), 67,1 i 69,9 (C-2), 80,8 i 82,1 (C(CH₃)₃), 119,4 i 120,3 (C-3'), 131,8 i 133,3 (C-2'), 153,8 i 157,1 (C=O carbat), 175,4 i 180,4 (CO₂H).
- **IR (NaCl):** ν 3076, 2977, 2927, 2879, 1740, 1699, 1410, 1392 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 256,20 (M + H)⁺, 154,10 (M - Boc)⁺, 110,30 (M - Boc - COOH)⁺.

(*R*)-2-al·lil-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidin-2-carboxilat de pentafluorofenil (**104**)

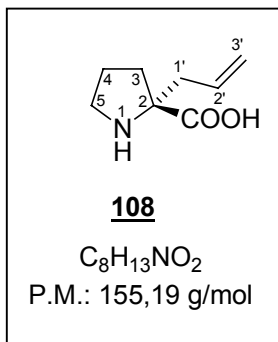


A una dissolució de l'àcid **98** (1,674 g, 6,56 mmol, 1 eq.) en THF (50 ml), s'hi afegí a 0 °C pentafluorofenol (1,207 g, 6,56 mmol, 1 eq.). A continuació, s'hi addicionà DCC (1,422 g, 6,89 mmol, 1,05 eq.) i la mescla es deixà agitar durant tota la nit, deixant pujar la temperatura gradualment fins a t.a. S'observà la formació d'un precipitat blanc, corresponent a la dicitclohexilhurea. Es filtrà el precipitat blanc i el filtrat s'evaporà a pressió reduïda. D'aquesta manera, s'obtingueren 2,653 g (96%) de l'éster desitjat **104** en forma d'oli incolor, que s'utilitzaren directament per a la següent reacció sense prèvia purificació.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃, rotàmer 1), 1,48 (s, 9H, C(CH₃)₃, rotàmer 2), 1,84-1,97 (m, 2H, H-4, rotàmer 1), 1,97-2,07 (m, 2H, H-4, rotàmer 2), 2,21-2,29 (m, 2H, H-3, rotàmer 1), 2,30-2,36 (m, 2H, H-3, rotàmer 2), 2,68 (dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 5,2 Hz, 1H, H-1'a, rotàmer 1), 2,72 (dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-1'a, rotàmer 2), 3,13 (dd, *J* = 14,0 Hz, *J* = 6,4 Hz, 1H, H-1'b, rotàmer 1), 3,22 (dd, *J* = 14,2 Hz, *J* = 6,6 Hz, 1H, H-1'b, rotàmer 2), 3,39-3,52 (m, 1H, H-5a, rotàmers 1 i 2), 3,66 (ddd, *J* = 10,5 Hz, *J* = 7,7 Hz, *J* = 5,7 Hz, 1H, H-5b, rotàmer 1), 3,78 (ddd, *J* = 10,8 Hz, *J* = 7,8 Hz, *J* = 4,2 Hz, 1H, H-5b, rotàmer 2), 5,18 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, H-3'a), 5,22 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, H-3'b), 5,68-5,84 (m, 1H, H-2').

- **^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 22,6 i 23,6 (C-4), 28,4 i 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34,1 i 36,0 (C-3), 37,9 i 39,4 (C-1'), 48,6 i 48,9 (C-5), 67,2 i 67,7 (C-2), 80,5 i 81,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 119,9 i 120,4 (C-3'), 132,1 i 132,7 (C-2'), 136,0-142,9 (C_6F_5), 153,4 i 153,9 (C=O carbat), 170,7 i 170,8 (CO_2Ar).
- **IR (NaCl):** ν 2980, 2933, 2874, 1788, 1701, 1673, 1520 cm^{-1} .
- **EM-ES:** m/z 422,4 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 183,0 ($\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$)⁺.

Àcid (R)-2-al·lil-pirrolidin-2-carboxílic (**108**)



MÈTODE A:

A una suspensió de L-prolina (7,50 g, 65,14 mmol, 1 eq.) en hexametildisilazà (37,1 ml), se li afegiren sota atmosfera d'argó 3 gotes d' H_2SO_4 i la mescla s'agità durant 45 min a reflux. Passat aquest temps, es deixà refredar la dissolució homogènia groguenca obtinguda fins a t.a. i s'hi addicionà gota a gota clorur de trimetilsilà (13,0 ml, 102,27 mmol, 1,57 eq.). La dissolució, que s'enterbolí per la formació d'un precipitat blanc, es deixà agitar a t.a. durant 3,5 h.

L'excés de reactius sililants s'evaporà a pressió reduïda, connectant directament el matràs al buit de la vitrina per mitjà d'una oliva (per evitar l'exposició del bicicle obtingut, altament inestable, a l'aire) i refredant el col·lector de dissolvent amb N_2 líquid. El cru resultant s'utilitzà directament per a la següent reacció, per a la qual cosa es dissolgué en THF anhidre (160 ml). La solució es refredà a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ i sota atmosfera d'argó, s'hi afegí gota a gota LDA 1,8 M en heptà, THF i etilbenzè (38,0 ml, 68,40 mmol, 1,05 eq.). La mescla resultant s'agità durant 30 min i a continuació s'hi addicionà bromur d'al·lil (6,20 ml, 71,65 mmol, 1,1 eq.). Es deixà agitar durant 4 h, deixant que la mescla passés de $-78\text{ }^\circ\text{C}$ a t.a. La reacció s'aturà per addició d' H_2O , s'evaporà el THF a pressió reduïda i s'extragué el cru amb CH_2Cl_2 (3 x 150 ml). Els extractes orgànics s'assecaren sobre Na_2SO_4 , es filtraren, s'evaporaren a sequedat i s'utilitzaren sense prèvia purificació per a la següent reacció. Per a dur a terme la hidròlisi del bicicle, es dissolgué el cru obtingut en una mescla de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (6:1) (225 ml), s'hi afegí sílica gel (14,52 g) i la mescla s'agità a t.a. durant 16 h. Finalment, es filtrà la mescla de reacció i el filtrat s'evaporà a pressió reduïda. El cru obtingut es redissolgué en una mescla de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (20:1) i es tornà a filtrar (per separar la sílica). Es tornà a evaporar el dissolvent del filtrat a pressió reduïda i finalment es purificà mitjançant cromatografia en columna, fent servir com a eluent un gradient de 9:1 a 7:3 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$. D'aquesta manera, s'obtingueren 2,12 g (21% en 3 passos) de l'al·lil prolina desitjada **108**.

MÈTODE B:

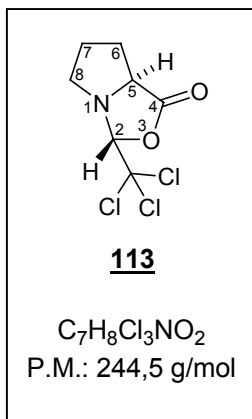
A una suspensió de L-prolina (19,0 g, 165,0 mmol, 1,0 eq.) en pentà (500 ml), s'hi addicionà pivalaldehyd (109,5 ml, 985 mmol, 5,97 eq.) i TFA (3,08 ml, 18,15 mmol, 0,11 eq.). La mescla s'agità a reflux amb un Dean-Stark durant 72 h. Passat aquest temps, s'hi afegí novament pivalaldehyd (19,4 ml, 175 mmol, 1,06 eq.) i TFA (1,12 ml, 6,6 mmol, 0,04 eq.) i es deixà agitar a

reflux durant 72 h més. Passat aquest temps, es filtrà el cru de reacció sota argó (degut a l'elevada inestabilitat del bicicle format en aire) i s'evaporà el filtrat a pressió reduïda a la vitrina fent servir el mateix sistema que el descrit pel mètode A. El cru obtingut s'utilitzà per a la següent reacció sense prèvia purificació, per la qual cosa es dissolgué en THF anhidre (200 ml) i la dissolució es refredà a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuació, s'hi afegí gota a gota LDA 2 M en THF i heptà (22,5 ml, 45 mmol, 1,05 eq.) i la solució s'agità durant 30 min. Seguidament, s'hi addicionà lentament el bromur d'al·lil (4,1 ml, 47 mmol, 1,1 eq.) i la mescla es deixà agitar durant 3,5 h, permetent que la temperatura passés de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a t.a. S'aturà la reacció per addició d' H_2O , s'evaporà el THF i s'extragué el cru amb CH_2Cl_2 (3 x 200 ml). Les fases orgàniques agrupades s'assecaren sobre Na_2SO_4 , es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. Finalment, s'hidrolitzà el bicicle al·lilat, agitant-lo a t.a. en una mescla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (6:1) (100 ml) i sílica gel (6,38 g) durant 14 h. Es filtrà el contingut del matràs amb un filtre de plecs i s'evaporà el filtrat a sequedat. Es redissolgué el cru obtingut en una mescla $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (20:1) (100 ml) per acabar de separar la sílica i es tornà a filtrar el contingut del matràs. S'evaporà el dissolvent del filtrat i es purificà el cru obtingut per cromatografia en columna, fent servir com a eluent un gradient de 9:1 a 7:3 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$. D'aquesta manera, s'obtingueren 2,26 g (9% en 3 passos) de l'al·lil prolina desitjada **108**.

MÈTODE C:

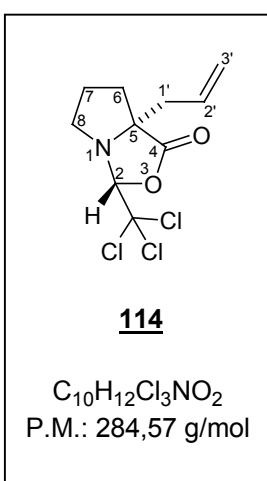
A un matràs amb el bicicle **114** (6,91 g, 24,30 mmol, 1 eq.), s'hi afegí HCl 6 N (82 ml). La mescla s'escalfà a reflux durant 2,5 h i a continuació es deixà agitant a t.a. durant 14 h. Es filtrà el contingut del matràs amb un filtre de plecs, s'extragué el filtrat de color marró fosc amb CH_2Cl_2 (3 x 200 ml) i s'evaporà la fase aquosa. El cru obtingut es purificà mitjançant una resina d'intercanvi iònic Dowex 50W x 8 (prèviament acondicionada amb HCl 6 N i NH_4OH 6 N) fent servir NH_4OH 0,5 N com a eluent. D'aquesta manera, s'obtingueren 2,37 g (63%) de l'al·lil prolina desitjada **108**.

- **$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz):** δ 1,82-2,06 (m, 3H, H-3a, H-4), 2,39-2,48 (m, 2H, H-1'b, H-3b), 2,88 (ddt, $J = 14,6\text{ Hz}$, $J = 6,2\text{ Hz}$, $J = 1,4\text{ Hz}$, 1H, H-1'a), 3,21-3,28 (m, 1H, H-5a), 3,40 (ddd, $J = 11,5\text{ Hz}$, $J = 7,7\text{ Hz}$, $J = 5,5\text{ Hz}$, 1H, H-5b), 5,18 (d, $J = 10,0\text{ Hz}$, 1H, H-3'a), 5,26 (ddd, $J = 17,2\text{ Hz}$, $J = 2,9\text{ Hz}$, $J = 1,8\text{ Hz}$, 1H, H-3'b), 5,79 (dddd, $J = 17,3\text{ Hz}$, $J = 10,0\text{ Hz}$, $J = 8,0\text{ Hz}$, $J = 6,1\text{ Hz}$, 1H, H-2').
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz):** δ 23,1 (C-4), 35,0 (C-3), 39,9 (C-1'), 45,7 (C-5), 73,9 (C-2), 119,2 (C-3'), 131,8 (C-2'), 173,9 (CO_2H).
- **IR (NaCl):** ν 3468, 3472, 3088, 2973, 1600 cm^{-1} .
- **EM-ES:** m/z 178,20 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 156,2 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 110,40 ($\text{M} - \text{CO}_2\text{H}$)⁺.
- **$[\alpha]_{\text{D}}$** = $-48,6^{\circ}$ (c 1, H_2O). Lit.¹⁰⁵ $[\alpha]_{\text{D}}$ = $-50,0^{\circ}$ (c 0,65, H_2O).

(2R, 5S)-2-triclorometil-1-aza-3-oxabicyclo[3.3.0]octan-4-ona (113)

Un matràs de dues boques acoblat a un Dean-Stark es carregà amb L-prolina (17,0 g, 147,4 mmol, 1 eq.), hidrat de cloral (40,0 g, 241,8 mmol, 1,64 eq.), benzè (500 ml) i DMSO (33 ml). La suspensió blanca s'escalfà a reflux durant 1,5 h i a continuació la mescla de color marró fosc obtinguda es filtra amb un filtre de plecs. S'evaporà el filtrat a pressió reduïda i el cru obtingut es redissolgué en $CHCl_3$. Es rentà amb H_2O (3 x 250 ml) i les fases aquoses s'ajuntaren i s'extragueren en $CHCl_3$. Finalment, s'agruparen totes les fases orgàniques obtingudes, s'assecaren sobre $MgSO_4$, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. D'aquesta manera, s'obtingueren 28,832 g (80%) del bicicle **113**, en forma d'oli marró.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,75 (m, 1H, H-7a), 1,93 (ddd, $J = 18,3$ Hz, $J = 12,5$ Hz, $J = 5,7$ Hz, 1H, H-7b), 2,12 (td, $J = 12,6$ Hz, $J = 5,2$ Hz, 1H, H-6a), 2,23 (dddd, $J = 13,0$ Hz, $J = 8,5$ Hz, $J = 8,5$ Hz, $J = 6,8$ Hz, 1H, H-6b), 3,13 (ddd, $J = 11,1$ Hz, $J = 5,7$ Hz, $J = 5,7$ Hz, 1H, H-8a), 3,43 (ddd, $J = 10,9$ Hz, $J = 7,9$ Hz, $J = 6,0$ Hz, 1H, H-8b), 4,12 (dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 4,8$ Hz, 1H, H-5), 5,16 (s, 1H, $CHCl_3$).
- **^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 25,5 (C-7), 30,1 (C-6), 58,1 (C-8), 62,6 (C-5), 100,8 (CCl_3), 103,9 (C-2), 175,7 (C=O).
- **IR (NaCl):** ν 2921, 2850, 1719, 1634 cm^{-1} .
- **EM-IQ:** m/z [%] 244 i 246 (M + H)⁺ [7 i 6], 116 (M - $CHCl_3$)⁺ [37], 70 (M - $CHCl_3$ - CO_2H)⁺ [100].

(2R, 5R)-5-al·lil-2-triclorometil-1-aza-3-oxabicyclo[3.3.0]octan-4-ona (114)

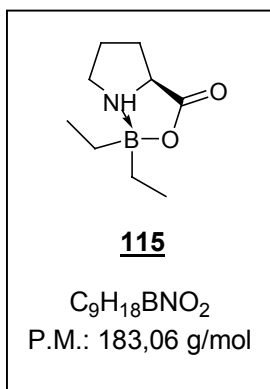
En un matràs sota atmosfera d'argó, es dissolgué el bicicle **113** (1,00 g, 4,09 mmol, 1 eq.) en THF anhidre (15 ml) i la dissolució es refredà a -78 °C. A continuació, s'hi afegí LDA 2 M en THF (3,07 ml, 6,13 mmol, 1,5 eq.) i la mescla es deixà agitar durant 30 min a -78 °C. Seguidament, s'hi addicionà bromur d'al·lil (1,04 ml, 12,27 mmol, 3 eq.) i la mescla de reacció s'agità durant la nit, passant de -78 °C fins a assolir gradualment t.a. S'aturà la reacció per addició d' H_2O (5 ml) i s'evaporà el THF a pressió reduïda. S'extragué amb $CHCl_3$ (3 x 10 ml) i les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren sobre Na_2SO_4 , es filtraren i s'evaporaren a sequedat. D'aquesta manera, s'obtingueren 0,762 g (66%) del bicicle al·lilat **114** en forma d'oli marró.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,65 (m, 1H, H-7a), 1,90 (dddd, $J = 15,9$ Hz, $J = 6,9$ Hz, $J = 5,2$ Hz, $J = 3,6$ Hz, 1H, H-7b), 2,03 (ddd, $J = 13,4$ Hz, $J = 10,2$ Hz, $J = 6,8$ Hz, 1H, H-6a), 2,14 (dddd, $J = 13,4$ Hz, $J = 8,2$ Hz, $J = 3,6$ Hz, $J = 0,8$ Hz, 1H, H-6b), 2,56 (dd,

$J = 13,8$ Hz, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-1'a), 2,64 (ddt, $J = 13,8$ Hz, $J = 6,6$ Hz, $J = 1,4$ Hz, 1H, H-1'b), 3,19 (dd, $J = 10,0$ Hz, $J = 5,2$ Hz, 1H, H-8a), 3,20 (dd, $J = 10,2$ Hz, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-8b), 4,98 (s, 1H, CHCl₃), 5,18 (m, 1H, H-3'a), 5,21 (m, 1H, H-3'b), 5,90 (m, 1H, H-2').

- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 25,4 (C-7), 35,4 (C-6), 41,8 (C-1'), 58,6 (C-8), 71,5 (C-5), 100,8 (CCl₃), 102,6 (C-2), 120,1 (C-3'), 132,2 (C-2'), 176,4 (C=O).
- **IR (NaCl):** ν 2975, 1801, 1704, 1653 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 285,9 i 284,0 (M + H)⁺, 156,2 (M - CHCl₃)⁺.

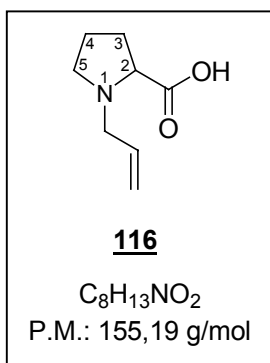
2,2-Dietil-5-oxotetrahidro-1,3,2-oxazaborole derivat de L-prolina (**115**)



En un matràs acoblat a un refrigerant, se suspengué la L-prolina (200 mg, 1,73 mmol, 1 eq.) en DME (5 ml). La suspensió blanca s'escalfà a 70 °C durant 1,5 h i a continuació s'aturà la reacció. Es filtrà el precipitat blanc format i s'assecà al buit. Es tornà a induir la cristal·lització a les aigües mares mitjançant l'addició d'un petit cristall. Es tornà a filtrar el precipitat blanc obtingut. D'aquesta manera, s'obtingueren 285 mg (91%) del complex **115** desitjat.

- **¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ -0,02-0,17 (m, 4H, CH₂), 0,53 (t, $J = 7,4$ Hz, CH₃), 0,57 (t, $J = 7,6$ Hz, CH₃), 1,53-1,61 (m, 2H, H-4), 1,68-1,78 (m, 1H, H-3a), 1,84-1,94 (m, 1H, H-3b), 2,63 (m, 1H, H-5a), 2,80 (dt, $J = 17,2$ Hz, $J = 5,9$ Hz, 1H, H-5b), 4,00 (ddd, $J = 9,4$ Hz, $J = 7,8$ Hz, $J = 4,8$ Hz, 1H, H-2).
- **¹³C-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ 9,5 (CH₃), 10,0 (CH₃), 10,6 (CH₂), 13,3 (CH₂), 26,2 (C-4), 28,3 (C-3), 47,8 (C-5), 62,3 (C-2), 175,0 (C=O).
- **IR (NaCl):** ν 3116, 2941, 2866, 2818, 1698 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 184,1 (M + 1)⁺, 116,0 (H-Pro-OH + 1)⁺.
- **AE:** Calc. per C₉H₁₈BNO₂: C (59,05%); H (9,91%); B (5,91%); N (7,65%); O (17,48%)
Trobada: C (59,66%); H (10,04%); N (7,41%)

Àcid (S)-1-al·lilpirrolidin-2-carboxílic (**116**)

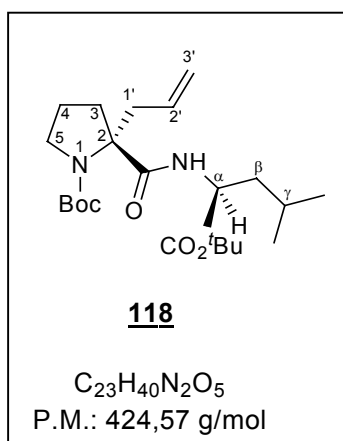


A una dissolució del complex **115** (106 mg, 0,58 mmol, 1 eq.) en THF (4 ml) a -78 °C, se li afegí LDA 2 M (0,32 ml, 0,64 mmol, 1,1 eq.) i es deixà agitar durant 30 min. A continuació, s'hi addicionà lentament el bromur d'al·lil (0,15 ml, 1,75 mmol, 3 eq.). La solució de color rogenc esdevingué groguenca i s'observà un petit bombolleig. Es deixà agitar durant 12 h i seguidament s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es redissolgué en CH₂Cl₂ (5 ml) i H₂O (5 ml) i se separaren les fases. La fase aquosa s'evaporà a sequedat i es purificà mitjançant cromatografia en columna amb una mescla de

CH₂Cl₂:MeOH. Així s'obtingueren 20 mg (48%) del producte *N*-al·lilat **116** en forma d'oli groguenc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,88-2,01 (m, 1H, H-4a), 2,03-2,18 (m, 2H, H-4b i H-3a), 2,36-2,47 (m, 1H, H-3b), 3,11 (ddd, *J* = 11,2 Hz, *J* = 9,2 Hz, *J* = 7,2 Hz, 1H, H-5a), 3,66 (ddd, *J* = 10,9 Hz, *J* = 7,1 Hz, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-5b), 3,76 (dd, *J* = 12,9 Hz, *J* = 6,9 Hz, 1H, H-2), 3,80-3,88 (m, 2H, H-1'), 5,48 (d, *J* = 10,4 Hz, H-3'a), 5,55 (d, *J* = 17,2 Hz, H-3'b), 5,97 (dddd, *J* = 17,1 Hz, *J* = 10,1 Hz, *J* = 7,1 Hz, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-2').
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 23,5 (C-4), 29,4 (C-3), 54,0 (C-1'), 57,2 (C-5), 68,6 (C-2), 124,8 (C-3'), 127,7 (C-2'), 171,1 (CO₂H).
- **IR (NaCl):** ν 3396, 2987, 1623 cm⁻¹.
- **EM-IQ:** m/z [%] 155 (M)⁺ [1], 110 (M - CO₂H)⁺ [58], 70 (M - CO₂H - CH₂CH=CH₂)⁺ [100].
- **AE:** Calc. per C₈H₁₃NO₂: C (61,91%); H (8,44%); N (9,03%); O (20,62%)
Trobada: C (61,60%); H (8,04%); N (9,55%); O (20,81%)

(2*R*)-1-(*tert*-butxicarbonil)-*N*-[(1*S*)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-3-metilbutil]-2-al·lil-pirrolidina-2-carboxamida (118**)**



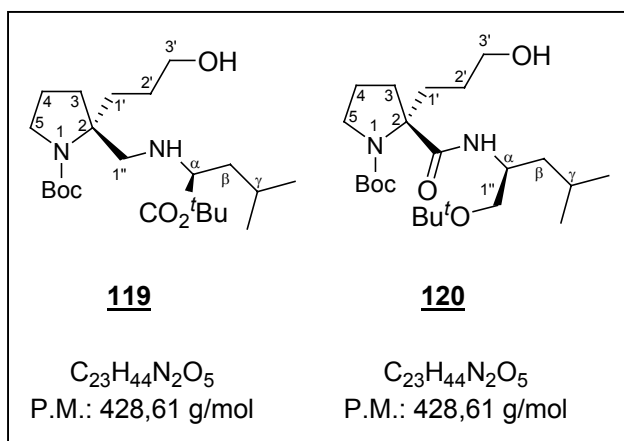
Es dissolgué l'àcid **98** (0,634 g, 2,485 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ (10 ml) i a continuació s'hi afegí DIEA (0,465 ml, 2,733 mmol, 1 eq.) i PyBOP (1,422 g, 2,733 mmol, 1,1 eq.). La mescla es deixà agitar a t.a. durant 30 min i seguidament s'hi addicionà H-Leu-O^tBu (0,512 g, 2,733 mmol, 1,1 eq.). S'agità durant 12 h més i a continuació s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció es purificà mitjançant cromatografia en columna, fent servir una mescla de CH₂Cl₂:MeOH (99:1) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 0,854 g (81%) del pseudodipèptid **118** en forma d'oli groguenc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 0,89-0,98 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1,46 (sa, 18 H, C(CH₃)₃), 1,50-1,87 (m, 6H, H-3, H-4, H-γ, H-1'a), 2,15 (sa, 1H, H-1'b), 2,54-2,62 (m, 1H, H-βa, rotàmer 1), 2,72 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 7,6 Hz, 1H, H-βa, rotàmer 2), 2,93-3,02 (m, 1H, H-βb, rotàmer 1), 3,08 (dd, *J* = 13,4 Hz, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-βb, rotàmer 2), 3,26 (dd, *J* = 16,8 Hz, *J* = 10,0 Hz, 1H, H-5a, rotàmer 1), 3,36 (dd, *J* = 16,0 Hz, *J* = 9,2 Hz, 1H, H-5a, rotàmer 2), 3,50 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-5b, rotàmer 1), 3,70 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, H-5b, rotàmer 2), 4,35 (dd, *J* = 10,8 Hz, *J* = 7,6 Hz, 1H, H-α, rotàmer 1), 4,48 (sa, 1H, H-α, rotàmer 2), 5,15 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H, H-3'), 5,66 (ddt, *J* = 17,2 Hz, *J* = 10,0 Hz, *J* = 7,3 Hz, 1H, H-2'), 6,56 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, NH), 8,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 22,2 i 22,6 (C-4), 23,0 (C-γ), 28,2 i 28,5 (C(CH₃)₃), 34,3 (C-1'), 37,8 i 38,7 (C-β), 41,5 i 42,6 (C-3), 49,2 i 49,7 (C-5), 51,3 i 52,0 (C-α), 68,4 i

70,0 (C-2), 80,2 i 81,1 (C(CH₃)₃), 81,4 i 82,0 (C(CH₃)₃), 119,4 i 119,8 (C-3'), 133,0 i 133,1 (C-2'), 153,9 i 155,4 (C=O carbat), 172,1 (C=O), 174,2 i 174,4 (C=O).

- **IR (NaCl):** ν 3289, 2976, 2933, 2872, 1736, 1682, 1541 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 425,5 (M + H)⁺, 369,3 (M - C(CH₃)₃)⁺.

(2R)-1-tert-butoxicarbonil-2-[(S)-1-tert-butoxi-4-metil-1-oxopentán-2-ilamino]-metil-2-(3-hidroxipropil)pirrolidina (119) i **(2R)-1-tert-butoxicarbonil-N-[(1S)-1-(tert-butoximetil)-3-metilbutil]-2-(3-hidroxipropil)pirrolidina-2-carboxamida (120)**



En un matràs sota atmosfera d'argó, es dissolgué el compost **118** (1,290 g, 3,038 mmol, 1 eq.) en THF anhidre (15 ml). Es refredà a 0 °C i s'hi addicionà gota a gota BH₃·SMe₂ 10 M en SMe₂ (0,33 ml, 3,34 mmol, 1,1 eq.). Es deixà agitar a 0 °C durant 10 min i passat aquest temps, es retirà el bany de gel i s'agità durant 1,5 h a t.a. Com que per CCF no s'observà cap canvi, s'hi afegí

novament BH₃·SMe₂ 10 M a 0 °C (0,27 ml, 2,74 mmol, 0,9 eq.) i es deixà agitar durant 1 h. A continuació, es diluí la mescla de reacció amb 4,3 ml d'Et₂O i a 0°C s'hi addicionà una mescla 2:1 de NaOH 3 M: H₂O₂ 30% (3,74 ml). S'observà un bombolleig provocat pel desprendiment d'H₂. Es deixà agitant durant 10 min a 0 °C i durant 3 h a t.a. S'observà la formació d'un precipitat blanc. Seguidament, s'evaporà el THF a pressió reduïda, s'afegí CH₂Cl₂ (15 ml) i H₂O (15 ml) a la mescla de reacció i se separaren les fases. La fase aquosa s'extragué amb CH₂Cl₂ (3 x 15 ml). Finalment, es rentaren les fases orgàniques agrupades amb H₂O (25 ml), s'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir un gradient d'hexà:EtOAc de 9:1 a 1:1. D'aquesta manera, s'obtingueren 319 mg (24%) del subproducte corresponent a l'alcohol **120** i 323 mg (25%) de l'alcohol **119**, en forma d'oli groguenc.

Producte **119**:

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H, CH(CH₃)₂, rotàmer 1), 0,92 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CH(CH₃)₂, rotàmer 2), 1,34-1,41 (m, 2H, H- β), 1,42-1,44 (m, 2H, H-2'), 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,49 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,63-1,91 (m, 1H, H-1'a rotàmer 1), 1,95-2,08 (m, 5H, H-1'b rotàmer 1, H-1'a rotàmer 2, H-3a, H- γ , H-4), 1,95-2,19 (m, 2H, H-3b, H-1'b rotàmer 2), 2,28 (d, J = 11,6 Hz, 1H, H-1''a, rotàmer 1), 2,48 (d, J = 11,6 Hz, 1H, H-1''a, rotàmer 2), 2,99-3,09 (m, 1H, H- α), 3,08 (d, J = 11,6 Hz, 1H, H-1''b, rotàmer 1), 3,12 (d, J = 11,6 Hz, 1H, H-1''b), 3,29-3,53 (m, 2H, H-5), 3,57-3,68 (m, 2H, H-3').
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 22,3 (CH(CH₃)₂, rotàmer 1), 22,5 i 22,6 (C-4), 23,0 (CH(CH₃)₂, rotàmer 2), 25,1 (C- γ), 27,5 (C-2'), 28,3 i 28,4 (C(CH₃)₃), 28,7 i 28,8

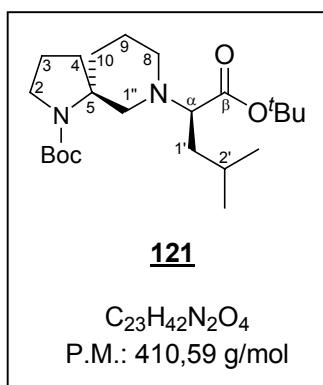
(C(CH₃)₃), 31,6 i 33,2 (C-1'), 34,7 i 36,2 (C-3'), 42,9 i 43,1 (C-β), 49,4 i 49,6 (C-5), 54,2 i 55,3 (C-1''), 61,7 i 61,8 (C-α), 63,2 i 63,5 (C-3'), 65,7 i 66,3 (C-2), 79,0 i 79,8 (C(CH₃)₃), 80,7 i 80,9 (C(CH₃)₃), 154,1 i 154,4 (C=O carbat), 175,4 i 175,7 (C=O).

- **IR (NaCl):** ν 3435, 2961, 2871, 1728, 1679 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 429,4 (M + H)⁺.
- **[α]_D²²:** + 20,2 (c 1, CHCl₃).
- **AE:** Calc. per C₂₃H₄₄N₂O₅: C (64,45%); H (10,35%); N (6,54%); O (18,66%)
Trobada: C (64,33%); H (10,10%); N (6,26%); O (19,31%)

Producte **120**:

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃), 0,96 (d, J = 6,4 Hz, 3H, CH₃), 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,51 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,53-1,74 (m, 3H, H-2' H- γ), 1,75-1,84 (m, 2H, H-β), 1,85-1,98 (m, 2H, H-1'), 2,03 (ddd, J = 14,2 Hz, J = 10,0 Hz, J = 4,2 Hz, H-4), 2,09-2,21 (m, 2H, H-3), 2,93 (dd, J = 13,0 Hz, J = 4,2 Hz, 1H, H-1''a), 3,24 (dd, J = 13,0 Hz, J = 2,6 Hz, 1H, H-1''b), 3,37-3,43 (m, 2H, H-5), 3,63 (m, 3H, H-3' i H α), 5,61 (sa, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,8 (CH₃), 22,1 (C-4), 23,6 (CH₃), 26,2 (C- γ), 27,2 (C-1'), 28,1 (C(CH₃)₃), 28,6 (C(CH₃)₃), 31,8 (C-2'), 35,1 (C-3), 35,2 (C-β), 49,4 (C-5), 61,8 (C-3'), 62,8 (C-1''), 65,1 (C-α), 65,8 (C-2), 80,3 (C(CH₃)₃), 83,0 (C(CH₃)₃), 155,3 (C=O carbat), 169,3 (C=O).
- **IR (NaCl):** ν 3430, 2958, 2870, 1728, 1688 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 429,43 (M + H)⁺, 373,33 (M - C(CH₃)₃)⁺.
- **AE:** Calc. per C₂₂H₄₀N₂O₆: C (64,45%); H (10,35%); N (6,54%); O (18,66%)
Trobada: C (64,87%); H (9,67%); N (6,22%); O (19,24%)

(5S)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-7-[(1*R*)-(tert-butoxicarbonil)-3-metilbutil]-1,7-diaza-espiro[4.5]decà (121**)**



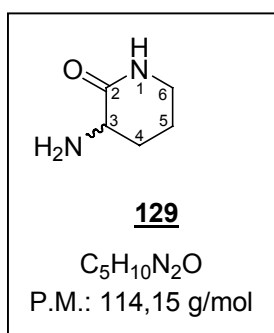
A un matràs amb l'alcohol **119** (295 mg, 0,688 mmol, 1 eq.) dissolt en CH₂Cl₂ anhidre (3,33 ml), s'hi afegí sota atmosfera d'argó Et₃N (0,19 ml, 1,332 mmol, 1,94 eq.). Es refredà la solució a -10 °C, s'hi addicionà gota a gota MsCl (0,103 ml, 1,322 mmol, 1,94 eq.) i la mescla s'agità durant 1 h, deixant que assolís t.a. S'aturà la reacció per addició d'H₂O (2 ml), se separaren les fases i la fase aquosa s'extragué amb 4 ml de CH₂Cl₂. Les fases orgàniques agrupades es rentaren amb HCl 0,1 M (4 ml), amb una solució saturada de NaHCO₃ (4 ml) i amb una solució saturada de NaCl

(4 ml). S'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. El cru obtingut s'utilitzà directament per a la següent reacció. Es dissolgué en THF anhidre (3,3 ml) i s'addicionà gota a gota a una solució refredada a 0°C de NaH (60% en oli mineral) (58 mg, 1,458 mmol, 2,12 eq.) en THF anhidre (3,33 ml). A continuació, s'hi afegí èter 15-corona-5

(0,15 ml, 0,739 mmol, 1,07 eq.). Passats 10 min, es retirà el bany de gel i es deixà agitar a t.a. durant 2 h. La reacció s'aturà per addició d'H₂O i s'extragué amb EtOAc (3 x 5 ml). Els extractes orgànics s'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna fent ús d'un gradient de 100:0 a 80:20 d'hexà:EtOAc. D'aquesta manera s'obtingueren 212 mg (75%) de l'epirolactam **121** en forma d'oli groguenc.

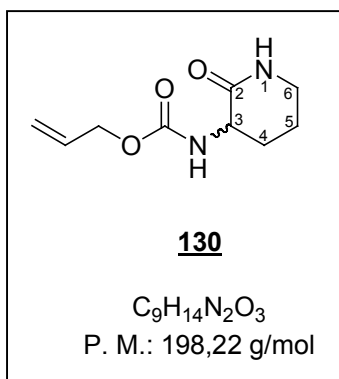
- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 0,89 i 0,92 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,24-1,72 (m, 7H, H-3, H-4, H-1', H-2'), 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,20-2,57 (m, 4H, H-β, H-10), 2,58-2,86 (m, 2H, H-2), 2,96-3,16 (m, 1H, H-a), 3,25-3,61 (m, 2H, H-8).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,7 i 22,2 (C-9), 22,7 i 23,1 (CH(CH₃)₂), 24,6 i 24,7 (C-3), 25,1 (CH(CH₃)₂), 28,6 (C(CH₃)₃), 28,8 (C(CH₃)₃), 32,6 i 33,8 (C-10), 36,5 i 37,6 (C-1'), 38,6 i 38,7 (C-4), 48,5 i 48,6 (C-8), 52,0 i 52,5 (C-2), 52,9 i 53,4 (C-β), 63,0 i 63,3 (C-5) 66,4 i 66,7 (C-α), 78,6 i 79,7 (C(CH₃)₃), 80,6 i 80,9 (C(CH₃)₃).
- **IR (NaCl):** ν 2958, 2870, 2812, 1724, 1694 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 411,41 (M + H)⁺, 355,3 (M - C(CH₃)₃)⁺.
- **[α]_D²²:** -40,4 (c 1, CHCl₃).
- **AE:** Calc. per C₂₂H₄₀N₂O₆: C (67,28%); H (10,31%); N (6,82%); O (15,59%)
Trobada: C (67,43%); H (10,70%); N (6,92%); O (14,95%)

3-Amino-piperidin-2-ona (**129**)



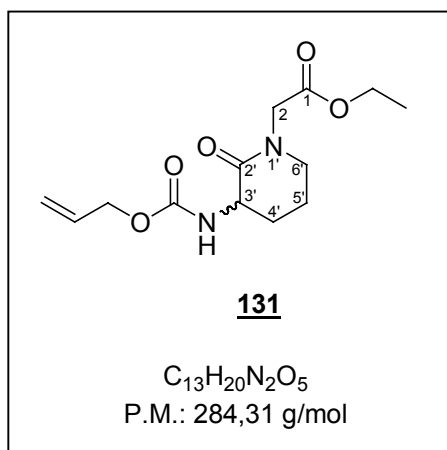
S'afegí l'hidroclorur de L-ornitina (10 g, 59,30 mmol, 1 eq.) a una solució de NaOH (2,38 g, 59,5 mmol, 1 eq.) en H₂O (10 ml) a 25 °C. Passats 15 min, s'addicionà aquesta solució a una mescla d'alúmina (30 g, 294,23 mmol, 5,0 eq.) en toluè (100 ml) i s'escalfà a reflux durant 1,5 h, recol·lectant l'aigua produïda en un Dean-Stark. Es deixà refredar a t.a. i a continuació es filtrà la mescla de reacció amb un filtre de plecs, el qual es rentà amb una barreja de CH₂Cl₂:MeOH (9:1). Els filtrats i els rentats s'evaporaren a pressió reduïda i rendiren el producte desitjat **129** (5,52 g, 82%) en forma de sòlid cristal·lí groguenc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,53-1,63 (m, 1H, H-4a), 1,80 (sa, 2H, NH₂), 1,82-1,95 (m, 2H, H-5), 2,17-2,24 (m, 1H, H-4b), 3,30-3,35 (m, 3H, H-3, H-6), 6,64 (sa, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,7 (C-5), 30,0 (C-4), 42,6 (C-6), 51,7 (C-3), 175,4 (C-2).
- **IR (NaCl):** ν 3234, 1666 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 115,5 (M + H)⁺.

3-(Al·liloxicarbonilamino)piperidin-2-ona (130)

A una dissolució del lactam **129** (3,75 g, 32,8 mmol, 1 eq.) i pirdina anhidra (3,33 ml, 41,1 mmol, 1,25 eq.) en THF anhidre, s'hi addicionà gota a gota a 0 °C el cloroformat d'al·lil (4,37 ml, 41,1 mmol, 1,25 eq.). S'observà la formació d'un precipitat blanc. S'atemperà la mescla de reacció fins a t.a. i es deixà agitant durant 2 h. Es filtrà el precipitat obtingut amb un filtre de plecs i el filtrat s'evaporà a pressió reduïda, rendint d'aquesta manera 5,67 g (87%) del producte desitjat **130** en forma de sòlid marronós.

- **1H -RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,64 (ddd, $J = 23,7$ Hz, $J = 11,5$ Hz, $J = 5,5$ Hz, 1H, H-4a), 1,94 (m, 2H, H-5), 2,45-2,56 (m, 1H, H-4b), 3,34 (m, 2H, H-6), 4,09 (ddd, $J = 11,6$ Hz, $J = 6,0$ Hz, $J = 5,6$ Hz, 1H, H-3), 4,58 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5,21 (dd, $J = 10,4$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1H, CH=CH₂), 5,31 (dd, $J = 17,2$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 1H, CH=CH₂), 5,69 (sa, 1H, NH), 5,88-5,97 (m, 1H, CH=CH₂), 6,09 (sa, 1H, NH).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,3 (C-5), 27,9 (C-4), 42,0 (C-6), 52,0 (C-3), 65,9 (CH₂CH=CH₂), 117,9 (CH=CH₂), 133,0 (CH=CH₂), 156,4 (C=O caramat), 171,5 (C-2).
- **IR (NaCl):** ν 3330, 3195, 1679, 1661, 1631 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 221,2 (M + Na)⁺, 199,2 (M + H)⁺, 141,1 (M – OCH₂CH=CH₂)⁺.
- **A.E:** Calc. per C₉H₁₄N₂O₃: C (54,53%); H (7,12%); N (14,13%); O (24,21%)
Trobada: C (54,67%); H (7,01%); N (14,04%); O (24,28%)

3-(Al·liloxicarbonilamino)-2-oxopiperidin-1-il acetat d'etil (131)

Es dissolgué el lactam **130** (2,04 g, 10,29 mmol, 1 eq.) en MeCN (50 ml) i a continuació s'hi addicionà l'agent de transferència de fase TBAB (13,27 g, 41,17 mmol, 4 eq.), K₂CO₃ (14,22 g, 102,9 mmol, 10 eq.) i finalment el bromoacetat d'etil (2,44 ml, 15,43 mmol, 1,5 eq.). Es deixà agitar vigorosament la mescla de reacció durant 48 h a t.a. Passat aquest temps, es filtrà el contingut del matràs amb un filtre de plecs i s'evaporà el filtrat a pressió reduïda. Es resuspengué el cru obtingut amb una mescla d'hexà: EtOAc (1:1) per tal de separar la major quantitat possible de l'agent de transferència de fase. Es

tornà a filtrar amb un filtre de plecs i s'evaporà el filtrat, el qual a continuació es purificà per mitjà de cromatografia en columna, fent servir com a eluent una mescla d'hexà:EtOAc (7:3). D'aquesta manera, s'obtingueren 2,92 g (50%) del producte *N*-alquilat **131** en forma d'oli groguenc i es recuperà el producte de partida no reaccionat.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,28 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1,64-1,75 (m, 1H, H-4'a), 1,99 (m, 2H, H-5'), 2,54 (ddd, *J* = 12,2 Hz, *J* = 5,0 Hz, *J* = 2,5 Hz, 1H, H-4'b), 3,40 (m, 2H, H-6), 3,92 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H, H-2a), 4,13-4,23 (m, 3H, H-3' i CO₂CH₂CH₃), 4,24 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H, H-2b), 4,58 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5,20 (dd, *J* = 10,4 Hz, *J* = 1,2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,31 (dd, *J* = 17,2 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,68 (sa, 1H, NH), 5,87-5,98 (m, 1H, CH=CH₂).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 14,4 (CO₂CH₂CH₃), 21,0 (C-5'), 27,9 (C-4'), 48,9 (C-6'), 49,2 (C-2), 52,3 (C-3'), 61,6 (CO₂CH₂CH₃), 65,8 (CH₂CH=CH₂), 117,8 (CH=CH₂), 133,0 (CH=CH₂), 156,4 (C=O carbat), 168,9 (C-1), 171,5 (C-2').
- **IR (NaCl):** ν 3329, 2978, 1744, 1725, 1658, 1646 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 285,3 (M + H)⁺, 242,4 (M – CH₂CH=CH₂)⁺, 239,2 (M – OEt)⁺.
- **AE:** Calc. per C₁₃H₂₀N₂O₅: C (54,92%); H (7,09%); N (9,85%); O (28,14%)
Troada: C (54,61%); H (6,88%); N (9,94%); O (28,57%)

7.2 EXPERIMENTAL CAPÍTOL 3

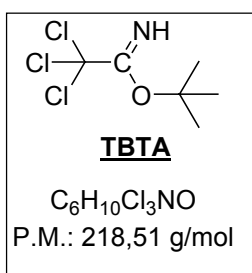
7.2.1 Material i instrumentació

RMN	Bruker <i>Avance</i> 400 MHz
	Bruker <i>Avance</i> 300 MHz
HPLC-MS	Thermolectron amb trampa d'ions amb quadrupol LCQ Advantage, mode postiu
HPLC analític	Gilson, amb detector de díode array de Termo <u>Columna:</u> YMC C ₁₈ , 100 x 4,6 mm
Espectròmetre de masses exactes	LC-MSD-TOF d'Agilent, amb fonts d'ionització ESI, APPI i APCI
Raigs X	Difractòmetre AXS <i>Smart</i> 2000 de Bruker, amb detector CCD.
Polarímetre	Perkin-Elmer
Sistema de purificació de dissolvents	GlassContour, Irvine, CA

Taula 16: Principals instruments emprats en l'experimental del Capítol 3

7.2.3 Procediments experimentals

Tricloroacetamidat de *tert*-butil (TBTA)



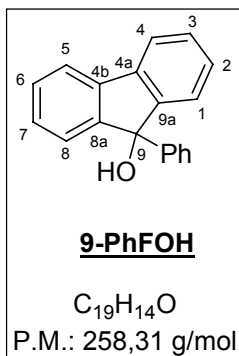
S'afegí *tert*-butòxid de potassi (16,8 g, 150 mmol, 0,1 eq.) a una mescla de *tert*-butanol (destil·lat prèviament sobre Mg i I₂) (300 ml, 3,14 mol, 2,1 eq.) i Et₂O anhidre (300 ml). Paral·lelament, en un altre matràs de 3 boques es barrejà tricloroacetnitril (150 ml, 1,50 mol, 1 eq.) i Et₂O anhidre (300 ml) i la mescla es refredà a 0 °C.

La dissolució del *tert*-butòxid de potassi s'afegí gota a gota per mitjà d'una cànula a la dissolució de tricloroacetnitril refredada a 0 °C. A continuació, s'agità a t.a. durant 45 min i finalment s'agità a reflux durant 1 h. Es deixà que la reacció assolís la t.a. i es filtrà sobre Celite®. El dissolvent s'evaporà a pressió reduïda (T ≤ 30 °C) fins a proporcionar un oli marronós, que es purificà per destil·lació al buit (fent passar aire pel refrigerant en lloc d'aigua ja que si no el producte cristal·litza en contacte amb aigua freda). D'aquesta manera s'obtingueren 175,0 g del producte desitjat (54 %).

- **¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 1,59 (s, 9H, (CH₃)₃), 8,24 (sa, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 27,7 ((CH₃)₃), 84,4 (C(CH₃)₃), 93,4 (CCl₃), 161,0 (C=NH).

- **HPLC-MS:** 240,5 (M + Na)⁺, 199,7 (M - NH)⁺, 100,7 (M - CCl₃)⁺, 74,0 (OC(CH₃)₃)⁺.

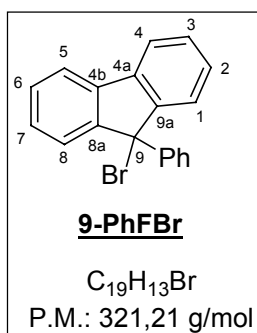
9-Fenil-9H-fluoren-9-ol (**9-PhFOH**)



En un matràs de 3 boques de 3 l sec, equipat amb un agitador de pales, es mesclà bromobenzè (158 ml, 1,5 mol, 1,5 eq.) en Et₂O (800 ml) i es refredà la solució a 0 °C. Paral·lelament, s'omplí una proveta seca amb una solució de 25 M BuLi en hexà (460 ml, 1,15 mol, 1,15 eq.) sota atmosfera de N₂ i s'afegí a la dissolució d'èter a 0 °C per mitjà d'una cànula. Un cop completada l'addició, la solució s'agità a 0 °C durant 20 min i a continuació s'afegí a 0 °C una solució de fluorenona (180 g, 1 mol, 1 eq.) en THF anhidre (300 ml) via cànula. Es retirà el bany de gel, i la solució es deixà agitar durant 2 h. S'incrementà la potència d'agitació, es cobrí el matràs amb paper d'alumini per protegir-lo de la llum, i es deixà agitar la mescla de reacció durant 12 h. S'observà la formació d'un precipitat (LiBr), el qual es dissolgué per addició d'H₂O (250 ml). Es separaren les fases i la fase orgànica es rentà amb H₂O (300 ml) i amb una dissolució saturada de NaCl (300 ml). Les fases aquoses es tornaren a extreure amb Et₂O (2 x 300 ml). S'agruparen les fases orgàniques i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda, fins a obtenir 237,6 g (92%) d'un oli groc corresponent a l'alcohol desitjat **9-PhFOH**.

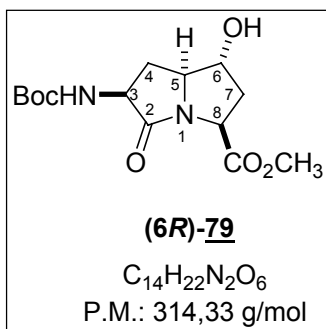
- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 2,50 (sa, 1H, OH), 7,28-7,44 (m, 11H, C₆H₅, C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, C-8), 7,69-7,74 (m, 2H, C-4 i C-5).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 83,3 (C-9), 119,8 (C₆H₅-p), 124,4, 125,0, 126,9, 127,9, 128,1, 128,8, 139,2 (C-4a i C-4b), 142,8 (C₆H₅-ipso), 150,1 (C-8a i C-9a).
- **HPLC-MS:** 258,5 (M)⁺, 241,2 (M - OH)⁺.

9-Bromo-9-fenil-9H-fluorè (**9-PhFBr**)



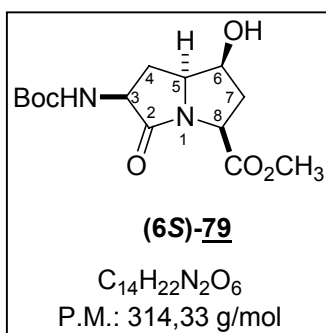
Es dissolgué l'alcohol **9-PhFOH** (237,6 g, 0,92 mol, 1 eq.) en toluè (800 ml) i la solució es transferí a un matràs Morton de 3 boques de 2 l, equipat amb un agitador mecànic. S'afegiren HBr 48% (400 ml, 3,54 mol, 3,84 eq.) i la mescla heterogènia s'agità vigorosament durant 3 dies. Les fases se separaren i la fase aquosa s'extragué amb toluè (500 ml). Les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren amb Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. El producte obtingut es recristal·litzà amb isoactà, i s'obtingueren 263,0 g (89%) de 9-Bromo-9-fenil-9H-fluorè **9-PhFBr** en forma de sòlid groguenc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 7,29-7,43 (m, 11H, C₆H₅, C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, C-8), 7,56-7,75 (m, 2H, C-4 i C-5).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 67,3 (C-9), 120,2 (C₆H₅-p), 126,0, 127,3, 127,9, 128,2, 128,4, 128,9, 138,0 (C-4a i C-4b), 141,0 (C₆H₅-ipso), 149,5 (C-8a i C-9a).
- **HPLC-MS:** 241,2 (M - Br)⁺.

(3S,5S,6R,8S)-3-N-(Boc)amino-6-hidroxi-pirrolizidinon-8-carboxilat de metil (79)

A una dissolució de l'hidroclorur **(4R)-167** (174 mg, 0,50 mmol, 1 eq.) en MeOH (10 ml), se li afegí Et_3N (208 μ l, 1,50 mmol, 3 eq.) i la mescla de reacció s'agità a reflux durant 24 h. Després d'evaporar el dissolvent a pressió reduïda, el residu es suspengué en CH_2Cl_2 (10 ml) i s'hi addicionà Et_3N (97 μ l, 0,70 mmol, 1,4 eq.) i Boc_2O (131 mg, 0,60 mmol, 1,2 eq.). La mescla de reacció es deixà agitar durant la nit a t.a. Seguidament, es diluí amb $CHCl_3$ (20 ml) i es rentà amb NaH_2PO_4 1 M (15 ml). La fase aquosa s'extragué amb $CHCl_3$ (15 ml) i les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren sobre Na_2SO_4 , es filtraren i es concentraren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir una mescla d'hexà:EtOAc (4:6). D'aquesta manera s'obtingueren 68 mg (43% en 2 passos) del bicicle **(6R)-79** en forma de sòlid blanc.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,42 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,80 (dd, $J = 21,6$ Hz, $J = 11,2$ Hz, 1H, H-4), 2,34-2,39 (m, 2H, H-7), 2,92-3,01 (m, 1H, H-4), 3,68 (dd, $J = 13,8$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-5), 3,75 (s, 3H, OCH_3), 4,14 (dd, $J = 16,4$ Hz, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-6), 4,23 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H, H-8), 4,58 (m, 1H, H-3), 5,41 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, NH).
- **^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 27,9 ($C(CH_3)_3$), 36,9 (C-4), 39,5 (C-7), 52,4 (OCH_3), 54,2 (C-8), 55,4 (C-3), 62,3 (C-5), 72,9 (C-6), 79,7 ($C(CH_3)_3$), 155,4 (C=O carbat), 171,0 (C=O), 171,7 (C=O).
- **$[\alpha]_D^{22}$:** -85,4° (c 1,6, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $C_{14}H_{23}N_2O_6$ (M + H) 315,1550; mesurat 315,1545.

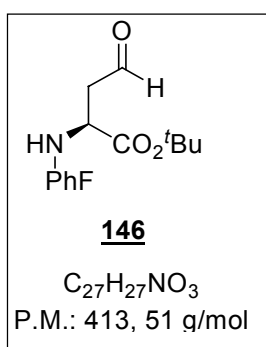
(3S,5S,6S,8S)-3-N-(Boc)amino-6-hidroxi-pirrolizidinon-8-carboxilat de metil (79)

A una dissolució de l'hidroclorur **(4S)-167** (128 mg, 0,40 mmol, 1 eq.) en MeOH (8 ml), se li afegí Et_3N (167 μ l, 1,20 mmol, 3 eq.) i la mescla de reacció s'agità a reflux durant 24 h. Després d'evaporar el dissolvent a pressió reduïda, el residu es suspengué en CH_2Cl_2 (8 ml) i s'hi addicionà Et_3N (78 μ l, 0,56 mmol, 1,4 eq.) i Boc_2O (105 mg, 0,48 mmol, 1,2 eq.). La mescla de reacció es deixà agitar durant la nit a t.a. Seguidament, es diluí amb $CHCl_3$ (15 ml) i es rentà amb una NaH_2PO_4 1 M (10 ml). La fase aquosa s'extragué amb $CHCl_3$ (10 ml) i les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren sobre Na_2SO_4 , es filtraren i es concentraren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir una mescla d'hexà:EtOAc (1:1). D'aquesta manera s'obtingueren 35 mg (28% en 2 passos) del bicicle **(6S)-79** en forma de sòlid blanc.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,44 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 2,15-2,34 (m, 2H, H-4), 2,55-2,74 (m, 2H, H-7), 3,76 (s, 3H, OCH_3), 3,95-4,02 (m, 1H, H-5), 4,17-4,22 (m, 1H, H-6), 4,40-4,52 (m, 1H, H-8), 4,59 (t, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-3), 5,46 (sa, 1H, NH).

- **^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 27,9 (C(CH_3)₃), 29,3 (C-4), 39,9 (C-7), 52,2 (OCH₃), 53,1 (C-8), 53,2 (C-3), 63,0 (C-5), 68,8 (C-6), 80,2 (C(CH_3)₃), 155,4 (C=O carbat), 171,7 (C=O), 171,8 (C=O).
- **$[\alpha]_D^{22}$:** -53,4° (c 0,5, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6$ (M + Na) 337,1381; mesurat 337,1370.

(2S)-2-[N-(9-fenilfluoren-9-il)amino]-4-oxobutanoat de *tert*-butil (**146**)

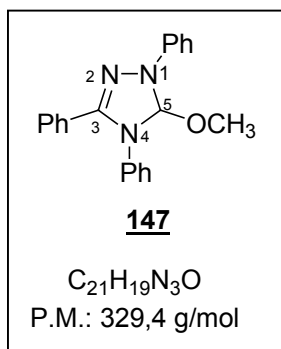


A una dissolució del dièster **156** (10 g, 22,55 mmol, 1 eq.) en toluè anhidre (230 ml) a -78°C , se li afegí gota a gota DIBAL-H 1 M en toluè (25,3 ml, 25,25 mmol, 1,12 eq.) i es deixà reaccionar durant 10 min. Seguidament, s'aturà la reacció per addició d'acetona (5,3 ml) i H_2O (5,3 ml). S'afegí NaHCO_3 (24 g) a la mescla de reacció i es deixà atemperar a t.a. A continuació, es filtrà sobre NaHCO_3 i es rentà abundantment amb EtOAc. Finalment, s'evaporà el filtrat a pressió reduïda, obtenint-se d'aquesta manera 9,232 g (99%) de l'aldehid **146**,

que s'utilitzà sense purificar per a la següent reacció.

- **^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 1,23 (s, 9H, C(CH_3)₃), 2,32-2,47 (m, 2H, CH₂), 3,03 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, CH), 7,20-7,44 (m, 11H, PhF), 7,70-7,74 (m, 2H, PhF), 9,51 (sa, 1H, CHO).
- **$[\alpha]_D^{22}$:** -240,0 (Lit.¹³⁰ -263,9)
- **HPLC-MS:** 414,7 (M + H)⁺, 241,3 (PhF)⁺.

5-metoxi-1,3,4-trifenil-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazole (**147**)



Mètode A: Es preparà una solució de NaOCH_3 0,9 M, per addició de Na (1,035 g, 45 mmol, 1,1 eq.) en MeOH anhidre (50 ml). Aquesta solució s'afegí lentament a una solució del perclorat **160** (16,245 g, 40,84 mmol, 1 eq.) en MeOH anhidre (90 ml). S'agità durant 1 h a t.a. i a continuació s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. Es dissolgué el cru obtingut en Et_2O i es filtrà el NaClO_4 format amb un filtre de plecs. S'evaporà el filtrat a pressió reduïda i es recristal·litzà el producte obtingut en MeOH. D'aquesta manera s'obtingueren 4,498 g

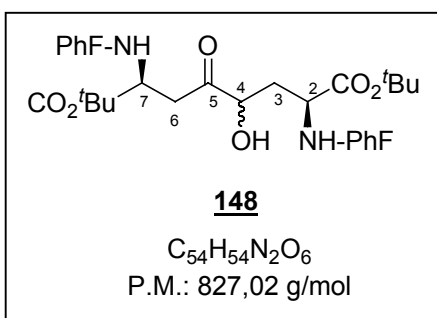
(33%) del triazole **147**.

Mètode B: En un matràs de 250 ml, es barrejaren HCO_2H (40,2 ml, 1,05 mol, 22,45 eq.) i Ac_2O (80,4 ml, 0,85 mol, 18,22 eq.) i la mescla s'escalfà durant 15 min a 60°C . Es deixà atemperar a t.a. i a continuació s'hi afegí lentament la benzamidina **159** (13,418 g, 46,69 mmol, 1 eq.), fent ús d'un bany d'aigua per refredar el matràs de reacció. La mescla de reacció es deixà agitant durant 24 h a t.a. Seguidament, s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda ($T = 30^\circ\text{C}$) i l'oli marró obtingut es dissolgué en MeOH (60 ml) i es refredà a 0°C . Amb un embut d'addició, s'afegí a 0°C i gota a gota una solució 25% NaOCH_3 en MeOH (58 ml, 253,52 mmol, 5,43 eq.). S'observà la formació d'un precipitat. Es deixà agitar la mescla de reacció durant 2 h a t.a. i a

continuació es filtrà el precipitat i es rentà amb MeOH. El cru es recristal·litzà en MeOH, obtenint-se d'aquesta manera 15,019 g (97% en 2 passos) del producte desitjat en forma de cristalls groguencs.

- **¹H-RMN (C₆D₆, 300 MHz):** δ 3,12 (s, 3H, OCH₃), 6,67 (s, 1H, H-5), 6,88-7,02 (m, 4H, C₆H₅), 7,08-7,12 (m, 5H, C₆H₅), 7,35-7,41 (m, 2H, C₆H₅), 7,69-7,75 (m, 4H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (C₆D₆, 300 MHz):** δ 47,1 (OCH₃), 101,2 (C-5), 113,7, 120,7, 123,3, 125,2, 128,8, 129,2, 129,4, 129,7, 140,9 (N-C₆H₅-*ipso*), 142,9 (N-C₆H₅-*ipso*), 145,3 (C-3).
- **HPLC-MS:** 298,2 (M - OCH₃)⁺.

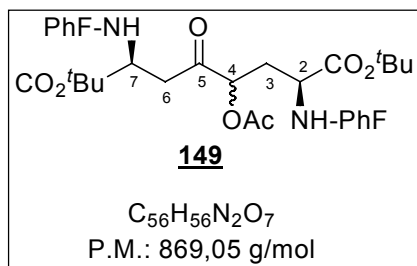
(2S,5RS,7S)-4-hidroxi-5-oxo-2,7-bis[N-(9-fenilfluoren-9-il)amino]suberat de di-*tert*-butil (148)



Es dissolgué l'aldehid 146 (2,79 g, 6,75 mmol, 1 eq.) en *t*BuOH anhidre (30 ml) en un matràs sec i s'escalfà a 50 °C durant 15 min sota atmosfera d'argó. A continuació, s'hi afegí el triazole 147 (0,556 g, 1,69 mmol, 0,25 eq.) i es deixà agitant durant 4 h a 80 °C. La mescla de reacció es refredà a t.a. i s'evaporà a sequedat a pressió reduïda. El cru taronja obtingut es purificà per

cromatografia en columna, fent servir com a eluent una mescla d'hexà:EtOAc (95:5). Les fraccions que contenien producte s'evaporaren i es precipitaren amb hexà, rendint d'aquesta manera 1,774 g (63%) de l'aciloina 148, com una mescla de diastereòmers 1:1.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,18 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,21 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,22 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,25 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,42-1,66 (m, 2H, H-6), 1,76-1,81 (m, 2H, H-6), 2,49 (dd, *J* = 15,8 Hz, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-3), 2,56 (dd, *J* = 16,0 Hz, *J* = 4,8 Hz, 2H, H-3), 2,72-2,82 (m, 4H, H-3 i H-7), 2,90-2,94 (m, 2H, H-2), 4,08 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-4), 4,36 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-5), 7,19-7,49 (m, 44H, PhF), 7,69-7,73 (m, 8H, PhF).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 27,4 (C(CH₃)₃), 27,5 (C(CH₃)₃), 36,2 (C-6), 37,5 (C-6), 42,9 (C-3), 42,9 (C-3), 52,7 (CHNH), 53,0 (CHNH), 53,1 (CHNH), 55,0 (CHNH), 72,6 (C-9' PhF), 72,7 (C-9' PhF), 72,7 (C-9' PhF), 72,7 (C-9' PhF), 74,7 (C-4), 74,7 (C-5), 80,5 (C(CH₃)₃), 80,7 (C(CH₃)₃), 80,9 (C(CH₃)₃), 81,0 (C(CH₃)₃), 119,3 (PhF), 119,4 (PhF), 119,4 (PhF), 119,5 (PhF), 119,6 (PhF), 119,7 (PhF), 119,7 (PhF), 119,8 (PhF), 125,6 (PhF), 125,7 (PhF), 125,7 (PhF), 125,8 (PhF), 126,7 (PhF), 126,8 (PhF), 126,9 (PhF), 127,0 (PhF), 127,3 (PhF), 127,4 (PhF), 127,5 (PhF), 127,5 (PhF), 127,5 (PhF), 127,6 (PhF), 127,6 (PhF), 127,7 (PhF), 127,9 (PhF), 128,0 (PhF), 128,0 (PhF), 128,2 (PhF), 139,6 (PhF), 139,7 (PhF), 139,8 (PhF), 139,9 (PhF), 140,7 (PhF), 140,8 (PhF), 147,4 (C8a' i C9a'), 148,0 (C8a' i C9a'), 148,4 (C8a' i C9a'), 148,6 (C8a' i C9a'), 172,8 (CO₂^tBu), 173,1 (CO₂^tBu), 173,4 (CO₂^tBu), 174,2 (CO₂^tBu), 209,2 (C=O), 210,0 (C=O).
- **HPLC-MS:** 849,2 (M + Na)⁺, 827,2 (M)⁺.

(2S,5RS,7S)-4-acetoxi-5-oxo-2,7-bis[N-(9-fenilfluoren-9-il)amino]suberat de di-tert-butil (149)

A una dissolució de l'aciloïna **148** (7,093 g, 8,58 mmol, 1 eq.) en THF anhidre (100 ml), se li addicionà Ac_2O (4,05 ml, 42,88 mmol, 5 eq.), piridina (2,08 ml, 25,74 mmol, 3 eq.) i DMAP (105 mg, 0,86 mmol, 0,1 eq.) i es deixà agitar durant 14 h a t.a. A continuació, es diluí la mescla de reacció amb EtOAc (150 ml), es rentà amb una solució saturada de $NaHCO_3$ (2 x 75 ml), amb una solució aquosa 1 M de $CuSO_4$ (2 x 75 ml) i amb una solució saturada de NaCl (2 x 75 ml). La fase orgànica s'assecà sobre Na_2SO_4 , es filtrà i es concentrà a pressió reduïda. El residu es suspengué en MeOH (75 ml), s'agità a reflux durant 10 min i es deixà refredar. D'aquesta manera es pogueren aïllar per filtració 4,622 g (33%) d'un precipitat blanc corresponents al diastereòmer de l'acetat (**4S**)-**149** amb menor R_f ($R_f = 0,19$ en hexà:Et₂O (75:25)).

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,19 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,25 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,55-1,78 (m, 2H, H-6), 1,80 (s, 3H, CH₃), 2,50-2,70 (m, 3H, H-3 i H-7), 2,94 (sa, 1H, H-2), 5,31 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, H-4), 7,16-7,40 (m, 22H, PhF), 7,69-7,71 (m, 4H, PhF).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 20,4 (CH₃), 27,4 (C(CH₃)₃), 27,5 (C(CH₃)₃), 35,0 (C-6), 43,2 (C-3), 52,2 (CH-NH), 72,3 (C-9' PhF), 72,8 (C-9' PhF), 75,3 (C-4), 80,8 (C(CH₃)₃), 80,8 (C(CH₃)₃), 119,3 (PhF), 119,4 (PhF), 119,6 (PhF), 125,1 (PhF), 125,5 (PhF), 125,5 (PhF), 125,6 (PhF), 125,8 (PhF), 125,8 (PhF), 125,9 (PhF), 126,6 (PhF), 126,7 (PhF), 126,9 (PhF), 127,4 (PhF), 127,5 (PhF), 127,7 (PhF), 127,0 (PhF), 128,0 (PhF), 139,6 (PhF), 139,6 (PhF), 140,7 (PhF), 140,7 (PhF), 144,2 (PhF), 148,1 (PhF), 148,6 (PhF), 169,8 (COCH₃), 174,7 (CO₂^tBu), 174,7 (CO₂^tBu), 204,1 (C-5).
- **$[\alpha]_D^{22}$:** -253 (c 17,0, CHCl₃).
- **HRMS:** calc. per $C_{56}H_{57}N_2O_7$ (M + H) 869,4166; mesurat 869,4164.

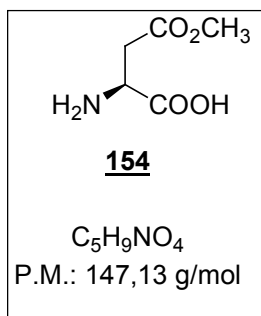
El filtrat es concentrà a pressió reduïda i es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent una mescla d'hexà:Et₂O (9:1). D'aquesta manera s'obtingueren 4,694 g (33%) del diastereòmer (**4R**)-**149** de major R_f ($R_f = 0,22$ en hexà:Et₂O (75:25)), en forma d'escuma blanca.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 1,25 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1,26 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1,74-1,92 (m, 2H, H-6), 2,02 (s, 3H, OCH₃), 2,34 (dd, $J = 17,1$ Hz, $J = 3,9$ Hz, 1H, H-3), 2,60 (dd, $J = 17,1$ Hz, $J = 4,6$ Hz, 1H, H-3), 2,69 (m, 1H, H-7), 2,84 (m, 2H, H-2), 5,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-4), 7,20-7,48 (m, 22H, PhF), 7,70-7,75 (m, 4H, PhF).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 21,0 (OCH₃), 28,1 (C(CH₃)₃), 28,3 (C(CH₃)₃), 35,3 (C-6), 44,1 (C-3), 52,7 (CH-NH), 53,1 (CH-NH), 73,6 (C-9' PhF), 73,6 (C-9' PhF), 75,7 (C-4), 81,6 (C(CH₃)₃), 81,7 (C(CH₃)₃), 120,0 (PhF), 120,2 (PhF), 120,4 (PhF), 120,5 (PhF), 125,7 (PhF), 126,2 (PhF), 126,2 (PhF), 126,6 (PhF), 126,6 (PhF), 126,7 (PhF), 126,7 (PhF), 127,5 (PhF), 127,7 (PhF), 128,2 (PhF), 128,4 (PhF), 128,5 (PhF), 128,7 (PhF), 128,7 (PhF), 128,8 (PhF),

128,8 (PhF), 140,3 (PhF), 140,4 (PhF), 141,5 (PhF), 141,6 (PhF), 144,9 (PhF), 145,0 (PhF), 149,6 (PhF), 149,7 (PhF), 170,5 (COCH₃), 173,4 (CO₂^tBu), 174,3 (CO₂^tBu), 204,6 (C-5).

- $[\alpha]_D^{22}$: -204 (c 14,4, CHCl₃).
- **HPLC-MS**: 891,2 (M + Na)⁺, 869,1 (M)⁺.

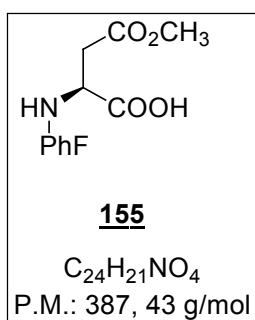
Éster β-metílic de l'àcid (S)-aspàrtic (**154**)



A un matràs contenint àcid S-aspàrtic (40 g, 300,5 mmol, 1 eq.) s'afegí MeOH (100 ml) i la suspensió es refredà a 0 °C. Paral·lelament, s'addicionà lentament clorur d'acetil (28 ml, 393,8 mmol, 1,31 eq.) a un altre matràs contenint MeOH (100 ml) refredat a 0 °C. Les dues mescles s'agitaren per separat a 0 °C durant 15 min. A continuació, la solució de clorur d'acetil en MeOH s'afegí gota a gota a la suspensió d'àcid aspàrtic en MeOH i la barreja s'agità durant 3 h a 0 °C. Passat aquest temps, es deixà agitar a t.a. durant tota la nit. La mescla s'abocà sobre un vas de precipitats contenint 600 ml d'èter dietílic i es refredà a 0 °C durant 2 h. Es filtrà el contingut i el sòlid obtingut s'assecà al buit, obtenint-se d'aquesta manera 41,04 g (74 %) de la sal d'hidroclorur de l'éster β-metílic de l'àcid S-aspàrtic. A aquest sòlid blanc se li afegí EtOH anhidre (225 ml) i òxid de propilè (75 ml, 1,08 mol, 4,83 eq) i la mescla es refluí durant 6 h. Seguidament, es deixà refredar a t.a. i es filtrà, obtenint d'aquesta manera 27,18 g (83 %) de l'aminoàcid desitjat **154**.

- **¹H-RMN (D₂O, 300 MHz)**: δ 2,88 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H, CH₂), 3,59 (s, 3H, CH₃), 3,90 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, H_α).
- **¹³C-RMN (D₂O, 300 MHz)**: δ 34,8 (CH₂), 51,0 (CH₃), 53,0 (CH), 172,9 (CO₂CH₃), 173,2 (CO₂H).
- **HPLC-MS**: 148,0 (M + H)⁺.

Éster β-metílic de l'àcid (S)-N-(9-fenilfluoren-9-il)-aspàrtic (**155**)

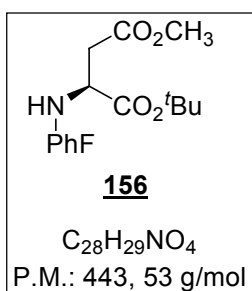


Es suspengué l'éster β-metílic de l'àcid aspàrtic **154** (26,625 g, 180,96 mmol, 1 eq.) en CHCl₃ anhidre (destil·lat sobre P₂O₅) (450 ml) i CH₃CN anhidre (90 ml) en un matràs Morton sec equipat amb un agitador mecànic. S'hi afegí TMSCl (destil·lat prèviament sobre CaH₂) (24,5 ml, 193,63 mmols, 1,07 eq.) per mitjà d'una cànula i la mescla s'escalfà a reflux durant 2 h. Passat aquest temps, es refredà a t.a., s'hi afegí gota a gota Et₃N (55,5 ml, 398,11 mmol, 2,2 eq.) i es deixà agitar durant 15 min. A continuació, s'hi addicionà Pb(NO₃)₂ (46,151 g, 139,34 mmol, 0,77 eq.) i PhFBr (80,217 g, 249,72 mmol, 1,38 eq.) dissolts en CHCl₃ anhidre (230 ml). La mescla s'agità vigorosament durant 3 dies a t.a. i es protegí de la llum mitjançant paper d'alumini. Seguidament, s'afegí MeOH (85 ml) a la mescla, s'agità durant 15 min, es filtrà i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El residu s'extragué amb una dissolució d'àcid cítric 5 % (900 ml) i

Et₂O (900 ml). La fase aquosa s'extragué amb Et₂O (2 x 900 ml) i els extrems orgànics agrupats s'assecaren sobre MgSO₄ i s'evaporà a pressió reduïda la major part del dissovent, deixant la mostra dissolta en aproximadament 200 ml Et₂O. La dissolució resultant es refredà a 0 °C i el producte obtingut es filtrà i es rentà amb ¹Pr₂O. Les aigües mares es tornaren a refredar i s'obtingué una altra partida de producte desitjat. Finalment les aigües mares es diluïren amb Et₂O (900 ml) i s'extraguïren amb una solució saturada de NaHCO₃ (100 ml). La fase aquosa s'acidificà amb HCl concentrat fins a pH = 5 i s'extragué amb Et₂O (2 x 100 ml). Les fases orgàniques s'assecaren sobre MgSO₄, es filtaren i s'evaporaren, deixant 100 ml de dissolvent. La solució es refredà i el producte obtingut es filtrà i es rentà amb ¹Pr₂O. D'aquesta manera s'obtingueren en total 44,926 g (64%) de producte desitjat **155**.

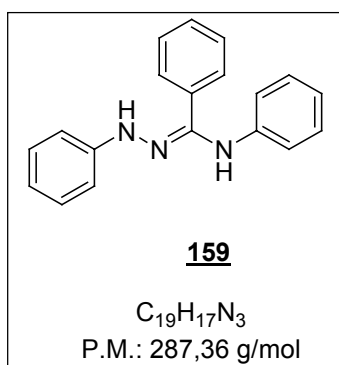
- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,97 (dd, *J* = 17,4 Hz i *J* = 4,6 Hz, 1H, CH₂), 2,81 (dd, *J* = 17,4 Hz i *J* = 3,4 Hz, 1H, CH₂), 2,90 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H, H_α), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 7,26-7,49 (m, 11H, PhF), 7,76 (dd, *J* = 20,0 Hz i *J* = 7,6 Hz, 2H, PhF-H-4 i PhF-H-5)
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 35,4 (CH₂), 52,5 (CH₃), 53,0 (CH), 72,9 (C-9' PhF), 120,9 (PhF), 121,1 (PhF), 124,9 (PhF), 125,5 (PhF), 126,1 (PhF), 128,3 (PhF), 128,8 (PhF), 129,2 (PhF), 129,7 (PhF), 129,8 (PhF), 140,8 (PhF), 173,1 (CO₂CH₃), 174,9 (CO₂H).
- **HPLC-MS:** 410,0 (M + Na)⁺, 387,7 (M + 1)⁺, 241,3 (PhF)⁺.

Éster α-*tert*-butílic β-metílic de l'àcid (S)-*N*-(9-fenilfluoren-9-il)-aspàrtic (**156**)



Es dissolgué l'àcid **155** (16,437 g, 42,43 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ anhidre (95 ml). Paral·lelament es dissolgué tricloroacetamidat de *tert*-butil (TBTA) (18,541 g, 84,85 mmol, 2 eq.) en CH₂Cl₂ anhidre (25 ml) i s'afegiren a la solució anterior. La mescla de reacció s'agità durant 2 dies a t.a. Passat aquest temps, es filtrà el sòlid blanc format i es tornà a afegir TBTA (9,27 g, 42,43 mmol, 1 eq.) a la mescla de reacció, la qual es deixà agitar durant un dia més a t.a. A continuació, es refredà la solució amb un bany de gel i es filtrà el sòlid blanc. S'evaporà a pressió reduïda el filtrat obtingut i es purificà el cru per cromatografia en columna, fent servir una mescla d'hexà:EtOAc (98:2) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 15,578 g (83%) del diéster **156** desitjat en forma de sòlid blanc.

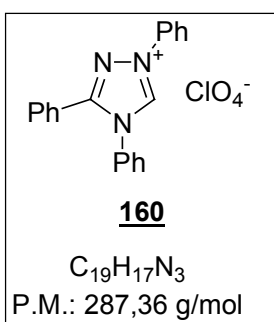
- **¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 1,26 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,32 (dd, *J* = 14,8 Hz, *J* = 5,6 Hz, 1H, CH₂), 2,50 (dd, *J* = 14,8 Hz, *J* = 5,8 Hz, 1H, CH₂), 2,90 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H, CH), 3,38 (sa, 1H, NH), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 7,19-7,43 (m, 11H, PhF), 7,68-7,74 (m, 2H, H-4 i H-5 PhF).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 28,2 (C(CH₃)₃), 41,0 (CH₂), 52,0 (CH₃), 53,9 (CH), 73,4 (C-9' PhF), 81,7 (C(CH₃)₃), 120,1 (PhF), 120,4 (PhF), 126,1 (PhF), 126,5 (PhF), 126,6 (PhF), 127,6 (PhF), 128,2 (PhF), 128,7 (PhF), 128,7 (PhF), 140,3 (PhF), 141,5 (PhF), 145,1 (C₆H₅-*ipso*), 149,3 (PhF), 149,5 (PhF), 171,7 (CO₂^tBu), 173,4 (CO₂CH₃).
- **[α]_D²²:** -231,2 (c 1.0, CHCl₃) (Lit. ^{124b} -233,7).
- **HPLC-MS:** 466 (M + Na)⁺, 443,9 (M)⁺, 241,3 (PhF)⁺.

(E)-N-fenil-N'-(fenilamino)benzamidina (159)

Es mesclaren benzanilida (25,0 g, 127 mmol, 1 eq.) i PCl₅ (26,4 g, 127 mmol, 1 eq.) en un matràs de 3 boques i s'escalfà (sense l'addició de cap dissolvent) a 80 °C durant 12 h, fins que no s'observà emissió d'HCl. S'evaporà a pressió reduïda la mescla de reacció i es diluï en Et₂O (250 ml). Aquesta solució groguenca s'afegí a un matràs amb K₂CO₃ (26 g, 188 mmol, 1,48 eq.) i es refredà a 0 °C. A continuació, s'addicionà lentament fenilhidrazina (25 ml, 254 mmol, 2 eq.). La mescla de reacció s'agità durant 15 min a 0 °C i seguidament durant 2 h a

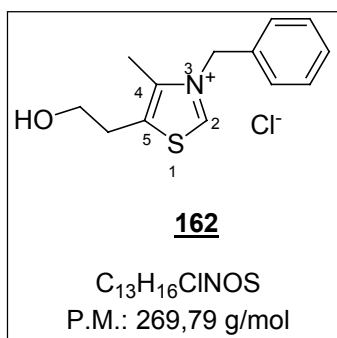
t.a. Finalment, es rentà el cru de reacció amb H₂O (150 ml), àcid cítric 1 M (150 ml), una solució saturada de NaHCO₃ (150 ml) i una solució saturada de NaCl (150 ml). La fase orgànica s'assecà amb MgSO₄, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda, rendint un sòlid de color rosa, que es recristal·litzà amb MeOH. D'aquesta manera, s'obtingueren 16,450 g (45 % en 2 passos) del producte desitjat **159**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 5,77 (sa, 1H, NH), 6,74-6,76 (m, 2H, C₆H₅), 6,90-6,95 (m, 2H, C₆H₅), 7,13-7,16 (m, 2H, C₆H₅), 7,23-7,32 (m, 4H, C₆H₅), 7,37-7,39 (m, 3H, C₆H₅), 7,64 (sa, 1H, NH), 7,74-7,77 (m, 2H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 300 MHz):** δ 113,8, 116,8, 120,6, 121,5, 127,0, 129,0, 129,7, 129,9, 135,0, 138,5, 141,7, 145,4.
- **HPLC-MS:** 288,1 (M + H)⁺.

Perclorat de 1,3,4-trifenil-1,2,4-triazoli (160)

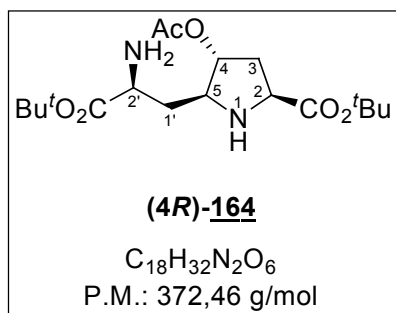
En un recipient d'hidrogenació, es dissolgué la benzamidina **159** (7,00 g, 24,37 mmol, 1 eq.) en HCO₂H 97% (88 ml, 2,22 mol, 91,6 eq.) i s'escalfà a 130 °C durant 12 h. A continuació, es deixà atemperar a t.a. i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. Seguidament, s'afegí lentament HClO₄ (38,4 ml, 0,64 mol, 26,1 eq.) i s'induí la cristal·lització rascant amb l'espàtula les parets del matràs. Es filtrà el precipitat marró obtingut i es recristal·litzà amb EtOH, obtenint-se d'aquesta manera 8,446 g (87%) del producte desitjat **160**, en forma de sòlid groguenc.

- **¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz):** δ 7,50-7,55 (m, 2H, C₆H₅), 7,60-7,82 (m, 11H, C₆H₅), 8,10-8,14 (m, 2H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ 120,6, 122,4, 126,6, 129,3, 130,3, 130,5, 131,0, 132,1, 132,4, 134,9, 143,3, 153,3.
- **HPLC-MS:** 298,2 (M - ClO₄)⁺.

Clorur de *N*-benzil-5-(2-hidroxiètil)-4-metil-1,3-tiazoli (162)

En un matràs de 3 boques de 250 ml equipat amb un refrigerant acoblat a un tub de $CaCl_2$, es mesclà 5-(2-hidroxiètil)-4-metil-1,3-tiazole (12 ml, 100 mmol, 1 eq.), clorur de benzil (11,54 ml, 100 mmol, 1 eq.) en MeCN (50 ml). La mescla s'agità a reflux durant 24 h i a continuació es deixà refredar fins a t.a. S'induí la cristal·lització rasant amb l'espàtula les parets del matràs i refredant a 0 °C. El sòlid obtingut es filtrà amb una placa filtrant i es rentà amb MeCN (2 x 50 ml). S'assecà parcialment a l'aire i finalment s'acabà d'assecar amb l'ajut del rotavapor amb un bany a 90 °C. D'aquesta manera s'obtingueren 17,302 g (68%) del producte desitjat **162**.

- **1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz):** δ 2,48 (s, 3H, CH_3), 3,13 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH_2CH_2OH), 3,83 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH_2OH), 5,76 (s, 2H, CH_2Ph), 7,36-7,39 (m, 2H, C_6H_5-o), 7,47-7,52 (m, 3H, C_6H_5-m i $-p$), 9,91 (s, 1H, H-2).
- **^{13}C -RMN (CD_3OD , 300 MHz):** δ 11,1 (CH_3), 29,8 (CH_2CH_2OH), 56,9 (CH_2Ph), 60,3 (CH_2OH), 128,4 (C_6H_5-p), 129,6 (C_6H_5-m), 129,7 (C_6H_5-o), 137,0 (C_6H_5-ips), 142,8 (C-4), 156,4 (C-2).
- **EM (ES):** m/z 234,2 (M - Cl) $^+$.

(2*S*,2'*S*,4*R*,5*S*)-4-acetoxi-5-(2'-(*tert*-butoxicarbonil)-2'-aminoetil)-pirrolidin-2-carboxilat de *tert*-butil (164)

En un matràs d'hydrogenació es dissolgué la cetona (**4*R***)-**149** (0,500 g, 0,575 mmol, 1 eq.) en una mescla EtOH:THF (4:1) (50 ml) i s'hi afegí HCl concentrat (5 μ l) i Pd/C 10% (50 mg, 10% en pes). Es purgà el matràs amb H_2 (fent el buit i trencant-lo amb H_2 3 vegades consecutives) i es deixà agitant-se durant 24 h sota una pressió de 8 atm d' H_2 . Passat aquest temps, s'hi afegí novament Pd/C 10% (50 mg) i es deixà agitar durant 24 h més a 8 atm de pressió. La mescla de reacció es filtrà sobre Celite® i es rentà abundantment amb MeOH (3 x 15 ml). El filtrat i els rentats s'ajuntaren i s'evaporaren a pressió reduïda, fins a obtenir un residu que es dissolgué en HCl 0,1 M (15 ml) i es rentà amb Et_2O (3 x 15 ml). La fase aquosa es basificà fins a pH = 9 amb una solució saturada de $NaHCO_3$ i s'extragué amb una mescla de $CHCl_3$: i PrOH (4:1) (4 x 15 ml). Les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren sobre $MgSO_4$, es filtraren i es concentraren a pressió reduïda. El residu obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent un gradient de 3-5% MeOH en CH_2Cl_2 . El primer producte en eluir fou el subproducte (2*S*,4*R*,5*S*)-5-(2'-(*tert*-butoxicarbonil)etil)-4-acetoxipirrolidin-2-carboxilat de *tert*-butil (**4*R***)-**163** (10 mg, 5%).

- **1H -RMN (CD_3OD , 300 MHz):** δ 1,45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,48 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,60-1,90 (m, 2H, H-1'), 2,03 (s, 3H, CH_3), 2,08-2,17 (m, 3H, H-3 i NH), 2,37 (dd, $J = 7,6$ Hz,

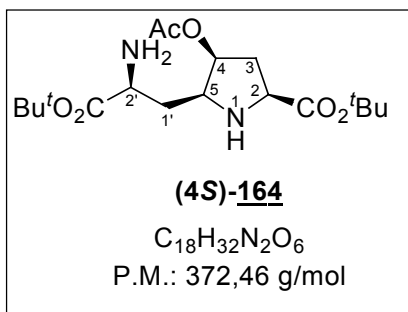
$J = 6,7$ Hz, 2H, H-2'), 3,08 (ddd, $J = 7,6$ Hz, $J = 6,7$ Hz, $J = 3,7$ Hz, 1H, H-5), 3,78 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-2), 4,85 (m, 1H, H-4).

- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz):** δ 21,0 (CH_3), 28,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29,8 (C-1'), 33,4 (C-2'), 36,9 (C-3), 60,3 (C-2), 65,0 (C-5), 79,8 (C-4), 81,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 172,2 (C=O), 174,1 (C=O), 174,1 (C=O).
- **$[\alpha]^{22}_{\text{D}}$:** - 16,7° (c 1,0, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_6$ (M + H) 358,222; mesurat 358,2230.

El segon producte eluït fou el producte desitjat **(4R)-164** (143 mg, 67%)

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,77-1,82 (m, 2H, H-1'), 2,04 (s, 3H, CH_3), 2,05-2,20 (m, 3H, H-3 i NH), 3,31 (dd, $J = 11,0$ Hz, $J = 6,4$ Hz, 1H, H-5), 3,52 (m, 1H, H-2'), 3,82 (t, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-2), 4,84 (m, 1H, H-4).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 21,5 (CH_3), 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36,6 (C-3), 38,0 (C-1'), 53,2 (C-2'), 59,6 (C-2), 61,8 (C-5), 79,1 (C-4), 81,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 81,8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 171,0 (C=O), 173,4 (C=O), 175,4 (C=O).
- **$[\alpha]^{22}_{\text{D}}$:** - 5,7° (c 1,4, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6$ (M + H) 373,2333; mesurat 373,2337.

(2S,2'S,4S,5S)-4-acetoxi-5-(2'-(*tert*-butoxicarbonil)-2'-aminoetil)-pirrolidin-2-carboxilat de *tert*-butil (164)



En un matràs d'hidrogenació es dissolgué la cetona **(4S)-149** (0,250 g, 0,288 mmol, 1 eq.) en una mescla EtOH:THF (7:1) (76 ml) i s'hi afegí HCl concentrat (31 μl) i Pd/C 10% (50 mg, 20% en pes). Es purgà el matràs amb H_2 (fent el buit i trencant-lo amb H_2 3 vegades consecutives) i es deixà agitant-se durant 24 h sota una pressió de 8 atm d' H_2 . La mescla de reacció es filtrà sobre Celite® i es rentà

abundament amb MeOH (3 x 15 ml). El filtrat i els rentats s'ajuntaren i s'evaporaren a pressió reduïda, fins a obtenir un residu que es dissolgué en HCl 0,1 M (15 ml) i es rentà amb Et_2O (3 x 15 ml). La fase aquosa es basificà fins a pH = 9 amb una solució saturada de NaHCO_3 i s'extragué amb una mescla de CHCl_3 :iPrOH (4:1) (4 x 15 ml). Les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren sobre MgSO_4 , es filtraren i es concentraren a pressió reduïda. El residu obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent un gradient de 3-5% MeOH en CH_2Cl_2 . El primer producte en eluir fou el producte desitjat **(4S)-164** (46 mg, 43%).

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,71 (ddd, 1H, $J = 13,8$ Hz, $J = 9,2$ Hz, $J = 4,4$ Hz, H-1'), 1,91 (ddd, $J = 13,6$ Hz, $J = 9,2$ Hz, $J = 4,4$ Hz, 1H, H-1'), 2,01 (s, 3H, CH_3), 2,09 (sa, 2H, H-3 i NH), 2,43 (ddd, $J = 15,0$ Hz, $J = 10,4$ Hz,

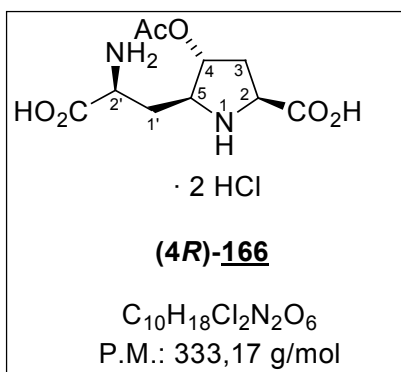
$J = 4,8$ Hz, 1H, H-3), 3,20 (m, 1H, H-5), 3,48 (dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-2'), 3,67 (dd, $J = 9,6$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-2), 5,10 (m, 1H, H-4).

- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 20,6 (CH_3), 27,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 33,3 (C-3), 37,9 (C-1'), 52,9 (C-2'), 58,5 (C-2), 58,9 (C-5), 75,5 (C-4), 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 81,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 170,1 (C=O), 172,9 (C=O), 174,7 (C=O).
- **$[\alpha]^{22}_{\text{D}}$:** + 10° (c 1,35, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6$ (M + H) 373,2333; mesurat 373,2328.

El segon producte eluït fou el subproducte (2*S*,5*R*)-5-(2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-aminoetil)-pirrolidín-2-carboxilat de *tert*-butil **165** (4,5 mg, 5 %)

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 1,33-1,40 (m, 2H, H-4), 1,46 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,80 (ddd, $J = 13,7$ Hz, $J = 9,1$ Hz, $J = 4,8$ Hz, 1H, H-1'), 1,85-1,97 (m, 3H, H-3, H-1, NH), 2,12 (ddd, $J = 17,7$ Hz, $J = 13,0$ Hz, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-3), 3,28-3,37 (m, 1H, H-5), 3,54 (dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-2'), 3,74 (dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 5,2$ Hz, 1H, H-2).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 27,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30,0 (C-3), 31,0 (C-4), 38,2 (C-1'), 52,8 (C-2'), 57,0 (C-2), 59,9 (C-5), 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 81,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 174,3 (CO_2^tBu), 174,4 (CO_2^tBu).
- **$[\alpha]^{22}_{\text{D}}$:** - 11,1° (c 1,0, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ (M + H) 315,2278; mesurat 315,2285.

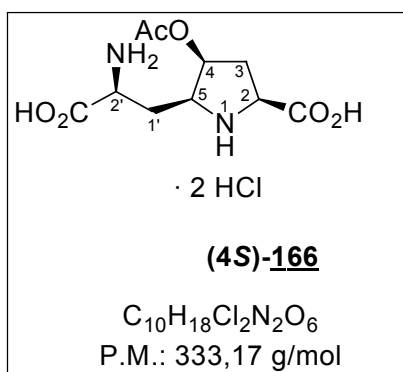
Àcid (2*S*,2'*S*,4*R*,5*S*)-4-acetoxi-5-(2'-amino-2'-carboxietil)-pirrolidín-2-carboxílic (**166**)



A un matràs amb el dièster *tert*-butílic (**4*R*)-164** (120 mg, 0,332 mmol, 1 eq.), se li afegí HCl 4,35 M en dioxà (5 ml) i la mescla de reacció es deixà agitar durant 6 h a t.a. A continuació, es concentrà a pressió reduïda i el residu es coevaporà en primer lloc amb H_2O i seguidament amb CH_2Cl_2 . D'aquesta manera, s'obtingueren 106 mg (99%) de l'hidroclorur (**4*R*)-166** en forma d'escuma blanca.

- **$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz):** δ 2,13 (s, 3H, CH_3), 2,31 (ddd, $J = 14,5$ Hz, $J = 8,2$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H, H-1'), 2,50-2,69 (m, 3H, H-1' i H-3), 4,20 (m, 1H, H-5), 4,29 (dd, $J = 9,4$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H, H-2'), 4,69 (t, $J = 9,4$ Hz, 1H, H-2), 5,31 (dt, $J = 5,4$ Hz, $J = 2,9$ Hz, 1H, H-4).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 300 MHz):** δ 22,7 (CH_3), 30,8 (C-3), 35,6 (C-1'), 50,2 (C-2'), 58,2 (C-2), 64,0 (C-5), 73,3 (C-4), 169,9 (CO_2H), 169,9 (CO_2H), 170,3 (C=O).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6$ (M + H) 261,1089; mesurat 261,1085.

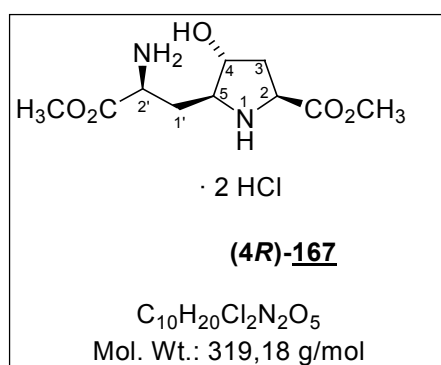
Àcid (2S,2'S,4S,5S)-4-acetoxi-5-(2'-amino-2'-carboxietil)-pirrolidin-2-carboxílic (166)



A un matràs amb el dièster *tert*-butílic **(4S)-165** (197 mg, 0,529 mmol, 1 eq.), se li afegí HCl 3,3 M en dioxà (10 ml) i la mescla de reacció es deixà agitar durant 6 h a t.a. A continuació, es concentrà a pressió reduïda i el residu es coevaporà en primer lloc amb H₂O i seguidament amb CH₂Cl₂. D'aquesta manera, s'obtingueren 174 mg (99%) de l'hidroclorur **(4S)-166** en forma d'escuma blanca.

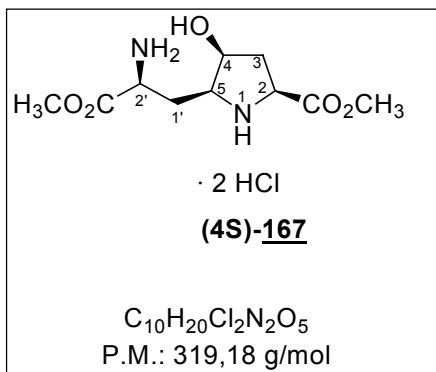
- **¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,37-2,67 (m, 3H, H-1' i H-3), 2,85 (ddd, *J* = 15,0 Hz, *J* = 10,6 Hz, *J* = 4,4 Hz, 1H, H-3), 4,19-4,26 (m, 2H, H-2' i H-5), 4,66 (dd, *J* = 10,4 Hz, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-2), 5,47-5,53 (m, 1H, H-4).
- **¹³C-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 19,0 (CH₃), 26,4 (C-3), 34,1 (C-1'), 49,3 (C-2'), 57,5 (C-2), 60,1 (C-5), 71,6 (C-4), 168,9 (CO₂H), 169,1 (CO₂H), 169,4 (C=O).
- **HRMS:** calc. per C₁₀H₁₇N₂O₆ (M + H) 261,1089; mesurat 261,1081.

(2S,2'S,4R,5S)-5-(2'-metoxicarbonil-2'-aminoetil)-4-hidroxi-pirrolidin-2-carboxilat de metil (167)



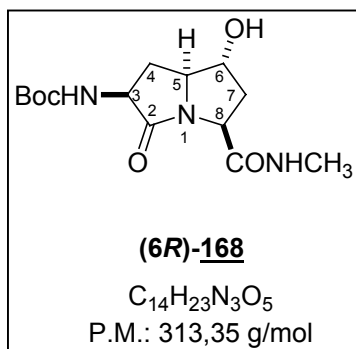
A 14 ml de MeOH a 0 °C, s'hi afegí gota a gota clorur d'acetil (3 ml, 42,2 mmol, 84,4 eq.) i la mescla de reacció es deixà agitar durant 10 min. La solució resultant s'addicionà al diàcid **(4R)-166** (168 mg, 0,50 mmol, 1 eq.) i s'agità a t.a. durant 14 h. Finalment, el contingut del matràs s'evaporà a pressió reduïda fins a obtenir 158 mg (99%) del dièster metílic **(4R)-167**, en forma de sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 2,28 (ddd, *J* = 14,8 Hz, *J* = 8,0 Hz, *J* = 5,2 Hz, 1H, H-1'), 2,37-2,47 (m, 1H, H-1'), 2,48-2,61 (m, 2H, H-3), 3,33 (ddd, *J* = 3,2 Hz, *J* = 1,6 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H, H-5), 3,89 (s, 3H, CH₃), 3,94 (s, 3H, CH₃), 4,38 (dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 5,4 Hz, 1H, H-2'), 4,42 (dd, *J* = 10,4 Hz, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-4), 4,71 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H, H-2).
- **¹³C-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 29,9 (C-3), 34,5 (C-1'), 49,5 (C-2'), 52,4 (OCH₃), 52,6 (OCH₃), 57,3 (C-2), 62,8 (C-5), 72,3 (C-4), 168,1 (CO₂CH₃), 168,5 (CO₂CH₃).
- **HRMS:** calc. per C₁₀H₁₉N₂O₅ (M + H) 247,1288; mesurat 247,1286.

(2S,2'S,4S,5S)-5-(2'-metoxycarbonil-2'-aminoetil)-4-hidroxipirrolidin-2-carboxilat de metil (167)

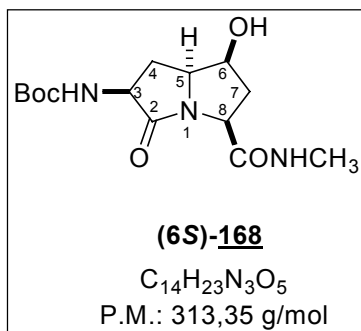
A 14 ml de MeOH a 0 °C, s'hi afegí gota a gota clorur d'acetil (3 ml, 42,2 mmol, 101,2 eq.) i la mescla de reacció es deixà agitar durant 10 min. La solució resultant s'addicionà al diàcid **(4S)-166** (139 mg, 0,417 mmol, 1 eq.) i s'agità a t.a. durant 12 h. Finalment, el contingut del matràs s'evaporà a pressió reduïda fins a obtenir 128 mg (96%) del dièster metílic **(4S)-167**, en forma de sòlid blanc.

- **$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz):** δ 2,36-2,45 (m, 1H, H-1'), 2,50 (sa, 2H, H-1' i H-3), 2,58-2,64 (m, 1H, H-3), 3,33 (m, 1H, H-5), 3,87 (s, 3H, CH_3), 3,92 (s, 3H, CH_3), 4,24-4,40 (m, 1H, H-2'), 4,48-4,54 (m, 1H, H-4), 4,56-4,66 (m, 1H, H-2).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz):** δ 28,6 (C-3), 38,3 (C-1'), 51,2 (C-2'), 54,1 (OCH_3), 54,2 (OCH_3), 59,4 (C-2), 63,3 (C-5), 69,8 (C-4), 170,0 (CO_2CH_3), 170,5 (CO_2CH_3).
- **HRMS:** calc. per $C_{10}H_{19}N_2O_5$ (M + H) 247,1288; mesurat 247,1284.

(3S,5S,6R,8S)-N'-metil-3-[N-(Boc)amino]-6-hidroxi-1-azabicclo-[3.3.0]-octan-2-ona carboxiamida (168)

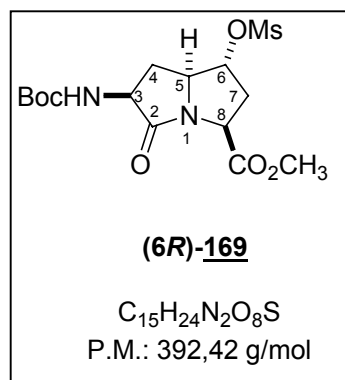
A una dissolució de 10 mg (0,03 mmol, 1 eq.) del bicicle **(6R)-79** en 0,5 ml de MeOH a 0 °C, se li adicionaren 10 ml (20 mmol, 667 eq.) de CH_3NH_2 2 M en MeOH i la mescla es deixà agitar a t.a. durant 18 h. A continuació, s'evaporà a pressió reduïda i es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent una mescla d'hexà:EtOAc (1:1). D'aquesta manera, s'obtingueren 9 mg (96%) de la carboxiamida **(6R)-168**.

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 1,37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2,08 (dd, $J = 21,7$ Hz, $J = 11,0$ Hz, 1H, H-4), 2,27 (dd, $J = 21,7$ Hz, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-4), 2,55 (dd, $J = 12,5$ Hz, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-7), 2,70 (ddd, $J = 12,0$ Hz, $J = 8,4$ Hz, $J = 5,6$ Hz, 1H, H-7), 2,75 (d, $J = 4,6$ Hz, 3H, CH_3), 3,58 (ddd, $J = 9,0$ Hz, $J = 8,7$ Hz, $J = 5,6$ Hz, 1H, H-5), 4,02-4,29 (m, 3H, H-3, H-6 i H-8), 5,16 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, NH), 6,93 (sa, 1H, NH).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 28,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29,7 (CH_3), 31,1 (C-4), 34,3 (C-7), 56,4 (C-8), 57,1 (C-3), 63,1 (C-5), 72,9 (C-6), 80,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155,7 (C=O carbamat), 170,2 (C=O), 170,7 (C=O).
- **HRMS:** calc. per $C_{14}H_{23}N_3O_5\text{Na}$ (M + Na) 336,1529; mesurat 336,1532.

(3S,5S,6S,8S)-N'-metil-3-[N-(Boc)amino]-6-hidroxi-1-azabicclo-[3.3.0]-octan-2-ona carboxiamida (168)

A una dissolució de 9,2 mg (0,029 mmol, 1 eq.) del bicicle (6S)-**79** en 0,5 ml de MeOH a 0 °C, se li addicionaren 10 ml (20 mmol, 690 eq.) de CH_3NH_2 2 M en MeOH i la mescla es deixà agitar a t.a. durant 16 h. A continuació, s'evaporà a pressió reduïda i es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent una mescla d'hexà:EtOAc (1:1). D'aquesta manera, s'obtingueren 8,7 mg (96%) de la carboxiamida (6S)-**168**.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,41 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 2,19 (m, 1H, H-4), 2,38 (dd, $J = 14,7$ Hz, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-4), 2,57 (m, 2H, H-7), 2,77 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H, CH_3), 3,90 (ddd, $J = 7,6$ Hz, $J = 3,5$ Hz, $J = 2,7$ Hz, 1H, H-5), 4,16 (t, $J = 3,3$ Hz, 1H, H-6), 4,40 (t, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-3), 4,47 (t, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-8), 5,34 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, NH), 7,11 (sa, 1H, NH).
- **^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 28,3 ($C(CH_3)_3$), 29,7 (CH_3), 31,9 (C-4), 38,8 (C-7), 55,2 (C-8), 55,5 (C-3), 62,5 (C-5), 70,0 (C-6), 80,7 ($C(CH_3)_3$), 155,8 (C=O carbat), 170,5 (C=O), 174,3 (C=O).
- **HRMS:** calc. per $C_{14}H_{23}N_3O_5N$ (M + Na) 336,1529; mesurat 336,1522.

(3S,5S,6R,8S)-3-[N-(Boc)amino]-6-metansulfoniloximetil-1-azabicclo-[3.3.0]-octan-2-ona 8-carboxilat de metil (169)

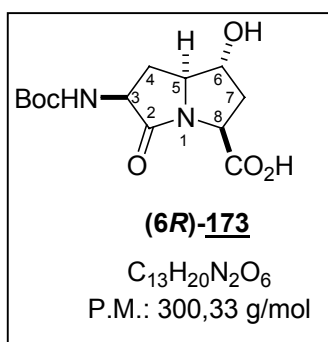
L'alcohol (6R)-**79** (11 mg, 0,035 mmol, 1 eq.) es dissolgué en CH_2Cl_2 (1 ml) i a 0 °C se li afegí DMAP (0,6 mg, $3,5 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0,1 eq.), Et_3N (14,6 μ l, 0,105 mmol, 3 eq.) i $MsCl$ (5,4 μ l, 0,070 mmol, 2 eq.). La mescla de reacció s'agità durant 30 min a 0 °C. A continuació, es retirà el bany de gel i es deixà agitant a t.a. durant 2 h. Passat aquest temps, s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda i el residu es redissolgué en en EtOAc (10 ml) i H_2O (5 ml). Se separaren les fases i la fase orgànica es rentà amb 10% HCl (3 ml), 5% $NaHCO_3$ (3 ml) i H_2O (3 ml). Finalment

s'assecà sobre Na_2SO_4 , es filtrà i es concentrà a sequedat, rendint d'aquesta manera 12,9 mg (94%) del mesilat (6R)-**169**.

- **1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):** δ 1,45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,94-2,02 (m, 1H, H-4), 2,61-2,65 (m, 2H, H-7), 3,09 (s, 3H, S- CH_3), 3,11-3,16 (m, 1H, H-4), 3,81 (s, 3H, OCH_3), 3,77 (ddd, $J = 9,5$ Hz, $J = 7,6$ Hz, $J = 5,5$ Hz, 1H, H-5), 4,32 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, H-6), 4,64 (dt, $J = 11,7$, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-8), 4,92 (dd, $J = 16,2$ Hz, $J = 8,3$ Hz, 1H, H-3), 5,16 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, NH).

- **^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 28,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30,1 (S- CH_3), 38,1 (C-4), 38,6 (C-7), 53,4 (OCH_3), 54,8 (C-8), 55,9 (C-3), 61,2 (C-5), 78,5 (C-6), 80,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155,8 (C=O carbat), 171,0 (C=O), 172,8 (C=O).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ (M + H) 393,1326; mesurat 393,1331.

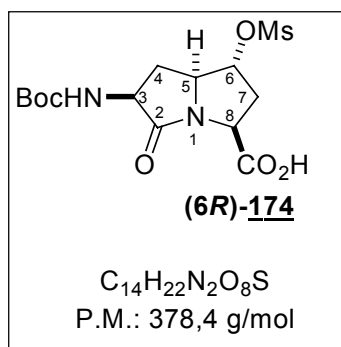
Àcid (3S,5S,6R,8S) 3-[N-(Boc)amino]-6-hidroxi-1-azabicyclo[3.3.0]-octan-2-ona 8-carboxílic (173)



A una dissolució del bicicle **(6R)-79** (25 mg, 0,08 mmol, 1 eq.) en una mescla dioxà:H₂O (1:1) (1,4 ml), se li afegí LiOH (2,9 mg, 0,119 mmol, 1,49 eq.) i s'agità a t.a. durant 2 h. A continuació, el dissolvent s'evaporà a pressió reduïda, el residu es redissolgué en H₂O (2 ml) i la solució s'acidificà a pH = 3 amb HCl 1%. S'extragué amb una mescla de CHCl_3 :*i*-PrOH (4:1) (4 x 10 ml). Les fases orgàniques s'agruparen, s'assecaren sobre Na_2SO_4 i s'evaporaren a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent una mescla CH_2Cl_2 :MeOH (7:3). D'aquesta manera, s'obtingueren 16 mg (67%) de l'àcid desitjat **(6R)-173**.

- **^1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz):** δ 1,47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,83 (dd, $J = 21,6$ Hz, $J = 11,5$ Hz, 1H, H-4), 2,28-2,39 (m, 2H, H-7), 2,72 (m, 1H, H-4), 3,62 (dt, $J = 8,8$ Hz, $J = 5,2$ Hz, 1H, H-5), 4,08-4,14 (m, 2H, H-6 i H-8), 4,66-4,72 (m, 1H, H-3), 6,96 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, NH).
- **^{13}C -RMN (CD_3OD , 400 MHz):** δ 27,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 35,7 (C-4), 40,0 (C-7), 46,9 (C-8), 56,1 (C-5), 62,8 (C-3), 73,2 (C-6), 79,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156,9 (C=O carbat), 172,9 (C=O).
- **$[\alpha]_D^{22}$:** -37,2° (c 1,0, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6$ (M + H) 301,1394; mesurat 301,1400.

Àcid (3S,5S,6R,8S) 3-[N-(Boc)amino]-6-metansulfoniloximetil-1-azabicyclo[3.3.0]-octan-2-ona 8-Carboxílic (174)



A una dissolució de l'èster metílic **(6R)-169** (23 mg, 0,059 mmol, 1 eq.) en una mescla dioxà:H₂O (1:1) (1,4 ml), se li afegí LiOH (2,3 mg, 0,096 mmol, 1,6 eq.) i es deixà agitar a t.a. durant 3 h. La mescla de reacció es concentrà a pressió reduïda i es purificà per cromatografia en columna, fent servir un gradient de 2-5% MeOH en CH_2Cl_2 . L'evaporació de les fraccions recol·lectades rendí 19 mg (86%) de l'àcid **(6R)-174**, en forma d'oli groguenc.

- **^1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz):** δ 1,47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,94-2,03 (m, 1H, H-4), 2,57-2,65 (m, 2H, H-7), 2,76-2,82 (m, 1H, H-4), 3,15 (s, 3H, CH_3), 3,92-4,01 (m, 1H, H-5), 4,10 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-8), 4,70 (dd, $J = 11,6$ Hz, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-3), 4,94-4,97 (m, 1H, H-6).

- **^{13}C -RMN (CD_3OD , 400 MHz):** δ 26,9 (C(CH_3)₃), 35,1 (C-4), 36,1 (CH₃), 37,8 (C-7), 55,3 (C-8), 57,1 (C-5), 60,5 (C-3), 78,2 (C-6), 78,8 (C(CH_3)₃), 156,2 (C=O caramat), 172,2 (C=O), 175,1 (C=O).
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$:** -14,4° (c 1,0, MeOH).
- **HRMS:** calc. per $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ (M + H) 379,1170; mesurat 379,1163.

7.3. EXPERIMENTAL CAPÍTOL 4

7.3.1. Principals dissolvents i reactius

Dissolvents:

- *N,N*-Dimetilformamida SDS (qualitat síntesi peptídica)
 - Diclorometà SDS (qualitat anàlisi), filtrat sobre Al₂O₃
 - Piperidina SDS (qualitat síntesi peptídica)
-

Dissolvents HPLC:

- Acetonitril J.T. Baker, Ultra Gradient HPLC Grade
 - H₂O Milli-Q (sistema de filtració de Millipore)
 - Metanol Chromanorm fro HPLC Isocratic Grade
 - TFA Fluorochem
-

AminoàcidsNovabiochem

Agents acoblants i altres:

- HBTU Novabiochem
 - DIPCDI Fluka
 - PyBOP Novabiochem
 - HOBt Novabiochem
 - DMAP Fluka
 - DIEA Merck
-

Reactius tests colorimètrics:

- Ninhidrina Merck
 - Verd de malalquita Aldrich
 - Cloranil Fluka
-

Resines

Novabiochem

- Wang
 - Rink amida
-

Taula 17: Principals reactius i dissolvents emprats en l'experimental del Capítol 4

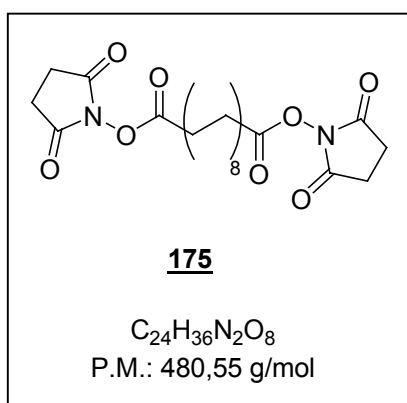
7.3.2 Material i instrumentació

HPLC analític	Waters, constituït per una bomba binària model 1525, un autoinjector model 717 plus, un detector de longitud d'ona dual model 2487 i un programa de control <i>Breeze</i> versió 3.2. <u>Columna</u> : <i>Symmetry C₁₈</i> , 4,6 x 150 mm, 5 µm (Waters)
HPLC semipreparatiu	Waters <i>Delta Prep</i> . 4000, constituït per Waters Prep LC Controller, un detector de longitud d'ona dual model 2487, un col·lector de fraccions Waters <i>Fraction Collector II</i> i un programa de control <i>MassLynx</i> versió 3.5. <u>Columna</u> : <i>Symmetry C₁₈</i> , 19 x 100 mm, 5 µm
Espectròmetre de masses	MALDI-TOF model Proteomics Analyzer 4700 d'Applied Biosystems
Espectròmetre d'UV-visible	Shimadzu, model UV-2501 PC
Liofilitzador	Virtis, model Freezmobile 12 EL
Anàlisi d'aminoàcids	Beckman System 6300
Centrífuga	Beckman Coulter, model <i>Allegra 21</i>

Taula 18: Principals instruments emprats en l'experimental del Capítol 4

7.3.3 Síntesi en solució d'intermedis

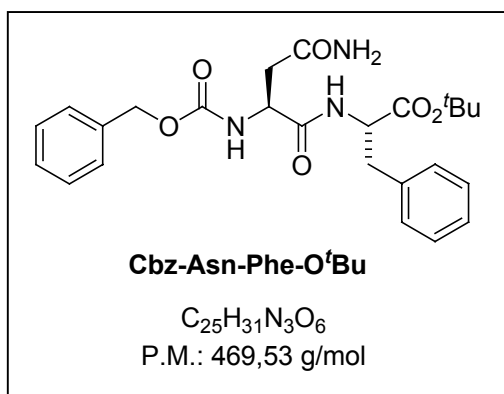
Éster *N*-Hidroxisuccinimídic de l'àcid hexadecandioic (**175**)



A una dissolució de l'àcid hexadecandioic (1,00 g, 3,49 mmol, 1 eq.) en DMF (30 ml), se li addicionà DMAP (0,938 g, 7,68 mmol, 2,2 eq.) i carbonat de *N,N'*-disuccinimidil (2,324 g, 9,07 mmol, 2,6 eq.). S'observà un bomboleig i al cap de poc temps, la solució s'enterbolí. Es deixà agitar a t.a. durant 12 h i a continuació es filtrà el precipitat blanc format. D'aquesta manera s'obtingueren 1,29 g (77%) del dièster desitjat **175**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,26 (sa, 16H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12), 1,29-1,33 (m, 4H, H-4 i H-13), 1,74 (m, 4H, H-3 i H-14), 2,60 (t, *J* = 7,6 Hz, H-2 i H-15), 2,83 (sa, 8H, N-CH₂CH₂-N).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 24,8 (C-3 i C-14), 25,8 (N-CH₂CH₂-N), 29,0, 29,3, 29,5, 29,7 i 29,8 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12 i C-13), 31,2 (C-2 i C15), 168,9 (C-1 i C-16), 169,4 (O=C-N-C=O).
- **IR (NaCl):** ν 2920, 2850, 1728 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 481,4 (M + H)⁺.

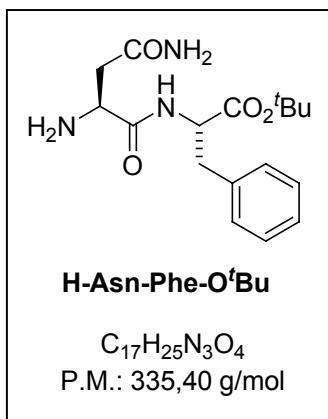
Cbz-Asn-Phe-O^tBu



A una suspensió de Cbz-Asn-OH (2,30 g, 8,5 mmol, 1 eq.) i H-Phe-O^tBu (2,20 g, 8,5 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ (150 ml), se li addicionà HOBt (1,60 g, 12 mmol, 1,41 eq.), HBTU (3,6 g, 8,9 mmol, 1,05 eq.) i DIEA (4,5 ml, 25,7 mmol, 3 eq.). La suspensió esdevingué una solució i es deixà agitant durant 4 h. Es rentà la mescla de reacció amb una solució saturada de NaCl (2 x 300 ml), amb àcid cítric 5% (2 x 200 ml), amb una

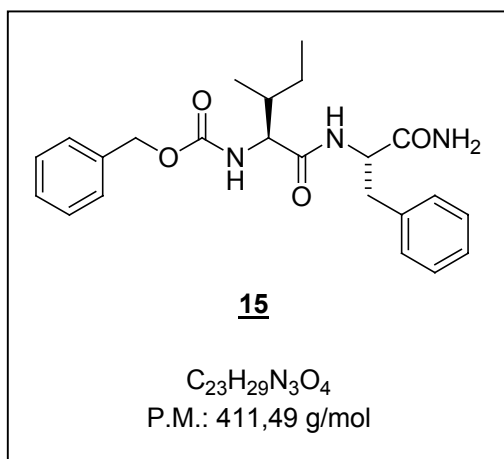
solució saturada de NaHCO₃ (2 x 200 ml) i finalment una altra vegada amb una solució saturada de NaCl (2 x 300 ml). S'assecà la fase orgànica amb Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir EtOAc com a eluent, obtenint-se d'aquesta manera 3,99 g (94%) del dipèptid desitjat **Cbz-Asn-Phe-O^tBu**, en forma de sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,60 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,57 (dd, *J* = 15,6 Hz, *J* = 2,6 Hz, 1H, CH₂CONH₂), 2,93 (dd, *J* = 15,4 Hz, *J* = 2,2 Hz, 1H, CH₂CONH₂), 3,05 (dd, *J* = 6,0 Hz, *J* = 3,6 Hz, 2H, CH₂Ph), 4,53 (m, 1H, H_α Asn), 4,67 (dt, *J* = 7,6 Hz, *J* = 6,4 Hz, 1H, H_α Phe), 5,10 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H, OCH₂Ph), 5,35 (sa, 1H, NH), 5,76 (sa, 1H, NH), 6,32 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, CONH₂), 7,17-7,36 (m, 10H, 2 C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 28,1(C(CH₃)₃), 36,9 (CH₂CONH₂), 38,2 (CH₂Ph), 51,6 (C_α Asn), 54,3 (C_α Phe), 67,4 (OCH₂Ph), 82,5 (C(CH₃)₃), 127,2 (C₆H₅), 128,3 (C₆H₅), 128,4 (C₆H₅), 128,6 (C₆H₅), 128,8 (C₆H₅), 129,7 (C₆H₅), 136,3 (C₆H₅-*ipso*), 136,3 (C₆H₅-*ipso*), 156,4 (C=O carbamat), 170,2 (C=O Asn), 170,5 (CO₂^tBu), 173,5 (CONH₂).
- **EM-ES:** m/z 492,3 (M + Na)⁺, 470,3 (M + H)⁺, 414,3 (M - ^tBu)⁺.

H-Asn-Phe-O^tBu

Es dissolgué el dipèptid **Cbz-Asn-Phe-O^tBu** (3,565 g, 7,57 mmol, 1 eq.) en MeOH (100 ml) i se li afegí Pd/C (10%) (0,350 g). S'hidrogenà la mescla de reacció per mitjà d'un globus ple d'H₂ i es deixà agitar a t.a. durant 12 h. Es filtrà la mescla de reacció amb un doble filtre de plecs i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda, rendint 2,411 g (95%) del dipèptid **H-Asn-Phe-O^tBu**, en forma d'oli incolor.

- **¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,38 (dd, *J* = 15,2 Hz, *J* = 8,6 Hz, 1H, CH₂CONH₂), 2,60 (dd, *J* = 15,2 Hz, *J* = 4,4 Hz, 1H, CH₂CONH₂), 3,01 (dd, *J* = 14,0 Hz, *J* = 7,6 Hz, 1H, CH₂Ph), 3,08 (dd, *J* = 14,0 Hz, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH₂Ph), 3,66 (dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 4,4 Hz, 1H, H_α Asn), 4,55 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H, H_α Phe), 7,20-7,30 (m, 10H, 2 x C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 27,0 (C(CH₃)₃), 37,5 (CH₂Ph), 39,9 (CH₂CONH₂), 51,9 (C_α Asn), 54,4 (C_α Phe), 81,9 (C(CH₃)₃), 126,7 (C₆H₅), 129,3 (C₆H₅), 129,8 (C₆H₅), 136,8 (C₆H₅-*ipso*), 170,8 (C=O), 174, 7 (C=O), 175,0 (C=O).
- **EM-ES:** m/z 336,3 (M + H)⁺, 280,2 (M – C(CH₃)₃)⁺, 263,2 (M – O^tBu)⁺.

Cbz-Ile-Phe-NH₂

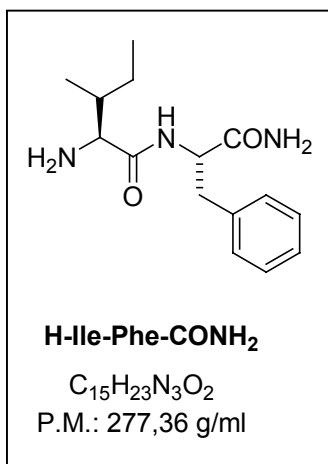
A una suspensió de Cbz-Ile-OH (4,775 g, 18 mmol, 1 eq.) i H-Phe-NH₂·HCl (3,613 g, 18 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ (250 ml), se li addicionà HOBt (3,886 g, 25,38 mmol, 1,41 eq.), HBTU (7,169 g, 18,9 mmol, 1,05 eq.) i DIPEA (9,2 ml, 54,10 mmol, 3 eq.). Es formà una espècie de gel blanquinós, que es deixà agitar a t.a. durant 3,5 h. Es rentà la mescla de reacció amb una solució saturada de NaCl (2 x 300 ml), amb àcid cítric 5% (2 x 300 ml), amb una solució saturada de NaHCO₃ (2 x 300 ml) i finalment una altra vegada amb una solució

saturada de NaCl (2 x 300 ml). La fase orgànica s'evaporà a pressió reduïda i el cru obtingut (7,259 g, 98%), s'utilitzà sense prèvia purificació en la següent reacció.

- **¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ 0,65 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CHCH₃), 0,72 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0,94-1,06 (m, 1H, CH₂CH₃), 1,22-1,31 (m, 1H, CH₂CH₃), 1,56-1,65 (m, 1H, CH(CH₃)(CH₂CH₃)), 2,78 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 9,2 Hz, 1H, CH₂Ph), 2,97 (dd, *J* = 13,8 Hz, *J* = 5,0 Hz, 1H, CH₂Ph), 3,81 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H_α Ile), 4,47 (td, *J* = 8,4 Hz, *J* = 5,2 Hz, 1H, H_α Phe), 5,01 (sa, 2H, OCH₂Ph), 7,05 (sa, 1H, NH), 7,11-7,37 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 7,88 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, NH).

- **¹³C-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ 11,6 (CH₂CH₃), 15,9 (CH₃), 24,9 (CH₂CH₃), 37,0 (CH(CH₃)(CH₂CH₃)), 38,4 (CH₂Ph), 54,2 (C_α Phe), 60,2 (C_α Ile), 66,1 (OCH₂Ph), 126,8 (C₆H₅), 128,3 (C₆H₅), 128,4 (C₆H₅), 128,6 (C₆H₅), 129,0 (C₆H₅), 129,8 (C₆H₅), 137,7 (C₆H₅-ipso), 138,4 (C₆H₅-ipso), 156,7 (C=O caramat), 171,5 (CONH), 173,4 (CONH).
- **EM-ES:** m/z 412,5 (M + H)⁺, 395,5 (M – NH₂)⁺, 367,5 (M – CONH₂)⁺.

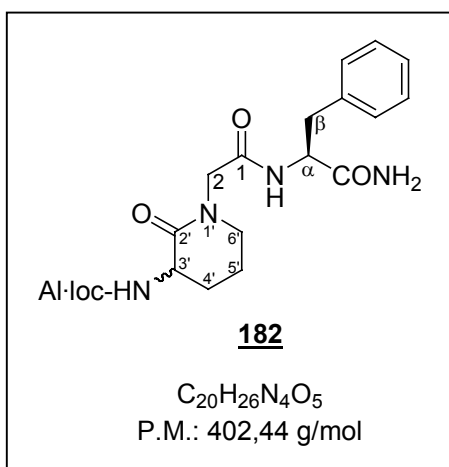
H-Ile-Phe-NH₂



Es suspengué el dipèptid **Cbz-Ile-Phe-CONH₂** (7,240 g, 17,59 mmol, 1 eq.) en MeOH (500 ml) i se li afegí Pd/C 10% (0,724 g), obtenint-se així una suspensió grisosa. S'hidrogenà la mescla de reacció per mitjà d'un globus ple d'H₂ i es deixà agitar a t.a. durant 12 h, temps en el qual la suspensió esdevingué una dissolució. Es filtrà la mescla de reacció amb un doble filtre de plecs i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda, rendint 4,760 g (98%) del dipèptid **H-Ile-Phe-CONH₂**, en forma de sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 0,79 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0,81 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CHCH₃), 0,96-1,00 (m, 1H, CH₂CH₃), 1,16-1,19 (m, 1H, CH₂CH₃), 1,63-1,65 (m, 1H, CHCH₃), 2,92 (dd, J = 13,6, J = 9,2 Hz, 1H, CH₂Ph), 3,16 (m, 2H, CH₂Ph i H_α Ile), 4,65 (dd, J = 9,2 Hz, J = 5,6 Hz, 1H, H_α Phe), 7,17-7,29 (m, 5H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CD₃OD, 400 MHz):** δ 10,8 (CH₂CH₃), 14,8 (CH₃), 23,7 (CH₂CH₃), 38,0 (CH₂Ph), 38,6 (CH(CH₃)(CH₂CH₃)), 54,2 (C_α Phe), 59,7 (C_α Ile), 126,6 (C₆H₅), 128,3 (C₆H₅), 129,1 (C₆H₅), 137,2 (C₆H₅-ipso), 175,0 (C=O), 175,5 (C=O).
- **EM-ES:** m/z 278,3 (M + H)⁺, 261,2 (M – NH₂)⁺, 233,3 (M – CONH₂)⁺.

Àcid N-Alloc-3-amino-2-oxopiperidinil acètic (**182**)



A una dissolució de l'àcid **82** (0,330 g, 0,390 mmol, 1eq.) en CH₂Cl₂ (13 ml), se li addicionà DIEA (204 μl, 1,171 mmol, 3 eq.), PyBOP (304 mg, 0,585 mmol, 1,5 eq.) i HOBt (896 mg, 0,585 mmol, 1,5 eq.). A continuació se li afegí H-Phe-NH₂·HCl (86 mg, 0,429 mmol, 1,1 eq.) dissolt en CH₂Cl₂ (1 ml) i amb 2 gotes de DIEA per tal d'alliberar l'amina. La mescla s'agità a t.a. durant 12 h. Seguidament, s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda i el cru es purificà per cromatografia en columna, fent servir CH₂Cl₂ com a eluent. Per tal de separar la mescla diastereomèrica

obtinguda, es procedí a fer una purificació per HPLC semipreparativa, fent servir un gradient de 25% a 32% de MeCN en 15 min. D'aquesta manera, s'obtingueren 172 mg (33%) del

diastereòmer **182a**, 121 mg (23%) del diastereòmer **182b** i 51 mg (10%) de la mescla dels dos diastereòmers.

Diastereòmer **182a**:

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,88 (sa, 2H, H-5'), 2,26 (sa, 2H, H-4'), 3,04 (sa, 1H, H-βa), 3,18 (sa, 2H, H-βb, H-2a), 3,43 (sa, 1H, H-6'a), 3,55 (sa, 1H, H-6'b), 4,00 (sa, 1H, H-3'), 4,35 (sa, 1H, H-2b), 4,52 (sa, 2H, OCH₂), 4,68 (sa, 1H, H-α), 5,19 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,27 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,79-6,10 (m, 2H, CH=CH₂, NH), 6,74 (sa, 1H, NH), 7,18-7,37 (m, 5H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,3 (C-5'), 28,0 (C-4'), 37,6 (C-β), 50,1 (C-6'), 52,2 (C-3'), 52,3 (C-2), 54,9 (C-α), 68,4 (OCH₂), 118,2 (CH=CH₂), 127,2 (C₆H₅-p), 128,9 i 129,0 (C₆H₅-o,m), 132,6 (CH=CH₂), 136,8 (C₆H₅-ipso), 156,8 (C=O carbat), 169,2 (C=O), 171,2 (C=O), 175,0 (C=O).
- **IR (NaCl):** ν 3306, 3061, 3023, 2940, 2870, 1666 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 425,2 (M + Na)⁺, 403,2 (M + H)⁺, 239,2 (M – Phe-NH₂)⁺, 211,2 (M – CONH-Phe-NH₂)⁺.
- **AE:** Calc. per C₂₀H₂₆N₄O₅: C (59,69%); H (6,51%); N (13,92%); O (19,88%)
Trobada: C (59,13%); H (6,30%); N (14,29%); O (20,28%)

Diastereòmer **182b**:

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 1,74-1,94 (m, 2H, H-5'), 2,08-2,24 (m, 2H, H-4'), 2,72 (sa, 2H, NH₂), 3,02-3,12 (m, 3H, H-6', H-βa), 3,24 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H-2a), 3,43 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H, H-βb), 3,66-3,78 (m, 1H, H-3'), 4,53 (dd, *J* = 13,4 Hz, *J* = 5,4 Hz, 1H, OCH₂), 4,62 (dd, *J* = 13,4 Hz, *J* = 5,0 Hz, 1H, OCH₂), 4,53-4,62 (m, 1H, H-2b), 4,74 (sa, 1H, H-α), 5,24 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,33 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,69 (sa, 1H, NH), 5,91 (ddd, *J* = 22,2 Hz, *J* = 10,8 Hz, *J* = 5,4 Hz, 1H, CH=CH₂), 6,58 (sa, 1H, NH), 7,18-7,44 (m, 5H, C₆H₅).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz):** δ 21,5 (C-5'), 28,2 (C-4'), 36,6 (C-β), 50,1 (C-6'), 52,3 (C-3'), 53,0 (C-2), 54,6 (C-α), 66,5 (OCH₂), 118,4 (CH=CH₂), 126,9 (C₆H₅-p), 128,7 i 129,4 (C₆H₅-o,m), 132,4 (CH=CH₂), 137,9 (C₆H₅-ipso), 156,9 (C=O carbat), 168,2 (C=O), 170,6 (C=O), 174,5 (C=O).
- **IR (NaCl):** ν 3275, 3064, 3027, 2943, 2873, 1716, 1663 cm⁻¹.
- **EM-ES:** m/z 425,2 (M + Na)⁺, 403,2 (M + H)⁺, 239,2 (M – Phe-NH₂)⁺, 211,2 (M – CONH-Phe-NH₂)⁺.
- **AE:** Calc. per C₂₀H₂₆N₄O₅: C (59,69%); H (6,51%); N (13,92%); O (19,88%)
Trobada: C (59,65%); H (6,21%); N (13,86%); O (20,28%)

7.3.4 Protocols generals per a la síntesi peptídica en fase sòlida

Per la síntesi en fase sòlida s'han utilitzat suports polimèrics d'estirè amb un 1% de divinilbenzè, funcionalitzats de diferent manera, en funció de l'estratègia sintètica i de la naturalesa del compost a sintetitzar. S'han emprat xeringues de polipropilè equipades amb una placa filtrant de polietilè porós. La resina es manté a la xeringa, on s'hi afegeix la quantitat de reactiu i/o dissolvent necessària, de manera que la resina quedi ben coberta i solvatada. L'agitació es duu a terme per mitjà de varetes de tefló i un cop finalitzada la reacció, el dissolvent i els excessos de reactius s'eliminen per filtració. La síntesi manual múltiple en paral·lel s'ha dut a terme en un bloc de polipropilè VacMan® de 20 posicions (Fig. 109), equipat amb claus giratòries que connecten amb un dipòsit central, sobre les quals es col·loquen les xeringues. En un dels laterals, trobem l'entrada del sistema de buit, per tal de facilitar la filtració dels residus provinents de les diferents etapes de rentat.



Figura 109: VacMan®

Protocol d'incorporació del primer aminoàcid sobre el suport polimèric

Resina Wang

El primer aminoàcid s'incorpora sobre la resina Wang per formació d'un enllaç éster, emprant com a catalitzador la dimetilaminopiridina (DMAP).

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DMF	Solvatació	1	10 min
2	10 eq. Fmoc-Aa-OH 5 eq. DIPCDI 0,1 eq. DMAP	Acoblament	1	1 h
3	DMF	Rentat	5	30 s

Taula 19: Cicle d'incorporació del primer aminoàcid a la resina Wang

Se solvata la resina amb DMF durant 10 min. En un tub a part, es dissol el Fmoc-Aa-OH en la mínima quantitat necessària de DCM (amb unes gotes de DMF en cas necessari) i s'hi addiciona la DIPCDI. Es barreja bé amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i s'aboca sobre la resina. Finalment, s'hi afegeix el DMAP i es deixa reaccionant durant 1 h, amb agitació manual ocasional.

Resina Rink amida MBHA

El primer aminoàcid s'incorpora sobre la resina Wang per formació d'un enllaç amida. Aquesta resina ens permet l'obtenció de la peptidil carboxamida.

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DMF	Solvatació	1	10 min
2	Piperidina 20% en DMF	Desprotecció	3	10 min
3	DMF	Rentat	5	30 s
4	DCM	Rentat	5	30s
5	DMF	Rentat	5	30 s
6	5 eq. Fmoc-Aa-OH 5 eq. HOBt 5 eq. DIPCDI	Acoblament	1	3 h
7	DMF	Rentat	5	30 s

Taula 20: Cicle d'incorporació del primer aminoàcid a la resina Rink amida MBHA

Se solvata la resina amb DMF durant 10 min. Com que la resina està protegida, en primer lloc cal fer la desprotecció del grup Fmoc amb piperidina 20% en DMF. En un tub a part, es dissol el Fmoc-Aa-OH i l'HOBt en la mínima quantitat necessària de DMF i s'hi addiciona la DIPCDI. Es barreja bé amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i s'aboca sobre la resina. Es deixa reaccionant durant 3 h amb agitació manual ocasional.

Resina de Barlos (2-CITritil)

El primer aminoàcid s'incorpora sobre la resina de Barlos mitjançant una substitució nucleòfila sota condicions suaus. Aquesta resina ens permet l'obtenció de la peptidil carboxiàcid amb els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids. Degut a l'elevada sensibilitat envers els àcids d'aquesta resina, cal que el DCM utilitzat es filtri prèviament sobre una columna d'Al₂O₃.

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DCM	Solvatació	1	10 min
2	1,2 eq. Fmoc-Aa-OH 4 eq. DIEA	Acoblament	1	2 h
3	DCM	Rentat	5	30 s
4	DMF	Rentat	5	30 s
5	DCM	Rentat	5	30 s

Taula 21: Cicle d'incorporació del primer aminoàcid a la resina de Barlos

Se solvata la resina amb DCM durant 10 min. En un tub a part, es dissol el Fmoc-Aa-OH i DIEA en la mínima quantitat necessària de DCM (amb unes gotes de DMF en cas necessari). Es barreja bé amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i s'aboca sobre la resina. Es deixa reaccionant durant 2 h amb agitació manual ocasional.

Protocol d'eliminació del grup Fmoc

Als aminoàcids o pseudodipèptids protegits amb el grup Fmoc, se'ls hi aplica el protocol descrit a la Taula 22, per tal d'eliminar-ne el grup protector.

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DMF	Solvatació	1	10 min
2	Piperidina 20% en DMF	Desprotecció	3	10 min
3	DMF	Rentat	5	30 s
4	DCM	Rentat	5	30 s
5	DMF	Rentat	5	30 s

Taula 22: Cicle d'eliminació del grup Fmoc

Se solvata la resina amb DMF durant 10 min i es fan 3 cicles de 10 min, afegint una dissolució de piperidina 20% en DMF, amb agitació manual ocasional.

Protocol de determinació del grau de funcionalització de la resina

Es pesen 3 alíquotes de la Fmoc-peptidil-resina seca (aprox. 5 μ mol) en 3 matrassos aforats de 10 ml. S'hi afegeix a cadascun 2 ml de piperidina 20% en DMF i es mescla bé amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur durant 30 min. A continuació s'enrasen els matrassos amb MeCN. S'agafen 2 ml d'aquestes solucions i es dilueixen en un aforat de 25 ml. De la mateixa manera, sense incorporar-hi la resina, es prepara una mostra patró que ens servirà de referència. S'omplen les cubetes d'UV amb 3 ml d'aquesta solució i es mesura l'absorbància a 304 nm. La funcionalització es pot calcular aplicant la següent fórmula:

$$\text{Funcionalització} = (\text{Abs}_{\text{mostra}} - \text{Abs}_{\text{ref}}) \times 163,96 / \text{mg de resina}$$

Protocol d'eliminació del grup Al·loc

Als pseudodipeptids protegits amb el grup Al·loc, se'ls hi aplica el protocol descrit a la Taula 23, per tal d'eliminar-ne el grup protector.

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DCM	Solvatació	1	10 min
2	10 eq. PhSiH ₃ 0,1 eq. Pd(Ph ₃) ₄	Desprotecció	3	20 min
3	DCM	Rentat	5	30 s
4	DMF	Rentat	5	30 s
5	DCM	Rentat	5	30 s

Taula 23: Cicle d'eliminació del grup Al·loc

Se solvata la resina amb DCM durant 10 min. Es fan 3 cicles de 20 min, afegint en primer lloc el Pd(Ph₃)₄ sòlid i seguidament el PhSiH₃, amb agitació manual ocasional.

Protocol de síntesi peptídica en fase sòlida amb l'estratègia Fmoc/^tBu

El creixement de la cadena peptídica es realitza mitjançant el protocol especificat a la Taula 24:

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DMF	Solvatació	1	10 min
2	Piperidina 20% en DMF	Desprotecció	3	10 min
3	DMF	Rentat	5	30 s
4	DCM	Rentat	5	30 s
5	DMF	Rentat	5	30 s
6	Fmoc-Aa-OH Agent acoblant	Acoblament	1	1 h
7	DMF	Rentat	5	30 s
8	DCM	Rentat	5	30 s
9	DMF	Rentat	5	30 s

Taula 24: Protocol general d'acoblament per a l'estratègia de síntesi Fmoc/Bu

DIPCDI/HOBt

Aquest mètode es basa en la formació de l'éster benzotriazole del Fmoc-Aa-OH. Els reactius que es fan servir són:

3 eq. Fmoc-Aa-OH

3 eq. DIPCDI

3 eq. HOBt

Es dissol l'aminoàcid protegit i l'HOBt en la mínima quantitat necessària d'una mescla DCM:DMF (1:1) i s'hi afegeix la DIPCDI. Es barreja amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i s'addiciona sobre la resina prèviament solvatada. Es deixa reaccionar durant 1 h amb agitació manual ocasional.

PyBOP/HOBt/DIEA

Aquests mètode es basa també en la formació de l'éster benzotriazole del Fmoc-Aa-OH i s'ha utilitzat per l'acoblament dels pseudodipèptids. Els reactius que es fan servir són:

3 eq. Fmoc-Aa-OH

3 eq. PyBOP

3 eq. HOBt

6 eq. DIEA

Es dissol l'aminoàcid protegit, el PyBOP i l'HOBt en la mínima quantitat necessària de DMF, s'hi afegeix la DIEA i immediatament s'addiciona sobre la resina prèviament solvatada amb DMF. Es deixa reaccionar durant 1 h amb agitació manual ocasional.

HBTU/HOBt/DIEA

Aquests mètode es basa també en la formació de l'éster benzotriazole del Fmoc-Aa-OH i s'ha utilitzat, alternativament al mètode del PyBOP, per l'acoblament dels pseudodipèptids. S'ha de prendre la precaució de no utilitzar mai un excés dels reactius d'acoblament basats en l'ió amini (com és el cas de l'HBTU) en relació amb l'amino àcid, ja que poden provocar la formació de guanidini, inactivant l'extrem *N*-terminal. Els reactius que es fan servir són:

3 eq. Fmoc-Aa-OH

2,9 eq. HBTU

3 eq. HOBt

6 eq. DIEA

Es dissol l'aminoàcid protegit, el PyBOP i l'HOBt en la mínima quantitat necessària de DMF, s'hi afegeix la DIEA i immediatament s'addiciona sobre la resina prèviament solvatada amb DMF. Es deixa reaccionar durant 1 h amb agitació manual ocasional.

Protocol general d'acetilació d'amines

Per tal d'acetilar les amines ancorades en el suport polimèric que no s'hagin acoblat i evitar la formació de subproductes peptídics de difícil separació, es segueix el protocol que es mostra a la Taula 25:

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DCM	Solvatació	1	10 min
2	10 eq. Ac ₂ O 10 eq. DIEA	Acetilació	2	20 min
3	DCM	Rentat	5	30 s

Taula 25: Protocol general d'acetilació d'amines

Se solvata la resina amb DCM durant 10 min. Es fan 2 cicles de 20 min, afegint en primer lloc el Ac₂O i seguidament la DIEA, amb agitació manual ocasional.

Protocol d'escissió del pèptid de la resina

Resina Wang i Rink amida MBHA

Abans de procedir a l'escissió del pèptid, cal eliminar el grup Fmoc del darrer aminoàcid, fent ús del protocol descrit a la Taula 22. Degut a la variabilitat del comportament de les diferents peptidil resines envers aquesta etapa, és convenient fer una prova preliminar a petita escala, per comprobar que les condicions de reacció són les idònies (*scavenger* i temps de reacció adequats). En el cas dels inhibidors sintetitzats en la present Tesi doctoral, degut a l'absència de grups protectors molt reactius, s'utilitzà TFA:H₂O (95:5) en el tractament acidolític.

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DMF	Rentat	5	30 s
2	DCM	Rentat	5	30 s
3	TFA:H ₂ O (95:5)	Escissió	1	2 h
4	TFA	Rentat	2	30 s

Taula 26: Protocol d'escissió del pèptid de la resina Wang i Rink amida MBHA

Després del tractament acidolític, es filtra al buit i el filtrat es recull en un matràs de vidre, on s'evapora el TFA sota corrent de N₂. A continuació s'hi afegeix TBME fred, es centrifuga i es decanta. Finalment el residu es dissol amb H₂O i MeCN, es liofilitza, s'analitza per HPLC i MALDI-TOF i en cas necessari, es purifica per HPLC semipreparativa.

Resina de Barlos

L'escissió de l'enllaç pèptid-resina mantenint els grups protectors de les cadenes laterals es pot dur a terme en el cas de la resina Barlos, fent servir el protocol descrit a la Taula 27.

Etapa	Reactius	Operació	Nº de tractaments	Temps
1	DCM	Rentat	5	30 s
2	DCM	Solvatació	1	10 min
3	1% TFA en DCM	Escissió	3	2 min
4	DCM	Rentat	5	30 s

Taula 27: Protocol d'escissió del pèptid protegit de la resina de Barlos

Després del tractament acidolític, es filtra al buit i el filtrat es recull en un matràs de vidre que conté una solució de pirdina 1% en DCM. El dissolvent s'evapora a pressió reduïda, el cru obtingut es redissol H₂O i MeCN i es liofilitza. Finalment, s'analitza per HPLC i MALDI-TOF i en cas necessari, es purifica per HPLC semipreparativa.

7.3.5 Mètodes analítics

Per al seguiment de reaccions en fase sòlida, s'han utilitzat una sèrie de tests colorimètrics que permeten avaluar la progressió de la reacció de manera qualitativa.¹⁸²

Tests colorimètrics

Test de ninhidrina¹⁸³ en suport polimèric. Detecció d'amines primàries

Aquest test permet detectar la presència d'amines primàries en un polímer, i s'utilitza per avaluar qualitativament l'extensió d'una reacció sobre un suport polimèric quan el producte de partida o el producte final tenen un grup amino primari. Per realitzar aquest test cal preparar els següents reactius:

Solució A: Es dissolen 40 g de fenol en 10 ml d'etanol absolut. Paral·lelament, es prepara una solució de 65 mg de KCN en 100 ml d'H₂O, i 2 ml d'aquesta solució es dilueixen en 100 ml de piridina acabada de destil·lar sobre ninhidrina. Tant la solució de fenol com aquesta última s'agiten per separat durant 45 min amb 4 g de resina Amberlite MB-3, es filtren i es mesclen.

Solució B: Es dissolen 2,5 g de ninhidrina en 50 ml d'etanol absolut. La solució es manté protegida de la llum.

El procediment experimental consisteix en afegir 3 gotes de solució A i 1 gota de la solució B sobre unes quantes boles de resina i esclafar durant 3 min a 110 °C.

Test +: aparició de color blau

Test -: resina incolora

Test de cloranil¹⁸⁴ en suport polimèric. Detecció d'amines secundàries

Aquest test permet la detecció d'amines secundàries. Es prepara una solució saturada de cloranil en toluè.

El procediment experimental consisteix en rentar unes quantes boles de resina amb metanol, assecar-les i afegir-hi 50 µl de la solució de cloranil i 200 µl d'acetona. S'agita durant 5 min a t.a.

¹⁸² Vázquez, J.; Qushair, G.; Albericio, F.; "Qualitative colorimetric tests for solid phase synthesis", *Methods in Enzymology*, **2003**, 369, (Combinatorial Chemistry, Part B), 21-35.

¹⁸³ Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I.; "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides"; *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598.

¹⁸⁴ a) Christensen, T.; "A chloranil color test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis"; *Pept., Struct. Biol. Funct. Proc. Am. Pept. Symp.*, 6th, **1979**, 385-388; b) Christensen, T.; *Acta. Chem. Scand. B*, **1979**, 33, 763.

Test +: aparició de color blau-verd

Test -: resina incolora

Test de verd de malaquita¹⁸⁵ en suport polimèric. Detecció d'àcids carboxílics

Aquest test serveix per la detecció d'àcids carboxílics. Es necessita una solució de 250 mg d'oxalat de verd de malaquita en 100 ml d'etanol.

El procediment experimental consisteix en addicionar a unes quantes boles de resina 1 ml de la solució de verd de malaquita i 1 gota de trietilamina. S'agita durant 1 min a t.a. i es fan successius rentats amb metanol fins que la solució sigui incolora.

Test +: resina de color verd

Test -: resina incolora

Purificació dels pèptids sintetitzats

Els pèptids sintetitzats s'han purificat mitjançant cromatografia líquida d'alta pressió a escala semipreparativa. S'ha utilitzat un flux de 15 ml/min, fent servir com a eluents:

- H₂O milli-Q amb 0,1% de TFA
- MeCN amb 0,1% de TFA

La detecció per UV s'ha dut a terme a $\lambda = 220$ i $\lambda = 254$ nm.

Espectrometria de masses MALDI-TOF

La massa molecular dels pèptids sintetitzats s'ha determinat per espectrometria de masses MALDI-TOF. Per a la preparació de les mostres, cal mesclar 1 μ l de la solució de pèptid (~1 mg/ml) amb 1 μ l de matriu, aplicar la barreja sobre la placa de MALDI i deixar-ho assecat a t.a. Les matrius emprades han estat:

- ACH (àcid α -ciano-4-hidroxi-cinàmic)
- DHB (àcid dihidroxibenzoic)

Aquestes matrius s'han preparat a una concentració de 10 mg/ml, fent servir com a dissolvent una mescla de MeCN:H₂O (1:1) amb 0,1% de TFA.

¹⁸⁵ Attardi, M.E.; Porcu, G.; Taddei, M.; "Malachite green, a valuable reagent to monitor the presence of free COOH on the solid-phase"; *Tetrahedron Lett.*; **2000**, *41*, 7391-7394.

7.3.6 Descripció dels inhibidors obtinguts

Inhibidors patró

Inhibidor **N2C1**

Resina: Rink amida MBHA

Funcionalització: 0,64 mmol/g

Escala: 64 μ mol

Grups protectors: Gln(Trt), Asn(Trt), Ser(^tBu), Thr(^tBu), Trp(Boc)

Massa obtinguda: 13,2 mg

Rendiment: 13%

Condicions purificació: 30 a 80% en 30 min

Puresa: 85%

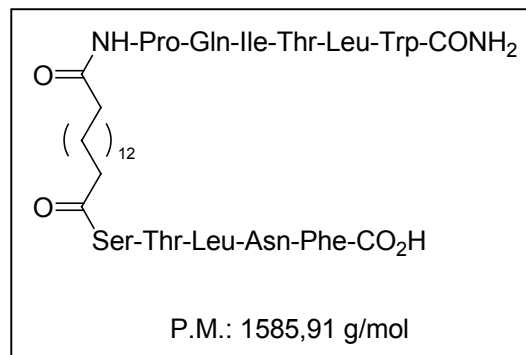
HPLC: t_R = 11,88 min (0 a 100% MeCN en 15 min)

t_R = 7,36 min (30 a 80% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 1608,8 (M + Na)⁺, 1624,8 (M + K)⁺

AAA: Pro 0,87 (1), Gln 1,06 (1), Ile 0,88 (1), Thr 1,96 (2), Leu 2,06 (2), Phe 1,01 (1), Ser 0,89 (1), Asn 0,98 (1).

Es detectà per MALDI la presència del producte de cross-coupling **N2N2**, però no es pogué aïllar per HPLC semipreparativa.



Inhibidor **N3C1**

Resina: Wang

Funcionalització: 0,96 mmol/g

Escala: 96 μ mol

Grups protectors: Gln(Trt), Asn(Trt), Ser(^tBu), Thr(^tBu)

Massa obtinguda: 13,4 mg

Rendiment: 9%

Condicions purificació: 40 a 90% en 30 min

Puresa: 91%

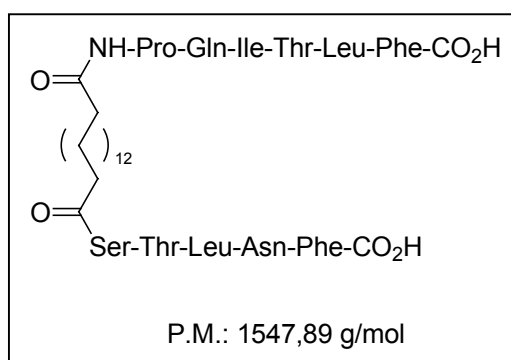
HPLC: t_R = 14,58 min (0 a 100% MeCN en 15 min)

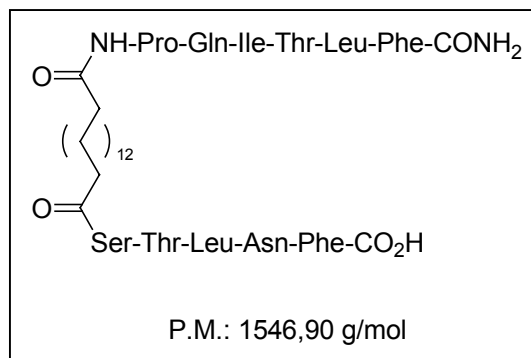
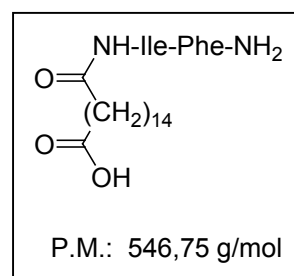
t_R = 14,42 min (30 a 80% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 1570,9 (M + Na)⁺, 1586,9 (M + K)⁺

AAA: Pro 0,92 (1), Gln 1,05 (1), Ile 0,86 (1), Thr 1,88 (2), Leu 1,98 (2), Phe 2,14 (2), Ser 0,92 (1), Asn 0,97 (1).

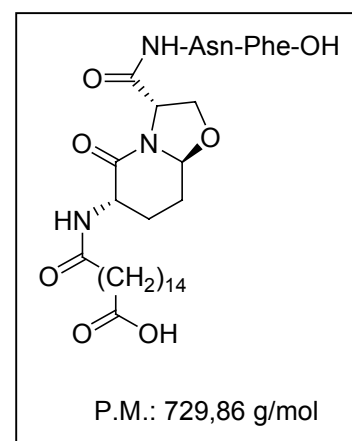
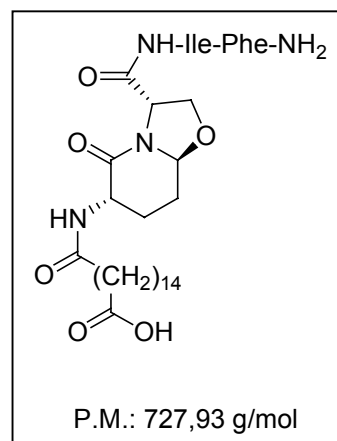
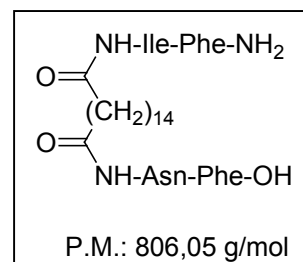
Es detectà per MALDI la presència del producte de cross-coupling **N3N3**, però no es pogué aïllar per HPLC semipreparativa.

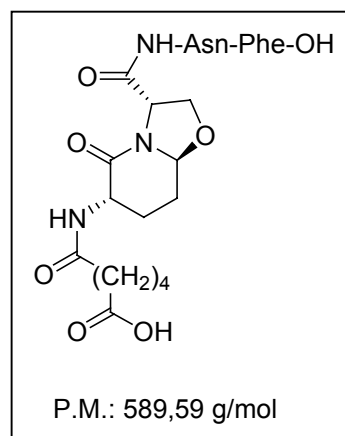
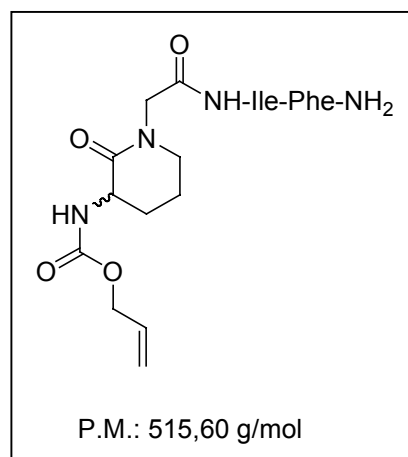
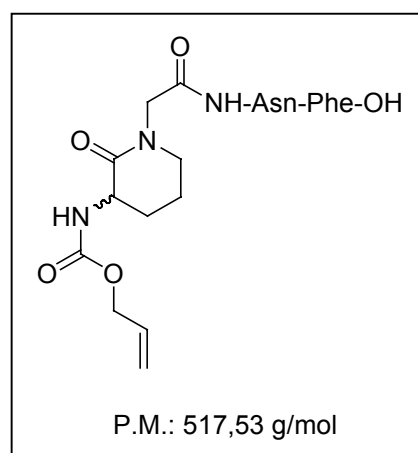


Inhibidor N4C1**Resina:** Rink amida MBHA**Funcionalització:** 0,64 mmol/g**Escala:** 64 μ mol**Grups protectors:** Gln(Trt), Asn(Trt), Ser(^tBu), Thr(^tBu)**Massa obtinguda:** 10,9 mg**Rendiment:** 11%**Condicions purificació:** 30 a 90% en 30 min**Puresa:** 82%**HPLC:** t_R = 11,54 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 6,59 min (30 a 80% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 1569,9 (M + Na)⁺, 1584,9 (M + K)⁺**AAA:** Pro 0,90 (1), Gln 1,00 (1), Ile 0,84 (1), Thr 2,14 (2), Leu 1,96 (2), Phe 2,16 (2), Ser 0,92 (1), Asn 0,97 (1).Es detectà per MALDI la presència del producte de cross-coupling **N4N4** però no es pogué aïllar per HPLC semipreparativa.**Inhibidor 176 i 176cc****Resina:** Rink amida MBHA**Funcionalització:** 0,66 mmol/g**Escala:** 66 μ mol**Massa obtinguda:** 7,2 mg**Rendiment:** 19%**Condicions purificació:** 35 a 90% MeCN en 50 min**Puresa:** 76%**HPLC:** t_R = 14,92 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 14,87 min (30 a 80% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 568,4 (M + Na)⁺, 584,3 (M + K)⁺Es detectà la presència del producte de cross-coupling **176cc**, del qual se'n pogueren aïllar 2,1 mg (Rendiment: 4%) durant la purificació per HPLC semipreparativa.**Puresa:** 96%**HPLC:** t_R = 15,21 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 15,03 min (30 a 80% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 829,4 (M + Na)⁺, 845,4 (M + K)⁺

Inhibidor CH-50 i 176cc**Resina:** Rink amida MBHA**Funcionalització:** 0,66 mmol/g**Escala:** 66 μ mol**Massa obtinguda:** 7,5 mg**Rendiment:** 14%**Condicions purificació:** 40 a 90% MeCN en 50 min**Puresa:** 93%**HPLC:** t_R = 13,66 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 12,56 min (30 a 80% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 829,5 (M + Na)⁺, 845,5 (M + K)⁺

S'observà la presència del producte de cross-coupling **176cc**, però no es pogué aïllar per HPLC semipreparativa.

Inhibidors tipus I**Inhibidor 177****Resina:** Rink amida MBHA**Funcionalització:** 0,66 mmol/g**Escala:** 47 μ mol**Massa obtinguda:** 12,5 mg**Rendiment:** 36%**Puresa:** 86%**HPLC:** t_R = 7,79 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 4,61 min (10 a 30% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 750,4 (M + Na)⁺, 766,4 (M + K)⁺**Inhibidor 178****Resina:** Wang**Funcionalització:** 0,96 mmol/g**Escala:** 288 μ mol**Massa obtinguda:** 47 mg**Rendiment:** 22%**Condicions purificació:** 40 a 65% MeCN en 15 min**Puresa:** 96%**HPLC:** t_R = 12,86 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 11,21 min (30 a 80% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 752,2 (M + Na)⁺, 768,2 (M + K)⁺

Inhibidor 179**Resina:** Wang**Funcionalització:** 0,96 mmol/g**Escala:** 288 μ mol**Massa obtinguda:** 64,5 mg**Rendiment:** 38%**Condicions purificació:** 10 a 30% MeCN en 15 min**Puresa:** 90%**HPLC:** t_R = 9,11 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 5,42 min (20 a 40% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 612,2 (M + Na)⁺, 628,2 (M + K)⁺**Inhibidors 183a i 183b****Resina:** Rink amida MBHA**Funcionalització:** 0,66 mmol/g**Escala:** 160 μ mol**Condicions purificació:** 27% MeCN en 15 min**Massa obtinguda (183a):** 23 mg**Rendiment:** 28%**Puresa:** 97%**HPLC:** t_R = 10,94 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 14,98 min (20 a 40% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 538,2 (M + Na)⁺, 554,2 (M + K)⁺**Massa obtinguda (183b):** 25 mg**Rendiment:** 30%**Puresa:** 82%**HPLC:** t_R = 10,98 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 15,36 min (20 a 40% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 738,3 (M + Na)⁺, 554,2 (M + K)⁺**Inhibidor 184****Resina:** Wang**Funcionalització:** 0,96 mmol/g**Escala:** 288 μ mol**Massa obtinguda:** 37 mg**Rendiment:** 25%**Condicions purificació:** 22% MeCN en 15 min**Puresa:** 98%**HPLC:** t_R = 9,52 min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 9,12$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 540,2 (M + Na)⁺, 556,1 (M + K)⁺

No es pogué separar la mescla de diastereòmers.

Inhibidor **185** i **185cc**

Resina: Rink amida MBHA

Funcionalització: 0,66 mmol/g

Escala: 198 μ mol

Massa obtinguda: 38 mg

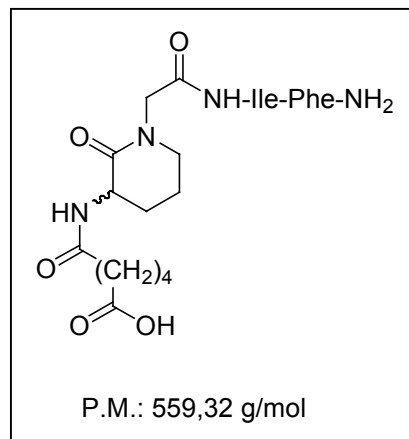
Rendiment: 34%

Condicions purificació: 23 a 24% MeCN en 15 min + 24 a 45% MeCN en 15 min

Puresa: 98%

HPLC: $t_R = 9,73$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 10,08$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)



MALDI-TOF: 582,2 (M + Na)⁺, 598,2 (M + K)⁺

No es pogué separar la mescla de diastereòmers i tot i es detectar-se la presència del producte de cross-coupling **185cc** no es pogué aïllar per purificació per HPLC semipreparativa.

HPLC: $t_R = 10,90$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 16,41$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 995,5 (M + Na)⁺, 1011,5 (M + K)⁺

Inhibidor **186** i **186cc**

Resina: Wang

Funcionalització: 0,96 mmol/g

Escala: 288 μ mol

Massa obtinguda: 26 mg

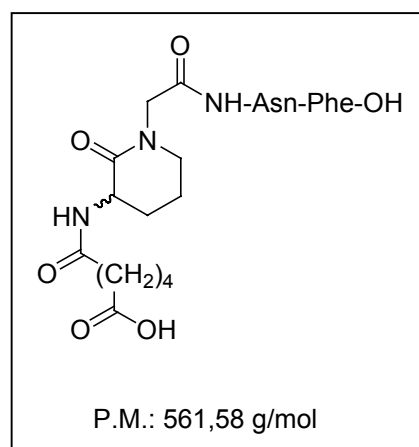
Rendiment: 16%

Condicions purificació: 10 a 17% MeCN en 15 min

Puresa: 97%

HPLC: $t_R = 13,86$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 14,76$ min (30 a 80% MeCN en 15 min)



MALDI-TOF: 584,2 (M + Na)⁺, 600,2 (M + K)⁺

No es pogué separar la mescla de diastereòmers però es detectà la presència del producte de cross-coupling **186cc**, del qual se'n pogueren aïllar 7,4 mg (Rendiment: 3%) durant la purificació per HPLC semipreparativa.

Puresa: 96%

HPLC: $t_R = 9,28$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 8,47$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 999,4 (M + Na)⁺, 1015,4 (M + K)⁺

Inhibidor **187** i **187cc**

Resina: Wang

Funcionalització: 0,96 mmol/g

Escala: 288 μ mol

Massa obtinguda: 49 mg

Rendiment: 18%

Condicions purificació: 43% MeCN en 15 min

Puresa: 92%

HPLC: $t_R = 12,89$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 11,17$ min (30 a 80% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 724,4 (M + Na)⁺, 740,4 (M + K)⁺

No es pogué separar la mescla de diastèròmers però es detectà la presència del producte de cross-coupling **187cc**, del qual se'n pogueren aïllar 9,1 mg (Rendiment: 3%) durant la purificació per HPLC semipreparativa.

Puresa: 96%

HPLC: $t_R = 11,88$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 9,61$ min (30 a 80% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 1139,6 (M + Na)⁺, 1155,6 (M + K)⁺

Inhibidors tipus II

Inhibidors **180** i **180cc**

Resina: Wang

Funcionalització: 0,96 mmol/g

Escala: 288 μ mol

Massa obtinguda: 40 mg

Rendiment: 16%

Condicions purificació: 15 a 45% MeCN en 15 min

Puresa: 96%

HPLC: $t_R = 10,23$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

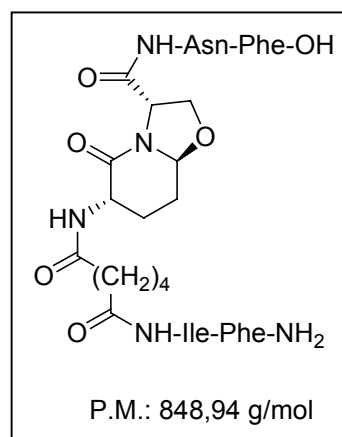
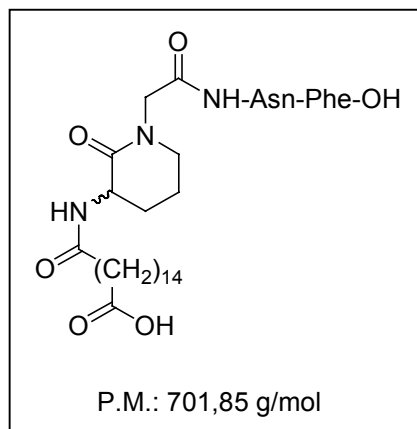
$t_R = 13,40$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 871,3 (M + Na)⁺, 887,3 (M + K)⁺

Es detectà la presència del producte de cross-coupling **180cc**, del qual se'n pogueren aïllar 11 mg (Rendiment: 4%) durant la purificació per HPLC semipreparativa.

Puresa: 91%

HPLC: $t_R = 9,45$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)



$t_R = 9,63$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 1055,4 (M + Na)⁺, 1071,3 (M + K)⁺

Inhibidor **181** i **181cc**

Resina: Rink amida MBHA

Funcionalització: 0,66 mmol/g

Escala: 99 μ mol

Massa obtinguda: 35,3 mg

Rendiment: 42%

Condicions purificació: 20 a 70% MeCN en 45 min

Puresa: 90%

HPLC: $t_R = 10,15$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 12,89$ min (20 a 40% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 871,4 (M + Na)⁺, 887,4 (M + K)⁺

Es detectà la presència del producte de cross-coupling **181cc**, del qual se'n pogueren aïllar 3,5 mg (Rendiment: 3%) durant la purificació per HPLC semipreparativa.

MALDI-TOF: 1051,5 (M + Na)⁺, 1067,5 (M + K)⁺

Inhibidor **188a** i **188b**

Resina: Rink amida MBHA

Funcionalització: 0,66 mmol/g

Escala: 205 μ mol

Condicions de purificació: 26% MeCN en 15 min

Massa obtinguda (188a**):** 45 mg

Rendiment: 27%

Puresa: 89%

HPLC: $t_R = 10,37$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

$t_R = 14,07$ min (26% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 843,4 (M + Na)⁺, 859,4 (M + K)⁺

Massa obtinguda (188b**):** 40 mg

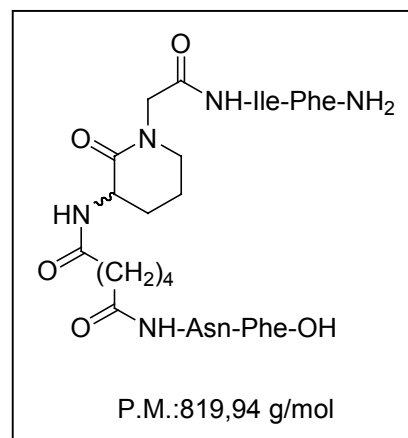
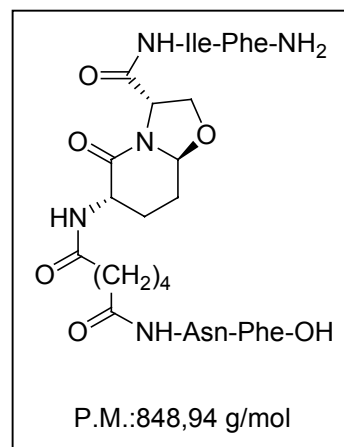
Rendiment: 24%

Puresa: 81%

HPLC: $t_R = 10,48$ min (0 a 100% MeCN en 15 min)

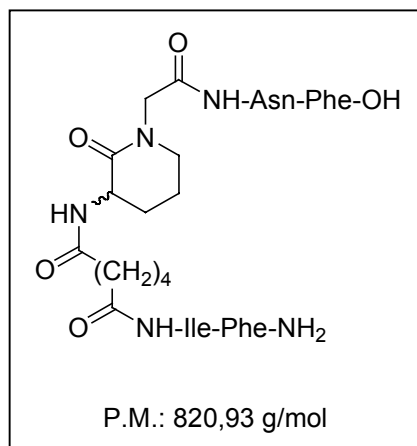
$t_R = 15,00$ min (26% MeCN en 15 min)

MALDI-TOF: 843,3 (M + Na)⁺, 859,3 (M + K)⁺



Inhibidor 189**Resina:** Wang**Funcionalització:** 0,96 mmol/g**Escala:** 288 μ mol**Massa obtinguda:** 80 mg**Rendiment:** 34%**Condicions purificació:** 15 a 45% MeCN en 15 min + 45 a 100% en 5 min**Puresa:** 96%**HPLC:** t_R = 13,88 min (0 a 100% MeCN en 15 min) t_R = 14,80 min (30 a 80% MeCN en 15 min)**MALDI-TOF:** 843,3 (M + Na)⁺, 883,3 (M + K)⁺

No es pogué separar la mescla de diastereòmers.



7.4 EXPERIMENTAL CAPÍTOL 5

7.4.1 Principals dissolvents i reactius

Plàsmid recombinant	Cedit per la Sílvia Frutos, del laboratori del Dr. Ernest Giralt
<i>E. coli</i> competents	Cedides pel laboratori del Dr. Miquel Pons
Medi LB	Pronadisa
Agar	Pronadisa
IPTG (β -D-1-tiogalactopiranosid d'isopropil)	Sigma
Bio-Rad Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad Laboratories
Substrat: DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS	Bachem
Solució Hellmanex	Hellma
Antibiòtics:	
▪ Canamicina	Sigma
▪ Cloramfenicol	Duchefa
Reactius per l'electroforesi:	
▪ Glicerol 87%	Merck
▪ Acrilamida/Bisacrilamida	Amresco
▪ APS (persulfat d'amoni, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Sigma
▪ SDS (1-dodecil sulfat de sodi)	Duchefa
▪ TEMED (<i>N,N,N,N'</i> -tetrametiletildiamina)	Sigma
▪ Patró de pesos moleculars	Bio-rad
▪ Blau de Coomassie	Sigma
▪ Tricina	Sigma
Sals i reactius per a les solucions tampó:	
▪ Tris-HCl	Sigma
▪ EDTA	Usb

▪ NaCl	Sigma
▪ Tritó X-100	Fluka
▪ Gu-HCl	Sigma
▪ DTT (1,4-ditio-DL-treitol)	Fluka
▪ Urea	Fluka

Dissolvents:

▪ Aigua	Milli-Q (sistema de filtració Millipore)
▪ Àcid acètic	SDS
▪ Isopropanol	Panreac (qualitat HPLC preparativa)
▪ DMSO	Panreac

Taula 28: Principals dissolvents i reactius utilitzats en el Capítol 5

7.4.2 Material i instrumentació

Autoclau	P-Selecta model <i>Presoclave 75</i>
Espectròmetre d'UV-visible	Perkin-Elmer model <i>Lambda 5 UV/Vis</i> Shimadzu model UV mini-1240
Centrifugues	Beckman Coulter model <i>Avanti J-20 XP</i> <ul style="list-style-type: none">▪ Rotor JA-25.50▪ Rotor JLA-8.1000 Eppendorf model 5414 D i 5415 R Beckman Coulter model <i>Allegra 21R</i>
FPLC	ÄKTA <i>Explorer</i> d'Amersham Biosciences
Columna exclusió molecular	Superdex 75 d'Amersham BioSciences
Columna d'intercanvi iònic	Hi-Trap SPHP 1 x 5 ml de GE Healthcare
Sonicador	IKASONIC U200-S d'IKA Labortechnik

Electroforesi en gel	Power-Pac Basic de Bio-rad
pHmetre	Crison model GLP21
Fluorímetre	Shimadzu model RF-1501
Fluorímetre de plaques	Bio-tek, model FL600
Plaques d'assaig de 96 pouets	Costar® 3631
Microcalorímetre isotèrmic de valoració	Microcal VP-ITC

Taula 29: Instruments utilitzats en el Capítol 5

7.4.3 Expressió de HIV-1 PR

Transformació

Per tal de dur a terme la transformació, es treballà amb material estèril i sota la vitrina de flux laminar.

Es descongelà en un bany de gel un eppendorf amb una alíquota de cèl·lules competents Rossetta-Lys i s'hi afegiren 3 µl del plàsmid amb l'ADN codificant per la proteasa del VIH-1. S'incubà en gel durant 20 min i a continuació es procedí a fer un xoc tèrmic, mitjançant una incubació a 42 °C durant 45 s, seguida d'una incubació en gel de 2 min. Després d'aquest tractament, s'addicionaren 900 µl ml de medi LB s'incubà durant 1 h a 37 °C amb agitació suau. Passat aquest temps, se sembrà el contingut de l'eppendorf sobre una placa de medi LB-agar amb resistència a canamicina i cloramfenicol i s'incubà a 37 °C (amb la placa girada del revés) durant tota la nit. L'endemà s'observà l'aparició de diferents colònies de cèl·lules, amb l'ADN codificant per la VIH-1 PR incorporat.

Expressió en medi ric

Es transferí una colònia de la placa a un tub falkon estèril amb 10 ml de medi LB, 10 µl de cloroamfenicol i 10 µl de canamicina. S'incubà durant tota la nit a 37 °C amb agitació intensa. L'endemà s'observà que la terbolesa del falkon s'havia incrementat considerablement. En un erlenmeyer de 2 l, es preparà 1 l de medi LB, s'autoclavà i s'hi afegiren 1 ml de cloramfenicol i 1 ml de canamicina. S'inoculà amb els 10 ml del pre-cultiu anterior i es deixà créixer a 37 °C sota intensa agitació durant aproximadament 2,5 h, fins a obtenir una $Abs_{(\lambda = 595 \text{ nm})} = 0,8$. A continuació, s'induí l'expressió mitjançant l'addició d'1 ml d'IPTG 1M i s'incubà durant 4 h a 37 °C. Passat aquest temps, es transferí el contingut de l'erlenmeyer a 2 pots de centrifuga adequats pel rotor JLA-8.1000 i es centrifugà a 4000 rpm a 4 °C durant 30 min.

Finalment, es decantà el sobrenedant, es resuspengué el precipitat en 50 ml de dissolució tampó, es transferí la suspensió a dos tubs de centrifuga de 25 ml aptes pel rotor JA-25.50 i es guardaren a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant la nit.

50 mM Tris-HCl (pH = 8)
1 mM EDTA
100 mM NaCl

Rentats

Es descongelen en un bany de gel els continguts dels pots de centrifuga obtinguts el dia anterior. Se sonicaren amb una punta grossa a una potència del 50% i intervals de 0,5, mantenint els tubs de centrifuga en un bany de gel (3 pulsos de 30 s cadascun, separats per intervals de 30 s).

S'obtingué una suspensió viscosa que se centrifugà a 20000g durant 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ amb un rotor JA-25.50.

Es decantà el sobrenedant i resuspengué en 20 ml de:

50 mM Tris-HCl (pH = 8)
1 mM EDTA
100 mM NaCl
0,1% tritó-X100

Es centrifugà a 20000g durant 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, es decantà el sobrenedant i es tornà a resuspendre en 20 ml de la solució anterior. Es tornà a centrifugar a 20000g durant 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, es decantà el sobrenedant i es resuspengué en 20 ml de:

50 mM Tris-HCl (pH = 8)
1 mM EDTA
100 mM NaCl

Es centrifugà a 20000g durant 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, es decantà el sobrenedant i es tornà a resuspendre en 20 ml de la solució anterior. Es tornà a centrifugar a 20000g durant 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, es decantà el sobrenedant i es resuspengué en 12 ml de:

50 mM Tris-HCl (pH = 8)
1 mM EDTA
100 mM NaCl
7 M Gu-HCl

Finalment, s'incubà a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant tota la nit. Mentrestant, es feu passar H_2O miliQ per la columna Superdex 75 i es deixà equilibrant a un flux de 0,2 ml/min durant la nit amb el següent eluent prèviament filtrat sobre un filtre de $0,22\text{ }\mu\text{m}$:

50 mM Tris-HCl (pH = 8)
100 mM NaCl
1 mM EDTA
5 mM DTT
6 M Urea

Cromatografia d'exclusió molecular

L'endemà se centrifugà a 20000g durant 50 min a t.a. i es filtrà el sobrenedant amb un filtre de 0,45 µm per tal de poder-lo carregar a la columna. Les condicions d'elució emprades foren les següents:

Columna: Superdex 75	λ lectura: 254 i 280 nm
Flux: 2 ml/min	Temperatura: ambient
Volum d'injecció: 0-10 ml	Fraccions recollides: 2 ml

Un cop acabada la purificació, s'analitzaren les diferents fraccions mitjançant electroforesi SDS-PAGE-Tris-Tricina. La composició dels gels utilitzats fou la següent:

	Gel separador (inferior)*	Gel concentrador (superior)*
H ₂ O miliQ	2,5 ml	4,4 ml
Glicerol 87%	2,4ml	-
Tris·HCl 3M (pH = 8,5)	6,7 ml	2,10 ml
Acrilamida:bisacrilamida (37,5:1)	8,1 ml	1,65 ml
SDS 20% (p/v)	100 µl	32 µl
APS 10% (p/v)	200 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Taula 30: Composició dels gels d'electroforesi.* Quantitats necessàries per la preparació de 2 gels

Es barrejaren 10 µl de les fraccions procedents de la cromatografia d'exclusió molecular i 10 µl de tampó de càrrega 2x en diferents eppendorfs. El tampó de càrrega utilitzat tenia la composició següent:

50 µl SDS 20%
 50 µl DTT 4M
 650 µl H₂O
 250 µl Tp 8x

S'escalfaren durant 5 min a 95 °C, se centrifugaren durant 0,5 min i finalment es carregaren les mostres en els pouets dels gels, juntament amb un patró de pesos moleculars comercial. El voltatge utilitzat fou de 120 V i la composició de les diferents solucions tampó és el que es detalla a continuació:

Solució ànode (cavitat central)	200 ml Tris·HCl 1M (pH = 8,9) 800 ml H ₂ O
Solució càtode (cavitat externa)	12,11 g Tris·HCl 0,1M 17,92 g Tricina 0,1 M 5 ml de SDS 20%
Fixador	250 ml Isopropanol 25% 100 ml àcid acètic 10% 650 ml H ₂ O
Colorant Blau de Coomassie	100 ml àcid acètic 900 ml H ₂ O 0,25 g Blau de Coomassie G-250
Decolorant	100 ml àcid acètic 10% 900 ml H ₂ O

Taula 31: Composició de les solucions per l'electroforesi

Un cop finalitzada l'electroforesi, els gels se submergiren en la solució fixadora durant 30 min i a continuació es tenyiren durant 1 h amb el colorant blau de Coomassie. Finalment, es s'agitaren durant la nit amb la solució decolorant juntament amb paper absorbent.

Les fraccions pràcticament pures es reservaren per a la cromatografia d'intercanvi iònic mentre que les fraccions que presentaven més impureses, es reagruparen i es concentraren per centrifugació a 4000 rpm amb un falkon cònic de la marca Milipore equipat amb una membrana. El contingut de la cavitat superior del falkon resultant de la centrifugació es tornà a purificar mitjançant la columna d'exclusió molecular, fent servir les mateixes condicions descrites anteriorment, però amb un flux de 1ml/min.

Cromatografia d'intercanvi iònic

Les fraccions pràcticament pures obtingudes a través de la cromatografia d'exclusió molecular es tornaren a purificar per cromatografia d'intercanvi iònic, fent servir les següents condicions:

Solució tampó A	50 mM Tris·HCl (pH = 8) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 6M Urea
Solució tampó B	50 mM Tris·HCl (pH = 8) 500 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 6 M Urea

Columna: Hi Trap SPHP

Gradient: de 0 a 100% de B en 1 volum de columna, seguit d'un rentat a 100% de B en 3 volums de columna

Flux: 1 ml/min

Volum d'injecció: 0-25 ml

Fraccions recollides: 2 ml

λ lectura: 254 i 280 nm

Temperatura: ambient

Les fraccions obtingudes a través de la cromatografia d'intercanvi iònic s'analitzaren per electroforesi de forma anàloga a la descrita anteriorment.

Es calculà la concentració aproximada de proteïna mitjançant l'absorbància mesurada a $\lambda = 595$ nm, fent ús del reactiu de Bradford. En la cubeta d'UV es mesclaren:

- 30 μ l solució de proteïna
- 770 μ l H₂O milli-Q
- 200 μ l reactiu de Bradford

La mescla s'incubà durant 5 min a t.a. i a continuació es mesurà l'absorbància.

Abs mesurada = 0,274

A partir de la recta patró obtinguda amb l'albumina de sèrum boví ($y = 0,0271x - 0,0023$), es pogué determinar la concentració de VIH-1 PR.

[HIV-1 PR]_{aprox.} = 25,4 μ M

Plegament de VIH-1 PR

Un cop purificada la proteïna, s'acidificà amb TFA 10% fins a pH = 3,5, s'introduí dins d'una bossa de parets poroses i se submergí en una proveta de 2 l amb la següent dissolució tampó:

10 mM NaOAc

30 mM NaCl

1 mM DTT

S'agità durant 2 h a 4 °C i a continuació, es canvià el contingut de la proveta per 2 l de solució tampó nova i es deixà agitant a 4 °C durant tota la nit.

L'endemà, es traié la diàlisi i es calculà la concentració de proteïna mitjançant l'absorbància mesurada a $\lambda = 595$ nm, fent ús del reactiu de Bradford de manera anàloga a la descrita anteriorment.

[HIV-1 PR] = 20,0 μ M

7.4.4 Fluorimetria

L'activitat dels inhibidors es determinà fluorimètricament fent servir el substrat DABCYL-g-Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS en una solució tampó composta de:

AcONa 10 mM pH = 4,7

NaCl 1 M

EDTA 1 mM

Les longituds d'ona d'excitació i emissió emprades van ser 340 nm i 490 nm, respectivament.

El substrat i els inhibidors es dissolgueren en DMSO i es prepararen stocks de concentració 3 mM.

En treballar amb les plaques d'assaig de 96 pouets s'utilitzà un volum final de 150 µl, mentre que en treballar amb les cubetes de quars, s'utilitzà un volum de 300 µl.

En tots els experiments, es realitzà un control postiu (proteasa i substrat, sense inhibidor) i un control negatiu (substrat, sense proteasa ni inhibidor).

En un experiment típic, es prepara la placa de 96 pouets amb aproximadament 75 µl de dissolució tampó, la quantitat necessària de la proteasa i l'inhibidor i s'incuba a 30 °C durant 10 min. Passat aquest temps, s'addiciona ràpidament amb una pipeta multicanal el substrat dissolt en 75 µl de dissolució tampó i es fa la mesura d'absorbància durant 30 min.

7.4.5 Calorimetria

Es prepararà una solució de l'inhibidor **176** 20 vegades més concentrada que la solució de proteïna, fent servir la mateixa solució tampó en què es trobava la HIV-1 PR (10 mM NaOAc, 30 mM NaCl, 1 mM DTT). S'afegí un 5% de DMSO per tal d'afavorir la solubilitat de l'inhibidor en la solució tampó. En la solució de HIV-1 PR també s'hi afegí un 5% de DMSO per tal no hi haguéssin diferències en la composició entre totes dues solucions que poguéssin influir en la mesura calorimètrica.

a) Determinació de la calor d'interacció inhibidor-proteasa

S'addicionaren periòdicament cada 3 min volums de 10 µl de la solució d'inhibidor ([I] = 400 µM) sobre la solució de HIV-1 PR ([HIV-1 PR] = 20 µM) i s'enregistrà la calor despresa.

b) Determinació de la calor de dilució de l'inhibidor

S'addicionaren periòdicament cada 3 min volums de 10 µl de la solució d'inhibidor ([I] = 400 µM) sobre la solució tampó i s'enregistrà la calor despresa.

c) Determinació de la calor de dilució de la proteasa

S'addicionaren periòdicament cada 3 min volums de 10 µl de la solució de proteasa ([HIV-1 PR] = 20 µM) sobre la solució tampó i s'enregistrà la calor despresa.