



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Nuevos deshidroaminoácidos quirales: síntesis, reactividad y aplicaciones biológicas
Autor/es
Marta Isabel Gutiérrez Jiménez
Director/es
Jesús Manuel Peregrina García y María del Mar Zurbano Asensio
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico



Nuevos deshidroaminoácidos quirales: síntesis, reactividad y aplicaciones biológicas, tesis doctoral de Marta Isabel Gutiérrez Jiménez , dirigida por Jesús Manuel Peregrina García y María del Mar Zurbano Asensio (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



NUEVOS DESHIDROAMINOÁCIDOS QUIRALES:
SÍNTESIS, REACTIVIDAD Y APLICACIONES BIOLÓGICAS

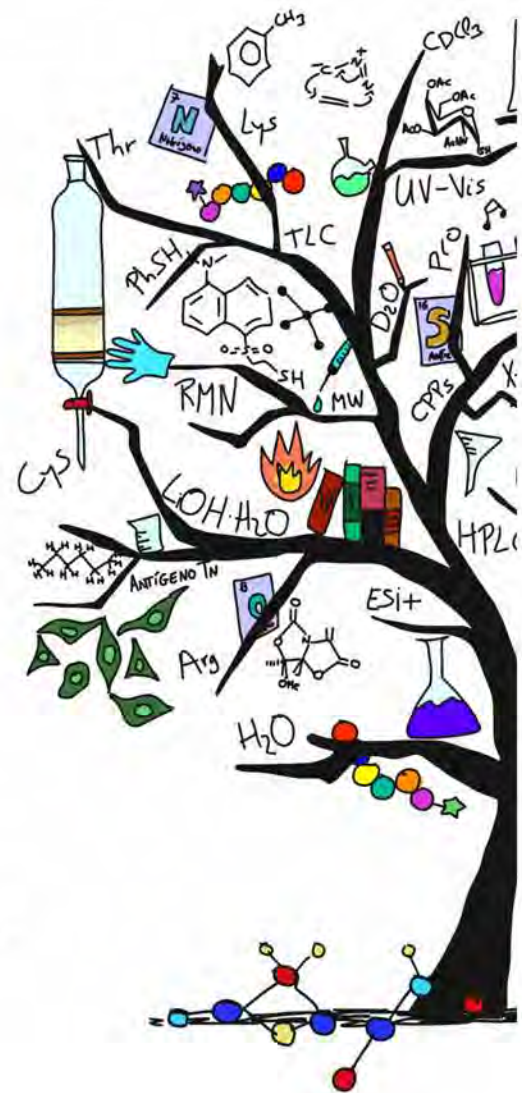
Marta Isabel
Gutiérrez Jiménez

Tesis Doctoral
2018



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA

NUEVOS DESHIDROAMINOÁCIDOS QUIRALES: SÍNTESIS, REACTIVIDAD Y APLICACIONES BIOLÓGICAS



Marta Isabel Gutiérrez Jiménez
Universidad de La Rioja
2018



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA

Centro de Investigación en Síntesis Química de La Rioja
CISQ
Grupo de Síntesis Orgánica Estereoselectiva - Química Biológica
GSOE-QuiBi



TESIS DOCTORAL

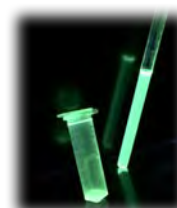
*NUEVOS DESHIDROAMINOÁCIDOS QUIRALES: SÍNTESIS,
REACTIVIDAD Y APLICACIONES BIOLÓGICAS*

Memoria presentada en la Universidad de La Rioja para optar al grado de Doctor
en Química por:



Marta Isabel Gutiérrez Jiménez

Marzo 2018



JESÚS MANUEL PEREGRINA GARCÍA, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja, y

MARÍA DEL MAR ZURBANO ASENSIO, Profesora Titular de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja,

CERTIFICAN:

Que la memoria **“Nuevos deshidroaminoácidos quirales: síntesis, reactividad y aplicaciones biológicas”** ha sido realizada por la Licenciada Marta Isabel Gutiérrez Jiménez en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja bajo su inmediata dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Química.

Logroño, Marzo 2018

Fdo: Jesús Manuel Peregrina García

Fdo: María del Mar Zurbano Asensio



ACTA DE GRADO DE DOCTOR

TRIBUNAL

Presidente/a:

Dr./Dra.

Secretario/a:

Dr./Dra.

Vocal:

Dr./Dra.

Reunido el día de la fecha el tribunal compuesto por los miembros que al margen se relacionan, se procede a la defensa de la tesis cuyos datos se indican:

Doctorando/a:

D./D^a.

Título de la tesis:

Directores/as de tesis:

Dr./Dra.

Dr./Dra.

Comisión Académica del Programa de Doctorado:

Programa cursado:

Una vez finalizada la defensa y contestadas las cuestiones formuladas, el tribunal acordó otorgar a la tesis la calificación de:

No apto

Aprobado

Notable

Sobresaliente

Logroño, a , a de de 20

Secretario/a del Tribunal

Presidente/a del Tribunal

Fdo.:

Fdo.:

Vocal

Fdo.:

En el caso de que el vocal haga su intervención a distancia por medios telemáticos (art. 11.2 de la Normativa de defensa de tesis doctoral en la Universidad de La Rioja), el/la Secretario/a deberá certificar dicha actuación.

Fdo.:



R.G

Esta Memoria pretende agrupar y plasmar el trabajo de investigación realizado durante estos últimos años. Pero no sólo la Química está presente en ella, sino muchas personas, muchos momentos que han hecho de este libro una realidad, que esconden no sólo átomos, moléculas, sino risas y lágrimas que me han acompañado durante el largo camino que supone realizar una Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi *padre* todo el apoyo mostrado, me ha dado fuerzas para seguir luchando por aquello que quería y en lo que creía, y seguro que lo seguirá haciendo. Por supuesto que no puedo olvidarme de mi *madre*, que sigue ayudándome a abrir todas las puertas que me llevan a cumplir mis sueños. Y a *David*, compañero de viaje no sólo durante estos años, sino durante el resto de mi vida.

Cuando decides investigar, de un modo u otro, acabas teniendo dos familias. La primera *familia*, a mi lado siempre, en los buenos y malos momentos. La segunda, forjando lazos poco a poco entre reacción y reacción. Y dentro de esta segunda familia, mis directores de Tesis, *Pere* y *Marimar*, y el resto de personas que junto con ellos me han formado, *Alberto*, *Héctor*, *Paco*, *Gonzalo*... Sin su trabajo y dedicación durante mi formación como Licenciada y Doctora ahora no podría estar escribiendo esto. Podría dedicar líneas y líneas, detenerme en cada uno de ellos, pero sé que ya saben todo lo que se agradece su esfuerzo. Además, no puedo olvidarme de otros *compañeros del departamento de Química y de la Facultad* que han hecho posible también que conociera otra parte importante de la ciencia, su divulgación. Gracias por permitirme colaborar en tantas y tantas actividades...

Querría agradecer al *resto de miembros del grupo*, no hace falta decir nombres pues ellos y ellas saben perfectamente quienes son y no quiero dejarme a nadie, por todos esos buenos momentos en el laboratorio y los despachos, y por supuesto fuera de la Universidad, pues la familia no sólo se forja en un edificio, sino con todos esos instantes que estarán sin duda en mi álbum de recuerdos. Y no puedo olvidarme de los *laboratorios vecinos*, con algunos de los cuales he apagado más de una vez la luz y hemos sido los primeros en abrir las puertas. Tampoco de todas aquellas personas que forman parte del *Servicio de Laboratorios*, ¡qué buen trabajo y compañía!, y tantas y tantas otras que me han caminado conmigo.

A todos los *Doctores* que ya no están por los pasillos, pero siguen formando parte de mi vida, de un modo u otro, no sólo para hablar de Química. En especial quiero nombrar a *Somovilla, Nuria y Héctor*, con los cuales empecé a entender lo que era la investigación; y por supuesto a *Rojas*, gran amigo, ¡cuántas risas habremos echado y cuántos buenos momentos! También *Charli y Eva*, después de tanto tiempo... adoptado me habéis como una padawan.

Nombrar también a mis amigos sorianos y a mis compañeros de batallas fuera de la Universidad, *Lucía, Fer y compañía*, no hace falta vernos para saber que estamos ahí. Nos leemos todas las semanas, no solo en *Principia*, y las locuras vienen solas.

Para terminar, quiero agradecer a la *Química* por ser el mundo en el que vivimos, por ayudar a comprenderlo mejor, y por supuesto, a mejorarlo. Como decía *Yoda*, "tu enfoque determina tu realidad", y ver el mundo a través de los ojos de la Química es impresionante.

“Nothing in life is to be feared.
It is only to be understood.”

Marie Skłodowska Curie

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se explora ampliar la reactividad de un tipo de deshidroaminoácidos quirales, ya conocidos, en los que la quiralidad está presente en el extremo amino en forma de carbamato cíclico. Además, utilizando los aminoácidos naturales serina y treonina como material de partida, se presenta la síntesis de nuevos deshidroaminoácidos quirales bicíclicos y, por tanto, más robustos que los anteriormente citados, poseyendo la quiralidad ahora en ambos extremos, el ácido carboxílico y el amino. Una vez sintetizados, se lleva a cabo un estudio de la reactividad de tipo Michael, y se presentan diversas aplicaciones.

Concretamente, en el **Capítulo 4**, se expande la reactividad sobre el doble enlace de algunos deshidroaminoácidos sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación, explorando así la reacción de cicloadición 1,3-dipolar con diazometano. Estas nuevas rutas nos permiten obtener derivados de ciclopropanaminoácidos, así como productos derivados de la extrusión, algunos de los cuales son nuevos deshidroaminoácidos quirales como la deshidrovalina, entre otros. Además, todas estas reacciones tienen lugar en pocos pasos, a temperatura ambiente, con alta estereoselectividad y buenos rendimientos.

En el **Capítulo 5**, se presenta el diseño y la síntesis de los nuevos deshidroaminoácidos quirales bicíclicos. Además, se estudian las aplicaciones sintéticas de los mismos, siendo una de ellas la obtención de derivados del antígeno sulfa-Tn, llevando a cabo una adición sulfa-Michael sobre dichos deshidroaminoácidos bicíclicos con D-GalNac- α -SH.

Esta reacción tiene lugar a temperatura ambiente y en poco tiempo, con un control total de la diastereoselectividad y un rendimiento elevado. En esta memoria también se muestra la síntesis del derivado del antígeno sulfa-Tn de treonina, siendo la primera vez que ha sido posible sintetizar este compuesto mediante una reacción de este tipo.

También, se ha realizado un estudio de la reacción de adición sulfa-Michael sobre estos nuevos deshidroaminoácidos quirales, sobre todo deshidroalanina, llevando a cabo las adiciones con varios tioles de diferente naturaleza. En este contexto, en el **Capítulo 6**, se presenta la síntesis de nuevos aminoácidos no naturales fluorescentes derivados de cisteína y se realiza un estudio de sus propiedades como marcadores fluorescentes.

Finalmente, los aminoácidos fluorescentes con mejores propiedades ópticas, se incorporan en la secuencia de varios péptidos penetrantes de membrana (CPPs). Con ellos se realizaron ensayos biológicos con células HeLa para probar sus propiedades fluorescentes como biomarcadores y se estudió así su capacidad de penetrar la membrana celular.

ABSTRACT

This doctoral thesis explores the reactivity of known chiral dehydroamino acids bearing the chirality in the N-terminal moiety. Starting from serine and threonine, new chiral dehydroamino acids with bicyclic structures, incorporating now the chirality in both N- and C-terminal moieties, have been synthesized. The reactivity of these new dehydroamino acids as Michael acceptors has been studied and several synthetic applications have been developed.

In particular, in **Chapter 4**, the reactivity on the double bond of some dehydroamino acids, previously synthesized in our research group is expanded, exploring the 1,3-dipolar cycloaddition reaction with diazomethane. These new routes allow us to obtain cyclopropanamino acid derivatives as well as products derived from extrusion, some of which are new chiral dehydroamino acids such as dehydrovaline, among others. In addition, all these reactions take place in just a few steps, at room temperature, with high stereoselectivity and good yields.

Chapter 5 presents the design and synthesis of the new chiral bicyclic dehydroamino acids. In addition, as a synthetic application, we synthesized several sulfa-Tn antigen derivatives, carrying out a sulfa-Michael addition on the bicyclic dehydroamino acids with D-GalNac- α -SH. This reaction takes place at room temperature, with total control of the diastereoselectivity and high yield. The synthesis of the threonine-sulfa-Tn antigen derivative is also reported, being the first time that it is synthesized using a Michael reaction.

A study of the sulfa-Michael addition reaction has been carried out on these new chiral bicyclic dehydroamino acids, especially dehydroalanine, carrying out the additions with several thiols of different nature, as nucleophiles. In this context, **Chapter 6** presents the synthesis of new non-natural fluorescent amino acids derived from cysteine and their properties as fluorescent markers are studied.

Finally, some of the fluorescent amino acids synthesized were incorporated into cell penetrating peptides (CPPs). These fluorescent CPPs were subjected to biological tests using HeLa cells to probe their fluorescent properties as biomarkers and their ability to penetrate the cell membrane.

ÍNDICE

Abreviaciones	I
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Aminoácidos y quiralidad	3
1.2 Deshidroaminoácidos	9
1.3 Reacciones de Michael	11
1.4 Reacciones de Michael y deshidroaminoácidos	16
Capítulo 2. Antecedentes	19
2.1 Síntesis de deshidroaminoácidos	21
2.1.1 <i>Mediante reacciones de eliminación</i>	25
2.1.2 <i>Mediante reacciones Horner-Wadsworth-Emmons y Wittig</i>	28
2.1.3 <i>Mediante el uso de la síntesis de Erlenmeyer y apertura de anillo de oxazolonas</i>	31
2.1.4 <i>A partir de nitroalcanos o de una formilamino-metilenación de Schöllhopf</i>	34
2.1.5 <i>Síntesis de N,O-acetales bicíclicos y nuevos derivados de Dha y Dhb quirales</i>	36
2.2 Adición de Michael para la obtención de compuestos azufrados biológicamente activos.....	40
2.2.1 <i>Deshidroaminoácidos quirales como precursores de derivados de Lantionina</i>	44
2.2.2 <i>Deshidroaminoácidos quirales como precursores de derivados de glicosilcisteína</i>	46

Capítulo 3. Objetivos 51

Capítulo 4. Cicloadición 1,3 dipolar 59

4.1 Introducción61

4.2 Cicloadición 1,3 dipolar64

4.3 Extrusión térmica y fotoquímica.....68

4.3.1 Extrusión vía térmica69

4.3.2 Extrusión vía fotoquímica72

Capítulo 5. Nuevos deshidroaminoácidos quirales: síntesis y reactividad 77

5.1 Introducción79

5.2 Síntesis de nuevos deshidroaminoácidos quirales para la obtención del antígeno sulfa-Tn83

5.2.1 Síntesis de nuevos deshidroaminoácidos quirales90

5.2.2 Síntesis de análogos azufrados del antígeno Tn.....96

5.2.3 Síntesis de dipéptidos que contienen un análogo azufrado del antígeno Tn108

5.3 Reactividad S-Michael utilizando tioles de diferente naturaleza 119

Capítulo 6. Síntesis de aminoácidos fluorescentes y su aplicación biológica	129
6.1 Introducción	131
6.2 Síntesis de aminoácidos fluorescentes	137
6.3 Síntesis de péptidos fluorescentes (CPPs) y ensayos biológicos	152
6.3.1 Síntesis y pruebas biológicas de un CPP derivado de cumarina	155
6.3.2 Síntesis y pruebas biológicas de CPPs derivados de dansilo ..	173
6.3.3 Síntesis y pruebas biológicas de otros CPPs derivados de dansilo	182
Capítulo 7. Conclusiones.....	195
Capítulo 8. Parte experimental	209
Anexo I. Espectros de RMN.....	285

Abreviaciones

$[\alpha]_D^{25}$	rotación específica
Δ	calentamiento, incremento
ΔG	energía libre de Gibbs
$\Delta\Delta G^\ddagger$	barreras de activación relativas
δ	desplazamiento químico
μ	micro
λ	longitud de onda
*	grupo fluorescente / quiral
$^\circ\text{C}$	grado Celsius
$^1\text{H RMN}$	resonancia magnética nuclear de protón
$^{13}\text{C RMN}$	resonancia magnética nuclear de carbono 13
Å	ångström
Ac	acetilo
AcCl	cloruro de acetilo
Ac₂O	anhídrido acético
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ala, A	alanina
ANAP	3-(6-acetilnaftalen-2-ilamino)-2-aminopropionato de metilo
anh	anhidro
Ar	grupo arilo / sustituyente aromático
Arg, R	arginina
Asp, D	ácido aspártico
B⁻	base
Bn	bencilo
Boc	terc-butoxicarbonilo
Boc₂O	dicarbonato de di-terc-butilo
BTA	benzotriazol
^tBuOK	terc-butóxido de potasio
Bu₄N⁺Br⁻	bromuro de tetrabutilamonio

Bu₃P	tributilfosfano
c	concentración
C	carbono
calcd.	calculado
cat	catalizador
Cbz	carboxibencilo
c.c.	concentrado
CDCl₃	cloroformo deuterado
CG	cromatografía de gases
CH₄	metano
CH₃Cl	cloroformo
CH₂N₂	diazometano
CIBIR	Centro de Investigación Biomédica de La Rioja
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CPPs	<i>cell penetrating peptides</i>
cuant.	cuantitativo
Cys, C	cisteína
d	doblete
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
dd	doblete de dobletes
ddd	doblete de dobletes de dobletes
Dha	deshidroalanina
Dhb	deshidrobutirina
Dhv	deshidrovalina
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA/DIE	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DM	dinámica molecular
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
d.r.	diastereoselectividad
dq	doblete de cuatripletas
dt	doblete de tripletas
e.d.	exceso diastereomérico

EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	ionización por electrospray
Et₃OBF₄	tetrafluoroborato de trietiloxonio
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ELLA	<i>Enzime-Linked Lectin Assay</i>
Et₂O	éter dietílico
eq	equivalente/s
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
g	gramos
Gal	galactosa
Glc	glucosa
Gly, G	glicina
GP	grupo protector
h	hora/s
H / H₂	hidrógeno
hv	irradiación de luz
HCl	ácido clorhídrico
H₂O	agua
H₃O⁺	ácido prótico
H₂O₂	agua oxigenada
H₂SO₄	ácido sulfúrico
HATU	3-óxido de hexafluorofosfato de 1-bis[dimetilamino]metileno]-1-H-1,2,3-triazolo[4,5b]piridina
HC(OMe)₃	ortoformiato de trimetilo
Hex	hexano
His, H	histidina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	hercio
HWE	<i>Horner-Wadsworth-Emmons</i>
J	constante de acoplamiento
K	grado Kelvin
Kcal	kilocaloría
KHDMS	hexametildisililamiduro de potasio
Leu, L	leucina

LG	<i>leaving group</i>
LiOH	hidróxido de Litio
Lys, K	lisina
M	molaridad
m	multiplete, masa, mili
m/z	relación masa/carga
Me	metilo
MeCN / CH₃CN	acetonitrilo
MeOH	metanol
mg	miligramo
MHz	megahercio
min	minuto/s
mL	mililitro
mmol	milimol
mol	mol/es
MOMCl	clorometil metil éter
Mp	<i>melting point</i>
MPT	modificaciones postraduccionales
MW	microondas
N	nitrógeno
Nm	nanómetros
Na₂CO₃	carbonato de sodio
NaEH	2-etilhexanoato de sodio
NH₃	amoníaco
NH₄Cl	cloruro de amonio
NOE	efecto nuclear <i>Overhauser</i>
NOESY	espectroscopía de efecto nuclear <i>Overhauser</i>
O	oxígeno
OR	<i>Optical Rotations</i>
OSu	<i>O</i> -succinimida
<i>p</i>	posición para
<i>p</i>-TsOH	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Pág.	página
Ph	fenil
Phe, F	fenilalanina
ppm	partes por millón

Pro, P	prolina
PrSH	propanotiol
r.t.	<i>room temperature</i>
R	sustituyente
RMN	resonancia magnética nuclear
Rdto	rendimiento
s	singlete, segundos
S	azufre
SBA	<i>Soybean agglutinin</i>
Ser, S	serina
SOCl₂	cloruro de tionilo
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Thr, T	treonina
TIS	triisopropilsilano
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TMB	2,2,3,3-tetrametoxibutano
TMS	tetrametilsilano
TS	estado de transición
Tyr, Y	Tirosina
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
Val, V	valina
W	vatios
z	carga
Zn	Zinc

Capítulo 1. Introducción

1.1 Aminoácidos y quiralidad

1.2 Deshidroaminoácidos

1.3 Reacciones de Michael

**1.4 Reacciones de Michael y
deshidroaminoácidos**



1.1 Aminoácidos y quiralidad

La quiralidad se define como una propiedad de un objeto que indica que no puede superponerse a su imagen especular y es esencial en nuestro mundo. Podemos encontrarla no solo en la naturaleza, sino también como ejemplo de inspiración para muchos arquitectos y diseñadores que la han utilizado en sus esculturas y edificios. Además, cabe destacar que la quiralidad es crucial en nuestras vidas. Seguramente, el ejemplo más conocido es la estructura de doble hélice de nuestro ADN, pero la mayor parte de las biomoléculas de nuestros organismos también son quirales.

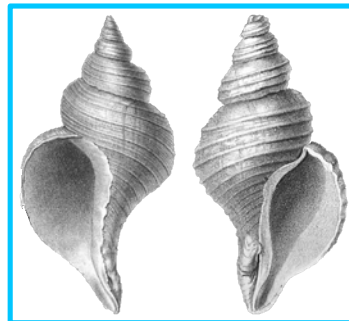


Figura 1.1 Ejemplo de quiralidad en la naturaleza, fósil *Neptunea angulata*.

Aunque el término quiral fue acuñado por primera vez en 1984 por el físico y matemático británico William Thomson, cuyo alias es Lord Kelvin, fue Louis Pasteur, químico y bacteriólogo francés, quien en 1848 separó, de una mezcla de cristales de sales de ácido tartárico, dos tipos de los mismos a los que llamó zurdo y diestro, imágenes especulares unos de otros, siendo así el primero en estudiar esta propiedad.¹

¹ Gal, J. *Chirality* **2011**, 23, 1.

Pasteur, estudiando entre otros los cristales rojos que podemos encontrar en el vino, llegó a conclusiones como que la actividad óptica de los compuestos orgánicos era resultado de la falta de simetría (él usaba la palabra disimetría) de las moléculas, y que en el ácido tartárico, al igual que los dos tipos de cristales que había separado eran imágenes especulares unos de otros, sus moléculas debían serlo.



Figura 1.2 A la izquierda Louis Pasteur. A la derecha cristales de ácido tartárico.

En la naturaleza, la mayoría de las moléculas quirales que podemos encontrar en organismos vivos están presentes solo en una de sus dos posibles formas enantioméricas. Según su quiralidad, dichas sustancias desviarán el plano de la luz polarizada hacia la derecha o izquierda. Pasteur las llamó “diestras” o dextrógiras, o “zurdas” o levógiras, respectivamente.

Algunas teorías dicen que esta homociralidad fue un prerequisite para la formación de las moléculas que permitieron la vida. Sin embargo, esta homociralidad surge a partir de un “caldo primigenio” que contenía una mezcla de ambos tipos de moléculas, las zurdas y las diestras.

Bajo el título “*A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions*”, Stanley L. Miller publicó en la revista *Science*² en el año 1953 la descripción de cómo obtener distintos aminoácidos por la acción de descargas eléctricas sobre una mezcla de gases de los que suponían que estaba compuesta la atmósfera terrestre primitiva (CH_4 , NH_3 , H_2O y H_2). Este joven químico, que posteriormente fue doctor, pudo reconocer la presencia de varios aminoácidos, como por ejemplo la alanina.

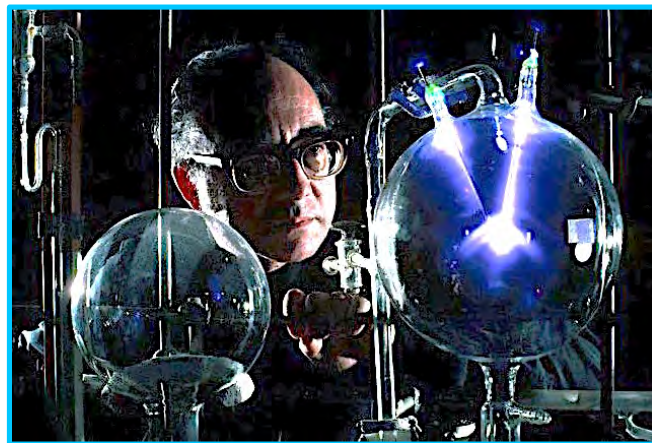


Figura 1.3 Stanley L. Miller y su experimento.

² (a) Miller, S. L. *Science* **1953**, *117*, 528. (b) Miller, S. L.; Urey, H. C. *Science* **1959**, *130*, 245. (c) Bada, J. L.; Lazcano, A. *Science* **2003**, *300*, 745. (d) Lazcano, A.; Bada, J. L. *Origins Life Evol. Biosph.* **2003**, *33*, 235. (e) Lazcano, A.; Bada, J. L. *Origins Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 373.

Era la primera vez que se obtenían compuestos esenciales para la vida, como son los aminoácidos, bajo las condiciones que propuso el bioquímico y biólogo ruso Aleksandr Ivánovich Oparin en su teoría del “caldo primigenio”.³ La existencia de átomos de carbono con cuatro sustituyentes diferentes permite que haya moléculas quirales, con sus dos posibles enantiómeros, imágenes especulares no superponibles. Durante la síntesis química y sin ayuda de ningún reactivo ni medio quiral, se forma una mezcla racémica de ambos enantiómeros. Por lo tanto, la homoquiralidad sigue siendo una cuestión importante que todavía se sigue estudiando.

Los aminoácidos y sus derivados se encuentran en la naturaleza desarrollando un papel muy importante para la vida. La homoquiralidad hace posible que predominen los L-aminoácidos en la naturaleza. De hecho, los veinte L-aminoácidos naturales son esenciales para la formación de péptidos y proteínas (**Figura 1.4**). Por contra, los carbohidratos pertenecen a la serie D. Éstos, además de ser importantes *per sé*, también son capaces de unirse covalentemente a péptidos y proteínas para formar los correspondientes derivados glicosilados, llamados glicopéptidos y glicoproteínas, respectivamente. Estos péptidos, proteínas y sus derivados glicosilados se comportan como cadenas muy flexibles pudiendo adoptar en disolución innumerables conformaciones. De todas ellas, sólo una minoría van a ser las activas biológicamente. Por ello, la síntesis de secuencias peptídicas modificadas con respecto a las que se encuentran en la naturaleza y que sean capaces de fijar la conformación bioactiva, es un objetivo importante en los estudios de investigación biomédica.

³ (a) Oparin, A. I. *Origin of Life*, Macmillan Co., New York, **1938**. (b) Urey, H. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1952**, 38, 351.

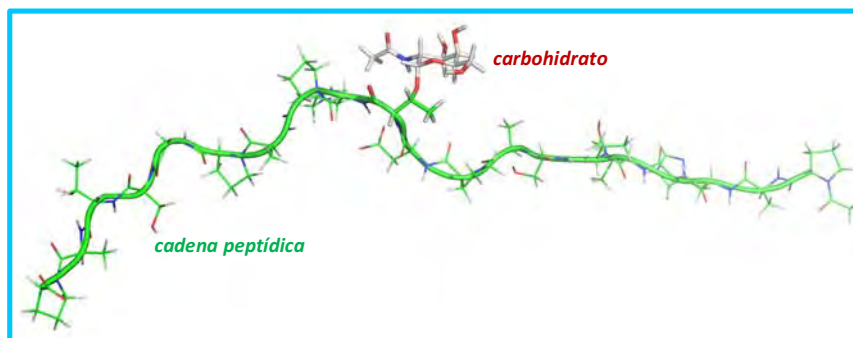


Figura 1.4 Parte de una glicoproteína donde la cadena peptídica (en verde) está formada por los residuos Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Ala.

Una de las posibles modificaciones se basa en la introducción de aminoácidos no naturales dentro de su estructura. Así, el diseño de nuevos péptidos donde los aminoácidos naturales son sustituidos por otros no naturales, ha sido y es un área de gran interés en la química orgánica.⁴

Por otro lado, se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de modificar la conformación de un glicopéptido para estabilizar una disposición que sea bioactiva, o mostrar conformeros que no existan en los derivados naturales, con el objetivo de modificar su interacción (*binding*) con las moléculas diana, y, por tanto, su actividad biológica.

⁴ (a) Jansson, A. M.; Hilaire, P. M. S.; Meldal, M. *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*; Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C.; Eds.; Houben-Weyl: Stuttgart, **2003**, 235. (b) Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579. (c) Wittmann, V. *Glycoscience: Glycoproteins*; Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J.; Eds.; SpringerVerlag: Berlin, **2001**, 2253. (d) Herzner, H.; Reipen, T.; Schultz, M.; Kunz, H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495. (e) Arsequell, G.; Valencia, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3045. (f) Taylor, C. M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317.

En concreto, nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia tanto en la síntesis de glicopéptidos no naturales, como en el estudio conformacional de dichos glicopéptidos, combinando técnicas experimentales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con cálculos de Dinámica Molecular (DM), lo que nos permite compararlos con sus análogos de residuos naturales, para ver si hay cambios en su comportamiento conformacional en disoluciones acuosas.⁵ Además, se realizan ensayos de tipo ELLA (*Enzime-Linked Lectin Assay*) y ELISA (*Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay*) para ver la afinidad de estas glicoproteínas con determinadas lectinas y anticuerpos, respectivamente.

⁵ (a) Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042. (b) Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9305. (c) Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2885. (d) Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7297. (e) Corzana, F.; Busto, J. H.; De Luis, M. G.; Fernández-Tejada, A.; Rodríguez, F.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3525. (f) Somovilla, V. J.; Bermejo, I. A.; Albuquerque, I. S.; Martínez-Sáez, N.; Castro-López, J.; García-Martín, F.; Compañón, I.; Hinou, H.; Nishimura, S.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Hurtado-Guerrero, R.; Peregrina, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Corzana, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18255. (g) Martínez-Sáez, N.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *45*, 7154. (h) Martínez-Sáez, N.; Supekar, N. T.; Wolfert, M. A.; Bermejo, I. A.; Hurtado-Guerrero, R.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Boons, G. J.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2294. (i) Martínez-Sáez, N.; Castro-López, J.; Valero-González, J.; Madariaga, D.; Compañón, I.; Somovilla, V. J.; Salvadó, M.; Asensio, J.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Bernardes, G. J. L.; Peregrina, J. M.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 9830.

1.2 Deshidroaminoácidos

Los α,β -deshidro- α -aminoácidos no pertenecen al grupo de los 20 L-aminoácidos naturales. Sin embargo, estos aminoácidos están presentes en la naturaleza en diferentes toxinas y antibióticos,⁶ formando péptidos principalmente.

La estructura principal presente en estos deshidroaminoácidos es un doble enlace C=C, el cual se encuentra entre el carbono α de la cadena principal y el carbono β de la cadena lateral del α -aminoácido. Por ello, cuando se usa el término deshidroaminoácido, nos estamos refiriendo a un α,β -deshidro- α -aminoácido (**Figura 1.5**).

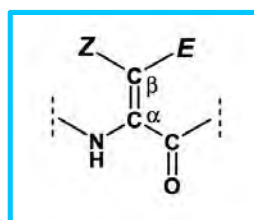


Figura 1.5 Esquema general de un α,β -deshidro- α -aminoácido.

⁶ Bonauer, C.; Walenzyk, T.; König, B. *Synthesis* **2006**, 1.

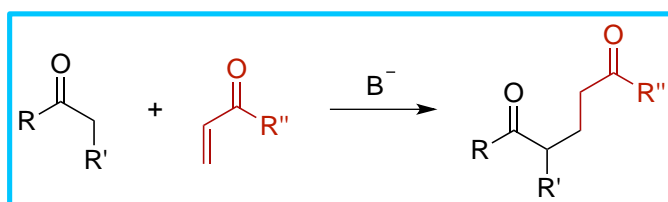
El doble enlace α,β está directamente relacionado con las propiedades conformacionales del aminoácido y, con ello, con la conformación de la molécula peptídica en la que esté presente.⁷ Ese doble enlace permite que se produzcan numerosas y diferentes reacciones, como por ejemplo adiciones de Michael, isomerizaciones *Z/E*, hidrogenaciones y cicloadiciones.⁸

⁷ Siodlak, D. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1.

⁸ (a) Stammer, C. H. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*; Weinstein, B., Ed: Dekker: Ney York, **1982**, 33. (b) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Wild, J. *Synthesis* **1988**, 159. (c) Humphrey, J. M.; Chamberlin, R. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243. (d) Chelucci, G.; Orru, G.; Pinna, G. A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9471. (e) Fan, Q. H.; Li, Y. M.; Chan A. S. C. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3385. (f) Genet, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *26*, 908. (g) Noyori, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008. (h) Tang, W. J.; Zhang, X. M. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3029. (i) Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645.

1.3 Reacciones de Michael

La reacción de Michael⁹ consiste en una adición de aniones estabilizados, como por ejemplo, enolatos y otros nucleófilos, sobre compuestos carbonílicos α,β -insaturados u otros compuestos similares (**Esquema 1.1**). Podría resumirse como una adición 1,4 o adición conjugada sobre dichos compuestos, aceptores de Michael. Además, esta reacción ha sido de gran importancia en el pasado, y sigue manteniendo su interés dentro del área de la síntesis orgánica.¹⁰



Esquema 1.1 Esquema general para la reacción de adición de Michael.

⁹ (a) Michael, A. *J. Prakt. Chem.* **1887**, *35*, 349. (b) Michael, A.; Freer, P. C. *J. Prakt. Chem.* **1891**, *43*, 390. (c) Michael, A.; Schulthess, O. *J. Prakt. Chem.* **1892**, *45*, 55. (d) Michael, A. *J. Prakt. Chem.* **1894**, *49*, 20.

¹⁰ (a) Bergmann, E. D.; Ginsburg, D.; Pappo, R. *Org. React.* **1959**, *10*, 179. (b) Jung, M., *Comprehensive Organic Synthesis*, 4, M. Semmelhack, Ed., Pergamon: London, **1991**, 1. (c) Lee, V. J. *Comprehensive Organic Synthesis*, Semmelhack, M., Ed., Pergamon: London, **1991**, *4*, 69. (d) Schmaltz, H. G., *Comprehensive Organic Synthesis*, Semmelhack, M., Ed., Pergamon: London, **1991**, *4*, 199. (e) Little, R. D.; Masjedizadeh, M. R.; Wallquist, O.; McLoughlin, J. I. *Org. React.* **1995**, *47*, 315. (f) Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E. *Progr. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487. (g) Pellisier, H. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9267. (h) Zhang, Y.; Wang, W. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *42*. (i) Reyes, E.; Uria, U.; Vicario, J. L.; Carrillo, L. *Org. React.* **2016**, *90*, 1.

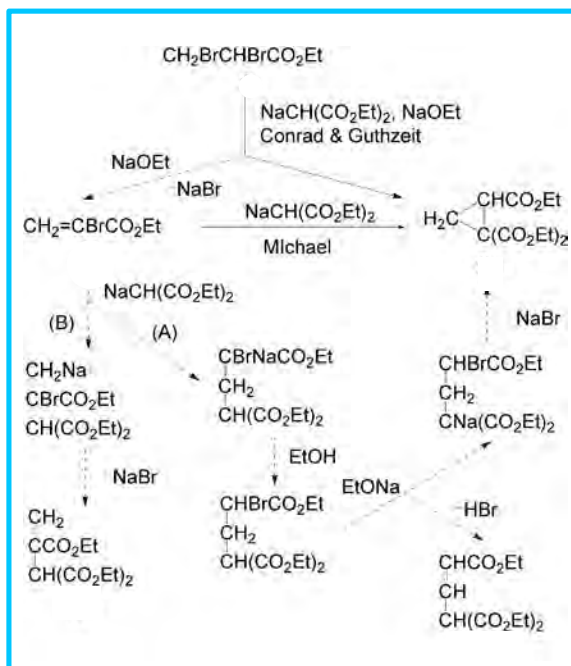
Esta reacción cumplió, en 2017, los 130 años desde que el químico americano Arthur Michael (1859-1942)¹¹ se encargó de darle nombre (**Figura 1.6**).



Figura 1.6 Arthur Michael (Imagen de la Colección Digital y Archivos de la Universidad de Tufts).

Arthur Michael no realizó de manera formal ningún grado o estudio universitario. Aun así, aprendió de Bunsen (Heidelberg), Hofmann (Berlín), Wurtz (París) y Mendeleev (St. Petersburgo). Su primer trabajo académico lo tuvo en Tufts donde, en 1887, describió la reacción por la cual ahora es recordado (**Esquema 1.2**).

¹¹ Tokoroyama, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2009.

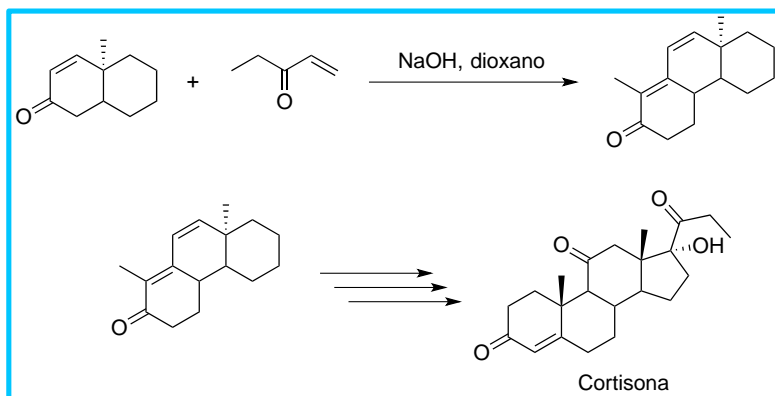


Esquema 1.2 Reacción de Michael descrita por Arthur Michael en 1887.

Esta reacción se ha utilizado, y se sigue utilizando de manera general, en el área de la síntesis orgánica debido a su capacidad de formar enlaces C-C.¹² Además, también suele utilizarse en cadena junto con otras reacciones. Por ejemplo, el caso más conocido se basa en una anulación de Robinson donde la adición de Michael tiene lugar en el primer paso. Esta secuencia de reacción de Michael, seguida de una condensación aldólica intramolecular, es de gran importancia en la síntesis de medicamentos antiinflamatorios esteroideos como la cortisona (**Esquema 1.3**).¹³

¹² Rubio, A.; Ezquerra, J.; Escribano, A.; Remuiñán, M. J.; Vaquero, J. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2171.

¹³ Woodward, R. B.; Sondheimer, F.; Taub, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 4057.



Esquema 1.3 Síntesis de la cortisona donde puede verse una reacción de Michael seguida de una condensación aldólica.

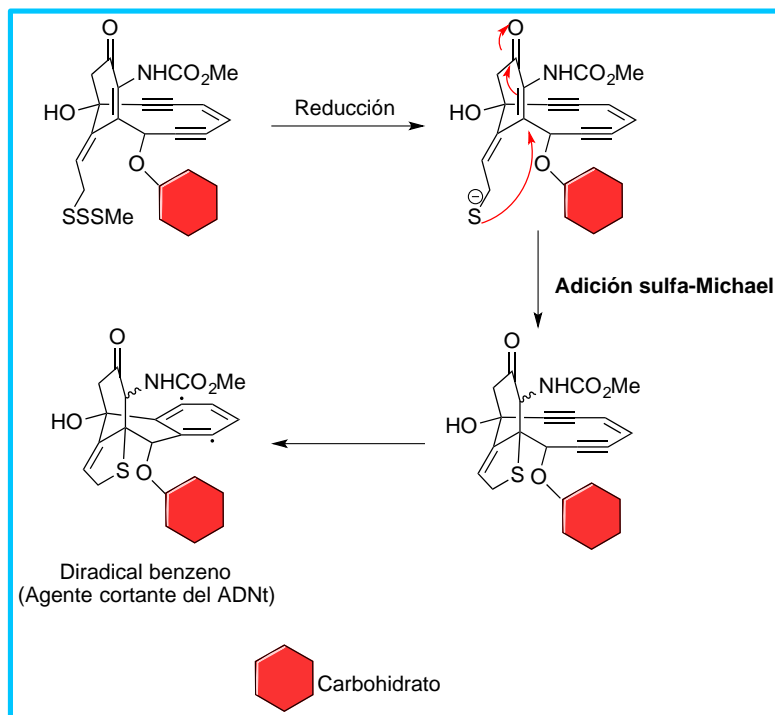
Aunque en la mayoría de los casos descritos para diferentes síntesis de Michael aparece el ataque de un enolato como nucleófilo, pueden encontrarse otros tipos de nucleófilos en estas reacciones, como por ejemplo, nucleófilos nitrogenados¹⁴ o nucleófilos azufrados.¹⁵

Si nos fijamos en la naturaleza, la reacción de Michael juega un papel crucial en los mecanismos de reactividad de diferentes biomoléculas. Una de ellas es la Calicheamicina, un antibiótico utilizado contra el cáncer que proviene de la bacteria *Micromonospora echinospora* y que contiene un grupo funcional enodiino en la parte activa de su estructura (**Esquema 1.4**).¹⁶

¹⁴ Fukuyama, T.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6723.

¹⁵ Binns, M.; Haynes, R.; Houston, T.; Jackson, W. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 573.

¹⁶ Nicolaou, K. C.; Sorensen, E. J. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*. Ed., VCH: Weinheim, **1995**.



Esquema 1.4. Ejemplo de una reacción de Michael en la Calicheamicina.

En esta reacción se forma, mediante una adición sulfa-Michael intramolecular, el precursor del compuesto dirradicálico encargado de abstraer dos átomos de hidrógeno de la cadena de desoxirribosa del ADN, provocando la escisión de las hebras y por tanto la ruptura del mismo.¹⁷

¹⁷ Walker, S.; Landovitz, R.; Ding, W. D.; Ellestad, G. A.; Kahne, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 4608.

1.4 Reacción de Michael y deshidroaminoácidos

Sabiendo que la reacción de Michael no sólo necesita un buen nucleófilo, sino que también es importante el aceptor, los deshidroaminoácidos son buenos candidatos en este contexto. En la bibliografía podemos encontrar numerosos ejemplos de adiciones de Michael, con diferentes nucleófilos, sobre estos deshidroaminoácidos. Por ejemplo, un estudio de las adiciones de Michael sobre deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb) (**Figura 1.7**), utilizando nucleófilos nitrogenados y azufrados, mostraba la importancia de las condiciones de esta reacción a la hora de obtener unos productos u otros.¹⁸

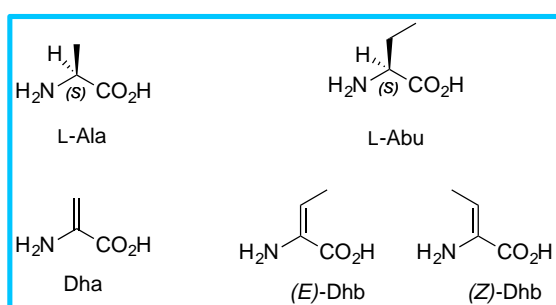
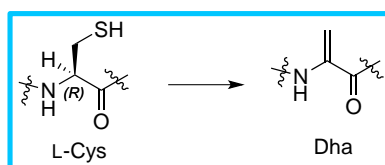


Figura 1.7. Estructura de los aminoácidos *L*-alanina (*L*-Ala) y ácido *L*-aminobutírico (*L*-Abu) y de los deshidroaminoácidos deshidroalanina (*Dha*) y deshidrobutirina (*Dhb*).

¹⁸ (a) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J.; Sebastiao, J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2000**, 3317. (b) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4099. (c) Abreu, A. S.; Silva, N. O.; Ferreira, P. M. T.; Queiroz, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *8*, 1537.

Además, podemos encontrar numerosos ejemplos de reacciones de Michael dentro del campo de la modificación química de proteínas.¹⁹ Son de gran importancia, en este contexto, la modificación selectiva de cisteínas,²⁰ donde el azufre juega un papel importante. Los métodos de eliminación de cisteínas dan acceso a deshidroalaninas (Dha) (**Esquema 1.5**).²¹ Estas deshidroalaninas son unos aceptores de Michael muy útiles en la síntesis de compuestos azufrados utilizando directamente la adición conjugada de nucleofilos azufrados como tioles.



Esquema 1.5. Deshidroalanina a partir de la L-cisteína (L-Cys).

Es importante destacar que si se usan Dha quirales pueden realizarse adiciones de Michael diastereoselectivas, dando lugar a cisteínas de una única configuración, o las D o las L.²² Aunque, hasta el momento, estas síntesis quedan limitadas a su uso para moléculas discretas.

¹⁹ Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174.

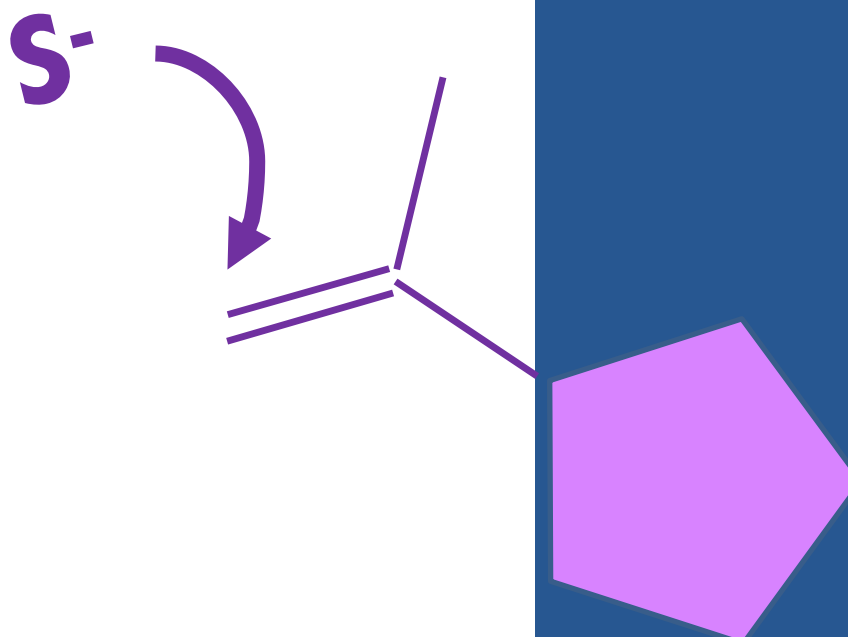
²⁰ (a) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. *Chem Asian J.* **2009**, *4*, 630. (b) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 730. (c) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L.; Fernández-González, M.; Anthony, D. C.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1432.

²¹ (a) Chalker, J. M.; Gunnoo, S. B.; Boutureira, O.; Gerstberger, S. C.; Fernández-González, M.; Bernardes, G. J. L.; Griffin, L.; Hailu, H.; Schofield, C. J.; Davis, B. G. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1666. (b) Bernardes, G. J. L.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052. (c) Bernardes, G. J. L.; Grayson, E. J.; Thompson, S.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; Oualid, F. E.; Claridge, T. D. W.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244.

²² Aydillo, C.; Compañón, I.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 789.

Capítulo 2. Antecedentes

- 2.1 Síntesis de deshidroaminoácidos
- 2.2 Adición de Michael para la obtención de compuestos azufrados biológicamente activos



2.1 Síntesis de deshidroaminoácidos

Debido a las posibilidades que ofrecen los deshidroaminoácidos, expuestas en el capítulo *Introducción*, la síntesis de estos compuestos ha despertado gran interés dentro del área de la química orgánica sintética.

A continuación, se recogen algunas publicaciones relacionadas con la síntesis de estos deshidroaminoácidos, especialmente los derivados de serina y treonina.¹

¹ (a) Ramesh, R.; De, K.; Chandrasekaran, S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10534. (b) Ramapanicker, R.; Mishra, R.; Chandrasekaran, S. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 123. (c) Nakamura, K.; Isaka, T.; Toshima, H.; Kodaka, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7221. (d) Sun, Y.; Wang, X.; Zheng, X.; Zhao, K. *Synlett* **2008**, 861. (e) Fanelli, R.; Jeanne-Julien, L.; René, A.; Martínez, J.; Cavelier, F. *Amino Acids*, **2015**, *47*, 1107. (f) Siodlak, D. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1. (g) Stammer, C. H. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*; Weinstein, B., Ed: Dekker: Ney York, **1982**, 33. (h) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Wild, J. *Synthesis* **1988**, 159. (i) Humphrey, J. M.; Chamberlin, R. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243. (j) Chelucci, G.; Orru, G.; Pinna, G. A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9471. (k) Fan, Q. H.; Li, Y. M.; Chan A. S. C. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3385. (l) Genet, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *26*, 908. (m) Noyori, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008. (n) Tang, W. J.; Zhang, X. M. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3029. (ñ) Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645. (o) Jiang, J.; Ma, Z.; Castle, S. L. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 5431.

Estos sustratos son considerados como buenos productos de partida en la síntesis de aminoácidos porque la amplia reactividad de las olefinas² hace que puedan sufrir un gran número de transformaciones químicas, por ejemplo, reacciones estereoselectivas como adiciones nucleófilas,³ adiciones radicalarias,⁴ cicloadiciones,⁵ epoxidaciones⁶ e hidrogenaciones,⁷ todas de manera asimétrica dando lugar a compuestos con alto valor biológico (**Esquema 2.1**).

² Bonauer, C.; Walenzyk, T.; König, B. *Synthesis* **2006**, 1.

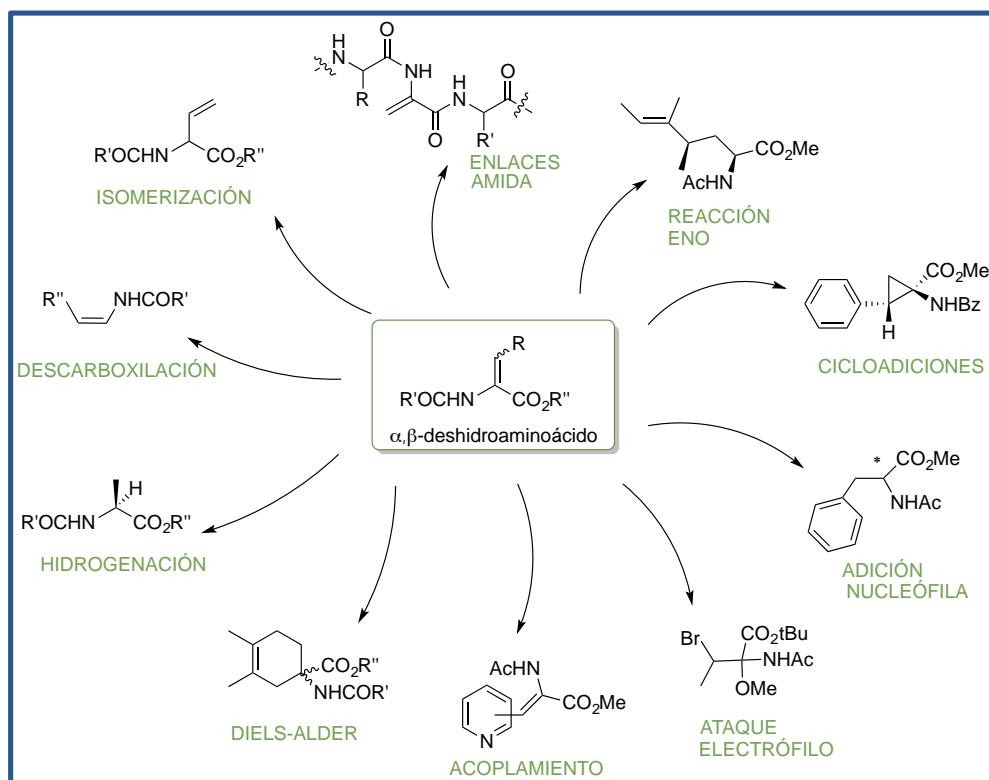
³ (a) Pyne, S. G.; Javidan, A.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Tetrahedron* **1995**, 51, 5157. (b) Javidan, A.; Schafer, K.; Pyne, S. G. *Synlett* **1997**, 100. (c) Bull, S. D.; Davies, S. G.; O'Shea, M. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3657. (d) Bull, S. D.; Davies, S. G.; Garner, A. C.; O'Shea, M. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 3281.

⁴ (a) Sibi, M. P.; Asano, Y.; Sausker, J. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 1293. (b) Sibi, M. P.; Patil, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 1235.

⁵ (a) Horikawa, H.; Nishitani, T.; Iwasaki, T.; Mushika, Y.; Inoue, I.; Miyoshi, M. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 4101. (b) Bueno, M. P.; Cativiela, C. A.; Mayoral, J. A.; Avenoza, A. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6551. (c) Cativiela, C.; Mayoral, J. A.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M.; Lahoz, F. J.; Gimeno, S. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4664. (d) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3375. (e) Avenoza, A.; Barriobero, J. I.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *Tetrahedron* **2001**, 57, 2745. (f) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Busto, J. H.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *Tetrahedron* **2001**, 57, 545. (g) Adams, L. A.; Aggarwal, V. K.; Bonnert, R. V.; Bressel, B.; Cox, R. J.; Shepherd, J.; De Vicente, J.; Walter, M.; Whittingham, W. G.; Winn, C. L. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9433.

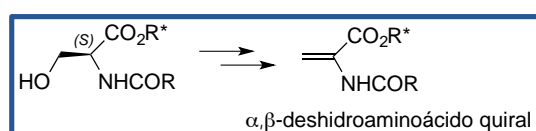
⁶ Bartels, A.; Jones, P. G.; Liebscher, J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3673.

⁷ (a) Oba, M.; Nakajima, S.; Nishiyama, K. *Chem. Comm.* **1996**, 1875. (b) Oba, M.; Terauchi, T.; Owari, Y.; Imai, Y.; Motoyama, I.; Nishiyama, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1275.



Esquema 2.1 Ejemplos de síntesis de diferentes compuestos en las cuales se utiliza un α,β -deshidroaminoácido como sustrato.

En la bibliografía podemos encontrar deshidroaminoácidos de esta familia donde la quiralidad está presente en la parte ácido del mismo. Por ejemplo, dichos sustratos se han utilizado para realizar sobre ellos cicloadiciones de Diels-Alder diastereoselectivas, pudiéndose obtener aminoácidos cíclicos conformacionalmente restringidos (**Esquema 2.1**).⁸ Sin embargo, no hay un gran número de deshidroaminoácidos donde la quiralidad se incorpore en la parte enamida (**Esquema 2.2**).

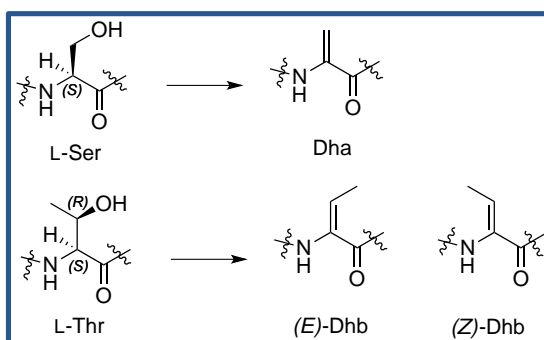


Esquema 2.2 Síntesis de deshidroaminoácido donde la quiralidad se encuentra en el grupo ácido.

⁸ Avenoza, A.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 721.

2.1.1 Mediante reacciones de eliminación

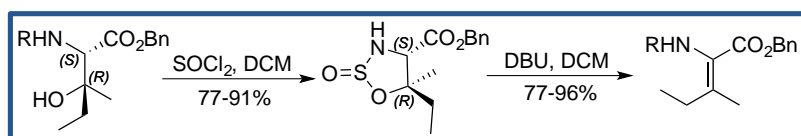
La eliminación de agua de los β -hidroxi- α -aminoácidos es una ruta muy común a la hora de sintetizar α,β -deshidroaminoácidos. Es un método muy utilizado a la hora de sintetizar deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb) a partir de serina y treonina, respectivamente. Para ello, hay que activar previamente el grupo hidroxilo pudiendo utilizar diferentes reactivos⁹ como, por ejemplo, cloruro de dicloroacetilo/trietilamina o carbodiimida/cloruro de cobre(I) (Esquema 2.3).



Esquema 2.3 Eliminación de agua a partir de la serina (Ser) y treonina (Thr) para formar deshidroalanina y deshidrobutirina.

⁹ (a) Goodall, K.; Parsons, A. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3259. (b) Li, K. W.; Wu, J.; Xing, W.; Simon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7237. (c) Cherney, R. J.; Wang, L. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2544. (d) Somekh, L.; Shanzer, A. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 907. (e) Suzen, S. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* **1999**, 28, 129. (e) Suzen, S.; Williams, J. M. *Turk. J. Chem.* **2000**, 24, 361. (f) Photaki, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 1123. (g) Schluter, D. N.; Mamantov, G.; Vercellotti, J. R. *Carbohydr. Res.* **1974**, 38, 333. (h) Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3131. (i) Jiménez, J. C.; Bayo, N.; Chavarría, B.; López-Macià, A.; Royo, M.; Nicolás, E.; Giralt, E.; Albericio, F. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, 9, 135 (j) Royo, M.; Jiménez, J. C.; López-Macià, A.; Giralt, E.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 45. (k) Sai, H.; Ogiku, T.; Ohmizu, H. *Synthesis* **2003**, 201. (l) Fukase, K.; Kitazawa, M.; Sano, A.; Shimbo, K.; Horimoto, S.; Fujita, H.; Kubo, A.; Wakamiya, T.; Shiba, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 2227. (m) Burrage, S.; Raynham, T.; Williams, G.; Essex, J. W.; Allen, C.; Cardno, M.; Swali, V.; Bradley, M. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1455.

Un método de eliminación estereoselectiva es el descrito por Wandless,¹⁰ la reacción de β -hidroxiaminoácidos con cloruro de tionilo da como resultado sulfamiditos cíclicos que, seguido de una eliminación antiperiplanar con 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) como base, da lugar, de una manera selectiva, a los α,β -deshidroaminoácidos *E* o *Z*, dependiendo de la configuración del β -hidroxiaminoéster (**Esquema 2.4**). La reacción puede realizarse en un único paso y cada alcohol terciario se transforma de manera estereoselectiva en un α,β -deshidroaminoéster. Este método también puede utilizarse en síntesis en fase sólida.



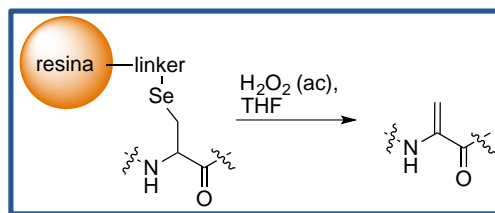
Esquema 2.4 Síntesis de deshidroaminoácidos a partir de alcoholes terciarios.

Otra posibilidad es la oxidación de tio-¹¹ y seleno-¹² aminoácidos seguida de una termólisis para dar los deshidroaminoácidos correspondientes con muy buenos rendimientos (**Esquema 2.5**).

¹⁰ Stohlmeyer, M. M.; Tanaka, H.; Wandless, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6100.

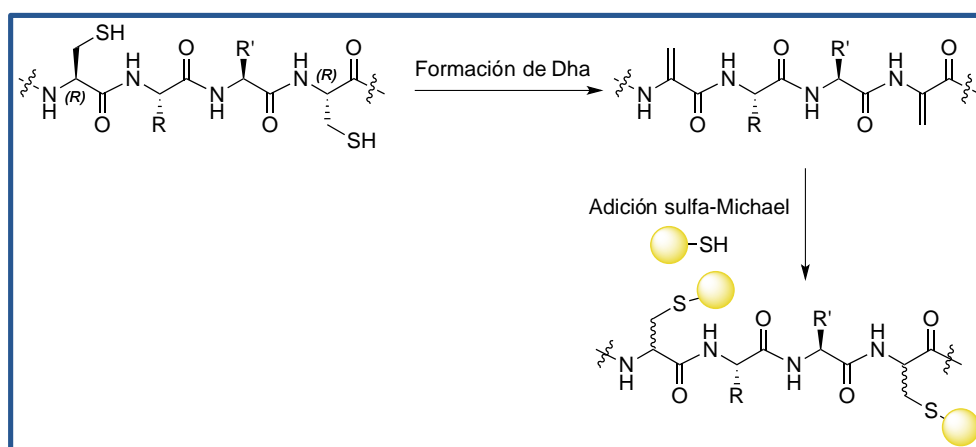
¹¹ (a) Rich, D. H.; Tam, J. P. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3815. (b) Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5997.

¹² (a) Walter, R.; Roy, J. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2561. (b) Nakamura, K.; Isaka, T.; Toshima, H.; Kodaka, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7221.



Esquema 2.5 Síntesis de deshidroalanina a partir de un seleno-aminoácido.¹³

Este tipo de reacciones puede usarse para modificar proteínas de manera selectiva¹⁴ utilizando, de nuevo, una eliminación para dar la deshidroalanina correspondiente a partir de cisteína, y una reacción S-Michael para modificar la estructura de la cisteína natural y generar las modificaciones deseadas dentro de las proteínas (**Esquema 2.6**).



Esquema 2.6 Modificación selectiva de cisteínas en proteínas a partir de la formación de Dha y posterior adición S-Michael.

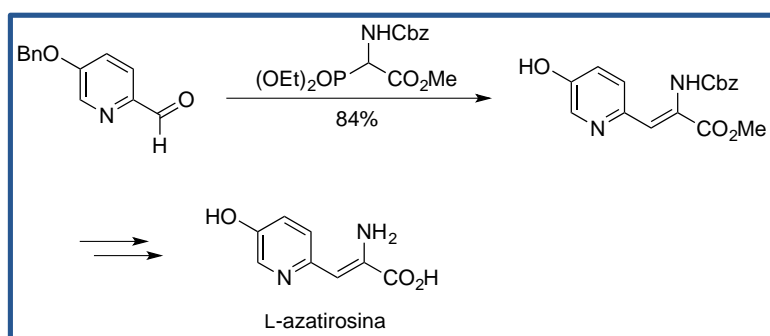
¹³ (a) Nakamura, K.; Ohnishi, Y.; Horikawa, E.; Konakahara, T.; Kodaka, M.; Okuno, H. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5445. (b) Horikawa, E.; Kodaka, M.; Nakahara, Y.; Okuno, H.; Nakamura, K. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8337.

¹⁴ Bouteira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174.

2.1.2 Mediante reacciones Horner-Wadsworth-Emmons y Wittig

La síntesis de diferentes α,β -deshidroaminoácidos puede llevarse a cabo mediante reacciones de acoplamiento C-C, utilizando para ello la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) o una reacción de Wittig, entre otras.

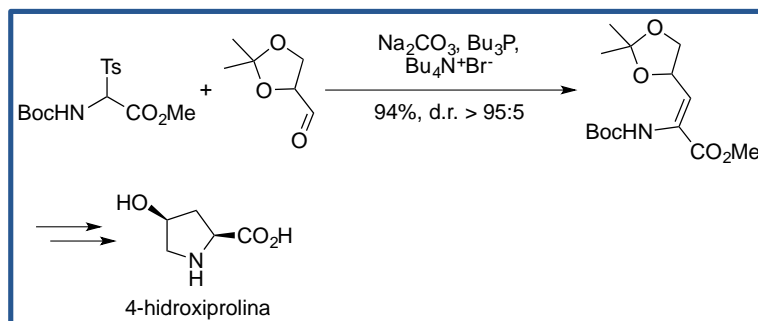
Por ejemplo, el uso de la reacción de HWE es clave en la síntesis de aminoácidos que contienen piridina,¹⁵ como la L-azatirosina (**Esquema 2.7**).



Esquema 2.7 Preparación de aminoácidos que contienen piridina utilizando la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE).

¹⁵ (a) Adamczyk, M.; Akireddy, S. R.; Reddy, R. E. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3421. (b) Adamczyk, M.; Akireddy, S. R.; Reddy, R. E. *Org. Lett.* **2001**, 3, 3157. (c) Adamczyk, M.; Akireddy, S. R.; Reddy, R. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 2385. (d) Adamczyk, M.; Akireddy, S. R.; Reddy, R. E. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 58, 6951.

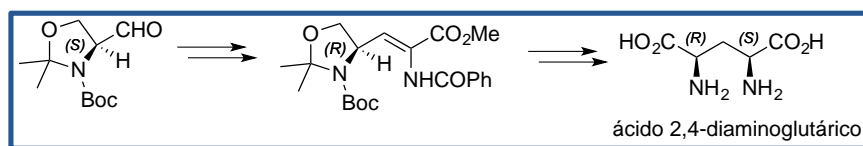
También se han descrito síntesis de deshidroaminoácidos utilizando una reacción tipo Wittig.¹⁶ Por ejemplo, en la síntesis de 4-hidroxiprolina, podemos encontrar una reacción de este tipo para formar el aminoácido necesario (Esquema 2.8).



Esquema 2.8 Síntesis de (*S,S*)-4-hidroxiprolina utilizando una reacción de Wittig donde se puede ver la formación de un deshidroaminoácido.

¹⁶ Kimura, R.; Nagano, T.; Kinoshita, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, 75, 2517.

Otro ejemplo de síntesis de estos compuestos α,β -insaturados es el realizado previamente por miembros de nuestro grupo de investigación donde se parte del aldehído de Garner¹⁷ para la obtención de un deshidroaminoácido, intermedio en la síntesis del ácido diaminoglutárico (**Esquema 2.9**).¹⁸



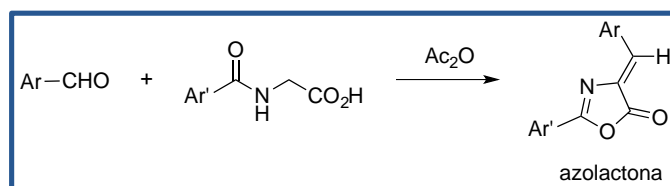
Esquema 2.9 Síntesis del ácido 2,4-diaminoglutárico a partir del aldehído de Garner.

¹⁷ (a) Garner, P.; Park, J. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2361. (b) Garner, P.; Park, J. M. *Org. Synth.* **1991**, *70*, 18.

¹⁸ (a) Avenzoza, A.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M., Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1555. (b) Avenzoza, A.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M., Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 863.

2.1.3 Mediante el uso de la síntesis de Erlenmeyer y apertura de anillo de oxazolonas

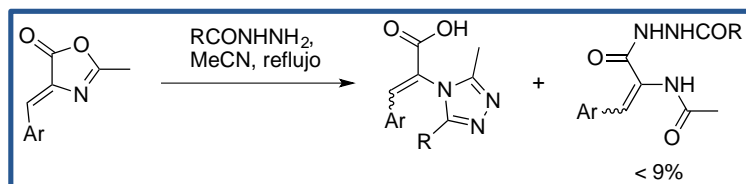
El método clásico para la preparación de deshidroaminoácidos con anillos aromáticos o heteroaromáticos es la síntesis de Erlenmeyer.¹⁹ Este procedimiento, también llamado síntesis de oxazolonas de Erlenmeyer-Plöchl, se basa en la síntesis de las azlactonas u oxazolonas mediante la condensación de aldehídos aromáticos con ácido hipúrico (derivados de glicina) en presencia de anhídrido acético (**Esquema 2.10**).



Esquema 2.10 Esquema general de la síntesis de Erlenmeyer-Plöchl.

¹⁹ (a) Schmidt, U.; Hausler, J.; Oehler, E.; Poisel, H. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1979**, 37, 251. (b) Erlenmeyer, E. *Ann.* **1892**, 271, 167. (c) Erlenmeyer, E. *Ann.* **1893**, 275, 1. (d) Erlenmeyer, E. *Ber.* **1900**, 33, 2036. (e) Erlenmeyer, E. *Ber.* **1902**, 35, 243. (f) Erlenmeyer, E. *Ann.* **1904**, 337, 265. (g) Cooper, A. J. L.; Ginos, J. Z.; Meister, A. *Chem. Rev.* **1983**, 83, 321. (h) Ivanova, G. *Tetrahedron* **1992**, 48, 177. (i) Bassi, D. A.; Deulofeu, V.; Ortega, F. A. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 171. (j) Zavyalov, S. I.; Dorofeyeva, O. V.; Rummyantseva, Y. Y. *Khim. Farmatsevticheskii Zh.* **1993**, 27, 76. (k) Bennett, E. L.; Niemann, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 1803. (l) Bennett, E. L.; Hoerger, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 5975. (m) Pages, R. A.; Burger, A. *J. Med. Chem.* **1966**, 9, 766. (n) Mosberg, H. I.; Sobczyk-Kojiro, K.; Subramanian, P.; Crippen, G. M.; Ramalingam, K.; Woodard, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 822. (ñ) Yu, C. M.; Zhou, B. C.; Su, W. K.; Xu, Z. Y. *Synth. Commun.* **2006**, 36, 3447. (o) Chandrasekhar, S.; Karri, P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5763. (p) Karade, N. N.; Shirodkar, S. G.; Dhoot, B. M.; Waghmare, P. B. *J. Chem. Res.* **2005**, 46. (q) Mogilaiah, K.; Prashanthi, M.; Reddy, C. S. *Indian J. Chem., Sect. B* **2003**, 42B, 2126. (r) Chandrasekhar, S.; Karri, P. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 785. (s) Rao, Y. S. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 722. (t) Boekelheide, V.; Schramm, L. M. *J. Org. Chem.* **1949**, 14, 298.

La formación de estas azolactonas u oxazolonas tiene numerosas aplicaciones, especialmente en la síntesis de aminoácidos. La apertura de los anillos formados puede dar lugar a diferentes deshidroaminoácidos (**Esquema 2.11**), aunque en algunos casos, se obtienen como producto minoritario.²⁰

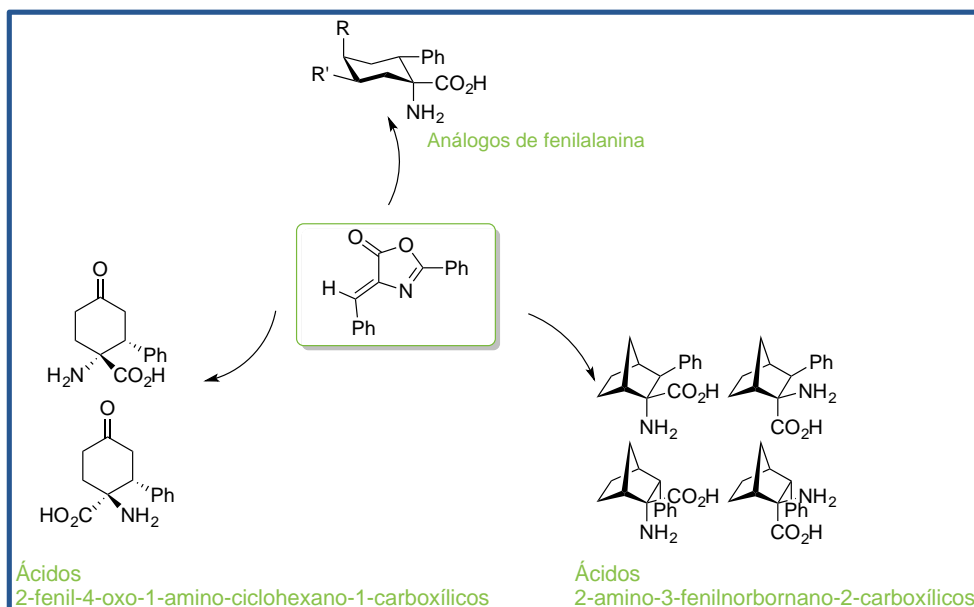


Esquema 2.11 Apertura de una ariloxazolona con acilhidrazina.

Las azolactonas u oxazolonas han sido muy útiles como productos de partida en la síntesis de derivados de aminoácidos también en nuestro grupo de investigación.

²⁰ Maekawa, K.; Kanno, Y.; Kubo, K.; Igarashi, T.; Sakurai, T. *Heterocycles* **2004**, *63*, 1273.

Por ejemplo, se ha utilizado esta vía para sintetizar análogos de fenilalanina,²¹ ácidos 2-amino-3-fenilnorbornano-2-carboxílicos,²² y ácidos 2-fenil-4-oxo-1-aminociclohexano-1-carboxílicos,²³ es decir, la síntesis de derivados de aminoácidos conformacionalmente rígidos, utilizando la reacción de Diels-Alder como etapa clave del proceso (**Esquema 2.12**).



Esquema 2.12 Derivados de aminoácidos a partir de oxazolonas.

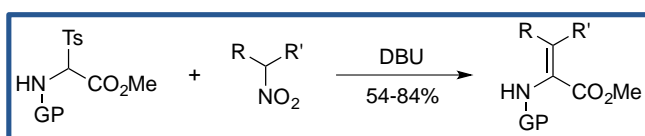
²¹ Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10987.

²² Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D.; Mayoral, J. A.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 667.

²³ Avenoza, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12989.

2.1.4 A partir de nitroalcanos o de una formilamino-metilenación de Schöllkopf

En la bibliografía se pueden encontrar ejemplos de síntesis de α,β -deshidroaminoésteres usando nitroalcanos.²⁴ Por ejemplo, la reacción de diferentes nitroalcanos con una glicina protegida ortogonalmente (**Esquema 2.13**). Una vez tratado con una base, el carbono α del nitroalcano tiene un carácter nucleófilo y ataca al intermedio imina formado en la eliminación del grupo saliente, donde sigue una eliminación, catalizada con DBU, de ácido nítrico para dar el correspondiente deshidroaminoácido.



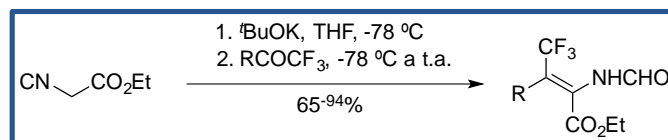
Esquema 2.13 Síntesis de α,β -deshidroaminoácidos a partir de nitroalcanos.

Este método puede utilizarse también en la síntesis de dipéptidos que contengan estos deshidroaminoácidos.²⁵

²⁴ Nagano, T.; Kinoshita, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 1605.

²⁵ Shiraishi, Y.; Yamauchi, H.; Takamura, T.; Kinoshita, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 2219.

La formilamino-metilenación de Schöllkopf permite la preparación estereoselectiva de butanoatos trisustituídos partiendo de isocianoacetato de etilo y diferentes trifluorometilcetonas (**Esquema 2.14**).²⁶



Esquema 2.14 Síntesis deshidroaminoácidos mediante la condensación de isocianoacetato con trifluorometilcetonas.

En este caso, los factores electrónicos y estéricos del sustituyente trifluorometilo hacen que esta reacción transcurra con una elevada estereoselectividad.

²⁶ Enders, D.; Chen, Z. H.; Raabe, G. *Synthesis* **2005**, 306.

2.1.5 Síntesis de *N,O*-acetales bicíclicos y nuevos derivados de Dha y Dhb quirales

Como ya se ha comentado anteriormente, a pesar de que existen numerosos trabajos a partir de α,β -deshidroaminoácidos, muy pocos presentan quiralidad. Y, cuando lo hacen, habitualmente se encuentra en el extremo carboxilo o bien como sustituyente del doble enlace C=C (**Figura 2.1**).

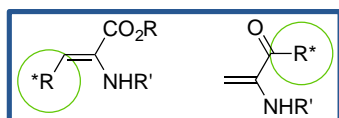
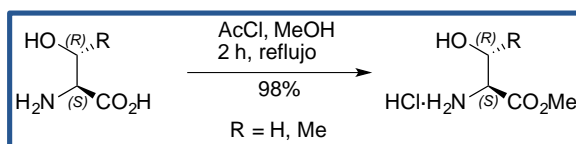


Figura 2.1 Quiralidad habitual presentada en los α,β -deshidroaminoácidos.

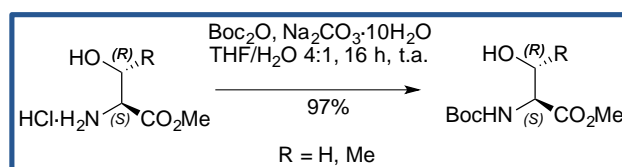
Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado la síntesis de nuevos *N,O*-acetales bicíclicos equivalentes de serina y treonina que incorporan cuatro centros estereogénicos, a partir de los aminoácidos enantioméricamente puros Ser y Thr protegidos en forma de éster metílico y NHBoc.

Para la síntesis de estos compuestos bicíclicos se realizó inicialmente una esterificación del grupo ácido del aminoácido correspondiente, Ser o Thr, por el método de Fischer (**Esquema 2.15**), con cloruro de acetilo y metanol, generando in situ cloruro de hidrógeno, durante dos horas y a reflujo, obteniéndose como único producto el clorhidrato del éster metílico de los aminoácidos de una manera casi cuantitativa.



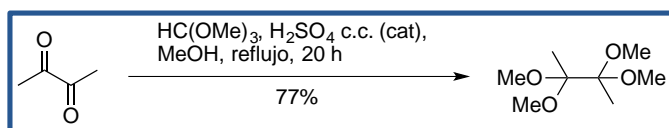
Esquema 2.15

Después, los clorhidratos obtenidos fueron tratados con carbonato de sodio decahidrato y anhídrido de Boc en una mezcla THF/H₂O en proporciones 4:1, durante 16 h a temperatura ambiente (**Esquema 2.16**). El objetivo es proteger la amina en forma de *tert*-butoxicarbonilo (*N*-Boc). Al añadir el carbonato sódico decahidrato fue importante medir el pH para asegurarse de que la disolución estaba básica. Tras evaporar el THF se realizaron extracciones con éter y acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con cloruro de sodio saturado y se secó con sulfato de sodio anhidro.



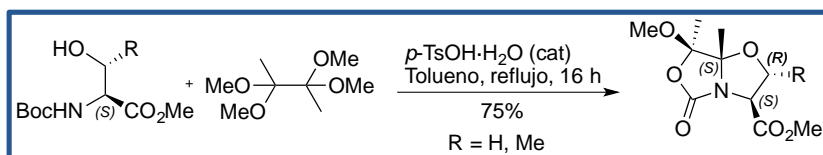
Esquema 2.16

Para la síntesis de los *N,O*-acetales bicíclicos derivados de Ser y Thr, también fue necesario sintetizar el tetrametoxibutano (TMB), que se obtuvo de la 2,3-butanodiona y del ortoformiato de trimetilonen MeOH utilizando una catálisis ácida con ácido sulfúrico concentrado (**Esquema 2.17**). El TMB fue purificado por destilación a vacío, lo cual hace que puedan obtenerse grandes cantidades de compuesto de una manera accesible ya que el costo del mismo es muy elevado.



Esquema 2.17

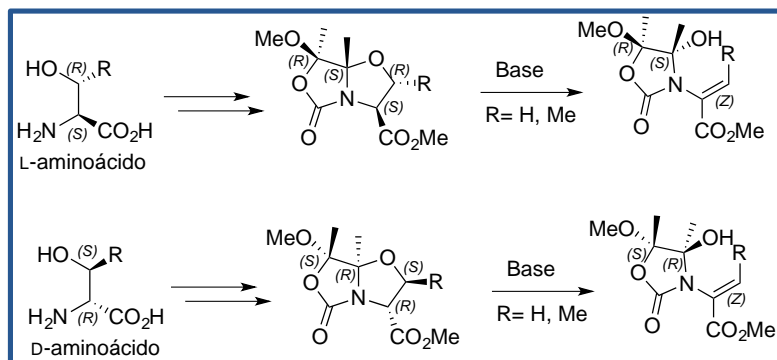
Una vez obtenidos estos precursores, los aminoácidos protegidos correspondientes y el TMB, se hicieron reaccionar para obtener los equivalentes bicíclicos de serina y de treonina. Para ello, se siguieron las condiciones de reacción que se describen a continuación (**Esquema 2.18**), utilizando el ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y tolueno como disolvente, a reflujo durante una noche.



Esquema 2.18

Estos derivados sirven como productos de partida en la síntesis de Dha y Dhb quirales mediante las reacciones retro-*O*-Michael/*C*-alquilación en cadena, como pasos clave en su obtención (**Esquema 2.19**).²⁷ Además, en nuestro caso, la quiralidad está presente en el extremo amina del aminoácido.

²⁷ (a) Aydillo C.; Jiménez-Osés G.; Busto J. H.; Peregrina J. M.; Zurbano M. M.; Avenzoza A. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4840. (b) Jiménez-Osés G.; Aydillo C.; Busto J. H.; Zurbano M. M.; Peregrina J. M.; Avenzoza A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5399. (c) Aydillo C.; Avenzoza A.; Busto J. H.; Jiménez-Osés G.; Peregrina J. M.; Zurbano M. M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 2829.



Esquema 2.19 Síntesis de deshidroaminoácidos quirales *Dha** y *Dhb** a partir de *L*- y *D*-serina y *L*- y *D*-treonina.

Estos compuestos han sido muy útiles en la síntesis de derivados biológicamente activos debido a su elevada reactividad y a que su quiralidad induce diastereoselectividad en las síntesis correspondientes, como se mostrará en el siguiente apartado de esta Memoria.

2.2 Adición de Michael para la obtención de compuestos azufrados biológicamente activos

Debido a la importancia de la síntesis de aminoácidos no naturales, mediante por ejemplo *S*-glicosilaciones, mencionadas en el capítulo *Introducción*, el estudio y la síntesis de nuevos aminoácidos derivados de cisteínas modificadas ha acaparado interés en el campo de la química orgánica durante los últimos años. A continuación, se muestran estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación donde se han desarrollado nuevas metodologías de síntesis con el objetivo de obtener diferentes compuestos enantioméricamente puros que contengan azufre, como la lantionina y derivados, y *S*-glicosilcisteínas, utilizando los deshidroaminoácidos nombrados con anterioridad en esta Memoria.

Los péptidos basados en aminoácidos proteínogénicos tienen aplicaciones limitadas en el ámbito de los medicamentos debido a su rápido metabolismo por proteólisis.²⁸ Numerosos aminoácidos no naturales se han utilizado y se siguen utilizando en la síntesis de nuevos medicamentos.²⁹

Por otro lado, el problema de la resistencia a los antibióticos es un hecho creciente que provoca un aumento en la demanda de nuevos compuestos antimicrobianos. Es por ello que el estudio y diseño de péptidos modificados que incorporan aminoácidos no naturales se ha visto incrementado en los últimos años.

²⁸ Marshall, S. A.; Lazar, G. A.; Chirino, A. J.; Desjarlais, J. R. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 212.

²⁹ (a) Ripka, A.; Rich, D. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 441. (b) Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 292.

Algunos de los compuestos donde la cisteína aparece en la naturaleza de un modo relevante son las lantioninas, presentes en la estructura de los lantibióticos (**Figura 2.2**).

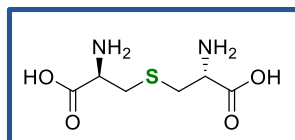


Figura 2.2 Estructura de la lantionina.

Los lantibióticos son una familia de antibióticos peptídicos con poder antimicrobiano que poseen todos ellos en su estructura (además de otros aminoácidos poco comunes) residuos de lantionina, encargados de enlazar las distintas partes de la cadena peptídica mediante puentes tioéter.³⁰ Estos puentes tioéter son mucho más fuertes y estables que los puentes disulfuro de las cisteínas.

Por todo ello, los péptidos que poseen puentes tioéter se pueden considerar como análogos de los unidos mediante cisteínas, pero introduciendo restricciones conformacionales que conllevan dichos cambios en las uniones peptídicas. La Nisina A (**Figura 2.3**) es un ejemplo de lantibiótico empleado como aditivo en alimentación (E234) para prevenir la aparición de determinadas bacterias.

³⁰ (a) Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633. (b) Patton, G. C.; van der Donk, W. A. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 543. (c) Paul, M.; van der Donk, W. A. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2005**, *2*, 23.

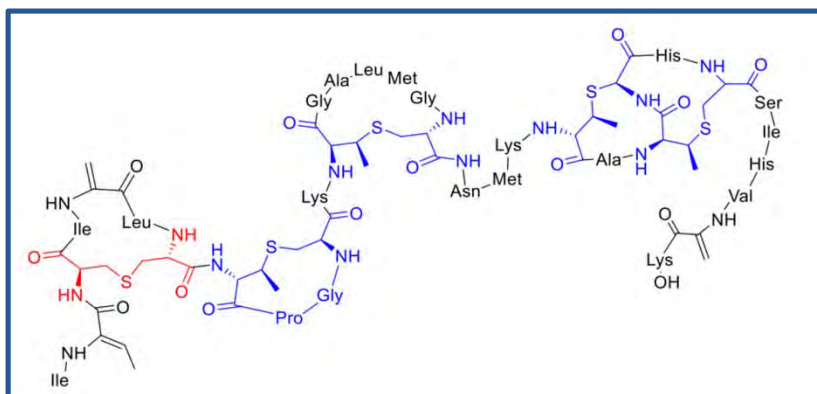
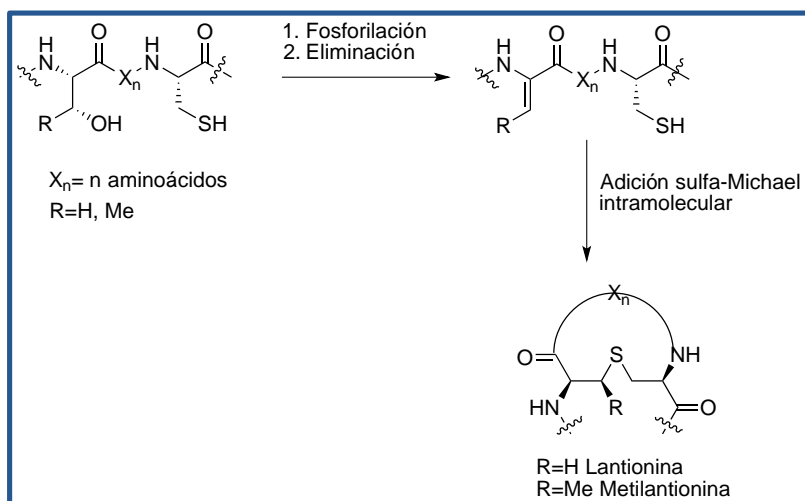


Figura 2.3 Estructura del antibiótico peptídico Nisina A. En ella pueden verse las subestructuras de meso-lantionina y β -metillantionina.

Otro caso importante en el que aparece azufre en la naturaleza lo encontramos en los aminoácidos naturales cisteína y metionina, siendo la nucleofilia del grupo $-SH$ de la cisteína una de las características más importantes de este aminoácido. Ese grupo tiol estabiliza la estructura terciaria de péptidos bioactivos importantes, por ejemplo, debido a su participación en puentes disulfuro.

Además, cabe destacar su participación como nucleófilo en las reacciones tipo Michael a la hora de estabilizar secuencias peptídicas,³¹ mediante la formación de dichas lantioninas (**Esquema 2.20**).

³¹ (a) Jocelyn, P. C. *Biochemistry of the SH Group. The Occurrence, Chemical Properties, Metabolism and Biological Functions of Thiols and Disulfides*; Academic Press: New York. **1972**. (b) Bulaj, G.; Kortemme, T.; Goldenberg, D. P. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8965. (c) Brotzel, F.; Mayr, H. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3814.



Esquema 2.20 Representación esquemática de la biosíntesis de una nisina.

Por todo ello, en nuestro grupo de investigación se han diseñado nuevas rutas para la síntesis de estas lantioninas, utilizando para ello los *N,O*-acetales bicíclicos³² nombrados previamente, o realizando una apertura sobre sulfamidatos cíclicos.³³

³² Aydillo C.; Avenzoza A.; Busto J. H.; Jiménez-Osés G.; Peregrina J. M.; Zurbano M. M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 334.

³³ Avenzoza A.; Busto J. H.; Jiménez-Osés G.; Peregrina J. M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2855.

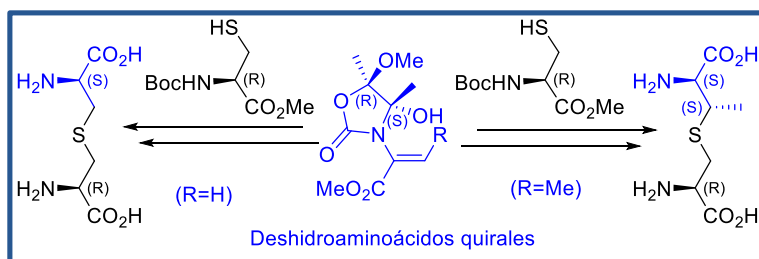
2.2.1 Deshidroaminoácidos quirales como precursores de derivados de Lantionina

Como se ha comentado anteriormente, estudios previos del grupo describen las síntesis de nuevos compuestos *N,O*-acetálicos y bicíclicos que son equivalentes sintéticos de la serina y treonina. A partir de ellos se obtuvieron los derivados de deshidroaminoácidos quirales (**Esquema 2.21**) donde se mantiene la estereoquímica de partida.²⁷



Esquema 2.21 Síntesis de *Dha* y *Dhb* quirales.

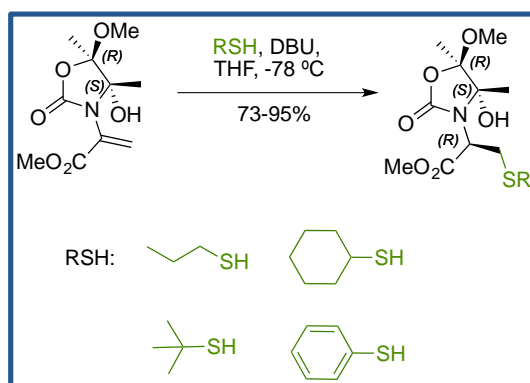
De este modo, se obtuvieron los deshidroaminoácidos quirales sobre los que se realizaron distintas adiciones estereoselectivas *S*-Michael, con el fin de obtener, de una manera simple y directa, los diferentes enantiómeros de lantionina y metillantionina (**Esquema 2.22**).³²



Esquema 2.22 Síntesis de lantionina y metillantionina.

Para ello, se realizaron adiciones 1,4 estereoselectivas sobre dos sustratos quirales. A partir de la deshidroalanina quiral (derivado de serina) se obtuvo la lantionina y a partir de la deshidrobutirina quiral (derivado de treonina) se obtuvieron dos diastereómeros de la metilantionina.

Además, para demostrar el potencial uso sintético de estos sistemas como nuevos *building blocks* quirales, se realizó la reacción de S-Michael de esta deshidroalanina con diferentes S-nucleófilos comerciales tales como el propano-1-tiol, ciclohexanotiol, *tert*-butiltiol y tiofenol, obteniéndose excelentes rendimientos en todos ellos (**Esquema 2.23**).²⁷



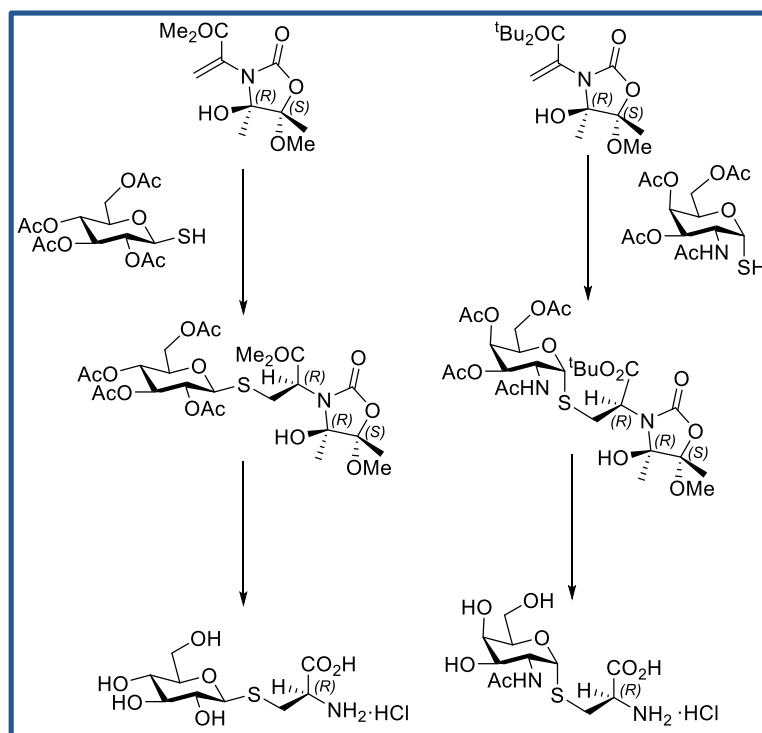
Esquema 2.23 Reacciones S-Michael sobre la Dha* con tioles de diferente naturaleza.

2.2.2 Deshidroaminoácidos quirales como precursores de derivados de glicosilcisteína

Otro trabajo reciente del grupo consiste en adiciones tipo S-Michael sobre los sustratos *N,O*-acetales bicíclicos quirales equivalentes sintéticos de la serina, con el fin de obtener, mediante esta ruta, cisteínas glicosiladas análogas del antígeno Tn (α -GalNAc-Ser/Thr).³⁴

Con este fin, se realizaron numerosas glicosilaciones mediante reacciones sulfa-Michael asimétricas sobre dichas deshidroalaninas quirales. A continuación, con una reacción de hidrólisis se produjo la desprotección, hidrolizándose el *N,O*-acetal y quedando el aminoácido glicosilado en forma de clorhidrato (**Esquema 2.24**).

³⁴ Aydillo, C.; Compañón, I.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 789.



Esquema 2.24 Obtención de análogos del antígeno Tn a partir de deshidroalaninas quirales mediante una adición S-Michael seguida de una hidrólisis.

El compuesto α -D-GalNAc-L-Cys (**Figura 2.4**) es particularmente importante porque es un análogo estructural del antígeno Tn, que se puede encontrar en las células cancerosas y, en consecuencia, ser útil para el desarrollo de vacunas y otros enfoques terapéuticos basados en la expresión de este antígeno Tn.³⁵

³⁵ (a) Lakshminarayanan, V.; Thompson, P.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Bradley, J. M.; Pathangey, L. B.; Madsen, C. S.; Cohen, P. A.; Gendler, S. J.; Boons, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 261. (b) Westerlind, U.; Schröder, H.; Hobel, A.; Gaidzik, N.; Kaiser, A.; Niemeyer, C. M.; Schmitt, E.; Waldmann, H.; Kunz, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *121*, 8413.

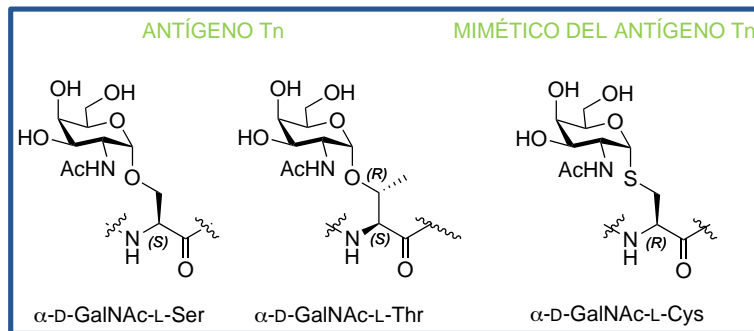


Figura 2.4 Estructura del antígeno Tn derivado de Ser y Thr (izquierda) y de su análogo azufrado derivado de Cys (derecha).

Para entender la actividad biológica de estos compuestos es necesario determinar la conformación mayoritaria en disolución acuosa. La disposición espacial que presenta el carbohidrato unido al péptido es importante para que éste pueda ser reconocido por sus correspondientes dianas biológicas. Para estudiar este comportamiento se realizó una comparación entre los análogos del antígeno Tn con serina, treonina y cisteína con objeto de entender las diferencias estructurales inducidas por el átomo de azufre. Este análisis conformacional se llevó a cabo mediante el uso de experimentos de RMN y dinámicas moleculares.

La disposición espacial del análogo del antígeno Tn con Cys está directamente relacionada con el análogo de Thr. De hecho, ambas moléculas disponen el carbohidrato de manera perpendicular a la cadena peptídica formando un bolsillo hidrofílico (*water pocket*) entre el péptido y los residuos de carbohidrato (**Figura 2.5**).

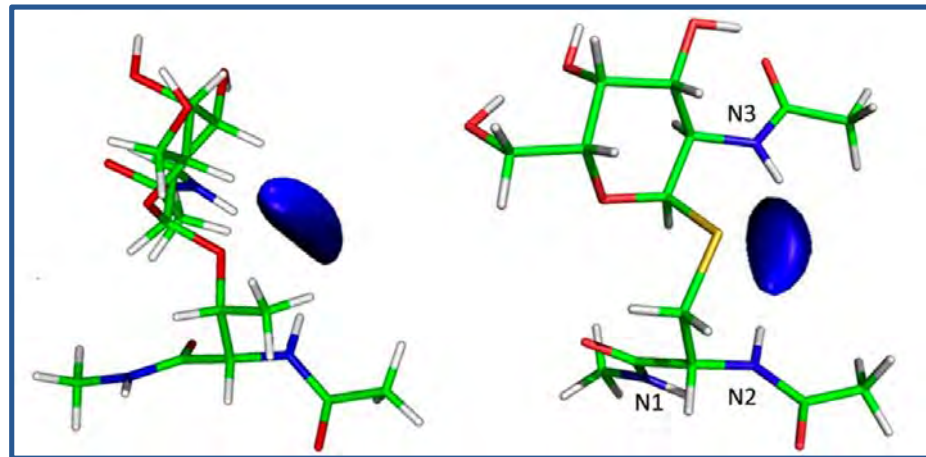


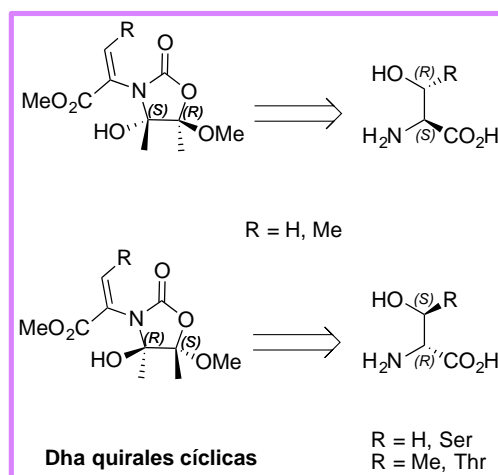
Figura 2.5 A la izquierda *Ac-L-Thr(α-D-GalNAc)-NHMe*, a la derecha *Ac-L-Cys(α-D-GalNAc)-NHMe*. Puede observarse el bolsillo hidrofílico formado en ambos casos.

Por último, para demostrar que este compuesto azufrado funciona como análogo del antígeno Tn, se estudió su afinidad con la lectina *Soybean agglutinin* (SBA) a través de ensayos de tipo ELLA (*Enzyme-Linked Lectin Assays*). Esta proteína reconoce específicamente al antígeno Tn. Por ello, los resultados de afinidad obtenidos se compararon con los que mostraba esta proteína con respecto al antígeno Tn derivado de Ser (α -D-GalNAc-L-Ser), demostrando que ambas moléculas tienen preferencias similares por esta lectina.³⁴

Capítulo 3. Objetivos

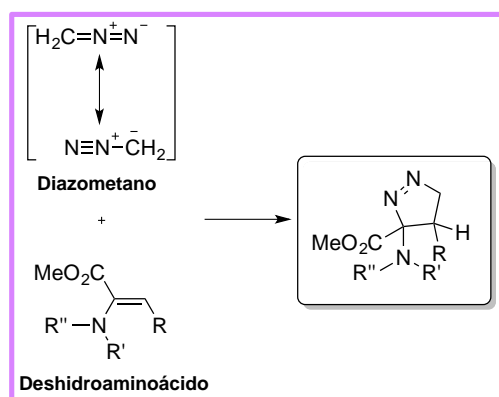


Como puede observarse, los deshidroaminoácidos han sido y son muy importantes a la hora de sintetizar compuestos biológicamente activos. Destacan, sobre todo, por su elevada reactividad y la posibilidad de realizar reacciones diastereoselectivas si se parte de deshidroaminoácidos quirales. De hecho, se ha descrito una ruta sintética para la obtención de deshidroaminoácidos quirales derivados de serina y treonina (**Esquema 3.1**) donde se ha estudiado con detalle su reactividad frente a nucleófilos azufrados y con los que se han sintetizado compuestos de gran utilidad biológica. Dichas rutas sintéticas comentadas en el apartado *Antecedentes* de esta Memoria sobresalen por ser métodos directos, en los que el producto de partida es un aminoácido sencillo, y a través de las cuales pueden obtenerse, de una manera diastereoselectiva, derivados de lantioninas y análogos del antígeno Tn.



Esquema 3.1 Retrosíntesis de deshidroaminoácidos quirales a partir de serina y treonina.

El primer propósito de esta Memoria es el de expandir la reactividad del doble enlace de los deshidroaminoácidos sintetizados con anterioridad (**Capítulo 4**). Dado que la reacción de cicloadición 1,3-dipolar, tanto con alquinos de azida¹ como con diazocompuestos, está siendo estudiada para modificar proteínas de una manera quimiosselectiva dentro del campo de la química biológica,^{2,3} nos centramos en ella con el fin de realizar un estudio preliminar con moléculas pequeñas, usando un diazocompuesto simple, como es el diazometano, como 1,3-dipolo, y los derivados quirales de Dha y Dhb, como dipolarófilos (**Esquema 3.2**).



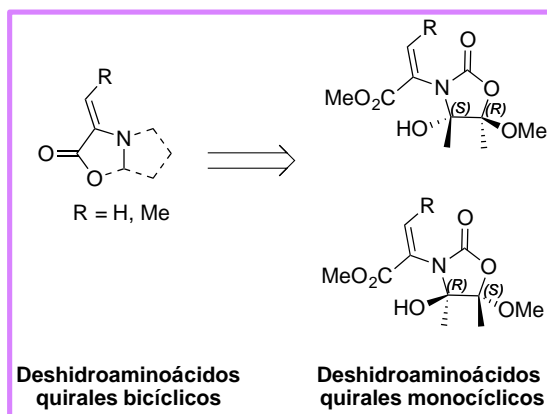
Esquema 3.2 Esquema general para una adición 1,3-dipolar sobre deshidroaminoácidos.

¹ (a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057. (c) Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565.

² (a) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666. (b) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, T.; Rutjes, F. P. J. T. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805. (c) Schilling, C. I.; Jung, N.; Biskup, M.; Schepers, U.; Bräse, S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840. (d) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592.

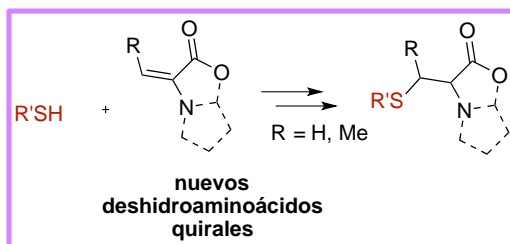
³ Aronoff, M. R.; Gold, B.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1538.

Además, se busca diseñar y sintetizar nuevos deshidroaminoácidos quirales derivados de Ser y Thr, que funcionen mejor y que estén relacionados estructuralmente con los derivados cíclicos previos (**Capítulo 5**). Por ello, se intenta aumentar su rigidez estructural haciendo que estos derivados, en lugar de ser monocíclicos, sean bicíclicos (**Esquema 3.3**).



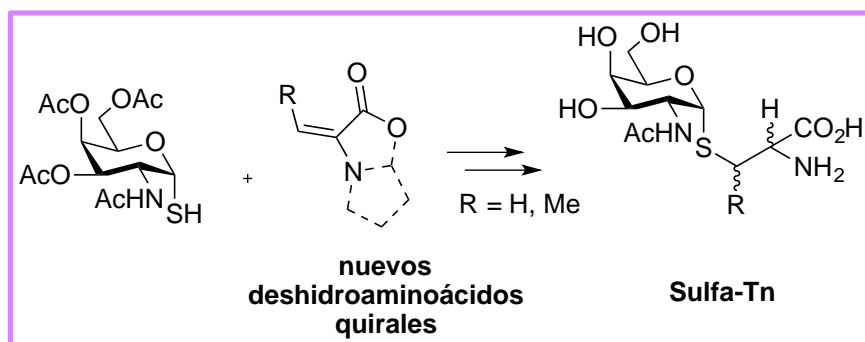
Esquema 3.3 Retrosíntesis de los nuevos deshidroaminoácidos quirales bicíclicos.

El siguiente objetivo consiste en poder estudiar la reactividad de los nuevos deshidroaminoácidos bicíclicos quirales frente a reacciones de tipo S-Michael utilizando nucleófilos azufrados, con el fin de mejorar la reactividad, tanto en rendimiento como en diastereoselectividad (**Capítulo 5**). Además, se pretenden utilizar diferentes tioles interesantes desde un punto de vista biológico (**Esquema 3.4**).



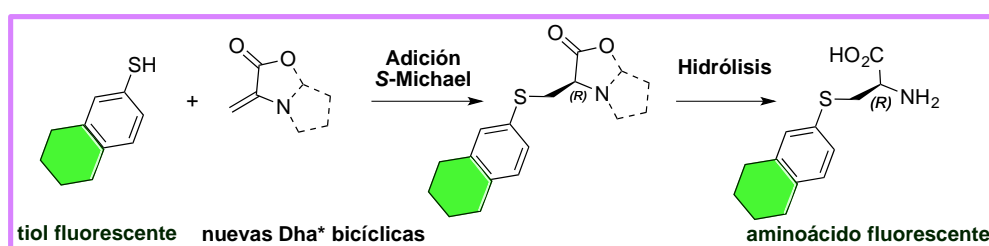
Esquema 3.4 Esquema general para la adición *S*-Michael sobre los nuevos deshidroaminoácidos quirales bicíclicos.

Uno de los tioles a utilizar es el carbohidrato α -D-GalNac-SH, con el objeto de diseñar una ruta alternativa para la síntesis de derivados azufrados del antígeno Tn (α -D-GalNac-L-Ser/Thr), ya sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación (**Capítulo 5**). Además, se pretende realizar la síntesis no sólo del análogo del derivado de serina, sino también del de treonina, incidiendo en la mejora de la reactividad de los nuevos deshidroaminoácidos quirales diseñados (**Esquema 3.5**).



Esquema 3.5 Síntesis de análogos azufrados del antígeno Tn a partir de los nuevos deshidroaminoácidos quirales bicíclicos.

Es importante decir que existe una necesidad de diseñar nuevos aminoácidos no naturales fluorescentes que tengan diferentes propiedades espectroscópicas para poder incorporarlos en cadenas peptídicas y proteínas, de manera que puedan estudiarse sus propiedades estructurales, su función, etc.⁴ Por ello, otro grupo de nucleófilos azufrados que se pretenden utilizar son diferentes tioles fluorescentes, con el objetivo de realizar la síntesis de derivados de Cys que también lo sean (**Capítulo 6**) (**Esquema 3.6**).



Esquema 3.6 Esquema general para la síntesis de nuevos aminoácidos fluorescentes mediante una reacción de adición sulfa-Michael sobre los nuevos deshidroaminoácidos quirales bicíclicos.

Una vez que se hayan sintetizado varios aminoácidos fluorescentes, se quieren elegir los de mejores propiedades espectroscópicas para, como último objetivo de esta Memoria, sintetizar nuevos péptidos penetrantes de células (CPPs, del inglés *cell penetrating peptides*) que sean fluorescentes.

⁴ (a) Lang, K.; Chin, J. W. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764. (b) Venkatraman, P.; Nguyen, T. T.; Sainlos, M.; Bilsel, O.; Chitta, S.; Imperiali, B.; Stern, L. J. *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 222. (c) Wang, J.; Xie, J.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738. (d) Stromgaard, A.; Jensen, A. A.; Stromgaard, K. *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 909. (e) Cohen, B. E.; McAnaney, T. B.; Park, E. S.; Jan, Y. N.; Boxer, S. G.; Jan, L. Y. *Science* **2002**, *296*, 1700. (f) Dougherty, D. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645.

Con ellos se pretende realizar el estudio de sus propiedades para poder ser incorporados en células con el fin de llevar a cabo diferentes ensayos biológicos para probar así su grado de penetrabilidad a través de la membrana celular (**Figura 3.1**).

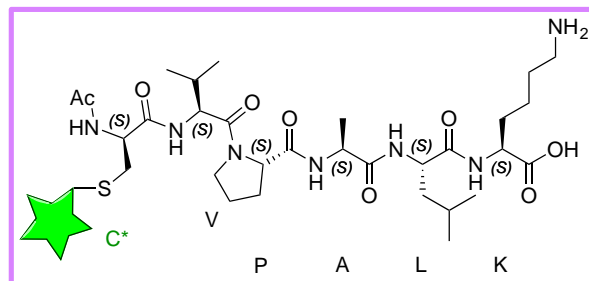


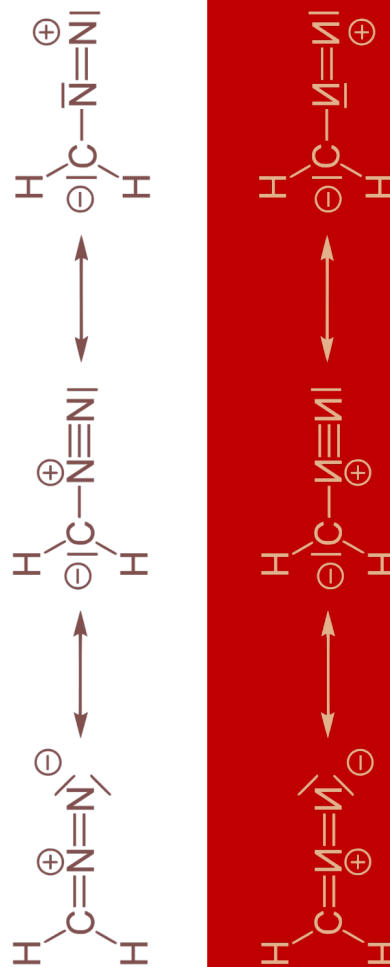
Figura 3.1 Ejemplo de secuencia peptídica objetivo.

Capítulo 4. Cicloadición 1,3-dipolar

4.1 Introducción

4.2 Cicloadición 1,3 dipolar

4.3 Extrusión vía térmica y vía fotoquímica



4.1 Introducción

La modificación química de proteínas es un campo emergente que constituye una de las bases de la química biológica. Las reacciones en proteínas con alto control de la quimioselectividad y regioselectividad son consideradas como una herramienta importante para el diseño de conjugados terapéuticos y nuevas modificaciones postraduccionales (MPT) de proteínas.¹ En este contexto, los α,β -aminoácidos insaturados deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb) tienen interés, tanto en el ámbito biológico como en el sintético,² debido a que funcionan como precursores de una gama de modificaciones postraduccionales de proteínas.

En general, la adición conjugada 1,4 de tioles³ a estos deshidroaminoácidos es la reacción más utilizada para conseguir este objetivo. Por ejemplo, se han hecho reaccionar tiocarbohidratos, como nucleófilos, con péptidos que contienen Dha, como aceptores de S-Michael, aunque con selectividades bajas.⁴

¹ (a) Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4740. (b) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174. (c) Agarwal, P.; Bertozzi, C. R. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *16*, 176.

² Siodłak, D. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1.

³ (a) Guo, J.; Wang, J.; Lee, J. S.; Schultz, P. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *120*, 6499. (b) Bernardes, G. J. L.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052. (c) Chalker, J. M.; Lercher, L.; Rose, N. R.; Schofield, C. J.; Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 1835. (d) Wang, Z. U.; Wang, Y. S.; Pai, P. J.; Russell, W. K.; Russell, D. H.; Liu, W. R. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5232.

⁴ (a) Cohen, S. B.; Halcomb, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2534. (b) Zhu, Y.; van der Donk, W. A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1189. (c) Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5997.

Motivados por este hecho, en nuestro grupo de investigación se ha descrito recientemente la síntesis de nuevos deshidroaminoácidos cíclicos quirales equivalentes de Dha y Dhb, **1** y **2**, derivados de serina y treonina respectivamente (**Figura 4.1**), que han demostrado comportarse como excelentes substratos en adiciones conjugadas 1,4 estereoselectivas de tipo sulfa-Michael.⁵

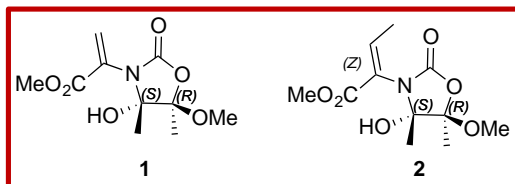


Figura 4.1 Dha y Dhb previamente sintetizadas en nuestro grupo de investigación.

Tal y como queda reflejado en el capítulo *Objetivos*, el primer propósito de esta Memoria es el de expandir la reactividad del doble enlace de los derivados de Dha y Dhb que han sido sintetizados. La cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen⁶ es una de las reacciones más importantes para funcionalizar las estructuras carbonadas, con el fin de mejorar las propiedades físicas y químicas en los derivados obtenidos, aumentando entonces el número de aplicaciones.

⁵ (a) Aydillo, C.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 334. (b) Aydillo, C.; Compañón, I.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 789. (c) Aydillo, C.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2829.

⁶ (a) Huisgen, R. *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604. (b) Huisgen, R.; Rapp, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 902.

Aunque los avances en la reacción concreta de la cicloadición 1,3-dipolar con alquinos de azida⁷ han convertido esta reacción en una herramienta extremadamente usada en química biológica⁸ para modificar proteínas de una manera quimioselectiva, recientemente ha sido descrita la cicloadición 1,3-dipolar de diazocompuestos como una alternativa a las azidas, con una reactividad similar pero diferente.⁹

De hecho, los péptidos que contienen Dha reaccionan con algunos diazocompuestos pero no con los correspondientes azido derivados.⁹

⁷ (a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057. (c) Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565.

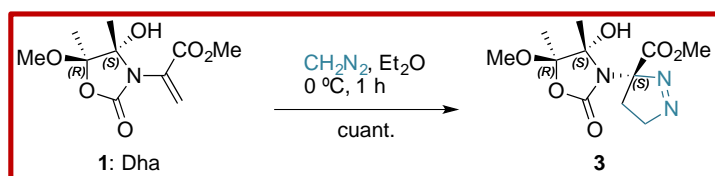
⁸ (a) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666. (b) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, T.; Rutjes, F. P. J. T. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805. (c) Schilling, C. I.; Jung, N.; Biskup, M.; Schepers, U.; Bräse, S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840. (d) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592.

⁹ Aronoff, M. R.; Gold, B.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1538.

4.2 Cicloadición 1,3 dipolar

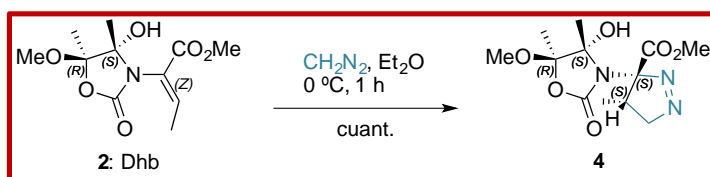
De esta manera, teniendo en cuenta estas características y como un estudio preliminar con moléculas pequeñas, nos centramos en esta cicloadición usando un diazocompuesto simple, como es el diazometano, como 1,3-dipolo y los derivados quirales de Dha y Dhb, **1** y **2**, como dipolarófilos.

Para ello, se disolvió la deshidroalanina cíclica quiral **1** en dietiléter y se enfrió hasta los 0 °C. Entonces se añadió una disolución de diazometano en éter gota a gota. Tras una hora agitando a baja temperatura, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente para eliminar el disolvente, evaporando sin calentar (**Esquema 4.1**). De este modo, evitamos la descomposición del compuesto **3**, que se obtiene de una manera casi cuantitativa.



Esquema 4.1

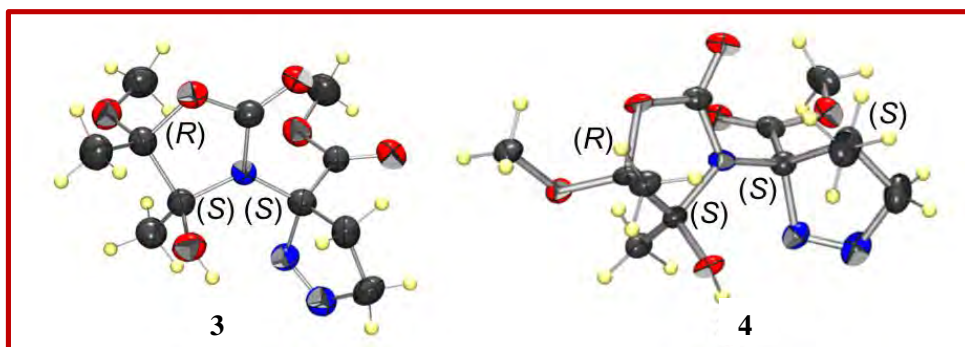
Para el derivado de treonina, la deshidrobutirina **2**, se procedió de la misma manera, obteniendo el compuesto **4** como único diastereómero (**Esquema 4.2**).



Esquema 4.2

Es de destacar que en ambos casos se obtiene un único compuesto, lo que supone un completo control estereoquímico de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

La configuración absoluta de los nuevos centros estereogénicos generados se determinó mediante difracción de Rayos X de los compuestos **3** y **4** (Figura 4.2).

Figura 4.2 Diagrama ORTEP obtenido por difracción de Rayos X de los compuestos **3** y **4**.

Esta reacción permite la formación de pirazolinas, las cuales debido a sus bioactividades variadas son unos importantes compuestos heterocíclicos de cinco miembros que contienen nitrógeno, muy usados en investigación farmacéutica.¹⁰ Además, las pirazolinas también son muy útiles como compuestos intermedios en síntesis orgánica.¹¹

La alta estereoespecificidad y estereoselectividad de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar son las razones clave de por qué estas reacciones son ampliamente usadas en síntesis orgánica. Por ejemplo, la conversión de estas 1-pirazolinas en ciclopropanos vía térmica o vía fotoquímica es un método sintético de los más utilizados.¹²

Teniendo en cuenta este hecho, el uso de los deshidroaminoácidos quirales **1** y **2** para inducir centros estereogénicos en la 1-pirazolina podría conceder a este proceso una gran versatilidad en la síntesis de estos derivados.

¹⁰ (a) Ramalingam, K.; Thyvelikakath, G. X.; Berlin, K. D.; Chesnut, R. W.; Brown, R. A.; Durham, N. N.; Ealick, A. E.; van der Helm, D. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 847. (b) Lombardino, J. G.; Otterness, I. G. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 830.

¹¹ (a) Louhichi, N.; Houas, A.; Hamadi, N. B.; Msaddek M. *J. Heterocyclic Chem.* **2012**, *49*, 267. (b) Lévai, A.; Silva, A. M. S.; Patonay, T.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Heterocyclic Chem.* **1999**, *36*, 1215.

¹² (a) Martín-Vilà, M.; Hanafi, N.; Jiménez, J. M.; Álvarez-Larena, A.; Piniella, J. F.; Branchadell, V.; Oliva, A.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3581. (b) Davies, H.; Bruzinski, P.; Lake, D.; Kong, N.; Fall, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6897. (c) Adams, L.; Aggarwal, V.; Bonnert, R.; Bressel, B.; Cox, R.; Shepard, J.; de Vincent, J.; Walter, M.; Whittingham, W.; Winn, C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9433. (d) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D.; García, J. I.; Jiménez, A. I. *Org. Lett.* **1997**, *53*, 4479. (e) Aggarwal, V.; Alonso, E.; Fang, G.; Ferrara, M.; Hynd, G.; Porcelloni, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1433. (f) Wurz, R.; Charette, A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2327.

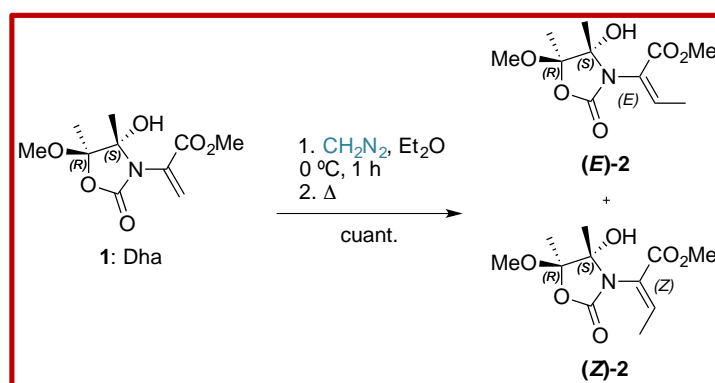
Por lo tanto, el control de la diastereoselectividad en esta cicloadición es crucial para la obtención de moléculas objetivo en sus formas enantioméricamente puras.

4.3 Extrusión térmica y fotoquímica

Una reacción de extrusión consiste en la eliminación o pérdida de dos átomos que forman un gas, como por ejemplo, nitrógeno. Si esta reacción se produce después de calentar se llama extrusión vía térmica. Si se produce vía radicalaria, con ayuda de un fotosensibilizador, se llama extrusión vía fotoquímica. A continuación, se muestra la pérdida de nitrógeno de los derivados formados tras la cicloadición 1,3 dipolar de diazometano a los deshidroaminoácidos quirales tanto por vía térmica como fotoquímica.

4.3.1 Extrusión vía térmica

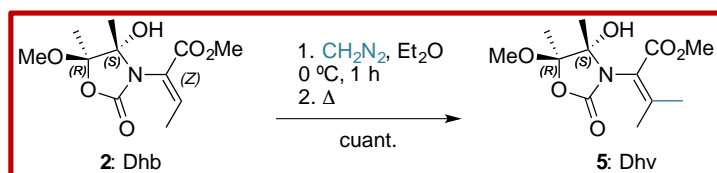
La versatilidad sintética de las pirazolinas **3** y **4** se pudo expandir tras un tratamiento térmico de las mismas.¹³ Para ello, se llevó a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de la Dha **1** en presencia de diazometano y, seguidamente, se calentó para dar lugar a la reacción de extrusión vía térmica. Se obtuvieron dos productos de extrusión, correspondientes con ambas isomerías, (*Z*) y (*E*), posibles para el doble enlace (**Esquema 4.3**).



Esquema 4.3

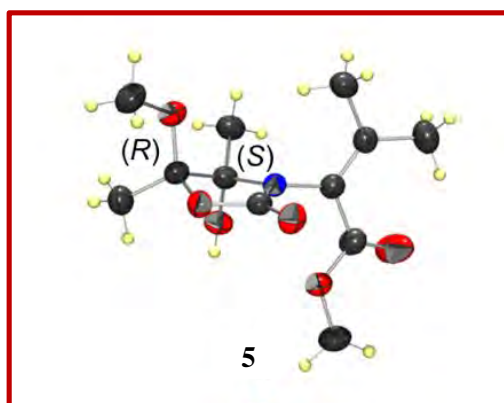
Se procedió de la misma manera con la Dhb **2**, realizando en primer lugar la adición de diazometano, y luego calentando, observando un único producto como resultado, un derivado de deshidrovalina (Dhv) (**Esquema 4.4**).

¹³ Crawford, R. J.; Mishra, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3963.



Esquema 4.4

De este modo, mientras que para la pirolisis de la 1-pirazolina **3**, derivada de la Dha **1**, da como resultado una mezcla de compuestos correspondientes con las Dhb (*Z*)-**2** y (*E*)-**2**, la pirolisis de la 1-pirazolina **4**, derivada de la Dhb **2**, permite la síntesis de la deshidrovalina (Dhv) quiral **5**, cuya estructura pudo ser determinada mediante análisis de difracción de Rayos X (**Figura 4.3**).

Figura 4.3 Diagrama ORTEP obtenido por difracción de Rayos X de la Dhv **5**

Por lo tanto, esta ruta sintética es un método excelente y muy sencillo para obtener olefinas quirales tetrasustituidas derivadas de aminoácidos que tienen, además, un valioso interés sintético.

A partir de estas olefinas tetrasustituidas se puede sintetizar un importante número de compuestos.¹⁴ El interés de las olefinas tetrasustituidas reside en que muchas de ellas muestran una actividad biológica importante, por ejemplo, efectos contra el cáncer de mama,¹⁵ medicamentos anti-inflamatorios,¹⁶ moduladores de receptores nucleares de hormonas¹⁷ o inhibidores de tubulina.¹⁸ Debido a esto, los métodos sintéticos que han surgido para tener acceso a estas olefinas tetrasustituidas están basados principalmente en el uso de catalizadores de metales de transición.¹⁹ Por ello, teniendo en cuenta todo ello y la actual demanda de síntesis de alquenos tetrasustituidos, el método que se describe en esta Memoria puede ser considerado como una interesante aproximación.

¹⁴ Gigant, N.; Quintin, F.; Bačkvall, J. E. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2796.

¹⁵ Beer, M. L.; Lemon, J.; Valliant, J. F. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8012.

¹⁶ Habeeb, A. G.; Praveen Rao, P. N.; Knaus, E. E. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3039.

¹⁷ Yu, H.; Richey, R. N.; Carson, M. W.; Coghlan, M. J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1685.

¹⁸ Aziz, J.; Brachet, E.; Hamze, A.; Peyrat, J.-F.; Bernadat, G.; Morvan, E.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Desravines, D.; Dubois, J.; Tueni, M.; Yassine, A.; Brion, J. D.; Alami, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 430.

¹⁹ (a) Suero, M. G.; Bayle, E. D.; Collins, B. S. L.; Gaunt, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5332. (b) Ishida, N.; Shimamoto, Y.; Murakami, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5434. (c) Paek, S. M., *Molecules* **2012**, *17*, 3348. (d) Roche, M.; Bignon, J.; Brion, J. D.; Hamze, A.; Alami, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7583. (e) He, Z.; Kirchberg, S.; Fröhlich, R.; Studer, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 3699. (f) Deng, Y.; Yu, J. Q. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 888. (g) Bera, M.; Modak, A.; Patra, T.; Maji, A.; Maiti, D. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5760. (h) Ye, X.; Shi, X. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4448. (i) Sevov, C. S.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10625.

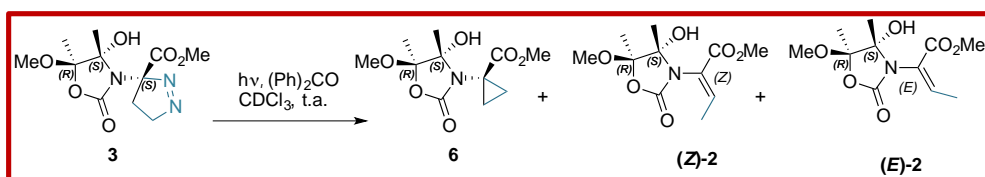
4.3.2 Extrusión vía fotoquímica

La pérdida de nitrógeno vía fotoquímica de las 1-pirazolinas es un método ampliamente usado en síntesis orgánica para obtener derivados de ciclopropano. El mecanismo de esta reacción suele involucrar 1,3-diradicales y es necesaria la presencia de un fotosensibilizador para que la reacción se lleve a cabo de una manera eficiente, evitando la generación de subproductos mediante reacciones laterales como la cicloreversión o la inserción de olefinas.²⁰ Con todo ello, el siguiente paso fue intentar la reacción de fotólisis de ambas 1-pirazolinas **3** y **4**.

Para ello, se procedió a irradiar una disolución en cloroformo deuterado de la 1-pirazolina **3** en presencia de 0.2 equivalentes de benzofenona como sensibilizador, utilizando un tubo de Pyrex para RMN en una lámpara de mercurio de media presión, a temperatura ambiente. Esta reacción nos permitió obtener el derivado de ciclopropano **6** acompañado de las Dhb correspondientes, productos de inserción, (**Z**)-**2** y (**E**)-**2** (Tabla 4.1)

²⁰ Muray, E.; Illa, O.; Castillo, J. A.; Álvarez-Larena, A.; Bourdelande, J. L.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4906.

Tabla 4.1 Rendimientos de los productos obtenidos en la reacción de fotólisis de la 1-pirazolina **3**.



Entrada	Concentración (M)	Sensibilizador	Tiempo (min)	6 ^a	(Z)-2 ^a	(E)-2 ^a
1	0.10	-	45	50	23	27
2	0.01	Ph ₂ CO	20	48	28	24
3	0.05	Ph ₂ CO	15	79 ^b	8	13
4	0.35	Ph ₂ CO	10	74	11	15

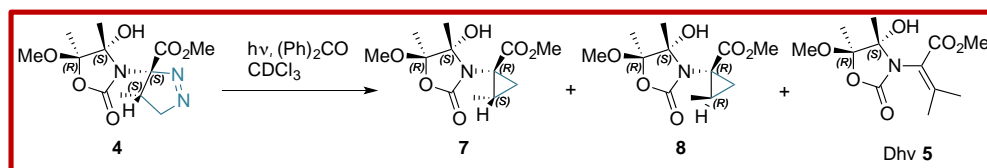
^aLa relación de productos fue determinada por cromatografía de gases (CG). ^bEl valor de rendimiento correspondiente con un 79% se obtuvo tras purificación por columna cromatográfica en gel de sílice.

Con el objeto de evitar o reducir la cantidad de las olefinas obtenidas se llevó a cabo la reacción en diferentes condiciones, variando la concentración de la 1-pirazolina **3** utilizada (**Tabla 4.1**), siendo las mejores condiciones las mostradas en la Entrada 3 de la **Tabla 4.1**, usando una concentración de 0.05 M.

En estas condiciones, en tan solo 15 min, el derivado de ciclopropano se obtuvo con un rendimiento del 79%, después de ser purificado por columna cromatográfica.

Cuando se aplicaron las mismas condiciones de fotólisis a la 1-pirazolina **4** se obtuvo una mezcla de los derivados de ciclopropano **7** y **8**, acompañados del derivado de Dhv **5** (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2 Rendimientos de los productos obtenidos en la reacción de fotólisis de la 1-pirazolina **4** a diferentes concentraciones de la misma, temperaturas y con diferentes sensibilizadores.



Entrada	Concentración (M)	Sensibilizador	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	7 ^a	8 ^a	Dhv 5 ^a
1	0.25	-	25	45	43	17	40
2	0.05	Ph ₂ CO	0	10	50	19	31
3	0.15	Ph ₂ CO	25	30	50	20	30
4	0.15	(CH ₃)CO	25	30	47	13	40
5	1.00	Ph ₂ CO	25	120	46	30	24

^aLa relación de productos fue determinada por cromatografía de gases (CG) y por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹H-RMN).

Al igual que para la 1-pirazolina **3**, se llevó a cabo la reacción en diferentes condiciones (**Tabla 4.2**), variando esta vez no solo la concentración del producto inicial sino también el sensibilizador y la temperatura.

Después de estudiar diferentes concentraciones y probando con acetona ((CH₃)CO) además de Ph₂CO como sensibilizador, las mejores condiciones para este caso son las correspondientes con la entrada 5, una concentración 1 M de la 1-pirazolina **3**, a temperatura ambiente durante 2 h, obteniéndose una mezcla de los derivados de ciclopropano **7** y **8** en una relación 46:30, acompañados de la Dhv **5** en un 24% de rendimiento.

Todos estos compuestos se pudieron purificar fácilmente por columna cromatográfica y la estereoquímica de los nuevos centros estereogénicos generados se pudo determinar por difracción de Rayos-X (**Figura 4.4**) debido a que se obtuvieron como sólidos cristalinos.

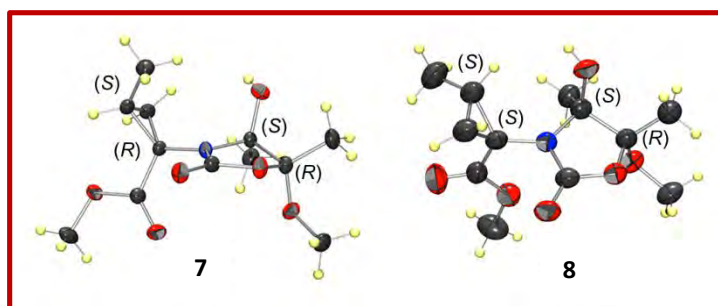
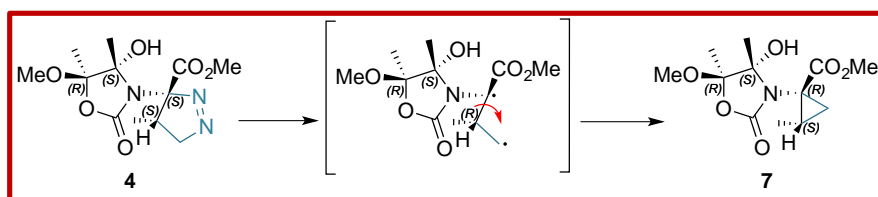


Figura 4.4 Diagrama ORTEP obtenido por difracción de Rayos X de los derivados **7** y **8**.

En todas las entradas de la **Tabla 4.2** se observa que el derivado de ciclopropano **7** es el mayoritario de los que se obtienen en la reacción de fotólisis. Este compuesto tiene la misma disposición espacial que el producto de partida **4**. Este hecho puede ser explicado si nos fijamos en el mecanismo propuesto para este tipo de reacciones de fotólisis.²⁰ Así, el intermedio diradical, por el cruce entre sistemas del estado fundamental, permite la formación del correspondiente ciclopropano. Este proceso es más rápido que la rotación del enlace C-C por lo que la reacción de fotólisis es algo estereoselectiva (**Esquema 4.5**)



Esquema 4.5

En conclusión, se ha expandido la reactividad de las Dha quirales, ya estudiadas como buenos aceptores de S-Michael, demostrando que también pueden comportarse como buenos dipolarófilos en reacciones de cicloadición 1,3-dipolar con diazometano. Estas reacciones son rápidas y limpias, y tienen lugar con altos grados de regio- y estereoselectividad formando un único derivado de 1-pirazolina el cual no es necesario purificar por columna.

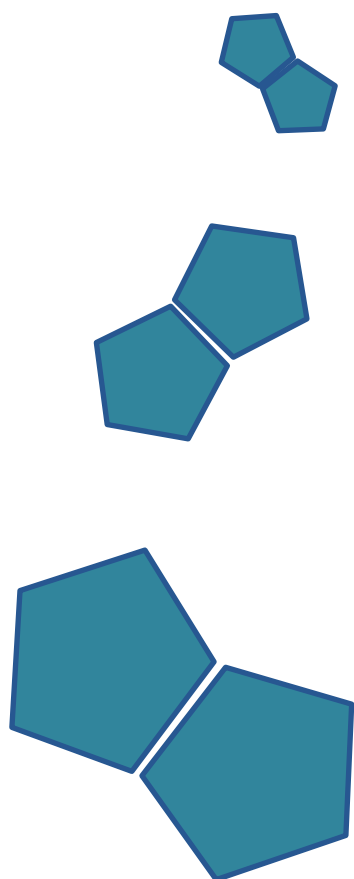
Además, mediante extrusión térmica se pueden obtener fácilmente olefinas más sustituidas. Y utilizando extrusión fotoquímica, es posible obtener de manera estereoselectiva derivados de ciclopropano- α -aminoácidos.

Capítulo 5. Nuevos deshidroaminoácidos quirales: síntesis y reactividad

5.1 Introducción

5.2 Síntesis de nuevos deshidroaminoácidos quirales para la obtención del antígeno sulfa-Tn

5.3 Reactividad S-Michael utilizando tioles de diferente naturaleza



5.1 Introducción

El hecho de encontrar la inusual expresión del antígeno Tn (α -D-GalNac-L-Ser/Thr) asociada con el crecimiento de tumores hace que dicho antígeno pueda considerarse como un punto innovador en el campo de la glicobiología.^{1a} En la última década se está realizando un esfuerzo considerable hacia el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer basadas en esta estructura sencilla.¹ Sin embargo, ninguna vacuna de este tipo ha alcanzado la fase clínica hasta el momento.^{2a} Esto probablemente se deba a la sensibilidad de estos antígenos a las glicosidasas endógenas, que degradan en vivo este compuesto, disminuyendo su biodisponibilidad.^{2b,c} Por lo tanto, se han propuesto numerosos compuestos análogos del antígeno Tn basados en modificaciones estructurales del mismo con el fin de aumentar la inmunogenicidad de las vacunas para el cáncer.³

¹ (a) Ju, T.; Otto, V. I.; Cummings, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1770. (b) Westerlind, U.; Schröder, H.; Hobel, A.; Gaidzik, N.; Kaiser, A.; Niemeyer, C. M.; Schmitt, E.; Waldmann, H.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8263. (c) Allen, J. R.; Harris, C. R.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1890. (d) Lakshminarayanan, V.; Thompson, P.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Bradley, J. M.; Pathangey, L. B.; Madsen, C. S.; Cohen, P. A.; Gendler, S. J.; Boons, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 261. (e) Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Gaekwad, J.; Buskas, T.; Boons, G. J. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 663. (f) Wilkinson, B. L.; Day, S.; Malins, L. R.; Apostolopoulos, V.; Payne, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635.

² (a) Miles, D.; Roch, H.; Martin, M.; Perren, T. J.; Cameron, D. A.; Glaspy, J.; Dodwell, D.; Parker, J.; Mayordomo, J.; Tres, A.; Murray, J. L.; Ibrahim, N. K. *Oncologist* **2011**, *16*, 1092. (b) Ohyama, C. *Int. J. Clin. Oncol.* **2008**, *13*, 308. (c) Paulsen, H.; Brockhausen, I. *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 867.

³ (a) Wang, Q.; Guo, Z. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 373. (b) Liu, C. C.; Ye, X. S. *Glycoconjugate J.* **2012**, *29*, 259. (c) Richichi, B.; Thomas, B.; Fiore, M.; Bosco, R.; Qureshi, H.; Nativi, C.; Renaudet, O.; BenMohamed, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11917. (d) Martínez-Sáez, N.; Supekar, N. T.; Wolfert, M. A.; Bermejo, I. A.; Hurtado-Guerrero, R.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Boons, G. J.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2294.

Estas aproximaciones suponen la preparación de glicopéptidos tipo mucina modificados^{4,5,6,7} o análogos del antígeno Tn restringidos conformacionalmente.⁸ Además, se han utilizado análogos de este antígeno basados en S-glicosilación de cisteínas (Cys).^{6b,9} Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se ha descrito que los péptidos con el derivado azufrado del antígeno Tn son reconocidos por anticuerpos monoclonales de MUC1.¹⁰

Desde el descubrimiento de la S-glicosilación de cisteínas¹¹ como una nueva modificación postraduccional (MPT),^{12,13} se han desarrollado numerosos métodos de S-glicosilación.^{11,14}

⁴ Oberbillig, T.; Mersch, C.; Wagner, S.; Hoffmann-Röder, A. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1487.

⁵ (a) Awad, L.; Madani, R.; Gillig, A.; Kolympadi, M.; Philgren, M.; Muhs, A.; Gérard, C.; Vogel, P. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8578. (b) Dondoni, A.; Marra, A. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4395. (c) Peri, F.; Cipolla, L.; Rescigno, M.; La Ferla, B.; Nicotra, F. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 325.

⁶ (a) Rich, J. J.; Bundle, D. R. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 897. (b) Bousquet, E.; Spadaro, A.; Pappalardo, M. S.; Bernardini, R.; Romeo, R.; Panza, L.; Ronsisvalle, G. *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 527.

⁷ Vichier-Guerre, S.; Lo-Man, R.; Huteau, V.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Bay, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3567.

⁸ Aydillo, C.; Navo, C. D.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10968.

⁹ Geraci, C.; Consoli, G. M.; Gelante, E.; Bousquet, E.; Pappalardo, M. S.; Spadaro, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 751.

¹⁰ (a) Martínez-Sáez, N.; Castro-López, J.; Valero-González, J.; Madariaga, D.; Compañón, I.; Somovilla, V. J.; Salvadó, M.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Bernardes, G. J. L.; Peregrina, J. M.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9830. (b) Martínez-Sáez, M.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7154.

¹¹ (a) Pachamuthu, K.; Schmidt, R. R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 160. (b) Tan, F. Y. Y.; Tang, C. M.; Exley, R. M. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 342. (c) Stepper, J.; Shastri, S.; Loo, T. S.; Preston, J. C.; Novak, P.; Man, P.; Moore, C. H.; Havlíček, V.; Patchett, M. L.; Norris, G. E. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 645.

¹² Venugopal, H.; Edwards, P. J. B.; Schwalbe, M.; Claridge, J. K.; Libich, D. S.; Stepper, J.; Loo, T.; Patchett, M. L.; Norris, G. E.; Pascal, S. M. *Biochemistry* **2011**, *50*, 2748.

Estos métodos usan como electrófilos carbohidratos adecuadamente protegidos que incorporan grupos salientes en el carbono anomérico, y como nucleófilos, derivados de Cys, obteniéndose habitualmente β -S-glicosil aminoácidos y β -S-glicopéptidos.¹⁵ Contrariamente, la formación de enlaces α -S-glicosídicos,^{15c} en concreto los que tienen el fragmento α -S-GalNAc presente en el antígeno sulfa-Tn **9**,^{16,17} han recibido menos atención. Los α -S-glicosil aminoácidos se obtienen por condensación de un derivado de β -bromoalanina con la correspondiente sal del tiolato del carbohidrato.¹⁷

¹³ (a) Oman, T. J.; Boettcher, J. M.; Wang, H.; Okalibe, X. N.; van der Donk, W. A. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 78. (b) Wang, H.; van der Donk, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16394. (c) Wang, H.; Oman, T. J.; Zhang, R.; García de Gonzalo, C. V.; Zhang, Q.; van der Donk, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 84.

¹⁴ Taylor, C. M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317.

¹⁵ (a) Floyd, N.; Vijayakrishnan, B.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7798. (b) Dondoni, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995. (c) Lázár, L.; Csávás, M.; Herczeg, M.; Herczegh, P.; Borbás, A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4650. (d) Markey, L.; Giordani, S.; Scanlan, E. M. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4270. (e) Dénès, F.; Pichowicz, M.; Povie, G.; Renaud, P. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2587.

¹⁶ (a) Zhu, X.; Schmidt, R. R. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 875. (b) Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12712. (c) Galonic, D. P.; Ide, N. D.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7359.

¹⁷ Thayer, D. A.; Yu, H. N.; Galan, M. C.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4596.

Por otro lado, el aminoácido insaturado deshidroalanina (Dha)^{18,19,20} tiene un gran interés tanto biológico como sintético¹⁸ usado como precursor químico de una gama de modificaciones postraduccionales (MPT) en el sitio activo por adición conjugada de tioles.²⁰ Por ejemplo, tioles con largas cadenas alquílicas o grupos fluorescentes, derivados de cisteína y tioacetato son ejemplos de nucleófilos usados para implementar estas MPT en péptidos usando este método. Además, los péptidos que contienen Dha han sido empleados como aceptores en reacciones de tipo S-Michael para nucleófilos como tiocarbohidratos, aunque con bajas diastereoselectividades.^{21,22}

Por todo ello, es de gran interés sintetizar nuevos deshidroaminoácidos quirales y estudiar su reactividad frente a nucleófilos azufrados, con la intención de mejorar la síntesis de miméticos de compuestos biológicos citados anteriormente, como el antígeno Tn. Del mismo modo es importante estudiar la posibilidad de sintetizar nuevos compuestos de interés biológico, a partir de dichos deshidroaminoácidos.

¹⁸ Kazmaier, U. *Synthesis and Chemistry of α,β -Didehydroamino Acids*. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim **2009**, 2, 3.

¹⁹ Willey, J. M.; van der Donk, W. A. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, 61, 477.

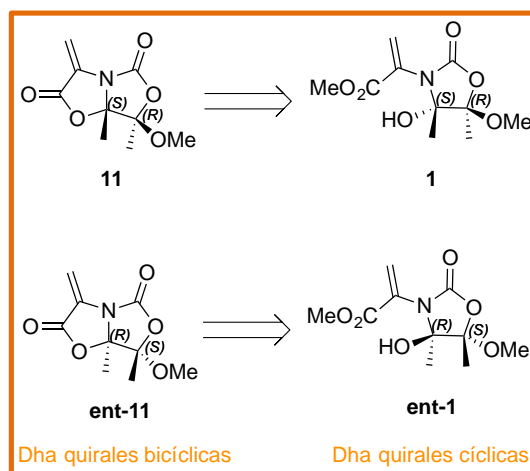
²⁰ (a) Levengood, M. R.; van der Donk, W. A. *Nat. Protoc.* **2007**, 1, 3001. (b) Bernardes, G. J. L.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5052. (c) Guo, J.; Wang, J.; Lee, J. S.; Schultz, P. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 6399. (d) Haj-Yahya, N.; Hemantha, H. P.; Meledin, R.; Bondalapati, S.; Seenaiiah, M.; Brik, A. *Org. Lett.* **2014**, 16, 540. (e) Chalker, J. M.; Lercher, L.; Rose, N. R.; Schofield, C. J.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 1835. (f) Vallée, M. R. J.; Schombs, M. W.; Balaban, Z. J.; Colyer, J.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 3014. (g) Grayson, E. J.; Bernardes, G. J. L.; Chalker, J. M.; Boutureira, O.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 4127. (h) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 730.

²¹ Cohen, S. B.; Halcomb, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2534.

²² (a) Zhu, Y.; van der Donk, W. A. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1189. (b) Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5997.

5.2 Síntesis de nuevos deshidroaminoácidos quirales para la obtención del antígeno sulfa-Tn

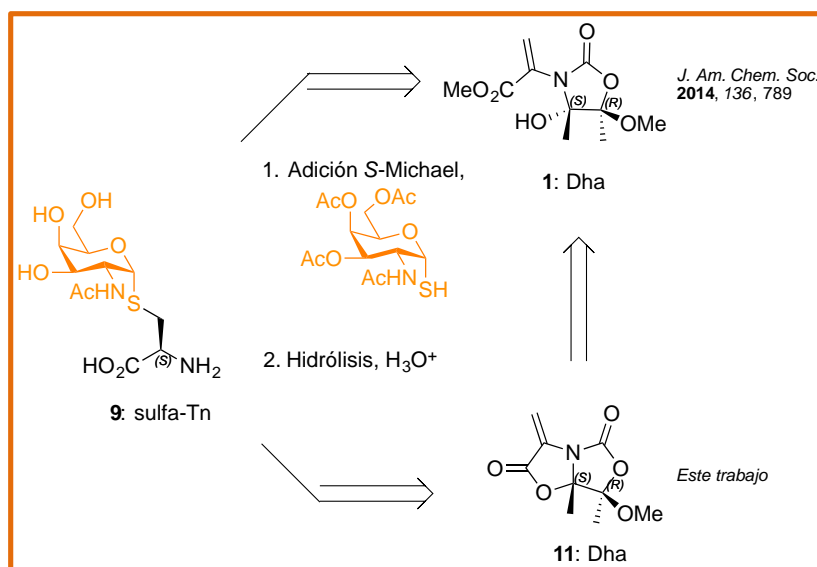
Motivados por la ausencia de procedimientos con un elevado control estereoselectivo para la formación de enlaces α -5-glicosídicos a partir de deshidroaminoácidos, en esta Memoria se presenta la síntesis de nuevos derivados quirales bicíclicos de Dha (**11** y **ent-11**) partiendo de las Dha **1** descrita en el capítulo anterior y de su enantiómero **ent-1** (Esquema 5.1).^{23a}



Esquema 5.1 Restrosíntesis de los nuevos derivados bicíclicos quirales de Dha partiendo de los derivados cíclicos quirales de Dha.

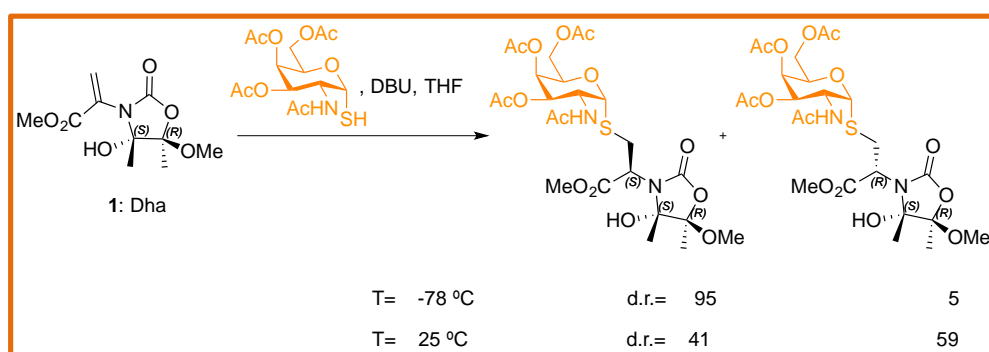
²³ (a) Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 334. (b) Aydillo, C.; Compañón, I.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 789.

La deshidroalanina (Dha) **1** que empleamos en este caso como precursora, se ha utilizado en diferentes reacciones diastereoselectivas de tipo S-Michael con diferentes tiocarbohidratos protegidos apropiadamente como la tri-*O*-acetil-2-acetamido-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranosas (abreviado como D-GalNAc- α -SH), generalmente con altos rendimientos y altas diastereoselectividades.^{23b} Este procedimiento se ha utilizado para la síntesis de la *S*-(2-acetamido-2-desoxi- α -D-galactopiranosil)-L-cisteína **9**, la cual se considera como un análogo del antígeno Tn, llamado antígeno sulfa-Tn (**Esquema 5.2**).



Esquema 5.2

Como ya se ha comentado en el capítulo *Antecedentes*, el paso clave en la obtención de este derivado es la reacción de adición sulfa-Michael sobre la Dha **1** con D-GalNAc- α -SH como nucleófilo azufrado, la cual ocurre con un rendimiento del 67%.^{23b,24} Además, con el fin de obtener una alta diastereoselectividad, se utilizó 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU), como base orgánica, y temperaturas criogénicas (dr > 95:5 a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$), ya que cuando esta reacción se realiza a temperatura ambiente la selectividad desaparece (dr = 41:59 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este hecho limita el alcance de esta reacción bajo condiciones biocompatibles y/o más suaves (Esquema 5.3).

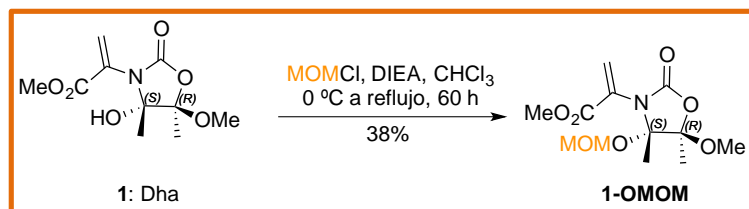


Esquema 5.3

Con el fin de probar la importancia del alcohol terciario del anillo de oxazolidin-2-ona de la Dha **1**, y comprobar así su rol como grupo estereodirector, se realizaron los siguientes experimentos.

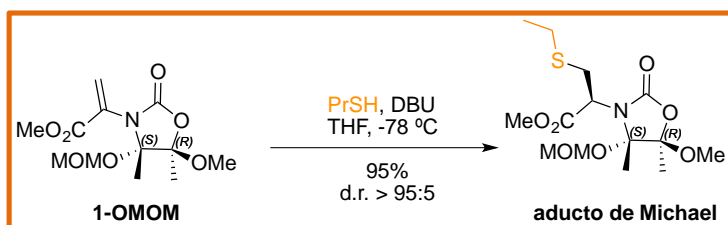
²⁴ Knapp, S.; Myers, D. S. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2995.

Primero se realizó la protección del grupo alcohol en la Dha **1** con clorometil metil éter (MOMCl) usando diisopropiletilamina (DIEA) como base, a reflujo en cloroformo como disolvente, dando como resultado el producto **1-OMOM** con un 38% de rendimiento (**Esquema 5.4**)



Esquema 5.4

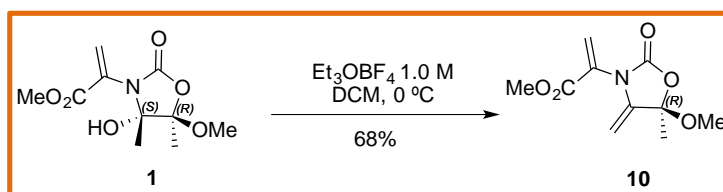
El compuesto **1-OMOM** obtenido se utilizó como aceptor en una reacción de adición S-Michael con propanotiol (PrSH) como nucleófilo azufrado, en presencia de DBU como base a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. La conversión y la diastereoselectividad obtenida fueron comprobados por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) siendo ambas similares al trabajo previo publicado (**Esquema 5.5**).^{23a}



Esquema 5.5

Este resultado nos permite concluir que el rol del alcohol terciario del anillo de oxazolidin-2-ona como grupo director en la estereoselectividad de la adición de sulfa-Michael puede descartarse. Seguidamente, se procedió a comprobar la necesidad de disponer de un centro quiral en esa posición sintetizando un nuevo derivado de Dha **10**.

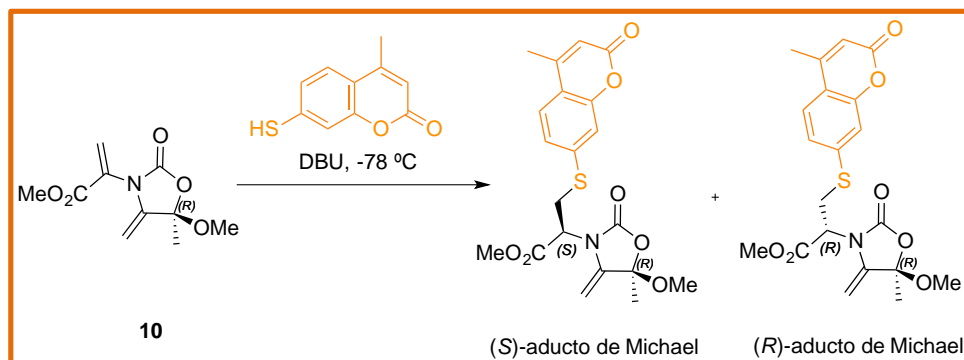
Para ello, se disolvió la Dha **1** en diclorometano bajo atmósfera de argón y se añadió una disolución 1.0 M de tetrafluoroborato de trietiloxonio (Et_3OBF_4) en diclorometano a una temperatura de 0 °C. Tras media hora de reacción el crudo se diluyó con más diclorometano, se lavó con HCl 0.5 M y se extrajo recogiendo la fase orgánica y purificándola por columna cromatográfica en gel de sílice, dando como resultado la Dha **10** como un aceite incoloro con un rendimiento del 68% (Esquema 5.6).



Esquema 5.6

Sobre este nuevo compuesto *N,O*-acetálico **10**, derivado de Dha, se realizó de nuevo una reacción de tipo *S*-Michael siguiendo la misma metodología utilizada para su análogo **1**. Para esta reacción se eligió un tiol de distinta naturaleza con el fin de poder utilizar otra base diferente a la DBU, la TEA, y así poder analizar un crudo de reacción más limpio.

En este caso, se observó que se perdía el control de la diastereoselectividad en la reacción de adición obteniendo dos compuestos como aductos de Michael, correspondientes con los dos diastereómeros posibles (**Esquema 5.7**).



Esquema 5.7

Esto se pudo comprobar con ayuda de la Resonancia Magnética Nuclear, donde en el espectro de ^1H se pueden observar señales correspondientes a dos protones alfa de los diastereómeros ya mencionados (**Figura 5.1**).

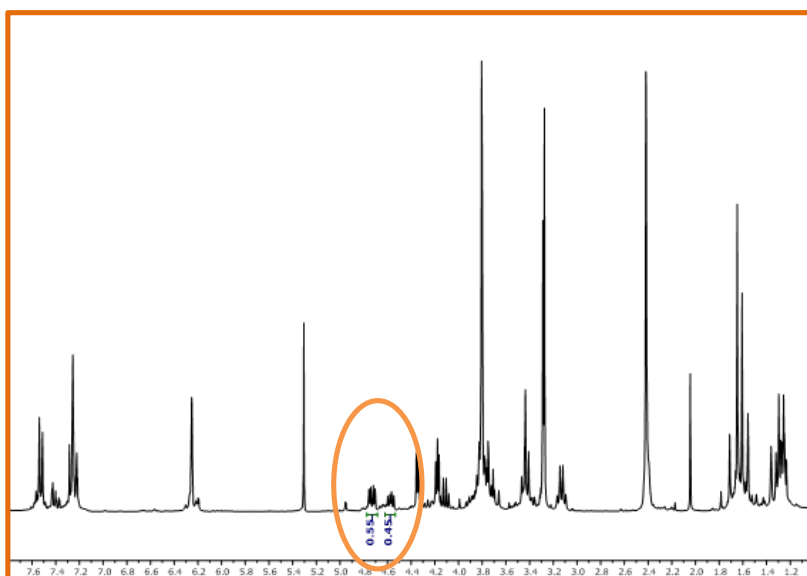


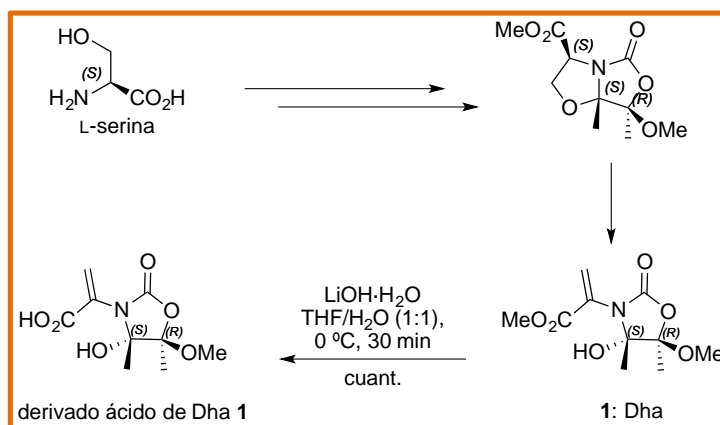
Figura 5.1 Espectro de ^1H RMN del crudo de la reacción de adición *S*-Michael sobre el deshidroaminoácido **10**.

Con todo ello, se pudo concluir que era necesario mantener la quiralidad en el carbono al que se une el alcohol terciario en el anillo de oxazolidin-2-ona, aunque se descartó el rol de dicho alcohol como grupo director, para que la reacción de adición sulfa-Michael sobre la deshidroalanina sintetizada se llevara a cabo con elevada diastereoselectividad.

5.2.1 Síntesis de nuevos deshidroaminoácidos quirales

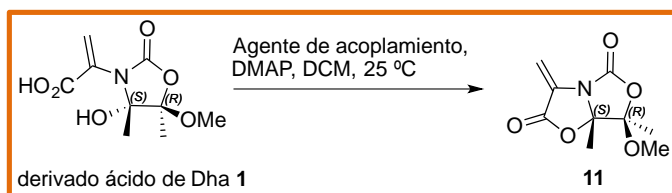
Observando la estructura de la Dha **1**, se propuso una lactonización del grupo alcohol, lo que nos permitiría mantener la quiralidad del carbono y, además, reducir de una manera significativa la flexibilidad conformacional, confiriendo más rigidez a la molécula, y más capacidad, por lo tanto, de inducir diastereoselectividad de una manera más robusta. Además, con esto podríamos conseguir simultáneamente la formación de otro anillo fusionado de oxazolidin-5-ona que podría facilitar la desprotección final o activar el carbono terminal del deshidroaminoácido bicíclico resultante, pudiendo permitir reacciones de acoplamiento en esa posición.

Por ello, sintetizamos una nueva Dha bicíclica quiral **11** en escala de gramo, en dos pasos, a partir de la Dha **1**, la cual recordemos que se obtenía de la L-Ser por formación del correspondiente biciclo, seguido de una reacción retro-Michael promovida por una base.^{23a} Primero, se realizó la hidrólisis básica del éster metílico del compuesto **1** utilizando hidróxido de litio monohidrato como base en una mezcla THF/H₂O en proporciones 1:1 como disolvente, con el fin de favorecer tanto la disolución del producto de partida como del producto final. La hidrólisis se realizó a 0 °C durante 30 min, obteniéndose el ácido carboxílico de manera casi cuantitativa. Para parar la reacción se utilizó una disolución de HCl 2 M, obteniendo el derivado ácido carboxílico de la Dha **1** como un sólido blanco (**Esquema 5.8**).



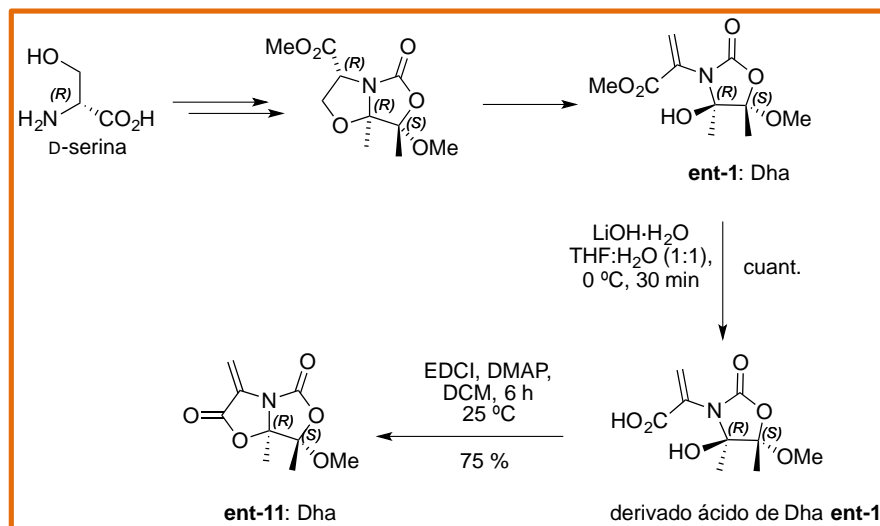
Esquema 5.8

El segundo paso consistió en una lactonización a través de una esterificación de Steglich con agentes de acoplamiento usando diclorometano (DCM) como disolvente (**Tabla 5.1**). Con el fin de optimizar esta reacción se exploraron diferentes agentes de acoplamiento, como la DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida), EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y DIC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida), y dejando diferentes tiempos de reacción. Se pudo comprobar que el mayor rendimiento obtenido fue el mostrado en la entrada 2 de la **Tabla 5.1** donde se utilizó EDCI como agente de acoplamiento, en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como base.

Tabla 5.1. Optimización de la reacción de lactonización para la Dha **11** con diferentes agentes de acoplamiento y tiempos.

Entrada	Agente de acoplamiento	Tiempo (horas)	Rendimiento (%)
1	DCC	6	50
2	EDCI	6	77
3	EDCI	16	51
4	EDCI	24	47
5	DIC	2	53
6	DIC	16	54

El mismo procedimiento fue utilizado para sintetizar el enantiómero del compuesto **11**, la Dha **ent-11**, partiendo en este caso de la D-serina en lugar de la L-serina como se hacía en el caso anterior (**Esquema 5.9**).



Esquema 5.9

La pureza diastereomérica de ambos sustratos se mantuvo durante la lactonización y se pudo corroborar ya que ambos compuestos se obtuvieron como cristales que pudieron ser estudiados por difracción de Rayos X (Figura 5.2).

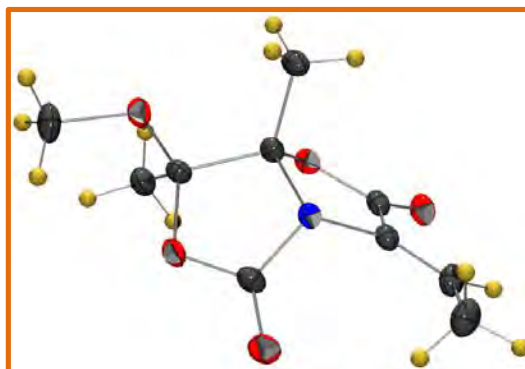
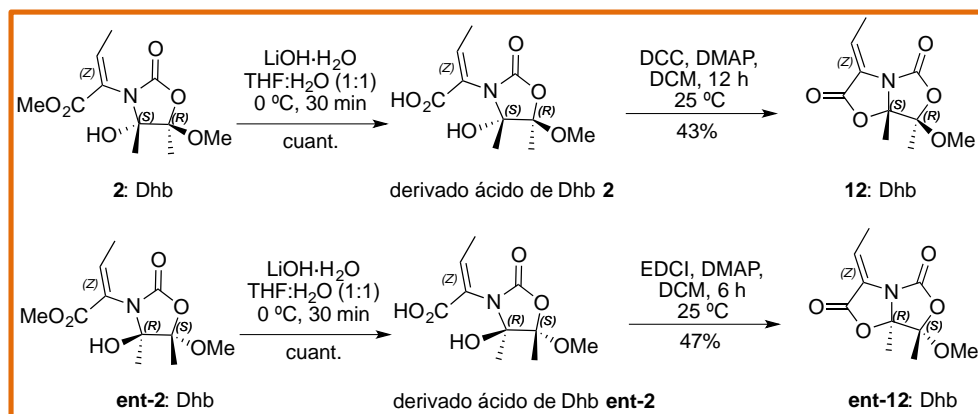


Figura 5.2 Diagrama ORTEP obtenido por difracción de Rayos X de los compuestos Dha 11 y ent-11.

De la misma manera y siguiendo la misma lógica que para los derivados de serina **11** y **ent-11**, se realizó la síntesis de los derivados de treonina **12** y **ent-12**. Para ambas síntesis se partió de los análogos de Dhb **2** y su enantiómero, siguiendo la misma metodología descrita para la obtención de las nuevas Dha bicíclicas quirales (**Esquema 5.10**).



Esquema 5.10

En este caso, los rendimientos para las reacciones de obtención de ambas Dhb bicíclicas quirales son menores que para sus análogos de serina. Esto probablemente se deba a la presencia del metilo de la treonina que disminuye su reactividad. De nuevo, los compuestos **12** y **ent-12** se obtuvieron como sólidos blancos cristalinos y su estereoquímica pudo ser confirmada por difracción de Rayos X (**Figura 5.3**).

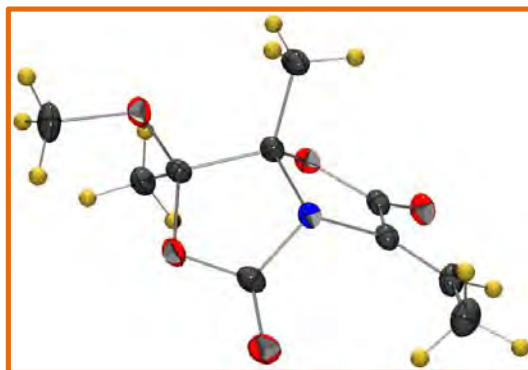
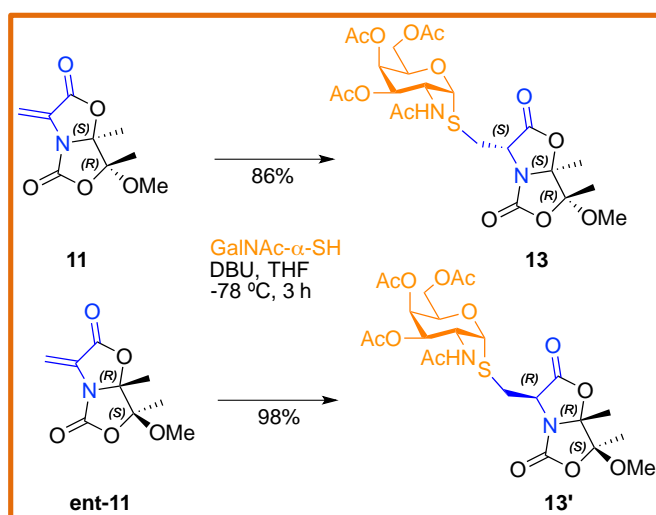


Figura 5.3 Diagrama ORTEP obtenido por difracción de Rayos X de los compuestos Dhb **12** y **ent-12**.

5.2.2 Síntesis de análogos azufrados del antígeno Tn

Una vez sintetizados los nuevos *N,O*-acetales bicíclicos quirales, equivalentes de Dha y Dhb, se procedió a realizar la síntesis de los análogos azufrados del antígeno Tn.

Se pudo demostrar que ambas Dha **11** y **ent-11** se comportan como excelentes aceptores de Michael, reaccionando de una manera muy limpia con D-GalNAc- α -SH con DBU como base, siguiendo las mismas condiciones que las descritas para los compuestos **1** y su enantiómero **ent-1**.^{23b} Después de 3 horas de reacción usando THF como disolvente a -78 °C se obtienen los compuestos **13** y **13'**, respectivamente, como únicos diastereoisómeros en la reacción de adición de Michael, y con unos rendimientos muy altos, del 86% y 98%, respectivamente (**Esquema 5.11**).



Esquema 5.11

La configuración absoluta de los nuevos centros estereogénicos generados en la adición conjugada 1,4 pudo ser determinada por experimentos de tipo RMN-NOESY (Figura 5.4). Tanto para el aducto **13** como para el **13'** se observa un pico de cruce en el espectro NOE entre los hidrógenos beta de la cisteína (–CH₂S–) y los hidrógenos del grupo metilo (CH₃) del carbono C^{7a} del sistema rígido bicíclico 2,5-dioxotetrahidro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol, hecho que confirma que el carbono alfa de la cisteína (C³ o C^α) tiene una configuración *S* para el compuesto **13** y una configuración *R* para el **13'**.

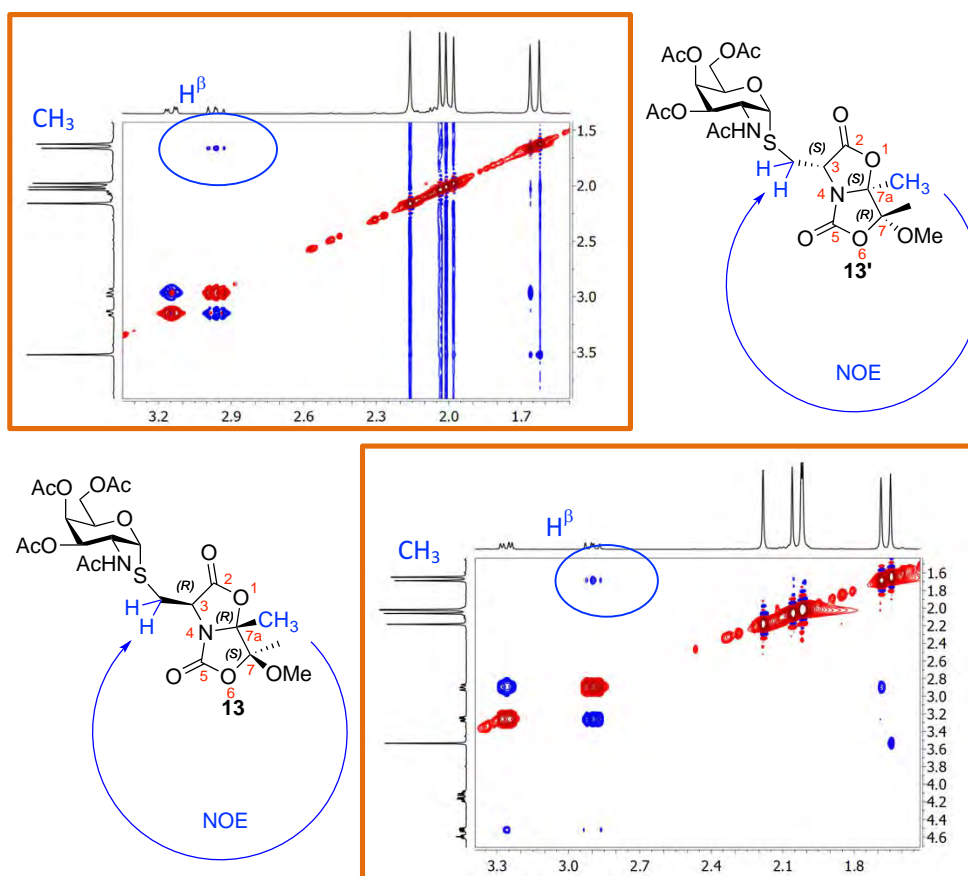


Figura 5.4 Experimentos de RMN NOESY para los compuesto **13** y **13'** donde puede confirmarse la configuración para el C^α en ambos casos.

Además, la estructura y configuración absoluta del compuesto **13'** pudo confirmarse por difracción de Rayos X, ya que dicho aducto se obtuvo como un compuesto cristalino, el cual pudo ser estudiado por esta técnica (**Figura 5.5**).

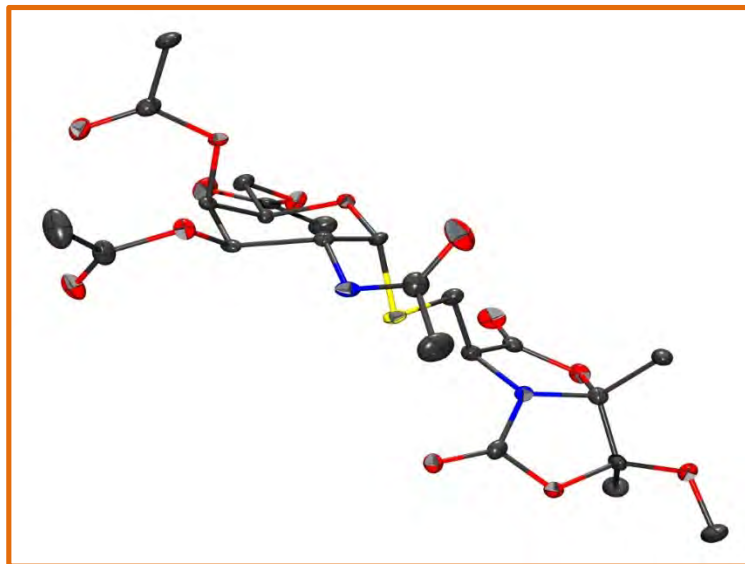
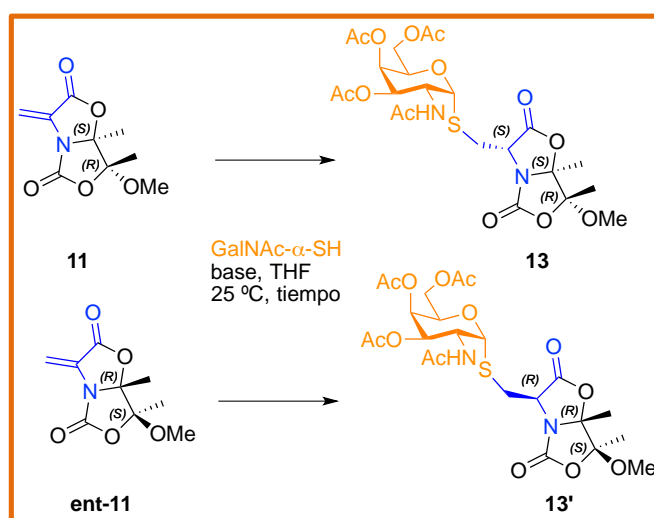


Figura 5.5 Diagrama ORTEP obtenido por difracción de Rayos X del aducto **13'**. Se omiten los átomos de H para una mayor claridad.

El hecho de que se observe una diastereoselectividad igual en la reacción de adición de tipo *S*-Michael con respecto a los acrilatos descritos anteriormente (**Dha 1** y **ent-1**) podría sugerir que ambos mecanismos de reacción, a través de los cuales se generan los nuevos centros estereogénicos, serían de la misma naturaleza.

Sin embargo, el siguiente paso fue probar la misma adición 1,4 sobre las Dha bicíclicas quirales **11** y **ent-11** a temperatura ambiente (25 °C), contrastando los resultados con las Dha que podríamos llamar de primera generación, **1** y **ent-1**, con las que la diastereoselectividad se perdía a esta temperatura (pág. 86).

Para las nuevas Dha **11** y **ent-11**, cuyas síntesis se describen en esta Memoria, se observa una diferencia importante, la cual es la total diastereoselectividad para la adición sulfa-Michael no sólo a -78 °C, sino también a 25 °C, manteniéndose los rendimientos elevados (**Esquema 5.12**).



Esquema 5.12

Con el fin de optimizar esta reacción se exploraron diferentes concentraciones de Dha, bases, además de la variación de temperatura ya comentada con anterioridad, mostrando todos los resultados obtenidos en la **Tabla 5.2**.

Para ello, se disolvió el α,β -deshidroaminoácido **11** como aceptor de Michael en THF junto con la correspondiente base y se le añadió, gota a gota (a un ritmo de 0.2 mL/min), una disolución del tiocarbohidrato D-GalNAc- α -SH como nucleófilo disuelto también en THF, a diferentes temperaturas. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (TLC) hasta una conversión total de la Dha inicial, entonces se añadió una disolución acuosa saturada de NH_4Cl .

Tras realizar extracciones, se separó el compuesto **13** y se obtuvieron diferentes valores de rendimiento mostrados en la **Tabla 5.2**. Los valores de conversión y de exceso diastereomérico se obtuvieron mediante experimentos de espectroscopía de ^1H RMN.

Tabla 5.2. Optimización de la reacción de adición S-Michael para la Dha **11** con D-GalNAc- α -SH como tiol variando la base y la concentración de aceptor.

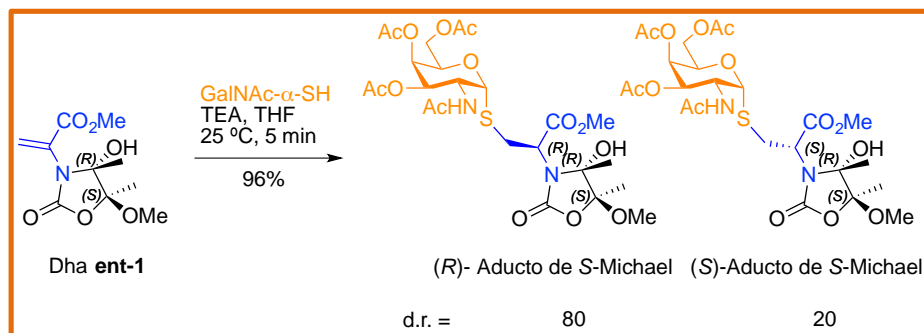
Entrada	Aceptor 11 (M)	D-GalNAc- α -SH (M)	Base	Base (mmol)	T (°C)	t (min) ^a	Rdto. (%)	d.r. (S:R) ^b
1^c	0.08	0.10	DBU	1.100	-78	180	98	>95:5
2^d	0.10	0.02	DBU	0.129	0	120	25	>95:5
3^d	0.10	0.02	DBU	0.129	25	120	20	>95:5
4	0.10	0.02	DBU	0.218	25	5	81	>95:5
5	0.10	0.04	TEA	0.218	25	5	96	>95:5
6	0.10	0.01	DBU	0.131	25	5	90	>95:5
7	0.10	0.01	TEA	0.131	25	5	91	>95:5
8	0.10	0.01	DBU	0.113	25	5	96	>95:5
9	0.10	0.01	TEA	0.113	25	5	98	>95:5
10	0.10	0.01	TEA	0.103	25	5	98	>95:5
11	0.50	0.10	TEA	4.640	25	5	99	>95:5

^a Tiempo una vez se ha completado la adición. ^b Determinado siguiendo la metodología descrita en la referencia 23 de la Memoria. ^c La base fue añadida directamente, no gota a gota. ^d Se detectó como subproducto un dímero derivado del tiocarbohidrato, pero no fue caracterizado.

Una vez exploradas todas las condiciones mostradas anteriormente, se llegó a la conclusión de que las mejores condiciones para la reacción a estudiar eran las correspondientes con la entrada 11 de la **Tabla 5.2**. Es decir, añadir condiciones equimoleculares de tiocarbohidrato y del α,β -deshidroaminoácido usando THF como disolvente y trietilamina (TEA) como base, a 25 °C, obteniendo así el aducto **13** con un rendimiento del 99% y una diastereoselectividad >95:5, en escala de gramo.

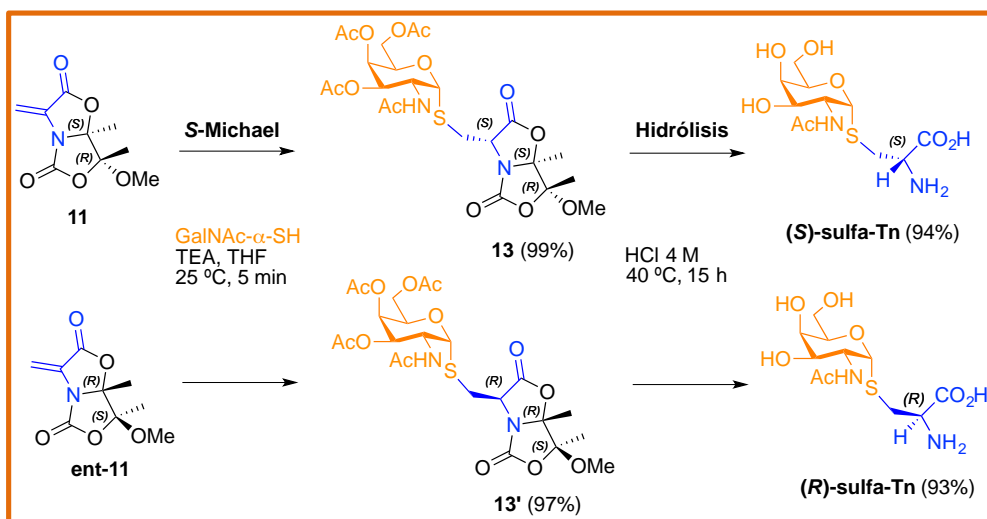
El tiempo de reacción correspondiente con dichas condiciones óptimas es de 5 minutos, el tiempo justo para la adición lenta del tiocarbohidrato sobre la Dha y su posterior seguimiento por TLC.

Por ello, dicha reacción puede ser considerada como una reacción *click*. Estas condiciones también se probaron para la Dha de primera generación **1** (**Esquema 5.13**) y aunque el rendimiento sigue siendo elevado, del 96%, la diastereoselectividad decrece (d.r. = 80:20).



Esquema 5.13

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo anterior, se prosiguió sintetizando los derivados azufrados del antígeno Tn con las nuevas Dha, **11** y **ent-11**, añadiendo a la etapa de adición sulfa-Michael, una etapa de hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (HCl 4 M) a 40 °C (**Esquema 5.14**).



Esquema 5.14

Además, este paso sirvió para corroborar, de nuevo, la estereoquímica del nuevo centro generado en la reacción de adición 1,4 pues ambos derivados se habían sintetizado con anterioridad,^{23b} como se ha mostrado en el capítulo *Antecedentes*. La estereoquímica de los carbonos alfa de los derivados del antígeno sulfa-Tn se verificó mediante sus respectivas propiedades ópticas y por espectroscopía de RMN, comparando los valores con los descritos previamente. La protección ortogonal de estos derivados S-glicosilados de aminoácidos se puede preparar mediante el protocolo descrito citado previamente.^{23b}

Aprovechando la elevada reactividad de los nuevos derivados de Dha **11** y **ent-11** sintetizados, el siguiente paso fue probar la misma reacción de adición de Michael sobre los nuevos derivados de Dhb **12** y **ent-12**, con el objetivo de realizar la síntesis de otro análogo del antígeno Tn azufrado pero esta vez derivado de treonina en lugar de serina (**Figura 5.6**).

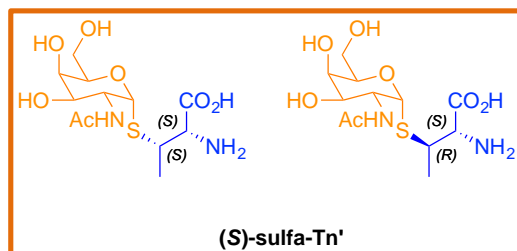
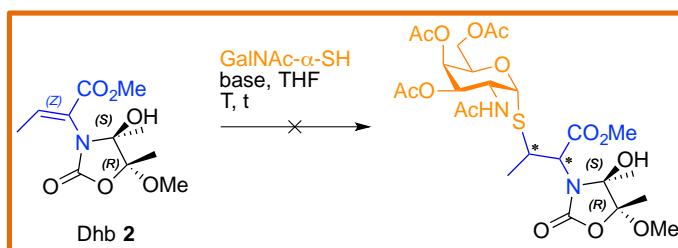


Figura 5.6 Derivados azufrados de L-treonina del antígeno Tn

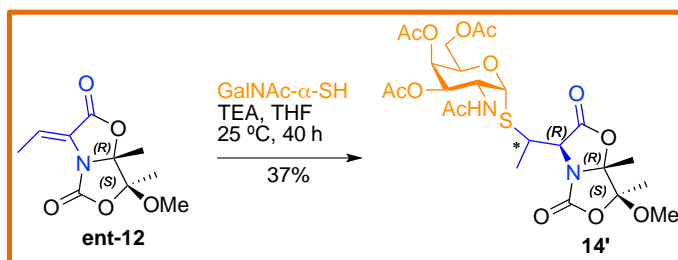
Para sintetizar estos derivados azufrados del antígeno Tn podríamos partir tanto de la familia de deshidroalaninas **2** y **ent-2** como de las nuevas Dhb descritas en esta *Memoria*, **12** y **ent-12**.

Siguiendo el mismo procedimiento que para el caso de las Dha, el primer paso fue realizar una adición 1,4 de tipo S-Michael sobre una de las Dhb, con D-GalNAc- α -SH como nucleófilo, utilizando diferentes bases, temperaturas y THF como disolvente (**Esquema 5.15**). Sin embargo, no se observó la formación de ningún producto de adición tras esta reacción.



Esquema 5.15

Sin embargo, si en lugar de utilizar como aceptor de Michael el α,β -deshidroaminoácido de primera generación **2** se utiliza el nuevo derivado bicíclico **ent-12**, utilizando TEA como base, y a temperatura ambiente, la reacción sí que tiene lugar, pudiéndose observar la formación de un único compuesto con una conversión del 50%, observada por ^1H RMN, y un rendimiento después de columna del 37% (**Esquema 5.16**).



Esquema 5.16

La reacción transcurrió de nuevo con elevada diastereoselectividad, siendo el aducto **14'** el único diastereoisómero observado de los cuatro posibles. La configuración absoluta del nuevo estereocentro generado pudo ser determinada por experimentos de RMN-NOESY, en los que se observó un pico de cruce NOE entre el protón en la posición beta y los protones del metilo (CH_3) del C^{7a} de la parte bicíclica de la molécula (**Figura 5.7**). Sin embargo, la configuración del carbono beta no ha podido ser determinada todavía.

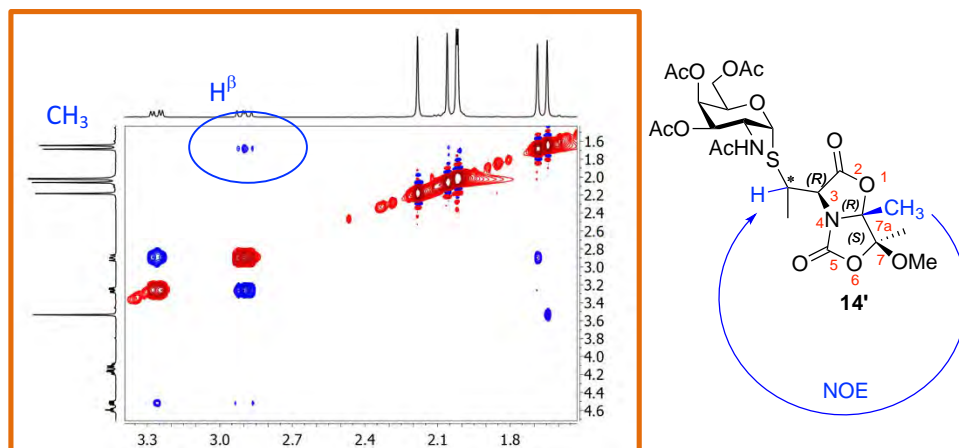


Figura 5.7 RMN NOESY del compuesto **14'**.

Esta reacción podría ser el primer ejemplo de una adición diastereoselectiva de un nucleófilo azufrado a una deshidrobutirina. Aún con todo lo anterior, la reacción es muy lenta, se necesitaron 40 horas para llegar a una conversión del 50% vista por ^1H RMN, aunque, tras purificar el aducto por columna cromatográfica en gel de sílice, el rendimiento fue tan solo del 37%. Bajo esas condiciones el tioazúcar no es muy estable y se degrada durante el transcurso de la reacción. Si en lugar de hacerla a temperatura ambiente se aumenta la misma a $50\text{ }^\circ\text{C}$, en tan solo 24 horas de reacción los resultados son peores, ya que la descomposición del azúcar es aún más rápida.

El siguiente paso sería la hidrólisis del aducto **14'** para llegar al análogo azufrado del antígeno Tn derivado de treonina (**Figura 5.7**), pero previamente habría que seguir intentando optimizar esta reacción, pues la comentada degradación del tioazúcar hace que el rendimiento conseguido para esta Memoria tenga un valor bajo.

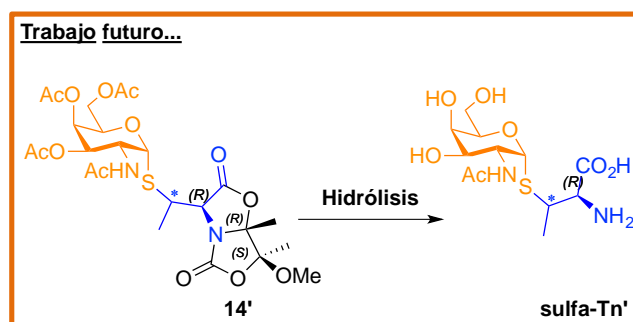


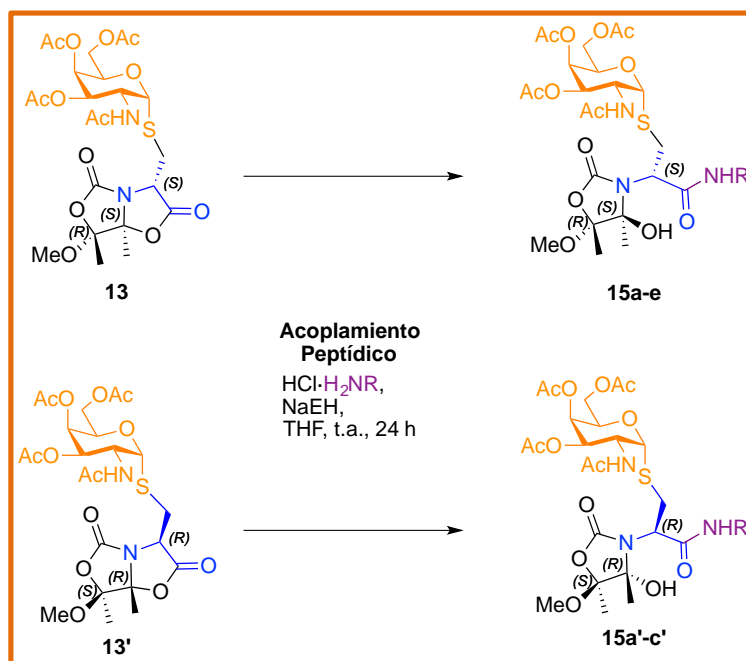
Figura 5.7. Previsión de trabajo futuro para la obtención del derivado azufrado de treonina del antígeno Tn.

5.2.3 Síntesis de dipéptidos que contienen un análogo azufrado del antígeno Tn

Además de la ventaja sintética de estos nuevos *N,O*-acetales bicíclicos como aceptores de Michael con respecto a sus precursores (elevada diastereoselectividad a temperaturas no criogénicas y elevados rendimientos con tiempos cortos de reacción), estos nuevos compuestos poseen un grupo ácido carboxílico protegido y activado para realizar acoplamiento peptídico en el anillo de oxazolidin-5-ona.

A modo de demostración, en esta Memoria se presenta la reacción de acoplamiento de las nuevas Dha **11** y **ent-11** con diferentes clorhidratos de α - y β -aminoésteres (Gly, Ala, Phe, Ser desprotegida y β -Ala).

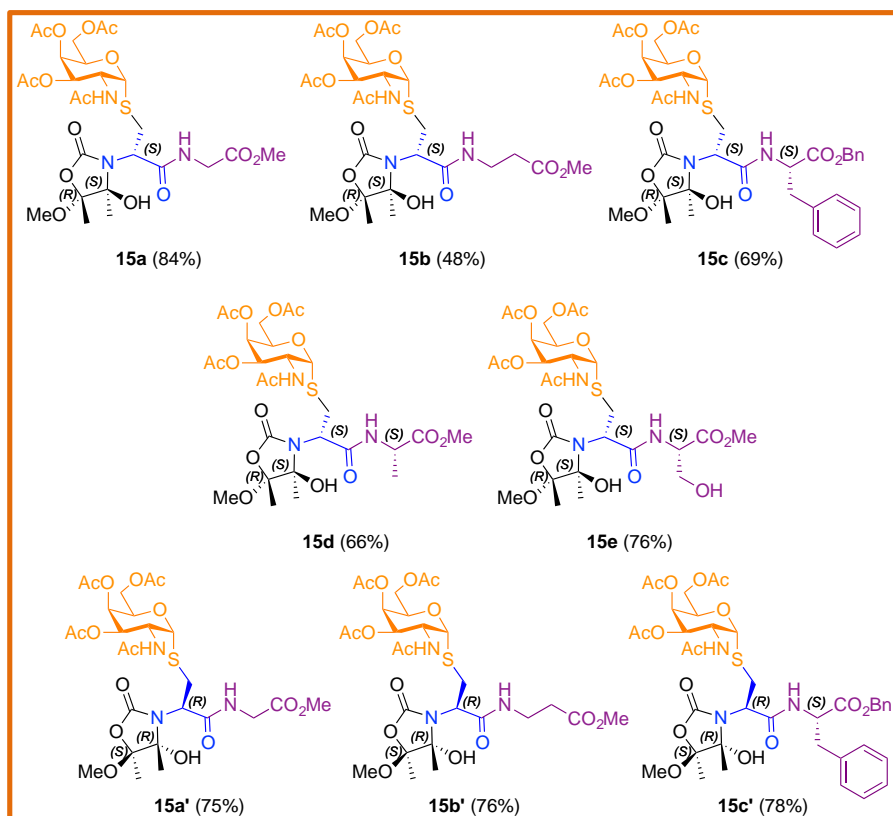
Para realizar ese acoplamiento se llevaron a cabo reacciones de aminólisis en presencia de 2-etilhexanoato de sodio (NaEH) como base, THF como disolvente, a temperatura ambiente y en 24 horas (**Esquema 5.17**).



Esquema 5.17

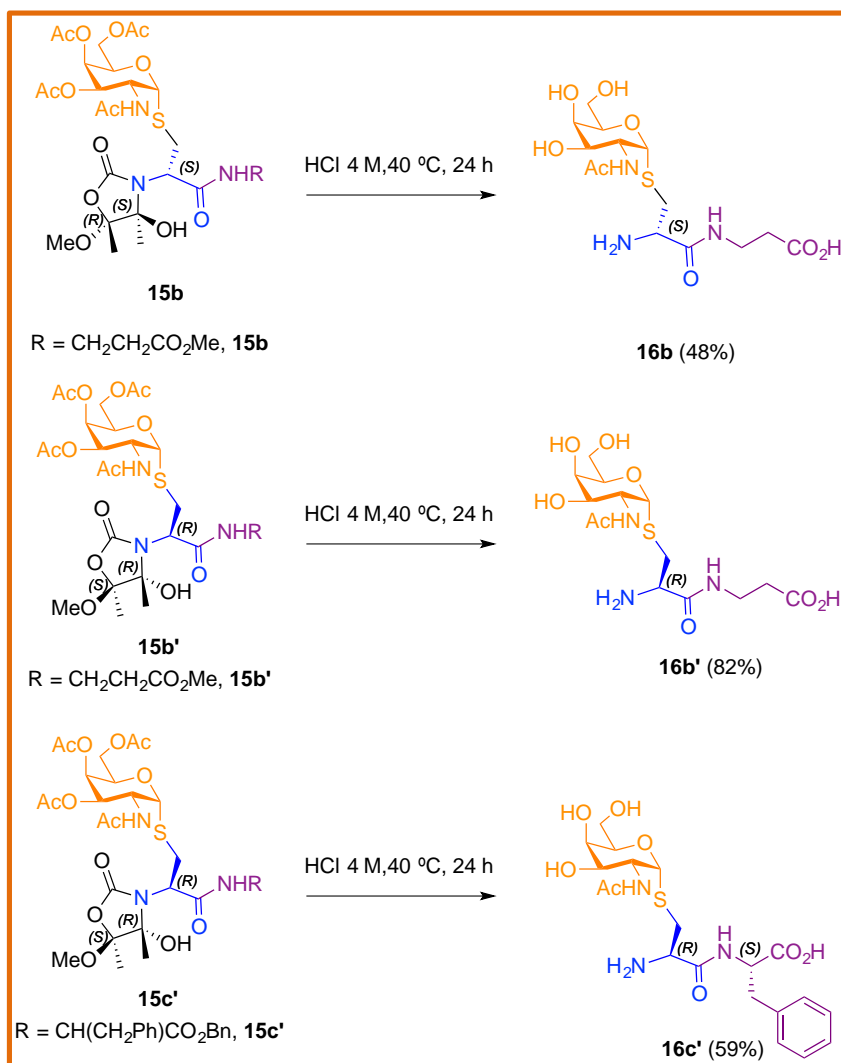
El rendimiento para todos los casos fue bueno, superior al 48% (Tabla 5.3). Las reacciones se realizaron en atmósfera inerte debido a la elevada higroscopicidad de la base utilizada, además así se evita la apertura de la lactona para dar el ácido. Todos los compuestos se purificaron mediante columna cromatográfica en gel de sílice.

Tabla 5.3. Reacción de aminólisis de las lactonas **13** y **13'** para dar los acoplamientos peptídicos con diferentes clorohidratos de α y β -aminoesteres.



Entrada	Aducto de Michael	HCl·H ₂ NR	Producto de aminólisis (Rdto, %)
1	13	HCl·Gly-OMe	15a (84)
2	13	HCl· β -Ala-OMe	15b (48)
3	13	HCl·Phe-OBn	15c (69)
4	13	HCl·Ala-OMe	15d (66)
5	13	HCl·Ser-OMe	15e (76)
6	13'	HCl·Gly-OMe	15a' (75)
7	13'	HCl· β -Ala-OMe	15b' (76)
8	13'	HCl·Phe-OBn	15c' (78)

El siguiente paso fue la hidrólisis ácida de tres de los derivados mostrados en la tabla anterior, **15b** y **15b'-c'**, para obtener los correspondientes dipéptidos monoglicosilados **16b** y **16b'-c'** (Esquema 5.18). Para ello, se realizó la hidrólisis de los aductos seleccionados con HCl 4 M a una temperatura de 40 °C y una posterior purificación de los productos obtenidos mediante HPLC preparativo. De esta manera, se pudieron obtener tres *S*-diglicopéptidos que fueron D-Cys(α -D-GalNAc)- β -Ala (**16b**), L-Cys(α -D-GalNAc)- β -Ala (**16b'**) y L-Cys(α -D-GalNAc)-L-Phe (**16c'**).

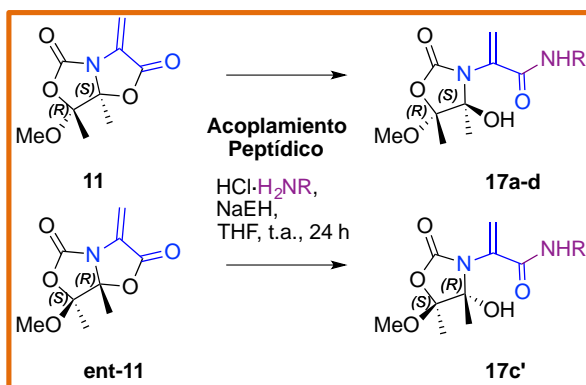


Esquema 5.18

Los rendimientos para los tres casos fueron elevados, 48% para el **16b**, 82% para el **16b'** y 59% para el **16c'**. De esta manera, se obtuvieron dipéptidos monoglicosilados que contenían el derivado azufrado del antígeno Tn, con una elevada diastereoselectividad y buenos rendimientos.

Además, la versatilidad sintética de los compuestos bicíclicos **11** y **ent-11** pudo ampliarse más todavía realizando dichos acoplamientos peptídicos antes de la reacción de adición sulfa-Michael. Así, siguiendo la misma metodología que para los acoplamientos anteriores, los equivalentes bicíclicos de Dha **11** y **ent-11** se hicieron reaccionar directamente con los diferentes clorhidratos de α - y β -aminoésteres usados anteriormente para obtener los deshidrodipéptidos **17c** y **17a'-d'** mostrados en la **Tabla 5.4**.

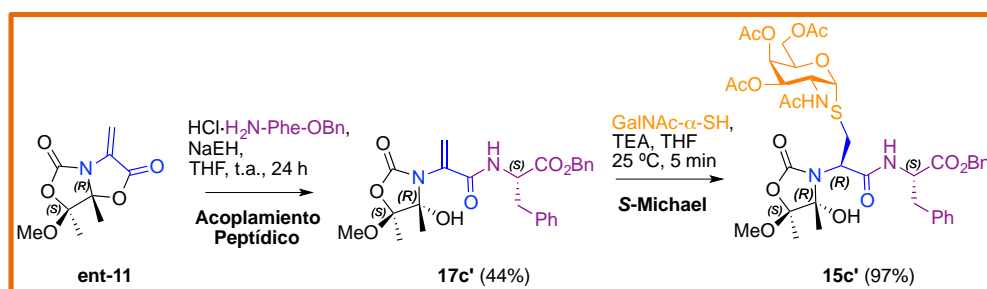
Tabla 5.4 Reacción de aminólisis de las lactonas **11** y **ent-111** para dar los acoplamientos peptídicos con diferentes clorhidratos de α y β -aminoésteres.



Entrada	Dha	HCl·H ₂ NR	Producto de aminólisis (Rdto, %)
1	11	HCl·Gly-OMe	17a (40)
2	11	HCl· β -Ala-OMe	17b (28)
3	11	HCl·Phe-OBn	17c (37)
4	11	HCl·Ala-OMe	17d (22)
5	ent-11	HCl·Phe-OBn	17c' (44)
6	ent-11	HCl·D-Phe-OBn	17c'-D-Phe (42)

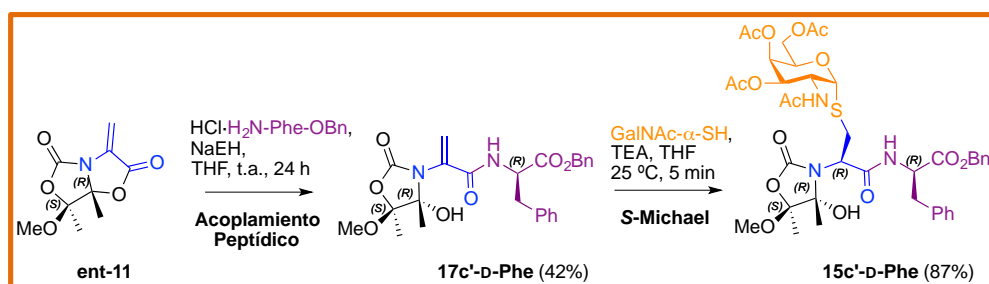
En este caso, los valores de los rendimientos obtenidos son moderados y menores que para el caso anterior, realizando la aminólisis después de la reacción de adición de Michael. Esto es debido a que en las Dha **11** y **ent-11**, tenemos el doble enlace del deshidroaminoácido, un punto de la molécula muy reactivo, lo cual hace que puedan darse reacciones laterales como reacciones de *N*-Michael y baje el rendimiento de la reacción de aminólisis.

El siguiente paso fue realizar la adición de D-GalNAc- α -SH sobre el deshidrodipéptido **17c'** utilizando la metodología óptima para las reacciones sulfa-Michael descrita en esta Memoria, con TEA como base y a 25 °C, obteniendo únicamente el *S*-glicodipéptido protegido **15c'** con un buen rendimiento (97%) para la reacción de adición y una excelente diastereoselectividad (d.r. > 95:5) (**Esquema 5.19**).



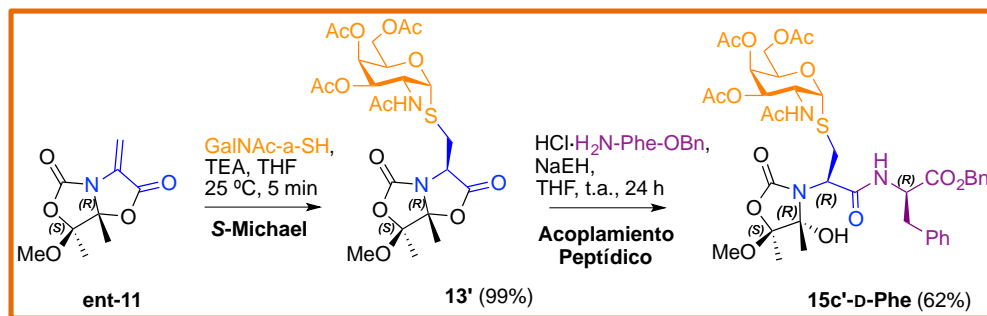
Esquema 5.19

Con el fin de descartar el rol como grupo estereodirector de la L-fenilalanina en la reacción de adición sulfa-Michael del compuesto **17c'** con el tioazúcar D-GalNAc- α -SH, también se realizó la síntesis del compuesto **15c'-D-Phe** (mediante la reacción de acoplamiento peptídico con la fenilalanina de la configuración contraria) y seguido la misma adición de Michael con el tioazúcar correspondiente, en las mismas condiciones, observando de nuevo un elevado rendimiento y una alta diastereoselectividad (d.r. > 95:5) (**Esquema 5.20**). Se obtuvo la misma inducción estereoquímica (*R*) en el carbono α de la cisteína.



Esquema 5.20

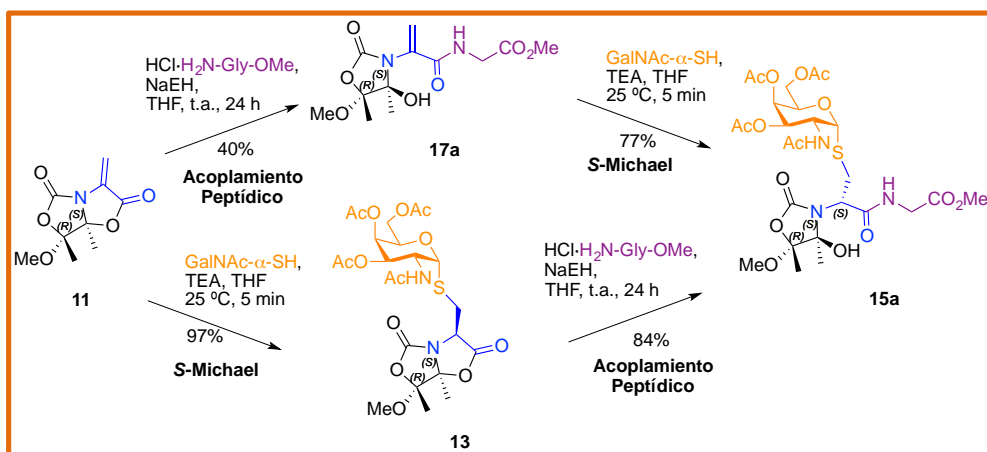
Para corroborar la estereoquímica obtenida, también se realizó la síntesis del compuesto **15c'-D-Phe** realizando la aminólisis de la lactona **13'** con el clorhidrato del éster bencílico de la D-fenilalanina, obteniéndose de nuevo la misma configuración para todos los centros generados (**Esquema 5.21**).



Esquema 5.21

Además, se ha demostrado que el compuesto bicíclico **11** tiene un comportamiento, en el ámbito estereoquímico, similar a su equivalente Dha **ent-11** pero induciendo, como es de esperar, la configuración contraria para el carbono α de la cisteína creado en la reacción de adición sulfa-Michael. Para ello, se llevó a cabo la reacción entre el deshidropéptido **17a** y el tioazúcar D-GalNAc- α -SH en las mismas condiciones utilizadas previamente, obteniéndose el aducto **15a**.

De nuevo, para corroborar la estereoquímica del centro generado, se sintetizó dicho aducto partiendo además del derivado **13** y realizando con él el acoplamiento peptídico, mediante la misma metodología utilizada con anterioridad, con el clorhidrato del aminoéster de glicina (**Esquema 5.22**).



Esquema 5.22

En conclusión, en este capítulo de la Memoria se presenta la síntesis de nuevos deshidroaminoácidos bicíclicos quirales, Dha y Dhb, que se pueden utilizar como aceptores en reacciones de tipo S-Michael. En concreto, los *N,O*-acetales bicíclicos equivalentes de serina, es decir, las Dha bicíclicas quirales, se comportan como excelentes aceptores en la citada reacción de adición 1,4 en presencia de tri-*O*-acetil-2-acetamido-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranosas con DBU o TEA como bases. Esta reacción sulfa-Michael tiene lugar con elevada diastereoselectividad y elevados rendimientos, y con tiempos cortos si se lleva a cabo a temperatura ambiente, por lo que puede considerarse como una reacción *click*.

Los aductos de Michael obtenidos se han podido hidrolizar fácilmente para obtener los correspondientes glicosil aminoácidos *S*- α -D-GalNAC-L-Cys y *S*- α -D-GalNAC-D-Cys, miméticos del antígeno Tn (α -D-GalNac-L-Ser). La ventaja de esta ruta sintética frente a la publicada por nuestro grupo previamente^{23b} consiste en un aumento del rendimiento en la reacción de adición conjugada 1,4, y la posibilidad de llevar a cabo la reacción de hidrólisis de los aductos de Michael de una manera limpia, evitando los problemas observados en otros casos.^{23b}

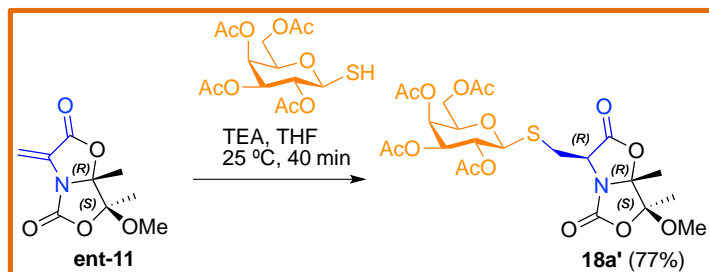
La subestructura de oxazolidinona de estas nuevas deshidroalaninas permite también reacciones de apertura de anillo con otros aminoácidos para obtener derivados de *S*-glicodipeptidos en los que se incorpora la subestructura del antígeno sulfa-Tn. Esta metodología se está expandiendo actualmente en nuestro grupo de investigación con el fin de obtener glicopéptidos más largos y poder incorporar la estructura de deshidroalanina dentro de una cadena peptídica, para poder así realizar la reacción de adición sulfa-Michael en un péptido de mayor tamaño.

5.3 Reactividad S-Michael utilizando tioles de diferente naturaleza

El uso de la reacción de adición conjugada 1,4 para la creación de enlaces C-S es de gran interés, teniendo en cuenta la posibilidad de hacer una síntesis estereoselectiva, además de la buena nucleofilia de los tioles utilizados en la misma. Como se puede ver en el capítulo *Antecedentes* de esta Memoria, ya se ha explorado con anterioridad la utilidad sintética de los deshidroaminoácidos quirales **1** y **ent-1** como aceptores de Michael frente a nucleófilos azufrados, para alcanzar productos de gran interés biológico. Además, en esta Memoria se presenta la buena reactividad de los nuevos α,β -deshidroaminoácidos quirales **11** y **ent-11** también como aceptores sulfa-Michael cuando los enfrentamos al nucleófilo D-GalNAc- α -SH.

Por todo ello, se decidió ampliar el número de tioles a probar sobre las nuevas Dha, bajo unas condiciones similares, aportando a esta reacción de adición conjugada 1,4 una lista de posibles modificaciones postraduccionales que se pueden encontrar fácilmente en péptidos y proteínas. Para ello, se realizó la reacción S-Michael utilizando como aceptor la Dha **ent-11**, siguiendo la metodología optimizada previamente para este tipo de reacción, utilizando para todos los casos THF como disolvente.

Con el fin de probar otro tipo de tioazúcares, habiéndose probado un α -tiocarbhidrato para la síntesis del sulfa-Tn, se decidió utilizar como nucleófilo un azúcar de configuración β , la β -tioglucopiranososa tetra-*O*-acetilada, utilizando TEA como base (**Esquema 5.23**).



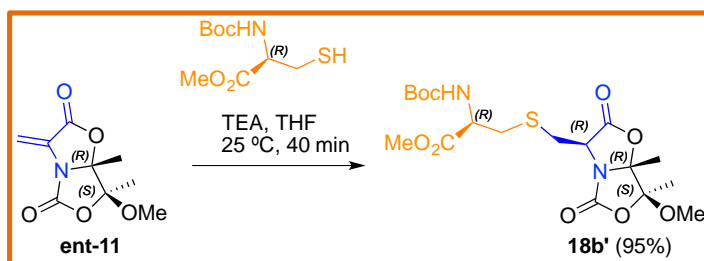
Esquema 5.23

Esta reacción llevó exclusivamente a la obtención del compuesto **18a'** (d.r. >95:5 por ^1H RMN). Si lo comparamos con la misma reacción de *S*-Michael sobre el análogo de Dha **ent-1** realizada previamente en nuestro grupo de investigación,²⁵ obtenemos la misma diastereoselectividad en el nuevo centro quiral generado. Los tiempos de reacción son similares por lo que, para este caso, la reacción funciona de la misma manera que para el análogo abierto, con la mejora de que, con la Dha bicíclica **ent-11**, la reacción transcurre a temperatura ambiente en lugar de a -78 °C como en el caso de la Dha **ent-1**.

²⁵ Aydillo, C. *Síntesis y aplicaciones de N,O-acetales bicíclicos derivados de hidroxiaminoácidos naturales*, Tesis Doctoral, Universidad de La Rioja, **2011**.

Además de glicosilaminoácidos, otros productos con azufre interesantes desde un punto de vista biológico son las lantioninas. Como ya se ha comentado anteriormente, son análogos de cisteína con un puente tioéter lo que le confiere mayor estabilidad frente a la degradación química y enzimática.

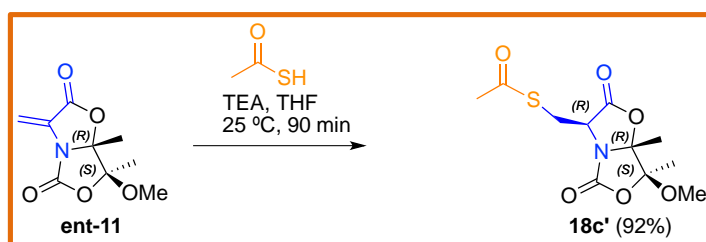
La adición sulfa-Michael sobre Dha con nucleófilos azufrados de tipo carbohidrato da excelentes resultados, por lo que se hizo reaccionar el enantiómero *R* del *N*-Boc-cisteinato de metilo con la nueva Dha **ent-11** utilizando de nuevo la metodología optimizada para este tipo de reacciones, con THF como disolvente y TEA como base (**Esquema 5.24**).



Esquema 5.24

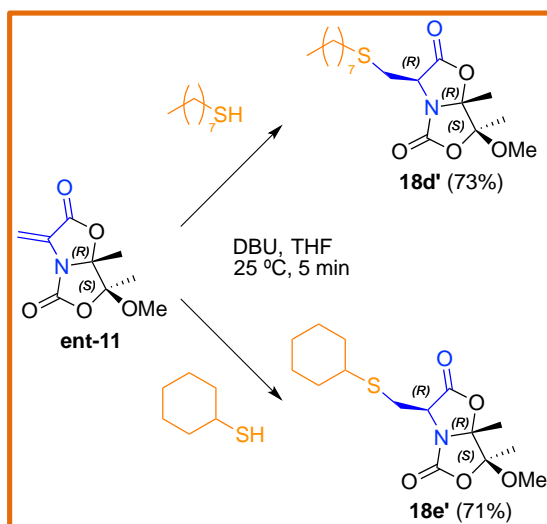
Si comparamos de nuevo esta reacción con la adición 1,4 sobre la Dha **ent-1** realizada previamente en nuestro grupo de investigación,²⁵ el rendimiento es algo mejor, de un 95%, mientras que en la prueba anterior era de un 90%. Además, de nuevo, los tiempos de reacción son similares, pero la reacción con la nueva Dha bicíclica **ent-11** funciona a temperatura ambiente de manera diastereoselectiva. De esta manera, tenemos acceso mediante otra ruta a derivados de lantioninas, los cuales, mediante las transformaciones correspondientes, podrían ser introducidos en las cadenas peptídicas deseadas.

Otro tipo de nucleófilos azufrados, con los que hemos probado su reactividad en esta reacción de tipo S-Michael frente a los nuevos *N,O*-acetales bicíclicos quirales descritos en esta Memoria, son los acil tioles. Con ese fin hemos realizado, siguiendo el procedimiento experimental optimizado para ello (THF como disolvente, TEA como base, y en 90 minutos), la reacción de adición conjugada 1,4 sobre la Dha **ent-11** con el ácido tioacético, obteniendo el aducto **18c'** con un rendimiento elevado del 92% (**Esquema 5.25**).



Esquema 5.25

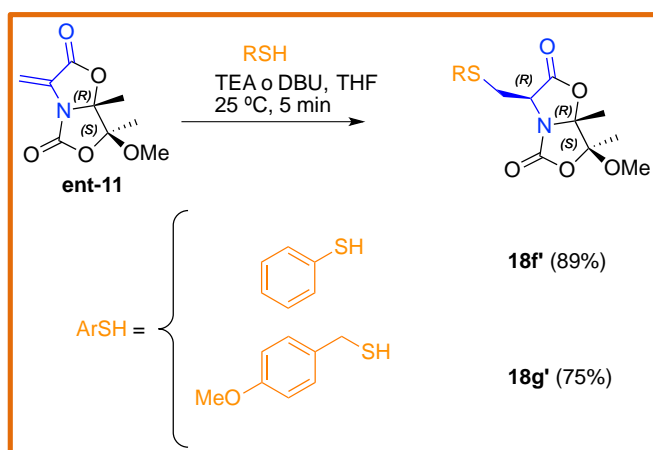
El siguiente tipo de nucleófilos azufrados que se probó fue el de los tioles alquílicos o alifáticos. En este caso se ha realizado la reacción S-Michael con octanotiol y con un tiol alquílico más impedido como el ciclohexanotiol, siguiendo la metodología optimizada, utilizando THF como disolvente y DBU como base, obteniendo los aductos **18d'** y **18e'** en tan solo 5 minutos y con unos rendimientos elevados del 73% y 71%, respectivamente (**Esquema 5.26**).



Esquema 5.26

De nuevo, este tipo de tioles ya se había probado previamente con el acrilato **ent-1**, utilizando como tioles el tiopropanol y el ciclohexanotiol. Para dichos casos la base utilizada fue DBU y la temperatura fue de -78 °C, obteniendo los correspondientes aductos con unos rendimientos elevados del 91% y 86%, respectivamente. Los tiempos de reacción, sin embargo, sí que se han visto reducidos al utilizar el nuevo aceptor bicíclico **ent-11**, pues utilizando el acrilato **ent-1** fueron de 15 minutos para el propanotiol y de 1 hora para el tiol más impedido. Hay que tener en cuenta, además, que el propanotiol es una cadena alifática de menor tamaño que la del octanotiol, por lo que la adición nucleófila puede darse con más facilidad.

Para terminar, el último grupo de tioles que se probaron para la reacción de adición 1,4 fue el de los tioles aromáticos. Para ello, se utilizaron como nucleófilos el tiofenol y el *p*-metoxibencilmercaptano. Siguiendo la metodología optimizada para la reacción *S*-Michael, utilizando THF como disolvente, TEA como base en los dos primeros casos y DBU en el último, en tan sólo 5 minutos, se obtuvieron los aductos **18f'** y **18g'** respectivamente, con elevados rendimientos todos ellos superiores al 75% (**Esquema 5.27**).



De nuevo, para el acrilato **ent-11** ya se había probado la reacción de adición sulfa-Michael con tioles aromáticos. Para el caso del tiofenol, por ejemplo, se llevó a cabo con DBU como base, a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fue necesaria 1 h de reacción para obtener el aducto correspondiente con un rendimiento también elevado del 73%. Sin embargo, con el nuevo acrilato bicíclico **ent-11**, los tiempos son muy cortos, de tan sólo 5 minutos, obteniendo rendimientos elevados para todas las reacciones.

En todos los casos, cada uno de los aductos de la adición conjugada 1,4 (**18a'-g'**) se obtuvo como un único estereoisómero con altos rendimientos y elevada diastereoselectividad (d.r. > 95:5). La configuración absoluta del nuevo centro estereogénico creado en cada caso pudo determinarse mediante experimentos de tipo RMN-NOESY (Figura 5.7)

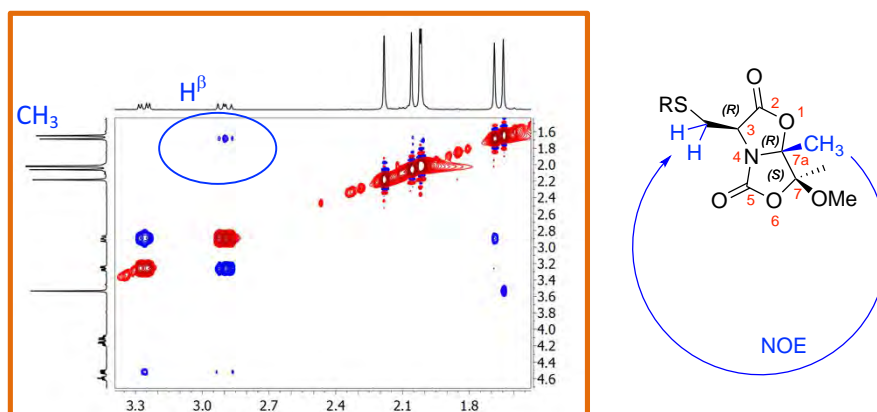


Figura 5.7 RMN NOESY general donde puede verse un pico de cruce entre los H^β y un grupo metilo.

Mientras que para la Dha **ent-1** se obtiene distinta estereoquímica en función de los S-nucleófilos probados,^{23a, 25} para la nueva Dha **ent-11** siempre se obtiene la misma estereoquímica. Este resultado indica un mecanismo robusto de estereoinducción para la protonación del enolato que se forma durante la adición conjugada en la Dha **ent-11**. Se realizó un trabajo de cálculos computacionales para los cuales se contó con la ayuda de uno de los miembros de nuestro grupo de investigación, experto en dichos cálculos mecanocuánticos.

De esta manera, la estructura calculada para el modelo del enolato, una vez que la base ha arrancado el protón en una primera etapa mecanística, usando MeS^- como nucleófilo, demuestra una ligera piramidalización del carbono en el enolato ($\theta = 8^\circ$) sugiriendo una protonación más favorable por la cara cóncava (*Si*) del biciclo (**Figura 5.8**).

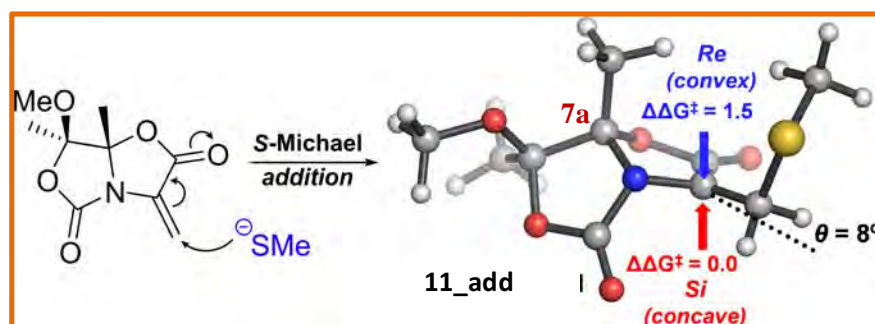


Figura 5.8 Mecanismo de la adición S-Michael de metanotiol sobre la Dha **11** en presencia de un modelo de DBU abreviada como base, calculado con $\text{PCM}_{\text{THF}}/\text{M06-2X}/6-31+\text{G}(\text{d,p})$. Las barreras de activación relativas ($\Delta\Delta G^\ddagger$) se dan en kcal mol^{-1} . Sólo se muestra la estructura de menor energía.

El impedimento estérico ejercido por el grupo metilo puente en la posición 7a, y la aparición de las fuerzas de torsión en el anillo de cinco miembros de la oxazolidin-5-ona, desfavorecen la protonación por la cara convexa (*Re*) del biciclo,²⁶ haciendo más favorable la que en principio parecía menos accesible, la cara cóncava del mismo. Esto se ha podido demostrar calculando la estructura de los estados de transición (TS) (**Figura 5.9**).

²⁶ Wang, H.; Houk, K. N. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 462.

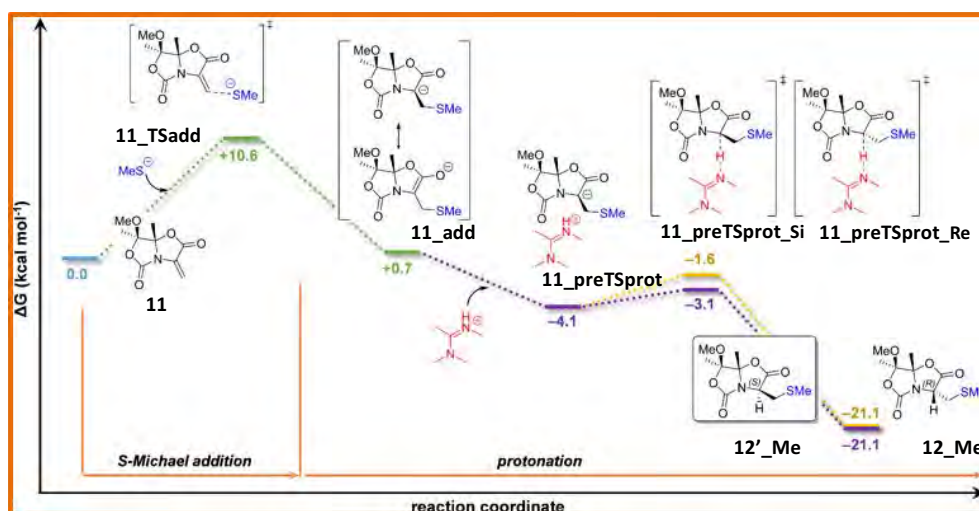
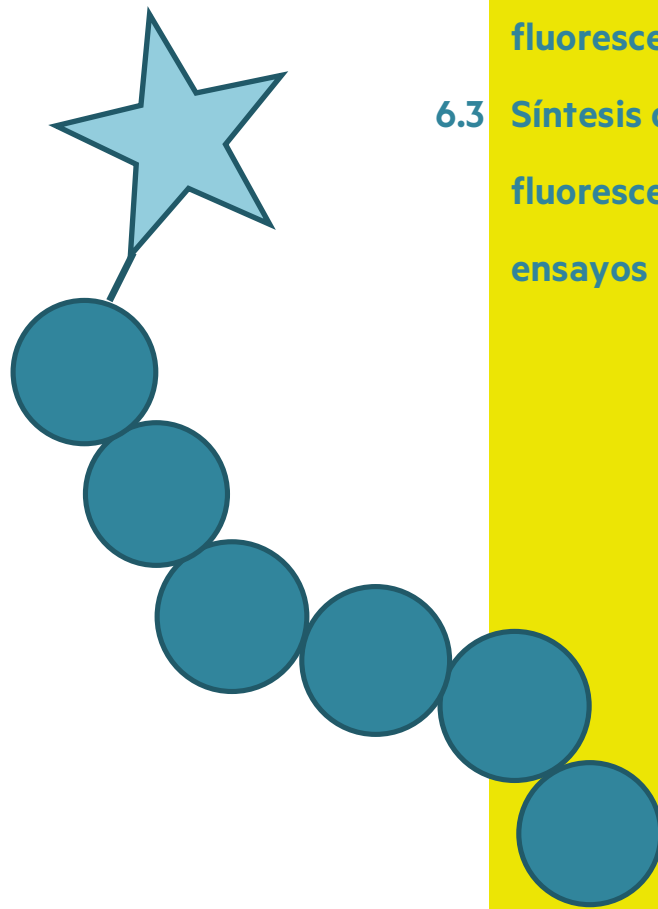


Figura 5.9 Camino de mínima energía calculado para la reacción S-Michael del metanotiol sobre la **Dha 11** calculado con PCM_{THF}/M06-2X/6-31+G(d,p).

Como puede comprobarse en la **Figura 5.9**, la diastereoselectividad observada se genera cinéticamente (en el estado de transición) durante la protonación del enolato ligeramente piramidalizado **11_add**. Además, cabe destacar que ambos epímeros de los derivados bicíclicos de cisteína **12_Me** y **12'_Me** son isoenergéticos, descartando así el control termodinámico para esta reacción altamente exergónica ($\Delta G = -4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$) incluso a temperatura ambiente.

Capítulo 6. Síntesis de aminoácidos fluorescentes y su aplicación biológica

- 6.1 Introducción
- 6.2 Síntesis de aminoácidos
fluorescentes
- 6.3 Síntesis de péptidos
fluorescentes (CPPs) y
ensayos biológicos



6.1 Introducción

La síntesis de aminoácidos no naturales fluorescentes y su incorporación en péptidos son una herramienta muy útil para estudiar diferentes procesos biológicos usando técnicas como la espectroscopía de fluorescencia. La actividad enzimática, la determinación estructural de las proteínas y su interacción con otras proteínas y ácidos nucleicos, son algunos ejemplos.¹ Los aminoácidos naturales, como por ejemplo triptófano y tirosina (**Figura 6.1**), poseen fluorescencia² pero sus propiedades ópticas son muy leves como para que funcionen como sondas. Por ello, existe una necesidad de diseñar nuevos aminoácidos no naturales fluorescentes, que tengan diferentes propiedades espectroscópicas, para poder incorporarlos en cadenas peptídicas y proteínas de forma que puedan estudiarse sus propiedades estructurales, su función, etc.³

¹ (a) Krueger, A. T.; Imperiali, B. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 788. (b) Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579. (c) Katritzky, A. R.; Narindoshvili, T. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 627. (d) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142.

² Beechem, J. M.; Brand, L. *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 43.

³ (a) Lang, K.; Chin, J. W. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764. (b) Venkatraman, P.; Nguyen, T. T.; Sainlos, M.; Bilsel, O.; Chitta, S.; Imperiali, B.; Stern, L. J. *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 222. (c) Wang, J.; Xie, J.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738. (d) Stromgaard, A.; Jensen, A. A.; Stromgaard, K. *ChemBioChem*. **2004**, *5*, 909. (e) Cohen, B. E.; McAnaney, T. B.; Park, E. S.; Jan, Y. N.; Boxer, S. G.; Jan, L. Y. *Science* **2002**, *296*, 1700. (f) Dougherty, D. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645.

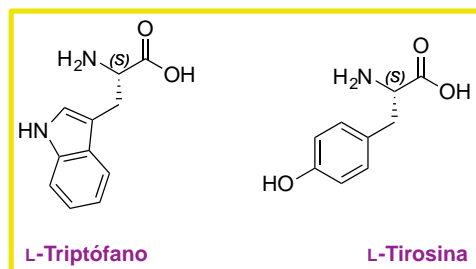


Figura 6.1 Aminoácidos naturales Triptófano y Tirosina.

En la bibliografía se pueden encontrar dos estrategias para la síntesis de aminoácidos no naturales fluorescentes. Por un lado, podemos incorporar fluoróforos conocidos a las cadenas laterales de diferentes α -aminoácidos,⁴ como por ejemplo el L-ANAP o L-3-(6-acetilnaftalen-2-ilamino)-2-aminopropionato de metilo, sintetizado por unión covalente del fluoróforo naftilo y el grupo hidroxilo de la L-serina usando una reacción de acoplamiento Fukuyama-Mitsunobu (**Figura 6.2**).⁵ Por otro lado, una segunda manera de poder sintetizar estos aminoácidos no naturales fluorescentes sería modificar la estructura de un aminoácido natural para crear uno nuevo fluorescente, por ejemplo, partiendo de aspártico y glutámico se han sintetizado aminoácidos fluorescentes basados en la estructura de cumarina (**Figura 6.2**).⁶

⁴ Wang, X.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9890.

⁵ Xiang, Z.; Wang, L. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6367.

⁶ (a) Brun, M. P.; Bischoff, L.; Garbay, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3432. (b) *Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives*. Ed: Santhosh Penta. Elsevier. **2016**.

Además, se ha visto que aumentar la aromaticidad del fluoróforo unido al aminoácido varía las propiedades espectroscópicas del aminoácido que estemos sintetizando.⁷

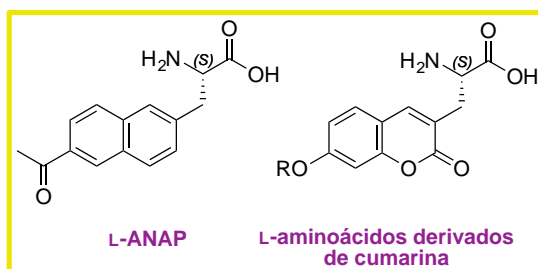


Figura 6.2 A la izquierda, estructura del aminoácido no natural fluorescente L-ANAP. A la derecha, estructura genérica de aminoácidos no naturales fluorescentes derivados de cumarina.

Aunque se han desarrollado varios protocolos sintéticos para la obtención de L-aminoácidos fluorescentes no naturales, existen muy pocos aplicados a los D-aminoácidos. Asimismo, recientemente, se ha demostrado que los D-aminoácidos fluorescentes permiten la detección rápida de la biosíntesis de la pared celular en células vivas y en numerosas especies bacterianas.⁸

⁷ (a) Chen, S.; Tsao, M. L. *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 1645. (b) Chen, S.; Fahmi, N. F.; Bhattacharya, L.; Wang, L.; Jin, Y.; Benkovic, S. J.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **2013**, *52*, 8580. (c) Chen, S.; Fahmi, N. F.; Wang, L.; Bhattacharya, L.; Benkovic, S. J.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12924 (d) Vela, M. A.; Fronczek, F. R.; Horn, G. W.; McLaughlin, M. L. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2913. (e) Cheruku, P.; Huang, J.; Yen, H.; Iyer, R. S.; Rector, K.; Martínez, J. S.; Wang, H. *Chem. Sci.* **2014**, 1150.

⁸ Kuru, E.; Hughes, H. V.; Brown, P. J.; Hall, E.; Tekkam, S.; Cava, F.; de Pedro, M. A.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12519.

Incluso se han utilizado para estudiar la síntesis de peptidoglicanos en algunas especies bacterianas.⁹

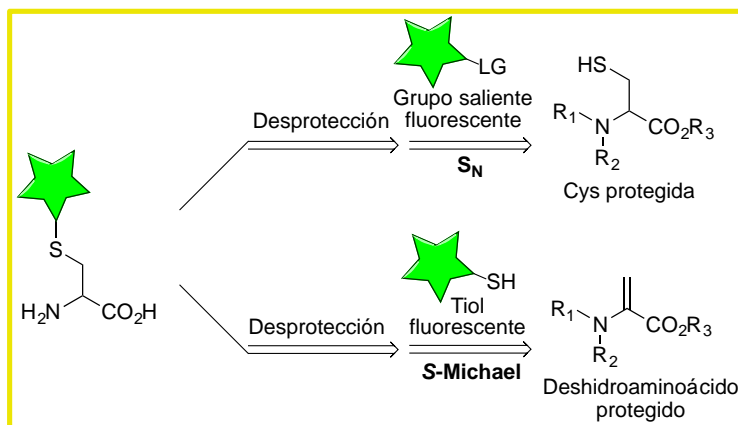
Aminoácidos funcionalizados con grupos nucleófilos en sus cadenas laterales, como lisina, tirosina o cisteína, son candidatos ideales para el desarrollo de aminoácidos fluorescentes mediante el acoplamiento del colorante electrófilo correspondiente. Teniendo en cuenta esta característica, y debido a la importancia de los D-aminoácidos fluorescentes no naturales,¹⁰ el objetivo de este capítulo es detectar la posibilidad de introducir varios fluoróforos, disponibles comercialmente, en aminoácidos derivados de D-cisteínas, para ser usados potencialmente en herramientas de diagnóstico con fines de imagen, cuando dichos aminoácidos son incorporados en péptidos.

En general, se puede acceder a la síntesis de aminoácidos fluorescentes derivados de cisteínas mediante el ataque nucleófilo del grupo sulfhidrilo de la cisteína a un fluoróforo que sea electrófilo (**Esquema 6.1**).

⁹ (a) Zunder, E. R.; Finck, R.; Behbehani, G. K.; Amir, E. D.; Krishnaswamy, S.; González, V. D.; Lorang, C. G.; Bjornson, Z.; Spitzer, M. H.; Bodenmiller, B.; Fantl, W. J.; Pe'er, D.; Nolan, G. P. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 316. (b) Pilhofer, M.; Aistleitner, K.; Biboy, J.; Gray, J.; Kuru, E.; Hall, E.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S.; Vollmer, W.; Horn, M.; Jensen, G. J. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2856. (c) Pinho, M. G.; Kjos, M.; Veening, J. W. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 601. (d) Ranjit, D. K.; Young, K. D. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 2452. (e) Tocheva, E. I.; López-Garrido, J.; Hughes, H. V.; Fredlund, J.; Kuru, E.; VanNieuwenhze, M. S.; Brun, Y. V.; Pogliano, K.; Jensen, G. J. *Mol. Microbiol.* **2013**, *88*, 673.

¹⁰ (a) Kóczán, G.; Csík, G.; Csámpai, A.; Balog, E.; Bősze, S.; Sohár, P.; Hudecz, F. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4589. (b) Maity, J.; Honcharenko, D.; Strömberg, R. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4780.

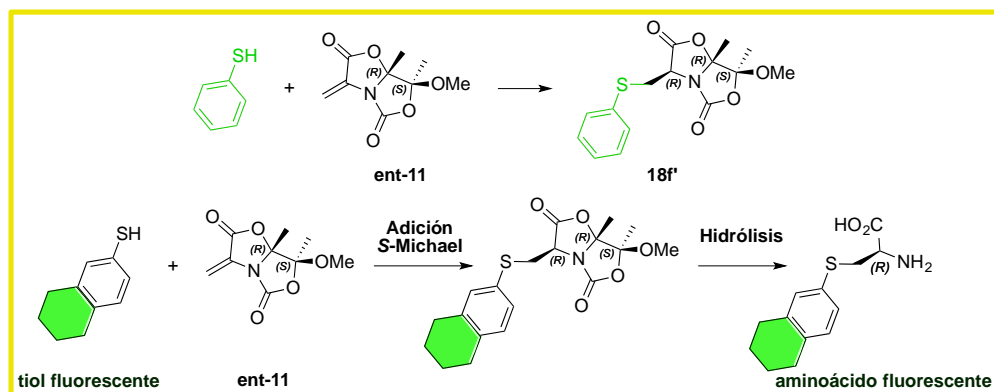
Sin embargo, la creación del enlace C-S que involucre el caso contrario, es decir, la reacción nucleófila de fluoróforos que incorporen el grupo tiol con derivados de aminoácidos que sean electrófilos, ha recibido mucha menor atención, o prácticamente ha sido inexplorada (**Esquema 6.1**).



Esquema 6.1 Retrosíntesis posibles para la obtención de Cys fluorescentes. Por un lado, se muestra la sustitución nucleófila para incorporar el fluoróforo a la cadena lateral del aminoácido. Por otro, una adición sulfa-Michael sobre una deshidroalanina.

Motivados por este hecho, en este capítulo queremos describir una nueva metodología sintética de derivados de cisteínas fluorescentes en sus formas enantioméricamente puras, utilizando para ello fluoróforos que incorporen el grupo tiol como nucleófilos. Con ellos, se pretende llevar a cabo adiciones de tipo S-Michael estereoselectivas sobre los deshidroaminoácidos quirales sintetizados en el capítulo anterior de esta Memoria.

La reacción de adición sulfa-Michael descrita anteriormente en esta Memoria ofrece la posibilidad de poder sintetizar nuevos aminoácidos fluorescentes. Las adiciones conjugadas 1,4 realizadas con tioles aromáticos permiten el marcaje de cisteínas si, además de usar un tiol aromático, usamos uno fluorescente (**Esquema 6.2**).

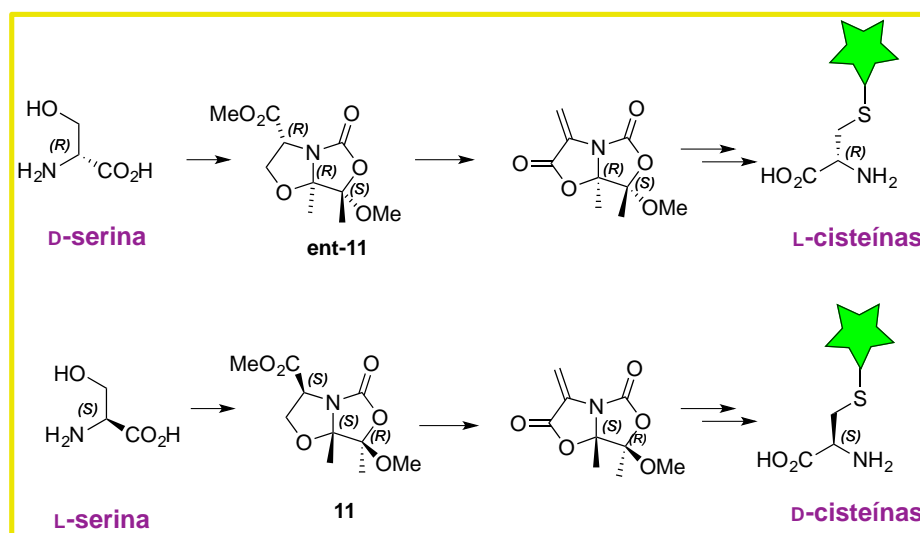


Esquema 6.2 Reacción de adición de Michael sobre una de las nuevas Dha quirales con tioles aromáticos fluorescentes para la obtención de diferentes aminoácidos fluorescentes.

Estos aductos de la reacción de Michael serían precursores de aminoácidos fluorescentes que podrían utilizarse como marcadores en la síntesis de péptidos fluorescentes, que además sean biológicamente activos para diferentes ensayos clínicos y biomédicos.

6.2 Síntesis de aminoácidos fluorescentes

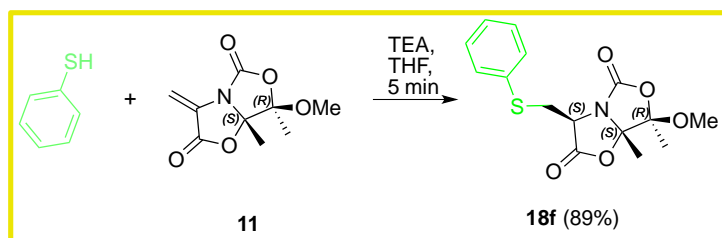
De esta manera, siguiendo la segunda metodología mostrada en el **Esquema 6.1**, realizando una adición S-Michael sobre una de las nuevas Dha quirales sintetizadas, se obtuvieron diferentes aminoácidos no naturales fluorescentes derivados de cisteína. Además, es importante decir que, si nos fijamos en toda la ruta sintética de dichos aminoácidos, partimos del aminoácido natural (L-serina) para obtener el de configuración contraria, no natural (D-cisteína). Por ello, para este caso, usaremos como aceptor de Michael la Dha quiral **11**, equivalente sintético de la L-serina, y tendremos como resultado los aminoácidos derivados de cisteína no naturales fluorescentes de la serie D (**Esquema 6.3**).



Esquema 6.3

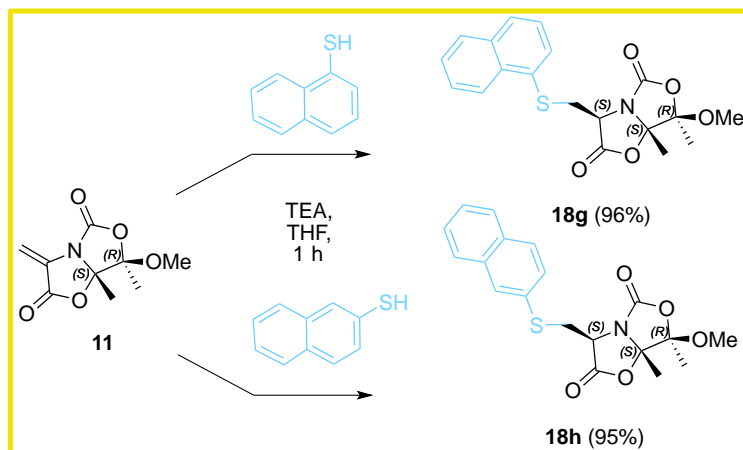
Para ello, en primer lugar, se realiza la adición sulfa-Michael con diferentes tioles aromáticos fluorescentes. Se realizó primero con el tiol aromático más sencillo, el tiofenol, con el que ya se había probado su buena reactividad, aumentando progresivamente la aromaticidad del fluoróforo, hasta incorporar un grupo cumarina o un grupo dansilo, de los cuales ya se conoce su fluorescencia.

Primeramente, se repitió la reacción de adición de Michael con el tiofenol, utilizando la metodología general optimizada para este tipo de reacciones: TEA como base, THF como disolvente y un tiempo de 5 minutos (**Esquema 6.4**) obteniendo como producto el compuesto **18f** con un rendimiento del 89%.



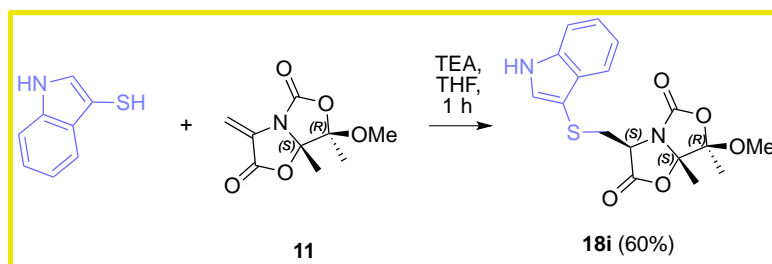
Esquema 6.4

Con el fin de aumentar la aromaticidad y poder comprobar si aumenta la fluorescencia, el siguiente paso fue realizar la misma adición conjugada 1,4 con dos derivados del naftalenotiol, el 1-naftalenotiol y el 2-naftalenotiol, siguiendo la metodología optimizada (TEA como base, THF como disolvente y en un tiempo de reacción de 1 hora) obteniendo los compuestos **18g** y **18h** con un rendimiento del 96% y 95%, respectivamente (**Esquema 6.5**).



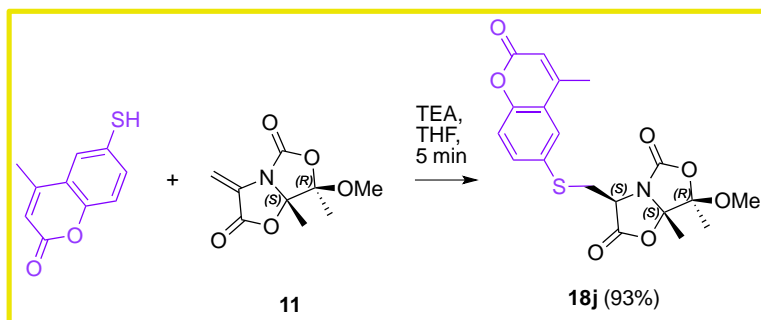
Esquema 6.5

El siguiente tiol que se probó como nucleófilo con el fin de obtener aminoácidos no naturales fluorescentes fue el 3-mercaptoindol. Este compuesto, a diferencia de los anteriores, posee un átomo de N que también puede ser nucleófilo frente a un electrófilo como es una Dha. Utilizando la misma metodología optimizada para la reacción sulfa-Michael, con TEA como base y THF como disolvente, en un tiempo de 1 hora, se obtiene el compuesto **18i** como único diastereómero de la adición conjugada 1,4 con un 60% de rendimiento tras purificación por columna cromatográfica en gel de sílice (**Esquema 6.6**).



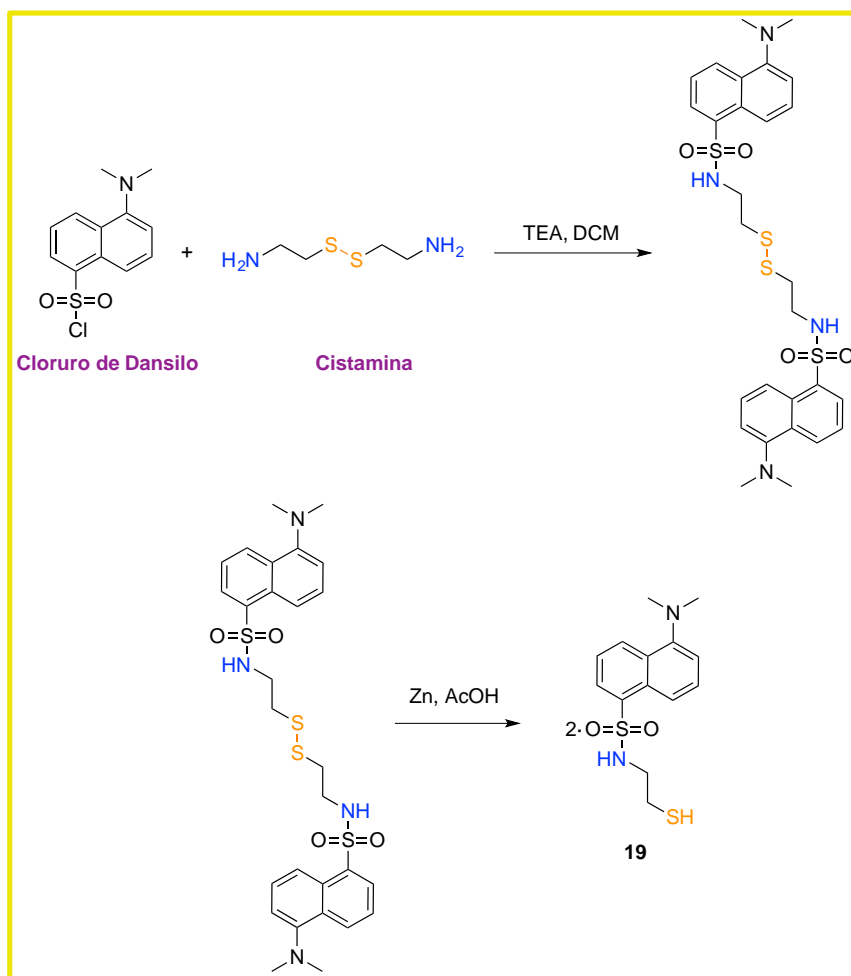
Esquema 6.6

El siguiente tiol que se incorporó a la Dha quiral **11** mediante la adición S-Michael fue un derivado de cumarina. Siguiendo, de nuevo, la misma metodología descrita con anterioridad, en un tiempo de 5 minutos, se obtiene el aducto **18j** como único diastereómero con un rendimiento del 93% (**Esquema 6.7**).



Esquema 6.7

Por último, se quiso realizar el derivado de Cys incorporando un grupo dansilo como fluoróforo en su estructura. Debido a que el dansilo no posee un azufre nucleófilo en su estructura, necesitamos partir del derivado cloruro de dansilo al que le incorporamos una cadena carbonada con dicho tiol. Primero se hizo reaccionar el cloruro de dansilo con la cistamina formando así un enlace sulfonamida en la molécula, utilizando TEA como base y diclorometano como disolvente. El siguiente paso consistió en la ruptura del puente disulfuro utilizando para ello Zn y ácido acético (AcOH) obteniendo dos equivalentes del dansilo deseado unido a la cadena azufrada (**Esquema 6.8**).

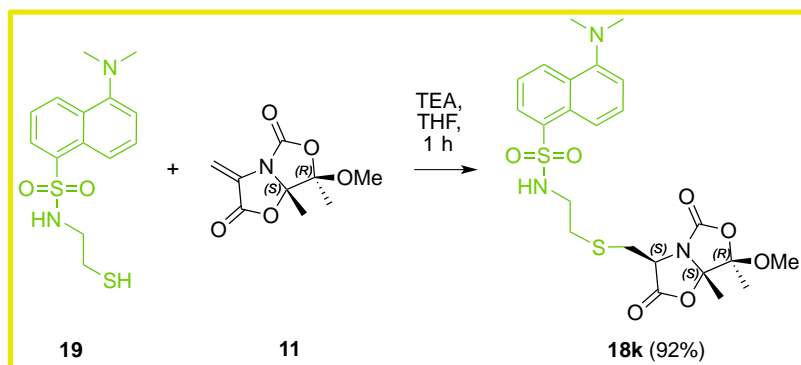


Esquema 6.8

El compuesto **19** se obtuvo de manera casi cuantitativa (99%) como un sólido verde amarillento y sus propiedades físicas y espectroscópicas coinciden con las descritas en la bibliografía.¹¹

¹¹ Robinson, C.; Hartman, R. F.; Rose, S. D. *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 265.

Con el nuevo tiol derivado de dansilo se realizó la reacción de adición 1,4 siguiendo de nuevo la metodología optimizada para este tipo de reacciones, usando TEA como base, THF como disolvente y en tan solo 1 hora de reacción, para obtener el aducto **18k** con un rendimiento del 92% como único diastereómero (**Esquema 6.9**).



Esquema 6.9

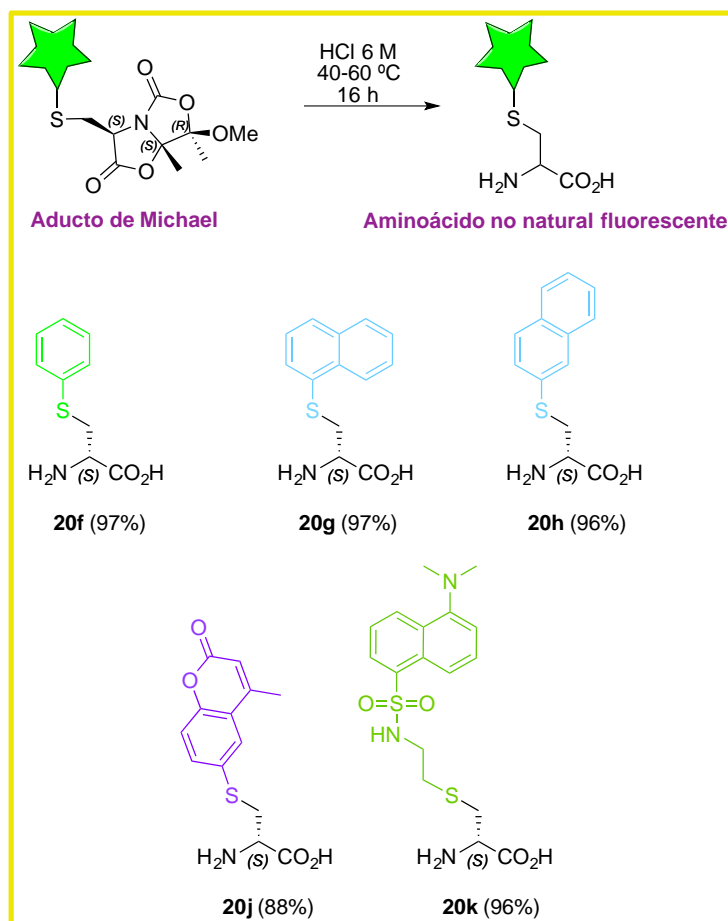
Es de destacar que el aducto **18k** es poco estable y descompone con el tiempo. Por ello, a la hora de caracterizarlo sólo se pudo realizar un espectro de ^1H -RMN y la determinación de su masa exacta mediante espectroscopía de masas de alta resolución de tipo electrospray (ESI). No se pudo determinar su espectro de ^{13}C -RMN. Por este motivo, este compuesto ha de ser utilizado inmediatamente después de su preparación.

Con todo ello, los aductos de Michael sintetizados fueron los mostrados en la **Tabla 6.1**, todos ellos obtenidos con altos rendimientos, elevada diastereoselectividad (d.r. > 95:5 determinada por H^1 -RMN), en tiempos breves y a temperatura ambiente.

Tabla 6.1 Resumen de compuestos obtenidos a partir de la reacción de adición sulfa-Michael de la Dha **11** con diferentes tioles fluorescentes.

Entrada	Aducto Michael	Rdto (%)
1	18f	89
2	18g	96
3	18h	95
4	18i	60
5	18j	93
6	18k	92

El siguiente paso en la ruta sintética para la obtención de los diferentes aminoácidos no naturales fluorescentes fue la hidrólisis, en medio ácido, de algunos de los derivados anteriores. Para ello, se utilizó HCl 4 M a 60 °C, y un tiempo de 16 horas, obteniendo los derivados correspondientes de una manera casi cuantitativa (**Esquema 6.10**). En el caso del aminoácido **18k**, para evitar la hidrólisis del grupo sulfonamida y dada su estabilidad, la reacción de hidrólisis se realizó a una temperatura inferior (40 °C).



Esquema 6.10

Todos estos aminoácidos no naturales presentan propiedades ópticas (**Figura 6.3**). Con el fin de saber si son o no buenos candidatos para realizar la síntesis posterior de compuestos de interés biológico que sean también fluorescentes, contenedores de estos aminoácidos como marcadores, se llevó a cabo un estudio experimental de sus propiedades ópticas.

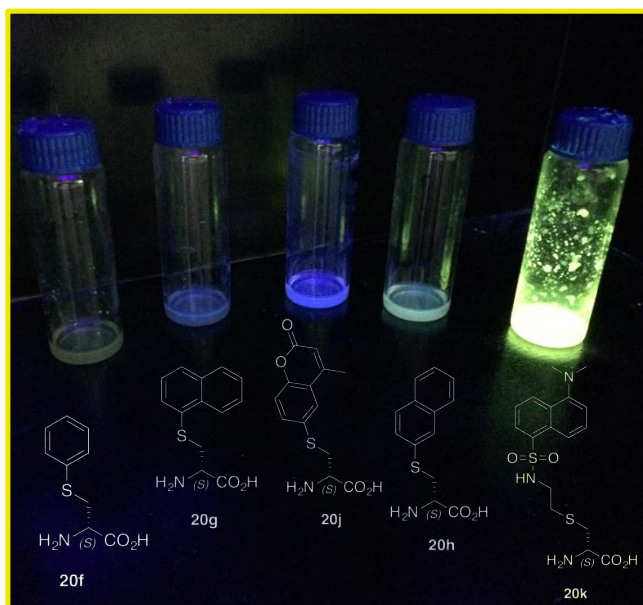


Figura 6.3 Fluorescencia observada de los aminoácidos obtenidos bajo luz ultravioleta.

Para ello, en primer lugar, se analizaron los espectros de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) de todos los aminoácidos anteriores en disolución de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración del orden de $1 \cdot 10^{-5}$ M para cada muestra (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Concentraciones de las disoluciones preparadas de los distintos aminoácidos no naturales fluorescentes en DMSO. Longitudes de onda máximas obtenidas tras medir sus espectros de absorción UV-Vis y su emisión, en nm.

Entrada	Aminoácido	Concentración (M)	$\lambda_{\text{máx}}$ (abs) (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (em) (nm)
1	20f	$1.1 \cdot 10^{-5}$	302	334
2	20g	$8.3 \cdot 10^{-5}$	307	370
3	20h	$7.3 \cdot 10^{-5}$	285	375
5	20j	$7.2 \cdot 10^{-5}$	337	396
6	20k	$5.0 \cdot 10^{-5}$	350	519

Cada aminoácido muestra una banda de absorción a una longitud de onda diferente, mostrando valores comprendidos entre los 150 y los 400 nm. Sin embargo, como puede observarse en la **Figura 6.4**, alguna de las bandas, como la del compuesto **20f**, no tiene la forma adecuada.

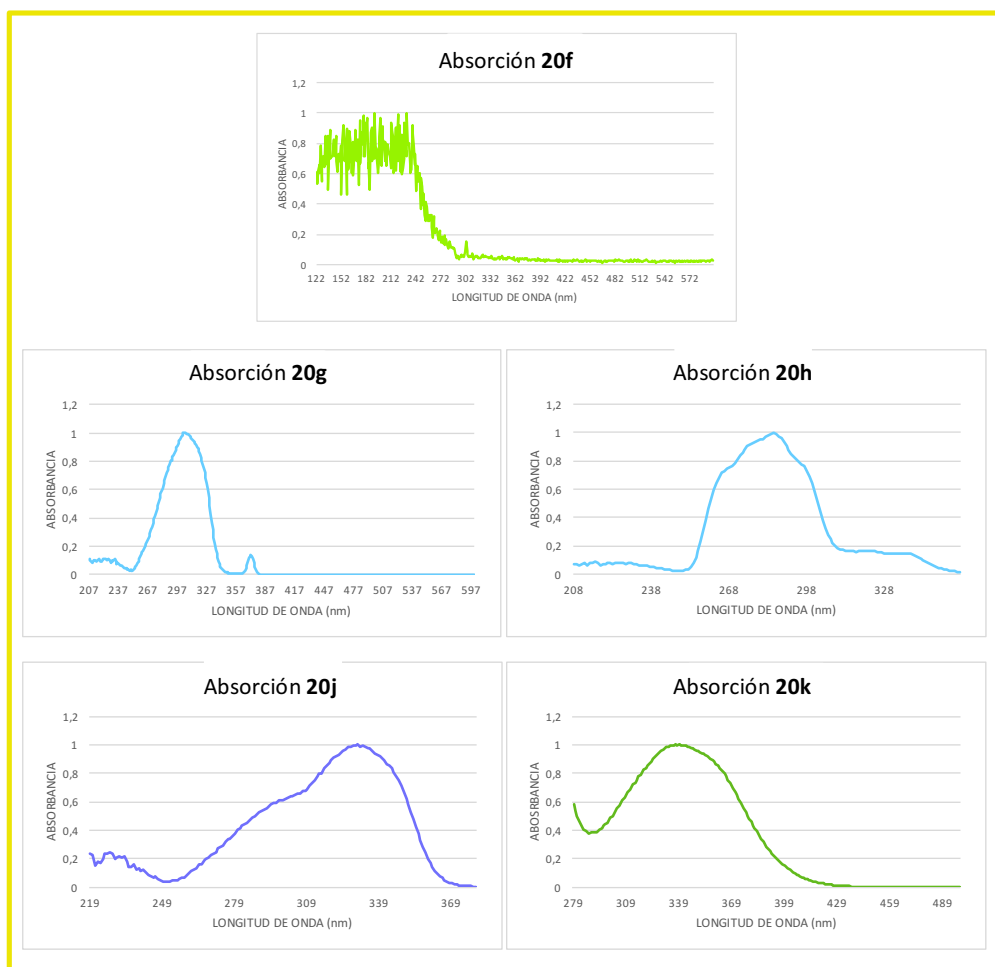


Figura 6.4 Espectros de absorción UV-Vis en disolución de DMSO de los compuestos **20f**, **20g**, **20h**, **20j**, y **20k**, en los que se puede observar sus $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción

Las bandas que pueden observarse en cada uno de los espectros se corresponden con las transiciones electrónicas debidas a la conjugación de los grupos aromáticos de los tioles que hemos adicionado y diferencian unos aminoácidos de otros. El compuesto **20f**, fenilcisteína, posee un espectro de absorción muy distinto a los otros cinco compuestos. Es el compuesto con menor absorción de todos y el que menos conjugación aromática posee.

Para el resto de aminoácidos no naturales, las longitudes de onda correspondientes con su absorción van a variar desde las más energéticas de $\lambda_{\text{máx}} = 285 \text{ nm}$ para el derivado **20h** hasta las menos energéticas de $\lambda_{\text{máx}} = 350 \text{ nm}$ para el derivado de dansilo **20k**, dependiendo de la naturaleza del grupo aromático unido al azufre (**Figura 6.5**).

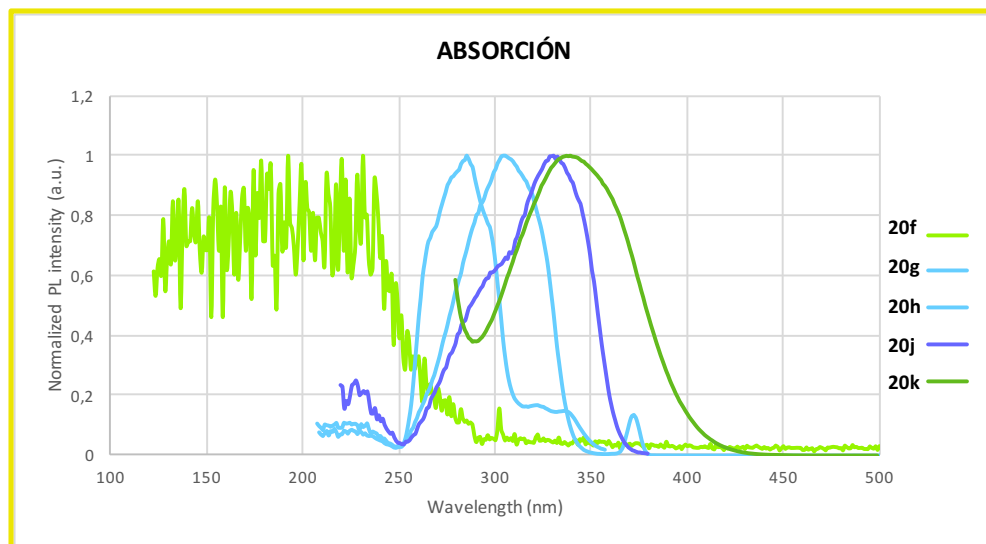


Figura 6.5 Espectros de absorción UV-Vis en disolución de DMSO de los compuestos **20f**, **20g**, **20h**, **20j** y **20k** superpuestos. Se puede observar la variedad de sus $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción.

Una vez estudiados sus espectros de absorción UV-Vis, el siguiente paso fue estudiar su luminiscencia, con el fin de comprobar la longitud de onda a la que emiten (**Tabla 6.2**). Como se puede ver en la **Figura 6.6**, todos ellos muestran perfiles de emisión distintos, en función de la conjugación y aromaticidad del grupo utilizado como tiol en la reacción de adición sulfa-Michael.

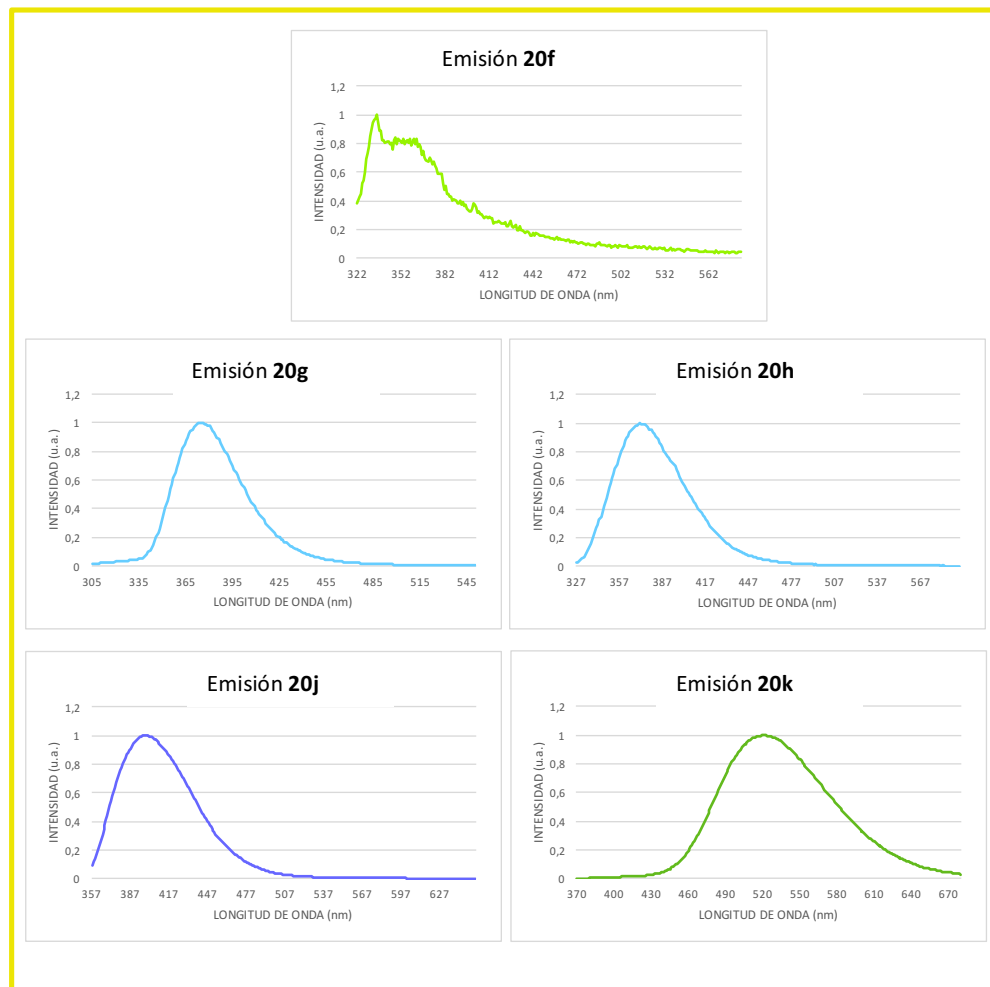


Figura 6.6 Espectros de emisión en disolución de DMSO de los compuestos **20f**, **20g**, **20h**, **20j** y **20k**, en los que se puede observar sus $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión.

Se pudo comprobar que los cinco aminoácidos son luminiscentes en disolución de DMSO a una concentración del orden de $1 \cdot 10^{-5}$ M y a temperatura ambiente. A excepción de los compuestos **20f** y **20h**, los aminoácidos no naturales sintetizados poseen una banda clara de emisión cuya $\lambda_{\text{máx}}$ está comprendida en el rango del visible. Las bandas de los compuestos **20f** y **20h** son menos claras dando también valores dentro del visible. Además, conforme aumenta la conjugación del anillo aromático, disminuye la energía de la emisión, es decir, las bandas se desplazan del azul hacia el verde, como puede observarse en la **Figura 6.7**.

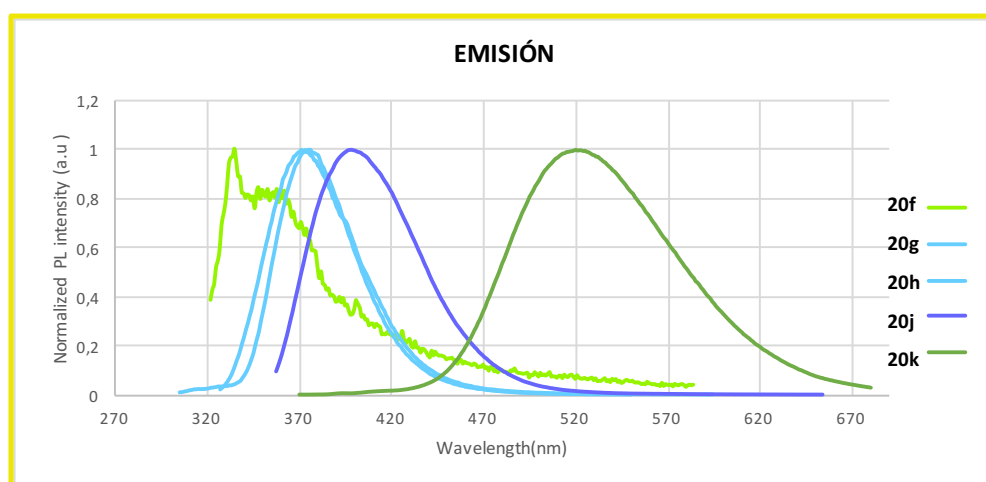


Figura 6.7. Espectros de emisión en disolución de DMSO de los compuestos **20f**, **20g**, **20h**, **20j** y **20k** superpuestos. Se puede observar que las longitudes de onda máximas se mueven desde el azul hasta el verde.

Para ser incorporados en péptidos de manera eficiente, los aminoácidos fluorescentes deben absorber preferentemente a longitudes de onda superiores a 320 nm,¹² donde la interferencia con la fluorescencia debida a las unidades intrínsecas de triptófano es insignificante. Los únicos dos derivados que cumplen esto son los derivados de cumarina y dansilo, **20j** y **20k** respectivamente. Por ello, podrían ser buenos candidatos para usarlos como marcadores en la síntesis de péptidos biológicamente activos. Con ellos, se decidió realizar la síntesis de péptidos fluorescentes debido a que tanto sus bandas de absorción UV-Vis como de emisión son las que se encuentran más desplazadas hacia mayores longitudes de onda (**Figura 6.8**).

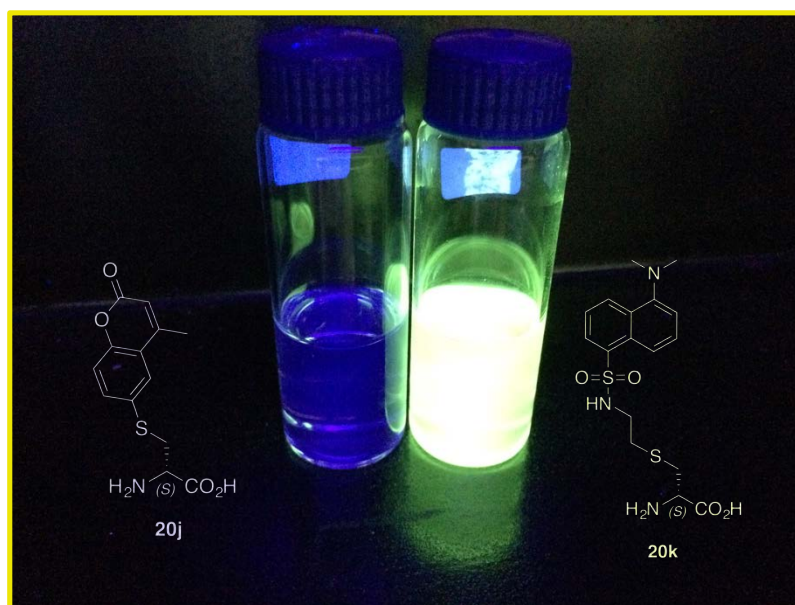


Figura 6.8 Fluorescencia observada bajo una luz ultravioleta de los dos aminoácidos elegidos, **20j** y **20k**, para la síntesis de péptidos.

¹² Katritzky, A. R.; Narindoshvili, T. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 627.

6.3 Síntesis de péptidos fluorescentes (CPPs) y ensayos biológicos

Los péptidos biológicamente activos que contienen marcadores fluorescentes son una herramienta muy útil para el estudio de la estructura biológica y la función,¹³ así como para poder visualizar procesos intracelulares o interacciones moleculares.¹⁴ La forma habitual de obtener péptidos fluorescentes implica la bioconjugación de un colorante fluorescente al péptido correspondiente, una vez que este péptido se ha sintetizado.^{12,15} Debido a esto, los colorantes fluorescentes comerciales a menudo contienen grupos salientes para reaccionar con grupos nucleófilos de amino o tiol de los péptidos, provenientes de residuos de His o Lys. Esta estrategia es difícil de aplicar a los péptidos que llevan más de un grupo amino o tiol, ya que pueden generarse varias especies o mezclas marcadas.

Otra estrategia menos utilizada para obtener péptidos marcados fluorescentes consiste en la incorporación a la secuencia peptídica de los aminoácidos comerciales, cuyo resto amino terminal porta un colorante fluorescente.

¹³ (a) Bradshaw, C. G.; Czeszkowski, G. K.; Turcatti, I. J. Beresford, A.; Chollet, J. J. *Med. Chem.* **1994**, *37*, 199. (b) Soleilhac, J. M.; Cornille, F.; Martin, L.; Lenoir, C.; Fournié-Zaluski, M. C.; Roques, B. P. *Anal. Biochem.* **1996**, *241*, 120.

¹⁴ (a) Turcatti, G.; Vogel, H.; Chollet, A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 3972. (b) Tota, M. R.; Strader, C. D. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16891. (c) Cowley, D. J.; Schulze, A. J. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 444.

¹⁵ (a) Lundblad, R. L.; MacDonald, F. M. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology 4th Edition*, CRC press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, **2010**. (b) Mihara, H.; Lee, S.; Shimohigashi, Y.; Aoyagi, H.; Kato, T.; Izumiya, N.; Costa, T. *FEBS Lett.* **1985**, *193*, 35. (c) Wang, W.; Liang, T. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 835.

Sin embargo, esta metodología presenta la desventaja de que el aminoácido fluorescente sólo puede incorporarse a la parte *N*-terminal de la secuencia.

Por lo tanto, el uso de aminoácidos fluorescentes no naturales adecuadamente protegidos (Fmoc) que incorporan un fluoróforo en la cadena lateral, como es el caso de **20j** y **20k**, permite la incorporación directa y específica del marcador fluorescente en un sitio determinado de la secuencia peptídica, como parte integrada de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, del inglés *Solid Phase Peptide Synthesis*).

En el mercado podemos encontrar numerosos péptidos con un fin terapéutico. Sin embargo, muchos están limitados a una actividad extracelular, limitando también sus capacidades terapéuticas. En cambio, los péptidos penetrantes de células (CPPs, del inglés *Cell Penetrating Peptides*) son una clase de péptidos, normalmente formados por unos 5-30 aminoácidos que, a diferencia de los péptidos más comunes, sí son capaces de penetrar la membrana celular. Desde el descubrimiento de los primeros CPPs hace más de 25 años, éstos se han usado para numerosas aplicaciones.¹⁶

En esta Memoria, se presenta la síntesis de nuevos CPPs fluorescentes para su posible utilización como marcaje celular. Para la síntesis de los nuevos CPPs, el primer paso fue la elección de los aminoácidos no naturales fluorescentes que iban a utilizarse como marcadores.

¹⁶ (a) Heitz, F. *Brit. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195.

Tras medir las propiedades ópticas de todos los derivados fluorescentes sintetizados, y por lo anteriormente comentado, se decidió utilizar tanto el derivado de cumarina **20j** como el de dansilo **20k**.

Pero para poder realizar la síntesis de diferentes péptidos fue necesario primero su protección ortogonal, de forma que pudiéramos utilizar la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).

De esta manera, el siguiente paso fue proteger el grupo amino de los aminoácidos no naturales fluorescentes elegidos, el derivado de cumarina **20j** y el de dansilo **20k**, con el grupo Fmoc, para proceder posteriormente a la síntesis de los péptidos deseados mediante la metodología de SPPS.

6.3.1 Síntesis y pruebas biológicas de un péptido derivado de cumarina

En la bibliografía podemos encontrar varios ejemplos en los que se han llevado a cabo estudios para comprobar las propiedades fluorescentes y la permeabilidad de péptidos fluorescentes en diferentes líneas celulares.

Por ejemplo, se ha evaluado la utilización de un péptido que posee un aminoácido derivado de cumarina en ensayos biológicos.¹⁷ Para ello, se incubó un péptido de 17 aminoácidos con células HeLa y se pudo observar su internalización utilizando la técnica de microscopía confocal (**Figura 6.9**).

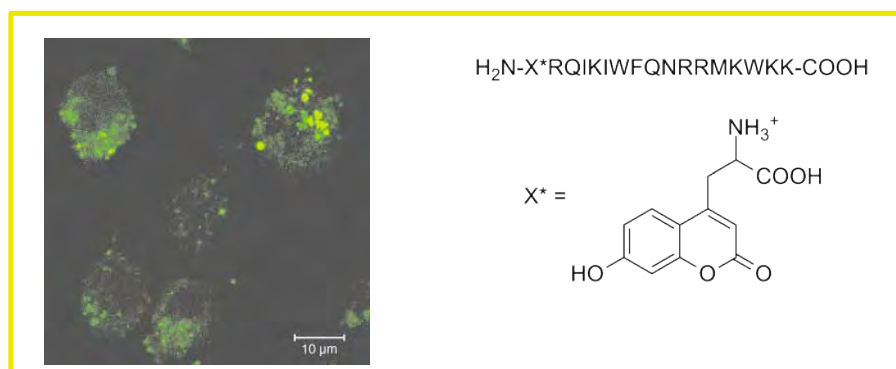


Figura 6.9 A la izquierda, células HeLa donde puede observarse fluorescencia debido a un CPP. A la derecha, CPP utilizado que incorpora un derivado de cumarina.

¹⁷ Brun, M.; Bischoff, L.; Garbay, C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3432.

Además, también se ha observado la internalización de un péptido de menor tamaño, seis aminoácidos en este caso, portador de un aminoácido no natural fluorescente en células epiteliales humanas (HeLa) y en fibroblastos de ratón (NIH 3T3) utilizando la técnica de microscopía confocal (**Figura 6.10**).¹⁸

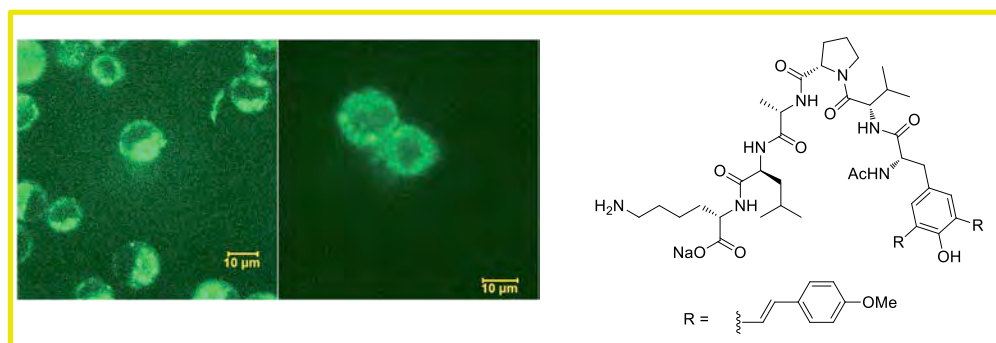
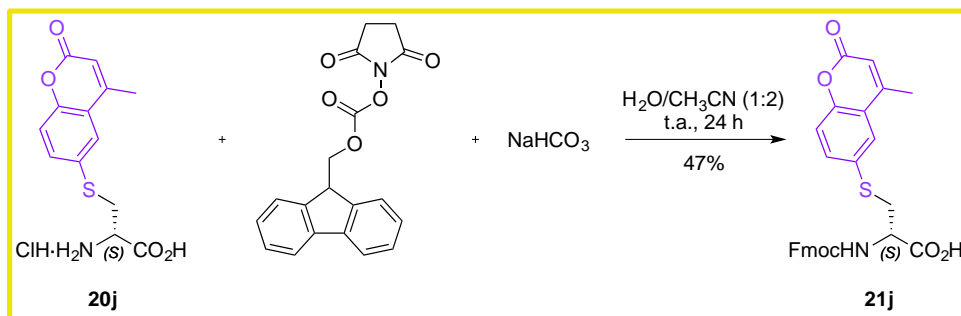


Figura 6.10. A la izquierda, células donde puede observarse fluorescencia debido a un CPP. A la derecha, CPP utilizado.

Con todo ello, nos decidimos por incorporar el derivado de la Cys fluorescente (Cys*, C*) a la secuencia peptídica de menor tamaño que existe, y que se corresponde con los aminoácidos Val-Pro-Ala-Leu-Lys. Es decir, se trata de sintetizar el péptido cuya estructura sea C*VPALK.

Como ya se ha comentado con anterioridad, el primer paso fue la protección ortogonal del aminoácido fluorescente para su posterior incorporación en el péptido. En nuestro caso, debíamos proteger el grupo amino en forma de carbamato de Fmoc (**Esquema 6.11**).

¹⁸ Cheruku, P.; Huang, J.; Yen, H.; Iyer, R. S.; Rector, K. D.; Martinez, J. S.; Wang, H. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1150.



Esquema 6.11

Para ello, se disolvió el compuesto **20j**, la Fmoc-OSu y el NaHCO₃ en una mezcla de H₂O/acetonitrilo (1:2) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. En el matraz de reacción se observa una formación de un gel debido a la diferente solubilidad de las cadenas laterales de nuestro derivado de cisteína con cumarina, lo cual dificultó su purificación. Para parar la reacción, se evaporó el acetonitrilo con ayuda de un rotavapor y se realizaron extracciones con Et₂O para eliminar el exceso de Fmoc-OSuc. Posteriormente, se acidificó la fase acuosa y se realizaron de nuevo extracciones con un disolvente orgánico (DCM o AcOEt) para recoger el aminoácido protegido deseado. Debido a su escasa solubilidad, tras utilizar la técnica de cromatografía en gel de sílice se obtuvo el derivado **21j** con un rendimiento del 47%.

Una vez purificado el aminoácido fluorescente deseado, es decir, el derivado de cisteín-cumarina **21j** protegido con Fmoc, el siguiente paso fue la construcción del esqueleto peptídico mediante la metodología de síntesis en fase sólida (SPPS).

Para la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es necesario un soporte sólido, una resina polimérica, que variará en función de las condiciones de reacción y de la protección del aminoácido que uniremos a él después de liberarlo de la misma. Además de la resina, son necesarios los reactivos para las diferentes reacciones que componen toda la síntesis (formación de enlaces peptídicos, desprotecciones, liberación de la resina) así como un disolvente que disuelva todos los reactivos anteriores (como la DMF o el DCM). La resina es la encargada de proteger el extremo C-terminal del aminoácido unido a ella permitiendo que crezca la cadena peptídica por el extremo amino.

La razón por la cual el extremo amino del aminoácido debe estar protegido, en nuestro caso como carbamato de Fmoc, es que de esta manera se obtienen mejores resultados aumentando el rendimiento global de la síntesis y evitando las reacciones paralelas del grupo amino de los aminoácidos. Este grupo Fmoc se debe eliminar tras cada acoplamiento, pero los grupos protectores y la resina deben permanecer para seguir evitando reacciones laterales. Además, los grupos carboxilo tienen que activarse para aumentar su electrofilia en la reacción de formación del enlace peptídico. Tras unir el primer aminoácido a la resina, el grupo protector del grupo amino terminal se elimina, se activa el siguiente aminoácido y se produce el siguiente acoplamiento. Estos pasos alternativos de desprotección, activación y acoplamiento se repiten hasta que se obtiene la cadena peptídica deseada, momento en el cual se desprotegen los grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos y se libera el péptido de la resina mediante un único paso llamado *cleavage*. En función de los grupos que haya en la cadena peptídica usaremos unos reactivos u otros.

El crudo puede separarse fácilmente de la resina y purificarse, en el caso de péptidos y como norma general, por métodos analíticos como HPLC identificando el pico deseado mediante espectrometría de masas (MS) con técnicas de ionización como el MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz utilizando un detector de tiempo de vuelo).

Una de las principales ventajas de la metodología de SPPS es la posibilidad de llevar a cabo reacciones de modo que el exceso de reactivos, los subproductos, etc; puedan ser retirados del matraz de reacción mediante etapas de lavado, sin necesidad de purificar los pasos intermedios. Además, añadiendo un exceso del aminoácido que se quiere acoplar, se aumenta considerablemente el rendimiento y se disminuye el tiempo de reacción si lo comparamos con la síntesis de péptidos en disolución.

En nuestro laboratorio disponemos de un equipo *Liberty Blue* (**Figura 6.11**), el cual nos permite realizar las síntesis de manera automática y asistida por microondas, acortando aún más los tiempos de reacción.



Figura 6.11 Equipo de SPPS Liberty Blue presente en nuestro laboratorio.

Como se ha comentado anteriormente, el péptido con el aminoácido derivado de cumarina a sintetizar tiene la secuencia Ac-C*VPALK-OH (Figura 6.12).

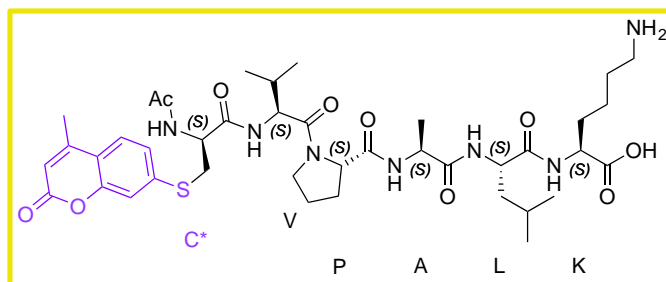


Figura 6.12. Estructura del péptido 22 Ac-C*VPALK-OH.

Para obtener péptidos, en cuyo extremo unido a la resina obtengamos al final un grupo ácido libre, debemos utilizar una resina que nos lo permita. En nuestro caso utilizamos la resina cloruro de 2-clorotritilo (**Figura 6.13**), la cual no puede utilizarse bajo la acción de los microondas, por lo que el péptido lo realizamos fuera del sintetizador automático, pero siguiendo la misma metodología de síntesis en fase sólida Fmoc.

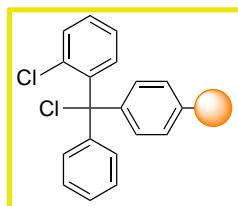
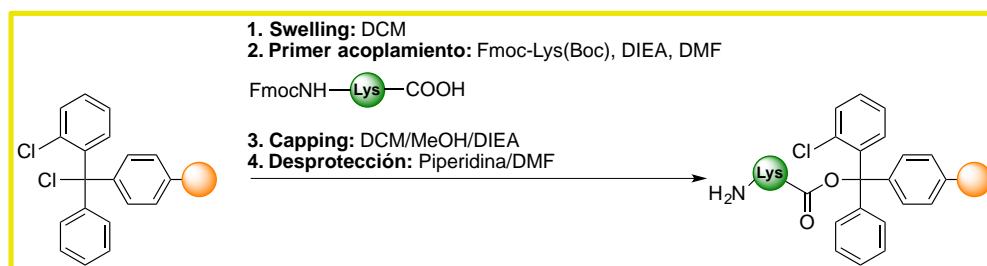


Figura 6.13 Estructura de la resina cloruro de 2-clorotritilo.

Existen otras resinas que se podrían haber utilizado, como las resinas Wang, resina HMPB. Sin embargo, la resina utilizada presenta la ventaja de evitar la contaminación de productos secundarios, como los diastereoisómeros ocasionados durante la unión del primer aminoácido.

Al comenzar la síntesis no fue necesaria una etapa de desprotección, como es el caso de otras resinas. Tras dejar la resina con disolvente (DMF o DCM en este caso) durante 15-30 min para hacer el hinchado (*swelling*) del polímero que forma la resina podemos proceder a realizar el primer acoplamiento (**Esquema 6.12**). Las esferas de la resina pueden aumentar su tamaño hasta seis veces el original en disolventes orgánicos.

Con ello, conseguimos aumentar la superficie de polímero, permitiendo que puedan unirse a él un mayor número de moléculas.



Esquema 6.12

El siguiente paso fue el acoplamiento del primer aminoácido (**Esquema 6.12**) a la resina, en este caso, el aminoácido lisina (K, Lys). Para ello se lavó la resina con el disolvente utilizado en la reacción, DCM. Se pesó la Lys protegida como carbamato de Fmoc, y su cadena lateral protegida como carbamato de Boc. Tras disolver dicho aminoácido en 2-3 mL de DCM se añadió sobre él la base (DIEA). Con esta resina tampoco es necesario añadir un agente de acoplamiento por lo que no se utilizó en este paso. Se añadió la mezcla sobre el recipiente reactor (*vessel*) que contenía la resina y se dejó reaccionando durante una noche.

Cuando un acoplamiento finaliza, se vacía el *vessel* y se lava la resina con el mismo disolvente de la reacción, en nuestro caso se usó DCM. De esta manera, obtuvimos Lys unida a la resina. Sin embargo, con el fin de evitar que el siguiente aminoácido se una también a la resina en lugar de a la Lys, es necesario añadir una mezcla de compuestos que bloquean las posiciones reactivas de la resina. A dicha mezcla se le denomina *cocktail capping*.

En nuestro caso, añadimos como *cocktail capping* 5 mL de una mezcla compuesta por DCM/MeOH/DIEA en proporciones 80:15:5 durante 10 minutos, dos veces (*double capping*).

Después de asegurarnos de que no se podían formar cadenas peptídicas diferentes a la deseada, el siguiente paso fue la desprotección del grupo Fmoc de la Lys (**Esquema 6.12**), utilizando para ello 5 mL de una disolución de piperidina en DMF al 20%. De nuevo se añadió al *vessel*, se dejó durante 5 min, se vació el *vessel*, se lavó la resina con DMF y se repitió el proceso dos veces. Para realizar el acoplamiento del segundo aminoácido (en nuestro caso leucina, Leu, L) se pesó, se disolvió en DMF, se le añadió la base (*N,N*-diisopropiletilamina, DIEA) y, ahora sí, agente de acoplamiento (3-óxido de hexafluorofosfato de 1-bis[dimetilamino]metileno]-1-*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridina, HATU). Dicha mezcla se añadió sobre la resina y se dejó reaccionar durante 30 min. Posteriormente, se realizó la desprotección del grupo amino de la Leu con la disolución de piperidina en DMF al 20%.

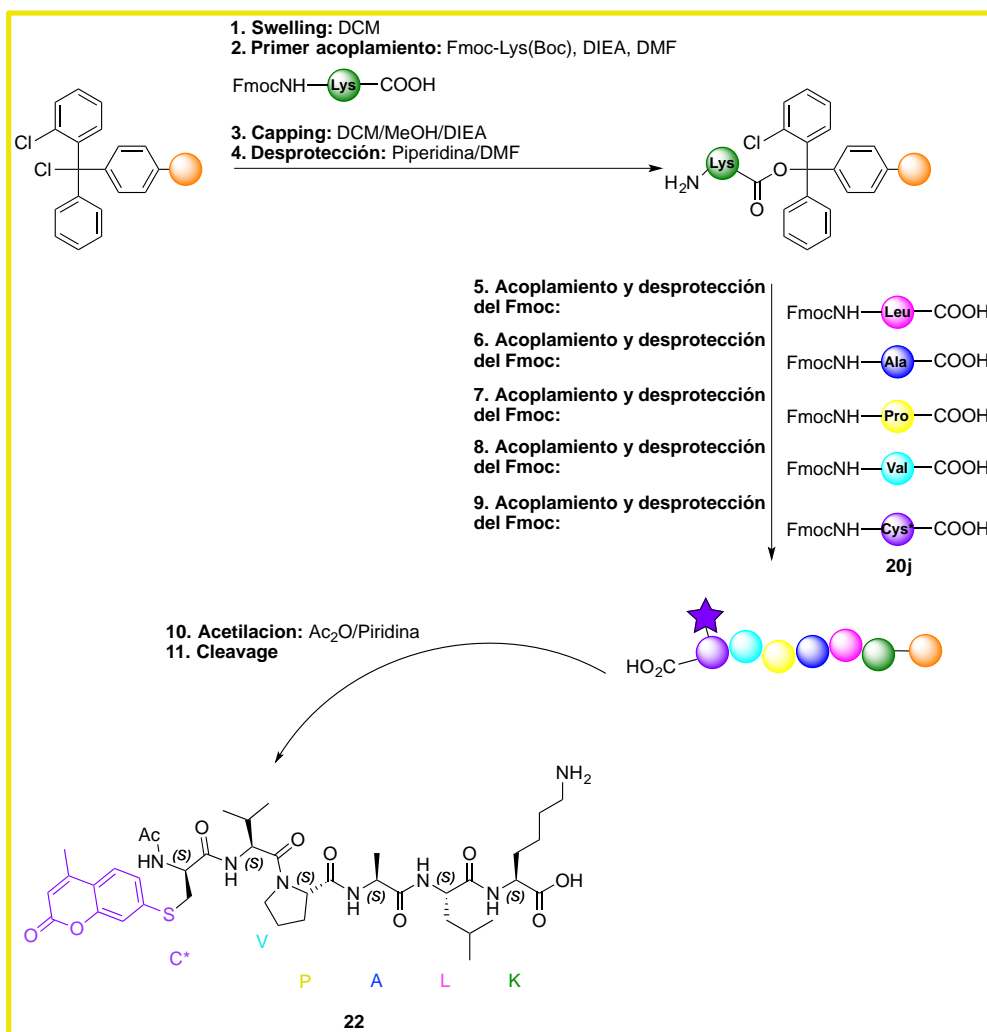
Este proceso de acoplamiento/desprotección se repitió tantas veces como aminoácidos había para formar la secuencia deseada (**Esquema 6.13**). Para el caso del aminoácido valina (Val, V) se realizó un *double coupling*, es decir, antes de desproteger se volvió a realizar otro acoplamiento. También, podría haberse dejado la reacción el doble de tiempo, pero se optó por añadir reactivos nuevos. Esto es necesario siempre que acoplemos un aminoácido a una prolina (P), debido a que la nucleofilia de ésta es menor por ser una amina secundaria.

El último aminoácido a acoplar era el aminoácido no natural con cumarina derivado de cisteína **21j** (**Esquema 6.13**). Para ello, se utilizaron 2.5 equivalentes de aminoácido con respecto a la resina, en lugar de los 5 equivalentes que se utilizaron para el resto de aminoácidos comerciales, por razones obvias. La reacción no se paró hasta pasada una hora, tiempo que se dedujo mediante la realización del conocido test de Kaiser.¹⁹

Seguidamente, tras desproteger el Fmoc del aminoácido no natural **21j** se realizó una acetilación utilizando una mezcla de anhídrido acético/piridina en proporciones 1:2 durante 1 h, con el fin de acetilar el extremo amino del péptido y poder simular así un nuevo enlace peptídico.

El último paso fue la liberación del péptido de la resina o *cleavage* añadiendo una mezcla de TFA/H₂O/TIS (ácido trifluoroacético (TFA) y triisopropilsilano (TIS)) en proporciones 9:0.5:0.5 durante dos horas. Se recogió la disolución resultante y se evaporó el disolvente para obtener así el péptido Ac-C*VPALK-OH, el cual pudo purificarse mediante HPLC.

¹⁹ Kaiser, E.; Colecott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.



Esquema 6.13

Una vez sintetizado y purificado el péptido **22**, derivado del aminoácido no natural cisteíncumarínico, se llevó a cabo un estudio experimental de sus propiedades ópticas.

Para ello, en primer lugar, se realizó su espectro de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración del orden de $1 \cdot 10^{-5}$ M (**Figura 6.14**).

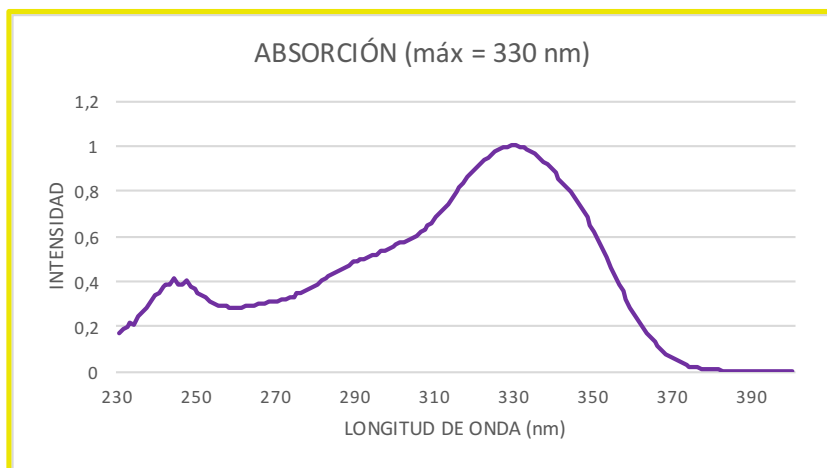


Figura 6.14 Espectro de absorción UV-Vis del péptido **22** donde puede verse un máximo a 330 nm.

Una vez registrado el espectro de absorción UV-Vis, el siguiente paso fue estudiar su luminiscencia, con el fin de comprobar la longitud de onda a la que emite el péptido fluorescente (**Figura 6.15**).

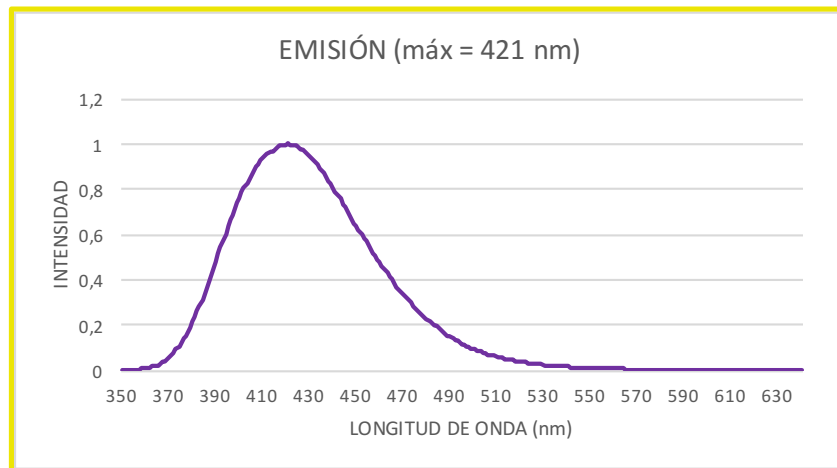


Figura 6.15 Espectro de emisión del péptido **22** donde puede verse un máximo a 421 nm.

El máximo valor de longitud de onda que puede observarse en el espectro de emisión es de 421 nm.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Tras la síntesis del péptido **22** y la comprobación de sus propiedades fluorescentes, el siguiente paso fue testear su actividad como CPP. Para ello, se realizaron ensayos biológicos en colaboración con un grupo de investigación del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) en los que se quiso observar la capacidad de este péptido de penetrar la membrana celular de células epiteliales cervicales humanas HeLa (**Figura 6.16**). Estas células crecen y se multiplican de manera muy rápida por lo que son células muy utilizadas en estudios de este tipo.

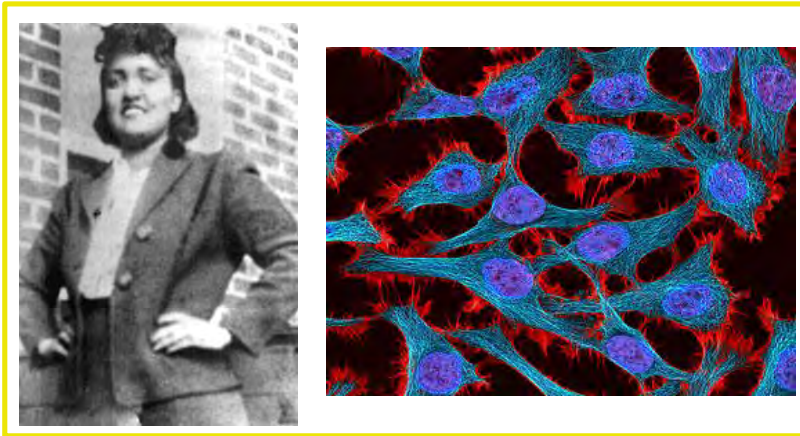


Figura 6.16 A la izquierda, Henrietta Lacks, mujer afroamericana que da nombre a las células HeLa, de la cual proceden dichas células tumorales que han servido para crear una línea de cultivo celular inmortal. A la derecha, imagen de estas células HeLa.

Para el estudio de la penetración del péptido en la membrana celular, primero se prepararon las células HeLa. Para que las células puedan ser almacenadas durante largos periodos de tiempo, éstas se mantienen congeladas en nitrógeno líquido. El proceso de congelación debe realizarse lentamente para evitar la muerte celular debida a la posible formación de cristales.

Las células se “tripsinizaron”, es decir, se añadió una disolución de tripsina para que las células adheridas se soltaran del sustrato, y se centrifugaron (1000 rpm, 5 min) a temperatura ambiente. Posteriormente, éstas se resuspendieron en medio de cultivo con un 10% de suero bovino fetal (SBF) y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, hasta una concentración final del mismo del 10 %. Las células se congelaron en criotubos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en recipientes de isopropanol durante una semana. Finalmente se conservaron en nitrógeno líquido hasta la realización de los ensayos.

Por el contrario, cuando se quieren descongelar y recuperar las células del nitrógeno líquido, se debe hacer todo más rápidamente. Los criotubos se sacaron del nitrógeno líquido y se mantuvieron en hielo seco hasta su descongelación, momento en el cual se colocaron de manera inmediata en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células se lavaron con medio de cultivo que contenía un 10% de SBF para eliminar el DMSO. Finalmente, se resuspendieron en medio de cultivo nuevo, se transfirieron a una placa de cultivo celular y se colocaron en una incubadora.

Las células Hela se cultivaron en medio de *Eagle* modificado de *Dulbecco* suplementado con suero de ternera fetal al 10% en volumen, 1-glutamina y penicilina – estreptomicina (100 unidades/mL y 100 mg/mL, respectivamente). Se mantuvieron en una incubadora a 37 °C bajo atmósfera de CO₂ al 5%.

En el momento de la realización de los ensayos, las células se sembraron en placas de 24 pocillos en las que se añadió después el péptido. Éste se disolvió en DMSO a una concentración de 10 mM, se tomaron 2 µL de la disolución que lo contenía y se añadieron sobre un cultivo de 500 µL de células.

Seguidamente, la placa se introdujo en la incubadora durante 2 h. Antes de la visualización mediante el microscopio de fluorescencia, se eliminó el medio de visualización y las células se enjuagaron. La fluorescencia se midió con un microscopio de fluorescencia *Leica* (DM6000 B), equipado con una cámara *Hamamatsu Orco-ER C10600* y un filtro *Leica A4* (Figura 6.17).



Figura 6.17 Ejemplo de microscopio de fluorescencia *Leica* DM6000 B.

Se tomó una gota de la disolución celular que contenía el péptido y se tomaron imágenes con el microscopio, utilizando el filtro más adecuado para las longitudes de onda de emisión y excitación medidas previamente. Sin embargo, este filtro permite el paso de la banda de excitación entre 340 y 380 nm, y la banda de emisión entre 450 y 490 nm.

Los valores de las longitudes de onda medidas para el péptido con cumarina son de 330 nm para la excitación y 421 nm para la emisión. Son valores cercanos a estos rangos, pero no comprendidos entre los valores adecuados para el filtro. Esta es la razón principal por la que hubo problemas para observar la fluorescencia. Apenas se pudo observar diferencia entre las células control y las incubadas con el péptido (**Figura 6.18**).

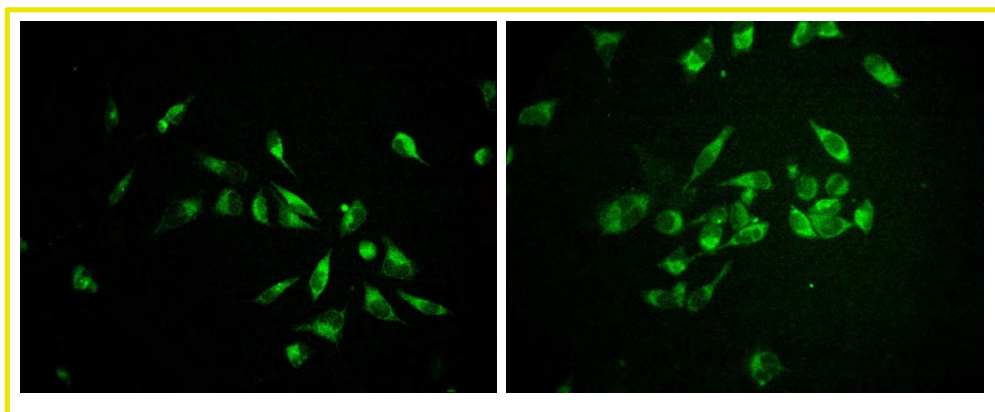


Figura 6.18 A la izquierda células control, a la derecha células incubadas con el péptido derivado de cumarina. Ambas se ven iguales.

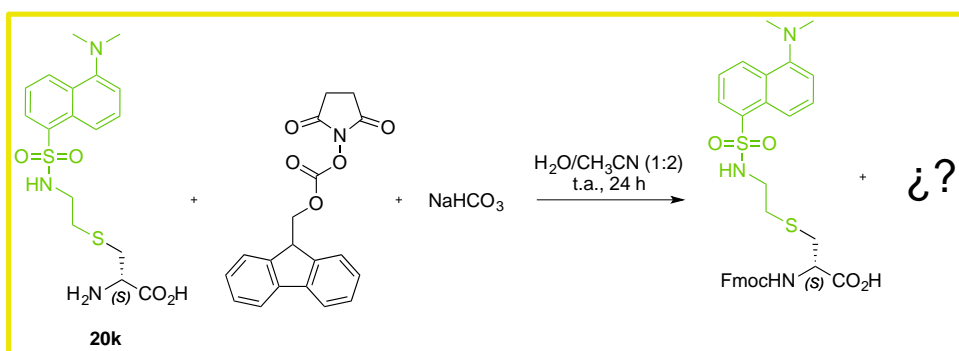
Además, la autofluorescencia de las células, debida a la presencia de aminoácidos aromáticos como Phe o Tyr que presentan fluorescencia, hace que estas diferencias sean menores, observándose en el control fluorescencia celular, pero no debida a la internalización del péptido.

El hecho de que no se observara diferencia también podría deberse a que el CPP sintetizado no fuera adecuado y no fuera internalizado por la membrana de las células. Para comprobarlo se debería utilizar un filtro en cuyo rango se encuentren los valores de las longitudes de onda de fluorescencia estudiadas para el péptido.

Antes de proceder a la compra de un filtro adecuado para este fluoróforo de cumarina, se decidió sintetizar su análogo con el aminoácido no natural fluorescente derivado de dansilo, cuyas longitudes de onda son diferentes.

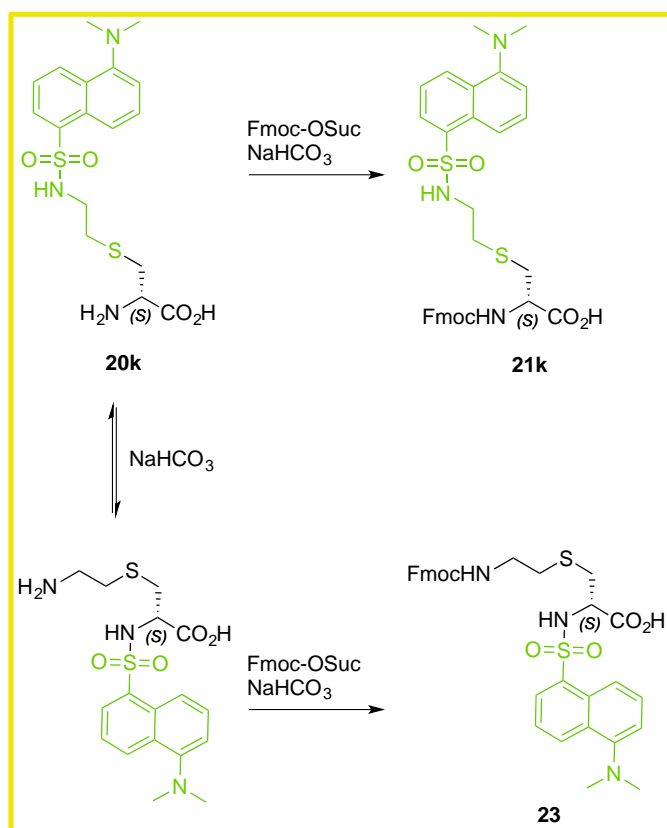
6.3.2 Síntesis y pruebas biológicas de CPPs derivados de dansilo

Para la síntesis del péptido fluorescente derivado de dansilo se siguió el mismo procedimiento que para el derivado anterior de cumarina. El primer paso fue la protección del grupo amina en forma de carbamato de Fmoc (**Esquema 6.14**). Para ello, se disolvió el compuesto **20k**, Fmoc-OSuc y NaHCO₃ en una mezcla de H₂O/CH₃CN (1:2) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. En el matraz de reacción se observó la formación de un gel debido a la diferente solubilidad de las cadenas laterales de nuestro derivado de cisteína con dansilo, lo cual dificultó su purificación. Para parar la reacción se evaporó el acetonitrilo, con ayuda de un rotavapor, y se realizaron extracciones con Et₂O para eliminar el exceso de Fmoc-OSuc. Posteriormente, se acidificó la fase acuosa y se realizaron de nuevo extracciones con un disolvente orgánico (DCM o AcOEt) para recoger el aminoácido protegido deseado. Debido a su escasa solubilidad, tras utilizar la técnica de cromatografía en gel de sílice se obtuvo lo que parecía ser el derivado de cisteína fluorescente protegido en forma de carbamato de Fmoc.



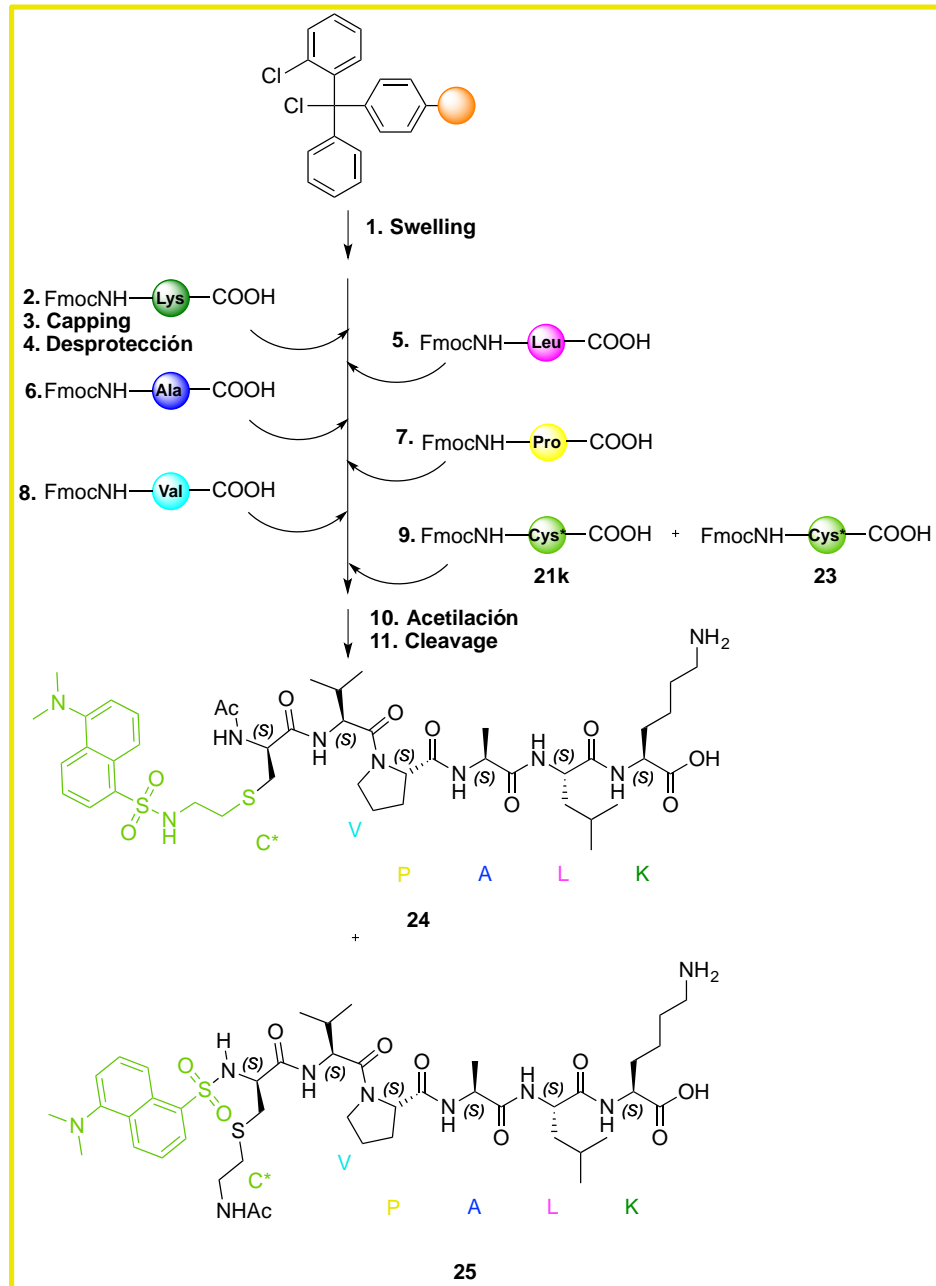
Esquema 6.14

Sin embargo, nos dimos cuenta de que el crudo obtenido eran realmente dos compuestos formados en la reacción, debido a la presencia de una base (**Esquema 6.15**). Por un lado, aparecía el compuesto deseado **21k**, y por otro uno equivalente **23** donde han cambiado de posición el grupo dansilo y el Fmoc, respectivamente.



Esquema 6.15

Sin embargo, decidimos continuar la síntesis con la mezcla de ambos compuestos, realizando así dos péptidos, con la misma secuencia que el derivado de cumarina **22**, Ac-C*VPALK-OH, y con el extremo ácido libre, utilizando la misma metodología de síntesis en fase sólida (**Esquema 6.16**).



Esquema 6.16

Ambos péptidos son fluorescentes y pudieron separarse y purificarse mediante HPLC, para poder después estudiar sus propiedades ópticas (**Figura 6.19**).

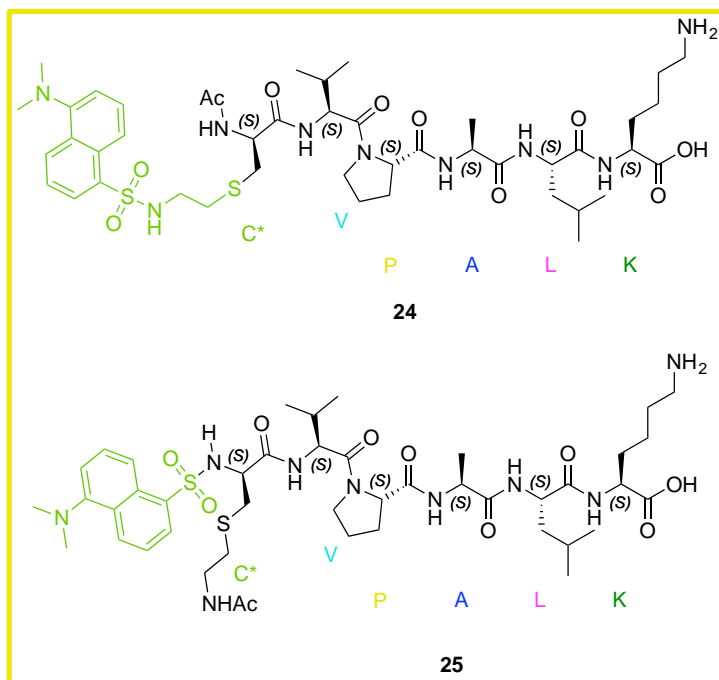


Figura 6.19 Péptidos obtenidos derivados de dansilo.

Primero se midieron las propiedades del péptido **24** correspondiente con la secuencia Ac-C*VPALK-OH y un mayor tiempo de retención. Y acto seguido se midieron las de su análogo **25**, correspondiente con un menor tiempo de retención en HPLC.

Para ello, en primer lugar, se analizaron sus espectros de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración del orden de $1 \cdot 10^{-5}$ M (**Figura 6.20**).

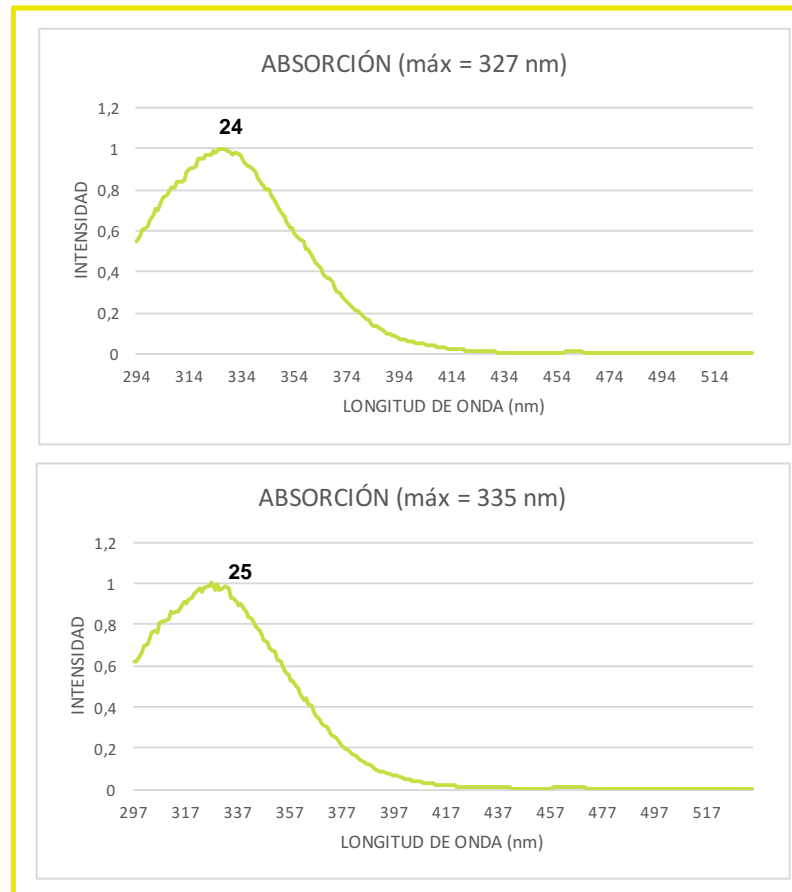


Figura 6.20 Espectros de absorción UV-Vis de los péptidos **24** y **25** donde puede verse los máximos en torno a 330 nm.

Una vez estudiados los espectros de absorción UV-Vis, el siguiente paso fue estudiar su luminiscencia, con el fin de comprobar la longitud de onda a la que emiten los péptidos fluorescentes (**Figura 6.21**).

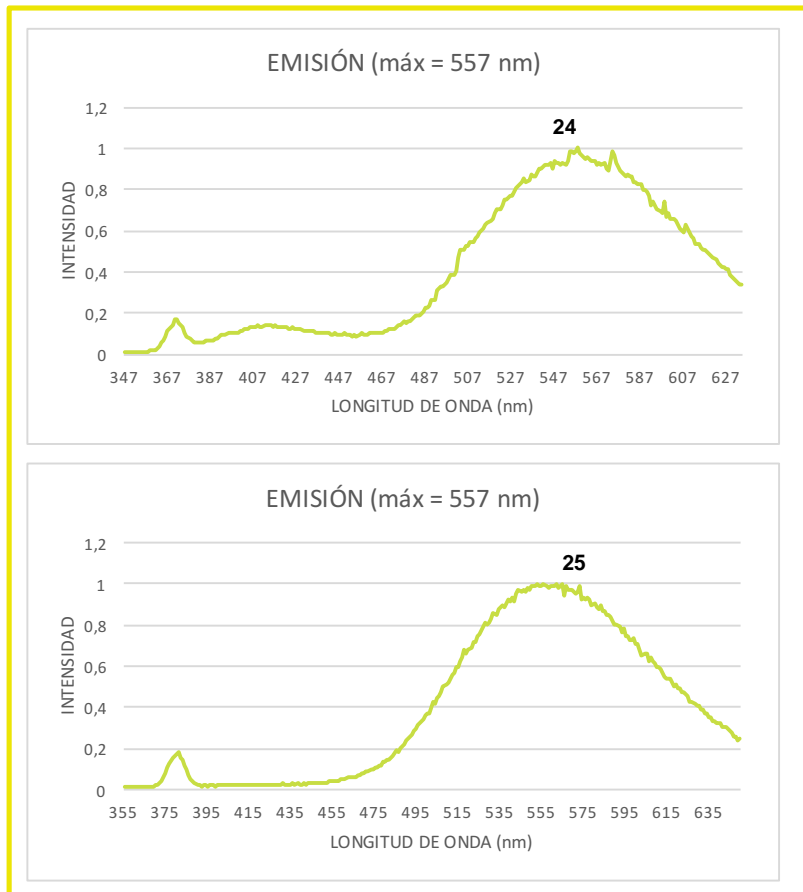


Figura 6.21 Espectro de emisión de los péptidos **24** y **25**, donde pueden verse los máximos a 557 nm.

El valor máximo de longitud de onda que puede observarse en el espectro de emisión es de 557 nm.

Se pudo observar que los valores de las longitudes de onda de ambos derivados fluorescentes son similares, siendo éstos más adecuados para el uso del filtro del que se dispone para el microscopio, que los valores de la longitud de onda de su análogo derivado de cumarincisteína (**Figura 6.22**).

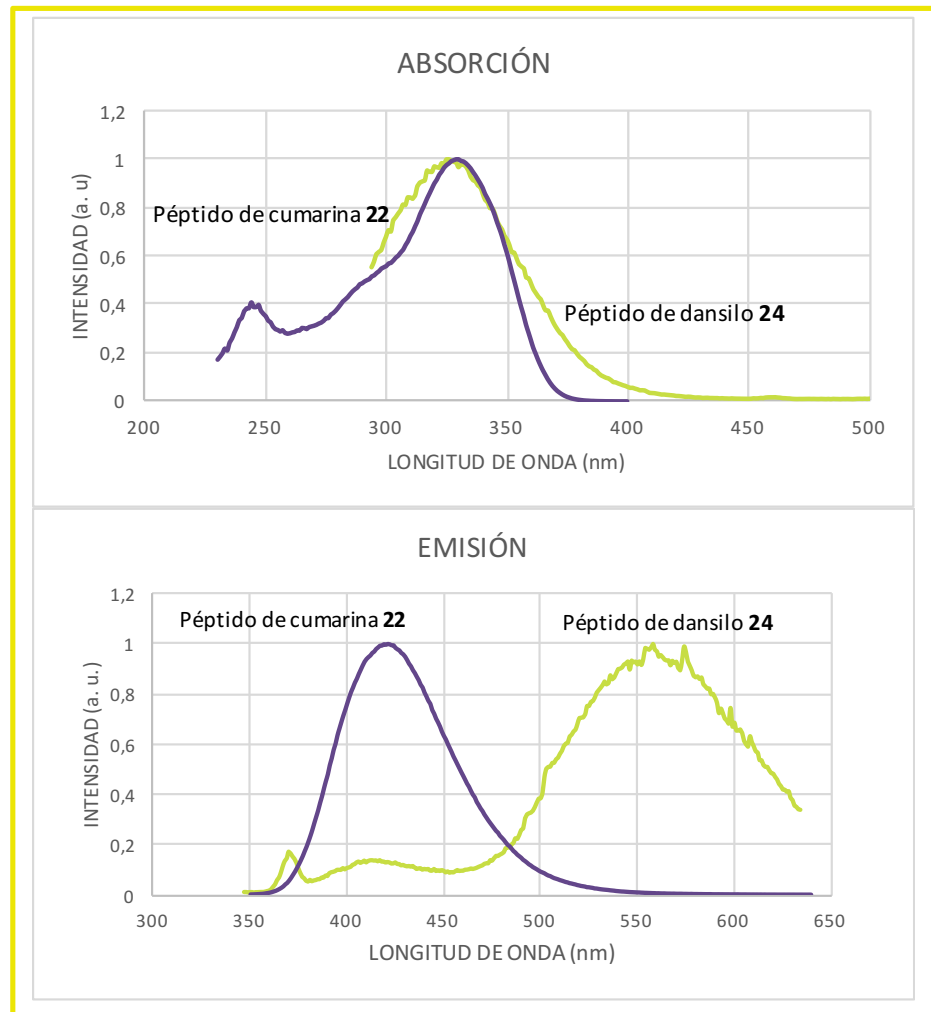


Figura 6.22 Espectros de absorción y emisión superpuestos de los péptidos de cumarina y dansilo, **22** y **24**, respectivamente.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Tras las síntesis de los derivados peptídicos **24** y **25** se realizaron ensayos biológicos de manera análoga a los realizados con el péptido **22** derivado de cumarina, testeando sendas actividades como CPPs. Para ello, de nuevo, se realizaron ensayos biológicos en colaboración con un grupo de investigación del CIBIR en los que se quiso observar la capacidad de estos péptidos de penetrar la membrana celular de las células epiteliales cervicales humanas HeLa.

Para la realización de estos ensayos, primero se prepararon las células HeLa, de manera idéntica a la realizada para el péptido anterior. Una vez preparadas se hicieron paralelamente los experimentos con ambos derivados de dansilo, disolviendo cada péptido en DMSO a una concentración de 10 mM y tomando 2 μL de la disolución que los contenía para añadirla sobre un cultivo de 500 μL de células. Seguidamente, se incubaron las células con cada péptido, en una estufa a 37 °C, durante 2 h. Tras este periodo de incubación, se midió la fluorescencia de las células con ayuda del microscopio de fluorescencia (**Figura 6.23**).

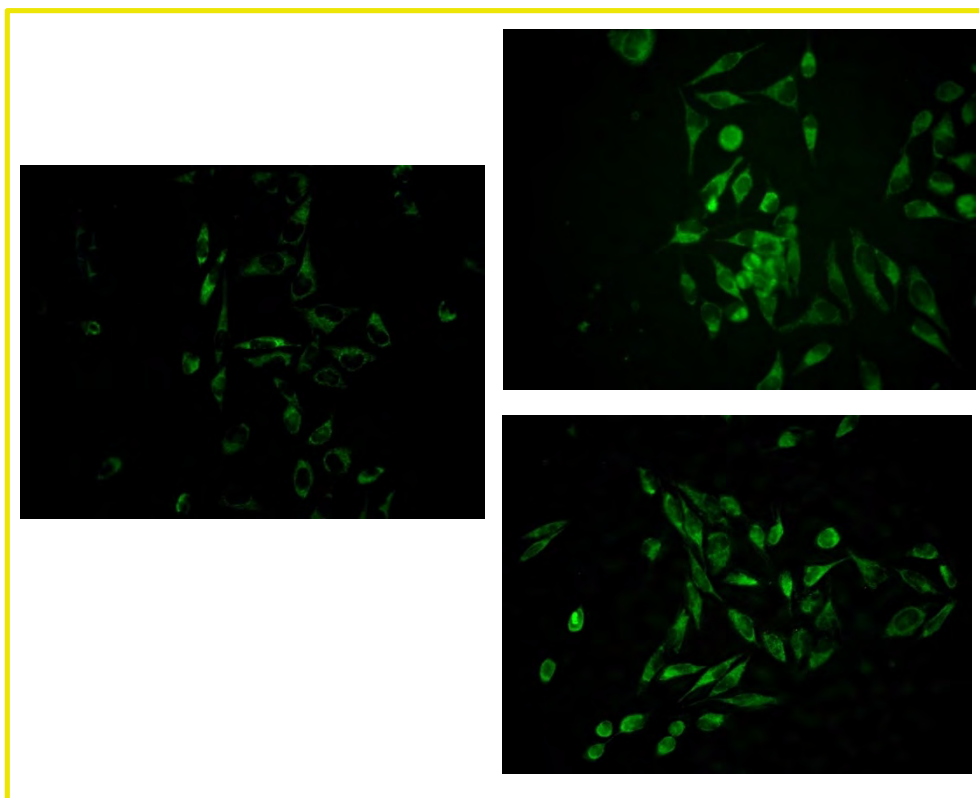


Figura 6.23 A la izquierda células control, a la derecha células incubadas con el péptido; Arriba incubadas con el péptido **24** y abajo incubadas con el péptido **25**. En este caso sí se observan diferencias entre las células del control y las que han sido internalizadas por las células HeLa.

Esta vez sí se pudieron observar diferencias entre las imágenes tomadas de control y las que contenían sendos péptidos, lo que parecía indicarnos que la secuencia peptídica era la adecuada. Por esta razón, decidimos sintetizar algún péptido más, utilizando como marcador el aminoácido no natural derivado de dansilo e introduciendo alguna pequeña variación.

6.3.3 Síntesis de otros derivados de dansilo y pruebas biológicas

En trabajos previos con este tipo de CPPs, siempre se han utilizado los péptidos con el extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico (CO₂H). Por eso, los péptidos anteriormente sintetizados se realizan con la resina cloruro de 2-clorotritilo, lo cual nos obliga a utilizar la SPPS de manera manual. Sin embargo, en nuestro laboratorio también disponemos de la resina *Rink Amide MBHA*, la cual, al realizar el *cleavage* peptídico, permite dejar el extremo C-terminal en forma de amida (CONH₂) (**Figura 6.24**).

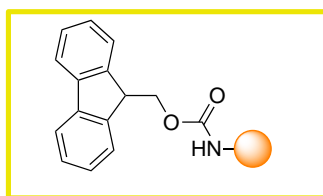


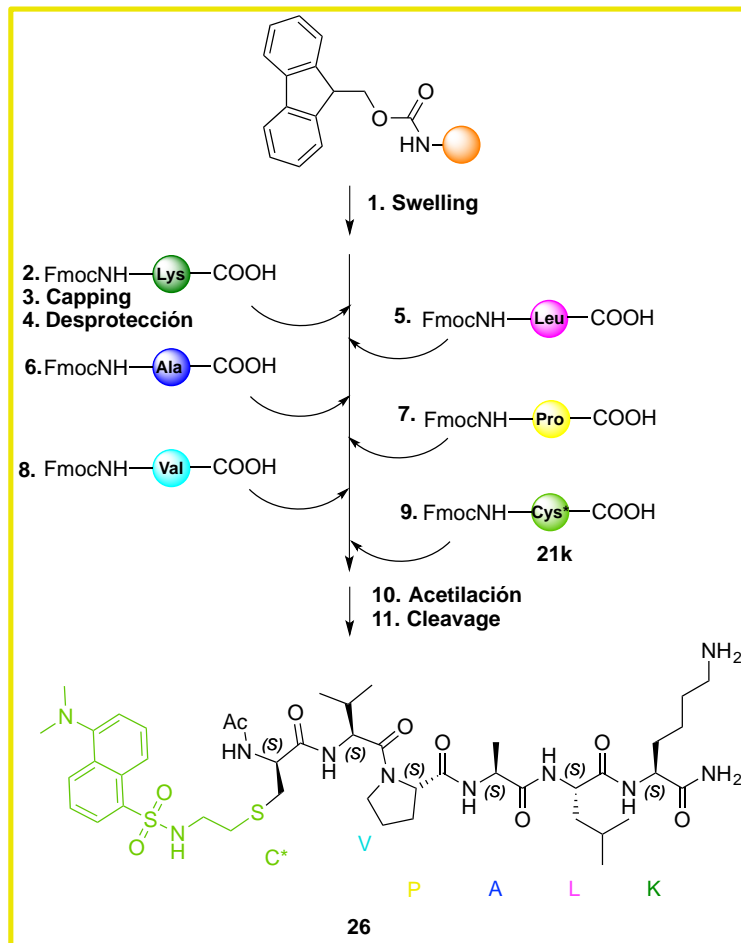
Figura 6.24 Resina Rink Amide MBHA.

Esta resina, además de ser más barata que la utilizada para los péptidos anteriores, permite el uso de ultrasonidos en la síntesis, lo que nos hizo posible realizarla con ayuda del sintetizador automático *Liberty Blue* disponible en el laboratorio (**Figura 6.17**).

Teniendo en cuenta que esto facilitaría muchísimo la síntesis de los CPPs fluorescentes, se decidió sintetizar el péptido Ac-C*VPALK-NH₂ mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida asistida por microondas (SPPS-MW) en el sintetizador automático citado, y usando la resina *Rink Amide MBHA* mencionada.

El objetivo es ver la influencia que podría tener el diferente extremo C-terminal (CO_2H ó CONH_2) en la penetración del CPP a través de la membrana celular.

Debido a que los acoplamiento con aminoácidos no naturales tienen que ser optimizados y que es necesaria más cantidad (en equivalentes) de éstos frente a la resina que realizando el acoplamiento fuera del sintetizador automático, todos los acoplamiento de los aminoácidos naturales se realizaron con ayuda del sintetizador automático a excepción del último, correspondiente con el enlace peptídico del aminoácido no natural derivado de dansilcisteína y el resto de la cadena peptídica (**Esquema 6.17**).



Esquema 6.17

El péptido **26** pudo purificarse por HPLC, para realizar después los mismos ensayos biológicos que se habían realizado con sus precursores. En este caso, se vió que no variaba mucho la fluorescencia con respecto a los péptidos con el extremo ácido libre (**Figura 6.25**).

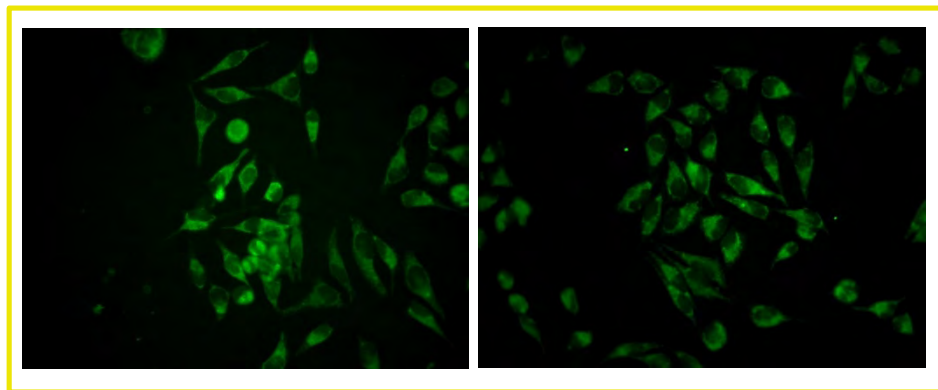


Figura 6.25 A la izquierda, células que han internalizado el péptido **24**, a la derecha, las que han internalizado el péptido **26**. No se observan diferencias determinantes entre ambas imágenes.

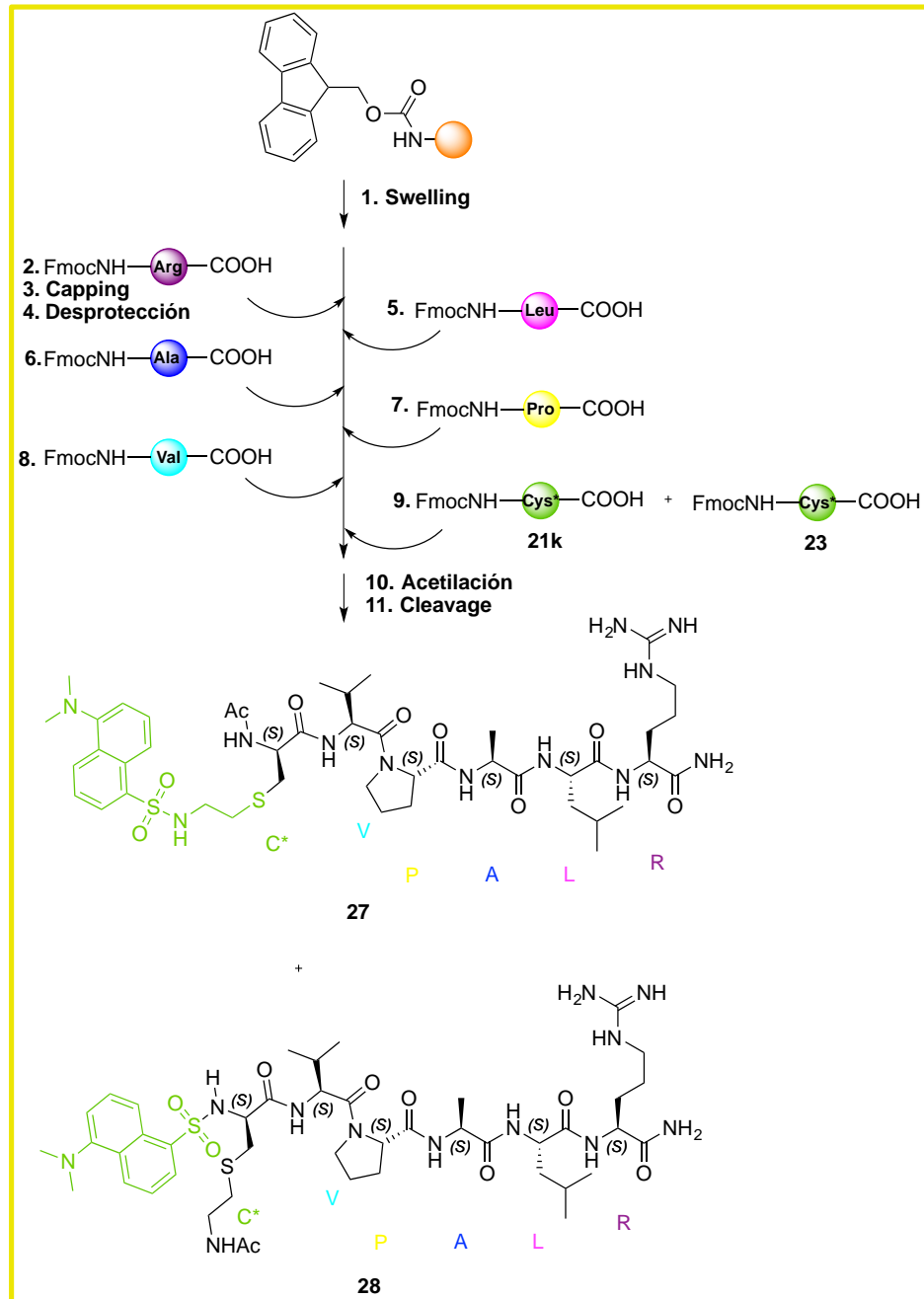
Posteriormente y con objeto de poder observar las células fluorescentes de mejor manera, se decidió sintetizar otro péptido diferente cuya capacidad de penetrar la membrana celular fuera mayor que el anterior.

Así, revisando bibliografía, encontramos que el cambio del aminoácido Lys (K) por Arg (R) aumenta este poder de penetración en más de un 20%.²⁰ Por ello, se decidió sintetizar la secuencia Ac-C*VPALR-NH₂.

²⁰ Gómez, J. A.; Chen, J.; Ngo, J.; Hajkova, D.; Yeh, I. J.; Gama, V.; Miyagi, M.; Matsuyama, S. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, 3594.

Para realizar sus síntesis se partió de la mezcla de derivados (**21k** y **23**) obtenidos al proteger con Fmoc el aminoácido **20k** derivado de dansilcisteína. De esta manera, se sintetizaron los dos derivados peptídicos deseados en un solo paso.

Para la síntesis de la secuencia peptídica objetivo, Ac-C*VPALR-NH₂, de nuevo se pudo utilizar el sintetizador automático *Liberty Blue* (**Esquema 6.18**).



Esquema 6.18

Ambos péptidos pudieron ser purificados y separados por HPLC.

Con todos los péptidos derivados de dansilo se decidió hacer un estudio comparativo, realizando de nuevo los ensayos biológicos para poder así comprobar con más detalle si había diferencias entre ellos.

ENSAYO COMPARATIVO DE PENETRACIÓN DE PÉPTIDOS EN CÉLULAS HELa

Este ensayo se realizó de nuevo en colaboración con el grupo de investigación del CIBIR, y para él, se utilizaron los péptidos **24**, **25**, **26** y **27** (Figura 6.26). Además, se utilizó el microscopio de fluorescencia y las imágenes se capturaron con el objetivo 40x y un zoom de 0.5. El filtro utilizado, al igual que en los casos anteriores, es el *Leica A4*.

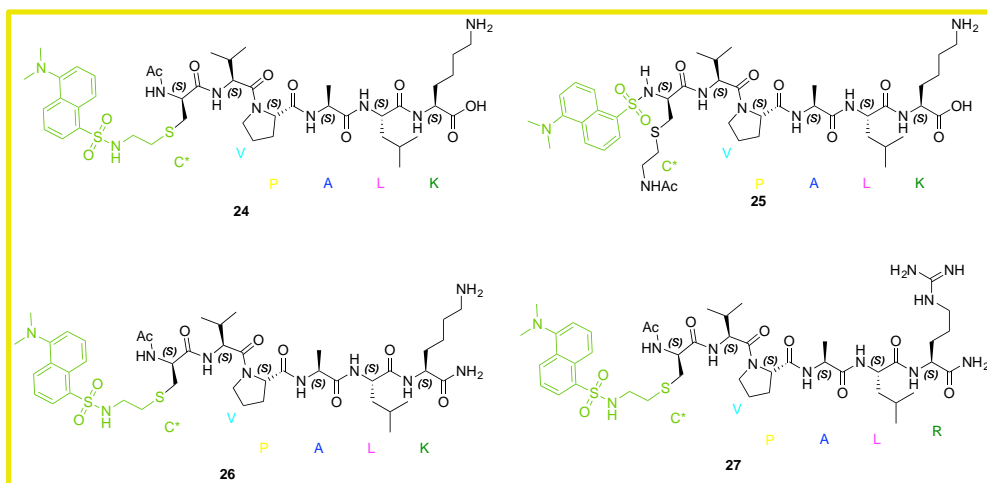


Figura 6.26 Todos los péptidos utilizados en el estudio.

Con el fin de observar la diferencia de fluorescencia de los péptidos, se prepararon las disoluciones de cada uno de ellos a la concentración deseada, 10 mM en DMSO, y se tomó una gota de dichas disoluciones para ver bajo el microscopio de fluorescencia, en las mismas condiciones que se mirarán después las células (luz visible y UV). El tiempo de exposición para tomar estas imágenes fue de 200 ms.

Se pudo comprobar que los cuatro péptidos daban fluorescencia en DMSO, aunque se observó una ligera diferencia entre los péptidos que contenían una Arg frente a los de la Lys, siendo estos últimos algo menos fluorescentes (Figura 6.27).

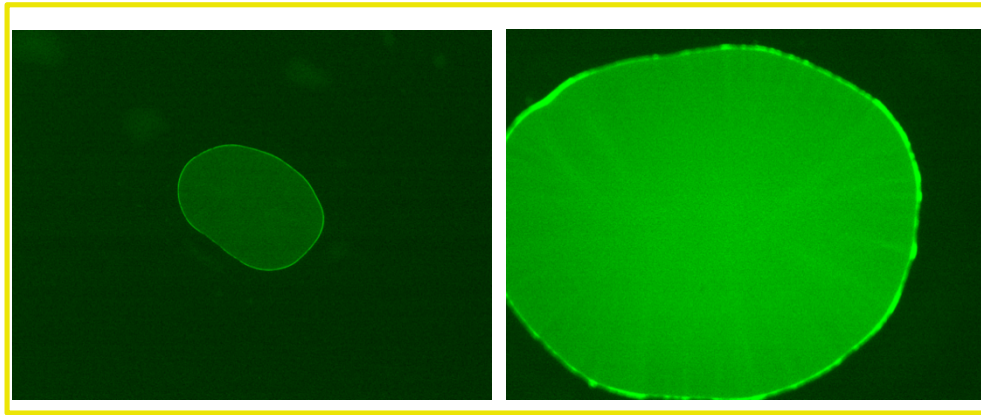


Figura 6.27 A la izquierda, disolución del péptido **24**. A la derecha, del **26**. El péptido **26** presenta algo más de fluorescencia bajo luz UV.

El siguiente paso fue medir la fluorescencia de las células una vez incubadas con los péptidos. Además, se tomaron unas fotografías con células control, las cuales habían sido incubadas sin el péptido, con el fin de distinguir la autofluorescencia de las células. Para intentar minimizar el efecto de que las células puedan variar al haber pasado más o menos tiempo durante el experimento, los controles se realizan al principio y al final de las medidas.

El orden de preparación de los experimentos se realizó en función de la fluorescencia observada previamente por las disoluciones de los péptidos en DMSO:

1. *Control 1*
2. *Péptido 26*
3. *Péptido 26 al doble de concentración*
4. *Péptido 27*
5. *Péptido 27 al doble de concentración*
6. *Péptido 24*
7. *Péptido 25*
8. *Control 2*

Para medir la autofluorescencia de las células, se realizó una preparación sin péptido y se observaron las mismas al microscopio con luz visible y luz UV, a varios tiempos de exposición: 50, 100, 200, 400, 800, 2000 y 4000 ms. Las células tienen una autofluorescencia que comienza a ser observada con 2 s de exposición (**Figura 6.28**)

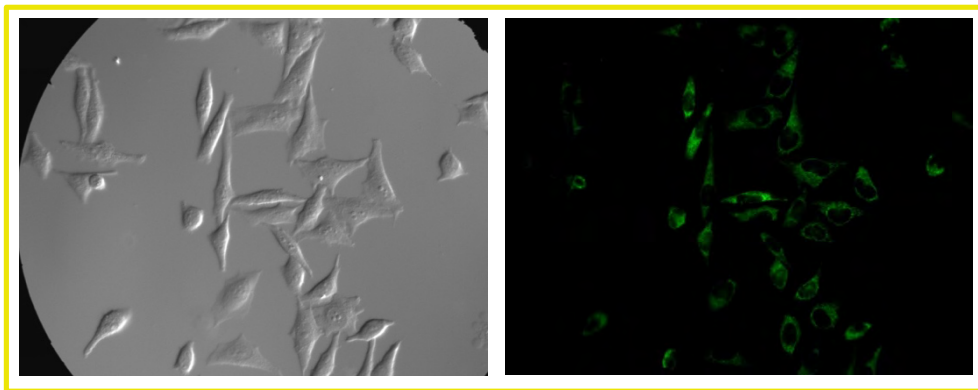


Figura 6.28 Ejemplo de células control, a la izquierda con luz visible y a la derecha, UV.

Una vez tomada la primera imagen de las células control, se tomaron las diferentes imágenes con los diferentes péptidos, así como una última imagen control para finalizar el experimento, en el orden indicado anteriormente. Las células incubadas con los péptidos se ensayaron en las mismas condiciones que las células control, observándose al microscopio con luz visible y luz UV, a varios tiempos de exposición: 50, 100, 200, 400, 800, 2000 y 4000 ms.

En todos los péptidos se observa fluorescencia, sin embargo, en los péptidos **24** y **25** las diferencias con la autofluorescencia son más sutiles y dependen de la imagen control con la que comparemos (**Figura 6.29**). Por lo tanto, los péptidos que nos permiten observar una mayor fluorescencia son el **26** y **27**.

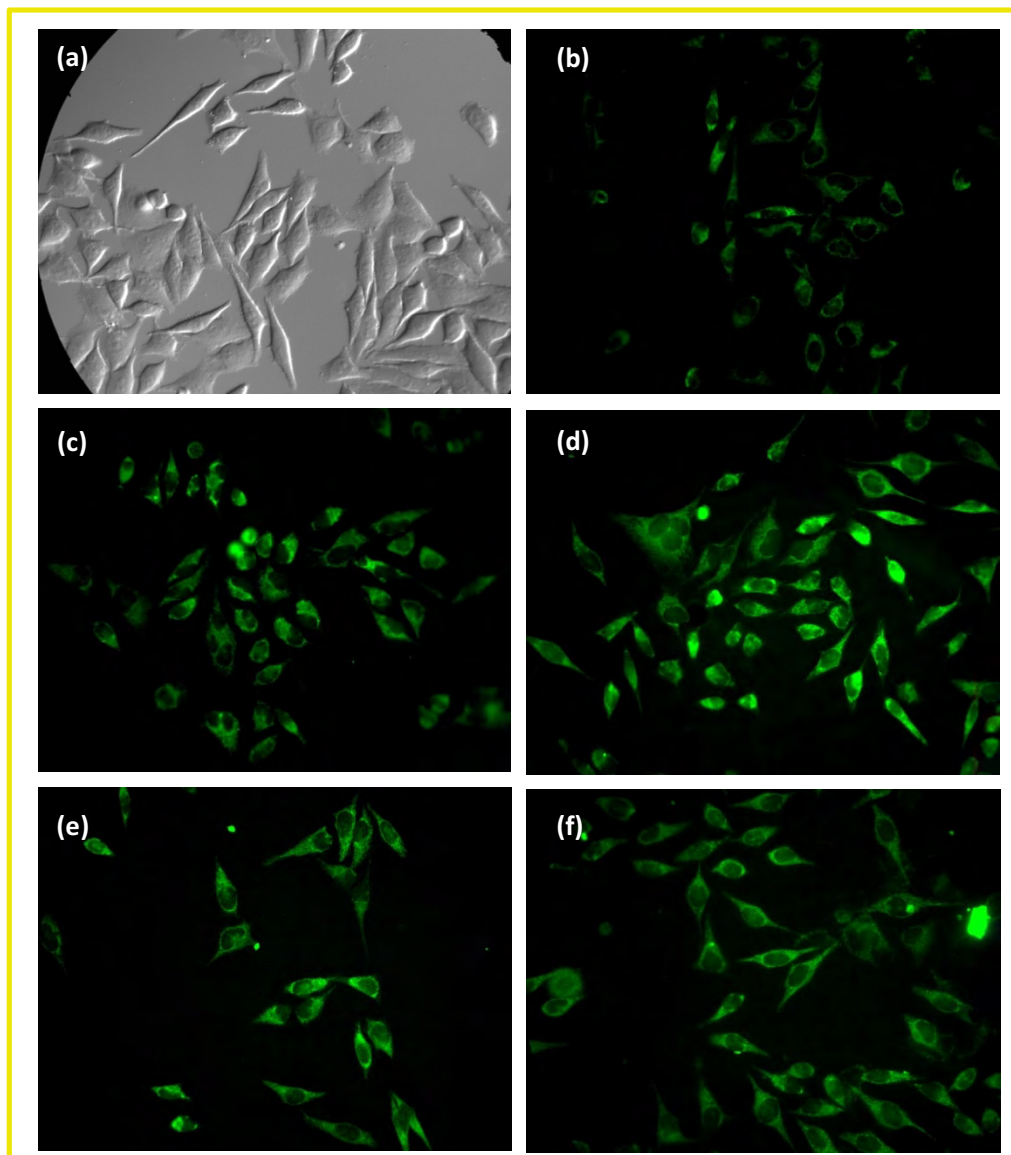


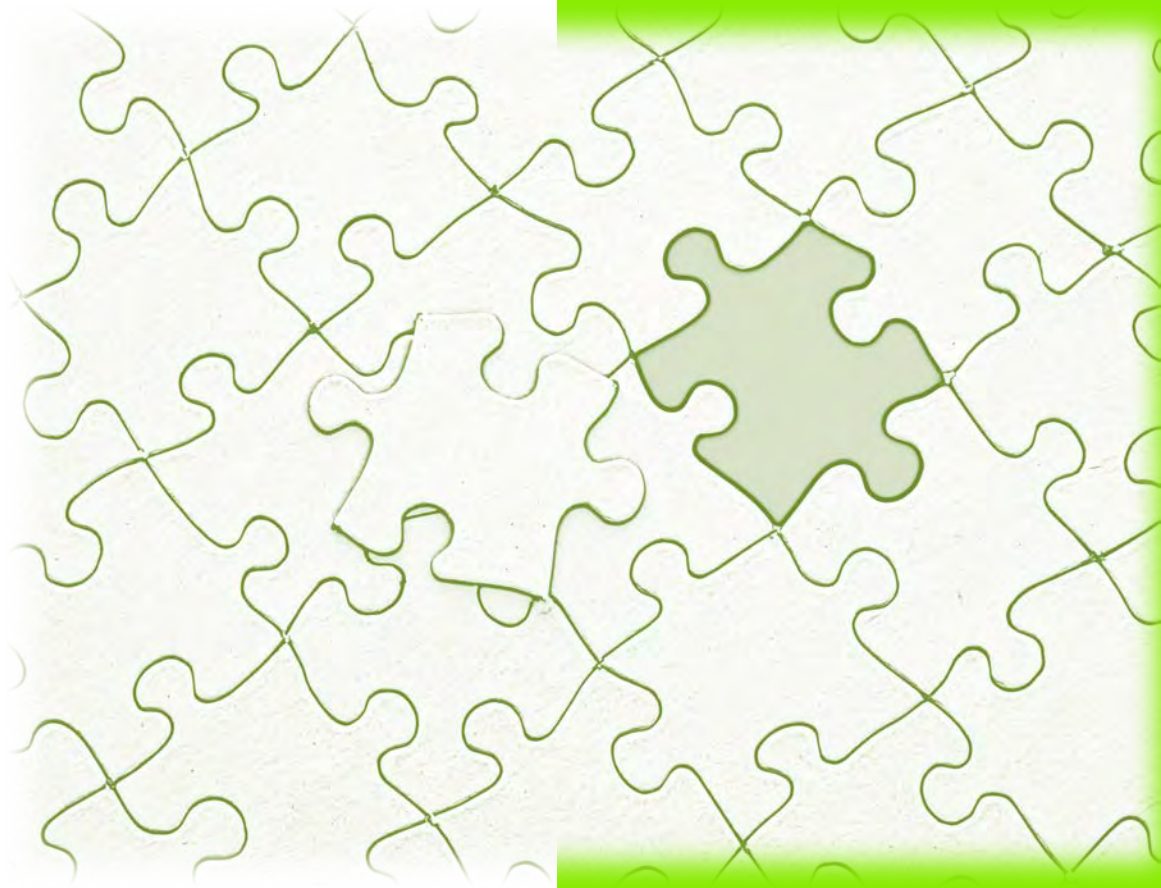
Figura 6.29 (a) Ejemplo de células bajo luz visible (b) Células control bajo luz UV (c) Células incubadas con el péptido **24** bajo luz UV (d) Células incubadas con el péptido **25** bajo luz UV (e) Células incubadas con el péptido **26** bajo luz UV (f) Células incubadas con el péptido **27** bajo luz UV.

La fluorescencia del péptido **26** se comienza a ver con 400-800 ms de exposición y el **27** con 800 ms de exposición. Por lo tanto, su fluorescencia se ve con menor tiempo de exposición que la propia autofluorescencia de las células HeLa, la cual se detectaba con 2000 ms.

El hecho de que los CPPs sintetizados derivados de dansilo con estructura Ac-C*VPALR-NH₂ presenten una mayor fluorescencia que los derivados cuya estructura es Ac-C*VPALK-NH₂ demuestra que el grado de penetrabilidad es mayor en aquellas que contiene Arg (R), como ya estaba descrito.²⁰

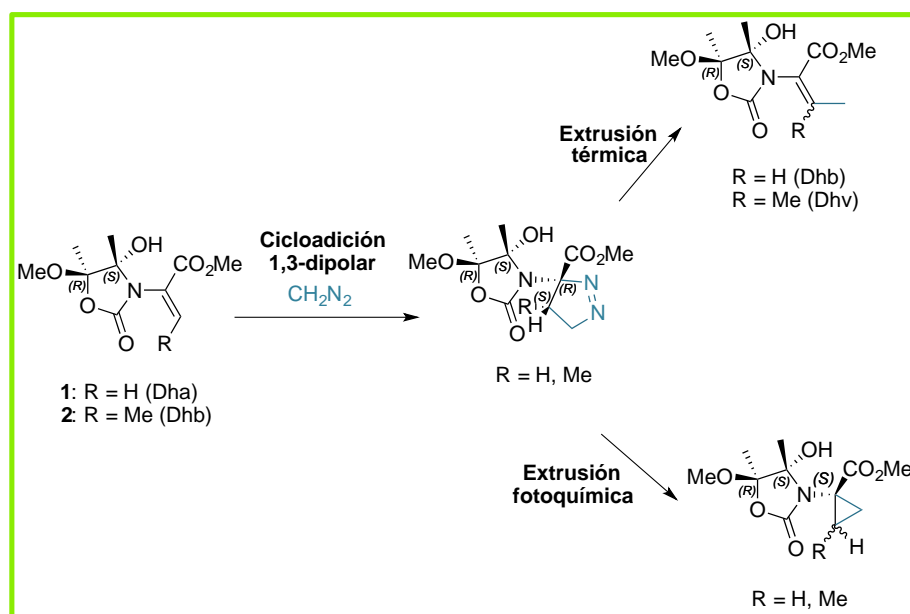
En conclusión, se ha sintetizado una batería de nuevos CPPs fluorescentes, y se han realizado estudios biológicos para comprobar su internalización en células HeLa. Se ha comprobado que, en función de la secuencia peptídica sintetizada, se puede variar también la fluorescencia mostrada por las células, debido a la diferente capacidad de penetrar la membrana celular.

Capítulo 7. Conclusiones



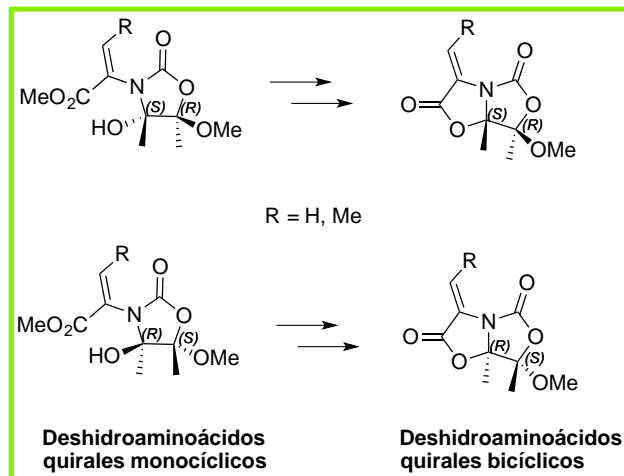
A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han presentado diversos resultados experimentales que, vistos en perspectiva, permiten exponer las siguientes conclusiones:

1. Se ha ampliado la reactividad del doble enlace de los deshidroaminoácidos quirales sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación. Se ha conseguido realizar sobre ellos la reacción de cicloadición 1,3-dipolar, usando el diazometano como 1,3-dipolo y los derivados quirales de Dha y Dhb, **1** y **2**, como dipolarófilos, obteniendo buenos rendimientos y selectividades (**Esquema 7.1**). Además, se han obtenido los productos procedentes de la extrusión vía térmica y fotoquímica de los aductos de la cicloadición, dando lugar a otros deshidroaminoácidos quirales cíclicos diferentes a los de partida, como, por ejemplo, la deshidrovalina (Dhv) o derivados de ciclopropano, respectivamente (**Esquema 7.1**).



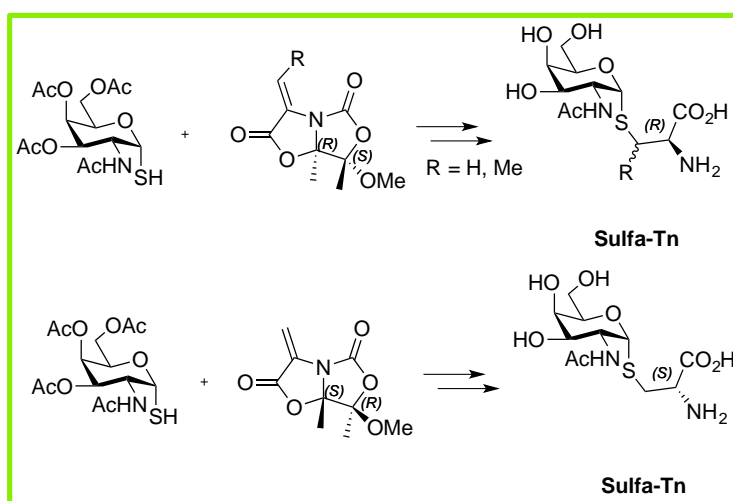
Esquema 7.1

2. Se han diseñado y sintetizado nuevos deshidroaminoácidos quirales derivados de Ser y Thr, relacionados estructuralmente con los deshidroaminoácidos cíclicos previos. Se ha conseguido aumentar su rigidez estructural haciendo que estos compuestos, en lugar de ser monocíclicos, sean bicíclicos (**Esquema 7.2**).



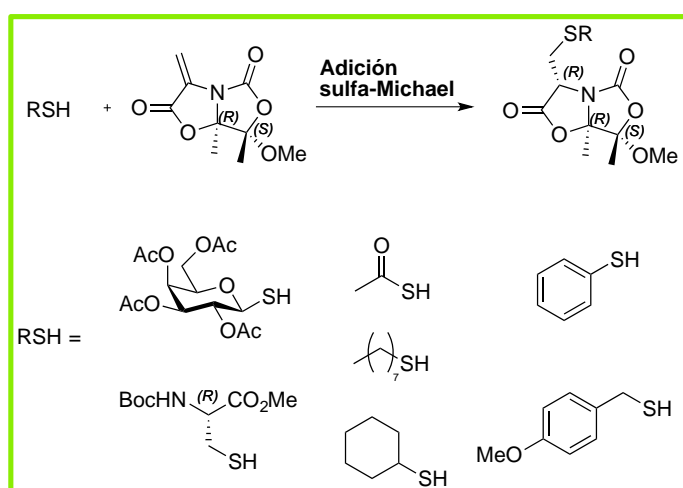
Esquema 7.2

3. Se ha utilizado como nucleófilo el carbohidrato D-GalNac- α -SH para realizar una reacción sulfa-Michael sobre los nuevos deshidroaminoácidos quirales, diseñando así una ruta alternativa para la síntesis de derivados azufrados del antígeno Tn (α -D-GalNac-L-Ser/Thr). Dicha reacción es rápida, transcurre a temperatura ambiente y proporciona elevados rendimientos y selectividades, por lo que se trata de una verdadera reacción “click”. Además, se ha podido realizar la síntesis, no sólo del análogo del derivado de serina, sino también del de treonina, incidiendo en la mejora de la reactividad de los nuevos deshidroaminoácidos quirales diseñados (**Esquema 7.3**).



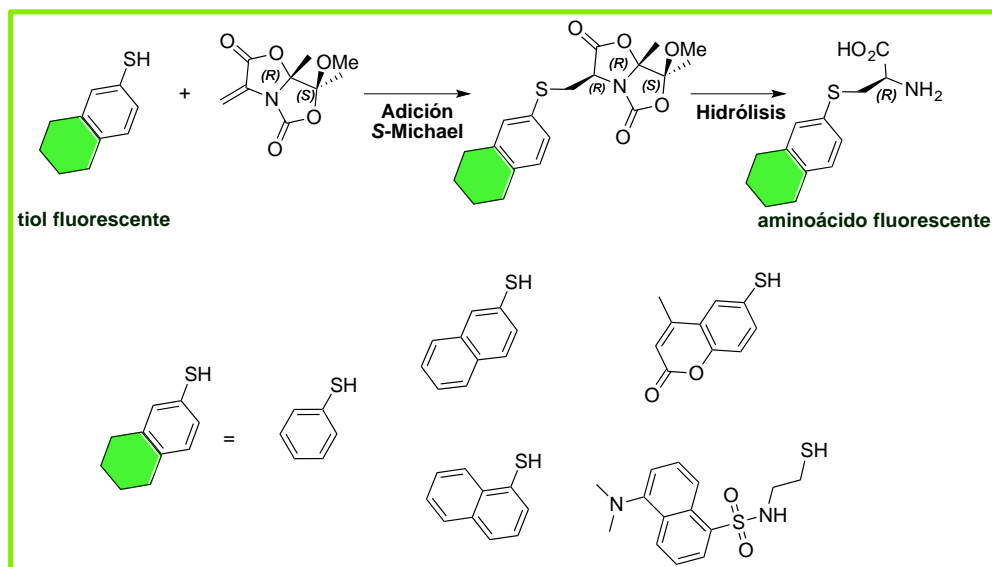
Esquema 7.3

4. Se ha ampliado la reactividad de los nuevos deshidroaminoácidos bicíclicos quirales frente a reacciones de tipo *S*-Michael, utilizando diferentes nucleófilos azufrados, mejorando, con respecto a los deshidroaminoácidos previos, el rendimiento y la diastereoselectividad. De este modo, se tiene acceso fácil a precursores de interesantes compuestos orgánicos bioactivos como *S*-glicosilaminoácidos, lantioninas y en general cisteínas *S*-funcionalizadas (**Esquema 7.4**).



Esquema 7.4

5. Se han conseguido diseñar y sintetizar nuevos aminoácidos no naturales fluorescentes para poder incorporarlos en cadenas peptídicas y proteínas. Por ello, se han utilizado otros nucleófilos azufrados fluorescentes en la adición de *S*-Michael sobre los deshidroaminoácidos quirales bicíclicos descritos, dando lugar a interesantes cisteínas fluorescentes, una vez llevada a cabo la correspondiente hidrólisis (**Esquema 7.5**).



Esquema 7.5

6. Una vez que se han sintetizado varios aminoácidos fluorescentes, se han seleccionado los de mejores propiedades luminiscentes para realizar la síntesis de nuevos péptidos penetrantes de células (CPPs) fluorescentes. Después de estudiar sus propiedades espectroscópicas, se han realizado ensayos biológicos en los que estos péptidos se han incorporado en células HeLa, probando así su grado de penetrabilidad a través de la membrana celular (**Figura 7.6**).

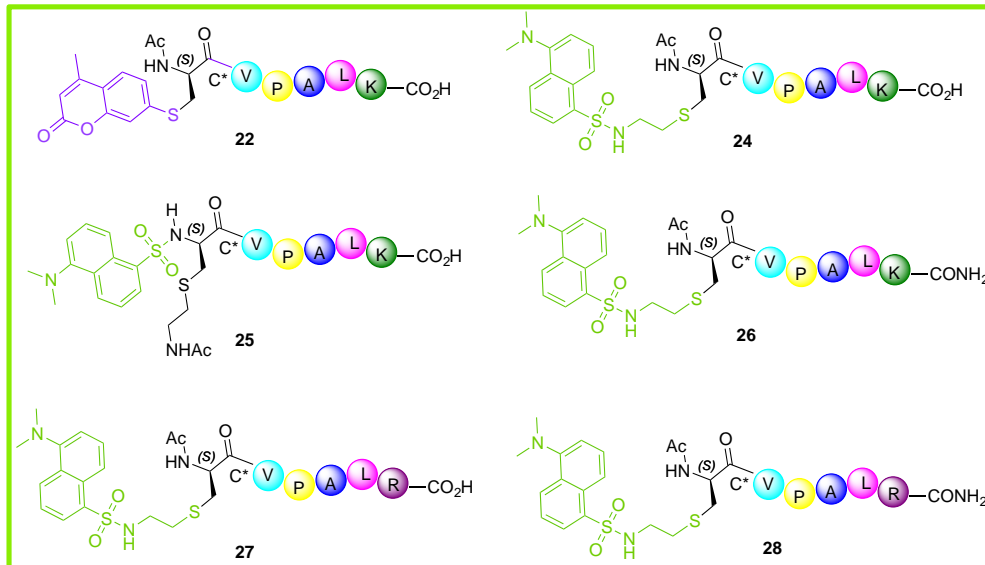


Figura 7.6 Péptidos fluorescentes sintetizados.

Con el trabajo realizado y presentado en esta Tesis Doctoral se han publicado los siguientes artículos y se han presentado las siguientes comunicaciones en congresos:

ARTÍCULOS EN PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

1. *“Bifunctional Chiral Dehydroalanines for Peptide Copupling and Stereoselective S-Michael Addition”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Navo, C. D.; Avenzoza, A.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Zurbano, M. M.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.
Org. Lett. **2016**, *18*, 2796.
2. *“Cell Penetrating Peptides containing Fluorescent d-Cysteines”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Asín, A.; Gómez-Orte, E.; Navo, C. D.; Compañón, I.; Ezcurra, B.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Jiménez-Osés, G.; Cabello, J.; Peregrina, J. M.
Enviado a publicar, **2018**.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFICOS:

1. **Póster:** “Stereoselective S-Michael additions of sulphur nucleophiles to a chiral dehydroalanine. Synthesis of fluorescent peptides.”
Asín, A.; Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Gómez-Orte, E.; Navo, C. D.; Compañón, I.; Ezcurra, B.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Jiménez-Osés, G.; Cabello, J.; Peregrina, J. M.
“16th Iberian Peptide Meeting (16EPI) / 4th Chemical Biology Group Meeting (4GEQB)”, Barcelona (Febrero 2018).

2. **Comunicación Oral:** *“Metodologías activas en el aprendizaje de la química; gamificación y aprendizaje por descubrimiento.”*

Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Bueno, D.

“XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ)”, Sitges (Junio 2017)

3. **Póster:** *“D-Cysteine-derived fluorescent non-natural amino acids using chiral dehydroalanines as S-Michael acceptors.”*

Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Navo, C. D.; Asín, A.; Avenzoa, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Ezcurra, B.; Gómez-Orte, E.; Cabello, J.

“XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ)”, Sitges (Junio 2017)

4. **Póster:** *“A biomimetic approach to histidinoalanine.”*

Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Navo, C. D.; Asín, A.; Marín, J.; Avenzoa, A.; Corzana, F.; Jimenez-Osés, G.; Zurbano, M. M.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.

“XII Simposio de Investigadores Jóvenes RSEQ-Sigma Aldrich”, Logroño (Noviembre 2016)

5. **Póster:** *“Chiral dehydroalanines as excellent S-Michael acceptors to synthesize sulfa-Tn antigen mimics.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Navo, C.D.; Avenoza, A.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Zurbano, M. M.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.
“III Biennial Meeting of the Chemical Biology Group / XII Carbohydrate Symposium”, Madrid (Marzo 2016)

6. **Comunicación Oral y Póster:** *“Síntesis de nuevos glicopéptidos y su aplicación biológica.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“IV Jornadas Doctorales del Grupo G9 de Universidades”, Pamplona (Marzo 2016)

7. **Comunicación Oral:** *“Synthesis of S-glycodipeptides through sulfa-Michael addition and lactone aminolysis sequence.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“XII Simposio de Investigadores Jóvenes RSEQ-Sigma Aldrich”, Barcelona (Noviembre 2015)

8. **Póster:** *“Synthesis of S-glycopeptides through sulfa-Michael addition and lactone aminolysis sequence.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“11th International Meeting of the Portuguese Carbohydrate Chemistry Group. 6th Iberian Carbohydrate Meeting”, Viseu – Portugal (Septiembre 2015)

9. **Comunicación Oral (Flash):** *“A chiral dehydroalanine as S-Michael acceptor in the synthesis of sulfa-Tn antigen.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“XXXV Bienal RSEQ”, La Coruña (Julio 2015)

10. **Comunicación Oral y Póster:** *“Síntesis de nuevos glicopéptidos y su aplicación biológica.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“II Jornadas Doctorales del Campus de Excelencia Internacional Iberus”, Jaca (Julio 2015)

11. **Póster:** *“Synthesis of a mimic of Tn antigen through a stereoselective sulfa-Michael addition.”*
Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“XI Simposio de Investigadores Jóvenes” Bilbao (Noviembre 2014)

12. **Póster:** *“Glycopeptides incorporating sulfur-based Tn antigen mimics.”*
Aydiillo, C.; Rojas, V.; Compañón, I.; Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Ayala, M.; Corzana, F.; Zurbano, M. M.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M.
“XI Jornadas de Carbohidratos. Universidad de La Rioja” Logroño (Mayo 2014)

13. **Póster:** *“Synthesis of S-glycodipeptides through sulfa-Michael addition and lactone aminolysis sequence.”*
Aydiillo, C.; Gutiérrez-Jiménez, M. I.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.
“2nd Meeting of the RSEQ Chemical Biology Group, XIV Iberian Peptide Meeting” Bilbao (Febrero 2014)

ORGANIZACIÓN DE CONGRESOS CIENTÍFICOS:

1. **Comité Organizador:** “XIII Simposio de Investigadores Jóvenes RSEQ-Sigma Aldrich”, Logroño (Noviembre 2016)

2. **Comité Organizador:** “One-day symposium on computational chemical biology honoring Ken Houk”, Logroño (Abril 2016).

Capítulo 8. Experimental



Reagents and general procedures. Commercial reagents were used without further purification. Solvents were dried and redistilled prior to use in the usual way. All reactions were performed in oven-dried glassware with magnetic stirring under an inert atmosphere unless noted otherwise. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on glass plates precoated with a 0.25 mm thickness of silica gel. The TLC plates were visualized with UV light and by staining with Hanessian solution (ceric sulfate and ammonium molybdate in aqueous sulfuric acid) or sulfuric acid-ethanol solution. Column chromatography was performed on silicagel (230–400 mesh). Optical rotations (OR) were measured with a polarimeter at a concentration (c) expressed in g/100 mL. Melting points were determined on a Büchi B-545 melting-point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on a polarimeter from solutions in 1.0 dm cells of capacity 1.0 or 0.35 mL.

High-resolution electrospray mass (ESI) spectra were recorded on a microTOF-Q-BRUKER spectrometer; accurate mass measurements were achieved by using sodium formate as an external reference.

NMR experiments. NMR experiments were performed on a 400 spectrometer at 298 K. Magnitude-mode ge-2D COSY spectra were acquired with gradients by using the cosygpqf pulse program with a pulse width of 90°. Phase-sensitive ge-2D HSQC spectra were acquired by using z-filter and selection before t1 removing the decoupling during acquisition by use of the invigpndph pulse program with CNST2 (JHC)=145. Phase-sensitive ge-2D NOESY experiments were performed. NOE intensities were normalized with respect to the diagonal peak at zero mixing time. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured with a Bruker Avance-

400 and Bruker ARX-300 spectrometer with TMS as the internal standard. Multiplicities are quoted as singlet (s), broad singlet (br s), doublet (d), doublet of doublets (dd), triplet (t), pentuplet (p), or multiplet (m). Spectra were assigned using COSY and HSQC. All NMR chemical shifts (δ) were recorded in ppm, and coupling constants (J) were reported in Hz. The results of these experiments were processed with MestreNova software.

Computational Details. Full geometry optimizations were carried out with Gaussian 09¹ using the M06-2X hybrid functional² and 6-31+G(d,p) basis set in combination with ultrafine integration grids. Bulk solvent effects in tetrahydrofuran were considered implicitly through the IEF-PCM polarizable continuum model.³ The possibility of different conformations was taken into account. Frequency analyses were carried out at the same level used in the geometry optimizations, and the nature of the stationary points was determined in each case according to the appropriate number of negative eigenvalues of the Hessian matrix.

¹ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, **2009**.

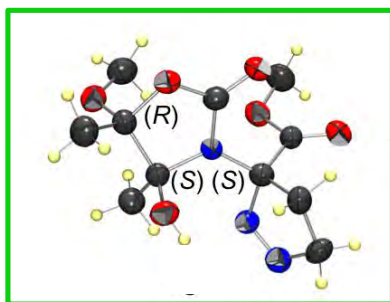
² Zhao, Y.; Truhlar, D. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.

³ Scalmani, G.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*.

The quasiharmonic approximation reported by Trular et al. was used to replace the harmonic oscillator approximation for the calculation of the vibrational contribution to enthalpy and entropy.⁴ Scaled frequencies were not considered. Cartesian coordinates, electronic energies, entropies, enthalpies, Gibbs free energies, and lowest frequencies of the calculated structures are available below.

X-ray data collection was performed on a Bruker Nonius diffractometer with Kappa geometry and CCD detector. SHELXL97, SIR2004 and SHELXS97 program was used for the resolution and refinement of crystal structures, and hydrogen atoms were fitted at theoretical positions. Graphical representations were performed using ORTEP-3 (2.0 version) from the cif file obtained after refinement. The images were generated with POV-Ray (3.7 version).

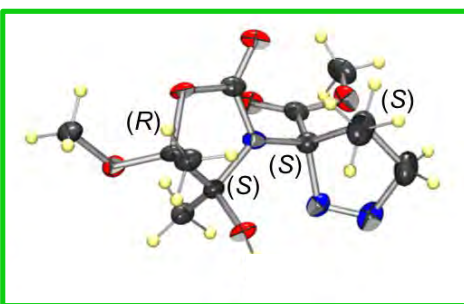
⁴ Ribeiro, R. F.; Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 14556.



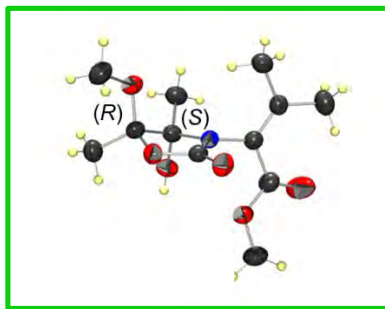
Crystal data for 3: $C_{11}H_{17}N_3O_6$, $M_w=287.28$, colourless prism of 0.32 x 0.2 x 0.1 mm, $T=100(2)$ K, orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $Z=4$, $a= 6.0265(3)$ Å, $b= 12.6656(7)$ Å, $c= 17.2990(6)$ Å, $\alpha=\gamma=\beta=90^\circ$, $V=1320.42(11)$ Å³, $d_{\text{calc}}=1.445$ gcm⁻³, $F(000)=608$, $\lambda=0.71073$ Å (Mo,

Ka), $\mu=0.118$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 2.35-28.22°, 11740 collected reflections, 3144 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0602$, $wR_2=0.1535$, ($R_1=0.1254$, $wR_2=0.1983$ all data), goodness of fit =1.022, residual electron density between 0.269 and -0.312 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.

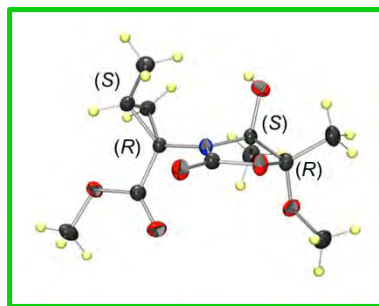
Crystal data for 4: $C_{12}H_{19}N_3O_6$, $M_w=301.30$, colourless prism of 0.42 x 0.30 x 0.15 mm, $T=100(2)$ K, monoclinic, space group $P2_1$, $Z=6$, $a=7,7189(2)$ Å, $b=34.7382(12)$ Å, $c=9.0207(3)$ Å, $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=112.892(2)^\circ$, $V=2228.31(12)$



Å³, $d_{\text{calc}}=1.347$ gcm⁻³, $F(000)=960$, $\lambda=0.71073$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.109$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 1.17-28.17°, 18796 collected reflections, 8537 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0689$, $wR_2=0.1876$, ($R_1=0.0973$, $wR_2=0.2302$ all data), goodness of fit =1.101, residual electron density between 0.875 and -0.679 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.

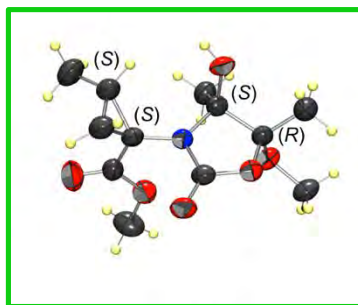


Crystal data for 5: $C_{12}H_{19}NO_6$, $M_w=273.28$, colourless prism of 0.50 x 0.18 x 0.17 mm, $T=173(2)$ K, orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $Z=4$, $a=8.6157(4)$ Å, $b=10.0562(6)$ Å, $c=16.3776(6)$ Å, $\alpha=\gamma=\beta=90^\circ$, $V=1418.97(12)$ Å³, $d_{\text{calc}}=1.279$ gcm⁻³, $F(000)=584$, $\lambda=0.71073$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.103$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 3.21-28.11°, 21835 collected reflections, 1943 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0415$, $wR_2=0.1000$, ($R_1=0.0537$ $wR_2=0.1065$ all data), goodness of fit =1.073, residual electron density between 0.201 and -0.145 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.

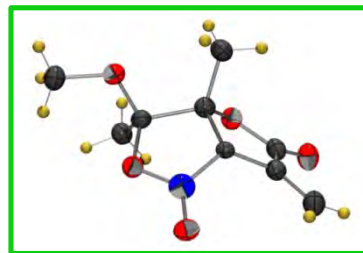


Crystal data for 7: $C_{12}H_{19}NO_6$, $M_w=273.28$, colourless prism of 0.75 x 0.50 x 0.13 mm, $T=173(2)$ K, monoclinic, space group $P2_1$, $Z=2$, $a=6.3098(3)$ Å, $b=8.5427(4)$ Å, $c=12.4809(6)$ Å, $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=91.170(3)^\circ$, $V=672.61(6)$ Å³, $d_{\text{calc}}=1.349$ gcm⁻³, $F(000)=292$, $\lambda=0.71073$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.108$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 4.64-28.12°, 6237 collected reflections, 1671 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0313$, $wR_2=0.0832$, ($R_1=0.0329$, $wR_2=0.0845$ all data), goodness of fit =1.062, residual electron density between 0.253 and -0.185 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.

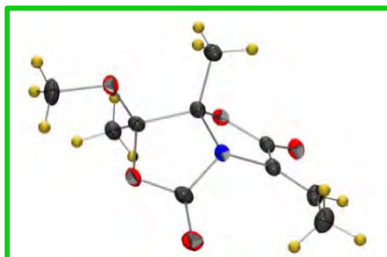
Crystal data for 8: C₁₂H₁₉NO₆, $M_w=273.28$, colourless prism of 0.75 x 0.50 x 0.13 mm, T=293(2) K, monoclinic, space group P2₁, Z=2, a=6.3820(13) Å, b=11.419(3) Å, c=9.7750(13) Å, $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=99.433(12)^\circ$, $V=702.7(2)$ Å³, $d_{\text{calc}}=1.292$ gcm⁻³, F(000)=292, $\lambda=0.71073$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.104$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 3.56-28.04°, 8320 collected reflections, 1712 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0563$, $wR_2=0.1019$, ($R_1=0.1327$, $wR_2=0.1247$ all data), goodness of fit =1.051, residual electron density between 0.197 and -0.157 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.



Crystal data for 11: C₉H₁₁NO₅, $M_w=213.19$, colourless prism of 0.47 x 0.30 x 0.15 mm, T=173(2) K, monoclinic, space group P2₁, Z=2, a=8.0163(7) Å, b=5.9409(6) Å, c=10.6300(10) Å, $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=108.560(5)^\circ$, $V=479.91(8)$ Å³, $d_{\text{calc}}=1.475$ gcm⁻³, F(000)=224, $\lambda=0.71073$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.12$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 3.8-27.5°, 2949 collected reflections, 2151 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0545$, $wR_2=0.1562$, ($R_1=0.0636$, $wR_2=0.1632$ all data), goodness of fit =1.09, residual electron density between 0.504 and -0.49 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.



Crystal data for 12: $C_{20}H_{26}N_2O_{10}$, $M_w=454.43$, colourless prism of 0.47 x 0.30 x 0.25 mm, $T=173(2)$ K, orthorhombic, space

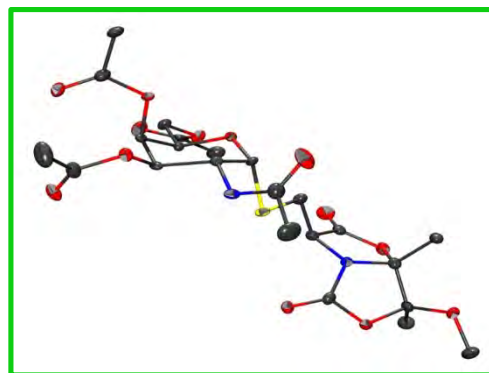


group $P2_12_12_1$, $Z=4$, $a=6.6775$ Å, $b=10.9381$ Å, $c=30.2729$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $V=2210.9$ Å³, $d_{calc}=1.365$ gcm⁻³, $F(000)=960$, $\lambda=0.71073$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.12$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 3.1-27.5°, 11439

collected reflections, 5004 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0486$, $wR_2=0.1125$, ($R_1=0.0808$, $wR_2=0.1253$ all data), goodness of fit =1.00, residual electron density between 0.29 and -0.29 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions.

Crystal data for 13':

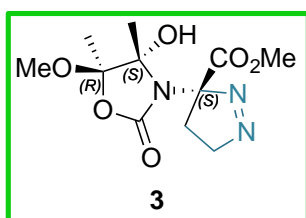
$C_{25}H_{36}Cl_4N_2O_{13}S$, $M_w=746.42$, colourless prism of 0.27 x 0.06 x 0.04 mm, $T=100(2)$ K, orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $Z=4$, $a=10.6272(10)$ Å, $b=12.2620(12)$ Å, $c=25.592(2)$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $V=3334.9(5)$ Å³, $d_{calc}=1.487$ gcm⁻³, $F(000)=1552$,



$\lambda=0.71076$ Å (Mo, Ka), $\mu=0.482$ mm⁻¹, Nonius Kappa CCD diffractometer, θ range 2.909-26.371°, 144723 collected reflections, 6810 unique, full-matrix least-squares (SHELXL97), $R_1=0.0421$, $wR_2=0.1019$, ($R_1=0.0500$, $wR_2=0.1057$ all data), goodness of fit =1.09, residual electron density between 0.426 and -0.506 eÅ⁻³. Hydrogen atoms fitted at theoretical positions

General Procedure for the 1,3-Dipolar Cycloadditions.

Dehydroamino acid (**1-2**, 0.34 mmol) was charged in a round bottomed flask, was dissolved in 2 mL of diethyl ether and stirred at 0 °C. Then, a 0.84 M ethereal solution of CH₂N₂ (0.80 mL, 0.68 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1 hour at 0 °C, and then, was allowed to reach room temperature. The flask was opened and stirred in a hood, until the solution lost its yellow coloration that indicates the presence of diazomethane. The mixture was evaporated without heating, to avoid decomposition, giving the corresponding 1-pyrazoline (**3-4**) as white solid without further purification.

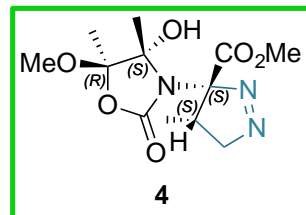
Methyl (S)-3-((4S,5R)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-4,5-dihydro-3H-pyrazole-3-carboxylate (3**).**

Following the general procedure for the 1,3-dipolar cycloadditions, 1-Pyrazoline **3** (94 mg, 0.33 mmol, 97%) was obtained starting from Dha **1** (85 mg, 0.34 mmol).

$[\alpha]_D^{25}$ (0.92, CHCl₃) = +167.5 Mp: decomposes. HRMS ESI (m/z) = 310.1006 [M+Na]⁺; calcd for C₁₁H₁₇N₃O₆Na⁺ = 310.1010. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.52 (s, 3H, CH₃), 1.82 (s, 3H, CH₃), 2.12-2.01 (m, 1H, CH₂CCO₂CH₃), 2.74 (ddd, J = 13.6, 8.4, 2.7 Hz, 1H, CH₂CCO₂CH₃), 3.47 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.64 – 4.49 (m, 1H, CH₂N=N), 4.96 (ddd, J = 18.1, 9.4, 2.7 Hz, 1H, CH₂N=N). ¹³C NMR (CDCl₃): d 15.8 (CH₃), 22.3 (CH₃), 30.0 (CH₂CCO₂CH₃), 51.0 (OCH₃), 53.6 (CO₂CH₃), 78.5 (CH₂N=N), 92.6 (CCH₃OH), 105.2 (CCO₂CH₃), 108.1 (CCH₃OCH₃), 154.3 (NCO₂), 166.8 (CO₂CH₃).

Methyl (3*S*,4*S*)-3-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-4-methyl-4,5-dihydro-3*H*-pyrazole-3-carboxylate (4).

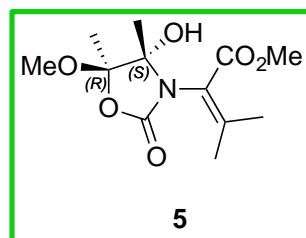
Following the general procedure for the 1,3-dipolar cycloadditions. 1-Pyrazoline **4** (308 mg, 1.02 mmol, 96%) was obtained starting from Dhb **2** (276 mg, 1.06 mmol).



$[\alpha]_D^{25}$ (c 1.11, CHCl_3) = +322.7 Mp = decomposes. HRMS ESI (m/z) = 324.1171 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}^+$ = 324.1166. ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.82 (d, J = 7.3 Hz, 3H, CHCH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 2.07 (s, 3H, CH_3), 2.91 (s, 1H, OH), 3.23 – 3.09 (m, 1H, CHCH_3), 3.52 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.86 – 4.69 (m, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (CDCl_3) : δ 16.0 (CHCH_3), 17.6 (CH_3), 23.4 (CH_3), 35.5 (CHCH_3), 51.6 (OCH_3), 53.6 (CO_2CH_3), 77.2 (CCO_2CH_3), 87.2 ($\text{CH}_2\text{N}=\text{N}$), 93.0 (CCH_3OH), 108.7 (CCH_3OCH_3), 152.9 (NCO_2), 166.2 (CO_2CH_3).

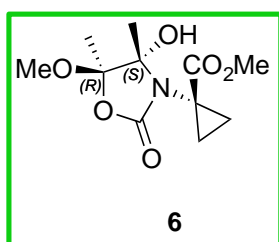
Methyl 2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-methylbut-2-enoate (5).

Pyrolysis was assayed obtaining a mixture of Dhb (*E*)-**2** and (*Z*)-**2** starting from 1-pyrazoline **3** and a unique product starting from 1-pyrazoline **4**, corresponding to Dhv **5** as a white solid.



$[\alpha]_D^{25}$ (*c* 0.60, CHCl₃) = -78.7 Mp: 73 °C. HRMS ESI (*m/z*) = 296.1105 [M+Na]⁺; calcd for C₁₂H₁₉NO₆Na⁺ = 296.1105. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.62 (s, 3H, CH₃), 1.94 (s, 3H, C=CCH₃), 2.26 (s, 3H, C=CCH₃), 3.44 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, CO₂CH₃), 5.11 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.3 (CH₃), 19.1 (CH₃), 22.4 (C=CCH₃), 23.7 (C=CCH₃), 50.7 (OCH₃), 52.8 (CO₂CH₃), 91.3 (CCH₃OH), 108.8 (CCH₃OCH₃), 119.6 (C=C(CH₃)₂), 155.1 (C=C(CH₃)₂), 158.2 (NCO₂), 167.9 (CO₂CH₃).

Methyl 1-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)cyclopropane-1-carboxylate (6).



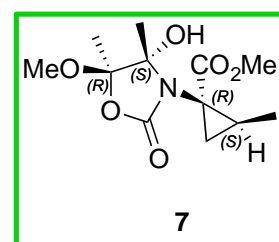
1-Pyrazoline (1.0 equiv) and the corresponding quantity of as sensitizer (benzophenone or acetone, see Tables 4.1 and 4.2) were charged in a pyrex NMR sample tube and dissolved in 0.5-1 mL of CDCl₃. The tube was attached on a 125 W medium-pressure mercury-lamp

and irradiated at room temperature. The reactions were monitored by ¹H NMR and the products ratio was determined by gas chromatography. Solvent was removed and the mixtures chromatographed. Following the mentioned protocol, starting from 1-pyrazoline **3** (13.4 mg, 0.045 mmol) with benzophenone (1.6 mg, 0.008 mmol) as a sensitizer, cyclopropane **6** was synthesized and 9.1 mg (0.035 mmol, 77%) were obtained after chromatographic column purification (hexane/AcOEt 6:4) as a white solid.

$[\alpha]_D^{25}$ (*c* 0.99, CHCl₃) = -98.1 Mp: 173 °C. HRMS ESI (*m/z*) = 282.0950 [M+Na]⁺; calcd for C₁₁H₁₇NO₆Na⁺ = 282.0948. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.41 – 1.51 (m, 5H, CH₃; CH₂), 1.58 (s, 3H, CH₃), 1.60 – 1.70 (m, 2H, CH₂), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, CO₂CH₃), 5.11 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.4 (CH₃), 17.5 (2xCH₂), 19.8 (CH₃), 50.7 (OCH₃), 53.2 (CO₂CH₃), 77.2 (CCH₂CH₂), 91.8 (CCH₃OH), 107.7 (CCH₃OCH₃), 156.3 (NCO₂), 175.3 (CO₂CH₃).

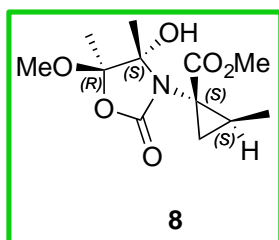
Methyl (1*R*,2*S*)-1-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-methylcyclopropane-1-carboxylate (7).

This compound was obtained pure from the reaction crude, following the same conditions as compound **6** but using different sensitizers (benzophenone or acetone, see Tables **4.1** and **4.2**), by re-crystallization in cold diethyl ether as a white crystalline solid.



$[\alpha]_D^{25}$ (*c* 0.93, CHCl₃) = -44.0 Mp: 144 °C. HRMS ESI (*m/z*) = 296.1110 [M+Na]⁺; calcd for C₁₂H₁₉NO₆Na⁺ = 296.1105. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.11 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CHCH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃), 1.49 – 1.41 (m, 1H, CH₂), 1.45 (s, 3H, CH₃), 1.62 – 1.56 (m, 1H, CH₂), 1.84-1.72 (m, 1H, CHCH₃), 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.58 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.15 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 12.6 (CHCH₃), 15.4 (CH₃), 19.2 (CH₃), 19.2 (CH₂), 23.1 (CHCH₃), 38.0 (CCHCH₂), 50.2 (OCH₃), 52.3 (CO₂CH₃), 90.3 (CCH₃OH), 107.7 (CCH₃OCH₃), 155.3 (NCO₂), 172.2 (CO₂CH₃).

Methyl (1*S*,2*S*)-1-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-methylcyclopropane-1-carboxylate (8**).**



This compound was obtained pure from the reaction crude, following the same conditions as compound **6** but using different sensitizers (benzophenone or acetone, see Tables **4.1** and **4.2**), as a white solid.

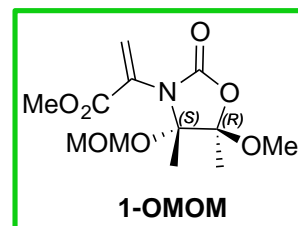
$[\alpha]_D^{25}$ (*c* 1.13, CHCl₃) = -82.7 Mp: 95 °C. HRMS ESI (*m/z*) = 296.1110 [M+Na]⁺; calcd for C₁₂H₁₉NO₆Na⁺ = 296.1105. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.34 (d, 3H, CH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.50 – 1.65 (m, 5H, CH₃; CHCH₂), 1.82 – 2.03 (m, 1H, CHCH₂), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, CO₂CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 12.3 (CH₃), 14.6 (CH₃), 19.2 (CH₃), 23.3 (CH₂), 25.7 (CH), 39.3 (CCHCH₂), 50.7 (OCH₃), 52.7 (CO₂CH₃), 92.1 (COH), 107.6 (COCH₃), 156.3 (NCO₂), 173.1 (CO₂CH₃).

Experiments to discard the role of the tertiary alcohol at the oxazolidin-2-one ring of Dha **1 or Dha ent-**1** as a stereodirecting group in the *S*-Michael addition.**

The tertiary alcohol of Dha **1** was protected with chloromethyl methyl ether (MOMCl) using *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) as a base at reflux of chloroform to give Dha **1-OMOM**, which was subjected to an *S*-Michael addition with PrSH in the presence of DBU at -78 °C.

Methyl 2-((4*S*,5*R*)-5-methoxy-4-(methoxymethoxy)-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)acrylate (1-OMOM).

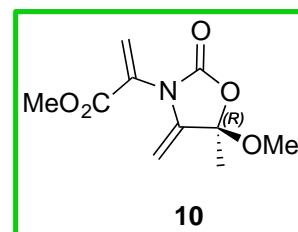
To a solution of compound **1** (202 mg, 0.824 mmol) in 5 mL of anhydrous CHCl₃, *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA, 0.717 mL, 4.12 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere. The solution



was cooled to 0 °C and chloromethyl methyl ether (MOMCl, 0.25 mL, 3.29 mmol) was dropwise added. The reaction mixture was warmed up to reflux and stirred for 60 h under an argon atmosphere. The reaction solution was washed with water and extracted with dichloromethane (2 × 30 mL). The combined organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and evaporated in vacuum to afford **1-OMOM** as a solid (90 mg, 38% yield). The yield and diastereoselectivity obtained (measured by NMR and HPLC) were similar to those observed for Dha **1** in a previous published work.⁵

Methyl (R)-2-(5-methoxy-5-methyl-4-methylene-2-oxooxazolidin-3-yl)acrylate (10).

Acrylate **1** (60 mg, 0.245 mmol) was dissolved in DCM (6 ml) under argon atmosphere and a 1.0 M Et₃OBF₄ solution in DCM (1.2 ml, 1.20 mmol) was added at 0 °C.

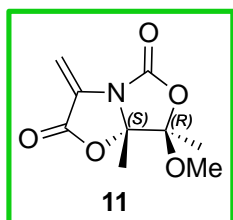


⁵ Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. *M. Org. Lett.* **2012**, *14*, 334.

After stirring for 30 min at this temperature, reaction mixture was diluted with DCM (20 ml) and washed with 0.5 M HCl (5 ml) was added. The aqueous phase was extracted with more DCM (2 x 5 ml) and the combined organic phases were washed with brine (15 ml), dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated. Purification by column chromatography using hexane/ethyl acetate (7:3) afforded compound **13** (38 mg, 0.167 mmol, 68%) as a colourless oil.

$[\alpha]_D^{25}$ (c 1.01, CHCl_3) = +27.8 ^1H NMR (CDCl_3): 1.73 (s, 3H, CH_3), 3.36 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.33 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, $\text{NC}=\text{CH}_2$), 4.38 (d, $J = 3.1$ Hz, $\text{NC}=\text{CH}_2$), 6.01 (s, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CCO}_2\text{Me}$), 6.71 (s, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CCO}_2\text{Me}$). ^{13}C NMR (CDCl_3): 26.3 (CH_3), 51.1 (OCH_3), 53.0 (CO_2CH_3), 85.8 ($\text{NC}=\text{CH}_2$), 106.8 (MeOCMe), 129.7 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CCO}_2\text{Me}$), 131.1 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CCO}_2\text{Me}$), 144.0 ($\text{NC}=\text{CH}_2$), 153.0 (NCO_2), 162.3 (CO_2Me).

(7*S*,7*aR*)-7-methoxy-7,7a-dimethyl-3-methylenedihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (11).



Compound **11** was obtained from methyl acrylate derivative **1** (2.08 g, 8.48 mmol) through a basic hydrolysis. This compound (**1**) was dissolved in THF (30 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Then, $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1.78 mg, 42.41 mmol) was dissolved in H_2O (30 mL) and was introduced in the flask.

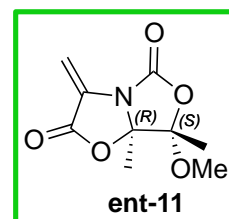
After the mixture was stirred at this temperature for 30 min, a 2 M HCl solution (21.24 mL, 42.47 mmol) was added in order to acidify the mixture. After that, the reaction crude was diluted with diethyl ether and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate.

The combined organic layers were washed with brine and dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was filtered and evaporated to give acid derivative of **1** as a white solid. The crude was dissolved in a schlenk in anhydrous CH_2Cl_2 (70 mL). Then, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (1.78 g, 9.33 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (1.24 g, 10.17 mmol), as coupling agents, were added under an inert atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 6 h and then, a 0.5 M HCl solution (70 mL) was added. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The solution was evaporated and the residue was purified by a silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate, 7:3) to give compound **11** (1.39 g, 6.52 mmol) as a white crystalline solid with a 77% yield.

$[\alpha]_D^{25}$ (1.06, CHCl_3) = 105.3 Mp: 102-106 °C. HRMS (ESI) m/z: 236.0533 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{Na}^+$, 236.0529. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.63 (s, 3H, Me), 1.64 (s, 3H, Me), 3.59 (s, 3H, OMe), 5.84 (s, 1H, CH_2), 5.97 (s, 1H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 17.5 (Me), 21.9 (Me), 52.4 (OMe), 98.5 (C^7a), 109.7 (CH_2), 110.1 (C^7), 130.1 ($\text{C}^2=\text{O}$), 153.2 ($\text{C}^5=\text{O}$), 163.1 ($\text{C}^3=\text{CH}_2$).

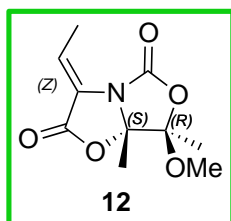
(7R,7aS)-7-Methoxy-7,7a-dimethyl-3-methylenedihydro-5H-oxazolo[4,3-b]oxazole-2,5(3H)-dione (ent-11).

Following the same procedure above described for compound **11** and starting from acrylate **ent-1** (2.08 g, 8.48 mmol), compound **ent-11** (1.35 g, 6.33 mmol) was obtained as a white crystalline compound with a 75% yield.



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃) = -107.4. Mp: 103 – 106 °C. HRMS (ESI) m/z : 236.0531 [M+Na]⁺; calcd for C₉H₁₁NO₅Na⁺, 236.0529. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra are identically to its enantiomer **11**.

(7*R*,7*aS*,*Z*)-3-ethylidene-7-methoxy-7,7*a*-dimethyldihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (12**).**



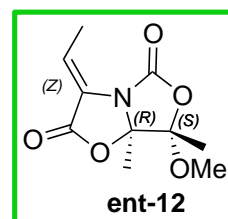
Acrylate compound (**12**) was obtained from compound **2** (300 mg, 1.15 mmol). Compound **2** was dissolved in a mixture of THF/H₂O (6 mL), then, LiOH·H₂O (242 mg, 5.75 mmol) was introduced into the flask. After the mixture was stirred at this temperature for 30 min, 2 M HCl was added in order to acidify

the mixture. After that, the reaction crude was diluted with diethyl ether, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was filtered and evaporated to give acid derivative of **2** as a white solid (278 mg, 1.13 mmol, 98%). This derivative **2** (200 mg, 816 μmol) was dissolved in a Schlenk in anhydrous DCM (5 mL). DCC (185 mg, 898 μmol) and DMAP (10 mg, 816 μmol) as coupling agents were added under inert atmosphere. After the mixture was stirred at room temperature for 6 h, the solution was filtered over celite pad and evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc 7:3) to give compound **12** (80 mg) as a white crystalline solid with a 43% yield.

$[\alpha]_D^{25}$ (1.03, CHCl_3) = -102.8 Mp: room temperature. HRMS (ESI) (m/z): 250.0693 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{Na}^+$, 250.0686. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.57 (s, 3H, Me), 1.65 (s, 3H, Me), 2.13 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, CHCH_3), 3.53 (s, 3H, OMe), 6.71 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CHCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.82 (CHMe), 14.88 (CHMe), 16.61 (Me_A), 16.80(Me_A), 20.79 (Me_B), 21.01(Me_B), 51.56 (OMe), 51.74 (OMe), 99.77(NCO), 108.02(OCO), 125.99(CCH), 129.96 (CHMe), 130.16 (CHMe), 155.36 (CC=O), 163.36 (NC=O).

(7*S*,7*aR*,*Z*)-3-ethylidene-7-methoxy-7,7*a*-dimethyldihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (ent-12).

Following the same procedure above described for compound **12** and starting from acrylate **ent-2** (2.08 g, 8.48 mmol), compound **ent-12** (1.35 g, 6.33 mmol) was obtained as a white crystalline compound with a 47% yield.



$[\alpha]_D^{25}$ (1.03, CHCl_3) = +102.8 Mp: room temperature. HRMS (ESI) (m/z): 250.0695 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{Na}^+$, 250.0686. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra are identically to its pure enantiomer **12**.

Optimization of Michael additions with D-GalNAc- α -SH.

To a solution of α,β -dehydroamino acid derivative **11** as Michel acceptor and the corresponding base in dry THF, a solution of the thiocarbohydrate D-GalNAc- α -SH (**13**) in dry THF was added dropwise (0.2 mL/min) at different temperatures.

After the completed addition, the reaction was followed by TLC chromatography until total conversion of the α,β -dehydroamino acid derivative and an aqueous saturated NH_4Cl solution (same volume as THF) was added. The aqueous phase was extracted twice with Et_2O and the combined organic phases were dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The conversion and the diastereomeric excess were determined by $^1\text{H-NMR}$ experiments. In order to optimize the Michael additions different conditions were tested:

Entry	Acceptor (mmol/M)	GalNAc- α -SH (mmol/M)	Base	Base (mmol)	T ($^\circ\text{C}$)	Time ^a (min)	Yield (%)	d.r. (S:R) ^b
1 ^c	0.900/0.075	1.100/0.100	DBU	1.100	-78	180	98	>95:5
2 ^d	0.117/0.100	0.129/0.020	DBU	0.129	0	120	25	>95:5
3 ^d	0.117/0.100	0.129/0.020	DBU	0.129	25	120	20	>95:5
4	0.073/0.100	0.218/0.020	DBU	0.218	25	5	81	>95:5
5	0.073/0.100	0.218/0.040	TEA	0.218	25	5	96	>95:5
6	0.094/0.100	0.131/0.010	DBU	0.131	25	5	90	>95:5
7	0.094/0.100	0.131/0.010	TEA	0.131	25	5	91	>95:5
8	0.094/0.100	0.113/0.010	DBU	0.113	25	5	96	>95:5
9	0.094/0.100	0.113/0.010	TEA	0.113	25	5	98	>95:5
10	0.094/0.100	0.103/0.010	TEA	0.103	25	5	98	>95:5
11	4.220/0.500	4.640/0.100	TEA	4.640	25	5	99	>95:5

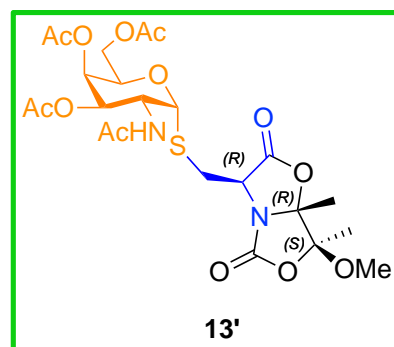
^a Time after the addition was completed. ^b Determined following the methodology described in reference 23 of the paper. ^c The base was added directly, not dropwise.

^d A by-product derived from thiocarbohydate was detected but not characterized.

Taking into account the results observed from this optimization, the entry 11 was used as a general method for the Michael additions. These conditions were also tested with Dha **ent-11** and although the yield was 96% the diastereoselectivity obtained decreased (d.r. = 80:20).

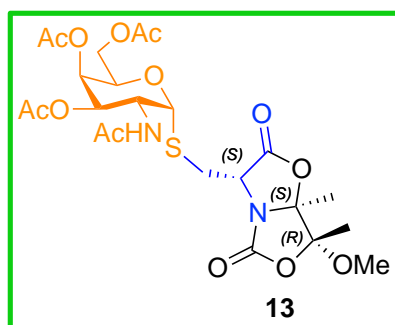
(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((3*R*,7*S*,7*aR*)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol-3-yl)methyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diyl diacetate (13'**).**

Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **11** (900.0 mg, 4.22 mmol), TEA (650 μ L, 4.64 mmol), and D-GalNAc- α -SH (1.69 g, 4.64 mmol) were reacted affording compound **13** as a white solid (2.4 g, 4.16 mmol, 99%) after purification by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).



$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 159.2 Mp: 76 – 78 °C. HRMS (ESI) m/z : 599.1521 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{SNa}^+$ 599.1517. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.63 (s, 3H, Me^{7a}), 1.66 (s, 3H, Me^7), 1.98 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.96 (dd, $J = 14.4, 11.3$ Hz, 1H, CH_2S), 3.15 (dd, $J = 14.4, 3.9$ Hz, 1H, CH_2S), 3.52 (s, 3H, OMe), 4.07 – 4.19 (m, 2H, CH^{6s}), 4.55 (dd, $J = 11.3, 3.9$ Hz, 1H, H^3), 4.65 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H^{5s}), 4.80 (ddd, $J = 11.8, 8.5, 5.3$ Hz 1H, H^{2s}), 5.07 (dd, $J = 11.7, 3.2$ Hz, 1H, H^{3s}), 5.42 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H^{4s}), 5.75 – 5.78 (m, 2H, H^{1s} , NHAc). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.6 (Me^{7a}), 20.7, 20.7, 20.7 ($3 \times \text{COCH}_3$), 22.3 (Me^7), 23.2 (COCH_3), 31.2 (CH_2S), 48.3 (C^{2s}), 51.7 (OMe), 61.9 (C^{6s}), 62.1 (C^3), 67.3 (C^{4s}), 67.7 (C^{5s}), 68.1 (C^{3s}), 85.3 (C^{1s}), 101.6 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 169.8, 170.2, 170.4, 170.5, 171.0 ($\text{C}^2=\text{O}$, $4 \times \text{COCH}_3$).

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((3S,7R,7aS)-7-methoxy-7,7a-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5H-oxazolo[4,3-b]oxazol-3-yl)methyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (13).

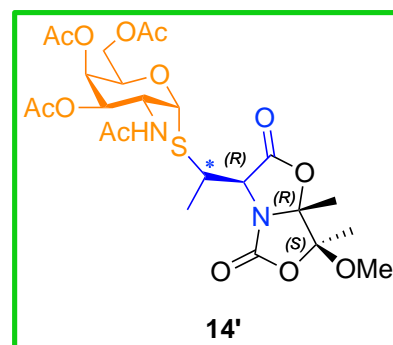


Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (900.0 mg, 4.22 mmol), TEA (650 μL , 4.64 mmol), and D-GalNAc- α -SH (1.69 g, 4.64 mmol) were reacted affording compound **13'** as a white solid (2.35 g, 4.08 mmol, 97%) after purification by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.03, CHCl_3) = 69.8 Mp: 63 – 64 °C. HRMS (ESI) m/z : 599.1520 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{SNa}^+$ 599.1517. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.65 (s, 3H, Me^{7a}), 1.69 (s, 3H, Me^7), 2.02 (d, $J = 2.8$ Hz, 6H, $2 \times \text{COCH}_3$), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 2.18 (s, 3H, COCH_3), 2.90 (dd, $J = 14.0, 10.4$ Hz, 1H, CH_2S), 3.26 (dd, $J = 14.1, 5.3$ Hz, 1H, CH_2S), 3.54 (s, 3H, OMe), 4.14 (ddd, $J = 28.8, 11.4, 6.5$ Hz, 2H, CH_2^{6s}), 4.52 (dd, $J = 10.2, 5.3$ Hz, 1H, H^3), 4.60 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H^{5s}), 4.83 – 4.90 (m, 1H, H^{2s}), 5.09 (dd, $J = 12.0, 3.2$ Hz, 1H, H^{3s}), 5.43 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H^{4s}), 5.70 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H^{1s}), 5.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, NHAc). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 20.7, 20.7, 20.8 ($3 \times \text{COCH}_3$), 22.4 (Me^7), 23.3 (COCH_3), 32.0 (CH_2S), 48.3 (C^{2s}), 51.8 (OMe), 60.1 (C^{6s}), 61.9 (C^3), 67.3 (C^{4s}), 68.0 (C^{5s}), 68.4 (C^{3s}), 85.1 (C^{1s}), 101.5 (C^{7a}), 108.5 (C^7), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 169.9, 170.2, 170.4, 170.6, 171.0 ($\text{C}^2=\text{O}$, $4 \times \text{COCH}_3$).

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((3*R*,7*S*,7*aR*)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol-3-yl)methyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (14').

Bicyclic acrylate **12** (30 mg, 0.132 mmol) was dissolved in THF (1 ml) and triethylamine (TEA, 22 ml, 0.158 mmol) is added. A THF solution (0.036 M) of GalNAc-SH (4 ml, 0.144 mmol) is added dropwise and the mixture is stirred at room temperature for 24 h. After that time, more GalNAc-SH solution (1 ml, 0.036 mmol)



and TEA (22 ml, 0.158 mmol) are added and the mixture is stirred at room temperature for other 20 h. Then, the mixture is diluted with diethylether (10 ml) and a saturated aqueous solution of NH_4Cl (15 ml) is added.

The combined organic phases are washed with brine (15 ml), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. Purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 95:5) afforded the corresponding adduct (24 mg, 0.041 mmol, 32%) as white foam.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 0.8. HRMS (ESI) m/z : 613,1678 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_{14}\text{SNa}^+$ 613,1674. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.61 (m, 6H, Me^{7a} , Me), 1.70 (s, 3H, Me^7), 1.95 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 3.30 (dd, $J = 9.8, 7.1$ Hz, 1H, CHS), 3.53 (s, 3H, OMe), 4.11 (dt, $J = 18.4, 8.5$ Hz, 2H, H^{6s}), 4.29 (m, 1H, H^3), 4.61 (m, 1H, H^{5s}), 4.78 (m, H^{2s}), 5.01 (dd, $J = 11.8, 3.2$, 1H, H^{3s}), 5.40 (m, 1H, H^{4s}), 5.63 (d, $J = 8.7$, 1H, NHAc), 5.75 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H^{1s}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.9 (Me^{7a}), 20.6, 20.6, 20.7, 20.7 (4x COCH_3), 22.1 (Me^7), 23.1 (Me), 41.0 (CHS), 48.3 (C^{2s}), 51.9 (OMe), 62.0 (C^{6s}), 66.4 (C^3), 67.3 (C^{4s}), 67.9 (C^{5s}), 68.1 (C^{3s}), 85.5 (C^{1s}), 100.7 (C^{7a}), 108.7 (C^7), 158.7 ($\text{C}^5=\text{O}$), 168.9, 170.2, 170.3, 170.9 ($\text{C}^2=\text{O}$, 4x COCH_3).

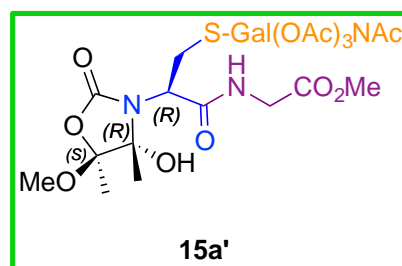
General method for aminolysis with amino ester hydrochlorides.

In a typical reaction, the corresponding bicyclic lactone (0.1 mmol), the corresponding amino ester hydrochloride (0.15 mmol) and sodium 2-ethylhexanoate (0.25 mmol) were charged in an oven dried Schlenk flask and subjected to vacuum/Ar cycle (x 5) to remove possible moisture. Under Ar atmosphere, dry THF (50 mL/mmol) was added into the flask by a syringe. The solution was stirred at room temperature for 24 h. After that time, brine and ethyl acetate were added to the solution. Layers were separated and aqueous layer was back extracted with more ethyl acetate.

Combined organic layers were collected, dried (over Na_2SO_4) and evaporated. The residues were purified by column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2) yielding the corresponding derivatives.

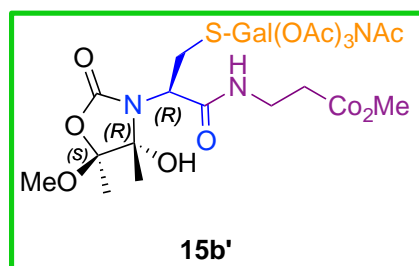
(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*R*)-2-((4*R*,5*S*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-((2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diyl diacetate (15a')

Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (100 mg, 0.173 mmol) and H-Gly-OMe·HCl (32.66 mg, 0.260 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (72.06 mg, 0.434 mmol) as a base, compound **15a** was obtained as a white solid after purification (87 mg, 0.130 mmol, 75%).



$[\alpha]_D^{25}$ (0.75, CHCl_3) = 56.4 Mp: 59–61 °C. HRMS (ESI) m/z : 688.2002 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{SNa}^+$ 688.1994. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.54 (s, 3H, Me^4), 1.60 (s, 3H, Me^5), 1.99 (s, 3H, COCH_3), 2.02 (s, 3H, COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 3.37 (dd, $J = 10.0, 7.5$ Hz, 2H, CH_2S), 3.46 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 4.04 (dd, $J = 5.4, 1.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_{2\alpha\text{-Gly}}$), 4.15 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{6\text{s}}$), 4.32 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 4.50–4.54 (m, 1H, $\text{H}^{5\text{s}}$), 4.69–4.75 (m, 1H, $\text{H}^{2\text{s}}$), 5.07 (dd, $J = 11.7, 3.2$ Hz, 1H, $\text{H}^{3\text{s}}$), 5.38–5.39 (m, 1H, $\text{H}^{4\text{s}}$), 5.69 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, $\text{H}^{1\text{s}}$), 5.77 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NHAc), 7.20 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, NH_{Gly}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.4 (Me^5), 20.1 (Me^4), 20.7, 20.7, 20.8 (3x COCH_3), 23.3 (COCH_3), 30.9 (CH_2S), 41.5 ($\text{CH}_{2\alpha\text{-Gly}}$), 48.8 ($\text{C}^{2\text{s}}$), 51.0 (OMe), 52.6 (OMe), 57.5 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 61.7 ($\text{C}^{6\text{s}}$), 67.2, 67.8 ($\text{C}^{4\text{s}}, \text{C}^{5\text{s}}$), 68.4 ($\text{C}^{3\text{s}}$), 85.4 ($\text{C}^{1\text{s}}$), 90.9 (C^4), 108.2 (C^5), 155.9 ($\text{C}^2=\text{O}$), 169.7, 170.1, 170.2, 170.7, 170.8, 171.1, 171.2 ($\text{C}_{\text{Cys}}=\text{O}, \text{CO}_2\text{Me}, 4\text{xCOCH}_3$).

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((R)-2-((4R,5S)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-((3-methoxy-3-oxopropyl)amino)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (15b').

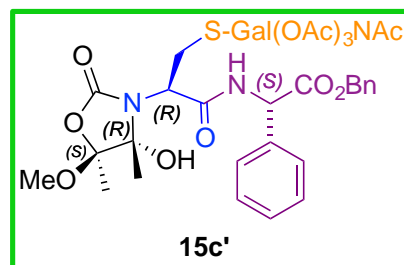


Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (100 mg, 0.173 mmol) and $\text{H}-\beta\text{-Ala-OMe}\cdot\text{HCl}$ (36.31 mg, 0.260 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (72.06 mg, 0.434 mmol) as a base, compound **15b** was obtained as a white solid after purification (90 mg, 0.132 mmol, 76%).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃) = 84.4 Mp: 65 – 67 °C. HRMS (ESI) m/z: 702.2177 [M+Na]⁺; calcd for C₂₇H₄₁N₃O₁₅SNa⁺ 702.2151. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.50 (s, 3H, Me⁴), 1.58 (s, 3H, Me⁵), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.55 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH_{2α-β-Ala}), 3.32 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_{2S}), 3.46 (s, 3H, OMe) 3.50 – 3.55 (m, 2H, CH_{2β-Ala}), 3.70 (s, 3H, OMe), 4.15 (dd, *J* = 4.3, 6.2 Hz, 2H, CH₂^{6s}), 4.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH_{α-Cys}), 4.50 (td, *J* = 6.3, 11.4 Hz, 1H, H^{5s}), 4.72 (ddd, *J* = 5.2, 8.2, 11.7 Hz, 1H, H^{2s}), 4.78 (s, 1H, OH), 5.03 (dd, *J* = 3.0, 11.6 Hz, 1H, H^{3s}), 5.39 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H^{4s}), 5.66 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H^{1s}), 5.97 (d, *J* = 8.22, 1H, NHAc), 7.21 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH_{β-Ala}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.4 (Me⁵), 20.2 (Me⁴), 20.7 (3xCOCH₃), 23.2 (COCH₃), 31.0 (CH_{2S}), 33.5 (CH_{2α-β-Ala}), 35.5 (CH_{2β-Ala}), 48.7 (C^{2s}), 50.9 (OMe), 51.9 (OMe), 57.8 (CH_{α-Cys}), 61.8 (C^{6s}), 67.3 (C^{4s}), 67.9 (C^{5s}), 68.5 (C^{3s}), 85.4 (C^{1s}), 90.9 (C⁴), 108.2 (C⁵), 155.8 (C²=O), 169.7, 170.2, 170.8, 170.9, 171.0, 172.5. (C_{Cys}=O, CO₂Me, 4xCOCH₃)

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*R*)-3-(((*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-(((4*R*,5*S*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diyl diacetate (15c').

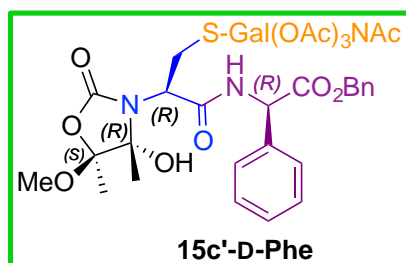
Procedure A: Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (100 mg, 0.173 mmol) and H-Phe-OBn·HCl (75.91 mg, 0.260 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (72.06 mg, 0.434 mmol) as a base, compound **15c** was obtained as a white foam after purification (112 mg, 0.134 mmol, 78%).



Procedure B: Compound **15c** could also be obtained by an optimal Michael addition using compound **17c** as Michael acceptor. Following the optimal conditions, derivative **17c** (10.0 mg, 0.021 mmol), TEA (3.3 μ L, 0.024 mmol), and D-GalNAc- α -SH (8.5 mg, 0.024 mmol) were reacted until total conversion of dehydropeptide (TLC, 24 h) affording compound **15c** as a white solid (16.9 mg, 0.02 mmol, 97%), after purification by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃) = 108.0 Mp: 87-93 °C. HRMS (ESI) m/z: 854.2769 [M+Na]⁺; calcd for C₃₉H₄₉N₃O₁₅SNa⁺ 854.2777. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.43 (s, 3H, Me⁴), 1.54 (s, 3H, Me⁵), 1.96 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 3.09 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH_{2 β -Phe}), 3.19 (s, 3H, OMe), 3.32 – 3.48 (m, 2H, CH₂S), 4.08 – 4.10 (m, 1H, CH _{α -Cys}), 4.13 (d, J = 6.4 Hz, 2H, CH_{2^{6s}}), 4.39 (s, 1H, OH), 4.49 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H^{5s}), 4.71 (ddd, J = 5.2, 8.2, 11.6 Hz, 1H, H^{2s}), 4.91 (dt, J = 5.8, 8.1 Hz, 1H, CH _{α -Phe}), 5.01 (dd, J = 3.2, 11.6 Hz, 1H, H^{3s}), 5.08 – 5.17 (m, 2H, OCH₂Ph), 5.37 (dd, J = 1.4, 3.3 Hz, 1H, H^{4s}), 5.63 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H^{1s}), 5.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NHAc), 7.04 – 7.37 (m, 11H, arom, NH_{Phe}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.2 (Me⁵), 19.6 (Me⁴), 20.7, 20.7, 20.8, 23.2 (4xCOCH₃), 30.7 (CH₂S), 37.9 (CH_{2 β -Phe}), 48.6 (C^{2s}), 50.7 (OMe), 53.6 (OMe), 57.5 (CH _{α -Cys}), 61.7 (C^{6s}), 67.2 (CH₂Ph), 67.3, 67.8 (C^{4s}, C^{5s}), 68.5 (C^{3s}), 85.6 (C^{1s}), 90.7 (C⁴), 108.2 (C⁵), 127.1 (C_{arom}), 128.6 (9xC_{arom}), 129.6 (CH _{α -Phe}), 134.9, 135.2 (2xC^{ipso}_{arom}), 155.3 (C^{2=O}), 169.0, 170.3, 170.7, 170.8, 170.9, 171.1 (C_{Cys=O}, CO₂Bn, 4xCOCH₃).

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*R*)-3-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-(((4*R*,5*S*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diyl diacetate (15*c*'-D-Phe).



Procedure A: Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **5** (100 mg, 0.173 mmol) and H-D-Phe-OBn·HCl (75.9 mg, 0.260 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate

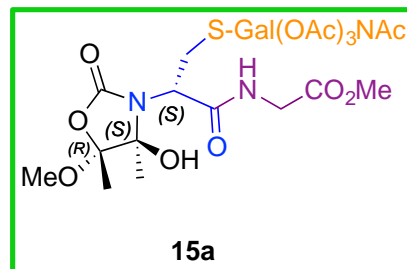
(72.1 mg, 0.434 mmol) as a base, compound **7c-D-Phe** was obtained as a white foam after purification (89 mg, 0.107 mmol, 62%) by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).

Procedure B: Compound **7c-D-Phe** could also be obtained by an optimal Michael addition using compound **9c-D-Phe** as Michael acceptor. Following the optimal conditions, derivative **9c-D-Phe** (15.2 mg, 0.032 mmol), TEA (5 μL, 0.036 mmol), and D-GalNAc-α-SH (13.0 mg, 0.036 mmol) were reacted affording compound **7c-D-Phe** as a colourless oil (23.5 mg, 0.028 mmol, 87%) after purification by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 104.8 HRMS (ESI) m/z : 854.2783 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{SNa}^+$ 854.2777. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.36 (s, 3H, Me^4), 1.56 (s, 3H, Me^5), 1.98 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 2.17 (s, 3H, COCH_3), 3.04 (dd, $J = 7.3, 14.0$ Hz, 1H, CH_2S), 3.16 – 3.29 (m, 3H, CH_2S , $\text{CH}_{2\beta\text{-Phe}}$), 3.39 (s, 3H, OMe), 4.10 – 4.20 (m, 3H, CH_2^{6s} , $\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 4.49 (td, $J = 1.4, 6.3$ Hz, 1H, H^{5s}), 4.73 (ddd, $J = 5.1, 8.4, 11.7$ Hz, 1H, H^{2s}), 4.85 (td, $J = 5.5, 7.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Phe}}$), 5.00 (dd, $J = 3.2, 11.7$ Hz, 1H, H^{3s}), 5.11 – 5.22 (m, 2H, CH_2Bn), 5.39 (dd, $J = 1.3, 3.3$ Hz, 1H, H^{4s}), 5.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H^{1s}), 6.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NHAc), 7.04 – 7.07 (m, 2H, arom), 7.23 – 7.25 (m, 3H, armo, NH_{Phe}), 7.31 – 7.39 (m, 7H, arom). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.6 (Me^5), 19.8 (Me^4), 20.7, 20.7, 20.7, 23.2 (4x COCH_3), 31.1 ($\text{CH}_{2\beta\text{-Phe}}$), 37.5 (CH_2S), 48.5 (C^{2s}), 50.9 (OMe), 53.8 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Phe}}$), 57.4 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 61.8 (C^{6s}), 67.2 (H^{4s}), 67.5 (CH_2Bn), 67.9 (C^{5s}), 68.5 (C^{3s}), 85.6 (C^{1s}), 90.9 (C^4), 108.3 (C^5), 127.1 (C_{arom}), 128.6, 128.6, 128.6, 128.6 (C_{arom}), 129.2 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Phe}}$), 135.0, 135.6 ($\text{C}^{\text{ipso}}_{\text{arom}}$), 155.9 ($\text{C}^2=\text{O}$), 169.2, 170.3, 170.8, 171.0, 171.2 ($\text{C}_{\text{Cys}}=\text{O}$, CO_2Bn , 4x COCH_3).

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*S*)-2-(((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-((2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diyl diacetate (15a).

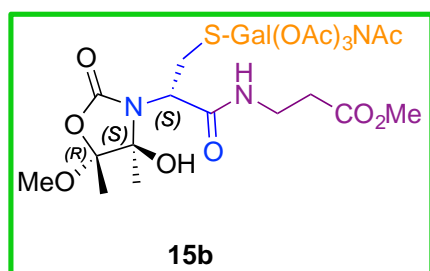
Procedure A: Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (50 mg, 0.087 mmol) and H-Gly-OMe-HCl (16.33 mg, 0.130 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (36.03 mg, 0.217 mmol) as a base, compound **15a** was obtained as a white solid after purification (49 mg, 0.073 mmol, 84%).



Procedure B: Compound **15a** could also be obtained by an optimal Michael addition using compound **17a** as Michael acceptor. Following the optimal conditions, derivative **17a** (30.0 mg, 0.099 mmol), TEA (15.1 μ L, 0.109 mmol), and GalNAc- α -SH (39.7 mg, 0.109 mmol) were reacted affording compound **15a'** as a white solid (51.0 g, 0.077 mmol, 77%) after purification by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 70.6 Mp: 75 – 78 °C. HRMS (ESI) m/z : 688.2006 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{SNa}^+$ 688.1994. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.51 (s, 3H, Me^4), 1.59 (s, 3H, Me^5), 1.97 (s, 3H, COCH_3), 2.00 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 3.30 (dd, $J = 14.1, 9.3$ Hz, 1H, CH_2S), 3.43 – 3.52 (m, 4H, OMe, CH_2S), 3.75 (s, 3H, OMe), 4.01 – 4.07 (m, 2H, $\text{CH}_{2\alpha\text{-Gly}}$), 4.17 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{6\text{s}}$), 4.26 – 4.31 (m, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 4.56 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, $\text{H}^{5\text{s}}$), 4.71 (s, 1H, $\text{H}^{2\text{s}}$), 5.07 (dd, $J = 11.6, 3.1$ Hz, 1H $\text{H}^{3\text{s}}$), 5.40 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, $\text{H}^{4\text{s}}$), 5.74 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, $\text{H}^{1\text{s}}$), 6.07 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NHAc), 7.27 (s, 1H, NH_{Gly}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.7 (Me^5), 20.1 (Me^4), 20.8, 20.8, 20.8 (3x COCH_3), 23.3 (COCH_3), 29.5 (CH_2S), 41.6 ($\text{CH}_{2\alpha\text{-Gly}}$), 48.7 ($\text{C}^{2\text{s}}$), 51.1 (OMe), 52.6 (OMe), 55.5 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 61.9 ($\text{C}^{6\text{s}}$), 67.3 – 67.6 ($\text{C}^{4\text{s}}, \text{C}^{5\text{s}}$), 68.6 ($\text{C}^{3\text{s}}$), 83.4 ($\text{C}^{1\text{s}}$), 91.0 (C^4), 108.5 (C^5), 155.8 ($\text{C}^2=\text{O}$), 169.8, 170.2, 170.4, 170.9, 171.2, 171.2 ($\text{C}_{\text{Cys}}=\text{O}, \text{CO}_2\text{Me}, 4\text{xCOCH}_3$).

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((S)-2-((4S,5R)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-((3-methoxy-3-oxopropyl)amino)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (15b).



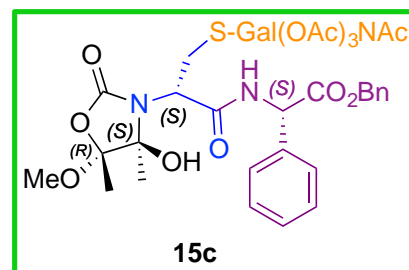
Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (50 mg, 0.087 mmol) and $\text{H}-\beta\text{-Ala-OMe}\cdot\text{HCl}$ (18.16 mg, 0.130 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (36.03 mg, 0.217 mmol) as a base, compound **15b** was

obtained as a white solid after purification (28 mg, 0.042 mmol, 48%).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃) = 71.8 Mp: 81-83 °C. HRMS (ESI) m/z : 702.2180 [M+Na]⁺; calcd for C₂₇H₄₁N₃O₁₅SNa⁺ 702.2151. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.47 (s, 3H, Me⁴), 1.58 (s, 3H, Me⁵), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.54 (t, 2H, CH_{2 α - β -Ala}), 3.27 (dd, J = 14.0, 9.1 Hz, 1H, CH₂S), 3.39 – 3.55 (m, 7H, OMe, CH₂S, CH _{α -Cys}, CH_{2 β - β -Ala}), 3.69 (s, 3H, OMe), 4.17 (d, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂^{6s}), 4.56 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H^{5s}), 4.66 – 4.78 (m, 2H, H^{2s}, OH), 5.06 (dd, J = 11.7, 3.0 Hz, 1H, H^{3s}), 5.40 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{4s}), 5.72 (d, J = 5.31 Hz, 1H, H^{1s}), 6.17 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHAc), 7.17 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH _{β -Ala}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.6 (Me⁵), 20.1 (Me⁴), 20.8 (3xCOCH₃), 23.2 (COCH₃), 23.2 (CH₂S), 33.7, 35.5 (CH_{2 β - β -Ala}, CH_{2 α - β -Ala}), 48.6 (C^{2s}), 51.0 (OMe), 51.9 (OMe), 55.8 (CH _{α -Cys}), 61.9 (C^{6s}), 67.2, 67.6 (C^{4s}, C^{5s}), 68.5 (C^{3s}), 83.5 (C^{1s}), 90.8 (C⁴), 108.3 (C⁵), 155.6 (C²=O), 169.6, 170.3, 170.9, 171.1, 171.2, 172.5. (C_{Cys}=O, CO₂Me, 4xCOCH₃).

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((S)-3-(((S)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-((4S,5R)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (15c).

Procedure A: Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (50 mg, 0.087 mmol) and H-Phe-OBn·HCl (37.95 mg, 0.130 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (36.03 mg, 0.217 mmol) as a base, compound **15c** was obtained as a white foam after purification (50 mg, 0.060 mmol, 69%).



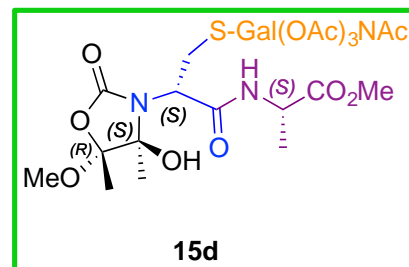
Procedure B: Compound **15c** could also be obtained by an optimal Michael addition using compound **17c** as Michael acceptor.

Following the optimal conditions, derivative **9c** (37.0 mg, 0.789 mmol), TEA (12.2 μ L, 0.089 mmol), and D-GalNAc- α -SH (31.5 mg, 0.089 mmol) were reacted affording compound **15c'** as a white solid (8.69 g, 4.08 mmol, 97%) after purification by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.01, CHCl₃) = 85.0 HRMS (ESI) *m/z*: 854.2761 [M+Na]⁺; calcd for C₃₉H₄₉N₃O₁₅SNa⁺ 854.2777. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.29 (s, 3H, Me⁴), 1.54 (s, 3H, Me⁵), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 3.03 (dd, *J* = 7.2, 14.1 Hz, 1H, CH_{2 β -Phe}), 3.15 – 3.29 (m, 2H, CH₂S, CH_{2 β -Phe}), 3.31 – 3.39 (m, 4H, OMe, CH₂S), 4.13 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂^{6s}), 4.11 – 4.14 (m, 1H, CH _{α -Cys}), 4.45 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H^{5s}), 4.65 – 4.72 (m, 1H, H^{2s}), 4.86 (dd, *J* = 7.2, 13.2 Hz, 1H, CH _{α -Phe}), 5.04 (dd, *J* = 3.2, 11.6 Hz, 1H, H^{3s}), 5.11 (d, *J* = 12.1, 1H CH₂Ph), 5.17 (d, *J* = 12.1, 1H, CH₂Ph), 5.30 (s, 1H, OH), 5.35 (d, *J* = 2.68 Hz, 1H, H^{4s}), 5.68 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H^{1s}), 5.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NHAc), 7.00 – 7.40 (m, 11H, arom, NH_{Phe}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.6 (Me⁵), 19.9 (Me⁴), 20.8, 20.8, 20.9, 23.3 (4xCOCH₃), 29.8 (CH₂S), 37.6 (CH_{2 β -Phe}), 48.8 (C^{2s}), 51.0 (OMe), 53.7 (OMe), 55.5 (CH _{α -Cys}), 62.0 (C^{6s}), 67.3 (CH₂Ph), 67.6, 67.7 (C^{4s}, C^{5s}), 68.5 (C^{3s}), 83.3 (C^{1s}), 90.7 (C⁴), 108.3 (C⁵), 127.3 (C_{arom}), 128.7, 128.8 (9xC_{arom}), 129.2 (CH _{α -Phe}), 135.1, 135.7 (2xC^{ipso}_{arom}), 155.5 (C²=O), 169.2, 170.3, 170.9, 171.1, 171.3 (C_{Cys}=O, CO₂Bn, 4xCOCH₃).

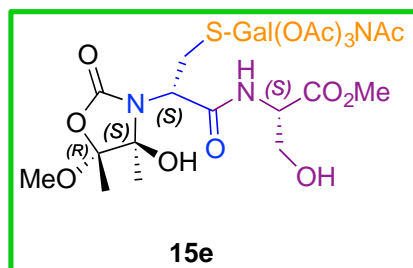
(2R,3R,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((2S)-2-((4S,5R)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-((1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (15d).

Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (50 mg, 0.087 mmol) and H-Ala-OMe-HCl (18.16 mg, 0.130 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (36.03 mg, 0.217 mmol) as a base, compound **15d** was obtained as a white foam after purification (39 mg, 0.057 mmol, 66%).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 69.2 HRMS (ESI) m/z : 702.2153 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{SNa}^+$ 702.2151. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1.49 (s, 3H, Me^4), 1.58 (s, 3H, Me^5), 1.97 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 3.18 – 3.28 (m, 1H, CH_2S), 3.44 – 3.32 (m, 1H, CH_2S), 3.46 (s, 3H, OMe) 3.75 (s, 3H, OMe), 4.16 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{6\text{s}}$), 4.34 (dd, $J = 8.6, 6.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 4.48 – 4.55 (m, 2H, CHMe , $\text{H}^{5\text{s}}$), 4.66 – 4.77 (m, 1H, $\text{H}^{2\text{s}}$), 4.85 (s, 1H, OH), 5.06 (dd, $J = 11.6, 3.2$ Hz, 1H, $\text{H}^{3\text{s}}$), 5.39 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\text{H}^{4\text{s}}$), 5.71 (s, 1H, $\text{H}^{1\text{s}}$), 5.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NHAc), 7.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NH_{Ala}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.5 (Me^5), 17.6 ($\text{CH}_3\text{-Ala}$), 20.0 (Me^4), 20.8, 20.8, 20.9, 23.3 (4x COCH_3), 29.8 (CH_2S), 48.7, 48.7 (C^2 , $\text{CH}_{\alpha\text{-Ala}}$), 51.0 (OMe), 52.8 (OMe), 55.5 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 61.8 ($\text{C}^{6\text{s}}$), 67.3, 67.6 ($\text{C}^{4\text{s}}$, $\text{C}^{5\text{s}}$), 68.6 ($\text{C}^{3\text{s}}$), 83.8 ($\text{C}^{1\text{s}}$), 90.8 (C^4), 108.3 (C^5), 155.9 ($\text{C}^2=\text{O}$), 168.9, 170.35, 170.9, 171.1, 171.2, 173.6 ($\text{C}_{\text{Cys}}=\text{O}$, CO_2Me , 4x COCH_3).

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((2*S*)-3-((3-hydroxy-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-3-oxopropyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diyl diacetate (15e).



Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **13** (50 mg, 0.087 mmol) and H-Ser-OMe-HCl (20.24 mg, 0.130 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (36.03 mg, 0.217 mmol) as a base, compound **15d** was obtained

as a white foam after purification (45 mg, 0.065 mmol, 76%).

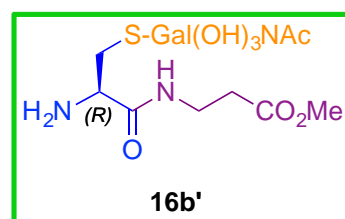
$[\alpha]_D^{25}$ (1.03, CHCl_3) = 73.8 HRMS (ESI) m/z : 718.2089 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{SNa}^+$ 718.2100. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.53 (s, 3H, Me^4), 1.58 (s, 3H, Me^5), 1.98 (s, 3H, COCH_3), 2.00 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 3.19 (dd, $J = 14.0, 8.4$ Hz, 1H, CH_2S), 3.44 (s, 4H, CH_2S , OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.91 – 4.03 (m, 2H, CH_2OH), 4.11 – 4.24 (m, 2H, CH_2^{6s}), 4.48 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 4.55 – 4.63 (m, 2H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Ser}}$, H^{5s}), 4.67 – 4.77 (m, 1H, H^{2s}), 5.04 (dd, $J = 11.7, 3.2$ Hz, 1H, H^{3s}), 5.14 (s, 1H, OH_{Ser}), 5.39 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H^{4s}), 5.71 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H^{1s}), 6.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NHAc), 7.60 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH_{Ser}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.5 (Me^5), 20.0 (Me^4), 20.8, 20.8, 20.8, 23.3 (4x COCH_3), 30.4 (CH_2S), 48.5, (C^{2s}), 50.9 (OMe), 53.0 (OMe), 53.6 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Ser}}$), 55.6 ($\text{CH}_{\alpha\text{-Cys}}$), 61.8 (C^{6s}), 62.4 (CH_2OH), 67.2, 67.5 (C^{4s} , C^{5s}), 68.6 (C^{3s}), 84.2 (C^{1s}), 91.0 (C^4), 108.4 (C^5), 156.3 ($\text{C}^2=\text{O}$), 169.4, 170.4, 171.1, 171.1, 171.2, 171.5 ($\text{C}_{\text{Cys}}=\text{O}$, CO_2Me , 4x COCH_3).

General method for acid hydrolysis in order to obtain S-glycopeptides.

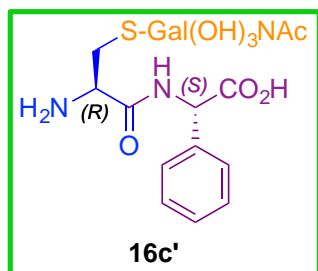
In a typical reaction, the corresponding protected S-glycopeptide (0.1 mmol) was treated with 4 M HCl aqueous solution (10 mL). The mixture was stirred at 40 °C during 16 h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude was purified by semi-preparative HPLC yielding the corresponding S-glycodipeptides.

D-Cys(α -D-GalNAc)- β -Ala (16b').

Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from **15b'** (40 mg, 0.059 mmol) and adding a 4 M HCl aqueous solution (5.9 mL), compound **16b'** was obtained as a colorless oil after purification (19 mg, 0.048 mmol, 82%).

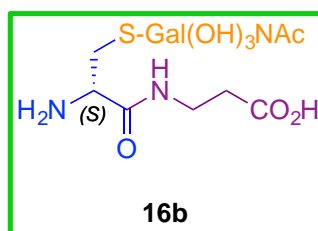


HRMS (ESI) m/z : 418.1247 $[M+Na]^+$; calcd for $C_{26}H_{39}N_3O_{15}SNa^+$ 418.1260. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 1.96 (s, 3H, OCH_3), 2.57 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $CH_{2\beta-\beta-Ala}$), 3.03 – 3.18 (m, 2H, CH_2S), 3.35 – 3.53 (m, 2H, $CH_{2\alpha-\beta-Ala}$), 3.72–3.76 (m, 3H, H^{3s} , CH_2^{6s}), 3.92 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H^{5s}), 4.16 – 4.21 (m, 2H, H^{4s} , $CH_{\alpha-Cys}$), 4.29 (dd, $J = 5.5, 11.5$ Hz, 1H, H^{2s}), 5.49 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H^{1s}). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 21.9 ($COCH_3$), 31.9 ($CH_{2\beta-\beta-Ala}$), 33.2 (CH_2S), 35.3 ($CH_{2\alpha-\beta-Ala}$), 49.9 (C^{2s}), 52.6 ($CH_{\alpha-Cys}$), 61.2 (C^{6s}), 67.3 (C^{3s}), 68.3 (C^{5s}), 72.3 (C^{4s}), 85.1 (C^{1s}), 167.7, 174.7, 175.8 ($3 \times C=O$).

L-Cys(α -D-GalNAc)-Phe (16c').

Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from **15c'** (60 mg, 0.072 mmol) and adding a 4 M HCl aqueous solution (7.2 mL), compound **16c'** was obtained as a colorless oil after purification (20 mg, 0.042 mmol, 59%).

HRMS (ESI) m/z : 494.1566 $[M+Na]^+$; calcd for $C_{20}H_{29}N_3O_8SNa^+$ 494.1573. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 1.94 (s, 3H, OCH_3), 2.72 – 2.78 (m, 1H, CH_2S), 2.93–3.01 (m, 2H, CH_2S , $CH_{2\beta-Phe}$), 3.36 (dd, $J = 4.6, 15.2$ Hz, 1H, $CH_{2\beta-Phe}$), 3.43 (dd, $J = 3.1, 11.5$ Hz, 1H, H^{3s}), 3.50 – 3.55 (m, 2H, CH_2^{6s} , H^{5s}), 3.63 – 3.69 (m, 2H, CH_2^{6s} , H^{4s}), 4.08 (dd, $J = 5.0, 8.2$ Hz, 1H, $CH_{\alpha-Cys}$), 4.20 (dd, $J = 5.6, 11.5$ Hz, 1H, H^{2s}), 4.88 (dd, $J = 4.5, 11.7$ Hz, 1H, $CH_{\alpha-Phe}$), 5.42 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H^{1s}), 7.24 – 7.36 (m, 5H, arom). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 21.8 ($COCH_3$), 32.7 (CH_2S), 36.4 ($CH_{2\beta-Phe}$), 49.9 (C^{2s}), 61.4 (C^{6s}), 67.2 (C^{3s}), 68.2 (C^{4s}), 53.0 ($CH_{\alpha-Cys}$), 53.8 ($CH_{2\alpha-\beta-Ala}$), 67.0 (C^{5s}), 86.9 (C^{1s}), 126.9, 128.6, 128.8 ($5 \times C_{arom}$), 168.1, 174.4, 176.8 ($3 \times C=O$).

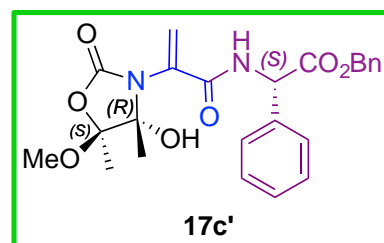
D-Cys(α -D-GalNAc)- β -Ala (16b).

Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from **15b** (40 mg, 0.059 mmol) and adding a 4 M HCl aqueous solution (5.9 mL), compound **16b** was obtained as a colorless oil after purification (19 mg, 0.048 mmol, 82%).

HRMS (ESI) m/z : 418.1247 $[M+Na]^+$; calcd for $C_{26}H_{39}N_3O_{15}SNa^+$ 418.1260. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 1.95 (s, 3H, OCH_3), 2.58 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $CH_{2\beta-\beta-Ala}$), 2.93 – 3.14 (m, 2H, CH_2S), 3.35 – 3.55 (m, 2H, $CH_{2\alpha-\beta-Ala}$), 3.72 – 3.77 (m, 3H, H^{3s} , CH_2^{6s}), 3.91 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H^{5s}), 4.07 (t, $J = 7.0$ Hz 1H, $CH_{\alpha-Cys}$), 4.17 (dd, $J = 3.5, 8.6$ Hz, 1H, H^{4s}), 4.28 (dd, $J = 5.6, 11.5$ Hz, 1H, H^{2s}), 5.52 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H^{1s}). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 21.9 ($COCH_3$), 31.6 ($CH_{2\beta-\beta-Ala}$), 33.2 (CH_2S), 35.4 ($CH_{2\alpha-\beta-Ala}$), 50.0 (C^{2s}), 52.9 ($CH_{\alpha-Cys}$), 61.4 (C^{6s}), 67.4 (C^{3s}), 68.4 (C^{5s}), 72.1 (C^{4s}), 85.1 (C^{1s}), 168.0, 174.7, 175.8 ($3 \times C=O$).

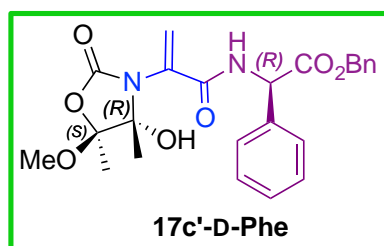
Benzyl (2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)acryloyl)-L-phenylalaninate (17c').

Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **ent-11** (23 mg, 0.107 mmol) and H-L-Phe-OBn·HCl (47.01 mg, 0.161 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (44.63 mg, 0.269 mmol) as base, compound **17c'** was obtained as a colorless oil after purification (22 mg, 0.047 mmol, 44%).



$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 75.6 HRMS (ESI) m/z : 491.1811 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}^+$ = 491.1789. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.36 (s, 3H, Me), 1.61 (s, 3H, Me), 3.17 – 3.19 (m, 2H, $\text{CH}_{2\beta\text{-Phe}}$), 3.35 (s, 3H, OMe), 4.96 (dt, J = 5.3, 8.0 Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Phe}}$), 5.11 – 5.22 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 5.29 (s, 1H, OH), 5.72 (s, 1H, = CH_2), 6.02 (s, 1H, = CH_2), 6.78 (d, J = 8.0 Hz, NH_{Phe}), 7.02 – 7.05 (m, 2H, Ar), 7.21 – 7.38 (m, 9H, Ar). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.4 (Me), 19.9 (Me), 37.5 ($\text{CH}_{2\text{Phe}}$), 50.8 (OCH₃), 53.8 (CH_{Phe}), 67.6 ($\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 90.9 (COH), 109.1 (COCH₃), 122.5 (=CH₂), 127.2 (CH_{Ar}), 128.7, 128.7, 128.8, 129.6, 134.8 (C_{Ar}), 134.9 (C=CH₂), 135.3 (C_{Ar}), 155.3 (CO₂N), 165.0 (CONH), 170.6 (CO₂Bn).

Benzyl (2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)acryloyl)-*D*-phenylalaninate (17*c'*-*D*-Phe).



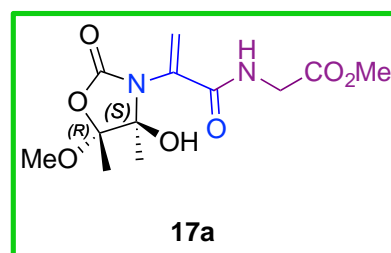
Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **ent-11** (40.0 mg, 0.188 mmol) and H-*D*-Phe-OBn·HCl (82.1 mg, 0.281 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (78.0 mg, 0.469 mmol)

as a base, compound **17*c'*-*D*-Phe** was obtained as a colorless oil after purification (37.0 mg, 0.079 mmol, 42%).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 57.9 HRMS (ESI) m/z : 491.1780 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}^+$ = 491.1789. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.34 (s, 3H, Me), 1.60 (s, 3H, Me), 3.18 (dd, J = 1.6, 5.7 Hz, 2H, $\text{CH}_{2\beta\text{-Phe}}$), 3.43 (s, 3H, OMe), 4.97 (dt, J = 5.7, 7.8 Hz, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Phe}}$), 5.14 – 5.25 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 5.70 (s, 1H, = CH_2), 6.11 (s, 1H, = CH_2), 6.99–7.02 (m, 3H, Ar, NH_{Phe}), 7.23 – 7.25 (m, 2H, Ar), 7.36 – 7.40 (m, 6H, Ar). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.5 (Me), 20.0 (Me), 37.4 ($\text{CH}_{2\text{Phe}}$), 50.8 (OCH_3), 53.8 (CH_{Phe}), 67.8 ($\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 90.8 (COH), 108.9 (COCH_3), 123.5 (=CH₂), 129.3 (C_{Ar}), 128.6, 128.7, 128.7, 128.7, 128.8 (C_{Ar}), 134.7 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 135.2, 135.2 (C_{Ar}), 155.1 (CO_2N), 164.7 (CONH), 171.3 (CO_2Bn).

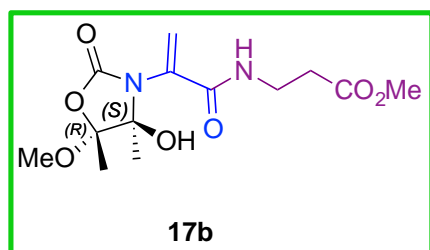
Methyl (2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)acryloyl)glycinate (17a).

Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **11** (54 mg, 0.235 mmol) and H-Gly-OMe·HCl (47.6 mg, 0.379 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (108.4 mg, 0.632 mmol) as a base, compound **17a** was obtained as a colorless oil after purification (30 mg, 0.099 mmol, 39%).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = -113.5 HRMS (ESI) m/z : 325.1011 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}^+$ = 325.1006. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (s, 3H, Me), 1.62 (s, 3H, Me), 3.45 (s, 3H, OCH_3), 3.77 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.11 (d, J = 5.3 Hz, 2H, $\text{CH}_{2\text{Gly}}$), 5.61 (s, 1H, OH), 5.74 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 6.24 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 7.20 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.6 (Me), 20.0 (Me), 41.8 ($\text{CH}_{2\text{Gly}}$), 51.0 (OCH_3), 52.8 (CO_2CH_3), 91.2 (COH), 109.3 (COCH_3), 123.9 ($=\text{CH}_2$), 135.1 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 155.6 (CO_2N), 165.6 (CONH), 170.3 (CO_2CH_3).

Methyl 3-(2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-acrylamido)-propanoate (17b).



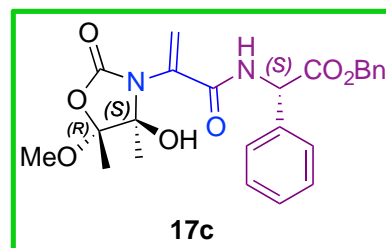
Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **11** (57 mg, 0.268 mmol) and β -Ala-OMe·HCl (55.8 mg, 0.40 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (114.5 mg, 0.668

mmol) as a base, compound **17b** was obtained as a colorless oil after purification (24 mg, 0.076 mmol, 28%).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = -106.3 HRMS (ESI) m/z : 339.1165 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}^+$ = 339.1163. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.38 (s, 3H, Me), 1.62 (s, 3H, Me), 2.59 (td, J = 5.9, 2.8 Hz, 2H, $\text{CH}_{2\beta\text{-Ala}}$), 3.44 (s, 3H, OCH_3), 3.65 – 3.53 (m, 2H, $\text{CH}_{2\beta\text{-Ala}}$), 3.70 (s, 3H, CO_2CH_3), 5.68 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 5.88 (s, 1H, OH), 6.06 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 7.21 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.6 (Me), 20.0 (Me), 33.3 ($\text{CH}_{2\beta\text{-Ala}}$), 35.7 ($\text{CH}_{2\beta\text{-Ala}}$), 50.9 (OCH_3), 52.0 (CO_2CH_3), 91.0 (COH), 109.3 (COCH_3), 122.5 ($=\text{CH}_2$), 135.7 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 155.6 (CO_2N), 165.7 (CONH), 172.9 (CO_2CH_3).

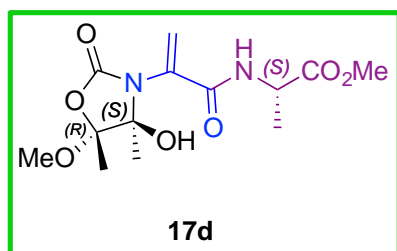
Benzyl (2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)acryloyl)-L-phenylalaninate (17c).

Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **11** (50 mg, 0.235 mmol) and H-Phe-OBn·HCl (102 mg, 0.35 mmol) using sodium 2-ethylhexanoate (100 mg, 0.586 mmol) as a base, compound **17c** was obtained as a white solid after purification (41 mg, 0.087 mmol, 37%).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃) = -74.7 Mp: 25-28 °C. HRMS (ESI) m/z : 491.1808 [M+Na]⁺; calcd for C₂₅H₂₈N₂O₇Na⁺ = 491.1789. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (s, 3H, Me), 1.57 (s, 3H, Me), 3.16 (dd, J = 5.5, 2.6 Hz, 1H, CH₂_{Ph}), 3.40 (s, 3H, OCH₃), 4.94 (q, J = 5.9 Hz, 1H, CH_{Ph}), 5.23 – 5.07 (m, 2H, CH₂_{Bn}), 5.32 (s, 1H, OH), 5.67 (s, 1H, =CH₂), 6.11 (s, 1H, =CH₂), 7.06 – 6.94 (m, 3H, Ar, NH), 7.29 – 7.15 (m, 4H, Ar), 7.42 – 7.29 (m, 5H, Ar). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.5 (Me), 19.9 (Me), 37.5 (CH₂_{Ph}), 50.8 (OCH₃), 53.8 (CH_{Ph}), 67.7 (CH₂_{Bn}), 90.9 (COH), 108.9 (COCH₃), 123.6 (=CH₂), 127.2 (CH_{Ar}), 128.6, 128.7, 128.8, 129.4, 134.8 (C_{Ar}), 135.1 (C=CH₂), 135.3 (C_{Ar}), 155.1 (CO₂N), 164.7 (CONH), 171.3 (CO₂Bn).

Methyl (2-((4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-methoxy-4,5-dimethyl-2-oxooxazolidin-3-yl)acryloyl)-L-alaninate (17d**).**



Following the general methodology for aminolysis with amino ester hydrochlorides, starting from **11** (30 mg, 0.141 mmol) and H-Ala-OMe·HCl (29.4 mg, 0.212 mmol) using sodium ethyl-hexanoate (60.6 mg, 0.352 mmol) as a

base, compound **17d** was obtained as a colorless oil after purification (10 mg, 0.031 mmol, 22%).

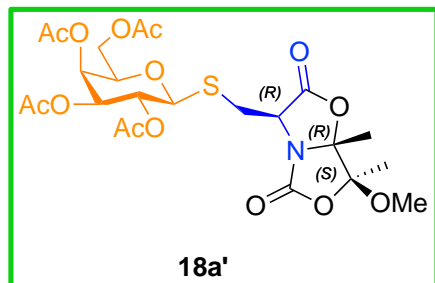
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = -104.0 HRMS (ESI) m/z : 339.1003 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}^+$ = 339.1163. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (s, 3H, Me), 1.46 (d, J = 7.2 Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 1.63 (s, 3H, Me), 3.45 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.63 (p, J = 7.2 Hz, 1H, CH_{Ala}), 5.63 (s, 1H, OH), 5.73 (s, 1H, = CH_2), 6.22 (s, 1H, = CH_2), 7.14 (d, J = 6.9 Hz, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.6 (Me), 17.9 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 20.1 (Me), 48.8 (CH_{Ala}), 50.9 (OCH_3), 52.9 (CO_2CH_3), 91.0 (COH), 109.0 (COCH_3), 123.4 (=CH₂), 135.4 (C=CH₂), 155.3 (CO_2N), 164.9 (CONH), 173.8 (CO_2CH_3).

Experiments to discard the role of the configuration of L-Phe as a stereodirecting group in the *S*-Michael addition of dehydropeptide **17c with GalNAc- α -SH.**

We synthesized the dehydropeptide **17c-D-Phe** starting from Dha **11** by aminolysis with the D-phenylalanine benzyl ester hydrochloride in the presence of sodium 2-ethylhexanoate as a base and anh. THF as a solvent at room temperature. We carried out the *S*-Michael addition of dehydropeptide **17c-D-Phe** with GalNAc- α -SH, in the same conditions described in Scheme 5.19 of the manuscript, obtaining high yield and diastereoselectivity of adduct **15c-D-Phe** with the same stereochemical induction (*R*) at the cysteine α -carbon that obtained in the *S*-Michael adduct **15c** when dehydropeptide **17c** was reacted with GalNAc- α -SH. To corroborate this stereochemical outcome, we synthesized the same compound **15c-D-Phe** by aminolysis of *S*-Michael adduct **13** with the D-phenylalanine benzyl ester hydrochloride.

Additionally, we demonstrated that the bicyclic Dha scaffold **ent-11** displays a stereochemical behaviour similar to its counterpart enantiomer Dha **11** but, obviously, it induces the contrary (*S*)-configuration at the cysteine α -carbon created in the *S*-Michael addition. To do this, we carried out the reaction between dehydropeptide **17a'** and GalNAc- α -SH in the same conditions, obtaining the Michael adduct **15a'**. To corroborate this stereochemical outcome, we synthesized the same compound **15a'** by aminolysis of derivative **13'** with glycine methyl ester hydrochloride.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((3*R*,7*S*,7*aR*)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol-3-yl)methyl)thio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (18a'**).**

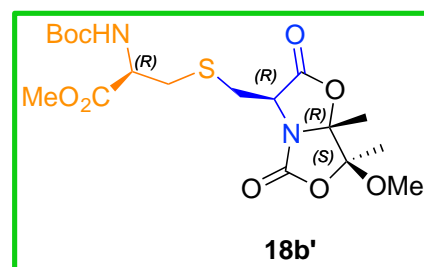


Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative ent-**11** (20.6 mg, 0.097 mmol), TEA (14.8 μ L, 0.106 mmol), and tetra-*O*-acetylated β -thioglucopyranose (38.7 mg, 0.106 mmol) were reacted affording compound **18a'** as a yellow oil (43.0 mg, 0.075 mmol, 77%) after purification by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt 1:1).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 0.8 HRMS (ESI) m/z : 600.1380 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_{14}\text{SNa}^+$ 600.1357. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.62 (s, 3H, Me^{7a}), 1.67 (s, 3H, Me^7), 2.01 (s, 3H, COCH_3), 2.03 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 2.09 (s, 3H, COCH_3), 2.89 (dd, $J = 14.2, 9.7$ Hz, 1H, CH_2S), 3.37 (dd, $J = 14.2, 4.8$ Hz, 1H, CH_2S), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.72-3.81 (m, 1H, H^{5s}), 4.17 (dd, $J = 12.5, 2.3$ Hz, 1H, H^{6s}), 4.27 (dd, $J = 12.4, 4.8$ Hz, 1H, H^{6s}), 4.59 (dd, $J = 9.7, 4.8$ Hz, 1H, H^3), 4.65 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H^{1s}), 5.03 – 5.14 (m, 2H, $\text{H}^{2s}, \text{H}^{4s}$), 5.25 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H^{3s}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 20.6, 20.6, 20.7, 20.7 (4x COCH_3), 22.1 (Me^7), 30.3 (CH_2S), 51.7 (OMe), 60.8 (C^3), 61.8 (C^{6s}), 68.1, 69.6 ($\text{C}^{2s}, \text{C}^{4s}$), 73.6 (C^{3s}), 76.1 (C^{5s}), 82.1 (C^{1s}), 101.5 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 158.7 ($\text{C}^5=\text{O}$), 169.4, 169.6, 170.1, 170.3, 170.7 ($\text{C}^2=\text{O}$, 4x COCH_3).

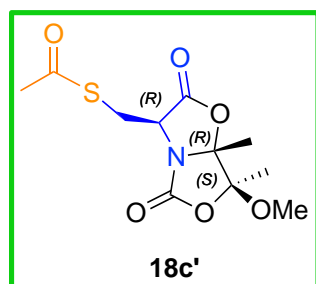
Methyl *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*S*-(((3*R*,7*S*,7*aR*)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol-3-yl)methyl)-*L*-cysteinate (18b'**).**

Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (10.0 mg, 0.047 mmol), TEA (14.4 μ L, 0.103 mmol), and *N*-Boc-*L*-cysteine methyl ester (12.1 mg, 0.052 mmol) were reacted affording compound **18b'** as a colourless oil (20.0 mg, 0.045 mmol, 95%) after purification by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt 6:4).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 22.1. HRMS (ESI) m/z : 471.1428 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9\text{SNa}^+$ 471.1408. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.45 (s, 9H, Boc), 1.62 (s, 3H, Me^{7a}), 1.67 (s, 3H, Me^7), 2.88 (dd, $J = 14.1, 10.4$ Hz, 1H, CH_2S), 3.13 (m, 3H, CH_2S , $\text{CH}_2^\beta_{\text{Cys}}$), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 4.49 (dd, $J = 10.2, 4.6$ Hz, 1H, H^3), 4.58 (s, 1H, $\text{H}^\alpha_{\text{Cys}}$), 5.37 (s, 1H, NH_{Cys}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 22.2 (Me^7), 28.3 (Boc), 33.5 (CH_2S), 34.6 ($\text{CH}_2^\beta_{\text{Cys}}$), 51.9 (OMe), 52.8 (OMe), 53.4 ($\text{CH}^\alpha_{\text{Cys}}$), 61.0 (C^3), 80.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 101.5 (C^{7a}), 108.3 (C^7), 158.9 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.2, 171.3 ($\text{C}^2=\text{O}$, $\text{C}_{\text{Cys}}=\text{O}$).

***S*-(((3*R*,7*S*,7*aR*)-7-Methoxy-7,7*a*-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol-3-yl)methyl) thioacetate (**18c'**).**

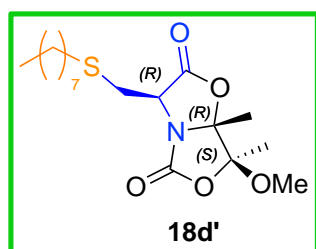


Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (14.4 mg, 0.068 mmol), TEA (10.4 μ L, 0.074 mmol), and thioacetic acid (5.7 mg, 0.074 mmol) were reacted affording compound **18c'** as a yellow oil (18 mg, 0.062 mmol, 92%) after purification by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH

95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃) = 10.6. HRMS (ESI) m/z : 312.0516 [M+Na]⁺; calcd for C₁₁H₁₅NO₆SN⁺ 312.0512. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.64 (s, 3H, Me^{7a}), 1.75 (s, 3H, Me⁷), 2.43 (s, 3H, Me), 3.25 (dd, J = 14.2, 10.5 Hz, 1H, CH₂S), 3.51 (m, 4H, CH₂S, OMe), 4.43 (dd, J = 10.5, 5.6 Hz, 1H, H³). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.6 (Me^{7a}), 22.1 (Me⁷), 29.7 (CH₂S), 30.5 (Me), 51.6 (OMe), 59.8 (C³), 101.6 (C^{7a}), 108.2 (C⁷), 158.8 (C⁵=O), 169.2 (C²=O), 193.8 (C=O).

(3*R*,7*S*,7*aR*)-7-Methoxy-7,7*a*-dimethyl-3-((octylthio)methyl)dihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18d'**).**



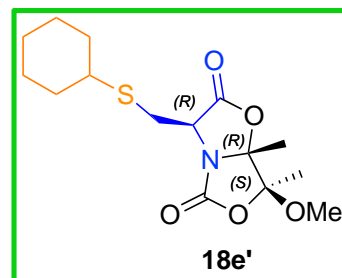
It is important to note that TEA is not adequate in this case to deprotonate this alkylthiol. Therefore, we used DBU as a base.

Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (16.9 mg, 0.079 mmol), DBU (13.0 μ L, 0.087 mmol), and octanethiol (12.8 mg, 0.087 mmol) were reacted affording compound **18d'** as a colourless oil (20.7 mg, 0.056 mmol, 73%) after purification by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt 1:1).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 39.2 HRMS (ESI) m/z : 298.0698 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{SNa}^+$ 298.0720. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.89-0.93 (m, 3H, Me), 1.29-1.44 (m, 10H, CH_2^{3-7}), 1.61 (s, 2H, CH_2^2), 1.64 (s, 3H, Me^{7a}), 1.70 (s, 3H, Me^7), 2.71 (dd, $J = 11.2, 4.1$ Hz, 2H, CH_2^1), 2.83 (dd, $J = 14.3, 10.0$ Hz, 1H, CH_2S), 3.13 (dd, $J = 14.3, 4.6$ Hz, 1H, CH_2S), 3.53 (s, 3H, OMe), 4.52 (dd, $J = 10.0, 4.6$ Hz, 1H, H^3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.1 (Me), 16.7 (Me^{7a}), 22.2 (Me^7), 22.6, 28.8, 29.2, 29.2, 29.2, 31.8 ($6\times\text{CH}_2^{2-7}$), 32.0 (CH_2^1), 32.9 (CH_2S), 51.7 (OMe), 61.1 (C^3), 101.5 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 159.0 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.7 ($\text{C}^2=\text{O}$).

(3*R*,7*S*,7*aR*)-3-((Cyclohexylthio)methyl)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyldihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18e')

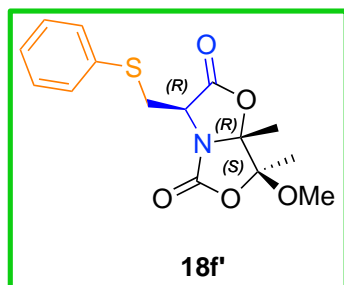
It is important to note that TEA is not adequate in this case to deprotonate this alkylthiol. Therefore, we used DBU as a base. Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (15.0 mg, 0.070 mmol), DBU (23.6 μ L, 0.155 mmol), and cyclohexanethiol (9.0 mg, 0.077 mmol)



were reacted affording compound **18e'** as a colourless oil (16.2 mg, 0.049 mmol, 71%) after purification by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt 8:2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 52.6 HRMS (ESI) m/z : 352.1185 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{SNa}^+$ 352.1189. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.31 (m, 5H, CH_2), 1.62 (s, 3H, Me^{7a}), 1.68 (s, 3H, Me^7), 1.78 (m, 2H, CH_2), 1.96 (m, 2H, CH_2), 2.84 (m, 2H, CH_2S , CH_2), 3.14 (dd, $J = 14.2, 4.7$ Hz, 1H, CH_2S), 3.50 (s, 3H, OMe), 4.49 (dd, $J = 9.9, 4.7$ Hz, 1H, H^3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 22.2 (Me^7), 25.7, 25.9, 25.9 (3x CH_2), 31.0 (CH_2S), 33.3, 33.3 (2x CH_2), 43.5 (CH), 51.7 (OMe), 61.3 (C^3), 101.5 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 158.9 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.7 ($\text{C}^2=\text{O}$).

(3*R*,7*S*,7*aR*)-7-Methoxy-7,7*a*-dimethyl-3-((phenylthio)methyl)dihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18*f*')



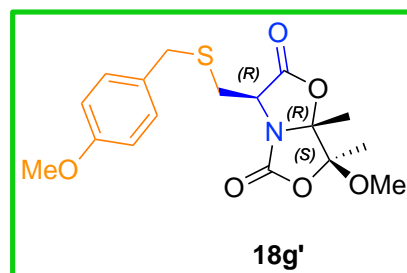
Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (20.0 mg, 0.094 mmol), TEA (14.4 μL , 0.103 mmol), and thiophenol (11.4 mg, 0.103 mmol) were reacted affording compound **18f'** as a colourless oil (27 mg, 0.084 mmol, 89%) after purification by silica gel column

chromatography (hexane/AcOEt 8:2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 4.1 HRMS (ESI) m/z : 346.0720 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{SNa}^+$ 346.0720. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.62 (s, 3H, Me^{7a}), 1.63 (s, 3H, Me^7), 3.14 (dd, $J = 14.2, 10.5$ Hz, 1H, CH_2S), 3.49 (m, 4H, CH_2S , OMe), 4.49 (dd, $J = 10.5, 4.3$ Hz, 1H, H^3), 7.35 (m, 3H, arom), 7.57 (m, 2H, arom). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.6 (Me^{7a}), 22.1 (Me^7), 36.6 (CH_2S), 51.6 (OMe), 60.4 (C^3), 101.6 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 127.9, 129.3, 132.2, 133.4 (5x C_{arom}), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.4 ($\text{C}^2=\text{O}$).

(3*R*,7*S*,7*aR*)-7-Methoxy-3-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-7,7a-dimethyldihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18*g*').

It is important to note that TEA is not adequate in this case to deprotonate this alkylthiol. Therefore, we used DBU as a base. Following the optimal conditions for the Michael additions, derivative **ent-11** (14.0 mg, 0.066 mmol), DBU (10.8 μ L, 0.072 mmol), and



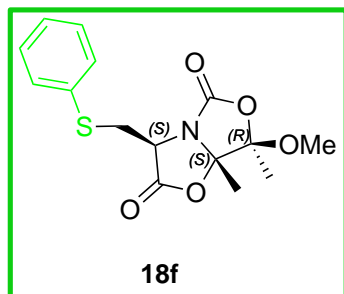
(4-methoxyphenyl)methanethiol (11.1 mg, 0.072 mmol) were reacted affording compound **18*g*'** as a colourless oil (18.2 mg, 0.050 mmol, 75%) after purification by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt 8:2).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3) = 41.2 HRMS (ESI) m/z : 390.0984 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{SNa}^+$ 390.0982. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.62 (s, 3H, Me^{7a}), 1.64 (s, 3H, Me^7), 2.69 (dd, $J = 14.4, 9.9$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\beta_2}\text{S}$), 2.96 (dd, $J = 14.4, 4.7$ Hz, 1H, $\text{CH}^{\beta_2}\text{S}$), 3.54 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.87 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, $\text{CH}'_2\text{S}$), 4.51 (dd, $J = 9.8, 4.7$ Hz, 1H, H^3), 6.86 – 6.91 (m, 2H, H_{arom}), 7.30-7.32 (m, 2H, H_{arom}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^7), 22.1 (Me^{7a}), 31.5 ($\text{CH}^{\beta_2}\text{S}$), 35.1 ($\text{CH}'_2\text{S}$), 51.7 (OMe), 55.3 (OMe), 60.8 (C^3), 101.5 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 113.9, 114.1, 128.8 ($3\times\text{C}_{\text{arom}}$), 130.2, 130.5 ($2\times\text{C}_{\text{arom}}$), 158.9 ($\text{C}^5=\text{O}$), 159.0 (C_{arom}), 170.6 ($\text{C}^2=\text{O}$).

General procedure for the Michael reaction.

To a solution of chiral α,β -dehydroamino acid (Dha) derivative **11** as a Michel acceptor and triethylamine as a base in dry THF, a solution of the corresponding SH-containing dye as a nucleophile in dry THF was added dropwise (0.2 mL/min) at room temperature. After the completed addition, the reaction was followed by TLC chromatography until total conversion of the Dha derivative **11** and an aqueous saturated NH_4Cl solution (same volume as THF) was added. The aqueous phase was extracted twice with ethyl ether and the combined organic phases were dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The conversion and the diastereomeric excess were determined by ^1H NMR experiments. In order to optimize the Michael additions different conditions were tested. In the case of compound **19**, dichloromethane was used instead THF due to problems of solubility in THF.

(3*S*,7*R*,7*aS*)-7-methoxy-7,7a-dimethyl-3-((phenylthio)methyl)dihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18f).

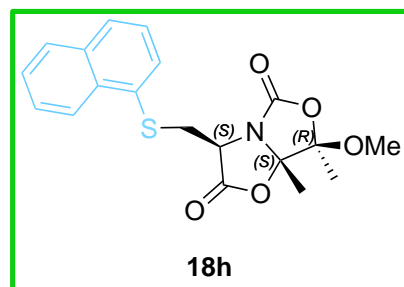


Following the general procedure for the Michael additions, Dha derivative **11** (20.0 mg, 0.094 mmol), triethylamine (14.4 μL , 0.103 mmol), and thiophenol (11.4 mg, 0.103 mmol) were reacted affording compound **18f** as a colourless oil (27 mg, 0.084 mmol, 89%) after purification by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3) = -4.2 HRMS (ESI) m/z : 346.0725 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{SNa}^+$ 346.0720. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.62 (s, 3H, Me^{7a}), 1.63 (s, 3H, Me^7), 3.14 (dd, $J = 14.2, 10.5$ Hz, 1H, CH_2S), 3.49 (m, 4H, CH_2S , OMe), 4.49 (dd, $J = 10.5, 4.3$ Hz, 1H, H^3), 7.35 (m, 3H, arom), 7.57 (m, 2H, arom). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.6 (Me^{7a}), 22.1 (Me^7), 36.6 (CH_2S), 51.6 (OMe), 60.4 (C^3), 101.6 (C^{7a}), 108.2 (C^7), 127.9, 129.3, 132.2, 133.4 ($5\times\text{C}^{\text{arom}}$), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.4 ($\text{C}^2=\text{O}$).

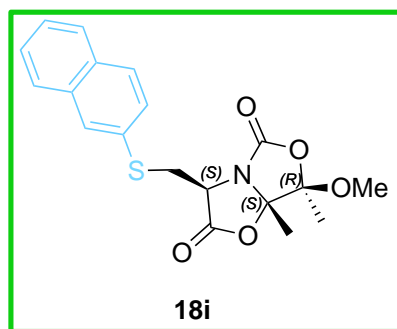
(3*S*,7*R*,7*aS*)-7-methoxy-7,7a-dimethyl-3-((naphthalen-1-ylthio)methyl)dihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18h).

Following the general procedure for the Michael additions, Dha derivative **11** (25.0 mg, 0.117 mmol), triethylamine (18.0 μL , 0.129 mmol) and 1-naphtalenethiol (16.0 μL , 0.129 mmol) were reacted affording compound **18h** as a yellow foam (42 mg, 0.113 mmol, 96%) after purification by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3): -3.3 HRMS (ESI+) (m/z): 396.0879 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{SNa}^+$: 396.0876. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.48 (s, 3H, Me^{7a}), 1.57 (s, 3H, Me^7), 3.15 (dd, 1H, $J = 14.2, 10.5$ Hz, H_β), 3.11 – 4.46 (m, 4H, H_α , OMe), 4.50 (dd, 1H, $J = 10.9, 4.2$ Hz, H_β), 7.42 – 7.61 (m, 3H, H^{arom}), 7.83 – 7.94 (m, 3H, H^{arom}), 8.50 (d, $J = 8.5$, 1H, H^{arom}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 21.9 (Me^7), 36.4 (C_β), 51.5 (OMe), 60.6 (C_α), 101.6 (C^{7a}), 107.8 (C^7), 125.3, 125.6, 126.4, 127.1, 128.8, 129.6, 130.2, 133.2, 133.6, 134.3 ($10\times\text{C}^{\text{arom}}$), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.3 ($\text{C}^2=\text{O}$).

(3*S*,7*R*,7*aS*)-7-methoxy-7,7a-dimethyl-3-((naphthalen-2-ylthio)methyl)dihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18i).**



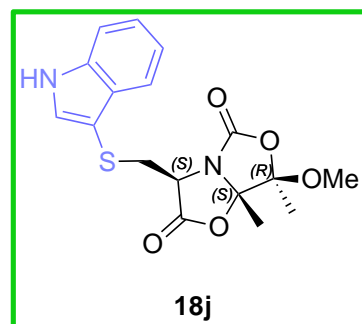
Following the general procedure for the Michael additions, Dha derivative **11** (25.0 mg, 0.117 mmol), triethylamine (18.0 μL , 0.129 mmol) and 2-naphtalenethiol (18.8 mg, 0.129) were reacted affording compound **18i** as a yellow foam (42 mg, 0.112 mmol, 95%) after purification by silica gel column

chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3): -53.7 HRMS (ESI+) (m/z): 396.0872 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{SNa}^+$: 396.0876. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.58 (s, 3H, Me^{7a}), 1.61 (s, 3H, Me^7), 3.20 (dd, 1H, $J = 14.2, 10.4$ Hz, H_β), 3.43 (s, 3H, OMe), 3.53 – 4.53 (m, 1H, H_α), 4.51 (dd, 1H, $J = 10.4, 4.2$ Hz, H_β), 7.47 – 7.50 (m, 2H, H^{arom}), 7.57 (mdd, $J = 8.6, 1.8, 1\text{H}$, H^{arom}), 7.80 – 7.82 (m, 3H, H^{arom}), 8.04 (d, $J = 1.5, 1\text{H}$, H^{arom}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 22.1 (Me^7), 36.3 (C_β), 51.6 (OMe), 60.3 (C_α), 101.6 (C^{7a}), 108.0 (C^7), 126.5, 126.8, 127.6, 127.7, 129.0, 130.6, 131.1, 132.6, 133.7 ($10\times\text{C}^{\text{arom}}$), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 170.4 ($\text{C}^2=\text{O}$).

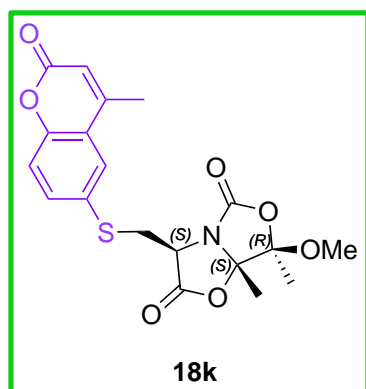
(3*S*,7*R*,7*aS*)-3-(((1*H*-indol-3-yl)thio)methyl)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyldihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18j).

Following general procedure for the Michael additions, Dha derivative **11** (25.0 mg, 0.117 mmol), triethylamine (18.0 μL , 0.129 mmol) and 1*H*-indole-3-thiol (17.50 mg, 0.129 mmol) were reacted affording compound **18j** as a yellow foam (25 mg, 0.069 mmol, 60%) after purification by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3): 174.3 HRMS (ESI+) (m/z): 385.0831 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{SNa}^+$: 385.0829. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.63 (s, 3H, Me^{7a}), 1.63 (s, 3H, Me^7), 2.82 (dd, 1H, $J = 14.1, 11.6$ Hz, H_β), 3.26 (dd, $J = 14.2, 3.8$, 1H, H_α), 3.51 (s, 3H, OMe), 4.43 (dd, 1H, $J = 11.5, 3.8$ Hz, H_β), 7.25 - 7.29 (m, 2H, H^{arom}), 7.42 - 7.45 (m, 1H, H^{arom}), 7.73 - 7.74 (m, 1H, H^{arom}), 7.82 (dd, $J = 7.5, 1.5$, 1H, H^{arom}), 8.51 (m, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.7 (Me^{7a}), 22.0 (Me^7), 36.7 (C_β), 51.7 (OMe), 60.2 (C_α), 101.7 (C^{7a}), 108.0 (C^7), 111.9, 119.0, 121.0, 123.0, 129.0, 132.5, 136.6 ($7\times\text{C}^{\text{arom}}$), 159.5 ($\text{C}^5=\text{O}$), 171.0 ($\text{C}^2=\text{O}$).

(3*S*,7*R*,7*aS*)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyl-3-(((4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-6-yl)thio)methyl)dihydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazole-2,5(3*H*)-dione (18k).

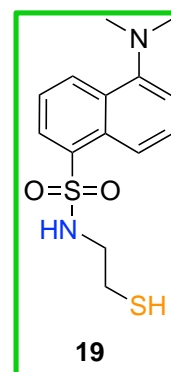


Following the general procedure for the Michael additions, Dha derivative **11** (53.0 mg, 0.249 mmol), triethylamine (38.2 μL , 0.274 mmol) and 7-mercapto-4-methylcoumarin (52 mg, 0.270 mmol) were reacted affording compound **18k** as a yellow solid (96 mg, 0.237 mmol, 93%) after purification by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3): -51.9 Mp: 128 – 130 °C. HRMS (ESI+) (m/z): 428.0763 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_7\text{SNa}^+$: 428.0774. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.60 (s, 3H, Me^{7a}), 1.66 (s, 3H, Me^7), 2.41 (d, 3H, $J=1.2$ Hz, Me^{4c}), 3.17 – 3.27 (m, 1H, H_β), 3.48 (s, 3H, OMe^7), 3.54 – 3.62 (m, 1H, H_β), 4.50 (dd, 1H, $J=10.0, 4.4$ Hz, H_α), 6.25 (d, 1H, $J=1.2$ Hz, H^{3c}), 7.30 – 7.36 (m, 2H, $\text{H}^{6c}, \text{H}^{8c}$), 7.50 – 7.56 (m, 1H, H^{5c}). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.8 (Me^{7a}), 18.7 (Me^{4c}), 22.4 (Me^7), 34.9 (CH_2S), 51.9 (OMe^7), 60.1 (C^3), 101.7 (C^{7a}), 108.4 (C^7), 115.0 (C^{3c}), 117.2 (C^{6c}), 118.8 (C_q^c), 125.3, 125.2 ($\text{C}^{8c}, \text{C}^{5c}$), 139.4, 152.0, 153.9 ($3\times\text{C}_q^c$), 158.8 ($\text{C}^5=\text{O}$), 160.4 ($\text{C}^c=\text{O}$), 170.1 ($\text{C}^2=\text{O}$).

5-(dimethylamino)-*N*-(2-mercaptoethyl)naphthalene-1-sulfonamide (**19**).

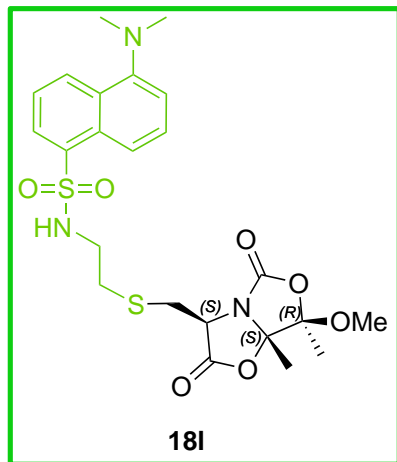
This compound **19** was synthesized starting from dansil chloride (1.1 g, 3.9 mmol) and cystamine chloride (400 mg, 1.77 mmol), in order to form a sulfonamide binding using TEA (1.5 mL, 1.94 mmol) as a base and CH_2Cl_2 (20 mL) as a solvent, under Argon atmosphere at 0 °C. After 24 h stirring at room temperature a solution of HCl 0.5 M was added. The dimer of compound **19** (1.28 g, 1.77 mmol, 99%) was yielding after extractions with CH_2Cl_2 . This dimer was dissolved in EtOH_{abs} (220 mL) and Zn (6.2 g) and AcOH glacial (14



mL) were added. This mixture reacted during 4 h and then extractions with CHCl_3 and water were necessary, yielding compound **19** (1.30 g, 4.19 mmol, 99%) as a green solid. The spectroscopy and physical properties were identically to those described in bibliography.⁶

⁶ Robinson, C.; Hartman, R. F.; Rose, S. D., *Bioorg. Chem.* **2008**, 36, 265.

5-(dimethylamino)-*N*-(2-(((3*S*,7*R*,7*aS*)-7-methoxy-7,7*a*-dimethyl-2,5-dioxotetrahydro-5*H*-oxazolo[4,3-*b*]oxazol-3-yl)methyl)thio)ethyl)naphthalene-1-sulfonamide (18**).**



Following the general procedure for the Michael additions, acrylate **11** (103.0 mg, 0.484 mmol), triethylamine (67 μ L, 0.491 mmol) and compound **19** (149 mg, 0.481) were reacted for 3 hours affording compound **18** as a light green-yellowish viscous solid (231 mg, 0.441 mmol, 92%). It is important to notice that, after finishing the Michael reaction, the adduct **18** must be used immediately in the next hydrolysis reaction to obtain amino acid

20, since it evolves to other unknown products in solution. Because of this, this compound only was characterized by a quick ^1H NMR experiment.

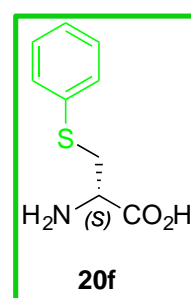
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, CHCl_3): -36.2 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.58 (s, 3H, Me^{7a}), 1.63 (s, 3H, Me^7), 2.75 (td, 2H, $J = 6.0, 1.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.85 (dd, 2H, $J = 14.6, 4.4$ Hz, H_β), 3.09 – 3.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.91 (s, 6H, Me), 3.53 (s, 3H, OMe^7), 4.39 (dd, 1H, $J = 10.2, 4.4$ Hz, H_α), 7.22 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H^{6d}), 7.52 – 7.65 (m, 2H, $\text{H}^{7d}, \text{H}^{3d}$), 8.3– 8.57 ($\text{H}^{2d}, \text{H}^{4d}, \text{H}^{8d}$).

General procedure for the hydrolysis reaction.

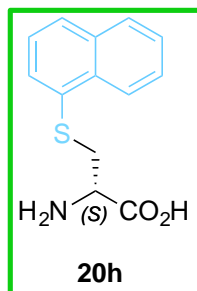
A 4 M HCl aqueous solution was added to the corresponding Michael adduct and the mixture was stirred at 60 °C for 16 h. The solvent was removed under vacuum and the crude was redissolved in water and washed with ethyl acetate. The aqueous phase was evaporated affording the corresponding free amino acid. In the case of Michael adduct **18l**, the mixture was stirred at 40 °C.

S-phenyl-D-cysteine (20f).

Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from **18f** (27 mg, 0.084 mmol) and adding a 4 M HCl aqueous solution (5 mL), compound **20f** was obtained as a yellow foam after purification (16 mg, 0.081 mmol, 97%).

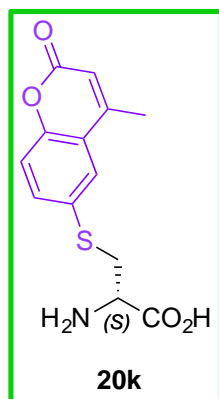


$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, DMSO): -2.5 HRMS (ESI+) (m/z): 198.0588 [M+H]⁺; calcd for C₉H₁₂NO₂S⁺: 198.0583. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 3.36 – 3.41 (m, 1H, H_β), 3.48 – 3.53 (m, 1H, H_β), 4.09 (dd, 1H, J=7.1, 4.4 Hz, H_α), 7.27 - 7.29 (m, 3H, H^{arom}), 7.42 – 7.44 (m, 2H, H^{arom}). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 34.2 (C_β), 52.1 (C_α), 128.1, 129.5, 131.4, 132.1 (5xC^{arom}), 170.2 (COOH).

S-(naphthalen-1-yl)-D-cysteine (20h).

Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from Michael adduct **18h** (42 mg, 0.112 mmol) and adding a 4 M HCl aqueous solution (5 mL), compound **20h** was obtained as a yellow foam after purification (27 mg, 0.109 mmol, 97%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (1.00, DMSO): 25.1. HRMS (ESI+) (m/z): 248.0738 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}^+$: 248.0740. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 3.36 – 3.41 (m, 1H, H_β), 3.48 – 3.53 (m, 1H, H_β), 4.09 (dd, 1H, $J = 7.1, 4.4$ Hz, H_α), 7.27 – 7.29 (m, 3H, H^{arom}), 7.42 – 7.44 (m, 2H, H^{arom}). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ (ppm): 42.1 (C_β), 54.2 (C_α), 124.3, 125.8, 126.7, 127.2, 128.9, 129.7, 130.1, 131.9, 132.1, 133.8 ($10\times\text{C}^{\text{arom}}$), 169.1 (COOH).

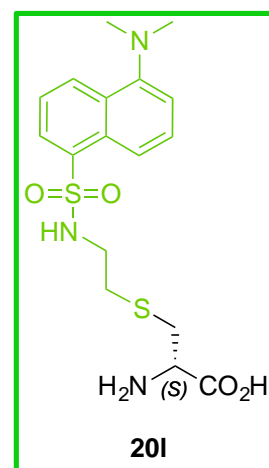
S-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-6-yl)-D-cysteine acid hydrochloride (20k).

Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from Michael adduct **18k** (176 mg, 0.435 mmol) and adding a 6 M HCl aqueous solution (20 mL), compound **20k** was obtained as yellow oil (120 mg, 0.381 mmol, 88%).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3): -27.7 HRMS (ESI+) (m/z): 302.0455 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{SNa}^+$: 302.0457. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.20 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, Me^{4c}), 3.44 – 3.64 (m, 2H, H_β), 4.23 (dd, 1H, $J = 7.2, 4.4$ Hz, H_α), 6.05 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, H^{3c}), 7.04 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H^{9c}), 7.17 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.9$ Hz, H^{7c}), 7.41 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H^{6c}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 17.8 (Me^{4c}), 32.3 (CH_2S), 51.8 (CHNH_2), 112.9 (C^{3c}), 115.7 (C^{6c}), 118.1 (C_q^c), 125.0, 125.6 (C^{8c} , C^{5c}), 138.8, 152.3, 155.5 ($3\times\text{C}_q^c$), 163.3 ($\text{C}^c=\text{O}$), 169.7 (COOH).

S-(2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)ethyl)-D-cysteine acid hydrochloride (20I).

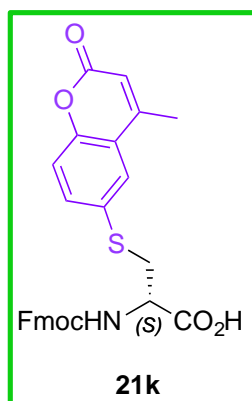
Following the general methodology for acid hydrolysis, starting from Michael adduct **18I** (231 mg, 0.441 mmol) and adding a 4 M HCl aqueous solution (20 mL), compound **20I** was obtained as green-yellowish foamy oil (168 mg, 0.422 mmol, 96%).



$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl_3): 4.8 HRMS (ESI+) (m/z): 398.1218 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2\text{NH}^+$: 398.1203. ^1H NMR

(400 MHz, D_2O) δ (ppm): 2.41 – 2.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.60 – 2.81 (m, 2H, H_β), 3.01 – 3.08 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.42 (s, 6H, Me), 3.99 (dd, 1H, $J = 7.3, 4.4$ Hz, H_α), 7.70 – 7.84 (m, 2H, H^{7d} , H^{3d}), 7.98 (t, 1H, $J = 8.6$ Hz, H^{6d}), 8.21, 8.34, 8.61 (H^{2d} , H^{4d} , H^{8d}). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ (ppm): 30.9 (C_β), 31.3 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 41.7 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 46.7 (Me), 46.8 (Me) 52.3 (C_α), 119.6, 125.7, 126.6, 130.5 (C^2 , C^4 , C^6 , C^8), 125.5, 127.0 (C^{4a} , C^{8a}) 128.1, 128.5 (C^7 , C^3), 135.1 (C^1), 138.3 (C^5), 170.6 (COOH).

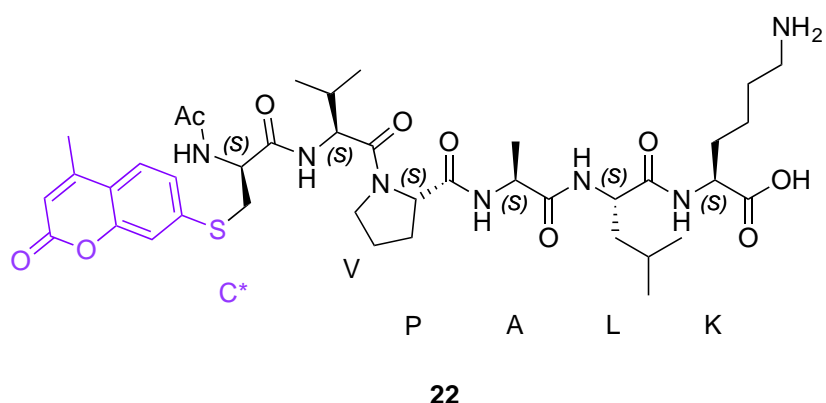
***N*-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*S*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-6-yl)-*D*-cysteine (**21k**).**



Derivative **20k** (207 mg, 0.521 mmol), FmocOSu (263 mg, 0.780 mmol) and NaHCO₃ (196 mg, 2.33 mmol) were dissolved in a mixture of H₂O/CH₃CN (1:2) (15 mL). The solution was stirred at room temperature for 24 h. CH₃CN was removed *in vacuo* and the aqueous phase was acidified with 2 M HCl (pH 2-3). The solvent was then removed and the crude was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/MeOH 95:5) affording compound **21k** as

yellow foamy oil (145 mg, 0.234 mmol, 47%).

$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CH₃OH): 13.1 HRMS (ESI+) (*m/z*): 524.1094 [M+Na]⁺; calcd for C₂₈H₂₃NO₆SN⁺: 524.1100. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 2.33 (s, Hz, 3H, Me^{4c}), 3.37 – 3.47 (m, 1H, H_β), 3.67 – 3.75 (m, 1H, H_β), 4.04 – 4.10 (m, 1H, CH^{Fmoc}), 4.19 – 4.37 (m, 2H, CH₂^{Fmoc}), 4.43 – 4.50 (m, 1H, H_α), 6.17 (s, 1H, H^{3c}), 7.23 – 7.82 (m, 11H, H_{arom}). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 18.4 (Me^{4c}), 35.1 (H_β), 48.4 (CH^{Fmoc}), 54.8 (H_α), 68.1 (CH₂^{Fmoc}), 114.5 (C^{3c}), 116.2 (C^{6c}), 120.8, 120.9, 125.2, 126.2, 126.3, 126.5, 128.2, 128.8, 128.8, 129.2 (CH_{arom}), 119.0, 142.5, 142.5, 143.6, 145.1, 145.2, 154.9, 155.0 (C_q^c, C_q^{Fmoc}), 158.3 (C=O), 162.7 (CO^{Fmoc}), 174.9 (COOH).

Ac-C(Cum)VPALK-OH (**22**).

The synthesis of peptide **22** was carried out by manual solid phase peptide synthesis (SPPS). 2-Chlorotrityl chloride resin (31.25 mg, 0.05 mmol) was introduced into a vessel reactor and subsequently swelling was performed with dichloromethane. Then, the corresponding protected first amino acid, lysine (117.1 mg, 0.350 mmol) was dissolved in DIEA (110 μ L) and CH_2Cl_2 (3 mL) and added to the vessel for 2 h. At this point, the capping of the resin was performed using a solution of acetic anhydride. Consecutive washes for Fmoc deprotection with piperidine and DMF were also made. Then, protected leucine (88.4, 0.250 mmol) was dissolved in DIEA (150 μ L), HATU (94.1 mg, 0.250 mmol) and DMF (3 mL) and added to the reactor for 30 min. Afterward, deprotection of Fmoc was carried out with piperidine and DMF. These steps were repeated as many times as amino acids were needed to couple. In the case of the fluorescent amino acid (**21g**) the reaction was stirred until the coupling was completed as deduced by Kaiser test.

As a next step, the terminal amino group was acetylated with a solution of acetic anhydride and pyridine (1:2) and the solution was stirred for 1 h. Finally, TFA (3.6 mL), thioanisole (200 μ L), anisole (80 μ L) and 1,2-ethanedithiol were added for the cleavage reaction and the removal of the side chain protecting group. The mixture was stirred for 2 h.

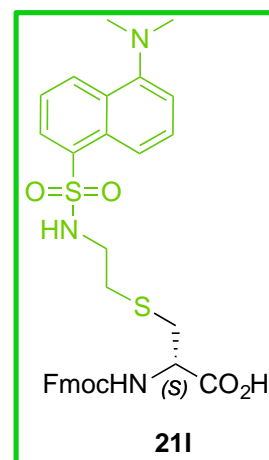
At this point, Et₂O was added in order to precipitate the peptide that was filtered and then purified by reverse phase HPLC and lyophilized. Semi-preparative HPLC gradient (t_R 24.5 min):

Entry	Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1%	CH ₃ CN + 0.05%
			TFA (%)	TFA (%)
1	0	10	95	5
2	10	10	70	30
3	33	10	47	53

HRMS (ESI+) (m/z): 830.4041 [$M+H$]⁺; calcd for C₄₀H₅₉N₇O₁₀SH⁺: 830.4044. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 0.81 (dd, 12 H, J = 22.6, 6.3 Hz, Me^V, Me^L), 1.27 (d, 3 H, J = 7.2 Hz, Me^A), 1.31 – 1.41 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-NH₂^K), 1.45 – 1.62 (m, 5H, CH₂-CH₂-NH₂^K, CH^L, H _{β ^L), 1.65 – 1.75 (m, 2H, CH₂^P), 1.75 – 1.88 (m, 4H, H _{β ^K, CH₂^P), 1.89 (s, 3H, NHAc), 1.92 (d, 1H, J = 7 Hz, H _{β ^V), 2.10 – 2.21 (m, 2H, CH₂^P), 2.32 (s, 3H, Me^{4c}), 2.90 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂-NH₂^K), 3.46 – 3.62 (m, 2H, H _{β ^{C*}), 4.00 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H _{α ^V), 4.14 – 4.31 (m, 4H, H _{α ^A, H _{α ^L, H _{α ^P, H _{α ^K), 4.53 (t, 1H, J = 6.3 Hz, H _{α ^{C*}), 6.20 (s, 1H, H^{3c}), 7.13 (s, 1H, H^{9c}), 7.22 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H^{7c}), 7.53 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H^{6c}).}}}}}}}}}}

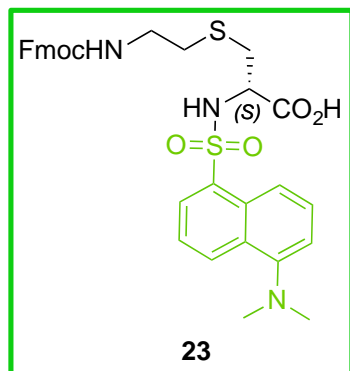
***N*-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*S*-(2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)ethyl)-*D*-cysteine (**211**).**

Derivative **20I** (207 mg, 0.521 mmol), FmocOSu (263 mg, 0.133 mmol) and NaHCO₃ (196 mg, 2.33 mmol) were dissolved in a mixture of H₂O/CH₃CN (1:2) (15 mL). The solution was stirred at room temperature for 24 h. CH₃CN was removed *in vacuo* and the aqueous phase was acidified with 2 M HCl (pH 2-3). The solvent was then removed and the crude was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/MeOH 95:5) affording compound **211** as a brownish viscous solid (145 mg, 0.234 mmol, 48%).



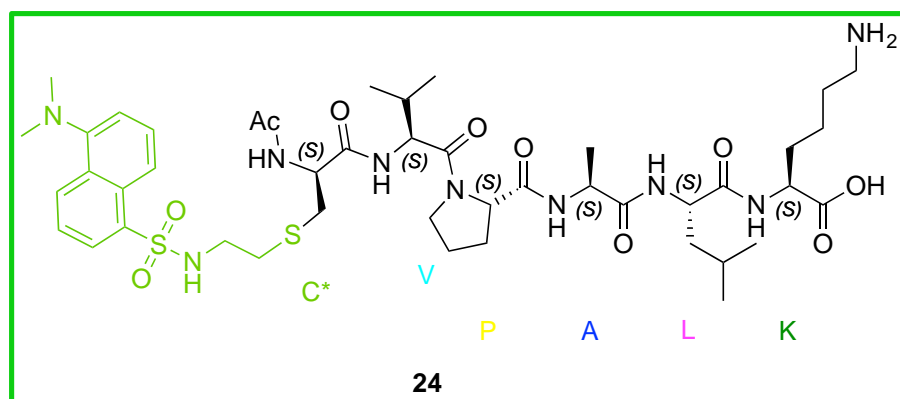
$[\alpha]_D^{25}$ (1.00, CHCl₃): 3.7 HRMS (ESI+) (m/z): 620.1919 [M+H]⁺; calcd for C₃₂H₃₃N₃O₆S₂H⁺: 620.1884. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 2.58 – 2.60 (m, 1H, CH₂-S), 2.64 (dd, 1H, *J* = 13.6, 9.8 Hz, H _{β}), 2.73 – 2.76 (m, 1H, CH₂-S), 2.77 – 2.80 (m, 1H, H _{β}), 2.81 (s, 6H, Me), 2.92 – 2.99 (m, 2H, CH₂-NH), 3.99 – 4.06 (m, 1H, H _{α}), 4.17 – 4.33 (m, 3H, CH^{Fmoc}, CH₂^{Fmoc}), 7.23 – 8.46 (m, 16H, H_{arom}, NHFmoc, NHSO₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ (ppm): 25.2 (CH₂-S), 32.6 (C _{β}), 42.5 (CH₂-NH), 45.1 (Me), 46.6 (CH^{Fmoc}) 53.9 (C _{α}), 65.7 (CH₂^{Fmoc}), 115.1, 119.1, 119.9, 120.0, 121.4, 123.6, 125.3, 127.1, 127.3, 127.6, 127.9, 128.2, 128.9, 129.5, 136.0, 137.4, 139.4, 140.7, 142.6, 143.8, 151.4, 156.0 (C_{arom}), 172.2, 173.8 (COOH, CO^{Fmoc}).

S-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)-N-((5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)-D-cysteine (23).



After the protection of derivative **20I** and subsequently purification by silica gel column chromatography, compound **23** was obtained as a brown solid.

HRMS (ESI+) (m/z): 620.1915 [$M+H$]⁺; calcd for $C_{32}H_{33}N_3O_6S_2H^+$: 620.1884. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 2.57 – 2.61 (m, 2H, CH₂S), 2.63 – 2.75 (m, 2H, H _{β}), 2.81 (s, 6H, Me), 2.90 – 3.00 (m, 2H, CH₂-NHSO₂), 3.85 – 3.96 (m, 1H, H _{α}), 4.15 – 4.30 (m, 3H, CH^{Fmoc}, CH₂^{Fmoc}), 7.21 – 8.49 (m, 16H, H^{aromáticos}, NH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ (ppm): 25.2 (CH₂-S), 31.4 (C _{β}), 42.6 (CH₂-NH), 45.0 (Me), 46.6 (CH^{Fmoc}), 59.7 (C _{α}), 65.5 (CH₂^{Fmoc}), 115.1, 119.1, 120.1, 121.4, 123.6, 125.2, 127.0, 127.3, 127.6, 127.8, 128.1, 128.9, 129.0, 129.1, 129.4, 136.0, 137.4, 140.7, 143.8, 143.8, 151.3, 151.3 (C^{aromáticos}), 170.3, 172.8 (COOH, C^{Fmoc}=O)

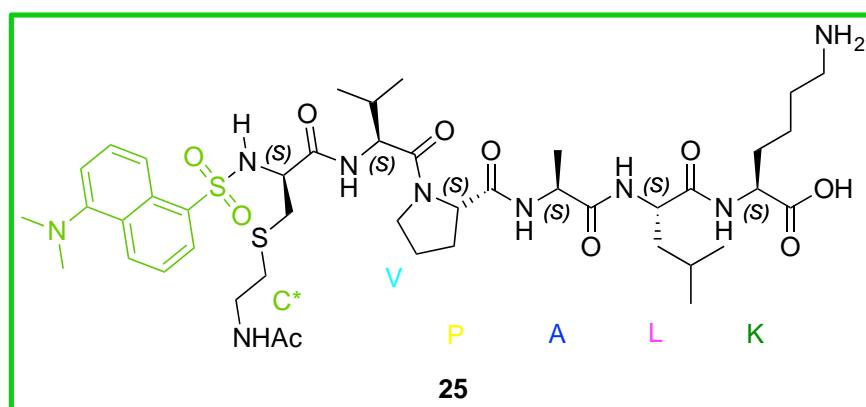
Ac-C(Dns)VPALK-OH (**24**).

The synthesis was carried out by manual SPPS following the same conditions as the previous peptide **22** but using as fluorescent amino acid compound **20I**. After elimination of the side chain protecting group and cleavage, compound **24** was obtained and then purified by reverse phase HPLC and lyophilized. Semi-preparative HPLC gradient (t_R 18.8 min):

Entry	Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% TFA (%)	CH ₃ CN + 0.05% TFA (%)
1	0	20	80	20
2	20	20	70	30

HRMS (ESI+) (m/z): 948.4673 [M+H]⁺; calcd for C₄₄H₆₉N₉O₁₀S₂H⁺: 948.4682. ¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 0.75 – 0.99 (m, 12 H, Me^V, Me^L), 1.39 (d, 3H, J = 7.2 Hz, Me^A), 1.54 – 1.76 (m, 7H, CH^L, H_β^L, CH₂-CH₂-NH₂^K, CH₂-CH₂-CH₂-NH₂^K), 1.99 (s, 3H, NHAc), 2.03 – 2.06 (m, 1 H, H_β^V), 2.22 – 2.37 (m, 2H, CH₂^P), 2.41 – 2.70 (m, 6H, H_β^{C*}, CH₂^P, CH₂-S^{linker}), 2.91 (s, 6H, Me^{C*}), 2.96 – 3.20 (m, 4H, CH₂-NH^{linker}, CH₂-NH₂^K), 3.63 – 3.86 (m, 4H, H_β^K, CH₂^P), 4.14 – 4.21 (m, 1H, H_α^{C*}), 4.26 – 4.40 (m, 5H, H_α^A, H_α^L, H_α^P, H_α^K, H_α^V), 7.34 – 8.87 (m, 12H, H_{arom}, CONH).

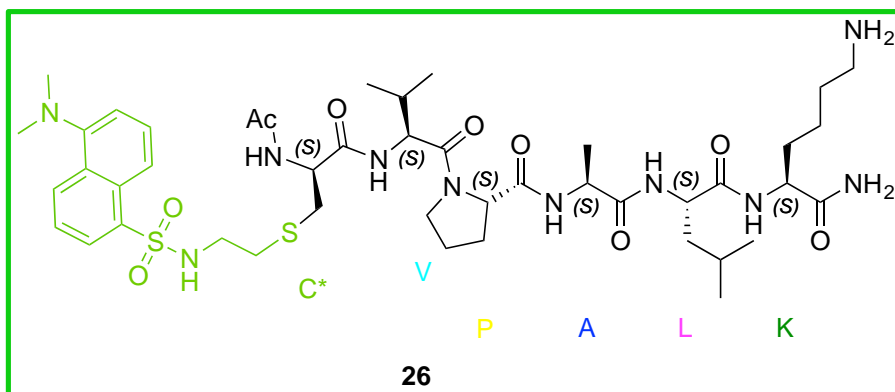
Ac-C'(Dns)VPALK-OH (**25**).



The synthesis was carried out by manual SPPS following the same conditions as the previous peptides but using as fluorescent amino acid compound **23**. After elimination of the side chain protecting group and cleavage, compound **25** was obtained and then purified by reverse phase HPLC and lyophilized. Semi-preparative HPLC gradient (t_R 16.4 min):

Entry	Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1%	CH ₃ CN + 0.05%
			TFA (%)	TFA (%)
1	0	20	80	20
2	20	20	70	30

HRMS (ESI+) (m/z): 948.4680 [M+H]⁺; calcd for C₄₄H₆₉N₉O₁₀S₂H⁺: 948.4682. ¹H NMR (400 MHz, H₂O:D₂O) δ (ppm): 0.82 – 0.97 (m, 12 H, Me^V, Me^L), 1.38 (d, J= 7.2 Hz, 3 H, Me^A), 1.60 – 1.75 (m, 7H, CH^L, H_β^L, CH₂-CH₂-NH₂^K, CH₂-CH₂-CH₂-NH₂^K), 1.99 (s, 3H, NHAc), 2.01 – 2.05 (m, 1 H, H_β^V), 2.17 – 2.28 (m, 2H, CH₂^P), 2.44 – 2.66 (m, 6H, H_β^{C*}, CH₂^P, CH₂-S^{linker}), 2.96 (s, 6H, Me^{C*}), 3.00 – 3.17 (m, 4H, CH₂-NH^{linker}, CH₂-NH₂^K), 3.50 – 3.70 (m, 4H, H_β^K, CH₂^P), 4.14 – 4.20 (m, 1H, H_α^{C*}), 4.28 – 4.44 (m, 5H, H_α^A, H_α^L, H_α^P, H_α^K, H_α^V), 7.34 – 8.87 (m, 12H, H_{aromatics}, NH_{amides}).

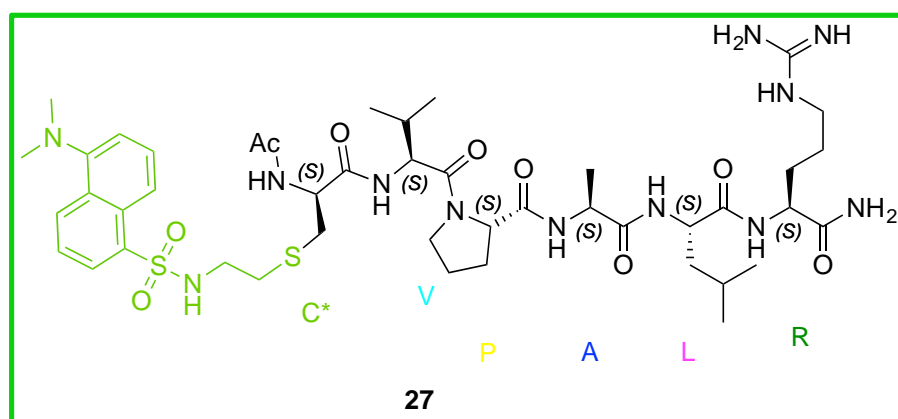
Ac-C(Dns)VPALK-NH₂ (26).

The synthesis was carried out by automatic SPPS following the same conditions as the previous peptide but using as fluorescent amino acid compound **6f**. After elimination of the side chain protecting group and cleavage, compound **8f** was obtained and then purified by reverse phase HPLC and lyophilized. Semi-preparative HPLC gradient (t_R 18.2 min):

Entry	Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1%	CH ₃ CN + 0.05%
			TFA (%)	TFA (%)
1	0	20	80	20
2	20	20	70	30

HRMS (ESI+) (m/z): 970.4836 [M+H]⁺; calcd for C₄₄H₇₀N₁₀O₉S₂H⁺: 970.4841. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 0.86-0.98 (m, 12 H, Me^V, Me^L), 1.38 (d, 3H, J = 7.2 Hz, Me^A), 1.51 – 1.97 (m, 11H, CH^L, H_β^L, CH₂-CH₂-NH₂^K, CH₂-CH₂-CH₂-NH₂^K, CH₂^P, H_β^K), 2.01 (s, 3H, NHAc), 2.02 – 2.11 (m, 1H, H_β^V), 2.22-2.37 (m, 2H, CH₂^P), 2.49 – 2.77 (m, 4H, H_β^{C*}, CH₂-S^{linker}), 3.01 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂-NH₂^K), 3.20 (t, 2H, J = 6.4 Hz, CH₂-NH^{linker}), 3.45 (s, 6H, Me^{C*}), 3.65 – 3.74 (m, 1H, CH₂^P), 3.83 – 3.91 (m, 1H, CH₂^P), 4.26 – 4.41 (m, 6H, H_α^A, H_α^L, H_α^P, H_α^K, H_α^V, H_α^{C*}), 7.91 (t, 2H, J=8.2 Hz, H^{3d}, H^{7d}), 8.00 – 8.06 (m, 1H, H^{6d}), 8.40 – 8.79 (m, 3H, H^{2d}, H^{4d}, H^{8d}).

Ac-C(Dns)VPALR-CONH₂ (27).

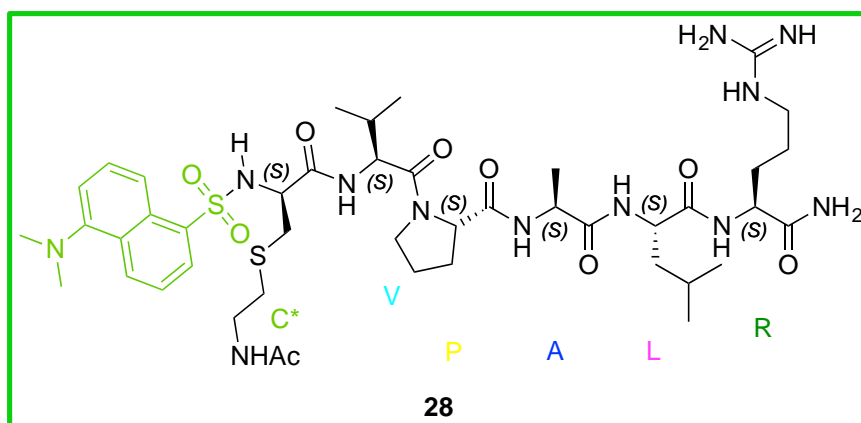


The synthesis was carried out by automatic solid phase peptide synthesis (SPPS) using automated synthesizer Liberty Blue and Rink Amide MBHA resin. The building block **20I** (0.150 mmol) was coupled manually.

After elimination of protecting groups and cleavage, peptide **27** was obtained and subsequently purified by reversed-phase HPLC and lyophilized. Semi-preparative HPLC gradient (t_R 19.3 min):

Entry	Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1%	CH ₃ CN + 0.05%
			TFA (%)	TFA (%)
1	0	20	80	20
2	20	20	70	30

HRMS (ESI+) (m/z): 975.4941 [$M+H$]⁺; calcd for C₄₄H₇₀N₁₂O₉S₂H⁺: 975.4903. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 0.81 – 1.00 (m, 12 H, Me^V, Me^L), 1.38 (d, 3 H, $J = 7.2$ Hz, Me^A), 1.53 – 1.72 (m, 5H, H $_{\beta}^L$, CH^L, CH₂-CH₂-NH₂^R), 1.71 – 1.96 (m, 4H, H $_{\beta}^R$, CH₂^P), 1.99 (s, 3H, NHAc), 2.03 (s, 1 H, H $_{\beta}^V$), 2.04 – 2.08 (m, 1H, CH₂^P), 2.22 – 2.33 (m, 1H, CH₂^P), 2.48 – 2.56 (m, 2H, CH₂-S^{linker}), 2.57 – 2.75 (m, 2H, H $_{\beta}^{C^*}$), 3.11 – 3.22 (m, 4 H, CH₂-NH^{linker}, CH₂-NH₂^R), 3.24 (s, 6H, Me^{C*}), 3.63 – 3.73 (m, 1H, CH₂^P), 3.80 – 3.91 (m, 1H, CH₂^P), 4.24 – 4.39 (m, 6H, H $_{\alpha}^{C^*}$, H $_{\alpha}^A$, H $_{\alpha}^L$, H $_{\alpha}^P$, H $_{\alpha}^R$, H $_{\alpha}^V$), 7.79 – 7.87 (m, 3H, H^{3d}, H^{6d}, H^{7d}), 8.31 – 8.62 (m, 3H, H^{2d}, H^{4d}, H^{8d}).

Ac-C'(Dns)VPALR-CONH₂ (**28**).

The synthesis was carried out by automatic solid phase peptide synthesis (SPPS) using automated synthesizer Liberty Blue and Rink Amide MBHA resin. The building block **23** (0.150 mmol) was coupled manually. After elimination of protecting groups and cleavage, peptide **28** was obtained and subsequently purified by reversed-phase HPLC and lyophilized. Semi-preparative HPLC gradient (t_R 16.7 min):

Entry	Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1%	CH ₃ CN + 0.05%
			TFA (%)	TFA (%)
1	0	20	80	20
2	20	20	70	30

HRMS (ESI+) (m/z): 975.4911 [M+H]⁺; calcd for C₄₄H₇₀N₁₂O₉S₂H⁺: 975.4903. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 0.81 – 0.96 (m, 12 H, Me^V, Me^L), 1.34 (d, 3 H, J= 7.2 Hz, Me^A), 1.50 – 1.67 (m, 5H, H_β^L, CH^L, CH₂-CH₂-NH₂^R), 1.67 – 1.93 (m, 4H, H_β^R, CH₂^P), 1.97 (s, 3H, NHAc), 1.99 – 2.13 (m, 2H, CH₂^P), 2.19 – 2.30 (m, 1H, H_β^V), 2.44 – 2.53 (m, 2H, CH₂-S^{linker}), 2.53 – 2.71 (m, 2H, H_β^{C*}), 3.09 – 3.19 (m, 4 H, CH₂-NH^{linker}, CH₂-NH₂^R), 3.31 (s, 6H, Me^{C*}), 3.62 – 3.72, (m, 1H, CH₂^P), 3.79 – 3.89 (m, 1H, CH₂^P), 4.21 – 4.36 (m, 5H, H_α^A, H_α^L, H_α^{C*}, H_α^R, H_α^V), 4.40 (d, 1H, J= 8.1 Hz, H_α^P), 7.79 – 7.91 (m, 3H, H^{3d}, H^{6d}, H^{7d}), 8.32 – 8.67 (m, 3H, H^{2d}, H^{4d}, H^{8d}).

BIOLOGICAL STUDY WITH CELL LINES

Cell line stocks. Cell lines were obtained from European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, United Kingdom) and they were maintained in liquid nitrogen for long-term storage. The freezing process was done slowly to avoid cell death due to possible crystal formation. Cells were trypsinized and spun down (1000 rpm, 5 min) at room temperature. Afterwards, cells were resuspended in culture medium with 10% FBS. In addition, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma), a cryoprotectant, was added to a 10% final concentration. Cells were frozen in cryotubes at -80 °C in isopropanol containers for a week. Afterwards, they were preserved permanently in liquid nitrogen. In contrast, thawing and recovery of cells from liquid nitrogen was done quickly. Cryotubes were removed from liquid nitrogen and maintained in dry ice until they thawed, at which point they were immediately placed in a 37 °C water bath. Cells were washed with culture medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% v/v fetal calf serum to eliminate DMSO. Finally, cells were resuspended in fresh medium, transferred to a flask for cell culture.

Cell culture. Briefly, HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% v/v fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and penicillin–streptomycin (100 units/mL and 100 mg/mL, respectively). Cells were maintained in an incubator at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. HeLa cells were seeded in 24-well plates at a density of 50000 cells/well and were cultured overnight. Prior to starting the experiment, medium was removed from the plates, and fresh medium containing 10 μM from the stock solution (10 mM in DMSO) of the required peptide was added to the cells.

Cells were cultured for 2 h before microscopy visualization. After that, peptide media was removed and cells were rinsed to take the images.

Fluorescence microscopy. Data were obtained with a Leica microscope (*DM6000B*) equipped with a *Hamamatsu Orca-ER C10600* and an A4 Leica filter.

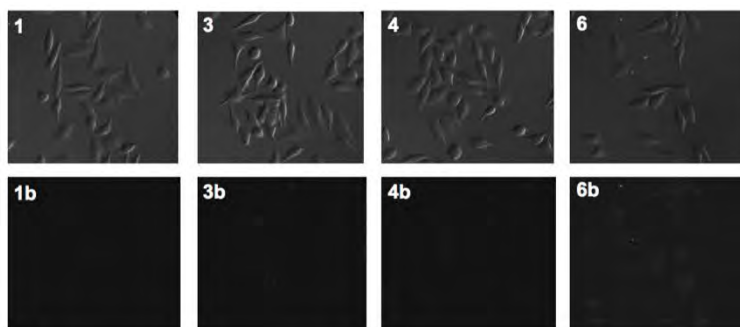
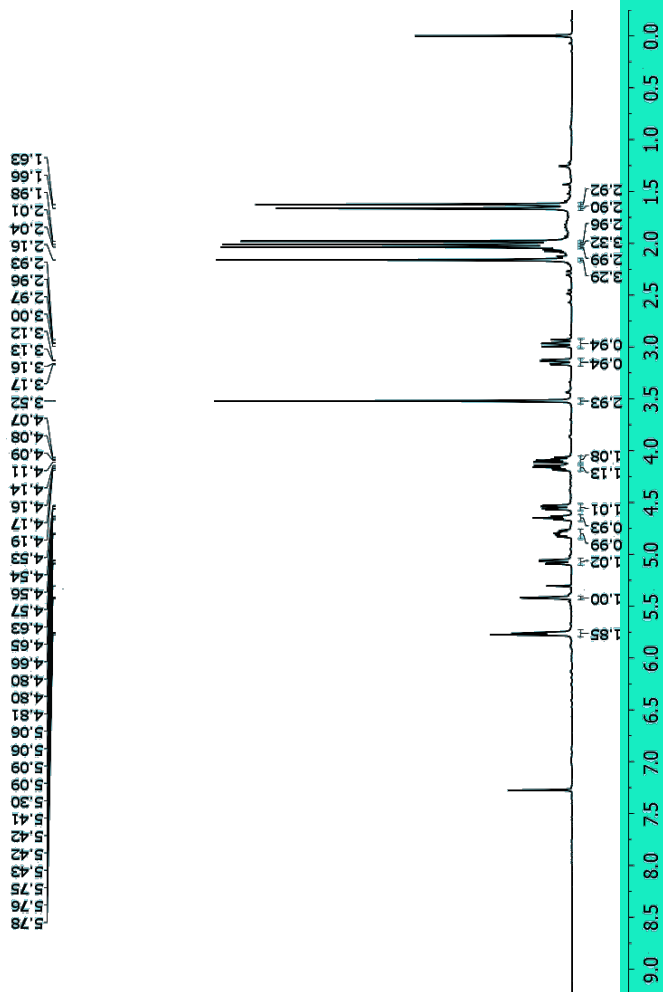


Figure 8.1. Visualization of the assayed peptides entry in HeLa cells. 1 to 6 show the Nomarski images of the cell cultures. Corresponding –b images show the cells under fluorescent optics using an A4 Leica filter with 2 s exposure time. Number 1 shows the control without any peptide, 3 shows peptide **24**, 4 shows peptide **26**, and 6 shows peptide **27**. Fluorescence is obvious after internalization of peptide **27**.

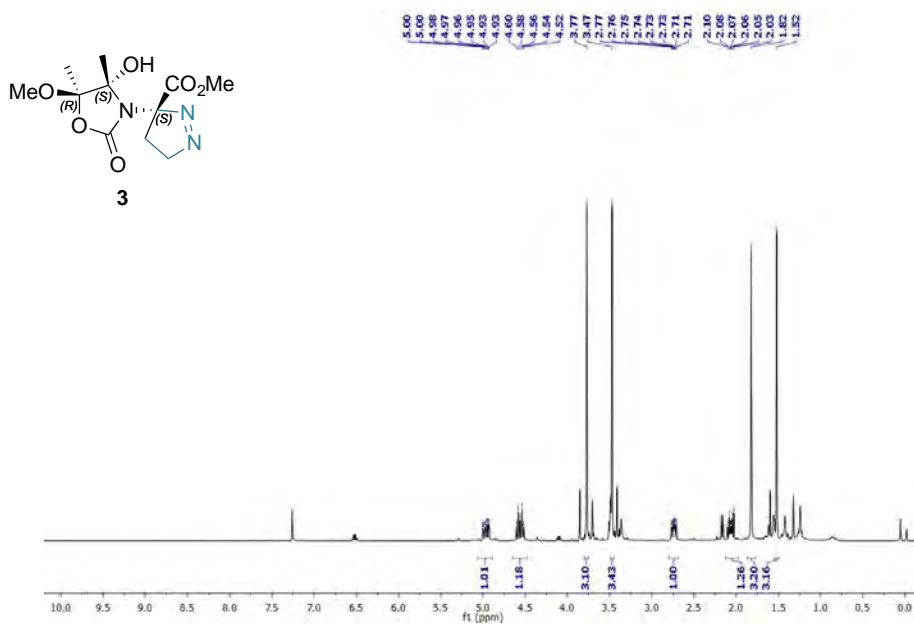
Capítulo 9. Anexo: Espectros de RMN



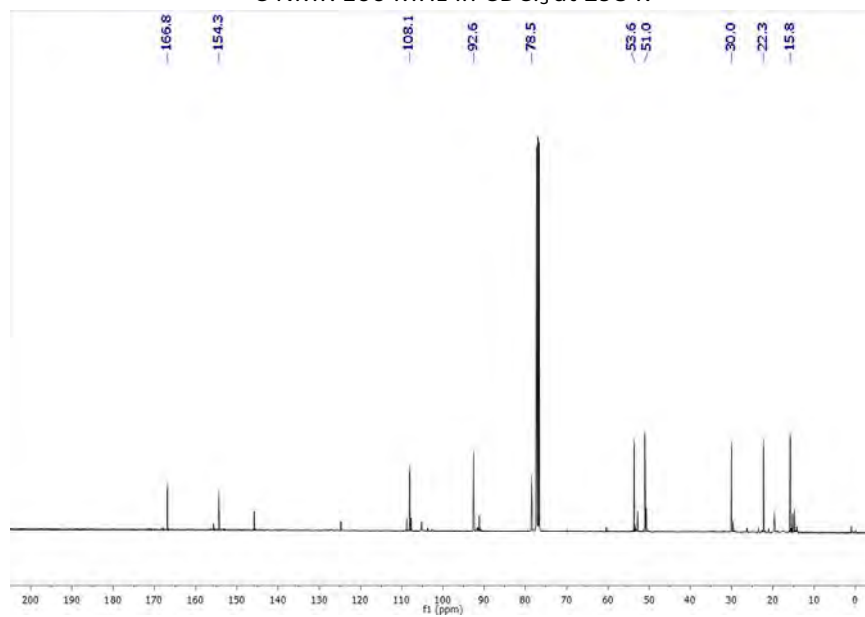
NMR experiments.

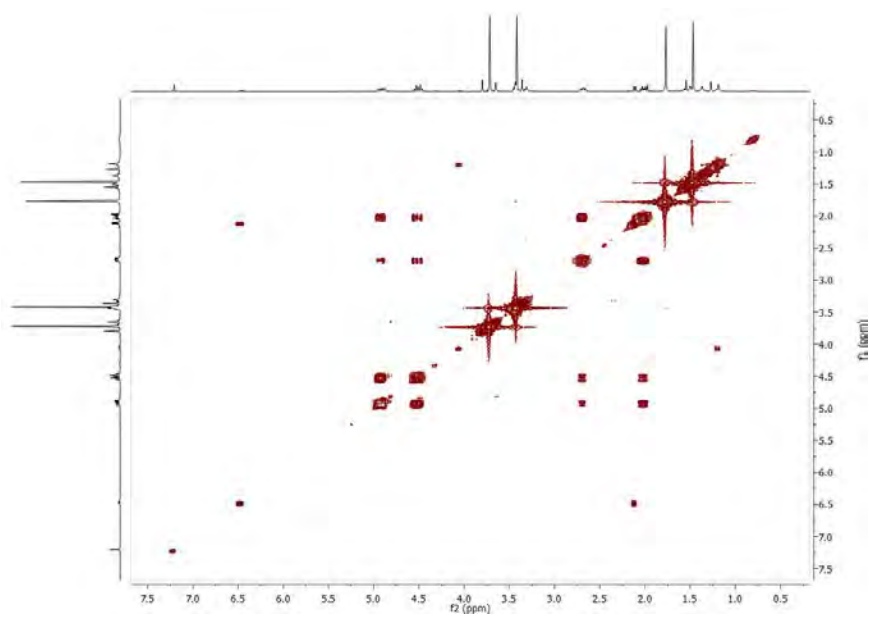
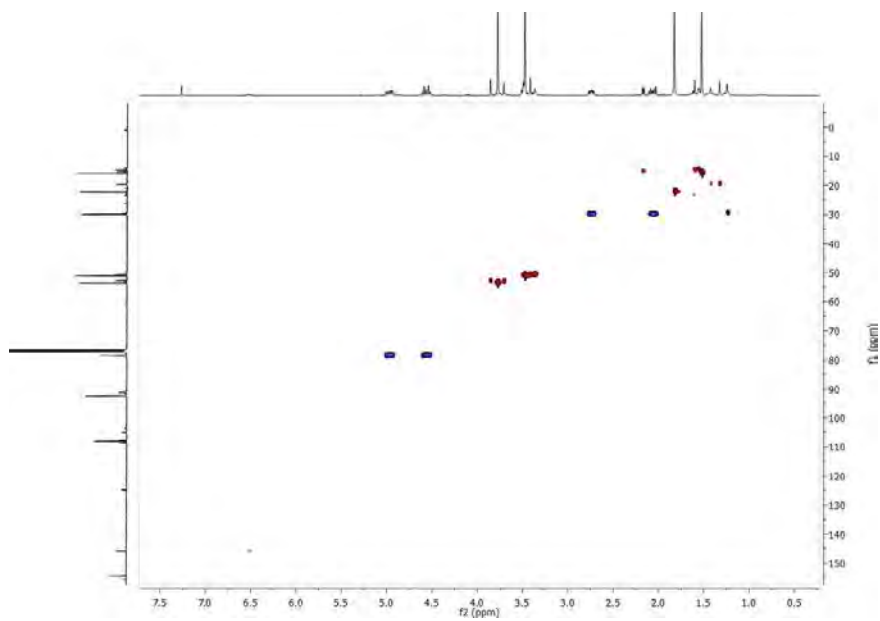
NMR experiments were performed on a 400 spectrometer at 298 K. Magnitude-mode ge-2D COSY spectra were acquired with gradients by using the cosygpqf pulse program with a pulse width of 90° . Phase-sensitive ge-2D HSQC spectra were acquired by using z-filter and selection before t1 removing the decoupling during acquisition by use of the invigpndph pulse program with CNST2 (J_{HC})=145. Phase-sensitive ge-2D NOESY experiments were performed. NOE intensities were normalized with respect to the diagonal peak at zero mixing time.

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**3**)

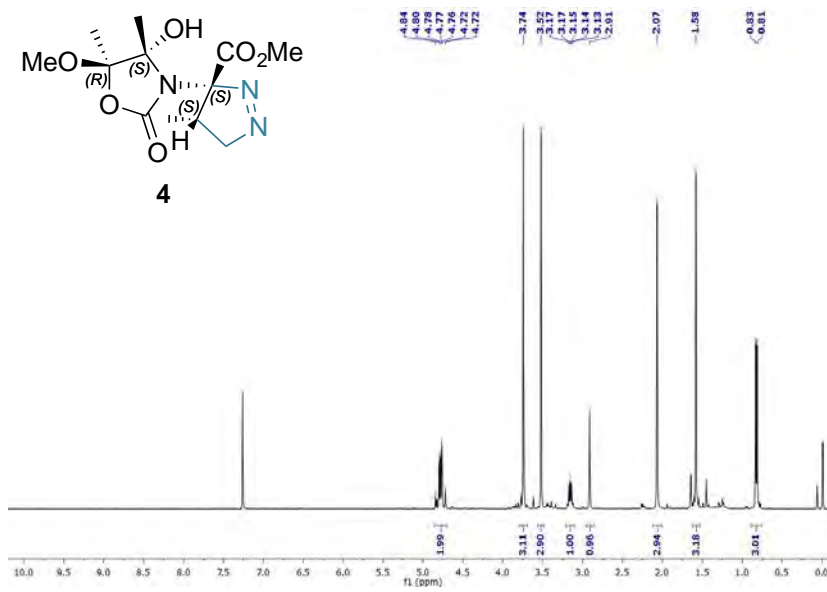


^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

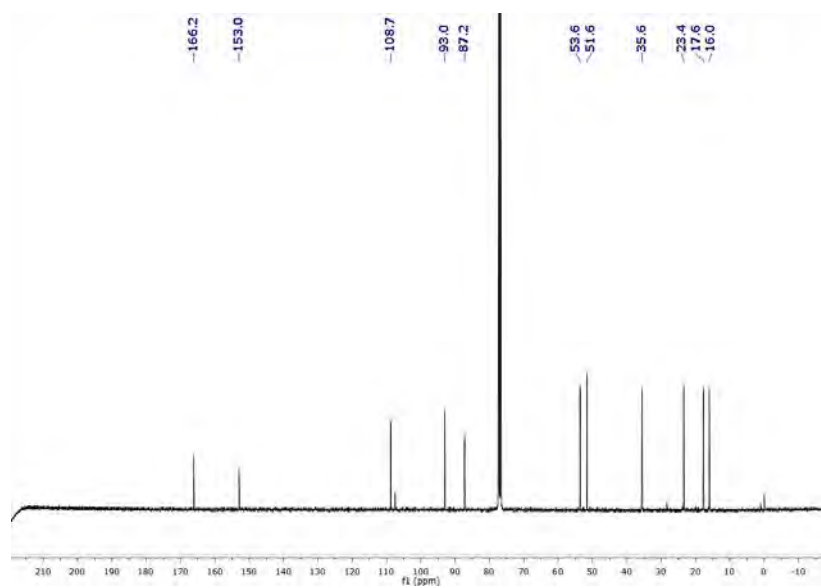


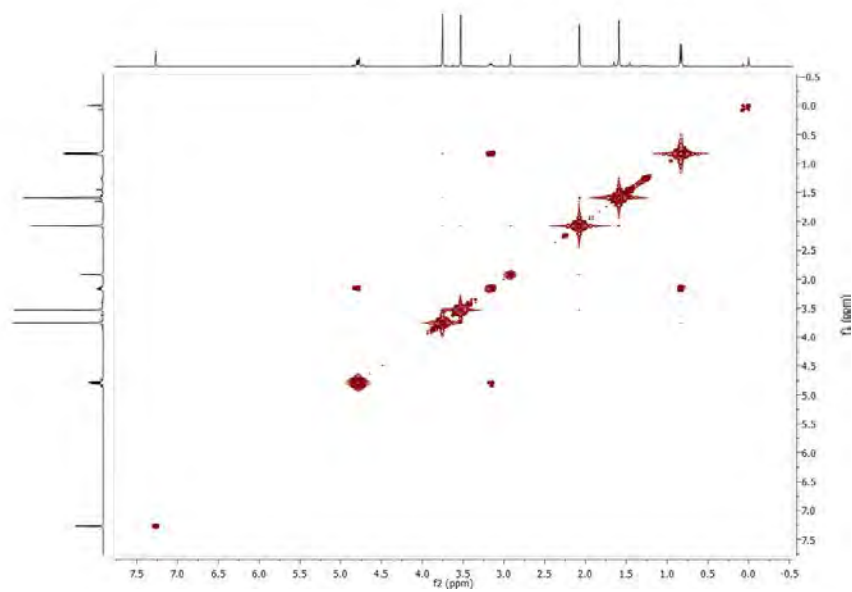
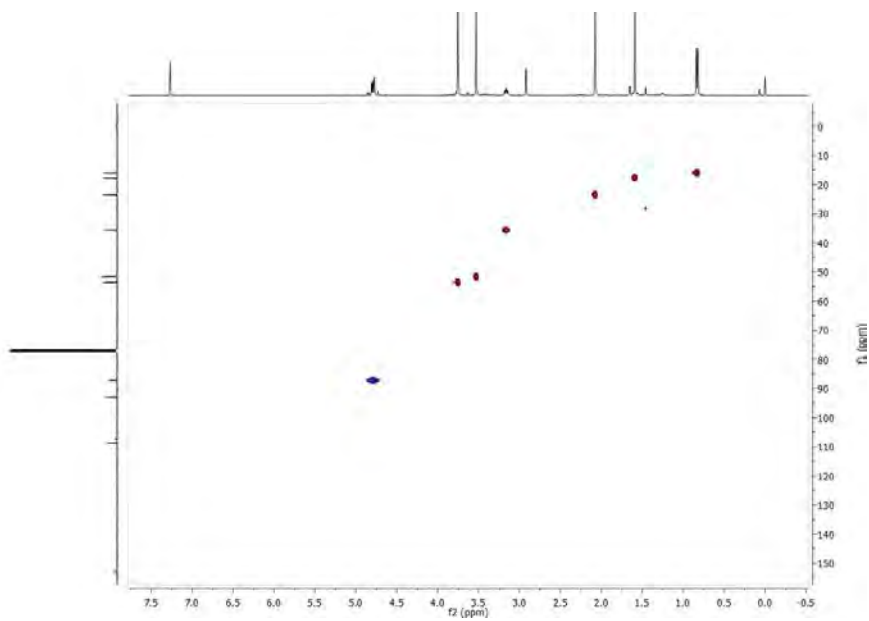
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

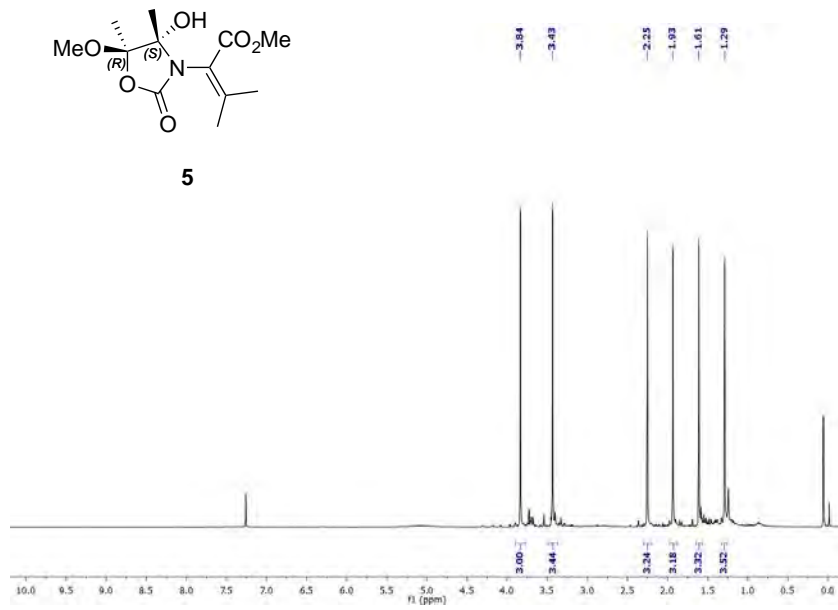
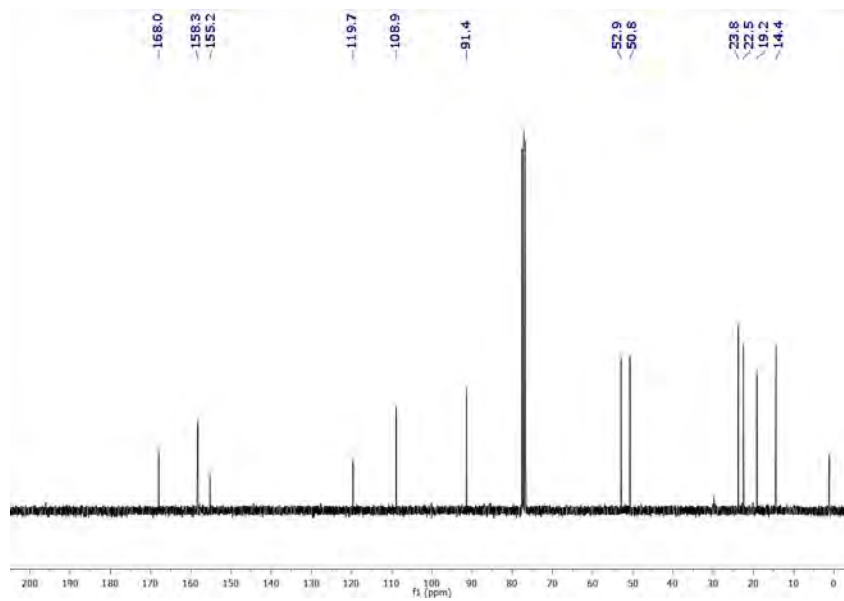
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**4**)

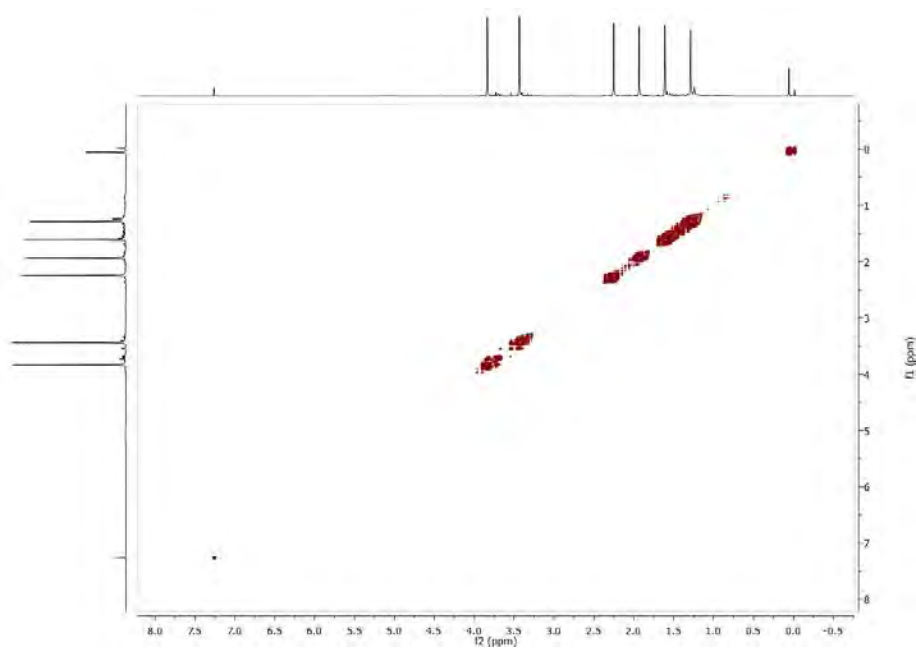
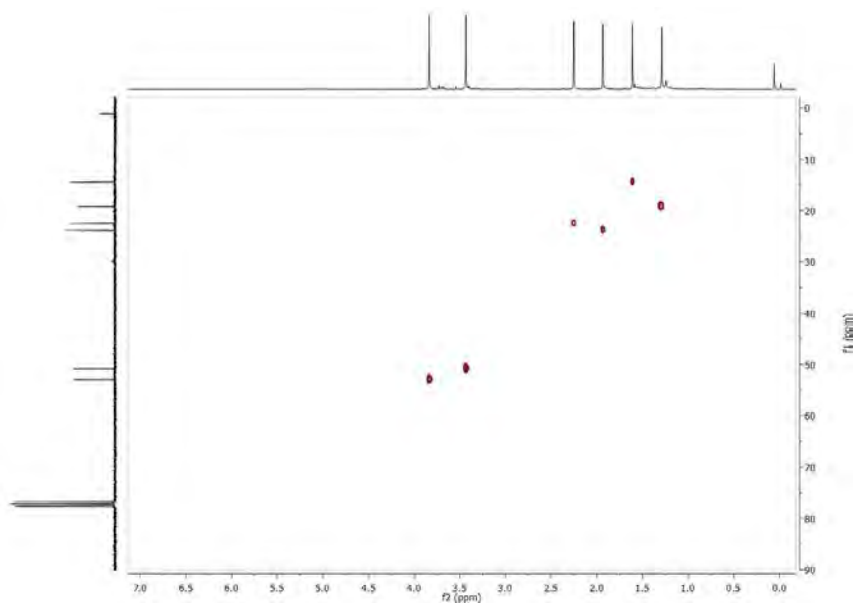


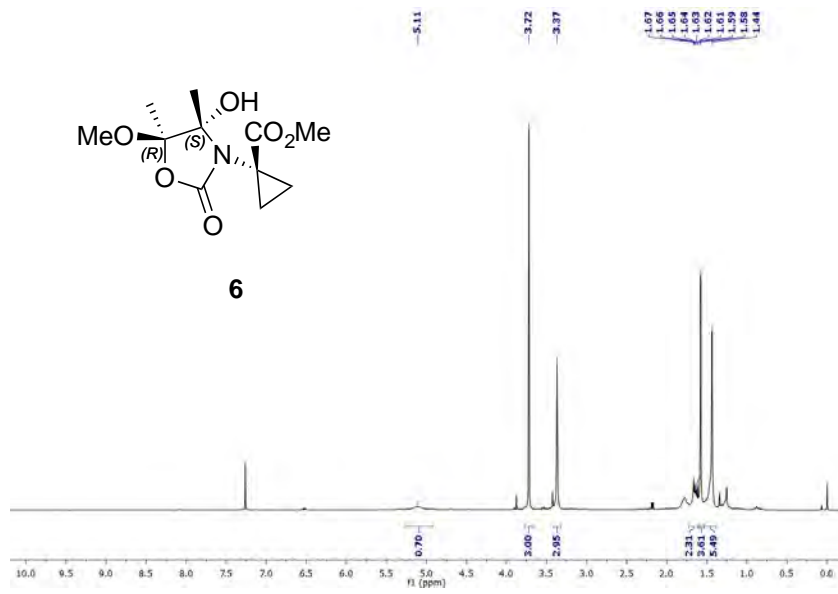
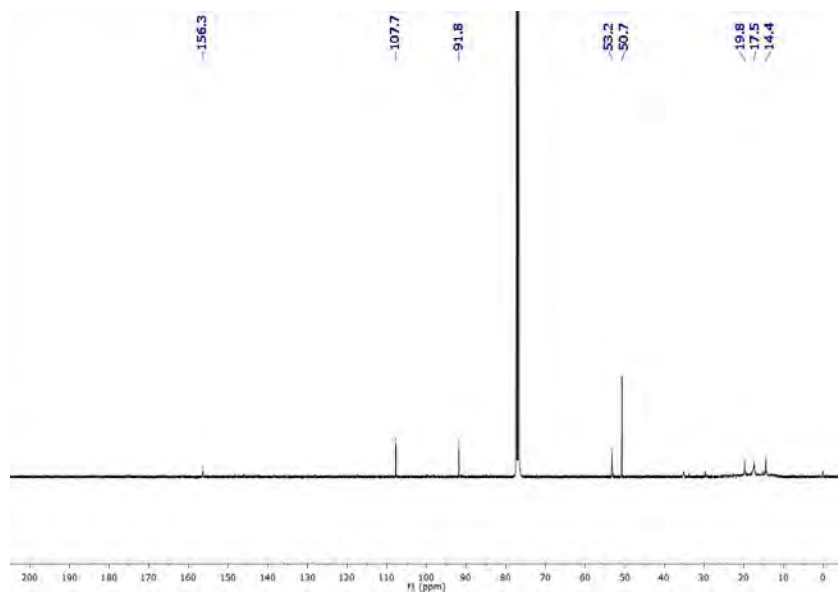
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

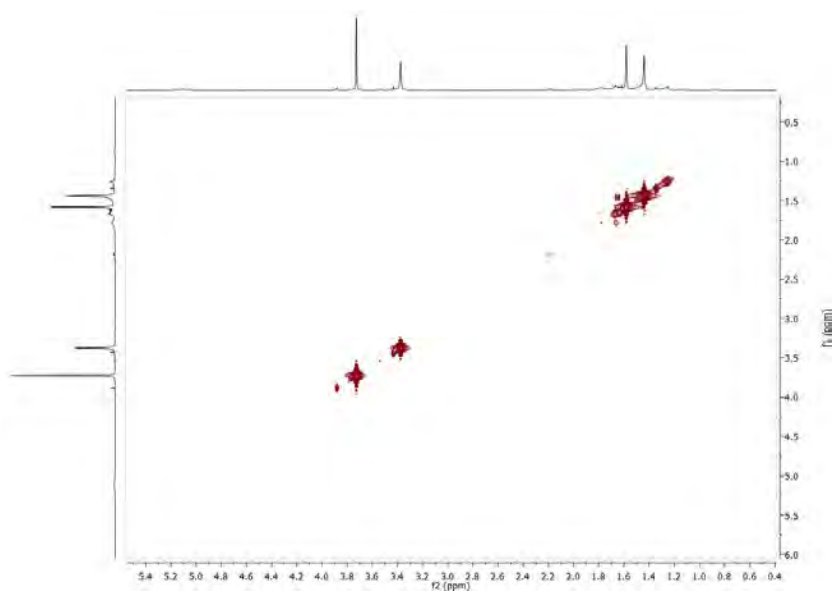
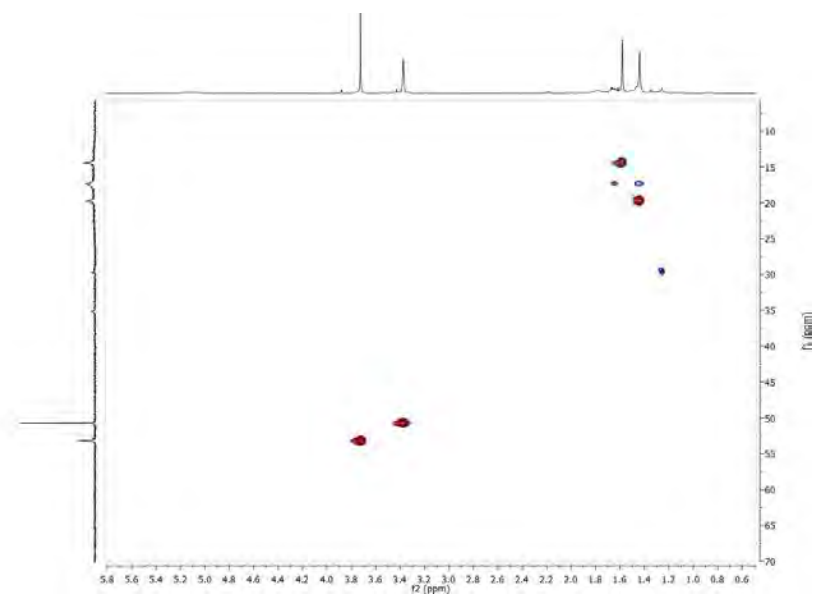


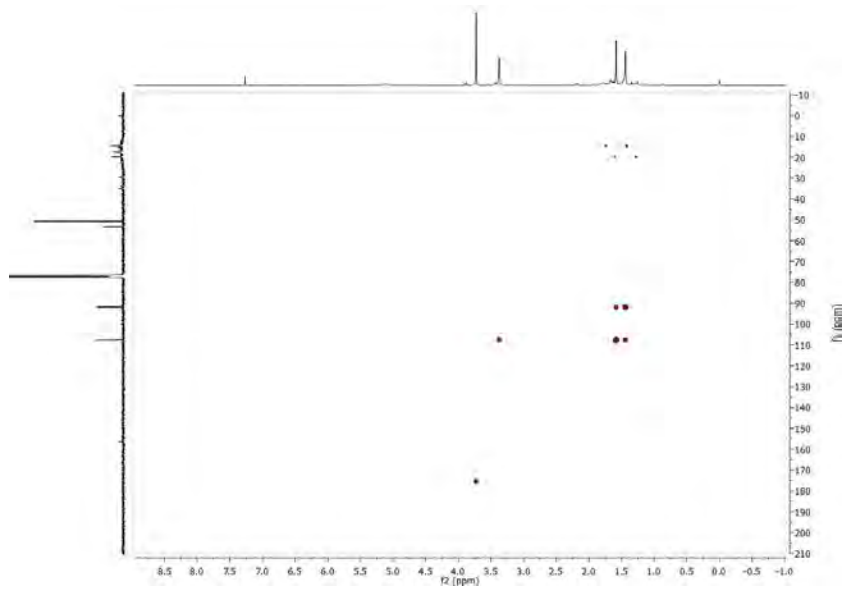
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

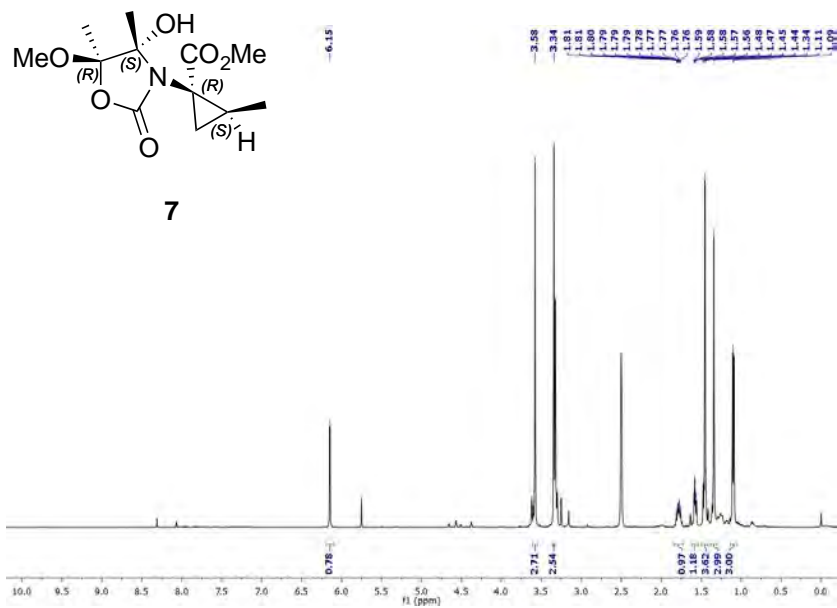
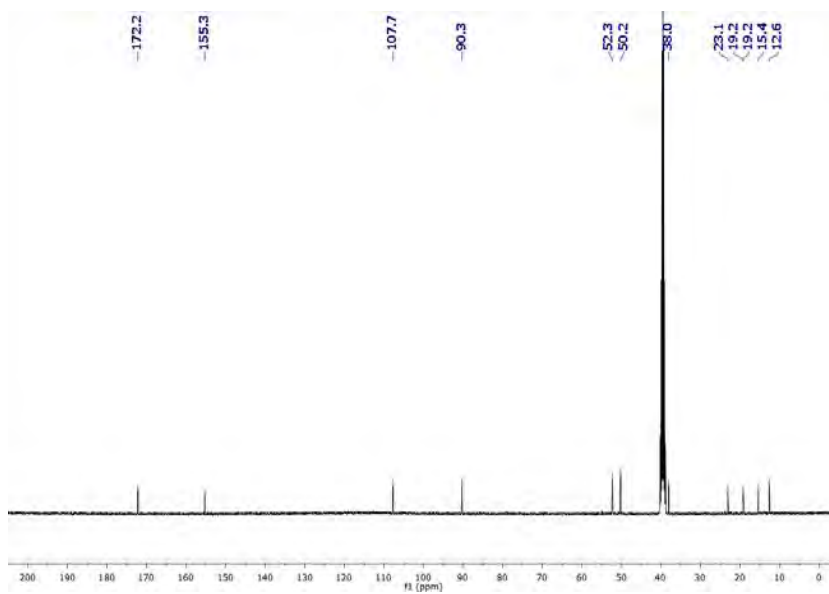
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (5) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

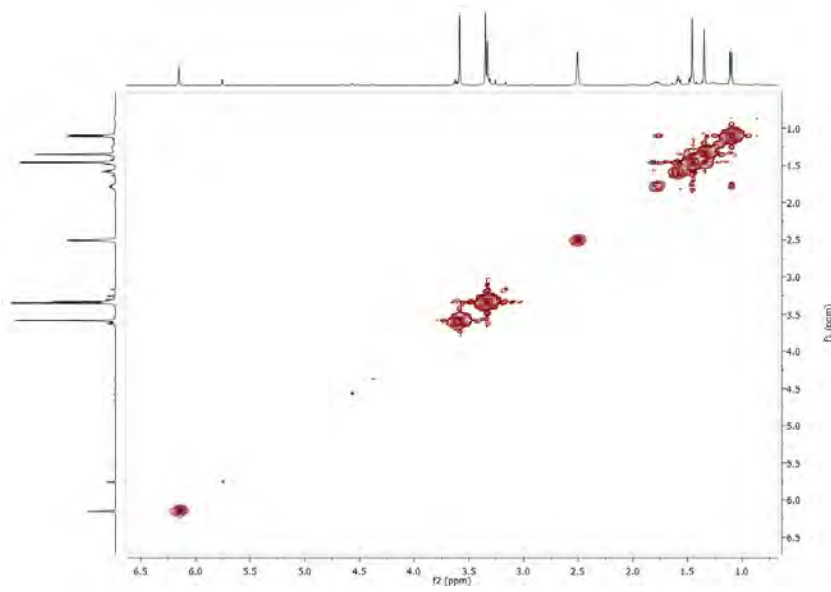
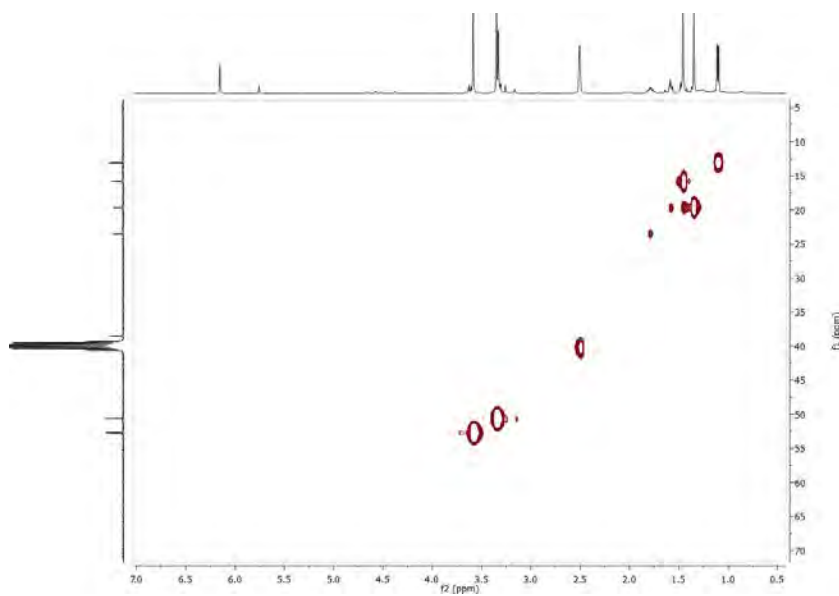
COSY in CDCl₃ at 298 KHSQC in CDCl₃ at 298 K

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (6) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

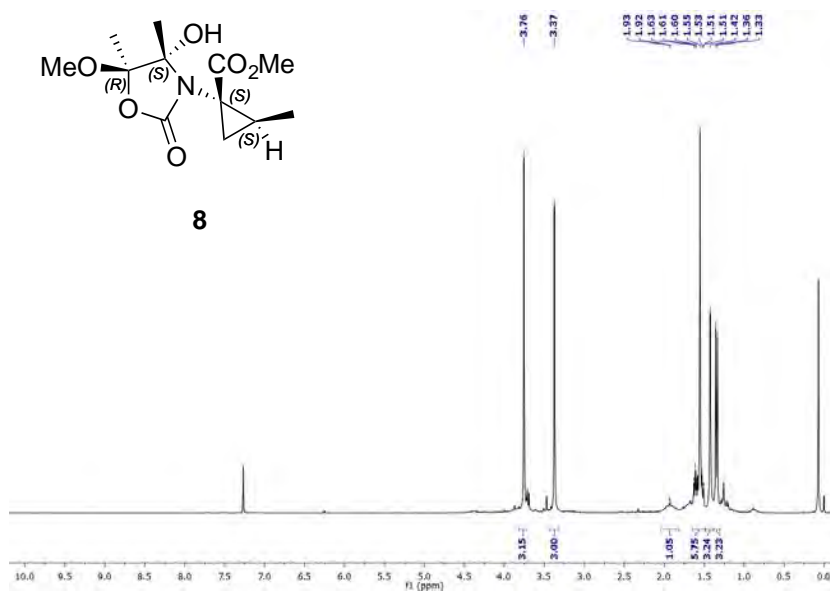
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

HMBC in CDCl_3 at 298 K

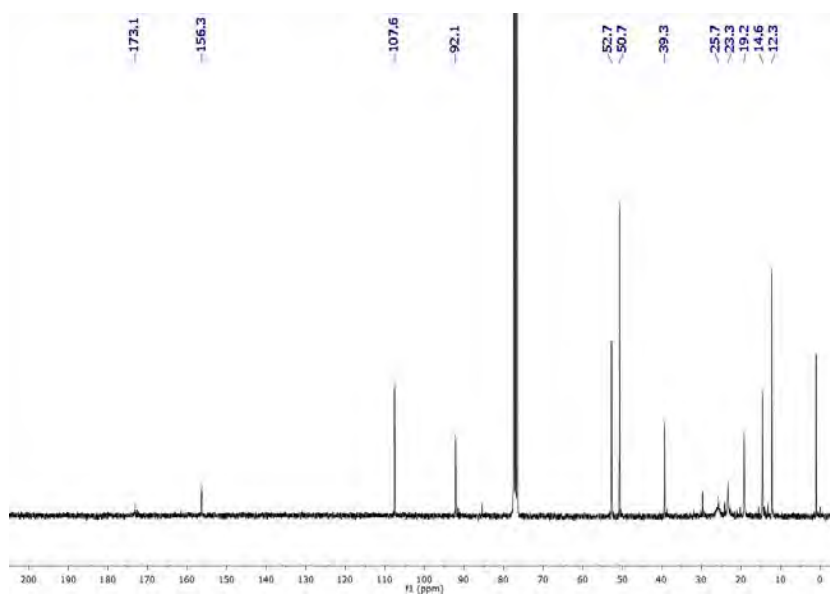
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (7) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

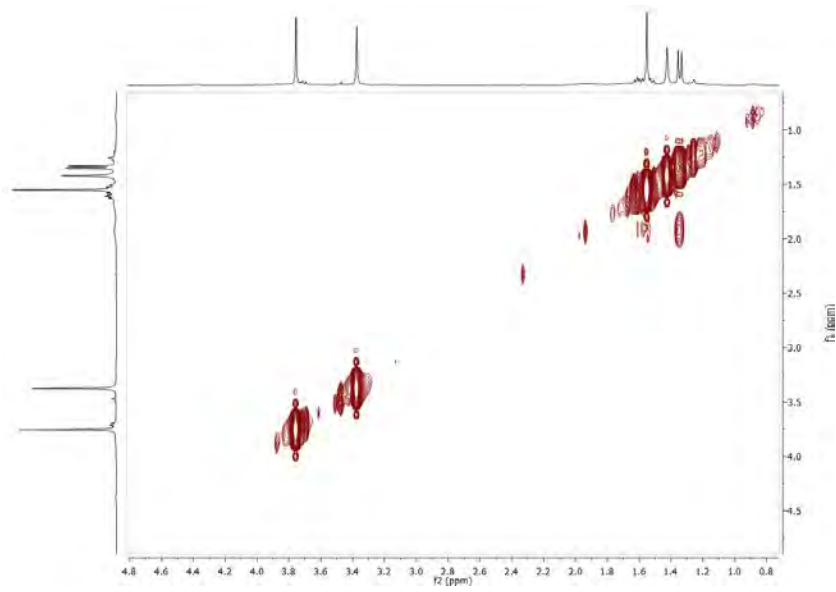
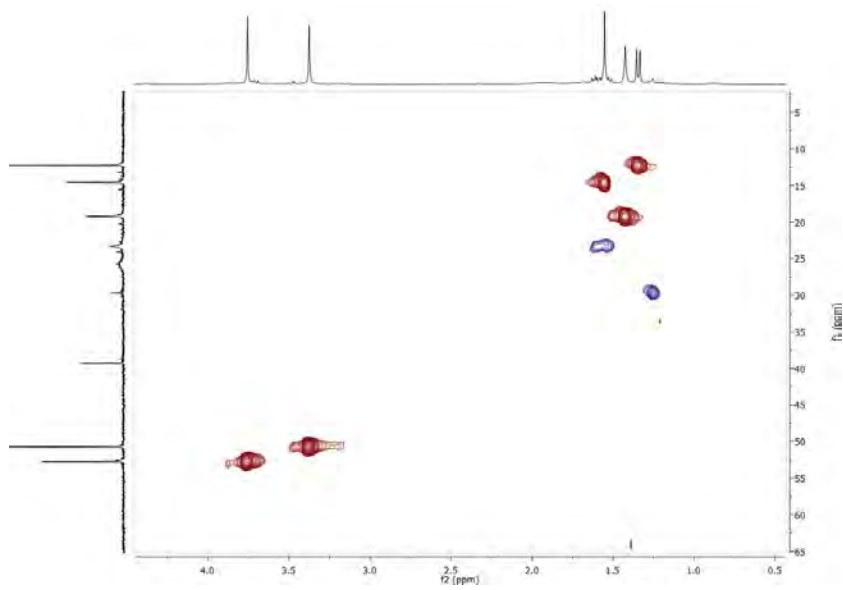
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

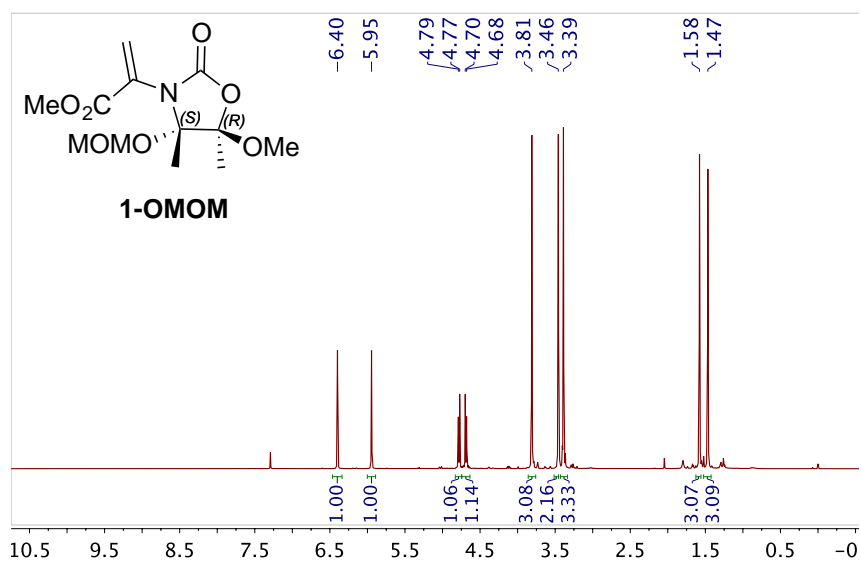
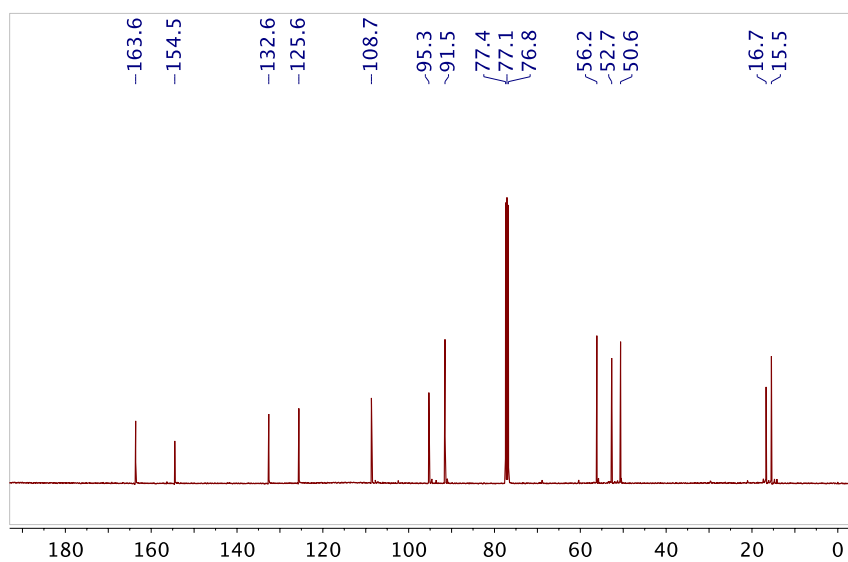
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**8**)



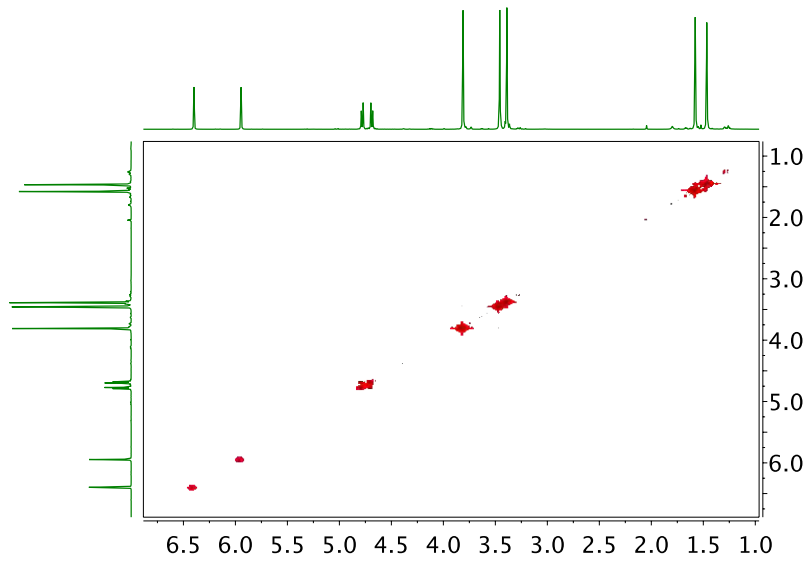
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K



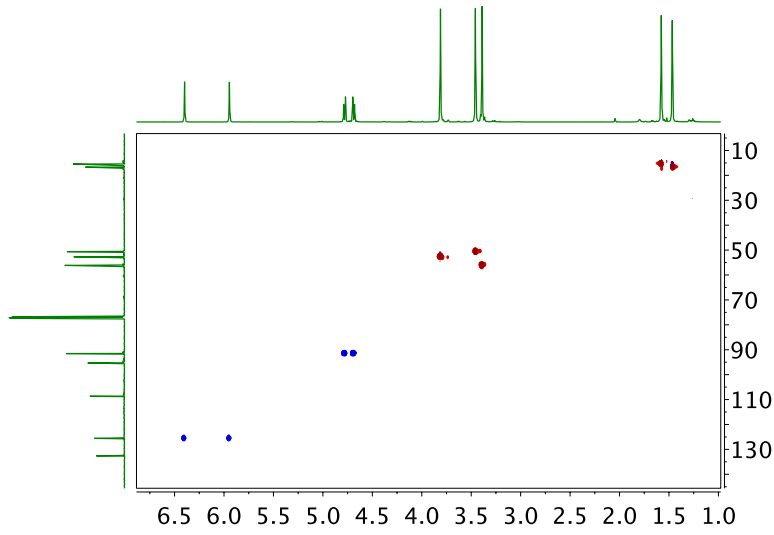
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

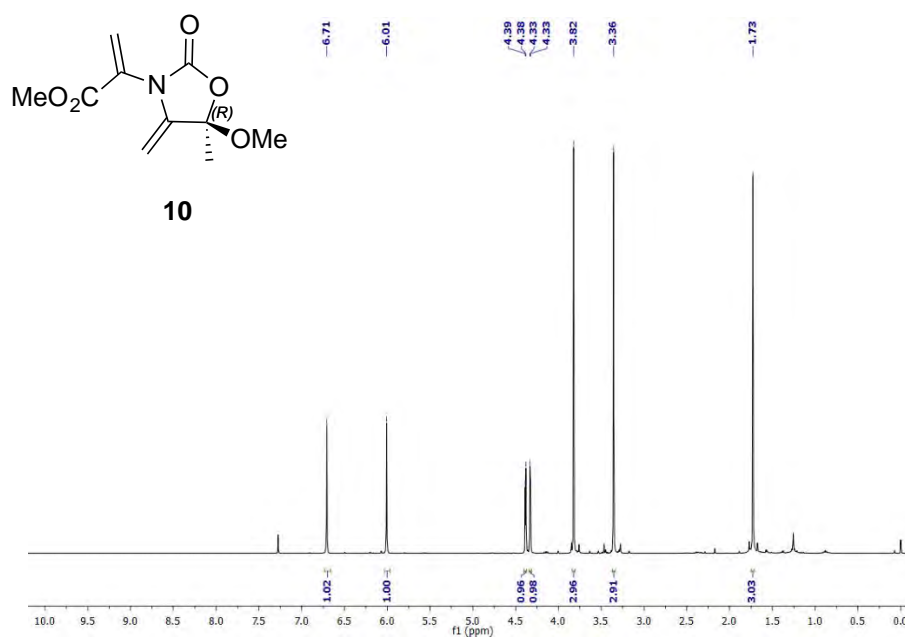
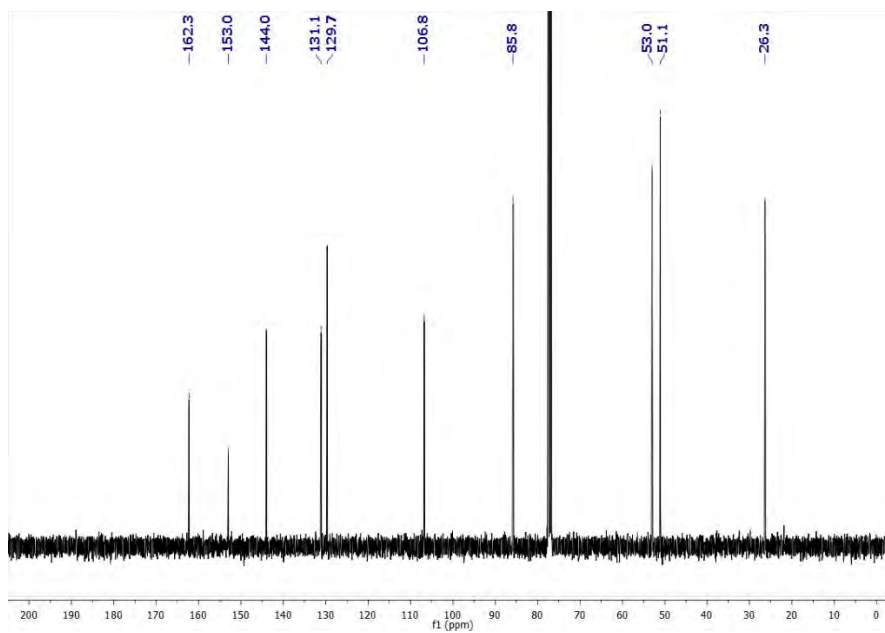
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**1-OMOM**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

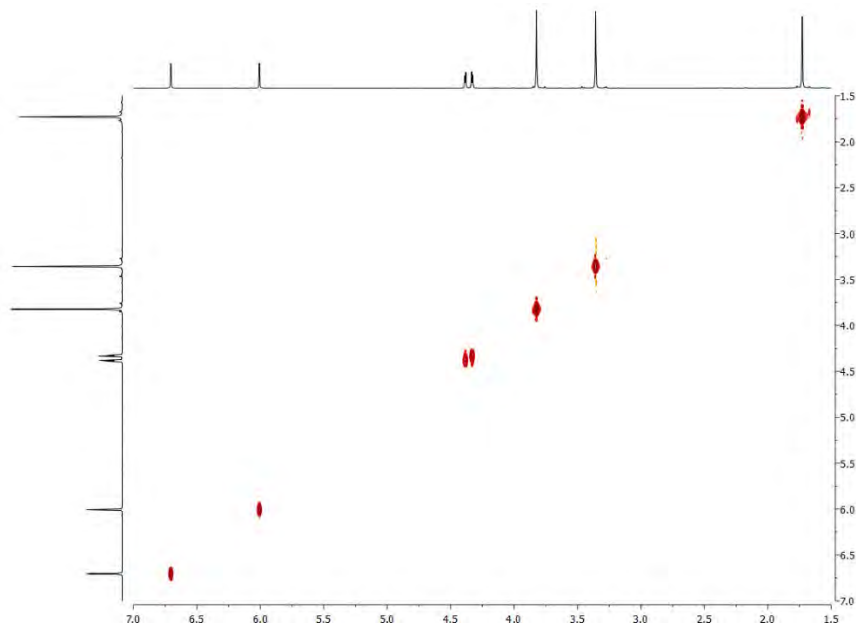
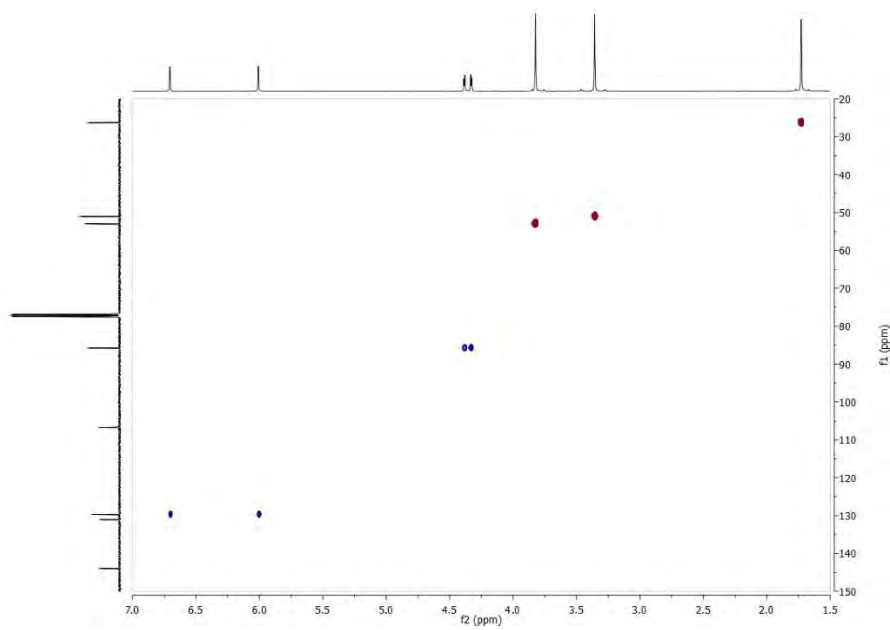
COSY in CDCl₃ at 298 K

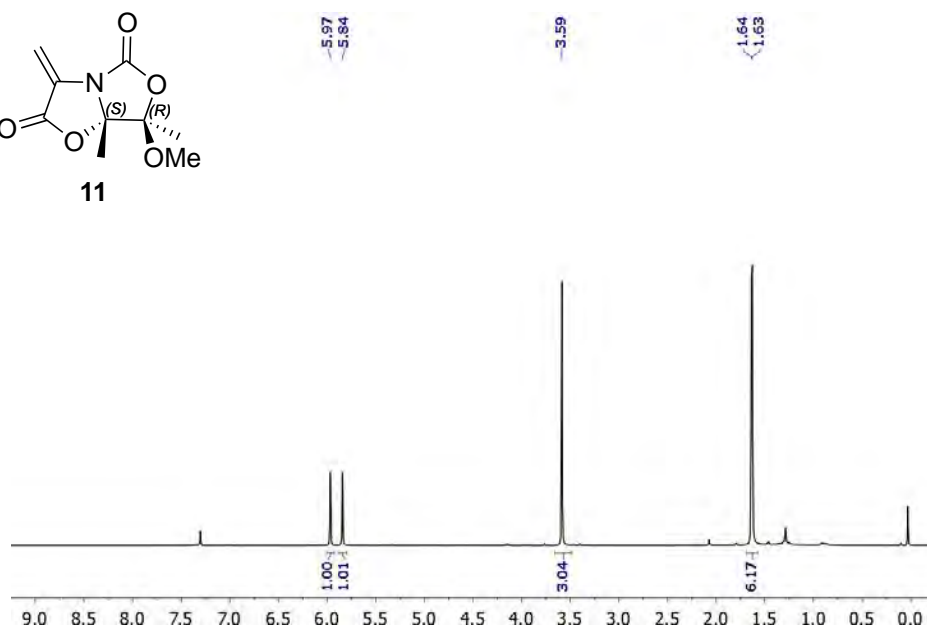
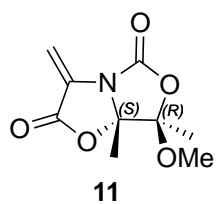
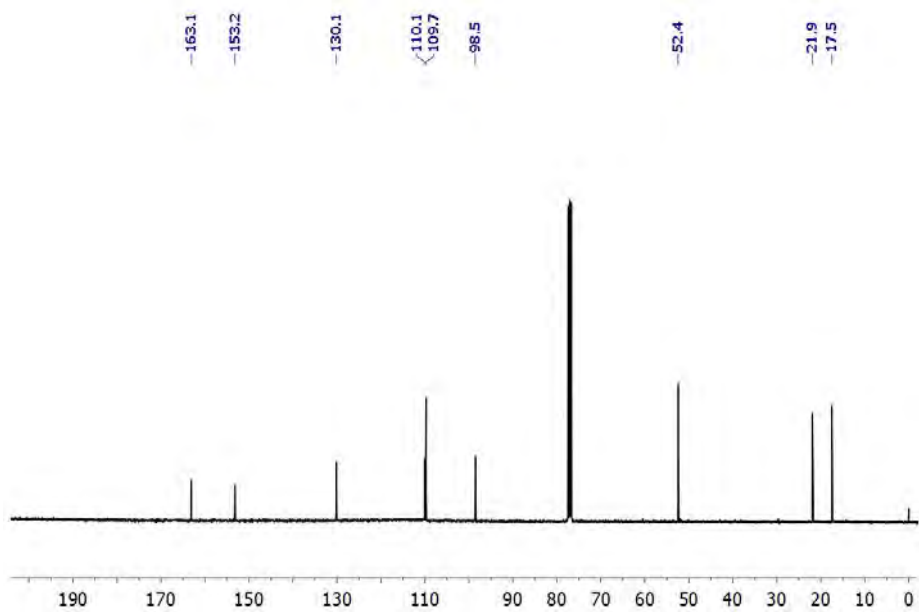


HSQC in CDCl₃ at 298 K

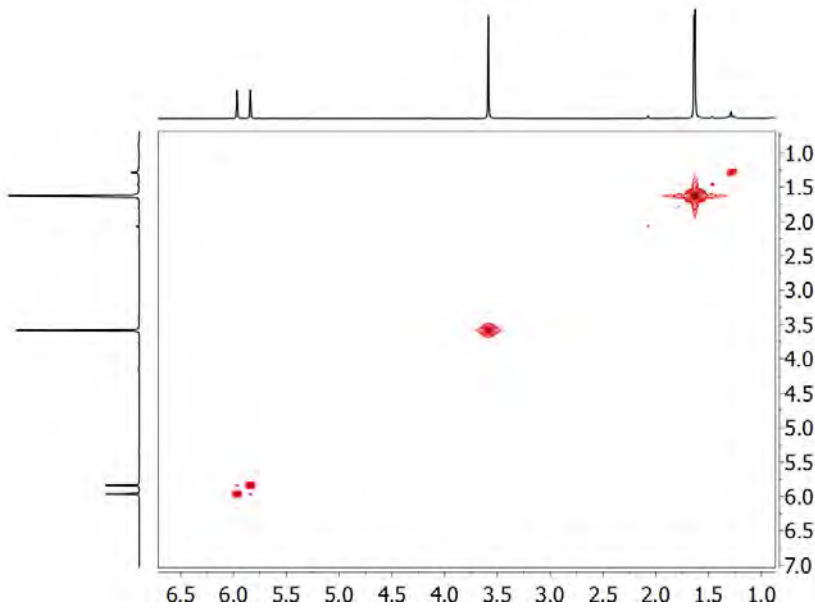


^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**10**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

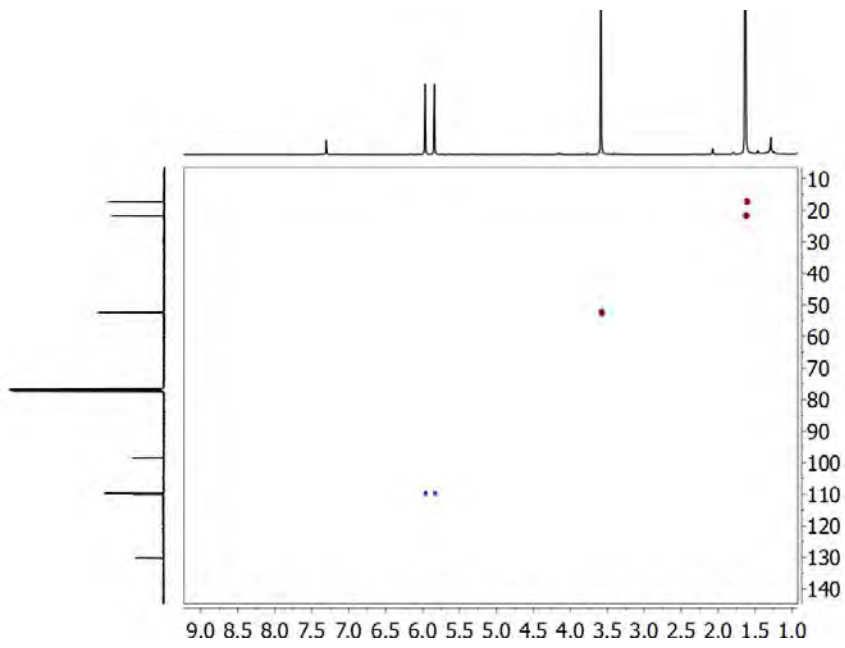
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

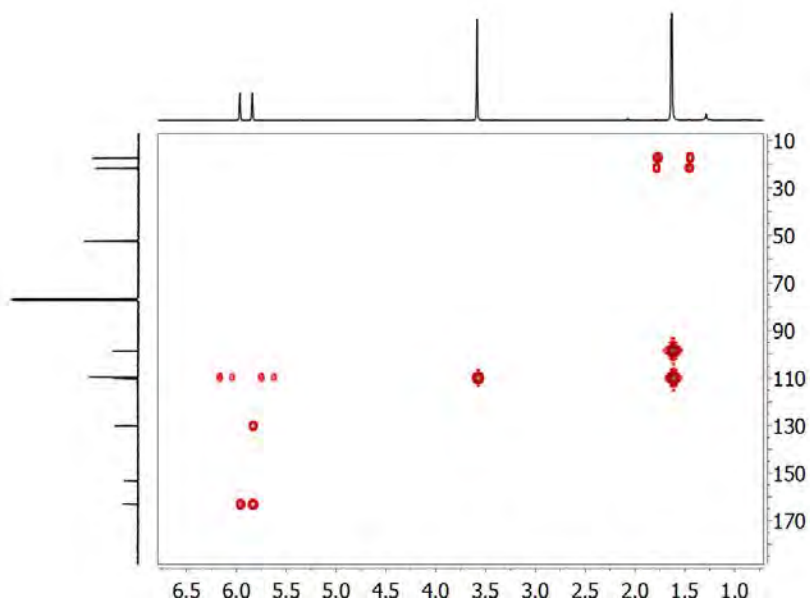
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**11**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

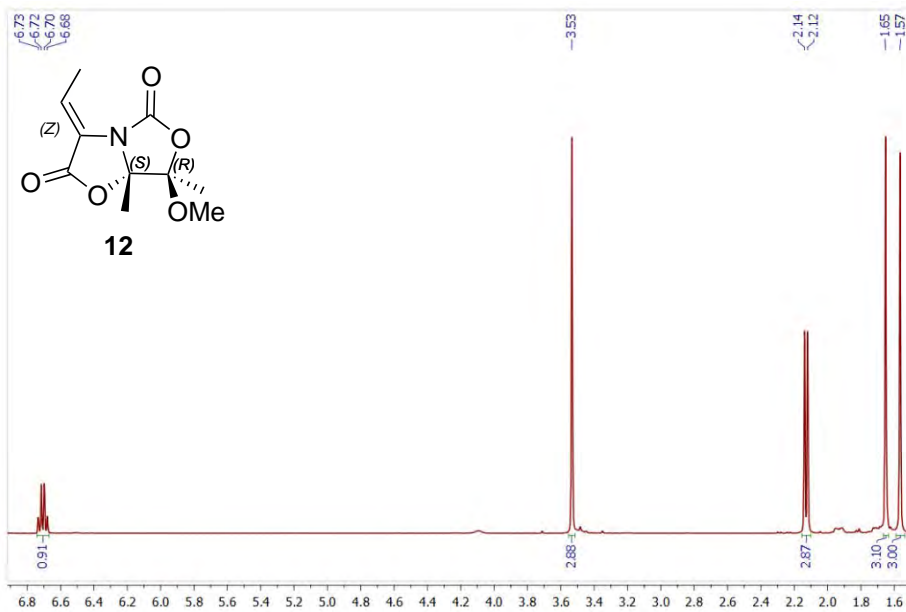
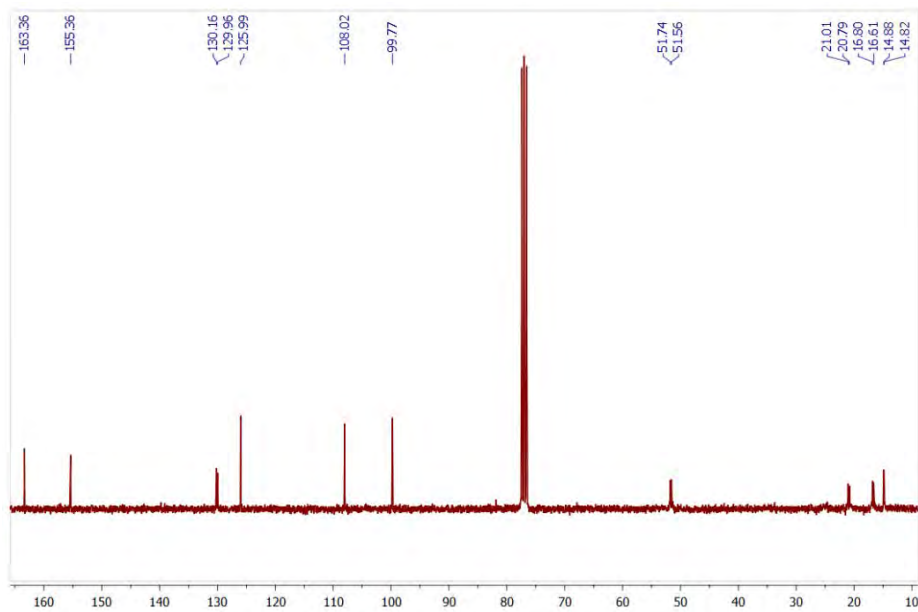
COSY in CDCl₃ at 298 K

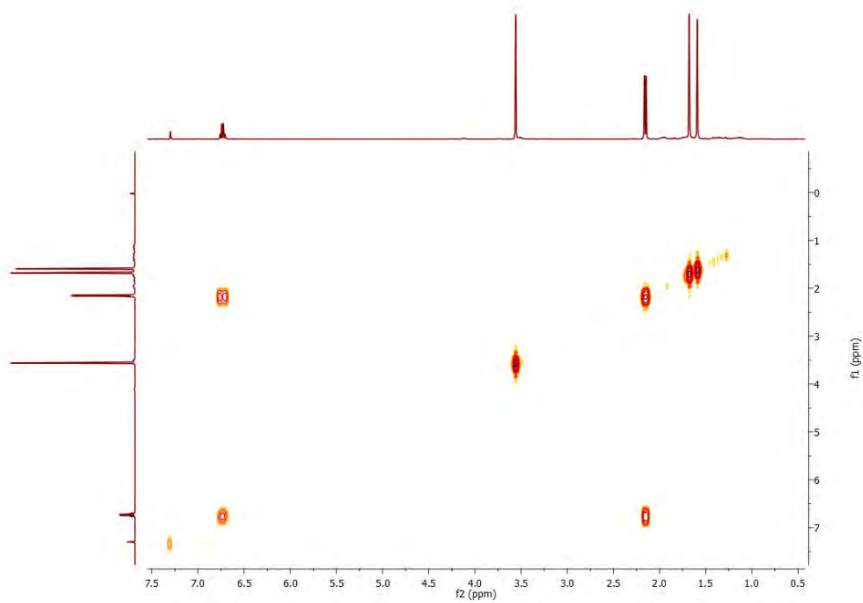
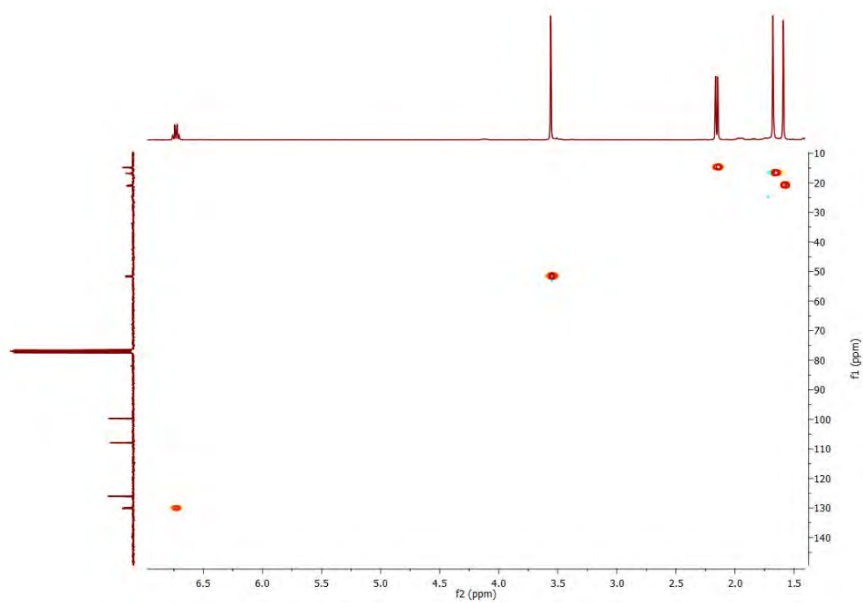


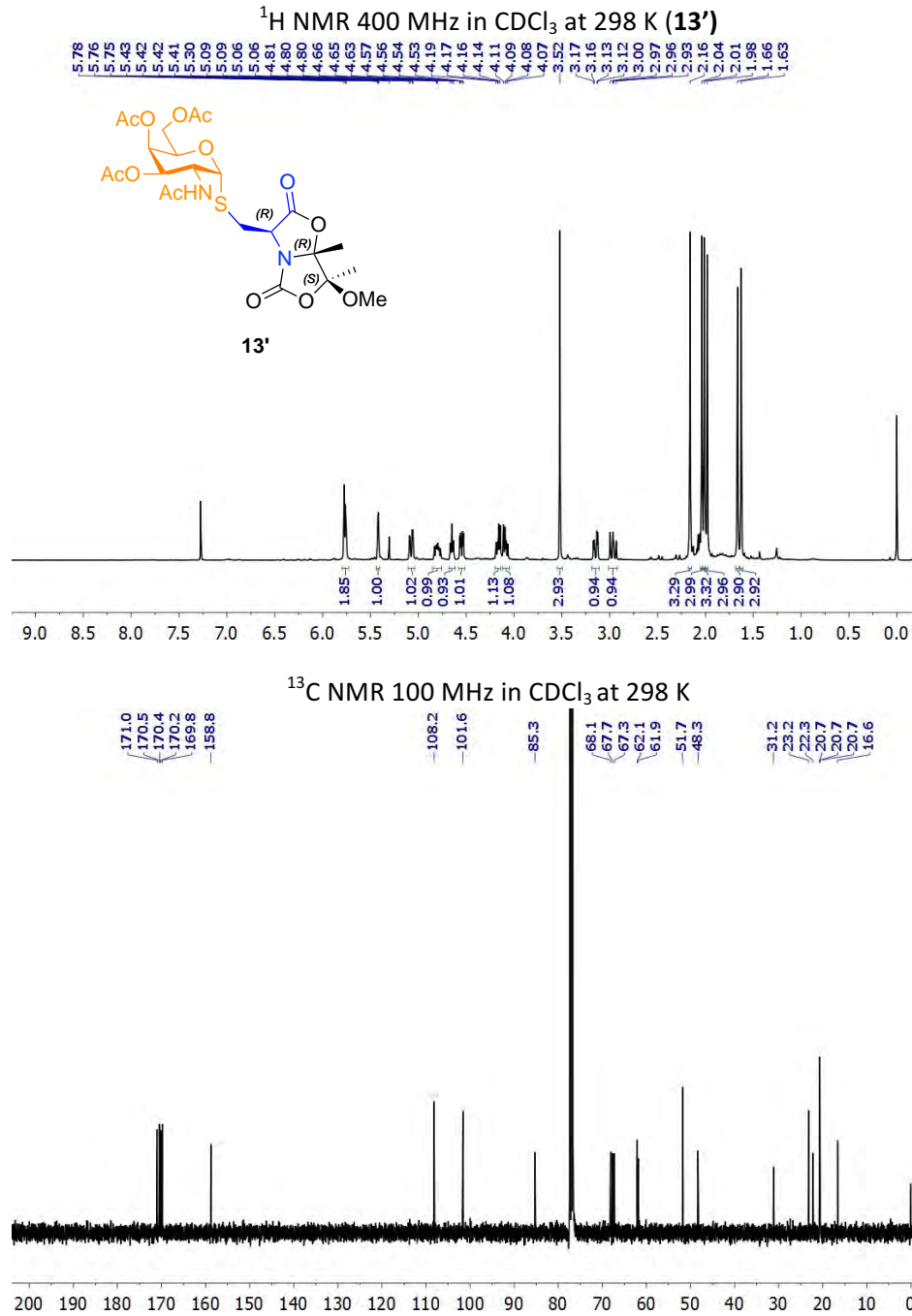
HSQC in CDCl₃ at 298 K

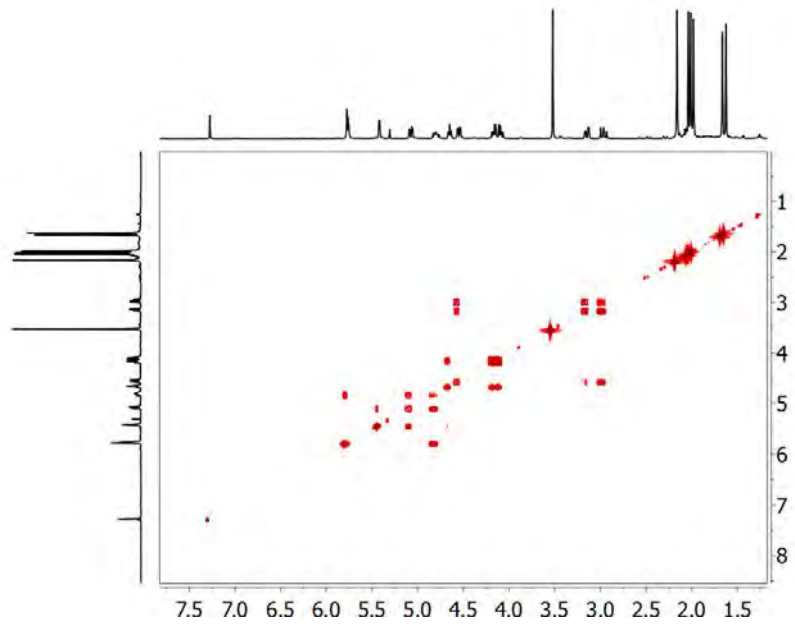
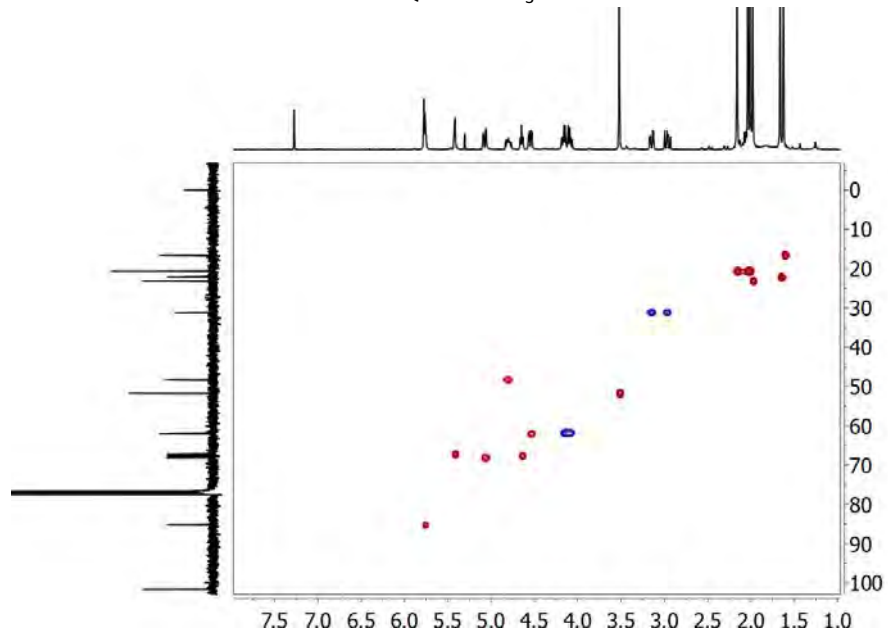


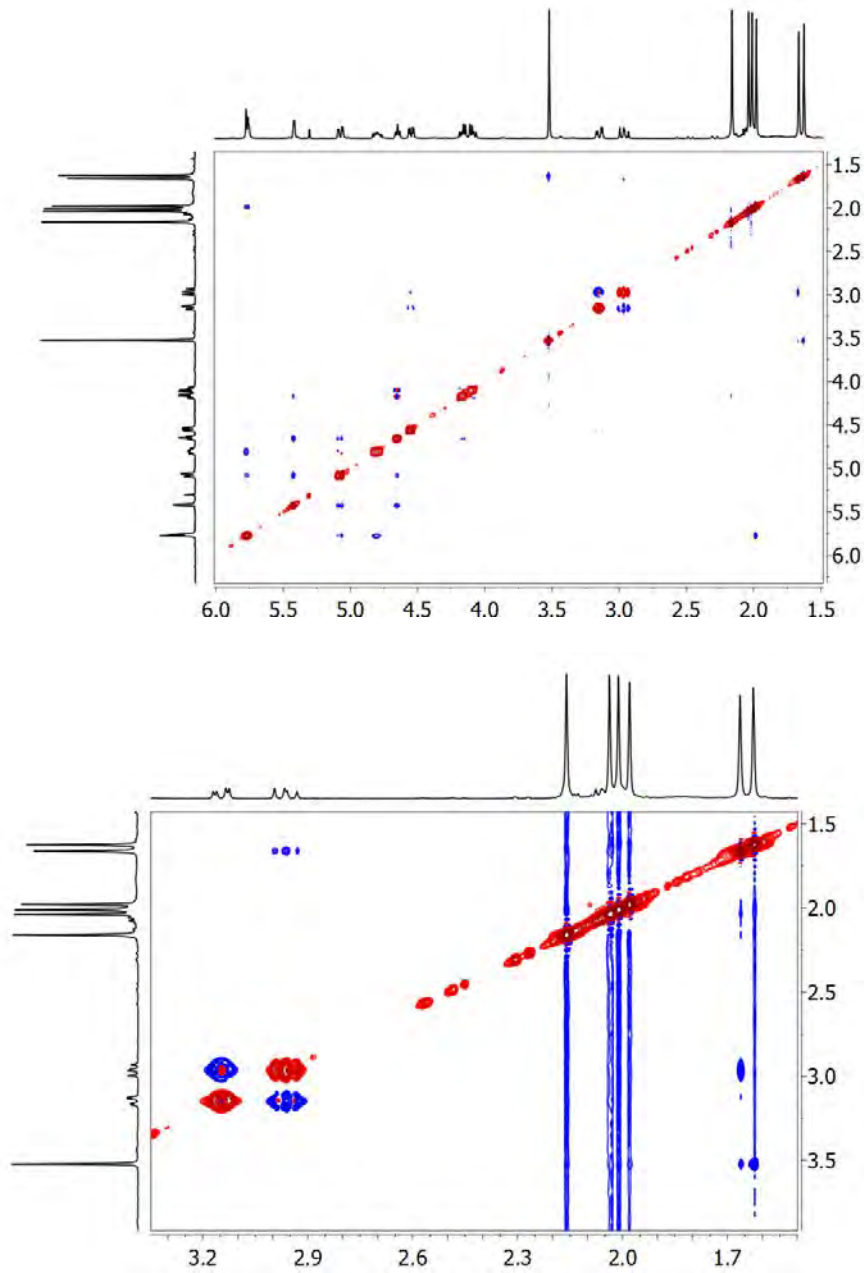
HMBC in CDCl_3 at 298 K

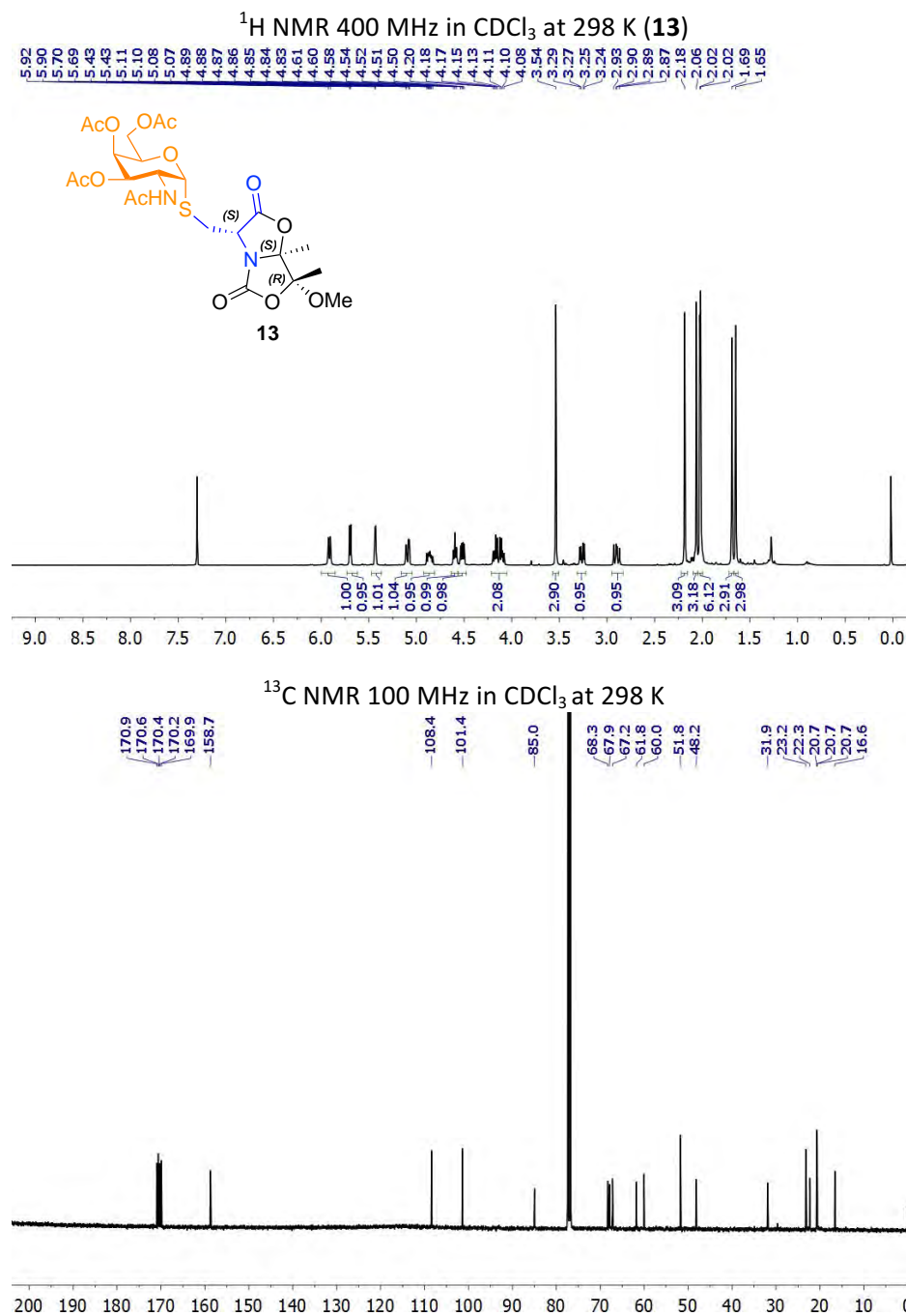
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**12**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

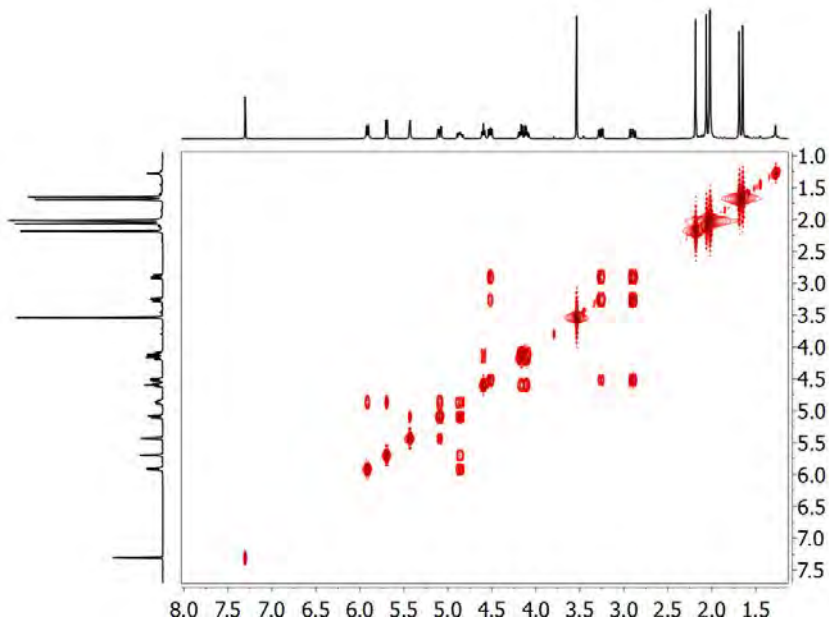
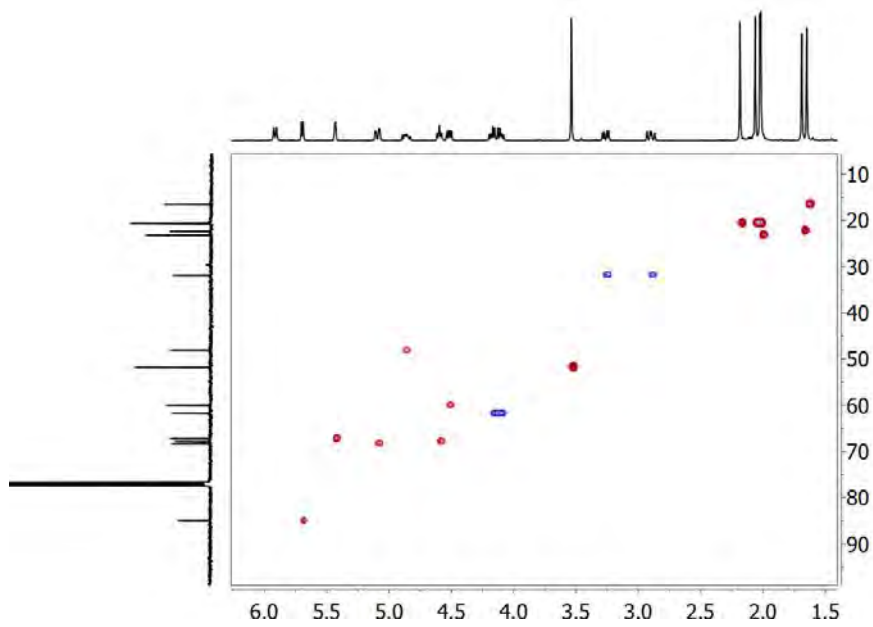
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

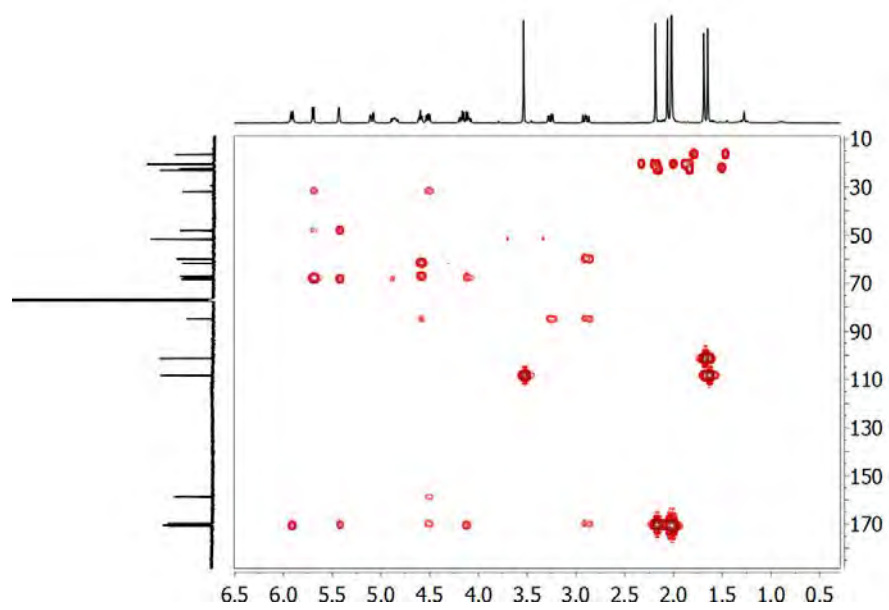


COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

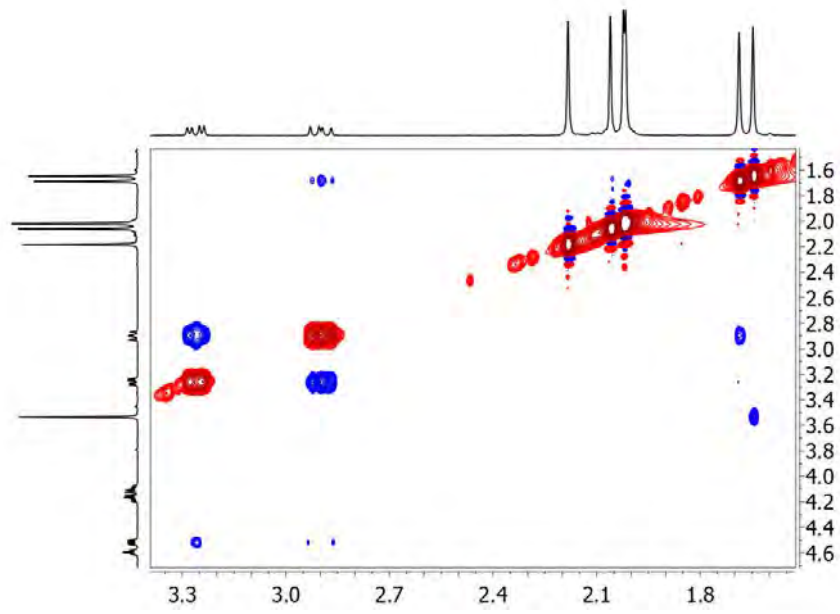
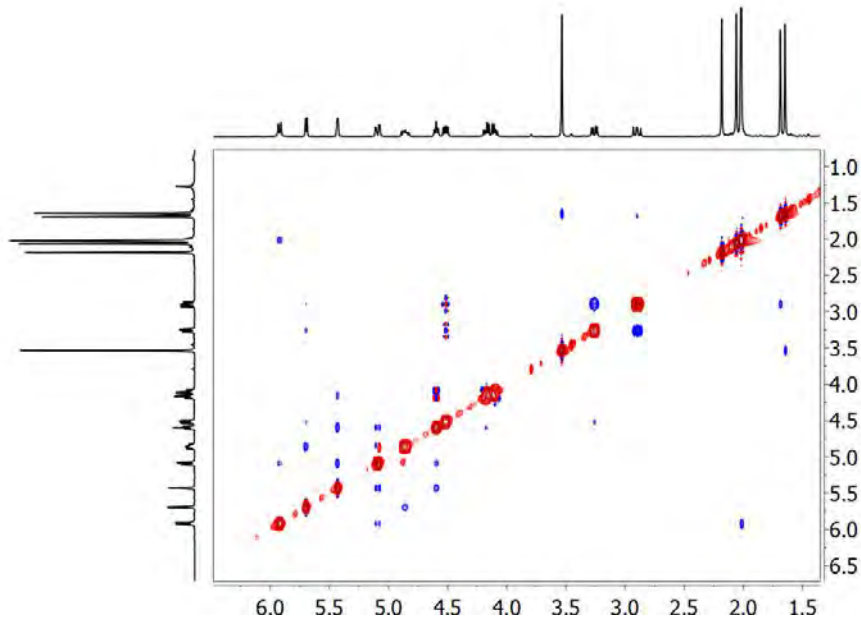
NOESY in CDCl_3 at 298 K

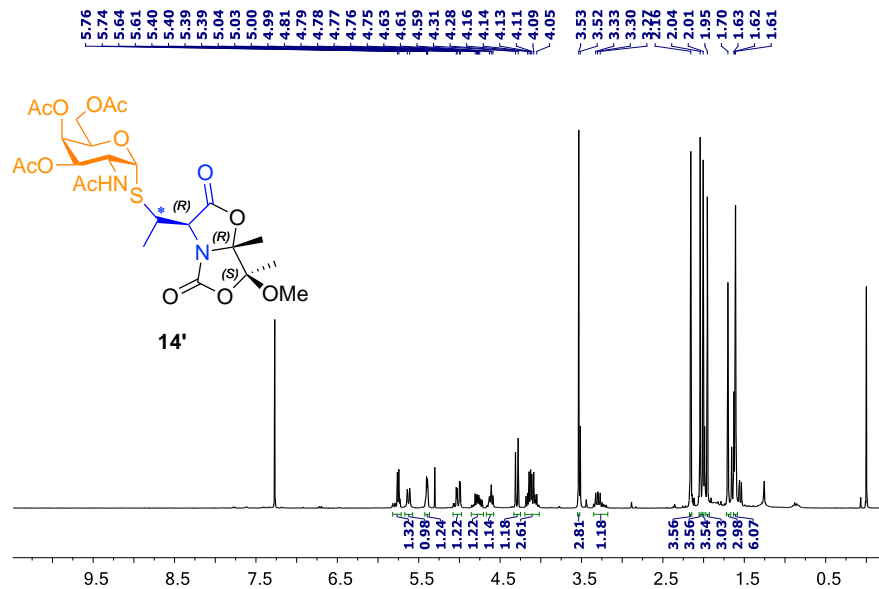
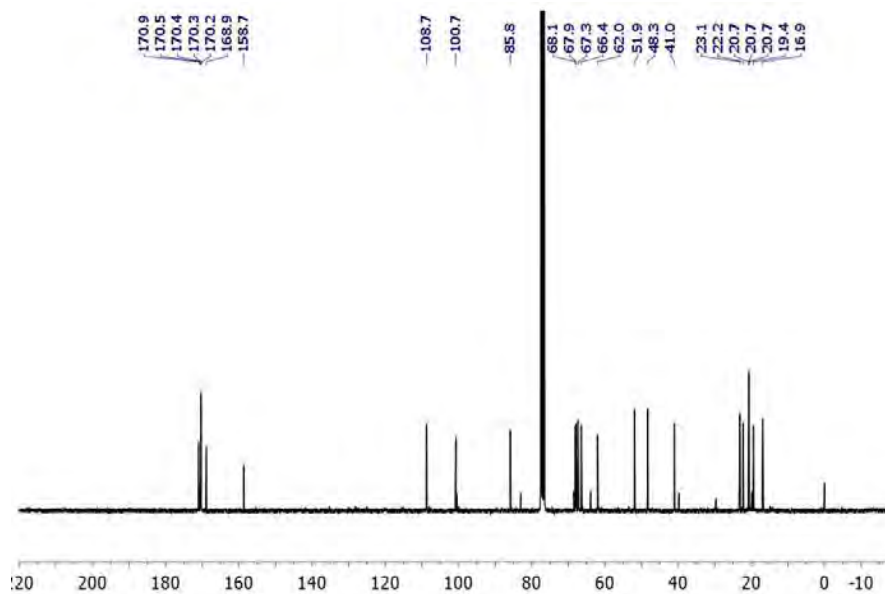


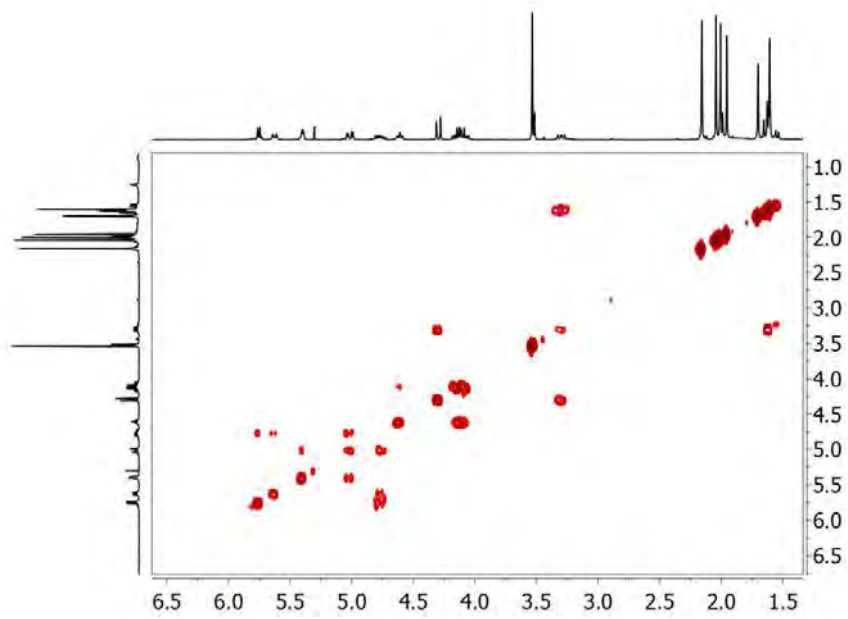
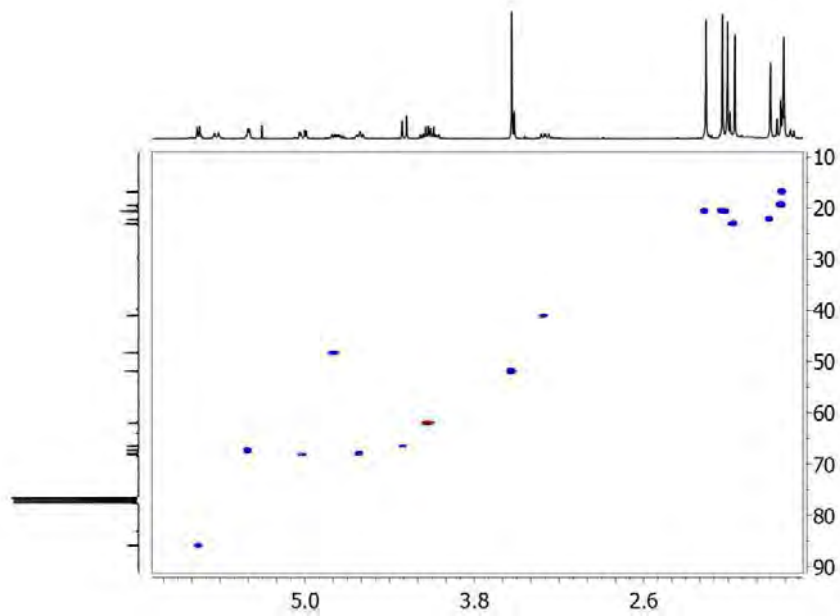
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

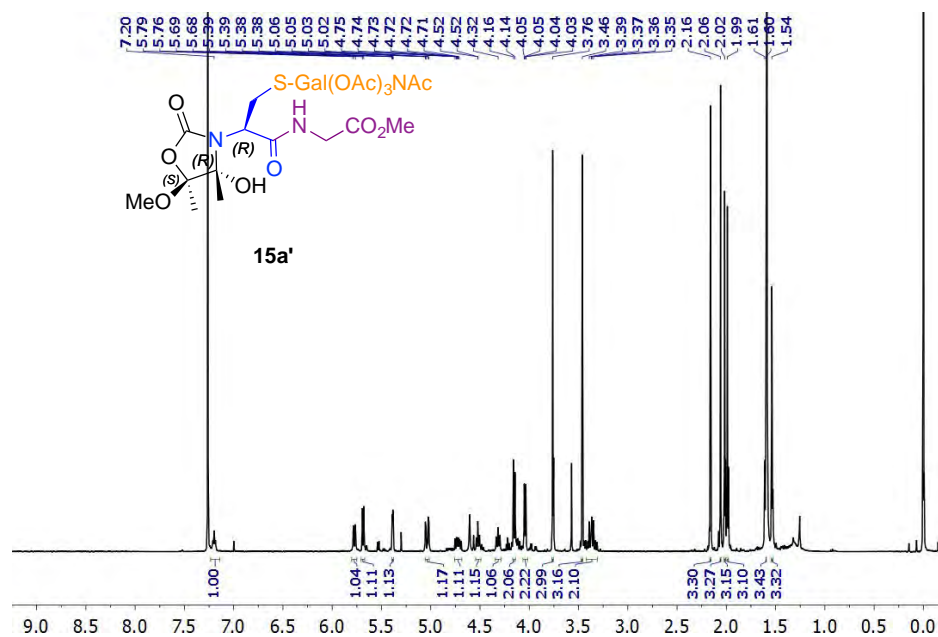
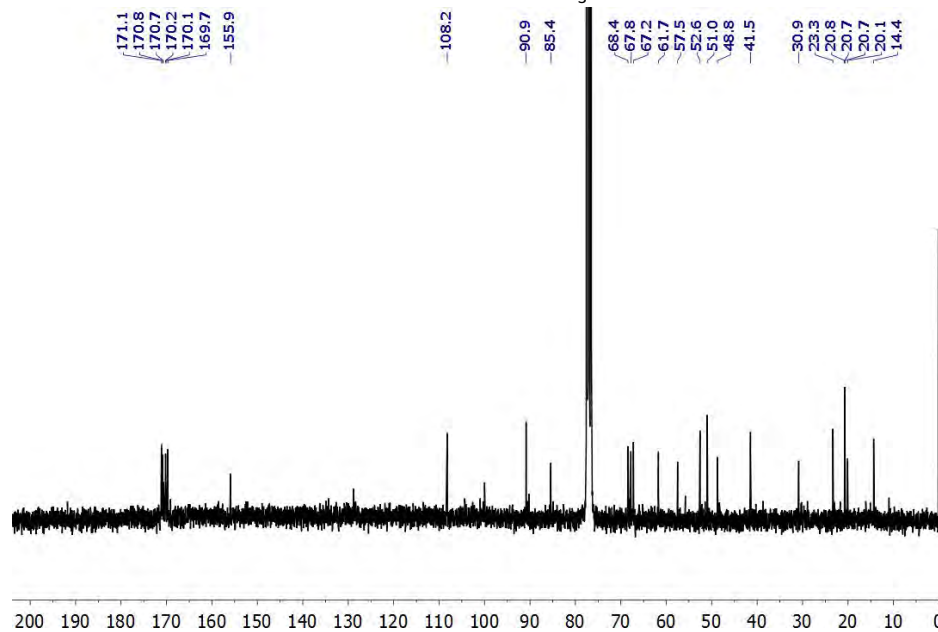
HMBC in CDCl_3 at 298 K

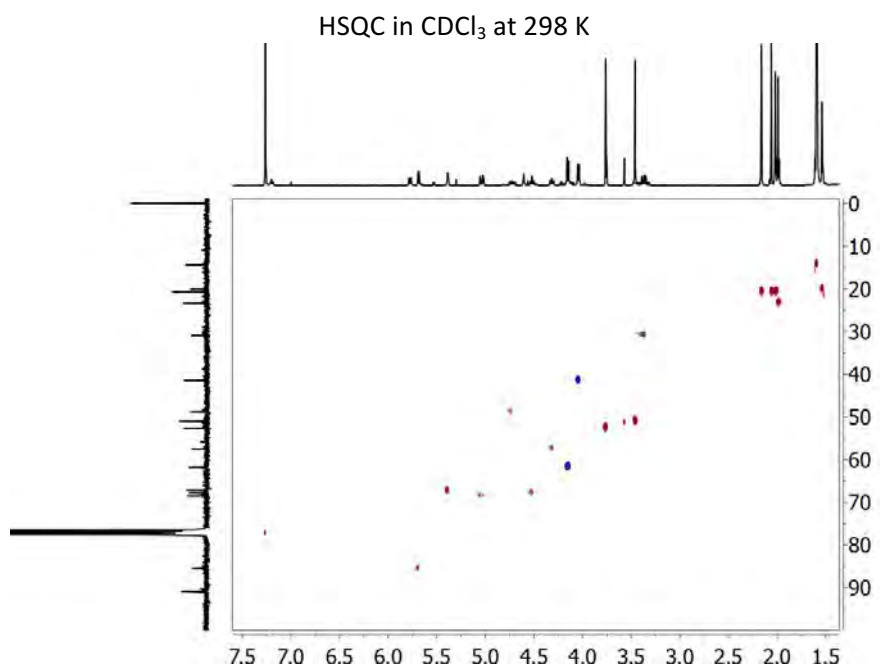
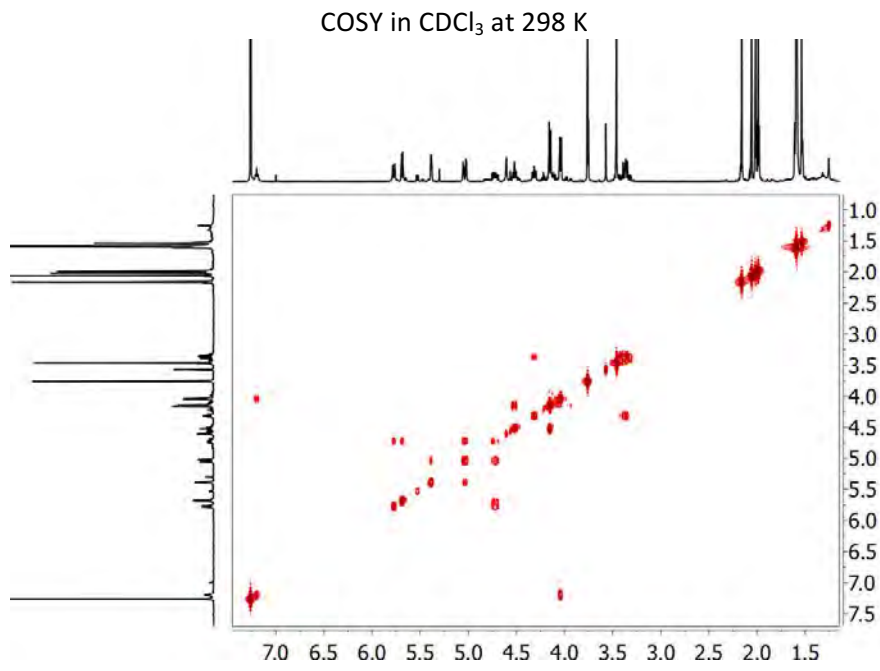
NOESY in CDCl_3 at 298 K

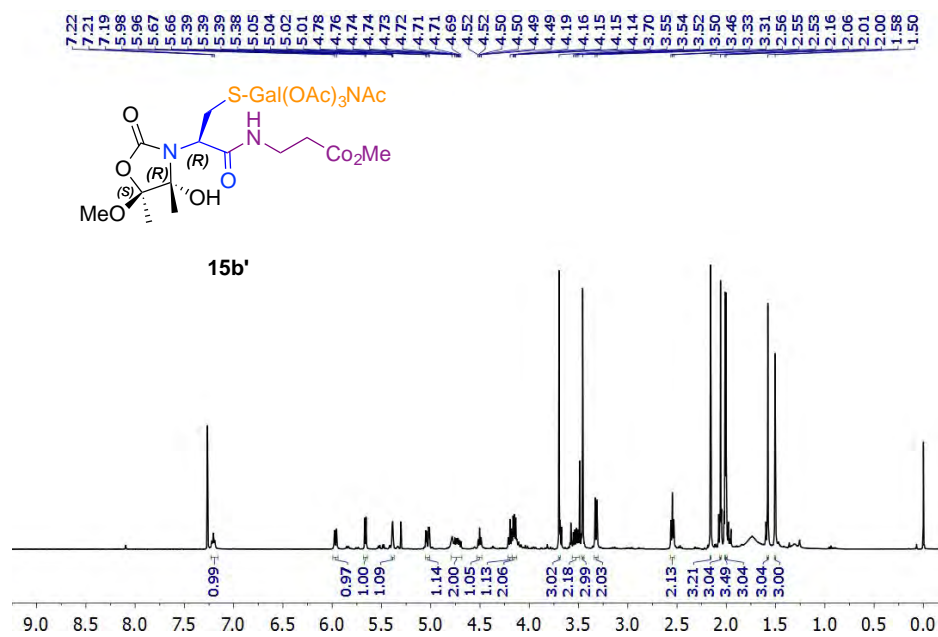
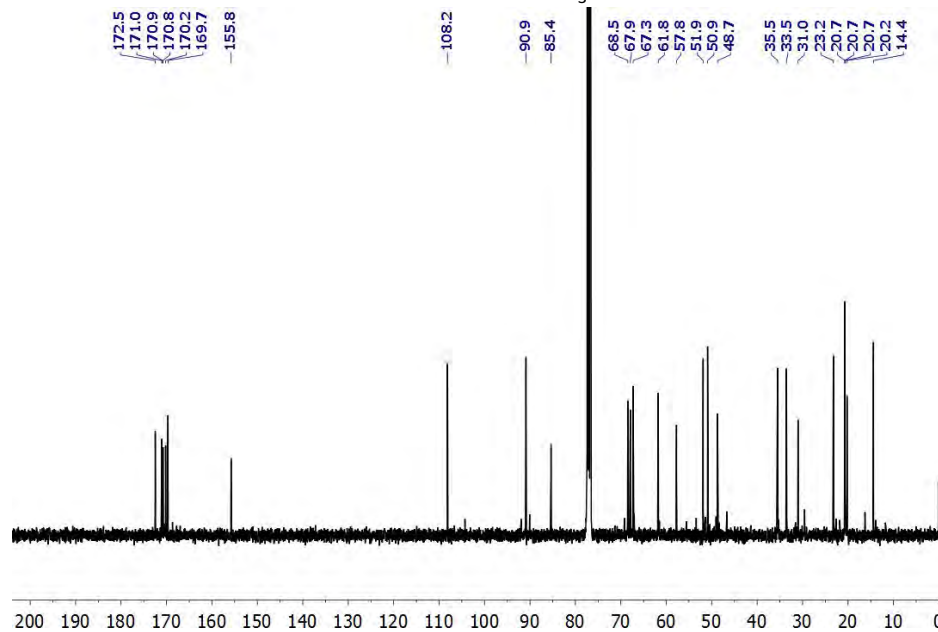


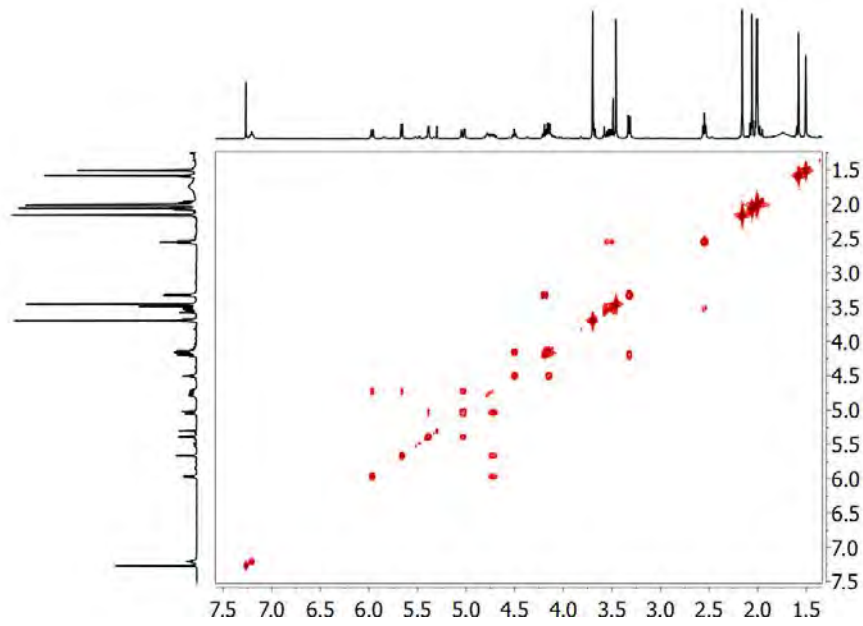
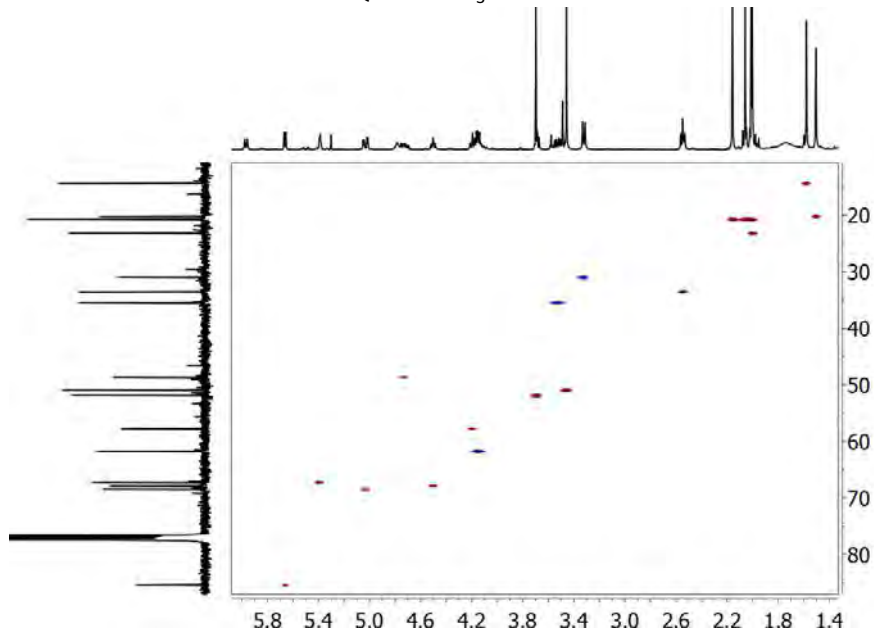
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**14'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

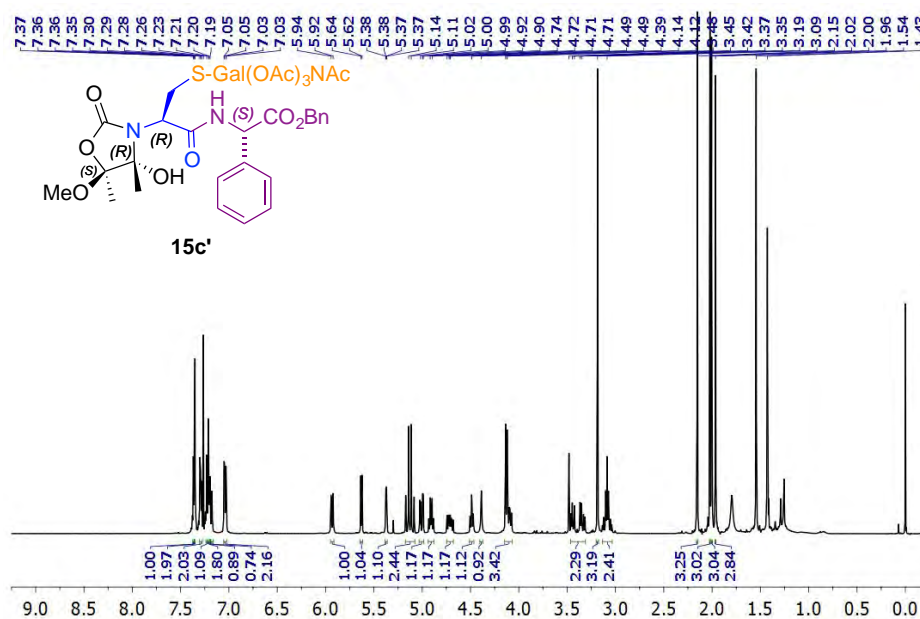
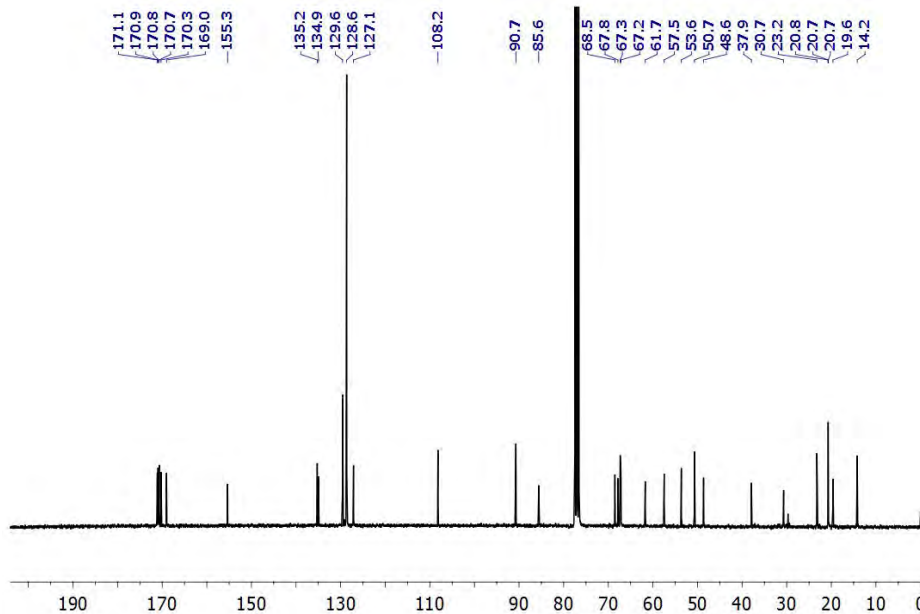
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

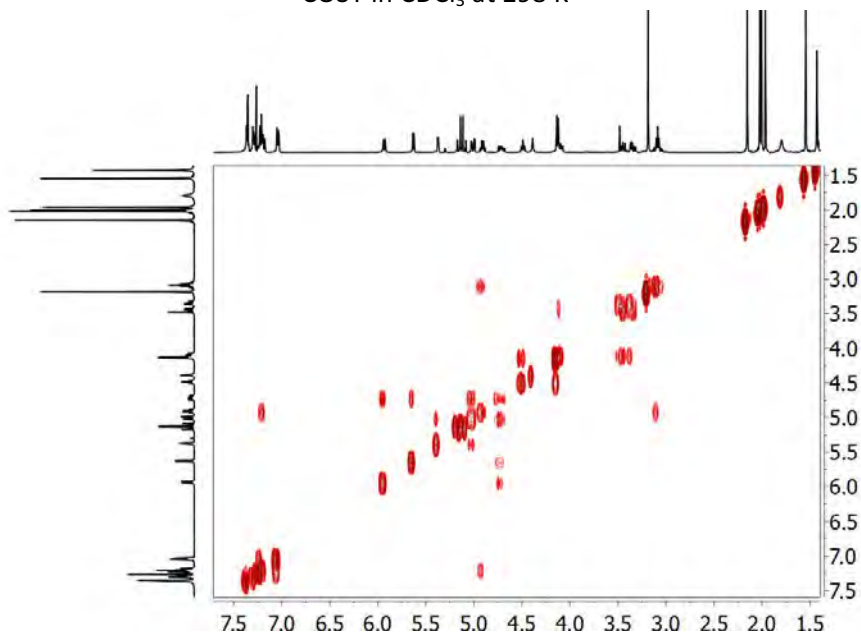
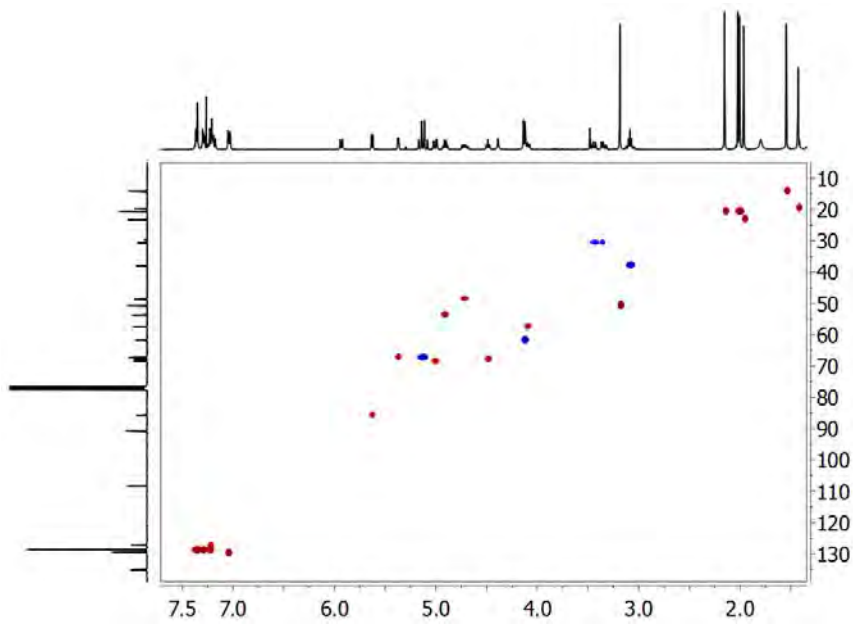
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**15a'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

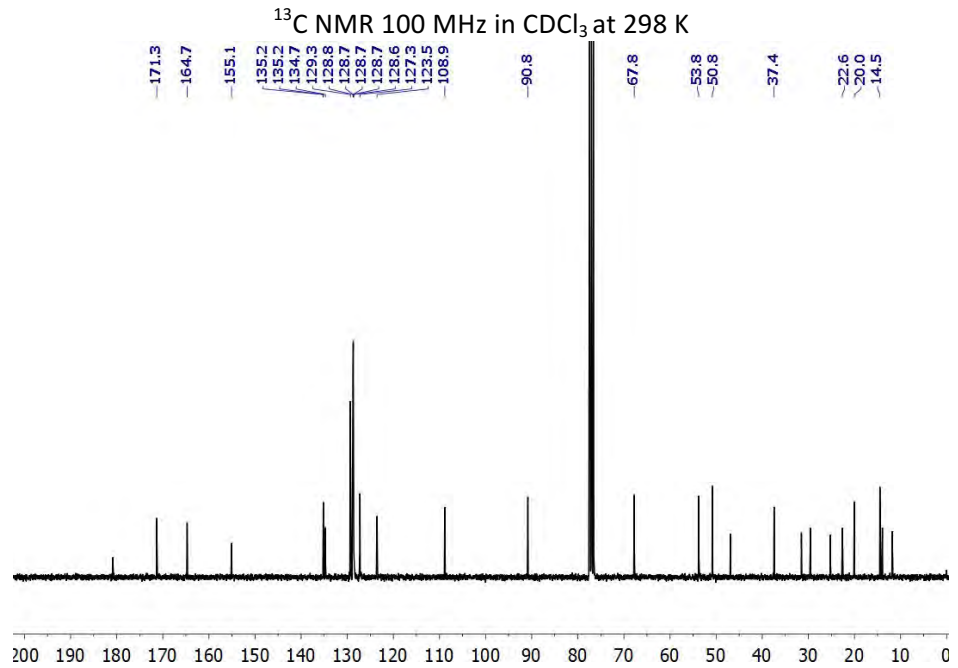
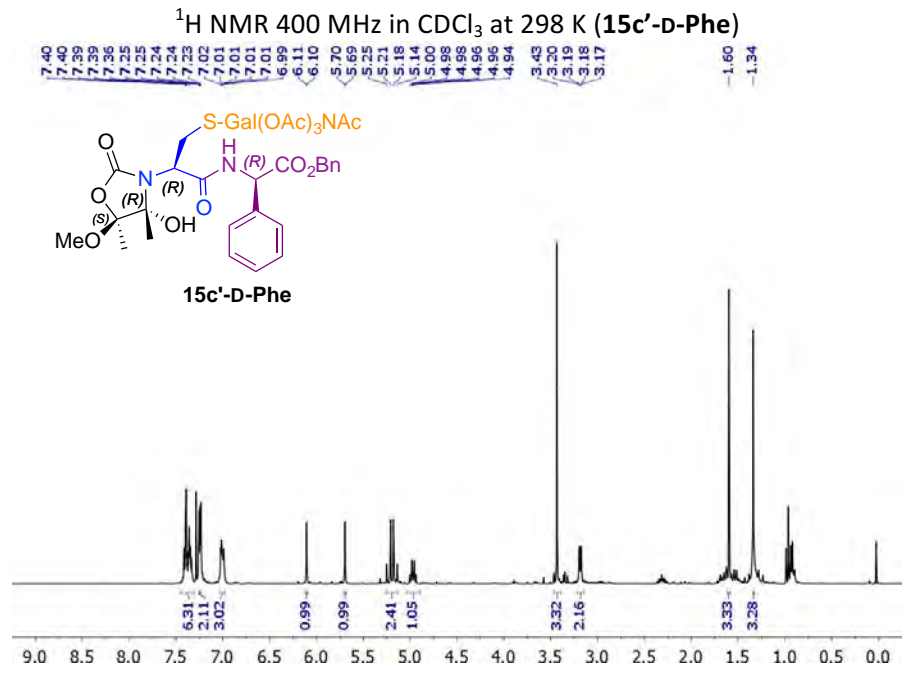


^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**15b'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

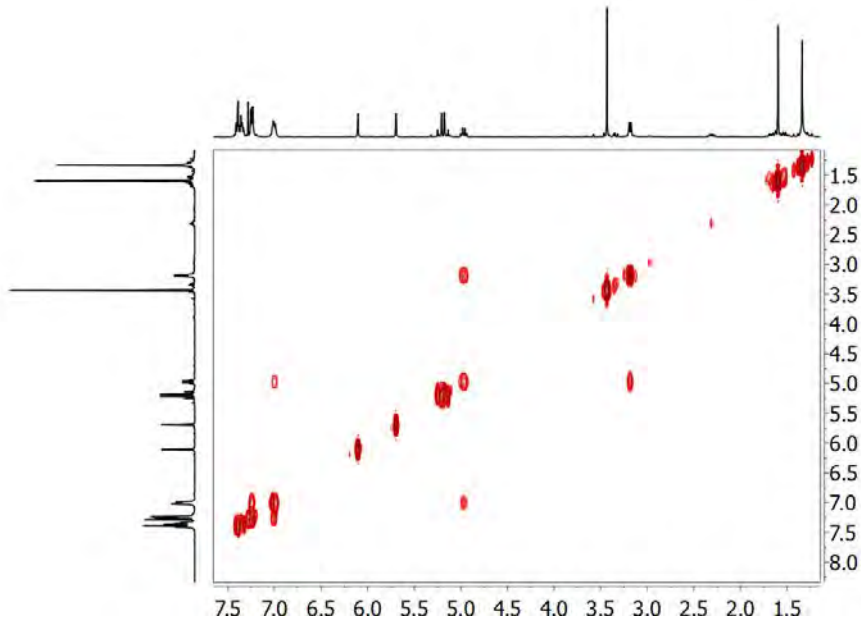
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K ($15\text{c}'$) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

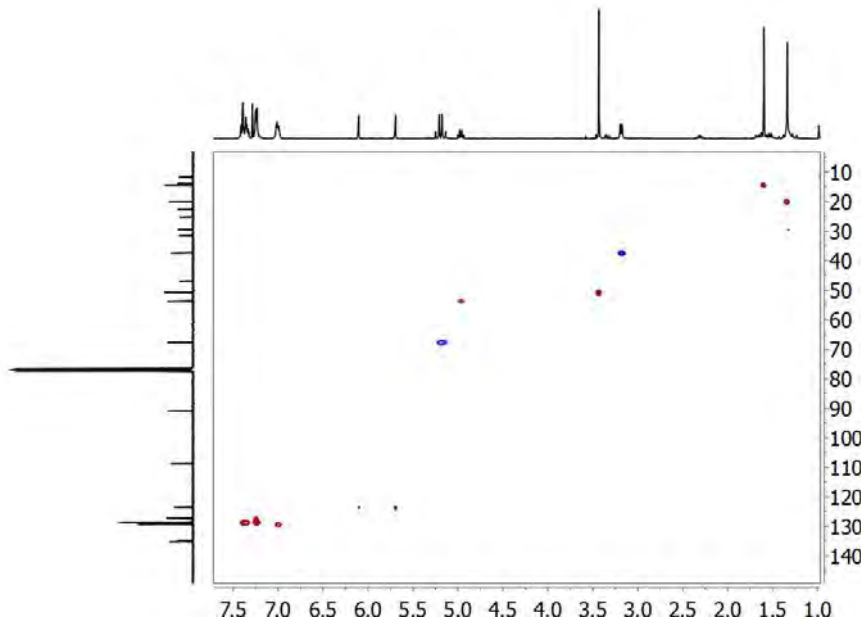
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

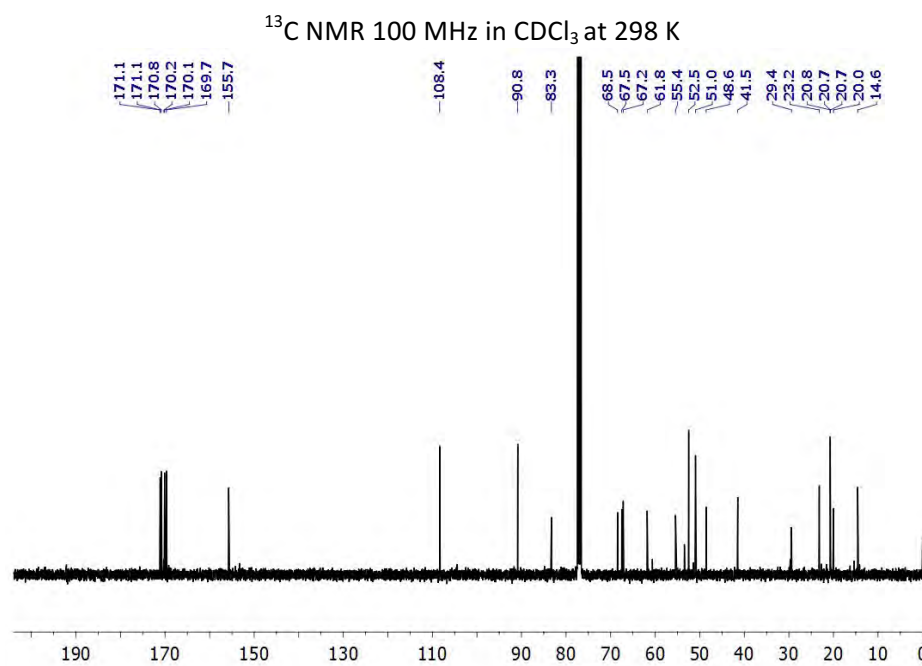
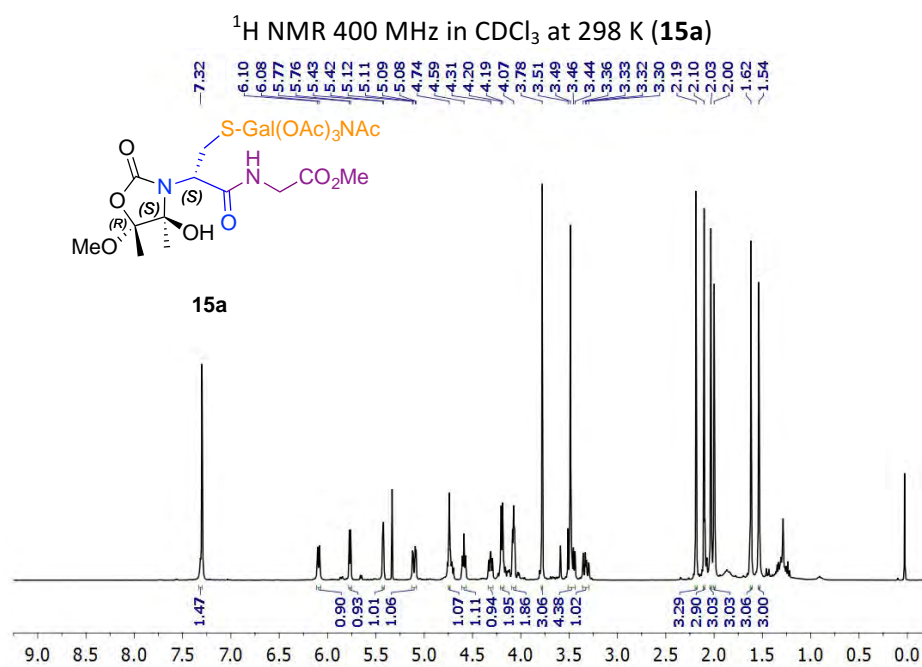


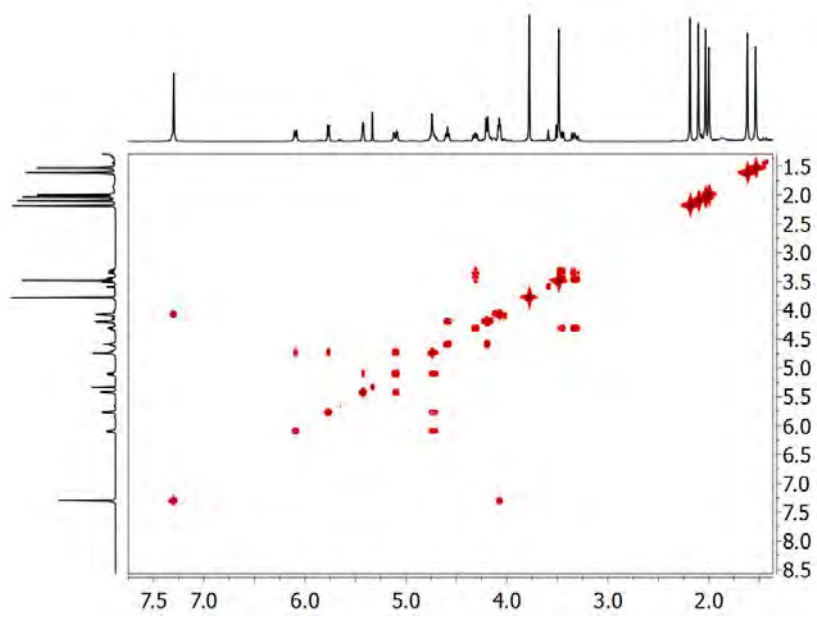
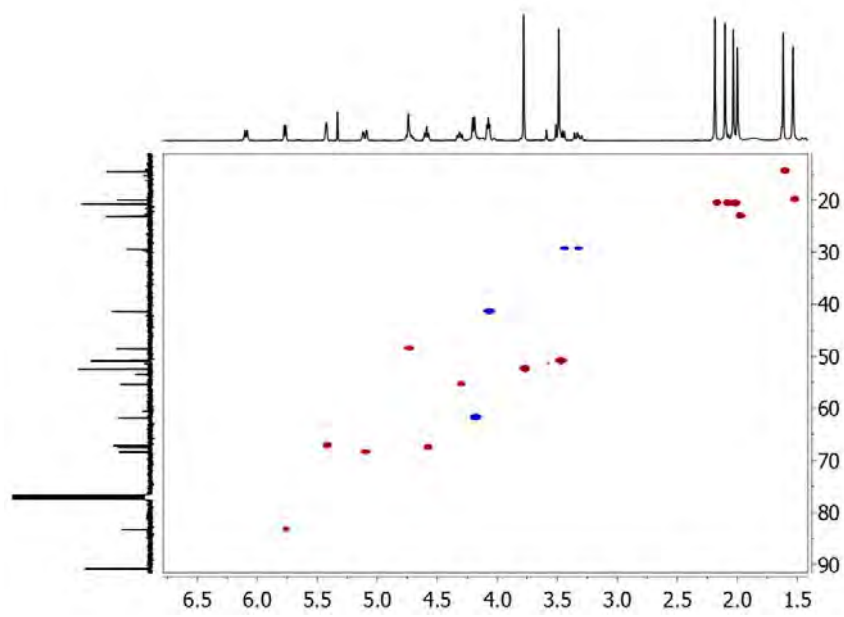
COSY in CDCl₃ at 298 K

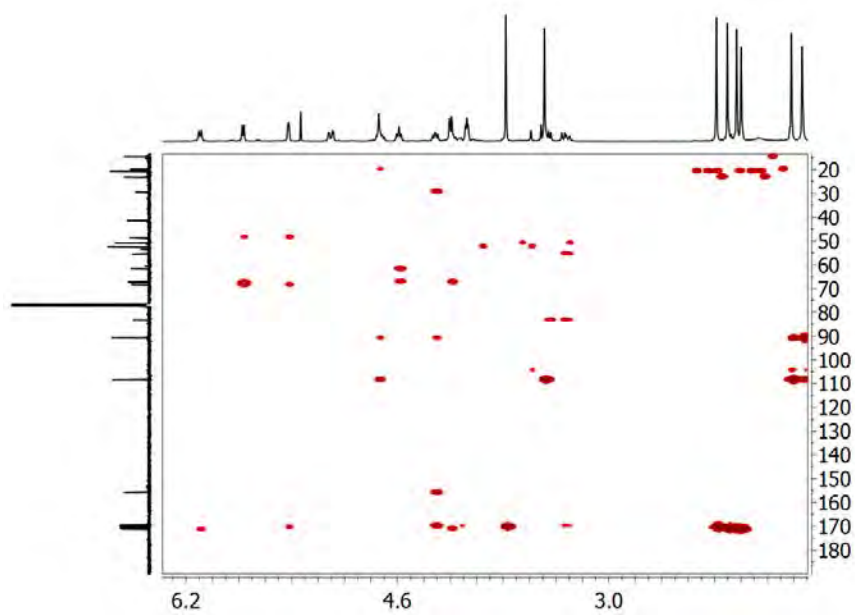


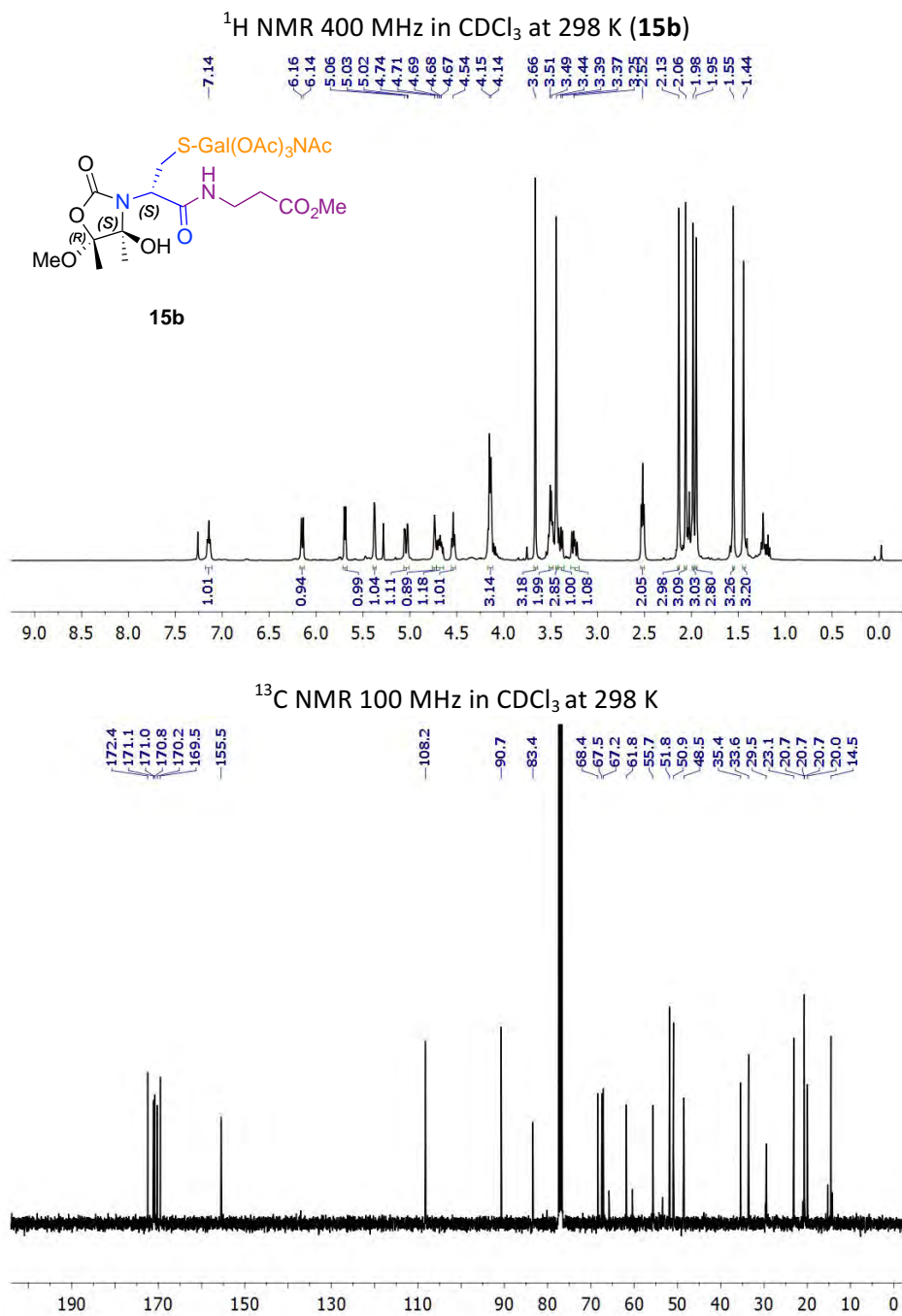
HSQC in CDCl₃ at 298 K

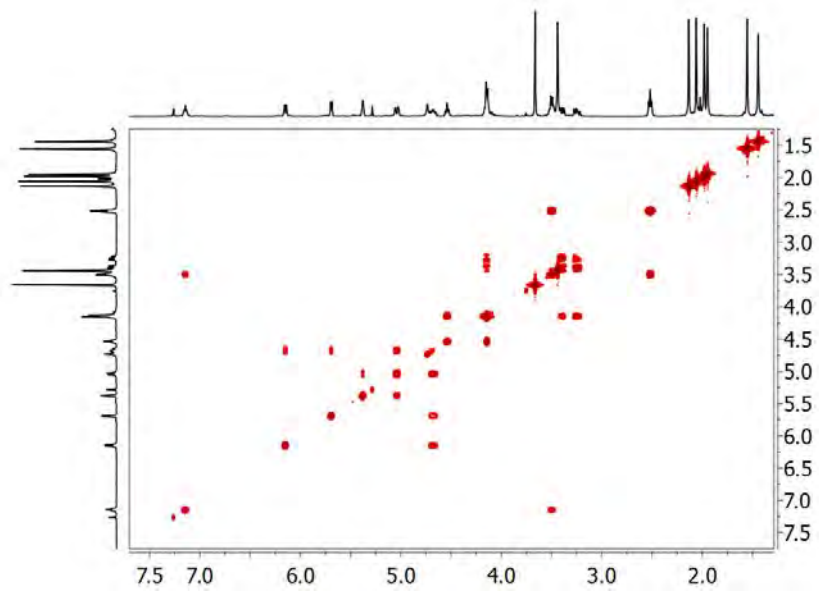
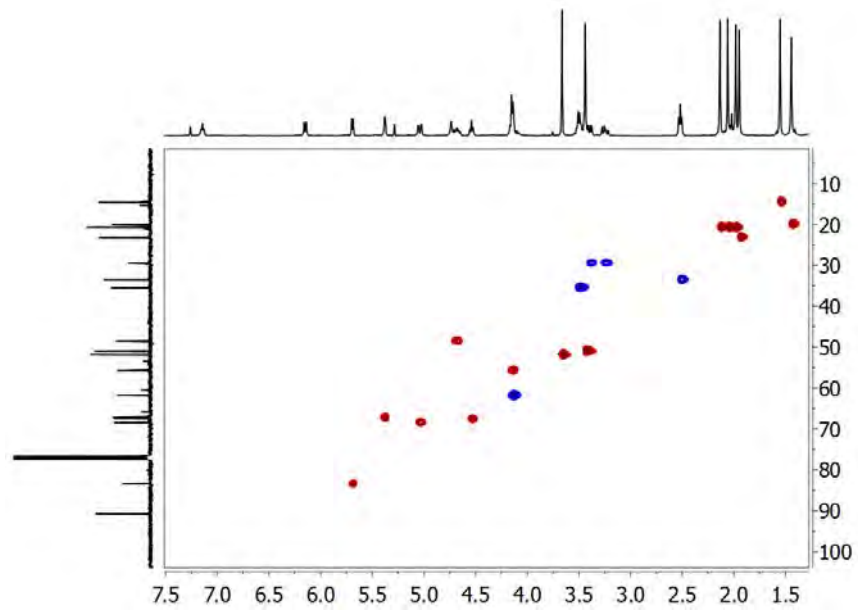


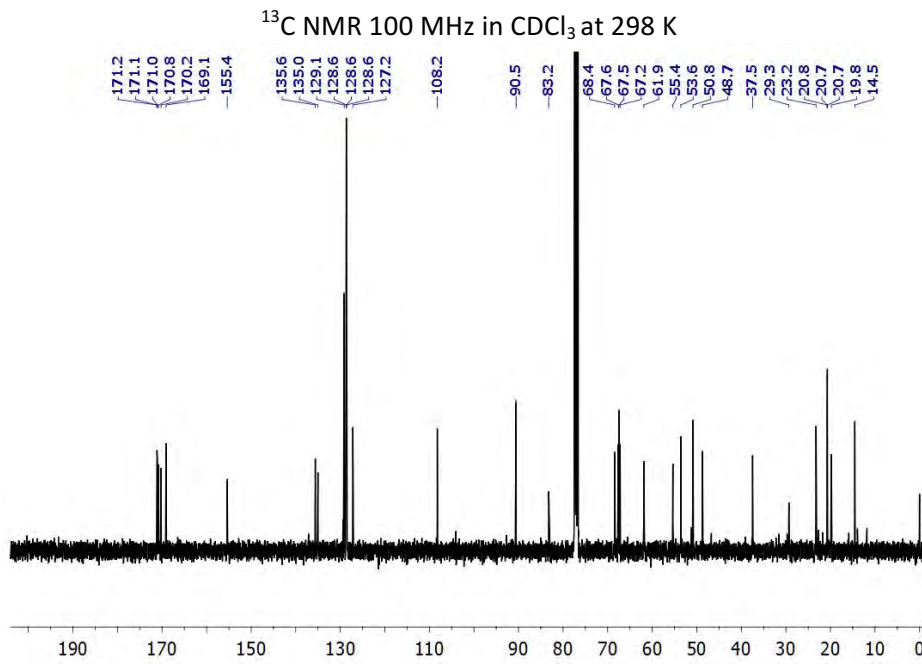
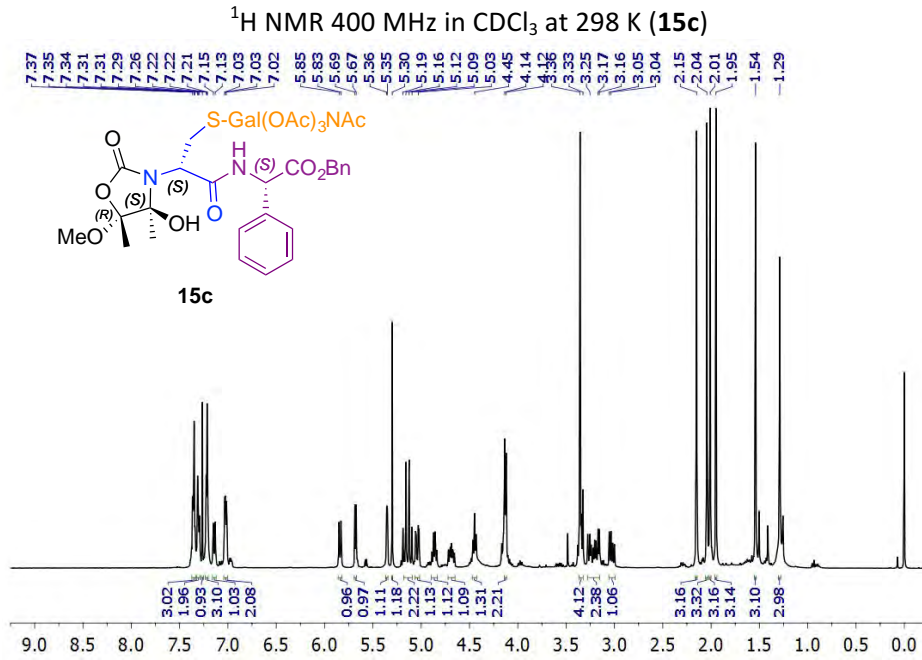


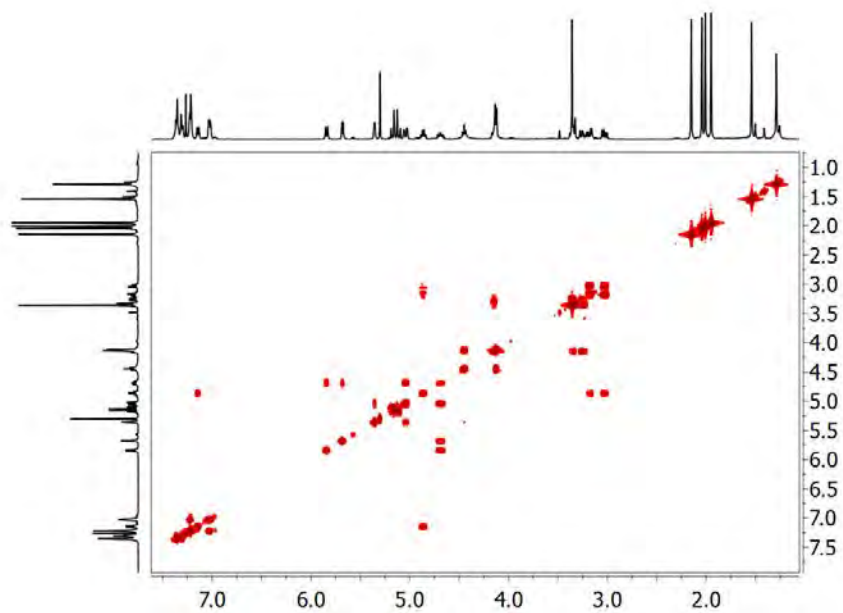
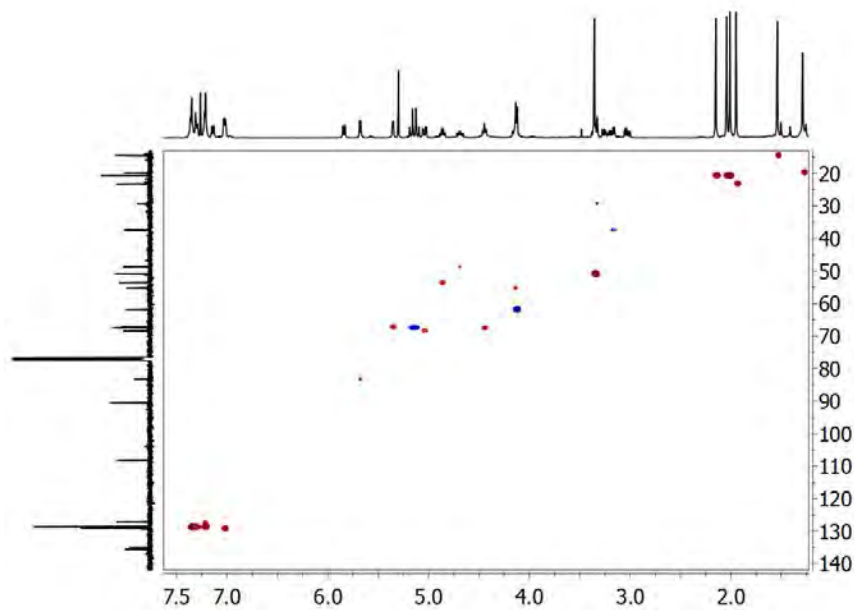
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

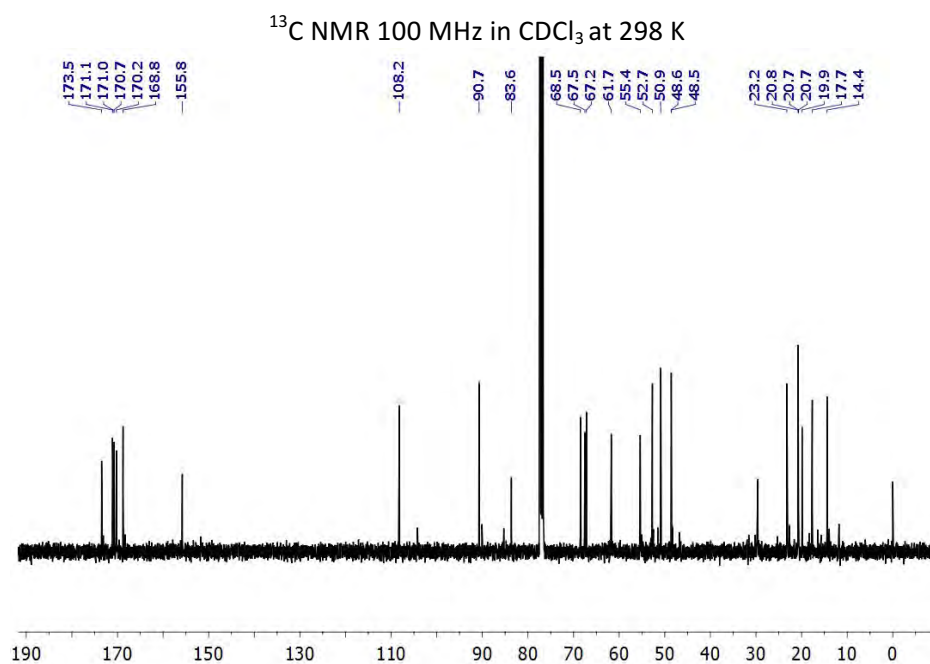
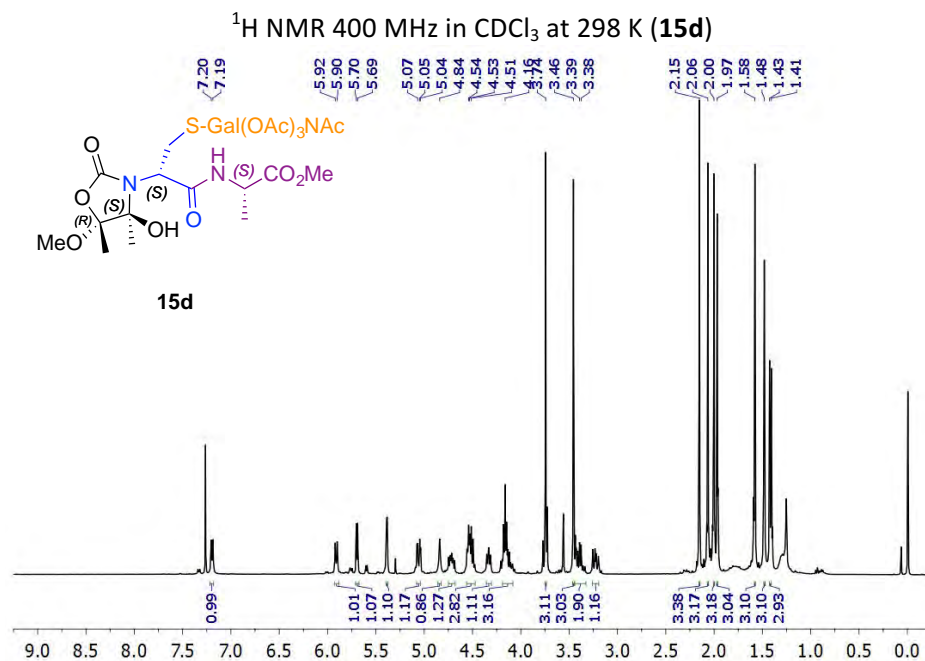
HMBC in CDCl_3 at 298 K

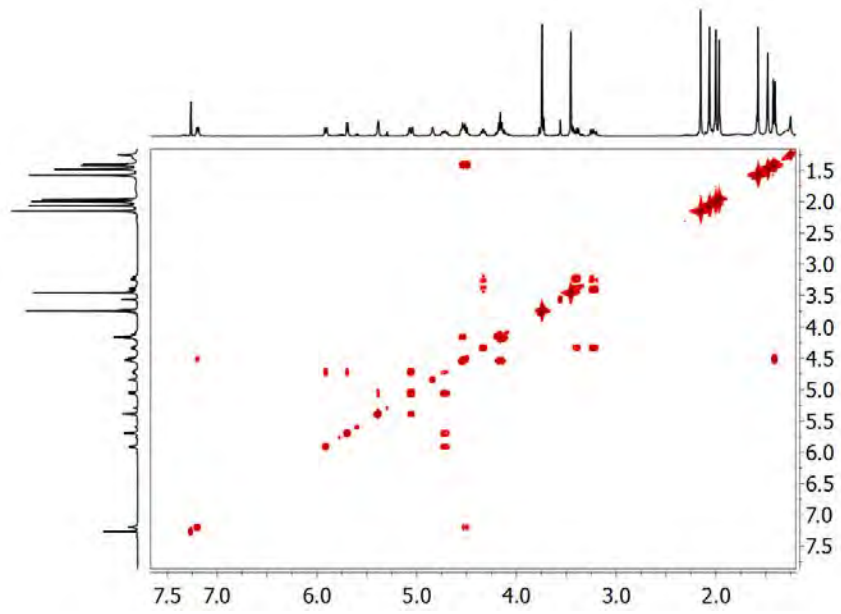
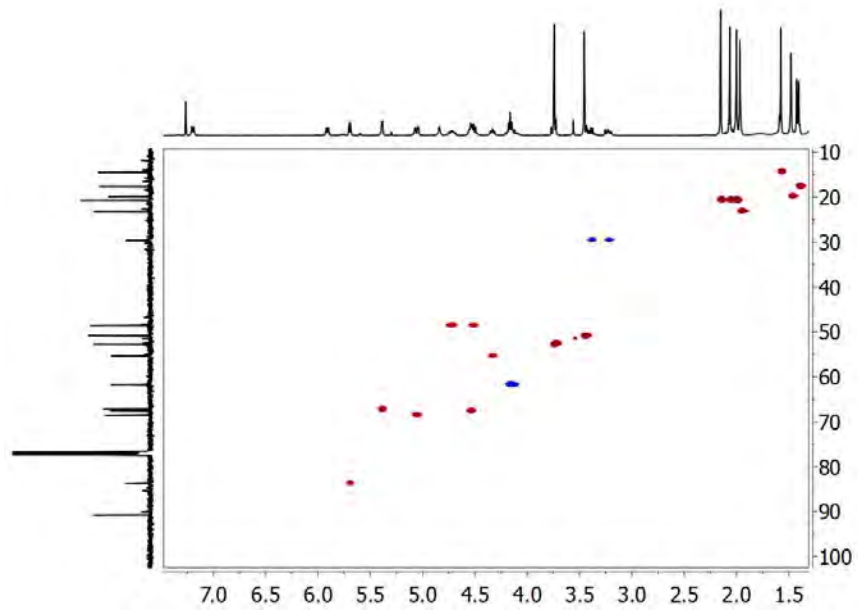


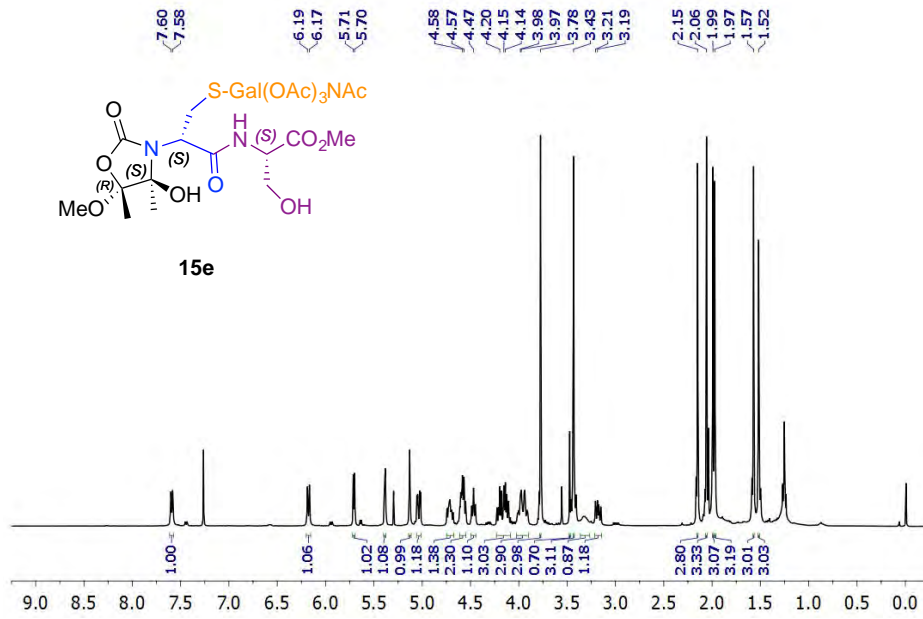
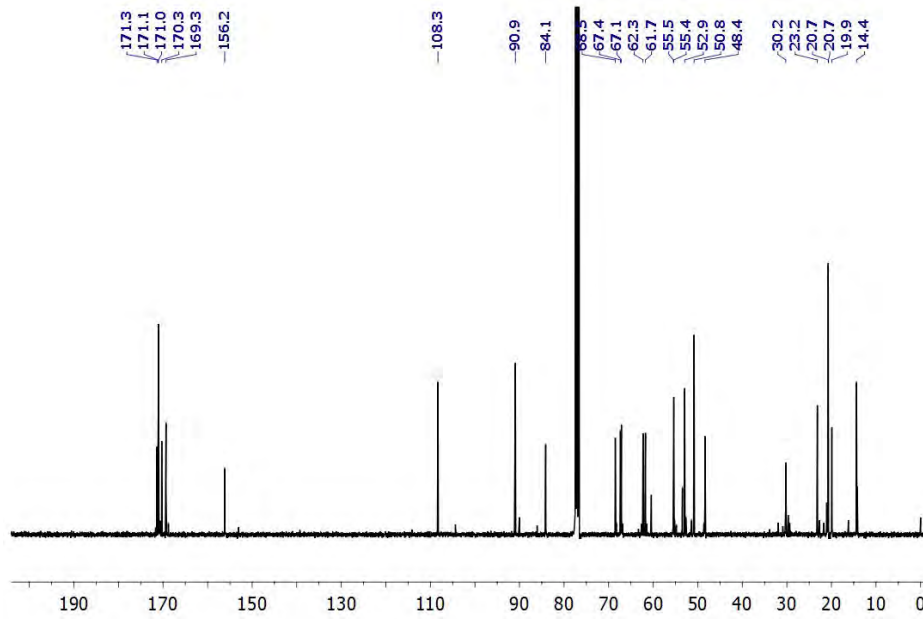
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

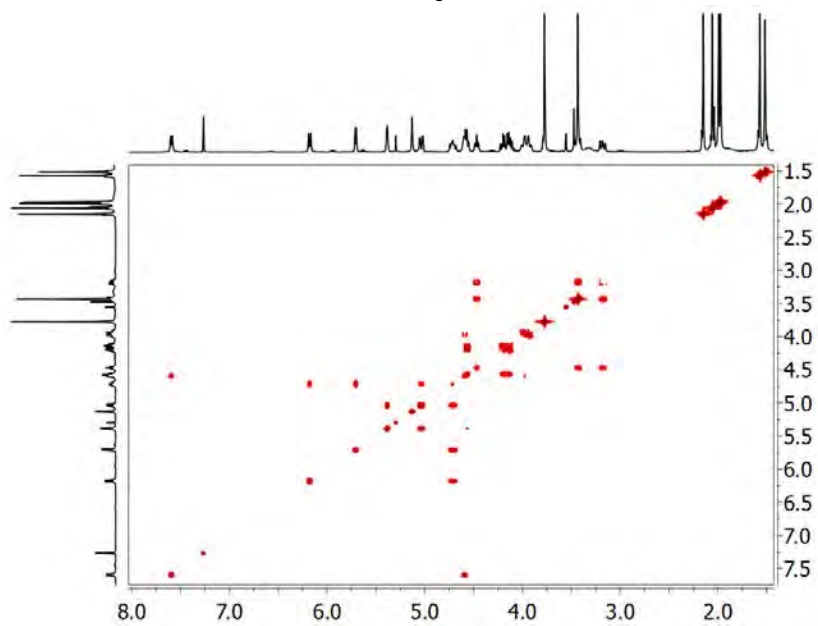
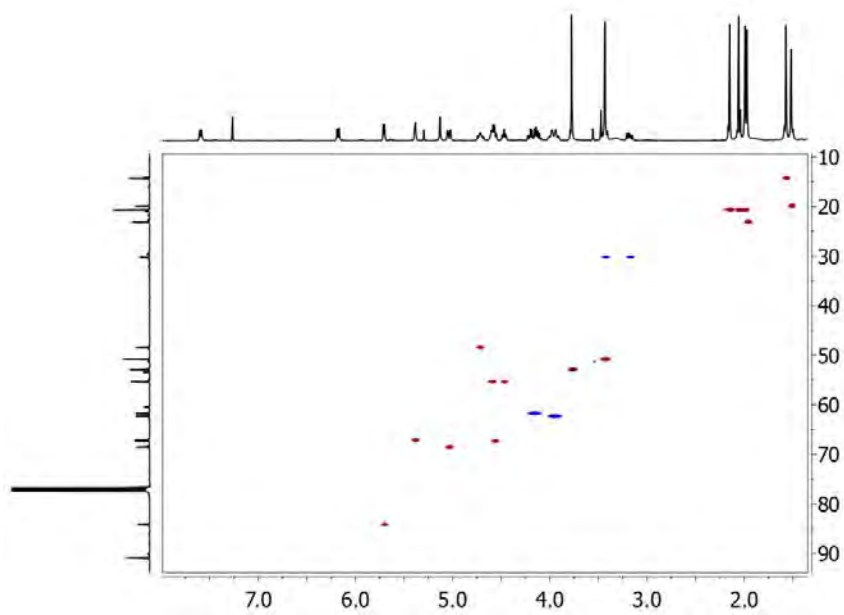


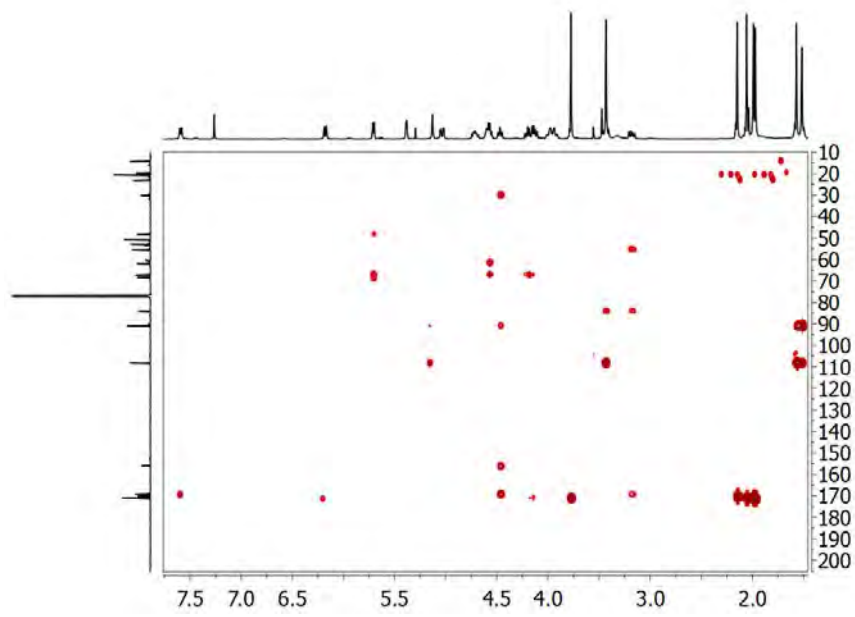
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

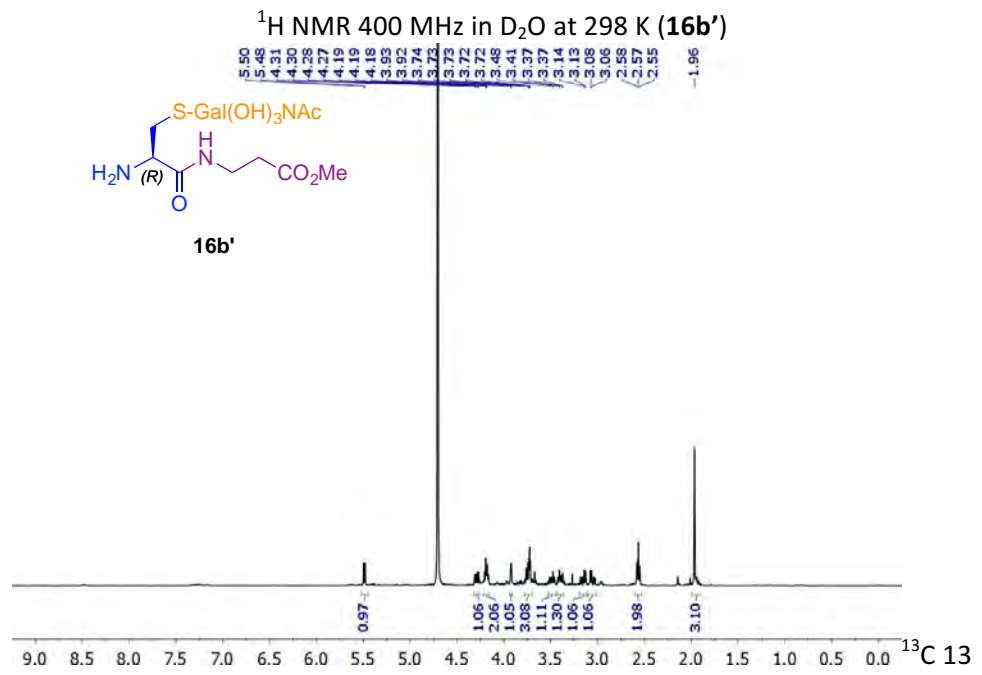
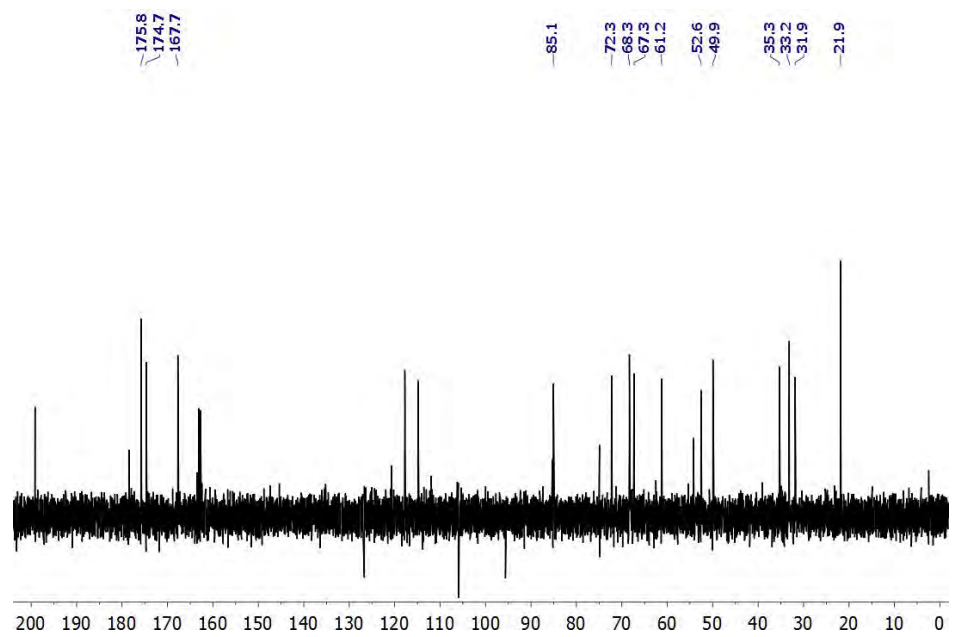


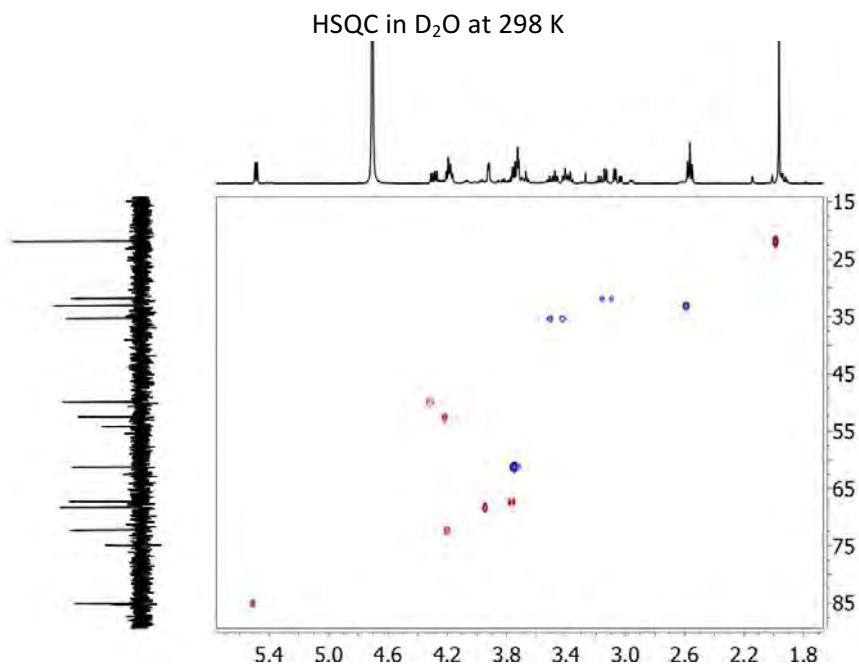
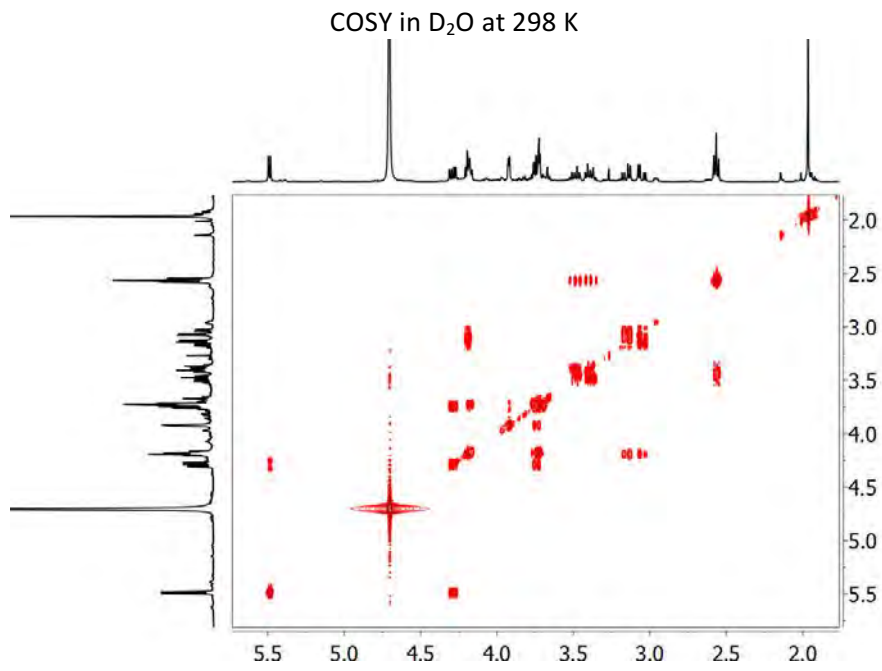
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

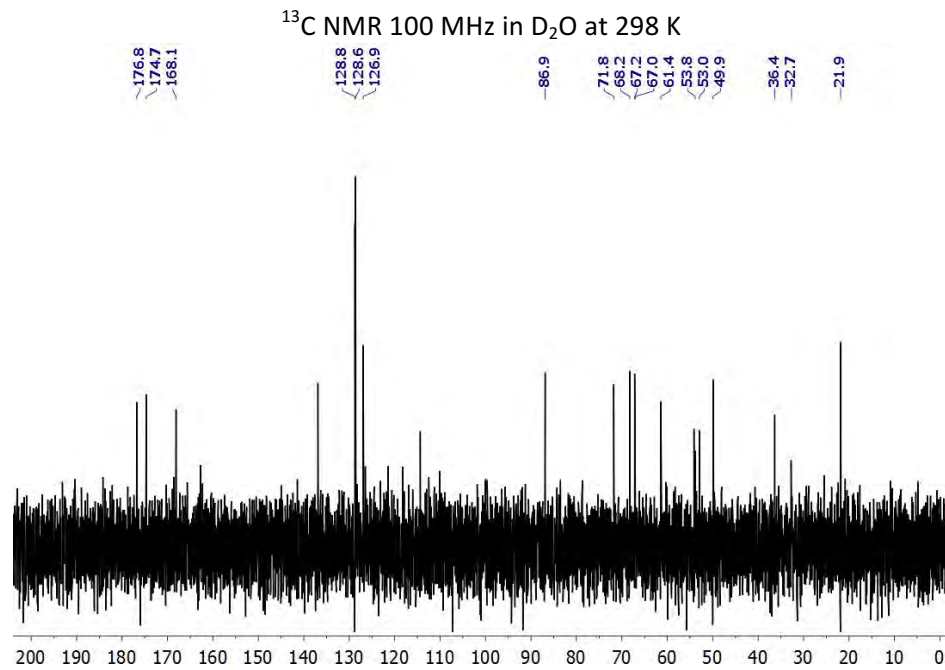
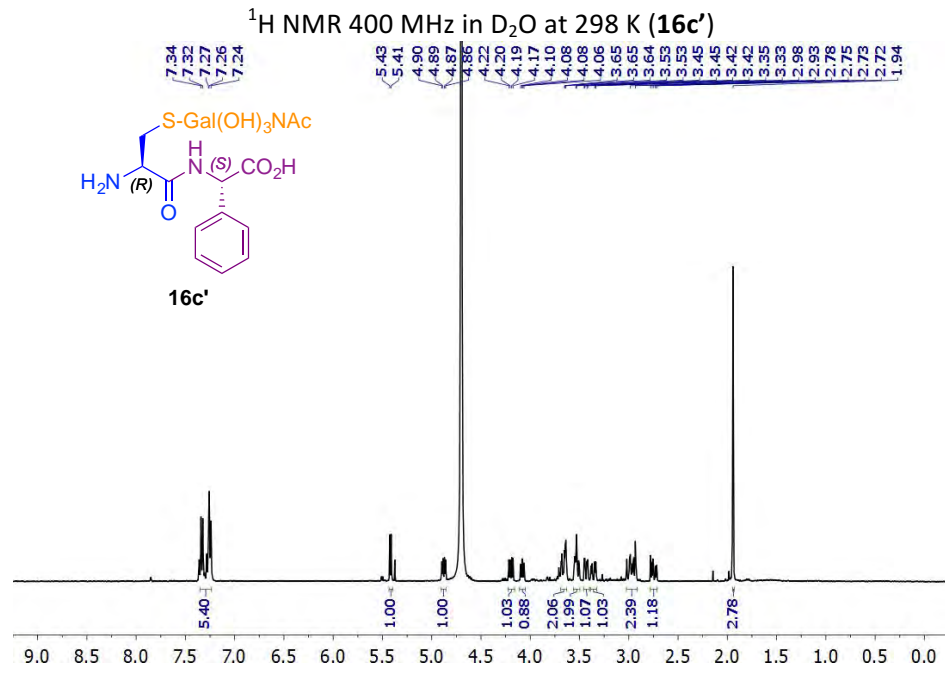
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**15e**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

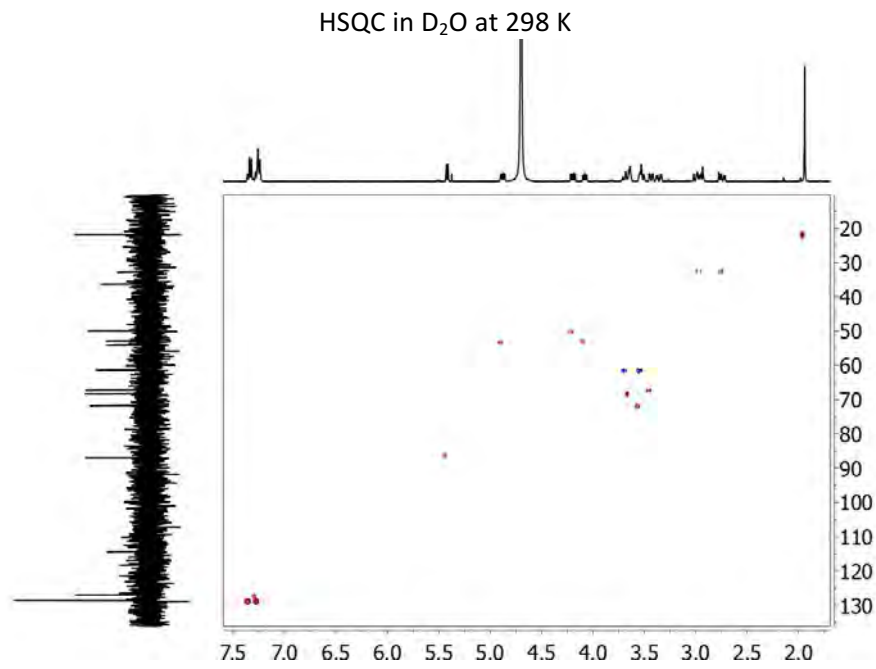
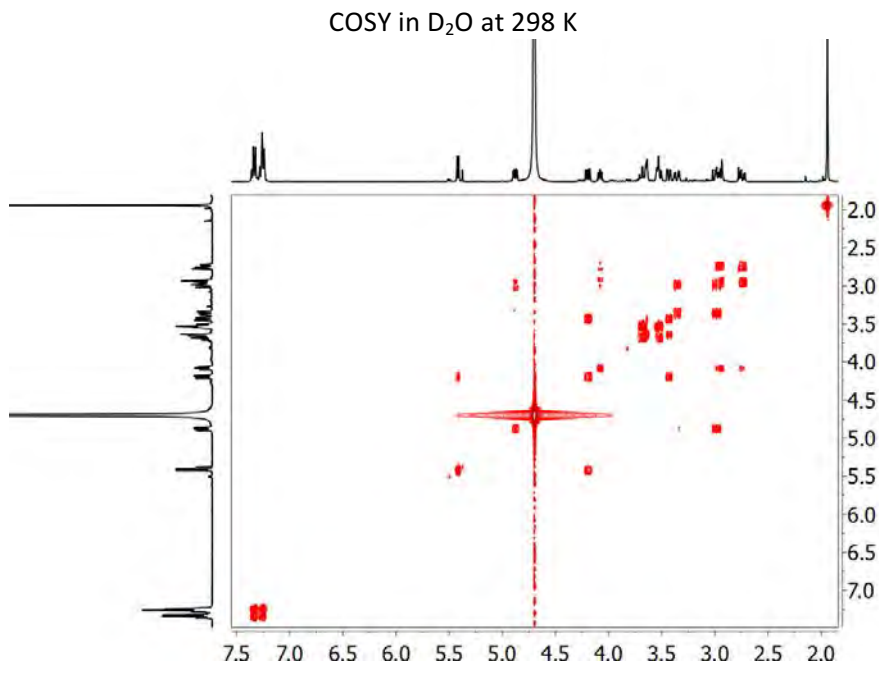
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

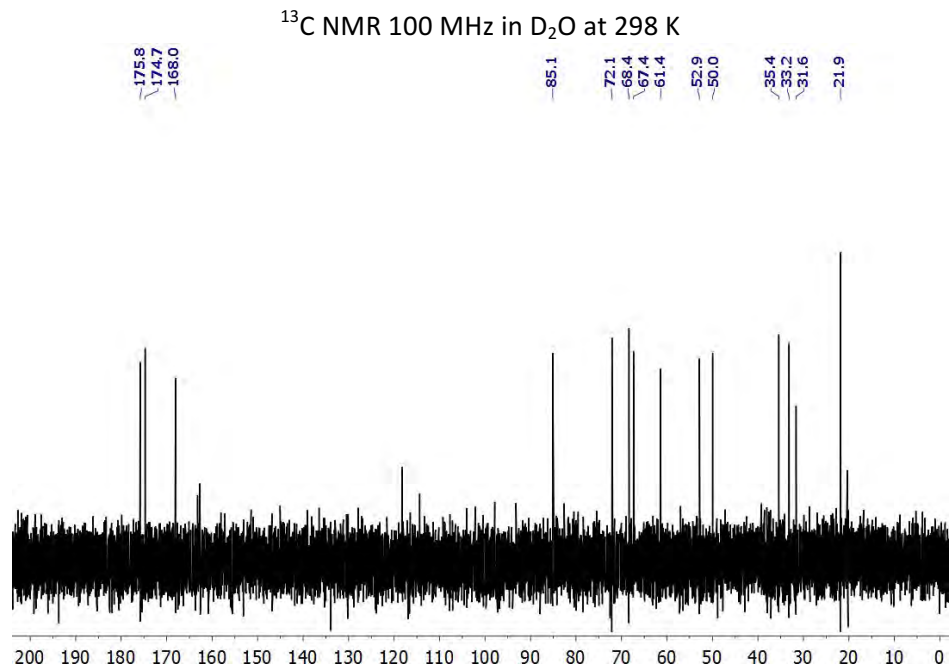
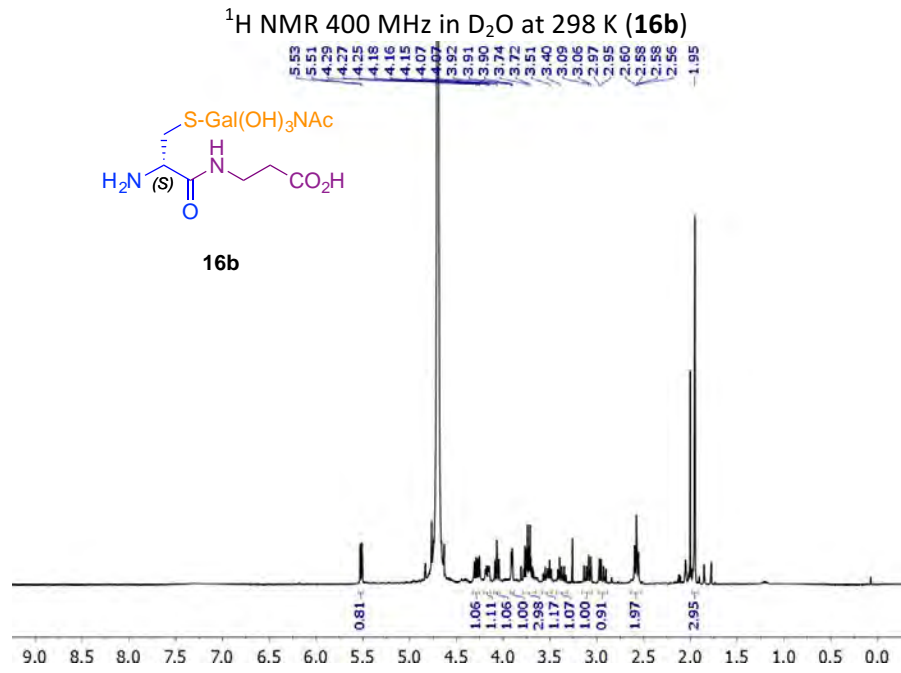
HMBC in CDCl_3 at 298 K

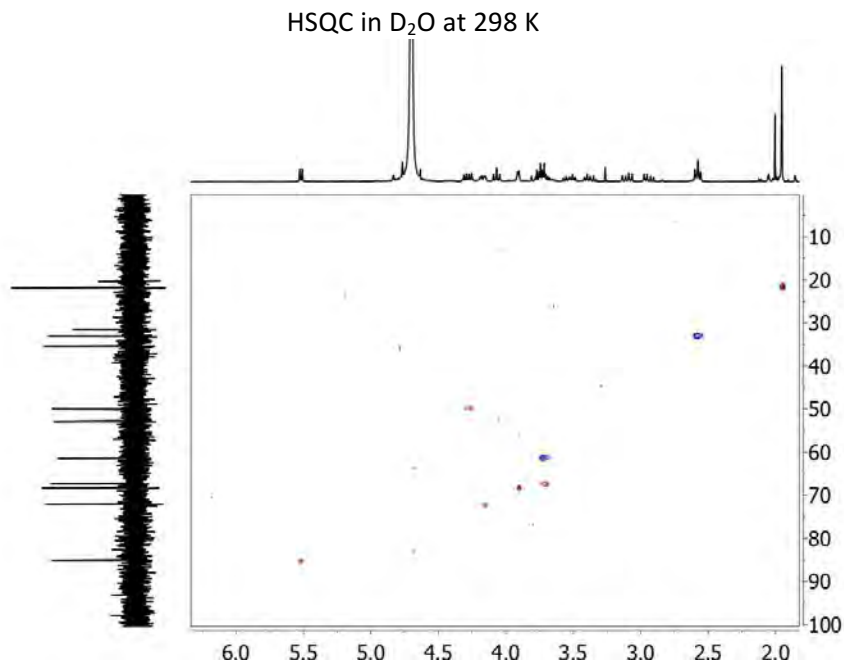
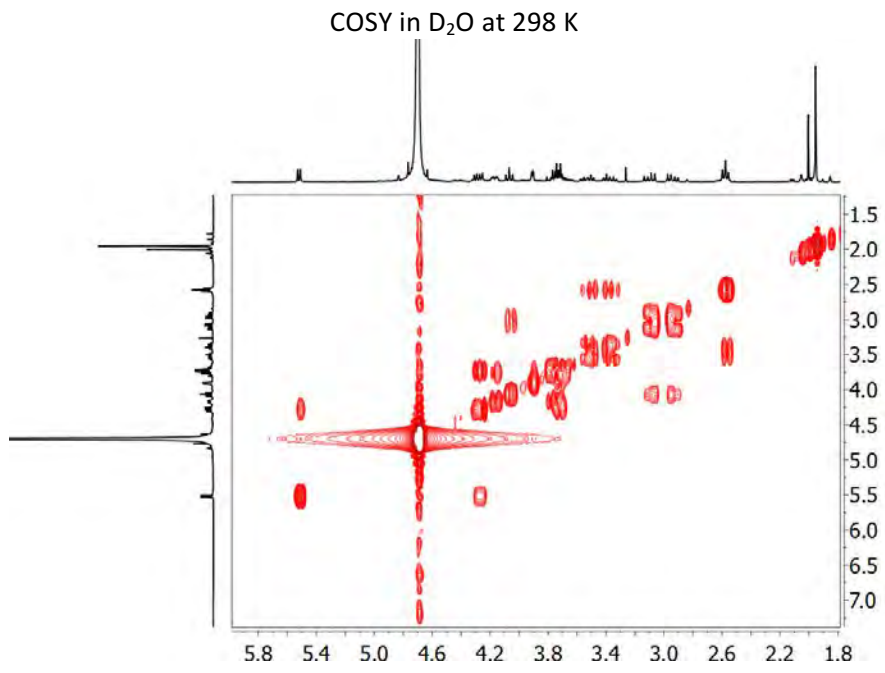
¹³C NMR 100 MHz in D₂O at 298 K

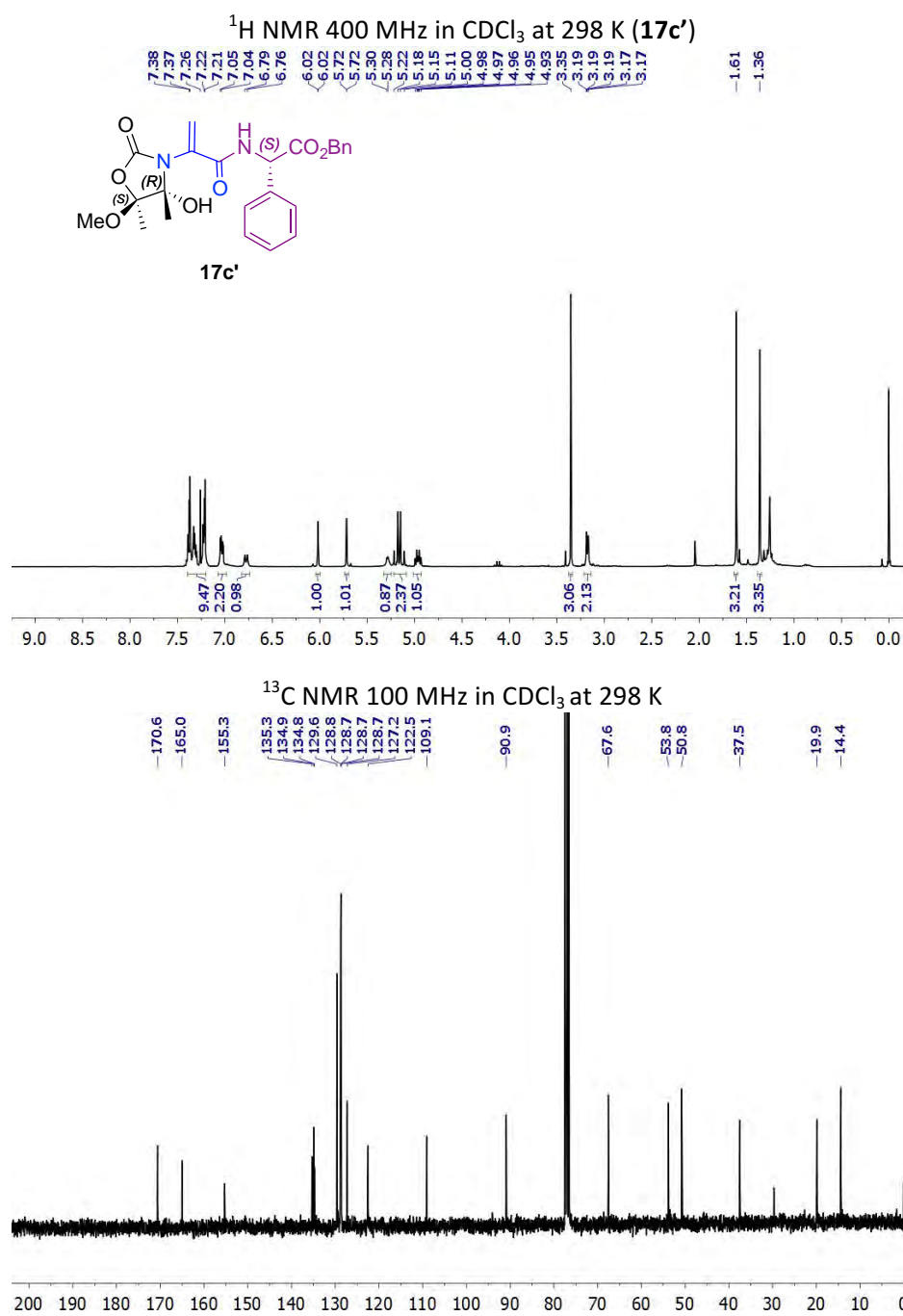


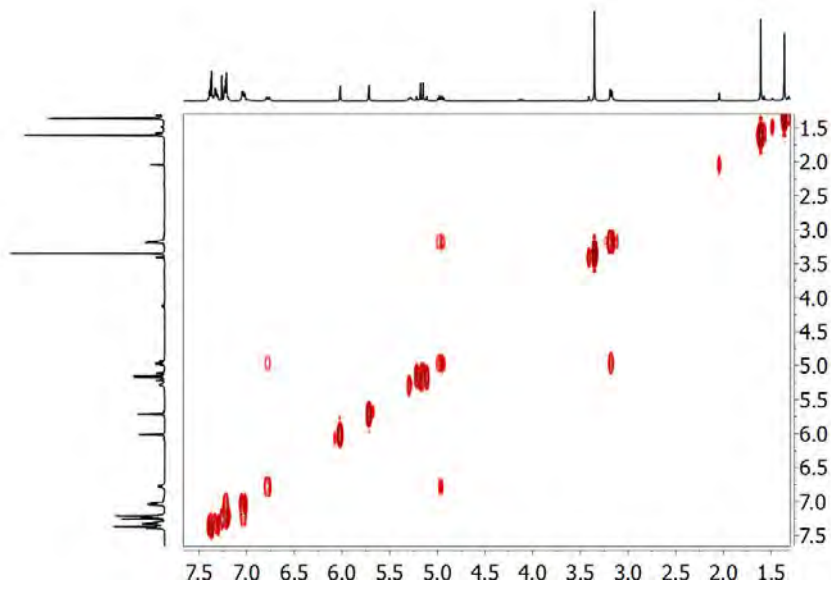
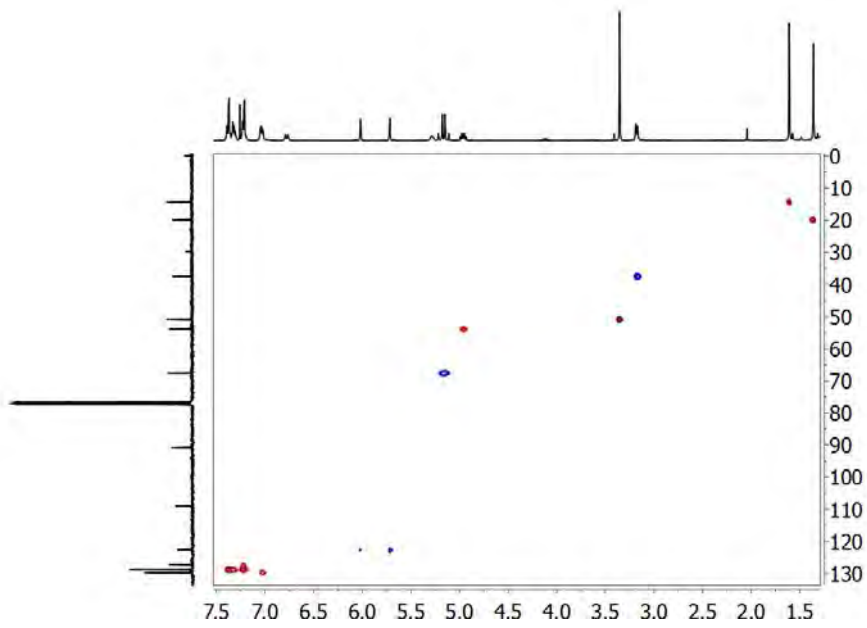


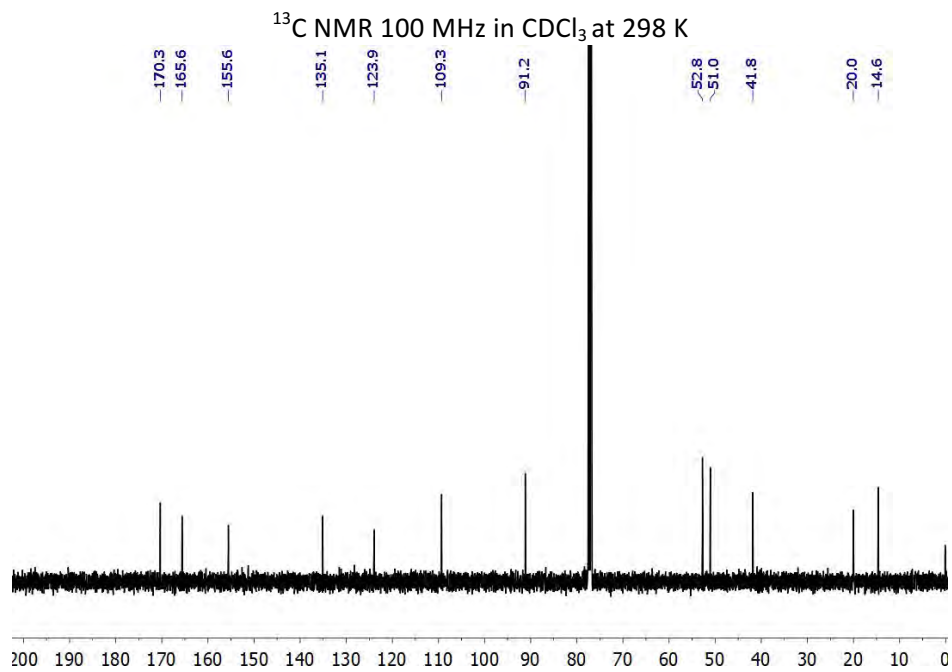
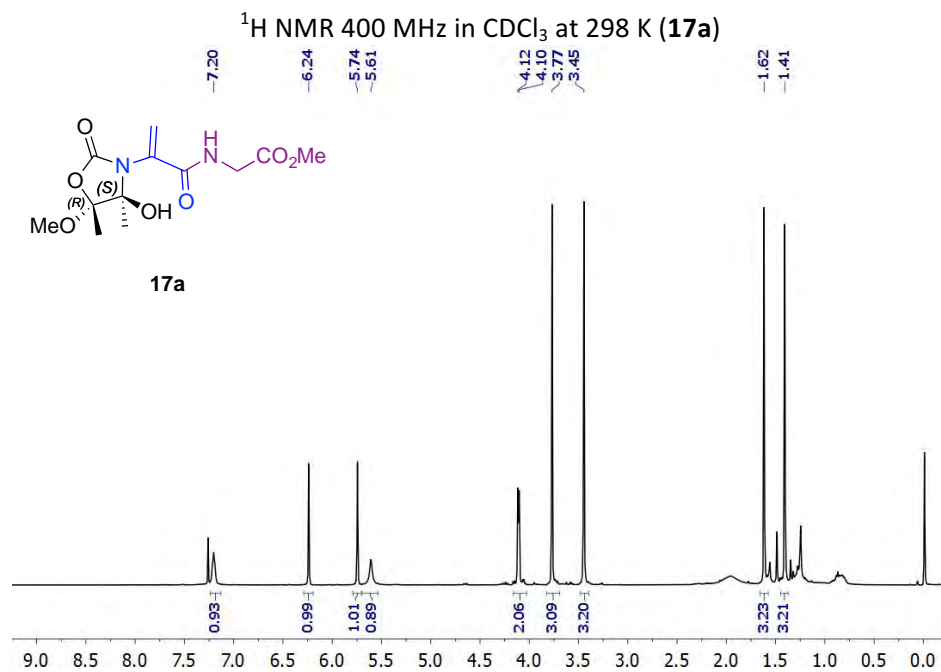


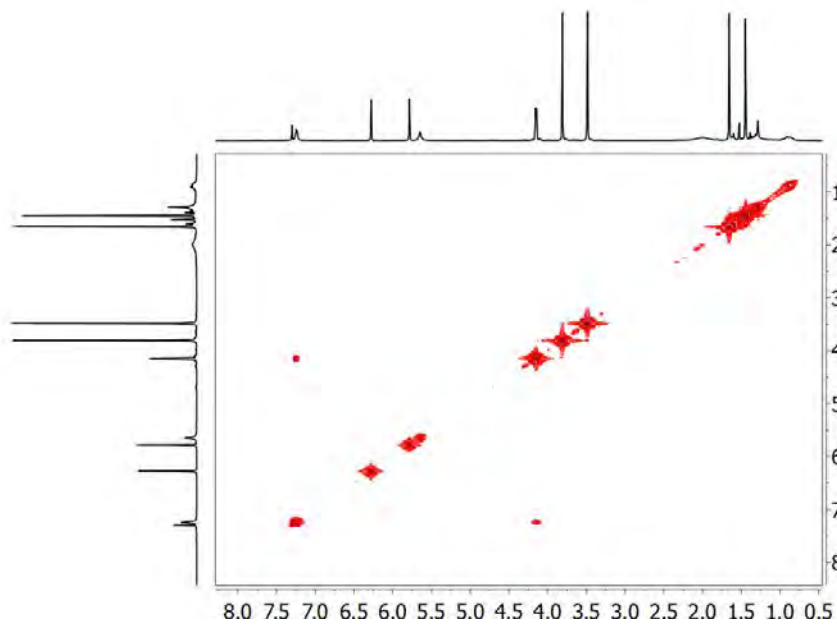
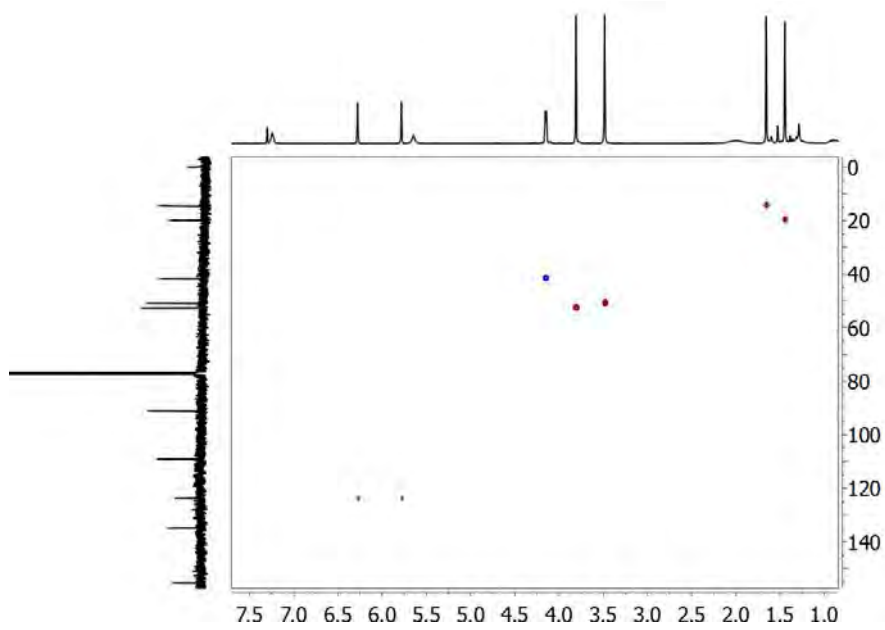


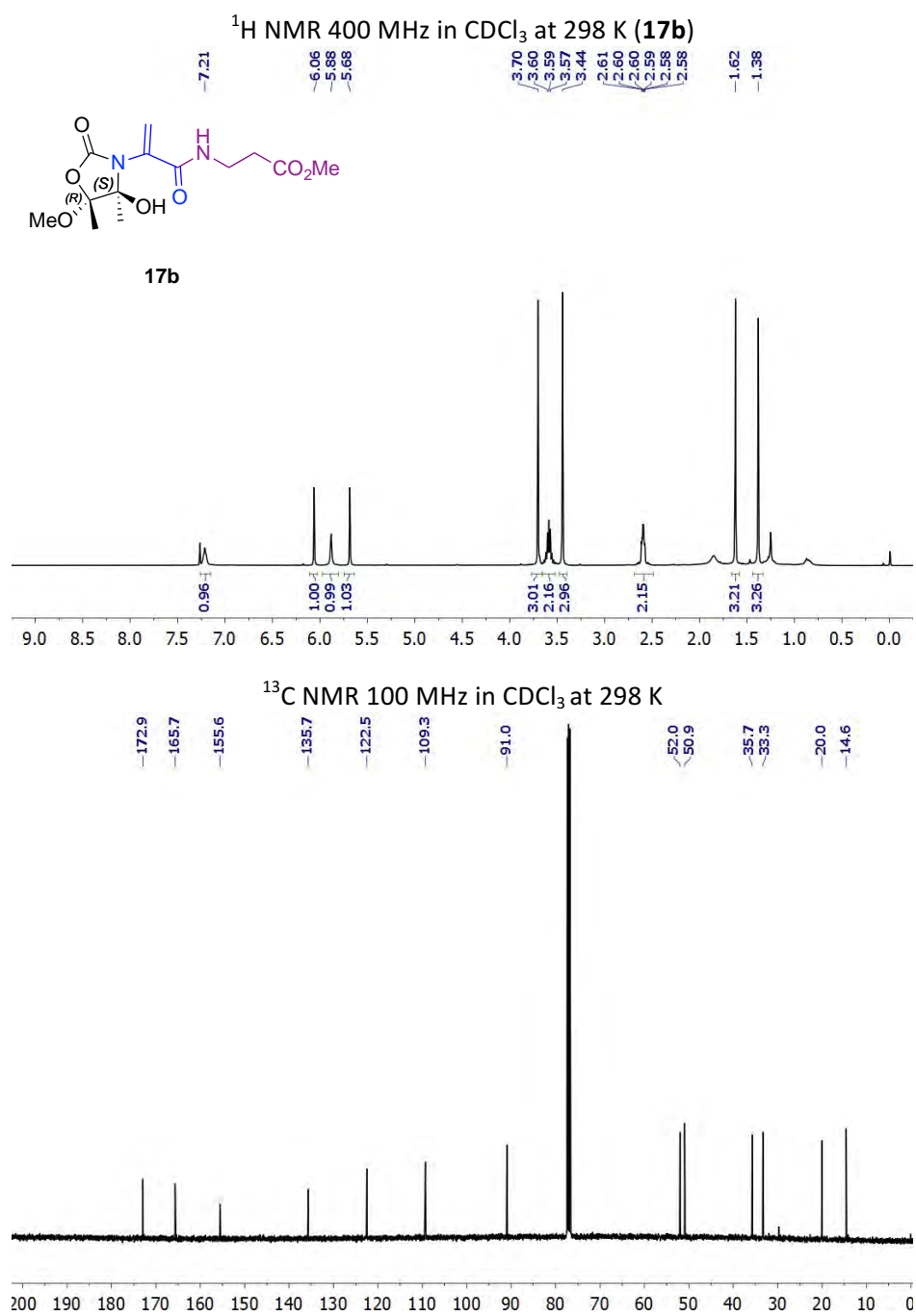




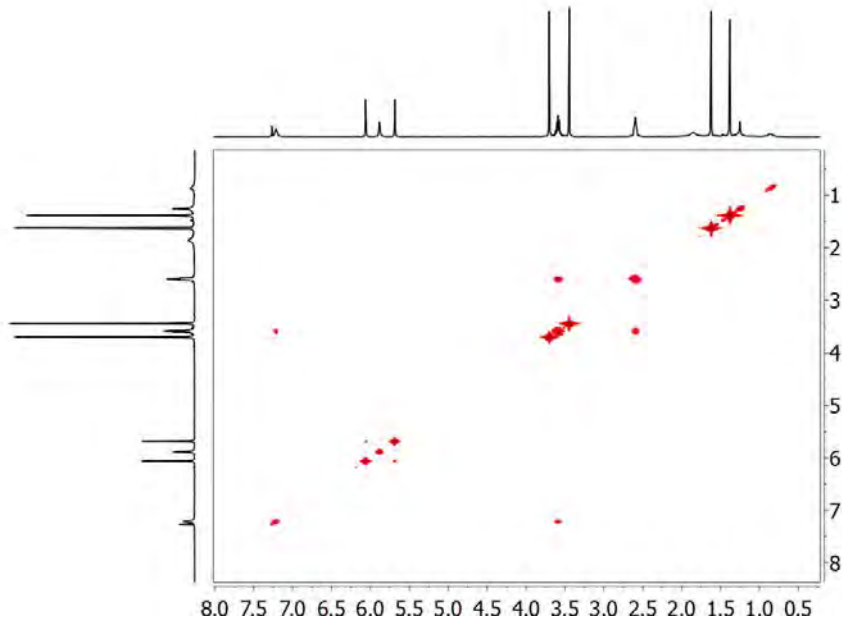
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K



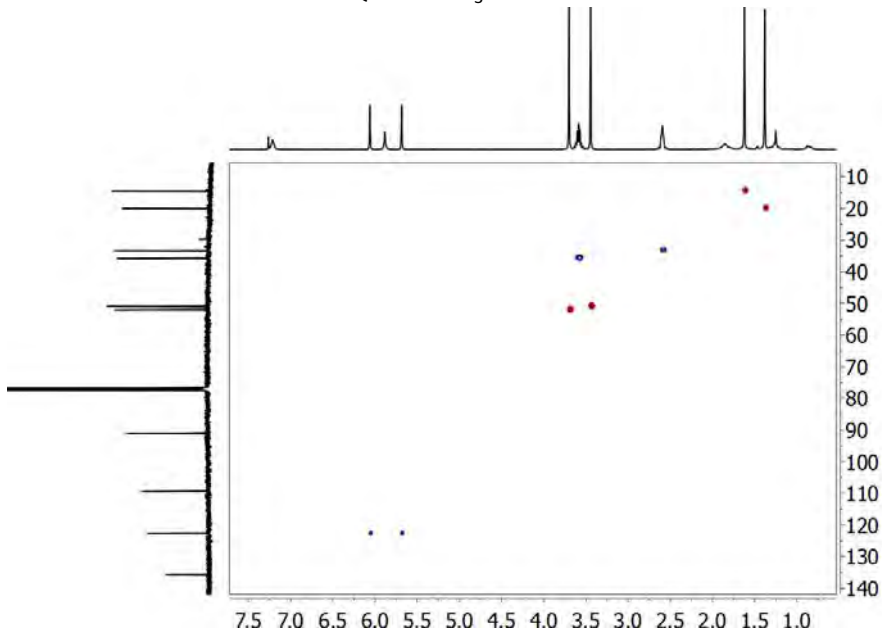
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

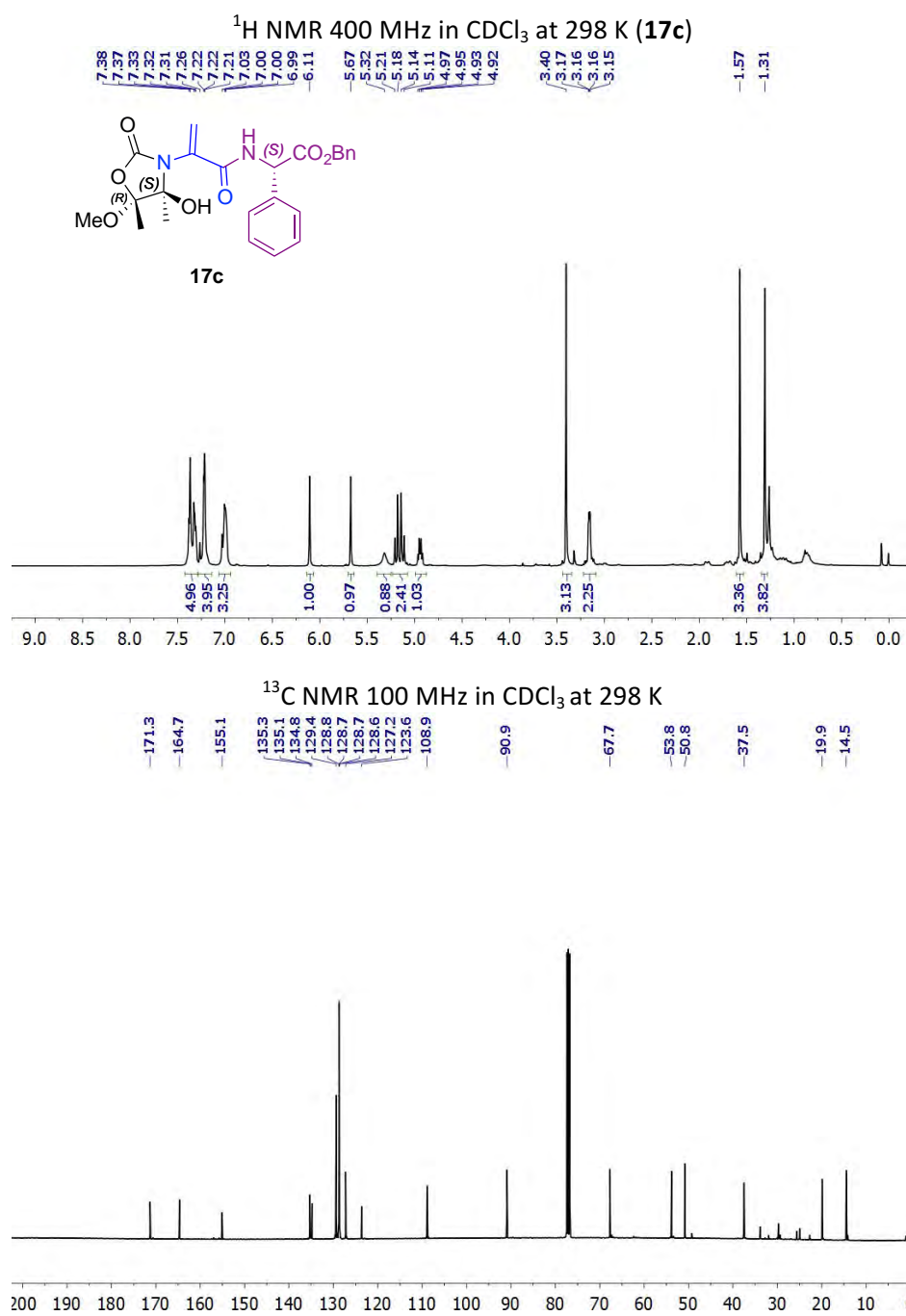


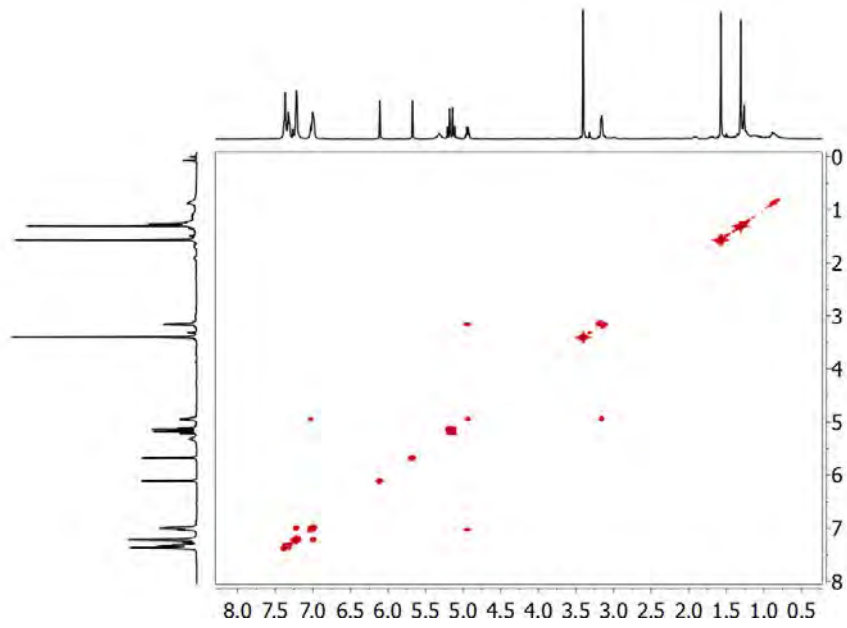
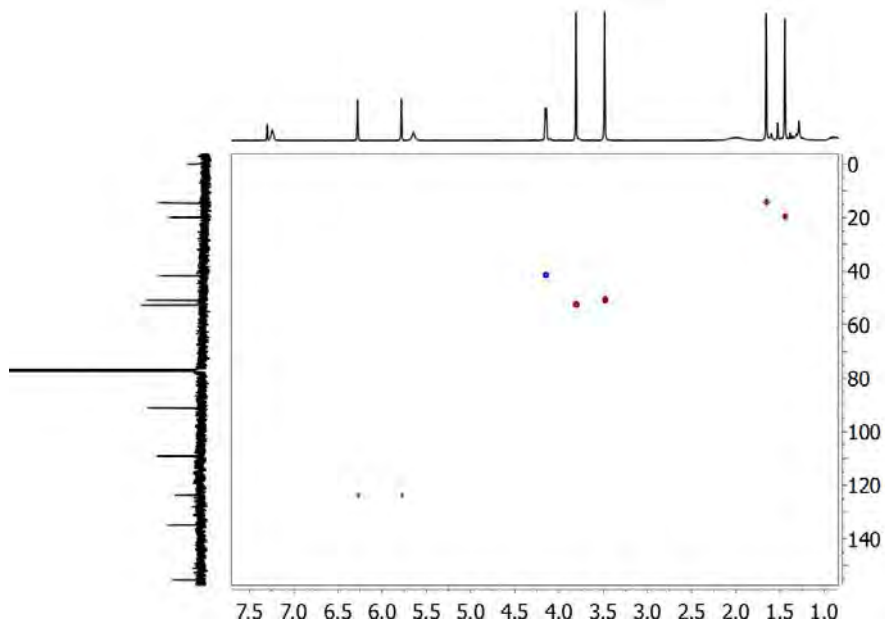
COSY in CDCl₃ at 298 K

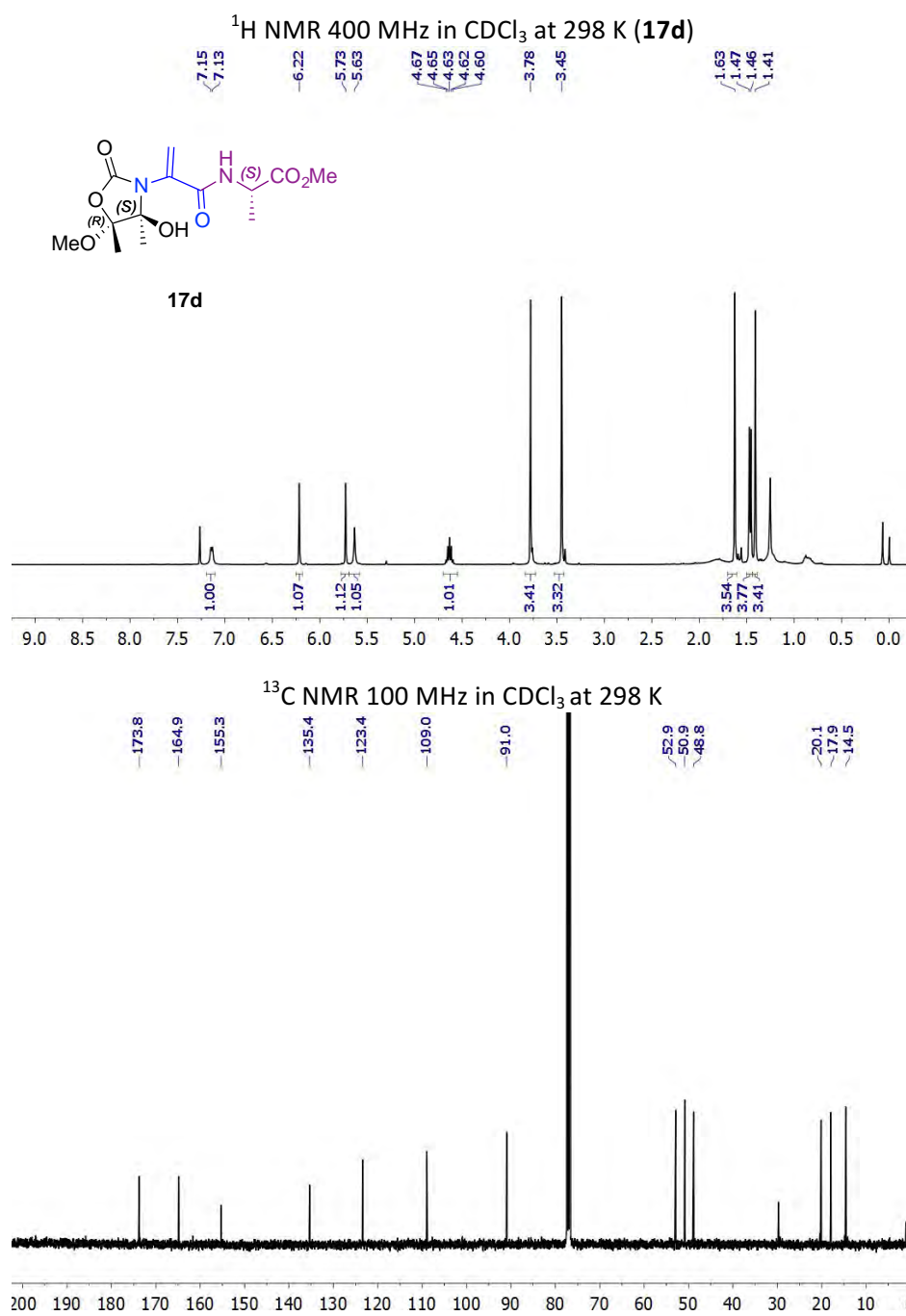


HSQC in CDCl₃ at 298 K

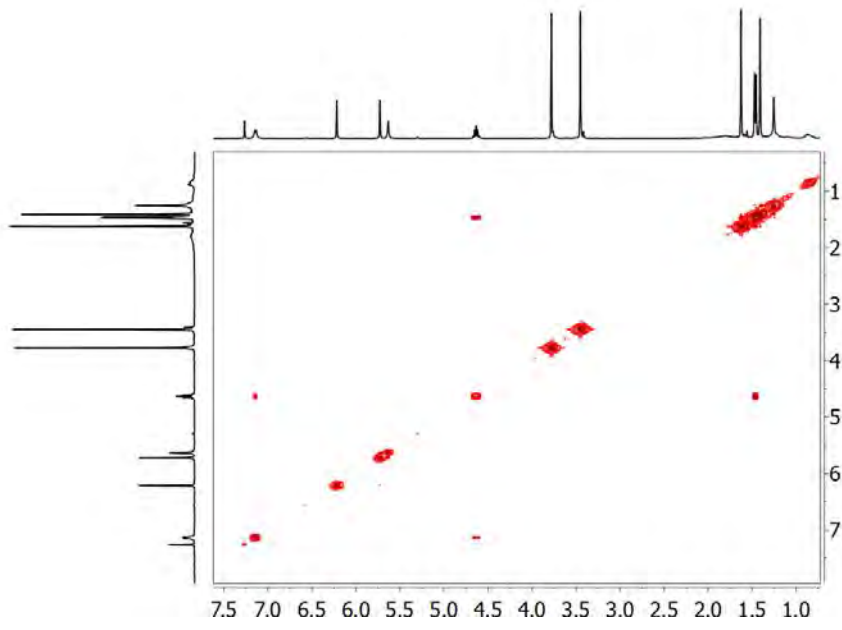




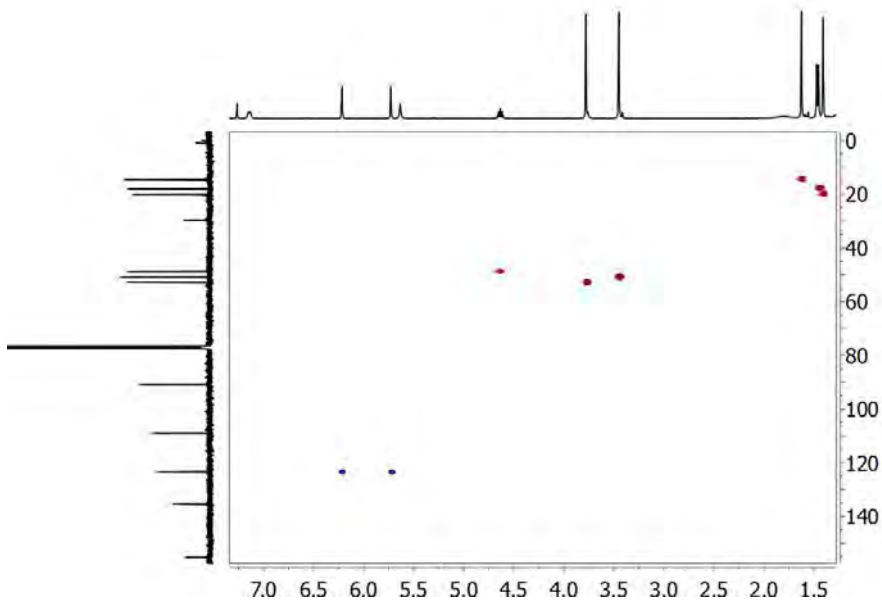
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

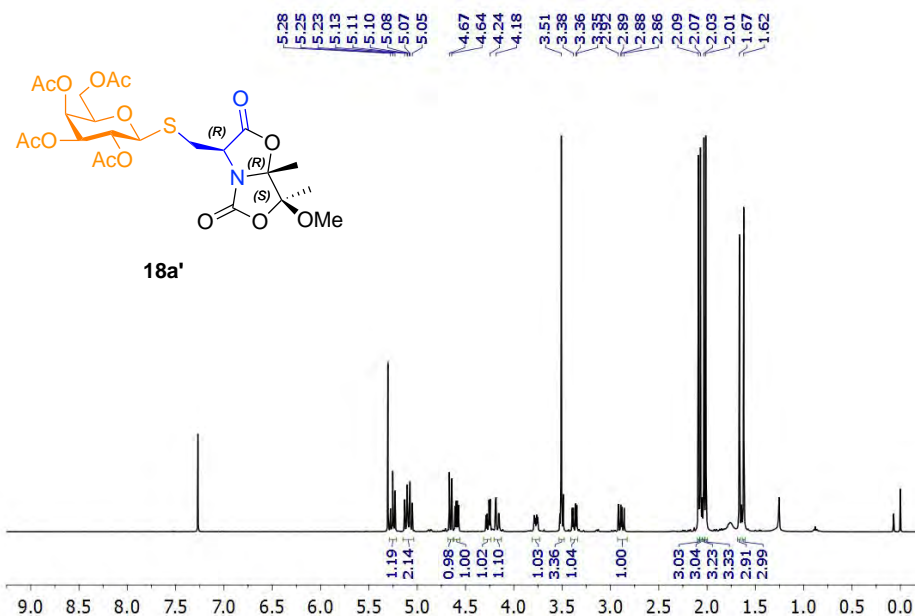
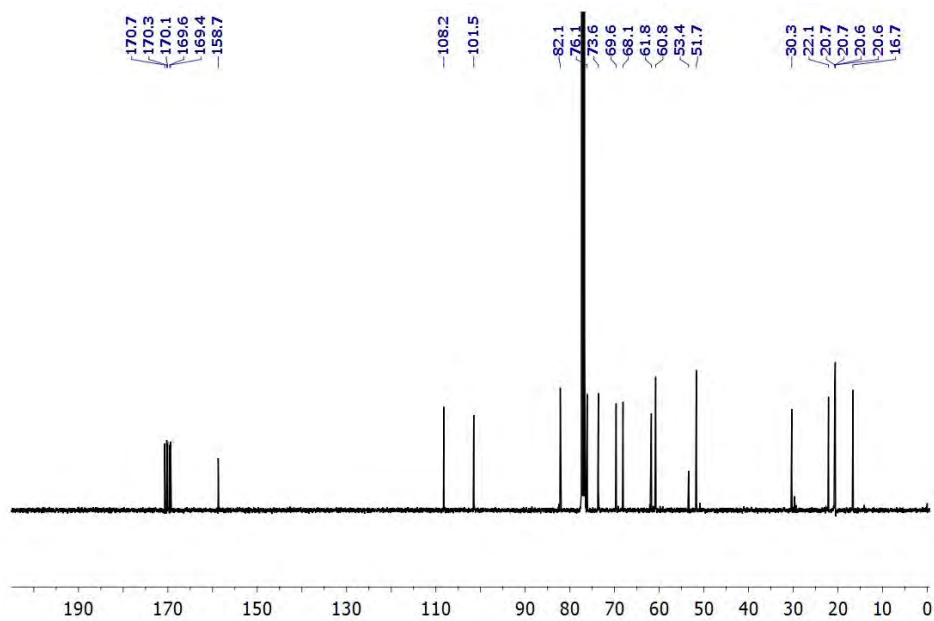


COSY in CDCl₃ at 298 K

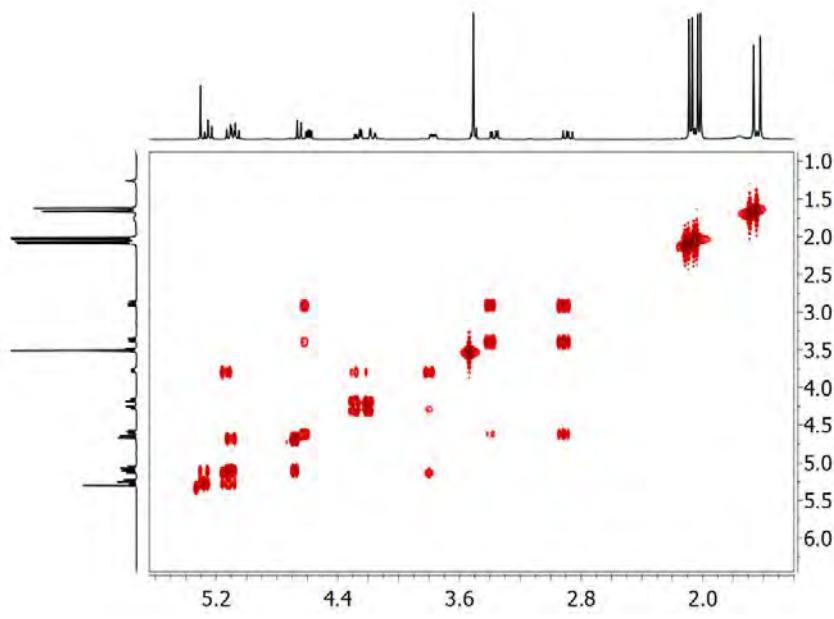


HSQC in CDCl₃ at 298 K

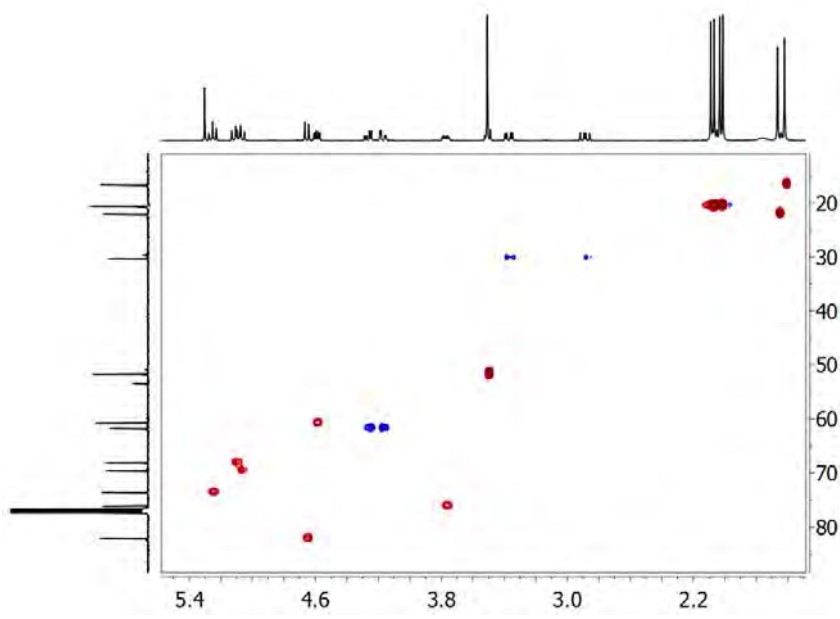


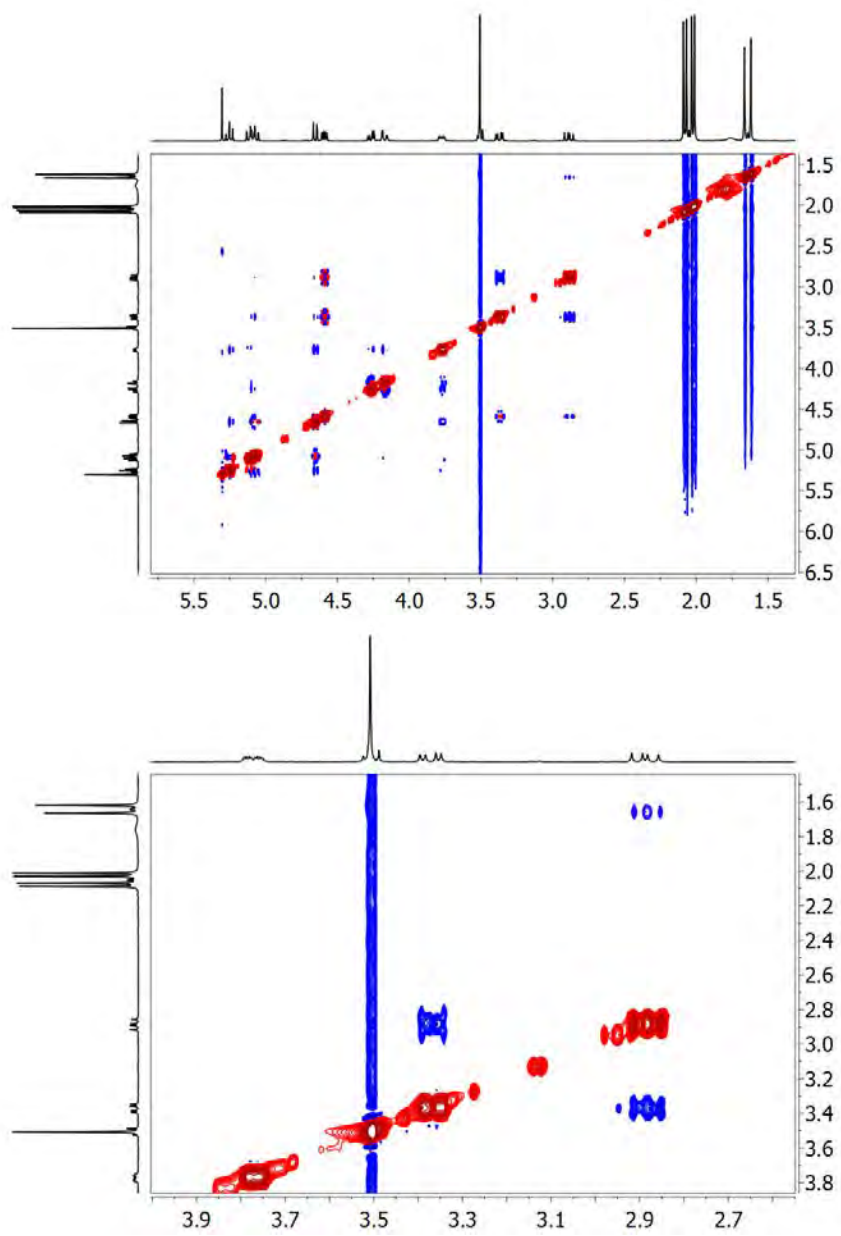
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**18a'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

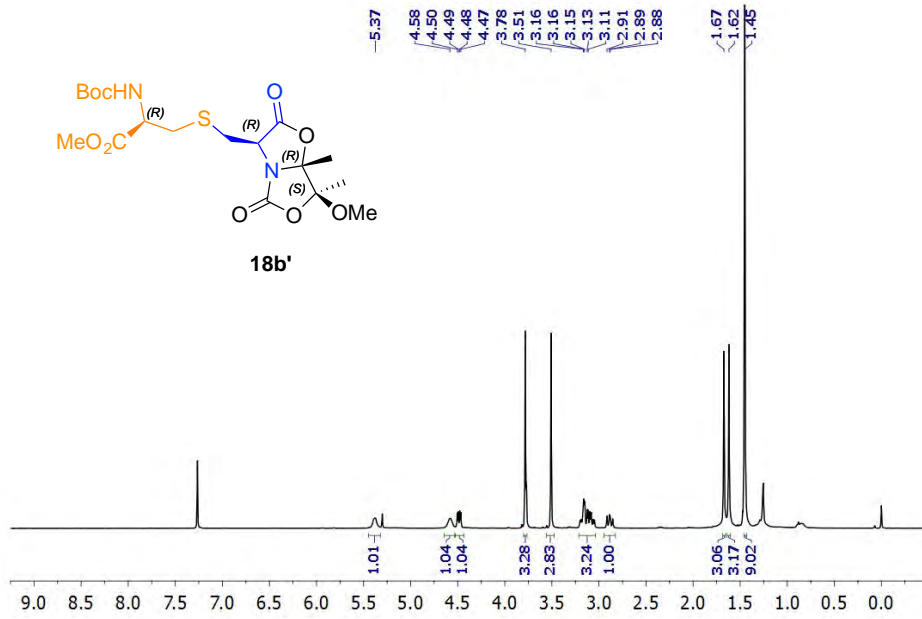
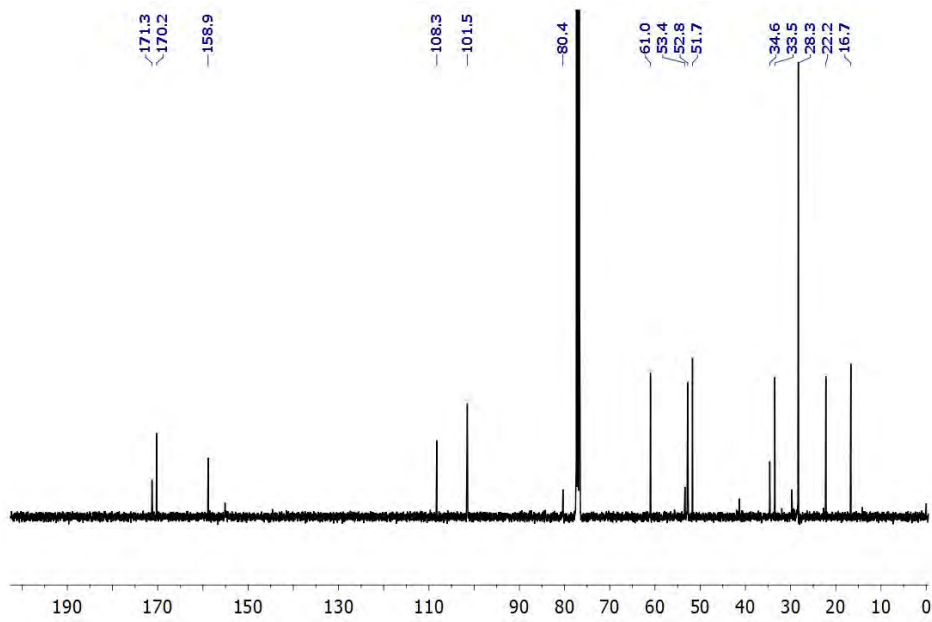
COSY in CDCl₃ at 298 K

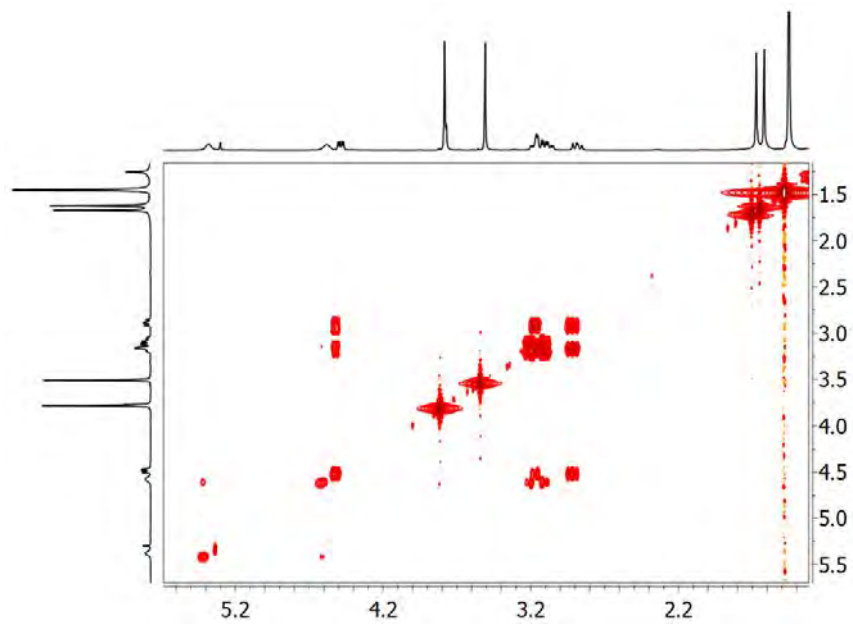
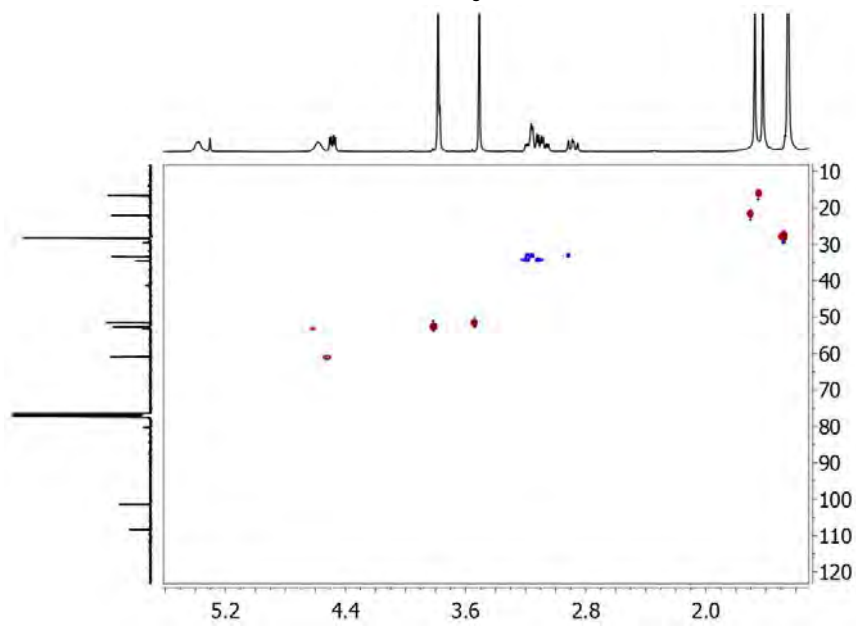


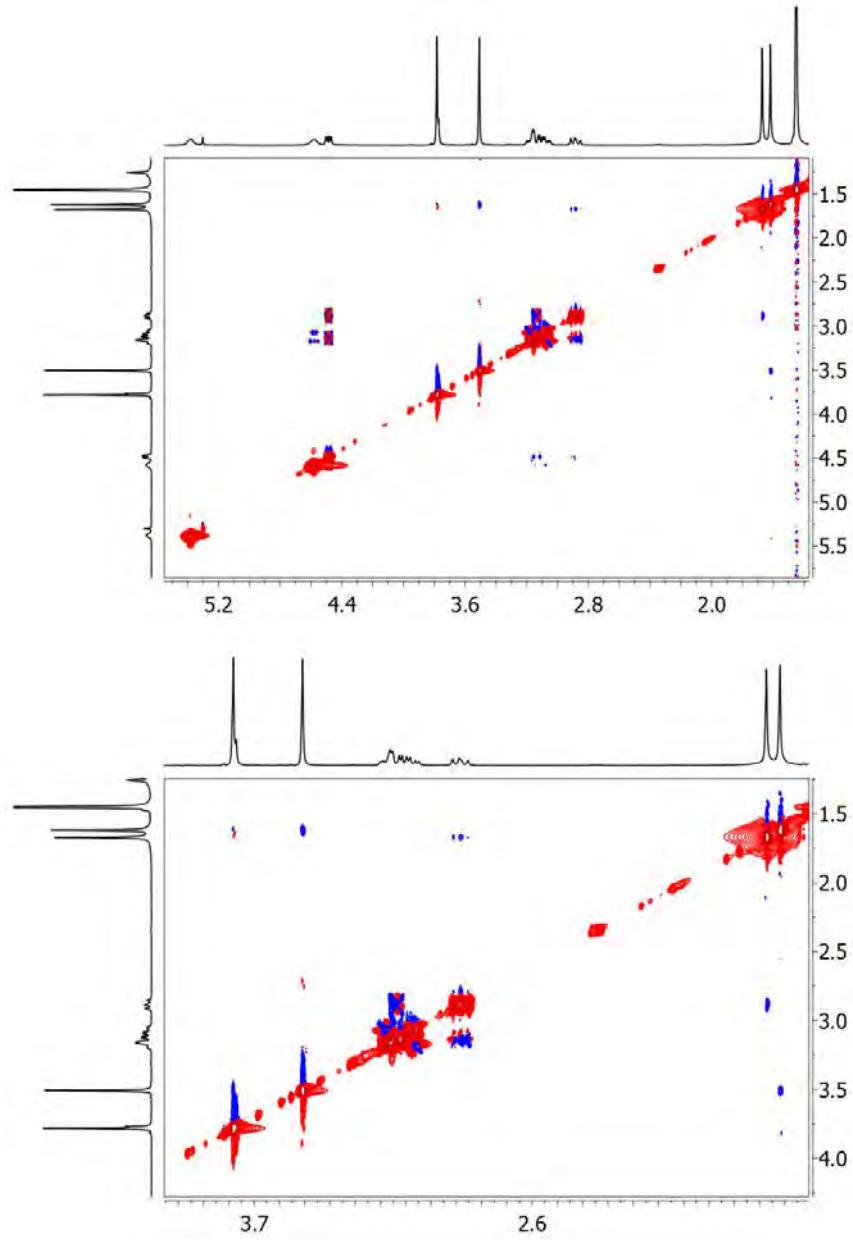
HSQC in CDCl₃ at 298 K

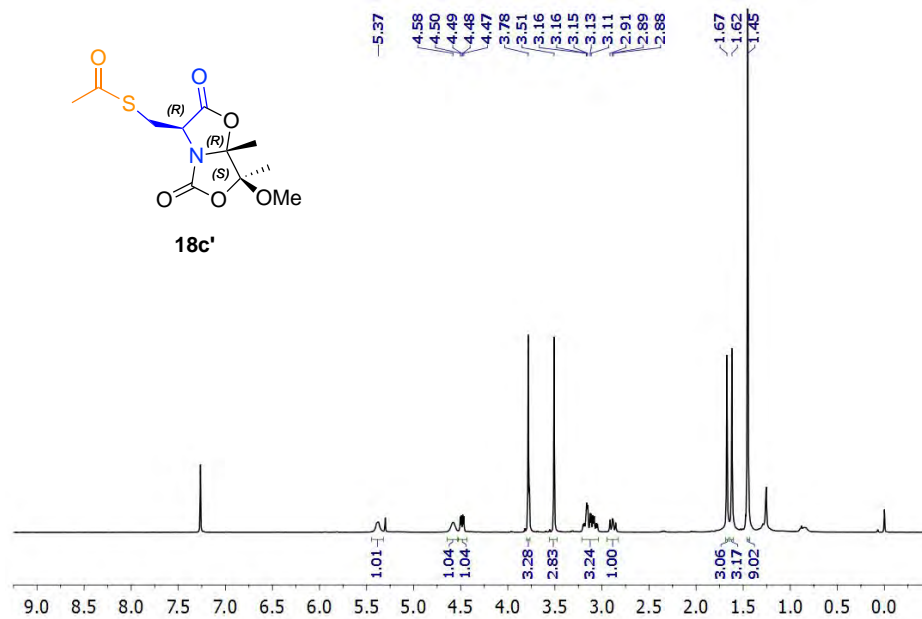
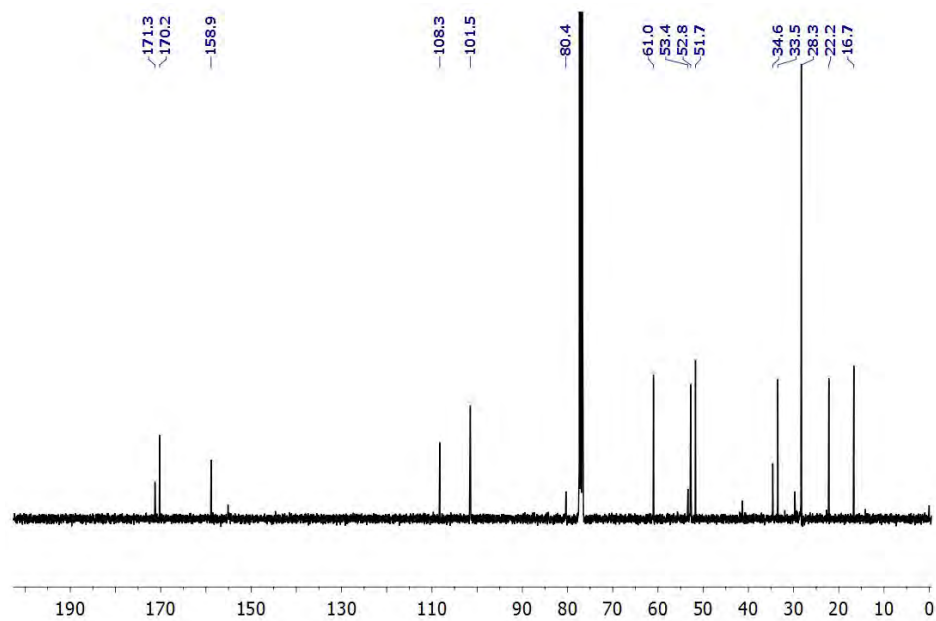


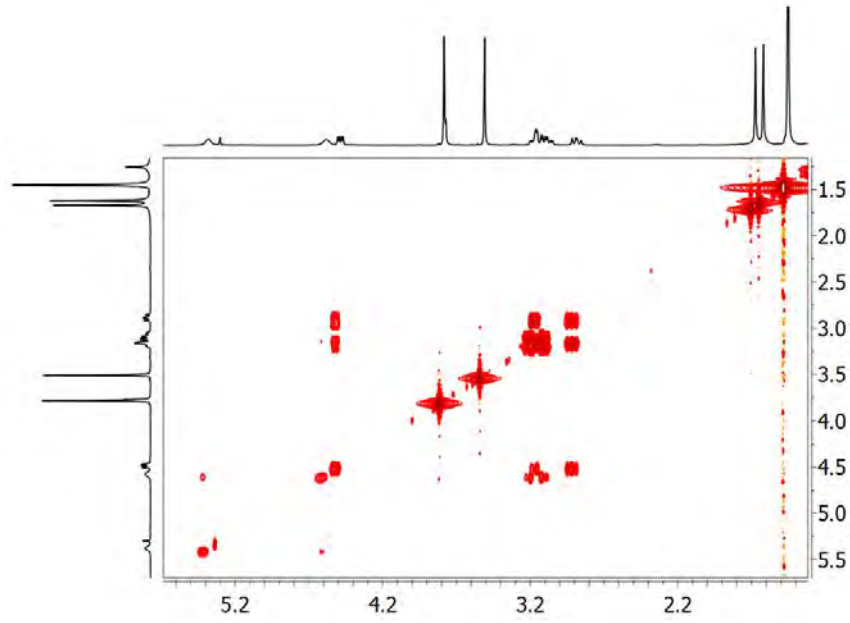
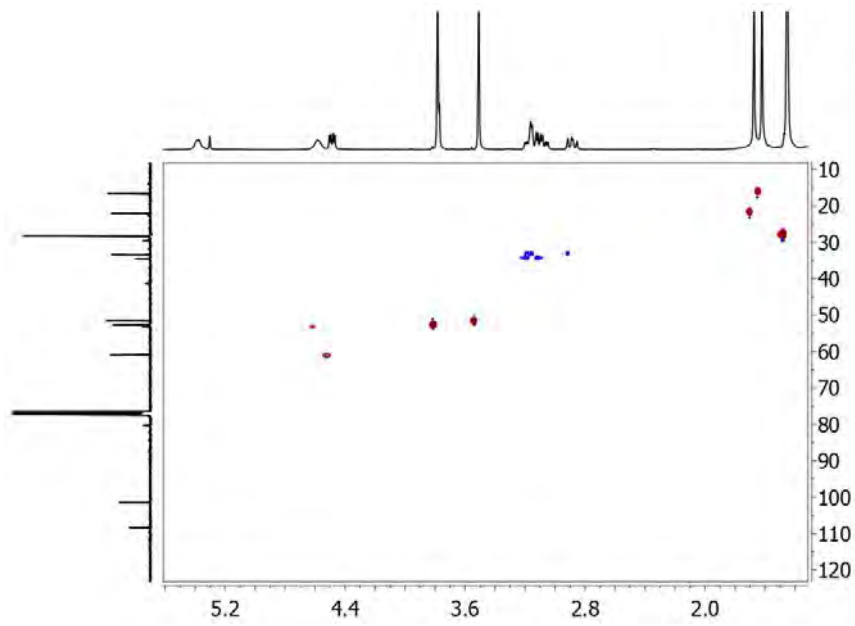
NOESY in CDCl_3 at 298 K

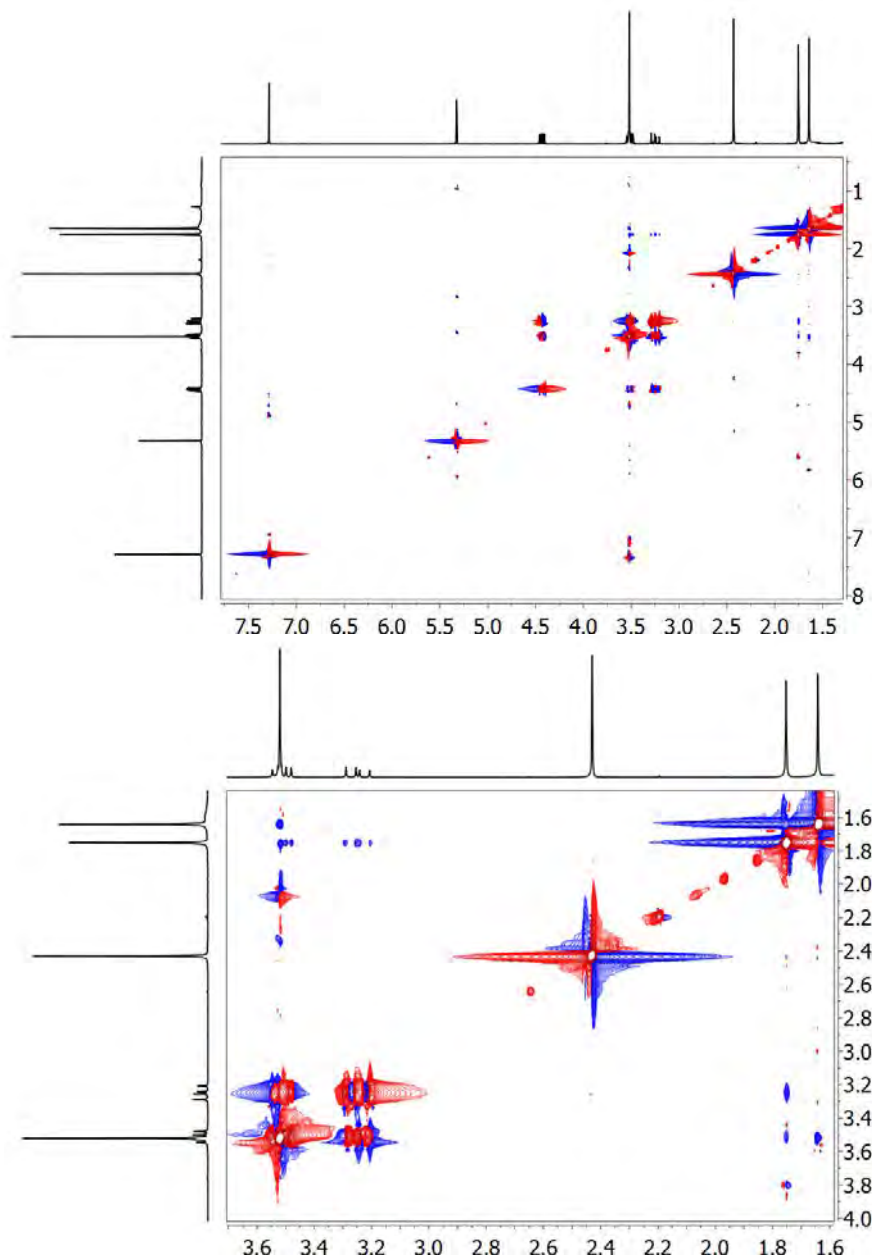
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**18b'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

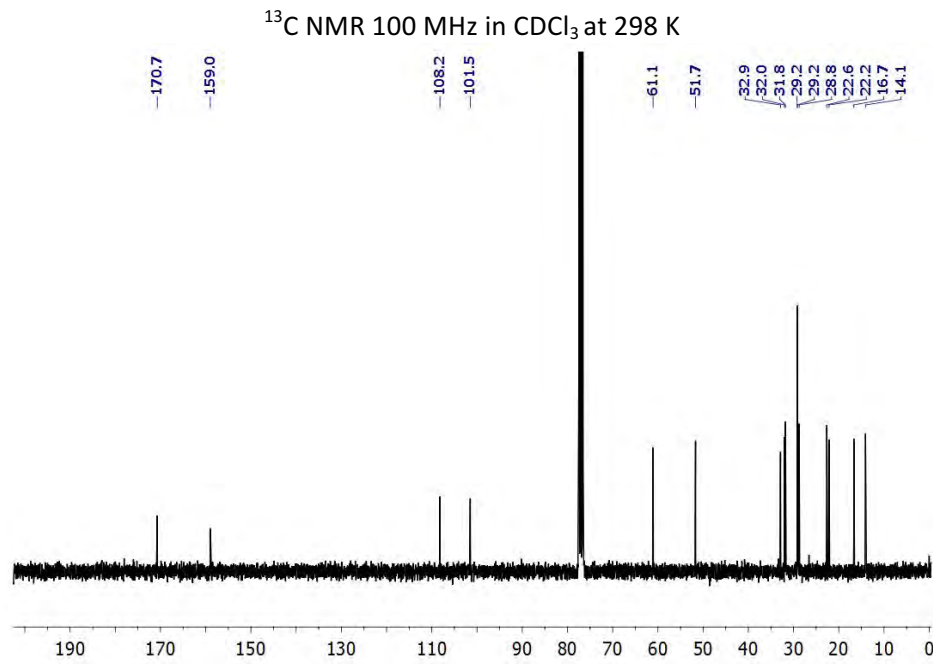
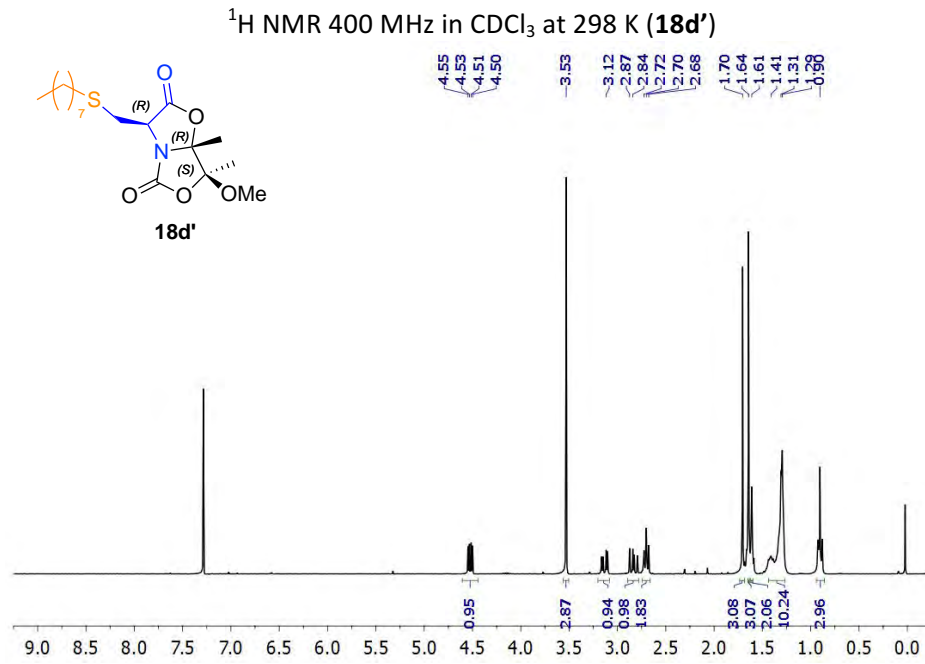
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

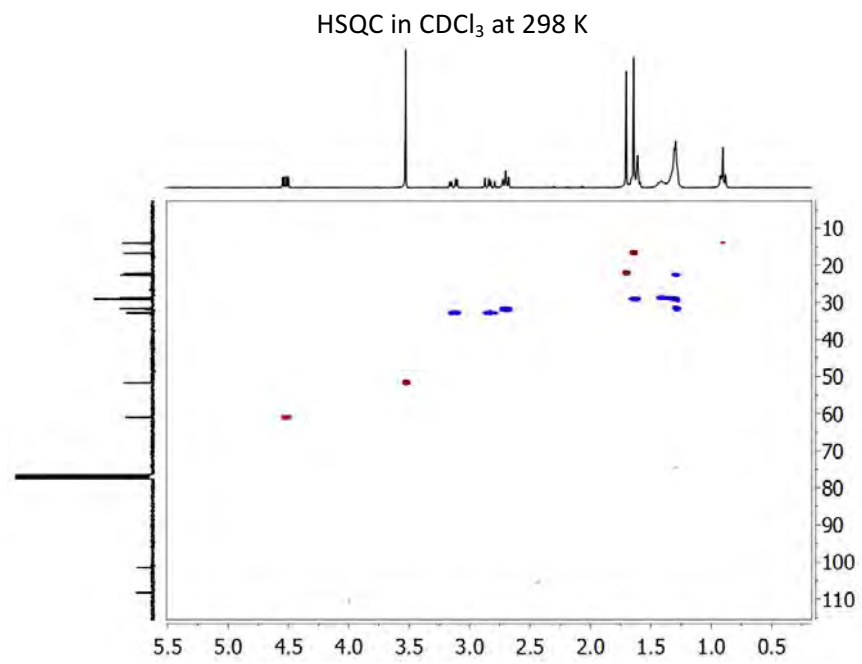
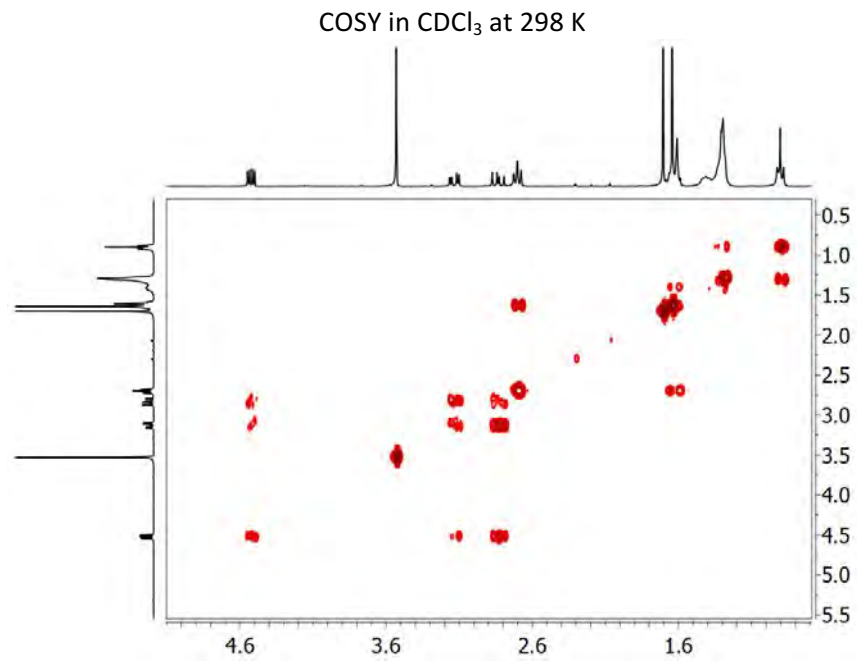
NOESY in CDCl_3 at 298 K

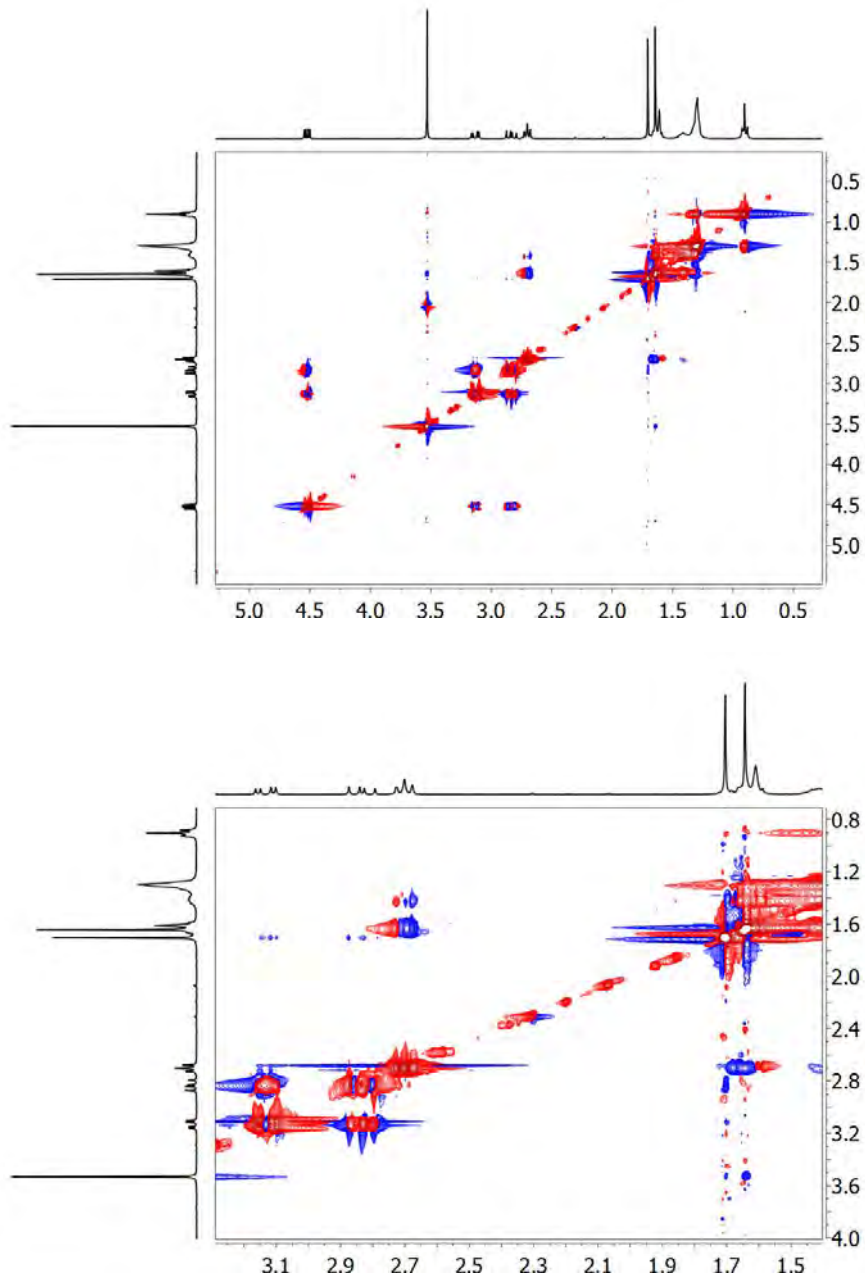
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**18c'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

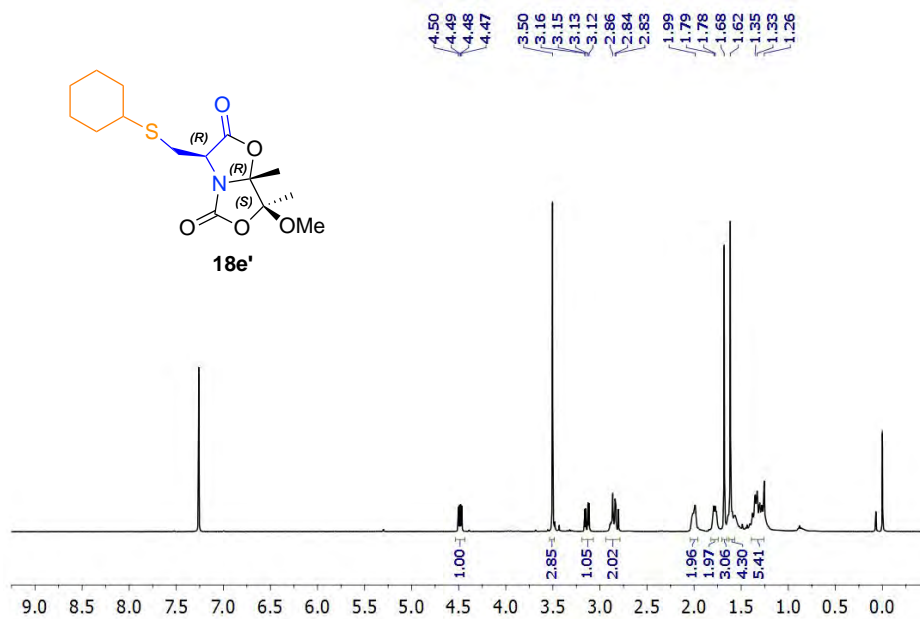
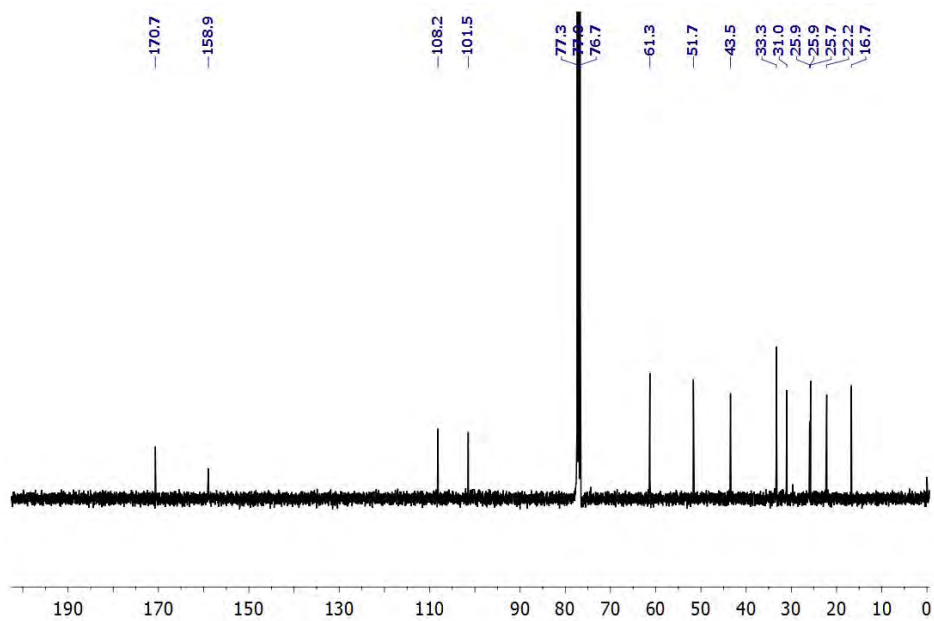
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

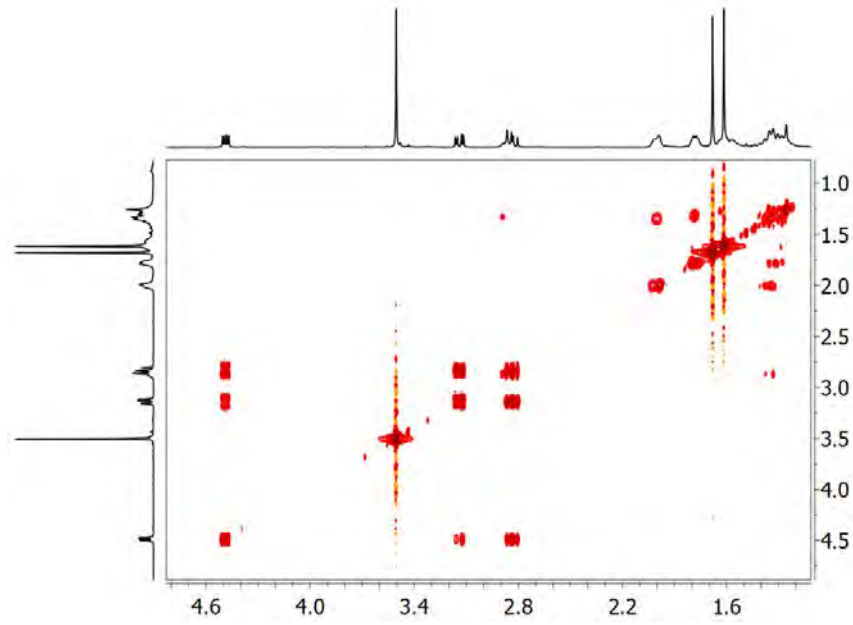
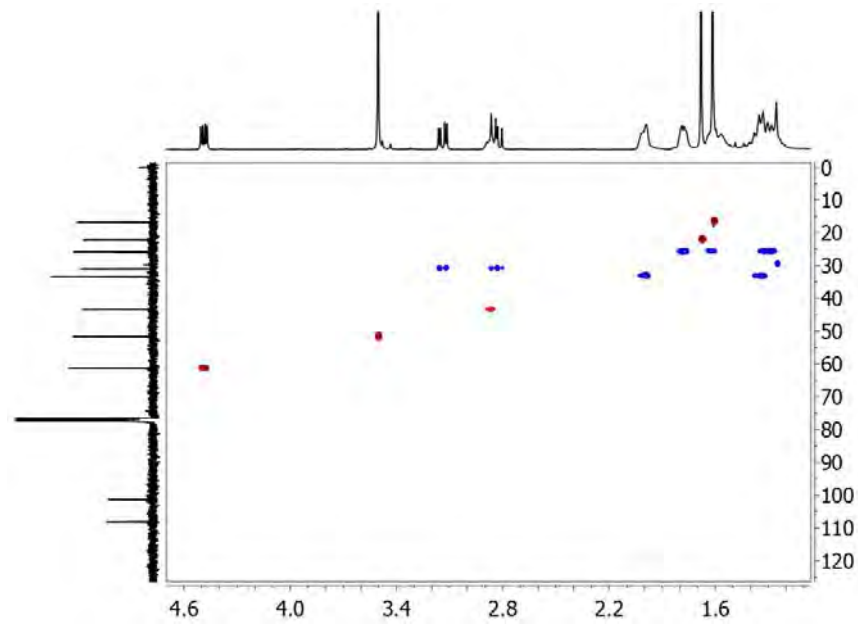
NOESY in CDCl_3 at 298 K

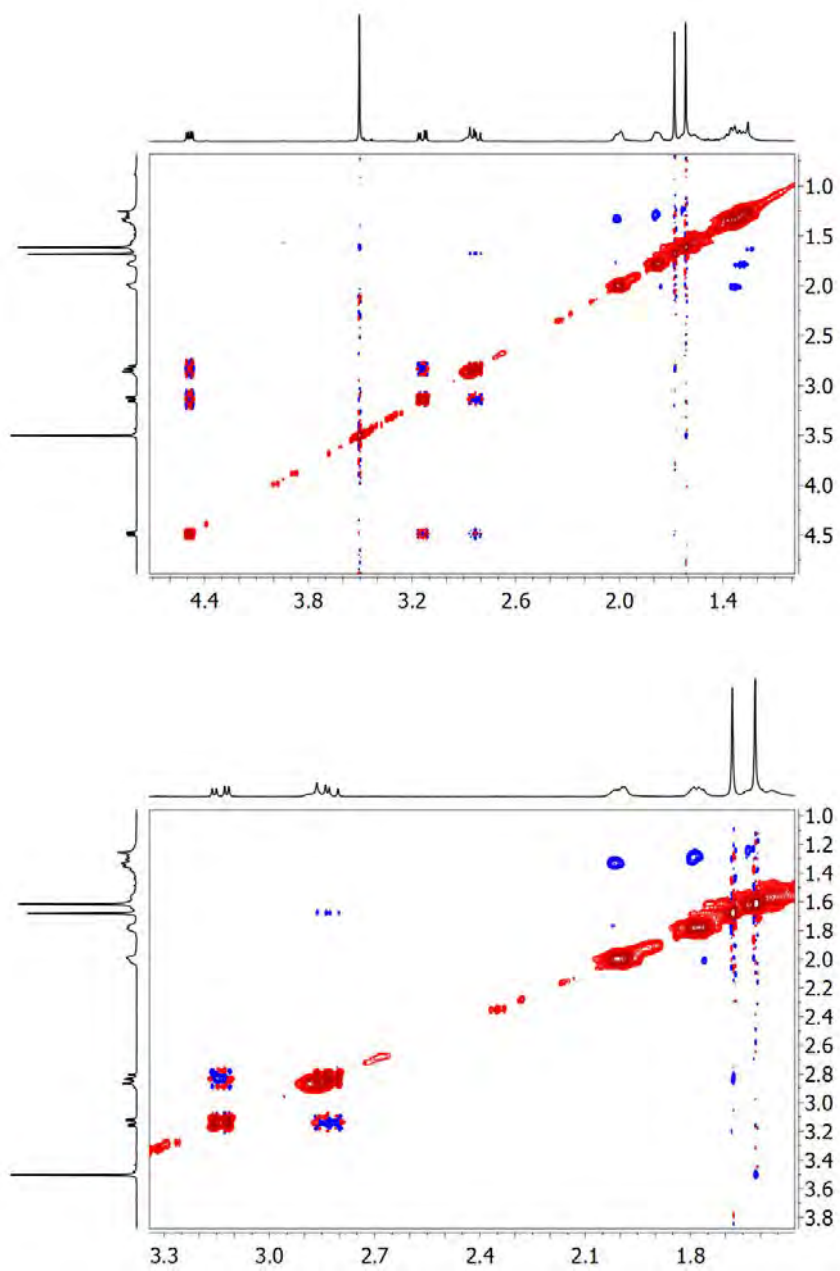


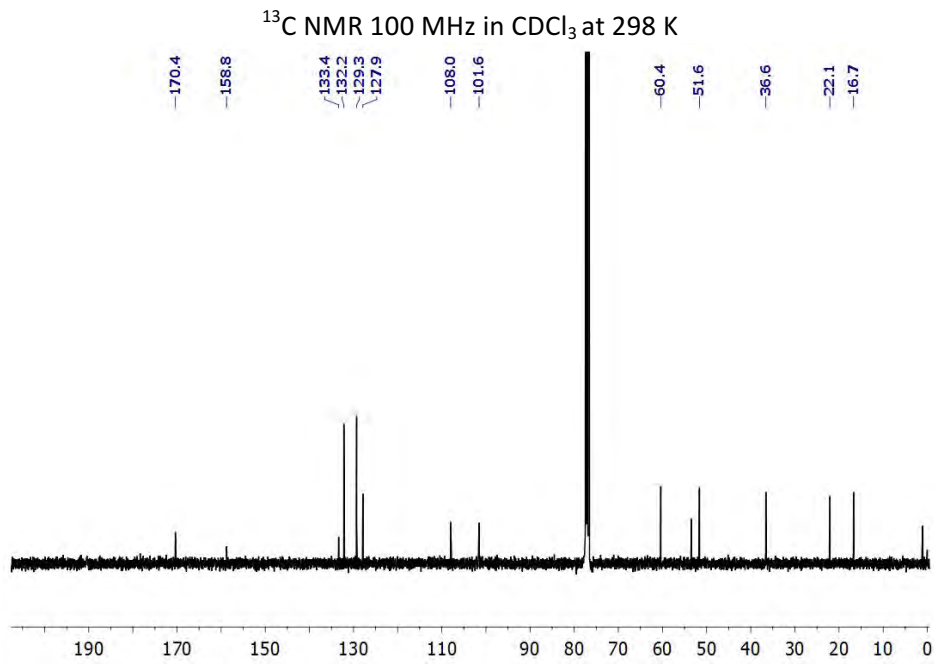
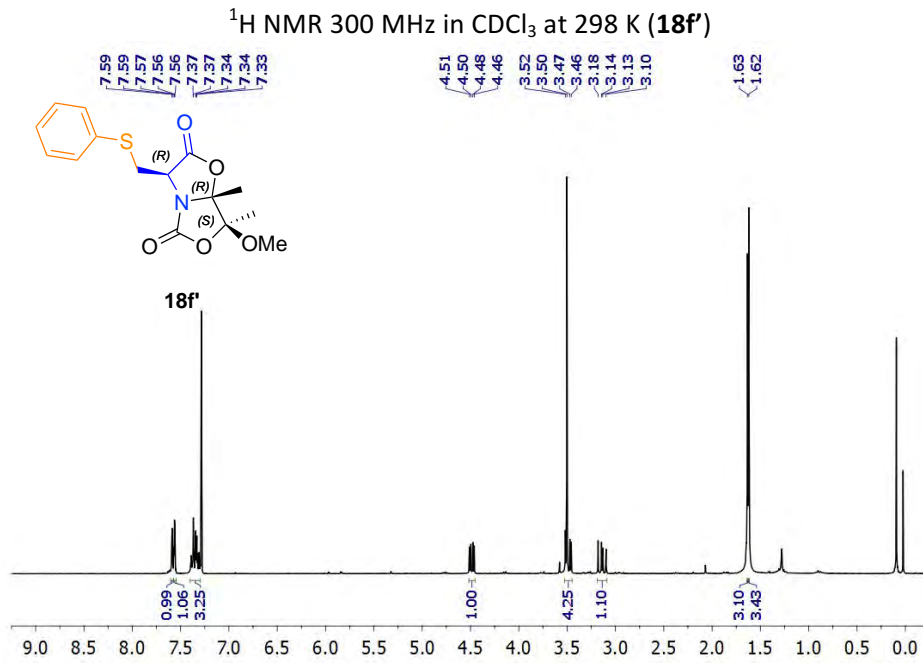


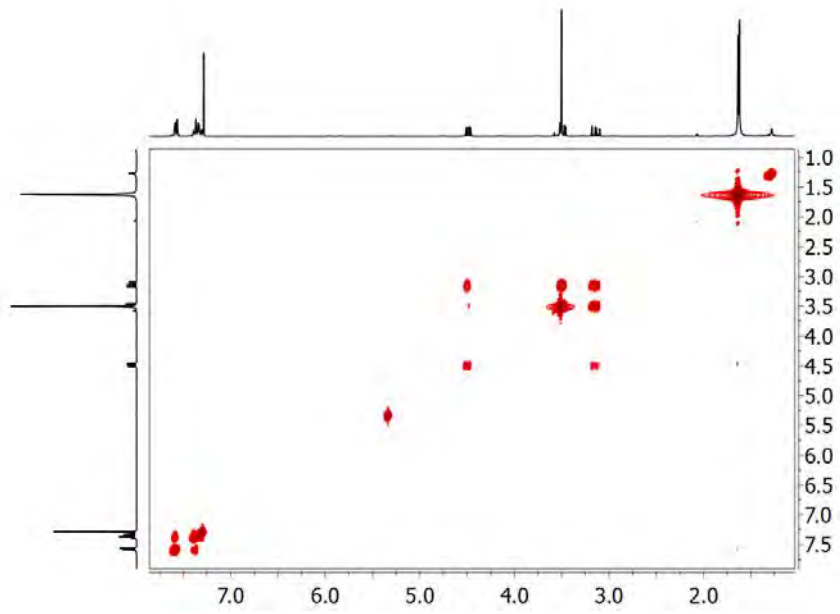
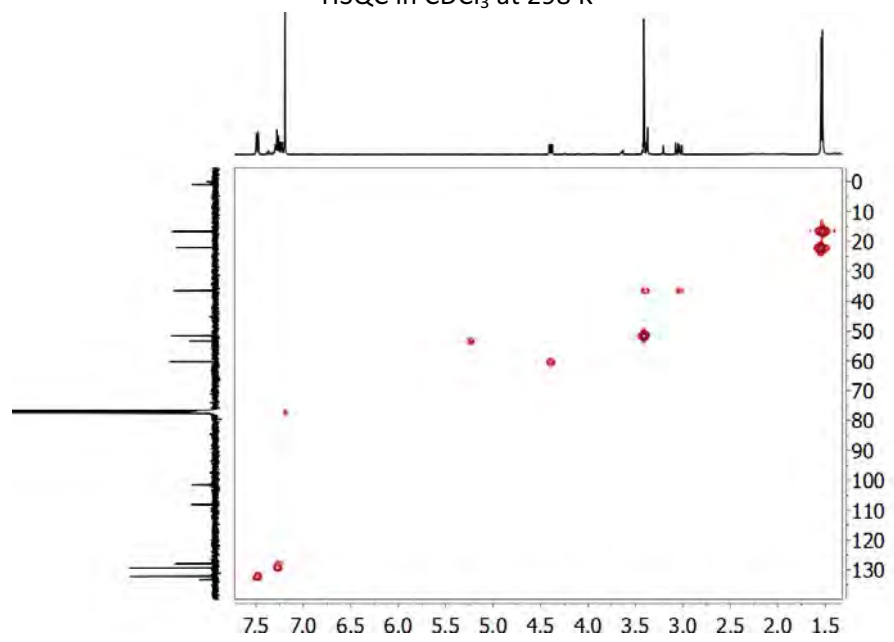
NOESY in CDCl_3 at 298 K

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**18e'**) ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

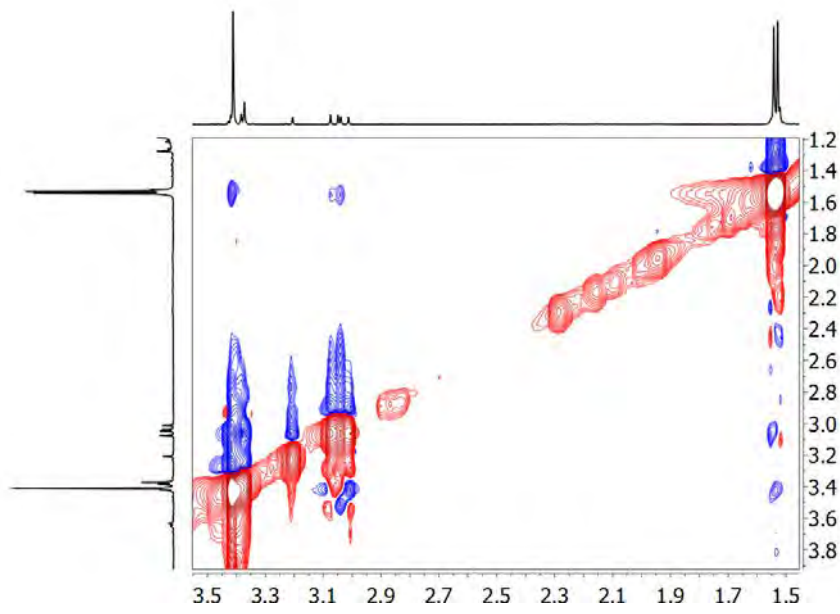
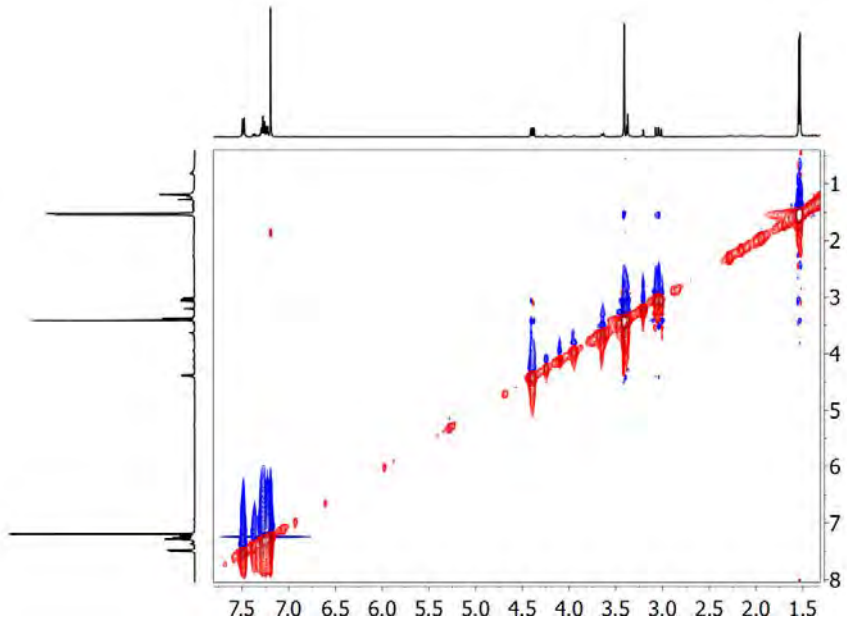
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

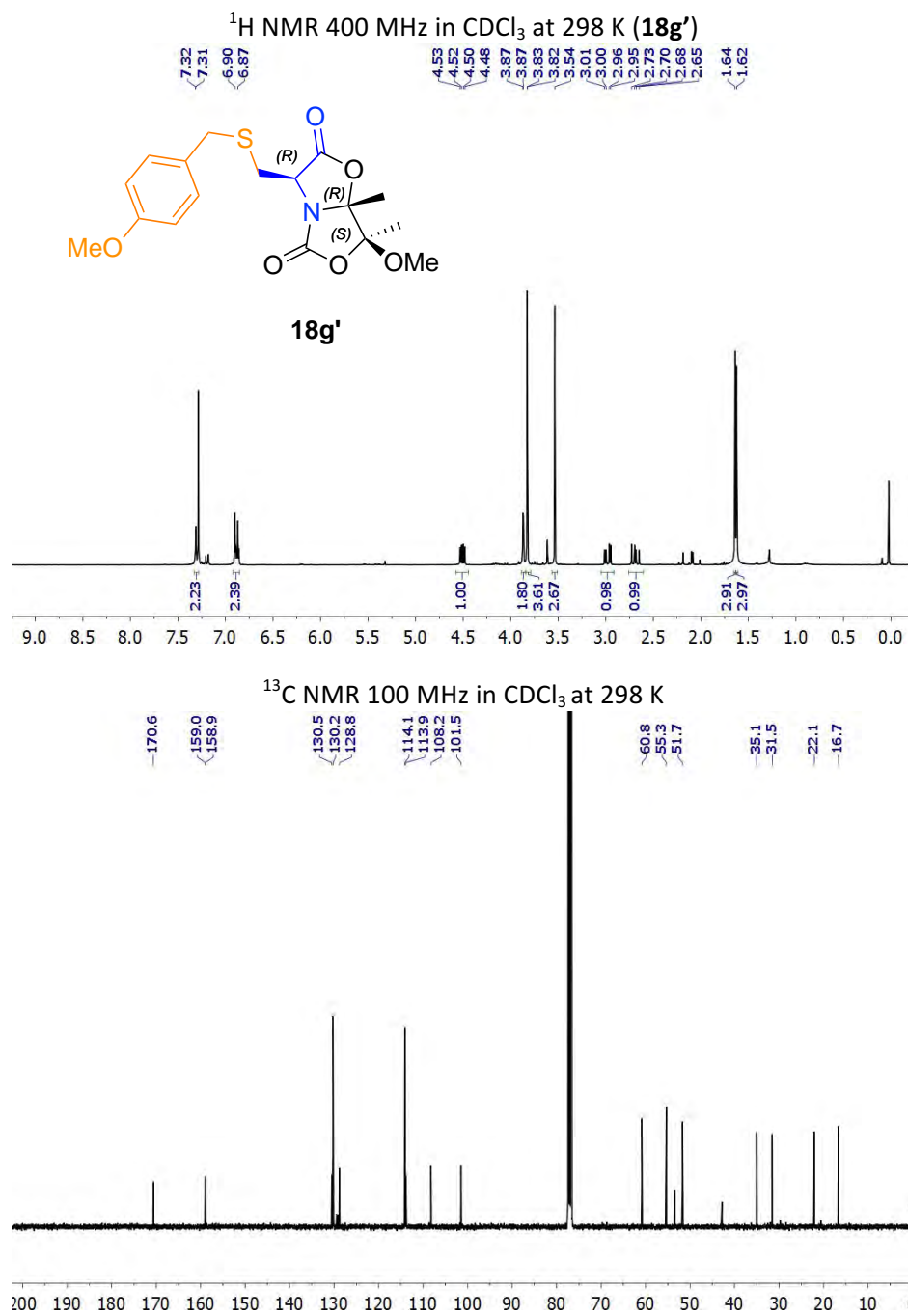
NOESY in CDCl_3 at 298 K



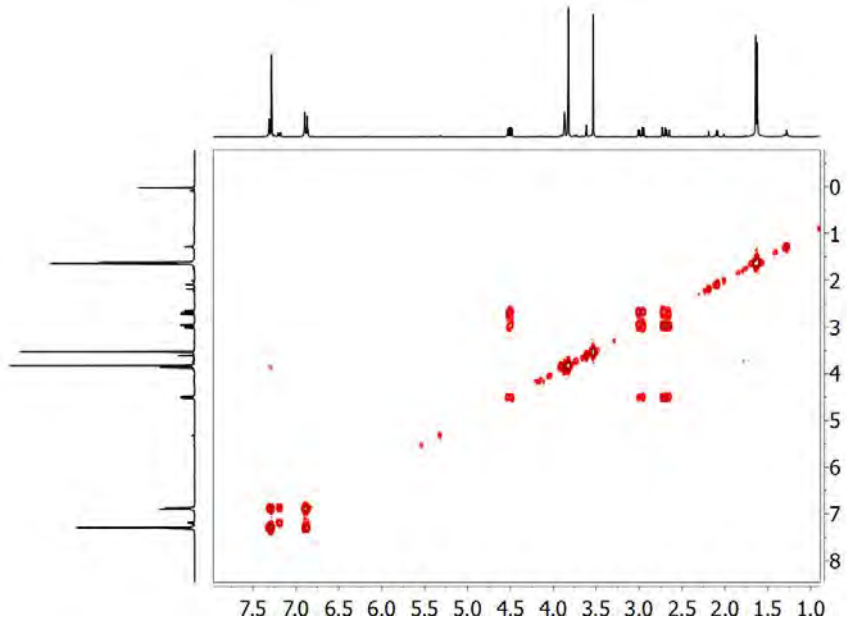
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

NOESY in CDCl₃ at 298 K

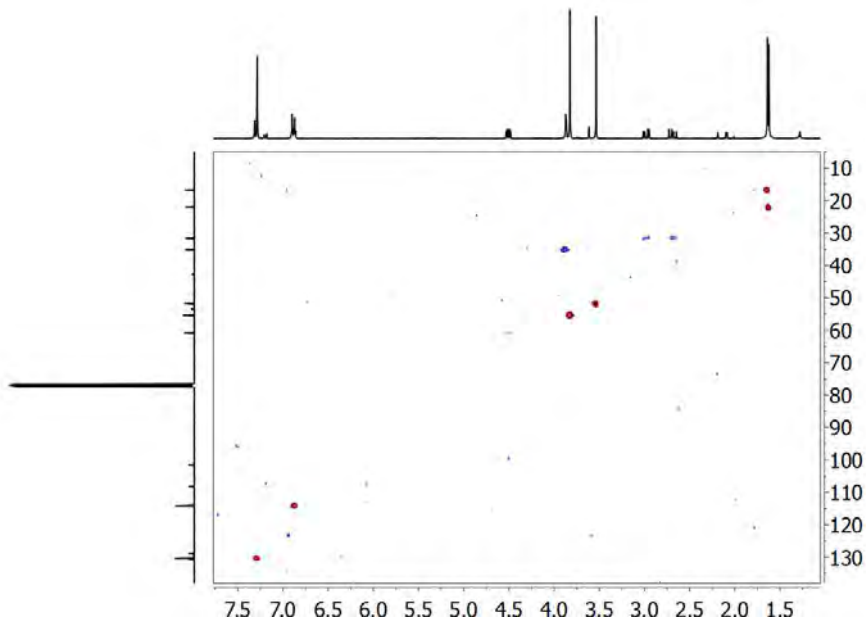


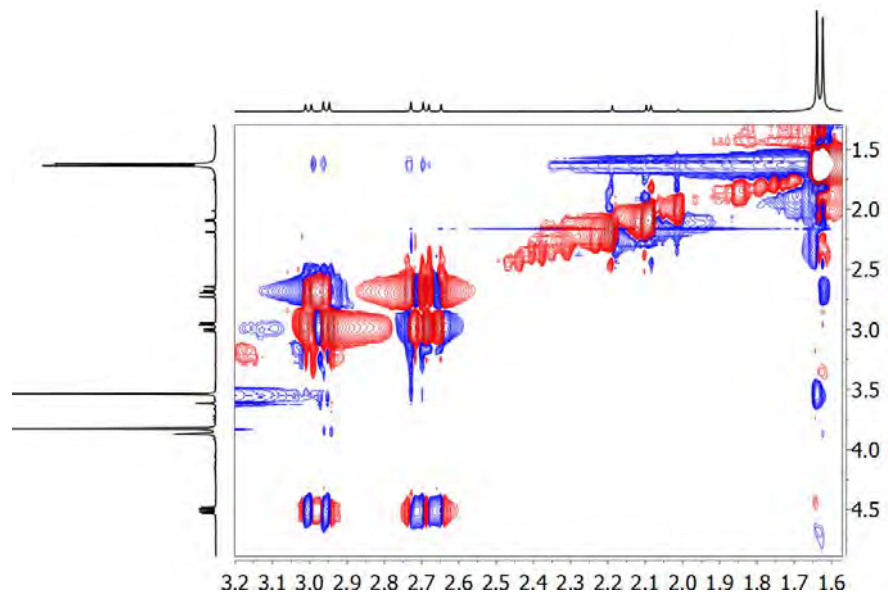
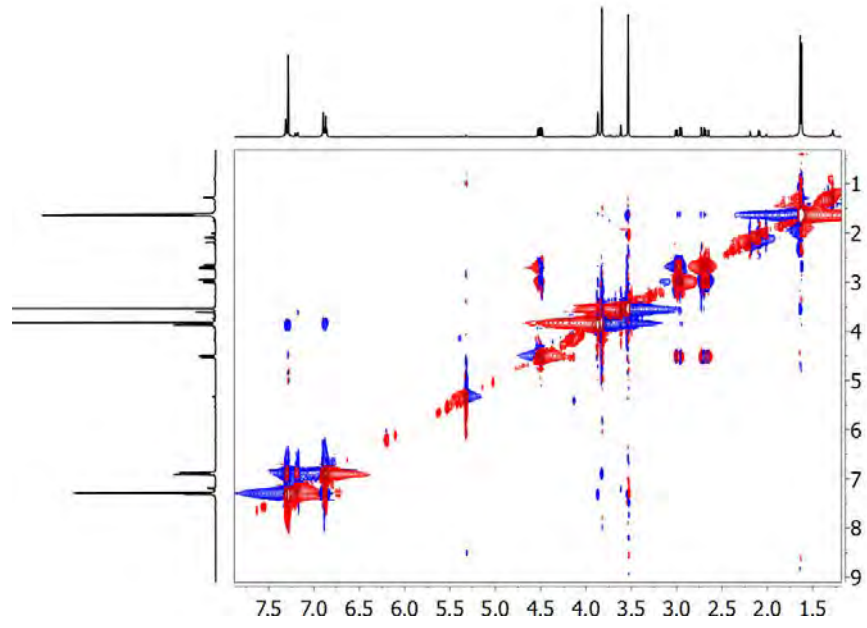


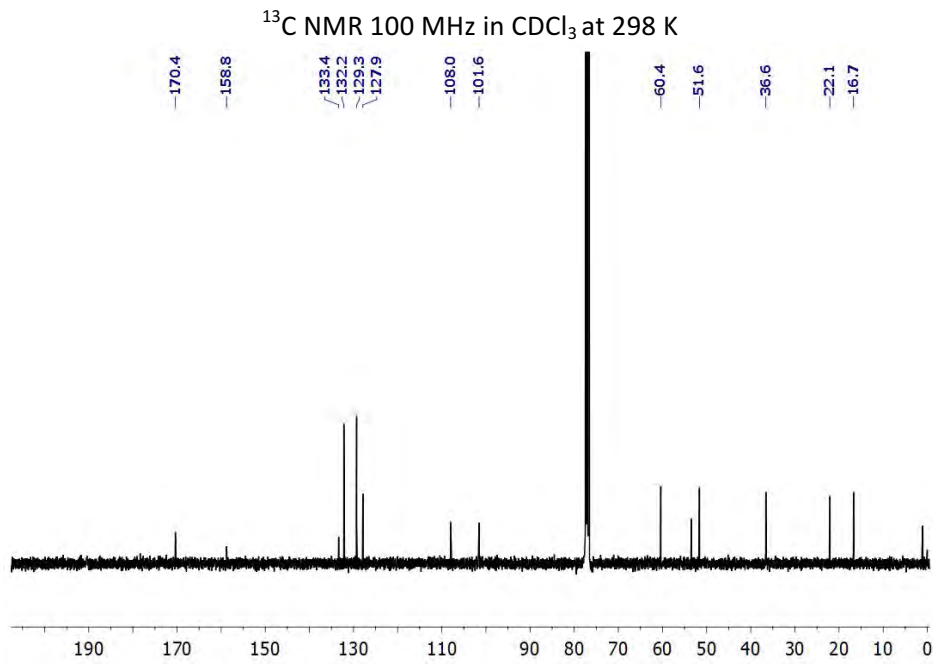
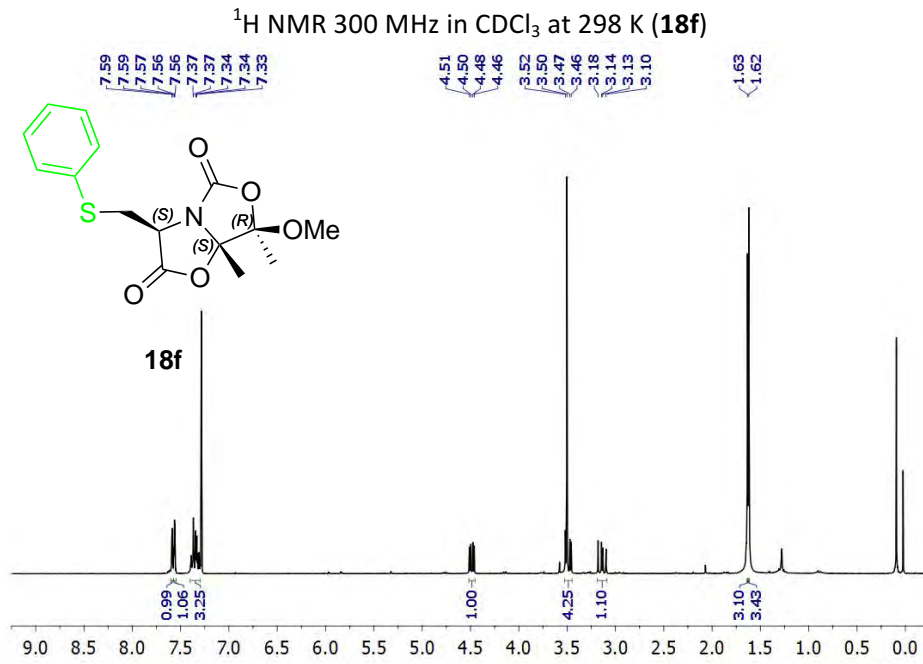
COSY in CDCl₃ at 298 K

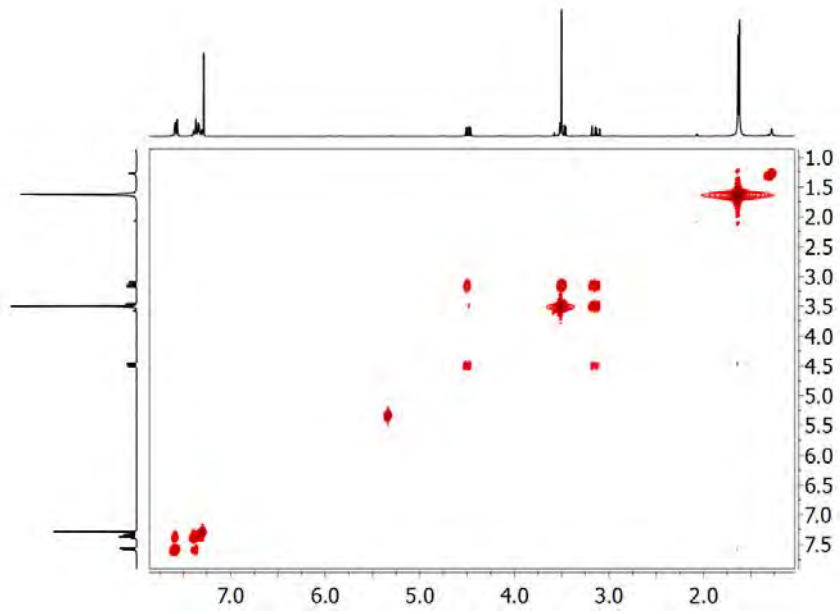
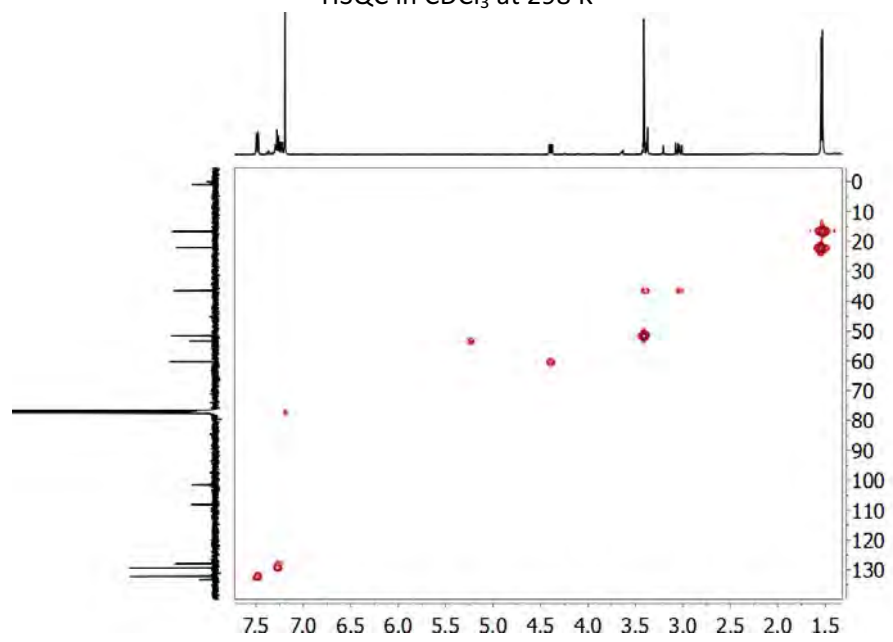


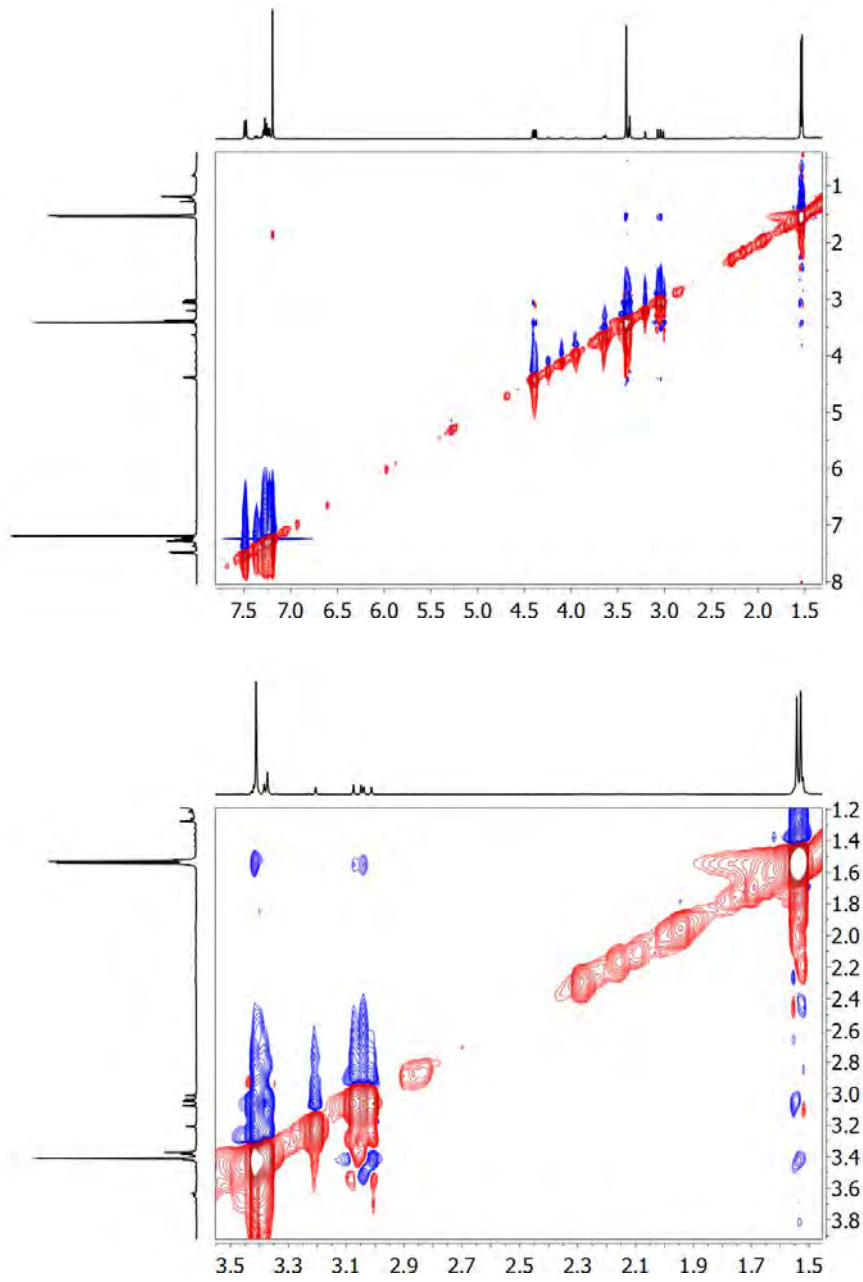
HSQC in CDCl₃ at 298 K

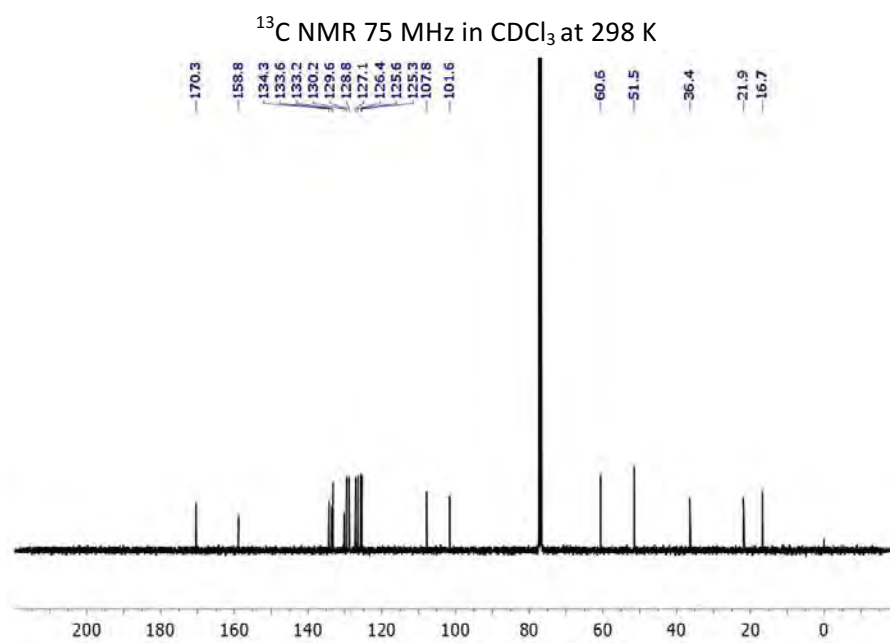
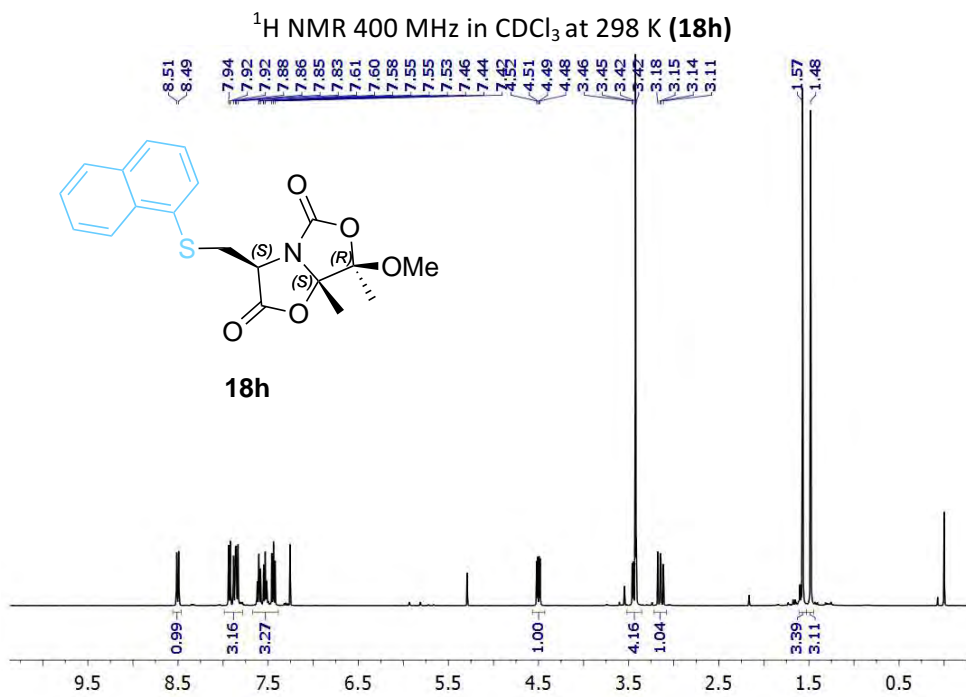


NOESY in CDCl_3 at 298 K

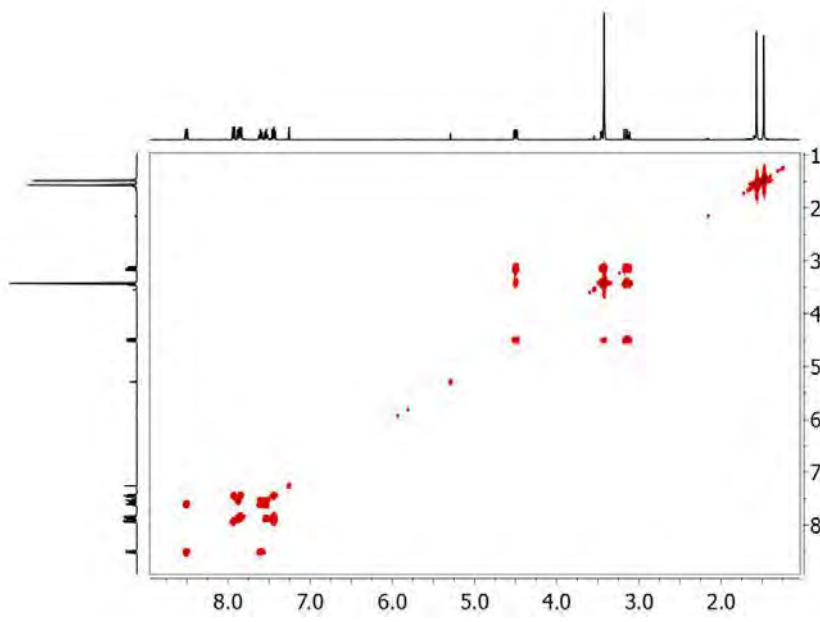


COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

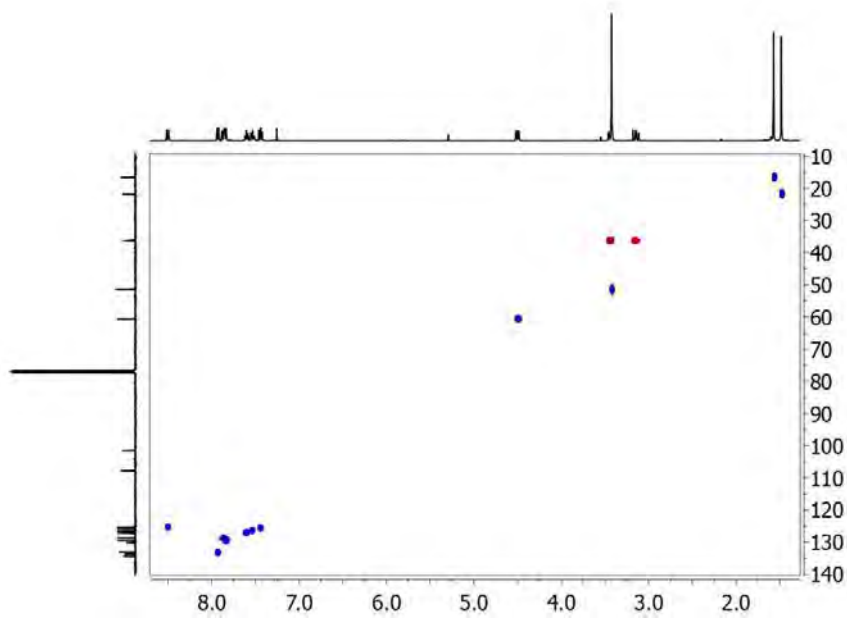
NOESY in CDCl_3 at 298 K



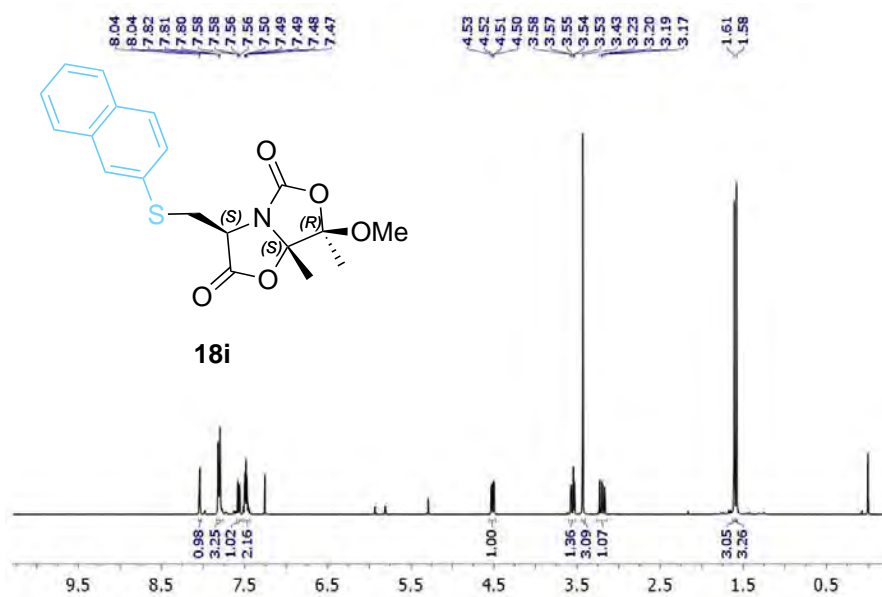
COSY in CDCl₃ at 298 K



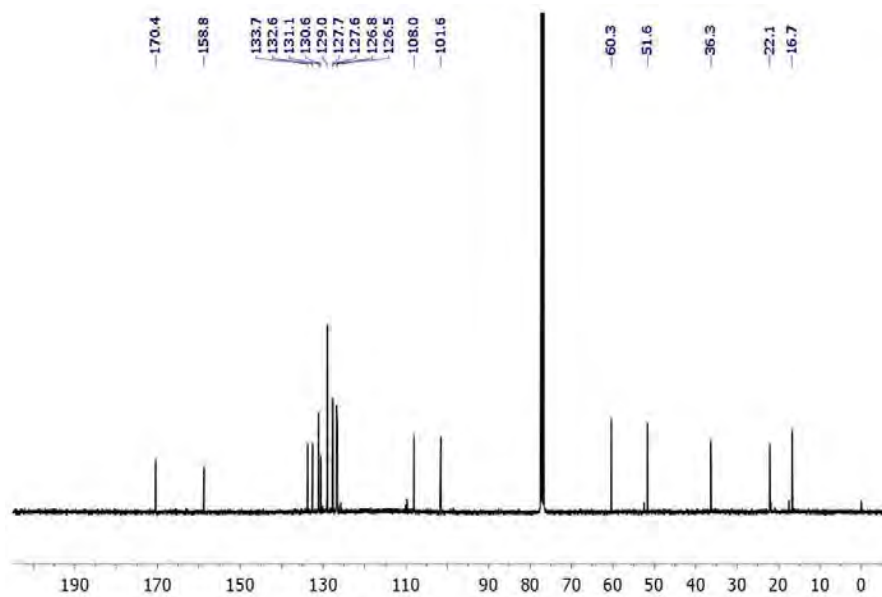
HSQC in CDCl₃ at 298 K

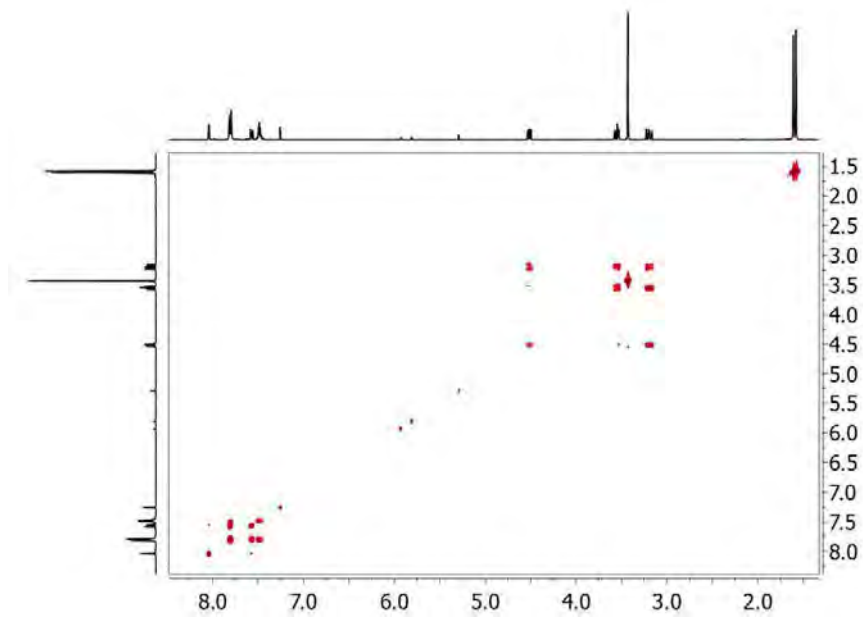
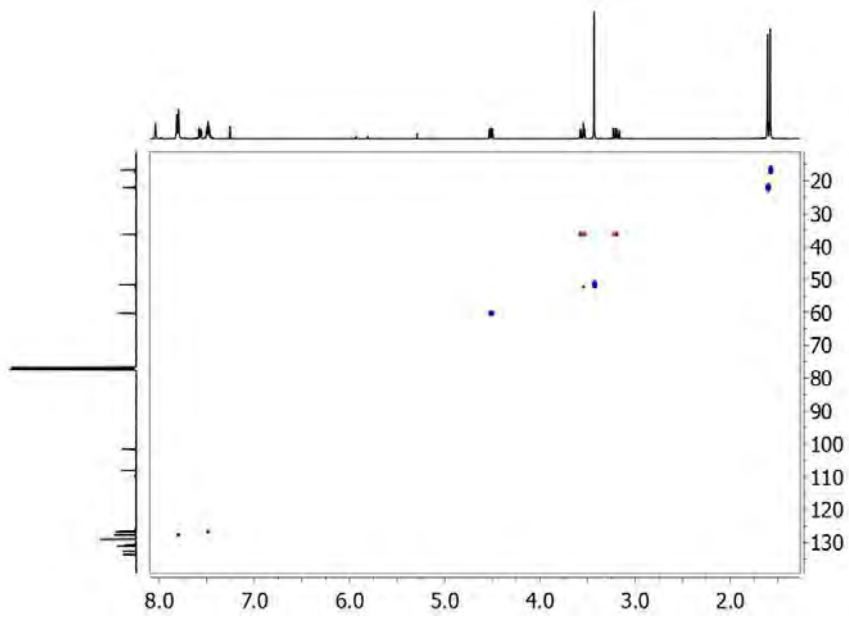


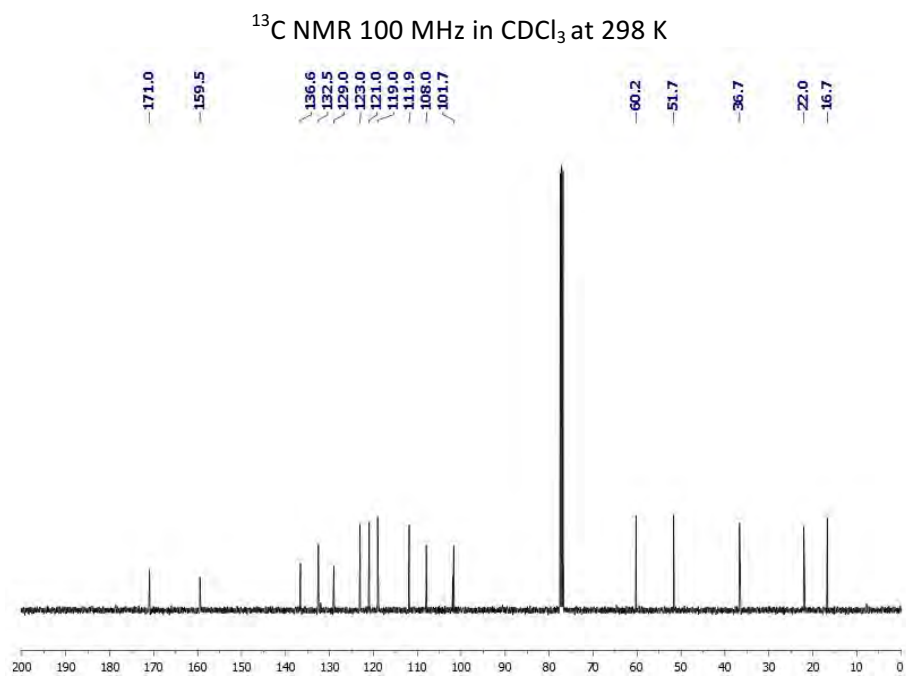
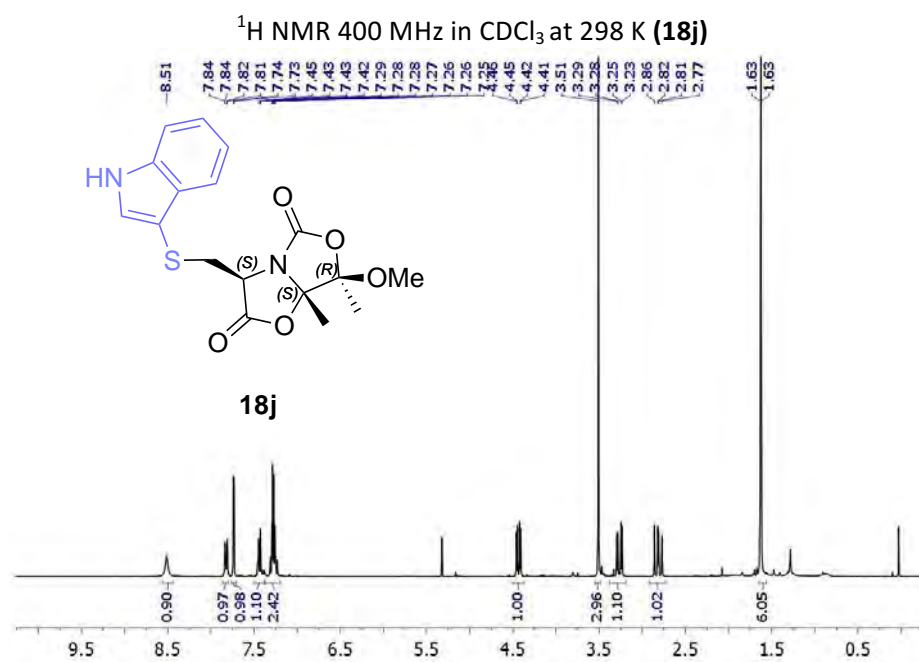
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**18i**)

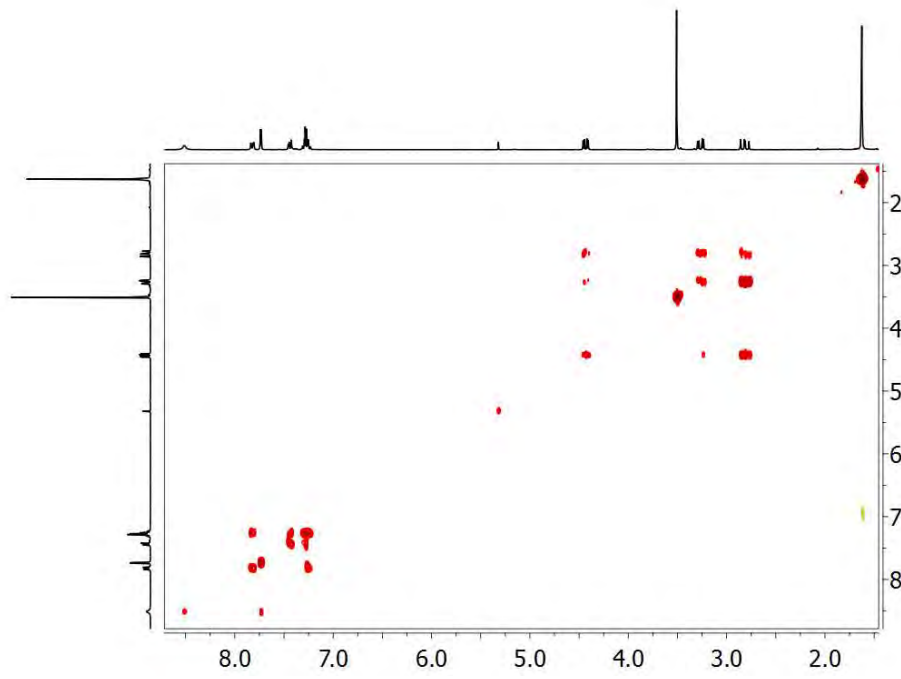


^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 at 298 K

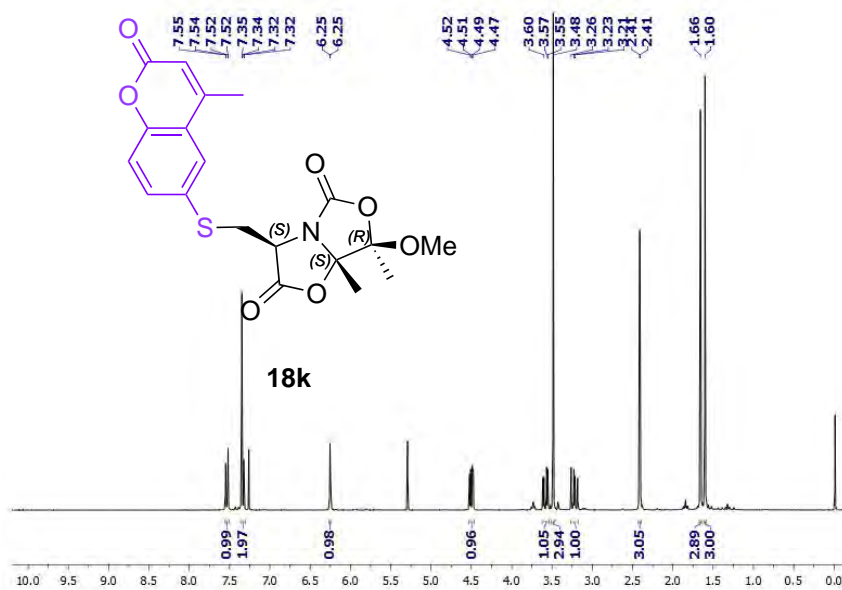


COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

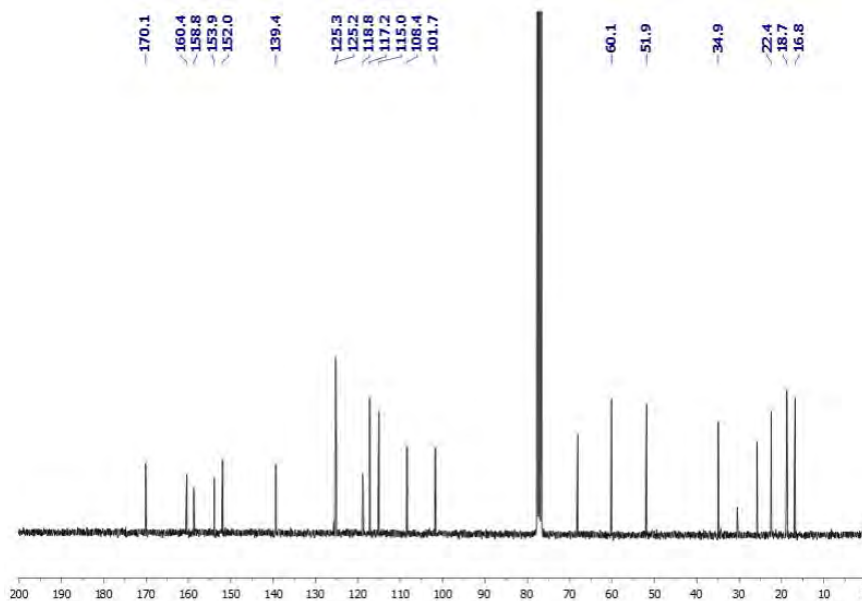


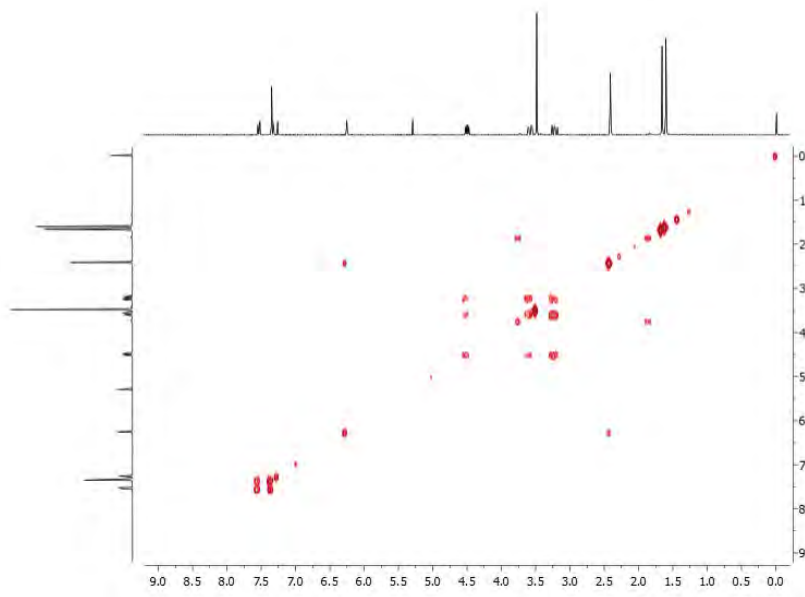
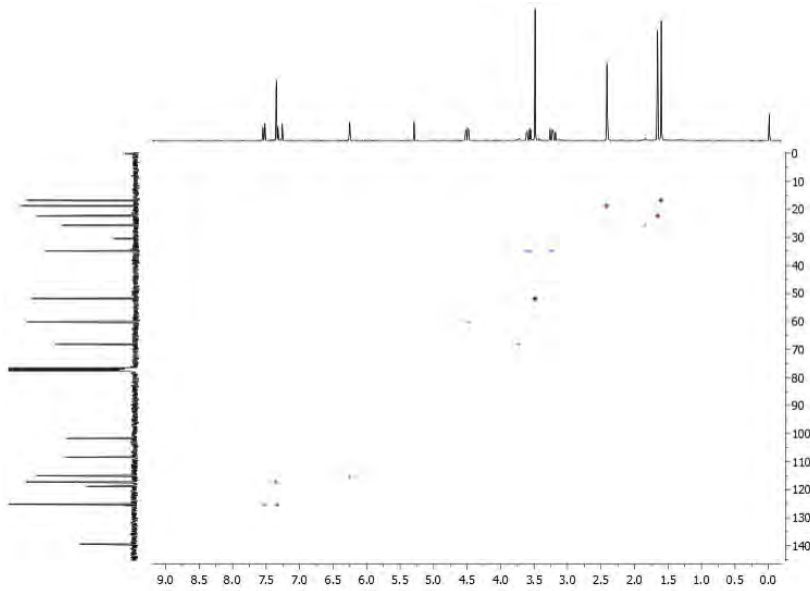
COSY in CDCl_3 at 298 K

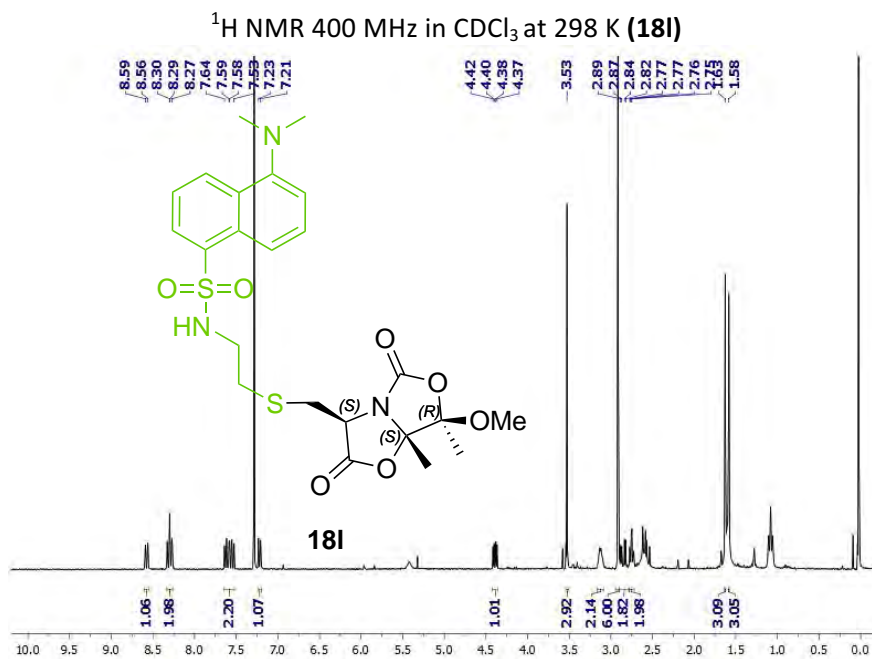
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**18k**)



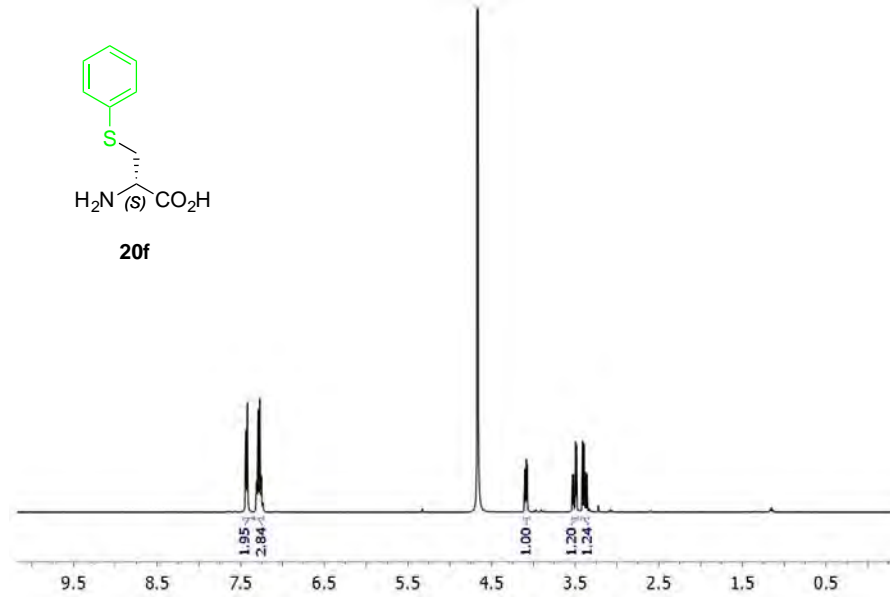
^{13}C NMR 75 MHz in CDCl_3 at 298 K



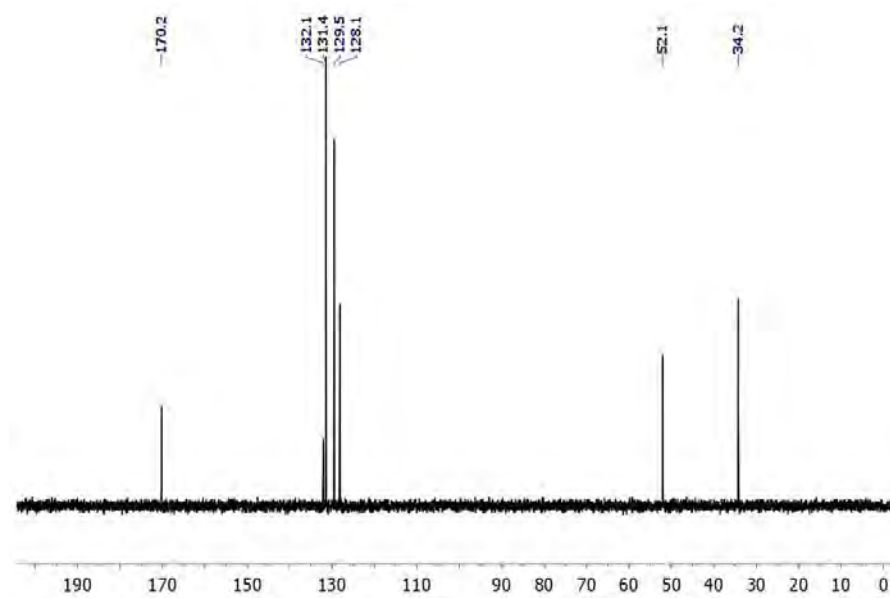
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

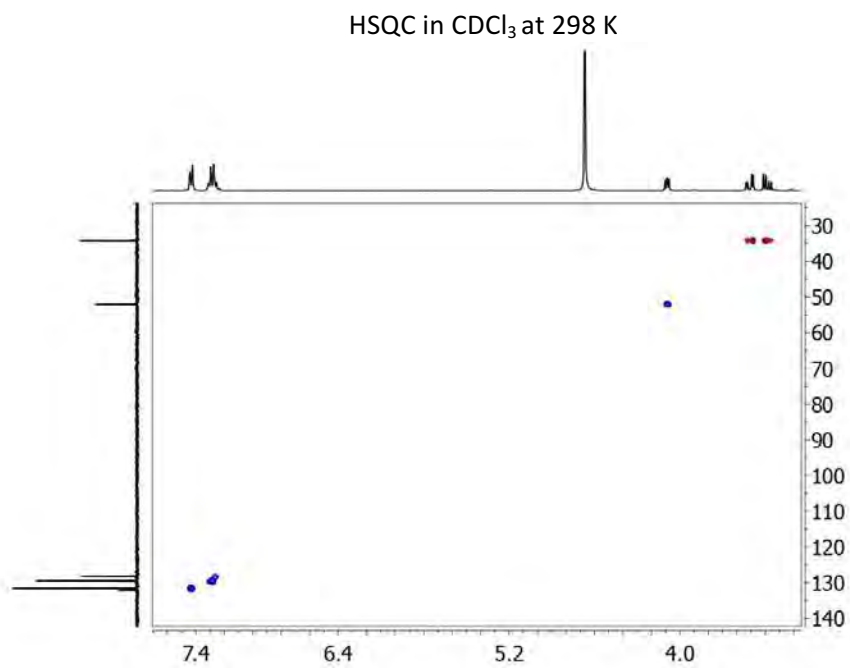
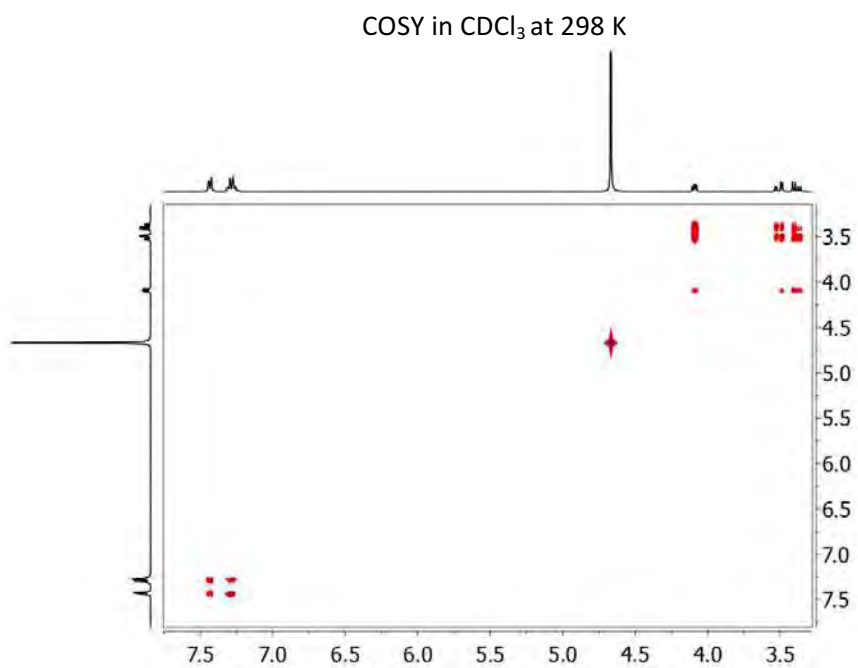


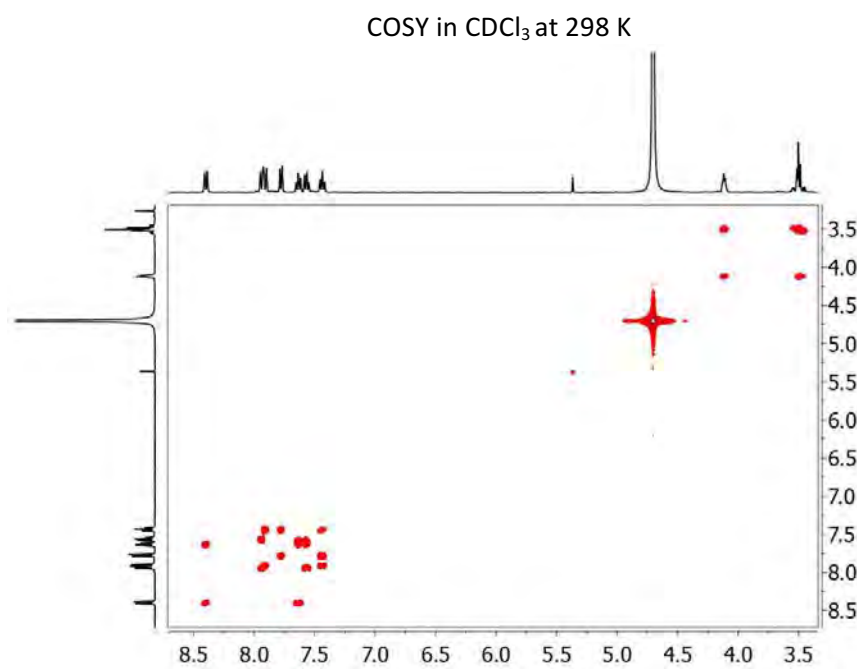
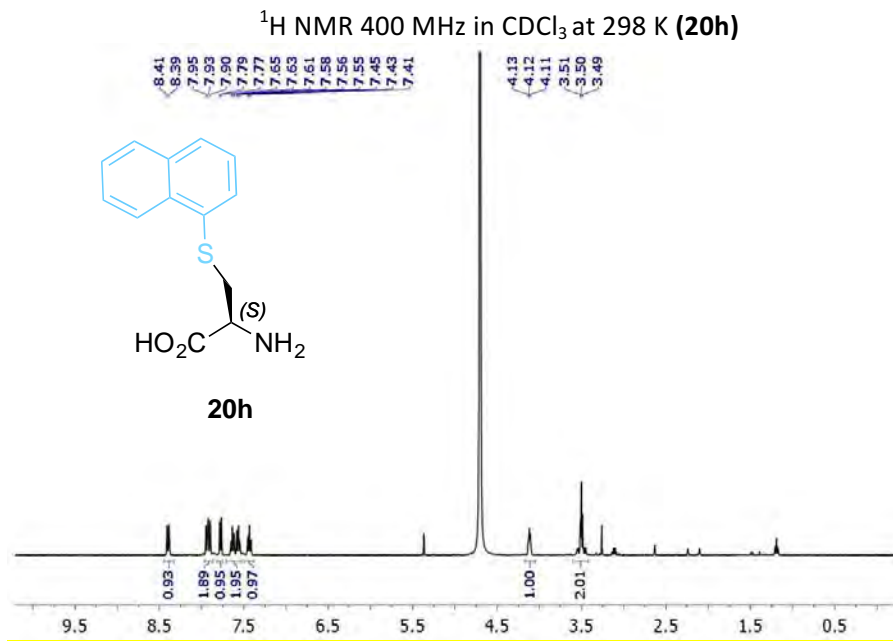
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 at 298 K (**20f**)

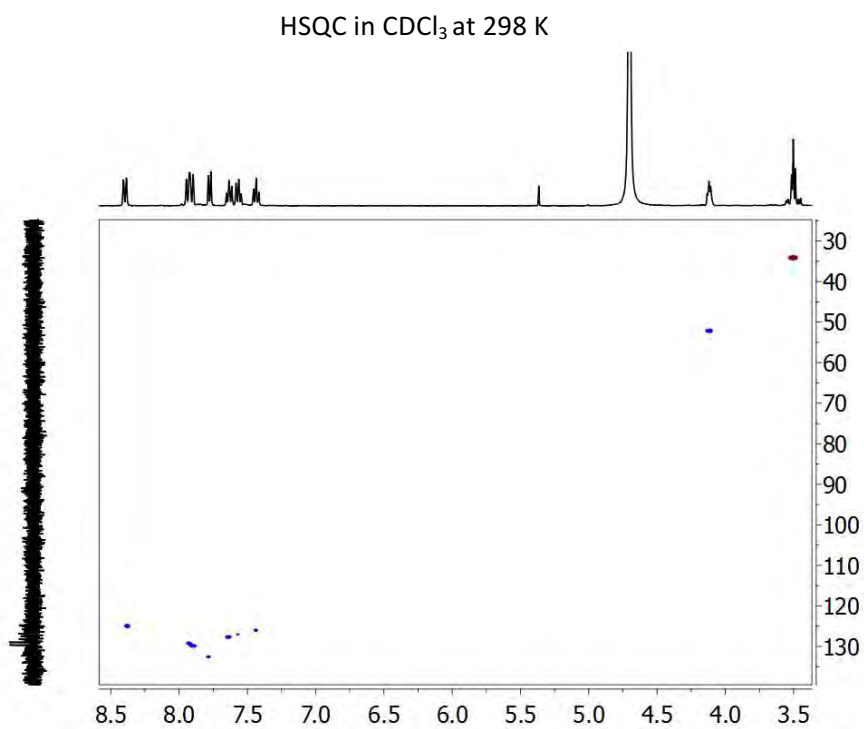


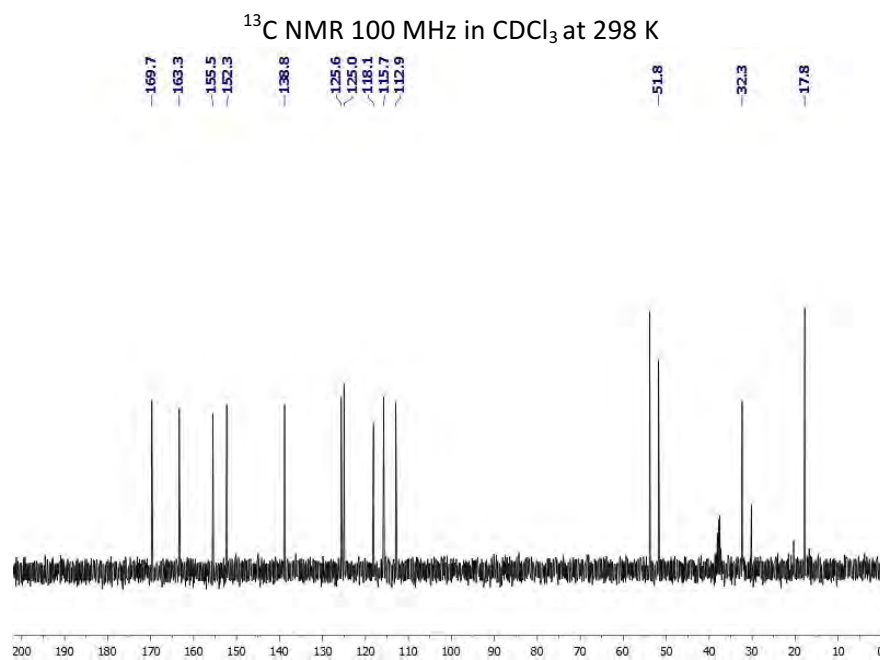
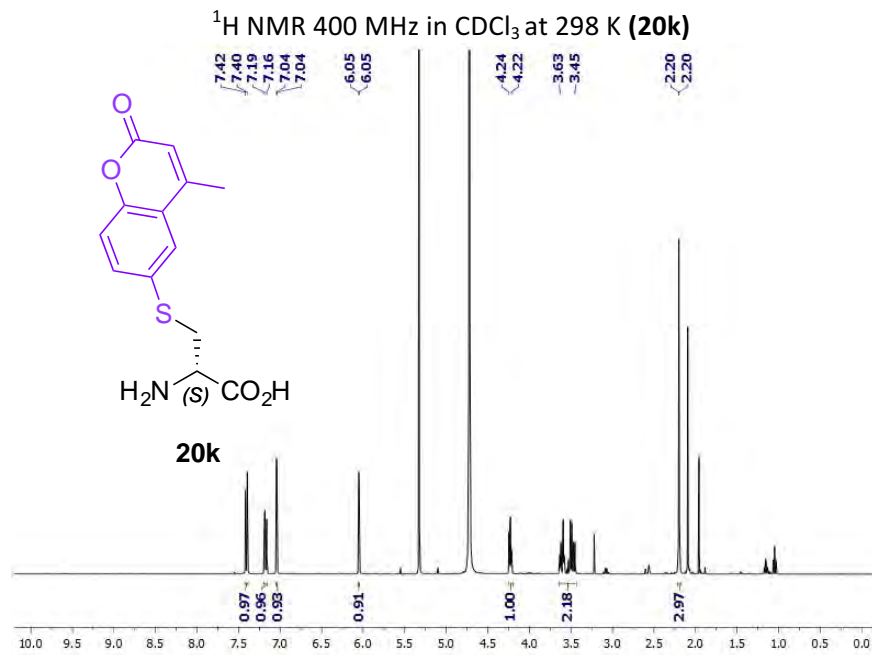
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 at 298 K

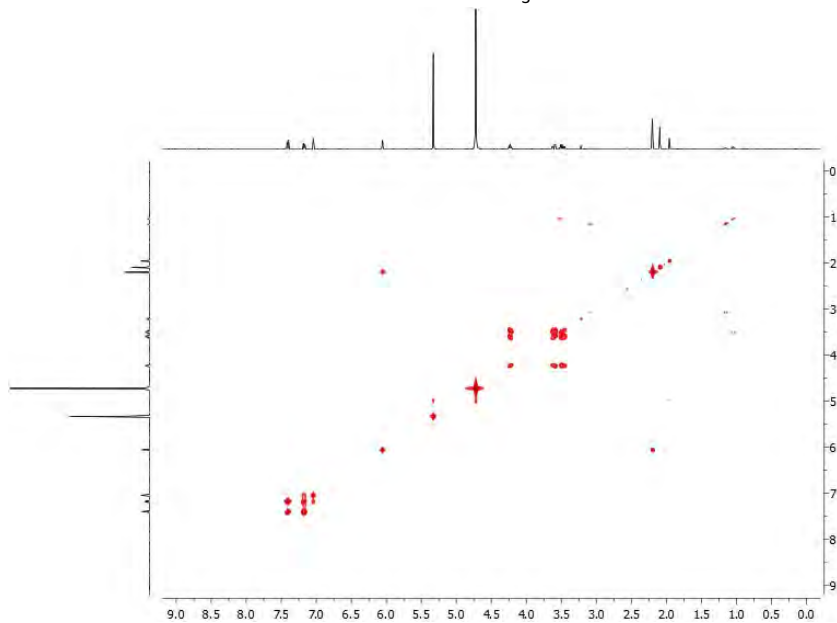
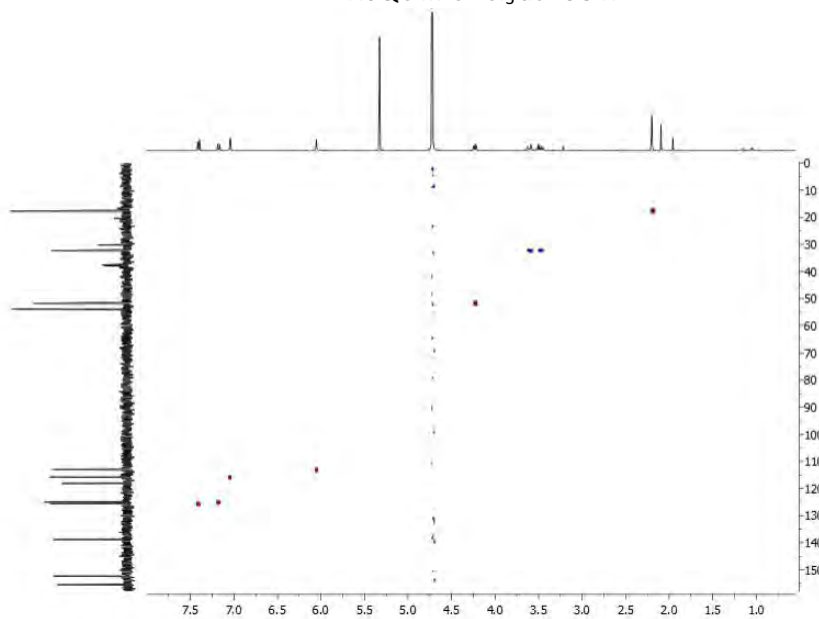


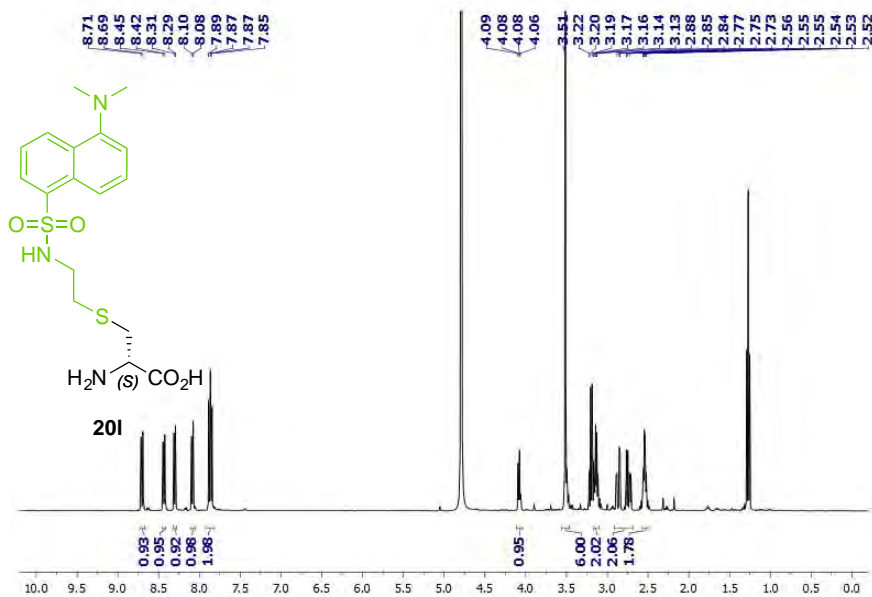
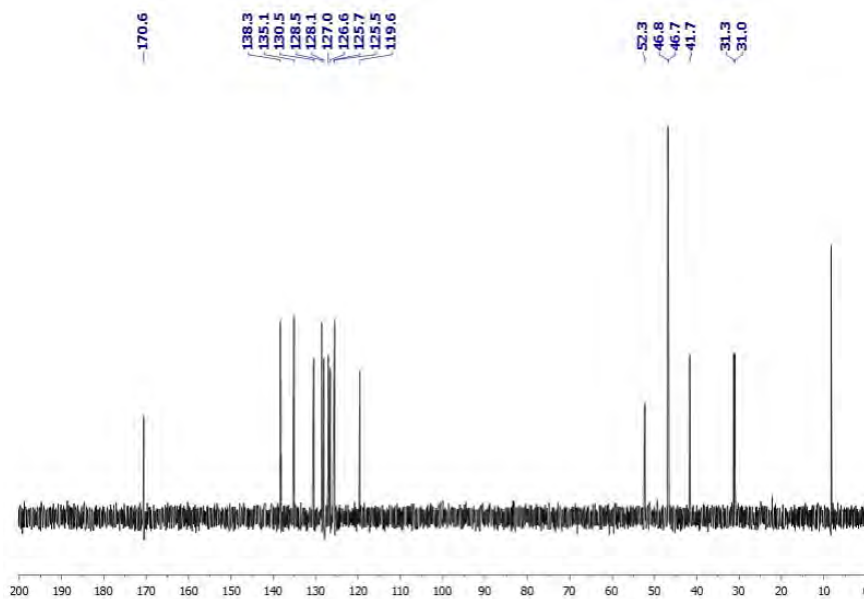


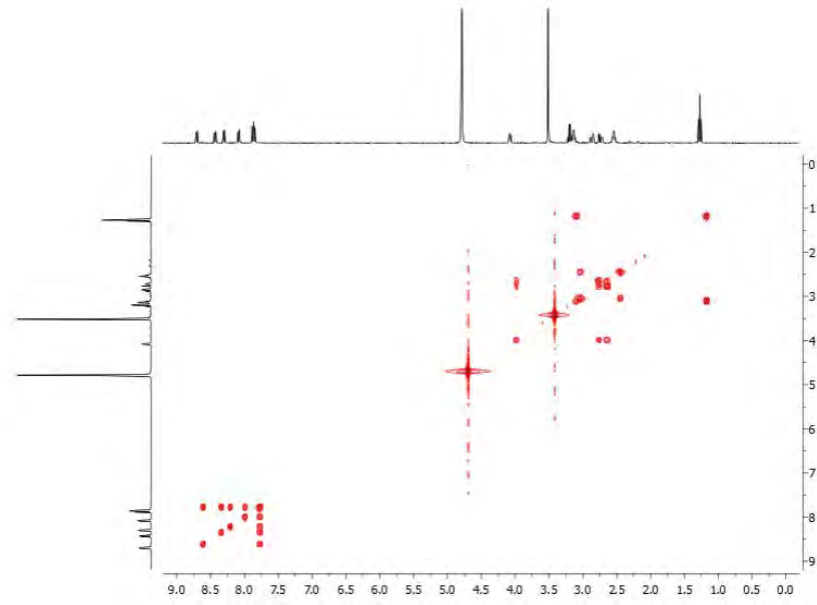
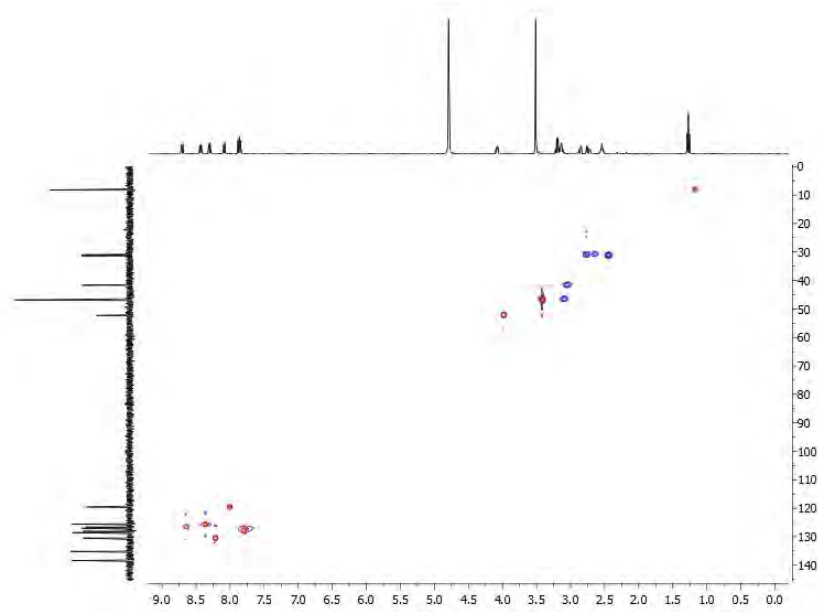


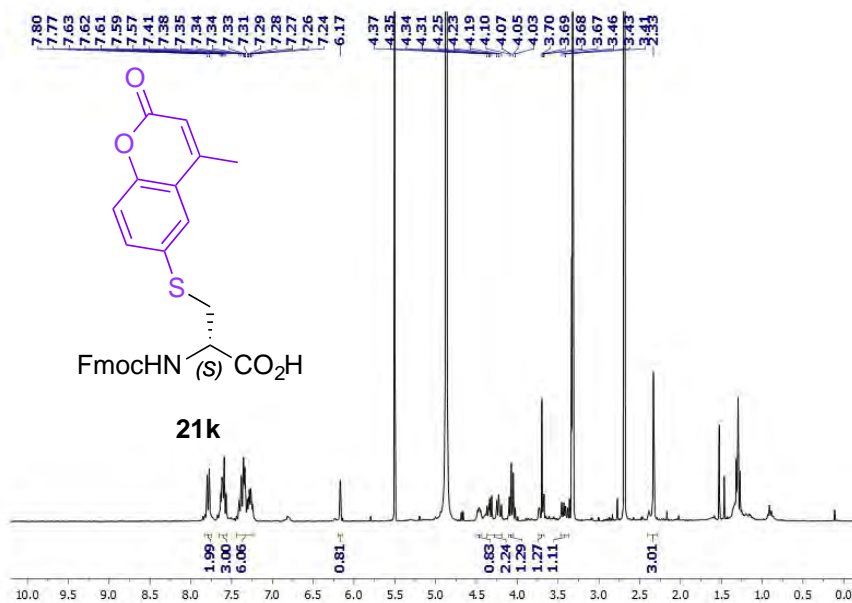
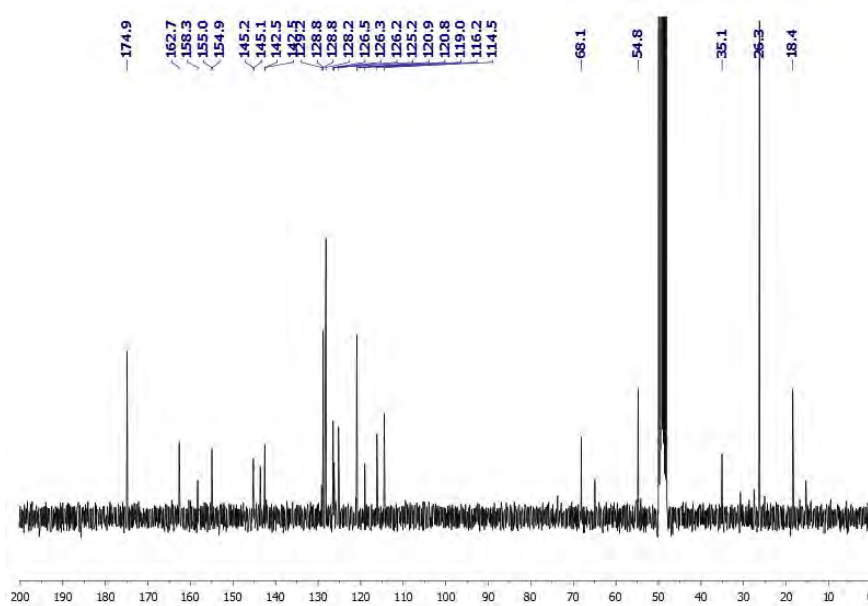


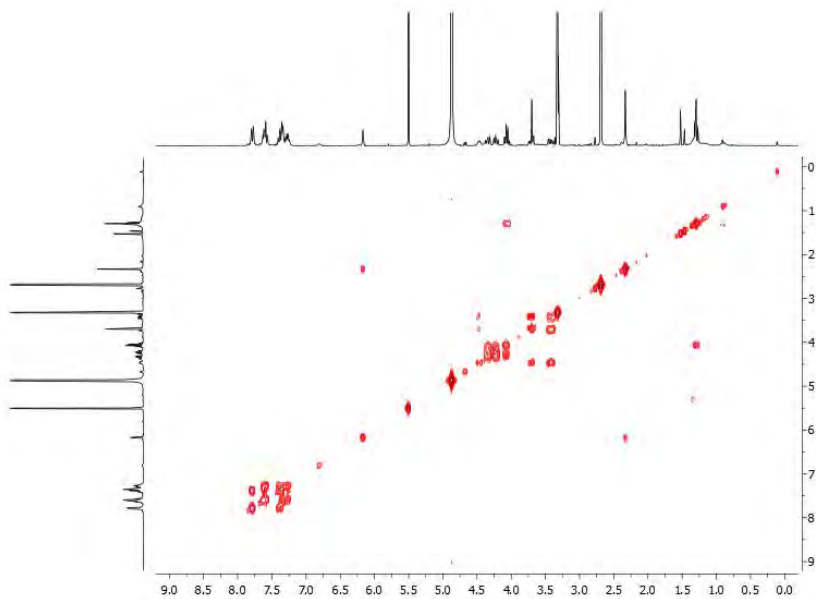
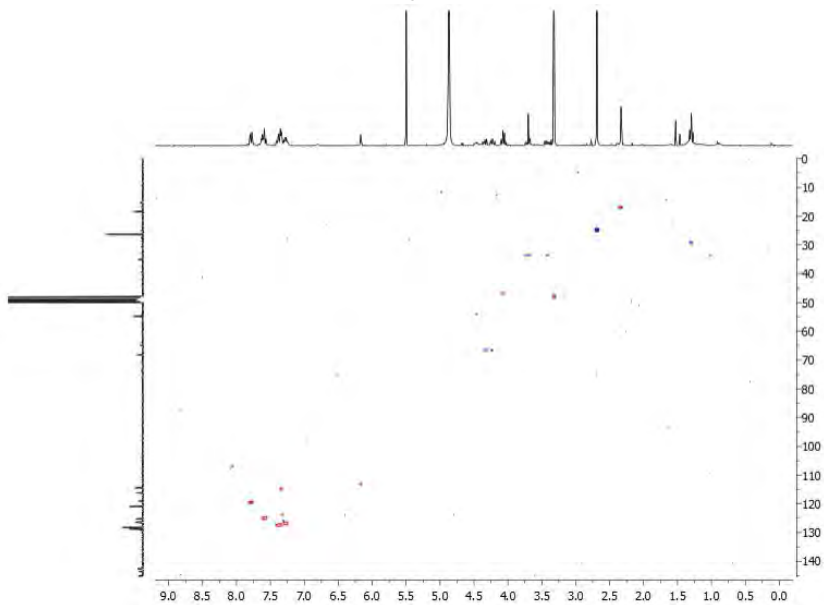


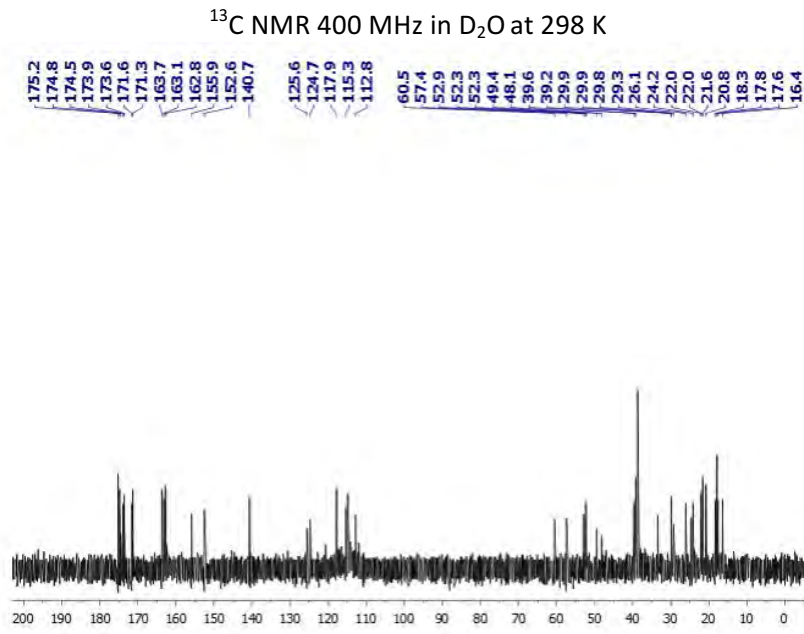
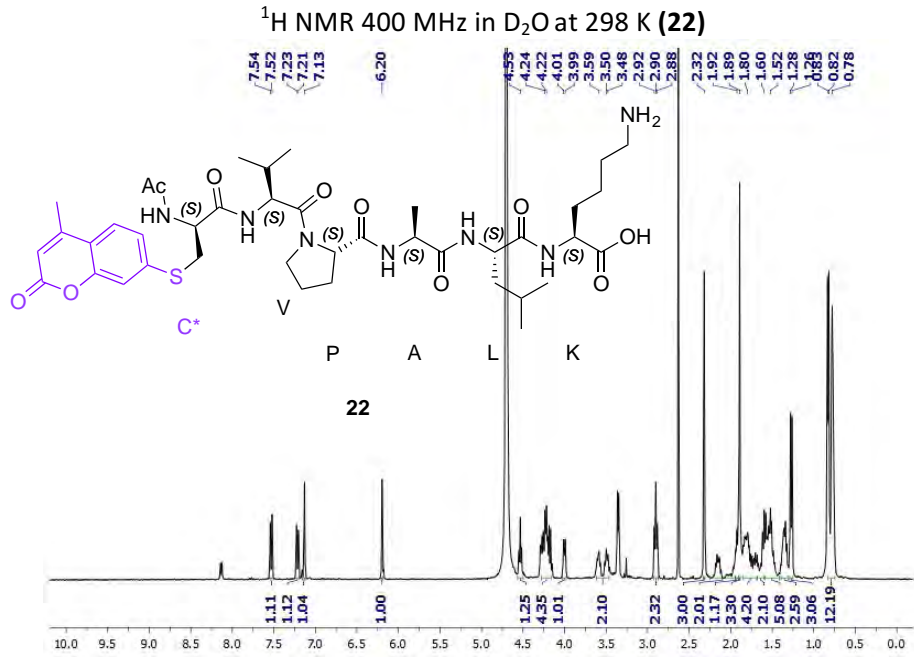
COSY in CDCl_3 at 298 KHSQC in CDCl_3 at 298 K

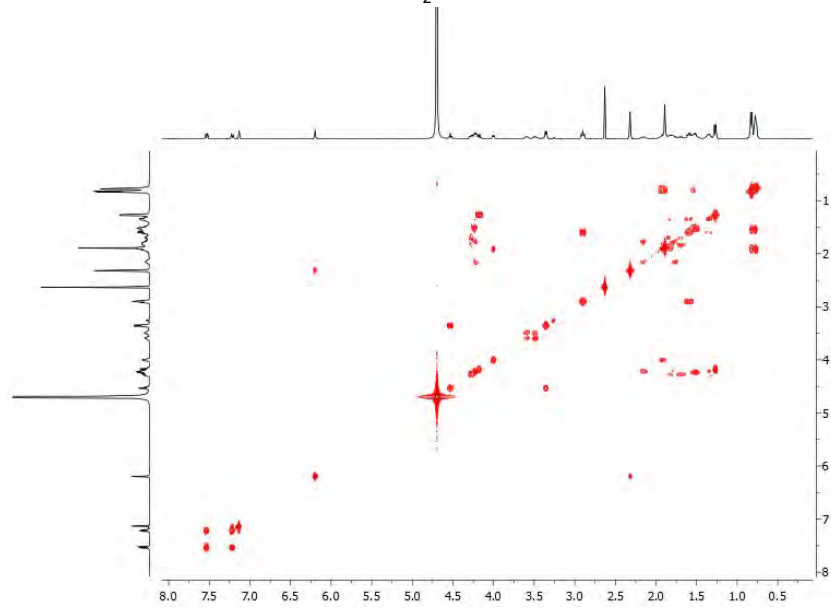
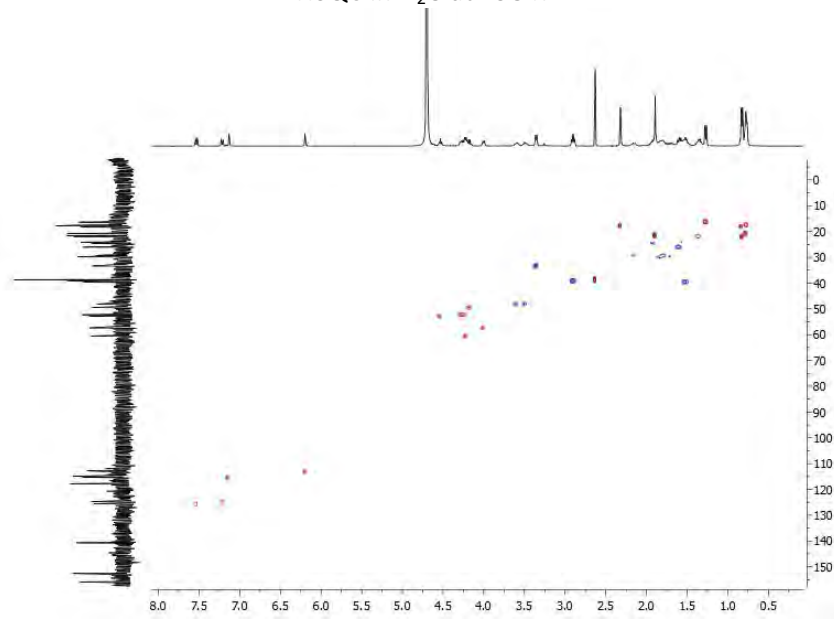
^1H NMR 400 MHz in D_2O at 298 K (**20I**) ^{13}C NMR 100 MHz in D_2O at 298 K

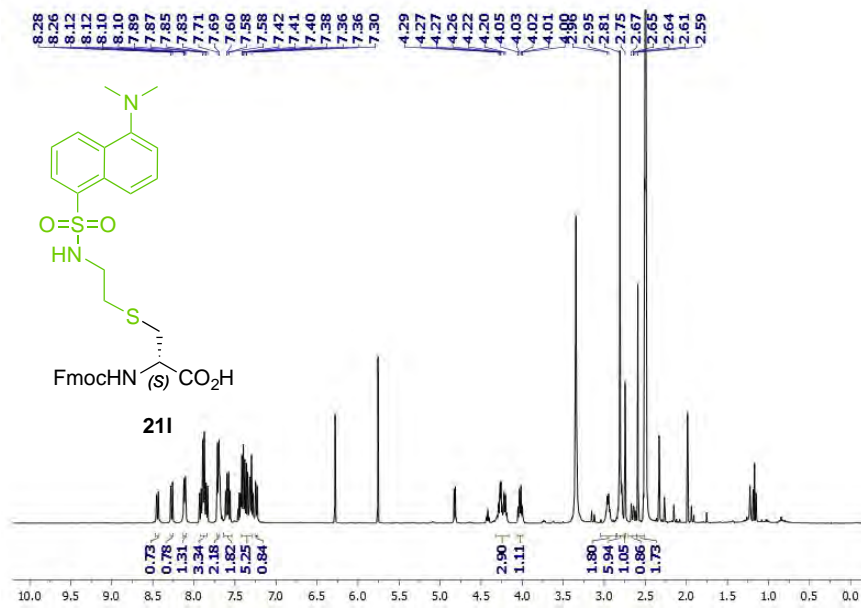
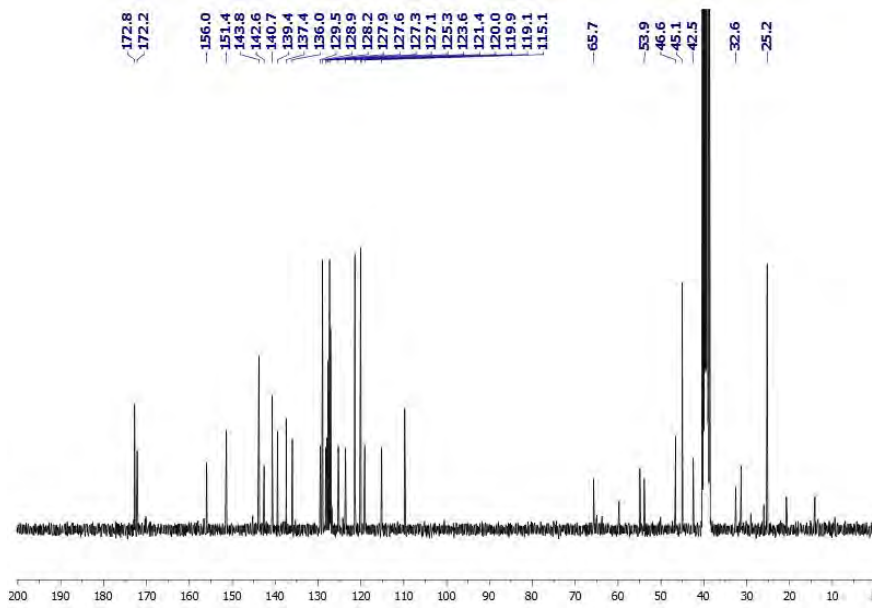
COSY in D₂O at 298 KHSQC in D₂O at 298 K

^1H NMR 300 MHz in CD_3OD at 298 K (**21k**) ^{13}C NMR 75 MHz in CD_3OD at 298 K

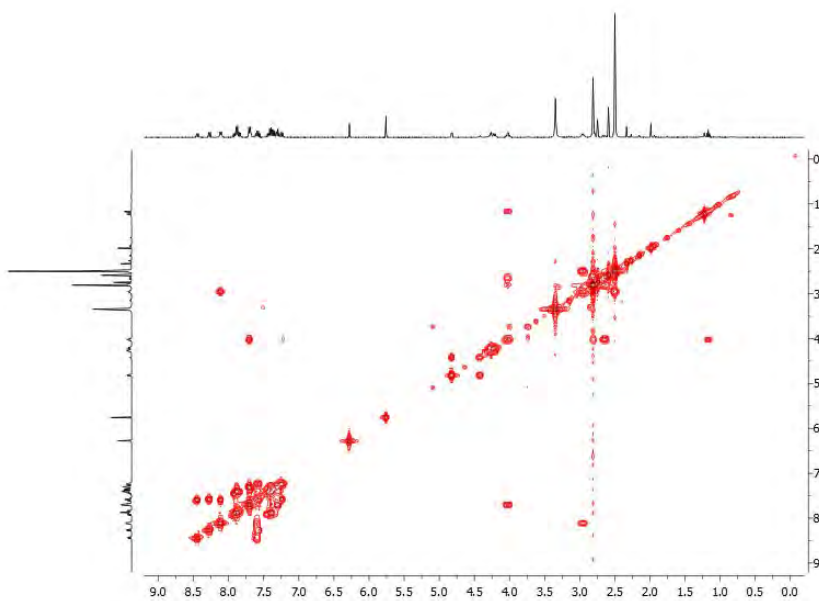
COSY in CD₃OD at 298 KHSQC in CD₃OD at 298 K



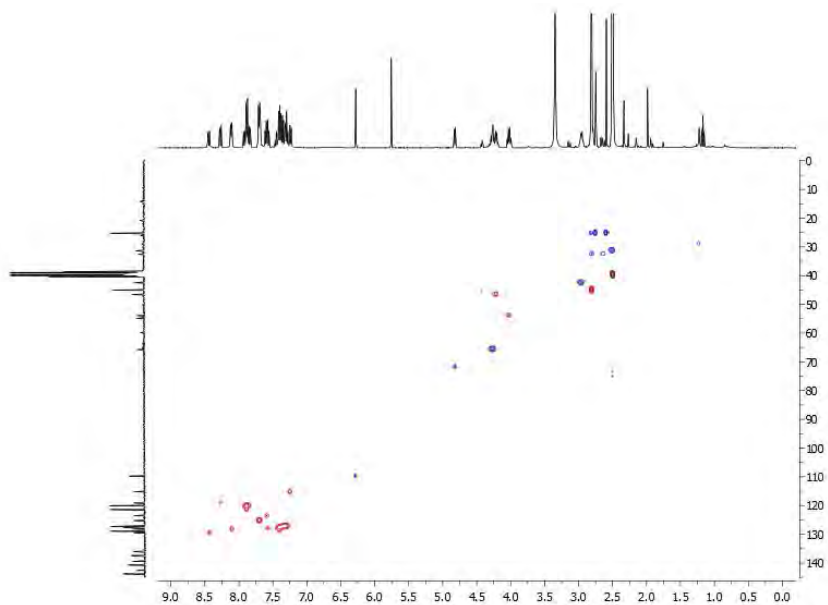
COSY in D₂O at 298 KHSQC in D₂O at 298 K

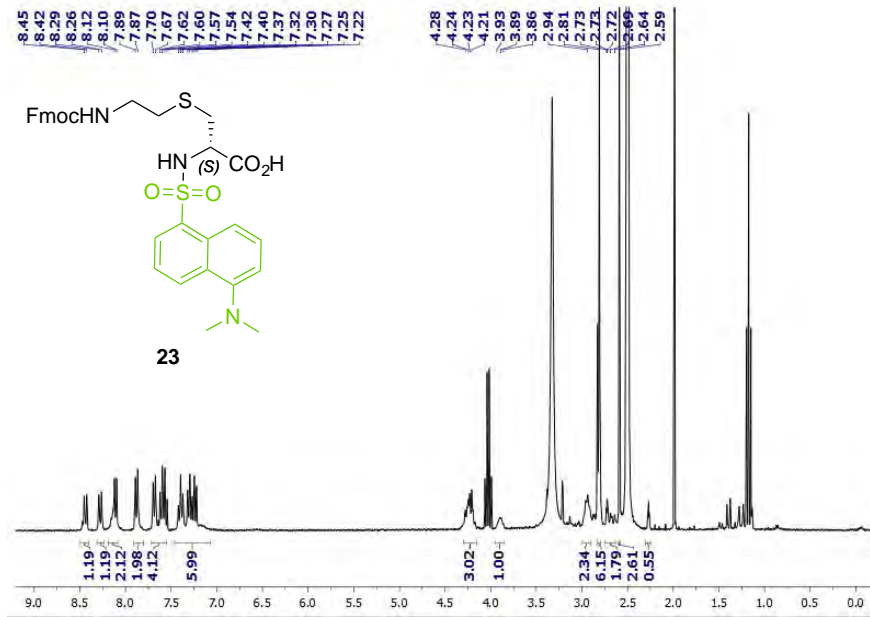
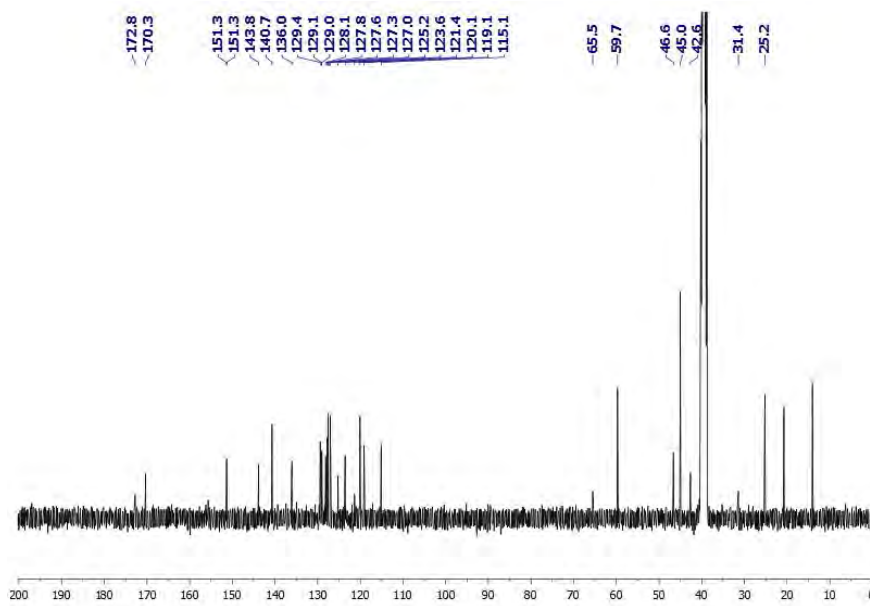
^1H NMR 400 MHz in DMSO at 298 K (**211**) ^{13}C NMR 100 MHz in DMSO at 298 K

COSY in DMSO at 298 K

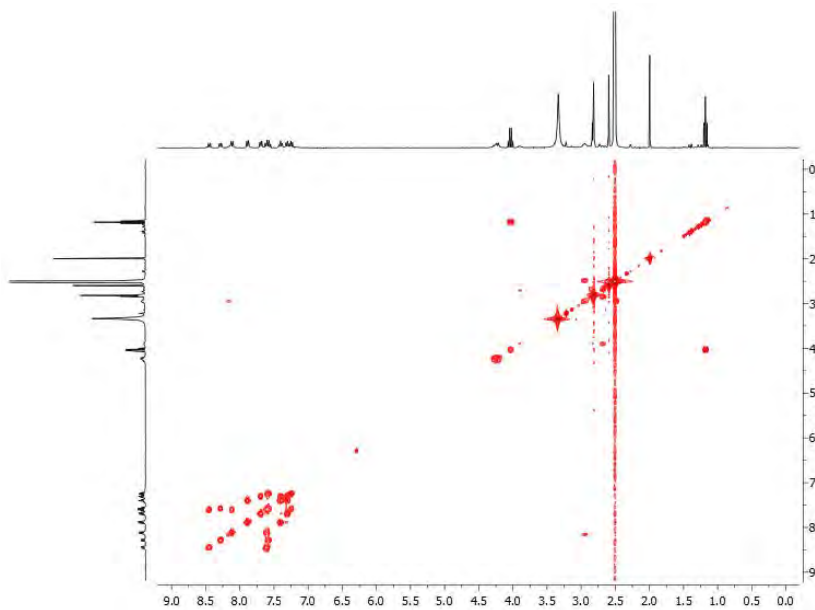


HSQC in DMSO at 298 K

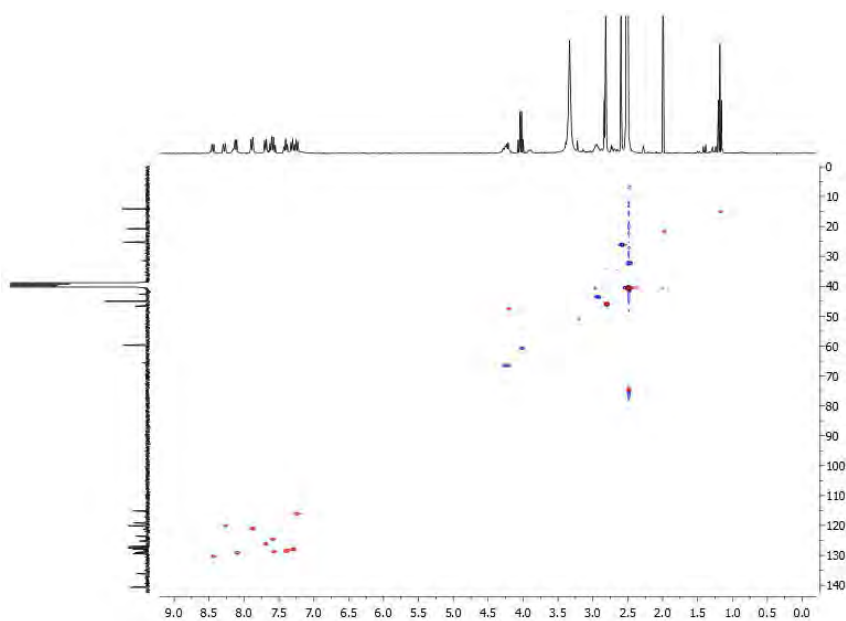


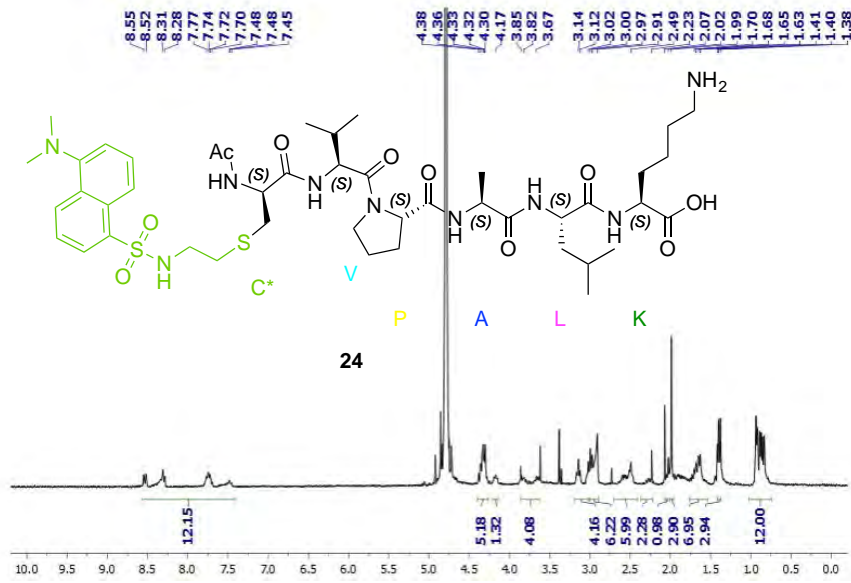
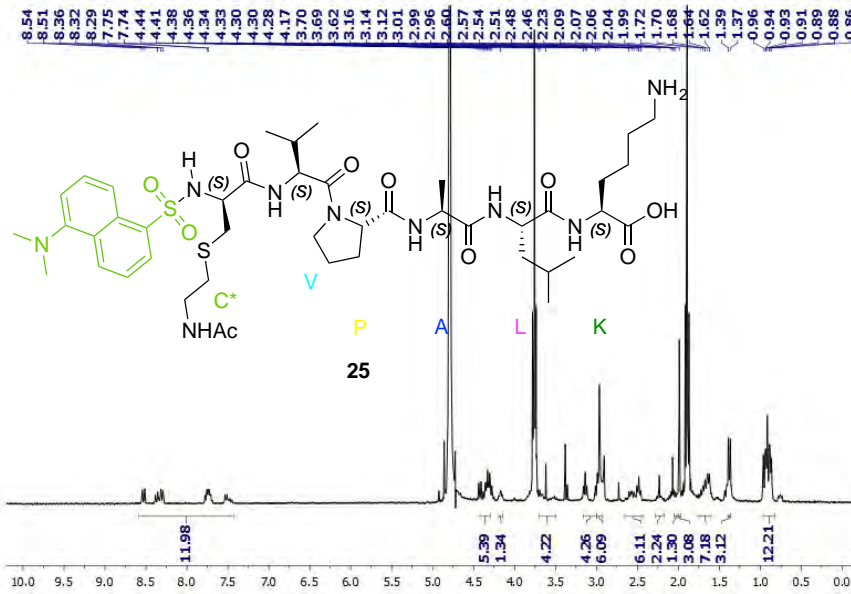
^1H NMR 400 MHz in DMSO at 298 K (**23**) ^{13}C NMR 100 MHz in DMSO at 298 K

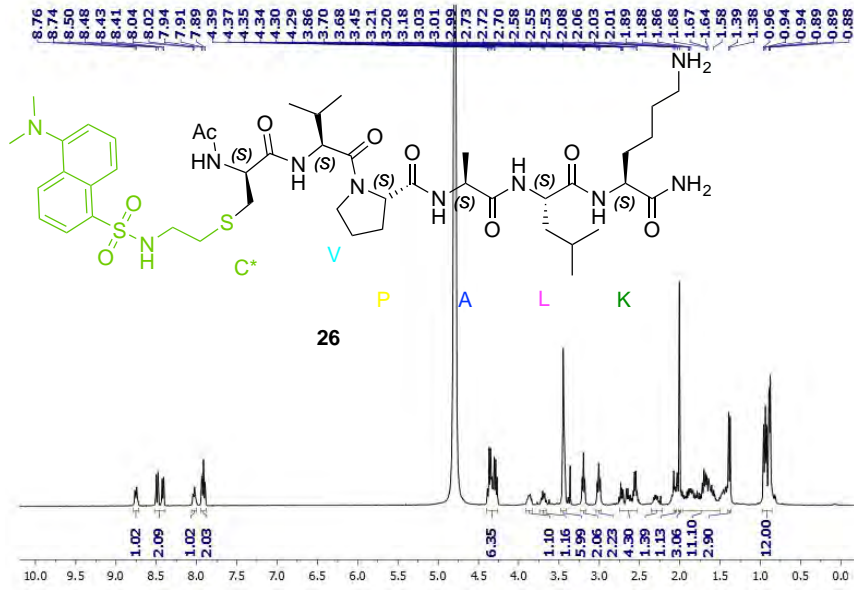
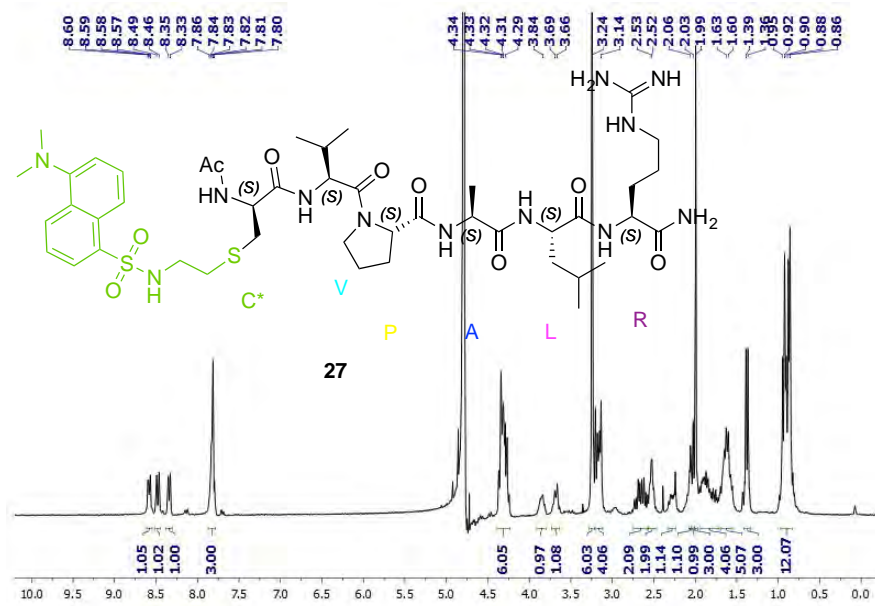
COSY in DMSO at 298 K

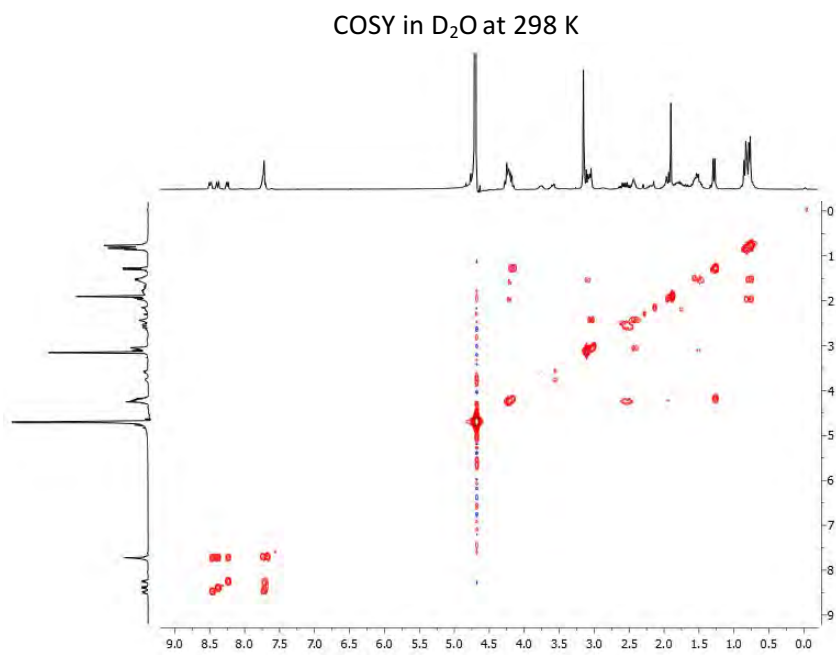
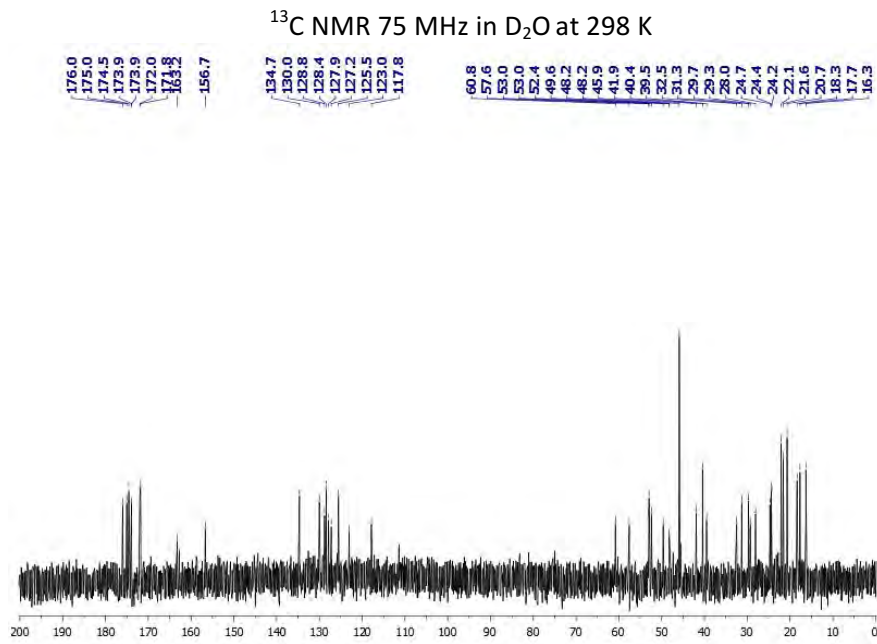


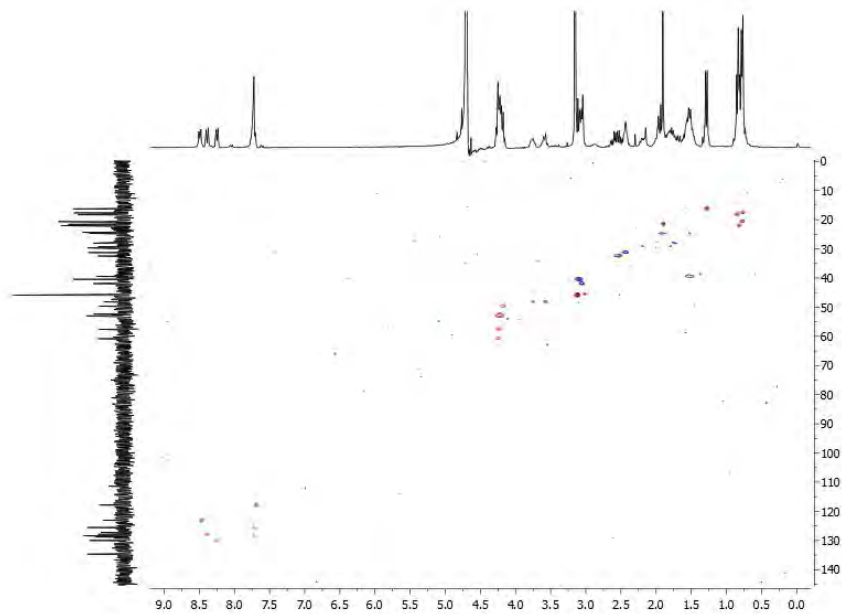
HSQC in DMSO at 298 K

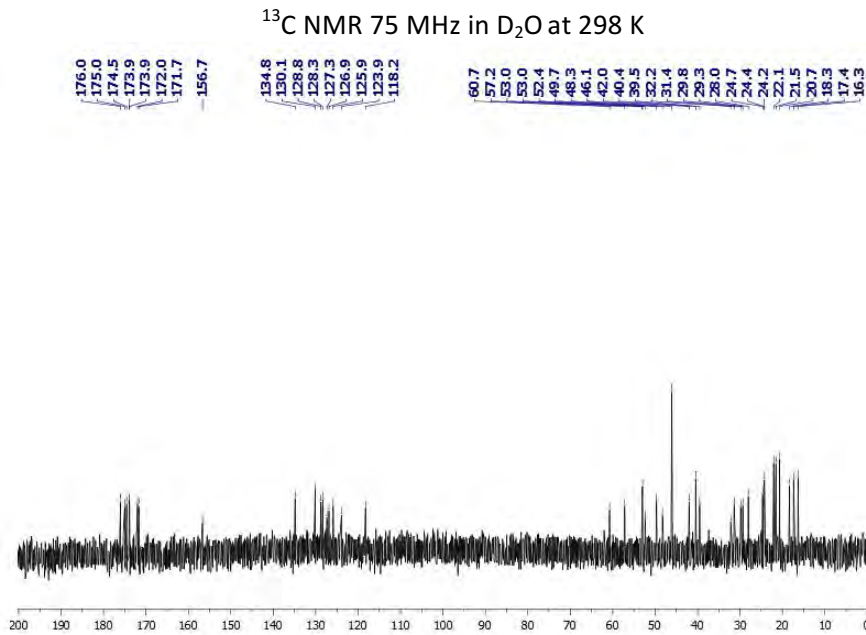
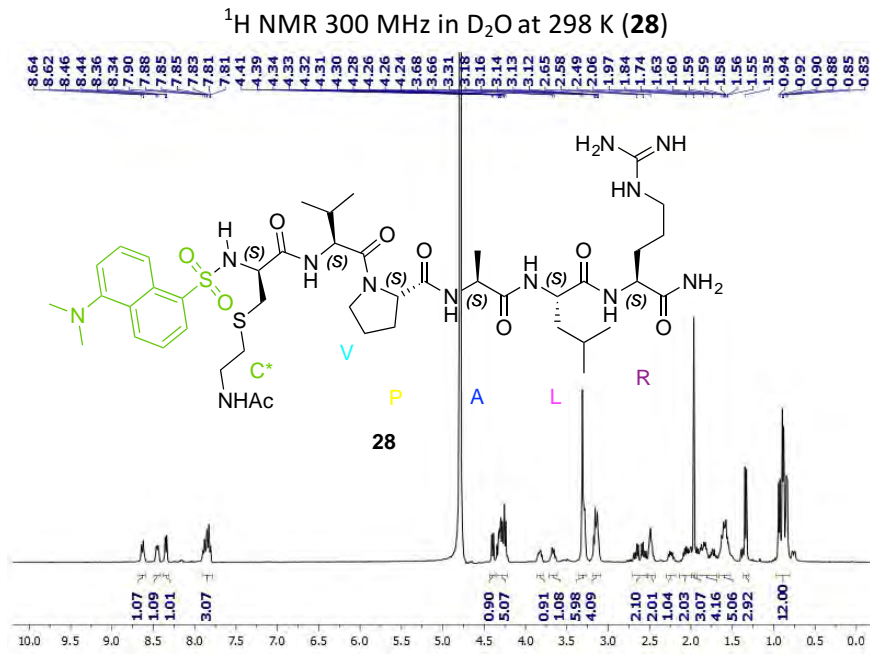


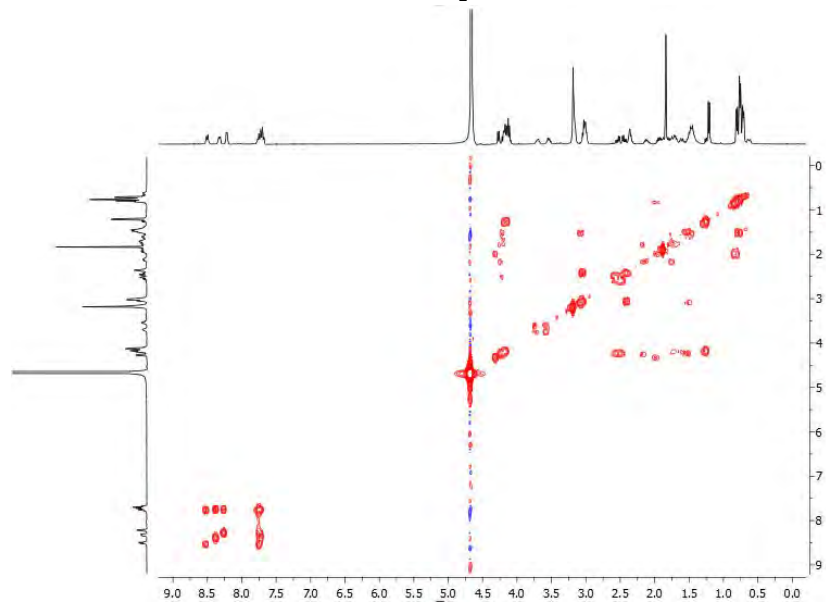
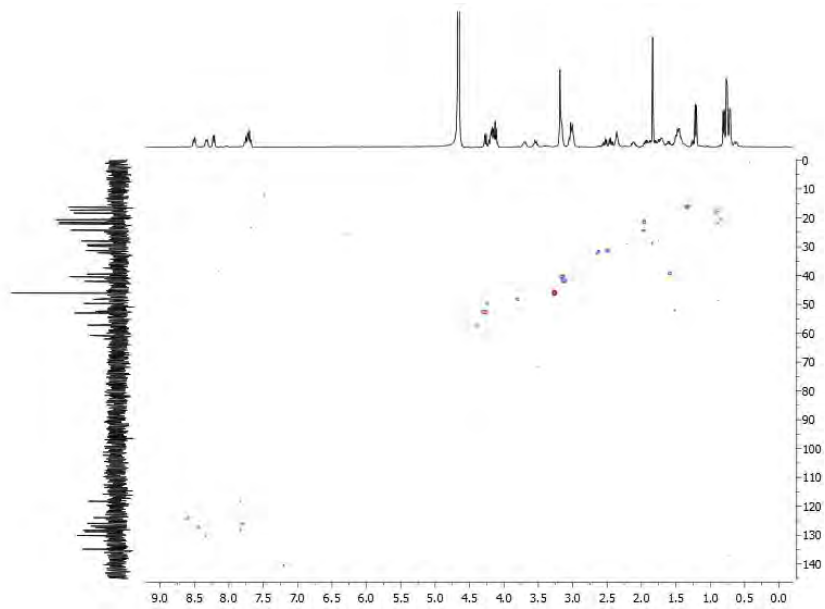
^1H NMR 400 MHz in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) at 298 K (24) ^1H NMR 400 MHz in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) at 298 K (25)

^1H NMR 400 MHz in D_2O at 298 K (26) ^1H NMR 300 MHz in D_2O at 298 K (27)



HSQC in D₂O at 298 K

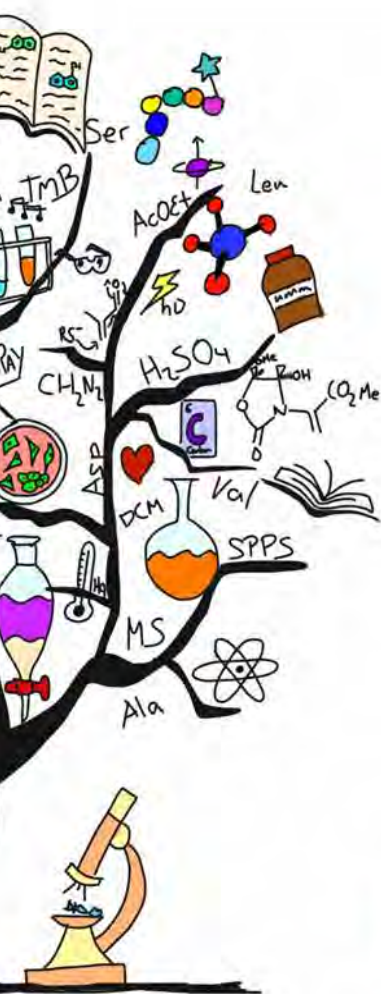


COSY in D₂O at 298 KHSQC in D₂O at 298 K



**"En la vida no hay cosas que temer,
sólo cosas que comprender"**

Marie Sklodowska Curie



**NUEVOS DESHIDROAMINOÁCIDOS QUIRALES:
SÍNTESIS, REACTIVIDAD Y APLICACIONES BIOLÓGICAS**

Marta Isabel
Gutiérrez Jiménez

Tesis Doctoral
2018

