

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



**Síntesis y evaluación biológica de inhibidores peptídicos de la
beta-secretasa y de nuevos derivados de nitroazúcares
(benzocarbazoldionas polihidroxiadas, beta-aminoácidos
cicloalcanicos polihidroxiados e iminoazúcares ramificados)**

JOSÉ MANUEL OTERO CASAS

Santiago de Compostela, Marzo de 2007

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



**Síntesis y evaluación biológica de inhibidores peptídicos de la
beta-secretasa y de nuevos derivados de nitroazúcares
(benzocarbazoldionas polihidroxiladas, beta-aminoácidos
cicloalcánicos polihidroxilados e iminoazúcares ramificados)**

Memoria que para optar al grado de
Doctor por la Universidade de
Santiago de Compostela presenta

JOSÉ MANUEL OTERO CASAS

Santiago de Compostela, Marzo de 2007

**Síntesis y evaluación biológica de inhibidores peptídicos de la
beta-secretasa y de nuevos derivados de nitroazúcares
(benzocarbazoldionas polihidroxiladas, beta-aminoácidos
cicloalcánicos polihidroxilados e iminoazúcares ramificados)**

Memoria que para optar al grado de
Doctor por la Universidade de
Santiago de Compostela presenta

JOSÉ MANUEL OTERO CASAS

Santiago de Compostela, Marzo de 2007

D. RAMÓN JOSÉ ESTÉVEZ CABANAS Y D. JUAN CARLOS ESTÉVEZ CABANAS, PROFESORES DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA:

CERTIFICAN: Que la memoria adjunta titulada **“Síntesis y evaluación biológica de inhibidores peptídicos de la beta-secretasa y de nuevos derivados de nitroazúcares (benzocarbazoldionas polihidroxiadas, beta-aminoácidos cicloalcanicos polihidroxiados e iminoazúcares ramificados)”**, que para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta D. José Manuel Otero Casas, ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica, bajo nuestra dirección.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizamos su presentación en la Facultad de Química de la Universidade de Santiago de Compostela.

Para que así conste, expedimos el presente certificado en Santiago de Compostela a 5 de Marzo de 2007.

Fdo. Ramón José Estévez Cabanas

Fdo. Juan Carlos Estévez Cabanas

AGRADECIMIENTOS:

El trabajo que se expone en la presente memoria ha sido llevado a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la Universidade de Santiago de Compostela, bajo la dirección de los profesores Dr. D. Ramón José Estévez Cabanas y el Dr. D. Juan Carlos Estévez Cabanas, a quienes quiero expresar mi más profundo agradecimiento, por la dedicación y paciencia con la que me han acompañado a lo largo de la realización de este trabajo.

Al profesor George W. J. Fleet, por su atención durante mi estancia en la Universidad de Oxford desde Junio hasta Septiembre de 2005.

También quiero agradecer a la profesora Dra. D. María de Carmen Villaverde y al Dr. D. Fredy Sussman su colaboración en el desarrollo de este trabajo, así como al Dr. Carlos Barcia, al Dr. Jacobo Cruces, a la Dra. Mónica Treus, a la Dra. Ana Martínez, a la Dra. Carmen Pampín y a la Dra. Raquel Soengas, de quienes he aprendido todo lo que sé hacer en el laboratorio.

A el resto de compañeros del laboratorio Luis, Fran, Marcos M., Lucía, Laura, Begoña, Fernando, Amalia; así como a la gente del laboratorio de Oxford, David, Sarah y Michaela, también quiero agradecer la amistad y compañerismo con la que siempre me han tratado.

A todos los compañeros del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, especialmente a Carlos Gregorio y Carlos Otero que siempre están dispuestos a ayudarte cuando lo necesitas.

A Ramón y Mencha del servicio de RMN, al Dr. Bruno Dacuña del servicio de Rayos X, y a todo el personal del C.A.C.T.U.S.

A mis padres José M. y Maricarmen y mi hermana Paloma, así como al resto de mi familia, por saber apoyarme durante este largo periodo de trabajo.

A Alicia, por aguantar que me lleve el trabajo para casa, y a toda su familia, Antonio, Maricarmen, Alba, Patricia, Alejandro,...

A Lápices 4, por la excelente edición de esta memoria, a pesar de las prisas que siempre les imponemos.

A la Xunta de Galicia, al Ministerio de Educación y Ciencia y a la Universidade de Santiago de Compostela por las becas y ayudas concedidas durante estos años.

*A María,
la primera científica de mi casa*

ABREVIATURAS UTILIZADAS

a	Ancho
A β	β -Amiloide
aa	Aminoácido
Ac	Acetil
ACH	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADEAR Centre	Alzheimer's Disease Education and Referral Centre
AE	Aminoetileno
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
Anal.	Analysis
APH-1	Anterior pharynx-defective phenotype
APP	Proteína precursora amiloide
ApoE	Apolipoproteína E
Aprox	Aproximadamente
aq	Acuoso
Ar	Aromático
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Aminoestatina
BACE	β -site APP-cleaving enzyme
Bn	Bencil
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonil
br	Broad
BTCA	Tricloroacetimidato de bencilo
^t Bu	<i>tert</i> -Butil
Bz	Benzoil
c	Concentración
°C	Grados Celsius
C.A.C.T.U.S.	Centro de Apoio Científico-Tecnolóxico da Universidade de Santiago

CAN	Nitrato cérico amónico
cap.	Capítulo
Cbz	Benciloxycarbonil
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
col.	Colaboradores
CSA	Ácido canforsulfónico
Cy	Ciclohexil
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DC	Dominio celular
DEPT	Distorsionless enhancement by polarization transfer
DHE	Dihidroxietileno
DIEA	Diisopropiletilamina
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
DME	Dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
E ₁ cB	Eliminación unimolecular de base conjugada
Ed.	Editorial
e.e.	Exceso enantiomérico
e.d.	Exceso diastereomérico
EM	Espectro de masas
eq	Equivalentes
Et	Etil
etc.	Etcétera
EUA	Estados Unidos de América
f	Fuerte
FRET	Transferencia energética de fluorescencia por resonancia

g	Gramo
Gp	Grupo protector
h	Hora
HE	Hidroxietileno
HEA	Hidroxietilamina
HM	Hidroximetileno
HMC	Hidroximetilcarbonilo
HMDS	Hexametildisilazano
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Hz	Hertzio
<i>i</i>	<i>iso</i>
IGF-I	Factor de crecimiento tipo insulina I
im	Imidazol
IR	Infrarrojo
IQ	Ionización química
^t Pr	Isopropil
^t Bu	Isobutil
I.U.P.A.C.	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LDA	Diisopropilamiduro de litio
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	Multiplete
M	Concentración molar
MCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
Me	Metil
mg	Miligramo
min	Minuto
MHz	Megahertzio
MOM	Metoximetilo
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MMLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
mmol	milimol
MMPP	Monoperoxifitalato de magnesio
m.p.	Melting point
Ms	Metanosulfonil (mesil)
MS	Mass spectrum
m/z	Masa por carga
ν	Número de onda
μ	Momento dipolar
μL	Microlitro
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NIA	Nacional Institute of Aging
nm	Nanómetro
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nu	Nucleófilo
<i>o</i>	<i>orto</i>
p	Presión
<i>p</i>	<i>para</i>
pág.	Página
PDB	Protein Data Bank
PDC	Dicromato de piridinio
p.eb.	Punto de ebullición
PEN-2	Presenilina enhancer-2
p.f.	Punto de fusión
Ph	Fenil
Pht	Ftalil
ppm	Partes por millón
PPTS	<i>p</i> -Toluensulfonato de piridinio
pi	Piridina
py	Pyridine
PS	Presenilina

PTSA	Ácido <i>para</i> -toluensulfónico
ref	Reflujo
Rf	Factor de retención
Rh	Rodamina
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.t.	Room temperature
s	Singlete
S	Estatina
st	Strong
t	Triplete
<i>t</i>	<i>terc</i>
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
TBDMS	<i>terc</i> -Butildimetilsilil
TBDPS	<i>terc</i> -Butildifenilsilil
TBTU	Tetrafluoroborato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-uronio
Tf	Trifluorometanosulfonilo
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
t.l.c.	Thin layer chromatography
TM	Transmembrana
TMS	Trimetilsilil
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)-metilamina
Ts	<i>para</i> -Toluensulfonil (tosil)
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VSR	Virus del sarcoma de Rous

NOMENCLATURA DE LOS PRODUCTOS SINTETIZADOS

La nomenclatura asignada a los productos obtenidos en este trabajo se ha determinado siguiendo las Reglas de Nomenclatura de Hidratos de Carbono (Wolfrom, M. L. "Rules of Carbohydrate Nomenclature" *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 281-291), mientras los productos mantenían similitudes estructurales con sus respectivos hidratos de carbono de partida. Para el resto de productos se empleó la aplicación AutoNom 2.1, incluida en el software ChemDraw Ultra 6.0, la cual utiliza las reglas de la I.U.P.A.C. para generar los nombres de los compuestos.

TABLA DE AMINOÁCIDOS (serie L)

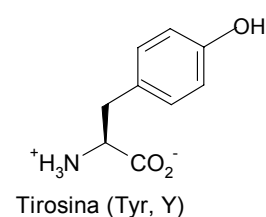
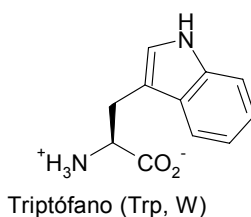
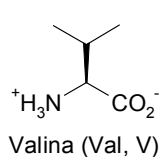
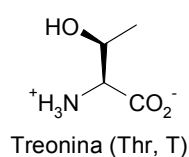
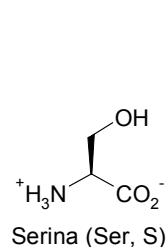
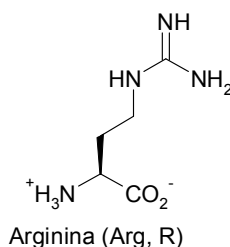
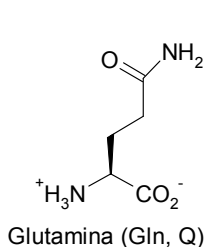
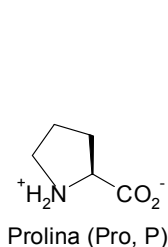
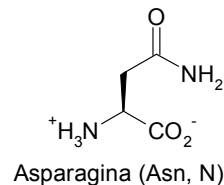
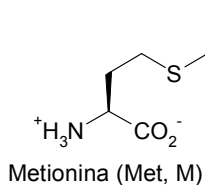
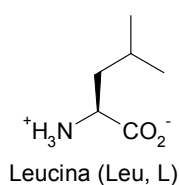
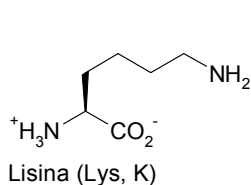
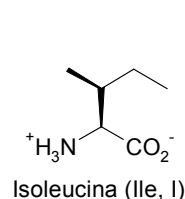
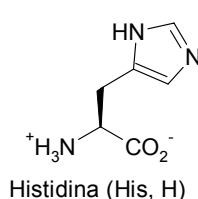
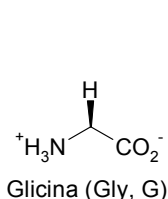
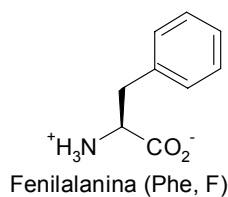
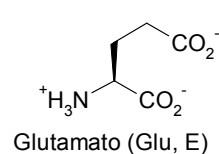
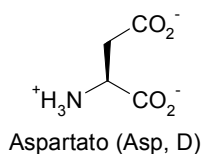
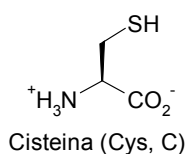
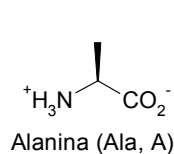


TABLA DE HEXOFURANOSAS (serie D)

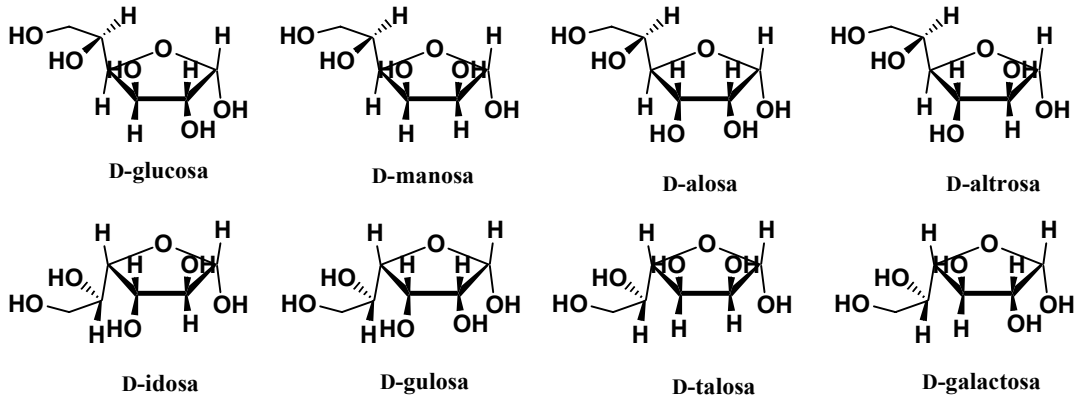
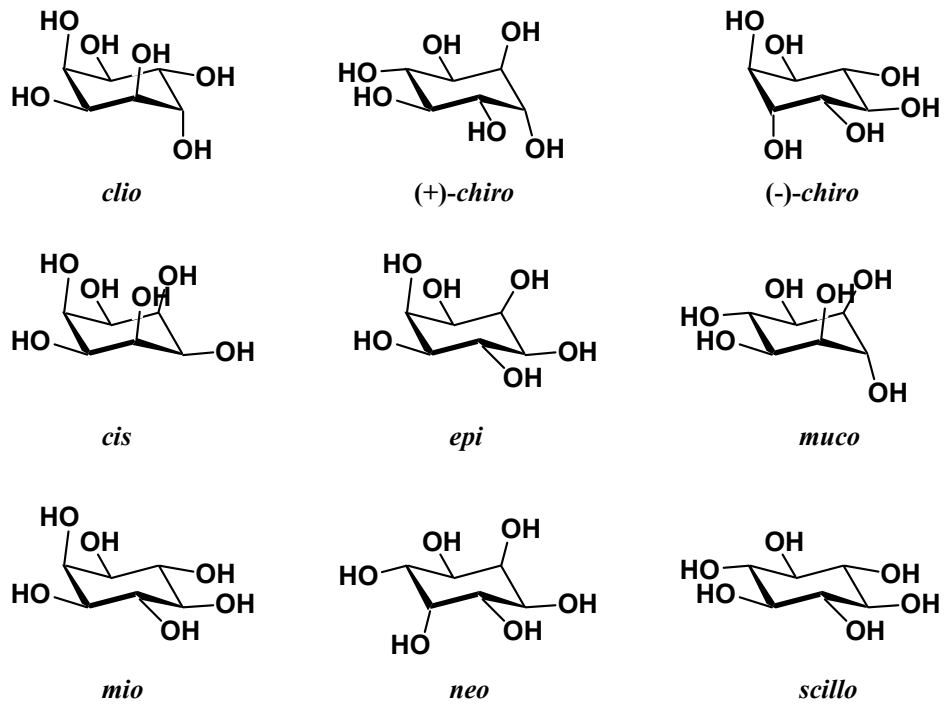


TABLA DE INOSITOLES



PARTE 1: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE LA β -SECRETASA

1. Introducción	1
1.1. Los comienzos de la enfermedad de Alzheimer.....	3
1.2. La enfermedad de Alzheimer hoy.....	4
1.2.1. Epidemiología.....	4
1.2.2. Sintomatología, diagnóstico y tratamiento.....	6
1.3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer.....	11
1.3.1. Placas neuríticas y ovillos neurofibrilares.....	12
1.3.2. Genética de la enfermedad.....	15
1.4. Procesado biológico de la APP: las enzimas secretasas.....	17
1.5. Características funcionales y estructurales de la β -secretasa.....	23
1.5.1. Estructura primaria.....	24
1.5.2. Estructura terciaria: sitio activo e inhibidores.....	25
2. Objetivos	35
3. Parte teórica	41
3.1. Síntesis de isómeros HE- δ -aminoácido.....	43
3.1.1. Antecedentes y plan de síntesis.....	43
3.1.2. Desarrollo del plan de síntesis.....	50
3.2. Síntesis de isómeros HE-1-aminobutan-2-ol.....	65
3.2.1. Antecedentes y plan de síntesis.....	65
3.2.2. Desarrollo del plan de síntesis.....	68
3.3. Síntesis y evaluación de inhibidores de la β -secretasa.....	79
3.3.1. Síntesis de inhibidores polipeptídicos.....	79
3.3.2. Evaluación de los inhibidores polipeptídicos.....	81
3.3.3. Valoración de los resultados obtenidos.....	87
4. Parte experimental	89
4.1. Técnicas instrumentales.....	91
4.2. Procedimientos experimentales.....	92
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2,6-dibromo-3,4,5-trihidroxihexanoico (30).....	92
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-6-bromo-4,5-dihidroxihexanoico (31).....	94
Preparación de la (<i>S</i>)-5-((<i>R</i>)-oxiran-2'-il)-dihidrofuran-2(3 <i>H</i>)-ona (32).....	96
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-6-ciclohexil-4,5-dihidroxihexanoico (33a).....	98
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-6-ciclohexil-4-	

hidroxi-5-metanosulfonatohexanoico (41a).....	100
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxihexanoico (28b).....	102
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (34a)....	104
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (10d).....	106
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)hexanoico (10e).....	108
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-isopropilhexanoico (10f).....	110
Preparación del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-2-isopropilhexanoico (8k)...	112
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihidroxi-7-metiloctanoico (33b).....	114
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-hidroxi-5-metanosulfonato-7-metiloctanoico (41b).....	116
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-azido-4-hidroxi-7-metiloctanoico (28c).....	118
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-azido-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (34d).....	120
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (10g).....	122
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-7-metil-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)octanoico (10k).....	124
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isopropil-7-metiloctanoico (10h).....	126
Preparación del ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-2-isopropil-7-metiloctanoico (8n).....	128
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-azido-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (34e).....	130
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (10i).....	132
Preparación del ácido (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-2,7-dimetiloctanoico (8o).....	134
Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-azido-4-hidroxi-7-metil-2-(2-metilprop-1-en-3-il)octanoico (34f).....	136

Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isobutil-7-metiloctanoico (10j).....	138
Preparación del ácido (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-5-(<i>t</i> -butoxicarbonilamino)-2-isobutil-7-metiloctanoico (8p).....	140
Preparación de la 1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropiliden-3- <i>O</i> -(<i>S</i> -metilditiocarbonato)- α -D-glucofuranosa (57).....	142
Preparación de la 3-desoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropiliden- α -D-glucofuranosa (50).....	144
Preparación de la 3-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden- α -D-glucofuranosa (58).....	146
Preparación de la 3-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-6- <i>O</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)- α -D-glucofuranosa (59).....	148
Preparación de la 5,6-anhidro-3-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden- α -D-glucofuranosa (51).....	150
Preparación de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden- α -D-glucofuranosa (52a).....	152
Preparación de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-5- <i>O</i> -metanosulfonil- α -D-glucofuranosa (60a).....	154
Preparación de la 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden- β -L-idofuranosa (53a).....	156
Preparación del 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-L-itol (54a).....	158
Preparación del 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-L-itol (63a).....	160
Preparación del 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-L-itol (64a).....	162
Preparación del (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-azido-5-benciloxi-7-ciclohexil-2-metilhept-2-eno (56a).....	164
Preparación del (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-amino-7-ciclohexil-2-metilheptan-5-ol (9a).....	166
Preparación de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2- <i>O</i> -isopropiliden- α -D-glucofuranosa (52b).....	168
Preparación de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-5- <i>O</i> -metanosulfonil- α -D-glucofuranosa (60b).....	170
Preparación de la 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2- <i>O</i> -isopropiliden- β -L-idofuranosa (53b).....	172
Preparación del 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-L-itol (54b).....	174
Preparación del 5-azido-4-benciloxi-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-L-itol (63b).....	176
Preparación del 5-azido-4- <i>O</i> -bencil-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-L-itol (64b).....	178

Preparación del (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-azido-5-benciloxi-2,8-dimetilnon-2-en-5-ol (56b).....	180
Preparación del (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-amino-2,8-dimetilnonan-5-ol (9b)....	182
Procedimiento para la valoración de los péptidos 1, 2, 3 y 4 frente a la enzima β -secretasa.....	184
5. Conclusiones.....	189

PARTE 2: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS DERIVADOS DE NITROAZÚCARES

1. Introducción	195
1.1. El grupo nitro y su química.....	197
1.2. Alquilaciones de nitronatos: aplicaciones.....	202
1.3. La reacción de Henry: aplicaciones.....	208
1.4. La reacción de Michael: aplicaciones.....	220
2. Objetivos	231
2.1. Objetivos.....	233
2.1.1. Síntesis de benzo[<i>b</i>]carbazol-6,11-dionas polihidroxiladas.....	233
2.1.2. Síntesis de β -aminoácidos cicloalcanicos polihidroxilados.....	235
2.1.3. Síntesis de iminoazúcares ramificados.....	237
3. Parte teórica	239
3.1. Aplicación de nitroazúcares a la síntesis de benzocarbazoldionas polihidroxiladas.....	241
3.1.1. Antecedentes y plan de síntesis.....	241
3.1.2. Primer ensayo de síntesis de hexahidrotetrahidroxi- benzo[<i>b</i>]carbazol-6,11-dionas: aproximación basada en la 2- hidroxi-1,4-naftoquinona.....	248
3.1.3. Segundo ensayo de síntesis de hexahidrotetrahidroxi- benzo[<i>b</i>]carbazol-6,11-dionas: aproximación basada en el 1,4- dimetoxinaftaleno.....	258
3.2. Aplicación de nitroazúcares a la síntesis de β -aminoácidos cicloalcanicos polihidroxilados.....	269
3.2.1. Antecedentes y plan de síntesis.....	269
3.2.2. Síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados.....	272
3.2.3. Replanteamiento de la síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados.....	286
3.2.4. Segundo replanteamiento de la síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados.....	294
3.2.5. Síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados.....	308
3.3. Applications of nitrosugars to the synthesis of branched chain iminosugars.....	319
3.3.1. Background.....	319
3.3.2. Objective and synthetic plan.....	323

3.3.3. Synthesis of C-4 branched chain 1,4-iminopentanol.....	324
3.3.4. Synthesis of novel C-4 branched chain derived from 240a.....	331
3.3.5. Preliminary glycosidase screening of polyhydroxylated pyrrolidine derivatives.....	337
3.3.6. Synthesis of branched polyhydroxylated azepane derivatives.....	339
4. Parte experimental.....	347
4.1. Técnicas instrumentales.....	349
4.2. Procedimientos experimentales.....	350
Preparación de 3-O-bencil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (164).....	350
Preparación de la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (165).....	352
Preparación de la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilopentadial-1,4-furanosa (121).....	354
Preparación de la 3-O-bencil-6-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (82e) y de la 3-O-bencil-6-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (82f).....	354
Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (128c).....	355
Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (161b).....	357
Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitro-D-glucosa (162b).....	360
Preparación del (1S,2S,3S,4R,5R,6R)-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitrociclohexano (147b).....	360
Preparación del (1S,2S,3S,4R,5R,6R)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (159b).....	363
Preparación de la (6bR,7R,8S,9S,10S,10aR)-8-benciloxi-7,8,9,10,10a,11-hexahidro-7,9,10-trihidroxi-6bH-benzo[a]carbazol-5,6-diona (160b).....	363
Preparación del 1,4-dimetoxinaftaleno (171c).....	366
Preparación del 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (171a).....	368
Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (172a).....	370
Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-6-nitro-L-idosa (175b).....	373
Preparación del (1R,2S,3S,4R,5S,6S)-3-benciloxi-5-(1',4'-	

dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxi-6-nitrociclohexano (173a).....	373
Preparación del (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-amino-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxiciclohexano (177a).....	375
Preparación del (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (159c).....	375
Preparación de la (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,11 <i>bS</i>)-2-benciloxi-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5-hexahidro-1,3,4-trihidroxi-11 <i>bH</i> -benzo[<i>b</i>]carbazol-6,11-diona (148c).....	376
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-5- <i>C</i> -(1,3-ditian-2-il)-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-6-nitro-β- <i>L</i> -idofuranosa (184a).....	378
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5- <i>C</i> -carbaldehido-5,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-6-nitro-β- <i>L</i> -idofuranosa (185a).....	381
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5- <i>C</i> -carboxil-5,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-6-nitro-β- <i>L</i> -idofuranosa (151c).....	381
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-5- <i>C</i> -metoxicarbonil-6-nitro-β- <i>L</i> -idofuranosa (151a).....	382
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-5- <i>C</i> -metoxicarbonil-6-nitro- <i>L</i> -idosa (179b).....	384
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (180a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (180b).....	384
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187b).....	385
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxilato de metilo (188c).....	388
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxilato de metilo (188a).....	388
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-5- <i>C</i> -(1,3-ditian-2-il)-6-nitro- <i>L</i> -idosa (189b).....	391
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (190a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (190b).....	391
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (192b).....	389
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehído (193a).....	394
Preparación del ácido (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-	

3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxílico (194a).....	394
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187b).....	395
Preparación del (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohex-1-enocarbaldéhidó (195a).....	395
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-6-nitro-5- <i>C</i> -(tris(feniltio)metil)- α - <i>D</i> -glucofuranosa (201b).....	397
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-1,2- <i>O</i> -isopropiliden-5- <i>C</i> -metoxicarbonil-6-nitro- α - <i>D</i> -glucofuranosa (151b).....	400
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-5- <i>C</i> -metoxicarbonil-6-nitro- <i>D</i> -glucosa (179d).....	402
Preparación del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (180c) y el (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (180d).....	402
Preparación del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (180c) y del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187c).....	403
Preparación del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxilato de metilo (188d).....	408
Preparación del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxiciclo-3,4-isopropilidendioxihexanocarboxilato de metilo (188b).....	408
Preparación del ácido (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohexánico (204a).....	410
Preparación del ácido (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-bis-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiciclohexánico (206a).....	410
Preparación del 2-((1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-bis-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (207a).....	413
Preparación del 2-((1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-amino-5,6-bis-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)ciclohexano-3,4-isopropilidendioxicarboxamido)acetato de metilo (208a).....	415
Preparación del 2-((1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-(benciloxicarbonilamino)acetilamino)-5,6-bis-(<i>t</i> -butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (209a).....	415
Preparación de la 3- <i>O</i> -bencil-5,6-didesoxi-5- <i>C</i> -(1,3-ditian-2-il)-6-nitro- <i>L</i> -idosa (189b).....	418

Preparación del (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-benciloxi-4-(1,3-ditian-2-il)-3-hidroxi-5-nitropentanal (210a).....	418
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (211a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (211b).....	419
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (218a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (218b).....	422
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219b).....	424
Preparación del ácido (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (220a) y del ácido (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (220b).....	424
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (221a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (221b).....	425
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (222a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (222b).....	427
Preparación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (223a) y del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (223b).....	427
Preparation of 1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropylidene- <i>D</i> -mannitol (234)....	432
Preparation of 1,2- <i>O</i> -isopropylidene- <i>D</i> -glyceraldehyde (112)....	434
Preparation of (<i>S</i>)-1-((<i>R</i>)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-nitroethanol (153a).....	434
Preparation of (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1-(<i>t</i> -butyldiphenylsilyloxy)-4-nitrobutane-2,3-diol (235b).....	436
Preparation of <i>t</i> -butyl(((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2,2-dimethyl-5-(nitromethyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (232a).....	438
Preparation of 2-((4' <i>S</i> ,5' <i>R</i>)-5'-((<i>t</i> -butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (154a), and (2 <i>R</i>) and (2 <i>S</i>)-2-[(4' <i>S</i> ,5' <i>R</i>)-5'-((<i>t</i> -butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl]-2-nitroethanol (236a)...	440

Preparation of 2-((4'S,5'R)-5'-((<i>t</i> -butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (154a), and (2 <i>R</i>) and (2 <i>S</i>)-2-[(4'S,5'R)-5'-((<i>t</i> -butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl]-2-nitroethanol (236a)...	442
Preparation of <i>t</i> -butyl(((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (233b).....	443
Preparation of ((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (233c).....	445
Preparation of ((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl methanesulfonate (233a).....	447
Preparation of (3 <i>a</i> ' <i>S</i> ,6 <i>a</i> ' <i>R</i>)-2,2,2',2'-tetramethyldihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5- <i>c</i>]pyrrol]-5'(3 <i>a</i> ' <i>H</i>)-ol (240a).....	449
Preparation of (3 <i>a</i> ' <i>S</i> ,6 <i>a</i> ' <i>R</i>)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5- <i>c</i>]pyrrole] (238a).....	452
Preparation of (3 <i>a</i> ' <i>S</i> ,6 <i>a</i> ' <i>R</i>)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5- <i>c</i>]pyrrole] (238a).....	454
Preparation of (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol hydrochloride (155b).....	454
Preparation of (3 <i>a</i> ' <i>S</i> ,6 <i>a</i> ' <i>R</i>)-5'-(allyloxy)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5- <i>c</i>]pyrrole] (245a).....	456
Preparation of (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-(allyloxy)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (246a).....	458
Preparation of (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2,2-bis(hydroxymethyl)-1-propoxypyrrolidine-3,4-diol (242a).....	460
Preparation of (3 <i>a</i> ' <i>S</i> ,6 <i>a</i> ' <i>R</i>)-2,2,2',2'-tetramethyl-3 <i>a</i> ',6 <i>a</i> '-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5- <i>c</i>]pyrrole]5'-oxide (248a).....	462
Preparation of (3 <i>a</i> ' <i>S</i> ,6 <i>a</i> ' <i>R</i>)-2,2,2',2'-tetramethyl-3 <i>a</i> ',6 <i>a</i> '-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5- <i>c</i>]pyrrole] (249a).....	464
Preparation of (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2,2-bis(hydroxymethyl)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrole-3,4-diol (250a) and (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-5,5-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-2,3,4-triol (251a).....	466
Preparation of 1,2- <i>O</i> -isopropylidene- α -D-glucofuranose (264a).....	468
Preparation of 1,2- <i>O</i> -isopropylidene-6- <i>O</i> - <i>p</i> -toluensulfonyl- α -D-glucofuranose (264b).....	470
Preparation of 6-azido-6-deoxy-1,2- <i>O</i> -isopropylidene- α -D-glucofuranose (265a).....	472
Preparation of 6-azido-3,5-di- <i>O</i> -benzyl-6-deoxy-1,2- <i>O</i> -	

isopropylidene- α -D-glucofuranose (265b).....	474
Preparation of 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene-6-nitro- α -D-glucofuranose (82b).....	476
Preparation of 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-O-isopropylidene-6-nitro-D- <i>glicero</i> - α -D- <i>gluco</i> -heptofuranose (258a).....	478
Preparation of 6-amino-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-O-isopropylidene-D- <i>glicero</i> - α -D- <i>gluco</i> -heptofuranose (267a).....	480
Preparation of (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-7,7-bis-(hydroxymethyl)azepane-2,3,4,5,6-pentaol (157a).....	482
Preparation of (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-4,5,6-triacetoxy-7,7-bis-(acetoxymethyl)azepane-2,3-diol (157b).....	484

5. Conclusiones.....	487
-----------------------------	------------

PARTE I

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE LA β -SECRETASA

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	35
3. PARTE TEÓRICA.....	41
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	89
5. CONCLUSIONES.....	189

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los comienzos de la enfermedad de Alzheimer.¹

A finales de 1906, Alois Alzheimer (1864-1915) presentó en un congreso germánico de psiquiatría una comunicación titulada “Sobre una enfermedad específica de la corteza cerebral”, en la que se recogía el caso clínico de Auguste D. (1850-1906), una mujer que con 51 años había desarrollado progresivamente y en un corto período de tiempo los siguientes síntomas: pérdida de memoria, desorientación, deterioro del lenguaje, de las habilidades motoras, de la percepción y manía persecutoria; los cuales la llevaron a su muerte a los 55 años de edad. La autopsia cerebral reveló una atrofia generalizada y el análisis neuropatológico dio a conocer, por primera vez, la presencia de neurofibrillas y de depósitos de una sustancia anómala asociada a la pérdida neuronal en la corteza cerebral, que años más tarde serían reconocidos como evidencia inequívoca de la dolencia. En 1910, la enfermedad descrita por Alzheimer fue reconocida como una demencia presenil y entendida como resultado inevitable del envejecimiento, y no fue hasta la década de los 60 cuando la comunidad científica empezó a demostrar un interés clínico más allá del estudio del comportamiento de los enfermos.

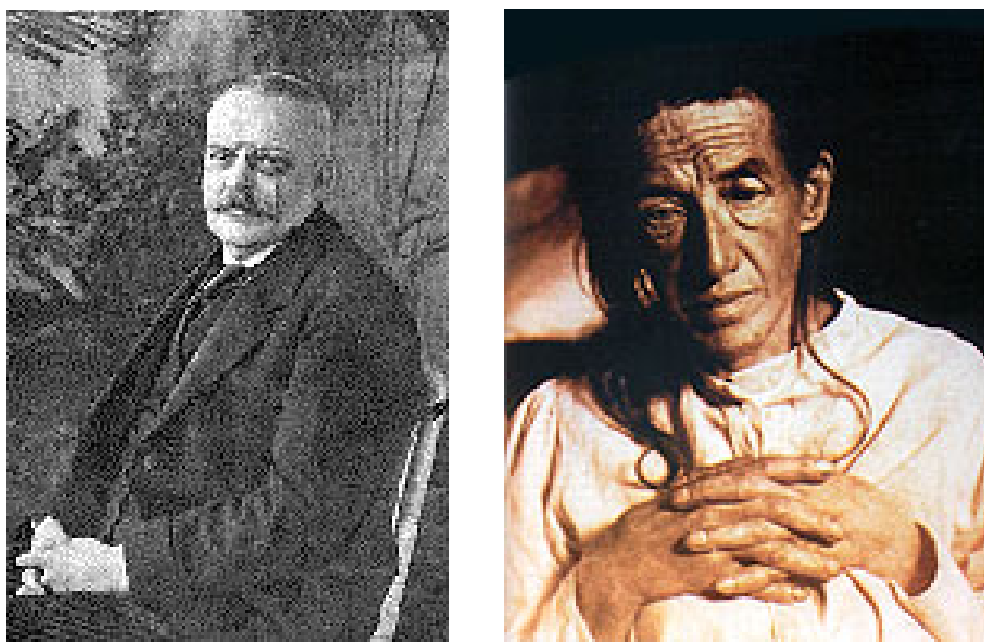


Figura 1: Alois Alzheimer y Auguste D.

¹ Sousa, S. L.; Franch, J. V.; Reglá, J. L. “Enfermedad de Alzheimer. Manual de demencias” 1996, 384-406, Ed. Prous Science, Barcelona.

1.2. La enfermedad de Alzheimer hoy.

1.2.1. Epidemiología.^{2,3}

La enfermedad de Alzheimer es una dolencia neurodegenerativa que de manera lenta y paulatina destruye las neuronas de quien la padece. Es la causa de demencia más común entre individuos de más de 65 años. Uno de los últimos estudios publicados sobre la incidencia de la enfermedad,⁴ estima que en el año 2001 24.3 millones de personas estaban afectadas y que esta cantidad se verá cuadruplicada en los próximos 40 años, debido a la disminución de la mortalidad por el aumento de la esperanza de vida. Se calcula que la cifra de enfermos aumenta en 4.6 millones de personas cada año, aproximadamente un nuevo caso cada siete segundos, y que en el año 2040 el número de enfermos rondará los 80 millones de afectados si no se encuentra antes un remedio que frene su avance.

Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto una serie de factores de riesgo que influyen en el desarrollo de esta enfermedad:^{3,5}

-Edad: la predisposición a padecer esta enfermedad aumenta exponencialmente con la edad, doblándose cada 5 años superados los 70 años de edad. Cabe hacer notar que las personas mayores suelen perder la memoria con el paso del tiempo, pero la inmensa mayoría de ellas están mentalmente sanas, lo que significa que la vejez por sí sola no es la causa de la dolencia.

-Sexo: casi todas las investigaciones muestran una mayor incidencia entre las mujeres, entre dos y tres veces mayor que entre hombres, que puede ser debida a su mayor esperanza de vida y a que la baja concentración de estrógenos en mujeres posmenopáusicas puede favorecer el desarrollo de la enfermedad.

² a) www.alzheimers.org/pubs/prog99.htm; Alzheimer's Disease Education and Referral Centre (ADEAR Centre), servicio del National Institute on Aging (NIA), Maryland EUA. b) www.alzheimer-europe.org/spanish/AD.htm; Organización no gubernamental Alzheimer-Europa, Luxemburgo, Europa.

³ Cacabelos, R. "Tratado de neurogeriátrica. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Epidemiología y genética" 1999, Ed. Masson, Barcelona.

⁴ Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M. "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study" *The Lancet* **2005**, 366, 2112-2117.

⁵ Lyketsos, C. G.; Colenda, C. C.; Beck, C.; Blank, K.; Doraiswamy, M. P.; Kalunian, D. A.; Yaffe, K. "Position statement of the American Association for Geriatric Psychiatry regarding principles of care for patients with dementia resulting from Alzheimer disease" *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2006**, 14, 561-573.

-Etnia y clase social: existe una mayor propensión a padecer la enfermedad en los individuos de raza negra de ambos sexos. Por otra parte, la clase social no es un factor de riesgo, aunque sí podría serlo el nivel educacional, siendo mayor al bajar el nivel (se cree que un cerebro ejercitado tiene menos probabilidades de padecer la enfermedad).

-Situación geográfica: la incidencia es mayor en los países occidentales (Norteamérica, Europa Occidental) y también en Rusia y Australia.

-Historia familiar: tener antecedentes familiares con síndrome de Down o Parkinson incrementa las posibilidades.

-Factores genéticos: existen dos tipos de enfermedad de Alzheimer que difieren en la edad de aparición y en la velocidad de progresión:

- *Familiar:* los primeros síntomas se manifiestan en edades comprendidas entre los 30 y 60 años, y aunque no es la más habitual, su evolución es más rápida. Está asociada a la presencia de mutaciones en ciertos genes; no obstante, esta herencia genética aumenta el riesgo de padecer la enfermedad, pero no es causa suficiente para su desarrollo.

- *Esporádica:* es la más frecuente, su progresión es más lenta y no está asociada a factores genéticos.

-Infarto cerebral: hace que se interrumpa el flujo sanguíneo y por lo tanto el aporte de oxígeno y glucosa a la zona afectada del cerebro, lo que produce daños en las células nerviosas. Se ha visto que los individuos que han sufrido esta afección presentan en mayor medida las lesiones neuropatológicas características de la enfermedad de Alzheimer, pero al igual que otros factores, no es por sí sola una causa suficiente.

-Niveles altos de colesterol: Existe cada vez mayor grado de evidencia de que los niveles altos de colesterol están ligados al riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, aunque el mecanismo de acción no está totalmente explicado aún.

-Otros: haber sufrido traumatismos craneales o cuadros depresivos pueden contribuir significativamente al desarrollo de la enfermedad.

1.2.2. Sintomatología, diagnóstico y tratamiento.^{6,7}

En la mayoría de los enfermos, los primeros síntomas aparecen en torno a los 60 años (variante esporádica), y se superponen con las manifestaciones normales del envejecimiento cerebral. Este solapamiento sintomático, su heterogeneidad y su curso progresivo hace difícil establecer patrones que permitan el diagnóstico de la enfermedad en los primeros estadios de su desarrollo.

Las alteraciones más importantes que se producen son la pérdida gradual de la memoria, la afasia (deterioro del lenguaje), la apraxia (deterioro de las habilidades motoras) y la agnosia (dificultades de percepción). La primera de ellas es la manifestación más habitual de la enfermedad y suele iniciarse con desorientación en el tiempo y en el espacio, ambulación errática, olvido de hechos recientes y su orden cronológico. Las alteraciones en el lenguaje son variables, se manifiestan al principio con una notable dificultad para encontrar la palabra adecuada, lo que obliga al enfermo a usar expresiones de contexto similar, hecho que se conoce como parafasia semántica, que en estadios posteriores puede reducirse a ecolalia (repetición involuntaria de una palabra que el paciente acaba de escuchar a su interlocutor) o a palilalia (repetición reiterativa, involuntaria y progresivamente acelerada de una sílaba, palabra o frase corta, disminuyendo la intensidad de emisión para acabar realizando movimientos articulatorios silenciosos con los labios). Las alteraciones en la capacidad motora también pueden aparecer al principio de la enfermedad y acaban por influir drásticamente en las actividades diarias del individuo; en una etapa más avanzada, le impedirán caminar, comer o tener control sobre sus necesidades fisiológicas.

Todos estos trastornos van haciéndose más acusados y en un estadio final de la enfermedad, el paciente pierde casi por completo su capacidad cognitiva y motora, su cuerpo se queda rígido y ya no responde a estímulos. Debido al acusado debilitamiento físico, existe una elevada probabilidad de que el paciente desarrolle otras enfermedades e infecciones, lo que conlleva a su muerte pasados entre diez y quince años desde los primeros síntomas.

Es obvio que a medida que la enfermedad avanza, el individuo se hace más dependiente de los demás y que poco a poco va requiriendo cuidados más especializados, que el entorno familiar no siempre es capaz de proporcionarle.

⁶ Díaz Brinton, R.; Yamazaki, R. S. "Advances and challenges in the prevention and treatment of Alzheimer's Disease" *Pharmaceutical Research* **1998**, *15*, nº 3, 386-398.

⁷ Mackenzie, I. R. A. "Anti-inflammatory drugs and Alzheimer-type pathology in aging" *Neurology* **2000**, *54*, 732-734.

Convivir con un enfermo de Alzheimer hace necesaria una total dedicación a él y supone una gran carga emocional y física para sus familiares, que a menudo requieren de ayuda externa para su cuidado, o bien lo internan en diferentes tipos de instituciones lo que implica además un elevado coste económico. Su enorme repercusión a todos los niveles familiares y su incidencia cada vez mayor la han convertido en una preocupación pública y científica de primer orden. Los gobiernos destinan cada vez cantidades más importantes de dinero para ayudar a los familiares en el cuidado de los enfermos, ya que esta tarea requiere muy a menudo asistencia exterior especializada que no todas las familias pueden costear.

La sociedad también ha empezado a darse cuenta de la dificultad que conlleva la convivencia con un enfermo de Alzheimer, surgiendo asociaciones y grupos de autoayuda que asesoran a los familiares de nuevos enfermos. Con la intención de hacer llegar al resto de la ciudadanía la problemática que entraña la convivencia con un enfermo de Alzheimer y la facilidad con la que cualquier individuo puede verse involucrado de manera activa o pasiva con esta enfermedad, se ha establecido desde el año 1994 el 21 de Septiembre como el día internacional de la enfermedad de Alzheimer, celebrando este día diversos actos públicos como conferencias, encuentros, mesas de información, acontecimientos deportivos para recaudar fondos, concursos fotográficos, etc.

Tal y como se indicó anteriormente, la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer es difícil y la exploración neuropsicológica se muestra como el mejor medio para determinar si el individuo la padece. Los cambios cognitivos asociados a esta demencia son los que producen una mayor incapacidad y así se pone de manifiesto en los tests de memoria y apraxia, entre otros, a los que se somete al enfermo. Es posible, además de esta exploración psicológica, obtener imágenes del cerebro del paciente por medio de técnicas de Tomografía de Emisión de Positrones o Resonancia Magnética Nuclear, que servirán para dar más peso al diagnóstico. Con las técnicas de examen existentes, es posible ver la evolución de la atrofia cerebral o medir el flujo de sangre que llega al cerebro, que es menor en quien padece la enfermedad debido al mal funcionamiento de algunas células nerviosas.⁸

⁸ Jagust, W.; Gitcho, A.; Sun, F. F. "Brain imaging evidence of preclinical Alzheimer's disease in normal aging" *Annals of Neurology* 2006, 59, 673-681.

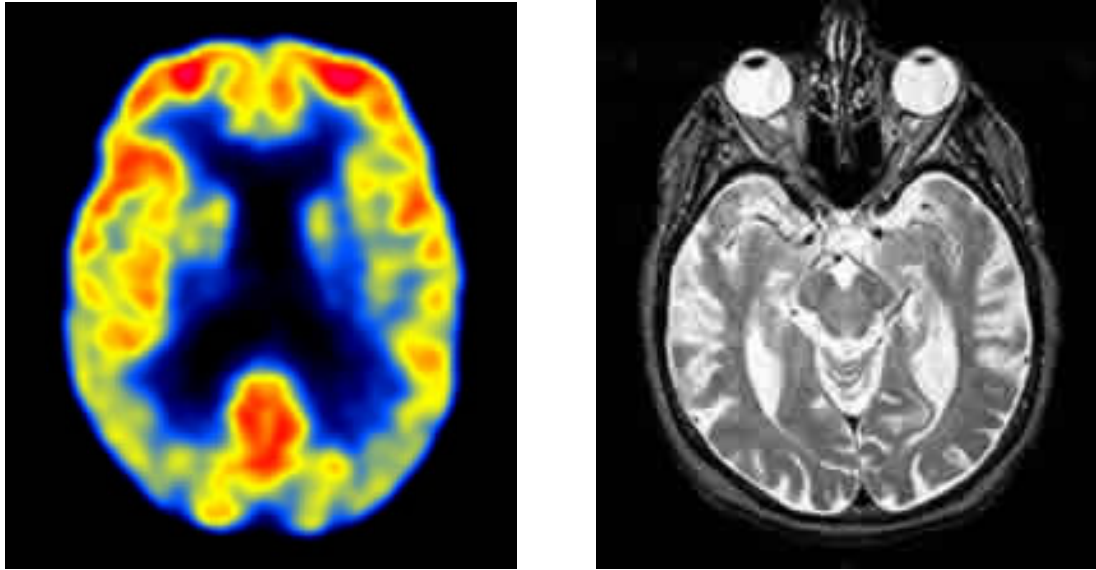


Figura 2: Izda.: Tomografía de Emisión de Positrones del cerebro de un paciente con Alzheimer leve, con el hemisferio derecho ligeramente más afectado que el izquierdo. Dcha.: Resonancia Magnética Nuclear de un cerebro con atrofia hipocámpica y amigdalalar en un paciente con enfermedad de Alzheimer.⁹

Con unos y otros resultados, se podrá concluir si el sujeto sufre esta dolencia, y un examen *post-mortem* de su cerebro dará las pruebas definitivas, ya que éste presentará un aspecto considerablemente más deteriorado de lo normal (Figura 3), debido en mayor medida a las dos lesiones características de la enfermedad: placas amiloides y ovillos neurofibrilares.

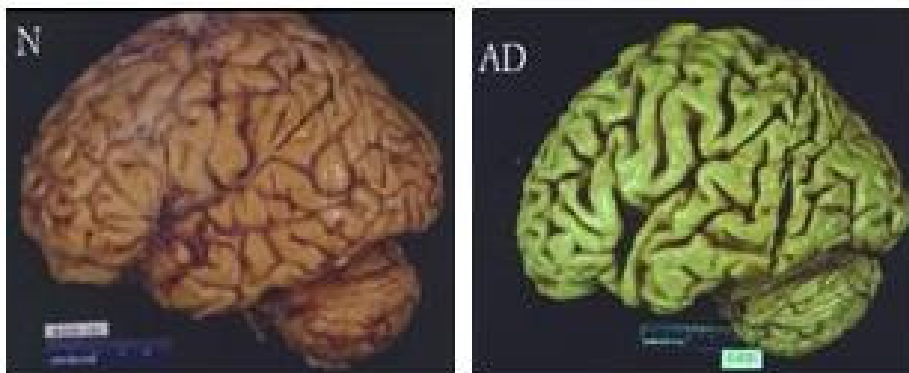


Figura 3: Izda.: Cerebro sano. Dcha.: Cerebro con Alzheimer.

En la actualidad, no existe ningún tratamiento que prevenga o cure este mal, si bien existen medicamentos que contribuyen a atenuar algunos de sus síntomas durante un período de tiempo limitado. De modo general, el uso de derivados anticolinesterásicos mejoran los niveles de acetilcolina en el cerebro y en el sistema

⁹ www.hipocampo.org; "La circunvalación de hipocampo: Alzheimer y demencias relacionadas".

nervioso central, ayudando a regular la memoria y a controlar los movimientos del músculo esquelético y liso. La Tacrina (Cognex®) fue uno de los primeros medicamentos empleados, pero hoy en día ha sido retirado y sustituido por otros inhibidores de la acetilcolinesterasa más específicos: el Donepezilo (Aricept®), la Rivastigmina (Exelon®) y la Galantamina (Razadyne®). También se emplea la Memantina (Bamenda®), que es un agente que regula el exceso de glutamato en el cerebro, lo cual puede producir un efecto neuroprotector, y la vitamina E, la cual en altas dosis puede producir un retraso en la evolución de la enfermedad.

Todos estos medicamentos son empleados en las fases iniciales de la enfermedad, y a medida que la enfermedad avanza se complementan con tratamientos para los diversos síntomas que la acompañan, tales como la depresión, estados de agitación, alteraciones del sueño, incontinencia urinaria, estreñimiento, infecciones urinarias, úlceras provocadas por la inmovilidad o tromboflebitis.

Encontrar sustancias que detengan la enfermedad y mejoren de manera significativa la calidad de vida del enfermo es uno de los objetivos primordiales de la investigación científica que se está llevando a cabo en la actualidad. Se han obtenido resultados esperanzadores en el desarrollo de vacunas para la enfermedad, tales como los desarrollados por Schenk y col.,¹⁰ de los laboratorios californianos Elan Corporation®, que iniciaron un trabajo con ratones transgénicos para probar una vacuna preventiva de la variante familiar de la enfermedad de Alzheimer. La vacuna AN-1792, está basada en una forma sintética de la proteína β -amiloide ($A\beta_{42}$), la cual conforma las placas neuríticas en los cerebros de los pacientes con Alzheimer. Su administración estimula al sistema inmunológico del paciente para eliminar las placas ya formadas y evitar la aparición de otras nuevas. En experimentos con ratones, el tratamiento redujo y ralentizó el avance de las placas, y estos resultados dieron paso a ensayos clínicos, en concreto en las fases leve y moderada de la enfermedad. Los resultados de este trabajo se presentaron en el Congreso Mundial de Alzheimer celebrado en el año 2000 en Washington, en el cual Schenk aseguró que la administración de la vacuna había demostrado ser segura en humanos. Sin embargo, los ensayos con la vacuna se vieron interrumpidos en Enero de 2002 después de que un importante número de pacientes tratados sufrieran inflamación en el sistema nervioso central pocas semanas después de recibir la segunda

¹⁰ Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. "Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse" *Nature* **1999**, *400*, 173-177.

inoculación de inmunoterapia.¹¹ Dichos ensayos fueron retomados a principios del 2005 una vez que los problemas de neuroinflamación surgidos fueron corregidos, pero los resultados no estarán disponibles hasta finales del 2007.

También, a mediados del año 2006 científicos del Instituto Metropolitano para la Neurociencia de Tokio presentaron prometedores resultados de una nueva vacuna ensayada sobre roedores, con la que se consiguió una importante disminución de los depósitos de placas neuríticas, sin la aparición de efectos neuroinflamativos colaterales, aunque hasta el momento no se han producido ensayos sobre humanos.¹²

Y por último, el Dr. Antón Álvarez del Centro de Investigación Biomédica EuroEspes en Bergondo (A Coruña) presentó en la X Conferencia Internacional sobre Alzheimer (Madrid, 15-20 Julio 2006) los importantes resultados obtenidos con el uso de un medicamento denominado Cere (Cerebrolysin) desarrollado a partir de proteínas cerebrales porcinas, con el que se observaron mejoras en los procesos de supervivencia de las neuronas (acción neurotrófica) e inhibición en las respuestas inflamatorias activadas durante la enfermedad (acción antiinflamatoria). Los resultados obtenidos abren una línea de investigación nueva en el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer, ya que hasta el momento no existían tratamientos neurotróficos que además de poseer actividad de crecimiento neuronal, bloquearan o redujeran de algún modo los potenciales efectos negativos de factores inflamatorios como el TNF-alfa (Factor de necrosis tumoral alfa).¹³

Un total de 251 pacientes de Alzheimer participaron durante 12 semanas en un ensayo de tratamiento con Cere y durante otras 12 sin el tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron que Cere reduce los niveles del factor TNF-alfa, de efectos inflamatorios, y aumenta los valores del factor IGF-I (Factor de crecimiento tipo insulina I), de efectos neurotróficos, en la sangre de los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

¹¹ a) Schenk, D. "Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning" *Nature Reviews Neuroscience* **2002**, 3, 824-828. b) Check, E. "Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug" *Nature* **2002**, 415, 462-462.

¹² Okura, Y.; Miyakoshi, A.; Kohyama, K.; Park I.-K.; Staufenbiel, M.; Matsumoto, Y. "Nonviral A β DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: Long-term effects and safety" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 9619-9634.

¹³ a) Álvarez, A.; Corzo, L.; Couceiro, V.; Sanpedro, C.; Cacabelos, R. "Cerebrolysin reduces the increased levels of serum tumor necrosis-alpha in Alzheimer's disease" *Alzheimer's and Dementia* **2006**, 2, 370. b) Álvarez, A.; Cacabelos, R.; Sanpedro, C.; Fantini, M. G.; Aleixandre, M. "Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease" *Neurobiology of Aging* **2006**, en prensa.

1.3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer.¹⁴

Tal como puso de manifiesto Alzheimer, la enfermedad presenta dos lesiones características, descritas como placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (Figura 4), que son responsables directas de la muerte neuronal asociada a la dolencia. Conocer cuál es su origen, dónde se localizan y cómo interactúan con las células nerviosas, provocándoles la muerte, son cuestiones de gran importancia a fin de entender el mecanismo de este proceso neurodegenerativo.

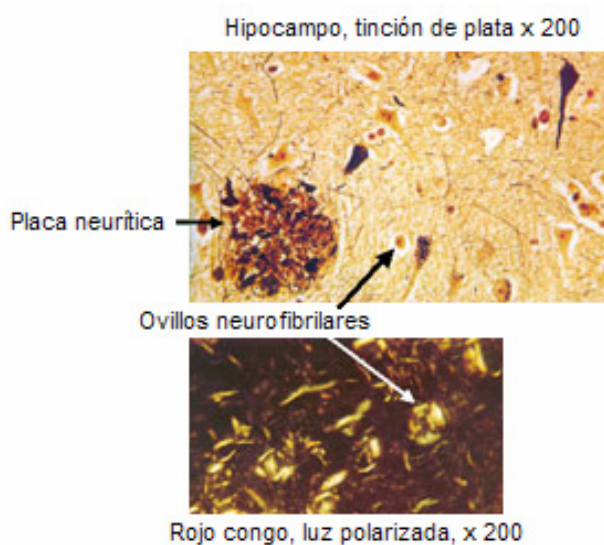


Figura 4: Detalle de las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer.

En los últimos 20 años se han clarificado muchos de los pasos implicados en el desarrollo de la enfermedad, pero los más significativos han sido la determinación de la composición de las lesiones, la identificación de cuatro genes que predisponen a los individuos hacia un desarrollo precoz de la enfermedad y el descubrimiento de nuevas enzimas que intervienen en los procesos de formación de los depósitos extracelulares.

¹⁴ Cacabelos, R. "Tratado de neurogeriatria. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Epidemiología y genética" 1999, Ed. Masson, Barcelona.

1.3.1. Placas neuríticas y ovillos neurofibrilares.¹⁵

Las placas neuríticas son lesiones esféricas extracelulares, constituidas mayoritariamente por depósitos extracelulares de la proteína β -amiloide ($A\beta$), de 40-42 aminoácidos, resultado de la ruptura proteolítica de una proteína transmembranal llamada proteína precursora amiloide (APP) por una serie de enzimas del tipo peptidasa comúnmente denominadas como secretasas (Figura 5).

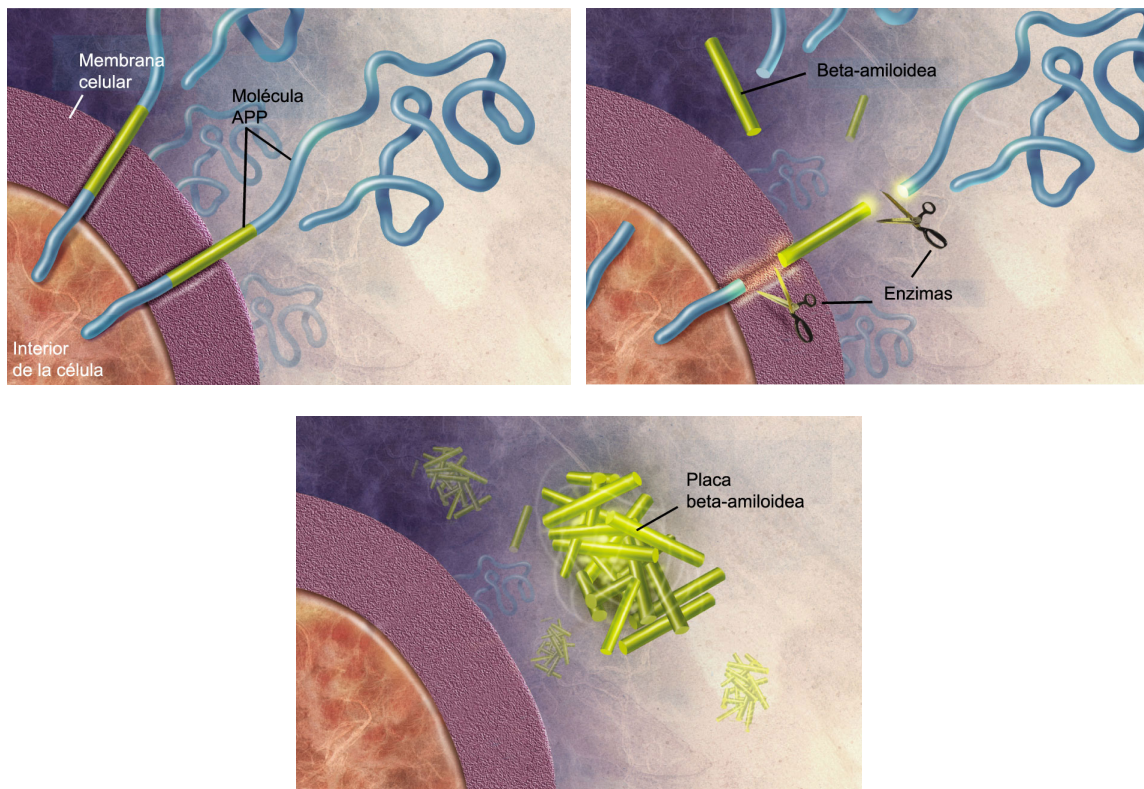


Figura 5: APP inmerso en membrana celular, acción de las enzimas y formación de una placa β -amiloide.¹⁶

La concentración plasmática de péptidos β -amiloides de 40 y 42 aminoácidos es mayor en pacientes con la enfermedad y en individuos que portan la mutación que implica un desarrollo temprano de ésta. Este papel potencial de las concentraciones plasmáticas de péptidos β -amiloides como marcadores de demencia

¹⁵ a) Sousa, S. L.; Franch, J. V.; Reglá, J. L. "Enfermedad de Alzheimer. Manual de demencias" 1996, 384-406, Ed. Prous Science, Barcelona. b) Potter, H.; Dressler, D. "The potential of BACE inhibitors for Alzheimer's therapy" *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 125-126.

¹⁶ www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/LaEnfermedaddeAlzheimer/default.htm; "La enfermedad de Alzheimer: Desentrañando el misterio" U.S. National Institute of Health.

incipiente avala la conveniencia de seguir realizando más investigaciones por esta vía.¹⁷

Las placas β -amiloideas están formadas por depósitos de proteínas β -amiloides agrupadas con la apolipoproteína E (ApoE) y otros tipos de proteoglicanos, en láminas β rodeadas de neuritas distróficas y componentes inflamatorios. Estos depósitos se entremezclan con los axones y dendritas de las neuronas, así como con células no nerviosas, como las microglías (encargadas de digerir células dañadas o sustancias extrañas susceptibles de producir inflamaciones) y astrocitos (células que sirven de soporte a las neuronas), impidiendo la realización del proceso sináptico y acumulándose sobre todo en la corteza cerebral y en el hipocampo.

No se conoce hasta el momento el mecanismo por el cual las proteínas β -amiloides se acumulan en forma de placas insolubles, y pese a que en un primer momento se postuló que una mayor expresión de ApoE4 (una de las tres isoformas en que se conoce a la proteína ApoE) era la responsable del desarrollo de la enfermedad, la aparición de individuos con exceso de esta proteína que no desarrollaron la demencia parece indicar que deben existir otras causas.

Por otra parte, los ovillos neurofibrilares son lesiones intraneuronales citoplasmáticas formadas por haces de filamentos apareados y helicoidales, los cuales pueden aparecer entremezclados con filamentos rectos. La subunidad proteica de estos ovillos es la proteína *tau*, que se localiza en los axones y está asociada a los microtúbulos, ya que es uno de los constituyentes del esqueleto interno de la neurona de función estabilizadora (Figura 6, pág. 14).

¹⁷ Van Oijen, M.; Hofman, A.; Soares, H. D.; Koudstaal, P. J.; Breteler, M. M. B. "Plasma β A₁₋₄₀ and β A₁₋₄₂ and the risk of dementia: a prospective case-cohort study" *The Lancet Neurology* **2006**, 5, 655-660.

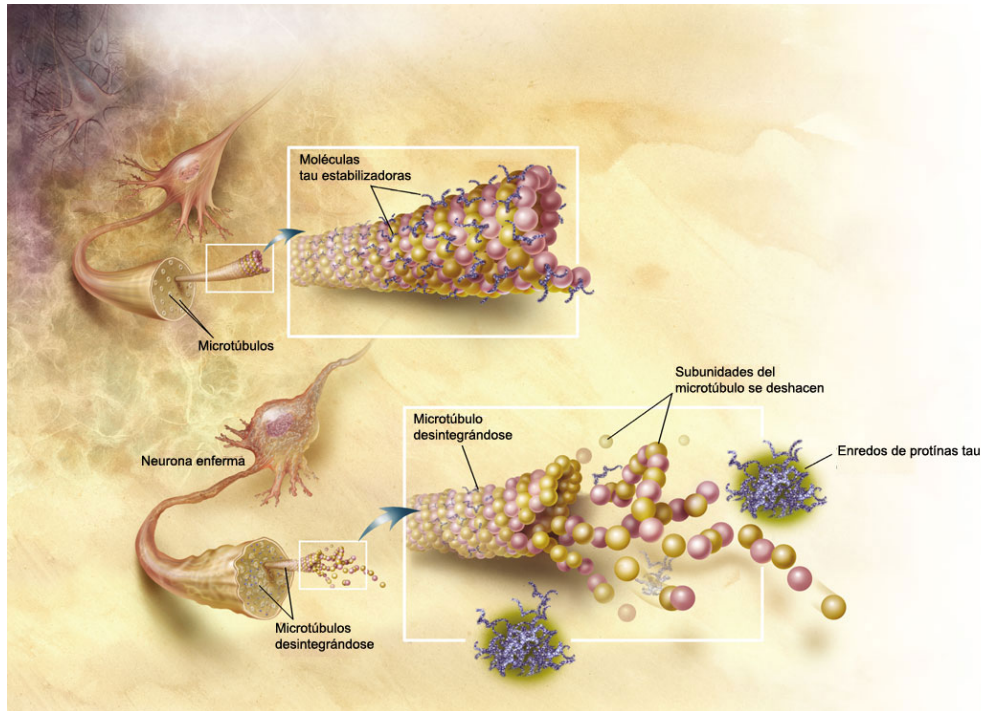


Figura 6: Formación de los ovillos neurofibrilares a partir de las proteínas tau constituyentes de los microtúbulos de las neuronas.

Estudios bioquímicos han puesto de manifiesto que la proteína *tau* encontrada en los ovillos neurofibrilares, así como en neuronas distróficas o en placas neuríticas, presenta una forma hiperfosforilada más insoluble que la forma normal, lo que favorece su acumulación. Aparece en gran cantidad en el cerebro de los enfermos, sobre todo en la corteza cerebral, hipocampo y en los lóbulos frontal, temporal y parietal (Figura 7).

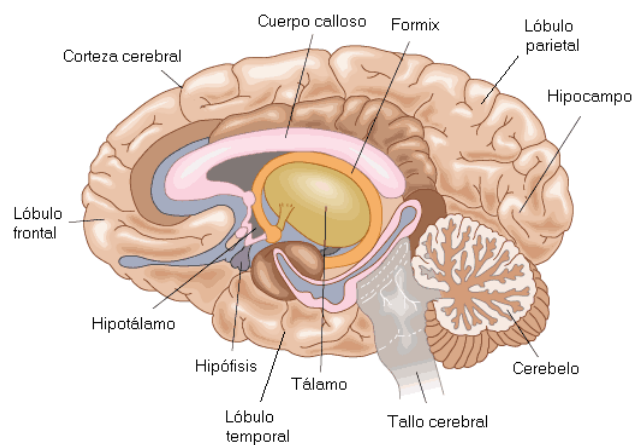


Figura 7: Corte transversal del encéfalo.¹⁸

¹⁸ <http://icarito.tercera.cl/icarito/2001/806/>; "Icarito enciclopedia escolar; sistema nervioso, el cerebro".

Estudios actuales tratan de resolver el mecanismo por el cual esta proteína se hiperfosforila, con el objetivo de inhibir la enzima que la lleva a cabo y detener el proceso de generación de ovillos neurofibrilares.

Aunque estas dos lesiones clásicas pueden aparecer independientemente una de otra, existen evidencias crecientes de que la formación de los ovillos atiende a una respuesta celular a la acumulación cerebral de proteínas A β y otras proteínas asociadas.

1.3.2. Genética de la enfermedad.¹⁹

Un 10% de los casos de Alzheimer se desarrollan en edades comprendidas entre los 30 y 60 años. Éstos y hasta un 50% de los casos restantes han hecho notoria la existencia de una base genética de carácter hereditario en la manifestación de la enfermedad. Esta base radica en mutaciones asociadas a cuatro genes, identificados mediante genética molecular:

- gen de la proteína precursora amiloide (APP), en el cromosoma 21;
- gen de la apolipoproteína E (ApoE), en el cromosoma 19;
- gen de la presenilina 1, en el cromosoma 14;
- gen de la presenilina 2, en el cromosoma 1.

Las mutaciones en los cromosomas 1, 14 y 21 están directamente relacionadas con el desarrollo temprano de la enfermedad, mientras que la mutación del cromosoma 19 incrementa el riesgo de padecer la enfermedad a edades más avanzadas.

a) Gen de la APP:

Codifica para la proteína APP, proteína transmembranal de 770 aminoácidos presente en las dendritas, los cuerpos celulares y los axones de las neuronas, cuya acción neuronal es todavía una incógnita. La APP es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, glicosilada en el aparato de Golgi y liberada en la membrana como una proteína transmembranal, quedando la porción 613-671, que contiene el fragmento β -amiloide, parcialmente incluida en la membrana. La acción proteolítica de ciertas enzimas sobre la porción extracelular de la misma da lugar a varios fragmentos proteicos solubles e inoos, así como al fragmento A β ₄₂, insoluble y neurotóxico.

¹⁹ Selkoe, D. J. "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's Disease" *Nature* 1999, 399 (supp), A23-A31.

Estudios genéticos han identificado varias mutaciones en este gen asociadas con la manifestación temprana y hereditaria de la enfermedad de Alzheimer, mostrando también que estas alteraciones en la secuencia de bases daban lugar a cambios en los grupos de aminoácidos de la proteína APP implicados directamente en el proceso proteolítico de formación del péptido patológico $A\beta_{42}$.

Una de las mutaciones más frecuente y perjudicial asociada al desarrollo temprano y familiar de la enfermedad de Alzheimer es la mutación sueca (swedish mutation), en la que se cambian los residuos de Lys⁶⁷⁰ y Met⁶⁷¹ (K y M) de la proteína de APP nativa por Asn y Leu (N y L) de la proteína de APP mutada (Figura 8).

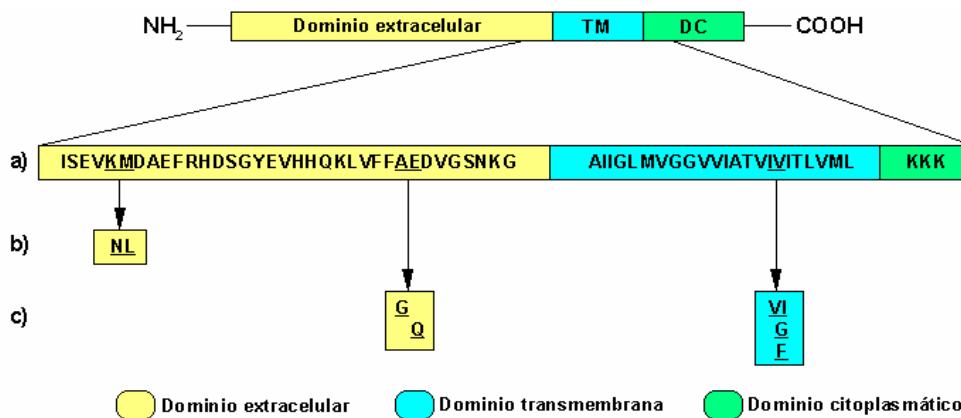


Figura 8: Dominio estructural de la APP humana, a) secuencia de aminoácidos sin mutar, b) localización de la mutación sueca, c) otras mutaciones.

b) Gen de la ApoE:

El gen de la ApoE puede presentar en humanos tres formas alélicas distintas:

- *Alelo ϵ_2* : es la variante menos común. Presenta una mayor incidencia en individuos longevos, mientras que su frecuencia se ve reducida en personas afectadas de Alzheimer, lo que sugiere que tiene un efecto preventivo contra la enfermedad.

- *Alelo ϵ_3* : es la forma alélica más común, presente en el 60% de los humanos.

- *Alelo ϵ_4* : su presencia es intermedia entre ϵ_2 y ϵ_3 , y está asociado con el incremento del riesgo de padecer la variante tardía de la enfermedad de Alzheimer. Aquellos individuos que presentan dos copias de este gen tienen un mayor riesgo que aquellos que sólo tienen una. A diferencia de lo que sucede con las mutaciones, el alelo ϵ_4 no es determinante para el desarrollo de la enfermedad. Se especula con que interfiera en los procesos de eliminación del péptido $A\beta_{42}$, dando lugar a acumulaciones de éste en el espacio extracelular.

c) Genes de las presenilinas 1 y 2:

El gen de la presenilina 1 está relacionado con una manifestación muy agresiva de la enfermedad. Por su parte, el de la presenilina 2, estructuralmente similar, incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Las presenilinas son proteínas que forman parte del complejo enzimático γ -secretasa cuya importante actividad en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer veremos a continuación.

1.4. Procesado biológico de la APP: las enzimas secretasas.²⁰

La APP es una de las muchas proteínas asociadas a las membranas celulares y se clasifica dentro del grupo de las proteínas transmembranales Tipo I, dado que atraviesa la membrana celular de lado a lado. Posee una región de aproximadamente 23 residuos hidrofóbicos cercana a su extremo carboxi terminal, que le permite anclarse a las membranas tanto de las células como de los orgánulos citoplasmáticos de las mismas, como son el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y los endosomas. Es durante su transporte hacia la membrana celular cuando la molécula de APP sufre rupturas proteolíticas específicas que la degradan en péptidos de distintos tamaños, que posteriormente serán secretados. Estos cortes son llevados a cabo por determinadas enzimas denominadas genéricamente secretasas.

Se conocen tres secretasas relacionadas con el proceso de degradación de la APP: α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa. Su acción difiere en la elección de los puntos proteolíticos en que degradan a la APP (variando así los péptidos que generan).

- **α -secretasa:**

La ruptura más habitual que sufre la APP es llevada a cabo por esta enzima y tiene lugar entre los aminoácidos 16 y 17 de la región A β , a 12 residuos del dominio transmembranal.

Esta proteasa da lugar a un fragmento largo y soluble (sAPP- α), que se libera al lumen desde la membrana celular, así como a una segunda fracción de 83 aminoácidos, denominada C83 por contener el extremo carboxi terminal, que queda retenida en la membrana celular (Figura 9, pág. 18).

²⁰ Selkoe, D. J. "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's Disease" *Nature* 1999, 399 (supp), A23-A31.

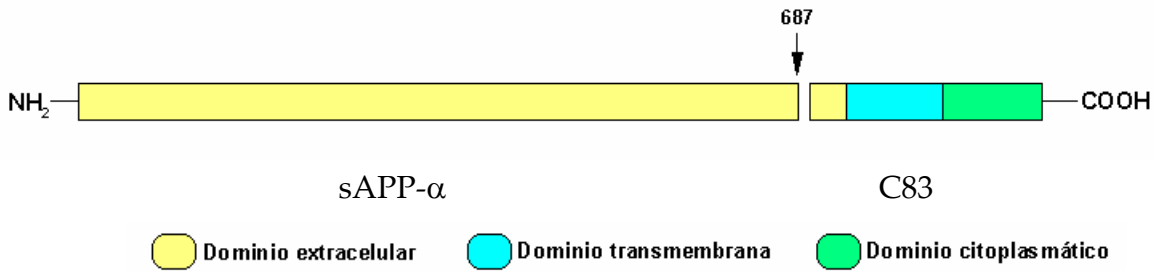


Figura 9: Metabolitos derivados de la acción de la α -secretasa sobre la APP.

Las α -secretasas se cree que son proteasas ancladas a la membrana celular, capaces de degradar múltiples proteínas transmembranales, y parece que cortan la APP a una distancia específica de la superficie celular, al tiempo que muestran una baja especificidad de secuencia.

Se cree que esta enzima previene la formación del péptido $A\beta$, por lo que su activación debería tener efectos beneficiosos para los enfermos; sin embargo, las sustancias conocidas activadoras de la proteína quinasa C, que activa la acción de esta secretasa, promueven la formación de tumores. En la actualidad se buscan nuevos activadores de la proteína quinasa C que no favorezcan este desarrollo tumoral.

En la mayoría de las células sólo una pequeña parte del total de APP producido es degradado por la α -secretasa, por lo que una gran cantidad de este péptido puede experimentar rupturas alternativas como las que a continuación se exponen.

- **γ -secretasa:²¹**

Las enzimas comúnmente denominadas γ -secretasas son una familia de complejos enzimáticos en los que puede variar alguna de las subunidades proteicas que lo forman. Por lo general contienen una unidad de presenilina (en la que las mutaciones provocan un aumento en la actividad de la enzima en el procesado de APP), una unidad de nicastrina, de PEN-2 (PS-enhancer o activador de presenilina) y de APH-1 (anterior pharynx-defective phenotype), cuyas funciones en la enzima no están del todo claras hasta el momento, aunque se sabe que la γ -secretasa tiene la importante función de llevar a cabo la hidrólisis de la proteína Notch, clave en el destino de las células durante el desarrollo embrionario (Figura 10, pág. 19).

²¹ Hass, C. "Take five-BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation" *The EMBO Journal* **2004**, 23, 483-488.

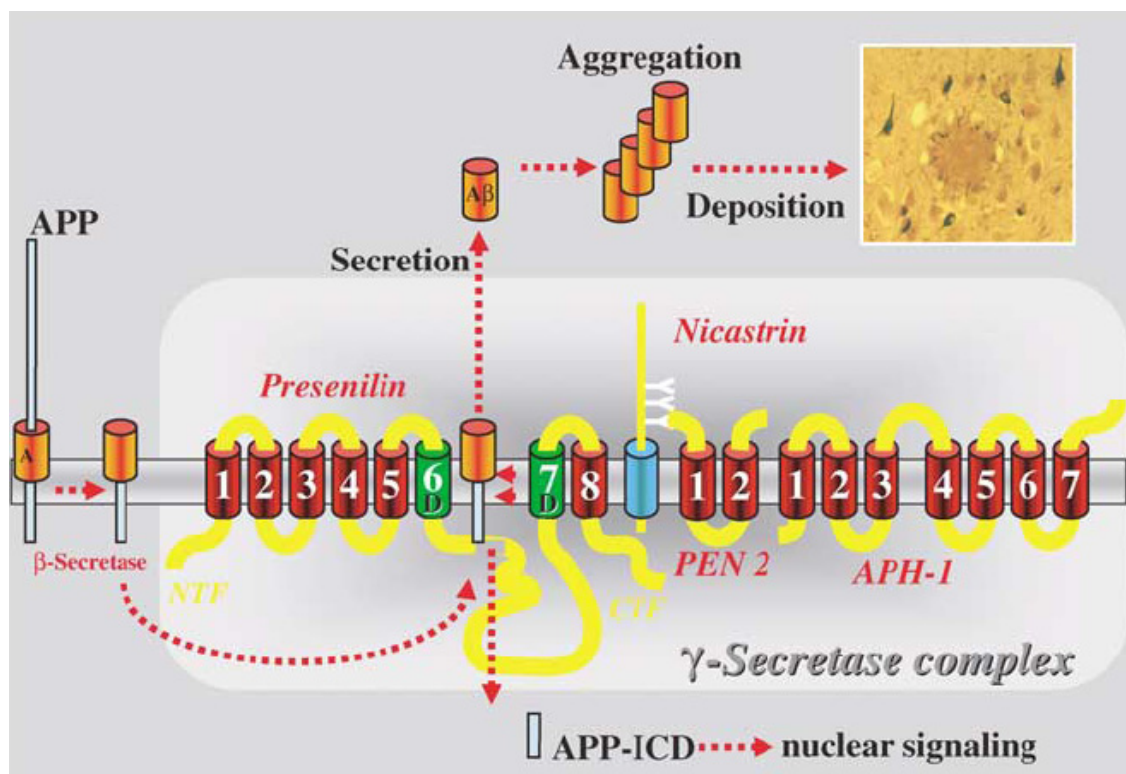


Figura 10: Representación del complejo enzimático γ -secretasa y acción proteolítica sobre el fragmento de APP tras la hidrólisis de la β -secretasa.

Estas enzimas llevan a cabo varias roturas hidrolíticas sobre fragmentos de APP procesados por otras enzimas. Por un lado realizan su acción sobre el fragmento C83, que queda insertado en la membrana celular después de la degradación llevada a cabo por la α -secretasa. Dan lugar a un fragmento pequeño llamado p3, cuyo extremo amino terminal es generado por la ruptura llevada a cabo por la α -secretasa, mientras que su extremo carboxi terminal se origina en la degradación efectuada por la γ -secretasa (Figura 11).

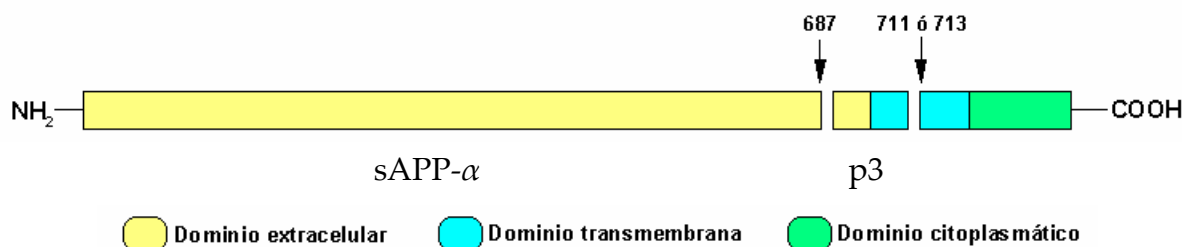


Figura 11: Metabolitos derivados de la acción de la α -secretasa y γ -secretasa sobre la APP.

Las γ -secretasas también actúan sobre un fragmento de 99 residuos, C99, resultado de la degradación de la APP por un nuevo tipo de enzima: la β -secretasa

(Figura 12, pág. 21). Esta acción conjunta de ambas enzimas, β - y γ -secretasa, se expone a continuación.

- **β -secretasa:**

Las enzimas vistas hasta ahora, si bien realizan procesos proteolíticos sobre la APP, ninguna de ellas, ni por separado ni teniendo en cuenta su acción conjunta, da lugar a la formación de los depósitos de péptido $A\beta_{42}$. Es presumible, por lo tanto, la presencia de una tercera enzima: la β -secretasa.

Numerosas enzimas, tales como la catepsina D o la metaloendopeptidasa, fueron aisladas como potenciales β -secretasas responsables de la formación del péptido $A\beta_{42}$, pero ninguna de ellas pasó el test al que fueron sometidas, dado que no degradaban la APP en la posición requerida para la formación de dicho péptido neuropatológico. Varios estudios sobre cultivos celulares permitieron establecer las características mínimas que la enzima buscada debía tener:

- Debía degradar específicamente la APP entre los aminoácidos Met⁶⁷¹-Asp⁶⁷² para generar un péptido soluble, sAPP- β similar al producido por la α -secretasa.

- Debía mostrar preferencia proteolítica en la posición de lisis, por la variante sueca de la APP frente a la forma común.

- Su actividad óptima debía desarrollarse a pH ácido.

- Debía estar presente en mayores cantidades en los tejidos neuronales.

El grupo de investigación encabezado por R. Vassar²² consiguió aislar una nueva proteína del tipo de las aspartilproteasas que cumplía con todas las características anteriormente expuestas, que denominaron BACE (β -site APP-cleaving enzyme). En concreto, los puntos que establecieron su validez como β -secretasa fueron los siguientes:

- La enzima degradaba la APP entre Met⁶⁷¹-Asp⁶⁷²

- Se localizaba intracelularmente en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi y en los endosomas, donde se había visto que tenía lugar el procesado de la APP.

- Mostraba el máximo de su actividad a un valor de pH óptimo de 4.5.

²² Vassar, R.; Bennet, B. D.; Khan, S. B.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fischer, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. " β -Secretase cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the transmembrane aspartic protease BACE" *Science* **1999**, 286, 735-741.

- Era una proteína transmembranal Tipo I con un dominio amino terminal dirigido hacia el lumen de la célula, en el que se localizaban dos dominios que conformaban el sitio activo característico de las aspartilproteasas, teniendo así la orientación topológica necesaria para poder degradar la APP en la posición β , entre los aminoácidos Met⁶⁷¹-Asp⁶⁷².

- Presentaba una mayor afinidad por la variante sueca de la APP frente a la forma común, incrementando entre cinco y seis veces la producción de A β ₄₂.

Tal y como se dijo anteriormente, para la producción de A β ₄₂, es necesaria la acción de dos enzimas: la β -secretasa y la γ -secretasa. La β -secretasa actúa en primer lugar produciendo un fragmento soluble amino terminal denominado sAPP- β y otro de menor tamaño denominado C99, de 99 residuos, que queda unido a la membrana celular. Es sobre este péptido integrado en la membrana sobre el que actúa la γ -secretasa, dando lugar finalmente al fragmento A β ₄₂, cuya acumulación extracelular desencadena una cascada neurotóxica y neuroinflamatoria causante de la muerte neuronal (Figura 12).

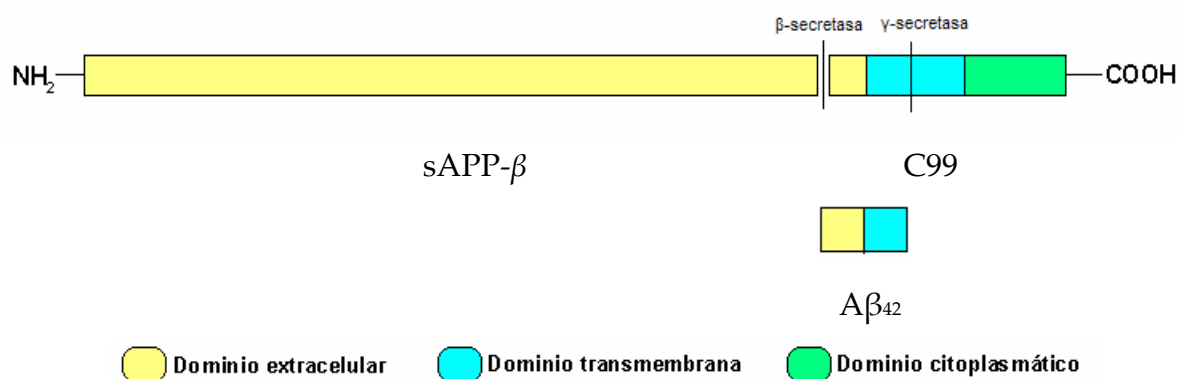
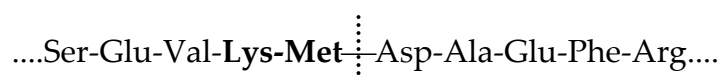


Figura 12: Metabolitos derivados de la acción de la β -secretasa y γ -secretasa sobre la APP.

Diversos estudios celulares han puesto de manifiesto que la β -secretasa es la enzima clave en la producción del péptido de 42 residuos, ya que mutaciones realizadas en la proteína APP sobre la posición de degradación γ no afectan a la producción del péptido insoluble, mientras que mutaciones en la posición de ruptura β dan lugar a un incremento de esta producción.

La secuencia de aminoácidos de la APP común en el sitio de β -degradación es la siguiente:



Si se cambian los aminoácidos Lys y Met propios de la variante nativa de la APP por Asn y Leu de la mutación sueca, se produce el aumento de producción del fragmento $A\beta_{42}$ anteriormente mencionado. Por otra parte, la sustitución de los aminoácidos de estas posiciones por otros distintos de los nativos o de la mutación sueca da lugar a la supresión de la producción de $A\beta_{42}$, por inhibición de la ruptura de la APP por la β -secretasa.

Asimismo, los cambios anteriores demostraron que las mutaciones sobre la APP afectan al balance de productos derivados de las rupturas β -secretasa/ γ -secretasa y α -secretasa/ γ -secretasa, lo que origina un incremento de la producción de $A\beta_{42}$ y la consecuente acumulación patogénica.

Aparte de la producción del péptido β -amiloide, el papel fisiológico de la β -secretasa no estaba claro hasta hace poco y este desconocimiento hacía peligrosa la utilización de inhibidores de su actividad para el tratamiento de la enfermedad. Mediante estudios con ratones modificados genéticamente para que no expresasen el gen de la β -secretasa, se determinó que la presencia de la enzima era fundamental para llevar a cabo procesos de desarrollo sináptico, cognitivo y emocional.²³

Posteriormente, se determinó que la acción principal de la β -secretasa en el organismo es la de llevar a cabo la mielinización y el envolvimiento axonal por las células de Schwann, muy probablemente vía procesado de la neuregulina 1.²⁴ Por lo tanto, la inhibición de esta enzima puede interferir en el desarrollo celular de la glía (célula de función estructural y reparadora de lesiones del sistema nervioso) y de la mielinización.

²³ a) Roberds, S. L.; Anderson, J.; Basi, G.; Bienkowski, M. J.; Branstetter, D. G.; Chen, K. S.; Freedman, S. B.; Frigon, N. L.; Games, D.; Hu, K.; Wood, K. J.; Kappenman, K. E.; Kawabe, T. T.; Kola, I.; Kuehn, R.; Lee, M.; Liu, W.; Motter, R.; Nichols, N. F.; Power, M.; Robertson, D. W.; Schenk, D.; Schoor, M.; Shopp, G. M.; Shuck, M. E.; Sinha, S.; Svensson, K. A.; Tatsuno, G.; Tintruo, H.; Wijsman, J.; Wright, S.; McConlogue, L. "BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics" *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1317-1324. b) Luo, Y.; Bolon, B.; Kahn, S.; Bennett, B. D.; Khan, S. B.; Denis, P.; Fan, W.; Kha, H.; Zhang, J.; Gong, Y.; Martin, L.; Louis, J. C.; Yan, Q.; Richards, W. G.; Citron, M.; Vassar, R. "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation" *Nature Neurosci.* **2001**, *4*, 231-232. c) Laird, F. M.; Cai, H.; Savonenko, A. V.; Farah, M. H.; He, K.; Melnikova, T.; Wen, H.; Chiang, H. C.; Xu, G.; Koliatsos, V. E.; Borchelt, D. R.; Price, D. L.; Lee H. K.; Wong, P. C. "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions" *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11693-11709.

²⁴ Willem, M.; Garratt, A. N.; Novak, B.; Citron, M.; Kaufmann, S.; Rittger, A.; DeStrooper, B.; Saftig, P.; Birchmeier, C.; Haass, C. "Control of peripheral nerve myelination by the β -Secretase BACE1" *Science* **2006**, *281*, 1438-1441.

1.5. Características funcionales y estructurales de la β -secretasa.

La β -secretasa es una enzima clasificada dentro del grupo de las aspartilproteasas, aunque no presenta demasiadas analogías en su secuencia de aminoácidos con respecto a las demás componentes del mismo (menos del 30% con la pepsina humana), siendo mayores las divergencias en los extremos amino y carboxi terminal. En las investigaciones mediante las cuales se trataba de ratificar su existencia y su implicación en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, se descubrió otra enzima, la BACE2, de la cual se sabe que procesa la APP en el centro del dominio $A\beta$, lo que significa que no genera el péptido neurotóxico $A\beta_{42}$. Su presencia en el sistema nervioso central es significativamente menor que la de la β -secretasa (o BACE1), aunque es mayor en tejidos periféricos, páncreas, placenta y estómago.²⁵ Sin embargo, no se conoce hasta el momento la actividad biológica de esta enzima. La BACE2 y la β -secretasa forman una nueva familia de aspartilproteasas transmembranales de relación bastante cercana a las que integran la familia de la pepsina. Dentro del grupo de las aspartilproteasas también se encuentran enzimas retrovirales homodímeras como son la del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o la del Virus del Sarcoma de Rous (VSR) (Figura 13).²⁶

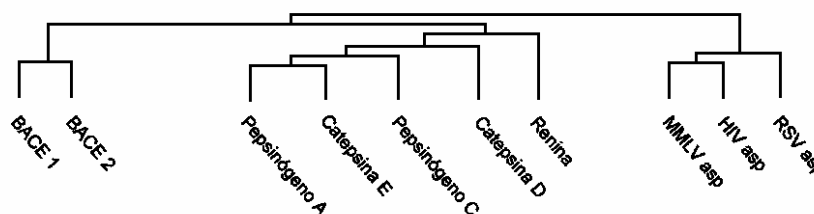


Figura 13: Árbol de evolución que muestra la relación entre BACE1, BACE2 y otras aspartil proteasas.

²⁵ a) Hussain, I.; Powell, D. J.; Howlett, D. R.; Chapman, G. A.; Gilmour, L.; Murdock, P. R.; Tew, D. G.; Meek, T. D.; Chapman, C.; Schneider, K.; Ratcliffe, S. J.; Tattersall, D.; Testa T. T.; Southan, C.; Ryan, D. M.; Simmons, D. L.; Walsh, F. S.; Dingwall, C.; Christie G. "ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the β -secretase site" *Mol. Cell. Neurosci.* **2000**, *14*, 419–427. b) Turner, R. T.; Loy, J. A.; Nguyen, C.; Devasamudram, T.; Ghosh, A. K.; Koelsch, G.; Tang, J. "Specificity of Memapsin 1 and its implications on the design of Memapsin 2 (β -secretase) inhibitor selectivity" *Biochemistry* **2002**, *42*, 8742-8746. c) Fluhrer, R.; Capell, A.; Westmeyer, G.; Willem, M.; Hartung, B.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B.; Haass, C.; Walter, J. "A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway" *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 1011–1020.

²⁶ Vassar, R.; Citron, M. " $A\beta$ -generation enzymes: recent advances in β - and γ -secretase research" *Neuron* **2000**, *27*, 419-422.

A pesar de la baja analogía en la secuencia y de que su actividad no sea inhibida por la pepstatina (inhibidor general de todas las aspartilproteasas²⁷), la β -secretasa cumple con dos puntos característicos y primordiales de las enzimas pertenecientes a este grupo, lo que justifica su clasificación en el mismo:

- Presenta un óptimo de actividad a pH ácido a un valor de 4.5.

- Presenta dos dominios que conforman el sitio activo, ambos con una elevada conservación de la secuencia respecto de las demás aspartilproteasas, las cuales tienen en cada uno de estos dominios un residuo Asp esencial en la actividad catalítica.

1.5.1. Estructura primaria.

La secuencia peptídica de la β -secretasa humana fue dilucidada por R. Vassar²⁸ y casi al mismo tiempo por J. Tang²⁹ (Figura 14, pág. 25). Consta de 501 aminoácidos, conteniendo un péptido señal de 21 aminoácidos en el extremo amino terminal, seguido de un dominio pro-proteína que se extiende desde el aminoácido 22 al 45. El dominio luminal (extracelular) de la proteína madura abarca desde el aminoácido 46 al 460, al que le sigue un dominio transmembranal de 17 residuos y finalmente el extremo carboxi terminal, constituido por 24 aminoácidos. En base a los distintos dominios que presenta y a la localización del sitio activo, se clasificó como proteína transmembrana Tipo I (igual que la APP).

El sitio activo anteriormente mencionado, característico de todas las aspartilproteasas, se localiza en la β -secretasa humana en las posiciones 93 a 95 y 289 a 291, respectivamente. Ambos están localizados en el dominio luminal, tal como se esperaría para poder actuar sobre el lugar de ruptura β de la APP. La secuencia de aminoácidos en la primera de las tríadas catalíticas (residuos 93 a 95) es Asp-Thr-Gly (D-T-G), totalmente coincidente con la de aspartilproteasas como la pepsina o la renina, mientras que la secuencia en la segunda tríada (residuos 289 a 291) es Asp-

²⁷ Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishima, H.; Matsuzaki, M.; Hamada, M. "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes" *J. Antibiot.* **1970**, 23, 259-262.

²⁸ Vassar, R.; Bennet, B. D.; Khan, S. B.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fischer, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. " β -Secretase cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the transmembrane aspartic protease BACE" *Science* **1999**, 286, 735-741.

²⁹ Tang, J.; Lin, X.; Koelsch, G.; Wu, S. "Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein" *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 4, 1456-1460.

Ser-Gly (D-S-G), en la que se cambia el residuo de Thr, habitual en las otras proteasas, por uno de Ser.

```

1 MAQALPWL LLMGAGVLP AHG TQHGIRLPLRSGLGGAPLGLRLPR ETDEE
51 PEEPGRRG SFVEMVDNLRGKSG QGYVEMTVGSPPTLNILV DTC SSNFA
101 VGAAPHPFLHRY YQRQLSSTYRDLRKGVYVPYTQ GKWEGELGTDLVSIPH
151 GP N VTVRANEIAAITESDKFFI N GSNWEGILGLYAEIARPDDSLPPFFDS
201 LVKQTHV PNLFLSLQL C GAGFP L N QSEVLASVGGSMIIGGIDHSLYTGSLW
251 YTPIRREWY YEVIIVRVEINGQDLKMD C KEYNYDKSIV DSG TTNLRRLPKK
301 VFEAAVKS IKAASSTEFKFPDGF WLGEQLVC WQAGTTPWNIFPVISLYLMG
351 EVT N QSFRTILPQQYL RPVEDVATSQDDC YKFAISQSSTGTVMGAVIME
401 GFYVVFDRARKRIGFAVSA CHVHDEFRTAAVEGPFVTLDMEDC GYNIPQT
451 DESTLMTIAY VMAAICALFMLPLCLMV CQWRCLRCLRQQHDDFADDISLL
501 X

```

#: Extremo N-terminal; #: Dominio pro-proteína; #: Dominio activo característico de las proteasas aspárticas; #: Dominio transmembrana; #: Punto N-glicosilado #: Residuos de cisteína de la zona luminal; #: Extremo C-terminal.

Figura 14: Secuencia de aminoácidos deducida para la β -secretasa humana. (Depositada en el GenBank, n^o de acceso AF190725).

La β -secretasa contiene también en el dominio luminal de su secuencia cuatro residuos N-glicosilados, que corresponden a residuos de Asn, así como seis residuos de Cys que permiten la formación de tres puentes disulfuro.

1.5.2. Estructura terciaria: sitio activo e inhibidores.

La estructura terciaria de la enzima β -secretasa (depositada en el Protein Data Bank),³⁰ se pudo obtener por primera vez a partir de la cristalización de un complejo de ésta con el inhibidor OM99-2 desarrollado por J. Tang (Figura 15, pág. 26).³¹ Este inhibidor, junto al OM99-1, fueron dos de los primeros inhibidores surgidos para la β -secretasa,³² cuyas altas constantes de inhibición (9.58 ± 2.86 y 6.48 ± 2.72 nM respectivamente) hacen que todavía sean considerados como inhibidores de referencia a la hora de estudiar nuevas estructuras.

³⁰ Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, N. I.; Bourne, P. E. "The Protein Data Bank" *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242. <<http://www.rcsb.org/pdb>>.

³¹ PDB ID: 1FKN. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. "Structure of the protease domain of Memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor" *Science* **2000**, *290*, 150-153.

³² Ghosh, A. K.; Shin, D.; Downs, D.; Koelsch, G.; Lin, X.; Ermolieff, J.; Tang, J. "Design of potent inhibitors for human brain Memapsin 2 (β -secretase)" *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3522-3523.

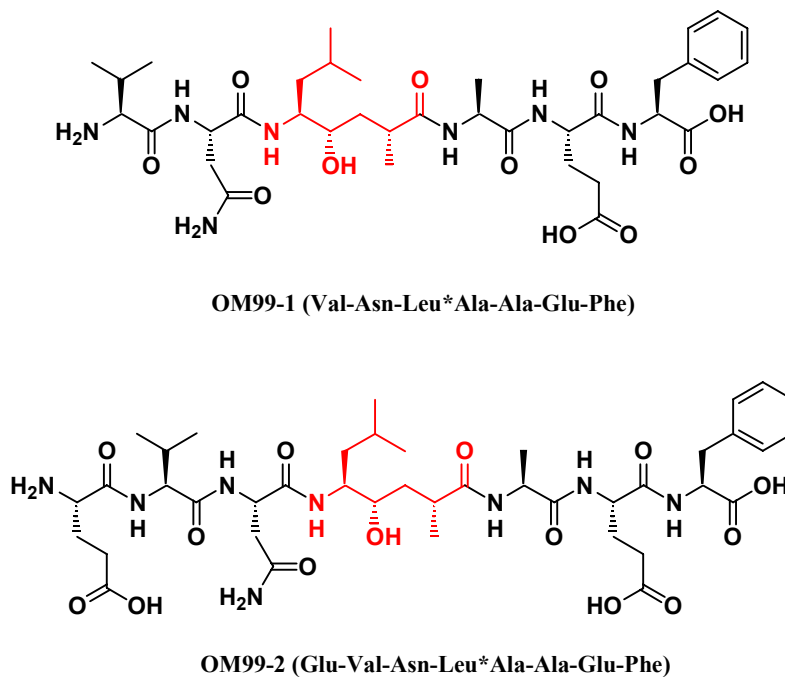


Figura 15: Estructura de los inhibidores OM99-1 y OM99-2.

Se tratan de dos inhibidores de tipo pseudopeptídico, esto es, formados por α -aminoácidos naturales unidos a un fragmento central de origen sintético, denominado isótero (en rojo), que mimetiza una secuencia de dos aminoácidos, en la que el enlace peptídico central ha sido sustituido por una secuencia no hidrolizable. Cuando un isótero reemplaza en una cadena peptídica un par de aminoácidos donde una aspartilproteasa lleva a cabo su acción, resulta un inhibidor que al disponerse en el sitio activo de la enzima, impide que tenga lugar su acción hidrolítica, desactivándola.

Dada la gran cantidad de aspartilproteasas descubiertas en los últimos años, con un importante papel en el desarrollo ciertas enfermedades (renina, problemas cardíacos; pepsina, problemas gástricos; proteasa del VIH, desarrollo del SIDA, etc.), la investigación en el campo de los inhibidores pseudopeptídicos para el tratamiento de dichos problemas ha experimentado un notable auge. La gran variedad de isóteros desarrollados, así como de derivados peptídicos que han demostrado tener capacidad para inhibir el sitio activo de aspartilproteasas, hace necesario establecer un sistema de clasificación de los isóteros que los agrupe en función de algún motivo estructural común (Figura 16, pág. 27).³³

³³ Yang, W.; Lu, W.; Lu, Y.; Zhong, M.; Sun, J.; Thomas, A. E.; Wilkinson, J. M.; Fucini, R. V.; Lam, M.; Randal, M.; Shi, X. P.; Jacobs, J. W.; McDowell, R. S.; Gordon, E. M.; Ballinger, M. D. "Aminoethylenes: A tetrahedral intermediate isostere yielding potent inhibitors of the aspartyl protease BACE-1" *J. Med. Chem.* **2005**, *49*, 839-842.

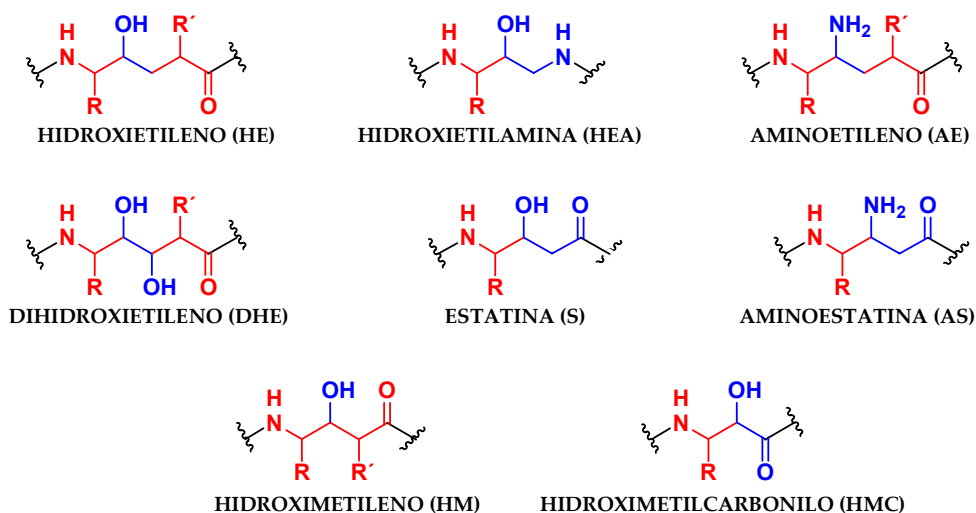


Figura 16: Clasificación de los isómeros de inhibidores de aspartilproteasas. En azul el motivo estructural del isómero que determina su clasificación.

Así, además de variar la naturaleza de los sustituyentes alquílicos R y R' que provienen del par de aminoácidos que el isómero sustituye, también es posible variar la estructura del motivo central, pudiendo ser de tipo etilénico o metilénico mono- o disustituido. Se constituyen así ocho grandes grupos de isómeros de inhibidores de aspartilproteasas, en cada uno de los cuales se pueden encontrar diferencias notables en función de los sustituyentes que acompañen al motivo central con el cual se nombran. Así por ejemplo, en la Figura 17 se incluyen tres inhibidores con isómeros de hidroxietileno en los que se pueden apreciar las diferencias a que nos referimos.

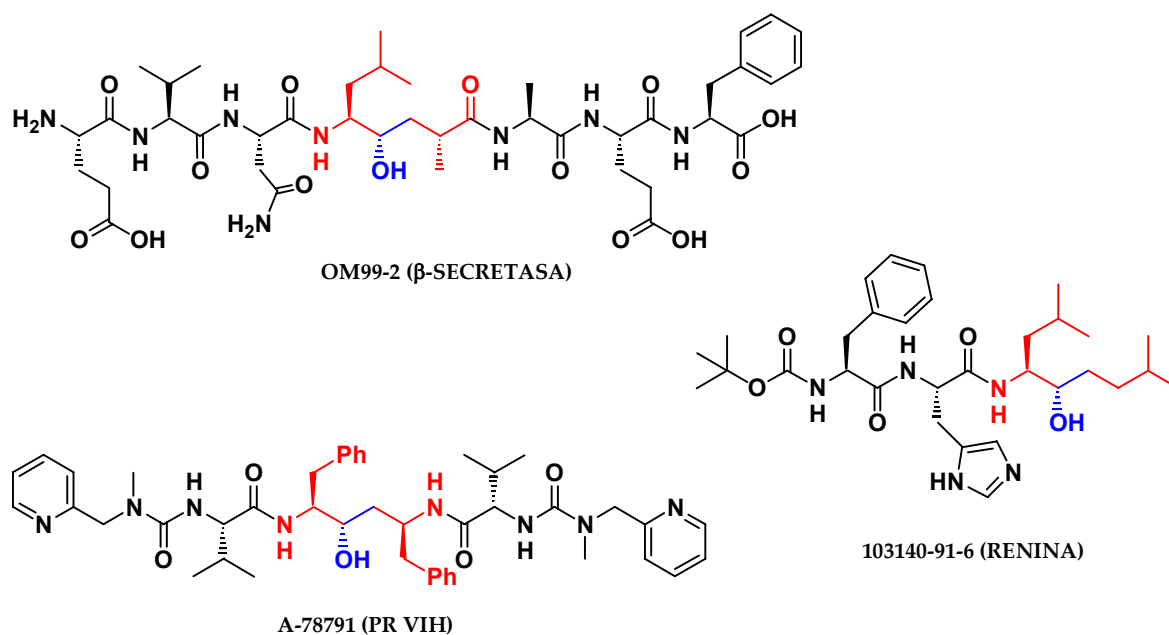


Figura 17: Tres ejemplos de inhibidores con isómeros de hidroxietileno. Entre paréntesis se indica la enzima a la que inhiben.

El inhibidor **OM99-2** incluye un isómero de hidroxietileno con la estructura más común, en la que un grupo amino en su extremo izquierdo y un grupo carboxilo en su derecho hacen que la unión de los aminoácidos laterales siga el mismo sentido que en un péptido natural. Sin embargo, el inhibidor **A-78791**³⁴ contiene un isómero de hidroxietileno en el que son dos grupos amino los que se encuentran en sus extremos, provocando que las dos cadenas peptídicas laterales a las que está unido tengan sentidos de avance contrarios. Por último, el inhibidor **103140-91-6**³⁵ contiene un isómero de hidroxietileno con sólo un grupo amino en su extremo, lo que implica que únicamente está unido a una cadena polipeptídica lateral. Se generan así inhibidores en los que el isómero está dispuesto en el extremo de la molécula.

En la Figura 18 (pág. 29) se representan los tres posibles mecanismos que se proponen para la hidrólisis de un péptido en el sitio activo de una aspartilproteasa.³⁶ El mecanismo tipo I es el más consistente, describiendo un proceso ácido-base donde el agua actúa como nucleófilo, atacando al carbonilo del enlace peptídico. El Asp desprotonado actúa como base, para abstraerle un protón a la molécula de agua y el Asp protonado actúa como ácido, protonando el oxígeno carbonílico e incrementando la carga parcial positiva sobre el carbono, que lo activa frente al ataque nucleofílico. Se origina así un estado de transición tetraédrico debido a la unión del hidroxilo del agua al carbono carbonílico, el cual evoluciona produciendo la rotura del enlace peptídico y restableciendo los protones en los dos residuos de Asp para poder llevar a cabo la hidrólisis de otro sustrato nuevo. El mecanismo tipo II es similar al tipo I, con la diferencia de que la unidad de Asp protonada cede el protón al grupo amino del enlace a hidrolizar, en lugar de cedérselo al carbonilo. Se forma así un intermedio zwitteriónico que evoluciona a continuación rompiendo el enlace peptídico. Y el mecanismo tipo III se basa en la formación de una unión covalente entre el Asp desprotonado del sitio activo y el carbonilo del péptido, obteniéndose un intermedio tetraédrico que evoluciona por rotura del enlace peptídico, liberando a continuación el fragmento unido a la enzima, por hidrólisis con la molécula de agua.

³⁴ Hosur, M. V.; Bhat, T. N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T.; Liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. "Influence of stereochemistry on activity and binding modes for C2 symmetry-based diol inhibitors of HIV-1 protease" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 847-855.

³⁵ Luly, J. R.; Yi, N.; Soderquist, J.; Stein, H.; Cohen, J.; Perun, T. J.; Plattner, J. J. "New inhibitors of human renin that contain novel Leu-Val replacements" *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1609-1616.

³⁶ a) Chatfield, D. C.; Brooks, B. R. "HIV-1 protease cleavage mechanism elucidated with molecular dynamics simulation" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5561-5572. b) Oldziej, S.; Ciarkowski, J. "Mechanism of action of aspartic proteinases: application of transition-state analogue theory" *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 583-588. c) Bugg, T. "An introduction to enzyme and coenzyme chemistry. Cap. 5. Hydrolytic and group transfer reactions" pág. 73, 1997, Ed. Blackwell Science, Oxford.

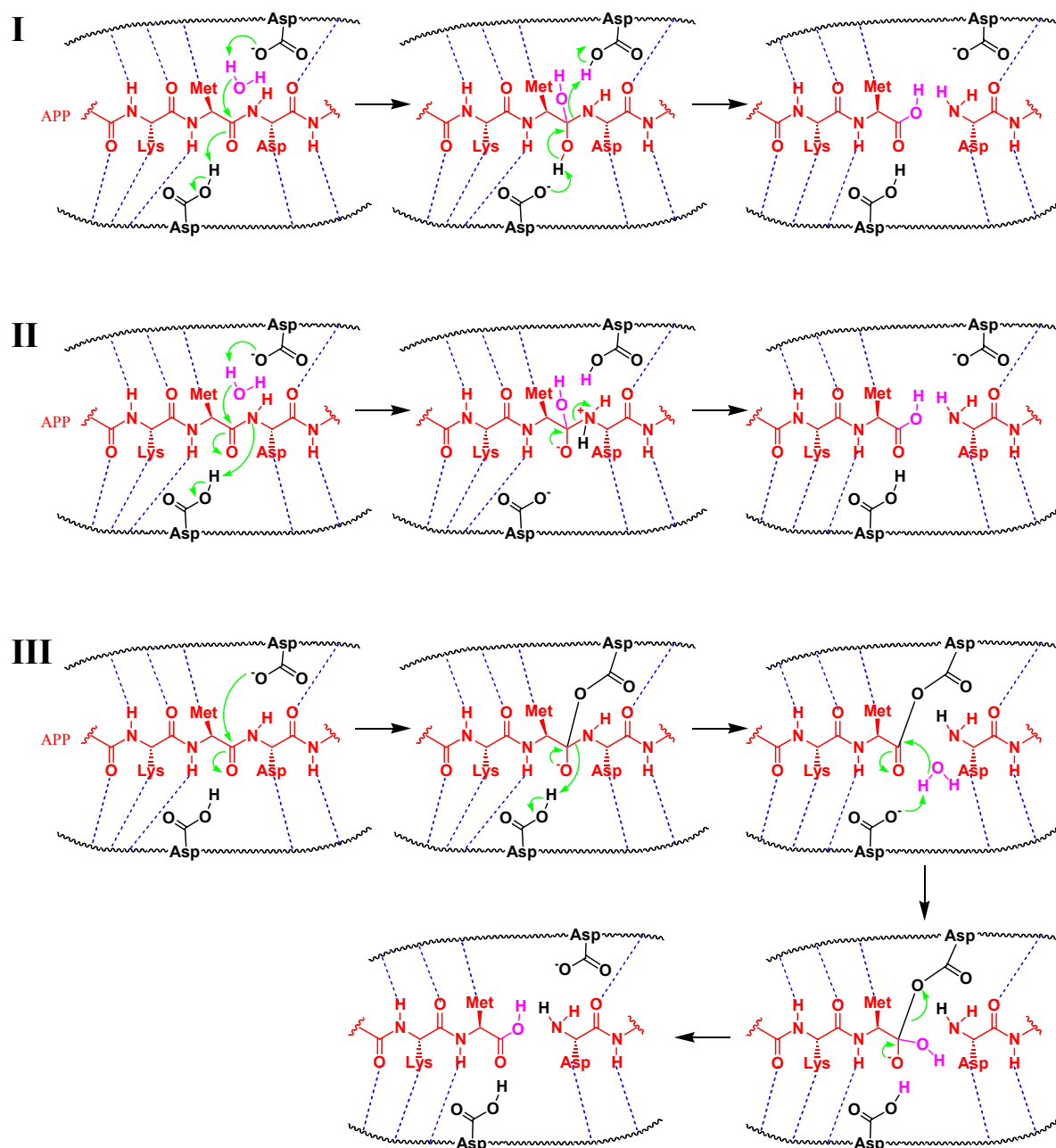


Figura 18: Mecanismos de hidrólisis de aspartilproteasas. I) catálisis ácido-base con intermedio neutro; II) catálisis ácido-base con intermedio zwitteriónico; III) ataque nucleófilo directo con intermedio covalente.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la primera imagen obtenida de la estructura terciaria de la enzima β -secretasa es debida a Tang, que logró cristalizar la enzima complejada con el inhibidor OM99-2 (Figura 19, pág. 30).³⁷ Actualmente no es la única imagen de que se dispone, ya que se han publicado en el Protein Data

³⁷ PDB ID: 1FKN. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. "Structure of the protease domain of Memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor" *Science* 2000, 290, 150-153.

Bank más de 15 estructuras de la β -secretasa complejada con diferentes tipos de inhibidores.³⁸



Figura 19: Estructura tridimensional de la β -secretasa complejada con el inhibidor OM99-2.

Fijándonos en la estructura tridimensional de la β -secretasa, se puede observar como está formada por dos lóbulos diferenciados (*N*-terminal amarillo y *C*-terminal azul), entre los cuales se genera una hendidura que conforma el sitio activo de la enzima, constituido por las dos triadas catalíticas (rojo) y la cadena lineal del inhibidor (verde). A pesar de la presencia de un “loop” (violeta) que tapa parcialmente el sitio activo, éste es bastante más accesible que el de otras aspartilproteasas como la pepsina.

³⁸ Ver las siguientes referencias en el PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>): 1W51; 2B8L; 2B8V; 1XS7; 1TQF; 2F3E; 2F3F; 1M4H; 1PY1; 1XN3; 2G94; 2FDP; 1YM2; 1YM4; 1FKN y 1CSB.

Tal y como se indicó previamente en la representación de los posibles mecanismos de hidrólisis de las aspartilproteasas (Figura 18, pág. 29), cuando un sustrato penetra en el sitio activo de la enzima, se producen una serie de interacciones enzima-sustrato mediante las cuales la enzima reconoce el punto de lisis sobre el que tiene que actuar. Estas interacciones tienen lugar entre los sustituyentes presentes en el sitio activo de la enzima y los sustituyentes del sustrato en las posiciones cercanas al punto de hidrólisis. Para conocerlas y cuantificarlas, se clasifican siguiendo el convenio de bolsillos diseñado por Dunbrack y col.,³⁹ en el que se considera que el sitio activo de la enzima está formado por bolsillos de diferente naturaleza hidrofílica, en los que tienen que encajar los residuos del sustrato peptídico. Los bolsillos de la enzima se designan mediante la letra S y un número y los residuos del sustrato con una P y el número del bolsillo que ocupen. Se indicarán con una tilde los bolsillos o residuos que estén dispuestos hacia el extremo C-terminal del sustrato, después del punto de hidrólisis (Figura 20).

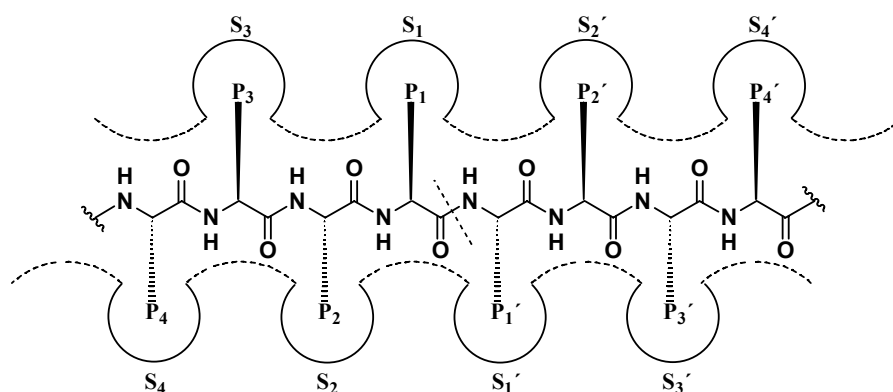


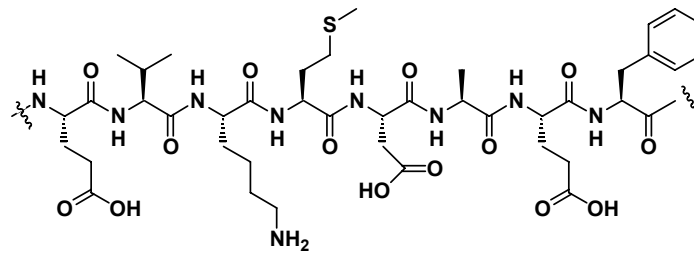
Figura 20: Representación del sitio activo de la β -secretasa.

Así pues, tenemos los bolsillos S_4 , S_3 , S_2 , S_1 , S_1' , S_2' , S_3' y S_4' , que difieren en tamaño y en carácter hidrofóbico. Por ejemplo, para la enzima β -secretasa, el bolsillo S_4 está muy expuesto al disolvente y presenta un elevado carácter hidrofílico, característica común a los bolsillos S_2 y S_1' , aunque en menor cuantía. Por otra parte, los bolsillos S_1 y S_3 son hidrofóbicos y sólo acomodan en su espacio residuos con semejante especificidad.

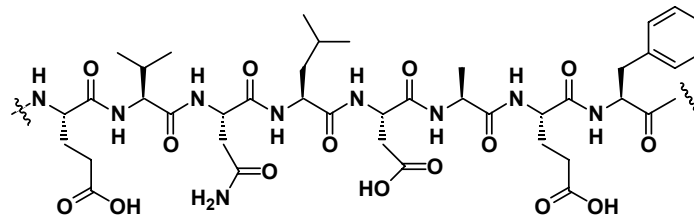
En la Figura 21 (pág. 32) se indican las posiciones que ocupan cada uno de los aminoácidos de diferentes sustratos que interactúan con la β -secretasa.

³⁹ Dunbrack Jr., R. L.; Sauder, J. M. "Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's Disease amyloid precursor protein β -secretase" *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 241-248.

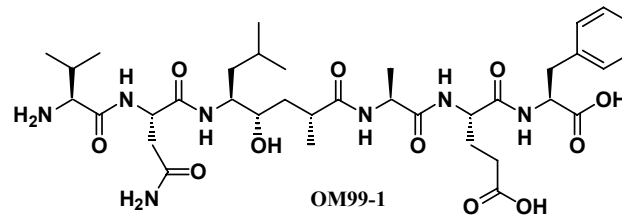
	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
APP nativa	Glu	Val	Lys	Met*	Asp	Ala	Glu	Phe
APP sueca	Glu	Val	Asn	Leu*	Asp	Ala	Glu	Phe
OM99-1	-	Val	Asn	Leu*	Ala	Ala	Glu	Phe
OM99-2	Glu	Val	Asn	Leu*	Ala	Ala	Glu	Phe



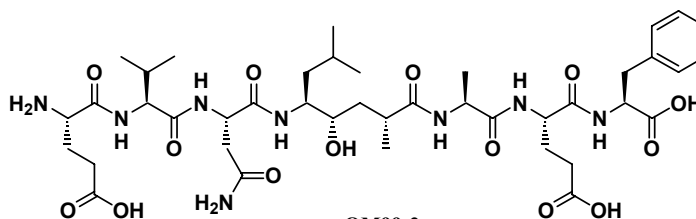
APP nativa



APP sueca



OM99-1



OM99-2

Figura 21: Secuencia de aminoácidos en la zona de unión con el centro activo de la enzima de APP (nativa y mutación sueca) e inhibidores OM99-1, OM99-2. (Para las APP el asterisco indica el punto de ruptura llevada a cabo por la β -secretasa. Para los inhibidores el asterisco indica que los aminoácidos son sustituidos por isómeros tipo hidroxietileno, que interactúan directamente con las triadas catalíticas de la β -secretasa).

Los inhibidores de la β -secretasa **OM99-1** y **OM99-2** tienen una secuencia peptídica similar a la de la **APP sueca** en su zona de unión al sitio activo de la enzima, aprovechando así la mayor afinidad que tiene la enzima por la secuencia de aminoácidos de la **APP sueca** que por la de la **APP nativa**.

La búsqueda exhaustiva destinada a encontrar moléculas que mimeticen el estado de transición que se genera entre la β -secretasa y la APP por las que la enzima tenga mayor afinidad, es la tarea que tiene ocupados actualmente a numerosos grupos de investigación. El objetivo final es el de conseguir moléculas realmente efectivas al ser administradas a enfermos, cuya afinidad por la enzima sea máxima, para lograr su inhibición completa, siendo necesario reducir su tamaño y optimizar su lipofilia, a fin de que puedan traspasar la selectiva barrera hemato-encefálica.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte de un proyecto más amplio, cuyo objetivo es el diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la β -secretasa, enzima interviniente en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Dentro de nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo estudios teóricos de diseño de inhibidores de varias enzimas intervinientes en enfermedades de importante actualidad. Los primeros estudios estuvieron relacionados con la proteasa del VIH, permitiendo sentar las bases metodológicas y obtener las primeras publicaciones.⁴⁰

Posteriormente se iniciaron estudios de modelización de inhibidores de la enzima β -secretasa, para cuyo desarrollo teórico se partió de la estructura tridimensional de la β -secretasa complejada con el inhibidor OM99-2, obtenida del Protein Data Bank (ID: 1FKN). A continuación, se buscaron inhibidores complejados con aspartilproteasas que presentasen mayor similitud de secuencia con la β -secretasa, dado que estos inhibidores pueden tener una buena afinidad por ésta. Los inhibidores elegidos deberían ser de origen pseudopeptídico, con isósteros hidroxilados, eligiendo finalmente los que provenían de complejos con las enzimas renina y pepsina.

Una vez obtenidas las estructuras de los inhibidores que servirían de base para realizar el estudio sobre la β -secretasa, se dispusieron en el sitio activo de la enzima, cuantificándose la energía de interacción entre el inhibidor y la enzima, por medio de una búsqueda conformacional de la disposición más favorable del inhibidor en el centro activo, seguido del cálculo del valor energético por medio de una función formada por tres términos, análoga a la empleada por Schoichet y col.⁴¹:

$$\Delta G_e = \Delta G_i + \Delta G_b + \Delta G_h$$

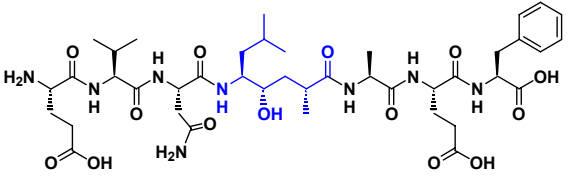
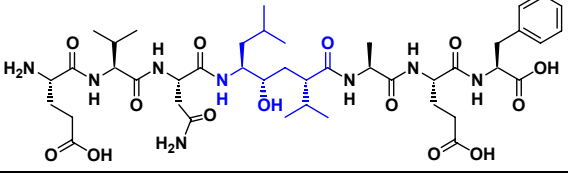
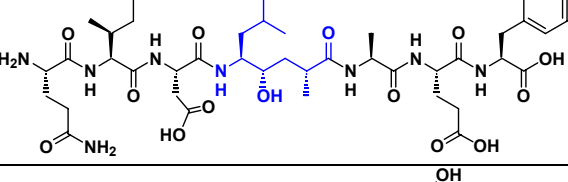
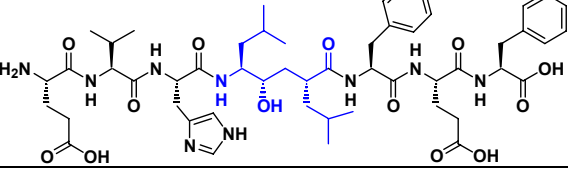
donde ΔG_e es la energía libre de enlace, ΔG_i es la energía libre de interacción, ΔG_b es la energía libre de desolvatación de Born y ΔG_h es la energía libre de interacción dependiente de la superficie hidrofóbica.

⁴⁰ a) Nauchitel, V.; Villaverde, M. C.; Sussman, F. "Solvent accessibility as a predictive tool for the free energy of inhibitor binding to the VIH-1 protease" *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1356-1364. b) Sussman, F.; Villaverde, M. C.; Davis, A. "Solvation effects are responsible for the reduced inhibitor affinity of some HIV-1 PR mutants" *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1024-1030. c) Sussman, F.; Martínez, L. A.; Villaverde, M. C. "Computer assisted evaluation of inhibitor sensitivity to HIV-1 PR mutants" *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1998**, *436* (Aspartic Proteinases), 91-97. d) Sussman, F.; Villaverde, M. C.; Martínez, L. A. "Modified solvent accessibility free energy prediction analysis of cyclic urea inhibitors binding to the HIV-1 protease" *Protein Eng.* **2002**, *15*, 707-711.

⁴¹ Shoichet, B. K.; Leach, A. R.; Kuntz, I. D. "Ligand solvation in molecular docking" *Proteins* **1999**, *34*, 4-16.

A continuación, se introdujeron las modificaciones estructurales necesarias en el inhibidor para tratar de optimizar su interacción con la enzima, obteniéndose nuevos valores energéticos de interacción. Se generó así un listado de más de cincuenta inhibidores potenciales de la β -secretasa ordenados según su energía de interacción.⁴² De estos nuevos inhibidores, veintiuno de ellos presentaron energías de unión con la enzima más favorables que la del inhibidor de referencia OM99-2.

Se fijó como objetivo genérico de esta tesis doctoral sintetizar la selección de siete inhibidores (1-7) que aparecen recogidos en la Figura 22, en la que también se ha incluido el inhibidor de referencia OM99-2. La característica estructural común de estos inhibidores a sintetizar es la de contener isómeros del grupo del hidroxietileno (remarcados en color azul).

Nº	ESTRUCTURA	ΔG_e (Kcal/mol)
OM99-2 (inhibidor de referencia)		-92.9
1		-76.1
2		-86.0
3		-113.3

⁴² Louro, L. G. "Diseño de inhibidores específicos de la β -secretasa, responsable del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer" Tesis de Licenciatura, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidade de Santiago de Compostela, Septiembre 2001.

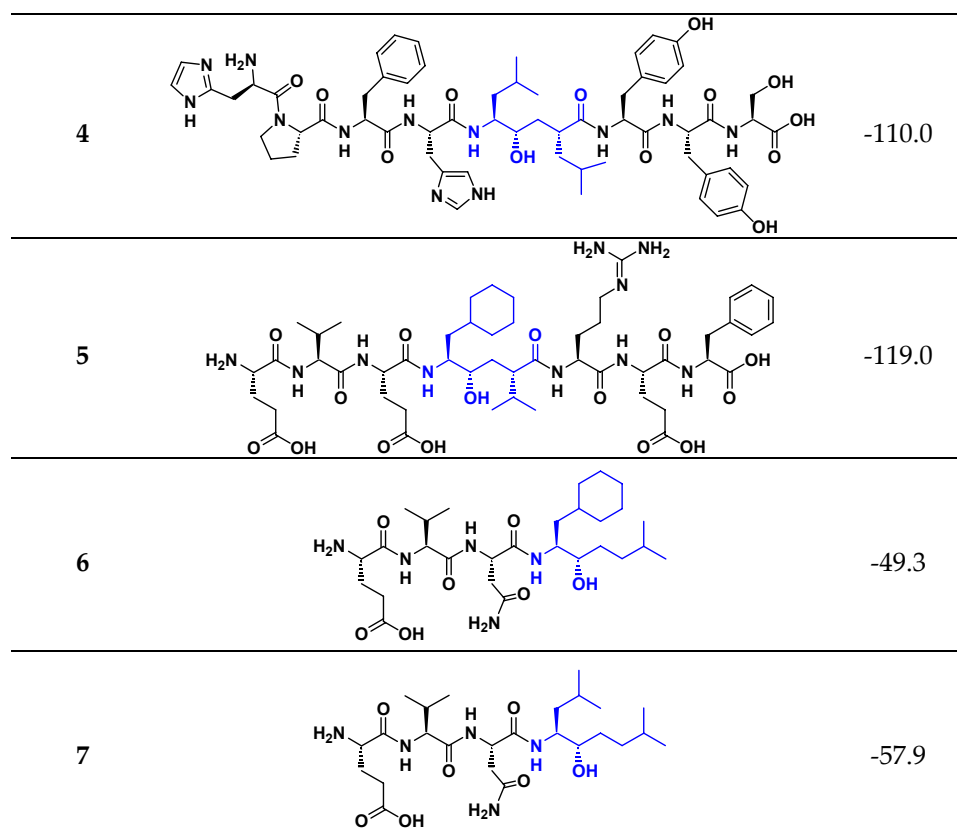


Figura 22: Estructura de potenciales inhibidores de la β -secretasa a sintetizar (ΔG_e : Energía libre de enlace enzima-inhibidor).

Tres de los inhibidores a sintetizar (3, 4 y 5) tienen energías de enlace más favorables que el inhibidor de referencia (OM99-2) mientras que los cuatro restantes (1, 2, 6 y 7) tienen energías de enlace menos favorables. La inclusión de estos inhibidores teóricamente menos activos, que parece estar en contradicción con el objetivo último de obtener inhibidores más potentes que el de referencia, es debida a que su consideración también proporcionará información útil acerca de la validez del método teórico empleado para predecir constantes de inhibición de la enzima β -secretasa.

Dado que los inhibidores elegidos incluyen isómeros de hidroxietileno (HE) unidos a cadenas peptídicas de aminoácidos proteinogénicos, fue la síntesis de los isómeros de la Figura 23 (pág. 40) la labor que nos ocupó en esta primera parte de la tesis doctoral.

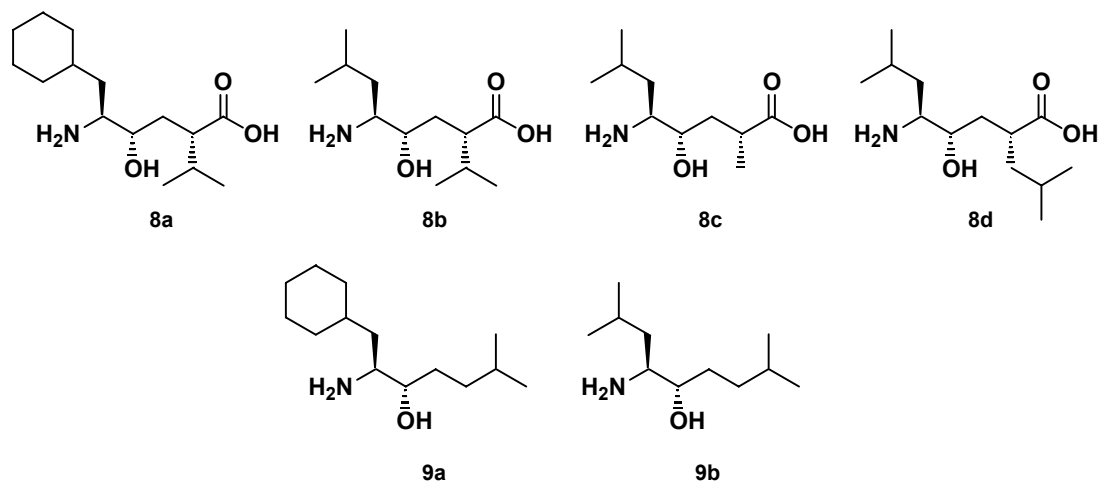


Figura 23: Isómeros de hidroxietileno de los inhibidores propuestos.

Se trata de seis isómeros de hidroxietileno, de los que los cuatro primeros tienen estructura de 2,5-dialquil-4-hidroxi- δ -aminoácido, que denominaremos en adelante isómeros HE- δ -aminoácido. Los dos últimos tienen estructura de 1,4-dialquil-1-aminobutan-2-ol, que denominaremos como isómeros HE-1-aminobutan-2-ol.

Nos propusimos sintetizar este panel de isómeros, desarrollando para ello procedimientos sintéticos suficientemente generales para la obtención futura de nuevos isómeros con variaciones en los grupos funcionales con respecto a los inicialmente estudiados.

Se afrontará luego la incorporación de estos isómeros en los inhibidores correspondientes y finalmente se llevarán a cabo estudios destinados a evaluar su capacidad de inhibición de la β -secretasa.

Los trabajos llevados a cabo se exponen a continuación en tres capítulos consecutivos. En el primero se expone la síntesis de los isómeros HE- δ -aminoácido, en el segundo la síntesis de los isómeros HE-1-aminobutan-2-ol y en el tercero la síntesis y evaluación biológica de los inhibidores.

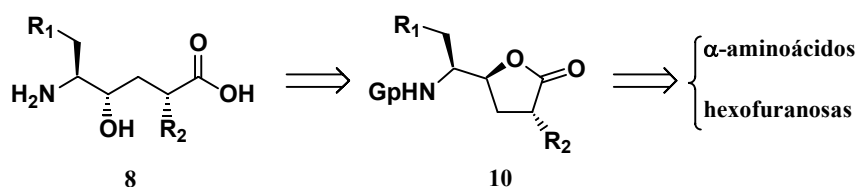
3. PARTE TEÓRICA

3.1. Síntesis de isómeros HE- δ -aminoácido.

3.1.1. Antecedentes y plan de síntesis.

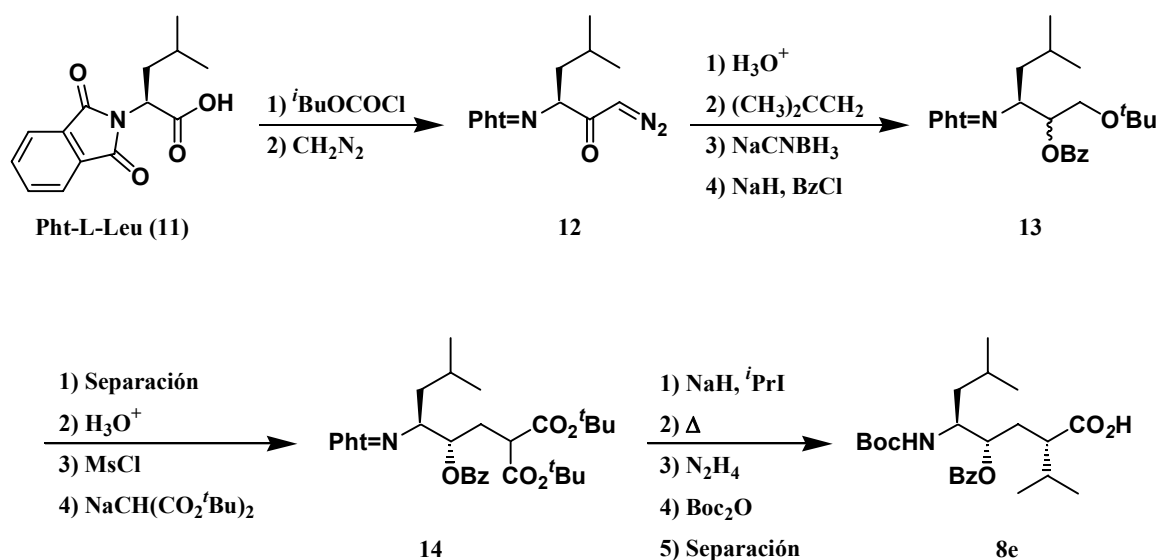
De acuerdo con el criterio expositivo, se discute en este capítulo la síntesis de isómeros del tipo HE- δ -aminoácido.

Nuestra estrategia de síntesis de este tipo de isómeros se formuló teniendo en cuenta los trabajos previos de síntesis de sus lactonas precursoras **10** a partir de α -aminoácidos o de hexofuranos (Esquema 1).



Esquema 1

La primera síntesis de isómeros HE- δ -aminoácido **8** a partir de α -aminoácidos fue llevada a cabo por Szelke⁴³, preparando el isómero **8e** a partir de la L-leucina protegida **11**, a través de una secuencia de reacciones no estereoselectivas y de separaciones cromatográficas indicadas en el Esquema 2.

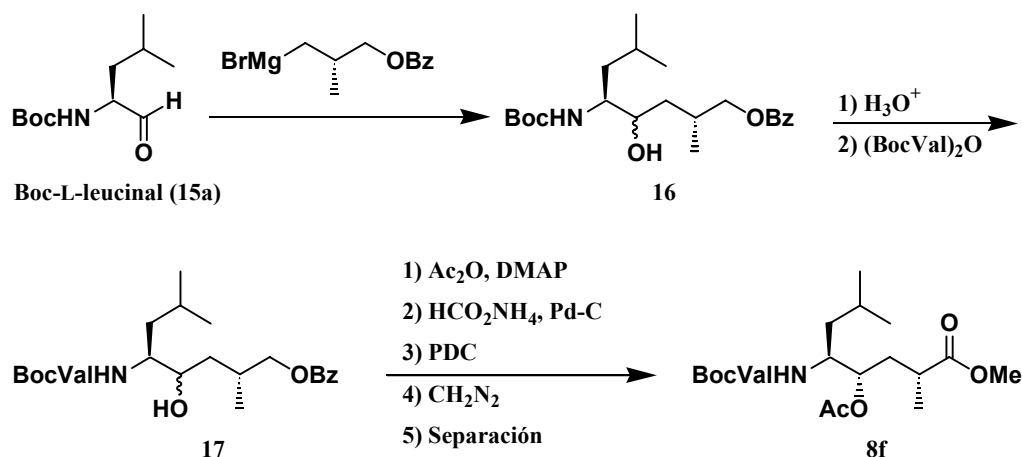


Esquema 2

⁴³ Szelke, M.; Leckie, B.; Hallett, A.; Jones, D. M.; Sueiras, J.; Atrash, B.; Lever, A. F. "Potent new inhibitors of human renin" *Nature* **1982**, 299, 555-557.

Esta síntesis comenzó con la transformación de la L-leucina protegida **11** en el diazocompuesto **12** por reacción con cloroformiato de isobutilo y diazometano. A continuación, se transformó el compuesto **12** en el dihidroxiderivado **13** por medio de la secuencia de reacciones indicadas: hidrólisis en medio ácido del grupo diazo, protección con isobutileno del hidroxilo generado, reducción del carbonilo con cianoborohidruro sódico y finalmente protección del nuevo hidroxilo con cloruro de benzoilo. Se obtuvo así la mezcla de epímeros **13**, la cual separó cromatográficamente, continuando la síntesis con el epímero con configuración (*S,S*). Las reacciones siguientes fueron: desprotección en medio ácido del hidroxilo terminal, transformación de éste en un mesilato y sustitución del mesilato por un grupo malonato. Una vez obtenido el malonato **14**, se llevó a cabo su transformación en el isómero **8e** por alquilación con yoduro de isopropilo, descarboxilación térmica, eliminación del grupo ftalilo y protección de la amina con anhídrido de *t*-butoxicarbonilo. Tras otra separación cromatográfica de los estereoisómeros formados en estos procesos, se obtuvo finalmente el isómero **8e**.

Posteriormente Rich preparó el isómero **8f** a partir del aminoaldehído **15a** derivado de la L-leucina, llevando a cabo diversos procesos no estereoselectivos que también requirieron de separación cromatográfica de las mezclas obtenidas (Esquema 3).⁴⁴



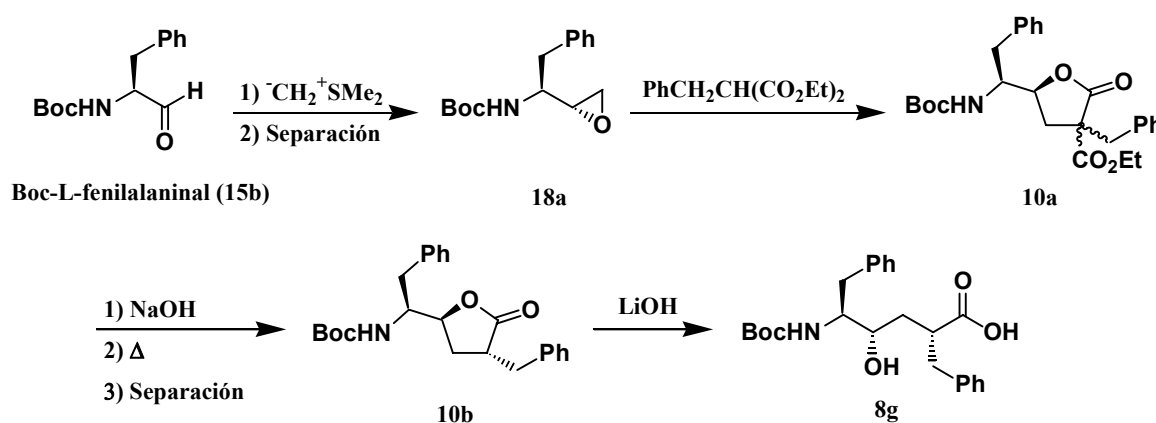
Esquema 3

Así, cuando el Boc-L-leucinal (**15a**) se hizo reaccionar con el quiral indicado, se produjo una mezcla de aminoalcoholes **16** la cual se sometió a condiciones ácidas de reacción para desproteger su grupo amino y a continuación se unió a este grupo una unidad de Boc-valina. Se obtuvo así el compuesto **17**, el cual se transformó en el

⁴⁴ Holliday, M. W.; Rich, D. H. "Synthesis of hydroxyethylene and ketomethylene dipeptide isosteres" *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4401-4404.

isómero **8f** por medio de la siguiente secuencia de reacciones: acetilación del hidroxilo libre, eliminación del grupo protector benzoilo, oxidación del hidroxilo terminal con PDC y esterificación con diazometano. Tras una separación cromatográfica de los estereoisómeros formados, se aisló finalmente el isómero **8f** buscado.

Otra síntesis de isómeros de tipo δ -aminoácido fue la desarrollada por Evans⁴⁵, que transformó el aminoaldehído **15b** en el isómero **8g** por medio de la secuencia de reacciones indicada a continuación.



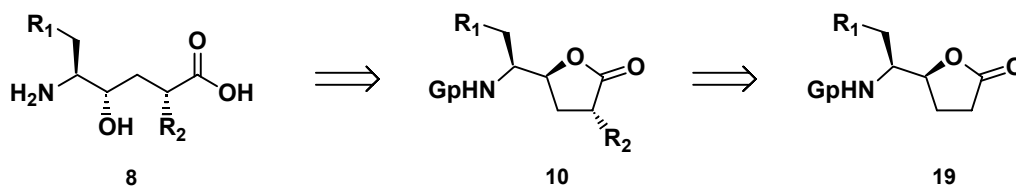
Esquema 4

Así, el aminoaldehído **15b** se hizo reaccionar con metililuro de dimetilsulfonio para generar el epóxido **18a**, tras separación comatográfica de la mezcla de epímeros formada. Este epóxido se transformó en la lactona **10a** por reacción con el malonato de dietilo indicado, y ésta se convirtió en la lactona **10b** precursora del isómero **8g** por hidrólisis con hidróxido sódico y descarbonilación térmica. La separación de la mezcla de lactonas formadas y la apertura del ciclo lactónico de **10b** con hidróxido de litio produjo el isómero **8g**.

En las síntesis de isómeros HE- δ -aminoácido posteriores basadas en α -aminoácidos, se emplearon como intermedios clave las aminolactonas **19** (Esquema 5, pág. 46), en las que ya están presentes los grupos amino, hidroxilo y carboxilo, así como el primer sustituyente alquílico R_1 de los isómeros de HE- δ -aminoácido **8**. La transformación de estas lactonas **19** en estos isómeros **8** implica una alquilación estereoselectiva de la posición α al carbonilo, destinada a introducir el grupo R_2 , generando así lactonas **10** que contienen todos los sustituyentes presentes

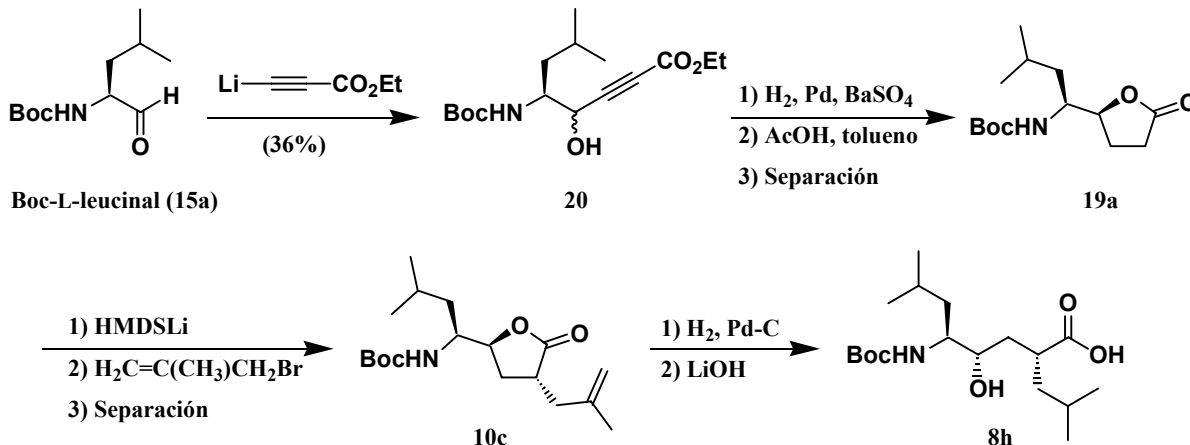
⁴⁵ Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Homnick, C. F.; Springer, J. P.; Hirshfield, J.; Veber, D. F. "A stereocontrolled synthesis of hydroxyethylene dipeptide isosteres using novel, chiral aminoalkyl epoxides and γ -(aminoalkyl)- γ -lactones" *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4615-4625.

en los isómeros **8**. Finalmente, la apertura del anillo lactónico de **10** da lugar de manera sencilla a los isómeros **8** buscados.



Esquema 5

En la primera síntesis basada en esta estrategia (Kleinman, 1986, Esquema 6), la lactona **10c** precursora del isómero **8h** se obtuvo a partir del aminoaldehído **15a** derivado de la *N*-Boc-L-leucina.⁴⁶ La adición no estereoespecífica del derivado litiado del propiolato de etilo al carbonilo produjo la mezcla epimérica **20**, que por hidrogenación catalítica generó un hidroxiéster que cicló espontáneamente, obteniéndose la lactona **19a** como diastereoisómero mayoritario, después de realizar una separación cromatográfica. La transformación de **19a** en el isómero **8h** se llevó a cabo por alquilación de su posición α , seguido de la separación de la mezcla de diastereoisómeros obtenida, la hidrogenación del doble enlace alílico y la apertura en medio básico del anillo lactónico de **10c**.



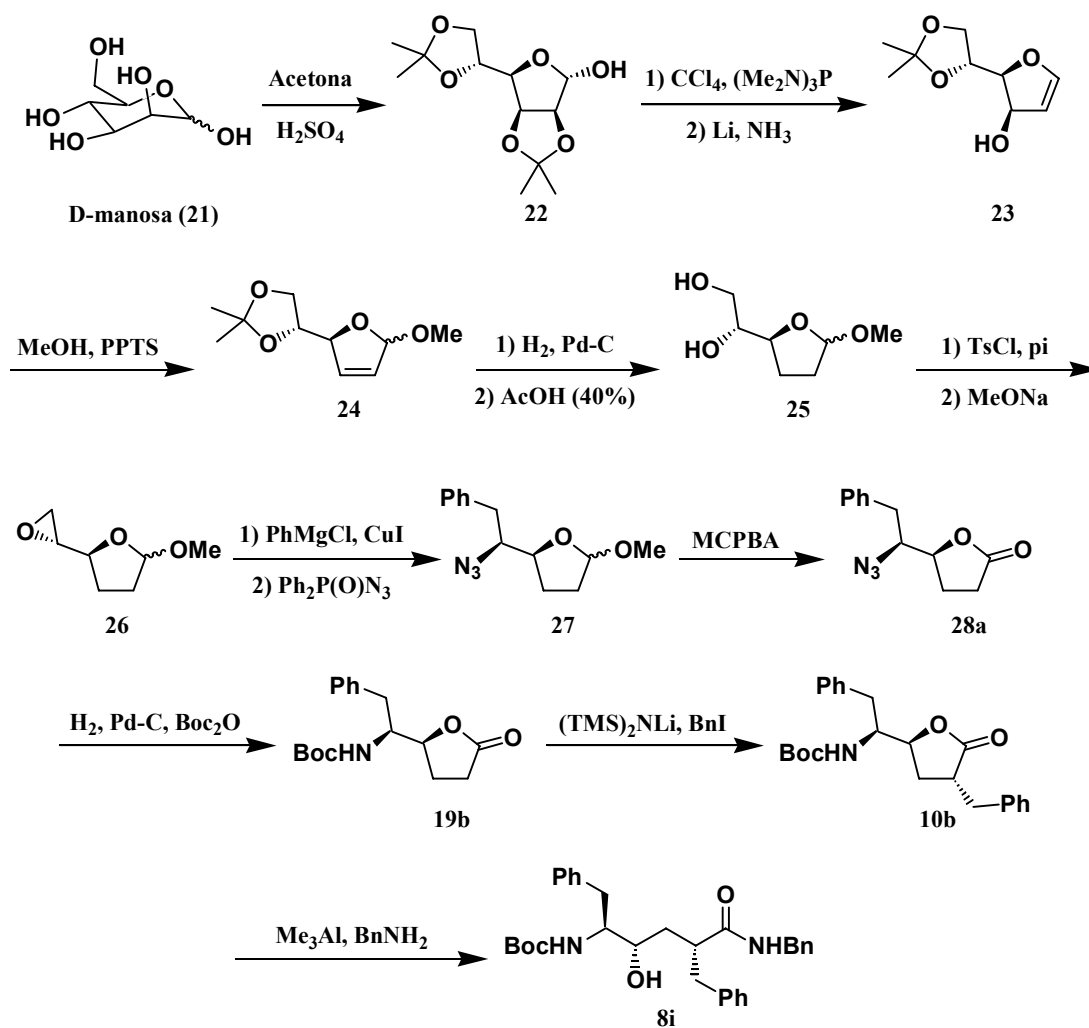
Esquema 6

Estas estrategias basadas en las lactonas dialquiladas **10** han resultado ser muy eficaces para sintetizar isómeros de HE- δ -aminoácido **8**. Pero cuentan con el gran inconveniente de que al partir de α -aminoácidos comerciales, el panel de sustituyentes R_1 en posición α al átomo de nitrógeno queda limitado a los existentes en dichos aminoácidos. La introducción de otros sustituyentes como ciclohexilo,

⁴⁶ Fray, A. H.; Kaye, R. L.; Kleinman, F. "A short, stereoselective synthesis of the lactone precursor to 2R,4S,5S hydroxyethylene dipeptide isosteres" *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4828-4833.

tolilo, *t*-butilo, etc. no fue llevada a cabo, debido probablemente a la complejidad añadida que supone tener que preparar los α -aminoácidos de partida requeridos.

Una alternativa de síntesis de lactonas **10** precursoras de isómeros de HE- δ -aminoácido **8** se basó en partir de hexofuranosas **22** obtenidas a partir de hexosas naturales. La única aportación correspondiente a esta estrategia se debe al grupo de Ghosh⁴⁷, que transformó la D-manosa (**21**) en la lactona clave **10b** en una secuencia de trece pasos (Esquema 7).



Esquema 7

El sustituyente de la posición C-5 del isómero final **8i**, se introdujo en la reacción de apertura del epóxiderivado **26**. A continuación se transformó el hidroxilo libre en un grupo azida, invirtiéndose la configuración de C-5. Tras oxidar la posición anomérica del furanósido **27** e hidrogenar el grupo azida en presencia de

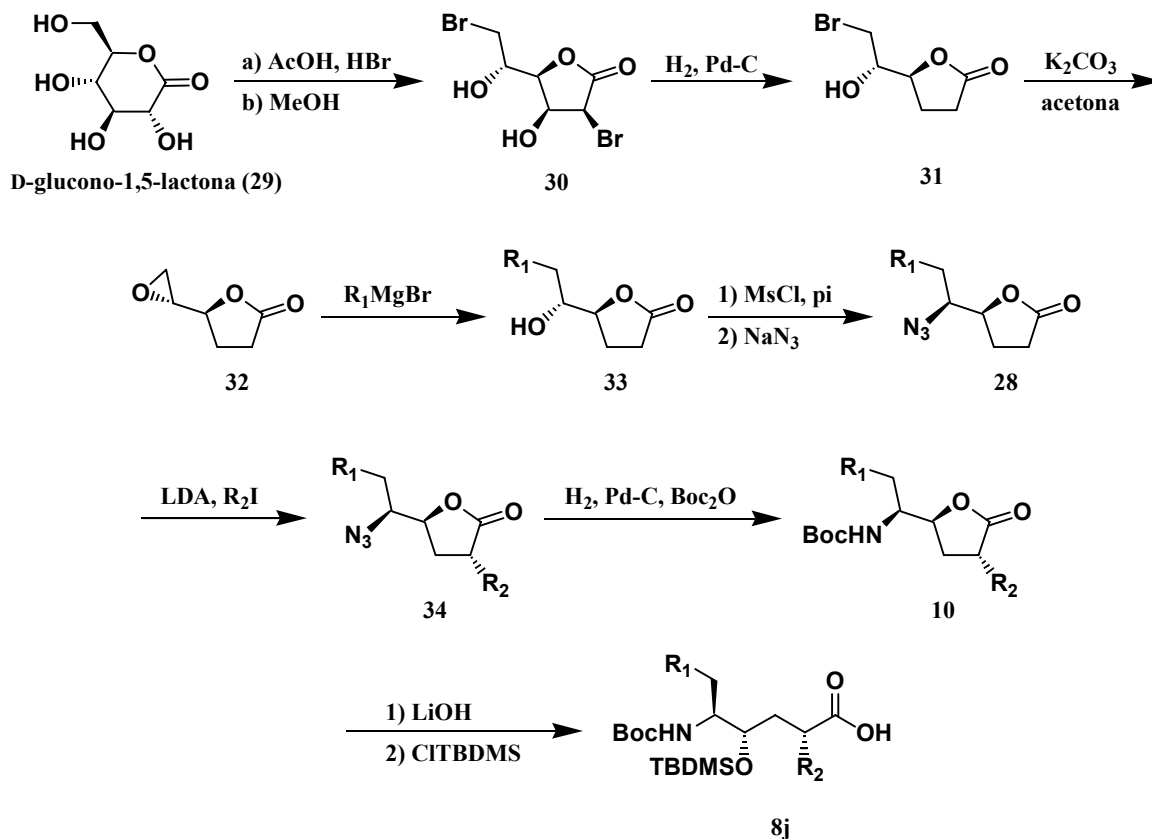
⁴⁷ Ghosh, A. K.; McKee, S. P.; Thompson, W. J. "An efficient synthesis of hydroxyethylene dipeptide isosteres: the core unit of potent HIV-1 protease inhibitors" *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6500-6503.

anhídrido de *t*-butoxicarbonilo, se obtuvo la lactona monoalquilada **19b**. La alquilación de su posición α con yoduro de bencilo condujo a la lactona **10b**, la cual por apertura de su ciclo lactónico con bencilamina condujo al isómero **8i**.

Esta estrategia sintética apenas explorada, es *a priori* más versátil que las previas en las que se parte de α -aminoácidos comerciales, dado que no presenta la limitación de éstas en cuanto a la naturaleza de grupos R_1 a introducir en la posición C-5 de los isómeros **8**. Efectivamente, la apertura controlada del epoxiderivado **26** con reactivos organometálicos adecuados, permitiría introducir cualquier sustituyente R_1 .

El único inconveniente aparente de esta aproximación reside en el hecho de que estas síntesis basadas en azúcares requieren secuencias más largas que las basadas en α -aminoácidos. Por ello, parece aconsejable acudir a ella cuando la basada en α -aminoácidos requiera partir de α -aminoácidos no proteinogénicos.

La experiencia previa de nuestro grupo de investigación en química de azúcares, así como el hecho de no haber sido apenas explorada la síntesis de isómeros del tipo HE- δ -aminoácido a partir de carbohidratos, nos llevó a abordar la síntesis de nuestro panel de isómeros de este tipo mediante el plan indicado a continuación:



Esquema 8

Se trata de una ruta que simplifica enormemente la síntesis de Ghosh que acabamos de exponer (Esquema 7, pág. 47), dado que el ciclo de δ -lactona se genera más temprano, al hacer uso de un método descrito de preparación de δ -lactonas **31** en una secuencia de dos etapas, a partir de la D-glucono-1,5-lactona (**29**) comercial.⁴⁸ La transformación de la δ -lactona **31** en isómeros **8j** incluiría etapas similares a la síntesis de Ghosh: generación de una unidad de epóxido exocíclica (compuesto **32**), apertura controlada de su unidad epoxídica para introducir sustituyentes R₁ (compuestos **33**), reemplazamiento del grupo OH por un grupo N₃ (compuestos **28**), alquilación de la posición α al carbonilo para introducir grupos R₂ (compuestos **34**), transformación del grupo azida en amino protegido (compuestos **10**) y apertura de su anillo de lactona, para generar isómeros **8j** protegidos de la manera adecuada para someterlos a procesos de acoplamiento peptídico, es decir, protegiendo el grupo amino como carbamato de *t*-butoxicarbonilo y el grupo hidroxilo con un *t*-butildimetilsililo. Se han elegido estos grupos protectores, por ser compatibles con las estrategias de acoplamiento peptídico a emplear para sintetizar nuestro panel de inhibidores peptídicos.

En este plan de síntesis hemos introducido una modificación adicional al procedimiento de obtención de isómeros de Ghosh, consistente en llevar a cabo sobre las azidolactonas **28** la alquilación de su posición α para introducir los grupos R₂ presentes en los isómeros **8j** (Esquema 8, pág. 48) en lugar de hacerlo sobre las carbamoilaminolactonas **19b** (Esquema 7, pág. 47). Esta modificación se debe a la facilidad que tienen los grupos amino protegidos de alquilarse con electrófilos activos como el yoduro de metilo,⁴⁹ lo que podría interferir en la introducción de un grupo metilo en la posición α de estas aminolactonas, para obtener isómeros **8j** con un metilo como sustituyente R₂.

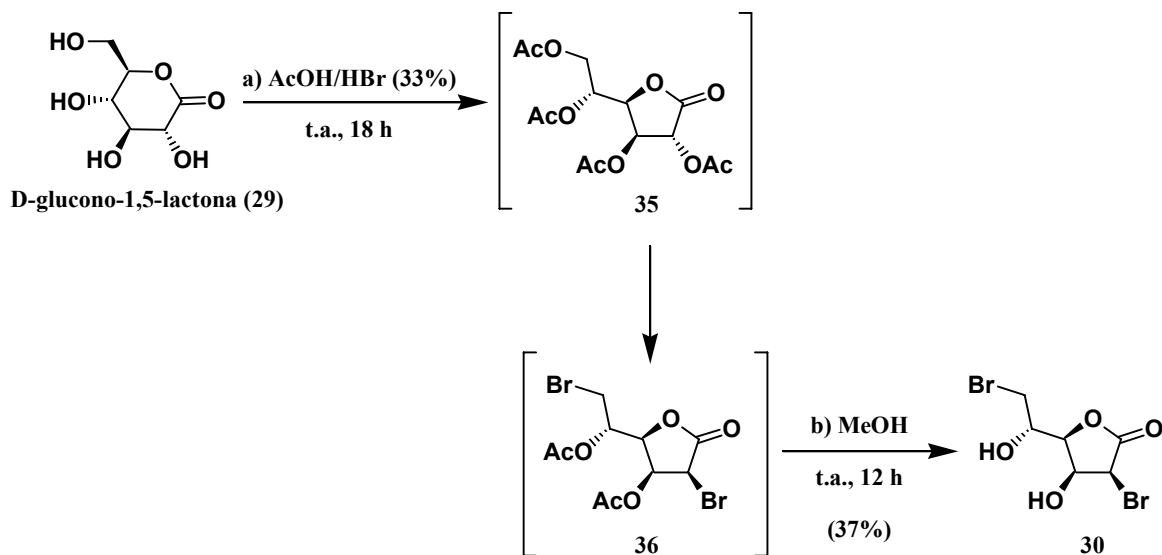
El desarrollo de este plan de síntesis se discute en el apartado siguiente.

⁴⁸ a) Bock, K.; Lundt, I.; Pedersen, C. "Preparation of some bromodeoxyaldonic acids" *Carbohydrate Res.* **1979**, *68*, 313-319. b) Lundt, I.; Pedersen, C. "Preparation of some 2,3-dideoxylactones by an unusual catalytic hydrogenolysis" *Synthesis* **1986**, 1052-1054.

⁴⁹ a) Kazuta, Y.; Tsujita, R.; Uchino, S.; Kamiyama, N.; Mochizuki, D.; Yamashita, K.; Ohmori, Y.; Yamashita, A.; Yamamoto, T.; Kohsaka, S.; Matsuda, A.; Satoshi, S. "Synthesis of (1*S*,2*R*)-1-phenyl-2-[(*S*)-1-aminoalkyl]-*N,N*-diethylcyclopropanecarboxamides as novel NMDA receptor antagonists having unique NMDA receptor subtype selectivity" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1199-1212. b) Maier, M. E.; Hermann, C. "Synthesis of the γ -amino- β -hydroxy acid of hapalosin via an asymmetric dihydroxylation route" *Tetrahedron* **2000**, *56*, 557-561.

3.1.2. Desarrollo del plan de síntesis.

De acuerdo con el plan de trabajo propuesto en la pág. 48, se llevó a cabo en primer lugar la transformación de la D-glucono-1,5-lactona (**29**) comercial en la dibromolactona **30** (Esquema 9), siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía.⁵⁰



Esquema 9

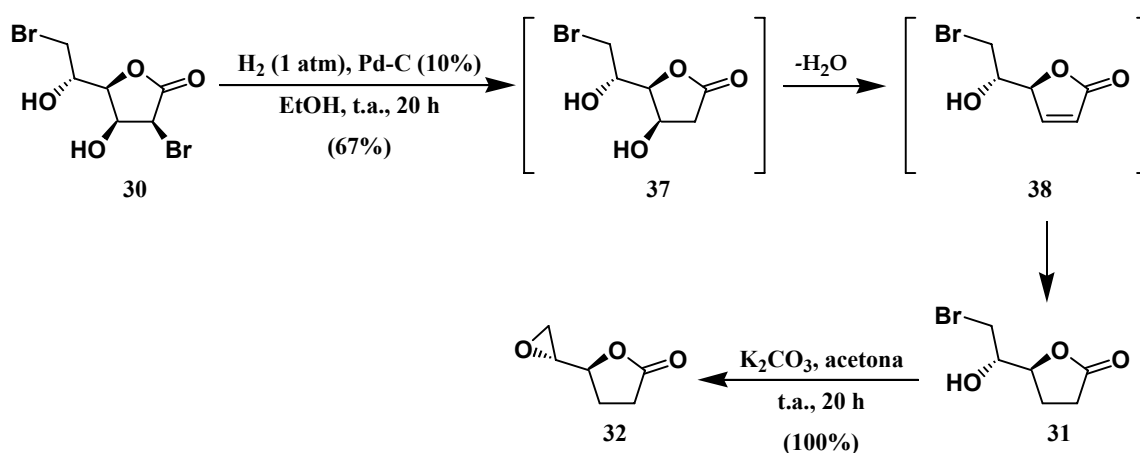
Este dibromoderivado **30** se obtuvo con un rendimiento moderado, cuando se hizo reaccionar la D-glucono-1,5-lactona (**29**) con una mezcla de bromuro de hidrógeno y ácido acético glacial al 33% durante 18 horas. La formación de **30** se explicó admitiendo que inicialmente se forma la tetraacetil-D-gluconolactona **35**, que en el propio medio de reacción por acción del bromuro de hidrógeno da la dibromodiacetillactona **36**, la cual se hidroliza espontáneamente por acción del metanol, produciendo el compuesto **30** deseado. La introducción selectiva de los átomos de bromo en las posiciones C-2 y C-6 de la lactona **36** se explica por la mayor reactividad de dichas posiciones en el derivado tetraacetilado **35**. El bajo rendimiento global no es un gran inconveniente para nuestros propósitos sintéticos, dado que los productos de partida son muy asequibles económicamente, la reacción es fácilmente escalable a valores de decenas de gramos y el producto de reacción se obtiene con pureza analítica por precipitación y lavado con diclorometano. Otra ventaja añadida es la debida a la simplificación ya comentada que supone nuestra

⁵⁰ Bock, K.; Lundt, I.; Pedersen, C. "Preparation of some bromodeoxyaldonic acids" *Carbohydrate Res.* **1979**, *68*, 313-319.

ruta de síntesis de isómeros de HE- δ -aminoácido en relación con la desarrollada previamente por Ghosh (Esquema 7, pág. 47).

La caracterización del compuesto **30** obtenido se hizo en base a sus propiedades espectroscópicas, siendo relevante su espectro de masas, en el que aparece el patrón de distribución isotópica típico de fragmentos con dos átomos de bromo [303, 305, 307 (1:2:1, MH^+ , 6%); 285, 287, 289 (1:2:1, $MH^+ - H_2O$, 7%)].⁵¹

La fase siguiente de nuestra síntesis consistió en la transformación de esta dibromolactona **30** en la epoxilactona **32**, necesaria para llevar a cabo los ensayos de adición de reactivos organometálicos previstos en nuestro plan de trabajo (Esquema 10).



Esquema 10

La hidrogenación de la dibromolactona **30** catalizada con un 5% de paladio sobre carbón activo en etanol, dio lugar a la bromolactona **31** en buen rendimiento.⁵² Su formación tiene lugar por hidrogenación *in situ* del doble enlace C=C de la lactona insaturada **38** resultante de la hidrogenolisis regioselectiva del enlace C-Br de la posición α al carbonilo de **30** y la subsiguiente deshidratación regioselectiva de la lactona **37** resultante. Esta bromolactona **31** se aisló como un sólido fácilmente cristizable y se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas, entre las que cabe destacar en su espectro de RMN-¹³C las dos señales de grupos CH_2 a 22.2 y 28.1 ppm, asignadas a las posiciones C-2 y C-3 de la lactona. En su espectro de masas aparecen dos señales con el patrón de distribución isotópica típico de fragmentos con un átomo de bromo [209, 211 (1:1, MH^+ , 17%) y 191, 193 (1:1, $MH^+ - H_2O$, 31%)].

⁵¹ Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. "Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos" 1998, Ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona.

⁵² Lundt, I.; Pedersen, C. "Preparation of some 2,3-dideoxylactones by an unusual catalytic hydrogenolysis" *Synthesis* **1986**, 1052-1054.

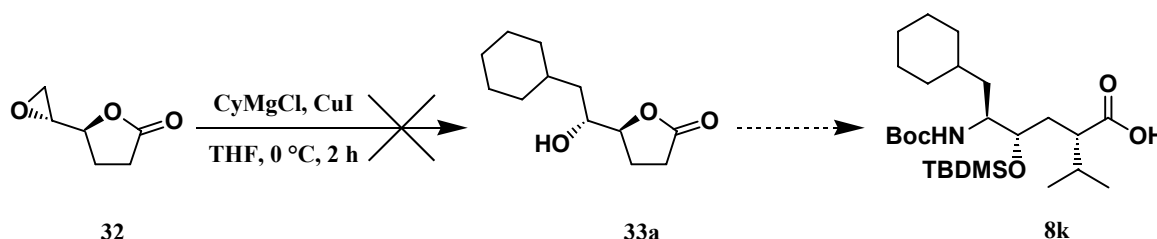
Prosiguiendo con nuestro plan de trabajo, el tratamiento de esta bromolactona **31** con carbonato potásico en acetona anhidra condujo de modo cuantitativo, tras veinte horas de reacción a temperatura ambiente, a la epoxilactona **32**, que se aisló como un aceite incoloro.⁵³ La estructura de este compuesto se confirmó gracias a sus propiedades espectroscópicas, de las que la cabe destacar la aparición en su espectro de IR de la señal debida al carbonilo a 1776 cm^{-1} , así como la presencia como pico base en su espectro de masas del ión molecular protonado [$129 (100, \text{MH}^+)$].

Esta lactona **32** es el compuesto intermedio clave en nuestro plan de síntesis, por ser la sustancia de partida común para la preparación de nuestro panel de isómeros HE- δ -aminoácido **8j**, cuya etapa inicial implica la apertura de su subunidad epoxídica con reactivos organometálicos portadores de los grupos alquilo presentes en la posición C-5 de los isómeros a sintetizar.

Se exponen a continuación de forma consecutiva la preparación de nuestros cuatro isómeros de HE- δ -aminoácido.

- *Síntesis del isómero HE- δ -aminoácido 8k.*

Se ensayó en primer lugar la preparación de la 6-ciclohexillactona **33a** haciendo reaccionar la epoxilactona **32** en THF anhidro con cloruro de ciclohexilmagnesio en presencia de ioduro de cobre (I) a $0\text{ }^\circ\text{C}$ (Esquema 11), siguiendo las condiciones de Ghosh para la apertura de epóxidos con reactivos organometálicos (Esquema 7, pág. 47).



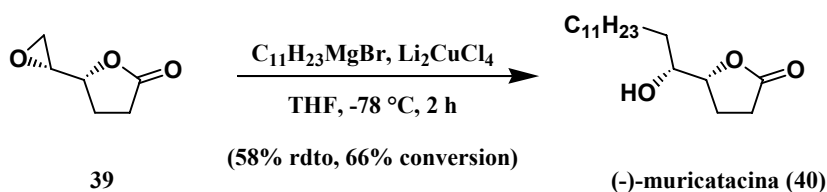
Esquema 11

Sin embargo, al cabo de dos horas se observó por c.c.f. la formación de una gran cantidad de productos. Un espectro de RMN- ^{13}C del crudo de reacción mostró múltiples señales debidas a la mezcla compleja de reacción obtenida, entre las que se observaron varios picos a 200-210 ppm, asignables a carbonilos de cetonas, indicando ello que no se pudo prevenir el proceso no deseado de apertura de la lactona por parte del reactivo organometálico. Ensayos de la reacción a -35 y $-78\text{ }^\circ\text{C}$

⁵³ Lundt, I.; Pedersen, C. "Preparation of enantiomerically pure mono- and diepoxylactones from aldonolactones" *Synthesis* **1992**, 7, 669-672.

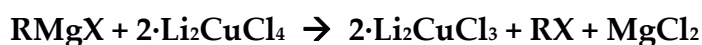
tampoco permitieron evitar este proceso competitivo, pues se obtuvieron mezclas complejas similares. Este inconveniente no existía en la ruta de Ghosh, en la que el epoxiderivado implicado (26, pág. 47) formaba parte de un compuesto de tipo acetálico.

Esta falta de selectividad del nucleófilo entre el epóxido y el grupo carbonilo se achacó a la alta reactividad del anión organometálico formado. Así, cuando en las condiciones de reacción empleadas se añade el cloruro de ciclohexilmagnesio sobre el epoxiderivado 32 en presencia de yoduro de cobre (I), la especie nucleófila que se forma es el organocuprato $Cy_2CuMgCl$, el cual tiene una baja selectividad a la hora de llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el epóxido o sobre el carbonilo. Sin embargo, encontramos precedentes bibliográficos del uso de nucleófilos derivados de organocupratos que mostraron mayor selectividad a la hora de llevar a cabo este ataque nucleofílico. Así, en la síntesis de la (-)-muricatacina (40) desarrollada por Sanière⁵⁴, el proceso clave final es la apertura de la epoxilactona 39 con bromuro de undecilmagnesio en presencia de tetraclorocuprato (II) de litio (Esquema 12).



Esquema 12

Como podemos ver, la reacción de la epoxilactona 39 con bromuro de undecilmagnesio en presencia de tetraclorocuprato (II) de litio produjo la adición regioselectiva al epóxido en un rendimiento del 58%. La mayor regioselectividad obtenida en este caso se debe a la menor reactividad del organocuprato que se genera en el proceso, que reacciona preferentemente con el epóxido, un electrófilo más reactivo que el carbonilo. Se sabe que cuando el exceso de un haluro de alquilmagnesio ($RMgX$) reacciona con el tetraclorocuprato (II) de litio, el Cu (II) se reduce rápidamente a Cu (I):

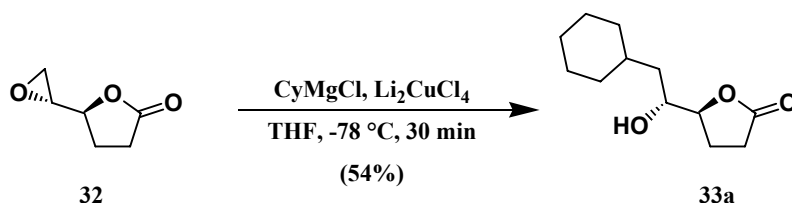


Se genera así el triclorocuprato (I) de litio más el haluro de alquilo y cloruro de magnesio. El triclorocuprato de litio reacciona con dos equivalentes más de haluro de alquilmagnesio, formando el organocuprato R_2CuLi . Este organocuprato de litio es menos reactivo que organocuprato de magnesio R_2CuMgX formado

⁵⁴ Sanière, M.; Charvet, I.; Le Ferrer, Y.; Depezay, J. C. "Enantiopure hydroxylactones from L-ascorbic and D-isoascorbic acids. Part I. Synthesis of (-)-muricatacin" *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1653-1662.

cuando se mezclan yoduro de cobre (I) con un haluro de alquilmagnesio.⁵⁵ Por lo tanto, reaccionará con mayor regioselectividad con el electrófilo más reactivo, en este caso el extremo epoxidico.

Nosotros decidimos aplicar estas nuevas condiciones de apertura a nuestra epoxilactona **32** (Esquema 13).



Esquema 13

La reacción de **32** con una disolución de cloruro de ciclohexilmagnesio (4 equivalentes) y tetraclorocuprato (II) de litio (0.4 equivalentes) condujo a la ciclohexillactona **33a** deseada en un rendimiento moderado del 54%.

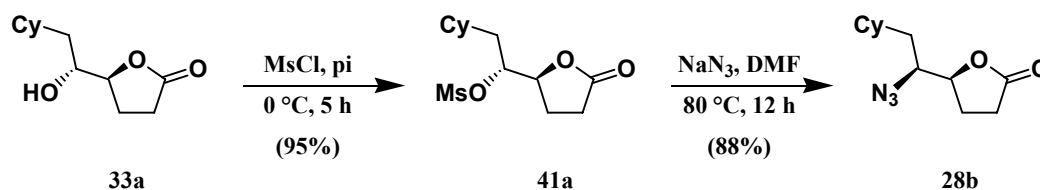
Con objeto de mejorar este rendimiento, se ensayó la utilización de una cantidad estequiométrica de la sal de cobre, pero desafortunadamente se obtuvo una mezcla compleja carente de interés sintético. La utilización de cantidades catalíticas de la citada sal menores que la inicial (0.1 y 0.2 equivalentes) conllevó invariablemente a la recuperación de parte del producto de partida, siendo el rendimiento global de la apertura del epóxido menor del 20%.

Las propiedades espectroscópicas de **33a** confirmaron plenamente su estructura. Así, su espectro de RMN-¹³C puso de manifiesto la presencia del grupo ciclohexilo mediante cinco señales a 20.8, 25.9, 26.1, 26.3 y 28.6 ppm, correspondientes a los cinco grupos CH₂, y la señal a 33.6 ppm correspondiente al grupo CH. El espectro de IR mostró a 3418 cm⁻¹ la banda correspondiente al grupo hidroxilo proveniente de la apertura del epóxido y a 1795 cm⁻¹ la señal correspondiente al grupo carbonilo de la lactona. Además, la presencia en el espectro de RMN-¹³C de un pico a 177.9 ppm, correspondiente al carbonilo de la lactona, puso

⁵⁵ Para ver otros procesos regioselectivos de organocupratos: a) Fouquet, G.; Schlosser, M. "Better carbon-carbon linkages by controlled copper catalysis" *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 50-51. b) Posner, G. H. "Substitution reactions using organocopper reagents" *Org. React.* **1975**, *22*, 253-400. c) Lipshutz, B. H.; Kozlowski, J.; Wilhelm, R. S. "Chemistry of higher order mixed organocuprates. 2. Reactions of epoxides" *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2305-2307. d) Erdik, E. "Copper(I) catalyzed reactions of organolithiums and Grignard reagents" *Tetrahedron* **1984**, *40*, 641-657. e) Lipshutz, B. H.; Wilhelm, R. S.; Kozlowski, J. A. "The chemistry of higher order organocuprates" *Tetrahedron* **1984**, *40*, 5005-5038. f) Bäckvall, J. E.; Dellén, M. "A dual regiocontrol in the copper-catalysed Grignard reaction with primary allylic acetates" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 827-829.

de manifiesto que este grupo funcional permanece inalterado en las nuevas condiciones de reacción.

Una vez obtenida esta hidroxilactona **33a**, se abordaron las fases siguientes de nuestro plan de síntesis del isómero **8k**, destinadas a reemplazar el grupo hidroxilo por un grupo amino e introducir el grupo isopropílico en la posición C-2 de la lactona. Para ello se llevó a cabo en primer lugar el reemplazamiento del hidroxilo por un grupo azida, siguiendo el protocolo indicado en el Esquema 14.⁵⁶



Esquema 14

La reacción de **33a** con cloruro de mesilo a 0 °C en presencia de piridina, condujo en excelente rendimiento al mesilato **41a**, que se caracterizó fácilmente a partir de sus propiedades espectroscópicas, fundamentalmente por la aparición en su espectro de RMN-¹H de un singulete a 3.05 ppm, que confirmó la presencia del grupo mesilo.

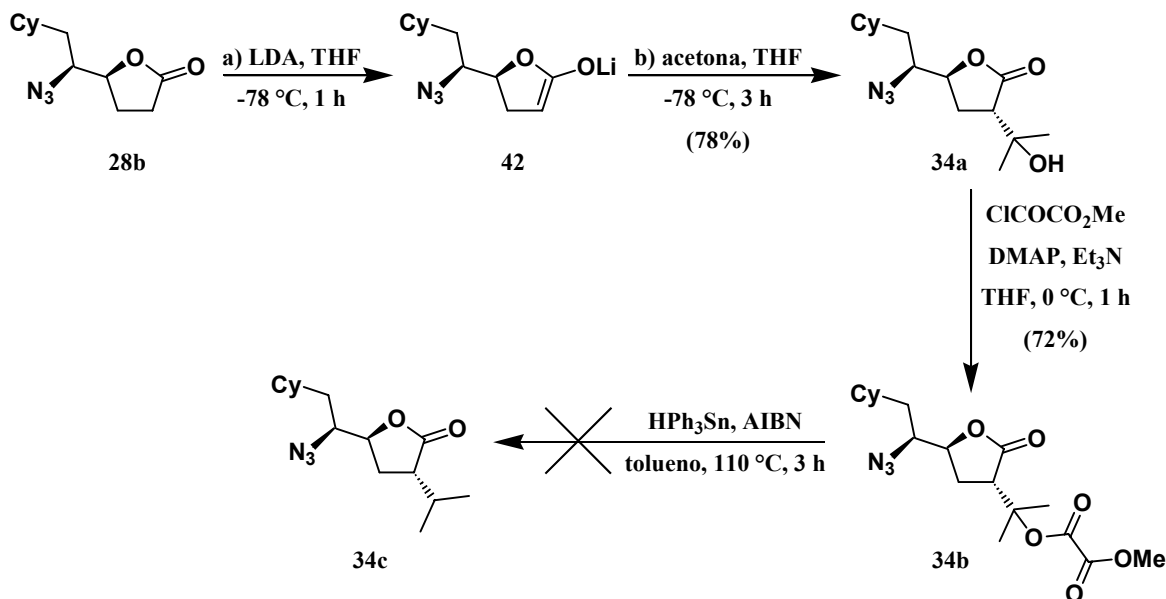
El tratamiento subsiguiente de **41a** con azida sódica en DMF anhidra a 80 °C condujo en muy buen rendimiento al azidoderivado **28b**, en cuyo espectro de IR se observó a 2107 cm⁻¹ la banda de absorción característica del grupo azida y a 1781 cm⁻¹ la banda característica del grupo carbonilo.

Prosiguiendo con nuestro plan de síntesis (Esquema 8, pág. 48), una vez obtenida la azidolactona **28b** se procedió a ensayar la introducción de un grupo isopropilo en la posición α a su grupo carbonilo. Teniendo en cuenta los precedentes bibliográficos sobre este tipo de alquilaciones,⁵⁷ se decidió descartar la alquilación directa del enolato **42a** (Esquema 15, pág. 56) con yoduro de isopropilo, debido a la tendencia de los haluros de alquilo secundarios a experimentar reacciones de β-eliminación frente a estas reacciones de sustitución nucleófila bimolecular. Por

⁵⁶ Fleet, G. W. J.; Witty, D. R. "Synthesis of homochiral β-hydroxy-α-aminoacids [(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxyproline and (2S,3R,4R)-3,4-dihydroxypipercolic acid] and of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol [DAB1] and fagomine [1,5-imino-1,2,5-trideoxy-D-arabino-hexitol]" *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 119-136.

⁵⁷ Pellissier, H.; Michellys, P.-Y.; Santelli, M. "Highly stereoselective alkylation of spiro-γ-lactones" *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5588-5591.

ello, se optó por llevar a cabo la alquilación de **28b** por el método indirecto indicado a continuación.⁵⁸



Esquema 15

Para ello se hizo reaccionar la ciclohexillactona **28b** con LDA recién preparado a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, generándose así el enolato **42**, al cual se le adicionó acetona seca. Al cabo de 3 horas de reacción a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvo la hidroxilactona **34a** con buen rendimiento, tras una purificación cromatográfica. La caracterización del producto obtenido se realizó en base a sus datos espectroscópicos. La presencia en su espectro de RMN-¹H de dos singletes a 1.27 y 1.34 ppm, debidos a los metilos del grupo 2-hidroxipropilo, así como la presencia en su espectro de IR de una banda a 3480 cm^{-1} , característica del grupo hidroxilo libre, confirmaron que la alquilación había transcurrido satisfactoriamente. La configuración del nuevo centro estereogénico de la posición C-2 se estableció basándose en los resultados similares previos y se confirmó mediante un estudio detallado de las constantes de acoplamiento observadas en su espectro de RMN-¹H para los protones H-2, H-3, H-3' y H-4 (Figura 24, pág. 57).

⁵⁸ Hanessian, S.; Grillo, T. A.; Smith, G. M. "Synthesis of (4S)-hydroxymethyl-(2R)-(2-propyl)butyrolactone: a quest for a practical route to an important hydroxyethylene isostere chiron" *Tetrahedron* **1997**, 53, 6281-6294.

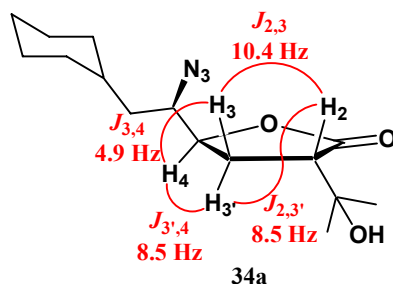


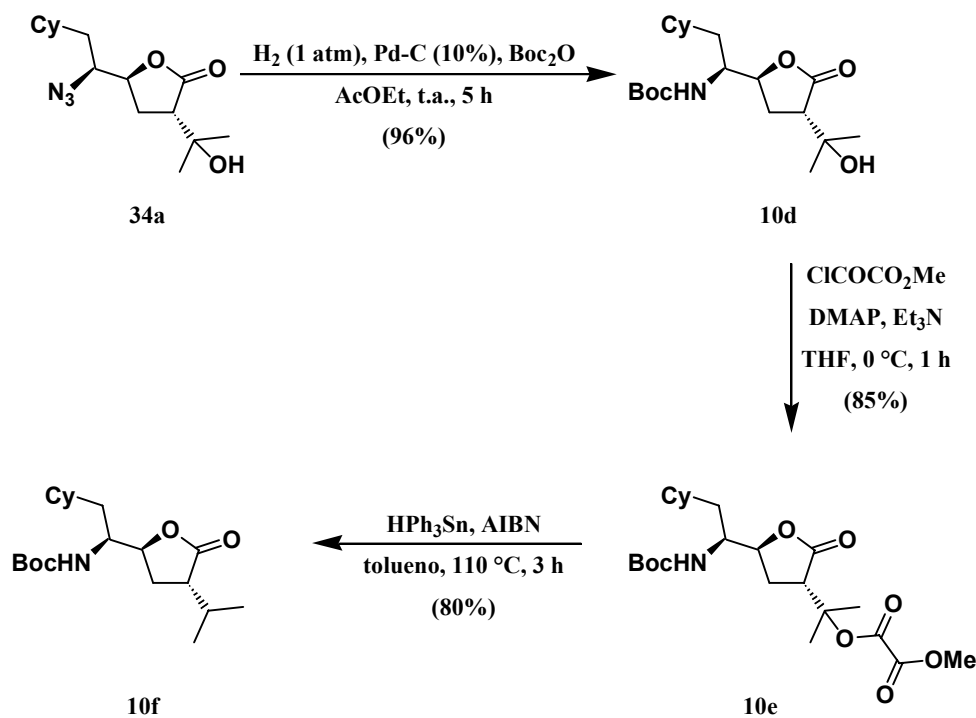
Figura 24: Constantes de acoplamiento de la lactona **34a**.

Tal y como se describe en la regla de Karplus de acoplamiento entre protones vecinales, el valor de la constante de acoplamiento entre dos protones depende del ángulo diedro que formen, de modo que la constante de acoplamiento es máxima (10-13 Hz) para ángulos diedro de 0° y 180° y es menor (4-8 Hz) si el ángulo diedro tiende a 90° ($J_{0^\circ} > J_{90^\circ} < J_{180^\circ}$). Dado que para el compuesto **34a** se observó en su RMN- ^1H que $J_{2,3} > J_{2,3'}$, los protones H-2 y H-3 deben estar en disposición *sin* formando un ángulo de 0° . Por otra parte, dado que $J_{3,4} < J_{3',4}$, los protones H-3 y H-4 deben estar en disposición *anti*. Consiguientemente H-2 y H-4 están también en disposición *anti*.

Este procedimiento indirecto para alquilar la lactona **28b** requiere ahora eliminar el hidroxilo presente en la hidroxilactona **34a** recién sintetizada. Nos pareció que sería un método adecuado para ello la formación de un oxalato sobre el grupo hidroxilo, para proceder después a su eliminación radicalaria por tratamiento con hidruro de trifenilestaño.⁵⁹ De acuerdo con ello, la azidolactona **34a** se transformó en el oxalato **34b**, pero desafortunadamente, al tratar este compuesto con hidruro de trifenilestaño se obtuvo una mezcla compleja de reacción carente de interés (Esquema 15, pág. 56).

Este resultado insatisfactorio se atribuyó a la presencia del grupo azida, dado que al hidrogenar **34a** y proteger la amina resultante como carbamato de *t*-butilo en **10d**, se obtuvieron resultados satisfactorios al repetir el proceso de desoxigenación (Esquema 16, pág. 58).

⁵⁹ Hanessian, S.; Grillo, T. A.; Smith, G. M. "Synthesis of (4S)-hydroxymethyl-(2R)-(2-propyl)butyrolactone: a quest for a practical route to an important hydroxyethylene isostere chiron" *Tetrahedron* **1997**, 53, 6281-6294.

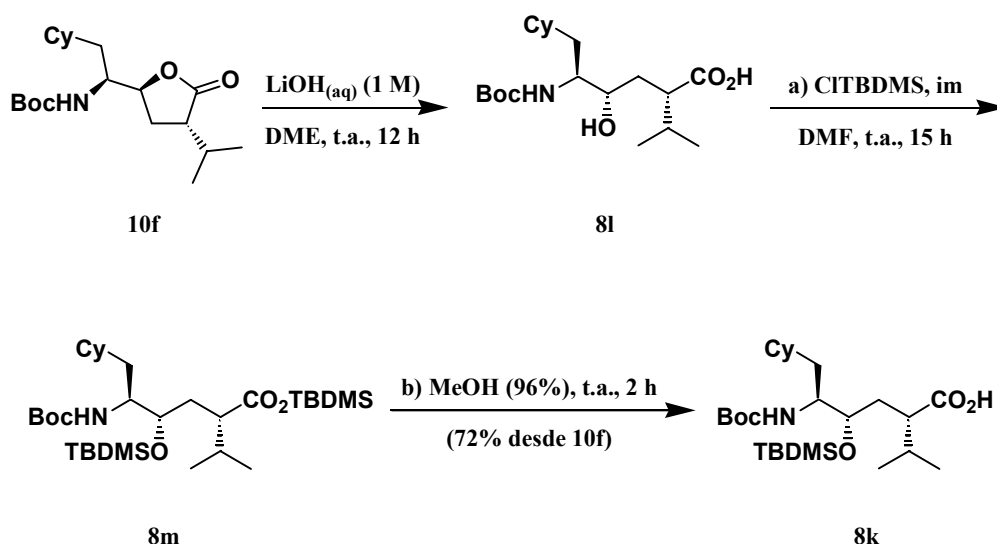


Esquema 16

Efectivamente, la hidrogenación catalítica de la azidolactona **34a** en presencia de anhídrido de *t*-butoxicarbonilo condujo de forma prácticamente cuantitativa a la aminolactona *N*-Boc protegida **10d**, que se caracterizó fácilmente en base las señales mostradas en sus espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C. Así, su grupo *t*-butoxicarbonilo mostró en el espectro de RMN-¹H un singlete de nueve protones a 1.45 ppm. Además su espectro de RMN-¹³C exhibió a 28.1 ppm las señales de los tres metilos del grupo Boc, a 71.3 ppm la señal de su carbono cuaternario y a 156.1 ppm la señal de su grupo carbonilo.

A continuación, se ensayó con la aminolactona **10d** la secuencia de desoxigenación probada anteriormente con **34a** (Esquema 15, pág. 56), observándose que el proceso deseado tuvo lugar de manera satisfactoria, con un rendimiento global del 68% (Esquema 16). La ciclohexilisopropillactona **10f** obtenida, mostró espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C muy similares a los de su análoga hidroxilada **10d**, diferenciándose en que los metilos del grupo isopropílico aparecieron ahora como dobletes a 0.93 y 1.00 ppm, debido a su acoplamiento con el protón que reemplaza al grupo hidroxilo. En el espectro de RMN-¹³C, el nuevo grupo CH generado apareció a 29.1 ppm.

Finalmente, una vez obtenida la lactona **10f** deseada, procedimos a llevar a cabo la apertura de su ciclo lactónico en medio acuoso básico, y a proteger a continuación el hidroxilo libre del δ -aminoácido **8l** resultante (Esquema 17, pág. 59).



Esquema 17

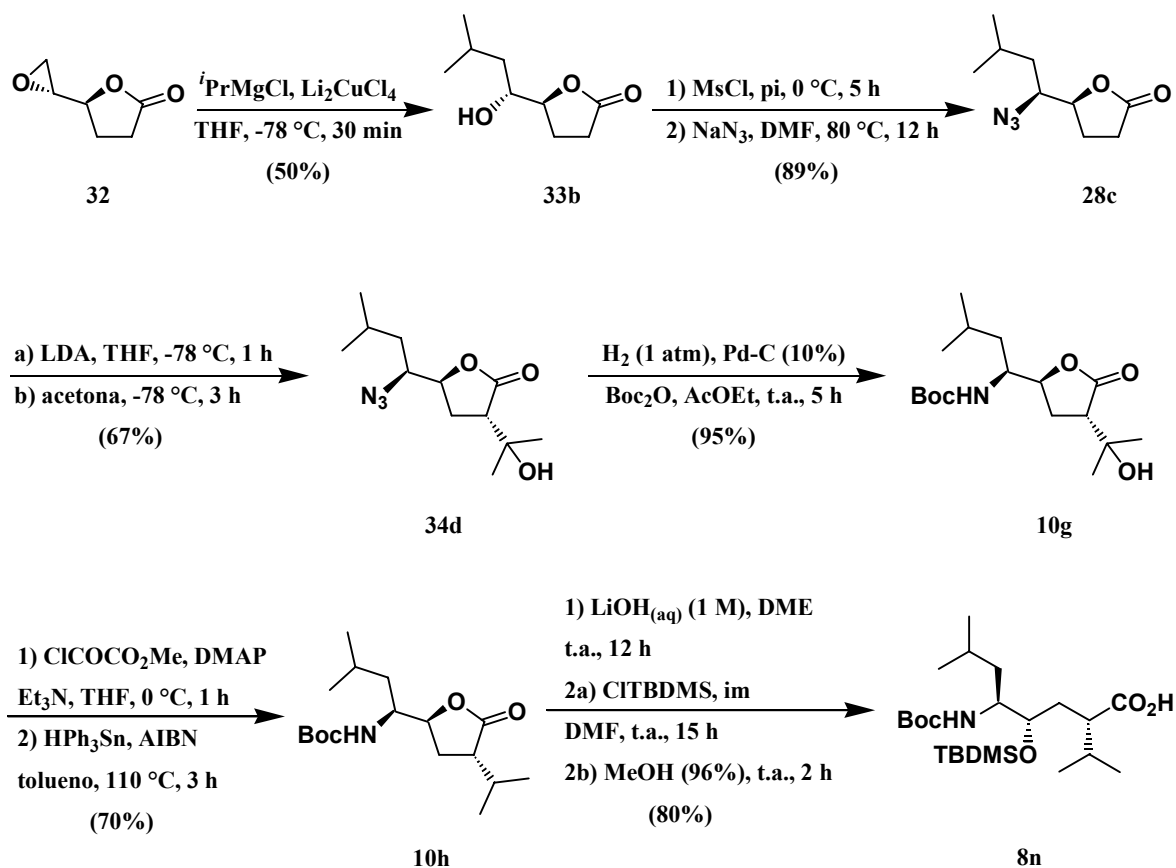
La reacción de **10f** con hidróxido de litio en una mezcla de agua y dimetoxietano condujo al hidroxiaácido **8l**, que se hizo reaccionar directamente con cloruro de *t*-butildimetilsililo e imidazol, para proteger su grupo OH libre. Dado que en estas condiciones de reacción se produjo también la sililesterificación del grupo carboxilo, el compuesto disililado **8m** se trató *in situ* con metanol para regenerar el grupo carboxilo libre.

Se obtuvo de este modo el isómero **8k** deseado con un rendimiento del 72% desde la lactona **10f**. Su fórmula y masa molecular, determinadas por medio de análisis elemental y espectrometría de masas, coincidieron con las teóricamente esperadas. Además, la aparición en su espectro de RMN-¹H de las señales propias del grupo *t*-butildimetilsililo [multiplete a 0.07-0.10 ppm (6 H, 2 × CH₃), singlete a 0.89 ppm (9 H, 3 × CH₃)] confirmaron la estructura del compuesto aislado.

De este modo, se obtuvo el primer isómero de nuestro panel de cuatro HE- δ -aminoácidos (Figura 23, pág. 40). El proceso desarrollado implicó la realización de una secuencia de doce reacciones, siendo el rendimiento global del 4% a partir de la D-glucono-1,5-lactona comercial.

• Síntesis de los isómeros **8n**, **8o** y **8p**.

Una vez puesta a punto nuestra aproximación de síntesis de isómeros de HE- δ -aminoácido mediante la preparación del isómero **8k**, se ensayó su aplicación a la síntesis de los restantes isómeros de nuestro panel de HE- δ -aminoácidos, abordando en primer lugar la preparación del isómero **8n** (Esquema 18, pág. 60).



Esquema 18

Para ello, partiendo de la epoxilactona **32** previamente preparada (Esquema 10, pág. 51), se llevó a cabo la apertura de su epóxido con el organocuprato ahora requerido ($i\text{PrMgCl} + \text{Li}_2\text{CuCl}_2$). Se obtuvo así en un rendimiento moderado del 50% la isopropilactona **33b**, cuyo grupo OH se reemplazó a continuación por un grupo azida. Una vez obtenida la azidolactona **28c**, se continuó llevando a cabo la alquilación estereoselectiva la posición α al carbonilo de **28c** por reacción con LDA y acetona en las condiciones indicadas, hidrogenado el grupo azida de **34d** y eliminando el grupo hidroxilo de **10g**. La configuración del centro estereogénico de la posición α de esta lactona **34d** se estableció fácilmente, como en el caso anterior, a partir de las constantes de acoplamiento entre los protones H-2, H-3, H-3' y H-4 observadas en su espectro de RMN- ^1H (Figura 25).

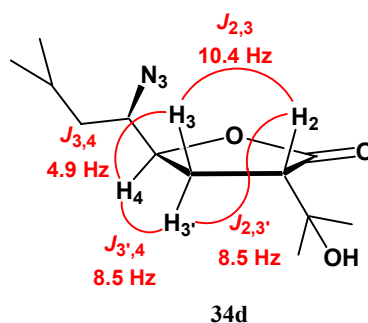


Figura 25: Constantes de acoplamiento de la lactona **34d**.

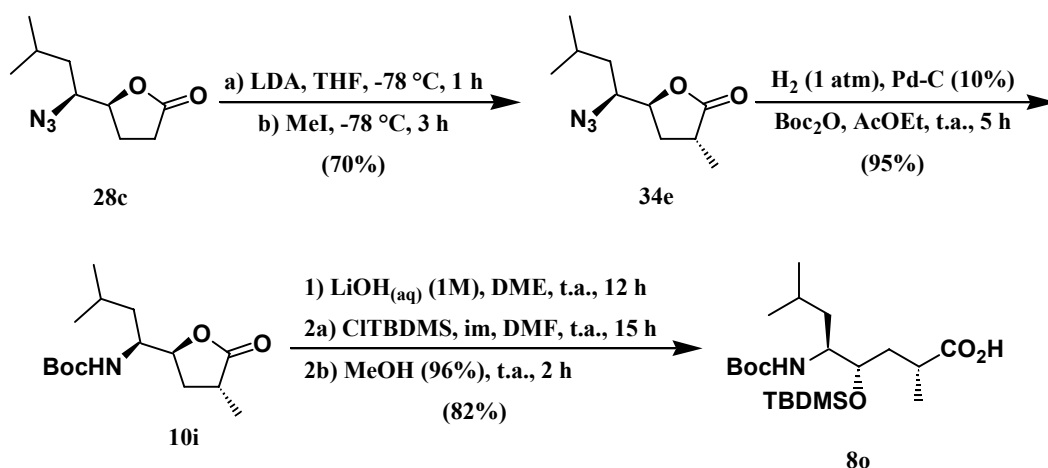
Tal y como se puede comprobar en la Figura 25, dado que $J_{2,3} > J_{2,3'}$, H-2 y H-3 están en disposición *sin*. Y dado que $J_{3,4} < J_{3',4}$ determina que H-3 y H-4 están en disposición *anti*. Consiguientemente H-2 y H-4 están también en disposición *anti*.

Finalmente se procedió a transformar la lactona **10h** en nuestro segundo isómero **8n**, mediante la secuencia de tres pasos que está indicada en el Esquema 18 (pág. 60).

Se obtuvo de este modo el isómero **8n**, cuya fórmula y masa molecular fueron confirmadas por medio de análisis elemental y espectrometría de masas. La aparición en su espectro de RMN-¹H de las señales del grupo *t*-butildimetilsililo [multiplete a 0.06-0.10 ppm (6 H, 2 × CH₃), singlete a 0.90 ppm (9 H, 3 × CH₃)] confirmaron también la estructura del compuesto aislado.

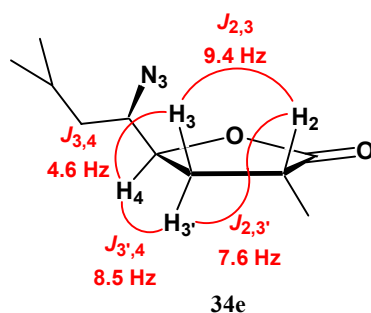
El rendimiento global de la síntesis de este isómero resulto ser de un 4%, tras una secuencia de doce reacciones desde la D-glucono-1,5-lactona comercial.

El tercer isómero a sintetizar tiene como sustituyentes un isopropilo y un metilo en las posiciones C-5 y C-2 respectivamente. La introducción del grupo metilo sobre la azidolactona **28c**, ya preparada anteriormente (Esquema 18, pág. 60), condujo a través del protocolo de preparación de nuestros dos primeros isómeros **8k** y **8n** a este tercer isómero **8o**, también con alto rendimiento y selectividad (Esquema 19, pág. 62).



Esquema 19

Como en los casos anteriores, la configuración del nuevo centro estereogénico formado tras la alquilación de la posición α de la azidolactona **28c** se determinó gracias a las constantes de acoplamiento de los protones H-2, H-3, H-3' y H-4 observadas en su espectro de RMN-¹H (Figura 26).

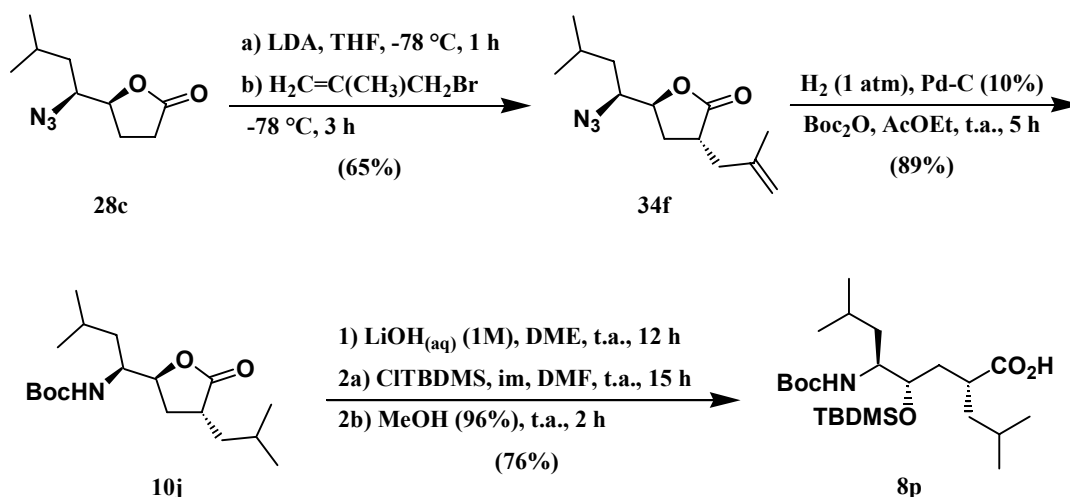
Figura 26: Constantes de acoplamiento de la lactona **34e**.

De nuevo, dado que $J_{2,3} > J_{2,3'}$, H-2 y H-3 están en disposición *sin*, y dado $J_{3,4} < J_{3',4}$, H-3 y H-4 están en disposición *anti*, lo que determina que H-2 y H-4 estén también en disposición *anti*.

El isómero **80** se obtuvo a partir de la lactona **10i**, como se explica en el Esquema 19, confirmándose su estructura mediante la obtención de su fórmula y masa molecular por medio de análisis elemental y espectrometría de masas. Este tercer isómero de HE- δ -aminoácido se obtuvo en un rendimiento global del 6%, mejorando el obtenido en los dos casos anteriores, dado que la secuencia de reacciones necesaria fue ahora de sólo 10 pasos.

Nuestro último isómero **8p** se diferencia de los dos anteriores, **8n** y **8o**, en el sustituyente de la posición C-2, que ahora es un grupo isobutilo. Su introducción sobre el precursor común a todos ellos, la azidolactona **28c**, condujo como se

esperaba, a este cuarto isómero **8p**. Ante la eventualidad de que la alquilación directa con bromuro de isobutilo se viese desfavorecida frente al proceso competitivo de deshidrohalogenación del grupo alquilante⁶⁰, se optó por llevar a cabo la alquilación indirecta con bromuro de metilalilo e hidrogenar luego el doble enlace C=C del sustituyente introducido en la etapa posterior de reducción del grupo azida a amina, tal y como se indica en el siguiente esquema.



Tal como se indica, la alquilación de **28c** con bromuro de metilalilo condujo a la lactona **34f** en la que la configuración del nuevo centro estereogénico formado se determinó gracias a las constantes de acoplamiento de los protones H-2, H-3, H-3' y H-4 observadas en su espectro de RMN-¹H (Figura 27).

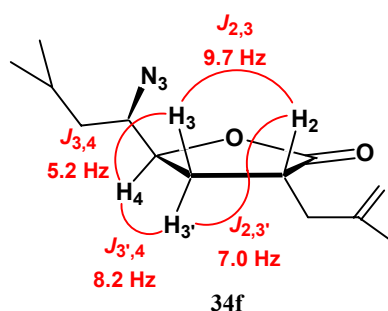


Figura 27: Constantes de acoplamiento de la lactona **34f**.

Así, dado que $J_{2,3} > J_{2,3'}$, H-2 y H-3 están en disposición *sin*, y dado $J_{3,4} < J_{3',4}$, H-3 y H-4 están en disposición *anti*, lo que implica que H-2 y H-4 estén también en disposición *anti*.

⁶⁰ Fray, A. H.; Kaye, R. L.; Kleinman, E. F. "A short, stereoselective synthesis of lactone precursor to (2R,4S,5S) hydroxyethylene dipeptide isosteres" *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4828-4833.

Finalmente, la hidrogenación de la lactona **34f** en las condiciones ya ensayadas en los casos similares previos, condujo en buen rendimiento a la lactona precursora **10j**, la cual se transformó en el isómero **8p** por medio de la secuencia de reacciones habitual, terminando así la síntesis de este último isómero con un rendimiento global del 5% después de 10 pasos de reacción.

3.2. Síntesis de isómeros HE-1-aminobutan-2-ol.

3.2.1. Antecedentes y plan de síntesis.

Con objeto de completar nuestro trabajo de síntesis de la relación de isómeros del panel de la pág. 40, se abordó en una segunda fase la preparación de los dos isómeros del tipo HE-1-aminobutan-2-ol allí incluidos (**9a** y **9b**)

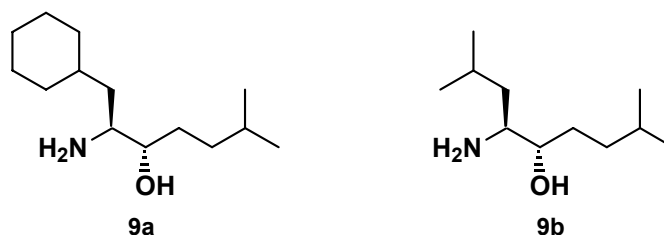
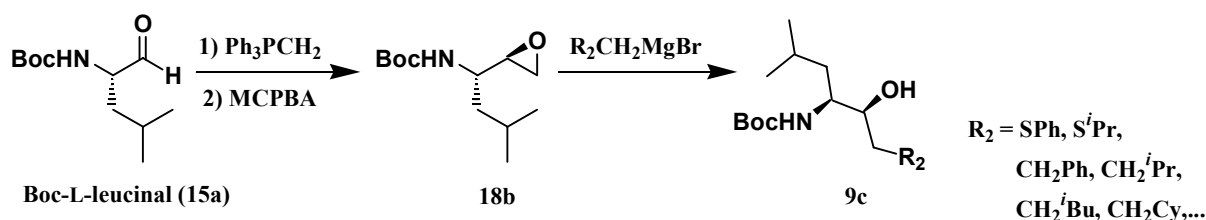


Figura 28: Isómeros de HE-2-aminobutan-2-ol.

Los inhibidores con isómeros de HE-1-aminobutan-2-ol han sido empleados con asiduidad para llevar a cabo la inhibición de la aspartilproteasa renina. Una de las primeras síntesis de este tipo de compuestos es debida a Luly⁶¹, que partió del aminoaldehído **15a** derivado de la L-leucina, con el que preparó el epoxiderivado **18b**, que transformó en los isómeros **9c** deseados (Esquema 21).



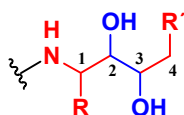
Esquema 21

Es evidente que esta estrategia de síntesis de isómeros HE-1-aminobutan-2-ol es de interés cuando se puede partir de aminoácidos proteínogénicos. En otros casos la síntesis se complica dada la necesidad de sintetizar los aminoácidos de partida.

⁶¹ a) Luly, J. R.; BaMaung, N.; Soderquist, J.; Fung, A. K. L.; Stein, H.; Kleinert, H. D.; Marcotte, P.A.; Egan, D. A.; Bopp, B.; Merits, I.; Bolis, G.; Greer, J.; Perun, T. J.; Plattner, J. J. "Renin inhibitors. Dipeptide analogues of angiotensinogen utilizing a dihydroxyethylene transition-state mimic at the scissile bond to impart greater inhibitory potency" *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2264-2276. b) Plattner, J. J.; Marcotte, P. A.; Kleinert, H. D.; Stein, H. H.; Greer, J.; Bolis, G.; Fung, A. K. L.; Bopp, B. A.; Luly, J. R.; Sham, H. L.; Kempf, D. J.; Rosenberg, S. H.; Dellaria, J. F.; De, B.; Merits, I.; Perun, T. J. "Renin inhibitors. Dipeptide analogues of angiotensinogen utilizing a structurally modified phenylalanine residue to impart proteolytic stability" *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2277-2288.

Las restantes síntesis de isómeros de HE-1-aminobutan-2-ol publicadas parten también de α -aminoácidos proteínogénicos, lo que conlleva a que no haya un procedimiento sencillo para la obtención de este tipo de isómeros cuando el sustituyente de la posición C-2 no provenga de un aminoácido proteínogénico.

Sin embargo, son mucho más abundantes las síntesis publicadas para la preparación de isómeros de dihidroxi-etileno (Figura 29).

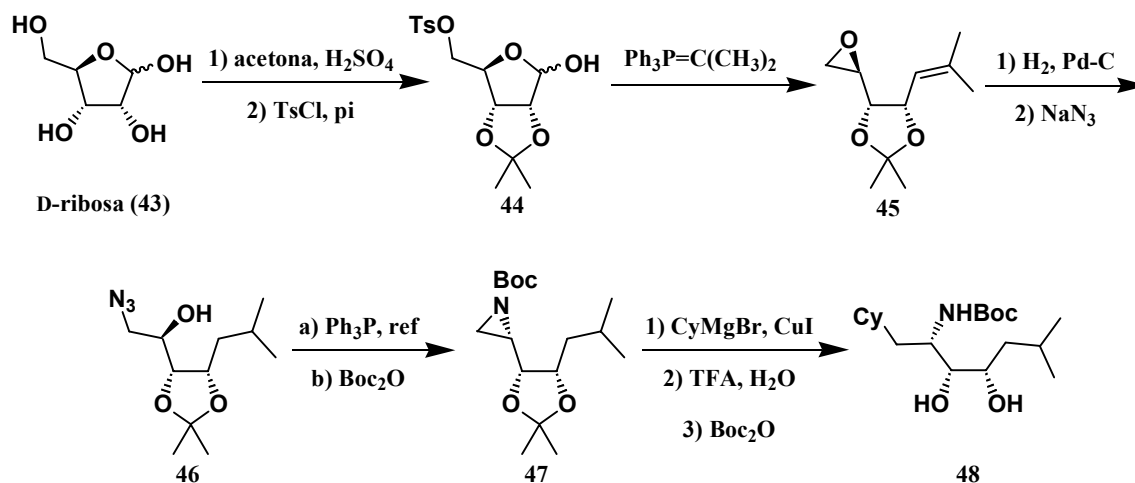


ISÓSTERO DIHIDROXIETILENO

Figura 29: Estructura general de isómeros de dihidroxi-etileno sin grupo ácido carboxílico.

Estos isómeros tienen una estructura similar a la de los que nos ocupa, conteniendo un grupo hidroxilo adicional en su posición C-3. Al igual que los isómeros de HE-1-aminobutan-2-ol, se incorporan en el extremo de una cadena peptídica, para generar inhibidores de aspartilproteasas.

Uno de los procedimientos más importantes y versátiles para la preparación de este tipo de isómeros fue desarrollado por Chan (Esquema 22).⁶² En él se parte de un azúcar en lugar de un aminoácido proteínogénico consiguiendo una estereoselectividad total en la introducción de los sustituyentes del isómero.



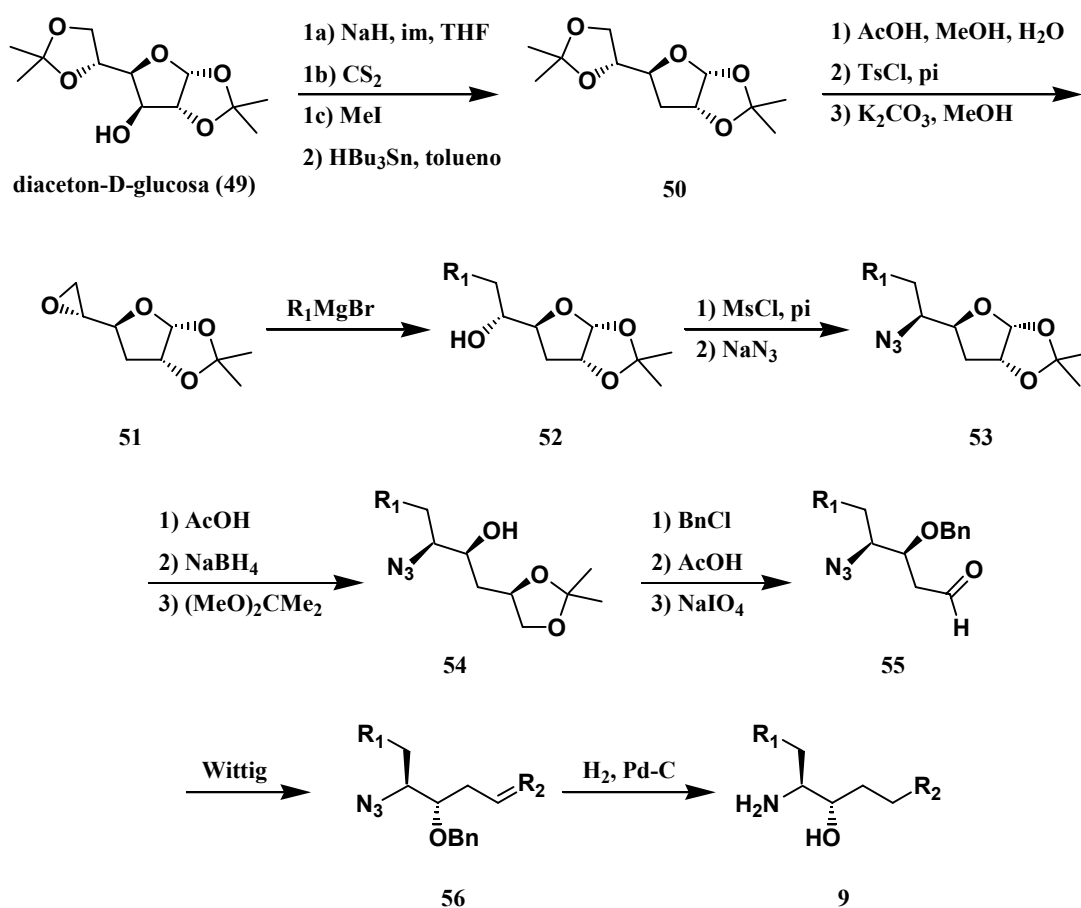
Esquema 22

Partiendo de la D-ribose (43) comercial, un proceso de dos reacciones condujo al lactol 44, sobre el que a través de una reacción de Wittig se introdujo un grupo

⁶² Chan, M. F.; Hsiao, C. N. "A versatile stereospecific synthesis of a dihydroxyethylene dipeptide isostere of renin inhibitors from D-ribose" *Tetrahedron Lett.* **1992**, 25, 3567-3570.

isopropilidénico, formándose así la olefina **45**. La hidrogenación de su doble enlace, seguida de la apertura del ciclo oxiránico con azida sódica, condujo al azidoalcohol **46**, el cual por reacción con trifenilfosfina y anhídrido de *t*-butoxicarbonilo dio la aziridina **47**. La reacción de este compuesto con bromuro de ciclohexilmagnesio, seguida de la hidrólisis ácida de los grupos protectores y la protección del grupo amino con anhídrido de *t*-butoxicarbonilo, permitió obtener el isómero de dihidroxietileno **48**, tras una secuencia totalmente estereoespecífica.

Aunque esta ruta no es directamente aplicable a la síntesis de isómeros de HE-1-aminobutan-2-ol (**9**), su enorme interés y versatilidad nos llevó a adaptarla a la síntesis de este tipo de isómeros, proponiendo para ello la estrategia siguiente a partir de la diaceton-D-glucosa (**49**) comercial.



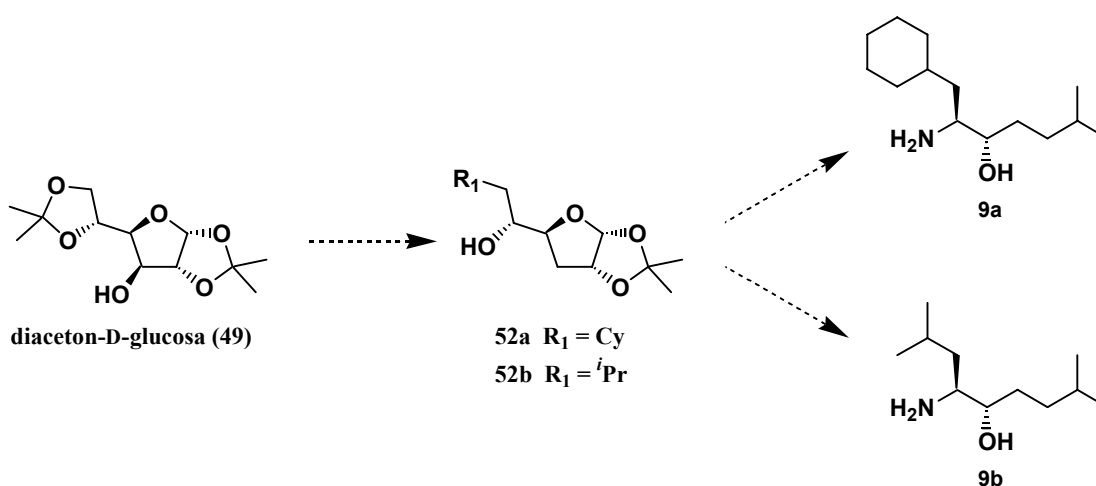
Esquema 23

La diaceton-D-glucosa (**49**) comercial se transformaría en su epoxiderivado **51**, sobre el que se llevaría a cabo la incorporación de la primera funcionalidad alquímica R₁ presente en los isómeros **9**, al permitirnos obtener hidroxifuranosas **52**. Después, se llevarían a cabo reacciones de transformación de estas hidroxifuranosas **52** en las

azidofuranosas **53**, que ya habían sido descritas por Hiroaki.⁶³ La no ensayada transformación de estos azidoderivados **53** en los azidoaldehídos **55**, a través de los azidoalcoholes **54**, nos permitiría obtener compuestos adecuados sobre los que llevar a cabo la introducción de grupos R_2 por medio de reacciones de Wittig conducentes a las olefinas **56**. Finalmente, la hidrogenación completa de **56** nos llevaría a los isómeros **9**, a incorporar en nuestros inhibidores peptídicos. Los trabajos de preparación de estos isómeros mediante este plan de síntesis se describen a continuación.

3.2.2. Desarrollo del plan de síntesis.

Basándonos en el plan de síntesis establecido, comenzamos el estudio de la síntesis de nuestros dos isómeros del tipo HE-1-aminobutan-2-ol **9a** y **9b** abordando la transformación de la diaceton-D-glucosa (**49**) en las hidroxifuranosas monoalquiladas **52a** y **52b** (Esquema 24).

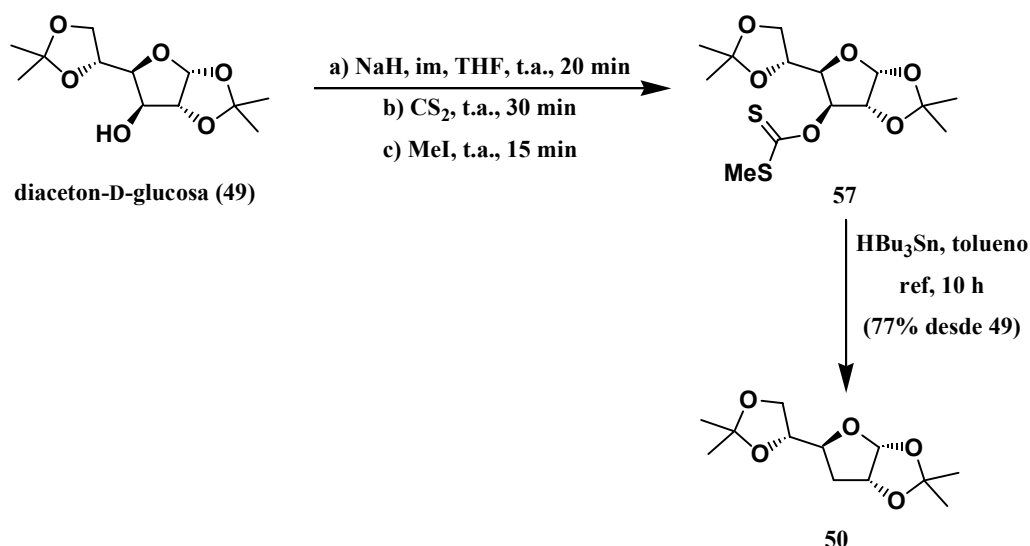


Esquema 24

Para ello, en primer lugar se aplicó a la diaceton-D-glucosa (**49**) la conocida secuencia de desoxigenación de Barton,⁶⁴ que nos permitió obtener en buen rendimiento la 3-desoxidiaceton-D-glucosa (**50**) (Esquema 25, pág. 69).

⁶³ Hiroaki, Y.; Takuro, K.; Takahide, N. "Synthesis of statine and its analogs" *Chem. Lett.* **1989**, 4, 687-690.

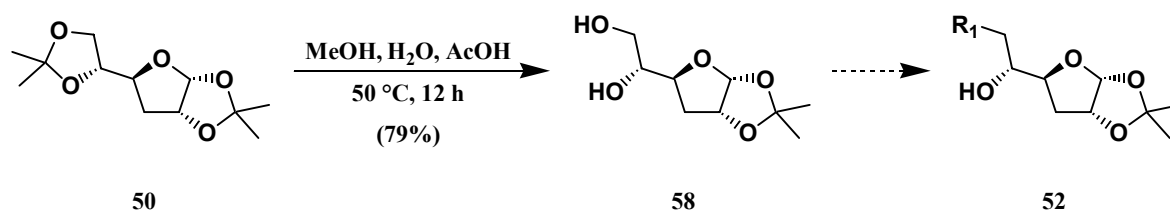
⁶⁴ Barton, D. H. R.; McCombie, S. W. "A new method for the deoxygenation of secondary alcohols" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1975**, 1574-1585.



Esquema 25

Esta secuencia comenzó con la reacción de la diacetone-D-glucosa (49) con hidruro sódico, disulfuro de carbono y yoduro de metilo. Se aisló así el S-metilditiocarbonato 57, el cual por reacción con hidruro de tributilestaño en tolueno a reflujo, condujo a la 3-desoxidiacetone-D-glucosa (50), como un aceite transparente tras su purificación en un horno de bolas (p.eb.: 120 °C, 5 mm Hg). La desoxigenación se confirmó en base a las propiedades espectroscópicas del producto obtenido, dado que el grupo CH₂ de la posición C-3 apareció en el espectro de RMN-¹H como un multiplete de un protón a 1.71-1.83 ppm y un doblete de otro protón a 2.20 ppm. En el espectro de RMN-¹³C la señal de este metileno apareció a 35.0 ppm y en el espectro de IR no apareció ninguna señal indicativa de la presencia de un hidroxilo libre.

La siguiente parte de nuestro trabajo consistió en estudiar la funcionalización programada de la posición C-6 de la 3-desoxi-D-glucofuranosa (50), con objeto de preparar las furanosas 52 (Esquema 26).

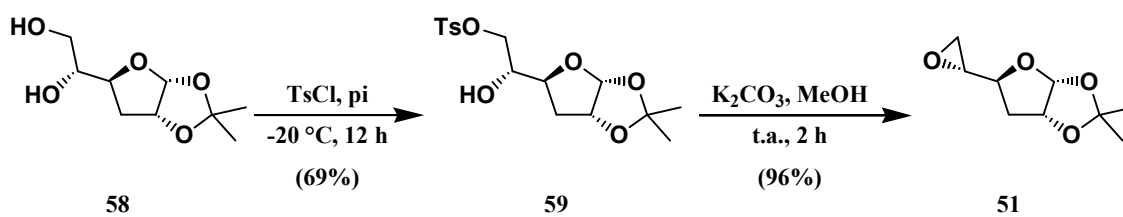


Esquema 26

El protocolo correspondiente a esta transformación comenzó con la hidrólisis selectiva del acetal exocíclico del sustrato 50, que se llevó a cabo calentando a 50 °C durante 12 horas una disolución de este compuesto en una mezcla de metanol, agua

y ácido acético. Se obtuvo de este modo la 3-desoxi-glucofuranosa **58** en un 79% de rendimiento, como un sólido blanco que se cristalizó en hexano (p.f.: 78-80 °C). La ausencia en su espectro de RMN- ^1H de las señales de dos de los cuatro metilos de los grupos isopropilidénicos del sustrato de partida, así como la aparición en el espectro de IR de una banda ancha a 3420 cm^{-1} , asignable a los dos hidroxilos libres, confirmó que el producto aislado era el esperado.

La siguiente tarea consistió en la tosilación selectiva del hidroxilo de la posición terminal del sustrato **58**, seguida de la formación del epóxido **51** (Esquema 27).⁶⁵



Esquema 27

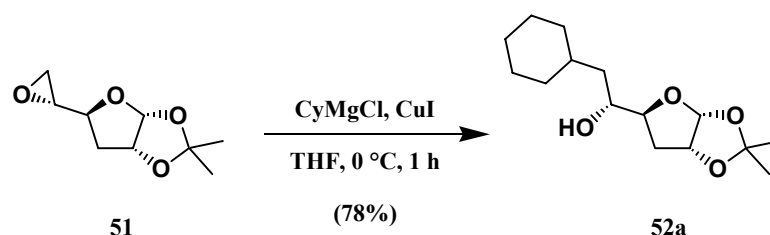
La reacción a -20 °C de la dihidroxifuranosa **58** con cloruro de tosilo en piridina seca condujo, tras 12 horas de reacción, a la tosil-D-glucofuranosa **59**, la cual, tras purificación cromatográfica, se disolvió en metanol anhidro y se trató con carbonato potásico anhidro. Al cabo de dos horas se aisló la epoxifuranosa **51** en buen rendimiento, en forma de aceite incoloro, el cual se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas. Su espectro de RMN- ^{13}C mostró las señales de los grupos CH y CH_2 del ciclo oxiránico a 51.4 y 44.9 ppm respectivamente, y su espectro de IR no mostró ninguna banda indicativa de la presencia de grupos OH libres.

Una vez obtenido este intermedio común para la síntesis de nuestros dos isómeros **9a** y **9b**, abordamos su preparación de forma independiente, procediendo a sintetizar en primer lugar el isómero **9a**.

- Síntesis del isómero HE-1-aminobutan-2-ol **9a**.

La preparación de este primer isómero se inició con la apertura del ciclo oxiránico de **51** con cloruro de ciclohexilmagnesio en presencia de yoduro de cobre (I), en las condiciones de Ghosh a que nos hemos referido anteriormente (Esquema 7, pág. 47).

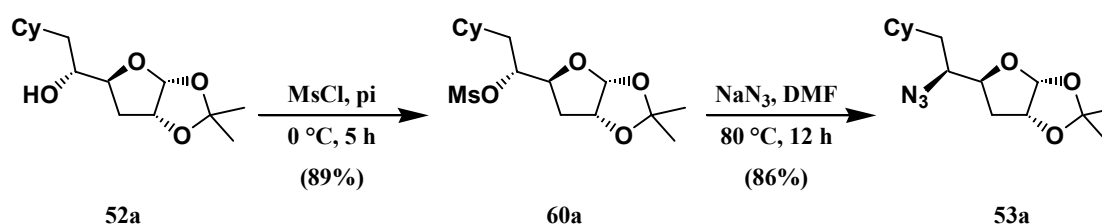
⁶⁵ Fleet, G. W. J.; Ramsden, N. G.; Witty, D. R. "A practical synthesis of deoxymannojirimycin and of (2S,3R,4R,5R)-3,4,5-trihydroxypipercolic acid from D-glucose" *Tetrahedron* **1989**, *45*, 327-336.



Esquema 28

La reacción de **51** con cloruro de ciclohexilmagnesio en tetrahidrofurano anhidro, en presencia de cloruro de cobre (I), condujo en buen rendimiento a la 6-ciclohexil- α -D-glucofuranosa **52a**, la cual se caracterizó a partir de sus datos espectroscópicos. La aparición en su espectro de RMN- ^{13}C de las señales del grupo ciclohexilo introducido (cinco grupos CH_2 a 26.0, 26.2, 26.5, 30.9 y 32.5 y un grupo CH a 33.8 ppm) confirmaron su estructura.

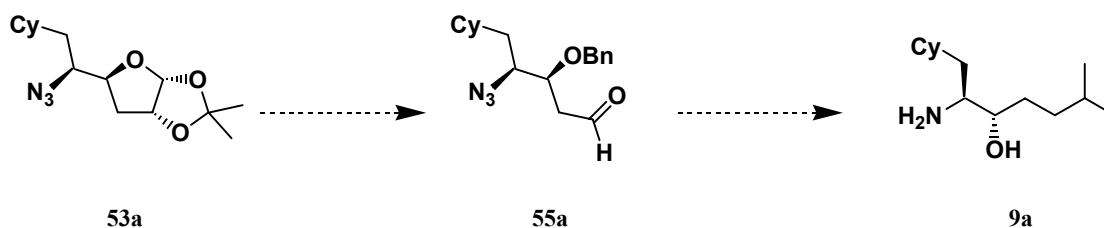
A continuación se llevaron a cabo las reacciones necesarias para transformar el grupo hidroxilo libre de la hidroxifuranosa **52a** en un grupo azido (Esquema 29), siguiendo un procedimiento similar al empleado previamente para preparar los isómeros HE- δ -aminoácido **8** (Esquema 14, pág. 55).



Esquema 29

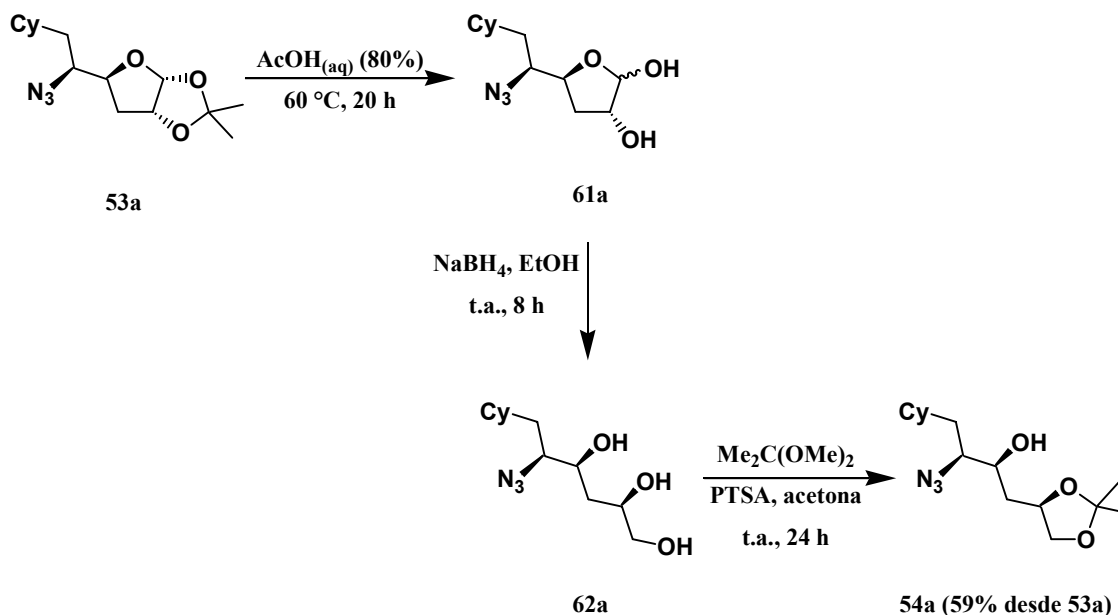
En primer lugar se llevó a cabo la reacción de mesilación del grupo hidroxilo libre de la furanosa **52a**, por reacción con cloruro de mesilo en piridina seca. Tras la elaboración, se obtuvo el mesilato **60a**, que se hizo reaccionar con azida sódica en DMF anhidra a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas y, tras una purificación cromatográfica, se obtuvo en excelente rendimiento la azidofuranosa **53a**, cuyo espectro de IR mostró a 2107 cm^{-1} la banda característica del grupo azido.

La última fase de la síntesis consistió en la introducción de la segunda cadena alquílica presente en el isómero a sintetizar. Tal y como habíamos previsto en el plan de síntesis inicial, nos pareció conveniente tratar de obtener a partir del azidoderivado **53a** el aldehído **55a**, para introducir luego mediante una reacción de Wittig la segunda funcionalidad alquílica: un grupo isopropilo (Esquema 30, pág. 72). La versatilidad de la reacción de Wittig previsiblemente permitirá introducir una gran diversidad de sustituyentes alquílicos en esta posición.



Esquema 30

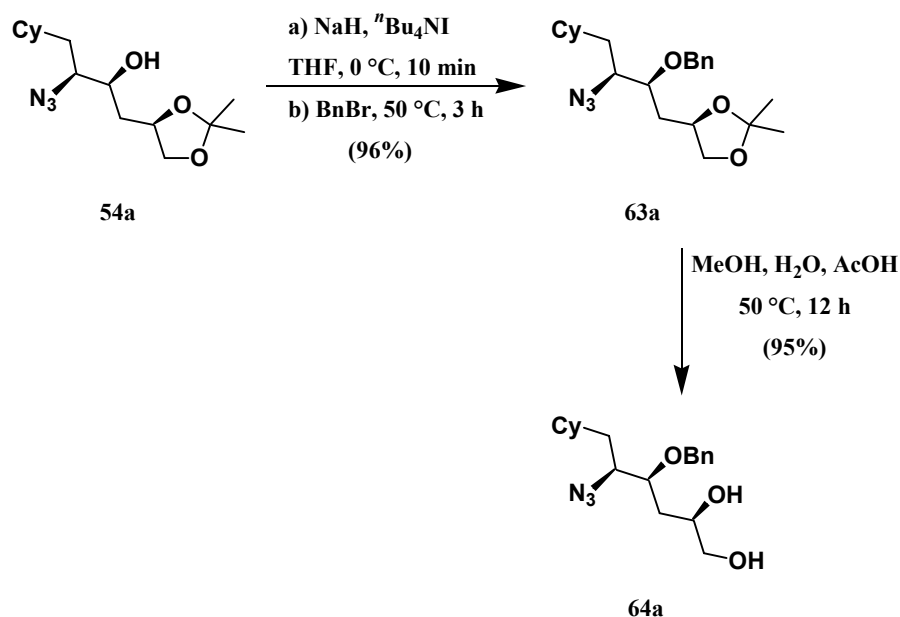
Esta parte final de la síntesis comenzó con la hidrólisis del azidoderivado **53a** en ácido acético concentrado a 60 °C, obteniéndose así el lactol **61a** (Esquema 31), cuya reducción con borohidruro sódico condujo al compuesto **62a**, que al ser tratado con 2,2-dimetoxipropano y acetona permitió obtener en rendimiento moderado el azidoalcohol **54a**.



Esquema 31

Este compuesto **54a** se caracterizó fácilmente en base a sus propiedades espectroscópicas. Cabe destacar entre ellas la presencia en su espectro de IR de las señales debidas al grupo hidroxilo y azido (3478 y 2107 cm^{-1} respectivamente), así como diversas señales de su espectro de RMN- ^{13}C (63.2 ppm para el grupo CH unido al hidroxilo libre, 69.4 ppm para el grupo CH_2 unido al hidroxilo protegido y 109.4 ppm para el carbono cuaternario del 1,3-dioxolano).

La siguiente tarea de la síntesis consistió en la bencilación del hidroxilo libre del compuesto **54a** y la eliminación del grupo isopropilidénico protector del diol terminal de **63a** (Esquema 32, pág. 73).

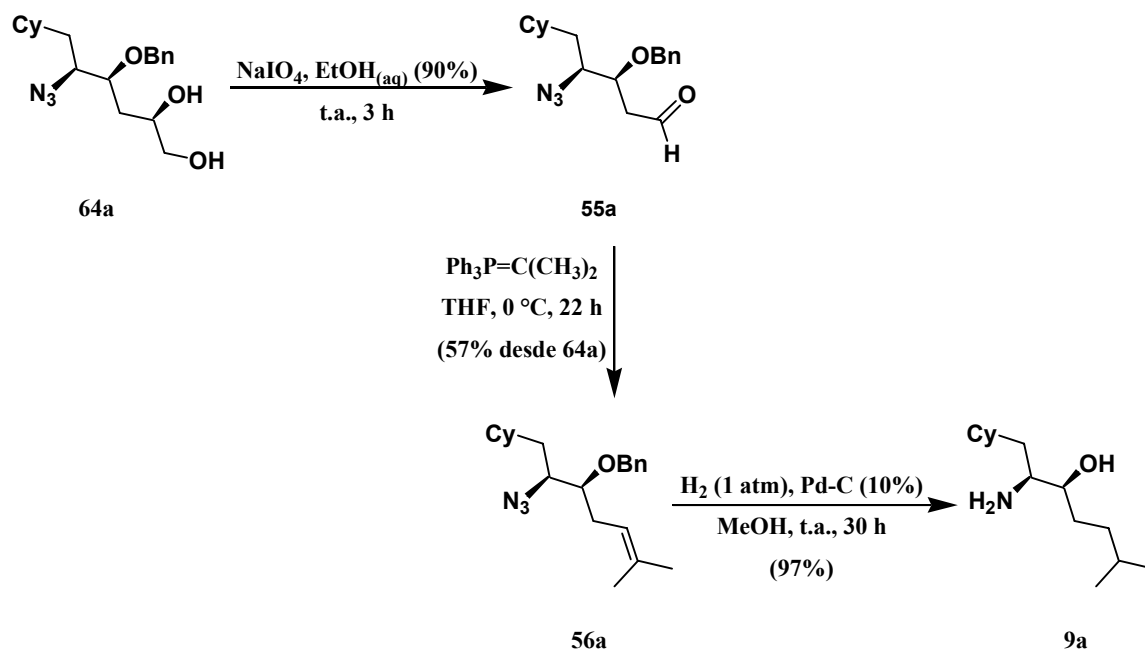


Esquema 32

Para llevar a cabo estos procesos, primero se hizo reaccionar el compuesto **54a** con hidruro sódico y bromuro de bencilo en THF anhidro, obteniéndose en rendimiento prácticamente cuantitativo el azidoderivado **63a**. La desprotección de su diol en medio ácido tuvo lugar en las condiciones usuales, calentando a 50 °C durante 12 horas una disolución del compuesto en una mezcla de metanol, ácido acético y agua. En el espectro de RMN-¹H del compuesto **64a** resultante se observó la ausencia de las señales del grupo isopropilidénico y la aparición de las señales del grupo bencílico (multiplete de cinco protones entre 7.27-7.36 ppm).

La última secuencia llevada a cabo fue la correspondiente a la reacción de obtención del aldehído **55a** seguida de la introducción del grupo isopropilidénico por medio de una reacción de Wittig (Esquema 33, pág. 74).⁶⁶ La hidrogenación posterior de la olefina **56a** obtenida nos permitió disponer de nuestro primer isómero del tipo HE-1-aminobutan-2-ol, el compuesto **9a**.

⁶⁶ Hajos, Z. G.; Wachter, M. P.; Adams, R. E.; Werblood, H. M. "Regiospecific synthesis of dioxabicyclooctanes containing a terminal prenyl sidechain" *Synth. Comm.* **1989**, *19*, 2891-2895.



Esquema 33

Para ello, tras llevar a cabo la ruptura oxidativa del diol de **64a** con peryodato sódico, el aldehído **55a** obtenido se sometió a las condiciones estándar de reacción de Wittig con el iluro de fósforo recién sintetizado a partir del yoduro de isopropiltrifenilfosfonio y *n*-butillitio. Tras 20 horas de reacción a 0 °C, se obtuvo la olefina **56a** con rendimiento moderado. Su espectro de RMN-¹³C mostró a 119.2 y 134.3 ppm las señales correspondientes al CH y C olefínicos respectivamente, así como a 17.9 y 25.8 ppm las señales de los CH₃ del grupo isopropeno introducido.

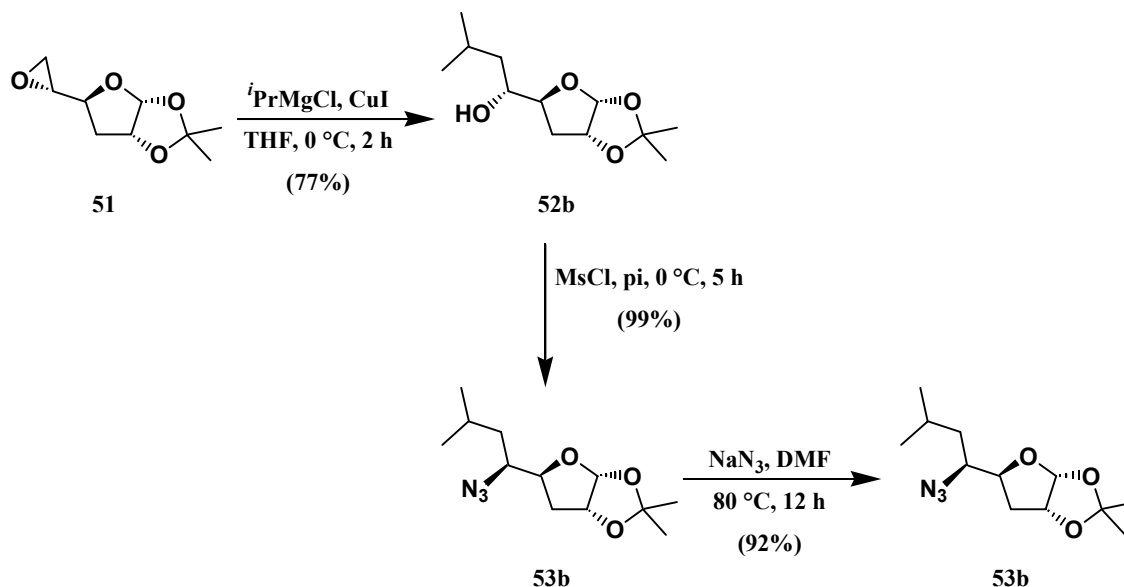
Finalmente, la hidrogenación simultánea de los grupos olefínico, azido y bencilo de **56a** a presión atmosférica durante 30 horas, empleando paladio sobre carbón activo como catalizador, dio en excelente rendimiento el isómero **9a** deseado, en la forma adecuada para su incorporación en inhibidores peptídicos, ya que no se requiere que el grupo hidroxilo esté protegido.

Este compuesto **9a** mostró en su espectro de RMN-¹³C dos señales a 22.6 y 22.9 ppm, correspondientes a los grupos CH₃, ocho señales a 26.3, 26.5, 26.6, 29.8, 32.6, 34.6, 35.0 y 43.7 ppm, correspondientes a los grupos CH₂, y cuatro señales a 28.3, 34.4, 52.4 y 80.6 ppm, correspondientes a los grupos CH.

Obtenido así este primer isómero de HE-2-aminoetanol, se pasó a aplicar esta estrategia de síntesis a la preparación de su análogo **9b** con sustituyentes isopropilo-isopropilo.

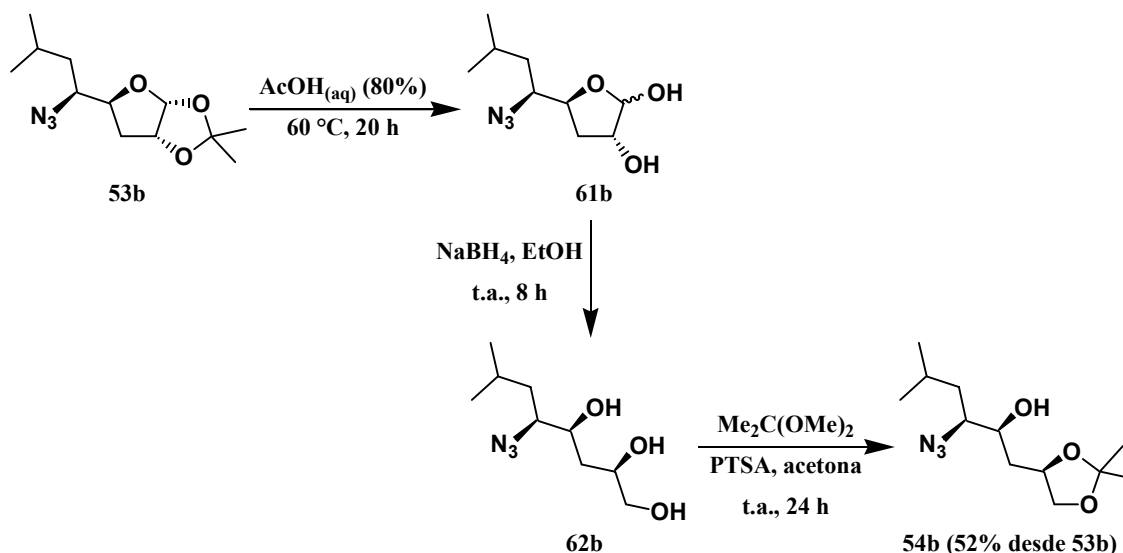
- Síntesis del isómero HE-1-aminobutan-2-ol **9b**.

Este segundo isómero HE-1-aminobutan-2-ol se preparó a partir del epóxido **51** previamente obtenido (Esquema 27, pág. 70), tal y como se indica a continuación:



En primer lugar, se hizo reaccionar **51** con cloruro de isopropilmagnesio, obteniéndose en un 77% la isopropilfuranosa **52b**, cuya estructura se confirmó fácilmente al observar en su espectro de RMN-¹³C la aparición de las señales pertenecientes al grupo isopropilo recién introducido (dos grupos CH₃ a 21.8 y 23.4 ppm y un grupo CH a 24.5 ppm). Cuando **52b** se sometió a continuación al protocolo ya empleado anteriormente en la transformación de un hidroxilo libre en un grupo azida, se obtuvo en excelente rendimiento la azidofuranosa **53b**, la cual mostró espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C similares a los de su precursor **52b**, y un espectro de IR en el que apareció la señal del grupo azida a 2111 cm⁻¹.

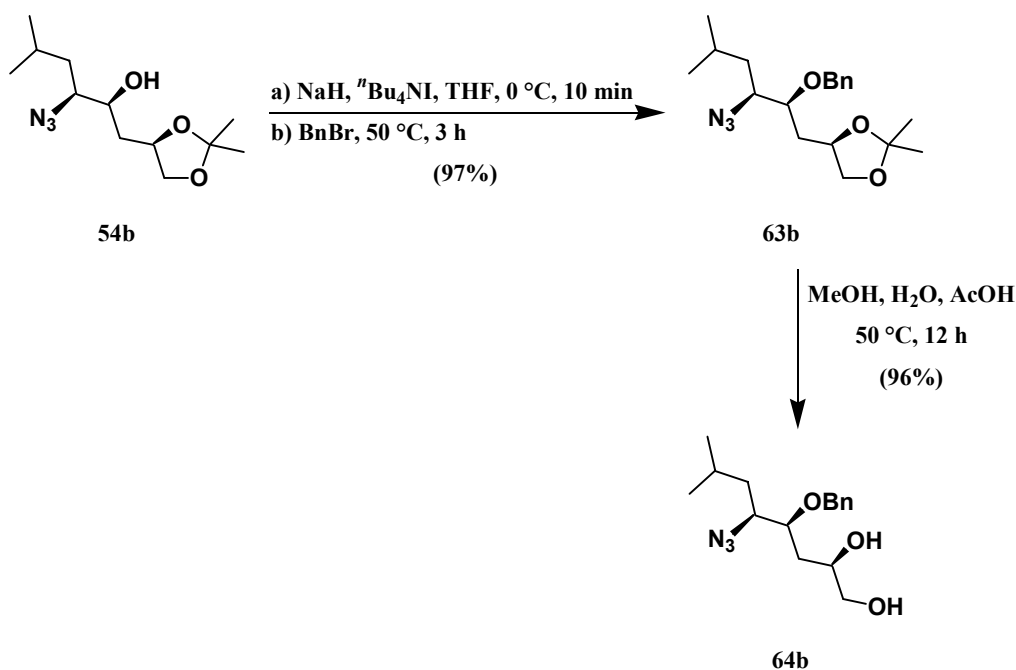
A continuación, esta azidofuranosa **53b** se hidrolizó en medio ácido para generar el lactol **61b** (Esquema 35, pág. 76), cuya reducción con borohidruro sódico condujo al compuesto **62b**, que por reacción con 2,2-dimetoxipropano produjo en un rendimiento global del 52% el azidoalcohol **54b**.



Esquema 35

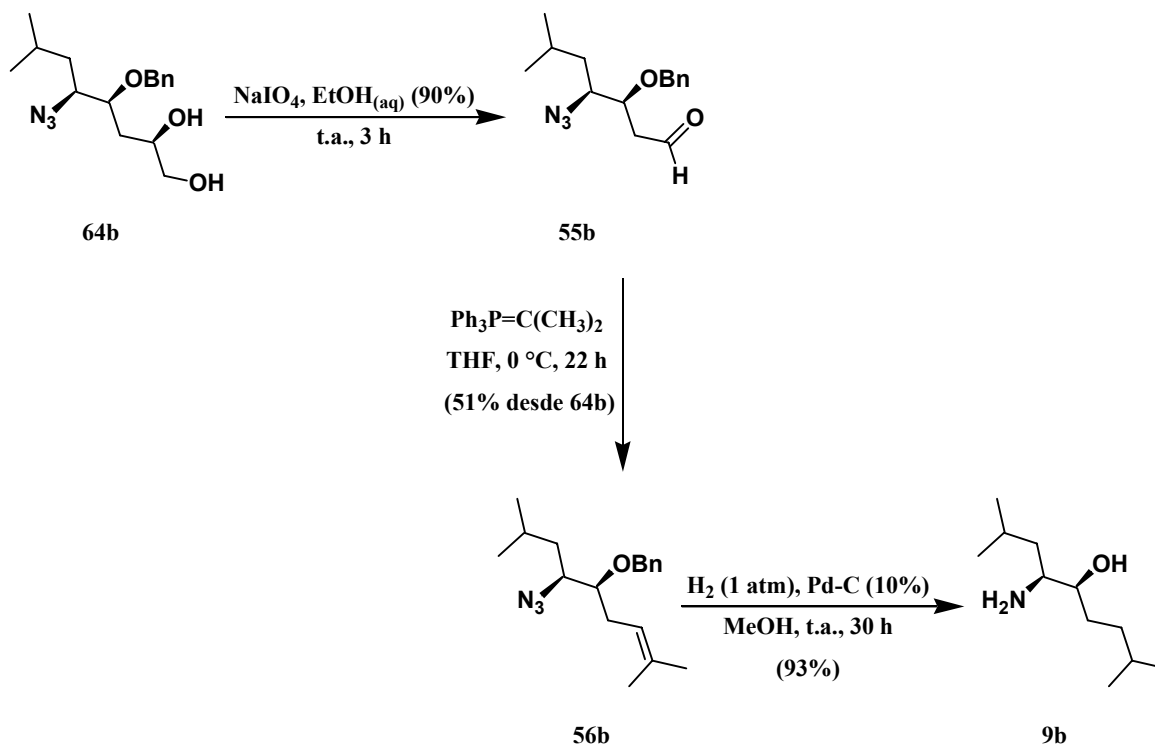
Este compuesto se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas, entre las que destacan en su espectro de RMN- ^{13}C las señales de los CH_3 del grupo isopropilidénico a 25.7 y 26.8 ppm y la del carbono cuaternario a 109.6 ppm, así como en su espectro de IR las señales de los grupos OH y N_3 a 3475 y 2108 cm^{-1} respectivamente.

Prosiguiendo con nuestro plan sintético, la protección del grupo hidroxilo de **54b** como grupo benciloxi dio lugar con rendimiento del 97% a la azida **63b** (Esquema 36).



Esquema 36

A continuación se calentó a 50 °C una disolución de **63b** en una mezcla de ácido acético, metanol y agua, obteniéndose en un 96% de rendimiento el diol **64b** deseado, que al reaccionar con peryodato sódico en etanol condujo al aldehído **55b** (Esquema 37).



Esquema 37

La reacción subsiguiente de **55b** con el iluro de isopropiltrifenilfosfonio condujo en un rendimiento moderado al azidoalqueno **56b**. Este compuesto se caracterizó a partir de sus propiedades espectroscópicas, siendo especialmente relevante la aparición en su espectro de RMN-¹³C de las señales de los carbonos olefínicos (119.2 ppm para el grupo CH y 134.4 ppm para el carbono cuaternario), así como a 17.9 y 25.8 ppm las señales de los CH₃ del grupo isopropilidénico introducido.

Por último, la hidrogenación exhaustiva de **56b** permitió hidrogenar el doble enlace carbono-carbono, reducir el grupo azida a amina y eliminar al grupo protector bencilo simultáneamente, obteniéndose directamente el aminoalcohol **9b** en un excelente rendimiento. Este compuesto mostró en su espectro de RMN-¹³C cuatro señales a 21.7, 22.6, 22.9 y 23.9 ppm, correspondientes a los grupos CH₃, tres señales a 29.8, 35.1 y 42.7 ppm, correspondientes a los grupos CH₂, y cuatro señales a 22.2, 23.5, 52.1 y 82.3 ppm, correspondientes a los grupos CH.

En definitiva, se ha desarrollado una estrategia de síntesis de isómeros de HE-1-aminobutan-2-ol **9** a partir de diacetón-D-glucosa (**49**) que permite controlar la

naturaleza y estereoquímica de todos y cada uno de los sustituyentes que contienen.⁶⁷ El rendimiento global del proceso fue del 7% en ambos casos, después de llevar a cabo 16 reacciones.

⁶⁷ Otero, J. M.; Estévez, J. C.; Sussman, F.; Villaverde, M. C.; Estévez, R. J. "Total synthesis of (5S,6S)-6-amino-2,8-dimethylnonan-5-ol and (5S,6S)-6-amino-7-cyclohexyl-2-methylheptan-5-ol" *ARKIVOC* **2007**, 380-388.

3.3. Síntesis y evaluación de inhibidores de la β -secretasa.

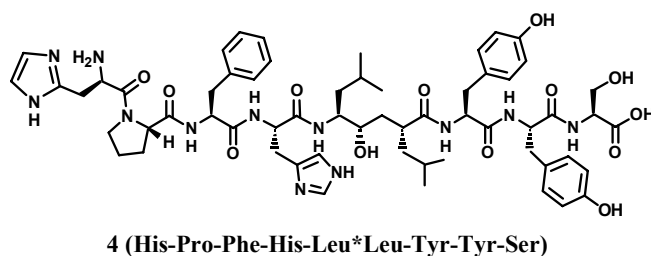
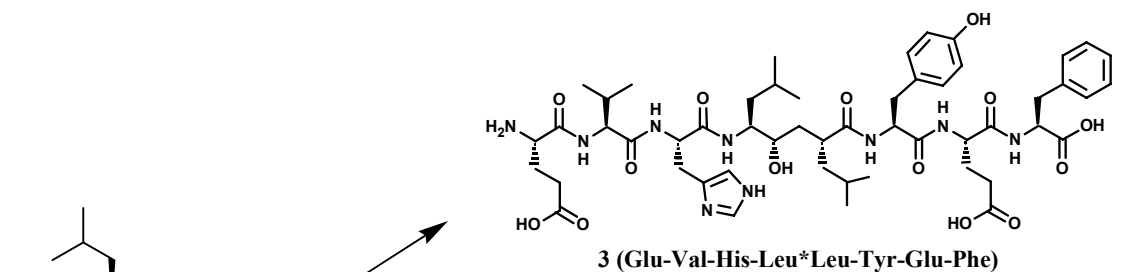
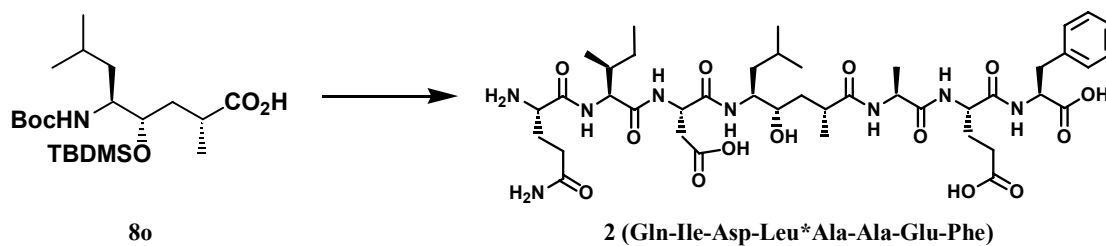
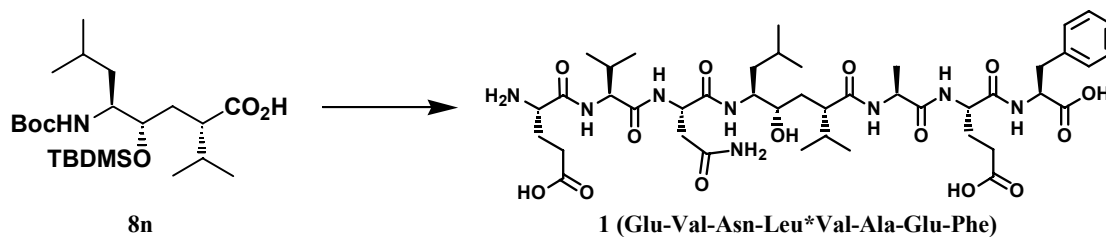
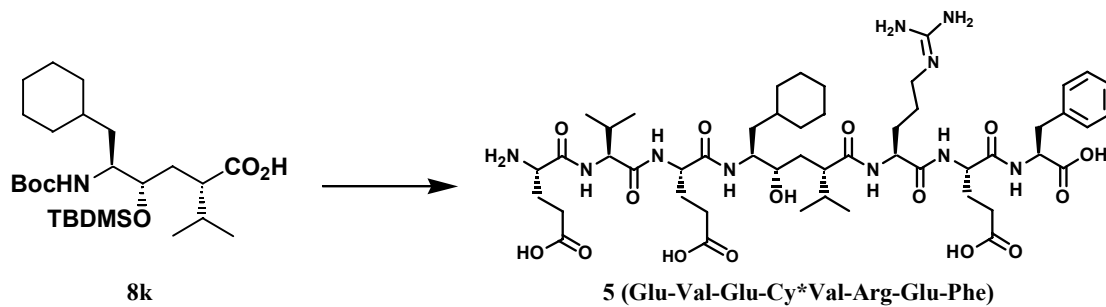
3.3.1. Síntesis de inhibidores polipeptídicos.

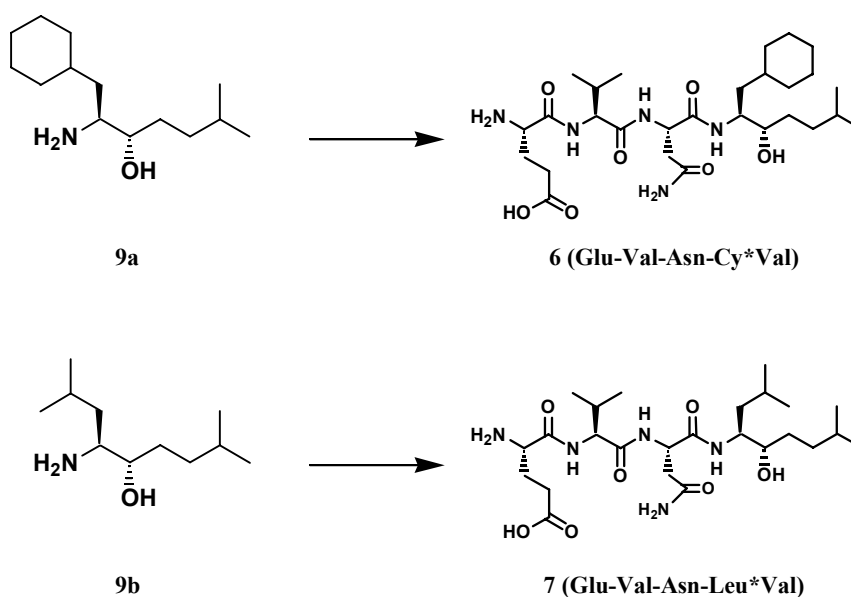
Una vez obtenidos nuestros seis isómeros del panel de la Figura 23 (pág. 40), con sus grupos funcionales convenientemente protegidos para su incorporación en péptidos, se procedió a sintetizar la relación de inhibidores de la Figura 22 (pág. 38-39), con objeto de evaluar su capacidad de inhibición de la β -secretasa.

Dichas síntesis fueron llevadas a cabo en el Servei de Síntesi de Pèptids perteneciente a la Universitat de Barcelona, donde se empleó un sintetizador automático de péptidos Applied Biosystems® ABI 433 A. Para la purificación de los péptidos obtenidos se empleó un sistema de HPLC preparativo Waters® DeltaPrep 4000.

Los péptidos sintetizados fueron analizados con un analizador de aminoácidos Beckman 6300 System Gold, después de haberlos hidrolizado con HCl 6M con un 1% de fenol durante 1 hora a 155 °C, concentrado a sequedad y disuelto en un tampón citrato de pH 2.2. También se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF en un espectrómetro de masas Applied Biosystems® 4700 Proteomics Analyzer empleando el método reflector y ACH como matriz.

De este modo, se sintetizaron con un grado de pureza mayor del 95% los siete inhibidores mostrados en el siguiente esquema.





Esquema 38

Con los isómeros **8k**, **8n**, **8o**, **9a** y **9b** se prepararon los inhibidores **5**, **1**, **2**, **6** y **7** respectivamente, mientras que con el isómero **8p** se prepararon los inhibidores **3** y **4** (el * indica la posición del isómero de hidroxietileno).

3.3.2. Evaluación de los inhibidores polipeptídicos.

El objetivo de esta parte final del trabajo, consistió en la valoración de la actividad (en % de inhibición e IC_{50})⁶⁸ de los inhibidores sintetizados frente a la enzima β -secretasa.

Estos ensayos fueron llevados a cabo por la Unidad de Avaluación de Actividades Farmacológicas de Compuestos Químicos perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela.

Hasta el momento sólo han sido evaluados cuatro de los inhibidores indicados en el Esquema 38, el **1**, **2**, **3** y **4**, estando los tres inhibidores restantes (**5**, **6** y **7**) en fase de evaluación.

1. Material y métodos empleados para llevar a cabo la valoración.

Para valorar la actividad de los inhibidores de la β -secretasa, se usó un kit comercializado por la casa Invitrogen® denominado "BACE1 (β -secretase) FRET Assay Kit, Red" (nº de catalogo P2985). Este kit contiene:

⁶⁸ IC_{50} es la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima.

- Enzima β -secretasa, en forma de disolución 50 mM en Tris (tris(hidroximetil)-metilamina, pH 7.5) y 10% de glicerol.
- Sustrato para la β -secretasa 75 μ M, formado por el péptido Rh-EVNLDAEFK-Quencher en disolución de bicarbonato amónico 50 mM.
- Disolución tampón de ensayo de pH 4.5 formada por acetato sódico 50 mM.
- Disolución de stop del ensayo formada por acetato sódico 2.5 M.
- Producto estándar de reacción de la hidrólisis 25 μ M, formada por el péptido Rh-EVNL en disolución de bicarbonato sódico 50 mM.

También fue necesario el siguiente material:

- Inhibidor estándar de referencia OM99-2 suministrado por la casa Bachem® (referencia H-5108.0500)
- Placas de pocillo opaco, 96 pocillos para lectura de fluorescencia (referencia 1450-581 de Wallac®).
- Placas estándar, 96 pocillos para dilución de compuestos.
- Rejilla de puntas de pipeta multicanal 10 μ L.
- Combitips de pipeta de repetición de volumen de carga de 1 mL.
- Pipeta multicanal (10 μ L).
- Pipeta de repetición (10 μ L).
- Detector multifuncional Tecan Ultra Evolution® con brazo robótico Tecan Connect®.

El método de valoración tiene como base teórica la medida de la variación observada en el proceso de transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET) del péptido sustrato que incluye el kit comercial. Este péptido está marcado con dos fluoróforos en sus extremos, un emisor de fluorescencia (un derivado de rodamina) y un aceptor de fluorescencia que actúa como atrapador (o quencher), capaz de absorber la fluorescencia del emisor. Mientras el péptido sustrato está íntegro, el emisor y el quencher están situados a una corta distancia y cuando se excita el emisor con una longitud de onda adecuada (530-545 nm), la mayor parte de la energía emitida (de longitud de onda comprendida entre 570-590 nm) es absorbida por el quencher por medio de un proceso cuántico denominado transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). De este modo no se observa emisión de fluorescencia por parte de la muestra, pero cuando la enzima β -secretasa actúa sobre el péptido sustrato, lo corta y los fluoróforos quedan separados, no pudiendo tener lugar el proceso de transferencia de fluorescencia por

resonancia y emitiéndose ésta al exterior. Se observa entonces un incremento de la fluorescencia de la muestra proporcional a la cantidad de péptido sustrato cortado por la enzima (Figura 30).⁶⁹

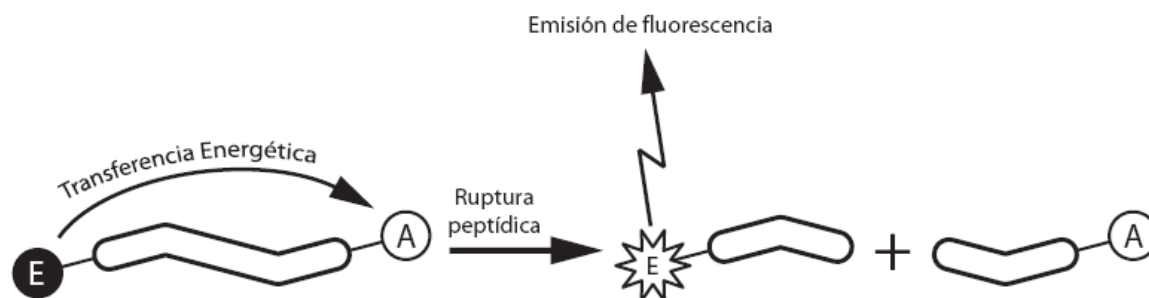


Figura 30: Procesos de emisión energética del péptido sustrato de la β -secretasa.

2. Ensayos de puesta a punto del método.

En primer lugar se hizo un seguimiento de la cinética de reacción de hidrólisis del péptido sustrato por parte de la enzima, con objeto de fijar un tiempo de lectura para los ensayos dentro del rango lineal de la reacción. Para ello, se llevaron a cabo ensayos cinéticos en los que se determinó el % de hidrólisis del péptido-sustrato (250 nM/pocillo) por parte de la enzima β -secretasa (10 mU/pocillo)⁷⁰ a distintos tiempos (Figura 31).

⁶⁹ a) Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J.C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. "β-Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE" *Science* **1999**, *286*, 735-741. b) Yan, R.; Bienkowski, M. J.; Shuck, M. E.; Miao, H.; Tory, M. C.; Pauley, A. M.; Brashler, J. R.; Stratman, N. C.; Mathews, W. R.; Buhl, A. E.; Carter, D. B.; Tomasselli, A. G.; Parodi, L. A.; Heinrikson, R. L.; Gurney, M. E. "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β-secretase activity" *Nature* **1999**, *402*, 533-537. c) Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D.; Doan, M.; Dovey, H. F.; Frigon, N.; Hong, J.; Jacobson-Croak, K.; Jewett, N.; Keim, P.; Knops, J.; Lieberburg, I.; Power, M.; Tan, H.; Tatsuno, G.; Tung, J.; Schenk, D.; Seubert, P.; Suomensari, S. M.; Wang, S.; Walker, D.; Zhao, J.; McConlogue, L.; John, V. "Purification and cloning of amyloid precursor protein β-secretase from human brain" *Nature* **1999**, *402*, 537-540. d) Hussain, I.; Powell, D.; Howlett, D. R.; Tew, D. G.; Meek, T. D.; Chapman, C.; Gloger, I. S.; Murphy, K. E.; Southan, C. D.; Ryan, D. M.; Smith, T. S.; Simmons, D. L.; Walsh, F. S.; Dingwall, C.; Christie, G. "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β-secretase" *Mol. Cell. Neurosci.* **1999**, *14*, 419-427. e) Citron, M. "Human β-secretase and Alzheimer's disease" *Expert. Opin. Ther. Targets* **2001**, *5*, 341-348.

⁷⁰ Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto a temperatura ambiente. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg proteína) o por mililitro de disolución (U/ml).

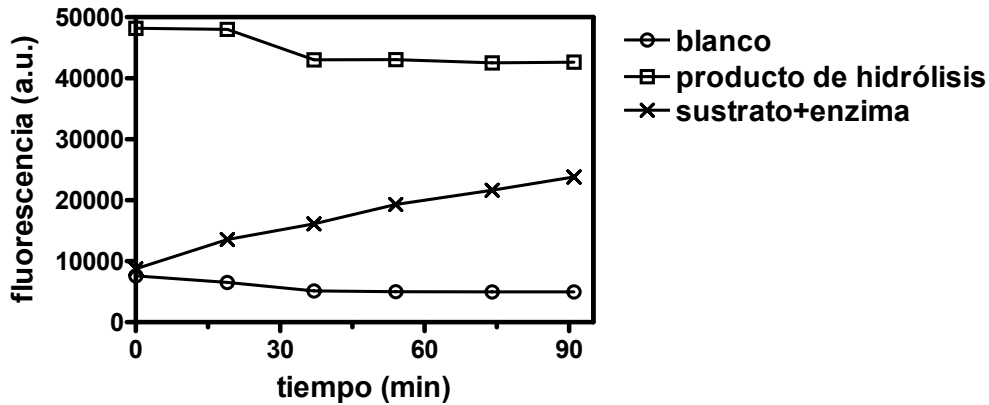


Figura 31: Medidas de la señal fluorescente correspondiente a 0% de péptido sustrato hidrolizado (○ blanco); 33.3% de péptido sustrato hidrolizado (□ producto de hidrólisis); y cinética de la reacción enzimática de hidrólisis del péptido sustrato por parte de la β -secretasa (× sustrato+enzima).

En las condiciones de trabajo empleadas, la cinética de hidrólisis siguió un rango lineal hasta porcentajes aproximadamente del 10% de hidrólisis del péptido sustrato, que correspondieron a tiempos de lectura en torno a 35 minutos (Figura 32). Por lo tanto se fijó en 35 minutos el tiempo de lectura para los siguientes ensayos realizados.

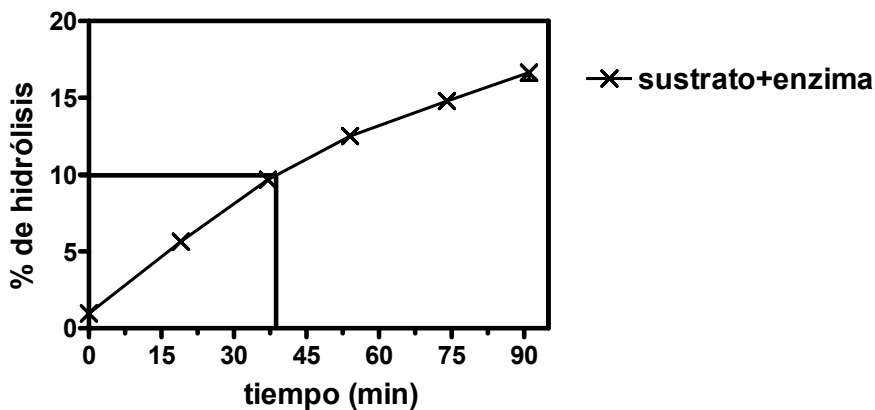


Figura 32: Cinética de la reacción enzimática de hidrólisis del péptido sustrato por parte la β -secretasa (× % de hidrólisis del péptido sustrato en función del tiempo de reacción).

A continuación fue necesario comprobar la exactitud del método por medio de la obtención de la actividad de un inhibidor estándar de la β -secretasa. Se empleó

el inhibidor OM99-2 cuyos valores de actividad ya habían sido descritos previamente en la bibliografía (Figura 33).⁷¹

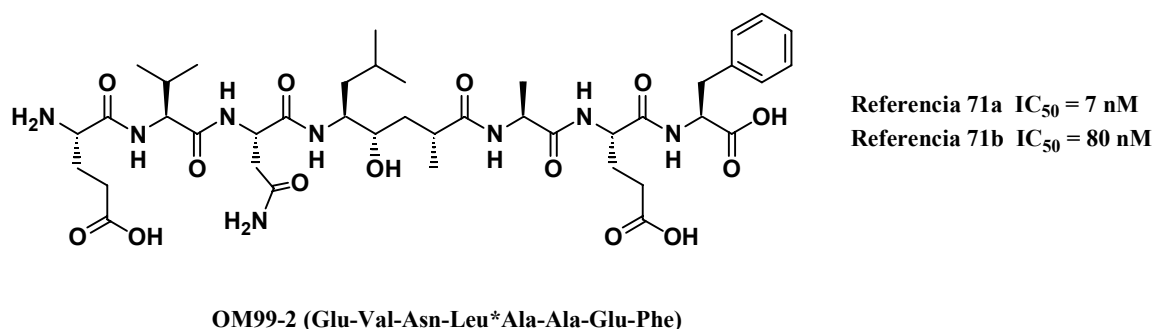


Figura 33: Inhibidor OM99-2 y valores de su actividad frente a la β -secretasa publicados.

El procedimiento empleado para llevar a cabo esta medida, fue el mismo que el empleado para evaluar la actividad de los demás péptidos inhibidores y que se explica en la parte experimental. Los resultados obtenidos para este inhibidor de referencia fueron de un % de inhibición = 95.85±2.91% y de un IC₅₀ = 19.11±0.14 nM, valores que se ajustan a los descritos en la Figura 33, por lo que tenemos la confirmación de la exactitud del método que empleamos. Estos valores se calcularon con la realización de una curva concentración-respuesta (Figura 34).

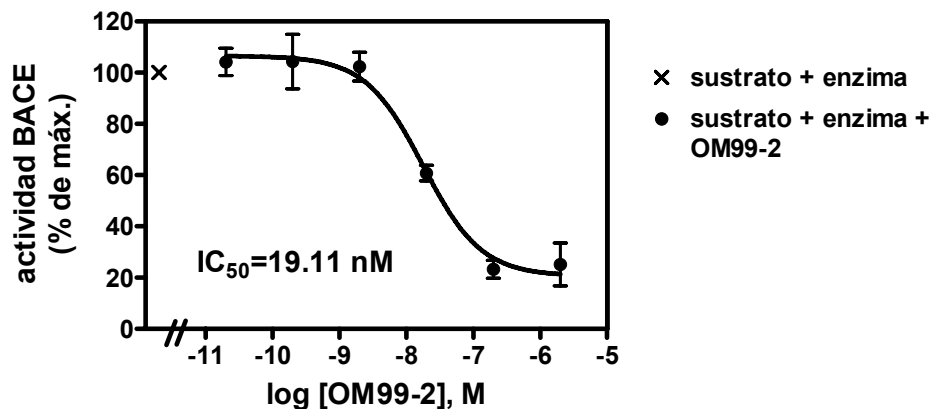


Figura 34: Curva concentración-respuesta de inhibición de la β -secretasa por el inhibidor estándar OM99-2 (expresada como % de máxima actividad de la enzima).

⁷¹ a) Bruinzeel, W.; Yon, J.; Giovannelli, S.; Masure, S. "Recombinant insect cell expression and purification of human β -secretase (BACE-1) for X-ray crystallography" *Protein Expression and Purification* **2002**, *26*, 139-148. b) Gruninger-Leitch, F.; Schlatter, D.; Kung, E.; Nelbock, P.; Dobeli, H. "Substrate and inhibitor profile of BACE (β -secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases" *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4687-4693.

3. Determinación del % de inhibición y del IC_{50} de los inhibidores 1, 2, 3 y 4.

Para llevar a cabo el estudio sobre los péptidos inhibidores sintetizados, en primer lugar se determinaron sus porcentajes máximos de inhibición de la actividad de la β -secretasa. Se empleó para ello una concentración de 20 μ M de inhibidor y los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla:

Nº de péptido	Secuencia	% de inhibición
OM99-2	Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe	95.85 \pm 2.91
1	Glu-Val-Asn-Leu*Val-Ala-Glu-Phe	91.39 \pm 5.98
2	Gln-Ile-Asp-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe	90.49 \pm 3.69
3	Glu-Val-His-Leu*Leu-Tyr-Glu-Phe	69.65 \pm 5.95
4	His-Pro-Phe-His-Leu*Leu-Tyr-Tyr-Ser	16.79 \pm 2.89

Figura 35: Valores de actividad de los péptidos ensayados.

Como se puede comprobar, los inhibidores 1, 2 y 3 son activos frente a la β -secretasa, mientras que el 4 presentó un porcentaje de inhibición muy bajo, indicativo de su inactividad frente a la enzima. El cálculo del IC_{50} de los inhibidores se llevó a cabo sólo con los más activos, esto es con 1 y 2, cuyos valores de porcentaje de inhibición mayores del 90% indican una buena afinidad con la β -secretasa. Se realizaron con estos péptidos los ensayos necesarios para obtener sus curvas concentración-respuesta y calcular así sus IC_{50} (Figura 36).

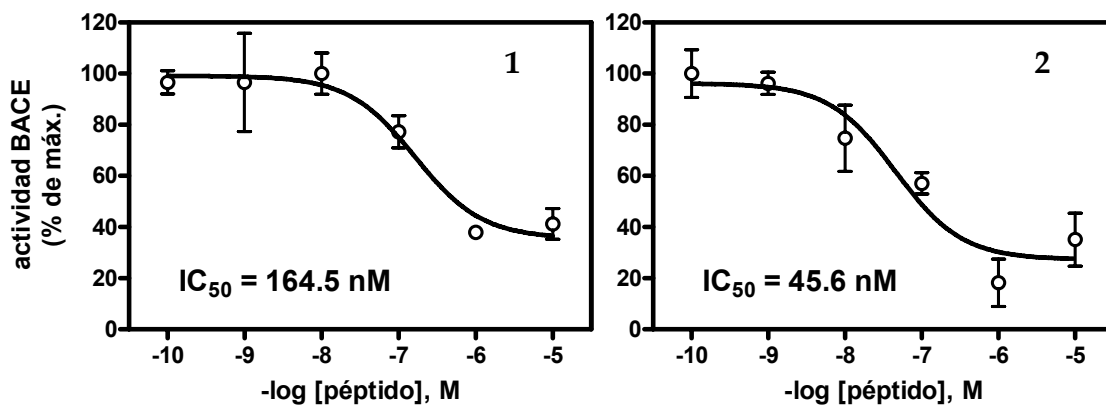


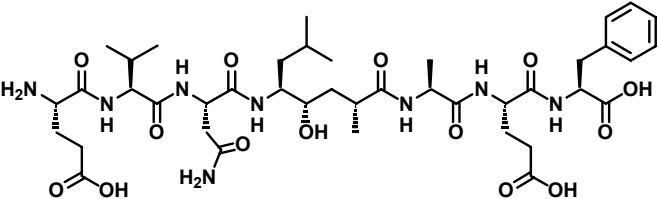
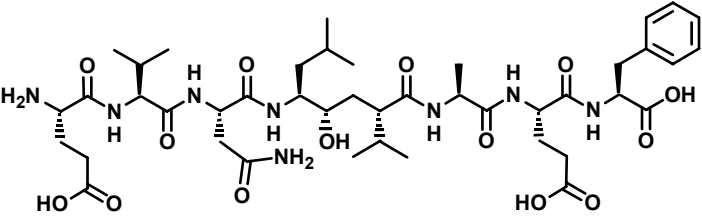
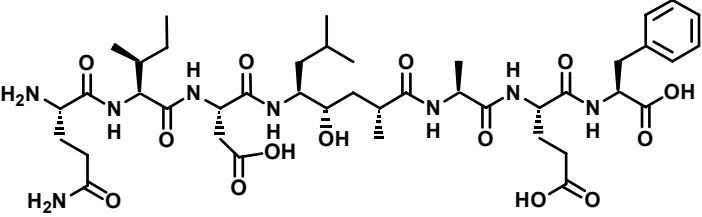
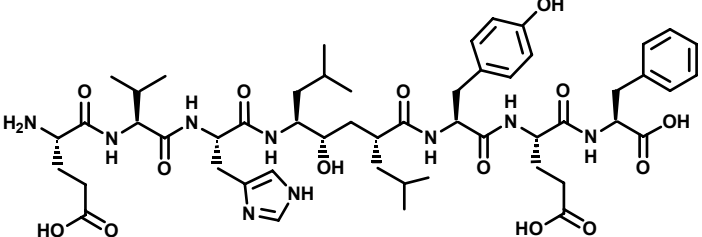
Figura 36: Curvas de concentración-respuesta de inhibición de β -secretasa de los péptidos 1 y 2 (expresada como % de máxima actividad de la enzima).

Los resultados obtenidos fueron de un IC_{50} = 164.5 nM para el inhibidor 1, y un IC_{50} = 45.6 nM para el inhibidor 2. El valor de IC_{50} del inhibidor de referencia

OM99-2 obtenido en estas condiciones fue de 19.1 nM, por lo tanto, ninguno de los inhibidores peptídicos evaluados mostró una actividad superior a la del inhibidor OM99-2 por la enzima β -secretasa.

3.3.3. Valoración de los resultados obtenidos.

Un estudio detallado de los resultados obtenidos, nos debería de proporcionar conclusiones acerca del trabajo realizado. Retomando la tabla inicial en la que indicábamos los valores teóricos de energía de enlace enzima-inhibidor calculados teóricamente (Figura 22, pág. 38-39), se había establecido que los cuatro inhibidores **1**, **2**, **3** y **4** y el inhibidor de referencia **OM99-2** tenían las energías de afinidad teóricas (ΔG_e) que se indican a continuación:

Nº	ΔG_e (Kcal/mol)	ESTRUCTURA	% de inhibición	IC ₅₀ (nM)
OM99-2 (inhibidor de referencia)	-92.9		95.85±2.91	19.11
1	-76.1		91.39±5.98	164.5
2	-86.0		90.49±3.69	45.5
3	-113.3		69.65±5.95	

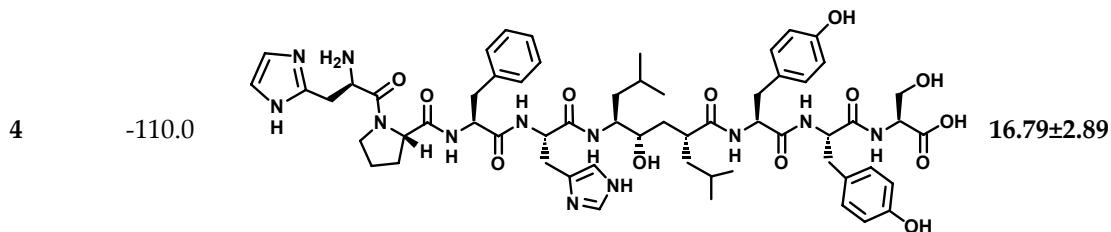


Figura 37: Resultados teóricos y experimentales de los inhibidores estudiados.

En esta tabla se incluyen en la cuarta y quinta columnas los resultados experimentales obtenidos en la evaluación de los inhibidores frente a la β -secretasa. La comparación de los datos teóricos de afinidad de los inhibidores (ΔG_e) con los datos experimentales de inhibición enzimática obtenidos, nos permiten establecer que para los inhibidores probados **1**, **2**, **3** y **4**, la predicción teórica no se corresponde con los valores experimentales encontrados. El modelo teórico predice para los inhibidores **3** y **4** energías de afinidad mayores que la del inhibidor de referencia **OM99-2** y valores de afinidad inferiores para los inhibidores **1** y **2**. Sin embargo, los porcentajes de inhibición de los cuatro inhibidores evaluados fueron menores que los del inhibidor de referencia **OM99-2**, siendo incluso inactivo el inhibidor **4**.

Por lo tanto, se ha demostrado experimentalmente que los valores de alta afinidad enzima-inhibidor predichos por el modelo teórico para los inhibidores **3** y **4** no se corresponden con los valores reales obtenidos. A falta de obtener los valores experimentales para el resto de los péptidos estudiados en este trabajo teórico, los primeros resultados experimentales obtenidos nos indican que el método de cálculo de las energías de afinidad inhibidor-enzima no reproduce correctamente los resultados reales de % de inhibición observados. Esto implica que este método debe ser revisado y modificado, de modo que sus predicciones se aproximen más a los resultados experimentales obtenidos. Esto permitiría obtener nuevos listados de potenciales inhibidores de la β -secretasa cuyas energías de afinidad enzima-inhibidor estén basadas en los valores reales de % de inhibición de inhibidores ya evaluados.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Técnicas instrumentales.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker® DPX-250 (250 MHz para ^1H y 62.5 MHz para ^{13}C) en CDCl_3 , salvo que se especifique lo contrario. Se utilizó TMS como referencia interna y los desplazamientos químicos vienen dados en la escala δ (ppm).

Los espectros de RMN de ^1H , DEPT y ^{13}C , que se incluyen en ese orden a continuación del procedimiento experimental para la preparación del compuesto al que correspondan, fueron procesados con el software MestReC 4.8.6.0.

Los espectros de masas de ionización química se realizaron en un espectrómetro cuadrupolar Hewlett Packard® 5988A mediante inserción directa.

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro MIDAC Prospect®-IR con software Grams/386 sobre una pastilla de cloruro sódico.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en un analizador CARLO ERBA EA 1108.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO® DIP-370, empleando una lámpara de Na (589 nm) y una cubeta de 5 cm. Los valores de concentración de la muestra se dan g/100 mL.

Los puntos de fusión se determinaron en un bloque Köfller-Thermogerate® y están sin corregir.

Las cromatografías en columna se hicieron sobre gel de sílice 60 Merck® 230-400 mesh (flash, 0.04-0.063), y las ccf se realizaron sobre gel de sílice 60 GF₂₅₄ Merck®. Como reveladores para visualizar las ccf se utilizaron una lámpara UV (λ : 254 y 360 nm) y mezcla Hanessian.

Los filtrados sobre celita se llevaron a cabo utilizando Celite 545 Coarse de Fluka®.

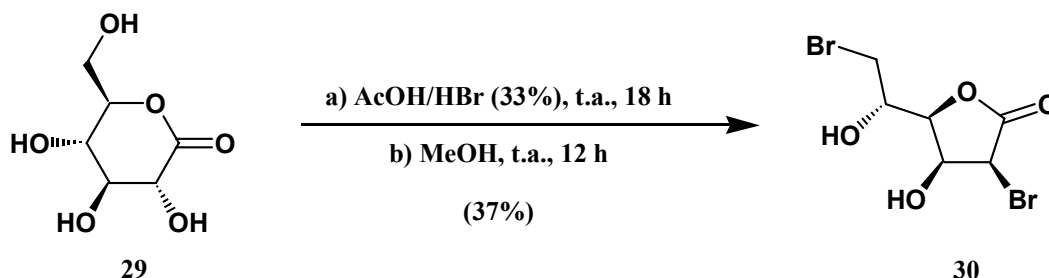
Las reacciones que se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón fueron realizadas en matraces que previamente fueron secados a la llama con un mechero mientras se purgaban con argón y a los que se conectó un globo lleno de argón.

Los reactivos y disolventes se purificaron y secaron según los procedimientos estándares descritos en la bibliografía.⁷²

⁷² Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of laboratory chemicals" 1988, Ed. Pergamon Press, Oxford.

4.2. Procedimientos experimentales.

Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-2,6-dibromo-3,4,5-trihidroxihexanoico (**30**).



En un matraz de fondo redondo de 2 L se disolvieron 25.0 g (140.3 mmoles) de la D-glucono-1,5-lactona (**29**) en 365 mL de una mezcla al 33% de bromuro de hidrógeno en ácido acético glacial y la disolución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadieron luego cuidadosamente 600 mL de metanol, controlando la temperatura de la mezcla con un baño de agua-hielo y se continuó la agitación 12 horas más a temperatura ambiente. La mezcla se concentró en el rotavapor a sequedad y se llevaron a cabo luego dos coevaporaciones con 240 mL de agua cada una. El residuo aceitoso se disolvió en 100 mL de agua y la disolución obtenida se extrajo con éter etílico (8 x 50 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor, obteniéndose un residuo del que por precipitación en diclorometano se aislaron 16.0 g (52.6 mmoles, 37%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-2,6-dibromo-3,4,5-trihidroxihexanoico (**30**) como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de diclorometano para dar un sólido incoloro de p.f. 126-128 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +56.1^\circ$ (c 1.4, AcOEt).

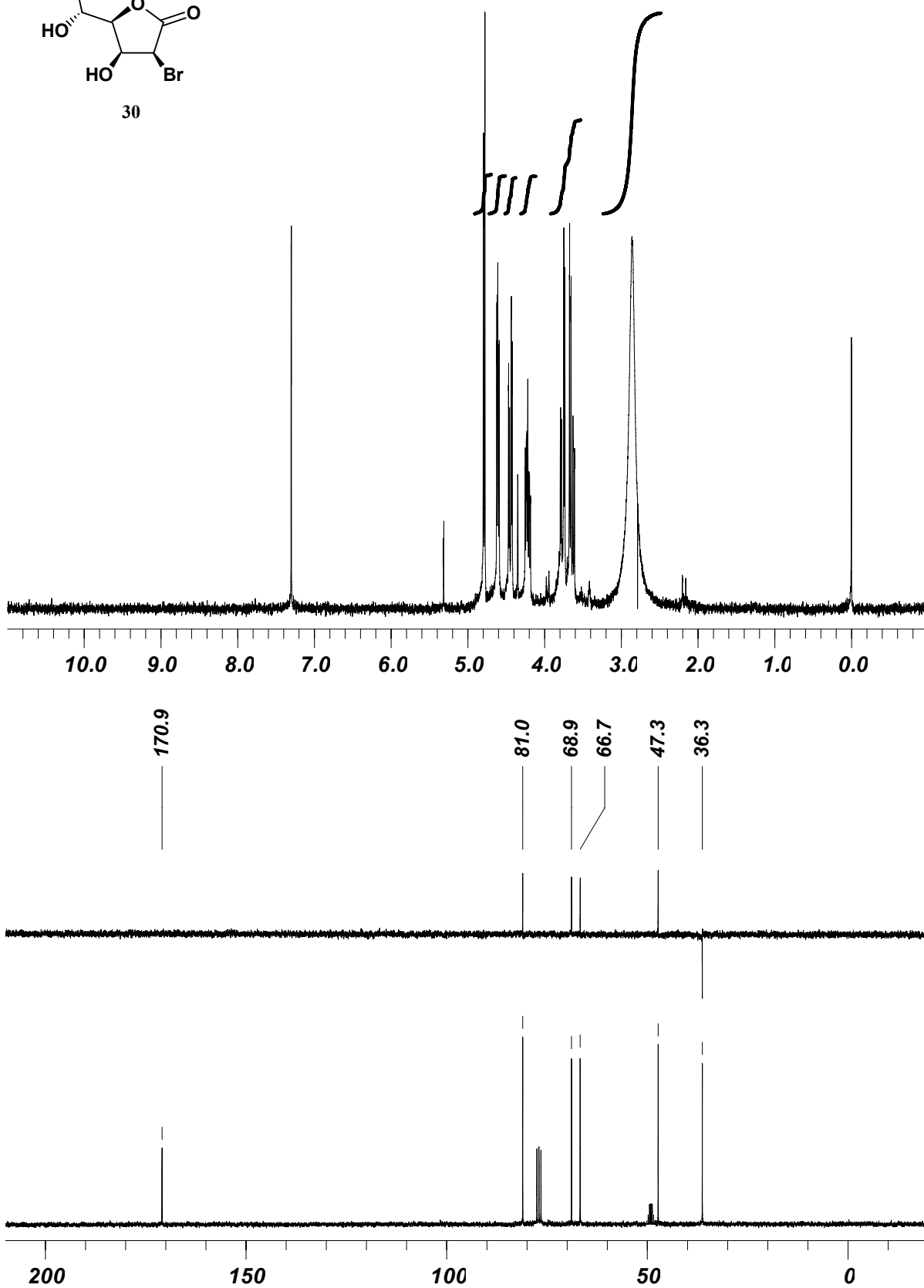
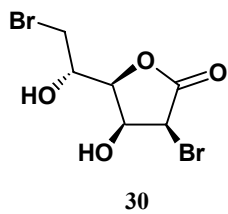
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 2.86 (sa, 2H, OH); 3.64 (dd, 1H, $J_{5,6}=4.9$ Hz, $J_{6,6}=11.0$ Hz, H-6); 3.76 (dd, 1H, $J_{5,6}=3.0$ Hz, $J_{6,6}=11.0$ Hz, H-6); 4.21 (ddd, 1H, $J_{5,6}=3.0$ Hz, $J_{5,6}=4.9$ Hz, $J_{4,5}=8.8$ Hz, H-5); 4.44 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.0$ Hz, $J_{4,5}=8.8$ Hz, H-4); 4.60 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.0$ Hz, $J_{2,3}=4.6$ Hz, H-3); 4.78 (d, 1H, $J_{2,3}=4.6$ Hz, H-2).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 36.3 (CH₂); 47.3 (CH); 66.7 (CH); 68.9 (CH); 81.0 (CH); 170.9 (CO).

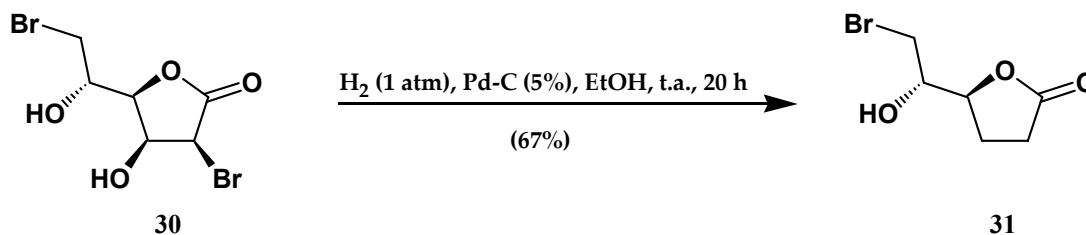
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3479 (a, OH); 1776 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 303, 305, 307 (6, 1:2:1, MH⁺); 285, 287, 289 (7, 1:2:1, [M - OH]⁺); 28 (100).

Análisis elemental: calculado para C₆H₈Br₂O₄: C 23.71, H 2.65; encontrado C 23.82, H 2.57.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-6-bromo-4,5-dihidroxihexanoico (31).



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvieron 5.13 g (16.9 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-2,6-dibromo-3,4,5-trihidroxihexanoico (30) en 50 mL de etanol y la disolución obtenida se desoxigenó bajo atmósfera de argón. Después de añadir 2.56 g (5% en peso de paladio) de paladio sobre carbón activo del 10%, se purgó el matraz de reacción con hidrógeno y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno ($p=1$ atm) durante 20 horas. Tras este tiempo el contenido del matraz se filtró sobre celita, que se lavó con etanol y el filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor. Después, tras realizar dos coevaporaciones con 40 mL de cloroformo cada una, el residuo obtenido se disolvió en 40 mL de cloroformo y a la disolución resultante se le añadió bicarbonato sódico sólido hasta que desapareció el color naranja. Se añadió luego una espátula de carbón activo, se filtró con una placa filtrante y el filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor, obteniendo un sólido que se cristalizó en éter etílico para dar 2.37 g (11.3 mmoles, 67%) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-6-bromo-4,5-dihidroxihexanoico (31) como un sólido incoloro de p.f. 77-78 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +23.6° (c 1.0, CHCl₃).

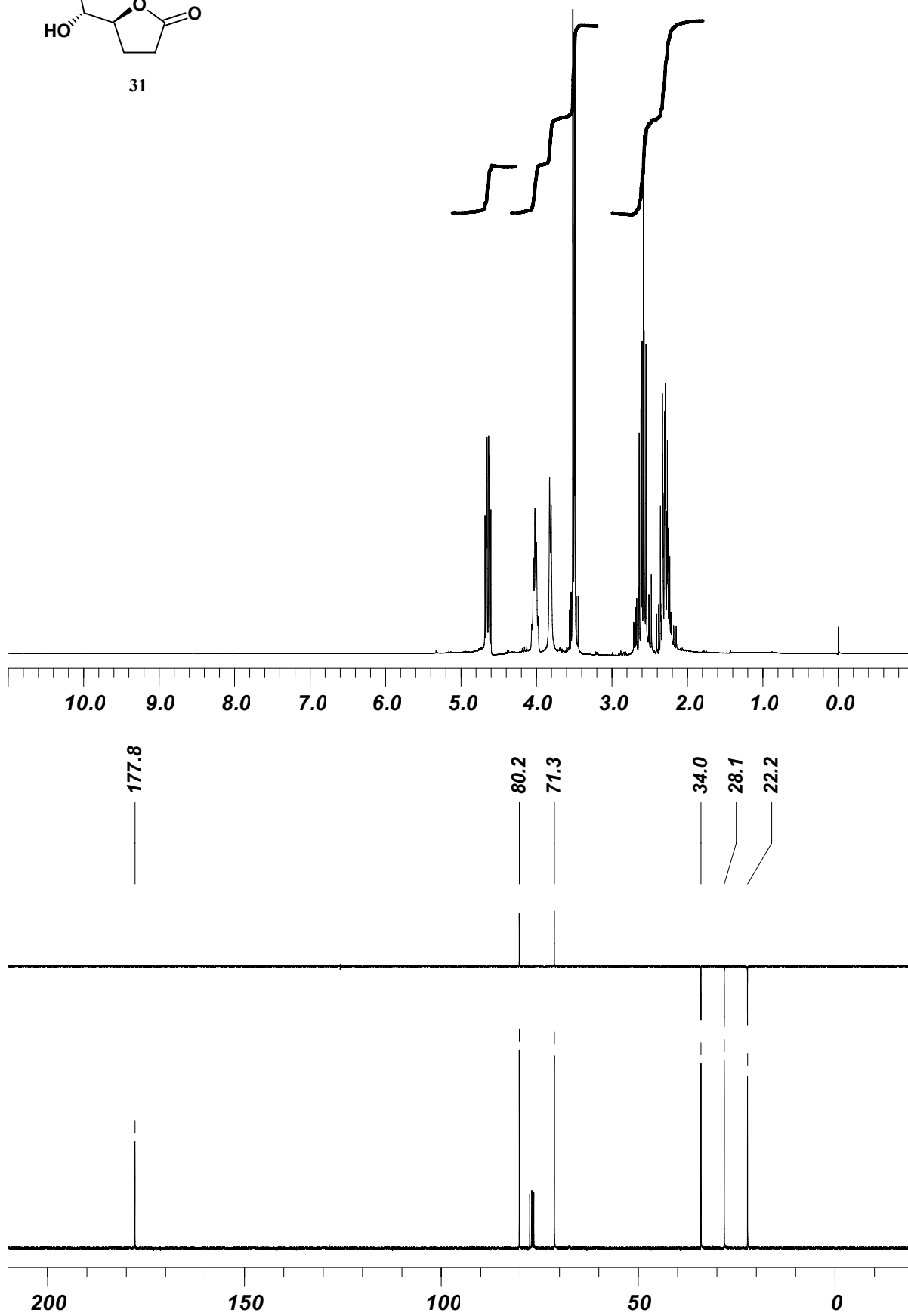
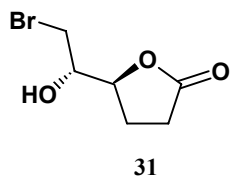
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 2.18-2.41 (m, 2H, 2 x H-3); 2.47-2.71 (m, 2H, 2 x H-2); 3.47 (dd, 1H, $J_{5,6}=6.1$ Hz, $J_{6,6}=10.7$ Hz, H-6); 3.54 (dd, 1H, $J_{5,6}=5.2$ Hz, $J_{6,6}=10.7$ Hz, H-6); 3.81 (d, 1H, $J_{5,OH}=5.2$ Hz, OH); 3.98-4.06 (m, 1H, H-5); 4.60-4.68 (m, 1H, H-4).

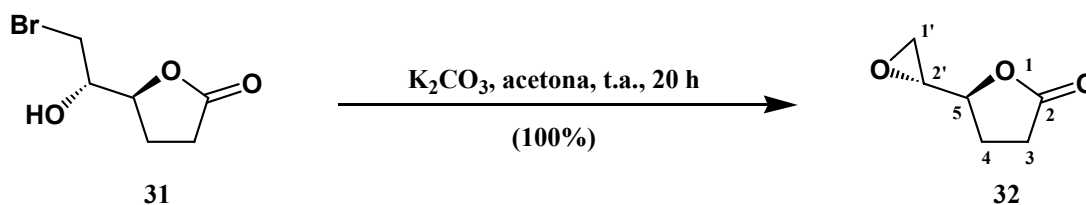
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 22.2 (CH₂); 28.1 (CH₂); 34.0 (CH₂); 71.3 (CH); 80.2 (CH); 177.8 (CO).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3410 (a, OH); 1737 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 209, 211 (17, 1:1, MH⁺); 191, 193 (31, 1:1, [M - OH]⁺); 113 (56, C₅H₅O₃); 41 (100%).

Análisis elemental: calculado para C₆H₉BrO₃: C 34.47, H 4.34; encontrado C 34.48, H 4.39.



Preparación de la (S)-5-((R)-oxiran-2'-il)-dihidrofuran-2(3H)-ona (**32**).

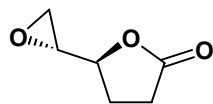
En un matraz de fondo redondo de 250 mL a 4.55 g (21.8 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-6-bromo-4,5-dihidroxihexanoico (**31**) se le añadieron 95 mL de acetona seca y 9.03 g (65.3 mmoles, 3 eq) de carbonato potásico anhidro y la suspensión obtenida se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 20 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró sobre una placa filtrante y los líquidos filtrados se concentraron en el rotavapor. El residuo aceitoso obtenido se disolvió en 40 mL de cloroformo, se trató la disolución con una espátula de carbón activo, se filtró sobre una placa filtrante y se concentró a sequedad, obteniéndose 2.80 g (21.8 mmoles, 100%) de la (S)-5-((R)-oxiran-2'-il)-dihidrofuran-2(3H)-ona (**32**) como un aceite amarillo pálido que se empleó en la siguiente reacción sin purificación adicional. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +12.6° (c 2.5, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.94-2.09 (m, 1H, H-4); 2.19-2.33 (m, 1H, H-4); 2.52-2.69 (m, 3H, 2 x H-3 + H-1'); 2.86-2.89 (m, 1H, H-1'); 3.23-3.27 (m, 1H, H-2'); 4.59-4.66 (m, 1H, H-5).

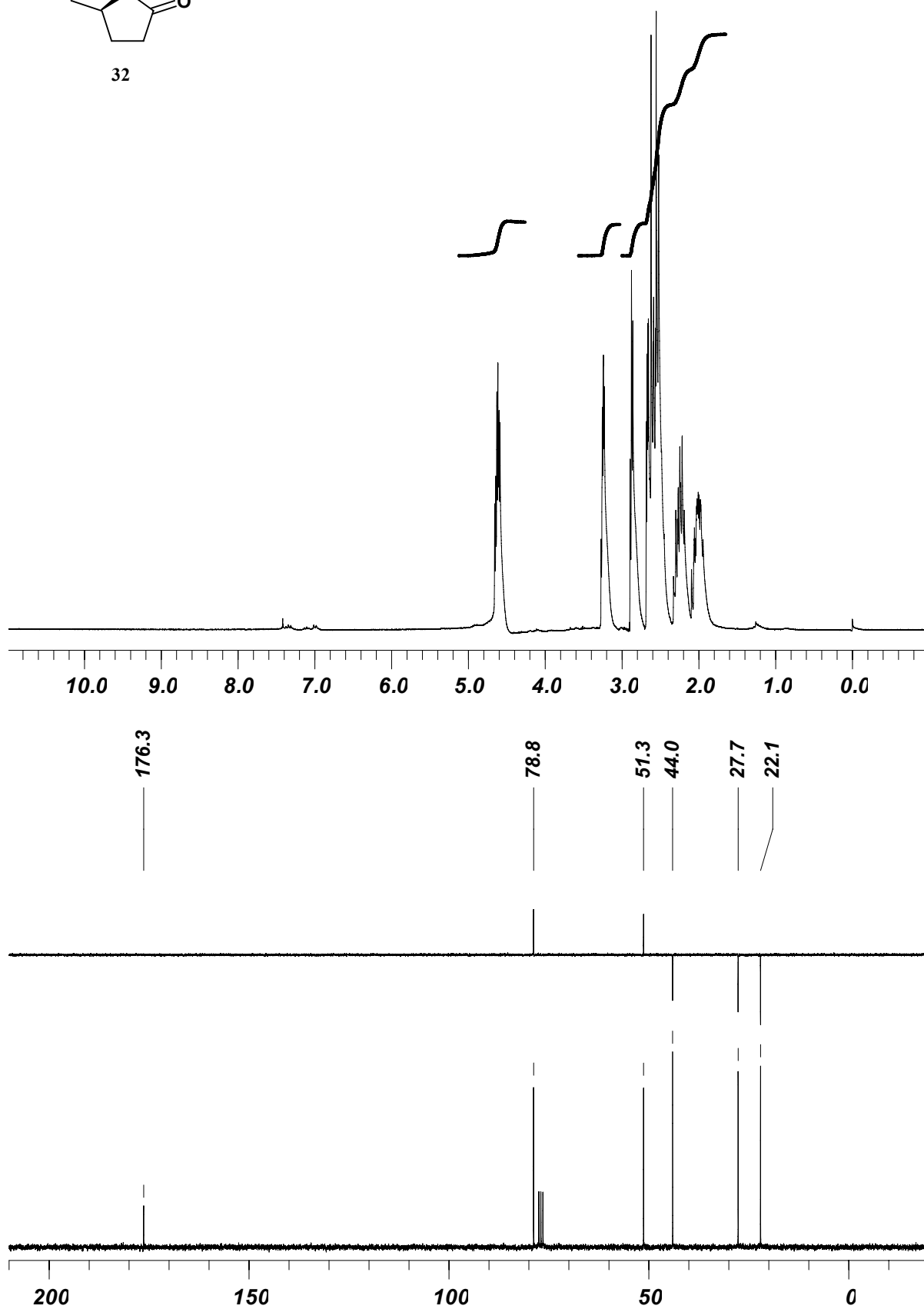
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 22.1 (CH₂); 27.7 (CH₂); 44.0 (CH₂); 51.3 (CH); 78.8 (CH); 176.3 (CO).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1776 (f, CO).

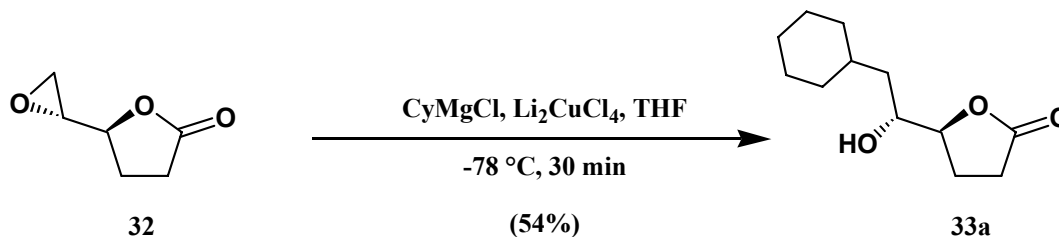
EM-IQ (*m/z*, %): 129 (100, MH⁺); 111 (14, [M - OH]⁺).



32



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-6-ciclohexil-4,5-dihidroxihexanoico (33a).



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se preparó una disolución de tetraclorocuprato (II) de litio, al añadir 0.50 g (11.9 mmoles, 0.8 eq) de cloruro de litio anhidro sobre una disolución de 0.82 g (5.93 mmoles, 0.4 eq) de cloruro de cobre (II) en 60 mL de tetrahydrofurano seco a temperatura ambiente. A esta disolución mantenida bajo atmósfera de argón y enfriada a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ se le añadieron lentamente 30 mL (59.3 mmoles, 4 eq) de una disolución 2.0 M de cloruro de ciclohexilmagnesio en éter etílico y la agitación se continuó a dicha temperatura durante 20 minutos, obteniendo así una disolución del organocuprato de ciclohexilo.

Esta disolución del organocuprato de ciclohexilo se añadió inmediatamente a una disolución de 1.90 g (14.8 mmoles) de la (*S*)-5-((*R*)-oxiran-2'-il)-dihydrofuran-2(3*H*)-ona (**32**) en 86 mL de tetrahydrofurano seco enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ y mantenida bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción así obtenida se agitó a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron 15 mL de disolución acuosa saturada de cloruro amónico. Tras dejar llegar el contenido del matraz de reacción a temperatura ambiente, se eliminó el tetrahydrofurano a presión reducida en el rotavapor, se añadieron 80 mL más de disolución acuosa saturada de cloruro amónico y la mezcla se extrajo con diclorometano (4 x 70 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad, obteniéndose un residuo que por purificación cromatográfica en columna (acetato de etilo/hexano 1:2) dio lugar a 1.70 g (8.0 mmoles, 54%) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-6-ciclohexil-4,5-dihidroxihexanoico (**33a**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó en una mezcla de éter etílico y hexano obteniéndose cristales incoloros de p.f. $79\text{-}80\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+32.2^\circ$ (c 1.0, CHCl_3).

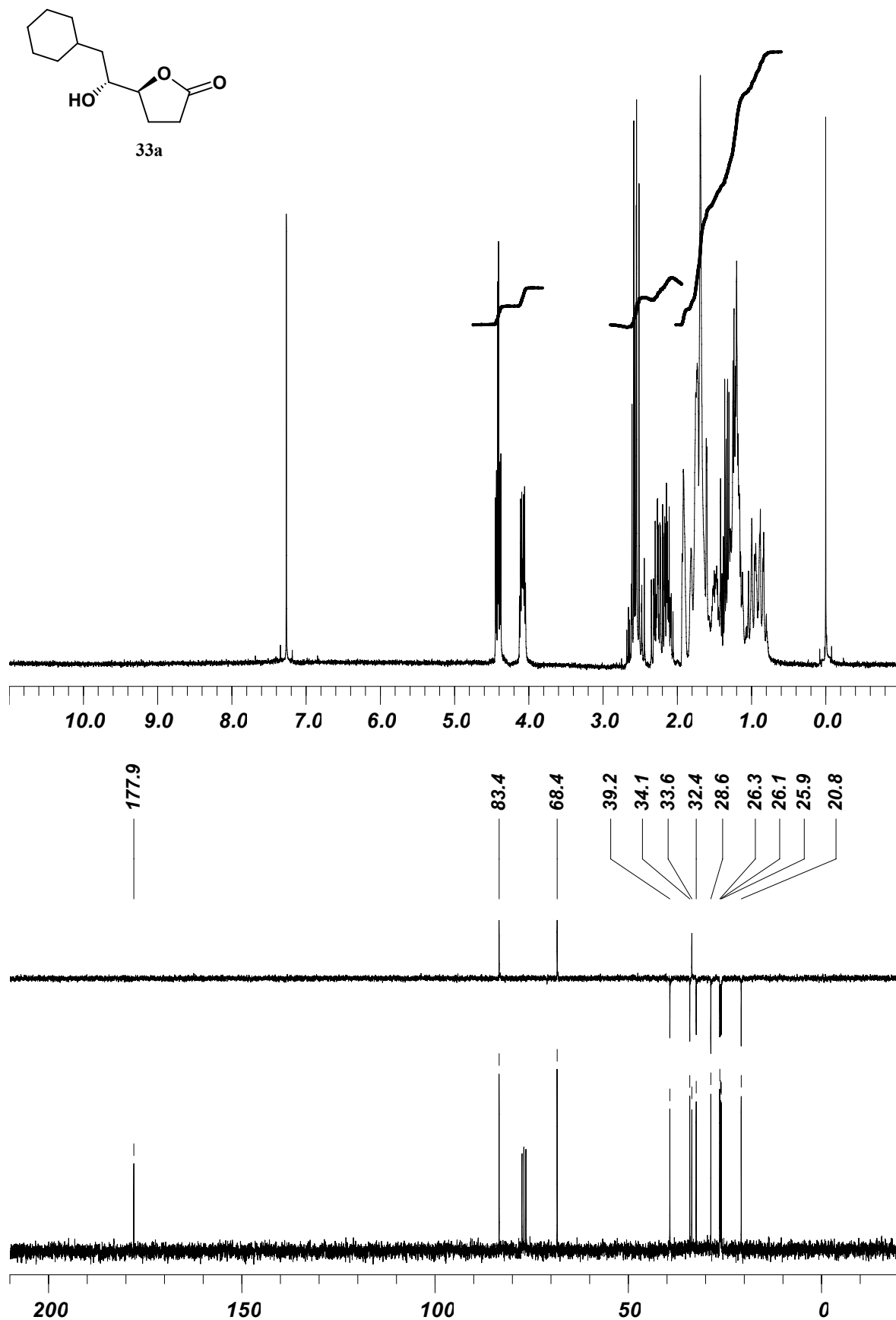
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.77-1.81 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-6); 1.91 (s, 1H, OH); 2.05-2.35 (m, 2H, 2 x H-3); 2.44-2.68 (m, 2H, 2 x H-2); 4.08 (ddd, 1H, $J_{5,6}=3.7\text{ Hz}$, $J_{4,5}=7.3\text{ Hz}$, $J_{5,6}=9.7\text{ Hz}$, H-5); 4.41 (dt, 1H, $J_{3,4}=3.0\text{ Hz}$, $J_{3,4}=7.3\text{ Hz}$, $J_{4,5}=7.3\text{ Hz}$, H-4).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 20.8 (CH_2); 25.9 (CH_2); 26.1 (CH_2); 26.3 (CH_2); 28.6 (CH_2); 32.4 (CH_2); 33.6 (CH); 34.1 (CH_2); 39.2 (CH_2); 68.4 (CH); 83.4 (CH); 177.9 (CO).

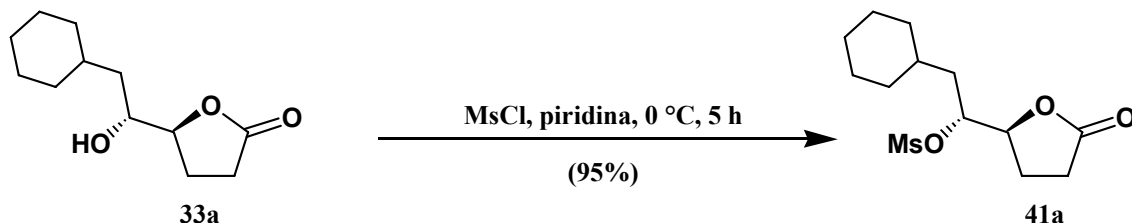
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3418 (a, OH); 1795 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 213 (13, MH^+); 195 (78, $[M - OH]^+$); 29 (100).

Análisis elemental: calculado para $C_{12}H_{20}O_3$: C 67.89, H 9.50; encontrado C 67.78, H 9.71.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-6-ciclohexil-4-hidroxi-5-metanosulfonatohexanoico (41a).



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvieron 1.04 g (4.91 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-6-ciclohexil-4,5-dihidroxihexanoico (**33a**) en 30 mL de piridina seca y a la disolución resultante enfriada a 0 °C se le añadieron gota a gota 1.44 mL (14.73 mmoles, 3 eq) de cloruro de mesilo, manteniendo luego la agitación a dicha temperatura durante 5 horas, tras las cuales se añadieron 50 mL de disolución acuosa saturada de sulfato de cobre. La disolución acuosa resultante se extrajo con diclorometano (4 x 50 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron primero con disolución acuosa saturada de sulfato de cobre (2 x 200 mL) y luego con agua (2 x 200 mL), se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo de este modo un residuo sólido que se cristalizó en una mezcla de éter etílico y hexano, aislándose 1.35 g (4.66 mmoles, 95%) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-6-ciclohexil-4-hidroxi-5-metanosulfonatohexanoico (**41a**), como un sólido blanco de p.f. 111-113 °C. $[\alpha]_{D^{20}}$: +22.5° (c 1.7, CHCl₃).

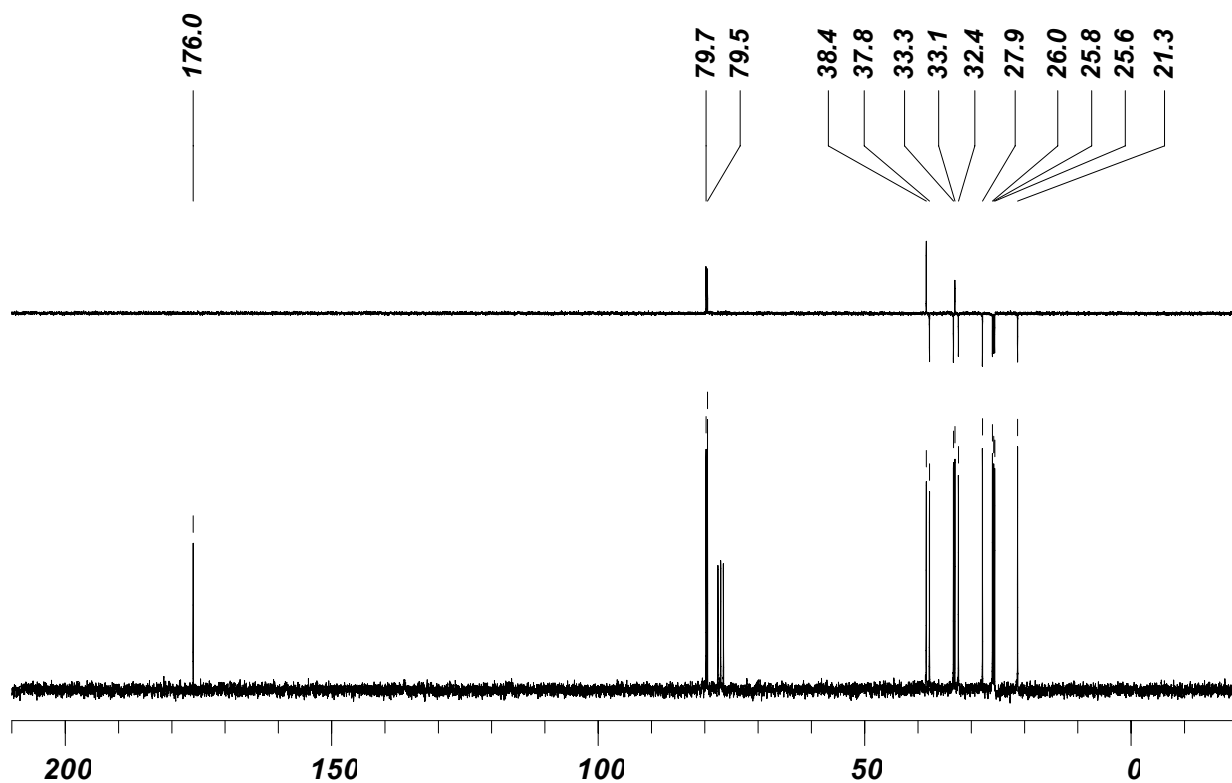
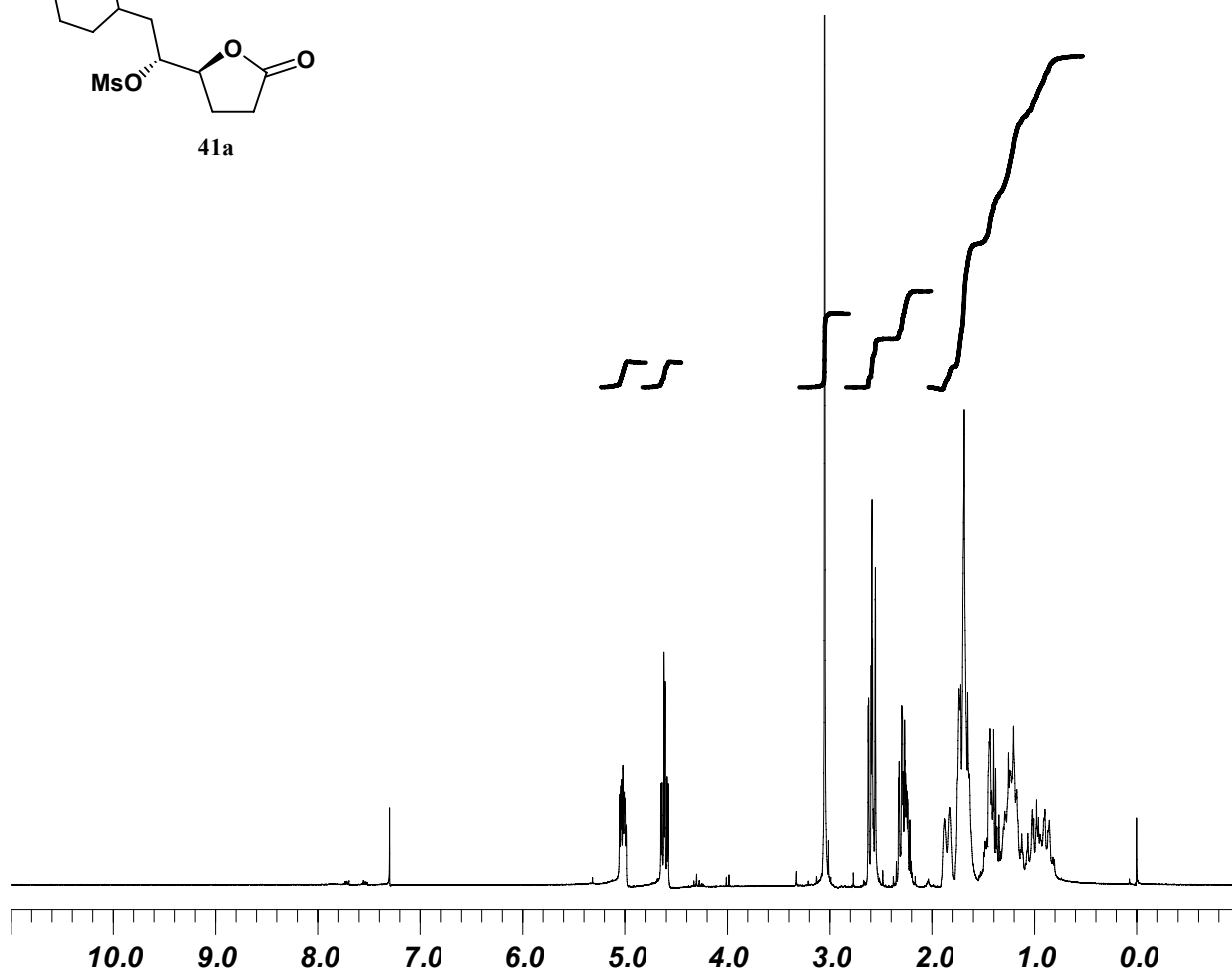
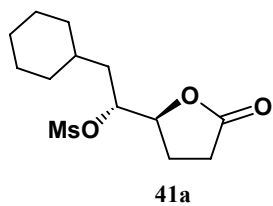
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.81-1.54 (m, 8H, 8 x Cy-H); 1.60-1.90 (m, 5H, 3 x Cy-H + 2 x H-6); 2.22-2.34 (m, 2H, 2 x H-3); 2.55-2.62 (m, 2H, 2 x H-2); 3.05 (s, 3H, CH₃); 4.61 (td, 1H, $J_{4,5}=2.7$ Hz, $J_{3,4}=J_{3,4}=7.4$ Hz, H-4); 4.98-5.05 (ddd, 1H, $J_{4,5}=2.7$ Hz, $J_{5,6}=4.9$ Hz, $J_{5,6}=7.9$ Hz, H-5).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 21.3 (CH₂); 25.6 (CH₂); 25.8 (CH₂); 26.0 (CH₂); 27.9 (CH₂); 32.4 (CH₂); 33.1 (CH); 33.3 (CH₂); 37.8 (CH₂); 38.4 (CH₃); 79.5 (CH); 79.7 (CH); 176.0 (CO).

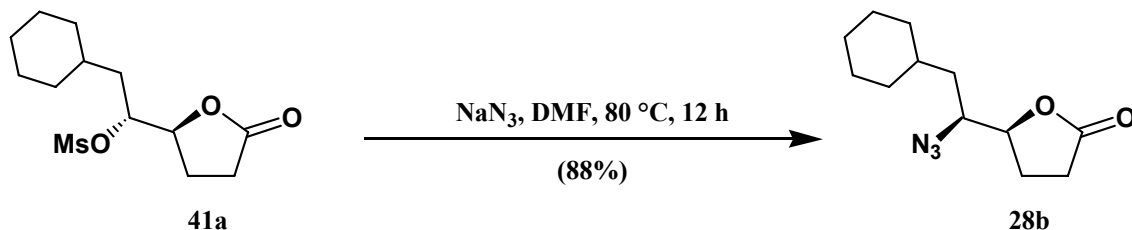
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1781 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 291 (16, MH⁺); 195 (100 [M - CH₃SO₃]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₂₂O₅S: C 53.77, H 7.64, S 11.04; encontrado C 54.03, H 7.63, S 11.26.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4S,5S)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxihexanoico (28b).



En un matraz de fondo redondo de 100 mL con un refrigerante se disolvieron 1.35 g (4.66 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4S,5R)-6-ciclohexil-4-hidroxi-5-metanosulfonatohexanoico (**41a**) en 46 mL de *N,N*-dimetilformamida seca y se añadieron 1.21 g (18.64 mmoles, 4 eq) de azida sódica. La suspensión resultante se agitó a 80 °C bajo atmósfera de argón durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se añadieron sobre la mezcla de reacción 30 mL de agua y se extrajo la mezcla con éter etílico (4 x 50 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución acuosa saturada de cloruro sódico (2 x 100 mL), se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. El crudo de reacción resultante se sometió a cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:3), aislándose 0.97 g (4.10 mmoles, 88%) de la 1,4-lactona del ácido (4S,5S)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxihexanoico (**28b**) como un aceite naranja. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +25.0° (c 2.0, CHCl_3).

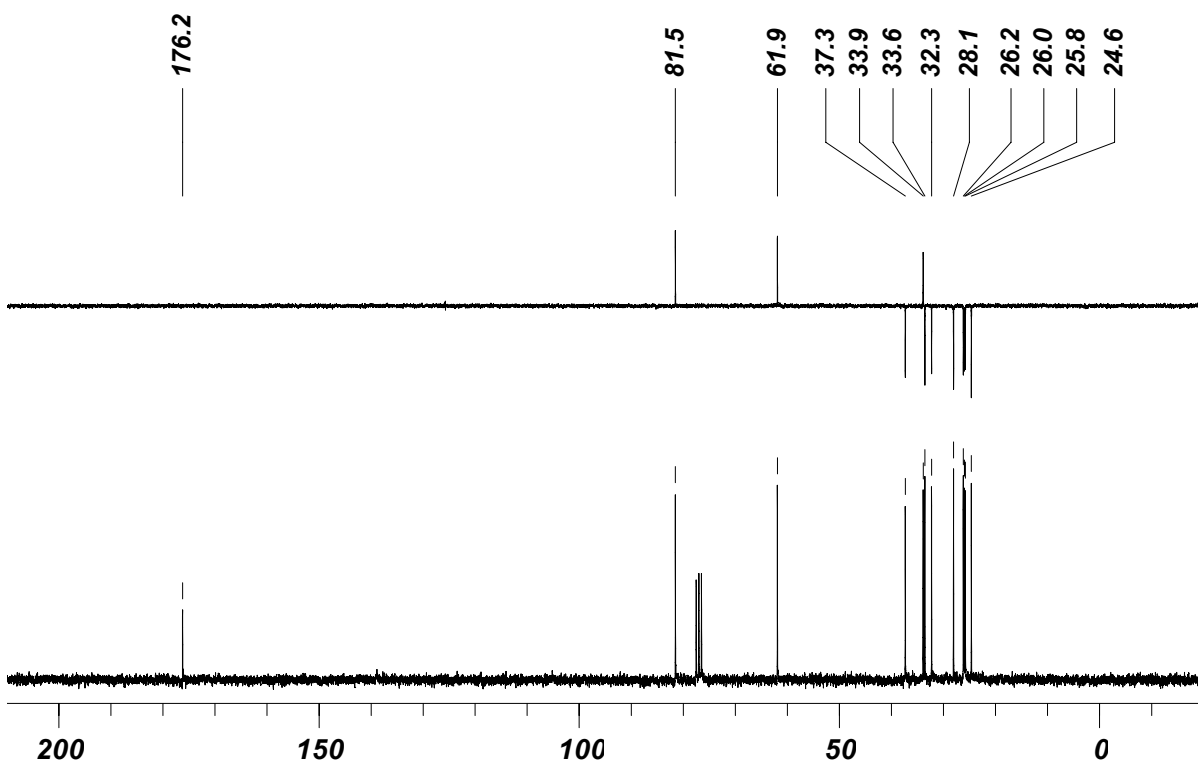
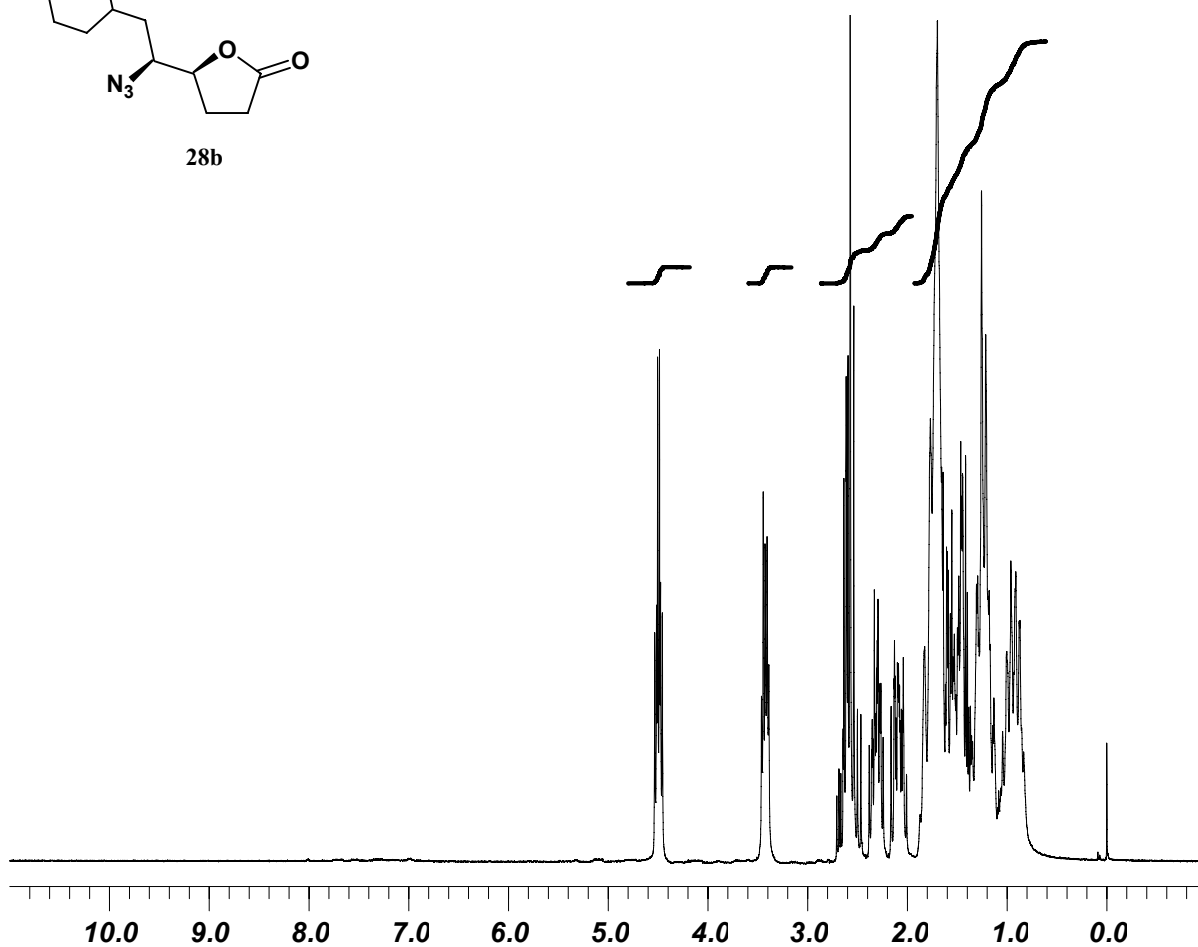
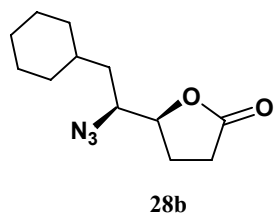
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.83-1.87 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-6); 2.01-2.16 (m, 1H, H-3); 2.24-2.38 (m, 1H, H-3); 2.47-2.71 (m, 2H, 2 x H-2); 3.38-3.46 (m, 1H, H-5); 4.49 (dt, 1H, $J_{4,5}=4.6$ Hz, $J_{3,4}=J_{3,4}=7.3$ Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 24.6 (CH_2); 25.8 (CH_2); 26.0 (CH_2); 26.2 (CH_2); 28.1 (CH_2); 32.3 (CH_2); 33.6 (CH_2); 33.9 (CH); 37.3 (CH_2); 61.9 (CH); 81.5 (CH); 176.2 (CO).

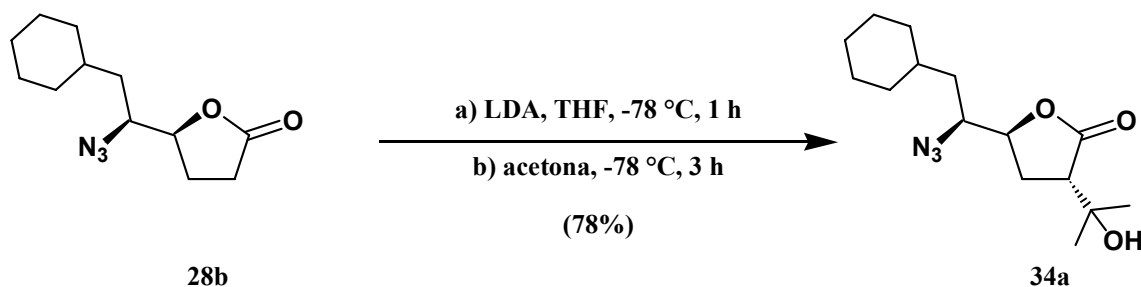
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2107 (f, N_3); 1781 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 238 (34, MH^+); 210 (100, $[\text{MH} - \text{N}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$: C 60.74, H 8.07, N 17.71; encontrado C 60.56, H 8.18, N 17.93.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (34a).



En un matraz de fondo redondo de 100 mL conectado a una atmósfera de argón se disolvieron 1.01 g (5.11 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxihexanoico (**28b**) en 12 mL de tetrahidrofurano seco. A esta disolución enfriada a -78 °C se le añadieron 27.4 mL (6.38 mmoles, 1.25 eq) de disolución 0.25 M de LDA recién preparada [añadiendo en un matraz de fondo redondo de 50 mL bajo atmósfera de argón, 4.3 mL (6.85 mmoles, 1.07 eq) de disolución 1.6 M en hexano de *n*-butillitio sobre una disolución a -78 °C de 0.90 mL (6.38 mmoles) de *N,N*-diisopropilamina seca en 22.2 mL de THF seco y agitando durante 30 minutos a 0 °C]. Tras agitar la mezcla de reacción durante 1 hora a -78 °C, se añadieron 0.64 mL (6.38 mmoles, 1.25 eq) de acetona seca y se continuó la agitación a -78 °C durante 3 horas más. Después se añadieron 28 mL de disolución acuosa saturada de cloruro amónico y una vez alcanzada la temperatura ambiente se extrajo la mezcla con diclorometano (3 x 25 mL), las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. Tras purificar el residuo así obtenido por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:2) se aislaron 1.17 g (3.99 mmoles, 78%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (**34a**), como un aceite amarillo claro. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +49.7° (c 1.9, CHCl₃).

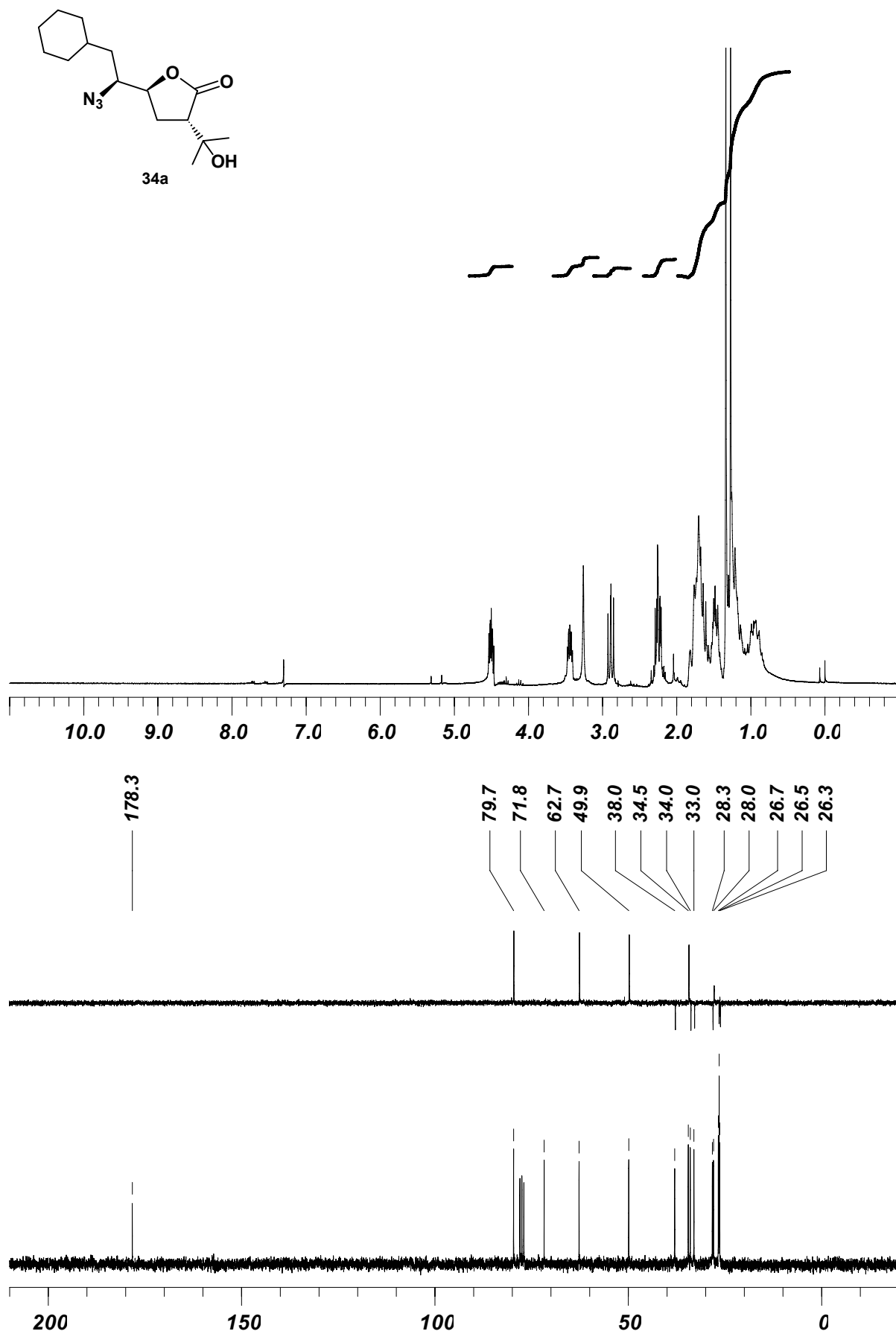
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.83-1.90 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-6); 1.27 (s, 3H, CH₃); 1.34 (s, 3H, CH₃); 2.24 (ddd, 1H, $J_{3,4}=4.9$ Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.26 (dt, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=8.5$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.89 (dd, 1H, $J_{2,3}=8.5$ Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, H-2); 3.26 (sa, 1H, OH); 3.40-3.47 (m, 1H, H-5); 4.50 (ddd, 1H, $J_{4,5}=3.7$ Hz, $J_{3,4}=4.9$ Hz, $J_{3,4}=8.5$ Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.3 (CH₂); 26.5 (CH₃ + CH₂); 26.7 (CH₂); 28.0 (CH₃); 28.3 (CH₂); 33.0 (CH₂); 34.0 (CH₂); 34.5 (CH); 38.0 (CH₂); 49.9 (CH); 62.7 (CH); 71.8 (C); 79.7 (CH); 178.3 (CO).

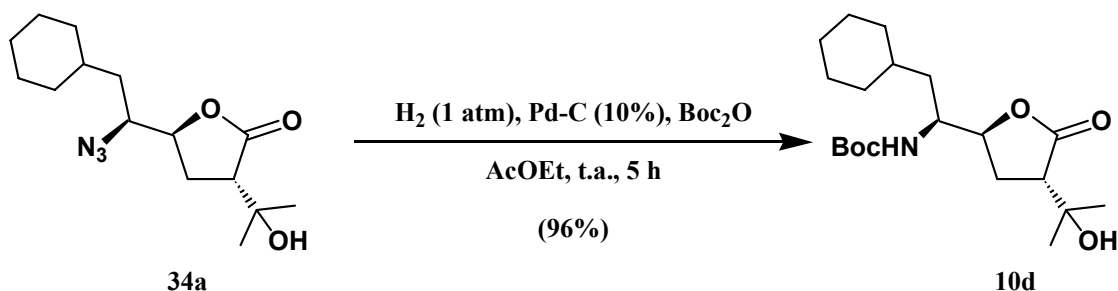
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3480 (a, OH); 2107 (f, N₃); 1762 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 296 (1, MH⁺); 250 (6, [M - N₂ - OH]⁺); 83 (100).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₂₅N₃O₃: C 60.99, H 8.53, N 14.23; encontrado C 61.15, H 8.47, N 14.09.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (10d).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL se disolvieron 0.52 g (1.78 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-azido-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (**34a**) en 9 mL de acetato de etilo, y una vez añadidos 0.43 g (1.95 mmoles, 1.1 eq) de anhídrido de *t*-butoxicarbonilo, se desoxigenó bajo atmósfera de argón. Después se añadieron 0.52 g (10% en peso de paladio) de paladio sobre carbón activo al 10% y la mezcla obtenida se purgó con hidrógeno, se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente y una atmósfera de presión de hidrógeno y luego se filtró sobre celita y se concentró a sequedad. Resultó así un crudo de reacción que por purificación en columna cromatográfica (acetato de etilo/hexano 1:3) rindió 0.63 g (1.71 mmoles, 96%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (**10d**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano, aislándose cristales incoloros de p.f. 121-122 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -16.1° (c 1.9, CHCl₃).

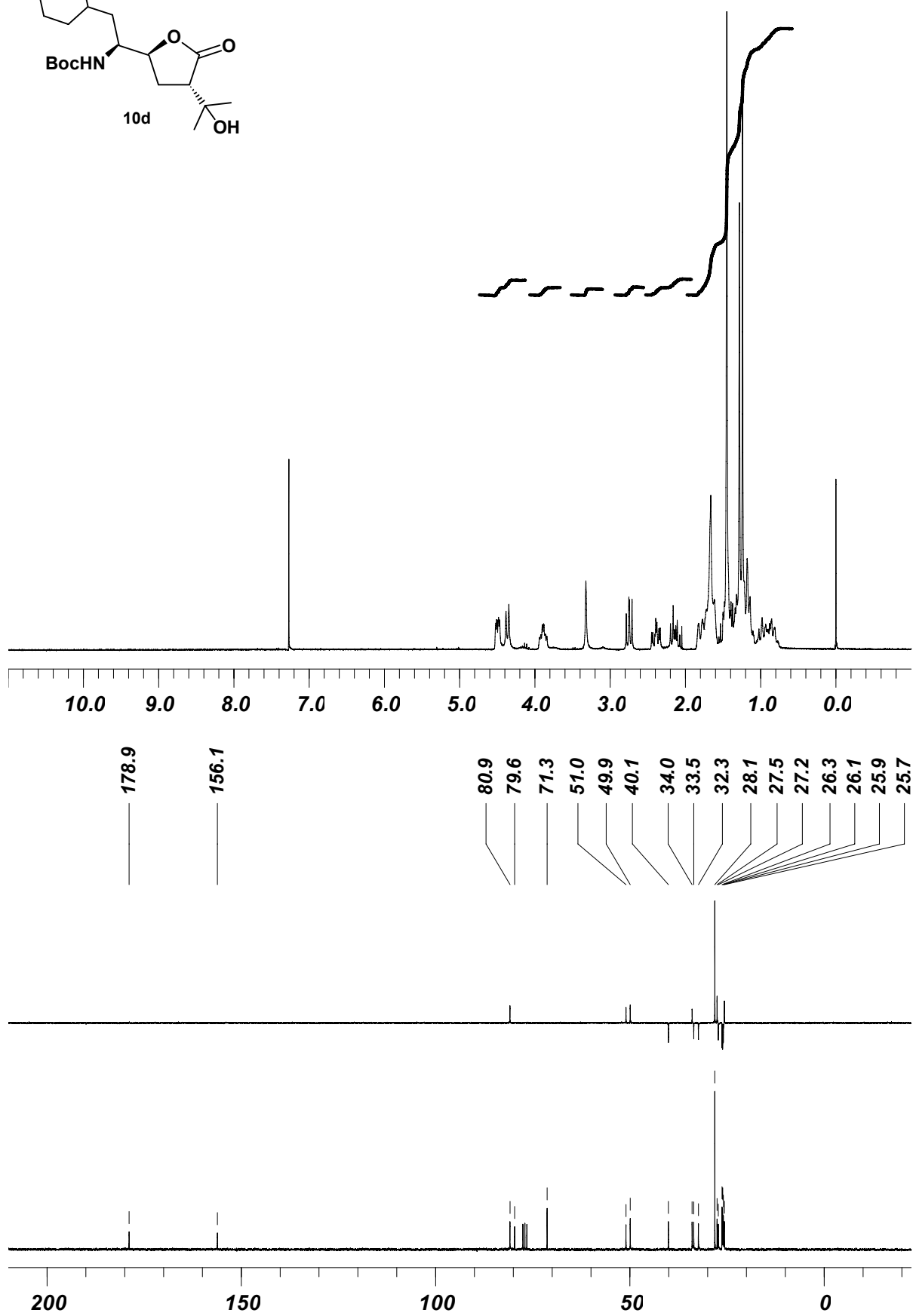
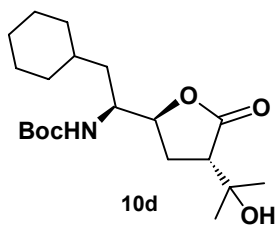
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.78-1.83 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-6); 1.24 (s, 3H, CH₃); 1.28 (s, 3H, CH₃); 1.45 (s, 9H, ^tBu); 2.13 (dt, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=8.6$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.39 (ddd, 1H, $J_{3,4}=4.0$ Hz, $J_{2,3}=10.7$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.75 (dd, 1H, $J_{2,3}=8.6$ Hz, $J_{2,3}=10.7$ Hz, H-2); 3.32 (sa, 1H, OH); 3.83-3.95 (m, 1H, H-5); 4.36 (d, 1H, $J_{5,\text{NH}}=9.4$ Hz, NH); 4.49 (ddd, 1H, $J_{4,5}=1.5$ Hz, $J_{3,4}=4.0$ Hz, $J_{3,4}=8.6$ Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.7 (CH₃); 25.9 (CH₂); 26.1 (CH₂); 26.3 (CH₂); 27.2 (CH₂); 27.5 (CH₃); 28.1 (3 x CH₃); 32.3 (CH₂); 33.5 (CH₂); 34.0 (CH); 40.1 (CH₂); 49.9 (CH); 51.0 (CH); 71.3 (C); 79.6 (C); 80.9 (CH); 156.1 (CO); 178.9 (CO).

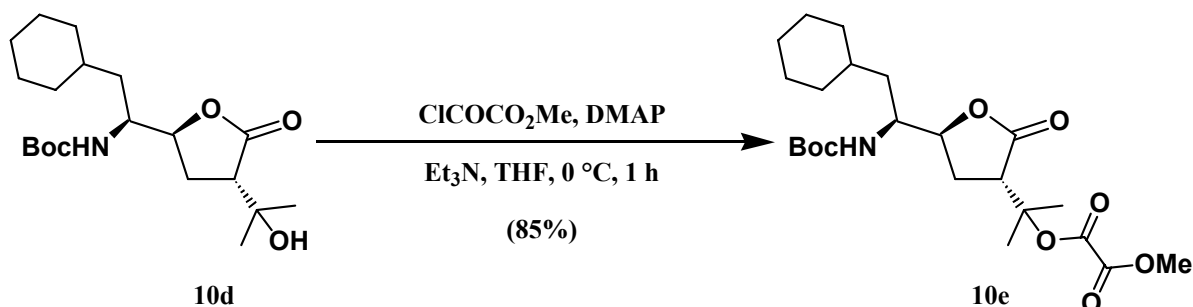
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3515 (m, NH); 3340 (f, OH); 1758 (f, CO); 1684 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 370 (1, MH⁺); 324 (10, [M - N₂ - OH]⁺); 252 (100, [M - C₅H₁₀NO₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₃₅NO₅: C 65.01, H 9.55, N 3.79; encontrado C 65.14, H 9.62, N 3.75.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)hexanoico (10e).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se disolvieron bajo atmósfera de argón 0.37 g (1.00 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)hexanoico (**10d**), 0.01 g (0.10 mmoles, 0.1 eq) de *N,N*-dimetilaminopiridina y 0.17 mL (1.25 mmoles, 1.25 eq) de trietilamina seca en 4 mL de tetrahidrofurano seco y a esta mezcla agitada y enfriada a 0 °C se le añadieron lentamente 0.12 mL (1.25 mmoles, 1.25 eq) de clorooxoacetato de metilo, continuando la agitación a 0 °C bajo atmósfera de argón durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se añadieron 20 mL de éter etílico, se lavó la fase orgánica obtenida con disolución saturada de cloruro sódico (2 x 20 mL), se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad, obteniéndose así un crudo de reacción que por purificación cromatográfica en columna (acetato de etilo/hexano 1:5) dio lugar a 0.39 g (0.85 mmoles, 85%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)hexanoico (**10e**), como un sólido amorfo de color blanco que no fue posible cristalizar. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -22.1° (c 2.6, CHCl₃).

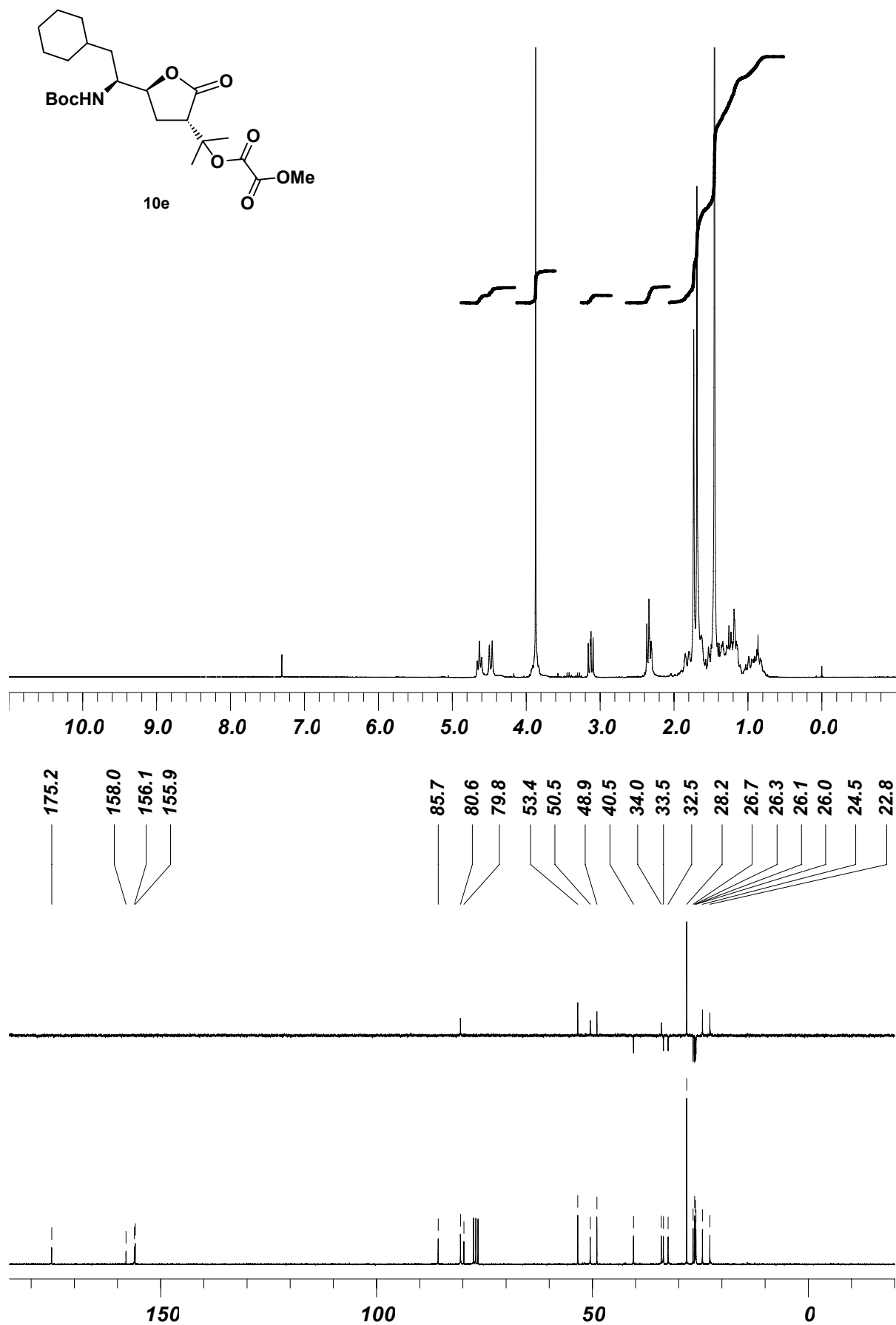
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.81-1.94 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-6); 1.45 (s, 9H, ^tBu); 1.69 (s, 3H, CH₃); 1.73 (s, 3H, CH₃); 2.30-2.37 (m, 2H, 2 x H-3); 3.13 (dd, 1H, $J_{2,3}=7.3$ Hz, $J_{2,3}=9.4$ Hz, H-2); 3.87 (s, 3H, OCH₃); 3.83-3.92 (m, 1H, H-5); 4.48 (d, 1H, $J_{5,\text{NH}}=9.7$ Hz, NH); 4.60-4.66 (m, 1H, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 22.8 (CH₃); 24.5 (CH₃); 26.0 (CH₂); 26.1 (CH₂); 26.3 (CH₂); 26.7 (CH₂); 28.2 (3 x CH₃); 32.5 (CH₂); 33.5 (CH₂); 34.0 (CH); 40.5 (CH₂); 48.9 (CH); 50.5 (CH); 53.4 (OCH₃); 79.8 (C); 80.6 (CH); 85.7 (C); 155.9 (CO); 156.1 (CO); 158.0 (CO); 175.2 (CO).

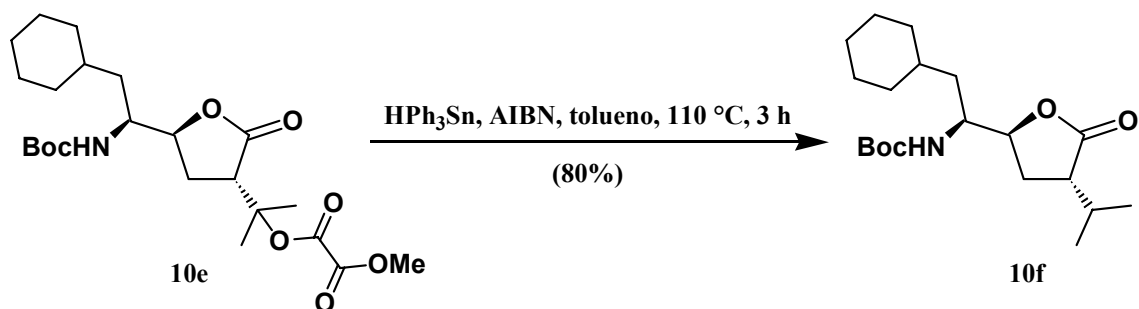
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3338 (a, NH); 1769 (f, CO); 1747 (f, CO); 1709 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 456 (1, MH⁺); 356 (8, [M - C₅H₇O₂]⁺); 252 (100%).

Análisis elemental: calculado para C₂₃H₃₇NO₈: C 60.64, H 8.19, N 3.07; encontrado C 60.77, H 8.46, N 2.96.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-isopropilhexanoico (10f).



En un matraz de fondo redondo al que se le acopló un refrigerante y se conectó a una línea de argón se disolvieron 0.32 g (0.76 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)hexanoico (**10e**) y 0.02 g (0.15 mmoles, 0.2 eq) de 2,2'-azobisisobutironitrilo en 15 mL tolueno seco y la disolución obtenida se desoxigenó a temperatura ambiente por burbujeo de argón. Tras añadir luego 0.54 g (1.53 mmoles, 2.0 eq) de hidruro de trifenilestaño, la mezcla de reacción se calentó a reflujo en atmósfera de argón durante 20 minutos y a 110 °C durante 3 horas. Tras ese tiempo el tolueno se eliminó a vacío en el rotavapor y el residuo resultante se disolvió en 10 mL de éter etílico. Luego se separó por filtración el residuo blanco insoluble de trifenilestaño y los líquidos filtrados se concentraron a sequedad en el rotavapor. El crudo de reacción así obtenido se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:10 a 1:6) aislándose 0.21 g (0.61 mmoles, 80%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-isopropilhexanoico (**10f**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano, dando lugar a cristales incoloros de p.f. 109-111 °C. $[\alpha]_D^{20}$: -34.7° (c 1.6, CHCl₃).

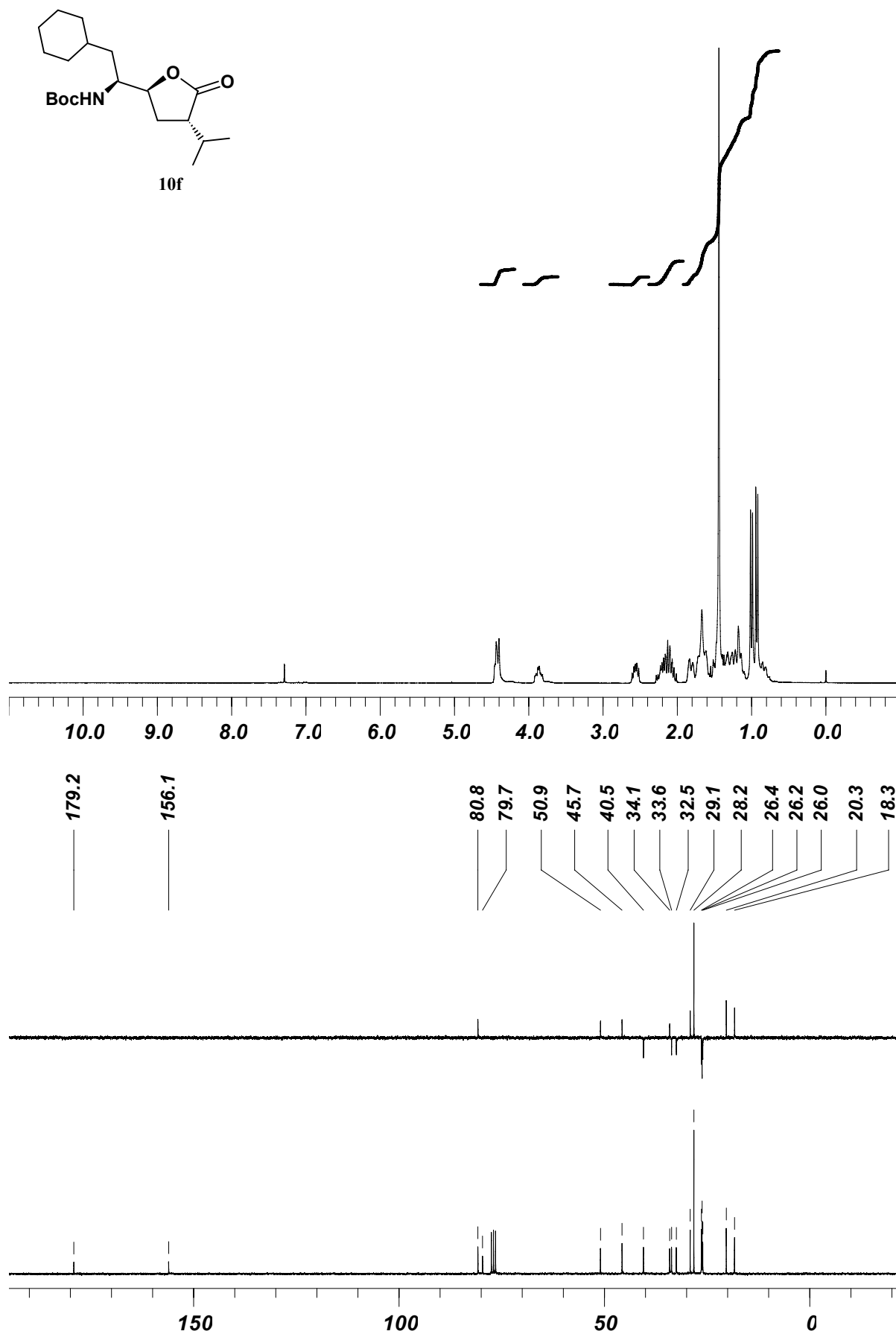
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.80-1.84 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-6); 0.93 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃); 1.00 (d, 3H, *J*=7.0 Hz, CH₃); 1.44 (s, 9H, ^tBu); 2.01-2.28 (m, 3H, 2 x H-3 + H-^tPr); 2.56 (ddd, 1H, *J*_{2,H-^tPr}=5.2 Hz, *J*_{2,3}=6.7 Hz, *J*_{2,3}=10.1 Hz, H-2); 3.81-3.92 (m, 1H, H-5); 4.38-4.46 (m, 2H, H-4 + NH).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 18.3 (CH₃); 20.3 (CH₃); 26.0 (CH₂); 26.2 (CH₂); 26.4 (CH₂); 28.2 (3 x CH₃); 29.1 (CH); 32.5 (CH₂); 33.6 (CH₂); 34.1 (CH); 40.5 (CH₂); 45.7 (CH); 50.9 (CH); 79.7 (C); 80.8 (CH); 156.1 (CO); 179.2 (CO).

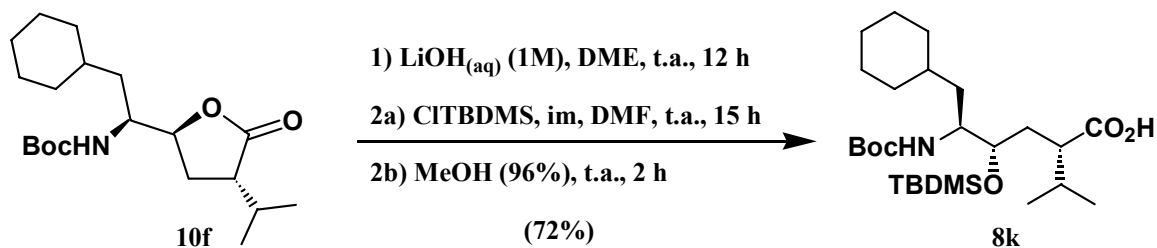
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3337 (m, NH); 1769 (f, CO); 1683 (f, CO).

EM-IQ (*m/z*, %): 354 (10, MH⁺); 338 (6, [M - CH₃]⁺); 298 (96, [M - C₄H₇]⁺); 254 (99, [M - C₅H₇O₂]⁺); 126 (100).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₃₅NO₄: C 67.95, H 9.98, N 3.96; encontrado C 67.82, H 10.12, N 3.86.



Preparación del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-2-isopropilhexanoico (**8k**).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL se disolvieron 0.35 g (0.99 moles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-4-hidroxi-2-isopropilhexanoico (**10f**) en 7 mL de 1,2-dimetoxietano y 7 mL de disolución acuosa 1.0 M de hidróxido de litio. La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y luego se acidificó hasta pH 4 con disolución acuosa al 10% de ácido cítrico. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (4 x 14 mL) y las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad, obteniendo un crudo de reacción que se secó en la línea de vacío.

El crudo de reacción obtenido se disolvió en 4 mL de *N,N*-dimetilformamida seca, añadiéndole luego 0.81 g de imidazol (11.88 moles, 12 eq) y 1.49 g (9.90 moles, 10 eq) de cloruro de *t*-butildimetilsililo. La disolución obtenida se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 15 horas, se añadieron 3.0 mL de metanol (96%), se agitó a temperatura ambiente 2 horas más y se concentró a vacío en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en 30 mL de una mezcla 1:1 de acetato de etilo y disolución acuosa al 10% de ácido cítrico, se separó la fase orgánica de la acuosa y esta última se extrajo con acetato de etilo (2 x 15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de cloruro sódico (30 mL), se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron, obteniendo así un crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6) para dar 0.35 g (0.71 mmoles, 72%) del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-2-isopropilhexanoico (**8k**), como un sólido amorfo de color blanco que no fue posible cristalizar. $[\alpha]_{D}^{20}$: -26.9° (c 1.5, CHCl₃).

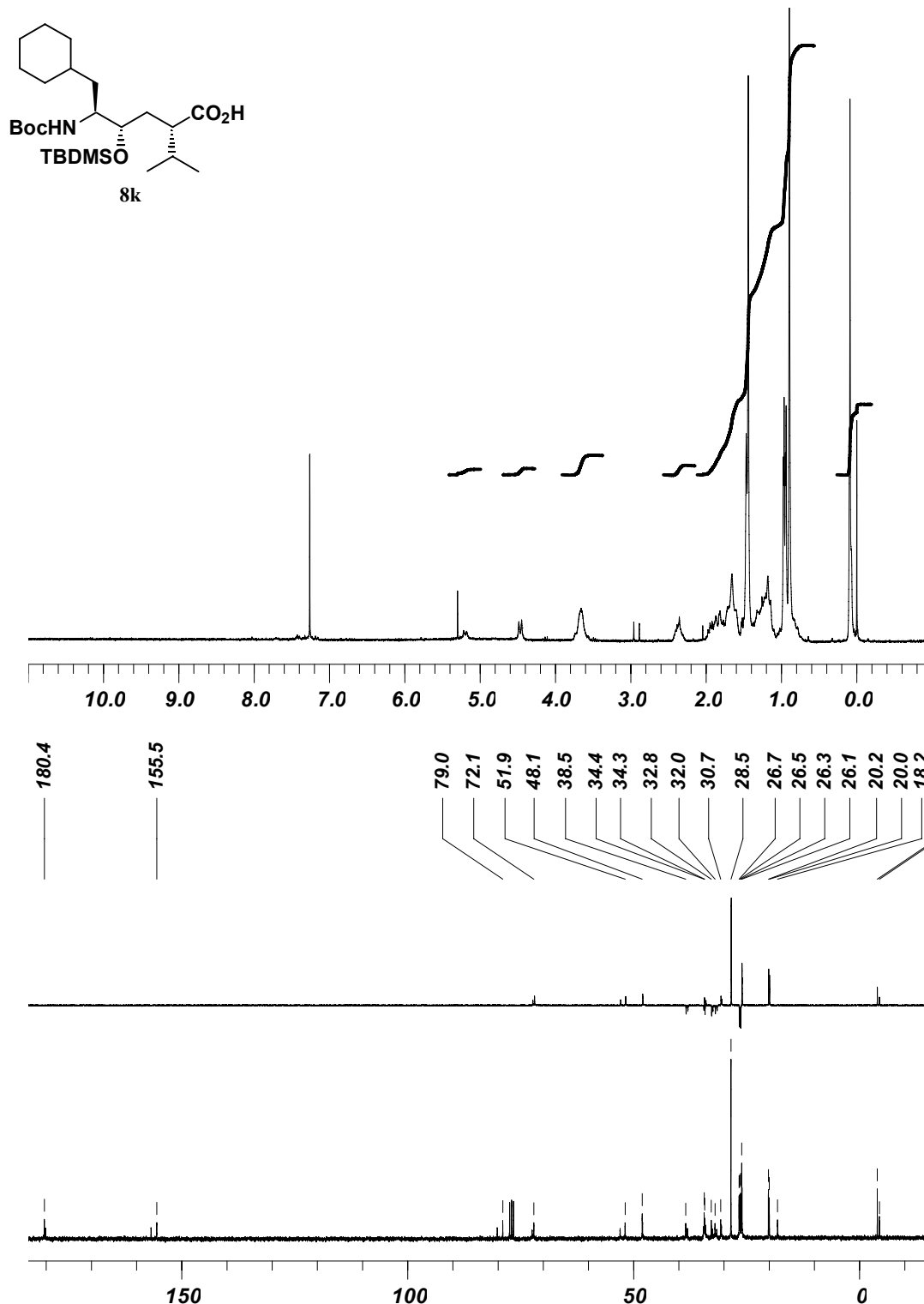
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.07-0.10 (m, 6H, 2 x CH₃Si); 0.78-1.53 (m, 8H, 8 x Cy-H); 0.89 (s, 9H, ^tBuSi); 0.95 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃); 0.96 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃); 1.44 (s, 9H, ^tBuO); 1.57-1.98 (m, 8H, 3 x Cy-H + 2 x H-3 + 2 x H-6 + ^tPr-H); 2.31-2.42 (m, 1H, H-2); 3.59-3.75 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.46 (d, 1H, *J*_{5,NH}=9.4 Hz, NH).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): -4.4 (CH₃); -3.9 (CH₃); 18.2 (C); 20.0 (CH₃); 20.2 (CH₃); 26.1 (3 x CH₃); 26.3 (CH₂); 26.5 (CH₂); 26.7 (CH₂); 28.5 (3 x CH₃); 30.7 (CH); 32.0 (CH₂); 32.8 (CH₂); 34.3 (CH₂); 34.4 (CH); 38.5 (CH₂); 48.1 (CH); 51.9 (CH); 72.1 (CH); 79.0 (C); 155.5 (CO); 180.4 (CO).

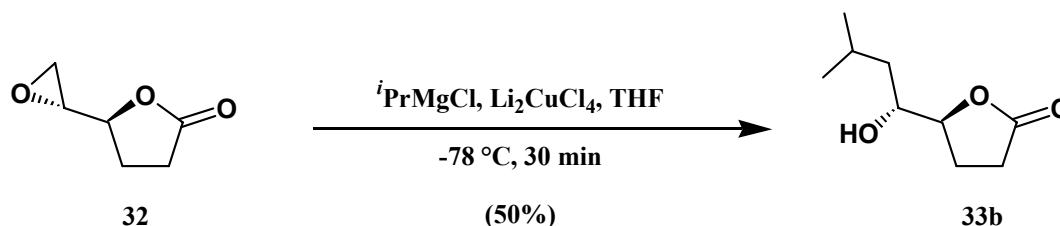
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3257 (a, OH, NH); 3112 (a, OH, NH); 1711 (f, CO).

EM-IQ (*m/z*, %): 486 (2, MH⁺); 57 (100).

Análisis elemental: calculado para C₂₆H₅₁NO₅Si: C 64.28, H 10.58, N 2.88; encontrado C 63.99, H 10.67, N 2.98.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-4,5-dihidroxi-7-metiloctanoico (**33b**).



Partiendo de 1.53 g (11.94 mmoles) de la (*S*)-5-((*R*)-oxiran-2'-il)-dihidrofuran-2(3*H*)-ona (**32**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **33a** (pág. 98), utilizando cloruro de isopropilmagnesio en lugar de cloruro de ciclohexilmagnesio, se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:2), 1.03 g (5.97 mmoles, 50%) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-4,5-dihidroxi-7-metiloctanoico (**33b**) como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano, aislándose cristales incoloros de p.f. 64-65 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +30.4° (c 1.6, CHCl₃).

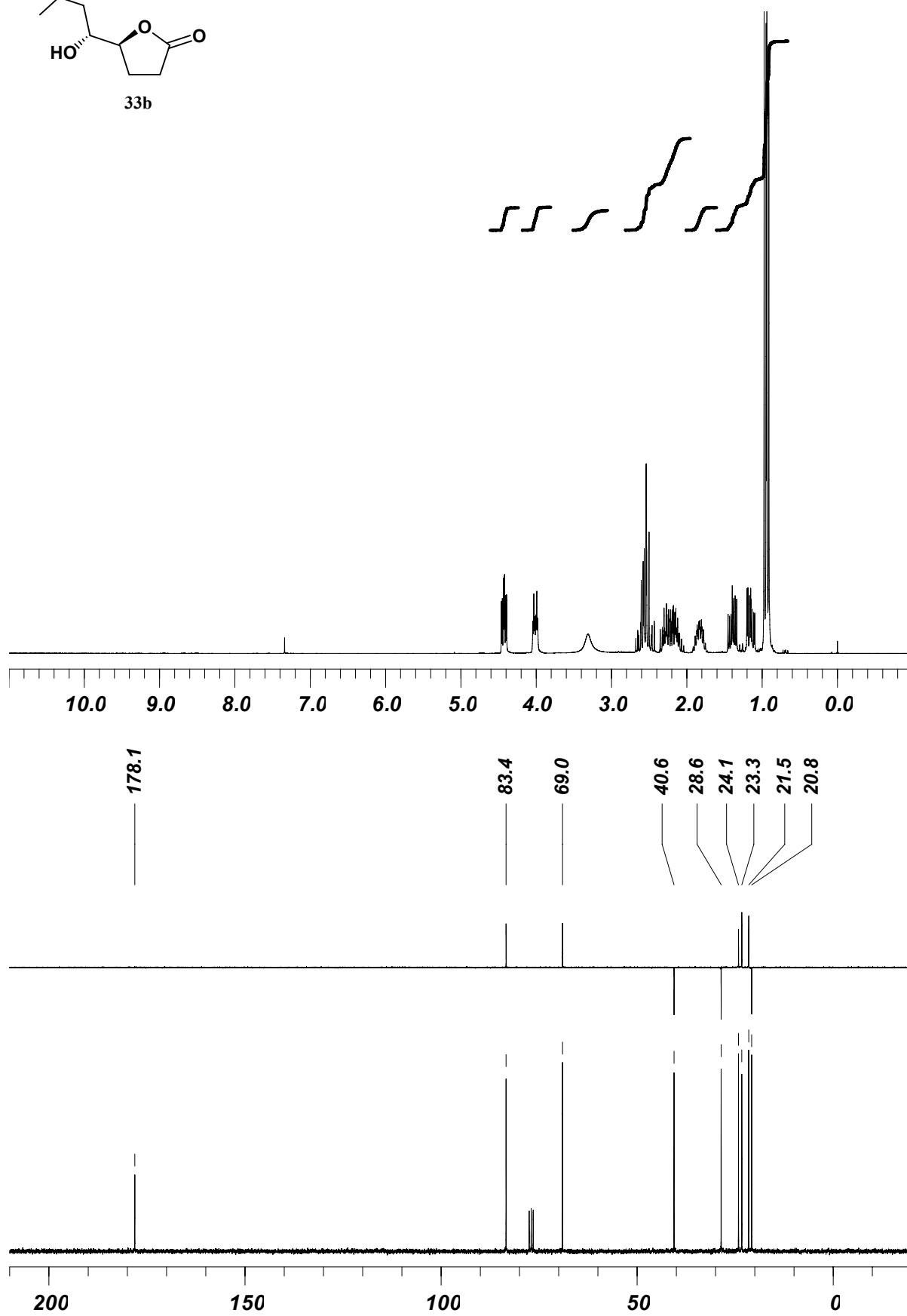
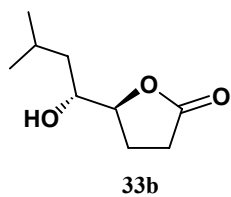
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.92 (d, 3H, $J_{7,8}$ =6.4 Hz, CH₃-8); 0.96 (d, 3H, $J_{7,8}$ =6.7 Hz, CH₃-8); 1.15 (ddd, 1H, $J_{5,6}$ =3.7 Hz, $J_{6,7}$ =9.1 Hz, $J_{6,6}$ =13.7 Hz, H-6); 1.39 (ddd, 1H, $J_{6,7}$ =5.1 Hz, $J_{5,6}$ =9.7 Hz, $J_{6,6}$ =13.7 Hz, H-6); 1.75-1.91 (m, 1H, H-7); 2.04-2.35 (m, 2H, 2 x H-3); 2.43-2.67 (m, 2H, 2 x H-2); 3.31 (sa, 1H, OH); 4.01 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ =3.0 Hz, $J_{5,6}$ =3.7 Hz, $J_{5,6}$ =9.7 Hz, H-5); 4.43 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ =3.0 Hz, $J_{3,4}$ =6.4 Hz, $J_{3,4}$ =7.0 Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 20.8 (CH₂); 21.5 (CH₃); 23.3 (CH₃); 24.1 (CH); 28.6 (CH₂); 40.6 (CH₂); 69.0 (CH); 83.4 (CH); 178.1 (CO).

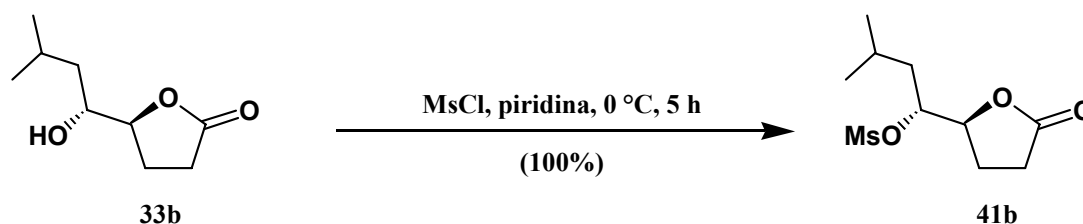
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3416 (a, OH); 1761 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 173 (77, MH⁺); 155 (100, [M - OH]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₉H₁₆O₃: C 62.77, H 9.36; encontrado C 62.62, H 9.58.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-4-hidroxi-5-metanosulfonato-7-metiloctanoico (41b).



Partiendo de 1.03 g (5.97 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-4,5-dihidroxi-7-metiloctanoico (**33b**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **41a** (pág. 100), se obtuvieron tras cristalización de una mezcla de éter etílico y hexano, 1.49 g (5.97 mmoles, 100%) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-4-hidroxi-5-metanosulfonato-7-metiloctanoico (**41b**), como un sólido incoloro de p.f. 88-89 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +21.9° (c 1.9, CHCl₃).

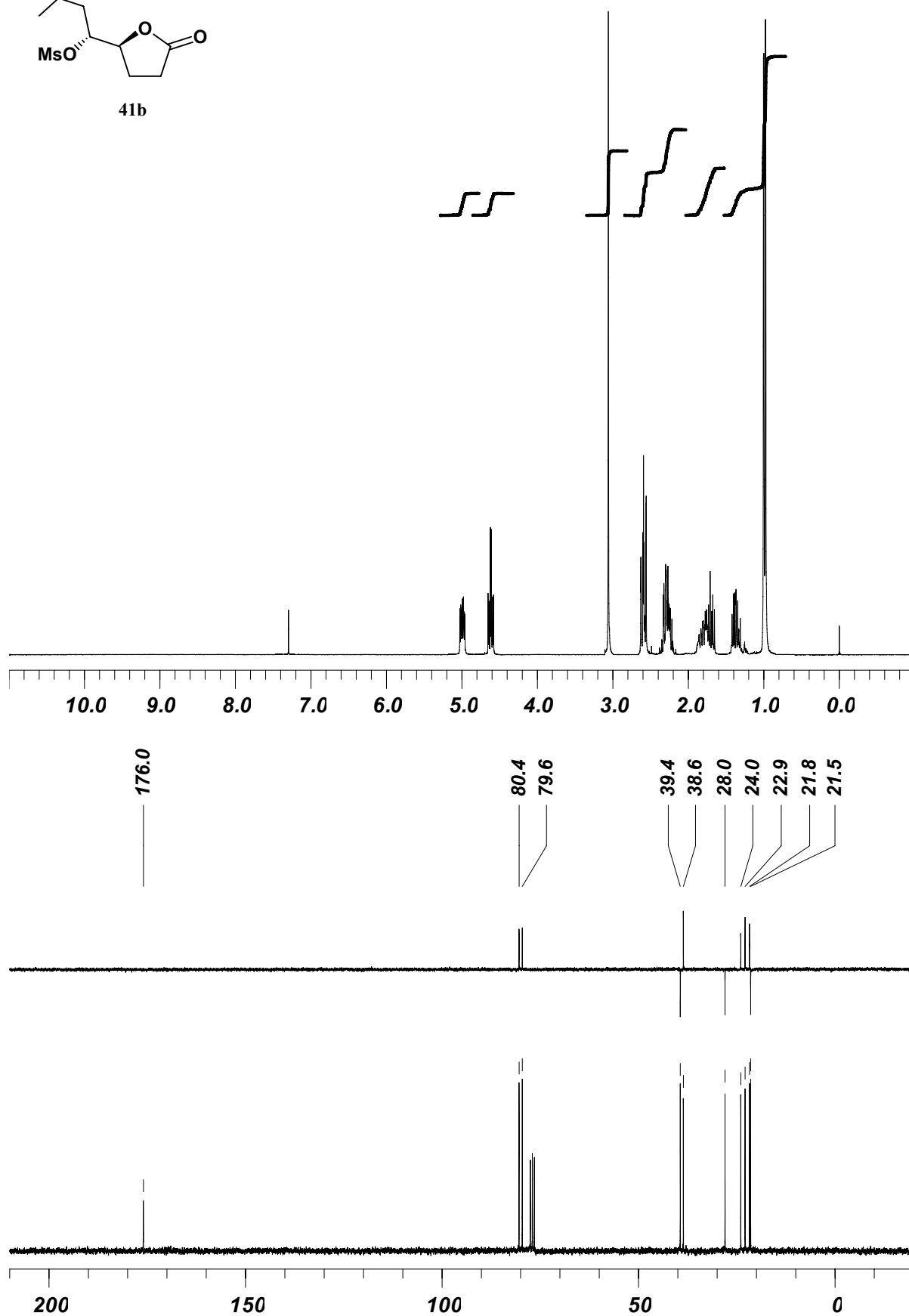
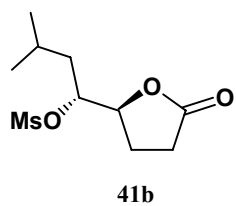
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.97 (d, 3H, $J_{7,8}$ =6.4 Hz, CH₃); 1.00 (d, 3H, $J_{7,8}$ =6.4 Hz, CH₃); 1.37 (ddd, 1H, $J_{5,6}$ =4.9 Hz, $J_{6,7}$ =8.5 Hz, $J_{6,6}$ =13.4 Hz, H-6); 1.72 (ddd, 1H, $J_{6,7}$ =5.1 Hz, $J_{5,6}$ =8.8 Hz, $J_{6,6}$ =13.4 Hz, H-6); 1.77-1.88 (m, 1H, H-7); 2.22-2.35 (m, 2H, 2 x H-3); 2.56-2.63 (m, 2H, 2 x H-2); 3.06 (s, 3H, CH₃); 4.62 (td, 1H, $J_{4,5}$ =2.7 Hz, $J_{3,4}$ = $J_{3,4}$ =7.6 Hz, H-4); 4.99 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ =2.7 Hz, $J_{5,6}$ =4.9 Hz, $J_{5,6}$ =8.8 Hz, H-5).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 21.5 (CH₂); 21.8 (CH₃); 22.9 (CH₃); 24.0 (CH); 28.0 (CH₂); 38.6 (CH₃); 39.4 (CH₂); 79.6 (CH); 80.4 (CH); 176.0 (CO).

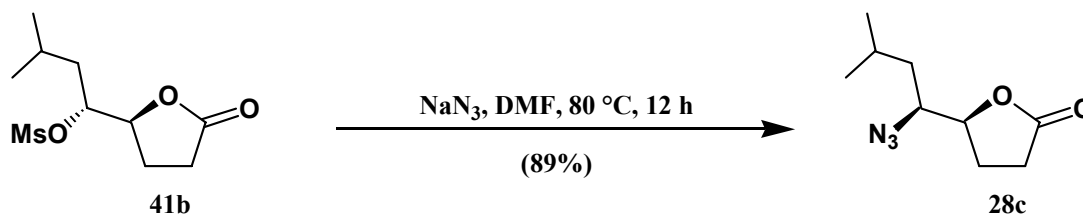
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1774 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 251 (75, MH⁺); 155 (100, [M - CH₃SO₃]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₀H₁₈O₅S: C 47.98, H 7.25, S 12.81; encontrado C 47.87, H 7.18, S 12.70.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metiloctanoico (28c).



Sometiendo 1.40 g (5.59 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*R*)-4-hidroxi-5-metanosulfonato-7-metiloctanoico (**41b**) al procedimiento descrito de preparación de **28b** (pág. 102), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:3), 0.98 g (4.97 mmoles, 89%) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metiloctanoico (**28c**) como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +35.6° (c 1.6, CHCl_3).

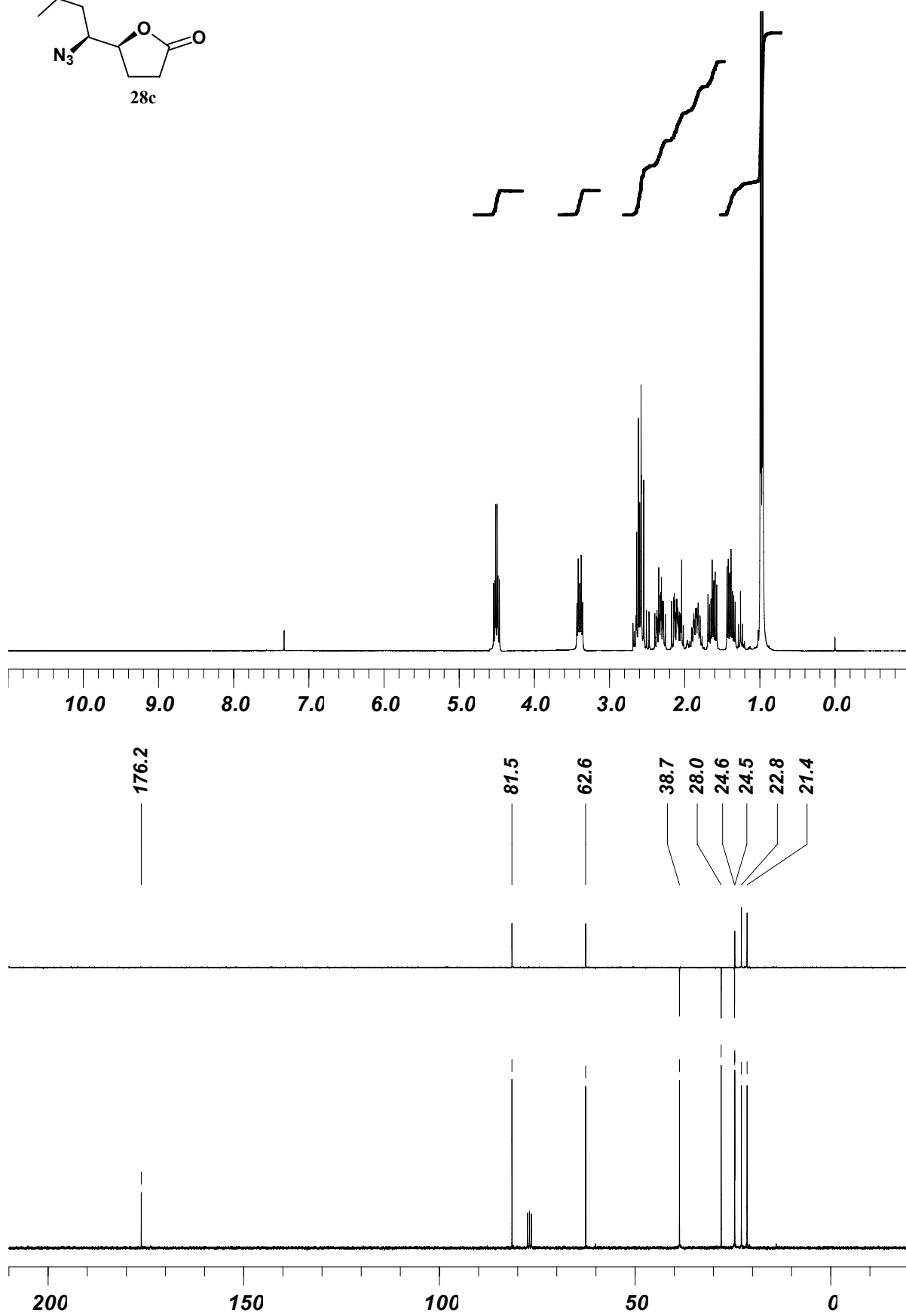
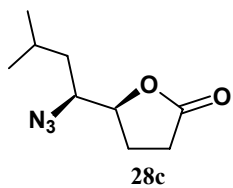
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.97 (d, 3H, $J_{7,8}=6.4$ Hz, CH_3); 0.98 (d, 3H, $J_{7,8}=6.7$ Hz, CH_3); 1.38 (ddd, 1H, $J_{5,6}=4.6$ Hz, $J_{6,7}=8.8$ Hz, $J_{6,6}=13.8$ Hz, H-6); 1.63 (ddd, 1H, $J_{6,7}=5.2$ Hz, $J_{5,6}=10.1$ Hz, $J_{6,6}=13.8$ Hz, H-6); 1.77-1.93 (m, 1H, H-7); 2.05-2.17 (m, 1H, H-3); 2.26-2.39 (m, 1H, H-3); 2.47-2.69 (m, 2H, 2 x H-2); 3.39 (dt, 1H, $J_{4,5}=J_{5,6}=4.6$ Hz, $J_{5,6}=10.1$ Hz, H-5); 4.50 (td, 1H, $J_{4,5}=4.6$ Hz, $J_{3,4}=J_{3,4}=7.3$ Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.4 (CH_3); 22.8 (CH_3); 24.5 (CH); 24.6 (CH_2); 28.0 (CH_2); 38.7 (CH_2); 62.6 (CH); 81.5 (CH); 176.2 (CO).

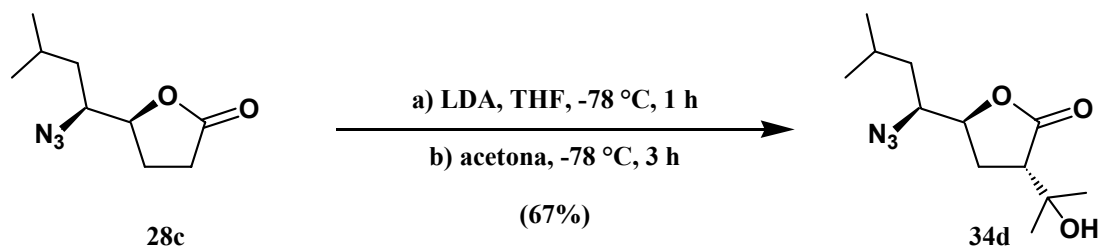
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2111 (f, N_3); 1781 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 198 (63, MH^+); 170 (100, $[\text{MH} - \text{N}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 54.81, H 7.67, N 21.30; encontrado C 55.04, H 7.74, N 21.31.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (34d).



Sometiendo 1.82 g (9.28 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metiloctanoico (**28c**) al procedimiento de preparación de **34a** (pág. 104), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:2), 1.59 g (6.22 mmoles, 67%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (**34d**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +57.2° (c 2.2, CHCl₃).

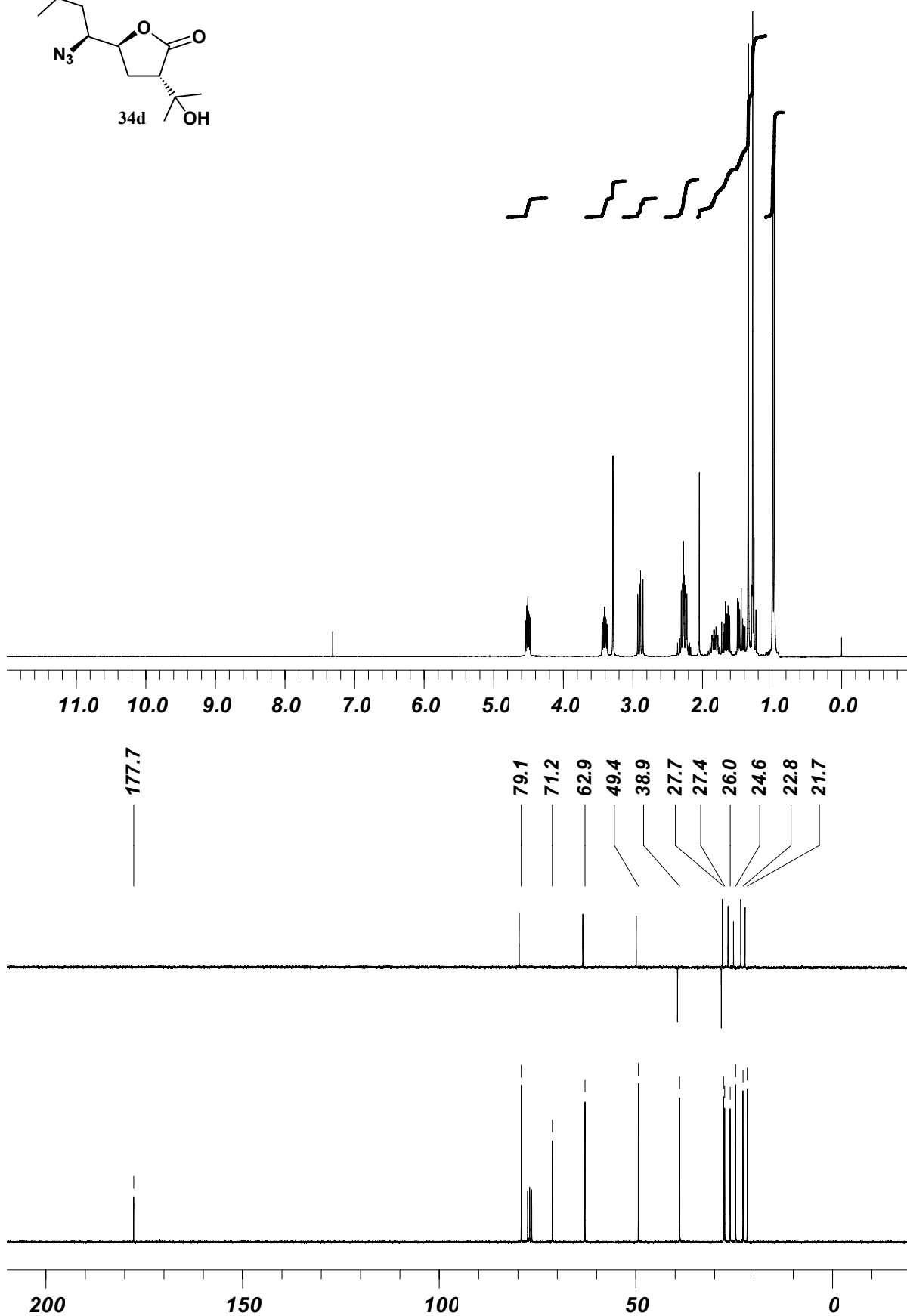
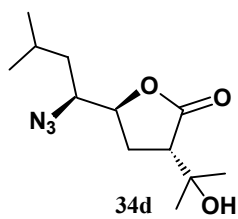
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.97 (d, 3H, $J_{7,8}=6.4$ Hz, CH₃); 0.98 (d, 3H, $J_{7,8}=6.7$ Hz, CH₃); 1.28 (s, 3H, CH₃); 1.34 (s, 3H, CH₃); 1.44 (ddd, 1H, $J_{5,6}=5.2$ Hz, $J_{6,7}=8.5$ Hz, $J_{6,6}=14.0$ Hz, H-6); 1.66 (ddd, 1H, $J_{6,7}=5.8$ Hz, $J_{5,6}=9.4$ Hz, $J_{6,6}=14.0$ Hz, H-6); 1.75-1.91 (m, 1H, H-7); 2.25 (ddd, 1H, $J_{3,4}=4.9$ Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.27 (dt, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=8.5$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.89 (dd, 1H, $J_{2,3}=8.5$ Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, H-2); 3.28 (s, 1H, OH); 3.40 (ddd, 1H, $J_{4,5}=3.7$ Hz, $J_{5,6}=5.2$ Hz, $J_{5,6}=9.4$ Hz, H-5); 4.51 (ddd, 1H, $J_{4,5}=3.7$ Hz, $J_{3,4}=4.9$ Hz, $J_{3,4}=8.5$ Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 21.7 (CH₃); 22.8 (CH₃); 24.6 (CH); 26.0 (CH₃); 27.4 (CH₃); 27.7 (CH₂); 38.9 (CH₂); 49.4 (CH); 62.9 (CH); 71.2 (C); 79.1 (CH); 177.7 (CO).

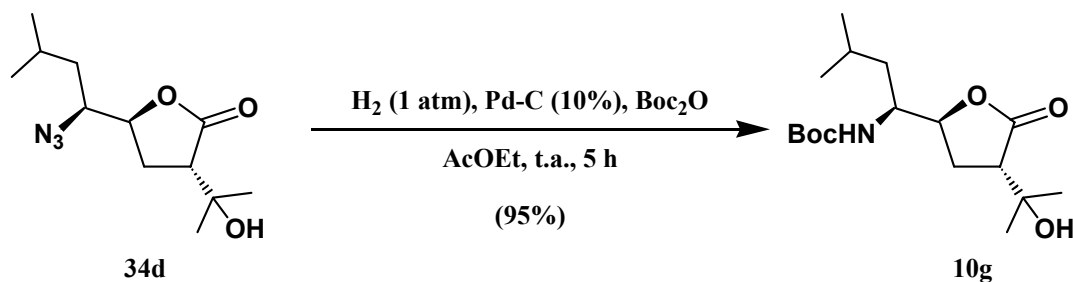
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3481 (a, OH); 2110 (f, N₃); 1763 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 256 (90, MH⁺); 238 (29, [M - OH]⁺); 210 (100, [M - N₂ - OH]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₂H₂₁N₃O₃: C 56.45, H 8.29, N 16.46; encontrado C 56.38, H 8.43, N 16.24.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (10g).



Haciendo reaccionar 1.75 g (6.85 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (**34d**) bajo las condiciones descritas para la preparación de **10d** (pág. 106), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 2:5), 2.14 g (6.51 mmoles, 95%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (**10g**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano, para dar cristales incoloros de p.f. 95-97 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -18.8° (c 2.1, CHCl_3).

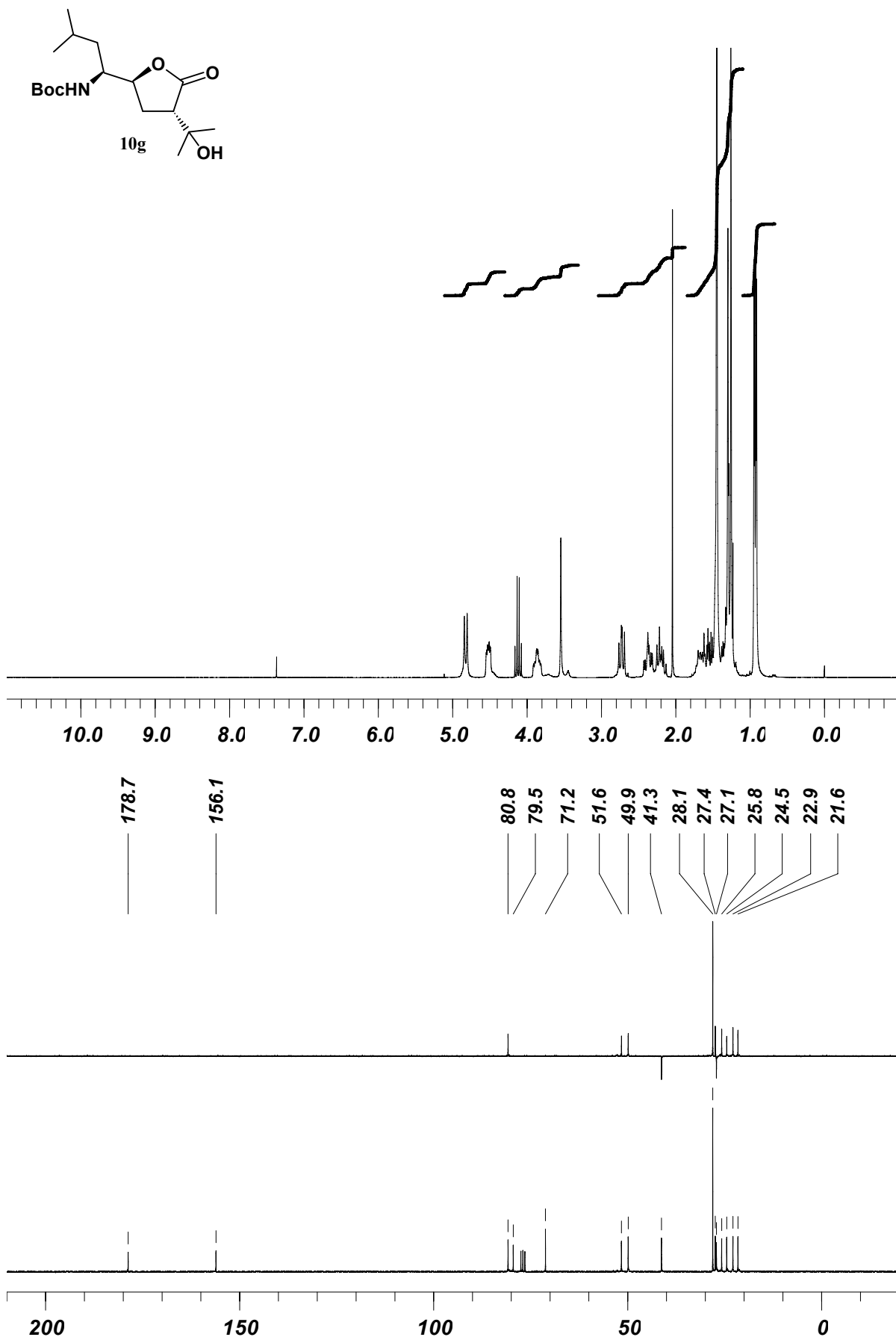
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.92 (d, 3H, $J_{7,8}=6.7$ Hz, CH_3); 0.94 (d, 3H, $J_{7,8}=6.4$ Hz, CH_3); 1.26 (s, 3H, CH_3); 1.30 (s, 3H, CH_3); 1.45 (s, 9H, tBu); 1.33-1.70 (m, 3H, 2 x H-6 + H-7); 2.19 (ddd, 1H, $J_{2,3}=8.2$ Hz, $J_{3,4}=8.5$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.37 (ddd, 1H, $J_{3,4}=4.6$ Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.73 (dd, 1H, $J_{2,3}=8.2$ Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, H-2); 3.54 (sa, 1H, OH); 3.81-3.91 (m, 1H, H-5); 4.52 (ddd, 1H, $J_{4,5}=1.5$ Hz, $J_{3,4}=4.6$ Hz, $J_{3,4}=8.5$ Hz, H-4); 4.82 (d, 1H, $J_{5,\text{NH}}=9.4$ Hz, NH).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.6 (CH_3); 22.9 (CH_3); 24.5 (CH_3); 25.8 (CH_3); 27.1 (CH_2); 27.4 (CH); 28.1 (3 x CH_3); 41.3 (CH_2); 49.9 (CH); 51.6 (CH); 71.2 (C); 79.5 (C); 80.8 (CH); 156.1 (CO); 178.7 (CO).

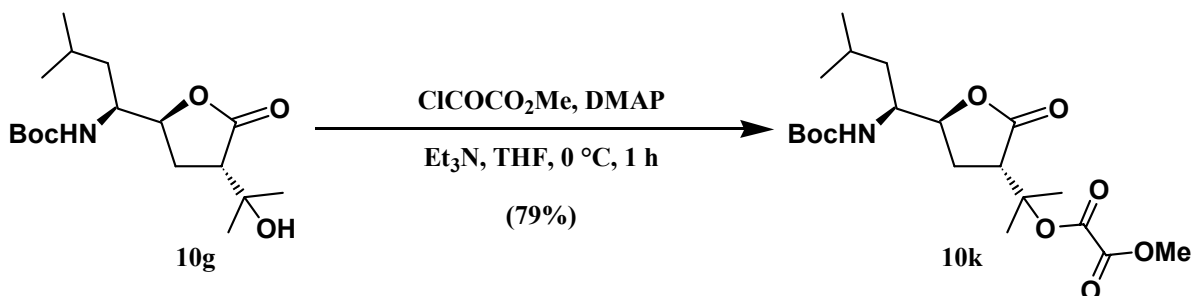
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3450 (m, NH); 3332 (m, OH); 1757 (f, CO); 1691 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 330 (3, MH^+); 314 (1, $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$); 212 (78, $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$); 83 (100).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_5$: C 61.98, H 9.49, N 4.25; encontrado C 61.89, H 9.35, N 3.96.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2S,4S,5S)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-7-metil-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)octanoico (10k).



Siguiendo las condiciones de reacción descritas para la preparación de 10e (pág. 108), se transformaron 1.62 g (4.93 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2S,4S,5S)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-7-metiloctanoico (10g) tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:4), en 1.62 g (3.89 mmoles, 79%) de la 1,4-lactona del ácido (2S,4S,5S)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-7-metil-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)octanoico (10k) como un aceite incoloro. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -25.5° (c 2.1, CHCl_3).

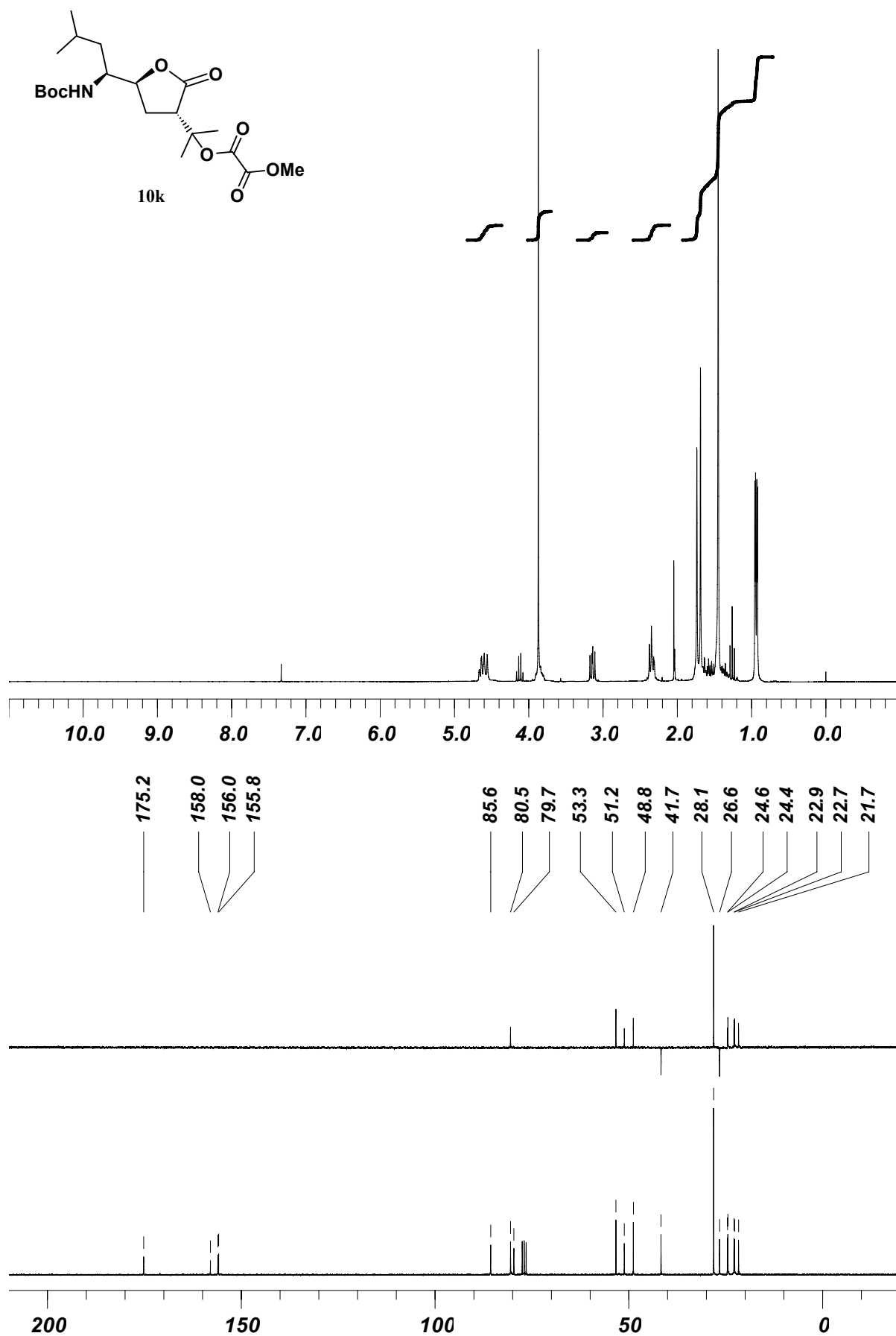
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.93 (d, 3H, $J_{7,8}=6.4$ Hz, CH_3); 0.94 (d, 3H, $J_{7,8}=6.7$ Hz, CH_3); 1.45 (s, 9H, ^tBu); 1.30-1.63 (m, 3H, 2 x H-6 + H-7); 1.69 (s, 3H, CH_3); 1.74 (s, 3H, CH_3); 2.31-2.38 (m, 2H, 2 x H-3); 3.14 (dd, 1H, $J_{2,3}=7.3$ Hz, $J_{2,3}=9.4$ Hz, H-2); 3.80-3.90 (m, 1H, H-5); 3.87 (s, 3H, OCH_3); 4.56-4.67 (m, 2H, H-4 + NH).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.7 (CH_3); 22.7 (CH_3); 22.9 (CH_3); 24.4 (CH_3); 24.6 (CH); 26.6 (CH_2); 28.1 (3 x CH_3); 41.7 (CH_2); 48.8 (CH); 51.2 (CH); 53.3 (OCH_3); 79.7 (C); 80.5 (CH); 85.6 (C); 155.8 (CO); 156.0 (CO); 158.0 (CO); 175.2 (CO).

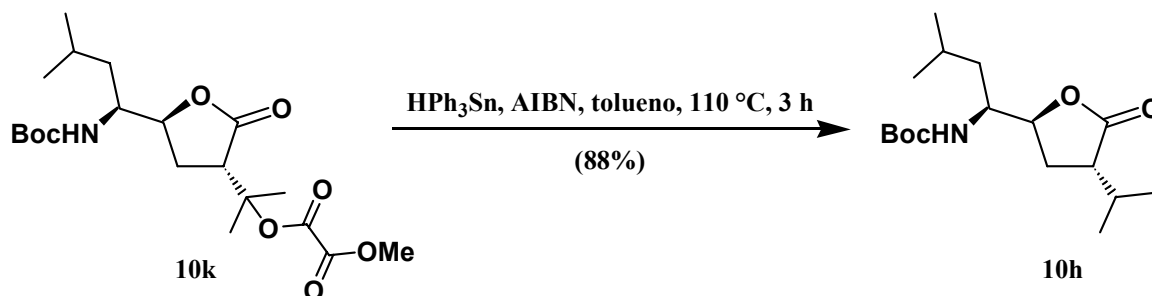
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3344 (a, NH); 1769 (f, CO); 1747 (f, CO); 1708 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 360 (3, $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7]^+$); 256 (69); 83 (100).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_8$: C 57.81, H 8.01, N 3.37; encontrado C 57.53, H 8.32, N 3.28.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isopropil-7-metiloctanoico (10h).



Partiendo de 1.62 g (3.89 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-7-metil-2-(2-propan-2-il oxalato de metilo)octanoico (10k) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de 10f (pág. 110), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:10 a 1:6), 1.07 g (3.42 mmoles, 88%) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isopropil-7-metiloctanoico (10h), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano, aislándose unos cristales incoloros de p.f.: 145-147 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -41.1° (c 1.5, CHCl₃).

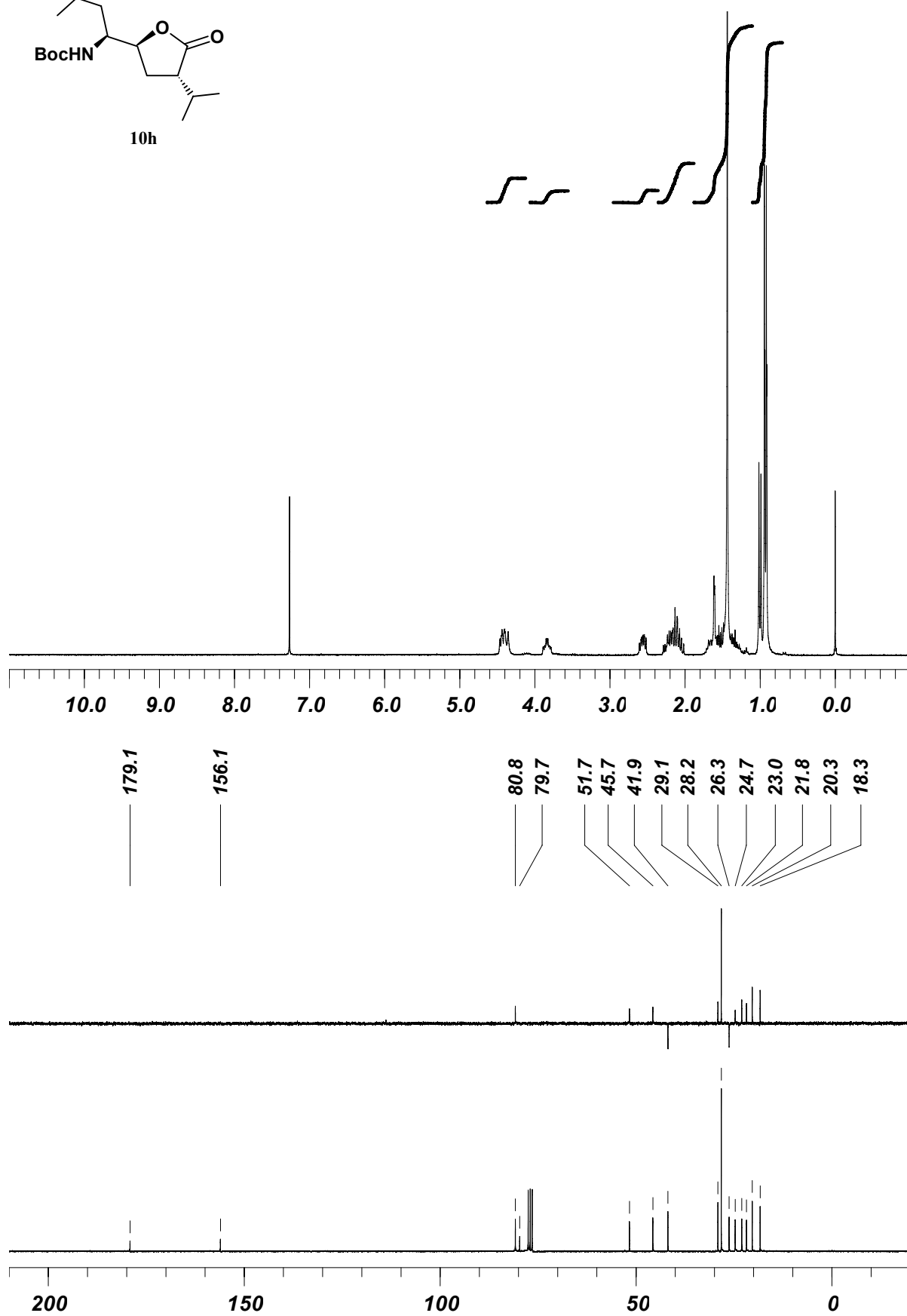
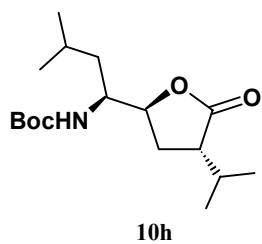
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.91-0.95 (m, 9H, 3 x CH₃); 1.00 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃); 1.26-1.74 (m, 3H, 2 x H-6 + H-7); 1.44 (s, 9H, ^{*t*}Bu); 2.02-2.29 (m, 3H, 2 x H-3 + H-^{*i*}Pr); 2.56 (ddd, 1H, *J*_{2,H-^{*i*}Pr}=5.2 Hz, *J*_{2,3}=7.0 Hz, *J*_{2,3}=10.4 Hz, H-2); 3.78-3.90 (m, 1H, H-5); 4.40-4.48 (m, 2H, H-4 + NH).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 18.3 (CH₃); 20.3 (CH₃); 21.8 (CH₃); 23.0 (CH₃); 24.7 (CH); 26.3 (CH₂); 28.2 (3 x CH₃); 29.1 (CH); 41.9 (CH₂); 45.7 (CH); 51.7 (CH); 79.7 (C); 80.8 (CH); 156.1 (CO); 179.1 (CO).

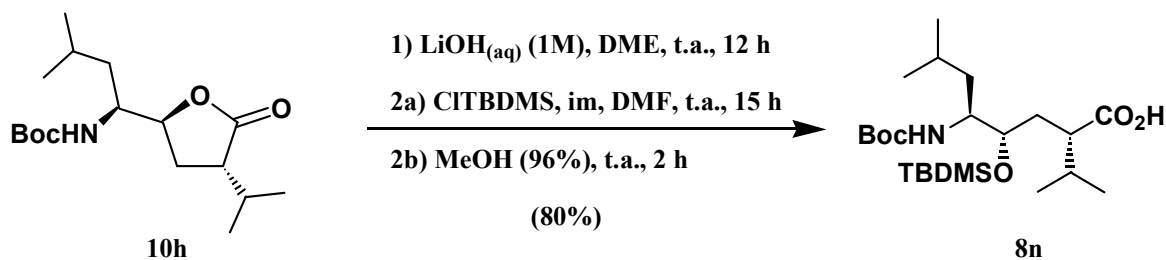
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3321 (m, NH); 1755 (f, CO); 1678 (f, CO).

EM-IQ (*m/z*, %): 314 (5, MH⁺); 298 (9, [M - CH₃]⁺); 258 (89, [M - C₄H₇]⁺); 214 (100, [M - C₅H₇O₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₇H₃₁NO₄: C 65.14, H 9.97, N 4.47; encontrado C 65.28, H 9.96, N 4.26.



Preparación del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isopropil-7-metiloctanoico (**8n**).



Sometiendo 0.86 g (2.74 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isopropil-7-metiloctanoico (**10h**) al procedimiento de preparación de **8k** (pág. 112), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), 0.98 g (2.20 mmoles, 80%) del ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isopropil-7-metiloctanoico (**8n**), como un sólido amorfo de color blanco que no fue posible cristalizar. [α]_D²⁰: -21.7° (c 1.8, CHCl₃).

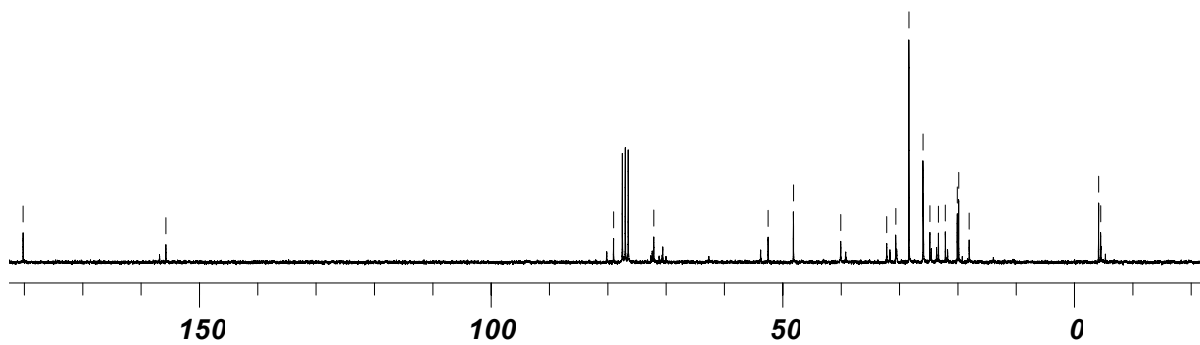
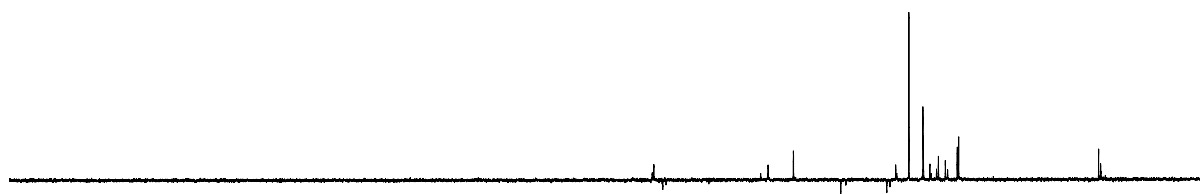
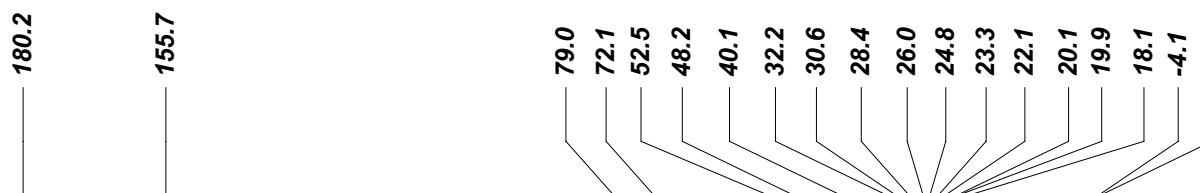
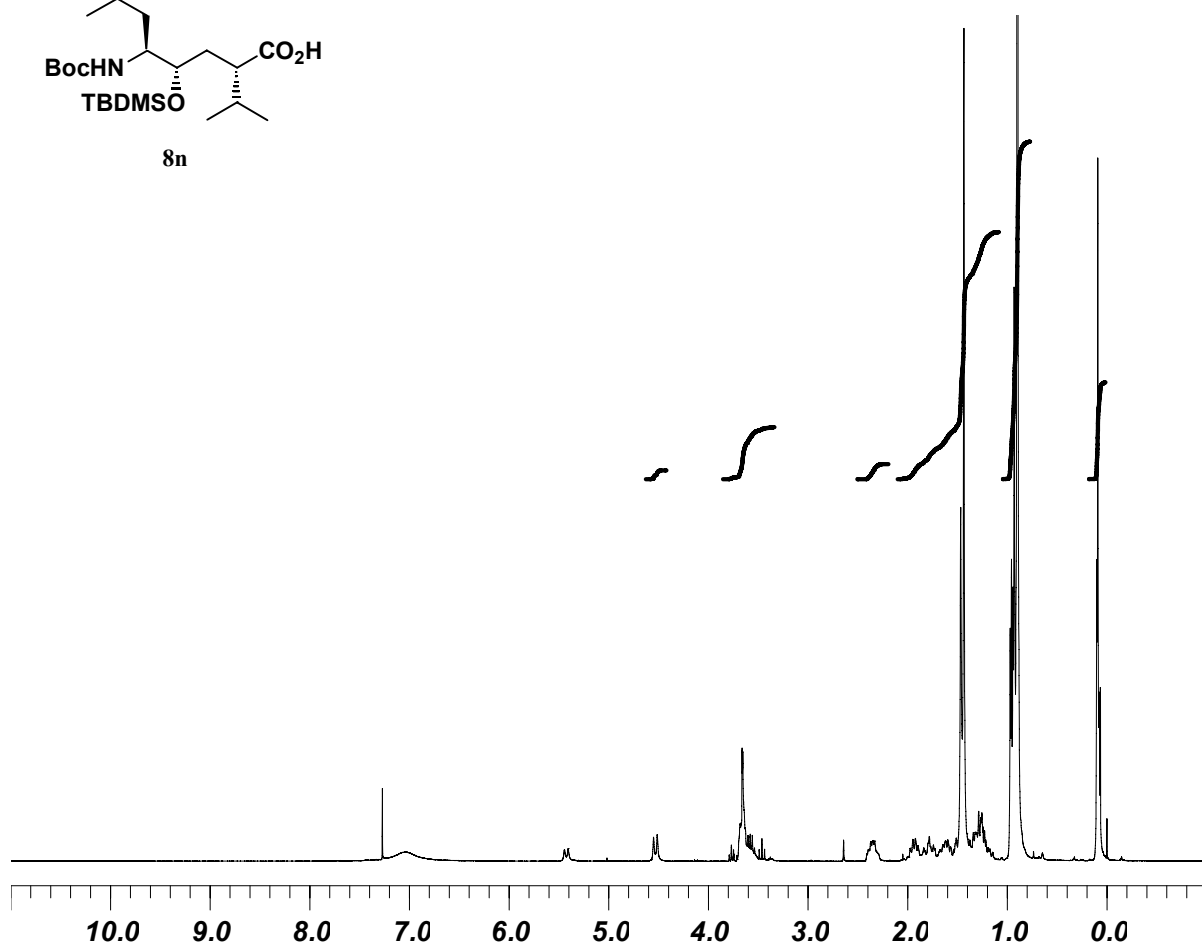
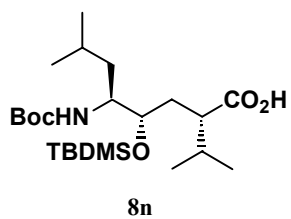
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.06-0.10 (m, 6H, 2 x CH₃Si); 0.89-0.97 (m, 12H, 4 x CH₃); 0.90 (s, 9H, ^tBuSi); 1.14-2.00 (m, 6H, 2 x H-3 + 2 x H-6 + H-7 + H-^tPr); 1.43 (s, 9H, ^tBuO); 2.29-2.41 (m, 1H, H-2); 3.54-3.68 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.53 (d, 1H, *J*_{5,NH}=9.1 Hz, NH).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): -4.5 (CH₃); -4.1 (CH₃); 18.1 (C); 19.9 (CH₃); 20.1 (CH₃); 22.1 (CH₃); 23.3 (CH₃); 24.8 (CH); 26.0 (3 x CH₃); 28.4 (3 x CH₃); 30.6 (CH); 32.2 (CH₂); 40.1 (CH₂); 48.2 (CH); 52.5 (CH); 72.1 (CH); 79.0 (C); 155.7 (CO); 180.2 (CO).

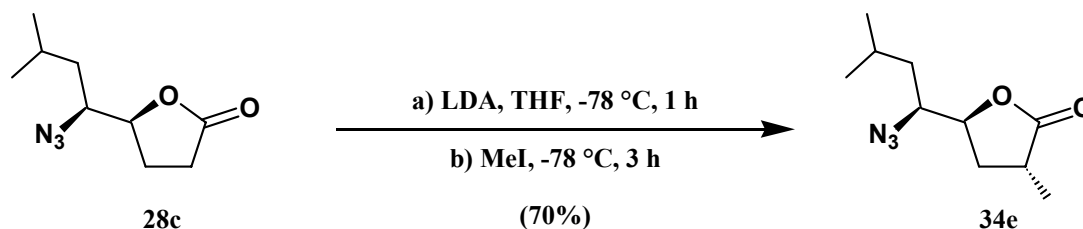
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3254 (a, OH + NH); 3108 (a, OH + NH); 1711 (f, CO).

EM-IQ (*m/z*, %): 446 (1, MH⁺); 346 (22, [M - C₅H₇O₂]⁺); 28 (100).

Análisis elemental: calculado para C₂₃H₄₇NO₅Si: C 61.98, H 10.63, N 3.14; encontrado C 61.93, H 10.69, N 2.88.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (34e).



Partiendo de 1.23 g (6.24 mmoles) la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metiloctanoico (**28c**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **34a** (pág. 104), añadiendo yoduro de metilo en lugar de acetona seca, se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), 0.92 g (4.36 mmoles, 70%) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (**34e**), como un aceite naranja. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +46.2° (c 2.1, CHCl₃).

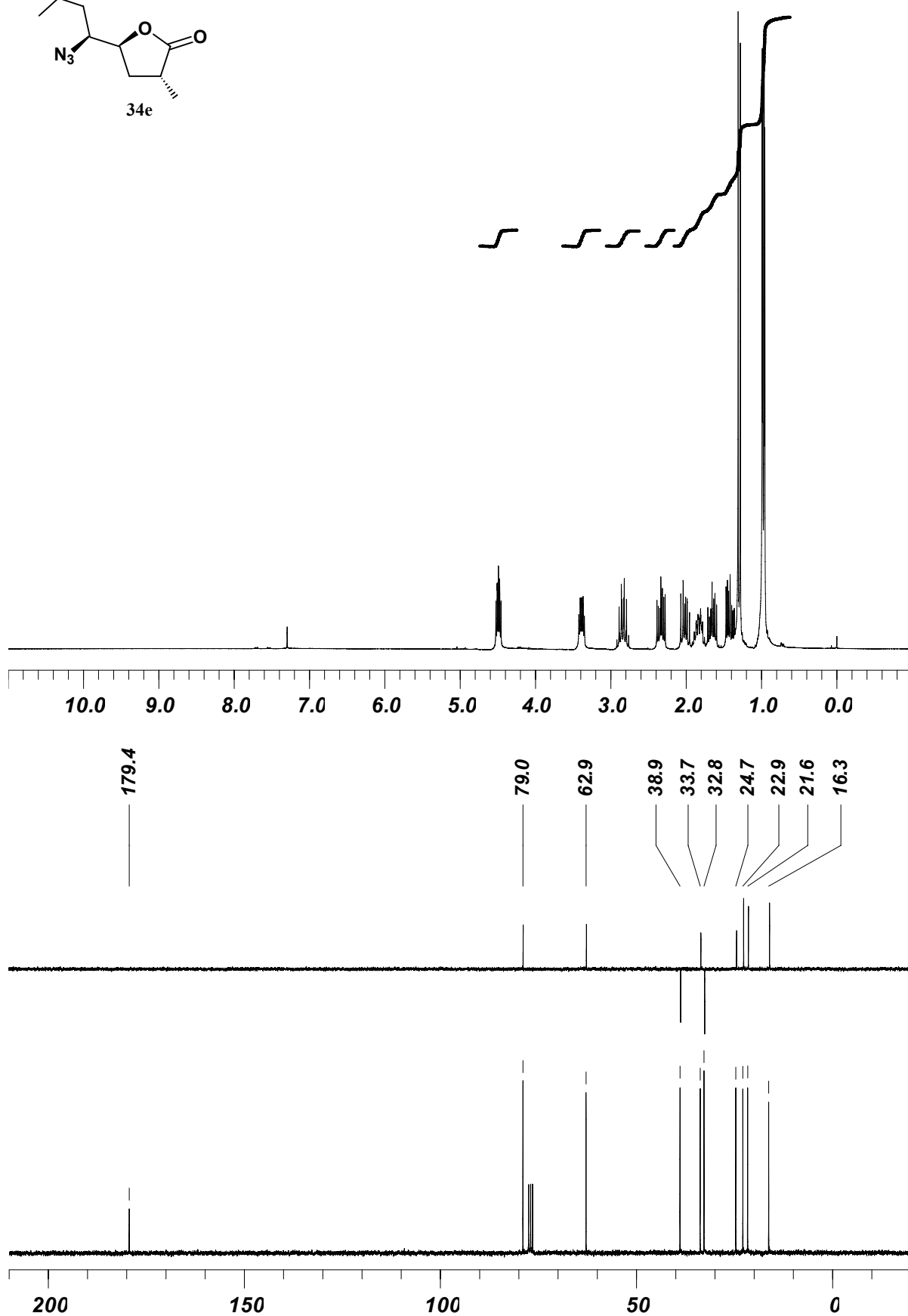
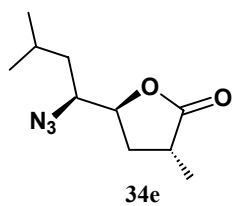
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.97 (d, 3H, $J_{7,8}$ =6.4 Hz, CH₃); 0.98 (d, 3H, $J_{7,8}$ =6.7 Hz, CH₃); 1.29 (d, 3H, J_{2,CH_3} =7.3 Hz, CH₃); 1.41 (ddd, 1H, $J_{5,6}$ =4.9 Hz, $J_{6,7}$ =9.4 Hz, $J_{6,6}$ =14.0 Hz, H-6); 1.65 (ddd, 1H, $J_{6,7}$ =5.2 Hz, $J_{5,6}$ =9.4 Hz, $J_{6,6}$ =14.0 Hz, H-6); 1.76-1.92 (m, 1H, H-7); 2.01 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ =7.6 Hz, $J_{3,4}$ =8.5 Hz, $J_{3,3}$ =13.1 Hz, H-3); 2.33 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ =4.6 Hz, $J_{2,3}$ =9.4 Hz, $J_{3,3}$ =13.1 Hz, H-3); 2.76-2.92 (m, 1H, H-2); 3.39 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ =4.0 Hz, $J_{5,6}$ =4.9 Hz, $J_{5,6}$ =9.4 Hz, H-5); 4.49 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ =4.0 Hz, $J_{3,4}$ =4.6 Hz, $J_{3,4}$ =8.5 Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 16.3 (CH₃); 21.6 (CH₃); 22.9 (CH₃); 24.7 (CH); 32.8 (CH₂); 33.7 (CH); 38.9 (CH₂); 62.9 (CH); 79.0 (CH); 179.4 (CO).

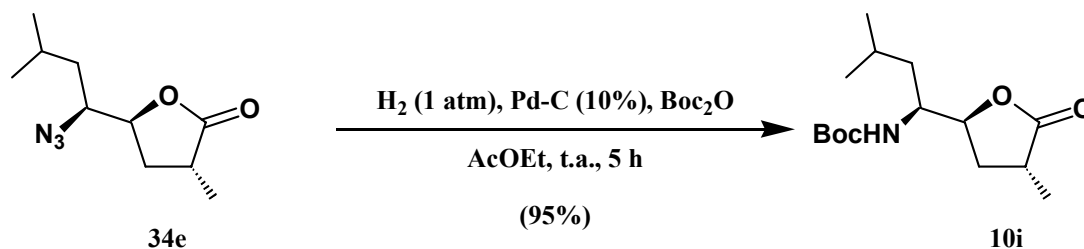
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2108 (f, N₃); 1778 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 212 (39, MH⁺); 184 (64, [MH - N₂]⁺); 101 (100).

Análisis elemental: calculado para C₁₀H₁₇N₃O₂: C 56.85, H 8.11, N 19.89; encontrado C 57.00, H 8.23, N 20.04.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (10i).



Haciendo reaccionar 0.86 g (4.07 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (**34e**) por el procedimiento descrito para la preparación de **10d** (pág. 106), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:4), 1.10 g (3.87 mmoles, 95%) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (**10i**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano, dando lugar a cristales incoloros de p.f. 86-87 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -26.0° (c 1.9, CHCl_3).

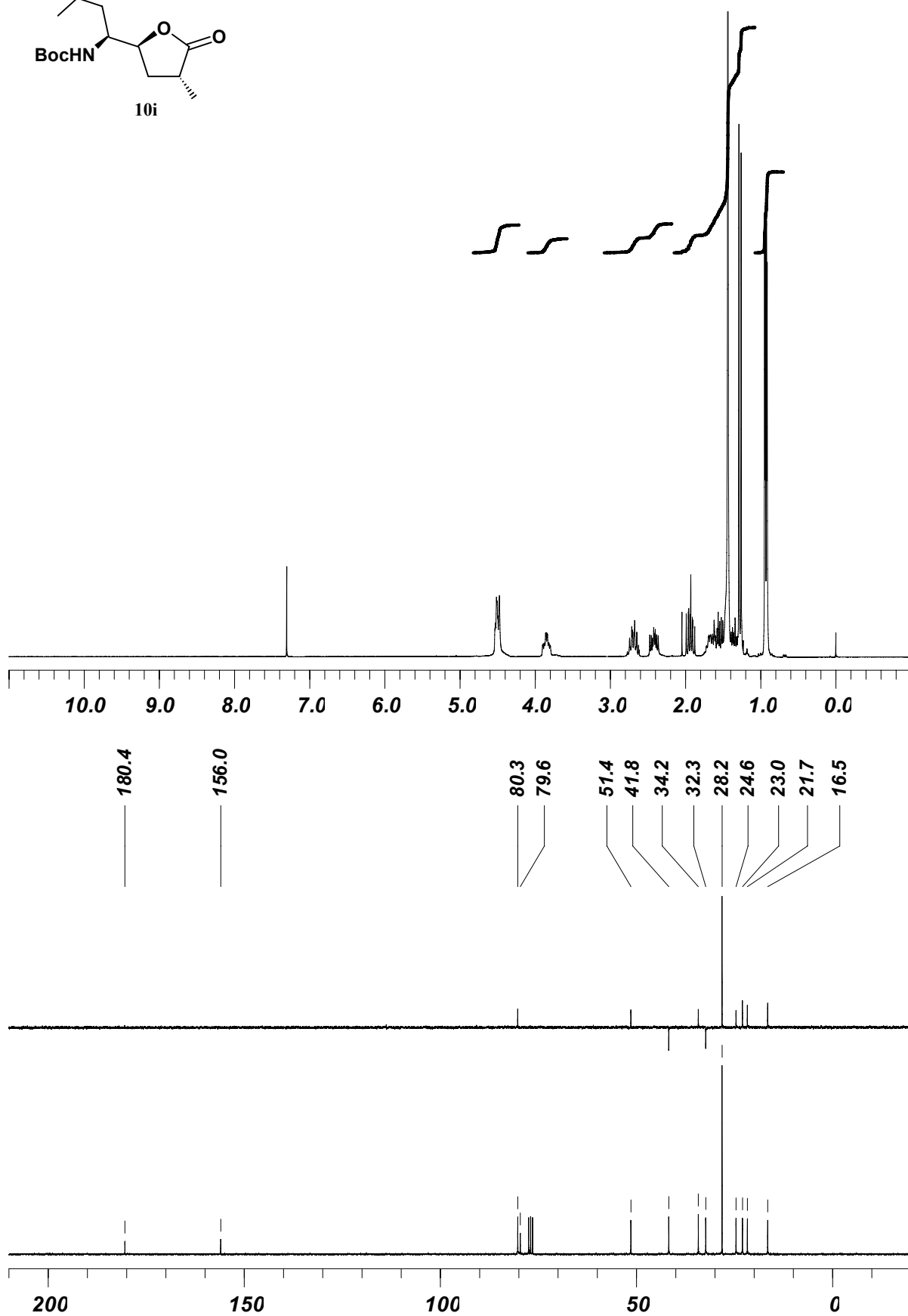
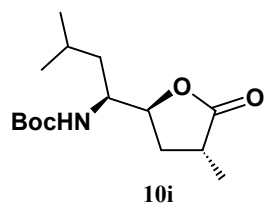
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.93 (d, 3H, $J_{7,8}=6.4$ Hz, CH_3); 0.94 (d, 3H, $J_{7,8}=6.4$ Hz, CH_3); 1.27 (d, 3H, $J_{2,\text{CH}_3}=7.3$ Hz, CH_3); 1.32-1.72 (m, 3H, 2 x H-6 + H-7); 1.44 (s, 9H, ^tBu); 1.93 (ddd, 1H, $J_{2,3}=7.0$ Hz, $J_{3,4}=8.2$ Hz, $J_{3,3}=14.9$ Hz, H-3); 2.42 (ddd, 1H, $J_{3,4}=5.2$ Hz, $J_{2,3}=9.7$ Hz, $J_{3,3}=14.9$ Hz, H-3); 2.62-2.77 (m, 1H, H-2); 3.80-3.90 (m, 1H, H-5); 4.47-4.54 (m, 2H, H-4 + NH).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 16.5 (CH_3); 21.7 (CH_3); 23.0 (CH_3); 24.6 (CH); 28.2 (3 x CH_3); 32.3 (CH_2); 34.2 (CH); 41.8 (CH_2); 51.4 (CH); 79.6 (C); 80.3 (CH); 156.0 (CO); 180.4 (CO).

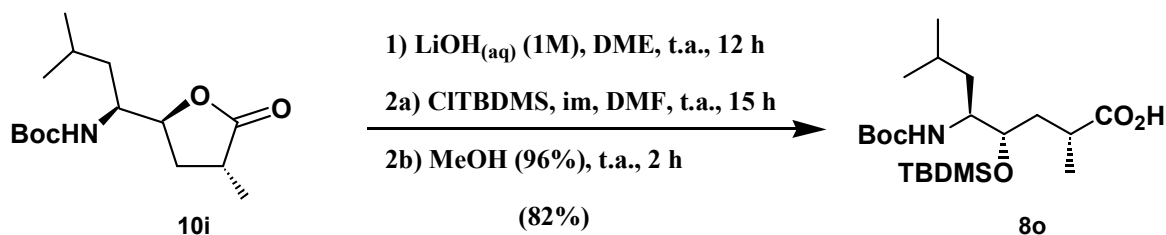
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3312 (m, NH); 1768 (f, CO); 1680 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 286 (10, MH^+); 230 (52, $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7]^+$); 99 (100).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_4$: C 63.13, H 9.54, N 4.91; encontrado C 63.28, H 9.83, N 4.93.



Preparación del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2,7-dimetiloctanoico (**8o**).



Sometiendo 1.05 g (3.68 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2,7-dimetiloctanoico (**10i**) al procedimiento de preparación de **8k** (pág. 112), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), 1.26 g (3.02 mmoles, 82%) del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2,7-dimetiloctanoico (**8o**), como un sólido amorfo que no fue posible cristalizar. $[\alpha]_{D^{20}}$: -28.3° (c 1.3, CHCl₃).

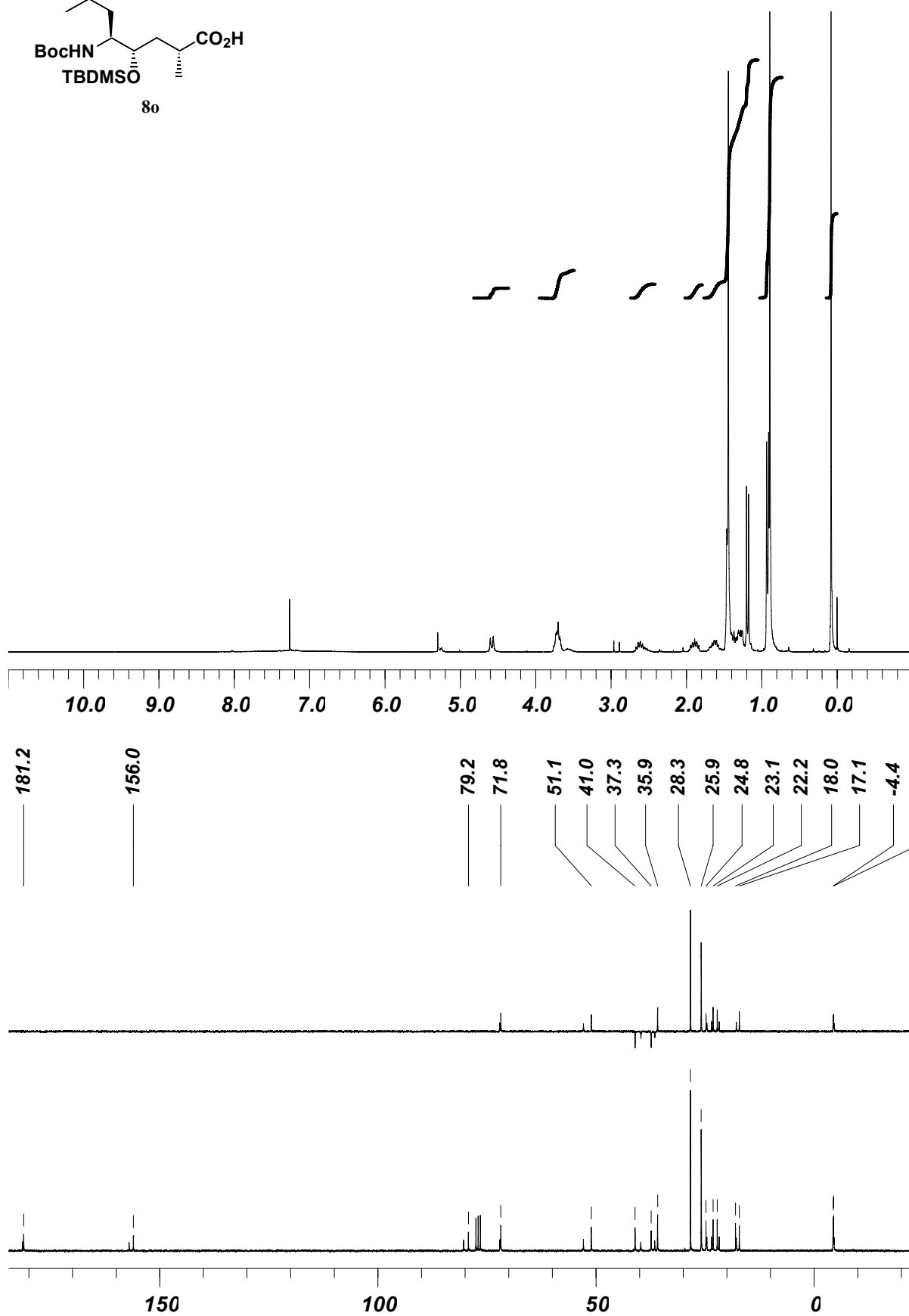
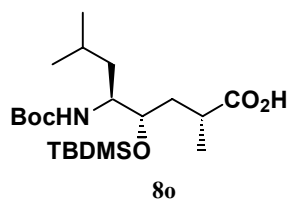
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.08 (s, 6H, 2 x CH₃Si); 0.89 (s, 9H, ^tBuSi); 0.91 (s, 3H, CH₃); 0.93 (s, 3H, CH₃); 1.19 (d, 3H, $J_{2,CH_3}=7.0$ Hz, CH₃); 1.26-1.40 (m, 3H, 2 x H-6 + H-7); 1.44 (s, 9H, ^tBuO); 1.55-1.94 (m, 2H, 2 x H-3); 2.50-2.70 (m, 1H, H-2); 3.68-3.75 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.58 (d, 1H, $J_{5,NH}=9.7$ Hz, NH).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): -4.5 (CH₃); -4.4 (CH₃); 17.1 (CH); 18.0 (C); 22.2 (CH₃); 23.1 (CH₃); 24.8 (CH₃); 25.9 (3 x CH₃); 28.3 (3 x CH₃); 35.9 (CH); 37.3 (CH₂); 41.0 (CH₂); 51.1 (CH); 71.8 (CH); 79.2 (C); 156.0 (CO); 181.2 (CO).

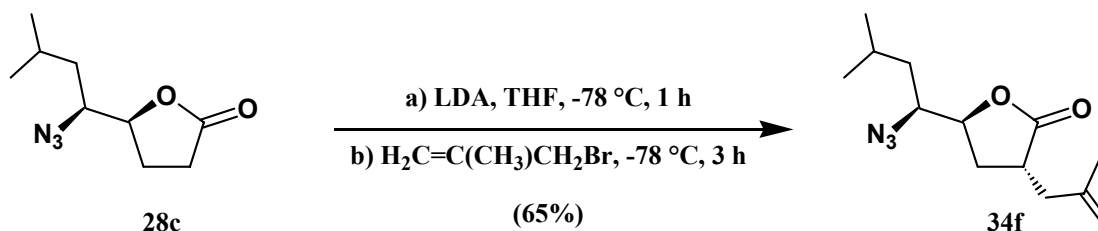
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3255 (a, OH + NH); 3105 (a, OH + NH); 1712 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 418 (13, MH⁺); 318 (35, [M - C₅H₇O₂]⁺); 28 (100).

Análisis elemental: calculado para C₂₁H₄₃NO₅Si: C 60.39, H 10.38, N 3.35; encontrado C 60.41, H 10.59, N 3.37.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metil-2-(2-metilprop-1-en-3-il)octanoico (34f).



Partiendo de 1.15 g (5.83 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metiloctanoico (**28c**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **34a** (pág. 104), añadiendo 3-bromo-2-metilprop-1-eno en lugar de acetona seca, se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:7), 0.95 g (3.79 mmoles, 65%) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metil-2-(2-metilprop-1-en-3-il)octanoico (**34f**), como un aceite transparente. $[\alpha]_{\text{D}^{20}}$: +27.2° (c 2.4, CHCl₃).

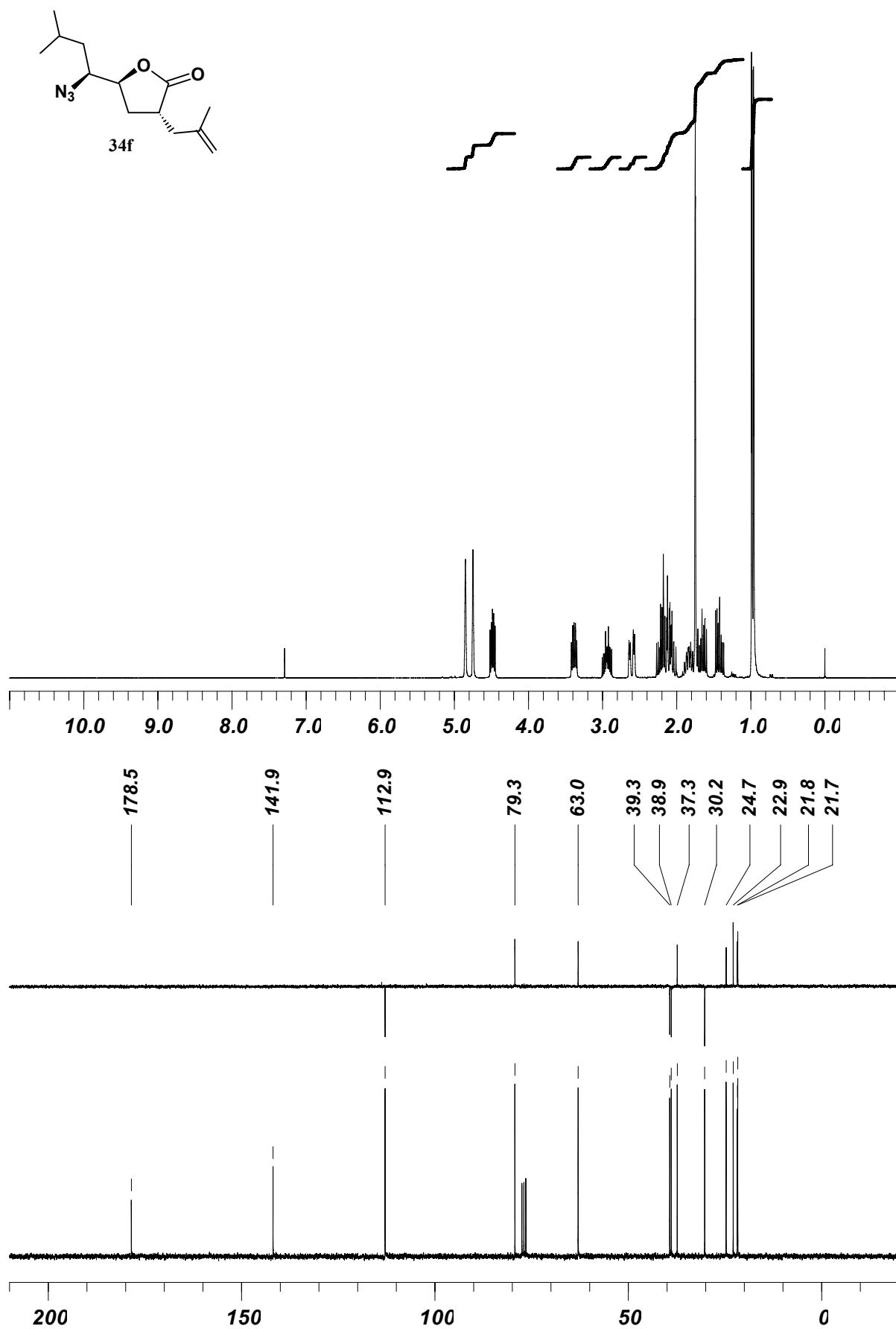
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.97 (d, 3H, $J_{7,8}=6.7$ Hz, CH₃); 0.98 (d, 3H, $J_{7,8}=6.7$ Hz, CH₃); 1.42 (ddd, 1H, $J_{5,6}=4.9$ Hz, $J_{6,7}=8.8$ Hz, $J_{6,6}=14.0$ Hz, H-6); 1.66 (ddd, 1H, $J_{6,7}=5.5$ Hz, $J_{5,6}=9.7$ Hz, $J_{6,6}=14.0$ Hz, H-6); 1.75 (s, 3H, CH₃); 1.78-1.89 (m, 1H, H-7); 2.07 (ddd, 1H, $J_{2,3}=7.0$ Hz, $J_{3,4}=8.2$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.07-2.13 (m, 1H, H-alilo); 2.21 (ddd, 1H, $J_{3,4}=5.2$ Hz, $J_{2,3}=9.7$ Hz, $J_{3,3}=13.4$ Hz, H-3); 2.60 (dd, 1H, $J=4.3$ Hz, $J=14.6$ Hz, H-alilo); 2.88-3.00 (m, 1H, H-2); 3.35-3.42 (m, 1H, H-5); 4.48 (ddd, 1H, $J_{4,5}=4.0$ Hz, $J_{3,4}=5.2$ Hz, $J_{3,4}=8.2$ Hz, H-4); 4.75 (s, 1H, H-alilo); 4.85 (s, 1H, H-alilo).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 21.7 (CH₃); 21.8 (CH₃); 22.9 (CH₃); 24.7 (CH); 30.2 (CH₂); 37.3 (CH); 38.9 (CH₂); 39.3 (CH₂); 63.0 (CH); 79.3 (CH); 112.9 (CH₂); 141.9 (C); 178.5 (CO).

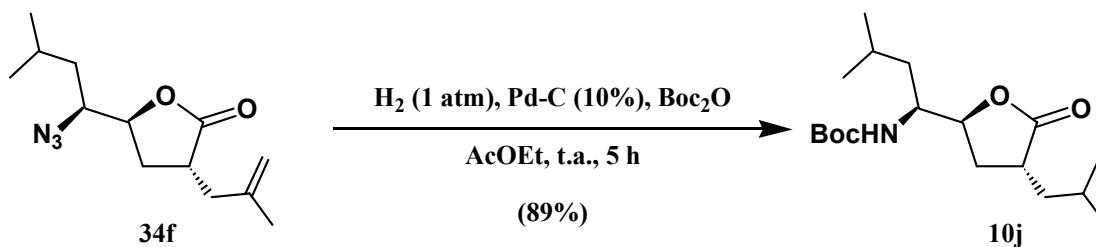
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2109 (f, N₃); 1778 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 252 (24, MH⁺); 224 (15, [MH - N₂]⁺); 39 (100).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₂₁N₃O₂: C 62.13, H 8.42, N 16.72; encontrado C 62.21, H 8.73, N 16.45.



Preparación de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isobutil-7-metiloctanoico (10j).



Haciendo reaccionar 0.89 (3.54 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-azido-4-hidroxi-7-metil-2-(2-metilprop-1-en-3-il)octanoico (**34f**) con las condiciones descritas para la preparación de **10d** (pág. 106), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:4), 1.03 g (3.15 mmoles, 89%) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isobutil-7-metiloctanoico (**10j**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de éter etílico y hexano dando cristales incoloros de p.f.: 129-131 °C. $[\alpha]_D^{20}$: -37.9° (c 1.9, CHCl_3).

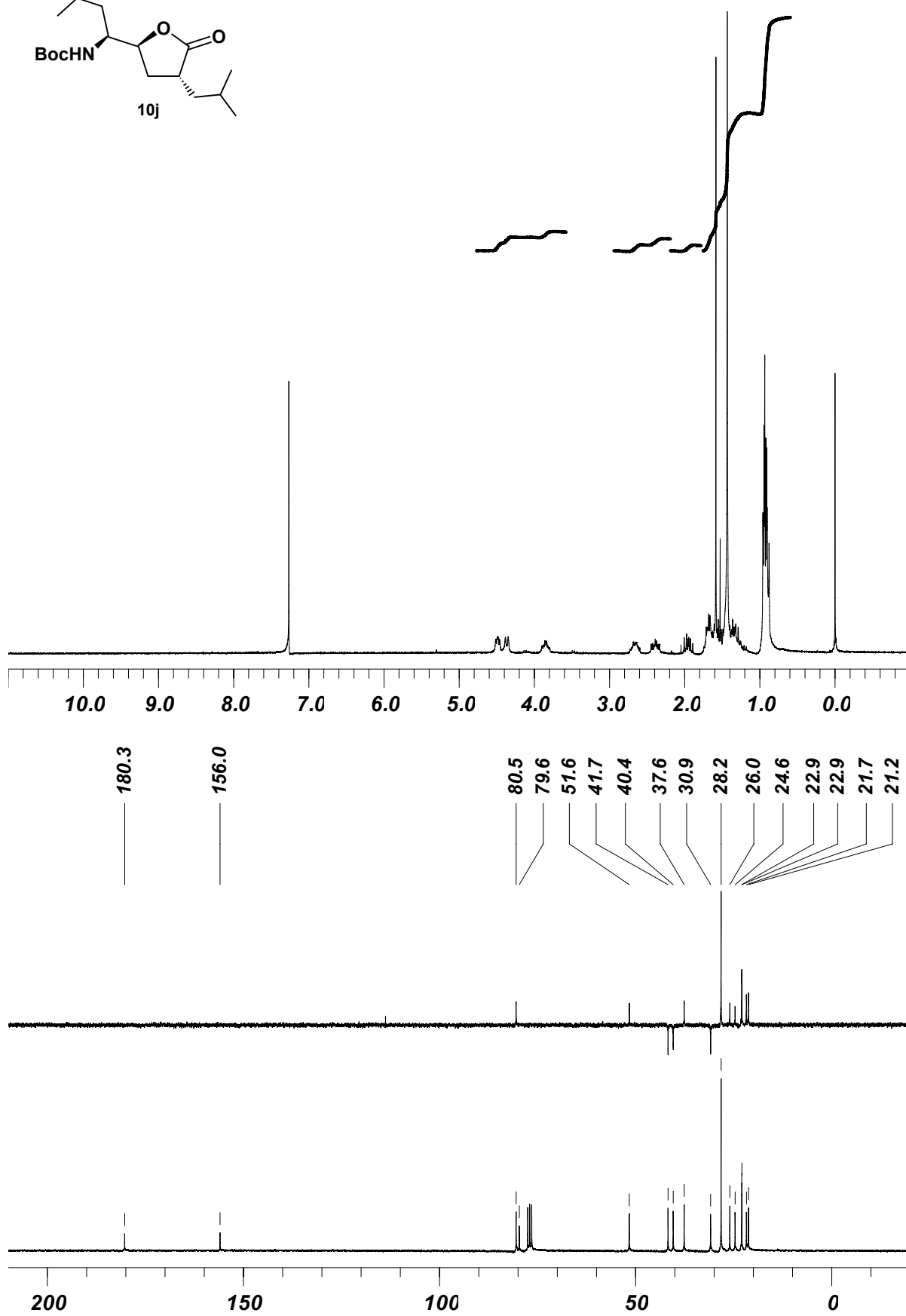
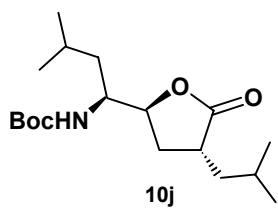
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.88-0.96 (m, 12H, 4 x CH_3); 1.29-1.75 (m, 6H, 2 x H-6 + H-7 + 3 x H-^{*i*}Bu); 1.43 (s, 9H, ^{*t*}Bu); 1.95 (ddd, 1H, $J_{2,3}=7.3$ Hz, $J_{3,4}=8.2$ Hz, $J_{3,3}=13.1$ Hz, H-3); 2.39 (ddd, 1H, $J_{3,4}=4.9$ Hz, $J_{2,3}=9.7$ Hz, $J_{3,3}=13.1$ Hz, H-3); 2.60-2.72 (m, 1H, H-2); 3.79-3.90 (m, 1H, H-5); 4.36 (d, 1H, $J_{5,\text{NH}}=9.7$ Hz, NH); 4.46-4.51 (m, 1H, H-4).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.2 (CH_3); 21.7 (CH_3); 22.9 (CH_3); 22.9 (CH_3); 24.6 (CH); 26.0 (CH); 28.2 (3 x CH_3); 30.9 (CH_2); 37.6 (CH); 40.4 (CH_2); 41.7 (CH_2); 51.6 (CH); 79.6 (C); 80.5 (CH); 156.0 (CO); 180.3 (CO).

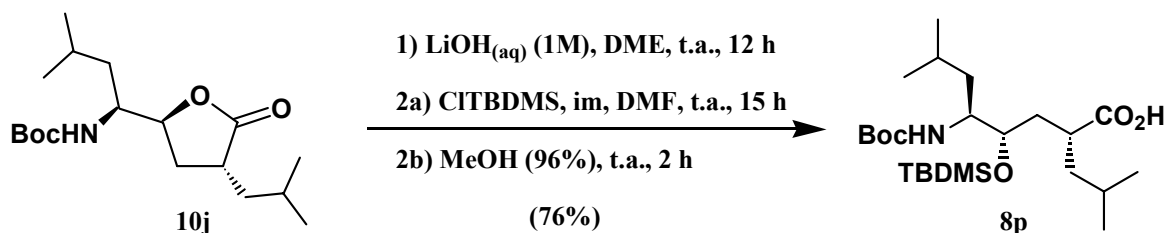
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3334 (m, NH); 1764 (f, CO); 1681 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 328 (3, MH^+); 272 (74, $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7]^+$); 228 (100, $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_4$: C 66.02, H 10.16, N 4.28; encontrado C 66.01, H 10.39, N 4.17.



Preparación del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isobutil-7-metiloctanoico (**8p**).



Partiendo de 0.99 g (3.02 mmoles) de la 1,4-lactona del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-2-isobutil-7-metiloctanoico (**10j**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **8k** (pág. 112), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), 1.06 g (2.30 mmoles, 76%) del ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isobutil-7-metiloctanoico (**8p**), como un sólido amorfo que no fue posible cristalizar. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -16.2° (c 1.8, CHCl₃).

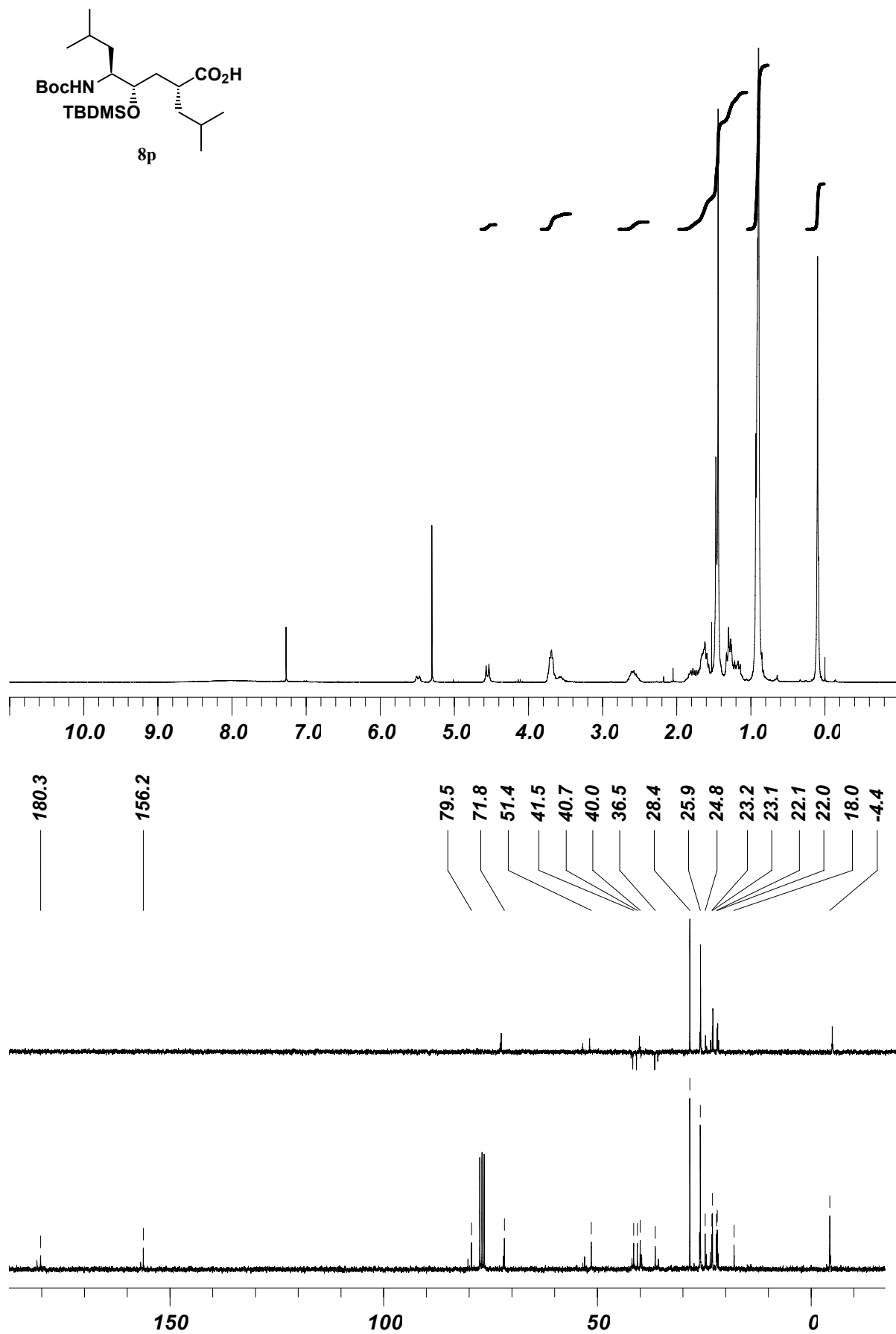
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.10 (s, 6H, 2 x CH₃Si); 0.89-0.93 (m, 20H, 3 x CH₃ + 2 x H-^{*i*}Bu + ^{*t*}BuSi); 1.14-1.33 (m, 4H, CH₃ + H-^{*i*}Bu); 1.44-1.47 (m, 10H, H-7 + ^{*t*}BuO); 1.57-1.87 (m, 4H, 2 x H-3 + 2 x H-6); 2.51-2.66 (m, 1H, H-2); 3.53-3.71 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.55 (d, 1H, $J_{5,\text{NH}}=9.1$ Hz, NH).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): -4.4 (2 x CH₃); 18.0 (C); 22.0 (CH₃); 22.1 (CH₃); 23.1 (2 x CH₃); 23.2 (CH); 24.8 (CH); 25.9 (3 x CH₃); 28.4 (3 x CH₃); 36.5 (CH₂); 40.0 (CH); 40.7 (CH₂); 41.5 (CH₂); 51.4 (CH); 71.8 (CH); 79.5 (C); 156.2 (CO); 180.3 (CO).

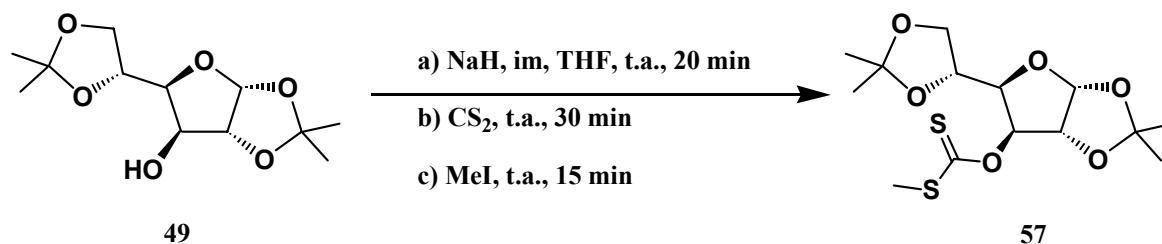
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3252 (a, OH + NH); 3098 (a, OH + NH); 1715 (f, CO).

EM-IQ (m/z , %): 460 (8, MH⁺); 360 (27, [M - C₅H₇O₂]⁺); 28 (100).

Análisis elemental: calculado para C₂₄H₄₉NO₅Si: C 62.70, H 10.74, N 3.05; encontrado C 62.49, H 11.11, N 2.93.



Preparación de la 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-3-O-(S-metilditiocarbonato)- α -D-glucofuranosa (57).



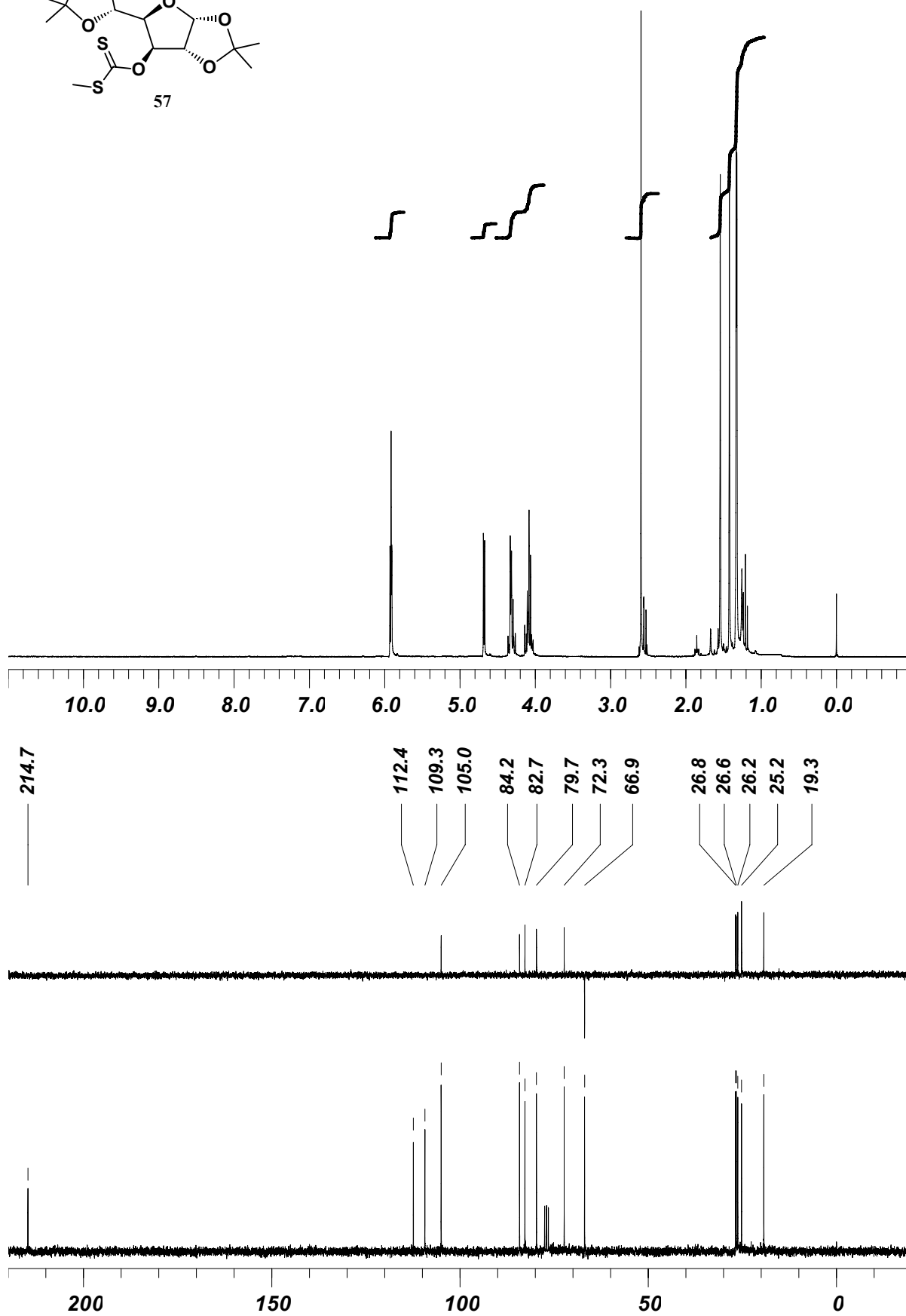
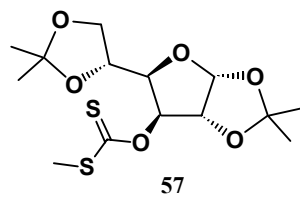
En un matraz de fondo redondo de 250 mL conectado a una línea de argón, se introdujeron 2.31 g (57.81 mmoles, 1.5 eq) de hidruro sódico (dispersión del 60% en aceite mineral), 0.01 g (0.15 mmoles, 0.004 eq) de imidazol y 75 mL de tetrahidrofurano seco. Sobre esta suspensión agitada se añadió una disolución de 10.03 g (38.54 mmoles) de diacetón-D-glucosa (**49**) en 75 mL de THF seco, continuando la agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se añadieron 7.0 mL (115.56 mmoles, 3.0 eq) de disulfuro de carbono y tras agitarla nueva mezcla durante 30 minutos, se añadieron 4.1 mL (65.54 mmoles, 1.7 eq) de yoduro de metilo, continuando la agitación 15 minutos más. A continuación se añadieron 2.0 mL de ácido acético glacial y la suspensión resultante se filtró sobre celita. Una vez concentrados a sequedad los líquidos filtrados, el semisólido obtenido se disolvió en 100 ml de éter etílico, obteniendo una suspensión que se filtró de nuevo sobre celita. Los líquidos filtrados se lavaron con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (3 x 50 mL) y agua destilada (3 x 50 mL), se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron a sequedad, obteniéndose un aceite oscuro espectroscópicamente puro, que se identificó como la 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-3-O-(S-metilditiocarbonato)- α -D-glucofuranosa (**57**) y se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -28.0° (c 1.0, CHCl₃).

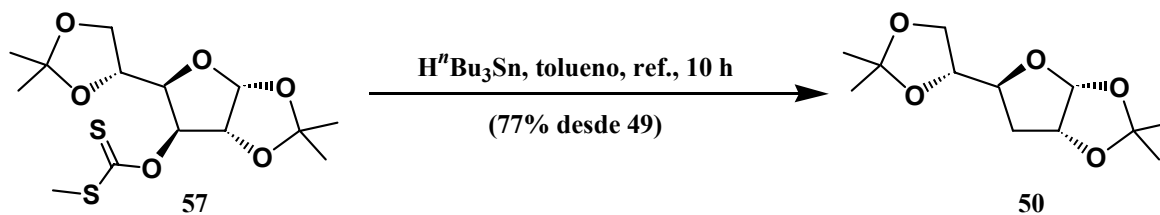
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.32 (s, 3H, CH₃); 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.42 (s, 3H, CH₃); 1.54 (s, 3H, CH₃); 2.59 (s, 3H, SCH₃); 4.03-4.14 (m, 2H, 2 x H-6); 4.26-4.36 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.68 (d, 1H, $J_{1,2}=4.0$ Hz, H-2); 5.90-5.93 (m, 2H, H-1 + H-3).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 19.3 (CH₃); 25.2 (CH₃); 26.2 (CH₃); 26.6 (CH₃); 26.8 (CH₃); 66.9 (CH₂); 72.3 (CH); 79.7 (CH); 82.7 (CH); 84.2 (CH); 105.0 (CH); 109.3 (C); 112.4 (C); 214.7 (C=S).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1077 (f, C=S).

EM-IQ (m/z, %): 335 (7, [M - CH₃]⁺); 303 (15, [M - SCH₃]⁺); 101 (100, [C₅H₉O₂]⁺).



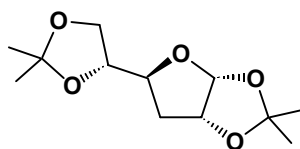
Preparación de la 3-desoxi-1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (50).

En un matraz de fondo redondo de 500 mL acoplado a un refrigerante y conectado a una línea de argón, se disolvieron 15.14 g (38.54 mmoles) de la 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-3-O-(S-metilditiocarbonato)- α -D-glucofuranosa (57) en 350 mL de tolueno seco y dicha disolución se desoxigenó por burbujeo de argón a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 16.0 mL (57.81 mmoles, 1.5 eq) de hidruro de tributilestaño y la mezcla se refluyó bajo atmósfera de argón durante 10 horas. Una vez concluida la reacción, se concentró el tolueno en el rotavapor y el residuo obtenido se disolvió en 100 ml de hexano y se filtró sobre silicagel de capa fina, que se lavó con 200 ml de una disolución de acetato de etilo/hexano 1:9. Los líquidos del filtrado reunidos se concentraron a sequedad en el rotavapor, obteniéndose un aceite naranja que se destiló en un horno de bolas (p.eb.: 120 °C; 5 mm Hg) para dar 7.22 g (29.54 mmoles, 77% desde 49) de la 3-desoxi-1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (50), como un aceite transparente. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -8.2° (c 0.9, CHCl_3).

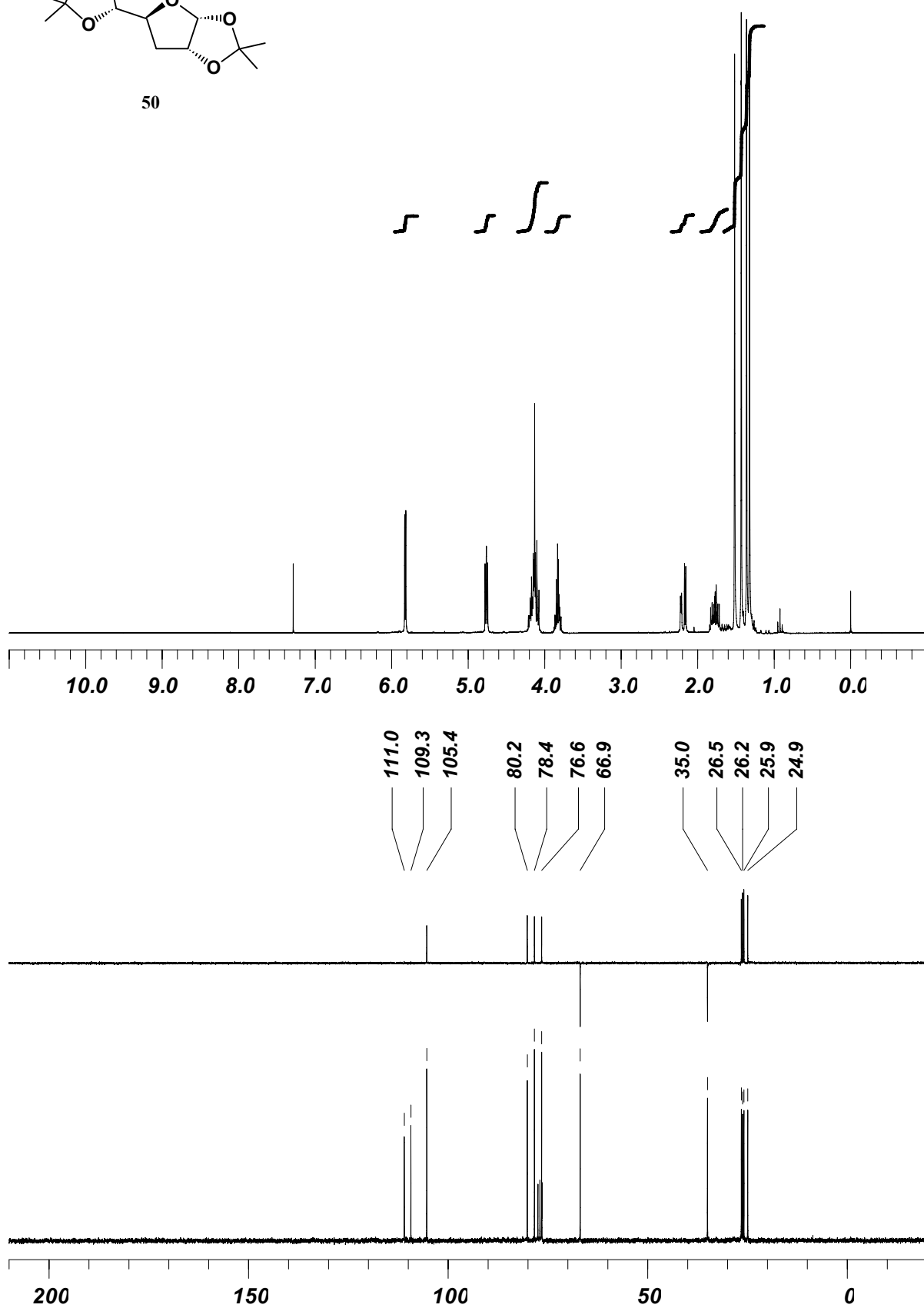
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.32 (s, 3H, CH_3); 1.35 (s, 3H, CH_3); 1.42 (s, 3H, CH_3); 1.51 (s, 3H, CH_3); 1.71-1.83 (m, 1H, H-3); 2.20 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.1$ Hz, $J_{3,3}=13.3$ Hz, H-3); 3.78-3.86 (m, 1H, H-6); 4.07-4.20 (m, 3H, H-6 + H-5 + H-4); 4.72-4.76 (m, 1H, H-2); 5.81 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1).

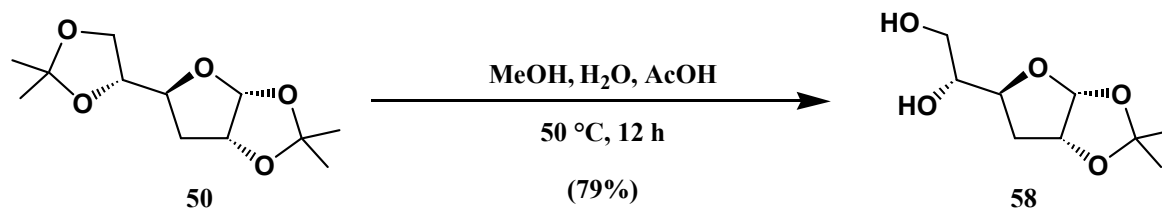
RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 24.9 (CH_3); 25.9 (CH_3); 26.2 (CH_3); 26.5 (CH_3); 35.0 (CH_2); 66.9 (CH_2); 76.6 (CH); 78.4 (CH); 80.2 (CH); 105.4 (CH); 109.3 (C); 111.0 (C).

EM-IQ (m/z , %): 245 (71, MH^+); 229 (74, $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$); 187 (100, $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_5\text{O}]^+$).



50



Preparación de la 3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (58).

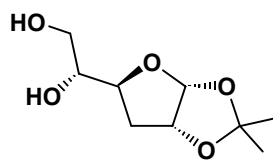
En un matraz de fondo redondo de 100 mL acoplado a un refrigerante, se disolvieron 4.01 g (16.42 mmoles) de la 3-desoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (50) en 60 mL de una mezcla de metanol, ácido acético y agua (1:1:1) y la disolución resultante se calentó a 50 °C durante 12 horas. Al cabo de este tiempo, se observó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 3:2) la desaparición del producto de partida y se evaporó el disolvente en el rotavapor. Tras tres coevaporaciones con porciones de 20 mL de tolueno, el crudo de reacción se purificó por cristalización en una mezcla de diclorometano y hexano, obteniéndose 2.66 g (13.01 mmoles, 79%) de la 3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (58), como un sólido blanco (p.f.: 78-80 °C). $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -6.8° (c 0.5, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.32 (s, 3H, CH₃); 1.51 (s, 3H, CH₃); 1.85 (ddd, 1H, $J_{2,3}=4.4$ Hz, $J_{3,4}=10.7$ Hz, $J_{3,3}=13.5$ Hz, H-3); 2.07 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.4$ Hz, $J_{3,3}=13.5$ Hz, H-3); 2.50 (sa, 2H, 2 x OH); 3.59 (dd, 1H, $J_{5,6}=6.6$ Hz, $J_{6,6}=11.3$ Hz, H-6); 3.72 (dd, 1H, $J_{5,6}=3.6$ Hz, $J_{6,6}=11.3$ Hz, H-6); 3.89-3.95 (m, 1H, H-5); 4.22 (dt, 1H, $J_{3,4}=J_{4,5}=4.4$ Hz, $J_{3,4}=10.7$ Hz, H-4); 4.76 (dd, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, $J_{2,3}=4.4$ Hz, H-2); 5.81 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1).

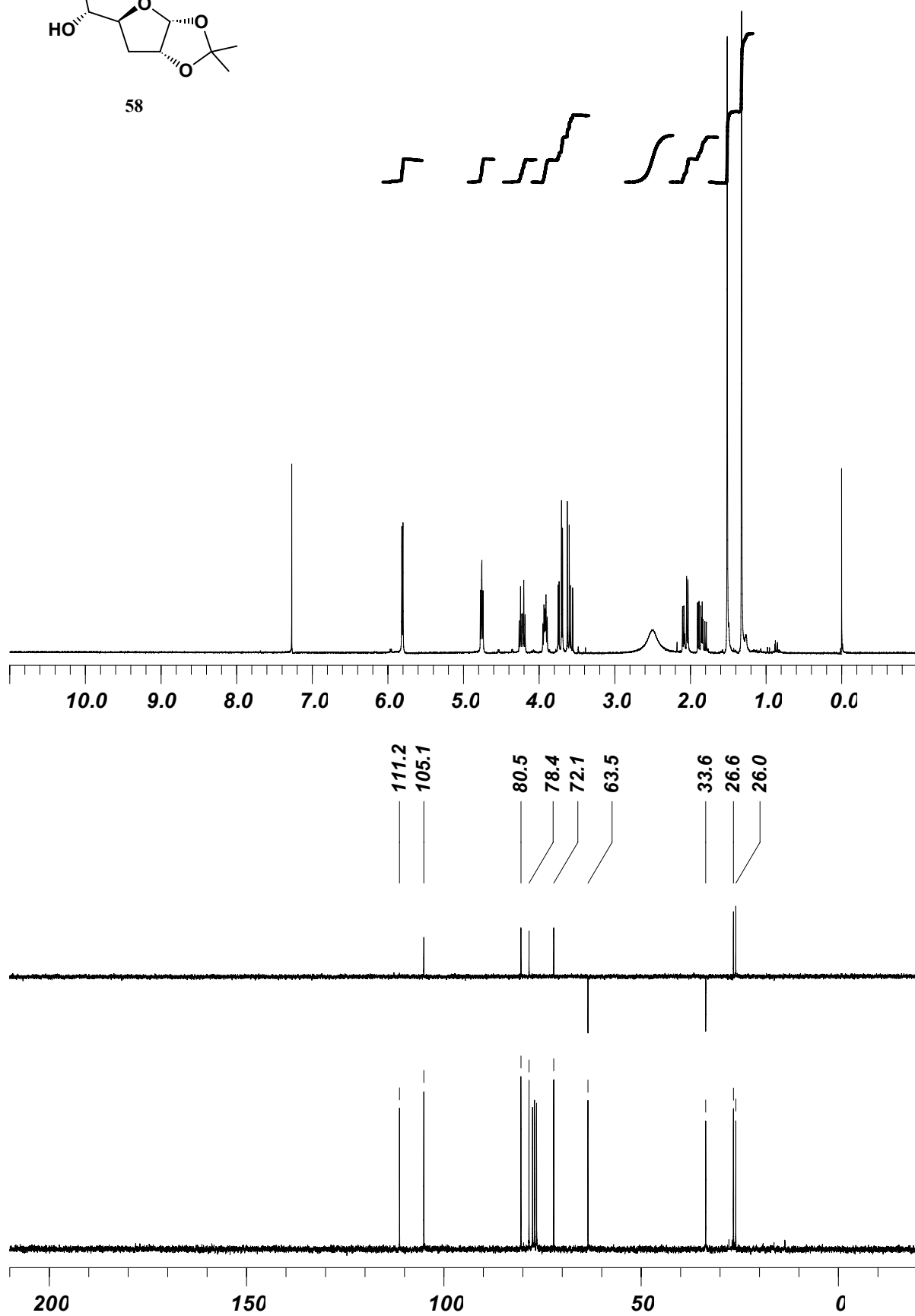
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.0 (CH₃); 26.6 (CH₃); 33.6 (CH₂); 63.5 (CH₂); 72.1 (CH); 78.4 (CH); 80.5 (CH); 105.1 (CH); 111.2 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3420 (a, OH).

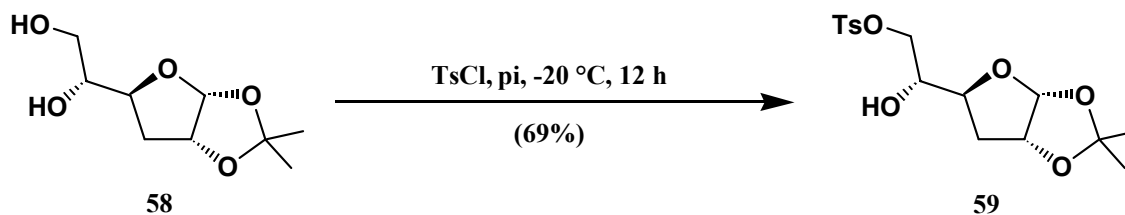
EM-IQ (m/z , %): 205 (3, MH⁺); 187 (6, [M - OH]⁺); 147 (36, [M - C₃H₅O]⁺); 59 (100, [C₃H₇O]⁺).



58



Preparación de la 3-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-O-(*p*-toluensulfonil)- α -D-glucofuranosa (59).



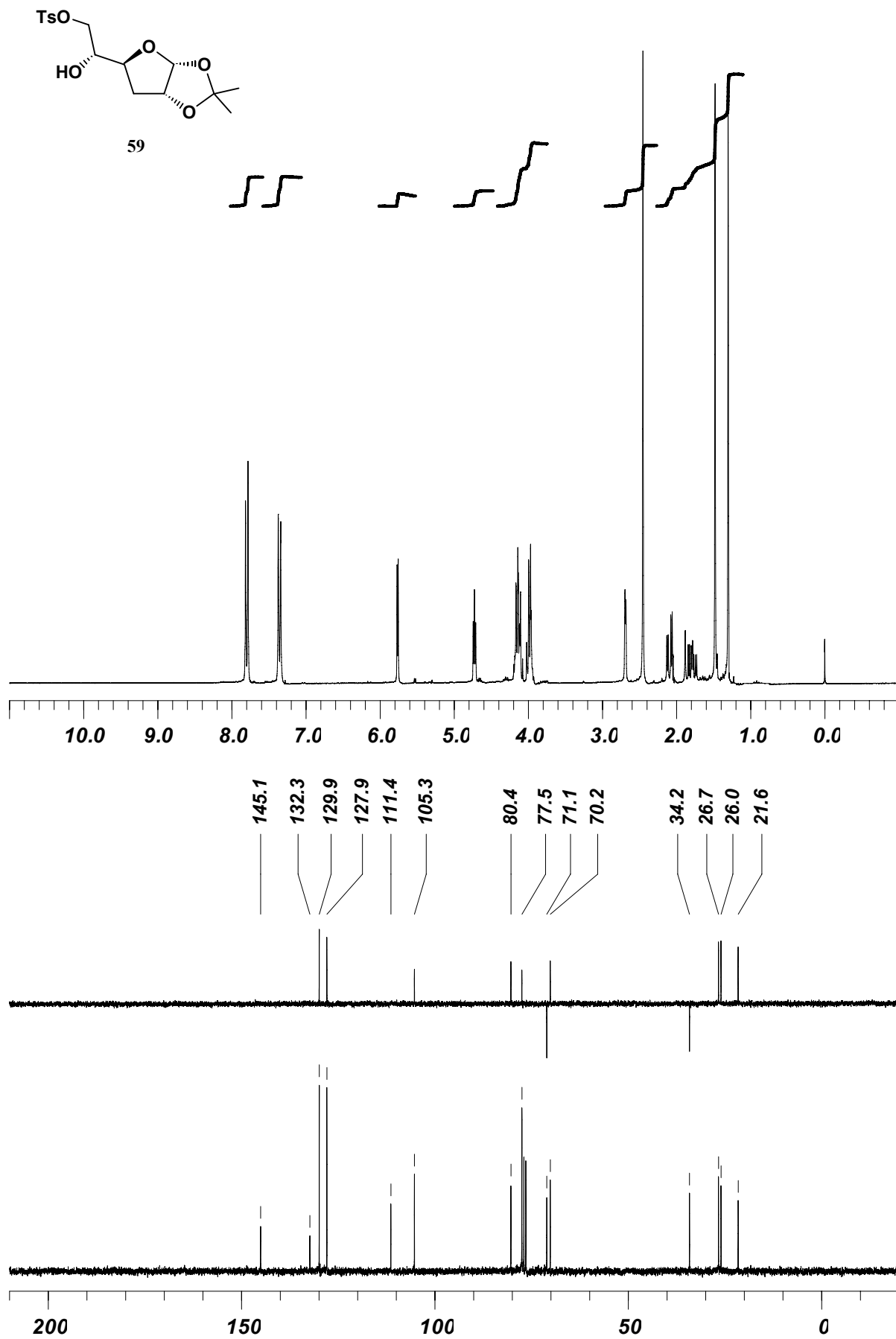
En un matraz de fondo redondo de 25 mL conectado a una línea de argón, se disolvieron 0.22 g (1.08 mmoles) de la 3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (58) en 4 mL de piridina seca. La disolución resultante se enfrió a -20 °C y se le añadieron 0.23 g (1.19 mmoles, 1.1 eq) de cloruro de *p*-toluensulfonilo disuelto en 1 mL de piridina seca, continuando la agitación a dicha temperatura durante 12 horas, en que se observó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 3:2) la desaparición del producto de partida. Se añadieron entonces 10 mL de disolución acuosa saturada de sulfato de cobre, se extrajo la mezcla con diclorometano (4 x 15 mL) y los extractos orgánicos reunidos se lavaron con disolución acuosa saturada de sulfato de cobre (2 x 50 mL) y agua destilada (2 x 50 mL), se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1.2:1), para dar 0.27 g (0.75 mmoles, 69%) de la 3-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-O-(*p*-toluensulfonil)- α -D-glucofuranosa (59), como un aceite naranja. $[\alpha]_{D^{20}}$: -4.0° (c 1.1, CHCl_3).

RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.30 (s, 3H, CH_3); 1.48 (s, 3H, CH_3); 1.79 (ddd, 1H, $J_{2,3}=4.5$ Hz, $J_{3,4}=10.7$ Hz, $J_{3,3}=13.5$ Hz, H-3); 2.09 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.4$ Hz, $J_{3,3}=13.5$ Hz, H-3); 2.45 (s, 3H, CH_3); 2.69 (d, 1H, $J_{5,\text{OH}}=2.8$ Hz, OH); 3.96-4.02 (m, 2H, 2 x H-6); 4.08-4.19 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.71-4.74 (m, 1H, H-2); 5.76 (d, 1H, $J_{1,2}=3.5$ Hz, H-1); 7.36 (d, 2H, $J=8.5$ Hz, 2 x H-Ph), 7.80 (d, 2H, $J=8.2$ Hz, 2 x H-Ph).

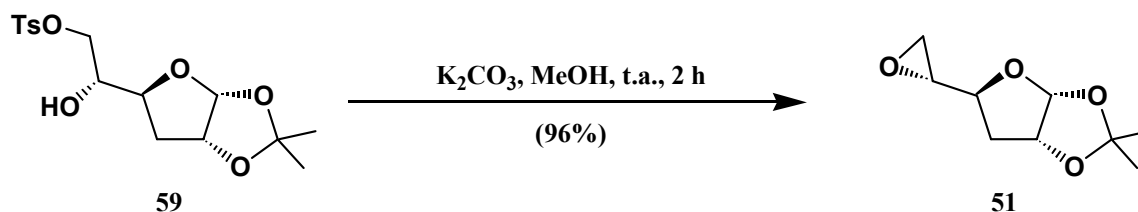
RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.6 (CH_3); 26.0 (CH_3); 26.7 (CH_3); 34.2 (CH_2); 70.2 (CH); 71.1 (CH_2); 77.5 (CH); 80.4 (CH); 105.3 (CH); 111.4 (C); 127.9 (2 x CH); 129.9 (2 x CH); 132.3 (C); 145.1 (C).

IR (ν , cm^{-1}): 3478 (a, OH).

EM-IQ (m/z , %): 359 (19, MH^+); 343 (28, $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$); 301 (82, $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_5\text{O}]^+$); 187 (55, $[\text{M} - \text{TsO}]^+$); 111 (100).



Preparación de la 5,6-anhidro-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (51).

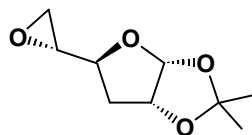


En un matraz de fondo redondo de 250 mL conectado a una línea de argón, se disolvieron 0.70 g (1.94 mmoles) de la 3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-*O*-(*p*-toluensulfonil)- α -D-glucofuranosa (59) en 90 mL de metanol seco y a esta disolución se le añadieron 0.67 g (4.85 mmoles, 2.5 eq) de carbonato potásico anhidro. La mezcla resultante se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 2 horas, observando por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 2:1) la desaparición del producto de partida. Se añadieron entonces 30 mL de agua y se evaporó el metanol en el rotavapor. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (4 x 30 mL) y las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron a sequedad, obteniéndose 0.35 g (1.86 mmoles, 96%) de la 5,6-anhidro-3-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (51), como un aceite naranja, que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -19.7° (c 1.3, CHCl_3).

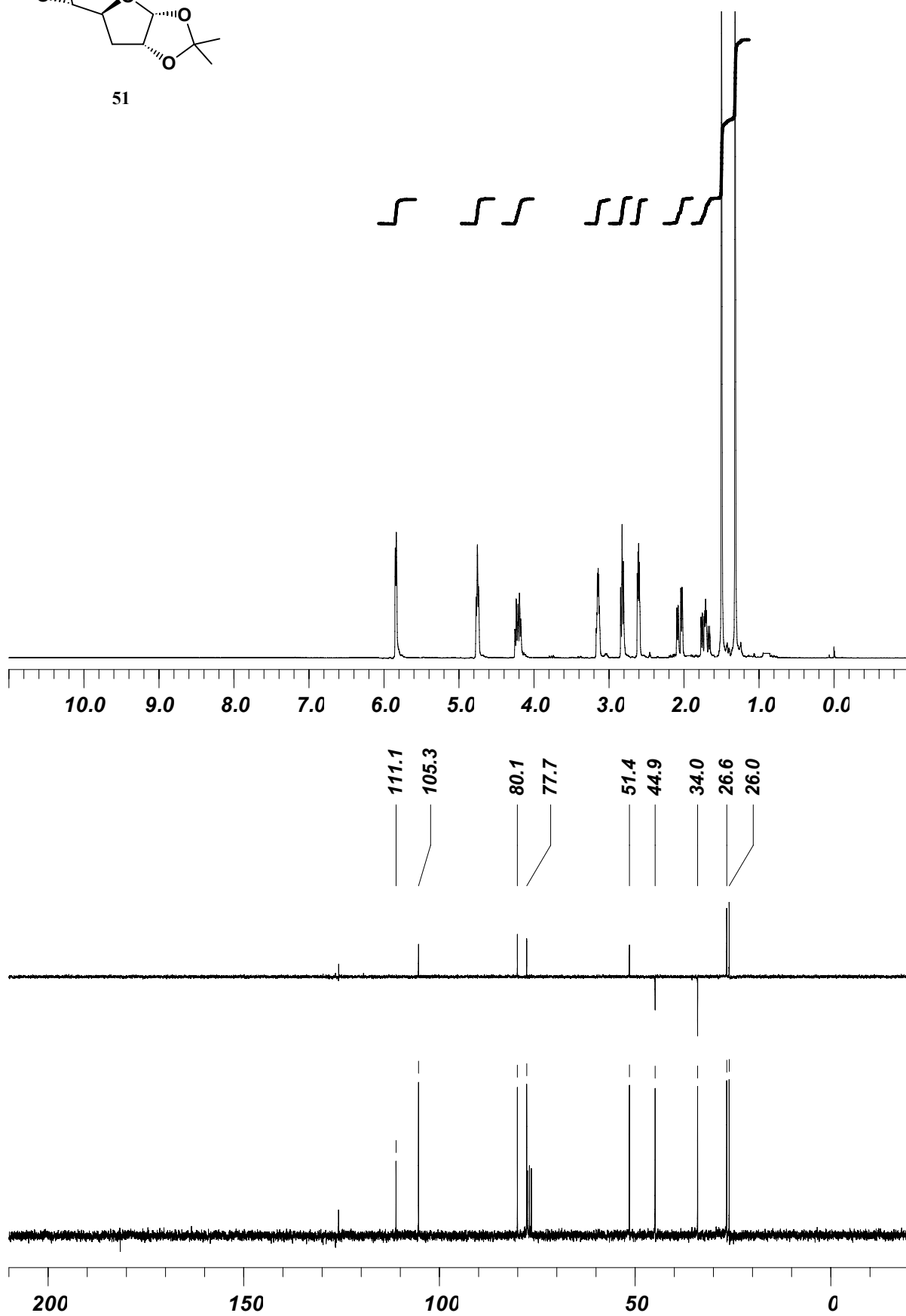
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.32 (s, 3H, CH_3); 1.50 (s, 3H, CH_3); 1.66-1.77 (m, 1H, H-3); 2.06 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.4$ Hz, $J_{3,3}=13.2$ Hz, H-3); 2.59-2.62 (m, 1H, H-6); 2.80-2.85 (m, 1H, H-6); 3.13-3.17 (m, 1H, H-5); 4.17-4.25 (m, 1H, H-4); 4.73-4.77 (m, 1H, H-2); 5.84 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 26.0 (CH_3); 26.6 (CH_3); 34.0 (CH_2); 44.9 (CH_2); 51.4 (CH); 77.7 (CH); 80.1 (CH); 105.3 (CH); 111.1 (C).

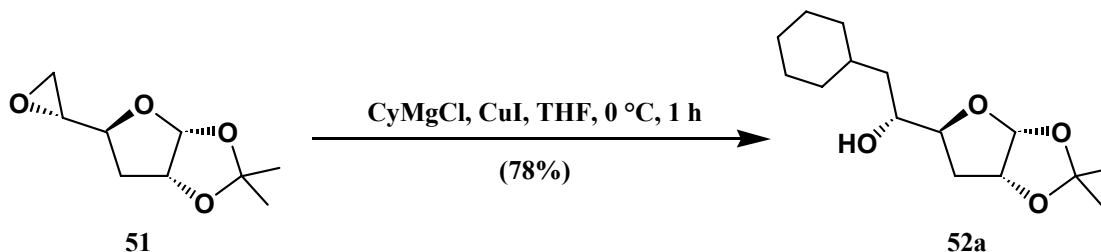
EM-IQ (m/z , %): 187 (4, MH^+); 129 (23, $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_5\text{O}]^+$); 59 (100, $[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}]^+$).



51



Preparación de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (52a).



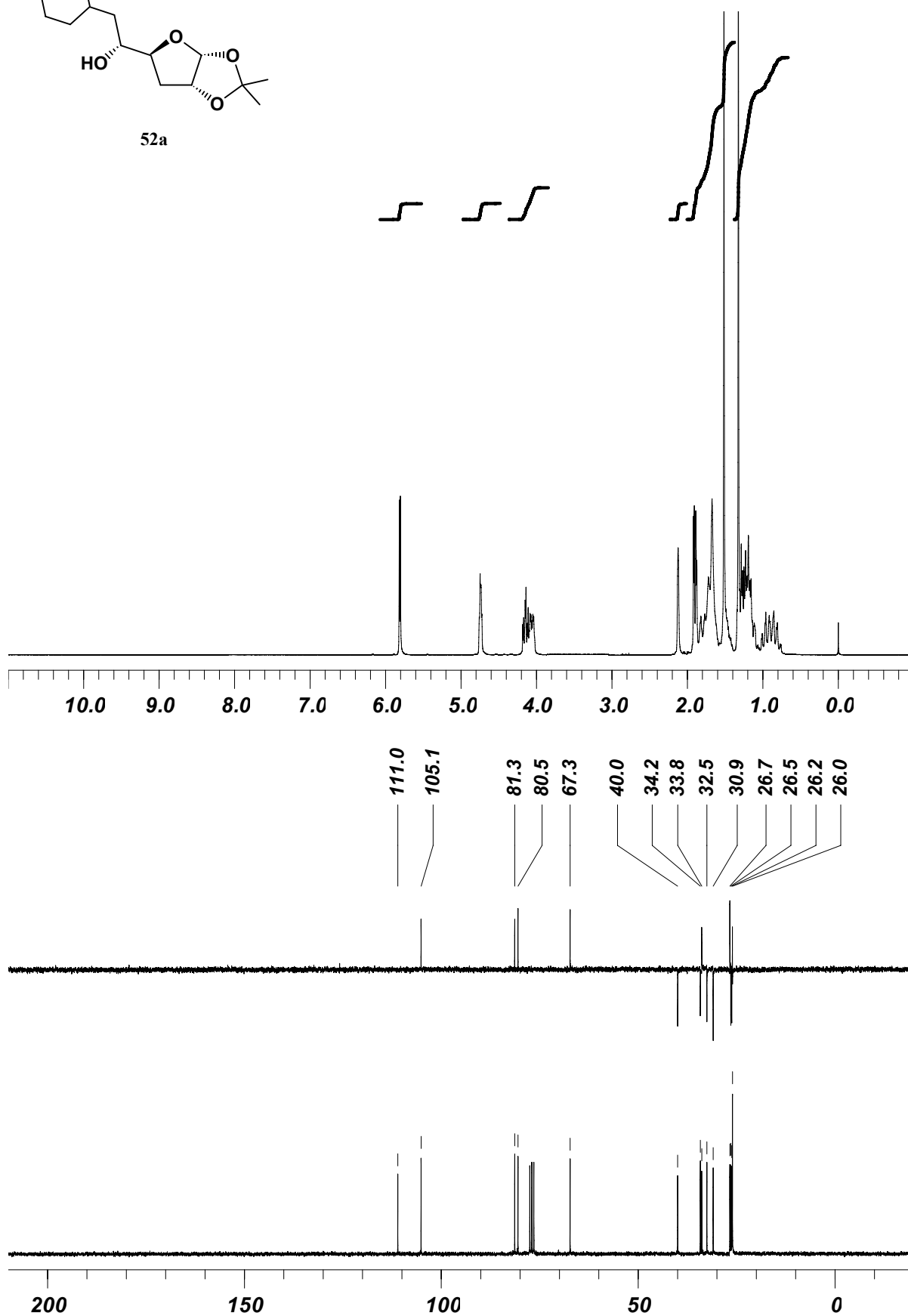
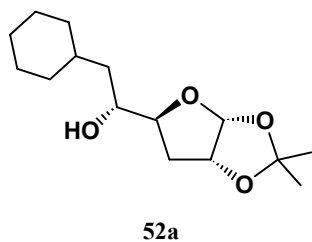
En un matraz de fondo redondo de 50 mL se preparó, bajo atmósfera de argón, una disolución con 0.46 g (2.48 mmoles) de la 5,6-anhidro-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**51**) y 0.02 g (0.124 mmoles, 0.05 eq) de yoduro de cobre (I) en 15 mL de tetrahidrofurano seco. Sobre esta disolución, enfriada a 0 °C, se añadieron 1.85 mL (3.70 mmoles, 1.4 eq) de disolución 2.0 M en éter etílico de cloruro de ciclohexilmagnesio, manteniendo la agitación a 0 °C durante 1 hora. Después se añadieron 10 mL de disolución acuosa saturada de cloruro amónico y se eliminó el tetrahidrofurano en el rotavapor. A continuación se añadieron 20 mL más de disolución acuosa saturada de cloruro amónico y la fase acuosa obtenida se extrajo con diclorometano (4 x 30 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron a sequedad, para dar un crudo de reacción que por cristalización en una mezcla de éter etílico y hexano permitió obtener 0.52 g (1.92 mmoles, 78%) de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**52a**) como un sólido blanco (p.f.: 127-128 °C). $[\alpha]_{D}^{20}$: -4.5° (c 0.4, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.76-1.05 (m, 2H, 2 x Cy-H); 1.06-1.29 (m, 5H, 5 x Cy-H); 1.32 (s, 3H, CH₃); 1.41-1.51 (m, 4H, CH₃ + Cy-H); 1.59-1.92 (m, 7H, 3 x Cy-H + 2 x H-6 + 2 x H-3); 2.12 (sa, 1H, OH); 4.02-4.18 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.72-4.76 (m, 1H, H-2); 5.81 (d, 1H, $J_{1,2}$ =3.7 Hz, H-1).

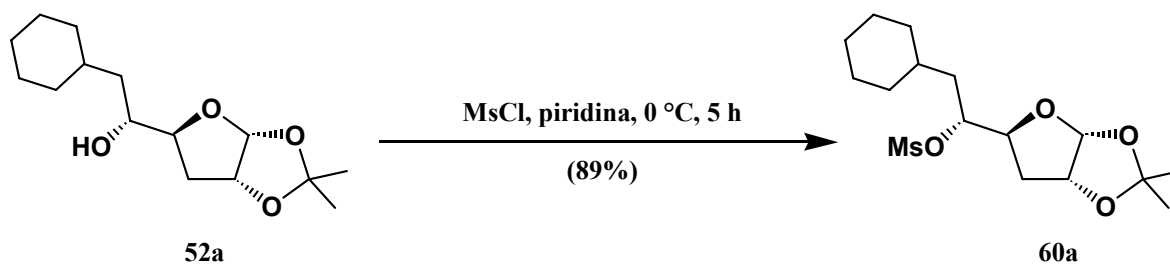
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.0 (CH₃ + CH₂); 26.2 (CH₂); 26.5 (CH₂); 26.7 (CH₃); 30.9 (CH₂); 32.5 (CH₂); 33.8 (CH); 34.2 (CH₂); 40.0 (CH₂); 67.3 (CH); 80.5 (CH); 81.3 (CH); 105.1 (CH); 111.0 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3494 (a, OH).

EM-IQ (m/z , %): 271 (28, MH⁺); 255 (22, [M - CH₃]⁺); 253 (20, [M - OH]⁺); 213 (100, [M - C₃H₅O]⁺); 195 (99, [M - C₃H₇O₂]⁺).



Preparación de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-5-O-metanosulfonil- α -D-glucofuranosa (60a).

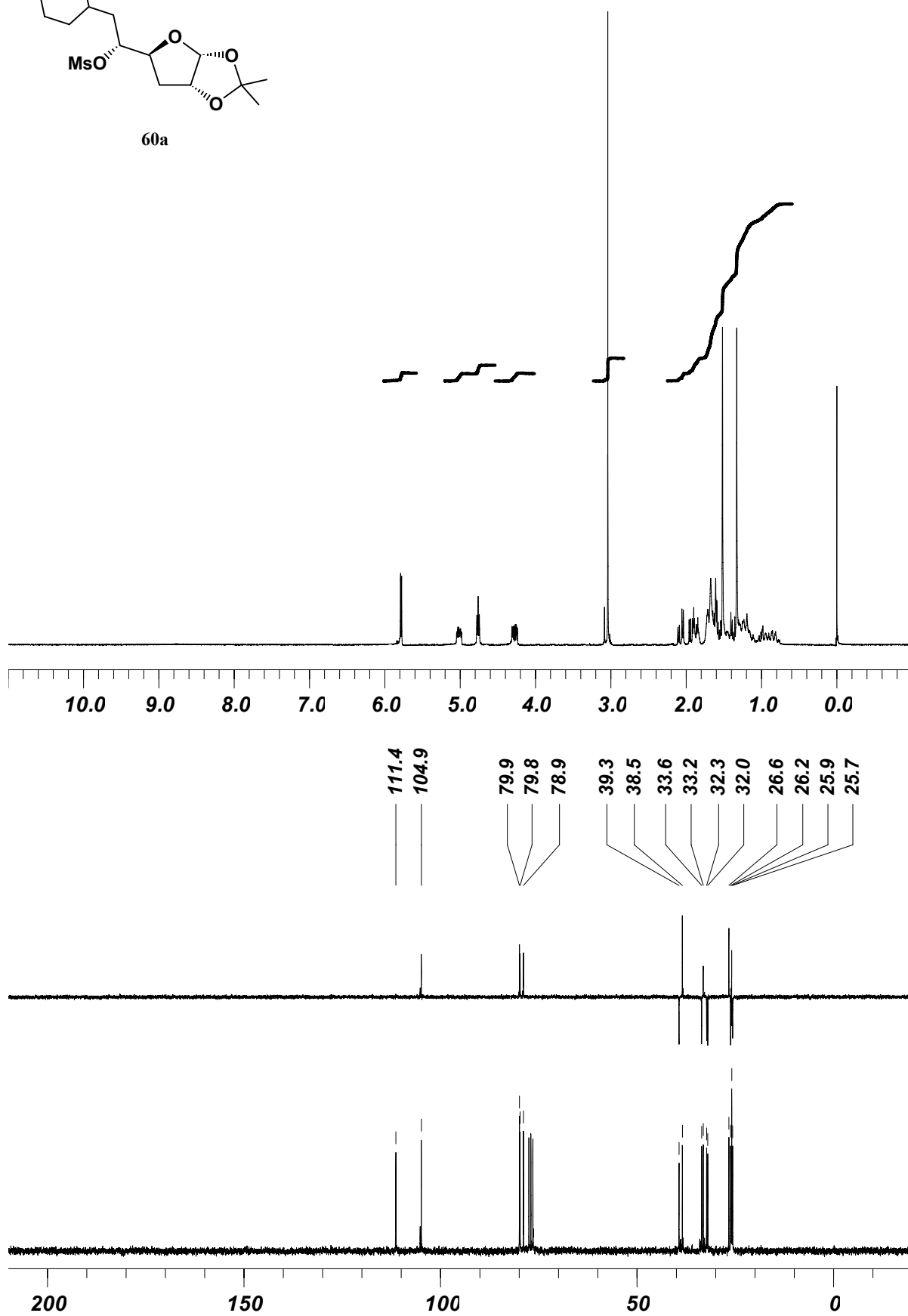
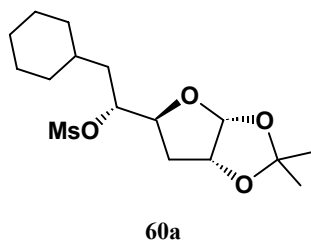


Partiendo de 0.70 g (2.61 mmoles) de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**52a**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **41a** (pág. 100), se obtuvieron tras cristalización en una mezcla de éter etílico y hexano, 0.81 g (2.23 mmoles, 89%) de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-5-O-metanosulfonil- α -D-glucofuranosa (**60a**), como un sólido blanco de p.f. 87-89 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -15.8° (c 1.1, CHCl₃).

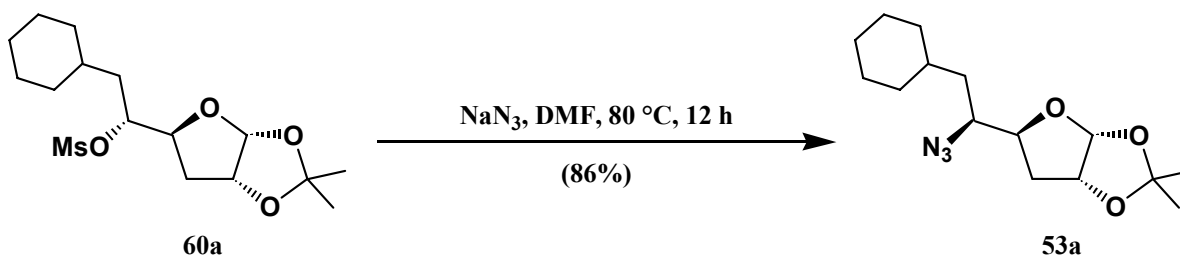
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.76-1.04 (m, 2H, 2 x Cy-H); 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.09-1.76 (m, 10H, 9 x Cy-H + H-6); 1.52 (s, 3H, CH₃); 1.81-1.96 (m, 2H, H-3 + H-6); 2.07 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.6$ Hz, $J_{3,3}=13.1$ Hz, H-3); 3.04 (s, 3H, CH₃); 4.28 (ddd, 1H, $J_{4,5}=2.7$ Hz, $J_{3,4}=4.6$ Hz, $J_{3,4}=10.7$ Hz, H-4); 4.74-4.78 (m, 1H, H-2); 4.98-5.04 (m, 1H, H-5); 5.78 (d, 1H, $J_{1,2}=3.7$ Hz, H-1).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.7 (CH₂); 25.9 (CH₂ + CH₃); 26.2 (CH₂); 26.6 (CH₃); 32.0 (CH₂); 32.3 (CH₂); 33.2 (CH); 33.6 (CH₂); 38.5 (CH₃); 39.3 (CH₂); 78.9 (CH); 79.8 (CH); 79.9 (CH); 104.9 (CH); 111.4 (C).

EM-IQ (m/z, %): 347 (1, [M - H]⁺); 253 (49, [M - CH₃SO₃]⁺); 17 (100).



Preparación de la 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden- β -L-idofuranosa (53a).



Partiendo de 0.70 g (2.02 mmoles) de la 6-ciclohexil-3,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-5-O-metanosulfonil- α -D-glucofuranosa (**60a**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **28b** (pág. 102), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:8), 0.51 g (1.73 mmoles, 86 %) de la 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden- β -L-idofuranosa (**53a**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -68.2° (c 1.0, CHCl_3).

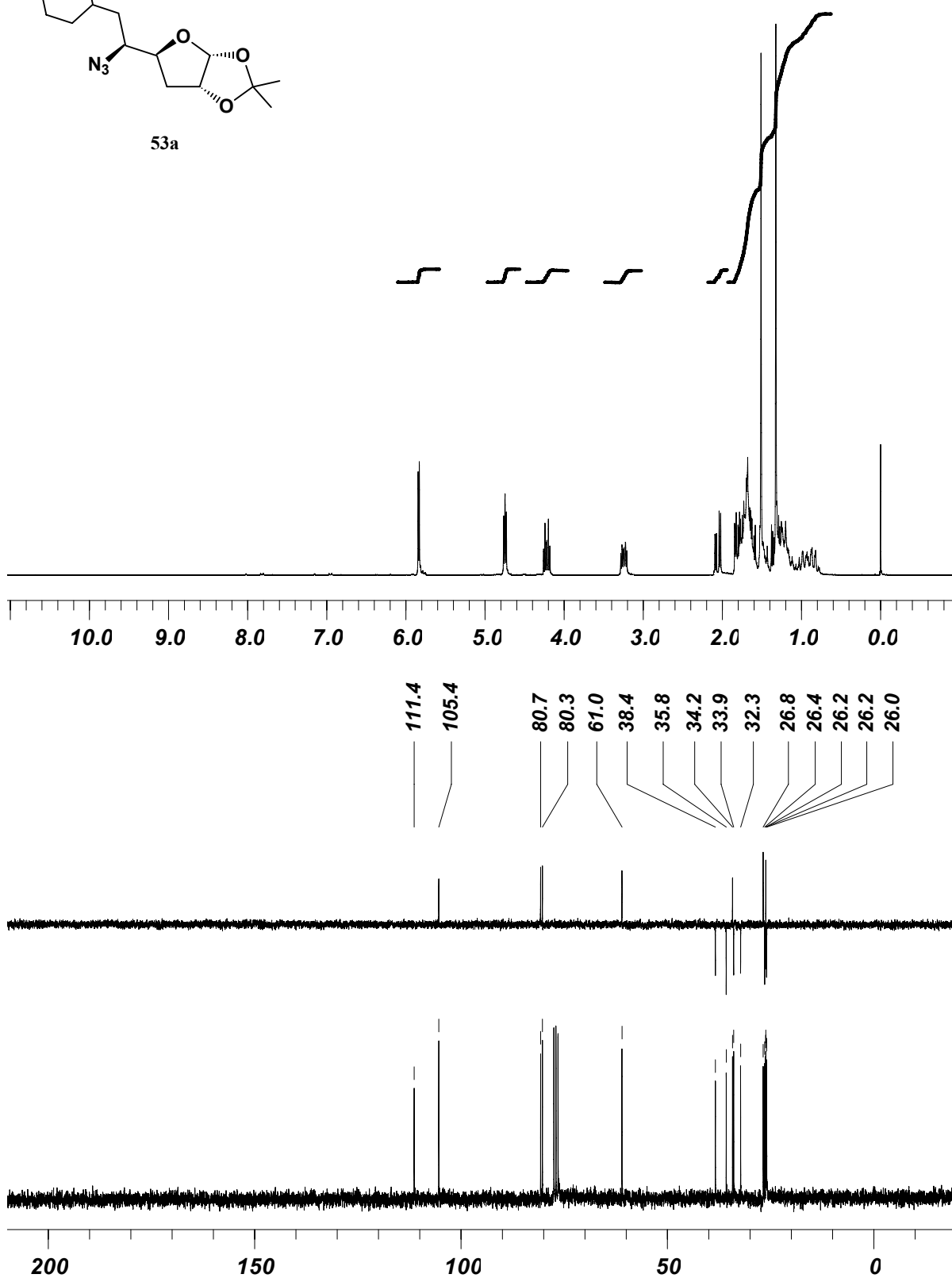
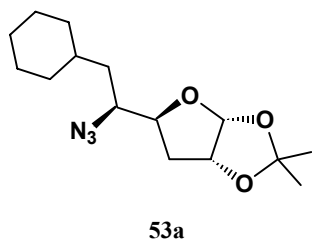
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.77-1.07 (m, 2H, 2 x Cy-H); 1.11-1.38 (m, 4H, 4 x Cy-H); 1.32 (s, 3H, CH_3); 1.48-1.85 (m, 8H, 5 x Cy-H + 2 x H-6 + H-3); 1.51 (s, 3H, CH_3); 2.06 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.6 \text{ Hz}$, $J_{3,3}=13.4 \text{ Hz}$, H-3); 3.21-3.28 (m, 1H, H-5); 4.18-4.26 (m, 1H, H-4); 4.73-4.77 (m, 1H, H-2); 5.84 (d, 1H, $J_{1,2}=3.7 \text{ Hz}$, H-1).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 26.0 (CH_2); 26.2 (CH_3); 26.2 (CH_2); 26.4 (CH_2); 26.8 (CH_3); 32.3 (CH_2); 33.9 (CH_2); 34.2 (CH); 35.8 (CH_2); 38.4 (CH_2); 61.0 (CH); 80.3 (CH); 80.7 (CH); 105.4 (CH); 111.4 (C).

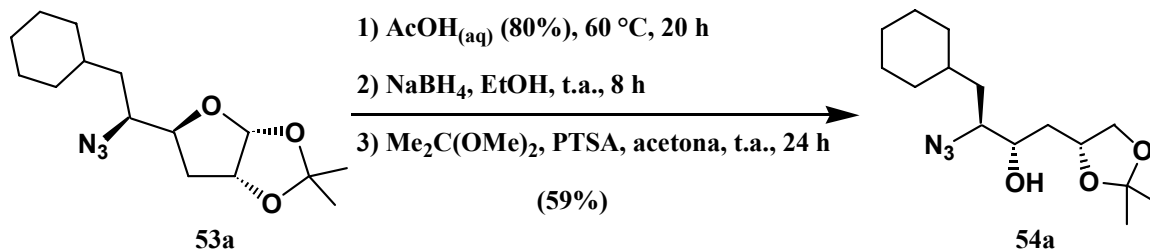
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2107 (f, N_3).

EM-IQ (m/z , %): 296 (3, MH^+); 268 (18, $[\text{MH} - \text{N}_2]^+$); 59 (55, $[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}]^+$); 17 (100).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$: C 60.99, H 8.53, N 14.23; encontrado C 61.00, H 8.23, N 14.04.



Preparación del 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden-L-iditol (54a).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL conectado a un refrigerante, una disolución de 0.49 g (1.65 mmoles) de la 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden- β -L-idofuranosa (**53a**) en 25 mL de ácido acético acuoso al 80% se calentó a 60 °C durante 20 horas. Tras eliminar el ácido acético en el rotavapor, se hicieron tres coevaporaciones con 10 mL de tolueno cada una, completando el secado del crudo en la línea de vacío. El residuo se disolvió en 40 mL de etanol absoluto, se enfrió a 0 °C y se le añadieron en cinco porciones 0.25 g (6.60 mmoles, 4.0 eq) de borohidruro sódico, dejando llegar a continuación el contenido del matraz de reacción a temperatura ambiente. Tras 8 horas de reacción, se neutralizó la mezcla obtenida con HCl 1 M y se concentró el etanol en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió con 30 mL de disolución acuosa saturada de cloruro sódico y se extrajo con acetato de etilo (4 x 30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron en el rotavapor, completando su secado en la línea de vacío. El residuo así obtenido se disolvió en 30 mL de acetona y 45 mL de 2,2-dimetoxipropano y se añadieron 1.0 g de sulfato de cobre anhidro y 0.03 g (0.16 mmoles, 0.1 eq) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado. La suspensión obtenida se agitó a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón, durante 24 horas y a continuación se neutralizó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La suspensión resultante se filtró y los líquidos filtrados se concentraron a sequedad, obteniéndose un residuo que se disolvió en 30 ml de agua y se extrajo con diclorometano (4 x 30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad. El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:8), obteniéndose 0.29 g (0.97 mmoles, 59%) del 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden-L-iditol (**54a**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_{D^{20}}$: -11.2° (c 0.5, CHCl₃).

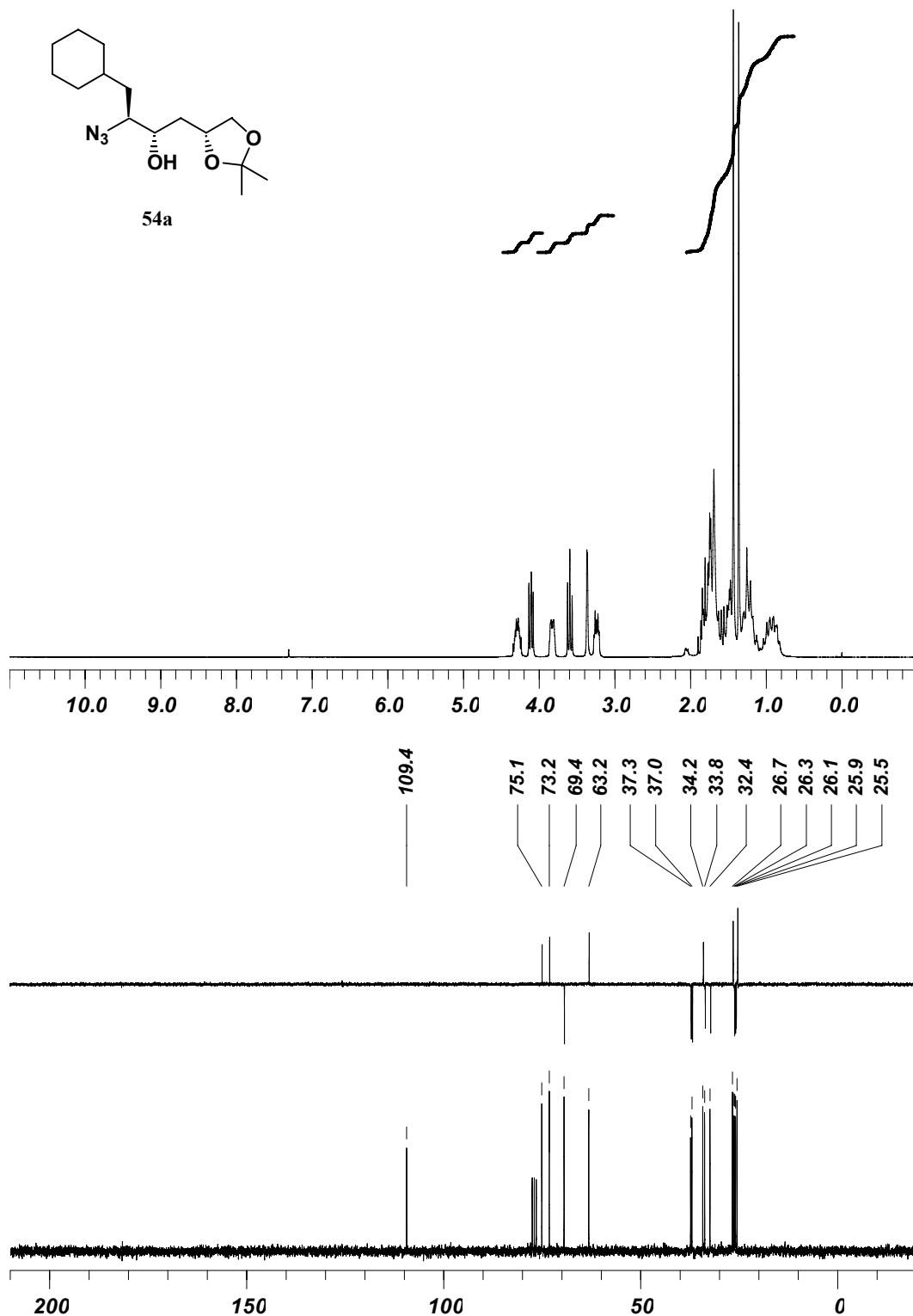
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.83-1.03 (m, 2H, 2 x Cy-H); 1.11-1.30 (m, 3H, 3 x Cy-H); 1.36 (s, 3H, CH₃); 1.43 (s, 3H, CH₃); 1.46-1.90 (m, 10H, 6 x Cy-H + 2 x H-3 + 2 x H-6); 3.21-3.27 (m, 1H, H-5); 3.36 (d, 1H, $J_{4,OH}$ =1.8 Hz, OH); 3.56-3.62 (m, 1H, H-1); 3.78-3.88 (m, 1H, H-4); 4.11 (dd, 1H, $J_{1,2}$ =6.1 Hz, $J_{1,1}$ =7.9 Hz, H-1); 4.24-4.34 (m, 1H, H-2).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.5 (CH₃); 25.9 (CH₂); 26.1 (CH₂); 26.3 (CH₂); 26.7 (CH₃); 32.4 (CH₂); 33.8 (CH₂); 34.2 (CH); 37.0 (CH₂); 37.3 (CH₂); 63.2 (CH); 69.4 (CH₂); 73.2 (CH); 75.1 (CH); 109.4 (C).

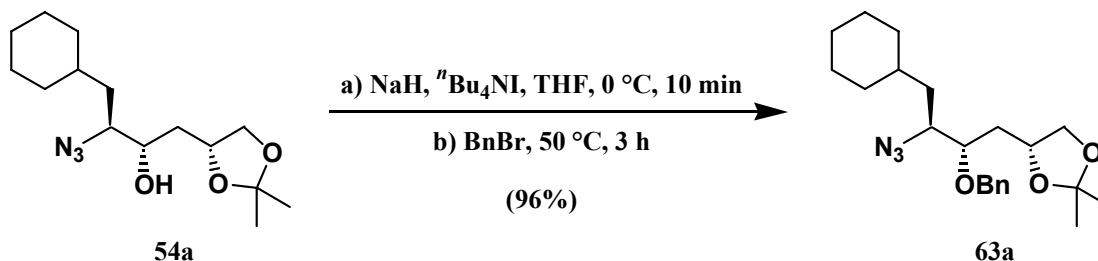
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3478 (a, OH); 2107 (f, N₃).

EM-IQ (*m/z*, %): 290 (1, MH⁺); 262 (2, [MH - N₂]⁺); 59 (100, [C₃H₇O]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₂₇N₃O₃: C 60.58, H 9.15, N 14.13; encontrado C 60.21, H 8.76, N 14.25.



Preparación del 5-azido-4-O-bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden-L-iditol (63a).



En un matraz de fondo redondo de 10 mL, conectado a una línea de argón, se introdujeron 0.04 g (1.00 mmoles, 1.3 eq) de hidruro sódico (dispersión del 60% en aceite mineral) y se lavaron con hexano seco (3 x 1 mL) para retirar el aceite mineral. A continuación se añadieron 0.003 g (0.008 mmoles, 0.01 eq) de yoduro de tetrabutilamonio y 2 mL de THF seco. Sobre esta suspensión, enfriada a 0 °C, se adicionó una disolución de 0.23 g (0.80 mmoles) del 5-azido-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden-L-iditol (**54a**) en 2 mL de tetrahydrofurano seco, continuando la agitación a esta temperatura durante 10 minutos y dejando luego llegar la reacción a temperatura ambiente, momento en el cual se añadieron 0.11 mL (0.88 mmoles, 1.1 eq) de bromuro de bencilo y la mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1 mL de metanol y se agitó la reacción 2 horas más. Una vez fría se filtró la suspensión resultante a través de celita, los líquidos filtrados se concentraron a sequedad y el residuo resultante se disolvió en 10 mL de diclorometano, se lavó con agua destilada (2 x 10 mL), se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Se obtuvo así un crudo que, tras purificación cromatográfica (acetato de etilo/hexano 1:10) rindió 0.30 g (0.77 mmoles, 96%) del 5-azido-4-O-bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden-L-iditol (**63a**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_D^{20}$: -21.7° (c 1.4, CHCl₃).

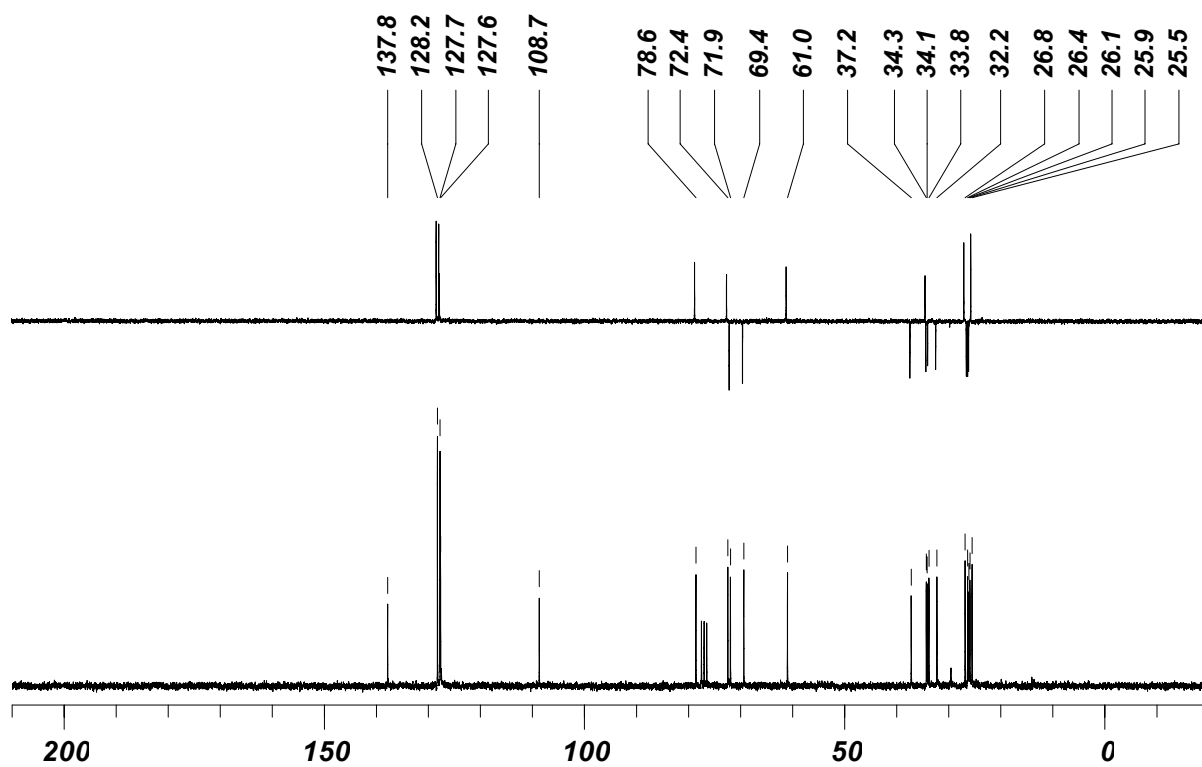
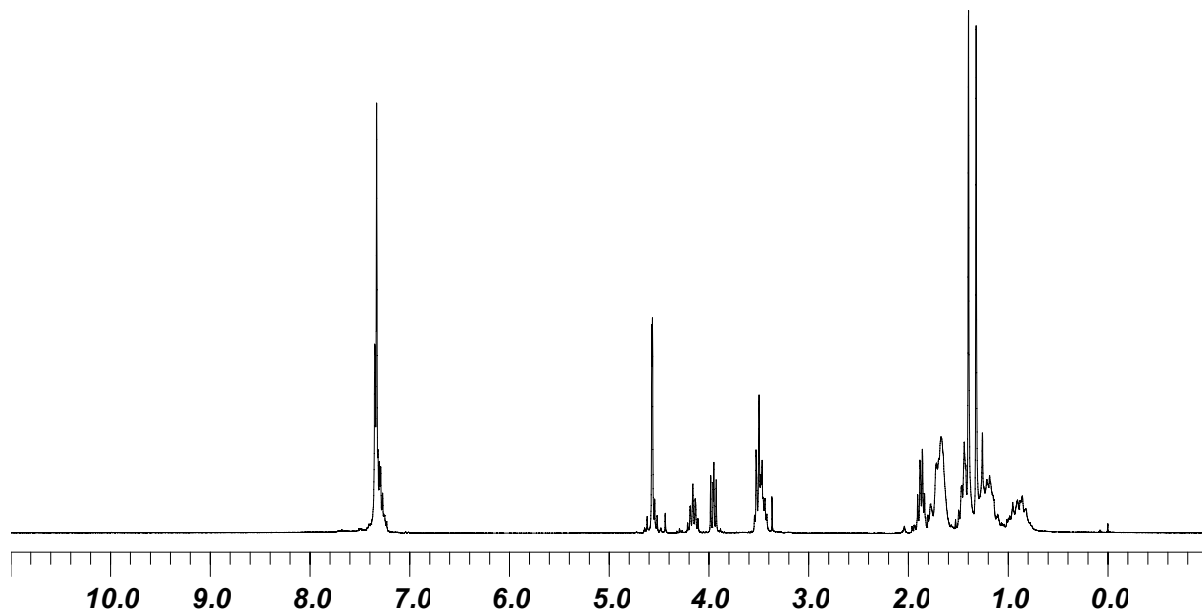
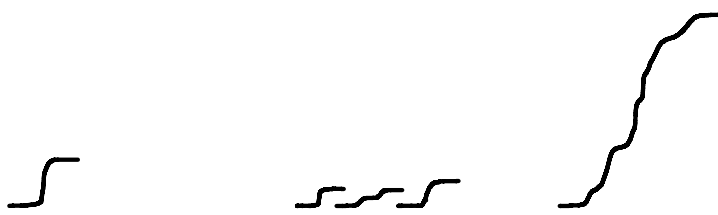
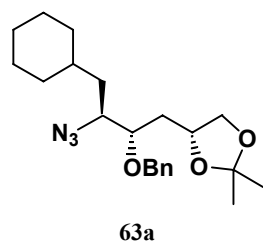
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.76-1.01 (m, 3H, 3 x Cy-H); 1.09-1.53 (m, 3H, 3 x Cy-H); 1.32 (s, 3H, CH₃); 1.40 (s, 3H, CH₃); 1.60-1.96 (m, 9H, 5 x Cy-H + 2 x H-3 + 2 x H-6); 3.42-3.54 (m, 3H, H-1 + H-4 + H-5); 3.95 (dd, 1H, $J_{1,2}=5.8$ Hz, $J_{1,1}=7.9$ Hz, H-1); 4.11-4.21 (m, 1H, H-2); 4.54 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂-Ph); 4.60 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂-Ph); 7.23-7.35 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.5 (CH₃); 25.9 (CH₂); 26.1 (CH₂); 26.4 (CH₂); 26.8 (CH₃); 32.2 (CH₂); 33.8 (CH₂); 34.1 (CH₂); 34.3 (CH); 37.2 (CH₂); 61.0 (CH); 69.4 (CH₂); 71.9 (CH₂); 72.4 (CH); 78.6 (CH); 108.7 (C); 127.6 (CH); 127.7 (2 x CH); 128.2 (2 x CH); 137.8 (C).

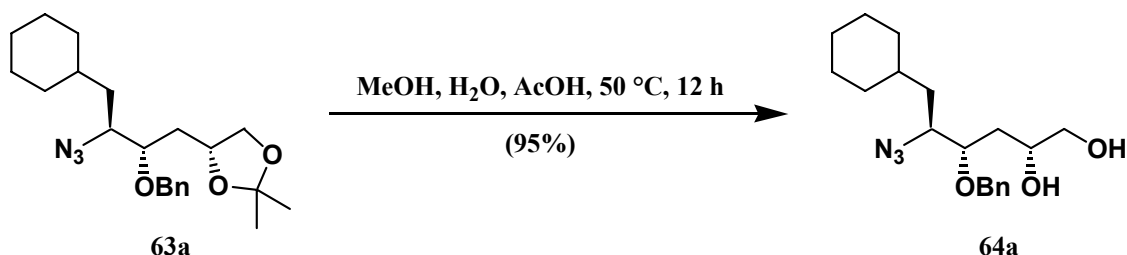
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2126 (f, N₃).

EM-IQ (m/z , %): 388 (7, MH⁺); 360 (54, [MH - N₂]⁺); 42 (100).

Análisis elemental: calculado para C₂₂H₃₃N₃O₃: C 68.19, H 8.58, N 10.84; encontrado C 68.49, H 8.50, N 10.78.



Preparación del 5-azido-4-O-bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-L-idoitol (64a).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se disolvieron 0.30 g (0.77 mmoles) del 5-azido-4-O-bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-1,2-O-isopropiliden-L-idoitol (**63a**) en 4 mL de una mezcla de metanol, ácido acético y agua (1:1:1) y la disolución resultante se calentó a 50 °C durante 12 horas. Una vez transcurrido dicho tiempo, el disolvente se eliminó en el rotavapor y el residuo se sometió a tres coevaporaciones con 2 mL de tolueno cada una. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:1.2), obteniéndose 0.25 g (0.73 mmoles, 95%) del 5-azido-4-O-bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-L-idoitol (**64a**), como un aceite naranja. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -37.0° (c 0.8, CHCl_3).

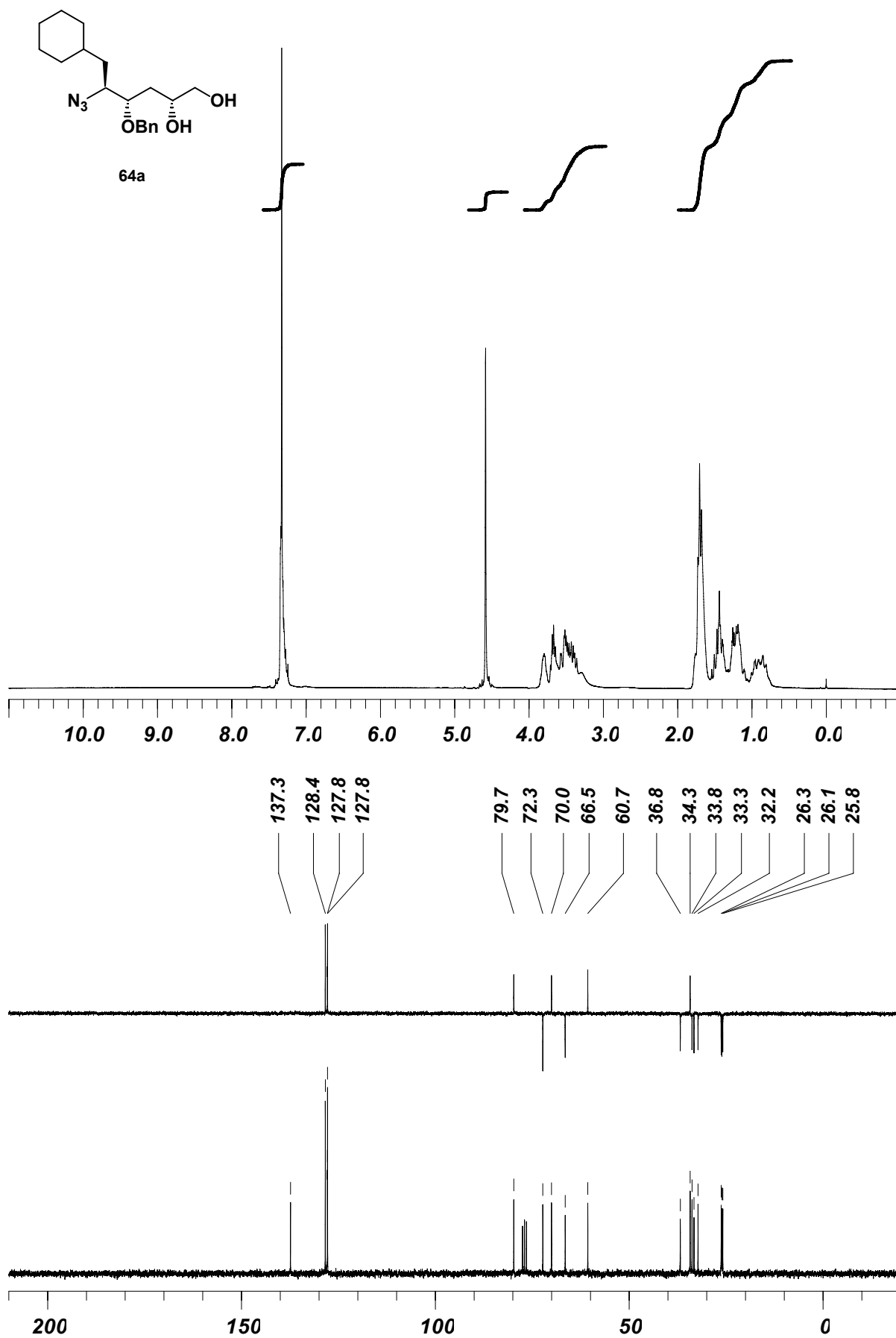
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.73-1.00 (m, 2H, 2 x Cy-H); 1.09-1.54 (m, 6H, 6 x Cy-H), 1.60-1.80 (m, 7H, 3 x Cy-H + 2 x H-3 + 2 x H-6); 3.19-3.82 (m, 7H, 2 x OH + 2 x H-1 + H-2 + H-4 + H-5); 4.58 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 7.27-7.36 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 25.8 (CH_2); 26.1 (CH_2); 26.3 (CH_2); 32.2 (CH_2); 33.3 (CH_2); 33.8 (CH_2); 34.3 (CH); 36.8 (CH_2); 60.7 (CH); 66.5 (CH_2); 70.0 (CH); 72.3 (CH_2); 79.7 (CH); 127.8 (2 x CH); 127.8 (CH); 128.4 (2 x CH); 137.3 (C).

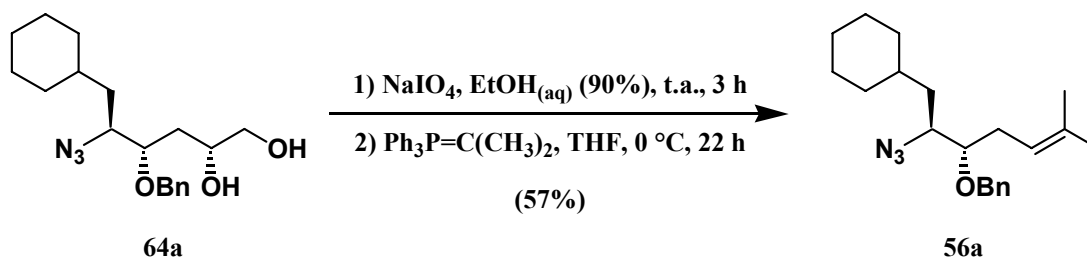
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3392 (a, OH); 2105 (f, N_3).

EM-IQ (m/z , %): 348 (6, MH^+); 320 (51, $[\text{MH} - \text{N}_2]^+$); 91 (100, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$: C 65.68, H 8.41, N 12.09; encontrado C 66.06, H 8.54, N 12.13.



Preparación del (5S,6S)-6-azido-5-benciloxi-7-ciclohexil-2-metilhept-2-eno (56a).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se disolvieron 0.25 g (0.73 mmoles) del 5-azido-4-O-bencil-6-ciclohexil-3,5,6-tridesoxi-L-idoitol (**64a**) en 6 mL etanol acuoso al 90%, se añadieron en cinco porciones 0.24 g (1.10 mmoles, 1.5 eq) de metaperyodato sódico y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después se añadieron 5 mL de diclorometano, se filtró la suspensión resultante y se concentraron a sequedad los líquidos filtrados. El crudo obtenido se secó en la línea de vacío y luego se disolvió bajo atmósfera de argón en 2 mL de tetrahydrofurano seco. A la disolución enfriada a 0 °C se le añadieron 1.9 mL (0.95 mmoles, 1.3 eq) de disolución 0.5 M del iluro de isopropiltrifenilfosfonio recién preparada [añadiendo en un matraz de 25 mL, bajo atmósfera de argón, 0.64 mL (1.02 mmoles, 1.07 eq) de disolución 1.6 M en hexano de n-butillitio sobre una suspensión de 0.39 g (0.95 mmoles) de yoduro de isopropiltrifenilfosfonio en 1.2 mL de tetrahydrofurano seco y agitando la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente]. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 22 horas, luego se añadieron 3 mL de agua, el tetrahydrofurano se eliminó en el rotavapor y la fase acuosa se extrajo con éter etílico (4 x 3 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con agua (2 x 10 mL), se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad. Se obtuvo así un residuo que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:50), obteniéndose 0.14 g (0.42 mmoles, 57%) del (5S,6S)-6-azido-5-benciloxi-7-ciclohexil-2-metilhept-2-eno (**56a**), como un aceite transparente. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -5.5° (c 0.4, CHCl₃).

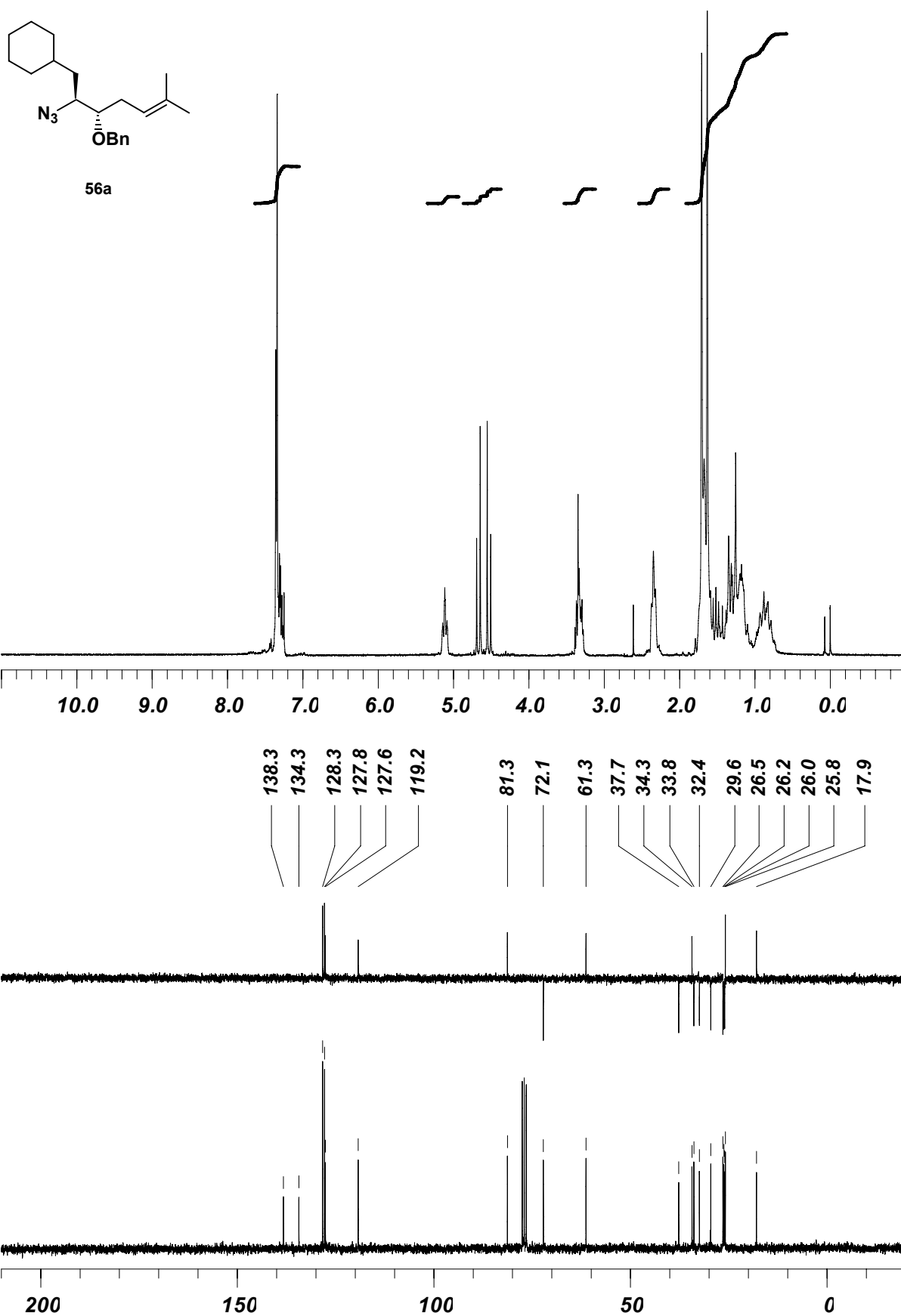
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.72-1.67 (m, 13H, 11 x Cy-H + 2 x H-7); 1.63 (s, 3H, CH₃); 1.71 (s, 3H, CH₃); 2.29-2.39 (m, 2H, 2 x H-4); 3.28-3.39 (m, 2H, H-5 + H-6); 4.53 (d, 1H, J=11.7 Hz, CH₂-Ph); 4.67 (d, 1H, J=11.7 Hz, CH₂-Ph); 5.07-5.16 (m, 1H, H-3); 7.25-7.36 (m, 5H, 5 x H-Ph).

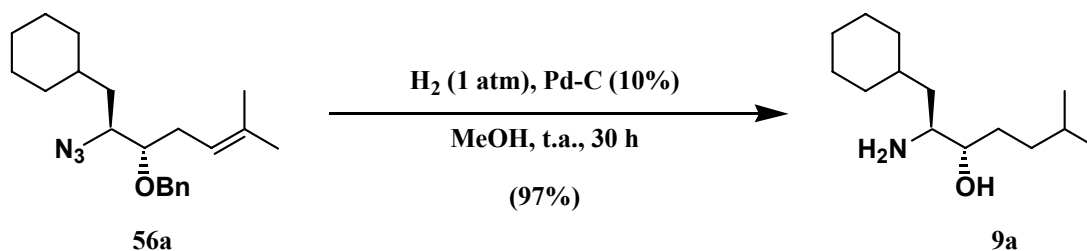
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 17.9 (CH₃); 25.8 (CH₃); 26.0 (CH₂); 26.2 (CH₂); 26.5 (CH₂); 29.6 (CH₂); 32.4 (CH₂); 33.8 (CH₂); 34.3 (CH); 37.7 (CH₂); 61.3 (CH); 72.1 (CH₂); 81.3 (CH); 119.2 (CH); 127.6 (CH); 127.8 (2 x CH); 128.3 (2 x CH); 134.3 (C); 138.3 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2104 (f, N₃).

EM (m/z, %): 342 (3, MH⁺); 314 (16, [MH - N₂]⁺); 107 (100, [PhCH₂O]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₂₁H₃₁N₃O: C 73.86, H 9.15, N 12.30; encontrado C 74.28, H 8.90, N 12.64.



Preparación del (5S,6S)-6-amino-7-ciclohexil-2-metilheptan-5-ol (**9a**).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL a una disolución desoxigenada de 0.14 g (0.42 mmoles) del (5S,6S)-6-azido-5-benciloxi-7-ciclohexil-2-metilhept-2-eno (**56a**) en 4 mL de metanol se le añadieron 0.28 g (20% en peso de paladio) de paladio sobre carbono activo del 10%, y la mezcla, una vez purgada con hidrogeno, se agitó bajo una presión de hidrógeno de 1 atmósfera a temperatura ambiente durante 30 horas. La mezcla de reacción se filtró luego a través de celita y el liquido filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor, obteniéndose 0.09g (0.40 mmoles, 97%) del (5S,6S)-6-amino-7-ciclohexil-2-metilheptan-5-ol (**9a**), como un aceite transparente espectroscópicamente puro. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -30.7° (c 0.8, CHCl_3).

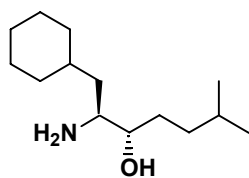
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.78-1.03 (m, 6H, 2 x CH_3); 1.07-1.84 (m, 18H, 11 x Cy-H + H-2 + 2 x H-3 + 2 x H-4 + 2 x H-7); 2.51-2.79 (m, 1H, H-6); 3.07-3.25 (m, 3H, NH_2 + H-5).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 22.6 (CH_3); 22.9 (CH_3); 26.3 (CH_2); 26.5 (CH_2); 26.6 (CH_2); 28.3 (CH); 29.8 (CH_2); 32.6 (CH_2); 34.4 (CH); 34.6 (CH_2); 35.0 (CH_2); 43.7 (CH_2); 52.4 (CH); 80.6 (CH).

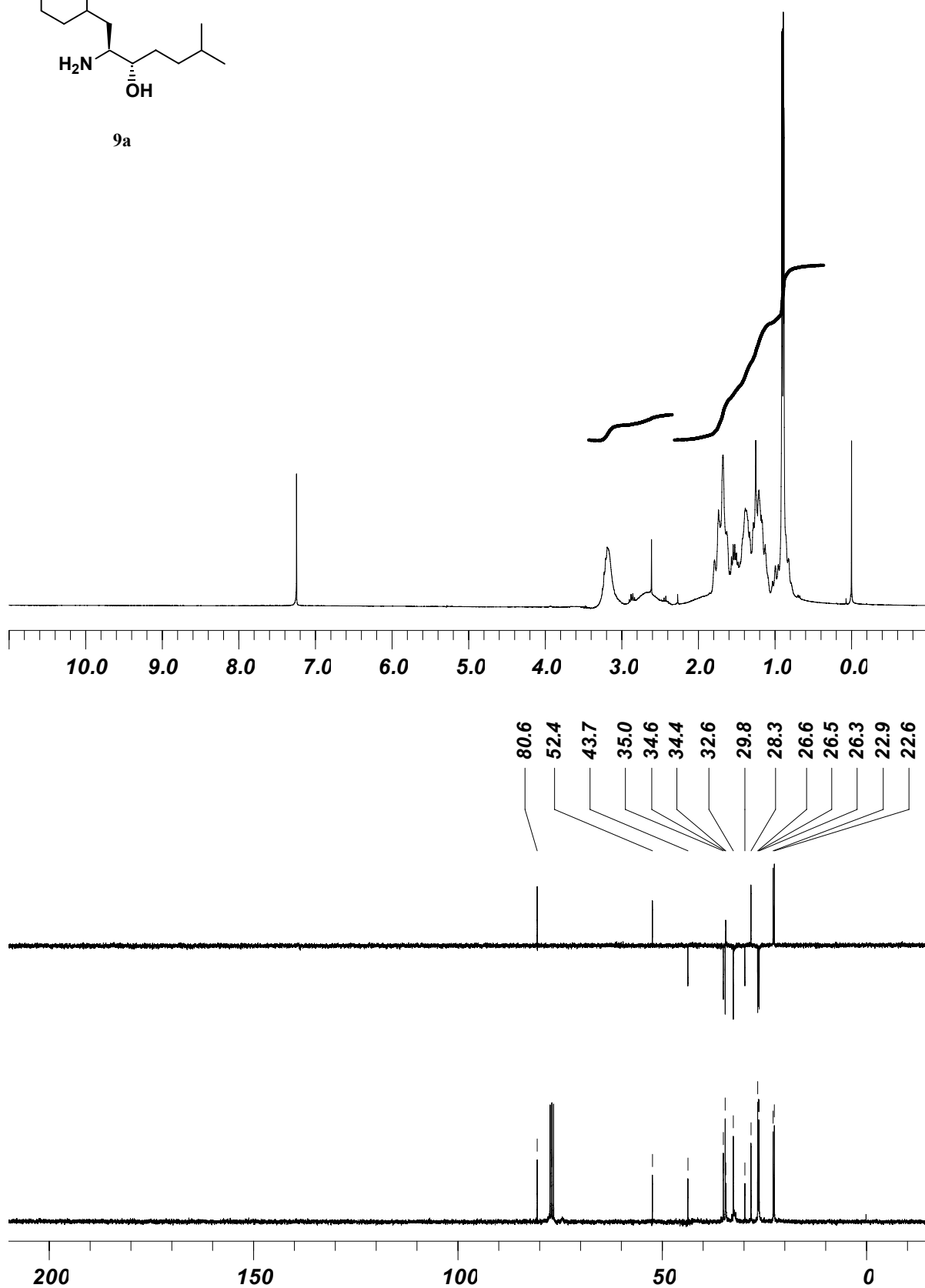
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3358 (a, OH + NH_2).

EM-IQ (m/z , %): 228 (5, MH^+); 210 (7, $[\text{M} - \text{OH}]^+$); 41 (100).

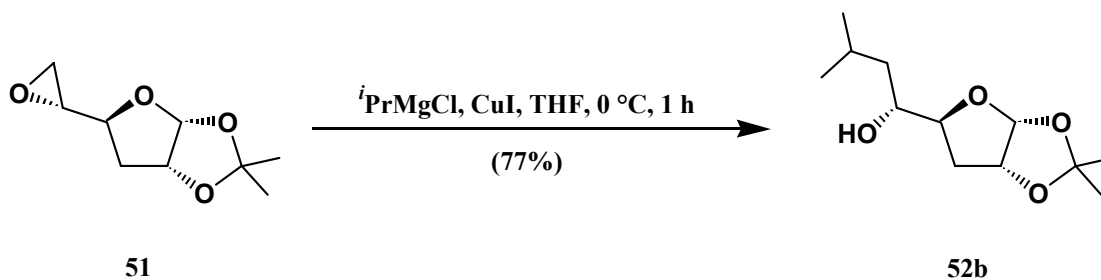
Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}$: C 73.95, H 12.85, N 6.16; encontrado C 73.84, H 12.55, N 6.31.



9a



Preparación de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**52b**).



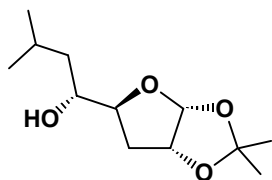
Partiendo de 0.46 g (2.48 mmoles) de la 5,6-anhidro-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**51**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **52a** (pág. 152), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:3), 0.44 g (1.91 mmoles, 77%) de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**52b**), como un aceite transparente. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -10.9° (c 0.9, CHCl_3).

RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.90-0.96 (m, 6H, 2 x CH_3); 1.07-1.18 (m, 1H, H-6); 1.25-1.38 (m, 1H, H-6); 1.32 (s, 3H, CH_3); 1.51 (s, 3H, CH_3); 1.77-1.85 (m, 1H, H-7); 1.88-1.92 (m, 2H, 2 x H-3); 2.16 (sa, 1H, OH); 3.99-4.06 (m, 1H, H-5); 4.12-4.19 (m, 1H, H-4); 4.72-4.76 (m, 1H, H-2); 5.80 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1).

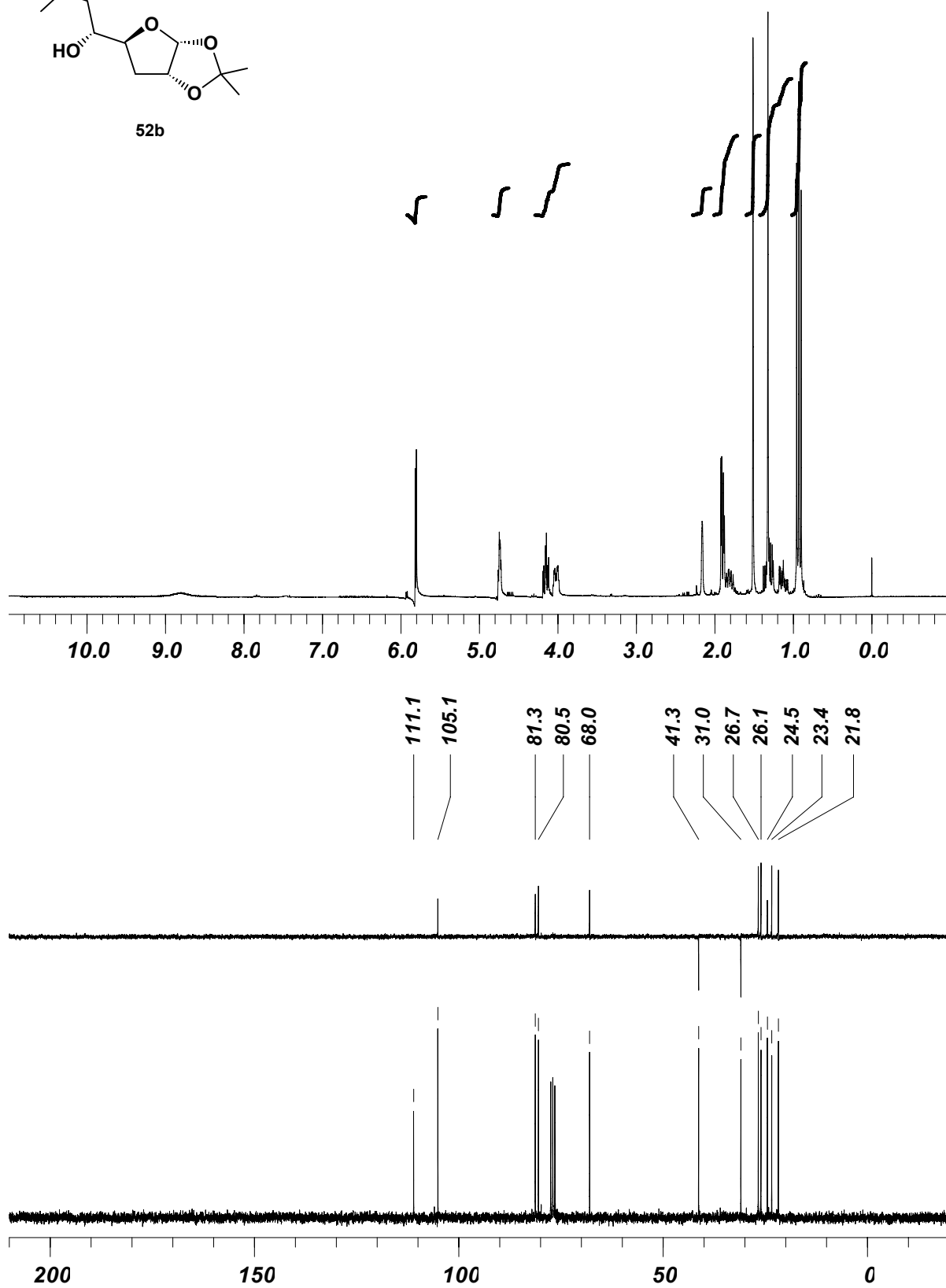
RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.8 (CH_3); 23.4 (CH_3); 24.5 (CH); 26.1 (CH_3); 26.7 (CH_3); 31.0 (CH_2); 41.3 (CH_2); 68.0 (CH); 80.5 (CH); 81.3 (CH); 105.1 (CH); 111.1 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3493 (a, OH).

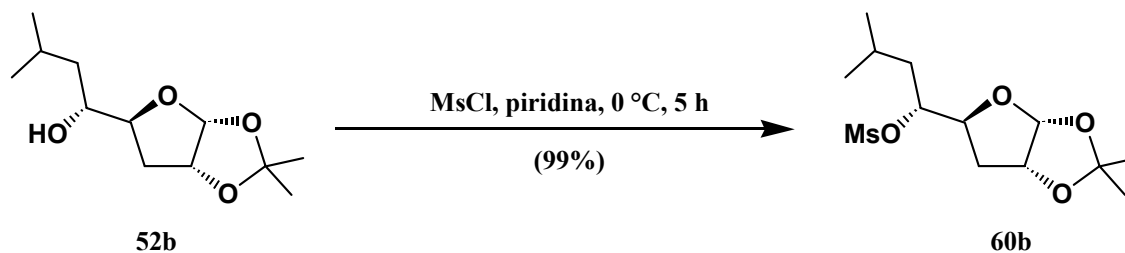
EM-IQ (m/z , %): 187 (4, $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7]^+$); 59 (100, $[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}]^+$).



52b



Preparación de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-5-O-metanosulfonyl- α -D-glucofuranosa (**60b**).

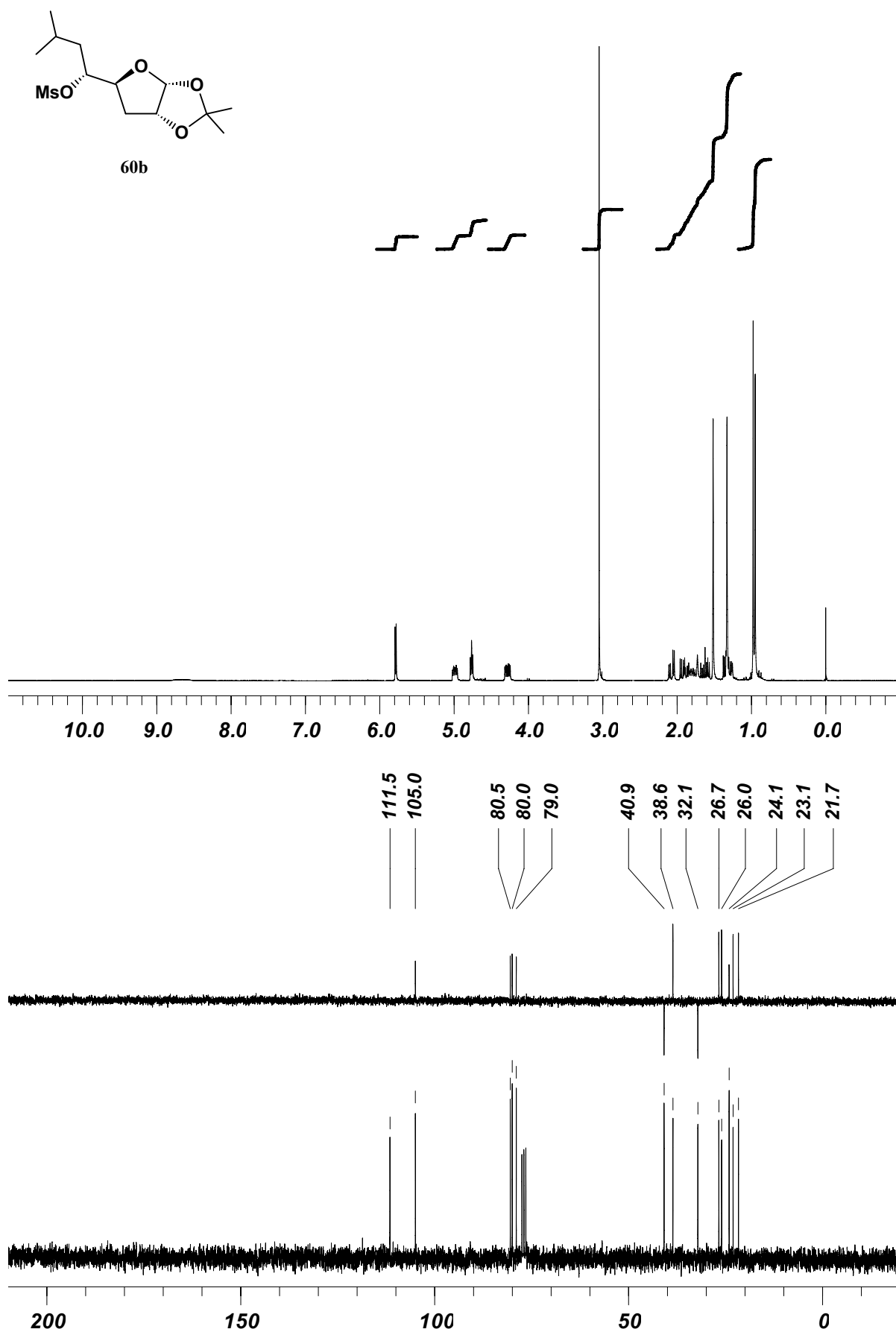


Partiendo de 0.53 g (2.32 mmoles) de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**52b**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **41a** (pág. 100), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:3), 0.70 g (2.30 mmoles, 99%) de la 3,6-didesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-5-O-metanosulfonyl- α -D-glucofuranosa (**60b**), como un aceite transparente. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -23.8° (c 1.2, CHCl_3).

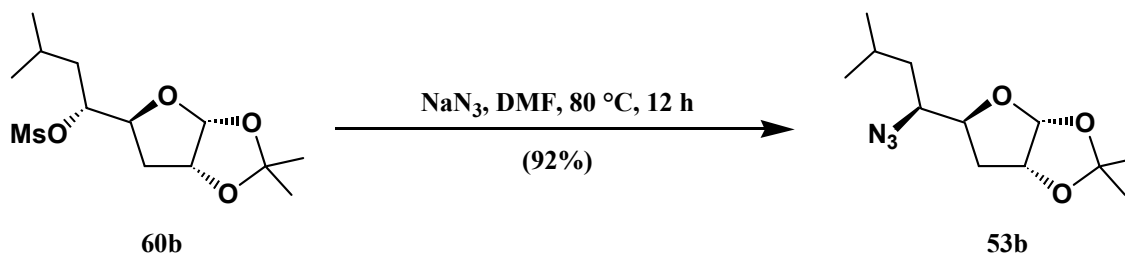
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.96 (d, 6H, $J=6.9$ Hz, 2 x CH_3); 1.25-1.38 (m, 1H, H-6); 1.33 (s, 3H, CH_3); 1.51 (s, 3H, CH_3); 1.57-1.96 (m, 3H, H-3 + H-6 + H-7); 2.07 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.7$ Hz, $J_{3,3}=13.2$ Hz, H-3); 3.05 (s, 3H, CH_3); 4.28 (ddd, 1H, $J_{4,5}=2.8$ Hz, $J_{3,4}=4.7$ Hz, $J_{3,4}=10.7$ Hz, H-4); 4.75-4.78 (m, 1H, H-2); 4.96-5.02 (m, 1H, H-5); 5.78 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.7 (CH_3); 23.1 (CH_3); 24.1 (CH); 26.0 (CH_3); 26.7 (CH_3); 32.1 (CH_2); 38.6 (CH_3); 40.9 (CH_2); 79.0 (CH); 80.0 (CH); 80.5 (CH); 105.0 (CH); 111.5 (C).

EM-IQ (m/z , %): 309 (1, MH^+); 213 (62, $[\text{M} - \text{CH}_3\text{SO}_3]^+$); 30 (100).



Preparación de la 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden- β -L-idofuranosa (53b).



Partiendo de 0.76 g (2.47 mmoles) de la 3,6-dideoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-5-O-metanosulfonil- α -D-glucofuranosa (**60b**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **28b** (pág. 102), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:11), 0.58 g (2.27 mmoles, 92 %) de la 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden- β -L-idofuranosa (**53b**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -46.8° (c 1.5, CHCl_3).

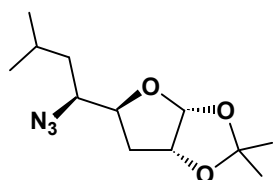
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.92-0.97 (m, 6H, 2 x CH_3); 1.23-1.34 (m, 1H, H-6); 1.32 (s, 3H, CH_3); 1.51 (s, 3H, CH_3); 1.61-1.85 (m, 3H, H-3 + H-6 + H-7); 2.06 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.4 \text{ Hz}$, $J_{3,3}=13.2 \text{ Hz}$, H-3); 3.17-3.25 (m, 1H, H-5); 4.18-4.26 (m, 1H, H-4); 4.73-4.77 (m, 1H, H-2); 5.83 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8 \text{ Hz}$, H-1).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.3 (CH_3); 23.1 (CH_3); 24.8 (CH); 26.0 (CH_3); 26.7 (CH_3); 35.6 (CH_2); 39.6 (CH_2); 61.6 (CH); 80.2 (CH); 80.5 (CH); 105.3 (CH); 111.2 (C).

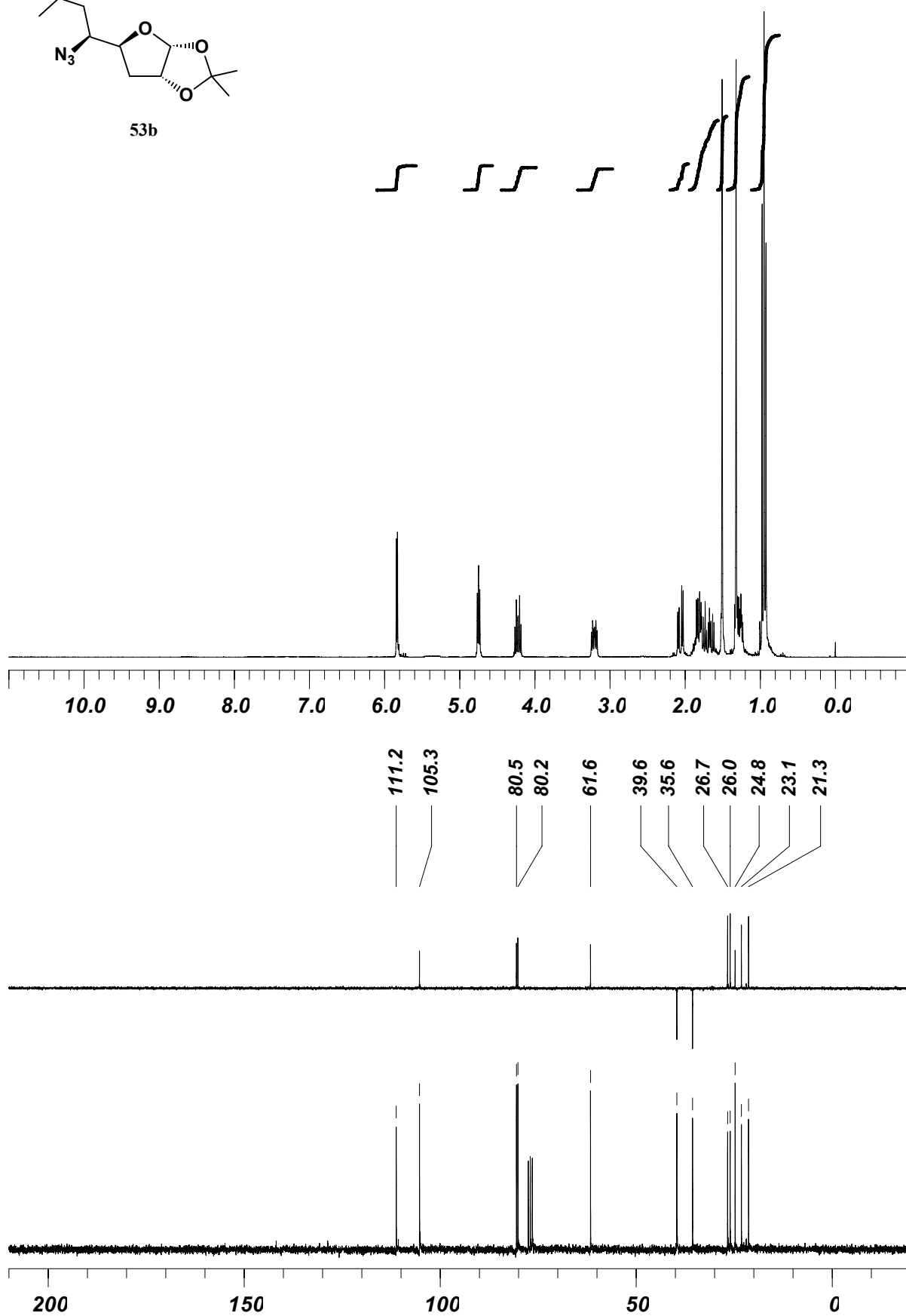
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2111 (f, N_3).

EM-IQ (m/z , %): 257 (1, MH_2^+); 17 (100).

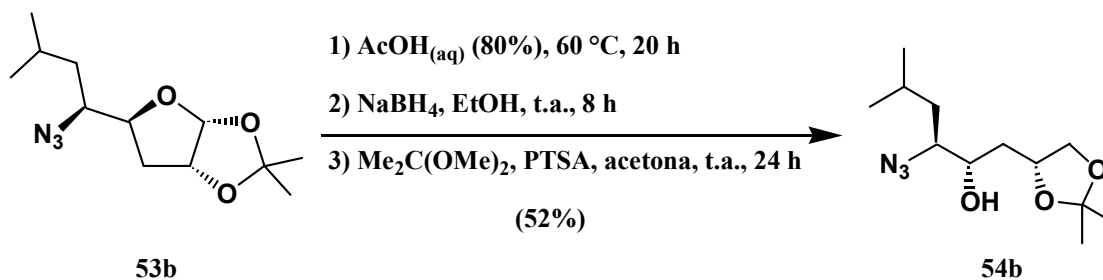
Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$: C 56.45, H 8.29, N 16.46; encontrado C 56.76, H 8.56, N 16.57.



53b



Preparación del 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-L-itol (54b).



Se hicieron reaccionar 0.28 g (1.11 mmoles) de la 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden- β -L-idofuranosa (**53b**) bajo las condiciones de reacción descrito para la preparación de **54a** (pág. 158), obteniendo tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), 0.15 g (0.58 mmoles, 52%) del 5-azido-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-L-itol (**54b**), como un aceite naranja. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -8.2° (c 0.8, CHCl_3).

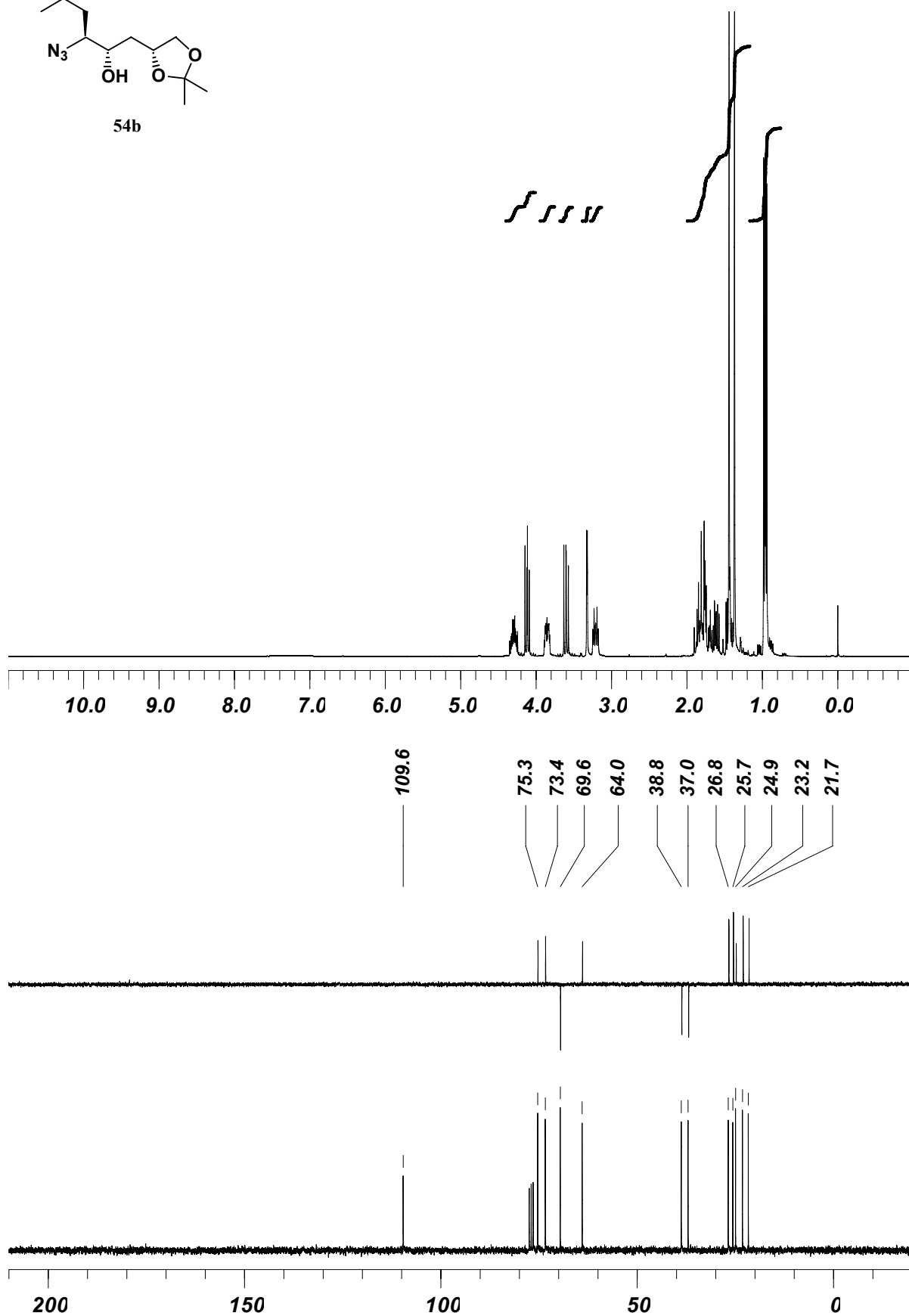
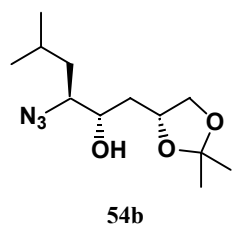
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.94-0.98 (m, 6H, 2 x CH_3); 1.37 (s, 3H, CH_3); 1.39-1.48 (m, 1H, H-7); 1.44 (s, 3H, CH_3); 1.57-1.90 (m, 4H, 2 x H-3 + 2 x H-6); 3.17-3.25 (m, 1H, H-5); 3.32 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}}=2.1$ Hz, OH); 3.60 (dd, 1H, $J_{1,2}=7.3$ Hz, $J_{1,1}=8.2$ Hz, H-1); 3.82-3.89 (m, 1H, H-4); 4.12 (dd, 1H, $J_{1,2}=6.1$ Hz, $J_{1,1}=8.2$ Hz, H-1); 4.25-4.35 (m, 1H, H-2).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.7 (CH_3); 23.2 (CH_3); 24.9 (CH); 25.7 (CH_3); 26.8 (CH_3); 37.0 (CH_2); 38.8 (CH_2); 64.0 (CH); 69.6 (CH_2); 73.4 (CH); 75.3 (CH); 109.6 (C).

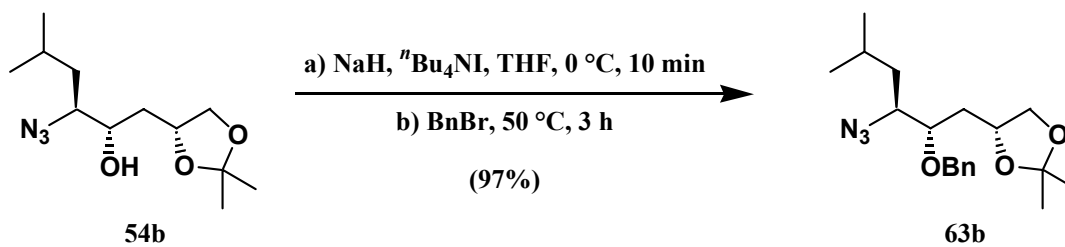
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3475 (a, OH); 2108 (f, N_3).

EM-IQ (m/z , %): 157 (1, $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^+$); 101 (27, $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2]^+$); 41 (100).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$: C 56.01, H 9.01, N 16.33; encontrado C 56.13, H 8.87, N 16.58.



Preparación del 5-azido-4-benciloxi-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-L-itol (63b).



Sometiendo 0.21 g (0.80 mmoles) del 5-azido-3,5,6-trideoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-L-itol (**54b**) al procedimiento descrito para la preparación de **63a** (pág. 160), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:11), 0.27 g (0.78 mmoles, 97%) del 5-azido-4-O-bencil-3,5,6-trideoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-L-itol (**63b**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_D^{20}$: -20.9° (c 2.1, CHCl₃).

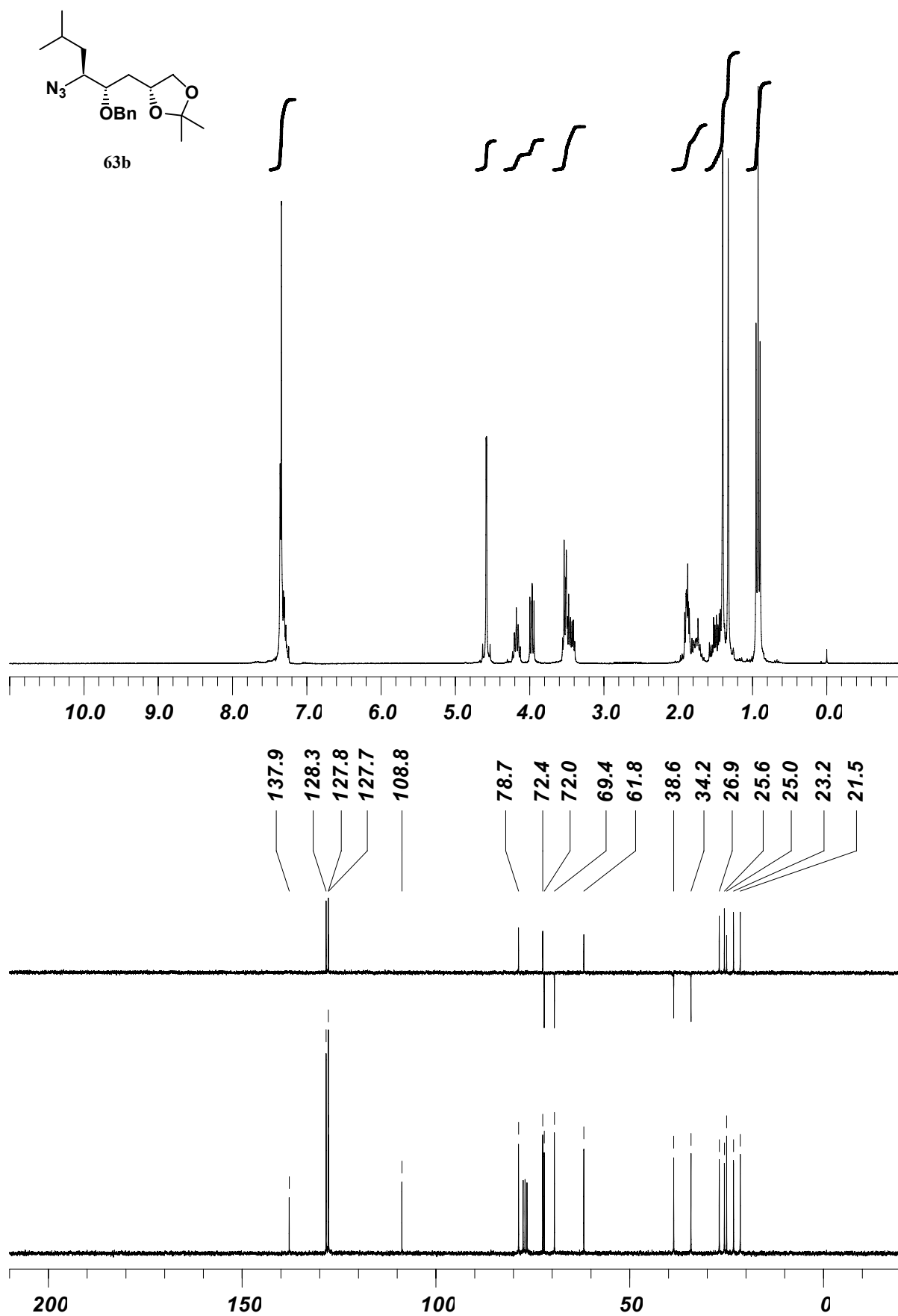
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.90-0.95 (m, 6H, 2 x CH₃); 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.35-1.58 (m, 2H, H-6 + H-7); 1.40 (s, 3H, CH₃); 1.68-1.91 (m, 3H, 2 x H-3 + H-6); 3.39-3.56 (m, 3H, H-1 + H-4 + H-5); 3.96 (dd, 1H, $J_{1,2}=6.1$ Hz, $J_{1,1}=7.9$ Hz, H-1); 4.12-4.23 (m, 1H, H-2); 4.55 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂-Ph); 4.60 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂-Ph); 7.34-7.36 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 21.5 (CH₃); 23.2 (CH₃); 25.0 (CH); 25.6 (CH₃); 26.9 (CH₃); 34.2 (CH₂); 38.6 (CH₂); 61.8 (CH); 69.4 (CH₂); 72.0 (CH₂); 72.4 (CH); 78.7 (CH); 108.8 (C); 127.7 (CH); 127.8 (2 x CH); 128.3 (2 x CH); 137.9 (C).

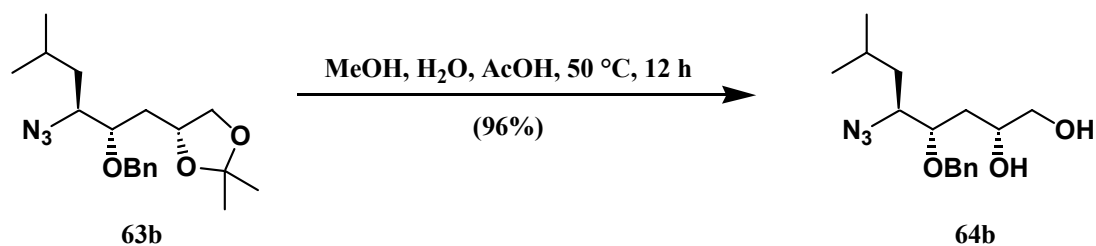
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2107 (f, N₃).

EM-IQ (m/z , %): 348 (10, MH⁺); 320 (100, [MH - N₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₂₉N₃O₃: C 65.68, H 8.41, N 12.09; encontrado C 65.61, H 8.50, N 12.25.



Preparación del 5-azido-4-O-bencil-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-L-itol (64b).



Partiendo de 0.27 g (0.77 mmoles) del 5-azido-4-O-bencil-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-1,2-O-isopropiliden-L-itol (**63b**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **64a** (pág. 162), se obtuvieron tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:1.2), 0.23 g (0.74 mmoles, 96%) del 5-azido-4-O-bencil-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-L-itol (**64b**), como un aceite naranja. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -31.7° (c 0.8, CHCl_3).

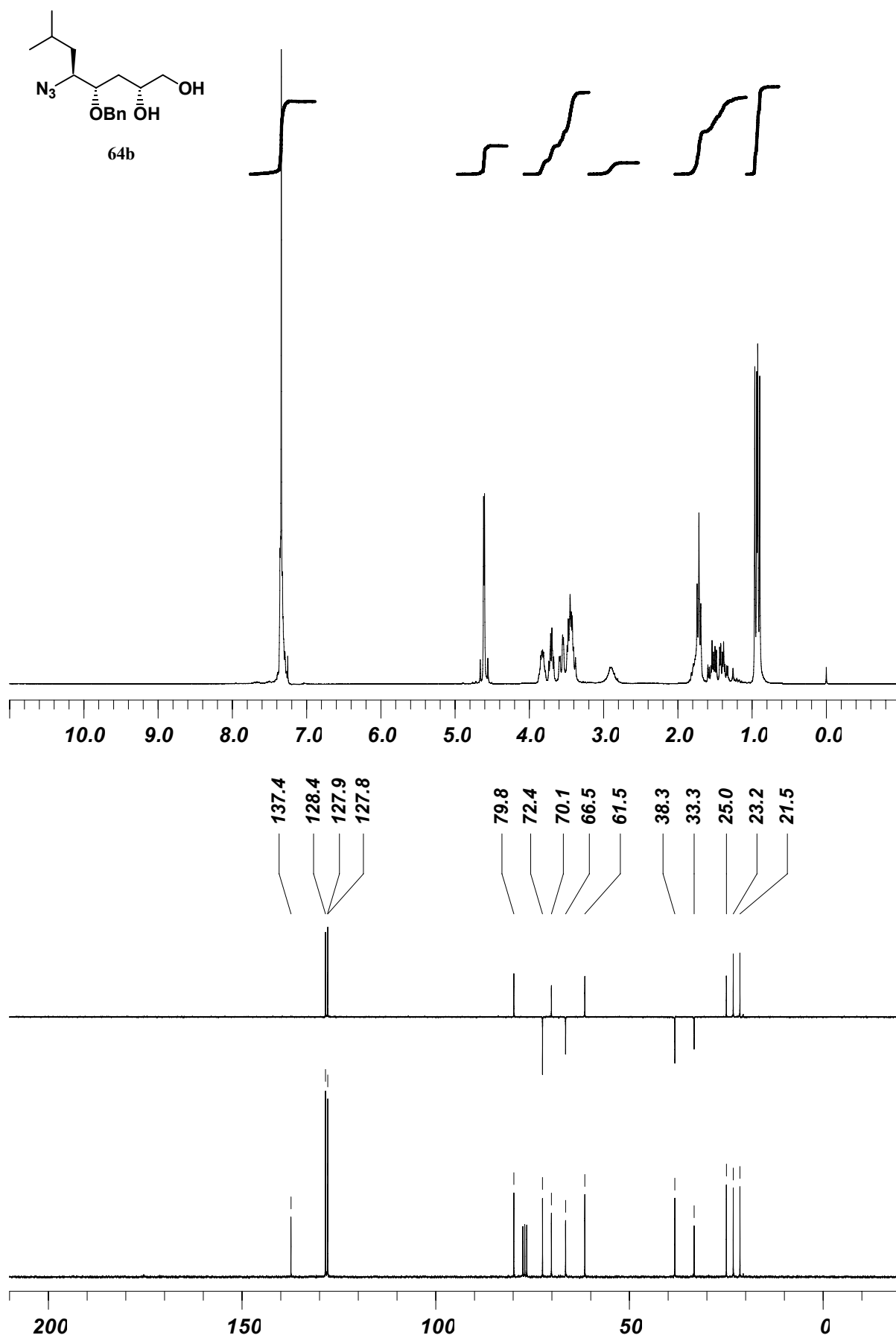
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.90-0.96 (m, 6H, 2 x CH_3); 1.33-1.60 (m, 2H, 2 x H-6); 1.69-1.74 (m, 3H, 2 x H-3 + H-7); 2.90 (sa, 1H, OH); 3.38-3.87 (m, 6H; OH + 2 x H-1 + H-2 + H-4 + H-5); 4.58 (d, 1H, $J=11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.64 (d, 1H, $J=11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 7.29-7.36 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.5 (CH_3); 23.2 (CH_3); 25.0 (CH); 33.3 (CH_2); 38.3 (CH_2); 61.5 (CH); 66.5 (CH_2); 70.1 (CH); 72.4 (CH_2); 79.8 (CH); 127.8 (2 x CH); 127.9 (CH); 128.4 (2 x CH); 137.4 (C).

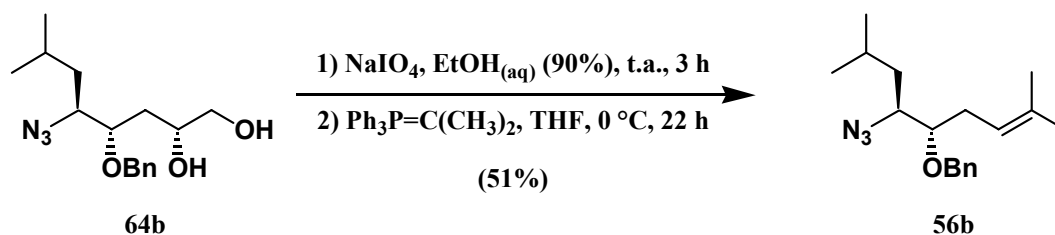
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3407 (a, OH); 2106 (f, N_3).

EM-IQ (m/z , %): 308 (11, MH^+); 280 (100, $[\text{MH} - \text{N}_2]^+$); 91 (41, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$: C 62.52, H 8.20, N 13.67; encontrado C 62.49, H 8.14, N 13.37.



Preparación del (5S,6S)-6-azido-5-benciloxi-2,8-dimetilnon-2-eno (56b).



0.24 g (0.77 mmoles) del 5-azido-4-*O*-bencil-3,5,6-tridesoxi-6-isopropil-L-itol (**64b**) se transformaron siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **56a** (pág. 164), tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:50), en 0.12 g (0.39 mmoles, 51%) del (5S,6S)-6-azido-5-benciloxi-2,8-dimetilnon-2-eno (**56b**), que se obtuvo como un aceite transparente. $[\alpha]_{\text{D}^{20}}$: +2.7° (c 1.4, CHCl_3).

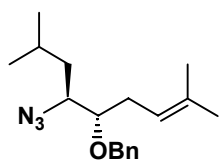
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.87-0.93 (m, 6H, 2 x CH_3); 1.21-1.61 (m, 3H, 2 x H-7 + H-8); 1.64 (s, 3H, CH_3); 1.71 (s, 3H, CH_3); 2.30-2.40 (m, 2H, 2 x H-4); 3.24-3.40 (m, 2H, H-5 + H-6); 4.54 (d, 1H, $J=11.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.68 (d, 1H, $J=11.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 5.09-5.17 (m, 1H, H-3); 7.26-7.36 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 17.9 (CH_3); 21.7 (CH_3); 23.2 (CH_3); 25.0 (CH); 25.8 (CH_3); 29.6 (CH_2); 39.1 (CH_2); 62.1 (CH); 72.2 (CH_2); 81.3 (CH); 119.2 (CH); 127.6 (CH); 127.8 (2 x CH); 128.3 (2 x CH); 134.4 (C); 138.3 (C).

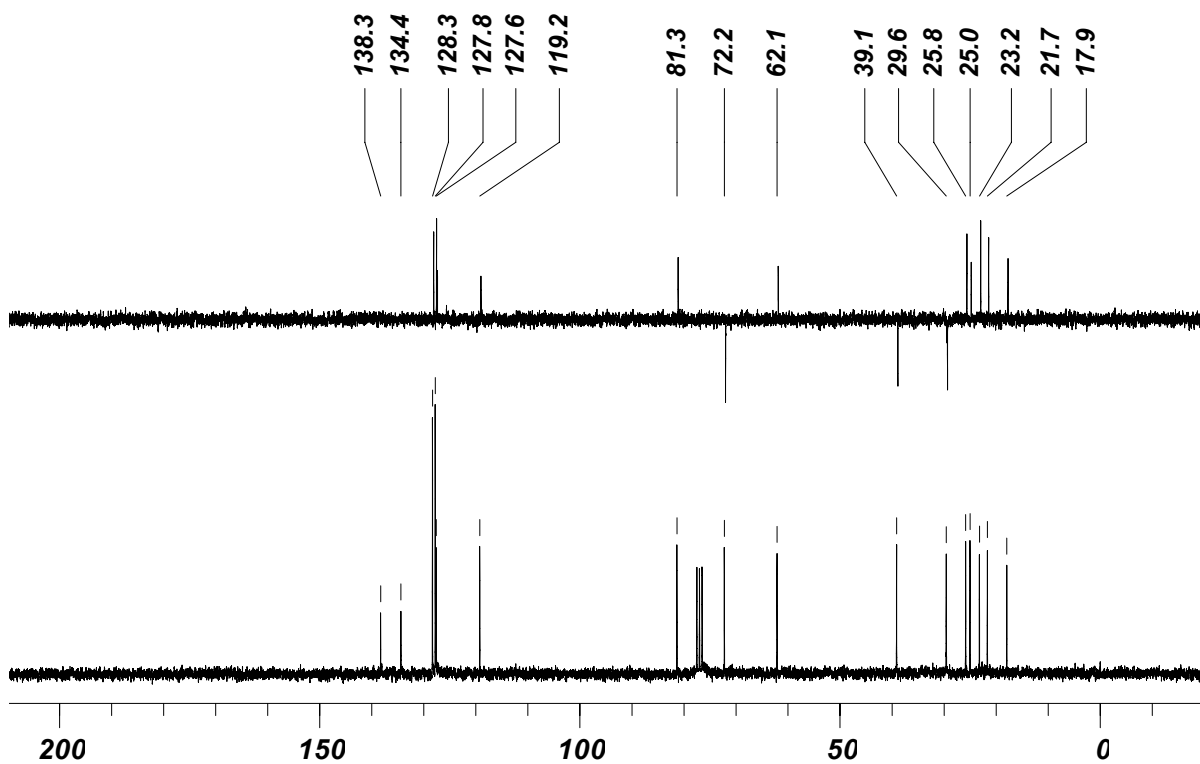
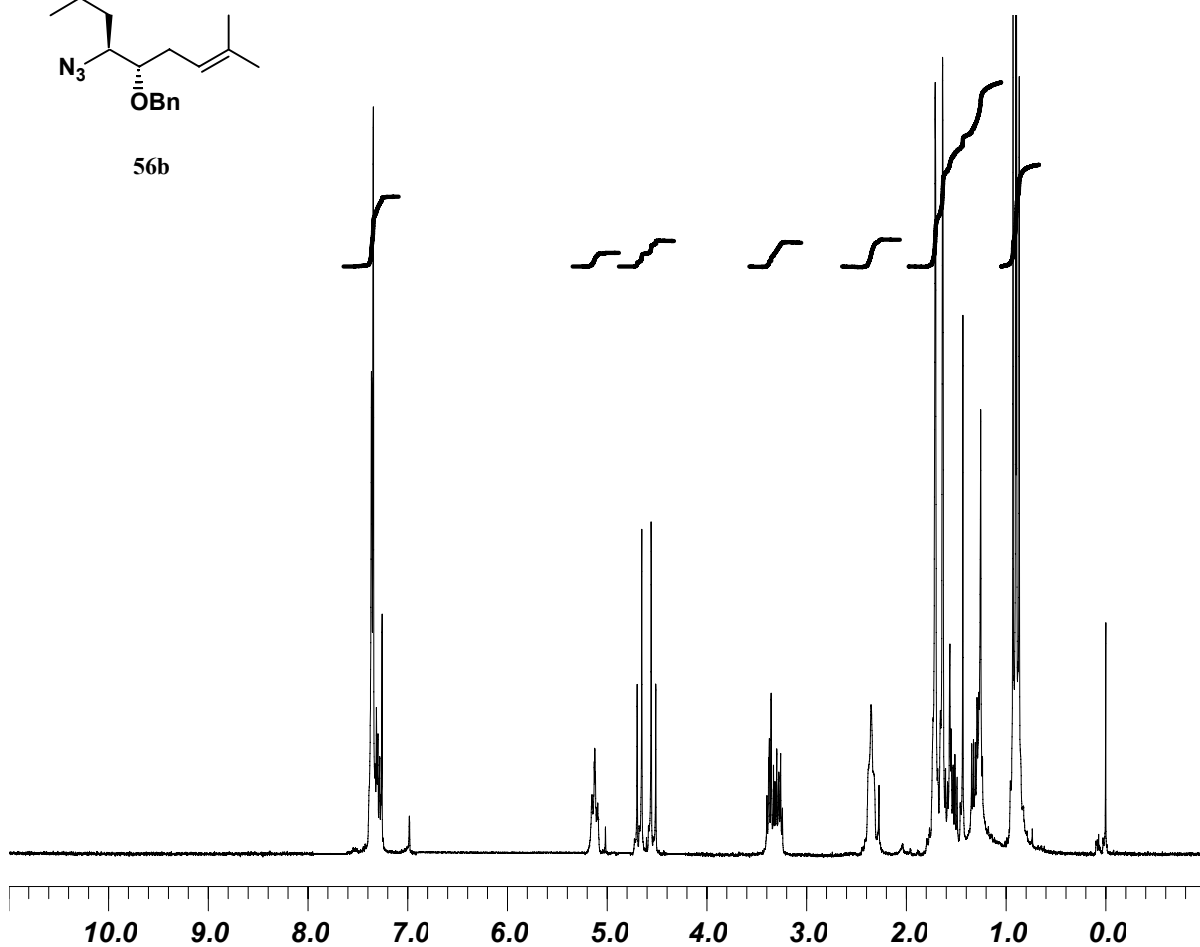
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2105 (f, N_3).

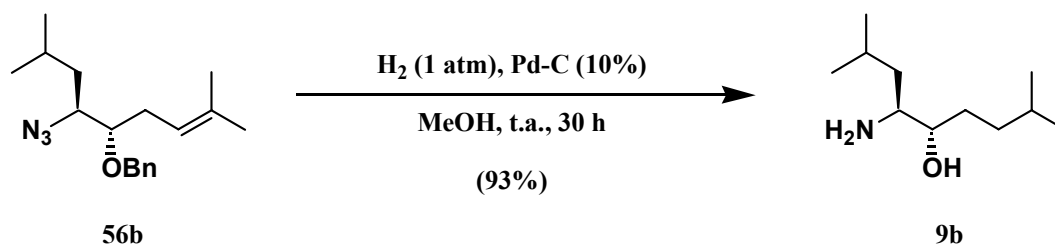
EM (m/z , %): 302 (10, MH^+); 274 (62, $[\text{MH} - \text{N}_2]^+$); 91 (100, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$: C 71.72, H 9.03, N 13.94; encontrado C 71.97, H 9.28, N 13.70.



56b



Preparación del (5*S*,6*S*)-6-amino-2,8-dimetilnonan-5-ol (**9b**).

La hidrogenación de 0.11 g (0.36 mmoles) del (5*S*,6*S*)-6-azido-5-benciloxi-2,8-dimetilnon-2-eno (**56b**) en las condiciones de reacción descritas para la preparación de **9a** (pág. 166), nos permitió obtener 0.06 g (0.33 mmoles, 93%) del (5*S*,6*S*)-6-amino-2,8-dimetilnonan-5-ol (**9b**) como un aceite transparente espectroscópicamente puro. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -21.0° (c 0.4, CHCl_3).

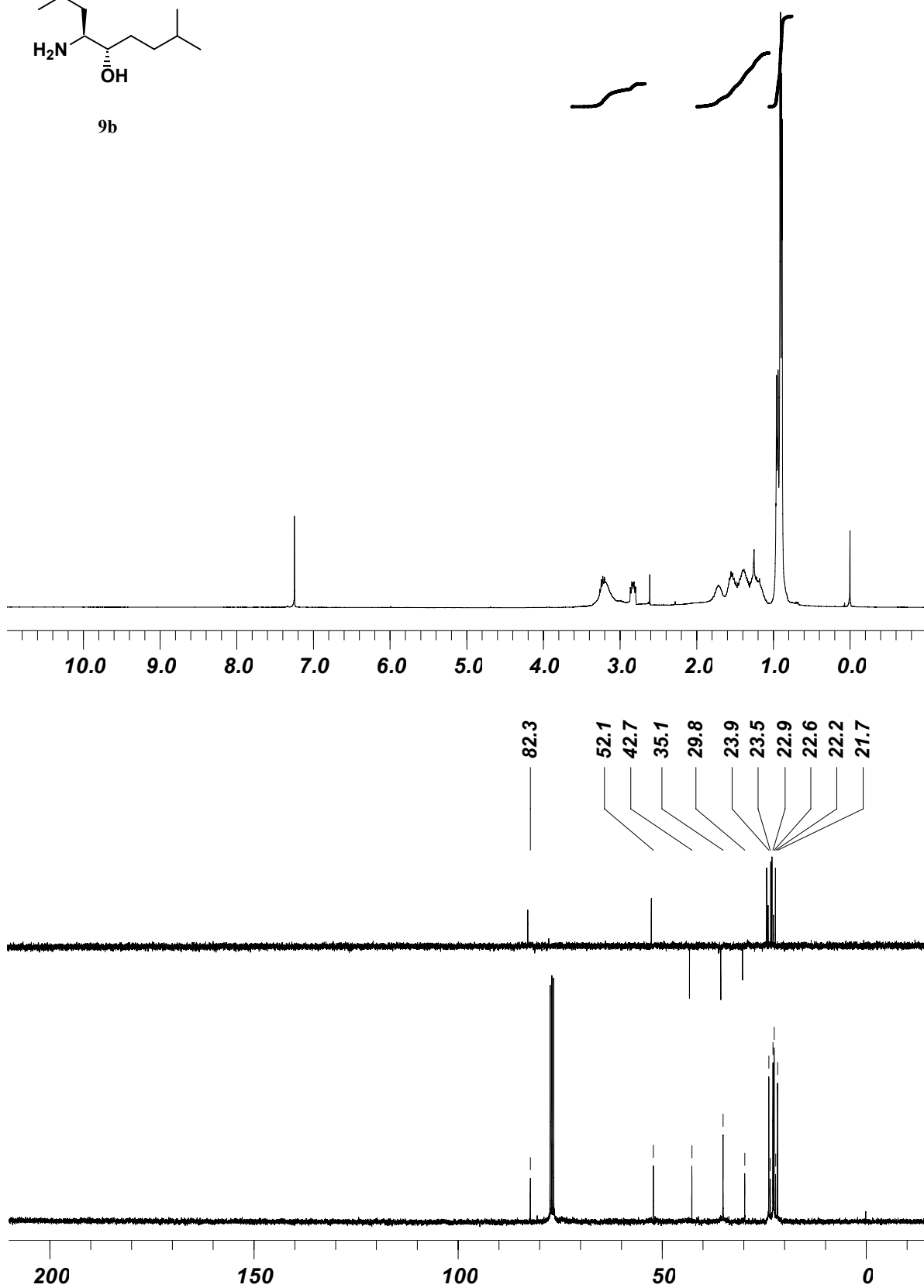
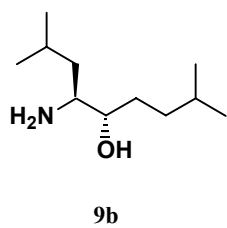
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 0.86-0.97 (m, 12H, 4 x CH_3); 1.07-1.80 (m, 8H, H-2 + 2 x H-3 + 2 x H-4 + 2 x H-7 + H-8); 2.80-2.87 (m, 1H, H-6); 3.05-3.33 (m, 3H, NH_2 + H-5).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 21.7 (CH_3); 22.2 (CH); 22.6 (CH_3); 22.9 (CH_3); 23.5 (CH); 23.9 (CH_3); 29.8 (CH_2); 35.1 (CH_2); 42.7 (CH_2); 52.1 (CH); 82.3 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3326 (a, OH + NH_2).

EM-IQ (m/z , %): 188 (1, MH^+); 171 (3, $[\text{M} - \text{OH}]^+$); 47 (100).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{NO}$: C 70.53, H 13.45, N 7.48; encontrado C 70.08, H 13.78, N 7.41.



Procedimiento para la valoración de los péptidos 1, 2, 3 y 4 frente a la enzima β -secretasa.

La valoración de la actividad de los péptidos obtenidos frente a la β -secretasa, se realizó añadiendo una disolución de la enzima sobre una disolución del péptido fluorescente sustrato junto a uno de los inhibidores. La emisión de fluorescencia debida a la concentración de péptido sustrato hidrolizado (sólo emite fluorescencia cuando está hidrolizado) es proporcional a la actividad del inhibidor. Inhibidores muy activos, no permiten que la enzima lleve a cabo su acción peptidasa con lo que no hay aumento de fluorescencia por parte de la muestra. Dado que se relacionó el porcentaje de inhibición con la fluorescencia emitida por la muestra, comprobamos primero que la emisión de fluorescencia y el porcentaje de péptido hidrolizado mantengan una relación lineal y hasta que valores se cumple esta linealidad.

Para ello, se prepararon las disoluciones de los reactivos con el material suministrado en el kit de ensayos.

- Se diluyeron 40 μ L de la disolución partida inicial de [75 μ M] del péptido sustrato con 3960 μ L de la *disolución tampón*, obteniendo así una disolución de péptido sustrato (*sustrato BACE1*) de [750 nM].

- Se disolvieron 5 unidades de enzima en 5 mL de la *disolución tampón*, obteniendo así una disolución de enzima (*enzima BACE1*) de [1 U/mL].

- Se diluyeron 10 μ L de la disolución de producto estándar de reacción de [25 μ M] con 323 μ L de disolución tampón, obteniendo así una disolución de producto (*producto BACE1*) de [750 nM].

- Se mezclaron 100 μ L de disolución *producto BACE1*, 200 μ L de disolución *sustrato BACE1* y 600 μ L de *disolución tampón*; para obtener así una disolución del 33.3% del sustrato hidrolizado (33.3% *producto de hidrólisis*).⁷³

- Se disolvieron los péptidos **OM99-2, 1, 2, 3 y 4** en los volúmenes necesarios de disolución tampón para obtener disoluciones de inhibidores (*péptido X BACE1*) de [20 μ M].

Según el kit de ensayos, todas estas concentraciones son las adecuadas cuando se utiliza un espectrofluorímetro capaz de detectar rodamina en

⁷³ Esta disolución de concentraciones [166.7 nM] de péptido sustrato y [83.3 nM] de péptido hidrolizado simula la fluorescencia emitida cuando transcurre el 33.3% de la hidrólisis en una disolución de concentración inicial [250 nM] de péptido sustrato. Se empleará el 33.3% de hidrólisis como porcentaje máximo para medir la fluorescencia emitida por la mezcla, ya que a mayores porcentajes de reacción se pierde la linealidad y la alta sensibilidad del detector empleado nos permite trabajar a valores pequeños.

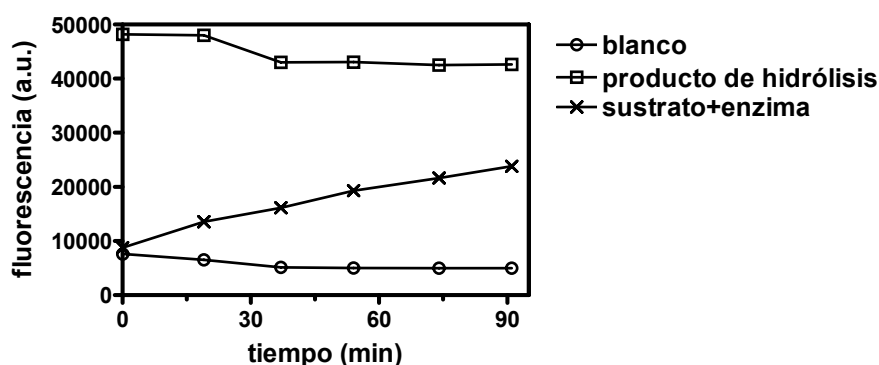
concentraciones [1 nM]; si el espectrofluorímetro fuese menos sensible, sería necesario duplicar la concentración de la disolución *sustrato BACE1*.

Se consideró que la relación entre el porcentaje de hidrólisis y la emisión de fluorescencia se mantiene lineal hasta un 10% de hidrólisis del sustrato inicial. Por lo tanto, fue necesario comprobar que se mantenía esta relación de linealidad y conocer el tiempo necesario para que la enzima llevase a cabo ese porcentaje de hidrólisis.

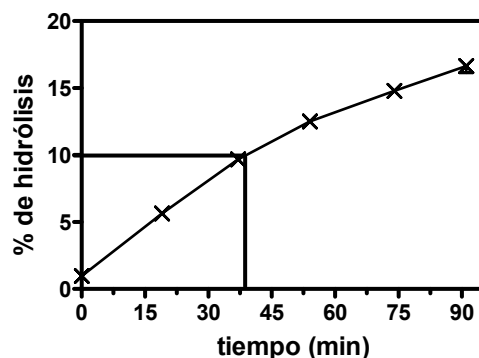
Para ello se realizó primero una cinética de la hidrólisis del péptido sustrato, por medio de las siguientes medidas en una placa de pocillo opaco (cada medida se realizó por duplicado):

- En un pocillo denominado **blanco** se añadieron 10 μL de *sustrato BACE1* y 20 μL de *disolución tampón*.
- En un pocillo denominado **producto de hidrólisis** se añadieron 30 μL de 33.3% *producto de hidrólisis*.
- En un pocillo denominado **sustrato+enzima** se añadieron 10 μL de *sustrato BACE1*, 10 μL de *disolución tampón* y 10 μL de *enzima BACE1*.

Se llevó la placa al espectrofluorímetro (temperatura ambiente, longitud de onda de excitación de 545 nm y detector leyendo a 585 nm) y se realizaron medidas de la fluorescencia emitida durante 90 minutos. Los resultados obtenidos se representaron en la siguiente gráfica, en la que observamos el aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo en el pocillo denominado **sustrato+enzima**.



Se relacionó el aumento de fluorescencia (F_H) observado en el pocillo **sustrato+enzima** con el porcentaje de hidrólisis del péptido sustrato por medio de la siguiente ecuación: $\% \text{ de hidrólisis} = [(F_H - F_B)/(F_P - F_B)] * 33.3$, considerando que el pocillo **blanco** representa un 0% de hidrólisis (F_B), y el pocillo **producto de hidrólisis** representa el 33.3% de sustrato hidrolizado (F_P). Con los valores de % de hidrólisis obtenidos a lo largo del tiempo se elaboró la siguiente gráfica:



En esta gráfica observamos que en las condiciones de trabajo empleadas, la cinética de hidrólisis mantiene un rango lineal hasta porcentajes aproximados del 10% de hidrólisis, los cuales se logran con tiempos de reacción de 35 minutos. Por lo tanto fijamos 35 minutos como el tiempo medio para llevar a cabo la lectura del resto de los ensayos.

El siguiente experimento realizado consistió en la medición del porcentaje de inhibición de cada uno de los péptidos disponibles (**OM99-2, 1, 2, 3 y 4**). Para ello, en placas de pocillo opaco se realizaron las siguientes mezclas por duplicado para cada péptido.

- En un pocillo denominado **blanco** se añadieron 10 μ L de *sustrato BACE1*, 10 μ L de *péptido X BACE1* y 10 μ L de *disolución de stop*⁷⁴.
- En un pocillo denominado **control** se añadieron 10 μ L de *sustrato BACE1* y 10 μ L de *disolución tampón*.
- En un pocillo denominado **inhibición** se añadieron 10 μ L de *sustrato BACE1* y 10 μ L de *péptido X BACE1*.

Después, se añadieron en todos los pocillos 10 μ L de *enzima BACE1* y se incubaron en la oscuridad durante 35 minutos a temperatura ambiente, de modo que tuvo lugar la reacción enzimática en cada uno de ellos (excepto en el **blanco**, en el que la adicción de la *disolución de stop* al principio impide que ésta tenga lugar). Al cabo de los 35 minutos se añadieron en todos los pocillos menos en el **blanco** 10 μ L de *disolución de stop*, con lo que se pararon todas las reacciones y se midió la fluorescencia de cada muestra (la fluorescencia es estable por un tiempo de hasta 24 horas, aunque es recomendable medirla inmediatamente). El valor del porcentaje de inhibición de cada péptido se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - \{(F_I - F_B)/(F_C - F_B)\}] * 100$$

siendo F_I , F_B y F_C los valores de fluorescencia medidos para los pocillos **inhibición**, **blanco** y **control** respectivamente.

⁷⁴ Disolución empleada para detener la reacción de hidrólisis del sustrato por la enzima.

Se obtuvieron así los siguientes porcentajes de inhibición:

Nº de péptido	Secuencia	% de inhibición
OM99-2	Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe	95.85±2.91
1	Glu-Val-Asn-Leu*Val-Ala-Glu-Phe	91.39±5.98
2	Gln-Ile-Asp-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe	90.49±3.69
3	Glu-Val-His-Leu*Leu-Tyr-Glu-Phe	69.65±5.95
4	His-Pro-Phe-His-Leu*Leu-Tyr-Tyr-Ser	16.79±2.89

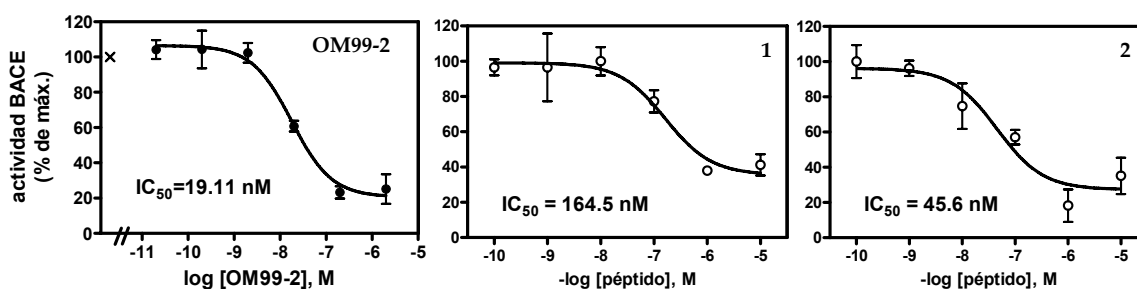
Por último, para los péptidos que dieron mayores porcentajes de inhibición (OM99-2, 1 y 2) se calcularon sus IC₅₀. Para ello, se realizaron curvas de relación concentración-respuesta en las que se representaron valores de % de actividad de la enzima frente a concentración de péptido inhibidor empleado. Las concentraciones a las que se va a medir la actividad de cada uno de los péptidos inhibidores variaron desde [10 µM] hasta [10 nM], obtenidas por sucesivas diluciones de la disolución de partida de [20 µM].

Las medidas se llevaron a cabo del mismo modo que las realizadas en la medición del porcentaje de inhibición, realizando por duplicado cada medida de emisión de fluorescencia para cada valor de concentración de cada péptido inhibidor.

Por medio de la ecuación:

$$\% \text{ actividad} = \left[\frac{(F_I - F_B)}{(F_C - F_B)} \right] * 100$$

se calculó la actividad de la enzima en cada ensayo y con el software GraphPad Prism® se construyeron las siguientes gráficas concentración-respuesta y se calculó el IC₅₀ para cada inhibidor.



Se obtuvieron así valores de IC₅₀ de 19.11 nM para el inhibidor OM99-2, 164.5 nM para el inhibidor 1 y 45.6 nM para el inhibidor 2.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado una nueva síntesis de ácidos 2,5-dialquil-5-amino-4-hidroxipentanoicos a partir de la D-glucono-1,5-lactona, que simplifica y acorta una síntesis previa similar de preparación de estos δ -aminoácidos a partir de la D-manosa. Ello permitió sintetizar por primera vez a partir de hidratos de carbono los compuestos siguientes: el ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-2-isopropilhexanoico, el ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isopropil-7-metiloctanoico, el ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2,7-dimetiloctanoico y el ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isobutil-7-metiloctanoico.

2. Se trata de una estrategia de síntesis de ácidos 2,5-dialquil-5-amino-4-hidroxipentanoicos de mayor alcance que la aproximación previa de síntesis de estos compuestos a partir de α -aminoácidos, mediante la cual fueron preparados previamente tres de nuestros δ -aminoácidos: el ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isopropil-7-metiloctanoico, el ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2,7-dimetiloctanoico y el ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isobutil-7-metiloctanoico.

3. Se ha desarrollado la primera síntesis de un 1,4-dialquil-1-aminobutan-2-ol (el (5*S*,6*S*)-6-amino-7-ciclohexil-2-metilheptan-5-ol), a partir de la D-glucosa, mediante una estrategia sintética novedosa, que también permitió preparar por primera vez a partir de un hidrato de carbono (la D-glucosa) un 1,4-dialquil-1-aminobutan-2-ol (el (5*S*,6*S*)-6-amino-2,8-dimetilnonan-5-ol), previamente obtenido a partir de L-leucina.

4. Los cuatro ácidos 2,5-dialquil-5-amino-4-hidroxipentanoicos recogidos en la conclusión primera permitieron preparar los cinco péptidos novedosos siguientes (el * denota al isómero de hidroxietileno):

El ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-6-ciclohexil-2-isopropilhexanoico se incorporó en el péptido Glu-Val-Glu-Cy*Val-Arg-Glu-Phe.

El ácido (2*S*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isopropil-7-metiloctanoico se incorporó en el péptido Glu-Val-Asn-Leu*Val-Ala-Glu-Phe.

El ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2,7-dimetiloctanoico se incorporó en el péptido Gln-Ile-Asp-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe.

El ácido (2*R*,4*S*,5*S*)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(*t*-butoxicarbonilamino)-2-isobutil-7-metiloctanoico se incorporó en el péptido Glu-Val-His-Leu*Leu-Tyr-Glu-Phe y en el péptido His-Pro-Phe-His-Leu*Leu-Tyr-Tyr-Ser.

5. Los dos 1,4-dialquil-1-aminobutan-2-oles de la conclusión tercera permitieron preparar los dos péptidos siguientes:

El (5*S*,6*S*)-6-amino-7-ciclohexil-2-metilheptan-5-ol se incorporó en el péptido Glu-Val-Asn-Cy*Val.

El (5*S*,6*S*)-6-amino-2,8-dimetilnonan-5-ol se incorporó en el péptido Glu-Val-Asn-Leu*Val.

6. Se evaluó la capacidad de inhibición de la β -secretasa de cuatro de los péptidos de la conclusión cuarta tomando como inhibidor de referencia el **OM99-2** (Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe), encontrándose que todos ellos poseen capacidades de inhibición inferiores a las de éste, como se indica en la tabla siguiente:

<i>Nº de péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>% de inhibición</i>	<i>IC₅₀ (nM)</i>
OM99-2	Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe	95.85±2.91	19.11
1	Glu-Val-Asn-Leu*Val-Ala-Glu-Phe	91.39±5.98	164.5
2	Gln-Ile-Asp-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe	90.49±3.69	45.5
3	Glu-Val-His-Leu*Leu-Tyr-Glu-Phe	69.65±5.95	
4	His-Pro-Phe-His-Leu*Leu-Tyr-Tyr-Ser	16.79±2.89	

PARTE II

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS DERIVADOS DE NITROAZÚCARES

1. INTRODUCCIÓN.....	195
2. OBJETIVOS.....	231
3. PARTE TEÓRICA.....	239
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	347
5. CONCLUSIONES.....	487

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El grupo nitro y su química.⁷⁵

En Química Orgánica el átomo de nitrógeno es, después de los de carbono, hidrógeno y oxígeno, el elemento más abundante. Su forma más representativa es el grupo amino, el cual está presente en biomoléculas imprescindibles para el desarrollo de los seres vivos (aminoácidos, nucleósidos, vitaminas, alcaloides, neurotransmisores, coenzimas,...). En estos compuestos el nitrógeno se encuentra en sus estados de oxidación más bajos, formando aminas (R_3N), sales de amonio (R_4N^+), iminas ($R-N=R$), amidas ($R_2NC=OR$) o nitrilos ($RC\equiv N$). El tipo de enlace que prevalece en estos grupos es el nitrógeno-carbono o nitrógeno-hidrógeno. También se conocen, aunque en menor medida, compuestos en los que el átomo de nitrógeno está unido a átomos de oxígeno, formando así hidroxilaminas (R_2N-OH), nitrosoderivados ($R-NO$) o nitroderivados ($R-NO_2$). El grupo nitro es el grupo funcional nitrogenado con mayor estado de oxidación (+IV), razón por la que provoca importantes cambios electroquímicos sobre los centros a los que está unido. Su estructura se representa por medio de los híbridos de resonancia recogidos en la siguiente figura.

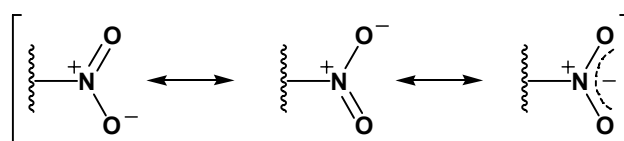


Figura 38: Híbridos de resonancia del grupo nitro.

Como vemos, se puede considerar al grupo nitro como un sistema zwitteriónico en el que la carga negativa está distribuida entre los dos oxígenos, portando el átomo de nitrógeno la carga positiva. Este hecho implica que el átomo de carbono al que permanezca directamente unido el grupo nitro experimenta un gran efecto de retirada de carga electrónica (observable por RMN), lo cual ocasionará que tenga un comportamiento químico especial.

Por lo general, los nitroalcanos simples son líquidos incoloros con momentos dipolares y puntos de ebullición altos (nitrometano, p.eb. 102 °C, $\mu=3.5$ D) y miscibles en la mayoría de los disolventes orgánicos. Los más sencillos son utilizados como combustibles de gran potencia (nitrometano) y los derivados orgánicos se emplean como explosivos (2,4,6-trinitrotolueno, nitroglicerina,...).

⁷⁵ Ono, N. "The nitro group in organic synthesis" 2001, Ed. Wiley-VCH, EUA.

Con respecto a sus propiedades espectroscópicas, el grupo nitro es detectado en los espectros de IR por sus dos fuertes bandas de absorción debidas a las tensiones simétrica y asimétrica de los enlaces N-O ($1344-1388\text{ cm}^{-1}$ y $1534-1553\text{ cm}^{-1}$); mientras que en espectrometría de masas es difícil observar el ión molecular de los nitroderivados, debido a su facilidad para experimentar fragmentaciones perdiendo átomos de oxígeno o el grupo nitro completo. En espectroscopia de RMN- ^{15}N el nitrógeno de nitroderivados suele aparecer a valores de 100-150 ppm (siendo el nitrometano la referencia interna) y en RMN- ^1H o RMN- ^{13}C , a pesar de no tener una referencia visual de la señal del nitrógeno, se puede observar su efecto en el carbono al que esté unido, produciendo en éste desplazamientos apreciables a campo bajo (los carbonos directamente unidos a un grupo nitro suelen aparecer entre 60 y 110 ppm y los protones unidos a dichos carbonos aparecen entre 4 y 5 ppm, en función del resto de sustituyentes).⁷⁶

La presencia del grupo nitro en síntesis orgánica ha experimentado un gran auge desde de los años 60, en que se empezó a investigar las aplicaciones de nitroderivados orgánicos como explosivos o propelentes. Esta investigación dio paso al descubrimiento de su alta reactividad química y su versatilidad para transformarse en diferentes grupos funcionales (Figura 39).

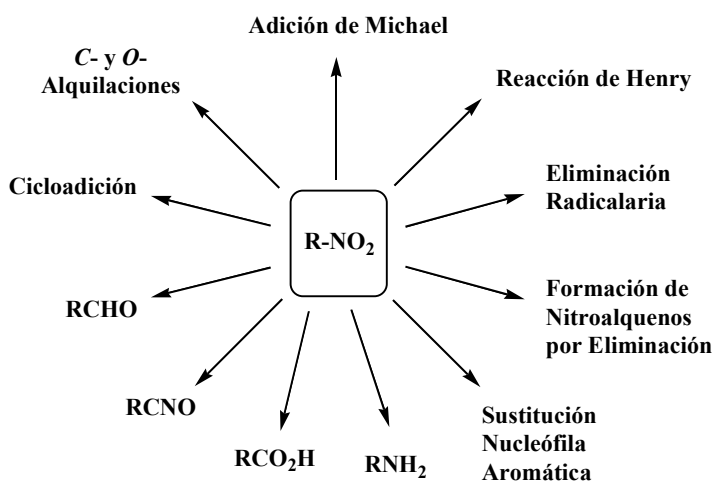


Figura 39: Reactividad de nitroderivados.

Así, un nitroderivado orgánico puede experimentar fácilmente reacciones de cicloadición de Diels-Alder, 1,3-dipolares o tándem; reacciones de C- y O-alquilación; adición de Michael cuando el grupo nitro está conjugado con un doble enlace; reacciones de Henry o nitro-aldólicas; eliminaciones radicalarias; formación

⁷⁶ Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. "Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos" Ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 1998.

de nitroalquenos por eliminación; sustituciones nucleofílicas aromáticas y transformación en multitud de grupos funcionales como aminas, ácidos carboxílicos, isocianatos, aldehídos, etc.

En cuanto a la preparación de nitroderivados, se pueden distinguir dos importantes métodos:

a) Aquellos en los que el grupo nitro se obtiene por oxidación de grupos nitrogenados (aminas, oximas, azidas, etc. entradas 1,⁷⁷ 2,⁷⁸ y 3⁷⁹ de la Figura 40).

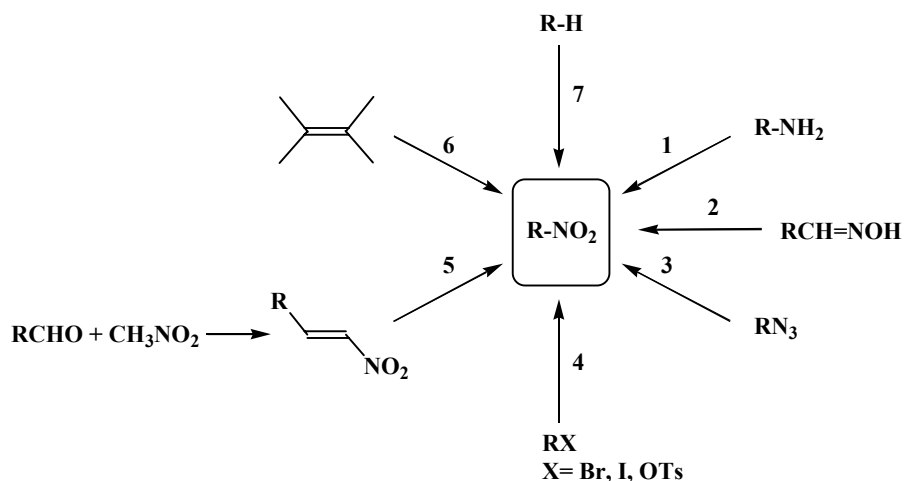


Figura 40: Formación de nitroderivados.

b) Aquellos en los que el grupo nitro se obtiene por nitración de hidrocarburos (alcanos, alquenos, hidrocarburos aromáticos, halogenuros de alquilo, alcoholes activados, compuestos carbonílicos, etc. entradas 4,⁸⁰ 5,⁸¹ 6,⁸² y 7⁸³ de la Figura 40).

⁷⁷ a) Gilbert, K. E.; Borden, W. T. "Peracid oxidation of aliphatic amines: general synthesis of nitroalkanes" *J. Org. Chem.* **1973**, *44*, 659-661. b) Bailey, P. S.; Keller, J. E. "Ozonation of amines. III. *t*-Butylamine" *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2680-2684.

⁷⁸ a) Emmons, W. D.; Pagano, A. S.; "Peroxytrifluoroacetic acid. VI. The oxidation of oximes to nitroparaffins" *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4557-4559. b) Ballini, R.; Marcantoni, E.; Petrini, M. "Synthesis of functionalized nitroalkanes by oxidation of oximes with urea-hydrogen peroxide complex and trifluoroacetic anhydride" *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4835-4838.

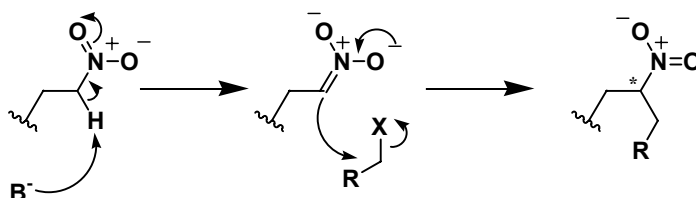
⁷⁹ Corey, E. J.; Samuelsson, B.; Luzzio, F. A. "A new method for the synthesis of organic nitro compounds" *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3682-3683.

⁸⁰ Kornblum, N.; Powers, J. W. "Synthesis of aliphatic nitro compounds" *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 455-456.

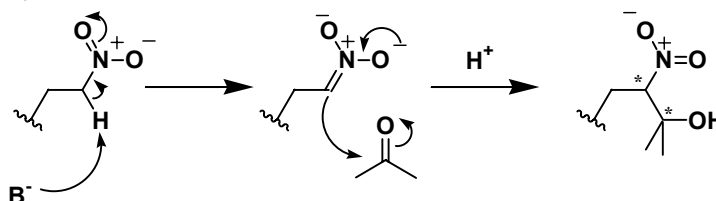
⁸¹ a) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Cossío, F. P.; García, J. M.; López, M. C.; Oiarbide, M. "Tributyltin hydride addition to nitroalkenes: a convenient procedure for the conversion of nitroalkenes into nitroalkanes and carbonyl compounds" *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2070-2078. b) Knochel, P.; Seebach, D. "Dehydration of nitroaldols with dicyclohexylcarbodiimide: preparation of nitroolefins under mild conditions" *Synthesis* **1982**, 1017-1018.

Las reacciones de C-alquilación de nitroderivados, la condensación nitroaldólica (o reacción de Henry) y la adición de Michael sobre nitroolefinas, son tres de los procesos más importantes en síntesis orgánica en los que tiene un papel fundamental la presencia de un grupo nitro (Figura 41).

C-Alquilación de nitronato :



Reacción de Henry:



Adición de Michael:

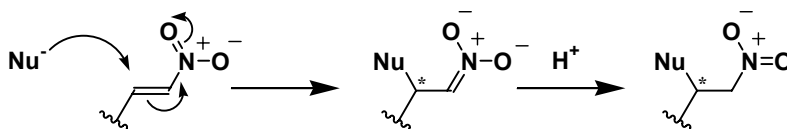


Figura 41: Mecanismos de la C-alquilación de nitronato, de la reacción de Henry y de la adición de Michael.

La reacción de C-alquilación de nitronatos aprovecha la facilidad con la que los nitroderivados orgánicos generan, en presencia de bases débiles, aniones nitronato que experimentan reacciones de C-alquilación con nucleófilos adecuados. La reacción de Henry o condensación nitroaldólica, se basa en el mismo principio, sólo que la adición del anión nitronato se realiza sobre carbonilos de aldehídos o cetonas. Por último, la adición de Michael aprovecha el efecto de retirada de carga que lleva a cabo un grupo nitro cuando se une directamente a una olefina,

⁸² a) Larkin, J. M.; Kreuz, K. L. "Conversion of vicinal nitro nitrates to nitroalkanes with sodium borohydride" *J. Org. Chem.* **1973**, 36, 2574-2575. b) Hwu, J. R.; Chen, K. L.; Ananthan, S. "A new method for nitration of alkenes to α,β -unsaturated nitroalkenes" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1425-1426.

⁸³ a) Olah, G. A.; Malhotra, R.; Narang, S. C. "Nitration: Methods and Mechanism" 1989, Ed. VCH, New York. b) Olah, G. A.; Rochin, C. "Desilylative nitration of alkyl- and allylsilanes with nitronium salts" *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 701-702.

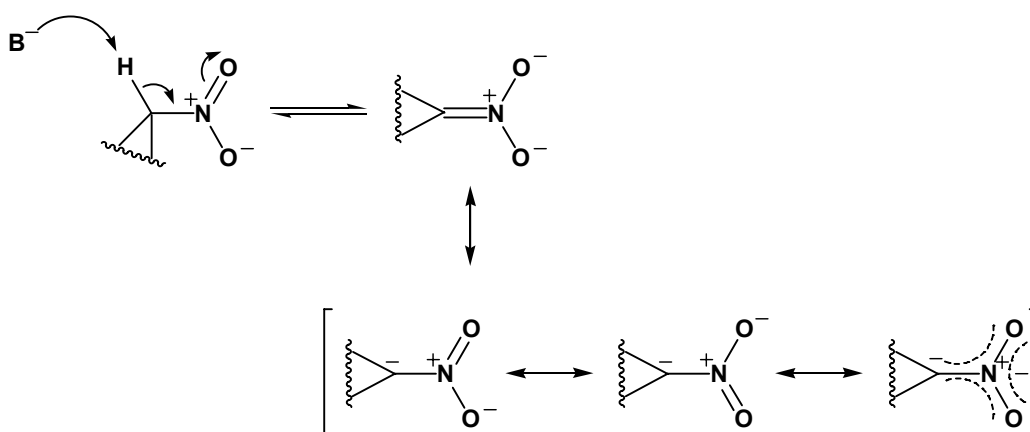
haciéndola más reactiva para experimentar adiciones conjugadas de nucleófilos de cualquier tipo.

Estos tres tipos de reacciones permiten llevar a cabo la funcionalización de las posiciones 1 ó 2 de un nitroderivado, lo que unido a la versatilidad del grupo nitro para ser transformado en otros grupos funcionales, hace de este tipo de química una herramienta muy poderosa a la hora de afrontar multitud de síntesis orgánicas complejas.

A continuación describiremos con más detalle estos tres importantes procesos para llevar a cabo reacciones de funcionalización de nitroderivados orgánicos.

1.2. Alquilaciones de nitronatos: aplicaciones.⁸⁴

Los nitroderivados son compuestos orgánicos relativamente ácidos (pKa en torno a 9-10), dado que estabilizan de modo efectivo la carga negativa en el carbono adyacente al grupo nitro. Esta estabilización se realiza por la deslocalización de la carga entre dicho carbono y los oxígenos del grupo nitro, obteniéndose así nucleófilos bidentados que pueden actuar por unión al carbono o por unión al oxígeno.



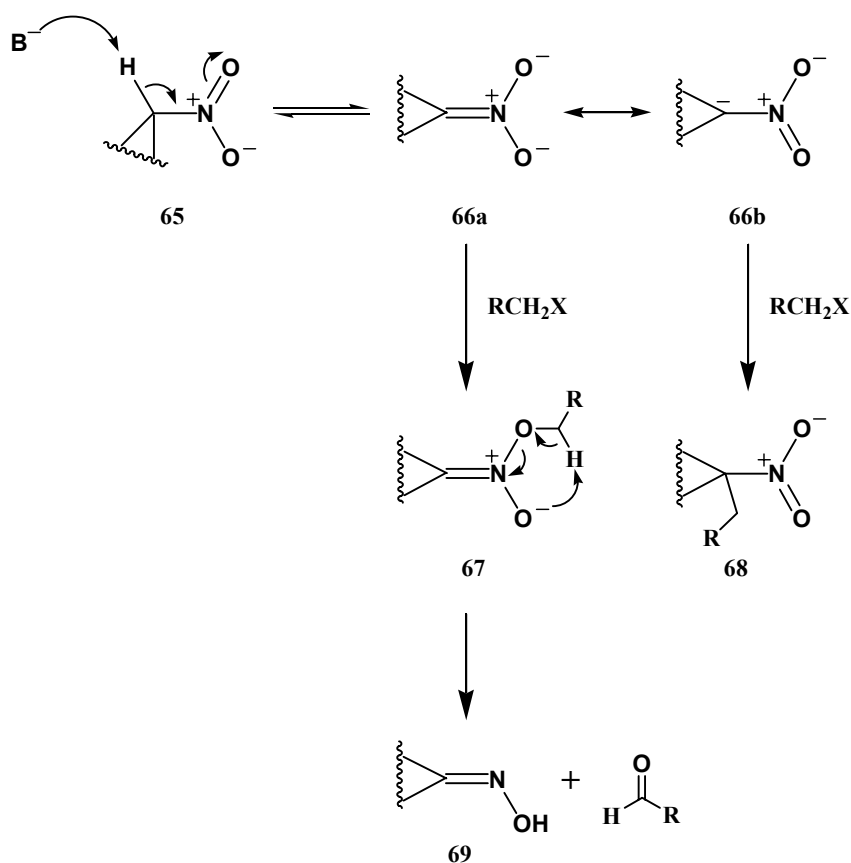
Esquema 39

Aunque estos nitronatos suelen comportarse como nucleófilos débiles, un aspecto importante de su reactividad es la reacción de C-alquilación, de utilidad para formar enlaces carbono-carbono.

Sin embargo, uno de los principales problemas de esta reacción es debido al carácter bidentado del anión nitronato, lo cual permite que se produzcan procesos de O-alquilación competitivos con los de C-alquilación (Esquema 40, pág. 203), generando así ésteres nitrónicos inestables **67** que se descomponen a oximas **69**. En general, el proceso de O-alquilación está más favorecido que el de C-alquilación dado el mayor carácter nucleófilo del átomo de oxígeno.⁸⁵

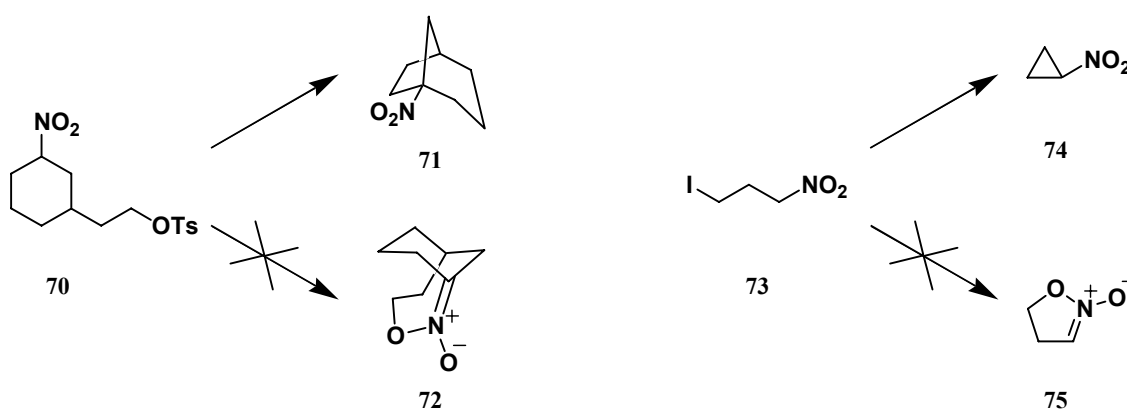
⁸⁴ Nielsen, A. T. "The Chemistry of the nitro and nitroso groups, Part 1" 1969, Ed. Wiley-Interscience, London.

⁸⁵ Kang, F. A.; Yin, C. L. "Synthesis and characterization of chiral nitronic esters via O-alkylation of (4*S**,5*R*)-(+)-4-(1'-nitro-1'-carbethoxymethyl)-5-[(1*R*)-menthyloxy]-3,4-dihydro-2(5*H*)-furanone with alkyl halides" *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5523-5527.



Esquema 40

Los primeros ejemplos conocidos de reacciones de C-alkilación de nitronatos fueron casos de formación de ciclos en los que la O-alkilación está desfavorecida, como ocurre en los procesos de ciclación intramolecular recogidos a continuación (Esquema 41).⁸⁶



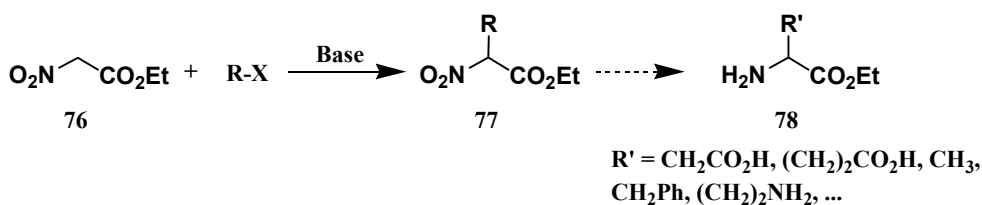
Esquema 41

⁸⁶ a) Etheredge, S. J. "Intramolecular C-alkylation of a nitronate anion. formation of a bridgehead nitro compound" *Tetrahedron Lett.* **1965**, 50, 4527-4530. b) Gabriel, S. "Nitromethan und phtalsäureanhydrid" *Chem. Ber.* **1903**, 36, 570-579.

En el primer caso, el proceso de O-alkilación produciría el bicyclo **72** con un doble enlace en la cabeza de puente, lo que hace que el anillo esté muy tensionado, favoreciéndose así el proceso de C-alkilación para formar el bicyclo **71**. En el segundo caso la formación del doble enlace endocíclico de **75** también está desfavorecida frente al proceso de ciclopropanación conducente a **74**.

Otro factor que influye en las alquilaciones de nitronatos es el disolvente empleado en la reacción, ya que en disolventes apolares la carga negativa del anión nitronato está más localizada sobre el átomo de carbono, favoreciendo por lo tanto el proceso de C-alkilación.⁸⁷

Una aplicación importante de la C-alkilación de nitronatos es la síntesis de aminoácidos a partir de ésteres del ácido 2-nitroacético **76** (Esquema 42).⁸⁸



Esquema 42

Sin embargo esta síntesis de aminoácidos presenta un inconveniente serio de falta de estereoselectividad, obteniéndose los aminoácidos en la mayor parte de los casos como mezclas racémicas.

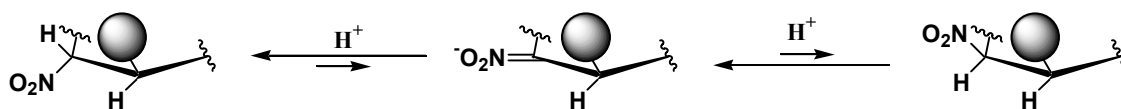
La alta acidez de los nitroderivados implica que los compuestos que tienen un grupo nitro en un carbono terciario quiral, sean compuestos inestables con tendencia a epimerizar, aunque estudios acerca de la acidez de nitroalcanos han demostrado que la estereoquímica de protonación de un nitronato plano está controlada por factores estéricos.⁸⁹ Es decir, cuando un nitronato plano se protona, su tendencia es la de disponer el grupo nitro de modo que las interacciones con los grupos más

⁸⁷ Dauzonne, D.; Royer, R. "A convenient route to substituted phenylalanines" *Synthesis*, **1987**, 4, 399-401.

⁸⁸ a) Gogte, V.; Natu, A. A.; Pore, V. S. "Alkylation of alkyl nitroacetates under PTC conditions" *Synth. Commun.*, **1987**, 17, 1421-1429. b) Zen, S.; Kaji, E. "Synthetic reactions of aliphatic nitro compounds. VIII. Formation of 4-substituted-3,5-bismethoxycarbonylisoxazoline N-oxides via O-alkylation of nitroacetate with n-alkylhalides" *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, **1974**, 22, 477-479. c) Zen, S.; Haruo, K.; Kaji, E. "The synthetic reactions of aliphatic nitro compounds. Part XII. A facile synthesis of anomeric methyl DL-tolyposaminides, methyl DL-forosaminides, and related substances" *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1977**, 43, 928-932.

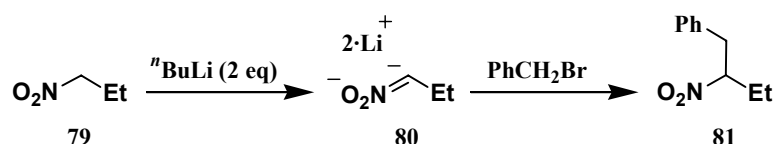
⁸⁹ Bordwell, F. G.; Yee, K. C. "The stereochemistry of protonation of nitrocycloalkane nitronate ions" *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5939-5944.

voluminosos de la molécula se minimicen. Este hecho es de gran importancia en procesos de funcionalización de nitroderivados en los que se produce la protonación de un nitronato intermedio, ya que la configuración del carbono que porta el grupo nitro estará controlada fundamentalmente por razones de tipo estérico en función de los sustituyentes que lo rodeen (Esquema 43).



Esquema 43

En un interesante trabajo de Seebach se describe un método de C-alkilación de nitroderivados que no reaccionan fácilmente con haluros de alquilo, que consiste en generar dianiones nitronato **80** por reacción de nitroalcanos **79** con dos equivalentes de *n*-butillitio, obteniéndose así un nucleófilo reactivo que se alquila en buen rendimiento con halogenuros de alquilo (Esquema 44).⁹⁰

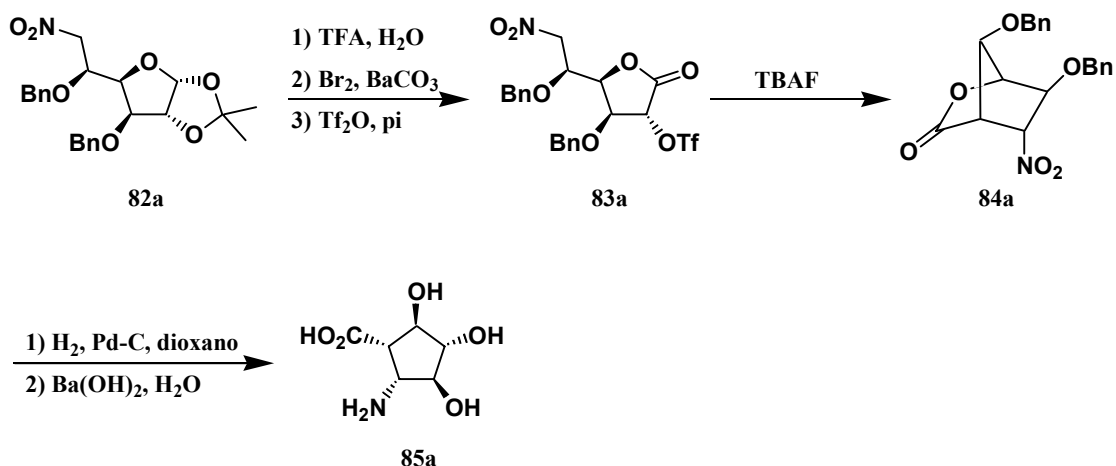


Esquema 44

En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una importante aplicación de la reacción de C-alkilación de nitronatos a la síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados.⁹¹ El proceso clave consistió en la alquilación intramolecular realizada con el nitrofurano **82a** para generar el bicicloderivado **84a** (Esquema 45, pág. 206).

⁹⁰ Seebach, D.; Lehr, F. "α,α-Doubly deprotonated nitroalkanes. Enhancement of the C-nucleophilicity of nitronates" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 505-506.

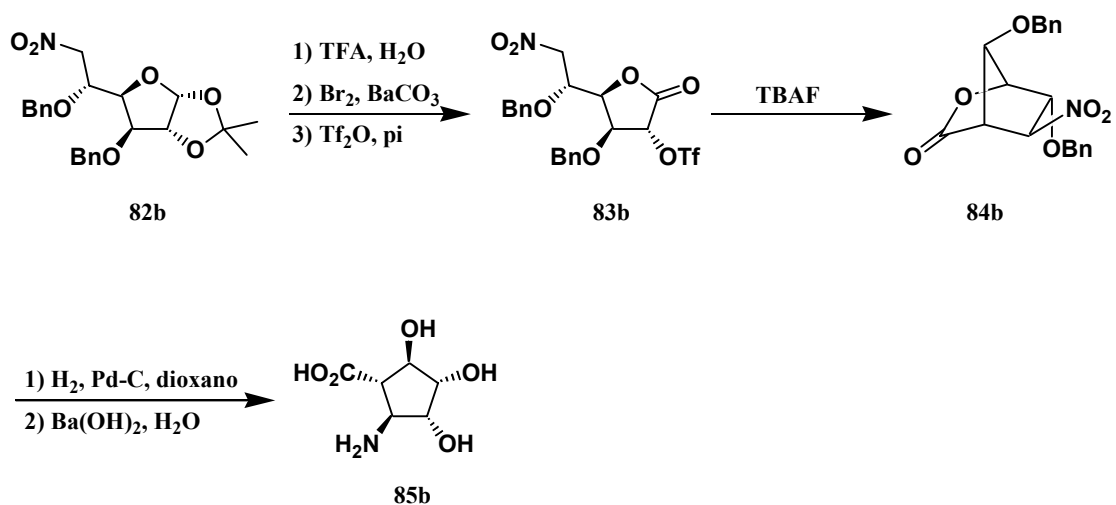
⁹¹ a) Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Stereocontrolled transformation of nitrohexofuranoses into cyclopentylamines via 2-oxabicyclo[2.2.1]heptanes: Incorporation of polyhydroxylated carbocyclic α-amino acids into peptides" *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1423-1425. b) Soengas, R. G.; Pampín, M. B.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Stereocontrolled transformation of nitrohexofuranoses into cyclopentylamines via 2-oxabicyclo[2.2.1]heptanes. Part 2: Synthesis of (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxy-2-aminocyclopentanecarboxylic acid" *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 205-211.



Esquema 45

Partiendo del nitroderivado **82a**, con configuración de β -L-idofuranosa, se obtuvo la lactona **83a**, por hidrólisis con ácido trifluoroacético, seguida de oxidación con bromo y carbonato de bario y reacción con anhídrido trifílico. Esta lactona **83a** se transformó, por reacción con fluoruro de tetrabutilamonio, de modo estereoselectivo en la biciclolactona **84a**, en la que el grupo nitro adoptó la disposición *trans* esperada con respecto al sustituyente benciloxi de la posición vecinal. La hidrogenación catalítica de **84a** produjo la reducción del grupo nitro a amino y la desbencilación del grupo benciloxi. Finalmente la hidrólisis con hidróxido de bario en medio acuoso permitió abrir el ciclo lactónico, obteniéndose así el β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado **85a**.

Esta secuencia sintética se aplicó también al nitroderivado **82b** con configuración de α -D-glucofuranosa (Esquema 46), obteniéndose de manera similar el β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado **85b**.



Esquema 46

La reacción de la lactona **83b** con fluoruro de tetrabutilamonio produjo también en este segundo caso únicamente el bicicloderivado **84b**, con el grupo nitro dispuesto en *trans* con respecto al sustituyente benciloxi de la posición vecinal.

En la actualidad se trabaja en nuestro grupo de investigación en el desarrollo de esta metodología de síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados, la cual evidentemente no puede ser aplicada a todo el panel de hexosas. La necesidad de que la cadena de nitroetileno de la posición C-4 de la furanosa de partida esté en disposición *trans* con respecto al hidroxilo de la posición C-2 para que pueda ocurrir la ciclación intramolecular de nitronatos conducente a las biciclolactonas, limita la utilización de este método a la mitad de las ocho D-hexofuranosas conocidas: la D-alosa, la D-glucosa, la D-idosa y la D-talosa y sus correspondientes hexosas de la serie L (Figura 42).

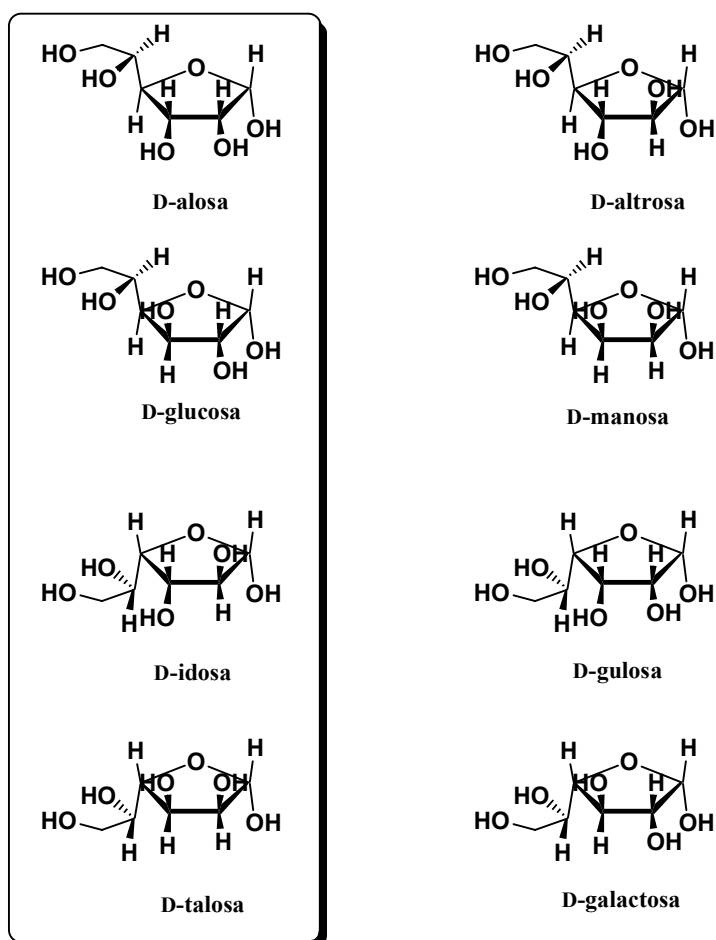
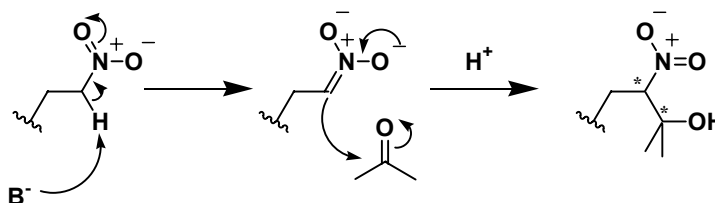


Figura 42: Hexofuranosas de la serie D.

1.3. La reacción de Henry: aplicaciones.

La reacción nitroaldólica o reacción de Henry, descubierta por L. Henry en 1895,⁹² es un proceso en el que tiene lugar la formación de un enlace carbono-carbono entre un anión nitronato y un carbonilo de aldehído o cetona. Su empleo en síntesis orgánica no ha dejado de crecer desde el momento de su descubrimiento, siendo un proceso clave en la síntesis de importantes compuestos orgánicos,⁹³ dado que combina la facilidad de formar enlaces carbono-carbono de la reacción aldólica con la versatilidad que tiene el grupo nitro para ser transformado en alguno de los muchos grupos funcionales que se pueden generar a partir de él. El mecanismo general para esta reacción se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 47

La reacción del anión nitronato con el carbonilo, conduce a la formación de un enlace carbono-carbono, obteniéndose así el correspondiente nitroalcohol, sobre el cual pueden haberse generado dos nuevos centros estereogénicos. La posibilidad de inducir quiralidad en la reacción para favorecer la formación de uno de los cuatro posibles estereoisómeros, confiere a este proceso una evidente utilidad adicional en la síntesis orgánica moderna.

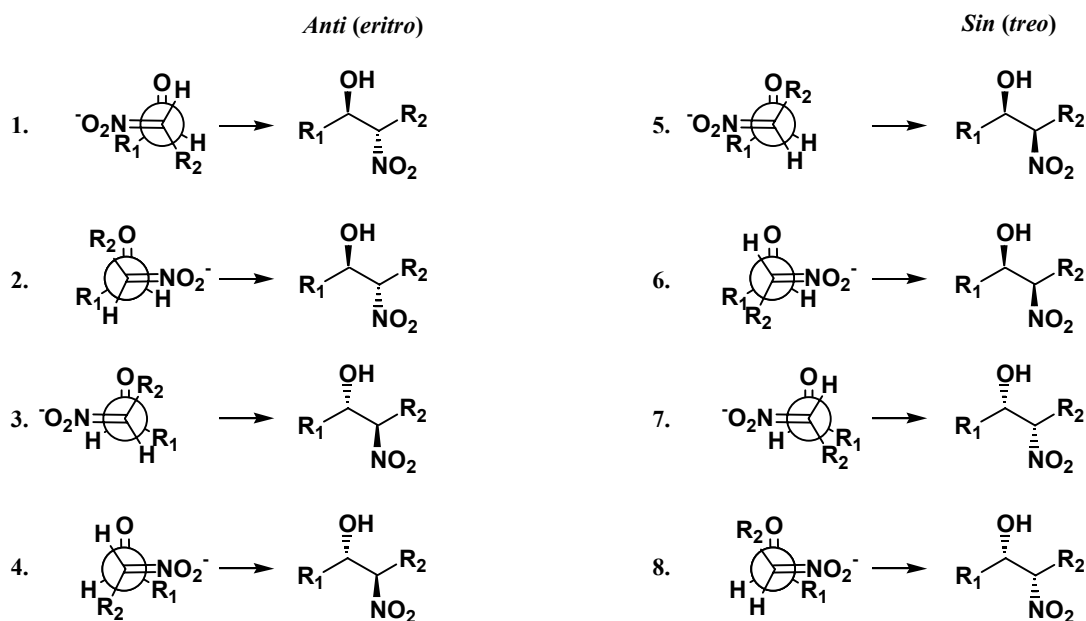
Por lo general, la reacción de Henry transcurre de un modo no estereoselectivo, generando una mezcla de estereoisómeros *anti* (*eritro*) y *sin* (*treo*), en función de la posición relativa de cada uno de los sustituyentes en el momento de la aproximación entre el nitronato y el carbonilo (Esquema 48, pág. 209)⁹⁴. Cálculos *ab initio* sugieren que los aniones nitronato libres (sin influencia del contraión)

⁹² Henry, L. "Nitro-alcohols" *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1895**, 120, 1265-1268.

⁹³ a) Feuer, H. "The chemistry of nitro and nitroso groups" 1970, Ed. Interscience, New York. b) Muller, H. "Methoden der organischen chemie" 1971, Ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. c) Trost, B. "Comprehensive organic chemistry" 1992, Ed. Pergamon, New York. d) Shvekhgeimer, M. C. A. "Aliphatic nitro alcohols. Synthesis, chemical transformations and applications" *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 35-68.

⁹⁴ Lecca, B.; Arrieta, A.; Morao, I.; Cossío, F. P. "Ab initio models for the nitroaldol (Henry) reaction" *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 20-28.

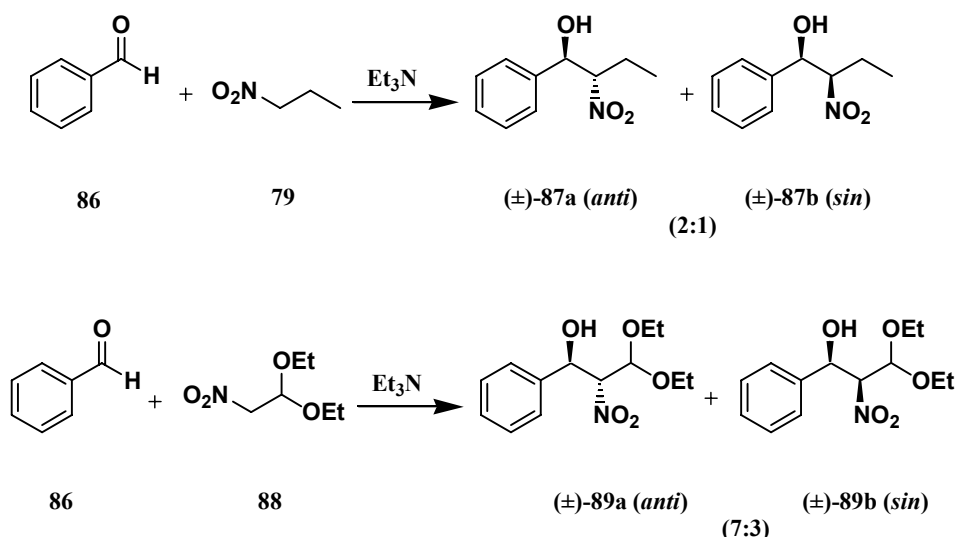
reaccionan con los aldehídos o cetonas a través de estados de transición en los cuales los dipolos debidos a los grupos nitro y carbonilo se disponen de manera antiperiplanar, formando un ángulo de 90° uno con respecto al otro. En el siguiente esquema se han recogido por medio de proyecciones de Newman las ocho posibles aproximaciones del anión nitronato al carbonilo de un aldehído, que justifican la formación de los cuatro estereoisómeros que pueden obtenerse en la reacción.



Esquema 48

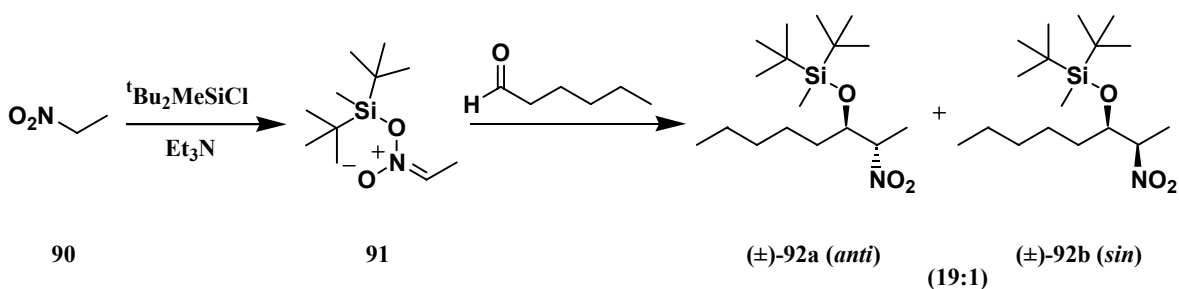
Un estudio detallado de cada una de las aproximaciones permite descartar algunas, por ser estéricamente más desfavorables. Así, las aproximaciones 5 y 8 son las únicas que disponen sus sustituyentes más pequeños casi eclipsados, esto implica que los sustituyentes voluminosos también lo estarán y que, por tanto, la energía del estado de transición sea muy desfavorable. Por otra parte, las aproximaciones 6 y 7 disponen los sustituyentes alquílicos R_1 y R_2 casi eclipsados, lo que hace que también estén poco favorecidas estéricamente. En el resto de las aproximaciones (1, 2, 3 y 4), los sustituyentes están dispuestos de manera alternada, lo que favorece más el acercamiento entre los reactivos. Estas predicciones indican que, teniendo en cuenta únicamente los factores estéricos de los sustituyentes, la reacción de Henry entre un nitronato y un aldehído debe generar mayoritariamente los estereoisómeros *anti* frente a los *sin*. Sin embargo, los valores experimentales de estereoselectividad no son tan acusados como en principio se podría esperar (Esquema 49, pág. 210).⁹⁵

⁹⁵ Morao, I.; Cossío, F. P. "Dendritic catalysts for the nitroaldol (Henry) reaction" *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 6461-6464.



Esquema 49

La baja estereoselectividad observada con estos dos casos sencillos se atribuye a que la reacción aldólica es un proceso de equilibrio, por lo que la reacción inversa de ruptura de un nitroalcohol para generar un carbonilo y un nitroderivado, conocida como reacción de retro-Henry, también ocurre en el medio de reacción. La presencia de este equilibrio determina que la estereoselectividad del proceso final sea menor que la inicialmente esperada. Sin embargo, cuando se lleva a cabo la reacción de Henry en condiciones en las que la reacción de retro-Henry no puede tener lugar, sí se observan excesos diastereoméricos mucho más acordes con los resultados teóricos esperados (Esquema 50).⁹⁶



Esquema 50

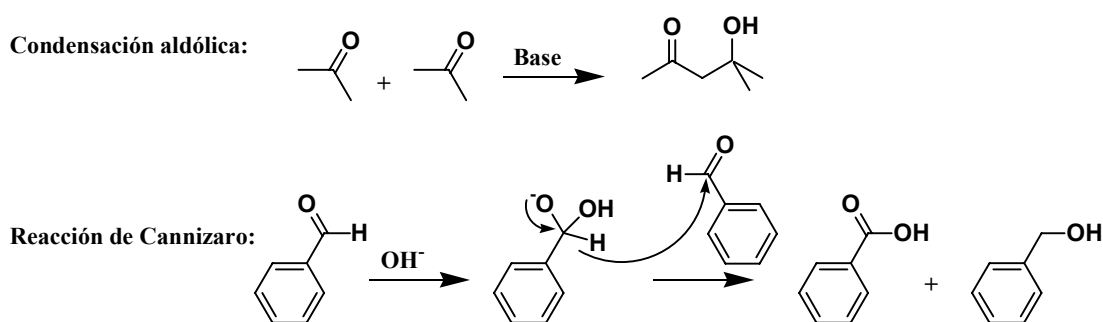
Así, en este proceso del Esquema 50 de adición del nitronato derivado de nitroetano **90** en presencia de cloruro de di-(*t*-butil)metilsilicio, se observa una tendencia muy acusada hacia la formación del nitroaldol *anti* frente al nitroaldol *sin*. En este caso, la formación del éter silílico del nitroalcohol final **92** impide que tenga

⁹⁶ Seebach, D.; Beck, A. K.; Lehr, F.; Weller, T.; Colvin, E. "Diastereoselective synthesis of β -nitro- and β -aminoalcohols" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, 20, 397-399.

lugar la reacción retro-Henry, por lo que la relación de diastereoisómeros que se observa es la inicialmente surgida en el proceso, sin que se vea afectada por reacciones de equilibración.

Esta facilidad que tienen los nitroaldoles de revertir mediante un proceso retro-Henry, provoca que sean compuestos térmicamente poco estables, con tendencia a epimerizar y difíciles de purificar. Además, existen otras dos situaciones que pueden interferir con la reacción de Henry. Son las siguientes:

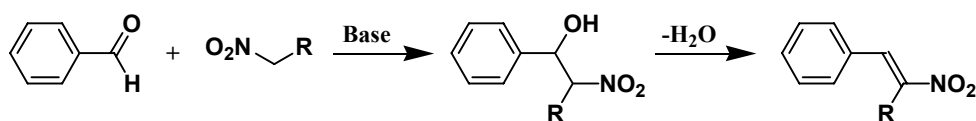
1) La posibilidad de que ocurran reacciones competitivas como la condensación aldólica o la reacción de Cannizzaro, catalizadas por el medio básico empleado (Esquema 51).



Esquema 51

Estos procesos se evitan llevando a cabo la reacción de Henry en condiciones de alta dilución.

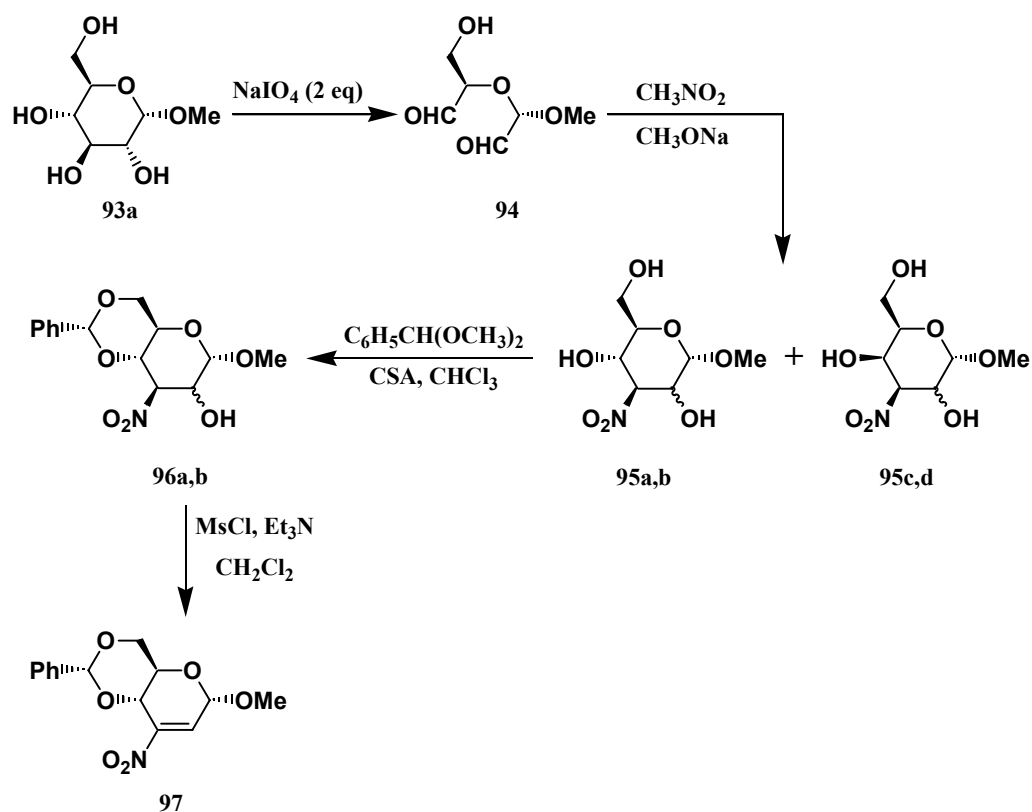
2) La posibilidad de que los 2-nitroaldoles inicialmente formados se deshidraten generando nitroalquenos. Este proceso es muy común cuando el alqueno se puede conjugar con sistemas arílicos presentes en la molécula (Esquema 52).



Esquema 52

Dada la gran cantidad de trabajos publicados sobre aplicaciones de la reacción de Henry en síntesis orgánica, nosotros nos referiremos en esta tesis únicamente a los relacionados con nitroderivados de hidratos de carbono, por ser estos los compuestos en los que se centra esta segunda parte de nuestro trabajo. Algunos ejemplos ilustrativos de la importancia de este proceso se describen a continuación.

Un ejemplo representativo de obtención de nitroazúcares es el correspondiente a la doble condensación de Henry que se incluye en el esquema siguiente.



Esquema 53

Este esquema recoge una síntesis llevada a cabo por Baer,⁹⁷ en la que la ruptura de la glucopiranosita **93a** con peryodato sódico conduce al dialdehído **94**, cuya doble condensación de Henry con nitrometano produce una compleja mezcla de nitroazúcares **95a-d**, en la que el carbono que porta el grupo nitro es el único de los tres estereocentros formados en el proceso que tiene una configuración única, debido a que la disposición ecuatorial de este grupo es la termodinámicamente más favorable y las condiciones de equilibrio de la reacción de Henry le permiten adoptarla. La ausencia de estereoselectividad de la posición C-2 se corrigió haciendo reaccionar la mezcla de diastereoisómeros **95a-d** con el dimetoxiacetal del benzaldehído en presencia de ácido canforsulfónico, que condujo únicamente a los

⁹⁷ a) Baer, H. H.; Werner, R. "A study of steric effects on nitromethylene acidity and the mechanism of epimerization in partially blocked nitro hexoses" *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 3197-3202. b) Baer, H. H.; Werner, R. "Reactions of nitro sugars. XXVI. Analysis and separation of stereoisomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy and column chromatography of benzylidene derivatives" *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 1216-1223. c) Baer, H. H.; Georges, F. Z. "Reactions of nitro sugars. 37. Preparation of nitro olefins via methanesulfonates" *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3474-3476.

derivados 1,3-dioxolánicos **96a,b** formados a partir de los estereoisómeros **95a,b**, en los que el hidroxilo de la posición C-4 está en disposición *trans* con respecto al hidroximetileno de la posición C-5. La transformación de **95c,d** en **95a,b** en las condiciones de reacción, se lleva a cabo por un mecanismo de retro-Henry de apertura del ciclo, seguido del cierre de éste por medio de una reacción de Henry, desplazándose finalmente el proceso hacia la formación total de **96a,b**. La deshidratación de la mezcla de nitroalcoholes **96a** y **96b** permitió obtener la nitroolefina **97** como único producto.

La reacción de Henry de nitroazúcares es una de las herramientas más empleadas para la obtención de ciclitoles. Se definen como ciclitoles (o cicloalcanopolioles) a la familia de cicloalcanos sustituidos con hidroxilos en todas sus posiciones (Figura 43). Los derivados de ciclohexano se denominan inositoles (**98**) y son compuestos presentes en los organismos vivos en forma de glicofosfolípidos denominados glicosilfosfatidilinositoles (GFI), que se encargan de la activación enzimática en el interior de la célula de la señal producida por la hormona insulina en el exterior.⁹⁸

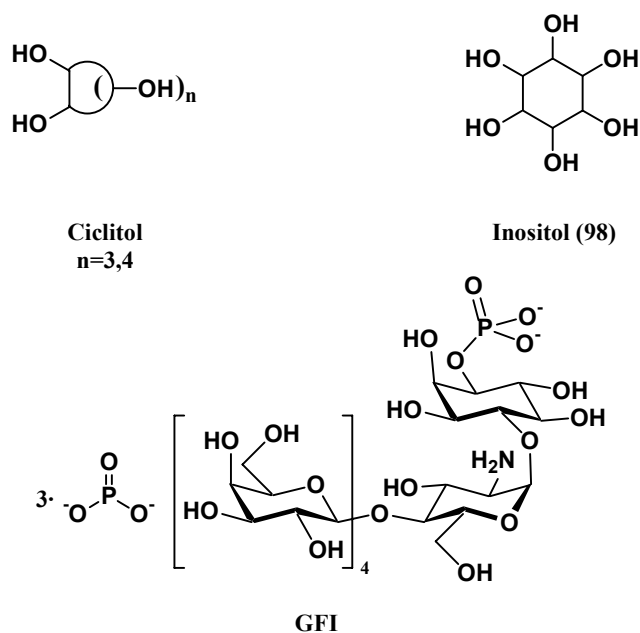
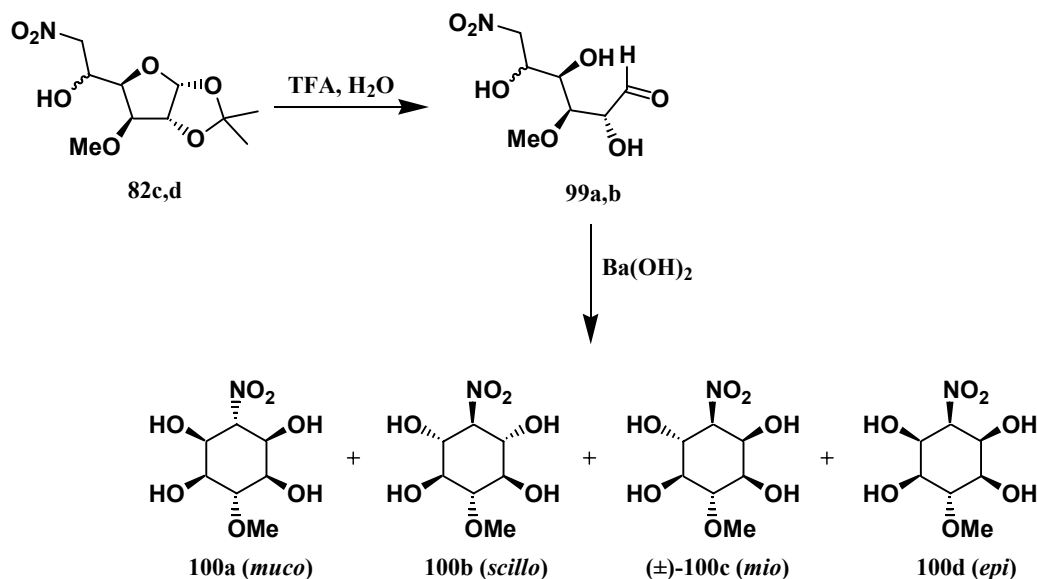


Figura 43: Estructuras generales de ciclitol, inositol (**98**) y glicosilfosfatidilinositol (GFI).

Fue Baer quien en 1973 sintetizó por primera vez nitroinositoles (**100**) a partir de nitroderivados de hidratos de carbono, llevando a cabo mediante una reacción de

⁹⁸ a) Cohen, P.; Houslay, M. D. "Molecular mechanisms of transmembrane signaling" 1985, Ed. Elsevier, Oxford. b) Saltiel, A. R.; Fox, J. A.; Sherline, P.; Cuatrecasas, P. "Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase" *Science* **1986**, 233, 967-972.

Henry la construcción del anillo ciclohexánico como resultado de la unión del metileno portador del grupo nitro al carbonilo del azúcar (Esquema 54).⁹⁹



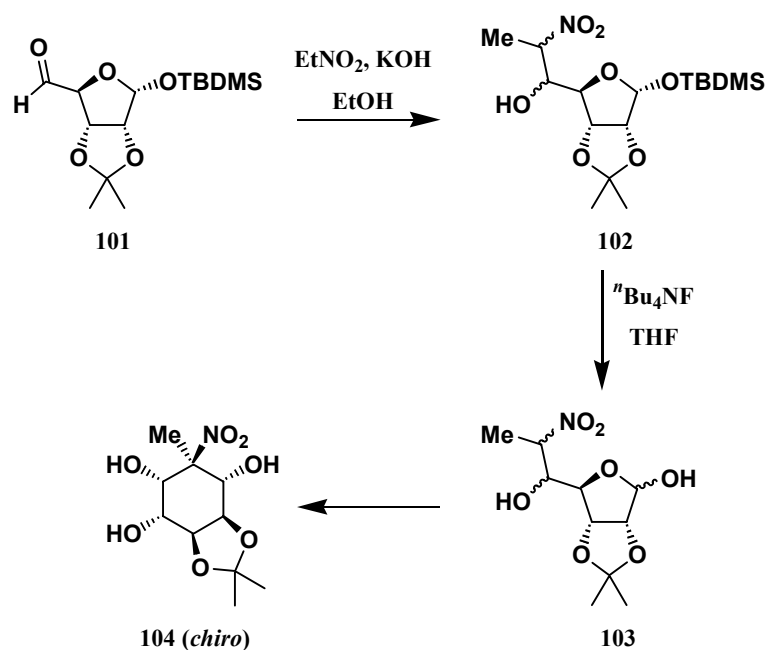
Esquema 54

Obtuvo así una mezcla de los nitroinositols **100a-d** a partir de la mezcla de las nitrohidroxifuranosas **82c,d**, al tratarlas primero con ácido trifluoroacético para obtener los nitroaldehídos **99a,b** y luego con hidróxido de bario para inducir la reacción de Henry intramolecular entre el nitronato de la posición C-6 y el aldehído de la posición C-1.

Otra interesante aplicación de nitroazúcares a la síntesis de inositols fue la desarrollada por Brewster en 1987, partiendo del aldehído derivado de la D-manosa **101** (Esquema 55, pág. 215).¹⁰⁰ Una primera condensación de Henry con nitroetano condujo a una mezcla de los compuestos **102**, que se transformaron en la mezcla de las nitrofuranosas **103**, las cuales mediante una condensación de Henry intramolecular dieron lugar al nitroinositol enantioméricamente puro **104**.

⁹⁹ a) Kovar, J.; Baer, H. H. "Cyclizations of dialdehydes with nitromethane. XV. Synthesis of four stereoisomeric deoxynitroinositol monomethyl ethers" *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 1801-1811. b) Kovar, J.; Baer, H. H. "A study on the kinetically controlled cyclization of 6-deoxy-3-O-methyl-6-nitro-D-glucose and -L-idose, and preparation of optically active nitroinositol derivatives" *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 2836-2842.

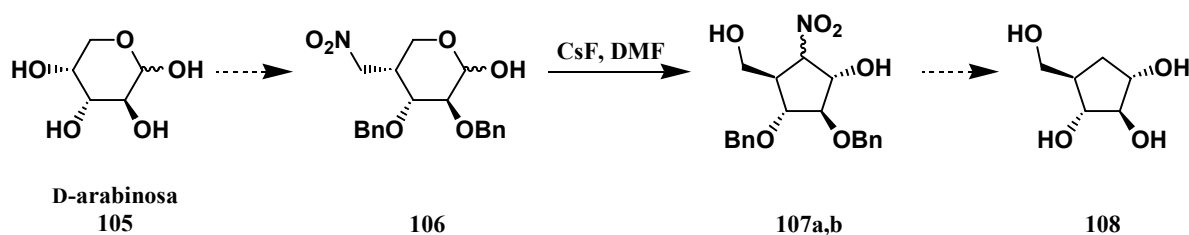
¹⁰⁰ Brewster, K.; Harrison, J. M.; Inch, T. D.; Williams, N. "Model studies of histrionicotoxin. The synthesis of the 1-azaspiro[5.5]undecane rings system from carbohydrate starting materials" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1987**, 21-26.



Esquema 55

El hecho de que se obtenga únicamente el inositol **104** a partir de la mezcla compleja de hasta cuatro isómeros **102**, es consecuencia de la reversibilidad de la reacción de Henry, que por equilibración conduce, en este caso, a la formación del estereoisómero termodinámicamente más estable.

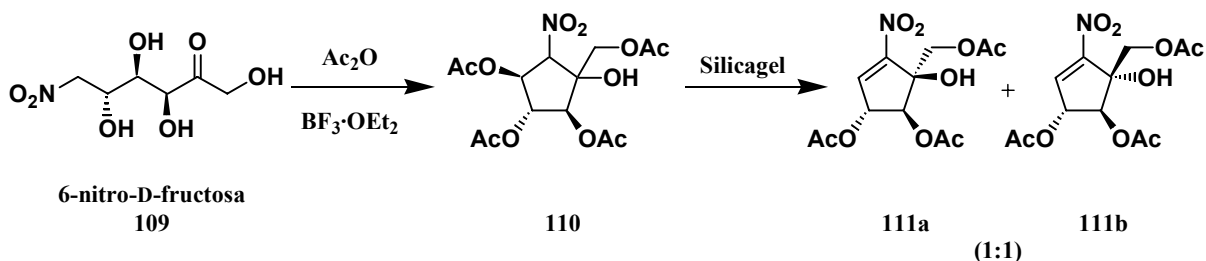
Se exponen a continuación dos interesantes síntesis de ciclopentanopolioles a partir de nitroazúcares. La primera, desarrollada por Yoshikawa en 1994, incluye como etapa clave una reacción de Henry intramolecular del nitroazúcar **106** obtenido a partir de la D-arabinosa (**105**). La mezcla de nitrociclitoles **107a** y **107b** obtenida se sometió a un proceso de eliminación radicalaria del grupo nitro, que permitió obtener enantioselectivamente el carboazúcar **108** (Esquema 56).¹⁰¹



Esquema 56

¹⁰¹ Yoshikawa, M.; Yokokawa, Y.; Inoue, Y.; Yamaguchi, S.; Murakami, N. "Facile syntheses of pseudo- α -D-arabinofuranose, and two pseudo-D-arabinofuranosynucleosides, (+)-cyclaramide and (+)-1-pseudo- β -D-arabinofuranosyluracil, from D-arabinose" *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9961-9974.

En la segunda síntesis, debida a Chou,¹⁰² la reacción de la 6-nitro-D-fructosa (**109**) con anhídrido acético dio lugar a una mezcla de tetraacetatos inestables **110**, que al someterla a purificación cromatográfica en silicagel se transformó en la mezcla de nitroalquenos **111a** y **111b**, por eliminación de un grupo acetato (Esquema 57).



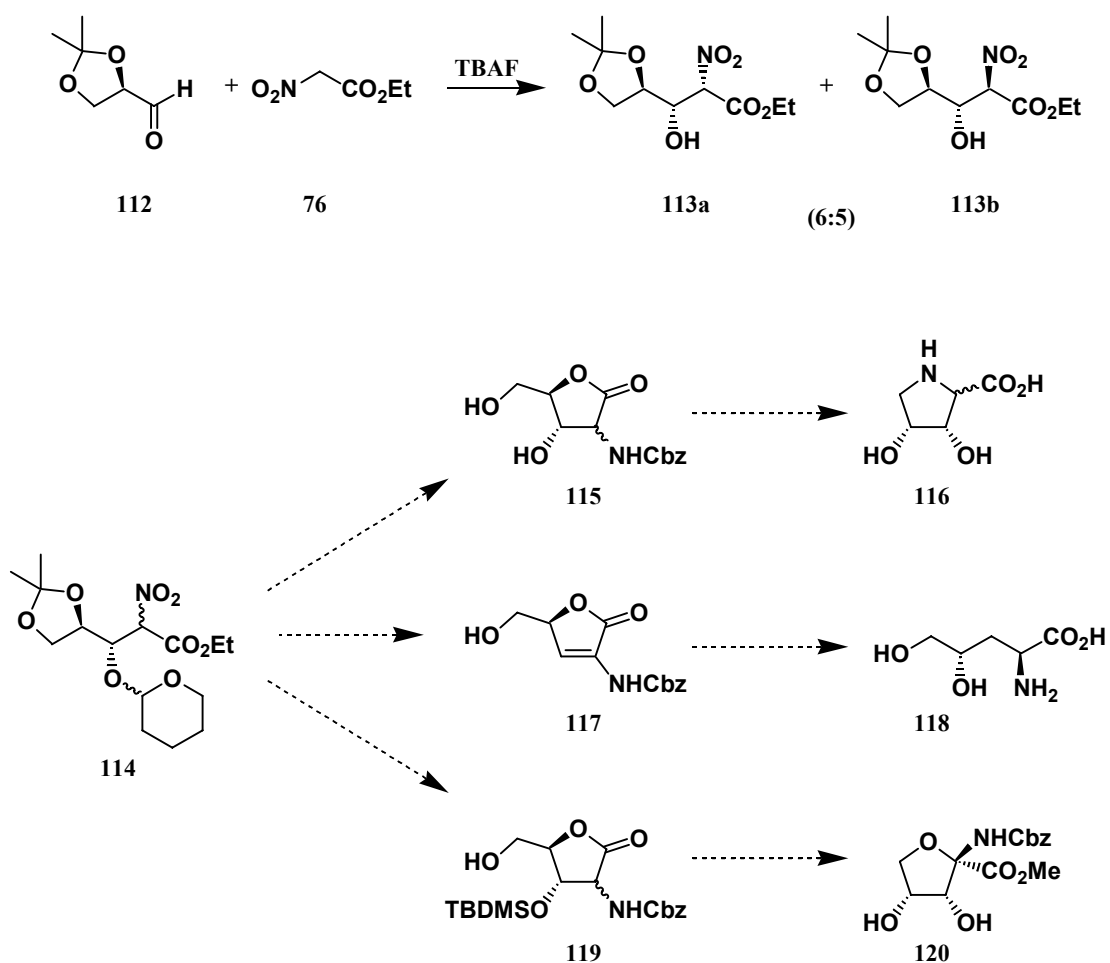
Esquema 57

Por último, mencionaremos también algunas aportaciones recientes de nuestro grupo de investigación, relativas a aplicaciones sintéticas de la reacción de Henry de nitroazúcares.

El primer trabajo desarrollado fue el correspondiente a la reacción de Henry de nitroacetato de etilo (**76**) con D-gliceraldehído (**112**) (Esquema 58, pág. 217),¹⁰³ que condujo a la mezcla de los dos estereoisómeros **113a** y **113b** en una relación 6:5. Tras proteger el hidroxilo libre para prevenir reacciones de retro-Henry, se obtuvo la mezcla de nitroderivados **114** (cuatro estereoisómeros) que fueron transformados mediante reacciones típicas de azúcares en las 3,4-dihidroxirolinas **116**, la D-treo-L-norvalina **118** y el aminoácido dihidroxifuránico **120**.

¹⁰² Chou, W. C.; Fotsch, C.; Wong, C. H. "Synthesis of nitrocyclitols based on enzymatic aldol reaction and intramolecular nitroaldol reaction" *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2916-2917.

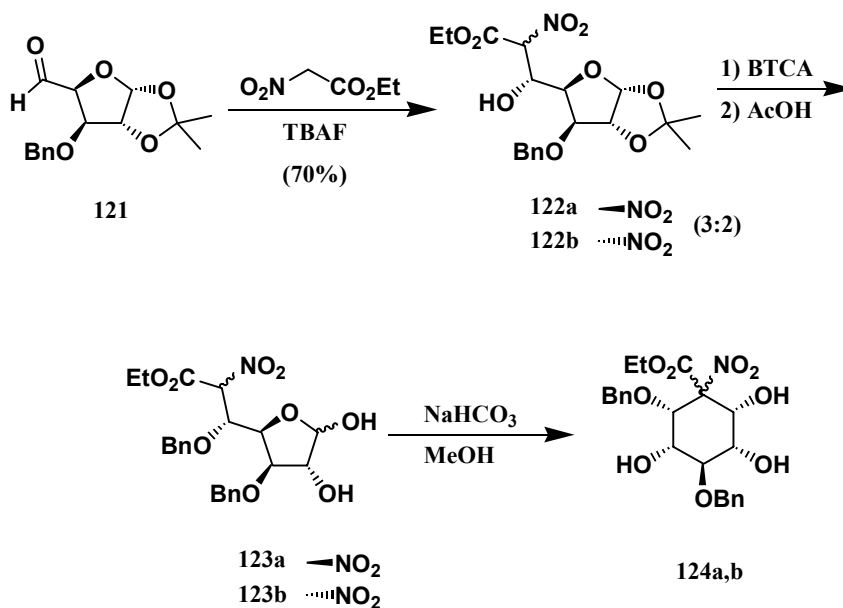
¹⁰³ Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Total synthesis of 3,4-dihydroxyprolines, D-threo-L-norvaline and (2*S*,3*R*,4*R*)-2-amino-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-carboxylic acid methyl ester" *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3955-3963.



Esquema 58

Una segunda aportación de nuestro grupo de investigación implicó una reacción de Henry de nitroacetato de etilo con el aldehído **121** obtenido a partir de la diaceton- α -D-glucosa (Esquema 59, pág. 218).¹⁰⁴

¹⁰⁴ Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J.; Maestro, M. A. "Synthesis of polyhydroxylated α -nitrocyclohexane carboxylic acids derived from D-glucose: a striking case of racemization" *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1653-1658.

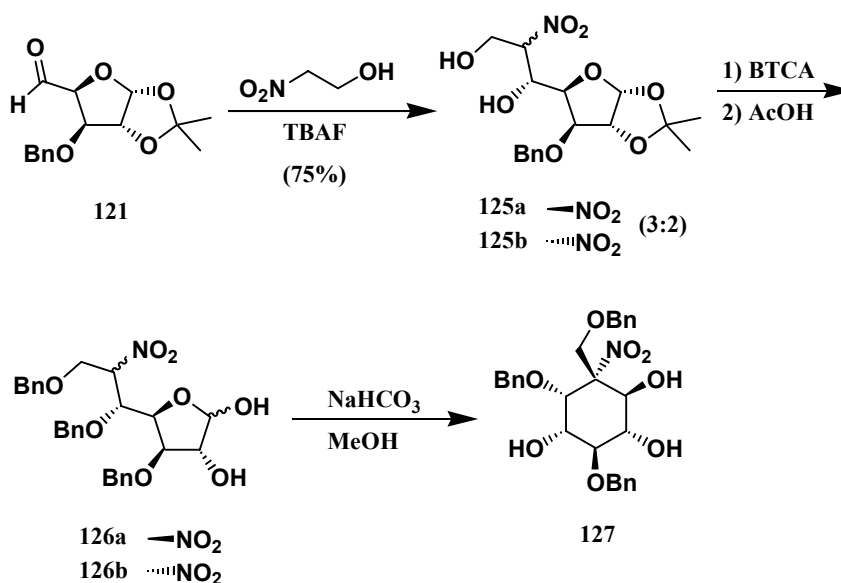


Esquema 59

La reacción del aldehído **121** con nitroacetato de etilo en presencia de fluoruro de tetrabutilamonio condujo en buen rendimiento a la obtención de los nitroazúcares **122a** y **122b** en relación 3:2. La protección del hidroxilo libre de éstos se llevó a cabo con tricloroacetimidato de bencilo y a continuación se realizó la hidrólisis del grupo protector isopropilidénico. Se obtuvo así la mezcla de nitroazúcares **123a** y **123b**, que al tratarla con bicarbonato sódico condujo a los nitroinositoles **124a** y **124b**. Cabe destacar que en este último proceso de ciclación, se obtuvieron únicamente dos de los cuatro posibles estereoisómeros.

Siguiendo un procedimiento similar al anterior, se estudió la adición de nitroetanol al mismo aldehído de partida **121** (Esquema 60, pág. 219).¹⁰⁵

¹⁰⁵ Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Transformation of D-glucose into 1D-3-deoxy-3-hydroxymethyl-*myo*-inositol by stereocontrolled intramolecular Henry reaction" *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4457-4459.



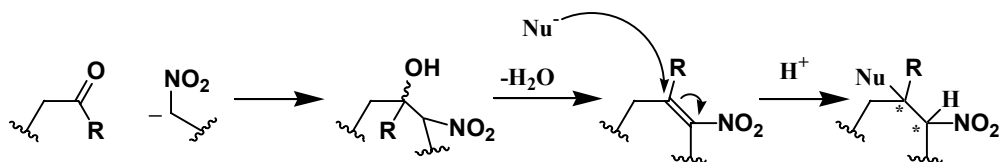
Esquema 60

Se obtuvo con un rendimiento del 75% la mezcla de los nitroazúcares **125a** y **125b** en una relación 3:2. Esta mezcla se sometió a la secuencia sintética anterior: protección con tricloroacetimidato de bencilo, hidrólisis en medio ácido y ciclación de Henry intramolecular con bicarbonato. Sin embargo, en ese caso el proceso de ciclación de Henry intramolecular de la mezcla **126a** + **126b** condujo únicamente al estereoisómero **127**, el más estable termodinámicamente de los cuatro posibles que se podían generar, cuya obtención única ha de ser atribuida a la formación inicial de los cuatro posibles productos de ciclación y subsiguiente desplazamiento del equilibrio entre ellos hacia **127**.

1.4. La reacción de Michael: aplicaciones.

Al igual que las cetonas α - β insaturadas, los nitroalquenos experimentan reacciones de adición de Michael con gran facilidad. La importancia de esta reacción en síntesis orgánica radica en la generación de enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo en condiciones suaves y de manera sencilla. La gran atracción de carga que provoca el grupo nitro sobre el doble con el que está conjugado, lo activa lo suficiente como para que se adicione sobre él nucleófilos de origen variado (carbaniones, alcóxidos, sulfuros, aminas, amiduros, fosfinas, etc.).

De modo general, los nitroalquenos se obtienen fácilmente por deshidratación de nitroalcoholes, los cuales se pueden obtener por reacción de Henry de nitronatos con cetoderivados (Esquema 61).

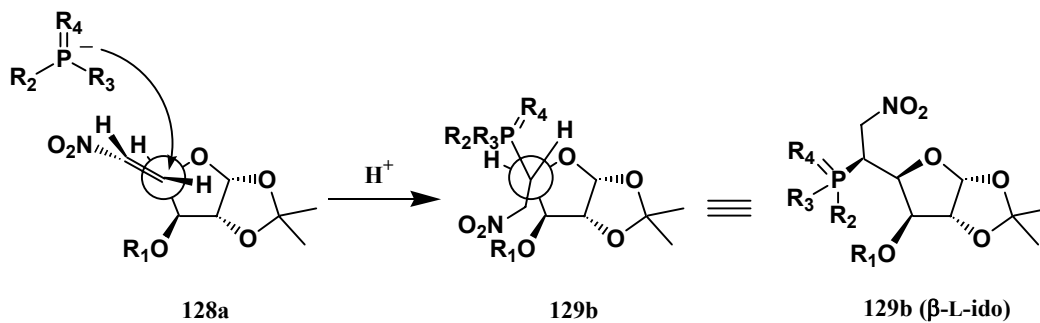


Esquema 61

La adición de Michael de un nucleófilo puede ocurrir por las dos caras del nitroalqueno, por lo que en aquellos casos en los que se generan dos centros estereogénicos, pueden dar lugar a la formación de cuatro diastereoisómeros. Sin embargo, si están presentes sustituyentes en el nucleófilo o en la nitroolefina que, por motivos estéricos o electrónicos, puedan influir en la selectividad del proceso, la reacción de adición de Michael puede transcurrir de modo altamente estereoselectivo. Esta posibilidad ha llevado a numerosos grupos de investigación a emplear sustratos quirales de variada naturaleza (campo en el que han demostrado ser ampliamente útiles los nitroalquenos derivados de hidratos de carbono) para ensayar este tipo de adiciones, pudiéndose llegar a controlar la estereoselectividad del proceso, tal y como se indica en los ejemplos siguientes.

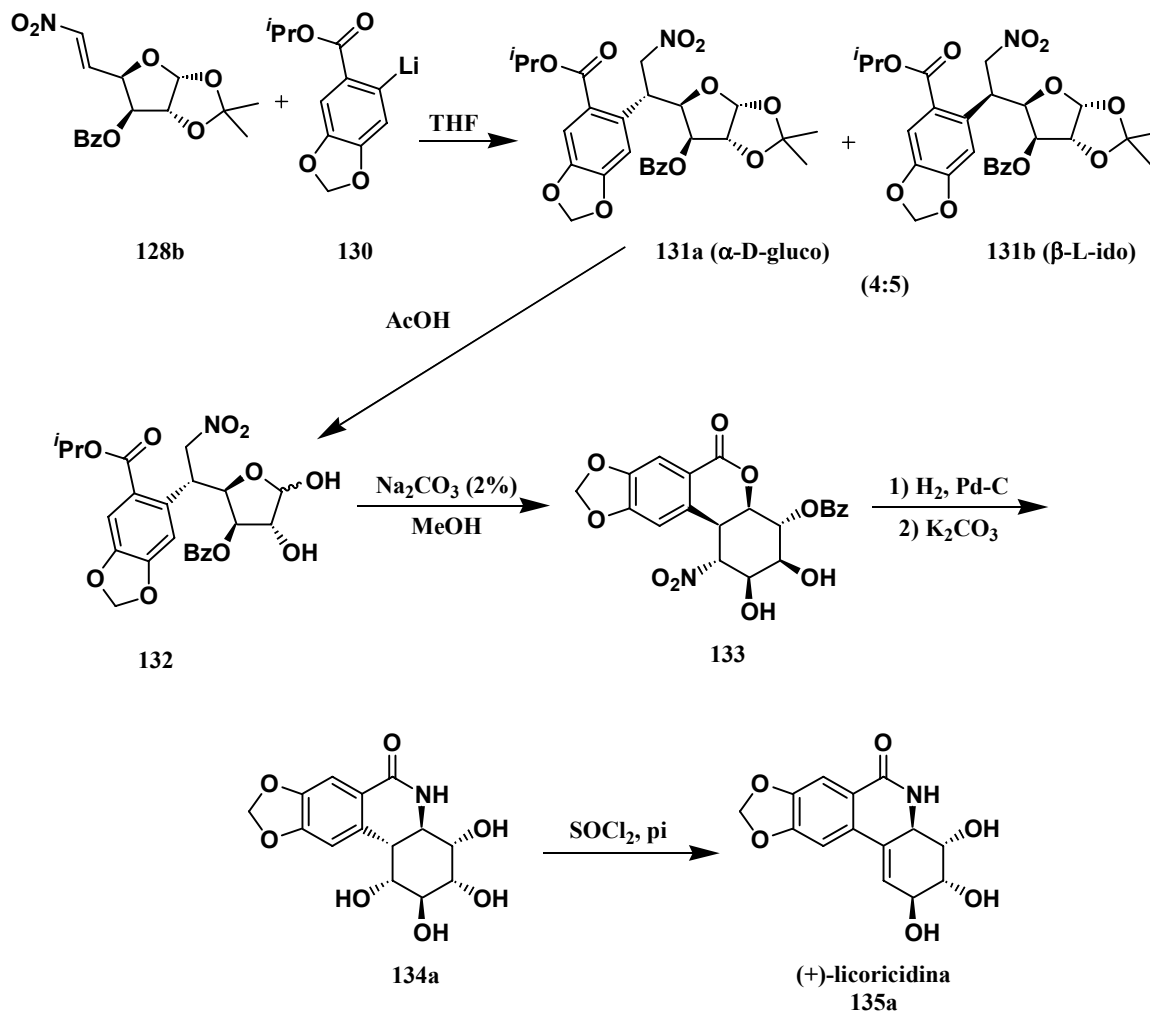
Yamashita y col. estudiaron adiciones de Michael de nucleófilos de fósforo sobre nitroderivados de la D-glucosa **128a**, obteniendo una cierta selectividad en la adición, tanto mayor cuanto más voluminosos son los sustituyentes de la fosfina empleada (Esquema 62).¹⁰⁶

¹⁰⁶ Yamashita, M.; Sugiura, M.; Tamada, Y.; Oshikawa, T.; Clardy, J. "First X-ray study on orientation of addition of phosphorous compounds to 3-O-alkyl-5,6-dideoxy-1,2-O-isopropylidene-6-C-nitro- α -D-xylo-hexo-5-(Z)-enofuranoses" *Chem. Lett.* **1987**, 1407-1408.



Esquema 63

Una importante síntesis total en la que una reacción de adición de Michael tiene un papel fundamental, es la de la (+)-licoricidina (135a), publicada por Paulsen en 1982 (Esquema 64).¹⁰⁸

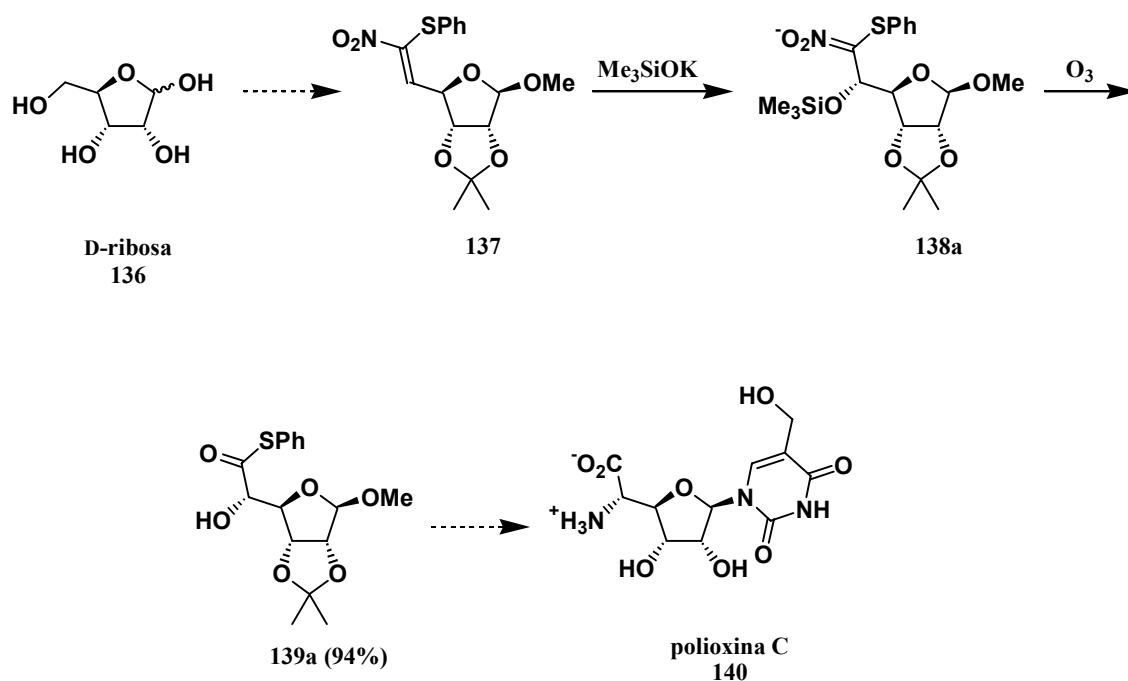


Esquema 64

¹⁰⁸ Paulsen, H.; Stubbe, M. "Chirale synthese von (+)-lycoridin" *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 3171-3174.

En este proceso, la reacción de Michael del derivado organolítico aromático **130** sobre el nitroazúcar **128b**, condujo a la mezcla de aductos **131a** y **131b** en una relación 4:5. El isómero **131a** se hidrolizó en ácido acético y se trató con carbonato potásico para producir así una reacción de Henry intramolecular, que generó como único estereoisómero el nitrociclohexano **133**. Finalmente la hidrogenación del grupo nitro a amino, seguida de la apertura del ciclo lactónico del compuesto resultante con carbonato potásico, produjo la formación de la lactama **134a**, la cual por deshidratación con cloruro de tionilo en piridina formó la (+)-licoricidina **135a**.

El profesor A. Barrett realizó numerosas aportaciones relacionadas con adiciones de Michael a nitroderivados de hidratos de carbono. En 1990 publicó una síntesis del antibiótico natural polioxina C (**140**) que incluye la transformación de la D-ribosa (**136**) en la nitroolefina **137**, sobre la que llevó a cabo la adición de Michael de un alcóxido sililado, que dio lugar al compuesto **139a**, precursor de dicho antibiótico, tras reacción con ozono del derivado **138a** (Esquema 65).¹⁰⁹

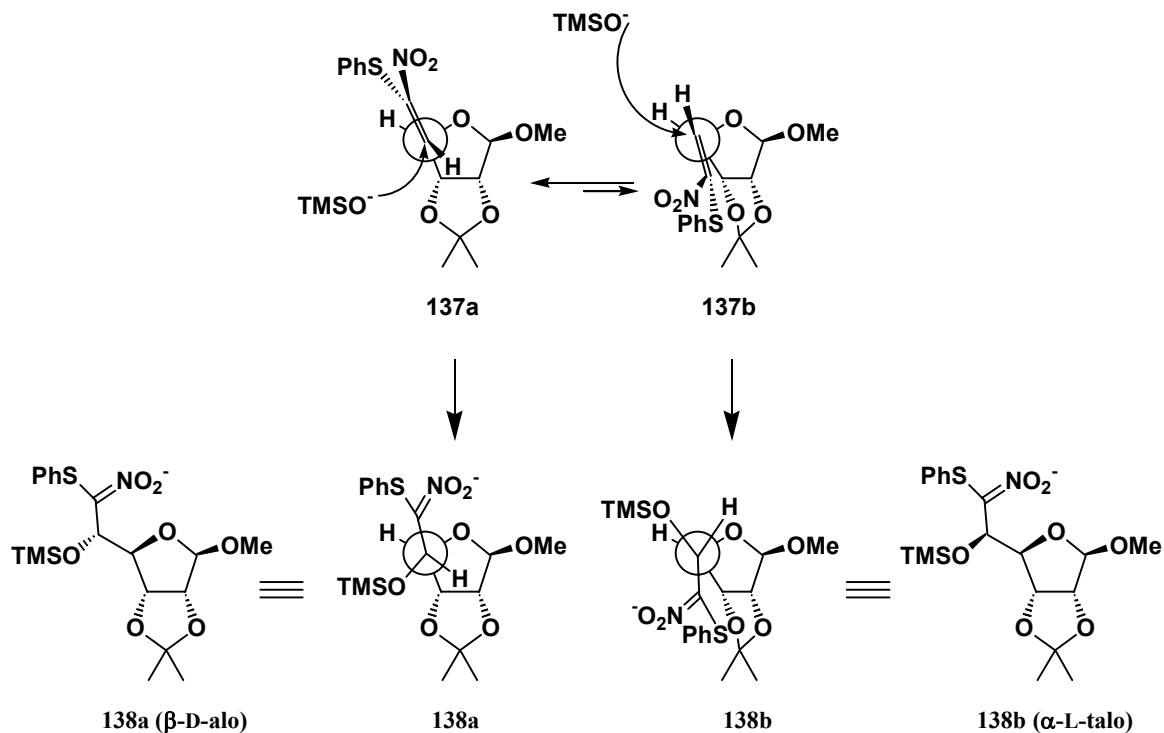


Esquema 65

La adición de Michael sobre **137** se produjo con un alto exceso diastereomérico (>50:1), lo que indica que el ataque nucleofílico ocurre preferentemente sobre una de las caras del doble enlace. La formación del

¹⁰⁹ Barrett, A. G. M.; Lebold, S. A. "(Phenyltio)nitromethane in the total synthesis of Polyoxin C" *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3853-3857.

diastereoisómero mayoritario **138a** se justificó en base a la regla de Felkin-Anh de adición a dobles enlaces o carbonilos en compuestos proquirales (Esquema 66).¹¹⁰



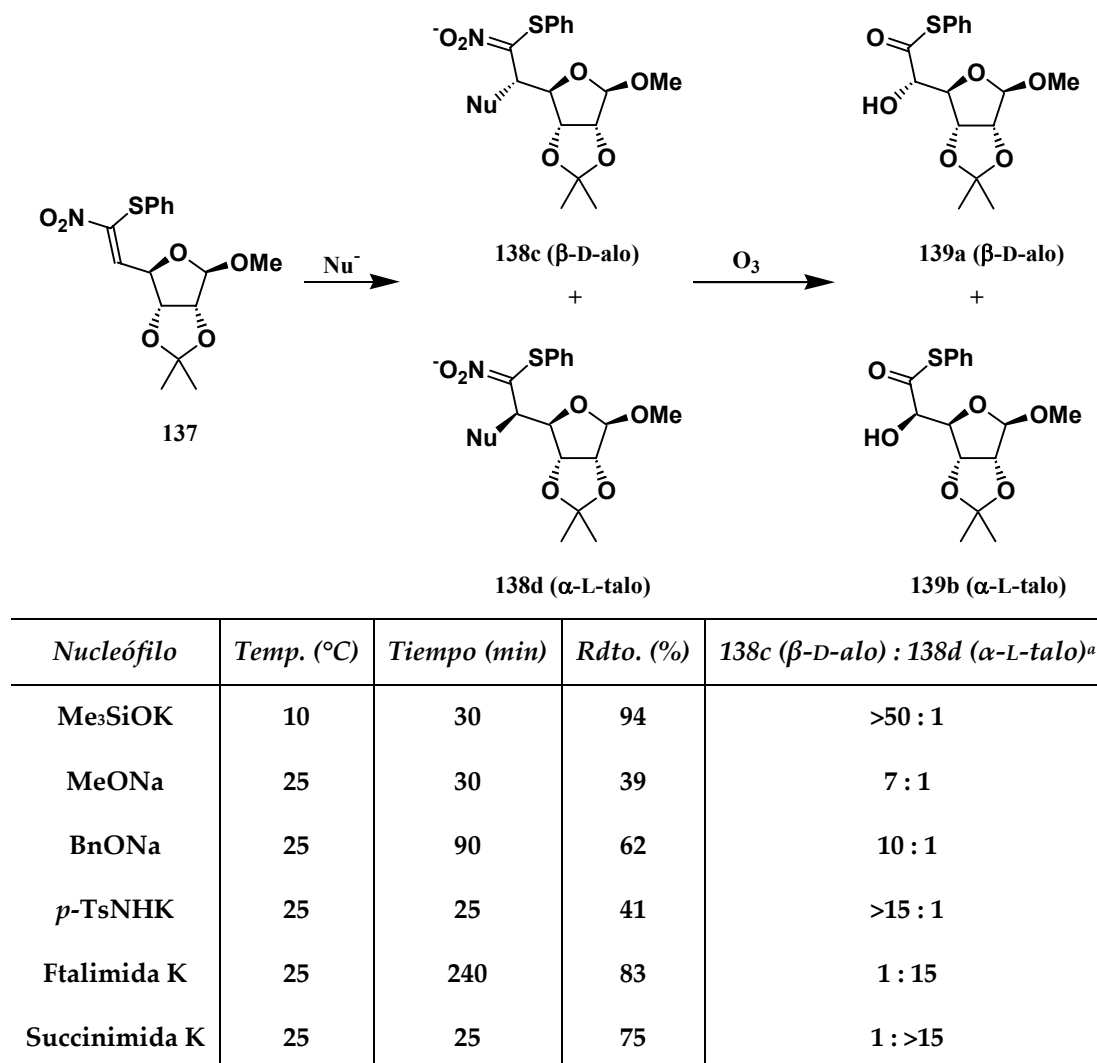
Esquema 66

La regla de Felkin-Anh tiene en cuenta factores electrónicos del doble enlace y de los sustituyentes electronegativos de sus proximidades. En olefinas con un sustituyente electronegativo en la posición α (como puede ser el oxígeno furánico del sustrato **137**) la disposición más favorecida del doble enlace con respecto al grupo electronegativo es antiperiplanar, formando un ángulo de 90° , debido a un efecto electrónico estabilizante que surge de la interacción entre un orbital sp^3 no enlazante del átomo electronegativo y el orbital π enlazante del doble enlace. Se obtienen así dos posibles conformaciones, **137a** y **137b**, que cumplen esta condición de ortogonalidad, de las que la conformación **137a** es energéticamente más favorable, por motivos estéricos. Este conformero será el mayoritario en disolución y el ataque del nucleófilo se llevará a cabo por su cara menos impedida del doble enlace, produciendo así el estereoisómero mayoritario **138a**.

En una comunicación posterior, Barrett y col. aportaron resultados obtenidos con adiciones de Michael de diversos nucleófilos sobre el mismo nitroalqueno **137**,

¹¹⁰ a) Chérest, M.; Felkin, H.; Prudent, N. "Torsional strain involving partial bonds. The stereochemistry of the lithium aluminium hydride reduction of some simple open-chain ketones" *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 2199-2204. b) Hoffmann, R. F. "Allylic 1,3-strain as a controlling factor in stereoselective transformations" *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1841-1860.

observando que en algunos casos se invertía la estereoselectividad del proceso de adición (Esquema 67).¹¹¹



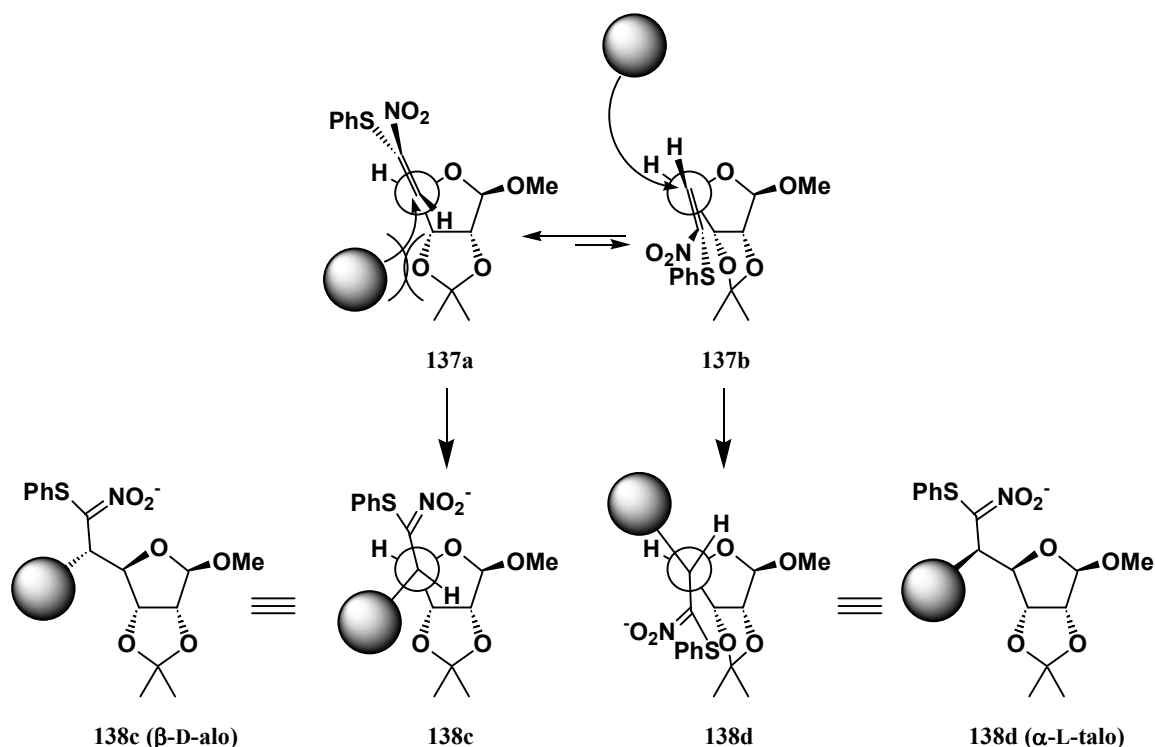
^a Relación determinada por RMN-¹H

Esquema 67

De nuevo el modelo de Felkin-Anh (Esquema 66, pág 224) explicó la diastereoselectividad de la adición en aquellos casos en que el estereoisómero mayoritario obtenido fue el de estructura de β -D-alofuranosa **138c**, independientemente del heteroátomo presente en el nucleófilo empleado (Me_3SiOK , MeONa , BnONa y *p*-TsNHK). Sin embargo, se encontró que la utilización de nucleófilos voluminosos (ftalimida y succinimida potásicas) invertía la estereoselectividad de la adición de Michael, obteniéndose ahora como estereoisómeros mayoritarios los de configuración de α -L-talofuranosa **138d**. Esta

¹¹¹ Barrett, A. G. M.; Weipert, P. D.; Dhanak, D.; Husa, R. K.; Lebold, S. A. "Stealth stereocontrol: Stereochemical reversal of a Michael addition reaction" *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9820-9824.

inversión de estereoselectividad se explicó en base a problemas estéricos de aproximación de los nucleófilos voluminosos al doble enlace de la nitroolefina **137** (Esquema 68).



Esquema 68

En este esquema se puede observar como la dirección de aproximación de Felkin-Anh de nucleófilos voluminosos al conformero **137a** se ve desfavorecida debido a la presencia del ciclo furánico adyacente al centro de ataque nucleofílico. La aproximación del sustituyente voluminoso al doble enlace del rotámero **137b** (de mayor energía que **137a**) está menos impedida estéricamente, siendo en este caso la observada experimentalmente, pese a que contradiga la regla de Felkin-Ahn. En términos energéticos podemos visualizar los dos procesos de adición con el siguiente gráfico (Figura 44, pág. 227).

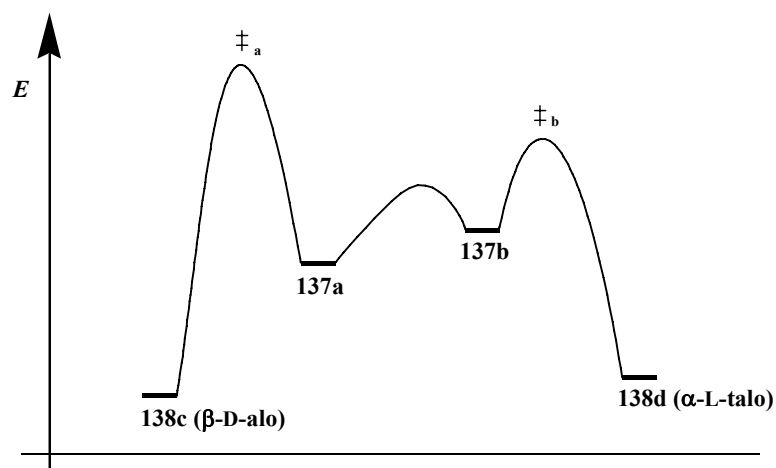


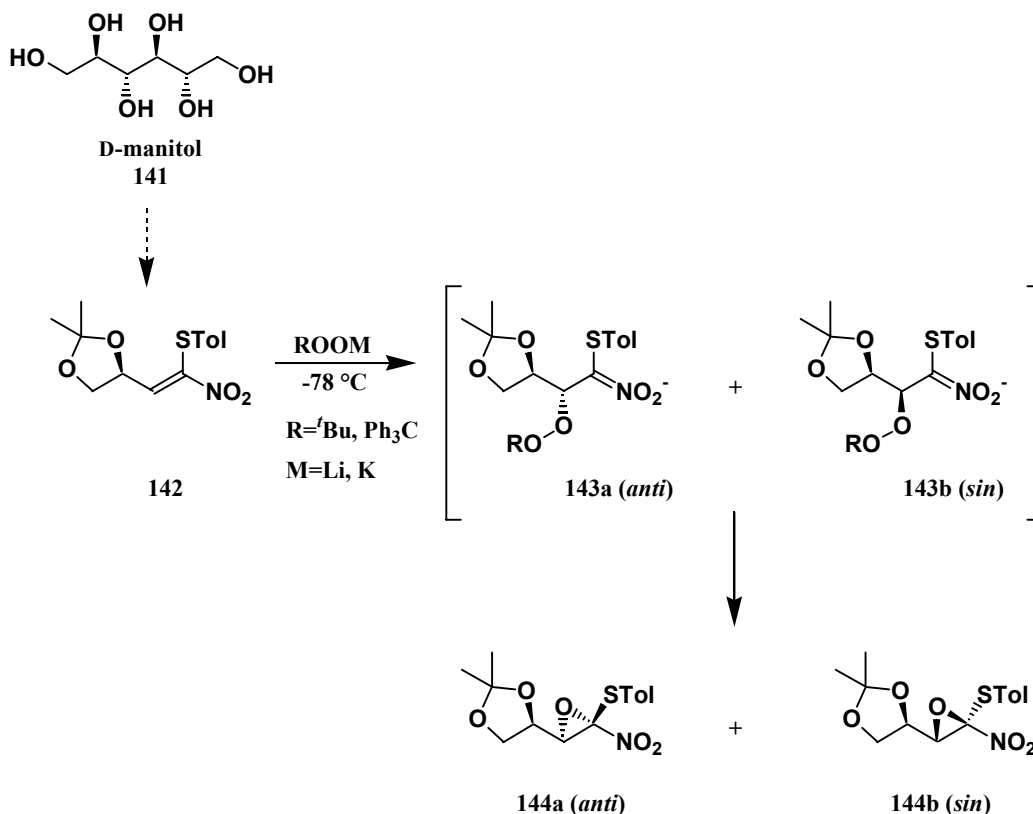
Figura 44: Aproximación del esquema energético de la adición de Michael sobre 137.

En el centro de la figura representamos los dos confórmeros (**137a** y **137b**) del nitroderivado **137**. La adición del nucleófilo a **137a** para dar **138c** pasa por un estado de transición (\ddagger_a) de muy alta energía, debido al impedimento estérico surgido en la aproximación. El menor impedimento estérico surgido en la aproximación del nucleófilo voluminoso al doble enlace del confórmero **137b**, hace que el estado de transición (\ddagger_b) para esta aproximación sea de menor energía, por lo que en este caso éste es el proceso favorecido.

Los procesos de adición de Michael también pueden modificar su estereoselectividad en función de factores electrónicos derivados de la naturaleza del contraión que acompaña al nucleófilo.

En 1995 Jackson comunicó los resultados obtenidos en reacciones de epoxidación de nitroalquenos con peroxidatos orgánicos.¹¹² Pese a que una reacción de epoxidación de un doble enlace no puede ser considerada en principio como una adición de Michael, cuando ésta se lleva a cabo sobre un nitroalqueno (Esquema 69, pág. 228), la unión del anión peroxidato para dar los intermedios **143** si cumple con las características de esta adición.

¹¹² Jackson, R. F. W.; Palmer, N. J.; Wythes, M. J.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J. "A new approach to the synthesis of β -hydroxy- α -amino acids using (aryltio)nitrooxiranes" *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6431-6440.



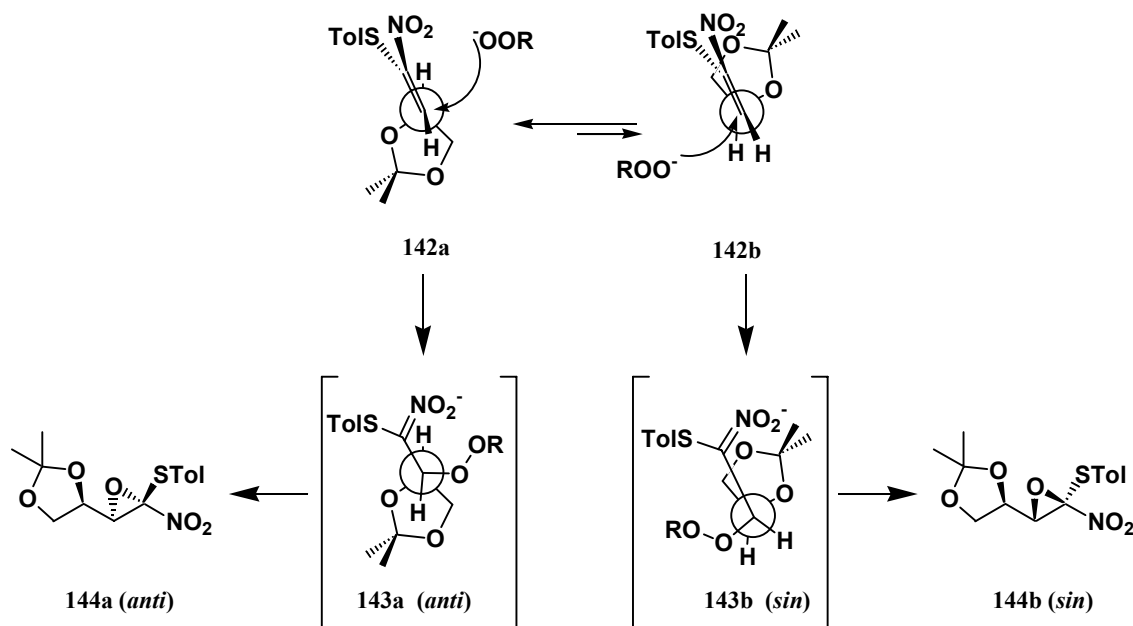
Reactivos	144a (anti) :144b (sin)
<i>t</i> BuOOLi/THF	1 : 5
<i>t</i> BuOOK/THF	6.5 : 1
<i>t</i> BuOOLi/Tolueno	1 : 15
Ph ₃ COOLi/THF	4 : 1
Ph ₃ COOK/THF	12 : 1

Esquema 69

Este Esquema 69 pone de manifiesto como el uso de diferentes tipos de nucleófilos va acompañado de cambios en la estereoselectividad del proceso. El empleo de *t*-butilperoxidato de litio o de potasio en THF conduce a estereoselectividades opuestas, lo que no puede justificarse en función de la voluminosidad del nucleófilo, como en el caso anterior (Esquema 67, pág. 225), ya que se trata del mismo nucleófilo, variando únicamente el contraión al que está unido.

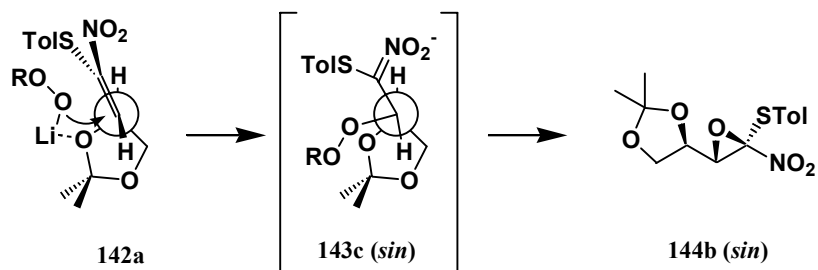
En el Esquema 70 (pág. 229) puede observarse que el modelo de Felkin-Anh predice que el compuesto de adición **144a (anti)** será el mayoritario cuando no estén

presentes factores adicionales a los contemplados por este modelo, dado que el confórmero **142a** es el energéticamente más favorable.



Esquema 70

Efectivamente, la aproximación Felkin-Anh es la que se observa cuando se utiliza como nucleófilo el *t*-butilperoxidato de potasio. Para explicar el comportamiento contrario del *t*-butilperoxidato de litio es necesario echar mano de una variación de la regla de Felkin-Anh que se produce cuando se emplean nucleófilos con cationes pequeños y muy electronegativos, como el catión litio. En estos casos la coordinación del átomo de litio al átomo de oxígeno próximo al doble enlace carbono-carbono en la conformación Felkin-Anh más favorable (**142a**) favorece la aproximación del nucleófilo por la cara más impedida del doble enlace (Esquema 71).



Esquema 71

Este modelo de aproximación, que podríamos denominar modelo de Felkin-Anh con coordinación del nucleófilo, explica por qué en este caso la

estereoselectividad del proceso de adición es la contraria a la predicha por la regla de Felkin-Anh. De acuerdo con este modelo se observó que al llevar a cabo esta reacción en tolueno en lugar de tetrahidrofurano la estereoselectividad se hiciese tres veces mayor. Ello se puede justificar admitiendo que al emplear un disolvente menos polar, disminuyen las interacciones disolvente-reactivos, con el consiguiente incremento de los efectos de coordinación entre los reactivos y el previsible aumento de la estereoselectividad predicha por la regla de Felkin-Anh con coordinación del nucleófilo (Esquema 71, pág. 229).

Por otra parte, se comprobó que durante la adición de trifenilmetilperoxidato de litio o de potasio a la nitroolefina **142**, el estereoisómero mayoritario fue siempre el **144a** (*anti*), predicho por la regla de Felkin-Anh, aunque con mejor exceso diastereomérico para la adición del derivado de potasio que para la del de litio. Este ensayo puso de manifiesto que con nucleófilos suficientemente voluminosos, la coordinación del nucleófilo a través del átomo de litio al oxígeno de la nitroolefina es más difícil, por lo que la aproximación del nucleófilo se lleva a cabo mayoritariamente siguiendo las pautas de la regla de Felkin-Anh.

En resumen, con esta serie de interesantes ejemplos hemos visto como se puede predecir y controlar la estereoselectividad en reacciones de adición de Michael sobre nitroolefinas, en función de la naturaleza de la nitroolefina, del nucleófilo, o del medio de reacción empleado. Estas variables dan una mayor versatilidad a una reacción con un amplio rango de uso en síntesis orgánica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos.

Los hidratos de carbono son compuestos especialmente útiles en síntesis orgánica como bloques de partida para la preparación de compuestos complejos con multitud de centros quirales. Dos son las razones fundamentales por las que numerosas síntesis orgánicas tienen algún tipo de hidrato de carbono como sustancia de partida:

- Asequibilidad económica. No existe en el mercado ninguna sustancia de partida económicamente más asequible que ciertos hidratos de carbono.
- Funcionalidad química. La alta sustitución presente en un hidrato de carbono, así como la selectividad con la que se puede llevar a cabo cada una de sus transformaciones, hace que sean bloques quirales excepcionalmente útiles para la preparación de numerosos compuestos químicos.

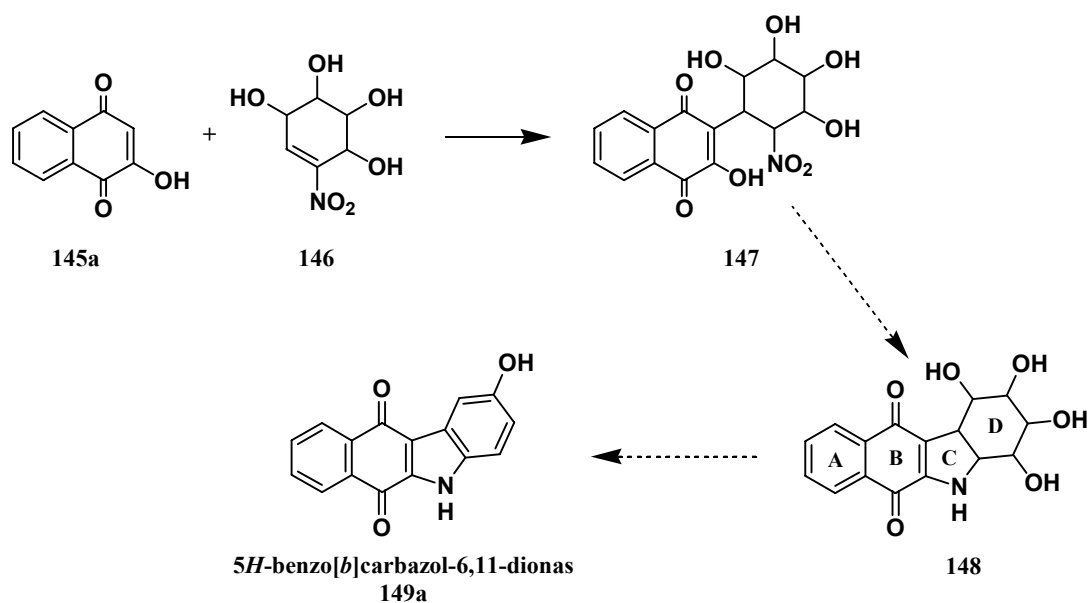
El objetivo genérico que nos hemos planteado desarrollar en la segunda parte de esta tesis doctoral es el de aprovechar la gran potencialidad sintética de los nitroazúcares para desarrollar aplicaciones sintéticas de hidratos de carbono todavía no exploradas. Esta potencialidad sintética resulta, como ya se ha indicado en esta memoria, de la combinación de las importantes propiedades químicas del grupo nitro con las posibilidades sintéticas que ofrecen los hidratos de carbono.

Este objetivo genérico se aborda en esta tesis mediante el estudio preliminar de los siguientes tres objetivos concretos: síntesis de benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas polihidroxiladas, síntesis de β -aminoácidos cicloalcanicos polihidroxilados y síntesis de iminoazúcares ramificados.

Se plantean a continuación estos tres objetivos, así como el interés de los mismos.

2.1.1. Síntesis de benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas polihidroxiladas.

Nuestro primer objetivo concreto, directamente relacionado con los trabajos previos de nuestro grupo de investigación sobre quinonas, consistió en iniciar estudios sobre la incorporación de hidratos de carbono en 1,4-naftoquinonas y explorar posibles aplicaciones sintéticas de estos compuestos novedosos. En concreto, nos propusimos iniciar estudios de preparación de nitrociclohexil-naftoquinonas **147** por adición de Michael de la naftoquinona **145a** a nitrociclohexenos polihidroxilados **146**, a preparar a partir de D-hexosas (Esquema 72, pág. 234).



Esquema 72

Una aplicación sintética de estas nitrociclohexilnaftoquinonas **147** a explorar es la correspondiente a su transformación en las hexahidrotetrahidroxi-benzo[*b*]carbazoldionas **148**, de evidente relación estructural con la 5H-benzo[*b*]carbazol-6,11-diona **149a**, en la que podrían transformarse por triple deshidratación de su anillo D (Esquema 72). Esta relación estructural entre ambos tipos de benzo[*b*]carbazoldionas es de gran interés si se tienen en cuenta las propiedades anticancerígenas de la 5H-benzo[*b*]carbazol-6,11-diona **149a**.¹¹³

Es también de gran interés la relación de estas nuevas hexahidrotetrahidroxi-benzo[*b*]carbazoldionas **148** con los antibióticos kinamicínicos **150** y con alcaloides de las *Amaryllidaceae*, como la pancratistatina **134b** (Figura 45, pág 235).¹¹⁴

¹¹³ Luo, Y. L.; Chou, T. C.; Cheng, C. C. "Design of antineoplastic agents on the basis of the "2-phenylnaphthalene-type" structural pattern 3. Synthesis and biological activity evaluation of 5H-benzo[*b*]naphtha[2,3-*d*]pyrrole-6,11-dione derivatives" *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 113-117.

¹¹⁴ Gould, S. J. "Biosynthesis of the kinamycins" *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2499-2509.

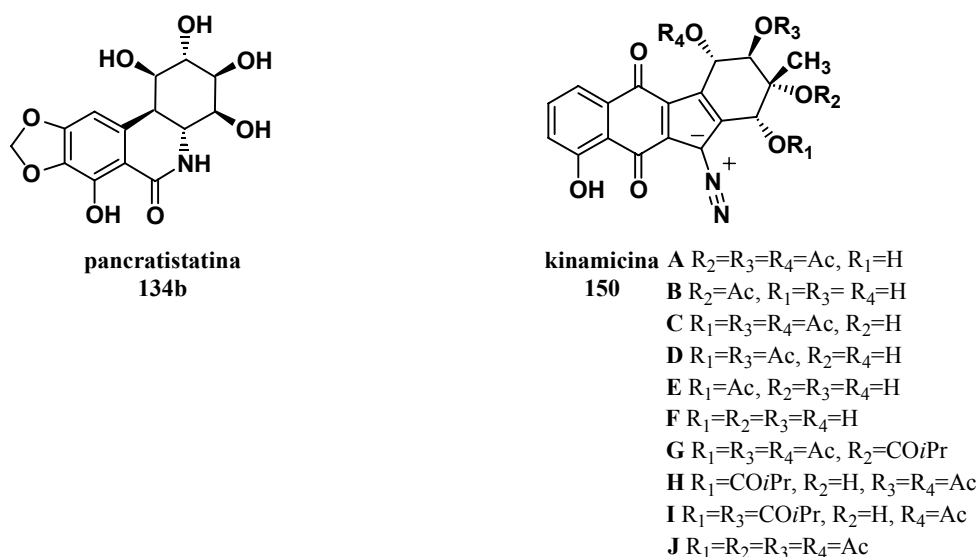


Figura 45: Estructura de la pancratistatina (134b) y de los antibióticos kinamicínicos (150).

Todo ello constituye un conjunto de elementos que inducen a pensar que estas hexahidrotetrahidroxibenzo[b]carbazoldionas **148** (Esquema 72, pág. 234) sean compuestos de potencial interés farmacológico.

2.1.2. Síntesis de β -aminoácidos cicloalcánicos polihidroxilados.

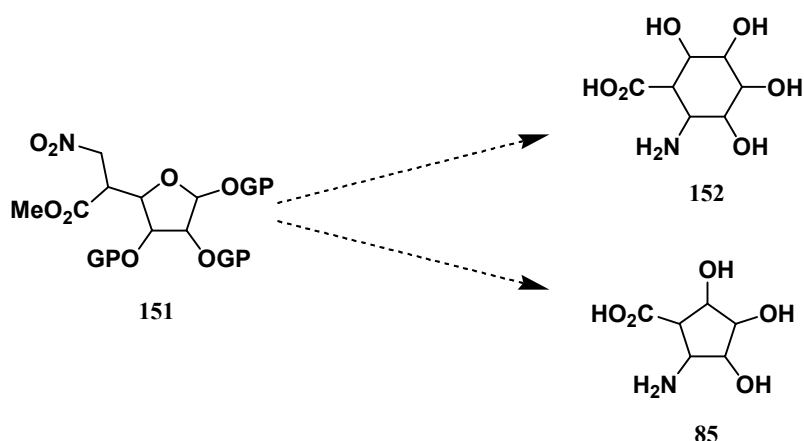
Las funciones biológicas y las limitaciones farmacológicas de los péptidos naturales han generado en los últimos años un creciente interés en la preparación de análogos resultantes de la sustitución de uno a más de sus α -aminoácidos por aminoácidos no naturales conformacionalmente restringidos. Los compuestos resultantes han incrementado su importancia, debido a las interesantes propiedades biológicas mostradas,¹¹⁵ siendo los mejores candidatos para llevar a cabo esta sustitución los β -aminoácidos, dada su resistencia a la degradación enzimática. Es

¹¹⁵ a) Gellman, S. H. "Foldamers: A manifesto" *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180. b) Kirshenbaum, K.; Zuckermann, R. N.; Dill, K. A. "Designing polymers that mimic biomolecules" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 530-535. c) Stigers, K. D.; Soth, M. J.; Nowick, J. S. "Designed molecules that fold to mimic protein secondary structures" *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 714-723. d) Andrews, M. J. L.; Tabor, A. B. "Forming stable helical peptides using natural and artificial amino acids" *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11711-11743. e) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. "Design of folded peptides" *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131-3152. f) Abele, S.; Seebach, D. "Preparation of achiral and of enantiopure geminally disubstituted β -amino acids for β -peptide synthesis" *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *1*, 1-15. g) Reinelt, S.; Marti, M.; Dedier, S.; Reitingner, T.; Folkers, G.; de Castro, J. A.; Rognan, D. " β -Amino acid scan of a class I major histocompatibility complex-restricted alloreactive T-cell epitope" *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24525-24530.

por ello, por lo que en los últimos años han sido varias las estrategias sintéticas propuestas para llevar a cabo su obtención.¹¹⁶

En conexión con los trabajos recientes de nuestro grupo de investigación sobre síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados a partir de nitrohexofuranosas, cuyo alcance y limitaciones se han indicado previamente (pág. 206-207), nos propusimos desarrollar una transformación alternativa de nitrohexofuranosas en β -aminoácidos ciclohexánicos y ciclopentánicos polihidroxilados, de previsible mayor alcance.

En la estrategia sintética a ensayar son compuestos clave las nitrohexofuranosas **151**, en las que ya está presente la funcionalidad del β -aminoácido, siendo su grupo carboximetilo el equivalente del grupo carboxilo y el grupo nitro el equivalente del grupo amino (Esquema 73).



Esquema 73

La transformación de estas nitrohexofuranosas **151** en los β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados **152** y en los β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados **85** implica aprovechar las propiedades del grupo nitro para generar los anillos ciclohexánicos o ciclopentánicos mediante reacciones de Henry

¹¹⁶ a) Lelais, G.; Seebach, D. " β^2 -Amino acids - syntheses, occurrence in natural products, and components of β -peptides" *Biopolymers* **2004**, 76, 206-243; b) Beddow, J. E.; Davies, S. G.; Smith, A. D.; Russell, A. J. "Asymmetric synthesis of 2-alkyl- and 2-aryl-3-aminopropionic acids (β^2 -amino acids) from (*S*)-*N*-acryloyl-5,5-dimethyloxazolidin-2-one SuperQuat derivatives" *Chem. Commun.* **2004**, 2778-2779; c) Sammis, G. M.; Jacobsen, E. N. "Highly enantioselective, catalytic conjugate addition of cyanide to α,β -unsaturated imides" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4442-4443. d) Davies, H. M. L.; Venkataramani, C. "Catalytic enantioselective synthesis of β^2 -amino acids" *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2197-2199. e) Bower, J. F.; Roshan, J.; Williams, A. C.; Williams, J. M. J. "Palladium-catalysed asymmetric allylic substitution: synthesis of α - and β -amino acids" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1411-1420.

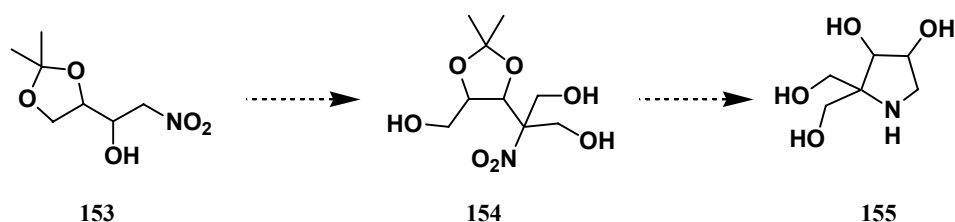
intramoleculares, para hidrolizar luego el grupo éster a ácido carboxílico y reducir el grupo nitro a amino.

2.1.3. Síntesis de iminoazúcares ramificados.

Los iminoazúcares son compuestos similares a las formas acetálicas cíclicas de los azúcares, en los que se ha sustituido el oxígeno que forma parte del ciclo por un átomo de nitrógeno. Dada la similitud estructural entre ambos tipos de compuestos, los iminoazúcares son capaces de penetrar en el sitio activo de las enzimas glicosídicas e inhibir su actividad. Esta importante propiedad ha hecho que en los últimos 30 años se hayan desarrollado numerosas síntesis de iminoazúcares de cinco, seis y siete eslabones, que han sido empleados como inhibidores de glicosidasas en el tratamiento de procesos patológicos en los que intervienen de algún modo este tipo de enzimas.¹¹⁷

Nuestro tercer objetivo concreto está relacionado con el interés que han adquirido recientemente los iminoazúcares ramificados.

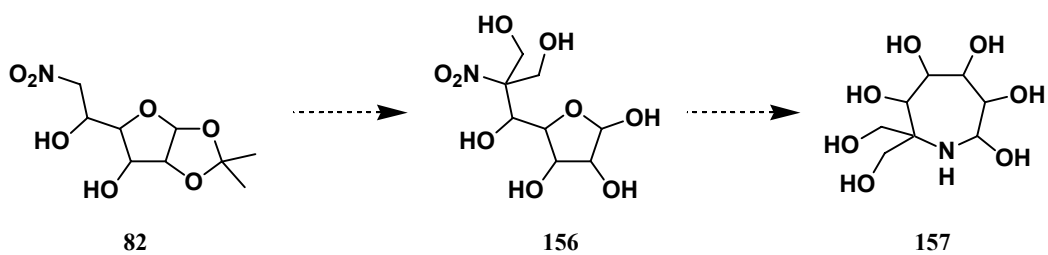
Nosotros nos propusimos iniciar estudios acerca de la aplicación de los nitroazúcares a la síntesis de iminoazúcares ramificados. En concreto decidimos investigar la estrategia siguiente de síntesis de iminopentitoles **155**, con objeto de evaluar su capacidad de inhibición de glicosidasas (Esquema 74).



Esquema 74

También nos fijamos como objetivo extender esta metodología sintética a las 6-nitrohexofuranosas **82** con objeto de preparar y evaluar biológicamente los nuevos azepanos ramificados **157** (Esquema 75, pág. 238).

¹¹⁷ a) Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. "Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin" *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-552. b) Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. "Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application" *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680.



Esquema 75

Los resultados logrados en los estudios llevados a cabo sobre estos tres objetivos concretos se exponen a continuación en los tres apartados incluidos en la parte teórica de la segunda parte de esta tesis doctoral.

3. PARTE TEÓRICA

3.1. Aplicación de nitroazúcares a la síntesis de benzocarbazoldionas polihidroxiladas.

3.1.1. Antecedentes y plan de síntesis.

Las 5*H*-benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas **149** son compuestos policíclicos formados por la fusión de un ciclo de 1,4-naftoquinona con un sistema indólico. Se trata de compuestos de origen sintético conocidos desde principios del siglo XX,¹¹⁸ que adquirieron importancia creciente a partir de 1970 a raíz de atribuirle erróneamente a los antibióticos kinamicínicos recién descubiertos¹¹⁹ estructuras de *N*-cianobenzo[*b*]carbazol-6,11-dionas **158a**, que fueron luego corregidas por las de diazobenzo[*b*]fluorendionas **150** (Figura 46).¹²⁰

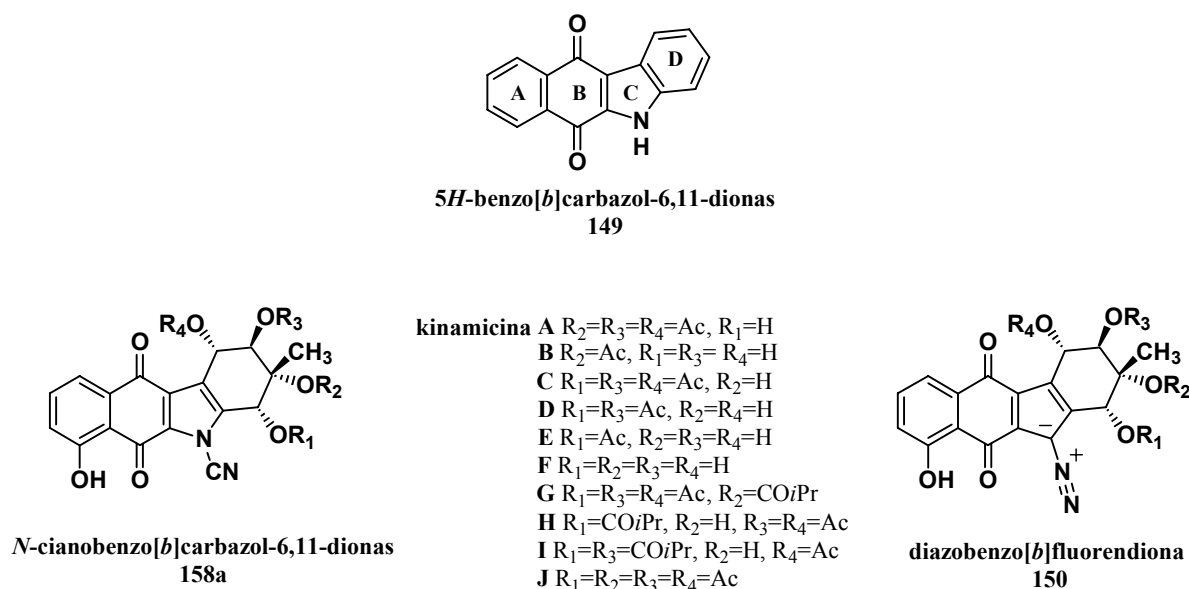


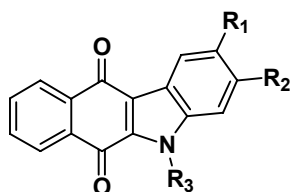
Figura 46: Estructuras inicial (**158a**) y corregida (**150**) de los antibióticos kinamicínicos.

¹¹⁸ Fries, K.; Kerkow, F. "Linear (benzonaphto)-parathiazines" *Ann.* **1922**, 427, 288-302.

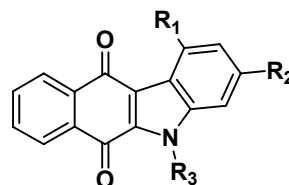
¹¹⁹ a) Ito, S.; Matsuya, T.; Ōmura, S.; Otani, M.; Nakagawa, A.; Takeshima, H.; Iwai, Y.; Ohtani, M.; Hata, T. "A new antibiotic, kinamycin" *J. Antibiot.* **1970**, 23, 315-317. b) Hata, T.; Ōmura, S.; Iwai, Y.; Nakagawa, A. Otani, M. "A new antibiotic, kinamycin: fermentation, isolation, purification and properties" *J. Antibiot.* **1971**, 24, 353-359. c) Ōmura, S.; Nakagawa, A.; Yamada, H.; Hata, T.; Furusaki, A. "Structures and biological properties of kinamycin A, B, C, and D" *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, 21, 931-940.

¹²⁰ a) Gould, S. J.; Tamayo, N.; Melville, C. R. ; Cone, M. C. "Revised structures for the kinamycin antibiotics: 5-diazobenzo[*b*]fluorenes rather than benzo[*b*]carbazole cyanamides" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2207-2208. b) Cone, M. C.; Hassan, A. M.; Gore, M. P.; Gould, S. J.; Borders, D. B.; Alluri, M. R. "Detection of phenanthroviridin a glycon in a UV mutant of *Streptomyces murayamaensis*" *J. Org Chem.* **1994**, 59, 1923-1924. c) Mithani, S.; Weeratunga, G.; Taylor, N. J.; Dmitrienko G. I. "The kinamycins are diazofluorenes and not cyanocarbazoles" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2209-2210.

Las importantes propiedades farmacológicas de los antibióticos kinamicínicos impulsaron el estudio de las benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas **149**, habiéndose preparado algunos derivados con importante actividad inhibidora contra el crecimiento de células cancerígenas en determinados tipos de leucemias (HL-60), (Figura 47).¹²¹



- 149b** R₁=OCH₃, R₂=H, R₃=H
c R₁=OCH₃, R₂=Cl, R₃=H
d R₁+R₂=OCH₂O, R₃=H
e R₁=OCOCH₃, R₂=H, R₃=H
f R₁=OCH₃, R₂=H, R₃=CH₃
g R₁=OCOCH₃, R₂=H, R₃=CH₃
h R₁=OCOCH₃, R₂=H, R₃=(CH₂)₂N(CH₃)₂
i R₁=OH, R₂=H, R₃=CH₃
j R₁=O(CH₂)₂N(CH₃)₂, R₂=H, R₃=CH₃
k R₁=O(CH₂)₂N(CH₃)₂·HCl, R₂=H, R₃=CH₃



- 149l** R₁=R₂=OCH₃, R₃=H
m R₁=R₂=OCH₃, R₃=CH₃
n R₁=R₂=OCH₃, R₃=(CH₂)₂N(CH₃)₂
o R₁=R₂=OH, R₃=H
p R₁=R₂=OH, R₃=CH₃
q R₁=OH, R₂=O(CH₂)₂N(CH₃)₂, R₃=CH₃

Figura 47: Benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas sustituidas.

A pesar del alto interés de estas benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas **149**, no se han preparado todavía análogos con los que se trate de mimetizar las estructuras polihidroxiladas naturales de los antibióticos kinamicínicos (**150**) o de los alcaloides de las *Amaryllidaceae* como la pancratistatina (**134b**), la licoricidina (**135a**) o la narciclasina (**135b**), compuestos que han demostrado tener importantes propiedades anticancerígenas, antivirales y antiparasitarias (Figura 48, pág. 243).¹²²

¹²¹ Luo, Y. L.; Chou, T. C.; Cheng, C. C. "Design of antineoplastic agents on the basis of the "2-phenylnaphthalene-type" structural pattern 3. Synthesis and biological activity evaluation of 5H-benzo[*b*]naphtha[2,3-*d*]pyrrole-6,11-dione derivatives" *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 113-117.

¹²² a) Pettit, G. R.; Pettit, G. R. III; Backhaus, R. A.; Boyd, M. R.; Meerow, A. W. "Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostyrils from *Hymenocallis*" *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 1682-1687. b) Gabrielsen, B.; Monath, T. P.; Huggins, J. W.; Kefauver, D. F.; Pettit, G. R.; Groszek, G.; Hollingshead, M.; Kirsi, J. J.; Shannon, W. M. "Antiviral (RNA) activity of selected *Amaryllidaceae* isoquinoline constituents and synthesis of related substances" *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 1569-1581. c) Amara, M. O.; Franetich, J. F.; Mazier, D.; Pettit, G. R.; Meijer, L.; Doerig, C.; Livage, I. D. "In vitro activities of two antimitotic compounds, pancratistatin and 7-deoxynarciclasine, against *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidium causing infections in humans" *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 3409-3415.

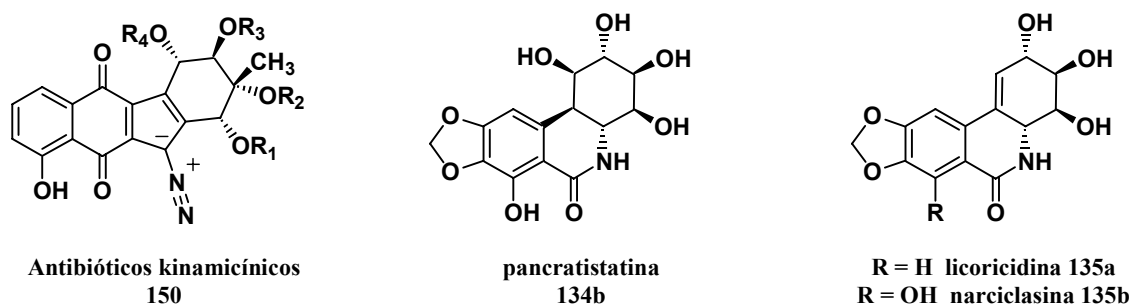


Figura 48: Estructura de antibióticos kinamicínicos y de alcaloides de las Amaryllidaceae.

Sin embargo, han sido descritas varias tetrahidrobenzo[b]carbazol-6,11-dionas **158** estructuralmente más simples, con el anillo D parcialmente hidrogenado, que se muestran en la Figura 49,¹²³ no habiéndose descrito previamente a nuestros trabajos ninguna con el anillo D totalmente hidrogenado.

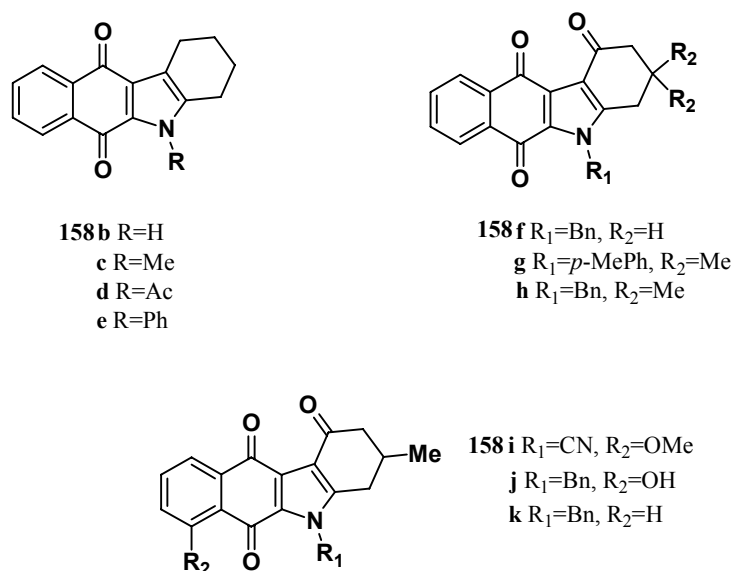
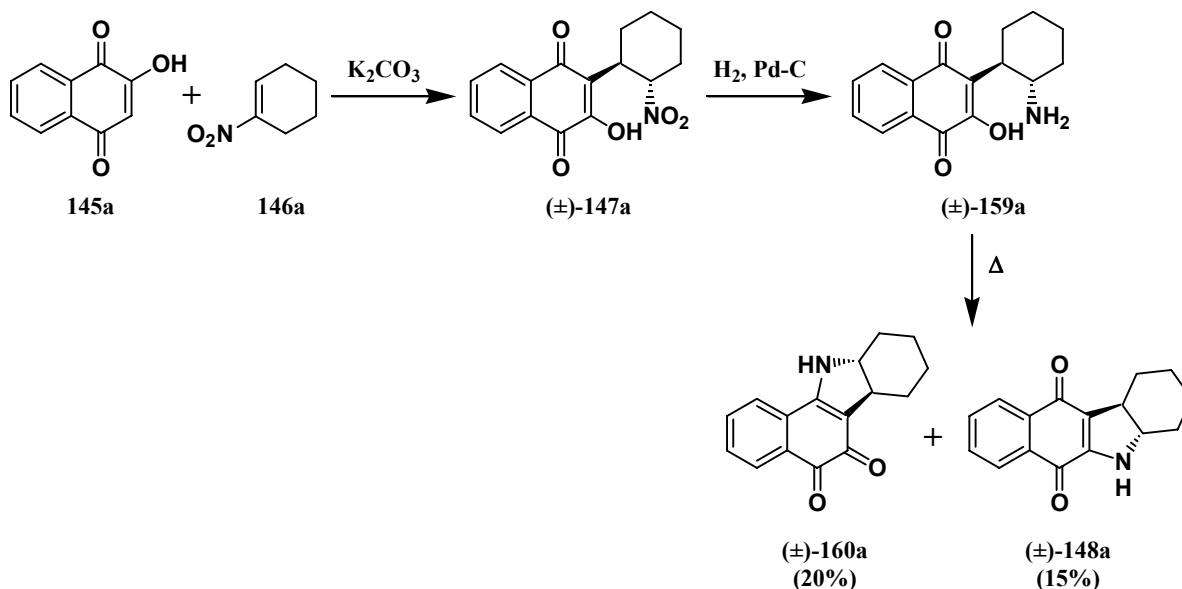


Figura 49: Ejemplos de tetrahidrobenzo[b]carbazol-6,11-dionas.

¹²³ a) Kobayashi, K.; Takeuchi, H.; Seko, S.; Kanno, Y.; Kujime, S.; Suginome, H. "Photoinduced Molecular Transformations. Part 142. One-step syntheses of 1H-benz[*f*]indole-4,9-diones and 1H-indole-4,7-diones by a new regioselective photoaddition of 2-amino-1,4-naphthoquinones and 2-amino-1,4-benzoquinones with alkenes" *Helvet. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2942-2950. b) Kobayashi, K.; Takeuchi, H.; Seko, S.; Suginome, H. "Photo-induced molecular transformations. Part 123. One-step synthesis of 1H-benz[*f*]indole-4,9-diones by a new regioselective photoaddition of 2-amino-1,4-naphthoquinone with various alkenes and its application to one-step synthesis of kinamycin skeleton" *Helvet. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1091-1094. c) Tanaka, K.; Takanoashi, A.; Morikawa, O.; Konishi, H.; Kobayashi, K. "One-pot synthesis of indolequinone derivatives from 2-acylamino-1,4-naphtho(or benzo)quinones and enamines" *Heterocycles* **2001**, *55*, 1561-1567. d) Wu, Y. L.; Chuang, C. P.; Lin, P. Y. "Oxidative free radical reactions between 2-amino-1,4-naphthoquinones and carbonyl compounds" *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5543-5549. e) Sullivan, P. J.; Moreno, R.; Murphy, W. S. "Regioselective synthesis of the kinamycin ABCD ring system" *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 535-538.

La síntesis de benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas **149** es un campo de trabajo en el que nuestro grupo de investigación tiene una gran experiencia, habiendo desarrollado varias síntesis de este tipo de compuestos.¹²⁴ Con motivo de la última contribución a este campo, se desarrolló la primera síntesis de una hexahidrobenczo[*b*]carbazol-6,11-dionas **148a**, mediante una estrategia especialmente diseñada para este propósito (Esquema 76).¹²⁵



Esquema 76

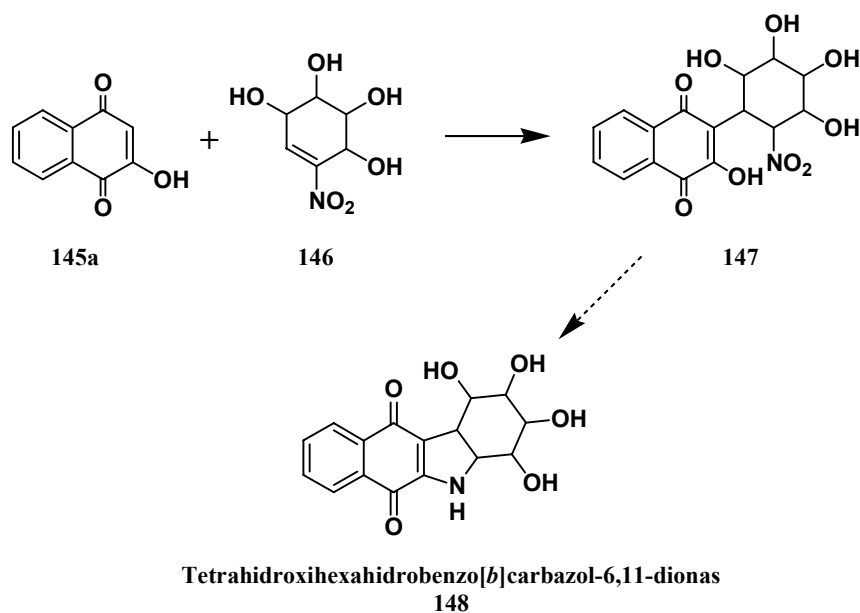
La adición de Michael de la hidroxiquinona **145a** al nitrociclohexeno **146a** condujo a la nitrociclohexilnaftoquinona **(±)-147a**, que por hidrogenación se transformó en la aminociclohexilnaftoquinona **(±)-159a**. El calentamiento de esta aminoquinona indujo su transformación en una mezcla de la

¹²⁴ a) Estévez, J. C.; Estévez, R. J.; Castedo, L. "A new, simple, efficient synthesis of benzo[*b*]carbazoles and indeno[1,2-*b*]indoles" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6479-6480. b) Cruces, J.; Estévez, J. C.; Castedo, L.; Estévez, R. J. "Palladium mediated total synthesis of *o*-acetylphenylacetic acids: a general route to indolo[2,3-*b*]naphthalene-6,11-diones" *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4825-4827. c) Cruces, J.; Martínez, E.; Treus, M.; Martínez, L. A.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J.; Castedo, L. "From phenylacetylphenylacetic acids to indoles: A simple new divergent synthesis of 6,11-dihydro-5*H*-benzo[*a*]carbazol-5,6-diones and 6,11-dihydro-5*H*-benzo[*b*]carbazol-6,11-diones" *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3015-3019. d) Barcia, J. C.; Cruces, J.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J.; Castedo, L. "Palladium-catalyzed synthesis of *o*-acetylbenzoic acids: a new, efficient general route to 2-hydroxy-3-phenyl-1,4-naphthoquinones and indolo[2,3-*b*]naphthalene-6,11-diones" *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5141-5144.

¹²⁵ Barcia, C. "Nuevas aportaciones a la síntesis de compuestos tetracíclicos de naturaleza isoquinolínica y naftoquinónica: 5,12b-dihidro-6*H*-isoindolo[1,2-*a*]isoquinolin-8-onas, 5,6,13,13a-tetrahidroisoquino[3,2-*a*]isoquinolin-8-onas, 5*H*-benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas y compuestos relacionados" 2005, Universidade de Santiago de Compostela, Servicio de publicaciones e intercambio, Santiago de Compostela.

hexahidrobenczo[*a*]carbazol-5,6-diona (\pm)-**160a** y la hexahidrobenczo[*b*]carbazol-6,11-diona (\pm)-**148a** buscada.

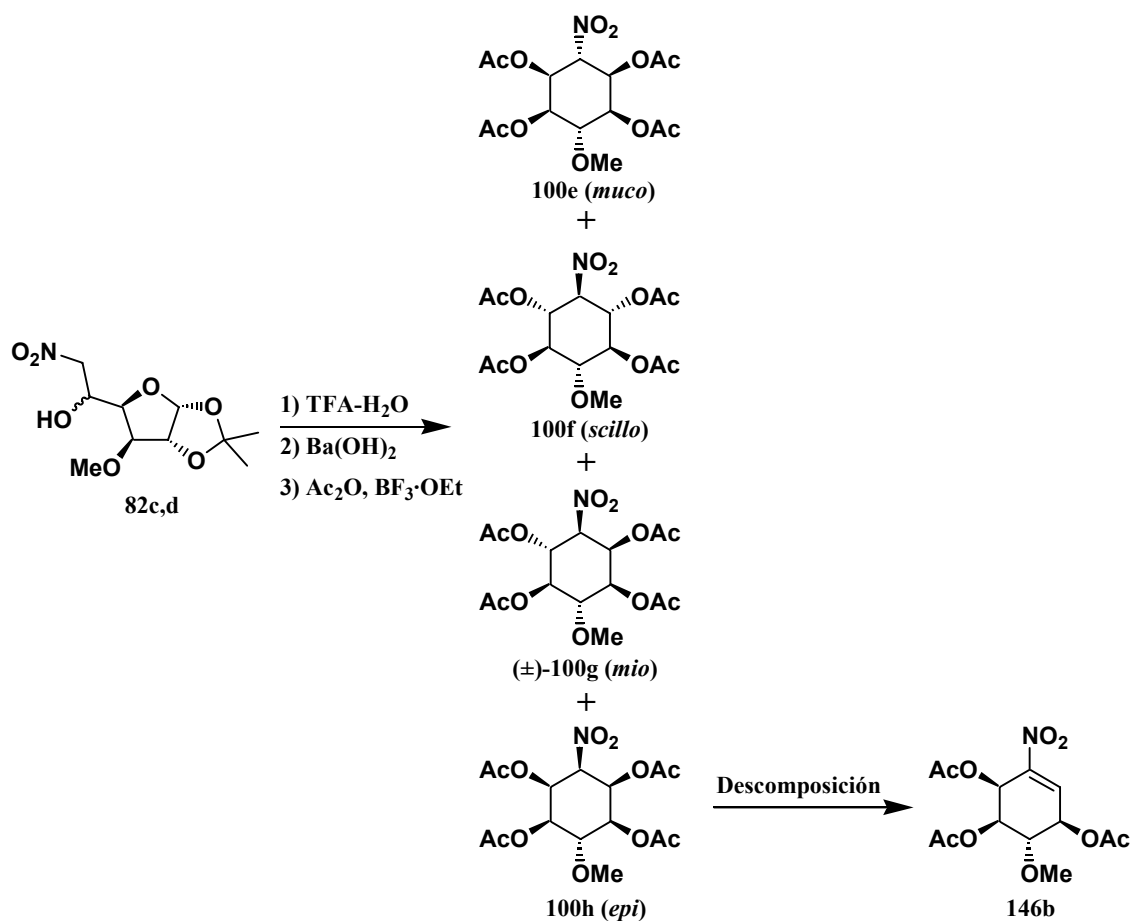
Nosotros consideramos la oportunidad de abordar la síntesis de hexahidrobenczo[*b*]carbazol-6,11-dionas polihidroxiladas **148** mediante un planteamiento similar, lo que implicaría obtener nitrociclohexilnaftoquinonas **147** por adición de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona **145a** a nitrociclohexenos polihidroxilados **146** y transformar luego estas ciclohexilnaftoquinonas **147** en nuestros objetivos sintéticos **148** (Esquema 77).



Esquema 77

Al acudir a la bibliografía, con objeto de encontrar precedentes de síntesis de nitrociclohexenos **146** a partir de azúcares, tuvimos la ocasión de establecer que esta transformación no ha sido prácticamente investigada, siendo el único caso descrito el de Baer¹²⁶ en el que se obtuvo el nitrociclohexeno **146b** por descomposición durante la cristalización del nitrotetraacetato **100h** (Esquema 78, pág. 246).

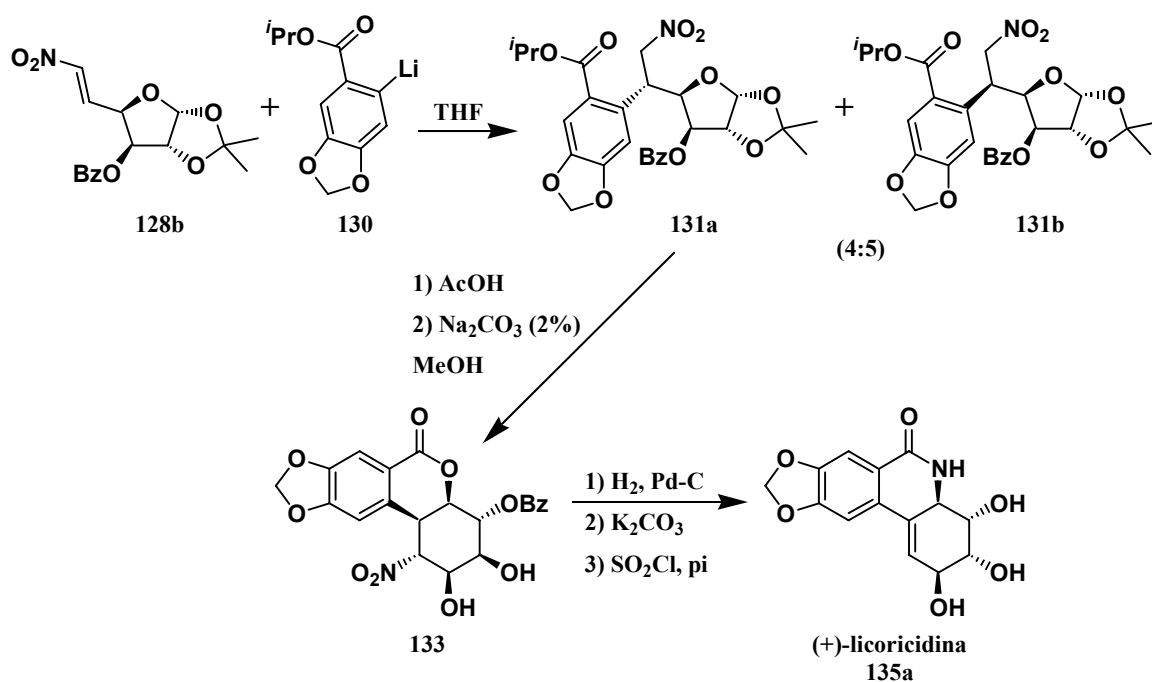
¹²⁶ Kovar, J.; Baer, H. H. "Cyclizations of dialdehydes with nitromethane. XV. Synthesis of four stereoisomeric deoxynitroinositol monomethyl ethers" *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 1801-1811.



Esquema 78

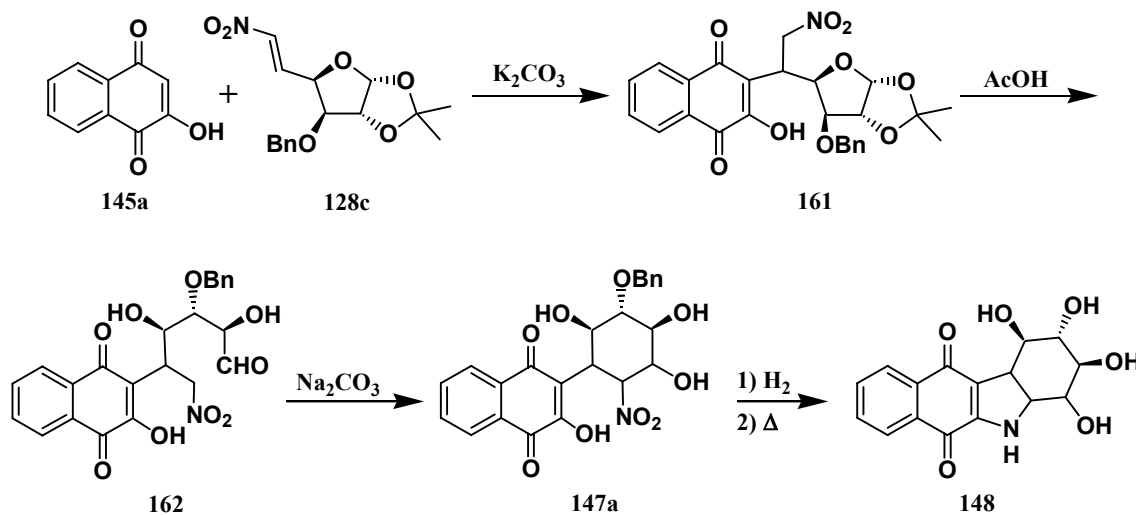
Este escaso estudio de la química de nitrociclohexenos polihidroxiados **146** nos llevó a tener en cuenta para nuestro plan de síntesis de hexahidrobencocarbazoldionas **148** el precedente siguiente de síntesis de alcaloides de las *Amaryllidaceae* (Esquema 79, pág. 247), ya expuesto previamente en el Esquema 64 de la pág. 222.¹²⁷

¹²⁷ Paulsen, H.; Stubbe, M. "Chirale synthese von (+)-lycoricidin" *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 3171-3174.



Esquema 79

De acuerdo con ello, decidimos modificar el plan inicial del Esquema 77 (pág. 245) planteando el siguiente plan de síntesis de hexahidrotetrahidroxi-benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas **148** (Esquema 80) referido al caso de la D-glucosa.



Esquema 80

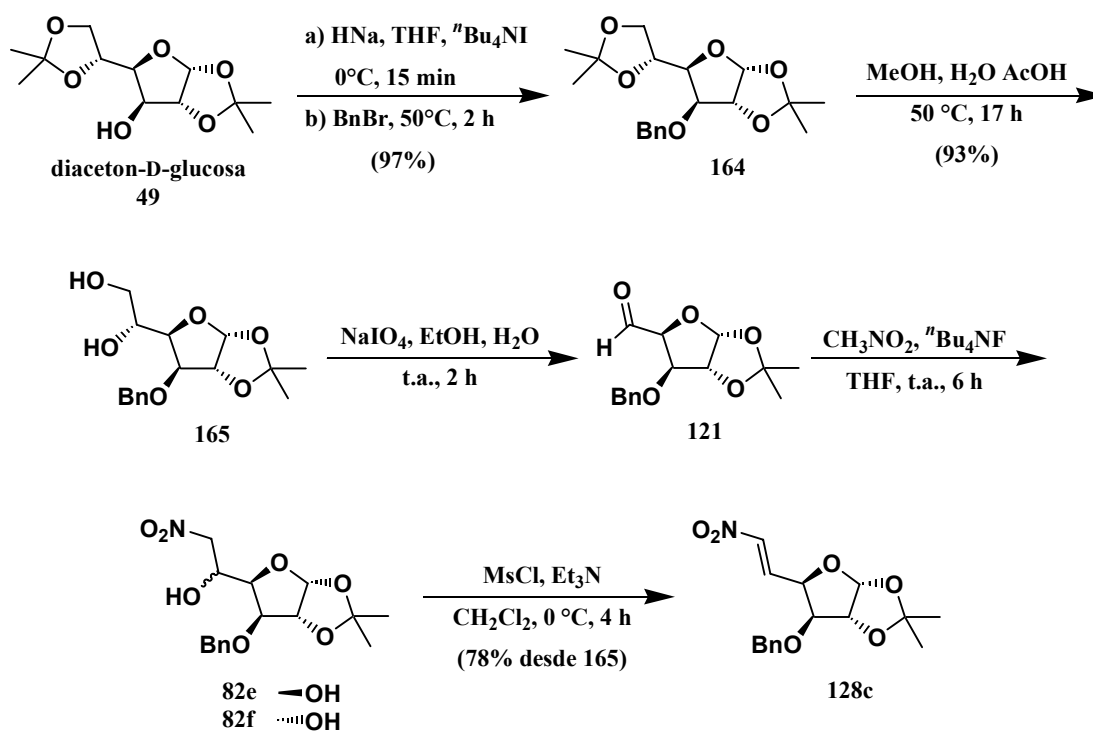
Se optó por tomar como sustancia de partida modelo para un estudio exploratorio la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (**145a**) y la nitroolefina **128c** fácil de preparar a partir de la diacetón- α -D-glucosa comercial. Una vez llevada a cabo la unión de ambos sustratos por medio de una reacción de adición de Michael, se obtendría la nitroquinona **161**, la cual, tras eliminación del grupo protector

isopropilidénico, daría el nitroaldehído **162** que en medio básico experimentaría una reacción de Henry intramolecular conducente a la nitrociclohexilnaftoquinona **147a**. La hidrogenación de su grupo nitro generaría una aminociclohexilnaftoquinona que debería ciclar a la hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazol-6,11-diona **148** buscada. No se ha especificado la estereoquímica de los centros estereogénicos que se crean en esta ruta sintética, por no ser predecibles de antemano.

Los resultados logrados en el desarrollo de este plan de síntesis se exponen a continuación.

3.1.2. Primer ensayo de síntesis de hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazol-6,11-dionas: aproximación basada en la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona.

Nuestro plan de síntesis de hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazoldionas **148** requiere partir de la nitroolefina clave **128c**, que se preparó a partir de diacetón- α -D-glucosa (**49**) como se indica en el Esquema 81.¹²⁸



Esquema 81

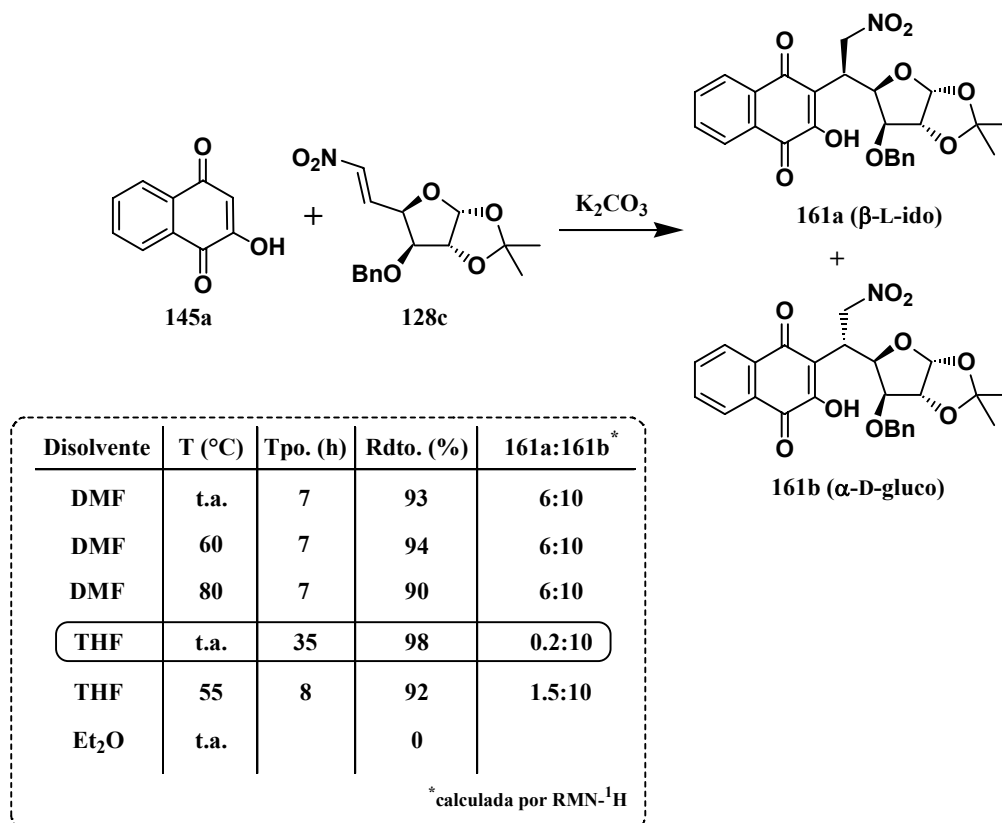
¹²⁸ Fleet, G. W. J.; Smith, P. W. "Methyl 2-azido-3-O-benzyl-2-deoxy- α -D-mannofuranoside as a divergent intermediate for the synthesis of polyhydroxylated piperidines and pyrrolidines: synthesis of 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-mannitol [2*R*,5*R*-dihydroxymethyl-3*R*,4*R*-dihydroxypyrrolidine]" *Tetrahedron* **1987**, *43*, 971-978.

Procediendo como se indica en la bibliografía, la 3-O-bencil-1,2-O-isopropililiden- α -D-glucofuranosa (**165**) se obtuvo en buen rendimiento en una secuencia en dos etapas, consistentes en la bencilación del hidroxilo libre de la posición C-3 de la diacetón-D-glucosa (**49**), seguida de la desprotección selectiva del sistema dihidroxílico de las posiciones C-5 y C-6 del compuesto **164**. La reacción del diol **165** con peryodato sódico produjo por ruptura oxidativa el aldehído **121**, que se trató directamente con nitrometano y fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahidrofurano, para dar una reacción de Henry conducente a los nitroderivados **82e,f** como mezcla de epímeros en relación 8:1 (determinada por RMN- ^1H), los cuales no se aislaron para identificación, dado que esta mezcla epimérica se trató directamente con cloruro de mesilo y trietilamina en diclorometano, para dar la nitroolefina **128c** deseada en un rendimiento del 78% (70% a partir del producto de partida comercial **49**). La caracterización de este compuesto se hizo en base a sus propiedades espectroscópicas, idénticas a las descritas en la bibliografía.¹²⁹

Aprovechando las bien conocidas propiedades nucleófilas de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (**145a**),¹³⁰ se estudió a continuación su reacción novedosa de adición de Michael a la nitroolefina **128c** (Esquema 82, pág. 250).

¹²⁹ Iida, T.; Funabashi, M.; Yoshimura, J. "Branched-chain sugars. III. Addition of vinylmagnesium bromide to 5,6-dideoxy-1,2-O-isopropylidene-6-C-nitro-3-O-substituted- α -D-xylo-hex-5-enofuranoses" *Bull. Chem. Soc. Japan* **1973**, *46*, 3203-3206.

¹³⁰ Emadi, A.; Harwood, J. S.; Kohanim, S.; Stagliano, K. W. "Regiocontrolled synthesis of the trimeric quinone framework of conocurvone" *Org. Lett.* **2002**, *4*, 521-524.



Esquema 82

En primer lugar se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente en *N,N*-dimetilformamida, obteniéndose, tras 7 h de reacción, una mezcla de los epímeros **161a** y **161b** en una relación aproximada 6:10 (25% de exceso diastereomérico, calculado por RMN-¹H, Figura 51, pág. 252), que pudieron separarse parcialmente por cromatografía en columna. Sus estructuras fueron establecidas a partir de sus propiedades espectroscópicas, muy similares para ambos compuestos, dado que en sus espectros de RMN-¹³C no se observaron las señales debidas a carbonos olefínicos y aparecieron las de la subunidad naftoquinónica. Sin embargo, estos datos espectroscópicos no nos dieron información acerca de la configuración del nuevo estereocentro formado, pero afortunadamente se pudo cristalizar el epímero mayoritario **161b** (p.f.: 130-131 °C, heptano) y obtener su imagen de difracción de Rayos X, que nos permitió asignar inequívocamente su estructura (Figura 50, pág 251).

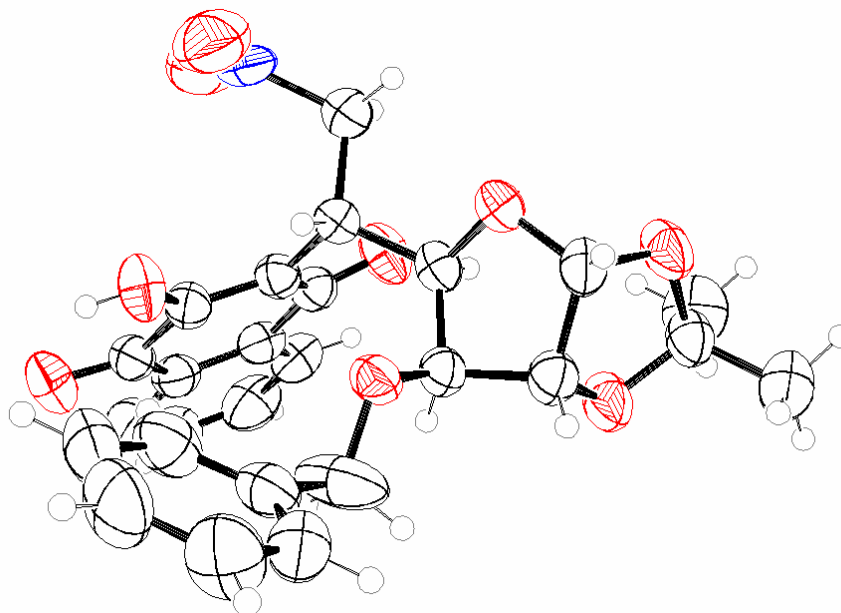


Figura 50: Representación en ORTEP-3¹³¹ del compuesto **161b**.

A continuación, para tratar de mejorar el exceso diastereomérico obtenido en esta primera adición, se estudió la influencia de ciertos parámetros en este proceso de adición de Michael, considerando en primer lugar la temperatura, observándose que se trataba de un factor no influyente, pues se obtuvieron mezclas de reacción similares en los tres casos ensayados (temperatura ambiente, 60 °C y 80 °C).

Se estudió en segundo lugar la influencia del disolvente, encontrándose que el uso de tetrahidrofurano a temperatura ambiente mejoró considerablemente la relación diastereomérica inicialmente obtenida con la *N,N*-dimetilformamida, dado que la relación epimérica de **161a**:**161b** fue ahora de 0.2:10 (96% de exceso diastereomérico, calculado por RMN-¹H, Figura 51, pág 252). También se llevó a cabo la reacción en éter etílico, pero se recuperaron los productos de partida inalterados, muy probablemente por la baja solubilidad del carbonato potásico en este disolvente.

Los excesos epiméricos se establecieron a partir de los espectros de RMN-¹H de los crudos de reacción, tomando como base de medida la intensidad de la señal del protón anomérico (H-1) de las furanosas **161a** y **161b**, que suele aparecer suficientemente alejado del resto de las señales, a valores próximos a 6 ppm. Ello

¹³¹ Farrugia, L. J. "ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI)" *J. Appl. Cryst.* **1997**, 30, 565-566.

permitió determinar sin problema la intensidad relativa de dicha señal para ambos epímeros y determinar a partir de ellas su proporción (Figura 51).

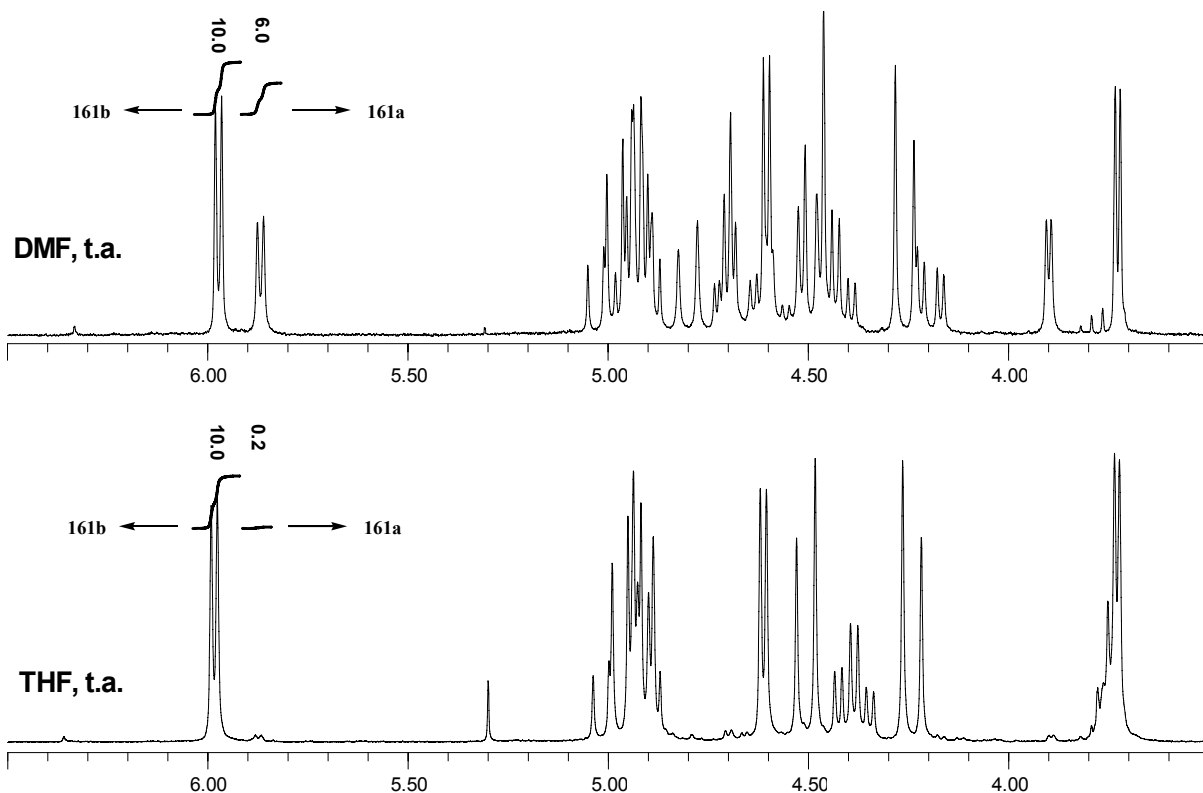
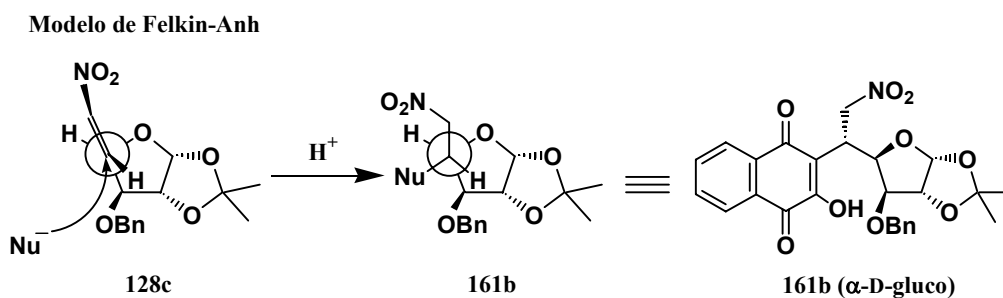


Figura 51: Detalle de los espectros de RMN-¹H de los crudos de reacción en DMF y en THF a temperatura ambiente.

La estereoselectividad observada en este proceso pudo explicarse fácilmente mediante el modelo de Felkin-Anh (Esquema 83).

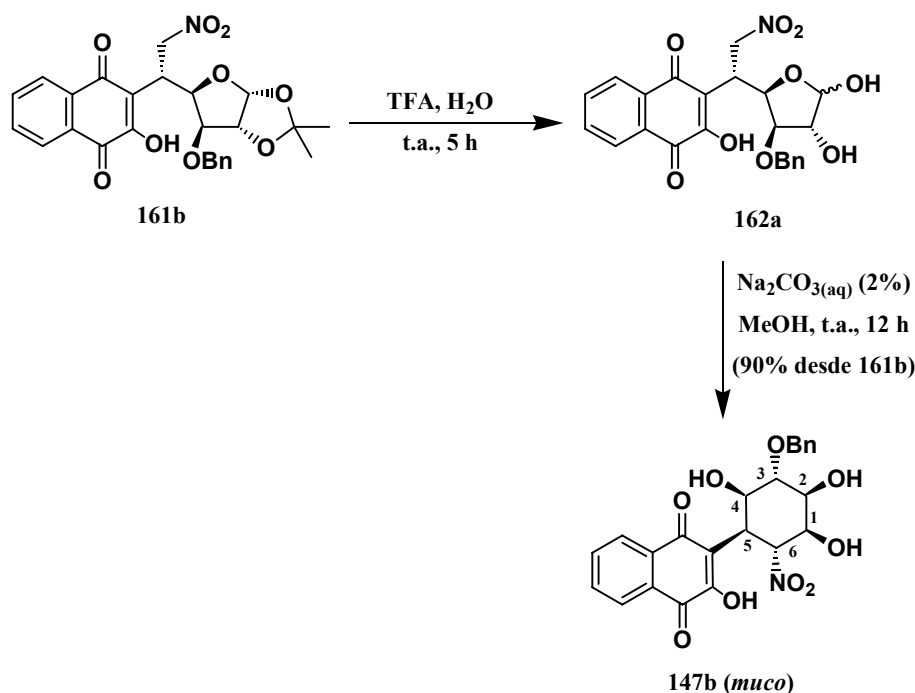


Esquema 83

Efectivamente, considerando la conformación de 128c en la que el doble enlace carbono-carbono está dispuesto ortogonalmente al sustituyente electronegativo (átomo de oxígeno endocíclico) y dirigido hacia el sustituyente menos voluminoso, el ataque por la cara contraria al sustituyente electronegativo (átomo de oxígeno endocíclico) explica el exceso diastereomérico observado

experimentalmente. La influencia de la polaridad del disolvente en dicho exceso está relacionada con la capacidad de los disolventes más polares para coordinar de manera más efectiva el nitroalqueno, permitiendo que el ataque del nucleófilo por la cara más impedida del doble enlace esté menos desfavorecido.

Prosiguiendo con nuestro plan de trabajo, la siguiente reacción a realizar fue la transformación de la naftilnitrofurano **161b** en la nitrociclohexilnaftoquinona **147b** (Esquema 84).



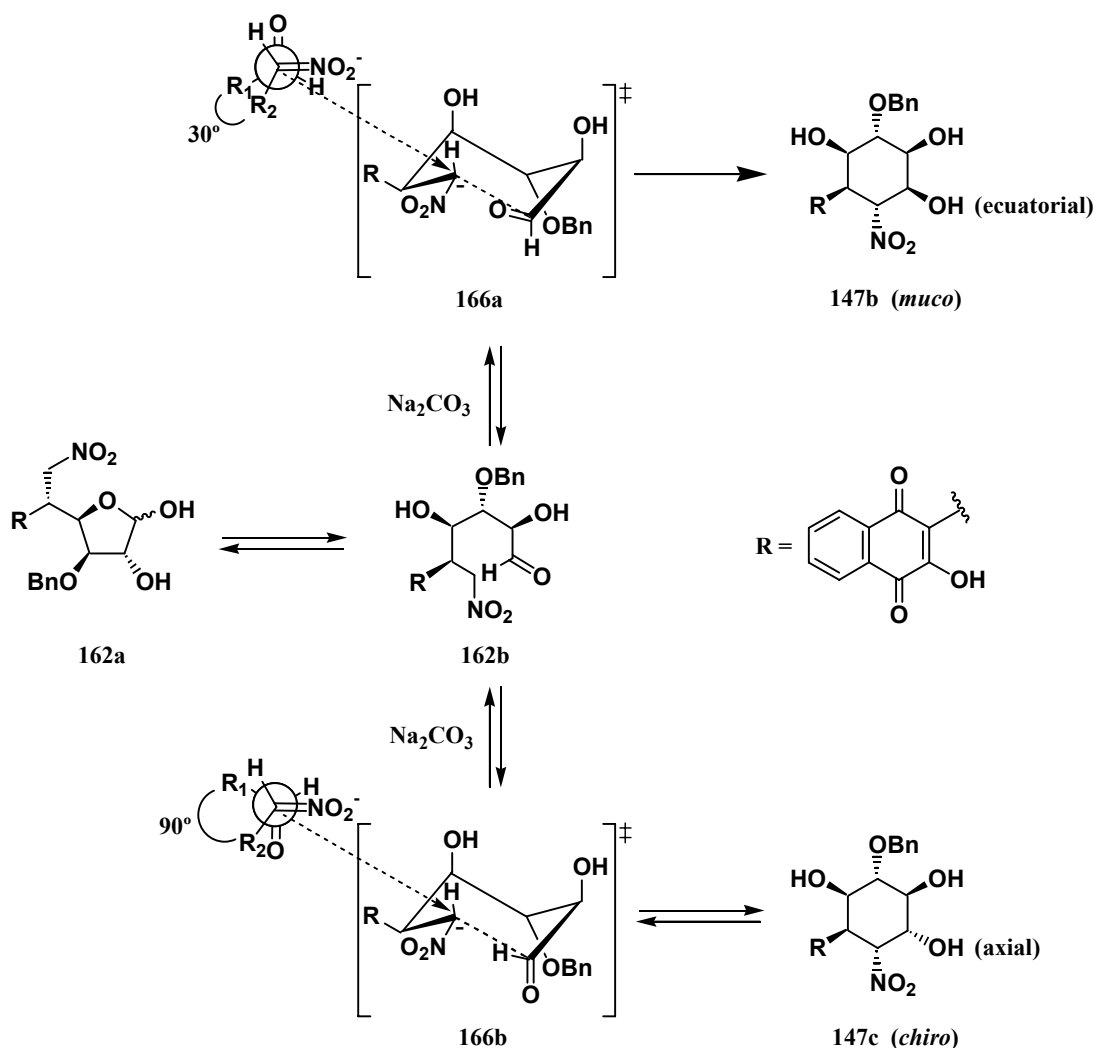
Esquema 84

Siguiendo la misma estrategia que la empleada por Paulsen en su síntesis de la (+)-licoricidina (Esquema 64, pág. 222)¹³², nuestra transformación se abordó generando primero la furanosa desprotegida **162a**, por reacción del epímero **161b** con ácido trifluoroacético y agua a temperatura ambiente. Esta glucofuranosa desprotegida **162a**, se disolvió directamente en metanol y se trató con disolución acuosa al 2% de carbonato sódico, conduciendo, tras purificación cromatográfica, al naftil-*muco*-nitroinositol **147b** como único producto de reacción.

Este resultado se puede explicar en términos mecanísticos, admitiendo que la forma abierta **162b** (Esquema 85, pág. 254) de la nitrofurano **162a** puede adoptar las dos conformaciones silla **166a** y **166b**, en las que se cumple que los dipolos del nitronato y el carbonilo forman un ángulo de 90° (tal y como se explicó en la

¹³² Paulsen, H.; Stubbe, M. "Chirale Synthese von (+)-Lycoricidin" *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3171-3174.

discusión teórica de la reacción de Henry de las pág. 208-209). En ambos conformeros los grupos quinona y nitro (más voluminosos) se disponen ecuatorialmente, teniendo los sustituyentes de los otros tres centros estereogénicos la disposición relativa que les corresponde. En el estado de transición tipo silla **166a** el ángulo diedro entre los enlaces carbono-carbono es de 30° , mientras que en el **166b** es de 90° . Esto implica que el estado de transición **166a** sea energéticamente más desfavorable que el **166b** dado que el primero tiene los sustituyentes más voluminosos más cercanos en el espacio. Sin embargo, el ciclohexano **147b** por tener el hidroxilo C-1 en disposición ecuatorial debe ser termodinámicamente más estable que el ciclohexano **147c**. La formación exclusiva del estereoisómero **147b** se justifica por equilibración entre los dos estereoisómeros formados, dado que el carácter reversible de la reacción de Henry permite que **147c** revierta a **147b** mediante una reacción de retro-Henry. Consiguientemente el proceso se orienta progresivamente en el sentido más favorecido termodinámicamente.



Esquema 85

La caracterización del *muco*-nitroinositol **147b** obtenido se realizó en base a sus propiedades espectroscópicas. La ausencia en su espectro de RMN-¹³C de la señal del grupo CH₂ de la posición C-6 de la furanosa precursora **161b** indicó claramente que había tenido lugar la ciclación deseada. La presencia en su espectro de RMN-¹H de un triplete debido al protón H-6 geminal al grupo nitro ($\delta=6.03$ ppm, $J_{1,6}=J_{5,6}=11.0$ Hz), indicó la existencia de un doble acoplamiento diaxial de este protón con los protones adyacentes H-1 y H-5 (geminales con los grupos hidroxilo de C-1 e hidroxiquinona, respectivamente), confirmándonos la disposición alternada de estos tres protones (Figura 52).

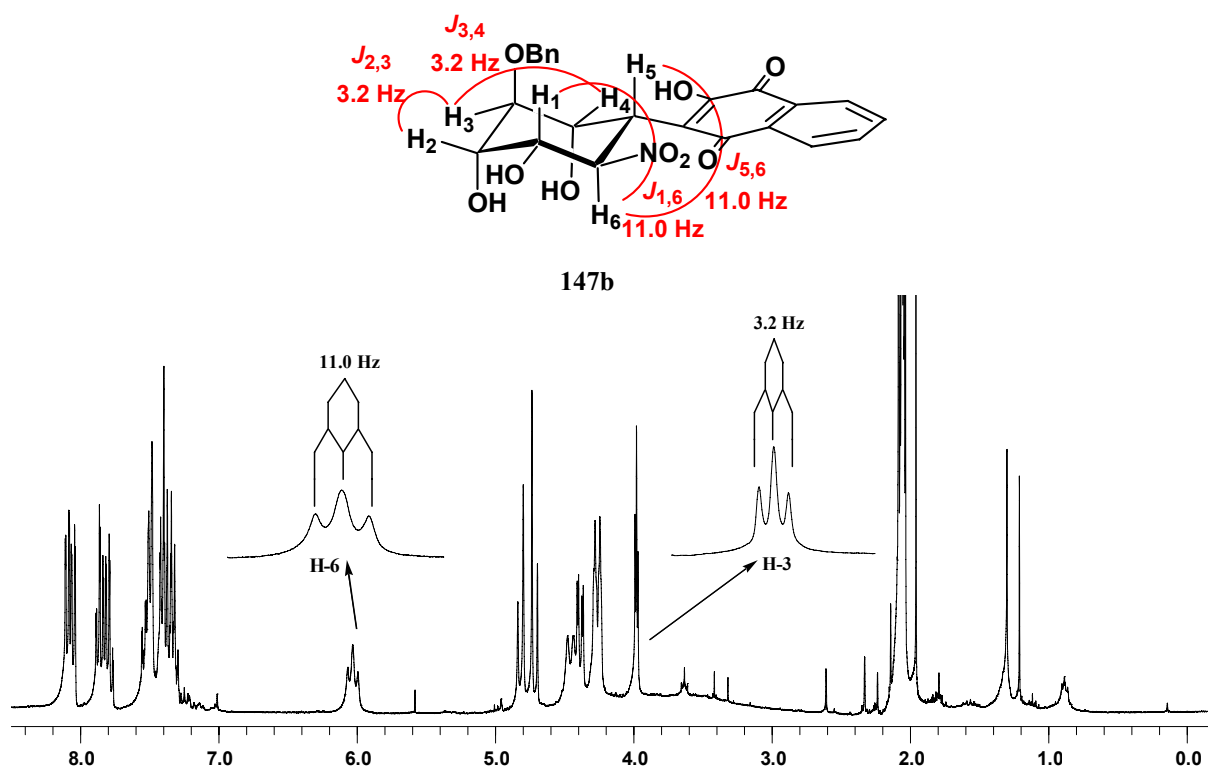


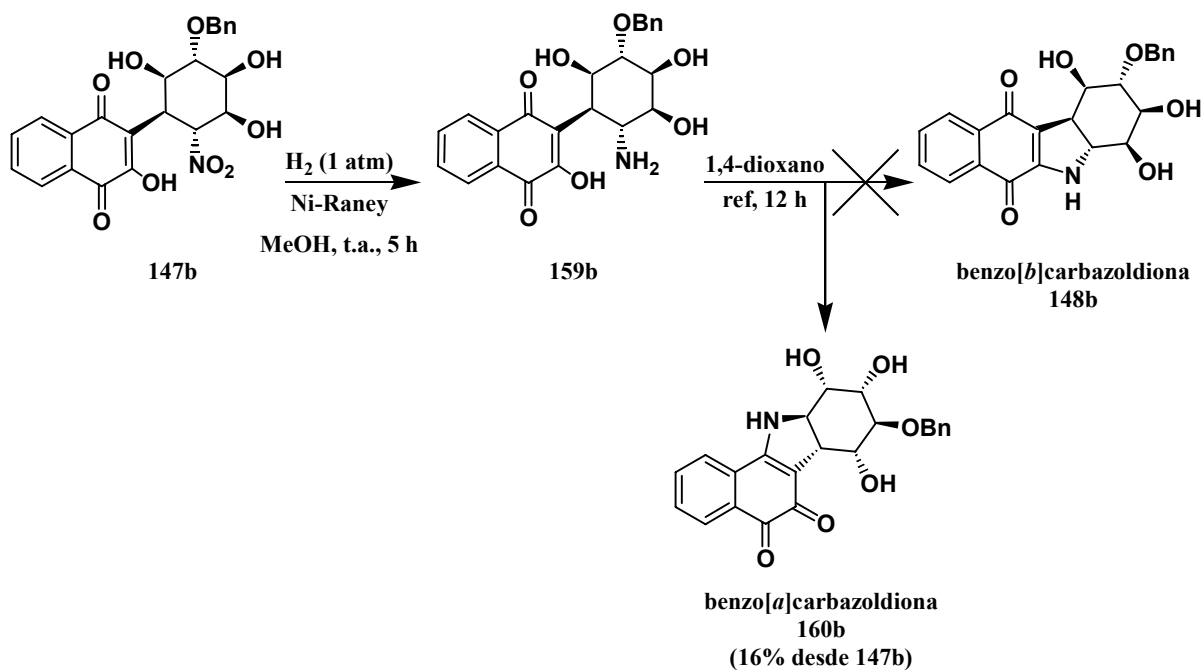
Figura 52: Espectro de RMN-¹H de **147b** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-6 y H-3.

Además, la presencia de un triplete correspondiente al protón H-3 geminal al grupo OBn ($\delta=3.98$ ppm, $J_{2,3}=J_{3,4}=3.2$ Hz) indica la disposición ecuatorial de los protones H-2, H-3 y H-4.

Obtenido el nitroinositol **147b**, se abordó la fase final de nuestro plan de síntesis de hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazoldionas. Se esperaba que la hidrogenación catalítica del grupo nitro¹³³ condujese al aminociclohexano **159b**, y

¹³³ Hass, H. B.; Berry, E. J.; Bender, M. L. "Carbon aralkylations of nitro paraffins" *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2290-2291.

que la posterior reacción de heteroanulación generase la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** deseada (Esquema 86).



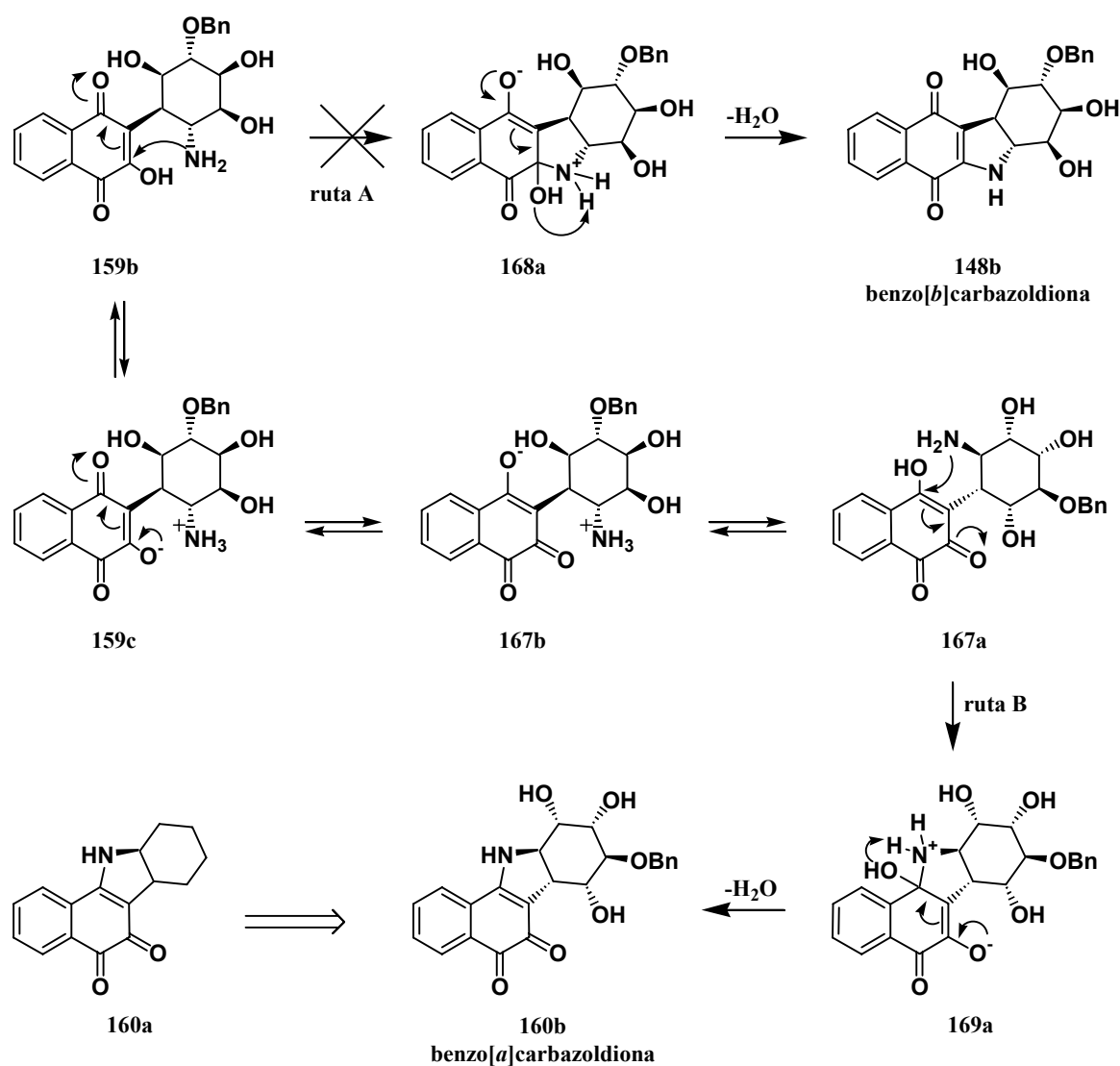
Esquema 86

Desafortunadamente, la ciclación intramolecular de **159b**, obtenido a partir del nitroderivado **147d** por hidrogenación catalítica con níquel Raney, no condujo a la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** esperada, sino a la benzo[*a*]carbazoldiona **160b**. A pesar de las similitudes estructurales entre la benzo[*a*]carbazoldiona **160b** y la benzo[*b*]carbazoldiona **148b**, propusimos que el producto obtenido era la benzo[*a*]carbazoldiona **160b**. La experiencia adquirida en nuestro grupo de investigación en la síntesis de este tipo de compuestos,¹³⁴ nos permitió saber que las benzo[*a*]carbazoldionas son sólidos rojos, con espectros de IR en los que las señales de los carbonilos aparecen como dos bandas entre 1600 y 1700 cm^{-1} y con espectros de RMN-¹³C en los que las dos señales de los carbonilos aparecen en torno a 180 ppm con muy poco margen de separación entre ellas (menos de 3 ppm). También pudimos establecer que las benzo[*b*]carbazoldionas son sólidos violetas oscuros, con espectros de IR en los que las señales de los carbonilos aparecen como una única banda entre 1600 y 1700 cm^{-1} y con espectros de RMN-¹³C en los que los carbonilos aparecen en torno a 170-185 ppm pero con una separación de 5-10 ppm entre las dos

¹³⁴ Cruces, J.; Martínez, E.; Treus, M.; Martínez, L. A.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J.; Castedo, L. "From phenylacetylphenylacetic acids to indoles: A simple new divergent synthesis of 6,11-dihydro-5H-benzo[*a*]carbazol-5,6-diones and 6,11-dihydro-5H-benzo[*b*]carbazol-6,11-diones" *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3015-3019.

señales. Nuestro compuesto **160b**, resultó ser un sólido rojo en cuyo espectro de IR aparecieron dos bandas a 1623 y 1671 cm^{-1} y en su espectro de RMN- ^{13}C las señales debidas a los carbonilos aparecieron a 180.6 y 182.4 ppm. Ello se asoció a la formación de la unidad de benzo[*a*]carbazoldiona.

La formación de **160b** puede racionalizarse en los términos expresados en el Esquema 87. La aminociclohexilnaftoquinona **159b**, existiría como una mezcla en equilibrio de dos formas tautoméricas **159b** y **167a**. El ataque conjugado intramolecular del grupo amino de **159b** al sistema *p*-quinónico conduciría a la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** deseada, previa deshidratación del intermedio **168a** inicialmente formado. Alternativamente, el ataque intramolecular del grupo amino del tautómero **167a** a su sistema *o*-quinónico conduciría a la benzo[*a*]carbazoldiona **160b** obtenida, a través de su precursor **169a**.



Esquema 87

Este resultado de obtención selectiva de la benzo[*a*]carbazoldiona **160b** no deja de ser sorprendente, toda vez que sería más probable que se formase una mezcla de las benzocarbazoldionas **148b** y **160b** correspondientes a los dos modos posibles de ciclación indicados para **159b**.

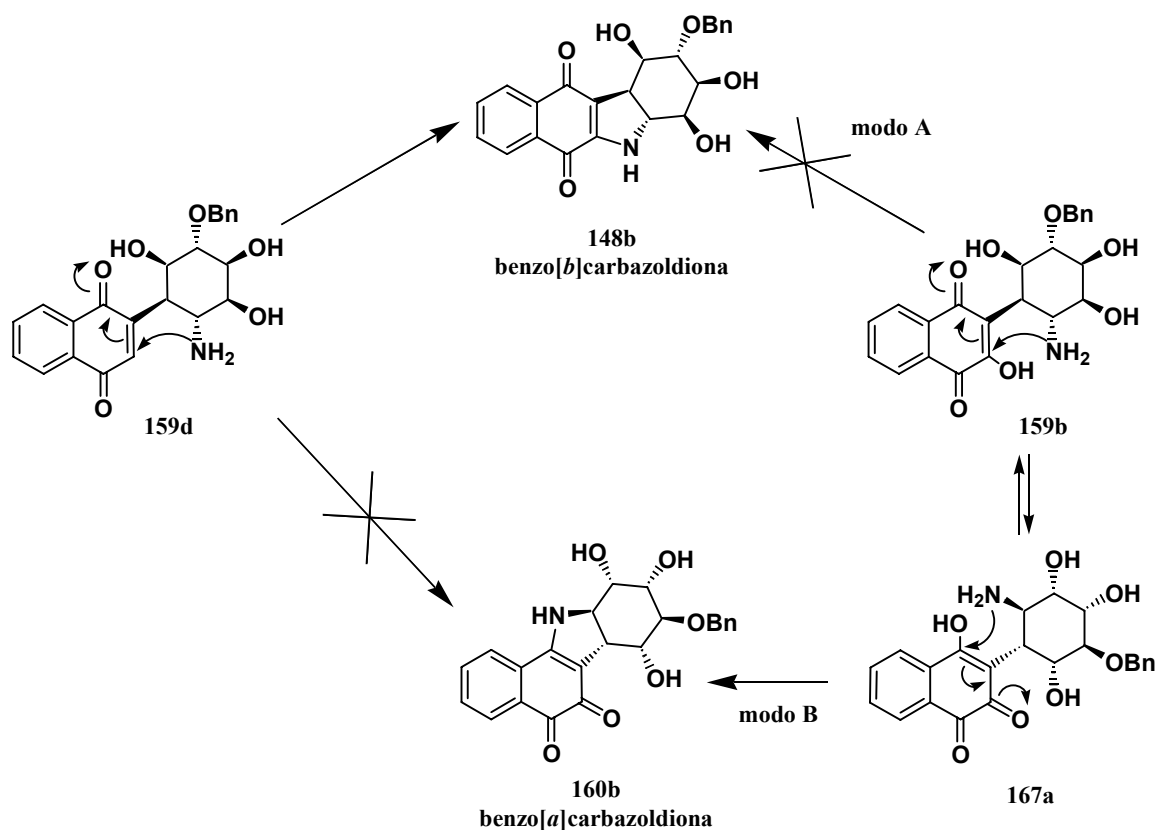
Se trata en cualquier caso de un resultado extraordinariamente interesante, porque, aunque no se pudo obtener la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** deseada, se consiguió preparar por primera vez una hexahidrotetrahidroxibenzo[*a*]carbazol-5,6-diona **160b**, con relación estructural con la benzo[*a*]carbazoldiona **160a** previamente preparada por nosotros.¹³⁵

3.1.3. Segundo ensayo de síntesis de hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazol-6,11-dionas: aproximación basada en el 1,4-dimetoxinaftaleno.

En el apartado anterior se pudo establecer que la aminociclohexilhidroxinaftoquinona **159b** puede existir en equilibrio con su tautómero **167a**, por lo que el grupo amino puede atacar intramolecularmente al sistema quinónico de las dos maneras indicadas en el Esquema 87 (pág. 257), observándose únicamente el modo de ataque B, lo que impidió obtener la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** deseada.

Es evidente que la presencia del grupo OH en la posición C-3 del ciclo naftoquinónico de **159b** es imprescindible para que pueda formarse la benzo[*a*]carbazoldiona **160b** obtenida. Ello nos llevó a introducir en la ruta sintética expuesta en el apartado previo (Esquemas 86 y 87, pág. 256 y 257) una modificación consistente en excluir la presencia de dicho grupo OH, lo que debería permitir generar la aminociclohexilnaftoquinona **159d**, que sólo admite un modo de adición conjugada del grupo amino al sistema quinónico, que conduciría inevitablemente a la benzo[*b*]carbazoldiona **148b**, que nos habíamos propuesto sintetizar (Esquema 88, pág 259).

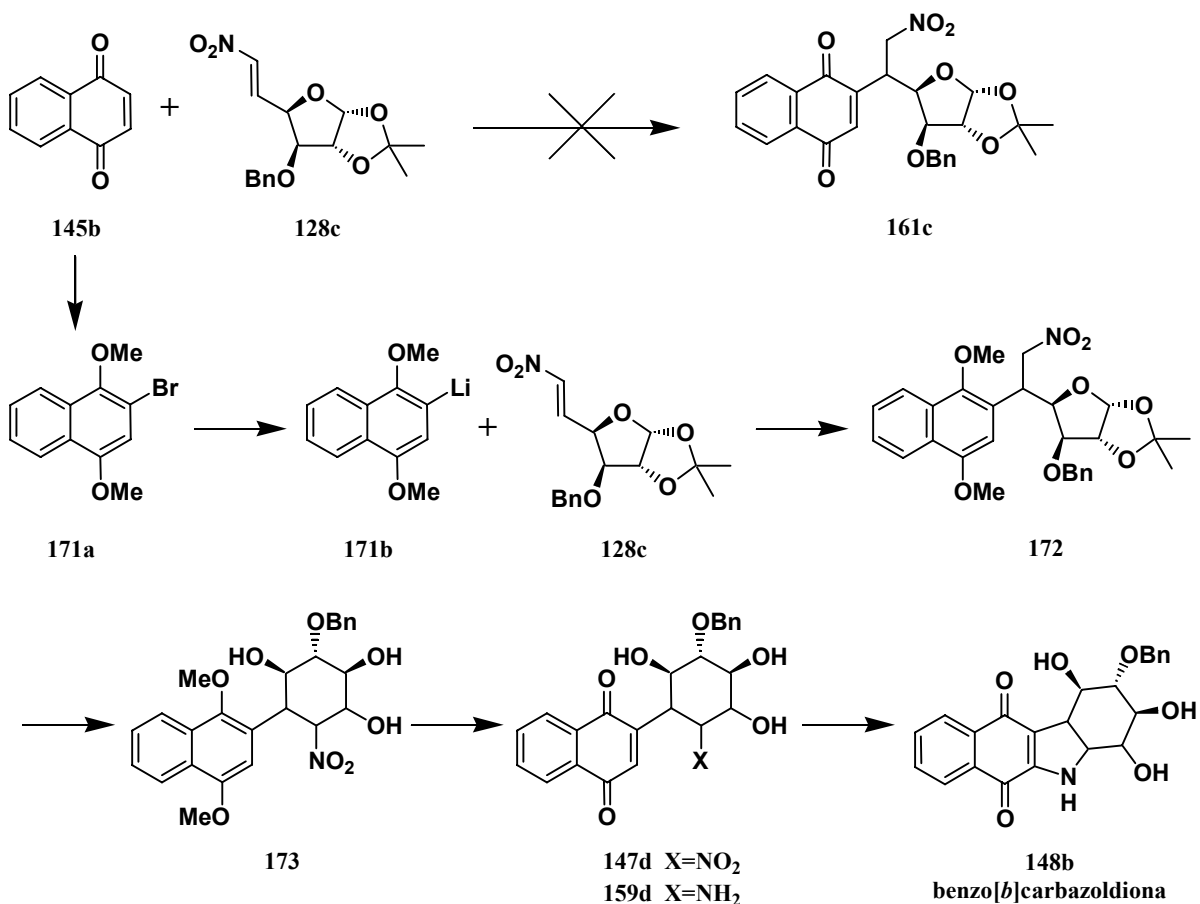
¹³⁵ a) Barcia, C. "Nuevas aportaciones a la síntesis de compuestos tetracíclicos de naturaleza isoquinolínica y naftoquinónica: 5,12b-dihidro-6H-isoindolo[1,2-*a*]isoquinolin-8-onas, 5,6,13,13a-tetrahidroisoquino[3,2-*a*]isoquinolin-8-onas, 5H-benzo[*b*]carbazol-6,11-dionas y compuestos relacionados" 2005, Universidade de Santiago de Compostela, Servicio de publicaciones e intercambio, Santiago de Compostela. b) Cruces, J.; Martínez, E.; Treus, M.; Martínez, L. A.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J.; Castedo, L. "From phenylacetylphenylacetic acids to indoles: A simple new divergent synthesis of 6,11-dihydro-5H-benzo[*a*]carbazol-5,6-diones and 6,11-dihydro-5H-benzo[*b*]carbazol-6,11-diones" *Tetrahedron* **2002**, 58, 3015-3019.



Esquema 88

La manera más sencilla de implementar sintéticamente esta idea consistiría en plantear una etapa inicial similar a la del apartado previo, empleando ahora como quinona de partida la 1,4-naftoquinona (**145b**) (carente de OH en la posición C-3) (Esquema 89, pág. 260). Ahora bien, esto es inviable, dado que este compuesto carece de las propiedades nucleófilas de su análogo hidroxilado en C-3, por lo que no puede dar una adición de Michael a la nitroolefina **128c**. Este problema se resolvió fácilmente utilizando como sustancia de partida un equivalente sintético de la 1,4-naftoquinona (**145b**) convenientemente funcionalizado, que fue el 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (**171a**), con su sistema quinónico protegido como un sistema dimetoxilado y con un átomo de bromo convenientemente dispuesto para generar su derivado litiado **171b**. Este compuesto debería dar una adición de Michael al doble enlace de la nitroolefina **128c** y abrir con ello la posibilidad de acceder a la aminociclohexilnaftoquinona **159d** requerida para poder obtener la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** deseada. Ello debería ocurrir fácilmente siguiendo un protocolo de trabajo similar al de la ruta del apartado anterior, generando a partir del aducto de Michael **172** el nitrociclohexil-1,4-dimetoxinaftaleno **173**, liberando a continuación su sistema 1,4-naftoquinónico protegido y reduciendo luego a amino el grupo nitro de la nitrociclohexil-1,4-naftoquinona **147d** resultante. Esta aminociclohexilnaftoquinona **159d** sólo admite un modo de adición conjugada del

grupo amino al sistema quinónico que sería la conducente al compuesto **148b** deseado.

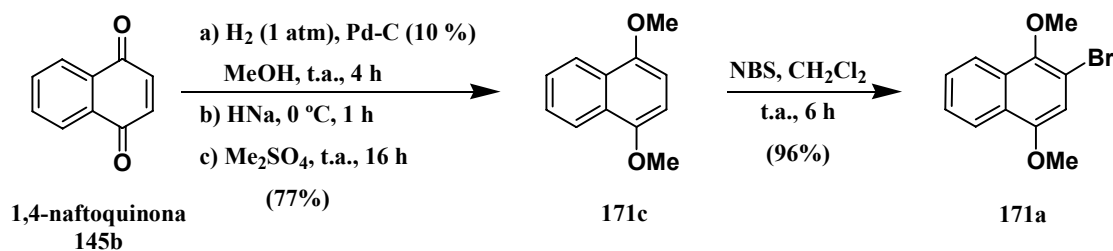


Esquema 89

Se comentan a continuación los resultados obtenidos al desarrollar este nuevo plan de síntesis.

El 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (**171a**) necesario para iniciar este segundo plan de síntesis se obtuvo fácilmente a partir de la 1,4-naftoquinona (**145b**) siguiendo un procedimiento descrito (Esquema 90).¹³⁶

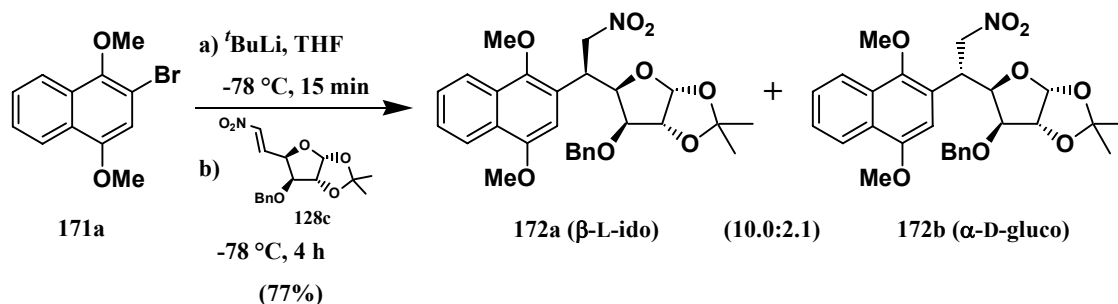
¹³⁶ a) Evans, P. A.; Brandt, T. A. "Hypervalent iodine chemistry: mecanistic investigation of the novel haloacetoxylation, halogenation, and acetoxylation reactions of 1,4-dimetoxynaphthalenes" *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5321-5326. b) Bloomer, J. Zheng, W. "Using NBS as a mild bromination reagent for polyalkoxyaromatic systems" *Synth. Commun.* **1998**, 28, 2087-2095.



Esquema 90

La 1,4 naftoquinona (**145b**) comercial se transformó mediante hidrogenación catalítica en su correspondiente dinaftol, que se trató directamente con hidruro sódico para formar su dialcóxido y luego éste con sulfato de dimetilo para atraparlo como 1,4-dimetoxinaftaleno (**171c**). Este compuesto se hizo reaccionar a continuación con *N*-bromosuccinimida, para dar el 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (**171a**), que se obtuvo con un rendimiento global del 74%.

A continuación se ensayó la reacción de adición de Michael programada del bromonaftaleno **171a** al nitrozúcar **128c**, previamente preparado a partir de la diaceton- α -D-glucosa (Esquema 81, pág. 248).



Esquema 91

El compuesto **171a** se trató con *n*-butillitio en tetrahidrofurano a -78°C y a continuación se adicionó sobre el 2-litio-1,4-dimetoxinaftaleno resultante la nitroolefina **128c**, obteniéndose, tras cuatro horas de reacción a -78°C , una mezcla de los nitroaductos **172a** y **172b**.

Aunque la metalación de **171a** se llevó a cabo inicialmente con *n*-butillitio, se comprobó que el uso de *t*-butillitio mejoraba considerablemente el rendimiento del proceso, al elevarlo de un 45 a un 77%.

En ambos casos se obtuvo una mezcla de epímeros en una relación 10:2.1 (65% de exceso diastereomérico, calculado del RMN- ^1H , Figura 54, pág 262), siendo el componente mayoritario el compuesto **172a**, con configuración de β -L-idofuranosa, como pudo establecerse mediante la obtención de la imagen de difracción de Rayos X de un cristal de este compuesto (Figura 53, pág. 262).

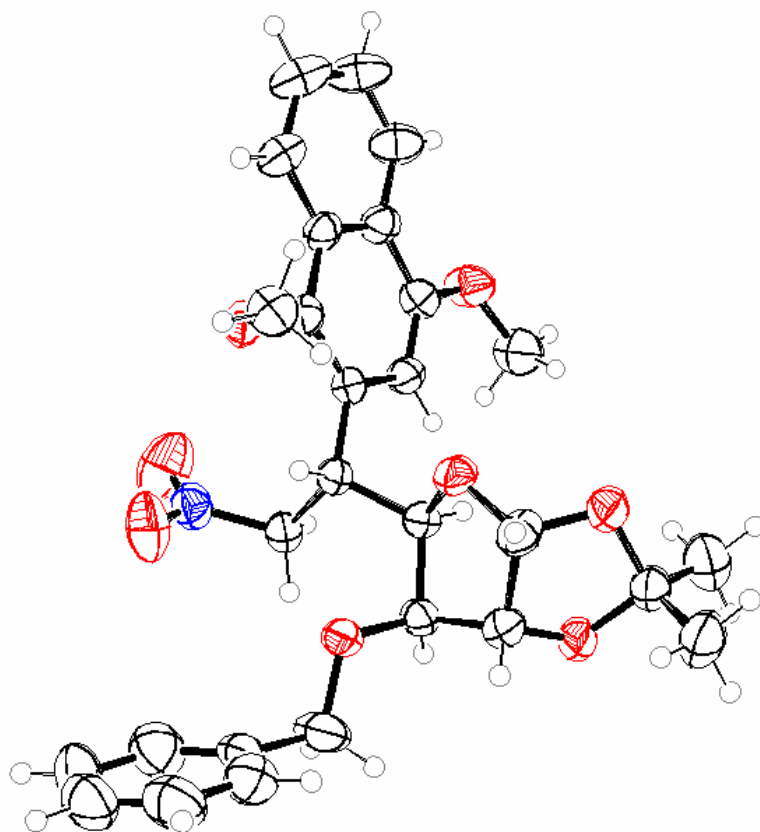


Figura 53: Representación en ORTEP-3 del compuesto **172a**.

La determinación del exceso diastereomérico obtenido se realizó con la ayuda de un espectro de RMN- ^1H del crudo de la reacción, tomando como base de cálculo la integral de la señal debida al protón anomérico (H-1) de cada una de las furanosas obtenidas (Figura 54).

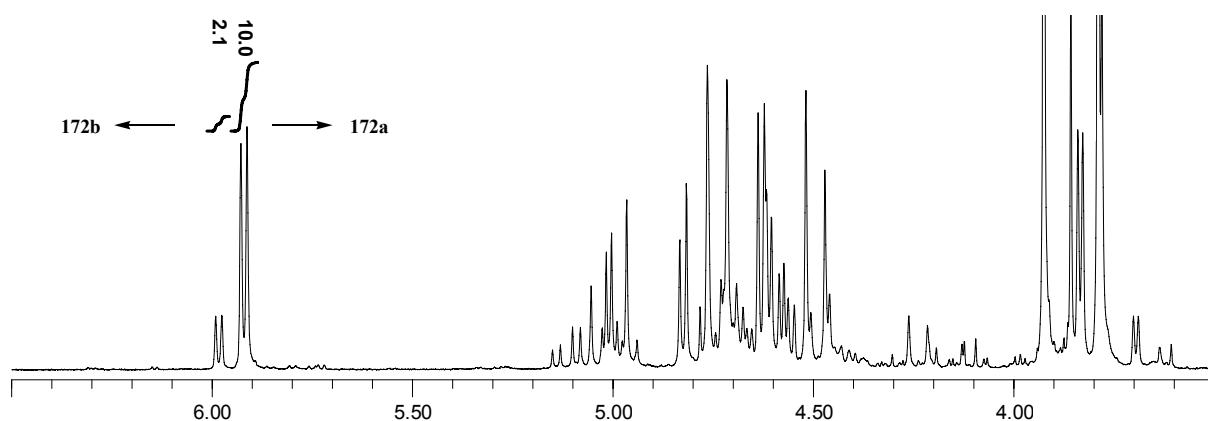
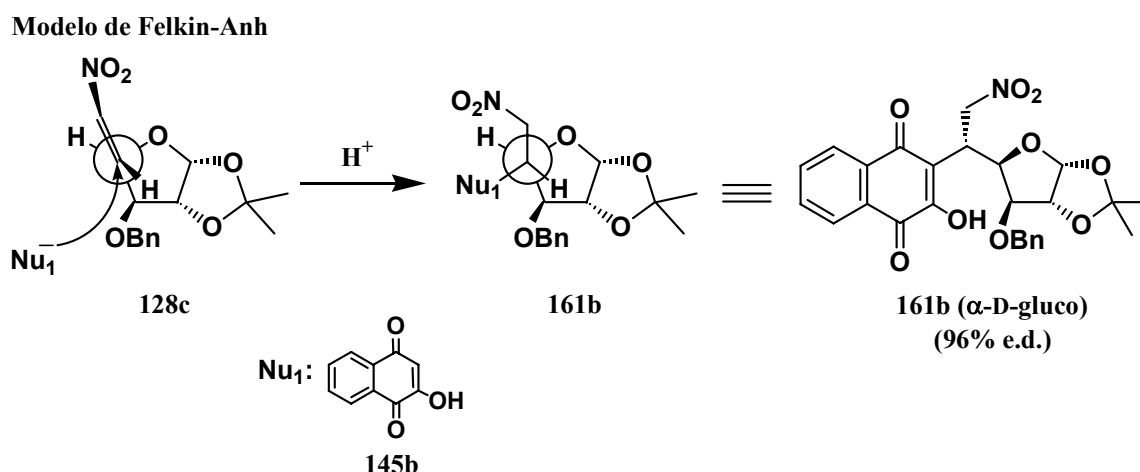


Figura 54: Detalle del espectro de RMN- ^1H de la mezcla **172a** + **172b**.

Un aspecto especialmente relevante de esta adición de Michael (Esquema 91, pág 261) es que el epímero mayoritario **172a** tiene la configuración contraria al

epímero mayoritario **161b** obtenido previamente como resultado de la adición de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (**145a**) a la nitroolefina **128c** (Esquema 82, pág. 249).

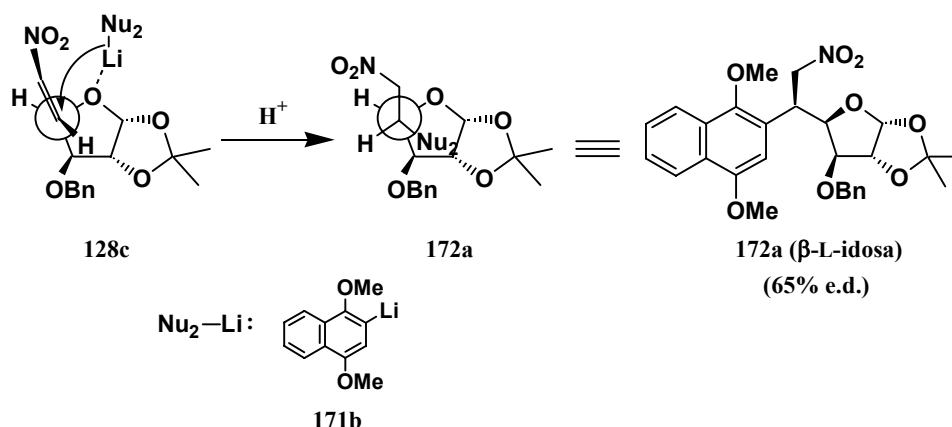
Dado que para este primer caso, se dedujo que la adición de **145a** a la nitroolefina **128c** seguía el modelo de Felkin-Anh (Esquema 92), sería incoherente pensar que en la adición del 2-litio-1,4-dimetoxinaftaleno (**171b**) a la misma nitroolefina **128c** la disposición espacial de la subunidad nitroetilénica fuese diferente, para tratar de explicar la inversión selectividad observada en la adición de Michael de este nucleófilo.



Esquema 92

Por lo tanto, debe de existir en este segundo caso de adición del 2-litio-1,4-dimetoxinaftaleno (**171b**) a la nitroolefina **128c** algún factor determinante de la inversión de estereoselectividad observada (Esquema 93).

Modelo de Felkin-Anh con coordinación del nucleófilo litiado

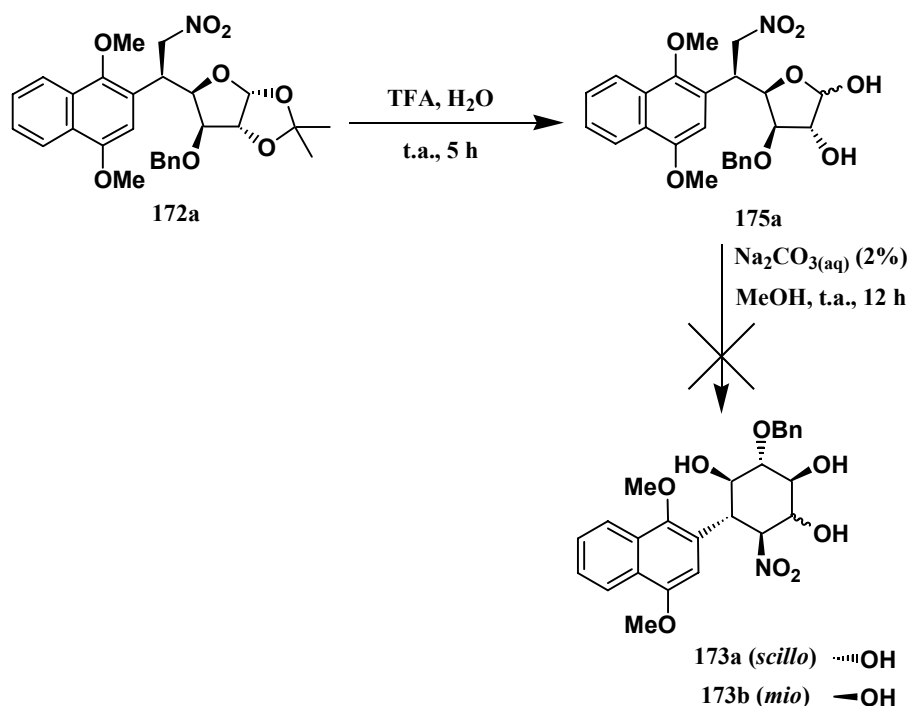


Esquema 93

Basándonos en los resultados obtenidos por Jackson (pág. 227)¹³⁷ en los que se estableció la influencia de los efectos de la coordinación nucleófilo-nitroolefina sobre la estereoselectividad de una adición de Michael, propusimos que la inversión de estereoselectividad observada en nuestro segundo proceso de adición de Michael (**171b** + **128c**) sería debida a la coordinación del nucleófilo con el oxígeno furánico a través del catión litio (Esquema 93, pág. 263)¹³⁸.

La coordinación del nucleófilo con el átomo de oxígeno a través del catión litio determina que la adición ocurra preferentemente por la cara más impedida del doble enlace de la nitroolefina **128c**, generando así el aducto con configuración de β -L-idofuranosa **172a** mayoritariamente. Este tipo de coordinación entre nucleófilos y átomos electronegativos sólo se produce cuando el contraión que acompaña al nucleófilo es pequeño y muy electronegativo, como el catión litio.

Una vez obtenido el nitronaftaleno **172a**, se procedió a continuar con el protocolo de reacciones previsto para generar la benzo[*b*]carbazoldiona **148b** (Esquema 94).

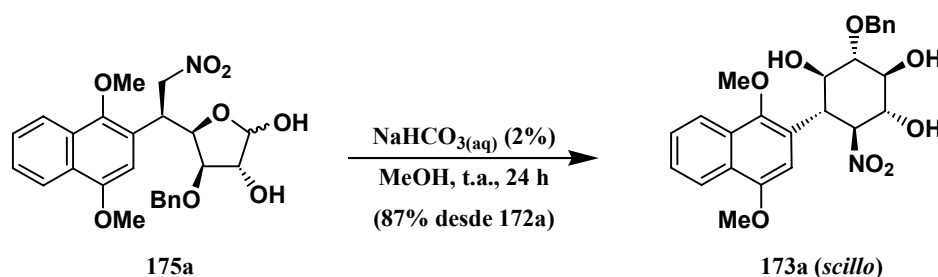


Esquema 94

¹³⁷ Jackson, R. F. W.; Palmer, N. J.; Wythes, M. J.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J. "A new approach to the synthesis of β -hydroxy- α -amino acids using (arylthio)nitrooxiranes" *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6431-6440.

¹³⁸ Chérest, M.; Felkin, H.; Prudent, N. "Torsional strain involving partial bonds. The stereochemistry of the lithium aluminium hydride reduction of some simple open-chain ketones" *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 2199-2204.

Para ello se liberó el OH de la posición anomérica de **172a** y el compuesto **175a** resultante se trató con disolución acuosa al 2% de carbonato sódico en metanol con objeto de inducir la ciclación de Henry intramolecular conducente a los nitrociclohexilnaftalenos **173a** o **173b**, o a la mezcla de ambos. Sin embargo, se obtuvo una mezcla de reacción compleja carente de interés, resultado sorprendente teniendo en cuenta el resultado satisfactorio logrado anteriormente al emplear condiciones similares para ciclar la hidroxiquinolilfuranosa **162a** (Esquema 84, pág. 253). La utilización de una base más débil como el bicarbonato sódico condujo en muy buen rendimiento a la obtención del naftilnitrociclohexano **173a** buscado, como único estereoisómero (Esquema 95).



Esquema 95

La caracterización del compuesto obtenido se realizó gracias a sus propiedades espectroscópicas. Así, la ausencia en su espectro de RMN-¹³C de la señal del grupo CH₂ de la posición C-6 de la furanosa precursora **172a** indicó claramente que la ciclación tuvo lugar. La aparición en el espectro de RMN-¹H de un triplete debido al protón H-6 geminal al grupo nitro ($\delta=5.15$ ppm, $J_{1,6}=J_{5,6}=10.3$ Hz), puso de manifiesto un doble acoplamiento diaxial de este protón con los protones adyacentes H-1 y H-5 (geminales con los grupos hidroxilo de C-1 y dimetoxinaftaleno respectivamente), confirmándonos la disposición alternada entre los tres sustituyentes (Figura 55, pág. 266).

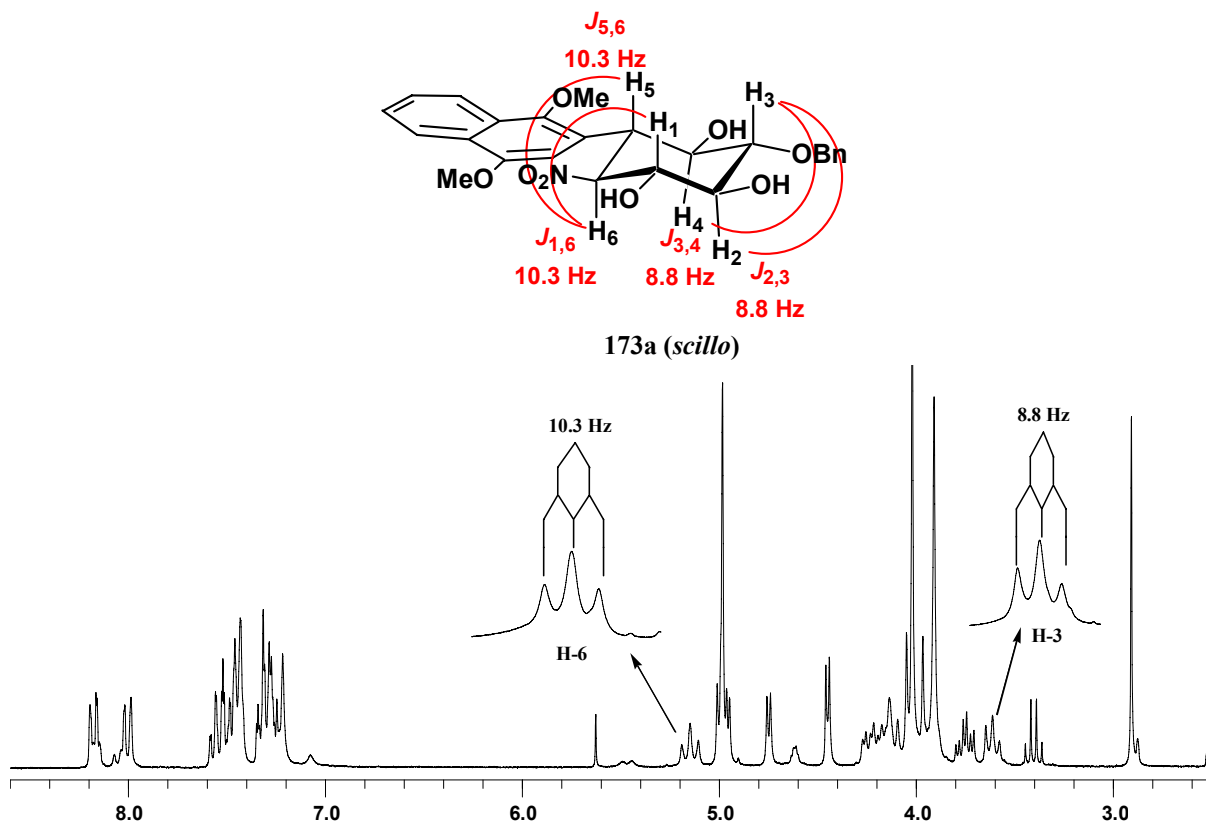
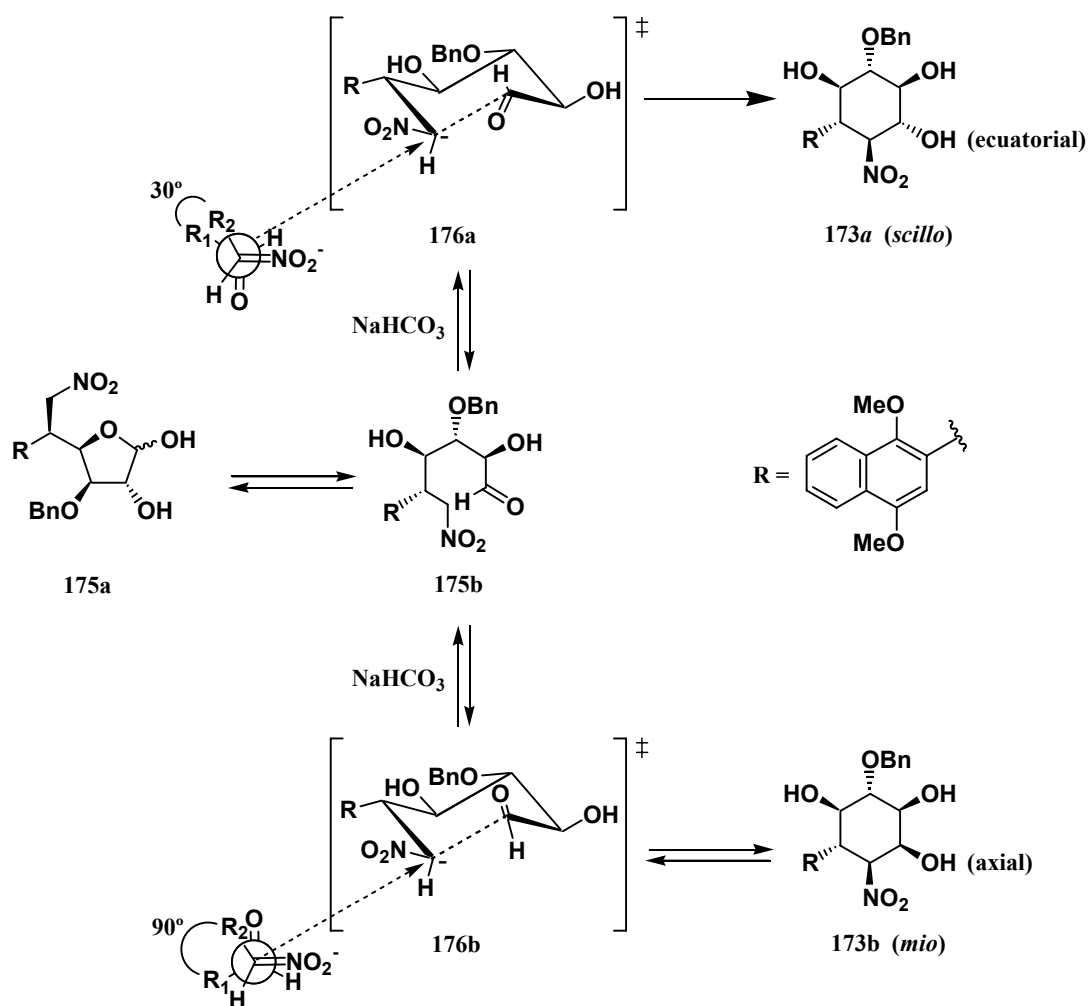


Figura 55: Espectro de RMN-¹H de **173a** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-6 y H-3.

Del mismo modo, la presencia de un triplete debido al protón H-3 geminal al grupo OBn ($\delta=3.61$ ppm, $J_{2,3}=J_{3,4}=8.8$ Hz) confirma la disposición axial de los protones de las posiciones H-2, H-3 y H-4.

Tal y como ocurrió en la reacción de Henry llevada a cabo con los derivados de 3-hidroxi-1,4-naftoquinona, en esta reacción con derivados de 1,4-dimetoxinaftaleno también se obtuvo como único estereoisómero el termodinámicamente más estable **173a**, ya que tiene todos sus grupos funcionales dispuestos ecuatorialmente.

Su formación puede justificarse admitiendo que son posibles dos modos de ciclación de Henry intramolecular del nitroaldehído **175b** (Esquema 96, pág. 267), que transcurrirán a través de los estados de transición **176a** y **176b** respectivamente, ambos con conformaciones tipo silla. El estado de transición **176a** (más desfavorable estéricamente) produce el epímero **173a** (más estable termodinámicamente) mientras que el estado de transición **176b** (más favorable estéricamente) produce el epímero **173b** (menos estable termodinámicamente). La condición de equilibrio químico de la reacción de Henry, orienta la reacción hacia la formación única del producto **173a** más estable termodinámicamente.

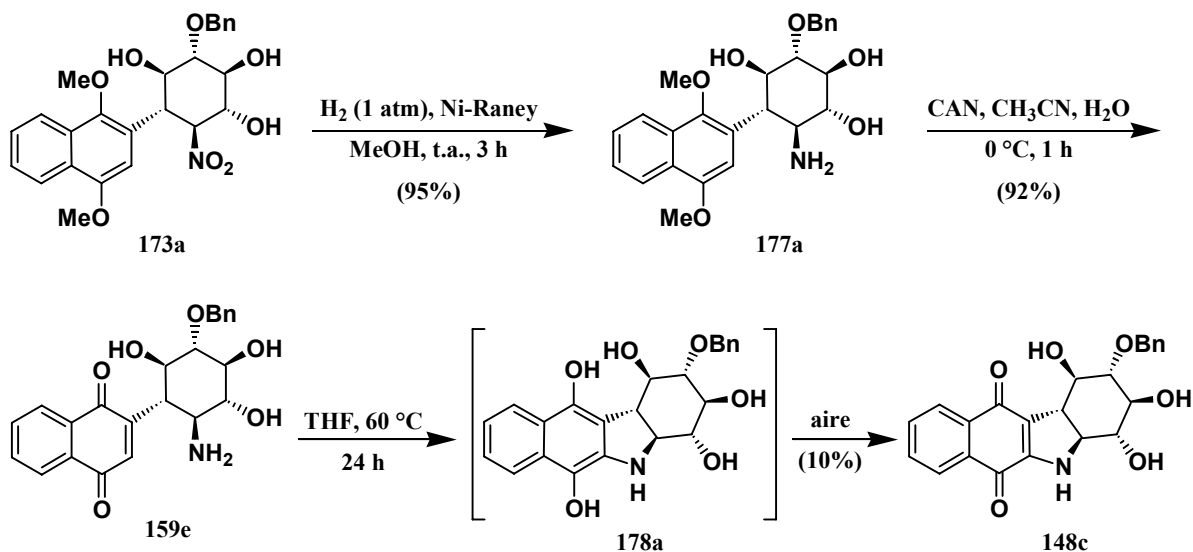


Esquema 96

Continuando con nuestro trabajo, una vez obtenido el naftilnitrociclohexano **173a**, se procedió a abordar su transformación en la benzo[*b*]carbazoldiona **148c** deseada (Esquema 97, pág. 268). Para ello se hidrogenó en primer lugar el grupo nitro de **173a**, obteniéndose el naftilaminociclohexano **177a** que se sometió inmediatamente a las condiciones típicas de oxidación de 1,4-dimetoxinaftalenos a 1,4-naftoquinonas,¹³⁹ al tratarlo con nitrato cérico amónico, obteniéndose sin dificultad la aminociclohexil-1,4-naftoquinona **159e**. Los rendimientos de estos dos procesos fueron excelentes, pero los productos no se caracterizaron debido a la dificultad para purificarlos dada su alta polaridad. Finalmente al calentar la aminociclohexanonaftoquinona **159e** en tetrahidrofurano a 60 °C durante 24 h, se produjo la heterociclación deseada conducente al intermedio dinaftólico **178a**, el cual

¹³⁹ Karichiappan, K.; Wege, D. "Naphto[2,3-*c*]furan-4,9-dione and a further exploratory approach to the ring system of ventilon A" *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 743-747.

por acción del oxígeno atmosférico se oxidó espontáneamente en el propio medio de reacción a la hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazol-6,11-diona **148c** deseada.



Esquema 97

Esta hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazol-6,11-diona **148c** se obtuvo en muy bajo rendimiento (10%), como un sólido de color violeta, que mostró en su espectro de RMN-¹³C señales de catorce carbonos entre 120 y 160 ppm, intervalo propio de carbonos aromáticos, de los que nueve correspondieron a grupos CH (cinco del OBn y cuatro de la naftoquinona) y cinco a carbonos cuaternarios (uno del OBn y cuatro de la naftoquinona). También mostró dos señales a 177.3 y 182.9 ppm correspondientes a los dos grupos carbonilo, los cuales en su espectro de IR mostraron una única banda de absorción a 1661 cm⁻¹.

En definitiva, hemos conseguido desarrollar un método de síntesis de hexahidrotetrahidroxibenzo[*b*]carbazol-6,11-dionas.¹⁴⁰ El bajo rendimiento de la reacción de heterociclación tiene que ser debido a la falta de coplanaridad entre el grupo quinónico y el sustituyente aminociclohexilo, hecho que dificulta mucho la aproximación entre ellos para que la adición conjugada sea efectiva.

Esta aproximación sintética ha de ser optimizada con objeto de mejorar el bajo rendimiento logrado, como paso previo a la extensión de esta metodología sintética al resto de las hexofuranosas con objeto de preparar un panel de benzo[*b*]carbazoldionas polihidroxiladas para estudios biológicos y evaluación farmacológica.

¹⁴⁰ Otero, J. M.; Barcia, J. C.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Preliminary studies on the incorporation of sugars into naphthoquinones: synthesis of (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,4*aS*,11*bS*)-2-(benzyloxy)-1,2,3,4,4*a*,5-hexahydro-1,3,4-trihydroxy-11*bH*-benzo[*b*]carbazole-6,11-dione" *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 11-14.

3.2. Aplicación de nitroazúcares a la síntesis de β -aminoácidos cicloalcanicos polihidroxilados.

3.2.1. Antecedentes y plan de síntesis.

Prosiguiendo con nuestro objetivo genérico de desarrollar nuevas aplicaciones sintéticas de los nitroderivados de hidratos de carbono, nos centramos en esta parte de la tesis en la síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos y ciclohexánicos polihidroxilados, cuyo interés reside en las importantes propiedades de los ácidos 2-aminociclopentánicos y 2-aminociclohexánicos como estabilizadores de conformaciones de β -péptidos (Figura 56, pág. 270).

El mayor interés actual de este tipo de compuestos es el estudio del efecto que produce su incorporación en cadenas peptídicas, habiendo realizado numerosas aportaciones a este campo el profesor Gellman, centradas fundamentalmente en el estudio de las propiedades de plegado de los homopolímeros de β -aminoácidos ciclopentánicos y ciclohexánicos, lo que le permitió establecer que los homopolímeros del ácido *trans*-2-aminociclopentánico se pliegan en hélices-12 muy estabilizadas, incluso en secuencias peptídicas muy cortas (6-8 eslabones).¹⁴¹ Un comportamiento similar se observa con los homopolímeros de los ácidos *trans*-2-aminociclohexánicos, que se pliegan en forma de hélices-14.¹⁴²

¹⁴¹ a) Schmitt M. A.; Choi, S. H.; Guzei I. A.; Gellman S. H. "New helical foldamers: heterogeneous backbones with 1:2 and 2:1 α : β -amino acid residue patterns" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4538-4539. b) Huck, B. R.; Gellman, S. H. "Synthesis of 2,2-disubstituted pyrrolidine-4-carboxylic acid derivatives and their incorporation into β -peptide oligomers" *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3353-3362. c) Murray, J. K.; Farooqi B.; Sadowsky J. D.; Scalf M.; Freund W. A.; Smith L. M.; Chen J.; Gellman S. H. "Efficient synthesis of a β -peptide combinatorial library with microwave irradiation". *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13271-13280. d) Peelen, T. J.; Chi, Y.; English, E. P.; Gellman, S. H. "Synthesis of 4,4-disubstituted 2-aminocyclopentanecarboxylic acid derivatives and their incorporation into 12-helical β -peptides". *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4411-4414. e) Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman S. H. "Two Helical Conformations from a Single Foldamer Backbone: "Split Personality" in short alpha/beta-peptides" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 505-510.

¹⁴² a) Raguse, T. L.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. "Structure-activity studies of 14-helical antimicrobial β -peptides: Probing the relationship between conformational stability and antimicrobial potency" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12774-12785. b) Murray, J. K.; Gellman, S. H. "Application of microwave irradiation to the synthesis of 14-helical β -peptides" *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1517-1520. c) Karlsson, A. J.; Pomerantz, W. C.; Weisblum, B.; Gellman, S. H.; Palecek, S. P. "Antifungal activity from 14-helical β -peptides" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12630-12631. d) Murray, J. K.; Gellman, S. H. "Microwave-assisted parallel synthesis of a 14-helical β -peptide library" *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 58-65.

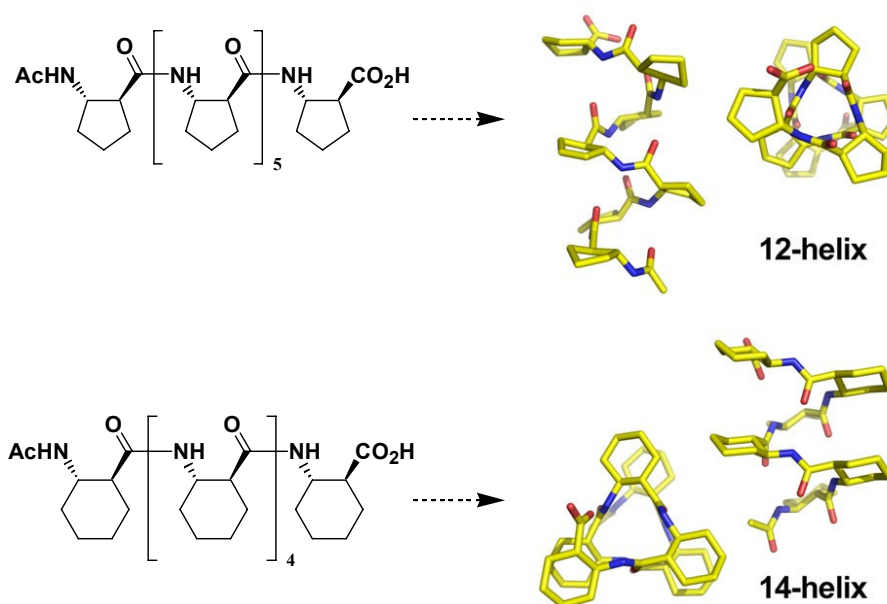


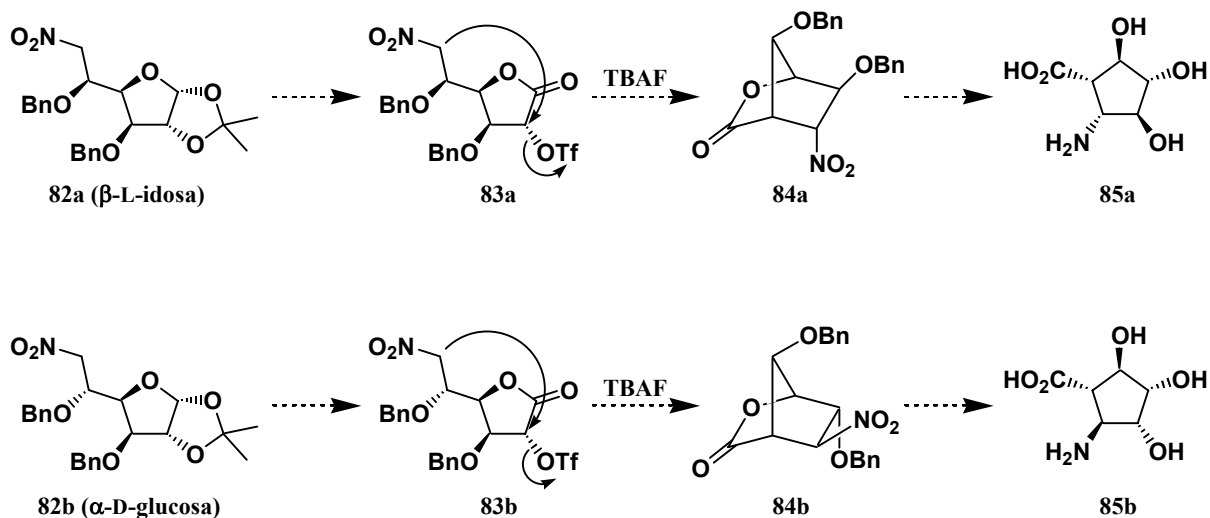
Figura 56: Hélices generadas por homopolímeros de β-aminoácidos ciclopentánicos y ciclohexánicos.

Nuestro grupo de investigación inició trabajos conducentes a preparar β-aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados, con un triple objetivo:

1. Incrementar significativamente el escaso número de β-aminoácidos ciclopentánicos conocidos.
2. Incorporar estos nuevos β-aminoácidos en péptidos, con vistas a disponer de β-péptidos solubles en agua.
3. Estudiar las propiedades de plegado de estos nuevos β-péptidos.

Este objetivo inicial de alcance ya fue abordado previamente en nuestro grupo, tal y como se indica en la introducción, mediante una estrategia sintética novedosa y de gran elegancia que permitió preparar enantioespecíficamente los primeros β-aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados conocidos (Esquema 98, pág. 271).¹⁴³

¹⁴³ a) Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Stereocontrolled transformation of nitrohexofuranoses into cyclopentylamines via 2-oxabicyclo[2.2.1]heptanes: Incorporation of polyhydroxylated carbocyclic α-amino acids into peptides" *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1423-1425. b) Soengas, R. G.; Pampín, M. B.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Stereocontrolled transformation of nitrohexofuranoses into cyclopentylamines via 2-oxabicyclo[2.2.1]heptanes. Part 2: Synthesis of (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxy-2-aminocyclopentanecarboxylic acid" *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 205-211.

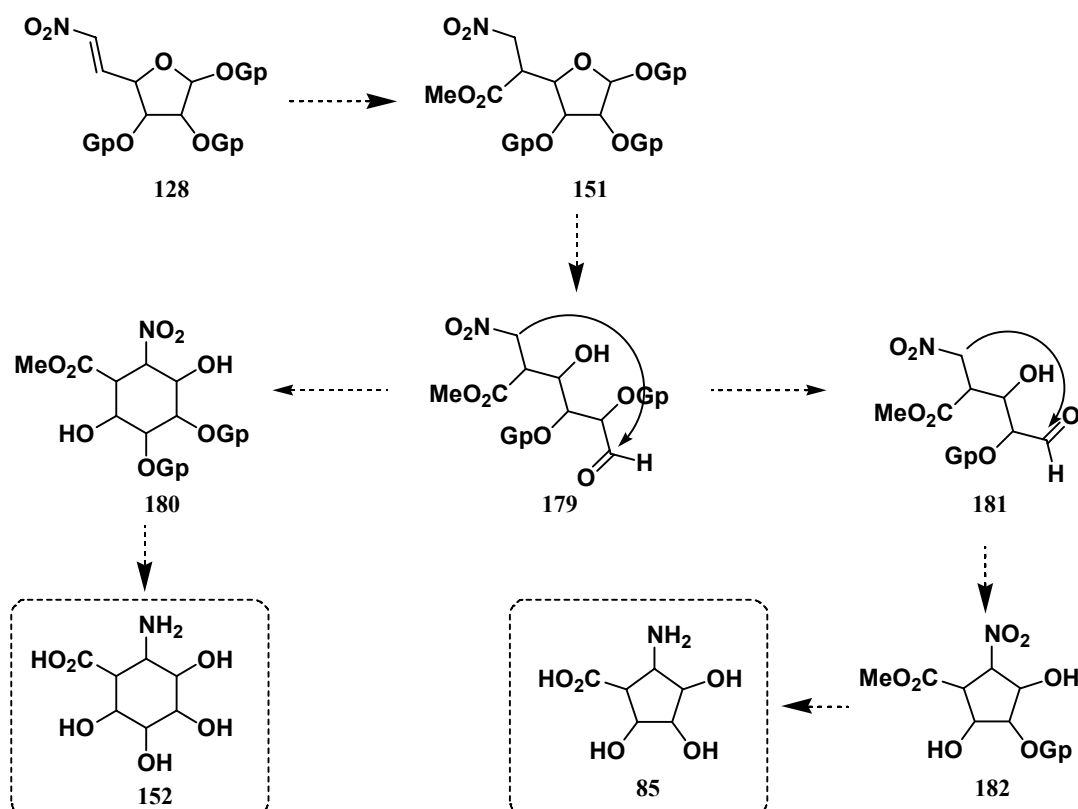


Esquema 98

La etapa clave de esta síntesis es la alquilación intramolecular de los nitronatos de las nitrohexofuranosas **83**, lo que afortunadamente condujo siempre selectivamente a las biciclolactonas **84** de mayor estabilidad termodinámica, a partir de las cuales se generaron fácilmente los β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados **85** correspondientes.

Los requerimientos estereoquímicos de la ciclación intramolecular de los compuestos **83** determinan que este método de síntesis de β -aminoácidos **85** sólo sea aplicable a ocho de las dieciséis hexosas: la D-glucosa, la D-idosa, la D-alosa y la D-talosa, y sus correspondientes formas de la serie L. Consiguientemente, este método sólo permite preparar ocho de los treinta y dos β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados **85**. Además, no permite obtener directamente a partir de las nitrohexofuranosas **82** β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxiados.

Nosotros hemos abordado en esta tesis esta problemática, planteando la preparación de estos dos tipos de β -aminoácidos cicloalcanicos polihidroxiados mediante una estrategia sintética divergente, a partir de las nitrometoxicarbonilhexofuranosas **151** a preparar mediante una funcionalización novedosa del doble enlace carbono-carbono de las nitroolefinas **128** (Esquema 99, pág. 272).



Esquema 99

En esta estrategia sintética el grupo nitro de las furanosas **151** juega un papel clave, en cuanto a su doble condición de precursor del grupo amino de los β-aminoácidos finales y de grupo auxiliar destinado a facilitar la etapa clave de la síntesis, la reacción de Henry intramolecular conducente a los nitrociclohexanos **180** y a los nitrociclopentanos **182**.

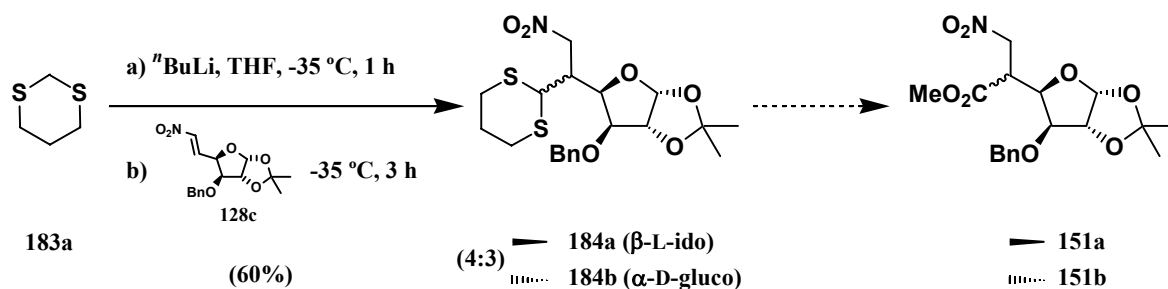
Esta nueva estrategia sintética debería carecer de las limitaciones de la estrategia previa de alquilación intramolecular de nitronatos (Esquema 98, pág. 271), por lo que sería de aplicación *a priori* a todas las hexosas y debería permitir preparar paneles más amplios de β-aminoácidos cicloalcanicos polihidroxiados.

Nosotros hemos llevado a cabo estudios preliminares sobre esta nueva estrategia de síntesis de β-aminoácidos cicloalcanicos polihidroxiados, cuyos resultados se comentan a continuación.

3.2.2. Síntesis de β-aminoácidos ciclohexánicos polihidroxiados.

Se decidió estudiar en primer lugar la aplicación de esta estrategia sintética al caso de la D-glucosa, que ya había sido transformada previamente en la nitroolefina requerida **128c** (Esquema 81, pág. 248). Consiguientemente, la primera

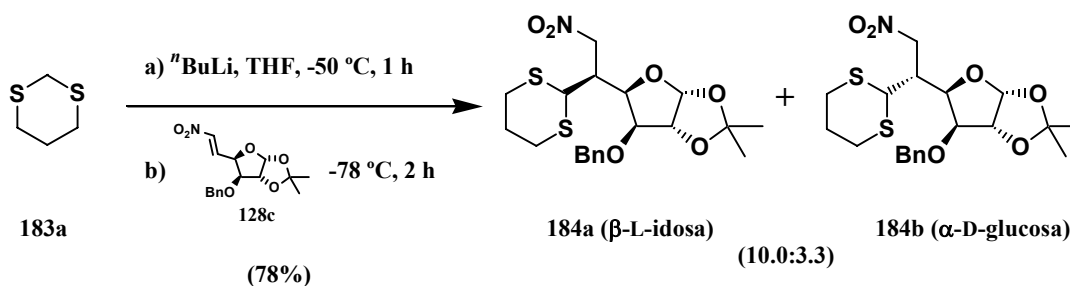
transformación a estudiar fue la introducción de un grupo carboxilo en la posición C-5 de este compuesto mediante la adición de Michael de un equivalente sintético apropiado. Ante las posibilidades contempladas en la bibliografía, se eligió como equivalente sintético el 1,3-ditiaciclohexano (**183a**), ya que esta adición ya había sido llevada a cabo por Funabashi¹⁴⁴ de un modo sencillo (Esquema 100) y la posterior transformación del grupo 1,3-ditianilo en un éster carboxílico suele ser un proceso sencillo.



Esquema 100

Efectivamente, Funabashi y col. llevaron a cabo la adición del anión litiado del 1,3-ditiano (**183a**) a la nitroolefina **128c** obteniendo una mezcla de aductos **184a** y **184b** en una relación 4:3 (14% de exceso diastereomérico), en la que el estereoisómero con estructura de β-L-idofuranosa **184a** fue el mayoritario (Esquema 100). Sin embargo, no transformaron ninguno de los componentes de dicha mezcla en sus respectivos nitroésteres **151a** y **151b**.

Nosotros iniciamos nuestros trabajos repitiendo este proceso de funcionalización del doble enlace nitroolefínico de **128c** con el anión litiado del 1,3-ditiano (**183a**), que llevamos a cabo a una temperatura inferior (Esquema 101).



Esquema 101

¹⁴⁴ Funabashi, M.; Yoshimura, J. "Branched-chain sugars. Part 14. Synthesis of new branched-chain cyclitols having *myo*- or *scyllo*-, and *muco*-configuration from 3-*O*-benzyl-5,6-dideoxy-5-[C-(1,3-dithian-2-yl)]-6-nitro-L-idofuranose and -D-glucofuranose" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 1425-1429.

Así, la reacción de la nitroolefina **128c** con el 2-litio-1,3-ditiano a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ dió una mezcla de epímeros **184a** + **184b** con un rendimiento del 78% y una relación diastereomérica 10.0:3.3 (50% de exceso diastereomérico calculado a partir de un RMN- ^1H del crudo de reacción, Figura 57), siendo el componente mayoritario la β -L-idofuranosa **184a** y el minoritario la α -D-glucofuranosa **184b**, mejorándose por lo tanto el rendimiento de la reacción, así como la relación diastereomérica 4:3 previamente obtenidos.

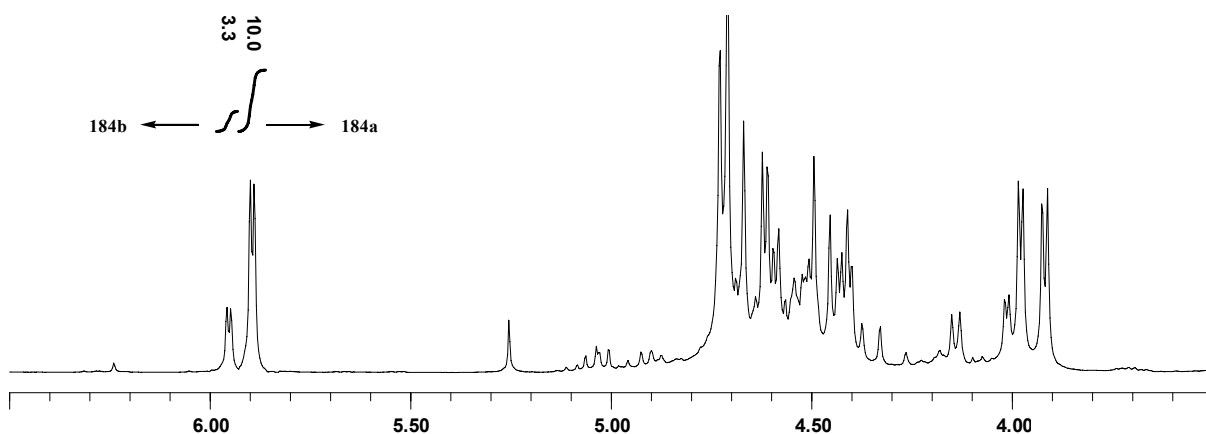


Figura 57: Detalle del espectro de RMN- ^1H de la mezcla de **184a** + **184b**.

Además, en nuestro experimento se confirmó inequívocamente mediante un experimento de difracción de Rayos X la estructura de **184a** (Figura 58), sustentada previamente en la bibliografía únicamente mediante las estructuras propuestas para derivados de este compuesto a partir de sus datos espectroscópicos.

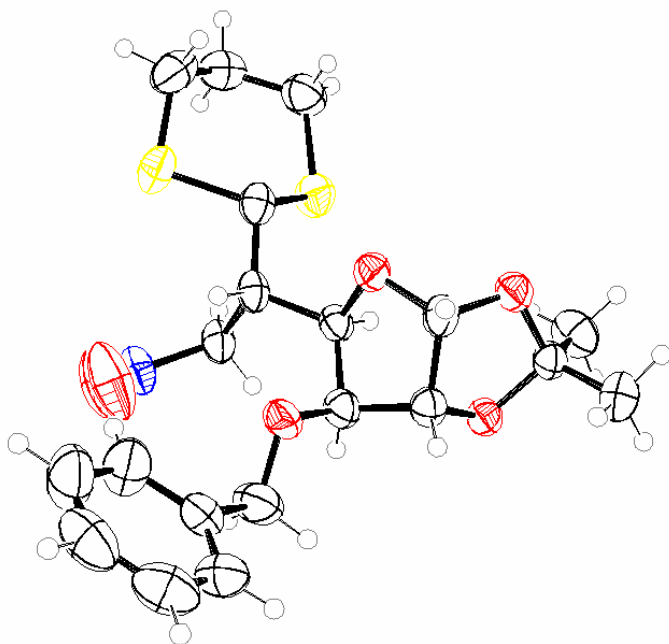
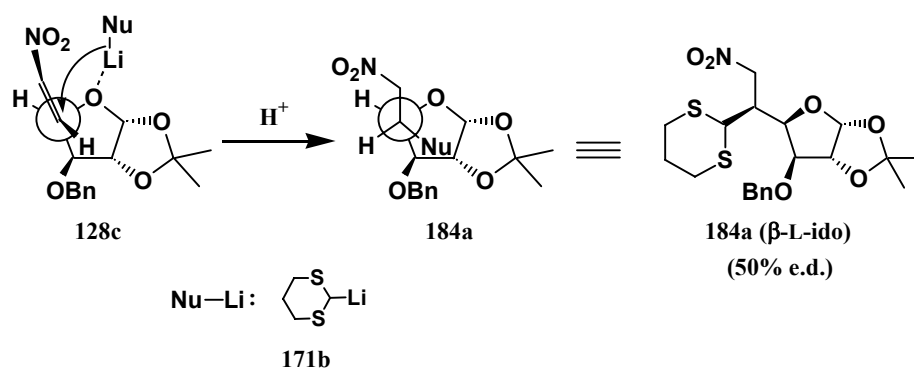


Figura 58: Representación en ORTEP-3 del compuesto **184a**.

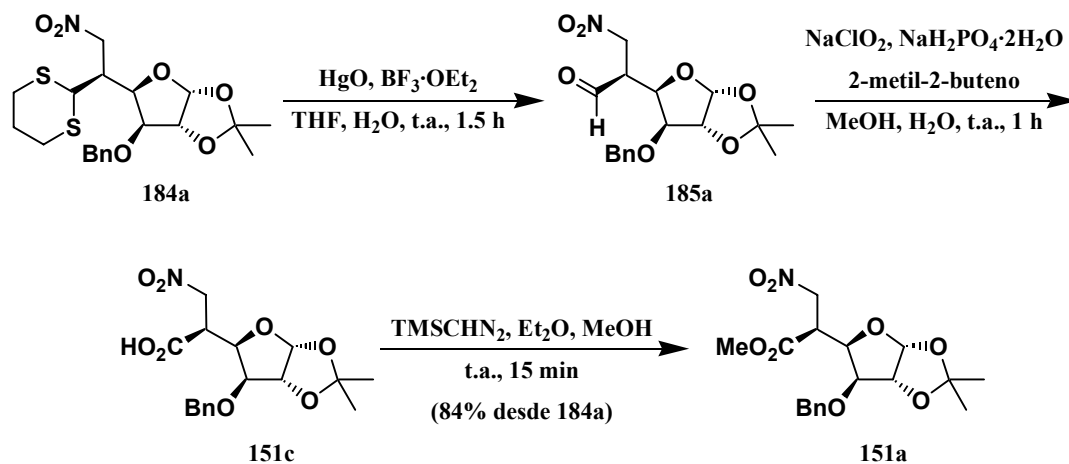
Por lo tanto, la adición de 2-litio-1,3-ditiano a la nitroolefina **128c** da como estereoisómero mayoritario el compuesto con configuración de β -L-idofuranosa **184a**, similar a la del compuesto **172a** obtenido previamente por la adición de Michael del 2-litio-1,4-dimetoxinaftaleno a dicha nitroolefina **128c** (Esquema 91, pág. 261). Ocurre también ahora que la adición obedece a la regla de Felkin-Anh con coordinación del nucleófilo litiado (Esquema 102), obteniéndose excesos diastereoméricos relativamente similares para ambos procesos (50% para la adición de 2-litio-1,3-ditiano y 65% para la adición de 2-litio-1,4-dimetoxinaftaleno). Ambos valores nos indican también que hay un porcentaje importante de adición no mediada por el efecto de coordinación, confirmando así los argumentos con los que habíamos predicho las estereoselectividades observadas en las adiciones anteriores.

Modelo de Felkin-Anh con
coordinación del nucleófilo litiado



Esquema 102

Una vez obtenida esta 5-ditiano- β -L-idofuranosa **184a**, se procedió a buscar condiciones adecuadas para llevar a cabo la desprotección de su grupo formilo enmascarado en forma de 1,3-ditiano, con objeto de transformarlo en un éster metílico (Esquema 103).



Esquema 103

Para ello, se llevó a cabo primero la eliminación del grupo ditionilo por reacción del compuesto **184a** con óxido de mercurio y trifluoroboroeterato.¹⁴⁵ La reacción, llevada a cabo a temperatura ambiente durante una hora y media, condujo de modo efectivo al aldehído **185a**, que se oxidó inmediatamente con clorito sódico y dihidrogenofosfato sódico.¹⁴⁶ Se obtuvo así el nitroácido **151c** correspondiente, que se esterificó por reacción con trimetilsilildiazometano,¹⁴⁷ aislándose tras purificación cromatográfica el nitroéster deseado **151a**. La ausencia en su espectro de RMN-¹³C de las señales del grupo ditionilo, así como la aparición de las señales del grupo metoxicarbonilo (52.6 ppm para el OCH₃ y 170.3 ppm para el C=O) y la presencia en su espectro de IR de una banda de carbonilo de éster a 1740 cm⁻¹, confirmaron la transformación del grupo 1,3-ditionilo de **184a** en el grupo metoxicarbonilo de **151a**.

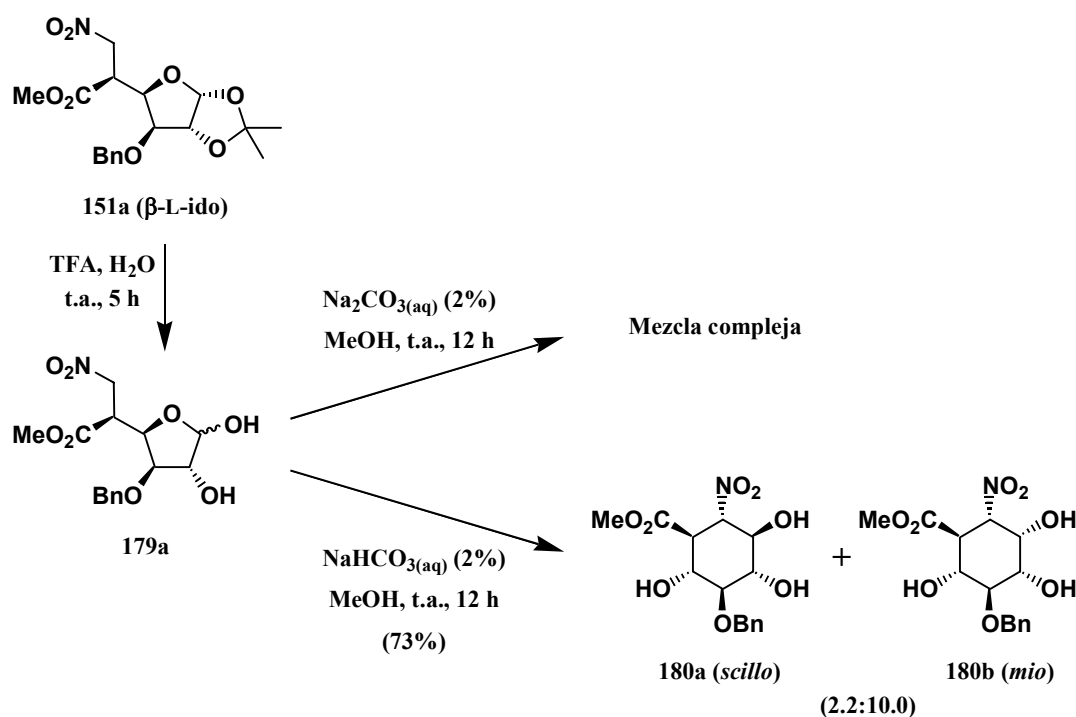
Una vez obtenido este nitroéster **151a**, estábamos en condiciones de abordar la preparación de β-aminoácidos cicloalcanicos de acuerdo con nuestro plan sintético del Esquema 99 (pág. 272). Decidimos estudiar primero la preparación de aminoácidos ciclohexánicos mediante la desprotección del grupo isopropilidénico de la furanosa **151a**, seguido de la reacción de Henry intramolecular del nitroderivado **179a** obtenido (Esquema 104, pág. 277).¹⁴⁸

¹⁴⁵ Vedejs, E.; Fuchs, P. L. "Improved aldehyde synthesis from 1,3-dithianes" *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 366-367.

¹⁴⁶ Postema, M. H. D.; Piper, J. L.; Liu, L.; Shen, J.; Faust, M.; Andreana, P. "Synthesis and partial biological evaluation of a small library of differentially-linked β-C-disaccharides" *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4748-4754.

¹⁴⁷ Austad, B. C.; Hart, A. C.; Burke, S. D. "Halichondrin B: synthesis of the C(37)-C(54) subunit" *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2011-2026.

¹⁴⁸ Funabashi, M.; Kobayashi, K.; Yoshimura, J. "Synthesis of new branched-chain cyclitols having *epi* and *allo* configuration and *myo* configuration respectively from 3-O-benzyl-5,6-dideoxy-5-[C-(1,3-dithian-2-yl)]-6-nitro-D-allofuranose and -L-talofuranose" *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1618-1621.



Esquema 104

Así, cuando se disolvió la β -L-idofuranosa **151a** en una mezcla de ácido trifluoroacético y agua y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante cinco horas, se produjo la hidrólisis de su grupo acetónido, obteniéndose el lactol **179a**, que se sometió directamente a una reacción de Henry intramolecular, empleando como base carbonato sódico, como se hizo previamente en las ciclaciones de la hidroxiquinona **162b** (Esquema 84, pág. 253) y del dimetoxinaftaleno **175a** (Esquema 94, pág. 264). El resultado de este proceso fue una mezcla de productos compleja carente de interés. Sin embargo, se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se empleó una base más suave como el bicarbonato sódico. En estas segundas condiciones de reacción se aisló, tras purificación cromatográfica, la mezcla inseparable de los β -nitroésteres **180a** y **180b** (73% de rendimiento), en una relación aproximada 2.2:10.0 (64% de exceso diastereomérico), calculada a partir del espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla, por comparación de las señales respectivas del átomo de carbono de la posición C-2 (portador del grupo nitro).¹⁴⁹ No se empleó para ello el espectro de RMN- ^1H , por carecer de señales apropiadas el cálculo de esta relación (Figura 59, pág. 278).

¹⁴⁹ El cálculo del exceso diastereomérico de una reacción a partir del espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla de productos obtenida, no es tan exacto como el realizado a partir del espectro de RMN- ^1H de dicha mezcla. Sin embargo, cuando el espectro de RMN- ^1H de la mezcla es complejo y no nos permite obtener esta información, se acudió al espectro de RMN- ^{13}C para deducir de un modo aproximado un valor del exceso diastereomérico del proceso.

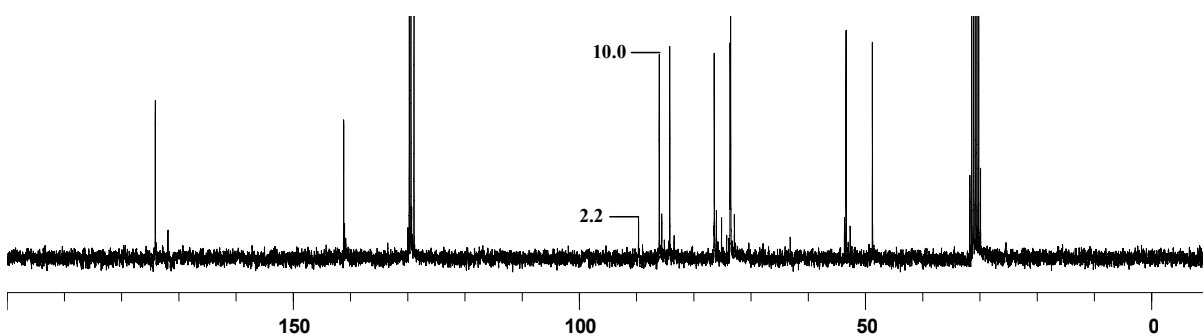


Figura 58: Detalle del espectro de RMN-¹³C de la mezcla de **180a** + **180b**.

La presencia en el espectro de RMN-¹³C de la mezcla aislada **180a** + **180b**, de sólo dos señales de grupos CH₂ a 73.3 y 75.2 ppm, debidas a los grupos OBn de **180a** y **180b** respectivamente, así como, otras dos señales de grupos CH a 88.3 y 84.7 ppm debidas a los carbonos portadores del grupo nitro de ambos compuestos, nos permitieron establecer que tuvo lugar la reacción de Henry intramolecular conducente a la formación de los nitrociclohexanos esperados.

La determinación de la estereoquímica de cada uno de los componentes de esta mezcla inseparable se determinó a partir de su complejo espectro de RMN-¹H (Figura 59).

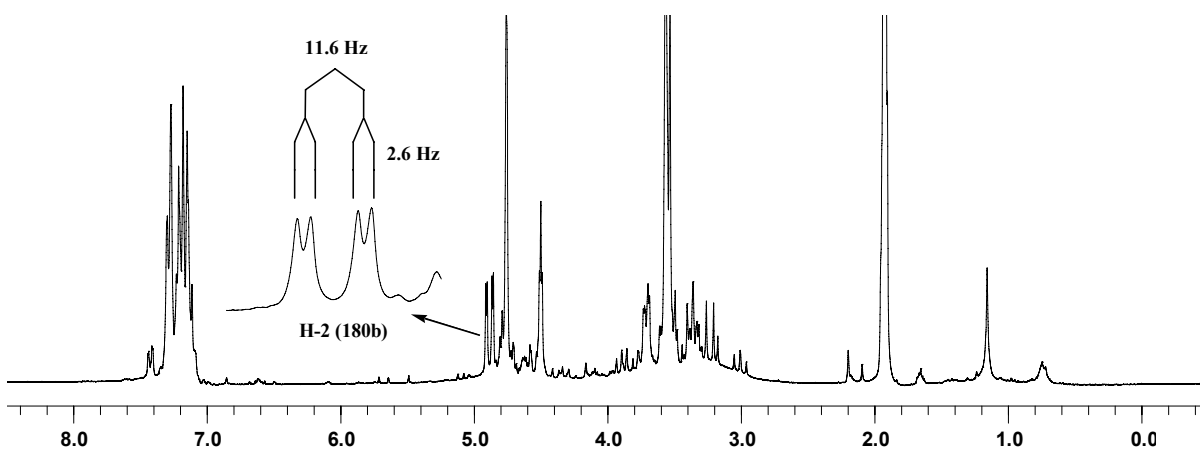


Figura 59: Detalle del espectro de RMN-¹H de mezcla de **180a** + **180b**. Se resalta el doble doblete debido al protón H-2 del compuesto mayoritario **180b**.

El espectro de RMN-¹H de la mezcla **180a** + **180b** resultó ser bastante complejo, pudiendo obtenerse información únicamente a partir del doble doblete a $\delta=4.88$ ppm con $J=11.6$ Hz y $J=2.6$ Hz, debido al protón H-2 (adyacente al grupo nitro) del componente mayoritario **180b** (Figura 60, pág. 279).

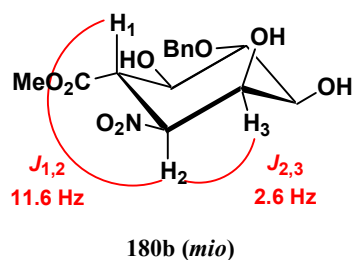
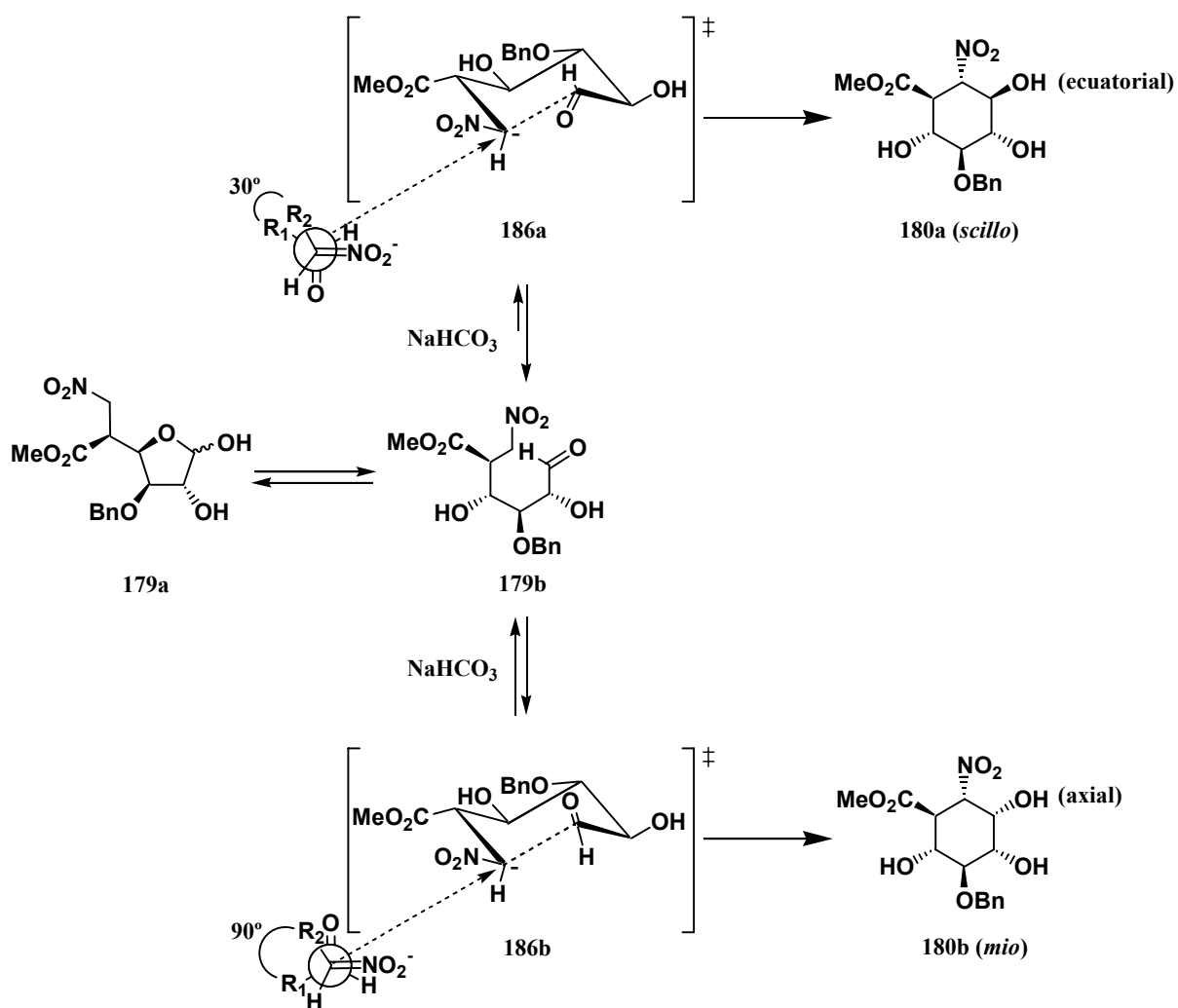


Figura 60: Estructura propuesta para **180b** en base a las constantes de acoplamiento observadas

Asumiendo, por analogía con los casos similares previos, que los grupos metoxycarbonilo y nitro de **180b** se disponen ecuatorialmente, consiguientemente los protones H-1 y H-2 están dispuestos axialmente. Ello justifica el valor $J=11.6$ Hz de la constante de acoplamiento entre estos dos protones. El valor de $J=2.6$ Hz corresponde por lo tanto al acoplamiento de H-2 con H-3, indicando ello que el protón H-3 está dispuesto ecuatorialmente.

Consiguientemente, al componente minoritario de la mezcla de reacción se le asignó la estructura **180a**, correspondiente al epímero del componente mayoritario **180b** en C-3, a pesar de carecer de evidencias espectroscópicas.

La formación de ambos estereoisómeros en la proporción obtenida se puede justificar en base al Esquema 105 (pág. 280).



Esquema 105

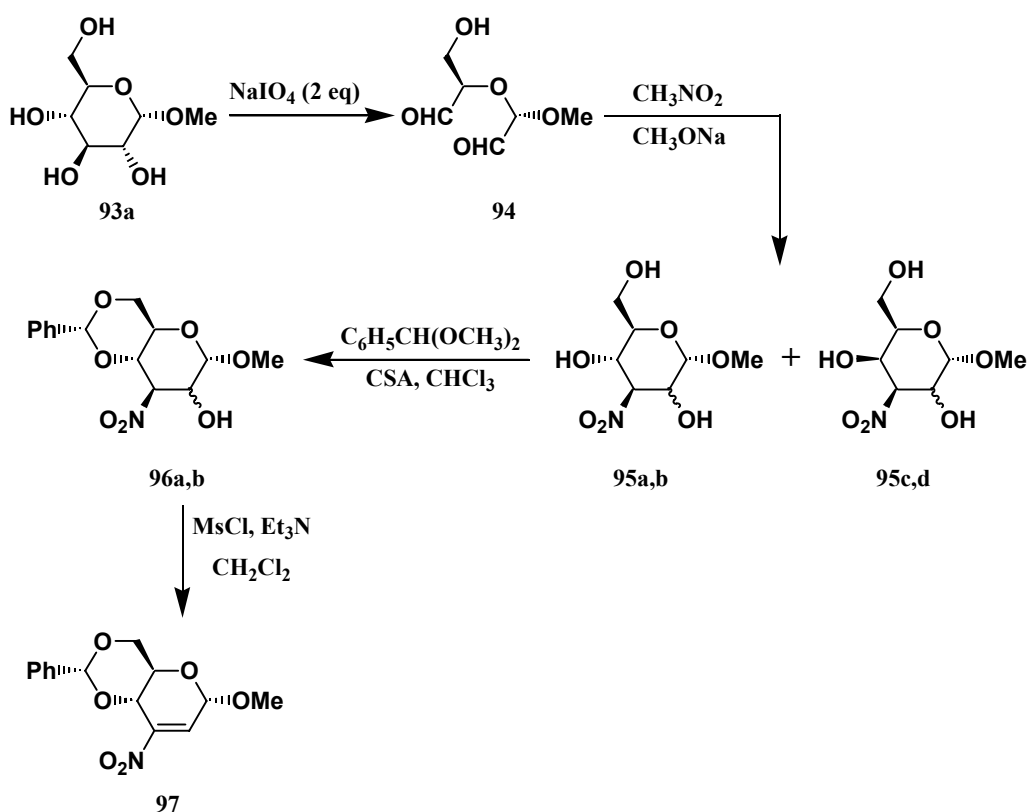
Por analogía con los dos casos similares previos (Esquema 85 y Esquema 96 pág. 254 y 267 respectivamente), esperábamos obtener también ahora únicamente o mayoritariamente el producto de ciclación de mayor estabilidad termodinámica **180a**. Sin embargo se obtuvo la mezcla **180a** + **180b**, en la que sorprendentemente el componente mayoritario fue el β -nitroéster **180b**, de menor estabilidad termodinámica que **180a**.

Este resultado puede explicarse admitiendo que la ciclación de **179b** conducente a la formación de estos dos compuestos está gobernada por factores de tipo cinético. Efectivamente, el nitronato de **179b** admite dos modos de ciclación conducentes a **180a** y **180b**, a través de los estados de transición **186a** y **186b**, respectivamente. La aproximación nitronato-carbonilo correspondiente a la silla **186b** es más favorable que la aproximación alternativa representada por la silla **186a**, dado que en la primera la interacción estérica entre los sustituyentes voluminosos R₁ y R₂ es menor que en la segunda, como ponen claramente de manifiesto las

respectivas representaciones de Newman. Consiguientemente el compuesto **180b** se forma más deprisa que **180a**, al ser termodinámicamente más estable el estado de transición **186b** que el **186a**.

Es necesario admitir además, que en este caso la base presente en el medio no es capaz de provocar una reequilibración de esta mezcla inicial **180a** + **180b** en favor del componente termodinámicamente más estable **180a**, que si habíamos observado en los casos similares previos, debido al carácter reversible de la reacción de Henry.

Prosiguiendo con nuestros trabajos, se hizo un intento de aislar el componente mayoritario de esta mezcla inseparable **180a** + **180b**, con objeto de poder fundamentar mejor su estructura **180b**, soportada únicamente mediante el espectro de RMN-¹H de esta mezcla. Nos basamos para ello en la solución dada por Baer¹⁵⁰ para resolver un problema similar (Esquema 106).

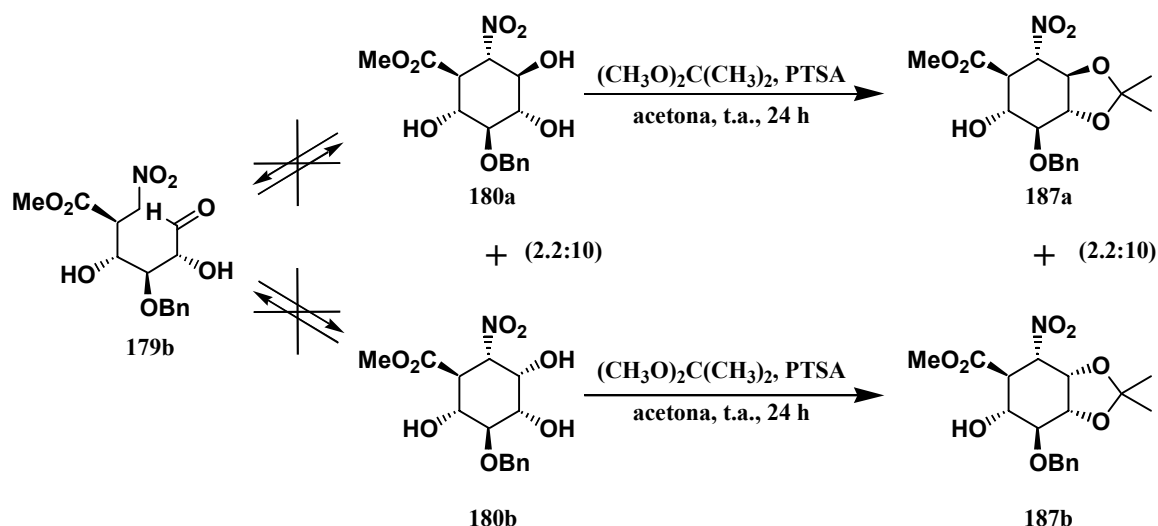


Esquema 106

¹⁵⁰ a) Baer, H. H.; Werner, R. "A study of steric effects on nitromethylene acidity and the mechanism of epimerization in partially blocked nitro hexoses" *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 3197-3202. b) Baer, H. H.; Werner, R. "Reactions of nitro sugars. XXVI. Analysis and separation of stereoisomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy and column chromatography of benzylidene derivatives" *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 1216-1223. c) Baer, H. H.; Georges, F. Z. "Reactions of nitro sugars. 37. Preparation of nitro olefins via methanesulfonates" *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3474-3476.

La reacción del dialdehído **94** con nitrometano en medio básico condujo a los cuatro nitroalcoholes **95a-d**, como una mezcla en equilibrio de **95a,b** con **95c,d** dado el carácter reversible de la reacción de Henry. Al tratar esta mezcla **95a-d** con fenilacetaldehído dimetilacetal, se observó que sólo reaccionan los componentes **95a** y **95b**, que tienen la disposición *trans* los grupos OH de la posición C-4 y de la posición C-6 favorecedora de la formación irreversible del anillo 1,3-dioxolánico de los compuestos **96a** y **96b**. Los compuestos **95c** y **95d**, darían este tipo de reacción mucho más lentamente, por lo que el proceso que se produce es la transformación de **95c** y **95d** en **95a** y **95b** por reequilibración de Henry. Como resultado de ello, se obtiene únicamente la mezcla de **96a** y **96b**.

Nosotros razonamos que de una manera similar nuestra mezcla **180a** + **180b** al reaccionar con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico debería conducir a la protección selectiva del sistema *cis*-1,2-diol del componente mayoritario **180b**, lo que combinado con la transformación de **180a** en **180b** por reequilibración de Henry, debería llevar a la formación de **187b** únicamente (Esquema 107).



Esquema 107

Sin embargo, cuando se trató nuestra mezcla de **180a** y **180b** con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico, se obtuvo una nueva mezcla constituida por **187a** y **187b**, como resultado de la protección simultánea de los respectivos sistemas 1,2-diólicos de las dos sustancias de partida, pudiendo establecerse a partir de su espectro de RMN-¹³C (Figura 61, pág. 283) que la proporción entre los componentes de la mezcla obtenida es la misma que la proporción 2.2:10.0 entre los componentes de partida **180a** y **180b**.

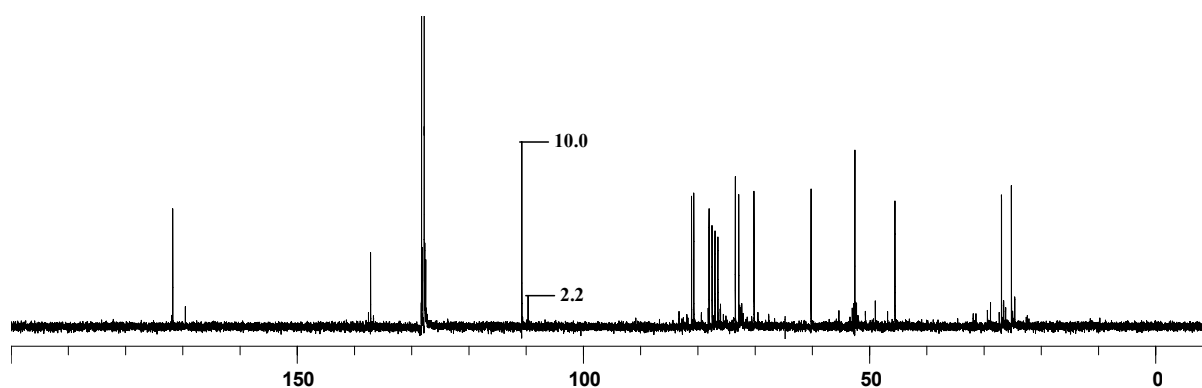


Figura 61: Detalle del espectro de RMN-¹³C de la mezcla de 187a + 187b.

Ello parece indicar que en nuestro caso la protección del sistema diólico de **180a** compite favorablemente con la transformación de **180a** en **180b** por reequilibración de Henry, no observándose este proceso, sino la transformación completa y simultánea de **180a** en **187a** y de **180b** en **187b**.

Afortunadamente, al someter a cromatografía de columna la mezcla de **187a** + **187b**, pudo aislarse la práctica totalidad del componente mayoritario **187b**, lo que representó un rendimiento del 59% (43% en global desde la nitrofuranosa **151a**, después de tres reacciones). El componente minoritario **187a** se obtuvo impurificado con trazas del mayoritario **187b**, por lo que se descartó.

La estructura de **187b** fue confirmada en base a sus propiedades espectroscópicas. La señal del protón H-2, geminal al grupo nitro, apareció en su espectro de RMN-¹H como un doble doblete a 5.10 ppm, con constantes de acoplamiento $J=3.9$ Hz y $J=11.8$ Hz (Figura 62, pág. 284). La necesaria orientación ecuatorial de los grupos metoxicarbonilo y nitro determina que H-1 y H-2 estén dispuestos axialmente, justificando ello el valor $J=11.8$ Hz. La multiplicidad de la señal observada se deriva también del acoplamiento de H-2 con H-3, por lo que el valor $J=3.9$ Hz de su constante de acoplamiento indica que H-3 se encuentra dispuesto ecuatorialmente. Además, la presencia de la señal del protón H-1, geminal al grupo metoxicarbonilo, como doble doblete a 3.44 ppm con constantes de acoplamiento de $J_{1,6}=9.3$ Hz y $J_{1,2}=11.8$ Hz, permitió confirmar la disposición axial de los protones H-1 y H-2 y establecer que H-6 también está dispuesto axialmente.

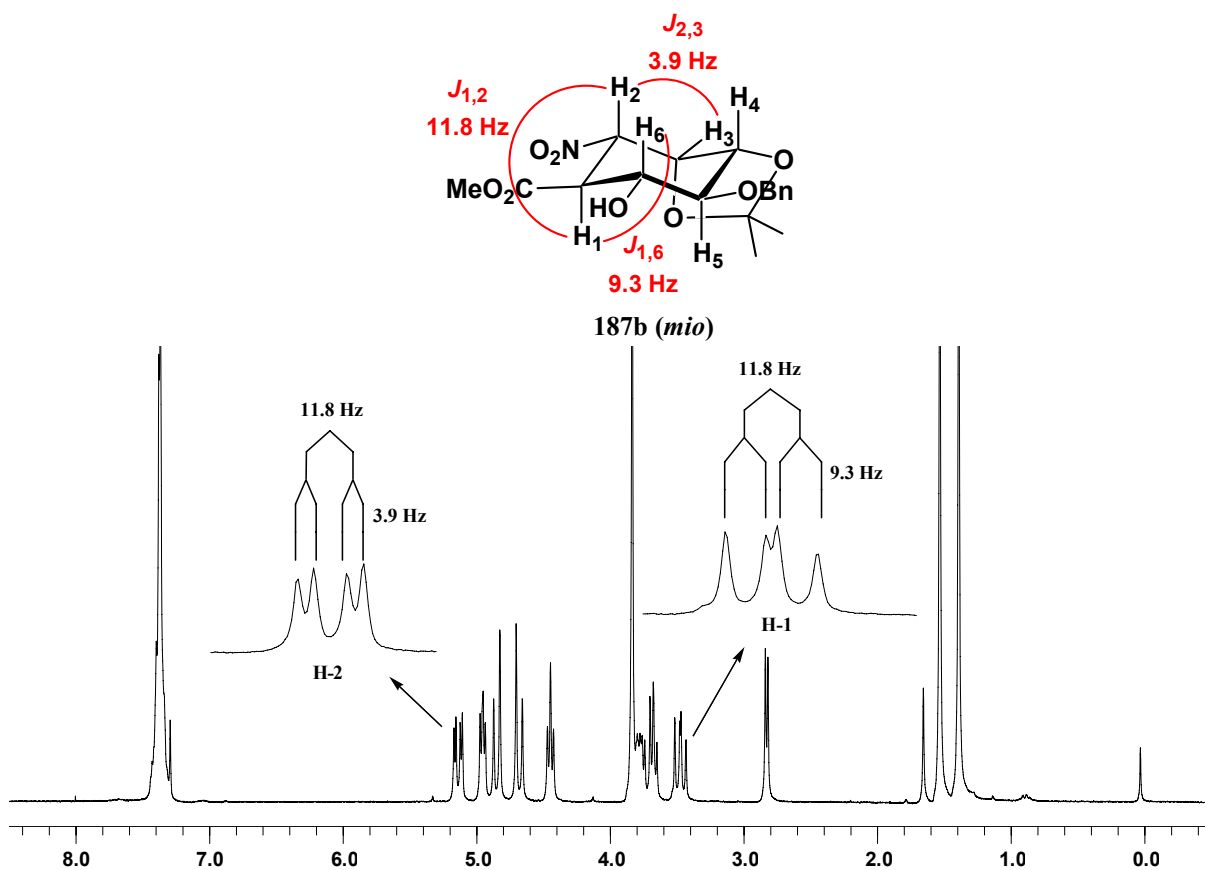


Figura 62: Espectro de RMN-¹H de **187b** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-2 y H-1.

Finalmente la estructura del compuesto **187b** se confirmó inequívocamente mediante un experimento de difracción de Rayos X (Figura 63).

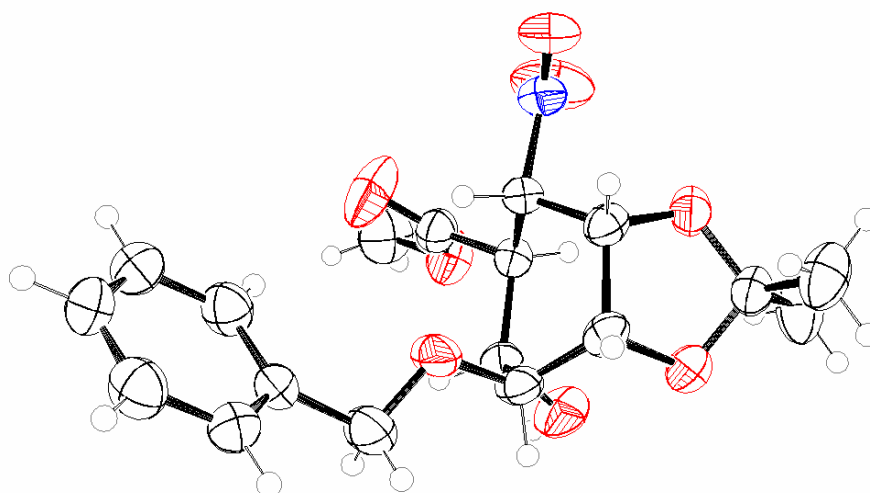
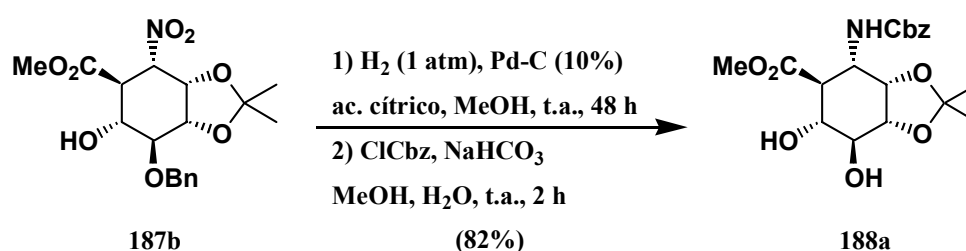


Figura 63: Representación en ORTEP-3 del compuesto **187b**.

Cabe destacar en esta estructura la conformación tipo bote adoptada por el ciclohexano en estado sólido, probablemente inducida por la presencia del ciclo dioxolánico.

Todo ello nos permitió confirmar la estructura que previamente asignamos a su precursor sintético **180b** (Esquema 104, pág. 277).

Una vez aislado enantioméricamente puro este nitroesterciclohexánico **187b**, prosiguiendo con nuestro plan de trabajo, se procedió a estudiar su transformación en el β -aminoácido ciclohexánico correspondiente, abordando en primer lugar la reducción de su grupo nitro en amino mediante una hidrogenación catalítica (Esquema 108).



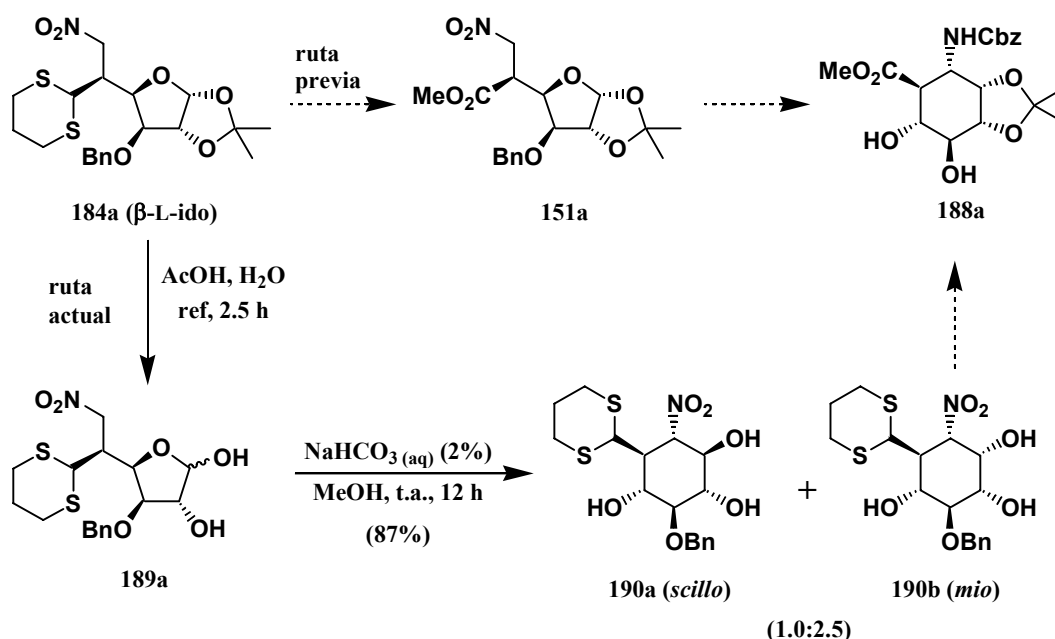
Esquema 108

La hidrogenación de **187b** con paladio sobre carbón activo y ácido cítrico, condujo tras 48 h al correspondiente aminoéster, que se trató directamente con cloruro de beniloxycarbonilo a temperatura ambiente, con objeto de proteger de manera inmediata su grupo amino. El compuesto obtenido se identificó como el aminoéster **188a**, en el que las condiciones de hidrogenación empleadas provocaron también la hidrogenólisis del grupo benciloxi de **187b**. La presencia en su espectro de RMN-¹³C de las señales del grupo benciloxycarbonilo [CH₂ a 67.6 ppm; seis carbonos aromáticos a 129.8 ppm (2 x CH), 130.1 ppm (2 x CH), 130.2 ppm (CH) y 139.0 ppm (C); y un carbonilo a 157.3 ppm], la masa molecular y la fórmula molecular obtenidas a partir de su espectro de masas [396 (4%, MH⁺)] y de su análisis elemental [calculado para C₁₉H₂₅NO₈: C 57.71; H 6.37; N 3.54; encontrado C 57.98, H 6.45, N 3.27], respectivamente, justificaron plenamente la estructura del compuesto obtenido.

En definitiva, se logró sintetizar el primer β -aminoácido ciclohexánico polihidroxilado conocido (**188a**), en una secuencia en la que el proceso clave fue la reacción de Henry intramolecular que permite generar el anillo ciclohexánico.

3.2.3. Replanteamiento de la síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados.

Para tratar de mejorar el rendimiento global del 35% con que se obtuvo el β -aminoéster **188a**, se abordó nuevamente su síntesis mediante una modificación de la ruta sintética expuesta en el apartado previo consistente en llevar a cabo la formación del anillo ciclohexánico en una etapa más temprana, a partir de la ditianilnitro- β -L-idofuranosa **184a**, a través de su derivado **189a**, lo que ya había sido llevado a cabo previamente por Funabashi (Esquema 109).¹⁵¹



Esquema 109

Empleando las condiciones de Funabashi, tras liberar la posición anomérica de **184a**, la reacción de Henry intramolecular subsiguiente de la nitrofuransosa **189a** con bicarbonato sódico en metanol condujo a la mezcla de nitrociclohexanos **190a** y **190b**, en una proporción 1:2.5 (43% de exceso diastereomérico), que no pudieron separarse mediante cromatografía en columna.

La proporción aproximada con la que se formaron estos dos epímeros **190a** y **190b** se estableció a partir de la relación entre los dos pares de señales de grupos CH en el espectro de RMN-¹³C de la mezcla (Figura 64, pág. 287).

¹⁵¹ Funabashi, M.; Yoshimura, J. "Branched-chain sugars. Part 14. Synthesis of new branched-chain cyclitols having *myo*- or *scyllo*-, and *muco*-configuration from 3-O-benzyl-5,6-dideoxy-5-[C-(1,3-dithian-2-yl)]-6-nitro-L-idofuranose and -D-glucofuranose" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 1425-1429.

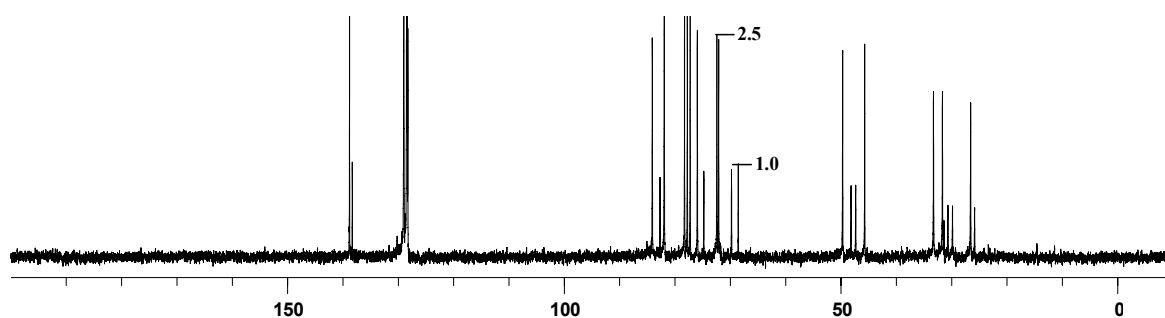


Figura 64: Detalle del espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla **190a** + **190b**.

A pesar de que la mezcla **190a** + **190b** obtenida no pudo separarse de manera eficaz por cromatografía en columna, sí se pudo obtener mediante cromatografía preparativa una pequeña fracción pura de cada uno de sus componentes, que se utilizó para determinar sus estructuras por medio de sus espectros de RMN- ^1H .

El componente mayoritario **190b** mostró en su espectro de RMN- ^1H la señal del protón H-2, geminal al grupo nitro, como un doble doblete a 4.68 ppm, con constantes de acoplamiento de $J_{1,2}=11.4$ Hz y $J_{2,3}=7.0$ Hz, lo que denota una disposición axial de dicho protón y del protón H-1, así como una disposición ecuatorial del protón H-3 (Figura 65), concordante con la necesaria disposición ecuatorial del grupo 1,3-ditiano y del grupo nitro.

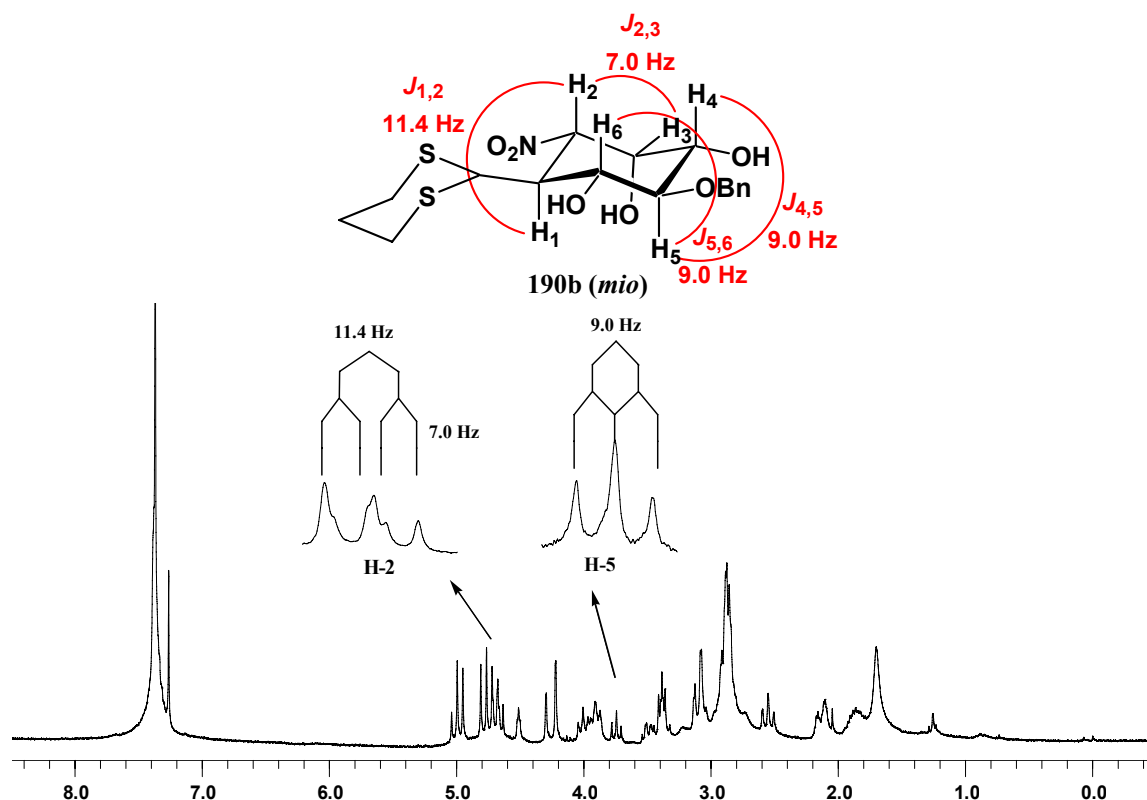


Figura 65: Espectro de RMN- ^1H de **190b** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-2 y H-5.

Además, la señal del protón H-5, geminal al grupo benciloxi, aparece como un triplete a 3.74 ppm, con constantes de acoplamiento de $J_{4,5}=J_{5,6}=9.0$ Hz, que solo son compatibles con una disposición axial de este protón y de sus vecinos H-4 y H-6.

El componente minoritario **190a**, mostró un espectro de RMN- 1 H en el que la señal correspondiente al protón H-2, geminal al grupo nitro, aparece como un triplete a 4.64 ppm con constantes de acoplamiento de $J_{1,2}=J_{2,3}=11.1$ Hz, lo que indica que H-2 y sus protones vecinos H-1 y H-3 están dispuestos axialmente (Figura 66).

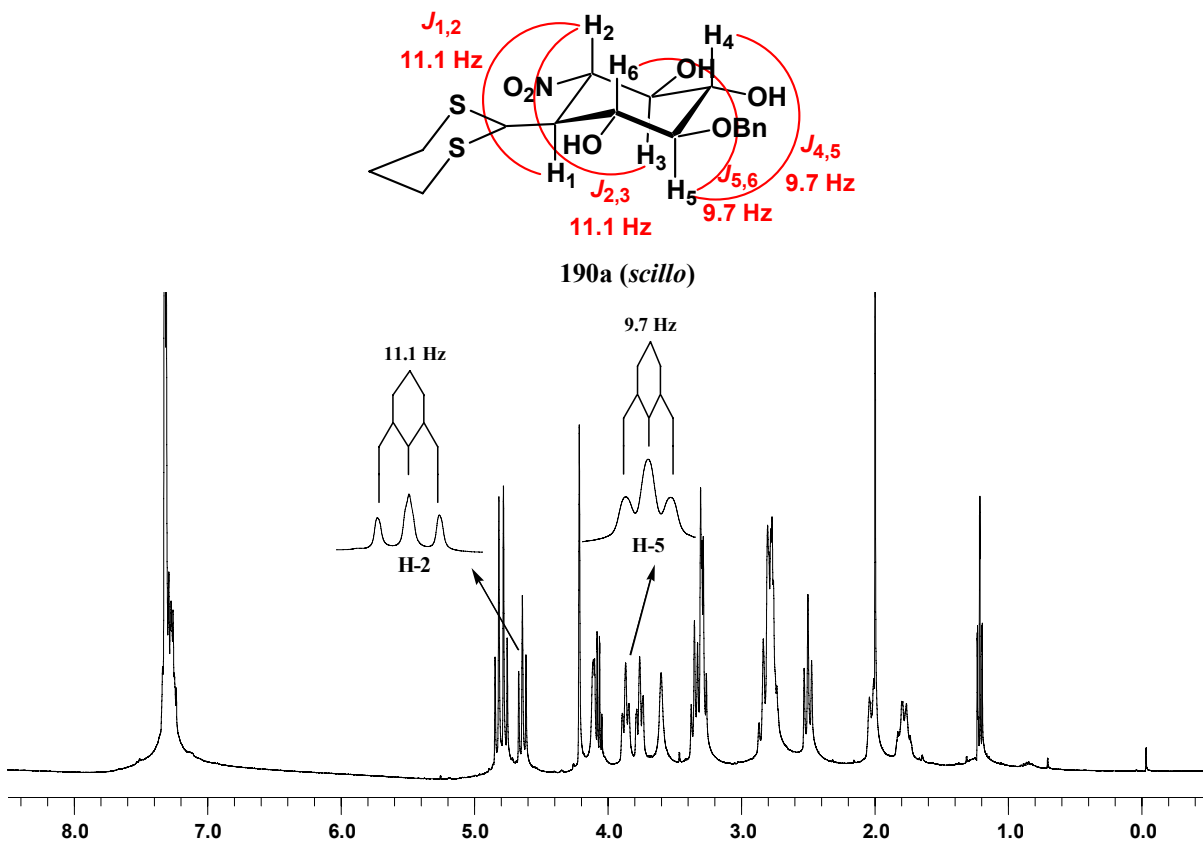
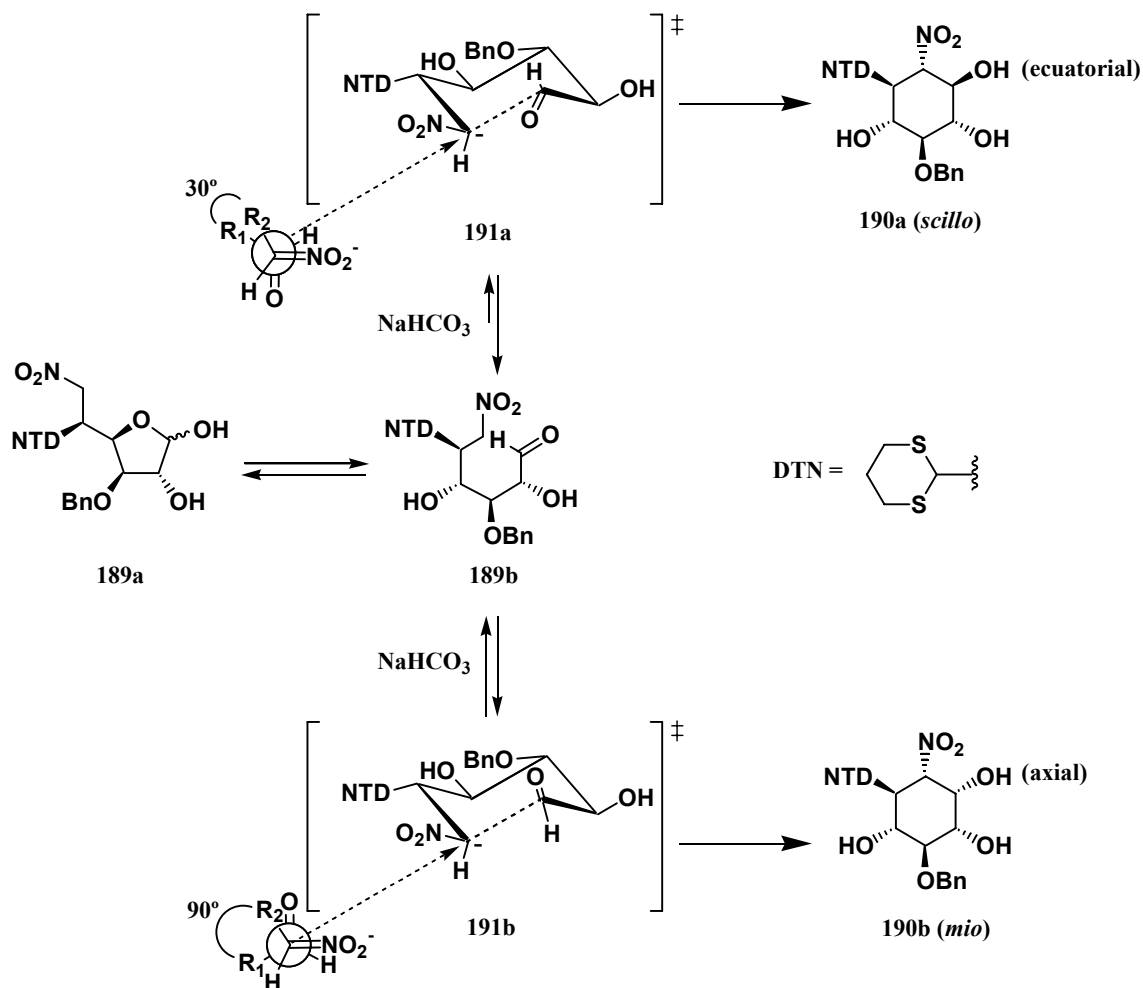


Figura 66: Espectro de RMN- 1 H de **190a** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-2 y H-5.

También se observa que la señal del protón H-5, geminal al grupo benciloxi, consiste en un triplete a 3.87 ppm con constantes de acoplamiento de $J_{4,5}=J_{5,6}=9.7$ Hz lo que indica que H-5 y sus protones vecinos H-4 y H-6 están dispuestos axialmente.

Por lo tanto, la reacción de Henry intramolecular de la 5-ditianil-6-nitrofurano **189a** dio un resultado similar al obtenido previamente en nuestra transformación análoga llevada a cabo con la 5-metoxicarbonil-6-nitrofurano **179a** (Esquema 104, pág. 277). Efectivamente, también se obtuvo ahora una mezcla de nitrociclohexanos **190a** + **190b** en la que el componente mayoritario fue el ciclohexano termodinámicamente menos estable **190b**, con todos sus sustituyentes

dispuestos ecuatorialmente, excepto el grupo OH de la posición C-3. Esto puede justificarse, al igual que en el caso previo, como resultado del control cinético a que está sometida la reacción de Henry conducente a dicha mezcla, que determina la formación mayoritaria del compuesto que implica el estado de transición más estable **191b** (Esquema 110).

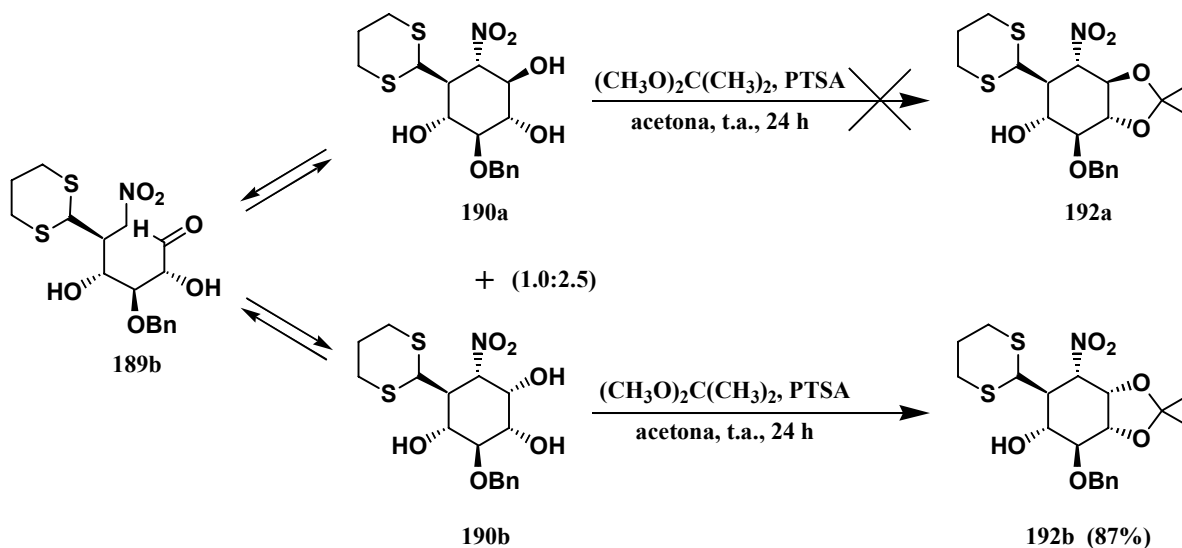


Esquema 110

La obtención mayoritaria del estereoisómero cinético **190b** indica que las condiciones de reacción empleadas tampoco permiten en el presente caso la reequilibración entre **190a** y **190b** que conduciría a la formación exclusiva o mayoritaria del estereoisómero termodinámicamente más estable **190a**.

Aclarado pues el problema de explicar la formación de la mezcla de nitrociclohexanos **190a** + **190b**, al encontrarnos ante una mezcla inseparable, decidimos proseguir esta segunda ruta de síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos que nos ocupa, abordando la separación de los componentes de esta mezcla como en

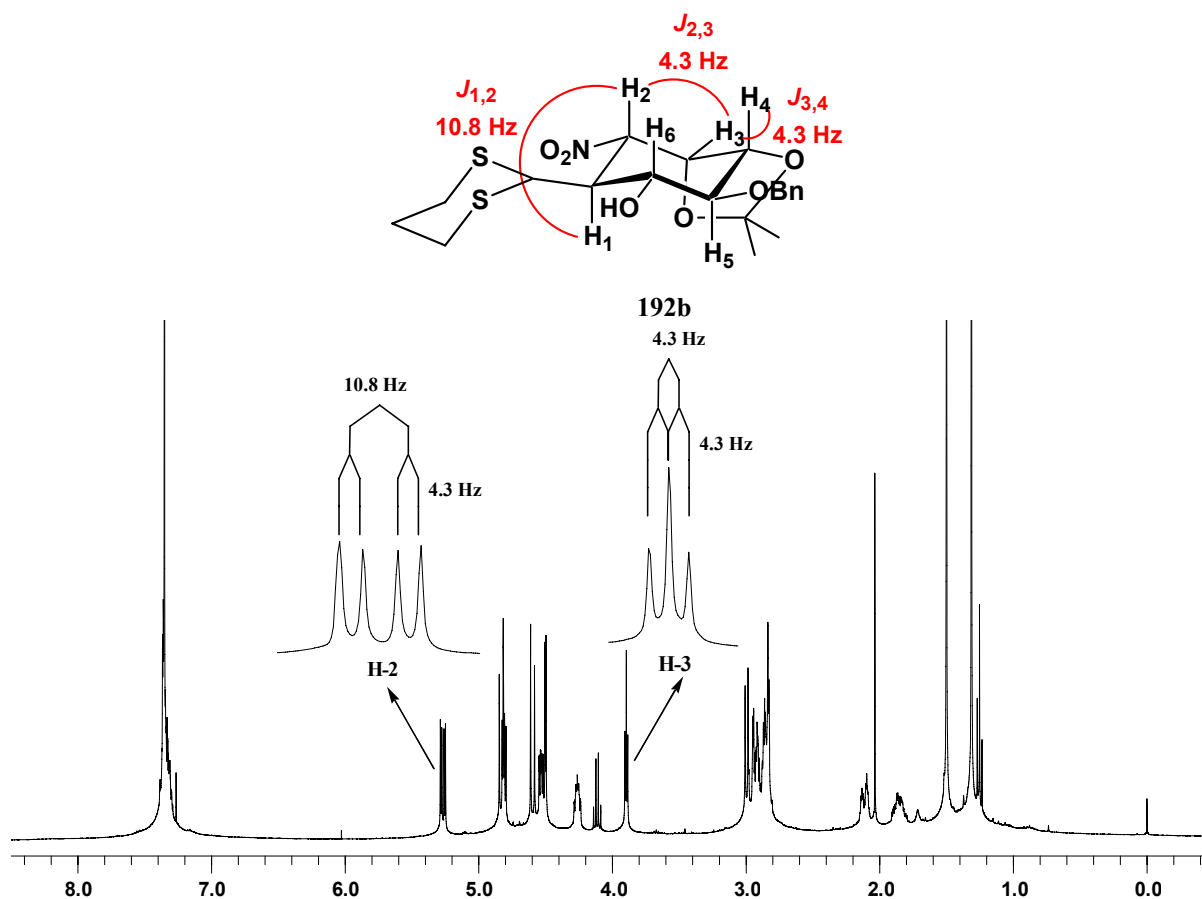
el caso similar previo (Esquema 107, pág. 282), tratándola con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico (Esquema 111).



Esquema 111

Observamos que en este caso la protección de los sistemas 1,2-diólicos de los componentes de la mezcla **190a** + **190b** condujo únicamente al nitrociclohexano **192b**, en lugar de formarse la mezcla de ciclohexanos **192a** + **192b** esperada. Este resultado se atribuyó a la mayor facilidad de formación del dioxolano *cis* de **192b**, frente a la formación del dioxolano *trans* de **192a** en las condiciones de reacción empleadas. La presencia de ácido *p*-toluensulfónico en el medio, permitiría reequilibrar simultáneamente la mezcla **190a** + **190b** en equilibrio, transformándose **190a** en **190b** a medida que este componente va dando lugar a su derivado **192b** y así la mezcla inicial se desplaza hacia la formación única de **192b**. Este proceso de reequilibración es claramente más favorable que el proceso de transformación de **190a** en **192a**.

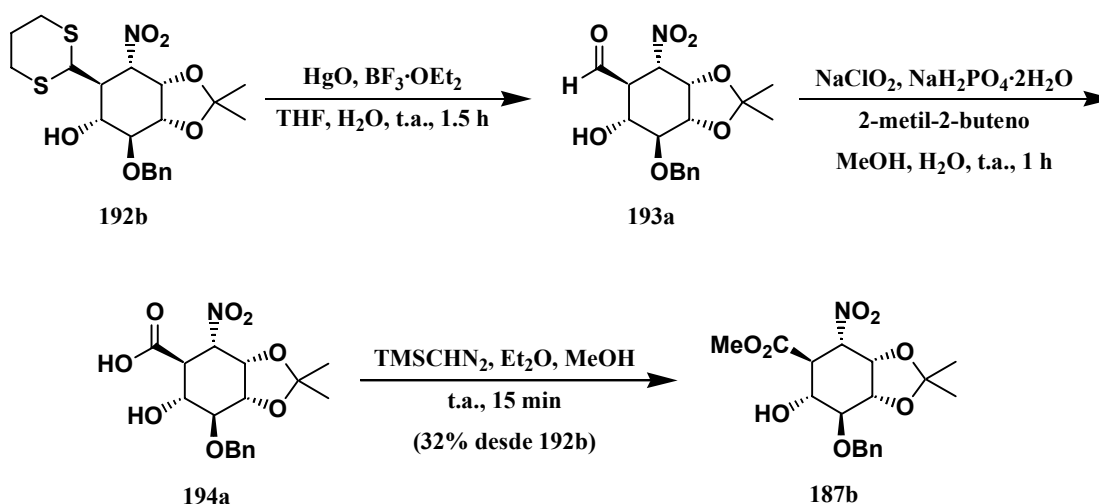
La estructura de **192b** se confirmó en base a sus propiedades espectroscópicas. Así, la aparición en su espectro de RMN-¹H de la señal del protón H-2, geminal al grupo nitro, en forma de doble doblete a 5.27 ppm, con constantes de acoplamiento $J_{1,2}=10.8$ Hz y $J_{2,3}=4.3$ Hz denotan una disposición axial de este protón y del protón H-1 y una disposición ecuatorial del protón H-3 (Figura 76, pág. 291). Además la aparición de la señal del protón H-3 (geminal al grupo OBn) en forma de triplete a 3.90 ppm, con constantes de acoplamiento $J_{2,3}=J_{3,4}=4.3$ Hz confirmó la disposición ecuatorial de H-3 y la disposición axial de H-2 y H-4.



*Figura 76: Espectro de RMN-¹H de **192b** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-2 y H-3.*

Esta segunda aproximación a la síntesis de β-aminoácidos ciclohexánicos polihidroxiados presenta una clara ventaja con respecto a la primera, al haber permitido transformar el precursor de estos β-aminoácidos común a ambas rutas sintéticas (la 5-ditianil-6-nitrohexofuranosa **184a**, Esquema 109, pág. 286) en un solo nitrociclohexano, el compuesto **192b**.

Se decidió por ello proseguir con este compuesto **192b** nuestro protocolo de síntesis de β-aminoácidos ciclohexánicos (Esquema 112, pág. 292).



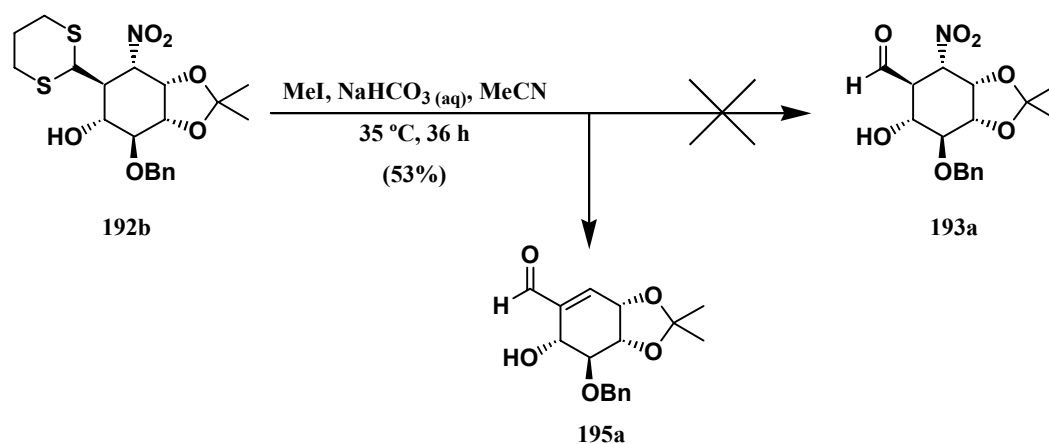
Esquema 112

Para ello, se llevó a cabo primero la desprotección del grupo formilo de **192b** con óxido de mercurio y trifluoroboroeterato, obteniéndose el nitroaldehído **193a**, que se oxidó inmediatamente con clorito sódico y dihidrogenofosfato sódico, generando así el correspondiente nitroácido **194a**, que al reaccionar con trimetilsilildiazometano permitió obtener el nitroéster ciclohexánico **187b** deseado, cuyas propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las del previamente sintetizado (Esquema 107, pág. 282).

Sin embargo, el bajo rendimiento obtenido (32%) ahora, menor que el rendimiento global del 43% logrado previamente (Esquemas 104 y 107, pág. 277 y 282, respectivamente), nos llevó a descartar esta aproximación a **187b**, frente a la inicialmente desarrollada.

En un intento de mejorar el rendimiento de esta última transformación de **192b** al nitroéster **187b**, se ensayaron otras condiciones de desprotección de formilos enmascarados en forma de 1,3-ditianos, consistentes en tratarlos con yoduro de metilo y bicarbonato sódico, para obtener así el ciclohexilaldehído **193a** (Esquema 113, pág. 293).¹⁵²

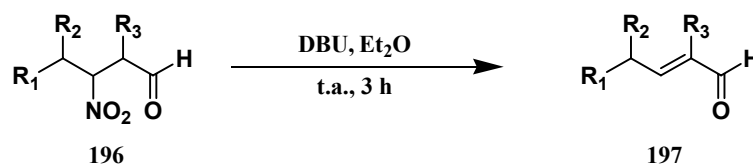
¹⁵² Grundmann, C.; Ruske, W. "The preparation of 6-amino-4-oxocaproic acid from furfural" *Chem. Ber.* 1953, 86, 939-943.



Esquema 113

Sin embargo, cuando se hizo reaccionar una disolución de **192b** en acetonitrilo con yoduro de metilo y bicarbonato sódico, se obtuvo tras 36 h de agitación a 35 °C el aldehído α,β -insaturado **195a**, en lugar del aldehído ciclohexánico **193a** esperado. La estructura de este compuesto **195a** se determinó a partir de sus propiedades espectroscópicas. La ausencia en su espectro de IR de las señales características del grupo nitro, nos confirmó que dicho grupo había sido eliminado. La presencia en su espectro de RMN-¹³C de un carbono de aldehído a 193.1 ppm y de dos carbonos olefínicos a 141.3 y 145.7 ppm, nos indicaron que se había formado el doble enlace carbono-carbono conjugado con el grupo carbonílico, apareciendo el resto de los grupos CH pertenecientes al anillo ciclohexánico a 73.4, 75.6, 79.6 y 81.7 ppm.

Una búsqueda bibliográfica nos confirmó la facilidad con la que se producen este tipo de eliminaciones cuando se someten β -nitroaldehídos a condiciones de reacción básicas (Esquema 114).¹⁵³

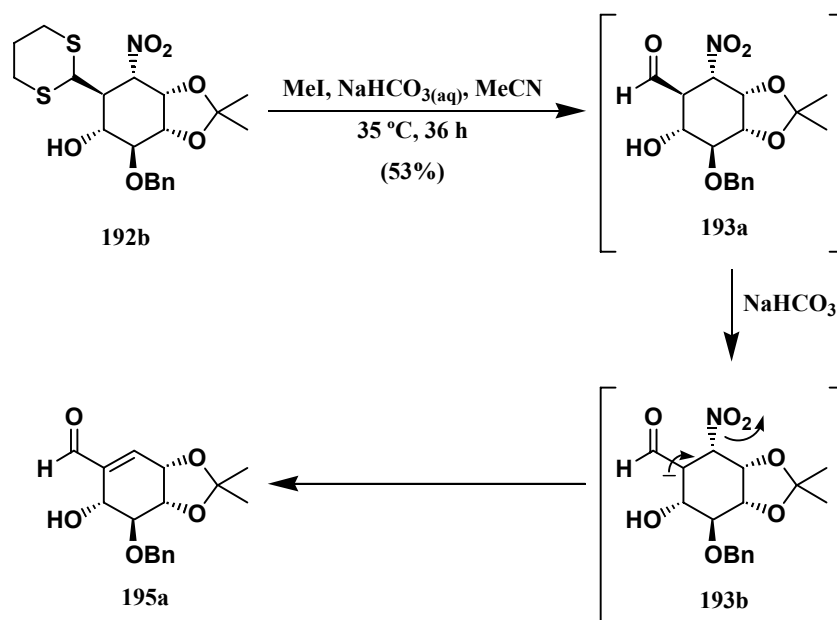


R ₁	R ₂	R ₃	Rdto, %	R ₁	R ₂	R ₃	Rdto, %
Me	Me	H	63	(CH ₂) ₄		H	63
Me	Et	H	59	Me	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	H	52
Me	<i>i</i> Bu	H	63	Cy	H	H	66
Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	H	65	<i>i</i> Pr	H	H	82
(CH ₂) ₄		H	70	Me	Me	Me	55
(CH ₂) ₄		H	55	Et	H	Me	52

Esquema 114

¹⁵³ Ono, N.; Miyake, H.; Tanikaga, R.; Kaji, A. "New synthesis of α,β -unsaturated aldehydes from nitro paraffins" *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5017-5019.

La eliminación observada en nuestro caso se puede explicar mecanísticamente considerando que durante la desprotección de **192b** se forma el nitroaldehído **193a** deseado, pero este compuesto en el propio medio básico de reacción elimina su grupo nitro mediante un proceso E1cB que conduce al aldehído α,β -insaturado **195a** (Esquema 115).



Esquema 115

Este compuesto **195a** tiene la estructura de las rancinamicinas, que son una familia de carboazúcares insaturados obtenidos de la *Streptomyces lincolnensis*, de los que se han descubierto importantes propiedades antibióticas.¹⁵⁴ Consiguientemente, la ruta conducente a **195a** constituye un método de síntesis enantioselectiva de este tipo de productos naturales.¹⁵⁵

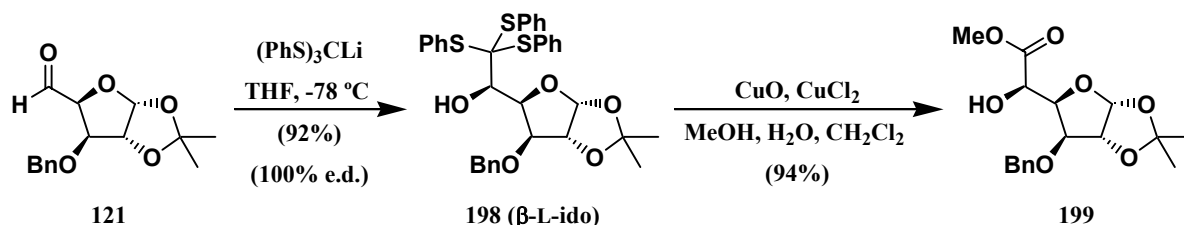
3.2.4. Segundo replanteamiento de la síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados.

Con objeto de resolver este problema inesperado de eliminación del grupo nitro de **193a** y también de acortar nuestro plan de síntesis de β -aminoácidos

¹⁵⁴ a) Argoudelis, A. D. ; Pike, T. R.; Sprague, R. W. "Rancinamycins, metabolites produced by *Streptomyces lincolnensis* in sulfur-depleted media" *J. Antibiot.* **1976**, 29, 777-786. b) Argoudelis, A. D.; Sprague, R. W.; Mizesack, S. A. "Rancinamycins I, II, III, and IV structural studies" *J. Antibiot.* **1976**, 29, 787-796.

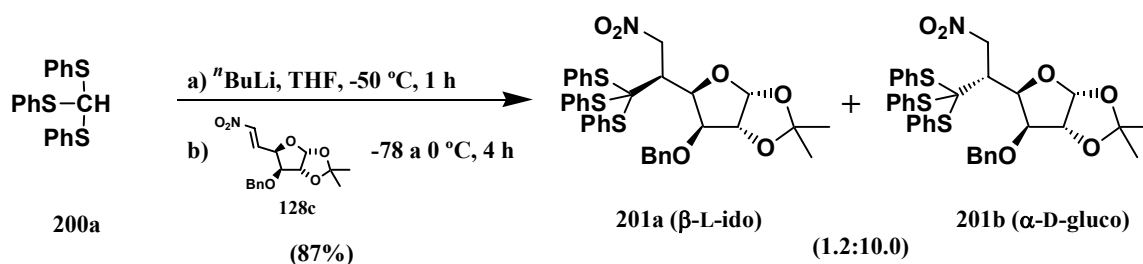
¹⁵⁵ Otero, J. M.; Fernández, F.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Preliminary studies on the synthesis of rancinamycins from nitrosugars: first total synthesis of (3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benzyloxy-6-hydroxy-3,4-(isopropylidendioxy)-cyclohex-1-enecarbaldehyde" *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 4045-4049.

ciclohexánicos polihidroxilados, decidimos introducir una nueva modificación en el plan inicial de síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos del Esquema 109 (pág. 286), consistente en emplear como equivalente sintético del grupo metoxicarboxilo un grupo tritiano en lugar de un grupo ditiano, dado que en medio metanólico estos grupos tritiano se transforman directamente en ésteres metílicos (Esquema 116).¹⁵⁶



Esquema 116

Se eligió para ello el tris(feniltio)metano (**200a**), dado que puede generar fácilmente nucleófilos litiados por reacción con *n*-butillitio. Además, su gran volumen podría inducir una mejor selectividad en su adición a la nitroolefina **128c** que la obtenida previamente por adición del grupo ditiano (Esquema 117).



Esquema 117

De acuerdo con este nuevo plan, cuando se hizo reaccionar una disolución de tris(feniltio)metano (**200**) en tetrahidrofurano con *n*-butillitio, se obtuvo el anión litiado correspondiente, sobre el que se adicionó a continuación la nitroolefina **128c** previamente preparada. Ello condujo a la obtención de una mezcla de productos de adición **201a** + **201b** en una relación 1.2:10.0 (79% de exceso diastereoisomérico) que fue calculada como en los casos previos a partir del espectro de RMN-¹H de la mezcla de reacción (Figura 77, pág. 296), midiendo la intensidad de la señal correspondiente al protón anomérico de cada uno de los componentes de la mezcla.

¹⁵⁶ Lubineau, A.; Gavard, O.; Alais, J.; Bonnaffé, D. "New accesses to L-iduronyl synthons" *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 307-311.

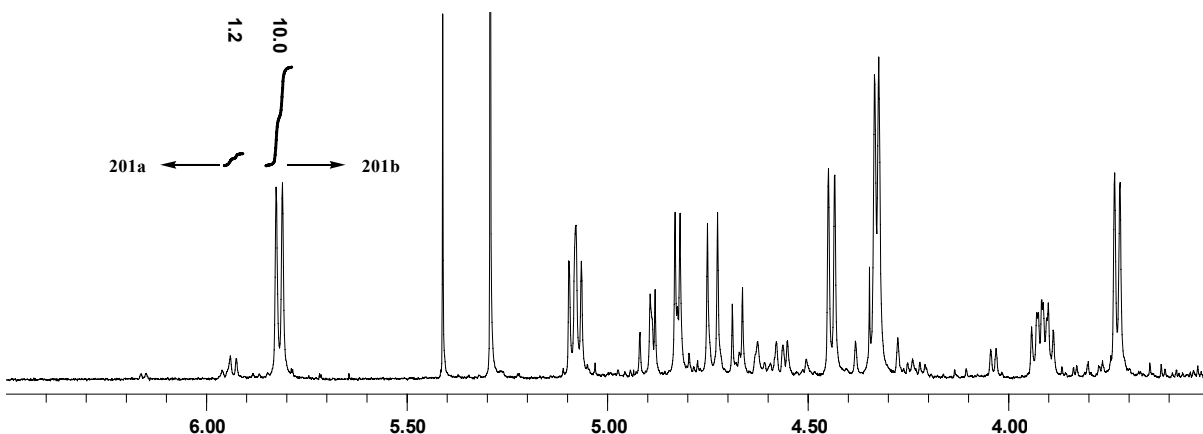


Figura 77: Detalle del espectro de RMN-¹H de la mezcla de **201a** + **201b**.

La mezcla **201a** + **201b** obtenida no pudo separarse inicialmente por cromatografía en columna. Sin embargo, el componente mayoritario **201b** pudo aislarse enantioméricamente puro por cristalización en éter etílico de la mezcla **201a** + **201b** obteniendo uso cristales incoloros de p.f. 132-134 °C, que nos permitieron realizar un experimento de difracción de Rayos X con el que determinamos inequívocamente su estructura (Figura 78).

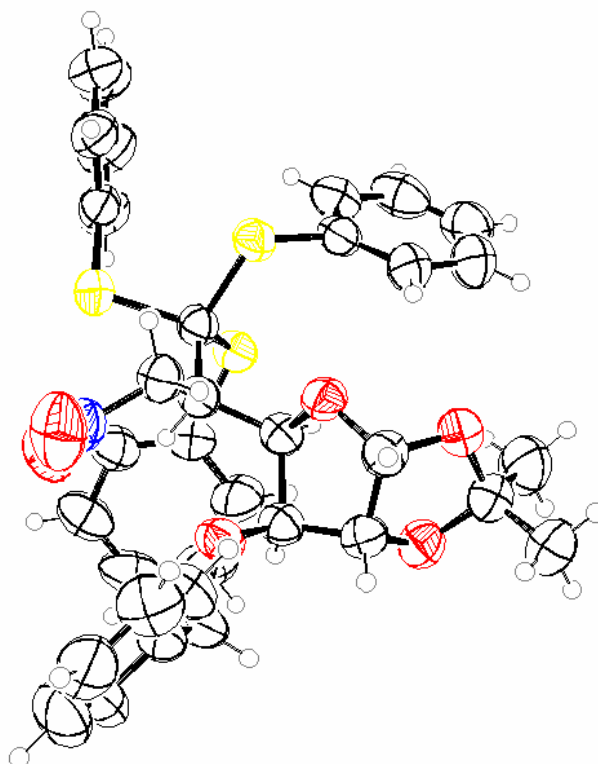
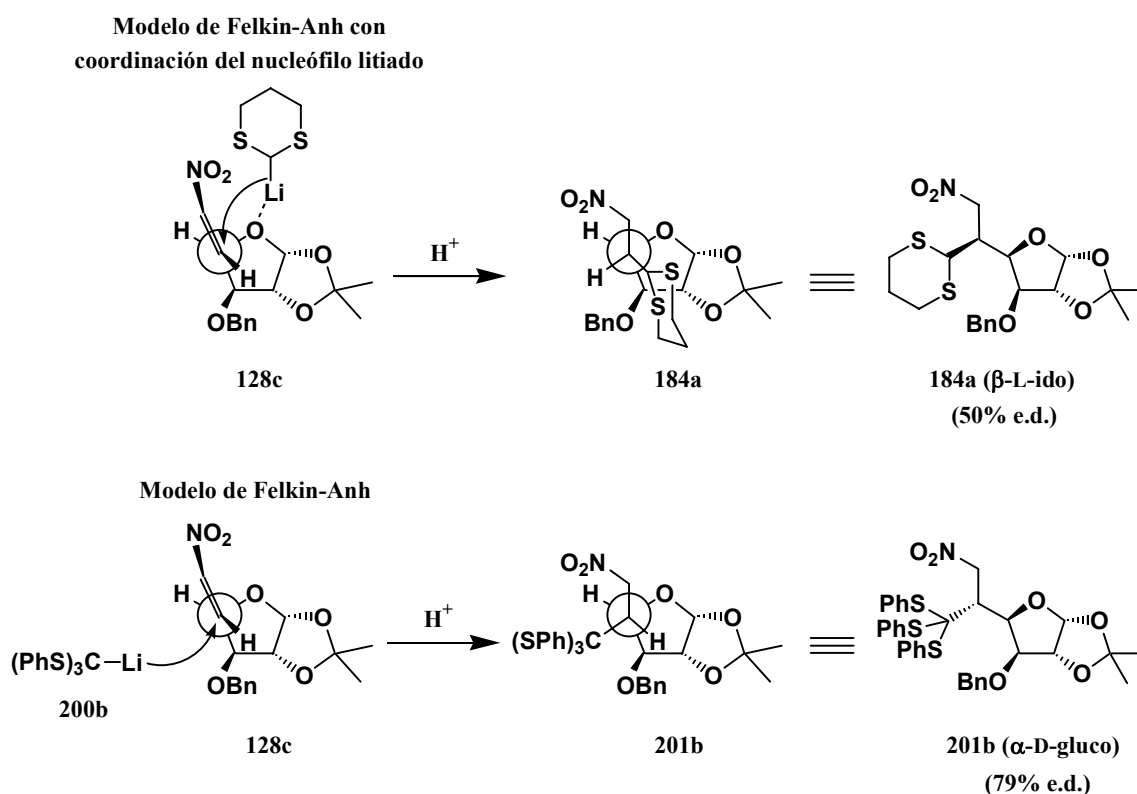


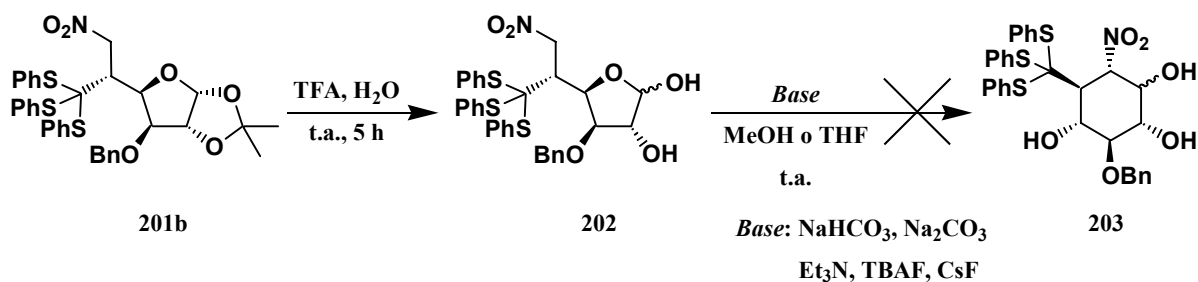
Figura 78: Representación en ORTEP-3 del compuesto **201b**.

Por analogía con el caso similar previo de adición de 2-litio-1,3-ditiano a la nitroolefina **128c** (Esquema 101, pág. 273), se esperaba obtener en el presente caso

como epímero mayoritario el aducto **201a** con configuración de β -L-idofuranosa, pero sorprendentemente se obtuvo mayoritariamente el aducto alternativo **201b** con configuración de α -D-glucofuranosa. Esta inversión en la estereoselectividad al sustituir el 2-litio-1,3-ditiano por 1-litio-tris(feniltio)metano (**200b**) se puede justificar admitiendo que la adición del anión tritiano a la nitroolefina **128c** se produce según la regla de Felkin-Anh, no observándose en el presente caso la coordinación del nucleófilo al oxígeno de la nitrofuranosa a través del catión litio, al estar altamente desfavorecida debido al gran volumen del nucleófilo tritiano empleado (Esquema 118).



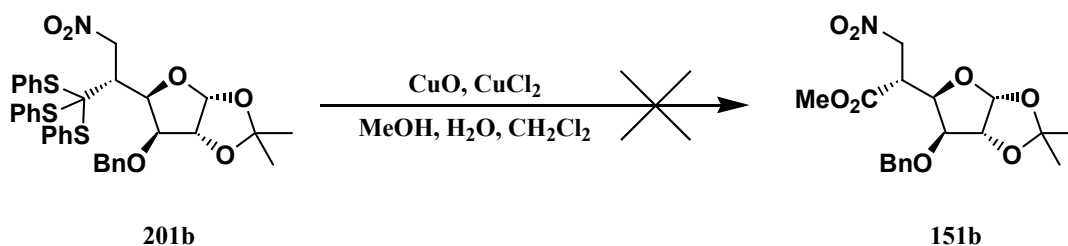
Nuestro nuevo plan de acceso a β -aminoácidos ciclohexánicos basado en tritianos se concretó a continuación en la generación del anillo ciclohexánico mediante el estudio de la transformación de **201b** en su derivado ciclohexánico **203**, a través de la nitrohexofuranosa **202** (Esquema 119, pág 298).



Esquema 119

De acuerdo con este plan, tras desproteger el hidroxilo de la posición anomérica de **201b** por tratamiento con ácido trifluoroacético acuoso, se ensayó la reacción de Henry intramolecular de **202** con diversas bases (bicarbonato sódico, carbonato sódico, trietilamina, fluoruro de tetrabutilamonio, fluoruro de cesio), obteniéndose en todos los casos una mezcla compleja de reacción carente de interés sintético.

Este resultado inesperado nos llevó a ensayar primero la transformación del grupo tris(feniltio)metilo en el grupo metoxycarbonilo, en la fase de nitrofuranosa **201b** previamente a la generación mediante una reacción de Henry intramolecular del anillo ciclohexánico del β -aminoácido ciclohexánico a sintetizar (Esquema 120).¹⁵⁷

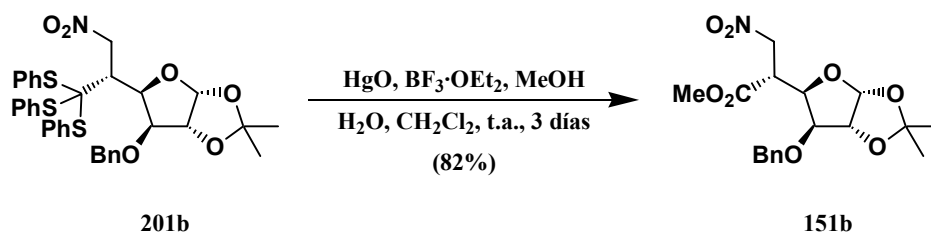


Esquema 120

Para ello, a una disolución del nitroderivado **201b** en una mezcla de metanol, agua y diclorometano, se le añadió óxido de cobre (II) y cloruro de cobre (II) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante cuatro días, recuperándose el producto de partida inalterado. Cuando el mismo proceso se llevó a cabo calentando a reflujo durante 12 horas, se obtuvo una mezcla compleja de productos carente de interés sintético. Sin embargo, cuando se ensayaron condiciones de reacción similares a las empleadas previamente para eliminar el grupo 1,3-ditianilo de la

¹⁵⁷ Lubineau, A.; Gavard, O.; Alais, J.; Bonnaffé, D. "New accesses to L-iduronyl synthons" *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 307-311.

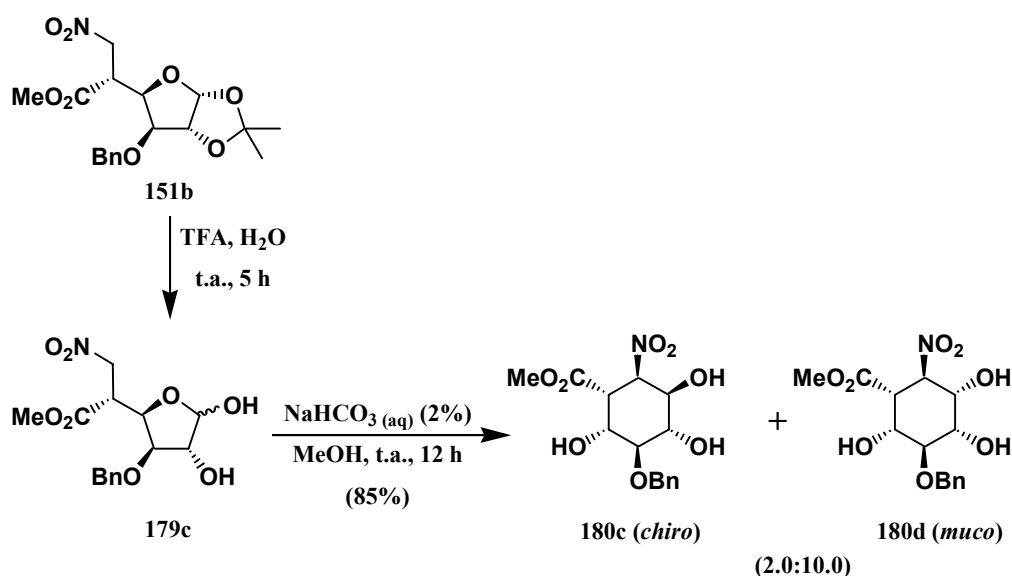
nitrofuranoso **184a** (Esquema 103, pág. 275), se obtuvieron resultados satisfactorios (Esquema 121).¹⁵⁸



Esquema 121

Así, cuando una disolución del nitroderivado **201b** en metanol, agua y diclorometano, se hizo reaccionar con óxido de mercurio (II) y trifluoroboroeterato, se obtuvo en un 82% de rendimiento, tras tres días de reacción a temperatura ambiente, el nitroéster **151b** deseado, con estructura de α -D-glucofuranosa. Las propiedades espectroscópicas de este compuesto fueron muy similares a las de su epímero β -L-idofuranósico **151a** previamente preparado (Esquema 103, pág. 275). Así, su espectro de RMN-¹³C mostró las señales del grupo metoxicarbonilo a 52.4 ppm (OCH₃) y 169.9 ppm (C=O), y su espectro de IR mostró una banda del grupo carbonilo a 1741 cm⁻¹ y dos bandas del grupo nitro a 1557 y 1376 cm⁻¹.

Continuando con nuestro plan de síntesis, se liberó la posición anomérica de **151b** por tratamiento con ácido trifluoroacético acuoso y la nitrofuranoso **179c** obtenida se sometió a una reacción de Henry intramolecular (Esquema 122).



Esquema 122

¹⁵⁸ Vedejs, E.; Fuchs, P. L. "Improved aldehyde synthesis from 1,3-dithianes" *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 366-367.

El tratamiento del D-glucoderivado **179c** con bicarbonato sódico en metanol condujo a una mezcla inseparable de epímeros **180c** + **180d**, en una proporción 2.0:10.0 (66% de exceso diastereomérico), calculada a partir del espectro de RMN-¹H del crudo de reacción, tomando como referencia el pico correspondiente al protón H-2, geminal al grupo nitro, de cada compuesto. La multiplicidad observada para dichas señales, también nos permitió establecer la configuración de ambos compuestos (Figura 79).

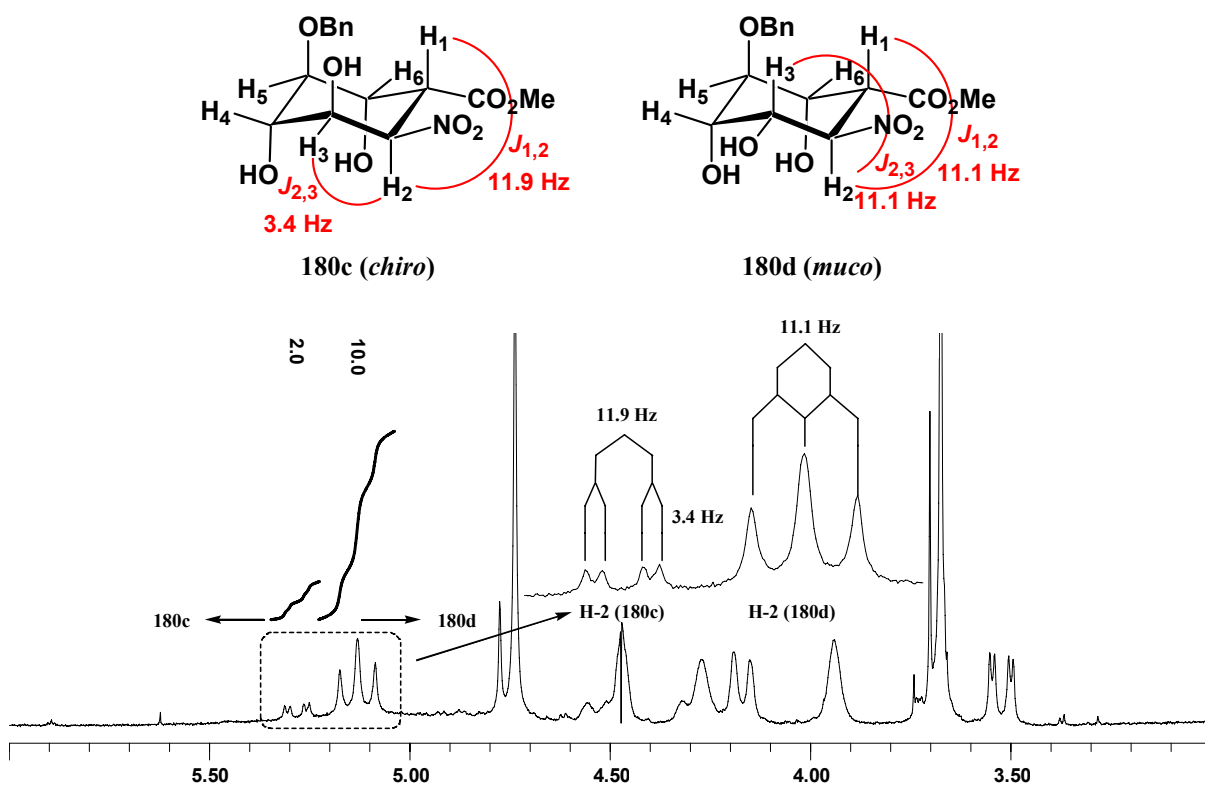


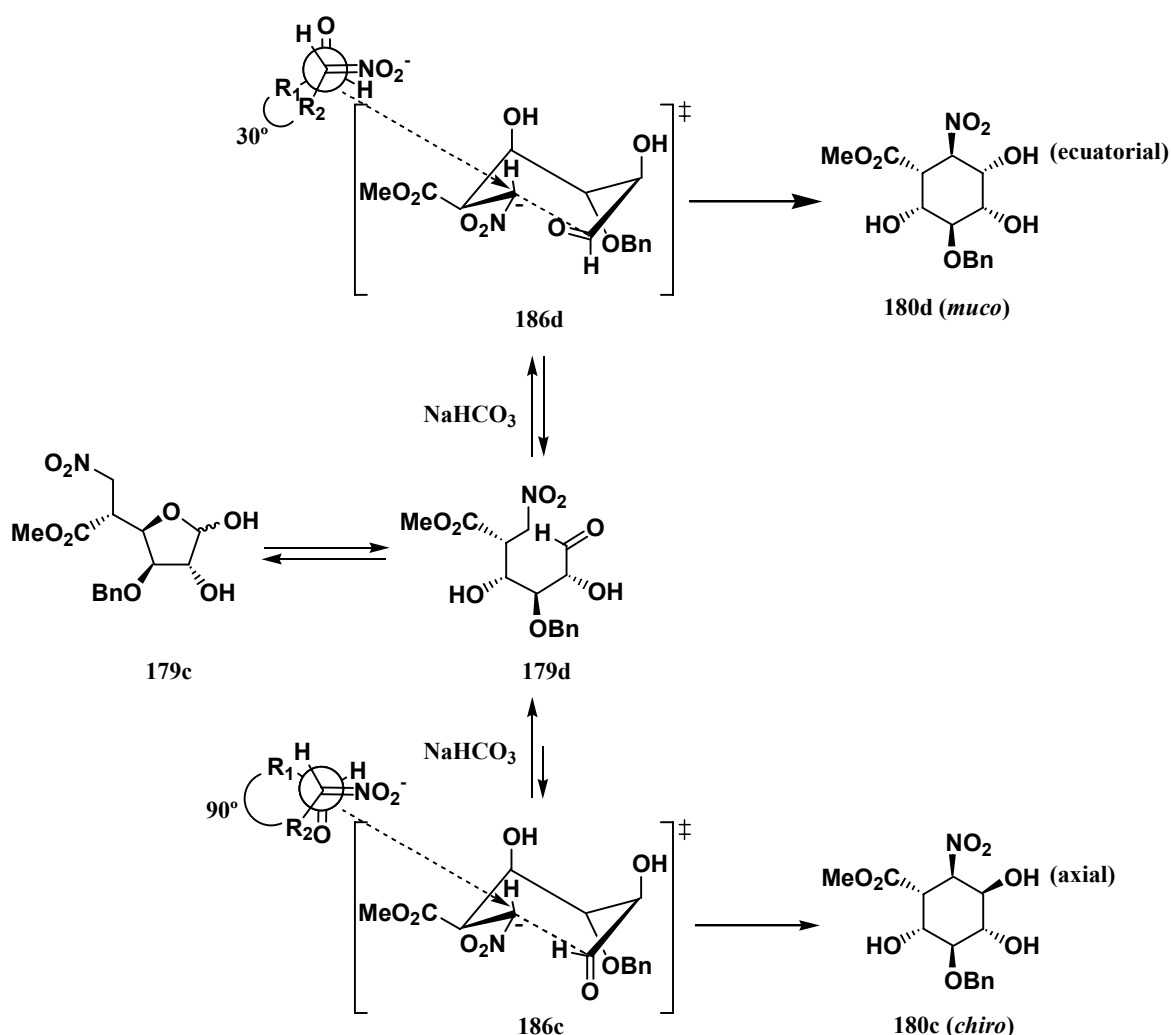
Figura 79: Detalle del espectro de RMN-¹H de la mezcla de **180c** + **180d**. Se amplían las señales de los protones H-2 para los dos componentes de la mezcla.

La señal del protón H-2 del compuesto mayoritario **180d**, apareció como un triplete a 5.13 ppm con constantes de acoplamiento $J_{1,2}=J_{2,3}=11.1$ Hz, debido a un doble acoplamiento diaxial de H-2 con H-1 y H-3. Esta disposición relativa entre estos protones determina que estamos ante un ciclohexano con el grupo metoxicarbonilo, el grupo nitro y el grupo hidroxilo en C-3 dispuestos ecuatorialmente (estructura **180d**).

Por otra parte, la señal del protón H-2 del compuesto minoritario **180c**, apareció como un doble doblete a 5.28 ppm con constantes de acoplamiento $J_{1,2}=11.9$ Hz y $J_{2,3}=3.4$ Hz, debido a un acoplamiento diaxial de H-2 con H-1 y a un acoplamiento axial-ecuatorial de H-2 con H-3. Esta disposición relativa entre estos protones sólo se da en el ciclohexano **180c**, en el que el grupo metoxicarbonilo y el

grupo nitro están dispuestos ecuatorialmente, estando el grupo hidroxilo en C-3 dispuesto axialmente.

En definitiva, esta ciclación de Henry de **179c** (Esquema 122, pág. 299), transcurrió con un exceso diastereomérico del 66%. Este valor es muy similar al 64% obtenido cuando se llevó a cabo previamente con su forma epimérica en C-5 la 5-metoxicarbonil-6-nitro-L-idosa **179a** (Esquema 104, pág. 277). Sin embargo, existe una diferencia importante entre ambos casos. En el presente caso el estereoisómero mayoritario fue el termodinámicamente más estable **180d** (Esquema 123), mientras que en el caso similar previo (Esquema 105, pág. 280) el producto mayoritario fue el termodinámicamente menos estable **180b**.



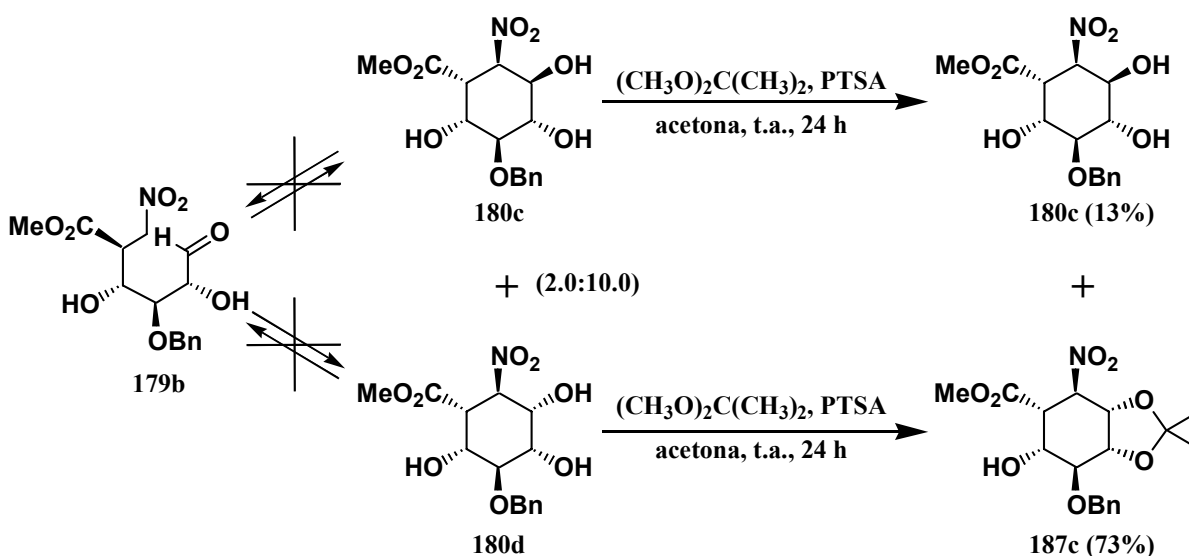
Esquema 123

El hecho de obtener en estas condiciones de ciclación mayoritariamente el compuesto más estable termodinámicamente **180d**, nos indica que en esta ciclación de Henry la base empleada es capaz de reequilibrar la mezcla **180c** + **180d**

inicialmente formada, en la que el compuesto **180c** (termodinámicamente menos estable) sería el mayoritario, ya que su formación transcurre a través del estado de transición **186c** más favorable termodinámicamente. La reequilibración de la mezcla favorece la formación del compuesto más estable termodinámicamente **180d**.

Este proceso de reequilibración no se observaba en la mezcla de ciclohexanos **180a** + **180b** obtenida anteriormente (Esquema 105, pág. 280), ya que **180a** y **180b** forman, respectivamente, sillas con seis y cinco sustituyentes en disposición ecuatorial. Esto hace que sean estructuras muy estables con poca tendencia a experimentar aperturas de tipo retro-Henry que favorezcan la formación del compuesto más estable termodinámicamente **180a**. Las sillas que forman nuestros actuales compuestos **180c** y **180d** (Esquema 123, pág. 301) tienen dos y tres sustituyentes, respectivamente, en disposición ecuatorial, lo que las hace menos estables termodinámicamente y con mayor tendencia a experimentar aperturas de tipo retro-Henry que favorecen la reequilibración hacia el compuesto más estable termodinámicamente **180d**.

Prosiguiendo con nuestros trabajos sintéticos, se afrontó a continuación la separación de los componentes de la mezcla **180c** + **180d** mediante la estrategia empleada en los casos similares previos (Esquemas 107 y 111, pág. 282 y 290, respectivamente). Para ello se hizo reaccionar esta mezcla con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico, observándose que afortunadamente el componente mayoritario **180d** se transformó en el derivado deseado **187c**, permaneciendo inalterado el componente minoritario **180c** debido a que en su conformación tipo silla favorecida todos sus hidroxilos están en disposición axial, resultando imposible la formación de un ciclo dioxolánico sobre dos grupos contiguos (Esquema 124).



Esquema 124

La nueva mezcla **180c** + **187c** obtenida se pudo separar cromatográficamente, obteniendo el compuesto **187c** en un rendimiento del 73% y el compuesto **180c** en un rendimiento del 13% (ambos rendimientos están calculados con respecto a la cantidad inicial de mezcla **180c** + **180d**). El compuesto **187c** se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas (Figura 80).

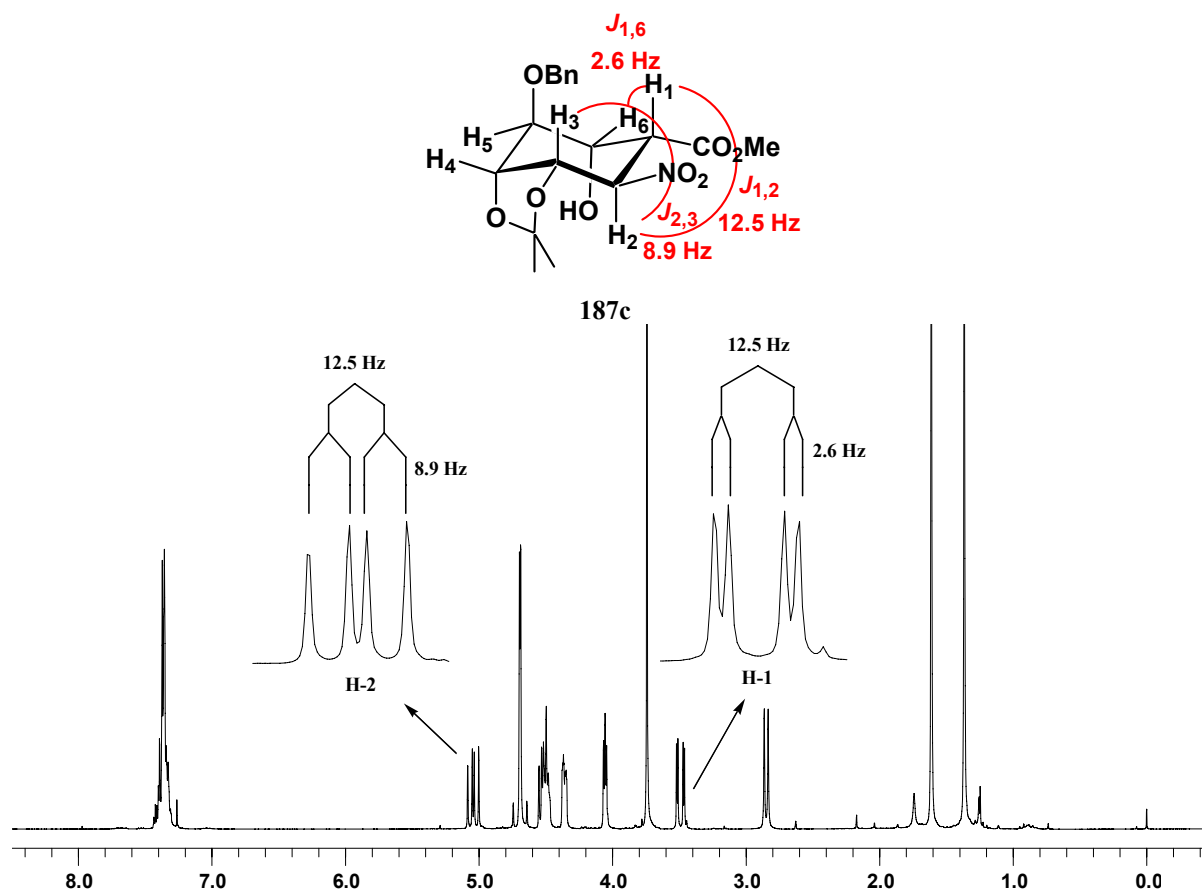


Figura 80: Espectro de RMN-¹H de **187c** en el que se resaltan las señales debidas a los protones H-2 y H-1.

Así, la aparición en su espectro de RMN-¹H de un doblete debido al protón H-2, geminal al grupo nitro, a 5.04 ppm con constantes de acoplamiento de $J_{1,2}=12.5$ Hz y $J_{2,3}=8.9$ Hz, denota una disposición axial de este protón y de sus vecinos H-1 y H-3. Además, la aparición de un doblete debido al protón H-1, geminal al grupo metoxicarbonilo, a 3.49 ppm con constantes de acoplamiento de $J_{1,6}=2.6$ Hz y $J_{1,2}=12.5$ Hz, confirma la disposición axial de los protones H-1 y H-2, y la disposición ecuatorial del protón H-6.

Finalmente la cristalización del derivado **187c** en una mezcla de éter etílico y hexano, nos permitió disponer de cristales adecuados para realizar un experimento de difracción de Rayos X, que permitió confirmar plenamente la estructura establecida a partir de los datos de RMN-¹H (Figura 81, pág. 304).

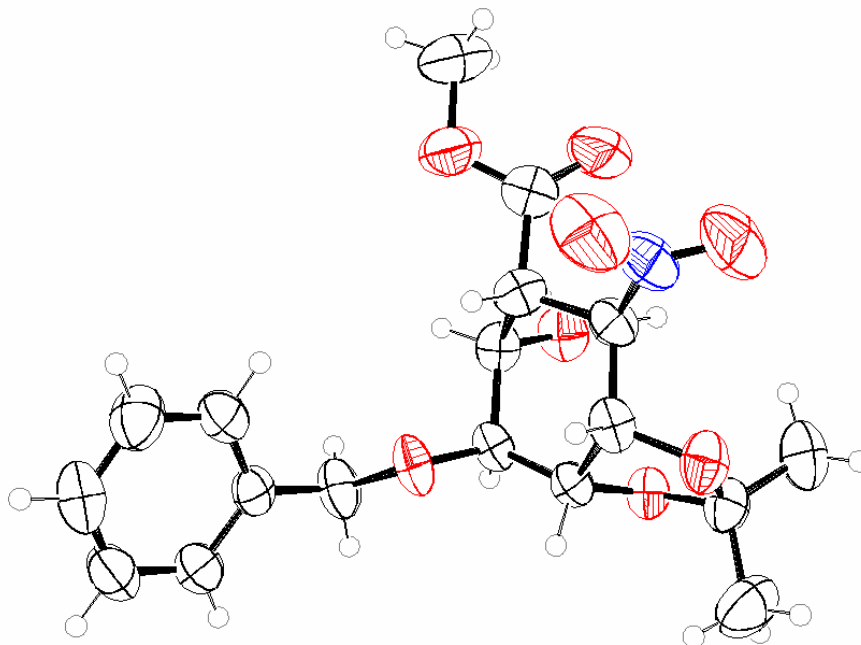
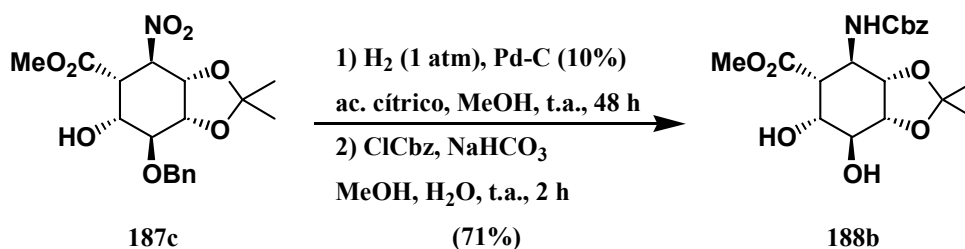


Figura 81: Representación en ORTEP-3 del compuesto 187c.

Todo ello nos permitió establecer inequívocamente que mediante esta última variante sintética que nos ocupa se obtuvo mayoritariamente el β -nitroéster ciclohexánico 187c.

Proseguimos nuestro proyecto de síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos sometiendo a una hidrogenación catalítica este nitroéster 187c, lo que provocó la reducción de su grupo nitro a amino y la eliminación del grupo bencilo protector del hidroxilo de la posición C-3 (Esquema 125). El aminoéster intermedio resultante se trató directamente con cloruro de benciloxicarbonilo en medio básico, obteniéndose así el β -aminoácido ciclohexánico polihidroxilado 188b.

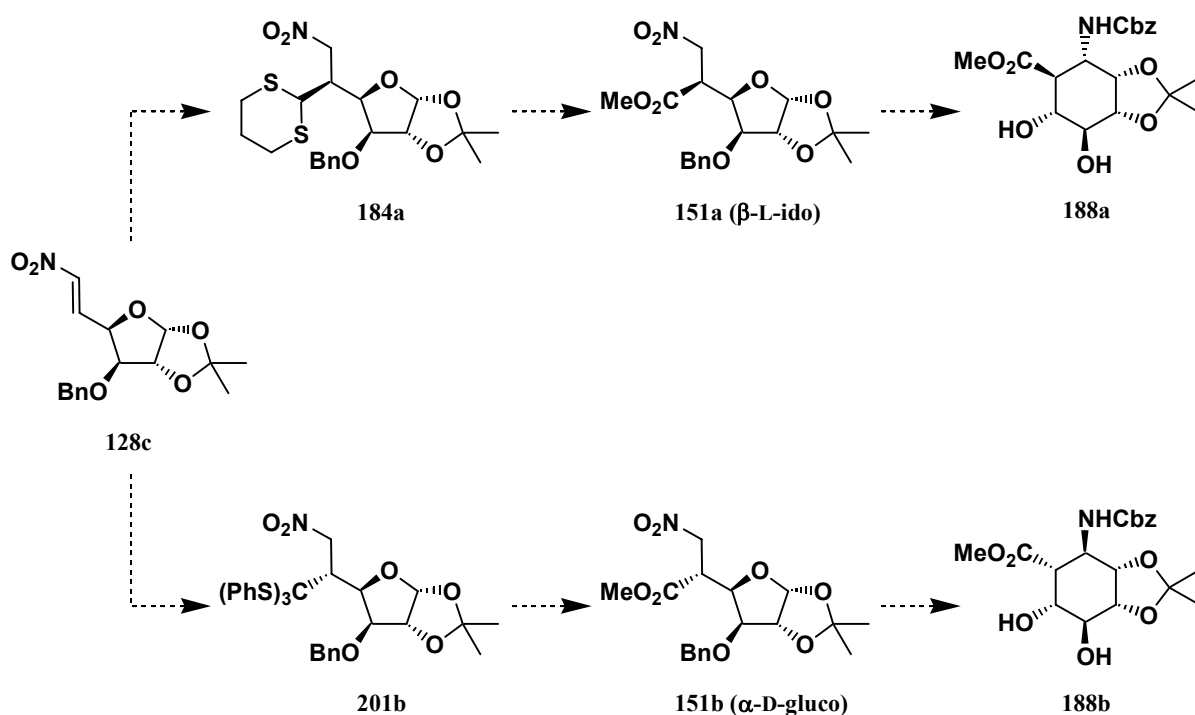


Esquema 125

La aparición en su espectro de RMN-¹³C de las señales del grupo benciloxicarbonilo [CH₂ a 67.3 ppm; seis carbonos aromáticos a 129.4 ppm (3 x CH), 130.1 ppm (2 x CH) y 139.4 ppm (C); y un carbonilo a 157.7 ppm], así como la masa molecular y la fórmula molecular obtenidas a partir de su espectro de masas [396

(8%, MH⁺) y de su análisis elemental [calculado para C₁₉H₂₅NO₈: C 57.71; H 6.37; N 3.54; encontrado C 57.91, H 6.30, N 3.37], respectivamente, confirmaron la estructura del compuesto **188b**.

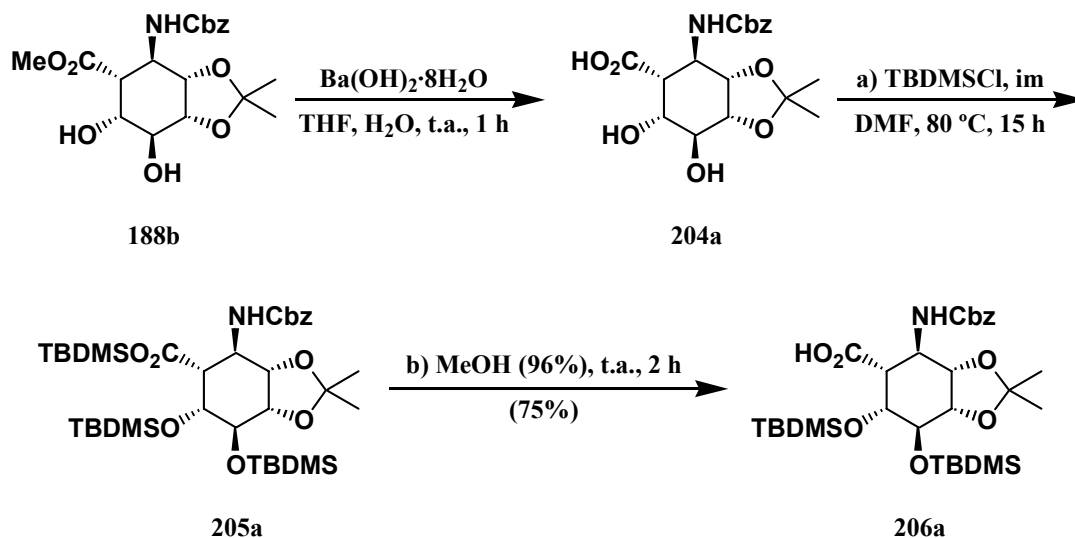
En definitiva, mediante esta última aproximación sintética basada en tritanos obtuvimos un segundo β-aminoácido ciclohexánico polihidroxilado **188b** que se distingue del inicialmente obtenido **188a** con ditianos en la disposición relativa de los grupos carboxilo y amino con respecto al resto de los sustituyentes (Esquema 126)



Este resultado tiene un enorme interés, porque nos ha permitido llevar a cabo la obtención de los dos β-aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados **188a** y **188b** a partir de un precursor común, la nitroolefina **128c**. La adición de derivados litiados de compuestos sulfurados sobre **128c** de manera estereoselectiva, nos permitió controlar la configuración del nitroéster **151** intermedio clave en esta síntesis, pudiendo obtenerse el que tiene la configuración de la β-L-idofuranosa **151a** o el que tiene la configuración de la α-D-glucofuranosa **151b**.

Se trata, de los dos primeros β-aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados descritos, cuya incorporación en péptidos se ensayó sólo con **188b**, mediante un protocolo sencillo consistente en acoplar sendas unidades de glicina a sus grupos amino y carboxilo. Para ello, se protegieron en primer lugar sus grupos hidroxilo

libres como grupos *t*-butildimetilsililo, de interés por la ortogonalidad generada en el sistema con el resto de los grupos protectores (Esquema 127).

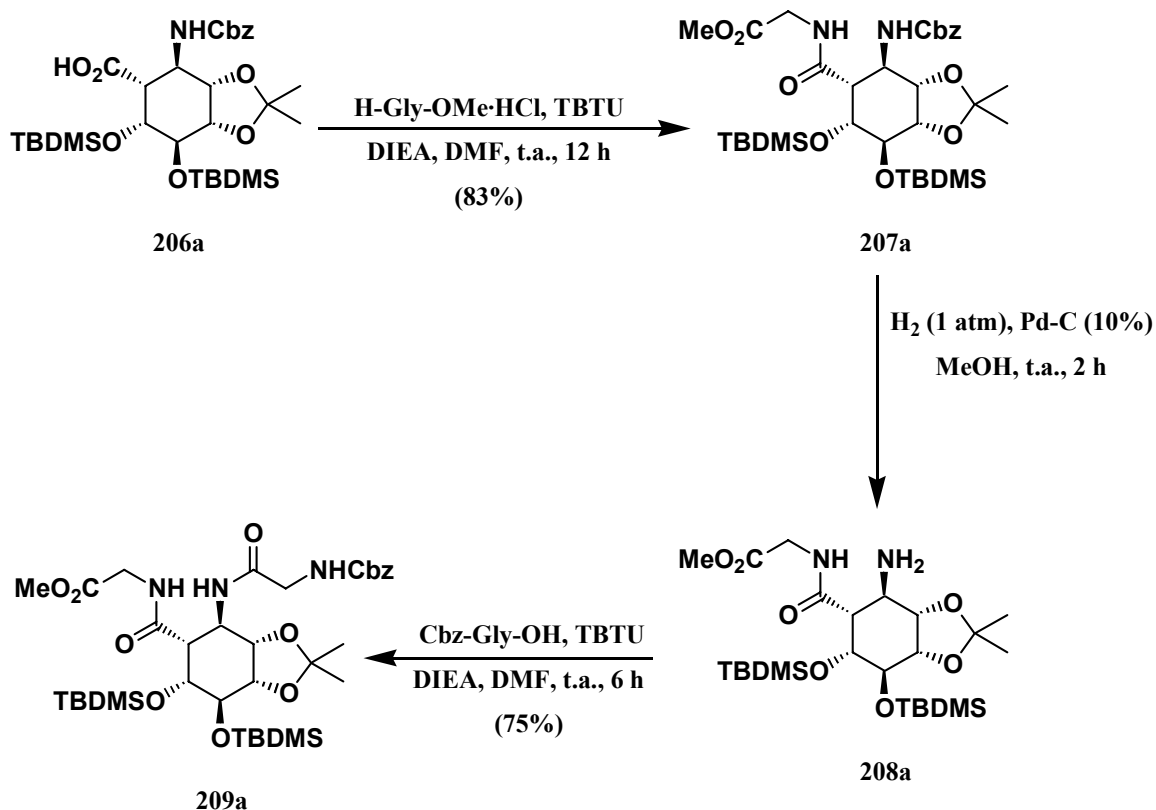


Esquema 127

Para llevar a cabo la protección, se optó primero por hidrolizar el grupo éster de **188b**, por tratamiento con hidróxido de bario en una mezcla de tetrahidrofurano y agua, tratando a continuación el ácido **204a** resultante directamente con exceso de cloruro de *t*-butildimetilsililo e imidazol en *N,N*-dimetilformamida anhidra, a 80 °C durante 15 h. Ello condujo al aminoácido sililesterificado **205a**, liberándose, a continuación, su grupo ácido carboxílico al tratarlo en el propio medio de reacción con metanol a temperatura ambiente durante 2 h. Tras purificación cromatográfica, se aisló el disililaminoácido **206a** deseado, que se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas. Así, en su espectro de RMN-¹³C aparecieron las señales de los grupos *t*-butildimetilsililo a los siguientes desplazamientos químicos: -5.4, -5.0, -4.9 y -4.6 ppm para los cuatro grupos CH₃, y 17.7 (C), 17.8 (C), 25.6 (3 × CH₃) y 25.6 (3 × CH₃) ppm para los dos grupos *t*-butilo. La masa molecular obtenida mediante espectrometría de masas [610 (46, MH⁺)] y la fórmula molecular obtenida mediante análisis elemental [calculado para C₃₀H₅₁NO₈Si₂: C 59.08, H 8.93, N 2.30; encontrado C 59.45, H 8.79, N 2.31] confirmaron la estructura del compuesto **206a** obtenido.

Disponiendo de este aminoácido **206a** convenientemente protegido, se procedió a llevar a cabo su incorporación en una cadena tripeptídica simple. Para ello, como ya se indicó, se decidió unir sendas unidades de glicina a sus extremos

carboxilo y amino, empleando como estrategia de síntesis la basada en la inducción de acoplamientos peptídicos con reactivos de naturaleza urónica (Esquema 128).¹⁵⁹



Esquema 128

La reacción del aminoácido **206a** con clorhidrato de metoxicarbonilglicina, TBTU y diisopropiletilamina en *N,N*-dimetilformamida anhidra a temperatura ambiente, condujo tras purificación cromatográfica, al dipéptido **207a** (83% de rendimiento), que se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas, entre las que cabe destacar la aparición en su espectro de RMN-¹³C de las señales debidas a la unidad de glicina introducida (CH₂ a 41.2 ppm, CH₃O a 52.0 ppm y C=O a 171.1 ppm).

Tras desproteger a continuación el extremo amino terminal de este dipéptido **207a**, mediante hidrogenación catalítica del grupo benciloxycarbonilo, el compuesto **208a** resultante se hizo reaccionar con el complejo formado entre la *N*-benciloxycarbonilglicina y el TBTU en *N,N*-dimetilformamida y diisopropiletilamina. Después de 6 horas de reacción a temperatura ambiente, se aisló tras purificación cromatográfica el tripéptido **209a** como un aceite amarillo que

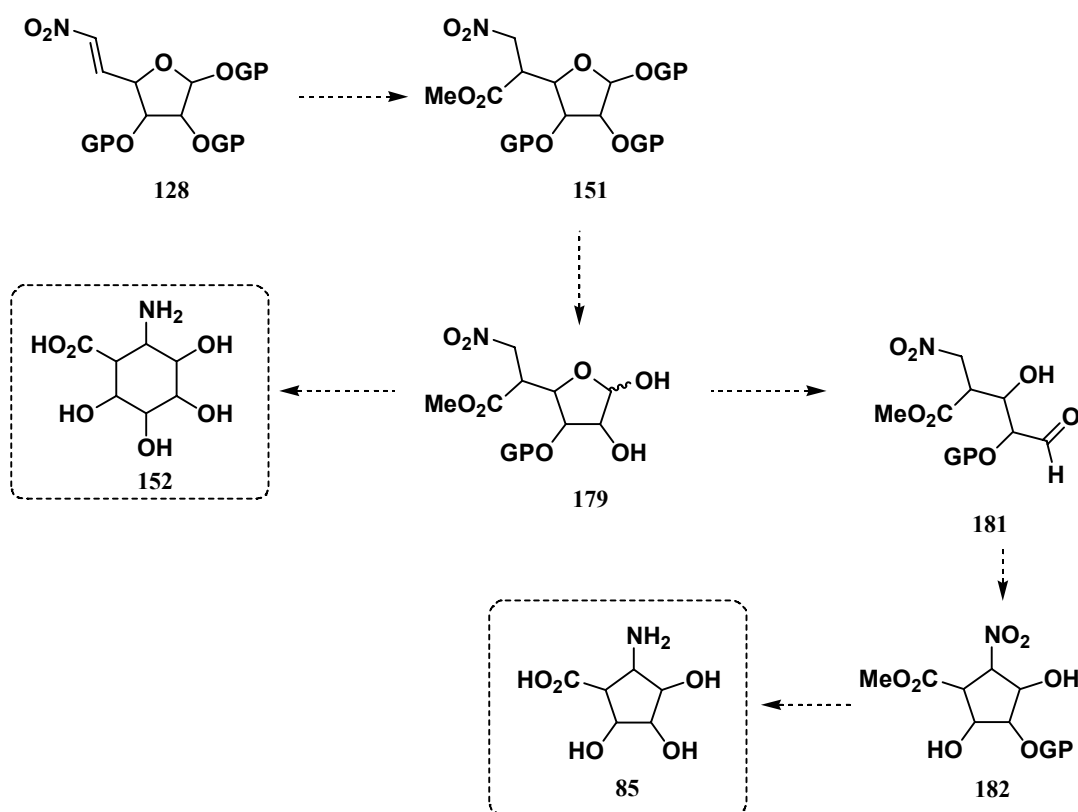
¹⁵⁹ Han, S. Y.; Kim, Y. A. "Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis" *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.

mostró en su espectro de RMN-¹³C las señales de la nueva unidad de glicina introducida [CH₂ a 45.2 ppm, CH₂O a 67.1, grupo fenilo a 128.1 ppm (3 x Ar-CH), 128.5 ppm (2 x Ar-CH) y 136.2 ppm (Ar-C); y dos C=O a 156.6 y 170.5 ppm], siendo confirmadas su fórmula y masa molecular mediante análisis elemental (calculado para C₃₅H₅₉N₃O₁₀Si₂: C 56.96, H 8.06, N 5.69; encontrado C 57.28, H 8.14, N 5.37) y espectrometría de masas [738 (100, MH⁺)] respectivamente.

Quedó demostrado con ello que es posible incorporar estos nuevos β-aminoácidos ciclohexánicos en péptidos, lo que es de interés evidente para la preparación y estudio de las propiedades estructurales de péptidos más complejos que incorporen estos β-aminoácidos novedosos.

3.2.5 Síntesis de β-aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados.

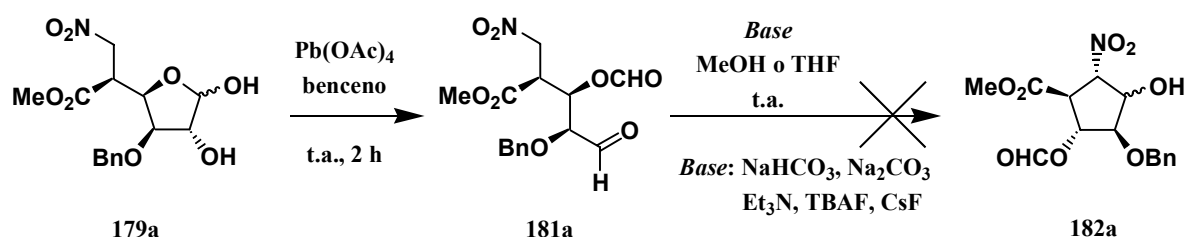
Una vez llevado a cabo exitosamente nuestro proyecto de síntesis de β-aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados **152** a partir de nitrohexofuranosas **128**, se abordó inmediatamente nuestro proyecto complementario de síntesis de β-aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados **85** a partir del intermedio **179** común a ambos tipos de aminoácidos (Esquema 129).



Esquema 129

El plan de síntesis diseñado para ello requiere, como ya se indicó previamente (pág. 272), reducir en una unidad el número de átomos de carbono de la cadena carbonada de las nitrohexofuranosas **179**, para someter luego los nitroaldehídos **181** resultantes a un protocolo de reacciones similar al que permitió transformar **179** en β -aminoácidos ciclohexánicos **152**. Ello implicará en el presente caso transformar mediante una reacción de Henry intramolecular nitroaldehídos **181** en ésteres β -nitrociclopentánicos **182**, reducir el grupo nitro a amino e hidrolizar finalmente el grupo metoxicarbonilo a ácido carboxílico.

De acuerdo con ello, la nitrohexosa **179a** previamente obtenida por hidrólisis ácida del derivado **151a** (Esquema 104, pág. 277), se trató con tetraacetato de plomo en benceno, para promover la ruptura oxidante de su sistema 1,2-diólico, obteniéndose así el nitroaldehído **181a** deseado (Esquema 130).

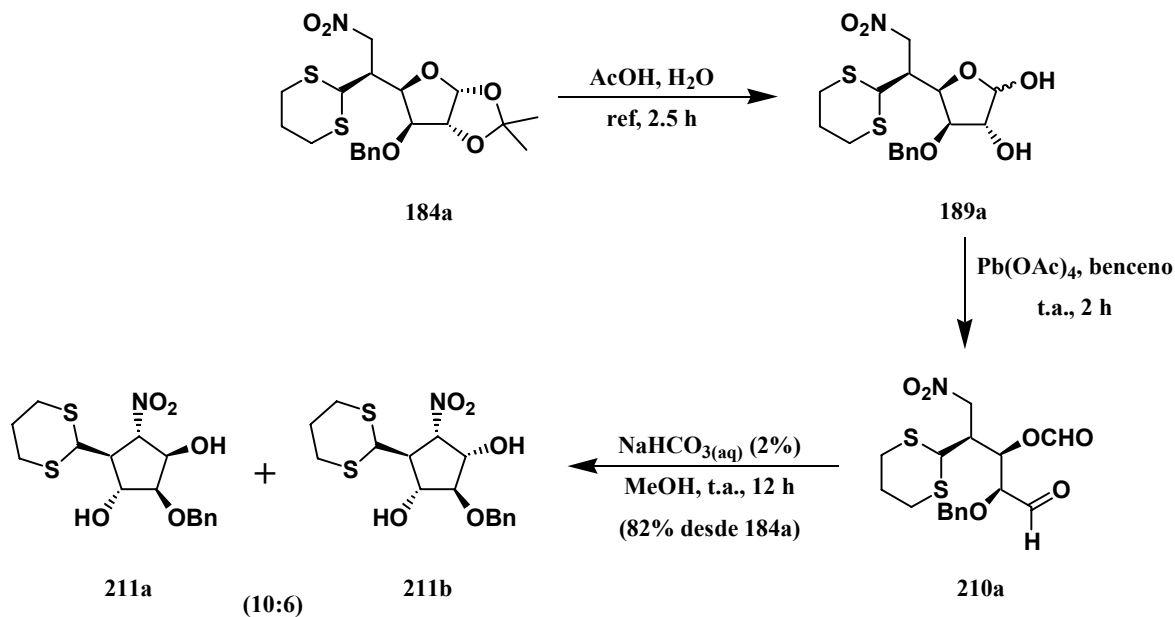


Esquema 130

Este nitroaldehído **181a** se utilizó directamente en la reacción de Henry intramolecular programada, debido a su baja estabilidad. No obstante, se realizó un RMN-¹³C del compuesto, que nos permitió establecer que la ruptura del sistema diólico de **179a** conducente a su formación había tenido lugar, dada la presencia de dos señales a 159.8 y 199.8 ppm debidas a sus dos grupos carbonilo.

Sin embargo, cuando se sometió el nitroaldehído **181a** a las condiciones de ciclación de Henry inducidas con bicarbonato sódico empleadas previamente con su análogo **179a** (Esquema 104, pág. 277), resultó una mezcla compleja carente de interés, obteniéndose resultados similares cuando se ensayó dicha ciclación con carbonato sódico, trietilamina, fluoruro de tetrabutilamonio y fluoruro de cesio, en metanol o en tetrahidrofurano como disolventes.

Vista la imposibilidad de llevar a cabo el proceso de ciclación con el nitroaldehído **181a**, se obtuvieron resultados satisfactorios cuando el anterior protocolo de reacciones (Esquema 130) se llevo a cabo con la 5-ditianil-6-nitrohexofuranosa **189a** (Esquema 131, pág. 310), obtenida previamente por hidrólisis ácida del compuesto **184a** (Esquema 109, pág. 286).



Esquema 131

Así, cuando se hizo reaccionar la 6-nitrohexofuranosa **189a** con tetraacetato de plomo en benceno, se obtuvo de manera satisfactoria el nitroaldehído **210a** deseado, que al ser tratado con bicarbonato sódico en metanol experimentó una reacción de Henry intramolecular conducente a la mezcla de nitrociclopentanos epiméricos **211a** y **211b**, obtenidos aproximadamente en una proporción 10:6 (25% de exceso diastereomérico), calculada a partir del espectro de RMN-¹³C del crudo de reacción, por comparación de las intensidades relativas de las señales indicadas en la Figura 82.

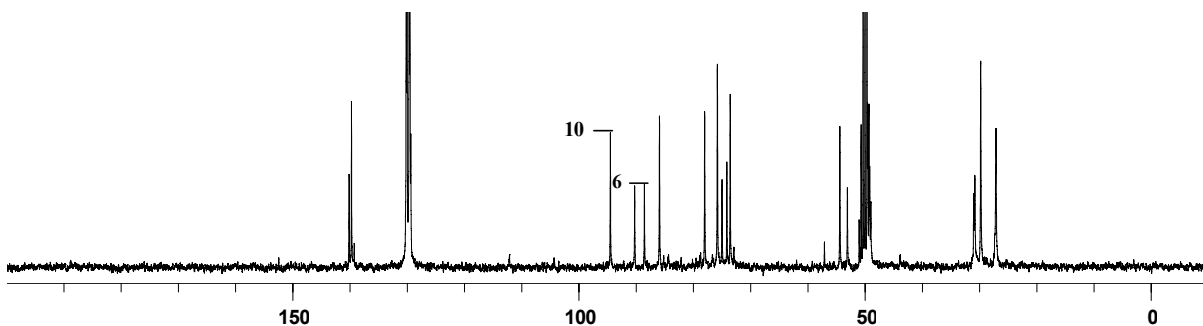


Figura 82: Detalle del espectro de RMN-¹³C de la mezcla de **211a** + **211b**.

Esta mezcla **211a** + **211b** no pudo ser separada por cromatografía en columna y su espectro de RMN-¹H resultó ser muy complejo para obtener información acerca de los dos productos formados. Únicamente se tuvo evidencia espectroscópica de la formación de la mezcla a partir de su espectro de RMN-¹³C, en el que fue posible identificar las señales correspondientes a los dieciséis carbonos del componente mayoritario **211a**: a 138.8 (C cuaternario), 129.3 (2 x CH), 128.8 (2 x CH), 128.5 (CH) y

72.7 (CH₂) ppm las señales correspondientes al grupo OBn; a 93.6 (CH), 85.0 (CH), 77.1 (CH), 74.9 (CH) y 53.5 (CH) ppm las señales correspondientes al ciclopentano, y a 48.7 (CH), 28.9 (2 x CH₂) y 26.2 (CH₂) ppm las señales correspondientes al grupo 1,3-ditianilo. También pudieron identificarse las señales correspondientes a los dieciséis carbonos del compuesto minoritario **211b**: a 139.2 (C cuaternario), 129.1 (2 x CH), 128.9 (CH), 128.6 (2 x CH) y 73.2 (CH₂) ppm las señales correspondientes al grupo OBn; a 89.4 (CH), 87.6 (CH), 74.9 (CH), 74.1 (CH) y 52.2 (CH) ppm las señales correspondientes al ciclopentano, y a 48.3 (CH), 30.1 (CH₂), 29.9 (CH₂) y 26.3 (CH₂) ppm las señales correspondientes al grupo 1,3-ditianilo.

Con objeto de poder establecer la configuración de cada uno de los componentes **211a** y **211b** de la mezcla formada se trató de aislar alguno de ellos por cristalización, obteniéndose cristales en los que las dos especies de la mezcla estaban presentes en relación similar a la inicial. Un experimento de difracción de Rayos X con estos cristales permitió asignar al componente mayoritario la estructura **211a** y al componente minoritario la estructura **211b**, ambos presentes en la celda de cristalización (Figura 83).

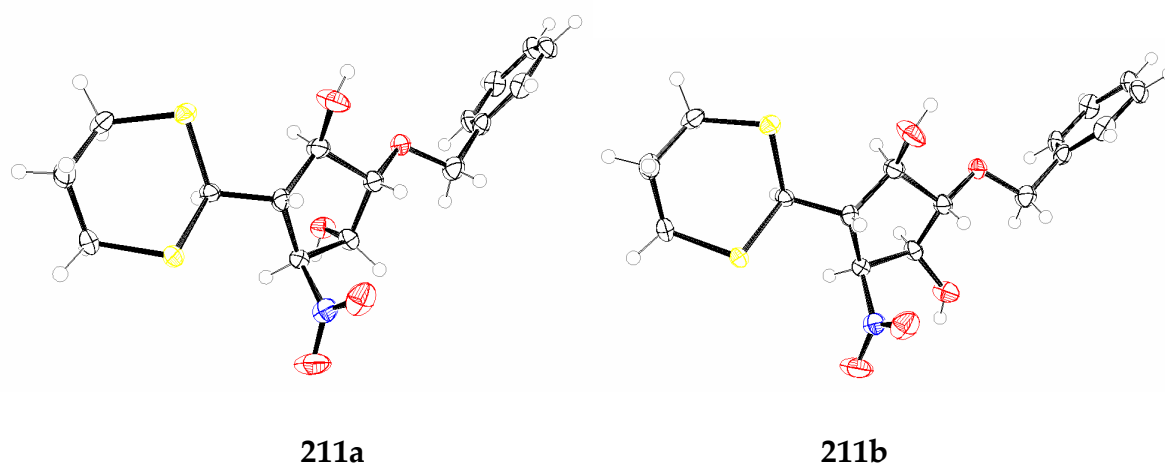
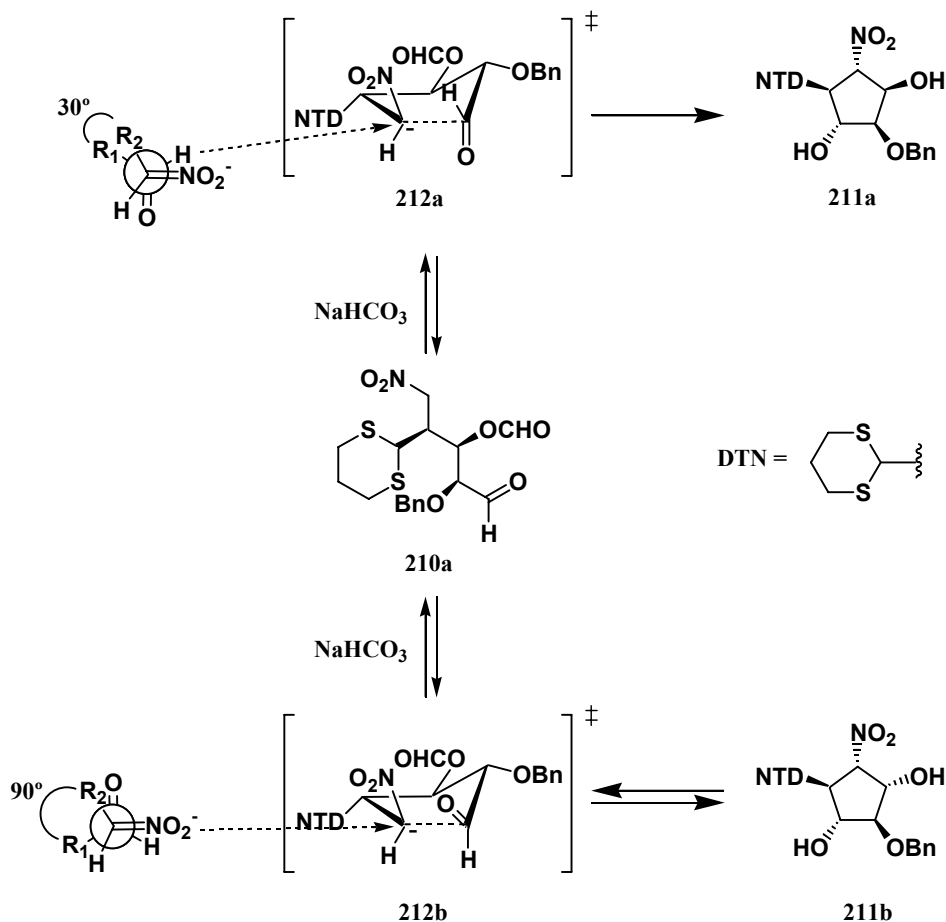


Figura 83: Representación en ORTEP-3 de **211a** (componente mayoritario) y **211b** (componente minoritario).

Consiguientemente se pudo establecer que el componente mayoritario **211a** tiene el sustituyente nitro y el hidroxilo de la posición C-3 en disposición *trans*, lo que implica que es el termodinámicamente más estable. El componente minoritario **211b** tiene dichos grupos nitro e hidroxilo en disposición *cis*, lo que implica una menor estabilidad termodinámica.

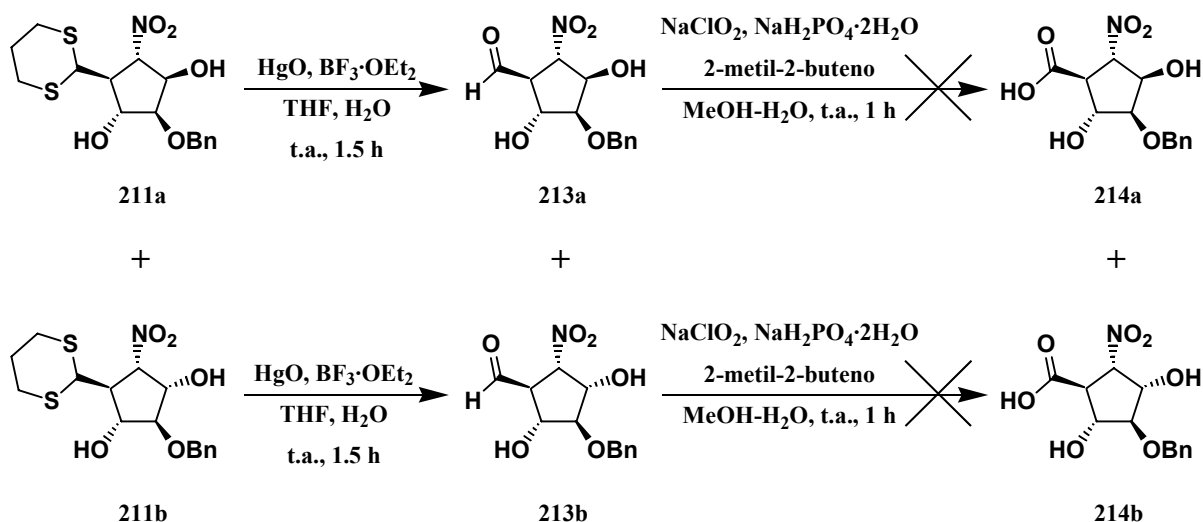
La formación de estos dos ciclopentanos diastereoméricos se puede explicar en base al Esquema 132 (pág. 312).



Esquema 132

La reacción de Henry intramolecular del nitronato del aldehído de partida **210a** puede ocurrir a través de los dos estados de transición ciclopentánicos **212a** y **212b** conducentes a los nitrociclopentanos **211a** y **211b** respectivamente. El estado de transición **212a** es termodinámicamente menos estable que el **212b**, debido a la mayor cuantía de la interacción estérica entre los respectivos grupos R_1 y R_2 . En este caso se obtiene mayoritariamente el componente de mayor estabilidad termodinámica **211a** (relación 10:6 entre **211a** y **211b**). Ello se puede explicar admitiendo que inicialmente se forma en mayor proporción el componente cinético **211b** pero luego se produce una reequilibración entre los dos productos de reacción, pasando a predominar el componente termodinámico **211a**.

Ante la imposibilidad de separar los dos componentes de la mezcla de **211a** + **211b**, optamos por proseguir con esta mezcla nuestro plan de trabajo, abordando la transformación del grupo 1,3-ditianilo en un grupo metoxycarbonilo (Esquema 133, pág. 313).



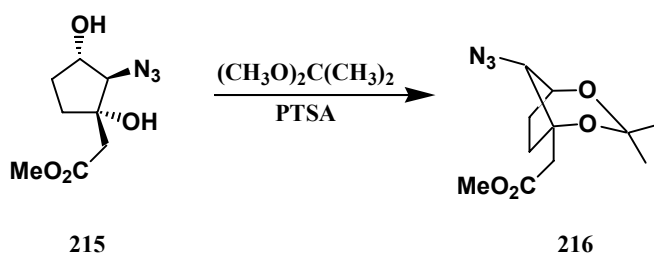
Esquema 133

Se llevó a cabo en primer lugar la transformación del grupo 1,3-ditiano en carbonilo en las condiciones indicadas, obteniéndose la mezcla de los nitroaldehídos **213a** + **213b** esperada. Aunque estos compuestos no se purificaron, debido a su baja estabilidad, un espectro de RMN- ^{13}C del crudo de reacción permitió establecer que había tenido lugar la desprotección del grupo formilo, ya que aparecieron las señales de los carbonilos a 200.5 y 199.8 ppm, respectivamente.

Se llevó a cabo a continuación la reacción de oxidación de la mezcla **213a** + **213b** con clorito sódico y dihidrogenofosfato sódico, pero se obtuvo una mezcla de reacción compleja, que en el RMN- ^{13}C mostró multitud de señales, que no pudieron ser asignadas a los compuestos **214a** + **214b** que estábamos buscando.

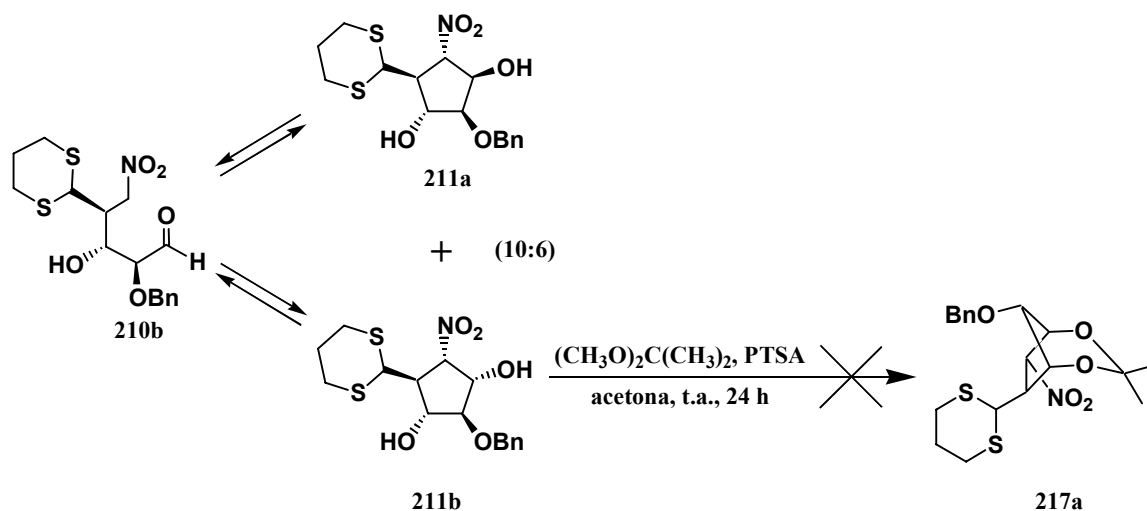
Este resultado no deseado se atribuyó a posibles procesos de oxidación de los hidroxilos libres o de eliminación del grupo nitro. Decidimos por ello proteger los hidroxilos libres de la mezcla de partida de **211a** + **211b** previamente a la transformación de sus grupos 1,3-ditiano en metoxicarbonilo. Tuvimos en cuenta para ello un precedente bibliográfico de protección de 1,3-dioles en ciclopentanos con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico (Esquema 134, pág. 314).¹⁶⁰

¹⁶⁰ Sun, H.; Abboud, K. A.; Horenstein, N. A. "A new route into hexahydro-cyclopenta[*b*]pyrrole-*cis*-3a,6-diols. Synthesis of constrained bicyclic analogues of pyrrolidine azasugars" *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10462-10469.



Esquema 134

Esperábamos que nuestra mezcla **211a** + **211b** reaccionase con 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico de manera similar y que consiguientemente reaccionase sólo el componente **211b** lo que debería conducir a obtener el derivado **217a**, como resultado de la necesaria reequilibración entre **211a** y **211b** a través de la forma abierta **210b** (Esquema 135).

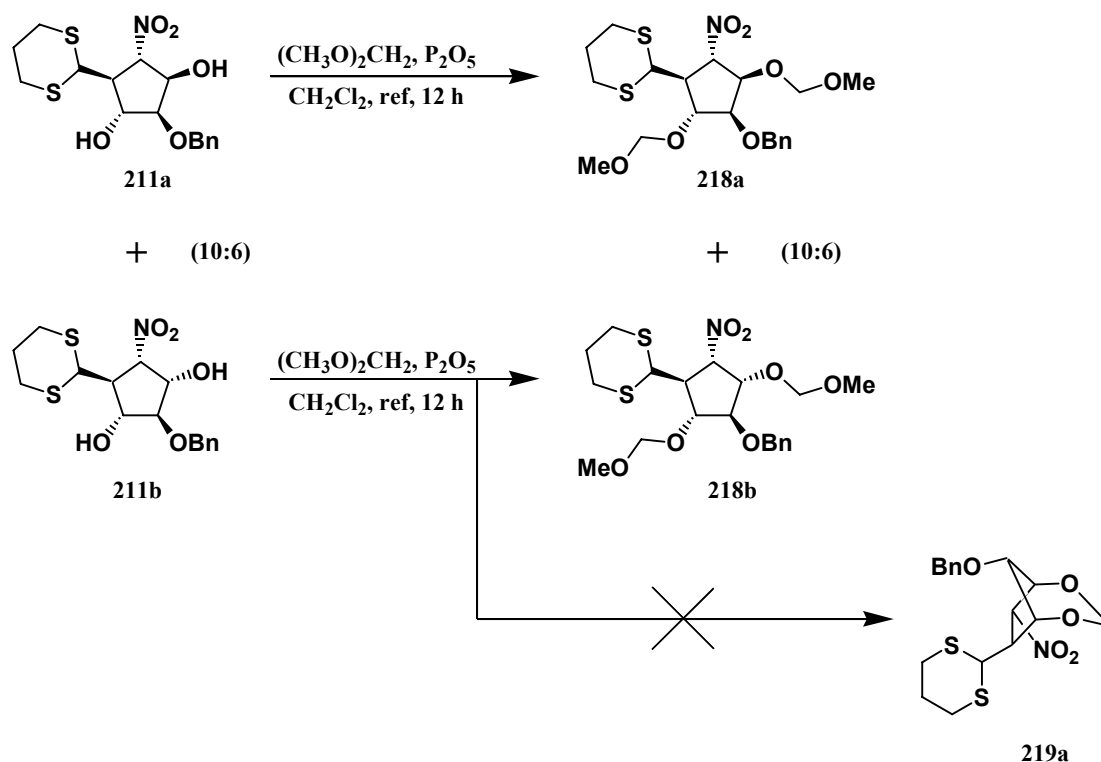


Esquema 135

Desafortunadamente, cuando se trató la mezcla de **211a** + **211b** con 2,2-dimetoxipropano, en acetona y ácido *p*-toluensulfónico, se obtuvo una mezcla compleja de reacción carente de interés.

Sin embargo, se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se emplearon condiciones de reacción más enérgicas, consistentes en el empleo de formaldehidodimetilacetal y pentóxido de fósforo en diclorometano a reflujo (Esquema 136, pág. 315).¹⁶¹

¹⁶¹ Fujii, K.; Nakano, S.; Fujita, E. "Improved method for methoxymethylation of alcohol under mild acidic conditions" *Synthesis* **1975**, 4, 276-277.

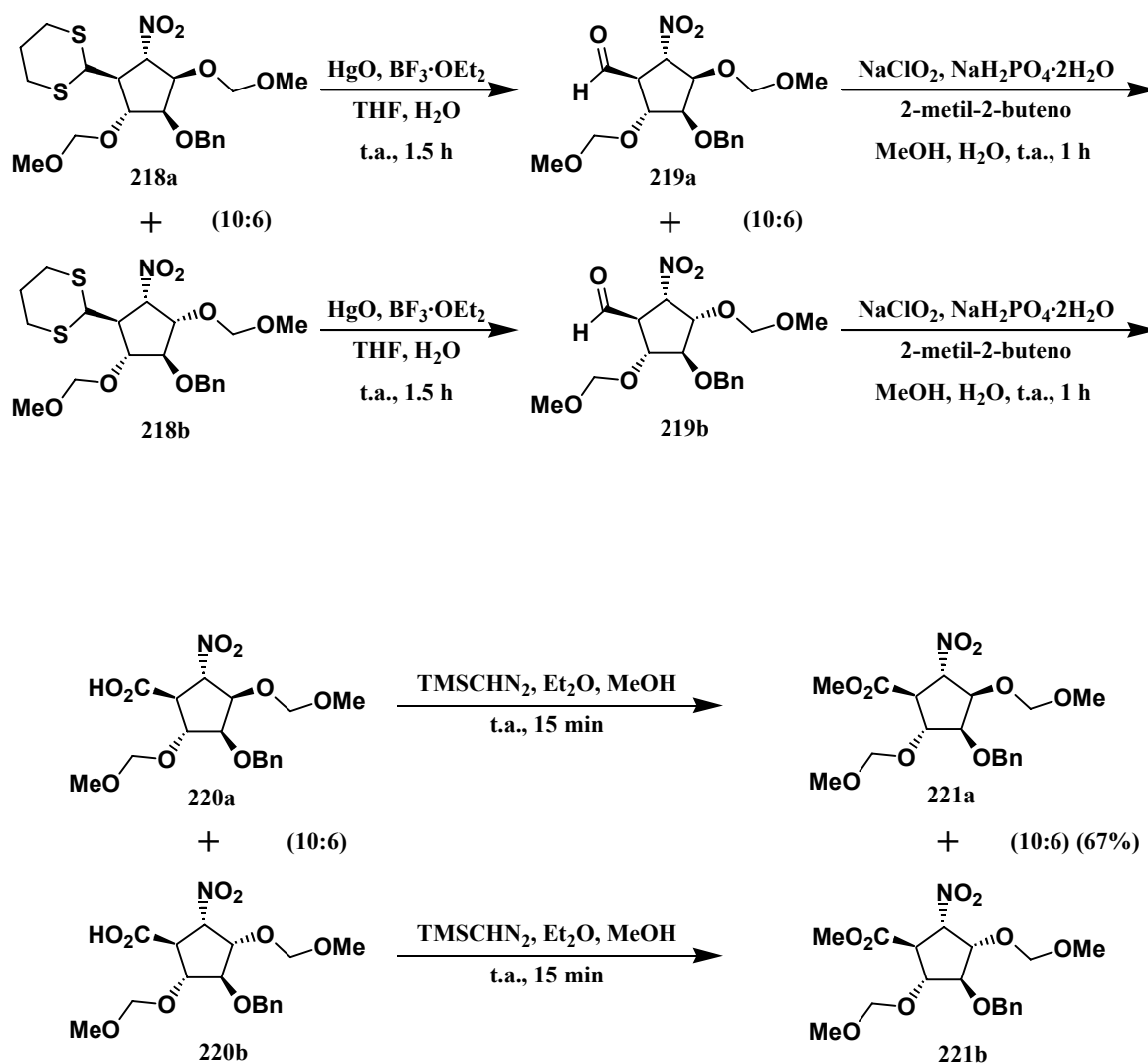


Esquema 136

Tras doce horas de reacción en las condiciones indicadas, se pudo aislar la mezcla de los productos **218a** y **218b** en relación idéntica a la de la mezcla de partida, lo cual indicó que en las condiciones de protección no hubo equilibración de las especies iniciales **211a** y **211b**, poniéndose también de manifiesto que la reacción intermolecular conducente al diacetal **218b** está favorecida en relación con la reacción alternativa de formación del acetal cíclico de **219a**.

Desafortunadamente esta nueva mezcla **218a** + **218b** obtenida no pudo ser separada por cromatografía en columna. Sus componentes se caracterizaron en base a las propiedades espectroscópicas de la mezcla. Así, su espectro de RMN- ^{13}C mostró para el compuesto mayoritario **218a** dos señales a 55.6 y 55.7 ppm y dos señales a 96.0 y 96.5 ppm, debidas a dos grupos OCH_3 y a dos grupos CH_2 , pertenecientes a los grupos metoximetilo introducidos. Para el compuesto minoritario **211b** estas señales aparecieron a 55.5 y 55.6 ppm para los grupos OCH_3 y a 95.8 y 96.0 ppm para los grupos CH_2 . El espectro de IR de la mezcla mostró las señales debidas al grupo nitro a 1554 y 1368 cm^{-1} , no observándose ninguna señal debida a grupos hidroxilo libres.

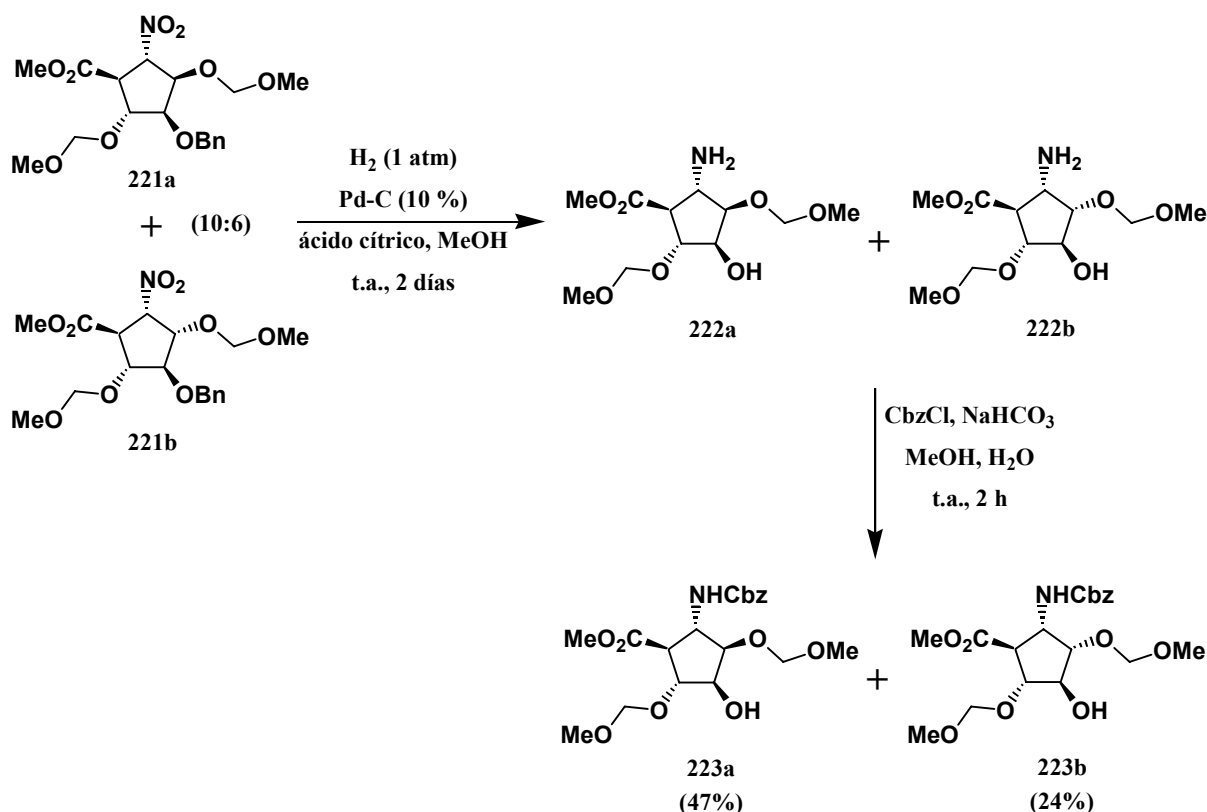
Puesto que la mezcla obtenida no pudo ser separada cromatográficamente, se utilizó directamente, como en el caso previo, para llevar a cabo la transformación prevista del grupo 1,3-ditianilo en un grupo metoxicarboxílico (Esquema 137, pág. 316).



Esquema 137

Así, cuando se hizo reaccionar la mezcla de ciclopentanos **218a** + **218b** con óxido de mercurio y trifluoroboroeterato, se obtuvo la mezcla esperada de β -nitroaldehídos **219a** + **219b**, los cuales se hicieron reaccionar a continuación con clorito sódico y dihidrogenofosfato sódico. Se llegó así a la mezcla de nitroácidos **220a** + **220b**, la cual al tratarla con trimetilsilildiazometano, condujo a la mezcla de nitroésteres ciclopentánicos **221a** + **221b**. Desafortunadamente esta mezcla siguió sin poder ser separada por cromatografía en columna, caracterizándose los nitroésteres obtenidos en base a las propiedades espectroscópicas de la mezcla. Así, el compuesto mayoritario **221a** mostró en el espectro de RMN-¹³C las señales del grupo metoxicarbonilo a 52.7 ppm (OCH₃) y 169.8 ppm (C=O). Para el compuesto minoritario **221b**, las señales correspondientes al grupo metoxicarbonilo aparecieron a 52.5 ppm (OCH₃) y 171.3 ppm (C=O). El espectro de IR de la mezcla mostró como bandas más significativas a 1741 cm⁻¹ la banda asociada al grupo carbonilo y a 1558 y 1377 cm⁻¹ las bandas del grupo nitro.

Por último, para completar la síntesis de los β -aminoácidos ciclopentánicos buscados, se llevó a cabo la reducción del grupo nitro a amino mediante la hidrogenación catalítica de la mezcla **221a** + **221b**, lo que condujo a la mezcla de las aminas **222a** + **222b**, en las que también se produjo la hidrogenolisis del grupo OBn de la posición C-4 (Esquema 138).



Esquema 138

El tratamiento de la mezcla de aminas **222a** + **222b** con cloruro de benciloxycarbonilo y bicarbonato sódico en metanol y agua, condujo a la mezcla de β -aminoésteres ciclopentánicos **223a** + **223b**, que afortunadamente pudo separarse por cromatografía en columna, obteniéndose así el componente mayoritario **223a** en un rendimiento del 47% y el componente minoritario **223b** en un rendimiento de 24%. Ambos compuestos fueron caracterizados en base a sus propiedades espectroscópicas. Para el compuesto mayoritario **223a** su espectro de RMN-¹³C mostró la siguiente serie de señales: dos señales a 172.5 y 52.1 ppm, correspondientes al grupo metoxycarbonilo; cinco señales a 82.4, 79.6, 73.9, 56.5 y 51.5 ppm, correspondientes a los grupos CH del ciclopentano; cuatro señales a 96.0, 95.9, 55.5, y 55.3 ppm correspondientes a los grupos metoximetilo, y cinco señales a 155.5, 136.1, 128.3 (2 x CH), 127.9 (3 x CH) y 66.5 ppm, correspondientes a los ocho carbonos del grupo benciloxycarbonilo. Para el compuesto minoritario **223b** aparecieron las siguientes señales: dos señales a 172.5 y 52.4 ppm correspondientes al grupo

metoxicarbonilo; cinco señales a 84.4, 80.1, 79.9, 55.8 y 53.6 ppm correspondientes a los grupos CH del ciclopentano; cuatro señales a 97.0, 96.1, 55.6 y 52.2 ppm correspondientes a los grupos metoximetilo, y cinco señales a 155.7, 136.2, 128.4 (2 x CH), 128.0 (3 x CH) y 66.7 ppm correspondientes a los ocho carbonos del grupo benciloxicarbonilo.

De este modo, se obtuvieron dos β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados, mediante la estrategia de síntesis divergente de β -aminoácidos cicloalcanicos polihidroxilados sobre la que versa el presente capítulo de esta tesis doctoral.

Esta nueva estrategia de síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos no tiene la limitación estructural de la inicialmente desarrollada en nuestro grupo de investigación (Esquema 98, pág. 271),¹⁶² por lo que podría ser aplicada *a priori* al panel completo de las dieciséis hexosas.

¹⁶² a) Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Stereocontrolled transformation of nitrohexofuranoses into cyclopentylamines via 2-oxabicyclo[2.2.1]heptanes: Incorporation of polyhydroxylated carbocyclic α -amino acids into peptides" *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1423-1425. b) Soengas, R. G.; Pampín, M. B.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. "Stereocontrolled transformation of nitrohexofuranoses into cyclopentylamines via 2-oxabicyclo[2.2.1]heptanes. Part 2: Synthesis of (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxy-2-aminocyclopentanecarboxylic acid" *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 205-211.

3.3. Applications of nitrosugars to the synthesis of branched chain iminosugars.

3.3.1 Background.

The last part of this doctoral thesis deals with investigations on a new route to branched chain iminosugars from nitrosugars and it was partially carried out in the Chemistry Department at the University of Oxford under the supervision of Professor George W. J. Fleet, a leading scientist in carbohydrate chemistry and, in particular, in the study of the synthesis and biological activity of iminosugars. In the eighties, he described the first total syntheses of five-, six- and seven-membered iminosugars and he stated that these compounds were bioactive as glycosidase inhibitors.¹⁶³

Iminosugars are analogues of furanoses or pyranoses where the ring oxygen is replaced by nitrogen. Since its discovery in the middle sixties,¹⁶⁴ they have been reported to be almost always glycosidase inhibitors.¹⁶⁵ They are involved in several important biological processes such as digestion, biosynthesis of glycoproteins and catabolism of glycoconjugates, with proven potential as anti-viral, anti-diabetic and antineoplastic compounds as well as modulators of the immune system.¹⁶⁶

¹⁶³ a) Fleet, G. W. J.; Gough, M. J.; Smith, P. W. "Enantiospecific synthesis of Swainsonine, (1S, 2R, 8R, 8aR)-1,2,8-trihydroxyoctahydroindolizine, from D-Mannose" *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1853-1856. b) Fleet, G. W. J.; Gough, M. J.; Shing, T. K. M. "Synthesis of 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol from D-mannose and D-glucose" *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4029-4032. c) Fleet, G. W. J.; Smith, P. W.; Evans, S. V., Fellows, L. E. "Design synthesis and preliminary evaluation of a potent α -mannosidase inhibitor: 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-mannitol" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1240-1241. d) Fleet, G. W. J.; Smith, P. W. "Enantiospecific syntheses of Deoxymannojirimycin, Fagomine and 2R,5R-dihydroxymethyl-3R,4R-dihydroxypyrrolidine from D-glucose" *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1469-1472. e) Fleet, G. W. J.; Shaw, A. N.; Evans, S. V.; Fellows, L. E. "Synthesis from D-glucose of 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitol, a potent α -L-fucosidase inhibitor" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 841-842. f) Fleet, G. W. J. "An alternative proposal for the mode of inhibition of glycosidase activity by polyhydroxylated piperidines, pyrrolidines and indolizidines" *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5073-5076. g) Fleet, G. W. J.; Namgoong, S. K.; Barker, C.; Baines, S.; Jacob, G. S.; Winchester, B. "Iminoheptitols as glycosidase inhibitors: Synthesis of and specific α -L-fucosidase inhibition by β -L-homofuconojirimycin and 1- β -C-Substituted deoxymannojirimycins" *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4439-4442.

¹⁶⁴ Inoue, S.; Tsuruoka, T.; Niida, T. "The structure of nojirimycin, a piperidinose sugar antibiotic" *J. Antibiot.* **1966**, 19, 288-291.

¹⁶⁵ Asano, N.; Oseki, K.; Kiuz H.; Matsui, K. "Nitrogen-in-the-ring pyranoses and furanoses: Structural basis of inhibition of mammalian glycosidases" *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3701-3706.

¹⁶⁶ a) Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. "Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application" *Tetrahedron:*

The first natural iminosugar described was nojirimycin (NJ, **224a**, Figure 85) which was isolated from *Streptomyces lavendulae*.¹⁶⁴ This mimic of D-glucopyranose (**93b**) shows antibiotic properties and it is a potent inhibitor of α - and β -glucosidases. As an iminosugar with a hydroxy group at C-1 it is fairly unstable, but it could be reduced by catalytic hydrogenation with a platinum catalyst or by NaBH₄ to the stable 1-deoxynojirimycin (DNJ, **224b**), and latter isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.).¹⁶⁷

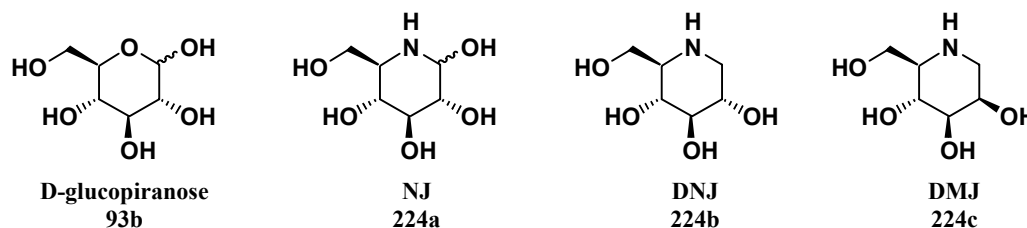


Figure 84: Structure of D-glucopyranose, nojirimycin and related compounds.

1-Deoxymannojirimycin (DMJ, **224c**), first isolated from the seeds of the legume *Lonchocarpus sericeus*,¹⁶⁸ is a potent inhibitor of glycoprotein processing α -mannosidase I¹⁶⁹, but a much better inhibitor of α -fucosidases.¹⁷⁰

Five-membered ring iminosugars are among the most active glycosidase inhibitors.¹⁷¹ This includes, several isomers of iminosugar **225** (Figure 85, page 321)

Asymmetry **2000**, *11*, 1645-1680. b) Somsak, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. "Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: Recent developments" *Current Pharmaceutical Design*, **2003**, *9*, 1177-1189. c) Ayad, T.; Genisson, Y.; Broussy, S.; Baltas, M.; Gorrichon, L. "A flexible route towards five-membered ring imino sugars and their novel 2-deoxy-2-fluoro analogues" *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *15*, 2903-2910. d) Lee, B. W.; Jeong, I. Y.; Yang, M. S.; Choi, S. U.; Park, K. H. "A short and efficient synthesis of 2R,3R,4R-3,4-dihydroxyproline, 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-xylitol, 2R,3R,4R,5S-3,4,5-trihydroxypipercolic acid, and 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-idoitol" *Synthesis* **2000**, *9*, 1305-1309.

¹⁶⁷ Yagi, M.; Kouno, T.; Aoyagi, Y.; Murai, H. "The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species" *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1976**, *50*, 571-572 (*Chem. Abstr.* *86*, 167851r).

¹⁶⁸ Fellows, L. E.; Bell, E. A.; Lynn, D. G.; Pilkievicz, F. J.; Miura, I.; Nakanishi, K. "Isolation and structure of an unusual cyclic amino alditol from a legume" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 977-978.

¹⁶⁹ Fuhrmann, U.; Bause, E.; Legler, G.; Ploegh, H. "Novel mannosidase inhibitor blocking conversion of high mannose to complex oligosaccharides" *Nature* **1984**, *307*, 755-758.

¹⁷⁰ Evans, S. V.; Fellows, L. E.; Shing, T. K. M.; Fleet, G. W. J. "Glycosidase inhibition by plant alkaloids which are structural analogues of monosaccharides" *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1953-1955.

¹⁷¹ Stutz, A. E. "Iminosugars as glycosidase inhibitors: nojirimycin and beyond" 1999, Ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

like natural imino-D-ribitols¹⁷², or 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol [DAB1] (**225a**) which is a potent and specific inhibitor of lysosomal α -mannosidase¹⁷³; 1,4-deoxy-1,4-imino-L-arabinitol (**225b**) which is as an α -glucosidase inhibitor with *in vitro* antiviral activity¹⁷⁴ and 1,4-deoxy-1,4-imino-D-lyxitol (**225c**) which has shown activity against α -galactosidase and α -glucosidase¹⁷⁵. Derivatives like **226** that bear an aromatic group at position C-1 are potent purine nucleoside phosphorylase (PNPase) inhibitors,¹⁷⁶ and derivatives as **227**, analogues of **225** with a substituent at C-1 position, have also been reported as powerful and specific glycosidase inhibitors.¹⁷⁷

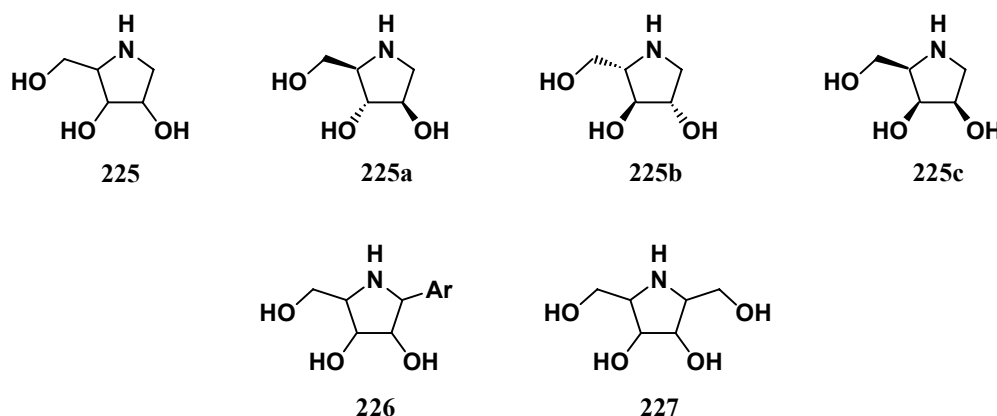


Figure 85: 1,4-dideoxy-1,4-imino-pentanol derivatives.

¹⁷² Mizushina, Y.; Xu, X.; Asano, N.; Kasai, N.; Kato, A.; Takemura, M.; Asahara, H.; Linn, S.; Sugawara, F.; Yoshida, H.; Sakaguchi, K. "The inhibitory action of pyrrolidine alkaloid, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol, on eukaryotic DNA polymerases" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 78-85.

¹⁷³ Fleet, G. W. J.; Witty, D. R. "Synthesis of homochiral β -hydroxy- α -aminoacids [(2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyproline and (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxypipercolic acid] and of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol [DAB1] and fagomine [1,5-imino-1,2,5-trideoxy-D-arabino-hexitol]" *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 87-96.

¹⁷⁴ Behling, J. R.; Campbell, A. L.; Babiak, K. A.; Neg, J. S.; Medich, J.; Farid, P.; Fleet, G. W. J. "Synthesis from D-lyxonolactone of 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol, a glucosidase inhibitor with *in vitro* anti-viral activity" *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3359-3366.

¹⁷⁵ Fleet, G. W. J.; Nicholas, S. J.; Smith, P. W.; Evans, S. V.; Fellows, L. E.; Nash, R. J. "Potent competitive inhibition of α -galactosidase and α -glucosidase activity by 1,4-dideoxy-1,4-iminopentitols: syntheses of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-lyxitol and of both enantiomers of 1,4-dideoxy-1,4-iminoarabinitol" *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3127-3130.

¹⁷⁶ a) Yu, C. Y.; Mu-Hua, H. "Radicamines A and B: Synthesis and revision of the absolute configuration" *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3021-3024. b) Schramm, V. L.; Tyler, P. C. "Imino-sugar-based nucleosides" *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 525-540. c) Ringia, E. A. T.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Murkin, A. S.; Schramm, V. L. "Transition state analogue discrimination by related purine nucleoside phosphorylases" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7126-7127.

¹⁷⁷ Yu, C. Y.; Asano, N.; Ikeda, K.; Wang, M. X.; Butters, T. D.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Winters, A. L.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J. "Looking glass inhibitors: L-DMDP, a more potent and specific inhibitor of alpha-glucosidases than the enantiomeric natural product DMDP" *Chem. Commun.* **2004**, *17*, 1936-1937.

Seven-membered ring iminosugars, commonly called azepanes (Figure 86), have shown promising glycosidase inhibitory activity in the treatment of various diseases such as diabetes, cancer, and viral infections, including AIDS.¹⁷⁸ For example, compound **228a** is better inhibitor of β -N-acetylglucosaminidase than 1-deoxynojirimycin (**224b**, Figure 84, page 320) which is often taken as a standard¹⁷⁹, and compounds **229a** and **229b** are potent inhibitors of α -galactosidase and β -galactosidase respectively.¹⁸⁰ Hydroxyl groups in azepanes adopts different conformations due to the flexibility of the seven-membered ring (compared with five- or six-membered ring iminosugars), thereby increasing the probability of formation hydrogen bonds with nitrogen bases, thus improving the ability to bind to the minor groove of DNA.¹⁸¹

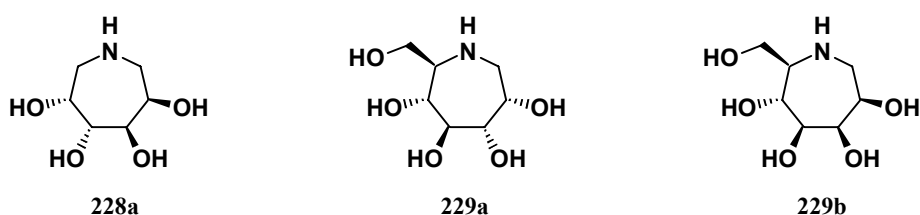


Figure 86: Representative azepane compounds.

Several isomers of polyhydroxylated azafuranoses (**225** and **227**), azapiranoses (**224** and **230**) and azepanes (**229** and **231**) could be glycosidase inhibitors (Figure 87, page 323). Hence derivatives of these compounds provide opportunities for new leads with increased potency and specificity. Therefore, it is of great interest to prepare branched analogues of these compounds and test their biological activity, to know how the introduction of the branch can affect the inhibitor activity.

¹⁷⁸ a) Bols, M.; Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X. "Recent Developments of Transition-State Analogue Glycosidase Inhibitors of Non-Natural Product Origin" *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-554. b) Dhavale, D. D.; Markad, S. D.; Karanjule, N. S.; PrakashaReddy, J. "Asymmetric dihydroxylation of D-glucose derived α,β -unsaturated ester: synthesis of azepane and nojirimycin analogues" *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4760-4766.

¹⁷⁹ Moris, F. V.; Qian, X. H.; Wong, C. H. "Enzymatic/Chemical Synthesis and Biological Evaluation of Seven-Membered Iminocyclitols" *J. Am. Chem.Soc.* **1996**, *118*, 7647-7662.

¹⁸⁰ Li, H.; Blériot, Y.; Chantereau, C.; Mallet, J. M.; Sollogoub, M.; Zhang, Y.; García, E. R.; Vogel, P.; Barbero, J. J.; Sinaÿ, P. "The first synthesis of substituted azepanes mimicking monosaccharides: a new class of potent glycosidase inhibitors" *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* 1492-1499.

¹⁸¹ Johnson, H. A.; Thomas, N. R. "Polyhydroxylated azepanes as new motifs for DNA minor groove binding agents" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 237-241.

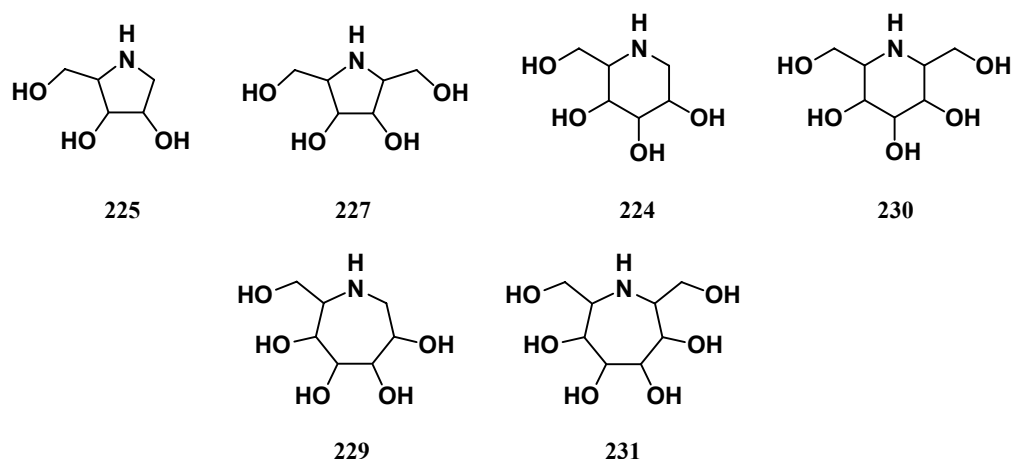
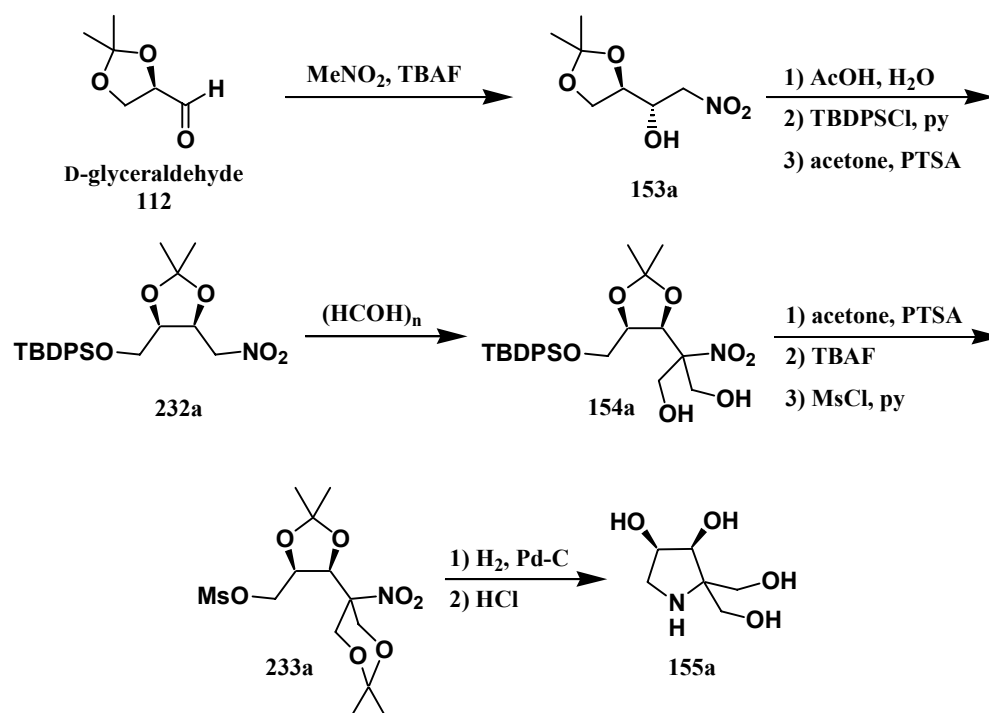


Figure 87: General structure of 5, 6 and 7 members iminosugars.

3.3.2 Objective and synthetic plan.

The last objective of this thesis was related to the synthesis of branched chain iminoderivatives from nitrosugars. Our first synthetic target was iminosugar **155a** and the starting compound was D-glyceraldehyde (**112**). For this sake we followed the synthetic plan shown in Scheme 139.



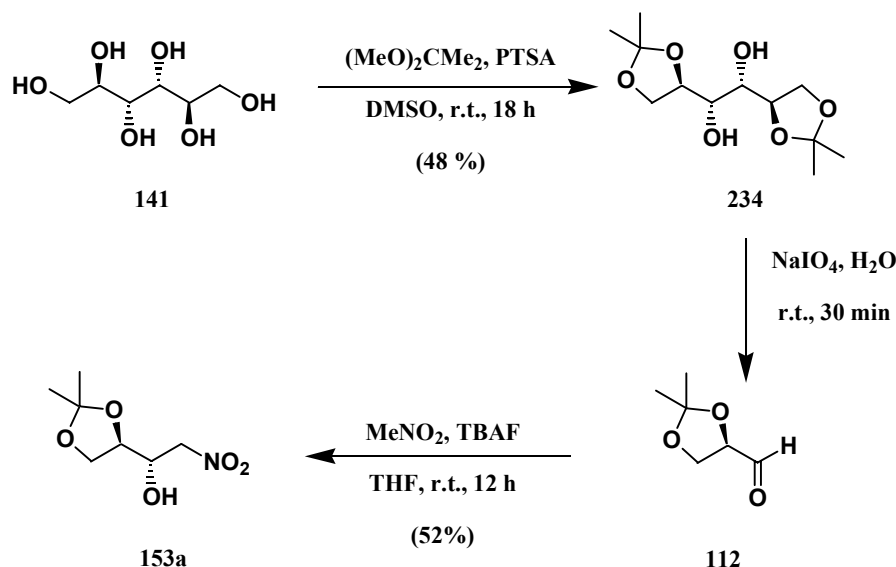
Scheme 139

According to the synthetic plan, D-glyceraldehyde (**112**) was transformed into the known nitroderivative **153a**, which was further modified by taking advantage of the synthetic versatility of nitro compounds. We considered the early introduction of

the two hydroxymethyl groups at the α position to the nitro group of nitrobutane **232a** by means of a double Henry reaction with formaldehyde and then to construct the nitrogen ring of target **155a** by reduction of the nitro group of **233a** to amino and subsequent intramolecular alkylation of this functionality. The results of this synthetic plan are discussed below.

3.3.3 Synthesis of C-4 branched chain 1,4-iminopentanol.

The starting D-glyceraldehyde (**112**) derivative was easily obtained from commercial D-mannitol (**141**) following a procedure already described in the literature, which involves the regioselective protection of its two terminal 1,2-dihydroxy functionalities as acetonides, by reaction with 2,2-dimethoxypropane, followed by oxidative rupture of the 1,2-diole system of the resulting D-mannitol derivative **234** by reaction with sodium metaperiodate (Scheme 140).¹⁸²



Scheme 140

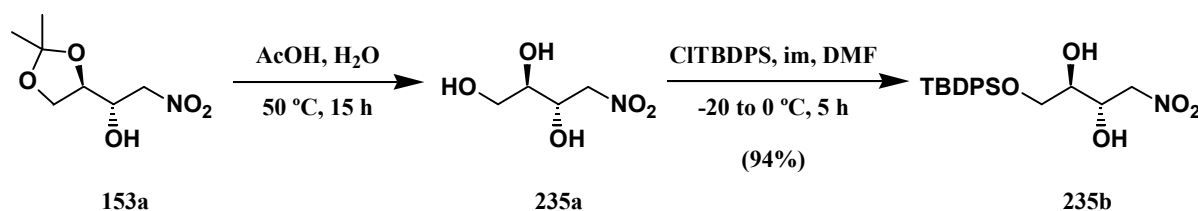
The next step involved a known Henry reaction of D-glyceraldehyde (**112**) with nitromethane in the presence of tetrabutylammonium fluoride, allowed us to obtain enantiopure nitroalcohol **153a** after crystallization.¹⁸³ This was confirmed

¹⁸² a) Choudary, B. M.; Sarma, M. R.; Prasad, A. D.; Narender, N. "New chiral phosphines derived from carbohydrates: synthesis, characterization and application in hydrogenation" *Indian J. Chem., section B: Org. Chem. Including Med. Chem.* **1994**, 33, 152-155. b) LeCocq, J.; Ballou, C. E. "Structure of cardiolipin" *Biochemistry* **1964**, 3, 976-980.

¹⁸³ Kozikowski, A. P.; Kitagawa, Y.; Springer, J. P. "An examination of the extent of diastereofacial selection in the reactions of a chiral nitrile oxide with achiral alkenes: a route to β -hydroxy carboxylic acids" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 23, 1460-1462.

by the ^{13}C -NMR of this compound, which shows in its ^{13}C -NMR two signals at 66.7 and 78.1 ppm of primary carbons C-1 and C-4 and by the IR spectrum, which display two bands at 1554 and 1386 cm^{-1} due to the nitro group.

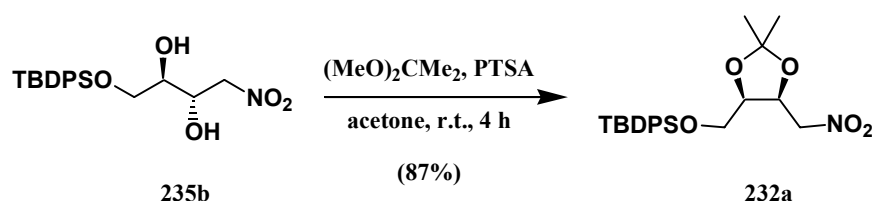
According to our synthetic plan, removal of the acetonide protecting group of **153a** was followed by the selective protection of the primary hydroxy group of the resulting 2,3,4-trihydroxynitrobutane **235a** by treatment with tributylidiphenylsilyl chloride in DMF at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 hours (Scheme 141).¹⁸⁴



Scheme 141

We confirmed that the *t*-butyldiphenylsilyl group was in position C-4 of compound **235b** with the help of ^1H -NMR spectrum of this compound which displays at 1.09 ppm a singlet due to the nine protons of the *t*-butyl group, and two multiplets of ten protons between 7.39 and 7.68 ppm corresponding to the two phenyl groups.

The next step involved protection of the 1,2-diole system of **235b** under standard conditions, which afforded the desired key compound **232a** (Scheme 142).

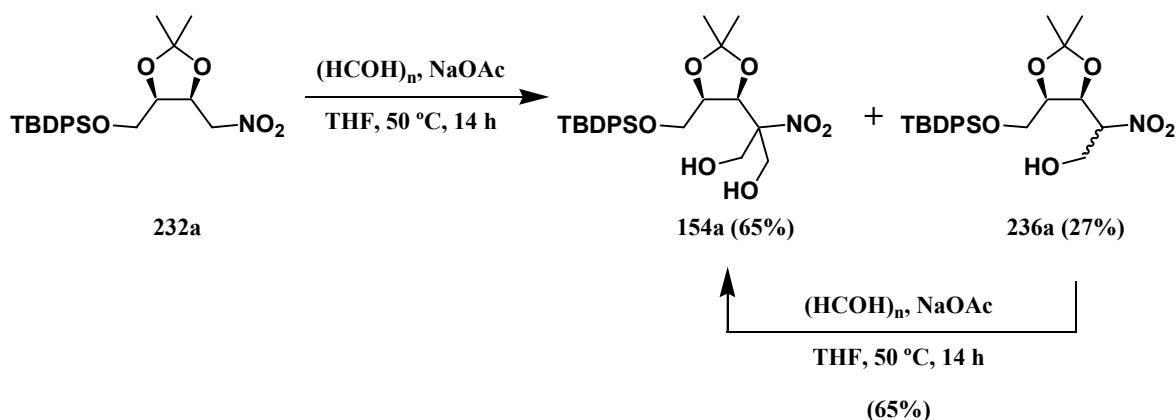


Scheme 142

Structure of compound **232a** was easily established on the basis of its ^{13}C -NMR spectrum. The appearance of two methyl groups at 25.2 and 27.7 ppm and a quaternary carbon at 109.8 ppm confirmed the formation of 1,3-dioxolane ring. Moreover the ^1H -NMR spectrum shows the signals of the two methyl groups as singlets at 1.34 and 1.43 ppm as well as the signals of TBDPS group at 1.06 ppm for *t*-butyl group and 7.38-7.66 for phenyl groups. The IR spectrum only shows a peak at 1559 cm^{-1} corresponding to the nitro group.

¹⁸⁴ Estévez, J. C.; Fleet, G. W. J.; Fairbanks, A. J. "Synthesis of tetrahydropyrans from sugar lactones" *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13591-13620.

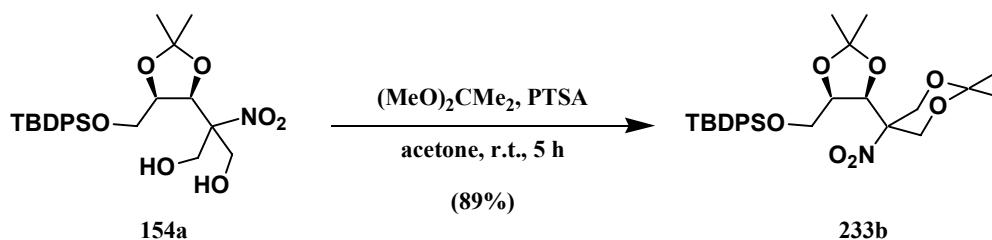
The next step in the route to five membered iminosugars was the programmed double hydroxymethylation of nitroderivative **232a**. With this aim, various conditions of reaction were assayed, using paraformaldehyde as a source of the hydroxymethyl groups and anhydrous tetrahydrofuran as the solvent. When the reaction was conducted with sodium methoxide, lithium hydroxide (a stoichiometric amount) or tetrabutylammonium fluoride (a catalytic amount) as the bases, complex reaction mixtures were always obtained. The best results were afforded by the use of potassium fluoride with 18-crown-6, sodium azide, or sodium acetate (stoichiometric amount) at room temperature, provided the desired dihydroxy compound **154a** in poor yields after long reaction times. But finally, when the reaction was carried out with sodium acetate at 50 °C the dihydroxymethyl compound **154a** was obtained in a 65% yield, together with a 27% yield of a epimeric mixture of the corresponding monohydroxylated derivative **236a**, which once isolated was easily converted into **154a** under the same reaction conditions. The global yield of the two processes was 83% (Scheme 143).



Scheme 143

The structure of the final product was established with the help of the ^{13}C -NMR and IR spectroscopical data. Its ^{13}C -NMR spectrum shows two signals at 61.9 and 62.7 ppm corresponding to the CH_2 groups of hydroxymethyl units and at 94.0 ppm the signal of the quaternary carbon linked to nitro group. The IR spectrum of **154a** shows a broad band at 3425 cm^{-1} corresponding to the free hydroxy groups and a peak at 1548 cm^{-1} corresponding to nitro group.

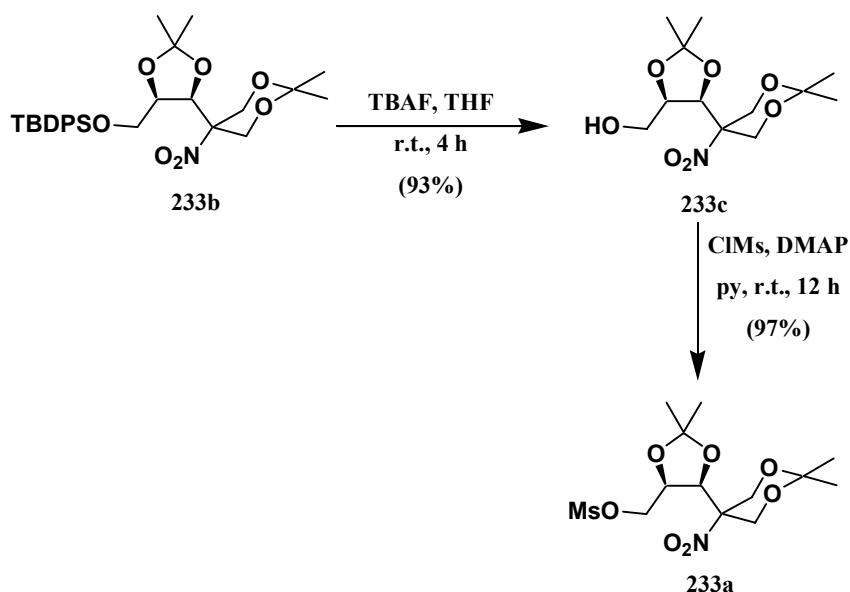
The assembly of a nitrogen ring of our target **155a** (Scheme 139, page 323) required the previous efficient protection of its two hydroxymethylene groups as an acetonide by reaction with 2,2-dimethoxypropane and *p*-toluensulfonic acid for 5 hours. The resulting diisopropylidene derivative **233b** was obtained in quite good yield (89%) (Scheme 144, page 327).



Scheme 144

Spectroscopic data confirmed the structure of **233b**. Its ^{13}C -NMR included the expected signals for its four methyl groups (21.2, 24.6, 25.7, and 26.6 ppm) and for its two quaternary carbons (99.4 ppm and 108.7 ppm) of isopropylidene units.

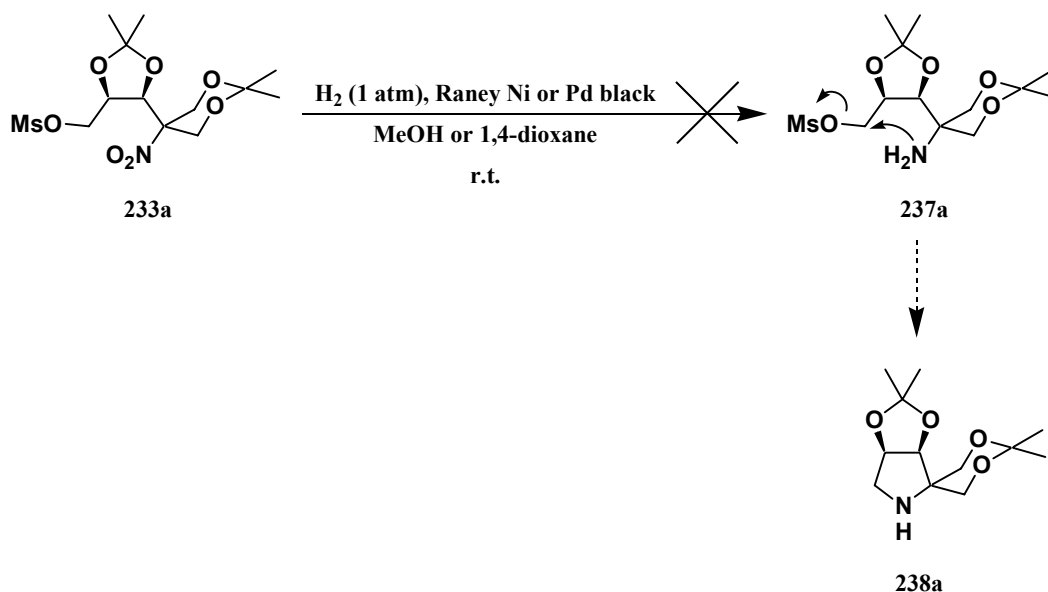
The key step of our synthetic plan, the ring closure leading to the nitrogenated ring of **238** (Scheme 146, page 328), required the presence of a good leaving group at the C-4 position. Introduction of a mesyl group at this position was achieved as follows: firstly removal of the silyl protecting group of compound **233b**, by treatment with tetrabutylammonium fluoride, which afforded compound **233c** in an excellent yield. Then we converted compound **233c** into its mesyl derivative **233a** upon reaction with methanesulfonyl chloride in the presence of pyridine and a catalytic amount of *N,N*-dimethylaminopyridine (Scheme 145).



Scheme 145

After chromatographic purification, the nitro mesilate **233a** was obtained in excellent yield and its structure was corroborated by means of its spectroscopic properties. Its ^{13}C -NMR spectrum shows an expected signal for the methyl group of mesyl functionality at 37.7 ppm.

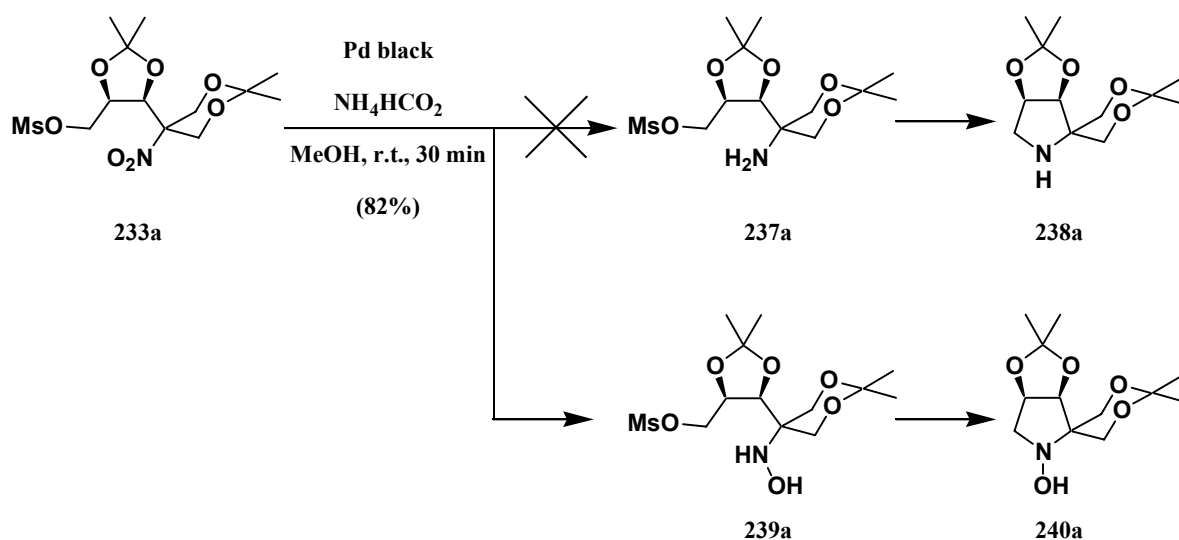
Following with our plan, we studied the reduction of the nitro group of **233a** to amino (Scheme 146).



Scheme 146

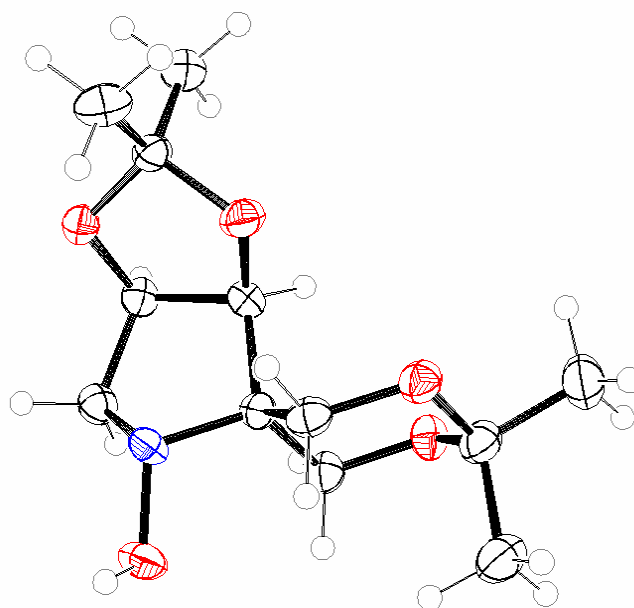
Our first attempt to reduce nitro compound **233a** with hydrogen at atmospheric pressure in the presence of Raney nickel or palladium black as catalysts failed to afford the desired amino compound and starting material was always recovered. But satisfactory results were achieved when the hydrogenation was carried out with palladium black and ammonium formate in methanol (Scheme 147, page 329).¹⁸⁵ Under these conditions, after 30 minutes of reaction at room temperature, a new compound was isolated by chromatographic column which was characterized as the iminosugar derivative **240a**. Mass spectrum shows a protonated molecular ion at $m/z=260$, which is sixteen units higher than those corresponding to the expected compound **238a**. This is in agreement with the molecular formula $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ found for compound **240a**, which includes an additional oxygen atom than the molecular formula $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ of the expected compound **238a**. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra also confirmed the structure **240a** proposed for the new compound, which was unambiguously corroborated by means of its X Ray structure (Figure 88, page 329).

¹⁸⁵ Ram, S.; Ehrenkaufner, R. E. "A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent" *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3415-3418.



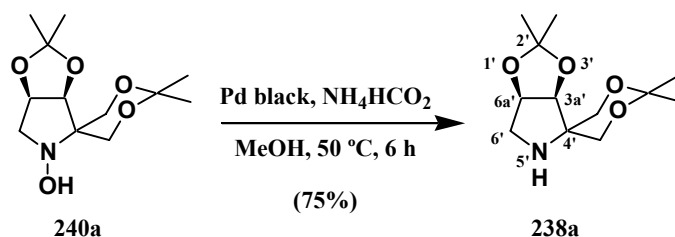
Scheme 147

The formation of compound **240a** may be explained by a mechanism that assumes the reduction of **233a** to a hydroxylamine **239a**, which spontaneously cyclises under the present reaction conditions. The incomplete reduction of the nitro group could be due to the steric hindrance around this group.

Figure 88: ORTEP-3 representation of compound **240a**.

To reach our final target (compound **238a**) we needed to achieve the total hydrogenation of the nitro to an amino group. After several unsuccessful attempts of catalytic hydrogenation (using palladium black or palladium oxide as the catalyst and atmospheric hydrogen pressure, and using palladium black and ammonium formate at room temperature), compound **238a** was achieved under the latter

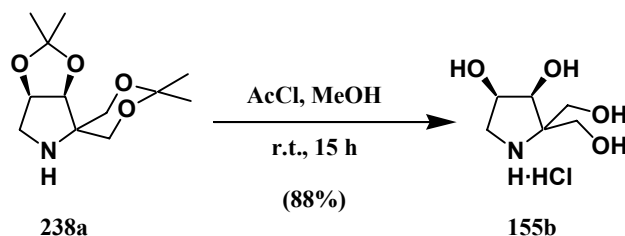
conditions when the temperature was raised from room temperature to 50 °C (Scheme 148).



Scheme 148

The spectroscopic data of compound **238a** were similar to the starting hydroxylamine **240a**. Main difference in the ^{13}C -NMR between both compounds were the signals of carbons C-6' at 50.6 ppm and the signal of C-4' at 61.1 ppm, which in the ^{13}C -NMR of **240a** appeared at 59.8 ppm for C-6' and at 65.0 for C-4'. But the most important evidence of formation of pyrrolidine **238a** was the presence in its mass spectrum of a peak at 244 m/z , which corresponds to the pseudomolecular ion MH^+ . Finally its elemental analysis confirmed that its molecular formula was $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$.

At last, deprotection of compound **238a** with acetyl chloride in methanol allowed the removal of the protection of its hydroxy substituents yielding iminosugar salt **155b** (Scheme 149).

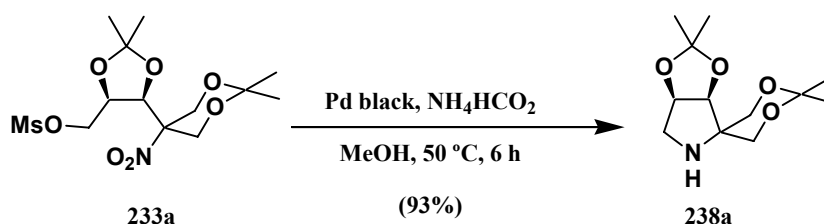


Scheme 149

The NMR data of **155b** matched those of its racemic mixture, previously prepared by Altenbach in 2001.¹⁸⁶ Its ^{13}C -NMR showed the three CH_2 signals at 49.4, 59.4 and 61.0 ppm, the two CH signals at 70.5 and 73.1 ppm and the quaternary carbon signal at 71.0 ppm.

¹⁸⁶ Altenbach, H. J.; Schieweck, F. "Synthesis of geminal bis(hydroxymethyl)pyrrolidine and pyrrolizidine imino sugars" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 3409-14.

After that, we could carry out one pot transformation of mesilate **233a** into the pyrrolidine **238a** (Scheme 150), under the above conditions for the transformation of **240a** to **238a** (Scheme 148, page 330).

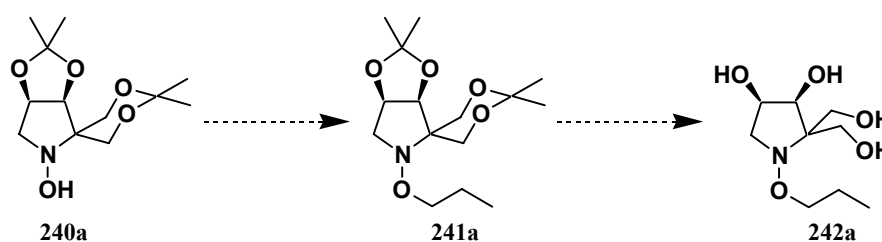


Scheme 150

This allowed us to obtain **238a** in 93% yield, which was significantly higher than 63% yield achieved in its indirect obtaining via compound **240a**.

3.3.4 Synthesis of novel C-4 branched chain derived from **240a**.

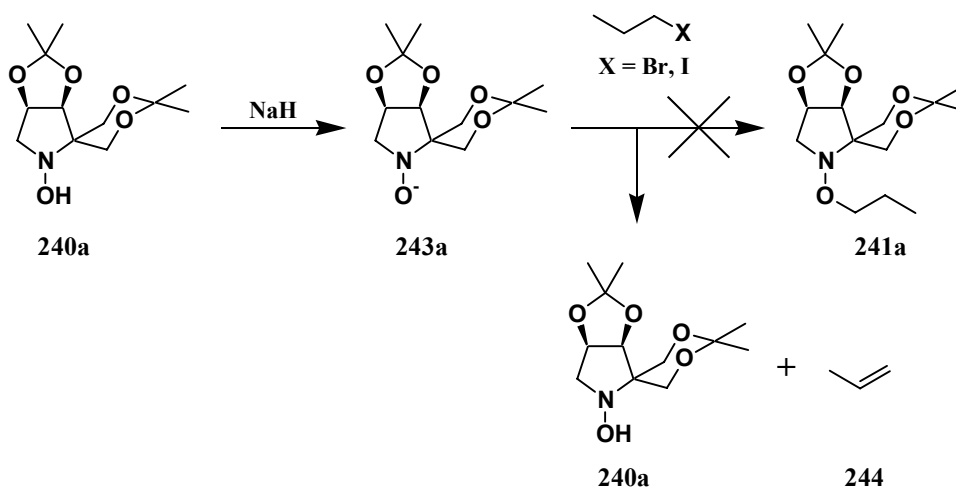
The unexpected formation of the hydroxypyrrolidine **240a** during the reduction and intramolecular cyclization of nitromesilate **233a**, led our work on a non programmed synthesis of new O-alkyl-N-hydroxypyrrolidine derivatives of interest for evaluation as glycosidase inhibitors. In fact, it is well-known that some O-alkyl-N-hydroxypyrrolidines have pronounced activity values as glycosidase inhibitors.¹⁸⁷ This prompted us to synthesize O-alkyl pyrrolidine **242a** for biological evaluation as glycosidase inhibitor (Scheme 151).



Scheme 151

In a first attempt to carry out the synthesis of this O-alkylated iminocompound **242a**, we tried to obtain it by O-alkylation of **240a** followed by removal of the hydroxy protecting groups of the expected compound **241a** (Scheme 152, page 332).

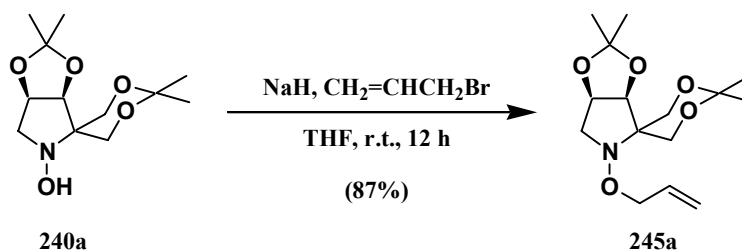
¹⁸⁷ Sun, L.; Li, P.; Landry, D. W.; Zhao, K. "Synthesis of N-alkoxytrihydroxypiperidine analogs of allopuranose" *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1547-1450.



Scheme 152

Unfortunately, the direct alkylation of **240a** by treatment with sodium hydride and propyl bromide failed to give the desired pyrrolidine **241a**, probably due to the competitive β-elimination process leading to propene (**244**). A similar unsuccessful result was obtained in a second attempt of alkylation of **240a** with propyl iodide under the same reaction conditions.

An alkyl derivative of **240a** was finally obtained by addition of the highly reactive propenyl bromide to this compound (Scheme 153).

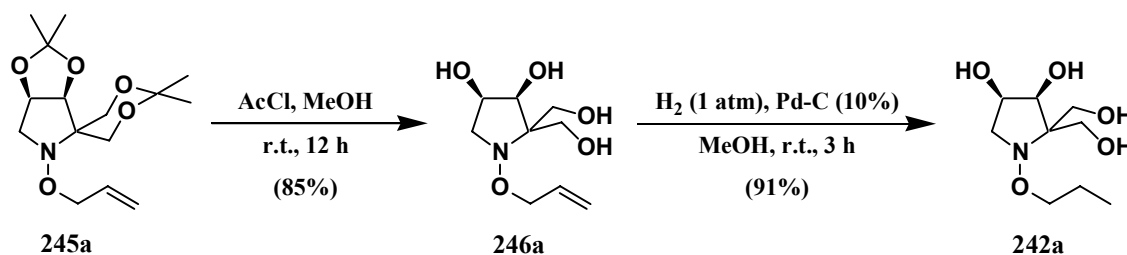


Scheme 153

Thus, the reaction of hydroxypyrrolidine **240a** with sodium hydride and propenyl bromide provided an 87% yield of *O*-propenyl derivative **245a**. The presence of the propenyl substituent was easily established from its ¹H-NMR spectrum, which showed two signals at 5.18 and 5.25 ppm, that correspond to the olefinic CH₂, and at 5.91 ppm a signal corresponding to olefinic CH. Its high resolution mass spectrum additionally confirmed that the molecular formula was C₁₅H₂₅NO₅.

The new iminosugar **245a** was treated with an acetyl chloride-methanol mixture in order to remove the hydroxy protecting groups. Catalytic hydrogenation

of the resulting compound **246a** finally provided the desired new iminosugar derivative **242a** (Scheme 154, page 333).



Scheme 154

We identified compound **242a** by its ^{13}C -NMR spectrum, which showed three signals at 10.5, 22.0 and 76.4 ppm corresponding to the three carbons of the propyloxy group, and six signals corresponding to the pyrrolidine ring, as follows: at 59.6, 61.7 and 63.4 ppm (CH_2 groups), 68.8 and 73.8 ppm (CH groups) and 70.5 ppm (quaternary carbon). Its elemental analysis confirmed its molecular formula $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_5$.

On the other hand, nectrisine (**247a**) and related compounds are a family of pyrrolidines with an endocyclic imino bound, which were discovered in the late eighties and have proved to be potent glycosidases inhibitors (Figure 89).¹⁸⁸

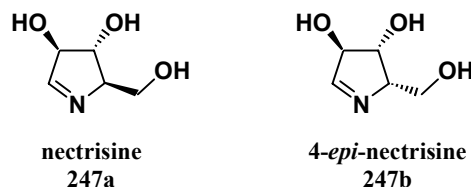
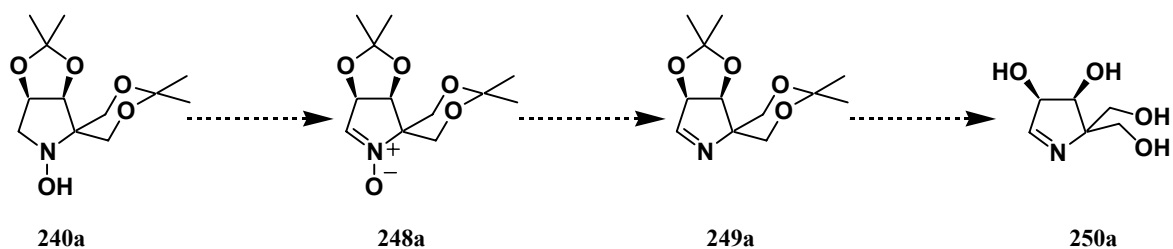


Figure 89: Nectrisine and 4-epi-nectrisine.

Because of their structural similarity to our branched iminosugars **155b** (Scheme 149, page 330), we considered of interest to prepare the novel branched chain nectrisine analogue **250a** which should be easily obtained from *N*-hydroxypyrrolidine **240a**, in order to evaluate it as glycosidase inhibitor (Scheme 155, page 334).

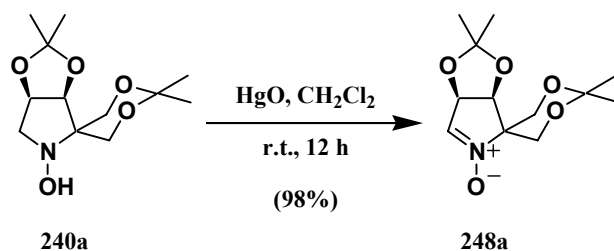
¹⁸⁸ a) Shibata, T.; Nakayama, O.; Tsurumi, Y.; Okuhara, M.; Terano, H.; Kohsaka, M. "A new immunomodulator, FR-900483" *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 296-301. b) Kayakiri, H.; Takase, S.; Setoi, H.; Uchida, I.; Terano, H.; Hashimoto, M. "Structure of FR 900483, a new immunomodulator isolated from a fungus" *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1725-1728. c) Tsujii, E.; Muroi, M.; Shiragami, N.; Takatsuki, A. "Nectrisine is a potent inhibitor of α -glucosidases, demonstrating activities similarly at enzyme and cellular levels" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 459-466.



Scheme 155

Accordingly, our synthetic plan leading to **250a** involves oxidation of **240a** to the nitronium **248a**, followed by reduction of this compound to imine **249a** and removal of the acetonide protecting groups of this precursor of our target **250a**.

Following a well-known procedure,¹⁸⁹ the oxidation of **240a** with mercury (II) oxide provided an almost quantitatively yield of the desired nitronium **248a** (Scheme 156).



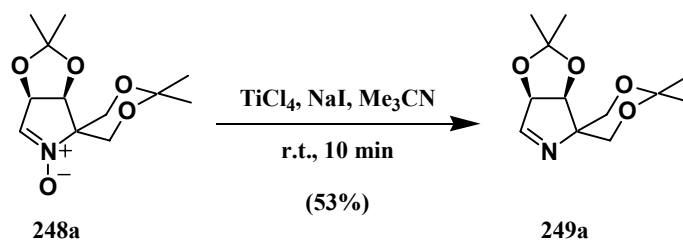
Scheme 156

The structure of **248a** was easily established from its spectroscopical and analytical data. The ¹H-NMR spectrum shows a doublet at 6.80 ppm corresponding to the proton on the C=N group. Formation of this functionality was additionally confirmed from a signal at 132.5 ppm present in its ¹³C-NMR spectrum, and due to the sp² carbon.

In the next step, the reaction of this nitronium **248a** with titanium tetrachloride and sodium iodide provided iminoderivative **249a** with a 53% yield (Scheme 157, page 335).¹⁹⁰

¹⁸⁹ Cicchi, S.; Höld, I.; Brandi, A. "New synthesis of five-membered cyclic nitrones from tartaric acid" *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5274-5275.

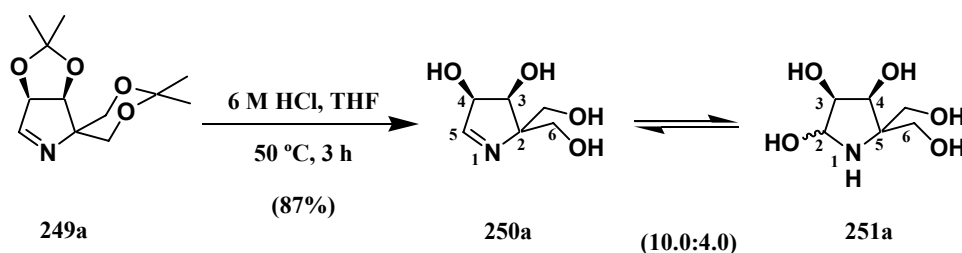
¹⁹⁰ Balicki, R. "TiCl₄/NaI - A novel, efficient reagent for mild reduction of the N-O bond in amine N-oxides and nitrones" *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 647-648.



Scheme 157

Removal of the oxygen atom attached to the nitrogen was confirmed from changes observed in the $^1\text{H-NMR}$ and the $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of this compound with respect to those of its precursor **248a**. Thus, the signal corresponding to the hydrogen attached to the sp^2 carbon now appears at 7.6 ppm and the signal corresponding to this carbon now appears at 167.5 ppm. Finally, high resolution mass spectrum confirmed the molecular mass of the isolated compound 242.1395 which corresponds to a molecular formula of $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_4$.

Finally, hydrolysis of **249a** with aqueous hydrochloric acid led us to the polyhydroxylated iminocompound **250a**, as the major component of an inseparable equilibrium mixture of this compound and its hydrated derivative **251a** (Scheme 158).



Scheme 158

The main component of the mixture, **250a** was identified by means of the $^1\text{H-NMR}$ and the $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of the mixture. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum shows a singlet at 7.57 ppm corresponding to the proton on the $\text{C}=\text{N}$ group, and two doublets at 4.08 and 4.53 ppm corresponding to H-3 and H-4 respectively. The $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum shows the signals for the two CH_2 groups at 62.9 and 65.1 ppm, for the CH groups at 72.8 and 78.8 ppm, for the quaternary carbon at 83.9 ppm and for the sp^2 carbon at 171.5 ppm. The hydrated form **251a** was identified mainly from a doublet at 4.22 ppm in its $^1\text{H-NMR}$ spectrum, due to the proton at position C-2, and for a signal at 96.4 ppm in its $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum assigned to the CH at C-2 position. The 10.0:4.0 ratio of the mixture **250a:251a** was determined from its $^1\text{H-NMR}$ spectrum by

measuring the intensity of the H-5 proton of compound **250a** at 7.57 ppm and the intensity of the H-2 proton of compound **251a** at 4.22 ppm (Figure 90).

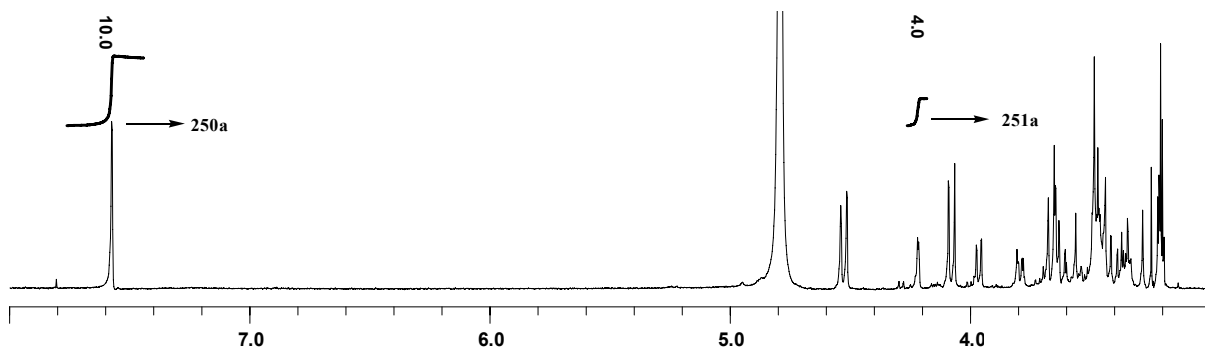
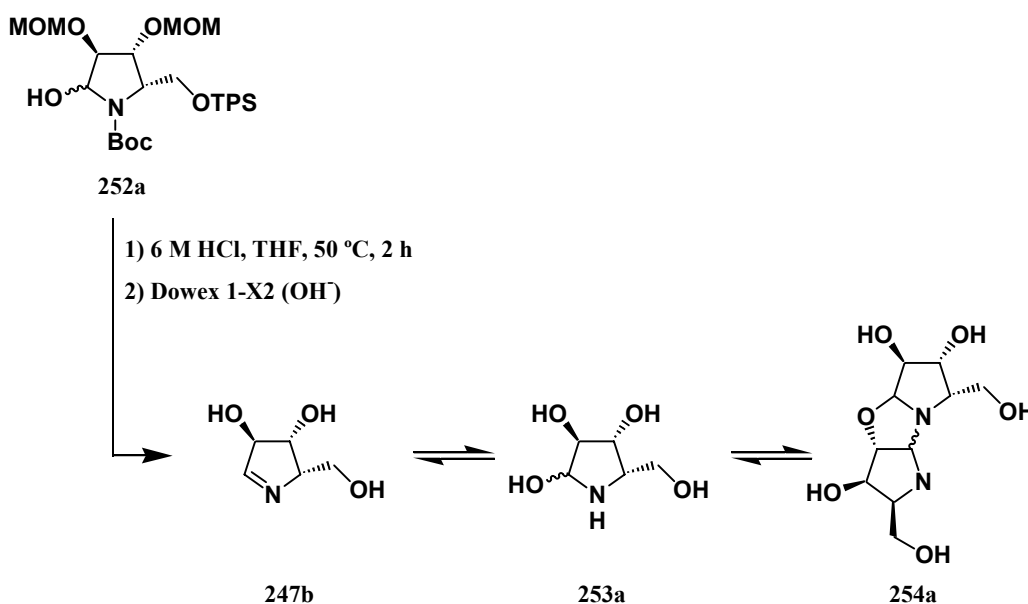


Figure 90: Detail of $^1\text{H-NMR}$ of mixture **250a** + **251a**.

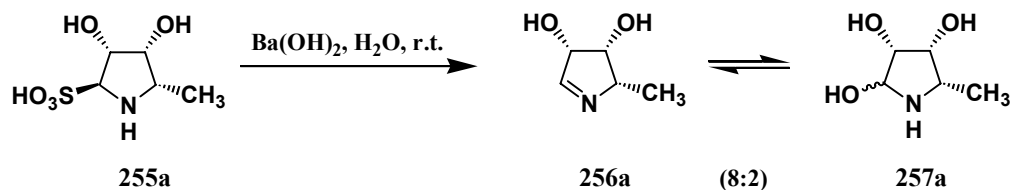
Equilibrium mixtures like one for **250a** + **251a** have been reported previously. In fact, in a synthesis of 4-*epi*-nectrisine (**247b**), Kim¹⁹¹ described the final product as an equilibrium mixture constituted by the 4-*epi*-nectrisine (**247b**) as major component, and small amounts of its hydrated form **253a** and dimer **254a** (Scheme 159).



Scheme 159

¹⁹¹ a) Kim, Y. J.; Kitahara, T. "Novel synthesis of nectrisine and 4-*epi*-nectrisine" *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3423-3426. b) Kim, Y. J.; Takatsuki, A.; Kogoshi, N.; Kitahara, T. "Synthesis of nectrisine and related compounds, and their biological evaluation" *Tetrahedron* **1999**, 55, 8353-8364.

A similar outcome was described by Joubert for the synthesis of pyrrolidine derivative **256a** (Scheme 160).¹⁹²



Scheme 160

Treatment of sulfonic compound **255a** with barium hydroxide produced the expected iminoderivative **256a** as the mayor component of an equilibrium mixture also constituted by **257a**.

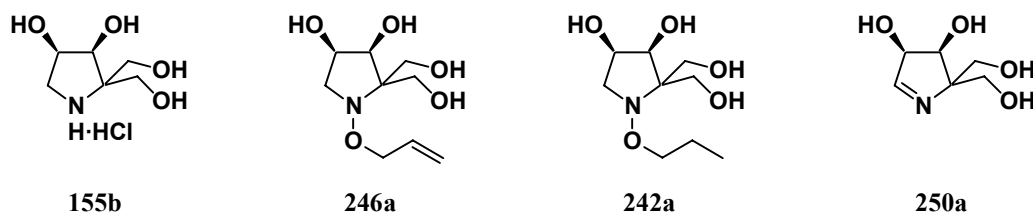
Since this mixture is unseparable, the biological assays were carried out for the combination of compounds.

3.3.5 Preliminary glycosidase screening of polyhydroxylated pyrrolidine derivatives.

Biological assays of the C-4 branched chain 1,4-iminopentanol **155b**, **246a**, **242a** and **250a2** (Figure 91, page 339) prepared by us as described above, were carried out in the Institute of Grassland and Environmental Research in Wales (UK). All enzyme and *para*-nitrophenyl substrates were purchased from Sigma. Enzymes were assayed at 20 °C in 0.1 M citric acid / 0.2 M disodium hydrogen phosphate buffers at the optimum pH for the enzyme. The incubation mixture consisted of 10 µl enzyme solution, 10 µl inhibitor solution in water (0.8 mM in the reaction mixture) and 50 µl of the appropriate 5 mM *para*-nitrophenyl substrate made up in buffer at the optimum pH for the enzyme. The reactions were stopped by addition of 0.4 M glycine (pH 10.4) during the exponential phase of the reaction, which was determined at the beginning of the assay using blanks with a 5 mM substrate solution. Absorbances were read at 405 nm using a Biorad microtitre plate reader (Benchmark). Water was substituted for the inhibitors in controls.

The inhibitors used in this glycosidase screening are showed in the next figure together with a table with the results of the evaluation, as percentage of inhibition.

¹⁹² Joubert, M.; Defoin, A.; Tarnus, C.; Strehl, J. "Synthesis of potent α -D-mannosidase and α -L-fucosidase inhibitors: 4-amino-4-deoxy-D-eruthrose and 4-amino-4,5-dideoxy-L-lyxose" *Synlett* **2000**, 9, 1366-1368.



Assay	Enzyme source	pH	[Enzyme] (U/ml)	% inhibition			
				155b	246a	242a	250a
α -glucosidase	Yeast	6.0	1	0	3	0	3
α -glucosidase	<i>Bacillus</i>	6.8	0.5	52	5	15	21
α -glucosidase	Rice	4.0	5	0	0	0	-12
β -glucosidase	Almond	5.0	0.25	0	0	0	0
α -galactosidase	Coffee bean	6.5	0.2	76	-11	48	10
β -galactosidase	Bovine liver	7.3	0.1	3	12	40	80
α -fucosidase	Bovine kidney	5.5	0.5	35	0	0	0
α -mannosidase	Jack bean	4.5	0.2	0	6	0	0
β -mannosidase	<i>Cellulomonas</i>	6.5	1	6	0	0	0
Naringinase	<i>Penicillium</i>	4.0	0.1	0	0	7	22
β -N-acetylglucosaminidase	Bovine kidney	4.2	0.5	-9	5	0	0
β -N-acetylglucosaminidase	Jack bean	7.0	0.5	6	0	0	0
β -N-acetylglucosaminidase	<i>Aspergillus</i>	5.0	0.5	-11	0	-7.5	0

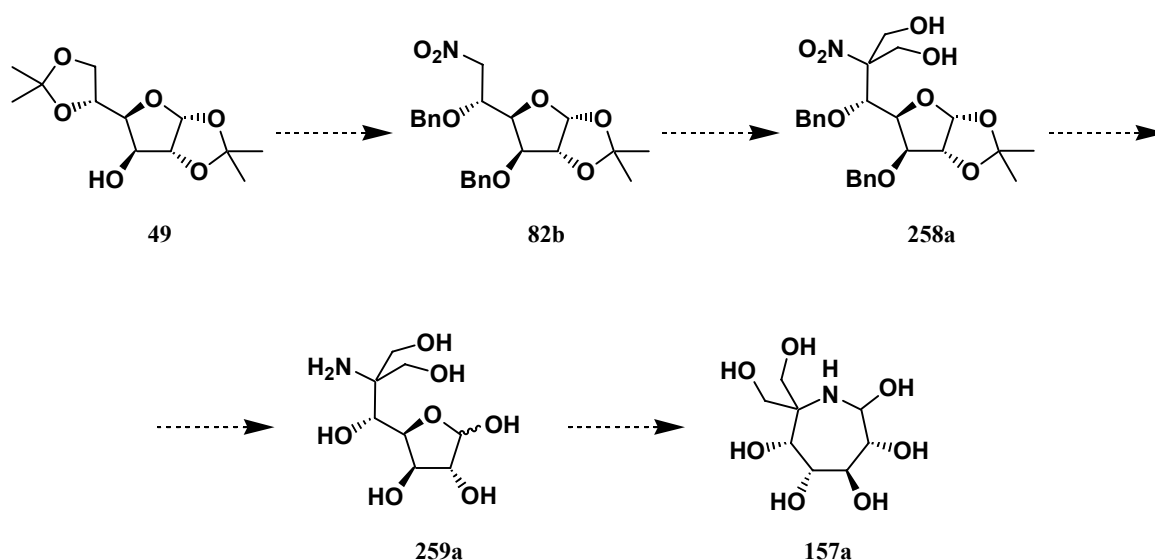
Figure 91: % of inhibition of glycosidases by **155b**, **246a**, **242a** and **250a**.

From the preliminary obtained results we can conclude that **155b** is a potent inhibitor of the α -galactosidase (Coffee bean source) but **250a** potently inhibits the β -galactosidase (Bovine liver source). **242a** is a weak but nonetheless quite specific inhibitor of both galactosidases and **246a** is not a good inhibitor of any of the glycosidases in Figure 91. In order to have a more complete picture, the actual IC_{50} and/or K_i values for these inhibitors need to be determined. Nevertheless, since compounds **155b**, **250a** and **242a** appear to show an interesting specificity as galactosidase inhibitors, it would be interesting to evaluate them as potential

chaperons for lysosomal storage disorders caused by a deficiency in lysosomal acidic α -galactosidase.¹⁹³

3.3.6 Synthesis of branched polyhydroxylated azepane derivatives.

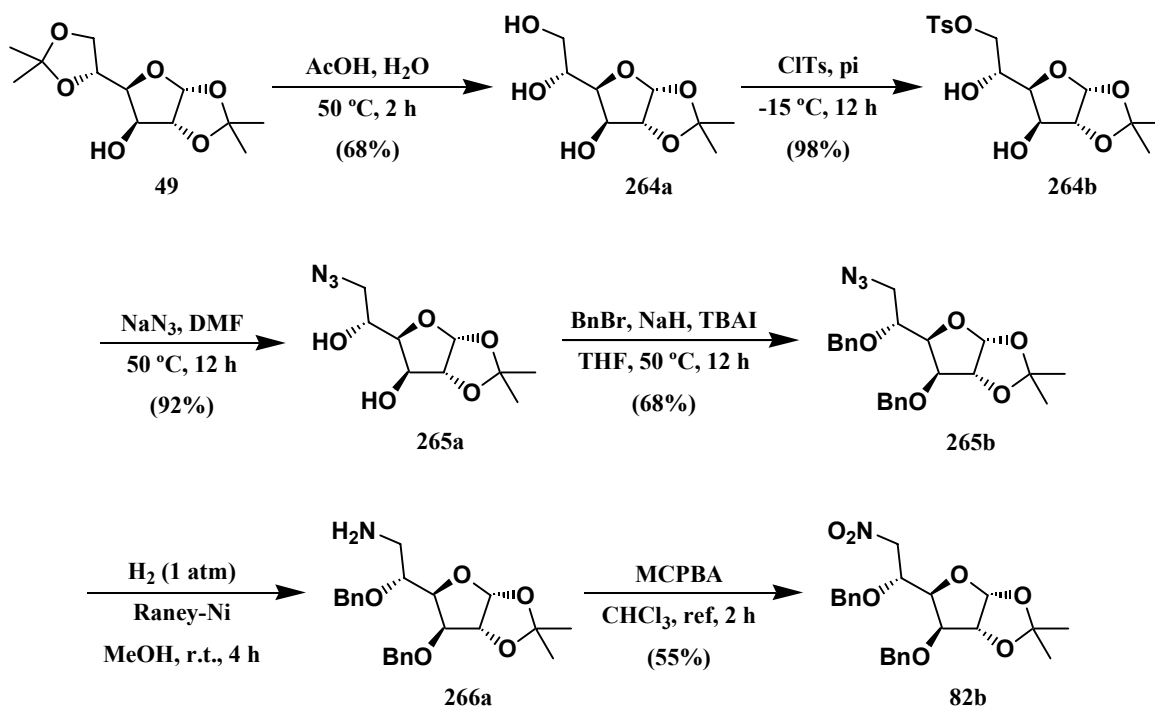
The novel synthetic methodology involved in our synthesis of branched chain 1,4-iminopentanol (described above) should have a great application for the transformation of sugars (other than D-glyceraldehyde) into a variety of new branched chain iminosugars. Accordingly, we decided to explore its application to D-glucose, as a representative hexose (Scheme 161).



Scheme 161

We reasoned that the nitrohexoglucufuranose derivative **82b** could afford the branched chain derivative **258a** by means of a double Henry reaction with formaldehyde. Then a sequence which includes a catalytic hydrogenation for reduction of the nitro group to amino, a hydrogenolysis of the benzyloxy substituents followed by the removal of the acetonide protecting group should provide the aminoglucose **259a**. Finally, the novel branched chain azepane **157a** would be obtained by an amino-carbonyl intramolecular reaction. This

¹⁹³ Otero, J. M.; Soengas, R. G.; Estévez, J. C.; Estevez, R. J.; Watkin, D. J.; Evinson, E. L.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J. "Preliminary studies on the transformation of nitrosugars into branched chain iminosugars: Synthesis of 1,4-dideoxy-4-C-hydroxymethyl-1,4-imino-pentanol" *Org. Lett.* **2007**, *9*, 623-626.

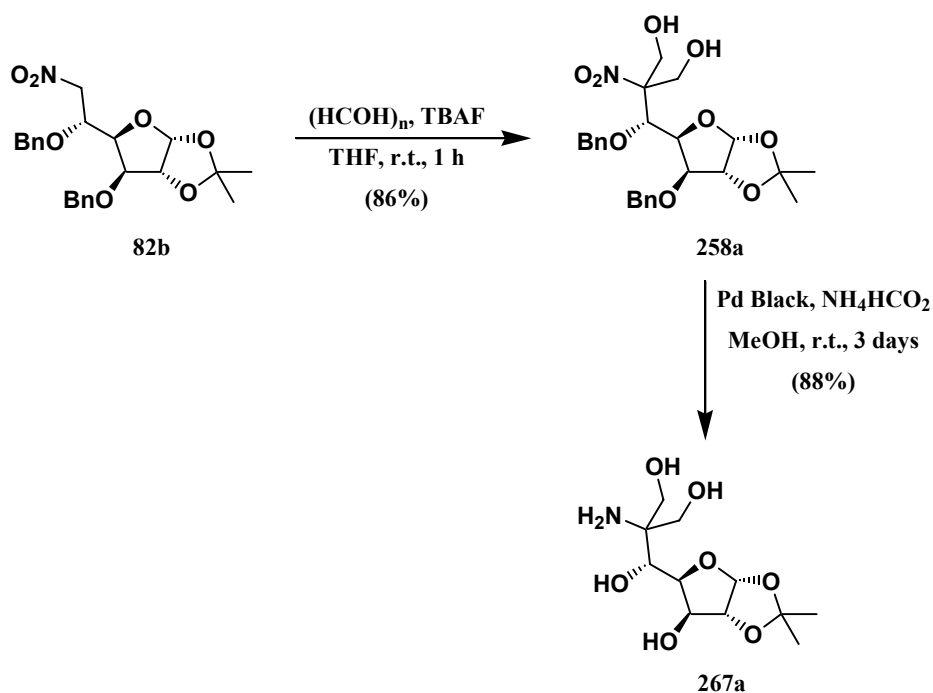


Scheme 163

We obtained furanose **264a** by selective acidic hydrolysis of the hexocyclic dioxolane subunit of commercial diacetone-D-glucose (**49**), achieved heating a solution of the glucose derivative in aqueous acetic acid solution at 50 °C for 2 hours. The resulting compound was then reacted with tosyl chloride in pyridine at -15 °C for 12 hours, allowing the selective tosylation of primary hydroxy group. Treatment of the tosyl derivative **264b** with sodium azide in anhydrous *N,N*-dimethylformamide at 50 °C for 12 hours, followed by the reaction of the resulting azidoderivative **265a** with benzyl bromide gave the fully protected azidofuranose **265b**. In the next step, the catalytic hydrogenation of **265b** with Raney-Nickel furnished aminofuranose **266a**, which was oxidized with *meta*-chloroperbenzoic acid to the desired nitrohexoglucofuranose **82b**.¹⁹⁶

Once the nitro compound **82b** was obtained, we proceeded to study the synthetic route for its branched chain derivative **258a**. In order to attain this objective, the conditions for a similar transformation (that of compound **232a** in Scheme 143, page 326) were slightly modified, since it was possible to use tetrabutylammonium fluoride as the required base (Scheme 164, page 342).

¹⁹⁶ Vega-Pérez, J. M.; Candela, J. I.; Blanco, E.; Iglesias-Guerra, F. "Potential anticancer drugs. Part 3. Alkylating agents from sugars. Stereoselective synthesis of 2,3-diaminoglucoses from 2-nitroalkenes, as intermediates in the synthesis of carriers of chlorambucil" *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9641-9650.



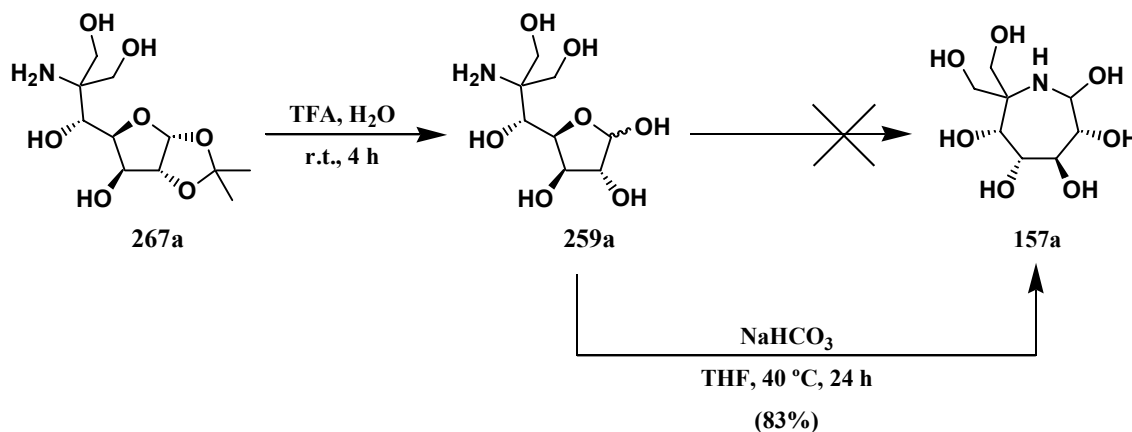
Scheme 164

The Henry reaction was unsuccessful when using excess of paraformaldehyde and catalytic amounts of tetrabutylammonium fluoride (0.5 eq); however, desired compound **258a** was obtained in good yield using stoichiometric amount of tetrabutylammonium fluoride in anhydrous tetrahydrofuran at room temperature for one hour. The presence of the two hydroxymethyl chains was easily established from the ^{13}C -NMR spectrum, which includes two signals at 62.3 and 63.6 ppm corresponding to the two methylene groups and a signal at 95.9 ppm corresponding to the C-6 quaternary carbon.

The catalytic hydrogenation of compound **258a** with ammonium formate and palladium black provided the desired reduction of the nitro group to amine, which was accompanied by the hydrogenolysis of its two benzyloxy substituents. The resulting compound **267a** was easily identified from its analytical and spectroscopical data. In this regard, the absence of signals for benzyl substituents in its ^{13}C -NMR spectrum confirmed the full debenzylation of the starting compound **258a**, and the presence of a signal at 64.2 ppm corresponding to the C-6 quaternary carbon indicates the reduction of nitro group to amino.

Finally, the amino compound **267a** was reacted with trifluoroacetic acid and water at room temperature for four hours (Scheme 165, page 343), but the resulting furanose **259a** did not give the expected spontaneous cyclization to azepane **157a**, because its precursor **259a** was the only product isolated, as it was easily established

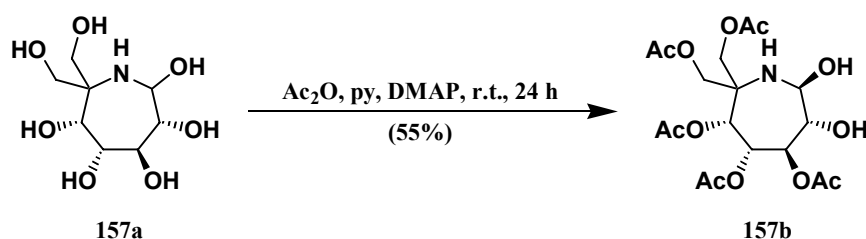
mainly from its ^{13}C -NMR, which clearly shows at 98.6 ppm (major component) and 93.8 ppm (minor component), the signals due to the anomeric carbons.



Scheme 165

However, when sodium carbonate was added to a solution of furanose **259a** in tetrahydrofuran and the stirred mixture was heated at 40 °C for 24 hours, formation of an only compound of higher R_f than that of the starting material was observed. Its ^{13}C -NMR spectrum showed eight carbon signals: two CH₂ groups at 62.3 and 69.8 ppm, five CH groups at 70.2, 72.7, 73.8, 78.5 and 95.6 ppm, and a quaternary carbon at 67.8 ppm. The ^1H -NMR spectrum, which was necessarily obtained in a solution of deuterated methanol, was very complex and not informative.

Although the ^{13}C -NMR spectrum is in accordance with structure **157a**, we decide to transform it into a derivative that may facilitate its characterization. Accordingly a solution of azepane **157a** in a 1:1 mixture of acetic anhydride and pyridine, to which a catalytic amount of *N,N*-dimethylaminopyridine was added, was stirred at room temperature for 24 hours, leading to compound **157b** (Scheme 166).



Scheme 166

Usual work-up followed by column chromatography allowed us to isolate a product, that showed in its ^{13}C -NMR spectrum the presence of signals for five acetyl

groups (20.5, 20.6, 20.6, 20.7 and 20.9 for the methyl groups and 169.6, 169.7, 170.0, 170.1, 170.6 ppm), two CH₂ groups (62.3 and 69.6 ppm), five CH groups (68.0, 68.3, 69.7, 75.5 and 91.2 ppm) and a quaternary carbon (64.4 ppm). This spectroscopic data showed that only five of the eight possible nuclei were acetylated. This must be due to minor reactivity of some nucleus or to steric hindrance. In order to help us to establish what positions were actually acetylated we realized two ¹H-NMR experiments. In the first one compound **157b** was dissolved in deuterated chloroform. In the second one a drop of deuterated water was added to the solution. Comparison of both spectra allowed us to recognize multiplicity changes due to proton-deuterium exchanges (Figure 92).

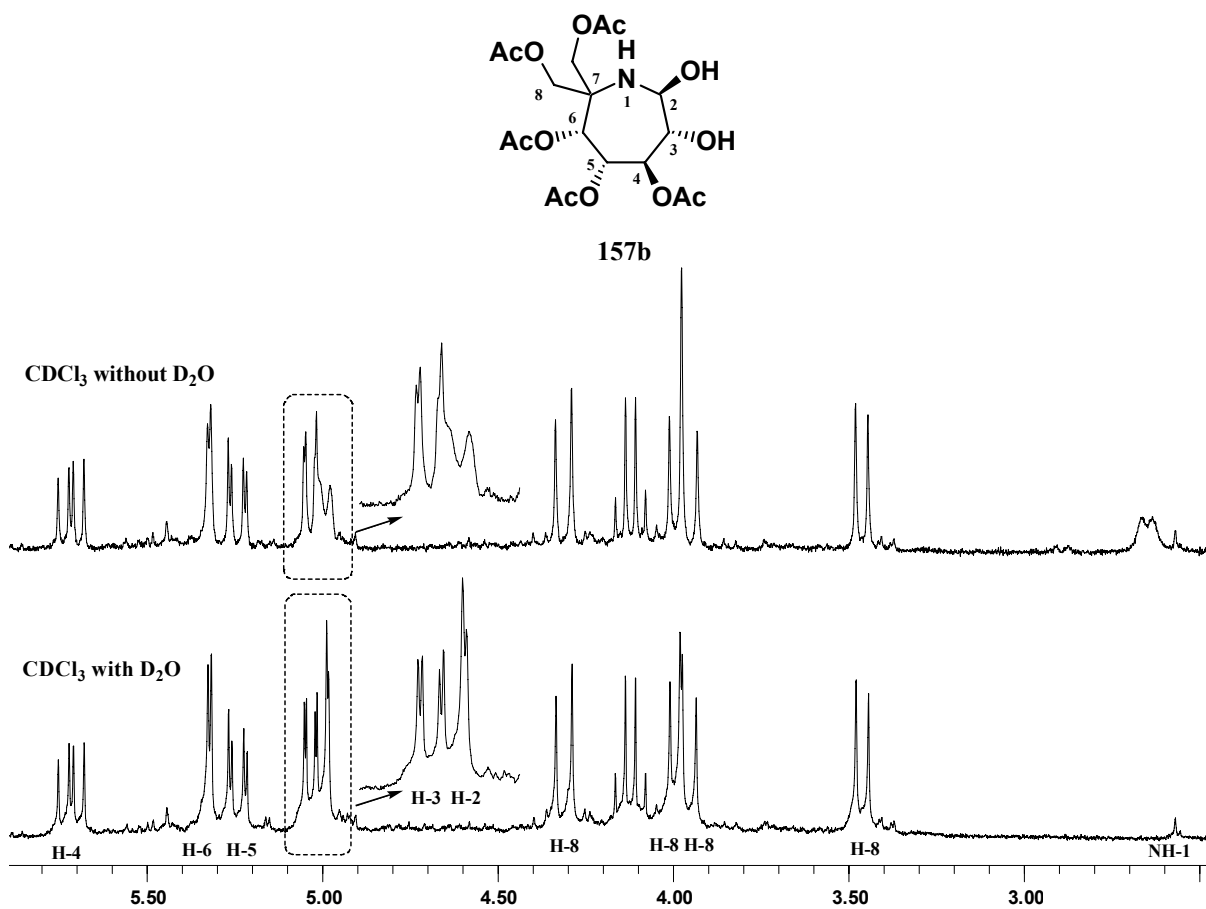


Figure 92: ¹H-NMR detail of **157b** in CDCl₃ and CDCl₃ with D₂O.

As we can see in Figure 92, the signals with changes in their multiplicity were: the multiplet at 2.65 ppm corresponding to NH disappears, the signal of H-2 at 4.99 ppm lost the coupling with the NH and OH signals becoming a doublet with $J_{2,3}=1.6$ Hz, and the signal of H-3 at 5.04 ppm lost its coupling with OH becoming a double doublet with $J_{2,3}=1.6$ Hz and $J_{3,4}=7.1$ Hz. These changes may be explained assuming that the amino group and the hydroxy groups at C-2 and C-3 positions were not acetylated. The coupling constant between H-2 and H-3 ($J_{2,3}=1.6$ Hz) suggested that

the hydroxyl group at C-2 and hydroxyl group at C-3 positions, have a *trans* disposition.

The rest of the spectroscopical data of compound **157b** are stated in Figure 93, together with the published spectroscopical data for the similar compound **228c**¹⁹⁷.

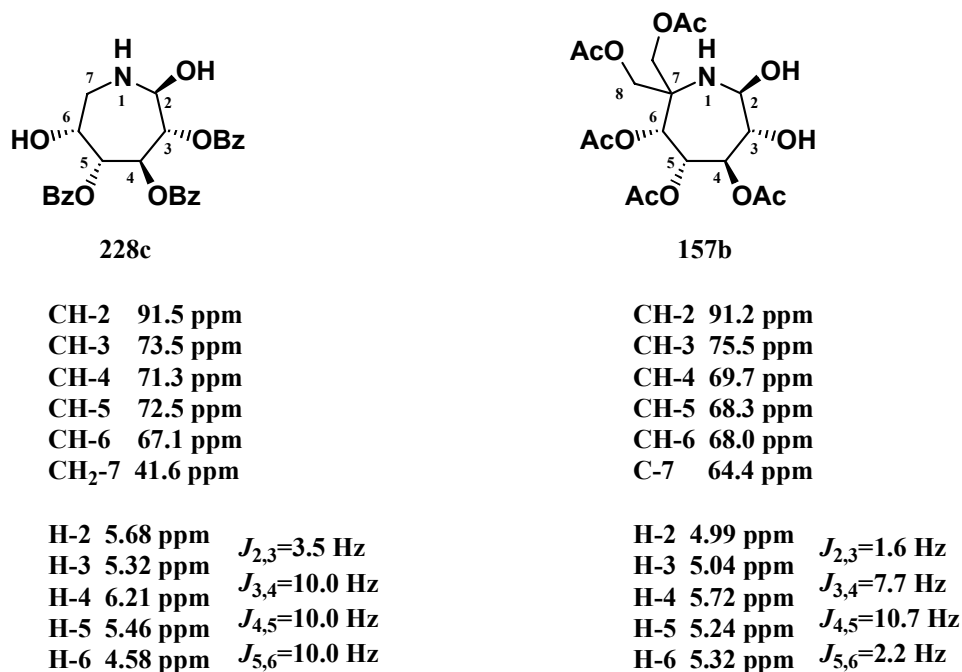


Figure 93: Spectroscopic data for 228c and 157b.

We can see that the shifts for C-2, C-3, C-4, C-5 y C-6 of compound **157b** in ¹³C-NMR are quite similar to those of compound **228c**. Shifts and coupling constants of **157b** protons obtained from its ¹H-NMR spectrum are in accordance with those reported for compound **228c**. These results supported the structure initially proposed for compound **157b** and for its polyhydroxylated analogue **157b**.

Our future plans include extending this methodology to the panel of 6-deoxy-6-nitrohexofuranoses to give rise to a great variety of novel branched azepanes.

¹⁹⁷ Fuentes, J.; Olano, D.; Pradera, M. A. "Efficient synthesis of seven-membered iminocyclitols from glycosylenamines" *Tetrahedron Lett.* **1990**, *40*, 4063-4066.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Técnicas instrumentales.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker® DPX-250 (250 MHz para ^1H y 62.5 MHz para ^{13}C), en un espectrómetro Varian® Mercury 300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C), o en un espectrómetro Bruker® DQX-400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) según se indique. Se utilizó TMS como referencia interna y los desplazamientos químicos vienen dados en la escala δ (ppm).

Los espectros de RMN de ^1H , DEPT y ^{13}C , que se incluyen en ese orden a continuación del procedimiento experimental para la preparación del compuesto al que correspondan, fueron procesados con el software MestReC 4.8.6.0.

Los espectros de masas de ionización química se realizaron en un espectrómetro cuadrupolar Hewlett Packard® 5988A mediante inserción directa, y los espectros de masas de electroespray se realizaron en un espectrómetro VG Autospec 20-250 mediante inserción directa.

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro MIDAC Prospect®-IR con software Grams/386 sobre una pastilla de cloruro sódico.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en un analizador CARLO ERBA EA 1108.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO® DIP-370, empleando una lámpara de Na (589 nm) y una cubeta de 5 cm. Los valores de concentración de la muestra se dan g/100 mL.

Los puntos de fusión se determinaron en un bloque Köfler-Thermogerate® y están sin corregir.

Las cromatografías en columna se hicieron sobre gel de sílice 60 Merck® 230-400 mesh (flash, 0.04-0.063), y las ccf se realizaron sobre gel de sílice 60 GF₂₅₄ Merck®. Como reveladores para visualizar las ccf se utilizó una lámpara UV (λ : 254 y 360 nm) y mezcla Hanessian.

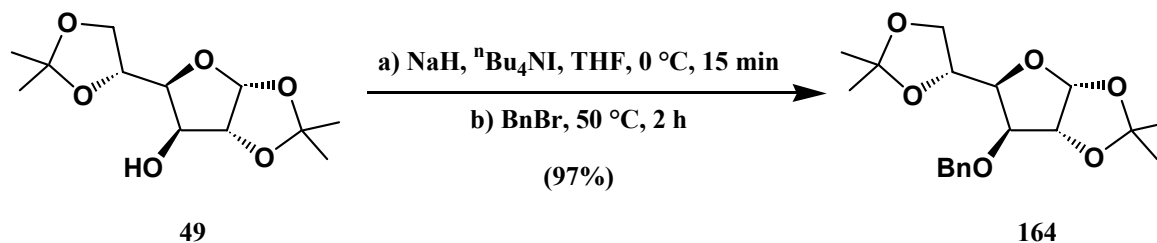
Las reacciones que se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón fueron realizadas en matraces que previamente fueron secados a la llama con un mechero mientras se purgaban con argón y a los que se conectó un globo lleno de argón.

Los reactivos y disolventes se purificaron y secaron según los procedimientos estándares descritos en la bibliografía.¹⁹⁸

¹⁹⁸ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; "Purification of laboratory chemicals" 1988, Pergamon Press, Oxford.

4.2. Procedimientos experimentales.

Preparación de 3-O-bencil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (164).

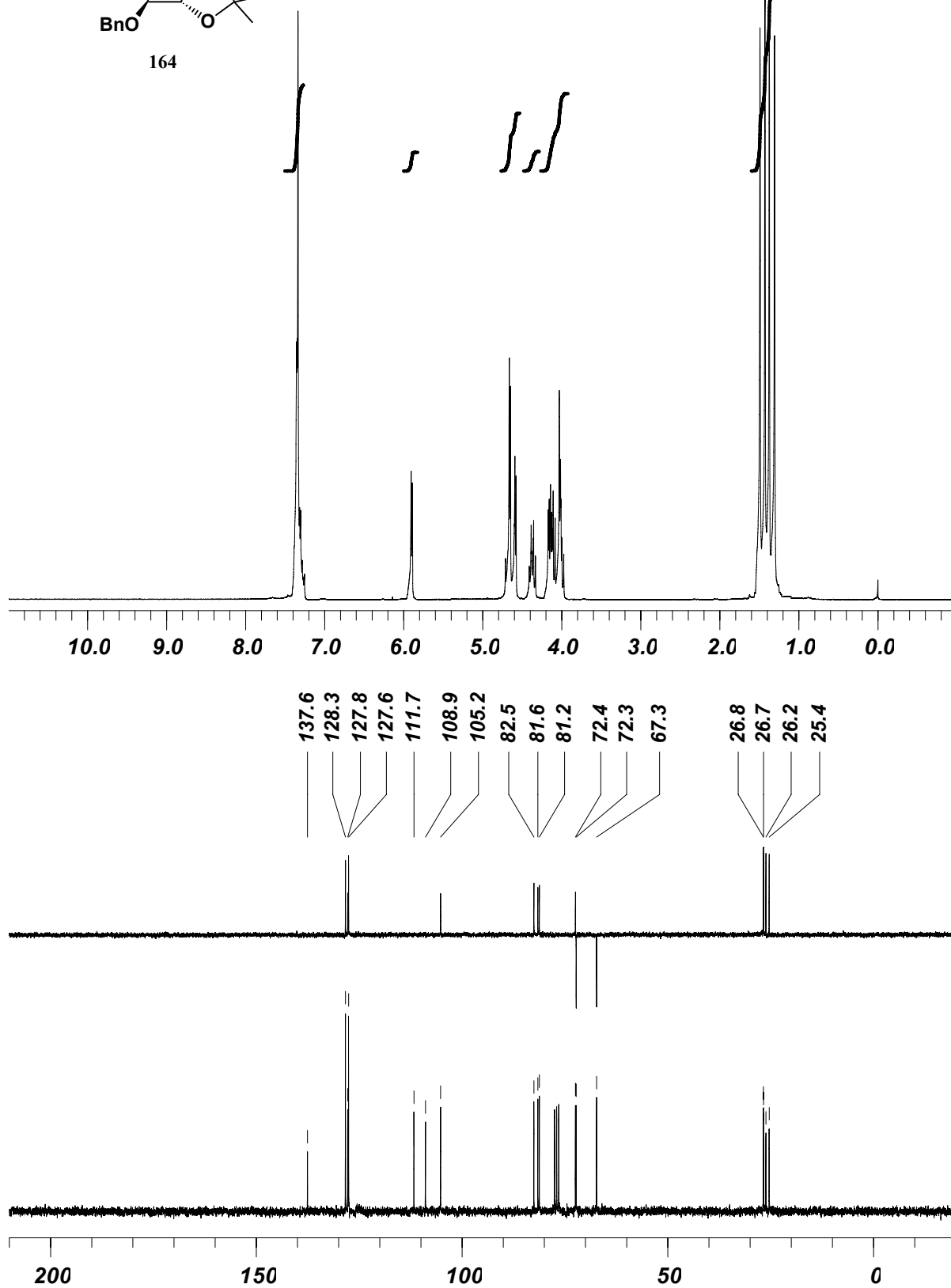
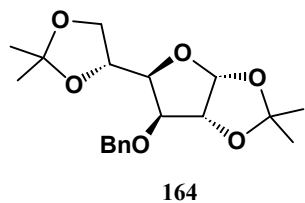


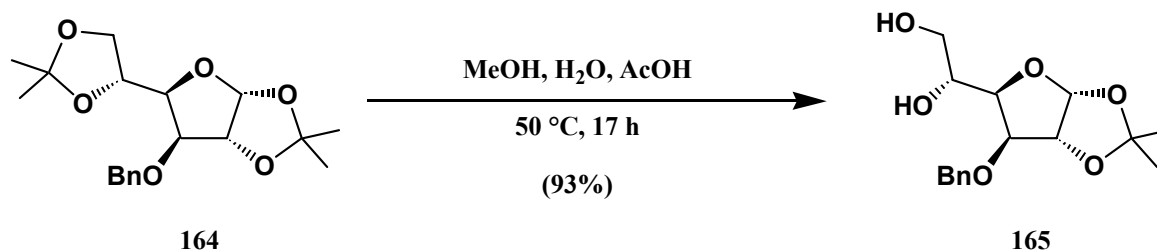
En un matraz de fondo redondo de 250 mL conectado a un refrigerante y bajo atmósfera de argón, se añadieron 1.70 g (42.14 mmoles, 1.2 eq) de hidruro sódico (dispersión del 60% en aceite mineral) y se lavó con hexano seco (3 x 15 mL) para eliminar el aceite. A continuación, se añadieron 0.15 g (0.35 mmoles, 0.01 eq) de yoduro de tetrabutilamonio y 35 mL de THF seco. Sobre esta suspensión enfriada a 0 °C se adicionó una disolución de 9.14 g (35.11 mmoles) de diacetone- α -D-glucosa (49) en 26 mL de tetrahidrofurano seco y tras 15 minutos de agitación se dejó llegar a temperatura ambiente, momento en el cual se añadieron 5.0 mL (42.14 mmoles, 1.2 eq) de bromuro de bencilo y se calentó la mezcla a 50 °C durante 3 horas bajo atmósfera de argón. Transcurrido ese tiempo se observó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:3) la desaparición del producto de partida, se añadieron 12 mL de metanol y se continuó la agitación a 50 °C durante 2 horas más. La mezcla de reacción se filtró a través de celita y la disolución filtrada se concentró a sequedad. El residuo resultante se disolvió en 150 mL de diclorometano, y la disolución se lavó con agua destilada (2 x 100 mL), se secó con sulfato sódico anhidro y se concentró a sequedad, obteniéndose un aceite que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:5), aislándose 11.95 g (34.10 mmoles, 97%) de la 3-O-bencil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (164) como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -29.8° (c 1.1, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH₃); 1.37 (s, 3H, CH₃); 1.43 (s, 3H, CH₃); 1.49 (s, 3H, CH₃); 3.97-4.03 (m, 2H, 2 x H-6); 4.08-4.17 (m, 2H, H-3 + H-4); 4.33-4.41 (m, 1H, H-5); 4.58 (d, 1H, $J_{1,2}$ =3.7 Hz, H-2); 4.58-4.66 (m, 2H, CH₂Ph); 5.90 (d, 1H, $J_{1,2}$ =3.7 Hz, H-1); 7.25-7.35 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.4 (CH₃); 26.2 (CH₃); 26.7 (CH₃); 26.8 (CH₃); 67.3 (CH₂); 72.3 (CH₂); 72.4 (CH); 81.2 (CH); 81.6 (CH); 82.5 (CH); 105.2 (CH); 108.9 (C); 111.7 (C); 127.6 (2 x CH); 127.8 (CH); 128.3 (2 x CH); 137.6 (C).

EM-IQ (m/z, %): 335 (4, [M - CH₃]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).



Preparación de la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**165**).

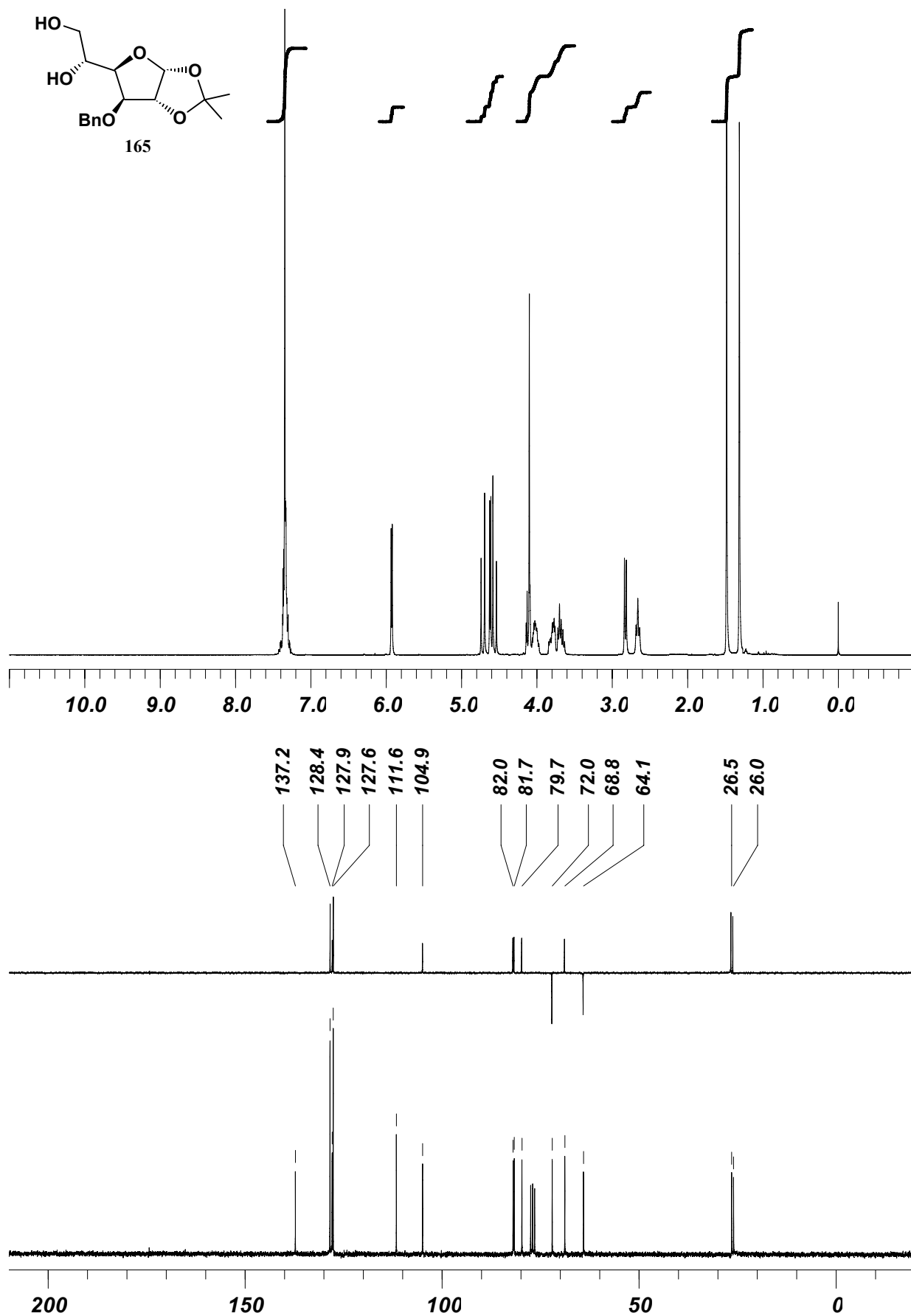
En un matraz de fondo redondo de 250 mL conectado a un refrigerante, se disolvieron 5.88 g (16.78 mmoles) de la 3-O-bencil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**164**) en 69 mL de una mezcla de metanol, ácido acético y agua (1:1:1) y la disolución resultante se calentó a 50 °C durante 17 horas. Al cabo de este tiempo, se observó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:1) la desaparición del producto de partida. El disolvente se eliminó en el rotavapor, se coevaporó el residuo obtenido tres veces con porciones de 30 mL de tolueno y se purificó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 3:2). Se obtuvieron así 4.85 g (15.62 mmoles, 93%) de la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**165**), como un aceite amarillo denso. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -49.9° (c 1.1, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH₃); 1.48 (s, 3H, CH₃); 2.66 (t, 1H, $J_{\text{OH-6}}=J_{\text{OH-6}}=6.0$ Hz, OH-6); 2.82 (d, 1H, $J_{\text{OH-5}}=6.3$ Hz, OH-5); 3.65-3.72 (m, 1H, H-6); 3.75-3.79 (m, 1H, H-6); 4.00-4.05 (m, 1H, H-5); 4.09-4.14 (m, 2H, H-3 + H-4); 4.55 (d, 1H, $J=11.9$ Hz, CH₂Ph); 4.62 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-2); 4.71 (d, 1H, $J=11.9$ Hz, CH₂Ph); 5.92 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1); 7.30-7.37 (m, 5H, 5 x H-Ph).

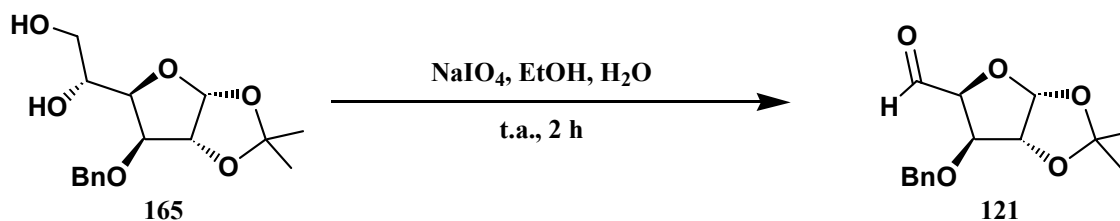
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.0 (CH₃); 26.5 (CH₃); 64.1 (CH₂); 68.8 (CH); 72.0 (CH₂); 79.7 (CH); 81.7 (CH); 82.0 (CH); 104.9 (CH); 111.6 (C); 127.6 (2 x CH); 127.9 (CH); 128.4 (2 x CH); 137.2 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3451 (a, OH).

EM-IQ (m/z , %): 310 (1, M⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

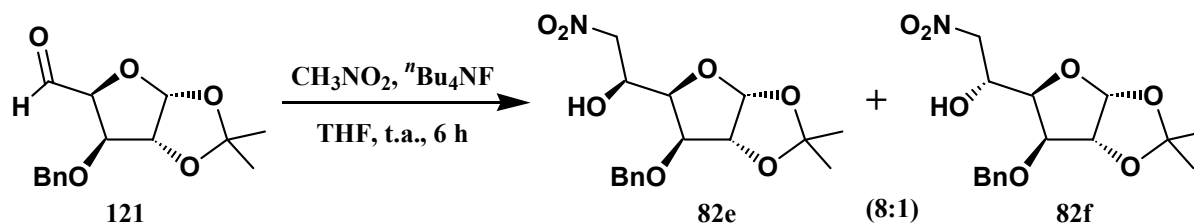


Preparación de la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilo-pentadial-1,4-furanosa (121).



Sobre una disolución de 4.77 g (15.36 mmoles) de la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-glucofuranosa (**165**) en 140 mL de una mezcla de etanol y agua (9:1) se añadieron en varias porciones 9.86 g (46.09 mmoles, 3.0 eq) de peryodato sódico y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Al cabo de este tiempo se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:1) la desaparición del producto de partida y se añadieron 100 mL de diclorometano. La suspensión obtenida se filtró a través de placa filtrante y la disolución filtrada se concentró en el rotavapor a sequedad. Se obtuvo así la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilo-pentadial-1,4-furanosa (**121**), como un aceite claro, que dada su inestabilidad se usó directamente sin purificación adicional.

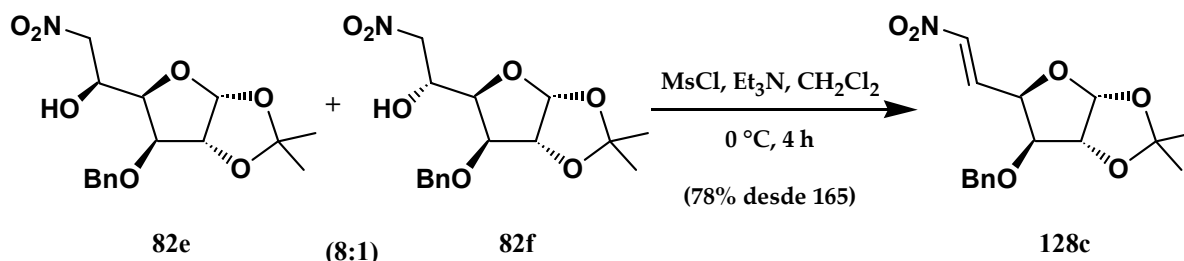
Preparación de la 3-O-bencil-6-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (82e) y la 3-O-bencil-6-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (82f).



En un matraz de fondo redondo de 500 mL purgado en la línea de vacío con la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden- α -D-xilo-pentadial-1,4-furanosa (**121**) recién obtenida, se añadieron 140 mL de tetrahidrofurano seco, 1.0 mL (18.44 mmoles, 1.2 eq) de nitrometano seco y 7.7 mL (7.70 mmoles, 0.5 eq) de fluoruro de tetrabutilamonio (disolución 1.0 M en tetrahidrofurano) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 3 horas. Tras este tiempo se añadieron 300 mL de diclorometano y la nueva mezcla se lavó con agua (3 x 250 mL). La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad, obteniéndose así una mezcla de la 3-O-bencil-6-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**82e**) y la 3-O-bencil-6-desoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**82f**) en relación 8:1 (calculada por RMN-

¹H), espectroscópicamente pura que se utilizó directamente en la etapa siguiente sin purificación adicional.

Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (128c).



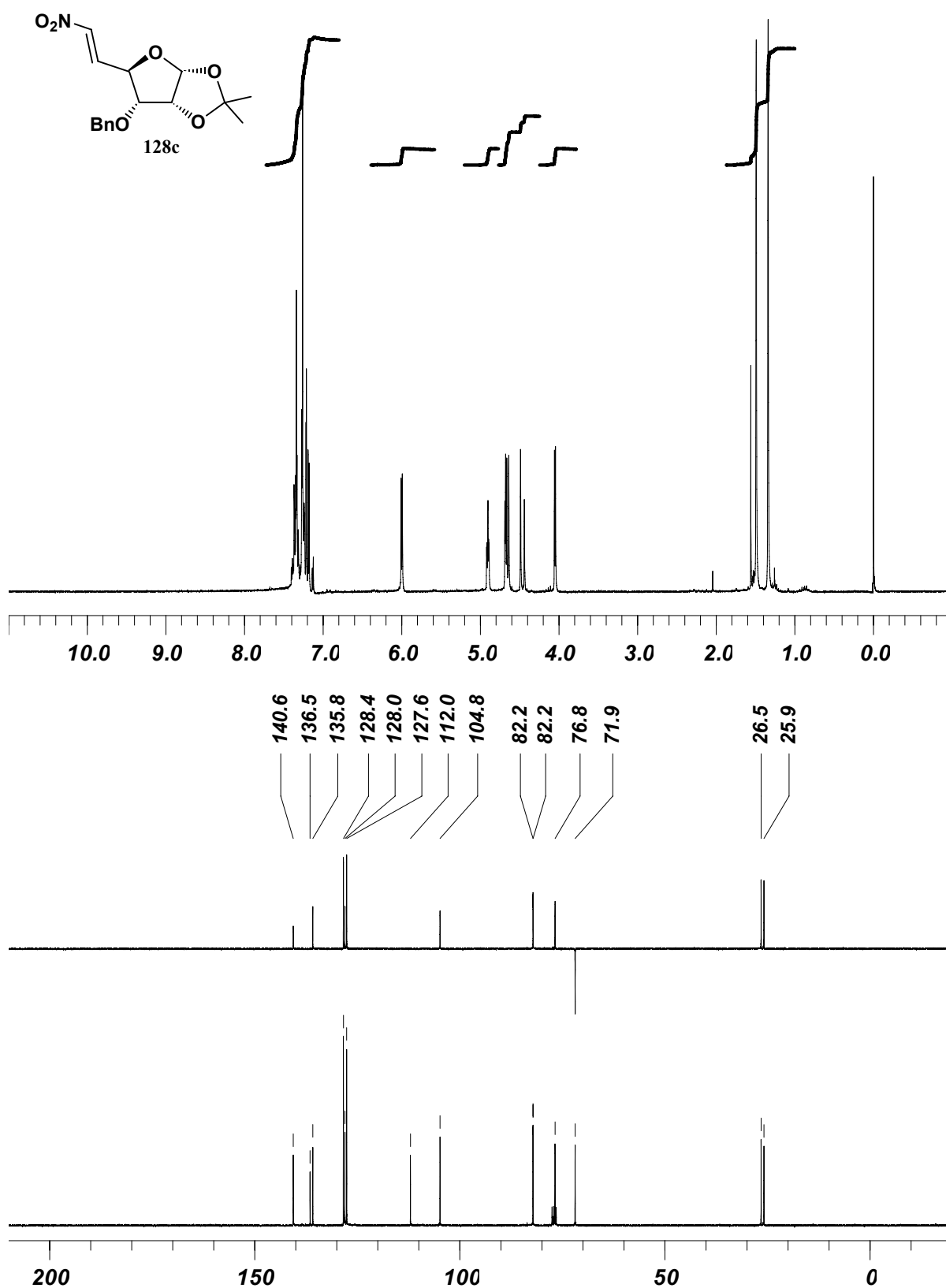
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se disolvieron bajo atmósfera de argón 5.4 g de la mezcla de epímeros **82e** y **82f** obtenida en el proceso anterior (pág. 354) en 18 mL de diclorometano seco. A esta disolución enfriada a 0 °C se le añadieron lentamente 4.8 mL (49.15 mL, 3.2 eq) de cloruro de mesilo y 9.2 mL (66.05 mmoles, 4.3 eq) de trietilamina seca, agitando luego la mezcla a 0 °C bajo atmósfera de argón durante 4 horas, tiempo que tardó en comprobarse por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:3) la desaparición del producto de partida. Una vez filtrada sobre celita la suspensión obtenida, la disolución filtrada se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en 100 mL de diclorometano, lavando luego la disolución resultante con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (2 x 100 mL) y agua destilada (100 mL), secándola con sulfato sódico anhidro, filtrándola y concentrándola a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así un residuo que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), aislándose 3.81 g (11.86 mmoles, 78% desde **165**) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (**128c**), como un aceite amarillo claro. $[\alpha]_D^{20}$: -32.9° (c 1.1, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.34 (s, 3H, CH₃); 1.49 (s, 3H, CH₃); 4.05 (d, 1H, $J_{3,4}$ =3.3 Hz, H-3); 4.46 (d, 1H, J =12.0 Hz, CH₂Ph); 4.66 (d, 1H, J =12.0 Hz, CH₂Ph); 4.67 (d, 1H, $J_{1,2}$ =3.7 Hz, H-2); 4.90 (td, 1H, $J_{4,6}$ =1.2 Hz, $J_{3,4}$ = $J_{4,5}$ =3.3 Hz, H-4); 6.00 (d, 1H, $J_{1,2}$ =3.7 Hz, H-1); 7.16 (dd, 1H, $J_{4,5}$ =3.3 Hz, $J_{5,6}$ =13.4 Hz, H-5); 7.24 (dd, 1H, $J_{4,6}$ =1.2 Hz, $J_{5,6}$ =13.4 Hz, H-6); 7.23-7.37 (m, 5H, 5 x H-Ph).

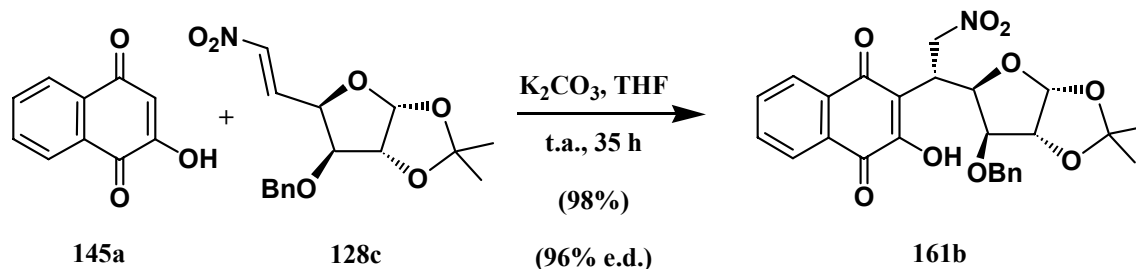
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.9 (CH₃); 26.5 (CH₃); 71.9 (CH₂); 76.8 (CH); 82.2 (CH); 82.2 (CH); 104.8 (CH); 112.0 (C); 127.6 (2 x CH); 128.0 (CH); 128.4 (2 x CH); 135.8 (CH), 136.5 (C); 140.6 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1526 (f, NO₂); 1354 (f, NO₂).

EM-IQ (m/z , %): 322 (1, MH⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).



Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**161b**).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL bajo atmósfera de argón, se disolvieron 0.59 g (1.83 mmoles) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (**128c**) en 17 mL de tetrahidrofurano seco y sobre esta disolución se añadieron 0.31 g (2.12 mmoles, 1.15 eq) de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (**145a**) y 0.51 g (3.65 mmoles, 2.0 eq) de carbonato potásico anhidro. La suspensión obtenida se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 35 horas, tras lo cual se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:6) la desaparición de la nitroolefina **128c** de partida. La disolución roja obtenida se acidificó con disolución acuosa de ácido clorhídrico al 10% hasta viraje a color amarillo, y a continuación el tetrahidrofurano se concentró en el rotavapor y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3 x 20 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad. Se obtuvo de este modo un crudo de reacción del que se aislaron por cromatografía en columna (diclorometano/metanol 60:1 a 30:1) 0.89 g (1.79 mmoles, 98%) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**161b**) en forma de un sólido amorfo de color amarillo, que se cristalizó en una mezcla de diclorometano y heptano aislándose cristales de color amarillo de p.f. 130-131 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +45.6° (c 1.1, CHCl₃).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.54 (s, 3H, CH₃); 1.61 (sa, 1H, OH); 3.73 (d, 1H, $J_{3,4}$ =3.0 Hz, H-3); 4.24 (d, 1H, J =11.6 Hz, CH₂Ph); 4.38 (ddd, 1H, $J_{5,6}$ =4.6 Hz, $J_{4,5}$ =9.7 Hz, $J_{5,6}$ =10.1 Hz, H-5); 4.51 (d, 1H, J =11.6 Hz, CH₂Ph); 4.61 (d, 1H, $J_{1,2}$ =4.0 Hz, H-2); 4.90 (dd, 1H, $J_{3,4}$ =3.0 Hz, $J_{4,5}$ =9.7 Hz, H-4); 4.90 (dd, 1H, $J_{5,6}$ =4.6 Hz, $J_{6,6}$ =12.2 Hz, H-6); 5.00 (dd, 1H, $J_{5,6}$ =10.1 Hz, $J_{6,6}$ =12.2 Hz, H-6); 5.98 (d, 1H, $J_{1,2}$ =4.0 Hz, H-1); 7.07-7.15 (m, 5H, 5 x H-Ph); 7.69-7.83 (m, 2H, H-6' + H-7'); 8.04-8.09 (m, 2H, H-5' + H-8').

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.1 (CH₃); 26.6 (CH₃); 35.1 (CH); 71.4 (CH₂); 75.9 (CH₂); 78.1 (CH); 80.7 (CH); 81.5 (CH); 104.7 (CH); 111.8 (C); 117.7 (C); 126.1 (CH); 126.9 (CH); 127.7 (CH); 128.1 (4 x CH); 129.0 (C); 132.3 (C); 133.0 (CH); 135.1 (CH); 136.2 (C); 154.7 (C); 180.4 (CO); 183.2 (CO).

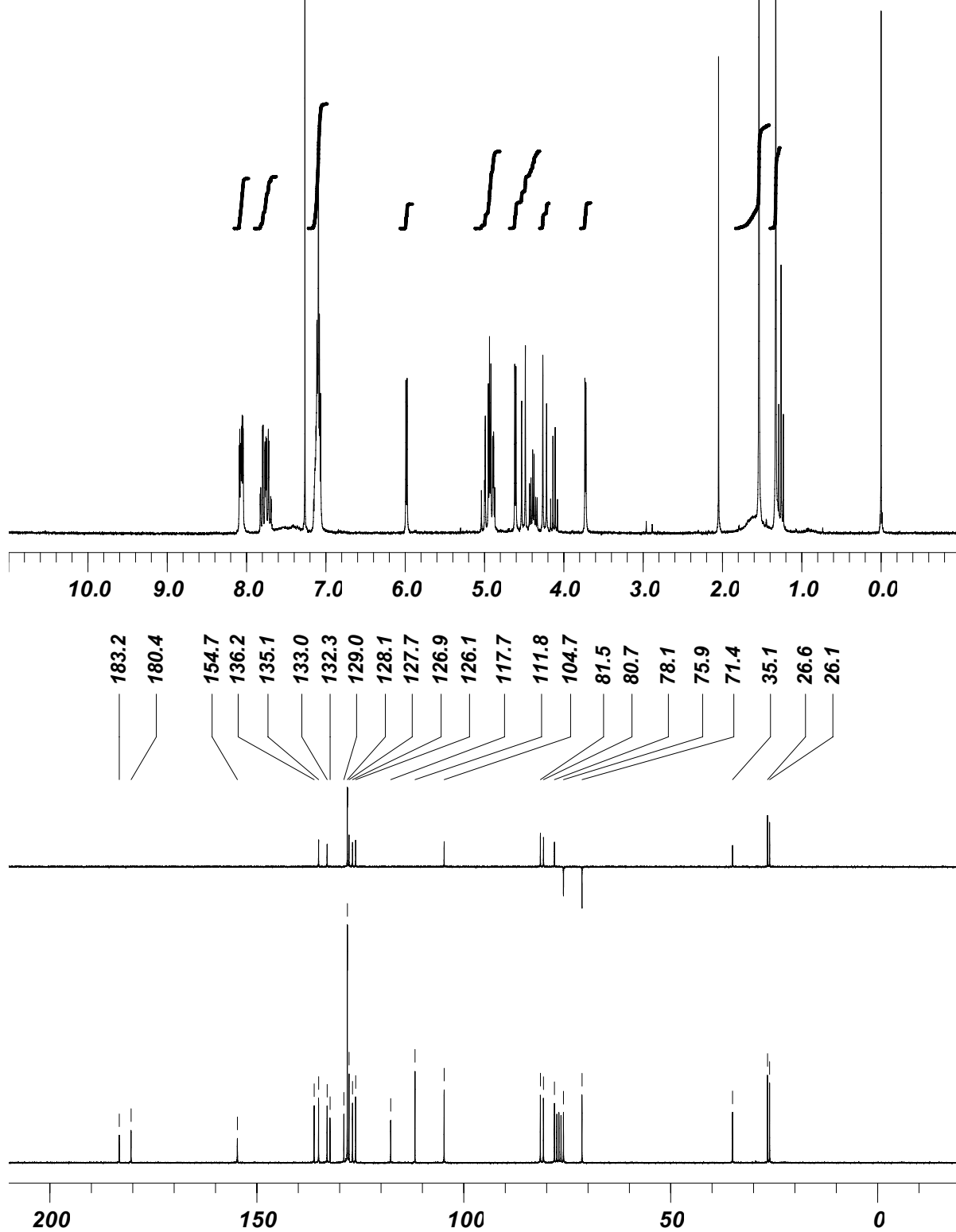
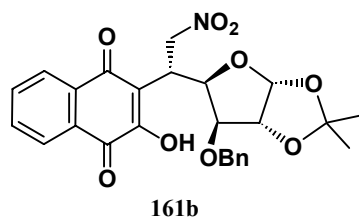
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3359 (a, OH); 1669 (m, CO); 1648 (m, CO); 1552 (f, NO₂); 1380 (f, NO₂).

EM-IQ (m/z , %): 496 (1, MH⁺); 480 (2, [M - CH₃]⁺); 438 (11, [M - C₃H₆O]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

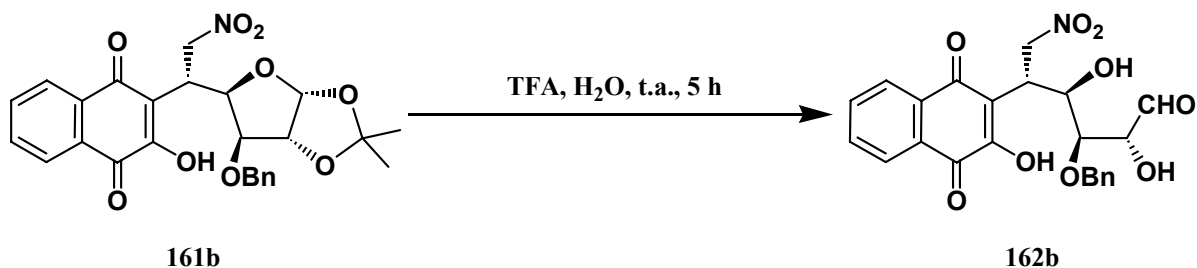
Análisis elemental: calculado para C₂₆H₂₅NO₉: C 63.03, H 5.09, N 2.83; encontrado C 62.74, H 5.15, N 2.81.

Rayos X:

Crystal identification	re07oc1n
Chemical formula	C ₂₆ H ₂₅ NO ₉
Formula weight	495.47
Temperature (K)	293
Wavelength (Å)	0.71069
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> (Å)	10.819(2)
<i>b</i> (Å)	12.807(2)
<i>c</i> (Å)	17.794(3)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Cell volume (Å ³)	2464.5(8)
<i>Z</i>	4
Calculated density (Mg/m ³)	1.335
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.102
<i>F</i> ₀₀₀	1040
Crystal size (mm)	0.47 x 0.36 x 0.14
Description of crystal	Yellow prism
Absorption correction	Semi-empirical from equivalent reflections
Transmission coefficients (min,max)	0.9538, 0.9859
θ range for data collection (°)	1.96 \leq θ \leq 22.40
Index ranges	-12 \leq <i>h</i> \leq 12, 0 \leq <i>k</i> \leq 14, 0 \leq <i>l</i> \leq 20
Reflections measured	21186
Unique reflections	4065
<i>R</i> _{int}	0.0367
Observed reflections (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	2940
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Parameters refined	359
Weighting scheme	Chebyshev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.050
<i>R</i>	0.0362
w <i>R</i>	0.0920
Residual electron density (min,max) (eÅ ⁻³)	-0.147, 0.122

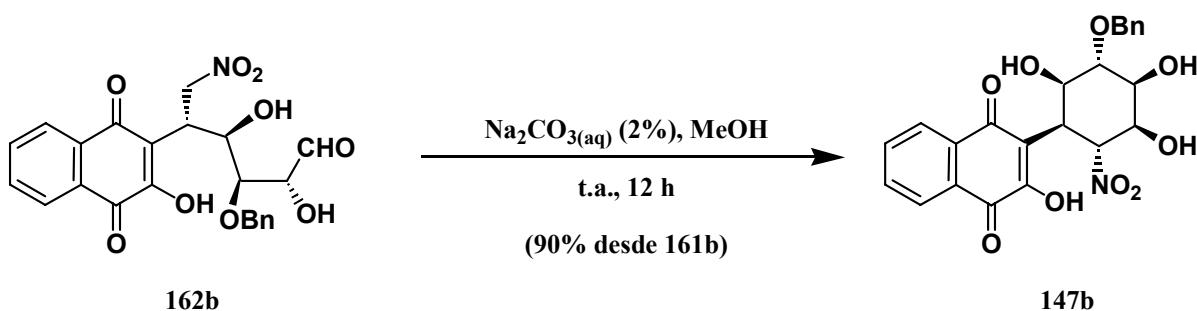


Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitro-D-glucosa (162b).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL a una disolución de 0.25 g (0.51 mmoles) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**161b**) en 1 mL de diclorometano se le añadieron 10 mL de una mezcla 2:1 de ácido trifluoroacético y agua. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, momento en el cual se comprobó por c.c.f. (diclorometano-metanol 20:1) la desaparición del producto de partida. El disolvente se eliminó en el rotavapor y se hicieron luego tres coevaporaciones con 4 mL de tolueno cada una. Se obtuvo así la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitro-D-glucosa (**162b**) como un aceite amarillo cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Preparación del (1S,2S,3S,4R,5R,6R)-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitrociclohexano (147b).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL con el compuesto **162b** obtenido del proceso anterior se añadieron 12 mL de metanol y 4 mL (0.76 mmoles, 1.5 eq) de disolución acuosa al 2% de carbonato sódico, dejando la disolución roja obtenida con agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Tras comprobar por c.c.f. (diclorometano-metanol 10:1) la desaparición del producto de partida se acidificó con resina ácida DOWEX 50 WX4-50 hasta observar viraje de color a naranja, se filtró la mezcla de reacción y la disolución filtrada se concentró a sequedad. El residuo

obtenido se purificó por cromatografía en columna (diclorometano-metanol-ácido acético 10:0.5:0.2), aislándose 0.21 g (0.46 moles, 90% desde **161b**) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitrociclohexano (**147d**) como un sólido amorfo de color naranja que no fue posible cristalizar. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +60.8° (c 4.5, CH₃COCH₃).

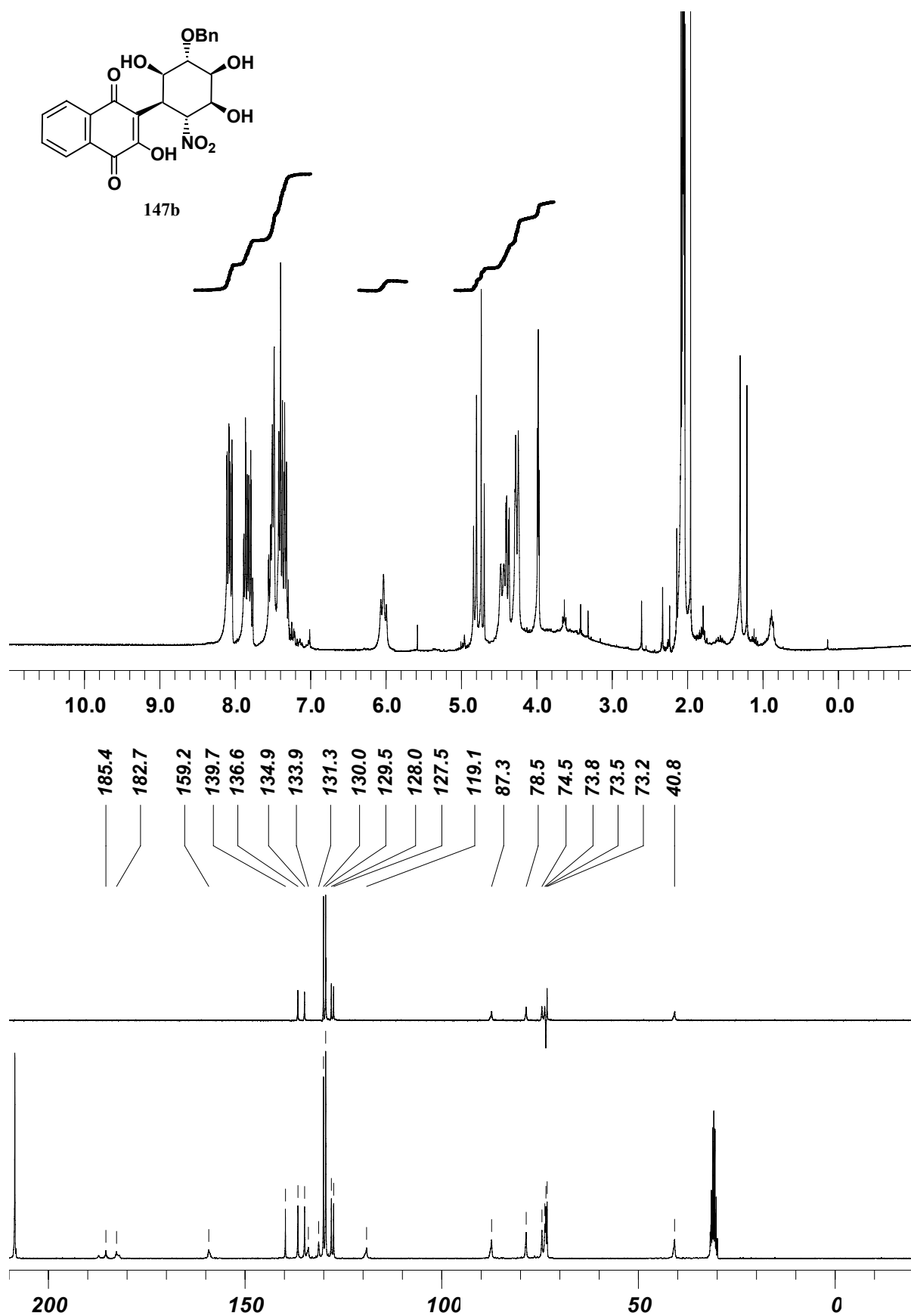
RMN-¹H (CD₃COCD₃, 300 MHz, ppm): 3.98 (t, 1H, $J_{3,4}=J_{2,3}=3.2$ Hz, H-3); 4.24-4.29 (m, 2H, H-2 + H-4); 4.39 (dd, 1H, $J_{1,2}=3.0$ Hz, $J_{1,6}=11.0$ Hz, H-1); 4.46 (d, 1H, $J_{5,6}=11.0$ Hz, H-5); 4.72 (d, 1H, $J=11.8$ Hz, CH₂-Ph); 4.82 (d, 1H, $J=11.8$ Hz, CH₂-Ph); 6.03 (t, 1H, $J_{1,6}=J_{5,6}=11.0$ Hz, H-6); 7.29-7.56 (m, 5H, 5 x H-Ph); 7.76-7.89 (m, 2H, H-6' + H-7'); 8.04-8.11 (m, 2H, H-5' + H-8').

RMN-¹³C (CD₃COCD₃, 62.5 MHz, ppm): 40.8 (CH); 73.2 (CH); 73.5 (CH₂); 73.8 (CH); 74.5 (CH); 78.5 (CH); 87.3 (CH); 119.1 (C); 127.5 (CH); 128.0 (CH); 129.5 (3 x CH); 130.0 (2 x CH); 131.3 (C); 133.9 (C); 134.9 (CH); 136.6 (CH); 139.7 (C), 159.2 (C); 182.7 (CO); 185.4 (CO).

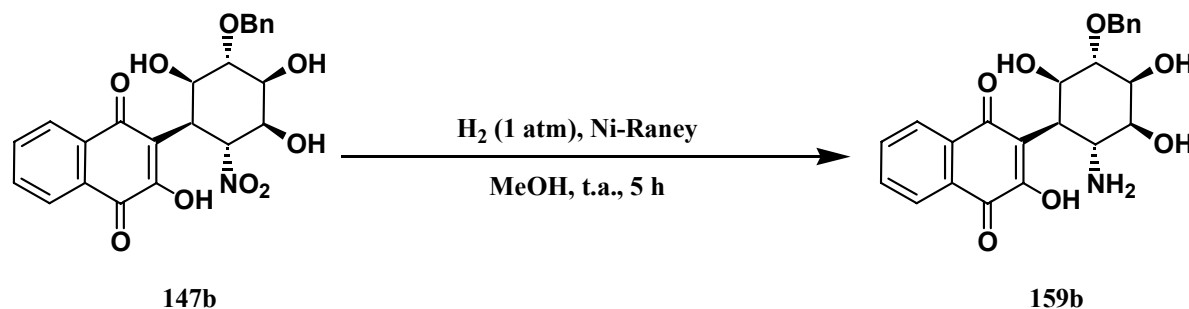
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3393 (a, OH); 1672 (m, CO); 1647 (m, CO); 1554 (f, NO₂); 1371 (m, NO₂).

EM-IQ (m/z , %): 349 (20, [MH - PhCH₂O]⁺); 281 (14, [M - C₁₀H₆O₃]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₂₃H₂₁NO₉: C 60.66, H 4.65, N 3.08; encontrado C 60.73, H 4.98, N 2.65.

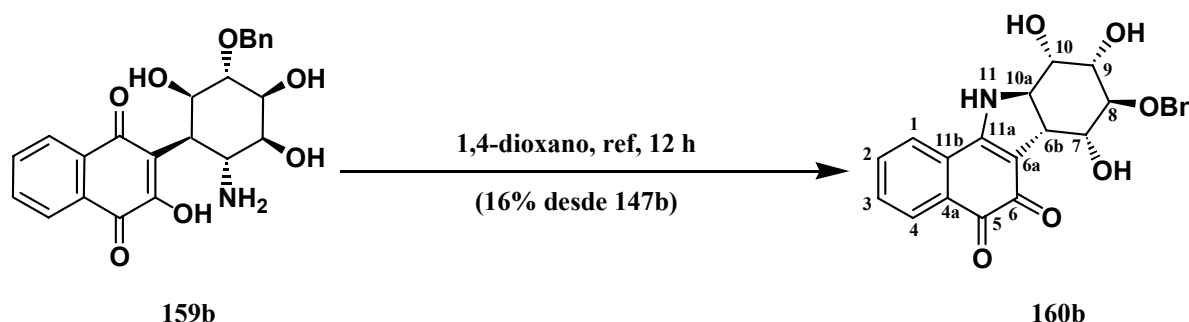


Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (**159b**).



En un matraz de fondo redondo de 10 mL, a una disolución desoxigenada de 0.05 g (0.110 mmoles) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitrociclohexano (**147b**) en 5 mL de metanol se le añadieron 0.10 mL (0.10 g, 200% en peso) de suspensión acuosa de Níquel-Raney. La mezcla se purgó con hidrógeno y se agitó bajo 1 atmósfera de presión de hidrógeno a temperatura ambiente durante 5 horas, cuando se estableció por c.c.f. (diclorometano/metanol 5:1) la desaparición del producto de partida. La suspensión obtenida se filtró sobre celita y la disolución filtrada se concentró a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así un crudo formado por el (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (**159b**) como un aceite amarillo el cual no se pudo purificar cromatográficamente dada su alta polaridad.

Preparación de la (6*bR*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*,10*aR*)-8-benciloxi-7,8,9,10,10*a*,11-hexahidro-7,9,10-trihidroxi-6*bH*-benzo[*a*]carbazol-5,6-diona (**160b**).



En un matraz de fondo de 10 mL acoplado a un refrigerante se calentó a reflujo durante 12 horas una disolución del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (**159b**) obtenido del proceso anterior, en 5 mL de 1,4-dioxano. Se comprobó por c.c.f. (diclorometano/metanol 3:1) la desaparición de la amina de partida y se eliminó el

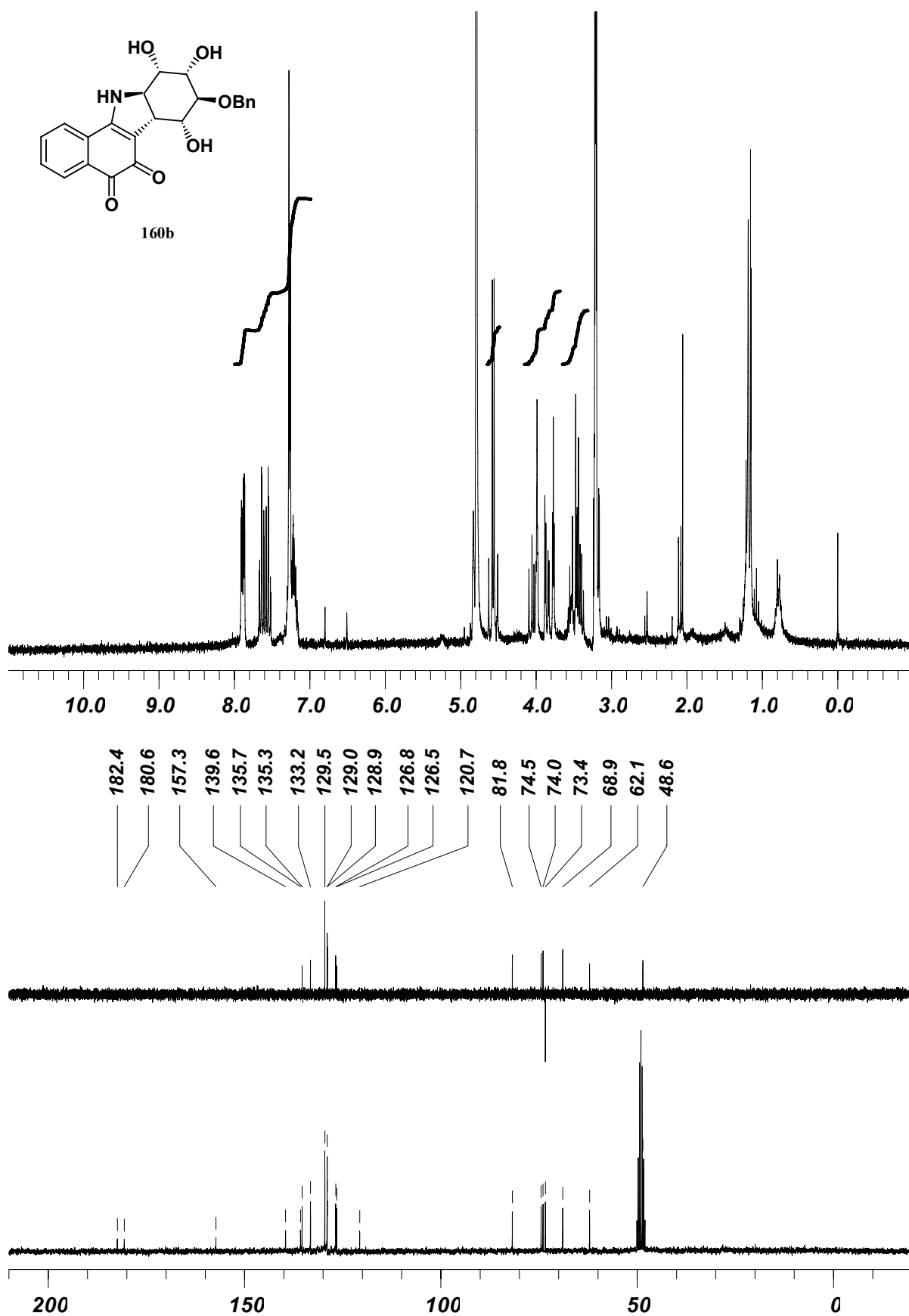
disolvente en el rotavapor, obteniéndose un residuo oscuro que se sometió a cromatografía de capa fina preparativa (diclorometano/metanol 9:1) aislándose 0.007 g (0.018 mmoles, 16%) de la (6*b*R,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*,10*a*R)-8-benciloxi-7,8,9,10,10*a*,11-hexahidro-7,9,10-trihidroxi-6*b*H-benzo[*a*]carbazol-5,6-diona (**160b**) en forma de sólido amorfo de color rojo que se cristalizó de metanol dando lugar a cristales de color rojo de p.f. 193-194 °C. $[\alpha]_D^{20}$: -112.3° (c 0.34, CH₃OH).

RMN-¹H (CD₃OD, 250 MHz, ppm): 3.37-3.57 (m, 2H, H-7 + H-8); 3.77 (t, 1H, $J_{8,9}=J_{9,10}=2.7$ Hz, H-9); 3.85 (dd, 1H, $J_{6b,7}=3.4$ Hz, $J_{6b,10a}=10.4$ Hz, H-6b); 3.97-4.09 (m, 2H, H-10 + H-10*a*); 4.53 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, CH₂-Ph); 4.60 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, CH₂-Ph); 7.16-7.29 (m, 5H, 5 x H-Ph); 7.51-7.67 (m, 2H, H-2 + H-3); 7.86-7.91 (m, 2H, H-1 + H-4).

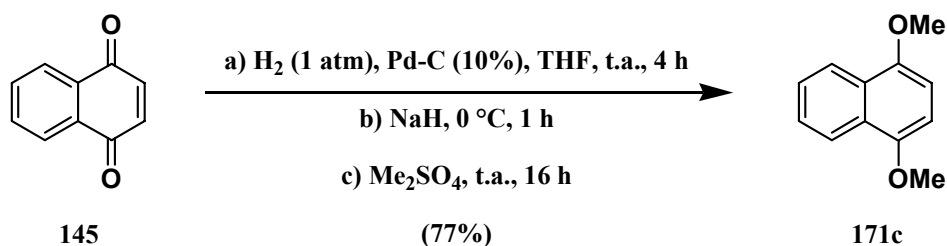
RMN-¹³C (CD₃OD, 62.5 MHz, ppm): 48.6 (CH); 62.1 (CH); 68.9 (CH); 73.4 (CH₂); 74.0 (CH); 74.5 (CH); 81.8 (CH); 120.7 (C); 126.5 (CH); 126.8 (CH); 128.9 (CH); 129.0 (2 x CH); 129.5 (2 x CH); 133.2 (CH + C); 135.3 (CH); 135.7 (C); 139.6 (C); 157.3 (C); 180.6 (C); 182.4 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3341 (a, OH); 1671 (m, CO); 1623 (m, CO).

EM-IQ (*m/z*, %): 409 (42, MH₂⁺); 408 (37, MH⁺); 358 (17); 185 (100).



Preparación del 1,4-dimetoxinaftaleno (171c).

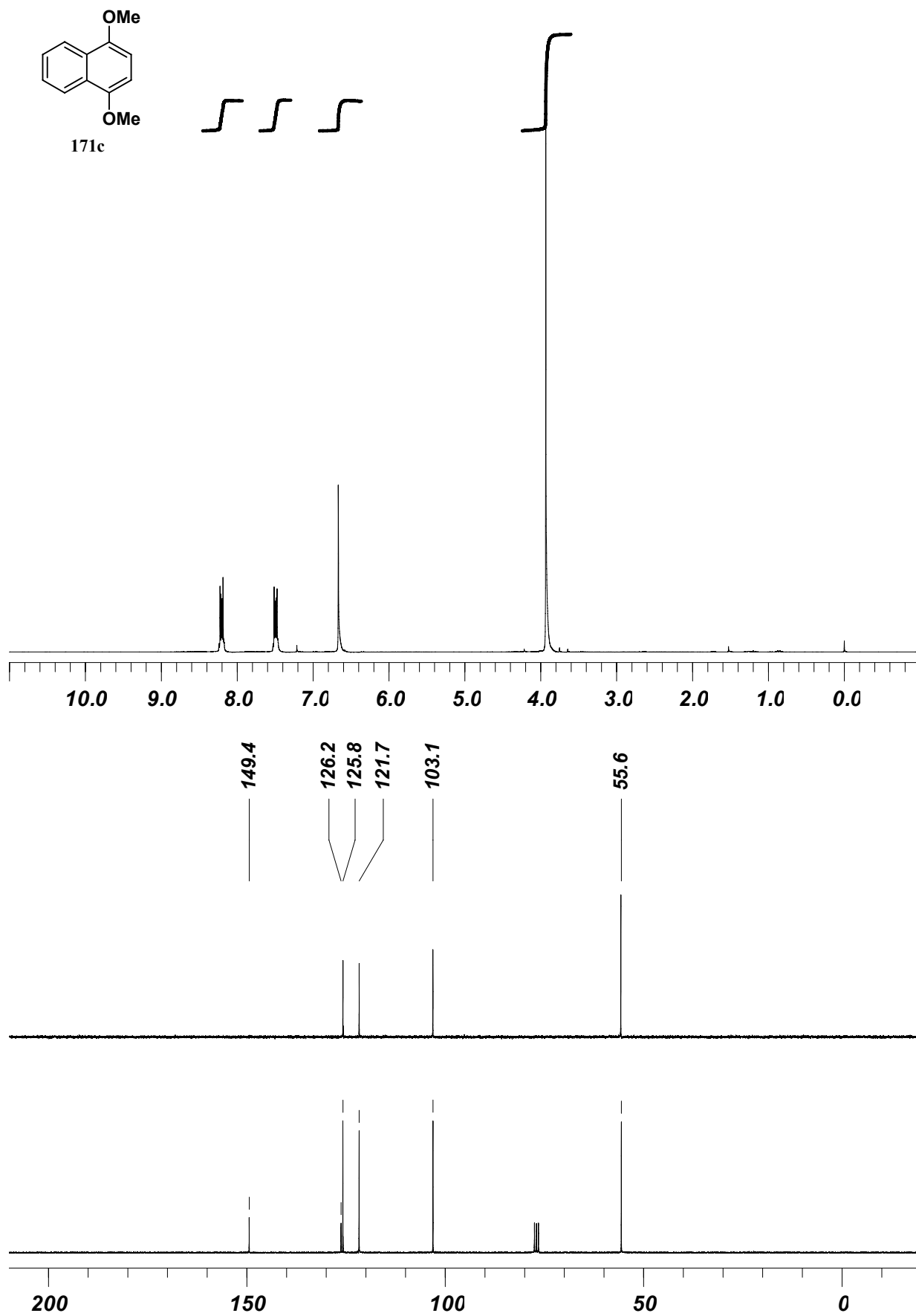


En un matraz de fondo redondo de 250 mL bajo atmósfera de argón, a una disolución desoxigenada de 4.65 g (29.40 mmoles) de 1,4-naftoquinona (**145b**) en 107 mL de tetrahidrofurano seco se le añadieron 2.32 g (5% de paladio en peso) de paladio sobre carbón activo al 10% y la mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno o (1 atmósfera de presión) durante 4 horas, tras lo cual, se purgó el matraz de reacción con argón, se enfrió la mezcla de reacción a 0 °C y se añadieron en varias porciones 3.53 g (88.2 mmoles, 3.0 eq) de hidruro sódico (dispersión del 60% en aceite mineral) que previamente había sido lavado con hexano seco (2 × 10 mL) y secado a vacío para eliminar el aceite mineral. Tras 1 hora de reacción, se añadieron lentamente 13.9 mL (147.0 mmoles, 5.0 eq) de sulfato de dimetilo y se dejó llegar el contenido del matraz a temperatura ambiente. Después de 16 horas de agitación bajo atmósfera de argón, se filtró la mezcla de reacción sobre celita, se concentraron los líquidos filtrados a sequedad en el rotavapor y el residuo obtenido se disolvió en 200 mL de éter etílico y 20 mL de trietilamina, y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos para destruir el exceso de sulfato de dimetilo. Por último, la disolución obtenida se lavó con ácido clorhídrico al 10% (2 × 100 mL), con agua destilada (2 × 100 mL) y con disolución saturada de cloruro sódico (100 mL), se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así un residuo del que por cristalización en éter etílico se aislaron 4.25 g (22.58 mmoles, 77%) de cristales incoloros de p.f. 86-87 °C del 1,4-dimetoxinaftaleno (**171c**).

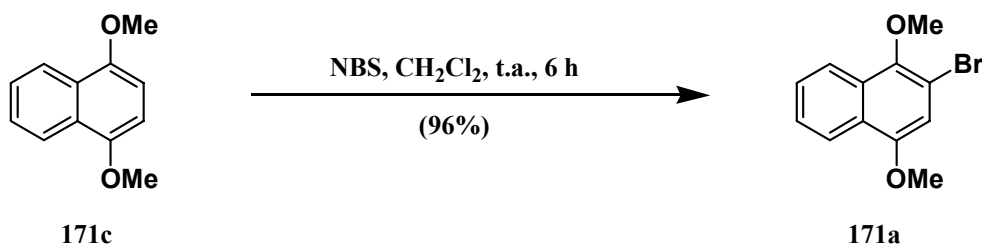
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 3.93 (s, 6H, 2 × OCH₃); 6.67 (s, 2H, H-2 + H-3); 7.49 (dd, 2H, *J*_{5,6}=6.4 Hz, *J*_{5,7}=3.3 Hz, H-6 + H-7); 8.21 (dd, 2H, *J*_{5,6}=6.4 Hz, *J*_{5,7}=3.3 Hz, H-5 + H-8).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 55.6 (2 × OCH₃); 103.1 (2 × CH); 121.7 (2 × CH); 125.8 (2 × CH); 126.2 (2 × C); 149.4 (2 × CO).

EM-IQ (m/z, %): 188 (100, M⁺); 189 (90, MH⁺); 173 (68, [M - CH₃]⁺).



Preparación del 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (171a).

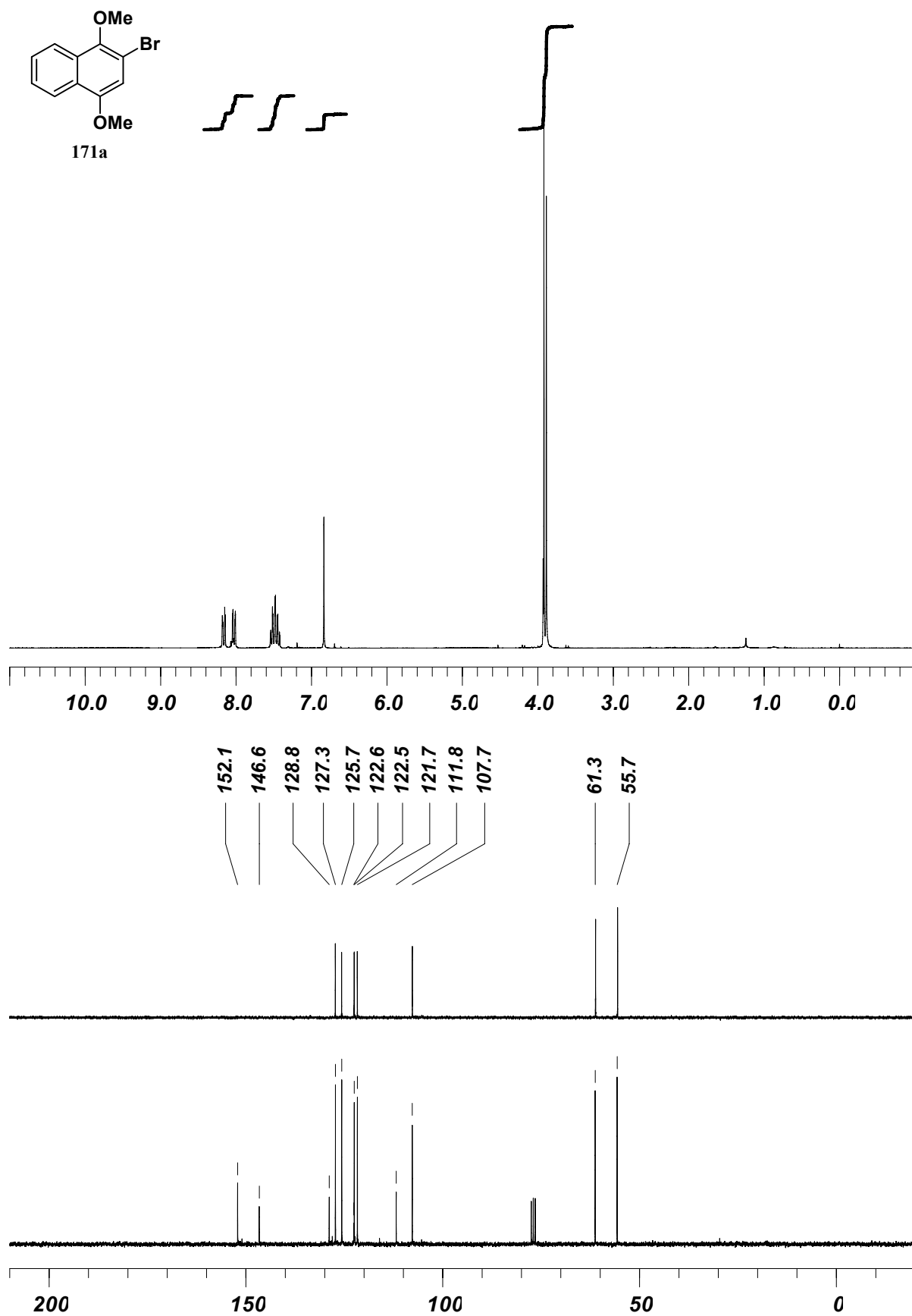


En un matraz de fondo redondo de 250 mL a una disolución de 4.19 g (22.26 mmoles) de 1,4-dimetoxinaftaleno (**171c**) en 130 mL de diclorometano se le añadieron en varias porciones 3.96 g (22.26 mmoles, 1.0 eq) de *n*-bromosuccinimida y la disolución amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Una vez transcurrido este tiempo se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:30) la desaparición del producto de partida. Tras lavar la disolución obtenida con disolución acuosa al 10% de sulfito sódico (4 x 80 mL), se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Se obtuvo así un residuo que por cristalización en etanol acuoso (80%) se obtuvieron 5.73 g (21.45 mmoles, 96%) de cristales incoloros de p.f. 59-60 °C del 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (**171a**).

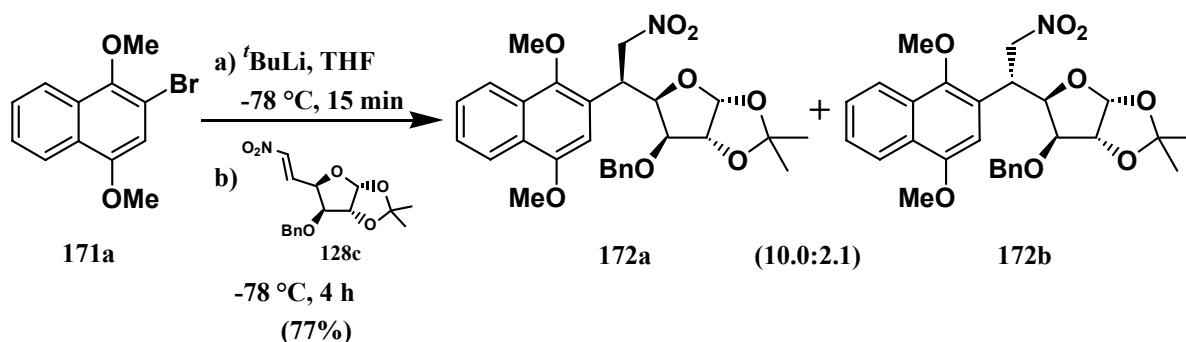
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 3.89 (s, 3H, OCH₃); 3.92 (s, 3H, OCH₃); 6.83 (s, 1H, H-3); 7.42-7.54 (m, 2H, H-6 + H-7); 8.01-8.05 (m, 1H, H-5); 8.14-8.18 (m, 1H, H-8).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 55.7 (OCH₃); 61.3 (OCH₃); 107.7 (CH); 111.8 (C); 121.7 (CH); 122.5 (CH); 122.6 (C); 125.7 (CH); 127.3 (CH); 128.8 (C); 146.6 (CO); 152.1 (CO).

EM-IQ (m/z, %): 267 + 269 (51 + 49, MH⁺); 266 + 268 (81 + 85, M⁺); 188 (100, [MH - Br]⁺).



Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro-β-L-idofuranosa (**172a**).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL bajo atmósfera de argón, a una disolución de 0.54 g (2.02 mmoles, 1.2 eq) de 2-bromo-1,4-dimetoxinaftaleno (**171a**) en 4 mL de tetrahidrofurano seco, enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, se le añadieron 1.9 mL (4.04 mmoles, 2.5 eq) de *t*-butillitio (disolución 2.1 M en pentano) y la mezcla obtenida se agitó a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Se añadió luego con una cánula una disolución de 0.52 g (1.61 mmoles) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (**128c**) en 4 mL de tetrahidrofurano seco. La mezcla obtenida se agitó a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de argón durante 4 horas, tras lo cual se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:3) la desaparición de la nitroolefina **128c** de partida. Se añadieron 10 mL de diclorometano y 10 mL de disolución acuosa saturada de cloruro amónico, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (2 x 10 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad, obteniéndose un crudo de reacción compuesto por una mezcla de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-β-L-idofuranosa (**172a**) y la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**172b**) en relación 10.0:2.1 (65% e.d., calculado por RMN- ^1H) que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6), aislándose 0.64 g (1.26 mmoles, 77%) de la mezcla inseparable **172a** + **172b**. El compuesto mayoritario **172a** se pudo aislar puro por cristalización de esta mezcla en éter etílico, obteniéndose 0.44 g (0.87 mmoles, 54%) en forma de cristales transparentes de p.f. $145\text{-}147\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -86.4° (c 1.5, CHCl_3).

RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 1.29 (s, 3H, CH_3); 1.47 (s, 3H, CH_3); 3.79 (s, 3H, OCH_3); 3.83 (d, 1H, $J_{3,4}=2.8\text{ Hz}$, H-3); 3.93 (s, 3H, OCH_3); 4.50 (d, 1H, $J=12.0\text{ Hz}$, CH_2Ph); 4.60 (dd, 1H, $J_{4,5}=8.0\text{ Hz}$, $J_{3,4}=2.8\text{ Hz}$, H-4); 4.63 (d, 1H, $J_{1,2}=3.7\text{ Hz}$, H-2); 4.70-4.74 (m, 1H, H-5); 4.75 (d, 1H, $J=12.0\text{ Hz}$, CH_2Ph); 4.80 (dd, 1H, $J_{6,6}=12.9\text{ Hz}$, $J_{5,6}=4.3\text{ Hz}$, H-6); 5.01 (dd, 1H, $J_{6,6}=12.9\text{ Hz}$, $J_{5,6}=9.6\text{ Hz}$, H-6); 5.92 (d, 1H, $J_{1,2}=3.7\text{ Hz}$, H-1); 6.62 (s, 1H, H-3'); 7.33-7.42 (m, 5H, 5 x H-Ph); 7.46 (dd, 1H, $J_{5,6}=8.3\text{ Hz}$, $J_{6,7}=7.1\text{ Hz}$, H-6'); 7.52 (dd, 1H, $J_{7,8}=8.3\text{ Hz}$, $J_{6,7}=7.1\text{ Hz}$, H-7'); 8.01 (d, 1H, $J_{7,8}=8.3\text{ Hz}$, H-8'); 8.19 (d, 1H, $J_{5,6}=8.3\text{ Hz}$, H-5').

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.1 (CH₃); 26.6 (CH₃); 37.7 (CH); 55.5 (OCH₃); 62.5 (OCH₃); 71.4 (CH₂); 75.7 (CH₂); 79.7 (CH); 81.2 (CH); 82.0 (CH); 102.0 (CH); 104.5 (CH); 111.7 (C); 122.2 (CH); 122.3 (CH); 124.1 (C); 125.6 (CH); 126.3 (C); 126.7 (CH); 127.2 (2 x CH); 128.2 (CH); 128.4 (C); 128.7 (2 x CH); 136.9 (C), 148.2 (C); 152.2 (C).

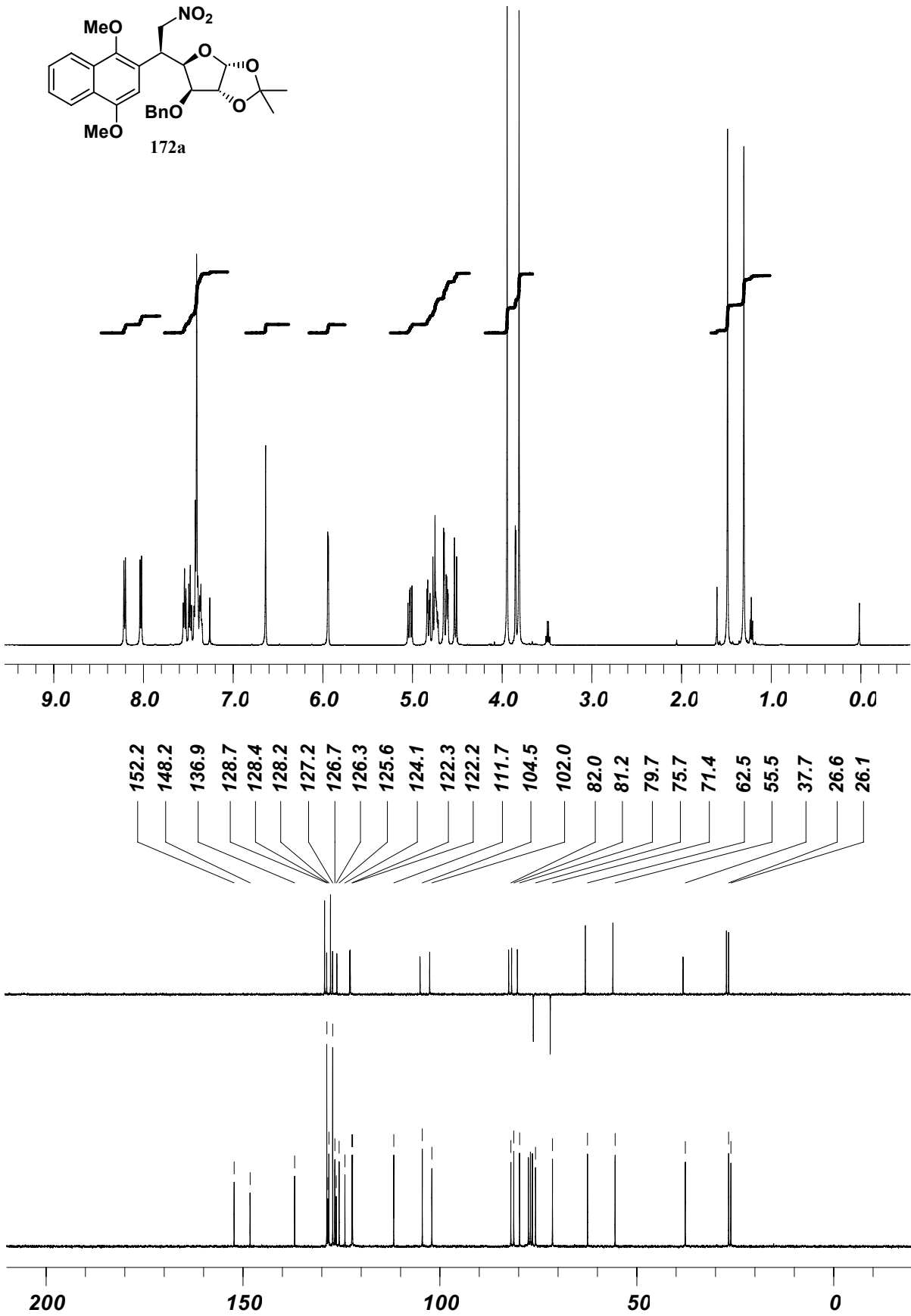
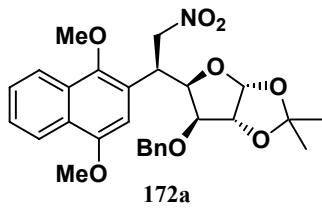
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1558 (f, NO₂); 1367 (f, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 509 (4, M⁺); 91 (25, [PhCH₂]⁺); 29 (100).

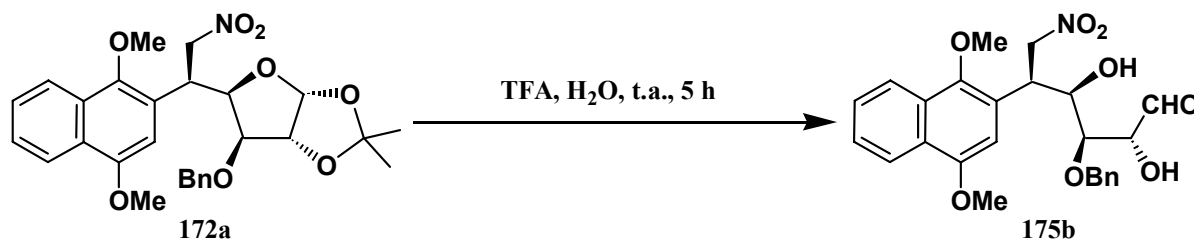
Análisis elemental: calculado para C₂₈H₃₁NO₈: C 66.00, H 6.13, N 2.75; encontrado C 65.89, H 6.03, N 2.55.

Rayos X:

Crystal identification	re03ocn
Chemical formula	C ₂₈ H ₃₁ NO ₈
Formula weight	509.54
Temperature (K)	293
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	9.7351(10)
<i>b</i> (Å)	12.9049(13)
<i>c</i> (Å)	11.0950(11)
α (°)	90
β (°)	108.266(2)
γ (°)	90
Cell volume (Å ³)	1323.6(2)
Z	2
Calculated density (Mg/m ³)	'not measured'
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.094
F ₀₀₀	540
Crystal size (mm)	0.6 x 0.21 x 0.05
Description of crystal	Colourless prism
Absorption correction	multi-scan 'symmetry-related measurements'
Transmission coefficients (min, max)	0.785708, 1
θ range for data collection (°)	1.93 \leq θ \leq 26.45
Index ranges	-12 \leq <i>h</i> \leq 11, -16 \leq <i>k</i> \leq 16, 0 \leq <i>l</i> \leq 1
Reflections measured	5398
Unique reflections	5398
R _{int}	0.0238
Observed reflections (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	3909
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Parameters refined	339
Weighting scheme	Chebychev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.067
R	0.0399
wR	0.0947
Residual electron density (min, max) (eÅ ⁻³)	-0.142, 0.211

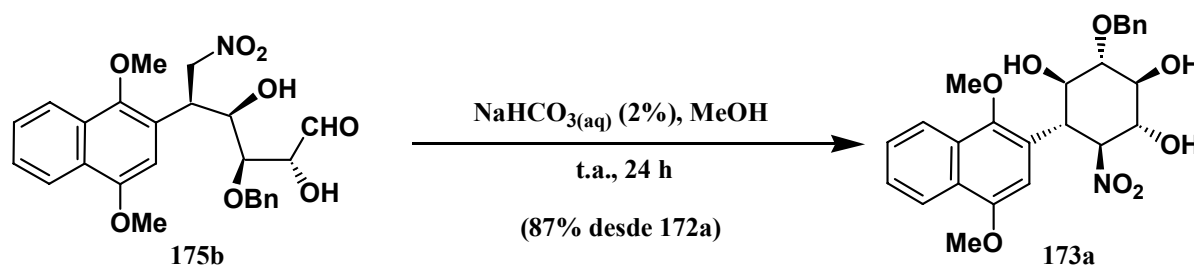


Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-6-nitro-L-idosa (175b).



Se hicieron reaccionar 0.39 g (0.76 mmoles) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro-β-L-idofuranosa (**172a**) en las condiciones de reacción descritas para la preparación de **162b** (pág. 360), obteniéndose la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-6-nitro-L-idosa (**175b**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Preparación del (1R,2S,3S,4R,5S,6S)-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxi-6-nitrociclohexano (173a).



El compuesto **175b** obtenido del proceso anterior se sometió a las condiciones de reacción descritas para la preparación de **147b** (pág. 360), utilizando disolución acuosa al 2% de bicarbonato sódico en lugar de disolución acuosa al 2% de carbonato sódico. Se obtuvo de este modo, tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:1), 0.31 g (0.66 moles, 87% desde **172a**) del (1R,2S,3S,4R,5S,6S)-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxi-6-nitrociclohexano (**173a**) como un sólido amorfo de color blanco que no se consiguió cristalizar. $[\alpha]_{D^{20}}$: +15.7° (c 2.00, CHCl₃).

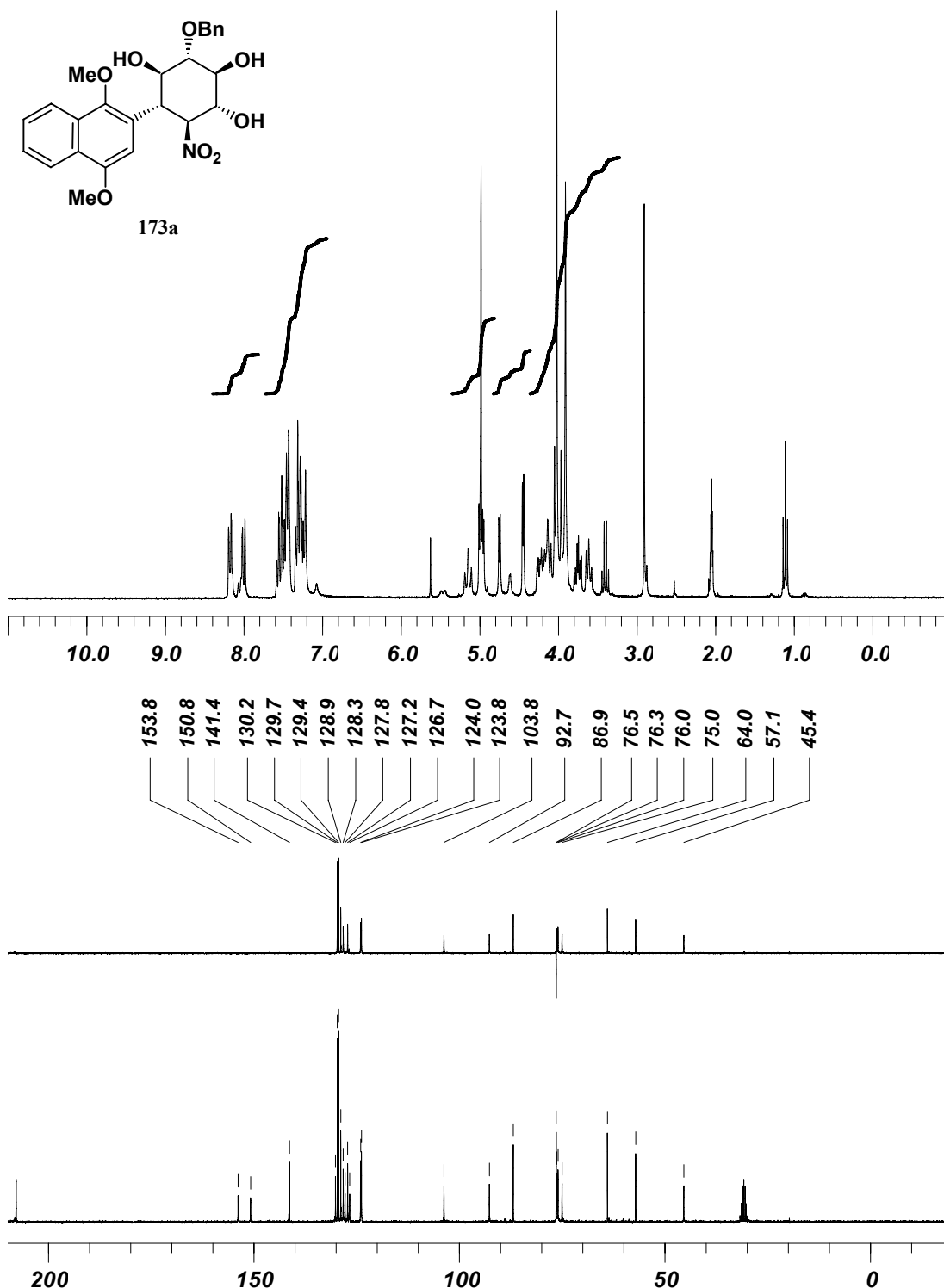
RMN-¹H (CD₃COCD₃, 250 MHz, ppm): 3.61 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=8.8$ Hz, H-3); 3.75 (ddd, 1H, $J_{2,OH}=4.3$ Hz, $J_{2,3}=8.8$ Hz, $J_{1,2}=9.1$ Hz, H-2); 3.91 (s, 3H, OCH₃); 3.96-4.06 (m, 1H, H-5); 4.02 (s, 3H, OCH₃); 4.09-4.15 (m, 1H, H-4); 4.21 (ddd, 1H, $J_{1,OH}=4.6$ Hz, $J_{1,2}=9.1$ Hz, $J_{1,6}=10.3$ Hz, H-1); 4.45 (d, 1H, $J_{2,OH}=4.3$ Hz, OH-2); 4.75 (d, 1H, $J_{1,OH}=4.6$ Hz, OH-1); 4.95-5.01 (m, 3H, OH-4 + CH₂Ph); 5.15 (t, 1H, $J_{1,6}=J_{5,6}=10.3$ Hz, H-6); 7.21 (s, 1H, H-3'); 7.24-7.35 (m, 3H, 3 x H-Ph); 7.40-7.58 (m, 4H, 2 x H-Ph + H-6' + H-7'); 7.98-8.19 (m, 2H, H-5' + H-8').

RMN-¹³C (CD₃COCD₃, 62.5 MHz, ppm): 45.4 (CH); 57.1 (OCH₃); 64.0 (OCH₃); 75.0 (CH); 76.0 (CH); 76.3 (CH); 76.5 (CH₂); 86.9 (CH); 92.7 (CH); 103.8 (CH); 123.8 (CH); 124.0 (CH); 126.7 (C); 127.2 (CH); 127.8 (C); 128.3 (CH); 128.9 (CH); 129.4 (2 x CH), 129.7 (2 x CH); 130.2 (C); 141.4 (C); 150.8 (C); 153.8 (C).

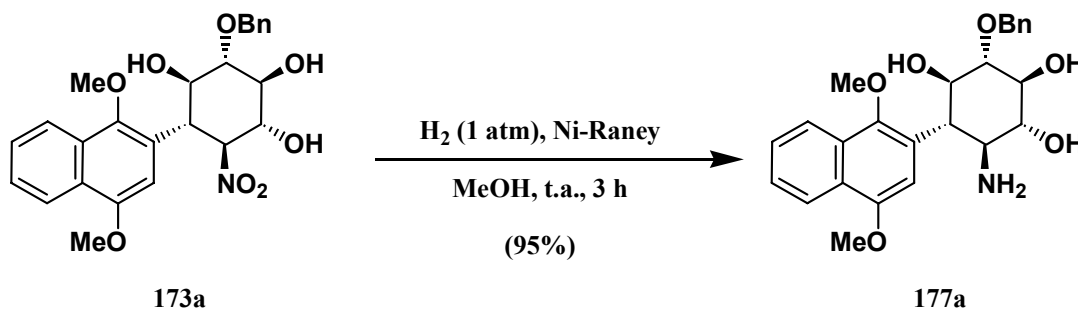
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3434 (a, OH); 1557 (f, NO₂); 1371 (f, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 469 (5, M⁺); 133 (100); 91 (25, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₂₅H₂₇NO₈: C 63.96, H 5.80, N 2.98; encontrado C 63.71, H 5.59, N 3.29.

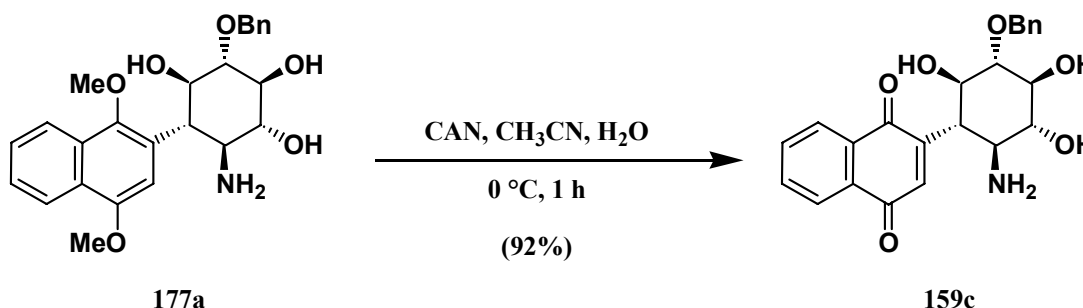


Preparación del (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-amino-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxiciclohexano (177a).



Se sometieron 0.061 g (0.13 mmoles) del (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxi-6-nitrociclohexano (173a) a las condiciones de hidrogenación descritas para la preparación de 159b (pág. 363), obteniéndose 0.053 g (0.12 mmoles, 95%) del (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-amino-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxiciclohexano (177a) como un aceite incoloro cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente reacción sin purificación adicional.

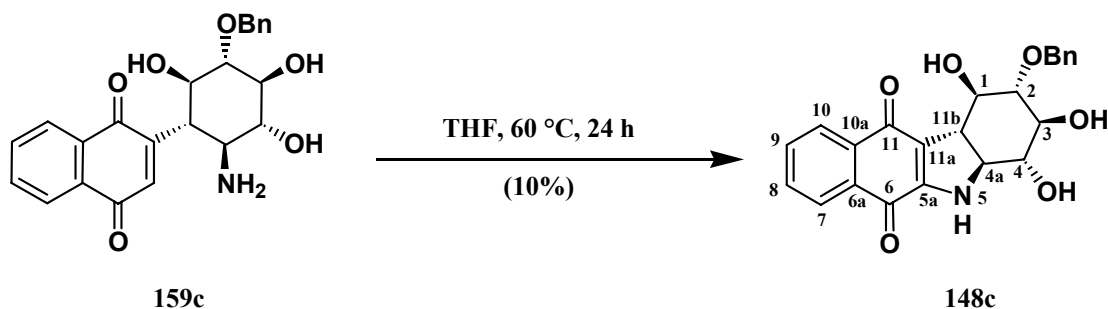
Preparación del (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (159c).



En un matraz de fondo redondo de 10 mL, a una disolución de 0.053 g (0.12 mmoles) del (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-amino-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxiciclohexano (177a) en 1 mL de acetonitrilo acuoso (90%), enfriada a 0 °C, se le añadió lentamente una disolución de 0.20 g (0.36 mmoles, 3.0 eq) de nitrato cérico amónico en 0.5 mL de acetonitrilo acuoso (50%). Se agitó la disolución obtenida a 0 °C durante 1 hora y tras comprobar por c.c.f. (diclorometano-metanol 9:1) la desaparición del producto de partida, se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de acetona, se filtró el sólido insoluble y se concentró el líquido filtrado a sequedad. Se obtuvieron así 0.045 g (0.11 mmoles, 92%) del (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(1',4'-

naftoquinon-2'-il)ciclohexano (**159c**) como un aceite amarillo cromatográficamente puro que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Preparación de la (1R,2S,3S,4R,4aS,11bS)-2-benciloxi-1,2,3,4,4a,5-hexahidro-1,3,4-trihidroxi-11bH-benzo[b]carbazol-6,11-diona (148c**).**



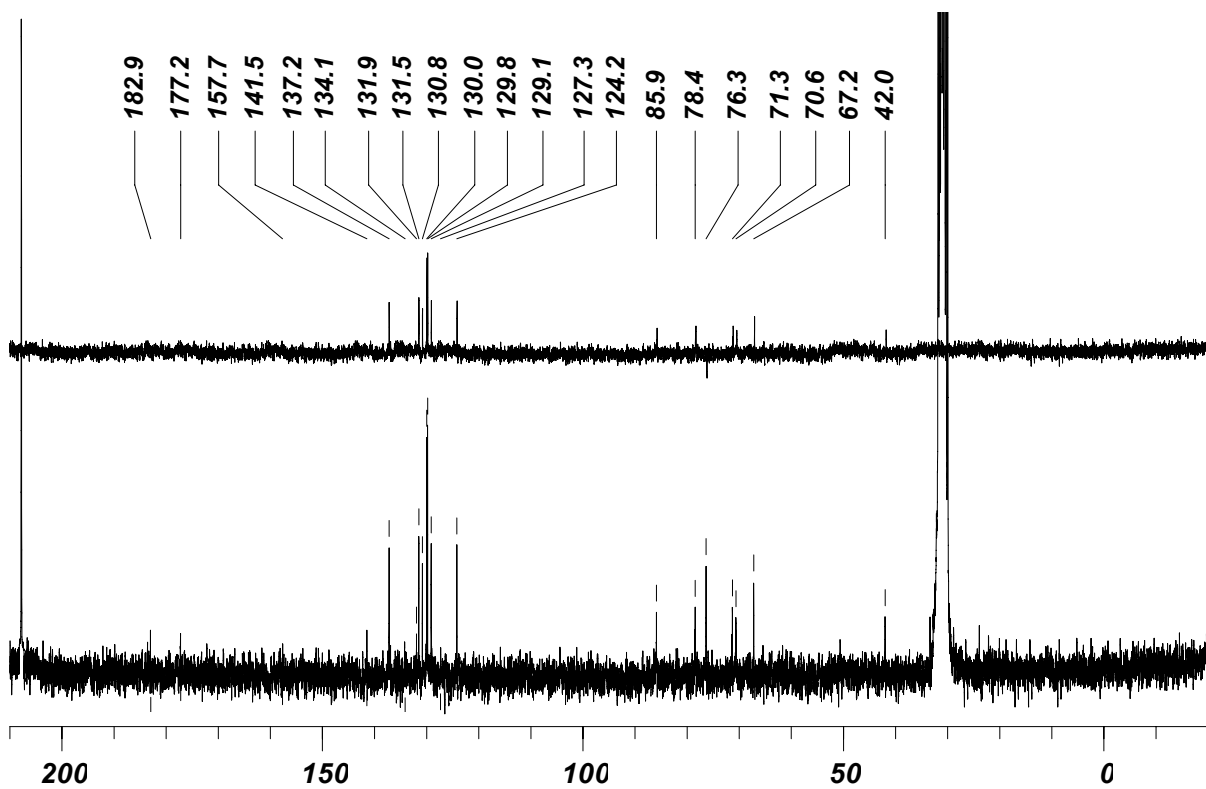
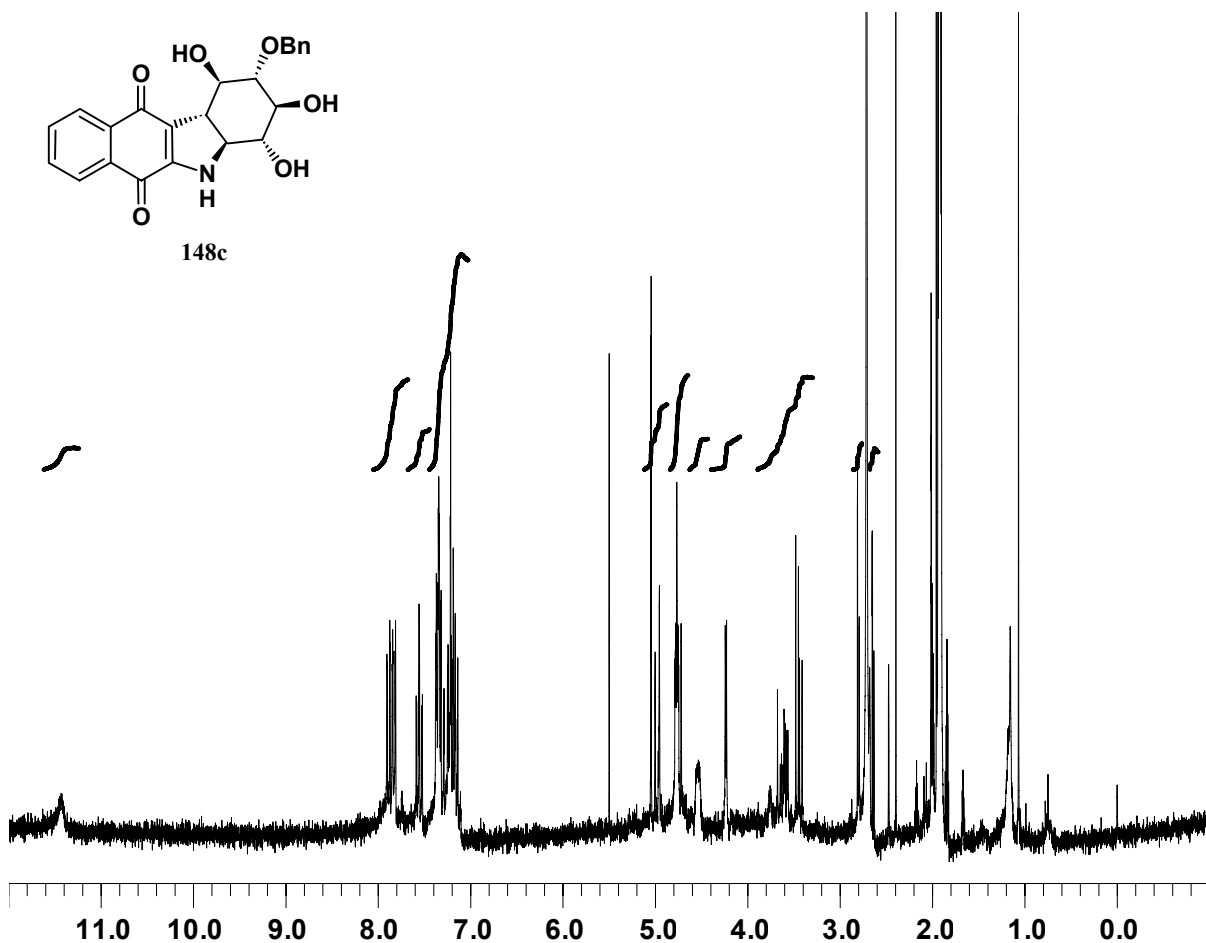
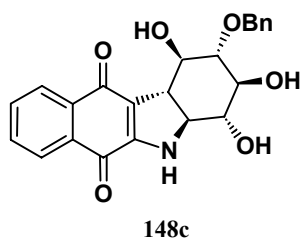
En un matraz de fondo redondo de 10 mL conectado a un refrigerante se disolvieron 0.045 g (0.11 mmoles) del (1R,2S,3S,4R,5S,6S)-6-amino-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(1',4'-naftoquinon-2'-il)ciclohexano (**159c**) en 3 mL de tetrahidrofurano y la disolución obtenida se calentó a 60 °C durante 24 horas. Tras este tiempo se comprobó por c.c.f. (diclorometano/metanol 4:1) la desaparición del producto de partida y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El crudo de reacción resultante se sometió a cromatografía de capa fina preparativa (diclorometano/metanol 9:1), aislándose 0.004 g (0.011 mmoles, 10%) de la (1R,2S,3S,4R,4aS,11bS)-2-benciloxi-1,2,3,4,4a,5-hexahidro-1,3,4-trihidroxi-11bH-benzo[b]carbazol-6,11-diona (**148c**) como un sólido amorfo de color violeta oscuro que se cristalizó de metanol para dar cristales de color violeta de p.f. >260 °C (descomposición). $[\alpha]_{D^{20}}$: +26.0° (c 0.10, CH₃COCH₃).

RMN-¹H (CD₃COCD₃, 250 MHz, ppm): 2.64 (s, 1H, OH); 2.80 (s, 1H, OH); 3.57 (dd, 1H, $J_{1,11b}=7.3$ Hz, $J_{4a,11b}=9.9$ Hz, H-11b); 3.73 (ddd, 1H, $J_{4a,5}=3.1$ Hz, $J_{4,4a}=7.5$ Hz, $J_{4a,11b}=9.9$ Hz, H-4a); 4.36 (d, 1H, $J=3.4$ Hz, OH); 4.63-4.69 (m, 1H, H-2); 4.87 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂Ph); 4.87-4.91 (m, 2H, H-1 + H-4); 5.11 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂Ph); 5.17 (d, 1H, $J_{2,3}=1.3$ Hz, H-3); 7.26-7.51 (m, 6H, 5 x H-Ph + H-7); 7.68 (td, 1H, $J=1.3$ Hz, $J=7.5$ Hz, H-10); 7.94-8.03 (m, 2H, H-8 + H-9), 11.42 (sa, 1H, NH).

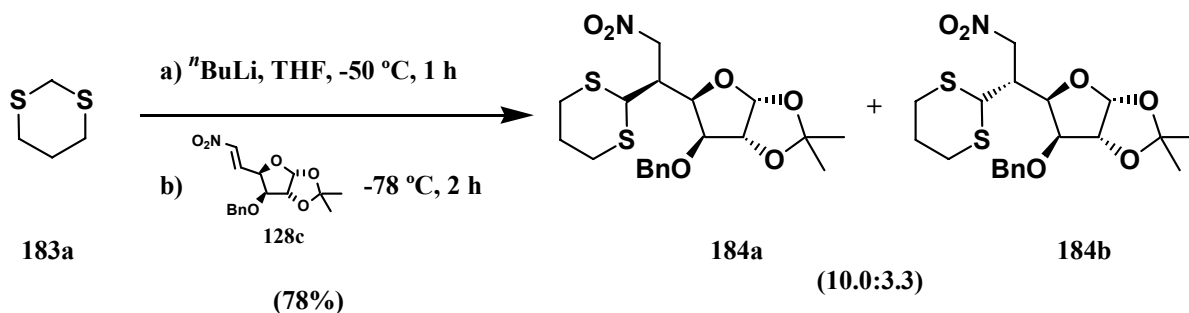
RMN-¹³C (CD₃COCD₃, 62.5 MHz, ppm): 42.0 (CH); 67.2 (CH); 70.6 (CH); 71.3 (CH); 76.3 (CH₂); 78.4 (CH); 85.9 (CH); 124.2 (CH); 127.3 (C); 129.1 (CH); 129.8 (2 x CH); 130.0 (2 x CH); 130.8 (CH); 131.5 (CH); 131.9 (C); 134.1 (C); 137.2 (CH); 141.5 (C); 157.7 (C); 177.2 (CO); 182.9 (CO).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3434 (a, OH + NH); 1661 (m, CO).

EM-FAB⁺ (m/z, %): 407 (1, M⁺); 390 (5, [M - OH]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).



Preparación de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**184a**).



En un matraz de fondo redondo de 250 mL bajo atmósfera de argón, a una disolución de 1.38 g (11.46 mmoles, 1.2 eq) de 1,3-ditiano (**183a**) en 15 mL de tetrahidrofurano seco, enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, se le añadieron 7.76 mL (12.42 mmoles, 1.3 eq) de *n*-butillitio (disolución 1.6 M en hexano) y la mezcla se agitó a $-50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora. Tras este tiempo, se añadió con una cánula una disolución de 3.07 g (9.55 mmoles) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (**128c**) en 15 mL de tetrahidrofurano seco. La mezcla obtenida se agitó a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de argón durante 2 horas, tras lo cual se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:3) la desaparición de la nitroolefina **128c**. Se añadieron luego sobre la mezcla de reacción 50 mL de diclorometano y 50 mL de disolución acuosa saturada de cloruro amónico. Una vez separada la fase orgánica, se extrajo la fase acuosa con diclorometano (2 x 50 mL) y las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo de este modo un crudo de reacción compuesto por una mezcla de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**184a**) y la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**184b**) en relación 10.0:3.3 (50% de e.d., calculado por RMN- ^1H). Este crudo se agitó con hexano caliente hasta la precipitación de un sólido blanco, que se filtró y se lavó con etanol. Se obtuvo así en esta precipitación 1.56 g (3.53 mmoles, 37%) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**184a**) como sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de éter etílico produciendo cristales incoloros de p.f. $155\text{-}157\text{ }^\circ\text{C}$ y $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -35.0° (c 1.75, CHCl_3). El hexano de la disolución filtrada se eliminó en el rotavapor y el residuo aceitoso remanente se sometió a cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6) aislándose 1.73 g (3.91 mmoles, 41%) de una mezcla inseparable de **184a** y **184b**, de la cual por cristalización en éter etílico, se aislaron 0.68 g (1.55 mmoles, 16%) del estereoisómero mayoritario **184a**. El estereoisómero minoritario **184b** no pudo aislarse puro, por lo que no fue caracterizado.

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.52 (s, 3H, CH₃); 1.80-2.13 (m, 2H, 2 × H-ditiano); 2.70-2.91 (m, 4H, 4 × H-ditiano); 3.42-3.51 (m, 1H, H-5); 4.03 (d, 1H, $J_{3,4}=3.1$ Hz, H-3); 4.17 (d, 1H, $J_{5,H\text{-ditiano}}=6.2$ Hz, H-ditiano); 4.43 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH₂Ph); 4.53-4.61 (m, 4H, H-2 + H-4 + H-6 + CH₂-Ph); 4.74 (dd, 1H, $J_{5,6}=5.2$ Hz, $J_{6,6}=14.5$ Hz, H-6); 5.9 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-1); 7.28-7.41 (m, 5H, 5 × Ar-H).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.3 (CH₂); 26.2 (CH₃); 26.7 (CH₃); 29.3 (CH₂); 29.4 (CH₂); 41.3 (CH); 46.9 (CH); 71.2 (CH₂); 74.1 (CH₂); 78.0 (CH); 81.3 (CH); 81.5 (CH); 104.2 (CH); 111.8 (C); 128.0 (3 × CH); 128.4 (2 × CH); 136.6 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1552 (f, NO₂); 1382 (m, NO₂).

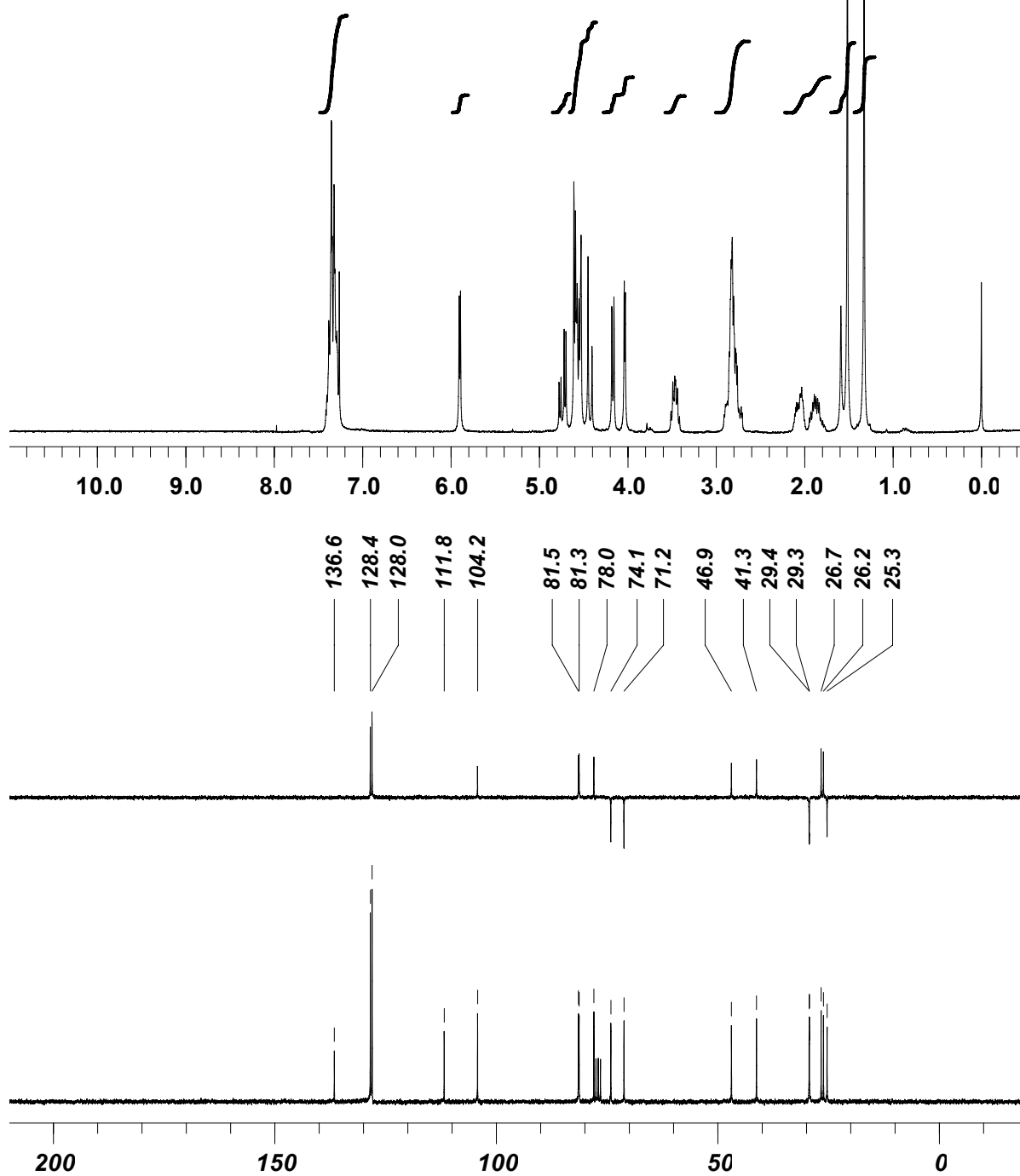
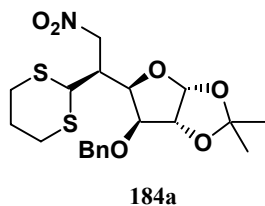
EM-IQ (m/z, %): 442 (36, MH⁺); 244 (100); 197 (45).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₂₇NO₆S₂: C 54.40, H 6.16, N 3.17, S 14.52; encontrado C 54.42, H 6.20, N 3.27, S 14.39.

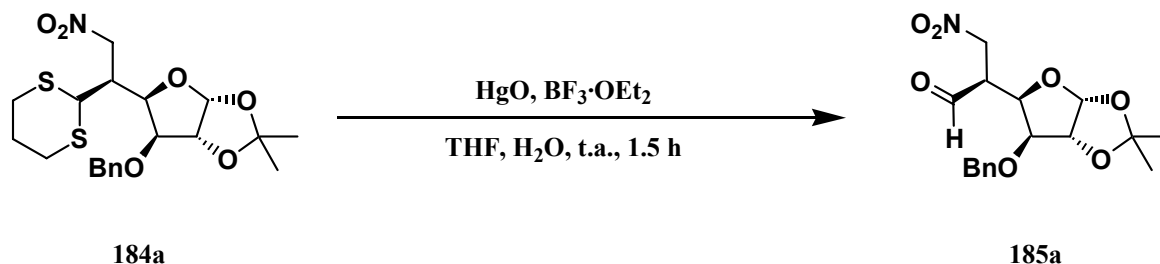
Rayos X:

Crystal identification	re04oc2n
Chemical formula	C ₂₀ H ₂₇ NO ₆ S ₂
Formula weight	441.55
Temperature (K)	293
Wavelength (Å)	0.71069
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> (Å)	5.193(5)
<i>b</i> (Å)	11.133(5)
<i>c</i> (Å)	37.150(5)
α (°)	90.000(5)
β (°)	90.000(5)
γ (°)	90.000(5)
Cell volume (Å ³)	2148(2)
<i>Z</i>	4
Calculated density (Mg/m ³)	1.366
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.284
<i>F</i> ₀₀₀	936
Crystal size (mm)	0.47 × 0.13 × 0.08
Description of crystal	Colourless plate
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Transmission coefficients (min, max)	0.747827, 1
θ range for data collection (°)	1.10 ≤ θ ≤ 26.35
Index ranges	-6 ≤ <i>h</i> ≤ 6, 0 ≤ <i>k</i> ≤ 13, 0 ≤ <i>l</i> ≤ 46
Reflections measured	4387
Unique reflections	4387
<i>R</i> _{int}	0.0000
Observed reflections (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	2997
Refinement method	Refinement on <i>F</i> ²
Parameters refined	264
Weighting scheme	Chebychev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.129
<i>R</i>	0.0430

wR	0.1253
Residual electron density (min, max) (eÅ ⁻³)	-0.328, 0.235

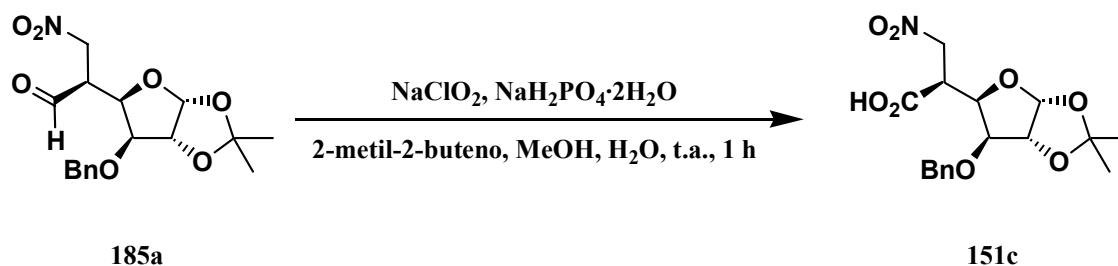


Preparación de la 3-O-bencil-5-C-carbaldehido-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**185a**).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL, a una suspensión de 1.07 g (4.95 mmoles, 5 eq) de óxido de mercurio (II) en 5 mL de tetrahidrofurano y 1 mL de agua destilada se le añadieron 0.63 mL (4.95 mmoles, 5 eq) de trifluoroboroeterato. A esta mezcla agitada bajo atmósfera de argón se le añadió una disolución de 0.44 g (0.99 mmoles) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1,3-ditian-2-il)-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**184a**) en 1 mL de tetrahidrofurano y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Tras comprobar por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:3) la transformación del producto de partida en un único producto de Rf inferior, se añadieron 20 mL de diclorometano y la suspensión resultante se filtró. La disolución filtrada se lavó con disolución acuosa saturada de cloruro amónico (4 x 20 mL), se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así la 3-O-bencil-5-C-carbaldehido-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**185a**) como un aceite transparente cromatográficamente puro, que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

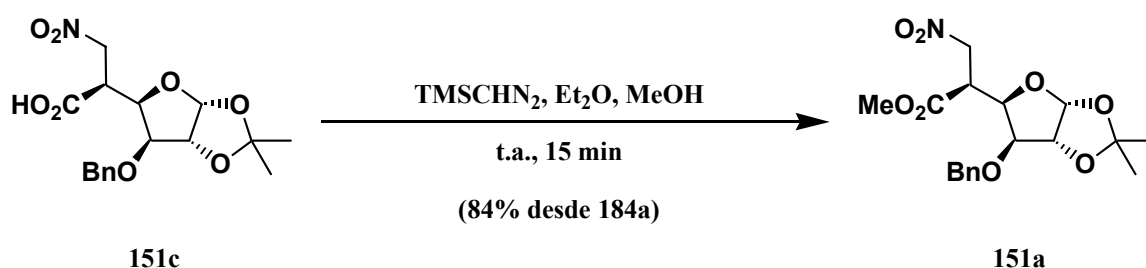
Preparación de la 3-O-bencil-5-C-carboxil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**151c**).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL, a una disolución de la 3-O-bencil-5-C-carbaldehido-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa (**185a**) obtenida en el proceso anterior, en 5 ml de disolución 3:1 de metanol y agua se le añadieron 0.8 mL (6.93 mmoles, 7 eq) de 2-metil-2-buteno, 0.14 g (1.29 mmoles, 1.3

eq) de clorito sódico y 0.18 g (1.19 mmoles, 1.2 eq) de dihidrogenofosfato sódico dihidratado. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, añadiéndole a continuación 15 mL de agua, acidificando con disolución acuosa de ácido clorhídrico al 10% y extrayendo finalmente con acetato de etilo (4 x 20 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así la 3-*O*-bencil-5-*C*-carboxil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-β-*L*-idofuranosa (**151c**) como un aceite amarillo cromatográficamente puro que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Preparación de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-β-*L*-idofuranosa (151a**).**



En un matraz de fondo redondo de 25 mL, a una disolución de la 3-*O*-bencil-5-*C*-carboxil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-β-*L*-idofuranosa (**151c**) obtenida en el proceso anterior (pág. 381), en 11 mL de una mezcla de éter etílico y metanol 7:2, se le añadieron 0.59 mL (1.19 mmoles, 1.2 eq) de trimetilsilildiazometano (disolución 2.0 M en éter etílico) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, concentrándola luego a sequedad en el rotavapor. El crudo obtenido se sometió a cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:4), aislándose 0.32 g (0.84 mmol, 84% desde **184a**) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-β-*L*-idofuranosa (**151a**), como un sólido amorfo de color blanco al cristalizarlo de una mezcla de éter etílico y hexano dio lugar a cristales incoloros de p.f. 76-77 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -43.0° (c 1.40, CHCl₃).

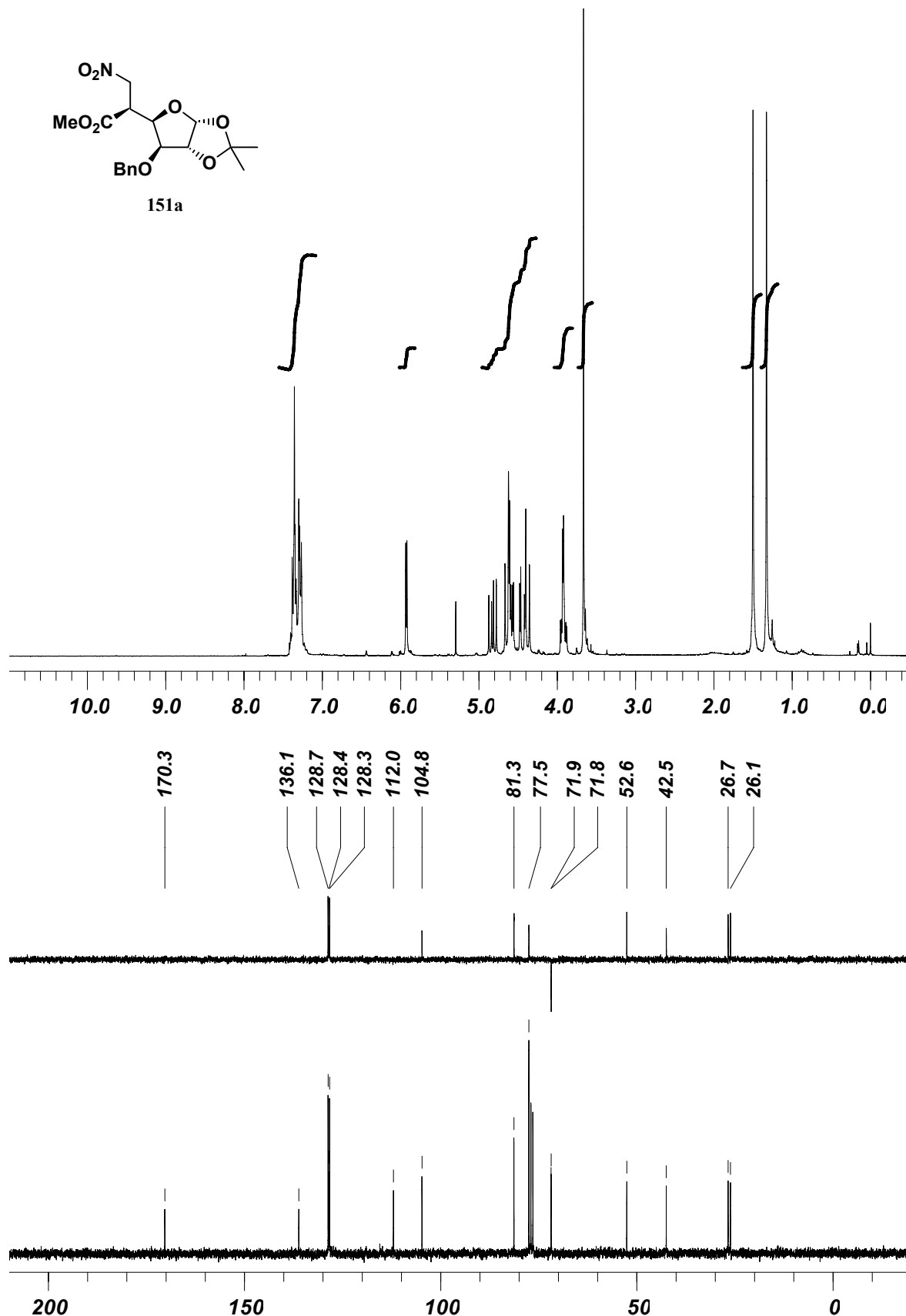
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.50 (s, 3H, CH₃); 3.66 (s, 3H, OCH₃); 3.88-3.96 (m, 2H, H-3 + H-5); 4.38 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, CH₂Ph); 4.44 (dd, 1H, *J*_{5,6}=3.6 Hz, *J*_{6,6}=15.1 Hz, H-6); 4.58 (dd, 1H, *J*_{3,4}=3.6 Hz, *J*_{4,5}=8.3 Hz, H-4); 4.61 (d, 1H, *J*_{1,2}=3.6 Hz, H-2); 4.64 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, CH₂Ph); 4.83 (dd, 1H, *J*_{5,6}=8.8 Hz, *J*_{6,6}=15.1 Hz, H-6); 5.93 (d, 1H, *J*_{1,2}=3.6 Hz, H-1); 7.27-7.38 (m, 5H, 5 x H-Ph).

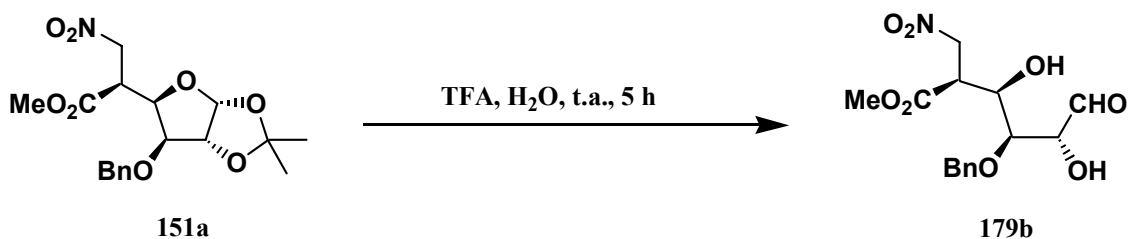
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.1 (CH₃); 26.7 (CH₃); 42.5 (CH); 52.6 (OCH₃); 71.8 (CH₂); 71.9 (CH₂); 77.5 (CH); 81.3 (2 x CH); 104.8 (CH); 112.0 (C); 128.3 (2 x CH); 128.4 (CH); 128.7 (2 x CH); 136.1 (C); 170.3 (CO).

IR (ν̄, cm⁻¹): 1740 (f, CO); 1554 (f, NO₂); 1380 (f, NO₂).

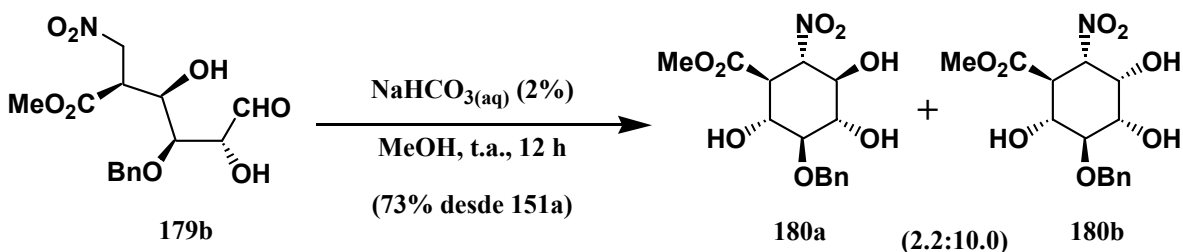
EM-IQ (m/z, %): 382 (6, MH⁺); 335 (8, [M - NO₂]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₈H₂₃NO₈: C 56.69, H 6.08, N 3.67; encontrado C 56.61, H 6.18, N 3.68.



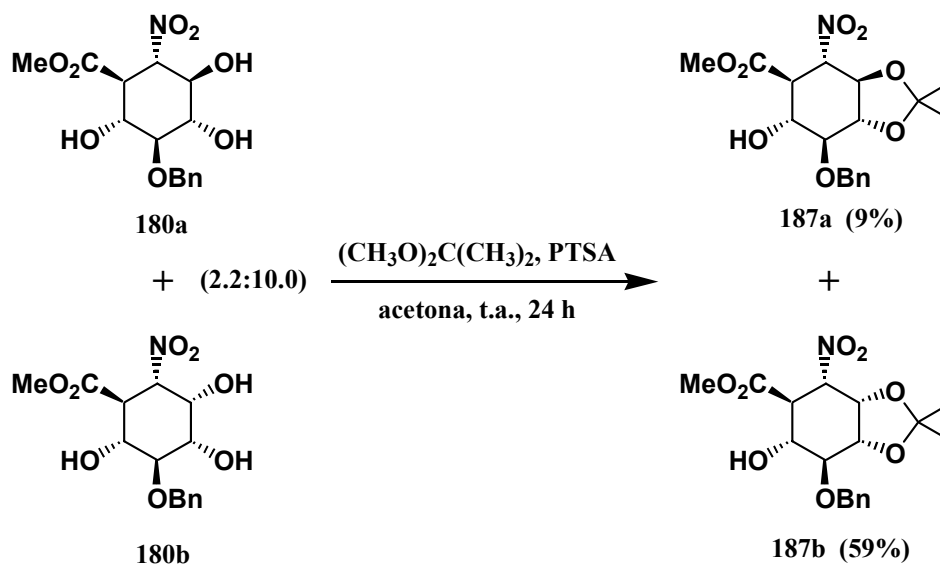
Preparación la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-*L*-idosa (**179b**).

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se disolvieron 0.23 g (0.60 mmoles) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro- β -*L*-idofuranosa (**151a**) en 12 mL de una mezcla 2:1 de ácido trifluoroacético y agua. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y a continuación se eliminó el disolvente en el rotavapor. Tras tres coevaporaciones con 6 mL de tolueno cada una, se obtuvo la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-*L*-idosa (**179b**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180a**) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180b**).

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se disolvió la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-*L*-idosa (**179b**) obtenida en el proceso anterior en 11 mL de metanol y 3.8 mL (0.90 mmoles, 1.5 eq) de disolución acuosa al 2% de bicarbonato sódico. La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, neutralizándola a continuación con resina ácida DOWEX 50 WX4-50, filtrándola y concentrándola finalmente a sequedad en el rotavapor. El residuo sólido resultante se sometió a cromatografía en columna (diclorometano-metanol 20:1), aislándose 0.15 g (0.44 mmoles, 73% desde **151a**) de una mezcla 2.2:10.0 (64% de e.d., calculado por RMN-¹³C) del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180b**), como un sólido amorfo blanco que no se consiguió cristalizar.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187b).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL, a una disolución de 0.15 g (0.44 mmoles) de una mezcla 2.2:10.0 del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180b**) en 6 mL de acetona y 9 mL de 2,2-dimetoxipropano, se le añadieron 0.21 g de sulfato de cobre anhidro y 0.02 g (0.12 mmoles, 0.2 eq) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 24 horas y a continuación se neutralizó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Tras filtrar la suspensión, se concentró a sequedad en el rotavapor la disolución filtrada, luego se disolvió el residuo obtenido en 10 mL de acetato de etilo y la disolución obtenida se lavó con disolución saturada de cloruro sódico (2 x 10 mL), se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Se obtuvo así un crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo-hexano 1:2.5), aislándose 0.10 g (0.26 mmoles, 59%) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**187b**) en forma de sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de una mezcla de diclorometano y éter etílico lo que dio lugar a cristales incoloros de p.f. 162-164 °C y $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -22.2° (c 2.11, CHCl₃). El producto minoritario **187a** (0.01 g, 0.04 mmoles, 9%) se obtuvo mezclado con producto mayoritario **187b** por lo que fue desechado.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.37 (s, 3H, CH₃); 1.49 (s, 3H, CH₃); 2.85 (d, 1H, $J_{6,\text{OH}}=5.1$ Hz, OH); 3.44 (dd, 1H, $J_{1,6}=9.3$ Hz, $J_{1,2}=11.8$ Hz, H-1); 3.64 (dd, 1H, $J_{4,5}=5.5$ Hz, $J_{5,6}=7.0$ Hz, H-5); 3.74 (ddd, 1H, $J_{6,\text{OH}}=5.1$ Hz, $J_{5,6}=7.0$ Hz, $J_{1,6}=9.3$ Hz, H-6); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 4.41 (dd, 1H, $J_{4,5}=5.5$ Hz, $J_{3,4}=5.9$ Hz, H-4);

4.65 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂Ph); 4.81 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH₂Ph); 4.91 (dd, 1H, $J_{2,3}=3.9$ Hz, $J_{3,4}=5.9$ Hz, H-5); 5.10 (dd, 1H, $J_{2,3}=3.9$ Hz, $J_{1,2}=11.8$ Hz, H-2); 7.30-7.38 (m, 5H, 5 x Ar-H).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.2 (CH₃); 27.1 (CH₃); 45.7 (CH); 52.8 (OCH₃); 70.4 (CH); 73.0 (CH₂); 73.6 (CH); 78.0 (CH); 80.2 (CH); 81.2 (CH); 111.1 (C); 128.0 (2 x CH); 128.2 (CH); 128.6 (2 x CH); 137.1 (C); 171.8 (CO).

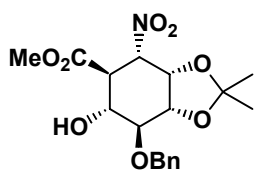
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3488 (a, OH); 1725 (f, CO); 1549 (f, NO₂); 1381 (m, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 382 (4, MH⁺); 366 (3, [M - CH₃]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

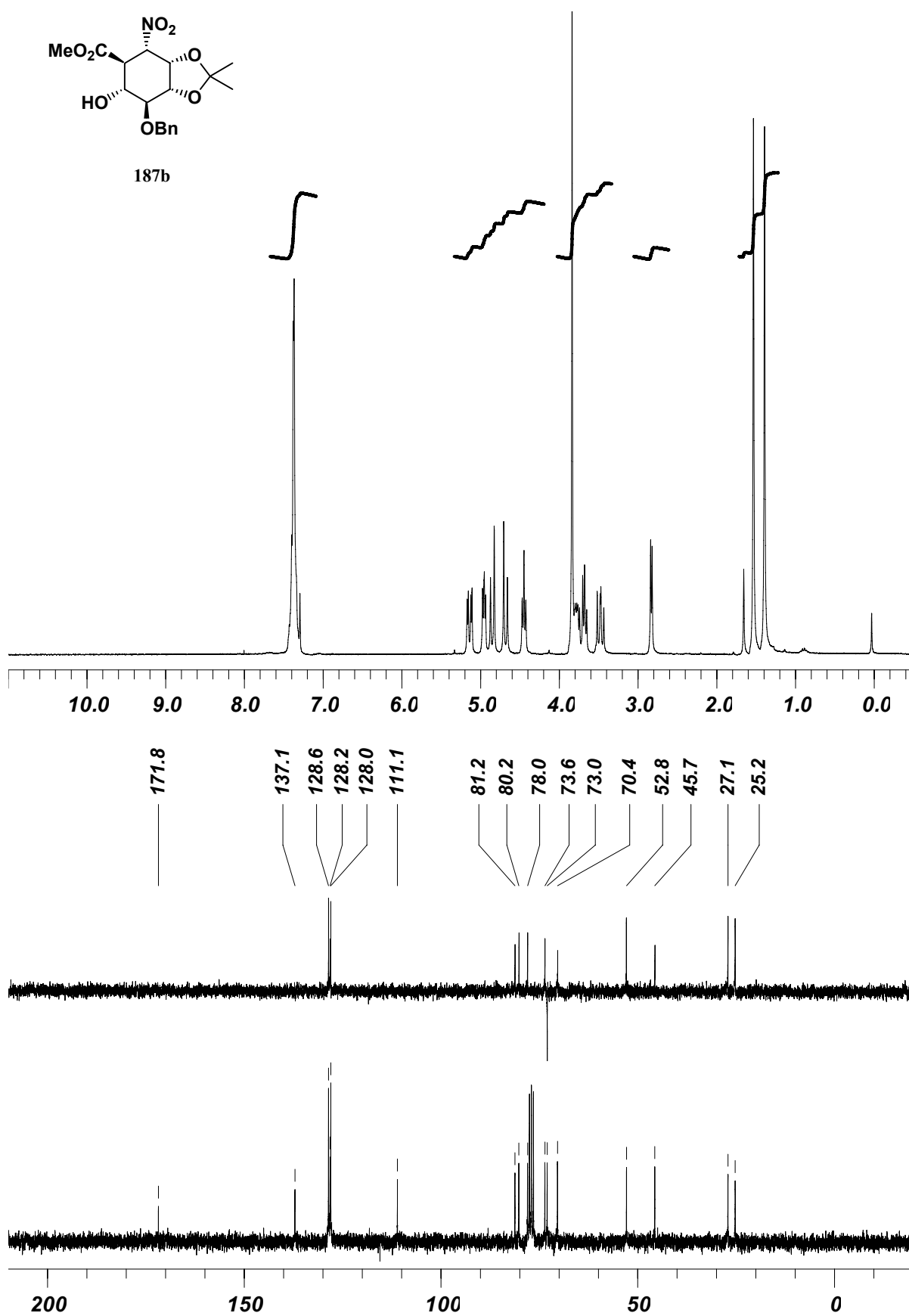
Análisis elemental: calculado para C₁₈H₂₃NO₈: C 56.69, H 6.08, N 3.67; encontrado C 56.89, H 6.05, N 3.72.

Rayos X:

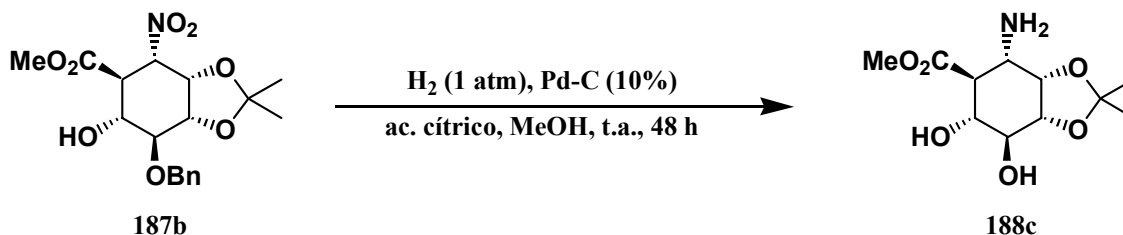
Crystal identification	re08oc2n
Chemical formula	C ₁₈ H ₂₃ NO ₈
Formula weight	381.37
Temperature (K)	293
Wavelength (Å)	0.71069
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	9.372(5)
<i>b</i> (Å)	6.075(5)
<i>c</i> (Å)	16.592(5)
α (°)	90
β (°)	104.925
γ (°)	90
Cell volume (Å ³)	912.8(9)
Z	2
Calculated density (Mg/m ³)	1.388
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.110
F ₀₀₀	404
Crystal size (mm)	0.45 x 0.18 x 0.18
Description of crystal	Colourless prism
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Transmission coefficients (min, max)	0.812387, 1
θ range for data collection (°)	2.25 \leq θ \leq 26.37
Index ranges	-11 \leq <i>h</i> \leq 11, 0 \leq <i>k</i> \leq 7, 0 \leq <i>l</i> \leq 20
Reflections measured	2046
Unique reflections	2046
R _{int}	0.0000
Observed reflections (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	2046
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Parameters refined	251
Weighting scheme	Chebyshev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.044
R	0.0664
wR	0.1028
Residual electron density (min, max) (eÅ ⁻³)	-0.161, 0.198



187b

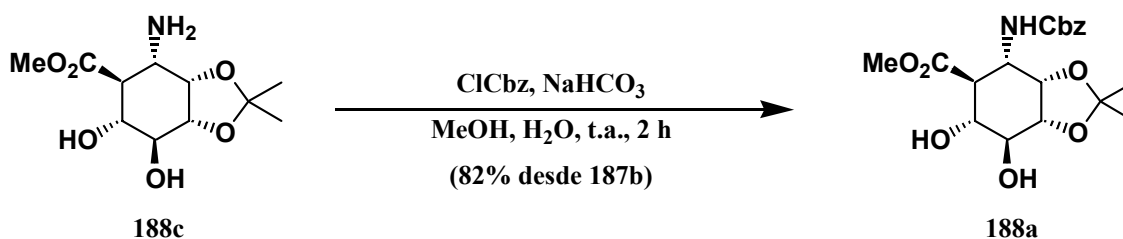


Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188c).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL, a una disolución desoxigenada de 0.18 g (0.48 mmoles) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187b) y 0.09 g (0.48 mmoles, 1 eq) de ácido cítrico en 7 mL de metanol, se le añadieron 0.18 g (10% en peso de paladio) de paladio sobre carbón activo al 10% y una vez purgado la mezcla de reacción con hidrógeno, se agitó a temperatura ambiente durante 2 días bajo 1 atmósfera de presión de hidrógeno y se filtró luego sobre celita. Tras concentrar a sequedad la disolución filtrada se obtuvo un residuo sólido cromatográficamente puro, correspondiente al (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188c) que se usó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188a).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL, a una disolución del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188c) obtenido de la reacción anterior, en 5 mL de metanol y 3 mL de disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico enfriada a 0 °C, se le añadieron 0.08 mL (0.60 mmoles, 1.25 eq) de cloroformiato de bencilo, dejando llegar luego el contenido del matraz a temperatura ambiente y agitándolo durante 2 horas. A continuación se concentró el metanol en el rotavapor, se añadieron 5 mL de agua destilada, se extrajo la suspensión acuosa con acetato de etilo (3 x 10 mL), y las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así un crudo de reacción que se

purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:1), aislándose 0.15 g (0.39 mmoles, 82% desde **187b**) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxyciclohexanocarboxilato de metilo (**188a**), como un aceite transparente. $[\alpha]_{D^{20}}$: -8.8° (c, 2.36 CH₃COCH₃).

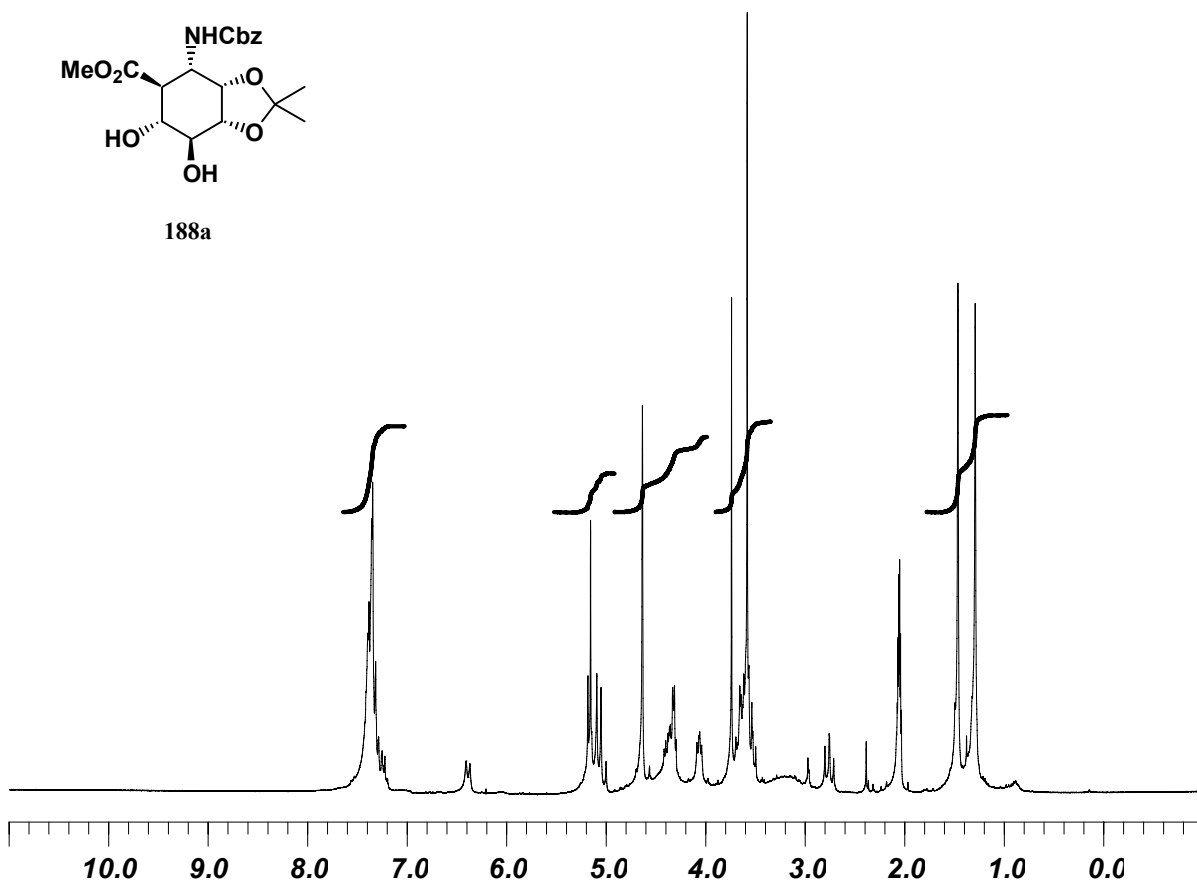
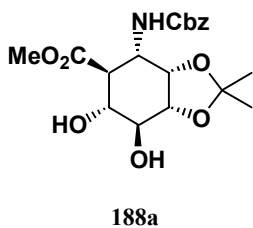
RMN-¹H (CD₃COCD₃, 250 MHz, ppm): 1.29 (s, 3H, CH₃); 1.46 (s, 3H, CH₃); 3.50-3.70 (m, 2H, H-1 + H-2); 3.58 (s, 3H, OCH₃); 4.04-4.09 (m, 1H, H-6); 4.30-4.42 (m, 3H, H-3 + H-4 + H-5); 5.00-5.18 (m, 2H, CH₂Ph); 7.31-7.41 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CD₃COCD₃, 62.5 MHz, ppm): 27.5 (CH₃); 29.5 (CH₃); 51.1 (CH); 52.1 (CH); 52.9 (CH₃); 67.6 (CH₂); 73.3 (CH); 77.5 (CH); 77.8 (CH); 81.2 (CH); 110.6 (C); 129.8 (2 x CH); 130.1 (2 x CH); 130.2 (CH); 139.0 (C); 157.3 (C); 173.7 (CO).

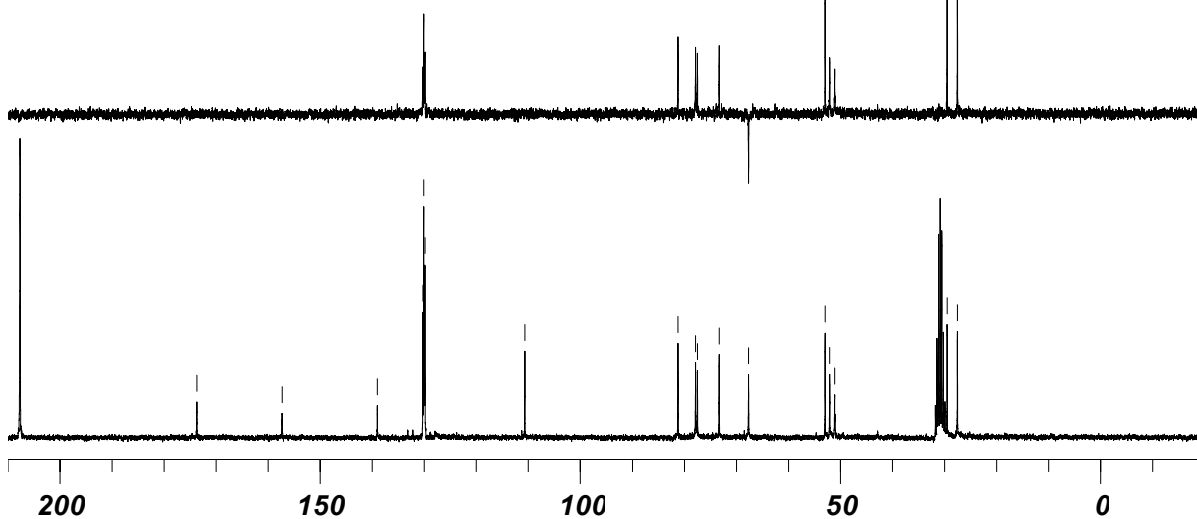
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3442 (a, OH); 3358 (a, NH); 1735 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 396 (2%, MH⁺); 338 (24%, [MH - C₂H₃O₂]⁺); 91 (100%, [PhCH₂]⁺).

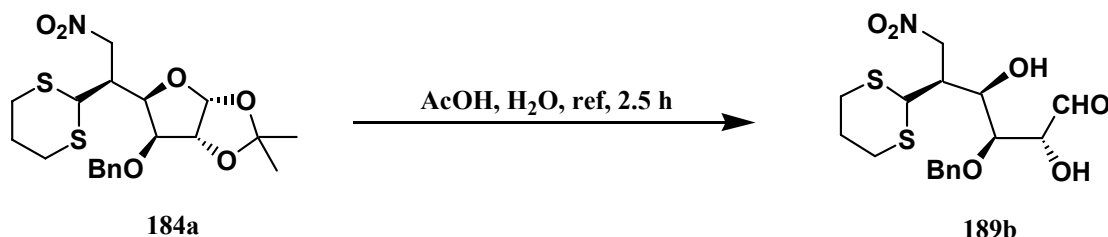
Análisis elemental: calculado para C₁₉H₂₅NO₈: C 57.71; H 6.37; N 3.54; encontrado C 57.98, H 6.45, N 3.27.



173.7
157.3
139.0
130.2
130.1
129.8
110.6
81.2
77.8
77.5
73.3
67.6
52.9
52.1
51.1
29.5
27.5

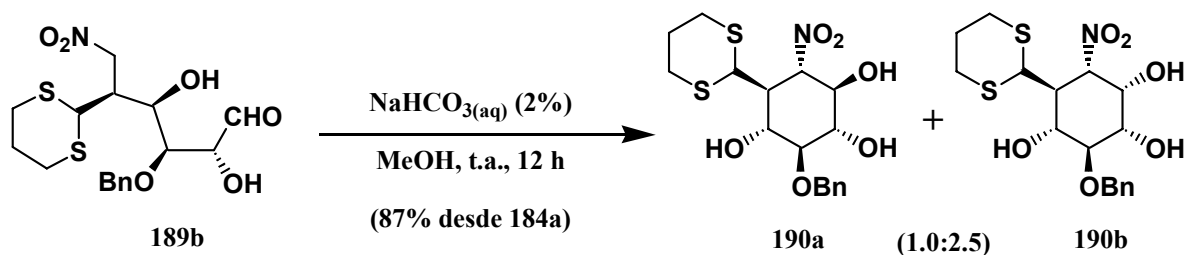


Preparación de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-6-nitro-*L*-idososa (**189b**).



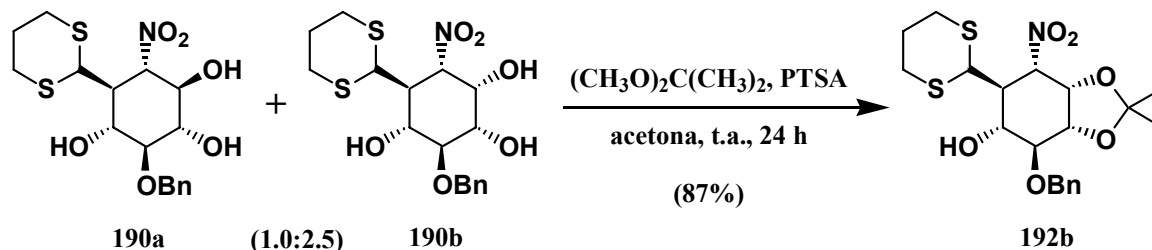
En un matraz de fondo redondo de 50 mL con un refrigerante acoplado, una disolución de 0.80 g (1.81 mmoles) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -*L*-idofuranosa (**184a**) en 36 mL de una mezcla 3:1 de ácido acético y agua se calentó a reflujo durante 2.5 horas y a continuación se eliminó el disolvente en el rotavapor y se hicieron tres coevaporaciones con 10 mL de tolueno cada una. Se obtuvo así la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-6-nitro-*L*-idososa (**189b**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**190a**) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**190b**).



La 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-6-nitro-*L*-idososa (**189b**) obtenida del proceso anterior se sometió a las condiciones de reacción descritas para la preparación de la mezcla **180a** + **180b** (pág. 384), obteniéndose tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo-hexano 2:3), 0.63 g (1.57 mmoles, 87% desde **184a**) de la mezcla inseparable del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**190a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**190b**) en relación 1.0:2.5 (43% de e.d., calculado por RMN-¹³C) como un sólido amorfo de color blanco que no se consiguió cristalizar.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (192b).



La mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**190a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**190b**) obtenida del proceso anterior se sometió a las condiciones de reacción descritas para la preparación de **187b** (pág. 385), obteniéndose tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo-hexano 1:3), 0.61 g (1.37 mmoles, 87%) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**192b**) como un sólido amorfo de color blanco que no se pudo cristalizar. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -60.5° (c 3.75, CHCl_3).

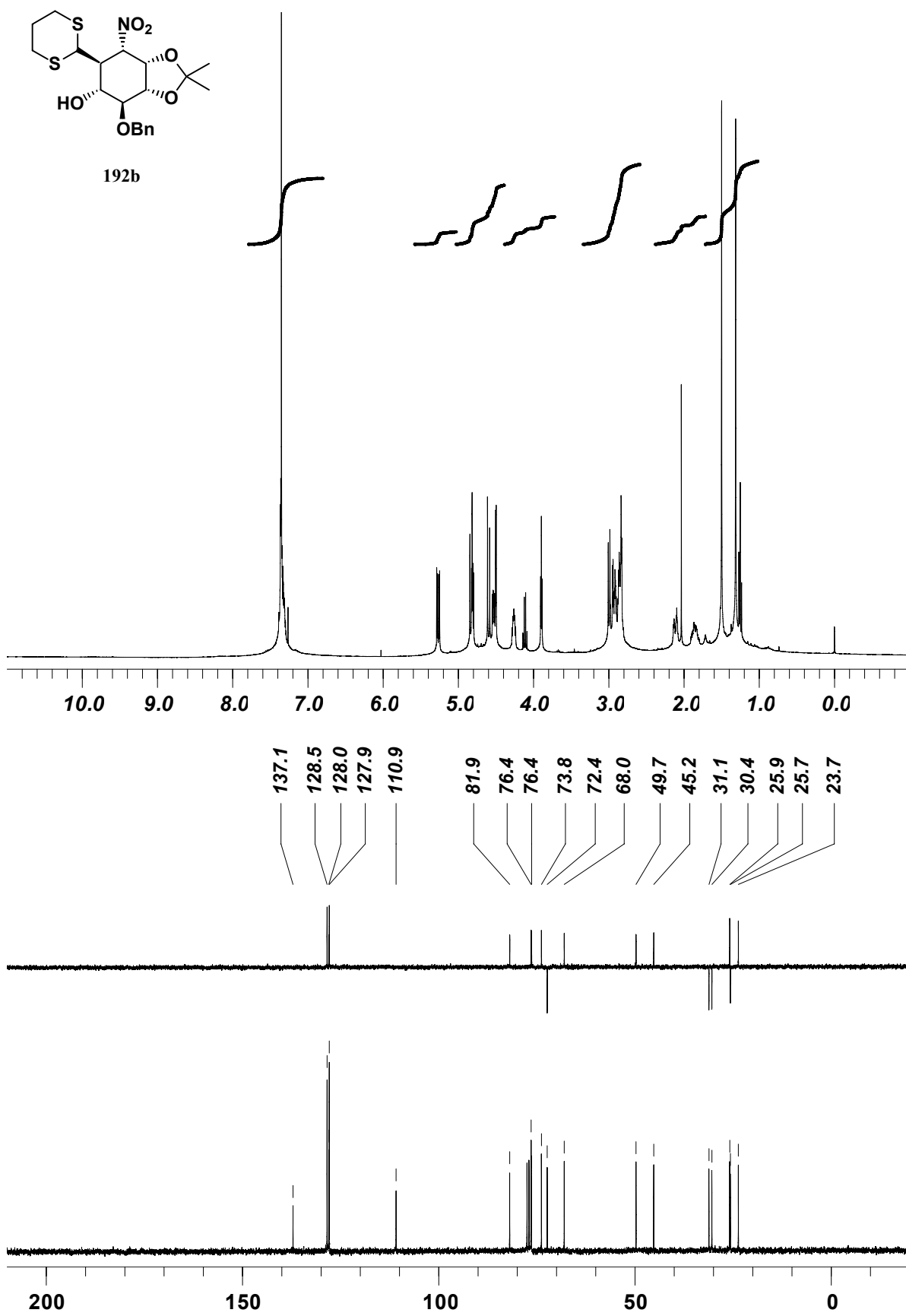
RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH_3); 1.50 (s, 3H, CH_3); 1.80-2.15 (m, 2H, 2 x H-ditiano); 2.81-3.01 (m, 6H, 4 x H-ditiano + OH + H-1); 3.90 (t, 1H, $J_{4,5}=J_{5,6}=4.3$ Hz, H-5), 4.24-4.29 (m, 1H, H-6); 4.50 (d, 1H, $J_{1,\text{H-ditiano}}=3.1$ Hz, H-ditiano); 4.53 (ddd, 1H, $J_{4,6}=1.2$ Hz, $J_{4,5}=4.3$ Hz, $J_{3,4}=7.0$ Hz, H-4); 4.60 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH_2Ph); 4.81 (dd, 1H, $J_{2,3}=4.3$ Hz, $J_{4,3}=7.0$ Hz, H-3); 4.83 (d, 1H, $J=11.7$ Hz, CH_2Ph); 5.27 (dd, 1H, $J_{2,3}=4.3$ Hz, $J_{1,2}=10.8$ Hz, H-2); 7.29-7.38 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 23.7 (CH_3); 25.7 (CH_2); 25.9 (CH_3); 30.4 (CH_2); 31.1 (CH_2); 45.2 (CH); 49.7 (CH); 68.0 (CH); 72.4 (CH_2); 73.8 (CH); 76.4 (CH); 76.4 (CH); 81.9 (CH); 110.9 (C); 127.9 (2 x CH); 128.0 (CH); 128.5 (2 x CH); 137.1 (C).

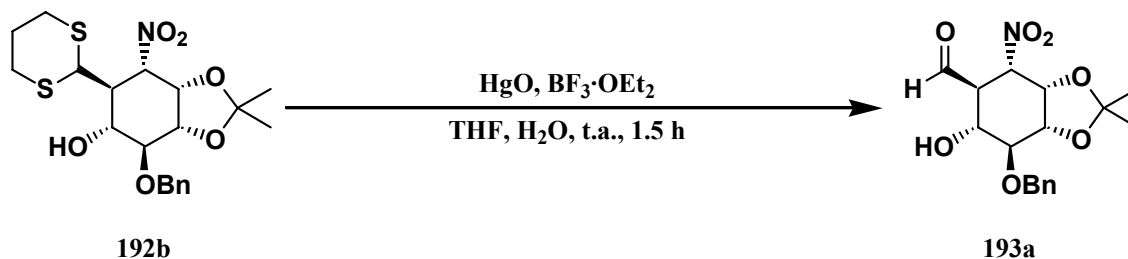
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3529 (a, OH); 1557 (f, NO_2); 1382 (m, NO_2).

EM-IQ (m/z, %): 442 (100, MH^+); 384 (16, $[\text{MH} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{S}_2$: C 54.40, H 6.16, N 3.17, S 14.52; encontrado C 54.82, H 6.34, N 3.03, S 14.10.

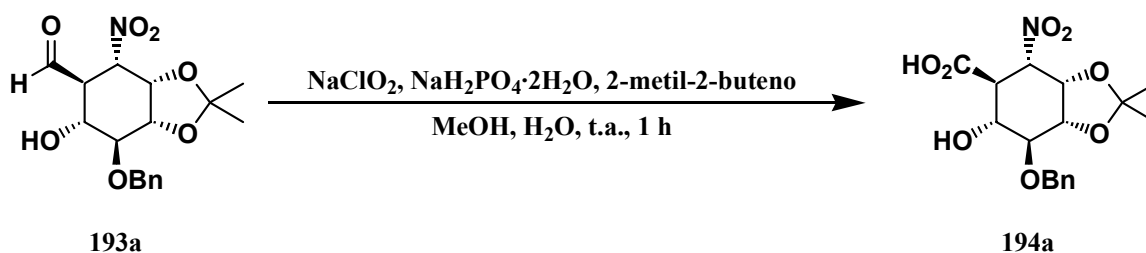


Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehído (193a).



0.35 g (0.79 mmoles) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**192b**) se sometieron a las condiciones de desprotección descritas para la preparación de **185a** (pág. 381), obteniéndose el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehído (**193a**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del ácido (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxílico (194a).



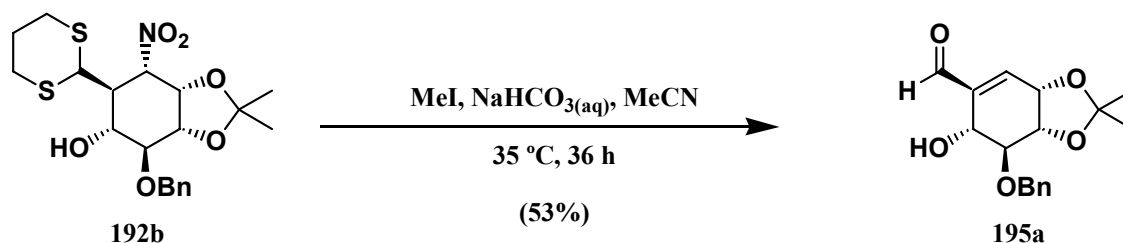
El (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehído (**193a**) obtenido de la reacción anterior se trató en las condiciones de reacción descritas para la preparación de **151c** (pág. 381), obteniéndose el ácido (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxílico (**194a**) como un aceite amarillo que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187b).



El ácido (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxílico (**194a**) obtenido de la reacción anterior se trató en las condiciones de reacción descritas para la preparación de **151a** (pág. 382), obteniéndose tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:3), 0.096 g (0.25 mmol, 32% desde **192b**) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**187b**) cuyos datos espectroscópicos fueron idénticos a los del compuesto previamente sintetizado (pág. 385).

Preparación del (3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohex-1-enocarbaldehído (195a).



En un matraz de fondo redondo de 25 mL conectado a un refrigerante, a una disolución de 0.25 g (0.56 mmoles) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**192b**) en 6 mL de acetonitrilo se le añadieron 1.1 mL de disolución acuosa 1 M de bicarbonato sódico y 0.35 mL (5.66 mmoles, 10 eq) de yoduro de metilo y la mezcla obtenida se calentó a 35 °C durante 36 horas. A continuación se eliminó el disolvente en el rotavapor y el crudo resultante se sometió a cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 2:5), aislándose 0.090 g (0.30 mmoles, 53%) del (3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohex-1-enocarbaldehído (**195a**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -23.7° (c 2.04, CHCl_3).

RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.48 (s, 3H, CH_3); 1.50 (s, 3H, CH_3); 3.11 (sa, 1H, OH); 3.64 (dd, 1H, $J_{3,4}=9.1$ Hz, $J_{4,5}=10.7$ Hz, H-4); 4.00 (dd, 1H, $J_{5,6}=5.5$ Hz, $J_{4,5}=10.7$ Hz, H-5); 4.46 (dt, 1H, $J_{2,3}=J_{3,6}=1.4$ Hz,

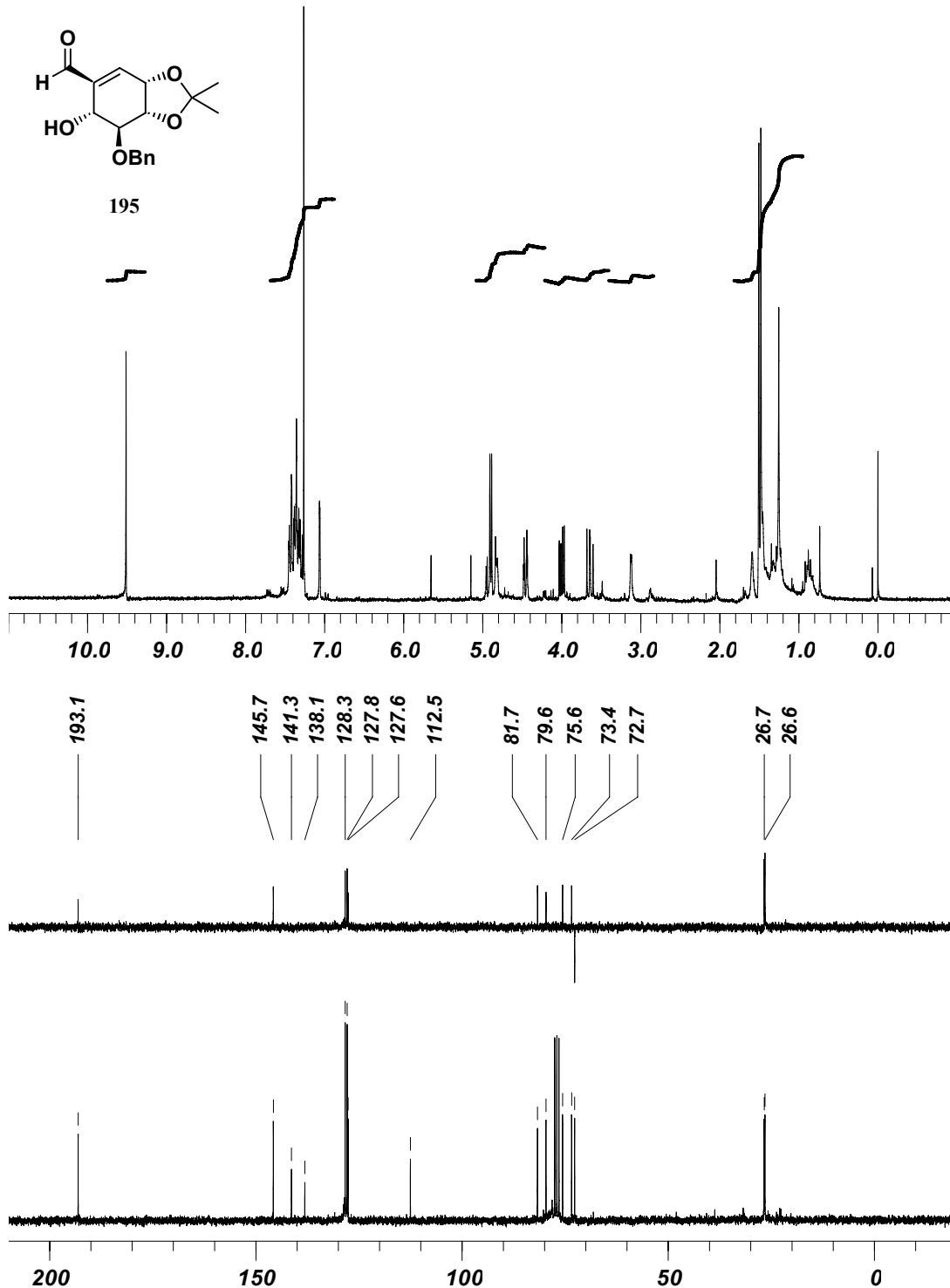
$J_{3,4}=9.1$ Hz, H-3); 4.79-4.95 (m, 3H, CH₂Ph + H-6); 7.06 (d, 1H, $J_{2,3}=1.4$ Hz, H-2); 7.28-7.45 (m, 5H, 5 x H-Ph); 9.51 (s, 1H, CHO).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.6 (CH₃); 26.7 (CH₃); 72.7 (CH₂); 73.4 (CH); 75.6 (CH); 79.6 (CH); 81.7 (CH); 112.5 (C); 127.6 (CH); 127.8 (2 x CH); 128.3 (2 x CH); 138.1 (C); 141.3 (C); 145.7 (CH); 193.1 (CHO).

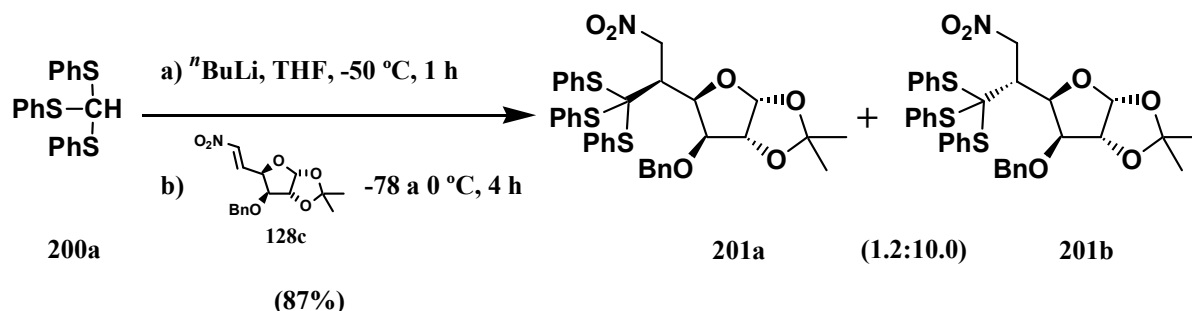
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3456 (a, OH); 1688 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 305 (100, MH⁺); 247 (65, [MH - C₃H₆O]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₇H₂₀O₅: C 67.09, H 6.62; encontrado C 67.15, H 6.74.



Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro-5-C-(tris(feniltio)metil)- α -D-glucofuranosa (**201b**).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL bajo atmósfera de argón, a una disolución de 2.71 g (7.97 mmoles, 1.2 eq) de tris(feniltio)metano (**200a**) en 10 mL de tetrahidrofurano seco, enfriada $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se le añadieron 5.0 mL (7.63 mmoles, 1.1 eq) de *n*-butillitio (disolución 1.55 M en hexano) y la mezcla se agitó a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Luego se añadió con una cánula una disolución de 2.10 g (6.53 mmoles) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro- α -D-xilo-hex-5-enofuranosa (**128c**) en 6.5 mL de tetrahidrofurano seco. La mezcla obtenida se dejó llegar lentamente a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora y se agitó 3 horas más a esta temperatura, tras lo cual se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:6) la desaparición de la nitroolefina **128c** de partida. Tras añadir 20 mL de diclorometano y 20 mL de disolución acuosa saturada de cloruro amónico, se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor, obteniendo un crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:5), aislándose 3.77 g (5.69 mmol, 87%) de una mezcla inseparable de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro-5-C-(tris(feniltio)metil)- β -L-idofuranosa (**201a**) y la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro-5-C-(tris(feniltio)metil)- α -D-glucofuranosa (**201b**) en relación 1.2:10.0 (79% de e.d., calculado por RMN- ^1H). El componente mayoritario **201b** se logró aislar puro por cristalización en éter etílico de la mezcla obteniéndose 2.93 g (4.63 mmol, 68%) en forma de cristales transparentes de p.f. $132\text{--}134\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -23.7° (c 2.04, CHCl_3). El componente minoritario **201a** no pudo aislarse puro, por lo que no fue caracterizado.

RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH_3); 1.53 (s, 3H, CH_3); 3.73 (d, 1H, $J_{3,4}=3.3\text{ Hz}$, H-3); 3.92 (ddd, 1H, $J_{5,6}=3.0\text{ Hz}$, $J_{4,5}=3.7\text{ Hz}$, $J_{5,6}=6.1\text{ Hz}$, H-5); 4.30 (d, 1H, $J=11.9\text{ Hz}$, CH_2Ph); 4.35 (d, 1H, $J=11.9\text{ Hz}$, CH_2Ph); 4.44 (d, 1H, $J_{1,2}=4.0\text{ Hz}$, H-2); 4.72 (dd, 1H, $J_{5,6}=6.1\text{ Hz}$, $J_{6,6}=15.5\text{ Hz}$, H-6); 4.85 (dd, 1H, $J_{5,6}=3.0\text{ Hz}$, $J_{6,6}=15.5\text{ Hz}$, H-6); 5.08 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.3\text{ Hz}$, $J_{4,5}=3.7\text{ Hz}$, H-4); 5.82 (d, 1H, $J_{1,2}=4.0\text{ Hz}$, H-1); 7.14-7.17 (m, 3H, 3 x H-Ph); 7.28-7.40 (m, 12H, 12 x H-Ph); 7.65-7.68 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.4 (CH₃); 27.1 (CH₃); 44.4 (CH); 71.7 (CH₂); 73.6 (CH₂); 78.2 (CH); 79.1 (C); 81.8 (CH); 83.8 (CH); 104.4 (CH); 111.6 (C); 127.7 (CH); 127.7 (2 x CH); 128.3 (2 x CH); 128.7 (6 x CH); 129.7 (3 x CH); 130.7 (3 x C); 136.4 (6 x CH); 136.9 (C).

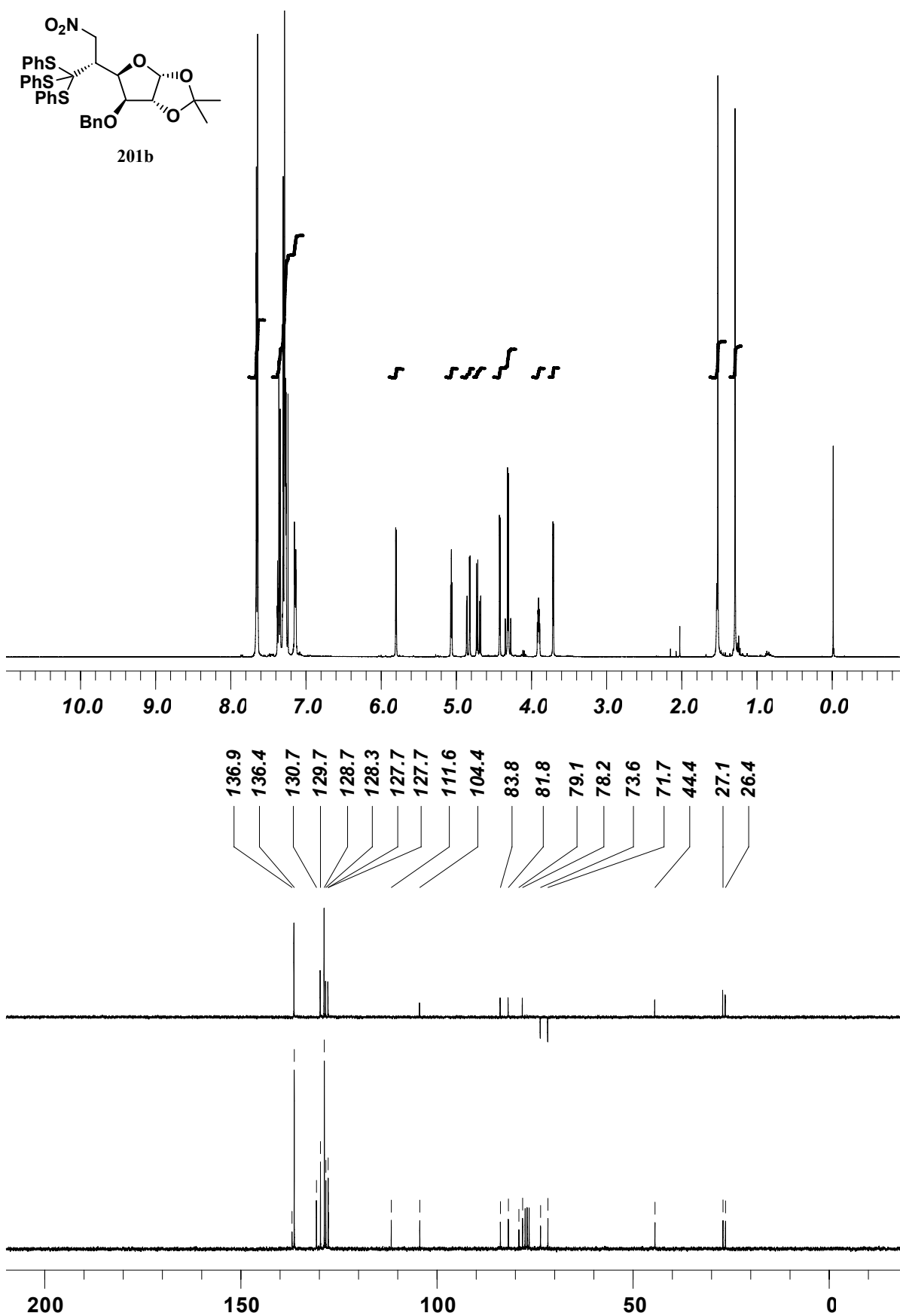
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1556 (f, NO₂); 1381 (m, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 662 (1, MH⁺); 552 (100, [M - PhS]⁺); 505 (23, [M - C₆H₆NO₂S]⁺).

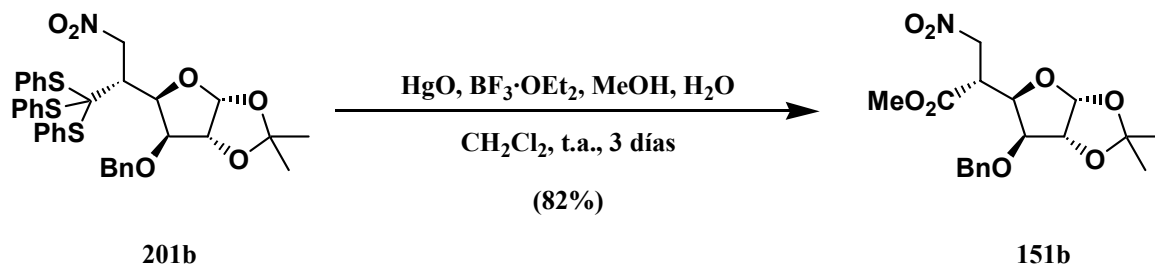
Análisis elemental: calculado para C₃₅H₃₅NO₆S₃: C 63.52, H 5.33, N 2.12, S 14.53; encontrado C 63.71, H 5.51, N 2.17, S 14.25.

Rayos X:

Crystal identification	2004re03
Chemical formula	C ₃₅ H ₃₅ NO ₆ S ₃
Formula weight	661.85
Temperature (K)	293
Wavelength (Å)	1.5418
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> (Å)	10.0260(1)
<i>b</i> (Å)	16.1540(2)
<i>c</i> (Å)	21.0175(2)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Cell volume (Å ³)	3403.99(6)
<i>Z</i>	4
Calculated density (Mg/m ³)	1.291
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	2.359
<i>F</i> ₀₀₀	1392
Crystal size (mm)	0.58 x 0.2 x 0.15
Description of crystal	Colourless prism
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Transmission coefficients (min, max)	0.509, 0.702
θ range for data collection (°)	3.45 \leq θ \leq 72.14
Index ranges	-12 \leq <i>h</i> \leq 12, -19 \leq <i>k</i> \leq 19, -25 \leq <i>l</i> \leq 25
Reflections measured	52263
Unique reflections	6636
<i>R</i> _{int}	0.0452
Observed reflections (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	6636
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Parameters refined	410
Weighting scheme	Chebyshev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.056
<i>R</i>	0.0308
<i>wR</i>	0.0817
Residual electron density (min, max) (eÅ ⁻³)	-0.165, 0.163



Preparación de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-5-C-metoxycarbonil-6-nitro- α -D-glucofuranosa (151b).



En un matraz de fondo redondo de 250 mL, a una suspensión de 1.55 g (7.14 mmoles, 3 eq) de óxido de mercurio (II) en 95 mL de metanol y 7.6 mL de agua destilada, se de añadieron bajo atmósfera de argón 0.36 mL (2.86 mmoles, 1.2 eq) de trifluoroboroeterato y una disolución de 1.57 g (2.38 mmoles) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-6-nitro-5-C-(tris(feniltio)metil)- α -D-glucofuranosa (**201b**) en 12 mL de diclorometano, agitando luego la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 3 días. Al cabo de este tiempo se comprobó por c.c.f. (acetato de etilo/hexano 1:3) la desaparición del producto de partida, por lo que la suspensión se filtró sobre celita lavando el residuo sólido retenido con acetato de etilo. La disolución filtrada se concentró a sequedad en el rotavapor y el crudo obtenido se disolvió en 40 mL de acetato de etilo, lavando luego la disolución resultante con disolución acuosa saturada de cloruro amónico (3 x 10 mL), secándola con sulfato sódico anhidro, filtrándola y concentrándola a sequedad en el rotavapor. El crudo así obtenido se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:8 a 1:3.5) aislándose 0.74 g (1.94 mmoles, 82%) de la 3-O-bencil-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden-5-C-metoxycarbonil-6-nitro- α -D-glucofuranosa (**151b**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -52.4° (c 1.21, CHCl_3).

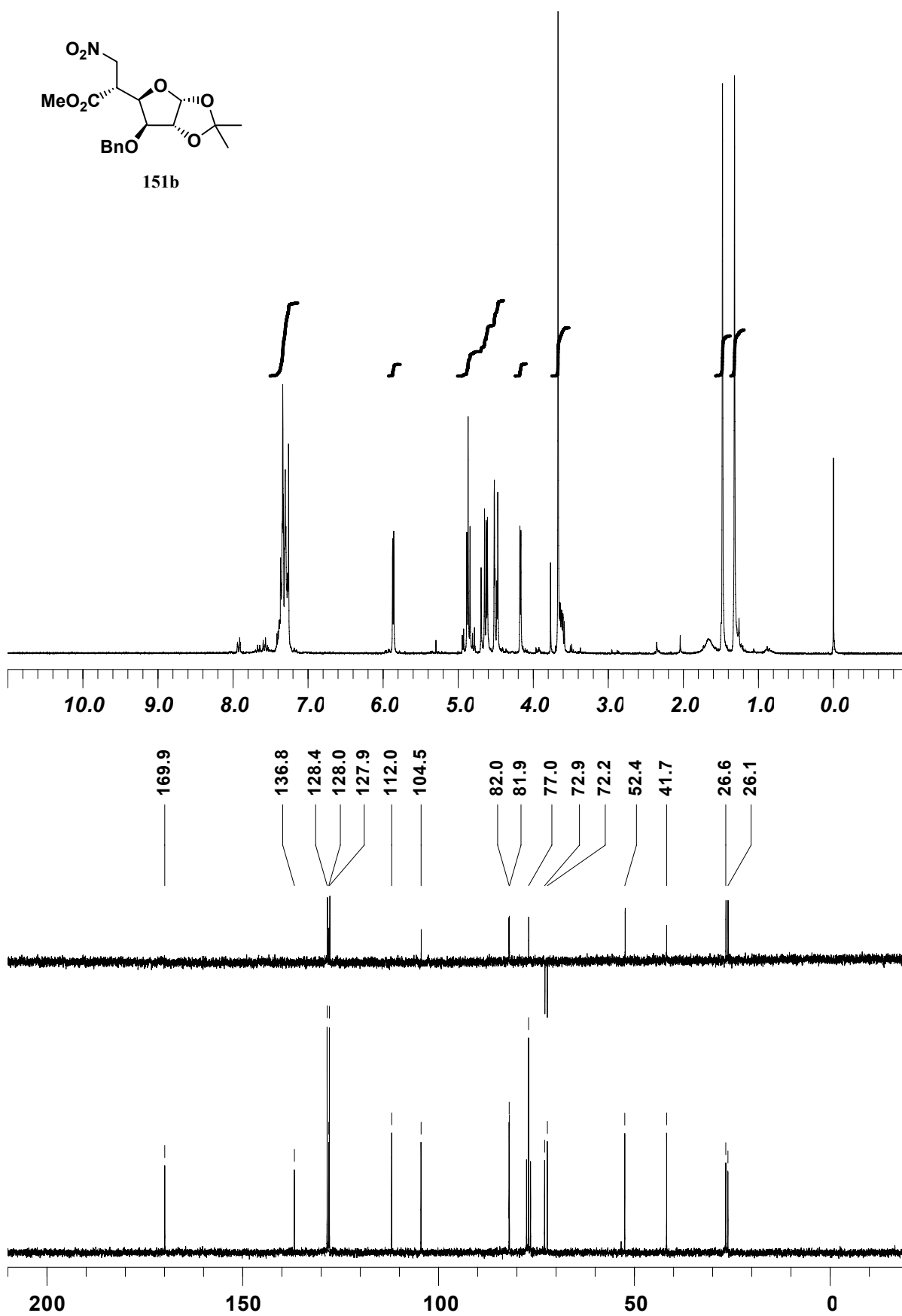
RMN- ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH_3); 1.48 (s, 3H, CH_3); 3.62 (ddd, 1H, $J_{5,6}=4.3$ Hz, $J_{5,6}=6.4$ Hz, $J_{4,5}=8.8$ Hz, H-5); 3.67 (s, 3H, OCH_3); 4.17 (d, 1H, $J_{3,4}=3.3$ Hz, H-3); 4.49 (d, 1H, $J=11.3$ Hz, CH_2Ph); 4.50 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.3$ Hz, $J_{4,5}=8.8$ Hz, H-4); 4.62 (d, 1H, $J_{1,2}=4.0$ Hz, H-2); 4.67 (d, 1H, $J=11.3$ Hz, CH_2Ph); 4.82 (dd, 1H, $J_{5,6}=6.4$ Hz, $J_{6,6}=15.0$ Hz, H-6); 4.90 (dd, 1H, $J_{5,6}=4.3$ Hz, $J_{6,6}=15.0$ Hz, H-6); 5.86 (d, 1H, $J_{1,2}=4.0$ Hz, H-1); 7.26-7.41 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 26.1 (CH_3); 26.6 (CH_3); 41.7 (CH); 52.4 (OCH_3); 72.2 (CH_2); 72.9 (CH_2); 77.0 (CH); 81.9 (CH); 82.0 (CH); 104.5 (CH); 112.0 (C); 127.9 (2 x CH); 128.0 (CH); 128.4 (2 x CH); 136.8 (C); 169.9 (CO).

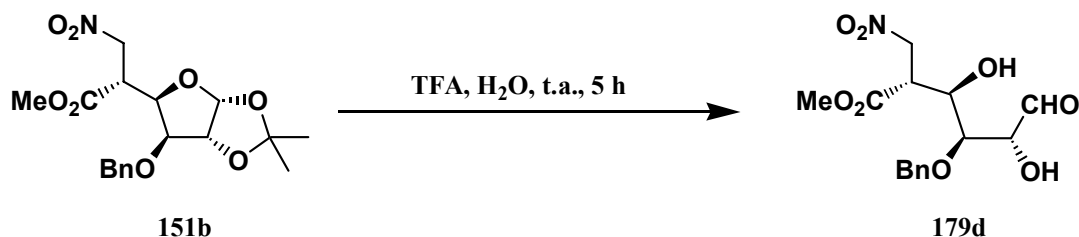
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 1741 (f, CO); 1557 (f, NO_2); 1376 (f, NO_2).

EM-IQ (m/z, %): 382 (12, MH^+); 306 (15, M - [$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$] $^+$); 91 (100, [PhCH_2] $^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_8$: C 56.69, H 6.08, N 3.67; encontrado C 56.39, H 6.10, N 3.73.

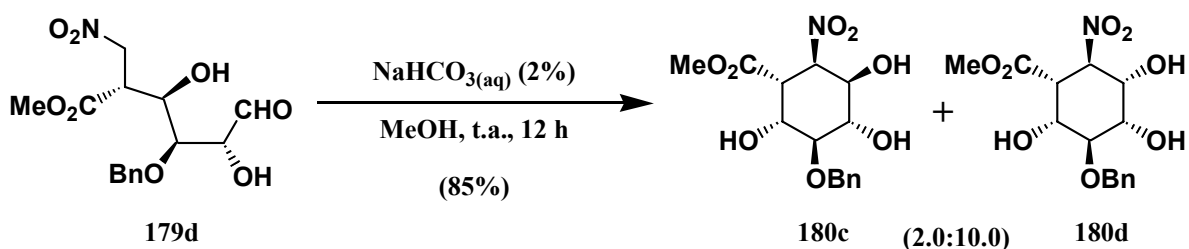


Preparación de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-*D*-glucosa (179d).



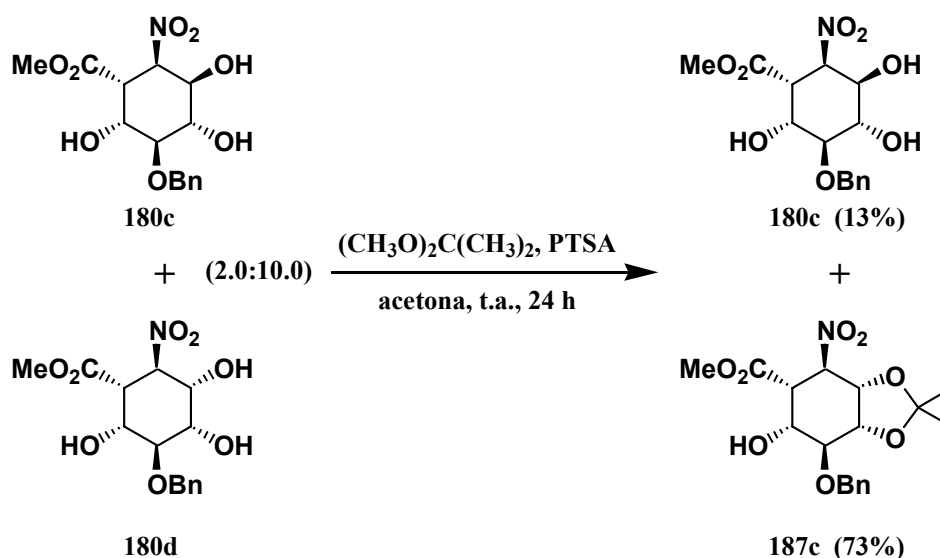
Partiendo de 0.45 g (1.17 mmoles) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropilideno-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro- α -*D*-glucofuranosa (**151b**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **179a** (pág. 384), se obtuvo la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-*D*-glucosa (**179d**) como un aceite incoloro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180c**) y el (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180d**).



Partiendo de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-*D*-glucosa (**179d**) obtenida de la reacción anterior y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de la mezcla **180a** + **180b** (pág. 384), se aisló tras purificación por cromatografía en columna (diclorometano-metanol 20:1), 0.33 g (0.99 mmoles, 85%) de una mezcla inseparable en relación 2.0:10.0 (66% de e.d., calculado por RMN-¹H) del (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180c**) y el (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180d**), como un sólido amorfo blanco que no se pudo cristalizar.

Preparación del (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180c**) y del (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**187c**).



Partiendo de 0.33 g (0.99 mmoles) de una mezcla 2.0:10.0 del (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180c**) y el (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180d**) y siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **187b** (pág. 385), se obtuvo así un residuo que se sometió a cromatografía en columna. Eluyendo primero con acetato de etilo/hexano 2:5 se obtuvieron 0.27 g (0.72 mmoles, 73%) del (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**187c**), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó en una mezcla de éter etílico y hexano produciendo cristales incoloros de p.f. 126-128 °C y $[\alpha]_{\text{D}^{20}}: -86.7^\circ$ (c 2.45, CHCl_3). A continuación se eluyó la columna cromatográfica con acetato de etilo/hexano 1:1, obteniéndose 0.04 g (0.13 mmoles, 13%) del (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (**180c**) como un sólido amorfo de color blanco que no se consiguió cristalizar. $[\alpha]_{\text{D}^{20}}: +56.6^\circ$ (c 2.03, CH_3COCH_3).

(1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187c**):**

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.37 (s, 3H, CH₃); 1.61 (s, 3H, CH₃); 2.85 (d, 1H, $J_{\text{OH},6}=7.3$ Hz, OH-6); 3.49 (dd, 1H, $J_{1,6}=2.6$ Hz, $J_{1,2}=12.5$ Hz, H-1); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 4.06 (dd, 1H, $J_{4,5}=2.6$ Hz, $J_{5,6}=3.1$ Hz, H-5); 4.35-4.37 (m, 1H, H-4); 4.48-4.55 (m, 2H, H-6 + H-3); 4.66 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH₂Ph); 4.72 (d, 1H, $J=11.4$ Hz, CH₂Ph); 5.04 (dd, 1H, $J_{2,3}=8.9$ Hz, $J_{1,2}=12.5$ Hz, H-2); 7.31-7.43 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 25.7 (CH₃); 27.9 (CH₃); 44.9 (CH); 52.7 (OCH₃); 69.7 (CH); 72.9 (CH₂); 73.5 (CH); 76.0 (CH); 76.2 (CH); 84.6 (CH); 110.9 (C); 127.8 (2 x CH); 128.3 (CH); 128.6 (2 x CH); 136.7 (C); 170.2 (C).

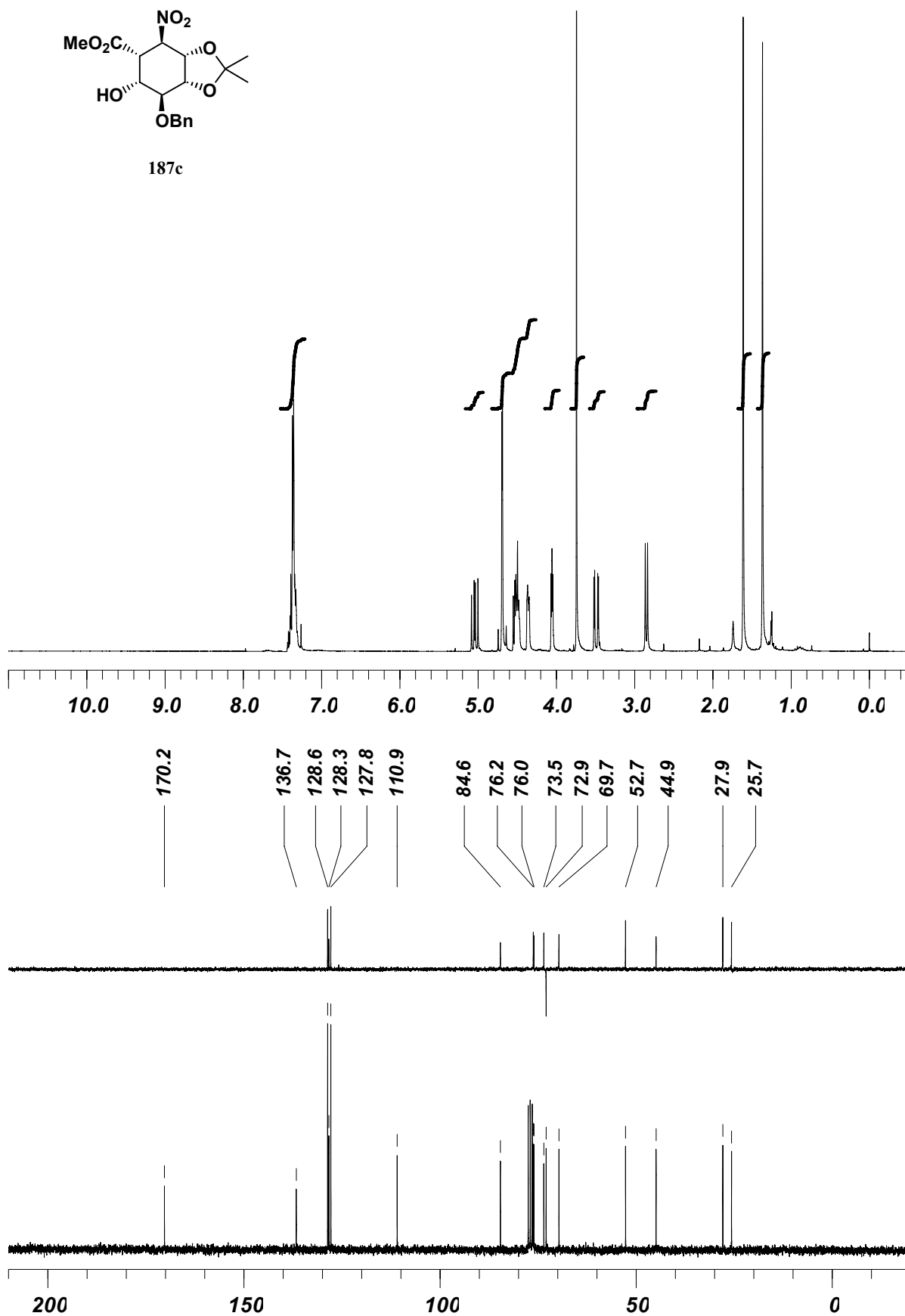
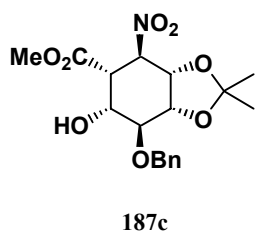
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3474 (a, OH); 1744 (f, CO); 1552 (f, NO_2); 1390 (f, NO_2).

EM-IQ (m/z , %): 382 (100, MH^+); 91 (45, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_8$: C 56.69, H 6.08, N 3.67; encontrado C 56.43, H 6.25, N 3.70.

Rayos X:

Crystal identification	re06oc1n
Chemical formula	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_8$
Formula weight	381.37
Temperature (K)	293
Wavelength (\AA)	0.71069
Crystal system	Orthorhombic
Space group	$P 2_1 2_1 2_1$
a (\AA)	6.017(5)
b (\AA)	9.417(5)
c (\AA)	33.452(5)
α ($^\circ$)	90
β ($^\circ$)	90
γ ($^\circ$)	90
Cell volume (\AA^3)	1895.5(19)
Z	4
Calculated density (Mg/m^3)	1.336
Absorption coefficient (mm^{-1})	0.106
F_{000}	808
Crystal size (mm)	0.42 x 0.4 x 0.24
Description of crystal	Colourless prism
Absorption correction	Multi scan Bruker SADABS
Transmission coefficients (min, max)	0.7542, 0.975
θ range for data collection ($^\circ$)	$2.25 \leq \theta \leq 22.42$
Index ranges	$-0 \leq h \leq 7, 0 \leq k \leq 11, 0 \leq l \leq 40$
Reflections measured	2054
Unique reflections	1573
R_{int}	0.0329
Observed reflections ($I > 2\sigma(I)$)	1573
Refinement method	Refinement on F^2
Parameters refined	289
Weighting scheme	Chebyshev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.135
R	0.0381
wR	0.1331
Residual electron density (min, max) ($\text{e}\text{\AA}^{-3}$)	-0.162, 0.204



(1R,2R,3R,4S,5S,6R)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (180c):

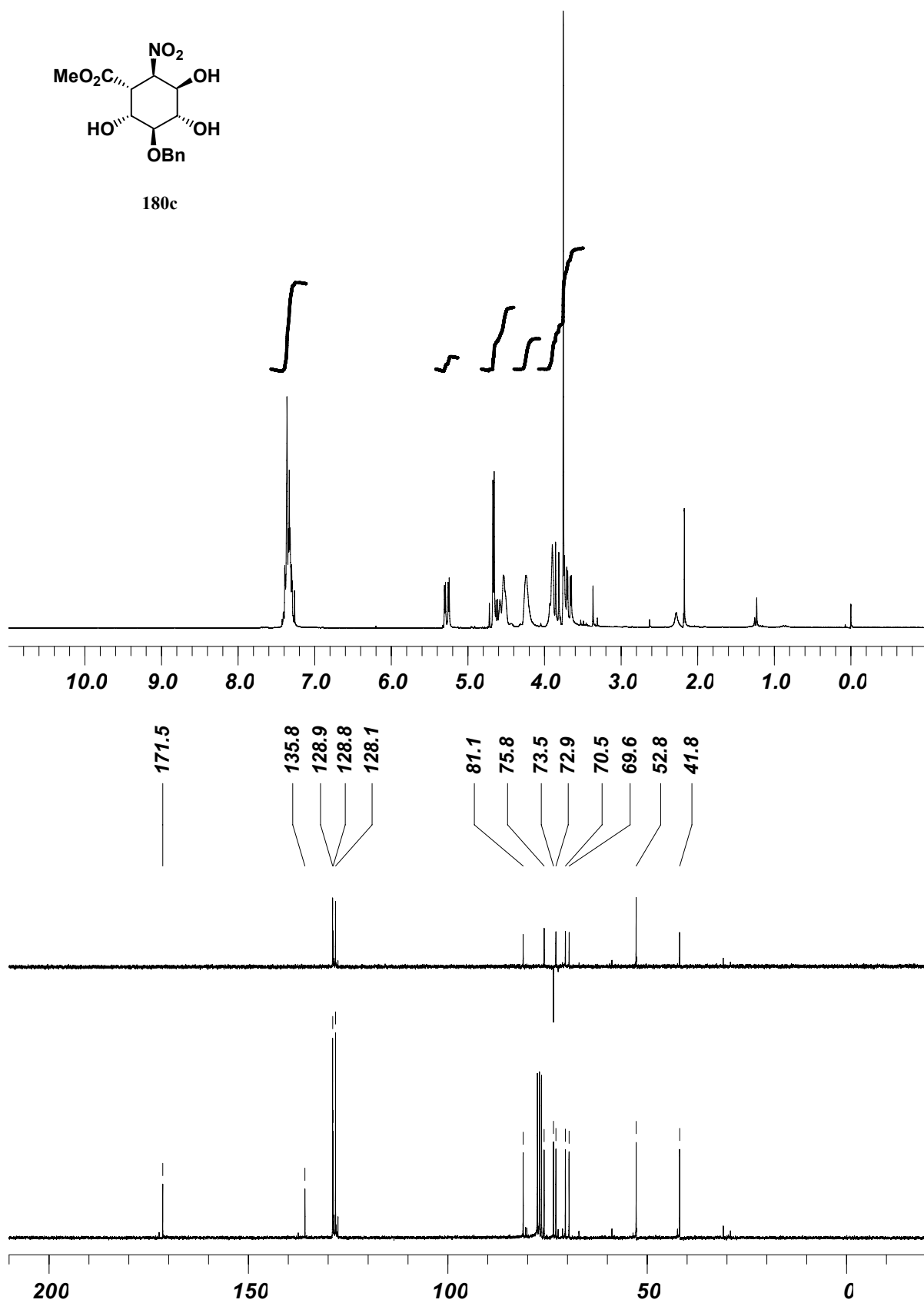
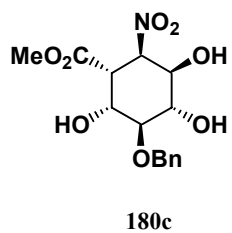
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 3.69 (dd, 1H, $J_{1,6}=3.1$ Hz, $J_{1,2}=11.9$ Hz, H-1); 3.76 (s, 3H, OCH₃); 3.81-3.93 (m, 3H, H-5 + 2 x OH); 4.23-4.58 (m, 4H, H-3 + H-4 + H-6 + OH); 4.63 (d, 1H, $J=11.6$ Hz, CH₂Ph); 4.70 (d, 1H, $J=11.6$ Hz, CH₂Ph); 5.28 (dd, 1H, $J_{2,3}=3.4$ Hz, $J_{1,2}=11.9$ Hz, H-2); 7.29-7.39 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 41.8 (CH); 52.8 (OCH₃); 69.6 (CH); 70.5 (CH); 72.9 (CH); 73.5 (CH₂); 75.8 (CH); 81.1 (CH); 128.1 (2 x CH); 128.8 (CH); 128.9 (2 x CH); 135.8 (C); 171.5 (C).

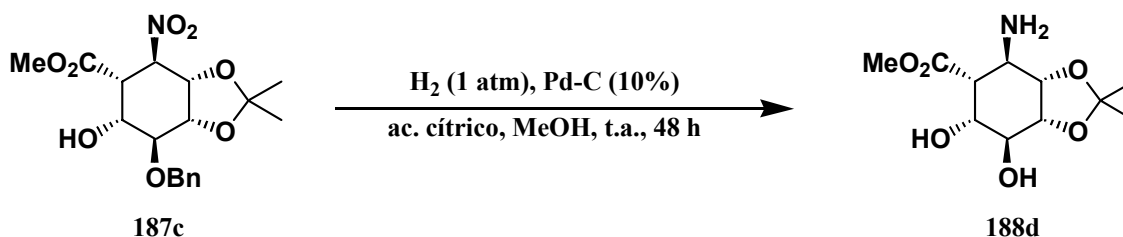
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3349 (a, OH); 1729 (f, CO); 1552 (f, NO₂); 1439 (m, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 341 (6, M⁺); 282 (32, [M - C₂H₃O₂]⁺); 91 (42, [PhCH₂]⁺); 57 (100).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₉NO₈: C 52.78, H 5.61, N 4.10; encontrado C 53.05, H 5.82, N 3.83.

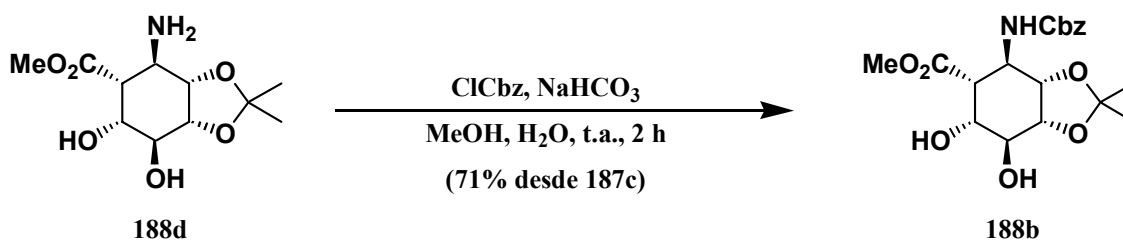


Preparación del (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188d).



Se hidrogenaron 0.30 g (0.81 mmoles) del (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo (187c) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de 188c (pág. 388), obteniéndose el (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188d) como un aceite incoloro cromatográficamente puro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188b).



El (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-amino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188d) obtenido de la reacción anterior, se sometió a las condiciones de reacción descritas para la preparación de 188a (pág. 388), obteniéndose tras cristalización en una mezcla de éter etílico y diclorometano, 0.23 g (0.57 mmoles, 71% desde 187c) del (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo (188b) como cristales incoloros de p.f. 146-148 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -39.8° (c, 2.13 CH_3COCH_3).

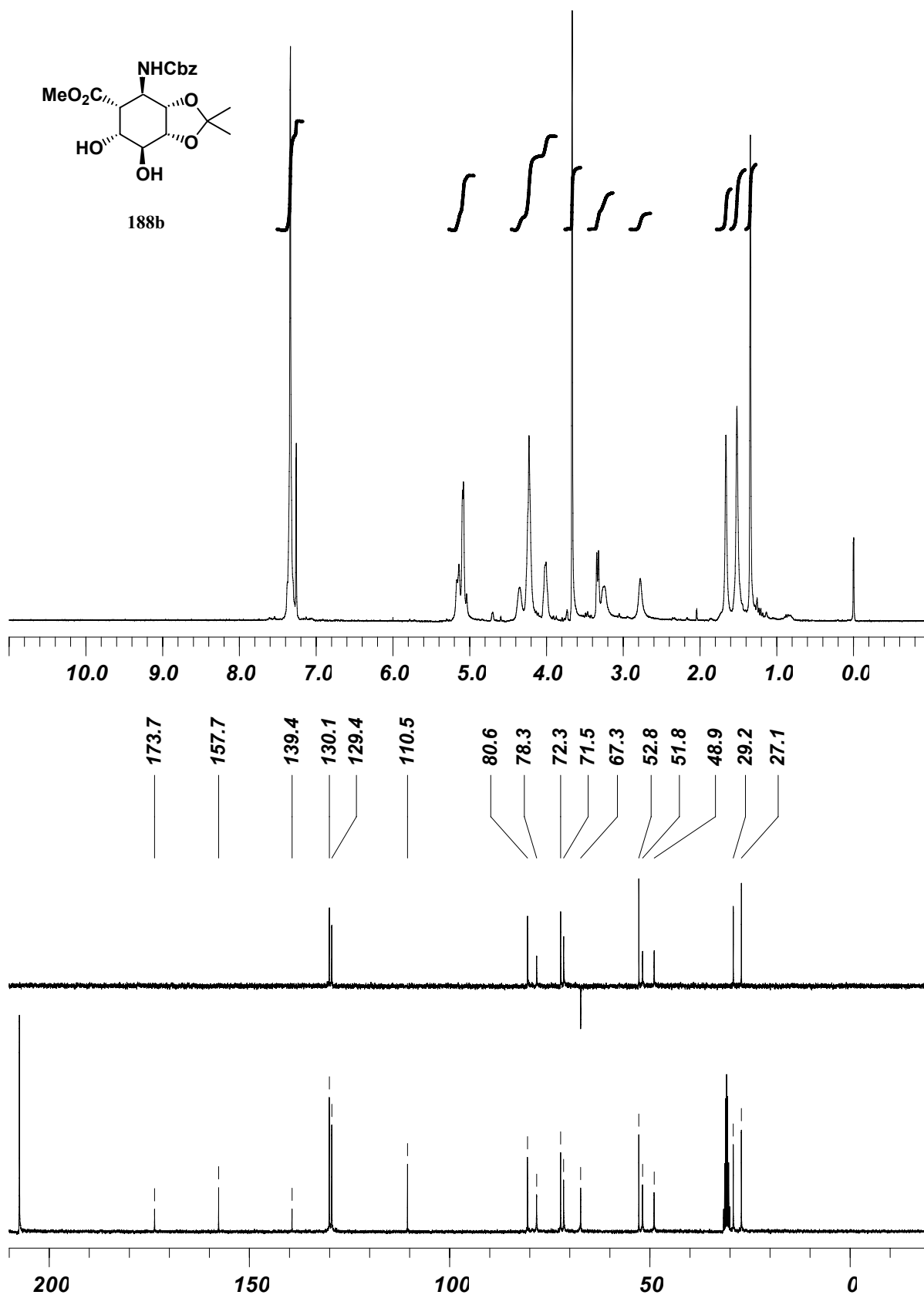
RMN-¹H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 1.34 (s, 3H, CH_3); 1.52 (s, 3H, CH_3); 1.66 (s, 2H, 2 x OH); 2.78 (sa, 1H, NH); 3.25 (sa, 1H, H-2); 3.33 (d, 1H, $J=7.0$ Hz, H-1); 3.66 (s, 3H, OCH_3); 4.02 (sa, 1H, H-6); 4.23 (sa, 2H, H-3 + H-4); 4.35 (sa, 1H, H-5); 5.04-5.14 (m, 2H, CH_2Ph); 7.31-7.37 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CD_3COCD_3 , 62.5 MHz, ppm): 27.1 (CH_3); 29.2 (CH_3); 48.9 (CH); 51.8 (CH); 52.8 (OCH_3); 67.3 (CH_2); 71.5 (CH); 72.3 (CH); 78.3 (CH); 80.6 (CH); 110.5 (C); 129.4 (3 x CH); 130.1 (2 x CH); 139.4 (C); 157.7 (CO); 173.7 (CO).

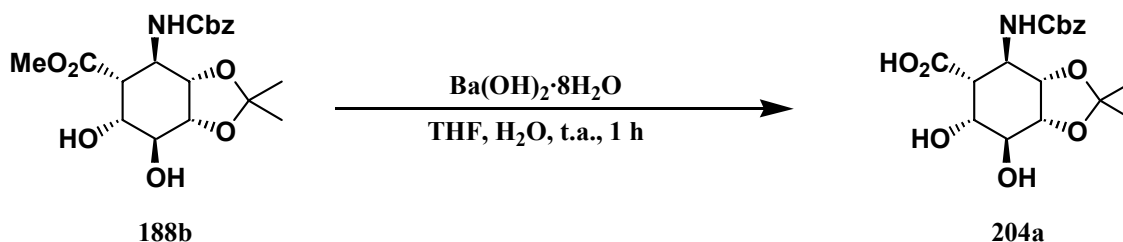
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3465 (a, OH); 3420 (f, NH); 1749 (f, CO); 1693 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 396 (8, MH⁺); 352 (9, [MH - C₃H₈]⁺); 338 (13, [MH - C₂H₃O₂]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₂₅NO₈: C 57.71; H 6.37; N 3.54; encontrado C 57.91, H 6.30, N 3.37.

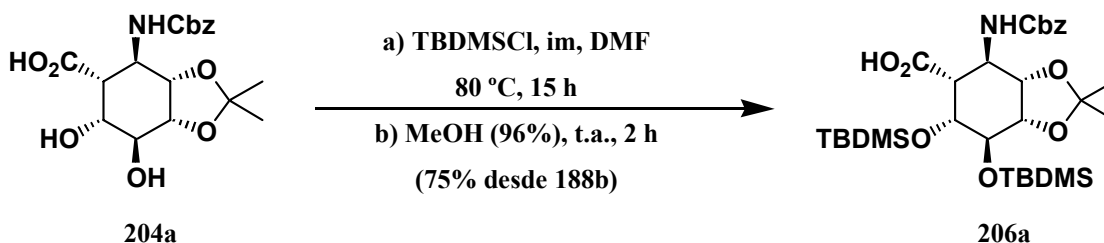


Preparación del ácido (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxyciclohexánico (204a).



En un matraz de fondo redondo de 100 mL, a una disolución de 0.34 g (0.85 mmoles) del (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxyciclohexanocarboxilato de metilo (**188b**) en 34 mL de una mezcla 1:2 de tetrahydrofurano y agua se le añadieron 0.80 g (2.55 mmoles, 3 eq) de hidróxido de bario octahidratado y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se neutralizó la disolución con resina ácida DOWEX 50 WX4-50, se filtró y se concentró a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así el ácido (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxyciclohexánico (**204a**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del ácido (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsiloxi)-3,4-isopropilidendioxyciclohexánico (206a).



El ácido (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxyciclohexánico (**204a**) obtenido de la reacción anterior se disolvió en un matraz de reacción de 10 mL conectado a un refrigerante y bajo atmósfera de argón, con 3.4 mL de *N,N*-dimetilformamida seca y se le añadieron 0.69 g (10.2 mmoles, 12 eq) de imidazol y 1.28 g (8.5 mmoles, 10 eq) de cloruro de *t*-butildimetilsililo. La mezcla resultante se calentó a 80°C durante 15 horas y transcurrido ese tiempo se añadieron 2.6 mL de metanol y se agitó 2 horas más a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el disolvente en el rotavapor y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (diclorometano/metanol 30:1), aislándose 0.39 g (0.64 mmoles, 75% desde **188b**) del ácido (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-

2-benciloxicarbonilamino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexánico (**206a**) en forma de sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de diclorometano obteniendo cristales incoloros con p.f. 152-154 °C. $[\alpha]_D^{20}$: -34.0° (c 1.33, cloroformo).

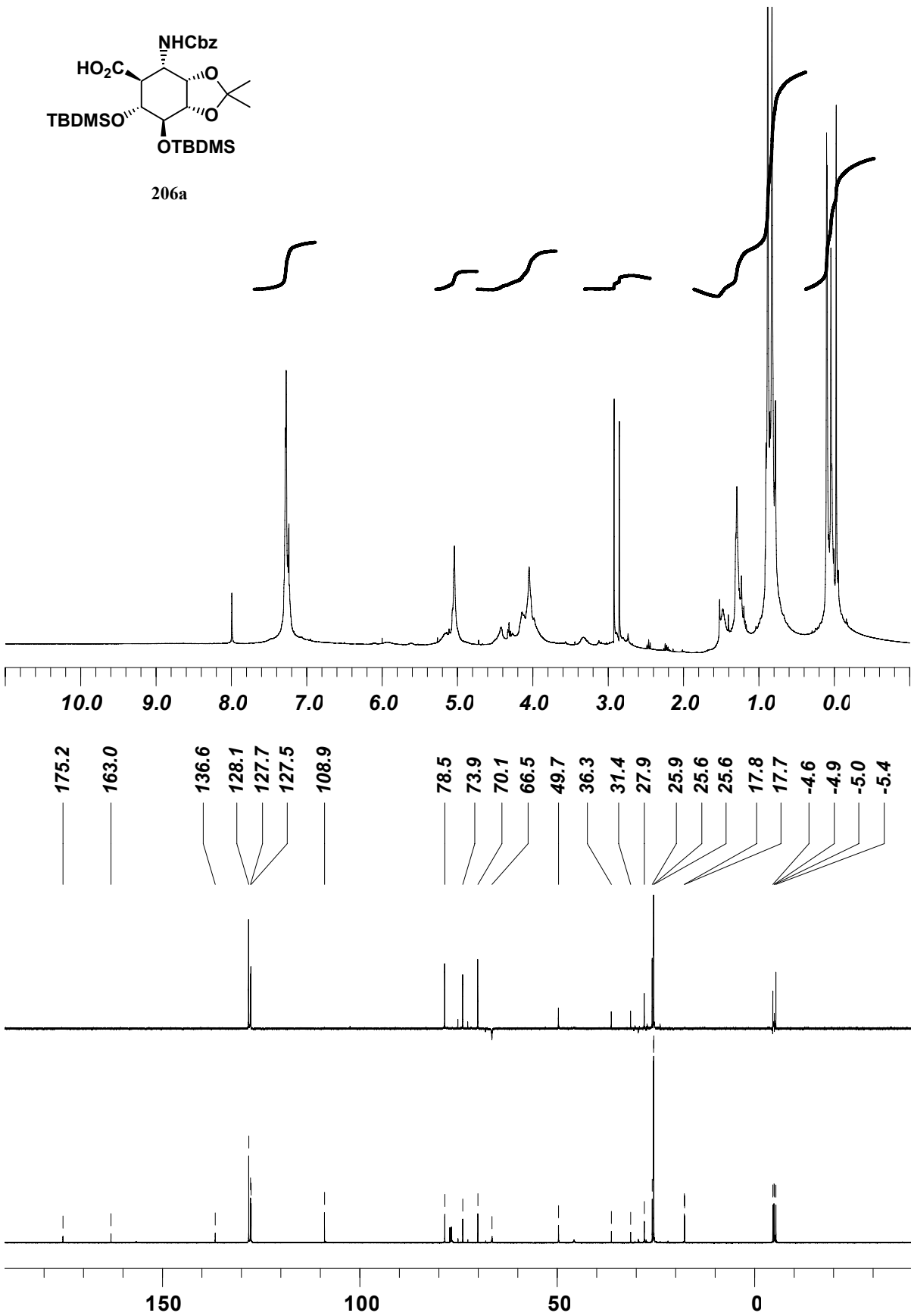
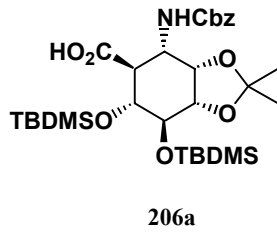
RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm): -0.06 (s, 3H, CH₃-Si); 0.01 (s, 3H, CH₃-Si); 0.06 (s, 3H, CH₃-Si); 0.07 (s, 3H, CH₃-Si); 0.80 (s, 9H, 3 x CH₃-^{*t*}BuSi); 0.85 (s, 9H, 3 x CH₃-^{*t*}BuSi); 1.26 (sa, 3H, CH₃); 1.45 (sa, 3H, CH₃); 2.82 (s, 1H, H-1); 2.89 (s, 1H, H-2); 3.95-4.17 (m, 4H, H-3 + H-4 + H-5 + H-6); 4.39 (sa, 1H, NH); 5.01-5.04 (m, 2H, CH₂Ph); 7.20-7.25 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm): -5.4 (CH₃); -5.0 (CH₃); -4.9 (CH₃); -4.6 (CH₃); 17.7 (C); 17.8 (C); 25.6 (3 x CH₃); 25.6 (3 x CH₃); 25.9 (CH₃); 27.9 (CH₃); 31.4 (CH); 36.3 (CH); 49.7 (CH); 66.5 (CH₂); 70.1 (CH); 73.9 (CH); 78.5 (CH); 108.9 (C); 127.5 (CH); 127.7 (2 x CH); 128.1 (2 x CH); 136.6 (C); 163.0 (CO); 175.2 (CO).

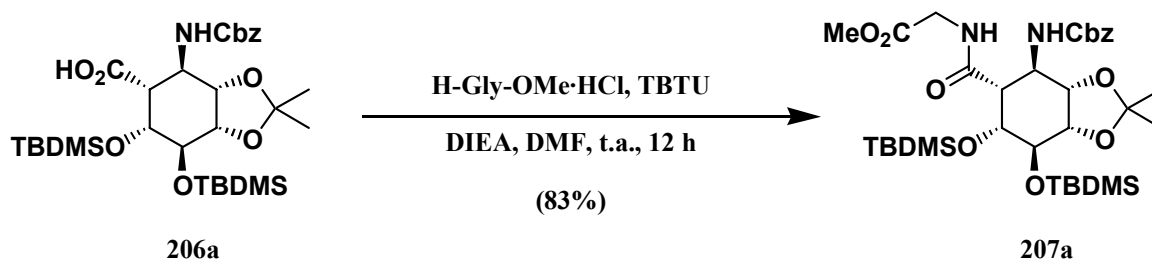
IR (ν̄, cm⁻¹): 3354 (a, NH + OH); 1718 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 610 (46, MH⁺); 566 (27, [MH - CHO₂]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₃₀H₅₁NO₈Si₂: C 59.08, H 8.93, N 2.30; encontrado C 59.45, H 8.79, N 2.31.



Preparación del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiclohexanocarboxamido)acetato de metilo (207a).



En un matraz de fondo redondo de 5 mL se disolvieron bajo atmósfera de argón, 0.054 g (0.090 mmoles) del ácido (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiclohexanocarboxílico (206a) en 1 mL de *N,N*-dimetilformamida seca. A continuación se añadieron 0.046 g (0.14 mmoles, 1.5 eq) de TBTU, la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron 0.014 g (0.11 mmoles, 1.2 eq) de clorhidrato de metoxycarbonilglicina y tras otros 15 minutos más de agitación 0.063 mL (0.36 mmoles, 4 eq) de diisopropiletilamina seca, continuando la agitación de la mezcla a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 12 horas. Finalmente la mezcla se concentró a sequedad en el rotavapor y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:5), aislándose 0.050 g (0.075 mmoles, 83%) del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiclohexanocarboxamido)acetato de metilo (207a), como un aceite amarillo. $[\alpha]_D^{20}$: -21.5° (c 3.01, cloroformo).

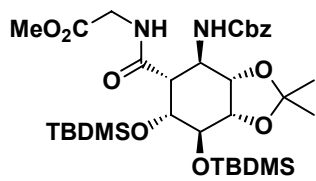
RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm): -0.09 (s, 3H, CH₃-Si); 0.03 (s, 3H, CH₃-Si); 0.04 (s, 3H, CH₃-Si); 0.05 (s, 3H, CH₃-Si); 0.82 (s, 9H, 3 x CH₃-^tBuSi); 0.85 (s, 9H, 3 x CH₃-^tBuSi); 1.13-1.22 (m, 1H, NH); 1.27 (s, 3H, CH₃); 1.47 (s, 3H, CH₃); 2.72-2.87 (m, 1H, H-1); 3.54-3.62 (m, 4H, OCH₃ + H-Gly); 3.85-4.09 (m, 5H, H-Gly + H-3 + H-4 + H-5 + H-6); 4.84-5.09 (m, 3H, H-2 + CH₂Ph); 7.02 (sa, 1H, NH); 7.21-7.27 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm): -5.5 (CH₃); -4.9 (CH₃); -4.7 (CH₃); -4.3 (CH₃); 17.8 (C); 17.9 (C); 25.6 (6 x CH₃); 26.0 (CH₃); 28.2 (CH₃); 41.2 (CH₂); 48.7 (CH); 48.9 (CH); 52.0 (OCH₃); 67.0 (CH₂); 69.7 (CH); 74.0 (CH); 77.9 (CH); 78.5 (CH); 109.4 (C); 127.9 (3 x CH); 128.3 (2 x CH); 136.3 (C); 157.5 (CO); 169.6 (CO); 171.1 (CO).

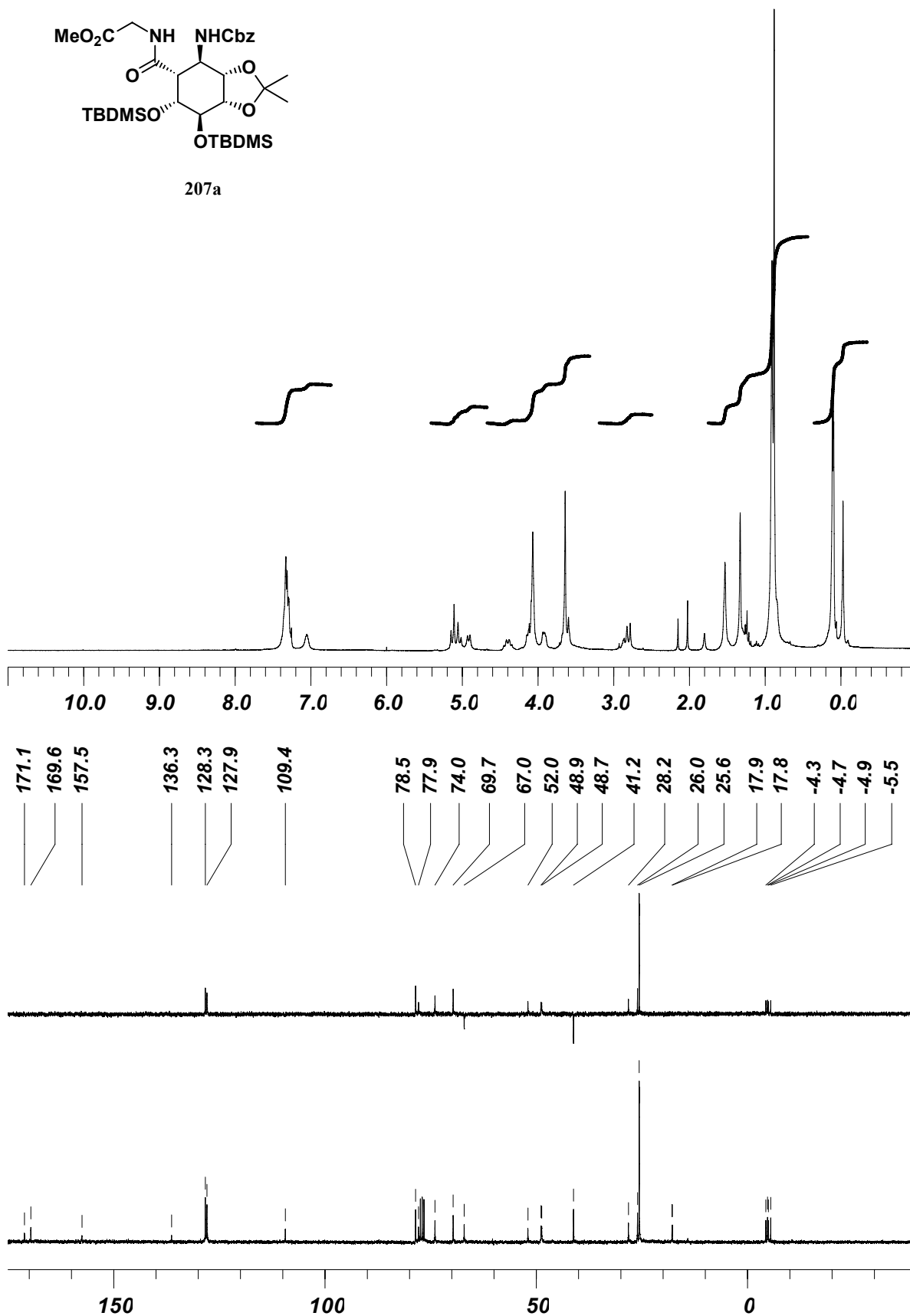
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3337 (a, NH); 1755 (f, CO); 1701 (f, CO); 1671 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 682 (13, MH⁺); 666 (4, [MH - CH₃]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

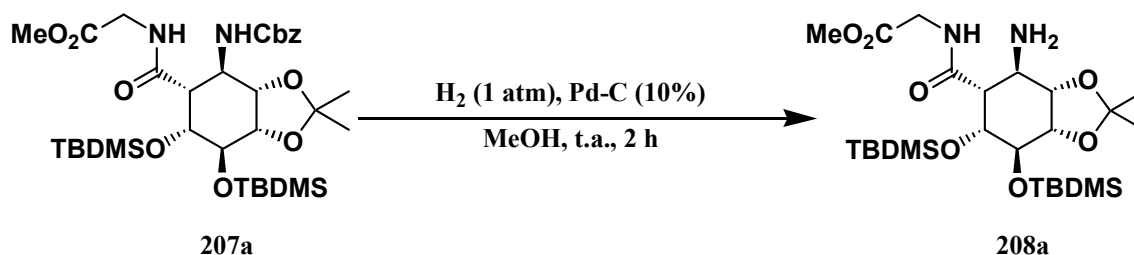
Análisis elemental: calculado para C₃₃H₅₆N₂O₉Si₂: C 58.20, H 8.29, N 4.11; encontrado C 58.49, H 8.04, N 3.97.



207a

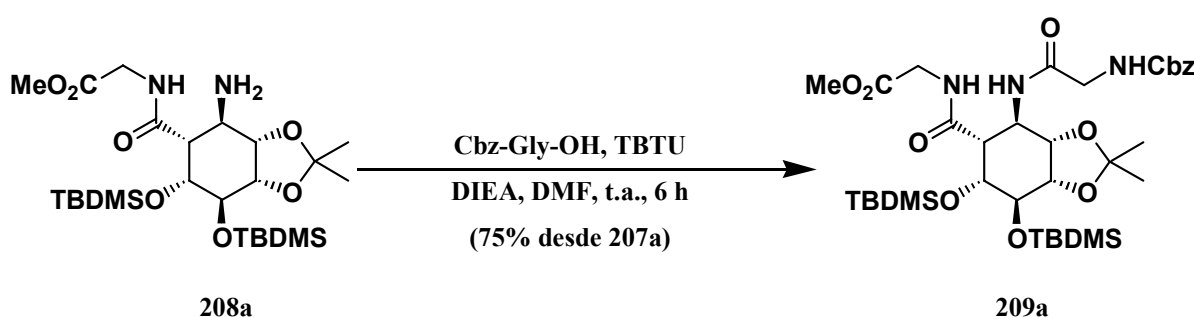


Preparación del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxi)ciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (208a).



En un matraz de fondo redondo de 10 mL con una disolución desoxigenada de 0.032 g (0.047 mmoles) del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxi)ciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (207a) en 1 mL de metanol se añadieron 0.032 g (10% en peso de paladio) de paladio sobre carbón activo al 10% y la mezcla se purgó con hidrógeno. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente bajo 1 atmósfera de presión de hidrógeno durante 2 horas y a continuación se filtró sobre celita y los líquidos filtrados se concentran a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxi)ciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (208a) como un aceite incoloro cromatográficamente puro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(2-(benciloxycarbonilamino)acetilamino)-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxi)ciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (209a).



Una disolución del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxi)ciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (208a) en 1 mL de *N,N*-dimetilformamida seca, se añadió a través de una cánula sobre una disolución de 0.011 g (0.054 mmoles, 1.15 eq) de *N*-benciloxycarbonilglicina y 0.030 g (0.087 mmoles, 1.85 eq) de TBTU en 0.5 mL de *N,N*-dimetilformamida seca. Tras agitar 15 minutos a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se añadieron 0.025 mL (0.14 mmoles, 3 eq) de diisopropiltilamina seca y se continuó la

agitación durante 6 h más. Después se eliminó el disolvente en el rotavapor y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 2:3), aislándose 0.026 g (0.035 mmoles, 75% desde **207a**) del 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(2-(benciloxycarbonilamino)acetilamido)-5,6-bis-(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxyciclohexanocarboxamido)acetato de metilo (**209a**), como un aceite amarillo. $[\alpha]_D^{20}$: -16.4° (c 1.66, CHCl₃).

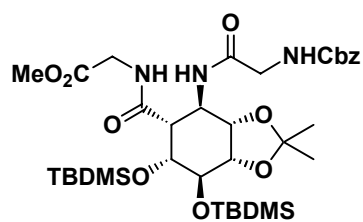
RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm): -0.05 (s, 3H, CH₃-Si); 0.09 (s, 3H, CH₃-Si); 0.12 (s, 3H, CH₃-Si); 0.13 (s, 3H, CH₃-Si); 0.90 (s, 9H, 3 x CH₃-^{*t*}BuSi); 0.92 (s, 9H, 3 x CH₃-^{*t*}BuSi); 1.32 (s, 3H, CH₃); 1.51 (s, 3H, CH₃); 1.80 (sa, 1H, NH); 2.82-2.91 (m, 1H, H-1); 3.48 (dd, 1H, *J*=4.7 Hz, *J*=17.0 Hz, H-Gly); 3.65 (s, 3H, OCH₃); 3.84 (dd, 1H, *J*=5.3 Hz, *J*=17.0 Hz, H-Gly); 3.94 (dd, 1H, *J*_{3,4}=4.7 Hz, *J*_{2,3}=8.8 Hz, H-3); 4.03-4.15 (m, 4H, H-4 + H-5 + H-6 + H-Gly); 4.31 (dd, 1H, *J*=7.0 Hz, *J*=17.0 Hz, H-Gly); 4.73-4.83 (m, 1H, H-2); 5.13 (s, 2H, CH₂Ph); 6.31 (sa, 1H, NH); 7.02 (sa, 1H, NH); 7.31-7.37 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm): -5.6 (CH₃); -4.9 (CH₃); -4.8 (CH₃); -4.4 (CH₃); 17.8 (C); 17.9 (C); 25.5 (3 x CH₃); 25.6 (3 x CH₃); 26.1 (CH₃); 28.1 (CH₃); 41.1 (CH₂); 45.2 (CH₂); 46.1 (CH); 48.9 (CH); 52.2 (OCH₃); 67.1 (CH₂); 69.8 (CH); 73.9 (CH); 77.2 (CH); 78.5 (CH); 109.4 (C); 128.1 (3 x CH); 128.5 (2 x CH); 136.2 (C); 156.6 (CO); 170.5 (CO); 171.4 (CO); 171.5 (CO).

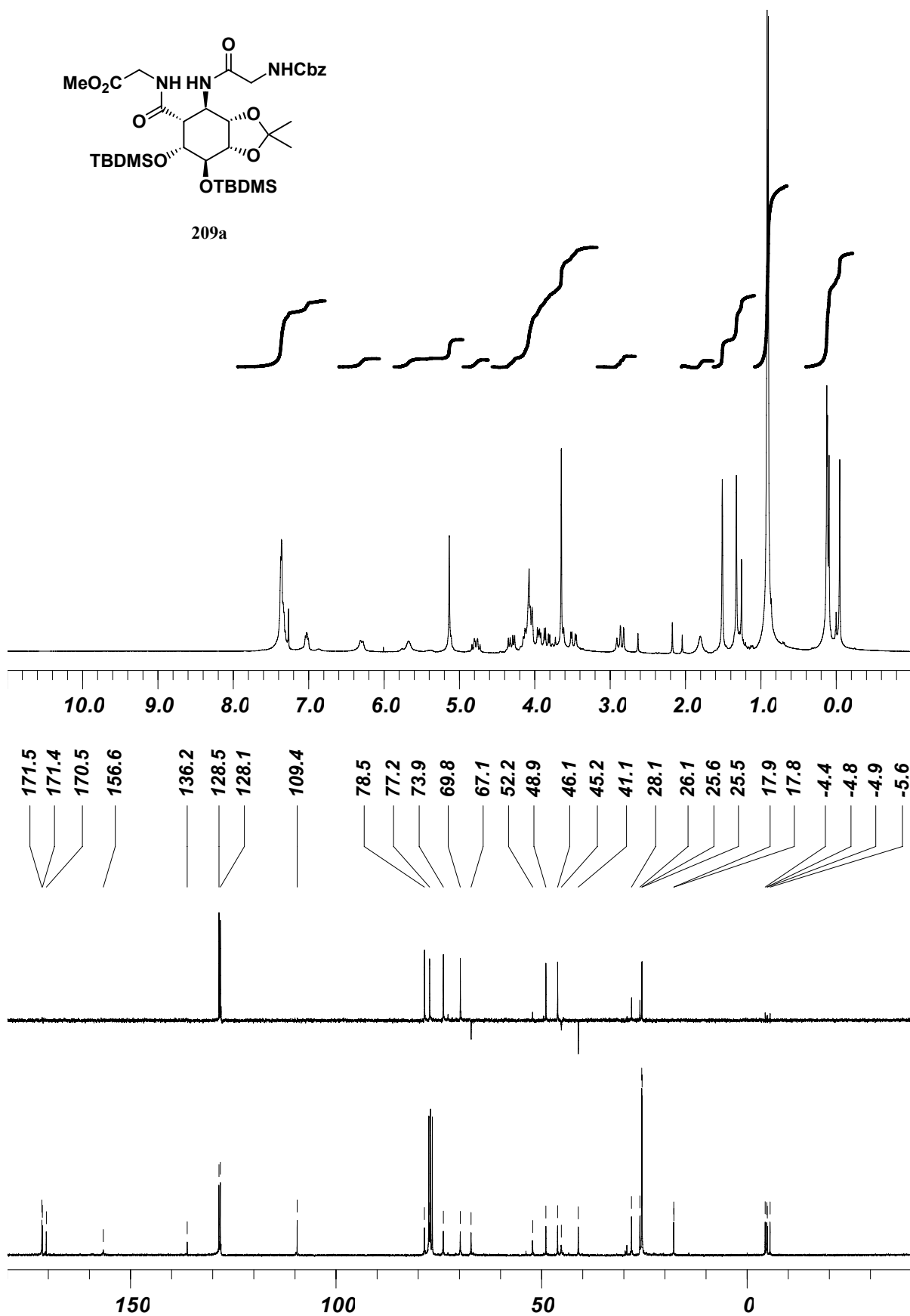
IR (ν̄, cm⁻¹): 3323 (a, NH); 1722 (f, CO); 1667 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 739 (50, MH₂⁺); 738 (100, MH⁺); 737 (60, M⁺); 91 (86, [PhCH₂]⁺).

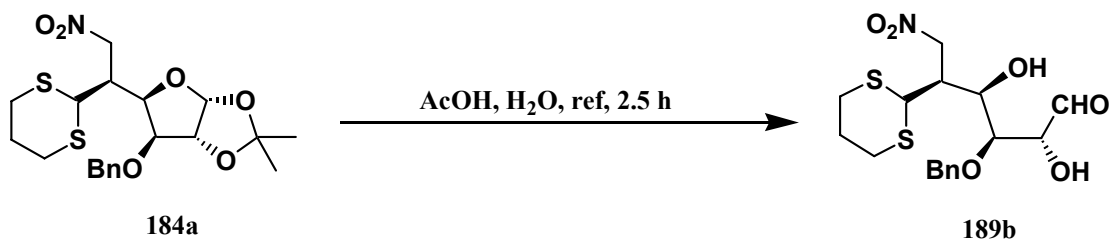
Análisis elemental: calculado para C₃₅H₅₉N₃O₁₀Si₂: C 56.96, H 8.06, N 5.69; encontrado C 57.28, H 8.14, N 5.37.



209a

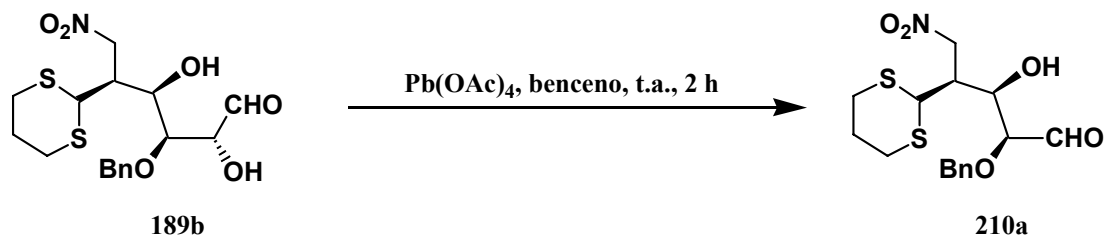


Preparación de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-6-nitro-*L*-idosa (**189b**).



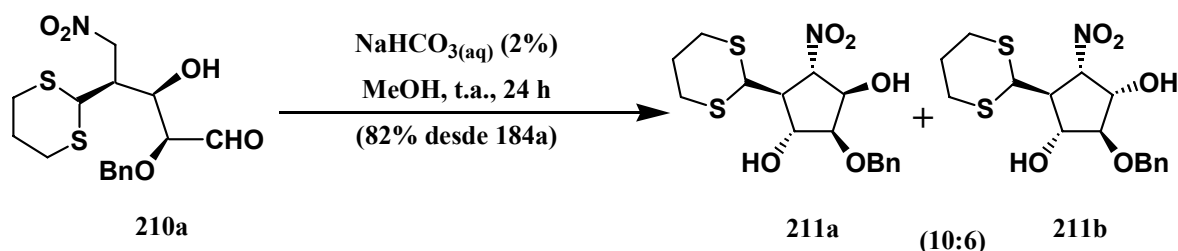
En un matraz de fondo redondo de 50 mL con un refrigerante acoplado, una disolución de 1.02 g (1.81 mmoles) de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -*L*-idofuranosa (**184a**) en 46 mL de una mezcla 3:1 de ácido acético y agua se calentó a reflujo durante 2.5 horas y a continuación se eliminó el disolvente en el rotavapor y se hicieron tres coevaporaciones con 10 mL de tolueno cada una. Se obtuvo así la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-6-nitro-*L*-idosa (**189b**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (2*S*,3*R*,4*S*)-2-benciloxi-4-(1,3-ditian-2-il)-3-hidroxi-5-nitropentanal (**210a**).



La 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditian-2-il)-6-nitro-*L*-idosa (**189b**) obtenida en la reacción anterior se disolvió en 23 mL de benceno y se le añadieron 1.02 g (2.31 mmoles, 1.0 eq) de tetraacetato de plomo. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se filtró, se diluyó con 50 mL de cloroformo y la disolución obtenida se lavó con agua (50 mL), disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (50 mL) y disolución acuosa saturada de cloruro sódico (50 mL), secándola luego con sulfato sódico anhidro, filtrándola y concentrándola a sequedad en el rotavapor. Se obtuvo así el (2*S*,3*R*,4*S*)-2-benciloxi-4-(1,3-ditian-2-il)-3-hidroxi-5-nitropentanal (**210a**) como un aceite incoloro cromatográficamente puro, que se usó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**211a**) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**211b**).



En un matraz de fondo redondo de 250 mL, se disolvió el (2*S*,3*R*,4*S*)-2-benciloxi-4-(1,3-ditian-2-il)-3-hidroxi-5-nitropentanal (**210a**) obtenido en la reacción anterior, en 60 mL de metanol y 20 mL (4.62 mmoles, 2.0 eq) de disolución acuosa al 2% de bicarbonato sódico. La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, se neutralizó con resina ácida DOWEX 50 WX4-50, se filtró y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:2) aislándose 0.71 g (1.89 mmoles, 82% desde **184a**) de una mezcla inseparable del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**211a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**211b**) en relación 10:6 (25% de e.d., calculado por RMN-¹³C), como un sólido amorfo de color blanco que se cristalizó de diclorometano, formando cristales incoloros de la mezcla **211a** + **211b**.

RMN-¹H (CD₃OD, 250 MHz, ppm): 1.71-2.04 (m, 4H, 2 x H-ditiano-211a + 2 x H-ditiano-211b); 2.61-2.91 (m, 8H, 4 x H-ditiano-211a + 4 x H-ditiano-211b); 3.04-3.23 (m, 2H, H-1-211a + H-1-211b); 3.71-3.81 (m, 2H, H-4-211a + H-4-211b); 3.98-4.05 (m, 2H, H-5-211a + H-5-211b); 4.15-5.15 (m, 10H, H-2-211a + H-2-211b + H-3-211a + H-3-211b + H-6-211a + H-6-211b + CH₂Ph-211a + CH₂Ph-211b); 7.25-7.40 (m, 10H, 5 x H-Ph-211a + 5 x H-Ph-211b).

RMN-¹³C (CD₃OD, 62.5 MHz, ppm): 26.2 (CH₂-211a); 26.3 (CH₂-211b); 28.9 (2 x CH₂-211a); 29.9 (CH₂-211b); 30.1 (CH₂-211b); 48.3 (CH-211b); 48.7 (CH-211a); 52.2 (CH-211b); 53.5 (CH-211a); 72.7 (CH₂-211a); 73.2 (CH₂-211b); 74.1 (CH-211b); 74.9 (CH-211a + CH-211b); 77.1 (CH-211a); 85.0 (CH-211a); 87.6 (CH-211b); 89.4 (CH-211b); 93.6 (CH-211a); 128.5 (CH-211a); 128.6 (2 x CH-211b); 128.8 (2 x CH-211a); 128.9 (CH-211b); 129.1 (2 x CH-211b); 129.3 (2 x CH-211a); 138.8 (C-211a); 139.2 (C-211b).

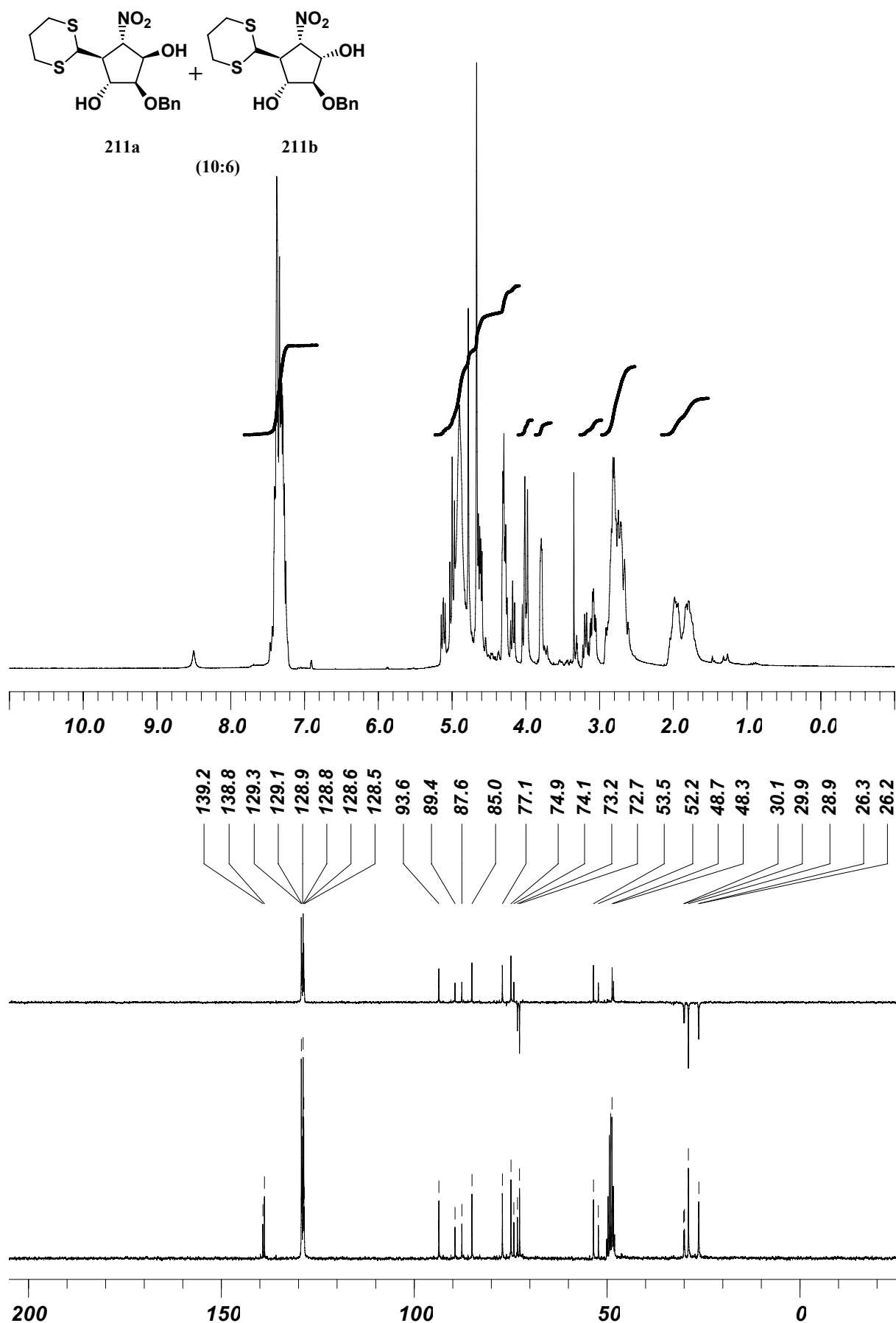
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3512 (a, OH); 3381 (a, OH); 1551 (f, NO₂); 1372 (f, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 371 (4, M⁺); 174 (52); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

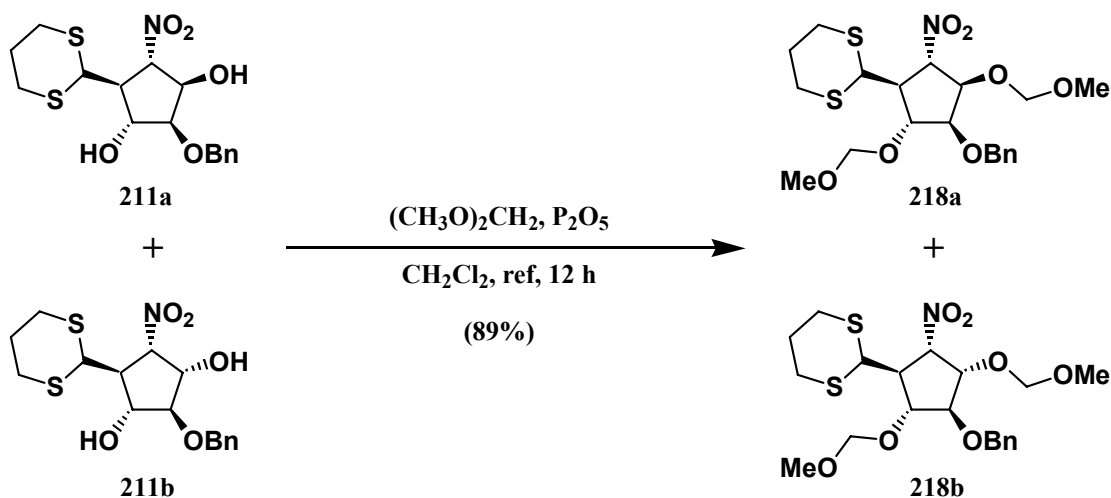
Análisis elemental: calculado para C₁₆H₂₁NO₅S₂: C 51.73, H 5.70, N 3.77, S 17.26; encontrado C 51.56, H 6.00, N 3.57, S 17.61.

Rayos X:

Crystal identification	re05oc1n
Chemical formula	C ₁₆ H ₂₁ NO ₅ S ₂
Formula weight	371.46
Temperature (K)	293
Wavelength (Å)	0.71069
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	12.727(3)
<i>b</i> (Å)	5.5940(12)
<i>c</i> (Å)	13.091(3)
α (°)	90
β (°)	114.634
γ (°)	90
Cell volume (Å ³)	847.2(3)
Z	2
Calculated density (Mg/m ³)	1.456
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.341
F ₀₀₀	392
Crystal size (mm)	0.25 x 0.1 x 0.1
Description of crystal	Colourless prism
Absorption correction	None
Transmission coefficients (min, max)	0.9197, 0.9667
θ range for data collection (°)	1.71 \leq θ \leq 26.43
Index ranges	-15 \leq <i>h</i> \leq 14, -6 \leq <i>k</i> \leq 6, 0 \leq <i>l</i> \leq 16
Reflections measured	7163
Unique reflections	3368
R _{int}	0.0349
Observed reflections (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	3368
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Parameters refined	272
Weighting scheme	Chebyshev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.086
R	0.0593
wR	0.0875
Residual electron density (min, max) (eÅ ⁻³)	-0.267, 0.235



Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**218a**) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**218b**).



En un matraz de fondo redondo de 50 mL conectado a un refrigerante y bajo atmósfera de argón, a una disolución de 0.23 g (0.62 mmoles) de una mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**211a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**211b**) en 13 mL de diclorometano seco, se le añadieron 1.7 mL (18.57 mmoles, 30 eq) de formaldehidodimetilacetal y 0.527 g (3.71 mmoles, 6 eq) de pentóxido de fósforo y la suspensión resultante se calentó a reflujo durante 12 horas. Luego se filtró y se eliminaron los disolventes en el rotavapor y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:6) aislándose 0.25 g (0.55 mmoles, 89%) de una mezcla inseparable del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**218a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal (**218b**), como un aceite amarillo.

RMN-¹H (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.79-2.13 (m, 4H, 2 x H-ditiano-218a + 2 x H-ditiano-218b); 2.61-2.90 (m, 8H, 4 x H-ditiano-218a + 4 x H-ditiano-218b); 3.18-3.42 (m, 2H, H-1-218a + H-1-218b); 3.29 (s, 3H, OCH_3 -218b); 3.31 (s, 3H, OCH_3 -218a); 3.37 (s, 3H, OCH_3 -218a); 3.39 (s, 3H, OCH_3 -218b); 3.70-3.96 (m, 4H, H-4-218a + H-5-218a + H-4-218b + H-5-218b); 4.08-4.38 (m, 4H, H-3-218a + H-6-218a + H-3-218b + H-6-218b); 4.56-4.80 (m, 12H, 2 x CH_2OMe -218a + CH_2Ph -218a + 2 x CH_2OMe -218b + CH_2Ph -218b); 5.13 (dd, 1H, $J_{2,3}=7.3 \text{ Hz}$, $J_{1,2}=8.9 \text{ Hz}$, H-2-218b); 5.23 (t, 1H, $J_{1,2}=J_{2,3}=6.6 \text{ Hz}$, H-2-218a); 7.23-7.35 (m, 10H, 5 x H-Ph-218a + 5 x H-Ph-218b).

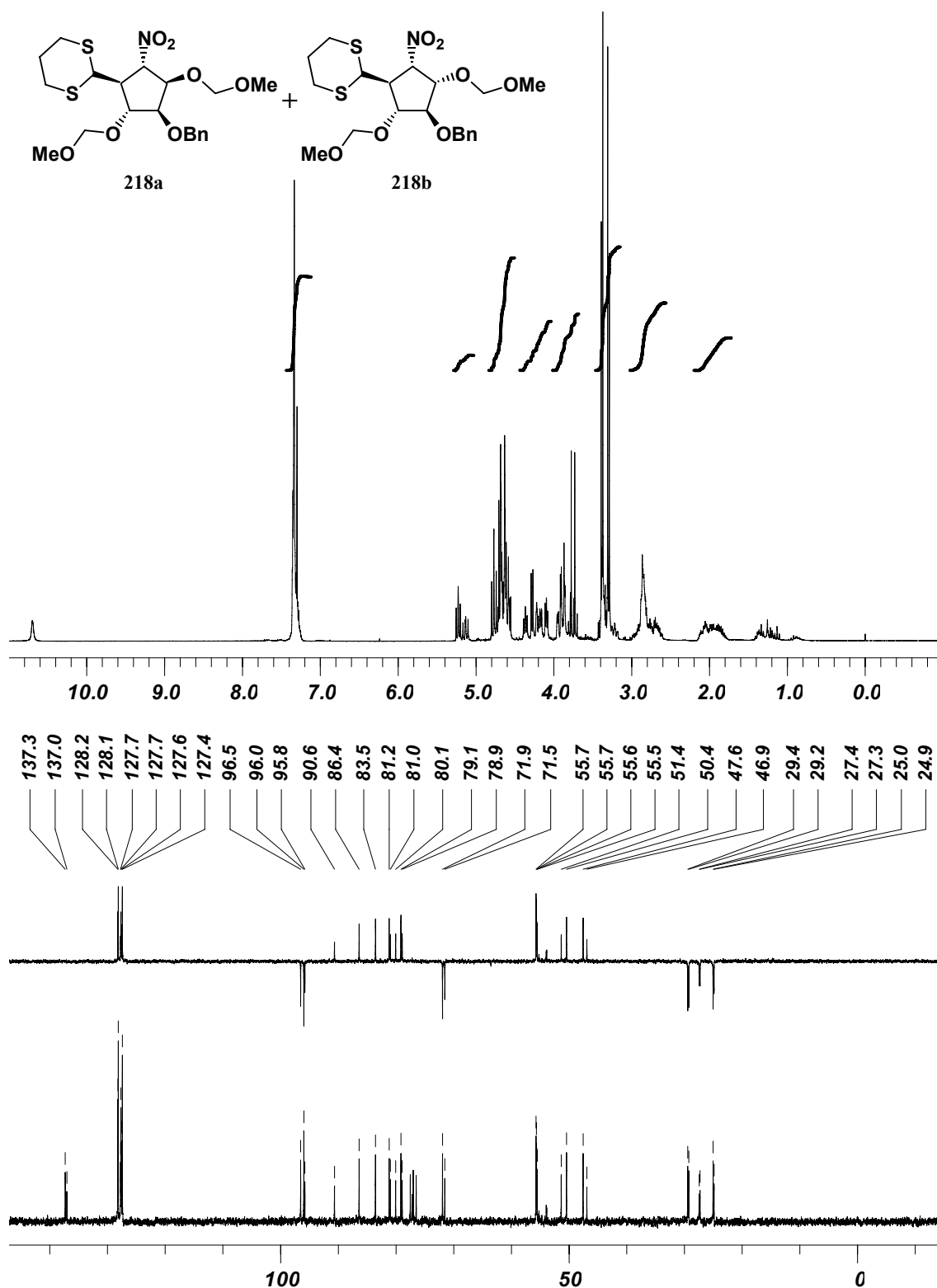
RMN-¹³C (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 24.9 (CH_2 -218b); 25.0 (CH_2 -218a); 27.3 (CH_2 -218b); 27.4 (CH_2 -218b); 29.2 (CH_2 -218a); 29.4 (CH_2 -218a); 46.9 (CH-218b); 47.6 (CH-218a); 50.4 (CH-218a); 51.4 (CH-218b); 55.5 (OCH_3 -218b); 55.6 (OCH_3 -218b); 55.6 (OCH_3 -218a); 55.7 (OCH_3 -218a); 71.5 (CH_2 -218b); 71.9 (CH_2 -218a); 78.9 (CH-218b); 79.1 (CH-218a); 80.1 (CH-218b); 81.0 (CH-218b); 81.2 (CH-218a); 83.5 (CH-218a); 86.4 (CH-218a); 90.6 (CH-218b); 95.8 (CH_2 -218b); 96.0 (CH_2 -218a + CH_2 -218b); 96.5 (CH_2 -218a);

127.4 (2 x CH-218a); 127.6 (2 x CH-218b); 127.7 (CH-218a); 127.7 (CH-218b); 128.1 (2 x CH-218a); 128.2 (2 x CH-218b); 137.0 (C-218b); 137.3 (C-218a).

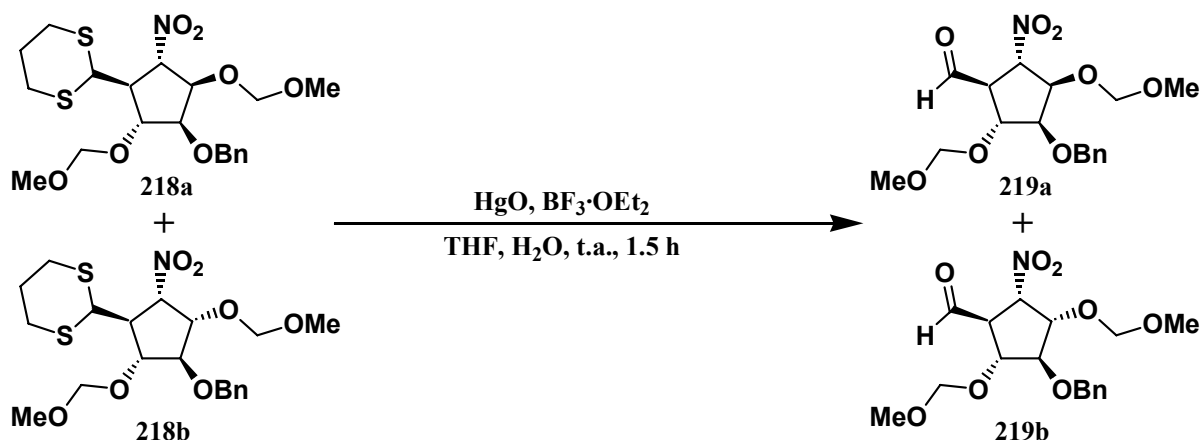
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 1554 (f, NO_2); 1368 (m, NO_2).

EM-IQ (m/z , %): 459 (3, M^+); 119 (57, $[\text{C}_4\text{H}_7\text{S}_2]^+$); 91 (100, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_7\text{S}_2$: C 52.27, H 6.36, N 3.05, S 13.95; encontrado C 52.45, H 6.22, N 2.89, S 14.05.

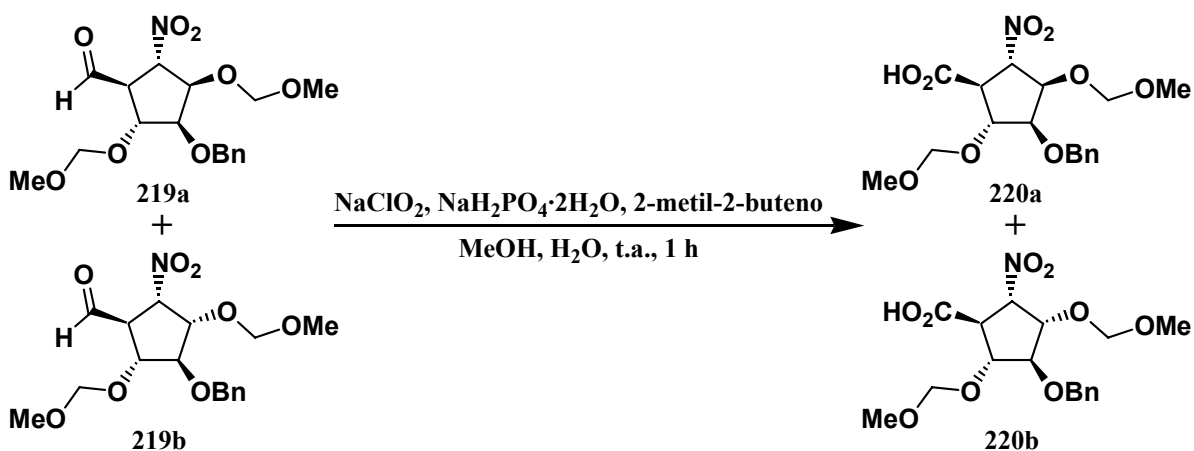


Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219a) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219b).



Se hicieron reaccionar 0.24 g (0.66 mmoles) de una mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído-ditiopropilenacetal (218a) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído-ditiopropilenacetal (218b) siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de 185a (pág. 381), obteniéndose una mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219a) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219b) como un aceite incoloro cromatográficamente puro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del ácido (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (220a) y del ácido (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (220b).



La mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (219a) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-

metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarbaldehído (**219b**) obtenida de la reacción anterior se trató en las condiciones de reacción descritas para la preparación de **151c** (pág. 381), obteniéndose una mezcla del ácido (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (**220a**) y el ácido (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (**220b**) como un aceite amarillo que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (221a**) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (**221b**).**



La mezcla del ácido (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (**220a**) y el ácido (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxílico (**220b**) obtenida de la reacción anterior se trató en las condiciones de reacción descritas para la preparación de **151a** (pág. 382), obteniéndose tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:5), 0.18 g (0.44 mmol, 67% desde **218a** + **218b**) de una mezcla inseparable del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (**221a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (**221b**), como un aceite incoloro.

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 3.29 (s, 3H, OCH₃-221b); 3.30 (s, 3H, OCH₃-221a); 3.33 (s, 3H, OCH₃-221b); 3.36 (s, 3H, OCH₃-221a); 3.55 (dd, 1H, *J*_{1,5}=2.7 Hz, *J*_{1,2}=6.9 Hz, H-1-221a); 3.70 (s, 3H, OCH₃-221a); 3.76 (s, 3H, OCH₃-221b); 3.83 (dd, 1H, *J*_{1,5}=6.7 Hz, *J*_{1,2}=9.6 Hz, H-1-221b); 3.95-3.98 (m, 2H, H-5-221a + H-5-221b); 4.21-4.25 (m, 1H, H-4-221b); 4.44-4.76 (m, 15H, H-3-221a + H-4-221a + 2 x CH₂OMe-221a + CH₂Ph-221a + H-3-221b + 2 x CH₂OMe-221b + CH₂Ph-221b); 5.30 (dd, 1H, *J*_{2,3}=5.5 Hz, *J*_{1,2}=9.6 Hz, H-2-221b); 5.45 (dd, 1H, *J*_{1,2}=6.9 Hz, *J*_{2,3}=8.2 Hz, H-2-221a); 7.25-7.36 (m, 10H, 5 x H-Ph-221a + 5 x H-Ph-221b).

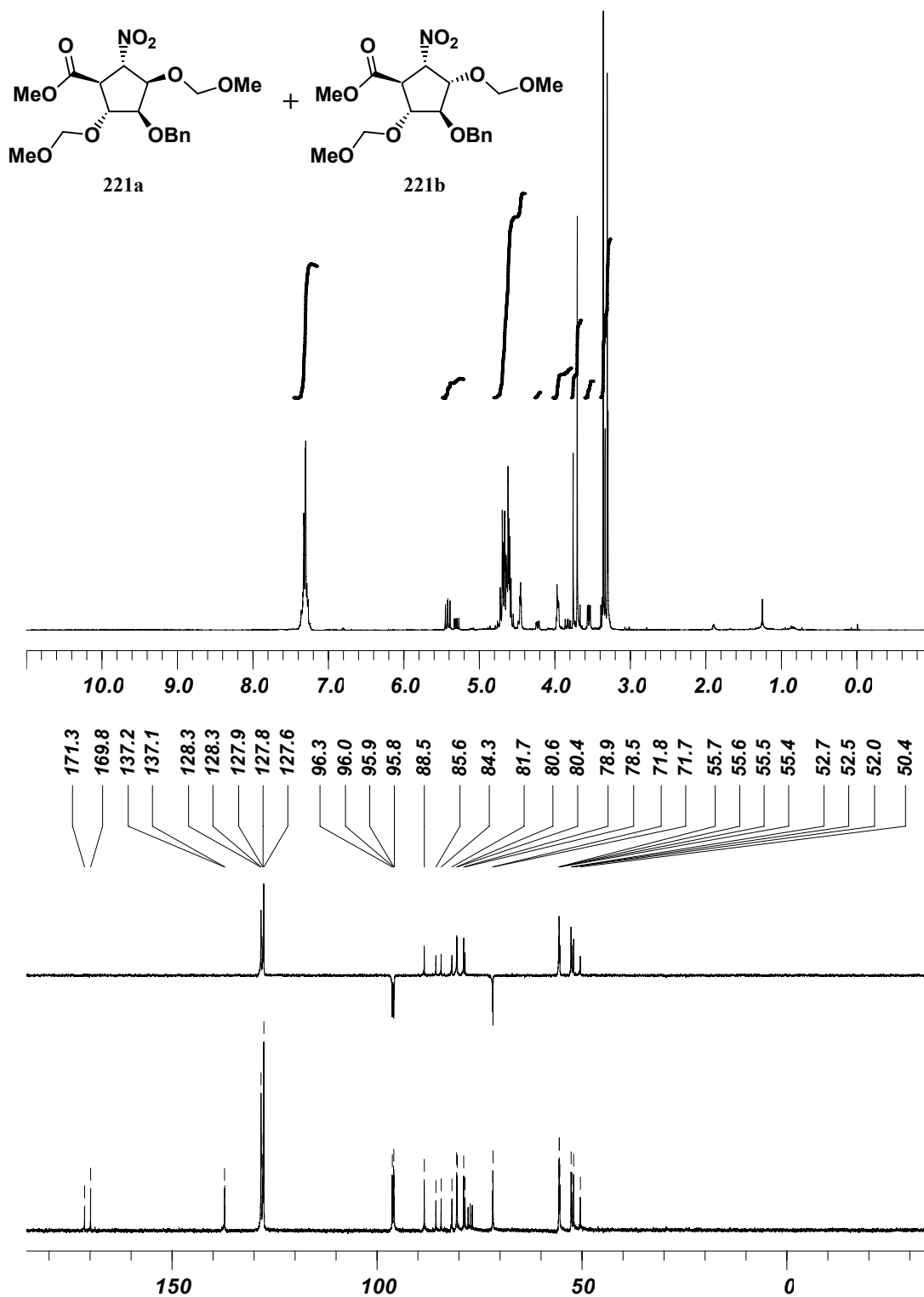
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 50.4 (CH-221b); 52.0 (CH-221a); 52.5 (OCH₃-221b); 52.7 (OCH₃-221a); 55.4 (OCH₃-221b); 55.5 (OCH₃-221a); 55.6 (OCH₃-221a); 55.7 (OCH₃-221b); 71.7 (CH₂-221a); 71.8 (CH₂-221b); 78.5 (CH-221b); 78.9 (CH-221a); 80.4 (CH-221a); 80.6 (CH-221a); 81.7 (CH-221b); 84.3 (CH-

221b); 85.6 (CH-221b); 88.5 (CH-221a); 95.8 (CH₂-221b); 95.9 (CH₂-221a); 96.0 (CH₂-221b); 96.3 (CH₂-221a); 127.6 (2 x CH-221a + 2 x CH-221b); 127.8 (CH-221a); 127.9 (CH-221b); 128.3 (2 x CH-221a); 128.3 (2 x CH-221b); 137.1 (C-221b); 137.2 (C-221a); 169.8 (CO-221a); 171.3 (CO-221b).

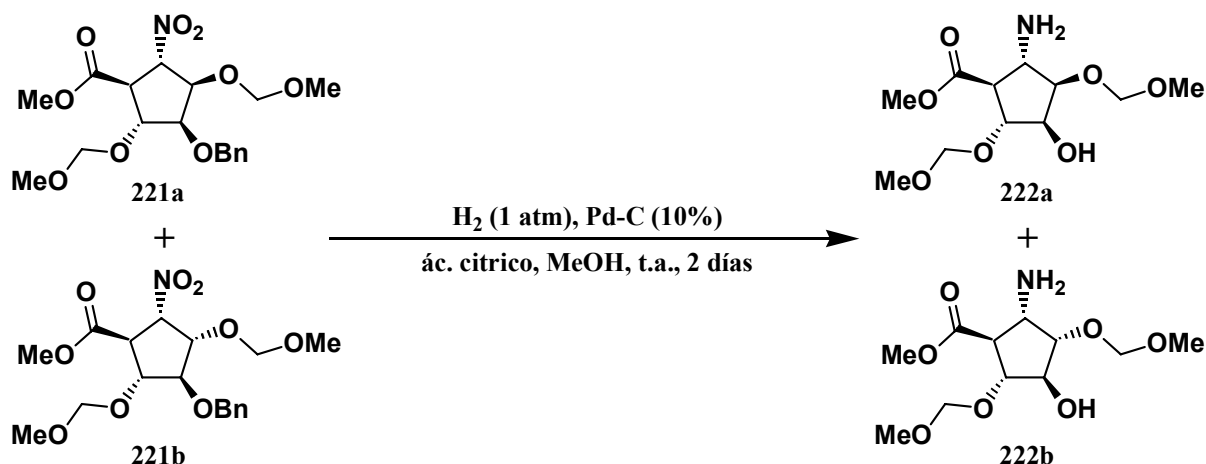
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1741 (f, CO); 1558 (f, NO₂); 1377 (m, NO₂).

EM-IQ (m/z, %): 400 (7, MH⁺); 354 (4, [M - C₂H₅O]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₈H₂₅NO₉: C 54.13, H 6.31, N 3.51; encontrado C 53.86, H 6.45, N 3.23.

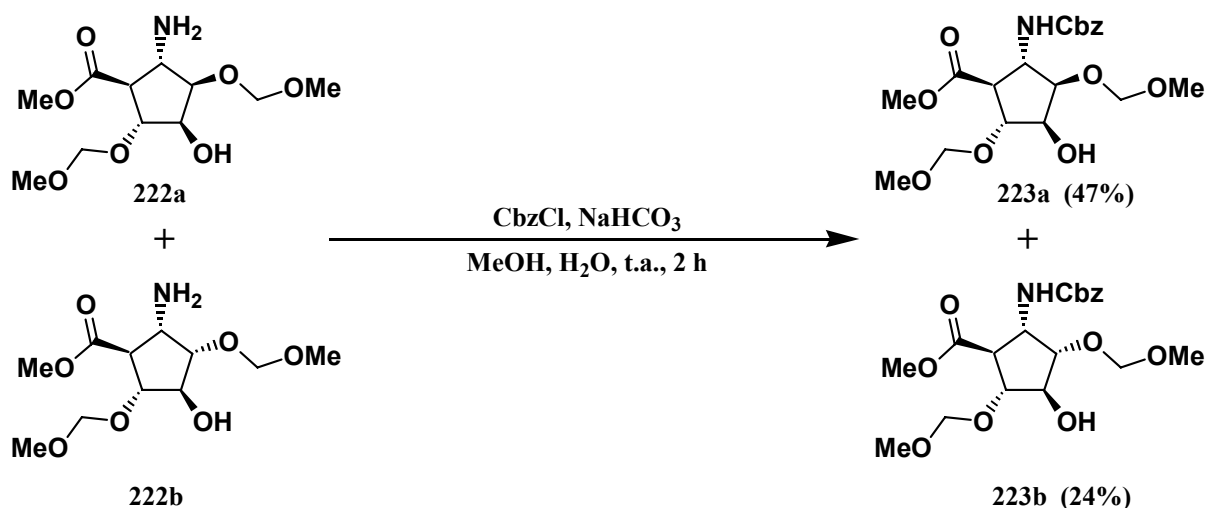


Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (222a) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (222b).



Se sometieron 0.33 g (0.84 mmoles) de una mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (221a) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-bis-metoximetoxi-2-nitrociclopentanocarboxilato de metilo (221b) a las condiciones de hidrogenación descritas para la preparación de 188c (pág. 388), obteniéndose una mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (222a) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (222b) como un aceite incoloro que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Preparación del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (223a) y del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (223b).



La mezcla del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (**222a**) y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-amino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (**222b**) obtenida en la reacción anterior, se sometió a las condiciones de reacción descritas para la preparación de **188a** (pág. 388), obteniéndose tras purificación por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano 1:1), 0.16 g (0.39 mmoles, 47%) del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (**223a**) como un aceite amarillo con $[\alpha]_{D^{20}}$: -4.9° (c 2.25, CHCl₃); y 0.08 g (0.20 mmoles, 24%) del (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (**223b**) como un aceite amarillo con $[\alpha]_{D^{20}}$: -19.1° (c 2.05, CHCl₃).

(1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (223a):

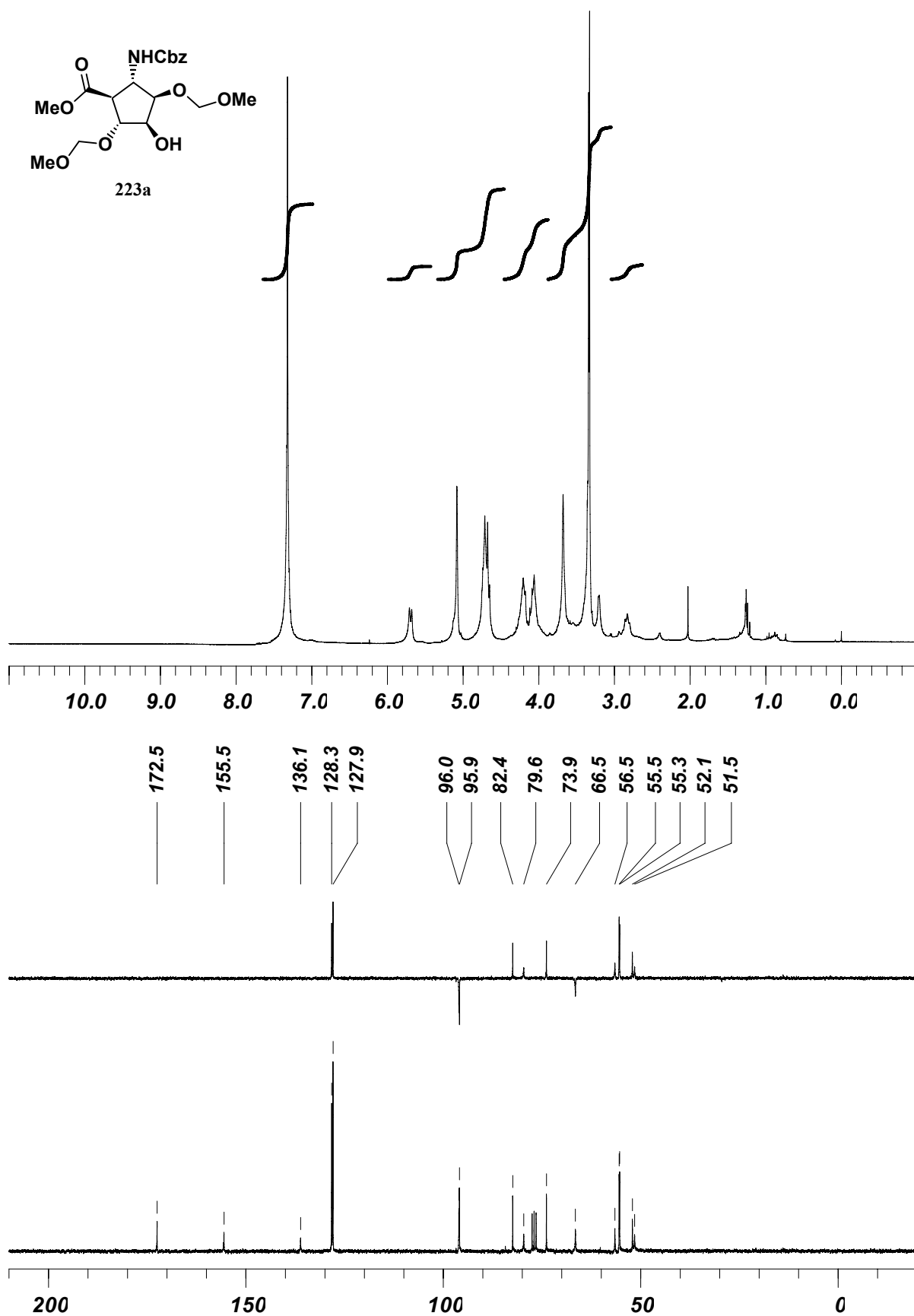
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 2.80-2.86 (m, 1H, H-1); 3.20 (s, 1H, OH); 3.32 (s, 3H, OCH₃); 3.34 (s, 3H, OCH₃); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 4.04-4.22 (m, 4H, H-2 + H-3 + H-4 + H-5); 4.65-4.75 (m, 4H, 2 x CH₂OMe); 5.08 (s, 2H, CH₂Ph); 5.69 (d, 1H, *J*=7.7 Hz, NH); 7.31-7.33 (m, 5H, 5 x H-Ph).

RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 51.5 (CH); 52.1 (OCH₃); 55.3 (OCH₃); 55.5 (OCH₃); 56.5 (CH); 66.5 (CH₂); 73.9 (CH); 79.6 (CH); 82.4 (CH); 95.9 (CH₂); 96.0 (CH₂); 127.9 (3 x CH); 128.3 (2 x CH); 136.1 (C); 155.5 (CO); 172.5 (CO).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3346 (a, OH + NH), 1731 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 414 (13, MH⁺); 354 (24, [M - C₂H₃O₂]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₂₇NO₉: C 55.20, H 6.58, N 3.39; encontrado C 55.45, H 6.81, N 3.31.



(1S,2S,3S,4S,5R)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo (223b):

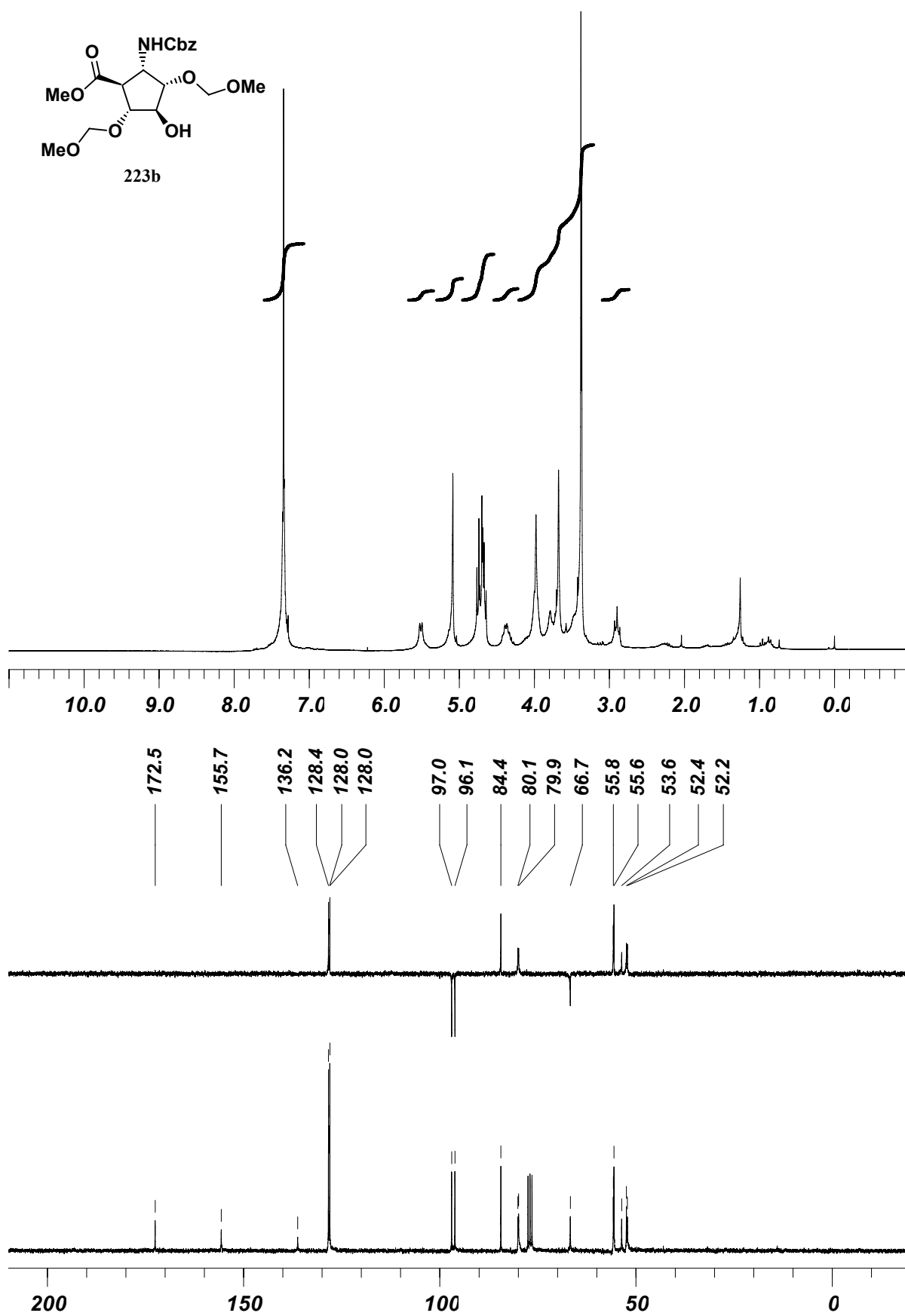
RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 2.86-2.93 (m, 1H, H-1); 3.37 (s, 3H, OCH₃); 3.38 (s, 3H, OCH₃); 3.42-4.42 (m, 5H, OH + H-2 + H-3 + H-4 + H-5); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 4.64-4.76 (m, 4H, 2 x CH₂OMe); 5.08 (s, 2H, CH₂Ph); 5.51 (d, 1H, J=7.6 Hz, NH); 7.31-7.35 (m, 5H, 5 x H-Ph).

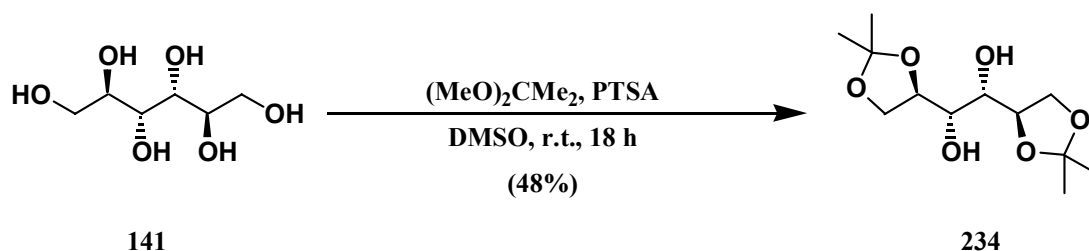
RMN-¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 52.2 (OCH₃); 52.4 (OCH₃); 53.6 (CH); 55.6 (OCH₃); 55.8 (CH); 66.7 (CH₂); 79.9 (CH); 80.1 (CH); 84.4 (CH); 96.1 (CH₂); 97.0 (CH₂); 128.0 (2 x CH); 128.0 (CH); 128.4 (2 x CH); 136.2 (C); 155.7 (CO); 172.5 (CO).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3438 (a, OH + NH), 1729 (f, CO); 1704 (f, CO).

EM-IQ (m/z, %): 414 (8, MH⁺); 354 (16, [M - C₂H₃O₂]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₂₇NO₉: C 55.20, H 6.58, N 3.39; encontrado C 55.38, H 6.72, N 3.21.



Preparation of 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-D-mannitol (**234**).

D-Mannitol (**141**) (61 g, 335.9 mmol), anhydrous dimethylsulfoxide (150 mL), 2,2-dimethoxypropane (120 mL, 1004.6 mmol, 3 eq) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (6.37 g, 33.49 mmol, 0.1 eq) were poured into a round bottom flask and the mixture was stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for 18 hours. Then the solution was added over sodium bicarbonate aqueous solution (3%, 400 mL) and the mixture was extracted with ethyl acetate (5 x 100 mL). The pooled organics layers were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude white solid obtained was crystallized from a mixture of diethyl ether/hexane (1:3) to give 42.3 g (161.3 mmol, 48%) of 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-D-mannitol (**234**) as a white solid with m.p. 120-122 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +1.9° (c 1.70, in methanol).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.34 (s, 6H, 2 x CH₃); 1.39 (s, 6H, 2 x CH₃); 2.86 (br s, 2H, 2 x OH); 3.72 (d, 2H, $J_{2,3}=6.6$ Hz, 2 x H-3); 3.97 (dd, 2H, $J_{1,2}=5.1$ Hz, $J_{1,1}=8.3$ Hz, 2 x H-1); 4.09 (dd, 2H, $J_{1,2}=6.3$ Hz, $J_{1,1}=8.3$ Hz, 2 x H-1); 4.12-4.17 (m, 2H, 2 x H-2).

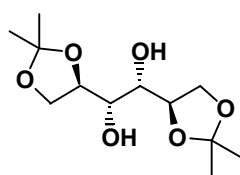
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 25.2 (2 x CH₃); 26.7 (2 x CH₃); 66.7 (2 x CH₂); 71.0 (2 x CH); 76.0 (2 x CH); 109.3 (2 x C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3446 (br, OH); 3292 (br, OH).

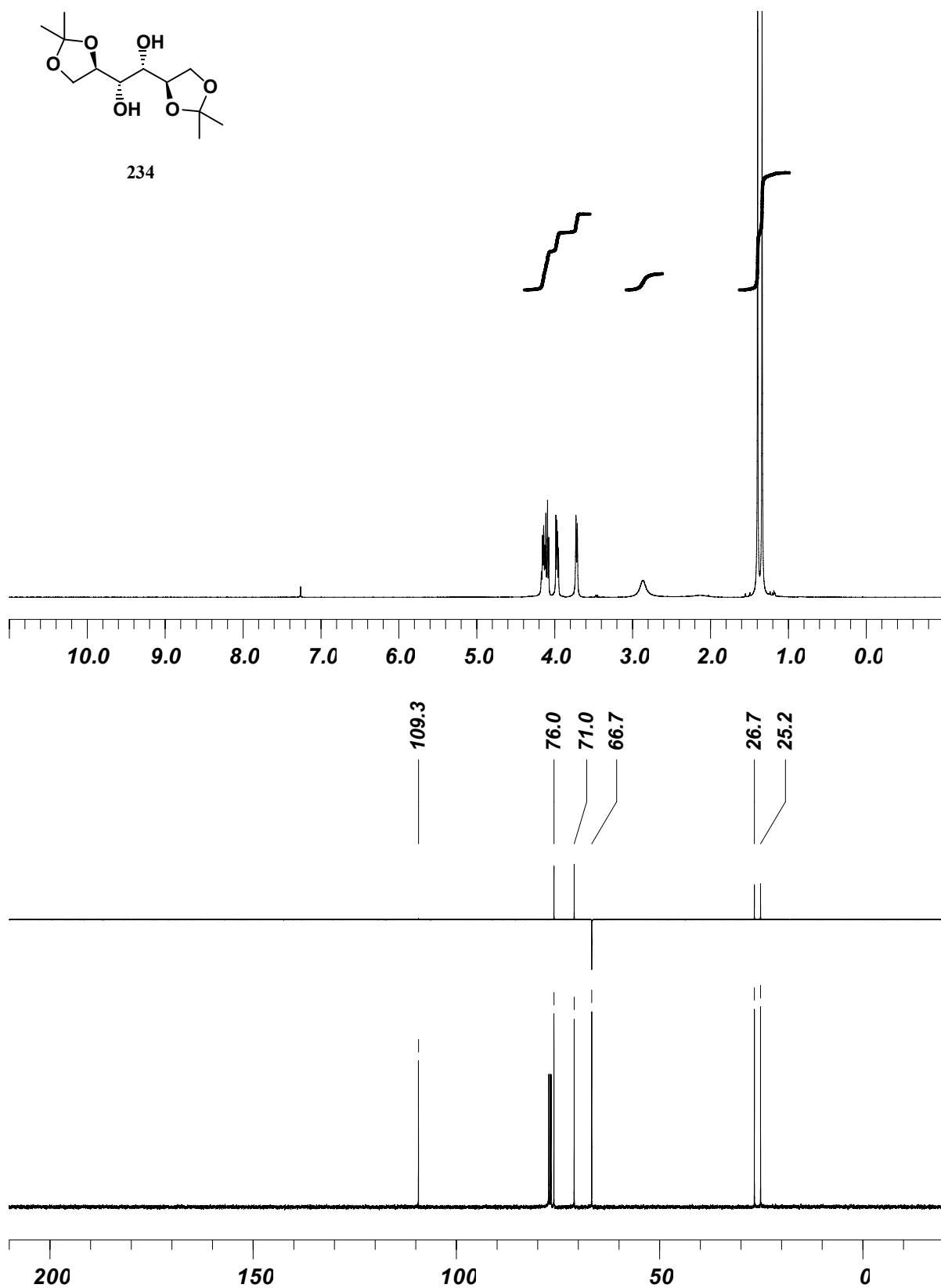
MS-ES (m/z, %): 261 (100, [M-H]).

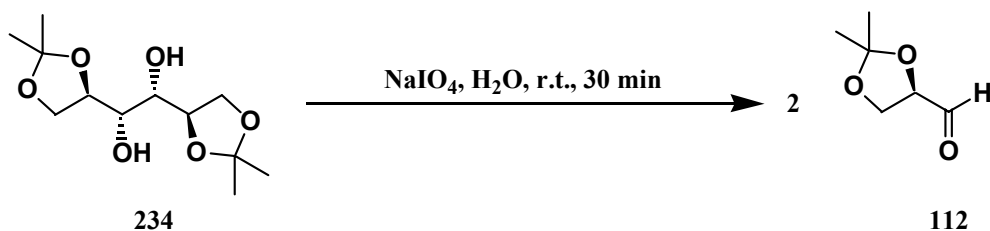
HRMS calculated for C₁₂H₂₂NaO₆ (MNa⁺): 285.1314. Found: 285.1309. $\Delta m=5 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for C₁₂H₂₂O₆: C 54.95; H 8.45. Found: C 54.80; H 8.50.

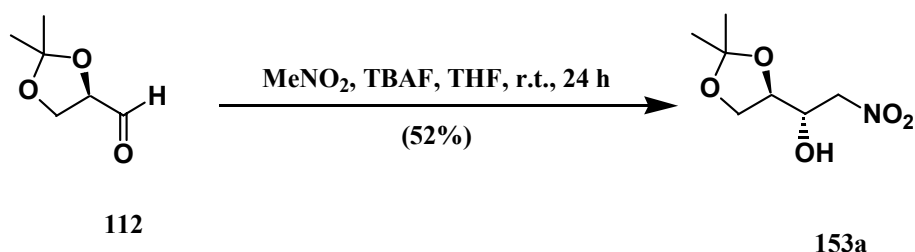


234



Preparation of 1,2-*O*-isopropylidene-D-glyceraldehyde (**112**).

1,2:5,6-Di-*O*-isopropylidene-D-mannitol (**234**) (2.02 g, 7.70 mmol) was added, portion wise, over a solution of sodium metaperiodate (2.31 g, 10.78 mmol, 1.4 eq) in water (40 mL) cooled at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm at room temperature, the stirring continued for 30 min, ethanol (40 mL) was added and the suspension filtered. The resulting solution was evaporated *in vacuo*, the residue was dissolved into methylene chloride (30 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered, evaporated *in vacuo* and the resulting residue was dried in the vacuum line to obtain the 1,2-*O*-isopropylidene-D-glyceraldehyde (**112**), which was used in the next reaction without further purification.

Preparation of (*S*)-1-((*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-nitroethanol (**153a**).

To a solution of 1,2-*O*-isopropylidene-D-glyceraldehyde (**112**) obtained from the above reaction, anhydrous tetrahydrofuran (33 mL), anhydrous nitromethane (1.44 mL, 30.8 mmol, 2 eq) and 1.0 M tetrabutylammonium fluoride solution (7.7 mL, 7.7 mmol, 1 eq) were added and the resulting solution was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 15 hours. The solvents were then evaporated up to ¼ of its volume, ethyl acetate (40 mL) was added and the mixture was washed with brine (2 x 40 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*. The resulting oil was crystallized from toluene to give (*S*)-1-((*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-nitroethanol (**153a**) (1.52 g, 7.95 mmol, 52%) as a white solid with m.p. 59-61 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -6.6° (c 5.00, in chloroform).

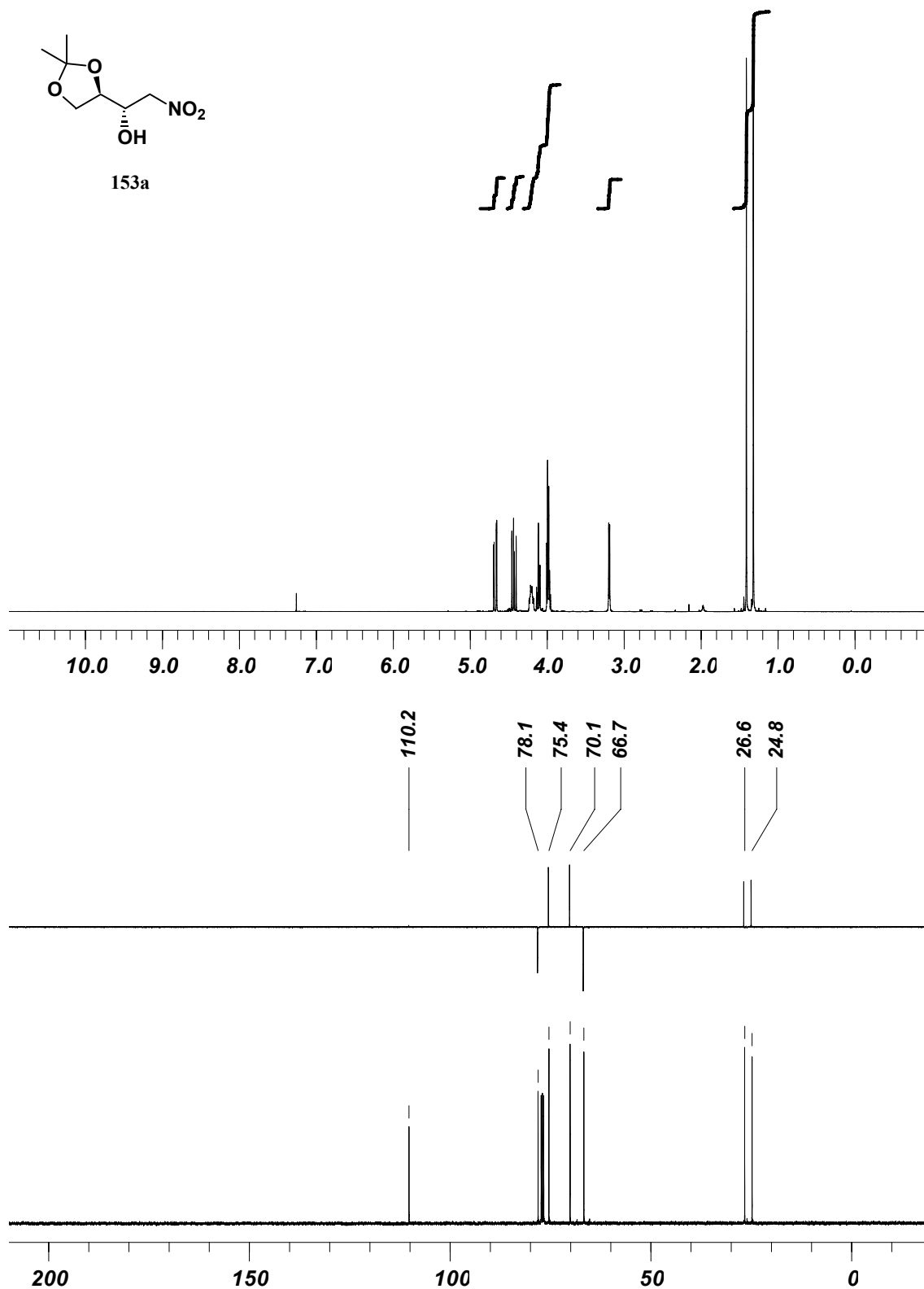
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.32 (s, 3H, CH₃); 1.41 (s, 3H, CH₃); 3.20 (br s, 1H, OH); 3.96-4.01 (m, 2H, H-5 + H-4); 4.09-4.14 (m, 1H, H-5); 4.18-4.24 (m, 1H, H-1); 4.43 (dd, 1H, $J_{1,2}=9.1$ Hz, $J_{2,2}=13.9$ Hz, H-2); 4.67 (dd, 1H, $J_{1,2}=2.3$ Hz, $J_{4,2}=13.9$ Hz, H-2).

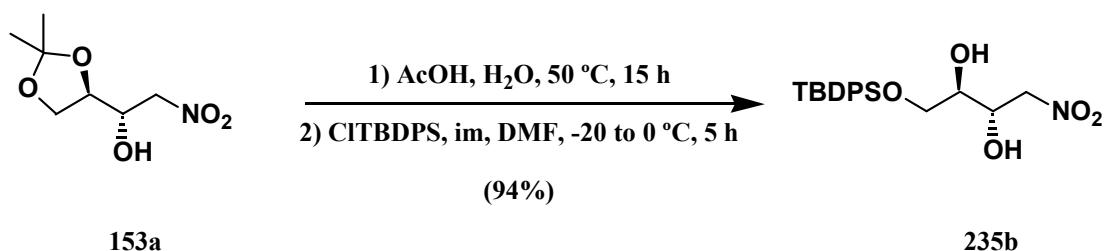
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, ppm): 24.8 (CH_3); 26.6 (CH_3); 66.7 (CH_2); 70.1 (CH); 73.4 (CH); 78.1 (CH_2); 110.2 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3365 (br, OH), 1554 (st, NO_2), 1386 (st, NO_2).

MS-ES (m/z , %): 190 (100, $[\text{M-H}]^-$).

Anal. calculated for $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_5$: C 43.98; H 6.85; N 7.33. Found: C 44.15; H 6.82; N 7.07.



Preparation of (2*R*,3*S*)-1-(*t*-butyldiphenylsilyloxy)-4-nitrobutane-2,3-diol (**235b**).

A solution of (*S*)-1-((*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-nitroethanol (**153a**) (3.69 g, 19.32 mmol) in a mixture of acetic acid and water (3:1, 310 mL) was heated at 50 °C for 15 hours, when t.l.c. (ethyl acetate-cyclohexane 1:1) showed absence of starting material. The solvents were then eliminated *in vacuo* and the residue coevaporated with toluene (3 x 50 mL). The crude residue was dried in the vacuum line, dissolved in dry DMF (48 mL), cooled to -20 °C, and then imidazole (3.42 g, 50.23 mmol, 2.6 eq) and *t*-butyldiphenylsilyl chloride (5.53 mL, 21.25 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was then stirred under nitrogen atmosphere at 0 °C for 5 hours when t.l.c. (ethyl acetate/cyclohexane 3:1) showed no starting material and brine (20 mL) was added. The mixture was extracted with ethyl acetate (5 x 20 mL) and the pooled organic layers were dried with anhydrous magnesium sulphate and evaporated to give a residue that was purified by flash column chromatography (dichloromethane/methanol 100:1) to afford (2*R*,3*S*)-1-(*t*-butyldiphenylsilyloxy)-4-nitrobutane-2,3-diol (**235b**) (7.07 g, 18.16 mmol, 94%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -18.1° (c 1.80, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.09 (s, 9H, 3 x CH₃); 2.55-2.57 (m, 2H, 2 x OH); 3.59-3.64 (m, 1H, H-2); 3.81-3.88 (m, 2H, 2 x H-1); 4.27-4.33 (m, 1H, H-3); 4.48 (dd, 1H, *J*_{3,4}=8.9 Hz, *J*_{4,4}=13.7 Hz, H-4); 4.73 (dd, 1H, *J*_{3,4}=2.4 Hz, *J*_{4,4}=13.7 Hz, H-4); 7.39-7.49 (m, 6H, 6 x H-Ph); 7.64-7.68 (m, 4H, 4 x H-Ph).

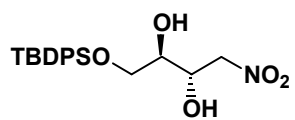
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 19.1 (C); 26.8 (3 x CH₃); 63.9 (CH₂); 69.3 (CH); 71.7 (CH); 78.1 (CH₂); 127.9 (2 x CH); 127.9 (2 x CH); 130.0 (CH); 130.0 (CH); 132.4 (C); 132.4 (C); 135.4 (4 x CH).

IR (ν̄, cm⁻¹): 3446 (br, OH), 1556 (st, NO₂).

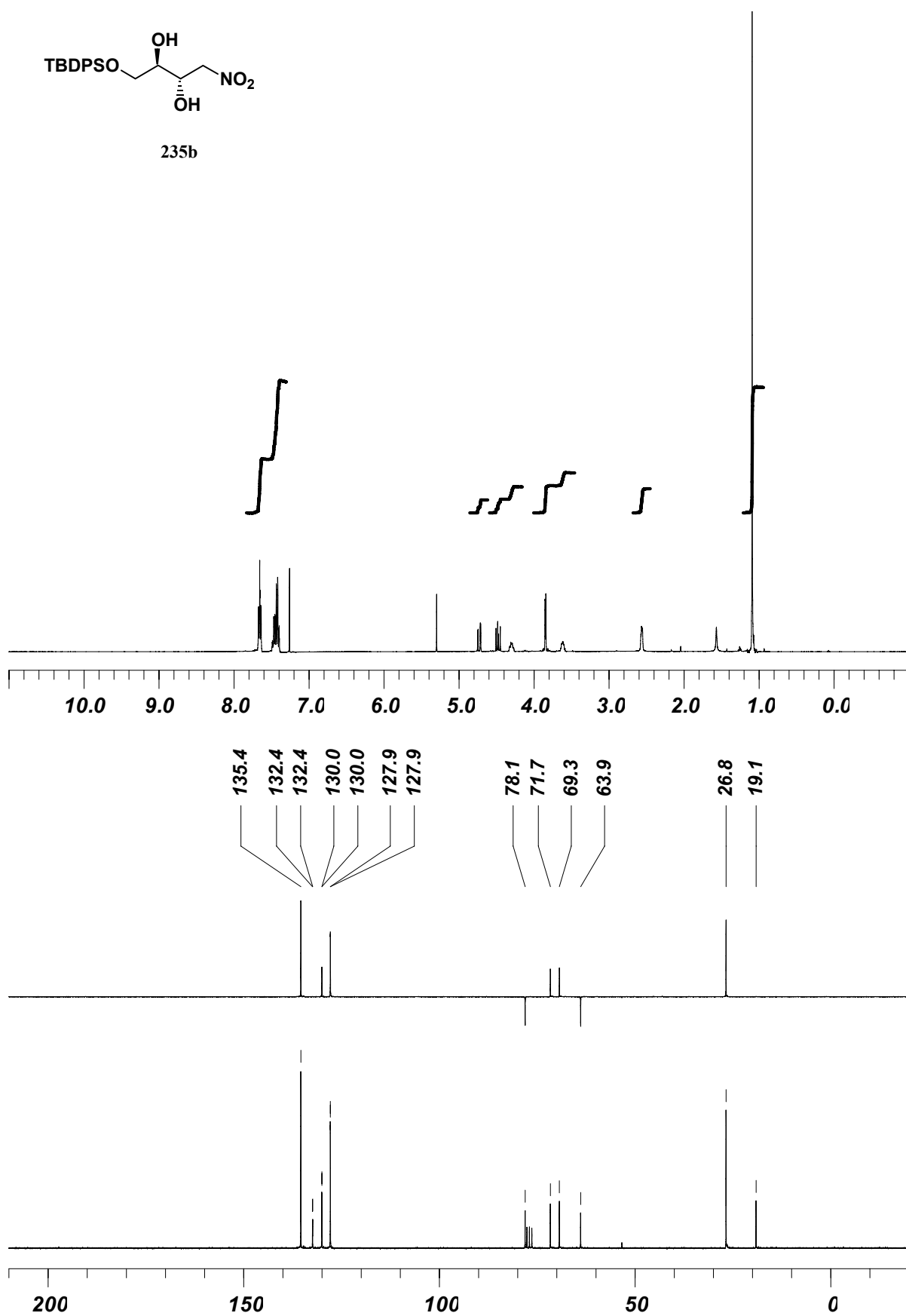
MS-ES (m/z, %): 389 (30, M⁺); 388 (100, [M - H]).

HRMS calculated for C₂₀H₂₇NNaO₅Si (MNa⁺): 412.1556. Found: 412.1551. Δm=5x10⁻⁴.

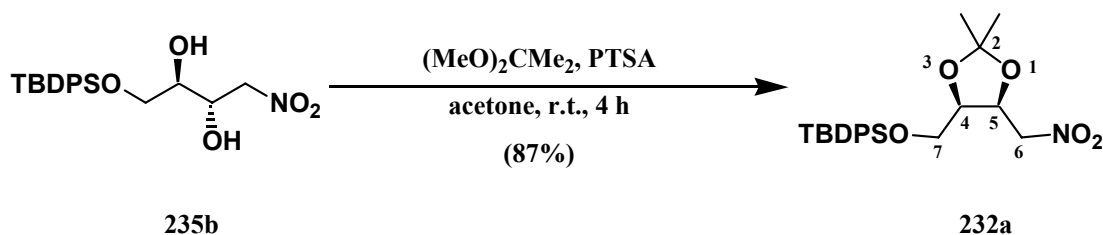
Anal. calculated for C₂₀H₂₇NO₅Si: C 61.67; H 6.99; N 3.60. Found: C 61.70; H 7.01; N 3.59.



235b



Preparation of *t*-butyl(((4*R*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-(nitromethyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (**232a**).



Anhydrous copper (II) sulphate (0.927 g, 5.81 mmol, 2.2 eq) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.076 g, 0.15 mmol, 0.15 eq) were added over a solution of (2*R*,3*S*)-1-(*t*-butyldiphenylsilyloxy)-4-nitrobutane-2,3-diol (**235b**) (1.030 g, 2.65 mmol) in 2,2-dimethoxypropane (32 mL) and acetone (21 mL). The reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for 4 hours and then drops of saturated sodium bicarbonate aqueous solution were added up to pH 7, the precipitate was filtered and the organic layer evaporated to dryness. The resulting oil was dissolved in ethyl acetate (30 mL), washed with brine (2 × 30 mL), dried with anhydrous magnesium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo* to obtain a yellow oil which on purification by flash column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 1:6) gave *t*-butyl(((4*R*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-(nitromethyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (**232a**) (0.985 g, 2.29 mmol, 87%), as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -30.5° (c 1.62, in chloroform).

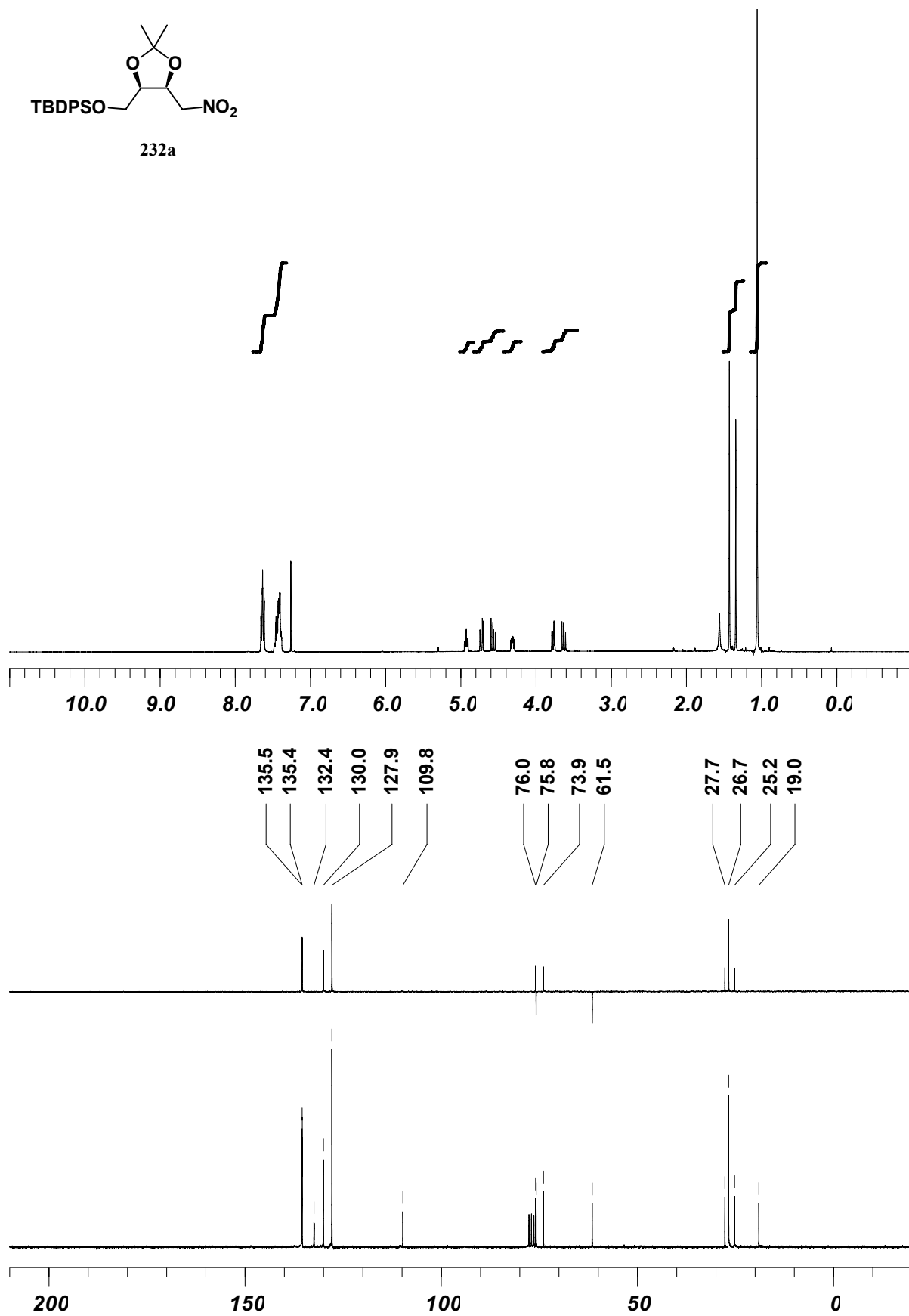
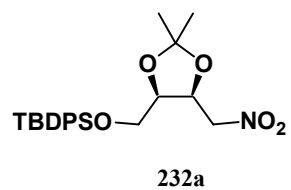
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.06 (s, 9H, 3 × CH₃); 1.34 (s, 3H, CH₃); 1.43 (s, 3H, CH₃); 3.63 (dd, 1H, $J_{4,7}=8.2$ Hz, $J_{7,7}=10.9$ Hz, H-7); 3.77 (dd, 1H, $J_{4,7}=4.1$ Hz, $J_{7,7}=10.9$ Hz, H-7); 4.31 (ddd, 1H, $J_{4,7}=4.1$ Hz, $J_{4,5}=6.1$ Hz, $J_{4,7}=8.2$ Hz, H-3); 4.57 (dd, 1H, $J_{5,6}=9.6$ Hz, $J_{6,6}=13.0$ Hz, H-6); 4.73 (dd, 1H, $J_{5,6}=3.4$ Hz, $J_{6,6}=13.0$ Hz, H-6); 4.93 (ddd, 1H, $J_{5,6}=3.4$ Hz, $J_{4,5}=6.1$ Hz, $J_{5,6}=9.6$ Hz, H-5); 7.38-7.48 (m, 6H, 6 × H-Ph); 7.61-7.66 (m, 4H, 4 × H-Ph).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 19.0 (C); 25.2 (CH₃); 26.7 (3 × CH₃); 27.7 (CH₃); 61.5 (CH₂); 73.9 (CH); 75.8 (CH₂); 76.0 (CH); 109.8 (C); 127.9 (4 × CH); 130.0 (2 × CH); 132.4 (2 × C); 135.4 (2 × CH); 135.5 (2 × CH).

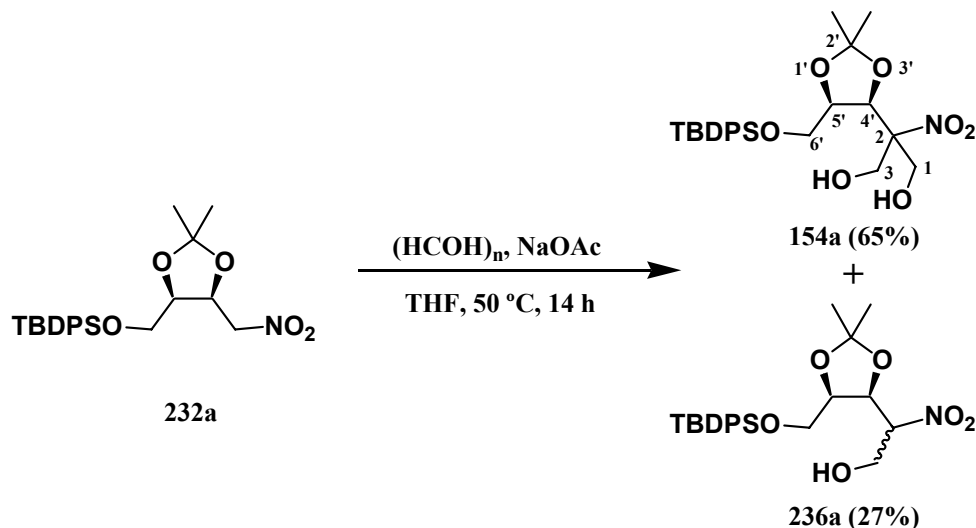
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1559 (st, NO₂).

MS-ES (m/z, %): 370 (100, MH - CH₂NO₂).

Anal. calculated for C₂₃H₃₁NO₅Si: C 64.31; H 7.27; N 3.26. Found: C 64.31; H 7.29; N 3.25.



Preparation of 2-((4*S*,5*R*)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (**154a**), and (*2R*) and (*2S*)-2-[(4*S*,5*R*)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl]-2-nitroethanol (**236a**).



A suspension of *t*-butyl(((4*R*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-(nitromethyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (**232a**) (0.333 g, 0.775 mmol), paraformaldehyde (0.466 g, 15.50 mmol, 10 eq) and anhydrous sodium acetate (0.191 g, 2.33 mmol, 1.5 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (9 mL) was heated under nitrogen atmosphere at 50 °C for 14 hours, when t.l.c. (ethyl acetate/cyclohexane 1:3) indicated absence of starting material. The suspension was filtered, the filtrate evaporated *in vacuo* and the crude residue purified by flash column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 1:3), to give (*2R*) and (*2S*)-2-[(4*S*,5*R*)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl]-2-nitroethanol (**236a**) (0.098 g, 0.213 mmol, 27%) as a colourless oil and 2-((4*S*,5*R*)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (**154a**) (0.246 g, 0.504 mmol, 65%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -1.8° (c 2.81, chloroform).

2-((4*S*,5*R*)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (154a**):**

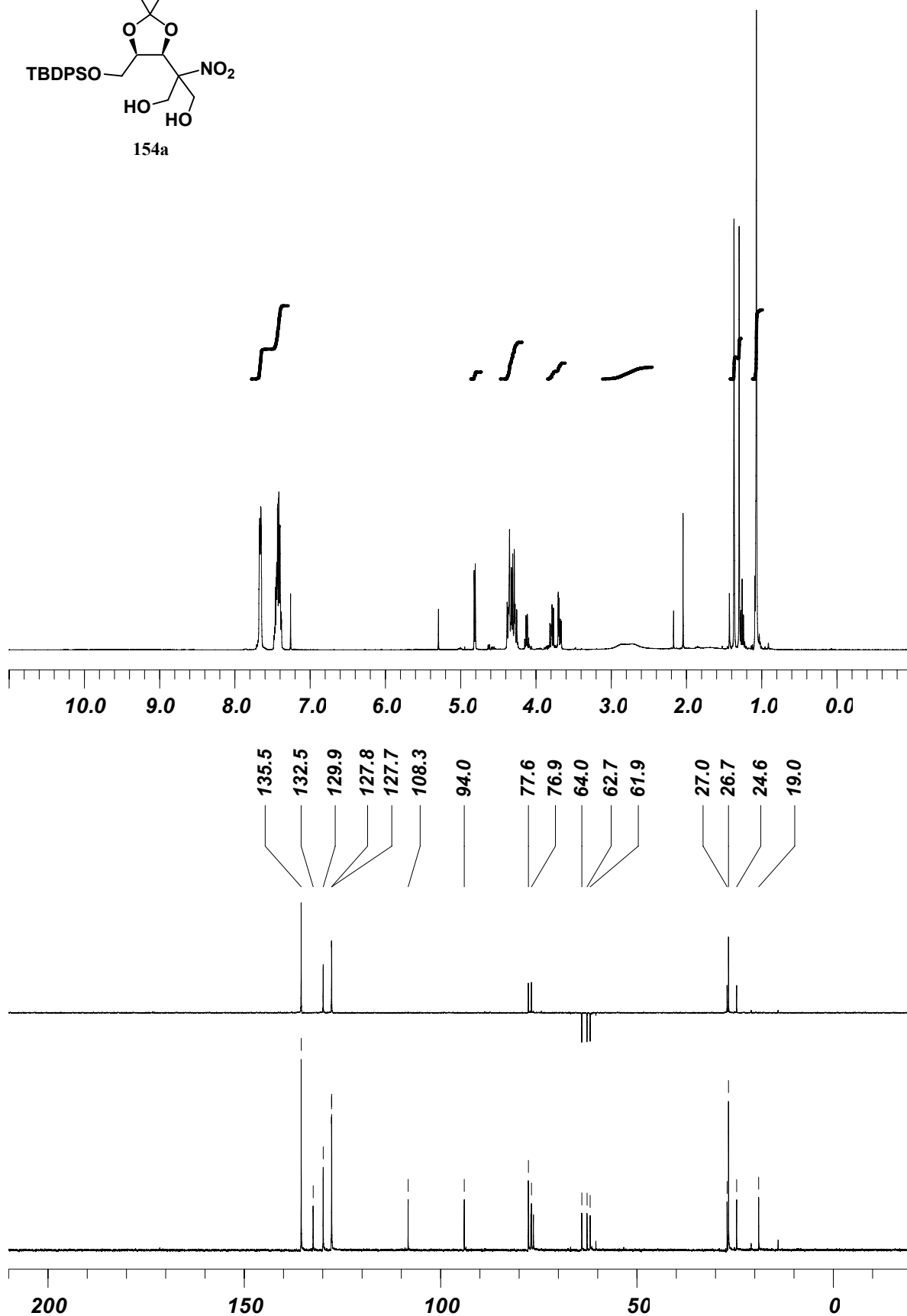
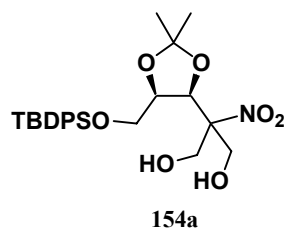
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.07 (s, 9H, 3 × CH₃); 1.30 (s, 3H, CH₃); 1.37 (s, 3H, CH₃); 2.70 (br s, 1H, OH); 2.88 (br s, 1H, OH); 3.68 (dd, 1H, $J_{5,6}=5.1$ Hz, $J_{6,6}=11.3$ Hz, H-6'); 3.79 (dd, 1H, $J_{5,6}=7.5$ Hz, $J_{6,6}=11.3$ Hz, H-6'); 4.26-4.38 (m, 5H, 2 × H-1 + 2 × H-3 + H-5'); 4.81 (d, 1H, $J_{4,5}=5.8$ Hz, H-4'); 7.38-7.48 (m, 6H, 6 × H-Ph); 7.64-7.68 (m, 4H, 4 × H-Ph).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 19.0 (C); 24.6 (CH₃); 26.7 (3 × CH₃); 27.0 (CH₃); 61.9 (CH₂); 62.7 (CH₂); 64.0 (CH₂); 76.9 (CH); 77.6 (CH); 94.0 (C); 108.3 (C); 127.7 (2 × CH); 127.8 (2 × CH); 129.9 (2 × CH); 132.5 (2 × C); 135.5 (4 × CH).

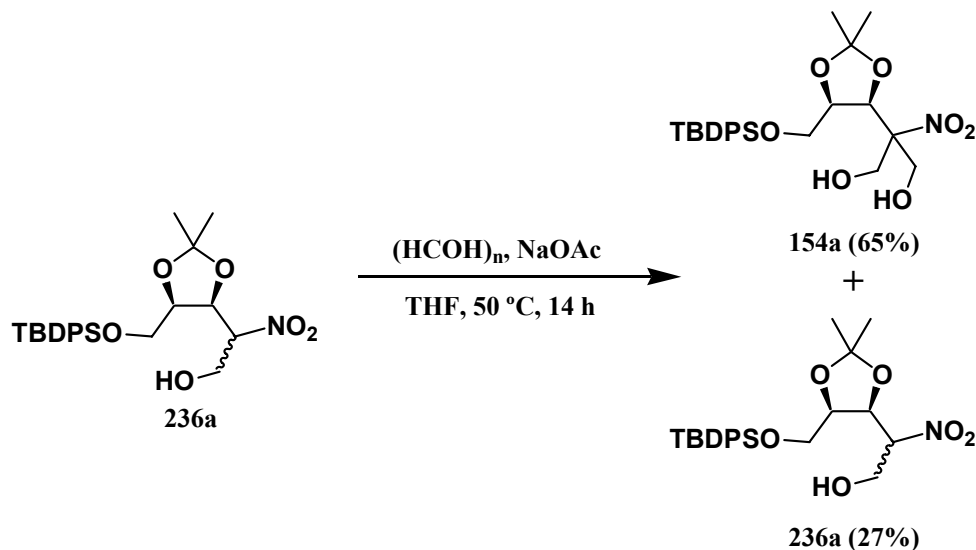
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3425 (br, OH); 1548 (st, NO₂).

MS-ES (m/z, %): 507 (60, M + NH₄⁺); 31 (100).

Anal. calculated for C₂₅H₃₅NO₇Si: C 61.32; H 7.20; N 2.86. Found: C 61.27; H 7.24; N 2.84.

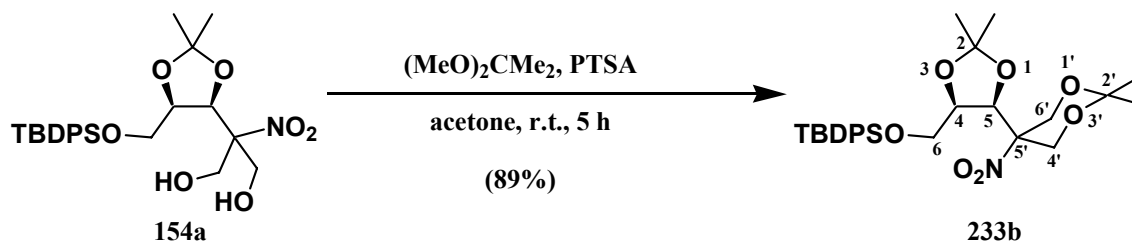


Preparation of 2-((4'S,5'R)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (**154a**), and (2*R*) and (2*S*)-2-[(4'S,5'R)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl]-2-nitroethanol (**236a**).



The recovered mixture of (2*R*) and (2*S*)-2-[(4'S,5'R)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl]-2-nitroethanol (**236a**) was submitted to the same reaction conditions to prepare **154a** + **236a** from **232a** (page 441), to afford 2-((4'S,5'R)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (**154a**) in a 65% yield. A 27% yield of starting material **236a** was also recovered.

Preparation of *t*-butyl(((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (**233b**).



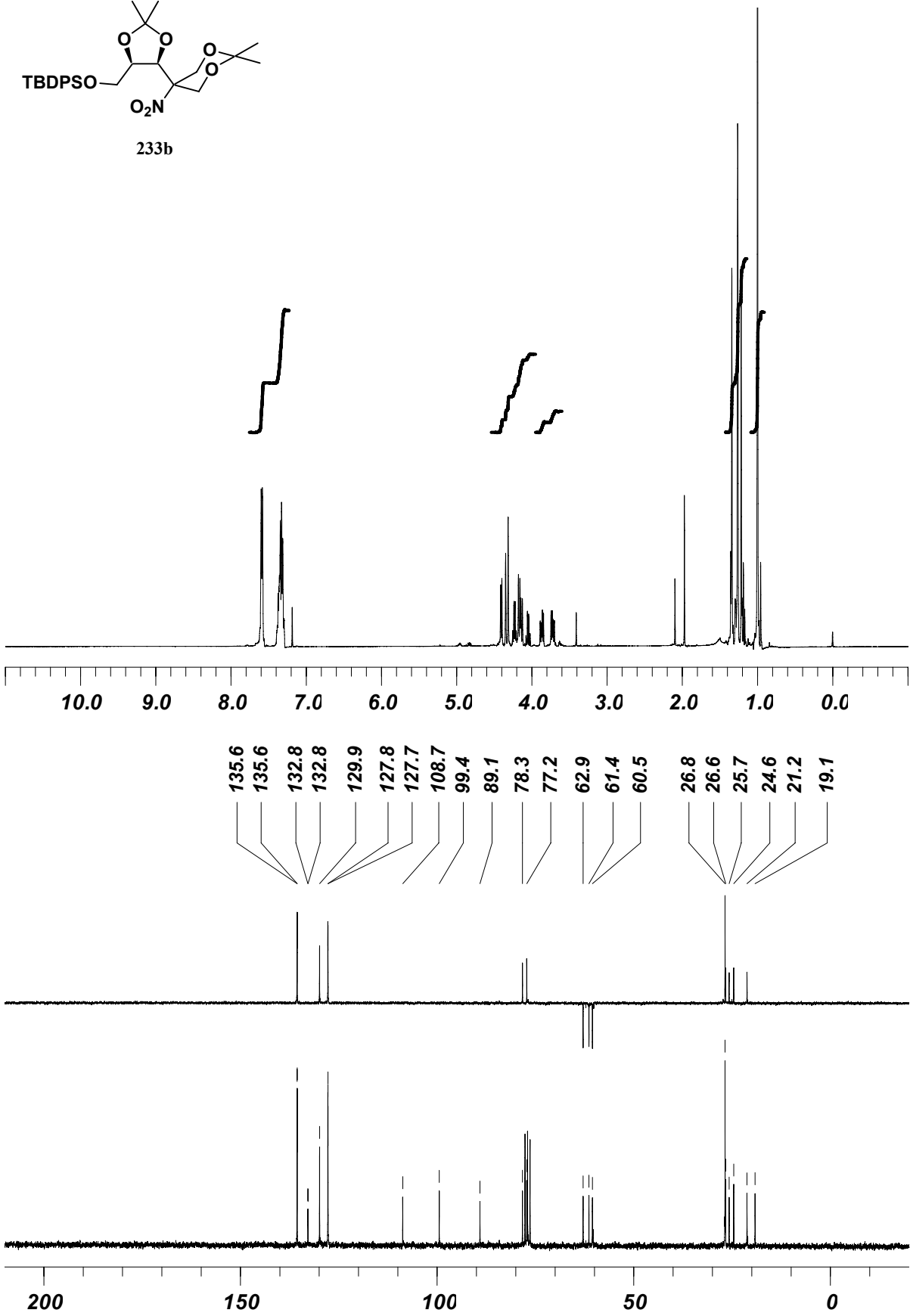
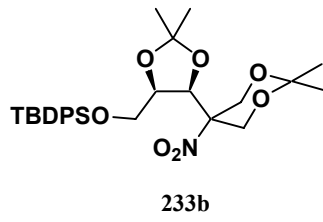
Following the same reaction conditions to prepare compound **232a** (page 438), 2-((4'*S*,5'*R*)-5'-((*t*-butyldiphenylsilyloxy)methyl-2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-2-nitropropane-1,3-diol (**154a**) (4.74 g, 9.68 mmol) was transformed in *t*-butyl(((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (**233b**) (4.55 g, 8.61 mmol, 89%) as a colourless oil after flash column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 1:15). $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -36.2° (c 2.49, in chloroform).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 1.07 (s, 9H, 3 x CH_3); 1.29 (s, 3H, CH_3); 1.34 (s, 6H, 2 x CH_3); 1.41 (s, 3H, CH_3); 3.79 (dd, 1H, $J_{4,6}=6.1$ Hz, $J_{6,6}=11.3$ Hz, H-6); 3.94 (dd, 1H, $J_{4,6}=6.1$ Hz, $J_{6,6}=11.3$ Hz, H-6); 4.21 (d, 1H, $J_{4,4'}=13.0$ Hz, H-4'); 4.24 (d, 1H, $J_{4,4'}=13.0$ Hz, H-4'); 4.30 (q, 1H, $J_{4,5}=6.1$ Hz, $J_{4,6}=6.1$ Hz, $J_{4,6}=6.1$ Hz, H-4); 4.40 (d, 2H, $J_{6,6'}=13.0$ Hz, 2 x H-6'); 4.48 (d, 1H, $J_{4,5}=6.1$ Hz, H-5); 7.37-7.47 (m, 6H, 6 x H-Ph); 7.65-7.67 (m, 4H, 4 x H-Ph).

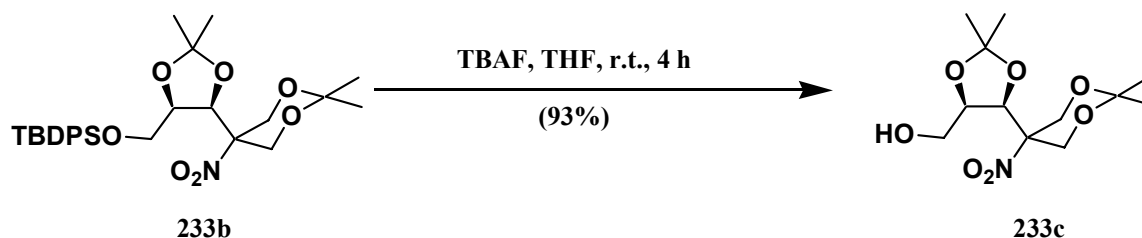
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, ppm): 19.1 (C); 21.2 (CH_3); 24.6 (CH_3); 25.7 (CH_3); 26.6 (CH_3); 26.8 (3 x CH_3); 60.5 (CH_2); 61.4 (CH_2); 62.9 (CH_2); 77.2 (CH); 78.3 (CH); 89.1 (C); 99.4 (C); 108.7 (C); 127.7 (2 x CH); 127.8 (2 x CH); 129.9 (2 x CH); 132.8 (C); 132.8 (C); 135.6 (2 x CH); 135.6 (2 x CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 1553 (st, NO_2).

MS-ES (m/z, %): 547 (100, M + NH_4^+).



Preparation of ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (233c).



Tetrabutylammonium fluoride (1 M solution in tetrahydrofuran, 1.28 mL, 1.28 mmol, 2 eq) was added over a solution of *t*-butyl(((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)diphenylsilane (233b) (0.340 g, 0.642 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (6 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 4 hours, when t.l.c. (ethyl acetate/cyclohexane 1:3) indicated no starting material. The reaction mixture was then evaporated *in vacuo* and the crude residue purified by flash column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 1:1.7) to give ((4*R*,5*S*)-5-(2,2-dimethyl-5-nitro-1,3-dioxan-5-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (233c) (0.173 g, 0.594 mmol, 93%) as a white solid which was crystallized from a mixture of diethyl ether and cyclohexane to give colourless crystals with m.p. 90-92 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -42.5° (c 1.57, in chloroform).

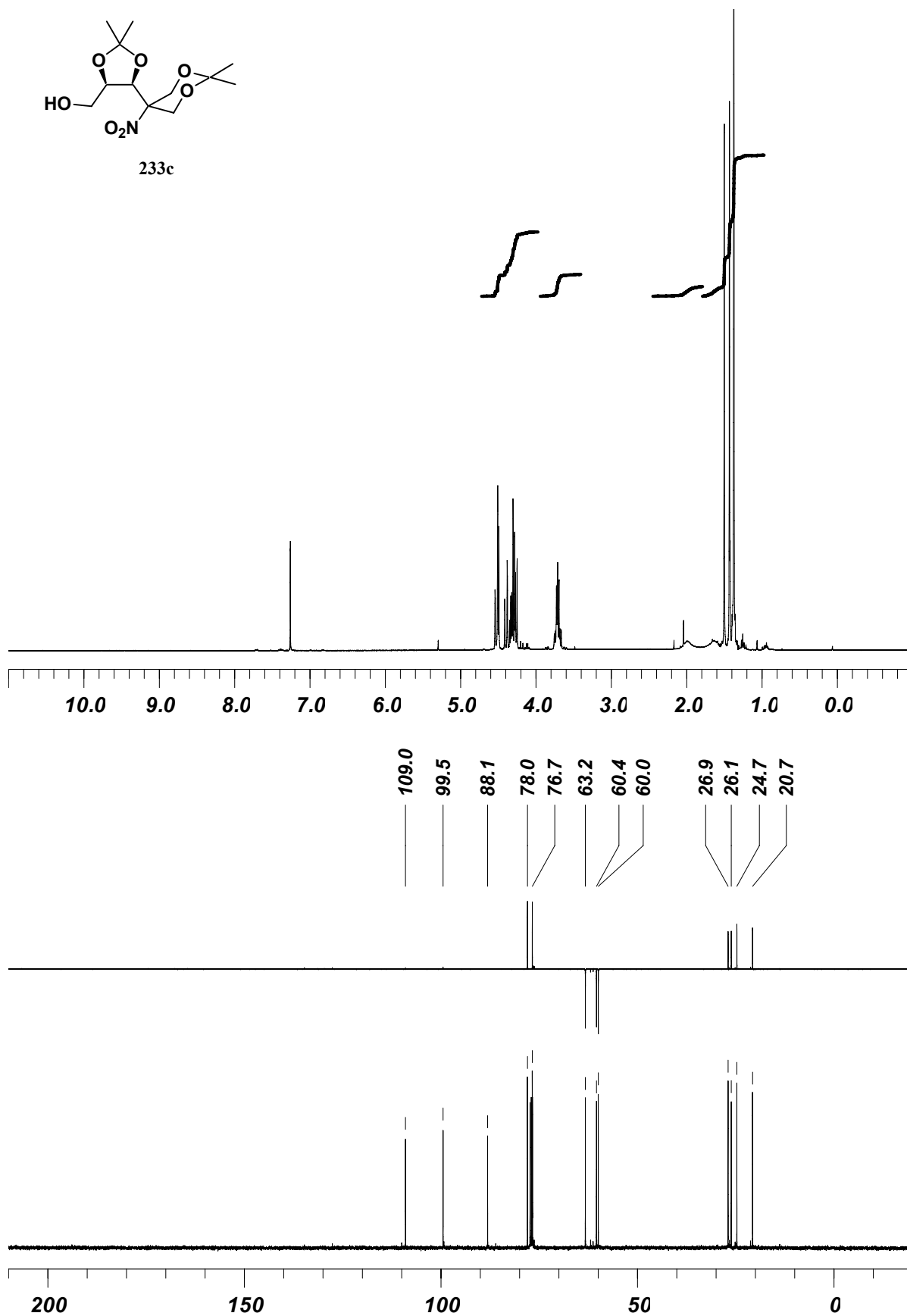
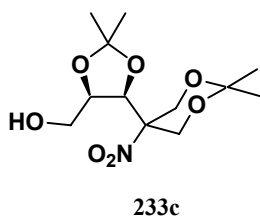
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.37 (s, 6H, 2 × CH₃); 1.43 (s, 3H, CH₃); 1.50 (s, 3H, CH₃); 2.00 (br s, 1H, OH); 3.69 (dd, 1H, $J_{4,5}=6.8$ Hz, $J_{6,6}=11.6$ Hz, H-6); 3.73 (dd, 1H, $J_{4,6}=4.8$ Hz, $J_{6,6}=11.6$ Hz, H-6); 4.26 (d, 1H, $J_{4',4}=13.3$ Hz, H-4'); 4.29 (d, 1H, $J_{4',4}=13.3$ Hz, H-4'); 4.32-4.35 (m, 1H, H-4); 4.40 (d, 1H, $J_{6',6}=13.0$ Hz, H-6'); 4.50 (d, 1H, $J_{4,5}=6.1$ Hz, H-5); 4.52 (d, 1H, $J_{6',6}=13.0$ Hz, H-6').

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 20.7 (CH₃); 24.7 (CH₃); 26.1 (CH₃); 26.9 (CH₃); 60.0 (CH₂); 60.4 (CH₂); 63.2 (CH₂); 76.7 (CH); 78.0 (CH); 88.1 (C); 99.5 (C); 109.0 (C).

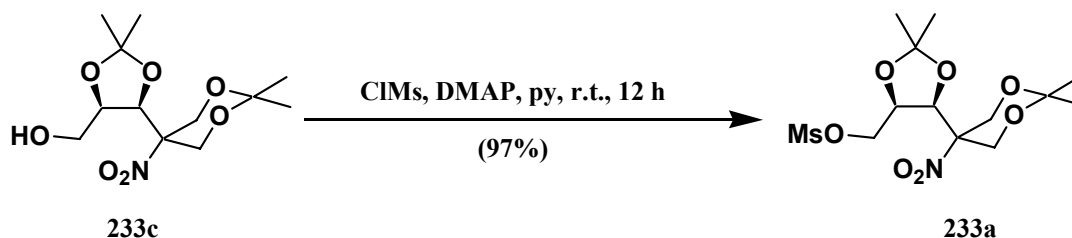
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3456 (br, OH); 1552 (st, NO₂).

MS-ES (m/z, %): 290 (10, [M-H]⁻); 58 (100).

HRMS calculated for C₁₂H₂₁NNaO₇ (MNa⁺), 314.1216. Found 314.1210. $\Delta m=6 \times 10^{-4}$.



Preparation of ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl methanesulfonate (233a).



N,N-Dimethylaminopyridine (0.009 g, 0.07 mmol, 0.05 eq) and methanesulfonyl chloride (0.33 mL, 4.22 mmol, 3 eq) were added over a solution of ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (**233c**) (0.41 g, 1.41 mmol) in anhydrous pyridine (11 mL) and the reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for 12 hours, when t.l.c. (ethyl acetate/cyclohexane 1:1) showed a single product and no starting material. The solvent was evaporated and the residue dissolved in dichloromethane (50 mL) and washed with aqueous saturated solution of copper (II) sulphate (50 mL), water (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulphate, filtered, concentrated *in vacuo* and the residue purified by flash column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 1:2) to afford ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl methanesulphonate (**233a**) (0.51 g, 1.37 mmol, 97%) as a yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -21.1° (c 2.33, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.37 (s, 6H, 2 × CH₃); 1.42 (s, 3H, CH₃); 1.49 (s, 3H, CH₃); 3.06 (s, 3H, CH₃); 4.19 (d, 1H, *J*_{4,4'}=12.9 Hz, H-4'); 4.22 (d, 1H, *J*_{6,6'}=13.1 Hz, H-6); 4.32-4.34 (m, 2H, 2 × H-6'); 4.40 (d, 1H, *J*_{6,6'}=13.1 Hz, H-6); 4.44-4.50 (m, 2H, H-4' + H-4); 4.54 (d, 1H, *J*_{4,5}=6.1 Hz, H-5).

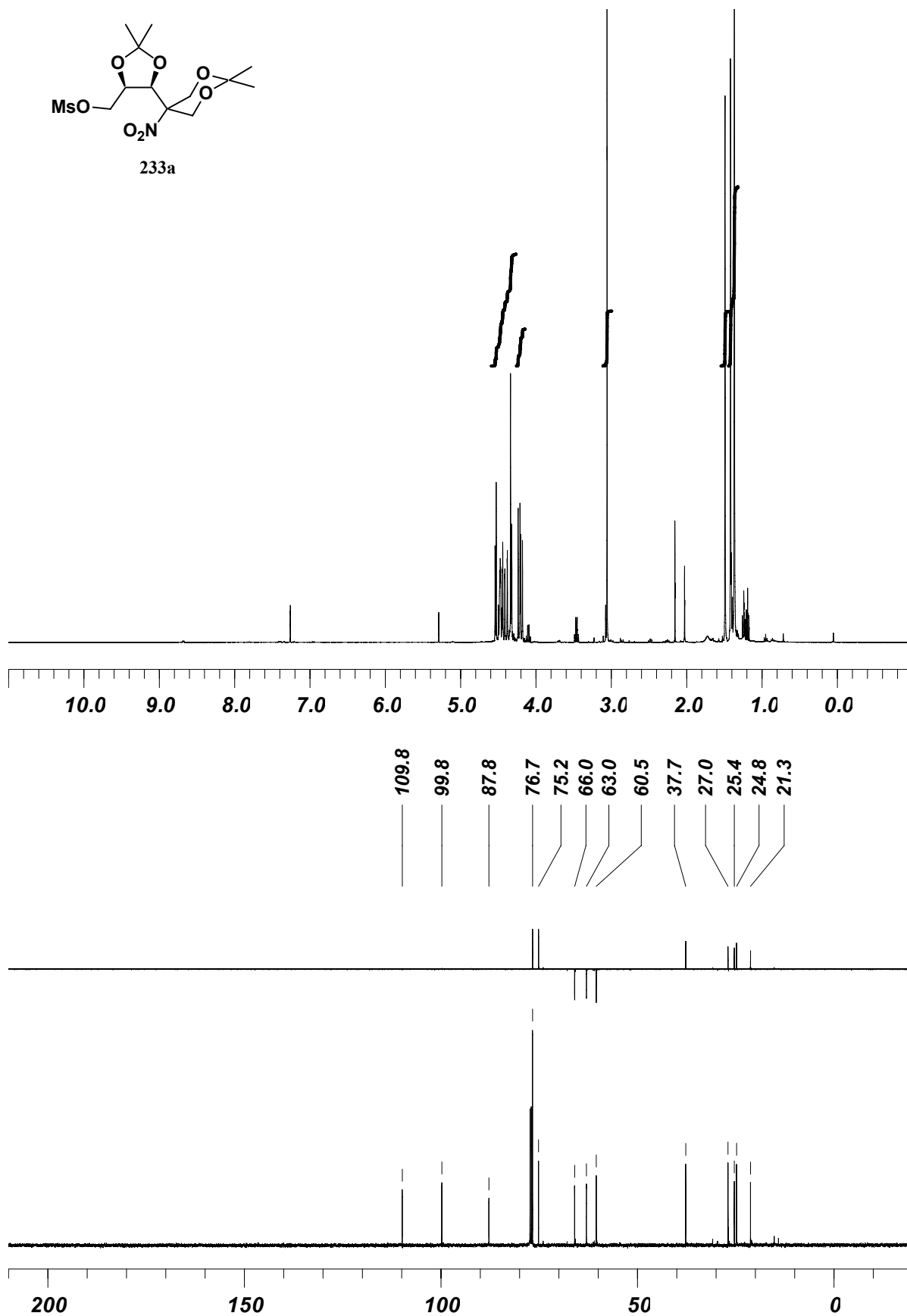
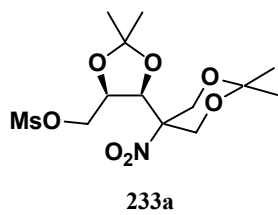
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 21.3 (CH₃); 24.8 (CH₃); 25.4 (CH₃); 27.0 (CH₃); 37.7 (CH₃); 60.5 (CH₂); 63.0 (CH₂); 66.0 (CH₂); 75.2 (CH); 76.7 (CH); 87.8 (C); 99.8 (C); 109.8 (C).

IR (ν̄, cm⁻¹): 1552 (s, NO₂).

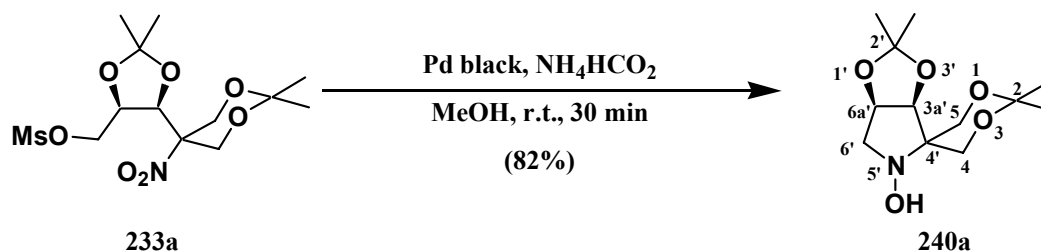
MS-ES (m/z, %): 368 (60, M - H⁺); 58 (100).

HRMS calculated for C₁₃H₂₃NNaO₉S (MNa⁺), 392.0991. Found 392.0986. Δm=5×10⁻⁴.

Anal. calculated for C₁₃H₂₃NO₉S: C 42.27; H 6.28; N 3.79. Found: C 42.61; H 6.25; N 3.49.



Preparation of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyldihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrol]-5'(3a'H)-ol (240a).



Palladium black (0.14 g, 20% w/w) and ammonium formate (1.22 g, 19.30 mmol, 10 eq) were added over a degassed solution of ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl methanesulphonate (233a) (0.71 g, 1.93 mmol) in methanol (40 mL) and the resulting mixture was stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for 30 minutes. The suspension was then filtered over a celite pad and the filtrate evaporated *in vacuo*, to afford a residue which was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 2:3) to give (3a'*S*,6a'*R*)-2,2,2',2'-tetramethyldihydrospiro[1,3-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol]-5'(3a'*H*)-ol (240a) (0.41 g, 1.58 mmol, 82%) as a white solid which was crystallized from a mixture of ethyl acetate and petroleum spirit 60-80 °C to give colourless crystals with m.p. 140-142 °C. [α]_D²⁰: -36.7° (c 2.33, in chloroform).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz, ppm): 1.23 (s, 3H, CH₃); 1.25 (s, 3H, CH₃); 1.35 (s, 3H, CH₃); 1.38 (s, 3H, CH₃); 2.88 (dd, 1H, *J*_{6',6a}=5.1 Hz, *J*_{6',6}=11.6 Hz, H-6'); 3.14 (d, 1H, *J*_{6',6}=11.6 Hz, H-6'); 3.30 (dd, 1H, *J*_{4,6}=1.3 Hz, *J*_{4,4}=11.9 Hz, H-4); 3.84 (d, 1H, *J*_{6,6}=11.4 Hz, H-6); 3.87 (dd, 1H, *J*_{4,6}=1.3 Hz, *J*_{6,6}=11.4 Hz, H-6); 4.30 (d, 1H, *J*_{4,4}=11.9 Hz, H-4); 4.61 (d, 1H, *J*_{3a',6a'}=6.8 Hz, H-3a'); 4.65 (dd, 1H, *J*_{6',6a}=5.1 Hz, *J*_{3a',6a'}=6.8 Hz, H-6a').

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz, ppm): 19.5 (CH₃); 24.9 (CH₃); 26.2 (CH₃); 28.7 (CH₃); 59.8 (CH₂); 60.7 (CH₂); 61.8 (CH₂); 65.0 (C); 77.0 (CH); 81.5 (CH); 99.2 (C); 112.4 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3240 (br, OH); 2991 (m, OH).

MS-ES (m/z, %): 260 (100, MH⁺); 244 (40, [MH - OH]⁺).

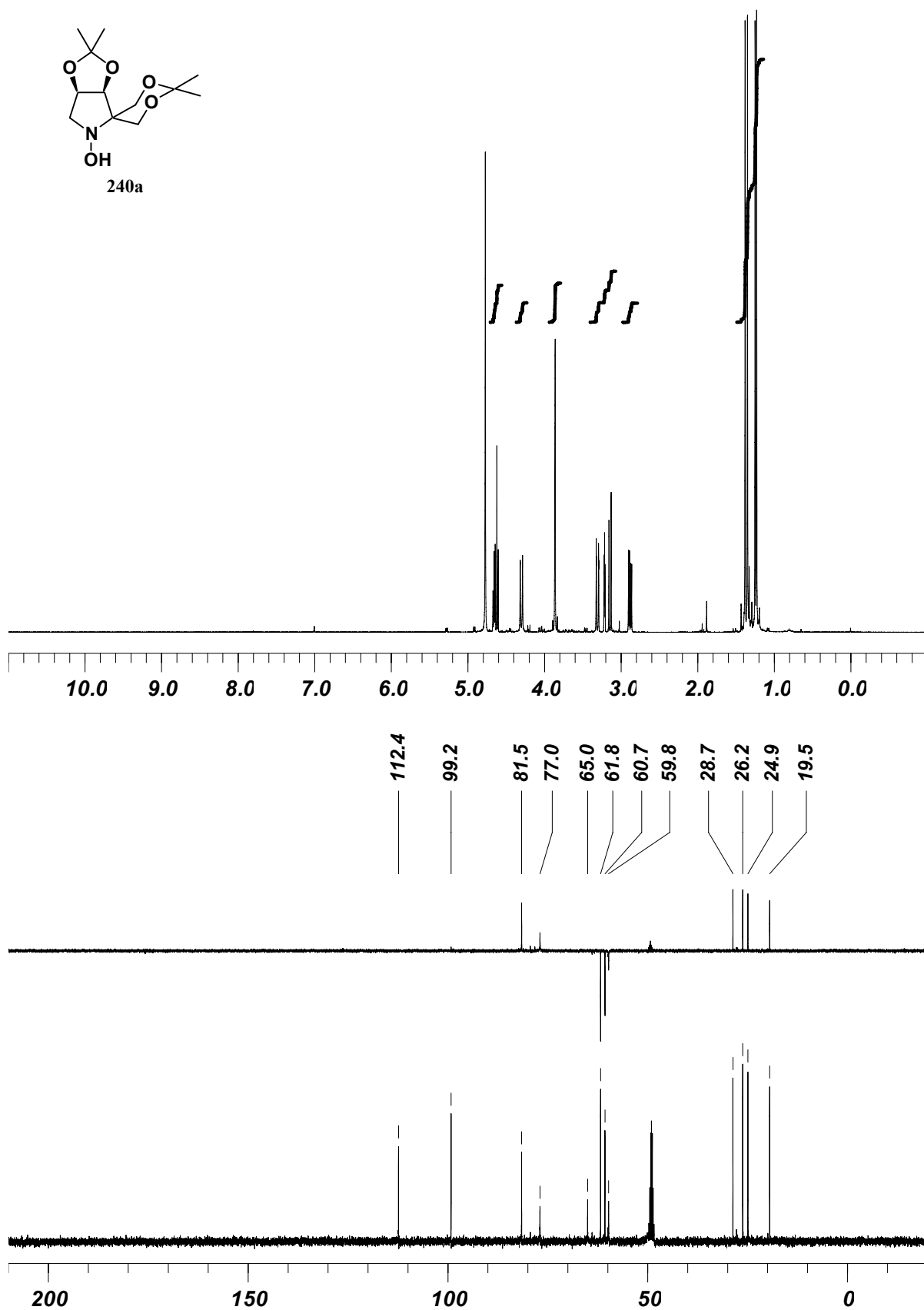
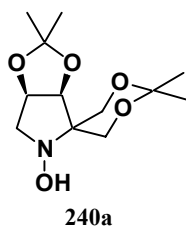
HRMS calculated for C₁₂H₂₁NNaO₅ (MNa⁺), 282.1317. Found 282.1312. $\Delta m=5 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for C₁₂H₂₁NO₅: C 55.58; H 8.16; N 5.40. Found: C 55.48; H 8.36; N 5.18.

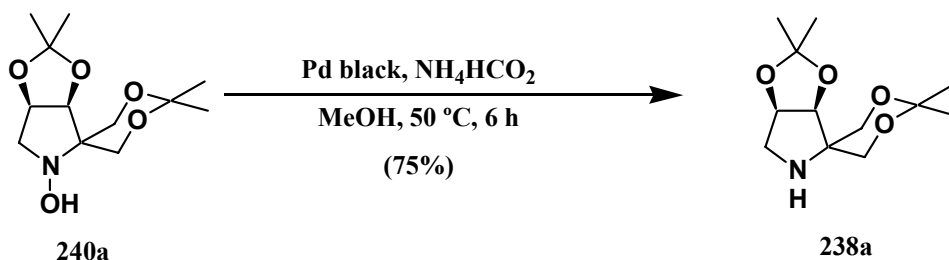
Rayos X:

Crystal identification	ARC1265
Chemical formula	C ₁₂ H ₂₁ NO ₅
Formula weight	259.30
Temperature (K)	150
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> (Å)	5.9773(2)

b (Å)	11.3531(5)
c (Å)	19.3477(10)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Cell volume (Å ³)	1312.95(10)
Z	4
Calculated density (Mg/m ³)	1.312
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.102
F_{000}	560
Crystal size (mm)	0.10 x 0.10 x 0.34
Description of crystal	Colourless prism
Absorption correction	Semi-empirical from equivalent reflections
Transmission coefficients (min, max)	0.97, 0.99
θ range for data collection (°)	$5.0 \leq \theta \leq 27.5$
Index ranges	$-0 \leq h \leq 7, 0 \leq k \leq 14, 0 \leq l \leq 25$
Reflections measured	7657
Unique reflections	1757
R_{int}	0.058
Observed reflections ($I > 2\sigma(I)$)	1156
Refinement method	Full-matrix least-squares on F
Parameters refined	167
Weighting scheme	Chebychev 3-term polynomial
Goodness of fit	1.1537
R	0.0333
wR	0.0356
Residual electron density (min, max) (eÅ ⁻³)	-0.13, 0.17



Preparation of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (238a).



Palladium black (0.010 g, 20% w/w) and ammonium formate (0.048 g, 0.077 mmol, 10 eq) were added over a degassed solution of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyldihydrospiro[1,3-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyrrol]-5'(3a'H)-ol (**240a**) (0.020 g, 0.077 mmol) in methanol (2 mL) and the resulting mixture was heated at 50 °C under nitrogen atmosphere for 6 hours. The suspension was then filtered over a celite pad and the filtrate evaporated *in vacuo*, to afford a residue which was purified by flash column chromatography (chloroform/methanol 20:1) to give (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1,3-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyrrole] (**238a**) (0.014 g, 0.058 mmol, 75%) as a yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -39.2° (c 0.97, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.35 (s, 3H, CH₃); 1.44 (s, 3H, CH₃); 1.47 (s, 3H, CH₃); 1.48 (s, 3H, CH₃); 1.93 (br s, 1H, NH); 2.80 (dd, 1H, $J_{6',6a'}=4.0$ Hz, $J_{6',6}=13.6$ Hz, H-6'); 3.03 (d, 1H, $J_{6',6}=13.6$ Hz, H-6'); 3.51 (dd, 1H, $J_{4,6}=1.8$ Hz, $J_{4,4'}=11.9$ Hz, H-4); 3.70 (d, 1H, $J_{4,4'}=11.9$ Hz, H-4); 3.74 (d, 1H, $J_{6,6'}=11.4$ Hz, H-6); 3.95 (dd, 1H, $J_{4,6}=1.8$ Hz, $J_{6,6'}=11.4$ Hz, H-6); 4.64 (d, 1H, $J_{3a',6a'}=5.6$ Hz, H-3a'); 4.75 (dd, 1H, $J_{6',6a'}=4.0$ Hz, $J_{3a',6a'}=5.6$ Hz, H-6a').

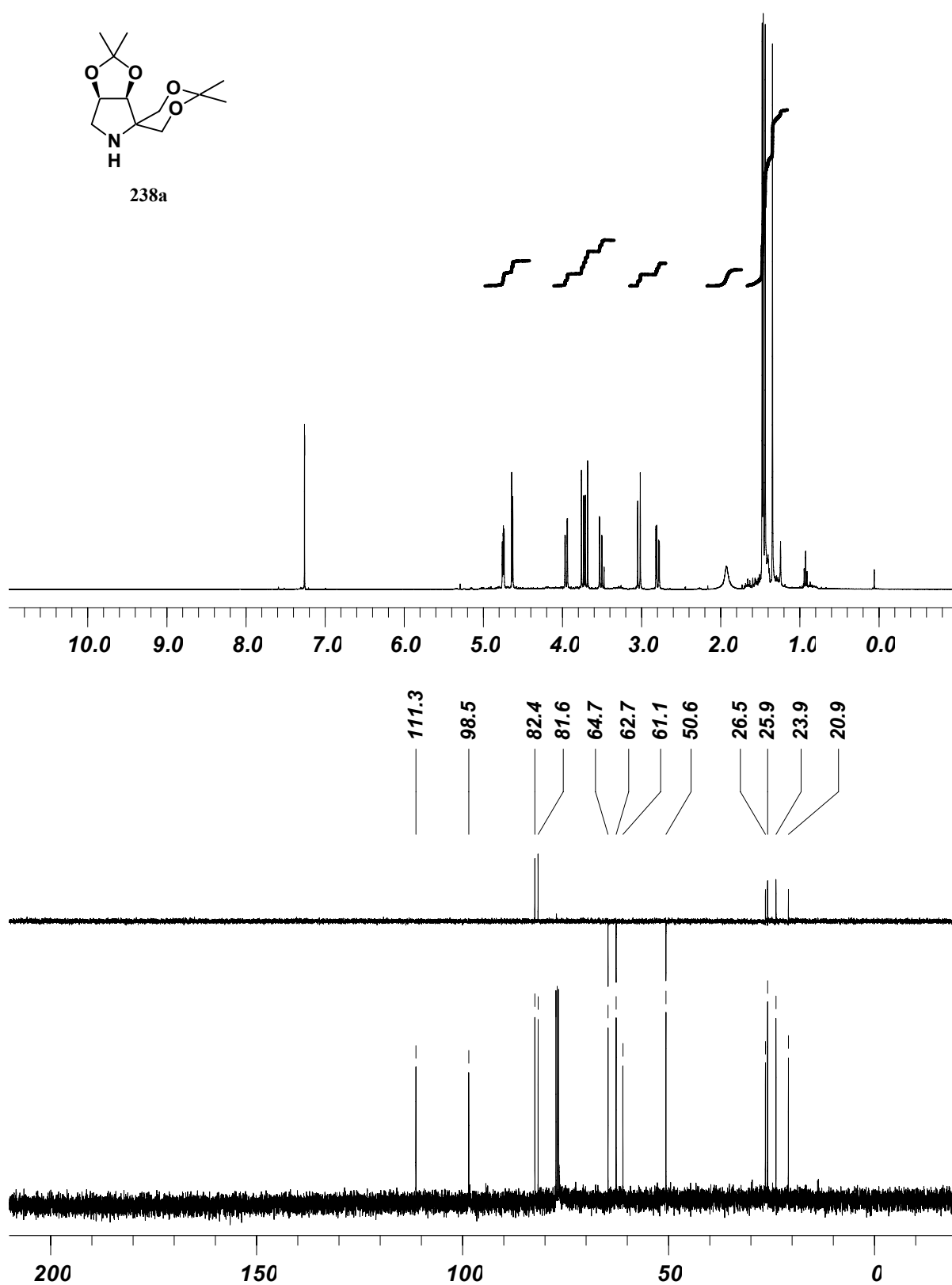
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 20.9 (CH₃); 23.9 (CH₃); 25.9 (CH₃); 26.5 (CH₃); 50.6 (CH₂); 61.1 (C); 62.7 (CH₂); 64.7 (CH₂); 81.6 (CH); 82.4 (CH); 98.5 (C); 111.3 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3300 (br, NH); 1454 (st); 1201 (st).

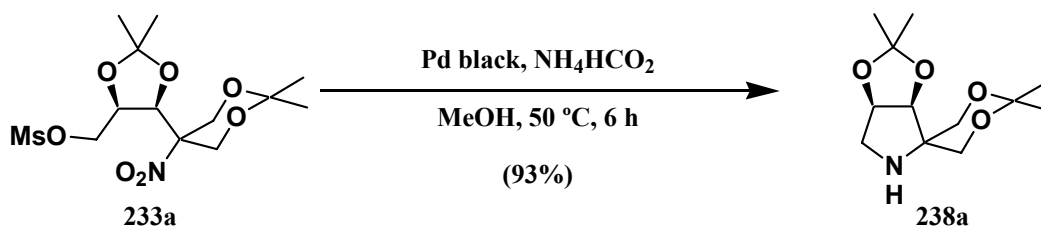
MS-ES (m/z, %): 244 (95, MH⁺); 174 (100).

HRMS calculated for C₁₂H₂₂NO₄ (MH⁺), 244.1549. Found 244.1543. $\Delta m=6 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for C₁₂H₂₁NO₄: C 59.24; H 8.70; N 5.76. Found: C 59.19; H 8.65; N 5.73.

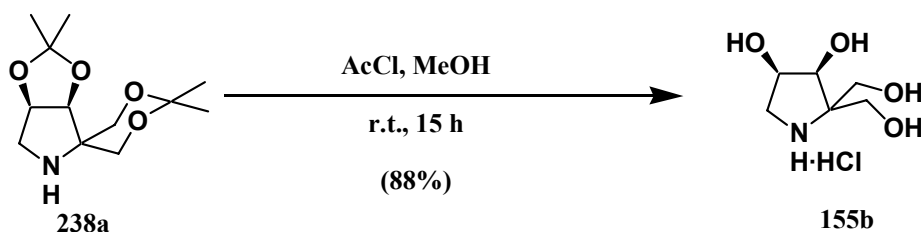


Preparation of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (238a).



Palladium black (0.36 g, 20% w/w) and ammonium formate (3.24 g, 52.20 mmol, 10 eq) were added over a degassed solution of ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimethyl-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-yl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl methanesulphonate (**233a**) (1.89 g, 5.22 mmol) in methanol (54 mL) and the resulting mixture was stirred at 50 °C for 6 hours under nitrogen atmosphere. Then the suspension was filtered over a celite pad and the filtrate evaporated *in vacuo*, to afford a residue which was purified by flash column chromatography (chloroform/methanol 20:1) to give (3a'*S*,6a'*R*)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1,3-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyrrole] (**238a**) (1.17 g, 4.86 mmol, 93%) as a yellow oil with identical spectroscopical data those previously reported (page 452).

Preparation of (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol hydrochloride (155b).



A solution of (3a'*S*,6a'*R*)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (**238a**) (0.17 g, 0.85 mmol) in dry methanol (4 mL) was added over a freshly made solution of methanolic hydrochloric acid [adding 5 mL of acetyl chloride over 14 mL of dry methanol at 0 °C] cooled at 0 °C and the resulting mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 12 hours. Solvents were removed *in vacuo* to afford a yellow oil which was crystallized from a mixture of ethyl acetate and methanol to afford (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol hydrochloride (**155b**) (0.15 g, 0.75 mmol, 88%) as a white solid with m.p. 112-114 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -5.2° (c 1.30, methanol).

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz, ppm): 3.35 (dd, 1H, $J_{4,5}=3.0$ Hz, $J_{5,5}=12.6$ Hz, H-5); 3.44 (dd, 1H, $J_{4,5}=4.5$ Hz, $J_{5,5}=12.6$ Hz, H-5); 3.74 (d, 1H, $J_{6,6}=12.1$ Hz, H-6); 3.77 (d, 1H, $J_{6,6}=12.4$ Hz, H-6); 3.84 (d, 1H, $J_{6,6}=12.1$ Hz, H-6); 3.97 (d, 1H, $J_{6,6}=12.4$ Hz, H-6); 4.32 (d, 1H, $J_{3,4}=4.8$ Hz, H-3); 4.48 (ddd, 1H, $J_{4,5}=3.0$ Hz, $J_{4,5}=4.5$ Hz, $J_{3,4}=4.8$ Hz, H-4).

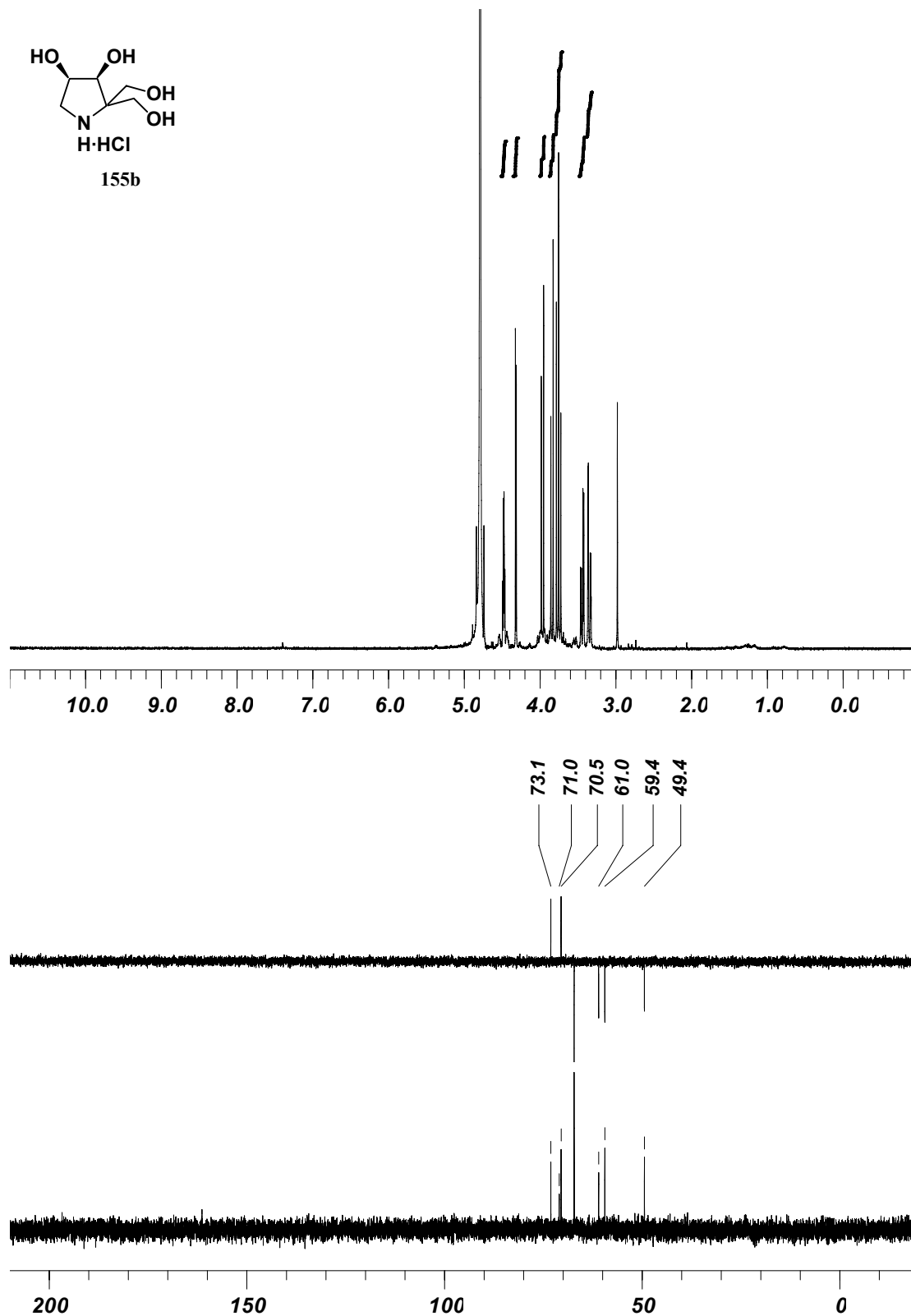
^{13}C -NMR (D_2O , 100 MHz, ppm): 49.4 (CH_2); 59.4 (CH_2); 61.0 (CH_2); 70.5 (CH); 71.0 (C); 73.1 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3384 (br, NH + OH).

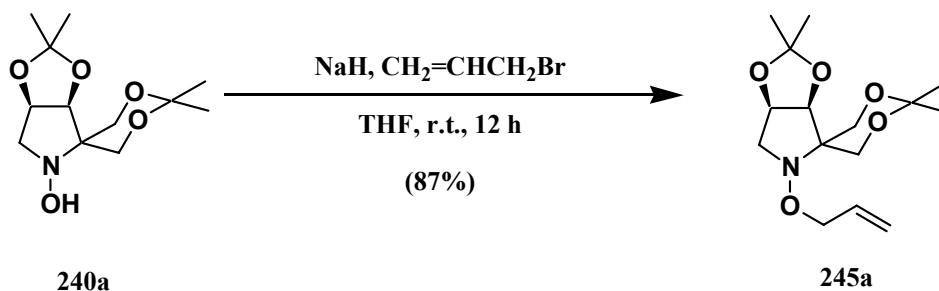
MS-ES (m/z , %): 198 (100, MCl^-).

HRMS calculated for $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NO}_4$ (MH^+): 164.0923. Found: 164.0917. $\Delta m = 6 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{ClNO}_4$: C 36.10; H 7.07; N 7.02. Found: C 35.97; H 7.30; N 6.84.



Preparation of (3a'S,6a'R)-5'-(allyloxy)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (245a).



Sodium hydride (0.08 g, 2.00 mmol, 2. eq) was added over a solution of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyldihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrol]-5'(3a'H)-ol (**240a**) (0.26 g, 1.00 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 5 minutes. Then allylbromide (0.17 mL, 2.00 mmol, 2 eq) was added and the reaction mixture stirred for 12 hours, when aqueous saturated solution of ammonium chloride (15 mL) was added and the aqueous layer extracted with dichloromethane (4 x 15 mL). The pooled organic extracts were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*, to afford a residue which was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/hexane 1:9) to give (3a'S,6a'R)-5'-(allyloxy)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (**245a**) (0.26 g, 0.87 mmol, 87%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -40.5° (c 2.73, in chloroform).

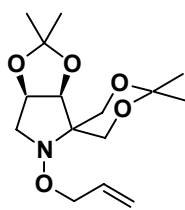
¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.35 (s, 3H, CH₃); 1.42 (s, 3H, CH₃); 1.48 (s, 3H, CH₃); 1.50 (s, 3H, CH₃); 2.95 (dd, 1H, $J_{6',6a'}=4.4$ Hz, $J_{6',6}=11.5$ Hz, H-6'); 3.34 (dd, 1H, $J_{4,6}=1.9$ Hz, $J_{4,4}=11.6$ Hz, H-4); 3.45 (d, 1H, $J_{6',6}=11.5$ Hz, H-6'); 3.94 (d, 1H, $J_{4,4}=11.6$ Hz, H-4); 4.09 (dd, 1H, $J_{4,6}=1.9$ Hz, $J_{6,6}=11.5$ Hz, H-6); 4.13-4.16 (m, 2H, 2 x H-allyl); 4.29 (d, 1H, $J_{6,6}=11.5$ Hz, H-6); 4.70-4.77 (m, 2H, H-3a' + H-6a'); 5.18 (tdd, 1H, $J_{8',10}=1.1$ Hz, $J_{10',10}=1.9$ Hz, $J_{9',10}=10.4$ Hz, H-10'); 5.24-5.26 (m, 1H, H-allyl); 5.82-5.99 (m, 1H, H-allyl).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 18.9 (CH₃); 24.7 (CH₃); 25.8 (CH₃); 27.9 (CH₃); 57.9 (CH₂); 59.3 (CH₂); 60.5 (CH₂); 64.3 (C); 75.2 (CH₂); 75.8 (CH); 80.0 (CH); 97.7 (C); 111.4 (C); 117.6 (CH₂); 133.7 (CH).

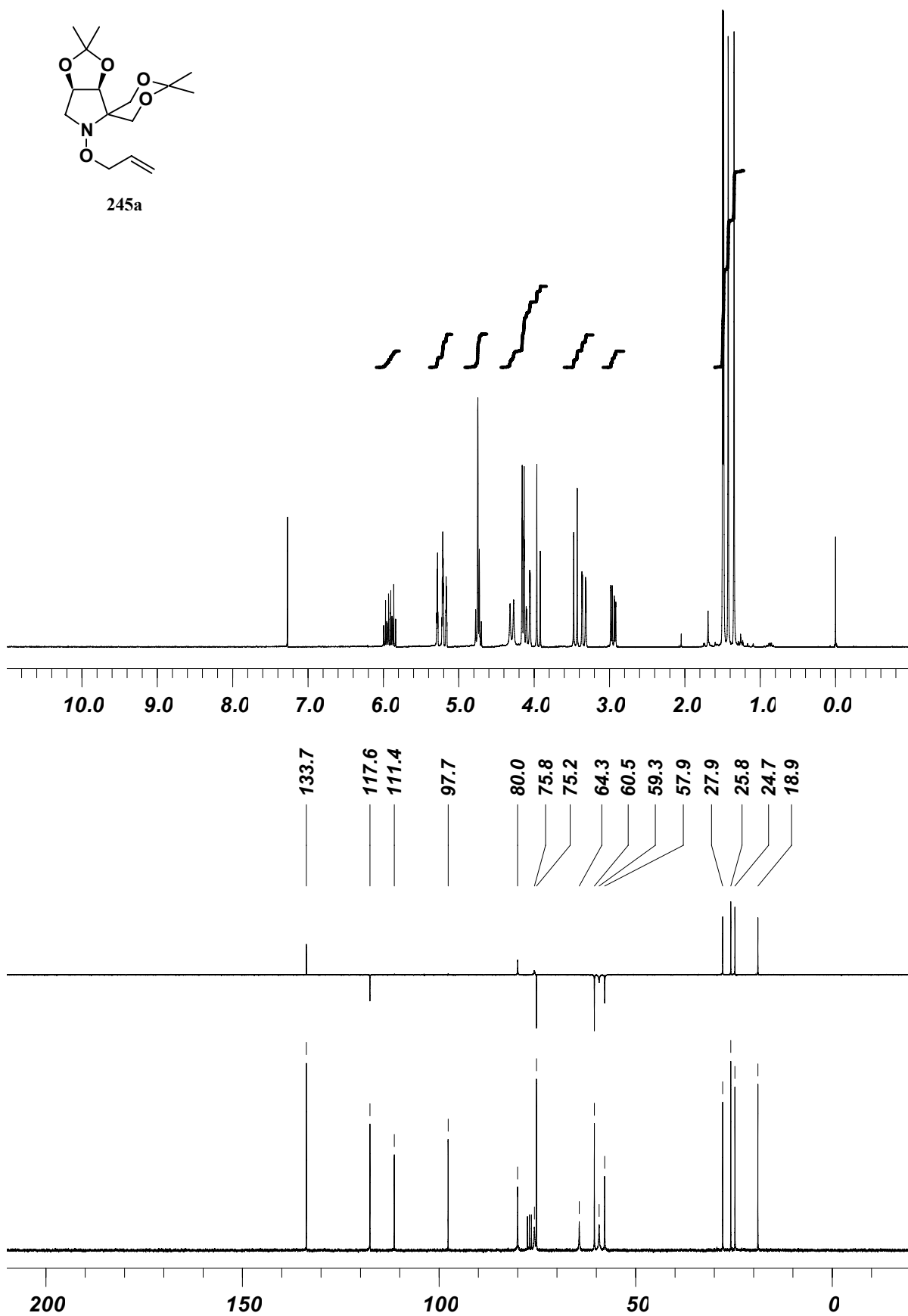
EM-IQ (m/z, %): 300 (43, MH⁺); 284 (26, [M - CH₃]⁺); 242 (100, [M - C₃H₅O]⁺).

HRMS calculated for C₁₅H₂₅NO₅ (M⁺): 299.1733. Found: 299.1736. $\Delta m=3 \times 10^{-4}$.

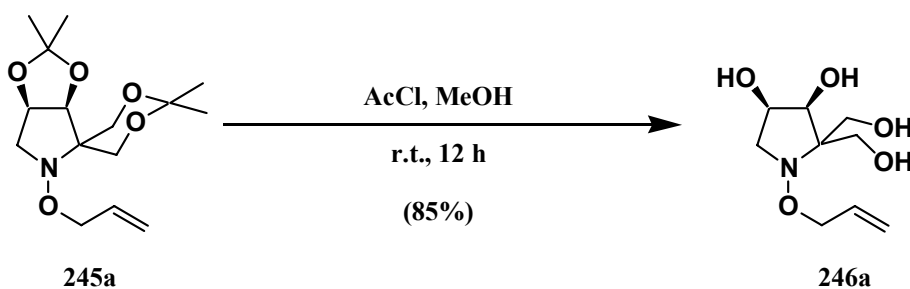
Anal. calculated for C₁₅H₂₅NO₅: C 60.18; H 8.42; N 4.68. Found: C 60.28; H 8.70; N 4.64.



245a



Preparation of (3*S*,4*R*)-1-(allyloxy)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (246a).



A solution of (3*a*'*S*,6*a*'*R*)-5'-(allyloxy)-2,2,2',2'-tetramethyltetrahydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-*c*]pyrrole] (**245a**) (0.16 g, 0.52 mmol) in dry methanol (3 mL) was added over a freshly made solution of methanolic hydrochloric acid [*adding 3.6 mL of acetyl chloride over 10 mL of dry methanol at 0 °C under nitrogen atmosphere*] cooled at 0 °C and the resulting mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 12 hours. Solvents were removed *in vacuo* and the crude residue was dissolved in methanol (4 mL) and 10% solution of methanolic ammonia was added up to pH 10. The resulting mixture was concentrated again *in vacuo* to afford an oil which was purified by flash column chromatography (chloroform/methanol 15:1) to give the (3*S*,4*R*)-1-(allyloxy)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (**246a**) (0.10 g, 0.44 mmol, 85%) as a colourless oil. [α]_D²⁰: -23.3° (c 1.47, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 3.15 (br s, 1H, OH); 3.27-3.44 (m, 2H, 2 × H-5); 3.69-3.84 (m, 5H, 4 × H-6 + OH); 4.16-4.39 (m, 6H, H-3 + H-4 + 2 × H-allyl + 2 × OH); 5.21-5.32 (m, 2H, 2 × H-allyl); 5.83-6.00 (m, 1H, H-allyl).

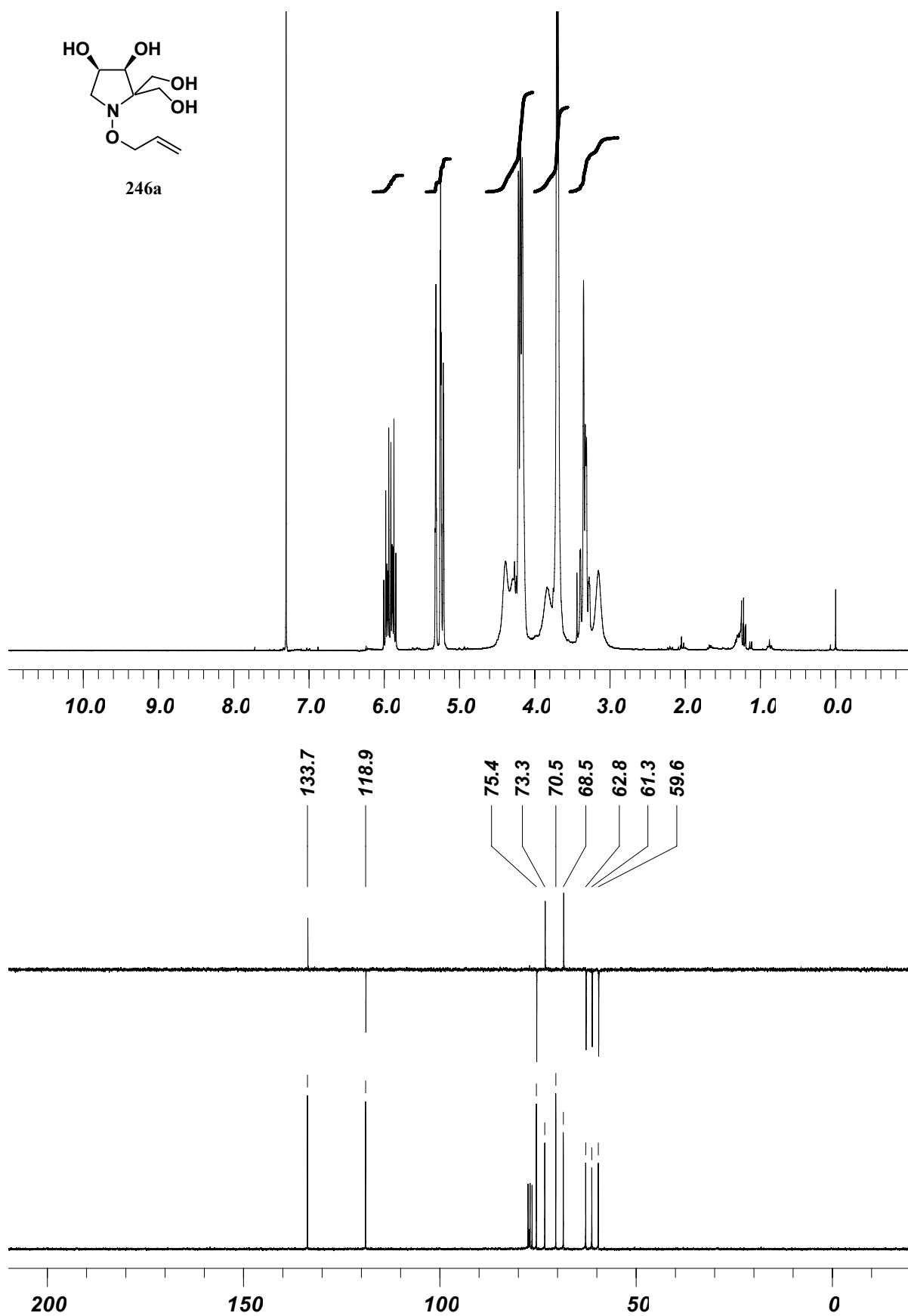
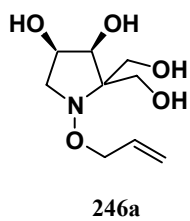
¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 59.6 (CH₂); 61.3 (CH₂); 62.8 (CH₂); 68.5 (CH); 70.5 (C); 73.3 (CH); 75.4 (CH₂); 118.9 (CH₂); 133.7 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3384 (br, OH).

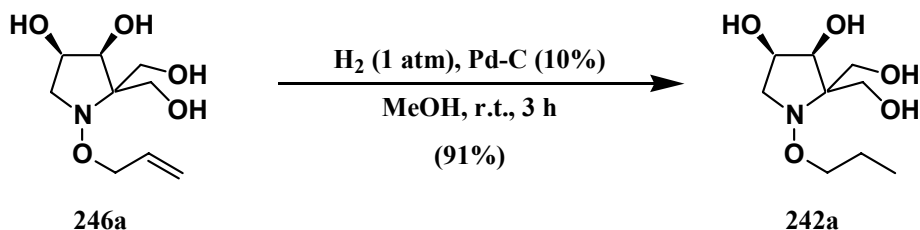
EM-ES (m/z, %): 220 (92, MH⁺); 188 (43, [M - CH₃O]⁺); 132 (100, [M - C₄H₇O₂]⁺).

HRMS calculated for C₉H₁₈NO₅ (MH⁺): 220.1185. Found: 220.1181. $\Delta m = 4 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for C₉H₁₇NO₅: C 49.31; H 7.82; N 6.39. Found: C 49.61; H 7.50; N 6.26.



Preparation of (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hydroxymethyl)-1-propoxypyrrolidine-3,4-diol (242a).



Palladium-carbon (10% w/w) (0.09 g, 10% w/w) was added over a degassed solution of (3*S*,4*R*)-1-(allyloxy)-2,2-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (**246a**) (0.09 g, 0.41 mmol) in methanol (5 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature under an hydrogen atmosphere for 3 hours. The reaction mixture was then filtered over a celite pad and the filtrate evaporated *in vacuo*, to afford a residue which was purified by flash column chromatography (chloroform/methanol 15:1) to give (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hydroxymethyl)-1-propoxypyrrolidine-3,4-diol (**242a**) (0.08 g, 0.37 mmol, 91%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -33.8° (c 1.61, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 0.92 (t, 3H, $J=7.7$ Hz, CH₃); 1.52-1.66 (m, 2H, CH₂); 2.56 (br s, 1H, OH); 2.85 (br s, 1H, OH); 3.23-3.57 (m, 5H, 2 x H-5 + CH₂ + OH); 3.63-3.74 (m, 5H, 4 x H-6 + OH); 4.16-4.17 (m, 2H, H-3 + H-4).

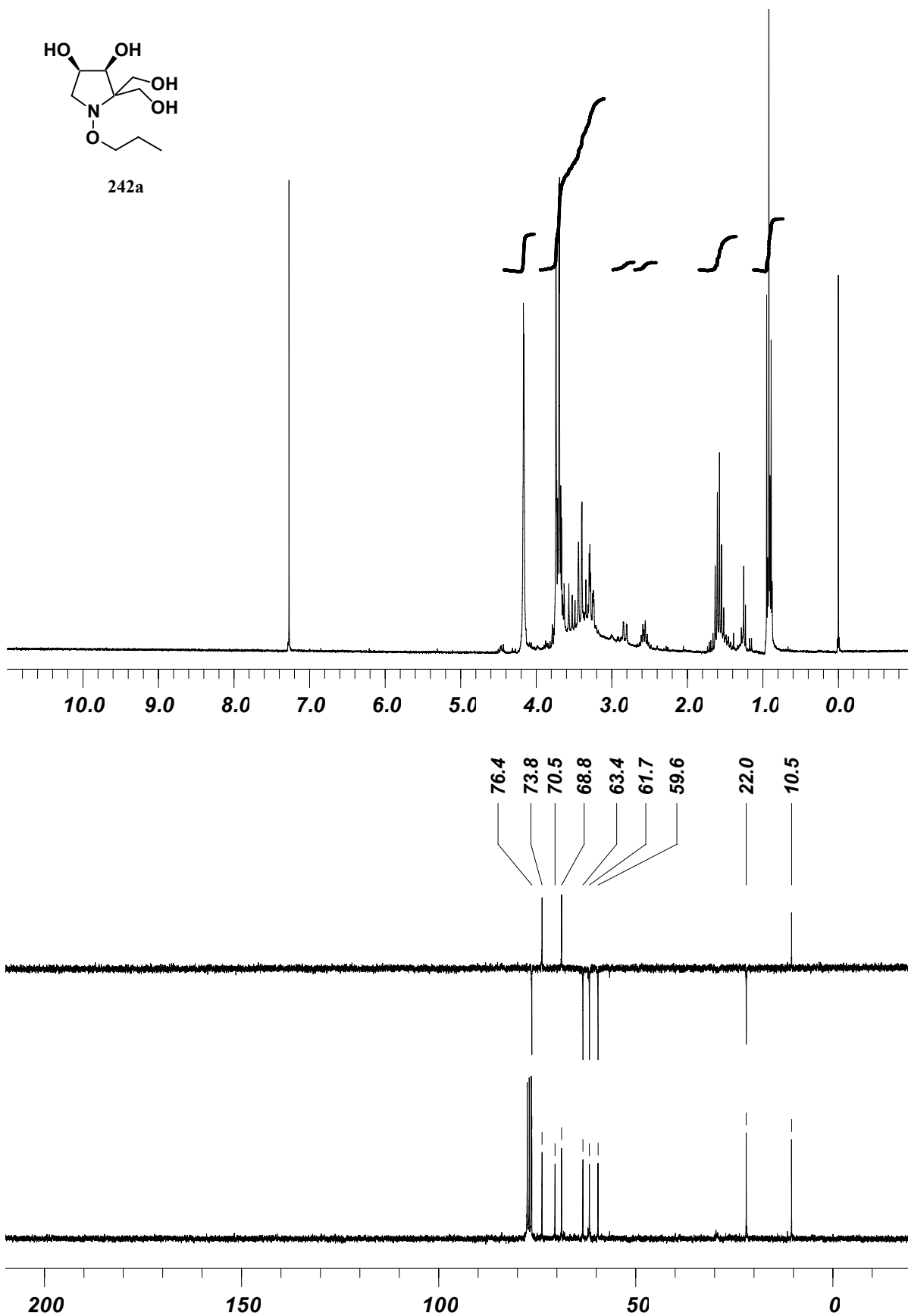
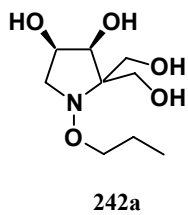
¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 10.5 (CH₃); 22.0 (CH₂); 59.6 (CH₂); 61.7 (CH₂); 63.4 (CH₂); 68.8 (CH); 70.5 (C); 73.8 (CH); 76.4 (CH₂).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3381 (br, OH).

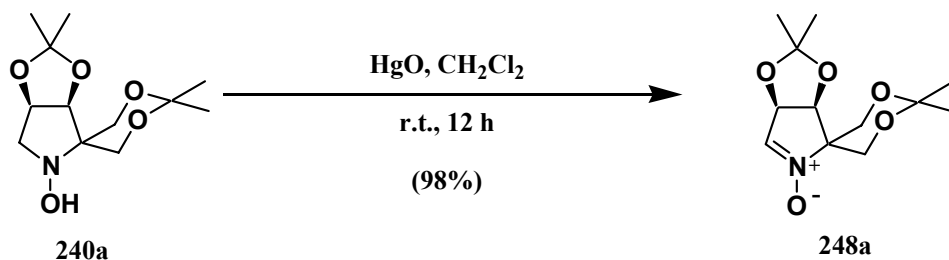
EM-ES (m/z, %): 222 (100, MH⁺); 206 (30, [M - CH₃]⁺); 190 (83, [M - CH₃O]⁺); 132 (98, [M - C₄H₉O₂]⁺).

HRMS calculated for C₉H₁₉NO₅ (M⁺): 221.1263. Found: 221.1260. $\Delta m=3 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for C₉H₁₉NO₅: C 48.86; H 8.66; N 6.33. Found: C 49.06; H 8.54; N 6.13.



Preparation of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyl-3a',6a'-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole]5'-oxide (248a).



Mercury (II) oxide yellow (0.28 g, 1.30 mmol, 2 eq) was added over a solution of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyldihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrol]-5'(3a'H)-ol (**240a**) (0.17 g, 0.65 mmol) in dichloromethane (3 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. The suspension was then filtered, the filtrate evaporated *in vacuo* and the residue purified by flash column chromatography (chloroform/methanol 10:1) to give (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyl-3a',6a'-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole]5'-oxide (**248a**) (0.16 g, 0.64 mmol, 98%) as a white solid which was crystallized from hexane to give colourless crystals with m.p. 86-88 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -3.3° (c 0.95, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm): 1.37 (s, 3H, CH₃); 1.39 (s, 6H, 2 × CH₃); 1.51 (s, 3H, CH₃); 3.32 (dd, 1H, $J_{4,6}=2.0$ Hz, $J_{4,4}=11.6$ Hz, H-4); 4.15 (dd, 1H, $J_{4,6}=2.0$ Hz, $J_{6,6}=11.4$ Hz, H-6); 4.36 (d, 1H, $J_{4,4}=11.6$ Hz, H-4); 4.44 (d, 1H, $J_{6,6}=11.4$ Hz, H-6); 4.95 (d, 1H, $J_{3a',6a'}=6.1$ Hz, H-3a'); 5.20 (dd, 1H, $J_{6',6a'}=0.5$ Hz, $J_{3a',6a'}=6.1$ Hz, H-6a'); 6.80 (d, 1H, $J_{6',6a'}=0.5$ Hz, H-6').

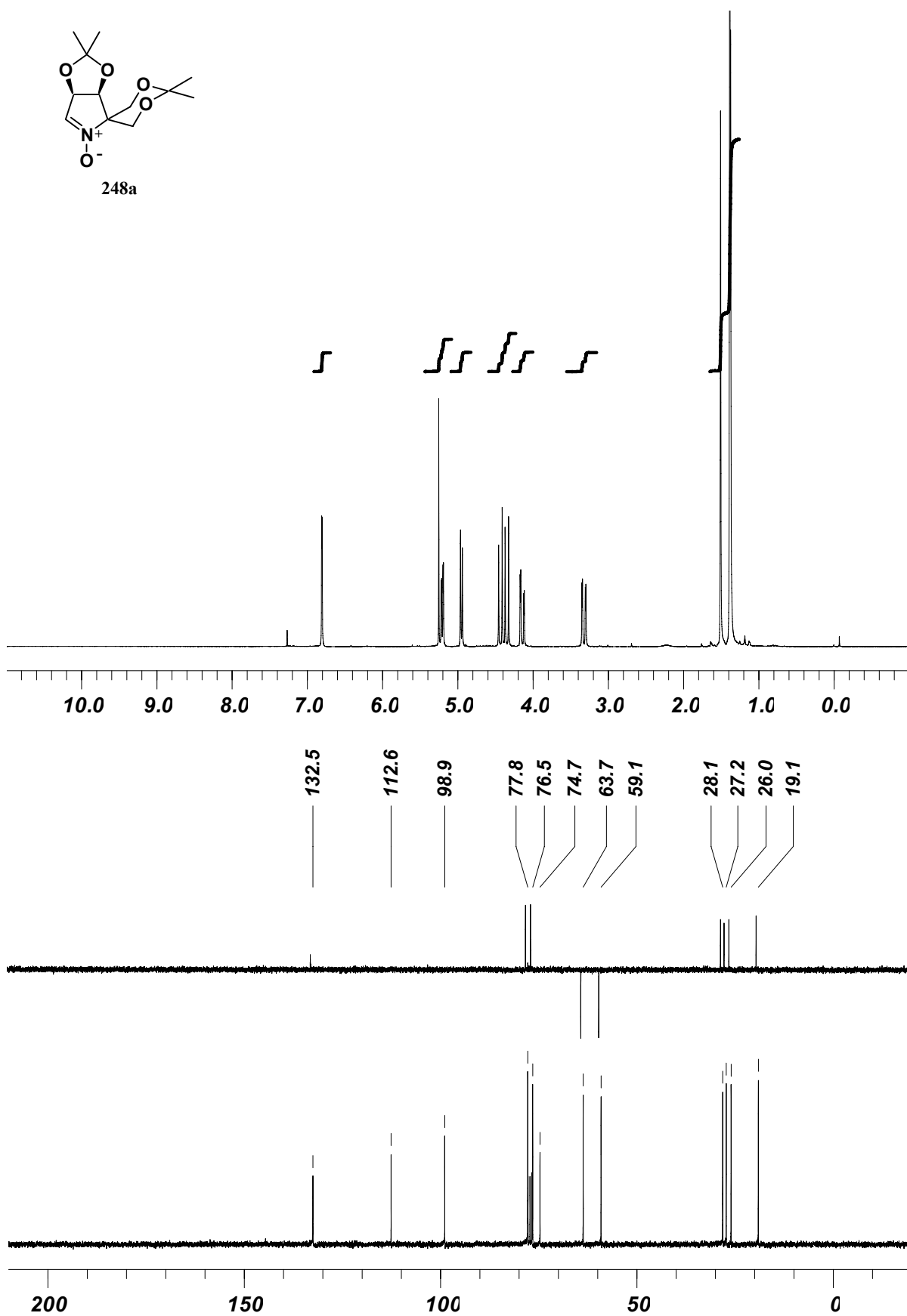
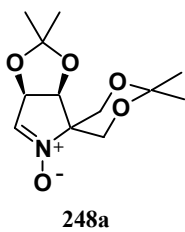
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm): 19.1 (CH₃); 26.0 (CH₃); 27.2 (CH₃); 28.1 (CH₃); 59.1 (CH₂); 63.7 (CH₂); 74.7 (C); 76.5 (CH); 77.8 (CH); 98.9 (C); 112.6 (C); 132.5 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1566 (st, CN); 1375 (st); 1208 (st); 1081 (st).

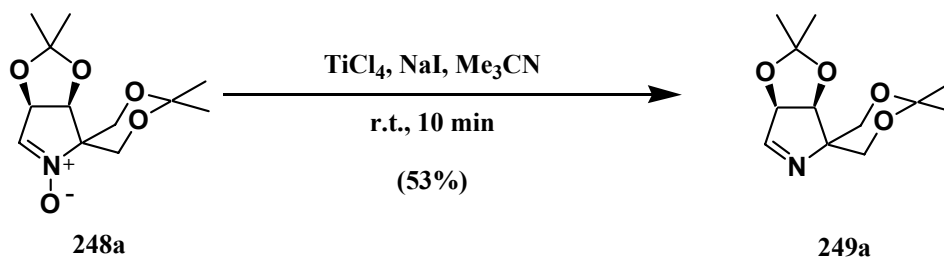
EM-ES (m/z, %): 258 (100, MH⁺); 242 (32, [M - CH₃]⁺).

HRMS calculated for C₁₂H₂₀NO₅ (MH⁺): 258.1341. Found: 258.1343. $\Delta m=2 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for C₁₂H₁₉NO₅: C 56.02; H 7.44; N 5.44. Found: C 56.08; H 7.71; N 5.42.



Preparation of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyl-3a',6a'-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (249a).



Sodium iodide (0.26 g, 1.74 mmol, 3 eq) and titanium tetrachloride (1.0 M solution in dichloromethane, 0.58 mL, 0.58 mmol, 1 eq) were added over a solution of (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyl-3a',6a'-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole]5'-oxide (**248a**) (0.15 g, 0.58 mmol) in anhydrous acetonitrile (6 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 10 minutes. Then the reaction mixture was quenched by addition of 1% potassium hydroxide aqueous solution (5 mL) and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (4 x 15 mL). The pooled organic extracts were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*, to afford a residue which was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/hexane 1.8:1) to obtain the (3a'S,6a'R)-2,2,2',2'-tetramethyl-3a',6a'-dihydrospiro[1',3'-dioxane-5,4'-[1,3]dioxolo[4',5-c]pyrrole] (**249a**) (0.07 g, 0.31 mmol, 53%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -34.4° (c 0.81, in chloroform).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.39 (s, 3H, CH₃); 1.41 (s, 3H, CH₃); 1.48 (s, 3H, CH₃); 1.57 (s, 3H, CH₃); 3.04 (dd, 1H, $J_{4,6}=2.2$ Hz, $J_{4,4}=11.8$ Hz, H-4); 4.04 (d, 1H, $J_{4,4}=11.8$ Hz, H-4); 4.11 (dd, 1H, $J_{4,6}=2.2$ Hz, $J_{6,6}=11.5$ Hz, H-6); 4.21 (d, 1H, $J_{6,6}=11.5$ Hz, H-6); 4.82 (d, 1H, $J_{3a',6a'}=5.5$ Hz, H-3a'); 5.16 (d, 1H, $J_{3a',6a'}=5.5$ Hz, H-6a'); 7.60 (s, 1H, H-6').

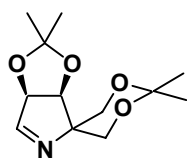
¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 19.1 (CH₃); 25.8 (CH₃); 27.0 (CH₃); 28.3 (CH₃); 61.9 (CH₂); 64.9 (CH₂); 74.5 (C); 79.0 (CH); 85.9 (CH); 98.2 (C); 112.8 (C); 167.5 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1676 (br, C=N); 1072 (st).

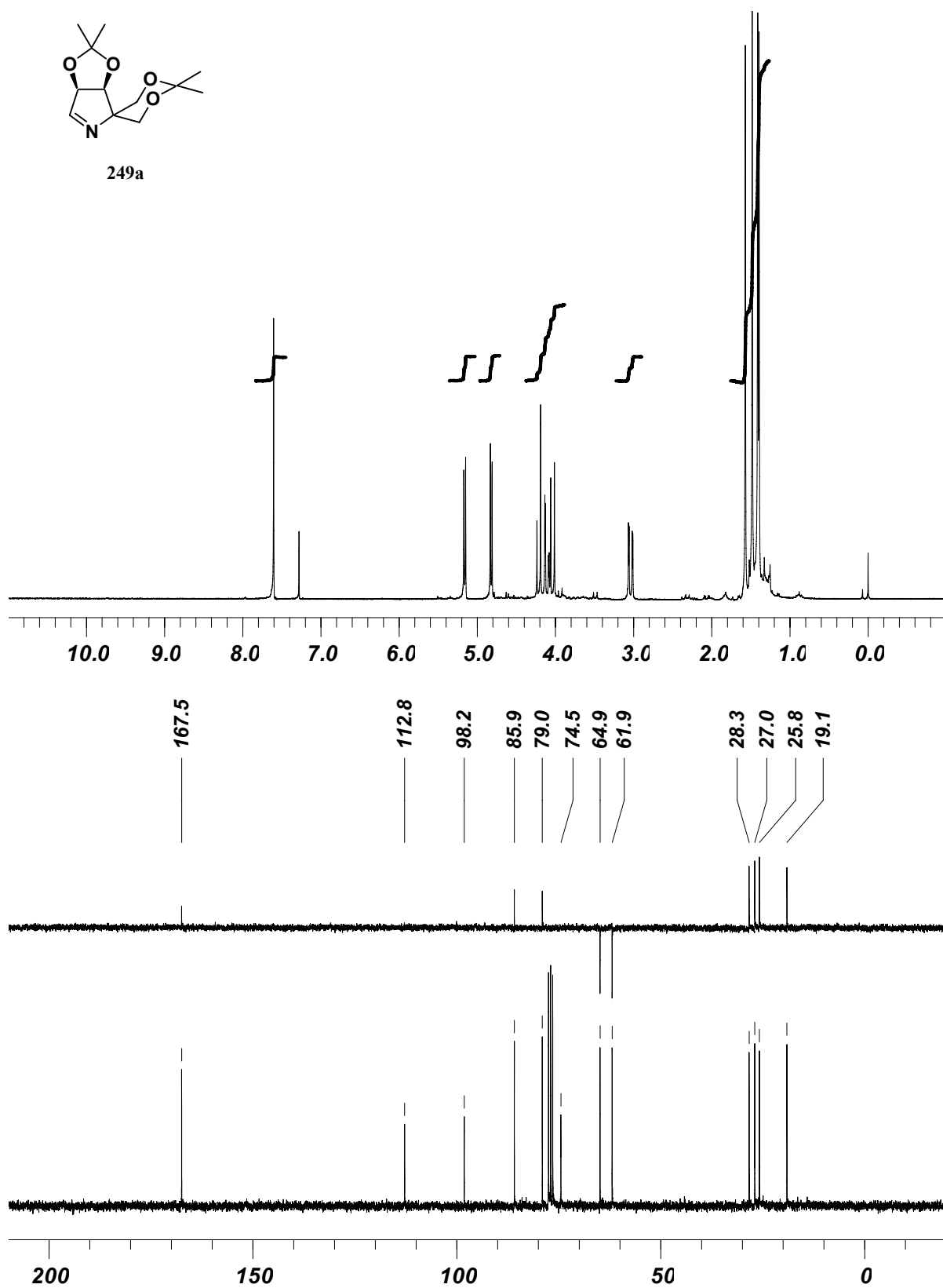
MS-ES (m/z, %): 242 (100, MH⁺); 226 (38, [M - CH₃]⁺); 184 (70, [M - C₃H₅O]⁺).

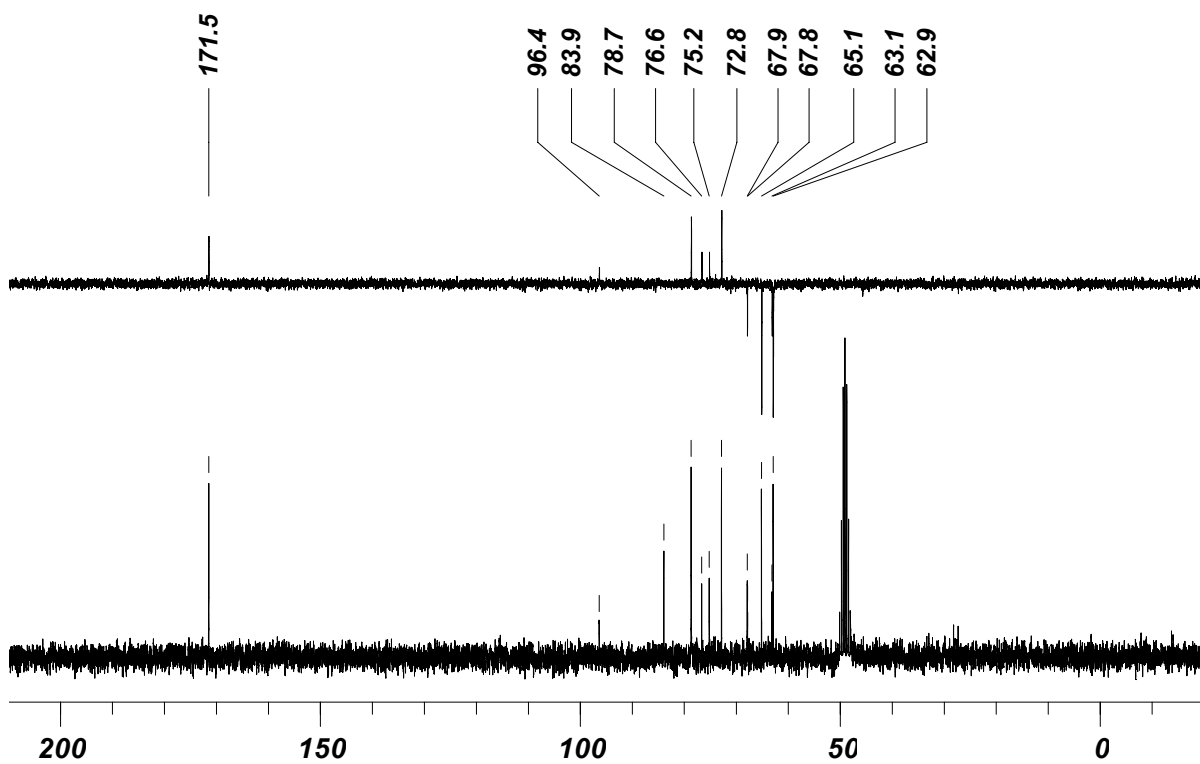
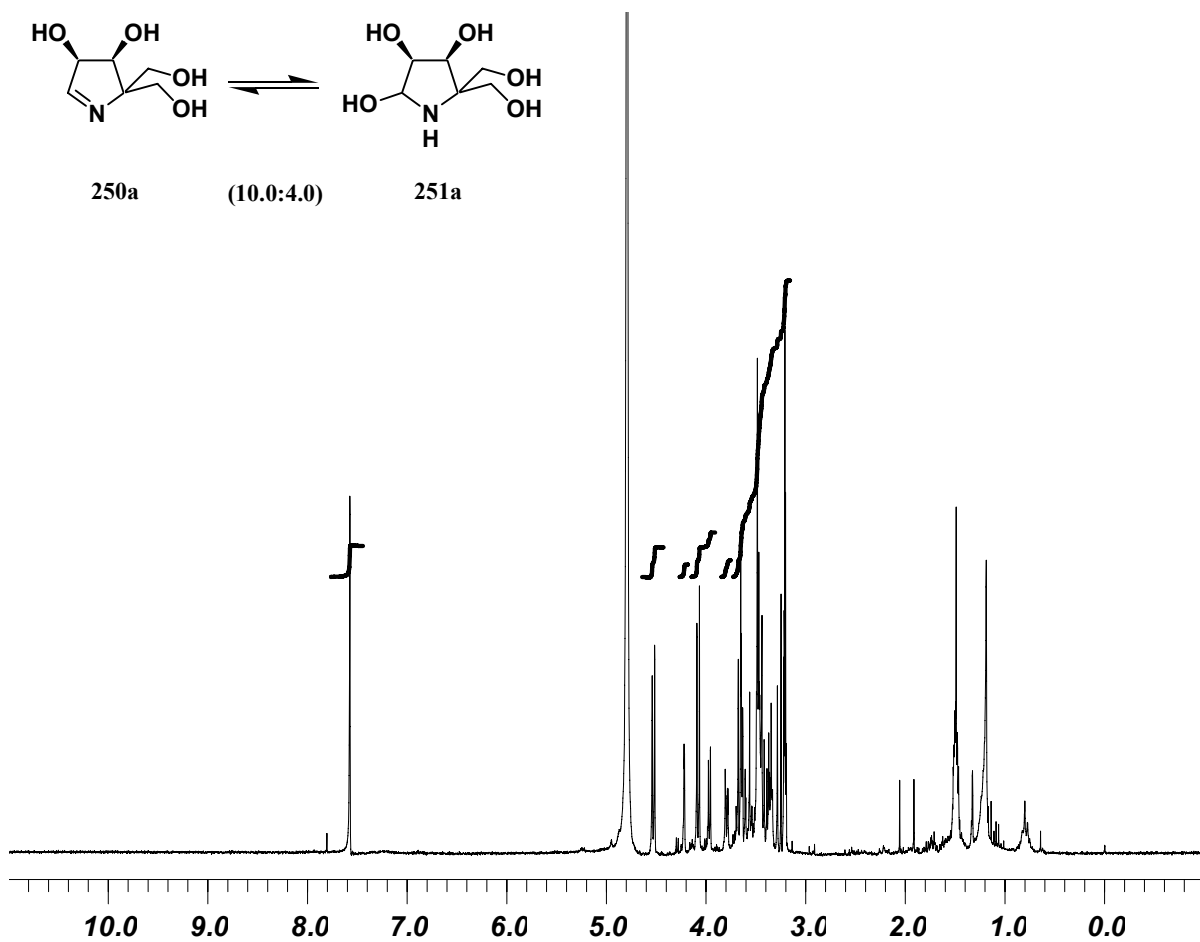
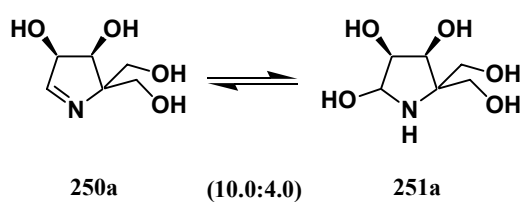
HRMS calculated for C₁₂H₂₀NO₄ (MH⁺): 242.1392. Found: 242.1395. $\Delta m=3 \times 10^{-4}$.

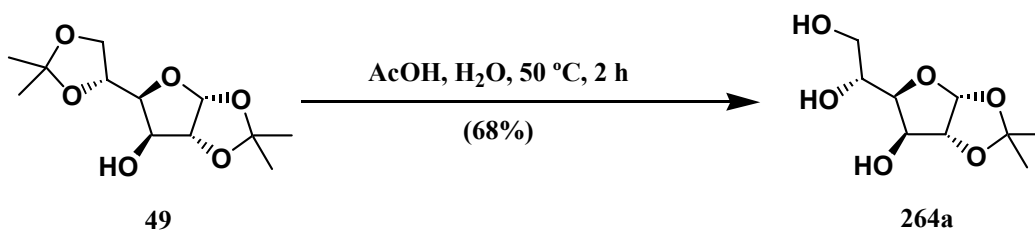
Anal. calculated for C₁₂H₁₉NO₄: C 59.73; H 7.94; N 5.81. Found: C 59.84; H 7.85; N 6.01.



249a





Preparation of 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (264a).

A solution of 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**49**) (10.00 g, 38.42 mmol) in a mixture 2:1 of acetic acid and water (110 mL) was heated at 50 °C for 2 hours. The reaction mixture was then evaporated *in vacuo*, coevaporated with toluene (3 x 20 mL) and the resulting solid residue was crystallized from a mixture of methanol and diethyl ether (1:1) to give the 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**264a**) (5.78 g, 26.25 mmol, 68%) as a white solid with m.p. 163-164 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -9.0° (c 1.02, in chloroform).

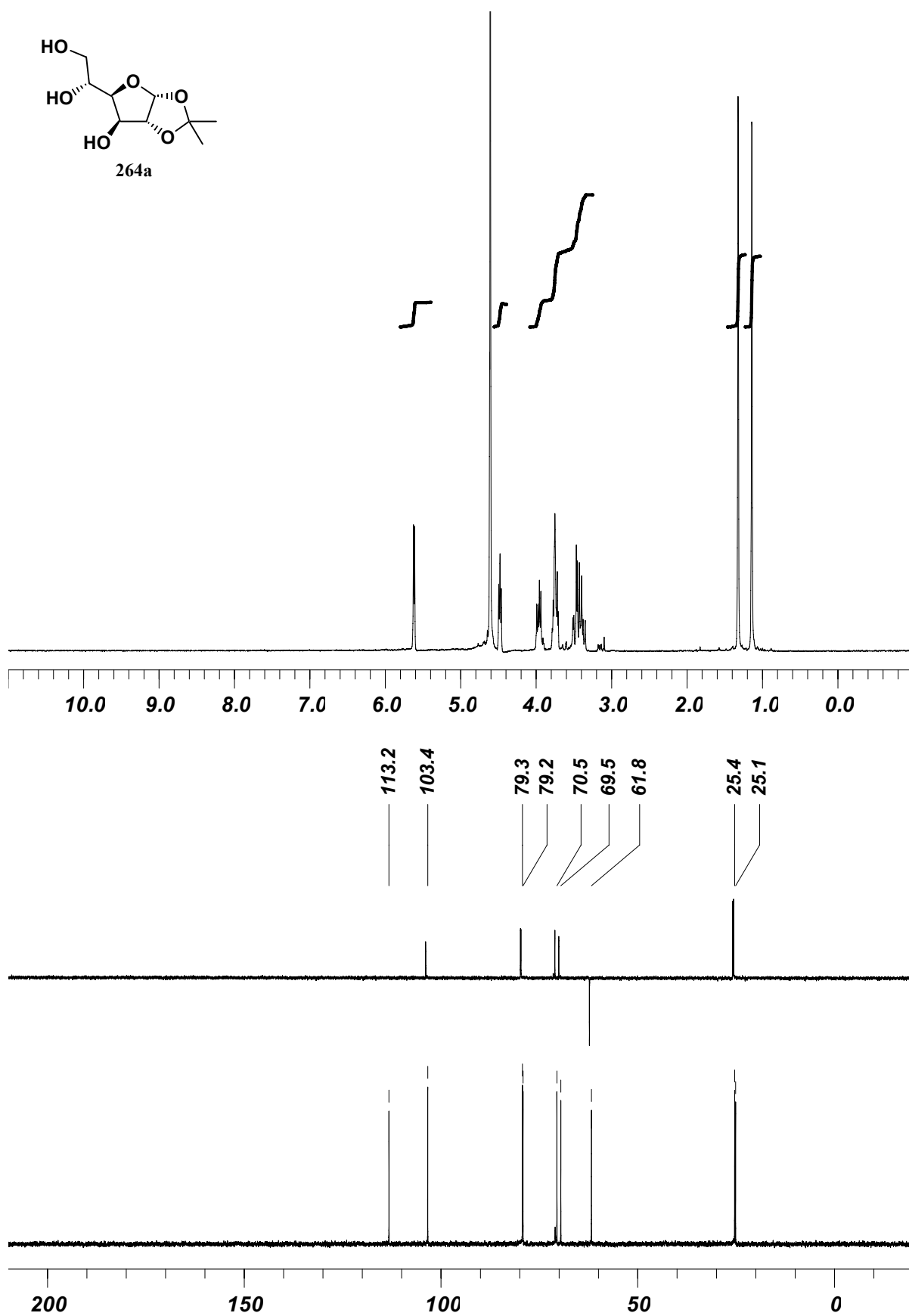
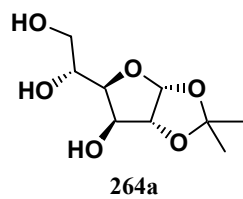
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 250 MHz, ppm): 1.14 (s, 3H, CH_3); 1.30 (s, 3H, CH_3); 3.41 (dd, 1H, $J_{5,6}=5.9$ Hz, $J_{6,6}=12.1$ Hz, H-6); 3.56 (dd, 1H, $J_{5,6}=2.8$ Hz, $J_{6,6}=12.1$ Hz, H-6); 3.67 (ddd, 1H, $J_{5,6}=2.8$ Hz, $J_{5,6}=5.9$ Hz, $J_{4,5}=8.8$ Hz, H-5); 3.88 (dd, 1H, $J_{3,4}=2.4$ Hz, $J_{4,5}=8.8$ Hz, H-4); 4.00 (d, 1H, $J_{3,4}=2.4$ Hz, H-3); 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-2); 5.60 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 62.5 MHz, ppm): 25.1 (CH_3); 25.4 (CH_3); 61.8 (CH_2); 69.5 (CH); 70.5 (CH); 79.2 (CH); 79.3 (CH); 103.4 (CH); 113.2 (C).

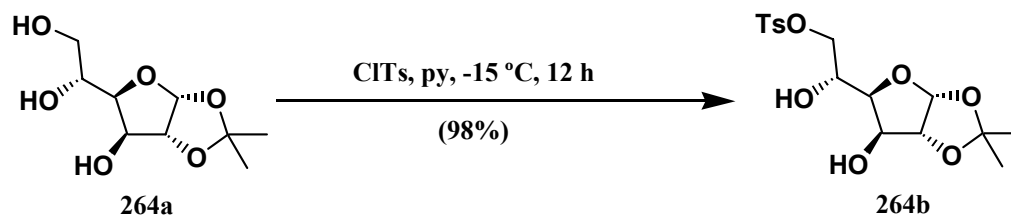
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3433 (br, OH).

MS-IQ (m/z , %): 221 (36, MH^+); 145 (100, $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2]^+$).

Anal. calculated for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6$: C 49.09; H 7.32. Found: C 49.01; H 7.44.



Preparation of 1,2-*O*-isopropylidene-6-*O*-*p*-toluenesulfonyl- α -D-glucofuranose (**264b**).



p-Toluenesulfonyl chloride (28.9 g, 152 mmol, 1.05 eq) was added over a solution of 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**264a**) (31.8 g, 144 mmol) in anhydrous pyridine (250 mL) under nitrogen atmosphere and cooled at -15 °C. The resulting mixture was stirred at -15 °C for 12 hours and then the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude residue was dissolved in dichloromethane (100 mL) and the organic layer washed with 0.5 M hydrochloric acid (50 mL) and sodium bicarbonate aqueous saturated solution (50 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated to dryness, to obtain a solid which was crystallized from a mixture of diethyl ether/hexane to give the 1,2-*O*-isopropylidene-6-*O*-*p*-toluenesulfonyl- α -D-glucofuranose (**264b**) (53 g, 141 mmol, 98%) as a white solid with m.p. 100-101 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -5.6° (c 0.81, in chloroform).

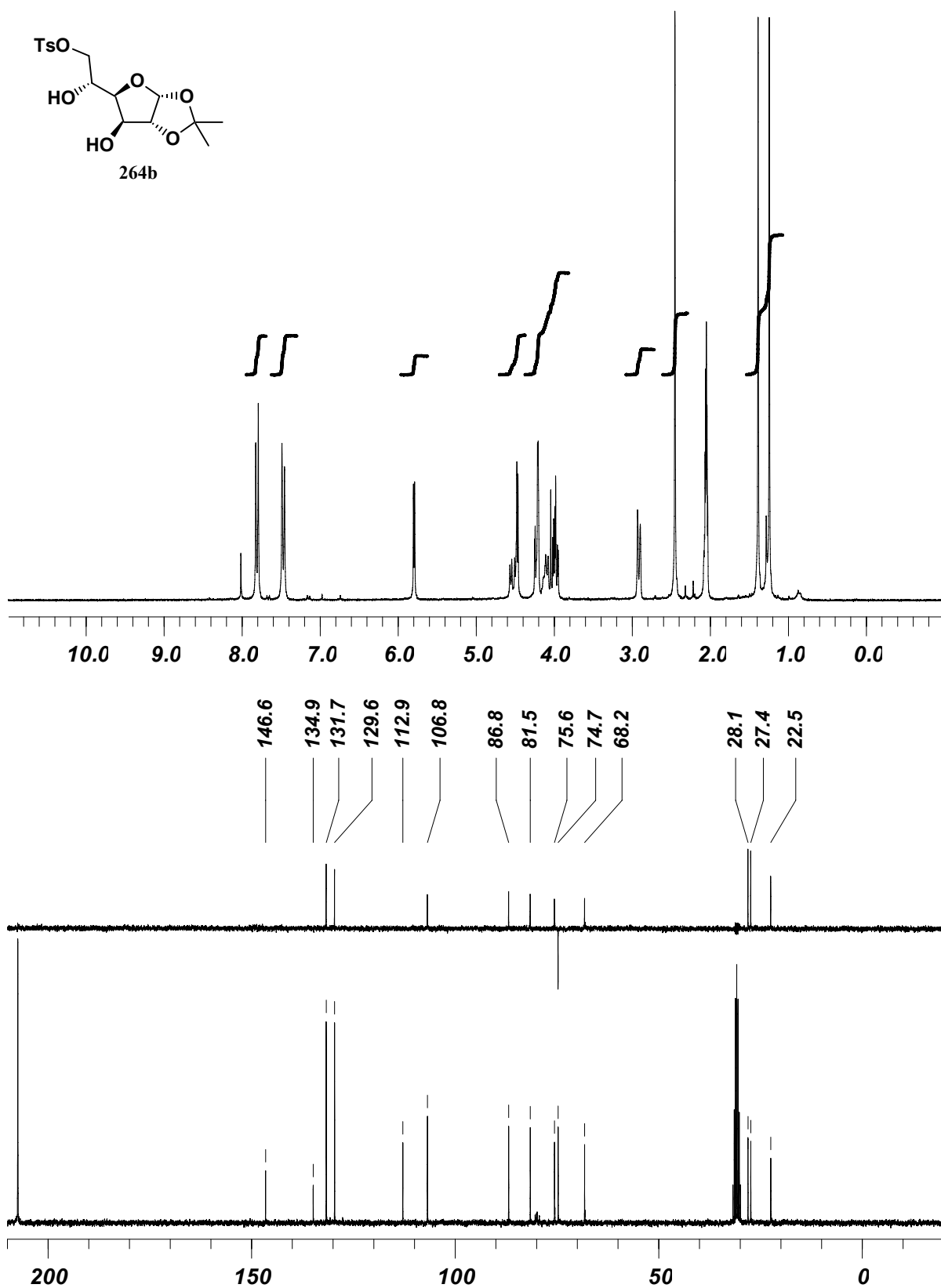
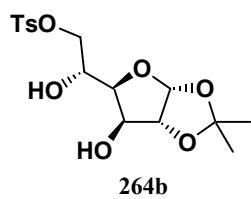
¹H-NMR (CD₃COCD₃, 250 MHz, ppm): 1.24 (s, 3H, CH₃); 1.39 (s, 3H, CH₃); 2.45 (s, 3H, CH₃); 2.90 (br s, 1H, OH); 2.93 (br s, 1H, OH); 3.95-4.25 (m, 4H, H-3 + H-5 + 2 x H-6); 4.46-4.57 (m, 2H, H-2 + H-4); 5.79 (d, 1H, $J_{1,2}$ =3.6 Hz, H-1); 7.45-7.82 (m, 4H, 4 x H-Ph).

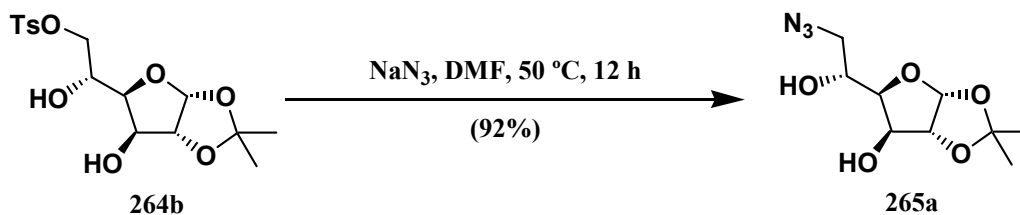
¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 62.5 MHz, ppm): 22.5 (CH₃); 27.4 (CH₃); 28.1 (CH₃); 68.2 (CH); 74.7 (CH₂); 75.6 (CH); 81.5 (CH); 86.8 (CH); 106.8 (CH); 112.9 (C); 129.6 (2 x CH); 131.7 (2 x CH); 134.9 (C); 146.6 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3457 (br, OH).

MS-IQ (m/z, %): 375 (1, [MH]⁺); 160 (100).

Anal. calculated for C₁₆H₂₂O₈S: C 51.33; H 5.92; S 8.56. Found: C 51.14; H 5.76; S 8.53.



Preparation of 6-azido-6-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**265a**).

Sodium azide (28.2 g, 434 mmol, 3 eq) was added over a solution of 1,2-*O*-isopropylidene-6-*O*-*p*-toluenesulfonyl- α -D-glucofuranose (**264b**) (53 g, 141 mmol) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (500 mL) and the resulting suspension was heated under nitrogen atmosphere at 50 °C for 15 hours. The solvent was removed *in vacuo*, the resulting residue dissolved in 200 mL of dichloromethane, and the solution was washed with water (3 x 50 mL) and brine (25 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*. The resulting crude product was crystallized from a mixture of diethyl ether and hexane to give the 6-azido-6-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**265a**) as a white solid with m.p. 104-106 °C. The mother liquids were concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (ethyl acetate/hexane 2:3) to give in overall 32.1 g (130 mmol, 92%) of **265a**. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -17.9° (c 1.09, chloroform).

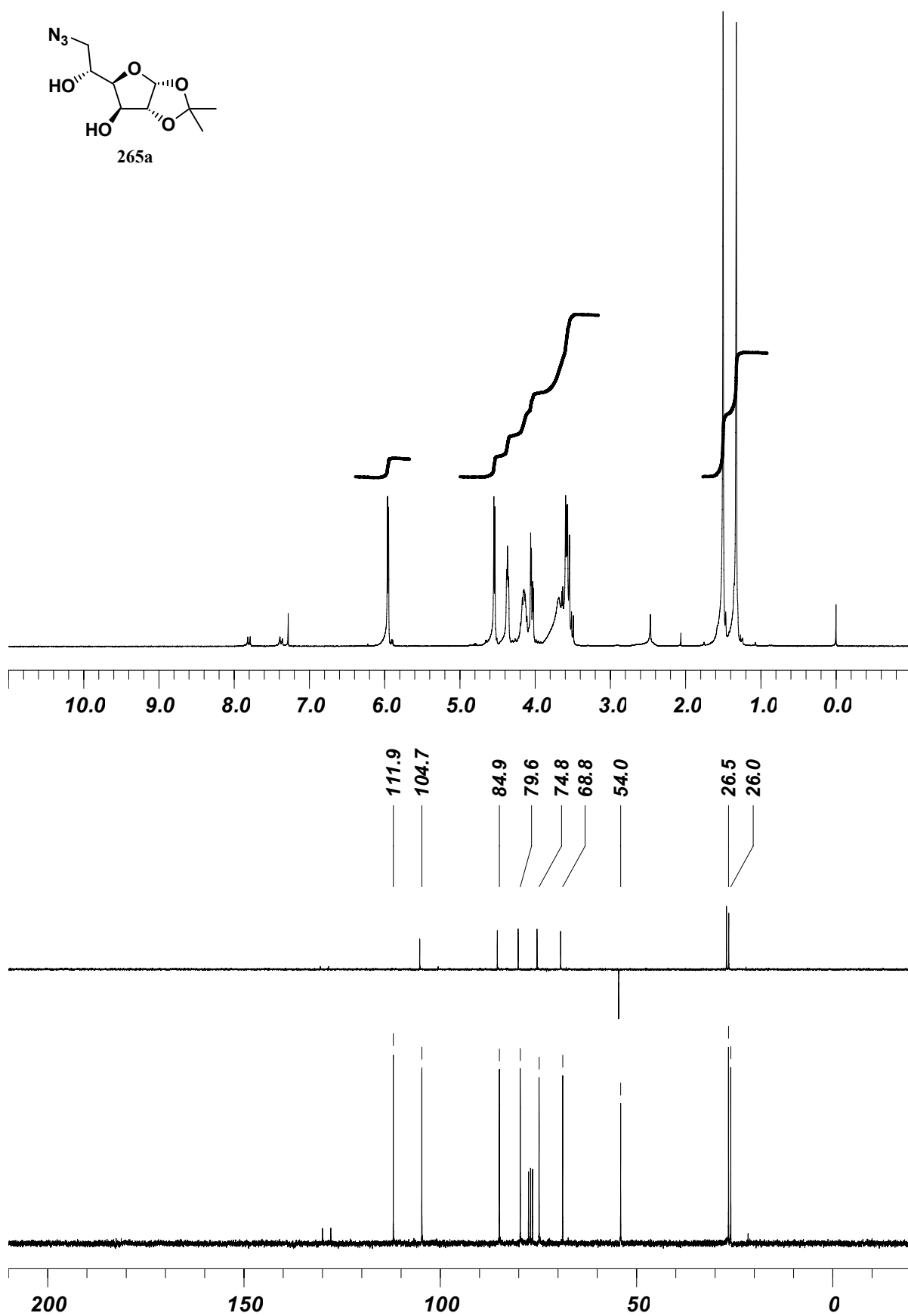
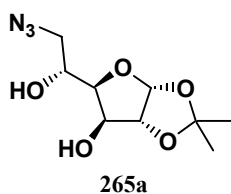
¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.33 (s, 3H, CH₃); 1.50 (s, 3H, CH₃); 3.43-3.65 (m, 4H, 2 x H-6 + 2 x OH); 4.05 (dd, 1H, $J_{3,4}=2.7$ Hz, $J_{4,5}=6.7$ Hz, H-4); 4.16 (ddd, 1H, $J_{5,6}=3.6$ Hz, $J_{5,6}=6.3$ Hz, $J_{4,5}=6.7$ Hz, H-5); 4.37 (d, 1H, $J_{3,4}=2.7$ Hz, H-3); 4.54 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-2); 5.96 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-1).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.0 (CH₃); 26.5 (CH₃); 54.0 (CH₂); 68.8 (CH); 74.8 (CH); 79.6 (CH); 84.9 (CH); 104.7 (CH); 111.9 (C).

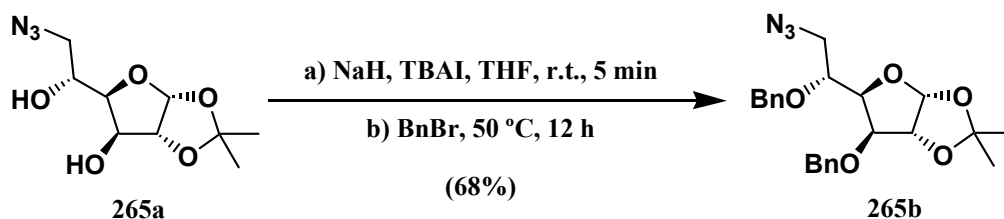
IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3435 (br, OH); 2108 (st, N₃).

MS-IQ (m/z, %): 246 (100, [M + H]⁺); 230 (2, [M - CH₃]⁺); 59 (100).

Anal. calculated for C₉H₁₅N₃O₅: C 44.08; H 6.17; N 17.13. Found: C 44.23; H 6.37; N 17.04.



Preparation of 6-azido-3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**265b**).



A solution of 6-azido-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**265a**) (29.9 g, 122 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (250 mL) was added dropwise over a suspension of sodium hydride (50% in mineral oil) (13.00 g, 274 mmol, 2.2 eq) and tetrabutylammonium iodide (2.25 g, 6.10 mmol, 0.05 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (250 mL). After stirring at room temperature under nitrogen atmosphere for 5 minutes, benzyl bromide (41.0 mL, 268 mmol, 2.2 eq) was added and the reaction mixture was heated at 50 °C for 16 hours. Methanol (20 mL) was then added and the mixture stirred 2 hours more. The resulting suspension was then filtered over a celite pad, the mother liquors were evaporated to dryness and the residue was dissolved in dichloromethane (200 mL). The organic solution was washed with water (2 x 100 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude product was crystallized from methanol to give 6-azido-3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**265b**) as a white solid with m.p. 50-51 °C. The mother liquids was concentrated *in vacuo* and the resulting oil purified by flash column chromatography (diethyl ether/hexane 1:3) to give in overall 35.4 g (83.0 mmol, 68%) of **265b**. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -66.7° (c 1.14, in chloroform).

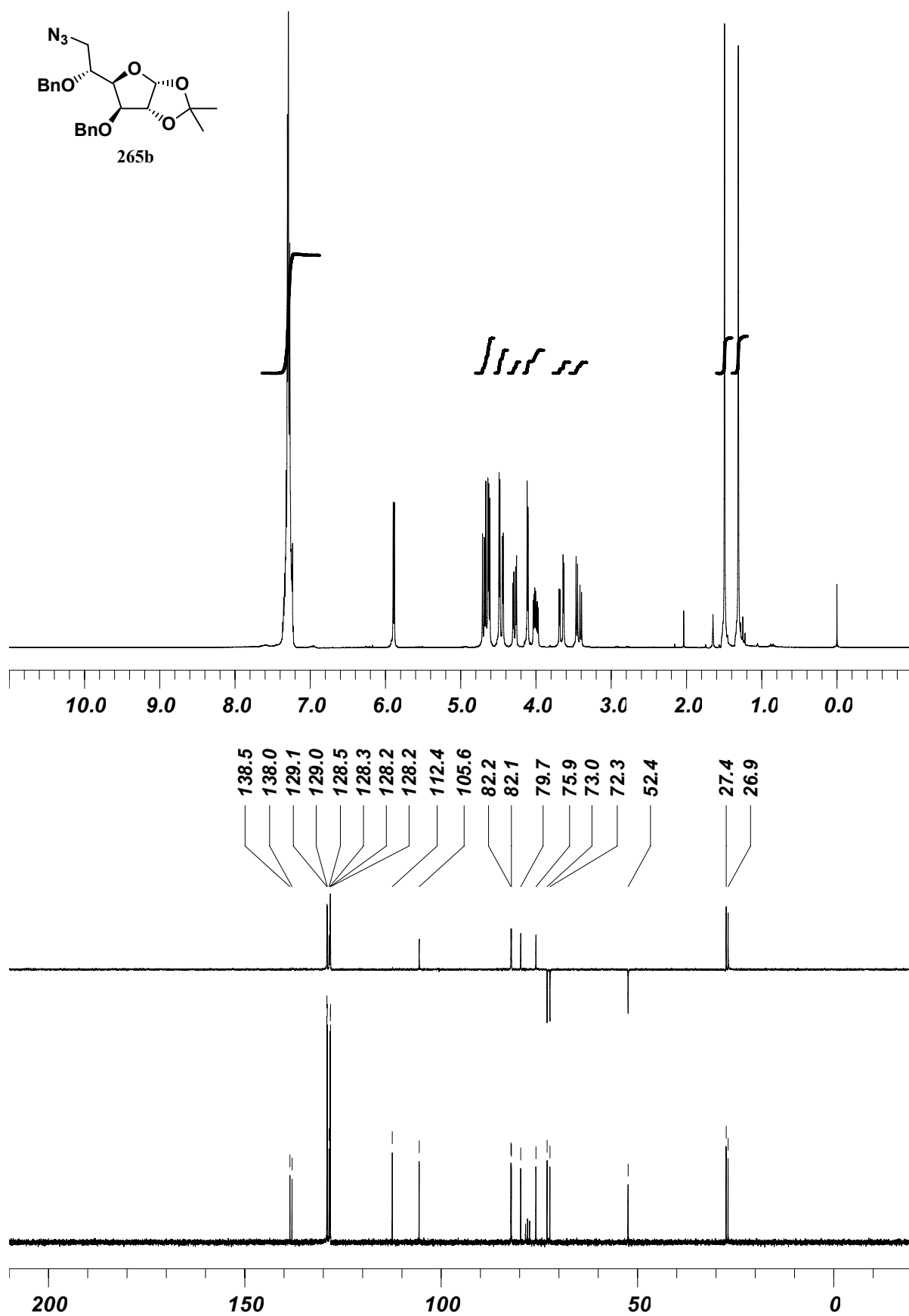
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.33 (s, 3H, CH_3); 1.51 (s, 3H, CH_3); 3.45 (dd, 1H, $J_{5,6}=5.2$ Hz, $J_{6,6}=13.2$ Hz, H-6); 3.68 (dd, 1H, $J_{5,6}=2.6$ Hz, $J_{6,6}=13.2$ Hz, H-6); 4.02 (ddd, 1H, $J_{5,6}=2.6$ Hz, $J_{5,6}=5.2$ Hz, $J_{4,5}=9.0$ Hz, H-5); 4.13 (d, 1H, $J_{3,4}=3.1$ Hz, H-3); 4.29 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.1$ Hz, $J_{4,5}=9.0$ Hz, H-4); 4.50 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-2); 4.46-4.73 (m, 4H, 2 x CH_2Ph); 5.90 (d, 1H, $J_{1,2}=3.8$ Hz, H-1); 7.26-7.40 (m, 10H, 10 x H-Ph).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 26.9 (CH_3); 27.4 (CH_3); 52.4 (CH_2); 72.3 (CH_2); 73.0 (CH_2); 75.9 (CH); 79.7 (CH); 82.1 (CH); 82.2 (CH); 105.6 (CH); 112.4 (C); 128.2 (2 x CH); 128.2 (2 x CH); 128.3 (CH); 128.5 (CH); 129.0 (2 x CH); 129.1 (2 x CH); 138.0 (C); 138.5 (C).

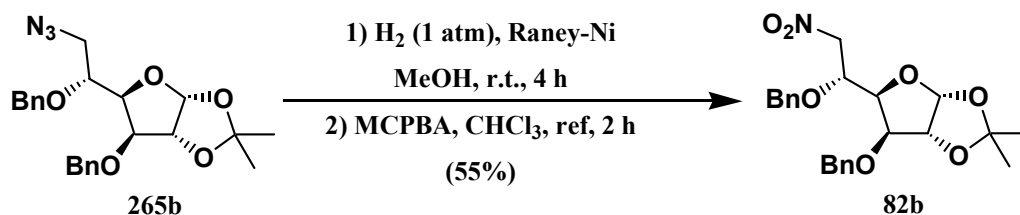
IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2101 (st, N_3).

MS-IQ (m/z, %): 398 (1, $[\text{M} - \text{N}_2]^+$); 397 (2, $[\text{M} - \text{H} - \text{N}_2]^+$); 91 (100, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Anal. calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$: C 64.92; H 6.40; N 9.88. Found: C 65.11; H 6.48; N 10.22.



Preparation of 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene-6-nitro- α -D-glucufuranose (**82b**).



A Raney-nickel water suspension (2.8 g, 50% w/w) was added over a degassed solution of 6-azido-3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-glucufuranose (**265b**) (5.52 g, 12.97 mmol) in methanol (195 mL) and the resulting suspension was purged with hydrogen and stirred at room temperature under hydrogen (1 atm) for 5 hours. Hydrogen was then removed purging with nitrogen and the metallic catalyst was filtered over a pad of celite. The resulting solution was evaporated *in vacuo*, to afford the amino intermediate which was dried in the vacuum line, dissolved in chloroform (325 mL) and anhydrous magnesium sulphate (26 g, 216 mmol, 16 eq) added. The suspension was stirred at room temperature for 5 minutes and then *meta*-chloroperbenzoic acid (26 g, 116 mmol, 9 eq) was added. This new mixture was refluxed for 2 hours and then cooled down to room temperature. Dichloromethane (100 mL) was added, the suspension was cooled in an ice-bath, the resulting mixture filtered and the solution evaporated *in vacuo*. The resulting residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL), the organic layer washed with saturated sodium bicarbonate aqueous solution (100 mL), water (100 mL) and brine (100 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo* to give a residue which was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/hexane 1:6.5) to give 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene-6-nitro- α -D-glucufuranose (**82b**) (3.06 g, 7.13 mmol, 55%) as a yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -33.0° (c 6.05, in chloroform).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH₃); 1.47 (s, 3H, CH₃); 4.06 (d, 1H, $J_{3,4}=3.1$ Hz, H-3); 4.21-4.25 (m, 1H, H-5); 4.41-4.82 (m, 6H, H-2 + H-4 + 2 x H-6 + 2 x CH₂-Ph); 5.89 (d, 1H, $J_{1,2}=3.7$ Hz, H-1); 7.15-7.38 (m, 10H, 10 x H-Ph).

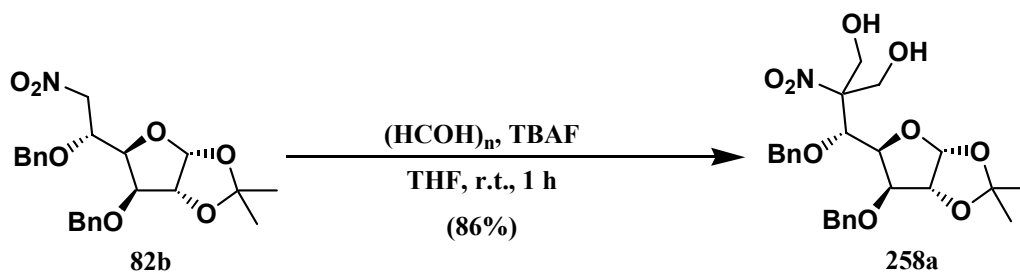
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 62.5 MHz, ppm): 26.2 (CH₃); 26.7 (CH₃); 71.7 (CH₂); 73.3 (CH₂); 73.7 (CH); 77.4 (CH₂); 79.4 (CH); 81.2 (CH); 81.4 (CH); 104.8 (CH); 112.1 (C); 127.7 (2 x CH); 127.8 (2 x CH); 127.9 (CH); 128.2 (CH); 128.4 (2 x CH); 128.6 (2 x CH); 136.7 (C); 137.2 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1554 (st, NO₂); 1376 (m, NO₂).

MS-IQ (m/z, %): 428 (1, [M - H]⁺); 338 (1, [M - H - OCH₂Ph]⁺); 91 (100, [PhCH₂]⁺).

Anal. calculated for C₂₃H₂₇NO₇: C 64.32; H 6.34; N 3.26. Found: C 64.20; H 6.33; N 3.44

Preparation of 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-O-isopropylidene-6-nitro-D-glicero- α -D-gluco-heptofuranose (258a).



Tetrabutylammonium fluoride (1.0 M solution in tetrahydrofuran, 1.34 mL, 1.34 mmol, 1 eq) was added over a suspension of paraformaldehyde (0.41 g, 13.5 mmol, 10 eq) and 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-1,2-O-isopropylidene-6-nitro- α -D-glucofuranose (**82b**) (0.29 g, 0.67 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (3.5 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 1 hour. Dichloromethane (10 mL) was added and the organic layer was washed with saturated ammonium chloride aqueous solution (3 x 5 mL), dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo*. The resulting crude product was purified by flash column chromatography (dichloromethane/methanol 50:1) to give 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-O-isopropylidene-6-nitro-D-glicero- α -D-gluco-heptofuranose (**258a**) (0.29 g, 0.58 mmol, 86%) as an amorphous white solid which could not be crystallized. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -67.8° (c 1.70, in chloroform).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.32 (s, 3H, CH_3); 1.49 (s, 3H, CH_3); 2.72 (br s, 1H, OH); 2.95 (br s, 1H, OH); 4.10 (d, 1H, $J_{4,5}=3.1$ Hz, H-5); 4.21-4.28 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.37-4.47 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.64 (d, 1H, $J_{1,2}=3.9$ Hz, H-2); 4.66-4.71 (m, 2H, H-3 + H-4); 5.91 (d, 1H, $J_{1,2}=3.9$ Hz, H-1); 7.10-7.39 (m, 10H, 10 x H-Ph).

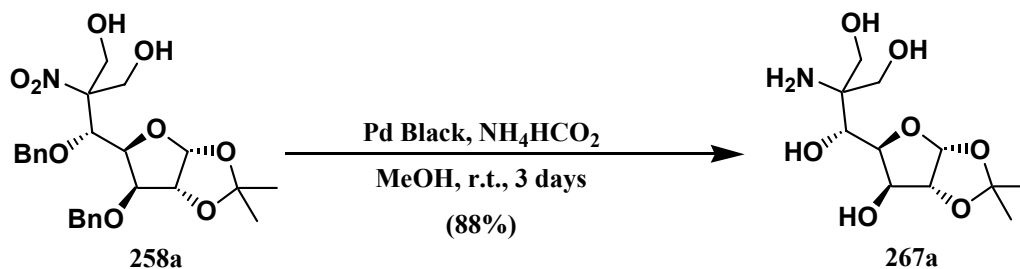
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 26.2 (CH_3); 26.7 (CH_3); 62.3 (CH_2); 63.6 (CH_2); 71.2 (CH_2); 75.1 (CH_2); 77.1 (CH); 78.5 (CH); 80.1 (CH); 81.7 (CH); 95.9 (C); 104.9 (CH); 112.3 (C); 127.3 (2 x CH); 127.6 (2 x CH); 127.9 (CH); 128.2 (CH); 128.4 (2 x CH); 128.6 (2 x CH); 136.6 (C); 137.1 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3472 (br, OH); 1546 (st, NO_2).

MS-IQ (m/z , %): 491 (1, $[\text{M} + \text{H}_2]^+$); 91 (100, $[\text{PhCH}_2]^+$).

Anal. calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_9$: C 61.34; H 6.38; N 2.86. Found: C 60.98; H 6.23; N 2.82.

Preparation of 6-amino-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-O-isopropylidene-D-glicero- α -D-gluco-heptofuranose (267a).



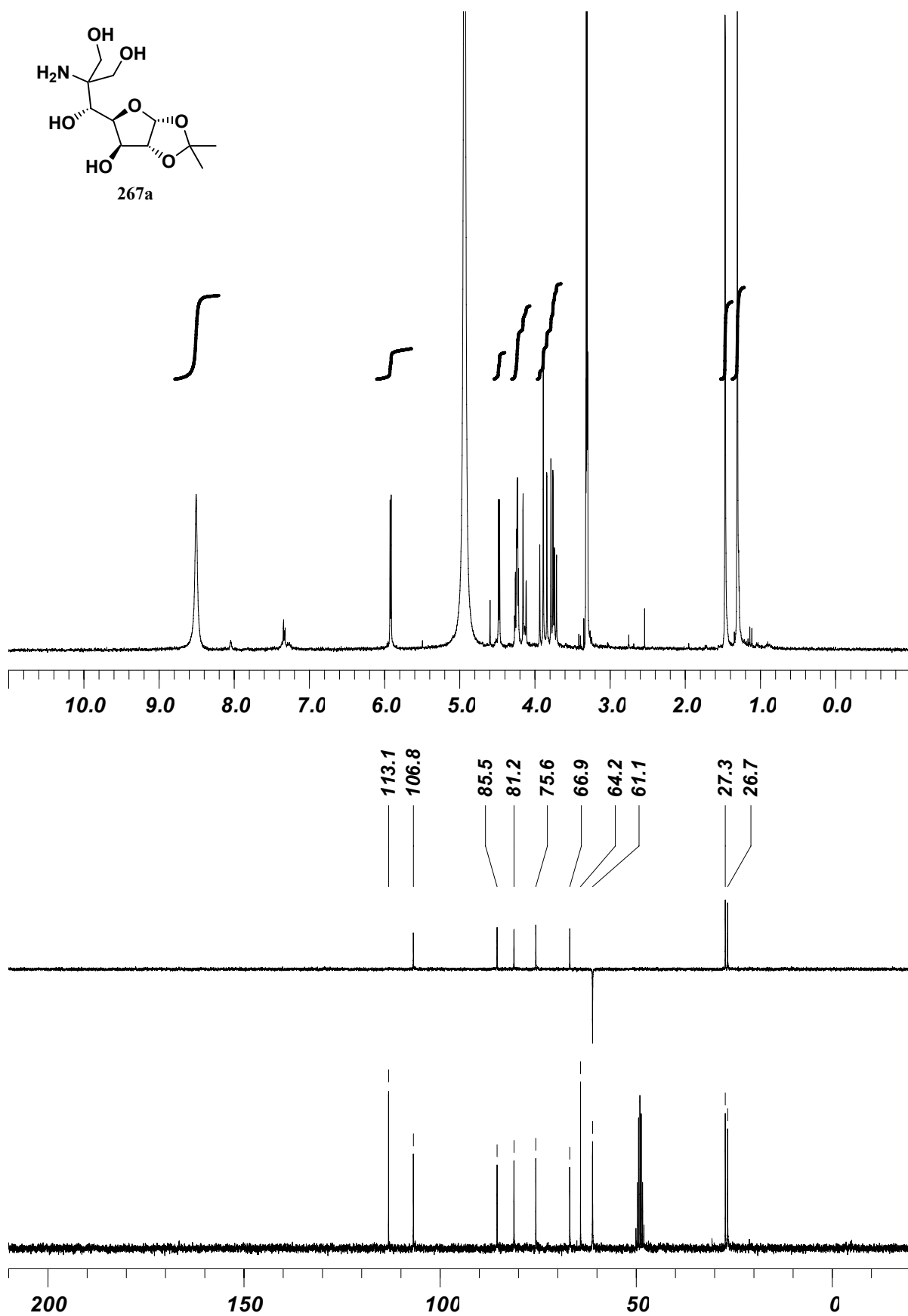
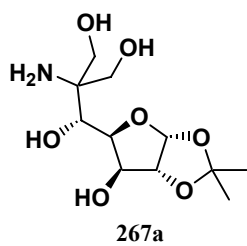
Palladium black (0.11 g, 20% w/w) and ammonium formate (2.09 g, 33.11 mmol, 30 eq) were added over a degassed solution of 3,5-di-O-benzyl-6-deoxy-6-nitro-D-glicero- α -D-gluco-heptofuranose (258a) (0.54 g, 1.10 mmol) in methanol (11 mL) and the resulting mixture was stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for 3 days. The suspension was then filtered over a celite pad and the filtrate evaporated *in vacuo*, to give 6-amino-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-O-isopropylidene-D-glicero- α -D-gluco-heptofuranose (267a) (0.27 g, 0.97 mmol, 88%) as a yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -20.3° (c 2.33, in methanol).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz, ppm): 1.31 (s, 3H, CH_3); 1.47 (s, 3H, CH_3); 3.74 (d, 1H, $J_{7,7}=11.5$ Hz, H-7); 3.76 (d, 1H, $J_{7,7}=11.5$ Hz, H-7); 3.86 (d, 1H, $J_{7,7}=11.5$ Hz, H-7); 3.91 (d, 1H, $J_{7,7}=11.5$ Hz, H-7); 4.14 (d, 1H, $J_{3,4}=10.3$ Hz, H-3); 4.22-4.28 (m, 2H, H-4 + H-5); 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-2); 5.92 (d, 1H, $J_{1,2}=3.6$ Hz, H-1); 8.51 (br s, 2H, NH_2).

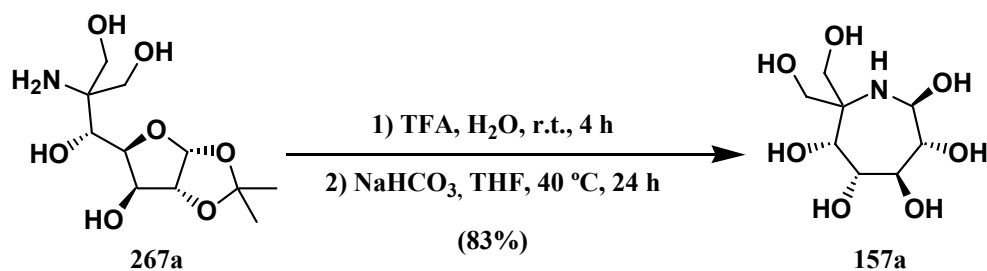
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 62.5 MHz, ppm): 26.7 (CH_3); 27.3 (CH_3); 61.1 (2 \times CH_2); 64.2 (C); 66.9 (CH); 75.6 (CH); 81.2 (CH); 85.5 (CH); 106.8 (CH); 113.1 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3425 (br, OH + NH_2)

MS-IQ (m/z, %): 280 (100, MH^+); 263 (46, $[\text{M} - \text{NH}_2]^+$); 222 (27, $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$).



Preparation of (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-7,7-bis-(hydroxymethyl)azepane-2,3,4,5,6-pentaol (157a).



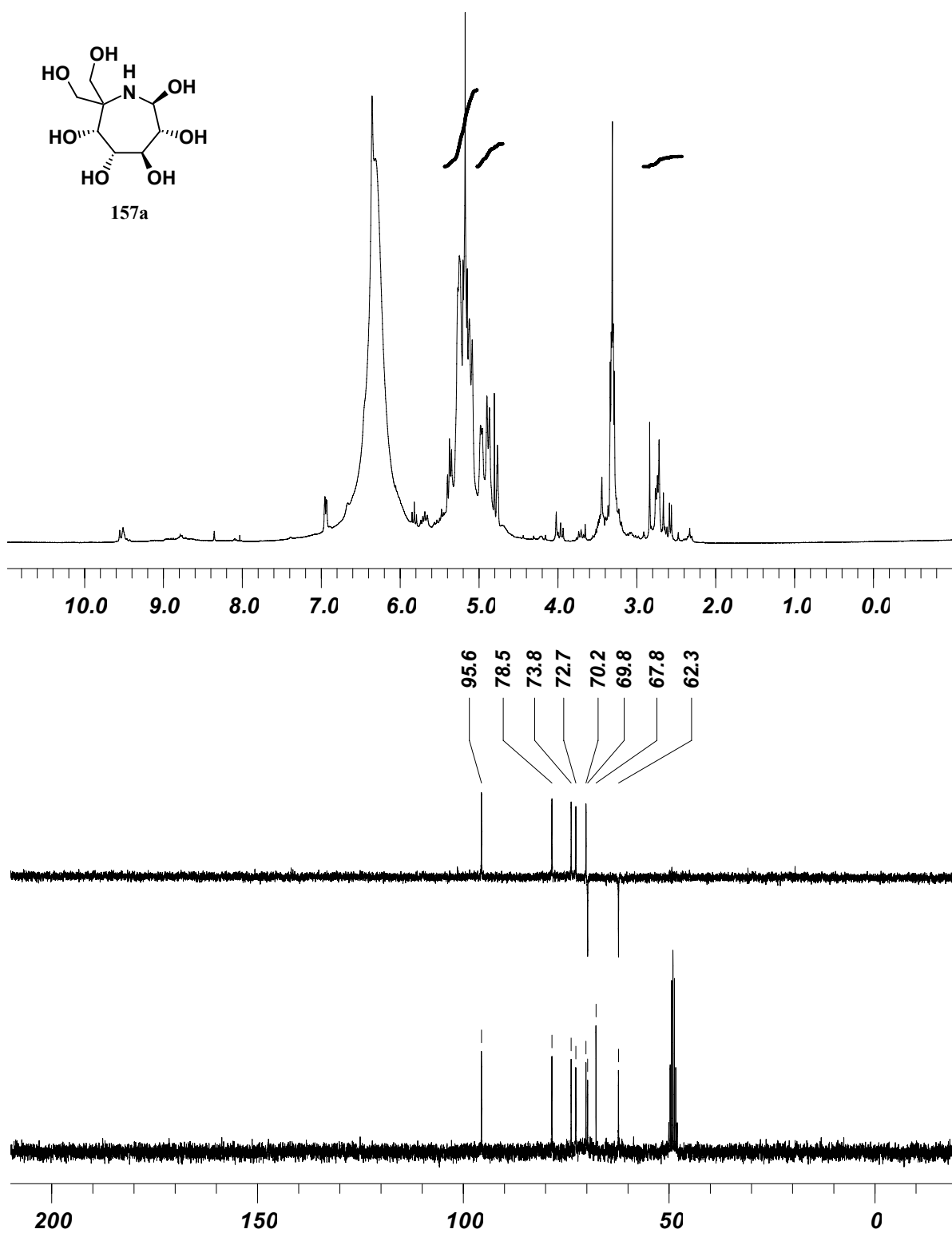
A solution of 6-amino-6-deoxy-6-C-hydroxymethyl-1,2-*O*-isopropylidene-*D*-*glycero*- α -*D*-*gluco*-heptofuranose (**267a**) (0.17 g, 0.61 mmol) in a mixture of trifluoroacetic acid and water (2:1, 9 mL) was stirred at room temperature for 4 hours. The solvents were then removed *in vacuo* and the residue coevaporated with toluene (3 x 5 mL). The crude reaction product was dried under the vacuum line and then was dissolved in tetrahydrofuran (9 mL) and sodium bicarbonate (0.077 g, 0.915 mmol, 1.5 eq) was added. The solution was heated at 40 °C for 24 h when t.l.c. (chloroform/methanol/water/acetic acid 60:30:5:3) showed no starting material. The solvent was evaporated *in vacuo*, the resulting residue dissolved in acetone, the solids filtered and the solution concentrated *in vacuo* to give (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-7,7-bis-(hydroxymethyl)azepane-2,3,4,5,6-pentaol (**157a**) (0.12 g, 0.51 mmol, 83%) as a yellow oil.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 2.71-2.76 (m, 1H, NH); 4.76-4.80 (m, 1H, H-8); 4.95-4.98 (m, 2H, 2 x H-8); 5.09-5.27 (m, 5H, H-3 + H-4 + H-5 + H-6 + H-8); 5.34-5.40 (m, 1H, H-2).

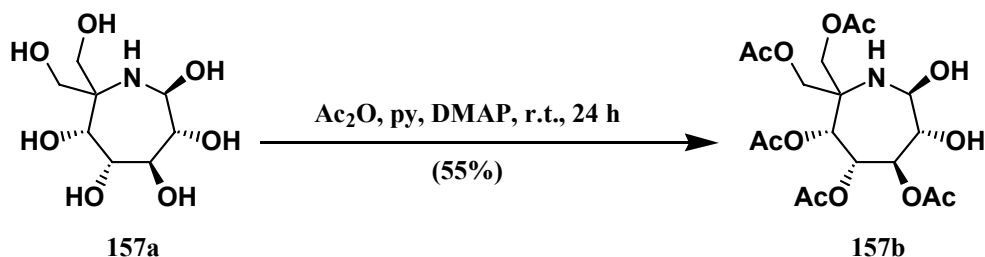
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 62.3 (CH_2); 67.8 (C); 69.8 (CH_2); 70.2 (CH); 72.7 (CH); 73.8 (CH); 78.5 (CH); 95.6 (CH).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3420 (br, OH + NH).

MS-ES (m/z , %): 240 (7, MH^+); 222 (63, $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$); 58 (100).



Preparation of (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5,6-triacetoxy-7,7-bis-(acetoxymethyl)azepane-2,3-diol (157b).



A solution of (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-7,7-bis-hydroxymethyl-azepane-2,3,4,5,6-pentaol (**157a**) (0.05 g, 0.21 mmol) and *N,N*-dimethylaminopyridine (0.002 g, 0.021 mmol, 0.1 eq) in a 1:1 mixture of pyridine and acetic anhydride (2 mL) was stirred at room temperature for 24 hours. Then solvents were removed *in vacuo* and the crude residue was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/hexane 1:1) to give (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5,6-triacetoxy-7,7-bis-(acetoxymethyl)azepane-2,3-diol (**157b**) (0.05 g, 0.11 mmol, 55%) as a colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}^{20}}$: -8.7° (c 1.01, in chloroform).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): 1.95 (s, 3H, CH_3); 2.02 (s, 3H, CH_3); 2.08 (s, 6H, 2 x CH_3); 2.21 (s, 3H, CH_3); 2.65 (br d, $J_{\text{NH},2}=7.1$ Hz, NH); 3.46 (d, 1H, $J_{8,8}=8.8$ Hz, H-8); 3.95 (d, 1H, $J_{8,8}=11.5$ Hz, H-8); 3.99 (d, 1H, $J_{8,8}=8.8$ Hz, H-8); 4.31 (d, 1H, $J_{8,8}=11.5$ Hz, H-8); 4.99 (dd, 1H, $J_{2,3}=1.6$ Hz, $J_{\text{NH},2}=7.1$ Hz, H-2); 5.03 (dd, 1H, $J_{2,3}=1.6$ Hz, $J_{3,4}=7.7$ Hz, H-3); 5.24 (dd, 1H, $J_{5,6}=2.2$ Hz, $J_{4,5}=10.7$ Hz, H-5); 5.32 (d, 1H, $J_{5,6}=2.2$ Hz, H-6); 5.72 (dd, 1H, $J_{3,4}=7.7$ Hz, $J_{4,5}=10.7$ Hz, H-4).

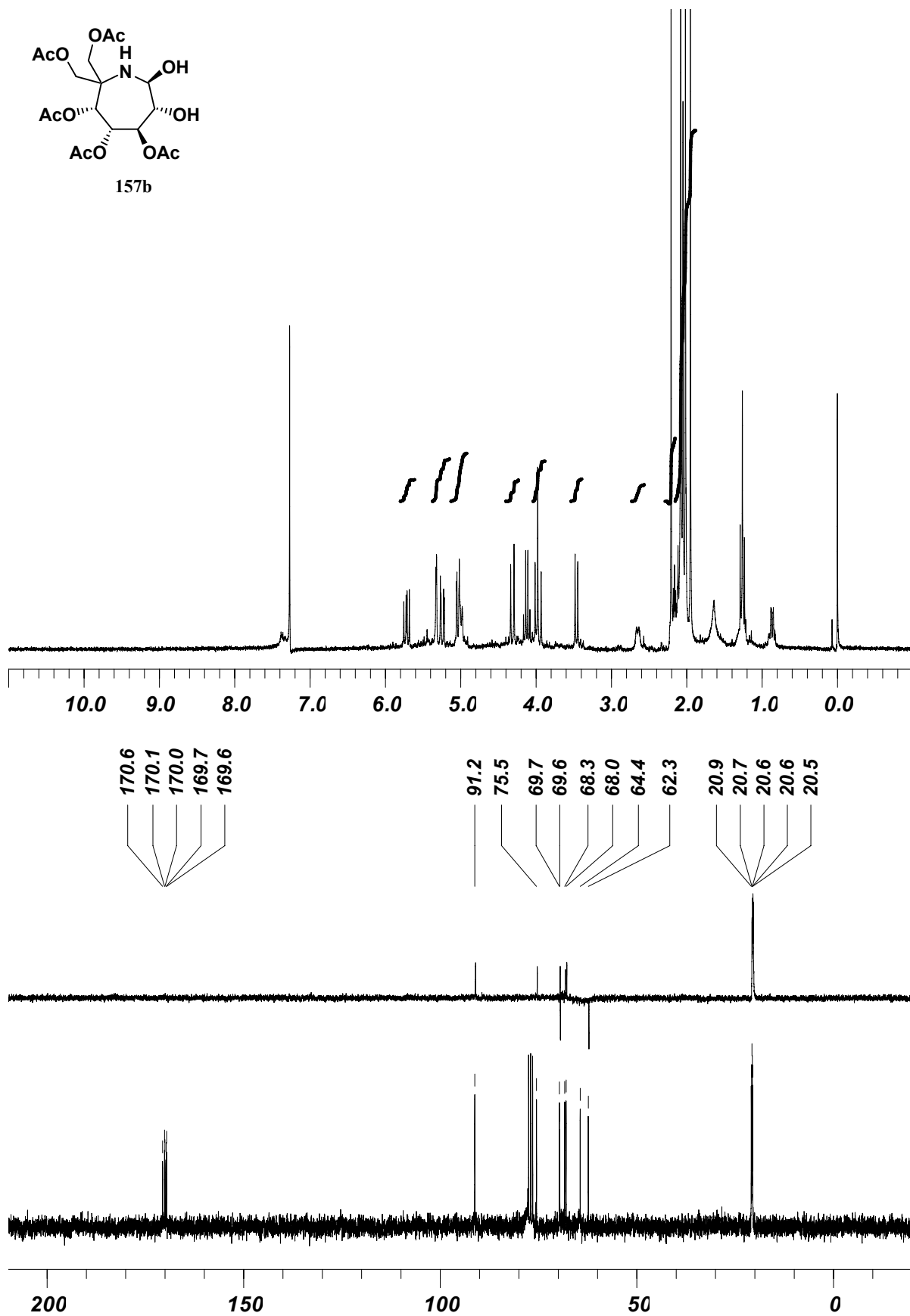
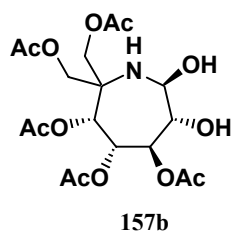
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz, ppm): 20.5 (CH_3); 20.6 (CH_3); 20.6 (CH_3); 20.7 (CH_3); 20.9 (CH_3); 62.3 (CH_2); 64.4 (C); 68.0 (CH); 68.3 (CH); 69.6 (CH_2); 69.7 (CH); 75.5 (CH); 91.2 (CH); 169.6 (C); 169.7 (C); 170.0 (C); 170.1 (C); 170.6 (C).

IR ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3476 (br, OH); 3327 (br, NH); 1748 (f, CO).

MS-ES (m/z , %): 450 (22, MH^+); 432 (100, $[\text{M} - \text{OH}]^+$).

HRMS calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NO}_{12}$ (MH^+): 450.1606. Found: 450.1592. $\Delta m=14 \times 10^{-4}$.

Anal. calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_{12}$: C 48.11; H 6.06; N 3.12. Found: C 48.32; H 6.25; N 2.97.



5. CONCLUSIONES

1. Se han iniciado estudios de incorporación de quinonas en carboazúcares mediante la adición de Michael de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona a la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-*xilo*-hex-5-enofuranosa, que han conducido a la formación de una mezcla de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa y la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa en una proporción 10.0:0.2 (exceso diastereomérico del 96%), lo que representa una selectividad notablemente elevada, predecible por la regla de Felkin-Anh.

2. Un protocolo de reacciones cuya etapa clave es una reacción de Henry intramolecular permitió transformar la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa enantioselectivamente en el (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitrociclohexano, que resultó ser el primer 5-naftil-6-nitrociclohexano polihidroxilado conocido, de previsible fácil transformación en naftilciclohexitales, compuestos novedosos no descritos todavía.

3. Este (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-3-benciloxi-1,2,4-trihidroxi-5-(3'-hidroxi-1',4'-naftoquinon-2'-il)-6-nitrociclohexano dio lugar en bajo rendimiento a la (6*bR*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*,10*aR*)-8-benciloxi-7,8,9,10,10*a*,11-hexahidro-7,9,10-trihidroxi-6*bH*-benzo[*a*]carbazol-5,6-diona mediante un protocolo de reacciones consistente en la reducción del grupo nitro a amino seguido de heteroanulación. Se obtuvo de esta manera la (6*bR*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*,10*aR*)-8-benciloxi-7,8,9,10,10*a*,11-hexahidro-7,9,10-trihidroxi-6*bH*-benzo[*a*]carbazol-5,6-diona, que resultó ser la primera hexahidrobenczo[*a*]carbazol-5,6-diona polihidroxilada conocida.

4. La adición de 1,4-naftoquinonas a nitroolefinas de azúcares se llevó a cabo utilizando sus correspondientes 1,4-dimetoxinaftalenos. Se encontró que la adición de Michael de 2-litio-1,4-dimetoxinaftaleno sobre la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-*xilo*-hex-5-enofuranosa conduce a la formación de una mezcla de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa y la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa en proporción 10.0:2.1 (exceso diastereomérico del 65%). La selectividad de la adición en este caso resultó ser menor y contraria a la del caso de la adición de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona.

5. Un protocolo de reacciones similar al de la conclusión segunda nos permitió transformar la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-C-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa en el (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3-benciloxi-5-(1',4'-

dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxi-6-nitrociclohexano, que resultó ser el primer 5-dimetoxinaftalenil-6-nitrociclohexano polihidroxilado conocido.

6. El (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3-benciloxi-5-(1',4'-dimetoxinaftalen-2'-il)-1,2,4-trihidroxi-6-nitrociclohexano dio lugar en bajo rendimiento a la (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,4*aS*,11*bS*)-2-benciloxi-1,2,3,4,4*a*,5-hexahidro-1,3,4-trihidroxi-11*bH*-benzo[*b*]carbazol-6,11-diona mediante un protocolo de reacciones consistente en reducir el grupo nitro a amino, desproteger el sistema quinónico y promover una heteroanulación. Se obtuvo de esta manera la (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,4*aS*,11*bS*)-2-benciloxi-1,2,3,4,4*a*,5-hexahidro-1,3,4-trihidroxi-11*bH*-benzo[*b*]carbazol-6,11-diona, que resultó ser la primera hexahidrobenczo[*b*]carbazol-6,11-diona polihidroxilada conocida.

7. La primera etapa de una ruta diseñada para sintetizar β-aminoácidos cicloalcanicos polihidroxilados, consistió en la adición conocida de Michael de 2-litio-1,3-ditiano a la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-α-*D*-xilo-hex-5-enofuranosa, que permitió obtener la mezcla esperada de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditiano-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-β-*L*-idofuranosa y la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditiano-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-α-*D*-glucofuranosa. Se encontraron nuevas condiciones de reacción que permitieron mejorar el rendimiento desde un 60 hasta un 78% y la diastereoselectividad desde un 14% hasta un 50%.

8. La 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditiano-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-β-*L*-idofuranosa permitió sintetizar por primera vez un β-aminoácido ciclohexánico polihidroxilado mediante la preparación del (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxilato de metilo. Se empleó para ello una secuencia sintética de ocho pasos, que implicó la preparación de tres compuestos novedosos en el orden siguiente: la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro-β-*L*-idofuranosa, el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo.

9. Se desarrolló una síntesis enantioselectiva del (3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohex-1-enocarbaldehído a partir de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditiano-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-β-*L*-idofuranosa obtenida como se indica en la conclusión séptima. La secuencia sintética implicó un protocolo de reacciones que incluye la preparación de los siguientes compuestos: el (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehido-ditiopropilenacetal, el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-

6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarbaldehidoditiopropilenacetal. Esta ruta puede considerarse como la primera síntesis enantioselectiva de un compuesto del tipo de las rancinamicinas.

10. Se desarrolló una modificación de la ruta de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados cuya primera etapa consistió en la adición de Michael novedosa del tris(feniltio)metilitio a la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-*xilo*-hex-5-enofuranosa, que dio lugar a la formación de una mezcla 10.0:1.2 de los compuestos novedosos 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-5-*C*-(tris(feniltio)metil)- α -D-glucofuranosa y 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-5-*C*-(tris(feniltio)metil)- β -L-idofuranosa, lo que implica un exceso diastereomérico del 79%. Ello pone claramente de manifiesto que la estereoquímica de la adición del tris(feniltio)metilitio a la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-*xilo*-hex-5-enofuranosa es la inversa de la del 2-litio-1,3-ditiano previamente citada en la conclusión séptima.

11. La 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-5-*C*-(tris(feniltio)metil)- α -D-glucofuranosa se transformó en el segundo β -aminoácido ciclohexánico polihidroxilado conocido, mediante la preparación del (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxi-ciclohexanocarboxilato de metilo. Se empleó para ello una secuencia sintética de seis pasos, que implicó la preparación de tres compuestos novedosos en el orden siguiente: la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropiliden-5-*C*-metoxicarbonil-6-nitro- α -D-glucofuranosa, el (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-3,4,6-trihidroxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo y el (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-benciloxi-6-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-2-nitrociclohexanocarboxilato de metilo. El β -aminoácido ciclohexánico polihidroxilado obtenido, el (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-5,6-dihidroxi-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxilato de metilo, se empleó para constituir un tripéptido sencillo, lo cual nos permitió preparar el novedoso 2-((1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(2-(benciloxicarbonilamino)acetilamido)-5,6-bis(*t*-butildimetilsililoxi)-3,4-isopropilidendioxiciclohexanocarboxamido)acetato de metilo.

12. Se iniciaron estudios de aplicación de nuestra metodología de síntesis de β -aminoácidos ciclohexánicos polihidroxilados a la síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados, mediante la transformación de la 3-*O*-bencil-5,6-didesoxi-5-*C*-(1,3-ditiano-2-il)-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- β -L-idofuranosa en la mezcla inseparable en proporción 10:6 del (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-4-benciloxi-3,5-dihidroxi-2-nitrociclopentanocarbaldehidoditiopropilenacetal, que se transformó

en los β -aminoácidos ciclohexánicos siguientes: el (1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo y el (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-3,5-bis-metoximetoxi-ciclopentanocarboxilato de metilo, en una secuencia de seis etapas.

13. Se ha desarrollado la primera síntesis enantioselectiva de 1,4-iminopentanoles ramificados con un grupo hidroximetilo en su posición C-4 transformando el D-gliceraldehído en el *t*-butil(((4*R*,5*S*)-2,2-dimetil-5-(nitrometil)-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)difenilsilano, que mediante una doble reacción de Henry con formaldehído, seguida de la manipulación de sus grupos funcionales, dio lugar al intermedio clave ((4*R*,5*S*)-5-(2',2'-dimetil-5'-nitro-1',3'-dioxan-5'-il)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil metanosulfonato. La reducción de su grupo nitro a amino fue seguida de una heteroanulación espontánea, que dio lugar al (3*a*'*S*,6*a*'*R*)-2,2,2',2'-tetrametildihidrospiro[1,3-dioxano-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pirrol]-5'(3*a*'*H*)-ol o al (3*a*'*S*,6*a*'*R*)-2,2,2',2'-tetrametiltetrahidrospiro[1,3-dioxano-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pirrol], dependiendo de las condiciones empleadas. El (3*a*'*S*,6*a*'*R*)-2,2,2',2'-tetrametiltetrahidrospiro[1,3-dioxano-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pirrol] se transformó fácilmente en el clorhidrato de (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol, y el (3*a*'*S*,6*a*'*R*)-2,2,2',2'-tetrametildihidrospiro[1,3-dioxano-5,4'-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pirrol]-5'(3*a*'*H*)-ol se transformó en los tres derivados siguientes: el (3*S*,4*R*)-1-(aliloxi)-2,2-bis(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol, el (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hidroximetil)-1-propoxipirrolidin-3,4-diol y el (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hidroximetil)-3,4-dihidro-2*H*-pirrol-3,4-diol.

14. La evaluación preliminar de la capacidad de inhibición de enzimas glicosídicas de los cuatro 1,4-iminopentanoles de la conclusión decimotercera nos permitió comprobar que el clorhidrato de (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol inhibe en un 76% la actividad de la α -galactosidasa, el (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hidroximetil)-3,4-dihidro-2*H*-pirrol-3,4-diol inhibe en un 80% la actividad de la β -galactosidasa, el (3*S*,4*R*)-2,2-bis(hidroximetil)-1-propoxipirrolidin-3,4-diol inhibe en un 48% la actividad de la α -galactosidasa y en un 40% la de la β -galactosidasa. El (3*S*,4*R*)-1-(aliloxi)-2,2-bis(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol no inhibe a ninguna de las glicosidasas con las que se evaluó.

15 Una modificación de la síntesis de 1,4-iminopentanoles ramificados (conclusión decimotercera) permitió transformar la 3,5-di-*O*-bencil-6-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro- α -D-glucofuranosa en el (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-7,7-bis(hidroximetil)azepan-2,3,4,5,6-pentaol mediante un protocolo de heteroanulación de la 3,5-di-*O*-bencil-6-desoxi-6-*C*-hidroximetil-1,2-*O*-isopropiliden-6-nitro-D-*glicero*- α -D-*gluco*-heptofuranosa que incluye una reducción del nitro a amino seguida de una

condensación amino-carbonilo. Ello constituyó la primera síntesis total de un 7,7-bis-(hidroximetil)azepano pentahidroxiado.