

Verónica Juste Navarro

Síntesis de pirrolidinas quirales.  
Aplicación al diseño de inhibidores  
de glicosiltransferasas

Director/es

Tejero López, Tomás  
Merino Filella, Pedro

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS QUIRALES.  
APLICACIÓN AL DISEÑO DE INHIBIDORES DE  
GLICOSILTRANSFERASAS

Autor

Verónica Juste Navarro

Director/es

Tejero López, Tomás  
Merino Filella, Pedro

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Escuela de Doctorado

2019



## TESIS DOCTORAL

# Síntesis de pirrolidinas quirales

## Aplicación al diseño de inhibidores de glicosiltransferasas

Verónica Juste Navarro

Zaragoza, Mayo 2019



Los Dres. Pedro Merino Filella y Tomás Tejero López, Catedráticos de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza,

**CERTIFICAN**

Que Dña. Verónica Juste Navarro ha realizado bajo su dirección, en el laboratorio de Síntesis Asimétrica del Departamento de Química Orgánica, el trabajo que se recoge en esta Memoria para optar al grado de Doctor en Química Orgánica, titulada:

*Síntesis de pirrolidinas quirales*

*Aplicación al diseño de inhibidores de glicosiltransferasas*

Y autorizan la presentación de la misma ante la Universidad de Zaragoza para que se cumplan los trámites reglamentarios, de acuerdo con la legislación vigente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expedimos y firmamos el presente documento de autorización en Zaragoza, 2019.

Pedro Merino Filella

Tomás Tejero López



Parte del trabajo desarrollado en esta Memoria se refleja en las siguientes publicaciones:

#### PUBLICACIONES

- ✓ Juste-Navarro, V.; Delso, I.; Tejero, T.; Merino, P., Azomethine Ylides from Nitrones: Using Catalytic *n*BuLi for Totally Stereoselective Synthesis of trans-2-Alkyl-3-oxazolines, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 11527-11532.
  
- ✓ Prieto, L.; Juste-Navarro, V.; Uria, U.; Delso, I.; Reyes, E.; Tejero, T.; Carrillo, L.; Merino, P.; Vicario, J.L., Regioselectivity Change in the Organocatalytic Enantioselective (3+2) Cycloaddition with Nitrones through Cooperative Hydrogen-Bonding Catalysis/Iminium Activation, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 2764-2768.
  
- ✓ Juste-Navarro, V.; Prieto, L.; Delso, I.; Manzano, R.; Tejero, T.; Reyes, E.; Vicario, J.L.; Merino, P., A Case of Thiourea-Assisted Iminium Formation by Hydroxyl Anion Binding: Kinetic, Spectroscopic and Computational Evidences, *Adv. Synth. Catal.*, **2017**, *359*, 4122-4128.



## LISTA DE ABREVIATURAS

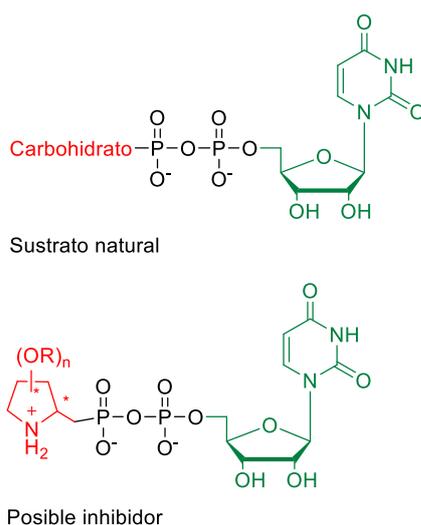
|                |   |
|----------------|---|
| $\delta$       | Desplazamiento químico  |
| $[\alpha]_D^t$ | Rotación específica   |
| $^{\circ}C$    | Grados centígrados  |
| Ac             | Acetato   |
| ACN            | Acetonitrilo  |
| Alil           | Alilo   |
| Alq            | Alquilo   |
| Anh.           | Anhídrido   |
| Ar             | Arilo   |
| Bn             | Bencilo   |
| Boc            | <i>tert</i> -butoxicarbonilo                                    |
| Cat.           | Catalizador   |
| Co-cat.        | Co-catalizador  |
| DABCO          | 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano                                   |
| DBU            | 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno                              |
| DCC            | <i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida                           |
| DCM            | Diclorometano   |
| DMAP           | 4-dimetilaminopiridina  |
| DMF            | Dimetilformamida  |
| DMP            | Dimetoxipropano   |
| DMSO           | Dimetilsulfóxido  |
| d.r.           | Relación diastereomérica  |
| ee             | Exceso enantiomérico  |
| eq.            | Equivalentes  |
| ESI            | Ionización en electrospray                                      |
| Et             | Etilo   |
| Fuc            | Fucosa  |
| Gal            | Galactosa   |
| GalNAc         | <i>N</i> -acetilgalactosamina                                   |
| GalNAc-T       | <i>O</i> -linked-UDP- <i>N</i> -acetilgalactosamina transferasa |
| Glc            | Glucosa   |
| GlcA           | Ácido glucurónico   |
| GlcNAc         | <i>N</i> -acetilglucosamina                                     |
| GpgS           | Glucosil-3-fosfoglicerato sintasa                               |
| GT             | Glicosiltransferasa   |
| GTB            | Galactosiltransferasa   |
| h              | Hora  |
| <i>h</i>       | Humano  |
| HLPC           | Cromatografía líquida de alta resolución                        |
| HRMS           | Espectrometría de masas de alta resolución                      |
| <i>i</i> -Bu   | <i>iso</i> -butilo  |
| <i>i</i> -Pr   | <i>iso</i> -propilo   |
| J              | Constante de acoplamiento                                       |
| $K_i$          | Constante de inhibición   |
| LDA            | Diisopropilamina de litio                                       |
| Man            | Manosa  |
| Me             | Metilo  |
| Min.           | Minutos   |
| Ms             | Mesilato  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| NOE                     | Efecto nuclear Overhauser                                     |
| NOESY                   | Espectroscopía de Efecto nuclear Overhauser                   |
| n.r.                    | No reacciona  |
| MOM                     | Metoximetilo  |
| MS                      | Espectrometría de Masas                                       |
| OGT                     | <i>O-linked</i> -UDP- <i>N</i> -acetilglucosamina transferasa |
| PDA                     | Detector de matriz de fotodiodos                              |
| PDB                     | Banco de datos de proteínas                                   |
| Ph                      | Fenilo  |
| ppm                     | Parte por millón  |
| PPTS                    | Piridinio <i>p</i> -toluensulfonato                           |
| PTSA                    | Ácido <i>p</i> -toluensulfónico                               |
| py                      | Piridina  |
| QToF                    | Cuadrupolo tiempo de vuelo                                    |
| quant.                  | Cuantitativo  |
| Rdto.                   | Rendimiento   |
| Rf                      | Factor de retención   |
| RMN                     | Resonancia Magnética Nuclear                                  |
| SA                      | Ácido sialico   |
| S <sub>N</sub> 1        | Sustitución nucleófila unimolecular                           |
| S <sub>N</sub> 2        | Sustitución nucleófila bimolecular                            |
| S <sub>N</sub> <i>i</i> | Sustitución nucleófila intramolecular                         |
| STD                     | Diferencia de Transferencia de Saturación                     |
| t                       | Tiempo  |
| t.a                     | Temperatura ambiente  |
| TBAF                    | Fluoruro de tetrabutilamonio                                  |
| TBAI                    | Ioduro de tetrabutilamonio                                    |
| TBDPS                   | <i>tert</i> -butildifenilsilano                               |
| TBSCl                   | Cloruro de <i>tert</i> -butilsilano                           |
| TEA                     | Trietilamina  |
| Tf                      | Triflato  |
| TFA                     | Ácido trifluoroacético  |
| THF                     | Tetrahidrofurano  |
| TLC                     | Cromatografía en Capa Fina                                    |
| TMS                     | Trimetilsilano  |
| TMSOTf                  | Trimetilsililmetanosulfonato                                  |
| TOCSY                   | Espectroscopía de Correlación Total                           |
| TPR                     | Repeticiones de Tetratricopeptidos                            |
| TS                      | Estado de transición  |
| U                       | Uridina   |
| UDP                     | Uridina difosfato   |
| XMP                     | Nucleósido monofosfato  |
| Xyl                     | Xilosa  |

## RESUMEN

### 1. INTRODUCCIÓN

El proyecto de investigación, en el que se enmarca el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se centra en el desarrollo de metodologías sintéticas de utilidad en la preparación de inhibidores enzimáticos de glicosiltransferasas (GTs). Estos enzimas glicosilan proteínas en las últimas etapas de la biosíntesis, haciéndolas funcionales. Gracias al conocimiento de su estructura, los sustratos naturales (dadores de Leloir) y de los distintos inhibidores descritos con anterioridad, se ha decidido sintetizar como posibles inhibidores, compuestos con modificaciones en la unidad de carbohidrato, en concreto, moléculas formadas por una unidad de reconocimiento enzimático (verde), unida a un glicomimético que sustituya al carbohidrato, en nuestro caso, un anillo de pirrolidina (rojo), intentando con ello mejorar la afinidad por el enzima (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura general del sustrato natural y el posible inhibidor

### 2. OBJETIVOS

Para poder cumplir con el objetivo principal de esta Tesis, la síntesis de inhibidores de glicosiltransferasas, ha sido necesario cumplir con los siguientes subobjetivos; el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas de pirrolidinas quirales altamente sustituidas, las cuales han sido posteriormente acopladas a una unidad de uridina monofosfato (UMP) para obtener así los distintos inhibidores.

Para la preparación de las pirrolidinas, se ha planteado el estudio de dos estrategias sintéticas; el desarrollo de la reacción de cicloadición de nitronas y aldehídos

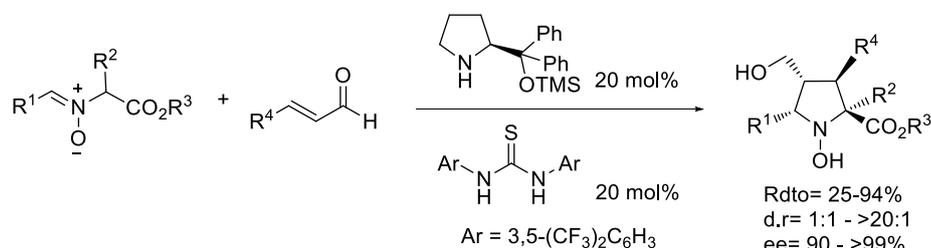
conjugados y por otro lado, el desarrollo de la reacción de adición de fosfonatos sobre nitronas cíclicas quirales. Durante el trabajo en la reacción de cicloadición, se encontró que en función de los sustratos empleados, se podían obtener otro tipo de heterociclos, 3-oxazolinas, por lo que también se decidió estudiar esta transformación en profundidad.

Habiéndose obtenido las pirrolidinas, se ha estudiado su acoplamiento con UMP, y con los inhibidores obtenidos, se han llevado a cabo estudios de interacción enzima-ligando, con el fin de valorar su afinidad.

### 3. CICLOADICIÓN DE ILUROS DE NITRONA; SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS QUIRALES

En este capítulo se describe en profundidad los estudios llevados a cabo para la reacción de cicloadición de nitronas y aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados que da lugar a *N*-hidroxipirrolidinas enantioméricamente puras y altamente sustituidas, que pueden ser fácilmente transformadas en las buscadas pirrolidinas.

Los análisis realizados para la optimización de condiciones de reacción pueden resumirse en el Esquema 1.



**Esquema 1.** Reacción general de cicloadición de nitronas y aldehídos conjugados

Siguiendo esta metodología se puede obtener una amplia variedad de *N*-hidroxipirrolidinas, con buenos rendimientos, excelentes enantioselectividades pero la diastereoselectividad del proceso es moderada. La reacción es aplicable a cualquier tipo de aldehído conjugado, mientras que las nitronas enolizables deben presentar sustituyentes aceptores aromáticos sobre el carbono de nitrona ( $\text{R}^1$ ).

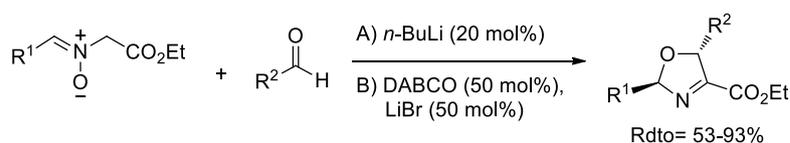
Esta transformación requiere de la presencia de dos organocatalizadores, un derivado de prolinol y una tiourea, que activan tanto el aldehído, vía iminio, como la nitrona, mediante enlaces de hidrógeno.

Un estudio en profundidad del mecanismo de la reacción reveló que se trata de un proceso por pasos que consiste primero en la formación del ión iminio seguido de una adición Michael por parte de la nitrona y una reacción tipo Mannich intramolecular que genera finalmente las *N*-hidroxipirrolidinas. Además, se ha determinado el papel que juegan ambos catalizadores. Las aminas secundarias de tipo prolinol, permiten la activación del aldehído mediante la formación del ión iminio y además al operar con un modelo estérico, favorecen la enantioselectividad del proceso. La tiourea permite la activación de la nitrona, en forma de enol, para la adición Michael, activa la nitrona frente a la reacción de tipo Mannich y además ayuda a la formación del ión iminio.

#### 4. REACCIÓN DE ILUROS DE *C*-ALQUILNITRONAS CON ALDEHÍDOS

Al intentar ampliar el alcance de la reacción descrita anteriormente sobre nitronas con restos alifáticos en R<sup>1</sup>, en lugar de aromáticos, se obtuvo otro tipo de heterociclos, 3-oxazolininas. En comparación con sus homólogos, 2-oxazolininas, estas han sido mucho menos estudiadas por lo que nos resultó interesante profundizar en el estudio de esta reacción.

El estudio de optimización de condiciones indica que los mejores resultados se obtienen utilizando base y litio en cantidades catalíticas, bien usando las condiciones A o B (Esquema 2).



**Esquema 2.** Reacción general de cicloadición de iluros de nitrona y aldehídos

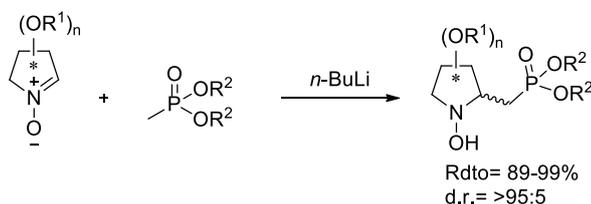
La metodología es aplicable a distintos tipos de aldehídos, sin embargo, queda restringida al uso de nitronas con sustituyentes alifáticos. El proceso resulta ser estereoselectivo, ya que únicamente se obtiene el isómero *trans*. Los intentos por inducir asimetría en el proceso resultaron infructuosos.

El estudio del mecanismo de reacción mediante técnicas espectroscópicas y computacionales, nos permitió proponer un ciclo catalítico, en el cual, la presencia de agua resulta crucial para el progreso de la reacción.

## 5. ADICIONES NUCLEÓFILAS SOBRE NITRONAS CÍCLICAS; SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS QUIRALES

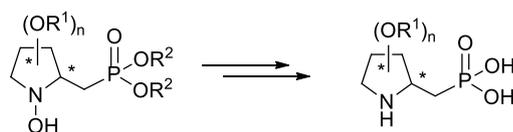
Retomando la síntesis de pirrolidinas quirales, se ha estudiado su obtención mediante adiciones nucleófilas de metilfosfonatos sobre nitronas cíclicas. Esta metodología permite funcionalizar las pirrolidinas con un grupo fosfonato adicional, lo cual resulta muy interesante para la obtención de los inhibidores de glicosiltransferasas.

Esta adición proporciona diversas *N*-hidroxipirrolidinas polihidroxiladas, con distintos patrones de sustitución, con muy buenos rendimientos y una excelente diastereoselectividad (Esquema 3).



**Esquema 3.** Reacción general de adición de metilfosfonatos a nitronas cíclicas

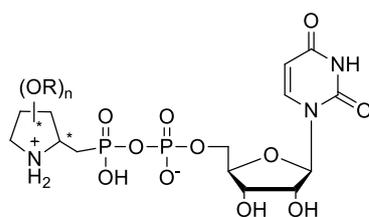
Las *N*-hidroxipirrolidinas pueden ser fácilmente transformadas en ácidos pirrolidinilfosfónicos (Esquema 4), los cuales serán utilizados para el acoplamiento con uridina monofosfato.



**Esquema 4.** Esquema general de obtención de ácidos pirrolidinilfosfónicos

## 6. SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE GLICOSILTRANSFERASAS Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENZIMA-LIGANDO

Con los ácidos pirrolidinilfosfónicos obtenidos por adición, se ha llevado a cabo el acoplamiento con uridina monofosfato (UMP) activada como imidazolato, llegándose a obtener varios inhibidores objetivo, cuya estructura general aparece representada en la Figura 2.



R= Bn, DMP Rdto= 90-92%

R= H Rdto= 30%

**Figura 2.** Estructura general de los inhibidores sintetizados

A continuación, se ha estudiado mediante técnicas computacionales de *docking* y espectroscópicas, mediante STD-NMR, las interacciones que se establecen entre los enzimas y los distintos inhibidores obtenidos. Se ha trabajado con dos enzimas, de la familia de glicosiltransferasas, que reconocen la unidad de uridina, OGT (*O-linked-N-Acetilglucosamina Transferasa*) y GalNAc-T2 (*O-linked-N-Acetilgalactosamina transferasa II*).

Los estudios computacionales de *docking* con OGT, revelan que la mayoría de estos compuestos interaccionan correctamente en el sitio activo de enzima, ya que la pose de la unidad de reconocimiento enzimático es la misma que la que adopta el sustrato natural (UDP-GlcNAc). Los estudios de STD-NMR indican que la interacción más fuerte se produce con aquellos compuestos cuyas pirrolidinas se encuentran protegidas con grupos bencilo y que a mayor número de sustituyentes, mayor es la interacción que se establece, por lo que estos compuestos tienen un alto potencial como inhibidores de OGT.

Los ensayos de *docking* con GalNAc-T2 reflejan que todos los inhibidores obtenidos interaccionan correctamente en el sitio activo del enzima, colocándose en poses similares a la del sustrato en el complejo ternario de Michaelis-Menten (UDP-5S-GalNAc). Las señales, casi inapreciables, en los espectros de STD-NMR de ciertos compuestos, pueden indicar una fuerte interacción o la poco probable falta de ella, por lo que a falta de ensayos biológicos, todo parece indicar que pueden funcionar como inhibidores del enzima.

Así pues, las pirrolidinas sintetizadas y funcionalizadas con ácidos fosfónicos pueden ser utilizadas como glicomiméticos para la obtención de análogos de nucleótidos que puedan utilizarse como inhibidores de glicosiltransferasas.



## ÍNDICE

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introducción</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Glicosiltransferasas  | 3         |
| 1.2      | Inhibidores de glicosiltransferasas   | 7         |
| 1.2.1.   | Inhibidores monosustrato  | 7         |
| 1.2.1.2  | Análogos estructurales del nucleósido                                       | 7         |
| 1.2.1.2  | Análogos estructurales de la unidad de pirofosfato                          | 9         |
| 1.2.1.3  | Análogos estructurales de la unidad de carbohidrato                         | 10        |
| 1.2.2    | Inhibidores bisustrato  | 11        |
| 1.2.3    | Inhibidores sin analogía estructural  | 11        |
| 1.3      | Diseño racional de inhibidores de glicosiltransferasas                      | 13        |
| 1.4      | Síntesis de pirrolidinas  | 15        |
| 1.5      | Bibliografía  | 19        |
| <b>2</b> | <b>Objetivos</b>  | <b>23</b> |
| <b>3</b> | <b>Cicloadición de iluros de nitrona; Síntesis de pirrolidinas quirales</b> | <b>27</b> |
| 3.1      | Introducción  | 29        |
| 3.2      | Hipótesis de trabajo  | 33        |
| 3.3      | Discusión de resultados   | 35        |
| 3.3.1    | Estudio de las condiciones de reacción                                      | 35        |
| 3.3.2    | Estudio del alcance de reacción   | 38        |
| 3.3.3    | Determinación de la configuración   | 41        |
| 3.3.4    | Utilidad sintética de las <i>N</i> -hidroxipirrolidinas obtenidas           | 44        |
| 3.4      | Estudio mecanístico de la reacción de cicloadición                          | 45        |
| 3.4.1    | Estudios experimentales   | 45        |
| 3.4.2    | Estudios cinéticos  | 48        |
| 3.4.3    | Propuesta mecanística; Ciclo catalítico                                     | 51        |
| 3.4.3.1  | Formación de ion iminio   | 54        |
| 3.4.3.2  | Enolización de la nitrona y adición Michael                                 | 65        |
| 3.4.3.3  | Reacción de Mannich intramolecular  | 67        |
| 3.4.4    | Estudios computacionales  | 68        |
| 3.5      | Conclusiones  | 75        |
| 3.6      | Experimental section  | 76        |
| 3.7      | Bibliografía  | 107       |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>4</b> | <b>Reacción de iluros de C-alkilnitronas con aldehídos .....</b>                    | <b>111</b> |
| 4.1      | Hipótesis de trabajo y estudio preliminar .....                                     | 113        |
| 4.2      | Aspectos generales sobre 3-oxazolinas .....   | 116        |
| 4.3      | Discusión de resultados .....   | 118        |
| 4.3.1    | Estudio de las condiciones de reacción .....  | 118        |
| 4.3.2    | Estudio del alcance de reacción .....   | 121        |
| 4.3.3    | Estudio de la obtención de 3-oxazolinas enantioméricamente puras....                | 125        |
| 4.4      | Estudio del mecanismo de reacción.....  | 127        |
| 4.4.1    | Estudios espectroscópicos .....   | 127        |
| 4.4.2    | Estudios computacionales.....   | 128        |
| 4.5      | Conclusiones .....  | 134        |
| 4.6      | Experimental section .....  | 135        |
| 4.7      | Bibliografía .....  | 155        |
| <b>5</b> | <b>Adiciones nucleófilas sobre nitronas cíclicas; síntesis de pirrolidinas.....</b> | <b>157</b> |
| 5.1      | Antecedentes sobre pirrolidinilfosfonatos como posibles inhibidores de GTs          | 159        |
| 5.2      | Hipótesis de trabajo .....  | 161        |
| 5.3      | Reacciones de adición nucleófila sobre nitronas.....                                | 163        |
| 5.4      | Discusión de resultados .....   | 167        |
| 5.4.1    | Síntesis de nitronas cíclicas polihidroxiladas .....                                | 167        |
| 5.4.2    | Síntesis de metilfosfonatos .....   | 168        |
| 5.4.3    | Adición de metilfosfonatos a nitronas cíclicas polihidroxiladas .....               | 170        |
| 5.4.4    | Determinación de la estereoquímica .....  | 172        |
| 5.4.5    | Obtención de ácidos pirrolidinilfosfónicos.....                                     | 175        |
| 5.5      | Conclusiones .....  | 182        |
| 5.6      | Experimental section .....  | 183        |
| 5.7      | Bibliografía .....  | 203        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>6</b> | <b>Síntesis de inhibidores de glicosiltransferasas y estudios de interacción enzima-ligando .....</b> | <b>205</b> |
| 6.1      | Antecedentes de inhibidores de GTs basados en pirrolidinilfosfonatos.....                             | 207        |
| 6.2      | Hipótesis de trabajo .....  | 209        |
| 6.3      | Discusión de resultados .....   | 210        |
| 6.3.1    | Activación de UMP .....   | 210        |
| 6.3.2    | Síntesis de inhibidores; acoplamiento fosfato-fosfonato.....  | 211        |
| 6.4      | Estudios de interacción enzima-ligando .....  | 214        |
| 6.4.1    | Estudios de interacción GalNAc-T2 .....   | 215        |
| 6.4.1.1  | Estudios de docking .....   | 219        |
| 6.4.1.2  | Estudios de STD-NMR .....   | 225        |
| 6.4.2    | Estudios de interacción con OGT .....   | 229        |
| 6.4.2.1  | Estudios de docking .....   | 231        |
| 6.4.2.2  | Estudios de STD-NMR .....   | 238        |
| 6.5      | Conclusiones .....  | 242        |
| 6.6      | Experimental Section.....   | 244        |
| 6.7      | Bibliografía .....  | 252        |



**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN**

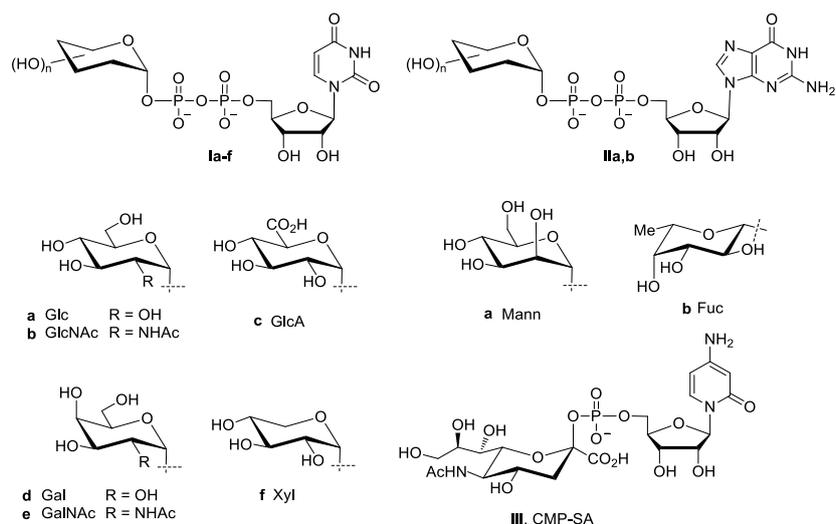


## 1.1. Glicosiltransferasas (GTs)

La Biología Molecular<sup>1</sup> define la transmisión de la herencia genética a través de tres procesos unidireccionales: 1) **replicación** del ADN; 2) **transcripción** de dicho ADN en ARN mensajero (ARN-m) y 3) **traducción** de dicho ARN-m en la cadena peptídica que conforma una proteína. Sin embargo, esta cadena peptídica, en la mayoría de los casos, está lejos de ser una proteína funcional ya que se requiere uno o más cambios químicos posteriores a su síntesis en los ribosomas. Estos cambios se denominan modificaciones post-traduccionales e incluyen la incorporación a la cadena peptídica de un carbohidrato (glicosilación), de un grupo fosfato (fosforilación), de un ácido graso (generalmente ácido palmítico) o de una molécula de ubiquitina. Las modificaciones post-traduccionales son responsables de la biodiversidad funcional de los seres vivos, y de todas ellas, la más abundante e importante, es la glicosilación. De hecho, más del 75% de las proteínas humanas son glicoproteínas. Los enzimas responsables de la glicosilación de proteínas son las glicosiltransferasas.

En realidad, las glicosiltransferasas son una familia de enzimas que comprende enzimas capaces de transferir una unidad de carbohidrato a otras moléculas.<sup>2</sup> Formalmente, un enzima que es capaz de hidrolizar un oligosacárido es una glicosiltransferasa ya que transfiere el carbohidrato al agua; estas enzimas, sin embargo se conocen como glicosilhidrolasas o glicosidasas y han sido ampliamente estudiadas.<sup>3,4</sup> Si la unidad de carbohidrato se transfiere a un oligosacárido se denominan, específicamente, transglicosidasas y aunque resultan mucho más importantes, se han estudiado en menor medida que las glicosidasas debido a que en su mayoría son enzimas de membrana y por ello resultan difíciles de aislar.<sup>5</sup> El término glicosiltransferasa se reserva para las enzimas que transfieren el carbohidrato a un lípido o a una proteína.<sup>6</sup>

En esta Memoria, nos hemos fijado en glicosiltransferasas que transfieren carbohidratos a proteínas. La casi totalidad de estos enzimas transfieren la unidad de carbohidrato a partir de un “azúcar activado” conocido como “dador de Leloir”, en honor a su descubridor. Existen nueve “dadores de Leloir” que diversas glicosiltransferasas utilizan para las glicosilaciones post-traduccionales (Figura 1.1).

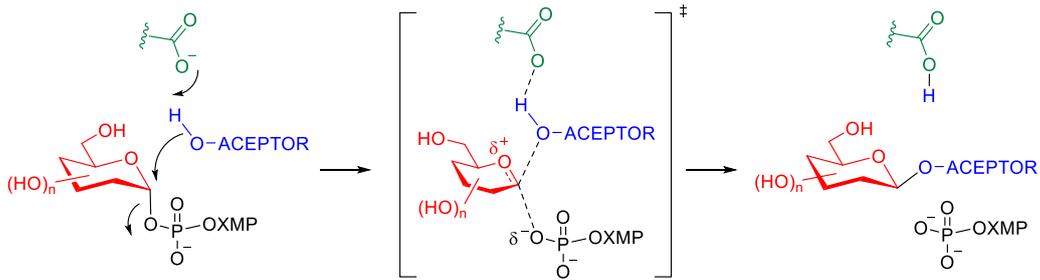


**Figura 1.1.** Dadores de Leloir: sustratos naturales para GTs. UDP-glucosa (Glc) **Ia**, UDP-*N*-Ac-glucosamina (GlcNAc) **Ib**, UDP-ácido glucurónico (GlcA) **Ic**, UDP-galactosa (Gal) **Id**, UDP-*N*-Ac-galactosamina (GalNAc) **Ie**, UDP-xilosa (Xyl) **If**, GDP-manosa (Mann) **IIa**, GDP-fucosa (Fuc) **IIb**, and CMP-ácido sialico (SA) **III**.

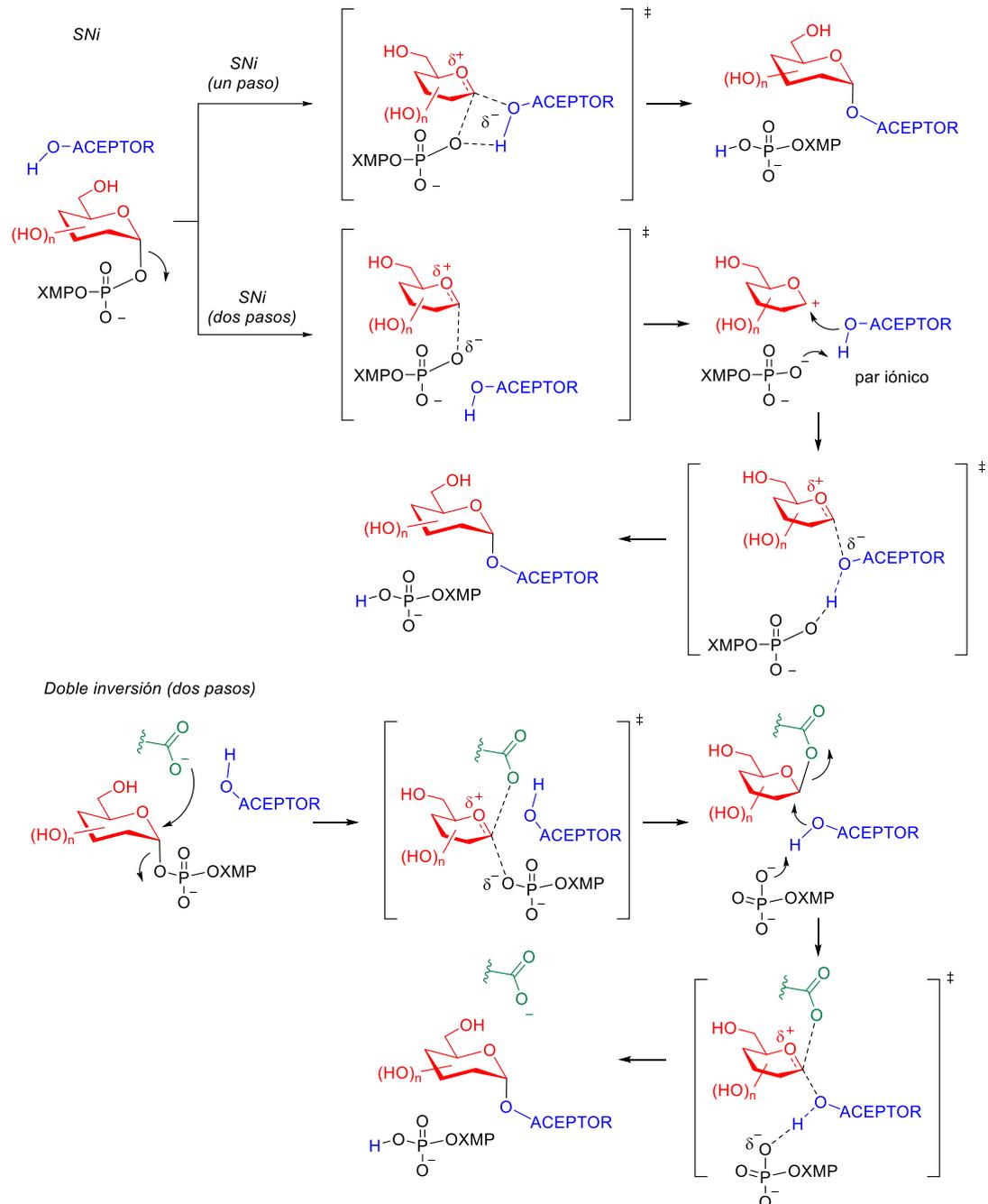
El carbohidrato activado tiene la estructura de un dinucleótido de uridina o guanina enlazado al carbono anomérico del carbohidrato que se va a transferir, con la excepción del dador **III** que contiene citosina y un único grupo fosfato.

Las glicosiltransferasas pueden clasificarse en función de si la transferencia de la unidad de carbohidrato tiene lugar con inversión (*invertig GTs*) o retención (*retaining GTs*) de configuración en el carbono anomérico (Figura 1.2). En este contexto, se han estudiado en detalle los mecanismos por los que las glicosiltransferasas transfieren la unidad de carbohidrato, especialmente cuando la reacción transcurre con retención de configuración,<sup>7-9</sup> situación en la que ha existido controversia durante varios años.<sup>8,10,11</sup>

**Mecanismo con inversión de configuración**



**Mecanismos con retención de configuración**



**Figura 1.2.** Mecanismos de transferencia de carbohidratos de glicosiltransferasas.

También se han estudiado en profundidad los procesos biológicos en los que intervienen glicosiltransferasas, fundamentalmente de señalización celular,<sup>12,13</sup> y su relación con determinadas patologías como cáncer,<sup>14,15</sup> diabetes<sup>16,17</sup> o Alzheimer,<sup>18</sup> que lleva a considerar dichos enzimas como dianas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.<sup>19,20</sup>

## 1.2. Inhibidores de glicosiltransferasas (GTs)

Los primeros estudios de inhibidores de glicosidasas datan de mediados del siglo XX.<sup>21</sup> Desde entonces, el desarrollo de inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas que comenzó más o menos contemporáneamente,<sup>22,23</sup> ha transcurrido de manera bien diferente. En comparación con el vasto desarrollo de inhibidores de glicosidasas desde las dos últimas décadas del siglo pasado,<sup>24</sup> los estudios dirigidos a la búsqueda de inhibidores específicos de glicosiltransferasas han progresado en menor medida,<sup>25</sup> probablemente por la mayor dificultad en comprender el mecanismo de acción de las glicosiltransferasas.<sup>26</sup> No ha sido hasta los primeros años del siglo XXI cuando ha tenido lugar un considerable auge de este tipo de inhibidores<sup>27,28</sup> con la elucidación del mecanismo enzimático de glicosiltransferasas de gran relevancia biológica como OGT<sup>29</sup> GalNAc-T2<sup>30</sup> o GpgS.<sup>31</sup>

Los inhibidores de glicosiltransferasas pueden clasificarse en función de su estructura.

### 1.2.1. Inhibidores monosustrato

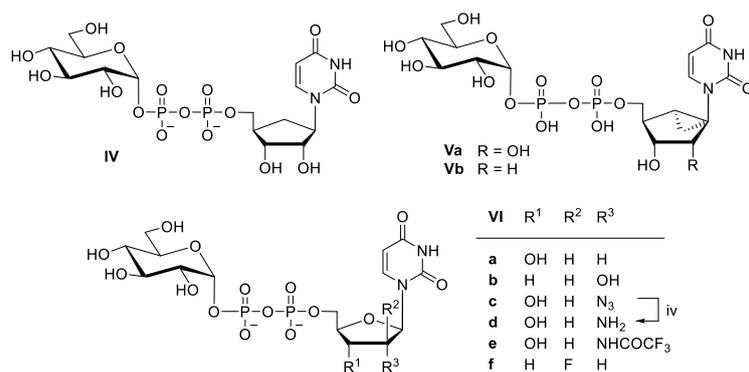
Los inhibidores monosustrato son compuestos que mimetizan uno de los sustratos del enzima, ya sea, en principio, el péptido aceptor o el dador de carbohidrato. En la práctica, en el caso de inhibidores monosustrato se trata de análogos estructurales del nucleótido dador de Leloir. Las modificaciones pueden llevarse a cabo en las diversas partes del dador (nucleósido, pirofosfato y carbohidrato).

#### 1.2.1.1. Análogos estructurales del nucleósido

La variabilidad estructural en el nucleósido puede extenderse tanto al anillo de ribosa como a la base heterocíclica (nucleobase).

##### *Variaciones en el anillo de ribosa*

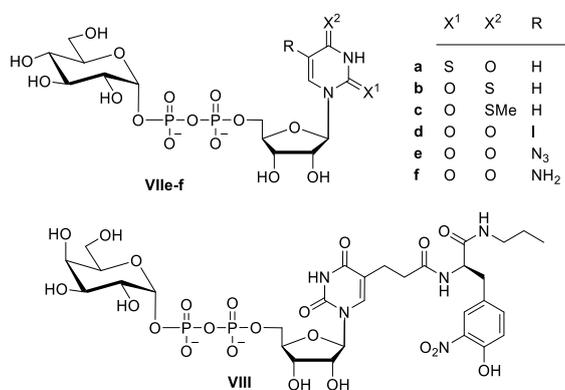
Se han descrito análogos de nucleósidos en los que el anillo de ribosa se ha sustituido por un ciclopentano,<sup>32</sup> eliminando el oxígeno endocíclico, como por ejemplo, los compuestos **IV** y **V** (Figura 1.3). Sin embargo no es una variación estructural que se haya estudiado ampliamente para los inhibidores de glicosiltransferasas. También se han sintetizado inhibidores con modificaciones en las posiciones 3 y 4 del anillo de ribosa, que incluyen la incorporación de distintos grupos funciones (**VIa-f**).<sup>33-37</sup>



**Figura 1.3.** Inhibidores de glicosiltransferasas con cambios estructurales en el anillo de furanosa

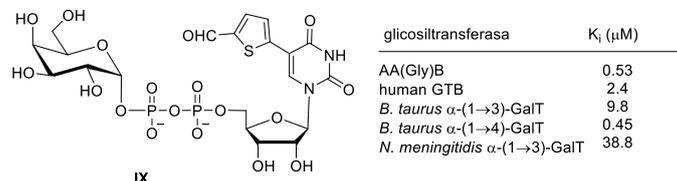
### Variaciones en la base heterocíclica

La base heterocíclica es la responsable del reconocimiento por parte del enzima y, por ello, responsable a su vez de la especificidad. Las interacciones que suele tener en el sitio activo pueden no ser muy fuertes pero si son muy selectivas. Como hemos visto anteriormente, las bases de los dadores de Leloir pueden ser uracilo o guanina. Aunque realizar cambios estructurales en la nucleobase no parece la mejor opción, debido a posibles cambios en la especificidad, en el caso de inhibidores de glicosiltransferasas ha sido una posibilidad que se ha considerado en varias ocasiones.<sup>33</sup> En la Figura 1.4 se muestran varios ejemplos representativos.



**Figura 1.4.** Inhibidores de glicosiltransferasas con modificaciones en la nucleobase

La presencia de grupos aromáticos en posición 5 de la nucleobase incrementa la afinidad por glicosiltransferasas.<sup>36</sup> Entre este tipo de derivados destaca el análogo **IX** que presenta una actividad cercana a la escala nanomolar frente a varias GTs (Figura 1.5).<sup>37</sup>



**Figura 1.5.** Inhibidores de glicosiltransferasas con modificaciones en la base heterocíclica

### 1.2.1.2. Análogos estructurales de la unidad de pirofosfato

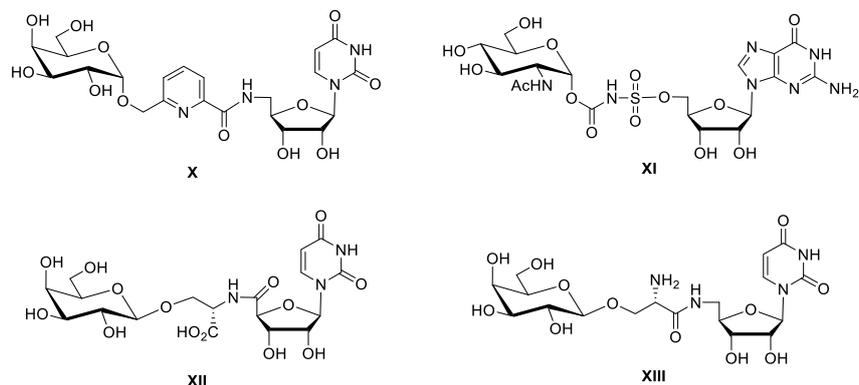
La unidad de pirofosfato presenta interacciones importantes en el sitio activo del enzima ya sea con metales en el caso de enzimas que los usen como cofactores, o bien con residuos específicos del sitio activo del enzima. En general, el grupo pirofosfato puede participar activamente en la transferencia.<sup>38</sup> La eliminación de alguna de las unidades de fosfato provoca una disminución importante en la afinidad.<sup>39</sup> Por otra parte, la presencia de dicho grupo, muy polar, limita enormemente el desarrollo de cualquier agente terapéutico debido a la baja bioaccesibilidad provocada por la alta polaridad de la molécula.<sup>28</sup>

Si se quieren estudiar mecanismos, afinidades, modos de acción e influencia de grupos funcionales en la formación de interacciones adicionales, puede ser más conveniente fijar el pirofosfato con el fin de poder cristalizar un complejo binario sustrato-proteína y estudiar interacciones con el resto del glicomimético.

Si lo que se quiere es desarrollar un agente terapéutico, se deben buscar grupos funcionales neutros que puedan sustituir al pirofosfato perdiendo la menor afinidad posible, es decir manteniendo interacciones en la misma (o quizá otra) zona del sitio activo. El aumento de la capacidad computacional para realizar simulaciones dinámicas de sistemas complejos y de la facilidad para realizar estudios estructurales ha permitido, en la última década, llevar a cabo estudios rigurosos de grupos que podrían utilizarse en lugar del grupo pirofosfato. Los primeros compuestos preparados de este tipo incluyen la sustitución del pirofosfato por sistemas 1,3-dicarbonílicos o por aminoácidos.<sup>40,41</sup>

Dentro de las posibles variaciones de este grupo, se ha estudiado la sustitución del pirofosfato por un anillo de piridina (**X**).<sup>42</sup> También se han elaborado inhibidores que

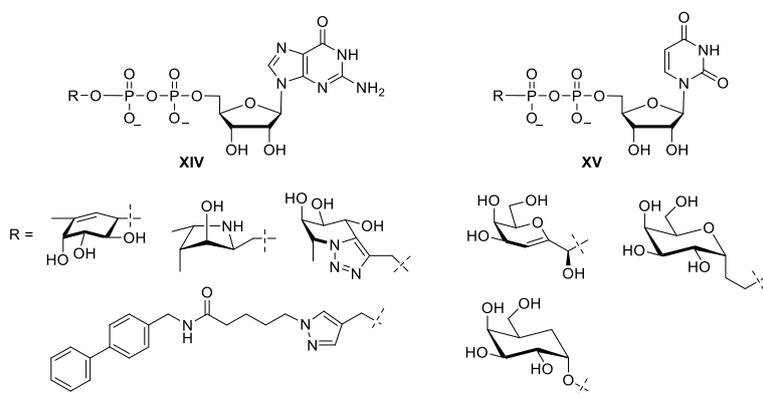
incluyen grupos sulfamato (**XI**) o unidades de serina con diversas orientaciones (**XII** y **XIII**) que aparecen ilustrados en la Figura 1.6.<sup>43</sup>



**Figura 1.6.** Inhibidores de glicosiltransferasas modificados en la unidad de pirofosfato

### **1.2.1.3. Análogos estructurales de la unidad de carbohidrato**

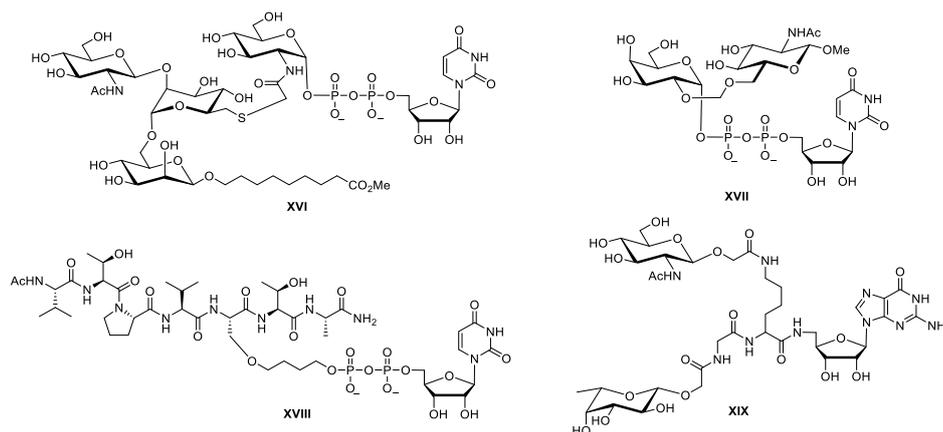
La unidad de carbohidrato no presenta interacciones muy fuertes lo cual resulta lógico si pensamos que es la parte de la molécula que se va a transferir. Su sustitución por un grupo que pueda presentar interacciones más fuertes y por tanto ser competitivo con el sustrato natural, parece la opción más lógica a la hora de diseñar un posible inhibidor. Efectivamente, hay multitud de trabajos que reclaman la síntesis de potenciales inhibidores de glicosiltransferasas pero se quedan en la mera construcción de un análogo estructural del carbohidrato (pirrolidinas, piperidinas, etc.), sin incorporar la unidad de nucleótido que es esencial para el reconocimiento y la especificidad. En la Figura 1.7 se dan ejemplos representativos de inhibidores de glicosiltransferasas en los que el carbohidrato se ha sustituido por otra estructura, conservándose la unidad de dinucleótido.<sup>44-46</sup>



**Figura 1.7.** Inhibidores de glicosiltransferasas modificados en la unidad de carbohidrato.

### 1.2.2. Inhibidores bisustrato

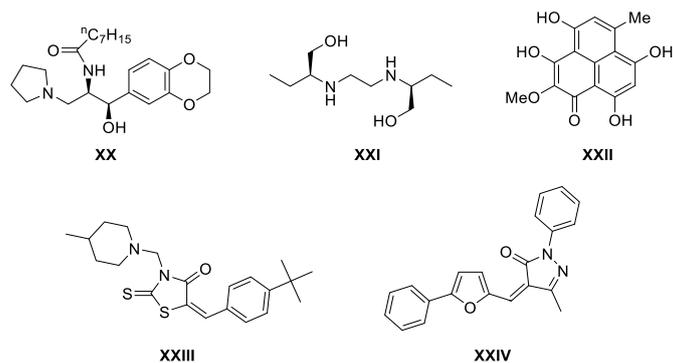
Los inhibidores bisustrato mimetizan ambos sustratos del enzima, tanto el carbohidrato activado, como el péptido aceptor.<sup>47</sup> Este tipo de inhibidores, en principio, deberían ser más activos al intentar ocupar las posiciones en el sitio activo de los dos sustratos. Sin embargo, son más complejos de diseñar y los resultados no son siempre los esperados. En la Figura 1.8 se dan algunos ejemplos representativos de inhibidores bisustrato.<sup>48-51</sup>



**Figura 1.8.** Inhibidores bisustrato de glicosiltransferasas.

### 1.2.3. Inhibidores sin analogía estructural

La mayoría de los inhibidores descritos se basan en la analogía estructural de uno o ambos sustratos de la reacción. Sin embargo, también se han diseñado diferentes inhibidores sin ninguna analogía estructural.<sup>52</sup> Se han utilizado derivados de carbohidratos,<sup>53</sup> pero las posibilidades son muy amplias, aminoácidos y péptidos hasta diaminas pasando por compuestos poliaromáticos. Una reciente revisión<sup>54</sup> describe los avances en este tipo particular de inhibidores de glicosiltransferasas. En la Figura 1.9 se recogen algunos ejemplos en los que se puede apreciar la variabilidad estructural y funcional que puede tener lugar.



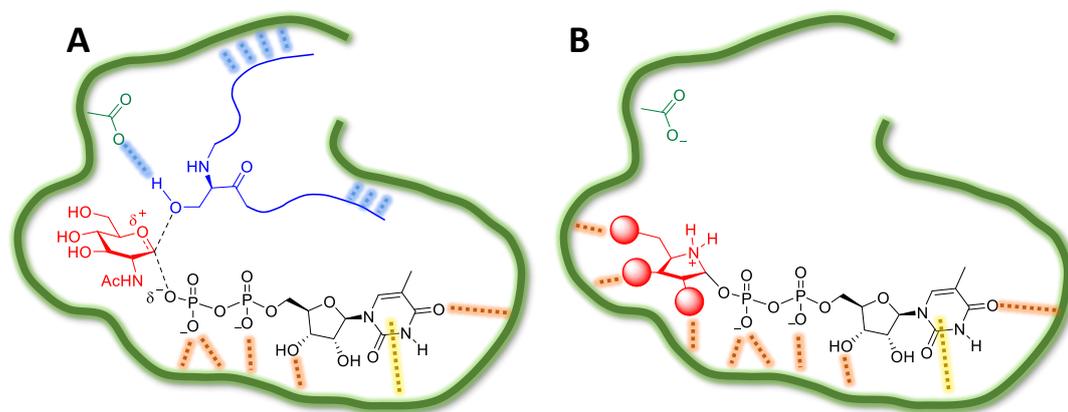
**Figura 1.9.** Inhibidores sin analogía estructural

En este apartado dedicado a inhibidores de glicosiltransferasas se ha intentado dar una visión muy general de la situación actual en el desarrollo de dichos compuestos sin entrar en detalles acerca de su síntesis o actividad biológica. Para una visión más detallada se recomienda la consulta de las diversas revisiones publicadas en la última década que cubren dichos aspectos.<sup>27,44,55-58</sup>

### 1.3. Diseño racional de inhibidores de glicosiltransferasas

El trabajo realizado en esta Memoria se basa en estudios teóricos y experimentales, realizados previamente en nuestro grupo de investigación y en otros laboratorios con lo que se ha colaborado, de diseño racional de inhibidores de GTs, centrándonos principalmente en los enzimas *O-linked N-acetilglucosamina transferasa* (OGT) y *N-acetilgalactosamina transferasa II* (GalNAc-T2).

De todas las posibles variaciones del sustrato natural que permiten la obtención de posibles inhibidores, en este trabajo, nos centraremos en las modificaciones del carbohidrato, ya que como se ha comentado con anterioridad al ser la unidad que se transfiere no presenta fuertes interacciones con el enzima y al modificarlo, estas se pueden incrementar sin alterar la especificidad y el reconocimiento que aporta la unidad nucleotídica. En principio, como se ha demostrado con anterioridad en el caso de glicosidasas, una posibilidad es remplazar la unidad de carbohidrato por un glicomimético del estado de transición, teniendo en cuenta tanto su estructura como su distribución de carga (Figura 1.10).<sup>59,60</sup>



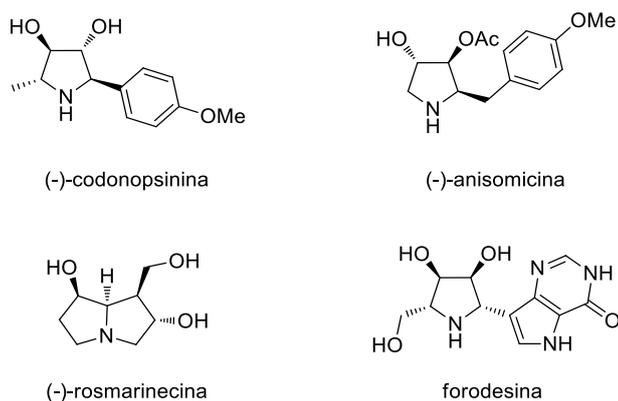
**Figura 1.10.** Pirrolidinas polihidroxiladas mimetizan el estado de transición de la hidrólisis de oligosacáridos. **A:** Ejemplo de estado de transición de la transferencia de GlcNAc (rojo) a un residuo de serina de un péptido (azul) con inversión de la configuración. **B:** Propuesta de inhibidor con interacciones adicionales en el sub-sitio donde se sitúa la unidad de carbohidrato, sustituido por una pirrolidina (rojo).

En el caso de glicosidasas, se conoce que la conformación típica de una pirrolidina protonada coincide en gran medida con la que presenta el anillo de piranosa en el estado de transición (Figura 1.10, **A**),<sup>61</sup> ya sea con un mecanismo de inversión como de retención. El nitrógeno cargado mimetiza la distribución de carga positiva en el oxígeno endocíclico y los grupos del anillo de pirrolidina pueden dar interacciones adicionales con residuos del sitio activo del enzima, mejorando así la afinidad (Figura 1.10, **B**).

En este sentido, entre la enorme variedad y cantidad de heterociclos nitrogenados saturados polihidroxiados (iminoazúcares) que se han descrito como glicomiméticos formando parte de inhibidores de glicosidasas (piperidinas, indolizidinas, pirrolizidinas, nortropanos, etc),<sup>24</sup> las pirrolidinas son un candidato excelente como glicomimético en este caso para el desarrollo de posibles inhibidores de glicosiltransferasas.<sup>39,62</sup>

## 1.4. Síntesis de pirrolidinas

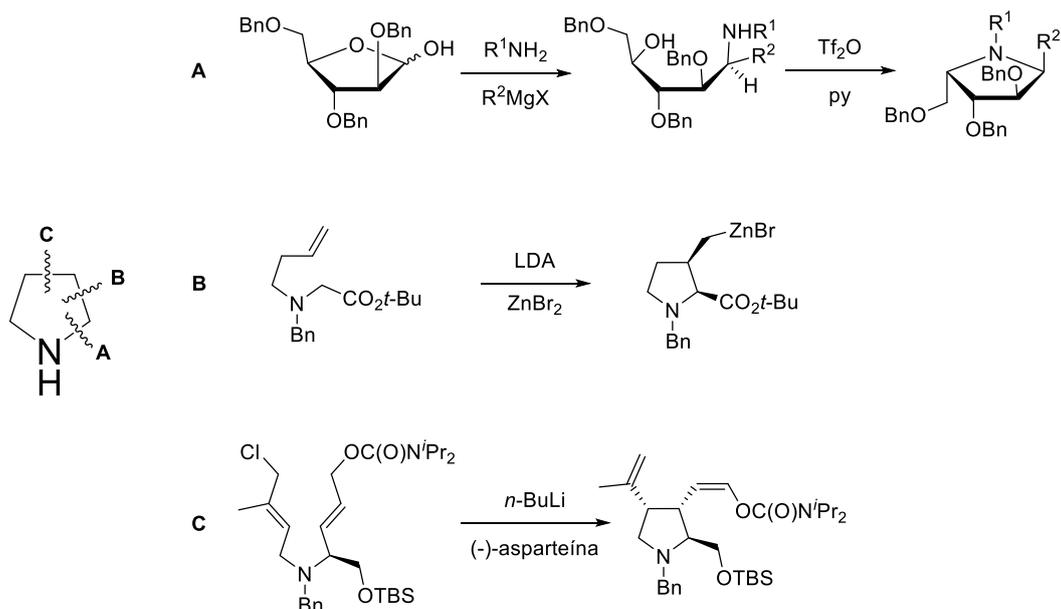
El anillo de pirrolidina se encuentra en un gran número de compuestos con actividad biológica por lo que resultan muy relevantes en el campo de la medicina (Figura 1.11). Además, este tipo de compuestos encuentra aplicación como ligandos quirales,<sup>63</sup> auxiliares quirales<sup>64</sup> y organocatalizadores,<sup>65,66</sup> y por ello, existe un gran número de publicaciones dedicadas al desarrollo de nuevas metodologías sintéticas para su preparación.



**Figura 1.11.** Ejemplos de pirrolidinas con actividad biológica

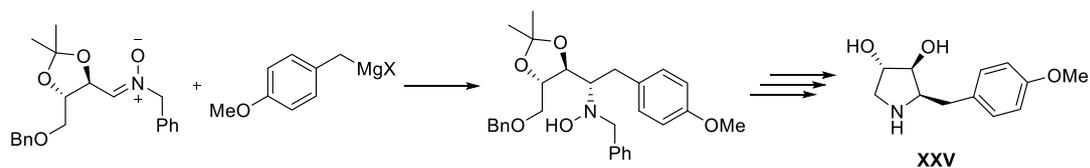
Existen numerosos métodos de síntesis de pirrolidinas, que se pueden clasificar en tres grandes grupos, ciclaciones, cicloadiciones o transformaciones del anillo.

En el caso de las reacciones de ciclación, todas las desconexiones a lo largo del anillo de pirrolidina, C1(C5)-N (**A**), C2-C3 (**B**) y C3-C4 (**C**), son posibles o viables. En el Esquema 1.1, aparecen representados ejemplos de estos tipos de ciclación.<sup>67-70</sup>



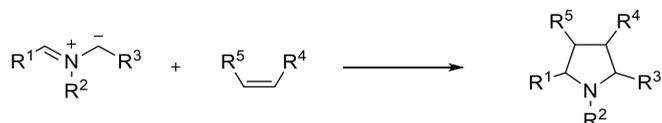
**Esquema 1.1.** Síntesis de pirrolidinas mediante ciclación

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado metodologías de síntesis a partir de nitronas acíclicas, que permiten la obtención de pirrolidinas quirales que presentan actividad biológica, como por ejemplo, la deacetilanisomicina (**XXV**) (Esquema 1.2).<sup>71</sup>



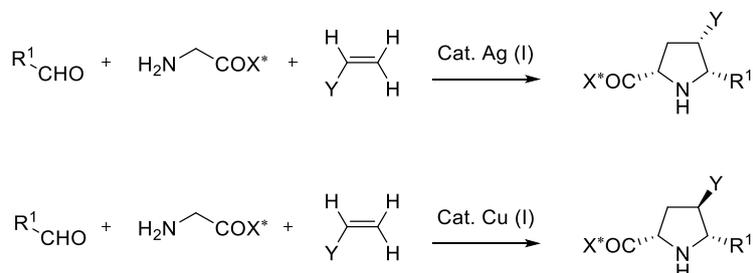
**Esquema 1.2.** Obtención de pirrolidinas a partir de nitronas acíclicas

Otra estrategia ampliamente utilizada para la obtención de pirrolidinas, son las reacciones de cicloadición<sup>72,73</sup> en las que se genera el ciclo por la formación dos nuevos enlaces. De las distintas posibilidades la más estudiada son las cicloadiciones 1,3-dipolares de iluros de azometino con compuestos insaturados (Esquema 1.3).<sup>74,75</sup>

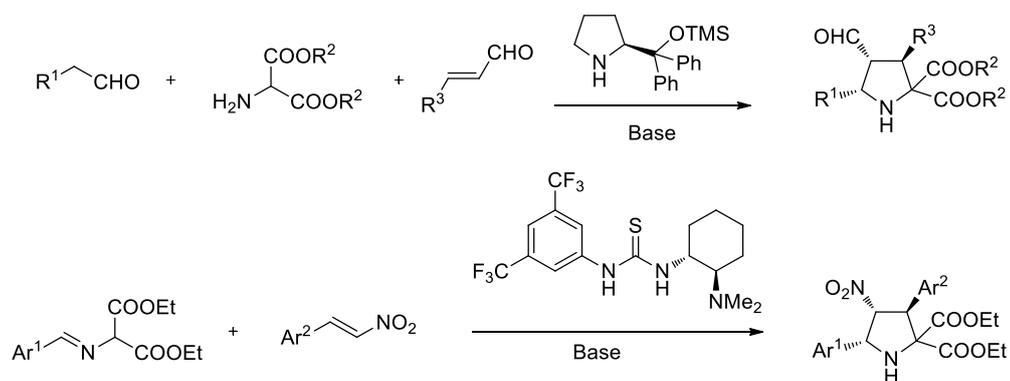


**Esquema 1.3.** Reacción general de cicloadición de iluros de azometino

Las dos aproximaciones más relevantes en cuanto a cicloadiciones de iluros de azometino son aquellas en las que se activa el iluro mediante la acción de un metal (Esquema 1.4)<sup>76,77</sup> o bien la activación del compuesto insaturado mediante el uso de organocatalizadores, bien sea vía iminio o mediante enlaces de hidrógeno (Esquema 1.5).<sup>78,79</sup>

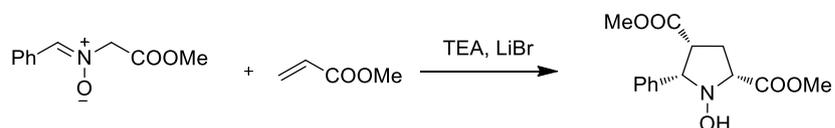


**Esquema 1.4.** Reacciones de cicloadición de iluros de azometino mediante catálisis metálica



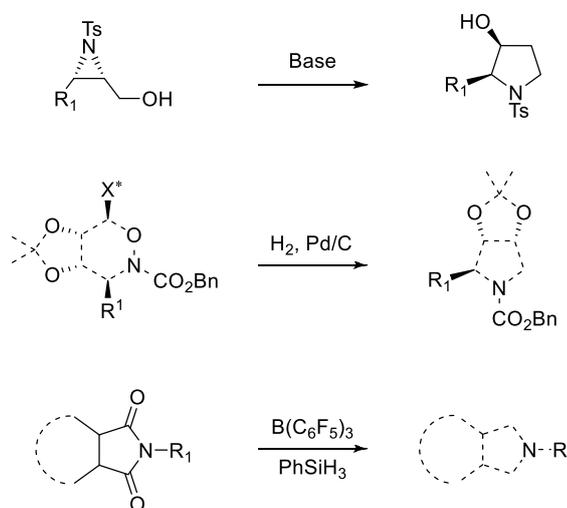
**Esquema 1.5.** Reacciones de cicloadición de iluros de azometino mediante organocatálisis

Nuestro grupo de investigación ha estudiado como alternativa a los iluros de azometino, los iluros de nitrona desarrollando una nueva metodología de síntesis de pirrolidinas mediante reacciones de cicloadición. Hasta el momento, dicha metodología sólo se ha desarrollado en serie racémica (Esquema 1.6).<sup>80</sup>



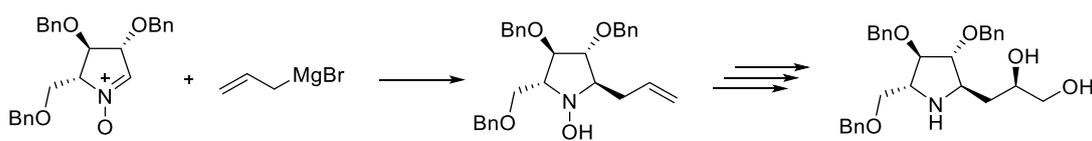
**Esquema 1.6.** Obtención de pirrolidinas a partir de iluros de nitrona

Por último, también es posible obtener pirrolidinas mediante transformaciones en el anillo, bien sea por expansión del anillo,<sup>81</sup> por contracción,<sup>82</sup> o mediante transformaciones del ciclo ya formado (Esquema 1.7).<sup>83</sup>



**Esquema 1.7.** Obtención de pirrolidinas por transformación del anillo

Dentro de las transformaciones en el anillo, también es posible obtener precursores de pirrolidinas mediante adiciones nucleófilas a nitronas. En este campo se utilizan principalmente nitronas polihidroxiladas, lo cual supone cierta ventaja, ya que como se ha indicado con anterioridad, la mayoría de las pirrolidinas con actividad biológica, portan estos sustituyentes. Los denominados precursores de las pirrolidinas son las correspondientes *N*-hidroxipirrolidinas, que tras una reducción generan pirrolidinas (Esquema 1.8).<sup>84</sup>



**Esquema 1.8.** Obtención de pirrolidinas a partir de adiciones a nitronas

De las diferentes estrategias existentes para la formación de pirrolidinas, en el trabajo desarrollado durante la Tesis Doctoral, nos centraremos en el desarrollo de nuevas metodologías basándonos en las reacciones de cicloadición de iluros de nitrona y en la adición nucleófila a nitronas cíclicas polihidroxiladas.

## 1.5. Bibliografía

- (1) Crick, F. *Nature* **1970**, 227, 561-563.
- (2) Breton, C.; Fournel-Gigleux, S.; Palcic, M. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, 22, 540-549.
- (3) Stutz Arnold, E.; Wrodnigg Tanja, M. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2011**, 66, 187-298.
- (4) Bojarova, P.; Kren, V. *Trends Biotechnol.* **2009**, 27, 199-209.
- (5) Srivastava, H. P.; Bilgrami, K. S. *Physiol. Micro-Org. Symp.* **1977**, 75-86.
- (6) Lairson, L. L.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**; 77, 521-555.
- (7) Tvaroska, I. *ACS Symp. Ser.* **2006**, 930, 285-301.
- (8) Ardevol, A.; Iglesias-Fernandez, J.; Rojas-Cervellera, V.; Rovira, C. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, 44, 51-60.
- (9) Gomez, H.; Polyak, I.; Thiel, W.; Lluch, J. M.; Masgrau, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4743-4752.
- (10) Gloster, T. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, 28, 131-141.
- (11) Jakeman, D. L. *ChemBioChem* **2011**, 12, 2540-2542.
- (12) Ostrowski, A.; van Aalten, D. M. F. *Biochem. J.* **2013**, 456, 1-12.
- (13) Jafar-Nejad, H.; Leonardi, J.; Fernandez-Valdivia, R. *Glycobiology* **2010**, 20, 931-949.
- (14) Ma, Z.; Vosseller, K. *Amino Acids* **2013**, 45, 719-733.
- (15) Singh, J. P.; Zhang, K.; Wu, J.; Yang, X. *Cancer Lett.* **2015**, 356, 244-250.
- (16) Ma, J.; Hart, G. W. *Expert Rev. Proteomics* **2013**, 10, 365-380.
- (17) Semba, R. D.; Huang, H.; Lutty, G. A.; Eyk, J. E.; Hart, G. W. *Proteomics Clin. Appl.* **2014**, 8, 218-231.
- (18) Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6839-6858.
- (19) Sun, X.-L. *Med. Chem.* **2013**, 3, 106-107.
- (20) Lynch, T. P.; Reginato, M. J. *Cell Cycle* **2011**, 10, 1712-1713.
- (21) Dahlqvist, A. *Acta Chem. Scand.* **1960**, 14, 1797-1808.
- (22) Nishimura, Y. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1992**, 10, 495-583.
- (23) Williams, J. M. In *Glycopeptides and Related Compounds*; Large, D.G.; Warren, C.D., Eds.; Marcel Dekker Inc. **1997**, 505-539.
- (24) De Raadt, A.; Ekhardt, C.; Legler, G.; Stutz, A.E. In *Iminosugars as glycosidase inhibitors: Nojirimycin and Beyond*; Stutz, A. E., Ed.; Wiley-VCH: Heidelberg, **1999**, 207-215.
- (25) Jung, K.-H.; Schmidt, R. R. *Carbohydr.-Based Drug Discovery* **2003**, 2, 609-659.
- (26) Liang, D.-M.; Liu, J.-H.; Wu, H.; Wang, B.-B.; Zhu, H.-J.; Qiao, J.-J. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 8350-8374.
- (27) Wang, S.; Vidal, S. *Carbohydr. Chem.* **2013**, 39, 78-101.
- (28) Wang, S.; Shen, D. L.; Lafont, D.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Mortuaire, M.; Shi, Y.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Lefebvre, T.; Pinto, B. M.; Vocadlo, D.; Vidal, S. *MedChemComm* **2014**, 5, 1172-1178.
- (29) Lazarus, M. B.; Jiang, J.; Gloster, T. M.; Zandberg, W. F.; Whitworth, G. E.; Vocadlo, D. J.; Walker, S. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 966-968.
- (30) Lira-Navarrete, E.; Iglesias-Fernández, J.; Zandberg, W. F.; Compañón, I.; Kong, Y.; Corzana, F.; Pinto, B. M.; Clausen, H.; Peregrina, J. M.; Vocadlo, D. J.; Rovira, C.; Hurtado-Guerrero, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8206-8210.

- (31) Albesa-Jové, D.; Mendoza, M. F.; Rodrigo-Unzueta, A.; Gomollón-Bel, F.; Cifuentes, J.; Urresti, S.; Comino, N.; Gómez, H.; Romero-García, J.; Lluch, J. M.; Sancho-Vaello, E.; Biarnés, X.; Planas, A.; Merino, P.; Masgrau, L.; Guerin, M. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9898-9902.
- (32) Romeo, G.; Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Merino, P. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3337-3370.
- (33) Ko, H.; Fricks, I.; Ivanov, A. A.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2030-2039.
- (34) Ko, H.; Das, A.; Carter, R. L.; Fricks, I. P.; Zhou, Y.; Ivanov, A. A.; Melman, A.; Joshi, B. V.; Kovac, P.; Hajduch, J.; Kirk, K. L.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5298-5311.
- (35) Melman, A.; Zhong, M.; Marquez, V. E.; Jacobson, K. A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8085-8088.
- (36) Pesnot, T.; Jorgensen, R.; Palcic, M. M.; Wagner, G. K. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 321-323.
- (37) Pesnot, T.; Palcic, M. M.; Wagner, G. K. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1392-1398.
- (38) Schimpl, M.; Zheng, X.; Borodkin, V. S.; Blair, D. E.; Ferenbach, A. T.; Schüttelkopf, A. W.; Navratilova, I.; Aristotelous, T.; Albarbarawi, O.; Robinson, D. A.; Macnaughtan, M. A.; Aalten, D. M. F. v. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 969-974.
- (39) Ghirardello, M.; de las Rivas, M.; Lacetera, A.; Delso, I.; Lira-Navarrete, E.; Tejero, T.; Martin-Santamaria, S.; Hurtado-Guerrero, R.; Merino, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7215-7224.
- (40) Heskamp, B. M.; Veeneman, G. H.; der Marel, G. A. v.; van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8397-8406.
- (41) Wang, R.; Steensma, D. H.; Takaoka, Y.; Yun, J. W.; Kajimoto, T.; Wong, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 661-672.
- (42) Wang, S.; Cuesta-Seijo, J. A.; Lafont, D.; Palcic, M. M.; Vidal, S. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15346-15357.
- (43) Wang, S.; Cuesta-Seijo, J. A.; Striebeck, A.; Lafont, D.; Palcic, M. M.; Vidal, S. *ChemPlusChem* **2015**, *80*, 1525-1532.
- (44) Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Mitchell, M. L.; Wong, C.-H. In *Iminosugar-based glycosyltransferase inhibitors*; Compain, P.; Martin, O.R., Eds; Wiley **2007**, 153-176.
- (45) Burkart, M. D., **1999**, The Mechanistic Study and Synthetic use of carbohydrate-modifying enzymes, PhD, The Scripps Research Institute, La Jolla, California.
- (46) Mitchell, M.; Qiao, L.; Wong, C.-H. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 596-599.
- (47) Izumi, M.; Yuasa, H.; Hashimoto, H. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 87-105.
- (48) Borodkin, V. S.; Schimpl, M.; Gundogdu, M.; Rafie, K.; Dorfmueller, H. C.; Robinson, D. A.; van Aalten, D. M. F. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 497-502.
- (49) Izumi, M.; Kaneko, S.; Yuasa, H.; Hashimoto, H. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 681-690.
- (50) Hanashima, S.; Inamori, K.-i.; Manabe, S.; Taniguchi, N.; Ito, Y. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3449-3462.
- (51) Hanashima, S.; Manabe, S.; Inamori, K.-i.; Taniguchi, N.; Ito, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5674-5677.
- (52) Tedaldi, L.; Evitt, A.; Goos, N.; Jiang, J.; Wagner, G. K. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1193-1201.
- (53) Zuegg, J.; Muldoon, C.; Adamson, G.; McKeveney, D.; Le Thanh, G.; Premraj, R.; Becker, B.; Cheng, M.; Elliott, A. G.; Huang, J. X.; Butler, M. S.; Bajaj, M.;

- Seifert, J.; Singh, L.; Galley, N. F.; Roper, D. I.; Lloyd, A. J.; Dowson, C. G.; Cheng, T.-J.; Cheng, W.-C.; Demon, D.; Meyer, E.; Meutermans, W.; Cooper, M. A. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7719-7729.
- (54) Tedaldi, L.; Wagner, G. K. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1106-1125.
- (55) Merino, P.; Tejero, T.; Delso, I.; Hurtado-Guerrero, R.; Gomez-SanJuan, A.; Sadaba, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1455-1464.
- (56) Roychoudhury, R.; Pohl, N. L. B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 168-173.
- (57) Trapannone, R.; Rafie, K.; van Aalten, D. M. F. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 88-93.
- (58) Walker-Nasir, E.; Ahmad, I.; Saleem, M.; Hoessli, D. C. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 591-607.
- (59) Gloster, T. M.; Meloncelli, P.; Stick, R. V.; Zechel, D.; Vasella, A.; Davies, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2345-2354.
- (60) Gloster, T. M.; Davies, G. J. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305-320.
- (61) Asano, N. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1479-1492.
- (62) Stocker, B. L.; Dangerfield, E. M.; Win-Mason, A. L.; Haslett, G. W.; Timmer, M. S. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1615-1637.
- (63) Fache, F.; Schulz, E.; Tommasino, M. L.; Lemaire, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2159-2232.
- (64) Georgieva, M. K.; Duarte, F. J. S.; Bakalova, S. M.; Santos, A. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 4841-4850.
- (65) Vicario, J. L.; Badia, D.; Carrillo, L.; Ruiz, N.; Reyes, E. In *Targets in Heterocyclic Systems*; Attanasi, O; Spinelli, D.; Merino, P., Eds.; Società Chimica Italiana, **2008**, *12*, 302-327.
- (66) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138-5175.
- (67) Lay, L.; Nicotra, F.; Paganini, A.; Pangrazio, C.; Panza, L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4555-4558.
- (68) Martinez, M. M.; Hoppe, D. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3743-3746.
- (69) Quancard, J.; Labonne, A.; Jacquot, Y.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Karoyan, P. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7940-7948.
- (70) Xia, Q.; Ganem, B. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 485-487.
- (71) Merino, P.; Franco, S.; Lafuente, D.; Merchan, F.; Revuelta, J.; Tejero, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2877-2881.
- (72) McGrane, P. L.; Livinghouse, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11485-11489.
- (73) Scott, M. E.; Lautens, M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3045-3047.
- (74) Coldham, I.; Hufton, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2765-2810.
- (75) Pandey, G.; Banerjee, P.; Gadre, S. R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4484-4517.
- (76) Garner, P.; Kaniskan, H. Ü.; Hu, J.; Youngs, W. J.; Panzner, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3647-3650.
- (77) Garner, P.; Hu, J.; Parker, C. G.; Youngs, W. J.; Medvetz, D. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3867-3870.
- (78) Ibrahem, I.; Rios, R.; Vesely, J.; Córdova, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6252-6257.
- (79) Herrera, R. P.; López, E. M. In *Targets in Heterocyclic Systems*; Attanasi, O; Spinelli, D.; Merino, P., Eds.; Società Chimica Italiana, **2014**, *18*, 236-261.
- (80) Merino, P.; Tejero, T.; Diez-Martinez, A.; Gueltekin, Z. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6567-6573.
- (81) Schomaker, J. M.; Bhattacharjee, S.; Yan, J.; Borhan, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1996-2003.
- (82) Streith, J.; Defoin, A. *Synlett* **1996**, 189-200.

- (83) Huang, P.-Q. *Synlett* **2006**, 1133-1149.
- (84) Delso, I.; Tejero, T.; Goti, A.; Merino, P. *Tetrahedron* **2010**, 66, 1220-1227.

**CAPÍTULO 2**  
**OBJETIVOS**



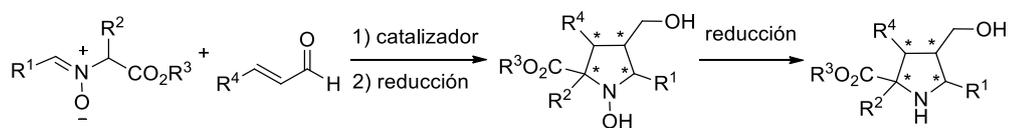
El principal objetivo del trabajo realizado en esta Memoria es el **desarrollo de metodologías de síntesis de pirrolidinas** enantioméricamente puras, para la construcción de **análogos de dadores de Leloir**.

Para conseguir el objetivo principal, se definen los siguientes objetivos específicos:

## 1. Síntesis de pirrolidinas

### 1.1. Cicloaddición organocatalítica asimétrica de iluros de nitrona

Se estudiará la reacción de cicloaddición de iluros de nitrona con aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados catalizada por aminas secundarias quirales no racémicas (organocatálisis de tipo iminio) con el fin de obtener pirrolidinas enantioméricamente puras. Este proceso puede definirse como una reacción concertada o una secuencia Michael-Mannich por lo que también se llevará a cabo el estudio del mecanismo de la reacción para determinar si es un proceso concertado o por pasos, así como el origen de la selectividad. La reducción tanto del aldehído como de la hidroxilamina resultante de la cicloaddición permitirá obtener pirrolidinas con un grupo hidroxilo sobre el que será posible acoplar posteriormente un dinucleótido a la pirrolidina.



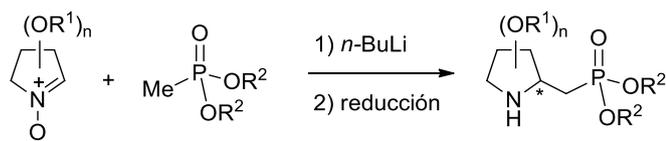
### 1.2. Cicloaddición de iluros de nitrona y aldehídos

Durante el desarrollo del objetivo anterior, se encontró que en función de los sustratos empleados, el heterociclo obtenido era una 3-oxazolina en lugar de la pirrolidina prevista inicialmente. El estudio del alcance y del mecanismo de esta reacción aparentemente anómala, pasó a ser un nuevo objetivo, no previsto inicialmente.



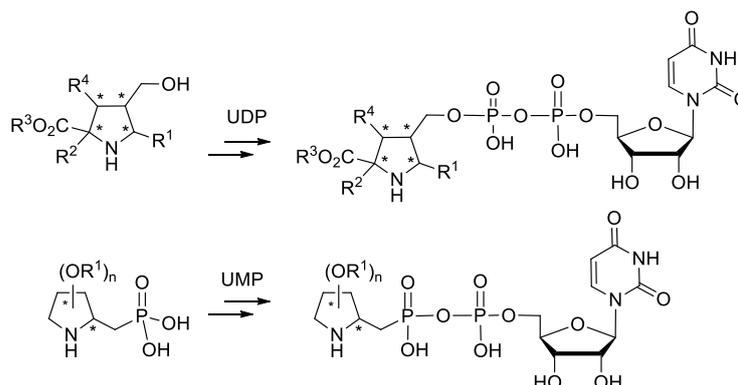
### 1.3. Adición nucleófila a nitronas cíclicas polihidroxiladas

Con el fin de obtener intermedios avanzados en la preparación de inhibidores de glicosiltransferasas, se estudiará la adición nucleófila diastereoselectiva de litiometilfosfonatos a nitronas cíclicas polihidroxiladas de cinco miembros. Esta reacción permitirá obtener, tras la reducción *in situ* de las hidroxilaminas resultantes, ácidos pirrolidinilfosfónicos sobre los que podrá ser acoplado en este caso un mononucleótido.



## 2. Síntesis de posibles inhibidores de GTs

En este apartado se estudiará la incorporación de una unidad de di- o mononucleótido a las pirrolidinas sintetizadas mediante los procesos de acoplamiento más adecuados en cada caso.



## 3. Estudio de interacción enzima-ligando

En este apartado se estudiará utilizando diversas técnicas, la interacción enzima-ligando. En concreto se utilizarán técnicas computacionales como es el *docking* y espectroscópicas como STD-NMR.

**CAPÍTULO 3**

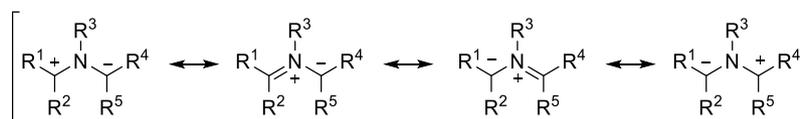
**CICLOADICIÓN DE ILUROS DE  
NITRONA;**

**SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS  
QUIRALES**



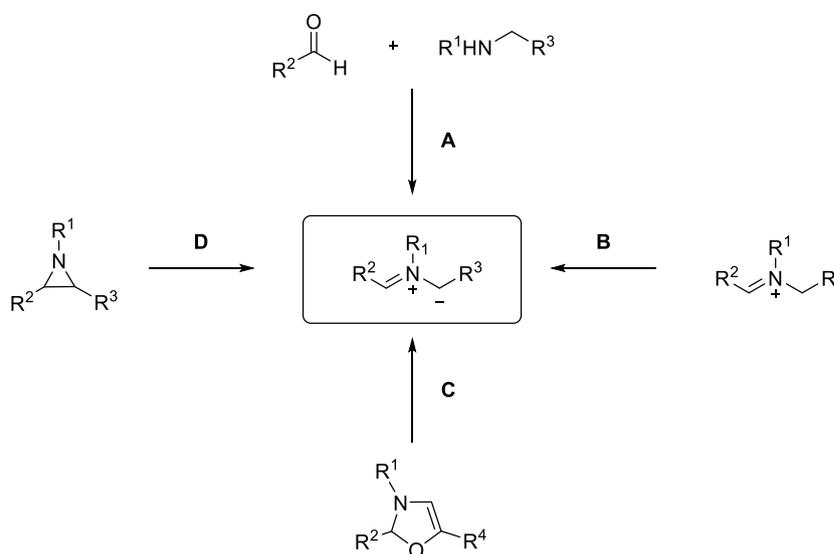
### 3.1. Introducción

Desde el punto de vista de la estructura electrónica y reactividad, y de acuerdo con la clasificación de Huisgen de 1963,<sup>1</sup> los iluros de azometino son 1,3-dipolos de tipo alilo que comparten cuatro electrones  $\pi$  entre tres átomos tal y como definió el propio Huisgen en 1968 (Esquema 3.1).<sup>2</sup>



Esquema 3.1. Iluros de azometino

Los iluros de azometino son especies inestables que deben generarse “*in situ*”. Dentro de los métodos de generación de iluros de azometino se pueden encontrar reacciones de condensación de aldehídos y aminas, normalmente,  $\alpha$ -aminoésteres o  $\alpha$ -aminoácidos (Esquema 3.2, **A**). También es posible prepararlos partiendo de iminas, bien sea por prototropía térmica, desprotonación, metalación o *N*-alquilación (Esquema 3.2, **B**), por apertura de heterociclos, como por ejemplo 4-oxazolinas (Esquema 3.2, **C**), o bien por apertura de aziridinas mediante luz o calor (Esquema 3.2, **D**).<sup>3</sup>

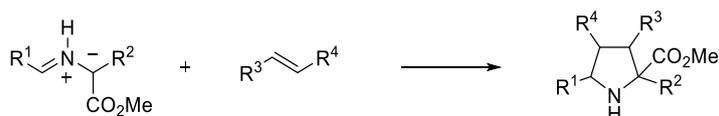


Esquema 3.2. Métodos generales de obtención de iluros de azometino

Los iluros de azometino, se pueden clasificar en función de su estabilidad si se encuentran estabilizados por un grupo aceptor directamente unido al carbono que soporta la carga negativa o si, por el contrario, no lo están. A partir de iluros de

azometino no estabilizados pueden obtenerse pirrolidinas<sup>4</sup> y sistemas policíclicos<sup>5,6</sup> entre otros. A pesar de esta química de gran interés que ha sido recientemente revisada,<sup>7</sup> en este apartado nos fijaremos únicamente en iluros de azometino estabilizados.

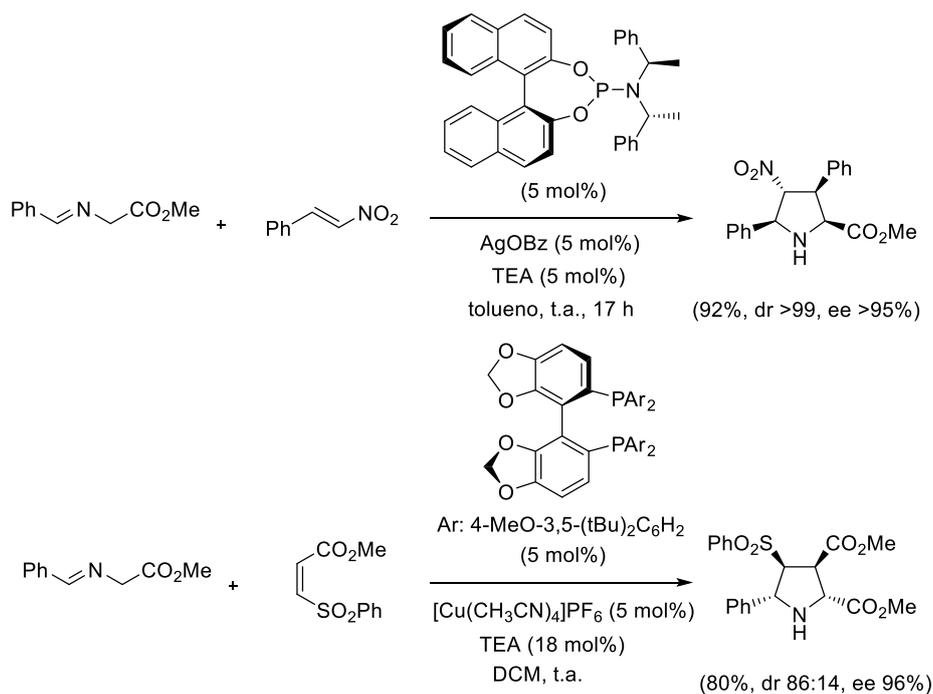
Los iluros de azometino pueden actuar como dipolos frente a alquenos dando lugar a reacciones de cicloadición 1,3-dipolar, proporcionando pirrolidinas sustituidas. En el caso de que el grupo aceptor estabilizante sea un grupo éster, los productos de la reacción son prolinas de gran interés sintético (Esquema 3.3).<sup>8</sup>



**Esquema 3.3.** Cicloadiciones de iluros de azometino estabilizados

Inicialmente, estas reacciones se consideraron como cicloadiciones 1,3-dipolares concertadas, más o menos asíncronas. Efectivamente, así es cuando el iluro de azometino no está estabilizado o se genera *in situ* a altas temperaturas como se ha mencionado anteriormente.<sup>9,10</sup>

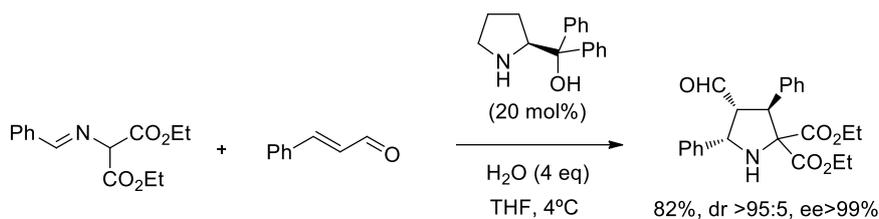
La posibilidad de generar iluros de metalo-azometino a partir de iminas permitió el empleo de ligando quirales sobre el metal y por tanto, la preparación de pirrolidinas enantioméricamente puras.<sup>11</sup> Los grupos de la Prof. C. Nájera<sup>12-17</sup> y el Prof. J. C. Carretero,<sup>18-23</sup> ambos referentes internacionales en este campo, han sido pioneros en las cicloadiciones enantioselectivas de iluros de metalo-azometino (Esquema 3.4).



**Esquema 3.4.** Cicloadiciones catalíticas enantioselectivas de iluros de metalo-azometino

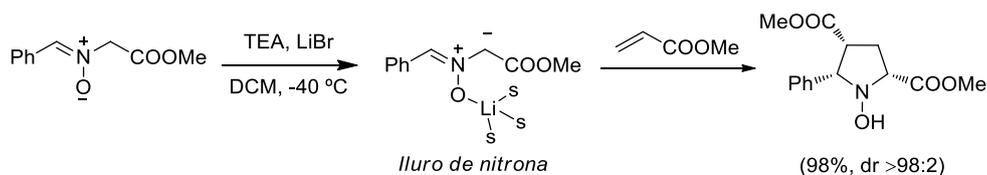
El grupo del Prof. F. Cossío<sup>16,24-27</sup> también ha contribuido notablemente a este campo centrándose en estudios mecanísticos que han determinado el carácter concertado o no de las reacciones estudiadas. En el caso de iluros de metalo-azometino, los primeros estudios mecanísticos indicaron que se trataba de reacciones concertadas.<sup>28</sup> Sin embargo, más adelante se demostró que la reacción podía ser un proceso de dos etapas consistentes en una primera adición de Michael seguida de una reacción de tipo Mannich.<sup>29</sup> En realidad, que el mecanismo sea concertado o por etapas depende especialmente de la naturaleza del dipolarófilo,<sup>30</sup> pero también de los sustituyentes del iluro de azometino como ha demostrado un estudio más reciente.<sup>31</sup>

En 2007, el grupo del Prof. José L. Vicario describió por primera vez el empleo de organocatalizadores quirales en reacciones de cicloadición de iluros de azometino. Estos iluros se forman por prototropía 1,2,<sup>32</sup> y la cicloadición resulta ser un proceso por etapas.<sup>33</sup> El empleo de organocatalizadores quirales ha permitido desarrollar toda una metodología de cicloadiciones organocatalíticas de iluros de azometino (Esquema 3.5).<sup>34-36</sup>



**Esquema 3.5.** Cicloadición organocatalítica enantioselectiva de iluros de azometino

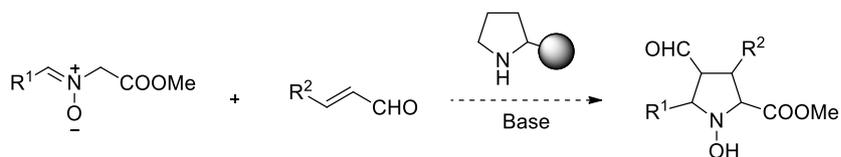
En nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo reacciones de cicloadición con un tipo particular de iluros de azometino, obtenidos a partir nitronas y que se han denominado como iluros de nitrona.<sup>37</sup> En este caso, el iluro correspondiente se forma por desprotonación de la nitrona en presencia de trietilamina (TEA) como base, actuando el catión  $\text{Li}^+$  como activante por coordinación con el átomo de oxígeno del grupo nitrona (Esquema 3.6). Al inicio de este trabajo, la reacción descrita se había llevado a cabo únicamente en serie racémica.



**Esquema 3.6.** Cicloadición de iluros de nitrona con acrilato de metilo

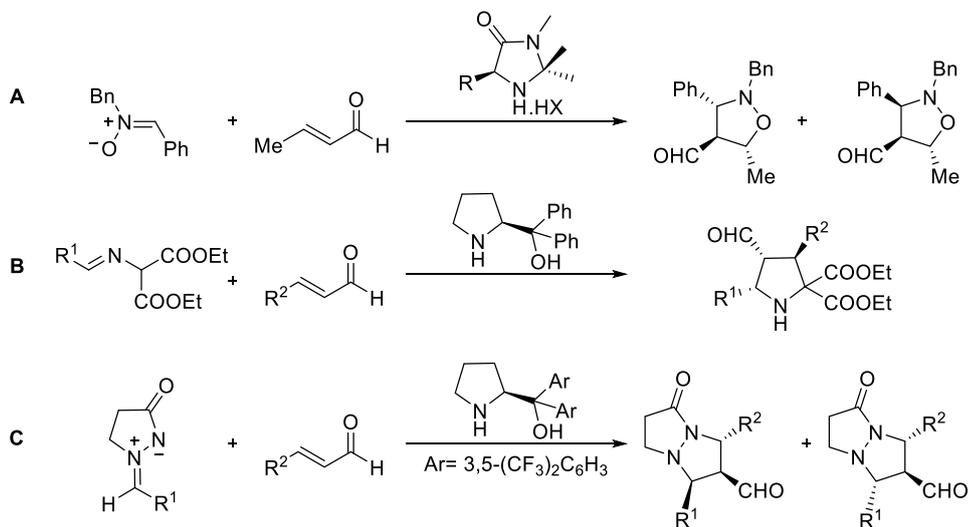
### 3.2. Hipótesis de trabajo

Con el objetivo de inducir quiralidad en la reacción de cicloadición (3+2) de iluros de nitrona (Esquema 3.6), nos planteamos cambiar el grupo éster por un grupo aldehído en la olefina utilizada, para poder utilizar organocatálisis de tipo iminio como metodología de inducción de quiralidad, lo que no es posible con el grupo éster (Figura 3.1). Para ello se emplearon como catalizadores aminas secundarias de tipo prolinol.



**Figura 3.1.** Obtención de *N*-hidroxipirrolidinas mediante reacciones de cicloadición

La capacidad que presentan las aminas primarias y secundarias para activar aldehídos o cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturados gracias a la formación de iminio, permite generar mejores dipolarófilos para las reacciones de cicloadición (3+2). La activación vía iminio ha sido explorada por numerosos autores desde que MacMillan descubrió estos procesos.<sup>38,39</sup> Especialmente esta aproximación se ha aplicado de forma exitosa en reacciones que hacen uso de nitronas (Esquema 3.7, **A**),<sup>40-42</sup> iluros de azometino (Esquema 3.7, **B**)<sup>32,36,43</sup> e iminas de azometino (Esquema 3.7, **C**)<sup>44-46</sup> como 1,3-dipolos.

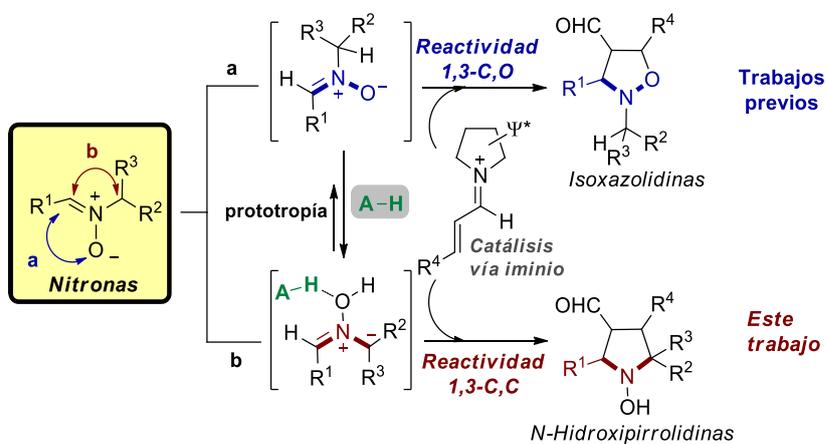


**Esquema 3.7.** Cicloadiciones (3+2) organocatalizadas vía iminio

El grupo funcional nitrona es uno de los dipolos más empleados en reacciones de cicloadición (3+2), debido a su gran estabilidad y su sencilla obtención, en comparación

con otros dipolos que es necesario generarlos “*in situ*”. De hecho, la cicloadición 1,3-dipolar entre nitronas y enales fue el primer ejemplo de cicloadición (3+2) catalítica y enantioselectiva activada vía iminio (Esquema 3.7, A).<sup>40</sup> Esta reacción permite la síntesis directa de isoxazolidinas, en la que la nitrona reacciona, como dipolo, a través del carbono y el oxígeno terminal (1,3-C,O).

Formalmente, el empleo de iluros de nitrona representa un dipolo alternativo, formado a través de dos átomos de carbono (1,3-C,C), en lugar de con el oxígeno terminal (1,3-C,O) (Figura 3.2). En este caso el producto final de la reacción sería una *N*-hidroxipirrolidina frente a las isoxazolidinas que se obtendrían haciendo uso del dipolo clásico (1,3-C,O) de las nitronas.

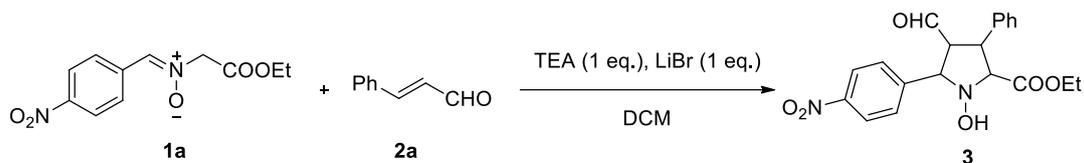


**Figura 3.2.** Planteamiento sintético

### 3.3. Discusión de resultados

#### 3.3.1. Estudio de las condiciones de reacción

En primer lugar y con el fin de valorar la viabilidad de la estrategia planteada, en concreto, si el aldehído conjugado reacciona al igual que lo hace el éster, se llevó a cabo un estudio preliminar, utilizando como nitrona **1a** y *trans*-cinamaldehído **2a**, en las condiciones descritas con anterioridad para la cicloadición (Esquema 3.8).

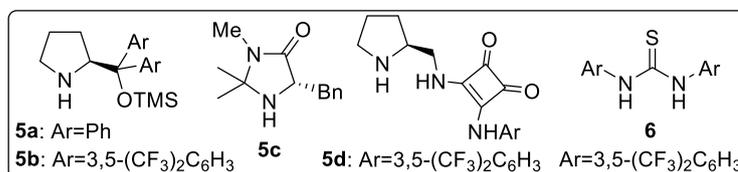
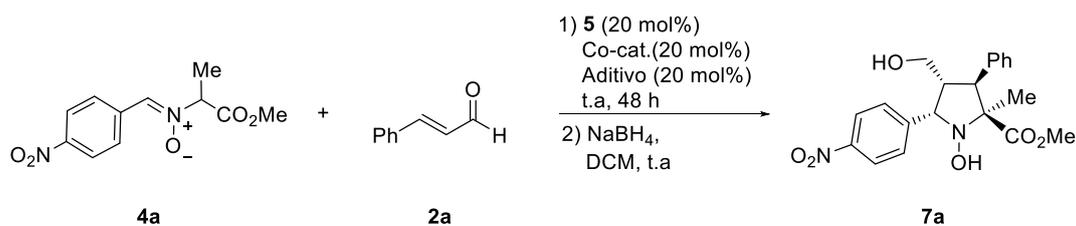


Esquema 3.8. Estudio preliminar de cicloadición

Tras seis días de reacción, se alcanzó una conversión de 44% y se observó por  $^1\text{H}$  RMN del crudo de reacción que como productos se obtenía una mezcla de dos diastereoisómeros en proporción 1:1. Tras un intento de purificación se obtuvo una mezcla más compleja probablemente debida a la epimerización del carbono al que se encuentra unido el aldehído.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observaron dos inconvenientes, el primero de ellos es la baja diastereoselectividad del proceso y el segundo, los problemas en la purificación del producto de adición (**3**). Para intentar solucionarlos, se decidió trabajar con nitronas que presenten un resto alquilo en la posición  $\alpha$  del átomo de nitrógeno, con el fin de incrementar la diastereoselectividad del proceso. Por otro lado, nos propusimos llevar a cabo la reducción del aldehído, con borohidruro de sodio, previa a la purificación con la idea de no encontrar mezclas complejas en el aislamiento como consecuencia de la posible epimerización.

Asimismo, se decidió aplicar una metodología organocatalítica con el fin mejorar los resultados y de inducir quiralidad en el proceso. Para ello, se llevó a cabo la reacción de la nitrona **4a** y *trans*-cinamaldehído **2a**, en diversas condiciones empleando aminas secundarias (**5**) como organocatalizadores. También se estudió el efecto de un ácido, de una base (TEA) o de una tiourea (**6**), como aditivos en el medio de reacción. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 3.1 que se muestra a continuación.



**Esquema 3.9.** Estudio de condiciones de reacción

**Tabla 3.1.** Estudio de condiciones de reacción (Esquema 3.9)

| #                | Cat.      | Co-cat.  | Aditivo             | Disolvente        | Rdto. [%] <sup>[a]</sup> | d.r. <sup>[b]</sup> | e.e. [%] <sup>[c]</sup> |
|------------------|-----------|----------|---------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1                | <b>5a</b> | -        | -                   | CHCl <sub>3</sub> | <5                       | n.d. <sup>[d]</sup> | n.d. <sup>[d]</sup>     |
| 2                | <b>5a</b> | -        | PhCO <sub>2</sub> H | CHCl <sub>3</sub> | <5                       | n.d. <sup>[d]</sup> | n.d. <sup>[d]</sup>     |
| 3                | <b>5c</b> | -        | HCl                 | MeNO <sub>2</sub> | <5                       | n.d. <sup>[d]</sup> | n.d. <sup>[d]</sup>     |
| 4                | <b>5a</b> | -        | TEA                 | CHCl <sub>3</sub> | 9                        | 2:1                 | 98                      |
| 5                | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | CHCl <sub>3</sub> | 92                       | 5:1                 | 98                      |
| 6                | <b>5b</b> | <b>6</b> | TEA                 | CHCl <sub>3</sub> | <5                       | n.d. <sup>[d]</sup> | n.d. <sup>[d]</sup>     |
| 7                | <b>5d</b> | <b>6</b> | TEA                 | CHCl <sub>3</sub> | 40                       | 4:1                 | 20                      |
| 8 <sup>[e]</sup> | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | CHCl <sub>3</sub> | 27                       | 5:1                 | 98                      |
| 9 <sup>[f]</sup> | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | CHCl <sub>3</sub> | 62                       | 6:1                 | 97                      |
| 10               | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | DCM               | 82                       | 3:1                 | 98                      |
| 11               | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | Tolueno           | 53                       | 4:1                 | 98                      |
| 12               | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | THF               | 28                       | 4:1                 | 98                      |
| 13               | <b>5a</b> | <b>6</b> | TEA                 | AcOEt             | 22                       | 4:1                 | 97                      |

[a] Rendimiento del producto aislado tras cromatografía en columna. [b] Determinado mediante <sup>1</sup>H RMN del crudo de reacción. [c] Determinado mediante HPLC en columna de fase estacionaria quiral, del diastereoisómero mayoritario del correspondiente alcohol después de la reducción (Ver parte experimental). [d] n.d.: No determinado. [e] Se incorpora TEA (40 mol%) como aditivo. [f] La reacción se lleva a cabo usando 1 eq. de **6** y 1 eq de TEA.

Cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de *O*-trimetilsilil difenilprolinol **5a**, como catalizador vía iminio, en ausencia de aditivos, no se observó reacción alguna (Tabla 3.1, entrada 1). La incorporación al sistema de ácido benzoico como aditivo prótico, con el fin de favorecer la formación del iminio correspondiente, tampoco dio lugar a la reacción esperada (Tabla 3.1, entrada 2). A continuación, se probó otro

catalizador, de tipo MacMillan (**5c**) en las condiciones descritas para la obtención de isoxazolidinas (Tabla 3.1, entrada 3),<sup>40</sup> pero tampoco se produjo la reacción deseada.

Retomando el catalizador de Hayasi-Jørgensen (**5a**), se adicionó un 20 mol% de TEA con la intención de favorecer la formación del correspondiente iluro (Tabla 3.1, entrada 4). En estas condiciones, se obtuvo la *N*-hidroxipirrolidina deseada con un 9% de rendimiento y con muy buena enantioselectividad (98%). El producto se aisló como una mezcla de 2 diastereoisómeros en proporción 2:1.

A continuación, con el fin de activar la nitrona para mejorar el rendimiento, teniendo en cuenta que el catalizador proporcionaba buena enantioselectividad, se adicionó al medio de reacción la tiourea **6** en un 20 mol%.<sup>47</sup> Tras 24 horas de reacción, el rendimiento alcanzó un 47%, manteniéndose el exceso enantiomérico y mejorando la diastereoselectividad hasta una proporción de 5:1. La misma reacción se dejó 48 horas y se consiguió un rendimiento de 92% (Tabla 3.1, entrada 5).

También se probaron otros catalizadores con sustituyentes más voluminosos (**5b**) y bifuncionales (**5d**). El uso de sustituyentes más voluminosos en el prolinol, provocó que la reacción no tuviera lugar (Tabla 3.1, entrada 6) mientras que el catalizador bifuncional proporcionó un rendimiento más bajo (40%) y una caída radical de la enantioselectividad (20%) (Tabla 3.1, entrada 7).

Así pues, continuando con el catalizador **5a**, se aumentó la proporción de TEA a un 40 mol% y también se produjo una caída del rendimiento (27%) (Tabla 3.1, entrada 8). El uso de cantidades equimoleculares tanto de TEA como de tiourea **6** tampoco mejoró los resultados, obteniéndose un rendimiento del 62% (Tabla 3.1, entrada 9).

Finalmente, se valoró el empleo de otros disolventes como DCM, tolueno, THF o AcOEt (Tabla 3.1, entradas 10-13). Únicamente el uso de DCM mejoró el rendimiento, aunque la diastereoselectividad resultó inferior. A raíz de estos datos se estimó que para obtener buenos resultados se requería del uso del catalizador **5a** en un 20 mol%, un 20 mol% de TEA y un 20 mol% de tiourea **6** y cloroformo como disolvente.

### 3.3.2. Estudio del alcance de reacción

Una vez establecido el protocolo para la síntesis de *N*-hidroxipirrolidinas, se continuó con el estudio del alcance de la reacción, valorando el uso de otros aldehídos y nitronas.

Las nitronas necesarias para este estudio se prepararon por condensación de las distintas hidroxilaminas con varios aldehídos (Esquema 3.10, Tabla 3.2). La mayoría de las nitronas preparadas, a excepción de la **4h**, presentan un grupo aromático con sustituyentes aceptores o dadores y pueden llevar un resto alquilo (Me, Et) en posición  $\alpha$  del grupo éster (nitronas **4**).



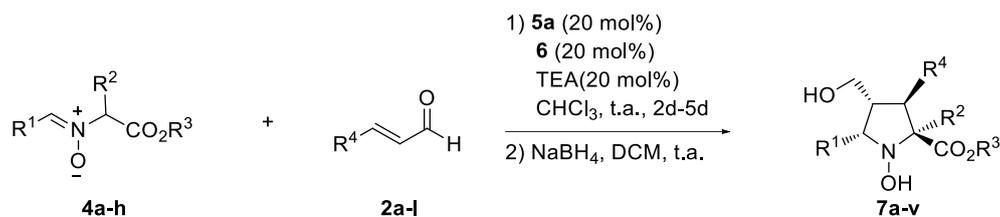
Esquema 3.10. Síntesis de nitronas

Tabla 3.2. Síntesis de nitronas (Esquema 3.10)

| Nitrona   | Aldehído  | R <sup>1</sup>  | Hidroxilamina | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | Rdto (%) <sup>[a]</sup> |
|-----------|-----------|---|---------------|----------------|----------------|-------------------------|
| <b>1a</b> | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>9a</b>     | H              | Et             | 96                      |
| <b>1b</b> | <b>8b</b> | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | <b>9a</b>     | H              | Et             | 94                      |
| <b>4a</b> | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>9b</b>     | Me             | Me             | 97                      |
| <b>4b</b> | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>9c</b>     | Me             | Et             | 96                      |
| <b>4c</b> | <b>8c</b> | 4-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 96                      |
| <b>4d</b> | <b>8d</b> | 3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 90                      |
| <b>4e</b> | <b>8f</b> | 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 98                      |
| <b>4f</b> | <b>8g</b> | Ph  | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 96                      |
| <b>4g</b> | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>9d</b>     | Et             | Me             | 97                      |
| <b>4h</b> | <b>8h</b> | COOEt   | <b>9d</b>     | Et             | Me             | 80                      |
| <b>4i</b> | <b>8b</b> | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 94                      |
| <b>4j</b> | <b>8i</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CH=CH            | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 93                      |
| <b>4k</b> | <b>8j</b> | 2-furil   | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 95                      |
| <b>4l</b> | <b>8k</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                | <b>9a</b>     | Me             | Me             | 95                      |

[a] Rendimiento del producto aislado tras cromatografía en columna.

Una vez que se disponía de todos los reactivos, se procedió al estudio del alcance de la reacción, cuyos resultados aparecen representados en la Tabla 3.3, que a continuación se comenta.



**Esquema 3.11.** Estudio del alcance de la reacción

**Tabla 3.3.** Estudio del alcance de la reacción (Esquema 3.11)

|                   |           | Nitrona   |                |                | Aldehído  |  | Producto  |                             |                     |                            |
|-------------------|-----------|---|----------------|----------------|-----------|--|-----------|-----------------------------|---------------------|----------------------------|
| #                 | 4         | R <sup>1</sup>  | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | 2         | R <sup>4</sup>                                       | 7         | Rdto.<br>[%] <sup>[a]</sup> | d.r. <sup>[b]</sup> | e.e.<br>[%] <sup>[c]</sup> |
| 1                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Me             | <b>2a</b> | Ph   | <b>7a</b> | 92                          | 5:1                 | 98                         |
| 2                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Me             | <b>2b</b> | 4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                    | <b>7b</b> | 84                          | 6:1                 | 99                         |
| 3                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Me             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7c</b> | 85                          | 6:1                 | >99                        |
| 4                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Me             | <b>2d</b> | 2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7d</b> | 72                          | 4:1                 | 94                         |
| 5                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Me             | <b>2e</b> | 4-Et <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>     | <b>7e</b> | 74                          | 2:1                 | >99                        |
| 6                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Me             | <b>2f</b> | 2-furil  | <b>7f</b> | 93                          | 9:1                 | >99                        |
| 7                 | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2g</b> | 3,5-(MeO) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> | <b>7g</b> | 83                          | 4:1                 | >99                        |
| 8                 | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2a</b> | Ph   | <b>7h</b> | 84                          | 4:1                 | 99                         |
| 9                 | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2h</b> | 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                    | <b>7i</b> | 81                          | 4:1                 | 99                         |
| 10                | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2i</b> | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                    | <b>7j</b> | 94                          | 4:1                 | 98                         |
| 11                | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2j</b> | 4-IC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                     | <b>7k</b> | 86                          | 5:1                 | 99                         |
| 12                | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2k</b> | 4-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>      | <b>7l</b> | 85                          | 4:1                 | 99                         |
| 13                | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2l</b> | 2-tienil   | <b>7m</b> | 78                          | 7:1                 | >99                        |
| 14                | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me             | Et             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7n</b> | 82                          | 5:1                 | 98                         |
| 15                | <b>4c</b> | 4-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | Me             | Me             | <b>2a</b> | Ph   | <b>7o</b> | 82                          | 9:1                 | 96                         |
| 16                | <b>4c</b> | 4-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | Me             | Me             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7p</b> | 84                          | 9:1                 | 96                         |
| 17                | <b>4c</b> | 4-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | Me             | Me             | <b>2l</b> | 2-tienil   | <b>7q</b> | 82                          | 10:1                | 99                         |
| 18                | <b>4d</b> | 3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> | Me             | Me             | <b>2c</b> | Ph   | <b>7r</b> | 80                          | 9:1                 | 98                         |
| 19 <sup>[d]</sup> | <b>4e</b> | 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | Me             | Me             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7s</b> | 51                          | 1:1                 | 90                         |
| 20                | <b>4f</b> | Ph  | Me             | Me             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7t</b> | 45                          | 1:1                 | 92                         |
| 21                | <b>4g</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Et             | Me             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7u</b> | 96                          | >20:1               | >99                        |
| 22 <sup>[d]</sup> | <b>4h</b> | CO <sub>2</sub> Et  | Et             | Me             | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | <b>7v</b> | 25                          | >20:1               | 98                         |

[a] Mezcla de diastereoisómeros tras la purificación. [b] Determinado por <sup>1</sup>H RMN del crudo de la reacción antes de la reducción. [c] Determinado mediante HPLC en columna de fase estacionaria quiral, del diastereoisómero mayoritario del correspondiente alcohol después de la reducción. [d] La reacción se lleva a cabo en presencia de 1 eq. de TEA y 1 eq. de **6**.

Como se observa en la tabla, esta reacción se puede aplicar eficientemente sobre una amplia familia de aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados con sustituyentes aromáticos **2a-l**, obteniéndose los correspondientes aductos **7a-n** con buenos rendimientos, moderada diastereoselectividad y una excelente enantioselectividad (Tabla 3.3, entradas 1-14) independientemente de la naturaleza electrónica del sustituyente arilo y de la posición de los sustituyentes del grupo arilo. En ninguno de los casos se observó como subproducto de reacción, la formación de la isoxazolidina resultante de la cicloadición 1,3-C,O característica del grupo funcional nitrona.

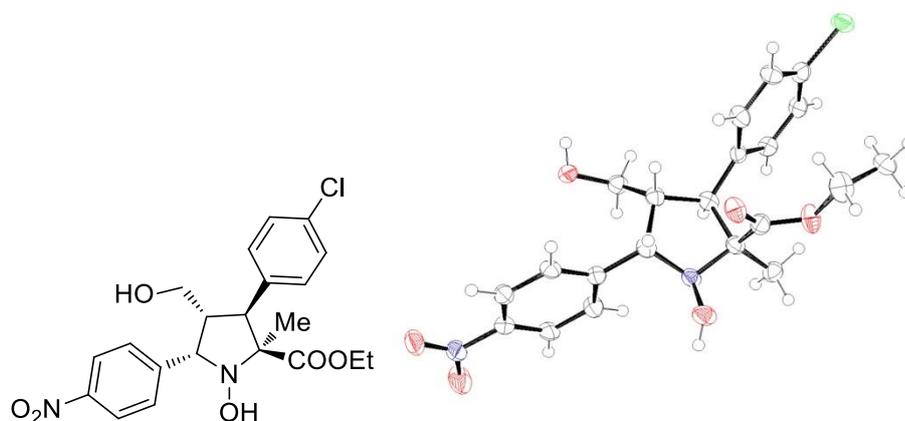
En cuanto a la naturaleza del grupo éster, no se observa un cambio importante de comportamiento, si se comparan la entrada 1 y 8, o la 3 y 14, en las que el éster es metílico o etílico respectivamente. En cuanto al carácter de la nitrona, considerando los distintos sustituyentes y patrones de sustitución en el anillo aromático, se observa que cuanto más pobre en densidad electrónica es el anillo, mayor rendimiento se obtiene (Tabla 3.3, comparar las entradas 15-18 con las entradas 19 y 20). De hecho, y aunque no aparecen reflejados en la tabla, se realizaron pruebas con nitronas que presentaban grupos arilo ricos en densidad electrónica (2-furilo **4k** o 4-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> **4l**) y la reacción no tuvo lugar. Tampoco se observó reacción con la nitrona conjugada derivada de *trans*-4-nitrocinnamaldehído (**4j**), ni siquiera con la nitrona derivada del 4-clorobenzaldehído (**4i**).

También se valoró el efecto del resto alquílico del carbono en  $\alpha$  al átomo de nitrógeno. La presencia de sustituyentes de mayor tamaño, al pasar de un grupo metilo a uno etilo, mejora considerablemente la diastereoselectividad (Tabla 3.3, entradas 3 y 21) manteniendo un buen rendimiento. Finalmente, se probó una nitrona derivada del glioxilato de etilo (**4h**), para valorar el uso de nitronas con sustituyentes no aromáticos, pero manteniendo el carácter aceptor (Tabla 3.3, entrada 22). En este caso, el rendimiento de la reacción fue bajo, 25%, aunque la diastereoselectividad y la enantioselectividad fueron excelentes.

### 3.3.3. Determinación de la estereoquímica

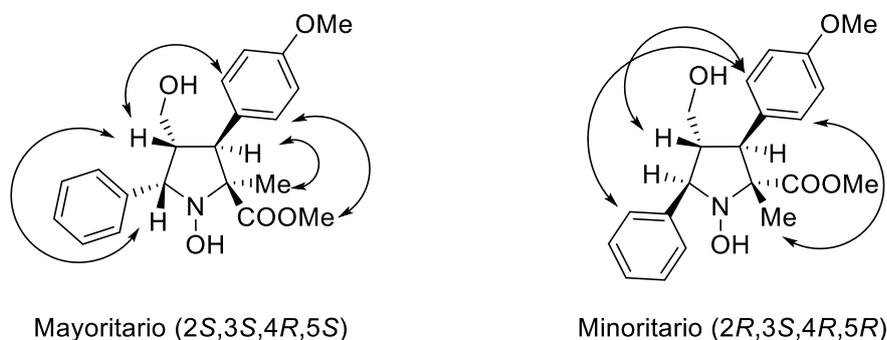
La determinación de la configuración absoluta de los productos de la reacción se llevó a cabo a partir de los datos de difracción de rayos X del diastereoisómero mayoritario de la *N*-hidroxipirrolidina **7j** (Figura 3.3) que resultó ser (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*). Para el resto de los cicloadductos (**7a-v**) se asumió que la configuración absoluta era la

misma ya que operaba el mismo mecanismo de reacción y las constantes y desplazamientos químicos determinados por  $^1\text{H}$  RMN eran similares.



**Figura 3.3.** Diagrama ORTEP del compuesto **7j**, mostrando los elipsoides con un 50% de probabilidad

La configuración del diastereoisómero minoritario se determinó por comparación de experimentos NOESY de los diastereoisómeros del compuesto **7t** por separado y se dedujo que se trataba del compuesto (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*) (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Configuraciones y correlaciones NOESY de los diastereoisómeros de **7t**

Las correlaciones espaciales más relevantes del espectro NOESY del diastereoisómero mayoritario se observan entre el metilo del éster y los protones orto del 4-metoxifenilo (Figura 3.5, **A**), estos con H4 (Figura 3.5, **B**) y este correlaciona con H5 (Figura 3.5, **C**), por lo tanto se encuentran en la misma cara. Por otro lado el NOE que se establece entre el grupo metilo de C2 con H3 es muy intenso (Figura 3.5, **D**). El diastereoisómero minoritario presenta NOE entre el grupo metilo de C2 y los protones orto del anillo en C3 (Figura 3.6, **E**), que a su vez, correlacionan con H4 (Figura 3.6, **F**) y el fenilo de C5 (Figura 3.6, **G**), por lo que se encuentran en la misma cara.

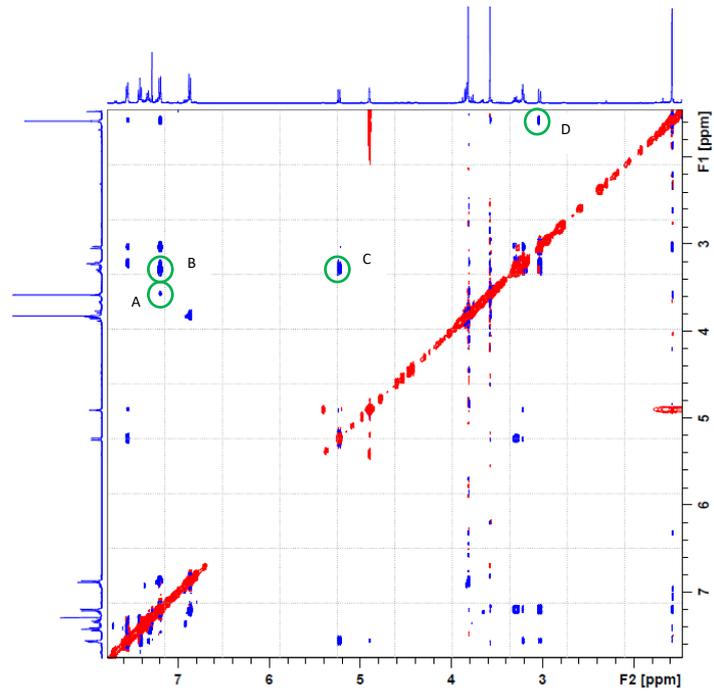


Figura 3.5. NOESY diastereoisómero mayoritario (*2S,3S,4R,5S*) de **7t**

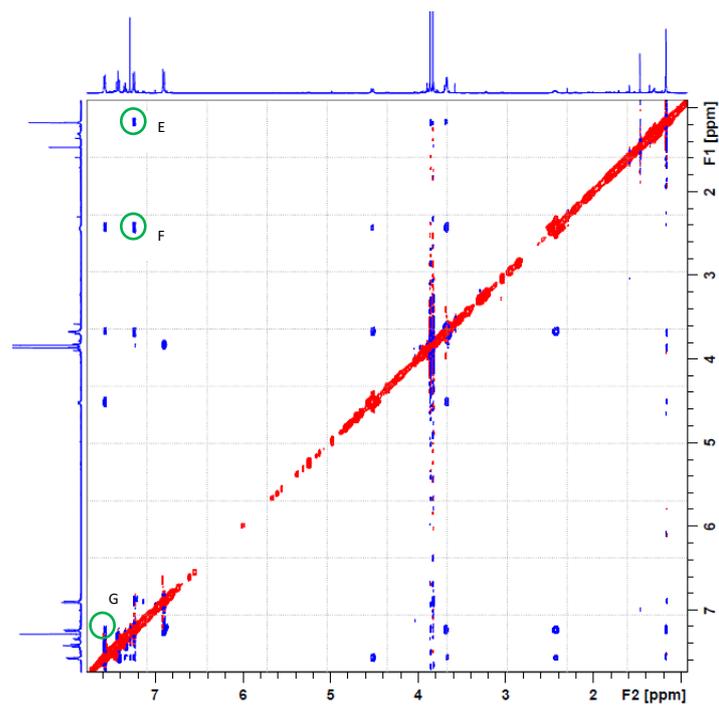
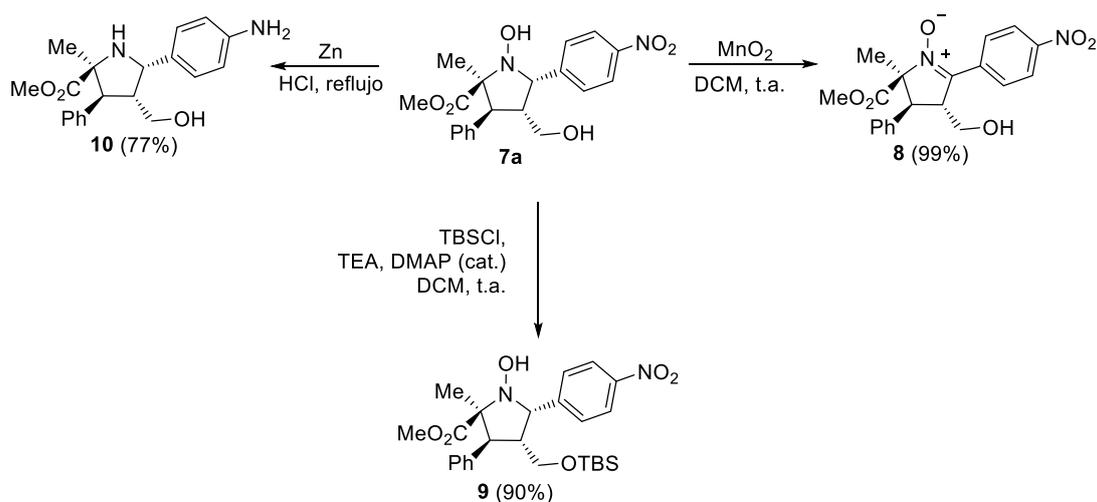


Figura 3.6. NOESY diastereoisómero minoritario (*2R,3S,4R,5R*) de **7t**

### 3.3.4. Utilidad sintética de las *N*-hidroxipirrolidinas obtenidas

Finalmente, se probaron ciertas transformaciones de las *N*-hidroxipirrolidinas obtenidas para obtener las pirrolidinas objetivo y también demostrar la posibilidad de llevar a cabo diversas reacciones orgánicas (Esquema 3.12). Tomando **7a** como ejemplo representativo, se consiguió oxidar a la correspondiente nitrona **8**, usando como oxidante manganesa,  $MnO_2$ , con un rendimiento excelente. Esta transformación abre la posibilidad de preparar hidroxipirrolidinas todavía más complejas. También se estudió el proceso de protección del alcohol primario con un silano voluminoso, consiguiéndose una protección selectiva frente al grupo hidroxilo de la *N*-hidroxilamina **9**. De cara a la obtención de la correspondiente pirrolidina cíclica altamente sustituida, se llevó a cabo la reacción de reducción del grupo hidroxilamina a amina **10** utilizando zinc en medio ácido. Se empleó ácido clorhídrico, ya que las pruebas llevadas a cabo con ácido acético, no fueron efectivas. Incluso fue necesario calentar a reflujo, lo que provocó la de reducción del grupo nitro a amina primaria.



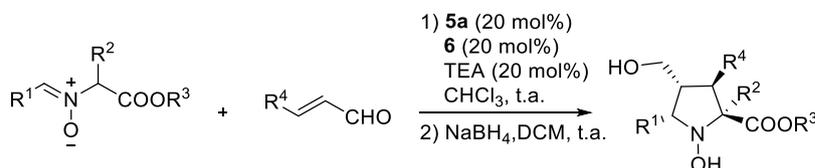
Esquema 3.12. Transformaciones de *N*-hidroxipirrolidinas

### 3.4. Estudio mecanístico de la reacción de cicloadición.

Para determinar el mecanismo de la reacción, dada la participación de dos compuestos como organocatalizadores se consideró el estudio detallado del mismo. Por ello se llevaron a cabo una serie de estudios experimentales, espectroscópicos y computacionales.

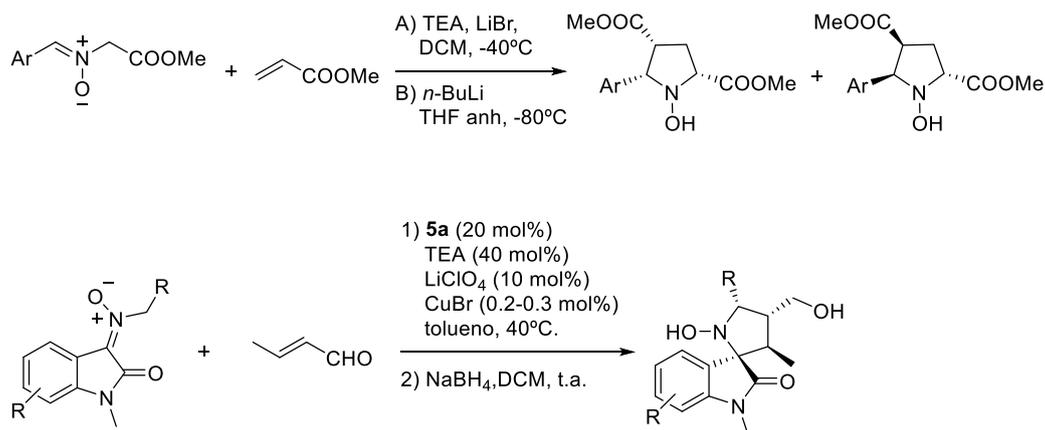
#### 3.4.1. Estudios experimentales

Al iniciar este estudio, se había establecido que las mejores condiciones para esta reacción requerían el uso del catalizador de Hayashi-Jørgensen **5a** (20 mol%), 1,3-bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiourea **6** (20 mol%) como co-catalizador, trietilamina (20 mol%) como aditivo y cloroformo como disolvente (Esquema 3.13).



Esquema 3.13. Condiciones de cicloadición escogidas

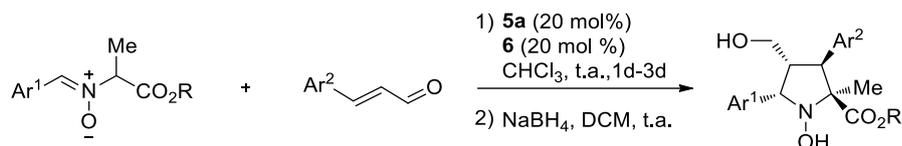
En primer lugar se estudió la influencia de la base TEA en la reacción, con la hipótesis de que pudiera actuar en la formación del correspondiente iluro de nitrona, como ya se había observado con anterioridad. Por ejemplo, en nuestro grupo de investigación, en el que se desarrolló una metodología sintética para la obtención de *N*-hidroxipirrolidinas quirales basadas en reacciones de nitronas y ésteres conjugados<sup>37</sup> o en el trabajo publicado recientemente por Chen y colaboradores, en el que se obtienen *N*-hidroxipirrolidinas quirales a partir de nitronas derivadas de isatina y aldehídos conjugados alifáticos (Esquema 3.14).<sup>48</sup>



**Esquema 3.14.** Reacciones de cicloadición con iluros de nitrona

Cuando se llevó a cabo la reacción de la nitrona **4a** con el aldehído **2a** en presencia de la tiourea **6** y en ausencia de base (Tabla 3.4, entrada 1) se obtuvo el producto **7a** con un rendimiento del 93% (d.r. 5:1, e.e. 98%), un resultado prácticamente idéntico al encontrado empleando 0,2 eq. de TEA (Tabla 3.1, entrada 6). Esta situación se repitió en una serie de experimentos realizados con distintas nitronas y aldehídos (ver Tabla 3.4, entradas 2-8, y comparar con la Tabla 3.3). Además, se observó que el tiempo de reacción era menor en ausencia de TEA (1 a 3 días) en comparación con las reacciones realizadas en presencia de 0,2 eq. de TEA (2 a 5 días).

Por otro lado, cuando se llevó a cabo un experimento en ausencia de la tiourea **6** (Tabla 3.4, entrada 9) no se observó reacción. Únicamente en este caso, ausencia de la tiourea **6**, añadir TEA al medio de reacción puede resultar favorable, aunque el rendimiento obtenido no pasa del 10% (1 eq. de TEA añadido, Tabla 3.4 entrada 10).



**Esquema 3.15.** Síntesis de *N*-hidroxipirrolidinas en ausencia de base

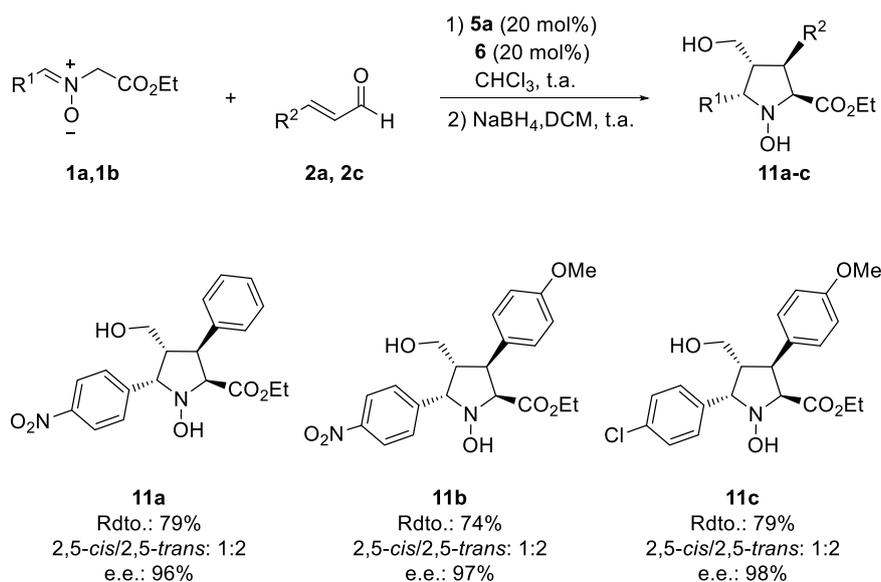
**Tabla 3.4.** Síntesis de *N*-hidroxipirrolidinas en ausencia de base (Esquema 3.15)

| #                 | <b>4</b>  | Ar <sup>1</sup>   | R  | <b>2</b>  | Ar <sup>2</sup>                                 | <b>7</b>  | Rdto<br>(%) <sup>[a]</sup> | d.r.<br><sup>[b]</sup> | e.e.<br>(%) <sup>[c]</sup> |
|-------------------|-----------|---|----|-----------|---|-----------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| 1                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me | <b>2a</b> | Ph  | <b>7a</b> | 93                         | 5:1                    | 98                         |
| 2                 | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>7c</b> | 90                         | 6:1                    | 99                         |
| 3                 | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Et | <b>2i</b> | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | <b>7j</b> | 95                         | 4:1                    | 98                         |
| 4                 | <b>4b</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Et | <b>2k</b> | 4-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | <b>7l</b> | 88                         | 4:1                    | 99                         |
| 5                 | <b>4c</b> | 4-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | Me | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>7q</b> | 84                         | 9:1                    | 96                         |
| 6                 | <b>4d</b> | 3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> | Me | <b>2a</b> | Ph  | <b>7o</b> | 87                         | 9:1                    | 98                         |
| 7                 | <b>4e</b> | 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                                 | Me | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>7s</b> | 55                         | 1:1                    | 90                         |
| 8                 | <b>4f</b> | Ph  | Me | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>7t</b> | 46                         | 1:1                    | 92                         |
| 9 <sup>[d]</sup>  | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>7c</b> | < 5                        | n.d.                   | n.d.                       |
| 10 <sup>[e]</sup> | <b>4a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>                   | Me | <b>2c</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>7c</b> | 10                         | n.d.                   | n.d.                       |

[a] Rendimiento aislado tras la purificación como mezcla de diastereoisómeros. [b] Determinado por <sup>1</sup>H RMN del crudo de reacción antes de la reducción. [c] Determinado por HPLC en fase estacionaria quiral. [d] En ausencia de tiourea. [e] En ausencia de tiourea y en presencia de 1 eq. de TEA.

De estos experimentos hay que concluir que los resultados encontrados en ausencia de la tiourea **6**, junto con los trabajos descritos con anterioridad,<sup>37,48</sup> nos llevaron a interpretar erróneamente el papel de TEA que, no sólo no es necesaria, sino que resulta perjudicial cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de **6** como aditivo.

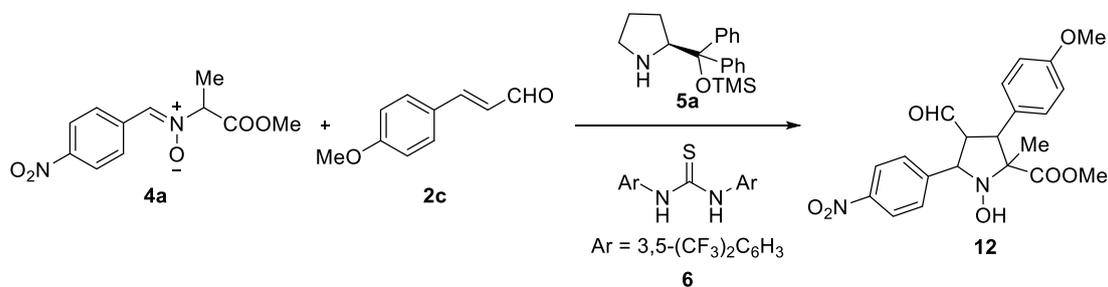
A raíz de estos resultados, que indican que la presencia de base no es necesaria, se retomaron las nitronas derivadas del glioxilato de etilo (**1a** y **1b**), con las que se inició el estudio y que proporcionaban una baja diastereoselectividad. En presencia de la tiourea **6**, la reacción transcurre satisfactoriamente obteniéndose buenos rendimientos y excelentes enantioselectividades, aunque la diastereoselectividad se mantiene baja, con una proporción 2:1 de los diastereoisómeros *2,5-trans* y *2,5-cis* (**11a-c**) (Esquema 3.16).



**Esquema 3.16.** Reacciones con nitronas derivadas de glioxilato

### 3.4.2. Estudios cinéticos

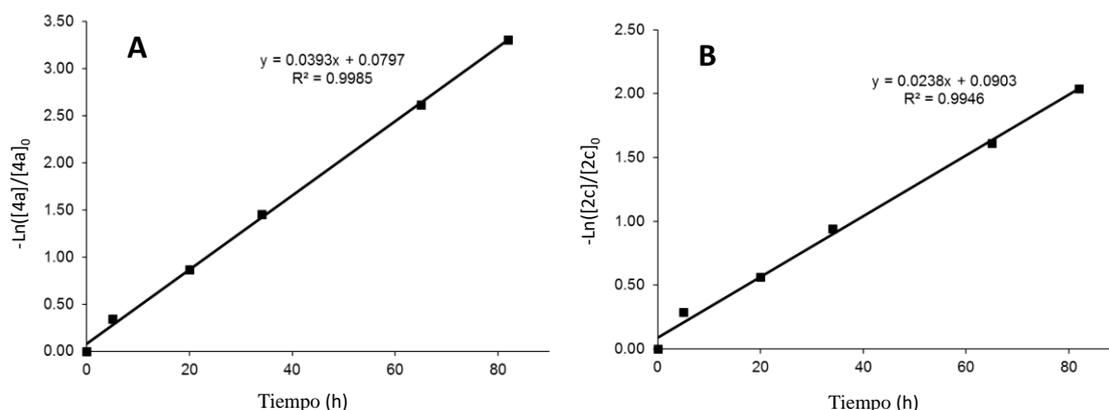
Se llevaron a cabo estudios cinéticos, usando como modelo la reacción de la nitrona **4a** con el aldehído **2c**, para determinar el orden de reacción de ambos compuestos (Esquema 3.17).



**Esquema 3.17.** Reacción modelo para los estudios cinéticos

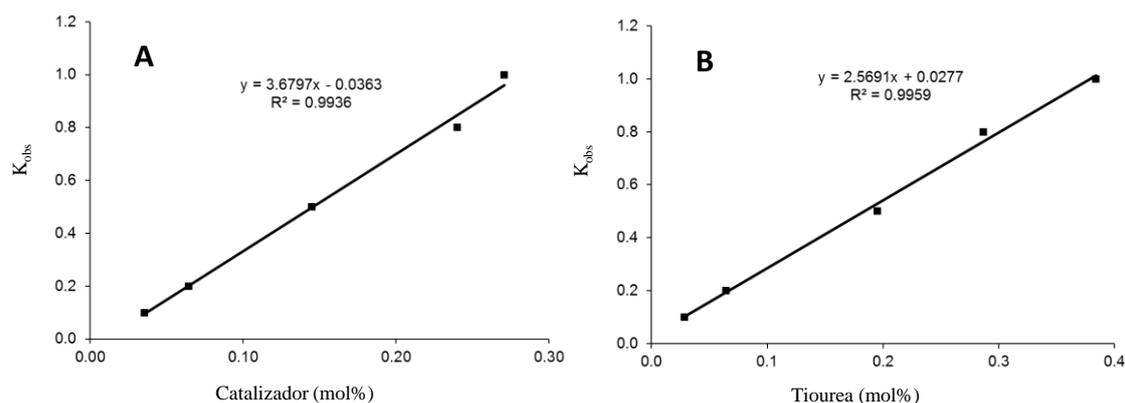
Las reacciones se siguieron por <sup>1</sup>H RMN utilizando etilencarbonato como referencia interna, que permite relacionar la integración de las señales de protón con las concentraciones a distintos tiempos. Todas las reacciones se realizaron en cloroformo deuterado (0.4 mL) y a temperatura ambiente. Para determinar el orden de reacción de la nitrona, se llevó a cabo el experimento en presencia de exceso de aldehído (3 eq.), para poder considerar su concentración como constante durante el avance de la reacción, 0.2 eq. de catalizador (**5a**) y 0.2 eq. de tiourea (**6**). La representación de ln([**4a**]/[**4a**]<sub>0</sub>) frente al tiempo, dio lugar a una recta, por lo tanto, la reacción era de

orden uno respecto de la nitrona (Figura 3.7, **A**). Se repitió el mismo estudio manteniendo constante la concentración de nitrona (3 eq.) y siguiendo la desaparición del aldehído (**2c**). El ajuste también indicó que se trataba de una reacción de orden uno respecto del aldehído (Figura 3.7, **B**).



**Figura 3.7.** Estudios cinéticos del orden de reacción de la nitrona **4a** (**A**) y el aldehído **2c** (**B**)

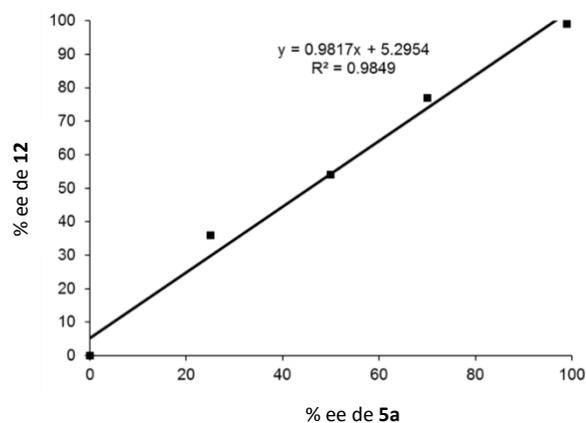
También se realizaron experimentos para determinar el orden de reacción, tanto del catalizador, *O*-TMS prolinol **5a**, como de la tiourea **6**. Para ello se representaron las constantes cinéticas observadas frente a la cantidad, expresada en mol%, de cada uno de ellos, véase Figura 3.8, **A** en el caso del catalizador y Figura 3.8, **B** para la tiourea. En ambos casos el orden de reacción determinado también fue uno.



**Figura 3.8.** Estudios del orden de reacción del catalizador **5a** (**A**) y la tiourea **6** (**B**)

A continuación se valoró la posibilidad de que se produjeran efectos no lineales que afectaran a la enantioselectividad del proceso, para lo cual se realizaron diversas pruebas en las que se varía el porcentaje de exceso enantiomérico del catalizador y se miden los excesos enantioméricos del producto obtenido. Como se observa en la Figura

3.9, la influencia es lineal, por lo tanto el catalizador actúa como una especie monomérica y se pueden descartar los efectos no lineales.

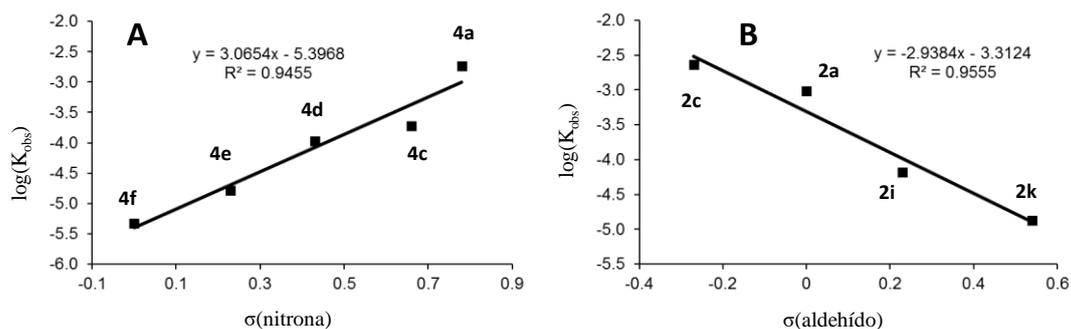


**Figura 3.9.** Estudio de linealidad del catalizador **5a**

Con el fin de obtener más información sobre el tipo de mecanismo con el que se estaba trabajando, se decidió estudiar la relación entre la densidad electrónica, tanto de los sustituyentes de la nitrona como del aldehído, es decir, los parámetros de Hammett ( $\sigma$ ) (Tabla 3.5),<sup>49</sup> con la constante cinética de la reacción (Figura 3.10).

**Tabla 3.5.** Parámetros de Hammett

| Nitrona   | $\sigma$ | Aldehído  | $\sigma$ |
|---|----------|---|----------|
| 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4a</b> )                   | 0.78     | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>2c</b> )              | -0.27    |
| 4-CNC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4c</b> )                                 | 0.66     | Ph ( <b>2a</b> )  | 0        |
| 3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> ( <b>4d</b> ) | 0.43     | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>2i</b> )               | 0.23     |
| 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4e</b> )                                 | 0.23     | 4-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>2k</b> ) | 0.54     |
| Ph ( <b>4f</b> )  | 0        |   |          |



**Figura 3.10** Dependencia de la velocidad de reacción con las propiedades electrónicas de los reactivos.

A: R B C B: Reacción de nitrona **4a** con distintos aldehídos.

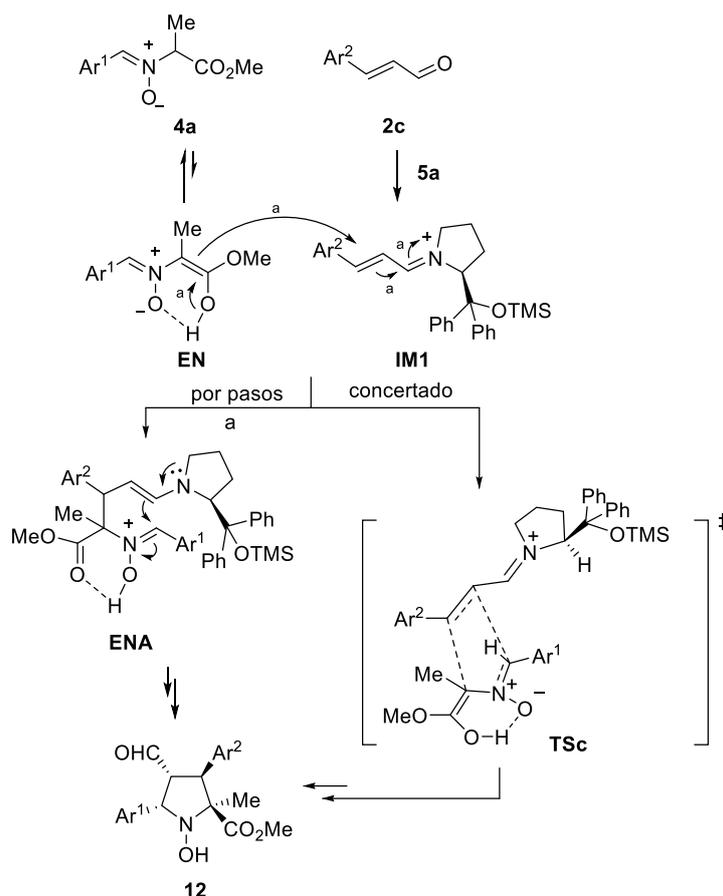
Estas representaciones indican que la relación es prácticamente lineal, siendo la situación más favorable para que se produzca la reacción el uso de sustituyentes aceptores en la nitrona y dadores en el aldehído.

### 3.4.3. Propuesta mecanística: Ciclo catalítico

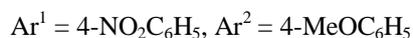
De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, es posible plantear un mecanismo para la reacción estudiada. Hay que considerar que el hecho de que la reacción sea de orden uno tanto para la nitrona como para el aldehído, permite suponer que no se encuentran asociados en el estado de reposo (*resting state*).

Para hacer la propuesta mecanística, se consideró la reacción de nitrona **4a** con el aldehído **2c** en presencia del catalizador **5a** y la tiourea **6** (Esquema 3.17). En primer lugar se plantea la formación de un ion iminio (**IM1**) a partir del aldehído **2c** y del catalizador **5a**. Este ion debe de reaccionar con la nitrona en forma de enol (**EN**) ya que la formación del iluro se descarta al no ser necesaria la presencia de una base en el medio de reacción (Esquema 3.18).

La reacción de las dos especies formadas, ion iminio y enol, puede tener lugar en una etapa según un mecanismo concertado a través de un estado de transición **TSc**, o mediante una reacción tándem Michael-Mannich intramolecular, que transcurre con la formación del intermedio **ENA**, para dar finalmente el producto de cicloadición **12**.

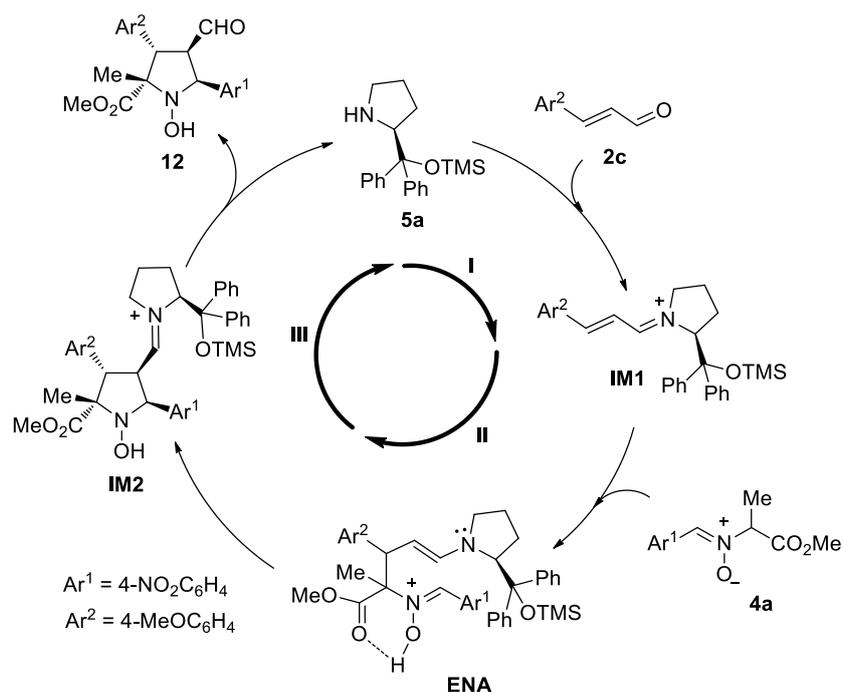


**Esquema 3.18.** Posibles mecanismos de reacción; concertado o por pasos



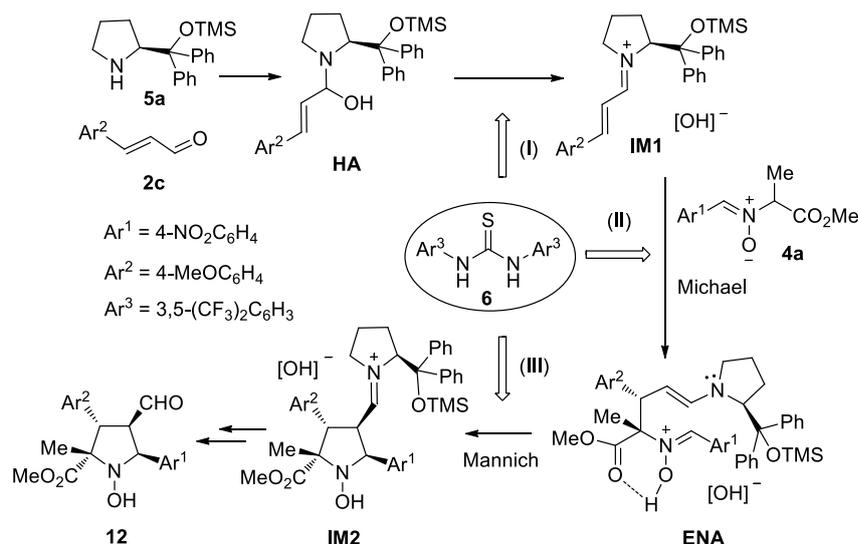
Los resultados observados con los parámetros de Hammett, parecen indicar que se trata de un mecanismo por pasos, ya que en el segundo paso, la reacción de tipo Mannich, la presencia de un grupo aceptor aumenta la electrofilia del carbono de la nitrona. Por el contrario, si se tratase de un mecanismo concertado la reacción se vería favorecida con el uso de sustituyentes dadores en la nitrona.

En la Figura 3.11 se ilustra el ciclo catalítico que responde, en términos generales, en primer lugar a la formación del ion iminio (**IM1**) (**I**), a continuación a la adición Michael del enol de nitrona para formar la enamina (**ENA**) (**II**), que posteriormente cicla mediante una reacción de tipo Mannich intramolecular, dando lugar a un nuevo ion iminio (**IM2**) (**III**) que se hidroliza para formar la correspondiente *N*-hidroxipirrolidina (**12**) regenerando el catalizador (**5a**).



**Figura 3.11.** Propuesta de ciclo catalítico

Teniendo en cuenta que la presencia de tiourea es crucial para el avance de la reacción, es importante determinar el papel que desempeña esta especie en el ciclo catalítico. La capacidad de las tioureas de formar enlaces de hidrógeno, le puede permitir desempeñar varias funciones en el ciclo catalítico propuesto, entre ellas; **(I)** favorecer la formación del iminio, **(II)** facilitar la enolización de la nitrona para que se produzca la adición Michael y/o **(III)** activar la electrofilia del carbono de la nitrona para el cierre de la molécula en la reacción tipo Mannich (Esquema 3.19).

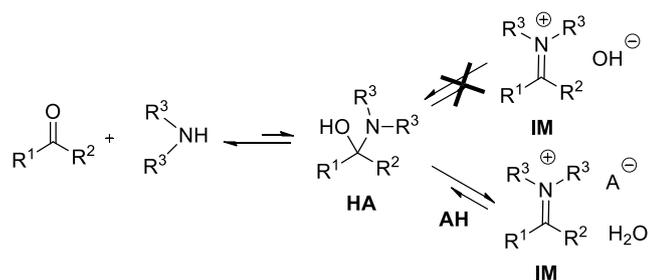


**Esquema 3.19.** Funciones de la tiourea en el mecanismo de reacción

A continuación se va a estudiar con detalle cada uno de los pasos nombrados. En primer lugar se estudiará la formación iminio (**I**).

### 3.4.3.1. Formación del ion iminio

Desde hace 20 años, la catálisis vía iminio se ha ido mostrando como un poderoso método en organocatálisis.<sup>50</sup> Cuando un grupo carbonilo se encuentra en presencia de una amina secundaria, se establece un equilibrio con el correspondiente hemiaminal (**HA**) que puede evolucionar al ion iminio (**IM**) aunque en general, no lo hace a través de un proceso espontáneo (Esquema 3.20).<sup>51</sup>

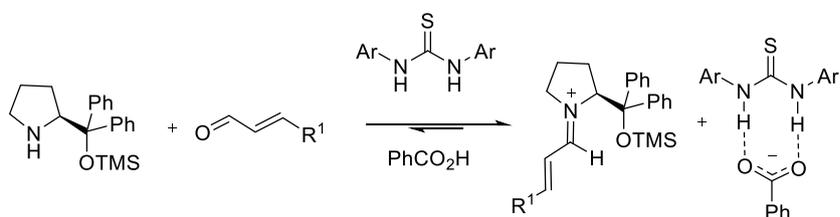


**Esquema 3.20.** Formación del ion iminio

En ciertos casos, un aditivo puede asistir, por medio de enlaces de hidrógeno, a la salida del grupo hidroxilo del hemiaminal y por lo tanto a la formación del ion iminio, tal y como se ha demostrado recientemente en nuestro laboratorio, en concreto en el caso de una reacción de oxa-Michael.<sup>52</sup> En cualquier caso, lo más común es que un

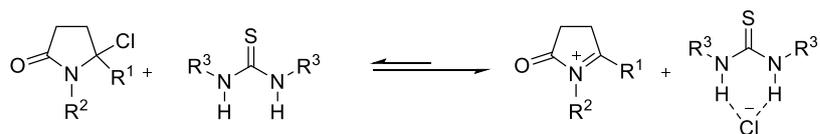
ácido de Brønsted (**AH**) ayude a la formación del iminio mediante la protonación del hidroxilo del hemiaminal. De hecho, la catálisis vía iminio generalmente requiere la adición de una amina secundaria quiral y un co-catalizador.

La reversibilidad del proceso ilustrado en el Esquema 3.17 normalmente es un inconveniente para muchas reacciones organocatalíticas, ya que hace que se requieran mayores tiempos de reacción. Con el fin de intentar aumentar la concentración de ion iminio, el uso de tioureas resulta eficaz por su capacidad para secuestrar el contraión (típico el benzoato) tal y como han demostrado Xu y colaboradores (Esquema 3.21).<sup>53</sup> En efecto, es conocido que las tioureas son capaces de reconocer aniones<sup>54,55</sup> y que la actividad organocatalítica de las tioureas, incluyendo su papel como catalizadores bifuncionales, está muy relacionada con esa capacidad de reconocimiento aniónico.<sup>56</sup>



**Esquema 3.21.** Reconocimiento aniónico por tioureas

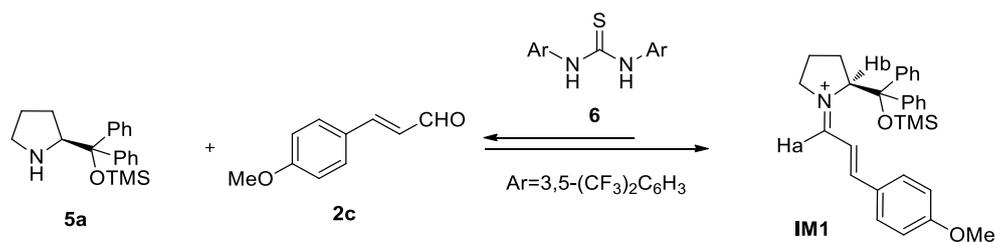
Jacobsen y colaboradores han estudiado que el reconocimiento del anión cloruro por una amidotiourea es crucial para la generación de un ion iminio en la reacción asimétrica de Pictet-Spengler (Esquema 3.22).<sup>57</sup>



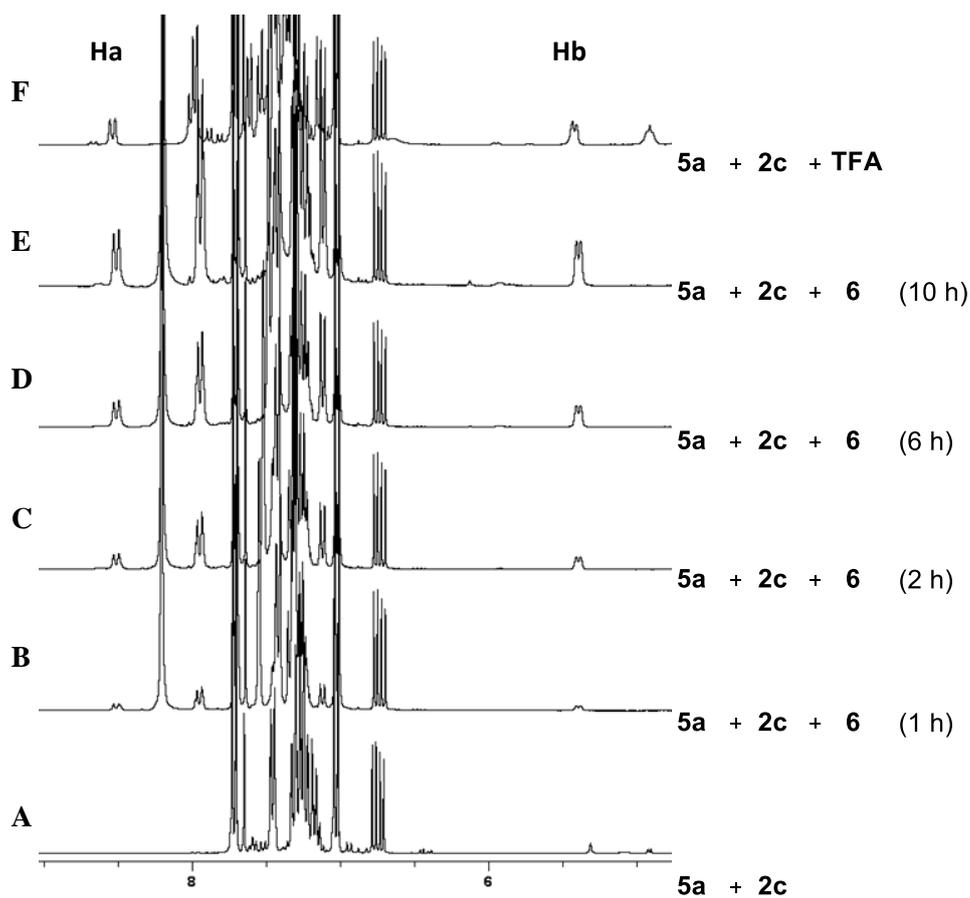
**Esquema 3.22.** Reconocimiento aniónico por tioureas

En algunos casos, un ion iminio ha podido ser aislado y caracterizado<sup>58,59</sup> a partir de una mezcla equimolecular de aldehído y amina tratada con un equivalente de ácido fuerte como puede ser el ácido perclórico o el trifluoroacético. Una de las técnicas escogidas para el estudio de su formación esa sido la Resonancia Magnética Nuclear de protón.

En nuestro caso, en primer lugar, se realizó la síntesis del ión iminio utilizando ácido trifluoroacético y se escogió 4-metoxicinamaldehído (**2c**) como aldehído de partida. Se mezclaron cantidades equimoleculares de este aldehído y de O-TMS prolinol (**5a**) y se disolvieron en DMSO deuterado. A continuación se añadió el ácido trifluoroacético y se midió el espectro de protón de la mezcla (Figura 3.12, **F**). Como señales características del ion iminio (**IM1**), se encontró un doblete que aparece en torno a 8,50 ppm que se corresponde con el protón **Ha** y una señal a 5,40 ppm correspondiente al protón en  $\alpha$  al nitrógeno del prolinol **Hb**.



**Esquema 3.23.** Estudio de formación de iminio (**IM1**)

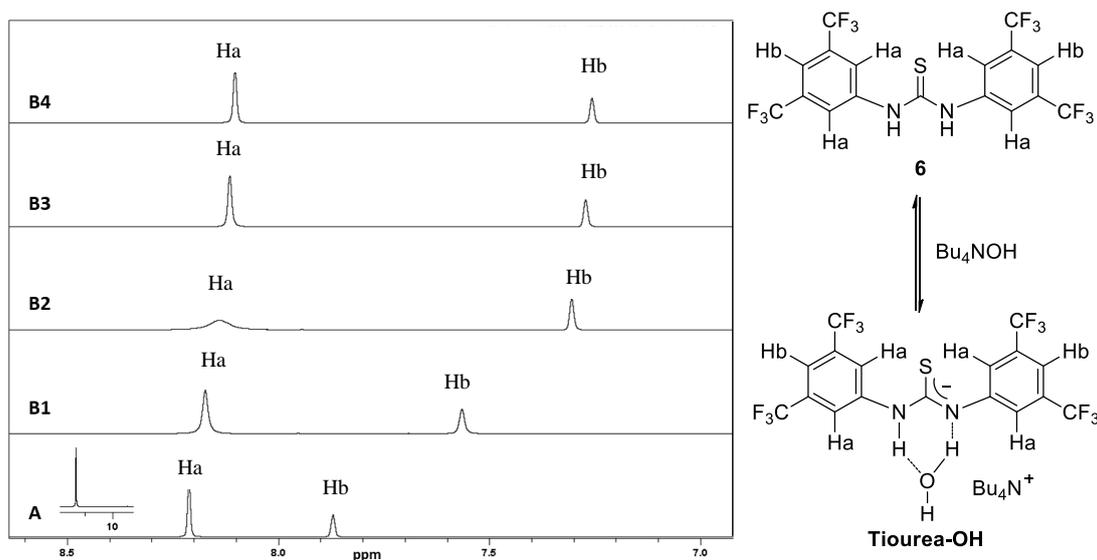


**Figura 3.12.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN del estudio de formación del iminio

En la Figura 3.12 traza **A** aparece el espectro de la mezcla equimolecular de catalizador y aldehído. Como se puede observar no se aprecia la formación de iminio ya que no aparecen las señales características de este. En las trazas intermedias se muestran los espectros de la mezcla equimolecular de catalizador, aldehído y tiourea (Esquema 3.23), y su evolución con el tiempo, tras 1 (Figura 3.12, **B**), 2 (Figura 3.12, **C**), 6 (Figura 3.12, **D**) y 10 (Figura 3.12, **E**) horas respectivamente. Como se puede observar la presencia de tiourea en el medio de reacción favorece la formación del iminio, ayudando en la eliminación del grupo hidróxilo y desplazando el equilibrio. Por lo tanto

uno de los papeles que desempeña la tiourea es el del reconocimiento del anión hidróxido.

Para confirmar este hecho, se llevó a cabo otro estudio utilizando la misma técnica, pero en este caso, tratando de comprobar la unión de la tiourea con el anión hidróxido (Figura 3.13).

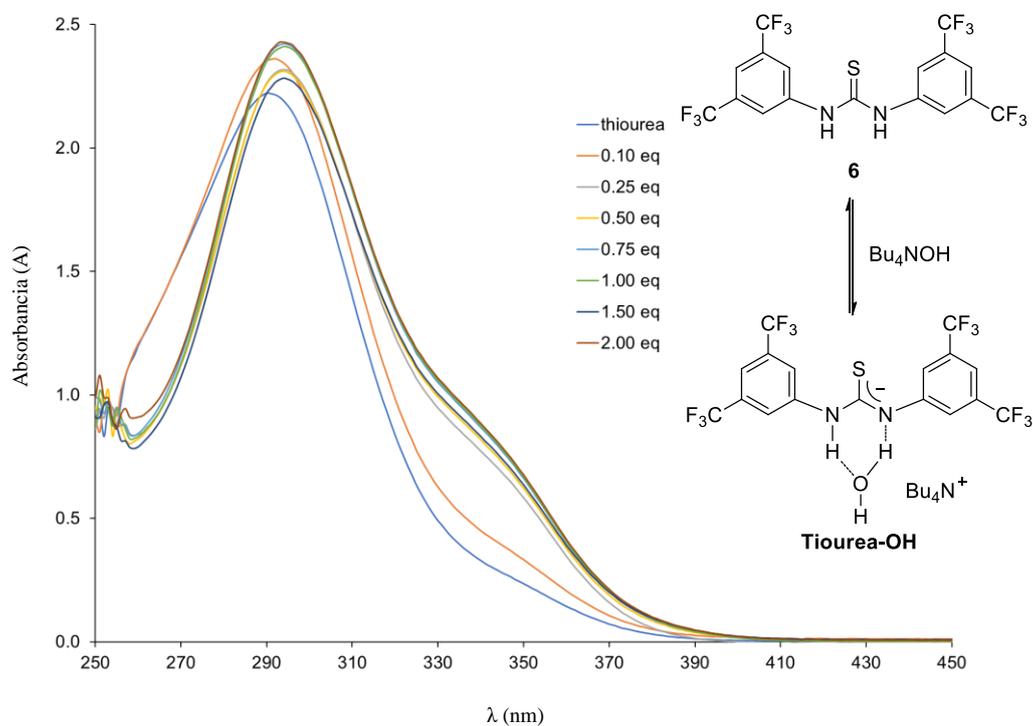


**Figura 3.13.** Estudio de reconocimiento aniónico por parte de la tiourea

En la Figura 3.13, aparecen los espectros resultantes de la adición de hidróxido tetrabutilamonio ( $\text{Bu}_4\text{NOH}$ ) sobre la tiourea **6** disuelta en DMSO deuterado. La traza **A**, se corresponde con el espectro de la tiourea, donde se observa por encima de 10 ppm la señal correspondiente a los grupos NH, a 8.20 ppm las señales de los protones en orto de los anillos aromáticos (Ha) y a casi 7,90 ppm los protones en la posición para (Hb). Las trazas de **B1** a **B4** se corresponden con la adición sucesiva de 0.5, 1, 1.5 y 2 equivalentes de  $\text{Bu}_4\text{NOH}$ . En los espectros se observa, la desaparición de las señales correspondientes a los grupos amino, debido al intercambio rápido con agua, y el apantallamiento que sufren los dos tipos de protones aromáticos, debido al aumento de la densidad electrónica, lo que indica la formación del complejo, **tiourea-OH**, representado a la derecha de los espectros.

Este mismo hecho se comprobó haciendo uso de otra técnica más sensible, como es el UV-Vis (Figura 3.14), en la que se observa la aparición de una nueva zona de

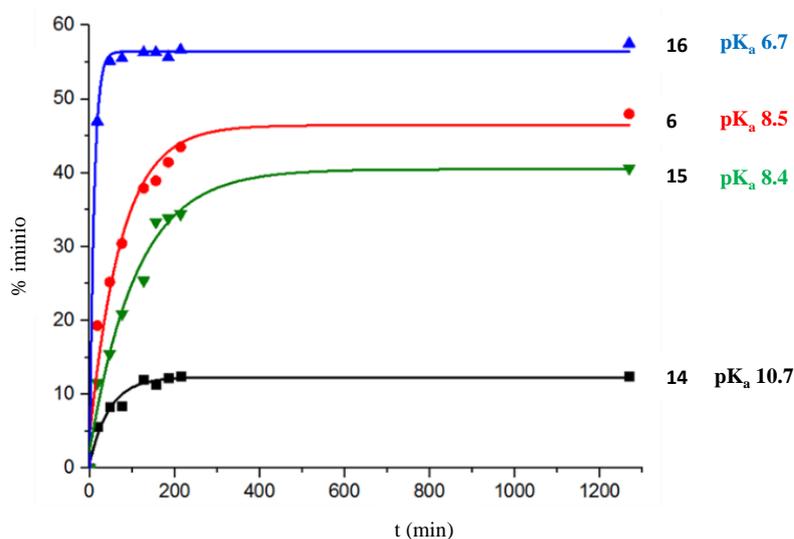
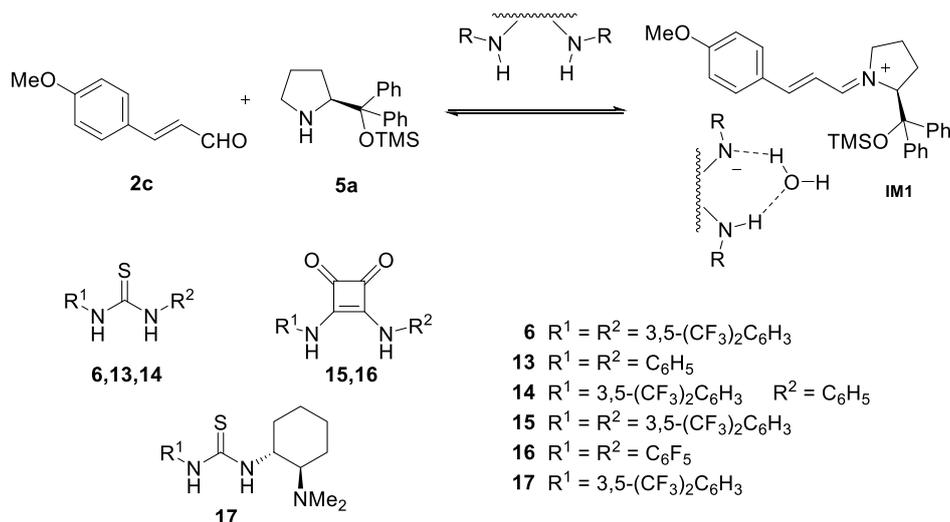
absorción en torno a los 350 nm que se corresponde con el complejo de reconocimiento aniónico.



**Figura 3.14.** Espectro UV-Vis de los complejo **tiourea-OH**

El uso de esta técnica, permitió calcular que la constante de asociación del complejo presenta un valor de  $\log K = 5,5 \pm 0.20$ .

Teniendo en cuenta que las tioureas son capaces de reconocer aniones y que por tanto favorecen la formación de un ion iminio, se decidió estudiar la influencia de distintas tioureas y escuaramidas en el proceso por medio de <sup>1</sup>H RMN (Figura 3.15).

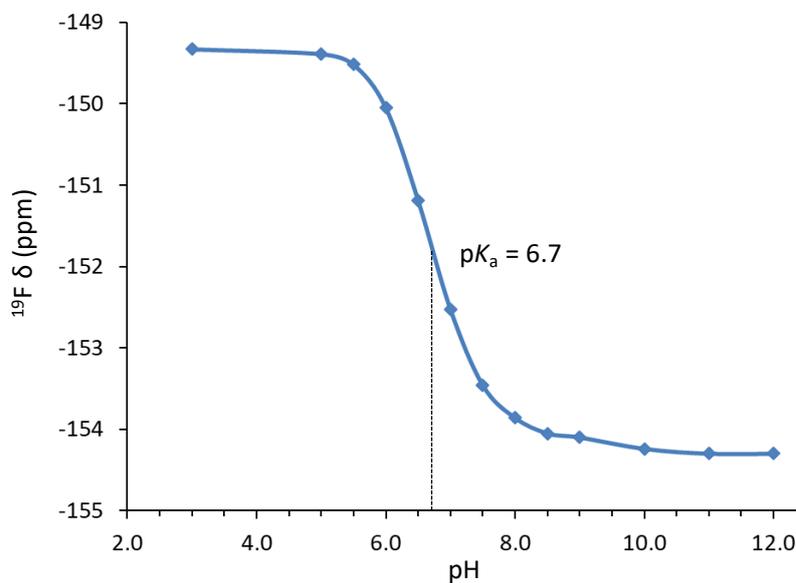


**Figura 3.15.** Estudio de formación de iminio con distintas tioureas y escuaramidas

Se estudiaron cuatro tioureas con distintos patrones de sustitución y también dos escuaramidas ya que con ellas la reacción también tiene lugar. La tiourea **17** no promueve la formación de iminio y por ese motivo no aparece representada en la gráfica, al igual que la tiourea **13**, que aunque si se observa que promueve la reacción, no lo hace de forma significativa.

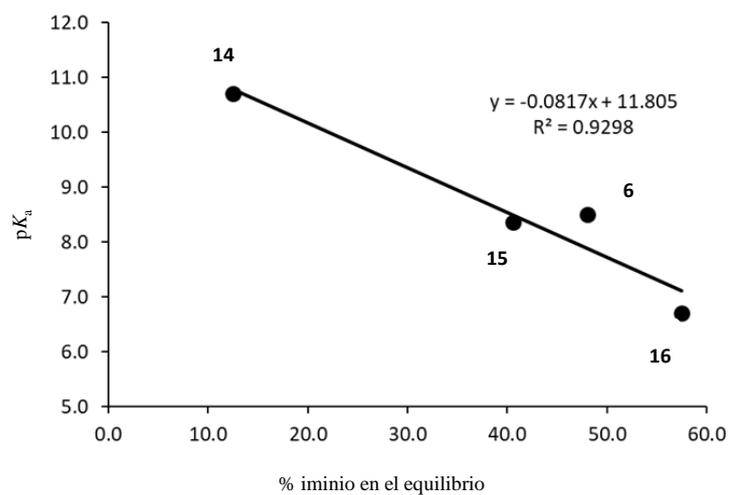
Las diferencias observadas en la formación del ion iminio se pueden relacionar con el pK<sub>a</sub> de los distintos co-catalizadores. Los mejores resultados, mayor porcentaje de ion iminio, los proporciona la escuaramida **16**, que presenta dos grupos pentafluorofenilo como sustituyentes. Los pK<sub>a</sub> que aparecen en la bibliografía son los siguientes: pK<sub>a</sub> (**6**)= 8.5, pK<sub>a</sub> (**13**)= 13.4, pK<sub>a</sub> (**14**)= 10.7 y pK<sub>a</sub> (**15**)= 8.4.<sup>60,61</sup> El pK<sub>a</sub> de la escuaramida **16** no aparece en la bibliografía, por lo que fue necesario establecer un valor aproximado del

mismo. Para ello se utilizó  $^{19}\text{F}$  RMN, midiendo la variación del desplazamiento químico de los núcleos de flúor en orto a distintos pH. La curva obtenida presentaba un punto de inflexión que se correspondía con el valor de  $\text{pK}_a$  del compuesto<sup>62</sup> indicando para **16** un  $\text{pK}_a = 6.7$  (Figura 3.16).



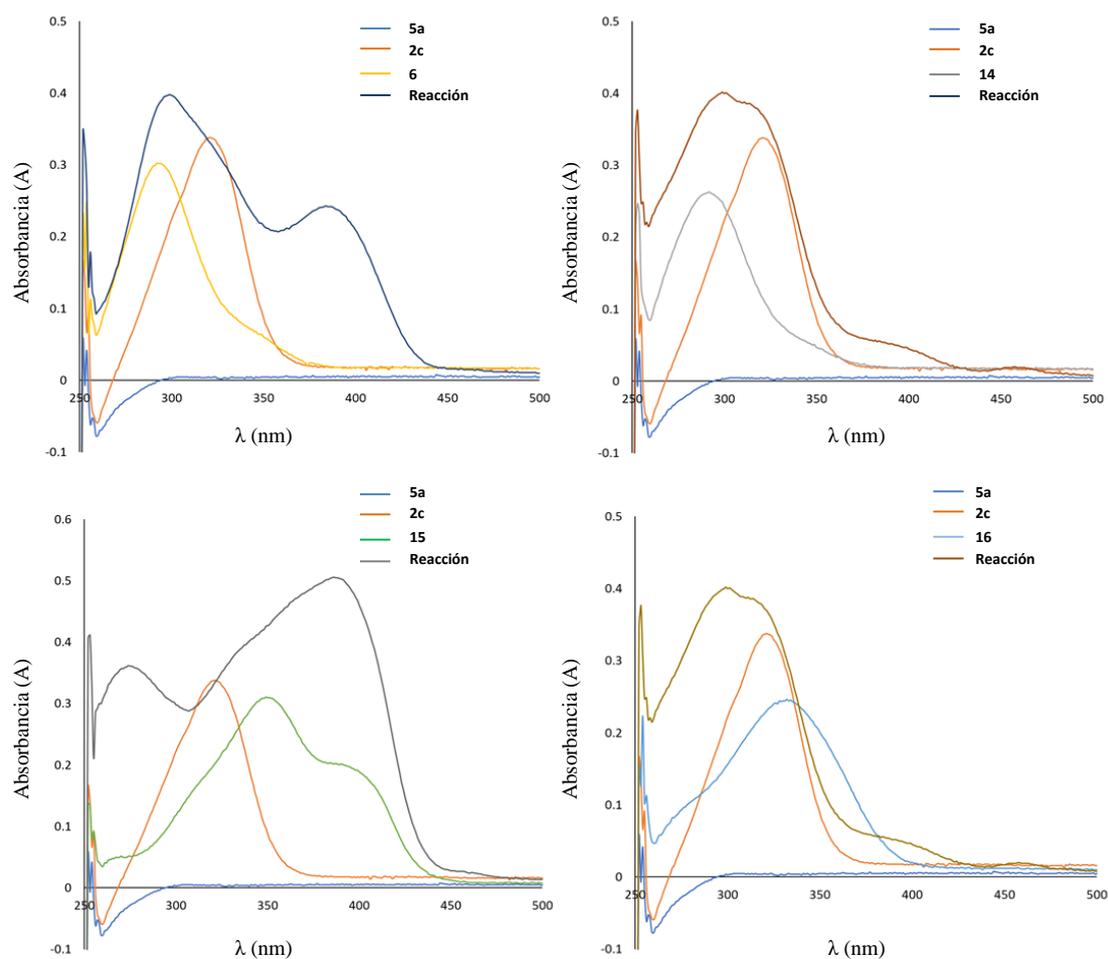
**Figura 3.16.** Estimación del  $\text{pK}_a$  de la escuaramida **16**

Conocidos todos los valores de  $\text{pK}_a$  de los co-catalizadores, representados frente al % de iminio que generan una vez alcanzado el equilibrio, se observa una tendencia lineal, lo cual indica que estos parámetros están relacionados y en este caso a menor  $\text{pK}_a$ , es decir, a mayor acidez, mayor porcentaje de iminio se obtiene (Figura 3.17).



**Figura 3.17.** Relación entre el pKa y el % de iminio obtenido

Las constantes de equilibrio calculadas, mediante  $^1\text{H}$  RMN para cada una de ellas presentan los siguientes valores;  $K_{\text{eq}}$  (**16**)=  $19.3 \pm 0.18$ ,  $K_{\text{eq}}$  (**6**)=  $10.3 \pm 0.15$ ,  $K_{\text{eq}}$  (**15**)=  $7.7 \pm 0.21$ ,  $K_{\text{eq}}$  (**14**)=  $1.1 \pm 0.19$ . Se intentó determinar el valor de dichas constantes utilizando una técnica más sensible, como es el UV-Vis, pero la superposición de las bandas de absorción impide un cálculo preciso (Figura 3.18).

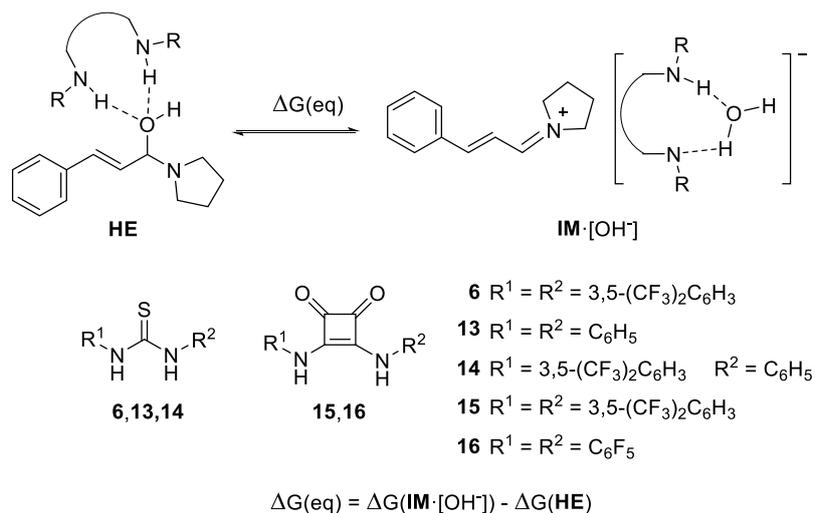


**Figura 3.18.** Espectros UV-Vis para los complejos tiourea-OH de los compuestos **6**, **14**, **15**, **16**

También se analizó por Espectrometría de Masas la formación de ion iminio asistida por la tiourea **6**. El análisis del espectro (+)-ESI-MS resultante de la mezcla de catalizador, aldehído y co-catalizador proporciona un pico de  $m/z = 470.2584$  que se asocia al ion iminio **IM1** ( $m/z = 470.2510$ ). El análisis de esta misma mezcla pero (-)-ESI-MS proporciona un pico de  $m/z = 499.0214$  que se puede asociar a la tiourea desprotonada ( $m/z = 499.0144$ ).

Si se admite que la formación de iminio (**IM1**) a partir de aldehído y catalizador, tiene lugar a través del correspondiente hemiaminal (**HE**) (Figura 3.19), el porcentaje de iminio en el equilibrio debe correlacionar con la diferencia de energía libre ( $\Delta G$  (eq)) entre el correspondiente par iónico **IM**·[OH] y el hemiaminal (**HE**) (Tabla 3.6).\*

\* Valores de energía absoluta (en hartrees) calculados, utilizando B3LYP-D3BJ/def2SVP/CPCM=CHCl<sub>3</sub> para los distintos hemiaminales e iminios y la variación de energía libre (en kcal/mol).

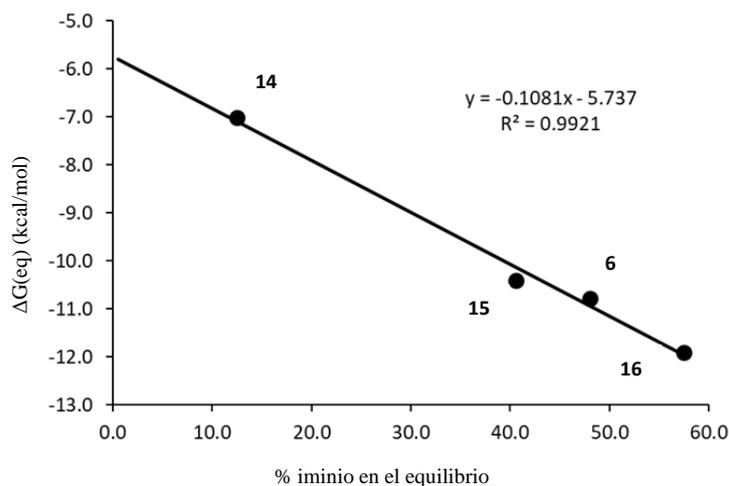


**Figura 3.19.** Equilibrio entre hemiaminal e iminio

**Tabla 3.6.** Cálculo de energías absolutas y relativas de HE e IM

|           | G(HE)        | G(IM·[OH <sup>-</sup> ]) | ΔG(eq) |
|-----------|--------------|--------------------------|--------|
| <b>6</b>  | -2991.792270 | -2991.809441             | -10.8  |
| <b>13</b> | -1644.606088 | -1644.609912             | -2.4   |
| <b>14</b> | -2318.201578 | -2318.212761             | -7.0   |
| <b>15</b> | -2858.239741 | -2858.256310             | -10.4  |
| <b>16</b> | -2502.659909 | -2502.678291             | -11.9  |

Si se representa la energía relativa ( $\Delta G(\text{eq})$ ) frente al % de iminio en el equilibrio obtenido experimentalmente, se observa una correlación lineal, que indica que la energía requerida para la formación del iminio debe ser superior a 5.7 kcal/mol. Por este motivo, la tiourea **13**, no es capaz de formar iminio, ya que la diferencia de energía entre el **HE** e **IM·[OH<sup>-</sup>]** es únicamente de 2.4 kcal/mol, lo cual resulta insuficiente, mientras que el resto de tioureas y escuramidias si superan esta cifra y siguen la misma tendencia que se observa al comparar con el  $\text{pK}_a$  de cada una de ellas (Figura 3.20).

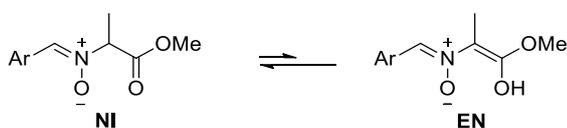


**Figura 3.20.** Dependencia lineal de la estabilidad relativa de los iones iminio formados por los distintos co-catalizadores y el % de iminio en el equilibrio

Por todos estos datos resulta evidente que las tioureas y escuaramidas estudiadas, en concreto la tiourea **6**, son capaces de promover la formación del ión iminio sin la ayuda de un co-catalizador ácido, que ha sido utilizado hasta la fecha para favorecer la eliminación del grupo hidroxilo del hemiaminal y obtener el correspondiente iminio.

### 3.4.3.2. Enolización de la nitrona y adición Michael

El siguiente paso del mecanismo de reacción, es la adición Michael de la nitrona (NI) al iminio generado (IM1). Como se ha comentado con anterioridad, para la reacción de cicloadición (3+2) de nitronas y aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, no es necesaria la presencia de una base que forme el correspondiente iluro de nitrona, por lo que la única alternativa posible es la formación de un enol de nitrona (EN) (Esquema 3.24).



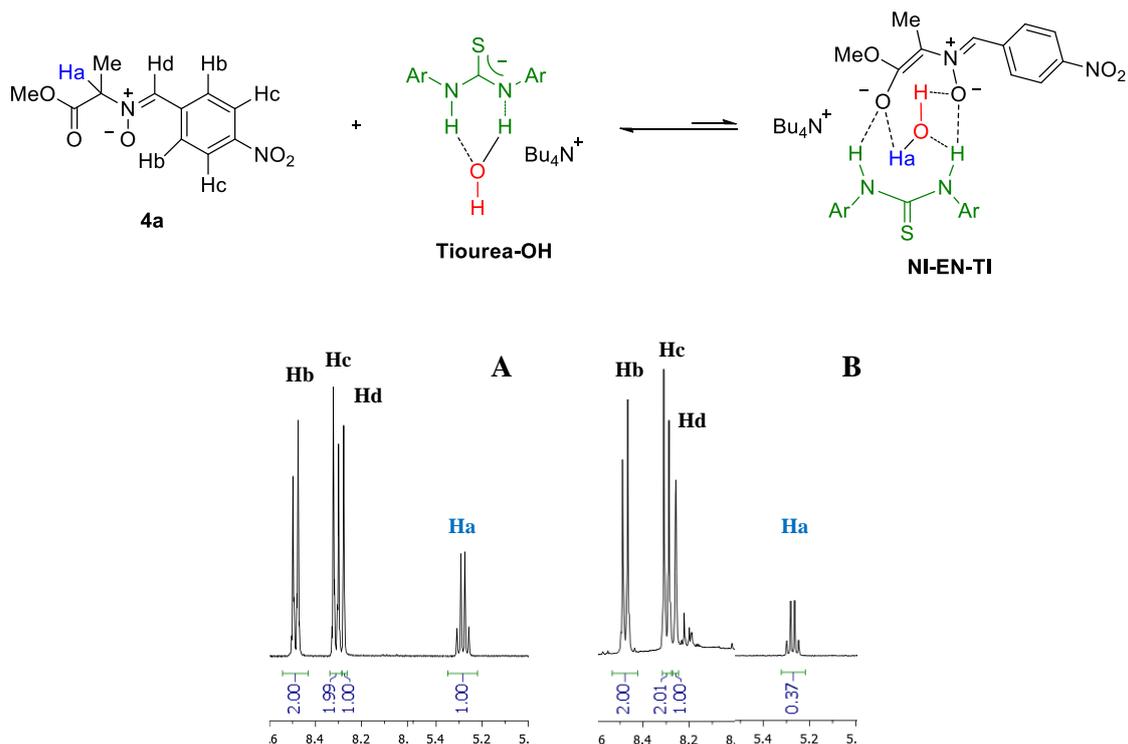
**Esquema 3.24.** Equilibrio de enolización de la nitrona

Para favorecer la formación del enol es necesaria la presencia del contraión que acompaña al iminio, es decir el complejo de **tiourea-OH**. Para poder realizar esta afirmación se llevaron a cabo diversas pruebas. En primer lugar se sintetizó y aisló el ion iminio **IM1**, siguiendo la metodología descrita por Hayashi y colaboradores, en la que emplean ácido perclórico para obtener el iminio con perclorato como contraión.<sup>58</sup>

Sobre una disolución de esta sal, en cloroformo deuterado, se añadió la correspondiente nitrona (**4a**) y tras 2 días, no se observó reacción alguna. La situación se repetía en caso de adicionar 1 equivalente de tiourea **6** a dicha mezcla. Tampoco se producía la reacción cuando se mezclaban catalizador (**5a**), aldehído (**2c**), nitrona (**4a**) y un co-catalizador ácido (ácido benzoico, acético, oxálico, trifluoroacético o clorhídrico). Estos resultados sugieren que no es necesaria únicamente una elevada concentración de ion iminio en la mezcla de reacción, sino que se requiere además de una activación adicional de la nitrona.

De hecho, cuando se añade sobre la mezcla de aldehído (**2c**), catalizador (**5a**) y nitrona (**4a**), el complejo resultante de la liofilización de una mezcla de tiourea con Bu<sub>4</sub>NOH en agua, la reacción transcurre con normalidad, de forma similar a lo descrito en la Tabla 3.4. Lo mismo ocurre cuando a la mezcla de perclorato de iminio, nitrona y tiourea se le añade Bu<sub>4</sub>NOH. Esto sugiere que la combinación de **tiourea-OH** es necesaria para el progreso de la reacción.

Con el fin de estudiar el efecto del complejo **tiourea-OH** sobre la nitrona se llevaron a cabo ciertos experimentos de <sup>1</sup>H RMN que corroboraban la formación de enol. Para ello se preparó el complejo de **tiourea-OH**, mezclando cantidades equimoleculares de tiourea **6** y de disolución acuosa 1M de Bu<sub>4</sub>NOH, agitando durante una hora y tras liofilizar el sólido obtenido, se añadieron 0.1 equivalentes del complejo sobre una disolución de nitrona (**4a**). Tal y como se observa en el espectro **B** de la Figura 3.21, se produce una disminución en la integración del protón Ha, respecto de la nitrona inicial (Figura 3.21, **A**), lo cual sugiere la formación de un equilibrio para formar el complejo denominado **NI-EN-TI** que aparece representado en la Figura 3.21.

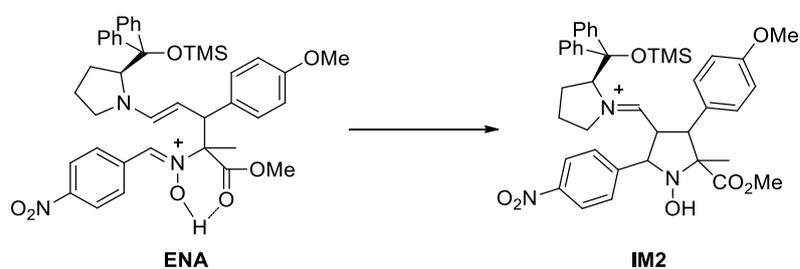


**Figura 3.21.** Enolización de la nitrona mediada por tiourea-OH

Estos resultados indican que la tiourea añadida juega un papel crucial en la reacción Michael, ya que es capaz de activar la nitrona mediante tautomería ceto-enólica, formando una especie (**NI-EN-TI**) que resulta crucial para el desarrollo de la reacción, como se demostrará más adelante por medio de herramientas computacionales.

### 3.4.3.3. Reacción de Mannich intramolecular

Finalmente, la reacción que genera el producto final (**12**), es una reacción de Mannich intramolecular (Esquema 3.25).



**Esquema 3.25.** Reacción Mannich intramolecular

Es conocido que este tipo de reacciones con nitronas requieren de la activación del carbono electrófilo de la nitrona.<sup>63</sup> A la vista de los resultados experimentales, todo apunta a que el complejo **tiourea-OH**, además de favorecer la enolización, puede activar la nitrona generando una red de puentes de hidrógeno como se muestra en la Figura 3.21 (**NI-EN-TI**). Por otro lado, también hay que considerar que, como se ha visto anteriormente en el análisis de los parámetros de Hammett (Tabla 3.5, Figura 3.10), la presencia de un grupo aromático aceptor en la nitrona, favorece la reacción probablemente porque supone el aumento en la electrofilia del átomo de carbono del grupo funcional nitrona.

El análisis del crudo de la reacción de catalizador **5a** (1 eq.), aldehído **2c** (1 eq.), nitrona **4a** (1eq.) y tiourea **6** (0.2 eq.) transcurridas 24 horas mediante (+)-ESI-MS, permitió observar iones cuya relación m/z es de 470.2672 y 722.3203. El ión con m/z 470.2672 se puede asociar a **IM1** y el de 722.3203 o bien con **ENA** o con **IM2**, los cuales aparecen representados en el ciclo catalítico propuesto (m/z calculadas: 470.2510 y 722.3256) y que se muestran en la Figura 3.22.

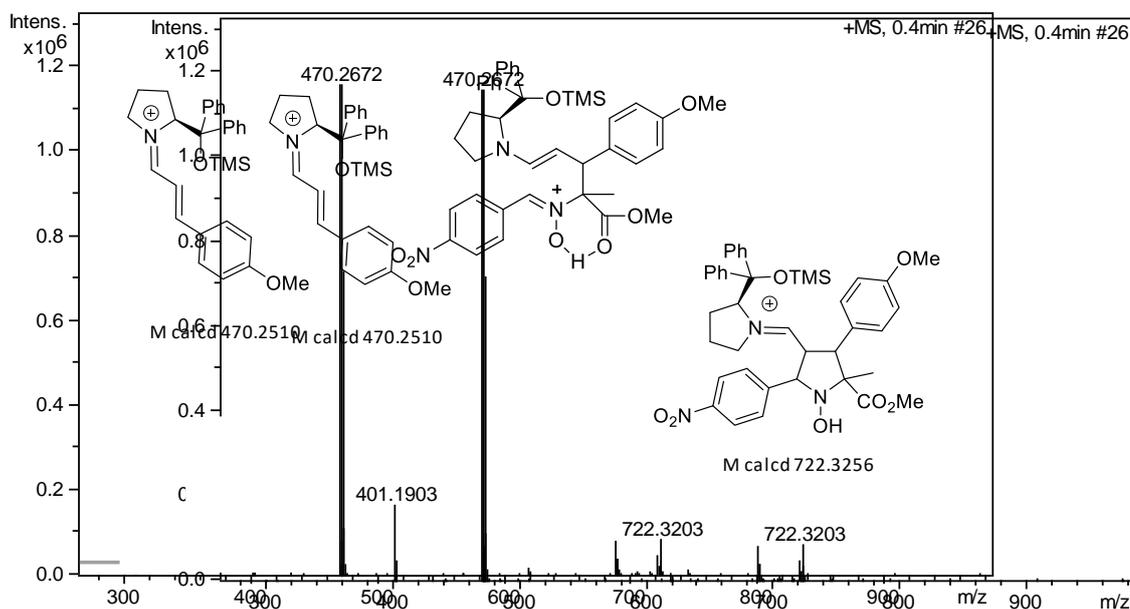


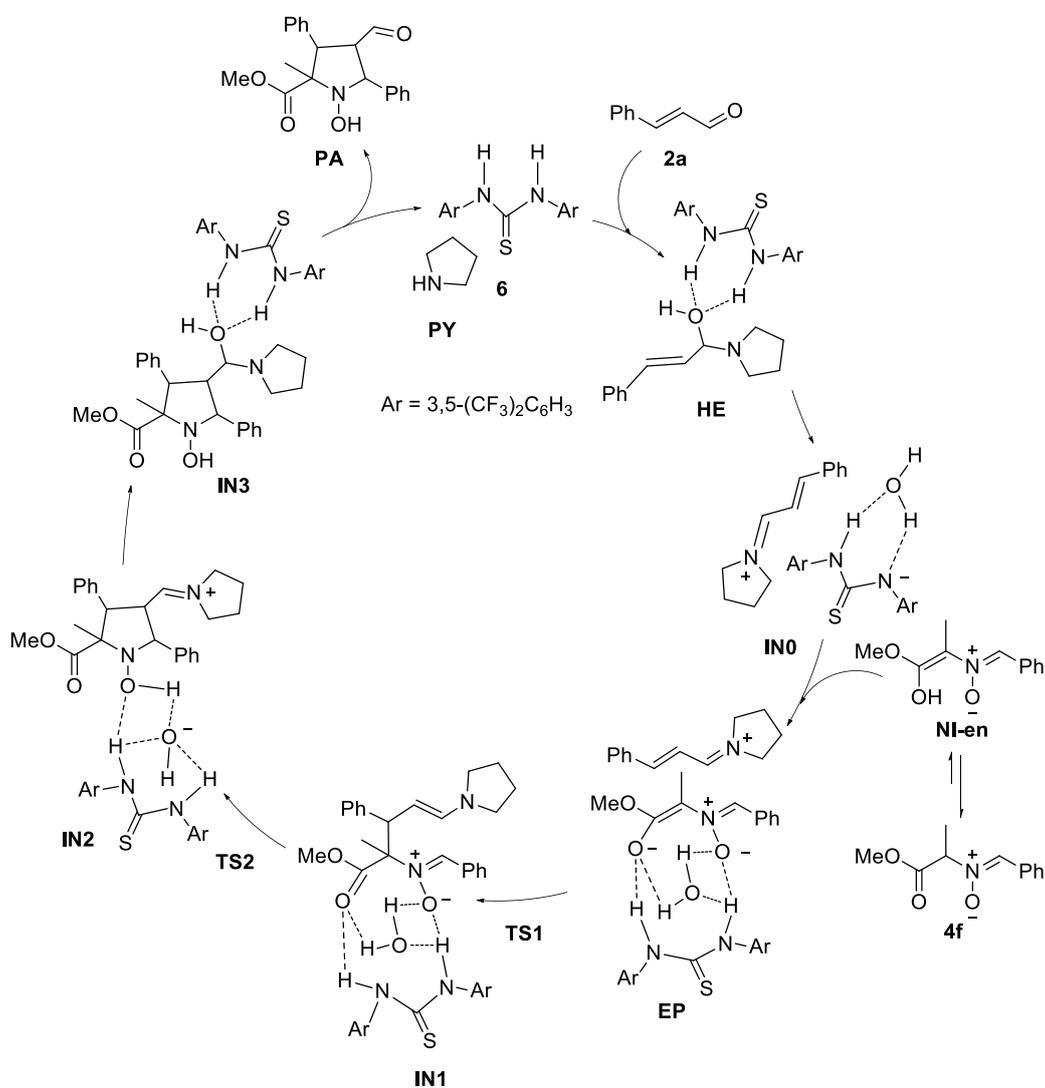
Figura 3.22. Espectro (+)-ESI-MS del crudo de reacción

### 3.4.4. Estudios computacionales

Para reafirmar nuestra hipótesis y precisar las especies involucradas en la reacción, se hizo uso de herramientas computacionales. Todos los cálculos realizados se llevaron a cabo en el programa Gaussian09, el funcional utilizado en la optimización de las

geometrías y las frecuencias de vibración es B3LYP y se incluyeron las correcciones de dispersión de Grimme (D3). Las configuraciones electrónicas de las moléculas se describen con las bases estándar split-valence def2SVP y las energías se calcularon con def2TZVP usando las geometrías optimizadas con def2SVP. Todos los cálculos se han realizado considerando como disolvente cloroformo con el modelo CPCM.

Para poder hacer cálculos más sencillos, se simplificaron las moléculas de estudio, considerando el catalizador como pirrolidina (**PY**) y un fenilo como sustituyente del aldehído conjugado **2a** y de la nitrona (**4f**). El ciclo catalítico obtenido de acuerdo con los cálculos computacionales aparece reflejado en la Figura 3.23.



**Figura 3.23.** Ciclo catalítico propuesto

El ciclo comienza con la formación del correspondiente hemiaminal **HE**, mediante la reacción del catalizador **PY** con el aldehído **2a**. La tiourea es capaz de formar enlaces

de hidrógeno con el grupo hidroxilo del **HE** y ayudar a eliminarlo para generar el correspondiente iminio, que forma un par iónico con el complejo **tiourea-OH (IN0)**. Este proceso se encuentra favorecido por una diferencia energética de 10.8 kcal/mol, de acuerdo con lo estudiado experimentalmente y aparece representado en el perfil energético del ciclo catalítico (Figura 3.24).

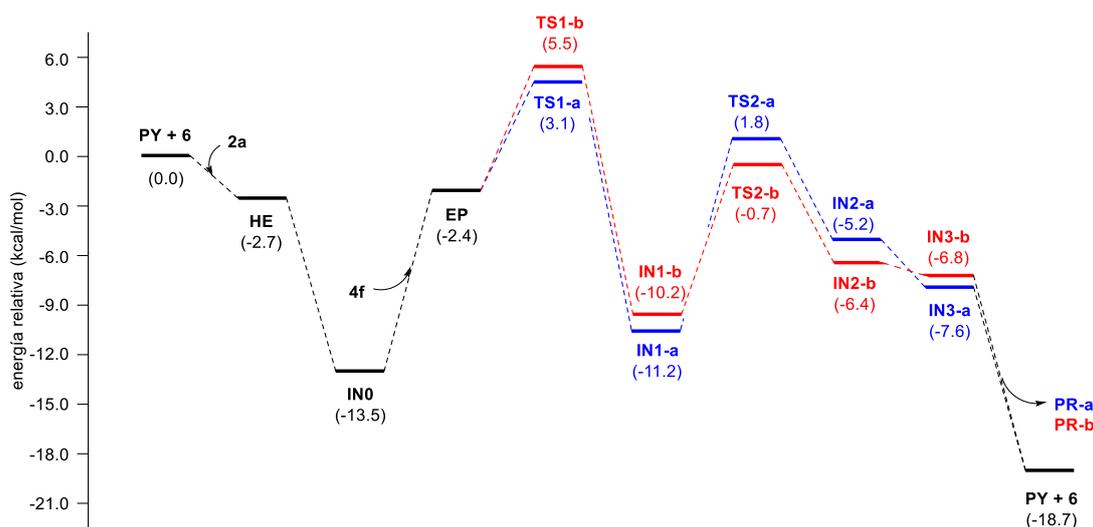


Figura 3.24. Perfil energético del ciclo catalítico

La alta estabilidad que presenta **IN0** es debida en parte a la presencia de interacciones de dispersión de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo aromático del iminio y uno de los anillos aromáticos de la tiourea tal y como puede observarse en la Figura 3.25.

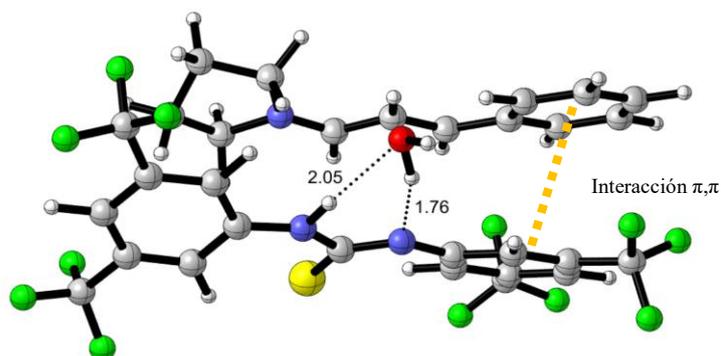
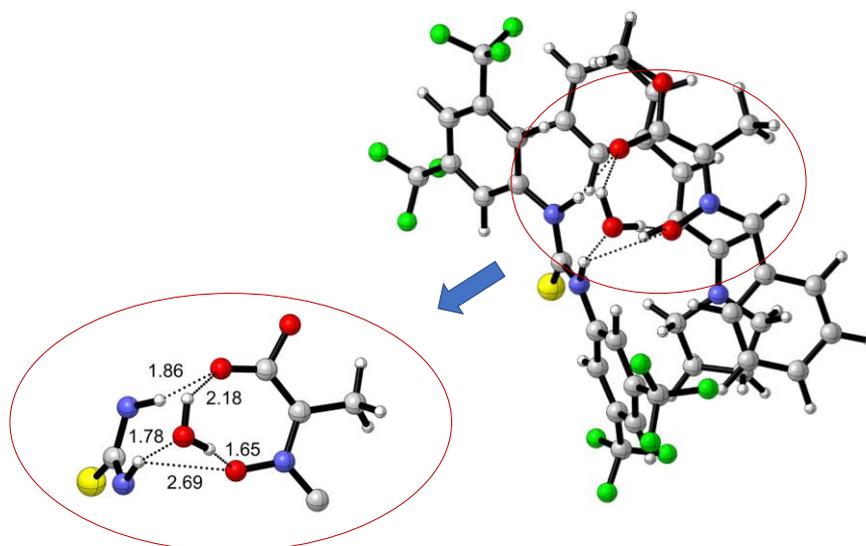


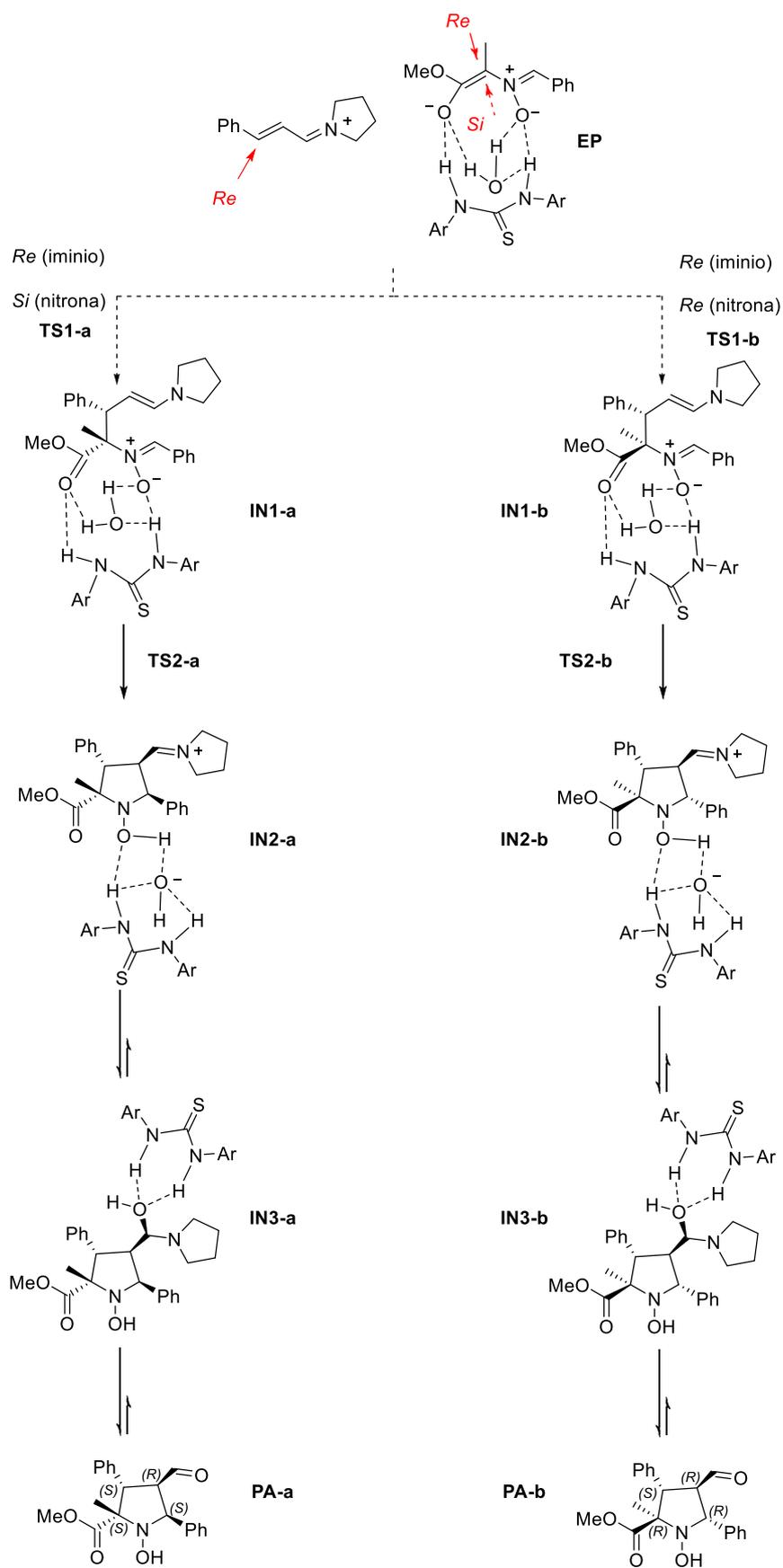
Figura 3.25. Interacciones de dispersión entre **IM** y **tiourea-OH**

El contraimiento del iminio, formado por el complejo **tiourea-OH**, favorece la enolización de la nitrona que se incorpora al ciclo catalítico para formar el “par de encuentro” (**EP**), en el que se forma una red de puentes de hidrógeno capaces de activar la nitrona para que se produzca la reacción Michael (Figura 3.26).



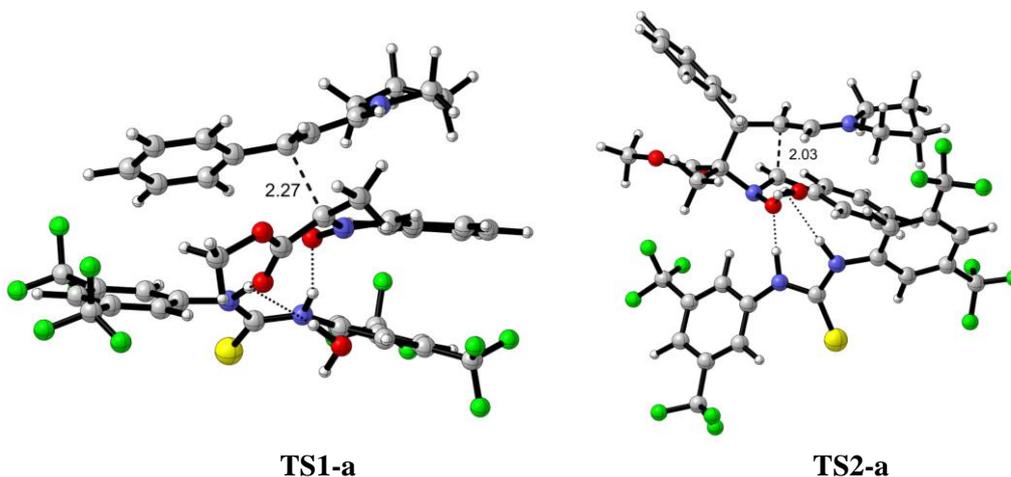
**Figura 3.26.** Red de puentes de hidrógeno en “par de encuentro” (**EP**)

Existen dos posibles aproximaciones de **EP** al iminio, que son las responsables de la obtención de dos diastereoisómeros. Se conoce que el catalizador **5a**, opera de acuerdo a un modelo estérico, particularmente cuando cataliza reacciones Michael, como es el caso. En consecuencia, únicamente se considera el ataque por la cara menos impedida del iminio, la cara *Re*. Una vez activada la nitrona en **EP** esta puede aproximarse al iminio por su cara *Re* o *Si* (Figura 3.27), dando lugar a dos posibles estados de transición **TS1-a**, si la aproximación es por la cara *Si* y **TS1-b** por la cara *Re*. Ambos estados de transición posibles para la reacción Michael se encuentran separados en energía por 2,4 kcal/mol (Figura 3.24) siendo de menor energía **TS1-a** y por lo tanto resulta favorable la formación de **IN1-a** que deriva en el diastereoisómero mayoritario de configuración (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*), lo cual, está de acuerdo con los resultados experimentales (Figura 3.28). El ataque por la cara *Re* de la nitrona, a través de **TS1-b**, conlleva a la formación del diastereoisómero minoritario (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*) (Figura 3.29).

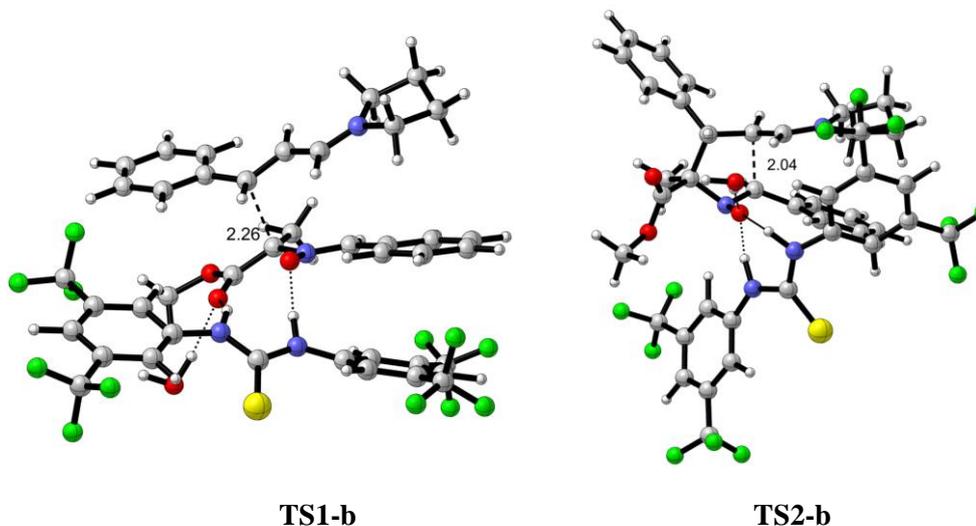


**Figura 3.27.** Rutas diastereotópicas para la formación del producto

Es necesario aclarar que para obtener los correspondientes **TS1-a** y **TS1-b**, se llevaron a cabo los cálculos de todas las posibles aproximaciones del iminio al “par de encuentro”, es decir, se debe tener en cuenta que el enol puede adoptar una conformación S o W. De todas las posibilidades, los **TS1-a** y **TS1-b**, se corresponden con las aproximaciones de mayor estabilidad por la cara *Si* y *Re* respectivamente.



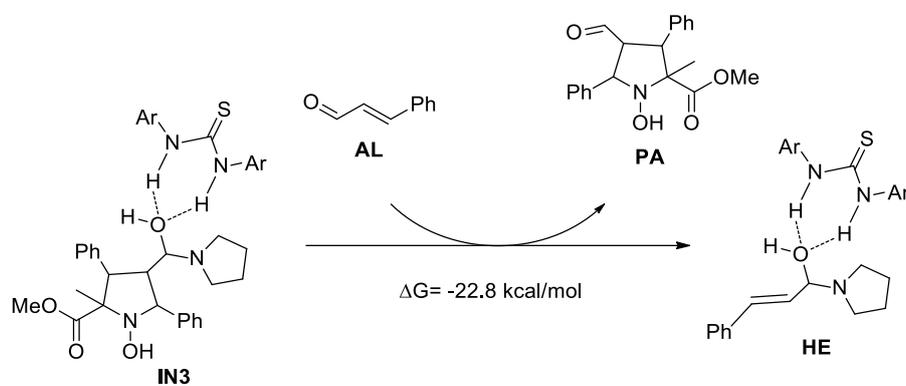
**Figura 3.28.** Estados de transición para el diastereoisómero mayoritario (*2S,3S,4R,5S*)



**Figura 3.29.** Estados de transición para el diastereoisómero minoritario (*2R,3S,4R,5R*)

Una vez que se ha producido la adición Michael (**IN1**), se produce la reacción Mannich intramolecular mediante el ataque de la enamina al carbono electrófilo de la nitrona que sigue activada por la presencia del complejo **tiourea-OH** a través de un estado de transición **TS2-a** localizado a 1.8 kcal/mol para el diastereoisómero mayoritario. Como resultado se obtiene un nuevo iminio (**IN2**). Este intermedio evoluciona al correspondiente hemiaminal (**IN3**) termodinámicamente favorecido por

una energía de 4,4 kcal/mol, en el caso del diastereoisómero mayoritario. A partir del hemiaminal, se recuperan las especies catalíticamente activas (**PY** y **6**) y el producto de la reacción (**PA**). La fuerza directriz del ciclo se corresponde con la regeneración del hemiaminal **HE** a partir de **IN3** y tiene un valor de  $\Delta G = -22.8$  kcal/mol (Figura 3.30).



**Figura 3.30.** Fuerza directriz del ciclo catalítico

### 3.5. Conclusiones

En el trabajo desarrollado se ha modificado la reactividad clásica de las nitronas como 1,3-dipolos frente a aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados. Es decir, en lugar de reactividad 1,3-C,O se ha promovido la reactividad 1,3-C,C, consiguiendo con ello la obtención de *N*-hidroxipirrolidinas quirales altamente sustituidas

La combinación de dos herramientas organocatalíticas, activación vía iminio junto con la activación mediante enlaces de hidrógeno, ha permitido modificar dicha reactividad e inducir quiralidad.

Esta metodología es aplicable a nitronas enolizables aromáticas con grupos atractores que estabilizan el enol que se forma e incrementan la electrofilia del carbono de la nitrona. Por el contrario, la preferencia de los sustituyentes del aldehído conjugado son grupos dadores. Esta tendencia indica que la reacción de cicloadición transcurre mediante un mecanismo por pasos.

El principal problema de esta metodología es que la diastereoselectividad del proceso no es muy elevada.

Las *N*-hidroxipirrolidinas obtenidas mediante esta metodología resultan ser potenciales “*chiral building blocks*” lo cual los hace muy interesantes en síntesis orgánica para la construcción de nuevas moléculas más complejas.

La reacción de cicloadición tiene lugar a través de un enol de nitrona intermedio, y no con la formación de un iluro como inicialmente se había supuesto.

La participación de tiourea en el proceso es fundamental en las etapas de formación de iminio, enolización de la nitrona y activación de la misma en la reacción de tipo Mannich.

Se ha determinado que la actividad de la tiourea frente a la formación de iminio está directamente relacionada con su valor de  $pK_a$  y que cuanto más ácida es mayor es la proporción de iminio.

### 3.6. Experimental Section.

#### General Methods.

**Miscellaneous:** Analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. Anhydrous solvents were purified and dried with activated molecular sieves prior to use. For reactions carried out under inert conditions, the argon was previously dried through a column of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and a column of KOH and CaCl<sub>2</sub>. All the glassware was dried for 12 hours prior to use in an oven at 140°C, and allowed to cool under a dehumidified atmosphere.<sup>3</sup> Reactions were monitored using analytical thin layer chromatography (TLC), in pre-coated silica-backed plates (Merck Kieselgel 60 F254). These were visualized by ultraviolet irradiation, permanganate potassium or *p*-anisaldehyde dips.<sup>4</sup> For flash chromatography Silicycle 40-63, 230-400 mesh silica gel was used.<sup>5</sup> For the removal of solvents under reduced pressure Büchi R-210 rotary evaporators were used.

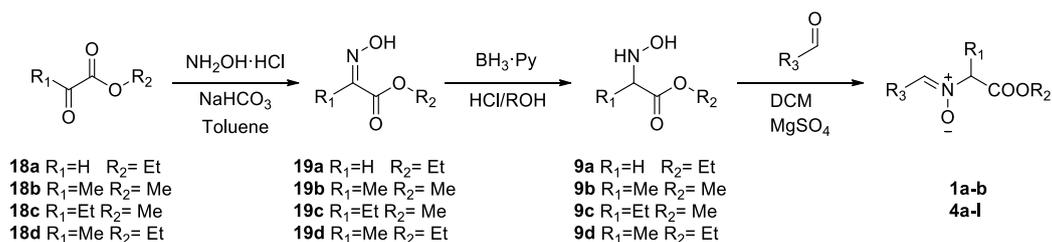
**NMR:** <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR were acquired at 25°C on Bruker AC-300 spectrometer 300 MHz or Bruker Avance 400MHz or AVANCE II 300 MHz instruments in the stated solvent. Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to residual solvent signals. NMR assignments were using standard 2D experiments.

**HRMS:** High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a QToF spectrometer equipped with an ESI (electrospray ionization) source (microTOF-Q, Bruker Daltonik) using sodium formate as external reference.

**HPLC:** High performance liquid chromatography on a chiral stationary phase was performed in a Waters 2695 chromatograph coupled to a Waters 2998 photodiode array detector. Daicel Chiralpak *AD-H*, *IA*, *IC*, *OD-H* columns (0.46 cm x 25 cm) were used; specific conditions are indicated for each case.

**X-ray** data collections were performed in an Agilent Supernova diffractometer equipped with an Atlas CCD area detector, and a CuKα micro-focus source with multilayer optics (λ = 1.54184Å, 250μm FWHM beam size). The sample was kept at 120 K with a Oxford Cryosystems Cryostream 700 cooler. The quality of the crystals was checked under a polarizing microscope, and a suitable crystal or fragment was mounted on a Mitegen Micromount<sup>TM</sup> using Paratone N inert oil and transferred to the diffractometer.

## General procedure A to obtain acyclic nitrones 1a-b, 4a-l.



To a stirred solution of the corresponding 2-(oxo)ester (**18a-d**) (42.9 mmol) in toluene (75 mL), hydroxylamine hydrochloride (42.9 mmol) and sodium bicarbonate (85.8 mmol) were added. The resulting suspension was stirred at ambient temperature for 16 h and then filtered. The filtrate is concentrated under reduced pressure and the crude product was dissolved in dichloromethane. The resulting solution was washed with brine. The organic layer was separated, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give the corresponding pure oxime, which was used in the next step without further purification.

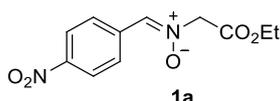
**18a** (4.67 g, 39.9 mmol) was obtained as yellow oil (Yield: 93%), **18b** (4.52 g, 38.6 mmol) was obtained as pale yellow oil (Yield: 90%). **18c** (5.17 g, 39.4 mmol) was isolated as yellow oil (Yield: 92%). **18d** (5.29 g, 40.3 mmol) was obtained as yellow oil (Yield: 94%).<sup>64-66</sup>

To a well-stirred solution of the corresponding oxime (**19a-d**) (27.0 mmol) in the suitable alcohol, depending on the substituent of the carboxylate, ROH (50 mL), cooled to 0 °C, borane-pyridine complex (135 mmol) was added slowly. When the addition finished, 7N HCl/ROH solution (270 mmol) were added dropwise at which time the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. The solvent was evaporated under reduced pressure without exceeding 40 °C and the residue is dissolved in dichloromethane. Solid sodium carbonate was added until gas evolution stopped. The salts were filtered off and the filtrate was evaporated to yield the corresponding pure hydroxylamine, which was used in the next step without further purification.

**9a** (2.89 g, 24.3mmol) was obtained as yellow oil (Yield: 90%), **9b** (3.1 g, 25.6 mmol) was obtained as pale yellow oil (Yield: 95%). **9c** (3.4 g, 25.4 mmol) was isolated as yellow oil (Yield: 94%). **9d** (3.5 g, 25.9 mmol) was obtained as yellow oil (Yield: 96%).<sup>67-69</sup>

To a well-stirred solution of the corresponding hydroxylamine (**9a-d**) (8.36 mmol) in dichloromethane (10 mL), magnesium sulfate (41.8 mmol) and the corresponding aldehyde (**8a-k**) (8.36 mmol) were added and the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 6 h. The solid was filtered off and the filtrate evaporated to yield the crude product which was purified by column chromatography (gradient Hexane/EtOAc 80:20 to EtOAc).

**(Z)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine oxide (1a).**



Following the general procedure **A**, **1a** (1.93 g, 7.69 mmol) was isolated as a yellow solid.

Yield: 96%. m.p. 114-116 °C.

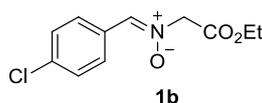
$R_f$  = 0.25; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.28 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.76 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 7.58 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 8.28-8.22 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.44-8.38 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.9 ( $\text{CH}_2$ ), 69.1 ( $\text{CH}_2$ ), 124.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 135.1 ( $\text{CH=N}$ ), 136.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 165.7 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 52.38; H, 4.80; N, 11.11. Found C, 52.40; H, 4.76; N, 11.25

**(Z)-1-(4-chlorophenyl)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)methanimine oxide (1b).**



Following the general procedure **A**, **1b** (1.90 g, 7.86 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 94%. m.p. 76-78 °C.

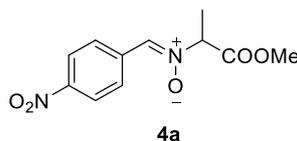
$R_f$  = 0.21; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.27 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.37-7.47 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.41 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 8.17-8.26 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.7 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 68.7 ( $\text{CH}_2$ ), 129.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 135.6 ( $\text{CH=N}$ ), 136.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 166.0 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ : C, 54.67; H, 5.01; Cl, 14.67; N, 5.80. Found C, 54.63; H, 5.09; Cl, 14.65; N, 5.80

**(Z)-N-(1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine oxide (4a).**



Following the general procedure **A**, **4a** (2.05g, 8.13 mmol) was isolated as a yellow solid. Yield: 97%. m.p. 150-152 °C.

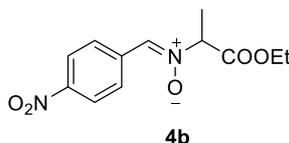
$R_f$  = 0.24; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.74 (d, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.85 (q, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.62 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8.19-8.32 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.34-8.49 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.7 ( $\text{CH}_3$ ), 53.4 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 72.4 ( $\text{CH}$ ), 124.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.3 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 136.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 168.3 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 52.38; H, 4.80; N, 11.11. Found C, 52.04; H, 4.92; N, 11.15.

**(Z)-1-ethoxy-N-(4-nitrobenzylidene)-1-oxopropan-2-amine oxide (4b).**



Following the general procedure **A**, **4b** (2.14 g, 8.03 mmol) was isolated as a yellow solid. Yield: 96%. m.p. 139-141 °C.

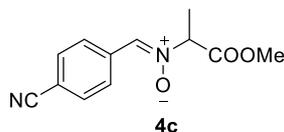
$R_f$  = 0.27; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.28 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.79 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.18-4.34 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.83 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.60 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8.20-8.30 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.35-8.45 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.9 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 15.6 ( $\text{CH}_3$ ), 62.5 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 74.0 ( $\text{CH}$ ), 123.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 135.7 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 147.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 167.4 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 54.13; H, 5.30; N, 10.52. Found C, 54.11; H, 5.36; N, 10.49.

**(Z)-N-(1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)-1-(4-cyanophenyl)methanimine oxide (4c)**



Following the general procedure **A**, **4c** (1.88 g, 8.03 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 96%. m.p. 144-146 °C.

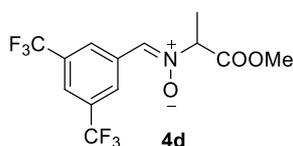
$R_f = 0.36$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.74 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.82 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.56 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.64-7.78 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.28-8.41 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.7 ( $\text{CH}_3$ ), 53.4 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 74.1 ( $\text{CH}$ ), 118.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.5 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 134.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 168.4 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 62.06; H, 5.21; N, 12.06. Found C, 61.98; H, 5.32; N, 12.00.

**(Z)-N-(3,5-bistrifluoromethyl)benzylidene-1-methoxy-1-oxopropan-2-amine oxide (4d).**



Following the general procedure **A**, **4d** (2.58 g, 7.52 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 90%. m.p. 138-140 °C.

$R_f = 0.58$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

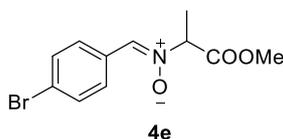
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.78 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.87 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.71 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.86 (s, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.74 (s, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.4 ( $\text{CH}_3$ ), 53.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 73.7 ( $\text{CH}$ ), 123.0 (q,  $J=272.8$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 123.5 (m,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.1 (m,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 131.9 (q,  $J=33.6$  Hz,  $\text{C}-\text{CF}_3$ ), 132.6 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 167.8 ( $\text{CO}$ ).

$^{19}\text{F NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -61.5 ppm.

Anal Calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_6\text{NO}_3$ : C, 45.59; H, 3.23; F, 33.21; N, 4.08. Found C, 49.50; H, 3.30; F, 33.26; N, 4.00.

**(Z)-N-(1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)-1-(4-bromophenyl)methanimine oxide (4e).**



Following the general procedure **A**, **4e** (2.33g, 8.19 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 98%. m.p. 138-140 °C.

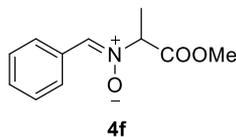
$R_f = 0.43$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.72 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.76 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.46 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.52-7.63 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.11-8.17 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.7 ( $\text{CH}_3$ ), 53.3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 73.7 ( $\text{CH}$ ), 124.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.9 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 168.6 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$ : C, 46.18; H, 4.23; Br, 27.93; N, 4.90. Found C, 46.11; H, 4.35; Br, 27.90; N, 4.87.

**(Z)-N-(1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)-1-phenylmethanimine oxide (4f).**



Following the general procedure **A**, **4f** (1.66 g, 8.02 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 96%. m.p. 116-118 °C.

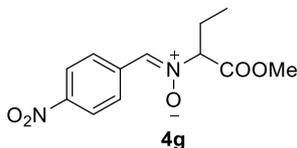
$R_f$  = 0.24; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.73 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.77 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.41-7.46 (m, 3H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.48 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8.18-8.29 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.7 ( $\text{CH}_3$ ), 53.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 73.4 ( $\text{CH}$ ), 128.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 134.9 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 153.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 168.8 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ : C, 63.76; H, 6.32; N, 6.76. Found C, 63.71; H, 6.41; N, 6.74.

**(Z)-N-(1-methoxy-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine oxide (4g).**



Following the general procedure **A**, **4g** (2.16 g, 8.10 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 97%. m.p. 146-148 °C.

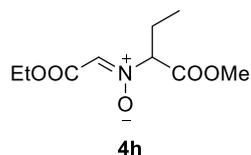
$R_f$  = 0.50; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.00 (t, 3H,  $J=7.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2.14 (dq, 1H,  $J=14.8$  Hz,  $J=7.4$  Hz,  $J=5.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.30 (ddq, 1H,  $J=14.8$  Hz,  $J=9.9$  Hz,  $J=7.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.58 (dd, 1H,  $J=9.9$  Hz,  $J=5.1$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.64 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8.20-8.29 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.41-8.46 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  10.3 ( $\text{CH}_3$ ), 23.0 ( $\text{CH}_2$ ), 53.3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 80.4 ( $\text{CH}$ ), 124.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 134.1 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 136.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 167.8 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 54.13; H, 5.30; N, 10.52. Found C, 54.06; H, 8.38; N, 10.45.

**2-ethoxy-N-(1-methoxy-1-oxobutan-2-yl)-2-oxoethan-1-imine oxide (4h).**



Following the general procedure **A**, **4h** (1.45 g, 6.69 mmol) was isolated as colorless oil.  
Yield: 80%. Mixture of isomers E/Z (2:1)

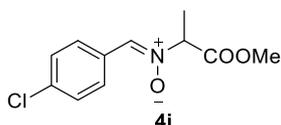
$R_f = 0.42$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.94 (t, 3H,  $J=7.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.98 (t, 3H,  $J=7.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.29 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.97-2.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.73 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.24 (q, 4H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4.45 (dd, 1H,  $J=9.6$  Hz,  $J=5.3$  Hz, CH), 6.44 (dd, 1H,  $J=9.2$  Hz,  $J=5.3$  Hz, CH), 7.16 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.31 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  9.9 ( $\text{CH}_3$ ), 10.0 ( $\text{CH}_3$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$ ), 52.9 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 53.1 (O- $\text{CH}_3$ ), 61.1 ( $\text{CH}_2$ ), 61.9 ( $\text{CH}_2$ ), 73.5 (CH), 81.0 (CH), 127.7 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 129.1 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 159.8 (CO), 161.2 (CO), 167.1 (CO), 167.3 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_5$ : C, 49.76; H, 6.96; N, 6.45. Found C, 49.71; H, 7.00; N, 6.38.

**(Z)-N-(4-chlorobenzylidene)-1-methoxy-1-oxopropan-2-amine oxide (4i).**



Following the general procedure **A**, **4i** (1.89 g, 7.86 mmol) was isolated as a white solid.  
Yield: 94%. m.p. 133-135 °C.

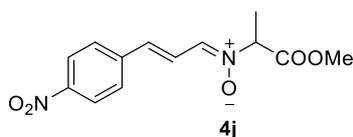
$R_f = 0.50$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.78 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.77 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz, CH), 7.36-7.41 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.46 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8.19-8.23 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.6 ( $\text{CH}_3$ ), 53.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 73.2 (CH), 128.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.8 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 130.0 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 134.1 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 136.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 168.3 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ : C, 54.67; H, 5.00; Cl, 14.67; N, 5.80. Found C, 54.61; H, 5.12; Cl, 14.60; N, 5.74.

**(Z)-1-methoxy-N-((E)-3-(4-nitrophenyl)allylidene)-1-oxopropan-2-amine oxide (4j).**



Following the general procedure **A**, **4j** (2.16 g, 7.77 mmol) was isolated as a yellow solid. Yield: 93%.

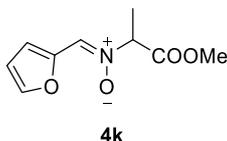
$R_f = 0.20$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.69 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.70 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 7.17 (d, 1H,  $J=15.9$  Hz, Ar- $\text{CH}=\text{CH}$ ), 7.40-7.57 (m, 2H, Ar- $\text{CH}=\text{CH}$ ,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.65-7.70 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.13-8.26 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.6 ( $\text{CH}_3$ ), 53.3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 72.3 ( $\text{CH}$ ), 122.4 (Ar- $\text{CH}=\text{CH}$ ), 124.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 135.4 (Ar- $\text{CH}=\text{CH}$ ), 136.2 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 143.0 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 148.0 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 168.6 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 56.11; H, 5.07; N, 10.07. Found C, 56.08; H, 5.10; N, 10.00.

**(Z)-N-(furan-2-ylmethylene)-1-methoxy-1-oxopropan-2-amine oxide (4k).**



Following the general procedure **A**, **4k** (1.57 g, 7.94 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 95%.

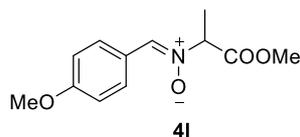
$R_f = 0.50$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.69 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.79 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 6.57 (ddd, 1H,  $J=3.5$  Hz,  $J=1.8$  Hz,  $J=0.7$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.54 (dd, 1H,  $J=1.8$  Hz,  $J=0.7$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.72 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.74 (dt, 1H,  $J=3.5$  Hz,  $J=0.7$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.5 ( $\text{CH}_3$ ), 53.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 71.8 ( $\text{CH}$ ), 112.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 115.6 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 125.9 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 144.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 147.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 168.7 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$ : C, 54.82; H, 5.62; N, 7.10. Found C, 54.80; H, 5.64; N, 7.12.

**(Z)-N-(1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)-1-(4-methoxyphenyl)methanimine oxide (4l)**



Following the general procedure **A**, **4l** (1.88 g, 7.94 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 95%. m.p. 120-122 °C.

$R_f$  = 0.24; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.71 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.76 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.72 (q, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}$ ), 6.86-7.01 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.40 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8.11-8.34 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  15.6 ( $\text{CH}_3$ ), 53.2 ( $\text{O}-\text{CH}_3$ ), 55.7 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 72.9 ( $\text{CH}$ ), 114.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 134.5 ( $\text{CH}=\text{N}$ ), 161.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 169.0 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ : C, 60.75; H, 6.37; N, 5.90. Found C, 60.65; H, 6.50; N, 5.74.

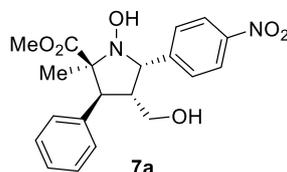
**General Procedure B to obtain 1-Hydroxypyrrolidine Adducts 7a-r, 7t-u.** The corresponding nitrone **4a-d**, **4f-g** (0.20 mmol), 1,3-bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)thiourea **6** (0.04 mmol) and triethylamine (0.04 mmol) were added to a solution of (2*S*)-2-[diphenyl[(trimethylsilyl)oxy]methyl]pyrrolidine **5a** (0.04 mmol) and the corresponding  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde **2a-l** (0.24 mmol) in dry chloroform (0.4 mL) in a screw capped vial equipped with a magnetic stirring bar. The reaction mixture was stirred at room temperature, until achievement of full conversion. The crude reaction mixture was concentrated and redissolved in dry dichloromethane (2 mL) and  $\text{NaBH}_4$  (0.80 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 4 hours, then 4 mL of water were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (*n*-Pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  1:1 to 3:7) to afford pure alcohols **7a-r**, **7t-u**.

**General Procedure C to obtain 1-Hydroxypyrrolidine Adducts 7s, 7v.** According to general procedure **B** but using the corresponding nitrone **4e**, **4h** (0.40 mmol), 1,3-bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)thiourea **6** (0.20 mmol), triethylamine (0.20 mmol), (2*S*)-2-[diphenyl[(trimethylsilyl)oxy]methyl]pyrrolidine **5a** (0.04 mmol) and the aldehyde **2c** (0.20 mmol) in dry chloroform (0.4 mL).

**General Procedure D to obtain 1-Hydroxypyrrolidine Adducts 11a-c.** The corresponding nitrone **1a-b** (0.20 mmol) and 1,3-bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)thiourea **6** (0.04 mmol) were added to a solution of (2*S*)-2-[diphenyl[(trimethylsilyl)oxy]methyl]pyrrolidine **5a** (0.04 mmol) and the corresponding  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde **2a, 2c** (0.20 mmol) in dry chloroform (0.4 mL) in a screw capped vial equipped with a magnetic stirring bar. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours. To the crude reaction mixture NaBH<sub>4</sub> (0.80 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 4 hours, then 4 mL of water were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (*n*-Pentane or Hexane/Et<sub>2</sub>O 1:1 to 3:7) to afford pure alcohols **11a-c**.

The racemic standards in order to find HPLC separation conditions were prepared using a mixture of enantiomers of catalyst **5a** (*R* and *S*).

**Methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (**7a**).**



Following the general procedure **B**, **7a** (71 mg, 0.18 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 92%. d.r. 5:1.

R<sub>f</sub> = 0.40; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.29\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.06 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.10-3.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.40 (tdd, *J* = 11.0, 6.8, 4.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.74\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 4.63\* (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 4.95 (s, 1H, NOH), 5.01\* (s, 1H, NOH), 5.36 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.19-7.37 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.77\* (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD) (\* denotes minor diastereomer resonances)  $\delta$  10.6\* (CH<sub>3</sub>C), 22.4 (CH<sub>3</sub>C), 45.3\* (C<sub>4</sub>), 46.5 (C<sub>4</sub>), 51.7 (C<sub>3</sub>), 52.7\* (C<sub>3</sub>), 52.8\* (CH<sub>3</sub>O), 55.5 (CH<sub>3</sub>O), 62.6 (CH<sub>2</sub>OH), 62.8\* (CH<sub>2</sub>OH), 68.8\* (C<sub>5</sub>), 71.0 (C<sub>5</sub>), 74.9\* (C<sub>2</sub>), 76.5 (C<sub>2</sub>), 123.7 (C<sub>Ar</sub>), 128.4\* (C<sub>Ar</sub>), 128.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.3\* (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 130.0\*

(C<sub>Ar</sub>), 131.1\* (C<sub>Ar</sub>), 131.1 (C<sub>Ar</sub>), 138.2 (C<sub>Ar</sub>), 138.6\* (C<sub>Ar</sub>), 148.3 (C<sub>Ar</sub>), 148.4\* (C<sub>Ar</sub>), 149.1\* (C<sub>Ar</sub>), 150.3 (C<sub>Ar</sub>), 173.8 (CO), 176.1\* (CO).

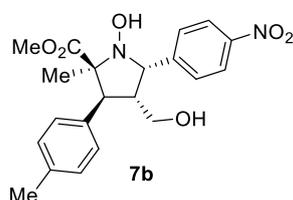
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +29.7).

Anal Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: C, 62.17; H, 5.74; N, 7.25. Found C, 62.15; H, 5.70; N, 7.29.

HRMS: Calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 409.1370 (M<sup>+</sup>+Na); found: 409.1369.

The ee (98%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [hexane/*i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min; τ<sub>minor</sub>=39.84 min, τ<sub>major</sub>=106.77 min.

**Methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-(*p*-tolyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7b).**



Following the general procedure **B**, **7b** (67 mg, 0.17 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 84%. d.r. 6:1.

R<sub>f</sub> = 0.45; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances) δ 1.28\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.33 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.34\* (s, *J* = 1.8 Hz, 3H, C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.01 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, *H*<sub>3</sub>), 3.04-3.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.29-3.44 (m, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.73\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 4.60\* (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub>), 5.01 (s, 1H, NOH), 5.07\* (s, 1H, NOH), 5.33 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub>), 7.10-7.16 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.75\* (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* denotes minor diastereomer resonances) δ 11.0\* (CH<sub>3</sub>C), 21.2 (CH<sub>3</sub>C), 21.8 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 45.2\* (C<sub>4</sub>), 45.8 (C<sub>4</sub>), 50.5\* (C<sub>3</sub>), 51.7 (C<sub>3</sub>), 52.4\* (CH<sub>3</sub>O), 53.8 (CH<sub>3</sub>O), 62.2 (CH<sub>2</sub>OH), 62.4\* (CH<sub>2</sub>OH), 67.9\* (C<sub>5</sub>), 70.1 (C<sub>5</sub>), 73.3\* (C<sub>2</sub>), 75.3 (C<sub>2</sub>), 123.5 (C<sub>Ar</sub>), 123.5\* (C<sub>Ar</sub>), 128.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.1\* (C<sub>Ar</sub>), 129.3\* (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 133.0 (C<sub>Ar</sub>), 133.7\* (C<sub>Ar</sub>), 137.6\* (C<sub>Ar</sub>), 137.9 (C<sub>Ar</sub>), 147.0\* (C<sub>Ar</sub>), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 148.3 (C<sub>Ar</sub>), 172.3 (CO), 174.5\* (CO).

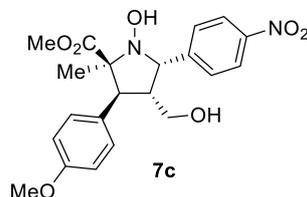
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +30.2).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: C, 62.99; H, 6.04; N, 7.00. Found C, 63.00; H, 6.03; N, 7.03.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 423.1527 (M<sup>+</sup>+Na); found: 423.1533.

The ee (99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak OD-3* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=20.90$  min,  $\tau_{\text{major}}=54.59$  min.

**Methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7c).**



Following the general procedure **B**, **7c** (71 mg, 0.17 mmol) was isolated as yellow oil. 48h. Yield: 85%. d.r. 6:1.

$R_f=0.41$ ; *n*-Pentane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.28\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.99 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.06-3.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.34 (tdd,  $J = 11.1, 6.9, 4.5$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.73\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.79 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.80\* (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 4.60\* (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 4.97 (s, 1H, NOH), 5.03\* (s, 1H, NOH), 5.33 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.85 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.16 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.70 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.75\* (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.22 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* denotes minor diastereomer resonances)  $\delta$  10.9\* (CH<sub>3</sub>C), 21.8 (CH<sub>3</sub>C), 45.3\* (C<sub>4</sub>), 45.9 (C<sub>4</sub>), 50.1\* (C<sub>3</sub>), 51.7 (C<sub>3</sub>), 52.4\* (CH<sub>3</sub>O), 53.4 (CH<sub>3</sub>O), 55.4 (C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 62.2 (CH<sub>2</sub>OH), 62.4\* (CH<sub>2</sub>OH), 67.8\* (C<sub>5</sub>), 70.0 (C<sub>5</sub>), 73.2\* (C<sub>2</sub>), 75.3 (C<sub>2</sub>), 113.9\* (C<sub>Ar</sub>), 114.2 (C<sub>Ar</sub>), 123.5 (C<sub>Ar</sub>), 123.6\* (C<sub>Ar</sub>), 128.0 (C<sub>Ar</sub>), 129.4\* (C<sub>Ar</sub>), 129.5\* (C<sub>Ar</sub>), 129.6\* (C<sub>Ar</sub>), 130.3 (C<sub>Ar</sub>), 147.0\* (C<sub>Ar</sub>), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 147.5\* (C<sub>Ar</sub>), 148.3 (C<sub>Ar</sub>), 159.2\* (C<sub>Ar</sub>), 159.4 (C<sub>Ar</sub>), 172.3 (CO), 174.5\* (CO).

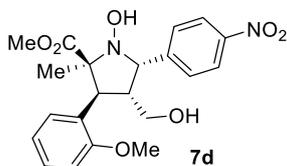
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +31.2).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 60.57; H, 5.81; N, 6.73. Found C, 60.54; H, 5.80; N, 6.72.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 439.1476 (M<sup>+</sup>+Na); found: 439.1476.

The ee (>99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=53.17$  min,  $\tau_{\text{major}}=112.73$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(2-methoxyphenyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7d).**



Following the general procedure **B**, **7d** (60 mg, 0.14 mmol) was isolated as yellow oil. 48h. Yield: 72%. d.r. 4:1.

$R_f = 0.40$ ; *n*-Pentane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances) δ 1.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.57\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.09-3.18 (m, 3H, H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH), 3.24-3.37 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 3.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.76\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.79\* (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 4.96\* (s, 1H, NOH), 5.02 (s, 1H, NOH), 5.35 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.86-6.98 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.19-7.31 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 22.2 (CH<sub>3</sub>C), 44.9 (C<sub>4</sub>), 45.9 (C<sub>3</sub>), 51.6 (CH<sub>3</sub>O), 55.6 (C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 62.5 (CH<sub>2</sub>OH), 70.2 (C<sub>5</sub>), 75.5 (C<sub>2</sub>), 110.9 (C<sub>Ar</sub>), 120.7 (C<sub>Ar</sub>), 123.5 (C<sub>Ar</sub>), 124.8 (C<sub>Ar</sub>), 127.9 (C<sub>Ar</sub>), 128.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 148.3 (C<sub>Ar</sub>), 158.1 (C<sub>Ar</sub>), 172.8 (CO).

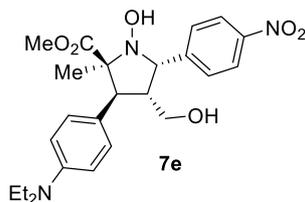
$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +22.9).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 60.57; H, 5.81; N, 6.73. Found C, 60.55; H, 5.82; N, 6.70.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 439.1476 (M<sup>+</sup>+Na); found: 439.1467.

The ee (94%) was determined by HPLC using a *Chiralpak OD-3* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 22.14$  min,  $\tau_{\text{major}} = 85.38$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-3-(4-(diethylamino)phenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7e).**



Following the general procedure **B**, **7e** (68 mg, 0.15 mmol) was isolated as yellow oil. 48 h. Yield: 74%. d.r. 2:1.

$R_f = 0.35$ ; *n*-Pentane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.07-1.22 (m, 6H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.29\* (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.54 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2.89 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 2.93-3.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.26-3.40 (m, 5H,  $H_4$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3.58 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.73\* (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.58\* (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 4.97 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.04\* (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.30 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 6.55-6.64 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 6.99-7.09 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.75\* (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (\* denotes minor diastereomer resonances)  $\delta$  10.9\* ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 12.7 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 21.8 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 44.4 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 45.3\* ( $\text{C}_4$ ), 45.9 ( $\text{C}_4$ ), 50.2\* ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 51.7 ( $\text{C}_3$ ), 52.3\* ( $\text{C}_3$ ), 53.6 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 62.5 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 62.6\* ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 67.9\* ( $\text{C}_5$ ), 70.1 ( $\text{C}_5$ ), 73.5\* ( $\text{C}_2$ ), 75.3 ( $\text{C}_2$ ), 111.5\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 111.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 121.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 122.5\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.5\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.5\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.1\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.3\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.4\* ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 172.5 ( $\text{CO}$ ), 174.8\* ( $\text{CO}$ ).

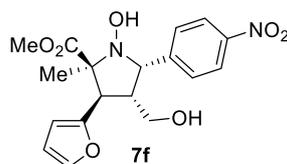
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +20.3).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$ : C, 63.00; H, 6.83; N, 9.18. Found C, 62.99; H, 6.85; N, 9.20.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_6]^+$ : 458.2286 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ); found: 458.2296.

The ee (>99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=36.73$  min,  $\tau_{\text{major}}=94.35$  min.

**Methyl (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3-(furan-2-yl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7f).**



Following the general procedure **B**, **7f** (70 mg, 0.19 mmol) was isolated as colorless oil. 48 h. Yield: 93%. d.r. 9:1.

$R_f = 0.48$ ; Hexane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{MeOD}$ ) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.26\* (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.64 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3.07-3.23 (m, 3H,  $H_3$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.27-3.39 (m, 1H,  $H_4$ ), 3.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.84\* (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.57\* (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 5.23 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 6.18-6.31 (m, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 6.38 (dd,  $J = 3.3, 1.9$  Hz, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.44

(dd,  $J = 1.9, 0.9$  Hz, 1H,  $H_{Ar}$ ), 7.77 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $H_{Ar}$ ), 8.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $H_{Ar}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, MeOD) (\* denotes minor diastereomer resonances)  $\delta$  22.8 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 44.3\* ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 45.6 ( $\text{C}_4$ ), 46.7\* ( $\text{C}_3$ ), 48.9 ( $\text{C}_3$ ), 51.9 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 52.9\* ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 62.5 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 62.8\* ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 69.5\* ( $\text{C}_5$ ), 70.8 ( $\text{C}_5$ ), 74.1\* ( $\text{C}_2$ ), 75.1 ( $\text{C}_2$ ), 108.2 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 108.6\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 111.2\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 111.3 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 123.7 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 123.8\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 131.0 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 131.0\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 143.2\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 143.3 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 148.4\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 148.5\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 148.7 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 149.9 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 153.4 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 153.8\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 173.8 ( $\text{CO}$ ), 175.8\* ( $\text{CO}$ ).

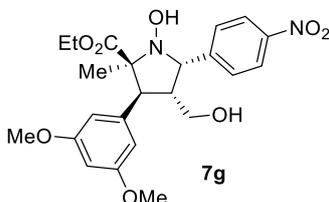
$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0, MeOH, +10.1).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$ : C, 57.44; H, 5.36; N, 7.44. Found C, 57.44; H, 5.39; N, 7.42.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_7]^+$ : 399.1163 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ); found: 399.1164.

The ee (>99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=39.73$  min,  $\tau_{\text{major}}=86.53$  min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-3-(3,5-dimethoxyphenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7g).**



Following the general procedure **B**, **7g** (77 mg, 0.17 mmol) was isolated as yellow oil. 48 h. Yield: 83%. d.r. 4:1.

$R_f = 0.47$ ; *n*-Pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.09 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.20\* (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.58 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2.98 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 3.07-3.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.35 (tdd,  $J = 11.0, 6.8, 4.5$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{C}_{Ar}\text{-OCH}_3$ ), 3.95-4.14 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.93 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.33 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 6.34-6.54 (m, 3H,  $H_{Ar}$ ), 7.70 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $H_{Ar}$ ), 8.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $H_{Ar}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 22.1 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 45.7 ( $\text{C}_4$ ), 54.2 ( $\text{C}_3$ ), 55.5 ( $\text{C}_{Ar}\text{-CH}_3\text{O}$ ), 61.0 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 62.2 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 70.1 ( $\text{C}_5$ ), 75.0 ( $\text{C}_2$ ), 99.5 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 107.0 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 108.4\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 123.5 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 123.9\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 128.7\* ( $\text{C}_{Ar}$ ), 129.4 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 138.6 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 147.4 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 148.2 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 161.0 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 171.8 ( $\text{CO}$ ).

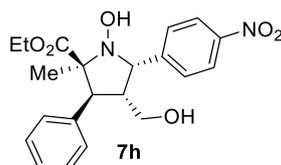
$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +13.4).

Anal Calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: C, 59.99; H, 6.13; N, 6.08. Found C, 60.00; H, 6.11; N, 6.11.

HRMS: Calculated for [C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub>]<sup>+</sup>: 483.1738 (M<sup>+</sup>+Na); found: 483.1719.

The ee (>99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak OD-3* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}$ =38.57 min,  $\tau_{\text{major}}$ =61.96 min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (7h).**



Following the general procedure **B**, **7h** (67 mg, 0.17 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 84%. d.r. 4:1.

R<sub>f</sub> = 0.43; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.01 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.06 (d,  $J$  = 10.8 Hz, 1H, H3), 3.10-3.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.39 (tdd  $J$  = 10.9, 6.8, 4.5 Hz, 1H, H4), 3.87-4.09 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 5.00 (s, 1H, NOH), 5.36 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 1H, H5), 7.19-7.39 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>), 7.71 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.23 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 22.0 (CH<sub>3</sub>C), 45.6 (C4), 54.0 (C3), 60.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 62.2 (CH<sub>2</sub>OH), 70.1 (C5), 75.1 (C2), 123.5 (C<sub>Ar</sub>), 128.0 (C<sub>Ar</sub>), 128.6 (C<sub>Ar</sub>), 128.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 136.2 (C<sub>Ar</sub>), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 148.2 (C<sub>Ar</sub>), 171.8 (CO).

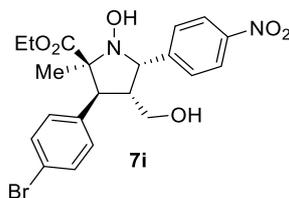
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +17.9).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: C, 62.99; H, 6.04; N, 7.00. Found C, 63.00; H, 6.01; N, 7.04.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 423.1527 (M<sup>+</sup>+Na); found: 423.1530.

The ee (99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{major}}$ =130.16 min,  $\tau_{\text{minor}}$ =35.34 min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-3-(4-bromophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7i).**



Following the general procedure **B**, **7i** (78 mg, 0.16 mmol) was isolated as colorless oil. 48 h. Yield: 81%. d.r. 4:1.

$R_f = 0.48$ ; *n*-Pentane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances) δ 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.43\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.04 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, *H*<sub>3</sub>), 3.06-3.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.33 (tdd, *J* = 11.0, 6.6, 4.5 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3.87-4.15 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 5.01 (s, 1H, NOH), 5.33 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub>), 5.43\* (s, 1H, NOH), 7.04\* (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 8.10\* (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 8.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 21.9 (CH<sub>3</sub>C), 45.5 (C<sub>4</sub>), 53.4 (C<sub>3</sub>), 61.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 62.0 (CH<sub>2</sub>OH), 69.9 (C<sub>5</sub>), 74.9 (C<sub>2</sub>), 122.0 (C<sub>Ar</sub>), 123.5 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 130.4 (C<sub>Ar</sub>), 131.8 (C<sub>Ar</sub>), 135.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 148.0 (C<sub>Ar</sub>), 171.6 (CO).

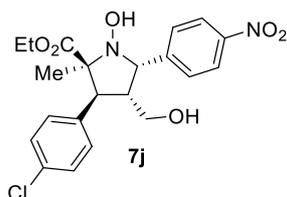
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +24.7).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: C, 52.62; H, 4.84; Br, 16.67; N, 5.84. Found C, 52.61; H, 4.86; Br, 16.64; N, 5.85.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 501.0534 (M<sup>+</sup>+Na); found: 501.0632.

The ee (99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min; τ<sub>minor</sub>=45.07 min, τ<sub>major</sub>=101.88 min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-3-(4-chlorophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7j).**



Following the general procedure **B**, **7j** (82 mg, 0.19 mmol) was isolated as colorless oil. 48 h. Yield: 94%. d.r. 4:1.

$R_f = 0.39$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.07 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.56 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3.06 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 3.09-3.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.34 (tdd,  $J = 10.8, 6.7, 4.6$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 3.88-4.13 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.94 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.33 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 7.21 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.30 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.70 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.23 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 21.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 45.6 ( $\text{C}_4$ ), 53.3 ( $\text{C}_3$ ), 61.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 62.0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 69.9 ( $\text{C}_5$ ), 75.0 ( $\text{C}_2$ ), 123.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 134.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 171.6 ( $\text{CO}$ ).

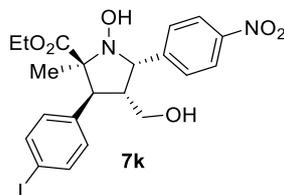
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +28.1).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_6$ : C, 58.00; H, 5.33; Cl, 8.15; N, 6.44. Found C, 57.99; H, 5.35; Cl, 8.19; N, 6.40.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{NaO}_6]^+$ : 457.1142 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ); found: 457.1111.

The ee (98%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 42.58$  min,  $\tau_{\text{major}} = 105.11$  min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-iodophenyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7k).**



Following the general procedure **B**, **7k** (91 mg, 0.17 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 86%. d.r. 5:1.

$R_f = 0.35$ ; *n*-Pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.07 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.59 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 3.03 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 3.07-3.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.33 (tdd,  $J = 10.9, 6.6, 4.6$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 3.89-4.14 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.96 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.33 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 7.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.65 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 21.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 45.4 ( $\text{C}_4$ ), 53.5 ( $\text{C}_3$ ), 60.9 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 62.2 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 69.9 ( $\text{C}_5$ ), 75.0 ( $\text{C}_2$ ), 93.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 171.6 ( $\text{CO}$ ).

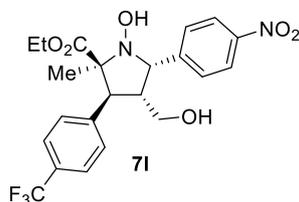
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +52.6).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{IN}_2\text{O}_6$ : C, 47.92; H, 4.40; I, 24.11; N, 5.32. Found C, 47.91; H, 4.36; I, 24.08; N, 5.34.

HRMS: Calculated for  $[C_{21}H_{23}IN_2NaO_6]^+$ : 549.0493 ( $M^+ + Na$ ); found: 549.0503.

The ee (99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak ID-3* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=50.99$  min,  $\tau_{\text{major}}=108.04$  min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (71).**



Following the general procedure **B**, **71** (80 mg, 0.17 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 85%. d.r. 4:1.

$R_f=0.46$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.02 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.09-3.26 (m, 3H, H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH), 3.34-3.47 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 3.88-4.12 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.95 (s, 1H, NOH), 5.37 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.41 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.59 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.71 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.25 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  13.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 21.9 (CH<sub>3</sub>C), 45.4 (C<sub>4</sub>), 53.7 (C<sub>3</sub>), 61.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 62.0 (CH<sub>2</sub>OH), 69.9 (C<sub>5</sub>), 75.0 (C<sub>2</sub>), 123.6 (C<sub>Ar</sub>), 124.0\* (C<sub>Ar</sub>), 125.6 (q, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 3.6 Hz, C<sub>Ar</sub>), 128.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 272.4 Hz, C<sub>Ar</sub>), 128.8\* (C<sub>Ar</sub>), 129.1 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 130.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 32.8 Hz, C<sub>Ar</sub>), 140.8 (C<sub>Ar</sub>), 147.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.8 (C<sub>Ar</sub>), 171.5 (CO).

<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -62.5 ppm.

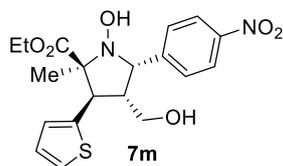
$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +23.6).

Anal Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: C, 56.41; H, 4.95; F, 12.17; N, 5.98. Found C, 56.43; H, 4.95; Br, 12.20; N, 5.99.

HRMS: Calculated for  $[C_{22}H_{23}F_3N_2NaO_6]^+$ : 491.1400 ( $M^+ + Na$ ); found: 491.1387.

The ee (99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IC* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=39.05$  min,  $\tau_{\text{major}}=89.02$  min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-(thiophen-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate (7m).**



Following the general procedure **B**, **7m** (63 mg, 0.16 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 78%. d.r. 7:1.

$R_f = 0.47$ ; *n*-Pentane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.13-3.44 (m, 4H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OH), 4.02-4.16 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.89 (s, 1H, NOH), 5.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.94-7.02 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.18-7.24 (m, 1H, H<sub>Ar</sub>), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 22.0 (CH<sub>3</sub>C), 47.9 (C<sub>4</sub>), 48.8 (C<sub>3</sub>), 61.2 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 61.7 (CH<sub>2</sub>OH), 70.0 (C<sub>5</sub>), 75.0 (C<sub>2</sub>), 123.6 (C<sub>Ar</sub>), 124.9 (C<sub>Ar</sub>), 126.3 (C<sub>Ar</sub>), 127.1 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 139.6 (C<sub>Ar</sub>), 147.5 (C<sub>Ar</sub>), 148.0 (C<sub>Ar</sub>), 171.5 (CO).

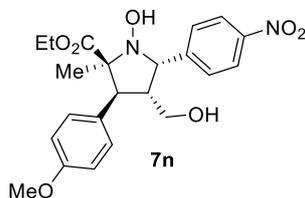
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (0.7, CHCl<sub>3</sub>, +61.8).

Anal Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: C, 56.15; H, 5.46; N, 6.89, S, 7.89. Found C, 56.14; H, 5.43; N, 6.90; S, 7.90.

HRMS: Calculated for [C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>S]<sup>+</sup>: 429.1019 (M<sup>+</sup>+Na); found: 429.1091.

The ee (>99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min; τ<sub>minor</sub>=42.35 min, τ<sub>major</sub>=93.22 min.

**Ethyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7n).**



Following the general procedure **B**, **7n** (71 mg, 0.16 mmol) was isolated as pale yellow oil. 48 h. Yield: 82%. d.r. 5:1.

$R_f = 0.40$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances) δ 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.17\* (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.53\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.55 (s,

3H, CH<sub>3</sub>C), 3.00 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, *H*3), 3.06-3.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.34 (tdd, *J* = 11.0, 6.8, 4.5 Hz, 1H, *H*4), 3.48\* (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, *H*3), 3.79 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>O), 3.91-4.14 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.95 (s, 1H, NOH), 5.33 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, *H*5), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.53\* (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 8.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances) δ 14.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 21.9 (CH<sub>3</sub>C), 45.8 (C4), 53.4 (C3), 55.4 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>O), 60.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 62.2 (CH<sub>2</sub>OH), 70.1 (C5), 75.1 (C2), 114.1 (C<sub>Ar</sub>), 123.5 (C<sub>Ar</sub>), 128.1 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 148.3 (C<sub>Ar</sub>), 159.4 (C<sub>Ar</sub>), 171.9 (CO).

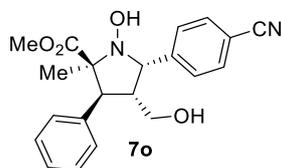
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +19.3).

Anal Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 61.39; H, 6.09; N, 6.51. Found C, 61.42; H, 6.07; N, 6.53.

HRMS: Calculated for [C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 453.1632 (M<sup>+</sup>+Na); found: 453.1613.

The ee (98%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min; τ<sub>minor</sub>=50.46 min, τ<sub>major</sub>=140.72 min.

**Methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-(4-cyanophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (7o).**



Following the general procedure **B**, **7o** (60 mg, 0.16 mmol) was isolated as pale yellow oil. 96 h. Yield: 82%. d.r. 9:1.

R<sub>f</sub>= 0.38; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances) δ 1.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.03 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz, *H*3), 3.12 (dd, 1H, *J* = 11.4, 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 3.17 (dd, 1H, *J* = 11.5, 4.7 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 3.35 (tdd, *J* = 11.0, 6.8, 4.5 Hz, 1H, *H*4), 3.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.72\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 4.56\*(d, 1H, *J* = 10.5 Hz, *H*5), 4.86 (s, 1H, NOH), 4.98\* (s, 1H, NOH), 5.28 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, *H*5), 7.19-7.33 (m, 5H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.62-7.71 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 21.9 (CH<sub>3</sub>C), 45.7 (C4), 51.7 (CH<sub>3</sub>O), 54.1 (C3), 62.2 (CH<sub>2</sub>OH), 70.3 (C5), 75.4 (C2), 111.4 (C<sub>Ar</sub>), 119.0 (CN), 128.2 (C<sub>Ar</sub>), 128.6 (C<sub>Ar</sub>), 128.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 132.2 (C<sub>Ar</sub>), 136.3 (C<sub>Ar</sub>), 145.9 (C<sub>Ar</sub>), 172.2 (CO).

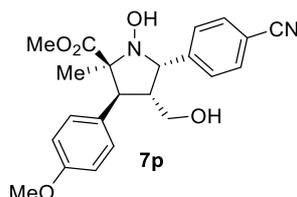
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (0.2, CHCl<sub>3</sub>, +25.6).

Anal Calcd. for  $C_{21}H_{22}N_2O_4$ : C, 68.84; H, 6.05; N, 7.65. Found C, 68.87; H, 6.00; N, 7.66.

HRMS: Calculated for  $[C_{21}H_{22}N_2NaO_4]^+$ : 389.1472 ( $M^+ + Na$ ); found: 389.1464.

The ee (96%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=26.79$  min,  $\tau_{\text{major}}=60.19$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-5-(4-cyanophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methylpyrrolidine-2-carboxylate (7p).**



Following the general procedure **B**, **7p** (67 mg, 0.17 mmol) was isolated as pale yellow oil. 96 h. Yield: 84%. d.r. 9:1.

$R_f=0.29$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.16 (s, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 2.98 (d, 1H,  $J = 11.0$  Hz, H3), 3.06-3.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.32 (tdd,  $J = 11.1, 6.8, 4.5$  Hz, 1H, H4), 3.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.79 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 4.94 (s, 1H, NOH), 5.27 (d, 1H,  $J = 10.9$  Hz, H5), 6.75-6.92 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.05-7.21 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.61-7.75 (m, 4H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  21.8 (CH<sub>3</sub>C), 45.9 (C4), 51.7 (CH<sub>3</sub>O), 53.5 (C3), 55.4 (C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 62.3 (CH<sub>2</sub>OH), 70.2 (C5), 75.3 (C2), 111.3 (C<sub>Ar</sub>), 114.2 (C<sub>Ar</sub>), 119.0 (CN), 128.1 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 132.2 (C<sub>Ar</sub>), 146.2 (C<sub>Ar</sub>), 159.4 (C<sub>Ar</sub>), 172.3 (CO).

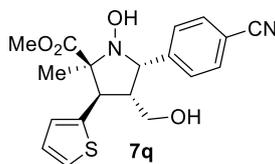
$[\alpha]_D^{20}$ : (0.2, CHCl<sub>3</sub>, +33.3).

Anal Calcd. for  $C_{22}H_{24}N_2O_5$ : C, 66.65; H, 6.10; N, 7.07. Found C, 66.67; H, 6.08; N, 7.04.

HRMS: Calculated for  $[C_{22}H_{24}N_2NaO_5]^+$ : 419.1567 ( $M^+ + Na$ ); found: 419.1571.

The ee (96%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}=36.65$  min,  $\tau_{\text{major}}=55.87$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-5-(4-cyanophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-3-(thiophen-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate (7q).**



Following the general procedure **B**, **7q** (61 mg, 0.16 mmol) was isolated as pale yellow oil. 96 h. Yield: 82%. d.r. 10:1.

$R_f = 0.36$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD)  $\delta$  1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.05-3.13 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3.14-3.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3.29-3.36 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>), 3.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 5.17 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.94-7.06 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.30 (dd,  $J = 4.8, 1.6$  Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>), 7.66-7.77 (m, 4H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 Mz, MeOD)  $\delta$  22.4 (CH<sub>3</sub>C), 49.2 (C<sub>4</sub>), 50.5 (C<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>O), 62.1 (CH<sub>2</sub>OH), 71.3 (C<sub>5</sub>), 76.2 (C<sub>2</sub>), 111.4 (C<sub>Ar</sub>), 120.1 (CN), 125.5 (C<sub>Ar</sub>), 127.3 (C<sub>Ar</sub>), 127.8 (C<sub>Ar</sub>), 131.2 (C<sub>Ar</sub>), 132.5 (C<sub>Ar</sub>), 141.6 (C<sub>Ar</sub>), 148.1 (C<sub>Ar</sub>), 173.7 (CO).

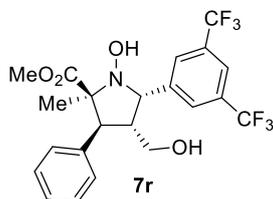
$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0, MeOH, +14.2).

Anal Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: C, 61.27; H, 5.41; N, 7.52; S, 8.61. Found C, 61.28; H, 5.42; N, 7.53; S, 6.83.

HRMS: Calculated for [C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S]<sup>+</sup>: 395.1036 (M<sup>+</sup>+Na); found: 395.1037.

The ee (99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak OD-3* column [hexane/*i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 27.97$  min,  $\tau_{\text{major}} = 42.40$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-5-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (7r).**



Following the general procedure **B**, **7r** (76 mg, 0.16 mmol) was isolated as pale yellow oil. 120 h. Yield: 80%. d.r. 9:1.

$R_f = 0.58$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (4:6)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (\* indicates minor diastereomer resonances)  $\delta$  1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.04-3.14 (m, 2H, H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH), 3.18 (dd, 1H,  $J = 11.1, 4.6$  Hz, CH<sub>2</sub>OH), 3.30-3.43 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 3.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.75\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 4.94 (s, 1H, NOH), 5.40 (d,

1H,  $J = 10.9$  Hz,  $H_5$ ), 7.27-7.38 (m, 5H,  $H_{Ar}$ ), 7.81 (s, 1H,  $H_{Ar}$ ), 7.95-8.03 (m, 2H,  $H_{Ar}$ ).  
 $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  21.7 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 45.3 ( $\text{C}_4$ ), 51.7 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 54.0 ( $\text{C}_3$ ), 62.0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 70.1 ( $\text{C}_5$ ), 75.5 ( $\text{C}_2$ ), 121.5 (q,  $^3J = 3.8$  Hz,  $\text{C}_{Ar}$ ), 125.4 (q,  $^1J = 272.7$  Hz,  $\text{C}_{Ar}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 128.6 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 128.8 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 129.0 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 131.2 (q,  $^2J = 33.1$  Hz,  $\text{C}_{Ar}$ ), 131.6 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 136.3 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 142.9 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 172.0 ( $\text{CO}$ ).

$^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -62.6 ppm.

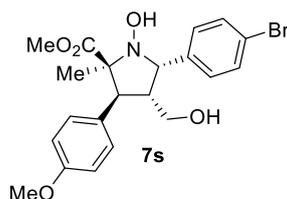
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (0.7,  $\text{CHCl}_3$ , +15.6).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{NO}_4$ : C, 55.35; H, 4.43; F, 23.88; N, 2.93. Found C, 55.31; H, 4.46; F, 23.90 N, 2.92.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{NNaO}_4]^+$ : 500.1267 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ); found: 500.1263.

The ee (98%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (99:1)]; flow rate 0.9 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 27.30$  min,  $\tau_{\text{major}} = 44.38$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-5-(4-bromophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methylpyrrolidine-2-carboxylate (7s).**



Following the general procedure **C**, **7s** (46 mg, 0.10 mmol) was isolated as pale yellow oil. 120 h. Yield: 51%. d.r. 1:1.

$R_f = 0.40$ ; Hexane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2.97 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 3.10-3.36 (m, 3H,  $H_4$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.79 (s, 3H,  $\text{C}_{Ar}\text{-OCH}_3$ ), 4.85 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.18 (d, 1H,  $J = 10.6$  Hz,  $H_5$ ), 6.81-6.88 (m, 2H,  $H_{Ar}$ ), 7.13-7.20 (m, 2H,  $H_{Ar}$ ), 7.39-7.44 (m, 2H,  $H_{Ar}$ ), 7.50-7.54 (m, 2H,  $H_{Ar}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  21.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 45.7 ( $\text{C}_4$ ), 51.6 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 53.3 ( $\text{C}_3$ ), 55.4 ( $\text{C}_{Ar}\text{-OCH}_3$ ), 62.5 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 69.8 ( $\text{C}_5$ ), 75.2 ( $\text{C}_2$ ), 114.1 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 121.5 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 129.6 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 130.1 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 131.8 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 139.4 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 159.4 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 172.4 ( $\text{CO}$ ).

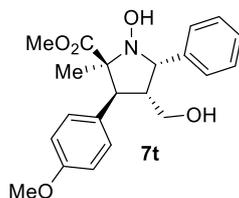
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (0.2,  $\text{CHCl}_3$ , +27.0).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{BrNO}_5$ : C, 56.01; H, 5.37; Br, 17.74; N, 3.11. Found C, 56.03; H, 5.36; Br, 17.76; N, 3.10.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{BrNNaO}_5]^+$ : 472.0736 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ); found: 472.0741.

The ee (90%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 24.41$  min,  $\tau_{\text{major}} = 35.10$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-5-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (7t).**



Following the general procedure **B**, **7t** (83 mg, 0.19 mmol) was isolated as pale yellow oil. 72 h. Yield: 45%. d.r. 1:1.

$R_f = 0.45$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.99 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.14-3.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.22-3.33 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 3.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.79 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 4.89 (s, 1H, NOH), 5.22 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.81-6.86 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.14-7.20 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.28-7.33 (m, 1H, H<sub>Ar</sub>), 7.30-7.43 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.50-7.57 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  21.8 (CH<sub>3</sub>C), 45.8 (C<sub>4</sub>), 51.4 (C<sub>3</sub>), 53.0 (CH<sub>3</sub>O), 55.2 (C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 62.3 (CH<sub>2</sub>OH), 70.1 (C<sub>5</sub>), 75.0 (C<sub>2</sub>), 113.9 (C<sub>Ar</sub>), 127.7 (C<sub>Ar</sub>), 128.1 (C<sub>Ar</sub>), 128.4 (C<sub>Ar</sub>), 128.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 140.1 (C<sub>Ar</sub>), 159.1 (C<sub>Ar</sub>), 172.4 (CO).

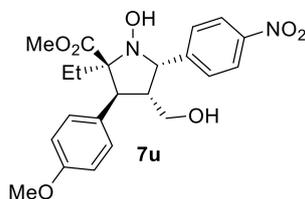
$[\alpha]_D^{20}$ : (0.6, CHCl<sub>3</sub>, +48.7).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>: C, 67.91; H, 6.78; N, 3.77. Found C, 67.90; H, 6.80; N, 3.76.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NNaO<sub>5</sub>]<sup>+</sup>: 393.1552 (M<sup>+</sup>+Na); found: 393.1583.

The ee (90%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [hexane/*i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 33.83$  min,  $\tau_{\text{major}} = 77.14$  min.

**Methyl (2S,3S,4R,5S)-2-ethyl-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (7u).**



Following the general procedure **B**, **7u** (83 mg, 0.19 mmol) was isolated as pale yellow oil. 72 h. Yield: 96%. d.r. >20:1.

$R_f = 0.43$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.20 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.85 (dq,  $J = 14.6, 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.06 (dq,  $J = 14.6, 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.06-3.37 (m, 4H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>,

CH<sub>2</sub>OH), 3.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.80 (s, 3H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 4.89 (s, 1H, NOH), 5.31 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub>), 6.81-6.90 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.06-7.19 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.68-7.73 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 8.20-8.30 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.2 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 25.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 45.7 (C<sub>4</sub>), 48.2 (C<sub>3</sub>), 51.6 (CH<sub>3</sub>O), 55.4 (C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 62.3 (CH<sub>2</sub>OH), 70.2 (C<sub>5</sub>), 77.7 (C<sub>2</sub>), 114.2 (C<sub>Ar</sub>), 123.6 (C<sub>Ar</sub>), 128.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.5 (C<sub>Ar</sub>), 148.5 (C<sub>Ar</sub>), 159.3 (C<sub>Ar</sub>), 172.8 (CO).

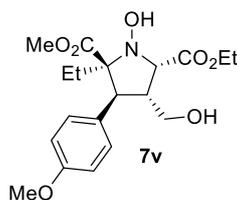
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (0.6, CHCl<sub>3</sub>, +48.7).

Anal Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 61.31; H, 6.09; N, 6.51. Found C, 61.30; H, 6.07; N, 6.54.

HRMS: Calculated for [C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 453.1632 (M<sup>+</sup>+Na); found: 453.1625.

The ee (>99%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (90:10)]; flow rate 1.0 mL/min; τ<sub>minor</sub>=33.83 min, τ<sub>major</sub>=77.14 min.

**5-Ethyl 2-methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-2-ethyl-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)pyrrolidine-2,5-dicarboxylate (7v).**



Following the general procedure **C**, **7v** (19 mg, 0.05 mmol) was isolated as pale yellow oil. 144 h. Yield: 25%. d.r. >20:1.

R<sub>f</sub> = 0.28; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC), 1.85-2.07 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.91 (ddd, *J* = 8.6, 6.5, 4.6 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3.31 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3.69-3.93 (m, 8H, C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>O, *H*<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH), 4.08-4.27 (m, 3H, *H*<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC), 6.10 (s, 1H, NOH), 6.77-6.89 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.12-7.24 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.6 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC), 25.4 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>), 47.3 (C<sub>4</sub>), 53.4 (C<sub>3</sub>), 53.8 (CH<sub>3</sub>O), 55.4 (C<sub>Ar</sub>-OCH<sub>3</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>OH), 61.4 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO), 67.0 (C<sub>5</sub>), 75.0 (C<sub>2</sub>), 114.3 (C<sub>Ar</sub>), 129.1 (C<sub>Ar</sub>), 132.3 (C<sub>Ar</sub>), 158.9 (C<sub>Ar</sub>), 171.2 (CO), 174.6 (CO).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +5.3 (*c* = 0.47, CHCl<sub>3</sub>).

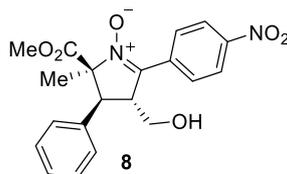
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (0.5, CHCl<sub>3</sub>, +5.3).

Anal Calcd. for  $C_{19}H_{27}NO_7$ : C, 59.83; H, 7.14; N, 3.67. Found C, 59.84; H, 7.15; N, 3.65.

HRMS: Calculated for  $[C_{19}H_{27}NNaO_7]^+$ : 404.1685 ( $M^+ + Na$ ); found: 404.1681.

The ee (98%) was determined by HPLC using a *Chiralpak IA* column [*hexane/i*-PrOH (95:5)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{major}$ =34.64 min,  $\tau_{minor}$ =45.18 min.

**(2*S*,3*S*,4*R*)-4-(hydroxymethyl)-2-(methoxycarbonyl)-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-phenyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole 1-oxide (8).**



To a solution of **7a** (38 mg, 0.10 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (0.2 mL),  $MnO_2$  activated (100 mg, 1.0 mmol) was added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then the crude mixture was filtered through a short pad of silica gel yielding the pure product **8** (38 mg, 0.10 mmol) as a yellow solid. Yield: 99%. d.r. > 20:1.

$R_f$  = 0.20; Et<sub>2</sub>O/EtOAc (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.91 (s, 3H,  $CH_3C$ ), 3.39 (s, 3H,  $CH_3O$ ), 3.57-3.68 (m, 1H,  $H_4$ ), 3.72 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H,  $H_3$ ), 4.00 (m, 1H,  $CH_2OH$ ), 4.09 (m, 1H,  $CH_2OH$ ), 7.26-7.34 (m, 2H,  $H_{Ar}$ ), 7.34-7.43 (m, 3H,  $H_{Ar}$ ), 8.25-8.38 (m, 4H,  $H_{Ar}$ ).

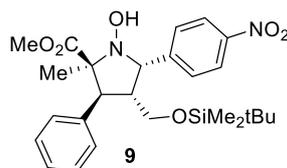
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  21.0 ( $CH_3C$ ), 48.4 ( $C_3$ ), 51.3 ( $C_4$ ), 52.9 ( $CH_3O$ ), 60.0 ( $CH_2OH$ ), 85.4 ( $C_2$ ), 123.8 ( $C_{Ar}$ ), 128.8 ( $C_{Ar}$ ), 128.9 ( $C_{Ar}$ ), 129.1 ( $C_{Ar}$ ), 134.6 ( $C_{Ar}$ ), 134.7 ( $C_{Ar}$ ), 141.6 ( $C_5$ ), 148.0 ( $C_{Ar}$ ), 168.6 ( $CO$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0,  $CHCl_3$ , +144.9).

Anal Calcd. for  $C_{20}H_{20}N_2O_6$ : C, 62.49; H, 5.24; N, 7.29. Found C, 62.50; H, 5.25; N, 7.27.

HRMS: Calculated for  $[C_{20}H_{20}N_2NaO_6]^+$ : 407.1219 ( $M^+ + Na$ ); found: 407.1220.

**Methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-4-(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)-1-hydroxy-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (9).**



To a solution of **7a** (38 mg, 0.10 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (1 mg, 0.01 mmol) in  $CH_2Cl_2$  at room temperature, tert-butyl dimethylsilyl chloride (30 mg, 0.20 mmol) and triethylamine (28  $\mu$ L, 0.20 mmol) were added. The mixture was stirred at

room temperature for 12 h. Then, the solvent was evaporated and the crude mixture was purified by flash column chromatography (Et<sub>2</sub>O /EtOAc 9:1 to 7:3) to afford pure **9** (45 mg, 0.09 mmol) as colorless oil. Yield: 90%. d.r. > 20:1.

R<sub>f</sub> = 0.45; Et<sub>2</sub>O /EtOAc (8:2)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.41 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), -0.40 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), 0.63 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.00-3.19 (m, 3H, H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH), 3.33 (tdd, *J* = 10.8, 6.1, 4.0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.74\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 4.88 (s, 1H, NOH), 5.24-5.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.15-7.36 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>), 7.62-7.77 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.13-8.25 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>).

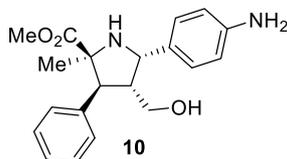
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -5.9 (SiCH<sub>3</sub>), -5.9 (SiCH<sub>3</sub>), 18.0 (CH<sub>3</sub>C), 22.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 45.6 (C<sub>4</sub>), 51.6 (C<sub>3</sub>), 53.6 (CH<sub>3</sub>O), 61.3 (CH<sub>2</sub>OH), 70.4 (C<sub>5</sub>), 75.4 (C<sub>2</sub>), 123.1 (C<sub>Ar</sub>), 127.9 (C<sub>Ar</sub>), 128.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.8 (C<sub>Ar</sub>), 136.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.2 (C<sub>Ar</sub>), 148.6 (C<sub>Ar</sub>), 172.4 (CO).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +18.2).

Anal Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si: C, 62.37; H, 7.25; N, 5.60; Si, 5.61. Found C, 62.36; H, 7.24; N, 5.62; Si, 5.60.

HRMS: Calculated for [C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>Si]<sup>+</sup>: 523.2240 (M<sup>+</sup>+Na); found: 523.2236.

**Methyl (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-(4-aminophenyl)-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (10).**



To a suspension of **7a** (38 mg, 0.10 mmol) in H<sub>2</sub>O (2 mL), HCl conc. (1mL) and Zn dust (260 mg, 4.0 mmol) were added. The mixture was heated to reflux for 3h until the solution turned from yellow to colorless. The mixture was cooled and basified to pH > 12 with aqueous NaOH 2.5 M, extracted with Et<sub>2</sub>O (5 x 5mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrated, evaporated and purified by flash column chromatography on triethylamine deactivated SiO<sub>2</sub> (Et<sub>2</sub>O/EtOAc 3:7 to 0:10) to afford pure **10** (26 mg, 0.08 mmol) as pale yellow oil. Yield: 77%. d.r. > 20:1.

R<sub>f</sub> = 0.28; /EtOAc (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.02 (dtd, *J* = 11.6, 6.0, 3.1 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.14 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.21-3.36 (m, 5H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>3</sub>O), 3.52\* (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 5.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.59-6.75 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.13-7.36 (m, 7H, H<sub>Ar</sub>).

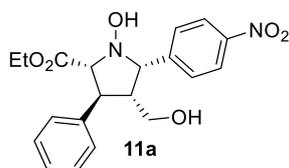
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.2 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 49.9 ( $\text{C}_4$ ), 51.5 ( $\text{C}_3$ ), 57.4 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 62.4 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 62.7 ( $\text{C}_5$ ), 70.0 ( $\text{C}_2$ ), 115.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 145.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 176.7 ( $\text{CO}$ ).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +62.1).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 70.57; H, 7.11; N, 8.23. Found C, 70.58; H, 7.12; N, 8.26.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_3]^+$ : 363.1685 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ); found: 363.1690.

**Ethyl (2*R*,3*S*,5*S*)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-5-(4-nitrophenyl)-3-phenylpyrrolidine-2-carboxylate (11a).**



Following the general procedure **D**, **11a** (61 mg, 0.16 mmol) was isolated as pale yellow oil. 16 h. Yield: 79%. d.r. 1:1.

$R_f$  = 0.39; Hexane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (2:8)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mixture of diastereoisomers)  $\delta$  0.90 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.14 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3.19-3.33 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.35-3.50 (m, 1H,  $H_4$ ), 3.64 (dd,  $J$  = 10.1, 7.4 Hz, 1H,  $H_3$ ), 3.81-4.01 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.12-4.27 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.47 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H,  $H_2$ ), 5.04 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 5.40 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H,  $H_5$ ), 5.50 (s, 1H,  $\text{NOH}$ ), 7.28-7.41 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.71 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.25 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mixture of diastereoisomers)  $\delta$  13.9 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 14.2 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 45.9 ( $\text{C}_4$ ), 46.0 ( $\text{C}_3$ ), 46.6 ( $\text{C}_4$ ), 49.9 ( $\text{C}_3$ ), 60.8 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 60.9 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 61.4 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 62.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 70.1 ( $\text{C}_5$ ), 72.7 ( $\text{C}_2$ ), 73.7 ( $\text{C}_2$ ), 123.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 147.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 170.5 ( $\text{CO}$ ), 171.9 ( $\text{CO}$ ).

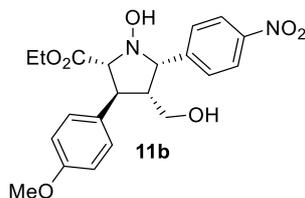
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +7.6).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ : C, 62.17; H, 5.74; N, 7.25. Found C, 62.15; H, 5.74; N, 7.26.

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_6]^+$ : 409.1376 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ); found: 409.1374.

The ee (96%) was determined by HPLC using a *Chiralpak ADH* column [*hexane/i-PrOH* (70:30)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}}$  = 9.58 min,  $\tau_{\text{major}}$  = 34.14 min.

**Ethyl (2R,3S,5S)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (11b).**



Following the general procedure **D**, **11b** (59 mg, 0.14 mmol) was isolated as pale yellow oil. 16 h. Yield: 71%. d.r. 1:1.

$R_f = 0.35$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of diastereoisomers)  $\delta$  0.96 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.15 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12-3.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.31-3.46 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 3.57 (dd,  $J = 10.2, 7.3$  Hz, H<sub>3</sub>), 3.82 (s, 1H, CH<sub>3</sub>O), 3.87-4.03 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.06-4.25 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.17 (d,  $J = 9.7$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 4.42 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.05 (s, 1H, NOH), 5.37 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 5.49 (s, 1H, NOH), 6.85 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 6.92 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.29 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.65-7.73 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.18-8.27 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of diastereoisomers)  $\delta$  14.0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 45.3 (C<sub>4</sub>), 45.6 (C<sub>4</sub>), 46.3 (C<sub>3</sub>), 50.0 (C<sub>3</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>O), 60.8 (CH<sub>2</sub>OH), 60.9 (CH<sub>2</sub>OH), 61.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 62.1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 70.1 (C<sub>5</sub>), 72.6 (C<sub>5</sub>), 72.8 (C<sub>2</sub>), 73.9 (C<sub>2</sub>), 114.2 (C<sub>Ar</sub>), 114.4 (C<sub>Ar</sub>), 123.6 (C<sub>Ar</sub>), 123.9 (C<sub>Ar</sub>), 128.4 (C<sub>Ar</sub>), 128.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.0 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 130.0 (C<sub>Ar</sub>), 147.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.7 (C<sub>Ar</sub>), 148.6 (C<sub>Ar</sub>), 159.1 (C<sub>Ar</sub>), 159.2 (C<sub>Ar</sub>), 170.6 (CO), 171.9 (CO).

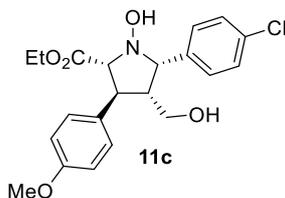
$[\alpha]_D^{20}$ : (0.2, CHCl<sub>3</sub>, +5.8).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 60.57; H, 5.81; N, 6.73. Found C, 60.56; H, 5.83; N, 6.75.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 439.1481 (M<sup>+</sup>+Na); found: 439.1480.

The ee (97%) was determined by HPLC using a *Chiralpak ADH* column [hexane/*i*-PrOH (70:30)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{minor}} = 12.96$  min,  $\tau_{\text{major}} = 33.15$  min.

**Ethyl (2*R*,3*S*,5*S*)-5-(4-chlorophenyl)-1-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxyphenyl)pyrrolidine-2-carboxylate (11c).**



Following the general procedure **D**, **11c** (62 mg, 0.15 mmol) was isolated as pale yellow oil. 16 h. Yield: 76%. d.r. 1:1.

$R_f = 0.37$ ; Hexane/Et<sub>2</sub>O (2:8)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of diastereoisomers) δ 0.96 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.20-3.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.45 (d,  $J = 7.3, 3.5$  Hz, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3.46-3.59 (m, 1H, *H*<sub>3</sub>), 3.79 (s, 1H, CH<sub>3</sub>O), 3.80 (s, 1H, CH<sub>3</sub>O), 3.85-4.03 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.05-4.19 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.25 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, *H*<sub>2</sub>), 4.39 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, *H*<sub>2</sub>), 4.99 (s, 1H, NOH), 5.23 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H, *H*<sub>5</sub>), 5.49 (s, 1H, NOH), 6.80-6.92 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.17-7.49 (m, 6H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of diastereoisomers) δ 14.0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 45.2 (C<sub>4</sub>), 46.2 (C<sub>3</sub>), 55.4 (CH<sub>3</sub>O), 60.6 (CH<sub>2</sub>OH), 62.5 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 69.9 (C<sub>5</sub>), 72.7 (C<sub>2</sub>), 114.1 (C<sub>Ar</sub>), 114.3 (C<sub>Ar</sub>), 128.9 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 130.5 (C<sub>Ar</sub>), 133.5 (C<sub>Ar</sub>), 138.0 (C<sub>Ar</sub>), 159.1 (C<sub>Ar</sub>), 170.7 (CO).

$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +8.6).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>5</sub>: C, 62.14; H, 5.96; Cl, 8.73; N, 3.45. Found C, 62.15; H, 5.96; Cl, 8.74; N, 3.44.

HRMS: Calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>ClNNaO<sub>5</sub>]<sup>+</sup>: 428.1241.1481 (M<sup>+</sup>+Na); found: 428.1239.

The ee (98%) was determined by HPLC using a *Chiralpak ADH* column [hexane/*i*-PrOH (75:25)]; flow rate 1.0 mL/min;  $\tau_{\text{major}} = 16.97$  min,  $\tau_{\text{minor}} = 12.70$  min.

### 3.7. Bibliografía

- (1) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- (2) Huisgen, R.; *Accad. Naz. dei Lincei* **1968**, 259-280.
- (3) Coldham, I.; Hufton, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2765-2810.
- (4) Barman, P. D.; Goyal, D.; Daravath, U. K.; Sanyal, I.; Mandal, S. B.; Banerjee, A. K. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3801-3804.
- (5) Lee, S.; Diab, S.; Queval, P.; Sebban, M.; Chataigner, I.; Piettre, S. R. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7181-7192.
- (6) Pandey, G.; Gupta, N. R.; Gadre, S. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 740-750.
- (7) Pandey, G.; Dey, D.; Tiwari, S. K. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 699-705.
- (8) Calaza, M. I.; Cativiela, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3427-3448.
- (9) Firestone, R. A. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2285-2290.
- (10) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 403-419.
- (11) Kanemasa, S.; Tsuge, O. *Adv. Cycloaddit.* **1993**, *3*, 99-159.
- (12) Casas, J.; Grigg, R.; Najera, C.; Sansano, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1971-1982.
- (13) Chinchilla, R.; Falvello, L. R.; Galindo, N.; Najera, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3133-3140.
- (14) Najera, C.; De Retamosa, M.; Sansano, J. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4025-4028.
- (15) Najera, C.; de Garcia Retamosa, M.; Sansano, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6055-6058.
- (16) Martin-Rodriguez, M.; Najera, C.; Sansano, J. M.; de Cozar, A.; Cossio, F. P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14224-14233.
- (17) Nájera, C.; Sansano, J. M. *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 2430-2448.
- (18) Cabrera, S.; Gomez Arrayas, R.; Carretero, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16394-16395.
- (19) Llamas, T.; Gomez Arrayas, R.; Carretero, J. C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1795-1798.
- (20) Lopez-Perez, A.; Robles-Machin, R.; Adrio, J.; Carretero, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9261-9264.
- (21) Lopez-Perez, A.; Adrio, J.; Carretero, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 340-343.
- (22) Hernández-Toribio, J.; Padilla, S.; Adrio, J.; Carretero, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8854-8858.
- (23) Pascual-Escudero, A.; de Cózar, A.; Cossío, F. P.; Adrio, J.; Carretero, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15334-15338.
- (24) Ayerbe, M.; Arrieta, A.; Cossio, F. P.; Linden, A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1795-1805.
- (25) Cabrera, S.; Arrayas, R. G.; Martin-Matute, B.; Cossio, F. P.; Carretero, J. C. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6587-6602.
- (26) Conde, E.; Rivilla, I.; Larumbe, A.; Cossío, F. P. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 11755-11767.
- (27) Conde, E.; Bello, D.; de Cozar, A.; Sanchez, M.; Vazquez, M. A.; Cossio, F. P. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1486-1491.
- (28) Barr, D. A.; Grigg, R.; Gunaratne, H. Q. N.; Kemp, J.; McMeekin, P.; Sridharan, V. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 557-570.
- (29) Najera, C.; Retamosa, M. d. G.; Martin-Rodriguez, M.; Sansano, J. M.; de Cozar, A.; Cossio, F. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5622-5634.
- (30) de Cozar, A.; Cossio, F. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 10858-10868.

- (31) Khlebnikov, A. F.; Konev, A. S.; Virtsev, A. A.; Yufit, D. S.; Mlostoń, G.; Heimgartner, H. *Helv. Chim. Acta* **2014**, *97*, 453-470.
- (32) Vicario, J. L.; Reboredo, S.; Badia, D.; Carrillo, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5168-5170.
- (33) Reboredo, S.; Reyes, E.; Vicario, J. L.; Badia, D.; Carrillo, L.; de Cozar, A.; Cossio, F. P. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7179-7188.
- (34) Fernandez, N.; Carrillo, L.; Vicario, J. L.; Badia, D.; Reyes, E. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12313-12315.
- (35) Reboredo, S.; Vicario, J. L.; Badia, D.; Carrillo, L.; Reyes, E. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3307-3312.
- (36) Iza, A.; Ugarriza, I.; Uria, U.; Reyes, E.; Carrillo, L.; Vicario, J. L. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8878-8884.
- (37) Merino, P.; Tejero, T.; Diez-Martinez, A.; Gultekin, Z. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6567-6573.
- (38) Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4243-4244.
- (39) MacMillan, D. W. C. *Nature* **2008**, *455*, 304.
- (40) Jen, W. S.; Wiener, J. J. M.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9874-9875.
- (41) Shen, Z.-L.; Goh, K. K. K.; Wong, C. H. A.; Loo, W.-Y.; Yang, Y.-S.; Lu, J.; Loh, T.-P. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5856-5858.
- (42) Otsuki, T.; Kumagai, J.; Kohari, Y.; Okuyama, Y.; Kwon, E.; Seki, C.; Uwai, K.; Mawatari, Y.; Kobayashi, N.; Iwasa, T.; Tokiwa, M.; Takeshita, M.; Maeda, A.; Hashimoto, A.; Turuga, K.; Nakano, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7292-7300.
- (43) Fraile, A.; Scarpino Schietroma, D. M.; Albrecht, A.; Davis, R. L.; Jørgensen, K. A. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 2773-2776.
- (44) Chen, W.; Yuan, X.-H.; Li, R.; Du, W.; Wu, Y.; Ding, L.-S.; Chen, Y.-C. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1818-1822.
- (45) Chen, W.; Du, W.; Duan, Y.-Z.; Wu, Y.; Yang, S.-Y.; Chen, Y.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7667-7670.
- (46) Izquierdo, C.; Esteban, F.; Parra, A.; Alfaro, R.; Alemán, J.; Fraile, A.; Ruano, J. L. G. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10417-10433.
- (47) Witten, M. R.; Jacobsen, E. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5912-5916.
- (48) Chen, Y.-R.; Zhan, G.; Du, W.; Chen, Y.-C. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 3759-3764.
- (49) Hammett, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96-103.
- (50) Erkkilä, A.; Majander, I.; Pihko, P. M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5416-5470.
- (51) Huang, Y.-Y.; Cai, C.; Yang, X.; Lv, Z.-C.; Schneider, U. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 5747-5763.
- (52) Orue, A.; Uria, U.; Roca-López, D.; Delso, I.; Reyes, E.; Carrillo, L.; Merino, P.; Vicario, J. L. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2904-2913.
- (53) Wang, Y.; Yu, T.-Y.; Zhang, H.-B.; Luo, Y.-C.; Xu, P.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12339-12342.
- (54) Schreiner, P. R.; Wittkopp, A. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 217-220.
- (55) Zhang, Z.; Schreiner, P. R. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1187-1198.
- (56) Xi, Y.; Shi, X. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8583-8585.
- (57) Raheem, I. T.; Thiara, P. S.; Peterson, E. A.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13404-13405.
- (58) Gotoh, H.; Uchimaru, T.; Hayashi, Y. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12337-12346.

- (59) Grošelj, U.; Seebach, D.; Badine, D. M.; Schweizer, W. B.; Beck, A. K.; Krossing, I.; Klose, P.; Hayashi, Y.; Uchimaru, T. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1225-1259.
- (60) Jakab, G.; Tancon, C.; Zhang, Z.; Lippert, K. M.; Schreiner, P. R. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1724-1727.
- (61) Ni, X.; Li, X.; Wang, Z.; Cheng, J.-P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1786-1789.
- (62) Bezençon, J.; Wittwer, M. B.; Cutting, B.; Smieško, M.; Wagner, B.; Kansy, M.; Ernst, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *93*, 147-155.
- (63) Merino, P.; Tejero, T. *Synlett* **2011**, *22*, 1965-1977.
- (64) Mirjafari, A.; Mobarrez, N.; O'Brien, R. A.; Davis Jr, J. H.; Noei, J. *C. R. Chim.* **2011**, *14*, 1065-1070.
- (65) Pitts, M. R.; Harrison, J. R.; Moody, C. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 955-977.
- (66) Kiessling, W.; Pritzkow, W.; Rudloff, Alkyl  $\alpha$ -oxiamidocarboxilate, DD71763, **1970**.
- (67) Miyabe, H.; Ueda, M.; Naito, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5043-5047.
- (68) Tjihuis, M. W.; Herscheid, J. D. M.; Ottenheijm, H. C. J. *Synthesis* **1980**, 890-893.
- (69) Hubregtse, T.; Hanefeld, U.; Arends, I. W. C. E. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2413-2422.

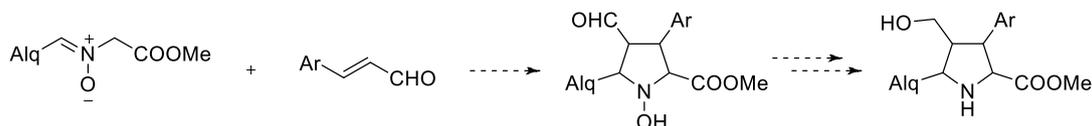


**CAPÍTULO 4**  
**REACCIÓN DE ILUROS DE**  
**C-ALQUILNITRONAS CON**  
**ALDEHÍDOS**



#### 4.1. Hipótesis de trabajo y estudio preliminar

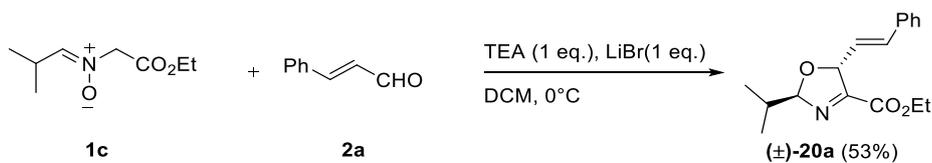
Durante el desarrollo del trabajo descrito en el capítulo anterior y con el fin de ampliar el alcance de la metodología de obtención de pirrolidinas quirales, se decidió llevar a cabo la reacción con nitronas que portaran un sustituyente alifático en el átomo de carbono (Esquema 4.1).



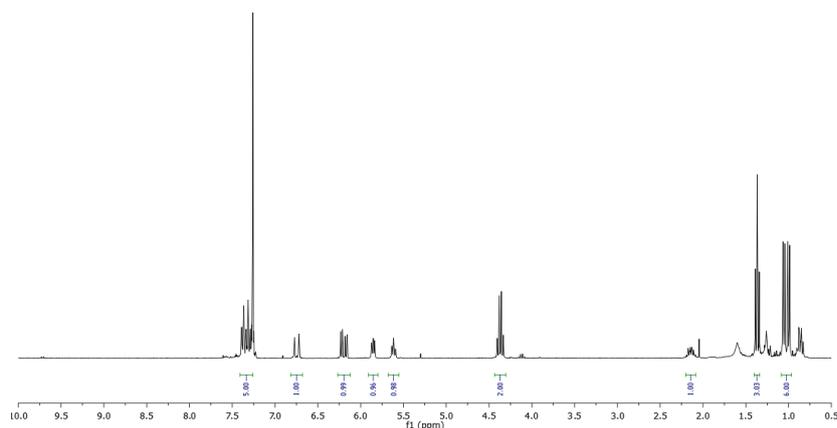
**Esquema 4.1.** Reacción de cicloadición de iluros de nitrona alifática y aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados

En primer lugar, se sintetizó la *C*-isopropilnitrona **1c** y se llevó a cabo la reacción con *trans*-cinamaldehído (**2a**), usando TEA y LiBr, en cantidades estequiométricas a 0°C, de acuerdo con el trabajo desarrollado con anterioridad en el grupo de investigación, para la obtención de *N*-hidroxipirrolidinas (Esquema 4.2).<sup>1</sup>

Se observó que el producto aislado de esta reacción no se correspondía con la *N*-hidroxipirrolidina esperada. El espectro de <sup>1</sup>H RMN mostraba que no se había producido adición sobre el doble enlace C=C, sino que había tenido lugar sobre el grupo carbonilo. En el espectro se observaron claramente las dos señales correspondientes a los protones olefínicos, mientras que había desaparecido la señal del protón del aldehído (Figura 4.1). Del análisis de los espectros de RMN se dedujo que el producto obtenido de la reacción era la 3-oxazolina **20a**.



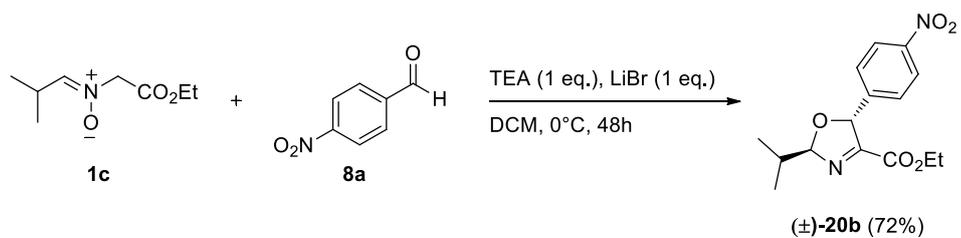
**Esquema 4.2.** Estudio preliminar de cicloadición de iluros de *C*-alquil nitronas



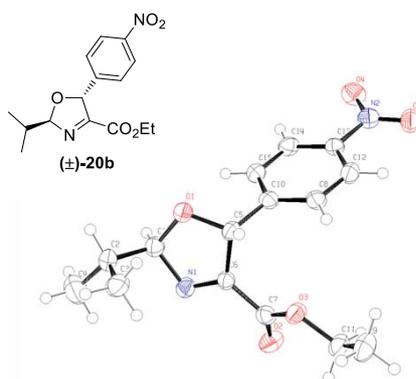
**Figura 4.1.**  $^1\text{H}$  RMN del producto **20a**

Con el fin de comprobar que la adición había tenido lugar sobre el grupo carbonilo, se repitió la reacción empleando esta vez 4-nitrobenzaldehído (**8a**), que no presenta un doble enlace C=C en su estructura (Esquema 4.3).

Esta reacción permitió obtener el producto de adición al grupo carbonilo **20b**, que fue cristalizado y su estructura resuelta mediante difracción de rayos X. El análisis cristalográfico permitió confirmar que los productos obtenidos eran 3-oxazolinas, los cuales se obtenían de forma totalmente estereoselectiva, ya que únicamente se observó el estereoisómero *trans* en ambos casos (Figura 4.2).



**Esquema 4.3.** Estudio preliminar de adición al carbonilo



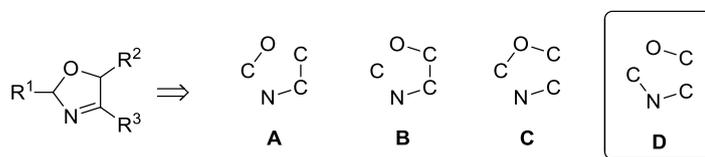
**Figura 4.2.** Diagrama ORTEP del compuesto **20b**, mostrando los elipsoides con un 50% de probabilidad

A raíz de este resultado, parecía interesante profundizar en el estudio de la reacción de cicloadición de iluros de nitrona con aldehídos para proporcionar 3-oxazolininas, ya que esta familia de compuestos ha sido escasamente estudiada en comparación con sus análogos las 2-oxazolininas.<sup>2-4</sup>

## 4.2. Aspectos generales sobre 3-oxazolinas

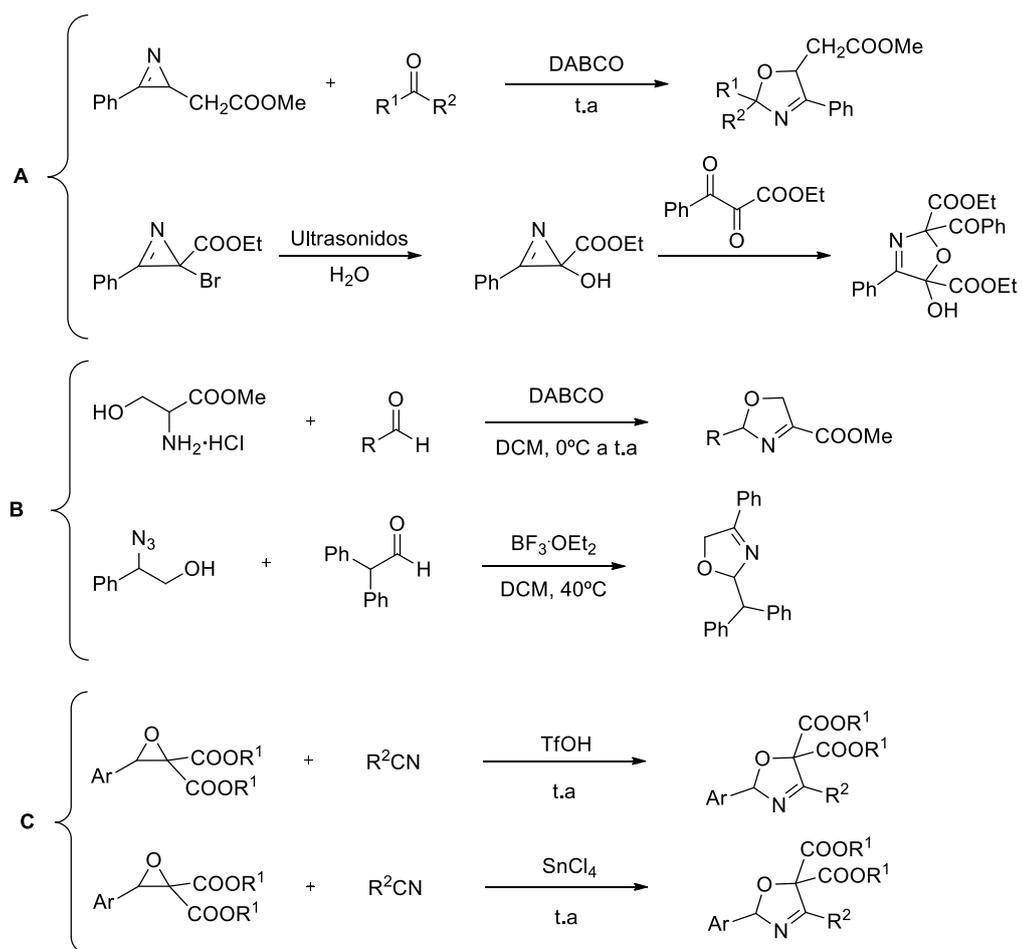
Las 3-oxazolinas, también denominadas, 2,5-dihidrooxazoles, son sistemas heterocíclicos que pueden ser utilizados como precursores de otros sistemas heterocíclicos, como oxazoles,<sup>5</sup> y además presentan aplicaciones en alimentación y perfumería.<sup>6,7</sup>

Si consideramos un análisis retrosintético de los fragmentos que se unen para formar el heterociclo, las estrategias sintéticas para la obtención de 3-oxazolinas, se pueden clasificar en tres grupos, que se representan en la Figura 4.3 (**A**, **B** y **C**). La reacción que habíamos encontrado, se corresponde con la desconexión **D**, que carece de antecedentes en la bibliografía.



**Figura 4.3.** Aproximaciones retrosintéticas de 3-oxazolinas

Los métodos descritos de obtención de 3-oxazolinas se basan en reacciones de apertura de aziridinas y posterior reacción con un compuesto carbonílico (Esquema 4.4, **A**),<sup>8-10</sup> reacciones de  $\beta$ -aminoalcoholes con aldehídos en medio básico (Esquema 4.4, **B**)<sup>11</sup> y recientemente, Zhong y colaboradores, han desarrollado una nueva metodología basada en una cicloadición (3+2) entre oxiranos y nitrilos promovida por ácido (Esquema 4.4, **C**).<sup>12,13</sup>



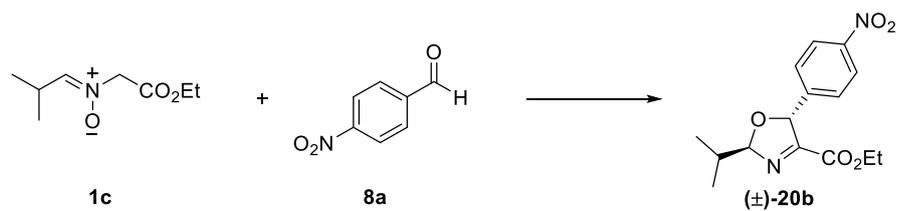
**Esquema 4.4.** Estrategias de síntesis de 3-oxazolininas

La reacción que se describe en esta Memoria constituye una nueva aproximación a 3-oxazolininas por cicloadición de un iluro de C-alkilnitrona con un aldehído (Figura 4.3 **D**). Además, es la única aproximación descrita en la bibliografía que permite preparar 3-oxazolininas de forma totalmente estereoselectiva.

### 4.3. Discusión de resultados

#### 4.3.1. Estudio de las condiciones de reacción

Para el estudio de las condiciones de reacción, se tomó como referencia la nitrona **1c** y el 4-nitrobenzaldehído (**8a**), utilizando inicialmente como base TEA y como sal de litio, LiBr. Los resultados de las diferentes condiciones estudiadas se recogen en la Tabla 4.1.



Esquema 4.5. Estudio de condiciones de reacción

**Tabla 4.1.** Estudio de las condiciones de reacción (Esquema 4.5)

| #                 | Base (eq.)  | Sal de litio (eq.)   | T (°C)              | t (h) | Disolvente | Rdto. (%) <sup>[a]</sup> |
|-------------------|-------------|----------------------|---------------------|-------|------------|--------------------------|
| 1                 | TEA (1.0)   | LiBr (1.0)           | 0                   | 48    | DCM        | 72                       |
| 2                 | TEA (1.0)   | LiBr (1.0)           | 0                   | 72    | MeCN       | 72                       |
| 3                 | TEA (1.0)   | LiBr (1.0)           | 50                  | 6     | MeCN       | 70                       |
| 4                 | TEA (1.0)   | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | MeCN       | 80                       |
| 5                 | TEA (1.0)   | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | DCM        | 68                       |
| 6                 | TEA (1.0)   | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | DMSO       | 36                       |
| 7                 | TEA (1.0)   | LiOAc (1.0)          | 25                  | 24    | MeCN       | 60                       |
| 8                 | TEA (1.0)   | CuBr (1.0)           | 25                  | 24    | MeCN       | 15                       |
| 9                 | DBU (1.0)   | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | MeCN       | 91                       |
| 10                | DABCO (1.0) | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | MeCN       | 94                       |
| 11 <sup>[b]</sup> | DABCO (1.0) | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | MeCN       | 10 <sup>[c]</sup>        |
| 12                | DABCO (1.0) | LiBr (0.5)           | 25                  | 24    | MeCN       | 88                       |
| 13                | DABCO (1.0) | LiBr (0.2)           | 25                  | 24    | MeCN       | 46                       |
| 14                | DABCO (0.5) | LiBr (1.0)           | 25                  | 24    | MeCN       | 90                       |
| 15                | DABCO (0.5) | LiBr (0.5)           | 25                  | 24    | MeCN       | 92                       |
| 16                | DABCO (0.2) | LiBr (0.2)           | 25                  | 48    | MeCN       | 30(30)                   |
| 17                |             | LiOH (1.0)           | 25                  | 12    | MeCN       | 87(8)                    |
| 18 <sup>[b]</sup> |             | LiOH (1.0)           | 25                  | 12    | MeCN       | 10 <sup>[c]</sup>        |
| 19                |             | LiOH (1.0)           | 25                  | 12    | EtOH       | 68                       |
| 20                |             | LiOH (0.5)           | 25                  | 12    | MeCN       | 80(15)                   |
| 21                |             | LiOH (0.2)           | 25                  | 96    | MeCN       | 10(50)                   |
| 22                |             | LiOH (0.1)           | 25                  | 96    | MeCN       | n.r. <sup>[c]</sup>      |
| 23                |             | <i>n</i> -BuLi (1.0) | -80                 | 24    | THF        | <10 <sup>[c]</sup>       |
| 24                |             | <i>n</i> -BuLi (1.0) | t.a. <sup>[d]</sup> | 12    | THF        | 74                       |
| 25                |             | <i>n</i> -BuLi (1.0) | -40 <sup>[d]</sup>  | 4     | THF        | 40 <sup>[c]</sup>        |
| 26                |             | <i>n</i> -BuLi (0.5) | -40 <sup>[d]</sup>  | 4     | THF        | 90                       |
| 27                |             | <i>n</i> -BuLi (0.2) | -40 <sup>[d]</sup>  | 4     | THF        | 90 <sup>[e]</sup>        |
| 28                |             | <i>n</i> -BuLi (0.1) | -40 <sup>[d]</sup>  | 24    | THF        | 68                       |

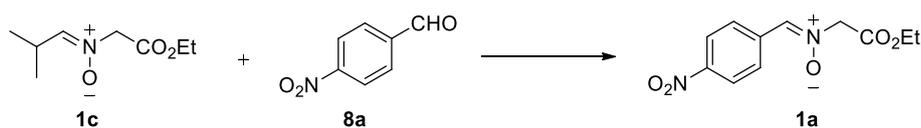
[a] Sólo se observa el isómero *trans*. Entre paréntesis se muestra el rendimiento de transoximación de la nitrona. [b] La reacción se lleva a cabo en presencia de tamices moleculares de 4Å. [c] Recuperación de los reactivos. [d] Adición de *n*-BuLi a -80°C y después de 5 min la reacción se lleva a la temperatura indicada. [e] El resultado es idéntico al pasar de -80°C a t.a.

En primer lugar se probaron diferentes temperaturas y disolventes (Tabla 4.1, entradas 1-6) concluyendo que los mejores resultados se obtenían a 25°C en acetonitrilo como disolvente.

A continuación se ensayó con acetato de litio y bromuro de cobre (I), pero se observó una disminución del rendimiento, principalmente en el caso de utilizar la sal de cobre (Tabla 4.1, entradas 7-8).

También se valoraron distintas bases orgánicas como DBU o DABCO (Tabla 4.1, entradas 9-10). En el caso de la utilización de DABCO como base se consiguió cierta mejora en el rendimiento (Tabla 4.1, comparar entradas 4 y 10), por lo que se decidió continuar los ensayos utilizando esta base. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción en presencia de tamices moleculares (Tabla 4.1, entrada 11). A la vista del bajo rendimiento obtenido, 10%, se dedujo que la presencia de agua en la reacción debía de resultar crucial.

En el siguiente paso del estudio de la reacción de cicloadición de iluros de nitrona y aldehídos, se planteó la hipótesis de que la reacción pudiera ser catalítica, tanto en base como en sal de litio. Así pues, se llevaron a cabo diversas pruebas variando la proporción de sal de litio, y también de base (Tabla 4.1, entradas 12-16), observándose que la reacción era catalítica en ambas especies. Por debajo de un 20 mol% de ambas especies (Tabla 4.1, entrada 16), se produce una pérdida considerable de rendimiento (30%) debido a la formación del producto de transoximación (**1a**), como resultado de la hidrólisis de la nitrona alifática y una posterior condensación con el aldehído aromático (Esquema 4.6). A pesar de la formación de una nueva nitrona, no se observó reactividad cruzada, siendo el producto **20c** el único presente en el medio de reacción.



**Esquema 4.6.** Reacción de transoximación de nitronas alifáticas

Con la intención de aunar la base y la sal de litio en una única especie se probó hidróxido de litio. Los resultados obtenidos (87%, Tabla 4.1, entrada 17) son comparables a los obtenidos con la combinación DABCO/LiBr, a pesar de que la solubilidad del LiOH en disolventes orgánicos es mucho menor. En estas condiciones se observó también la formación del producto de transoximación (**1a**) (8%, Tabla 4.1, entrada 17) descrito anteriormente. También se llevó a cabo la reacción en condiciones anhidras (Tabla 4.1, entrada 18), y como se había observado anteriormente, el rendimiento cayó a un 10%. En un intento de mejorar la solubilidad de LiOH en el

medio de reacción, se utilizó EtOH como disolvente, pero el rendimiento obtenido disminuyó apreciablemente (68%, Tabla 4.1, entrada 19). Como en el caso de la combinación DABCO/LiBr, el hidróxido de litio también puede usarse en cantidades catalíticas proporcionando rendimientos similares en tiempos de reacción más reducidos (Tabla 4.1, entradas 20-22). A pesar de estos resultados, los problemas de solubilidad y de transoximación, determinaron que la mejor opción para llevar a cabo la reacción era el empleo del sistema DABCO/LiBr.

Otro reactivo que se comporta como base y aporta el catión litio necesario es *n*-BuLi. La reacción empleando *n*-BuLi se llevó a cabo en THF anhidro a -80°C, usando cantidades equimoleculares de reactivos (Tabla 4.1, entrada 23). Se observó que tras 24 horas de reacción, el rendimiento no superó el 10%, sin embargo, si transcurridos 5 minutos después de la adición de *n*-BuLi a -80°C, la reacción se lleva a temperatura ambiente, el rendimiento aumenta a un 74% en la mitad el tiempo (Tabla 4.1, entrada 24). Una temperatura de reacción inferior, -40 °C, proporcionó tras 4 horas de reacción un 40% de rendimiento (Tabla 4.1, entrada 25). Por último, se valoró el empleo de una cantidad subestequiométrica de *n*-BuLi<sup>14</sup> (Tabla 4.1, entradas 26-28).\* Como se muestra en la Tabla 4.1, el rendimiento aumentó al disminuir la proporción de *n*-BuLi de forma que el empleo de un 20 mol% de permitió obtener la 3-oxazolina **20c** con un 90% de rendimiento en 4 horas.

El estudio preliminar de la reacción mostró dos condiciones óptimas:

Método A: *n*-BuLi (20 mol%), THF anh., de -80 a -40 °C

Método B: DABCO (50 mol%), LiBr (50 mol%), MeCN, 25 °C

Ambas condiciones fueron las que se emplearon para analizar el alcance de reacción como se describe a continuación.

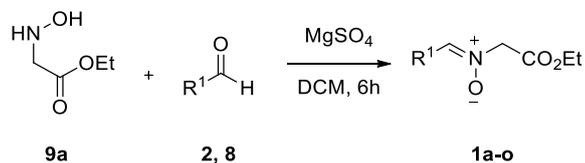
#### 4.3.2. Estudio del alcance de reacción

Con el fin de evaluar la versatilidad en la formación de 3-oxazolininas a partir de la reacción de cicloadición de iluros de nitronas con aldehídos, se decidió preparar una serie de nitronas, cuya síntesis aparece representada en la Esquema 4.7. La condensación de la hidroxilamina **9a** con distintos aldehídos (**8**) proporciona las correspondientes nitronas (**1a-o**) con excelentes rendimientos.

---

\* En la bibliografía aparece un único ejemplo (ref. 14) en el que se emplean cantidades subestequiométricas de *n*-BuLi, en concreto en la adición de fosfitos a carbonilos.

Las nitronas sintetizadas aparecen recogidas en la Tabla 4.2 e incluyen nitronas alifáticas y aromáticas, y dentro de estas encontramos, sustituyentes tanto dadores como aceptores, así como nitronas heteroatómicas o conjugadas.



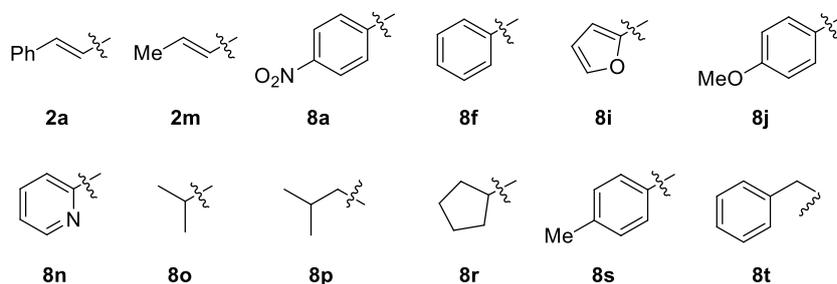
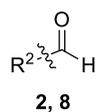
**Esquema 4.7.** Síntesis de nitronas

**Tabla 4.2.** Síntesis de nitronas acíclicas (Esquema 4.7)

| Nitrona   | Aldehído  | R <sup>1</sup>                                  | Rdto (%) <sup>[a]</sup> |
|-----------|-----------|---|-------------------------|
| <b>1a</b> | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 92                      |
| <b>1b</b> | <b>8b</b> | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 93                      |
| <b>1c</b> | <b>8o</b> | <i>i</i> -Pr                                    | 90                      |
| <b>1d</b> | <b>8p</b> | <i>i</i> -Bu                                    | 88                      |
| <b>1e</b> | <b>8q</b> | Ciclohexil                                      | 90                      |
| <b>1f</b> | <b>8r</b> | Ciclopentil                                     | 90                      |
| <b>1g</b> | <b>2a</b> | Ph-CH=CH  | 92                      |
| <b>1h</b> | <b>8e</b> | 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 91                      |
| <b>1i</b> | <b>8f</b> | Ph  | 85                      |
| <b>1j</b> | <b>8i</b> | 2-furil   | 80                      |
| <b>1k</b> | <b>8j</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | 95                      |
| <b>1l</b> | <b>8k</b> | 3-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | 87                      |
| <b>1m</b> | <b>8l</b> | 1,1'-bifenil                                    | 94                      |
| <b>1n</b> | <b>8m</b> | 2-naftil  | 91                      |
| <b>1o</b> | <b>8n</b> | 2-piridil                                       | 88                      |

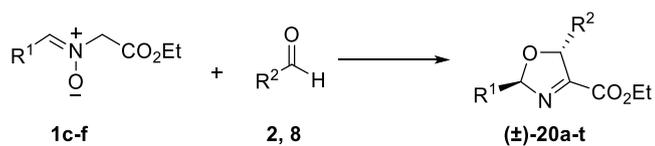
[a] Rendimiento del producto aislado tras cromatografía en columna

Para estudiar el alcance de la reacción, también se seleccionaron una serie de aldehídos de caracteres diferentes, que incluyen alifáticos, aromáticos, heteroaromáticos y conjugados. Estos aldehídos aparecen representados en la Figura 4.4.



**Figura 4.4.** Aldehídos escogidos para el estudio de cicloadición

Se aplicaron las dos metodologías anteriormente optimizadas (Método A y B) con el fin de poder comparar resultados. En la Tabla 4.3 que se muestra a continuación aparecen resumidos los resultados obtenidos.



**Esquema 4.8.** Estudio del alcance de la reacción

**Tabla 4.3.** Estudio del alcance de la reacción (Esquema 4.8)

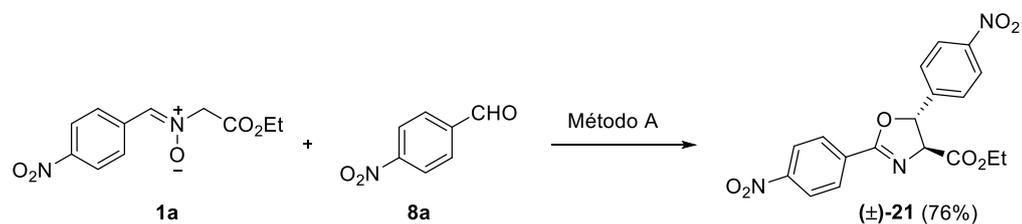
| #                 | Nitrona   | R <sup>1</sup> | Aldehído  | R <sup>2</sup>                                  | Prod.      | Rdto. (%) <sup>[a][b]</sup> |
|-------------------|-----------|----------------|-----------|---|------------|-----------------------------|
| 1 <sup>[c]</sup>  | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>2a</b> | ( <i>E</i> )-PhCH=CH                            | <b>20a</b> | 69 (53)                     |
| 2                 | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | <b>20b</b> | 90 (92)                     |
| 3                 | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8f</b> | Ph  | <b>20c</b> | 89 (90)                     |
| 4 <sup>[c]</sup>  | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8s</b> | 4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               | <b>20d</b> | 78 (69)                     |
| 5 <sup>[d]</sup>  | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8j</b> | 4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>              | <b>20e</b> | 75 (64)                     |
| 6                 | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8o</b> | <i>i</i> -Pr                                    | <b>20f</b> | 86 (82)                     |
| 7                 | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8p</b> | <i>i</i> -Bu                                    | <b>20g</b> | 88 (89)                     |
| 8                 | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8r</b> | ciclopentil                                     | <b>20h</b> | 89 (85)                     |
| 9                 | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8t</b> | PhCH <sub>2</sub>                               | <b>20i</b> | 93 (91)                     |
| 10 <sup>[c]</sup> | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>2m</b> | ( <i>E</i> )-MeCH=CH                            | <b>20j</b> | 78 (71)                     |
| 11                | <b>1d</b> | <i>i</i> -Bu   | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | <b>20k</b> | 93 (90)                     |
| 12                | <b>1d</b> | <i>i</i> -Bu   | <b>8f</b> | Ph  | <b>20l</b> | 88 (85)                     |
| 13                | <b>1e</b> | ciclohexil     | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | <b>20m</b> | 92 (90)                     |
| 14                | <b>1e</b> | ciclohexil     | <b>8f</b> | Ph  | <b>20n</b> | 90 (87)                     |
| 15                | <b>1e</b> | ciclohexil     | <b>8o</b> | <i>i</i> -Pr                                    | <b>20o</b> | 78 (80)                     |
| 16 <sup>[c]</sup> | <b>1e</b> | ciclohexil     | <b>2m</b> | ( <i>E</i> )-MeCH=CH                            | <b>20p</b> | 72 (68)                     |
| 17                | <b>1f</b> | ciclopentil    | <b>8a</b> | 4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | <b>20q</b> | 92 (89)                     |
| 18                | <b>1f</b> | ciclopentil    | <b>8f</b> | Ph  | <b>20r</b> | 90 (86)                     |
| 19                | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8n</b> | 2-piridil                                       | <b>20s</b> | 86 (89)                     |
| 20                | <b>1c</b> | <i>i</i> -Pr   | <b>8i</b> | 2-furil   | <b>20t</b> | 92 (90)                     |

[a] Método A: 20 mol% BuLi, THF, de -80° C a -40°C, 4 h. Método B (entre paréntesis): 50 mol% DABCO, 50 mol% LiBr, MeCN, t.a., 24 h. [b] Aislado tras purificación por columna cromatográfica. Únicamente se obtiene el isómero *trans*. [c] Tiempo de reacción 36 h. [d] Tiempo de reacción 48 h.

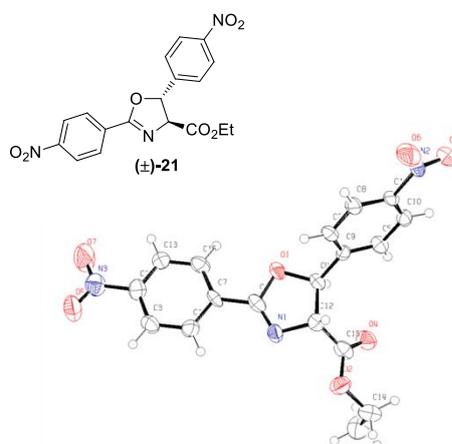
Los resultados obtenidos por ambas metodologías resultan ser comparables. En cuanto a las nitronas con un sustituyente alifático, la reacción transcurre tanto con aldehídos alifáticos como aromáticos. En el caso de aldehídos con sustituyentes dadores (Tabla 4.3, entradas 4-5) y de aldehídos conjugados (Tabla 4.3, entradas 1, 10 y 16) se requiere de un tiempo adicional para alcanzar buenos rendimientos. Con estos últimos en ningún momento se observó la formación del producto de adición al doble enlace.

El alcance de la cicloadición, en cuanto a las nitronas, es limitado, ya que únicamente las nitronas alifáticas dan lugar a la reacción de formación de 3-oxazolininas. Las nitronas aromáticas, heteroaromáticas y conjugadas no dan lugar a la transformación (**1b**, **1g-o**). Únicamente, la nitrona derivada del 4-nitrobenzaldehído **1a**

reacciona con el 4-nitrobenzaldeído (**8a**) para formar la correspondiente 2-oxazolina **21** (Esquema 4.9). El análisis por difracción de rayos X del producto aislado, mostró que también había sido obtenido de forma totalmente estereoselectiva (Figura 4.5).



**Esquema 4.9.** Reacción de obtención de 2-oxazolina (**21**)



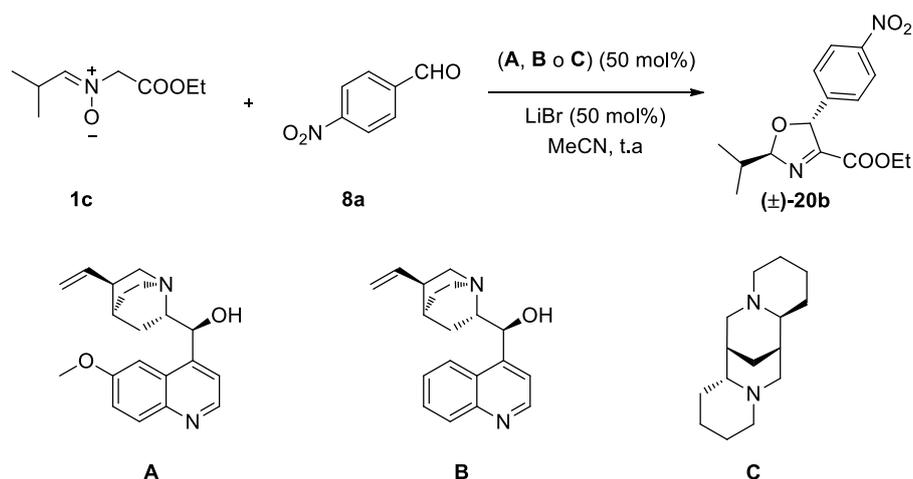
**Figura 4.5.** Diagrama ORTEP del compuesto **21**, mostrando los elipsoides con un 50% de probabilidad

Estos resultados ilustran el hecho de que en esta reacción, las *C*-arilnitronas son menos reactivas que las *C*-alquilnitronas y que sólo en el caso más favorable, el del compuesto **1a**, en el que el carbono de la nitrona es más electrófilo y lo mismo para el aldehído, se produce la transformación. La formación de la 2-oxazolina **21** puede deberse a la migración del doble enlace como consecuencia de una estabilización por conjugación.

#### 4.3.3. Estudio de obtención de 3-oxazolinas enantioméricamente puras

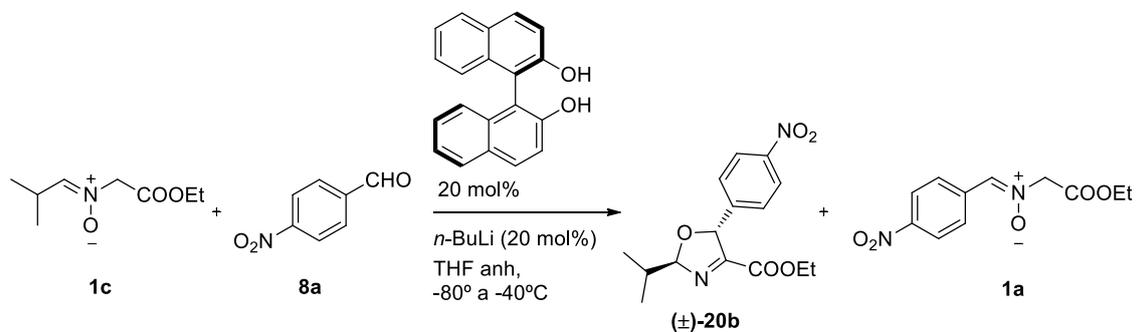
Tal y como se ha comentado hasta ahora, la metodología desarrollada permite la obtención de 3-oxazolinas haciendo uso de una base y una sal de litio, generando únicamente el estereoisómero *trans*. Con el fin de obtener el producto de forma enantioméricamente pura, se llevaron a cabo una serie de pruebas empleando bases no racémicas. Así, se sustituyó la base, DABCO, por compuestos como quinidina (**A**),

cinchonidina (**B**) y esparteína (**C**) que pueden actuar como base y son ópticamente activos. Estas pruebas permitieron la obtención de la correspondiente 3-oxazolina, sin embargo, el análisis del producto mediante HPLC quiral, indicó que en todos los casos, se trataba de una mezcla equimolecular de enantiómeros (Esquema 4.10). Este resultado parecía indicar que, si bien la base es necesaria para arrancar un protón, no participa en la etapa en la que se forman los centros estereogénicos de la 3-oxazolina.



**Esquema 4.10.** Reactividad en presencia de bases enantioméricamente puras

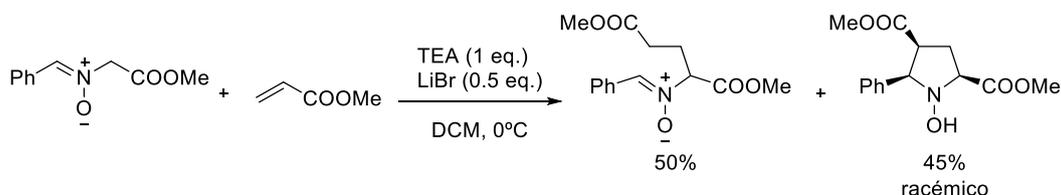
También se probó el uso de (*R*)-Binol para inducir asimetría. Con esto, se intentó conseguir la coordinación de litio a los grupos hidroxilo del binol y así que estuviera situado en un entorno asimétrico. En esta reacción se obtuvo únicamente un 30% de rendimiento (**20b**) ya que el producto mayoritario fue la nitrona generada por transoximación (**1a**) (Rdto= 45%). El análisis por HPLC quiral indicó que se obtenía la 3-oxazolina (**20b**) como una mezcla equimolecular de sus enantiómeros (Esquema 4.11).



**Esquema 4.11.** Reactividad en presencia de (*R*)-Binol

#### 4.4. Estudio del mecanismo de reacción

El estudio de la reacción de cicloadición de iluros de *C*-arilnitronas con ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados, desarrollado con anterioridad en nuestro grupo de investigación,<sup>1</sup> demostró que el proceso transcurriría por pasos, gracias al aislamiento del intermedio inicial de la adición Michael y a los resultados de los cálculos computacionales (Esquema 4.12).



**Esquema 4.12.** Adición por pasos de iluro de nitrona a éster  $\alpha,\beta$ -insaturado

Por el contrario, para la reacción entre iluros de *C*-alquilnitronas y aldehídos en condiciones catalíticas, ningún intento de aislar un intermedio ha dado resultado. Sobre el mecanismo de la reacción, el único dato experimental que se tiene es que en presencia de tamices moleculares, la reacción no tiene lugar, por lo que la presencia de agua, tal y como se ha comentado, resulta indispensable.

##### 4.4.1 Estudios espectroscópicos

Se llevaron a cabo estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN) con el fin de elucidar el mecanismo de la reacción. Para ello, una mezcla de nitrona **1c** y aldehído **8a** en THF-*d*<sub>8</sub> como disolvente a -80 °C, se trató con un 20 mol% de *n*-BuLi monitorizándolo su evolución por RMN (Figura 4.6). La traza **A** de la figura muestra una sección del espectro de la mezcla de nitrona y aldehído. Se observó que las señales aromáticas y del protón de nitrona a 6.90 ppm desaparecían completamente tras la adición de un 20 mol% de *n*-BuLi a -80 °C y tras 2 minutos (Figura 4.6, traza **B**) aparecía una señal característica del producto a 6.20 ppm, correspondiente a H5. También se observó la aparición de dos señales nuevas a 4.40 y 5.31 ppm, que experimentos selectivos TOCSY indicaron que correlacionaban entre sí y que podrían corresponder a las señales de los protones H4 y H5 del intermedio **IN4**. La reacción no progresó a -80 °C después 4 horas (Figura 4.6, traza **C**), pero después de calentar a -40 °C, al cabo de 4 horas, las señales de 4.40 y 5.31 ppm desaparecieron y únicamente se observaron las señales correspondientes al producto final (Figura 4.6, traza **D**). Esto evidencia el hecho de que la 3-oxazolinona se forma durante el transcurso de la reacción

sin que sea necesario el aporte de una fuente de protones cuando se detiene la reacción o mediante un agente externo.

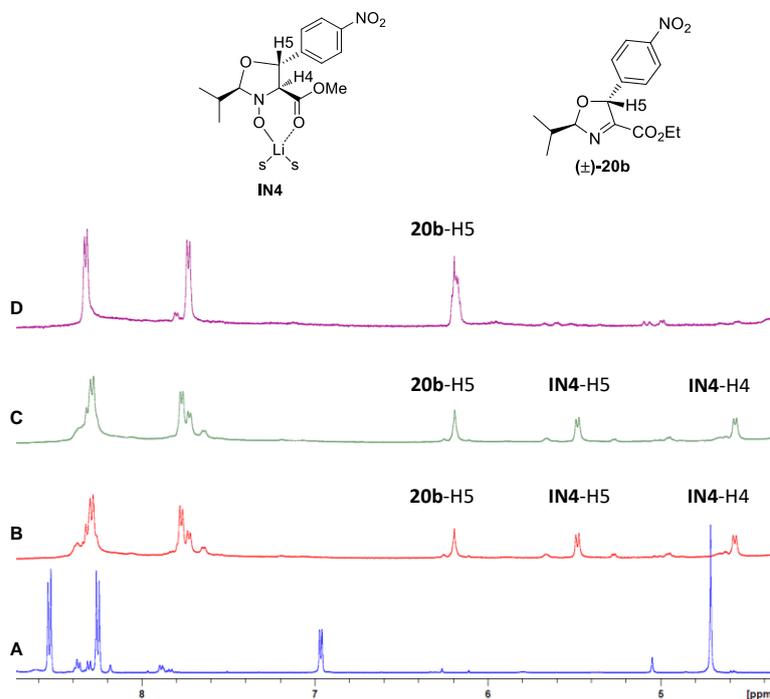


Figura 4.6. Estudios espectroscópicos de RMN

#### 4.4.2 Estudios computacionales

Debido a la falta de información experimental sobre otros posibles intermedios de reacción, se decidió estudiar el mecanismo mediante técnicas computacionales. Para ello se modelizó la reacción entre la nitrona (**NI**) y el aldehído (**AL**) catalizada por *n*-BuLi considerando la formación del correspondiente iluro de nitrona (**YL**) como primer paso de la reacción. Para conseguir una mayor eficiencia en los cálculos teóricos, la nitrona utilizada como modelo se simplificó considerando un resto metilo en el sustituyente alifático, al igual que el aldehído (Esquema 4.13).



Esquema 4.13. Reacción modelo para el estudio computacional

Se ha llevado a cabo un estudio completo de todos los posibles caminos de reacción y la optimización de todas las geometrías, usando M06-2X/6-311+G(d,p)/PCM=THF

como nivel de teoría. El ciclo catalítico que se propone aparece representado en la Figura 4.7.

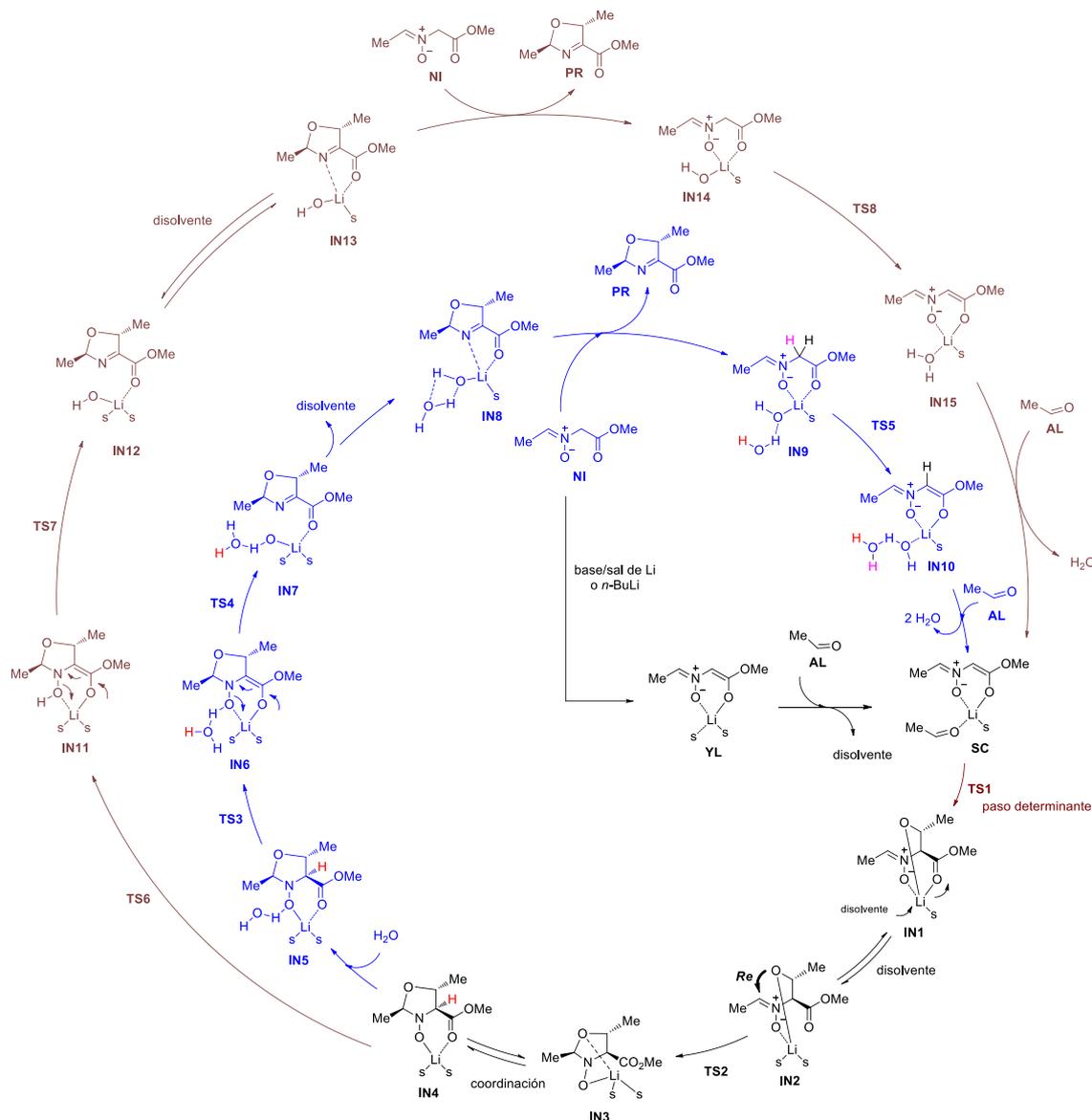


Figura 4.7. Ciclo catalítico

Para poder explicar con más claridad el mecanismo de reacción, se ha representado en marrón el ciclo en condiciones anhidras, que tiene lugar en la primera vuelta o cuando se emplea *n*-BuLi en cantidad equimolecular. En azul, se representa el ciclo catalítico en presencia de agua que se ha generado tras el primer ciclo y que como se va a comentar, requiere de menor energía, por lo que una vez que se ha formado la primera molécula de agua (final del ciclo marrón), el ciclo transcurre por el camino azul.

De forma general, el ciclo catalítico se compone de los siguientes pasos; en primer lugar se produce la formación de iluro que se coordina a litio (YL) al igual que el

aldehído, formando el complejo inicial (**SC**) en el cual ambos reactivos se encuentran activados. Este complejo puede evolucionar por dos caminos diferentes, dependiendo de la cara del aldehído por la que ataca el iluro (Figura 4.8). En los cálculos, así como en las figuras, sólo se ha considerado la aproximación inicial por la cara *Si* del iluro, ya que el ataque por la otra cara daría lugar a los correspondientes enantiómeros con los mismos valores de energía. Los estados de transición encontrados, **TS1-a**, para el ataque por la cara *Si*, y **TS1-b**, para la cara *Re* del aldehído, generan los intermedios **IN1-a** e **IN1-b** respectivamente que, tras un cambio en la coordinación en el que entra una molécula de disolvente, generan **IN2-a** e **IN2-b**. Estos intermedios tienen la flexibilidad conformacional suficiente para dar dos posibles ataques, dependiendo de la cara de la nitrona (a través de **TS2-a-Re** y **TS2-a-Si** desde **IN2-a** y **TS2-b-Re** y **TS2-b-Si** desde **IN2-b**) y generar el anillo de 1,3-oxazolidina (**PR**).

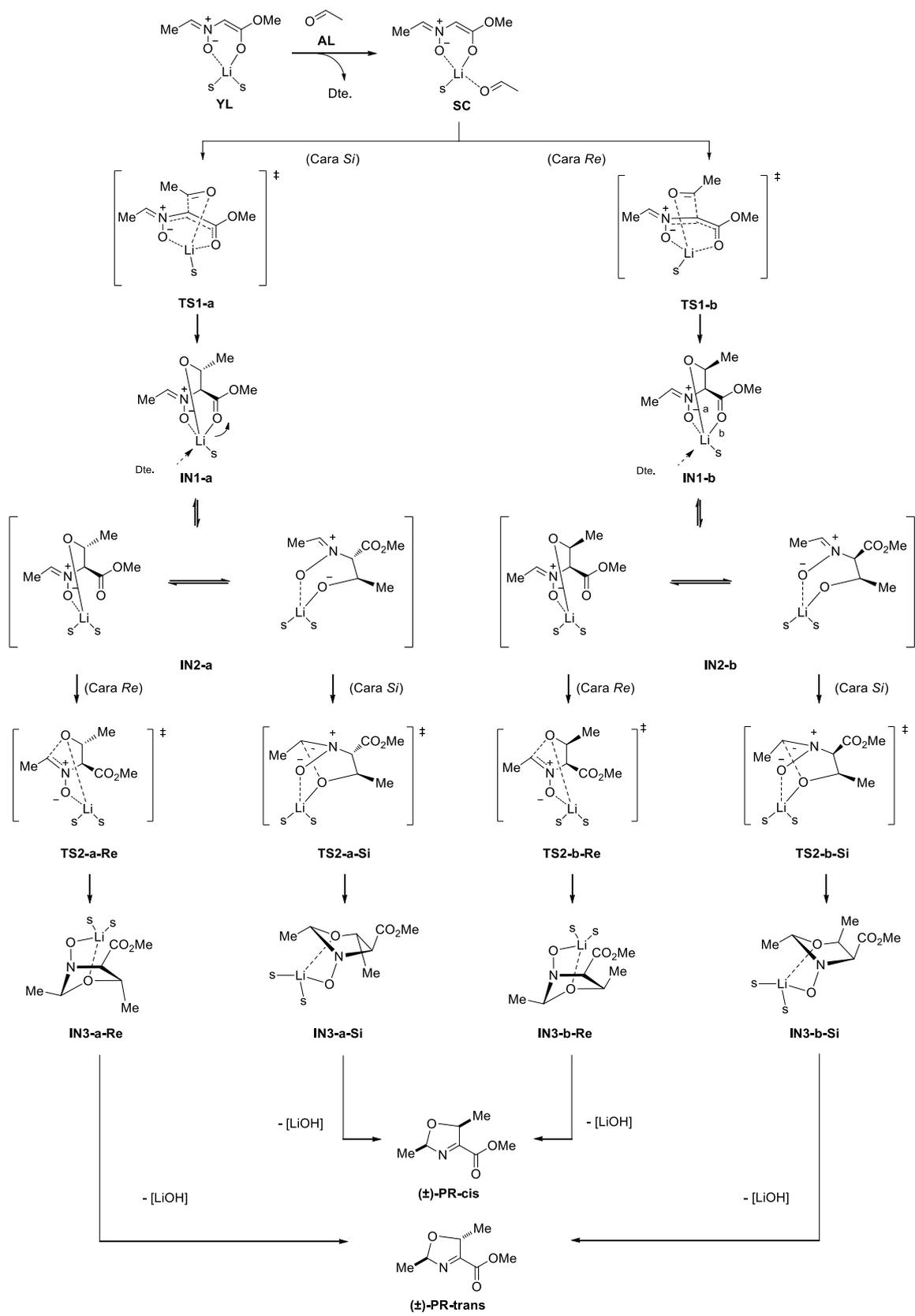
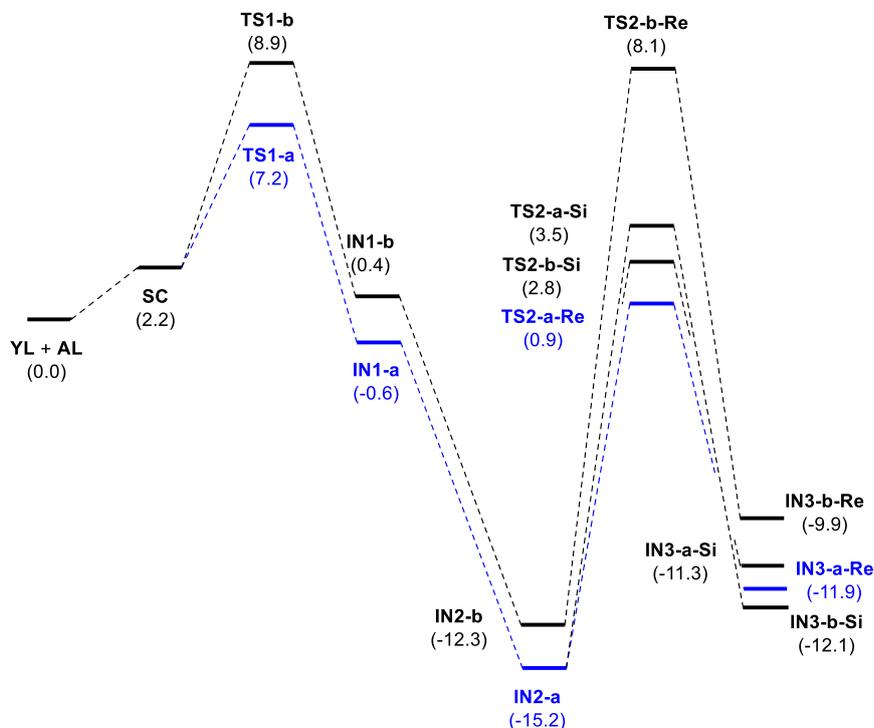


Figura 4.8. Reacción entre YL y AL

Así pues, **IN3-a-Re** y **IN3-b-Si** convergen al estereoisómero *trans* racémico (**PR-trans**), mientras que **IN3-a-Si** y **IN3-b-Re** convergen al racémico *cis* (**PR-cis**). La selectividad *cis/trans* se debe valorar según las diferentes energías, que se ilustran en la Figura 4.9.



**Figura 4.9.** Diagrama de energía para la reacción entre YL y AL

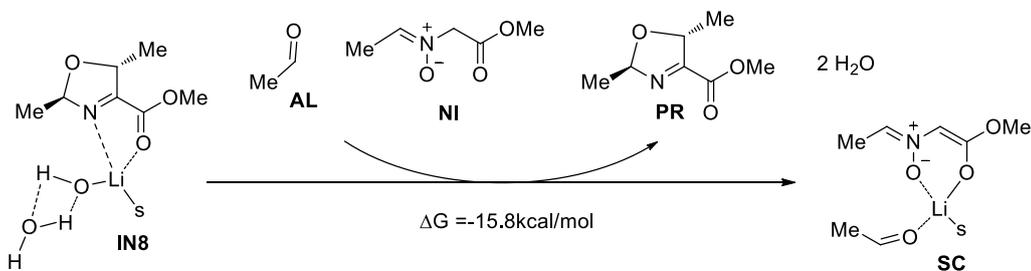
Teniendo en cuenta que el paso determinante de la velocidad de la reacción es la formación de **IN1**, la formación de **IN1-a** está favorecida energéticamente frente a **IN1-b** (1.7 kcal/mol), por lo que tras el cambio en la coordinación del intermedio, se genera principalmente **IN2-a**. Este intermedio puede ciclar por ambas caras de la nitrona, sin embargo, la cara *Re* se encuentra favorecida en energía (2.6 kcal/mol), por lo que se obtiene mayoritariamente el estereoisómero *trans* del producto, lo cual está en concordancia con los datos experimentales.

Tras un cambio en la coordinación del catión litio en **IN3** para formar **IN4**, la interacción con una molécula de agua (**IN5**) promueve la migración del protón, marcado en rojo en el ciclo catalítico (Figura 4.7), proporcionando el enolato **IN6**, lo que facilita la ruptura del enlace N-O para dar el intermedio **IN7** con el anillo de 3-oxazolina. El paso desde **IN4** hasta **IN7**, puede considerarse como un proceso de  $\beta$ -eliminación asistido por el catión litio. Finalmente, la pérdida de una molécula de disolvente del catión litio, forma **IN8**, precursor inmediato del producto final. Una nueva molécula de

nitrona (**NI**) desplaza la oxazolina (**PR**) y regenera la especie catalíticamente activa (**IN9**), que vuelve a entrar en el ciclo, formando el complejo activado (**SC**) y generando una molécula de agua que resulta necesaria para el progreso de la reacción. De hecho, si se elimina el agua de la reacción, tal y como se ha observado experimentalmente (Tabla 4.1, entradas 11 y 18) con la presencia de tamices moleculares, el rendimiento decae drásticamente.

Cuando se utilizan cantidades estequiométricas de base/sal de litio, la reacción se completa en un sólo ciclo. En este caso, la prototropía que sufre **IN4** puede estar facilitada por el ácido conjugado de la base empleada (DABCO- $H^+$ ). Cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de 1 eq. de *n*-BuLi (ciclo marrón), la transformación de **IN4** pasa a través de un estado de transición intramolecular (**TS6**) de mayor energía ( $\Delta G = 10$  kcal/mol), lo cual justifica el bajo rendimiento obtenido (Tabla 4.1, entrada 23). Para poder sobrepasar esta barrera y obtener un mayor rendimiento, es necesario un aporte energético que se consigue al aumentar la temperatura de  $-80^\circ\text{C}$  a  $-40^\circ\text{C}$  (Tabla 4.1, entradas 24 y 25).

La fuerza directriz del ciclo catalítico de menor energía, el representado en azul, se determina por la diferencia de energía de **IN8**, el aldehído (**AL**) y la nitrona (**NI**) con la regeneración del complejo activado (**SC**), el producto (**PR**) y dos moléculas de  $H_2O$ . En este caso el valor es de  $\Delta G = -15.8$  Kcal/mol (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Fuerza directriz del ciclo catalítico

## 4.5 Conclusiones

Las nitronas acíclicas alifáticas han demostrado ser reactivos de gran interés para la preparación de nuevos heterociclos.

Las nitronas con un resto alifático en el átomo de carbono reaccionan con aldehídos en presencia de una base y del catión litio, dando lugar a 3-oxazolininas 2,5-disustituidas con estereoquímica *trans*.

En el caso de que el aldehído sea  $\alpha,\beta$ -insaturado se obtiene únicamente el producto de adición al grupo carbonilo, sin observarse en ningún momento la adición al doble enlace C=C.

Las nitronas preparadas con un resto aromático en el átomo de carbono del grupo funcional nitrona, no reaccionan con aldehídos en condiciones similares y por lo tanto no generan 3-oxazolininas. Únicamente, la nitrona con un grupo *p*-nitrofenilo en el átomo de carbono reacciona dando lugar en este caso a una 2-oxazolinina, por conjugación del doble enlace con el anillo aromático.

La presencia del catión litio en cantidades subestequiométricas promueve el ciclo catalítico activando los reactivos y facilitando la eliminación de agua, necesaria para que la reacción progrese. Por tanto, la reacción descrita puede considerarse como autocatalítica.

El exceso de agua o sales de litio, como LiOH, provoca una reacción paralela indeseada de transoximación.

La presencia de bases o auxiliares quirales no influye en la estereoselectividad del proceso, que sigue siendo totalmente *trans*, pero no son capaces de inducir quiralidad.

El mecanismo propuesto justifica que sin agua en el medio de reacción la energía necesaria para la transformación es muy superior y por lo tanto el rendimiento obtenido es muy bajo.

## 4.6 Experimental Section

### General Methods

**Miscellaneous:** Analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. Anhydrous solvents were purified and dried with activated molecular sieves prior to use. All the glassware was dried for 12 hours prior to use in an oven at 140°C, and allowed to cool under humidified atmosphere. Reactions were monitored using analytical thin layer chromatography (TLC), in pre-coated silica-backed plates (DC-Fertigfolien ALUGRAM<sup>®</sup> xtra SIL G/UV<sub>254</sub>). These were visualized by ultraviolet irradiation, permanganate potassium or *p*-anisaldehyde dips. For flash chromatography Silica Gel 60, 63-200 microns was used. For the removal of solvents under reduced pressure Büchi R-210 rotary evaporators were used.

**NMR:** <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR were acquired at 25°C on Bruker Avance 400 MHz or AVANCE II 300 MHz instruments in the stated solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm relative to residual solvent signals and coupling constants (*J*) in hertz (Hz). NMR assignments were using standard 2D experiments.

**Melting points:** m.p. were determined in a Büchi instrument and they were uncorrected.

**Elemental analyses:** were performed on a Perkin Elmer 240B microanalyzer or with a Perkin-Elmer 2400 instrument.

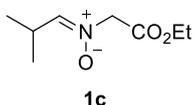
**HPLC:** High performance liquid chromatography on chiral stationary phase was performed in a Waters 2695 chromatograph coupled to a Waters 2998 photodiode array detector. Diacel Chiralpack *IA* column (0.46 cm x 25 cm) was used.

**X-ray:** data collections were performed in an Agilent Supernova diffractometer equipped with an Atlas CCD area detector, and a CuK $\alpha$  micro-focus source with a multilayer optics ( $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ , 250  $\mu\text{m}$  FWHM beam size). The sample was kept at 120 K with a Oxford Cryosystems Cryostream 700 cooler. The quality of the crystals was checked under polarizing microscope, and a suitable crystal or fragment was mounted on a Mitegen Micromount<sup>TM</sup> using Paratone N inert oil and transferred to the diffractometer.

### Synthesis of acyclic nitrones **1c-o**

According to general procedure A, explained in chapter 3 section 3.6, nitrones **1c-o** has been prepared.

#### (*Z*)-2-ethoxy-N-(2-methylpropylidene)-2-oxoethanamine oxide (**1c**).



Following the general procedure, **1c** (338 mg, 1.95 mmol) was isolated as a yellow oil. Yield: 90%.

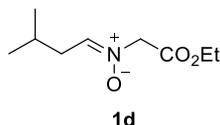
$R_f = 0.10$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  1,08 (d, 6H,  $J=6,8$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ) 1,24 (t, 3H,  $J=7,1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 3,07-2,94 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 4,18 (q, 2H,  $J=7,1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4,61 (s, 2H,  $\text{N-CH}_2$ ), 6,88 (d, 2H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH=N}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  14.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 18.8 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 26.7 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 62.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 66.9 ( $\text{N-CH}_2$ ), 146.6 ( $\text{CH=N}$ ), 166.9 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_3$ : C, 55.47; H, 8.73; N, 8.09. Found C, 55.63; H, 8.65; N, 8.15

#### (*Z*)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-3-methylbutan-1-imine oxide (**1d**).



Following the general procedure, **1d** (358 mg, 1.91 mmol) was isolated as a yellow oil. Yield: 88%.

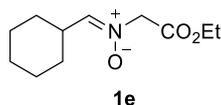
$R_f = 0.10$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.98 (d, 6H,  $J=6.7$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 1.29 (t, 3H,  $J=7.2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.90-2.00 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 2.45 (t, 2H,  $J=6.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 4.25 (q, 2H,  $J=7.2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.57 (s, 2H,  $\text{N-CH}_2$ ), 6.82 (t, 1H,  $J=6.0$  Hz,  $\text{CH=N}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 22.5 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 26.0 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 35.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 62.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 66.3 ( $\text{N-CH}_2$ ), 143.0 ( $\text{CH=N}$ ), 165.5 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_3$ : C, 57.73; H, 9.15; N, 7.48. Found C, 57.59; H, 9.05; N, 7.36.

**(Z)-1-cyclohexyl-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)methanimine oxide (1e).**



Following the general procedure, **1e** (417 mg, 1.95 mmol) was isolated as a white solid.

Yield: 90%. m.p. 58-60°C.

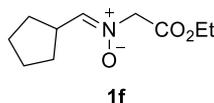
R<sub>f</sub> = 0.15; Hexane/EtOAc (5:5)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1.16-1.29 (m, 3H, CH<sub>2</sub> cy), 1.27 (t, 3H, J=7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.33-1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub> cy), 1.61-1.74 (m, 3H, CH<sub>2</sub> cy), 1.83-1.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub> cy), 2.86-2.95 (m, 1H, CH cy), 4.22 (q, 2H, J=7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.45 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 6.54 (d, 1H, J=7.3 Hz, CH=N).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.2 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub> cy), 26.4 (CH<sub>2</sub> cy), 28.9 (CH<sub>2</sub> cy), 35.6 (CH cy), 62.4 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 67.0 (CH<sub>2</sub>-N), 145.8 (CH=N), 166.2 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>: C, 61.95; H, 8.98; N, 6.57. Found C, 61.88; H, 9.13; N, 6.74

**(Z)-1-cyclopentyl-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)methanimine oxide (1f).**



Following the general procedure, **1f** (389 mg, 1.95 mmol) was isolated as a yellow oil.

Yield: 90%.

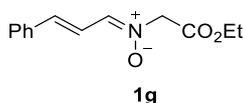
R<sub>f</sub> = 0.13; Hexane/EtOAc (5:5)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1.28 (t, 3H, J= 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.39-1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub> cy), 1.59-1.70 (m, 4H, CH<sub>2</sub> cy), 1.95-2.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub> cy), 3.30-3.18 (m, 1H, CH cy), 4.22 (q, 2H, J=7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.46 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 6.67 (d, 1H, J=7.2 Hz, N=CH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.2 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub> cy), 30.5 (CH<sub>2</sub> cy), 37.3 (CH cy), 62.4 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 66.7 (N-CH<sub>2</sub>), 146.8 (N=CH), 166.2 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>: C, 60.28; H, 8.60; N, 7.03. Found C, 60.37; H, 8.69; N, 6.91

**(1Z-2E)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-3-phenylprop-2-en-1-imine oxide (1g).**



Following the general procedure, **1g** (466 mg, 2 mmol) was isolated as a white solid.

Yield: 92%. m.p. 87-89 °C.

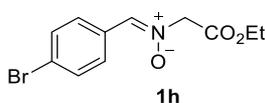
$R_f = 0.16$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.26 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.59 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 7.09 (d, 1H,  $J=15.8$  Hz,  $\text{CH=CH-CH}$ ), 7.27-7.46 (m, 5H,  $\text{CH=CH-CH}$ ,  $\text{CH=N}$ ,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.51-7.56 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 66.7 ( $\text{CH}_2$ ), 118.4 ( $\text{CH=CH-CH}$ ), 127.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 136.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 139.0 ( $\text{CH=N}$ ), 139.2 ( $\text{CH=CH-CH}$ ), 166.1 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ : C, 66.94; H, 6.48; N, 6.00. Found C, 67.00; H, 6.45; N, 5.99.

**(Z)-1-(4-bromophenyl)-N-2-ethoxy-2-oxoethylmethanimine oxide (1h).**



Following the general procedure, **1h** (565 mg, 1.97 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 91%. m.p. 96-98 °C.

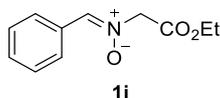
$R_f = 0.23$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.27 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.39 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 7.54-7.62 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.10-8.19 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.7 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 68.7 ( $\text{CH}_2$ ), 124.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 130.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 132.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 135.7 ( $\text{CH=N}$ ), 166.0 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$ : C, 46.18; H, 4.23; Br, 27.93; N, 4.90. Found C, 46.16; H, 4.25; Br, 27.88; N, 4.91

**(Z)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-phenylmethanimine oxide (1i).**



Following the general procedure, **1i** (382 mg, 1.84 mmol) was isolated as a yellow solid. Yield: 85%. m.p. 89-91 °C.

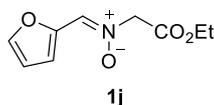
$R_f = 0.39$ ; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.27 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.69 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 7.42-7.47 (m, 3H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.46 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 8.19-8.27 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 68.6 (N- $\text{CH}_2$ ), 128.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 130.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 131.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 136.9 ( $\text{CH=N}$ ), 166.2 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>: C, 63.76; H, 6.32; N, 6.76. Found C, 63.81; H, 6.29; N, 6.75

**(Z)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-(furan-2-yl)methanimine oxide (1j).**



Following the general procedure, **1j** (342 mg, 1.74 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 80%. m.p. 65-67 °C.

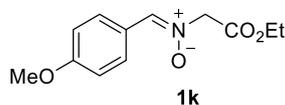
R<sub>f</sub> = 0.21; Hexane/EtOAc (5:5)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1.29 (t, 3H, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.25 (q, 2H, *J*=7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.65 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 6.59 (ddd, 1H, *J*= 3.5 Hz, *J*= 1.8 Hz, *J*=0.7 Hz, H<sub>Ar</sub>), 7.55 (dd, 1H, *J*= 1.8 Hz, *J*=0.7 Hz, H<sub>Ar</sub>), 7.61 (s, 1H, CH=N), 7.75 (d, 1H, *J*= 3.5 Hz, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.2 (CH<sub>3</sub>), 62.6 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 66.9 (N-CH<sub>2</sub>), 112.6 (C<sub>Ar</sub>), 115.9 (C<sub>Ar</sub>), 127.6 (CH=N), 144.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.0 (C<sub>Ar</sub>), 166.0 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>: C, 54.82; H, 5.62; N, 7.10. Found C, 54.86; H, 5.58; N, 7.15.

**(Z)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-(4-methoxyphenyl)methanimine oxide (1k).**



Following the general procedure, **1k** (489 mg, 2.06 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 95%. m.p. 91-93 °C.

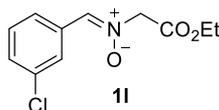
R<sub>f</sub> = 0.28; Hexane/EtOAc (3:7)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1.30 (t, 3H, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 4.26 (q, 2H, *J*=7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.89-7.00 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.33 (s, 1H, CH=N), 8.15-8.31 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>3</sub>-O), 62.5 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 68.2 (CH<sub>2</sub>), 114.2 (C<sub>Ar</sub>), 123.7 (C<sub>Ar</sub>), 130.8 (C<sub>Ar</sub>), 136.3 (C<sub>Ar</sub>), 161.8 (CH=N), 166.5 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>: C, 60.75; H, 6.37; N, 5.90. Found C, 60.70; H, 6.39; N, 5.87

**(Z)-1-(3-chlorophenyl)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)methanimine oxide (1l).**



Following the general procedure, **1l** (456 mg, 1.89 mmol) was isolated as a white solid.

Yield: 87%. m.p. 75-77 °C.

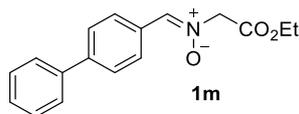
$R_f$  = 0.38; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.30 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.27 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.70 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.31-7.47 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.42 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 7.96-8.00 (m, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.43-8.44 (m, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.7 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 68.8 ( $\text{CH}_2$ ), 127.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 130.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 130.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 132.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 138.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 135.5 ( $\text{CH=N}$ ), 166.0 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ : C, 54.67; H, 5.01; Cl, 14.67; N, 5.80. Found C, 54.63; H, 5.09; Cl, 14.65; N, 5.80

**(Z)-1-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)methanimine oxide (1m).**



Following the general procedure, **1m** (578 mg, 2.04 mmol) was isolated as a white solid.

Yield: 94%. m.p. 88-90 °C.

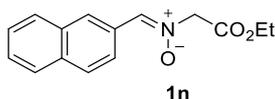
$R_f$  = 0.23; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.31 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.28 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.71 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.32-7.42 (m, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.43-7.50 (m, 3H,  $\text{CH=N}$ ,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.64-7.67 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.68-7.78 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.25-8.39 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 68.6 ( $\text{CH}_2$ ), 127.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 136.4 ( $\text{CH=N}$ ), 140.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 143.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 166.2 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ : C, 72.07; H, 6.05; N, 4.94. Found C, 72.02; H, 6.08; N, 4.93

**(Z)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-(naphthalene-2-yl)methanimine oxide (1n).**



Following the general procedure, **1n** (508 mg, 1.97 mmol) was isolated as a white solid.

Yield: 91%. m.p. 90-92 °C.

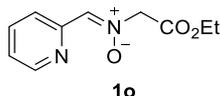
$R_f$  = 0.26; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.31 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.29 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.86 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.52-7.60 (m, 3H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.90-7.96 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.05-8.09 (m, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.22 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 9.46-9.49 (m, 1H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.3 ( $\text{CH}_3$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 69.3 ( $\text{CH}_2$ ), 122.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 125.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 125.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 126.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 131.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.7 ( $\text{CH=N}$ ), 133.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 166.4 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ : C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. Found C, 70.05; H, 5.87; N, 5.50

**(Z)-N-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-(pyridin-2-yl)methanimine oxide (1o).**



Following the general procedure, **1o** (398 mg, 1.91 mmol) was isolated as a yellow solid. Yield: 88%. m.p. 75-77 °C.

$R_f$  = 0.15; Hexane/EtOAc (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.29 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.26 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.75 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 7.31 (ddd, 1H,  $J=7.6$  Hz,  $J=4.8$  Hz,  $J=0.9$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.74 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ), 7.80 (td, 1H,  $J=7.6$  Hz,  $J=1.7$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.63 (ddd, 1H,  $J=4.8$  Hz,  $J=1.7$  Hz,  $J=0.9$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ), 9.08 (dt, 1H,  $J=7.6$  Hz,  $J=0.9$  Hz,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 68.7 ( $\text{CH}_2$ ), 123.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 124.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.3 ( $\text{CH=N}$ ), 149.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 150.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 165.8 (CO).

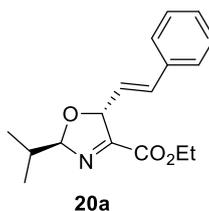
Anal Calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 57.69; H, 5.81; N, 13.45. Found C, 57.61; H, 5.79; N, 13.49.

### Synthesis of 3-oxazolines 20a-t.

**Method A.** To a cooled (-78 °C) solution of the corresponding nitron (0.5 mmol) in anhydrous THF (5 mL), *n*-BuLi (63  $\mu$ L of a 1.6M solution in hexanes, 0.1 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at -80°C for 15 min at which time a cooled (-78 °C) solution of aldehyde (0.5 mmol) in anhydrous THF (5 mL), was added via cannula. The reaction mixture was kept at -80°C for additional 5 min and then placed in bath a -40 °C for 4 hours. Ammonium chloride (1 mL) was added and the reaction mixture was warmed at ambient temperature, diluted with dichloromethane (15 mL) and treated with a saturated solution of ammonium chloride (10 mL). The organic layer was separated, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (gradient from hexane 100% to 7:3 hexane/EtOAc) to give the pure 3-oxazoline.

**Method B.** To a solution of the corresponding nitron (0.5 mmol) in acetonitrile (5 mL), aldehyde (0.5 mmol), DABCO (0.25 mmol) and LiBr (0.25 mmol) were added. The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 24 h at which time a saturated solution of ammonium chloride (10 mL) was added. The reaction mixture was diluted with dichloromethane (15 mL) and the organic layer was separated, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (gradient from hexane 100% to 7:3 hexane/EtOAc) to give the pure 3-oxazoline.

### Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-((*E*)-styryl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20a).



Following both methodologies, **20a** was isolated as yellow oil. Method A: 69%, 99 mg, 0.35 mmol. Method B: 53%, 76 mg, 0.27 mmol.

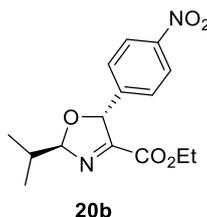
$R_f$  = 0.71; Hexane/EtOAc (7:3)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.00 (d, 3H,  $J=7.3$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.05 (d, 3H,  $J=7.3$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.37 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.20-2.08 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4.37 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.61 (td, 1H,  $J=6.4$  Hz,  $J=1.0$  Hz,  $H_5$ ), 5.85 (dd, 1H,  $J=6.4$  Hz,  $J=4.5$  Hz,  $H_2$ ), 6.20 (dd, 1H,  $J=15.8$  Hz,  $J=6.4$  Hz,  $\text{PhCH=CH}$ ), 6.75 (dd, 1H,  $J=15.8$  Hz,  $J=1.0$  Hz,  $\text{PhCH=CH}$ ), 7.39-7.27 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.1 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 16.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 33.6 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 62.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 86.1 ( $\text{C}_5$ ), 110.5 ( $\text{C}_2$ ), 123.8 ( $\text{PhCH=CH}$ ), 126.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.2 ( $\text{PhCH=CH}$ ), 136.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.6 ( $\text{C}_4$ ), 162.5 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ : C, 71.06; H, 7.37; N, 4.87. Found C, 71.23; H, 7.49; N, 4.62

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-(4-nitrophenyl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20b).**



Following both methodologies, **20b** was isolated as a white solid. Method A: 90%, 138 mg, 0.45 mmol. Method B: 92%, 141 mg, 0.46 mmol. m.p. 84-86 °C.

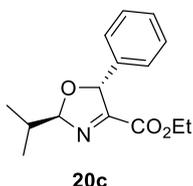
$R_f$  = 0.43; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.03 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.05 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.20-2.08 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4.22 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.22 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 6.02 (d, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 6.05 (dd, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $J=4.3$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.55-7.51 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 8.22-8.18 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 16.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 34.3 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 62.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 87.2 ( $\text{C}_5$ ), 112.6 ( $\text{C}_2$ ), 124.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 145.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.4 ( $\text{C}_4$ ), 162.0 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 58.82; H, 5.92; N, 9.15. Found C, 58.67; H, 6.11; N, 9.29

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-phenyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20c).**



Following both methodologies, **20c** was isolated as yellow oil. Method A: 89%, 116 mg, 0.45 mmol. Method B: 90%, 118 mg, 0.45 mmol.

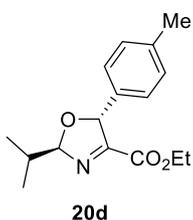
$R_f$  = 0.39; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.02 (d, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.07 (d, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.24 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.22-2.10 (m, 1H, CH), 4.23 (dq, 2H,  $J=10.9$  Hz,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.24 (dq, 2H,  $J=10.9$  Hz,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.94 (d, 1H,  $J=6.7$  Hz,  $H_5$ ), 6.00 (dd, 1H,  $J=6.7$ ,  $J=4.5$  Hz,  $H_2$ ), 7.37-7.27 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  13.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 16.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.7 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 33.8 (CH), 62.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 88.0 ( $C_5$ ), 111.5 ( $C_2$ ), 127.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.8 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 137.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 160.5 ( $C_4$ ), 163.1 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ : C, 68.94; H, 7.33; N, 5.36. Found C, 68.83; H, 7.45; N, 5.48

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-(*p*-tolyl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20d).**



Following both methodologies, **20d** was isolated as yellow oil. Method A: 78%, 107 mg, 0.39 mmol. Method B: 69%, 95 mg, 0.35 mmol.

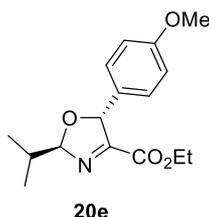
$R_f = 0.72$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.01 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.03 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.23 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.06-2.13 (m, 1H, CH), 2.33 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 4.20 (dq, 2H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.21 (dq, 2H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.87 (d, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $H_5$ ), 5.92 (dd, 1H,  $J=6.6$ ,  $J=4.7$  Hz,  $H_2$ ), 7.14-7.18 (m, 4H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 21.3 ( $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 34.2 (CH), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 88.1 ( $C_5$ ), 111.6 ( $C_2$ ), 127.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.6 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 135.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 139.0 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 160.9 ( $C_4$ ), 163.4 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ : C, 69.79; H, 7.69; N, 5.09. Found C, 69.86; H, 7.84; N, 4.96

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-(4-methoxyphenyl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20e).**



Following both methodologies, **20e** was isolated as yellow oil. Method A: 75%, 109 mg, 0.38 mmol. Method B: 64%, 93 mg, 0.32 mmol.

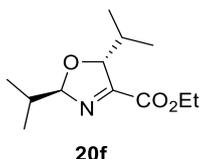
$R_f = 0.71$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.00 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.03 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.23 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.04-2.12 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 4.19 (dq, 2H,  $J=9.6$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.20 (dq, 2H,  $J=9.6$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.89 (d, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $H_5$ ), 5.91 (dd, 1H,  $J=6.6$ ,  $J=4.7$  Hz,  $H_2$ ), 6.85-6.90 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 7.16-7.21 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 34.2 (CH), 55.6 ( $\text{O-CH}_3$ ), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 87.9 ( $\text{C}_5$ ), 111.5 ( $\text{C}_2$ ), 114.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.9 ( $\text{C}_4$ ), 163.5 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ : C, 65.96; H, 7.27; N, 4.81. Found C, 66.12; H, 7.18; N, 4.97

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2,5-diisopropyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20f).**



Following both methodologies, **20f** was isolated as colorless oil. Method A: 86%, 98 mg, 0.43 mmol. Method B: 82%, 93 mg, 0.41 mmol.

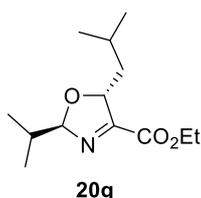
$R_f = 0.65$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.77 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-C}_2$ ), 0.94 (d, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-C}_5$ ), 0.95 (d, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-C}_5$ ), 1.02 (d, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-C}_2$ ), 1.35 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.98 (septd, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $J=4.7$  Hz,  $\text{CH-C}_2$ ), 2.16 (septd, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $J=2.5$  Hz,  $\text{CH-C}_5$ ), 4.32 (dq, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.33 (dq, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.90 (dd, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $J=2.5$  Hz,  $H_5$ ), 5.60 (dd, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $J=4.7$  Hz,  $H_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 16.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 19.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 31.7 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 34.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 91.1 ( $\text{C}_5$ ), 111.2 ( $\text{C}_2$ ), 161.7 ( $\text{C}_4$ ), 164.4 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ : C, 63.41; H, 9.31; N, 6.16. Found C, 64.58; H, 9.45; N, 6.25

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-5-isobutyl-2-isopropyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20g).**



Following both methodologies, **20g** was isolated as colorless oil. Method A: 88%, 106 mg, 0.44 mmol. Method B: 89%, 107 mg, 0.45 mmol.

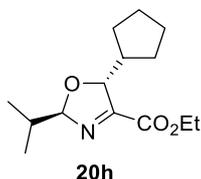
$R_f$  = 0.61; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.92-0.97 (m, 12H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>-CH), 1.35 (t, 3H,  $J$ =7.1 Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.42-1.49 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 1.56-1.62 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 1.75-1.85 (m, 1H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 1.93-2.02 (m, 1H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>-CH), 4.32 (q, 2H,  $J$ =7.1 Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.02 (ddd, 1H,  $J$ =9.4 Hz  $J$ =6.5 Hz,  $J$ =2.9 Hz,  $H_5$ ), 5.61 (dd, 1H,  $J$ =6.9 Hz,  $J$ =4.8 Hz,  $H_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.1 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 21.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$ ), 23.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$ ), 25.7 ( $\text{CH-CH}_2$ ), 33.9 (( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>-CH), 41.6 ( $\text{CH}_2$ ), 62.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 84.9 ( $\text{C}_5$ ), 109.8 ( $\text{C}_2$ ), 161.4 ( $\text{C}_4$ ), 165.4 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ : C, 64.70; H, 9.61; N, 5.80. Found C, 64.63; H, 9.55; N, 5.65

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-5-cyclopentyl-2-isopropyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20h).**



Following both methodologies, **20h** was isolated as colorless oil. Method A: 89%, 113 mg, 0.45 mmol. Method B: 85%, 107 mg, 0.43 mmol.

$R_f$  = 0.65; Hexane/EtOAc (8:2)

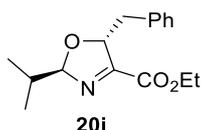
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.35 (t, 3H,  $J$ =7.1 Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.43-1.56 (m, 5H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.59-1.74 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.97 (septd, 1H,  $J$ =6.8 Hz,  $J$ =4.6 Hz,  $\text{CH}$ ), 2.27-2.37 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{cy}}$ ), 4.32 (dq, 1H,  $J$ =10.8 Hz,  $J$ =7.1 Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.33 (dq, 1H,  $J$ =10.8 Hz,

$J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.04 (dd, 1H,  $J=6.8$  Hz,  $J=3.6$  Hz,  $H_5$ ), 5.62 (dd, 1H,  $J=6.8$  Hz,  $J=4.6$  Hz,  $H_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 25.9 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.0 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.8 ( $\text{CH}_2$  cy), 29.5 ( $\text{CH}_2$  cy), 34.3 ( $\text{CH}$  cy), 42.8 ( $\text{CH}$ ), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 88.6 ( $C_5$ ), 110.9 ( $C_2$ ), 161.8 ( $C_4$ ), 164.6 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ : C, 66.37; H, 9.15; N, 5.53. Found C, 66.53; H, 9.35; N, 5.39

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-5-benzyl-2-isopropyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20i).**



Following both methodologies, **20i** was isolated as yellow oil. Method A: 93%, 128 mg, 0.47 mmol. Method B: 91%, 125 mg, 0.46 mmol.

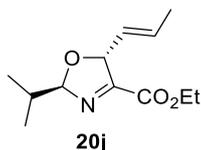
$R_f = 0.68$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.89 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 0.90 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.37 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.88-2.00 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 2.98 (dd, 1H,  $J=14.2$  Hz,  $J=5.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 3.15 (dd, 1H,  $J=14.2$  Hz,  $J=3.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 4.26-4.41 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.26 (ddd, 1H,  $J=6.7$  Hz,  $J=5.9$  Hz,  $J=3.9$  Hz,  $H_5$ ), 5.36 (dd, 1H,  $J=6.7$  Hz,  $J=4.7$  Hz,  $H_2$ ), 7.16-7.30 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 33.9 ( $\text{CH}$ ), 39.3 ( $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 62.5 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 86.8 ( $C_5$ ), 110.5 ( $C_2$ ), 127.0 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.6 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 129.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 137.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 161.3 ( $C_4$ ), 163.9 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ : C, 69.79; H, 7.69; N, 5.09. Found C, 69.85; H, 7.75; N, 5.15

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-((*E*)-prop-1-en-1-yl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20j).**



Following both methodologies, **20j** was isolated as yellow oil. Method A: 78%, 88 mg, 0.39 mmol. Method B: 71%, 80 mg, 0.36 mmol.

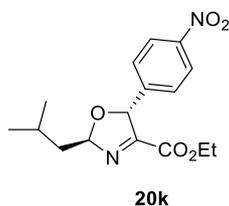
$R_f = 0.56$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.95 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 0.97 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.33 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.71 (ddd,  $J=6.6$  Hz,  $J=1.6$  Hz,  $J=0.9$

Hz, CH=CH-CH<sub>3</sub>), 2.00 (septd, 1H, *J*= 6.8 Hz, *J*= 4.8 Hz, CH), 4.30 (dq, 1H, *J*= 10.9 Hz, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.31 (dq, 1H, *J*= 10.9 Hz, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 5.33-5.36 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 5.45 (ddq, 1H, *J*= 15.8 Hz, *J*=6.9 Hz, *J*=1.6 Hz, C<sub>5</sub>-CH=CH), 5.66 (dd, 1H, *J*=6.3 Hz, *J*=4.8 Hz, H<sub>2</sub>), 5.85 (dq, 1H, *J*=15.8 Hz, *J*=6.6 Hz, *J*=1.0 Hz, C<sub>5</sub>-CH=CH).  
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.2 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.0 (CH<sub>3</sub>-CH), 17.6 (CH<sub>3</sub>-CH), 17.8 (CH<sub>3</sub>-CH=CH), 33.9 (CH), 62.3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 86.5 (C<sub>5</sub>), 110.4 (C<sub>2</sub>), 126.5 (C<sub>5</sub>-CH=CH), 130.6 (C<sub>5</sub>-CH=CH), 161.0 (C<sub>4</sub>), 163.0 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>: C, 63.98; H, 8.50; N, 6.22. Found C, 64.11; H, 8.42; N, 6.35

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isobutyl-5-(4-nitrophenyl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20k).**



Following both methodologies, **20k** was isolated as yellow oil. Method A: 93%, 149 mg, 0.47 mmol. Method B: 90%, 144 mg, 0.45 mmol.

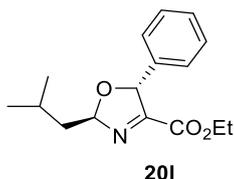
R<sub>f</sub> = 0.53; Hexane/EtOAc (8:2)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1.02 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH<sub>3</sub>-CH), 1.03 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH<sub>3</sub>-CH), 1.24 (t, 3H, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.61-1.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.73-1.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.90-2.01 (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH), 4.22 (dq, 1H, *J*=10.9 Hz, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.22 (dq, 1H, *J*=10.9 Hz, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 6.04 (d, 1H, *J*=6.4 Hz, H<sub>5</sub>), 6.25 (ddd, 1H, *J*=7.2 Hz, *J*=6.4 Hz, *J*=5.5 Hz, H<sub>2</sub>), 7.51-7.57 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 8.15-8.23 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.0 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-CH), 23.1 (CH<sub>3</sub>-CH), 25.2 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH), 44.9 (CH<sub>2</sub>), 62.8 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 86.4 (C<sub>5</sub>), 107.3 (C<sub>2</sub>), 124.1 (C<sub>Ar</sub>), 128.5 (C<sub>Ar</sub>), 145.3 (C<sub>Ar</sub>), 148.4 (C<sub>Ar</sub>), 160.5 (C<sub>4</sub>), 161.5 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 59.99; H, 6.29; N, 8.74. Found C, 60.23; H, 6.19; N, 8.58

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isobutyl-5-phenyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20l).**



Following both methodologies, **20l** was isolated as yellow oil. Method A: 88%, 121 mg, 0.44 mmol. Method B: 85%, 117 mg, 0.43 mmol.

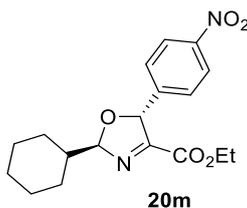
$R_f = 0.54$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.01 (d, 3H,  $J=6.7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.02 (d, 3H,  $J=6.7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.22 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.62 (ddd, 1H,  $J=13.7$  Hz,  $J=7.2$  Hz,  $J=6.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 1.75 (ddd, 1H,  $J=13.7$  Hz,  $J=7.2$  Hz,  $J=5.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 1.88-2.00 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 4.18 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.19 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.92 (d, 1H,  $J=6.4$  Hz,  $H_5$ ), 6.16 (ddd, 1H,  $J=7.2$  Hz,  $J=6.4$  Hz,  $J=5.4$  Hz,  $H_2$ ), 7.27-7.38 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 22.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 23.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 25.2 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ ), 45.0 ( $\text{CH}_2$ ), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 87.5 ( $\text{C}_5$ ), 106.6 ( $\text{C}_2$ ), 127.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.9 ( $\text{C}_4$ ), 162.7 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ : C, 69.79; H, 7.69; N, 5.09. Found C, 69.94; H, 7.48; N, 4.86

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-cyclohexyl-5-(4-nitrophenyl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20m).**



Following both methodologies, **20m** was isolated as yellow oil. Method A: 92%, 159 mg, 0.46 mmol. Method B: 90%, 156 mg, 0.45 mmol.

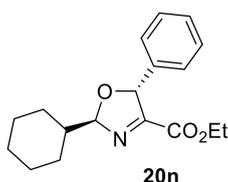
$R_f = 0.51$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.17-1.32 (m, 5H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.24 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.66-1.72 (m, 1H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.75-1.88 (m, 5H,  $\text{CH}_2$  cy,  $\text{CH}$  cy), 4.21 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.22 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.99 (d, 1H,  $J=6.7$  Hz,  $H_5$ ), 6.02 (dd, 1H,  $J=6.7$  Hz,  $J=4.3$  Hz,  $H_2$ ), 7.46-7.58 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.13-8.24 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.3 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.7 ( $\text{CH}_2$  cy), 27.6 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.4 ( $\text{CH}_2$  cy), 43.9 ( $\text{CH}$  cy), 62.7 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 87.0 ( $\text{C}_5$ ), 112.0 ( $\text{C}_2$ ), 124.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 145.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.4 ( $\text{C}_4$ ), 161.8 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 62.42; H, 6.40; N, 8.09. Found C, 62.28; H, 6.59; N, 8.21

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-cyclohexyl-5-phenyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20n).**



Following both methodologies, **20n** was isolated as yellow oil. Method A: 90%, 137 mg, 0.45 mmol. Method B: 87%, 131 mg, 0.44 mmol.

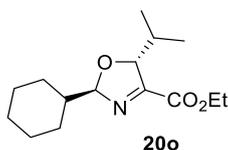
$R_f$  = 0.47; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.10-1.16 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.13 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.17-1.20 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.59-1.63 (m, 1H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.65-1.78 (m, 5H,  $\text{CH}_2$  cy,  $\text{CH}$  cy), 4.09 (dq, 1H,  $J=10.3$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.11 (dq, 1H,  $J=10.3$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.79 (d, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $H_5$ ), 5.85 (dd, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $J=4.5$  Hz,  $H_2$ ), 7.18-7.29 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.3 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.7 ( $\text{CH}_2$  cy), 27.6 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.4 ( $\text{CH}_2$  cy), 43.9 ( $\text{CH}$  cy), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 88.1 ( $\text{C}_5$ ), 111.2 ( $\text{C}_2$ ), 127.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.8 ( $\text{C}_4$ ), 163.1 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ : C, 71.73; H, 7.69; N, 4.65. Found C, 71.58; H, 7.93; N, 4.49

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-cyclohexyl-5-isopropyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20o).**



Following both methodologies, **20o** was isolated as yellow oil. Method A: 78%, 104 mg, 0.39 mmol. Method B: 80%, 107 mg, 0.40 mmol.

$R_f$  = 0.66; Hexane/EtOAc (8:2)

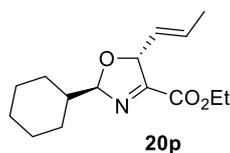
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.75 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.01 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.10-1.27 (m, 5H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.35 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.63-1.77 (m, 6H,  $\text{CH}_2$  cy,  $\text{CH}$  cy), 2.17 (septd, 1H,  $J=6.8$  Hz,  $J=2.6$  Hz,  $\text{CH}$ ), 4.30 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,

$J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.31 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.87 (dd, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $J=2.6$  Hz,  $H_5$ ), 5.58 (dd, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $J=4.4$  Hz,  $H_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 15.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 19.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.3 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.8 ( $\text{CH}_2$  cy), 27.7 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.1 ( $\text{CH}_2$  cy), 31.7 ( $\text{CH}$ ), 44.1 ( $\text{CH}$  cy), 62.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 90.9 ( $\text{C}_5$ ), 110.6 ( $\text{C}_2$ ), 161.7 ( $\text{C}_4$ ), 164.1 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ : C, 67.38; H, 9.43; N, 5.24. Found C, 67.24; H, 9.59; N, 5.35

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-cyclohexyl-5-((*E*)-prop-1-en-1-yl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20p).**



Following both methodologies, **20p** was isolated as yellow oil. Method A: 72%, 96 mg, 0.36 mmol. Method B: 68%, 90 mg, 0.34 mmol.

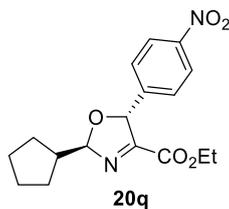
$R_f=0.65$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.1-1.28 (m, 7H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.33 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.65-1.68 (m, 1H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.70 (ddd,  $J=6.6$  Hz,  $J=1.6$  Hz,  $J=0.8$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH-CH}_3$ ), 1.73-1.81 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  cy,  $\text{CH}$  cy), 4.29 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.30 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.28-5.31 (m, 1H,  $H_5$ ), 5.45 (ddq, 1H,  $J=15.2$  Hz,  $J=7.0$  Hz,  $J=1.6$  Hz,  $\text{C}_5\text{-CH}=\text{CH}$ ), 5.64 (dd, 1H,  $J=6.3$  Hz,  $J=4.7$  Hz,  $H_2$ ), 5.84 (dq, 1H,  $J=15.2$  Hz,  $J=6.6$  Hz,  $J=1.0$  Hz,  $\text{C}_5\text{-CH}=\text{CH}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}=\text{CH}$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.3 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.7 ( $\text{CH}_2$  cy), 27.6 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.4 ( $\text{CH}_2$  cy), 43.7 ( $\text{CH}$  cy), 62.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 86.3 ( $\text{C}_5$ ), 109.8 ( $\text{C}_2$ ), 126.5 ( $\text{C}_5\text{-CH}=\text{CH}$ ), 130.6 ( $\text{C}_5\text{-CH}=\text{CH}$ ), 161.1 ( $\text{C}_4$ ), 163.2 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ : C, 67.90; H, 8.74; N, 5.28. Found C, 68.15; H, 8.90; N, 5.16

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-cyclopentyl-5-(4-nitrophenyl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20q).**



Following both methodologies, **20q** was isolated as yellow oil. Method A: 92%, 153 mg, 0.46 mmol. Method B: 89%, 148 mg, 0.45 mmol.

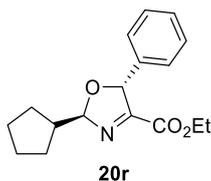
$R_f = 0.43$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.24 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.48-1.68 (m, 6H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.75-1.86 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  cy), 2.27-2.37 (m, 1H, CH cy), 4.21 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.22 (dq, 2H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 6.04 (d, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $H_5$ ), 6.12 (dd, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $J=6.6$  Hz,  $H_2$ ), 7.51-7.55 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 8.17-8.21 (m, 2H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 25.9 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.1 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.1 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.4 ( $\text{CH}_2$  cy), 45.3 (CH cy), 62.7 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 86.9 ( $\text{C}_5$ ), 111.5 ( $\text{C}_2$ ), 124.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 145.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 148.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.5 ( $\text{C}_4$ ), 161.8 (CO).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 61.44; H, 6.07; N, 8.43. Found C, 61.58; H, 6.24; N, 8.37

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-cyclopentyl-5-phenyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20r).**



Following both methodologies, **20r** was isolated as yellow oil. Method A: 90%, 129 mg, 0.45 mmol. Method B: 86%, 124 mg, 0.43 mmol.

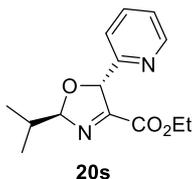
$R_f = 0.46$ ; Hexane/EtOAc (8:2)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.22 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.45-1.55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.58-1.68 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  cy), 1.72-1.89 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  cy), 2.25-2.34 (m, 1H, CH cy), 4.19 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 4.20 (dq, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.92 (d, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $H_5$ ), 6.03 (dd, 1H,  $J=6.6$  Hz,  $J=6.4$  Hz,  $H_2$ ), 7.26-7.38 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 26.0 ( $\text{CH}_2$  cy), 26.1 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.1 ( $\text{CH}_2$  cy), 28.4 ( $\text{CH}_2$  cy), 45.3 ( $\text{CH}$  cy), 62.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 88.1 ( $\text{C}_5$ ), 110.8 ( $\text{C}_2$ ), 127.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.4 ( $\text{C}_4$ ), 163.1 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ : C, 71.06; H, 7.37; N, 4.87. Found C, 70.94; H, 7.51; N, 4.95

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-2-isopropyl-5-(pyridine-2-yl)-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20s).**



Following both methodologies, **20s** was isolated as yellow oil. Method A: 86%, 113 mg, 0.43 mmol. Method B: 89%, 117 mg, 0.45 mmol.

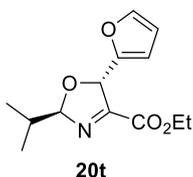
$R_f$  = 0.43; Hexane/EtOAc (7:3)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  1.02 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.04 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.21 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.05-2.18 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4.18-4.24 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 5.88 (dd, 1H,  $J=6.3$  Hz,  $J=4.8$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 5.97 (d, 1H,  $J=6.3$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.23-7.23 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7.34-7.36 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7.70-7.75 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 8.51-8.53 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.1 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 17.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 33.9 ( $\text{CH}$ ), 62.3 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 88.6 ( $\text{C}_5$ ), 112.1 ( $\text{C}_2$ ), 122.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 150.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 157.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 160.6 ( $\text{C}_4$ ), 162.5 ( $\text{CO}$ ).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 64.11; H, 6.92; N, 10.68. Found C, 63.94; H, 7.08; N, 10.73

**Ethyl (2*R*\*,5*R*\*)-5-(furan-2-yl)-2-isopropyl-2,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (20t).**



Following both methodologies, **20t** was isolated as yellow oil. Method A: 92%, 116 mg, 0.46 mmol. Method B: 90%, 113 mg, 0.45 mmol.

$R_f$  = 0.31; Hexane/EtOAc (8:2)

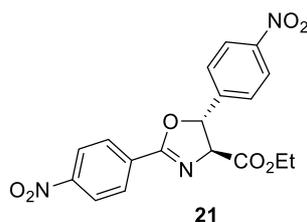
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  0.99 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.02 (d, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1.26 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 2.01-2.16 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4.21-4.29 (m, 2H,

CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 5.80 (dd, 1H, *J*=6.2 Hz, *J*=4.9 Hz, *H*<sub>2</sub>), 5.95 (d, 1H, *J*=6.2 Hz, *H*<sub>5</sub>), 6.36-6.39 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.39-7.40 (m, 1H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.1 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.0 (CH<sub>3</sub>-CH), 17.6 (CH<sub>3</sub>-CH), 33.8 (CH), 62.5 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 80.6 (C<sub>5</sub>), 109.4 (C<sub>Ar</sub>), 110.4 (C<sub>Ar</sub>), 111.0 (C<sub>Ar</sub>), 111.0 (C<sub>2</sub>), 143.5 (C<sub>Ar</sub>), 150.7 (C<sub>4</sub>), 160.6 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: C, 62.14; H, 6.82; N, 5.57. Found C, 62.05; H, 7.01; N, 5.67

**Ethyl (4*S*\*,5*R*\*)-2,5-bis(4-nitrophenyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carboxylate (**21**).**



Following Method B, **21** (146 mg, 0.38 mmol) was isolated as a white solid. Yield: 76%. m.p. 90-92 °C.

R<sub>f</sub> = 0.25; Hexane/EtOAc (8:2)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1.35 (t, 3H, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.32 (dq, 1H, *J*=10.8 Hz, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.33 (dq, 1H, *J*=10.8 Hz, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.82 (d, 1H, *J*=8.0 Hz, *H*<sub>4</sub>), 6.05 (d, 1H, *J*=8.0 Hz, *H*<sub>5</sub>), 7.62-7.57 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.29-8.23 (m, 4H, *H*<sub>Ar</sub>), 8.35-8.34 (m, 2H, *H*<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 14.3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 62.8 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 77.5 (C<sub>4</sub>), 83.1 (C<sub>5</sub>), 124.1 (C<sub>Ar</sub>), 124.6 (C<sub>Ar</sub>), 126.8 (C<sub>Ar</sub>), 130.2 (C<sub>Ar</sub>), 132.8 (C<sub>Ar</sub>), 146.6 (C<sub>Ar</sub>), 148.6 (C<sub>Ar</sub>), 150.5 (C<sub>Ar</sub>), 163.6 (C<sub>2</sub>), 170.1 (CO).

Anal Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: C, 56.11; H, 3.92; N, 10.91. Found C, 56.27; H, 4.16; N, 10.78

## 4.7 Bibliografía

- (1) Merino, P.; Tejero, T.; Diez-Martinez, A.; Gultekin, Z. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6567-6573.
- (2) Gant, T. G.; Meyers, A. I. *Tetrahedron* **1994**, 50, 2297-2360.
- (3) Kempe, K.; Lobert, M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *J. Comb. Chem.* **2009**, 11, 274-280.
- (4) Brandstätter, M.; Roth, F.; Luedtke, N. W. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 40-51.
- (5) Yeh, V.; Iyengar, R. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Katritzky, A. R., Ramsden, C. A., Scriven, E. F. V., Taylor, R. J. K., Eds.; Elsevier: Oxford, **2008**, 487-543.
- (6) Maga, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 1049-1050.
- (7) Xiao, Z.; Lu, J. R. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 6487-6497.
- (8) Sá, M. C. M.; Kascheres, A. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3749-3752.
- (9) Zeng, T.-T.; Xuan, J.; Ding, W.; Wang, K.; Lu, L.-Q.; Xiao, W.-J. *Org. Lett.* **2015**, 17, 4070-4073.
- (10) Pinho e Melo, T. M. V. D.; Lopes, C. S. J.; Beja, A. M.; Paixão, J. A.; Silva, M. R.; Alte da Veiga, L. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 66-71.
- (11) Murai, K.; Takahara, Y.; Matsushita, T.; Komatsu, H.; Fujioka, H. *Org. Lett.* **2010**, 12, 3456-3459.
- (12) Zhou, H.; Zeng, X.; Ding, L.; Xie, Y.; Zhong, G. *Org. Lett.* **2015**, 17, 2385-2387.
- (13) Zhou, H.; Zeng, X.; Xie, Y.; Zhong, G. *Synlett* **2015**, 26, 1693-1696.
- (14) Liu, C.; Zhang, Y.; Qian, Q.; Yuan, D.; Yao, Y. *Org. Lett.* **2014**, 16, 6172-6175.



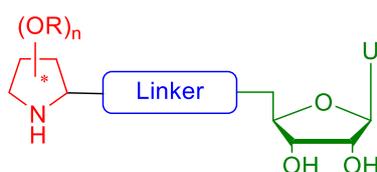
## **CAPÍTULO 5**

# **ADICIONES NUCLEÓFILAS SOBRE NITRONAS CÍCLICAS; SÍNTESIS DE PIRROLIDINAS QUIRALES**



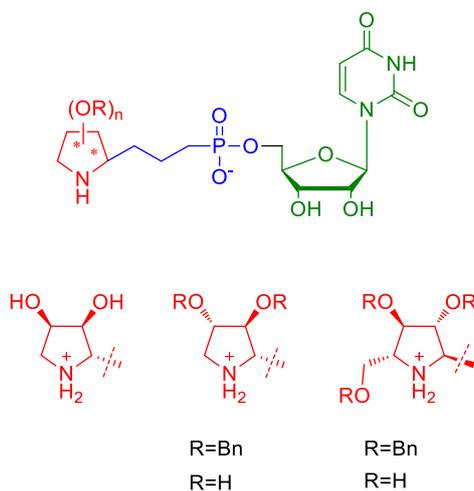
## 5.1. Antecedentes sobre pirrolidinilfosfonatos como posibles inhibidores de GTs

Como se ha comentado en la introducción de esta Memoria, en los últimos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado en el diseño racional y síntesis de inhibidores de glicosiltransferasas (GTs). Una de las modificaciones introducidas ha sido sustituir la unidad de carbohidrato que transfiere el enzima, por un anillo de pirrolidina polihidroxilada para intentar así aumentar su afinidad. Estos compuestos presentan la siguiente estructura general (Figura 5.1).<sup>1,2</sup>



**Figura 5.1.** Estructura general de inhibidores de GTs objetivo

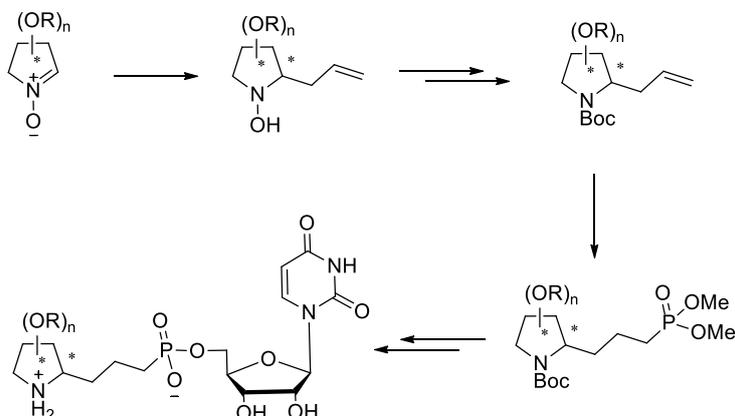
Las primeras aproximaciones desarrolladas en este grupo de investigación han consistido en la obtención de una familia de compuestos que han sido evaluados biológicamente frente a *hOGT* y cuyas estructuras aparecen representadas en la Figura 5.2.<sup>1</sup>



**Figura 5.2.** Inhibidores de GTs desarrollados previamente

Para la obtención de dichos compuestos, fue necesario elaborar una nueva metodología de síntesis de pirrolidinilfosfonatos, basada, en términos generales, en la adición de un grupo alilo sobre nitronas cíclicas polihidroxiladas, una posterior

fosforilación del grupo alilo y por último el acoplamiento con el nucleósido, en este caso el derivado de uridina (Esquema 5.1).<sup>1</sup>

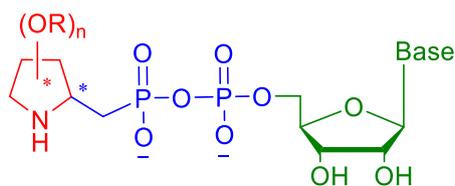


**Esquema 5.1.** Síntesis de pirrolidinilfosfonatos estudiados como inhibidores de GTs

Estos compuestos fueron valorados como posibles inhibidores frente a *hOGT*, encontrándose valores de  $K_i$  que oscilan en un intervalo de 87.9 a 4139.3  $\mu\text{M}$ , lo que indicaba que los compuestos más activos, los valores más bajos, presentaban capacidad inhibitoria. Estos datos se comentaran en el capítulo 6 más en profundidad.

Con el fin de aumentar la afinidad por el sitio activo del enzima, además de poder valorar el efecto de los sutituyentes en el anillo de pirrolidina, en este trabajo se ha decidido sustituir el linker de tres átomos de carbono por una unidad de fosfonato que se asemeja en mayor medida al sustrato natural y a las interacciones que genera en el sitio catalítico del enzima. De esta forma, pensabamos que se podría determinar qué pirrolidina es la más adecuada para los distintos enzimas.

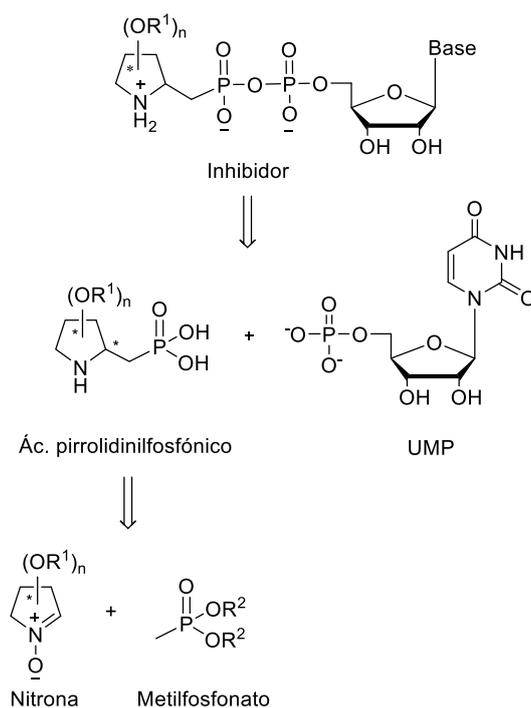
Por todo lo anteriormente expuesto se decidió preparar una serie de compuestos cuya estructura general aparece representada en la Figura 5.3 para estudiar sus propiedades como inhibidores de GTs.



**Figura 5.3.** Estructura general de inhibidores objetivo

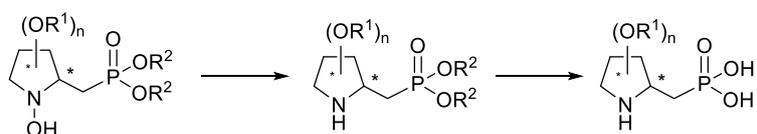
## 5.2. Hipótesis de trabajo

De acuerdo con la experiencia de grupo de investigación y con el fin de obtener los inhibidores de GTs propuestos, nos planteamos la posibilidad de obtener pirrolidinas quirales portadoras de un resto de ácido fosfónico, que pudieran ser acopladas a la unidad de reconocimiento enzimático (UMP). Estos ácidos pirrolidinilfosfónicos se podían obtener mediante reacciones de adición nucleófila sobre nitronas cíclicas quirales polihidroxiladas (Esquema 5.2).



**Esquema 5.2.** Análisis retrosintético para la obtención de los inhibidores objetivo

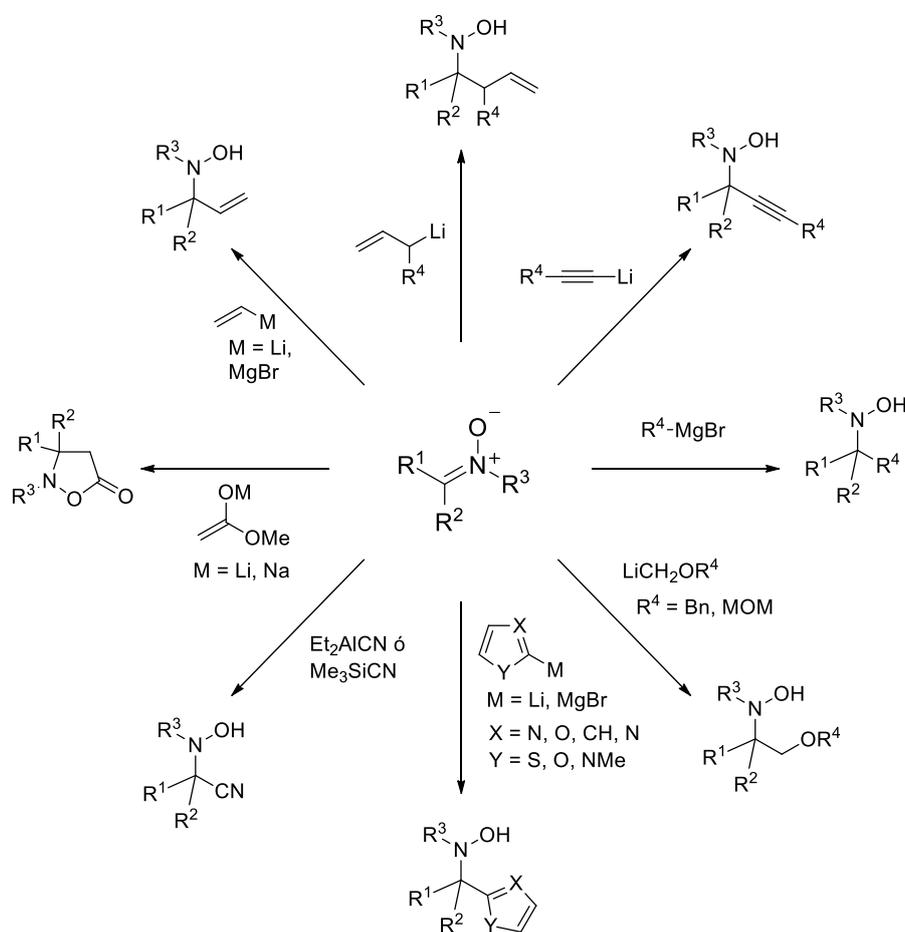
Como reactivos de partida, se van a utilizar nitronas que presentan una variedad en el número de sustituyentes y en el patrón de sustitución. Estas nitronas son análogas a las empleadas en el trabajo anterior<sup>1</sup> y se preparan fácilmente a partir de carbohidratos o de otros productos naturales (“*chiral pool*”). Respecto de los metilfosfonatos que se van a utilizar, se prestará especial atención a la ortogonalidad entre los grupos protectores de los grupos OH del anillo de pirrolidina ( $R^1$ ) y el grupo fosfonato ( $R^2$ ), de cara a la desprotección selectiva (Esquema 5.3) y al acoplamiento de los ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos resultantes con la unidad de reconocimiento de GTs, en nuestro caso, uridina monofosfato (UMP).



**Esquema 5.3.** Planteamiento sintético para la obtención de ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos

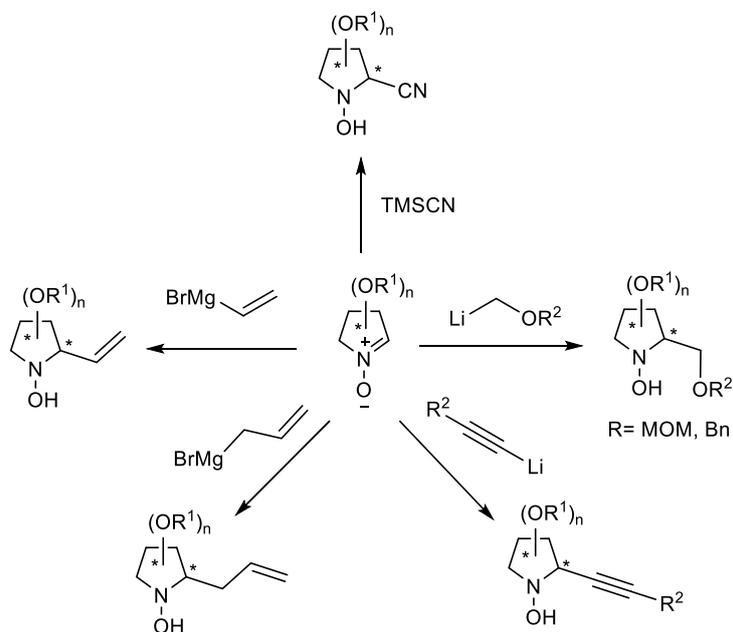
### 5.3. Reacciones de adición nucleófila sobre nitronas

La adición nucleófila a nitronas ha sido un tema de investigación de nuestro grupo desde el año 1992, habiendo dado lugar a un buen número de metodologías sintéticas que han permitido preparar  $\alpha$ - y  $\beta$ -amino ácidos,<sup>3,4</sup>  $\alpha,\beta$ -diamino ácidos,<sup>5</sup> ácidos piroglutámicos,<sup>6</sup> ácidos pipercolicos,<sup>7</sup> 1,2-diaminas,<sup>8</sup> análogos de nucleósidos,<sup>9-11</sup> carbohidratos nitrogenados,<sup>12</sup> iminoazúcares,<sup>13</sup> tropanos<sup>14</sup> y productos naturales como Polioxina J,<sup>15</sup> Anisomicina,<sup>16</sup> Lentiginosina<sup>17</sup> o Radicamina B.<sup>18</sup> Estas metodologías desarrolladas aparecen recogidas en varias revisiones<sup>19-22</sup> y también han permitido la síntesis de pirrolidinas (Esquema 5.4).<sup>23-25</sup>



Esquema 5.4. Adiciones nucleófilas a nitronas

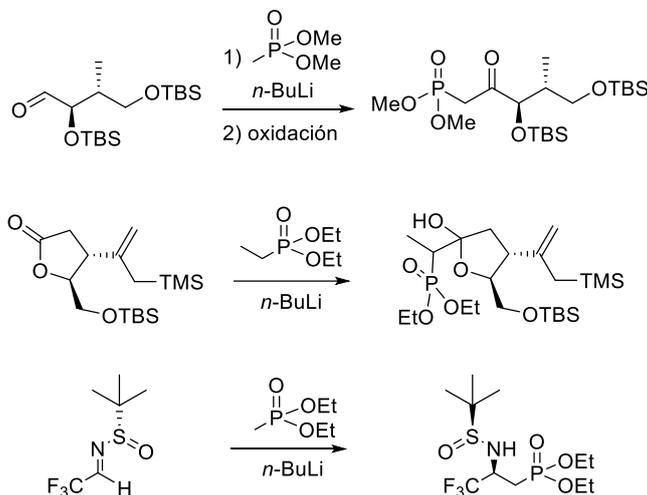
La adición nucleófila sobre nitronas cíclicas, resulta ser un método directo de obtención de pirrolidinas sustituidas, existiendo diversos ejemplos en la bibliografía,<sup>26-28</sup> algunos de ellos desarrollados también en nuestro grupo de investigación (Esquema 5.5).<sup>29-31</sup>



**Esquema 5.5.** Adición nucleófila sobre nitronas cíclicas polihidroxiladas

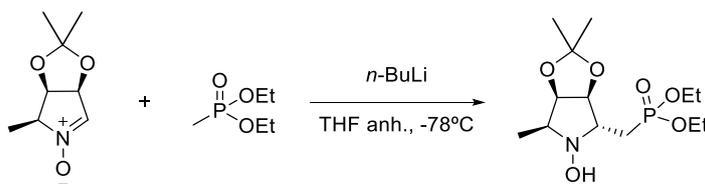
Los nucleófilos utilizados en estas reacciones de adición son muy diversos y entre ellos cabe destacar, organolíticos, magnesianos o cianuros. Las *N*-hidroxipirrolidinas obtenidas pueden transformarse de forma sencilla en las correspondientes pirrolidinas mediante un proceso de reducción del enlace N-O.

El nucleófilo que se va a emplear en el trabajo que se describe es litiometilfosfonato que se puede preparar por tratamiento de un metilfosfonato con *n*-BuLi. En la bibliografía se puede encontrar varios ejemplos de la reacción de estos litiados con distintos electrófilos como aldehídos,<sup>32-34</sup> lactonas<sup>33</sup> o iminas activadas,<sup>34,35</sup> entre otros (Esquema 5.6).<sup>36</sup>



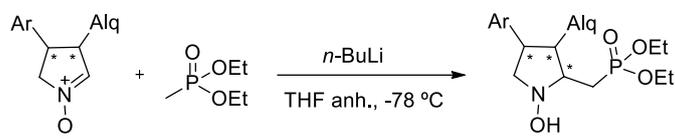
**Esquema 5.6.** Ejemplos de adición de litiometilfosfonatos

También existe en la bibliografía un único ejemplo de la adición de dietil litiometilfosfonato sobre la nitrona cíclica mostrada en el Esquema 5.7.<sup>37</sup> La *N*-hidroxipirrolidina obtenida ha sido utilizada como precursor de la correspondiente pirrolidina y valorada como inhibidor frente a  $\alpha$ -L-fucosidasa.



**Esquema 5.7.** Ejemplo de adición de litiometilfosfonatos sobre nitronas cíclicas

Recientemente en nuestro grupo de investigación, se ha llevado a cabo la adición de litiometilfosfonato de dietilo sobre nitronas cíclicas quirales obtenidas a partir de  $\gamma$ -nitroaldehídos. (Esquema 5.8).<sup>2</sup>



**Esquema 5.8.** Antecedentes de adiciones en el grupo de investigación

Resulta llamativo que con estas nitronas que presentan sustituyentes poco polares como grupos aromáticos y cadenas alquílicas, únicamente el metilfosfonato de dietilo dio lugar a la adición. Otros metilfosfonatos que se ensayaron como el de dimetilo y dibencilo, no proporcionaron el producto de reacción.

## 5.4. Discusión de resultados

### 5.4.1. Síntesis de nitronas cíclicas polihidroxiladas

Para la preparación de pirrolidinas quirales se seleccionaron tres nitronas cíclicas quirales representativas que se muestran en la Figura 5.4. Estas nitronas se pueden sintetizar a partir de D-arabinopiranososa (nitrona **22a**),<sup>38</sup> L-tartrato de dietilo (nitrona **22b**)<sup>39,40</sup> y D-arabinofuranosa perbencilada (nitrona **22c**).<sup>41,42</sup>

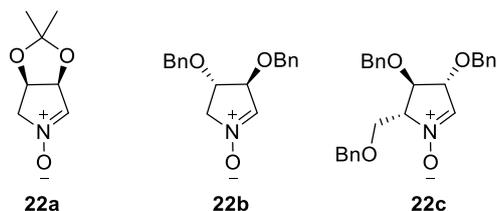
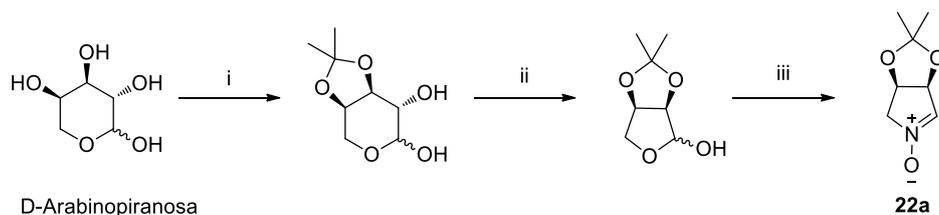


Figura 5.4. Nitronas seleccionadas para el estudio de adición

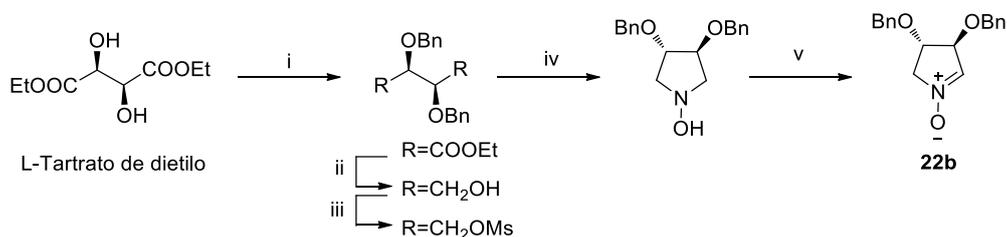
La síntesis de la nitrona **22a** consiste en tres pasos en los que se protege selectivamente los grupos hidroxilo de C3 y C4 de la D-arabinopiranososa mediante un grupo isopropilideno (i), a continuación se produce la ruptura oxidativa entre C1 y C2 (ii) y por último en un proceso “one-pot” se produce la reacción del hemiacetal con el clorhidrato de hidroxilamina para formar la correspondiente oxima y entonces se activa “*in situ*” el hidroxilo en C4 en forma de mesilato para que se produzca la *N*-alquilación (iii) (Esquema 5.9). El rendimiento global de la síntesis es del 32%.



Esquema 5.9. Síntesis de la nitrona **22a**. (i) DMP, PTSA, DMF anh., 4 h, t.a. crudo. (ii) NaIO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 2 h, t.a. crudo. (iii) NH<sub>2</sub>OH·HCl, MsCl, tamices moleculares-4Å, py, 16 h, t.a.

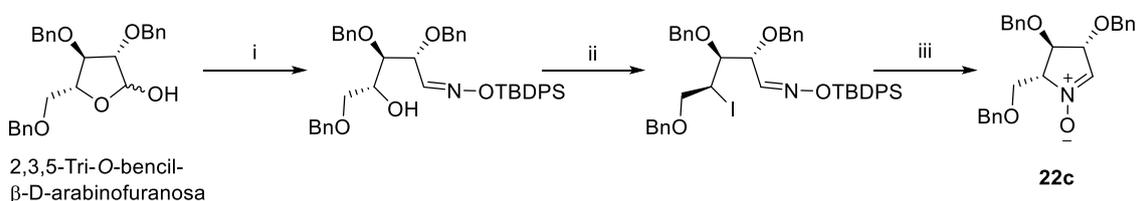
La nitrona **22b** se sintetiza a partir de L-tartrato de dietilo mediante la protección con grupos bencilo de los alcoholes secundarios (i), a continuación se reducen los grupos éster con LiAlH<sub>4</sub> generando el correspondiente diol (ii) que se activa como dimesilato (iii). La adición de clorhidrato de hidroxilamina permite la obtención de la *N*-

hidroxipirrolidina (iv) que se oxida a nitrona usando manganesa (v) (Esquema 5.10). El rendimiento global de la síntesis de **22b** es del 79%.



**Esquema 5.10.** Síntesis de la nitrona **22b**. (i) BnBr, Ag<sub>2</sub>O, TBAI cat., DCM, 8 h, reflujo. (ii) LiAlH<sub>4</sub>, THF anh., 5 h, reflujo. (iii) MsCl, TEA, DCM, 3 h. (iv) NH<sub>2</sub>OH·HCl, TEA, tolueno, 6 h, reflujo. (v) MnO<sub>2</sub>, DCM, 5 h.

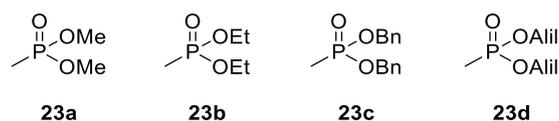
Por último, la nitrona **22c** se obtiene a partir del producto comercial 2,3,5-tri-*O*-bencil-β-D-arabinofuranosa (Esquema 5.11). El hemiacetal reacciona con una hidroxilamina *O*-sililada para formar la correspondiente oxima (i). A continuación, se lleva a cabo la sustitución, con inversión de la configuración, del hidroxilo por un mejor grupo saliente (ii). Finalmente la desprotección del silano favorece la *N*-alquilación y la molécula cicla recuperando la configuración inicial (iii). El rendimiento global de la síntesis de **22c** es de un 65%.



**Esquema 5.11.** Síntesis de la nitrona **22c**. (i) NH<sub>2</sub>OTBDPS, PPTS cat., tamices moleculares-4Å, tolueno, reflujo 12 h. (ii) PPh<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, imidazol, tolueno, tamices moleculares-4Å, 3 h, 60°C. (iii) TBAF, THF anh., 30 min, 0°C a t.a.

#### 5.4.2. Síntesis de metilfosfonatos

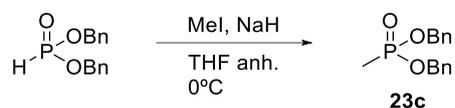
Para llevar a cabo las reacciones de adición, se escogieron los fosfonatos mostrados en la Figura 5.5, teniendo en cuenta además del distinto tamaño, que podía influir en la diastereoselectividad del proceso, en la necesidad de llevar a cabo la liberación del ácido fosfónico, previo al acoplamiento con la unidad nucleotídica de reconocimiento enzimático, UMP.



**Figura 5.5.** Metilfosfonatos seleccionados para el estudio de adición

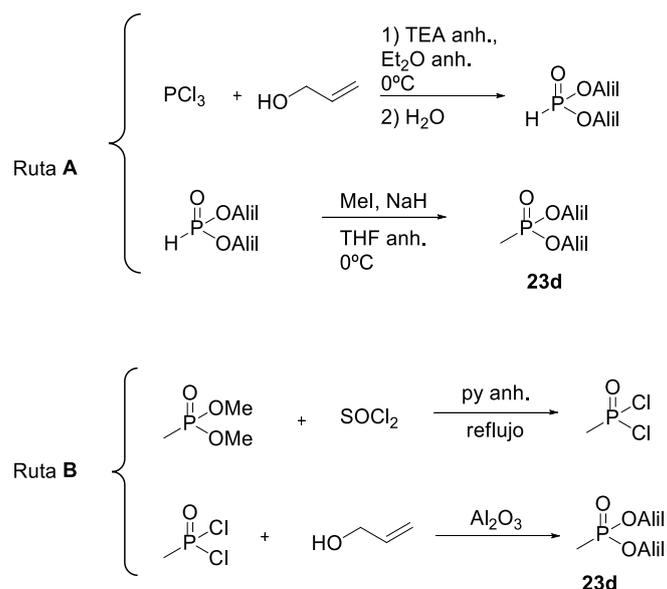
Los metilfosfonatos de dimetilo (**23a**) y dietilo (**23b**) son comerciales, mientras que el metilfosfonato de dibencilo (**23c**) y de dialilo (**23d**) tuvieron que ser sintetizados.

La obtención de metilfosfonato de dibencilo (**23c**) se llevó a cabo por metilación de fosfito de dibencilo comercial, con yoduro de metilo como agente alquilante, en THF anhidro y en presencia de hidruro de sodio como base (Esquema 5.12).<sup>43</sup> El producto de la reacción se obtuvo con un excelente rendimiento del 98%.



**Esquema 5.12.** Síntesis de metilfosfonato de dibencilo

En cuanto al metilfosfonato de dialilo (**23d**), se plantearon dos posibles estrategias sintéticas, la primera de ellas consiste en la reacción de tricloruro de fósforo en medio básico con alcohol alílico, para formar fosfito de dialilo que se metila en condiciones idénticas a las empleadas en la síntesis de metilfosfonato de dibencilo (Esquema 5.13, Ruta **A**).<sup>44</sup> La segunda estrategia consiste en la reacción de metilfosfonato de dimetilo con cloruro de tionilo, para sustituir los grupos metoxi por cloruros, y la posterior reacción del dicloruro resultante con alcohol alílico en presencia de alúmina neutra, para generar el producto deseado (Esquema 5.13, Ruta **B**).<sup>45,46</sup>

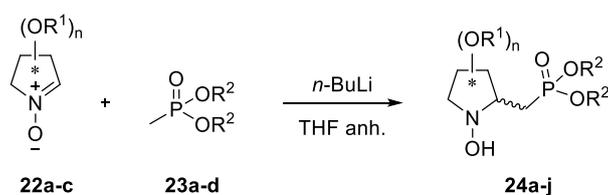


**Esquema 5.13.** Síntesis de metilfosfonato de dialilo

La ruta **B** resultó más apropiada (Rdto. = 94%), ya que en el primer paso de la ruta **A**, junto con el fosfito dialilado se generaron los análogos monoalilado y trialilado, subproductos que provocaban una importante caída del rendimiento global.

#### 5.4.3. Adición de metilfosfonatos a nitronas cíclicas polihidroxiladas

Una vez que se dispuso de todos los reactivos necesarios, se procedió al estudio de la reacción de adición de los metilfosfonatos a las nitronas cíclicas seleccionadas. De acuerdo con la bibliografía y experiencias previas en nuestro grupo de investigación, las reacciones se llevaron a cabo usando *n*-BuLi como base para la formación “*in situ*” del litio correspondiente y sobre el cual se adicionó la nitrona (Esquema 5.14). En la Tabla 5.1, aparecen reflejados los resultados obtenidos.



**Esquema 5.14.** Estudio de adición

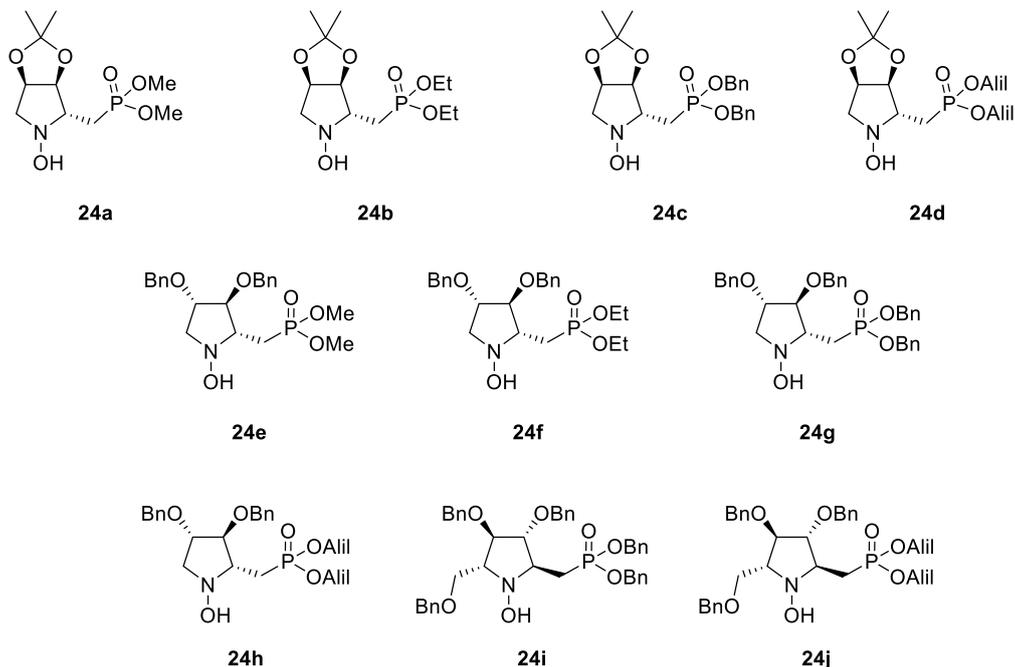
**Tabla 5.1.** Estudio de adición (Esquema 5.14)

| #  | Nitrona    | Fosfonato  | T (°C) | t (h) | Producto   | Rdto. (%) <sup>[a]</sup> | d.r. <sup>[b]</sup> |
|----|------------|------------|--------|-------|------------|--------------------------|---------------------|
| 1  | <b>22a</b> | <b>23a</b> | -78    | 2     | <b>24a</b> | 95                       | >95:5               |
| 2  | <b>22a</b> | <b>23b</b> | -78    | 1     | <b>24b</b> | 99                       | >95:5               |
| 3  | <b>22a</b> | <b>23c</b> | -78    | 1     | <b>24c</b> | 95                       | >95:5               |
| 4  | <b>22a</b> | <b>23d</b> | -78    | 4     | <b>24d</b> | 95                       | >95:5               |
| 4  | <b>22b</b> | <b>23a</b> | -78    | 2     | <b>24e</b> | 96                       | >95:5               |
| 5  | <b>22b</b> | <b>23b</b> | -78    | 2     | <b>24f</b> | 89                       | >95:5               |
| 6  | <b>22b</b> | <b>23c</b> | -78    | 2     | <b>24g</b> | 98                       | >95:5               |
| 7  | <b>22b</b> | <b>23d</b> | -78    | 3     | <b>24h</b> | 92                       | >95:5               |
| 8  | <b>22c</b> | <b>23c</b> | -78    | 4     | <b>24i</b> | 96                       | >95:5               |
| 9  | <b>22c</b> | <b>23d</b> | -78    | 16    | <b>24j</b> | 98                       | >95:5               |
| 10 | <b>22c</b> | <b>23d</b> | -30    | 6     | <b>24j</b> | 97                       | 70:30               |

[a] Aislado tras purificación por columna cromatográfica. [b] Determinado por <sup>1</sup>H RMN del crudo de reacción.

Como se observa en la tabla, la reacción transcurre con rendimientos y diastereoselectividades excelentes, observándose un único diastereoisómero, a -78°C. El tiempo de reacción fue relativamente corto (Tabla 5.1, entradas 1-8), excepto en el caso de la nitrona **22c** con fosfonato de dialilo **23d** (Tabla 5.1, entrada 9), en el que es necesario aumentar el tiempo de reacción considerablemente, 16 h, para mantener el excelente rendimiento. Con el fin de acortar el tiempo de esta reacción, se decidió aumentar la temperatura (Tabla 5.1, entrada 10) pero la diastereoselectividad empeoró considerablemente.

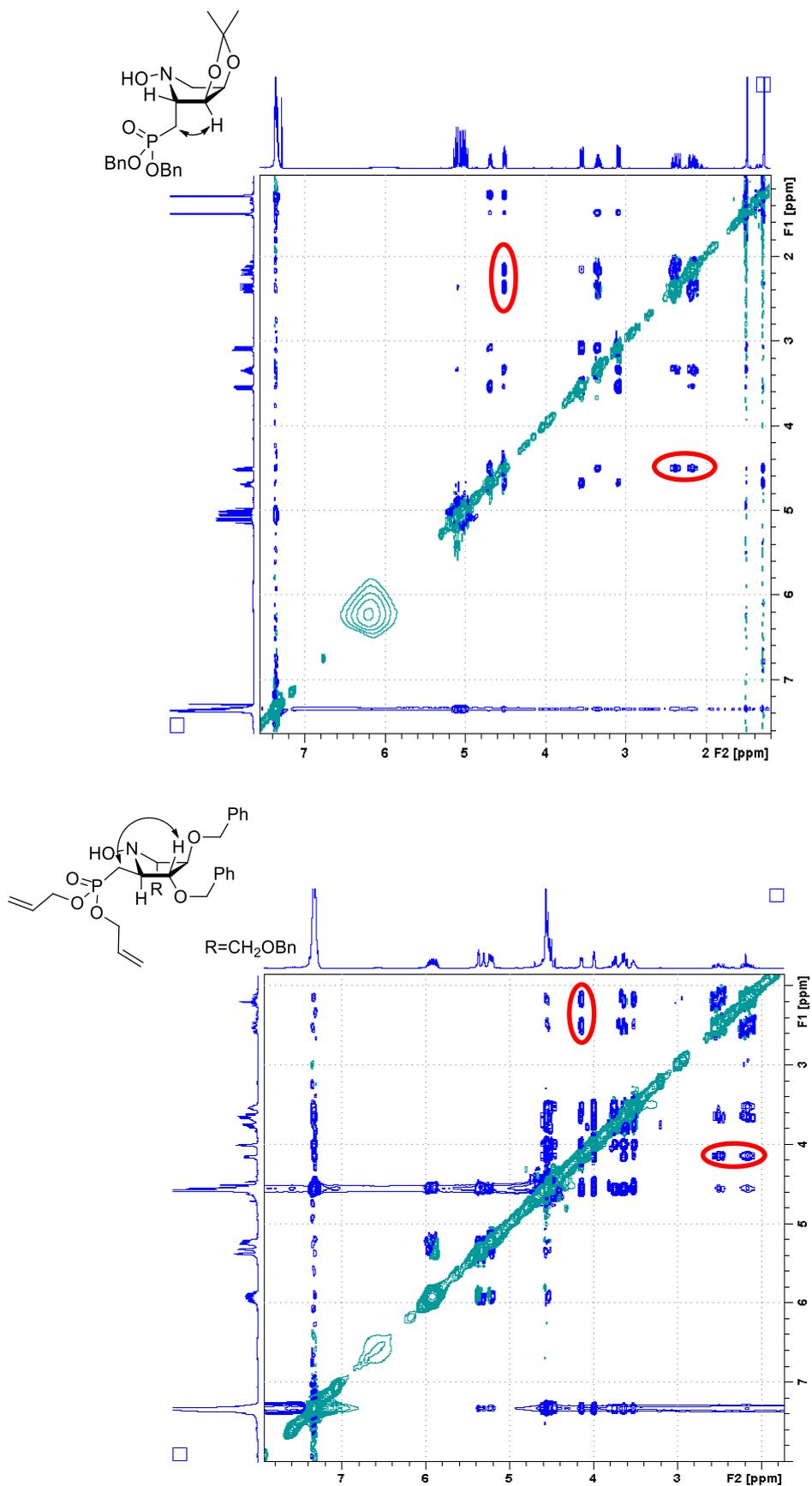
Las *N*-hidroxipirrolidinas quirales obtenidas siguiendo esta metodología se muestran en la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** *N*-hidroxipirrolidinas obtenidas por adición de metilfosfonatos sobre nitronas polihidroxiladas

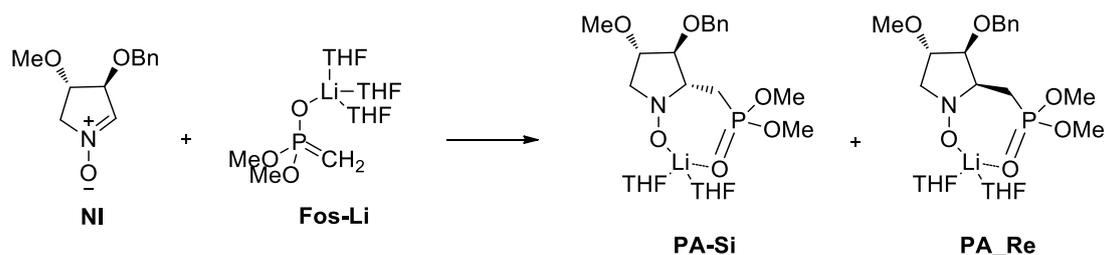
#### 5.4.4. Determinación de la estereoquímica

La estereoquímica del nuevo centro quiral formado, se determinó mediante experimentos NOESY de Resonancia Magnética Nuclear. En todos los casos se observó la correlación entre los protones del grupo CH<sub>2</sub> unido a fósforo con el protón situado en la posición adyacente, lo que indicaba que el ataque del litiometilfosfonato se había producido por la cara menos impedida de la nitrona, es decir, la opuesta al sustituyente en posición 3 del anillo. Para ilustrar este hecho, se han seleccionado un par de experimentos de NOESY de las *N*-hidroxipirrolidinas obtenidas, que se representan en la Figura 5.7.

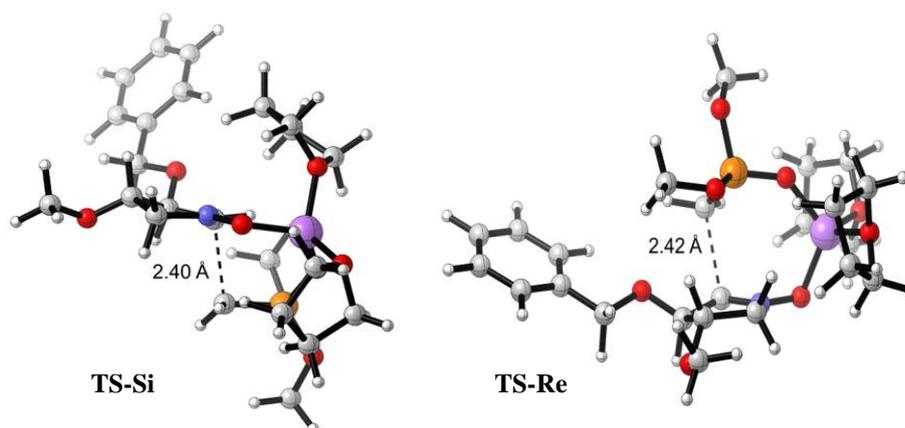


**Figura 5.7.** Espectros NOESY donde se muestran las correlaciones espaciales para las *N*-hidroxipirrolidinas **24c** e **24j** respectivamente

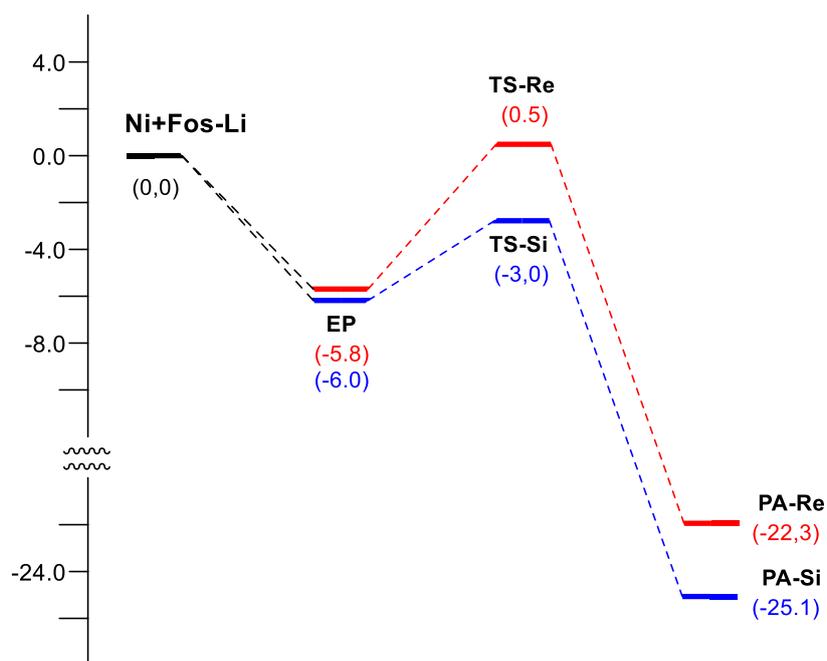
Un modelo teórico realizado en nuestro grupo de investigación con la nitrona simplificada **NI** (Esquema 5.15), mostró que, efectivamente, el estado de transición más bajo en energía de las dos posibles adiciones (cara *Re* y *Si* de la nitrona **NI**) correspondía a la adición por la cara menos impedida. En la Figura 5.8, se muestran los dos posibles estados de transición (**TS-Si** y **TS-Re**). La diferencia de energía entre ambos es de 3.5 kcal/mol (Figura 5.9), lo que justifica la obtención de un único diastereoisómero en la reacción (**PA-Si**).



**Esquema 5.15.** Modelo de reacción para el estudio teórico



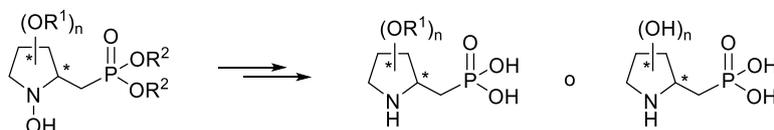
**Figura 5.8.** Estados de transición calculados para la cara *Si* (izquierda) y *Re* (derecha)



**Figura 5.9.** Diagrama de energía calculado para la adición de litiometilfosfonato de dimetilo sobre la nitrona simplificada

#### 5.4.5. Obtención de ácidos pirrolidinilfosfónicos

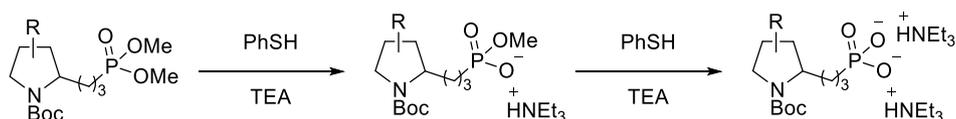
Para llevar a cabo el acoplamiento de los pirrolidinil derivados preparados con UMP, era imprescindible obtenerlos en forma de ácido fosfónico. Por ello, el siguiente paso fue la preparación de los correspondientes ácidos pirrolidinilfosfónicos a partir de los pirrolidinilfosfonatos sintetizados. Adicionalmente a la ruptura de los enlaces fosfonato, se llevó a cabo la reducción del enlace N-O de las *N*-hidroxipirrolidinas con el fin de evitar posibles interferencias durante el proceso de acoplamiento (Esquema 5.16).



**Esquema 5.16.** Obtención de pirrolidinilfosfónicos a partir de *N*-hidroxipirrolidinas

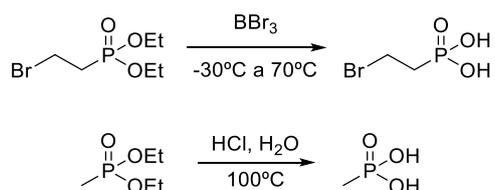
En función de la naturaleza del grupo  $R^2$  sobre el fosfonato y del método empleado para su eliminación, era posible obtener los correspondientes ácidos pirrolidinilfosfónicos tanto manteniendo los grupos  $-OR^1$  en el anillo de pirrolidina, como con los grupos  $-OH$  libres.

En la bibliografía se habían descrito diferentes métodos para la obtención de ácidos fosfónicos a partir de fosfonatos. En el caso de metil derivados, el grupo metilo se podía eliminar por tratamiento con tiofenol en medio básico. Esta metodología, que se había utilizado con anterioridad en el grupo de investigación, suponía una eliminación secuencial de los grupos metilo, lo que conllevaba a un aumento del número de pasos en la ruta sintética (Esquema 5.17).<sup>1,47</sup>



**Esquema 5.17.** Desprotección del grupo dimetoxifosfonato

De acuerdo con la bibliografía, en los etil derivados, el grupo alquilo se podía eliminar utilizando tribromuro de boro y calentando de  $-30^{\circ}\text{C}$  a  $70^{\circ}\text{C}$ , o bien empleando condiciones fuertemente ácidas y a alta temperatura (Esquema 5.18).<sup>48,49</sup>



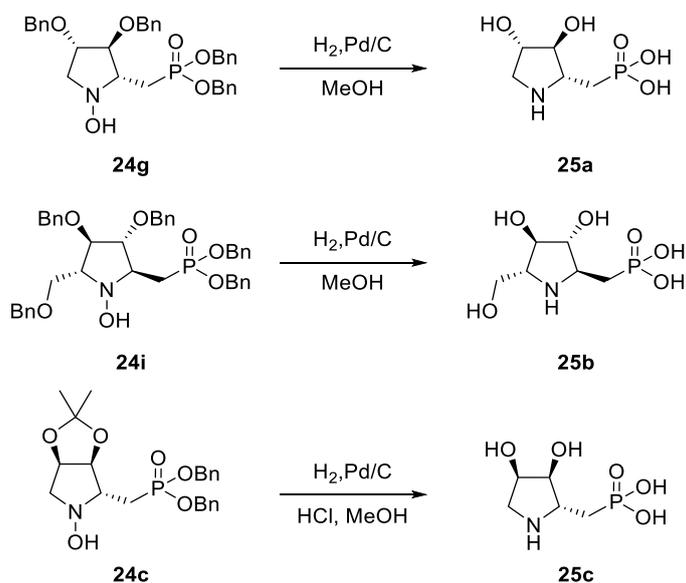
**Esquema 5.18.** Desprotección del grupo dietoxifosfonato

Ninguno de los métodos citados fue empleado ya que desde un punto de vista práctico, resultaba más adecuado el uso de los derivados de bencilo y alilo en el fosfonato, para conseguir una desprotección total o parcial en los ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos.

#### *Ácidos pirrolidinilfosfónicos a partir de dibencilfosfonatos*

Los grupos bencilo pueden ser eliminados bien usando la estrategia anteriormente nombrada, con  $\text{BBr}_3$ , o bien por hidrogenación en presencia del catalizador adecuado.<sup>48,50</sup> Teniendo en cuenta que algunas de las pirrolidinas preparadas también tenían ese grupo protector, esta estrategia podía resultar interesante para la desprotección total y la generación de los correspondientes ácidos pirrolidinilfosfónicos con los grupos OH.

La hidrogenación catalítica en presencia de paladio (0) sobre el compuesto **24g** y **24i** dio lugar a la desprotección total de los grupos hidroxilo de la pirrolidina y el fosfonato, al igual que la reducción del grupo hidroxilamina a amina en un sólo paso. Además, la aplicación de esta misma metodología sobre **24c**, presencia de HCl, permitió la desprotección y la eliminación del grupo acetal de la pirrolidina (Esquema 5.19).



**Esquema 5.19.** Obtención de ácidos pirrolidinilfosfónicos con grupos OH libres

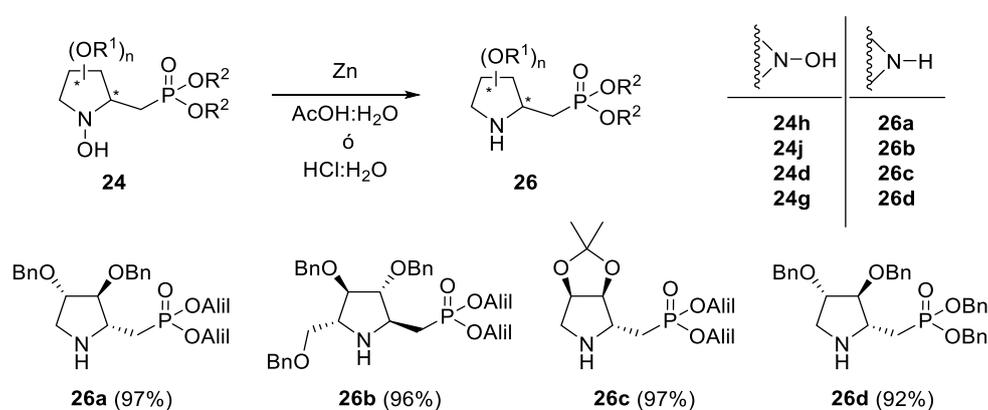
De esta forma, se obtuvieron los correspondientes ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos (**25a-c**) como productos crudos, identificados por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, pero acompañados de una pequeña cantidad de impurezas de carácter desconocido. Al igual que el resto de los ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos descritos en esta Memoria, estos productos fueron utilizados sin purificación en la reacción de acoplamiento con uridinamonofofato (UMP), debido a los problemas que suponía su carácter zwitteriónico.

En general, los espectros de RMN, principalmente de fósforo, mostraron dos conjuntos de señales que se pueden atribuir bien a una mezcla de tautómeros, o bien a un equilibrio conformacional. La modelización preliminar de las distintas posibilidades mediante cálculos computacionales, indicaron que probablemente se trataba de una mezcla de tautómeros.

### Ácidos pirrolidinilfosfónicos a partir de dialilfosfonatos

La eliminación del grupo alilo es compatible con los grupos protectores bencilo y acetal sobre los OH pirrolidínicos, por lo que los alilfosfonatos ofrecían la oportunidad de preparar ácidos fosfónicos manteniendo los grupos protectores citados.

En primer lugar, era necesaria la reducción del enlace N-O para obtener las correspondientes pirrolidinas. Para ello se trataron los *N*-hidroxi derivados con zinc en medio ácido.<sup>51,52</sup> Esta reacción transcurre a temperatura ambiente utilizando como disolvente una mezcla de agua y ácido acético en proporción 1:1 (Esquema 5.20).



Esquema 5.20. Reducción de *N*-hidroxilamina a amina

Se seleccionaron las *N*-hidroxipirrolidinas **24** que aparecen representadas en el esquema, y se obtuvieron las correspondientes pirrolidinas (**26a-c**) con excelentes rendimientos. En el caso de la *N*-hidroxipirrolidina **24j**, la reducción en ácido acético resultó ser mucho más lenta, 36 horas frente a las 18 horas del resto, y la conversión no fue completa (70%), por lo que se decidió cambiar este ácido por uno más fuerte, HCl. En estas condiciones, la conversión hacia **26b** es total en 18 horas.

También se llevó a cabo la reacción con la *N*-hidroxipirrolidina **24g**, que presenta el grupo dibencilfosfonato. Igualmente en este caso, se obtuvo la pirrolidina **26d** con excelente rendimiento.

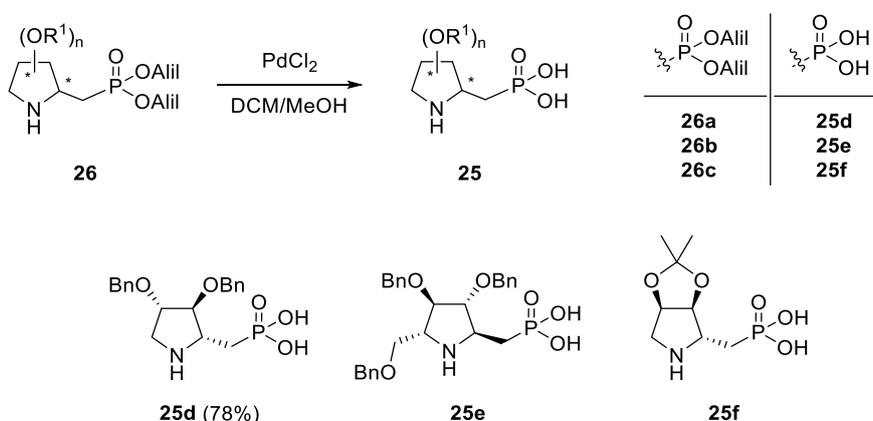
Para la eliminación del grupo alilo y obtención de los ácidos fosfónicos correspondientes se ensayaron tres métodos:

- Reacción catalizada por *tetrakis*(trifenilfosfina)paladio (0) con un nucleófilo, como dimedona.<sup>53</sup>
- Tratamiento con cloruro de paladio (II) en cantidades catalíticas en DCM/MeOH.<sup>54</sup>
- Reacción con hexacloroplatinato (IV) de potasio en DMF.

El primer método no resultó adecuado, aunque se consiguió eliminar el grupo alilo, a la vista de los espectros de <sup>1</sup>H RMN del crudo, la purificación de la reacción resultó infructuosa. Se probó a purificar con resina de intercambio catiónico (Amberlist<sup>®</sup> y Dowex<sup>®</sup>) o por cromatografía en fase reversa, utilizando C18, pero en todos los casos se obtuvo una mezcla de productos con cantidades importantes de dimedona.

El segundo método resultó ser el más favorable, a pesar de que los intentos de purificación del producto no resultaron del todo satisfactorios, probablemente por su carácter zwitterionico. Así, una vez que se observaba la ausencia de las señales correspondientes de los grupos alilo por RMN de protón, los complejos de paladio que acompañaban al producto se eliminaban mediante filtración y el uso de “scavengers”.

El empleo de hexacloroplatinato (IV) de potasio también proporcionó los ácidos fosfónicos correspondientes, pero la necesidad de emplear cantidades estequiométricas de complejo y la dificultad de eliminar los restos de metal, ya que el complejo Pt-alilo es soluble en disolventes orgánicos, nos llevó a continuar con el método anterior.



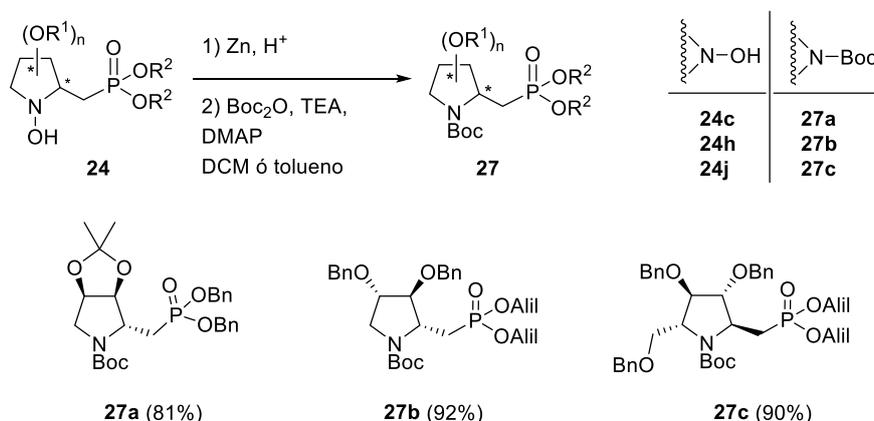
**Esquema 5.21.** Obtención de ácidos pirrolidinilfosfónicos con grupos OH protegidos

La eliminación del grupo alilo con PdCl<sub>2</sub> permitió obtener los ácidos β-aminofosfónicos indicados en el Esquema 5.21, que mantienen los grupos protectores en el anillo de pirrolidina. La purificación de los productos resultó ser problemática, obteniéndose con una pequeña cantidad de impurezas a excepción del ácido **25d**, que pudo ser aislado por precipitación en fase acuosa.

#### Preparación de *N*-Boc derivados

En previsión de que el grupo amino libre de los ácidos pirrolidinilfosfónicos preparados pudiera dar lugar a problemas en el proceso de acoplamiento posterior con la unidad de reconocimiento enzimático (UMP), se llevó a cabo un estudio de protección del NH pirrolidínico con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc).

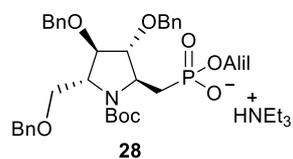
La preparación de los *N*-Boc derivados **27** se llevó a cabo por tratamiento del producto crudo de la reducción de las *N*-hidroxipirrolidinas **24** con di-*tert*-butil dicarbonato (Boc<sub>2</sub>O) en presencia de TEA y DMAP.<sup>1</sup> En el Esquema 5.22 se muestran los *N*-Boc-pirrolidinilfosfonatos preparados (**27**).



**Esquema 5.22.** Protección de pirrolidinas con Boc

Para la obtención del *N*-Boc derivado **27c**, debido al impedimento estérico generado por el sustituyente en posición 5, fue necesario el empleo de un exceso de Boc<sub>2</sub>O y tolueno a reflujo como disolvente. El empleo de condiciones más suaves (DCM) dio lugar a un rendimiento muy inferior (40%).<sup>55</sup> Es interesante comentar que, durante la purificación de este compuesto por cromatografía en columna, cuando se utilizó un eluyente con un 2% de TEA añadido, para prevenir la hidrólisis del grupo Boc debida a la acidez de la sílice, se obtuvo como producto mayoritario, el fosfonato

de trietilamionio **28** con un rendimiento del 55% y únicamente un 30% del producto deseado **27c** (Figura 5.10). Una columna rápida con un eluyente sin TEA añadida, permitió aislar **27c** con un 90% de rendimiento.



**Figura 5.10.** Subproducto obtenido en la purificación de **27c**

Aunque los N-Boc derivados **27** pueden ser transformados en los correspondientes ácidos fosfónicos, los primeros ensayos de acoplamiento que se describen en el capítulo siguiente mostraron que no era necesaria la protección en el átomo de nitrógeno, por lo que no se hizo más trabajo en esa dirección.

## 5.5. Conclusiones

Se ha desarrollado un método de preparación de ácidos pirrolidinilfosfónicos a partir de la reacción de adición de metilfosfonatos sobre nitronas cíclicas quirales polihidroxiladas.

La diastereoselectividad del proceso de adición de los litiometilfosfonatos generados “in situ” sobre las nitronas estudiadas es excelente, únicamente se obtiene el estereoisómero *trans* respecto del grupo adyacente en el anillo. Igualmente, los rendimientos de la reacción son excelentes 89-99%.

Se han encontrado condiciones para transformar las *N*-hidroxipirrolidinas resultantes de la adición, en los correspondientes ácidos fosfónicos, con o sin grupos protectores sobre los OH pirrolidínicos.

El principal problema que presenta esta estrategia, radica en la imposibilidad de purificación, por métodos convencionales, de los ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos finales, debido a su carácter zwitteriónico.

Por todo lo anterior, la metodología desarrollada resulta una buena herramienta para la preparación de glicomiméticos basados en pirrolidinas y funcionalizados con un grupo fosfonato, que en comparación con el grupo fosfato del sustrato natural, no puede ser hidrolizado.

## 5.6. Experimental section

### General Methods

**Miscellaneous:** Analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. Anhydrous solvents were purified and dried with activated molecular sieves prior to use. All the glassware was dried for 12 hours prior to use in an oven at 140°C, and allowed to cool under humidified atmosphere. Reactions were monitored using analytical thin layer chromatography (TLC), in pre-coated silica-backed plates (DC-Fertigfolien ALUGRAM<sup>®</sup> xtra SIL G/UV<sub>254</sub>). These were visualized by ultraviolet irradiation, permanganate potassium or *p*-anisaldehyde dips. For flash chromatography Silica Gel 60, 63-200 microns was used. For the removal of solvents under reduced pressure Büchi R-210 rotary evaporators were used.

**NMR:** <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and <sup>31</sup>P-NMR were acquired at 25°C on Bruker Avance 400MHz or AVANCE II 300 MHz instruments in the stated solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm relative to residual solvent signals and coupling constants (*J*) in hertz (Hz). NMR assignments were using standard 2D experiments.

**Optical rotations:**  $[\alpha]_D$  were taken on a JASCO DIP-370 polarimeter at indicated temperature.

**Melting points:** m.p. were determined in a Büchi instrument and they were uncorrected.

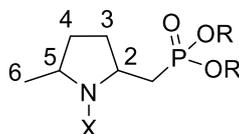
**Elemental analyses:** were performed on a Perkin Elmer 240B microanalyzer or with a Perkin-Elmer 2400 instrument.

**HRMS:** High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a QToF spectrometer equipped with an ESI (electrospray ionization) source (microTOF-Q, Bruker Daltonik) using sodium formate as external reference.

### General notes

Compounds **22a-c** were prepared according to methods reported in literature. The detailed experimental procedure, physical and spectroscopic properties of the aforementioned compounds were found to be identical to those reported.

NMR assignments were made using this general pattern, showed in Figure 5.11.



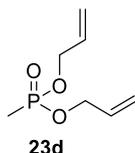
**Figure 5.11.** Description for NMR assignment of pirrolidine ring

### Procedure for the preparation of dibenzyl methylphosphonate (**23c**).



To a well stirred solution of dibenzyl phosphite (4.27 mmol, 0.82 mL) in anhydrous THF (10 mL) under argon at 0°C, NaH (8.54 mmol) was added. The mixture was stirred for 5 min and then MeI (10.7 mmol, 0.65 mL) was added. The reaction was stirred at 0°C during 2 h and after that it was warmed at room temperature and water (10 mL) was added. The mixture was extracted with DCM (3x20 mL), the combined organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude was purified with flash chromatography (Hexane/EtOAc 30:70) to give **23c** (4.18 mmol) with a yield of 98%. The physical and spectroscopic properties of the aforementioned compound was found to be identical to those reported.<sup>43</sup>

### Procedure for the preparation of diallyl methylphosphonate (**23d**).



**Method A:** to a well stirred solution of PCl<sub>3</sub> (65.81 mmol, 5.8 mL) in dry Et<sub>2</sub>O (120 mL), cooled with an ice bath and under an argon atmosphere, distilled TEA (0.13 mol, 18.53 mL) was added dropwise. After the addition of the base, allyl alcohol (0.13 mol, 9 mL) diluted with 30 mL of anhydrous Et<sub>2</sub>O was also added dropwise. The reaction was stirred at room temperature until no PCl<sub>3</sub> signal in <sup>31</sup>P-NMR was observed. After that, H<sub>2</sub>O (80 mL) was added and the mixture was stirred overnight. Then aq. NaHCO<sub>3</sub> (70 mL) was added to neutralized hydrochloric acid, and, also solid NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was isolated, dried and the solvent was eliminated. The crude only contains diallyl phosphite (21.06 mmol) which was pure enough to continue without any other purification. Yield (first step): 32%. To obtain the corresponding methyl phosphonate **23d** the same method that is described for dibenzyl methylphosphonate is used. Yield (second step): 95%.<sup>44</sup>

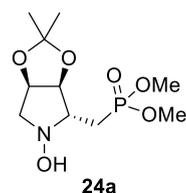
**Method B:** SOCl<sub>2</sub> (1.25 mmol, 91 mL) was heated to reflux and then a previously prepared solution of dimethyl methylphosphonate (0.5 mmol, 55 mL) with catalytic pyridine (0.01 mmol, 400μL), was added dropwise. The mixture was stirred 8h at reflux and then the excess of thionyl chloride was eliminated under reduced pressure

(it's important not to heat the rotavapor bath) to give methylphosphonyl dichloride (quant.). Then allyl alcohol (16.55 mmol, 1.15 mL) was treated with neutral activated alumina (22.56 mmol) in a single neck round bottom flask and methylphosphonyl dichloride (7.52 mmol) was added at 0°C. The resultant dispersion was shaken occasionally at room temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC suspending a few milligrams of the mixture in 1 mL of diethyl ether. When the reaction was complete the dispersion mixture was extracted with ether (3x50 mL) and filtered. The solvent was removed and the residue was purified by column chromatography (Hexane/AcOEt 30:70) to give **23d** (7.07 mmol) with a yield of 94 %. The physical and spectroscopic properties of the aforementioned compound was found to be identical to those reported.<sup>46</sup>

#### General procedure E to obtain ((1-Hydroxypyrrolidin-2-yl) methyl)phosphonates (**24a-j**).

To a well stirred solution of the corresponding phosphonate **23a-d** (1.28 mmol) in anhydrous THF (3 mL) cooled to -78 °C, under an argon atmosphere, *n*-BuLi (1.28 mmol) was added dropwise. After 10 min, a solution of the corresponding nitrene **22a-c** (0.64 mmol) in anhydrous THF (2 mL), was added dropwise. The reaction was monitored by TLC and kept at -78 °C until disappearance of the nitrene. When the reaction is finished, saturated NH<sub>4</sub>Cl solution (5 mL) was added. Then the reaction was warm to room temperature and extracted with DCM (3x10 mL). The combined organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtrated and then the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (gradient Hexane/EtOAc 80:20 to EtOAc)

#### Dimethyl ((3*aS*,4*R*,6*aR*)-5-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-3*aH*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methylphosphonate (**24a**).



Following the general procedure E, **24a** (170 mg, 0.60 mmol), was isolated as pale yellow oil. Yield: 95%. d.r. >95:5.

R<sub>f</sub> = 0.04; EtOAc/MeOH (9:1)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.30 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.52 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2.04-2.18 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.28-2.46 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.21 (dd, 1H,  $J=12.1$  Hz,  $J=4.5$  Hz,  $H_5$ ), 3.38-3.48 (m, 1H,  $H_2$ ), 3.62 (dd, 1H,  $J=12.1$  Hz,  $J=6.1$  Hz,  $H_5$ ), 3.76 (d, 3H,  $J=4.5$  Hz,  $\text{OCH}_3$ ), 3.80 (d, 3H,  $J=4.5$  Hz,  $\text{OCH}_3$ ), 4.58 (dd, 1H,  $J=6.8$  Hz,  $J=5.1$  Hz,  $H_3$ ), 4.75-4.84 (m, 1H,  $H_4$ ).

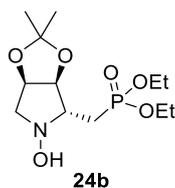
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.8 (d,  $J=142.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 24.8 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 26.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 52.7 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{OCH}_3$ ), 52.9 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{OCH}_3$ ), 62.0 ( $\text{C}_5$ ), 68.41 (d,  $J=3.0$  Hz,  $\text{C}_2$ ), 77.2 ( $\text{C}_4$ ), 83.3 (d,  $J=10.9$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 114.0 ( $\text{C}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.4 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (0.5,  $\text{CHCl}_3$ , +4.7).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{P}$ : C, 42.71; H, 7.17; N, 4.98; P, 11.01. Found C, 42.63; H, 7.21; N, 4.95; P, 11.20.

**Diethyl ((3a*S*,4*R*,6a*R*)-5-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methylphosphonate (24b).**



Following the general procedure E, **24b** (195 mg, 0.63 mmol), was isolated as colorless oil. Yield: 99%. d.r. >95:5.

$R_f=0.10$ ; EtOAc/MeOH (9:1)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.31 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.34 (td, 6H,  $J=7.1$  Hz,  $J=0.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.51 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2.07 (ddd, 1H,  $J=19.6$  Hz,  $J=15.2$  Hz,  $J=7.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.28 (ddd, 1H,  $J=18.6$  Hz,  $J=15.2$  Hz,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.10 (dd, 1H,  $J=11.8$  Hz,  $J=4.8$  Hz,  $H_5$ ), 3.27-3.35 (m, 1H,  $H_2$ ), 3.54 (dd, 1H,  $J=11.8$  Hz,  $J=6.1$  Hz,  $H_5$ ), 4.08-4.21 (m, 4H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 4.52 (dd, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $J=5.1$  Hz,  $H_3$ ), 4.73-4.78 (m, 1H,  $H_4$ ).

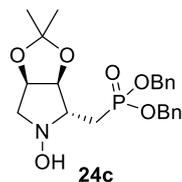
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.4 (d,  $J=5.9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 24.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 25.8 (d,  $J=141.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 27.1 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 61.9 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 62.1 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 62.2 ( $\text{C}_5$ ), 68.2 (d,  $J=3.9$  Hz,  $\text{C}_2$ ), 77.5 ( $\text{C}_4$ ), 83.8 (d,  $J=11.3$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 113.7 ( $\text{C}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  29.6 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -23.5).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{P}$ : C, 46.60; H, 7.82; N, 4.53; P, 10.01. Found C, 46.43; H, 7.95; N, 4.49; P, 10.52.

**Dibenzyl ((3*aS*,4*R*,6*aR*)-5-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-3*aH*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methylphosphonate (24c).**



Following the general procedure E, **24c** (262 mg, 0.60 mmol), was isolated as colorless oil. Yield: 95%. d.r. >95:5.

$R_f = 0.51$ ; EtOAc (100%)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.26 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.47 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 2.14 (ddd, 1H,  $J=19.7$  Hz,  $J=15.3$  Hz,  $J=7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.35 (ddd, 1H,  $J=18.8$  Hz,  $J=15.3$  Hz,  $J=6.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.06 (dd, 1H,  $J=11.8$  Hz,  $J=4.8$  Hz,  $H_5$ ), 3.32 (dtd, 1H,  $J=12.0$  Hz,  $J=6.9$  Hz,  $J=5.3$  Hz,  $H_2$ ), 3.52 (dd, 1H,  $J=11.8$  Hz,  $J=6.1$  Hz,  $H_5$ ), 4.48 (dd, 1H,  $J=6.9$  Hz,  $J=5.3$  Hz,  $H_3$ ), 4.64-4.69 (m, 1H,  $H_4$ ), 4.94-5.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 7.30-7.37 (m, 10H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

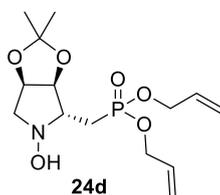
$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.9 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 26.4 (d,  $J=141.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 27.0 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ), 62.2 ( $\text{C}_5$ ), 67.5 (d,  $J=6.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 67.7 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 68.1 (d,  $J=3.7$  Hz,  $\text{C}_2$ ), 77.3 ( $\text{C}_4$ ), 83.3 (d,  $J=9.7$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 113.8 (C), 127.9 (d,  $J=2.7$  Hz,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 (d,  $J=0.9$  Hz,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.3 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.4 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30.5 ppm.

$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -14.2).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P}$ : C, 60.96; H, 6.51; N, 3.23; P, 7.15. Found C, 60.85; H, 6.74; N, 3.32; P, 7.12.

**Diallyl (((3*aS*,4*R*,6*aR*)-5-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-3*aH*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methyl)phosphonate (24d).**



Following the general procedure E, **24d** (200 mg, 0.60 mmol), was isolated as yellow oil. Yield: 95%. d.r. >95:5.

$R_f = 0.46$ ; DCM/ACN (5:5)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.20 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.40 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.82-2.03 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.26-2.38 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.99 (dd, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $J=4.2$  Hz,  $H_5$ ),

3.20-3.29 (m, 1H, *H*2), 3.33 (dd, 1H, *J*= 11.6 Hz, *J*=5.9 Hz, *H*5), 4.42-4.55 (m, 5H, *H*3, *OCH*<sub>2</sub>Allyl), 4.59-4.66 (m, 1H, *H*4), 5.13-5.19 (m, 2H, *CH*<sub>2</sub>Allyl), 5.24-5.31 (m, 2H, *CH*<sub>2</sub>Allyl), 5.79-5.91 (m, 2H, *CH*Allyl).

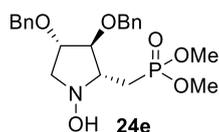
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 24.4 (d, *J*=148.8 Hz, *CH*<sub>2</sub>P), 24.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 61.7 (C5), 66.1 (d, *J*=6.3 Hz, *OCH*<sub>2</sub>Allyl), 66.3 (d, *J*=3.2 Hz, *OCH*<sub>2</sub>Allyl), 67.1 (C2), 76.9 (C4), 82.7 (d, *J*= 8.4 Hz, C3), 113.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 117.8 (*CH*<sub>2</sub>Allyl), 117.8 (*CH*<sub>2</sub>Allyl), 132.7 (d, *J*=6.5 Hz, *CH*Allyl), 132.8 (d, *J*=6.4 Hz, *CH*Allyl).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 30.5 ppm.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, -9.3).

Anal Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub>P: C, 50.45; H, 7.26; N, 4.20; P, 9.29. Found C, 50.55; H, 7.24; N, 4.19; P, 9.27.

**Dimethyl ((2*R*,3*S*,4*S*)-4,3-bis(benzyloxy)-1-hydroxypyrrolidin-2-yl)methylphosphonate (24e).**



Following the general procedure E, **24e** (255 mg, 0.61 mmol), was isolated as yellow oil. Yield: 96%. d.r. >95:5.

*R*<sub>f</sub> = 0.29; EtOAc (100%)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.08-2.36 (m, 2H, *CH*<sub>2</sub>P), 3.05-3.27 (m, 2H, *H*2, *H*5), 3.51 (d, 1H, *J*=11.6 Hz, *H*5), 3.72 (d, 3H, *J*=0.3 Hz, *CH*<sub>3</sub>), 3.75 (d, 3H, *J*=0.3 Hz, *CH*<sub>3</sub>), 3.86 (d, 1H, *J*=6.8 Hz, *H*3), 3.98 (d, 1H, *J*=6.6 Hz, *H*4), 4.39-4.60 (m, 4H, *CH*<sub>2</sub>Bn), 7.27-7.39 (m, 10H, *H*<sub>Ar</sub>).

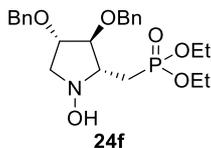
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27.2 (d, *J*=139.4 Hz, *CH*<sub>2</sub>P), 52.5 (d, *J*=6.6 Hz, *CH*<sub>3</sub>), 52.9 (d, *J*=6.6 Hz, *CH*<sub>3</sub>), 60.3 (C5), 68.0 (d, *J*=4.5 Hz, C2), 71.4 (*CH*<sub>2</sub>Bn), 72.1 (*CH*<sub>2</sub>Bn), 80.0 (C4), 87.2 (d, *J*= 10.6 Hz, C3), 127.9 (*C*<sub>Ar</sub>), 127.9 (*C*<sub>Ar</sub>), 128.4 (*C*<sub>Ar</sub>), 128.5 (*C*<sub>Ar</sub>), 137.6 (*C*<sub>Ar</sub>), 137.7 (*C*<sub>Ar</sub>).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32.6 ppm.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +6.3).

Anal Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>6</sub>P: C, 59.85; H, 6.70; N, 3.32; P, 7.35. Found C, 59.64; H, 6.85; N, 3.42; P, 7.32.

**Diethyl** ((2*R*,3*S*,4*S*)-4,3-bis(benzyloxy)-1-hydroxypyrrolidin-2-yl)methylphosphonate (**24f**).



Following the general procedure E, **24f** (256 mg, 0.57 mmol), was isolated as yellow oil. Yield: 89%. d.r. >95:5.

$R_f = 0.38$ ; DCM/ACN (3:7)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.27-1.33 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2.13-2.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.20-3.35 (m, 2H,  $H_2$ ,  $H_5$ ), 3.58 (d, 1H,  $J=11.7$  Hz,  $H_5$ ), 3.90 (d, 1H,  $J=6.3$  Hz,  $H_3$ ), 3.98-4.04 (m, 1H,  $H_4$ ), 4.04-4.19 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.38-4.60 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 7.28-7.42 (m, 10H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

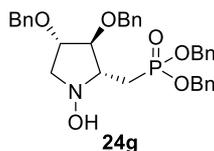
$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.3 ( $\text{CH}_3$ ), 16.4 ( $\text{CH}_3$ ), 27.7 (d,  $J=140.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 60.3 ( $\text{C}_5$ ), 62.0 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 62.3 (d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 68.7 (d,  $J=3.0$  Hz,  $\text{C}_2$ ), 71.4 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 72.2 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 79.9 ( $\text{C}_4$ ), 86.8 (d,  $J=10.2$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 127.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P NMR}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  29.4 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (0.7,  $\text{CHCl}_3$ , +15.7).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}$ : C, 61.46; H, 7.18; N, 3.12; P, 6.89. Found C, 61.25; H, 7.23; N, 3.15; P, 6.92.

**Dibenzyl** ((2*R*,3*S*,4*S*)-4,3-bis(benzyloxy)-1-hydroxypyrrolidin-2-yl)methylphosphonate (**24g**).



Following the general procedure E, **24g** (359 mg, 0.63 mmol), was isolated as yellow oil. Yield: 98%. d.r. >95:5.

$R_f = 0.57$ ; EtOAc (100%)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.31 (ddd, 2H,  $J=19.4$  Hz,  $J=6.2$  Hz,  $J=4.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.11-3.26 (m, 2H,  $H_2$ ,  $H_5$ ), 3.52 (d, 1H,  $J=11.4$  Hz,  $H_5$ ), 3.93 (dd, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $J=1.9$  Hz,  $H_3$ ), 3.98-4.02 (m, 1H,  $H_4$ ), 4.41-4.60 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 4.94-5.10 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 7.28-7.38 (m, 20H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

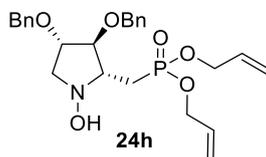
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.2 (d,  $J=140.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 60.4 ( $\text{C5}$ ), 67.1 (d,  $J=6.5$  Hz,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 67.6 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 67.8 (d,  $J=4.5$  Hz,  $\text{C2}$ ), 71.2 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 71.9 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 80.1 ( $\text{C4}$ ), 87.1 (d,  $J=9.7$  Hz,  $\text{C3}$ ), 127.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.2 (d,  $J=5.6$  Hz,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.4 (d,  $J=5.5$  Hz,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.4 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +7.4).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{NO}_6\text{P}$ : C, 69.10; H, 6.33; N, 2.44; P, 5.40. Found C, 68.95; H, 6.49; N, 2.50; P, 5.36.

**Diallyl ((2*R*,3*S*,4*S*)-4,3-bis(benzyloxy)-1-hydroxypyrrolidin-2-yl)methylphosphonate (24h).**



Following the general procedure E, **24h** (278 mg, 0.59 mmol), was isolated as brown oil. Yield: 92%. d.r. >95:5.

$R_f$  = 0.57; EtOAc (100%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.24 (ddd, 2H,  $J=19.3$  Hz,  $J=10.3$  Hz,  $J=6.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.04-3.19 (m, 2H,  $H_2$ ,  $H_5$ ), 3.46 (d, 1H,  $J=11.4$  Hz,  $H_5$ ), 3.86 (dd, 1H,  $J=7.0$  Hz,  $J=1.8$  Hz,  $H_3$ ), 3.93-4.00 (m, 1H,  $H_4$ ), 4.37-4.60 (m, 8H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ,  $\text{OCH}_{2\text{Allyl}}$ ), 5.14-5.40 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{Allyl}}$ ), 5.83-6.00 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 7.27-7.37 (m, 10H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

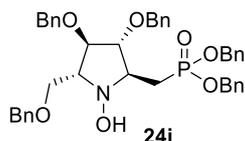
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.2 (d,  $J=141.0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 60.3 ( $\text{C5}$ ), 66.1 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{OCH}_{2\text{Allyl}}$ ), 66.5 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{OCH}_{2\text{Allyl}}$ ), 67.8 (d,  $J=4.4$  Hz,  $\text{C2}$ ), 71.2 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 72.0 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 80.1 ( $\text{C4}$ ), 87.2 (d,  $J=10.2$  Hz,  $\text{C3}$ ), 117.8 ( $\text{CH}_{2\text{Allyl}}$ ), 117.8 ( $\text{CH}_{2\text{Allyl}}$ ), 127.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.9 (d,  $J=6.2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 133.0 (d,  $J=6.2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 137.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.3 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , +10.2).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}$ : C, 63.41; H, 6.81; N, 2.69; P, 6.54. Found C, 63.35; H, 6.89; N, 2.75; P, 6.57.

**Dibenzyl (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-1-hydroxypyrrolidin-2-yl)methylphosphonate (24i).**



Following the general procedure E, **24i** (430 mg, 0.61 mmol), was isolated as yellow oil. Yield: 96%. d.r. >95:5.

$R_f$  = 0.79; EtOAc (100%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.21 (ddd, 1H,  $J=19.5$  Hz,  $J=15.3$  Hz,  $J=8.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.50 (ddd, 1H,  $J=19.0$  Hz,  $J=15.3$  Hz,  $J=6.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.52-3.61 (m, 2H,  $H_6$ ,  $H_5$ ), 3.63-3.69 (m, 1H,  $H_2$ ), 3.73 (dd, 1H,  $J=9.1$  Hz,  $J=4.4$  Hz,  $H_6$ ), 3.98 (t, 1H,  $J=3.0$  Hz,  $H_4$ ), 4.14 (dd, 1H,  $J=5.5$  Hz,  $J=3.0$  Hz,  $H_3$ ), 4.43-4.55 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.96-5.09 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 7.25-7.35 (m, 25H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

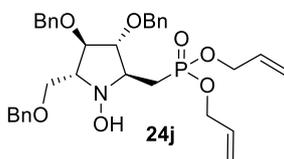
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.4 (d,  $J=139.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 64.5 (d,  $J=3.6$  Hz, C2), 67.3 (d,  $J=6.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 68.8 (C6), 70.2 (C5), 71.3 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.8 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.2 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 84.2 (C4), 85.8 (d,  $J=8.4$  Hz, C3), 127.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.8 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.8 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 136.1 (d,  $J=6.1$  Hz,  $C_{\text{Ar}}$ ), 136.2 (d,  $J=6.2$  Hz,  $C_{\text{Ar}}$ ), 137.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 137.8 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 137.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.6 ppm.

$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -32.1).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{NO}_7\text{P}$ : C, 70.98; H, 6.39; N, 2.02; P, 4.46. Found C, 70.85; H, 6.41; N, 2.09; P, 4.42.

**Diallyl (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-1-hydroxypyrrolidin-2-yl)methylphosphonate (24j).**



Following the general procedure E, **24j** (372 mg, 0.63 mmol), was isolated as brown oil. Yield: 98%. d.r. >95:5.

$R_f$  = 0.77; EtOAc (100%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.04-2.21 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.35-2.53 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.45-3.53 (m, 1H,  $H_5$ ), 3.54-3.66 (m, 2H,  $H_2$ ,  $H_6$ ), 3.72 (dd, 1H,  $J=9.4$  Hz,  $J=4.9$  Hz,

H6), 3.96 (t, 1H,  $J=3.1$  Hz, H4), 4.11 (dd, 1H,  $J=5.5$  Hz,  $J=2.6$  Hz, H3), 4.43-4.59 (m, 10H,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 5.16-5.38 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.81-5.97 (m, 2H,  $\text{CHAllyl}$ ), 7.27-7.36 (m, 15H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.1 (d,  $J=140.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 64.4 (d,  $J=3.5$  Hz, C2), 66.2 (d,  $J=3.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 66.3 (d,  $J=3.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 69.0 (C6), 70.1 (C5), 71.4 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.8 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.2 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 84.3 (C4), 85.8 (d,  $J=8.1$  Hz, C3), 117.8 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 117.9 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 127.5 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.6 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 132.9 ( $\text{CHAllyl}$ ), 132.9 ( $\text{CHAllyl}$ ), 137.9 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 138.0 ( $C_{\text{Ar}}$ ), 138 ( $C_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.6 ppm.

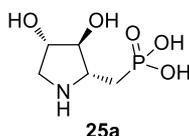
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -30.1).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{NO}_7\text{P}$ : C, 66.77; H, 6.79; N, 2.39; P, 5.22. Found C, 66.71; H, 6.82; N, 2.41; P, 5.15.

### General procedura F to obtain ((pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acids (25a-c).

A stirred solution of the corresponding phosphonate **24g**, **24i** or **24c** (0.60 mmol) in MeOH (4 mL) was treated with Pd/C (10 mol%) and stirred at room temperature for 3 days under an hydrogen atmosphere (25 mbar). When reaction is finished, controlling by NMR, it was filtered through a celite pad and methanol was removed under reduced pressure to give the corresponding phosphonic acid (**25a-c**) which were used without further purification in next chapter.

### (((2R,3S,4S)-3,4-dihydroxypyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acid (25a).



Following general procedure **F**, **25a** (102 mg) was obtained as an oil, contaminated with a small amount of undefined compounds (<5%).

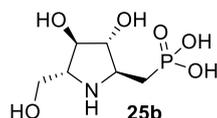
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  2.09-3.23 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.28-3.36 (m, 0.7H, H5), 3.40-3.48 (m, 0.3H, H5 $\prime$ ), 3.54 (dd, 0.7H,  $J=12.7$  Hz,  $J=5.0$  Hz, H5), 3.58-3.62 (m, 0.3H, H5 $\prime$ ), 3.63-3.71 (m, 0.7H, H2), 3.93-4.01 (m, 0.3H, H2 $\prime$ ), 4.17 (t, 0.7H,  $J=3.5$  Hz, H3), 4.20-4.24 (m, 0.3H, H3 $\prime$ ), 4.27-4.32 (m, 0.7H, H4), 4.34-4.37 (m, 0.3H, H4 $\prime$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  27.8 (d,  $J=123.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 49.9 (C5), 50.7 (C5), 58.0 (C2), 61.4 (C2), 73.8 (C4), 74.1 (C4), 79.0 (C3), 79.1 (C3).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  19.6 y 20.7 ppm

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{P}]^-$ : 196.0380 ( $\text{M}^-$ -H); found: 196.0381

**((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-dihydroxy)-5-((benziloxy)methyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)-phosphonic acid (25b).**



Following general procedure **F**, **25b** (123 mg) was obtained as an oil, contaminated with a small amount of unidentified compounds (<5%)

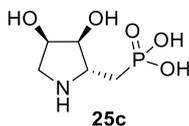
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  2.07-2.31 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.55-3.76 (m, 2H,  $H_2$ ,  $H_5$ ), 3.79-3.88 (m, 1H,  $H_6$ ), 3.89-3.96 (m, 1H,  $H_6$ ), 4.00-4.13 (m, 2H,  $H_3$ ,  $H_4$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  28.3 (d,  $J=133.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 58.1 (C6), 58.2 (C2), 62.6 (C5), 74.2 (C4), 78.3 (C3).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  18.9 y 20.3 ppm

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{P}]^+$ : 228.0632 ( $\text{M}^+$ +H); found: 228.0632

**((2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-dihydroxypyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acid (25c).**



According to general procedure **F**, but in the presence of 3 drops of concentrated HCl, **25c** (104 mg) was obtained as an oil, contaminated with a small amount of unidentified compounds (<5%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  1.94-2.20 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.20-3.25 (m, 1H,  $H_5$ ), 3.43-3.49 (m, 1H,  $H_5$ ), 3.56-3.65 (m, 1H,  $H_2$ ), 4.00 (dd, 1H,  $J=8.9$  Hz,  $J=4.0$  Hz,  $H_3$ ), 4.21-4.30 (m, 1H,  $H_4$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  27.3 (d,  $J=136.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 49.4 (C5), 56.0 (d,  $J=5.0$  Hz, C2), 68.5 (C4), 75.2 (C3).

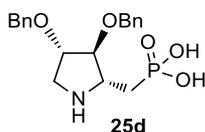
$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  19.3 y 21.6 ppm

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{P}]^-$ : 196.0380 ( $\text{M}^-$ -H); found: 196.0378

**General procedure G to obtain ((pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acids (25d-f).**

To a stirred solution of the corresponding pyrrolidinylphosphonate **26a-c** (1.40 mmol) in DCM/MeOH (2:3), PdCl<sub>2</sub> (0.7 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature 18h under argon atmosphere. When the reaction is finished it was filtered through celite and washed with MeOH. After that, the solution was stirred 2 h with scavengers (Quadra Pure® TU), in order to eliminate possible remains of palladium. The resulting mixture was filtrated and the solvent evaporated under reduced pressure to afford the corresponding phosphonic acids as crude product.

**((2*R*,3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzyloxy)pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acid (25d).**



Following general procedure **G**, the crude product was dissolved in chloroform and washed with water. The compound **25d** which crystallized in aqueous phase, was filtered and isolated (412 mg, 1.09 mmol) as a white solid. Yield: 78%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.06-2.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>P), 2.39-2.52 (m, 1H, CH<sub>2</sub>P), 3.41-3.62 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 3.87-4.04 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>), 4.30-4.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Bn), 4.40-4.46 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Bn), 4.48-4.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 7.17-7.25 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>).

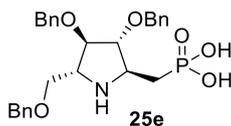
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 29.7 (CH<sub>2</sub>P), 48.4 (C<sub>5</sub>), 58.9 (C<sub>2</sub>), 71.4 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.0 (CH<sub>2</sub>Bn), 79.4 (C<sub>4</sub>), 85.5 (d, *J*=15.4 Hz, C<sub>3</sub>), 127.9 (C<sub>Ar</sub>), 128.0 (C<sub>Ar</sub>), 128.5 (C<sub>Ar</sub>), 136.9 (C<sub>Ar</sub>), 137.0 (C<sub>Ar</sub>).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20.6 y 21.4 ppm

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +8.2).

HRMS: Calculated for [C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>P]<sup>+</sup>: 378.1465 (M<sup>+</sup>+H);, found: 378.1450

**((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acid (25e).**



According to general procedure **G**, compound **25e** (449 mg) was obtained as an oil, contaminated with a small amount of unidentified compounds (<5%).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, MeOD) (selected signals)  $\delta$  1.94-2.17 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.61-3.69 (m, 2H,  $H_6$ ), 3.70-3.79 (m, 1H,  $H_2$ ), 3.87-4.03 (m, 3H,  $H_3$ ,  $H_4$ ,  $H_5$ ), 4.32-4.50 (m, 6H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 7.11-7.20 (m, 15H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

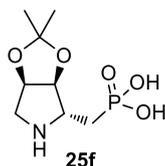
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD) (selected signals)  $\delta$  29.4 ( $\text{CH}_2\text{P}$ ), 58.0 ( $\text{C}_5$ ), 60.8 ( $\text{C}_2$ ), 67.3 ( $\text{C}_6$ ), 71.8 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 72.0 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 72.9 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 82.6 ( $\text{C}_4$ ), 85.5 ( $\text{C}_3$ ), 127.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.6 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.1 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 136.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.1 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz, MeOD) (selected signals)  $\delta$  18.3 y 17.4 ppm

MS: Calculated for  $[\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_6\text{P}]^-$ : 496.1894 ( $\text{M}^-$ -H); found: 496.2

MS: Calculated for  $[\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_6\text{P}]^+$ : 498.2040 ( $\text{M}^+$ +H); found: 498.3

**(((3*a*S,4*R*,6*a*R)-2,2-dimethyltetrahydro-3*a*H-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methyl)phosphonic acid (25f).**



According to general procedure **G**, compound **25f** (289 mg) was obtained as an oil, contaminated with a small amount of unidentified compounds (<5%).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, MeOD) (selected signals)  $\delta$  1.32 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.53 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.95-2.08 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.48 (d, 1H,  $J=13.2$  Hz,  $H_5$ ), 3.57 (dd, 1H,  $J=13.2$  Hz,  $J=4.6$  Hz,  $H_5$ ), 3.60-3.78 (m, 1H,  $H_2$ ), 3.98-4.12 (m, 1H,  $H_3$ ), 4.86 (d, 1H,  $J=5.7$  Hz,  $H_4$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD) (selected signals)  $\delta$  24.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 26.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.3 (d,  $J=128.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 50.4 ( $\text{C}_5$ ), 62.3 ( $\text{C}_2$ ), 70.1 ( $\text{C}_4$ ), 84.6 (d,  $J=11.2$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 113.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz, MeOD)  $\delta$  17.8 y 18.8 ppm

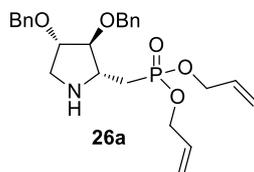
HRMS: Calculated for  $[\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{P}]^-$ : 236.0693 ( $\text{M}^-$ -H); found: 236.0691

#### **General procedure H to obtain ((pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonates (26a-d).**

To a well stirred solution of the corresponding *N*-hydroxypyrrolidine **24** (1.50 mmol) in 5 mL of a mixture of  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$  (1:1), Zn (3 mmol) was added. The mixture was vigorously stirred for 5 hours at room temperature. When reaction is finished, it was diluted with water, basified with solid  $\text{NaHCO}_3$  to pH= 9 and extracted with DCM

(3x50 mL). The combined organic layers were dried with anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure.

**Diallyl (((2*R*,3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzyloxy)pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonate (26a).**



Following general procedure **H**, **26a** was obtained as crude (668.1 mg, 1.46 mmol), pure enough to be used in the next step without further purification. Brown oil. Yield: 97%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.04 (ddd, 1H, *J*=17.7 Hz, *J*=15.2 Hz, *J*=8.3 Hz, CH<sub>2</sub>P), 2.20 (ddd, 1H, *J*=18.9 Hz, *J*=15.2 Hz, *J*=5.7 Hz, CH<sub>2</sub>P), 3.08 (dd, 1H, *J*=12.1 Hz, *J*=2.5 Hz, H<sub>5</sub>), 3.15 (dd, 1H, *J*=12.1 Hz, *J*=5.5 Hz, H<sub>5</sub>), 3.35-3.42 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 3.83 (dd, 1H, *J*=4.4 Hz, *J*=1.8 Hz, H<sub>3</sub>), 3.96-3.99 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 4.49-4.57 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>Allyl, CH<sub>2</sub>Bn), 5.18-5.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Allyl), 5.29-5.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Allyl), 5.86-5.96 (m, 2H, CH<sub>Allyl</sub>), 7.27-7.37 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>).

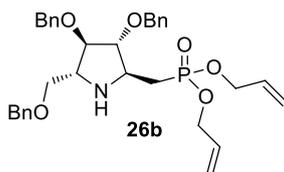
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 30.1 (d, *J*=139.8 Hz, CH<sub>2</sub>P), 50.6 (C<sub>5</sub>), 58.5 (d, *J*=4.0 Hz, C<sub>2</sub>), 66.0 (d, *J*=6.3 Hz, OCH<sub>2</sub>Allyl), 66.1 (d, *J*=6.2 Hz, OCH<sub>2</sub>Allyl), 71.2 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.7 (CH<sub>2</sub>Bn), 83.5 (C<sub>4</sub>), 88.5 (d, *J*=6.2 Hz, C<sub>3</sub>), 117.8 (CH<sub>2</sub>Allyl), 117.9 (CH<sub>2</sub>Allyl), 127.6 (C<sub>Ar</sub>), 127.6 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (C<sub>Ar</sub>), 132.6 (d, *J*= 6.2 Hz, CH<sub>Allyl</sub>), 132.9 (d, *J*=6.2 Hz, CH<sub>Allyl</sub>), 137.8 (C<sub>Ar</sub>), 137.9 (C<sub>Ar</sub>).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 30.2 ppm.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +11.3).

Anal Calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>P: C, 65.63; H, 7.50; N, 3.06; P, 6.77. Found C, 65.58; H, 7.54; N, 3.00; P, 6.80.

**Diallyl (((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonate (26b).**



Following general procedure **H**, but using HCl instead of AcOH, **26b** was obtained as crude (831.8 mg, 1.44 mmol), pure enough to be used in the next step without further purification. Yield: 96%

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.93-2.32 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.80 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 3.42-3.50 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ), 3.51-3.55 (m, 2H,  $\text{H}_6$ ), 3.57-3.64 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 3.86 (t, 1H,  $J=3.2$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 3.90 (dd, 1H,  $J=4.1$  Hz,  $J=3.2$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 4.49-4.57 (m, 10H,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 5.21 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.31 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.86-5.96 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 7.28-7.34 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ).

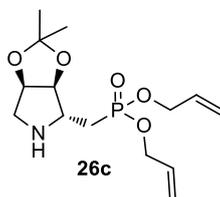
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30.0 (d,  $J=139.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 56.8 (d,  $J=3.9$  Hz,  $\text{C}_2$ ), 62.0 ( $\text{C}_5$ ), 66.0 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 66.1 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 70.7 ( $\text{C}_6$ ), 71.6 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.8 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.1 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 85.6 ( $\text{C}_4$ ), 88.4 (d,  $J=13.8$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 117.9 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 118.0 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.6 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.6 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.8 (d,  $J=4.4$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 132.9 (d,  $J=4.4$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 137.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30.4 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -28.3).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{NO}_5\text{P}$ : C, 68.62; H, 6.98; N, 2.42; P, 5.36. Found C, 68.60; H, 7.01; N, 2.38; P, 5.38.

**Diallyl (((3*aS*,4*R*,6*aR*)-2,2-dimethyltetrahydro-3*aH*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methyl)phosphonate (26c).**



Following general procedure **H**, **26c** was obtained as crude (461.7 mg, 1.46 mmol), pure enough to be used in the next step without further purification. Brown oil. Yield: 97%.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.28 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.46 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.80-2.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.94 (dd, 1H,  $J=13.3$  Hz,  $J=4.3$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 3.09 (d, 1H,  $J=13.3$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 3.56-3.64 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.47-4.64 (m, 5H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 4.71 (dd, 1H,  $J=5.7$  Hz,  $J=4.3$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 5.18-5.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.29-5.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.85-6.02 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ).

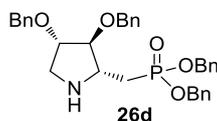
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 26.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.9 (d,  $J=141.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 51.3 ( $\text{C}_5$ ), 59.7 ( $\text{C}_2$ ), 66.2 (d,  $J=6.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 66.4 (d,  $J=6.2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 80.9 ( $\text{C}_4$ ), 85.5 (d,  $J=12$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 111.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 118.0 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 118.1 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 132.8 (d,  $J=5.3$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 132.9 (d,  $J=5.4$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  29.2 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -8.5).

Anal Calcd. for  $C_{14}H_{24}NO_5P$ : C, 52.99; H, 7.62; N, 4.41; P, 9.76. Found C, 52.97; H, 7.64; N, 4.45; P, 9.71.

**Dibenzyl (((2*R*,3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzyloxy)pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonate (**26d**).**



Following general procedure **H**, **26d** was obtained as crude (769.5 mg, 1.38 mmol), pure enough to be used in the next step without further purification. Brown oil. Yield 92%

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2.02-2.28 (m, 2H,  $CH_2P$ ), 3.01-3.18 (m, 3H,  $H_5$ ,  $NH$ ), 3.34-3.49 (m, 1H,  $H_2$ ), 3.82-3.88 (m, 1H,  $H_3$ ), 3.91-3.99 (m, 1H,  $H_4$ ), 4.37-4.56 (m, 4H,  $CH_{2Bn}$ ), 4.91-5.12 (m, 2H,  $CH_{2Bn}$ ), 7.26-7.47 (m, 20H,  $H_{Ar}$ ).

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  30.3 (d,  $J=139.5$  Hz,  $CH_2P$ ), 50.4 ( $C_5$ ), 58.3 (d,  $J=3.6$  Hz,  $C_2$ ), 67.0 (d,  $J=6.4$  Hz,  $POCH_{2Bn}$ ), 67.1 (d,  $J=6.2$  Hz,  $POCH_{2Bn}$ ), 71.0 ( $CH_{2Bn}$ ), 71.5 ( $CH_{2Bn}$ ), 83.3 ( $C_4$ ), 88.1 (d,  $J=12.8$  Hz,  $C_3$ ), 127.5 ( $C_{Ar}$ ), 127.5 ( $C_{Ar}$ ), 127.7 ( $C_{Ar}$ ), 127.8 ( $C_{Ar}$ ), 128.1 ( $C_{Ar}$ ), 128.2 ( $C_{Ar}$ ), 128.3 ( $C_{Ar}$ ), 128.4 ( $C_{Ar}$ ), 136.1 (d,  $J=6.1$  Hz,  $C_{Ar}$ ), 136.2 (d,  $J=6.2$  Hz,  $C_{Ar}$ ), 137.7 ( $C_{Ar}$ ), 137.8 ( $C_{Ar}$ ).

$^{31}P$  NMR (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  30.3 ppm

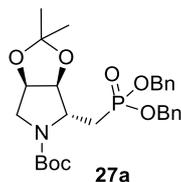
$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0,  $CHCl_3$ , +9.2).

Anal Calcd. for  $C_{33}H_{36}NO_5P$ : C, 71.08; H, 6.51; N, 2.51; P, 5.55. Found C, 71.00; H, 6.54; N, 2.48; P, 5.62.

**General procedure I to obtain N-Boc pyrrolidines (27a-b).**

To a well stirred solution of the corresponding crude pyrrolidine **26** (0.235 mmol) in anhydrous DCM (10 mL),  $Boc_2O$  (0.282 mmol), TEA (0.282 mmol) and DMAP (0.01 mmol) were added. The mixture was stirred 18 h at room temperature. After that time, the mixture was washed with  $KHSO_4$  (1N) and also with brine. The organic layer was dried with  $MgSO_4$ , filtered and the solvent was eliminated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (Hexane/AcOEt 60:40).

**(3a*S*,4*R*,6a*R*)-tert-butyl 4-((bis(benzyloxy)phosphoryl)methyl)-2,2-dimethyldihydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrole-5(4*H*)-carboxylate (27a).**



Following general procedure **I**, compound **27a** (98.5 mg, 0.190 mmol) was isolated as yellow oil. Yield for rotamers mixture (1:1): 81%.

$R_f = 0.29$ ; Hexane/AcOEt (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.40 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.96-2.04 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.13-2.22 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.35 (dd, 0.5H,  $J=12.9$  Hz,  $J=5.1$  Hz,  $H_5$ ), 3.41 (dd, 0.5H,  $J=12.9$  Hz,  $J=5.1$  Hz,  $H_5$ ), 3.67 (d, 0.5H,  $J=12.9$  Hz,  $H_5$ ), 3.80 (d, 0.5H,  $J=12.9$  Hz,  $H_5$ ), 4.17-4.39 (m, 1H,  $H_2$ ), 4.58-4.67 (m, 1H,  $H_3$ ), 4.75-4.83 (m, 1H,  $H_4$ ), 4.90-5.06 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 7.28-7.36 (m, 10H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

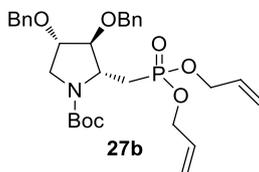
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.7 ( $\text{CH}_3$ ), 26.7 ( $\text{CH}_3$ ), 27.1 (d,  $J=128.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 28.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.4 (d,  $J=128.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 51.0 ( $\text{C}_5$ ), 51.7 ( $\text{C}_5$ ), 59.2 ( $\text{C}_2$ ), 67.3 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 67.3 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 78.2 ( $\text{C}_3$ ), 79.1 ( $\text{C}_3$ ), 79.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 79.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 83.5 ( $\text{C}_4$ ), 84.3 ( $\text{C}_4$ ), 111.5 ( $\text{C}$ ), 127.9 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.0 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 135.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 135.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 153.5 ( $\text{CO}$ ), 153.8 ( $\text{CO}$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.4 y 28.9 ppm.

$[\alpha]_D^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -11.8).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{NO}_7\text{P}$ : C, 62.66; H, 7.01; N, 2.71; P, 5.98. Found C, 62.68; H, 6.99; N, 2.73; P, 6.00.

**Tert-butyl (2*R*,3*S*,4*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-2-((bis(allyloxy)phosphoryl)methyl)pyrrolidine-1-carboxylate (27b).**



Following general procedure **I**, compound **27b** (120.5 mg, 0.216 mmol) was isolated as yellow oil. Yield for rotamers mixture (1:1): 92%.

$R_f = 0.50$ ; Hexane/AcOEt (5:5)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.45 (s, 4.5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.47 (s, 4.5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.25-2.42 (m, 1.5H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 2.66 (ddd, 0.5H,  $J=20.5$  Hz,  $J=15.1$  Hz,  $J=3.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.49-

3.69 (m, 2H, *H5*), 3.97-4.00 (m, 1H, *H3*, OCH<sub>2</sub>Allyl), 4.10-4.26 (m, 1.5H, *H3*, *H2*), 4.42-4.69 (m, 8.5H, *H4*, OCH<sub>2</sub>Allyl, CH<sub>2</sub>Bn), 5.17-5.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Allyl), 5.28-5.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Allyl), 5.83-5.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Allyl), 7.27-7.36 (m, 10H, *H*<sub>Ar</sub>).

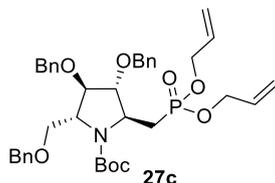
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27.4 (d, *J*=132.7 Hz, CH<sub>2</sub>P), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.5 (d, *J*=133.6 Hz, CH<sub>2</sub>P), 50.3 (C5), 50.9 (C5), 57.6 (d, *J*=1.6 Hz, C2), 57.9 (d, *J*=1.4 Hz, C2), 65.9 (d, *J*=5.3 Hz, OCH<sub>2</sub>Allyl), 66.0 (d, *J*=5.1 Hz, OCH<sub>2</sub>Allyl), 71.1 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.1 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.2 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.2 (CH<sub>2</sub>Bn), 79.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.2 (C3), 81.3 (C3), 81.6 (C4), 83.2 (C4), 117.8 (CH<sub>2</sub>Allyl), 117.9 (CH<sub>2</sub>Allyl), 117.9 (CH<sub>2</sub>Allyl), 118.0 (CH<sub>2</sub>Allyl), 127.4 (CH<sub>Ar</sub>), 127.6 (CH<sub>Ar</sub>), 127.6 (CH<sub>Ar</sub>), 127.7 (CH<sub>Ar</sub>), 127.7 (CH<sub>Ar</sub>), 128.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 132.7 (d, *J*= 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>Allyl), 132.8 (d, *J*=5.9 Hz, CH<sub>2</sub>Allyl), 132.9 (d, *J*=5.9 Hz, CH<sub>2</sub>Allyl), 132.9 (d, *J*=6.5 Hz, CH<sub>2</sub>Allyl), 137.4 (C<sub>Ar</sub>), 137.4 (C<sub>Ar</sub>), 137.9 (C<sub>Ar</sub>), 138.0 (C<sub>Ar</sub>), 154.0 (CO), 154.1 (CO).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 29.2 y 29.3 ppm.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, +12.2).

Anal Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>7</sub>P: C, 64.62; H, 7.23; N, 2.51; P, 5.55. Found C, 64.59; H, 7.25; N, 2.48; P, 5.58.

**Tert-butyl (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-5-((bis(allyloxy)phosphoryl)methyl)pyrrolidine-1-carboxylate (27c).**



To a well stirred solution of pyrrolidine **26b** (0.356 mmol) in toluene (0.1 mL), di-*tert*-butyl dicarbonate (0.772 mmol) was added. The mixture was stirred and warmed to reflux for 16 hours. When the reaction was finished, controlling by <sup>31</sup>P-NMR, MeOH (5 mL) was added and the resulting solution was stirred at reflux for 1 hour. The residue was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography (Hexane/AcOEt 50:50). Compound **27c** (217.2 mg, 0.320 mmol) was obtained as brown oil. Yield for rotamers mixture (1:1): 90%

R<sub>f</sub> = 0.57; Hexane/AcOEt (5:5)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.42 (s, 4,5H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.48 (s, 4,5H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.21-2.46 (m, 1,5H, CH<sub>2</sub>P), 2.81 (ddd, 0.5H, *J*=21.2 Hz, *J*=15.1 Hz, *J*=2.8 Hz, CH<sub>2</sub>P), 3.48-3.55 (m, 1H, *H6*), 3.77 (dd, 0.5H, *J*=8.8 Hz, *J*=4.2 Hz, *H6*), 3.99-4.05 (m, 1H, *H5*, *H6*),

4.13-4.26 (m, 2.5H, *H2*, *H5*, *H3*), 4.38-4.67 (m, 11H, *H4*,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$   $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 5.17-5.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.28-5.38 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.82-5.97 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 7.21-7.35 (m, 15H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

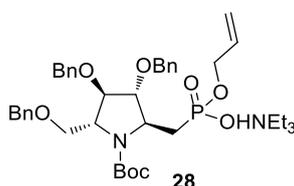
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.5 (d,  $J=133.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 28.2 (d,  $J=133.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 58.9 (*C2*), 59.0 (*C2*), 62.4 (*C5*), 62.7 (*C5*), 65.9-66.1 (m,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 67.9 (*C6*), 68.7 (*C6*), 71.0 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.1 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.2 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.3 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.9 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.9 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 80.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 80.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.0 (*C3*), 82.6 (*C3*), 83.2 (*C4*), 84.0 (*C4*), 117.9 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 118.0 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 118.0 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 118.0 ( $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 127.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.6 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.2 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.3 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 132.7-133.0 (m,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 137.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 137.9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 138.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 153.4 (CO), 153.5 (CO).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  29.0 y 29.3 ppm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : (1.0,  $\text{CHCl}_3$ , -25.2).

Anal Calcd. for  $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{NO}_8\text{P}$ : C, 67.34; H, 7.14; N, 2.07; P, 4.57. Found C, 67.31; H, 7.10; N, 2.08; P, 4.59.

**Triethylammonium allyl (((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benziloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonate (28).**



Purification of compound **27c** by column chromatography using 2% of TEA with the eluent afford compound **28** (144.7 mg, 0.196 mmol) as a rotamers mixture (1:1) with a yield of 55%.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.29 (t, 9H,  $J=7.3$  Hz,  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 1.38 (s, 4,5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.48 (s, 4,5H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.07-2.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.02 (q, 6H,  $J=7.3$  Hz,  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 3.51 (dd, 1H,  $J=10.6$  Hz,  $J=8.8$  Hz, *H6*), 3.69-3.77 (m, 1H, *H5*), 3.98-4.03 (m, 1H, *H6*), 4.06-4.27 (m, 2H, *H2*), 4.32-4.67 (m, 10H, *H4*, *H3*,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$   $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 5.01-5.10 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.19-5.31 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{Allyl}$ ), 5.82-5.97 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{Allyl}}$ ), 7.21-7.30 (m, 15H,  $H_{\text{Ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.4 ( $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2\text{P}$ ), 30.0 ( $\text{CH}_2\text{P}$ ), 45.4 ( $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 60.0 (d,  $J=2.0$  Hz, *C2*), 60.1 (d,  $J=2.0$  Hz, *C2*), 62.3 (*C5*), 62.5 (*C5*), 64.6 (d,  $J=5.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Allyl}$ ), 64.8 (d,  $J=5.3$  Hz,

OCH<sub>2</sub>Allyl), 68.1 (C6), 68.9 (C6), 70.7 (CH<sub>2</sub>Bn), 70.9 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.0 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.8 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.8 (CH<sub>2</sub>Bn), 79.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 82.6 (C3), 83.0 (C3), 83.6 (C4), 84.2 (C4), 1175.7 (CH<sub>2</sub>Allyl), 115.9 (CH<sub>2</sub>Allyl), 127.1 (CH<sub>Ar</sub>), 127.1 (CH<sub>Ar</sub>), 127.2 (CH<sub>Ar</sub>), 127.3 (CH<sub>Ar</sub>), 127.3 (CH<sub>Ar</sub>), 127.4 (CH<sub>Ar</sub>), 127.7 (CH<sub>Ar</sub>), 127.7 (CH<sub>Ar</sub>), 128.0 (CH<sub>Ar</sub>), 128.1 (CH<sub>Ar</sub>), 128.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.2 (CH<sub>Ar</sub>), 134.7-134.8 (m, CH<sub>Allyl</sub>), 137.9 (C<sub>Ar</sub>), 138.0 (C<sub>Ar</sub>), 138.3 (C<sub>Ar</sub>), 138.5 (C<sub>Ar</sub>), 138.5 (C<sub>Ar</sub>), 138.6 (C<sub>Ar</sub>), 153.3 (CO), 153.9 (CO).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 21.2 y 20.8 ppm.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: (1.0, CHCl<sub>3</sub>, -15.3).

Anal Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P: C, 66.65; H, 8.05; N, 3.79; P, 4.19. Found C, 66.68; H, 8.00; N, 3.78; P, 4.20.

## 5.7. Bibliografía

- (1) Ghirardello, M.; Perrone, D.; Chinaglia, N.; Sádaba, D.; Delso, I.; Tejero, T.; Marchesi, E.; Fogagnolo, M.; Rafie, K.; van Aalten, D. M. F.; Merino, P. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 7264-7272.
- (2) Mendoza, D. S., **2016**, *Aproximaciones sintéticas para la preparación de inhibidores de glicosiltransferasas*, University of Zaragoza, Zaragoza.
- (3) Merino, P.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5627-5630.
- (4) Merino, P.; Castillo, E.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2371-2374.
- (5) Merino, P.; Lanaspá, A.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 629-646.
- (6) Merino, P.; Anoro, S.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, T.; Tunon, V. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1590-1596.
- (7) Merino, P.; Mannucci, V.; Tejero, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3943-3959.
- (8) Merino, P.; Lanaspá, A.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2381-2401.
- (9) Chiacchio, U.; Borrello, L.; Crispino, L.; Rescifina, A.; Merino, P.; Macchi, B.; Balestrieri, E.; Mastino, A.; Piperno, A.; Romeo, G. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4054-4057.
- (10) Merino, P.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5575-5589.
- (11) Merino, P.; Franco, S.; Garces, N.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *Chem. Commun.* **1998**, 493-494.
- (12) Dondoni, A.; Franco, S.; Merchan, F.; Merino, P.; Tejero, T. *Synlett* **1993**, 78-80.
- (13) Merino, P.; Delso, I.; Tejero, T.; Cardona, F.; Marradi, M.; Faggi, E.; Parmeggiani, C.; Goti, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2929-2947.
- (14) Delso, I.; Tejero, T.; Goti, A.; Merino, P. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4139-4143.
- (15) Dondoni, A.; Junquera, F.; Merchan, F. L.; Merino, P.; Tejero, T. *Chem. Commun.* **1995**, 2127-2128.
- (16) Merino, P.; Franco, S.; Lafuente, D.; Merchan, F.; Revuelta, J.; Tejero, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2877-2881.
- (17) Cardona, F.; Moreno, G.; Guarna, F.; Vogel, P.; Schuetz, C.; Merino, P.; Goti, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6552-6555.
- (18) Merino, P.; Delso, I.; Tejero, T.; Cardona, F.; Goti, A. *Synlett* **2007**, 2651-2654.
- (19) Matute, R.; García-Viñuales, S.; Hayes, H.; Ghirardello, M.; Daru, A.; Tejero, T.; Delso, I.; Merino, P. *Curr. Org. Synth.* **2016**, *13*, 669-686.
- (20) Merino, P.; Tejero, T. *Synlett* **2011**, 1965-1977.
- (21) Merino, P.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, T. *Synlett* **2000**, 442-454.
- (22) Merino, P. *C. R. Chim.* **2005**, *8*, 775-788.
- (23) Merino, P.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Romero, P.; Tejero, T.; Uriel, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3731-3743.
- (24) Merino, P. In *Targets in Heterocyclic Systems*; Attanasi, O., Spinelli, D., Eds.; RSC Publishing: London, **2003**; *7*, 140-156.
- (25) Merino, P.; Padar, P.; Delso, I.; Thirumalaikumar, M.; Tejero, T.; Kovacs, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5013-5016.
- (26) Berini, C.; Minassian, F.; Pelloux-Leon, N.; Denis, J.-N.; Vallee, Y.; Philouze, C. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2574-2586.

- (27) Mita, N.; Tamura, O.; Ishibashi, H.; Sakamoto, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1111-1114.
- (28) Ballini, R.; Marcantoni, E.; Petrini, M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1316-1318.
- (29) Delso, I.; Tejero, T.; Goti, A.; Merino, P. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 1220-1227.
- (30) Marradi, M.; Cicchi, S.; Ignacio Delso, J.; Rosi, L.; Tejero, T.; Merino, P.; Goti, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1287-1290.
- (31) Goti, A.; Cicchi, S.; Mannucci, V.; Cardona, F.; Guarna, F.; Merino, P.; Tejero, T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4235-4238.
- (32) Hocková, D.; Holý, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4445-4453.
- (33) Hubert, J. G.; Furkert, D. P.; Brimble, M. A. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2231-2239.
- (34) Łyżwa, P.; Błaszczak, J.; Sieroń, L.; Mikołajczyk, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2106-2115.
- (35) Turcheniuk, K. V.; Poliashko, K. O.; Kukhar, V. P.; Rozhenko, A. B.; Soloshonok, V. A.; Sorochinsky, A. E. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11519-11521.
- (36) Sittiwong, W.; Cordonier, E. L.; Zempleni, J.; Dussault, P. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5568-5571.
- (37) Chevrier, C.; Le Nouën, D.; Defoin, A.; Tarnus, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2384-2392.
- (38) Cicchi, S.; Marradi, M.; Vogel, P.; Goti, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1614-1619.
- (39) Cicchi, S.; Marradi, M.; Goti, A.; Brandi, A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6503-6505.
- (40) Wu, S.-F.; Zheng, X.; Ruan, Y.-P.; Huang, P.-Q. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2967-2975.
- (41) Holzapfel, C. W.; Crous, R.; Greyling, H. F.; Verdoorn, G. H. *Heterocycles* **1999**, *51*, 2801-2806.
- (42) Cardona, F.; Faggi, E.; Liguori, F.; Cacciarini, M.; Goti, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2315-2318.
- (43) Meyer, O.; Grosdemange-Billiard, C.; Tritsch, D.; Rohmer, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4367-4372.
- (44) Kassa, T. W.; Zhang, N.; Palmer, A. F.; Matthews, J. S. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2013**, *41*, 109-115.
- (45) Li, X.; Yuan, L.; Wang, Q.; Liang, L.; Huang, G.; Liu, S.; Liu, J. *Synlett* **2017**, *28*, 986-988.
- (46) Acharya, J.; Shakya, P. D.; Pardasani, D.; Palit, M.; Dubey, D. K.; Gupta, A. K. *J. Chem. Res.* **2005**, *2005*, 194-196.
- (47) Carbain, B.; Martin, S. R.; Collins, P. J.; Hitchcock, P. B.; Streicher, H. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2570-2575.
- (48) Gauvry, N.; Mortier, J. *Synthesis* **2001**, *2001*, 0553-0554.
- (49) Norlin, R.; Lindberg, G. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, *46*, 599-604.
- (50) Nie, P.; Groaz, E.; De Jonghe, S.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1203-1206.
- (51) van der Werf, A.; Hribersek, M.; Selander, N. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2374-2377.
- (52) Li, X.; Qin, Z.; Wang, R.; Chen, H.; Zhang, P. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1792-1798.
- (53) Berkowitz, D. B.; Sloss, D. G. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7047-7050.
- (54) Li, T.; Tikad, A.; Pan, W.; Vincent, S. P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5628-5631.
- (55) Kuznetsov, N. Y.; Kolomnikova, G. D.; Khrustalev, V. N.; Golovanov, D. G.; Bubnov, Y. N. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5647-5655.

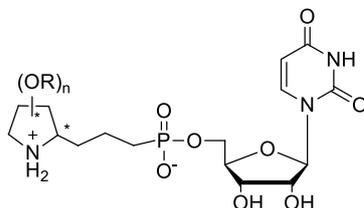
## **CAPÍTULO 6**

# **SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE GLICOSILTRANSFERASAS Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENZIMA-LIGANDO**



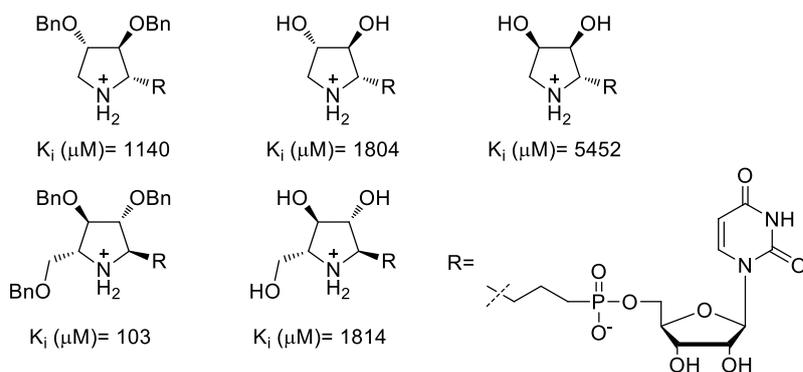
## 6.1. Antecedentes de inhibidores de GTs basados en pirrolidinilfosfonatos

En nuestro grupo de investigación se han preparado inhibidores de GTs, cuya estructura general aparece representada en el Figura 6.1.<sup>1</sup>



**Figura 6.1.** Estructura general de inhibidores obtenidos con anterioridad

Los resultados de los estudios espectroscópicos, computacionales y bioquímicos llevados a cabo sobre *hOGT* con estos compuestos, han aportado datos interesantes para el diseño racional de nuevos inhibidores que son el objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. En términos generales, la mayor afinidad por el enzima se obtiene cuando los grupos hidroxilo de la pirrolidina portan grupos bencilos, ya que se establecen interacciones hidrofóbicas adicionales en el sitio activo. De acuerdo con esto, cuanto mayor es el número de sustituyentes hidrofóbicos, mayor afinidad se obtiene. Para ilustrar este hecho se presentan las  $K_i$  medidas para los compuestos preparados (Figura 6.2) que muestran una buena actividad para el derivado tribencilado.

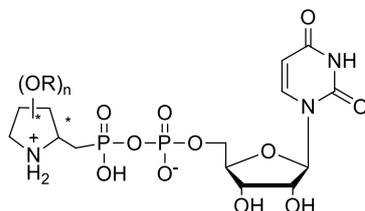


**Figura 6.2.** Estudios de inhibición con *hOGT* de los inhibidores sintetizados con anterioridad

A falta de datos biológicos y espectroscópicos con este tipo de compuestos y GalNAc-T2 únicamente se dispone de los datos obtenidos mediante métodos computacionales de *docking*. Estos datos no indican una tendencia clara en cuanto a la presencia de hidroxilos libre o protegidos, pero sí parecen indicar que a menor número de sustituyentes mayor energía de unión enzima-sustrato.

## 6.2. Hipótesis de trabajo

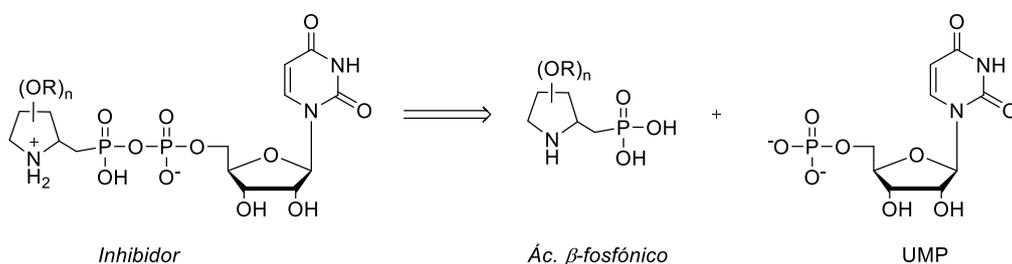
Con el fin de mejorar la afinidad por el enzima, nos planteamos incluir como *linker* una estructura más similar al sustrato natural, un fosfonato (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Estructura general de los posibles inhibidores objetivo

En el trabajo descrito hasta ahora, se han desarrollado dos nuevas metodologías para la obtención de pirrolidinas quirales altamente sustituidas. En la primera de ellas (capítulo 3), reacción de cicloadición de iluros de nitrona con aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, las pirrolidinas se obtienen con buenos rendimientos y enantioselectividades, sin embargo, la diastereoselectividad del proceso no es elevada y no es una reacción fácilmente escalable. Además, estudios preliminares de *docking* indicaron que las interacciones con los enzimas, eran en este caso menores que con otro tipo de pirrolidinas. Por todo ello, se descartó esta metodología para su uso en la preparación de inhibidores de GTs.

En consecuencia, para la síntesis de inhibidores de OGT y GalNAc-T2 se han utilizado como glicomiméticos, únicamente los ácidos  $\beta$ -aminofosfónicos preparados en el capítulo 5 (Esquema 6.1).



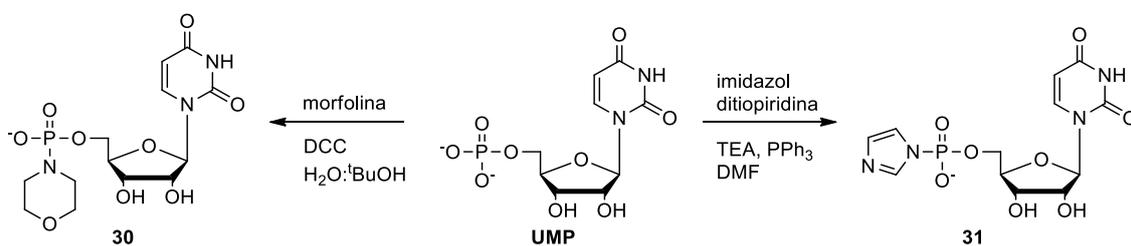
**Esquema 6.1.** Análisis retrosintético de los posibles inhibidores objetivo

### 6.3. Discusión de resultados

Para llevar a cabo el acoplamiento de los ácidos pirrolidinilfosfónicos preparados con el nucleótido UMP, son necesarias dos etapas: i) la activación del nucleótido y ii) la reacción de la especie activada con el ácido fosfónico.

#### 6.3.1. Activación de UMP

Los dos métodos principales de activación de nucleótidos son la formación del correspondiente morfolidato<sup>2,3</sup> o imidazolato.<sup>4-6</sup> Para comprobar cuál de las dos estrategias resultaba más apropiada se ensayaron ambas a partir de UMP (Esquema 6.2).



Esquema 6.2. Activación del nucleótido UMP

La metodología de activación como morfolidato (**30**) necesita tiempos de reacción muy elevados (10 días) y un gran exceso de morfolina y DCC (2 eq. adicionados cada día). Además, la purificación del compuesto resultante requiere del uso de resinas de exclusión molecular, como por ejemplo, DEAE-Sephadex.<sup>3</sup>

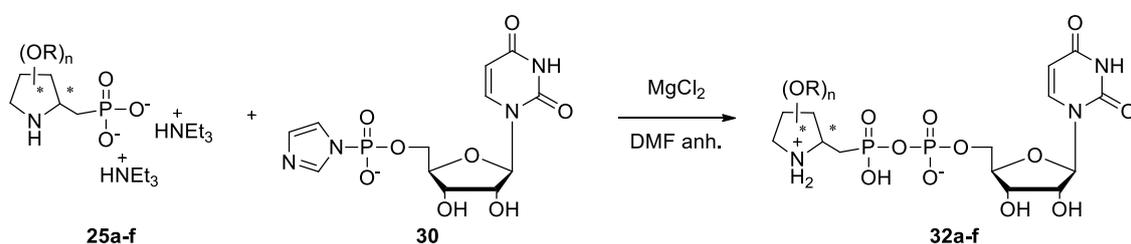
Por otro lado, en la activación en forma de imidazolato (**31**), el tiempo de reacción es considerablemente menor (15 horas) y la purificación por precipitación mediante adición de acetona anhidra, resulta mucho más sencilla, proporcionando un excelente rendimiento (92%). Por ello, se decidió continuar con este procedimiento.

El procedimiento experimental consiste en la formación inicial de la sal de ditrietilamonio de UMP mediante una columna de intercambio catiónico, a partir de la sal disódica comercial. Una vez obtenida la sal se le hace reaccionar con ditiopiridina, trifenilfosfina e imidazol en medio básico, para obtener finalmente el correspondiente imidazolato (**31**).

### 6.3.2. Síntesis de inhibidores; Acoplamiento fosfato-fosfonato

En la bibliografía se encuentran diversos artículos en los que se llevan a cabo reacciones de acoplamiento fosfato-fosfato, haciendo uso de sales tales como  $ZnCl_2$ ,  $MgCl_2$  o  $CaCl_2$ .<sup>5,7,8</sup> En nuestro caso, después de algunos ensayos, se decidió utilizar el cloruro de magnesio.

En primer lugar se llevó a cabo la formación de la sal de ditrietilamonio, del ácido pirrolidinilfosfónico (**25a-f**), por tratamiento con TEA. A continuación, bajo atmósfera inerte y utilizando DMF anhidra como disolvente, se añadió el imidazolato de UMP (**31**) y la sal de magnesio (Esquema 6.3).



Esquema 6.3. Reacción de acoplamiento fosfato-fosfonato

Utilizando esta metodología se han obtenido los compuestos (**32a-f**) (Figura 6.4).

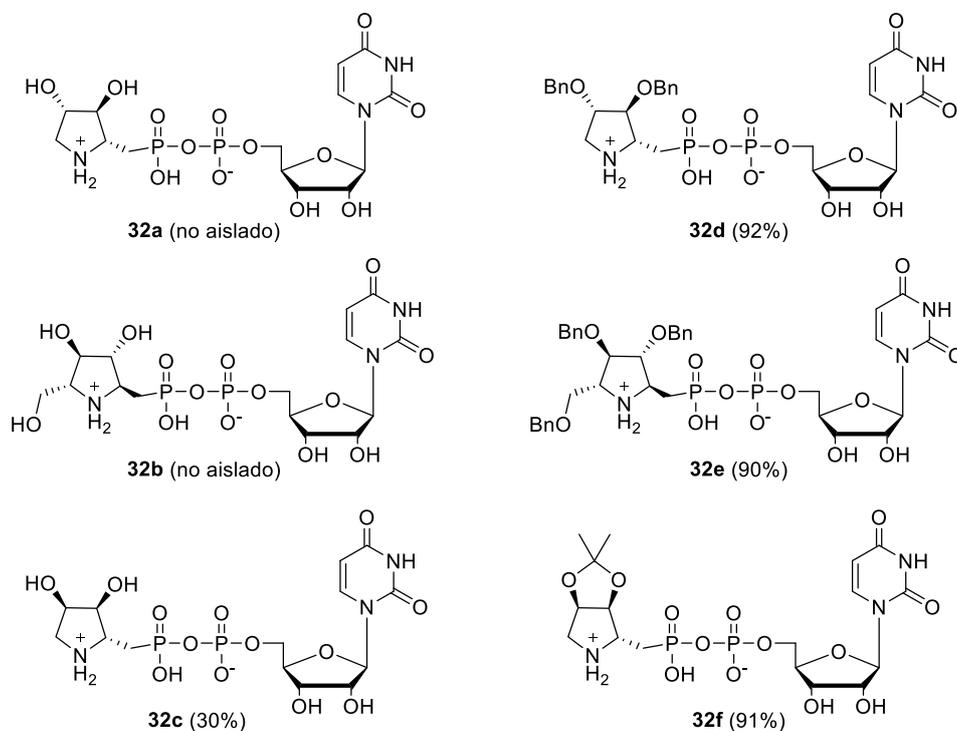
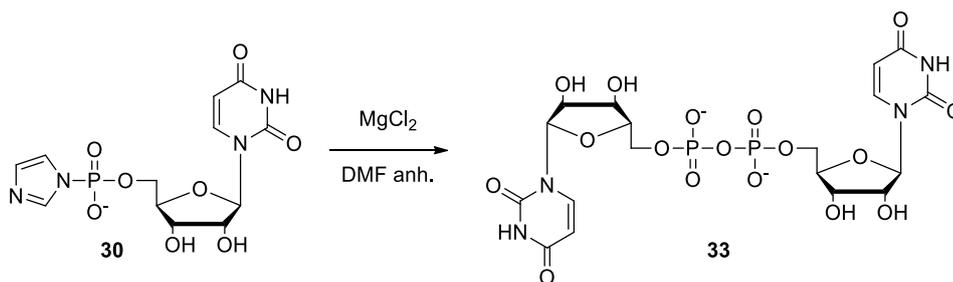


Figura 6.4. Posibles inhibidores de GTs obtenidos

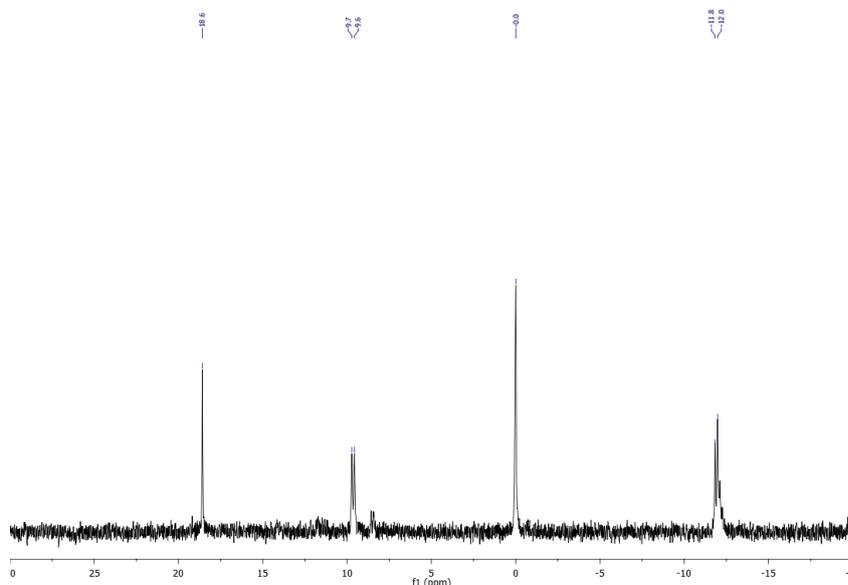
En general, los tiempos de reacción fueron largos. En los productos con grupos benciloxi (**32d** y **32e**) o en forma de acetal (**32f**), se observó una conversión completa tras 7 días de reacción. Por otro lado, cuando los hidroxilo estaban libres, tras 19 días se alcanzó únicamente una conversión de 40% para **32a**, de 45% para **32b** y de 34% para **32c**.

La baja conversión puede deberse a la reacción paralela de dimerización del imidazolato de UMP, que a pesar de estar en exceso se consume antes que el ácido aminofosfónico. Así, en los espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN de los crudos de reacción, se observó una señal singlete a -11.4 ppm, que correspondía al producto de dimerización **33**. De forma similar, en el análisis por Espectrometría de Masas se encontró un anión cuya  $m/z = 629.0567$  que se asoció con el dímero ( $m/z$  calculada 629.0539). Finalmente, cuando se reprodujeron las condiciones de acoplamiento, en ausencia del correspondiente ácido aminofosfónico, se obtuvo producto de dimerización **33** (Esquema 6.4).<sup>9</sup>



**Esquema 6.4.** Reacción paralela de dimerización de UMP-imidazolato

Los productos con los grupos hidroxilo libres (**32a-c**) resultaron problemáticos en su aislamiento. Para poder separarlos del dímero de UMP por HPLC, fue necesario utilizar como eluyente agua tamponada a  $\text{pH}=4$  con  $\text{HCOONH}_4$ . En estas condiciones, era obligatorio neutralizar la disolución resultante con  $\text{NH}_3$  al 25% lo antes posible, para evitar la hidrólisis del producto. A pesar de ello, los compuestos **32a** y **32b** se obtuvieron tras el proceso de purificación con cantidades importantes de los productos de hidrólisis, por lo que no pudieron ser completamente caracterizados. En la Figura 6.5 se muestra el espectro de  $^{31}\text{P}$  RMN de la mezcla obtenida tras la purificación del producto **32a**, donde además de sus señales características (9.7 y -11.9 ppm) aparecen la señal del ácido fosfónico (18.6 ppm) y la de UMP (0.0 ppm). Por el contrario, el compuesto **32c**, si se pudo aislar y caracterizar con un rendimiento aceptable (30%) considerando la baja conversión de la reacción.



**Figura 6.5.** Espectro de  $^{31}\text{P}$  RMN tras el aislamiento del producto **32a**

Los productos que presentaban los grupos hidroxilo protegidos no dieron ningún tipo de problema en la purificación, ya que no requirieron el uso de tampón en el eluyente, separándose correctamente del dímero de UMP. Los compuestos (**32d-f**) se aislaron con muy buenos rendimientos, 92%, 90% y 91% respectivamente.

Como se ha adelantado en el capítulo 5, estos últimos resultados, permitieron concluir que no era necesaria la protección del grupo NH de la pirrolidina para llevar a cabo la reacción de acoplamiento. Esto simplificó enormemente la ruta sintética, ya que no fue necesaria la secuencia de reacciones de protección/desprotección, que conllevaría el uso de medios ácidos o básicos con el riesgo de reacciones indeseadas, como la hidrólisis del pirofosfato formado.

#### 6.4. Estudios de interacción enzima-ligando

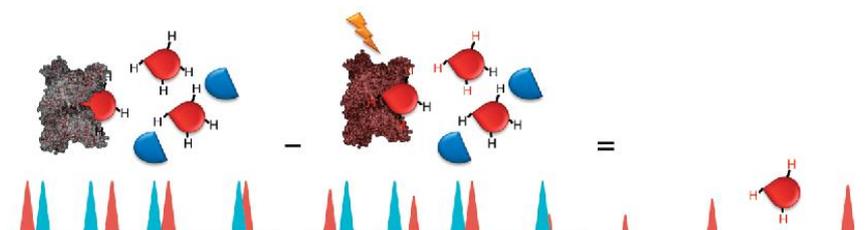
Como se ha comentado, el objetivo de esta Tesis Doctoral, era la preparación de pirrolidinil derivados para estudiarlos como posibles inhibidores de glicosiltransferasas. Dentro de esta amplia familia de enzimas, se ha considerado trabajar con dos enzimas significativos, *O-linked-N-acetilglucosamina transferasa humana (hOGT)* y *N-acetilgalactosamina transferasa II (hGalNAc-T2)*. Para valorar las interacciones enzima-ligando se ha hecho uso de dos herramientas; estudios computacionales de *docking* y estudios de Resonancia Magnética Nuclear mediante STD.

El *docking*, es una herramienta computacional que permite predecir la conformación preferida de una molécula, al estar unida con otra, con el fin de formar un complejo estable.<sup>10</sup> Se utiliza para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña (ligando) dentro de, por ejemplo, una proteína que será donde ejerza su acción, con lo que permite predecir la afinidad y la actividad de dicho ligando. Debido a ello, este método juega un papel muy importante en el diseño racional de fármacos.<sup>11</sup>

Los experimentos de STD-NMR, (“Saturation Transfer Difference” o Diferencia de Transferencia de Saturación), permiten conseguir información acerca de la fuerza y zonas de interacción entre el enzima y el ligando. De hecho, esta es una de las técnicas de RMN más potentes para la detección y caracterización de interacciones ligando-enzima en disolución.

Los experimentos de STD se llevan a cabo con una muestra formada por el receptor, en este caso el enzima, en muy baja concentración, del orden de  $10^{-5}$  hasta  $10^{-8}$  M, y uno o varios ligandos en gran exceso (1:10 hasta 1:1000). Con esta muestra se realizan dos experimentos que se van acumulando, el primero de ellos es un experimento monodimensional de protón ( $^1\text{H}$  RMN) en el equilibrio, llamado experimento de referencia o espectro *off-resonance* ( $\text{STD}_{\text{off}}$ ). El segundo consiste también en un  $^1\text{H}$  RMN en el cual todos los protones del receptor, en este caso un enzima, se encuentran irradiados selectivamente durante un tiempo determinado, conocido como tiempo de saturación (TS). Durante este tiempo la saturación de los protones del enzima se transfiere mediante difusión de spin a los protones del ligando que interaccionan con el enzima. La adquisición del experimento de protón cuando se encuentra irradiada la proteína se conoce como *on-resonance* ( $\text{STD}_{\text{on}}$ ).

En el espectro de la diferencia ( $STD_{diff} = STD_{off} - STD_{on}$ ), sólo se conservan las señales de los ligandos que han recibido transferencia de saturación por parte del enzima. La diferencia de intensidad de las señales en el espectro de diferencia es debida a la proximidad de los protones con el receptor, a mayor proximidad, mayor intensidad de señal y viceversa (Figura 6.6).

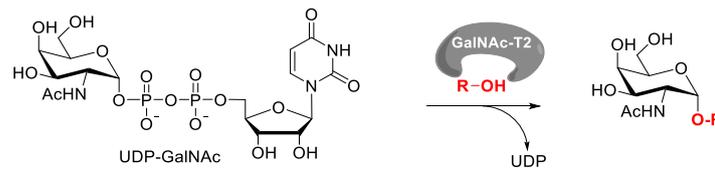


**Figura 6.6.** Ilustración del experimento de STD-NMR

#### 6.4.1 Estudios de interacción con *N*-Acetilgalactosamina transferasa II (GalNAc-T2)

GalNAc-T2 es un enzima que pertenece a la familia de las *N*-acetilgalactosamina transferasas (GalNAc-Ts). Esta familia de enzimas fue descubierta en 1967,<sup>12</sup> parcialmente caracterizada en 1977<sup>13</sup> y a principios de la década de los 90 se aisló por primera vez GalNAc-T2.<sup>14,15</sup>

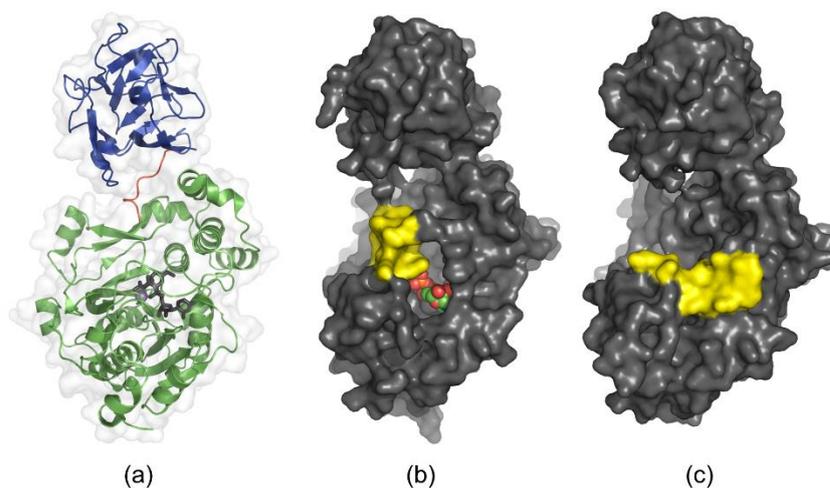
GalNAc-T2 es una proteína transmembrana localizada en el aparato de Golgi, encargada de transferir una unidad de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) desde UDP-GalNAc a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) de la proteína aceptora, y presenta cierta preferencia por glicosilar residuos de Thr, manteniendo la configuración del carbono anomérico (Figura 6.7).



**Figura 6.7.** Representación del proceso de *O*-glicosilación por parte de GalNAc-T2

La glicosilación con *N*-acetilgalactosamina que llevan a cabo la familia de GalNAc-Ts, es un proceso muy común en proteínas humanas. Alteraciones de este proceso son fenómenos comunes en determinados tipos de cáncer.<sup>16</sup> En muchos procesos tumorales se presenta una producción aumentada de mucinas, incluyendo cánceres de páncreas, pulmón, mama, ovario, etc. Dos mucinas de membrana (MUC1 y MUC4) han sido ampliamente estudiadas en relación a su implicación patológica en el proceso de estas enfermedades.<sup>17-19</sup> Las mucinas, por definición son proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas en las células de los tejidos epiteliales de la mayoría de los metazoos. La principal característica de las mucinas es su capacidad de formación de geles y por ello cumplen funciones desde lubricación a señalización celular. Las mucinas se encuentran bajo investigación como posibles marcadores diagnósticos para la aparición de procesos malignos.<sup>20</sup>

GalNAc-T2, al igual que el resto de enzimas de la familia de GalNAc-Ts presenta una estructura formada por un dominio de lectina en la region *C*-terminal (azul) unido mediante un *linker* flexible o loop (rojo) al dominio catalítico en la región *N*-terminal (verde) (Figura 6.8, **a**). En el caso de GalNAc-T2, el *linker* flexible juega un papel esencial,<sup>21,22</sup> ya que este enzima presenta dos conformaciones distintas; una conformación abierta o inactiva, en la que el sitio catalítico está expuesto al disolvente (Figura 6.8, **b**) y una conformación cerrada o activa, en la cual el sitio activo está protegido (Figura 6.8, **c**).<sup>23</sup> Este enzima requiere de la presencia de Mg (II) o Mn (II) para poder llevar a cabo la glicosilación.

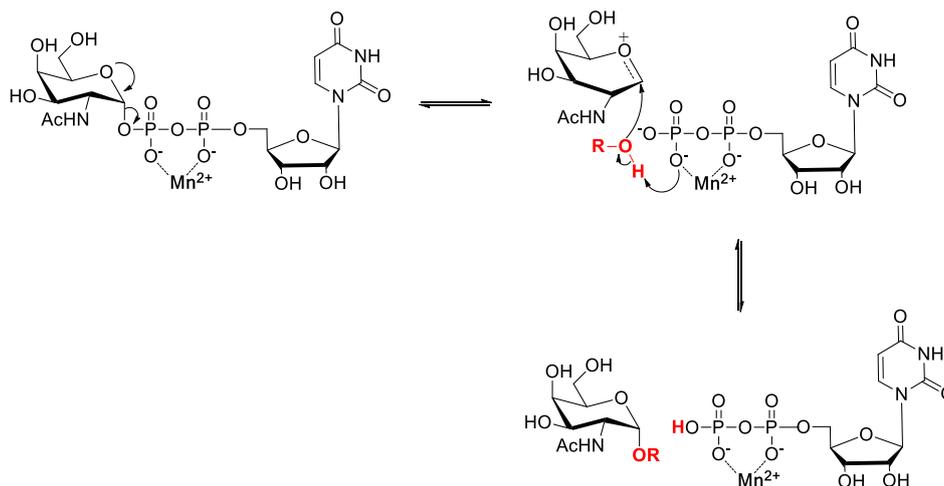


**Figura 6.8.** (a) Estructura cristalina del complejo GalNAc-T2, UDP-GalNAc y Mn (II) (PDB ID: 4D0T). (b) Representación de superficie de la forma abierta o inactiva de GalNAc-T2 formando complejo con UDP y Mn (II) (PDB ID: 2FFV), *linker* (amarillo). (c) Representación de superficie de la forma cerrada o activa de GalNAc-T2 formando complejo con UDP-GalNAc y Mn (II) (PDB ID: 4D0T), *linker* (amarillo)

El dominio de lectina, no interviene en la actividad catalítica pero si presenta una elevada afinidad por glicopéptidos con GalNAc y por tanto modula la especificidad por el sustrato aceptor.<sup>24</sup>

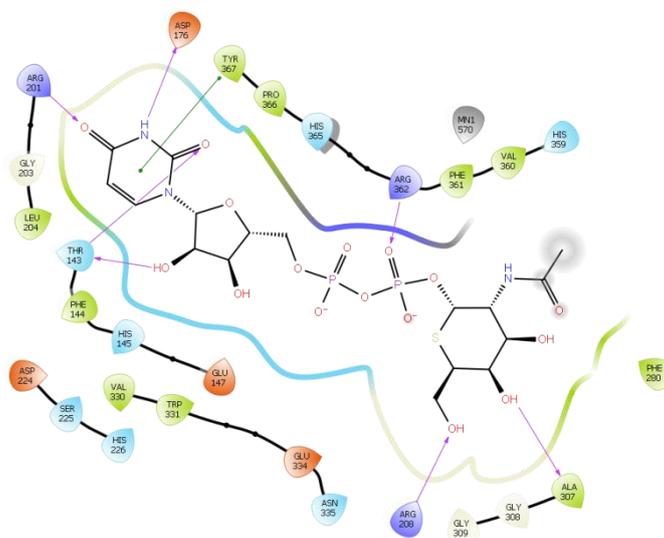
Estudios de la estructura cristalográfica del sitio catalítico de GalNAc-T2 indican que se establece un equilibrio dinámico entre la forma abierta y cerrada. Cuando se une el sustrato dador, es decir UDP-GalNAc, en la conformación abierta, se produce un cambio en la conformación del loop, seguida de la unión del sustrato aceptor.<sup>22</sup> Las interacciones de tipo *stacking* entre la unidad de GalNAc y los residuos de His365 y Phe369, mantienen dicha conformación.<sup>22</sup>

Estudios computacionales han revelado que el mecanismo de retención de la configuración del carbono anomérico transcurre a través de una reacción de sustitución nucleófila intramolecular ( $S_Ni$ ). Como primer paso se produce la ruptura del enlace glicosídico de UDP-GalNAc y la correspondiente formación del par iónico, oxocarbenio-UDP. A continuación, la unidad de UDP, que actúa como base, activa el ataque del hidroxilo aceptor (ROH) para generar UDP y la proteína glicosilada (Figura 6.9).<sup>25</sup>



**Figura 6.9.** Mecanismo de GalNAc-T2 de tipo  $S_Ni$  con retención de la configuración

Se ha logrado cristalizar un complejo ternario formado por el enzima, un péptido aceptor, Mn(II) y UDP-5S-GalNAc (PDB: 4D0Z). Este complejo de tipo Michaelis-Menten se utiliza para el estudio de interacciones con GalNAc-T2. El sitio activo del enzima presenta las siguientes interacciones con UDP-5S-GalNAc (Figura 6.10):



**Figura 6.10.** Interacciones de UDP-5S-GalNAc en el sitio activo de GalNAc-T2 en la conformación cerrada (4D0Z)

- Enlaces de hidrógeno de uridina con Thr143, Arg201 y Asp176.
- $\pi$ -stacking con Tyr367.
- Enlace de hidrógeno entre ribosa y Thr143.
- Coordinación del pirofosfato con el Mn (II) (no aparece representado en la figura) y con los residuos del centro activo Asp224, His226 e His359.
- Enlace de hidrógeno del  $\alpha$ -fosfato con Arg362.
- Enlaces de hidrógeno del azúcar con Ala307 y Arg208, orientando el grupo acetilo hacia el exterior del sitio catalítico.

#### 6.4.1.1. Estudios de docking

En el grupo de investigación se ha estudiado mediante *docking* la interacción con GalNAc-T2 de los compuestos sintetizados **32**. Para ello, se han utilizado los datos del enzima obtenidos por difracción de rayos X del complejo formado con UDP-5S-GalNAc (PDB: 4D0Z),<sup>22</sup> un análogo del sustrato natural UDP-GalNAc en el que el átomo de oxígeno de la posición 5 de la galactosa, ha sido sustituido por azufre. En la Tabla 6.1 se recogen los valores de las energías de interacción encontrados.

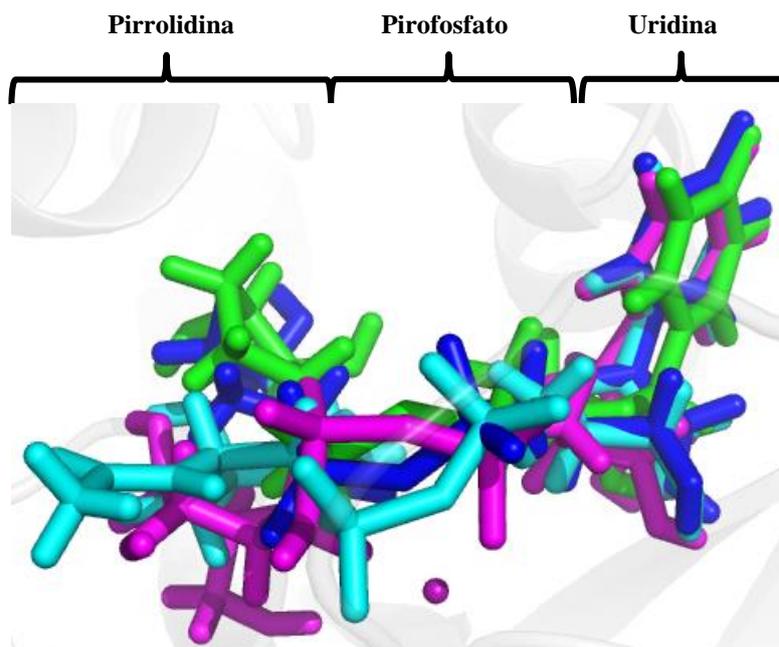
**Tabla 6.1.** Resultados de energías de unión según *docking*

| Inhibidor  | Energía de unión <sup>[a]</sup> | Inhibidor  | Energía de unión <sup>[a]</sup> |
|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|
| <b>32a</b> | -10.72                          | <b>32d</b> | -11.89                          |
| <b>32b</b> | -14.02                          | <b>32e</b> | -14.55                          |
| <b>32c</b> | -11.36                          | <b>32f</b> | -7.54                           |

[a] Energía calculada utilizando Glide en Kcal/mol

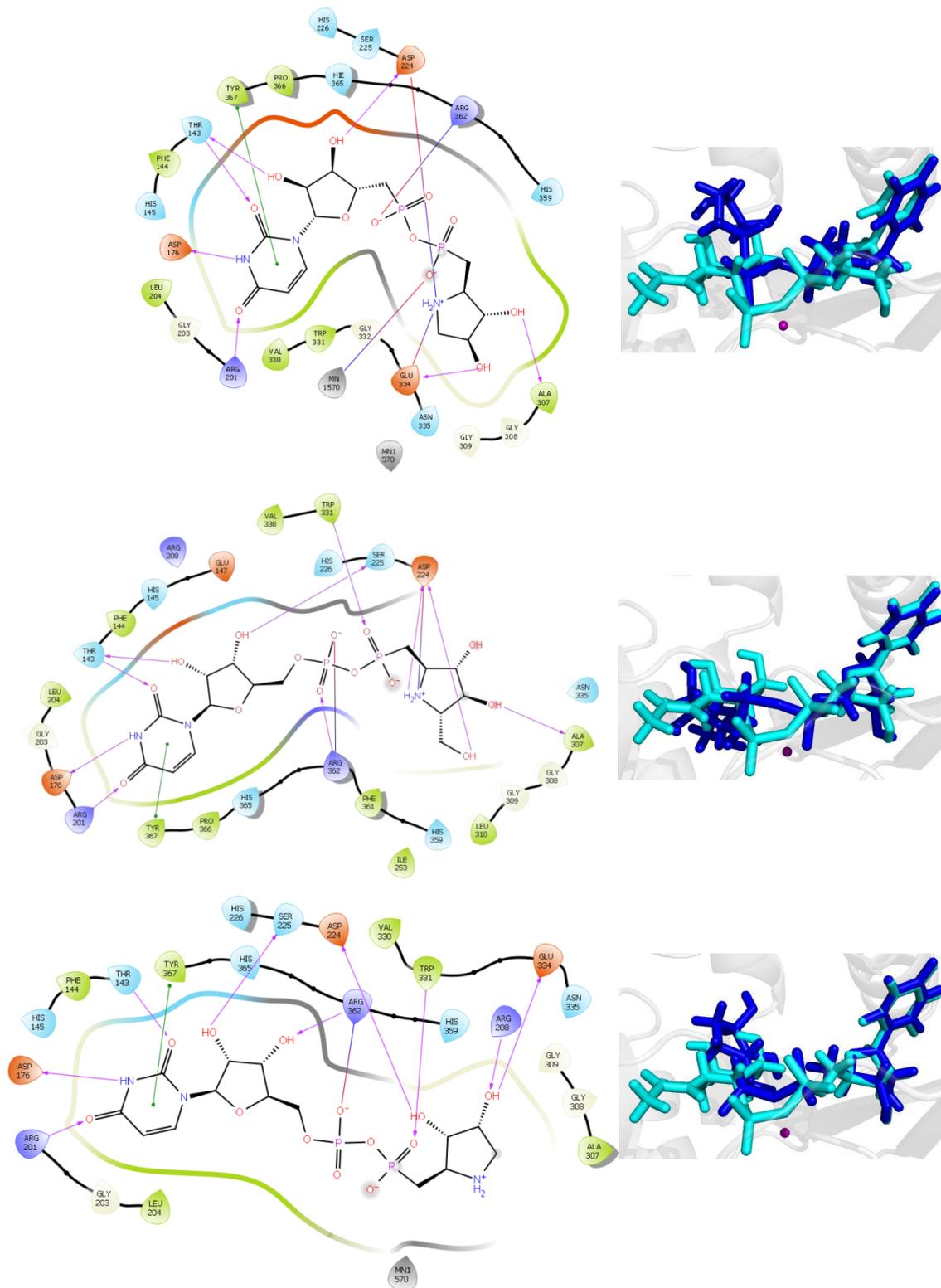
Los valores obtenidos para los productos sintetizados fueron inferiores (menor energía de interacción) a la energía de unión calculada para la interacción con UDP-5S-GalNAc (-16.26 Kcal/mol), sustrato que se había utilizado para la obtención de la estructura cristalina. Sin embargo, estos valores resultaron ser superiores en casi todos los casos al calculado para el sustrato natural UDP-GalNAc (-10.85 Kcal/mol).

El análisis de los estudios de *docking* de los inhibidores con los grupos hidroxilo de la pirrolidina libres **32a-c**, comparados con UDP-5S-GalNAc como ligando de referencia, determinan que se colocan en una pose similar. La posición de la zona de reconocimiento enzimático es prácticamente idéntica por lo que presenta las mismas interacciones. El *linker*, es decir, el pirofosfato se encuentra coordinado al Mn(II), sin embargo, la variación en su pose es algo más acusada. Donde más diferencias se observan es en la pose de la pirrolidina respecto de 5S-GalNAc (Figura 6.11)



**Figura 6.11.** Comparación de UDP-5S-GalNAc (turquesa), **32a** (verde), **32b** (morado), **32c** (azul)

A continuación, nos centraremos en la descripción de la colocación y las interacciones que presentan las distintas pirrolidinas y se compararán con las que presenta UDP-5S-GalNAc (Figura 6.12).



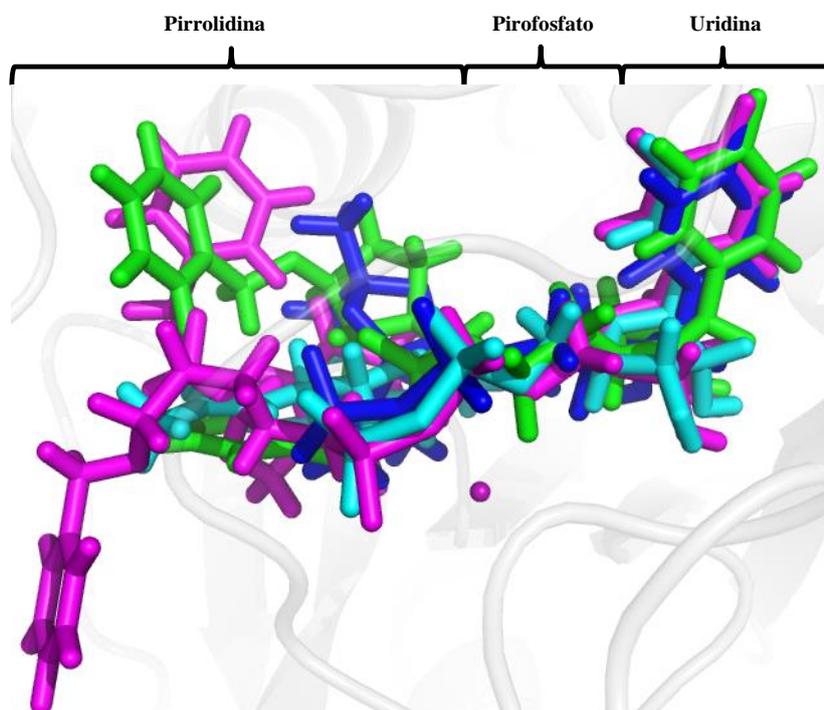
**Figura 6.12.** Superior; **32a** (azul) frente a UDP-5S-GalNAc (turquesa). Central; **32b** (azul) frente a UDP-5S-GalNAc (turquesa). Inferior; **32c** (azul) frente a UDP-5S-GalNAc (turquesa). Izquierda; Diagrama de interacciones. Derecha; Superposición de ligando y UDP-5S-GalNAc

Los grupos hidroxilo de la pirrolidina del compuesto **32a** interacciona con Ala307, como UDP-5S-GalNAc, y Glu334 mediante enlaces de hidrógeno, y la amina protonada presenta interacción electrostática con Glu334 y Asp224 (Figura 6.12, superior).

De forma similar, un grupo hidroxilo de **32b** interacciona con Ala307, al igual que el ligando de referencia, mientras que otro lo hace con Asp224. El grupo amino protonado también presenta un enlace de hidrógeno con Asp224, además de interacción electrostática. Estas interacciones adicionales que presenta la pirrolidina, junto con la casi exacta superposición del pirofosfato, pueden incrementar la energía de unión enzima-ligando (-14.02 Kcal/mol) sin embargo, no llega a superar la energía de unión con UDP-5S-GalNAc (-16.26 Kcal/mol) (Figura 6.12, central).

Los grupos hidroxilo de la pirrolidina **32c** se unen a Arg208, formando un enlace de hidrógeno, como UDP-5S-GalNAc, y a Glu334 y Asp224 mediante fuerzas electrostáticas (Figura 6.12, inferior).

En cuanto a los inhibidores sintetizados con los grupos hidroxilo protegidos **32d-f**, si se comparan con UDP-5S-GalNAc, se observa un desplazamiento considerable en sus poses dependiendo del número y patrón de sustitución aunque el nucleósido y en concreto la uridina tiene poses muy similares (Figura 6.13).

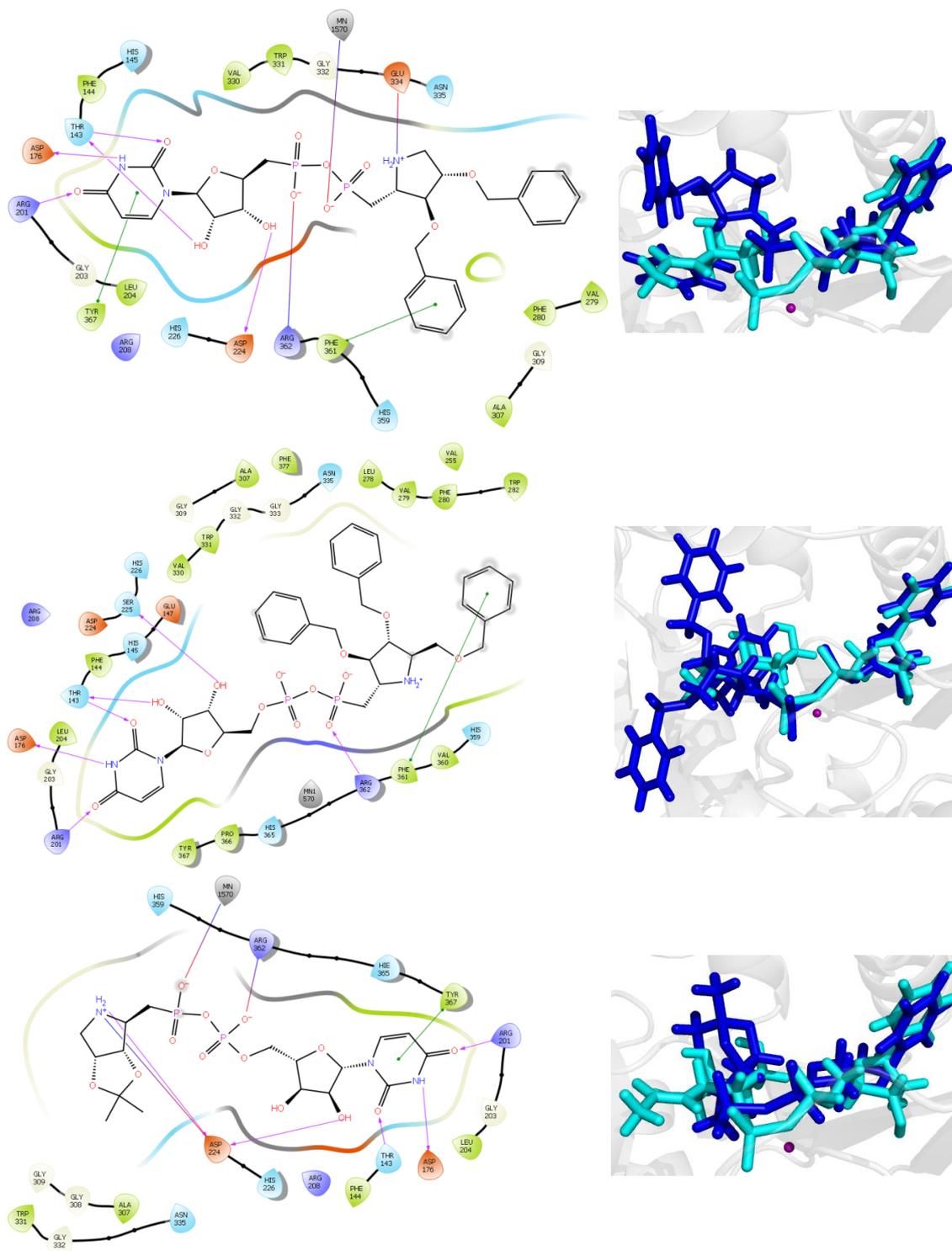


**Figura 6.13.** Comparación de UDP-5S-GalNAc (turquesa), **32d** (verde), **32e** (morado) y **32f** (azul)

La pirrolidina del ligando **32d** orienta los grupos bencilo hacia un bolsillo hidrofóbico que forman los residuos de Val279, Phe280, Trp331 y Phe377, formando además un  $\pi$ -stacking con Phe361. El grupo amino protonado presenta fuerzas electrostáticas con Glu334 (Figura 6.14, superior).

El mayor tamaño del compuesto **32e** le obliga a tomar una pose más forzada. La pirrolidina está invertida por el giro el enlace fosfonato para introducir los grupos bencilo en el bolsillo hidrofóbico. El grupo bencilo de C5 se orienta hacia el exterior del sitio catalítico y forma un  $\pi$ -stacking con Phe361 mientras que los grupos bencilo de C3 y C4 forman un plano y se orientan hacia los residuos del bolsillo próximo al sitio catalítico. Las interacciones adicionales que proporcionan los grupos bencilo pueden incrementar la energía de unión enzima-ligando y por este motivo ésta alcanza el valor más elevado, entre todos los ligandos sintetizados, de -14.55 Kcal/mol (Figura 6.14, central).

En el caso del compuesto **32f** la pirrolidina se encuentra invertida debido al giro del metileno del fosfonato. El acetal se orienta hacia residuos hidrofóbicos como Val330 y Trp331. El grupo amino de la pirrolidina tiene un enlace de hidrógeno e interacciones electrostáticas con Asp224. La energía de unión enzima-ligando de este compuesto ( $\Delta G = -7.54$  Kcal/mol) es muy inferior a la que proporcionan el resto de los ligandos sintetizados, probablemente por la falta de grupos capaces de formar interacciones adicionales (Figura 6.14, inferior).



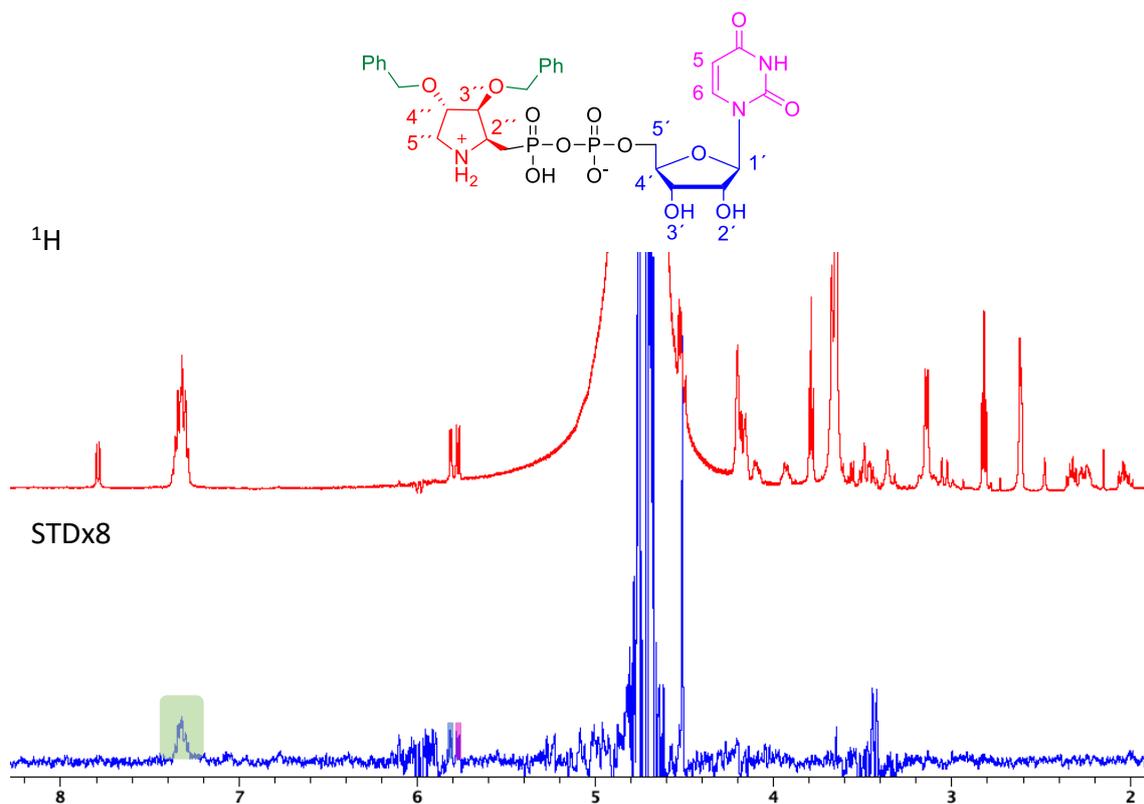
**Figura 6.14.** Superior; **32d** (azul) frente a UDP-5S-GalNAc (turquesa). Central; **32e** (azul) frente a UDP-5S-GalNAc (turquesa). Inferior; **32f** (azul) frente a UDP-5S-GalNAc (turquesa). Izquierda; Diagrama de interacciones. Derecha; Superposición de ligando y UDP-5S-GalNAc

#### **6.4.1.2. Estudios de STD-NMR**

Con el fin de evaluar de forma experimental la interacción de los productos preparados **32** con GalNAc-T2 se llevaron a cabo experimentos utilizando la técnica de STD-NMR. Para medir los espectros se utilizó GalNAc-T2, proporcionada por el Dr. Ramón Hurtado, en concentración 1  $\mu$ M y con un exceso de ligando en concentración 1 mM (Ver experimental).

En los ensayos realizados, únicamente se observaron señales de STD con los compuestos **32d** y **32e**. La ausencia de señales en los espectros STD puede ser debida a dos causas bien diferentes. Por un lado, es posible que no exista interacción entre el sustrato en estudio y el enzima y al no haber transferencia de saturación, la señal de diferencia medida sea nula. Este podría ser el caso del compuesto **32f** que presentaba una baja energía de unión en los estudios de *docking* (-7.54 Kcal/mol). Por otro lado, cuando la interacción enzima-ligando, es muy fuerte, la disociación lenta del ligando hace que en disolución haya una concentración muy baja de ligando saturado. Cuando se da esta situación, la señal de STD medida es muy baja o nula y este podría ser el caso de los compuestos **32a-c**.

En el caso del ligando **32d**, en el espectro de STD se observaron señales correspondientes a los grupos fenilo de la pirrolidina (verde) y a la zona de reconocimiento enzimático, de la que se aprecian los protones H1' de la ribosa (azul) y H6 del uracilo (rosa). La intensidad del STD es moderada ya que se encuentra multiplicada por un factor de 8 (Figura 6.15).



**Figura 6.15.** Espectros de STD-NMR de **32d** con GalNAc-T2

Para el compuesto **32e**, también se observaron las mismas señales que para **32d** pero con una mayor intensidad, llegando incluso a verse, aunque con poca intensidad, la señal de H5 del uracilo (rosa) (Figura 6.16).

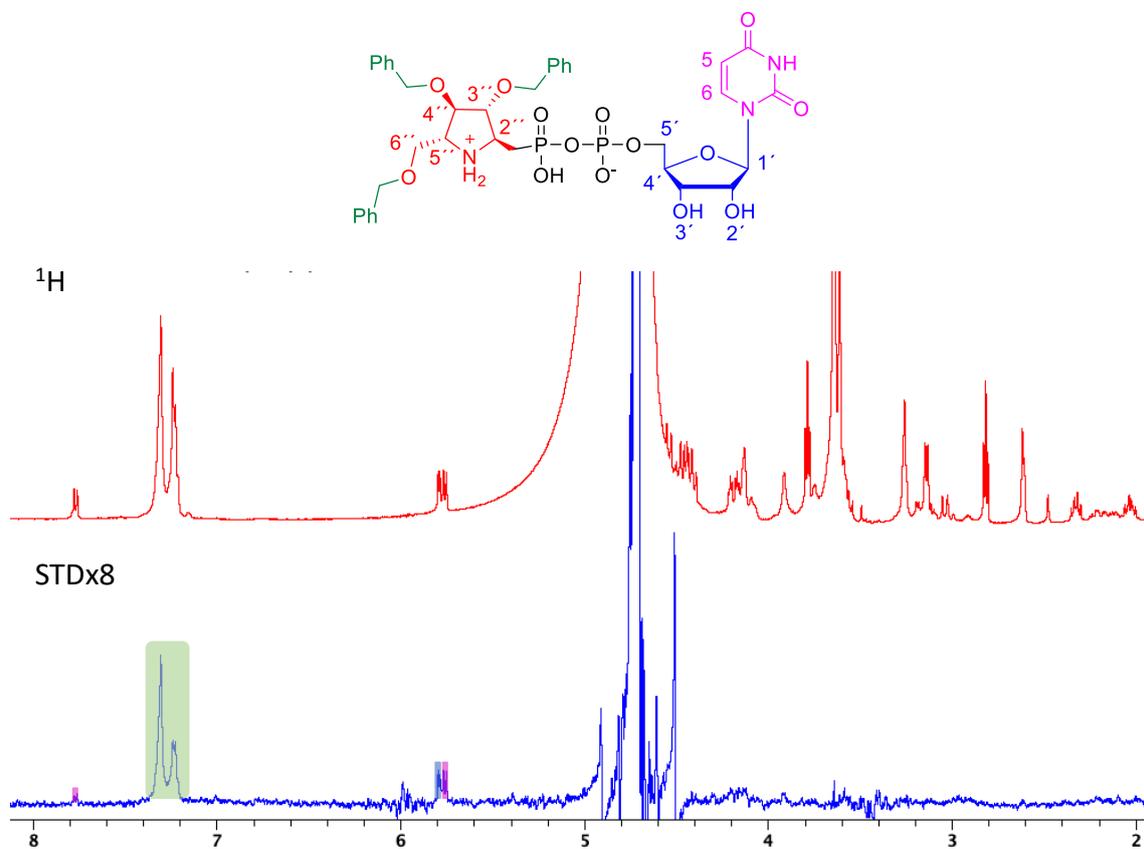


Figura 6.16. Espectros de STD-NMR de **32e** con GalNAc-T2

Con el compuesto, **32e**, se llevó a cabo un estudio de competencia con uridina difosfato (UDP), ligando que presenta afinidad con GalNAc-T2.<sup>23</sup> Para ello sobre la muestra que contiene **32e** y GalNAc-T2, se añadió UDP en exceso (1.5 mM) y se registró a continuación el espectro de STD (Figura 6.17). Cuando se comparó el nuevo espectro, con el obtenido para el ligando **32e** (Figura 6.16), se observó una ligera disminución de la intensidad de las señales de **32e** y la aparición de las señales de H1' y H6 del UDP. Esto significaba que, efectivamente, **32e** entraba en el sitio activo y existía una competencia entre ambos ligandos por ocupar el sitio catalítico.

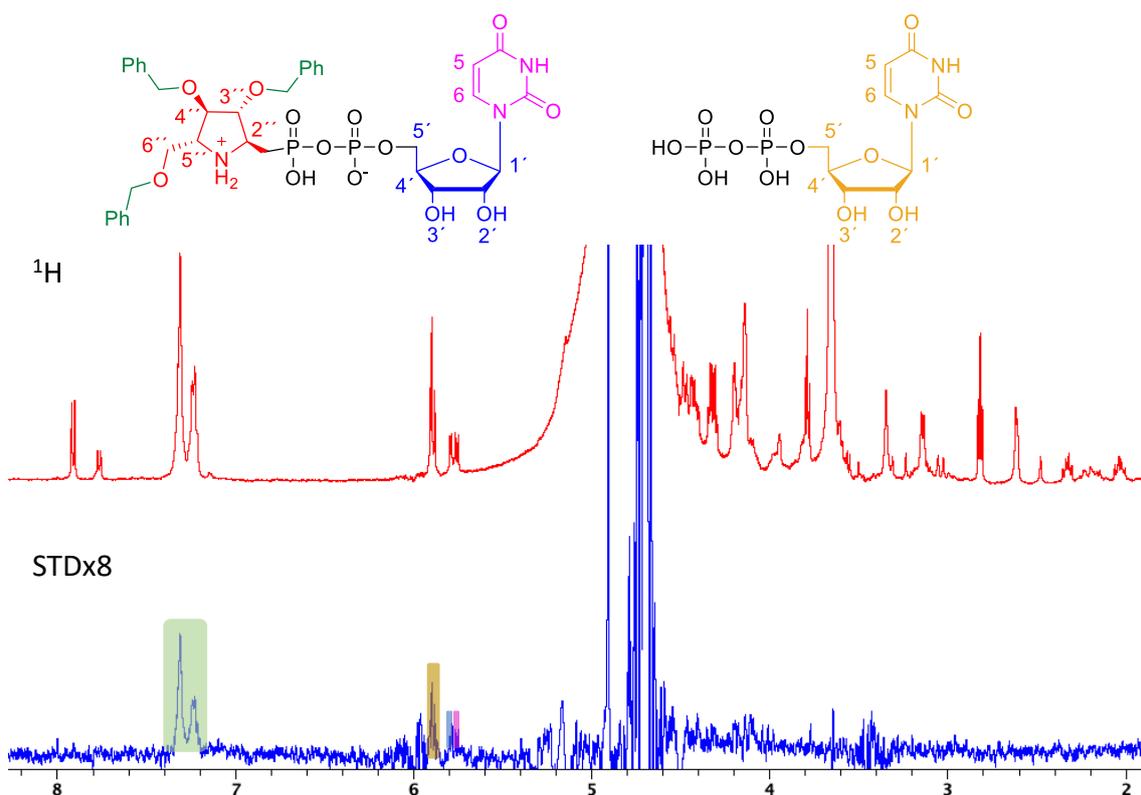
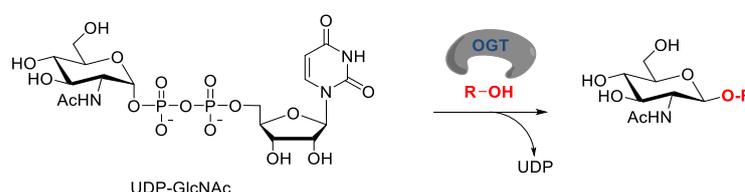


Figura 6.17. Estudio de competencia de **32e** y UDP

A la vista de los resultados obtenidos tanto por *docking* como por STD, los compuestos con los grupos hidroxilo de la pirrolidina libres (**32a-c**), presentan un gran potencial como inhibidores que debe de ser confirmado por medio de ensayos biológicos, como medidas de  $K_i$ . Los compuestos con los grupos de la pirrolidina protegidos como bencilos (**32d** y **32e**) también podrían comportarse como inhibidores, siguiendo la tendencia de que a mayor número de sustituyentes mayor interacción. En el caso de la pirrolidina protegida con un grupo acetal (**32f**), el hecho de no proporcionar señales en el STD unido a la baja energía de unión calculada por *docking* indica que su potencial como inhibidor es reducido.

## 6.4.2 Estudios de interacción con *O-linked-N-acetilglucosamina* transferasa (OGT)

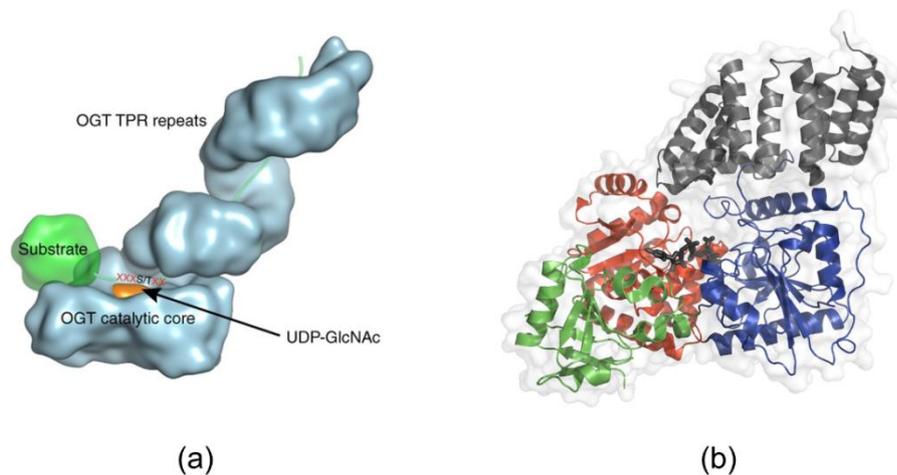
El enzima *O-linked-N-acetilglucosamina* transferasa (OGT) fue descubierto en 1984<sup>26</sup> y aislada en 1992.<sup>27</sup> Dentro de la célula, se encuentra localizada en el citosol y también en el núcleo celular. Este enzima se encarga de transferir una unidad de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) desde el correspondiente dador de Leloir, UDP-GlcNAc, a un aminoácido, bien sea serina (Ser) o treonina (Thr), de una cadena peptídica, que actúa como aceptor. Esta transferencia tiene lugar con inversión de la configuración (Figura 6.18).



**Figura 6.18.** Representación del proceso de *O*-glicosilación por parte de OGT

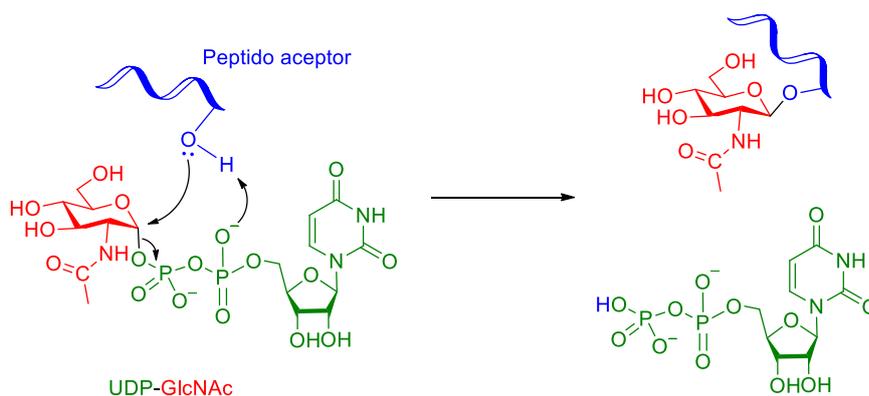
Varios estudios han demostrado que OGT interviene en diversas rutas de señalización,<sup>28</sup> entre ellas, la señalización Notch, que se relacionan con enfermedades como cáncer, Parkinson, Alzheimer o diabetes.<sup>29-31</sup>

La estructura de OGT en humanos fue resuelta en 2011<sup>32</sup> formando un complejo con UDP y también con UDP-GlcNAc. Su estructura está formada por varios tipos de dominios. El dominio *N*-terminal, donde se encuentran varias unidades de tetratricopéptidos (TPR), que son importantes ya que establecen interacciones con péptidos, y el dominio *C*-terminal, donde se encuentra el centro activo. Ambos dominios terminales presentan un plegamiento tipo Rossmann, típico del reconocimiento nucleotídico. Entre estos dos dominios terminales se encuentra otro dominio intermedio (Figura 6.19).



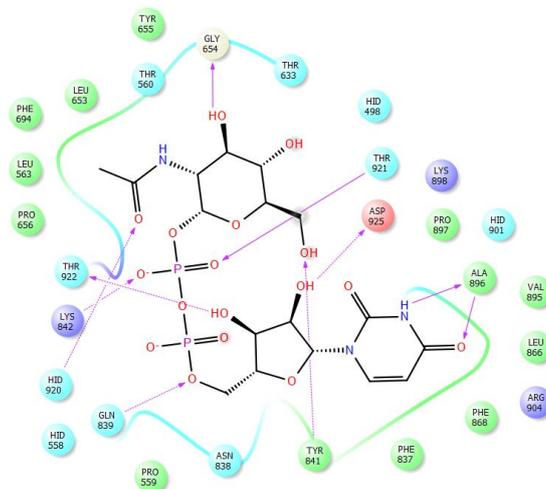
**Figura 6.19.** (a) Representación de la superficie del sitio activo y la TPR de OGT, formando complejo con UDP-GlcNAc y la proteína sustrato.<sup>33</sup> (b) Estructura cristalina del sitio catalítico de OGT con UDP-GlcNAc (PDB ID: 4GZ5); TPR (gris), región *N*-terminal (azul), dominio intermedio (verde) y región *C*-terminal (rojo).

Los estudios del mecanismo de la reacción enzimática, indican que OGT glicosila proteínas con inversión de la configuración y no requiere de un metal para llevar a cabo su actividad catalítica.<sup>34,35</sup> Estos estudios apuntan a que en primer lugar se produce el ataque del grupo hidroxilo del sustrato aceptor al carbono anomérico del sustrato dador. Este proceso provoca la escisión del enlace glicosídico, aumentando la densidad electrónica en el  $\beta$ -fosfato (que estabiliza el residuo de Lys842) y contribuye a que el  $\alpha$ -fosfato actúe como base inicial siendo el  $\beta$ -fosfato el aceptor final del protón (Figura 6.20).



**Figura 6.20.** Mecanismo propuesto para la transferencia de GlcNAc

Estudios de la estructura cristalográfica del sitio activo de OGT permiten conocer las siguientes interacciones que se producen con el sustrato natural (UDP-GlcNAc) (Figura 6.21).



**Figura 6.21.** Interacciones de UDP-GlcNAc con el sitio activo de OGT (PDB ID: 4GZ5)

- $\pi$ - $\pi$  “*stacking*” (no aparece representado en la figura) del anillo de uracilo con His901.
- Enlaces de hidrógeno del anillo de uracilo con Ala896.
- Enlace de hidrógeno del anillo de ribosa con Asp925 y Thr922.
- Enlace de hidrógeno entre el  $\alpha$ -fosfato y Gln839.
- Enlace de hidrógeno entre el  $\beta$ -fosfato y Thr921.
- Interacción electrostática entre el  $\beta$ -fosfato y Lys842.
- Enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo de azúcar con los residuos Tyr841, Gly654.
- Enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del grupo NAc e His920.

#### **6.4.2.1. Estudios de docking**

Se ha llevado a cabo en el grupo de investigación un estudio de *docking* de los compuestos sintetizados **32a-f** con el enzima OGT utilizando una estructura previamente publicada (PDB: 4GZ5).<sup>34</sup> Del estudio realizado se han obtenido los valores de energía de unión enzima-ligando que se presentan en la Tabla 6.2.

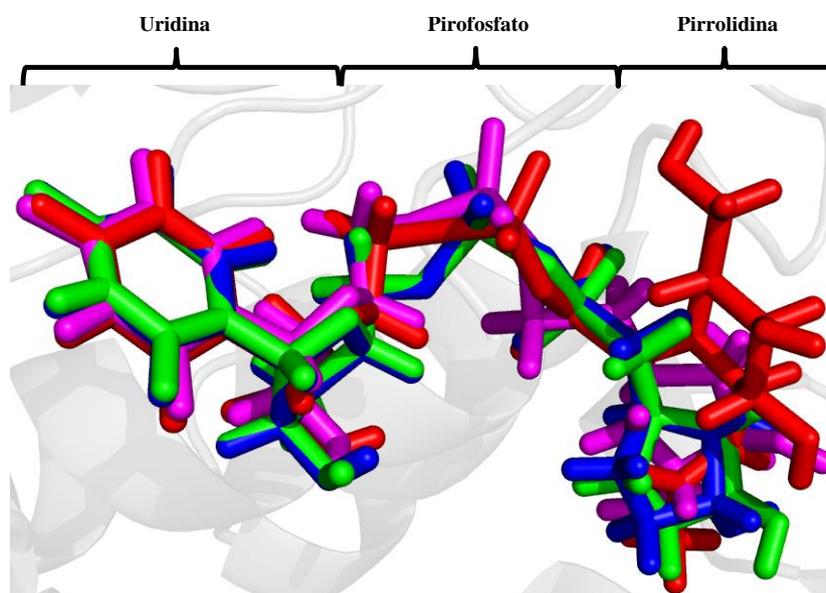
**Tabla 6.2.** Resultados de energías de unión según *docking*

| Inhibidor  | Energía de unión <sup>[a]</sup> | Inhibidor  | Energía de unión <sup>[a]</sup> |
|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|
| <b>32a</b> | -11.32                          | <b>32d</b> | -6.84                           |
| <b>32b</b> | -12.18                          | <b>32e</b> | -4.74                           |
| <b>32c</b> | -11.40                          | <b>32f</b> | -4.80                           |

[a] Energía calculada utilizando Glide en Kcal/mol

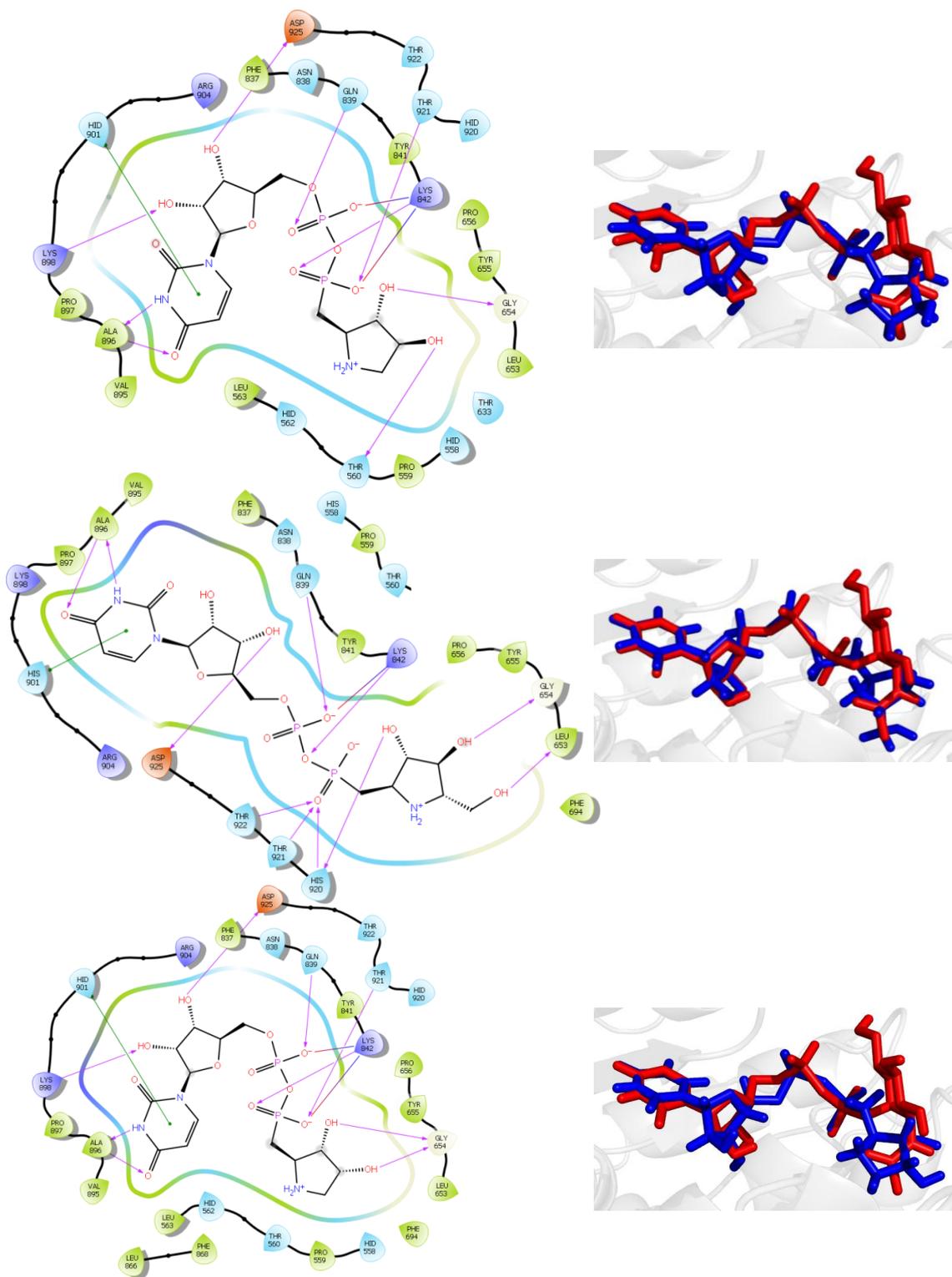
Si se comparan los valores obtenidos para las energías de unión de los compuestos sintetizados, con el valor que se obtiene para el sustrato natural (-12.33 Kcal/mol), se observa que la unión en todos los casos resulta ser más débil. También se observa una clara diferencia entre los inhibidores con los grupos de la pirrolidina libres y protegidos.

Por otro lado, la comparación de las poses que adoptan los tres compuestos sintetizados con los grupos hidroxilo libres (**32a-c**) (Figura 6.22), indica una colocación casi exacta del nucleósido y del *linker* (pirofosfato), siendo la pirrolidina la que mayor libertad tiene en su ubicación en el sitio activo, aunque manteniéndose siempre en una posición próxima.



**Figura 6.22.** Comparación de UDP-GlcNAc (rojo), **32a** (verde), **32b** (morado) y **32c** (azul)

A continuación, nos centraremos en la descripción de la colocación y las interacciones que presentan las distintas pirrolidinas y su comparación con las que presenta el sustrato natural (Figura 6.23).



**Figura 6.23.** Superior; **32a** (azul) frente a UDP-GlcNAc (rojo). Central; **32b** (azul) frente a UDP-GlcNAc (rojo). Inferior; **32c** (azul) frente a UDP-GlcNAc (rojo).

Izquierda; Diagrama de interacciones. Derecha; Superposición de ligando y UDP-GlcNAc

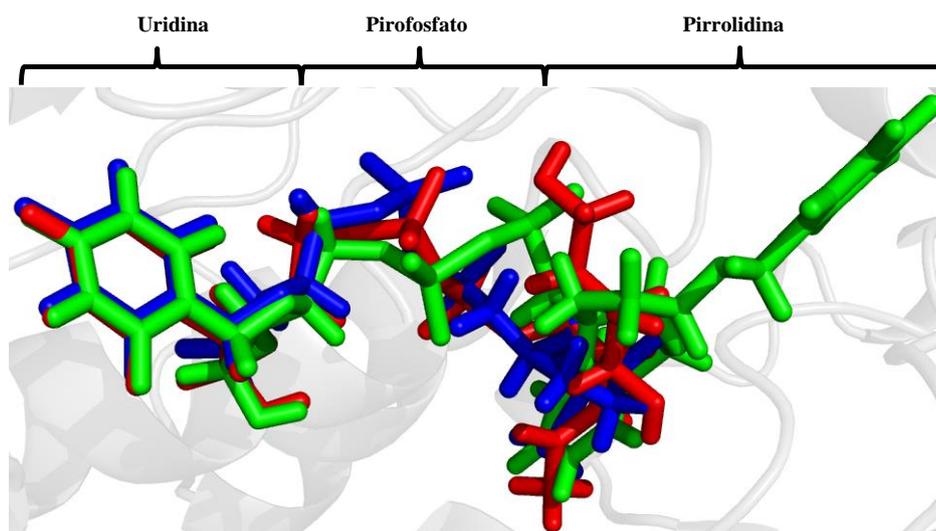
El anillo de pirrolidina del compuesto **32a** se encuentra invertido gracias a la libertad de giro del grupo metileno del fosfonato y presenta interacciones polares con Gly654 y Thr560 pero pierde respecto del azúcar de UDP-GlcNAc las interacciones con Tyr841 e His920 (Figura 6.23, superior).

En el compuesto **32b** la pirrolidina respecto de la glucosa, preserva los enlaces de hidrógeno con His920 y Gly654 y sustituye la interacción con Tyr841 por Leu653, por lo que la posición que ocupan ambos anillos es próxima aunque no idéntica (Figura 6.23, central).

El compuesto **32c** adopta una pose casi idéntica a **32a**. En ambos casos se invierte la pirrolidina y presentan las mismas interacciones. Las diferencias observadas son debidas a la distinta disposición de los hidroxilos, así en el caso de **32a**, el hidroxilo de C3 forma un enlace de hidrógeno con Gly654 y el de C4 con Thr560, mientras que en **32c** ambos hidroxilos forman enlace de hidrógeno con el mismo residuo de Gly654 (Figura 6.23, inferior).

En términos generales, en los inhibidores con los grupos hidroxilo libres (**32a-c**), la zona de reconocimiento mantiene las mismas interacciones que el sustrato natural, el grupo pirofosfato presenta un cierto desplazamiento respecto al UDP-GlcNAc y cada pirrolidina presenta sus propias interacciones, sin embargo, estas variaciones no se ven reflejadas en valores de energía de unión muy diferentes.

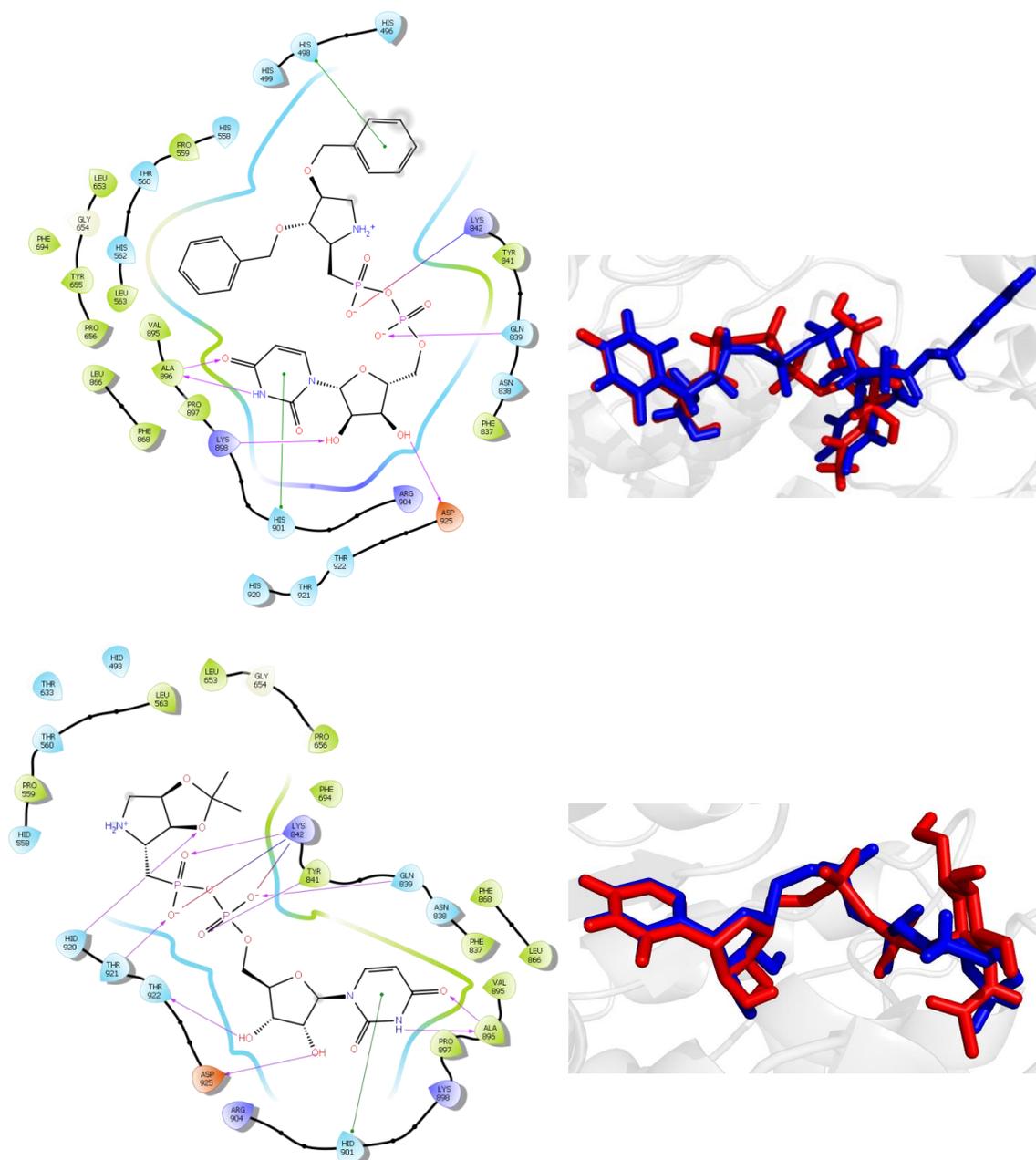
En cuanto a los compuestos que presentan los grupos hidroxilo de la pirrolidina protegidos (**32d-f**), las poses adoptadas muestran una colocación casi idéntica en la zona de reconocimiento para **32d** y **32f** respecto de UDP-GlcNAc (Figura 6.24), mientras que **32e** toma una pose muy distinta.



**Figura 6.24.** Superposición de UDP-GlcNAc (rojo), **32d** (verde) y **32f** (azul)

En el compuesto **32d**, el anillo de pirrolidina expone el bencilo de C4 hacia el exterior del sitio catalítico e interacciona mediante  $\pi$ -stacking con el residuo de His498, mientras que coloca el grupo bencilo de C3 en la posición del carbohidrato del sustrato natural (Figura 6.25, superior).

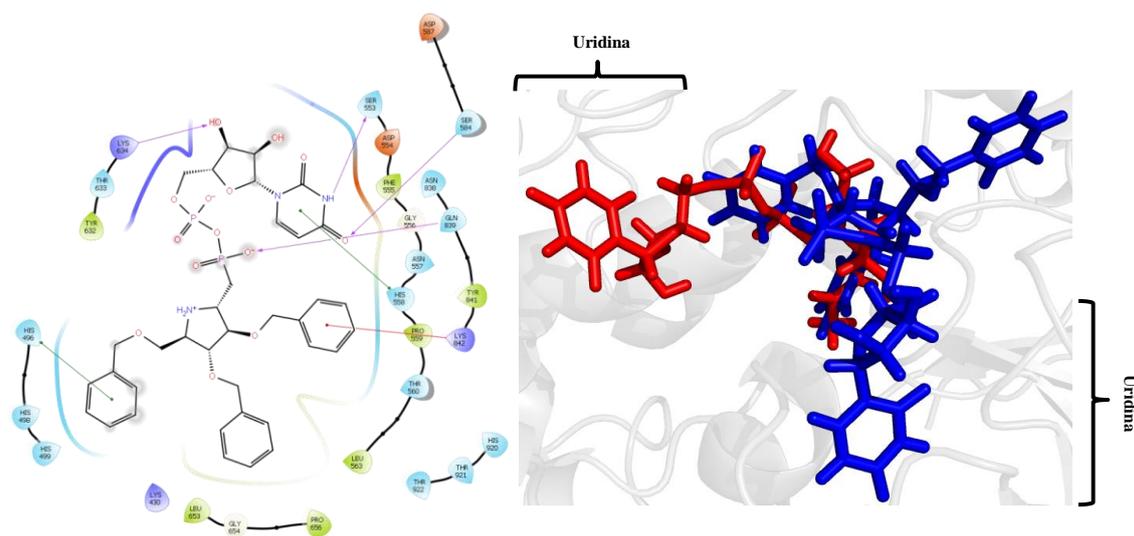
El caso del compuesto **32f** el anillo de pirrolidina al no tener los hidroxilos libres para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno y ser el grupo protector un acetal que no puede formar  $\pi$ -stacking, apenas muestra interacciones a excepción de un enlace de hidrógeno con His920 (Figura 6.25, inferior).



**Figura 6.25.** Superior; **32d** (azul) frente a UDP-GlcNAc (rojo). Inferior; **32f** (azul) frente a UDP-GlcNAc (rojo). Izquierda; Diagrama de interacciones. Derecha; Superposición de ligando y UDP-GlcNAc

Por el contrario, el compuesto **32e** toma una pose totalmente distinta a la de UDP-GlcNAc y ubica uno de los grupos bencilo en una zona próxima a la que ocupa el nucleósido del sustrato natural en el sitio catalítico (Figura 6.26). La uridina en lugar de interactuar con Ala896, lo hace con Ser553 y Ser584 mediante enlaces de hidrógeno y sustituye el  $\pi$ -stacking con His901 por la His558. El anillo de ribosa orienta los grupos hidroxilo al exterior del sitio catalítico y presenta un enlace de hidrógeno con Lys364. El grupo pirofosfato, en concreto el grupo fosfonato se orienta hacia el exterior y forma un único enlace con Glu369. Del anillo de pirrolidina el grupo bencilo de C5 forma un

$\pi$ -stacking con His496 y C3 forma una interacción de tipo catión- $\pi$  con Lys842. En resumen, se observa una pérdida importante de interacciones en la zona de reconocimiento se sólo se compensa en parte por las interacciones favorables de dos de los grupos bencilo.



**Figura 6.26.** Izquierda; Diagrama de interacciones de **32e**. Derecha; Superposición de **32e** (azul) y UDP-GlcNAc (rojo)

Es de destacar que los valores de *docking* calculados no están de acuerdo con los datos experimentales obtenidos previamente en el grupo de investigación. Así, los valores más favorables de *docking* se encuentran para las pirrolidinas que presentan grupos OH libres (Tabla 6.2), mientras que los valores de  $K_i$  determinados experimentalmente en análogos con este tipo de pirrolidinas son muy débiles (Figura 6.2). Por el contrario, el valor de  $K_i$  más favorable se obtiene con la pirrolidina tribencilada, mientras que según el cálculo de docking sería derivado que presenta las interacciones más débiles. Basándonos en estos resultados, los estudios de STD-NMR se llevaron a cabo únicamente con los derivados que presentaban el anillo de pirrolidina con grupos protectores.

### 6.4.2.2. Estudios de STD-NMR

Para los estudios de STD-NMR se consideraron los sustratos **32d-f**, que llevan grupos bencilo o acetal en el anillo de pirrolidina. Para medir los espectros se utilizó OGT, proporcionada por el Prof. Daan van Aalten, en concentración 1  $\mu\text{M}$  y con un exceso de ligando en concentración 1 mM (Ver experimental).

El análisis del espectro de STD del compuesto **32e** (Figura 6.27) indica que se produce una interacción fuerte entre el ligando y el enzima, ya que como aparece indicado en la figura, el espectro aparece multiplicado únicamente por un factor de 2. Este hecho contrasta fuertemente con la baja energía de interacción calculada por *docking* (Tabla 6.2). Las señales que aparecen, podemos clasificarlas según su proximidad al enzima en función de la intensidad que presentan. Las señales más intensas y por lo tanto las más próximas al enzima son los grupos fenilo (verde) junto con sus grupos metileno. Con una menor intensidad aparecen las señales de la zona de reconocimiento como son los protones H6 y H5, de la uridina (rosa) y los correspondientes a la ribosa (azul). En cuanto al anillo de pirrolidina (rojo), esta se une mediante los protones H3'', H4'' y H5''.

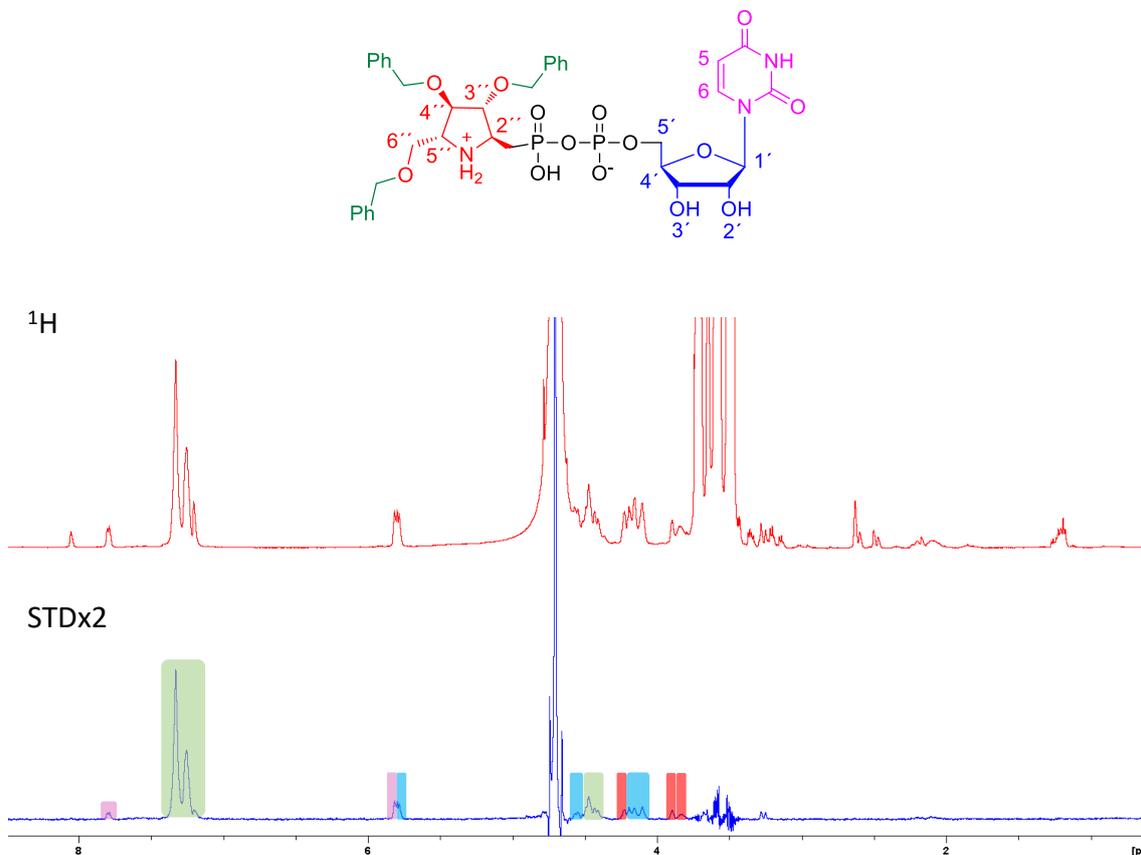
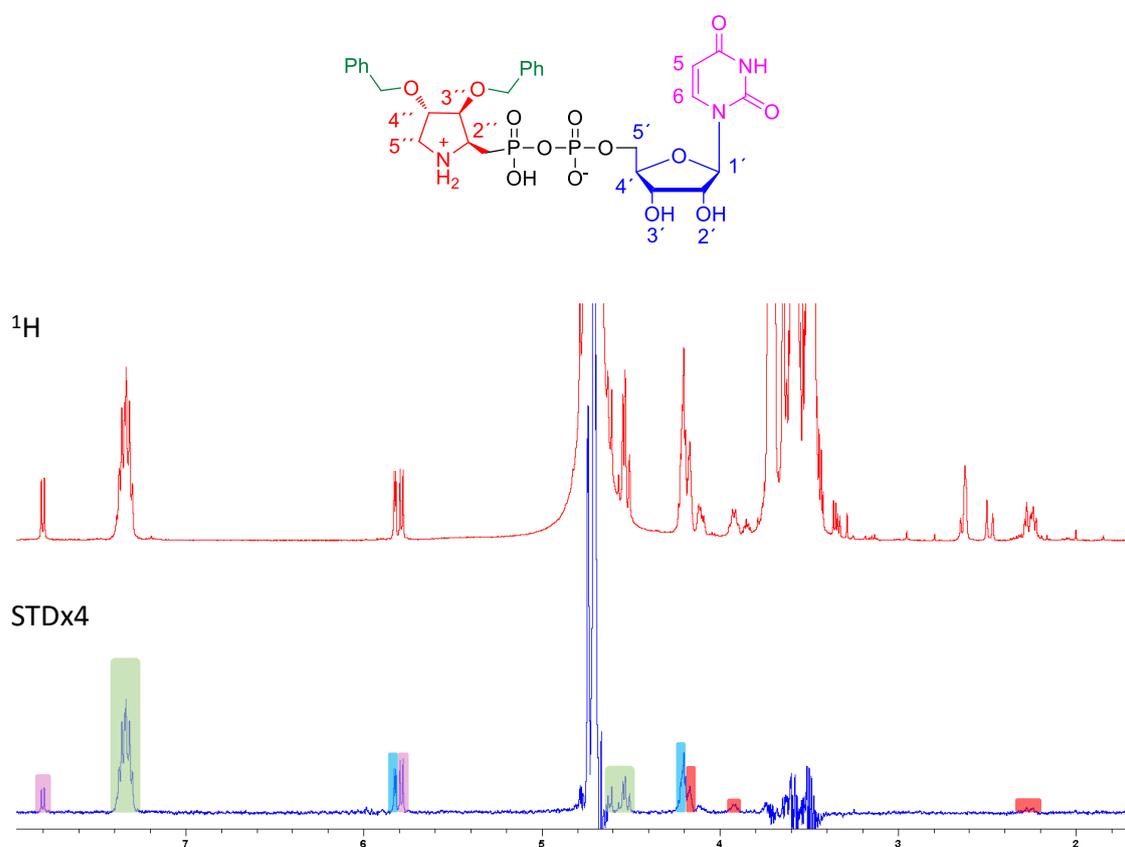


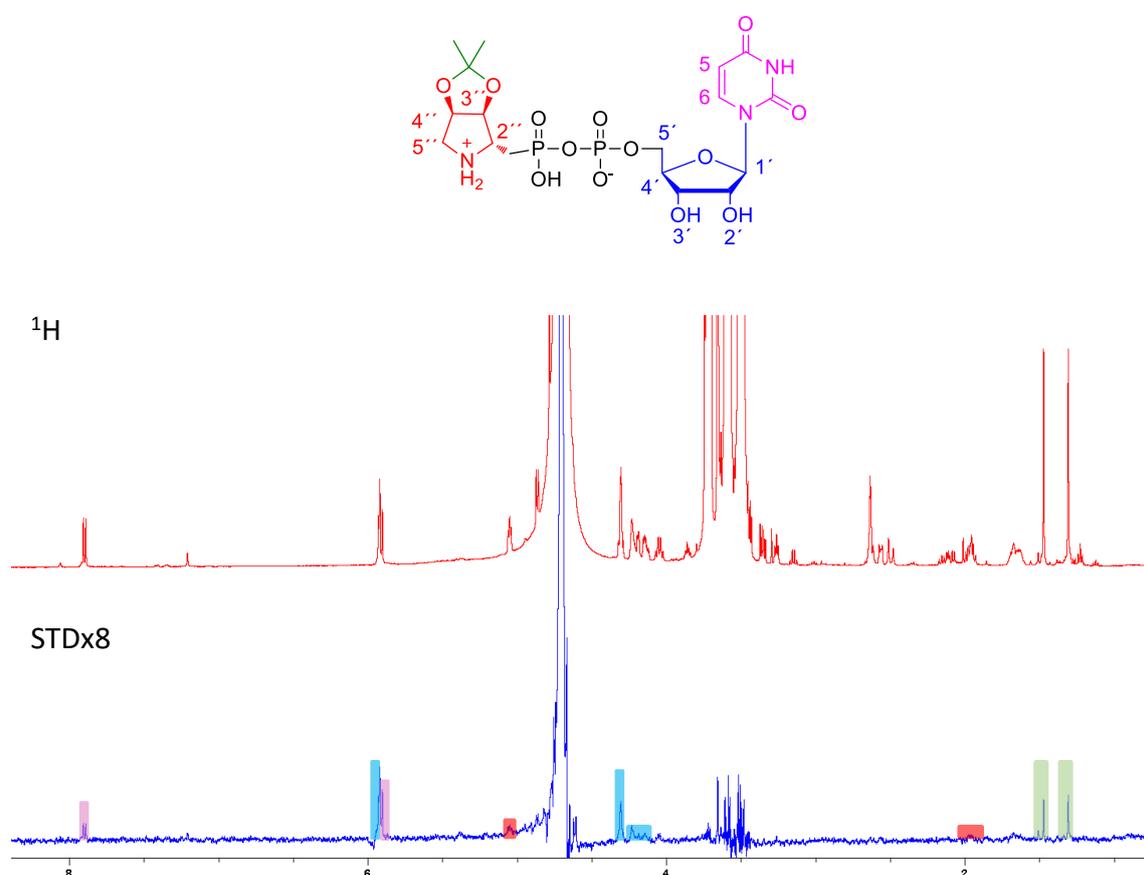
Figura 6.27. Espectros STD-NMR de **32e** con OGT

El análisis del espectro de STD-NMR del compuesto **32d** indica que la unión que se establece es menor que con el compuesto **32e**, ya que el espectro está multiplicado por un factor de 4. Al igual que ocurría en el compuesto anterior, los protones que interaccionan con OGT con intensidad elevada, son los grupos bencilos (verde). También la zona de reconocimiento presenta interacción con el enzima ya que aparecen las señales de H6 y H5 de la uridina (rosa) y los protones de la ribosa (azul). En cuanto a la pirrolidina (rojo), aparecen señales correspondientes a los protones H3'' y H4''. Con una intensidad muy débil aparecen también las señales correspondientes a H2'' y al grupo metileno unido al pirofosfato (Figura 6.28).



**Figura 6.28.** Espectros de STD-NMR de **32d** con OGT

El estudio de STD del compuesto **32f**, indica que la interacción entre el ligando y el enzima es más débil ya que aparece multiplicado por un factor de 8 (Figura 6.29). En este caso, las señales más intensas que se observan son las correspondientes al protón H6 de la uridina (rosa) y al anomérico de la ribosa (azul), con menor intensidad aparecen las señales de H5 de la uridina, H2' de la ribosa y los grupos metilo del acetal (verde). Con una intensidad muy débil se observan también señales que provienen de la ribosa, el grupo metileno del fosfonato y el protón H4'' de la pirrolidina (rojo). Es de destacar la diferencia entre señales correspondientes a los grupos bencilo en **32d** y **32e** (Figuras 6.27 y 6.28) y las señales correspondientes al grupo isopropilideno en **32f** (Figuras 6.29).



**Figura 6.29.** Espectros de STD-NMR de **32f** con OGT

Los resultados del análisis de los espectros de STD-NMR están de acuerdo con los obtenidos con anterioridad en el grupo de investigación. Así, se puede afirmar, que la tendencia en cuanto a la sustitución en el anillo de pirrolidina, se mantiene, es decir, un mayor número de grupos bencilo da lugar a una mayor afinidad. Sería interesante disponer de datos actividad biológica ( $K_i$ ) de los productos **32a-f** para poder comparar con más precisión entre ellos, así como con los compuestos preparados anteriormente que carecen de uno de los grupos fosfato.

## 6.5. Conclusiones

La condensación de ácidos pirrolidinilmetilfosfónicos con UMP activado es una estrategia útil para la preparación de nucleótidos análogos de dadores de Leloir donde el anillo de pirrolidina actúa como glicomimético.

La activación como imidazolato de la unidad de reconocimiento enzimático (UMP) resulta una estrategia más adecuada que la activación como morfolidato, para el acoplamiento fosfonato-fosfato, facilitando el proceso de obtención y de purificación.

El acoplamiento fosfonato-fosfato resulta más efectivo en la obtención de inhibidores de GTs con los grupos hidroxilo de la pirrolidina protegidos. Para los compuestos con los grupos hidroxilo libres, la baja conversión que proporciona debida a la reacción paralela de dimerización, provoca una importante caída de rendimiento.

La presencia del grupo amino libre de la pirrolidina no interfiere en la reacción de acoplamiento, no siendo necesario el uso de un grupo protector en esta posición. Esto evita los problemas generados en la desprotección de la pirrolidina, que conllevaría probablemente a la hidrólisis del inhibidor preparado.

Los valores de *docking* calculados para la interacción entre los sustratos preparados y GalNAc-T2, son en casi todos los casos, mejores que para el sustrato natural. Esto avala la posibilidad de emplear derivados de pirrolidina como inhibidores de este enzima.

El derivado más activo frente a GalNAc-T2 según *docking* es el compuesto tribencilado **32e**. Este derivado presenta además señales en los espectros STD-NMR que indican que interacciona con el enzima.

La ausencia de señales en los espectros de STD-NMR de los compuestos **32a-c**, podría estar causada por una disociación enzima-ligando lenta, lo cual indicaría, un fuerte potencial de estos compuestos como inhibidores para este enzima.

Los valores de *docking* calculados para la interacción entre los sustratos preparados y OGT, son sorprendentemente bajos e inferiores en todos los casos, al sustrato natural.

Por el contrario, los compuestos con grupos bencilo proporcionan señales intensas en los experimentos de STD-NMR con OGT, principalmente el derivado tribencilado, lo que avala su posible utilidad como inhibidores de este enzima.

El anillo de pirrolidina presenta un alto potencial como sustituto del carbohidrato para la síntesis de posibles inhibidores de glicosiltransferasas, principalmente cuando presenta grupos bencilo como sustituyentes.

## 6.6. Experimental Section

### General Methods

**Miscellaneous:** Analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. Anhydrous solvents were purified and dried with activated molecular sieves prior to use. All the glassware was dried for 12 hours prior to use in an oven at 140°C, and allowed to cool under humidified atmosphere. For the removal of solvents under reduced pressure Büchi R-210 rotary evaporators were used.

**NMR:**  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^{31}\text{P}$  NMR were acquired at 25°C on Bruker Avance 400MHz or AVANCE II 300 MHz instruments in the stated solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm relative to residual solvent signals and coupling constants ( $J$ ) in hertz (Hz). NMR assignments were using standard 2D experiments.

**HPLC: Analytical:** Column Atlantis<sup>®</sup> dc18 5 $\mu\text{m}$ , 4.6x100 mm. **Semipreparative:** (Column Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu\text{m}$ , 19x100 mm) was carried out in a waters 515 pump with PDA detection.

**HRMS:** High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a QToF spectrometer equipped with an ESI (electrospray ionization) source (microTOF-Q, Bruker Daltonik) using sodium formate as external reference.

### COMPUTACIONAL STUDIES

*Macromolecule preparation.*

*GalNAc-T2:* The X-ray crystal structure of the closed and active conformation (PDB ID: 4D0Z, in complex with UDP-5S-GalNAc, EA2 peptide and  $\text{Mn}^{+2}$ ). Chain A was selected. Using the Protein Preparation Wizard tool included in Maestro package all waters, ethylene glycol and ligands were deleted but  $\text{Mn}^{+2}$  were conserved, missing atoms and cap termini were added, side chains and loops were filled by Prime, and hydrogens were added with Epik24 at physiological pH. Charges were assigned to all atoms with the OPLS\_2005 force field and the final protein structure was finally minimized with the same force field.

*OGT:* The X-ray crystal structure of *h*OGT (PDB ID: 4GZ5, in complex with UDP-GlcNAc) was selected. Chain C was selected and isolated from the crystal PDB file. Using the Protein Preparation Wizard tool included in Maestro package all waters, sulfate ions and ligand were deleted, missing atoms and cap termini were added, side chains and loops were filled by Prime, and hydrogens were added with Epik24 at

physiological pH. Charges were assigned to all atoms with the OPLS\_2005 force field and the final protein structure was finally minimized with the same force field.

#### *Ligand preparation.*

The 3D structures of the compounds were built from their SMILES codes using Corina3D model. All ligands were subjected to geometry optimization by using the MMFFs force field implemented in Maestro, to generate ionization states was used Epik, in order to simulate the physiological pH. Regarding the setting stereoisomer options, the number of stereoisomers generated was limited up to 32 per ligand.

#### *Docking calculations.*

*GalNAc-T2: Docking* was performed by Glide implemented in Maestro. In Glide, a cubic grid of  $25^3 \text{ \AA}^3$  was generated for the protein, defining as center the center of mass between the residues Asp176, His145, Arg362 and His226. No restrictions were established on the torsion angles for the ligands. Extra precision *docking* was performed.

*OGT: Docking* was performed by Glide implemented in Maestro. In Glide, a cubic grid of  $35^3 \text{ \AA}^3$  was generated for the protein, defining as center the center of mass of UDP-GlcNAc. No restrictions were established on the torsion angles for the ligands. Extra precision *docking* was performed.

### **STD-NMR STUDIES**

*GalNAc-T2:* STD experiments were recorded on a Bruker 500 MHz spectrometer to samples containing the corresponding ligand [1 mM], GalNAc-T2 [1  $\mu\text{M}$ ],  $\text{MnCl}_2$  [75  $\mu\text{M}$ ] and deuterated buffer of TRIS-d11 [25 mM] at pH 7.40, NaCl 7.5 mM and  $\beta$ -mercaptoethanol [1 mM] (as stabilizer). Temperature was fixed at 25 °C. 1024 spectra were recorded for *on* and *off* resonance.

*OGT:* STD experiments were recorded on a Bruker 500 MHz spectrometer to samples containing the corresponding ligand [1 mM], human OGT [1  $\mu\text{M}$ ] and deuterated buffer of TRIS-d11 [25 mM] at pH 7.40 and temperature was fixed at 25 °C. 1024 spectra were recorded for *on* and *off* resonance.

## General notes

NMR assignments were made using this general pattern, showed in Figure 6.30

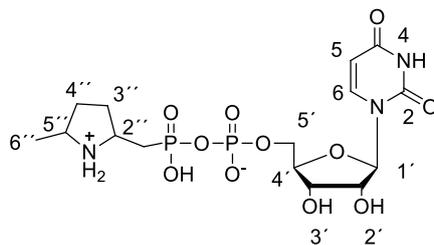
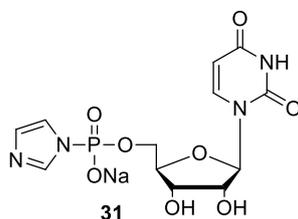


Figure 6.30. Description for NMR assignment

**Sodium** ((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl (1*H*-imidazol-1-yl)phosphonate (**31**).



Commercially available nucleotide, UMP disodium salt, was converted into uridinemonophosphate ditriethylammonium salt, by passing it through Dowex 50W previously activated as triethylammonium form (using triethylammonium chloride 0.5 M solution). The residue was lyophilized and dried under vacuum (in a desiccator containing P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>), to give the triethylammonium salt as a white solid. To a solution of UMP triethylammonium salt (527 mg, 1.0 mmol), 2,2'-dithiopyridine (4.3 mmol), and imidazole (10.0 mmol) in anhydrous DMF (4 mL), was added triethylamine (4.0 mmol) and triphenylphosphine (3.0 mmol) at room temperature under argon. The reaction was stirred for 15 h. The product was precipitated from the reaction mixture by the addition of an anhydrous solution of NaClO<sub>4</sub> (8.0 mmol) in dry acetone (60 mL). The heterogeneous mixture was cooled at 0 °C under argon. The precipitate was filtered, washed repeatedly with cold dry acetone, and dried in vacuo over P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, to give **31** (365 mg, 0.92 mmol) as a white solid. Yield: 92%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.99-4.10 (m, 1H, H4'), 4.11-4.24 (m, 3H, H5', H3'), 4.29 (t, 1H, J= 4.3 Hz, H2'), 5.88 (d, 1H, J= 8.1 Hz, H5), 5.90 (d, 1H, J=4.9 Hz, H1'), 7.13 (s, 1H, H4<sub>Im</sub>), 7.31(s, 1H, H5<sub>Im</sub>), 7.68 (d, 1H, J=8.1 Hz, H6), 7.94 (s, 1H, H2<sub>Im</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  65.1 (d,  $J=5.7$  Hz,  $\text{C5}'$ ), 69.4 ( $\text{C2}'$ ), 73.5 ( $\text{C3}'$ ), 82.5 (d,  $J=8.7$  Hz,  $\text{C4}'$ ), 88.9 ( $\text{C1}'$ ), 12.4 ( $\text{C5}$ ), 120.1 (d,  $J=6.2$  Hz,  $\text{C4}_{\text{Im}}$ ), 129.2 ( $\text{C5}_{\text{Im}}$ ), 129.3 ( $\text{C2}_{\text{Im}}$ ), 141.2 ( $\text{C6}$ ), 152.1 ( $\text{CO}$ ), 166.7 ( $\text{CO}$ ).

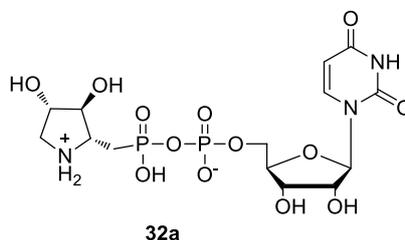
$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -8.09 ppm

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}]^-$ : 373.0555; found: 373.0556

### General procedure J to obtain inhibitors 32a-f.

The corresponding ((pyrrolidin-2-yl)methyl)phosphonic acids (**25a-f**) as triethylammonium salt (0.20 mmol) and  $\text{MgCl}_2$  (0.40 mmol) were vigorously stirred in dry DMF (1.5 mL) until clear solution was obtained. To this mixture was then added a solution of **31** (0.26 mmol) in anhydrous DMF (1.5 mL) under argon. This reaction mixture was stirred for several days at room temperature, and the reaction progress was monitored by  $^{31}\text{P}$ -NMR. The reaction was quenched by the addition of water (10 mL, HPLC grade). The solvents were removed under pressure and the crude was purified using semipreparative HPLC.

### (2R,3S,4S)-3,4-(dihydroxy)-2-(UDP-methyl)pyrrolidine (**32a**).

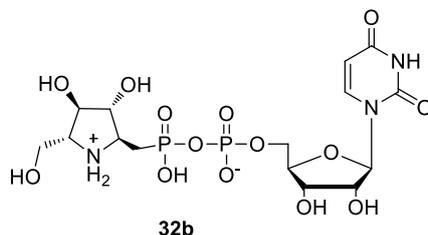


Following general procedure **J**, **32a** was purified by semipreparative HPLC (Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu\text{m}$ , 19x100 mm) using ammonium formate 50 mM (pH=4) as eluent. Flow rate; 5.1 mL/min,  $\tau$  =11 min. This compound (40 mg) was obtained as mixture of **32a**, UMP and **25a** (1:2:2). Reaction time: 10 days.

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (selected signals)  $\delta$  9.7 (d, 1P,  $J=25.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), -11.9 (d, 1P,  $J=25.1$  Hz,  $\text{P-O}$ )

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{P}_2]^-$ : 502.0633; found: 502.0673

**(2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-(dihydroxy)-2-((hydroxy)methyl)-5-(UDP-methyl)pyrrolidine (32b).**

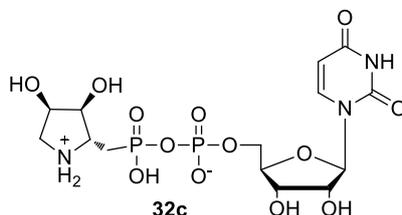


Following general procedure **J**, **32b** was purified by semipreparative HPLC (Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu$ m, 19x100 mm) using ammonium formate 50 mM (pH=4) as eluent. Flow rate; 5.1 mL/min,  $\tau$  =14 min. This compound (45 mg) was obtained as mixture of **32b**, UMP and **25b** (1:2:2). Reaction time: 10 days.

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O) (selected signals)  $\delta$  10.2 (d, 1P,  $J$ =25.3 Hz, CH<sub>2</sub>P), -10.9 (d, 1P,  $J$ =25.3 Hz, P-O)

HRMS: Calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>]<sup>-</sup>: 532.0739; found: 532.0721

**(2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-dihydroxy-2-(UDP-methyl)pyrrolidine (32c).**



Following general procedure **J**, **32c** was purified by semipreparative HPLC (Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu$ m, 19x100 mm) using ammonium formate 50 mM (pH=4) as eluent. Flow rate; 8.5 mL/min,  $\tau$  =13 min. **32c** (30 mg, 0.06 mmol) was isolated as a white solid. Reaction time: 10 days. Yield: 30%.

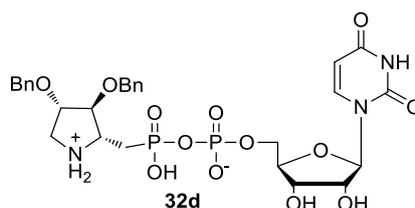
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.20 (ddd, 1H,  $J$ = 15.5 Hz,  $J$ =15.5 Hz,  $J$ =9.6 Hz, CH<sub>2</sub>P), 2.34 (ddd, 1H,  $J$ = 19.7 Hz,  $J$ =15.5 Hz,  $J$ =4.3 Hz, CH<sub>2</sub>P), 3.34 (dd, 1H,  $J$ =13.1 Hz,  $J$ =2.1 Hz, H5'), 3.58 (dd, 1H,  $J$ =13.1 Hz,  $J$ =4.7 Hz, H5'), 3.75-3.83 (m, 1H, H2'), 4.14 (dd, 1H,  $J$ =8.5 Hz,  $J$ =4.1 Hz, H4'), 4.17-4.22 (m, 1H, H5), 4.23-4.30 (m, 2H, H3', H4'), 4.39-4.43 (m, 1H, H2), 5.95 (d, 1H,  $J$ =8.1 Hz, H6), 5.97 (d, 1H,  $J$ =3.8 Hz, H1), 7.93 (d, 1H,  $J$ =8.1 Hz, H5).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  28.3 (d,  $J=138.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 49.2 ( $\text{C}5''$ ), 56.8 ( $\text{C}2''$ ), 64.9 ( $\text{C}5'$ ), 68.8 ( $\text{C}2'$ ), 69.5 ( $\text{C}3'$ ), 73.7 ( $\text{C}4''$ ), 75.3 (d,  $J=12.1$  Hz,  $\text{C}4'$ ), 83.0 (d,  $J=8.9$  Hz,  $\text{C}3''$ ), 88.6 ( $\text{C}1'$ ), 102.6 ( $\text{C}6$ ), 137.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 141.6 ( $\text{C}5$ ), 151.8 ( $\text{C}2$ ), 166.2 ( $\text{C}4$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  10.6 (d,  $J=24.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), -11.4 (d,  $J=24.9$  Hz,  $\text{P-O}$ )

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{P}_2]^-$ : 502.0663; found: 502.0673

**(2*R*,3*S*,4*S*)-3,4-(dibenzyloxy)-2-(UDP-methyl)pyrrolidine (32d).**



Following general procedure **J**, **32d** was purified by semipreparative HPLC (Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu\text{m}$ , 19x100 mm) using a mixture of ACN:H<sub>2</sub>O (1:9) as eluent. Flow rate; 17.0 mL/min,  $\tau$  =30 min. **32d** (123 mg, 0.18 mmol) was isolated as a white solid. Reaction time: 7 days. Yield: 92%.

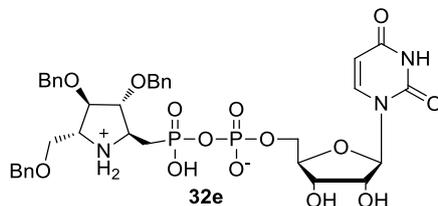
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2.25-2.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 3.46-3.63 (m, 2H,  $\text{H}5''$ ), 3.93-4.05 (m, 1H,  $\text{H}2''$ ), 4.06-4.34 (m, 7H,  $\text{H}4''$ ,  $\text{H}3''$ ,  $\text{H}4'$ ,  $\text{H}3'$ ,  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}5'$ ), 4.52-4.70 (m, 4H,  $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 5.84 (d, 1H,  $J=8.1$  Hz,  $\text{H}6$ ), 5.88 (d, 1H,  $J=4.1$  Hz,  $\text{H}1'$ ), 7.32-7.50 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7.85 (d, 1H,  $J=8.1$  Hz,  $\text{H}5$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  24.5 (d,  $J=138.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), 49.0 ( $\text{C}5''$ ), 60.0 (d,  $J=3.3$  Hz,  $\text{C}2''$ ), 64.7 (d,  $J=5.2$  Hz,  $\text{C}5'$ ), 69.2 ( $\text{C}2'$ ), 71.3 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 72.0 ( $\text{CH}_{2\text{Bn}}$ ), 73.8 ( $\text{C}3'$ ), 79.7 ( $\text{C}4''$ ), 82.8 (d,  $J=9.2$  Hz,  $\text{C}4'$ ), 84.6 (d,  $J=12.1$  Hz,  $\text{C}3''$ ), 88.7 ( $\text{C}1'$ ), 102.4 ( $\text{C}6$ ), 128.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.6 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 136.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 141.3 ( $\text{C}5$ ), 151.5 ( $\text{C}2$ ), 166.0 ( $\text{C}4$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  9.8 (d, 1P,  $J=25.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ ), -10.9 (d, 1P,  $J=25.6$  Hz,  $\text{P-O}$ )

HRMS: Calculated for  $[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_2]^+$ : 728.1357; found: 728.1346

**(2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-(dibenzoyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-5-(UDP-methyl)pirrolidine (32e).**



Following general procedure **J**, **32e** was purified by semipreparative HPLC (Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu$ m, 19x100 mm) using a mixture of ACN:H<sub>2</sub>O (3:7) as eluent. Flow rate; 10.2 mL/min,  $\tau$  =15 min. **32e** (144 mg, 0.18 mmol) was isolated as a white solid. Reaction time: 7 days. Yield: 90%.

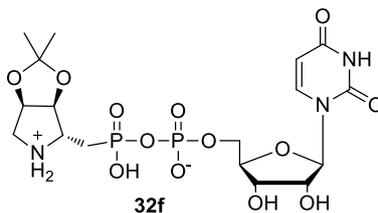
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.12-2.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>P), 3.62-3.69 (m, 2H, H6'), 3.76-3.86 (m, 1H, H2'), 3.91-4.00 (m, 2H, H3'', H5''), 4.15-4.30 (m, 5H, H4'', H2', H4', H5'), 4.15-4.30 (m, 7H, CH<sub>2</sub>Bn, H3'), 5.84 (d, 1H, *J*=8.1 Hz, H6), 5.87 (d, 1H, *J*=4.4 Hz, H1'), 7.28-7.44 (m, 15H, H<sub>Ar</sub>), 7.85 (d, 1H, *J*=8.1 Hz, H5).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  29.1 (d, *J*=126.4 Hz, CH<sub>2</sub>P), 54.0 (C5''), 58.9 (C2''), 64.7 (C5'), 67.2 (C6'), 69.3 (C2'), 71.3 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.6 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.6 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.9 (C3'), 82.1 (C4'), 82.9 (C4'), 86.3 (C3''), 88.7 (C1'), 102.4 (C6), 127.6 (C<sub>Ar</sub>), 127.8 (C<sub>Ar</sub>), 127.8 (C<sub>Ar</sub>), 128.1 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (C<sub>Ar</sub>), 136.8 (C<sub>Ar</sub>), 137.2 (C<sub>Ar</sub>), 137.3 (C<sub>Ar</sub>), 141.2 (C5), 151.3 (C2), 165.7 (C4).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  10.9 (d, *J*=25.4 Hz, CH<sub>2</sub>P), -11.0 (d, 1P, *J*=25.4 Hz, P-O)

HRMS: Calculated for [C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 848.1932; found: 848.1942

**((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2,2-dimethyltetrahydro-3*aH*-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)methyl)-5-(UDP-methyl)pirrolidine (**32f**).**



Following general procedure **J**, **32f** was purified by semipreparative HPLC (Atlantis<sup>®</sup> dc18 OBD 5 $\mu$ m, 19x100 mm) using H<sub>2</sub>O as eluent. Flow rate; 6.8 mL/min,  $\tau$  =21 min. **32f** (99 mg, 0.18 mmol) was isolated as a white solid. Reaction time: 7 days. Yield: 91%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.36 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.53 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.98-2.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>P), 3.48-3.56 (m, 2H, H5''), 4.04-4.14 (m, 1H, H2''), 4.16-4.32 (m, 3H, H4', H5'), 4.33-4.40 (m, 2H, H3', H2'), 4.88-4.95 (m, 1H, H3''), 5.07-5.14 (m, 1H, H4''), 5.97 (d, 1H, *J*=8.1 Hz, H6), 5.98 (d, 1H, *J*=4.0 Hz, H1'), 7.96 (d, 1H, *J*=8.1 Hz, H5), 8.15 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  22.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.2 (d, *J*=136.7 Hz, CH<sub>2</sub>P), 49.0 (C5''), 60.4 (d, *J*=2.6 Hz, C2''), 64.8 (d, *J*=5.5 Hz, C5'), 69.5 (C2'), 73.7 (C3'), 77.8 (C4''), 83.0 (d, *J*=9.0 Hz, C4'), 83.2 (d, *J*=13.8 Hz, C3''), 88.5 (C1'), 102.4 (C6), 112.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 141.6 (C5), 151.8 (C2), 166.2 (C4).

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  10.0 (d, 1P, *J*=25.4 Hz, CH<sub>2</sub>P), -11.1 (d, 1P, *J*=25.4 Hz, P-O)

HRMS: Calculated for [C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>P<sub>2</sub>]<sup>-</sup>: 542.0946; found: 542.0942

## 6.7. Bibliografía

- (1) Ghirardello, M.; Perrone, D.; Chinaglia, N.; Sádaba, D.; Delso, I.; Tejero, T.; Marchesi, E.; Fogagnolo, M.; Rafie, K.; van Aalten, D. M. F.; Merino, P. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 7264-7272.
- (2) Moffatt, J. G.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- (3) Adam, A.; Moffatt, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 838-842.
- (4) Steogon; P. J.; Bretner, M.; Jankowska, M.; Felczak, K.; Stolarski, R.; Wiczorek, Z.; Caipostalcode, A. L.; Rhoads, R. E.; Temeriusz, A.; Haber, D.; Darzynkiewicz, E. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **1995**, *14*, 717-721.
- (5) Kowalska, J.; Osowniak, A.; Zuberek, J.; Jemielity, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3661-3664.
- (6) Huang, K.; Frey, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9548-9549.
- (7) Ziemniak, M.; Szabelski, M.; Lukaszewicz, M.; Nowicka, A.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E.; Wiczorek, Z.; Jemielity, J. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 20943-20958.
- (8) Li, T.; Tikad, A.; Pan, W.; Vincent, S. P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5628-5631.
- (9) Shaver, S. R.; Rideout, J. L.; Pendergast, W.; Douglass, J. G.; Brown, E. G.; Boyer, J. L.; Patel, R. I.; Redick, C. C.; Jones, A. C.; Picher, M.; Yerxa, B. R. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 183.
- (10) Lengauer, T.; Rarey, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 402-406.
- (11) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
- (12) McGuire, E. J.; Roseman, S. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 3745-3747.
- (13) Hill, H. D., Jr.; Reynolds, J. A.; Hill, R. L. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3791-3798.
- (14) Homa, F. L.; Hollander, T.; Lehman, D. J.; Thomsen, D. R.; Elhammer, A. P. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12609-12616.
- (15) White, T.; Bennett, E. P.; Takio, K.; Sorensen, T.; Bonding, N.; Clausen, H. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24156-24165.
- (16) Hakomori, S. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2405-2414.
- (17) Singh, A. P.; Moniaux, N.; Chauhan, S. C.; Meza, J. L.; Batra, S. K. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 622.
- (18) Singh, A. P.; Chauhan, S. C.; Bafna, S.; Johansson, S. L.; Smith, L. M.; Moniaux, N.; Lin, M. F.; Batra, S. K. *Prostate* **2006**, *66*, 421-429.
- (19) Singh, A. P.; Chaturvedi, P.; Batra, S. K. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 433.
- (20) Niv, Y. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 2139-2141.
- (21) Lira-Navarrete, E.; de las Rivas, M.; Companon, I.; Pallares, M. C.; Kong, Y.; Iglesias-Fernandez, J.; Bernardes, G. J. L.; Peregrina, J. M.; Rovira, C.; Bernado, P.; Bruscolini, P.; Clausen, H.; Lostao, A.; Corzana, F.; Hurtado-Guerrero, R. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6937.
- (22) Lira-Navarrete, E.; Iglesias-Fernandez, J.; Zandberg, W. F.; Companon, I.; Kong, Y.; Corzana, F.; Pinto, B. M.; Clausen, H.; Peregrina, J. M.; Vocadlo, D. J.; Rovira, C.; Hurtado-Guerrero, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8206-8210.
- (23) Fritz, T. A.; Raman, J.; Tabak, L. A. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8613-8619.
- (24) Wandall, H. H.; Irazoqui, F.; Tarp, M. A.; Bennett, E. P.; Mandel, U.; Takeuchi, H.; Kato, K.; Irimura, T.; Suryanarayanan, G.; Hollingsworth, M. A.; Clausen, H. *Glycobiology* **2007**, *17*, 374-387.
- (25) Gómez, H.; Mendoza, F.; Lluch, J. M.; Masgrau, L. In *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*; Karabencheva-Christova, T., Ed.; Academic Press: **2015**; *100*, 225-254.

- (26) Torres, C. R.; Hart, G. W. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3308-3317.
- (27) Haltiwanger, R. S.; Blomberg, M. A.; Hart, G. W. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9005-9013.
- (28) Donnell, N.; Zachara, N. E.; Hart, G. W.; Marth, J. D. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 1680.
- (29) Pinho, S. S.; Reis, C. A. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 540.
- (30) Taniguchi, N.; Honke, K.; Fukuda, M.; Narimatsu, H.; Yamaguchi, Y. Angata, T., *Handbook of Glycosyltransferases and related genes*; 2 ed.; Springer Japan, **2014**.
- (31) Janetzko, J.; Trauger, S. A.; Lazarus, M. B.; Walker, S. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 899.
- (32) Lazarus, M. B.; Nam, Y.-S.; Jiang, J.-Y.; Sliz, P.; Walker, S. *Nature* **2011**, *469*, 564-567.
- (33) Pathak, S.; Alonso, J.; Schimpl, M.; Rafie, K.; Blair, D. E.; Borodkin, V. S.; Schüttelkopf, A. W.; Albarbarawi, O.; van Aalten, D. M. F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 744-750.
- (34) Lazarus, M. B.; Jiang, J.; Gloster, T. M.; Zandberg, W. F.; Whitworth, G. E.; Vocadlo, D. J.; Walker, S. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 966-968.
- (35) Schimpl, M.; Zheng, X.; Borodkin, V. S.; Blair, D. E.; Ferenbach, A. T.; Schüttelkopf, A. W.; Navratilova, I.; Aristotelous, T.; Albarbarawi, O.; Robinson, D. A.; Macnaughtan, M. A.; van Aalten, D. M. F. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 969.