



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Reacciones de metátesis e hidrotiolación como herramientas sintéticas para la obtención de compuestos con interés biológico
Autor/es
Víctor Rojas Ocáriz
Director/es
Alberto Avenozza Aznar y Jesús Héctor Busto Sancirán
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico



Reacciones de metátesis e hidrotiolación como herramientas sintéticas para la obtención de compuestos con interés biológico, tesis doctoral de Víctor Rojas Ocáriz, dirigida por Alberto Avenzoza Aznar y Jesús Héctor Busto Sancirán (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2016
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

FACULTAD DE CIENCIAS, ESTUDIOS
AGROALIMENTARIOS E INFORMÁTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

TESIS DOCTORAL

**REACCIONES DE METÁTESIS E
HIDROTIOLACIÓN COMO
HERRAMIENTAS SINTÉTICAS PARA
LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS
CON INTERÉS BIOLÓGICO**

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

Víctor Rojas Ocáriz

Noviembre 2015

ALBERTO AVENOZA AZNAR, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja y

JESÚS HECTOR BUSTO SANCIRIÁN, Profesor Titular de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja

CERTIFICAN:

*Que la memoria " **REACCIONES DE METÁTESIS E HIDROTIOLACIÓN COMO HERRAMIENTAS SINTÉTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON INTERÉS BIOLÓGICO**" ha sido realizada por el Licenciado **Víctor Rojas Ocáriz** en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja bajo su inmediata dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Química.*

Logroño, Noviembre 2015

Fdo.: Alberto Avenoza Aznar

Fdo.: Jesús Héctor Busto Sancirián

A mi familia y amigos, por estar ahí.

Resumen

Esta Tesis se centró en el estudio de la reactividad de sistemas insaturados, tanto de alquenos como de alquinos, con el propósito de obtener sistemas más complejos con interés biológico. Para ello, se emplearon las reacciones de metátesis e hidrotiolación como etapas clave de este estudio.

En la primera parte, se realizó un estudio pormenorizado de la reacción de metátesis sobre sistemas 7-azabicyclo. Se llevó a cabo la reacción de metátesis de reorganización de anillo (RRM) sobre diversos N-acil-7-azanorbornenos-1-sustituídos en diferentes condiciones de reacción para obtener lactamas bicíclicas y un nuevo sistema espirocíclico, con subestructuras de pirrolizidina, indolizidina y pirrol[1,2a]azepina.

En la segunda parte, se aplicó la reacción de metátesis cruzada (CM) para obtener una familia de neoglicoaminoácidos con un espaciador, generado en el propio proceso de metátesis, que se empleó para separar la parte carbohidrato del residuo aminoácido. El análisis conformacional de estos derivados mostró la elevada flexibilidad de la parte carbohidrato en comparación con la mayor restricción en la disposición espacial de estos carbohidratos en los glicoaminoácidos naturales.

Ante la imposibilidad de emplear la metodología anterior con derivados de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), se decidió generar el espaciador empleando la reacción de hidrotiolación tanto sobre alquenos (TEC) como sobre alquinos (TYC). En función de los materiales de partida empleados, el compuesto final puede presentar uno o dos carbohidratos en la cadena lateral del aminoácido. Posteriormente, estos neoglicoaminoácidos fueron incorporados a un epítipo de reconocimiento de una glicoproteína tipo mucina (MUC1) con la secuencia APDTRP. Los carbohidratos unidos al esqueleto peptídico no fueron capaces de fijar una determinada conformación tal y como se desprende de los estudios conformacionales realizados. Además, se llevaron a cabo estudios de afinidad entre lectinas y neoglicoconjugados con un único carbohidrato, mostrando que los nuevos compuestos elongados presentaban un comportamiento similar al del epítipo natural de serina.

Por último, se logró elucidar la estructura de rayos X del estado asociado de uno de los glicopéptidos con el fragmento scFv del anticuerpo SM3.

Abstract

This thesis is focused on the study of reactivity of unsaturated systems, both alkenes and alkynes, to provide other more complex systems with a biological interest. For this purpose, metathesis and hydrothiolation reactions have been used as key steps.

In the first part of this report, we performed a thorough study of the metathesis reaction on 7-azanorbornene systems. Ring rearrangement metathesis (RRM) in *N*-acyl-1-substituted-7-azanorbornene derivatives was carried out in different reaction conditions to achieve bicyclic lactams and a novel spirocyclic system with pyrrolizidine, indolizidine and pyrrole[1,2a]azepine substructures.

In the second part, we applied the cross metathesis reaction (*CM*) to obtain a family of neoglycoaminoacid derivatives with a linker, which is generated in the *CM* process, and used to separate the sugar moiety of the amino acid residue. The conformational analysis of these new neoglycoconjugates showed the high flexibility of the carbohydrate moiety in comparison to the more restricted spatial arrangement of these carbohydrates in natural glycoaminoacids.

Having in mind we were unable to make use of *CM* reaction employing *N*-acetyl-*D*-galactosamine (GalNAc), we decided to create the linker from hydrothiolation reaction, applied to alkenes (TEC) and alkynes (TYC). Depending on starting materials, the final compound can present one or two sugars on the side chain of the amino acid. Afterwards, these neoglycoaminoacids have been incorporated into an epitope of recognition of a mucin-like glycoprotein (MUC1) with the APDTRP sequence. Sugar moieties linked to backbone were not able to fix a specific conformation, as it was deduced from conformational analysis. Additionally, affinity studies between lectins and the neoglycoconjugates with a sole carbohydrate were carried out, showing that the new elongated compounds had a similar behavior than the observed in the natural epitope of serine.

Finally, we were able to elucidate the X-ray structure of one of our neoglycopeptides associated with the scFV fragment of SM3 antibody.

Índice

Abreviaciones	I
1. Introducción general y objetivos	1
1.1 Química de carbohidratos	3
1.2 Metátesis e hidrotiolación de alquenos	7
1.3 Conceptos relevantes en el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos	10
1.4 Química de azabiciclos	15
1.5 Objetivos	18
2. Metátesis sobre sistemas 7-azanorborneno-1-sustituidos	19
2.1 Introducción y antecedentes	21
2.1.1 Mecanismo de Chauvin	21
2.1.2 Clasificación de los procesos de metátesis	23
2.1.3 Catalizadores de rutenio	25
2.1.4 Secuencias de metátesis de reorganización de anillo (RRM)	27
2.2 Objetivos	33
2.3 Discusión de resultados	35

2.3.1 Síntesis de materiales de partida	35
2.3.2 Reacciones de metátesis: secuencia RRM	39
2.4 Conclusiones	51
3. La reacción de metátesis en carbohidratos	53
3.1 Introducción y antecedentes	55
3.1.1 Metátesis cruzada de carbohidratos con péptidos y proteínas	59
3.2 Objetivos	65
3.3 Discusión de resultados	66
3.3.1 Síntesis de materiales de partida	66
3.3.2 Reacciones de metátesis	72
3.3.3 Análisis conformacional	76
3.4 Conclusiones	86
4. La reacción de hidrotiolación en alquenos	89
4.1 Introducción y antecedentes	91
4.1.1 Iniciadores radicalarios	92
4.1.2 Mecanismo de reacción	96
4.2 Objetivos	98
4.3 Discusión de resultados	99
4.3.1 Síntesis de materiales de partida	100
4.3.2 Reacciones de hidrotiolación	105
4.4 Conclusiones	120
5. La reacción de hidrotiolación en alquinos	123
5.1 Introducción y antecedentes	125

5.1.1 Hidrotiolación de alquinos (TYC)	125
5.1.2 Catálisis mediada por metal	130
5.2 Objetivos	131
5.3 Discusión de resultados	132
5.3.1 Síntesis de materiales de partida	133
5.3.2 Reacciones TYC	136
5.3.3 Reacciones TYC-TEC	138
5.3.4 Reacciones de acoplamiento con metales de transición	140
5.4 Conclusiones	141
6. Síntesis de tioglicopéptidos	143
6.1 Introducción y antecedentes	145
6.1.1 Lectinas	145
6.1.2 Anticuerpos	146
6.2 Objetivos	146
6.3 Discusión de resultados	148
6.3.1 Síntesis de péptidos	148
6.3.2 Análisis conformacional	152
6.3.3 Actividad biológica con lectinas	172
6.3.4 Actividad biológica con anticuerpos	180
6.4 Conclusiones	183
7. Conclusiones	185
8. Experimental section	193
8.1 Experimental section of Chapter 2	195
8.2 Experimental section of Chapter 3	215
8.3 Experimental section of Chapter 4	235

8.4 Experimental section of Chapter 5	262
8.5 Experimental section of Chapter 6	283
9. Annexes	299
Annex.1 NMR spectra of Chapter 2	301
Annex.2 NMR spectra of Chapter 3	319
Annex.3 NMR spectra of Chapter 4	327
Annex.4 NMR spectra of Chapter 5	339
Annex.5 NMR spectra of Chapter 6	359
Annex.6 HPLC cromatogram	369
Annex.7 X-Ray diffraction	374

Abreviaciones

δ	desplazamiento químico
®	marca registrada
μL	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius
$^1\text{H NMR}$	resonancia magnética nuclear de protón
$^{13}\text{C NMR}$	resonancia magnética nuclear de carbono-13
AAM	2-acetamidoacrilato de metilo
Ac	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
ADMET	polimerización por metátesis de dienos acíclicos (<i>Acyclic Diene METathesis polymerization</i>)
AIBN	azobisisobutironitrilo, VAZO64®
atm	atmósferas
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> butoxicarbonilo
BP	benzofenona
^tBu	<i>tert</i> butilo
br s	singlete ancho
cat	catalizador
Cbz	benciloxicarbonilo
CM	metátesis cruzada (<i>Cross Metathesis</i>)
cm	centímetro
col.	colaboradores
COSY	COrelated SpectroscopY
CQ	canforquinona
Cy	ciclohexilo
Cys, C	Cisteína
d	doblete
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCE	dicloroetano
DCM	diclorometano
dd	doblete de dobletes
ddd	doblete de dobletes de dobletes
ddt	doblete de dobletes de tripletes
DIEA	diisopropiletilamina

DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DM	Dinámica Molecular
DM-tar	Dinámica Molecular con restricciones promediadas en el tiempo
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPAP	2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona
ELISA	<i>Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay</i>
ELLA	<i>Enzyme-linked Lectin Assay</i>
ESI	ionización por electrospray
Et	etilo
EtOH	etanol
Et₂O	éter dietílico
Et₃N	trietilamina
eq.	equivalente/s
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Fmoc-OSu	Fmoc <i>N</i> -hidroxisuccinimida
g	gramo
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
Gly, G	Glicina
h	hora
Hz	hertz
HPA	lectina <i>Helix Pomatia Agglutinin</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazolil)uronio
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>J</i>	constante de acoplamiento
m	multiplete
min	minutos
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
m/z	relación masa/carga
M	molaridad, metal

Me	metilo
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MOM	metoximetilo
N	normalidad
nm	nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ns	nanosegundos
OD₄₅₀	Densidad óptica a 450 nm
Ph	fenilo
P(n-Bu)₃	tri-n-butilfosfina
ppII	poliprolina
ppm	partes por millón
Py	piridina
q	cuatriplete
R	alquilo, arilo
RCM	metátesis de cierre de anillo (<i>Ring Closing Metathesis</i>)
RMN, NMR	Resonancia Magnética Nuclear
ROM	metátesis de apertura de anillo (<i>Ring Opening Metathesis</i>)
ROMP	polimerización por metátesis con apertura de anillo (<i>Ring Opening Metathesis Polymerization</i>)
RRM	metátesis de reorganización de anillo (<i>Ring-Rearrangement Metathesis</i>)
Rto	rendimiento
r.t.	temperatura ambiente (room temperature)
s	singlete, carbohidrato (<i>sugar</i>)
SBA	lectina <i>SoyBean Agglutinin</i>
Ser, S	Serina
SM	auto-metátesis (<i>Self-Metathesis</i>)
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
t	pseudotriplete, triplete, tiempo
T	temperatura
td	triplete de dobles
TBTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
TEC	reacción tiol-eno (<i>Thiol-Ene Coupling</i>)
TFA	ácido trifluoroacético

TMB	tetrametilbenzidina
TMDPO	óxido de 2,4,6-trimetilbenzoildifenilfosfina
THF	tetrahidrofurano
Thr, T	Treonina
TMS	tetrametilsilano
Tol	tolueno
TX	tioxantona
TYC	reacción tiol-ino (<i>Thiol-Yne Coupling</i>)
UVA	ultravioleta A (onda larga)
v.	versión
W	watios

1. Introducción general y objetivos

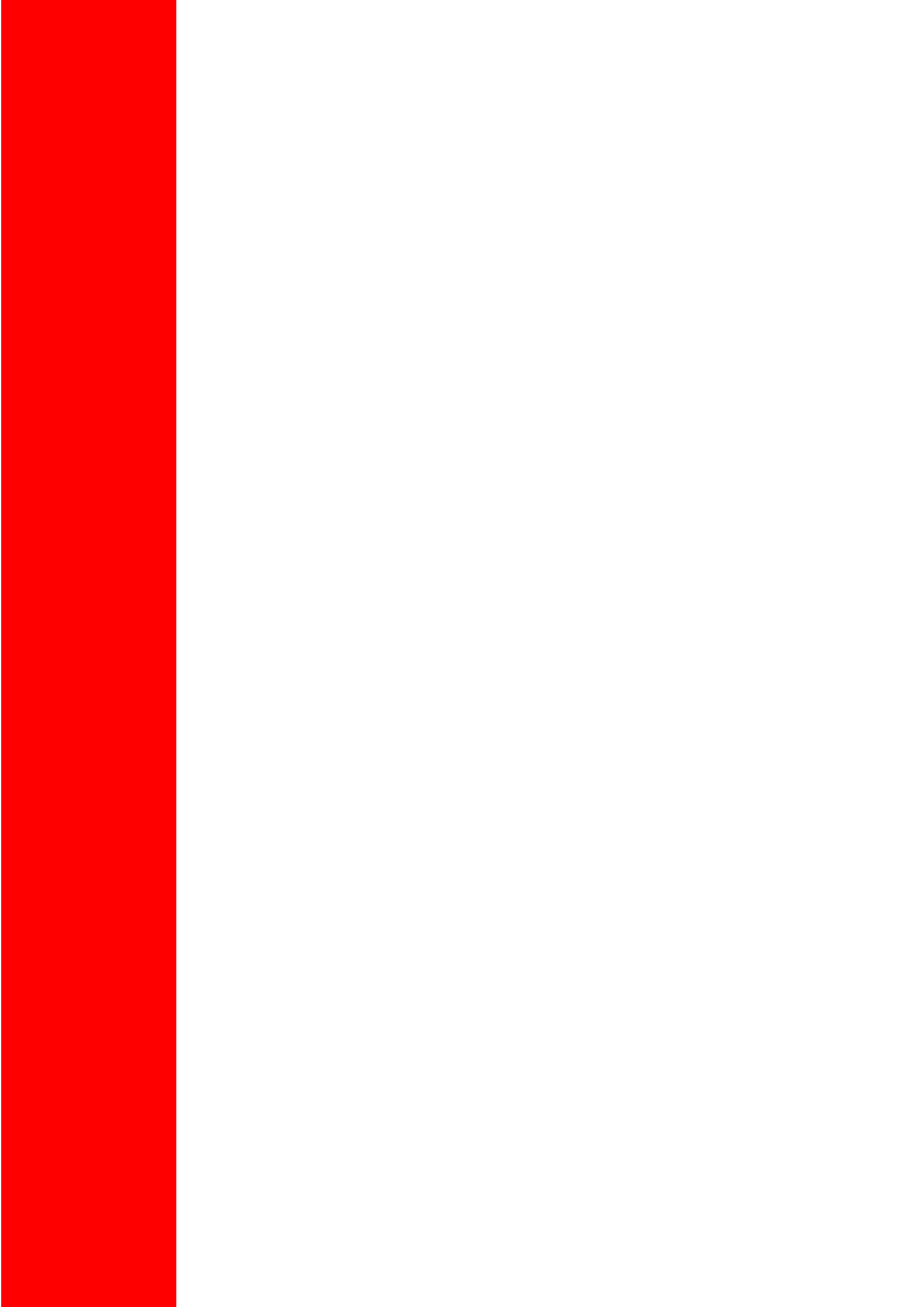
1.1 Química de carbohidratos

1.2 Metátesis e hidrotiolación de alquenos

1.3 Conceptos relevantes en el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos

1.4 Química de azabiciclos

1.5 Objetivos



1.1 Química de carbohidratos

La Química de Carbohidratos es una parte de la Química Orgánica que ha adquirido entidad propia desde comienzos del siglo XX, debido seguramente a la importancia química, biológica e industrial de estos compuestos. Ya muy avanzada la segunda mitad del siglo XX, sucedieron dos hitos que han potenciado a la Química de Carbohidratos como una de las áreas con más desarrollo dentro de la Química Orgánica actual. El primero se debió a la toma de conciencia del potencial sintético de los carbohidratos, ya que éstos constituyen una fuente de quiralidad natural, abundante, versátil y barata. La polifuncionalidad de las moléculas de carbohidrato, el gran número de posibilidades estereoquímicas y la reactividad, especialmente del carbono anomérico, son un reto para el desarrollo de procesos de síntesis donde los carbohidratos son materias primas, intermedios quirales clave, auxiliares o inductores quirales. El segundo hecho fue el descubrimiento de las importantes y variadas actividades biológicas de los carbohidratos y sus derivados, que han dado lugar a una nueva rama interdisciplinar de la Ciencia denominada Glicobiología.¹

No hay duda de que la presencia de carbohidratos en la superficie celular juega un papel clave en variedad de procesos biológicos. Podemos encontrarlos formando parte de los glicolípidos (carbohidratos unidos a lípidos) y de las glicoproteínas (carbohidratos unidos a proteínas), los cuales están presentes en muchos e importantes procesos celulares que ocurren en nuestro organismo. Por ejemplo, la especificidad de los grupos sanguíneos (A, B, AB y 0) viene determinada por la diferente parte carbohidrato que contienen ciertos glicoconjugados presentes en la superficie de los glóbulos rojos de la sangre. Además, las glicoproteínas también están involucradas en el desarrollo neuronal, en la actividad hormonal, en la respuesta inmune y en procesos inflamatorios y de fertilización.²

Un aspecto interesante de estos glicanos es su papel post-traducciona como “control de calidad” en la síntesis de proteínas, asegurando de esta manera un plegamiento adecuado de las mismas.³ Por otro lado, se conoce que los carbohidratos unidos a la proteína alteran la estructura y en consecuencia, la función de ésta.⁴ Además, la glicosilación parece aumentar la estabilidad de la proteína reduciendo su

¹ Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.; Freeze, G.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M. E. *Essentials of Glycobiology 2nd Ed.* **2009**, Cold Spring Harbor Labs, New York.

² (a) Bertozzi, C.R.; Kiessling, L.L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364. (b) Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I.A.; Dwek, R.A. *Science* **2001**, *291*, 2370-2376. (c) Talbot, p.; Shur, B.D.; Myles, D.G. *Biol. Reprod.* **2003**, *68*, 1-9. (d) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.

³ (a) Helenius, A. *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 253-265. (b) Helenius, A.; Aebi, M. *Science* **2001**, *291*, 2364-2369. (c) Trombetta, E.S.; Helenius, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 587-592.

⁴ (a) Karlsson, K.A. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 265-272. (b) Park, H.; Suzuki, T.; Lennarz, W.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 11163-11168.

vulnerabilidad a la degradación proteolítica, lo cual ayuda a su transporte.⁵ La glicosilación anormal puede provocar variaciones en el plegamiento de las proteínas alterando su estructura terciaria. Además, este tipo de errores post-traduccionales están asociados con fallos en el sistema inmune así como con enfermedades infecciosas y cáncer.

Los carbohidratos alteran también otras propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Por ejemplo, las denominadas glicoproteínas anticongelantes⁶ permiten sobrevivir, a temperaturas muy bajas, a animales que habitan en aguas polares. Estas glicoproteínas inhiben el crecimiento de cristales de hielo en su interior, evitando así la congelación de los fluidos de estos organismos vivos. Esta característica ha suscitado un enorme interés en medicina y en la industria.

Las mucinas son un tipo de glicoproteínas de alto peso molecular presentes en la membrana celular. Estas moléculas están involucradas en diversos procesos biológicos,⁷ como la inflamación, la respuesta inmune, la comunicación intercelular, el crecimiento y adherencia celular y la actividad anticongelante, entre otros. Además, estas glicoproteínas se encuentran alteradas en células tumorales, lo cual hace que su estudio sea relevante de cara al desarrollo de métodos de detección o terapias contra el cáncer.

Desde el punto de vista estructural, en las mucinas, el primer residuo de carbohidrato unido a la cadena peptídica es, generalmente, *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), y se une a serina o treonina a través de un enlace α -*O*-glicosídico. A este glicosilaminoácido se le conoce como antígeno Tn.⁸ De igual manera, se ha identificado una modificación de este antígeno, el antígeno sialil-Tn (sTn), presente en numerosos tipos de cáncer.⁹ Esta modificación es un *O*-glicano que contiene un residuo de ácido siálico unido mediante un enlace α 2-6 a un residuo de GalNAc- α -*O*-Ser/Thr. A toda la unidad carbohidrato se conoce como Neu5Ac(α 2-6)GalNAc (Figura 1.1).

⁵ Opendakker, G.; Rudd, P.M.; Ponting, C.P.; Dwek, R.A. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1330-1337.

⁶ (a) Chen, L.; DeVries, A.L.; Cheng, C.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 3811-3816. (b) Tsvetkova, N.M.; Phillips, B.L.; Krishnan, V.V.; Feeney, R.E.; Fink, W.H.; Crowe, J.H.; Risbud, S.H.; Tablin, F.; Yeh, Y. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 464-473. (c) Tachibana, Y.; Fletcher, G. L.; Fujitani, N.; Tsuda, S.; Monde, K.; Nishimura, S.I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 856-862.

⁷ (a) Sears, P.; Wong, C.-H. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 223-252. (b) Gaidzik, N.; Westerlind, U.; Kunz, H. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4421-4442.

⁸ (a) Dahr, W.; Uhlenbruck, G.; Gunson, H.H.; Van Der Hart, M. *Vox Sang.* **1975**, *29*, 36-50. (b) Ju, T.; Otto, V. I.; Cummings, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1770-1791.

⁹ Julien, S.; Videira, P. A.; Delannoy, P. *Biomolecules* **2012**, *2*, 435-466.

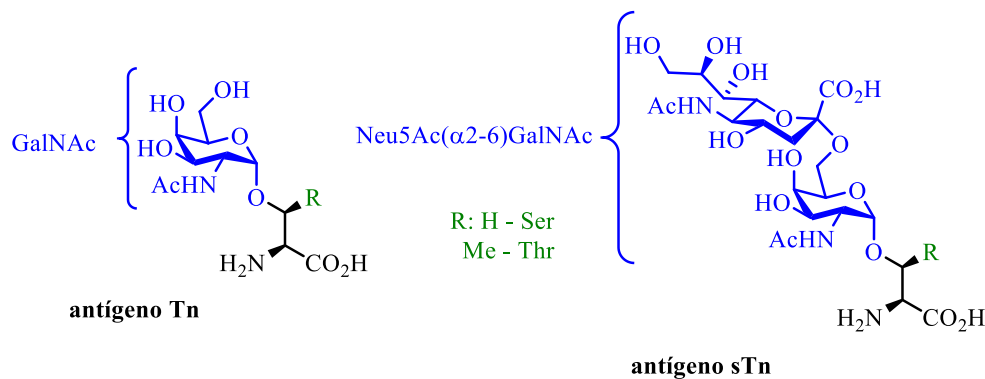


Figura 1.1 Antígenos Tn y sTn.

Una de las mucinas más estudiadas es la MUC1,¹⁰ la cual es una glicoproteína asociada a la membrana celular. Esta mucina de elevado peso molecular está formada por la repetición de la secuencia de veinte aminoácidos HGVTSPDTRPAPGSTAPPA (histidina-glicina-valina-treonina-serina-alanina-prolina-aspartato-treonina-arginina-glicina-serina-treonina-alanina-prolina-prolina-alanina) (Figura 1.2). Este dominio presenta cinco puntos de *O*-glicosilación: tres treoninas y dos serinas.¹¹ Además, presenta tres regiones importantes. La primera de ellas es la secuencia GVTSA (glicina-valina-treonina-serina-alanina), sustrato de partida para las enzimas GalNAc transferasas.¹² La segunda es el fragmento PDTR (prolina-aspartato-treonina-arginina). Esta secuencia peptídica es un epítipo reconocido por distintos anticuerpos del tipo anti-MUC1.¹³ La tercera es el fragmento GSTAP (glicina-serina-treonina-alanina-prolina); recientemente, se han identificado anticuerpos que reconocen los antígenos Tn y sTn unidos a esta región.¹⁴

¹⁰ (a) Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.; Miles, D. W.; Dalziel, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313. (b) Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J. M.; Plunkett, T.; Graham, R.; Correa, I.; Miles, D.; Smith, M. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209-221. (c) Parry, A. L.; Clemson, N. A.; Ellis, J.; Bernhard, S. S. R.; Davis, B. G.; Cameron, N. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9362-9365.

¹¹ Müller, S.; Goletz, S.; Packer, N.; Gooley, A.; Lawson, A. M.; Hanisch, F. G. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24780-24793.

¹² Dziadek, S.; Griesinger, C.; Kunz, H.; Reinscheid, U. M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.

¹³ (a) Takeuchi, H.; Kato, K.; Denda-Nagai, K.; Hanisch, F.G.; Clausen, H.; Irimura, T. *J. Immunol. Methods* **2002**, *270*, 199-209. (b) Burchell, J. M.; Gendler, S. J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Girling, A.; Lewis, A.; Millis, R.; Lampert, D. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476-5482.

¹⁴ Huang, Z. H.; Shi, L.; Ma, J. W.; Sun, Z. Y.; Cai, H.; Chen, Y. X.; Zhao, Y. F.; Li, Y. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8730-8733.

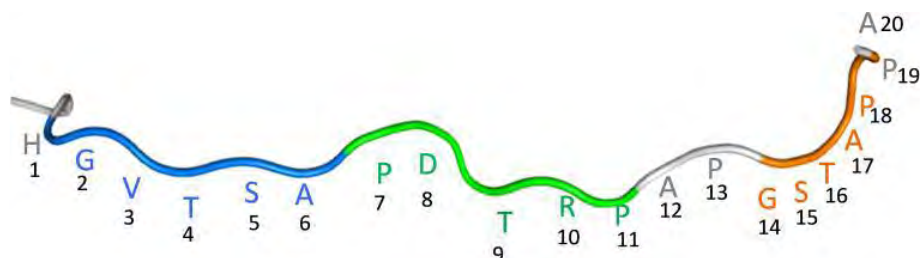


Figura 1.2 Secuencia de repetición de la MUC1 donde se muestran los distintos residuos que la constituyen así como los tres epítopos principales en distintos colores.

Desde un punto de vista estructural, el conocimiento preciso de las conformaciones preferentes adoptadas por glicopéptidos naturales así como sus dinámicas (flexibilidad o rigidez de los residuos carbohidrato o el esqueleto peptídico) es necesario para explicar la afinidad de enlace y selectividad frente a diferentes dianas biológicas. Además, la síntesis de glicopéptidos análogos a otros naturales pero estructuralmente modificados, llamados neoglicopéptidos, es un campo emergente. Estos compuestos pueden ayudarnos a completar nuestro conocimiento de diferentes procesos biológicos y también ofrecen una batería de nuevos candidatos a dianas biológicas. Una interesante aproximación para proveer de flexibilidad al fragmento carbohidrato es el uso de espaciadores. Por lo tanto, una variedad de espaciadores no naturales entre el extremo reductor del azúcar y el péptido han sido empleados, incluyendo el uso de espaciadores con grupos funcionales apropiados, para llevar a cabo conexiones selectivas.¹⁵

Mientras que en glicopéptidos naturales las interacciones del residuo carbohidrato con las dianas biológicas están, hasta cierto punto, limitadas por sus modos de presentación, otras interacciones diferentes pueden ser moduladas por la naturaleza subyacente de los aminoácidos.

En este aspecto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado numerosos trabajos en los que se ha logrado descifrar las diferencias conformacionales que presenta el antígeno Tn en función de si el aminoácido unido al carbohidrato es

¹⁵ (a) Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131-163. (b) Miller, N.; Williams, G. M.; Brimble, M. A. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, *16*, 125-132. (c) Fiore, M.; Lo Conte, M.; Pacifico, S.; Marra, A.; Dondoni, A. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 444-447. (d) Specker, D.; Wittmann, V. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *267*, 65-107. (e) Nicotra, F.; Cipolla, L.; Peri, F.; La Ferla, B.; Redaelli, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2007**, *61*, 353-398.

serina, treonina u otros (naturales o no naturales), lo que a su vez modifica su actividad biológica.¹⁶

El químico orgánico dispone de diversas metodologías sintéticas para obtener compuestos modificados de los naturales y que puedan ofrecer diferentes propiedades que los hagan interesantes a nivel terapéutico. Entre estas metodologías, dos son las empleadas en esta tesis: las reacciones de metátesis y de hidrotiolación de alquenos.

1.2 Metátesis e hidrotiolación de alquenos

Un campo fundamental dentro de la Química Orgánica es el desarrollo de nuevos métodos de síntesis, como los que nos permiten la formación de nuevos enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo de forma fácil y eficaz. En este sentido, la comunidad científica proporciona nuevos conocimientos que profundizan en la comprensión del comportamiento y la reactividad de las moléculas, lo que, unido a la imaginación del investigador, ha permitido el desarrollo de metodologías sintéticas cada vez más sofisticadas, así como su aplicación a la preparación de sistemas cada vez más complejos. Desde la síntesis de la urea,¹⁷ llevada a cabo por Wöhler en 1828 a partir de isocianato de amonio, el ácido acético (Kolbe, 1845) o la glucosa (Fischer, 1890),¹⁸ los enormes progresos que han tenido lugar en este campo se han basado en la capacidad de los químicos para desarrollar nuevos métodos de construcción de enlaces.

Como ejemplo de tres grandes metodologías clásicas de formación de enlaces carbono-carbono tenemos la reacción de Grignard,¹⁹ la cicloadición de Diels-

¹⁶ (a) Corzana, F.; Busto, J. H.; Engelsen, S. B.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864-7871. (b) Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14640-14648. (c) Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; García de Luis, M.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458-9467. (d) Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042-7058. (e) Corzana, F.; Busto, J. H.; García de Luis, M.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3863-3874. (f) Corzana, F.; Busto, J. H.; Marcelo, F.; García de Luis, M.; Asensio, J. L.; Martín-Santamaría, S.; Sáenz, Y.; Torres, C.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5319-5321. (g) Corzana, F.; Busto, J. H.; Marcelo, F.; García de Luis, M.; Asensio, J. L.; Martín-Santamaría, S.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3105-3110. (h) Corzana, F.; Fernández-Tejada, A.; Busto, J. H.; Joshi, G.; Davis, A. P.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 110-117.

¹⁷ Wöhler, F. *Ann. Chim. Phys.* **1828**, *37*, 330-334.

¹⁸ Nicolaou, K. C.; Montagnon, T. *Molecules that changed the world* **2008**, Wiley-VCH, Weinheim.

¹⁹ Richey, H. G. *Grignard Reagents: New Developments* **2000**, Wiley, Chichester.

Alder²⁰ y la reacción de Wittig,²¹ descubiertas en la primera mitad del siglo XX. Actualmente dos procesos rivalizan en importancia con los anteriores, sin menospreciar otras reacciones, como son la activación del enlace Carbono-Hidrógeno²² en las reacciones de acoplamiento²³ o la reacción de metátesis.²⁴ Esto se debe básicamente a la gran variedad de materiales de partida compatibles, y a la diversidad de transformaciones.

De esta forma, la metátesis de olefinas ha sido una de las reacciones químicas que más se ha estudiado y desarrollado en las últimas décadas, hecho que fue reconocido con la entrega del premio Nobel de Química en el año 2005 a los investigadores Y. Chauvin, R. R. Schrock y R. H. Grubbs por su contribución al avance de esta reacción.²⁵

El nombre dado a esta reacción proviene del griego: *meta*, que significa cambio, y *thesis*, que significa posición y se ajusta perfectamente a su significado, ya que podríamos definirla como la ruptura de dos dobles enlaces y la formación de otros dos nuevos, en la que se “intercambian” los sustituyentes de los alquenos (Esquema 1.1).

²⁰ (a) Diels, O.; Alder, K. *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122. (b) Diels, O.; Alder, K. *Ber.* **1929**, *62*, 2081-2087.

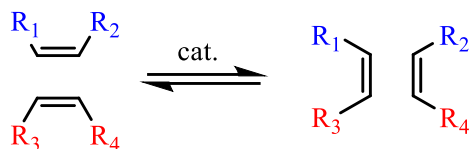
²¹ (a) Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Ber.* **1954**, *87*, 1318-1330. (b) Wittig, G.; Haag, W. *Ber.* **1955**, *88*, 1654-1666.

²² Chatt, J.; Davidson, J. M. *J. Chem. Soc.* **1965**, 843-855.

²³ (a) *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (11), volumen especial dedicado a acoplamientos con diferentes centros metálicos. (b) http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2010/ (Página activa en noviembre de 2015). (c) de Meijere, A.; Bräse, S.; Oestreich, M. *Metal catalyzed cross-coupling reactions and a more* **2014**, *Vol 1-3*, Wiley-VCH. (d) Colacot, T. *New trends in cross coupling: Theory and applications* **2014**, Royal Society of Chemistry.

²⁴ Para revisión sobre metátesis ver: (a) Grubbs, R. H.; Chang, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450. (b) Schrock, R. R. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8141-8153. (c) Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012-3043. (d) Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29. (e) Grubbs, R. H. *Handbook of Metathesis 2ª Ed* **2015**, *Vol I-III*, Wiley-VCH. (f) Grubbs, R. H. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7117-7140. (g) Astruc, D. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 42-56 (h) Carmona, E.; De la Mata, J.; Belderrain, T. R. *An. Quim.* **2005**, *104*, 70-77. (i) Avendaño, C. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **2006**, *72*, 107-137. (j) Hoveyda, A. H.; Zhungralin, A. R. *Nature* **2007**, *450*, 243-251. (k) Nevado, C. *An. Quim.* **2008**, *104*, 15-22.

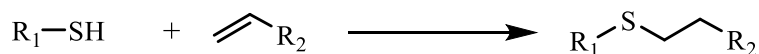
²⁵ (a) http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2005/ (Página activa en noviembre de 2015) (b) Chauvin, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3740-3747. (c) Schrock, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3478-3759. (d) Grubbs, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3760-3765.



Esquema 1.1

Esta sencilla idea se ha convertido en una herramienta muy versátil en la formación de dobles enlaces carbono-carbono, tanto para la síntesis de moléculas orgánicas complejas o productos naturales en el ámbito académico, como en el de industrias tan variadas como la farmacéutica, la biotecnológica, la alimentaria..., y sobre todo para la síntesis de nuevos polímeros con características especiales. También está encuadrada dentro de un campo en expansión, como es la química sostenible, ya que las cantidades de catalizadores metálicos necesarias para que se produzca la reacción son muy pequeñas.

Por otro lado, las reacciones que permiten generar enlaces carbono-heteroátomo están tomando fuerza, como por ejemplo las reacciones de hidrotiolación de alquenos o alquinos, sobre todo en la síntesis industrial de polímeros.²⁶ Este tipo de reacción utiliza la versatilidad que poseen los sistemas insaturados para generar enlaces carbono-azufre y formar así tioéteres con multitud de aplicaciones (Esquema 1.2).



Esquema 1.2 Esquema general para la reacción de hidrotiolación de alquenos.

La hidrotiolación de alquenos ha ganado un creciente interés por su potencial utilidad como reacción “click” (condiciones sencillas de reacción, robusted, eficiencia, tolerancia al oxígeno...), lo que permite abrir nuevas oportunidades para sustituir la reacción click catalizada mediante Cu entre azidas y alquinos, y evitar la toxicidad del cobre y el peligro inherente de trabajar con azidas.

²⁶ (a) Lowe, A. B. *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 17-36. (b) Fairbanks, B.D.; Scott, T.F.; Kloxin, C.J.; Anseth, K.S.; Bowman, C.N. *Macromolecules* **2009**, *42*, 211-217.

1.3 Conceptos relevantes en el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos

Para poder conocer la estructura de un péptido o glicopéptido es importante definir y establecer los ángulos diedros más significativos desde un punto de vista conformacional.

La estructura de la cadena peptídica viene determinada por los valores de los ángulos diedros *Phi* (Φ) y *Psi* (Ψ). Así, la rotación en torno al enlace entre el $C\alpha$ y el NH está definida por el ángulo diedro Φ , mientras que el giro en torno al enlace formado entre el $C\alpha$ y el $C=O$ está caracterizado por el ángulo Ψ (Figura 1.3).

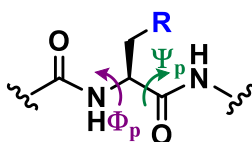


Figura 1.3 Ángulos diedros Φ/Ψ que definen la conformación del esqueleto peptídico.

Aunque existe un gran número de combinaciones para los valores que pueden tomar los ángulos Φ y Ψ , sólo algunas de ellas van a dar lugar a conformaciones energéticamente favorables. Dentro de éstas destacan la hélice- α y la hoja plegada β , también conocida como lámina β , estructuras secundarias particularmente estables que forman parte de gran número de proteínas.

En la hélice- α , los aminoácidos están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira, con unos 3.6 aminoácidos por vuelta. Cada aminoácido supone un giro de unos 100° en la hélice y los carbonos α de dos aminoácidos contiguos están separados por 1.5 \AA . Todas las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas hacia el exterior de la hélice. El hidrógeno del grupo amida de un aminoácido (i) puede establecer un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo del aminoácido ($i+4$). De esta forma, cada aminoácido (i) de la hélice forma dos enlaces de hidrógeno mediante su enlace peptídico y el enlace peptídico del aminoácido en ($i+4$) y en ($i-4$). En total son 7 enlaces de hidrógeno por vuelta, lo que estabiliza enormemente a esta estructura (Figura 1.4a).

La lámina β se forma por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos amino de una de las cadenas forman enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo de la opuesta.

Los giros son regiones de los péptidos en los que las cadenas polipeptídicas sufren un cambio de dirección durante su plegamiento. Los más importantes son los giros beta (β -turn) que se caracterizan por presentar un enlace de hidrógeno intramolecular entre el residuo CO (i) y el residuo NH ($i+3$). Hay varios tipos (I a VIII), pero los principales son β -I y β -II, que se diferencian en los ángulos phi y psi de los residuos $i+1$ e $i+2$. En los giros suelen abundar las glicinas y las prolinas.

Los valores de los ángulos para la hélice- α son $\Phi = \pm 55^\circ$ y $\Psi = \pm 45^\circ$. Para la lámina β , las cadenas paralelas toman unos valores para los ángulos de rotación de $\Phi = -119^\circ$ y $\Psi = +113^\circ$, y las cadenas antiparalelas de $\Phi = -139^\circ$ y $\Psi = +135^\circ$. Todas estas conformaciones son más estables que una estructura totalmente extendida, $\Phi = \Psi = +180^\circ$. En la Figura 1.4b se puede ver la estructura terciaria de una proteína que contiene hélices- α , láminas β y giros.

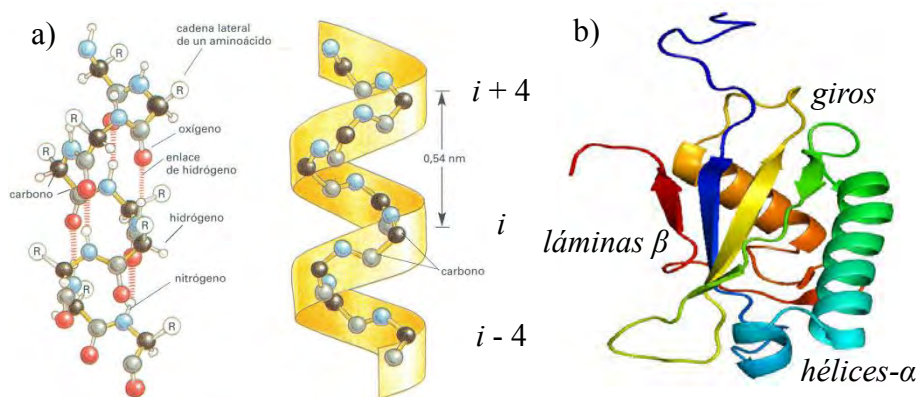


Figura 1.4 a) Esquema de una hélice- α . b) Estructura de una proteína que contiene hélices- α , láminas β y giros.

El bioquímico G. N. Ramachandran ideó un gráfico bidimensional para representar la conformación de una cadena polipeptídica de una manera más intuitiva.²⁷ En este gráfico se representan los valores de los ángulos diedros Φ y Ψ de cada uno de los residuos que componen la cadena. En el gráfico de la Figura 1.5 se muestra la representación de la hélice- α y la lámina β , además de otras conformaciones usuales, como la poliprolina (ppII).

²⁷ Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. *Adv. Prot. Res.* **1968**, 23, 283-438.

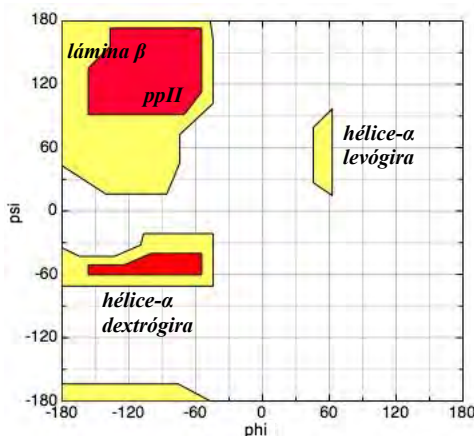


Figura 1.5 Diagrama de Ramachandran donde se representan las conformaciones de menor energía para péptidos.

Además, en nuestro caso con un espaciador carbonado entre la parte carbohidrato y aminoácido, tendremos que tener en cuenta la flexibilidad añadida por estos nuevos ángulos diedros, determinados por los ángulos χ^n (Figura 1.6). Estos ángulos van a influir en la conformación de cada residuo y, por tanto, en la de los glicopéptidos de los que forman parte.²⁸

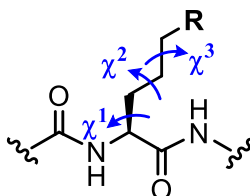


Figura 1.6 Ángulos χ^n que definen la conformación de la cadena lateral.

Por otro lado, para el caso de los glicopéptidos, existe otro elemento a tener en cuenta, la disposición espacial del carbohidrato, que va a venir dada por los dos ángulos diedros que se muestran en la Figura 1.7. El ángulo de torsión Φ está definido por la rotación en torno al enlace entre el C anomérico del carbohidrato y el O/S del enlace glicosídico, mientras que la rotación alrededor del enlace entre el O/S y el carbono exocíclico contiguo forma el ángulo Ψ . Para no confundir los ángulos diedros de la parte carbohidrato y del esqueleto peptídico, a partir de ahora

²⁸ (a) Hruby, V. J.; Li, G.; Haskell-Luevano, C.; Shenderovich, M. *Pept. Sci.* **1997**, *43*, 219-266. (b) Hruby, V. J.; Cowell, S. M.; Lee, Y. S.; Cain, J. P. *Cur. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2789.

se denominarán Φ_s y Ψ_s , haciendo referencia la 's' a *sugar*, y los de la parte peptídica serán Φ_p y Ψ_p .

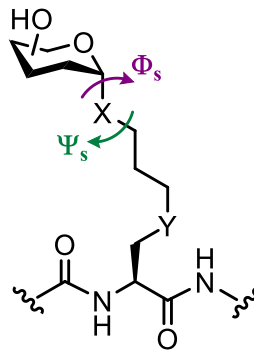


Figura 1.7 Ángulos Φ_s/Ψ_s que definen la conformación del carbohidrato.

Análogamente a lo encontrado para los ángulos Φ_p y Ψ_p de la cadena peptídica, sólo algunos de los valores posibles para Φ_s y Ψ_s van a dar lugar a conformaciones energéticamente favorables. En este contexto, cabe destacar la rigidez que normalmente presenta el ángulo diédrico Φ_s debido al efecto exo-anomérico. Para poder entender qué es el efecto exo-anomérico conviene introducir en primer lugar el efecto anomérico.

Efecto anomérico

El efecto anomérico es un efecto esteroelectrónico que describe la tendencia de los sustituyentes heteroatómicos unidos a la posición anomérica a preferir la orientación axial sobre la ecuatorial. Se explica a través de la interacción estabilizante que se da entre pares de electrones no enlazantes del O5 (orbital "n") con el orbital vacío antienlazante " σ^* " del enlace C1-O1 (Figura 1.8). Para que se dé este efecto es necesaria la disposición antiperiplanar del par de electrones y del enlace, cosa que ocurre en los enlaces glicosídicos α , conduciendo a una situación de estabilidad energética, a pesar de existir interacciones estéricas desestabilizantes 1,3-diaxiales.

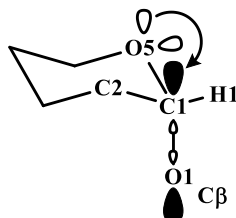


Figura 1.8 Efecto anomérico.

Efecto exo-anomérico

El término exo-anomérico se refiere a la preferencia espacial del sustituyente que ocupa la posición anomérica de tal manera que los enlaces C1-O5 y O1-C β estén en disposición gauche. Se explica a través de la interacción estabilizante que se da entre los pares de electrones no enlazantes del O1 (orbital "n") con el orbital vacío antienlazante " σ^* " del enlace C1-O5 (Figura 1.9). Para que se dé este efecto es necesario la disposición antiperiplanar del par de electrones y del enlace. Este efecto influye notablemente en las conformaciones del ángulo diedro $\Phi_s = \text{O5-C1-O1-C}\beta$. De hecho, es responsable de la rigidez conformacional que presenta, en general, Φ_s .

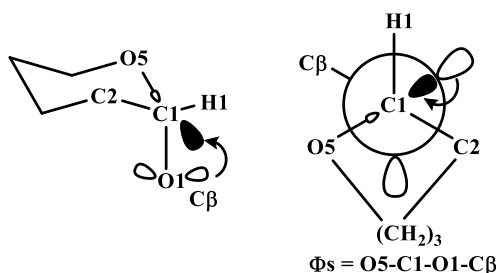
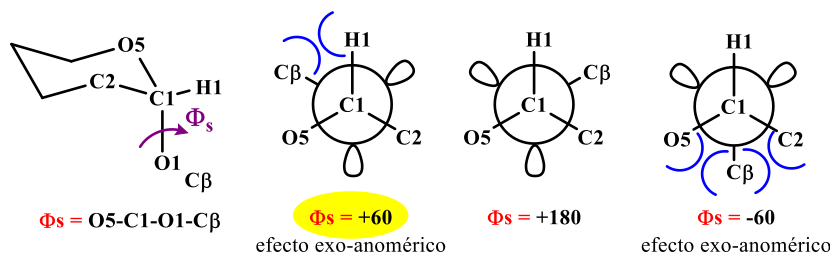
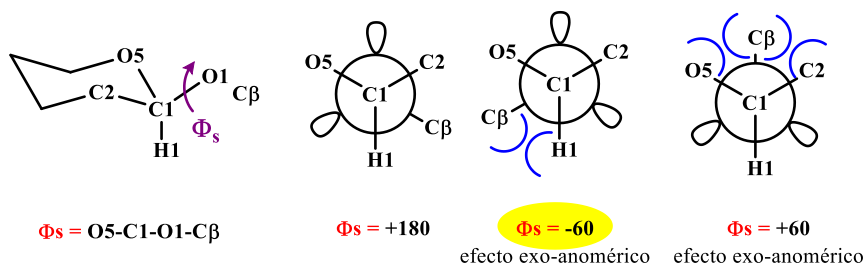


Figura 1.9 Proyección de Newman del enlace C1-O1 para mostrar el efecto exo-anomérico en un α -glicosido.

En este sentido, tanto para el enlace glicosídico α como para el enlace glicosídico β se obtienen dos conformaciones estabilizadas debido al efecto exo-anomérico, siendo Φ_s de $+60^\circ$ y -60° . Sin embargo, la situación de mínima energía para el enlace glicosídico α se corresponde con $\Phi_s = +60^\circ$ y para el enlace glicosídico β con $\Phi_s = -60^\circ$, debido a que estas conformaciones presentan menor impedimento estérico (Figura 1.10).

Enlace glicosídico α **Enlace glicosídico β** **Figura 1.10** Proyección de Newman del efecto exo-anomérico.

Por lo tanto, podemos concluir diciendo que la estructura secundaria de péptidos y glicopéptidos es función, en último término, de los valores de los ángulos diedros Φ_p , Ψ_p , χ^n , Φ_s y Ψ_s .

1.4 Química de azabiciclos

Muchos de los compuestos orgánicos con actividad fisiológica deben sus propiedades a la presencia de heteroátomos que, en muchas ocasiones, forman parte de ciclos, dando lugar a los heterociclos. Además, de los productos naturales conocidos, un gran número son también heterocíclicos. No debe extrañar, por tanto, que dentro de la bibliografía, la síntesis, el aislamiento, las propiedades... de los heterociclos sea uno de los aspectos más importantes dentro de la Química Orgánica.²⁹

Junto al oxígeno, el nitrógeno es uno de los heteroátomos más habituales en los compuestos orgánicos. Uno de los heterociclos nitrogenados más sencillos que

²⁹ (a) Gilchrist, T. L. *Heterocyclic Chemistry*, 3ª ed., Addison Wesley Longman, Harlow, 1997. (b) Joule, J. A., Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*, 4ª ed., Blackwell Publishing, London, 2000.

existe es la pirrolidina (Figura 1.11). Este compuesto cíclico de cinco miembros se encuentra en las hojas del tabaco y la zanahoria. Podemos hallarlo también como subestructura en alcaloides, fármacos, incorporado en estructuras bicíclicas o en aminoácidos como la prolina.³⁰



Figura 1.11 Estructura de pirrolidina.

La pirrolidina también forma parte de biciclos, tanto fusionados como espirociclos o estructuras con átomos puente. A continuación se describen algunas de estas estructuras en dos grupos, alcaloides y fármacos.

Alcaloides

La pirrolidina se encuentra presente en el esqueleto de la pirrolizidina.³¹ Este esqueleto ha sido encontrado en muchos alcaloides aislados de insectos y plantas. Estos compuestos y sus productos metabolizados funcionan como feromonas o agentes defensivos en insectos y tienen actividad biológica en mamíferos. Esto ha llevado al diseño de rutas sintéticas de los compuestos naturales y sus isómeros, para el estudio de la relación estructura-actividad.

Las estructuras derivadas de sistemas 7-azabicyclo[2.2.1]heptano han sido objetos de numerosas investigaciones que han dado como resultado el desarrollo de nuevos métodos para su construcción.³² Hasta hace unos 30 años, estas síntesis solo eran objeto de interés académico, ya que ningún compuesto de origen natural presentaba esta subestructura.

Sin embargo, una de las estructuras azabíclicas que más atención ha despertado en los últimos años es la epibatidina (Figura 1.12).³³ Este alcaloide, aislado por vez primera en 1974 por Daly y col. está presente en la piel de la *Epipedobates tricolor*, una rana originaria de Ecuador. Su actividad analgésica es más potente que la de la morfina, pero es tóxica en las dosis necesarias. Desde su

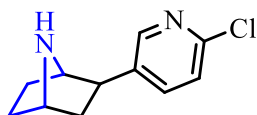
³⁰ O'Hagan, D. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 435-446.

³¹ Liddell, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 773-781.

³² Chen, Z.; Trudell, M. L. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1179-1193.

³³ Daly, J. W.; Garraffo, H. M.; Spande, T. F.; Decker, M. W.; Sullivan, J. P.; Williams, M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 131-135.

descubrimiento y caracterización estructural en 1992³⁴ se han llevado a cabo numerosas síntesis, tanto de este compuesto como de análogos. En este campo nuestro grupo de investigación ha desarrollado, tanto la síntesis total³⁵ y formal³⁶ de la epibatidina, como la síntesis de diversos análogos.³⁷



Epibatidina

Figura 1.12

Fármacos

Otra estructura azabíciclica de interés es la que podemos encontrar en fármacos como el Maraviroc³⁸ (Figura 1.13), comercializado contra el VIH desde 2007, y que se espera tenga en 2016 un nivel de negocio de 221 millones de dólares.³⁹ El Tiotropio⁴⁰ es un fármaco anticolinérgico, usado de forma inhalada como broncodilatador.

³⁴ (a) Daly, J.; Tokuyama, T.; Fujiwara, T.; Highet, R.; Karle, I. . *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 830-836. (b) Spande, T. F.; Garraffo, H. M.; Edwards, M. W.; Yeh, H. J. C.; Pannell, L.; Daly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3475-3478.

³⁵ Avenzo, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M. *Synthesis* **1998**, 1335-1338.

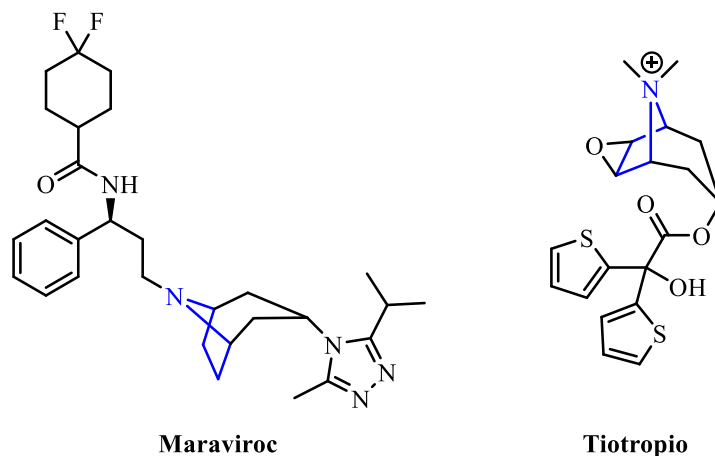
³⁶ Avenzo, A.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3999-4007.

³⁷ Avenzo, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Dordal, A.; Frigola, J.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4505-4511.

³⁸ (a) Price, D. A.; Gayton, S.; Selby, M. D.; Ahman, J.; Haycock-Lewandowski, S.; Stammen, B. L.; Warren, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5005-5007. (b) De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1297-1313.

³⁹ <http://consensus.druganalyst.com/Guest/GlaxoSmithKline/Selzentry> (Página activa en noviembre de 2015).

⁴⁰ ZuWallack, A. R.; ZuWallack, R. L. *Expert Opin. Pharmacother.* **2004**, *5*, 1827-1835.

**Figura 1.13**

1.5 Objetivos

Vista la importancia que recientemente han adquirido las estructuras basadas en sistemas azabicíclicos, el *Capítulo 2* de esta tesis doctoral se centrará en el estudio de la reactividad de metátesis de olefinas sobre sistemas 7-azanorborno, ampliando a sistemas *N*-sustituidos y con sustitución en la posición cabeza de puente.

Posteriormente se trasladará los conocimientos adquiridos para estudiar reacciones de metátesis cruzada entre sistemas basados en carbohidratos y aminoácidos para obtener así glicomiméticos elongados (*Capítulo 3*).

A partir del cuarto capítulo se pretende llevar a cabo distintos estudios de reactividad de sistemas insaturados para la obtención de compuestos con interés biológico, empleando metodologías sintéticas como la hidrotiolación de alquenos (*Capítulo 4*) o alquinos (*Capítulo 5*).

De esta manera, se podrían obtener *O*- y *S*-glicoaminoácidos que, una vez incorporados en péptidos (*Capítulo 6*), podrían ser capaces de modular el reconocimiento molecular de dichos péptidos modificados por parte de las correspondientes dianas biológicas, como pueden ser lectinas o anticuerpos.

2. Metátesis sobre sistemas 7-azanorborneno-1-sustituidos

2.1 Introducción y antecedentes

2.1.1 Mecanismo de Chauvin

2.1.2 Clasificación de los procesos de metátesis

2.1.3 Catalizadores de rutenio

2.1.4 Secuencias de metátesis de reorganización de anillo (RRM)

2.2 Objetivos

2.3 Discusión de resultados

2.3.1 Síntesis de materiales de partida

2.3.2 Reacciones de metátesis: secuencia RRM

2.4 Conclusiones



2.1 Introducción y antecedentes

Como se ha comentado anteriormente, la metátesis de olefinas ha sido una de las reacciones químicas que más se ha estudiado y desarrollado en las últimas décadas. Esta reacción puede ser interpretada como un “intercambio” de parejas, los dos alquenos, los cuales “intercambian” sus sustituyentes, generando así dos nuevos alquenos (Figura 2.1).

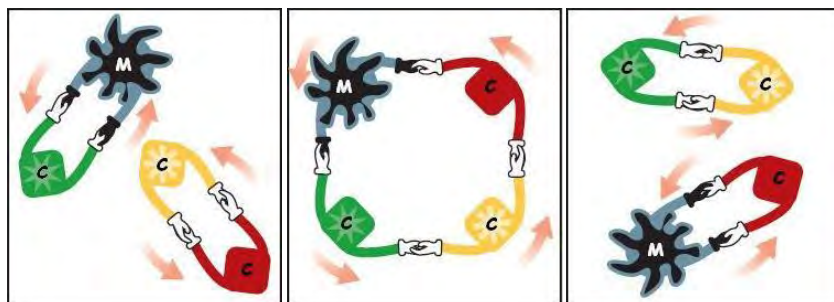
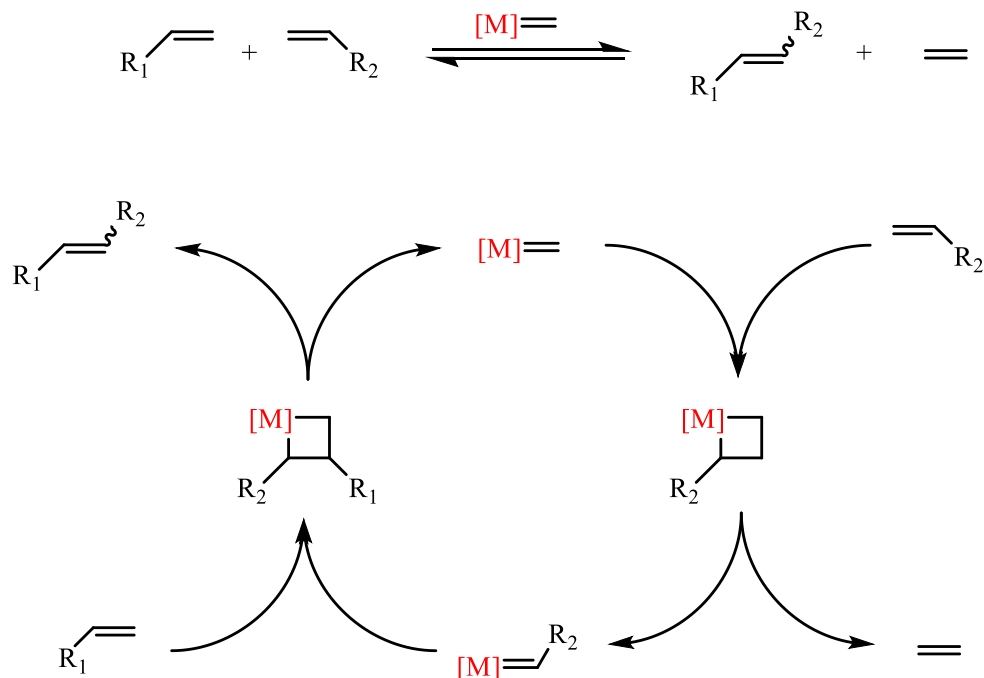


Figura 2.1

2.1.1 Mecanismo de Chauvin

En 1971, Y. Chauvin, del Instituto Francés del Petróleo y su doctorando Herisson propusieron el mecanismo que es actualmente aceptado.⁴¹ Su idea se basa en la actividad catalítica de un carbeno metálico, compuesto que presenta un doble enlace metal-carbono, que reacciona con una olefina para formar un intermedio metalociclobutano que se rompe para generar una nueva olefina y un nuevo carbeno que puede continuar la reacción. Esta idea se ilustra en el Esquema 2.1.

⁴¹ Chauvin, Y.; Herisson, J. L. *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161-176.



Esquema 2.1

Este planteamiento está basado en tres artículos publicados en 1964: la desproporción del propeno, por Banks y Bailey,⁴² la polimerización de ciclopenteno por Natta⁴³ y la caracterización de la primera estructura con doble enlace metal-carbono por Fischer.⁴⁴

Antes del mecanismo, Chauvin también publicó varios ensayos cuyos resultados no podían ser explicados por ninguna de las otras propuestas existentes,⁴⁵ como la transformación del 2-buteno en propeno catalizada por una mezcla de WCl_6 y $MeLi$, en la que se produciría primero la metilación del wolframio para dar “ $W-CH_3$ ” y éste, por una α -eliminación, se transformaría en el carbeno “ $W=CH_2$ ”, dando lugar a la metátesis.

⁴² Banks, R. L.; Bailey, G. C. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1964**, *3*, 170-173.

⁴³ Natta, G.; Dall'Asta, G.; Mazzanti, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 723-729.

⁴⁴ Fischer, E. O.; Maasböl, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 580-581.

⁴⁵ (a) Chauvin, Y. *C. R. Hebd. Seances Acad. C.* **1973**, *276*, 169-171. (b) Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1976**, *177*, 2637-2646.

En este sentido, merece la pena destacar los trabajos de Casey y Burkhard, haciendo reaccionar isobuteno con $[W(CO)_5(=CPh_2)]$ para obtener 1,1-difeniletileno,⁴⁶ los estudios llevados a cabo por Katz con carbenos de wolframio⁴⁷ o los trabajos realizados por Grubbs con el reactivo de Tebbe.⁴⁸

2.1.2 Clasificación de los procesos de metátesis

La reacción de metátesis está involucrada en una gran variedad de procesos reactivos que se pueden clasificar en función del tipo de olefinas y la transformación que tiene lugar (Esquema 2.2).

- a) Metátesis con cierre de anillo (Ring Closing Metathesis, **RCM**).⁴⁹ Se produce el cierre de un ciclo a partir de dos alquenos pertenecientes a la misma molécula. Tiene gran aplicabilidad sintética porque permite la formación de anillos difíciles de obtener por otros métodos.
- b) Metátesis con apertura de anillo (Ring Opening Metathesis, **ROM**). Es el proceso inverso al anterior; tiene lugar la apertura de un ciclo que posee un alqueno en su estructura.
- c) Metátesis cruzada (Cross Metathesis, **CM**).⁵⁰ La reacción se produce entre dos alquenos que pertenecen a moléculas diferentes. El principal problema es el control de la selectividad, ya que la reacción puede tener lugar entre moléculas de una misma olefina (homodimerización) o formarse productos con los sustituyentes no deseados.

⁴⁶ Casey, C. P.; Burkhardt, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7808-7809.

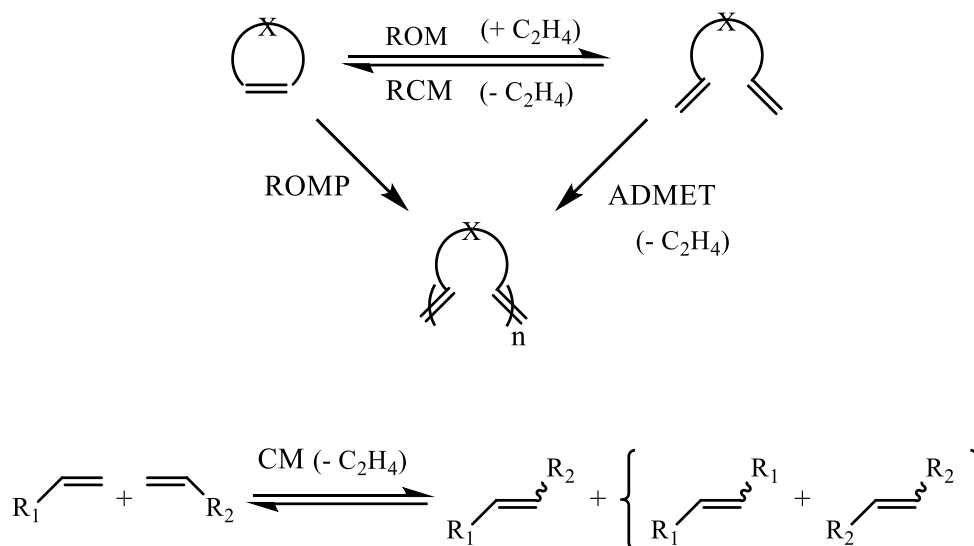
⁴⁷ (a) Katz, T. J.; McGinnis, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1592-1594. (b) McGinnis, J.; Katz, T. J.; Hurwitz, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 605-606. (c) Katz, T. J.; Lee, S. J.; Acton, N. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 4247-4250. (d) Katz, T. J.; Lee, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 422-424.

⁴⁸ (a) Howard, T. R.; Lee, J. B.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6876-6878. (b) Lee, J. B.; Ott, K. C.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *104*, 7491-7496.

⁴⁹ (a) Armstrong, S. K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 371-388. (b) Yet, L. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2963-3008. (c) Deiters, A.; Martin, S. F. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2199-2238. (d) Nakamura, I.; Yamamoto, Y. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2127-2198. (e) Ghosh, S.; Ghosh, S.; Sarkar, N. *J. Chem. Sci.* **2006**, *118*, 223-235. (f) Monfette, S.; Fogg, D. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3783-3816.

⁵⁰ (a) Schuster, M.; Lucas, N.; Blechert, S. *Chem Commun.* **1997**, 823-824. (b) Brümmer, O.; Rückert, A.; Blechert, S. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 441-444. (c) Blackwell, H. E.; O'Leary, D. J.; Chatterjee, A. K.; Washenfelder, R. A.; Bussmann, D. A.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 58-71. (d) Vernall, A. J.; Abell, A. D. *Aldrichimica Acta* **2003**, *36*, 93-105. (e) Connon, S. J.; Blechert, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1900-1923.

- d) Polimerización por metátesis con apertura de anillo (Ring Opening Metathesis Polimerization, **ROMP**).⁵¹ En este caso se produce la apertura de un ciclo que posee un doble enlace seguido de polimerización. Está favorecido termodinámicamente para anillos tensionados.
- e) Polimerización por metátesis de dienos acíclicos (Acyclic Diene METathesis polimerization, **ADMET**).⁵² Consiste en la polimerización de un dieno acíclico a la vez que se libera una olefina de bajo peso molecular (etileno si los dobles enlaces son terminales) cada vez que se produce la reacción. Este proceso compite con la RCM.



Esquema 2.2

De todas ellas, las más utilizadas han sido la RCM y ROMP; sin embargo, también encontramos en la bibliografía reacciones tándem o dominó. Su importancia se debe al ahorro de tiempo, ya que reducen el número de etapas de manipulación (aislamiento, purificación, consumo de disolventes,...), obteniendo en una sola etapa

⁵¹ (a) Buchmeiser, M. R. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1565-1604. (b) Slugovc, C. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1283-1297. (c) Bielawski, C. W.; Grubbs, R. H. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1-29.

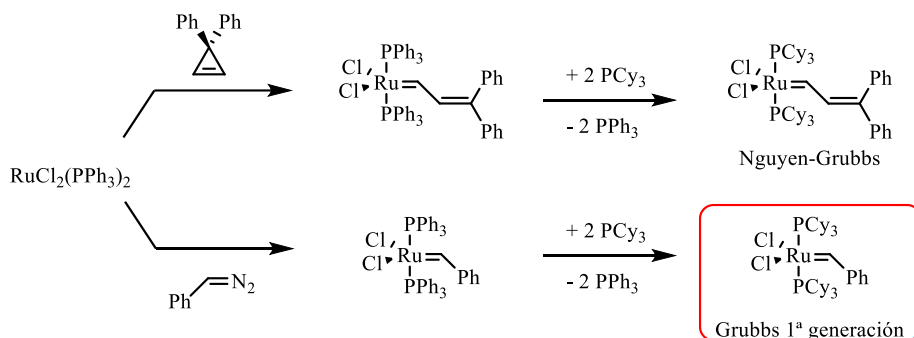
⁵² Ivin, K. J.; Mol, J. C. *Olefin Metathesis and Metathesis Polymerization* **1997**, Academic: London.

moléculas complejas con estereoquímica controlada. Podemos ver por ejemplo: ROM-RCM,⁵³ ROM-CM-RCM,⁵⁴ CM-RCM,⁵⁵ ROM-CM⁵⁶ o ROM-RCM-CM.^{56c,d}

2.1.3 Catalizadores de rutenio

El primer catalizador de rutenio estructuralmente bien caracterizado fue sintetizado en 1992 por Nguyen y Grubbs (Esquema 2.3).⁵⁷ Su actividad no es muy elevada y su síntesis no podía ser escalada más allá de gramos, pero exhibía una gran tolerancia frente al oxígeno y al agua.

En 1995 se realizó la síntesis del catalizador conocido como *Grubbs 1ª generación* (Esquema 2.3).⁵⁸ Partiendo de $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ y utilizando derivados diazoalcanos, permitía su producción a gran escala (se lleva a cabo a escala de 10 Kg. aproximadamente) y por tanto, su comercialización. Este hecho posibilitó su uso generalizado en investigación.



Esquema 2.3

- ⁵³ (a) Adams, J. A.; Ford, J. G.; Stamatos, P. J.; Hoveyda, A. H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9690-9696. (b) Voigtmann, U.; Blechert, S. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3971-3974. (c) Stragies, R.; Blechert, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9584-9591. (d) Cefalo, D. R.; Kiely, A. F.; Wucher, M.; Jamieson, J. Y.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3139-3140. (e) Takao, K.-i.; Nanamiya, R.; Fukushima, Y.; Namba, A.; Yoshida, K.; Tadano, K.-i. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5582-5585.
- ⁵⁴ (a) Arjona, O.; Csaky, A. G.; Leon, V.; Medel, R.; Plumet, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 565-567. (b) Arjona, O.; Cabas, M. J.; Nieto-Rubio, J.; Querejeta, A. *Heterocycles* **2006**, *68*, 2079-2086.
- ⁵⁵ (a) Smith, A. B.; Adams, C. M.; Kozmin, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 990-991. (b) Furstner, A.; Thiel, O. R.; Ackermann, L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 449-451.
- ⁵⁶ (a) La, D. S.; Sattely, E. S.; Ford, J. G.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7767-7778. (b) Michaut, M.; Parrain, J. L.; Santelli, M. *Chem. Commun.* **1998**, 2567-2568. (c) Arjona, O.; Csaky, A. G.; Medel, R.; Plumet, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1380-1383. (d) Jeon, K. O.; Rayabarapu, D.; Rolfe, A.; Volp, K.; Omar, I.; Hanson, P. R. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4992-5000.
- ⁵⁷ Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974-3975.
- ⁵⁸ Schwab, P.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *114*, 100-110.

Los estudios llevados a cabo sobre este catalizador, condujeron a diversas modificaciones y cambios de ligandos. El más importante fue la sustitución de una de las fosfinas por ligandos carbeno *N*-heterocíclicos (NHC, del inglés *Nitrogen Heterocyclic Carbene*).⁵⁹ Los ligandos NHC tienen un comportamiento parecido al de las fosfinas, pero poseen un carácter σ -dador mayor, lo que favorece la disociación de la fosfina, primer paso del mecanismo. El inconveniente inicial que presentaba era su dificultad en la preparación y aislamiento, debido a su alta reactividad. Este problema fue resuelto por Arduengo y col., quienes los estabilizaron uniendo al carbeno diferentes grupos voluminosos. Este cambio dio lugar al catalizador de Grubbs de 2^a generación,⁶⁰ que presenta una mayor actividad en la metátesis (Figura 2.2).

Otra modificación destacada ha sido la inclusión por parte de Hoveyda de ligandos isopropoxi-bencilideno quelantes.⁶¹ Sus catalizadores tienen actividades comparables a las del catalizador de Grubbs de segunda generación y son especialmente útiles en metátesis de alquenos polisustituídos, metátesis cruzada selectiva y con olefinas atractoras de electrones.

Posteriormente, ante la baja reactividad de olefinas π -conjugadas, como enonas y ésteres acrílicos, R. H. Grubbs ha desarrollado otro catalizador basado en rutenio que presenta un carbeno similar al desarrollado junto a Nguyen, capaz de catalizar eficientemente la reacción de metátesis de olefinas 1,1-disustituídas.⁶²

⁵⁹ (a) Arduengo, A. J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 913-921. (b) Herrmann, W. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1290-1309. (c) Díez-González, S. *N-Heterocyclic carbenes: From laboratory curiosities to efficient synthetic tools* **2011**, Royal Society of Chemistry. (d) Glorius, F. *N-Heterocyclic carbenes in transition metal catalysis* **2007**, Springer. (e) Nolan, S.P. *N-Heterocyclic Carbenes: Effective tools for organometallic synthesis* **2014**, Wiley-VCH.

⁶⁰ (a) Scholl, M.; Trnka, T. M.; Morgan, J. P.; Grubbs, R. H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2247-2250. (b) Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953-956. (c) Trnka, T. M.; Morgan, J. P.; Sanford, M. S.; Wilhelm, T. E.; Scholl, M.; Choi, T. L.; Ding, S.; Day, M. W.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2546-2558. (d) Love, J. A.; Sanford, M. S.; Day, M. W.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10103-10109. (e) Chatterjee, A. K.; Choi, T. L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360-11370.

⁶¹ (a) Kingsbury, J.S.; Harrity, J. P. A.; Bonitatebus, P. J.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 791-799. (b) Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179. (c) Grela, K.; Harutyunyan, S.; Michrowska, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4038-4040.

⁶² Chatterjee, A.K.; Morgan, J.P.; Scholl, M.; Grubbs, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3783-3784.

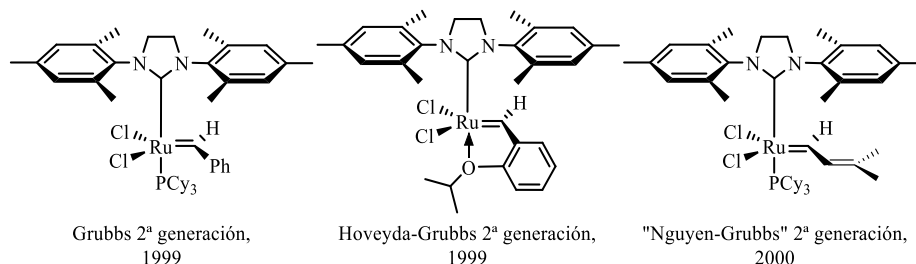


Figura 2.2

En los últimos años, Grubbs ha descrito una serie de nuevos catalizadores que son capaces de generar selectivamente los alquenos Z. Estos catalizadores se basan en complejos ditiolato-rutenio (Figura 2.3a) o en complejos que involucran un grupo adamantilo y un grupo nitrato, de los cuales dos de los más recientes se muestran en la Figura 2.3b.⁶³

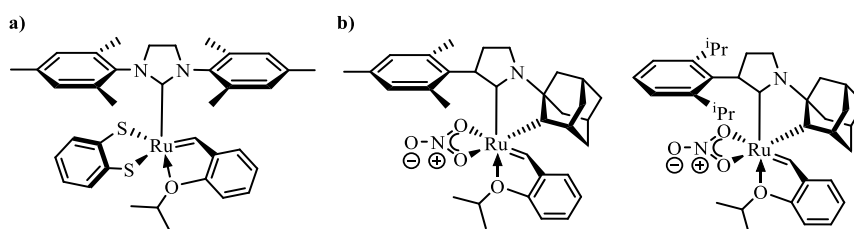


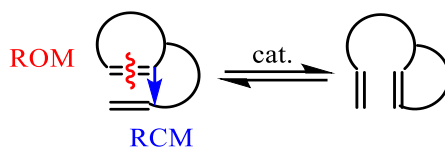
Figura 2.3 Nuevos catalizadores Z-selectivos.

2.1.4 Secuencias de metátesis de reorganización de anillo (RRM)

Entre las diferentes posibilidades de combinación de las reacciones de metátesis, una de las más interesantes y estudiadas en los últimos años ha sido la que se denomina metátesis de reorganización de anillo (Ring-Rearrangement Metathesis, RRM),⁶⁴ dada su utilidad para la formación de carbociclos y heterociclos con la estereoquímica controlada. En su versión más sencilla, esta reacción implica la reacción intramolecular entre un alqueno endocíclico, que se abre, para cerrarse con otro doble enlace exocíclico presente en la molécula, lo que equivale a una secuencia ROM-RCM (Esquema 2.4).

⁶³ Hoveyda, A. H. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4763–4792.

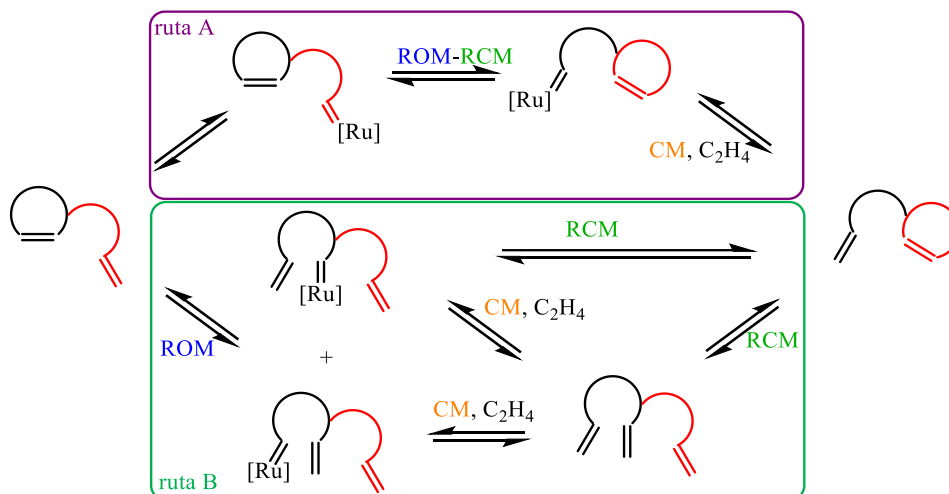
⁶⁴ (a) Grubbs, R. H. *Handbook of Metathesis* **2003**, Wiley-VCH, Weinheim (Capítulo 2.4), 151–175. (b) Holub, N.; Blechert, S. *Chem Asian J.* **2007**, *2*, 1064–1082. (c) Vincent, G.; Karila, D.; Khalil, G.; Sancibrao, P.; Gori, D.; Kouklovsky, C. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9358–9365. (d) Lam, J. K.; Pham, H. V.; Houk, K. N.; Vanderwal, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17585–17594.



Esquema 2.4

El equilibrio se desplaza por una combinación de factores termodinámicos (pérdida de tensión de anillo, posición de los sustituyentes o pérdida de un alqueno volátil) y factores cinéticos, como la formación de un carbeno menos reactivo. Una de las características más importantes de esta secuencia es la de transferir la información estereoquímica de los reactivos a los productos, por lo que ha sido ampliamente utilizada en la síntesis de compuestos naturales.

Mecanísticamente, esta secuencia también dispone de varios caminos de reacción (Esquema 2.5). Se asume habitualmente que para las olefinas cíclicas tensionadas el primer paso es la apertura del ciclo (ruta B).



Esquema 2.5 Posible mecanismo RRM con etileno.

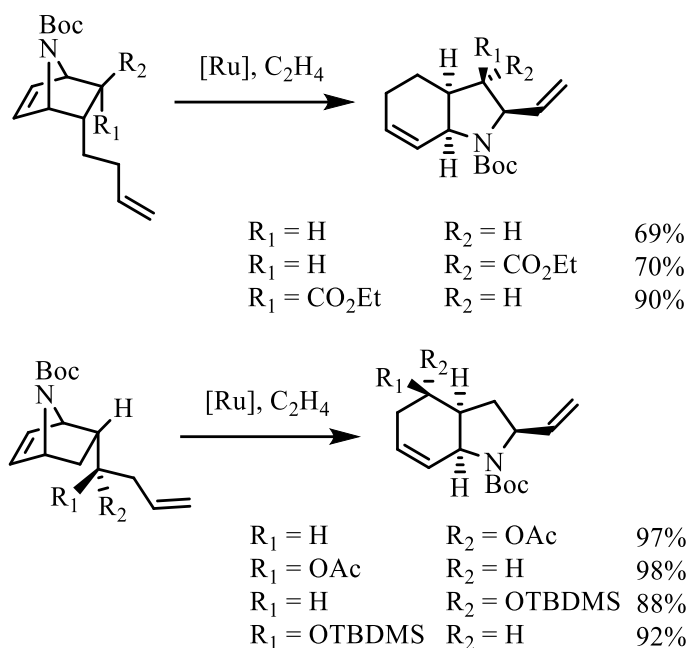
El primer ejemplo de estas secuencias se debe a Grubbs que, en 1996, llevó a cabo secuencias RCM-ROM-RCM.⁶⁵ Un año más tarde, el grupo de Hoveyda llevó

⁶⁵ Zuercher, W. J.; Hashimoto, M.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6634-6640.

a cabo reacciones dominó ROM-RCM orientadas a la síntesis de cromenos.⁶⁶ Estos primeros trabajos ya ponían de manifiesto la importancia de las condiciones de reacción utilizadas y cómo pequeños cambios en la estructura afectaban a la reactividad.

Respecto a las condiciones de reacción, los autores mostraban la importancia de trabajar en condiciones diluidas, para evitar reacciones intermoleculares de formación de dímeros y cómo la presencia de etileno en la reacción mejoraba los rendimientos, ya que la reacción del dímero con etileno regeneraba el monómero.

Ejemplos de RRM presentes en la bibliografía partiendo de estructuras 7-azanorborneno se limitan a dos bastante recientes. Por un lado aparece un trabajo del grupo de Rainier,⁶⁷ donde se describe la síntesis de derivados hexahidroindolinas mediante esta metodología (Esquema 2.6). Las cargas de catalizador de *Grubbs de 2ª generación* oscilan entre 5 y 15%.

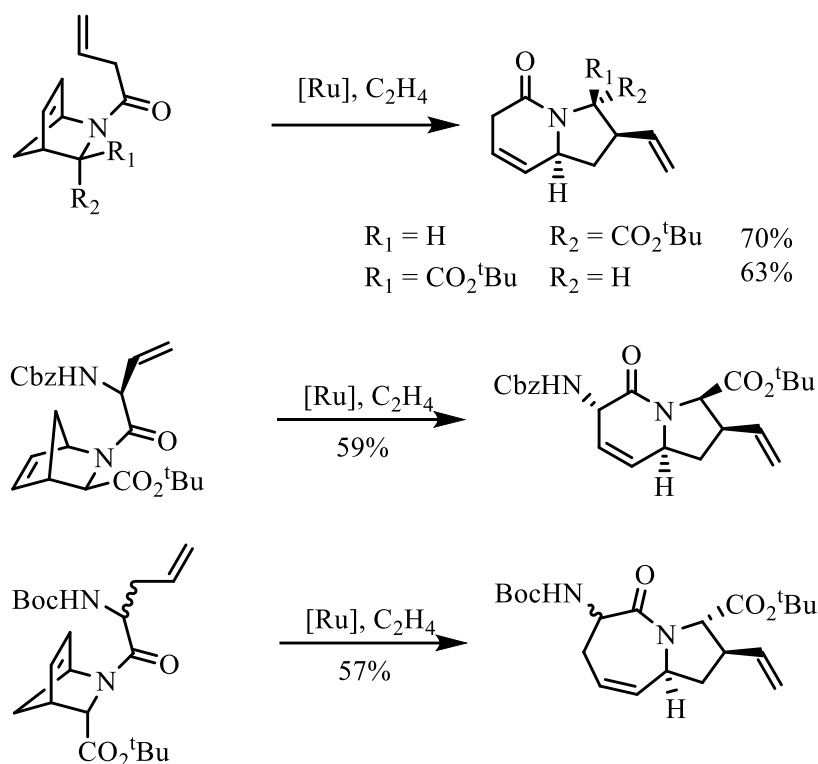


Esquema 2.6

⁶⁶ Harrity, J. P. A.; Visser, M. S.; Gleason, J. D.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1488-1489.

⁶⁷ Liu, Z.; Rainier, J. D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 459-462.

El segundo de los ejemplos se debe a Maison y colaboradores.⁶⁸ Su interés se centra en la síntesis de azabiciclo[x.3.0]alquenos, pudiendo ser sintetizados a partir de sistemas 2-azanorborneno o 7-azanorborneno. Partiendo de diferentes 2-azanorbornenos, en los que están presentes estructuras peptídicas, se obtienen las estructuras objetivo. En todos los casos los autores utilizan etileno, con un 10% de catalizador de Grubbs y a reflujo de CH₂Cl₂, consiguiendo rendimientos aceptables (Esquema 2.7).

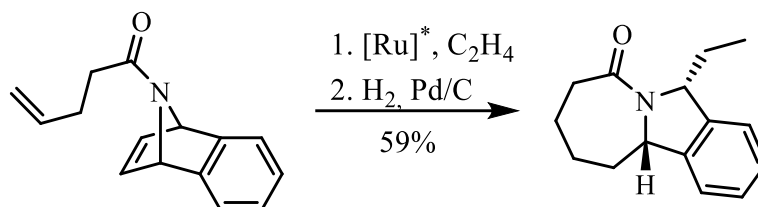


Esquema 2.7

El mismo grupo ha llevado a cabo la secuencia ROM-RCM para lograr la desimetrización de 7-azabicycloalquenos en condiciones similares, pero empleando un catalizador quiral de rutenio (Esquema 2.8).⁶⁹

⁶⁸ Buchert, M.; Meinke, S.; Prenzel, A. H. G. P.; Deppertmann, N.; Maison, W. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5553-5556.

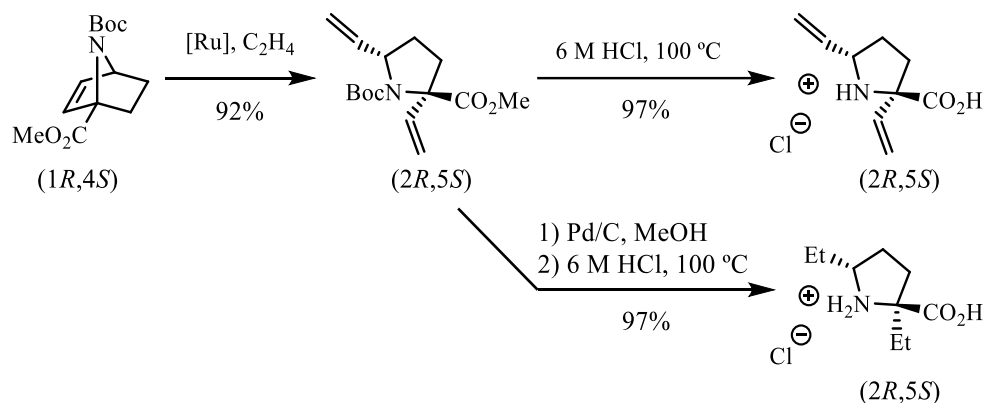
⁶⁹ Maison, W.; Büchert, M.; Deppertmann, N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2007**, *3*, No 48.



Esquema 2.8

En los últimos años, en nuestro grupo de investigación, se ha estudiado en profundidad sistemas 7-azanorborneno-1-sustituídos.⁷⁰

Se han llevado a cabo reacciones de apertura de anillo sobre sustratos derivatizados, logrando así obtener derivados de prolina cuaternarios, enantioméricamente puros (Esquema 2.9).⁷¹



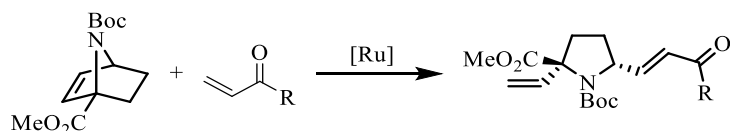
Esquema 2.9

De igual manera se llevó a cabo reacciones ROM-CM, enfrentado el sustrato de estudio a diversos acrilóil derivados, lo que nos proporcionó una vía de obtención de interesantes α -aminodiácidos y derivados de pirrolizina que incorporan estereocentros cuaternarios (Esquema 2.10).⁷²

⁷⁰ Tesis Doctoral de Javier Carreras Pérez-Aradros 2009, Universidad de La Rioja.

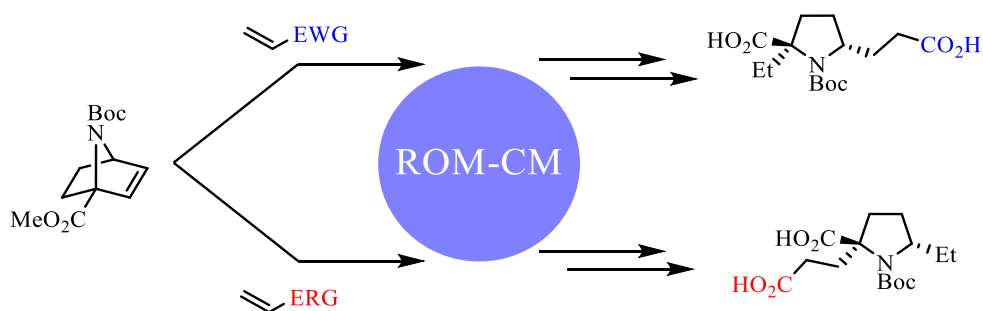
⁷¹ Carreras, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. *Synthesis* 2010, 3353-3357.

⁷² Carreras, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. *Org. Lett.* 2007, 9, 1235-1238.



Esquema 2.10

También se estudió estas reacciones entre el derivado 7-azanorborno-1-sustituido frente a diferentes olefinas, pudiendo modular la regioselectividad en el proceso de metátesis en función de las características electrónicas (electroatractoras o electrodonadoras) de las olefinas acíclicas, tal y como se muestra en el Esquema 2.11.⁷³

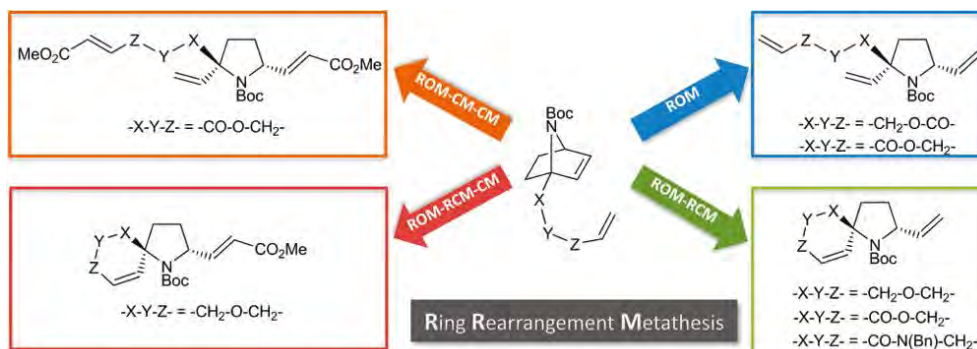


Esquema 2.11 Secuencias de metátesis ROM-CM en función del grupo electro atractor (EWG) o electro donador (ERG).

Por último, se llevaron a cabo reacciones de metátesis en sustratos 7-azabíclicos donde la posición cabeza de puente fue funcionalizada con un doble enlace exocíclico. Se estudiaron las secuencias ROM-RCM y ROM-RCM-CM,⁷⁴ obteniendo estructuras espirocíclicas nitrogenadas (Esquema 2.12).

⁷³ Carreras, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1736-1739.

⁷⁴ Carreras, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3381-3391.



Esquema 2.12

2.2 Objetivos

Las subestructuras pirrolizidina, indolizidina y pirrolo[1,2-a]azepina están presentes en un alto número de compuestos azabicíclicos, de forma abundante en la naturaleza (Figura 2.4).

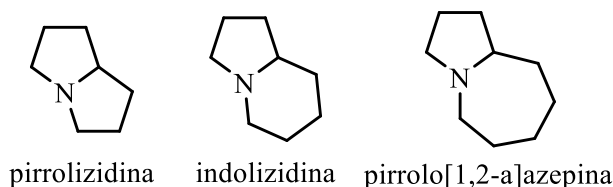


Figura 2.4

El esqueleto pirrolizidina (1-azabiciclo[3.3.0]octano) se encuentra en los llamados alcaloides pirrolizidínicos,⁷⁵ que han sido ampliamente estudiados por su potente actividad inhibitoria de glicosidasas. Además, los miembros de esta familia de alcaloides poseen un amplio rango de actividades biológicas que incluye actividad antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatoria, carcinogénica y hepatotóxica. Por estas razones, los alcaloides de pirrolizidina son buenos candidatos como nuevos

⁷⁵ (a) Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680. (b) Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265-295. (c) Asano, N.; Kato, A.; Watson, A. A. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 145-154. (d) Liddell, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 441-447. (e) Liddell, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 773-781. (f) Brandi, A.; Cardona, F.; Cicchi, S.; Cordero, F. M.; Goti, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7808-7821. (g) Majik, M. S.; Tilve, S. G. *Synthesis* **2012**, 2673-2681.

fármacos para tratar múltiples enfermedades. El esqueleto indolizidina⁷⁶ (1-azabicyclo[4.3.0]nonano), especialmente en su forma polihidroxilada, está presente en estructuras de alcaloides como swainsonina, un alcaloide indolizidina que inhibe α -manosidasas y castanospermina, un alcaloide polihidroxilado que inhibe la α -glucosidasa. La subestructura pirrolo[1,2-a]azepina (1-azabicyclo[5.3.0]decano) está presente en muchos de los alcaloides con estructura única de *Stemona*, que ha suscitado la atención debido a sus propiedades químicas y biológicas.⁷⁷

En particular, las subestructuras pirrolizidina, indolizidina y pirrolo[1,2-a]azepina, que están presentes en lactamas bicíclicas insaturadas fusionadas, han sido sintetizadas usando una metodología basada en RCM partiendo de derivados de prolina. Estas lactamas son de interés como un nuevo tipo de sustitutos de dipéptidos.⁷⁸

Además, el esqueleto pirrolizidina aparece en aminoácidos azabicyclo[3.3.0]octanona, particularmente en derivados del ácido 3-amino-2-oxo-1-azabicyclo[3.3.0]octano-8-carboxílico (Figura 2.5),⁷⁹ que han sido empleados como peptidomiméticos, sustitutos de dipéptidos.

⁷⁶ (a) Asano, N. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology* (Eds. E. Fattorusso and O. Tagliatela-Scafati) **2008**, Wiley-VCH, Weinheim, 111-138. (b) Michel, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 139-165 y revisiones anuales anteriores sobre los alcaloides indolizidina and quinolizidina. (c) Gómez, L.; Garrabou, X.; Joglar, J.; Bujons, J.; Parella, T.; Vilaplana, C.; Cardona, P. J.; Clapés, P. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6309-6321. (d) Brogini, G.; Zecchi, G. *Synthesis* **1999**, 905-917.

⁷⁷ (a) Pilli, R. A.; Ferreira de Oliveira, M. C. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 117-127. (b) Cid, P.; Closa, M.; de March, P.; Figueredo, M.; Font, J.; Sanfeliu, E.; Soria, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4215-4233. (c) Alibés, R.; Blanco, P.; Casas, E.; Closa, M.; de March, P.; Figueredo, M.; Font, J.; Sanfeliu, E.; Álvarez-Larena, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3157-3167. (d) Nath, M.; Mukhopadhyay, R.; Bhattacharjya, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 317-320. (e) Pilli, R. A.; Rosso, G. B.; Ferreira de Oliveira, M. C. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1908-1937. (f) Wang, Y.; Zhu, L.; Zhang, Y.; Hong, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2787-2790.

⁷⁸ (a) Beal, L. M.; Liu, B.; Chu, W.; Moeller, K. D. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10113-10125. (b) Grossmith, C. E.; Senia, F.; Wagner, J. *Synlett* **1999**, 1660-1662. (c) Zaminer, J.; Brockmann, C.; Huy, P.; Opitz, R.; Reuter, C.; Beyermann, M.; Freund, C.; Mueller, M.; Oschkinat, H.; Kuehne, R.; Schmalz, H.-G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7111-7115. (d) Hoffmann, T.; Waibel, R.; Gmeiner, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3361-3364. (e) Arisawa, M.; Takezawa, E.; Nishida, A.; Mori, M.; Nakagawa, M. *Synlett* **1997**, 1179-1180. (f) Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Gluckman, P. D. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1847-1850. (g) Belvisi, L.; Colombo, L.; Manzoni, L.; Potenza, D.; Scolastico, C. *Synlett* **2004**, 1449-1471. (h) Mutlak, H.; Hassan, A. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 9100-9106.

⁷⁹ (a) Dietrich, E.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6988-6996. (b) Salvati, M.; Cordero, F. M.; Pisaneschi, F.; Bucelli, F.; Brandi, A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8836-8847. (c) F. M. Cordero, F. Pisaneschi, K. Meschini Batista, S. Valenza, F. Machetti, A. Brandi, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 856-867. (d) M. H. V. Ramana Rao, E. Pinyol, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 736-743.

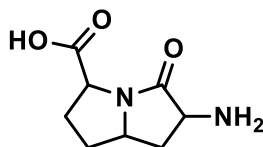
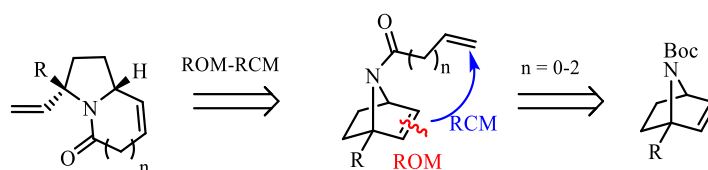


Figura 2.5

En esta tesis, se desarrolla un acceso general a una variedad de derivados de 7-azanorborneno-1-sustituidos y su uso en una nueva y eficiente secuencia de RRM tipo II'.⁸⁰ Esta clase de proceso RRM está definido como tipo II' porque estos compuestos azabicíclicos con varios patrones olefinicos exocíclicos en la posición del nitrógeno podrían conducir a unos sistemas fusionados lineales, análogos a reacciones RRM de derivados de 8-oxabicyclo[3.2.1]octano que condujo a 4-pironas bicíclicas fusionadas (Esquema 2.13).⁸⁰ Esta estrategia abre el camino a la síntesis de nuevos derivados de pirrolizidina, indolizidina y pirrolo[1,2-a]azepina que contienen un estereocentro cuaternario.



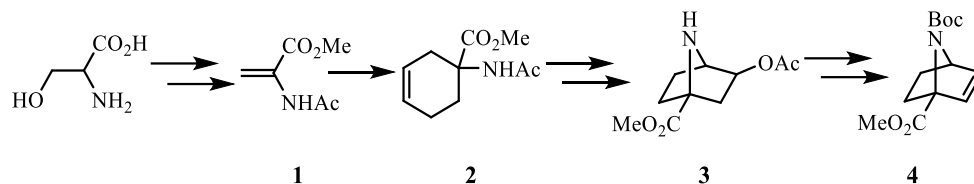
Esquema 2.13 Proceso RRM para sistemas 7-azanorbornenos-1-sustituidos.

2.3 Discusión de resultados

2.3.1 Síntesis de materiales de partida

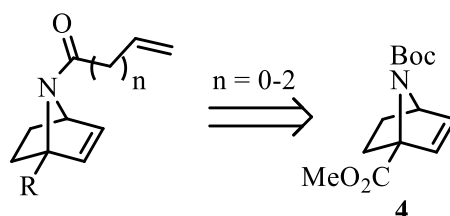
La síntesis del *N*-Boc-7-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-1-carboxilato de metilo **4** se llevó a cabo siguiendo la metodología que ya se había empleado anteriormente en nuestro grupo de investigación.^{71,72} A partir de serina comercial se obtuvo 2-acetamidoacrilato de metilo (AAM) **1**, sobre el cual se realizó una cicloadición de Diels-Alder **2**, seguida de una ciclación intramolecular para obtener el precursor de 7-azanorborneno **3** y posteriormente obtener el *N*-Boc-7-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-1-carboxilato de metilo **4** por eliminación de AcOH (Esquema 2.14).

⁸⁰ Usher, L. C.; Jiménez, M. E.; Ghiviriga, I.; Wright, D. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4560-4562.



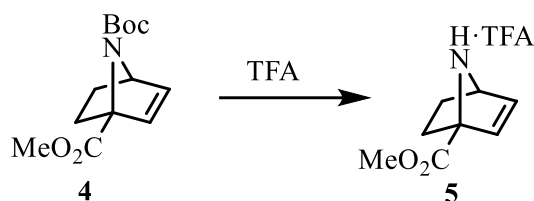
Esquema 2.14

Para llevar a cabo la secuencia ROM-RCM detallada en el Esquema 2.13, e intentar la síntesis de nuevos biciclos nitrogenados, el primer objetivo es la síntesis de derivados del azanorboneno 4 que presenten un doble enlace exocíclico en la posición nitrogenada (Esquema 2.15).



Esquema 2.15

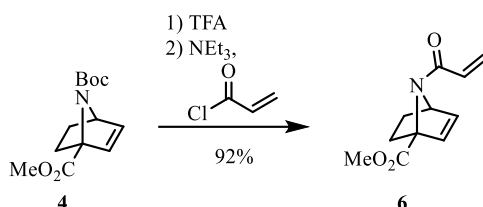
La primera etapa a seguir es la hidrólisis del grupo protector de la amina, en este caso *terc*butoxicarbonilo (Boc). Empleando ácido trifluoroacético en diclorometano y a temperatura ambiente, se obtiene el trifluoroacetato del azanorboneno sobre el cual se va a introducir diferentes alquenos que van a dar lugar a las secuencias RRM (Esquema 2.16).



Esquema 2.16

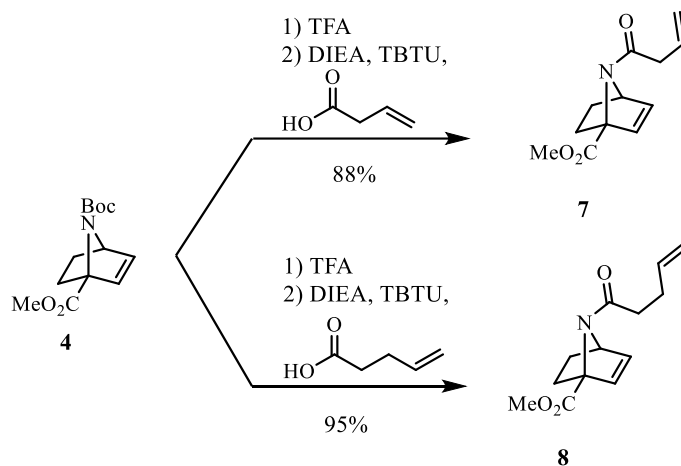
Sobre esta sal se realizaron varias reacciones para obtener los precursores. En primer lugar se empleó cloruro de acrilóilo en presencia de trietilamina, bajo

atmósfera de argón, obteniendo la acrilamida **6** con un rendimiento global de las dos etapas del 92% (Esquema 2.17).



Esquema 2.17

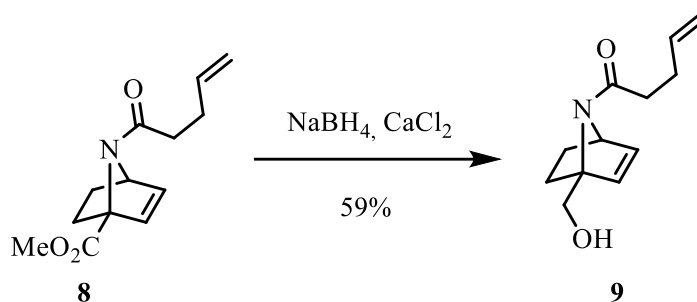
Para extender la cadena uno o dos carbonos más, se emplearon los correspondientes ácidos carboxílicos que se activaron mediante el empleo de agentes de acoplamiento. En concreto, se empleó tetrafluoroborato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio (TBTU) como agente de acoplamiento, en presencia de diisopropiletilamina (DIEA) y los correspondientes ácidos, ácido 3-butenóico y ácido 4-pentenóico, respectivamente. De esta manera se obtuvieron sendos precursores **7** y **8**, con rendimientos del 88% y 95%, respectivamente (Esquema 2.18).



Esquema 2.18

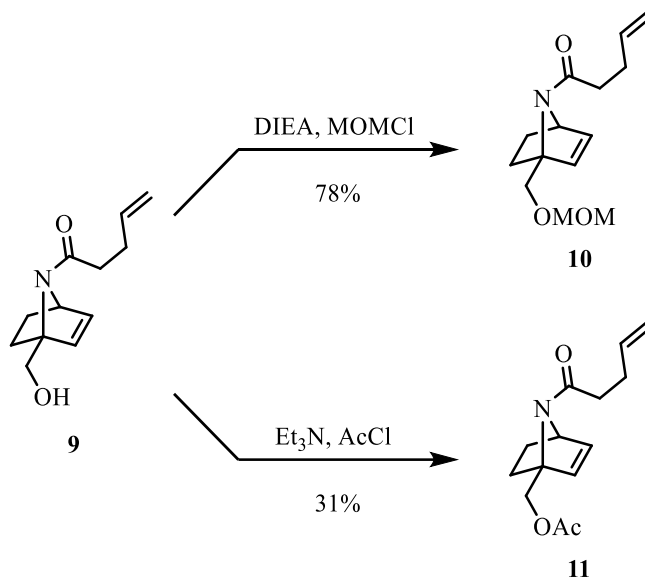
Para evaluar la influencia del sustituyente en posición cabeza de puente en la regioselectividad del proceso RRM se sintetizaron otros tres precursores diferentes. Para ello, se realizó la reducción del éster metílico del compuesto **8** con

$\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$ formado *in situ* a partir de NaBH_4 y CaCl_2 en una mezcla EtOH/THF, tal como había descrito nuestro grupo para un sistema similar.⁷⁴ De esta forma se obtuvo el alcohol **9**, con un rendimiento moderado (Esquema 2.19).



Esquema 2.19

La protección de este alcohol por tratamiento con clorometil metil éter (MOMCl) y DIEA en CH_2Cl_2 nos condujo al compuesto **10**. Mientras que el compuesto **11** fue obtenido con rendimiento bajo mediante la acetilación del alcohol **9**, empleando cloruro de acetilo en presencia de Et_3N en CH_2Cl_2 (Esquema 2.20).

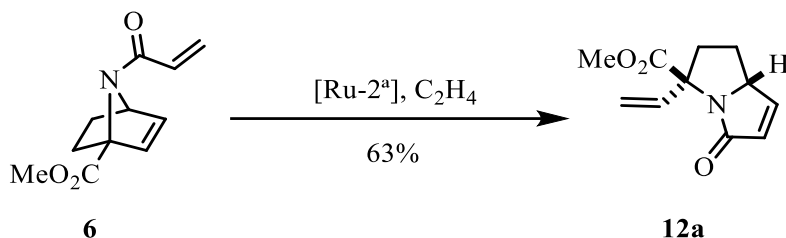


Esquema 2.20

2.3.2 Reacciones de metátesis: secuencia RRM

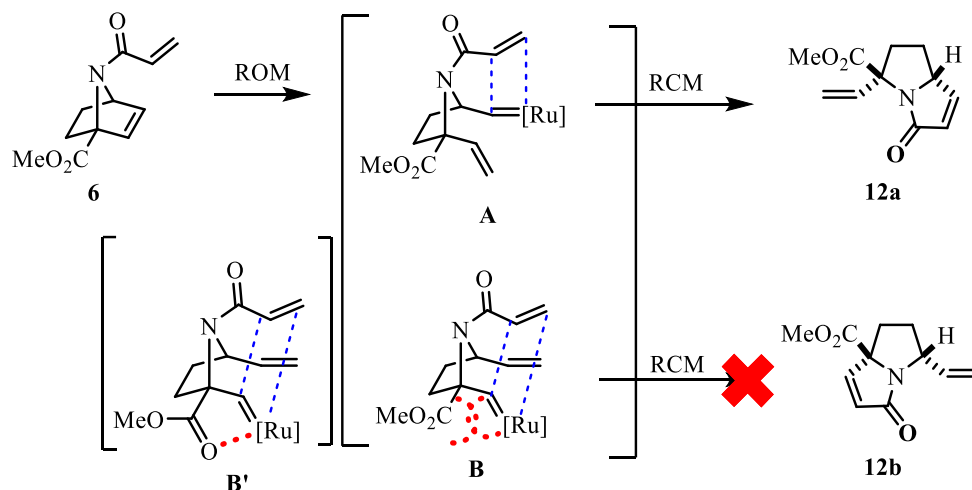
Una vez que se llevó a cabo la síntesis de los precursores (**6** - **11**) se pasó a ensayar las secuencias de reacción RRM. Teniendo en cuenta la experiencia de nuestro grupo, las condiciones iniciales elegidas fueron emplear atmósfera de etileno y tolueno a 80 °C, ya que en trabajos previos se había visto que la secuencia ROM-RCM requería elevada temperatura para obtener buena reactividad. El catalizador de rutenio empleado fue el de Grubbs de 2ª generación, en cantidades que oscilaron entre 5 y 10% (Figura 2.2).

En primer lugar, para acceder al sistema pirrolizidina se hizo reaccionar al compuesto **6**, obteniendo un único compuesto con la estructura bicíclica **12a** tras columna cromatográfica con un aceptable rendimiento (58%) tras 3 horas de reacción en CHCl₃ a 55 °C (Esquema 2.21). La reacción se repitió cambiando el disolvente a tolueno y a 80 °C, lo que significó una ligera mejora en el rendimiento de la reacción (63%), obteniéndose nuevamente un único compuesto bicíclico. Con el fin de aumentar el rendimiento se varió el catalizador, empleando el catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (Figura 2.2) al tratarse de una olefina con un grupo electroattractor. Sin embargo, el rendimiento obtenido fue inferior a los anteriores (45%).



Esquema 2.21

En este tipo de reacciones, una vez realizada la secuencia ROM, y en función de dónde se sitúe el carbeno, la secuencia RCM posterior puede dar lugar a dos regioisómeros, **12a** y **12b** (Esquema 2.22).



Esquema 2.22

La regioselectividad observada se puede explicar a partir del intermedio carbénico **A**, cuya preferencia en el medio de reacción puede achacarse a una de estas dos circunstancias; o bien, a la inestabilidad del regioisómero **B** producto del efecto estérico (interacción desestabilizante entre el rutenio y el grupo metoxicarbonil), o bien, a la existencia de un metalocomplejo no reactivo que es desactivado por una interacción intramolecular entre el rutenio y el oxígeno carbonílico del grupo éster (intermedio **B'**).^{50e,81}

Mediante experimentos de RMN monodimensionales y bidimensionales se dedujo que el isómero obtenido es el compuesto **12a** (Figura 2.6). Como puede verse, se observa un acoplamiento entre los CH vinílicos endocíclicos (CH) con el CH cabeza de puente (CH).

⁸¹ (a) BouzBouz, S.; Cossy, J. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1451-1454. (b) BouzBouz, S.; Simmons, R.; Cossy, J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3465-3467.

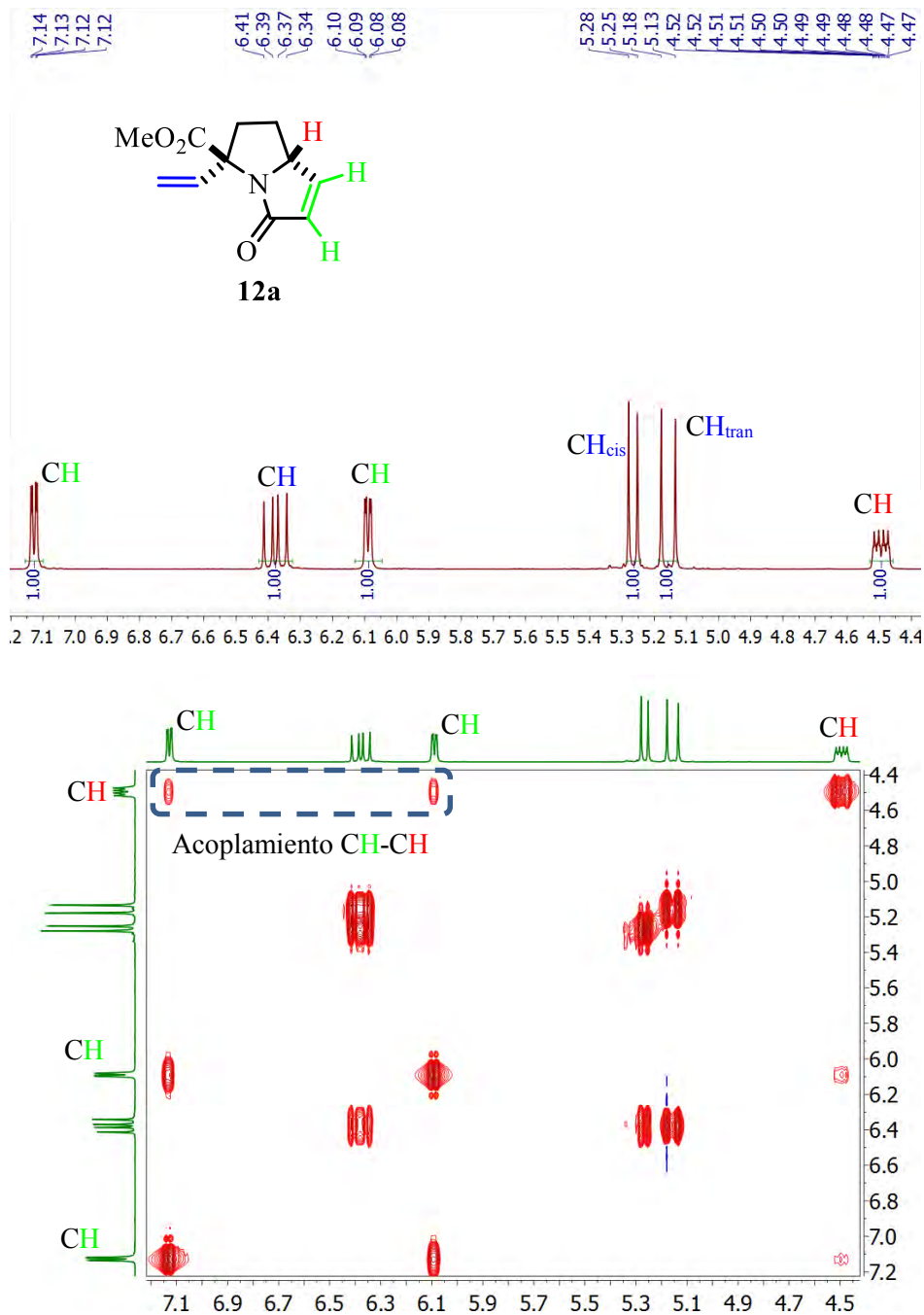


Figura 2.6 Ampliación de ¹H RMN (arriba) y COSY (abajo).

Este nuevo compuesto contiene la subestructura de pirrolizidina, presente en alcaloides como el pyrrolam A (Figura 2.7).⁸²

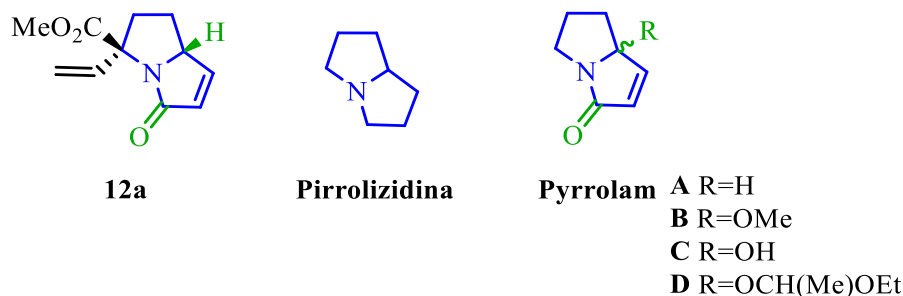


Figura 2.7

En 1990, Zeeck y col. aislaron los compuestos pyrrolam A-D de la bacteria *Streptomyces olivaceus*.⁸³ El pyrrolam A ha mostrado cierta actividad herbicida y desde entonces se han publicado un buen número de síntesis.^{78e,84}

Esta estructura está presente también en un compuesto bioactivo como el UCS1025 A.⁸⁵ Este es un compuesto natural aislado del caldo de cultivo de un hongo (*Acremonium sp.*)⁸⁶ y cuya estructura fue descrita en el año 2002.⁸⁷ Este producto natural tiene propiedades antimicrobianas,⁸⁶ citotóxicas⁸⁶ y de inhibición de la telomerasa.^{85c,87}

⁸² (a) Watson, R. T.; Gore, V. K.; Chandupatla, K. R.; Dieter, R. K.; Snyder, J. P. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6105-6114. (b) Majik, M. S.; Shet, J.; Tilve, S. G.; Parameswaran, P. S. *Synthesis* **2007**, 663-665.

⁸³ Grote, R.; Zeeck, A.; Stümpfel, J.; Zähler, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 525-530.

⁸⁴ (a) Aoyagi, Y.; Manabe, T.; Ohta, A.; Kurihara, T.; Pang, G.-L.; Yuhara, T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 869-876. (b) Murray, A.; Proctor, G. R.; Murray, P. J. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3757-3766. (c) Giovenzana, G. B.; Sisti, M.; Palmisano, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 515-518. (d) Huang, P. Q.; Chen, Q. F.; Chen, C. L.; Zhang, H. K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3827-3832. (e) Majik, M. S.; Parameswaran, P. S.; Tilve, S. G. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1500-1504.

⁸⁵ (a) Hoye, T. R.; Dvornikovs, V.; Sizova, E. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5191-5194. (b) Hoye, T. R.; Dvornikovs, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2550-2551. (c) Lambert, T. H.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 426-427.

⁸⁶ (a) Nakai, R.; Ogawa, H.; Asai, A.; Ando, K.; Agatsuma, T.; Matsumiya, S.; Akinaga, S.; Yamashita, Y.; Mizukami, T. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 294-296. (b) Akama, T.; Asai, A.; Nara, S.; Yamashita, Y.; Agatsuma, T.; Mizukami, T.; Ikeda, S.; Saitoh, Y. WO 01/29043, **2001**.

⁸⁷ Agatsuma, T.; Akama, T.; Nara, S.; Matsumiya, S.; Nakai, R.; Ogawa, H.; Otaki, S.; Ikeda, S.; Saitoh, Y.; Kanda, Y. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4387-4390.

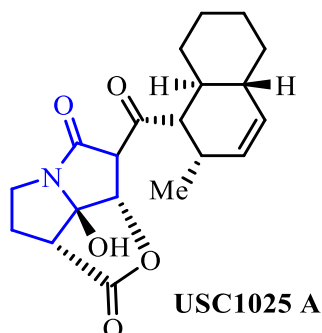
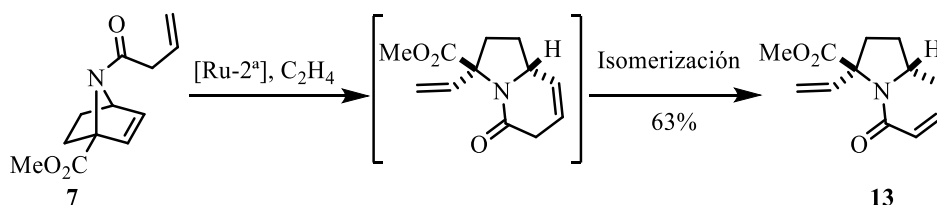


Figura 2.8. Estructura del inhibidor de telomerasa USC1025 A.

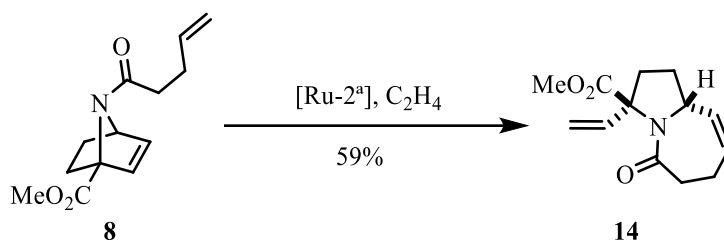
A continuación se decidió comprobar la reactividad del alil derivado **7**, en las mismas condiciones ensayadas en la secuencia anterior, obteniendo la estructura bicíclica **13** con un aceptable rendimiento (63%) en 7 horas de reacción. Nuevamente se obtuvo un único regioisómero de los dos posibles, con estructura de indolizidina. El compuesto obtenido es el resultado de un proceso de isomerización del doble enlace dando el compuesto α,β -insaturado más estable (Esquema 2.23).⁸⁸ Nuevamente se decidió cambiar el disolvente para rebajar la temperatura de reacción, por lo que se empleó CH_2Cl_2 a temperatura ambiente, y tras 25 horas de reacción se obtuvo el mismo compuesto con un rendimiento parecido (58%).



Esquema 2.23

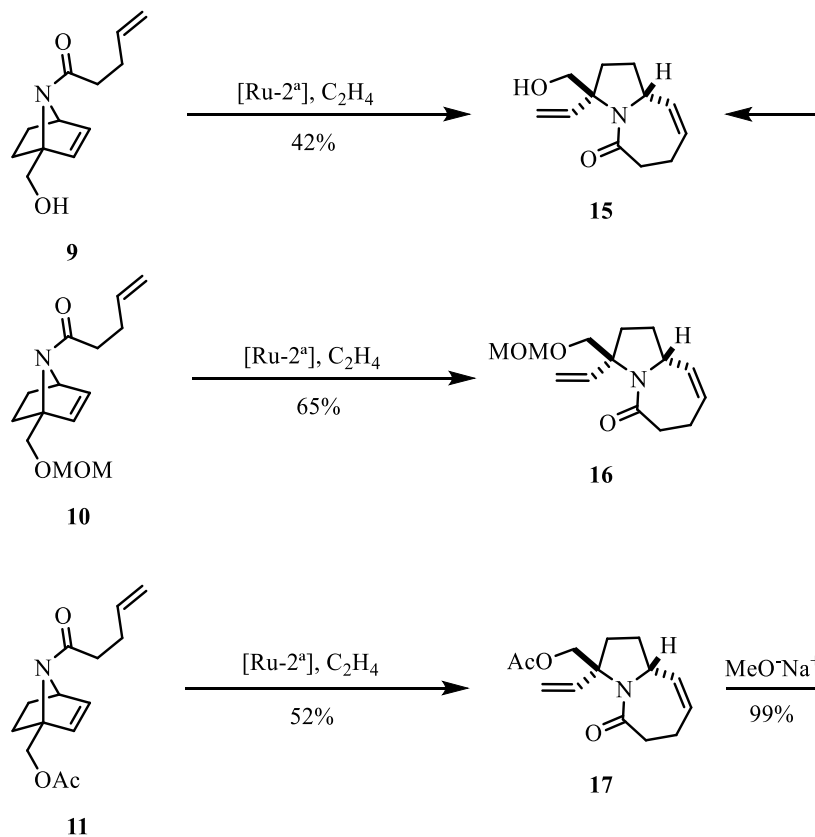
Para acceder al sistema pirrolo[1,2-a]azepina se hizo reaccionar al homoalil derivado **8** en las mismas condiciones de reacción, obteniendo un único compuesto con la estructura bicíclica **14** tras columna cromatográfica con un aceptable rendimiento (59%) en 7 horas de reacción (Esquema 2.24). La reacción se repitió cambiando el disolvente a cloroformo y la temperatura a 55 °C, sin notar un cambio sustancial en el rendimiento (53%, tras columna cromatográfica), obteniéndose nuevamente un único compuesto bicíclico.

⁸⁸ Donohoe, T. J.; O'Riordan, T. J. C.; Rosa, C. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1014-1017.

**Esquema 2.24**

Empleando esta reacción como modelo y con el propósito de evaluar la influencia del sustituyente en la posición cabeza de puente sobre el rendimiento y la regioselectividad del proceso, se estudió la reacción RRM para los compuestos **9**, **10** y **11**. Se decidió utilizar cloroformo como disolvente y emplear así una temperatura inferior a la empleada con tolueno.

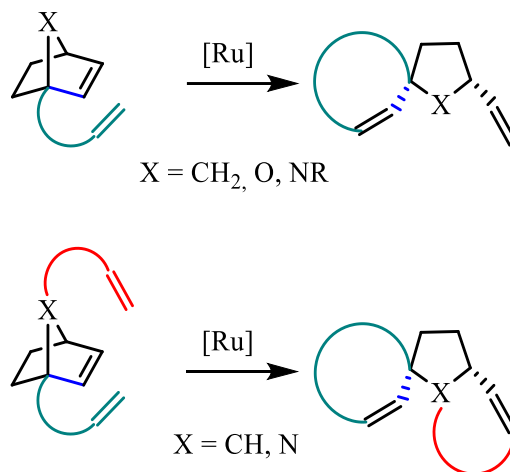
De esta manera se procedió a la secuencia RRM, obteniendo sendos biclos **15**, **16** y **17**, con unos rendimientos moderados que van desde el 42% para el compuesto **15**, al 65% para el biclo **16** pasando por el 52% para el compuesto **17**. En todos los casos se obtuvo un solo regioisómero, que nuevamente dejaba el grupo vinilo exocíclico sobre el carbono cuaternario (Esquema 2.25). El compuesto **15** fue obtenido de manera cuantitativa a partir del compuesto **17** mediante tratamiento con metóxido de sodio en metanol y posterior purificación por columna cromatográfica.



Esquema 2.25

Para explorar los procesos de metátesis en la obtención de sistemas moleculares más complejos, se diseñó una nueva vía de reorganización de anillo para generar sistemas espirocíclicos. Los espirociclos⁸⁹ son compuestos bicíclicos unidos a través de un único carbono (Esquema 2.26). La naturaleza tetraédrica de este átomo hace que ambos ciclos se coloquen de forma prácticamente perpendicular, provocando conformaciones poco usuales que pueden tener interesantes aplicaciones.

⁸⁹ (a) Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 779-828. (b) Kotha, S.; Deb, A. C.; Lahiri, K.; Manivannan, E. *Synthesis* **2009**, 165-193.



Esquema 2.26

Las estructuras espirocíclicas nitrogenadas las encontramos en muchos productos naturales con actividad biológica, como la histrionicotoxina, con propiedades neurotóxicas⁹⁰ o la horsfilina,⁹¹ que tiene actividad analgésica y antibiótica y se usa en el sur de Asia como compuesto medicinal (Figura 2.9).

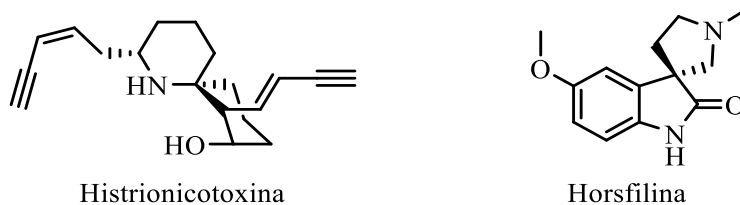


Figura 2.9

Este tipo de estructuras espirocíclicas están presentes como subestructuras en compuestos que han sido probados como agonistas de la serotonina, un

⁹⁰ Takahashi, K.; Witkop, B.; Brossi, A.; Maleque, M. A.; Albuquerque, E. X. *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 252-261.

⁹¹ (a) Jossang, A.; Jossang, P.; Hadi, H. A.; Sevenet, T.; Bodo, B. *J. Org. Chem.* **2002**, *56*, 6527-6530. (b) Kulkarni, M. G.; Dhondge, A. P.; Chavhan, S.W.; Borhade, A. S.; Shaikh, Y. B.; Birhade, D. R.; Desai, M. P.; Dhattrak, N. R. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 876-879.

neurotransmisor del sistema nervioso central (**a**, Figura 2.10)⁹² o en compuestos patentados con propiedades como pesticidas o herbicidas (**b**, Figura 2.10).⁹³

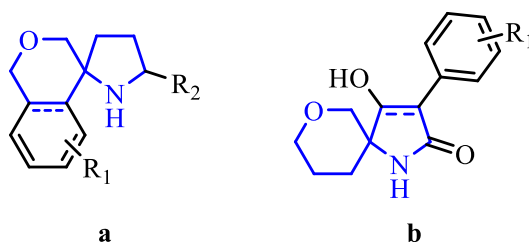
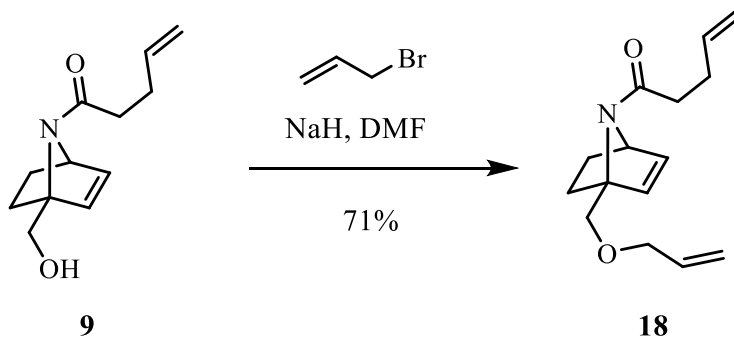


Figura 2.10

Para obtener estos sistemas, podemos emplear la secuencia ROM-RCM-RCM sobre el derivado del azanorborneno **18**, que presenta un doble enlace adicional en la posición cabeza de puente. Para sintetizar el compuesto **18** se trató al alcohol **9** con bromuro de alilo en presencia de hidruro de sodio en DMF, obteniendo así el compuesto **18** con buen rendimiento (Esquema 2.27).

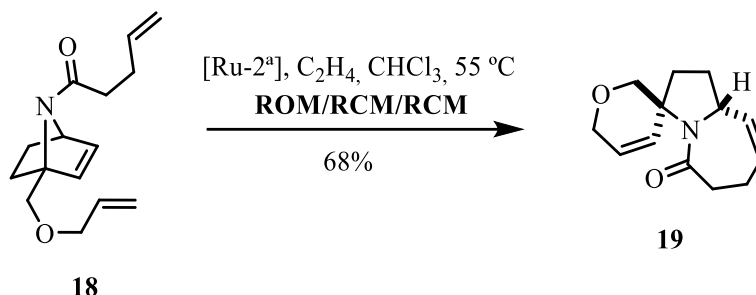


Esquema 2.27

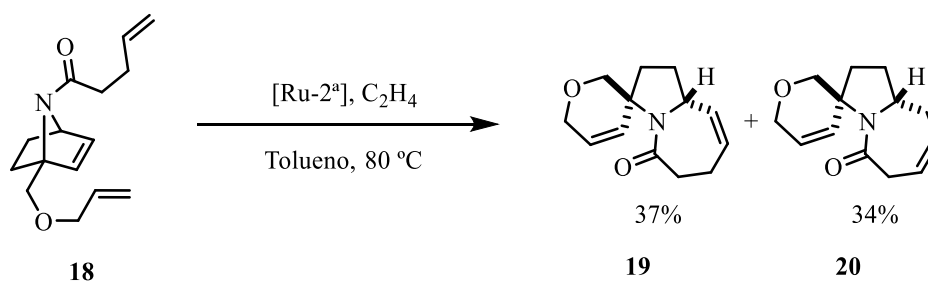
Por último, se llevó a cabo la reacción con el trieno **18** en cloroformo a 55 °C, formándose así la pirrolidina espirocíclica **19** con un buen rendimiento.

⁹² (a) Comoy, C.; Marot, C.; Podona, T.; Baudin, M. L.; Morin-Allory, L.; Guillaumet, G.; Pfeiffer, B.; Caignard, D. H.; Renard, P.; Rettori, M. C.; Adam, G.; Guardiola-Lemaître, B. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4285-4298. (b) Usse, S.; Guillaumet, G.; Viaud, M. C. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 914-917.

⁹³ *WO Pat.* 2008067911, 2008.

**Esquema 2.28**

En general, esta secuencia de metátesis dominó involucra una reacción ROM del doble enlace endocíclico tensionado y dos reacciones RCM consecutivas. Sin embargo, el compuesto **19** isomeriza parcialmente. Cuando el proceso RRM se lleva a cabo en tolueno a 80 °C se obtiene una mezcla del compuesto **19** y el nuevo compuesto isomerizado **20**, con unos rendimientos del 37% y 34% respectivamente. El ciclo de 10 miembros, consecuencia de la reacción RCM entre los alquenos acíclicos, no fue observado.

**Esquema 2.29**

La estructura del compuesto **20** fue determinada inequívocamente por el análisis de difracción de rayos X de los correspondientes monocristales (Figura 2.11).

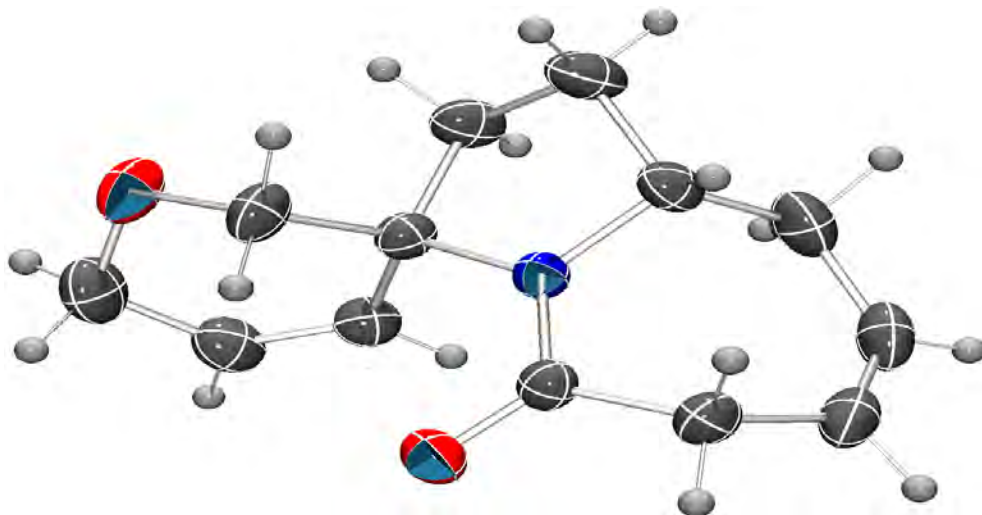
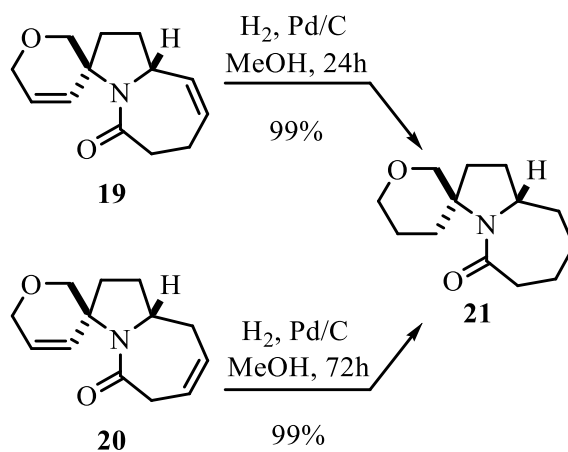


Figura 2.11 Diagrama ORTEP3 para el compuesto 20.

Los compuestos espirénicos insaturados **19** y **20** fueron convertidos en el correspondiente compuesto saturado **21**. Ambas reacciones se realizaron por hidrogenación heterogénea con H_2 (1 atm), empleando paladio soportado sobre carbono como catalizador y metanol como disolvente, obteniendo así el compuesto **21** con excelentes rendimientos en ambos casos (Esquema 2.30).



Esquema 2.30

2.4 Conclusiones

1. Se han sintetizado varios azanorbornenos que presentan sustituyentes con un segundo doble enlace exocíclico en la posición 7 o un tercer doble enlace sobre la posición cabeza de puente.

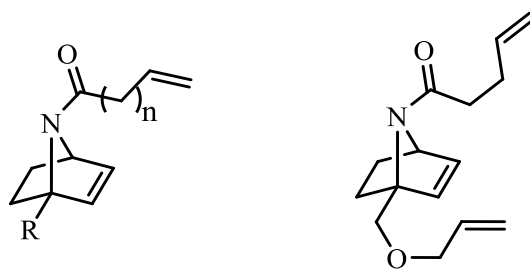


Figura 2.12

2. Se han explorado diferentes condiciones de reacción para obtener lactamas bicíclicas y sistemas espirocíclicos mediante secuencias de reorganización de anillo, ROM-RCM o ROM-RCM-RCM.

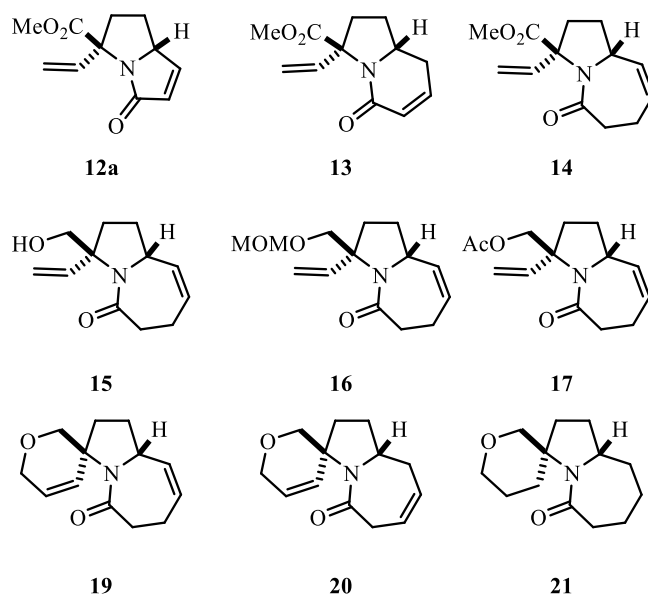


Figura 2.13

3. En todos los casos se ha obtenido un único regioisómero de los dos posibles, el que sitúa al ciclo lactámico en el lado de la posición cabeza de puente menos impedida estéricamente.

3. La reacción de metátesis en carbohidratos

3.1 Introducción y antecedentes

3.1.1 Metátesis cruzada de carbohidratos con péptidos y proteínas

3.2 Objetivos

3.3 Discusión de resultados

3.3.1 Síntesis de materiales de partida

3.3.2 Reacciones de metátesis

3.3.3 Análisis conformacional

3.4 Conclusiones



3.1- Introducción y antecedentes

Las glicoproteínas^{1,94} son claramente una clase importante de compuestos como lo demuestra el hecho de que alrededor del 50% de los péptidos de origen natural estén glicosilados (Figura 3.1).

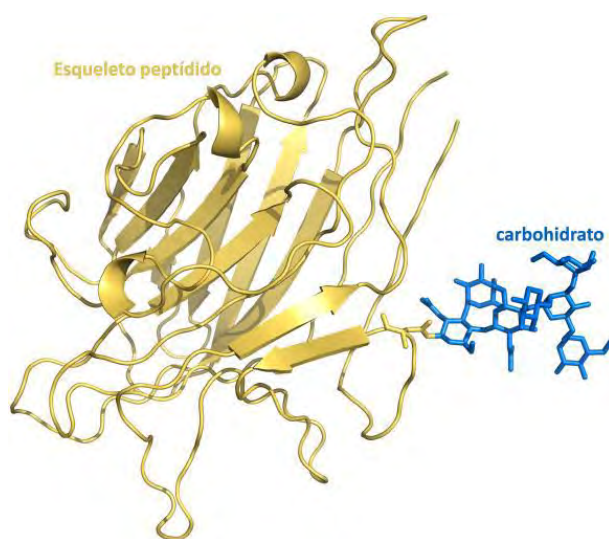


Figura 3.1. Ejemplo de la estructura 3D de una glicoproteína (pdb: 1AX0).

Debido a que las estructuras de las cadenas de los carbohidratos no están codificadas genéticamente ni su biosíntesis controlada por transcripción directa, la glicosilación se lleva a cabo a través de complejas modificaciones co- y post-traduccionales. En función de la disponibilidad de los sustratos y la competición entre enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, suelen existir modificaciones en la naturaleza y extensiones de la glicosilación que dan como resultado una mezcla heterogénea de diferentes carbohidratos con el mismo esqueleto proteínico (glicofomas). Los carbohidratos están unidos a proteínas principalmente mediante un enlace *N*-glicosídico a la cadena lateral de asparagina dentro de la secuencia de consenso Asn-Xxx-Ser/Thr (Figura 3.2). El primer carbohidrato ligado al nitrógeno en las *N*-glicopéptidos/proteínas es la β -*N*-acetilglucosamina (GlcNAc β), aunque también pueden encontrarse patrones menos

⁹⁴ (a) Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G.-J. *Chem. Commun.* **2009**, 5335-5349. (b) Pratt, M.R.; Bertozzi, R. C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68 (c) Van den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151-208. (d) Strous, G. J.; Dekker, J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *27*, 57-92.

habituales, tales como glucosa (Glc) o *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). En el caso de los *O*-glicopéptidos/proteínas, el primer monosacárido se une a la cadena peptídica a través del grupo hidroxilo de una serina o treonina, predominando el anómero α de GalNAc (denominado antígeno Tn), aunque de forma minoritaria también se encuentran en la naturaleza *O*-glicanos cuyo primer monosacárido es GlcNAc unido a grupos hidroxilo de tirosina e hidroxilisina.⁹⁵

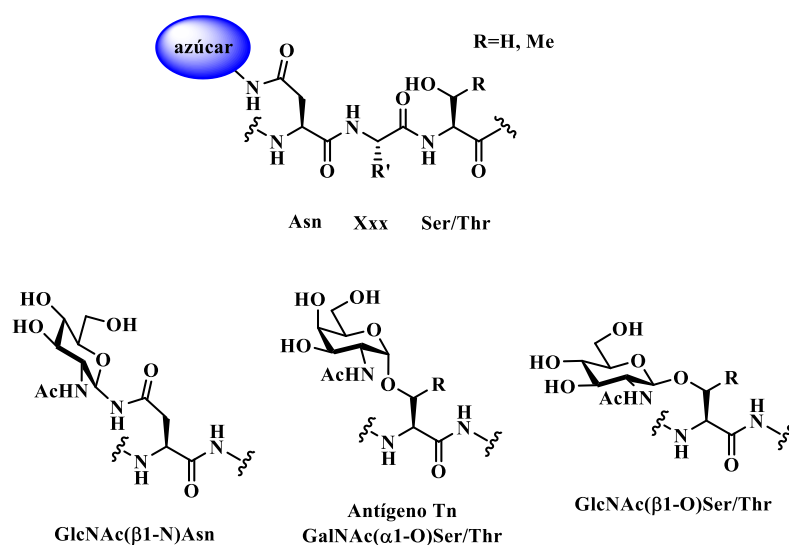


Figura 3.2 Estructuras representativas de *N*- y *O*-glicopéptidos.

La diversidad estructural de glicopéptidos y glicoproteínas es esencial para el alcance y especificidad de su función biológica.⁹⁶ Así los podemos encontrar involucrados en el reconocimiento celular, el desarrollo neuronal y la respuesta inflamatoria. Además, las proteínas que actúan como epítomos provistos de glicanos pueden jugar un papel importante en la vigilancia inmunológica. Los glicanos

⁹⁵ (a) Wittmann, V. *Glycoproteins: Occurrence and significance* en *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology 2ª Ed* (Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J. Eds). **2008**, Springer, Berlin, 1735-1770. (b) Wittmann, V. *Glycopeptides and Glycoproteins: Synthesis, Structure, and Application* **2007**, Springer, Berlin. (c) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720. (d) Hanisch, F. G. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 143-149. (e) Zachara, N. E.; Hart, G. W. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 431-438. (f) Brocke, C.; Kunz, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085-3112.

⁹⁶ (a) Wittmann, V. *Glycoproteins properties* en *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology 2ª Ed* (Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J. Eds). **2008**, Springer, Berlin, 1771-1793. (b) Bennett, C.S.; Payne, R.J.; Koeller, K.M.; Wong, C.-H. *Biologically relevant glycopeptides: Synthesis and applications* en *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology 2ª Ed* (Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J. Eds). **2008**, Springer, Berlin, 1795-1884.

pueden también cambiar las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los propios péptidos (por ejemplo, infiriendo plegamientos o mejorando la estabilidad proteolítica). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, cada vez existe un mayor requerimiento para acceder a glicoproteínas. El fin último es obtener una mejor comprensión del papel de la glicosilación en biología molecular e investigar el potencial de glicoproteínas como agentes terapéuticos. Desafortunadamente, el aislamiento de glicoproteínas de fuentes naturales es complicado y a pesar del avance de los métodos de síntesis de glicopéptidos complejos sigue existiendo la necesidad de nuevas y más sencillas metodologías de obtención de los mismos. Así lo muestran recientes y excelentes revisiones en el campo de la síntesis de glicopéptidos y glicoproteínas.^{96b,97}

Con estas modernas metodologías se puede acceder a nuevos miméticos de glicopéptidos y glicoproteínas con uniones no nativas, o diferentes grupos funcionales, los denominados neoglicopéptidos y neoglicoproteínas respectivamente. Estos neoglicoconjugados proporcionan alternativas útiles para el estudio de las relaciones estructura-actividad. Además, se puede lograr una mayor estabilidad respecto a la degradación química y enzimática⁹⁸ mediante la introducción de enlaces *C*- y *S*-glicosídicos,⁹⁹ incrementando las potenciales aplicaciones terapéuticas.

Un ejemplo de estas modificaciones que proporciona la propia Naturaleza es la incorporación de un enlace *S*-glicosídico como ocurre en la Sublancina 168, un tioglicopéptido natural que presenta amplio espectro de actividad bactericida (Figura 3.3),¹⁰⁰ extraído de la bacteria *Bacillus Subtilis* 168. Se ha demostrado

⁹⁷ (a) Gamblin, D.P.; Scanlan, E.M.; Davis, B.G. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131-163. (b) Davis, B.G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-602. (c) Zhu, X.; Schmidt, R.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1900-1934. (d) Rich, J.R.; Withers, S.G. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 206-216. (e) Nicotra, F.; Cipolla, L.; Peri, F.; La Ferla, B.; Redaelli, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2008**, *61*, 353-398.

⁹⁸ (a) Wilson, J. C.; Kiefel, M. J.; Angus, D. I.; von Itzstein, M. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 443-446. (b) Witczak, Z. J.; Chhabra, R.; Chen, H.; Xie, X.-Q. *Carbohydr. Res.* **1997**, *301*, 167-175. (c) Driguez, H. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 311-318. (d) Hasegawa, A.; Morita, M.; Kojima, Y.; Ishida, H.; Kiso, M. *Carbohydr. Res.* **1991**, *214*, 43-53.

⁹⁹ (a) Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1384-1390. (b) Pachamuthu, K.; Schmidt, R. R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 160-187. (c) Zhu, X.; Schmidt, R. R. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 875-887. (d) Schips, C.; Ziegler, T. J. *Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 773-788. (e) Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-601. (f) Aydiillo, C.; Compañón, I.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 789-800. (g) Taylor, C. M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317-11362. (h) Jobron, L.; Hummel, G. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2265-2267.

¹⁰⁰ (a) Hsieh, Y. S. Y.; Wilkinson, B. L.; O'Connell, M. R.; Mackay, J. P.; Matthews, J. M.; Payne, R. *J. Org. Lett.* **2012**, *14*, 1910-1913. (b) Zhu, X.; Haag, T.; Schmidt, R. R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 31-33. (c) Stepper, J.; Shastri, S.; Loo, T. S.; Preston, J. C.; Novak, P.; Man, P.; Moore, C. H.; Havlicek, V.; Patchett, M. L.; Norris, G. E. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 645-650. (d) Venugopal, H.; Edwards, P. J. B.; Schwalbe, M.; Claridge, J. K.; Libich, D. S.; Stepper, J.; Loo, T.; Patchett, M. L.; Norris, G. E.; Pascal,

inequívocamente que la Sublacina 168 es un *S*-glicopéptido de β -glucosa sobre el residuo Cys22. Este tipo de glicosilación es inusual, ya que, como hemos comentado anteriormente, lo más habitual es encontrar *O*- o *N*-glicopéptidos.

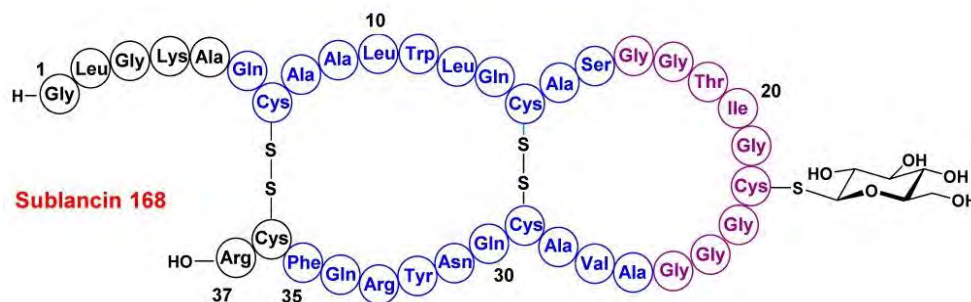
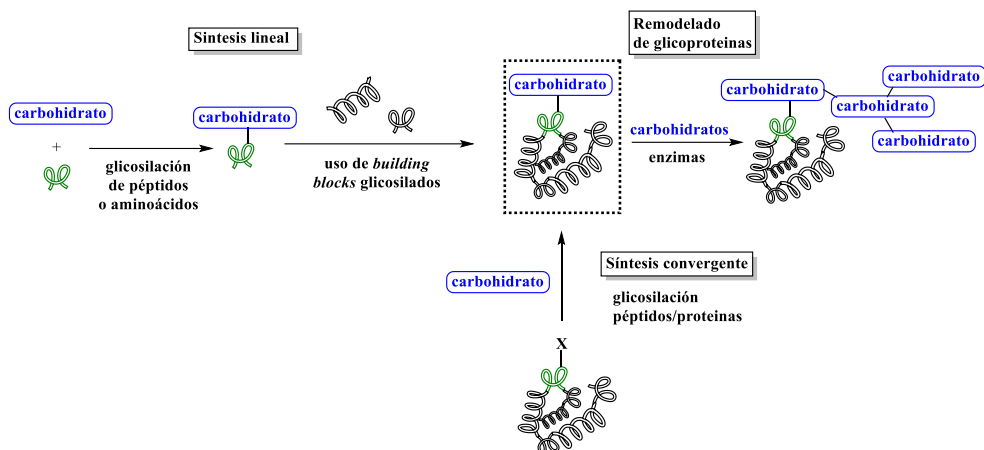


Figura 3.3

Los glicopéptidos y glicopéptidomiméticos de hasta 50 residuos de aminoácidos de longitud son generalmente sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida (*SPPS*) por etapas. La *SPPS* puede ser llevada a cabo de una manera lineal por incorporación de *building blocks* de aminoácidos glicosilados protegidos (Esquema 3.1), pero las desventajas de esta aproximación, sobre todo para glicopéptidos glicosilados con oligosacáridos, son la manipulación de grupos protectores complejos y la formación de enlaces glicosídicos inestables en un estadio temprano de la síntesis. Además, para péptidos largos, los rendimientos y la pureza decrecen debido a efectos de agregación y a la acumulación de subproductos. En una aproximación más convergente, el enlace glicosídico es formado en un esqueleto peptídico pre-ensamblado de manera selectiva al final de la síntesis (Esquema 3.1); aunque, esto requiere no sólo de carbohidratos sino también de residuos de aminoácidos protegidos de manera ortogonal. Los componentes carbohidratos de glicopéptidos ensamblados pueden entonces ser extendidos por métodos enzimáticos o químicos.

S. M. *Biochemistry* **2011**, 50, 2748-2755. (e) Oman, T. J.; Boettcher, J. M.; Wang, H. A.; Okalibe, X. N.; van der Donk, W. A. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 78-80. (f) Zhu, X.; Pachamuth, K.; Schmidt, R. R. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5641-5651



Esquema 3.1 Estrategias para síntesis de glicopéptidos.

A pesar de los desafíos, se ha conseguido la síntesis de estructuras complejas de glicopéptidos y neoglicopéptidos.¹⁰¹ La limitación de tamaño asociada con la *SPPS* se ha superado también mediante el ensamblaje de fragmentos de glicopéptidos manejables en proteínas completas usando técnicas de *Chemical Ligation*.^{97b,102} Las mejoras a través del uso de técnicas enzimáticas, moleculares y biología celular modernas han permitido alta especificidad, introduciendo de manera selectiva aminoácidos naturales y funcionalizados. Por lo tanto, en combinación con métodos de glicosilación quimioselectiva, la síntesis de glicoproteínas con modificaciones selectivas (*site-selective*) está siendo cada vez más factible.^{97a, 102c}

3.1.1 Metátesis cruzada de carbohidratos con péptidos y proteínas

Las reacciones catalizadas por metales de transición son una poderosa herramienta para crear enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo en la síntesis de moléculas pequeñas. En los últimos años ha aumentado el número de

¹⁰¹ (a) Macmillan, D.; Bertozzi, C.R. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9515-9525. (b) Ragupathi, G.; Koide, F.; Livingston, P.O.; Cho, Y.S.; Endo, A.; Wan, Q.; Spassova, M.K.; Keding, S.J.; Allen, J.; Ouerfelli, O.; Wilson, R.M.; Danishefsky, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2715-2725. (c) Davis, B.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4674-4678. (d) Piontek, C.; Ring, P.; Harjes, O.; Heinlein, C.; Mezzato, S.; Lombana, N.; Pöhner, C.; Püttner, M.; Silva, D.V.; Martin, A.; Schmid, F.X.; Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1936-1940. (e) Piontek, C.; Silva, D.V.; Heinlein, C.; Pöhner, C.; Mezzato, S.; Ring, P.; Martin, A.; Schmid, F.X.; Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941-1945.

¹⁰² (a) Kent, S.B.H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338-351. (b) Hackenberger, C.P.R.; Schwarzer, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030-10074. (c) de Graaf, A.J.; Kooijman, M.; Hennink, W.E.; Mastrobattista, E. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1281-1295. (d) Payne, R.J.; Wong, C.-H. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 21-43.

publicaciones que describen el uso de metales de transición para modificar péptidos y proteínas.

Los ejemplos más notorios son las reacciones de cicloadición click catalizadas por cobre (CuAAC) y la metátesis de olefinas. Al igual que la CuAAC, la metátesis de olefinas es altamente quimoselectiva y eficiente, teniendo lugar en medios acuosos y a temperatura ambiente, próximos a un pH neutro y a baja concentración (propiedades extremadamente adecuadas para reacciones con proteínas). Esta sección resume la aplicación de metátesis de olefinas a la síntesis de neoglicopéptidos y neoglicoproteínas. Una excelente revisión hecha por Davis y col.¹⁰³ proporciona una discusión más detallada de la modificación de péptidos por metátesis cruzada (Figura 3.4).

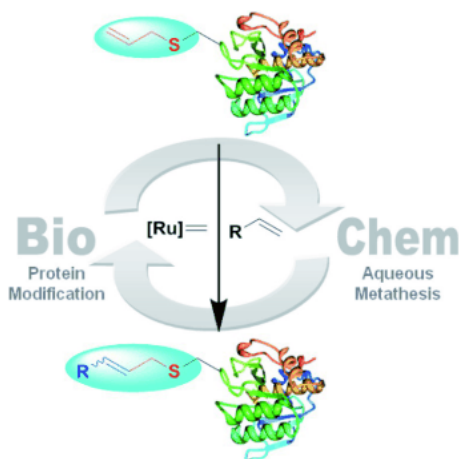
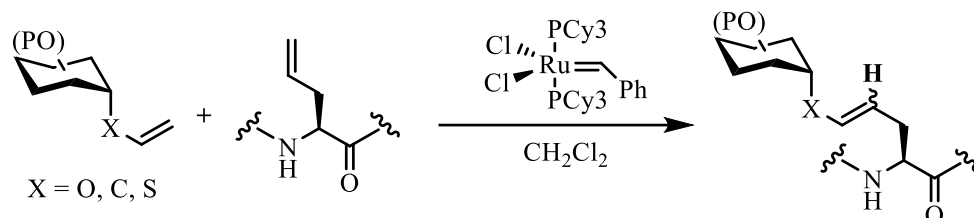


Figura 3.4

Los primeros ejemplos (Esquema 3.2) que demuestran la viabilidad de la síntesis de glicopéptidos por metátesis por *CM* se deben a Roy y col.¹⁰⁴

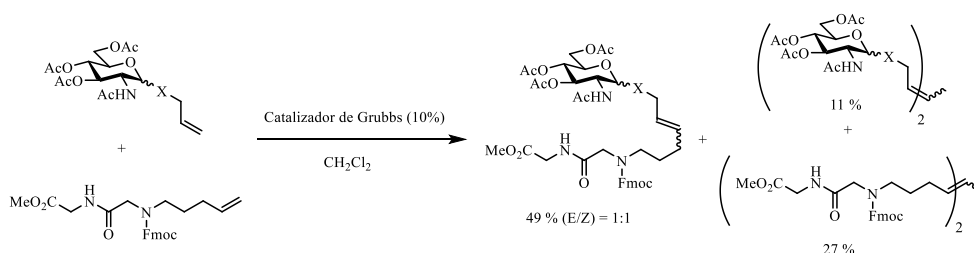
¹⁰³ Lin, Y.A.; Chalker, J.M.; Davis, B.G. *ChemBioChem*. **2009**, *10*, 959-969.

¹⁰⁴ Hu, Y.-J.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3305-3308.



Esquema 3.2 Síntesis de neoglicósidos vía CM.

En este trabajo se estudia la metátesis cruzada, en presencia de catalizador de Grubbs de 1ª generación, de mono-*N*-alquencil (-alil, -butenil y -pentenil) derivados del dipéptido diglicina con varios *O*- y *C*-alilglicósidos convenientemente protegidos (Esquema 3.3). Los productos deseados fueron obtenidos en rendimientos que oscilaban entre el 40 y el 52%, no encontrando diferencias significativas entre las reactividades de *O*- y *C*-alilglicósidos tanto de sus anómeros α como β . Los productos de *CM* fueron acompañados por los subproductos resultantes de la homodimerización de los derivados procedentes tanto del carbohidrato como del péptido (Esquema 3.3).



Esquema 3.3 Metátesis cruzada entre *N*-pentenil derivado de diglicina y *O*- y *C*-alquencilcarbohidratos.

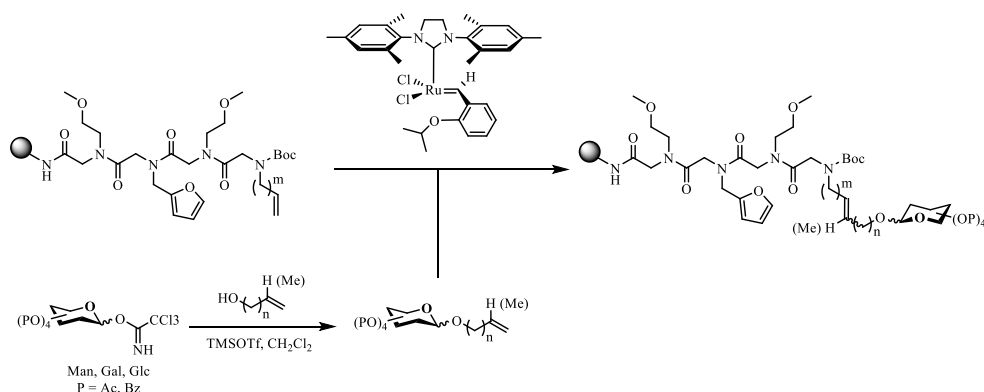
McGarvey y col. estudiaron la influencia de los grupos protectores de la parte carbohidrato y las condiciones de reacción que favorecían la *CM*, entre *C*-alquencilcarbohidratos y alquencilaminoácidos/péptidos, frente al proceso de autometátesis (*SM*, del inglés *self-metathesis*), empleando el catalizador de Grubbs de 2ª generación.¹⁰⁵

Un estudio más completo del potencial de la metátesis cruzada de olefinas para acceder a glicopeptidos fue publicado en 2012.¹⁰⁶ En este estudio, la *CM* fue

¹⁰⁵ McGarvey, G. J.; Benedum, T. E.; Schmidtman, F. W. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3591-3594.

¹⁰⁶ Khan, S. N.; Kim, A.; Grubbs, R. H.; Kwon, Y. U. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2952-2955.

realizada en fase sólida, empleando resinas del tipo *Rink amide* y *TentaGel*. Se estudiaron varios parámetros que incluyeron diferentes catalizadores, distintos tipos de carbohidratos, sus grupos protectores, longitud de cadena del alqueno, condiciones de reacción... Varios modelos peptídicos (tetra- y pentapéptidos) con distinto patrón *N*-alqueno, *N*-terminal o en medio de la secuencia fueron sintetizados en fase sólida. La amina terminal se protegió con un grupo Boc antes de las reacciones de *CM* en fase sólida (Esquema 3.4). Varios alquenilglicósidos protegidos (Ac, Bz) fueron sintetizados a partir de tricloroacetamidas de glicosilo como glicosiladores y alcoholes insaturados (but-3-en-1-ol, pent-4-en-1-ol y 3-metilbut-3-en-1-ol) como aceptores, en presencia de TMSOTf como promotor. El catalizador libre de fosfina (Esquema 3.4), usado al 5 % mol, resultó ser el más adecuado para este caso. Entre otras cosas, este estudio demostró que el tipo de resina tiene poca influencia en la reacción *CM*.



Esquema 3.4 Metátesis cruzada en fase sólida.

Por otro lado, los sulfuros de alilo resultaron ser sustratos más reactivos presumiblemente por la mejora en la actividad del catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación. Mecánicamente, esto se puede explicar debido a la preferencia del rutenio por coordinarse con el azufre antes que con el oxígeno, dando lugar a la posterior formación de un intermedio alquiliden-Ru más reactivo.¹⁰⁷

Para el caso de *S*-aliltiocarbohidratos, la búsqueda bibliográfica no arrojó ningún resultado de *CM* sobre alquenilpéptidos. Sin embargo, sí se encuentran

¹⁰⁷ Lin, Y.A.; Chalker, J.M.; Floyd, N.; Bernardes, G.J.L.; Davis, B.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643

ejemplos de *CM* en el ámbito de la modificación *site-selective* de proteínas (Figura 3.5).^{107,108}

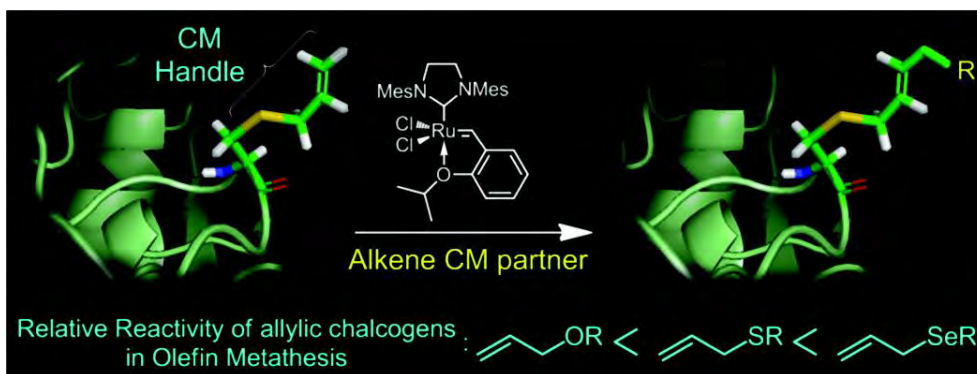
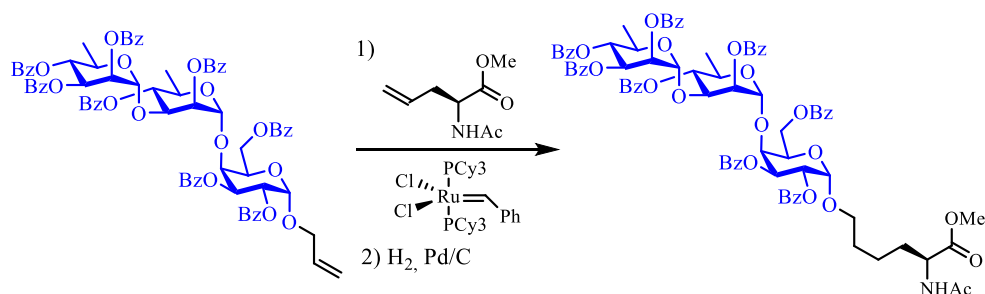


Figura 3.5 Modificación *site-selective* de proteínas por Davis.

En el terreno de las vacunas basadas en carbohidratos (*CBV*) se han descrito dos ejemplos de su síntesis cuya etapa clave es una *CM*. El primero de ellos hace referencia al diseño, desarrollado por el grupo de Roy, de una vacuna contra la *Burkholderia Cepacia* y que se basa en la reacción *CM* entre una unidad trisacárida y un derivado de alilglicina (Esquema 3.5).¹⁰⁹



Esquema 3.5

Dentro del campo de la elaboración de nuevas vacunas terapéuticas contra el cáncer y en la búsqueda de una vacuna sintética mas completa contra el cáncer de ovario, Danishefsky propone la estrategia basada en la inclusión de diferentes

¹⁰⁸ (a) Lin, Y.A.; Chalker, J.M.; Davis, B.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811. (b) Chalker, J.M.; Lin, Y.A.; Boutureira, O.; Davis, B.G. *Chem. Commun.* **2009**, 3714-3716.

¹⁰⁹ Fauré, R.; Shiao, T. C.; Lagnoux, D.; Giguère, D.; Roy, R. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2704-2708.

antígenos de carbohidratos como Globo-H, Le^y, GM₂, sialil-Tn, TF, y Tn en una misma cadena peptídica con la multiantigenicidad que refleja la heterogeneidad (Figura 3.6).^{102b,110}

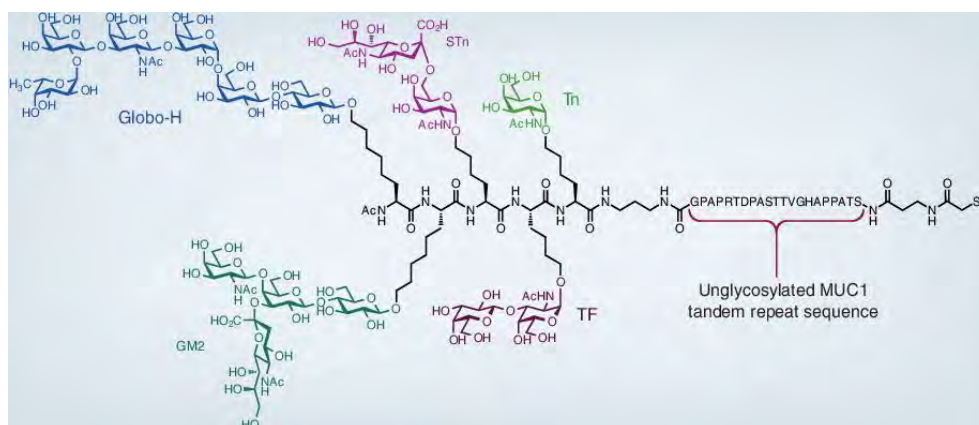
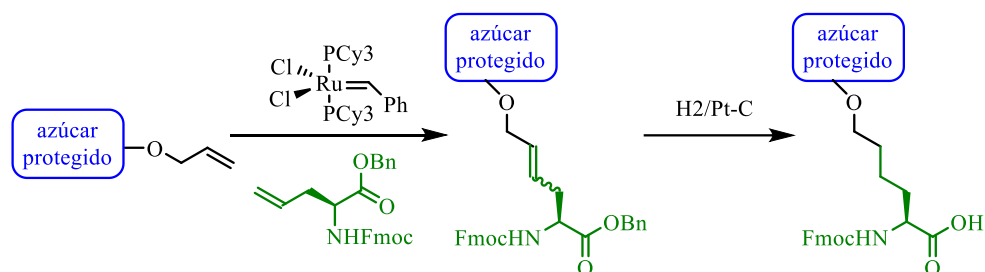


Figura 3.6 Vacuna pentavalente de Danishefsky.

La administración de estas vacunas multiantigénicas es ventajosa ya que se requiere un menor nivel de proteína portadora y se evita la necesidad de validar por separado cada componente de la vacuna.^{102b} Los autores desarrollaron varias rutas sintéticas para la preparación de distintos neoglicósidos. Una de ellas implica la metátesis cruzada entre carbohidratos funcionalizados con alqueno y Fmoc-L-alilglicina-OBn, empleando el catalizador de Hoveyda-Grubbs de primera generación seguido por una etapa de hidrogenación (Esquema 3.6).^{102b} De esta forma se introduce un espaciador entre la parte carbohidrato y la parte peptídica que permite la coexistencia de diferentes antígenos.

¹¹⁰ (a) Zhu, J.; Wan, Q.; Lee, D.; Yang, G.; Spassova, M.K.; Ouerfelli, O.; Ragupathi, G.; Damani, P.; Livingston, P.O.; Danishefsky, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9298-9303. (b) Lee, D.; Danishefsky, S.J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2167-2170. (c) Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 11937-11942. (d) Ragupathi, G.; Koide, F.; Livingston, P. O.; Cho, Y. S.; Endo, A.; Wan, Q.; Spassova, M. K.; Keding, S. J.; Allen, J.; Ouerfelli, O.; Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2715-2725. (e) Keding, S.J.; Atsushi, E.; Biswas, K.; Zatorski, A.; Coltart, D.M.; Danishefsky, S.J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3413-3416



Esquema 3.6 Glicoaminoácidos glicosilados por Danishefsky.

3.2 Objetivos

Como se ha comentado en la introducción general, las conformaciones preferentes adoptadas por los glicopéptidos vienen determinadas por las interacciones carbohidrato-aminoácido, lo que le transfiere una mayor o menor flexibilidad a dicho carbohidrato. Para aumentar esta flexibilidad se puede recurrir a la introducción de espaciadores entre ambos extremos, y para ello, nos planteamos la preparación de los siguientes compuestos diana (Figura 3.7) mediante el proceso de metátesis cruzada como el paso clave en su síntesis.¹¹¹ Así mismo se realizará el estudio de su análisis conformacional en disolución acuosa. Estos compuestos, derivados de glucosa, presentan un espaciador de cuatro átomos de carbono entre el residuo carbohidrato y el esqueleto peptídico e incorporan ambos enlaces, *O*- y *S*-glicosídico.

¹¹¹ (a) Leeuwenburgh, M. A.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 757-765. (b) Aljarilla, A.; López, J. C.; Plumet, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6123-6143. (c) López, J. C.; Plumet, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1803-1825. (d) Nolen, E. G.; Kurish, A. J.; Potter, J. M.; Donahue, L. A.; Orlando, M. D. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3383-3386. (e) McGarvey, G. J.; Benedum, T. E.; Schmidmann, F. W. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3591-3594.

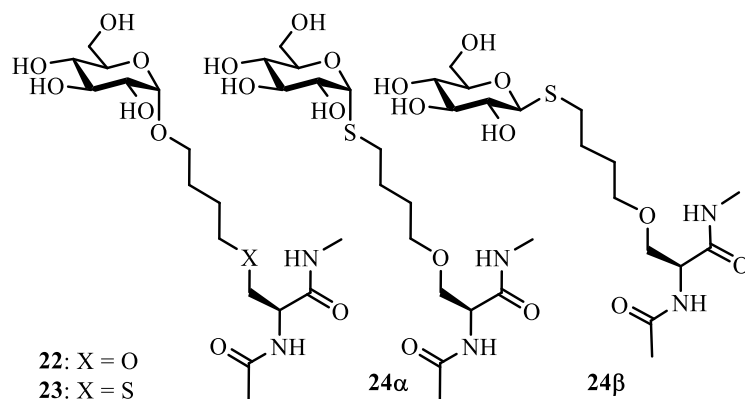
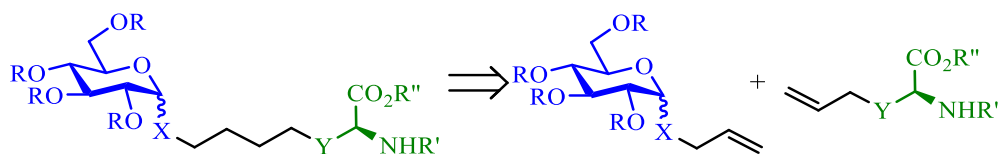


Figura 3.7 Neoglicoconjugados objetivo.

3.3 Discusión de resultados

Desde un punto de vista retrosintético e implicando una desconexión de metátesis de alquenos, la obtención de los neoglicosilaminoácidos objetivo requiere partir de un alil-carbohidrato que actúa como glicosil dador y los correspondientes alil derivados de los distintos aminoácidos convenientemente protegidos (Esquema 3.7).



Esquema 3.7

Para llevar a cabo la reacción es necesario, por tanto, la obtención de estos nuevos alil derivados en escala de gramo, de una manera sencilla y asequible.

3.3.1 Síntesis de materiales de partida

En primer lugar, se va a describir las metodologías seguidas para la obtención de los derivados de carbohidratos (glucosa y tioglucosa) necesarios (Figura 3.8). Para el caso de la glucosa se ha seguido la metodología descrita en la

bibliografía ya que este compuesto **25** está descrito para su obtención a escala multigramo.¹¹²

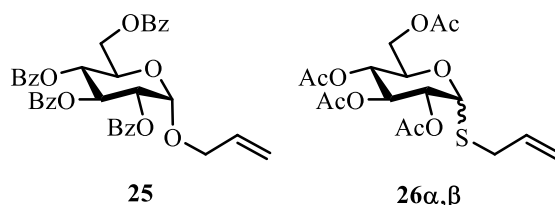
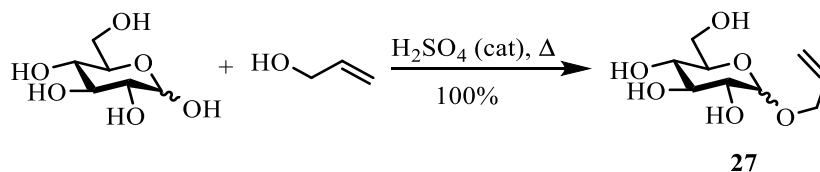


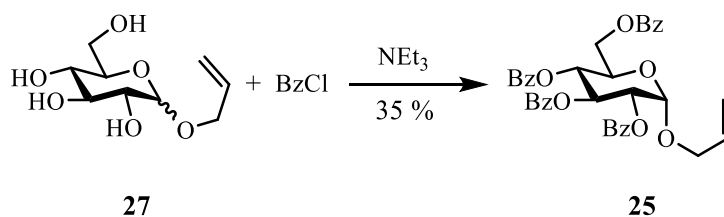
Figura 3.8 Carbohidratos protegidos.

Para la obtención del derivado de α -*O*-glucopiranosido de alilo se partió de D-glucosa. Se trató ésta con alcohol alílico en presencia de H_2SO_4 a reflujo. La reacción se neutralizó mediante la adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y la forma básica de DOWEX® (Dowex® Monosphere® 550A hydroxide form, CAS 69011-18-3), una resina de intercambio aniónico. Tras filtración y evaporación se obtuvo el compuesto **27** como una mezcla de anómeros α y β (Esquema 3.8).



Esquema 3.8

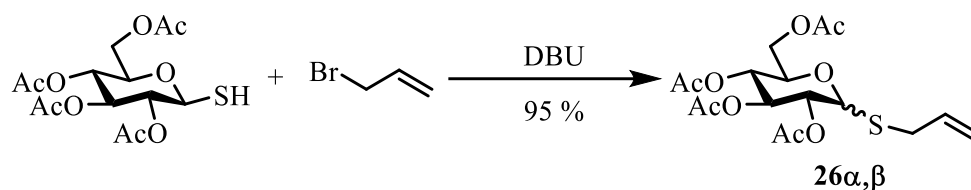
Dicha mezcla se hizo reaccionar con cloruro de benzoilo y NEt_3 en CH_2Cl_2 como disolvente. Tras la purificación por columna cromatográfica, se obtuvo el anómero α como un sólido blanco (Esquema 3.9).



Esquema 3.9

¹¹² Otey, F.H.; Westhoff, R. P.; Mehlretter, C.L. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **1972**, *1*, 70-73.

Para la obtención del *S*-tioglucopiranosido de alilo, se partió de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio-D-glucosa comercial, que se hizo reaccionar con bromuro de alilo y DBU en THF. Tras la purificación y caracterización, se observó que el centro anomérico había epimerizado, obteniendo una mezcla de anómeros α : β en una relación 1:9, mayoritaria en β (Esquema 3.10).



Esquema 3.10

A continuación se describe la metodología que nos permitió obtener los distintos aminoácidos que presentaban un doble enlace carbono-carbono en su cadena lateral (Figura 3.9).

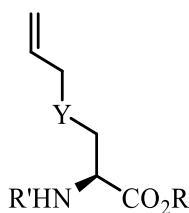
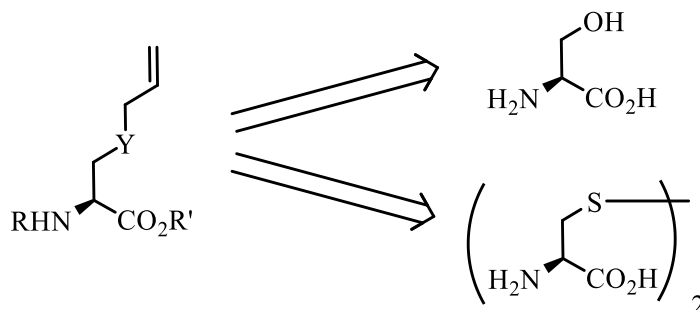


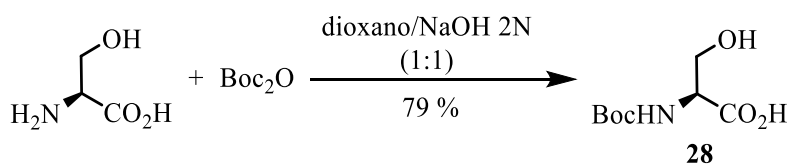
Figura 3.9 Esquema general de los aminoácidos buscados.

Para generar estos alquenilaminoácidos, se empleó como sustratos de partida o bien el aminoácido libre de L-serina (Ser) o bien L-cistina (Cys-Cys), debido a la complejidad de proteger únicamente el grupo amino de la L-cisteína (Cys). Sobre estos compuestos se va a incorporar el grupo alilo en el heteroátomo de la cadena lateral (Esquema 3.10).



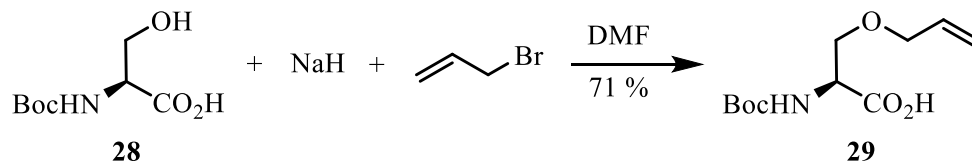
Esquema 3.10 Esquema retrosintético para los aminoácidos buscados.

En primer lugar se llevó a cabo la protección del grupo amino con el grupo Boc. Se seleccionó este grupo ya que en la etapa de incorporación del alqueno sobre la cadena lateral se va a emplear un medio fuertemente básico, incompatible con la química del grupo protector Fmoc. Para introducir este grupo protector se llevó a cabo la reacción entre L-serina y Boc₂O en una mezcla 1:1 de dioxano/NaOH 2N, obteniéndose así el compuesto **28** con buen rendimiento (Esquema 3.11).



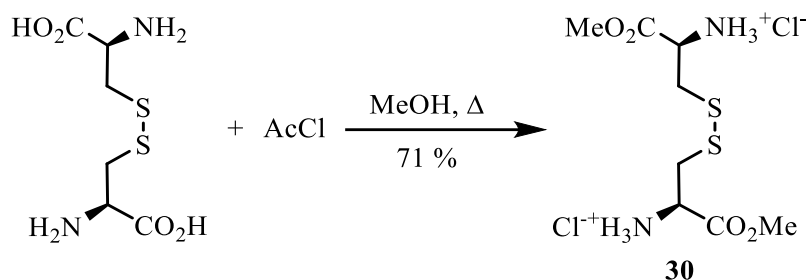
Esquema 3.11

La siguiente etapa de reacción consistió en la incorporación del grupo alilo sobre la cadena lateral. El compuesto **28** se hizo reaccionar con dos equivalentes de NaH en DMF a 0 °C, y después se adicionó bromuro de alilo, obteniendo el precursor del alquenilaminoácido **29** con buen rendimiento (Esquema 3.12).



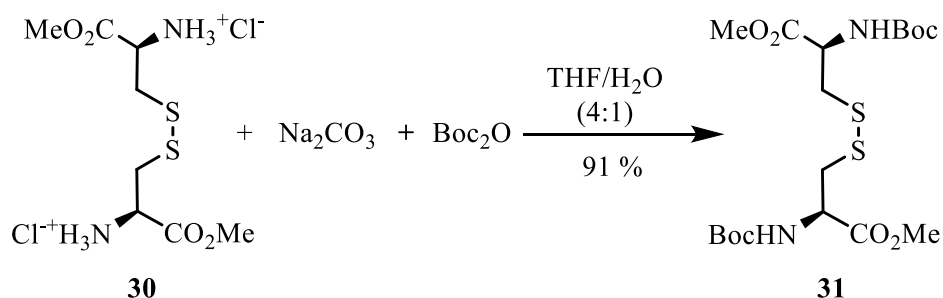
Esquema 3.12

Para la obtención del derivado de cisteína, se partió de L-cistina que se hizo reaccionar con cloruro de acetilo en metanol a reflujo, obteniendo así el clorhidrato del éster dimetílico de L-cistina, **30** (Esquema 3.13).



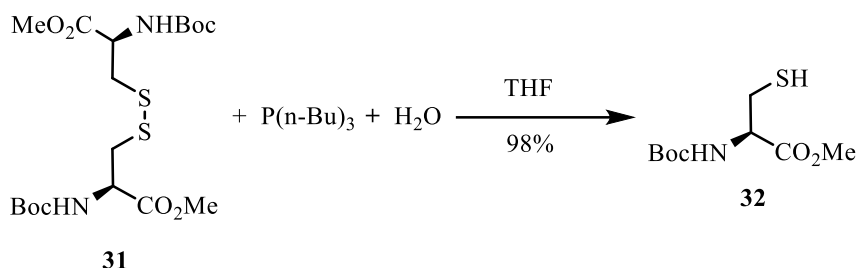
Esquema 3.13

El clorhidrato **30** se trató con carbonato de sodio y se hizo reaccionar con Boc_2O en una mezcla 4:1 de THF/ H_2O , obteniéndose así el compuesto **31** con excelente rendimiento (Esquema 3.14).

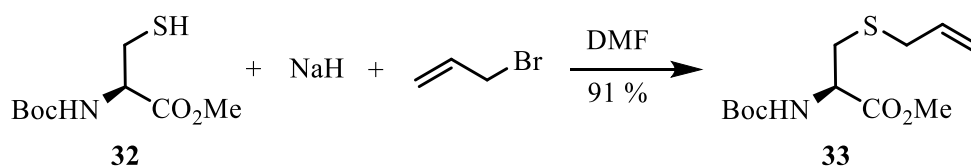


Esquema 3.14

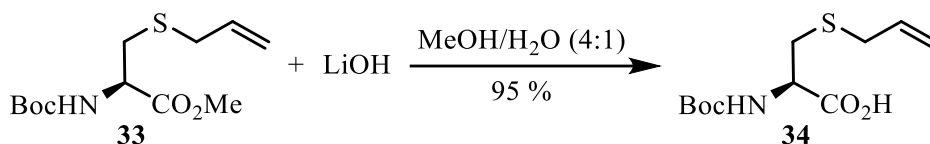
El enlace disulfuro se rompió empleando tributilfosfina en presencia de agua y empleando THF como disolvente. Así se obtuvo el compuesto **32**, con el grupo tiol libre y listo para incorporar el grupo alilo sobre la cadena lateral (Esquema 3.15).

**Esquema 3.15**

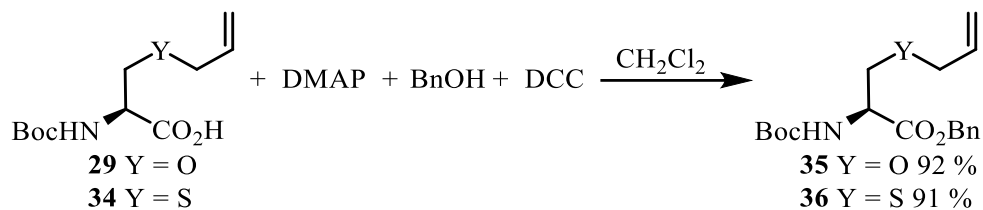
El tiol **32** se hizo reaccionar con un equivalente de NaH en DMF a 0 °C, y después se adicionó bromuro de alilo, obteniendo el compuesto **33** con excelente rendimiento (Esquema 3.16).

**Esquema 3.16**

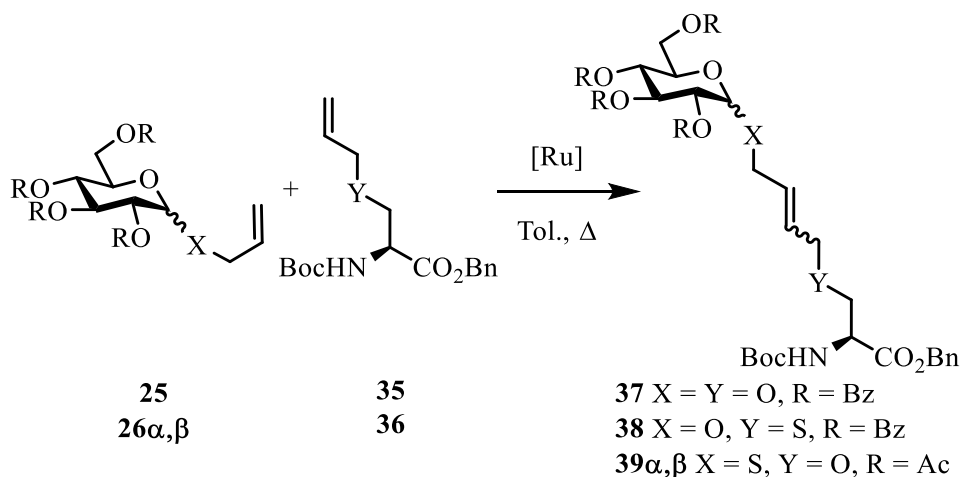
A continuación se hidrolizó el grupo éster, tratando el compuesto **33** con hidróxido de litio en MeOH/H₂O (4:1) durante 12 horas, obteniendo el precursor del alquenilaminoácido con excelente rendimiento (Esquema 3.17).

**Esquema 3.17**

Ambos derivados alquenilaminoácidos, compuestos **29** (Ser) y **34** (Cys), fueron tratados con 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y alcohol bencílico en CH₂Cl₂ anhidro. A continuación se añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC) y se dejó reaccionar durante toda la noche. Tras purificación por columna cromatográfica, se obtuvieron sendos compuestos protegidos en el grupo ácido como ésteres bencílicos con muy buenos rendimientos (Esquema 3.18).

**Esquema 3.18****3.3.2 Reacciones de metátesis**

En primer lugar, y con la intención de evaluar la viabilidad de la reacción de metátesis de carbohidratos, así como la elección correcta del catalizador, se llevó a cabo una serie de reacciones modificando la relación carbohidrato/aminoácido y variando el tipo de catalizador (Esquema 3.19 y Tabla 3.1).

**Esquema 3.19**

Empleando tolueno a 80 °C se llevó a cabo las distintas reacciones tal y como se recogen en la Tabla 3.1. Los catalizadores empleados fueron en todos los casos catalizadores de 2^a generación.

Tabla 3.1 Condiciones evaluadas en la reacción de CM.

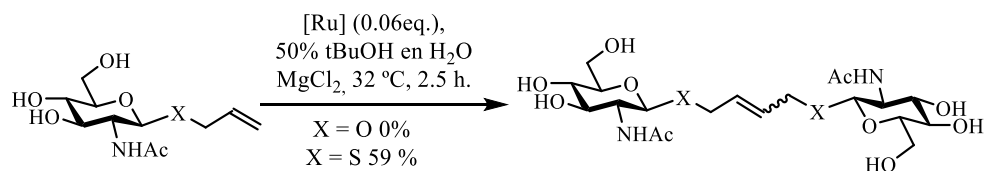
Entrada	Carbohidrato		Aminoácido		Catalizador tipo	Rto. CM	
	X	eq	Y	eq		% ^b	Comp.
1	O	1	O	5	Grubbs	No detectado	-
2	O	2 + 2 ^a	O	1	Grubbs	45	37
3	O	2 + 2 ^a	O	1	Hoveyda-Grubbs	55	37
4	O	2 + 2 ^a	O	1	Nguyen-Grubbs	25	37
5	O	2 + 2 ^a	S	1	Grubbs	45	38
6	O	2 + 2 ^a	S	1	Hoveyda-Grubbs	49	38
7	S	2 + 2 ^a	O	1	Grubbs	44	39 α,β
8	S	2 + 2 ^a	O	1	Hoveyda-Grubbs	47	39 α,β
9	S	2 + 2 ^a	S	1	Grubbs	No detectado	-
10	S	2 + 2 ^a	S	1	Hoveyda-Grubbs	No detectado	-

^a 2 + 2 hace referencia a una segunda carga de 2 equivalentes transcurridas 9 h de reacción. ^b Rendimiento después de purificación por cromatografía de columna.

A la vista de estos resultados, se observa que el catalizador que mejores rendimientos genera es el catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación.

Como puede observarse en la tabla, el *O*-glicósido presenta una moderada reactividad para la obtención de los compuestos **37** (55%, entrada **3**) y **38** (49%, entrada **6**).

Especialmente destacable es el rendimiento observado para **39 α,β** (47%, entrada **8**) ya que con carácter general los tioglicósidos exhiben una pobre o nula reactividad (entradas **9** y **10**) frente a la CM.^{108a,111b} De hecho, estos tioglicósidos han sido descritos como altamente reactivos en reacciones de auto-metátesis (*SM*, del inglés *self-metathesis*),^{108a} (Esquema 3.20) observándose rendimientos similares (40-50%) en reacciones de CM.



Esquema 3.20

El principal subproducto detectado corresponde a la *SM* del derivado del aminoácido, mientras que también se detectó el producto de *SM* de la parte glucídica (Figura 3.11). Ambos compuestos fueron observados en todas las reacciones mediante espectrometría de masas.

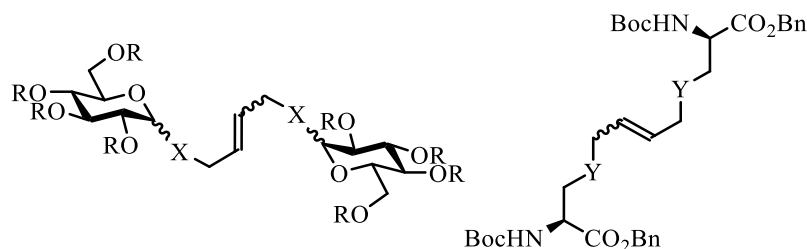
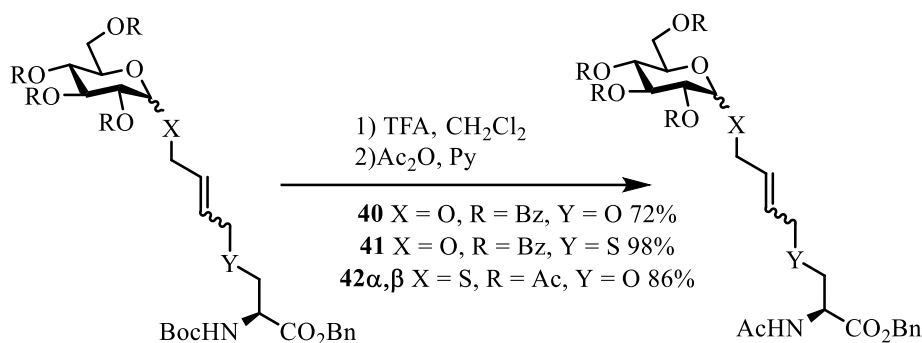


Figura 3.11 Estructuras de *SM* de carbohidrato y aminoácido, respectivamente.

La reacción de *CM* entre un derivado protegido de *S*-alilcisteína y un derivado de *O*-alil carbohidrato con enlace α -*O*-glicosídico genera un moderado rendimiento del correspondiente glicoconjugado (entradas **5** y **6**, Tabla 3.1).^{95f} Además, si la reacción tiene lugar entre ambos derivados insaturados que contienen azufre, la reacción no progresa y se recuperan los productos de partida (entradas **9** y **10**, Tabla 3.1).

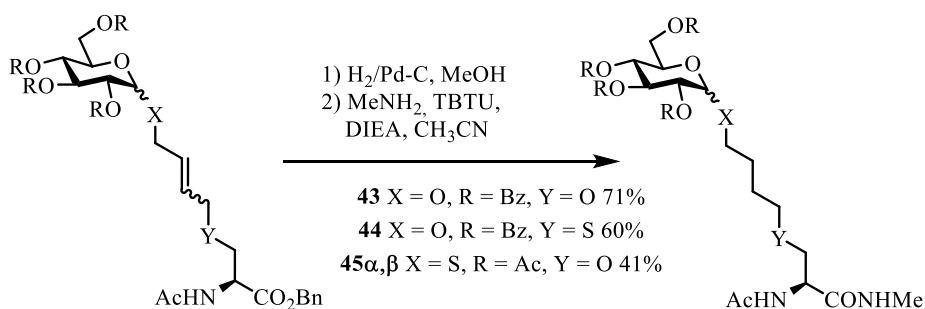
Una vez obtenidos los glicoaminoácidos **37**, **38** y **39 α,β** , sintetizados todos ellos como una mezcla *Z* y *E*, éstos pueden ser vistos como *building blocks* adecuadamente protegidos y listos para su uso para síntesis de nuevos neoglicopéptidos. En este caso, se decidió transformarlos en las correspondientes diamidas con la intención de que estos compuestos emulen a péptidos y así poder estudiar su conformación.

Se llevó a cabo la desprotección del grupo Boc mediante condiciones habituales, empleando una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ (1:1). A continuación, y sin etapa de purificación intermedia, se funcionalizó el grupo amina realizando una acetilación con Ac₂O en piridina, obteniendo así los compuestos **40**, **41** y **42 α,β** con rendimientos que fueron de buenos a excelentes (Esquema 3.21).



Esquema 3.21

A continuación se llevó a cabo la hidrogenación del doble enlace y la hidrogenólisis simultánea del grupo protector del ácido empleando condiciones de atmósfera de H₂ (1 atm), con paladio soportado sobre carbono como catalizador y metanol como disolvente. Seguidamente se generó el enlace amida empleando metilamina, DIEA y TBTU como agente de acoplamiento, obteniendo así los compuestos **43**, **44** y **45 α,β** tras la purificación. Como se puede observar, los compuestos que se obtienen con menor rendimiento son los que presentan un átomo de azufre en su estructura, debido a su conocida actividad como “envenenador” del catalizador, desactivando su actividad catalítica (Esquema 3.22).¹¹³

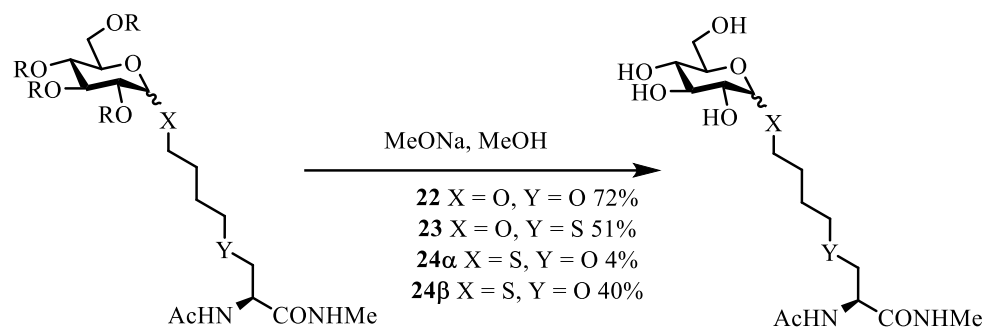


Esquema 3.22

Por último, se liberaron los grupos hidroxilos de los carbohidratos empleando una disolución saturada de MeONa en MeOH, obteniendo así las

¹¹³ Inglezakis, V. J.; Pouloupoulos S. G. *Adsorption, Ion Exchange and Catalysis: Design of Operations and Environmental Applications* 2006, Elsevier.

diamidas objetivo con rendimientos moderados. Los compuestos **24 α** y **24 β** pudieron ser separados mediante purificación por HPLC semipreparativo (Esquema 3.23).



Esquema 3.23

Adicionalmente, se trató de reproducir estos resultados empleando otros derivados de carbohidratos de mayor implicación biológica, como son *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (Figura 3.12). Como ya se había descrito en la bibliografía, estas reacciones no progresaron adecuadamente, presumiblemente por problemas de coordinación entre el catalizador y el residuo acilamino sobre el carbono 2 del carbohidrato.^{108a}

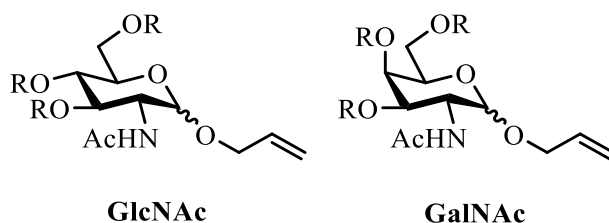


Figura 3.12 Carbohidratos con residuo acetamido en el carbono 2.

La comparación de reactividad entre el derivado de Glc **25** y el de GlcNAc vendría a indicar que el grupo acetamido debe de contribuir de forma adversa por razones estéricas, electrónicas o de coordinación a la ausencia de reactividad frente a la *CM*.

3.3.3 Análisis conformacional

Una vez sintetizados los cuatro compuestos objetivo (**22**, **23**, **24 α** y **24 β**) en sus formas enantioméricamente puras, se llevaron a cabo los análisis

conformationales en disolución acuosa,¹¹⁴ mediante RMN y cálculos de dinámica molecular (DM) de estos simples modelos de neoglicopéptidos.

El primer paso para el análisis conformacional consistió en la asignación de las señales de los espectros de ¹H y ¹³C para todas las moléculas, para lo que se realizaron los correspondientes espectros bidimensionales COSY y HSQC.

A modo de ejemplo, se explicará el tratamiento para el compuesto **22**, ya que para el resto de compuestos se realiza de manera análoga. En las Figuras 3.13, 3.14 y en la Tabla 3.2 se recoge la asignación de todos los protones, así como sus constantes de acoplamiento.

¹¹⁴ (a) Peters, T.; Pinto, B. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 710-720. (b) Jimenez-Barbero, J.; Peters, T. *NMR Spectroscopy of glycoconjugates* **2003**, Wiley-VCH.

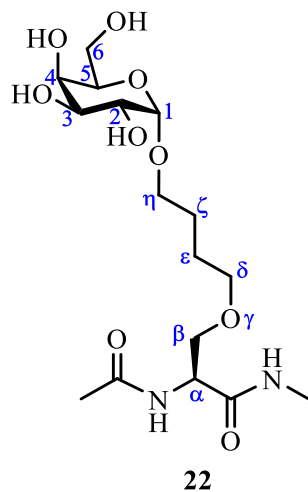


Figura 3.13 Designación atómica en la diamida **22**.

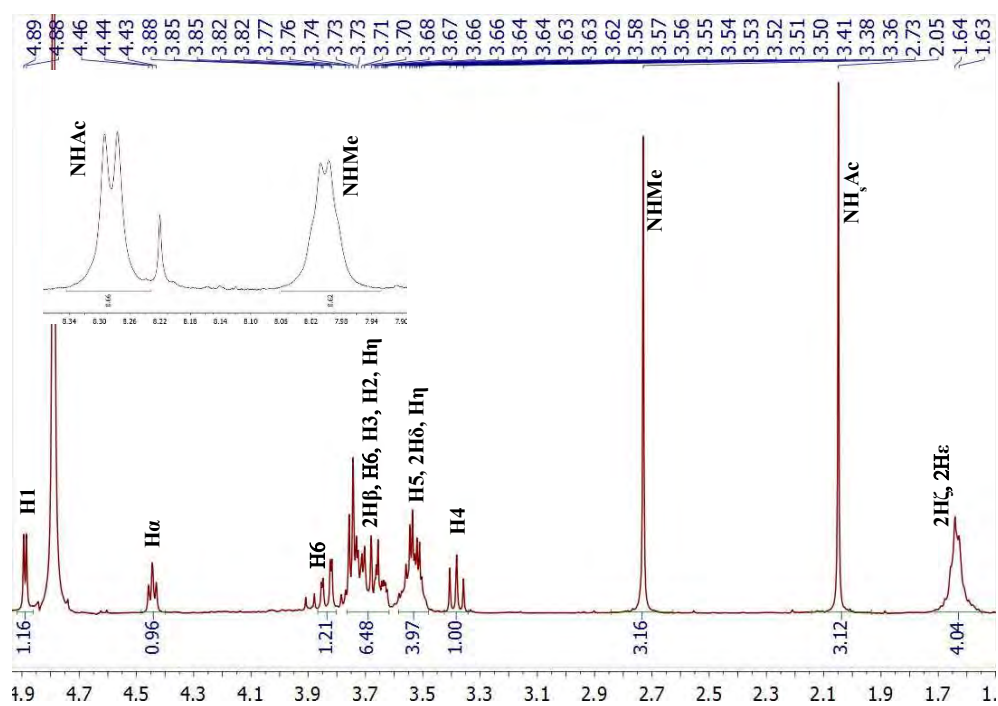


Tabla 3.2 Asignación de los protones y constantes de acoplamiento ${}^nJ_{H,H}$ experimentales para el compuesto **22**.

δ (ppm)	protones	multiplicidad ^b	${}^nJ_{H,H}$ (Hz)
1.57 - 1.69	2H ζ , 2H ϵ	m (4H)	-
2.05	COCH ₃	s (3H)	-
2.73	NHCH ₃	s (3H)	-
3.34 - 3.43	H4	m (1H)	-
3.46 - 3.60	2H δ , H η , H5	m (4H)	-
3.62 - 3.77	2H β , H η , H2, H3, H6	m (6H)	-
3.84	H6	dd (1H)	${}^3J_{H6, H6} = 12.2$ ${}^2J_{H6, H5} = 2.2$
4.44	H α	t (1H)	${}^3J_{H\alpha, H\beta} = 5.3$
4.89	H1	d (1H)	${}^3J_{H1, H2} = 3.8$
7.91 ^c	NHMe	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 4.3$
8.28 ^c	NHAc	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.1$

^a Datos obtenidos del experimento 1H RMN (400 MHz) en D₂O (25 °C), ^b s = singlete, d = doblete, t = triplete, dd = doblete de doblete, m = multiplete. ^c Datos obtenidos del experimento 1H RMN (400 MHz) en H₂O/D₂O (9:1) (25 °C).

A continuación, se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY en una mezcla H₂O/D₂O (9:1) y pH 5.2 a 25 °C para obtener experimentalmente las distancias relevantes protón-protón.

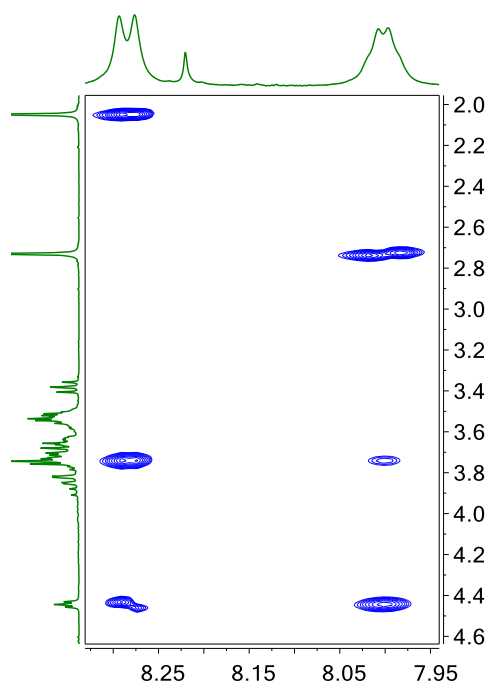


Figura 3.15 Experimento 2D-NOESY del compuesto **22**.

Las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones de amida se pudieron obtener de forma semicuantitativa, por integración de los correspondientes picos de cruce. Estas distancias fueron empleadas como restricciones en simulaciones de dinámica molecular (DM)¹¹⁵ con restricciones promediadas en el tiempo (DM-tar),¹¹⁶ con el objetivo de obtener una distribución de conformeros de baja energía (dependiente de los campos de fuerza de mecánica molecular) que fueran capaces de reproducir cuantitativamente los datos de RMN. Este procedimiento aporta una vía sencilla y robusta para considerar la alta flexibilidad de estos glicopéptidos en la interpretación de los datos de RMN y ha sido aplicado para describir satisfactoriamente el análisis conformacional de moléculas flexibles en disolución. Es conveniente mencionar que, en todos los casos, la concordancia entre las distancias experimentales y las teóricas fueron más que satisfactorias. La Tabla 3.3 muestra las distancias H-H experimentales y teóricas para el compuesto **22**.

¹¹⁵ Hinchliffe, *A Molecular Modelling for Beginners* **2003**, Wiley.

¹¹⁶ (a) Hendrickx, P. M. S.; Corzana, F.; Depraetere, S.; Tourwé, D. S. T.; Augustyns, K.; Martins, J. *C. J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 561-572. (b) Pearlman, D. A. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 1-16.

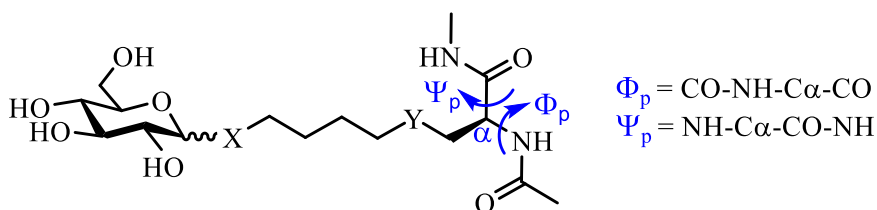
Tabla 3.3 Distancias^a H-H experimentales y teóricas para **22**.

	Experimental	DM-tar ^b
NHAc-NHMe	3.1	3.3
NHAc-H _α	2.7	2.9
NHMe-H _α	2.5	2.6
NHAc-Ac	2.3	2.4
NHMe-Me	2.7	2.7

^a Distancias expresadas en Å. ^b DM-tar de 80 ns en disolvente implícito.

Las DM-tar se llevaron a cabo directamente en agua utilizando un modelo de disolvente implícito y empleando un tiempo de simulación de 80 ns. Para su realización, se utilizó el programa AMBER¹¹⁷ y el campo de fuerzas denominado también AMBER,¹¹⁸ complementado con GLYCAM-06¹¹⁹ para simular adecuadamente el comportamiento conformacional del carbohidrato. Como puede observarse en la Tabla 3.3, existe una buena correlación entre los datos teóricos y experimentales, lo que valida las simulaciones realizadas.

De forma similar se estudiaron los diferentes glicopéptidos. Así, en la siguiente figura se muestran las distribuciones Φ/Ψ para parte peptídica de los glicopéptidos modelo, obtenidas por cálculos de DM.

**Figura 3.16** Ángulos de torsión del esqueleto peptídico.

¹¹⁷ (a) Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. R.; Cheatham, T. E., III; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 1-41. (b) Kollman, P. A.; et al. **1999**, AMBER 6, University of California, San Francisco.

¹¹⁸ Cornell, W. D.; Cieplack, P. C.; Bayly, I.; Gould, I. R.; Merz, K.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197.

¹¹⁹ Woods, R. J.; Dwek, R. A.; Edge, C. J.; Fraser-Reid, B. *J. Phys. Chem. B* **1995**, *99*, 3832-3846.

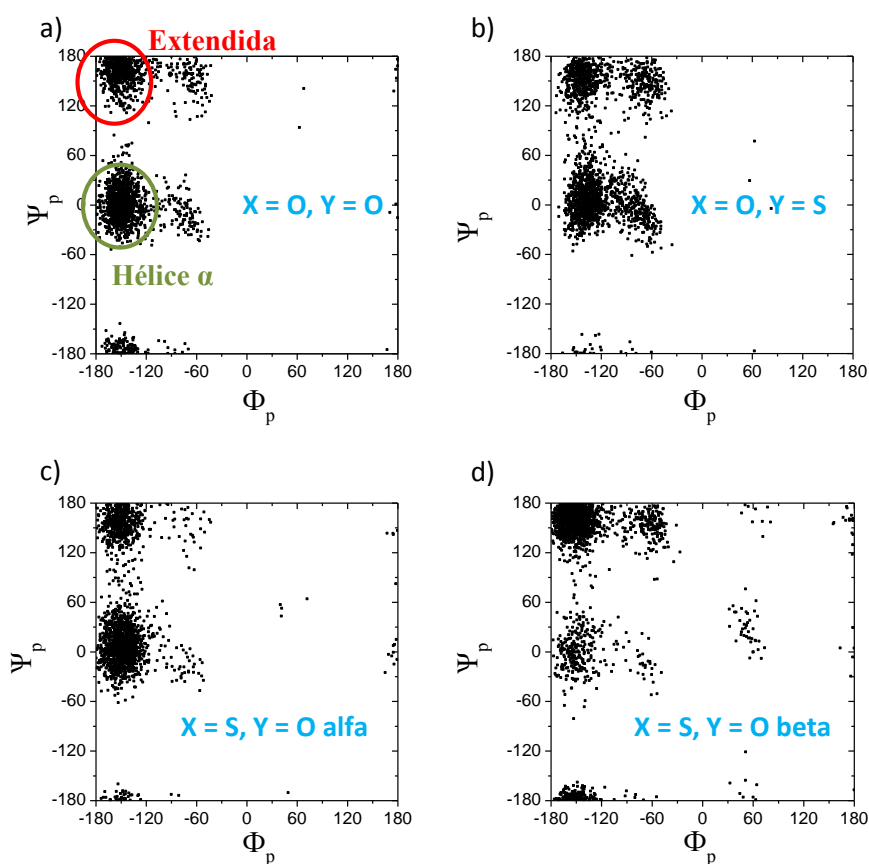


Figura 3.17 Diagramas de Ramachandran con los valores Φ_p/Ψ_p para los compuestos a) **22**, b) **23**, c) **24 α** y d) **24 β** .

Como se desprende de la observación de los respectivos diagramas de Ramachandran, el esqueleto peptídico exhibe dos conformaciones mayoritarias, tipo hélice y extendida, excepto para el compuesto **24 β** (gráfica **d** de la Figura 3.17), que muestra principalmente la conformación extendida, con aproximadamente el 95% de la población, con valores aproximados de $\Phi_p = \Psi_p = 180^\circ$. Este resultado está de acuerdo con el NOE de intensidad media entre los grupos NH observados exclusivamente en el glicopéptido **24 β** .

La estabilización de la conformación hélice presentada en los compuestos **22**, **23** y **24 α** , con enlaces α -glicosídicos, puede ser atribuida a los enlaces de

hidrógeno intermoleculares entre el carbohidrato y la parte peptídica, tal y como se muestra en la Figura 3.18.

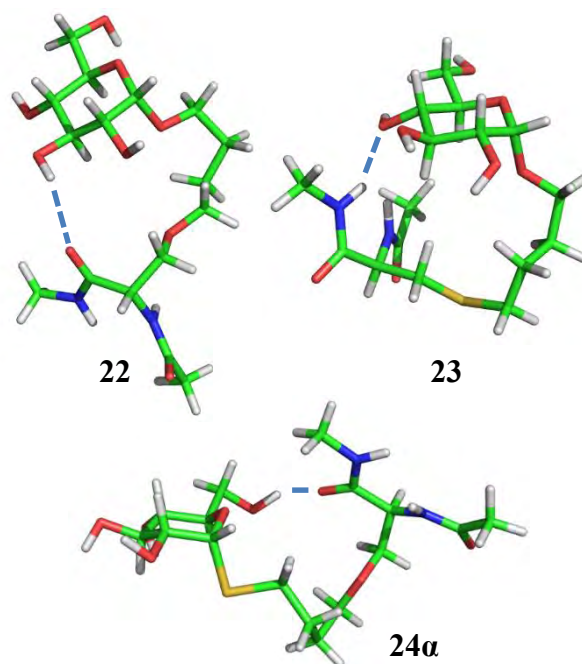


Figura 3.18 Enlaces de hidrógeno intermoleculares.

Respecto al enlace glicosídico, el ángulo Φ_s (O5-C1-X-C η) (Figura 3.19) es bastante rígido en todos los compuestos, en concordancia con el efecto exoanomérico.¹²⁰ Por otro lado se observaron diferencias significativas en el ángulo de torsión Ψ_s (C1-X-C η -C ζ) (Figura 3.20). Mientras que para compuestos con enlace *O*-glicosídico (**22** y **23**) este ángulo muestra valores próximos a 180°, para los derivados con enlace *S*-glicosídico (**24a** y **24b**), se observaron tres conformaciones mayoritarias, con valores de Ψ_s próximos a -60, 60 y 180°. Estos tres conformeros mayoritarios para los compuestos **24a** y **24b** coinciden con los mínimos locales calculados previamente para 4-tio- α -maltósido de metilo¹²¹ y otros tioglucósidos,^{95f} y son consistentes con estudios en los que se observa que el átomo de azufre en el enlace glicosídico proporciona un alto grado de flexibilidad entre las unidades

¹²⁰ (a) Lemieux, R. U.; Pavia, A. A.; Martin, J. C.; Watanabe, K. A. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 4427-4439. (b) Lemieux, R. U.; Koto, S. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1933-1944. (c) Thatcher, G. R. J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects* **1993**, American Chemical Society, Washington DC.

¹²¹ Mazeau, K.; Tvaroska, I. *Carbohydr. Res.* **1992**, *225*, 27-41.

Debido al solapamiento de señales en el RMN de ^1H , no se ha podido determinar con precisión el porcentaje de cada conformero y en alguno de ellos puede estar sobrestimado por el Campo de Fuerzas General de Amber (*GAFF* del inglés) empleado en estos cálculos de DM-tar.¹²² En la Figura 3.21 se muestran los conjuntos con las diferentes las disposiciones espaciales para los compuestos **22**, **23**, **24 α** y **24 β** procedentes de las simulaciones DM-tar.

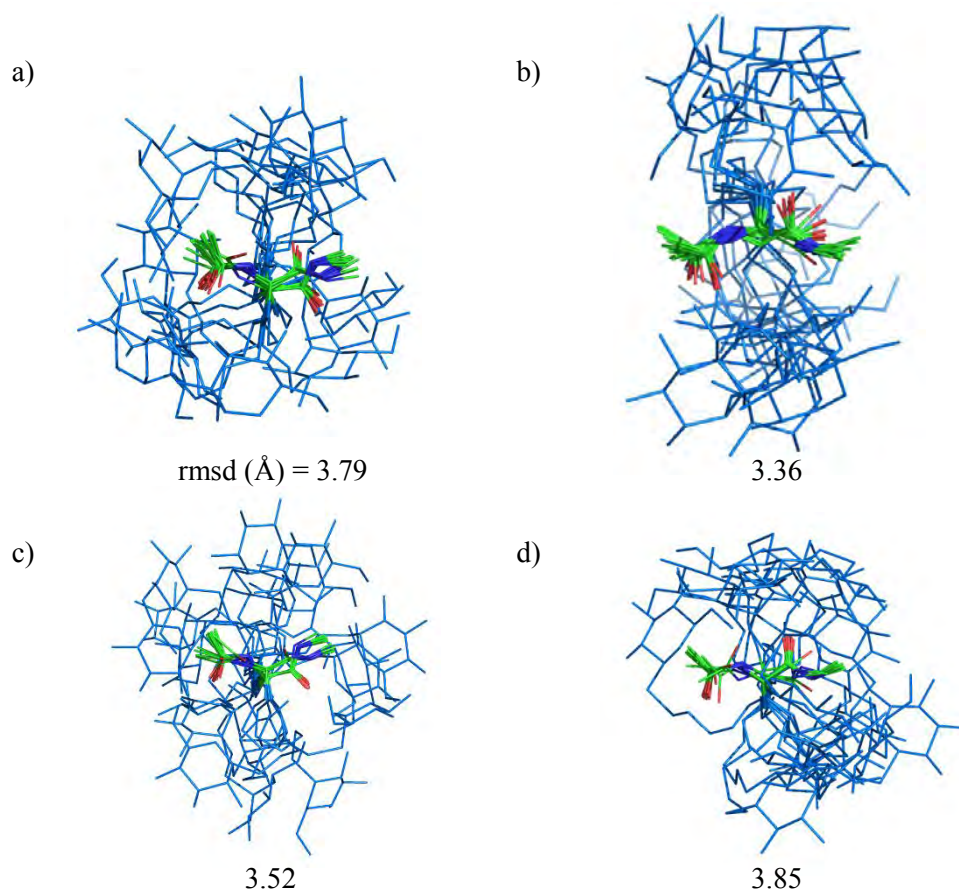


Figura 3.21 Conjuntos de disposiciones espaciales calculados para los compuestos **22** (a), **23** (b), **24 α** (c) y **24 β** (d), obtenidos a partir de las simulaciones DM-tar, mostrando la desviación cuadrática media (rmsd) en Å.

¹²² Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. *Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.

Curiosamente, tanto la combinación de los diferentes heteroátomos (O / S) como la presencia de un espaciador de cuatro carbonos permiten una amplia gama de disposiciones espaciales para el residuo carbohidrato con respecto al esqueleto peptídico, que podrían tener consecuencias importantes en los procesos de reconocimiento molecular. Además, la flexibilidad extra mostrada por los *S*-glicopéptidos, junto con el auge que ha adquirido recientemente este tipo de enlace glicosídico, nos está permitiendo desarrollar una nueva línea de investigación orientada al diseño de nuevos *S*-glicopéptidos que son capaces de emular importantes *O*-glicopéptidos naturales. De hecho, diferentes carbohidratos unidos a cisteína están actualmente siendo incorporados en péptidos relevantes biológicamente.^{100a}

3.4 Conclusiones

1. Se ha llevado a cabo la síntesis y optimización del proceso de metátesis cruzada entre derivados de aminoácidos y carbohidratos para la obtención de cuatro neoglicopéptidos modelo (Figura 3.22). Todos ellos han sido obtenidos con moderados rendimientos, debido a la competencia con reacciones de auto-metátesis entre los productos de partida.

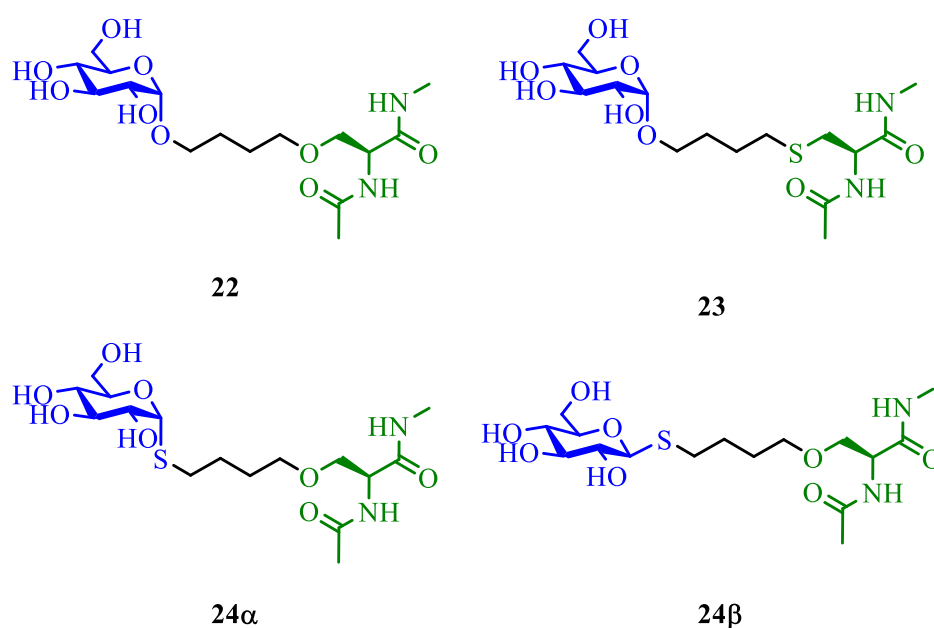


Figura 3.22 Neoglicopéptidos modelo.

2. Todos los compuestos presentan un residuo carbohidrato basado en glucosa enlazado a distintos aminoácidos mediante un espaciador. Del estudio de sus análisis conformacionales en disolución acuosa se observa que el carbohidrato presenta mayor libertad a la hora de adquirir una disposición espacial con respecto a los glicosilaminoácidos naturales, cuyas disposiciones espaciales son más restringidas.

4. La reacción de hidrotiolación en alquenos

4.1 Introducción y antecedentes

4.1.1 Iniciadores radicalarios

4.1.2 Mecanismo de reacción

4.2 Objetivos

4.3 Discusión de resultados

4.3.1 Síntesis de materiales de partida

4.3.2 Reacciones de hidrotiolación

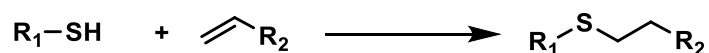
4.4 Conclusiones

4.1 Introducción y antecedentes

Como se ha explicado anteriormente, la presencia de un espaciador entre la parte glicona y la aglicona puede conferir a estos tipos de glicoderivados una alta flexibilidad a la hora de disponer espacialmente el carbohidrato, infiriéndole así una alta libertad a la hora de presentarse respecto a un residuo o una cadena peptídica. Debido a esta flexibilidad se pueden producir interacciones que establezcan determinadas conformaciones y la actividad de dichas biomoléculas puede verse, por tanto, modificada sustancialmente.

En el capítulo anterior mostramos como este espaciador puede generarse mediante reacciones de metátesis entre el carbohidrato y el aminoácido convenientemente protegidos. Sin embargo, cuando intentamos acceder a los derivados con *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) como parte carbohidrato, no se obtuvieron buenos resultados.

Otra posibilidad de generar un espaciador entre ambas partes es recurrir a reacciones radicalarias tipo hidrotiolación de alquenos o también conocidas como reacciones tiol-eno (TEC o *thiol-ene coupling* del inglés). Estas reacciones han adquirido relevancia en los últimos años debido a su versatilidad en la construcción de enlaces carbono-azufre que, como puede verse en el Esquema 4.1, involucra nuevamente a un alqueno y a un tiol.

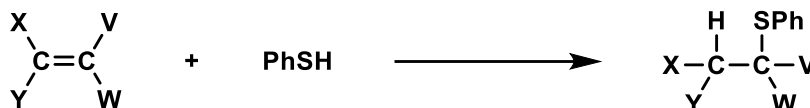


Esquema 4.1 Esquema general para la reacción de hidrotiolación.

La reacción de hidrotiolación de alquenos fue descrita hace más de un siglo por Theodor Posner, cuando enfrentó tiofenol a distintos sistemas insaturados (Esquema 4.2).¹²³ Desde entonces ha sido empleada en mayor o menor medida, aunque relegada a la síntesis de tioéteres simples. Hace poco más de dos décadas, resurgió con fuerza debido a la posibilidad de emplear dicha reacción para la síntesis de polímeros o como una poderosa herramienta de química supramolecular y bioconjugación en química biológica, con particular énfasis en glicoquímica.¹²⁴

¹²³ Posner, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 646-657.

¹²⁴ (a) Marra, A.; Staderini, S.; Berthet, N.; Dumy, P.; Renaudet, O.; Dondoni, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1144-1149. (b) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573. (c) Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T. M. *J. Polym. Sci. Part A* **2004**, *42*, 5301-5338. (d) Dondoni, A.; Marra, A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 573-586.



Esquema 4.2 Reacción descrita por T. Posner en 1905.

Esta reacción posee la mayoría de las características típicas de las reacciones click, como por ejemplo ortogonalidad con otros procedimientos sintéticos comunes (indudablemente unos de los aspectos más notables), condiciones de reacción muy suaves, uso de catalizadores y disolventes benignos, alta velocidad de reacción, insensibilidad a agua u oxígeno, regio y estereoselectividad completa, fácil disponibilidad de los tioles y alquenos, facilidad en las etapas de purificación y, generalmente, altos rendimientos.¹²⁵

Para entender correctamente cómo funciona la reacción de tiol-eno es necesario hacer una breve reseña de los iniciadores radicalarios más empleados, así como sus diferentes mecanismos de reacción.

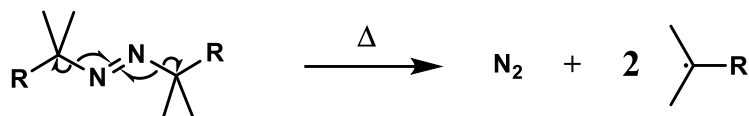
4.1.1 Iniciadores radicalarios

Los distintos tipos de iniciadores pueden subdividirse en dos grupos, atendiendo a qué condiciones son necesarias para la iniciación de la reacción radicalaria, ya sea mediante calor o por luz, dividiéndose por tanto en vía térmica o vía fotoquímica, respectivamente.

Vía Térmica

Los iniciadores pertenecientes a este subgrupo también podrían denominarse iniciadores tipo azo, ya que todos ellos presentan un grupo azo en su estructura, siendo este grupo funcional el que inicia todo el proceso, pero necesitando para ello el empleo de altas temperaturas que propicien la salida de nitrógeno. El mecanismo de pérdida de la molécula de nitrógeno se muestra en el Esquema 4.3, de manera que se generan dos especies iniciadoras de radicales.

¹²⁵ (a) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021. (b) Dondoni, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995-8997. (c) Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062-5064. (d) Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355-1387. (e) Witczak, Z. J.; Bielski, R. *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies* **2013**. John Wiley and Sons. (Part 2: Thio-Click Chemistry in Glycoscience: Overview and Perspectives (Witczak, Z. J.) y Part 3: Free-Radical Thiol-ene and Thiol-yne Couplings as Click Processes for Glycoconjugation (Dondoni, A.; Marra, A.)).

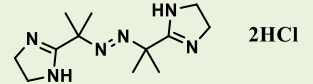
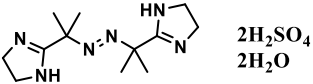
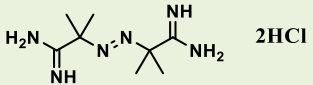
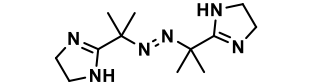
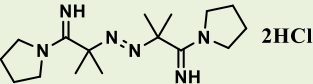
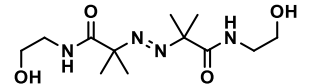
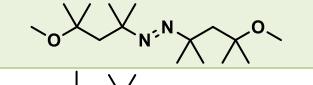
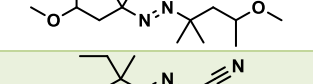
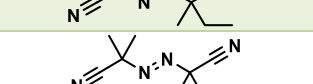
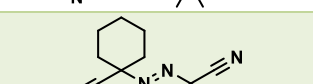
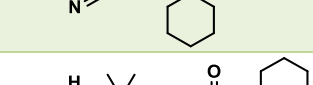
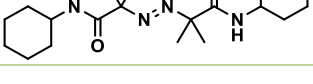


Esquema 4.3 Mecanismo de salida de N_2 y formación de radicales.

El grupo R puede variar en función de la solubilidad que se quiera dar al iniciador, para poder emplearlo tanto en disolventes orgánicos como en disolventes acuosos, persiguiendo así los objetivos de la química sostenible.

Muchos de estos iniciadores se comercializan bajo el nombre de Vazo®, nombre registrado por la multinacional DuPont®. En la Tabla 4.1 se recogen los más comunes, así como la temperatura para que su vida media sea de 10 horas y también su solubilidad en diferentes disolventes.

Tabla 4.1 Iniciadores radicalarios comerciales tipo VAZO[®].¹²⁶

Nombre Comercial	Estructura	T ($t_{1/2} = 10\text{h}$)	Soluble en
VA-44	 2HCl	44 °C	Acuoso
VA-46B	 2H ₂ SO ₄ 2H ₂ O	47 °C	Acuoso
VA-50	 2HCl	56 °C	Acuoso
VA-61	 2HCl	61 °C	Acuoso
VA-67	 2HCl	67 °C	Acuoso
VA-86	 2HCl	87 °C	Acuoso
VA-70	 2HCl	30 °C	No acuoso
VA-65	 2HCl	51 °C	No acuoso
VAZO67		67 °C	No acuoso
VAZO64		65 °C	No acuoso
VAZO88		88 °C	No acuoso
VAm-111		111 °C	No acuoso

¹²⁶ Información extraída de DuPont[®] y Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Vía Fotoquímica

A diferencia del subgrupo anterior, la mayoría de los iniciadores que se emplean en este tipo de vía no suelen presentar el grupo azo (aunque alguno de éstos, bajo condiciones fotoquímicas también se comportan de igual manera), sino que, en su lugar, requieren de un grupo funcional capaz de absorber la energía lumínica, ya sea luz ultravioleta o del espectro visible, necesaria para efectuar la ruptura de enlaces.

Actualmente existen muchos tipos de iniciadores, clasificados en dos grupos, Tipo I y Tipo II. Esta clasificación atiende al tipo de mecanismo y al número de moléculas implicadas en el proceso de generación de los radicales, pudiendo ser por tanto, unimolecular (Tipo I) o bimolecular (Tipo II).

- Fotoiniciadores Tipo I: Fotoiniciadores Unimoleculares

Estos fotoiniciadores experimentan una ruptura de enlace homolítica tras la absorción de luz. La estructura más común en este tipo de iniciadores se basa en benzoína o sus derivados, siendo el 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DPAP) el más extendido en síntesis de polímeros. Dentro de este grupo, podemos encontrar también fotoiniciadores no basados en benzoína, como el óxido de 2,4,6-trimetilbenzoildifenilfosfina (TMDPO) (Figura 4.1).

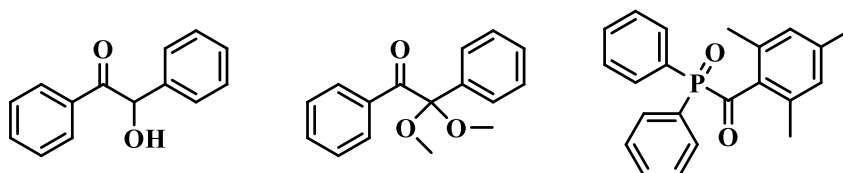
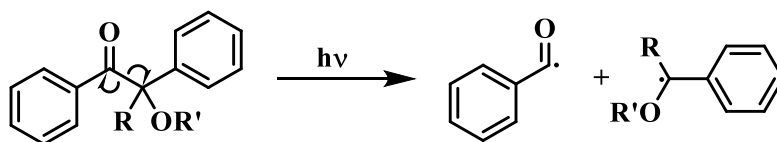


Figura 4.1 Estructuras de Benzoína, DPAP y TMDPO.

Como puede verse en el mecanismo que siguen estos fotoiniciadores, tras la irradiación se generan dos especies radicalarias procedentes del producto de partida.



Esquema 4.4 Mecanismo de generación de radicales del DPAP.

- Fotoiniciadores Tipo II: Fotoiniciadores Bimoleculares

Esta segunda clase de iniciadores está basada en compuestos cuyo estado excitado triplete reacciona con otra especie dadora de hidrógeno, iniciando de esta manera el proceso radicalario mediante un proceso bimolecular. Dentro de este grupo podemos encontrar sistemas basados en benzofenona (BP), tioxantona (TX) o canforquinona (CQ), requiriendo de un coiniador como pueden ser alcoholes, aminas o tioles, que actúan como dadores de protones (Figura 4.2).

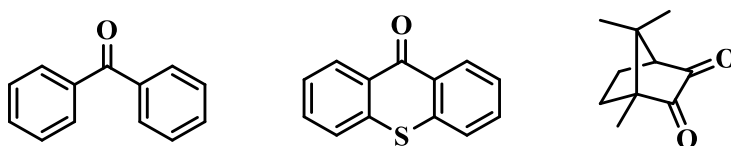
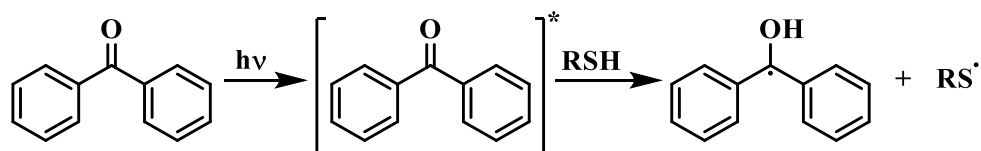


Figura 4.2 Estructura de Benzofenona, tioxantona y canforquinona.

Como puede verse en el mecanismo que siguen estos fotoiniciadores, existe una primera etapa en la cual se emplea la energía procedente de la luz para excitar al fotoiniciador, siendo esta especie excitada la que sustrae un protón del coiniador. De esta manera se obtienen dos especies radicalarias procedentes de distintos productos de partida.



Esquema 4.5 Mecanismo de generación de radicales de la BP.

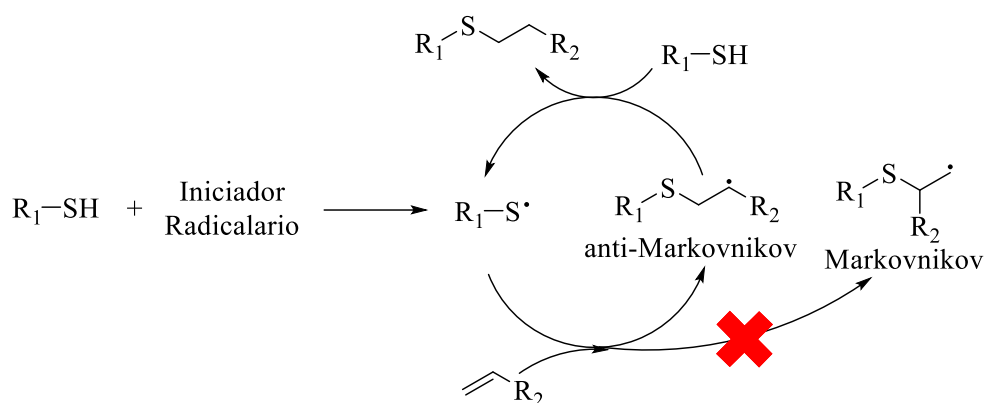
4.1.2 Mecanismo de reacción

Pese a que la reacción TEC es conocida desde 1905, no fue hasta bastante después cuando su mecanismo fue propuesto por Kharasch y colaboradores.¹²⁷ Actualmente, está bien establecido que la reacción tiol-eno se inicia con la formación del radical tílo, que se genera a partir de un tiol en presencia de un iniciador radicalario. Este radical tílo generado se adiciona al alqueno con una regioselectividad anti-Markovnikov,¹²⁸ de manera que se genera un radical

¹²⁷ Kharasch, M. S.; Read, A. T.; Mayo, F. R. *Chem. Ind.*, **1938**, 57, 752-754.

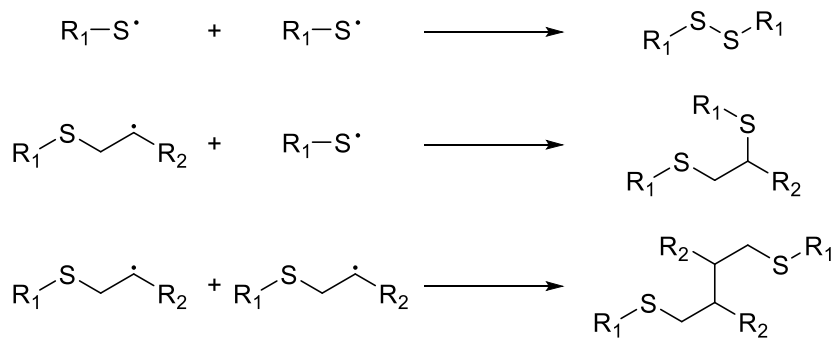
¹²⁸ (a) Floyd, N.; Vijayakrishnan, B.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7798-7802. (b) Lázár, L.; Csávás, M.; Herczeg, M.; Herczegh, P.; Borbás, A. *Org. Lett.* **2012**, 14, 4650-4653.

secundario, cuya estabilidad es superior al radical primario que se generaría de darse una adición Markovnikov (Esquema 4.6). Finalmente, el tioetil radical derivado abstrae un hidrógeno del tiol, conduciendo al tioéter final y a un nuevo radical tílo, iniciando así nuevamente el proceso en cadena, lo que representa la etapa de propagación del proceso radicalario.



Esquema 4.6

Las etapas de terminación, pueden generar tres nuevas especies no deseadas, todas ellas presentando dos átomos de azufre sobre su estructura, bien en forma de puente disulfuro o sendos tioéteres (Esquema 4.7).



Esquema 4.7 Etapas de terminación del proceso radicalario.

4.2 Objetivos

Teniendo en cuenta que *O*-glicopéptidos que presentan un residuo GalNAc en su estructura son empleados para el diseño de vacunas contra el cáncer,¹²⁹ y dado que no fue posible realizar la reacción de metátesis a partir de sustratos derivados de GalNAc (Capítulo anterior), se decidió llevar a cabo la reacción de hidrotiolación para generar el espaciador entre el resto carbohidrato y el aminoácido.

Así, y con la intención de estudiar en que medida afecta la presencia de un espaciador a la hora de disponer el carbohidrato respecto al residuo peptídico y basándonos en la versatilidad que presenta la reacción de hidrotiolación de alquenos, el principal objetivo de este capítulo es la síntesis de una serie de nuevos tioglicosilaminoácidos elongados, empleando la reacción de hidrotiolación.

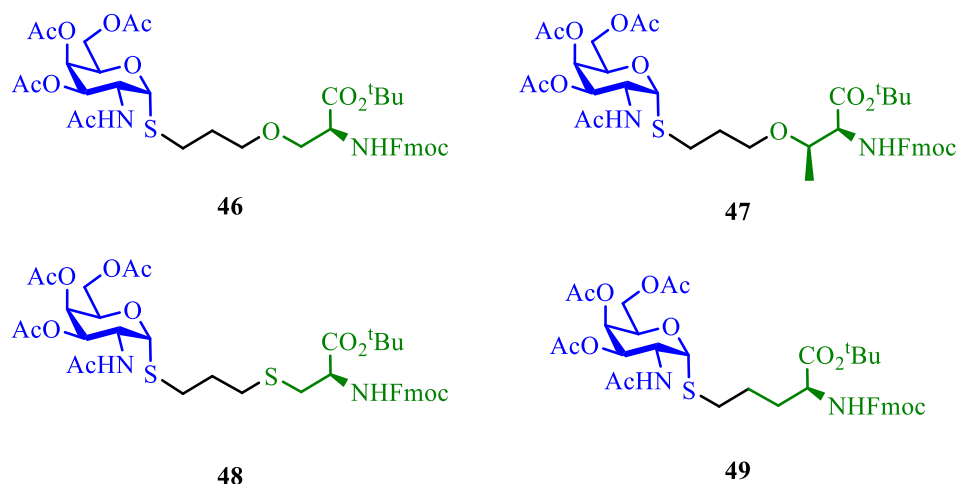


Figura 4.3 Tioglicosilaminoácidos objetivo de este trabajo.

Los compuestos que se pretende sintetizar presentan un espaciador de tres carbonos entre los heteroátomos, frente al de cuatro carbonos visto en el capítulo anterior. Esto responde al tipo sustratos de partida así como al tipo de reacción empleada para la síntesis de los mismos.

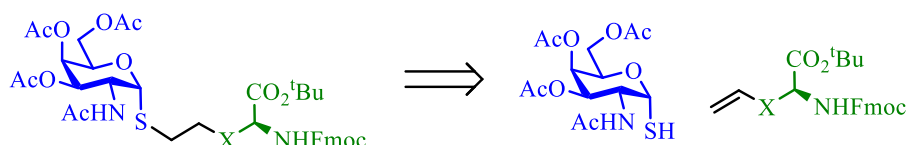
A su vez, estos nuevos compuestos están preparados para su utilización en síntesis en fase sólida y aparecen en la Figura 4.3. Se emplearon los grupos protectores Fmoc para el grupo amino y el grupo *terc*butilo para el ácido carboxílico

¹²⁹ Allen, J. R.; Harris, C. R.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1890-1897.

para poder incorporar estas moléculas, en un trabajo posterior, en distintas secuencias peptídicas empleando la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS del inglés) mediante estrategia Fmoc.¹³⁰

4.3 Discusión de resultados

Desde un punto de vista retrosintético e implicando una desconexión de hidrotiolación, la obtención de los tioglicosilaminoácidos objetivo requiere partir de un mismo tiocarbohidrato que actúa como glicosil dador, la 2-acetamido-2-deoxi-1-tio-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-galactopiranososa, abreviado como GalNAc- α -SH, y los correspondientes alquenil derivados de los distintos aminoácidos convenientemente protegidos (Esquema 4.8).



Esquema 4.8

Para llevar a cabo la reacción es necesario, por tanto, la obtención de los distintos alquenilaminoácidos y el tiocarbohidrato en escala de gramo, de una manera sencilla y asequible.

Atendiendo a la bibliografía, se encuentran muy pocos ejemplos de reacciones tiol-eno en los que se emplean tiocarbohidratos como tioles^{124d,128d,131} o alquenil-aminoácidos como alquenos,¹³² y menos aún en los que usan ambos sustratos.^{15c,128c} En la mayoría de los casos, el tiocarbohidrato empleado es el anómero β (tanto de glucosa, galactosa o manosa), mientras que apenas se pueden encontrar descritos alguno de los derivados de β -GluNAc o β -GalNAc.^{128c} Sorprendentemente, al revisar en la bibliografía, no se encuentra ningún ejemplo en el que el tiocarbohidrato que se emplea como tiol sea α -GalNAc.

¹³⁰ (a) Chang, C. D.; Meienhofer, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249. (b) Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1978**, 537-539. (c) Chang, C. D.; Waki, M.; Ahmad, M.; Meienhofer, J.; Lundell, E. O.; Haug, J. D. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.

¹³¹ (a) Fiore, M.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4422-4425. (b) Gómez-García, M.; Benito, J. M.; Butera, A. P.; Ortiz-Mellet, C.; García-Fernandez, J.; Jiménez-Blanco, J.L. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1273-1288. (c) Gómez-García, M.; Benito, J. M.; Gutiérrez-Gallego, R.; Maestre, A.; Ortiz-Mellet, C.; García-Fernandez, J.; Jiménez-Blanco, J.L. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1849-1860.

¹³² Karmann, L.; Kazmaier, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 7101-7109.

4.3.1 Síntesis de materiales de partida

En primer lugar, se va a describir una mejora de la metodología descrita en la bibliografía para la obtención del GalNAc- α -SH a escala multigramo, dado que este compuesto está descrito para su obtención a escala de 300 mg.¹³³

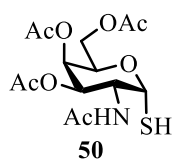
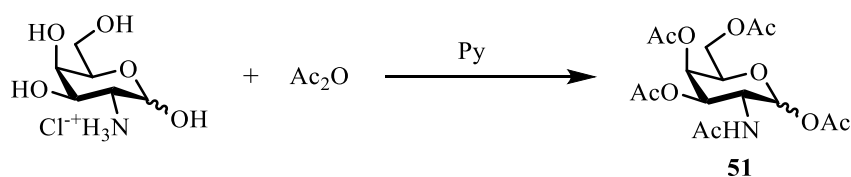


Figura 4.4 GalNAc- α -SH.

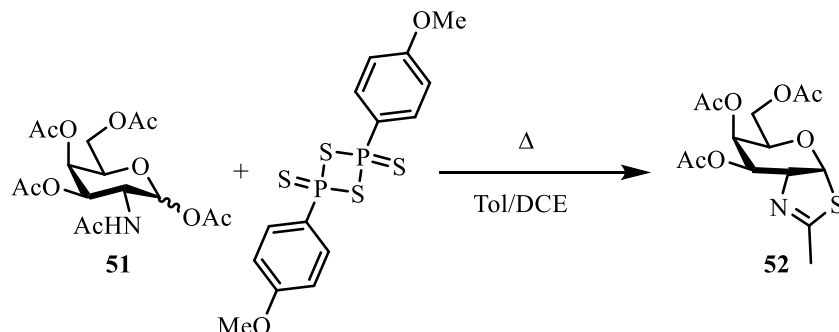
El primer paso para la obtención de GalNAc- α -SH es partir del clorhidrato de D-galactosamina, un producto comercialmente disponible. Se trató este compuesto con una mezcla Ac₂O y piridina. Tras la evaporación del disolvente y sin requerir ninguna etapa de purificación se obtuvo de manera cuantitativa una mezcla de anómeros α y β del derivado penta-acetilado de la galactosamina (Esquema 4.9).



Esquema 4.9

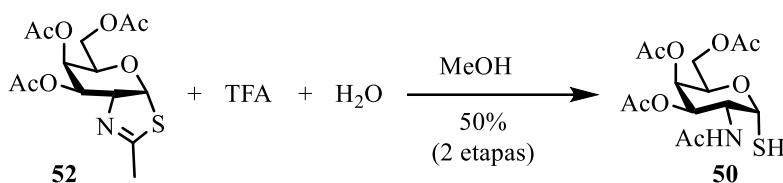
Dicha mezcla se hizo reaccionar con el reactivo de Lawesson en tolueno/dicloroetano (1:1), para obtener de esta manera la triacetiltiazolina **52**.

¹³³ Knapp, S.; Myers, D.S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2995-2999.



Esquema 4.10

Posteriormente, el crudo de reacción fue redissuelto en metanol y tratado con TFA y H₂O. Tras la purificación por columna cromatográfica se obtuvieron 9.55 g. del tiocarbhidrato GalNAc- α -SH buscado con un rendimiento global de 50%.



Esquema 4.11

Una vez preparado el tiocarbhidrato, el siguiente paso es la preparación de los derivados de los aminoácidos; por ello, ahora, se describirán las metodologías que nos permitirán obtener los distintos aminoácidos que presentan un doble enlace carbono-carbono sobre su cadena lateral (Figura 4.5).

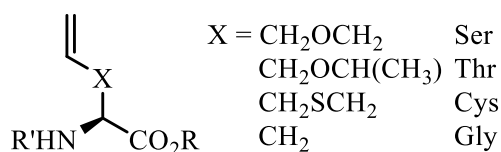
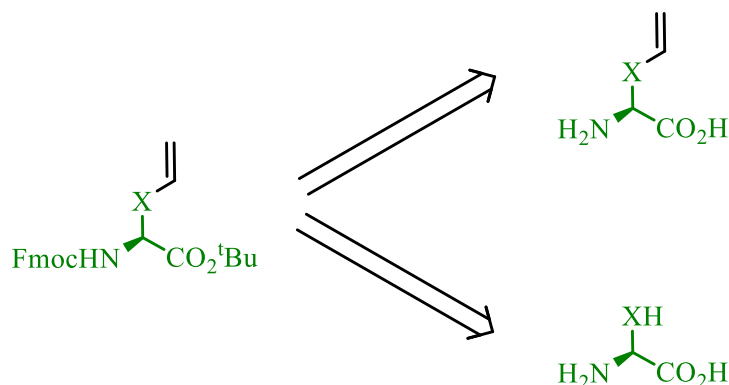


Figura 4.5 Esquema general de los aminoácidos buscados.

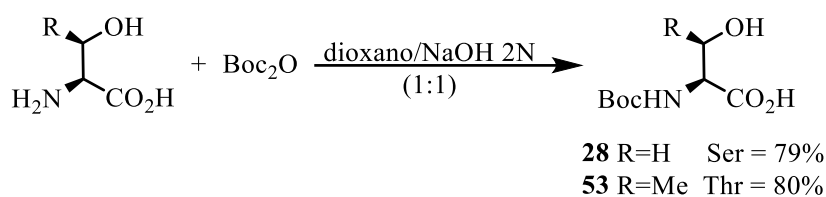
Para generar estos alquenilaminoácidos, se va a emplear dos estrategias diferentes. Una, se basa en la alilación de los aminoácidos libres serina y treonina. La

otra parte del alquenal derivado de cisteína o de la alilglicina. Todos estos compuestos de partida son accesibles comercialmente (Esquema 4.12).



Esquema 4.12 Esquema retrosintético para los aminoácidos buscados.

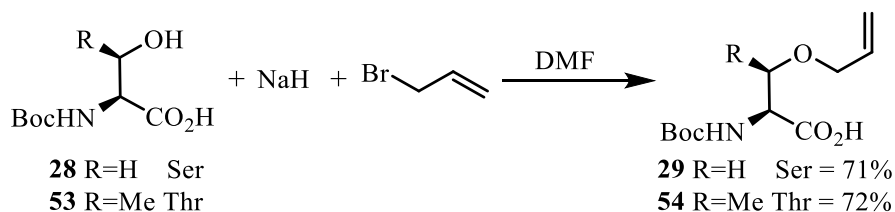
En primer lugar, se llevó a cabo la protección del grupo amino, tanto de serina como de treonina, con el grupo Boc siguiendo la metodología vista en el *Capítulo 3*. Se seleccionó este grupo ya que en la etapa de incorporación del alqueno sobre la cadena lateral se va a emplear un medio fuertemente básico, incompatible con el grupo protector Fmoc. Por esta razón, posteriormente se llevará a cabo un intercambio de grupos funcionales para obtener los compuestos preparados para la metodología Fmoc. Para introducir el grupo protector Boc se llevó a cabo la reacción entre los correspondientes aminoácidos libres, serina y treonina, y Boc₂O en una mezcla 1:1 de dioxano/NaOH 2N, obteniéndose así los *N*-Boc-aminoácidos con buenos rendimientos (Esquema 4.13).



Esquema 4.13

La siguiente etapa de reacción consistió en la incorporación de la insaturación sobre la cadena lateral. Los aminoácidos se hicieron reaccionar con dos equivalentes de hidruro de sodio en DMF a 0 °C, y después se adicionó bromuro de

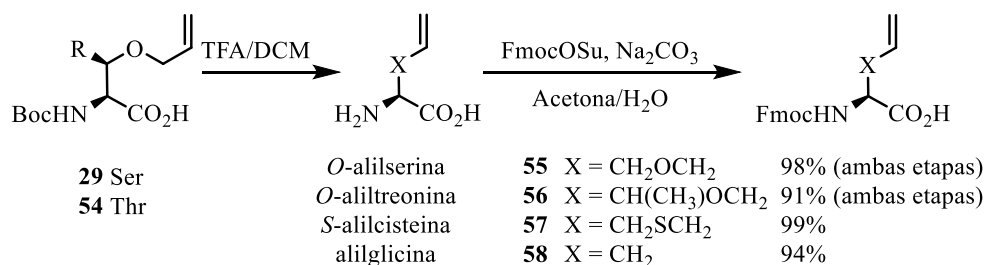
alilo. Así se obtuvieron los precursores de los *O*-alil-aminoácidos **29** y **54** con buenos rendimientos (Esquema 4.14).



Esquema 4.14

El siguiente paso consistió en la desprotección del grupo carbamato utilizando una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ (1:1). De esta manera se obtuvieron los correspondientes aminoácidos con sus grupos amino como sal trifluoroacética y ácido carboxílico y que incorporan un alqueno en la cadena lateral. Por su parte, los alil derivados de cisteína y glicina son comerciales, y pueden ser incorporados a la estrategia sintética que estamos desarrollando (Esquema 4.15).

Los alquenilaminoácidos libres fueron disueltos en una mezcla acetona/H₂O (1:1) y tratados con carbonato de sodio y Fmoc *N*-hidroxisuccinimida (FmocOSu). Tras la etapa de purificación mediante columna cromatográfica se obtuvieron los correspondientes *N*-Fmoc-alquenilaminoácidos **55-58**.

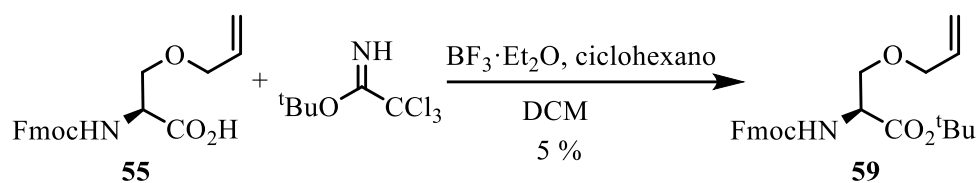


Esquema 4.15

La última etapa consistió en la protección del grupo carboxilo en forma de éster *terc*butílico, para lo cual se probaron diversas reacciones:

Método del tricloroacetimidato¹³⁴

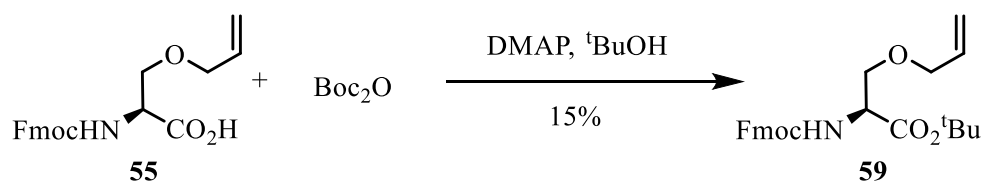
El *terc*butil éster es generado enfrentando al ácido libre frente a 2,2,2-tricloroacetimidato de *terc*butilo en presencia del aducto dietileter-trifluoruro de boro y ciclohexano, en diclorometano. Desafortunadamente, este procedimiento no generó rendimientos satisfactorios, llegando a ser únicamente del 5% en el caso de la serina (Esquema 4.16).



Esquema 4.16

Método del anhídrido de Boc¹³⁵

Otro método que se ha probado para la generación del éster *terc*butílico ha sido el que enfrenta el *N*-Fmoc-derivado con Boc₂O y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) disueltos en *terc*butanol. Nuevamente, este procedimiento generó el compuesto deseado, pero con unos rendimientos muy bajos, siendo del 15% en el caso de serina (Esquema 4.17).



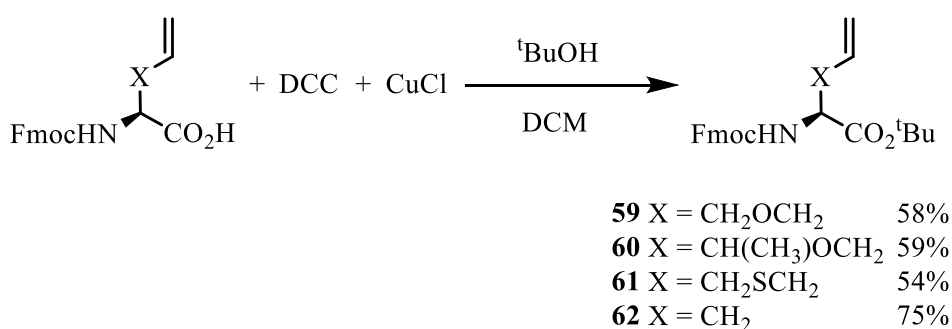
Esquema 4.17

¹³⁴ (a) Armstrong, A.; Brackenridge, I.; Jackson, R. F. W.; Kirk, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2483-2486. (b) ten Brink, H.T.; Rijkers, D.T.S; Liskamp, R.M.J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1817-1824.

¹³⁵ Hishikawa, K.; Nakagawa, H.; Furuta, T.; Fukuhara, K.; Tsumoto, H.; Suzuki, T.; Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7488-7489.

Método del cloruro de cobre (I)¹³⁶

Este método permitió la síntesis del éster *terc*butílico al añadir sobre una mezcla de CuCl, DCC y ^tBuOH, preactivada durante cinco días, una disolución del Fmoc-alquencilaminoácido en CH₂Cl₂ y bajo atmósfera de argón. Tras la purificación por columna cromatográfica se obtuvieron los cuatro aminoácidos convenientemente protegidos. En este caso, los rendimientos fueron satisfactorios, yendo desde moderados a buenos (Esquema 4.18).



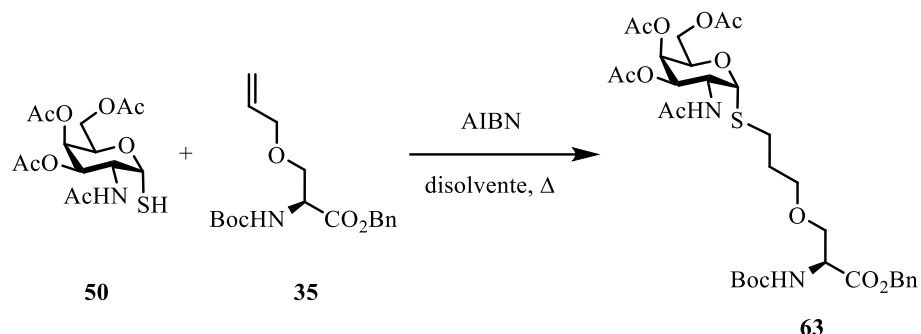
Esquema 4.18

4.3.2 Reacciones de hidrotiolación

En primer lugar, y con la intención de evaluar la viabilidad de la reacción TEC, se llevó a cabo la reacción enfrentando GalNAc- α -SH al derivado de serina **35**, sintetizado en el capítulo anterior.

Se decidió probar la reacción de hidrotiolación mediante la vía térmica empleando como iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN) (Esquema 4.19).

¹³⁶ Våbenø, J.; Brisander, M.; Lejon, T.; Luthman, K. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9186-9191.



Esquema 4.19

La reacción se llevó a cabo modificando los equivalentes entre carbohidrato, aminoácido e iniciador, para optimizar el proceso. De igual manera, se evaluó si la temperatura afectaba o no a la reacción, para lo que se modificaron las condiciones empleando reflujo de distintos disolventes.

Empleando CHCl_3 a reflujo se llevó a cabo la reacción entre 2.2 equivalentes de aminoácido, 1 equivalente de carbohidrato y 0.6 equivalentes de iniciador (Entrada 1 de Tabla 4.2), obteniendo el glicosilaminoácido con un rendimiento del 28%. Invertiendo la proporción entre carbohidrato y aminoácido y manteniendo la cantidad de iniciador, se logró aumentar el rendimiento hasta el 44% (Entrada 2 de Tabla 4.2). Si aumentamos la cantidad de iniciador a 1.2 equivalentes, logramos aumentar el rendimiento hasta el 50% (Entrada 3 de Tabla 4.2).

Por otro lado, se decidió aumentar la temperatura, para lo cual fue necesario sustituir el cloroformo por dicloroetano, observando que el rendimiento cayó al 14% (Entrada 4 de Tabla 4.2), debido seguramente a que el tiempo de vida media del AIBN a esta temperatura es de apenas 45 minutos, mientras que para la temperatura del cloroformo es de 1040 minutos.¹³⁷

En las mejores condiciones descritas anteriormente se decidió realizar la reacción en ausencia de oxígeno. De esta forma y con CHCl_3 desgasificado se logró aumentar el rendimiento hasta el 57% (Entrada 5 de Tabla 4.2).

¹³⁷ Valores calculados de http://www2.dupont.com/Vazo/en_US/products/grades/grade_selector.html (Página activa en noviembre de 2015).

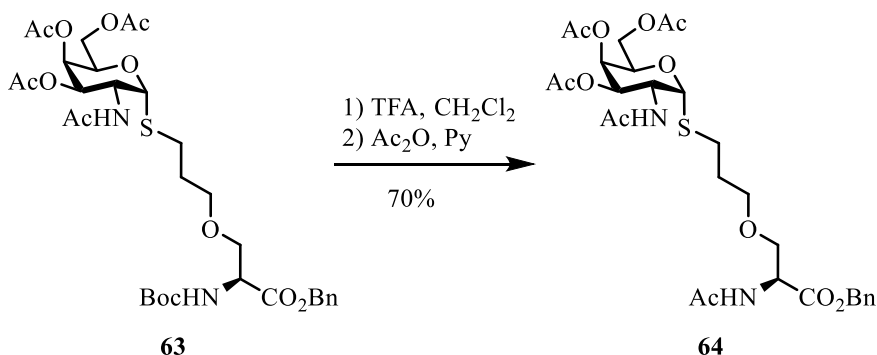
Tabla 4.2 Condiciones evaluadas en la reacción TEC térmica.

Entrada	Carbohidrato (eq.)	Aminoácido (eq.)	AIBN (eq.)	Disolvente	T (°C)	Rto. (%)
1	1.0	2.2	0.6	CHCl ₃	61	28
2	2.2	1.0	0.6	CHCl ₃	61	44
3	2.2	1.0	1.2	CHCl ₃	61	50
4	2.2	1.0	1.2	ClCH ₂ CH ₂ Cl	84	14
5	1.7	1.0	1.2	CHCl ₃ desgasificado	61	57

A la vista de estos resultados, se observa que las últimas condiciones probadas generaron el tioglicoaminoácido objetivo con mejor rendimiento, por lo que se emplearán estas mismas condiciones para la síntesis de los *buildings blocks* basados en la estrategia Fmoc.

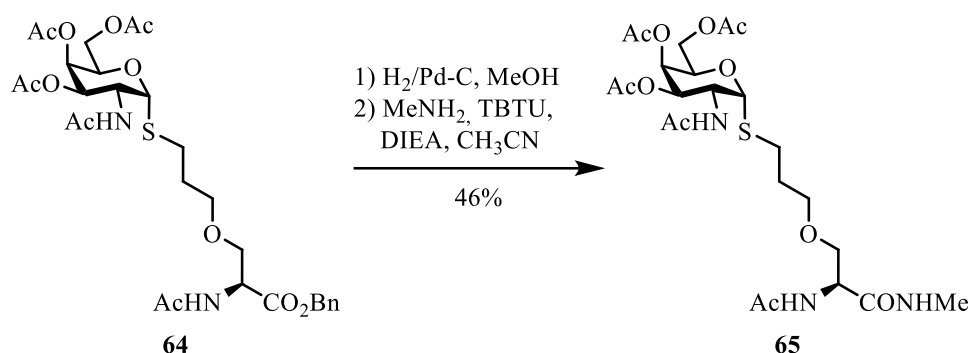
Una vez obtenido el glicoaminoácido **63**, se transformó en la correspondiente diamida con la intención de que este compuesto emule a un péptido y así poder evaluar su posible actividad biológica.

Se llevó a cabo la desprotección del grupo Boc mediante condiciones habituales, empleando una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ (1:1). A continuación, y sin etapa de purificación, se funcionalizó el grupo amina realizando una acetilación con Ac₂O en piridina, obteniendo así el compuesto **64** con un rendimiento del 70% (Esquema 4.20).



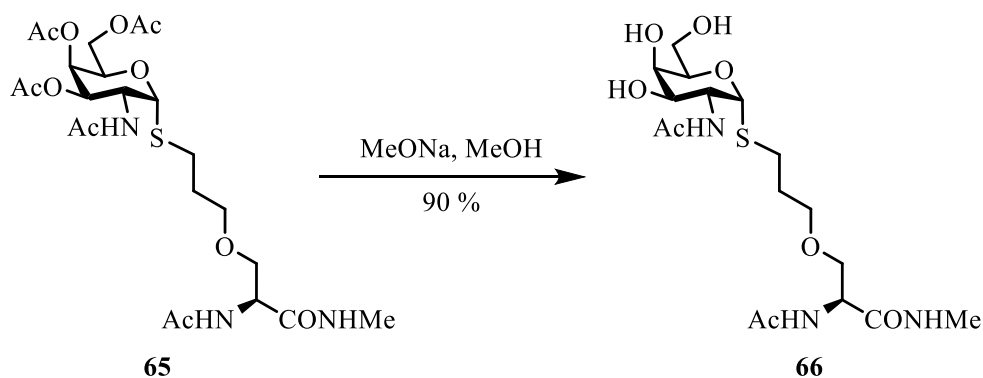
Esquema 4.20

A continuación se llevó a cabo la desprotección del grupo ácido empleando condiciones de hidrogenólisis con H_2 (1 atm), empleando paladio soportado sobre carbono como catalizador y MeOH como disolvente. Seguidamente se generó el enlace amida empleando metilamina, DIEA y TBTU como agente de acoplamiento, obteniendo así el compuesto **65** tras la purificación por columna cromatográfica (Esquema 4.21).



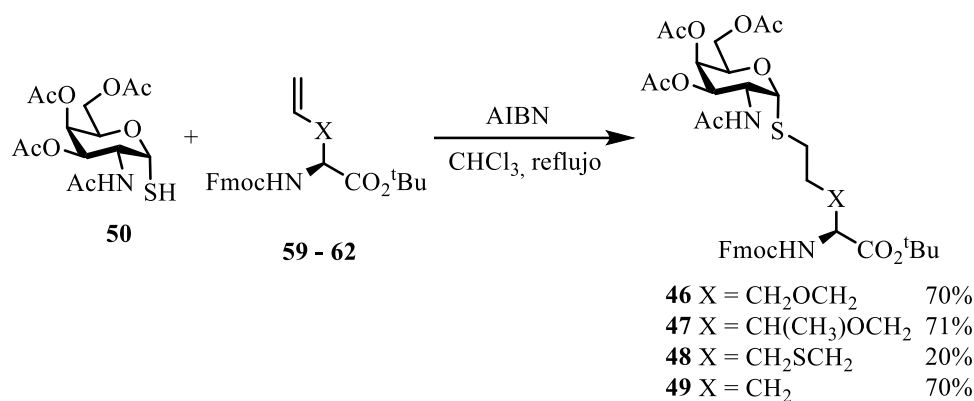
Esquema 4.21

Por último, se liberaron los grupos hidroxilos del carbohidrato empleando una disolución saturada de metóxido de sodio en MeOH, obteniendo así la diamida del derivado de serina con un rendimiento del 90% tras la purificación por HPLC semipreparativo (Esquema 4.22).



Esquema 4.22

Una vez la reacción de hidrotiolación ha sido optimizada, se estudió la reactividad entre el GalNAc- α -SH y los correspondientes aminoácidos descritos en el apartado 4.3.1, tal y como se recoge en el Esquema 4.23.



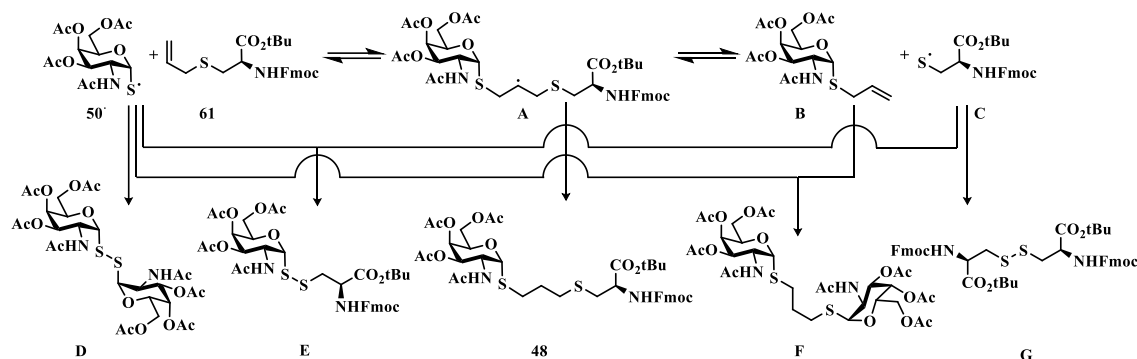
Esquema 4.23

Mediante estas condiciones se obtuvieron los correspondientes tioglicosilaminoácidos elongados. Los rendimientos mejoraron algo respecto a los obtenidos en la reacción TEC con los aminoácidos protegidos con Boc y Bn en los grupos amina y ácido carboxílico respectivamente.

Tanto para el derivado de serina, treonina como alilglicina se obtuvieron los correspondientes compuestos objetivo con un rendimiento en torno al 70%, mientras que para el compuesto derivado de cisteína, el rendimiento cae al 20%.

Este bajo rendimiento puede ser explicado por los subproductos que se observan en el análisis por espectrometría de masas del crudo de reacción. Estos subproductos son debidos a la inestabilidad del intermedio radical **A**, generado justo tras la reacción de hidrotiolación, que puede descomponerse y generar un nuevo tioradical **C** y el correspondiente α -tioalil-GalNAc **B**. A su vez, **C** puede reaccionar con el radical tiólo **50'** dando **E**, o bien reaccionar consigo mismo y generar **G**. También puede tener lugar la reacción TEC entre el alil-tiocarbohidrato generado in situ (**B**) y el radical tiólo **50'**, formando **F**, a la vez que el radical tiólo puede, nuevamente, reaccionar consigo mismo, generando **D**. Esta última posibilidad también se observa en el resto de reacciones con los otros aminoácidos, pero en menor medida. Todas estas opciones se recogen en el Esquema 4.24.

Además, se observó que el compuesto **48** descomponía al ser purificado mediante columna cromatográfica. Debido al elevado número de subproductos que se generan y la complejidad de su purificación, no fue posible obtener el derivado de cisteína con el mismo rendimiento que en el resto de compuestos.



Esquema 4.24

Para tratar de aumentar estos rendimientos, se exploró la versión fotoquímica de la reacción TEC^{104c,138} dado que esta reacción se considera una reacción click fotoinducida^{124d,139} con aplicaciones a diversos campos de estudio de sistemas biomoleculares, como ya se comentó al inicio de este capítulo. Para ello se seleccionó como fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DPAP), un fotoiniciador de Tipo I.

Para realizar estas reacciones, se empleó un reactor fotoquímico Luzchem® (LZC-4V) equipado con 16 lámparas UVA con la emisión centrada a 350 nm y con una potencia 8 W en cada lámpara (Figura 4.6).

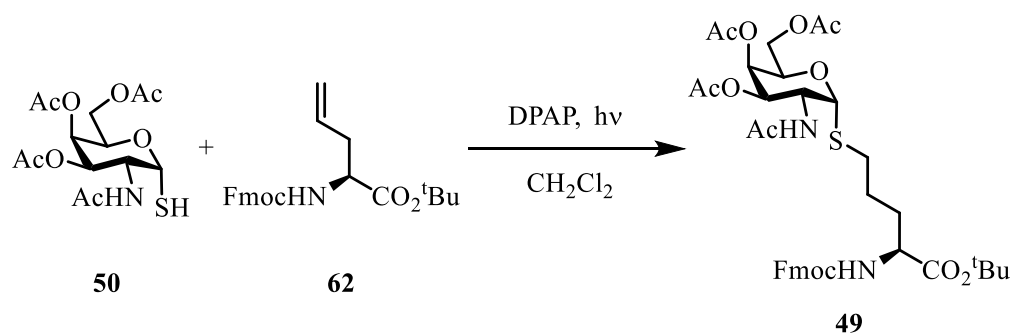
¹³⁸ Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12712-12713.

¹³⁹ (a) Tasdelen, M. A.; Yagci, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5930-5938. (b) Saada, M.-C.; Ombouma, J.; Montero, J.-L.; Supuran, C. T.; Winum, J.-Y. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5699-5701.



Figura 4.6 Equipo LZC-4V.

Se optimizaron las diferentes condiciones de reacción sobre un mismo sustrato, el derivado de alilglicina, y posteriormente se extendieron las condiciones al resto de los sustratos (Esquema 4.25).



Esquema 4.25

En primer lugar se seleccionó diclorometano como disolvente y las reacciones se irradiaron con luz de 350 nm a temperatura ambiente. Empleando estas condiciones se llevó a cabo la reacción entre 1 equivalente de aminoácido, 1.2 equivalentes de carbohidrato y 0.8 equivalentes de fotoiniciador, obteniendo el glicosilaminoácido con un rendimiento del 40% (Entrada 1 de Tabla 4.3). La reacción se realizó en tubos de ensayo introducidos en un carrusel incorporado en el propio equipo, situando a los tubos a una distancia de 10 cm de las lámparas, tal y como se muestra en la Figura 4.7.

Tabla 4.3 Condiciones evaluadas en la reacción TEC fotoquímica.

Entrada	Agitación	DPAP	Diclorometano (por 0.33 mmol aminoácido)	tiempo	distancia lámpara	%
1	carrusel	0.8	3 mL	7 h	10 cm	40
2	magnética	0.8	3 mL	6 h	15 cm	33
3	magnética	0.8	3 mL	4 h	2-3 cm	40
4	magnética	0.8	3 mL desgasificado	8 h	2-3 cm	52
5	magnética	0.4	3 mL desgasificado	8 h	2-3 cm	30
6	magnética	0.4	1 mL desgasificado	8 h	2-3 cm	50

**Figura 4.7** Carrusel del equipo LZC-4V.

La siguiente variable que se modificó fue el método de agitación, pasando del sistema de carrusel a una agitación magnética, aprovechándonos de que el equipo incorpora un agitador magnético en el centro del mismo (a una distancia de 15 cm de las lámparas) como puede verse en la Figura 4.8. Las reacciones se realizaron en viales de vidrio tapados con septum. Bajo estas condiciones, el rendimiento de la reacción cayó al 33%, debido seguramente a la mayor distancia entre las lámparas y el vial (Entrada 2 de Tabla 4.3).

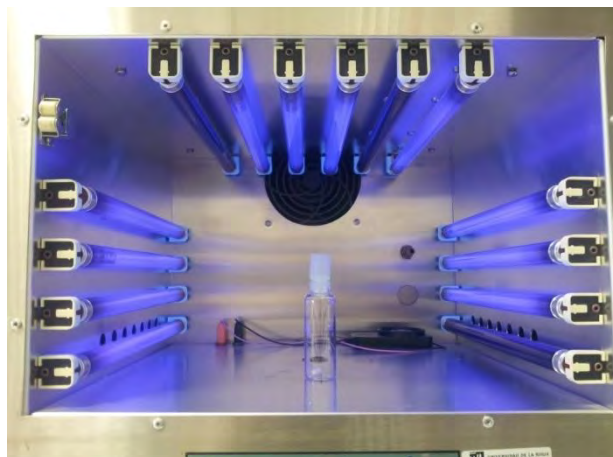


Figura 4.8 Agitación magnética del equipo LZC-4V (15 cm).

Para solventar este hándicap, se introdujo una placa agitadora dentro del fotorreactor, de manera que logramos situar el vial de reacción a 2-3 cm de las lámparas, tal y como se aprecia en la Figura 4.9. Repitiendo la reacción en las mismas condiciones, se obtuvo el glicoderivado con un rendimiento del 40%, igualando al método del carrusel, pero en menor tiempo (Entrada 3 de Tabla 4.3).

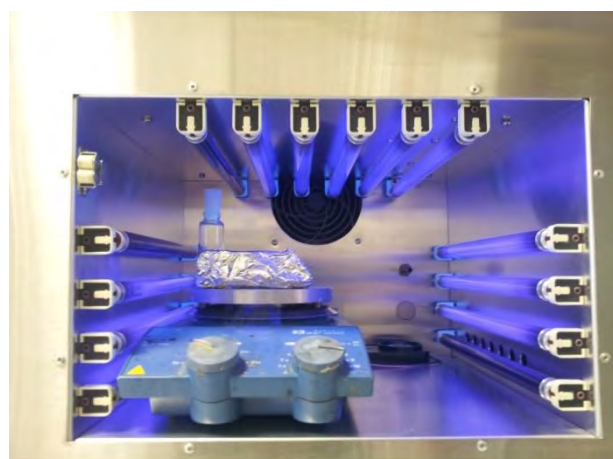


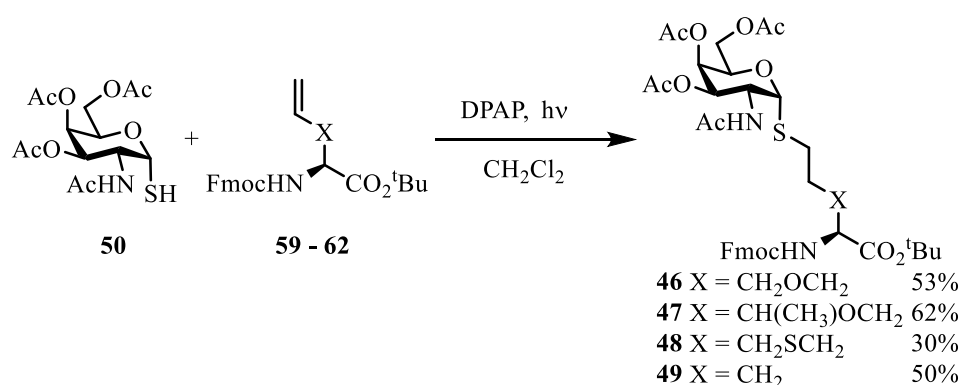
Figura 4.9 Agitación magnética del equipo LZC-4V (2-3 cm).

Para evaluar en qué medida afecta la presencia de oxígeno en el disolvente, se empleó diclorometano desgasificado, logrando aumentar el rendimiento hasta el 52% (Entrada 4 de Tabla 4.3).

Por último, se decidió reducir la carga de fotoiniciador. Se rebajó los equivalentes de 0.8 a 0.4, manteniendo todas las demás variables sin modificar y se observó que el rendimiento cayó hasta el 30% (Entrada 5 de Tabla 4.3). Sin embargo, si se rebaja tanto la cantidad de fotoiniciador como el volumen de disolvente desgasificado, se observa que el rendimiento de nuevo asciende hasta el valor de 50% (Entrada 6 de Tabla 4.3).

A la vista de estos resultados, se decidió extender estas últimas condiciones de reacción al resto de aminoácidos. Pese a presentar un rendimiento del 50%, inferior al de la entrada 4 (Tabla 4.3), este método emplea menor cantidad de iniciador radicalario y menor volumen de disolvente.

Con las condiciones optimizadas, se llevó a cabo la reacción entre el GalNAc- α -SH y los correspondientes aminoácidos, tal como se recoge en el Esquema 4.26.

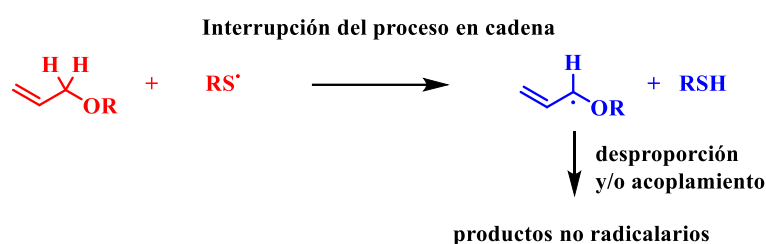


Esquema 4.26

De nuevo, se observa que el *building block* derivado de cisteína se obtiene con un rendimiento muy inferior al resto de compuestos, debido a la inestabilidad del intermedio radical y a los subproductos que se generan durante la reacción.

Está bien referenciado en la bibliografía que este tipo de reacciones que involucran *O*- y *S*-alil derivados funcionan con rendimientos que van de bajos a moderados.¹⁴⁰

Recientes estudios muestran una alta estabilidad de los radicales alílicos o bencílicos, formados por la abstracción del átomo de hidrógeno del débil enlace C-H por los radicales tiólo durante la reacción de hidrotiolación,^{128d} de manera que éstos pueden acumularse y terminar el proceso en cadena o a través de recombinación o reacciones de desproporción (Esquema 4.27).



Esquema 4.27 Estabilidad de radicales alílicos.

La reducción, por un reactivo externo, de los radicales estabilizados no deseados permitiría regenerar el sustrato de partida y reparar la cadena radicalaria.

Sin embargo, estos reactivos externos tienen unos estrictos requerimientos que cumplir:

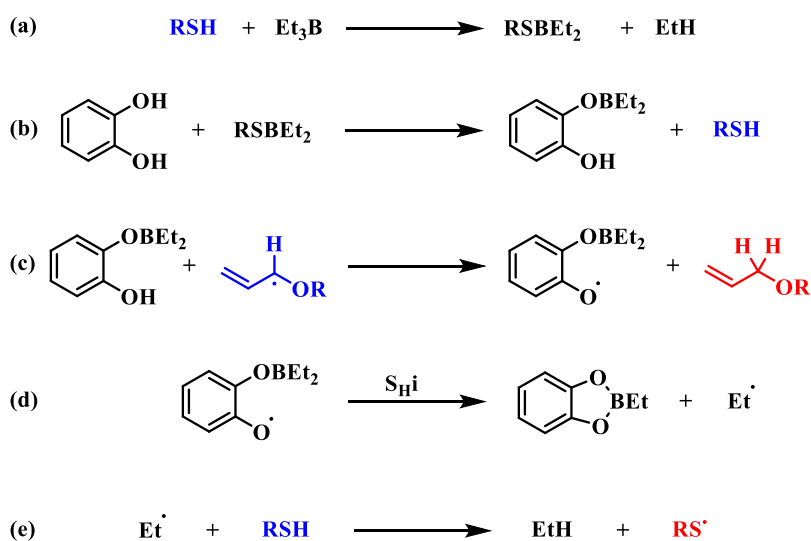
- 1) Deben presentar un enlace débil en un átomo de hidrogeno para permitir transferirlo y estabilizar a los radicales alílicos y bencílicos.
- 2) El radical resultante no debiera reaccionar con el alqueno, debe ser inmediatamente convertido en el radical tiólo intermedio para regenerar el proceso en cadena.
- 3) Si fuera posible, el reactivo debiera presentar baja toxicidad y ser comercialmente accesible y barato.

A la vista de estos requerimientos, y revisando la bibliografía, encontramos una novedosa modificación de la reacción de acoplamiento tiol-eno descrita por el

¹⁴⁰ (a) Triola, G.; Brunsveld, L.; Waldmann, H. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3646-3649. (b) Merbouh, N.; Wallner, F. K.; Cociorva, O. M.; Seeberger, P. H. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 651-653.

profesor Philippe Renaud, empleando catecol en presencia de trietilborano en soluciones desgasificadas y con trazas de oxígeno.¹⁴¹

El Esquema 4.28 recoge el mecanismo propuesto por Renaud para este proceso. La reacción comienza con una importante evolución de etano (a) y la subsiguiente formación de un monoborinato (b). Tras la etapa de transferencia de protón (c), el radical ariloxilo resultante experimenta una rápida ciclación *5-exo* generando un radical etilo (d) que, a su vez, reinicia el proceso de reacción con el tiol dando lugar al radical tiilo (e).

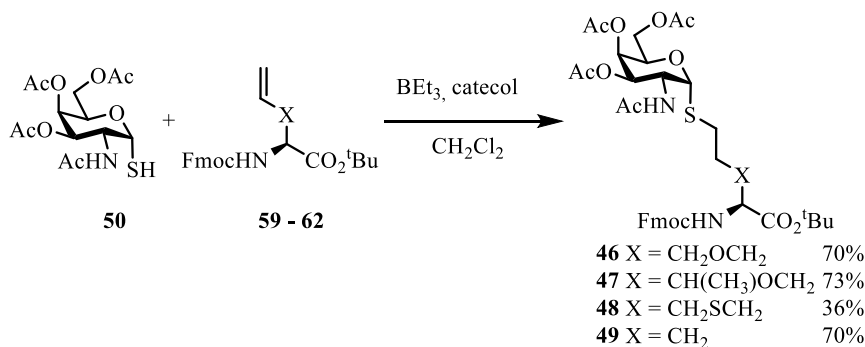


Esquema 4.28 Mecanismo *Repairing Way* de la reacción TEC con catecol/ BEt_3 .

A la vista de los resultados obtenidos tras las reacciones radicalarias por las vías térmica y fotoquímica, se llevó a cabo la reacción por la reciente metodología descrita por P. Renaud y colaboradores, denominada *Repairing Way*.^{128d}

Mediante esta metodología se enfrentaron 2 equivalentes de GalNAc- α -SH y un equivalente de los correspondientes alquenilaminoácidos protegidos en presencia de 1.2 equivalentes de BEt_3 y 1.2 equivalentes de catecol, empleando como disolvente diclorometano en una concentración en alqueno de 0.75 M.

¹⁴¹ Povie, G.; Tran, A.-T.; Bonnaffé, D.; Habegger, J.; Hu, Z.; Le Narvor, C.; Renaud, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3894-3898.



Esquema 4.29

Los rendimientos obtenidos por esta metodología igualan a los obtenidos a través de la vía térmica, salvo en el caso del glicoderivado de cisteína **48**, que es ligeramente superior, pero sigue siendo bastante bajo debido a las reacciones paralelas que se producen. Esta metodología supone una ligera mejora debido al menor tiempo de reacción y a una purificación por columna cromatográfica menos complicada.

Ante esta eventualidad, se optó por cambiar de estrategia y situar al alqueno en la parte carbohidrato y el grupo tiol en la parte aminoácido. A modo de ejemplo, se decidió abordar la reacción de hidrotiolación partiendo de cisteína, enfrentándola al correspondiente alil derivado *O*-glicosilado para obtener el compuesto elongado **67** (Figura 4.10).

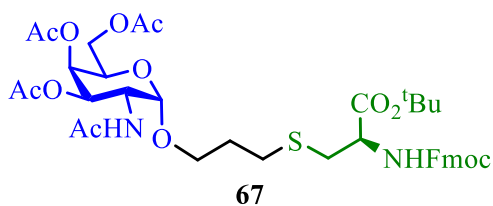
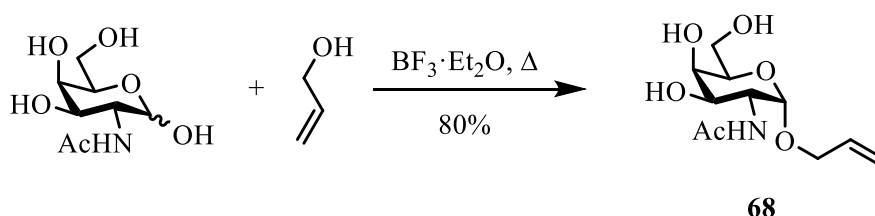


Figura 4.10

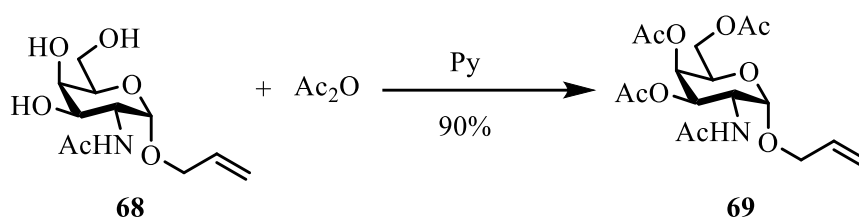
El carbohidrato se preparó a partir de *N*-acetilgalactosamina comercial. Se adicionó aducto de dietiléter-trifluoruro de boro a una disolución del carbohidrato en

alcohol alílico como disolvente a temperatura de reflujo (96 °C), obteniendo así únicamente el anómero α , compuesto **68**, con buen rendimiento (Esquema 4.30).¹⁴²



Esquema 4.30

El siguiente paso fue la protección de los grupos hidroxilo, para lo cual se hizo reaccionar el compuesto **68** en presencia de Ac₂O en piridina. Tras purificación por columna cromatográfica se obtuvo el compuesto **69** con un 90% de rendimiento (Esquema 4.31).

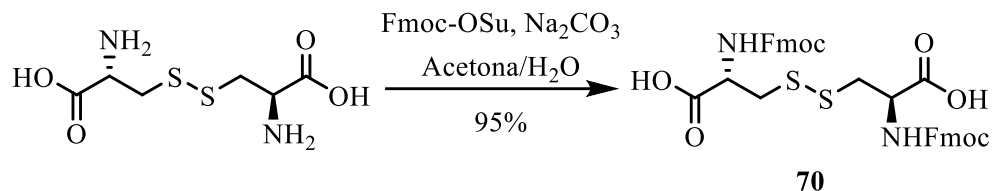


Esquema 4.31

El aminoácido convenientemente protegido se preparó siguiendo la metodología vista en el capítulo anterior, mediante la ruptura del enlace disulfuro de la L-cistina, para lo que fue necesario protegerla previamente.

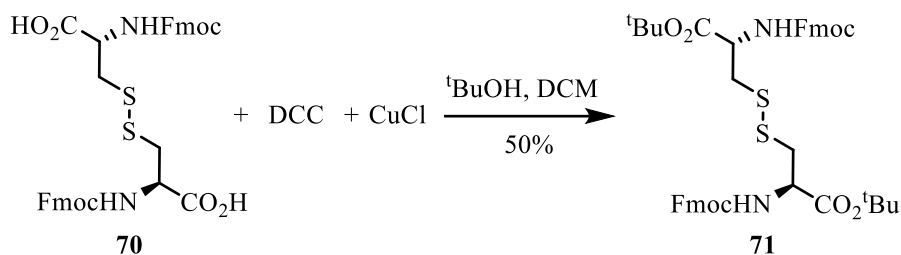
Se partió de L-cistina comercial, y se protegieron ambos grupos amino como Fmoc, para lo cual se disolvió el aminoácido comercial en una mezcla acetona/agua (1:1) y se trató con Na₂CO₃ y Fmoc-OSu. Tras la etapa de purificación se obtuvo *N,N'*-Bis(Fmoc)-L-cistina de manera casi cuantitativa (Esquema 4.32).

¹⁴² Feng, F.; Okuyama, K.; Niikura, K.; Ohta, T.; Sadamoto, R.; Monde, K.; Noguchi, T.; Nishimura, S.I. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1617-1623.



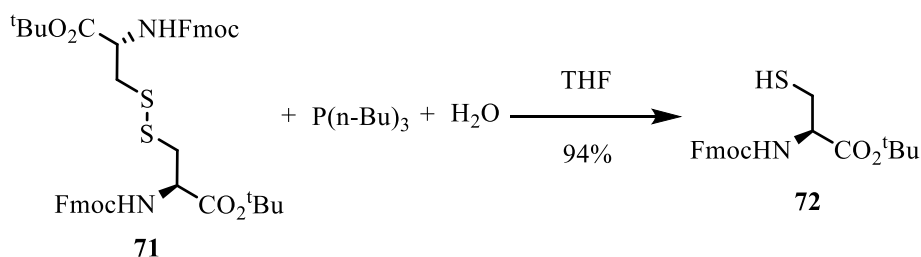
Esquema 4.32

Después se protegió el grupo carboxílico empleando la metodología del cloruro de cobre (I) expuesta anteriormente. Tras la purificación se obtuvo el compuesto **71** con un moderado rendimiento (Esquema 4.33).



Esquema 4.33

Por último, se llevó a cabo la ruptura del puente disulfuro con tri-n-butilfosfina ($P(n-Bu)_3$) y THF, en presencia de agua (Esquema 4.34).

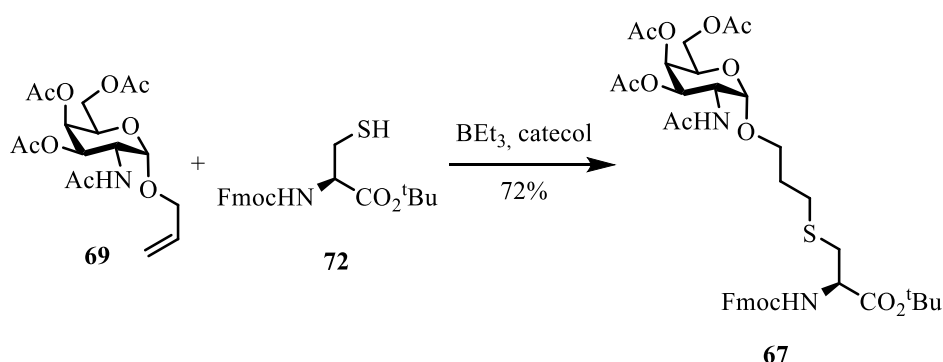


Esquema 4.34

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción tiol-eno sobre los sustratos **69** y **72**, empleando las condiciones descritas mediante la vía *Repairing Way*, debido a que los tiempos de reacción son más cortos, la purificación por columna

cromatográfica más sencilla y los rendimientos algo mejores que los obtenidos por las otras vías.

Para ello se hizo reaccionar a temperatura ambiente 2 equivalentes del aminoácido **72** y 1 equivalente del carbohidrato **69** en presencia de 1.2 equivalentes de BEt_3 y 1.2 equivalentes de catecol, empleando como disolvente diclorometano en una concentración en alqueno de 0.75 M. Tras la etapa de purificación se obtuvo el compuesto **67** con un rendimiento del 72% (Esquema 4.35).



4.4 Conclusiones

1. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se efectúa una reacción TEC que involucra al tiocarbohidrato GalNAc- α -SH como fuente de tiol.
2. Se ha logrado la síntesis y optimización del proceso de hidrotiolación para la obtención de cinco tioglic aminoácidos protegidos a través de tres vías sintéticas, vía térmica, vía fotoquímica y *Repairing Way*. Cuatro de los tioglicosil aminoácidos han sido obtenidos con buenos rendimientos, salvo el derivado de cisteína **48**, debido a la aparición de reacciones colaterales y a la dificultad de purificación del producto final (Figura 4.11).

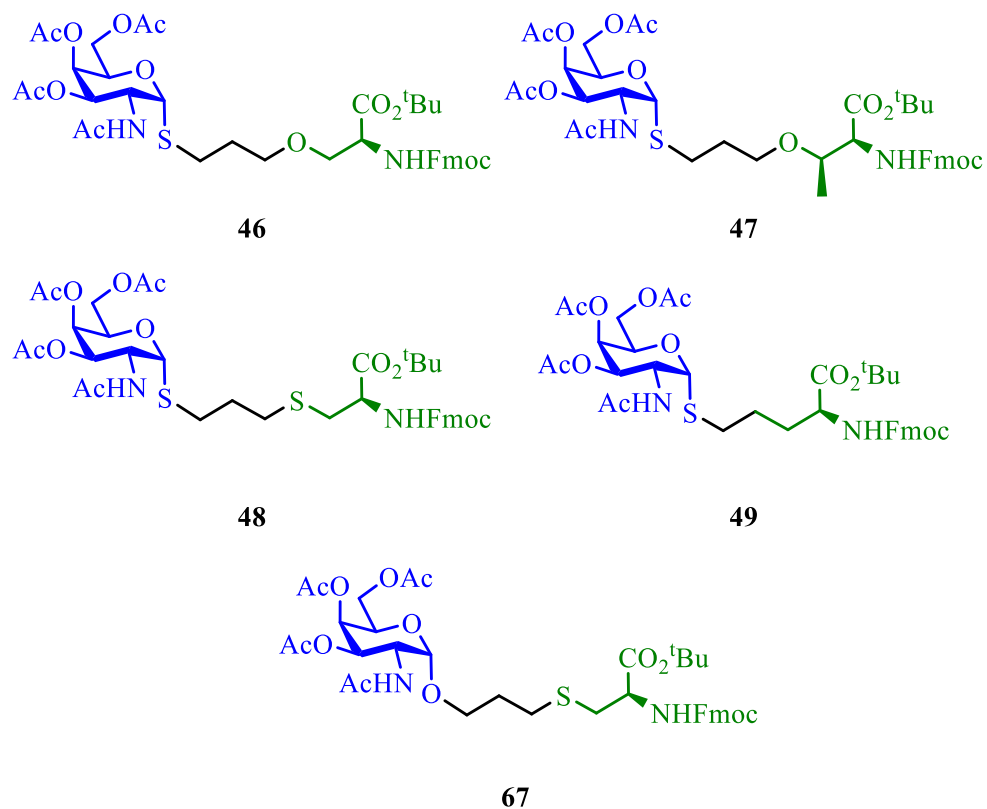


Figura 4.11 *O*- y *S*-Glicoaminoácidos sintetizados y preparados para su inclusión en síntesis en fase sólida.

5. La reacción de hidrotiolación en alquinos

5.1 Introducción y antecedentes

5.1.1 Hidrotiolación de alquinos (TYC)

5.1.2 Catálisis mediada por metal

5.2 Objetivos

5.3 Discusión de resultados

5.3.1 Síntesis de materiales de partida

5.3.2 Reacciones TYC

5.3.3 Reacciones TYC-TEC

5.3.4 Reacciones de acoplamiento con metales de transición

5.4 Conclusiones



5.1 Introducción y antecedentes

Como se ha explicado anteriormente, la presencia de un espaciador entre la parte glicona y la aglicona puede conferir a los glicoderivados una alta flexibilidad a la hora de disponer espacialmente el carbohidrato, dotándole así de una alta libertad a la hora de presentarse respecto a un residuo o a una cadena peptídica (Figura 5.1).

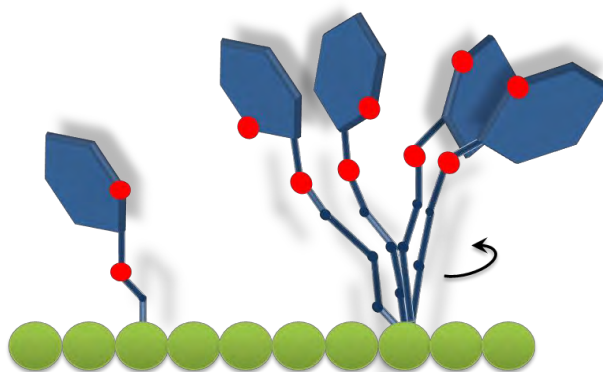


Figura 5.1 Glicopéptido restringido (izquierda) y no restringido (derecha).

Esta flexibilidad puede ser modulada si introducimos en dicho espaciador un punto rígido como puede ser un doble enlace. De igual manera, si se introduce un segundo carbohidrato sobre la cadena lateral del mismo aminoácido, ambos azúcares no pueden adquirir todas las disposiciones espaciales que presentaban cuando sólo había un único carbohidrato, quedando por tanto estas posiciones restringidas. Las insaturaciones en el espaciador pueden ser incorporadas a la estructura de la molécula mediante reacciones de hidrotiolación bien por vía radicalaria, bien por vía mediada por metales de transición sobre sustratos que presenten un triple enlace.

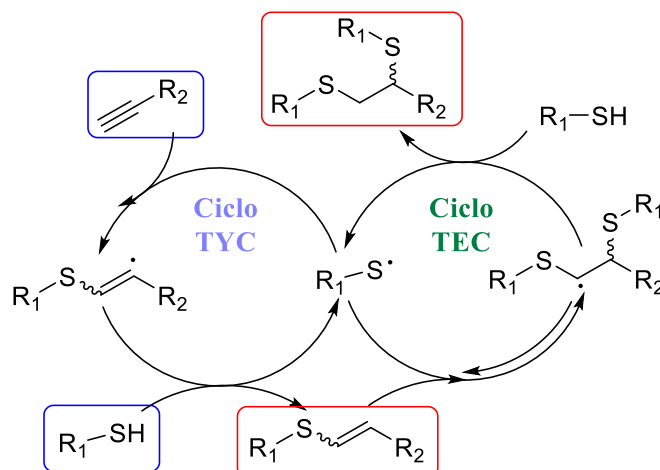
5.1.1 Hidrotiolación de alquinos (TYC)

En otros trabajos de síntesis de este tipo de conjugados encontramos la adición de tioglucósidos a alquilpéptidos así como la generación de dendrímeros de manera fotoinducida.¹⁴³ En este trabajo se emplea la hidrotiolación de alquinos (TYC, de sus siglas en inglés) para la obtención de glicoconjugados. Esta reacción, descubierta en el primer tercio del siglo XX,¹⁴⁴ nos sirve para introducir dos tioéteres

¹⁴³ Massi, A.; Nanni, D. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3791-3807.

¹⁴⁴ (a) Finzi, C.; Venturini, G.; Santini, L. *Gazz. Chim. Ital.* **1930**, *60*, 798-811. (b) Kohler, E.P.; Potter, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1316-1325.

a través de un triple enlace carbono-carbono mediante un mecanismo multietapa como se puede ver en el Esquema 5.1.



Esquema 5.1

La primera etapa de reacción es de nuevo una adición de un radical tiólo al enlace múltiple carbono-carbono, que proporciona un radical vinil β -sulfanilo sustituido. Una transferencia de hidrógeno del tío de partida conduce a un sulfuro de vinilo y un nuevo radical tiólo, que mantiene el proceso en cadena (**Ciclo TYC**, Esquema 5.1). El proceso completo, aunque regioselectivo, al menos con alquinos terminales, es a menudo poco estereoselectivo, dado que los productos de sulfuro de vinilo son frecuentemente formados como una mezcla de estereoisómeros Z y E. Uno de los principales requerimientos de las reacciones de la química click, por ejemplo la estereoselectividad, se pierde. En cambio, vale la pena señalar que las adiciones de radicales a alquenos son generalmente más rápidas que a alquinos,¹⁴⁵ pero lo primero ocurre habitualmente de manera reversible (**Ciclo TEC**, Esquema 5.1),¹⁴⁶ mientras que los últimos son sustancialmente irreversibles, al menos con radicales alquiltiolo.¹⁴⁷ Esto quiere decir que los radicales TEC a menudo requieren

¹⁴⁵ (a) Gazith, M.; Szwark, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3339-3343. (b) Ito, O.; Omori, R.; Matsuda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3934-3937.

¹⁴⁶ (a) Benati, L.; Montevecchi, P. C.; Spagnolo, P. *J. Chem. Soc.* **1991**, 2103-2109. (b) Ogawa, A.; Tanaka, H.; Yokoyama, H.; Obayashi, R.; Yokoyama, K.; Sonoda, N. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 111-115. (c) Taniguchi, T.; Fujii, T.; Idota, A.; Ishibashi, H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3298-3301.

¹⁴⁷ (a) Heiba, E. I.; Dessau, R. M. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3837-3840. (b) Montevecchi, P. C.; Navacchia, M. L. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5600-5607. (c) Melandri, D.; Montevecchi, P. C.; Navacchia, M. L. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12227-12236. (d) Rosenstein, I. *J Radicals in Organic Synthesis*; Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, *1*, 50-71. (e) Bertrand, M. P.; Ferreri, C. *Radicals in Organic Synthesis*; Wiley-

un exceso de alquienol y/o altas concentraciones de tiol¹⁴⁸ para desplazar el equilibrio hacia los productos sulfurados.

A consecuencia de esto, un tratamiento adicional es necesario para deshacerse de ese exceso, perdiendo por tanto otra de las principales ventajas de las reacciones click. Por el contrario, la mayoría de reacciones radicalarias TYC son normalmente mucho más eficientes cuando se llevan a cabo con cantidades equimolares de los reactivos, ya que los radicales vinilo intermedios se forman de una manera prácticamente irreversible y, además, abstraen un átomo de hidrógeno del tiol más rápidamente que sus homólogos de alquilo. Sin embargo, se debe tener siempre en cuenta la concentración de los reactivos, ya que las altas diluciones pueden dar lugar a reacciones secundarias apreciables; por ejemplo, la dimerización de los radicales tiolo para dar el disulfuro correspondiente.

De todos modos, el punto más importante es que, contrariamente a los productos de TEC (sulfuros de alquilo), los productos de TYC (sulfuros de vinilo) son especies reactivas que pueden someterse a una adición posterior de otro radical tiolo para dar bis-aductos bis-sulfuro a través de la intermediación del radical alquil α,β -disulfanil-disustituido (secuencia **TYC-TEC**, Esquema 5.1).¹⁴⁹ Desde un punto de vista de la química click, este proceso secundario provoca inconvenientes adicionales relacionados tanto con regio como estereoselectividad. De hecho, los bis-sulfuros poseen un nuevo centro quiral que se crea sin ninguna estereoselectividad; más crucialmente, aunque la bis-adición 1,2 es la regla de oro y es observada, por ejemplo, con todos los alquilo acetilenos terminales, bis-adiciones 1,1 pueden competir con ciertos alquinos (especialmente arilacetilenos y derivados del ácido arilpropiónico), dando lugar a problemas de regioselectividad notables.

La tolerancia de esta reacción a una amplia gama de grupos funcionales hace de ésta una herramienta ideal para la aplicación en procesos de formación de bioconjugados.

Uno de los grupos de investigación que más ampliamente ha estudiado este tipo de reactividad es el grupo de Alessandro Dondoni, que ha estudiado tanto la reacción de hidrotiolación sobre carbohidratos funcionalizados con alquenos^{131a} como la hidrotiolación de alquinos.¹⁵⁰

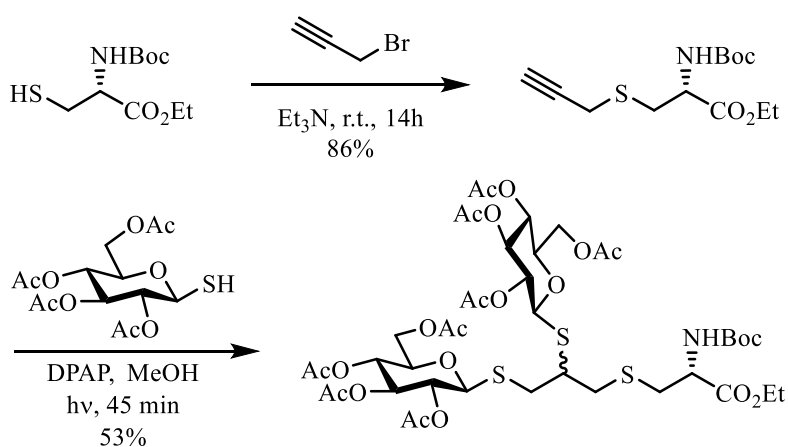
VCH, Weinheim, **2001**, 2, 485-504. (f) Chatgililoglu, C.; Ferreri, C. *The Chemistry of Triple-Bonded Functional Groups*; Wiley **1994**, 2, 917-944. (g) Chatgililoglu, C.; Bertrand, M. P.; Ferreri, C. *S-Centered Radicals*; Wiley **1999**, 311-354.

¹⁴⁸ Dondoni, A.; Massi, A.; Nanni, P.; Roda, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11444-11449.

¹⁴⁹ Lowe, A. B.; Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4745-4750.

¹⁵⁰ Lo Conte, M.; Pacifico, S.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4644-4647.

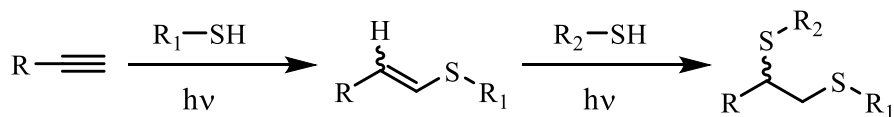
Otro grupo representativo que ha llevado a cabo estudios sobre la reacción TYC es el grupo de Alessandro Massi, que ha sintetizado glico/tiodendrimeros como tioglicopéptidos, tanto de glucosa como galactosa.¹⁵¹ Para realizar la reacción TYC se introduce en el aminoácido/péptido un grupo alquino terminal, por ejemplo un grupo propargilo, mediante el uso de la reactividad de la cadena lateral tiol de la cisteína como se puede ver en el Esquema 5.2.¹⁵⁰ Después la reacción fotoinducida se llevó a cabo en metanol como disolvente, con irradiación de 365 nm en presencia de DPAP durante 45 min.



Esquema 5.2

De esta forma se introducen dos tioazúcares obteniendo exclusivamente ditióéteres con adición 1,2.

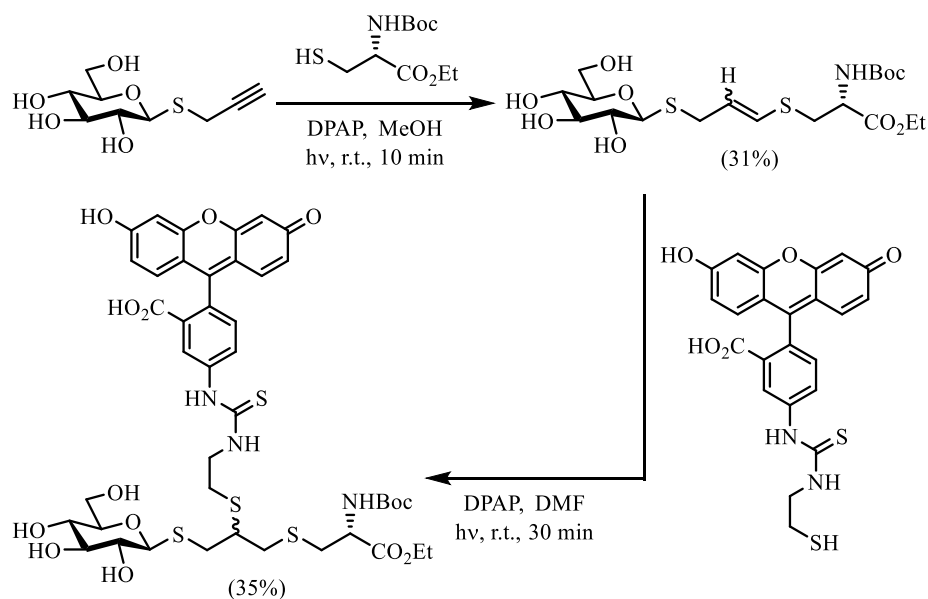
Se ha demostrado que para pequeñas moléculas orgánicas en disolventes orgánicos, la hidrotiolación fotoinducida se puede llevar a cabo mediante la adición secuencial de dos diferentes tioles como se puede ver en el Esquema 5.3.



Esquema 5.3

¹⁵¹ Minozzi, M.; Monesi, A.; Nanni, D.; Spagnolo, P.; Marchetti, N.; Massi, A. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 450-459.

Para corroborar la forma secuencial de introducir dos tioéteres distintos, Dondoni y col. llevaron a cabo la reacción con el derivado de L-cisteína y un tiocarbohidrato.¹⁵² Se puede ver, en el Esquema 5.4, que en este caso el tiocarbohidrato es el que porta el grupo propargilo.



Esquema 5.4

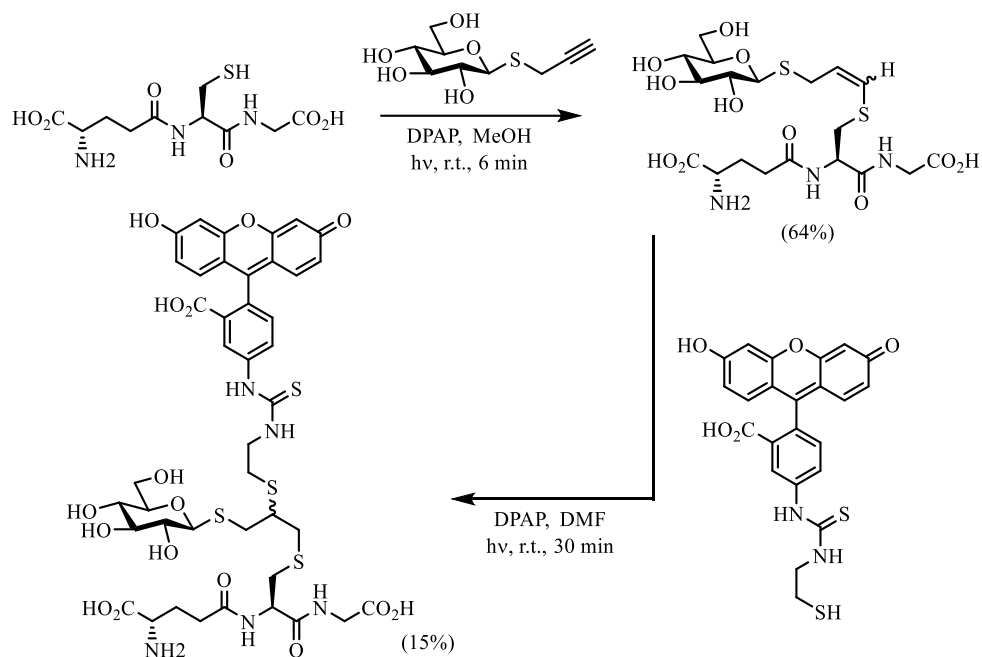
Se introdujo un equivalente del derivado de cisteína con un exceso del tiocarbohidrato y la reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente en un disolvente prótico (MeOH), mediante irradiación a 365 nm usando DPAP como el iniciador radical durante 10 min.

En la segunda etapa se hizo reaccionar el alquenil derivado anterior con un fluorescentiol y DPAP en DMF durante 30 min., obteniendo así el derivado tritioéter, con un rendimiento del 35%.

Viendo el éxito de los resultados obtenidos por el grupo de Dondoni, con un aminoácido modelo, se trasladó la misma estrategia a un tripéptido como se ve en el Esquema 5.5.

¹⁵² Lo Conte, M.; Staderini, S.; Marra, A.; Sanchez-Navarro, M.; Davis, G. B.; Dondoni, A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 11086-11088.

Se trabajó en las mismas condiciones que en el ejemplo anterior dando como resultado una segunda incorporación del carbohidrato como una mezcla de diastereómeros con muy buena conversión (> 95%); sin embargo, el rendimiento fue más modesto en la última etapa ya que hubo problemas en la purificación.¹⁵²

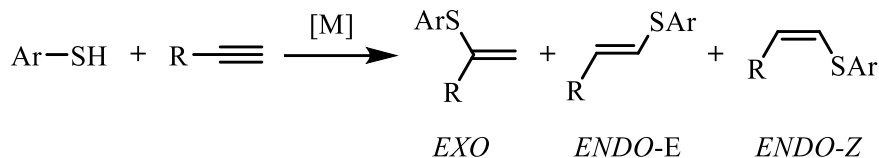


Esquema 5.5

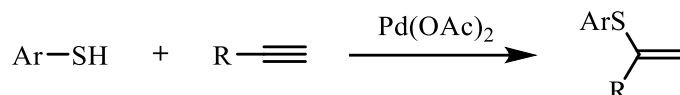
5.1.2 Catálisis mediada por metal

Como se ha comentado anteriormente, las reacciones TYC (al igual que las TEC) se desarrollan a través de un mecanismo anti-Markovnikov para alquinos terminales, disponiendo el carbohidrato sobre el carbono menos impedido del triple enlace, y por tanto, dejando el doble enlace generado tras la adición del tiol dentro de la cadena lineal, lo que a partir de ahora denotaremos como *ENDO*.

Si por el contrario se desea que la hidrotiolación se produzca a través de un mecanismo Markovnikov y por tanto, disponga el doble enlace fuera de la conexión entre el azufre y la otra molécula, se deben emplear reacciones de adición de tioles a alquinos catalizadas por metales de transición. A esta disposición del doble enlace se le denominará a partir de ahora *EXO* (Esquema 5.6).

**Esquema 5.6**

El primer ejemplo descrito en la bibliografía para adiciones de tioles a acetilenos mediadas por metales de transición data de 1992, de mano del profesor Noboru Sonoda.¹⁵³ Se hizo reaccionar diferentes tiofenoles aromáticos frente a acetilenos, empleando como catalizador compuestos de metales de transición, siendo el acetato de paladio (II) el que mejores resultados produjo (Esquema 5.7).

**Esquema 5.7**

Más recientemente se ha descrito una amplia batería de catalizadores basados en metales de transición, que modulan la reactividad de hidrotiolación de alquinos.¹⁵⁴ En función del catalizador empleado se puede lograr modular el regioisómero, obteniendo así los isómeros *EXO*, el *ENDO-Z* o el *ENDO-E* (Esquema 5.6). Por ejemplo, empleando catalizadores de Pd se obtiene mayoritariamente el regioisómero *EXO*, mientras que si se emplean catalizadores de Rh se obtiene mayoritariamente el *ENDO-E* o si se emplea Cu, se obtiene principalmente el *ENDO-Z*.

5.2- Objetivos

Esta estrategia permite obtener una mayor diversidad estructural entre la parte carbohidrato y la parte aminoácido pudiendo introducir una insaturación o dos carbohidratos en la cadena lateral. Así, el objetivo de este capítulo es la síntesis de una serie de nuevos tioglicosilaminoácidos insaturados y bis(tioglicosil)-

¹⁵³ Kuniyasu, H.; Ogawa, A.; Sato, K-I.; Ryu, I.; Kambe, N.; Sonoda, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5902-5903.

¹⁵⁴ Castarlenas, R.; Di Giuseppe, A.; Pérez-Torrente, J.J.; Oro, L.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 211-222.

aminoácidos. Los compuestos que se pretende obtener aparecen ya preparados para su utilización en síntesis en fase sólida (Figura 5.2).

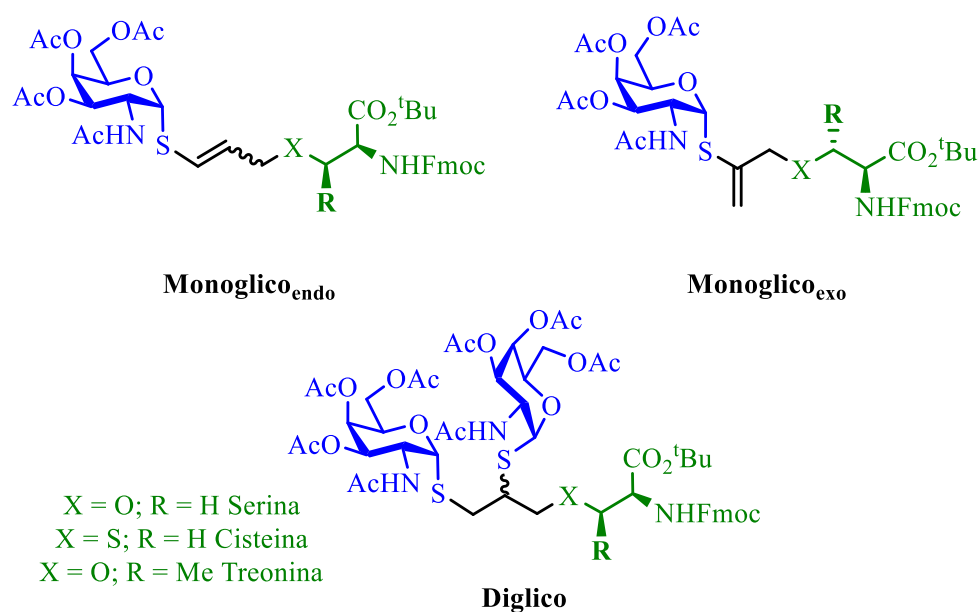
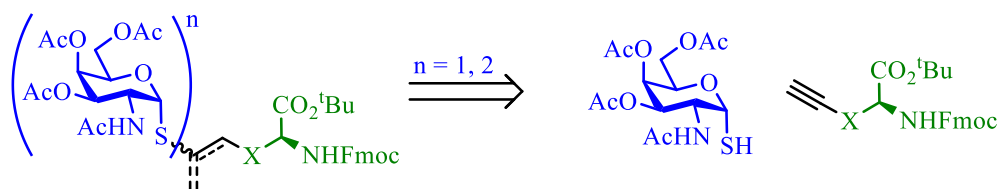


Figura 5.2 Tioglicosilaminoácidos estudiados en este trabajo.

Se emplearon los grupos protectores Fmoc para el grupo amino y el grupo *terc*butilo para el ácido carboxílico para poder incorporar estas moléculas en distintas secuencias peptídicas empleando la síntesis de péptidos en fase sólida (*SPPS* del inglés) mediante estrategia Fmoc.¹³⁰

5.3 Discusión de resultados

Desde un punto de vista retrosintético e implicando una desconexión de hidrotiolación, la obtención de los tioglicosilaminoácidos objetivo requiere partir de un mismo tiocarbhidrato que actúa como glicosil dador, 2-acetamido-2-desoxi-1-tio-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-galactopiranososa, preparado ya en el *Capítulo 4*, y los correspondientes propargil derivados de los distintos aminoácidos convenientemente protegidos (Esquema 5.8).



Esquema 5.8

Para llevar a cabo la reacción es necesario, por tanto, la obtención de estos nuevos alquilaminoácidos en escala de gramo, de una manera sencilla y asequible.

5.3.1 Síntesis de productos de partida

Dado que la síntesis de GalNAc- α -SH ya ha sido descrita en el *Capítulo 4*, el siguiente paso es la preparación de los derivados de los aminoácidos (Figura 5.3).

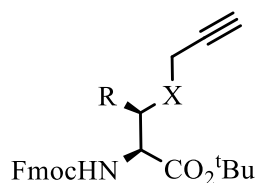
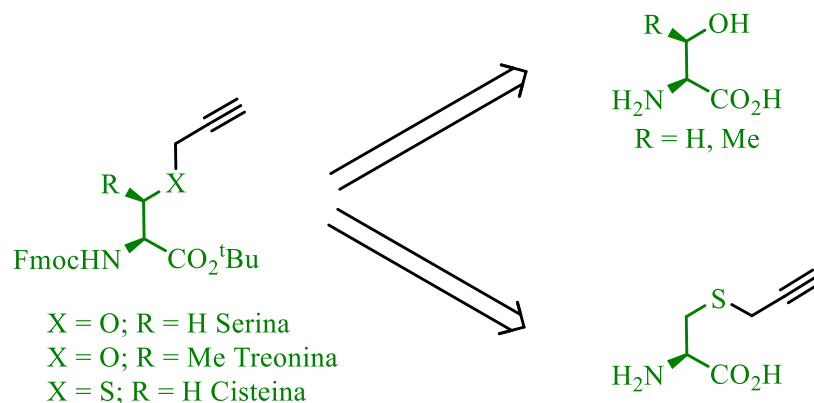


Figura 5.3 Esquema general de los aminoácidos buscados.

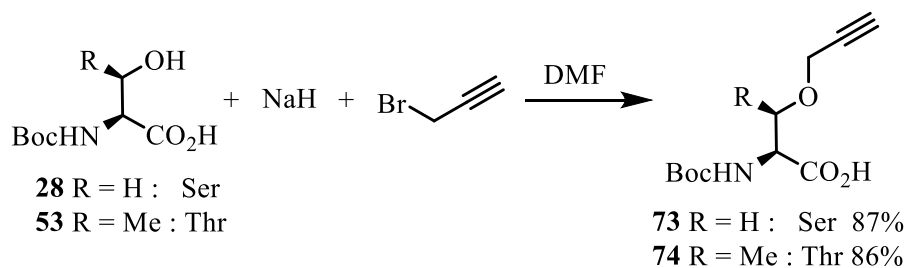
Para generar estos alquilaminoácidos, se va a emplear dos estrategias diferentes. Una se basa en la *O*-propargilación de los aminoácidos libres serina y treonina. La otra, parte del propargil derivado de cisteína, debido a la complejidad de proteger únicamente el grupo amino en el caso de cisteína. Todos estos compuestos de partida son accesibles comercialmente (Esquema 5.9).



Esquema 5.9 Esquema retrosintético para los aminoácidos buscados.

La síntesis de estos compuestos se llevó a cabo empleando la misma metodología descrita en el *Capítulo 4*. Protección del grupo amino con el grupo Boc, incorporación del alquino sobre la cadena lateral, liberación de grupo amino, protección de éste con el grupo Fmoc y protección del grupo carboxilo en forma de éster *terc*butílico.

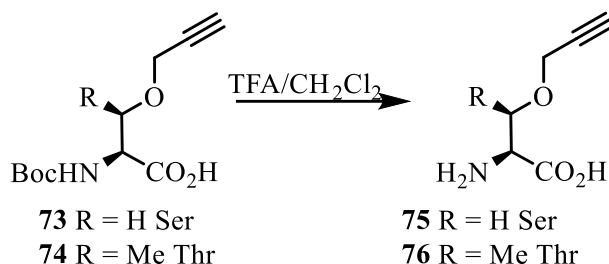
Se partió de los compuestos **29** y **53** preparados en el capítulo anterior. Estos aminoácidos se hicieron reaccionar con NaH en DMF a 0 °C, y después se adicionó bromuro de propargilo. Así se obtuvieron los derivados de los alquínilaminoácidos con buenos rendimientos (Esquema 5.10).



Esquema 5.10

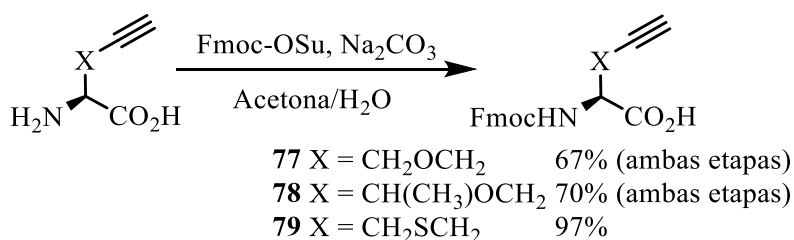
El siguiente paso consistió en la desprotección del grupo carbamato utilizando una mezcla TFA/CH₂Cl₂ (1:1). De esta manera se obtuvieron los correspondientes aminoácidos con sus grupos amino y ácido carboxílico libres, que

incorporan un alquino en la cadena lateral y que se emplearon en la siguiente etapa sin purificación previa (Esquema 5.11).



Esquema 5.11

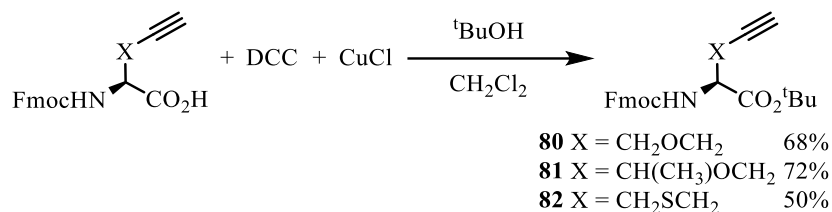
Los alquinilaminoácidos libres, incluyendo el derivado comercial de cisteína, fueron disueltos en una mezcla acetona/agua (1:1) y tratados con Na_2CO_3 y Fmoc-OSu. Tras la etapa de purificación mediante columna cromatográfica se obtuvieron los correspondientes *N*-Fmoc-alkinilaminoácidos con rendimientos que fueron de buenos a excelentes (Esquema 5.12).



Esquema 5.12

La última etapa consistió en la protección del grupo carboxilo en forma de éster *terc*butílico, empleando para ello la metodología del cloruro de cobre (I).

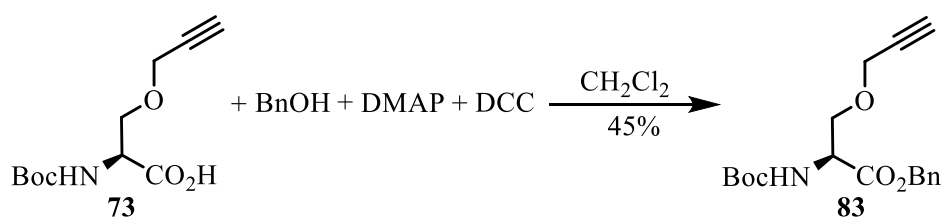
Se formó el éster *terc*butílico al añadir sobre una mezcla de CuCl , DCC y $^t\text{BuOH}$, preactivada durante cinco días, una disolución del *N*-Fmoc-alkinilaminoácido en CH_2Cl_2 y bajo atmósfera de argón. Tras la purificación por columna cromatográfica se obtuvieron los tres aminoácidos convenientemente protegidos. En este caso, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, yendo desde moderados a buenos (Esquema 5.13).



Esquema 5.13

Con el fin de estudiar la versatilidad de la reacción decidimos probar otros grupos protectores. Así se sintetizó el derivado protegido en el amino como Boc y en el ácido como Bn. Para la preparación de este compuesto, se siguió la metodología expuesta en el capítulo anterior.

El compuesto **73** se añadió sobre una mezcla de BnOH y DMAP en CH₂Cl₂ seco a 0 °C. A continuación se añadió DCC y se dejó agitando a temperatura ambiente durante un día. Tras filtrar las sales de urea generadas y la purificación por columna cromatográfica, se obtuvo el compuesto **83** con un moderado rendimiento (Esquema 5.14).

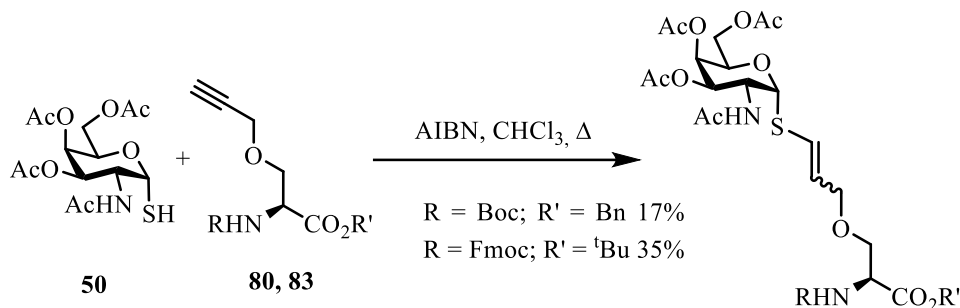


Esquema 5.14

5.3.2 Reacciones TYC

En primer lugar, y con la intención de evaluar la reactividad de los alquinos frente a GalNAc- α -SH, se enfrentó dicho sustrato a los derivados de serina **80** y **83** descritos en el apartado anterior.

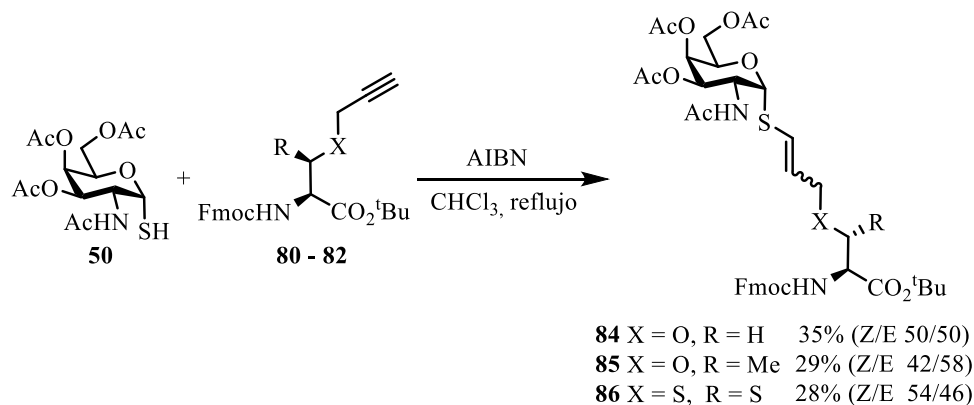
Atendiendo a los resultados observados en el *Capítulo 4*, se llevó a cabo la reacción mediante la vía térmica, empleando como iniciador AIBN (1.2 eq.) y 1.7 equivalentes del carbohidrato en CHCl₃ desgasificado a reflujo (Esquema 5.15).



Esquema 5.15

De igual manera que ocurría con el alqueno con la TEC en el *Capítulo 4*, se observa que la pareja de grupos protectores **Boc-Bn** genera unos rendimientos inferiores a los generados por los grupos protectores **Fmoc-^tBu**, corroborando que para este tipo de sustratos es más conveniente el empleo de este segundo tipo de grupos protectores para llevar a cabo la reacción de hidrotiolación. En ambos casos se obtuvieron mezclas Z y E que no pudieron ser separadas ni su relación determinada.

A continuación se llevaron a cabo las reacciones en las condiciones indicadas, entre el GalNAc- α -SH y los correspondientes aminoácidos descritos en el apartado 5.3.1, tal y como se recoge en el Esquema 5.16.

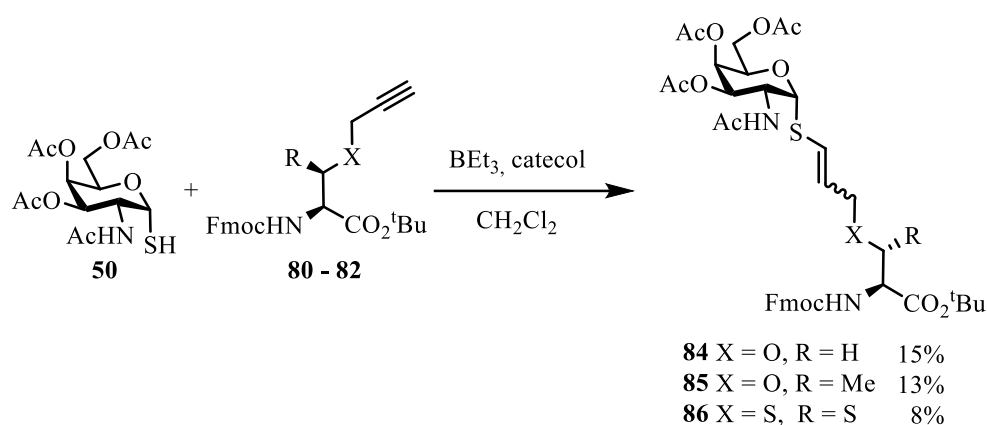


Esquema 5.16

Mediante estas condiciones se obtuvieron los correspondientes tioglicosilaminoácidos insaturados, como una mezcla de isómeros ENDO-Z/ENDO-

El no separables mediante columna cromatográfica. La relación de los isómeros ENDO-Z/ENDO-E fue calculada mediante $^1\text{H NMR}$.

Adicionalmente, se llevó a cabo la reacción empleando las condiciones *Repairing Way*. Atendiendo a las condiciones anteriormente ensayadas se emplearon 1.2 equivalentes tanto del borano como del co-iniciador de reacción, enfrentando 2 equivalentes de GalNAc- α -SH y un equivalente de los correspondientes alquilaminoácidos protegidos, empleando como disolvente diclorometano en una concentración final de alquino de 0.75 M (Esquema 5.17).



Esquema 5.17

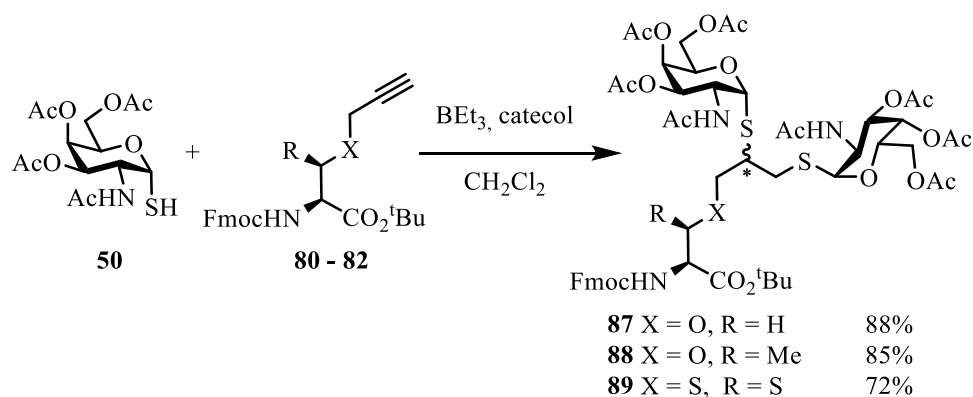
A diferencia de lo observado anteriormente, los rendimientos obtenidos por esta metodología cayeron a valores del 8 al 15% de los correspondientes endo-Z y endo-E. Analizando los subproductos generados por espectrometría de masas, se observó que en lugar de producirse la monoglicosilación de los aminoácidos, se produce una segunda incorporación de la unidad carbohidrato sobre los mismos. Por ello, se planteó una nueva ruta sintética para la síntesis de estos diglicocompuestos, que se expondrá en el apartado siguiente.

5.3.3 Reacciones TYC-TEC

Para optimizar la obtención de los compuestos que presentan dos carbohidratos, se llevó a cabo una pequeña modificación de la reacción probada anteriormente.

Se enfrentaron 3 equivalentes de GalNAc- α -SH y un equivalente de los correspondientes alquilaminoácidos protegidos en presencia de 1.2 equivalentes

de BEt_3 y 1.2 equivalentes de catecol, empleando como disolvente diclorometano en una concentración en alquino de 0.75 M; logrando así, la obtención de los correspondientes diglicocompuestos mostrados en el Esquema 5.18, con buenos rendimientos que fueron desde 72 a 88 %. Como se puede observar, la presencia de un segundo carbohidrato sobre el carbono ϵ , genera un nuevo centro estereogénico cuya configuración no es controlada, obteniendo así los compuestos como una mezcla diastereomérica.



Esquema 5.18

Los epímeros generados mediante la reacción no son separables mediante una cromatografía clásica, por lo que se recurrió a la purificación de estos compuestos mediante HPLC semipreparativo, logrando únicamente separar los compuestos del derivado de treonina **88**, pero no los de serina o cisteína. Sin embargo la cantidad obtenida de los derivados de treonina sólo fue suficiente para su inambigua caracterización (Figura 5.4). Para las reacciones posteriores se empleará la mezcla diastereomérica.

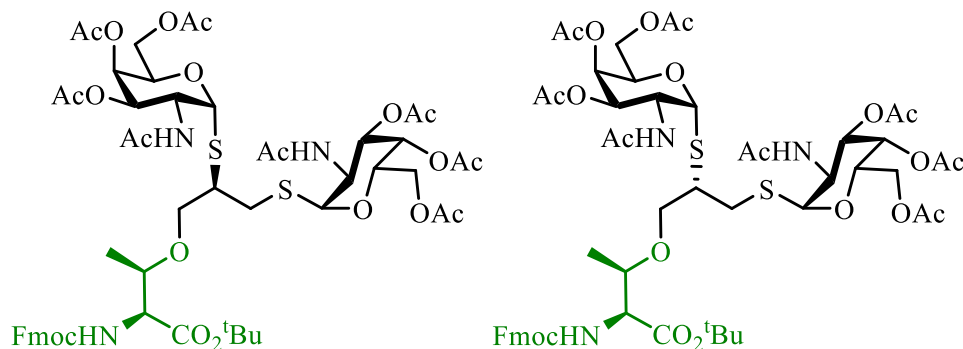
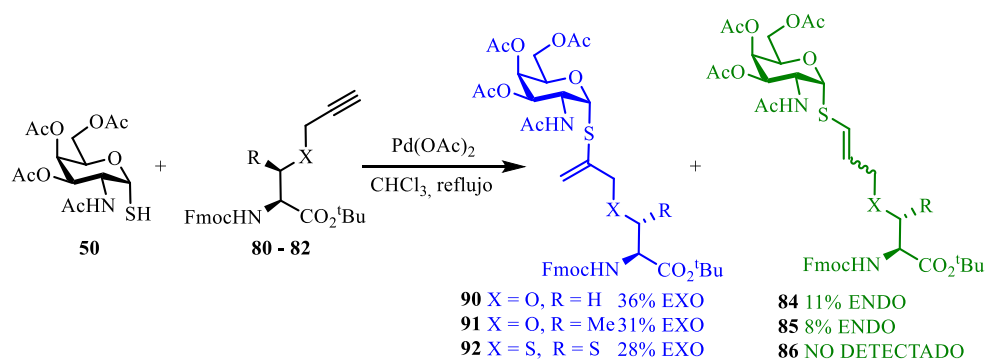


Figura 5.4 Compuestos **88A** y **88B**.

5.3.4 Reacciones de acoplamiento con metales de transición

Para obtener los regioisómeros *EXO* se recurrió al empleo de catalizadores basados en metales de transición, en este caso Pd(OAc)₂.

Atendiendo a la bibliografía, se llevó a cabo la reacción entre 1.5 eq. de GalNAc- α -SH y los correspondientes propargilaminoácidos en presencia de 0.4 eq. de catalizador de bisacetato de paladio, tal y como se recoge en el Esquema 5.19.



Esquema 5.19

Tras purificación cromatográfica, se obtuvieron los correspondientes tioglicosilaminoácidos EXO con unos rendimientos muy moderados, similares a los obtenidos para los regioisómeros ENDO por la vía térmica (radicalaria). También se observó la aparición de los regioisómeros anti-Markovnikov en muy bajo

rendimiento para los derivados de serina y treonina, mientras que no se observó para el derivado de cisteína.

5.4 Conclusiones

1. Se ha llevado a cabo por primera vez reacciones TYC que involucran un carbohidrato como GalNAc- α -SH, no descritas en la bibliografía anteriormente.
2. Se ha llevado a cabo la síntesis y optimización del proceso de hidrotiolación de alquinos para la obtención de nueve neotioglicoaminácidos protegidos a través de tres condiciones: vía térmica, *Repairing Way* y acoplamiento con paladio (Figura 5.5). En el caso de la obtención de los compuestos monoglicosilados, éstos se han obtenido con bajos rendimientos, no superiores al 40%, mientras que para los compuestos diglicosilados se obtienen los compuestos con rendimientos superiores al 70%.

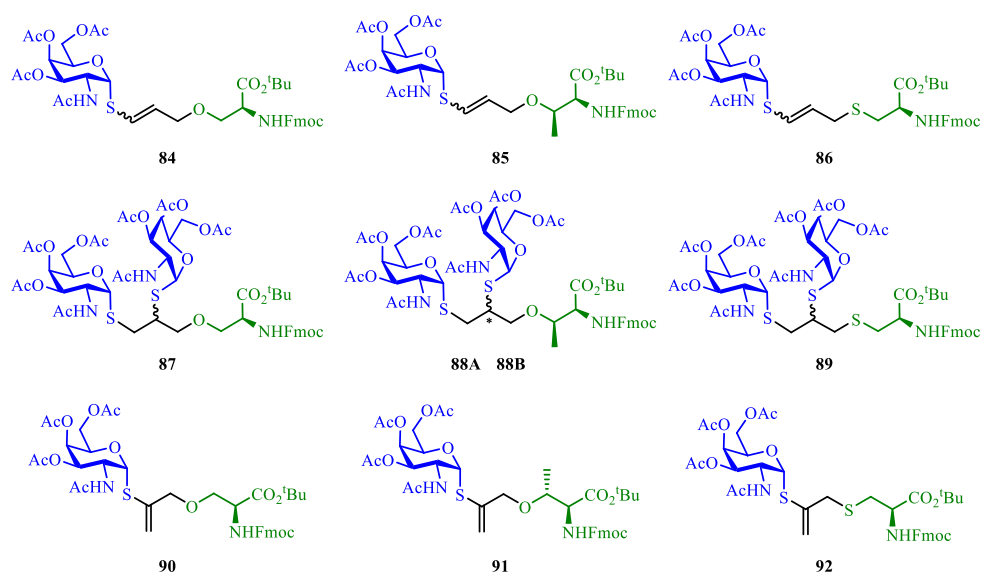


Figura 5.5 Neotioglicoaminoácidos sintetizados y preparados para su inclusión en síntesis en fase sólida.

6. Síntesis de tioglicopéptidos

6.1 Introducción y antecedentes

6.1.1 Lectinas

6.1.2 Anticuerpos

6.2 Objetivos

6.3 Discusión de resultados

6.3.1 Síntesis de péptidos

6.3.2 Análisis conformacional

6.3.3 Actividad biológica con lectinas

6.3.4 Actividad biológica con anticuerpos

6.4 Conclusiones



6.1 Introducción y antecedentes

En este capítulo se pretende hacer un estudio conformacional y de actividad frente a lectinas y anticuerpos sobre los análogos de un epítipo de reconocimiento de la mucina MUC1, obtenidos mediante la incorporación de los tioglicoaminoácidos sintetizados en los capítulos anteriores.

6.1.1 Lectinas

Como se ha comentado en el capítulo 1 de introducción, el antígeno Tn es una estructura asociada a tumores en humanos.^{3c,4,8,9} Las lectinas son unas proteínas que interactúan con carbohidratos con una alta especificidad y de una manera no covalente.¹⁵⁵ El término lectina proviene de la palabra latina *legere*, que significa “seleccionar” o “escoger”. Las lectinas no presentan ninguna actividad tipo anticuerpo, ni catalíticas o enzimáticas, por lo que no producen respuesta inmune. Estas proteínas que se unen a carbohidratos están presentes en multitud de organismos, desde virus y bacterias a plantas y animales.

Existen infinidad de lectinas, que se clasifican en función de su procedencia o la especificidad del monosacárido con el cual interactúan,¹⁵⁶ pero para este estudio se han seleccionado las lectinas *Soybean Agglutinin* (SBA) y *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA). Se han seleccionado estas dianas biológicas por varias razones. Ambas reconocen específicamente al carbohidrato GalNAc, son lectinas estables y que están comercialmente disponibles y además de ambas lectinas están resueltas sus estructuras cristalinas con diferentes ligandos como son el disacárido Gal β (1-4)GalNAc en el caso de la SBA y el antígeno Tn en el caso de la HPA (Figura 6.1).¹⁵⁷ Recientemente, nuestro grupo de investigación ha sido capaz de resolver la estructura cristalina de la SBA junto al antígeno Tn.¹⁵⁸

¹⁵⁵ Sharon, N.; Lis, H. *Lectins 2nd Ed.* **2007**, Springer, The Netherlands.

¹⁵⁶ Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.

¹⁵⁷ Lescar, J.; Sanchez, J.-F.; Audfray, A.; Coll, J.-L.; Breton, C.; Mitchell, E.-P.; Imberty, A. *Glycobiology* **2007**, *17*, 1077-1083.

¹⁵⁸ Madariaga, D.; Martínez-Saez, N.; Somovilla, V.J.; Coelho, H.; Valero-Gonzalez, J.; Castro-Lopez, J.; Asensio, J.L.; Jimenez-Barbero, J.; Busto, J.H.; Avenoza, A.; Marcelo, F.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F.; Peregrina, J.M. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 747-756

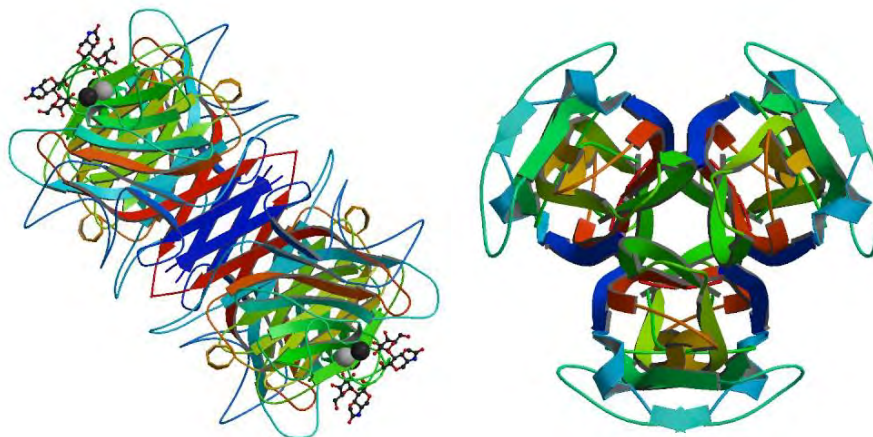


Figura 6.1 Dominios de la lectina SBA (PDB: 1sbf) y HPA (PDB: 2ce6).

6.1.2 Anticuerpos

Como se ha comentado en el capítulo 1 de introducción, la secuencia peptídica PDTR es un epítipo reconocido por distintos anticuerpos del tipo anti-MUC1. El desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales, anticuerpos homogéneos e idénticos, ha permitido realizar avances significativos en el estudio de antígenos tumorales. Es por ello, que constituyen una excelente herramienta para analizar la capacidad inmunogénica de los antígenos que se desean estudiar.

Sin embargo, y a diferencia de las lectinas, cuyo sitio de reconocimiento involucra a la parte carbohidrato del glicopéptido, los anticuerpos reconocen fundamentalmente la parte peptídica. De esta forma, el estudio con anticuerpos complementaría al realizado con las diferentes lectinas. Así, se podría comprobar como afecta la presencia del espaciador y de los átomos de azufre a las interacciones existentes entre el anticuerpo y la parte peptídica de los diferentes análogos sintetizados.

En este sentido, y para desarrollar el estudio que se propone, se seleccionó el anticuerpo monoclonal SM3 que ya había sido empleado anteriormente en nuestro grupo de investigación por ser comercial y conocerse su estructura de rayos X.

6.2 Objetivos

Con el fin de estudiar cómo las diferencias estructurales modulan el reconocimiento molecular entre distintos sistemas biológicos de interés y péptidos

miméticos de la MUC1, se decidió llevar a cabo la síntesis de los glicopéptidos **93** a **97** (Figura 6.2). Todos ellos presentan la secuencia de 6 aminoácidos APDX*RP, epítipo de reconocimiento molecular de la mucina MUC1, donde X* es un tioglicoaminoácido derivado de Ser, Thr, Cys o Gly con un espaciador carbonado de tres carbonos. En la molécula **97** se ha reducido la longitud del espaciador para evaluar cómo afecta la distancia entre el carbohidrato y el esqueleto a la hora de interactuar con las dianas biológicas.

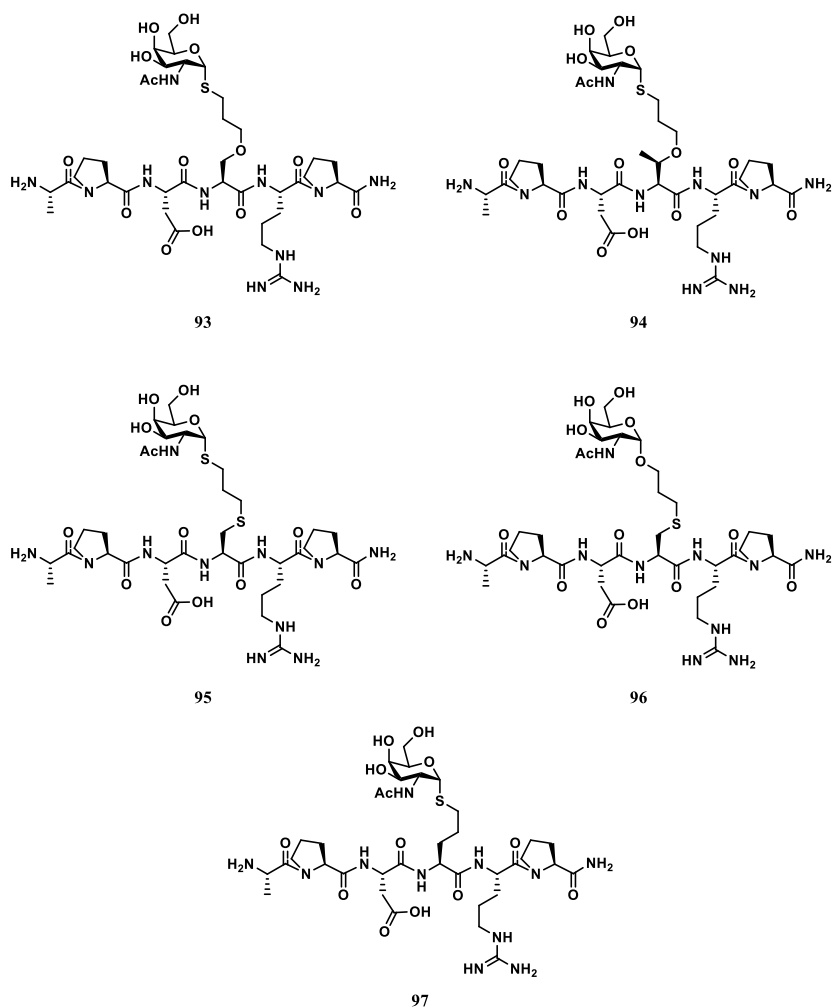


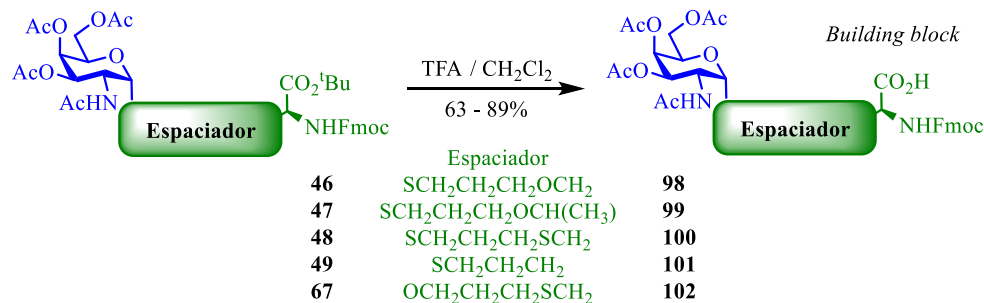
Figura 6.2

Además de la síntesis, se llevará a cabo el análisis conformacional en el estado libre para las moléculas objetivo. El estudio de actividad se realizó sobre las lectinas *Soybean Agglutinin* (SBA) y *Helix Pomatia Agglutinin* (HPA) mediante ensayos ELLA.

6.3 Discusión de resultados

6.3.1 Síntesis de péptidos

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de los *building blocks* para su incorporación en síntesis en fase sólida, mediante la adición de una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ (1:1) sobre los compuestos **46**, **47**, **48**, **49** y **67**, para hidrolizar el grupo éster. Tras su correspondiente purificación mediante columna cromatográfica, se obtuvieron los *building blocks* **98** a **102**, listos para su incorporación a la cadena peptídica. Estos compuestos fueron caracterizados y sus datos pueden encontrarse en el apartado experimental. Todos estos compuestos se obtuvieron con buenos rendimientos (79 - 89 %) salvo el compuesto **100**, el que presenta dos átomos de azufre en el espaciador. Como ya se comentó en el *Capítulo 4*, este compuesto descompone fácilmente mediante la purificación por columna cromatográfica, por lo que el rendimiento obtenido fue del 63% (Esquema 6.1).



Esquema 6.1

Una vez obtenidos los *building blocks*, se abordó la síntesis peptídica de los cinco tioglicohexapéptidos mediante síntesis en fase sólida. A continuación se describe de manera detallada la metodología utilizada para la obtención del tioglicopéptido **93**, ya que la síntesis para todos los tioglicopéptidos se realizó de manera análoga.

La síntesis del tioglicohexapéptido **93** se realizó utilizando un sintetizador automático de péptidos Applied Biosystem 433A. Se empleó la resina polimérica

Rink Amide MBHA (Figura 6.3), que fue elegida con el objetivo de obtener el extremo C-terminal en forma de amida, simulando un enlace peptídico más. De igual manera se seleccionaron aminoácidos adecuadamente protegidos para su uso mediante la estrategia Fmoc, que están comercialmente disponibles a excepción de los compuestos glicosilados.

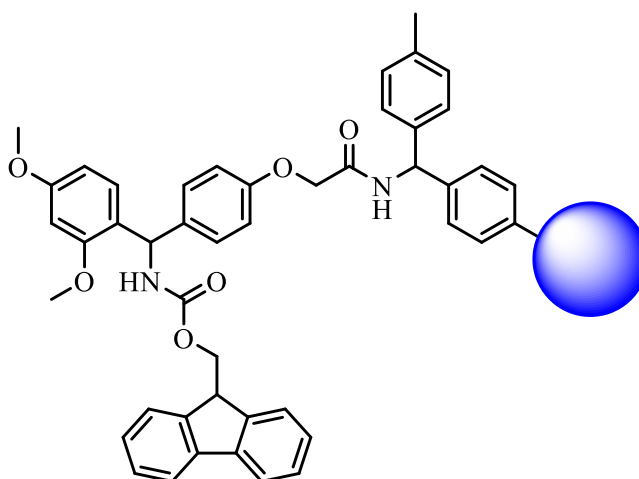


Figura 6.3 Resina MBHA empleada para SPPS (Novabiochem®).

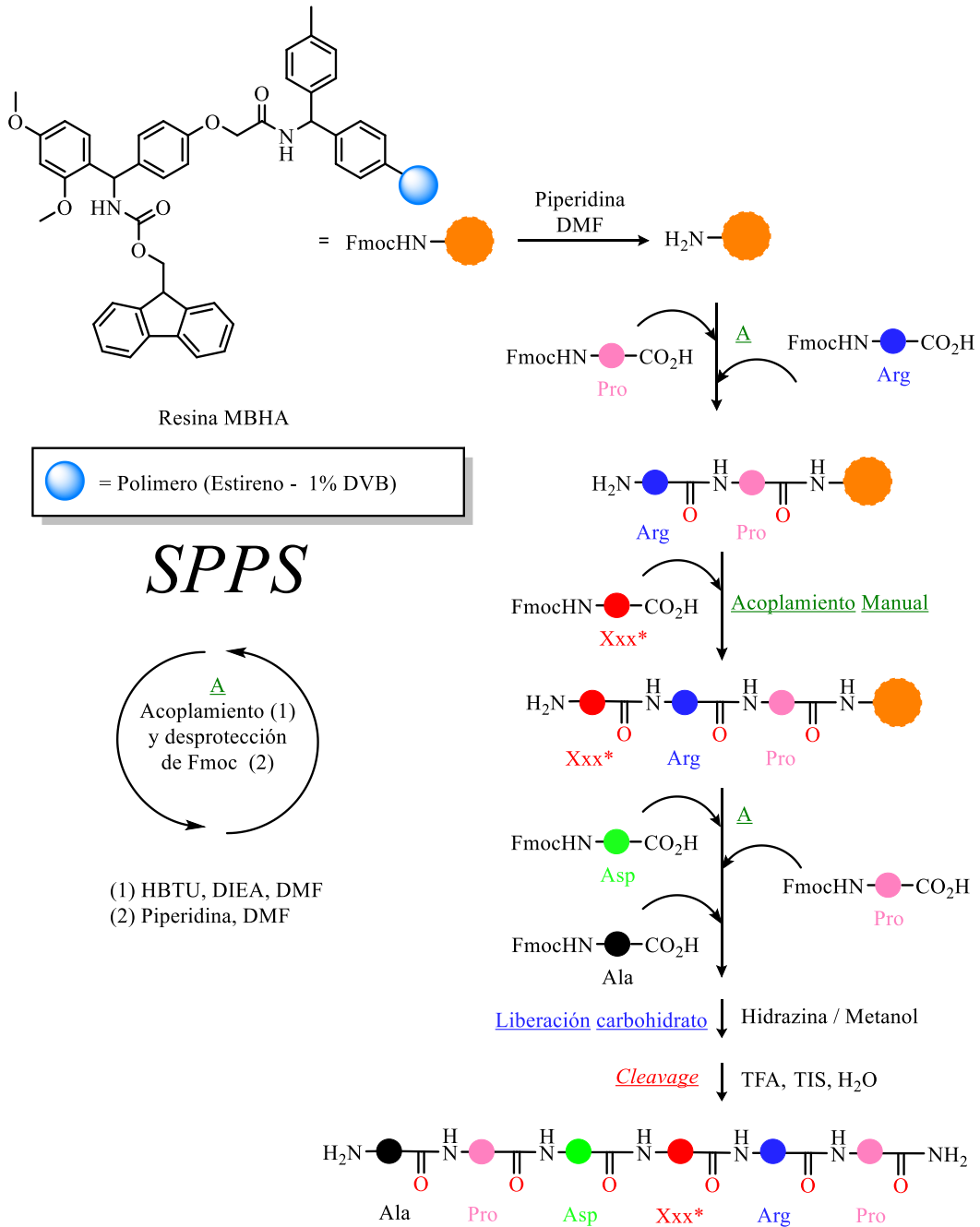
La elongación de la cadena peptídica tuvo lugar desde la Pro6 hasta la Ala1. La desprotección del Fmoc se llevó a cabo usando piperidina. Mientras que los acoplamientos tuvieron lugar utilizando *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1H-benzotriazolil)uronio (HBTU) como agente de acoplamiento, DIEA como base y DMF como disolvente.

Tras la desprotección del grupo amino de la Arg5, el soporte sólido fue extraído del sintetizador para llevar a cabo el acoplamiento de forma manual de dicha arginina con el *building block* glicosilado **98**. De este modo, fue posible reducir notablemente el número de equivalentes de dicho compuesto (Desde 10 equivalentes que se emplean en el sintetizador a 3 equivalentes que se emplean en el método manual). Nuevamente se usó HBTU y DIEA en DMF. El tiempo de reacción aumentó notablemente respecto a los acoplamientos realizados por el sintetizador. La formación del enlace amida fue chequeada mediante el test de Kaiser.¹⁵⁹ Una vez finalizado el acoplamiento manual, la resina fue lavada con DMF, MeOH y DCM, y se incorporó nuevamente al sintetizador para completar la secuencia peptídica.

¹⁵⁹ Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

Seguidamente se desprotegeron los grupos hidroxilo del GalNAc. Para ello, se trató la resina con una mezcla de hidrazina/MeOH (7:3).

Finalmente, se realizó el *cleavage*, produciendo simultáneamente la liberación del péptido de la resina y la eliminación de los distintos grupos protectores de las cadenas laterales mediante la adición de un *cocktail* de TFA, triisopropilsilano (TIS) y agua (19:0.5:0.5). Tras la adición de éter etílico frío, el compuesto precipitó. El precipitado se filtró y lavó con éter etílico frío un par de veces para eliminar el TFA restante. Después se redisolvió con agua y se filtró, tras lo cual fue purificado mediante HPLC semipreparativo, obteniendo así el análogo del epítipo de mucina **93** (Esquema 6.2). De forma similar, y partiendo de los *building blocks* **99**, **100**, **101** y **102** se obtuvieron los glicopéptidos **94**, **95**, **97** y **96** respectivamente



Esquema 6.2 Síntesis de los tioglicohexapéptidos en fase sólida (SPPS).

6.3.2 Análisis conformacional

Una vez obtenidos tanto la diamida **66** (*Capítulo 4*) como los tioglicohexapéptidos **93** a **97** se llevó a cabo su estudio conformacional en agua mediante RMN y cálculos de DM.

El primer paso para el análisis conformacional consistió en la asignación de las señales de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para todos los compuestos, realizándose los correspondientes espectros bidimensionales COSY y HSQC.

En primer lugar, se llevaron a cabo los cálculos para la molécula más sencilla, el tioglicopéptido modelo **66**. En las Figura 6.4, Figura 6.5 y la Tabla 6.1 se recogen la designación atómica y la asignación de todos los protones para el compuesto **66**, así como las constantes de acoplamiento de los mismos

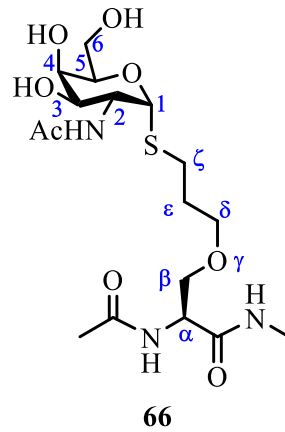


Figura 6.4 Designación atómica de la diamida **66**.

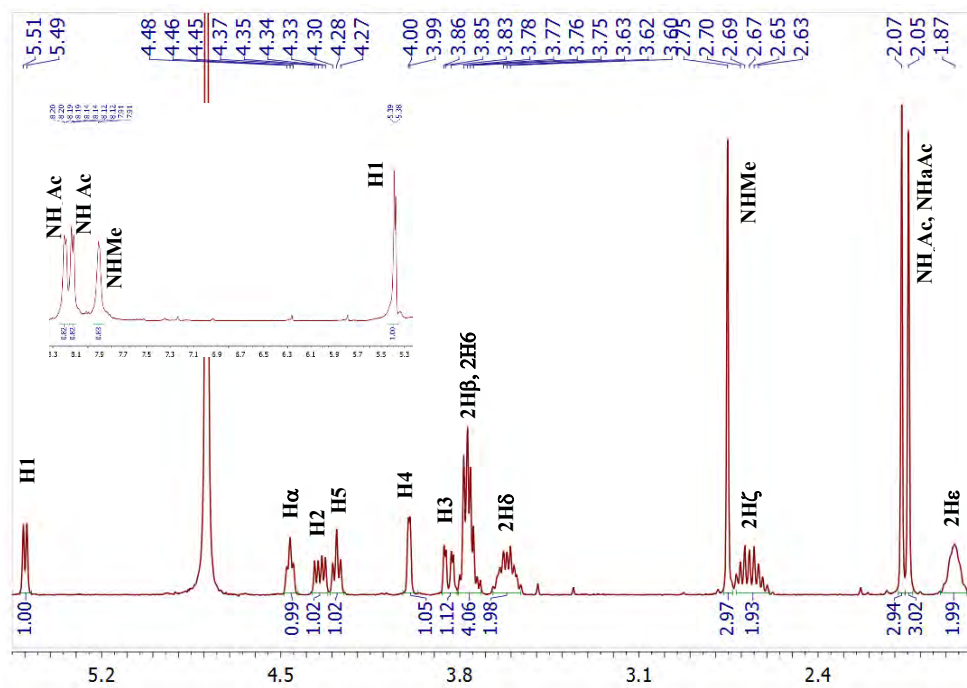


Figura 6.5 Asignación de protones en el compuesto **66**.

Tabla 6.1 Asignación de los protones y constantes de acoplamiento ${}^nJ_{H,H}$ experimentales para el compuesto **66**.

δ (ppm)	protones	multiplicidad ^b	${}^nJ_{H,H}$ (Hz)
1.81 - 1.94	H ϵ	m (2H)	-
2.05	COCH ₃ ^d	s (3H)	-
2.07	COCH ₃ ^e	s (3H)	-
2.61 - 2.72	H ζ	m (2H)	-
2.75	CH ₃	s (3H)	-
3.55 - 3.69	H δ	m (2H)	-
3.71 - 3.80	H δ , H β	m (4H)	-
3.84	H3	d (1H)	${}^3J_{H3, H2} = 11.4$ ${}^3J_{H3, H4} = 3.1$
4.00	H4	d (1H)	${}^3J_{H4, H3} = 2.4$
4.28	H5	t (1H)	${}^3J_{H5, H6} = 6.1$ ${}^3J_{H5, H6'} = 6.1$
4.35	H2	dd (1H)	${}^3J_{H2, H3} = 11.4$ ${}^3J_{H2, H1} = 5.5$
4.46	H α	t (1H)	${}^3J_{H\alpha, H\beta} = 4.9$
5.50	H1	d (1H)	${}^3J_{H1, H2} = 5.5$
7.91 ^c	NHMe	s (1H)	-
8.13 ^c	NHAc ^d	d (1H)	${}^3J_{NH, H2} = 7.6$
8.20 ^c	NHAc ^e	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 5.5$

^a Datos obtenidos del experimento ¹H RMN (400 MHz) en D₂O (25 °C), ^b s = singlete, d = doblete, t = triplete o pseudotriplete, dd = doblete doblete, m = multiplete, br s = singlete ancho, ^c Datos obtenidos del experimento ¹H RMN (400 MHz) en H₂O/D₂O (25 °C). ^d Señales correspondientes a la parte carbohidrato. ^e Señales correspondientes a la parte aminoácido.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY en una mezcla H₂O/D₂O (9:1) (Figura 6.6).

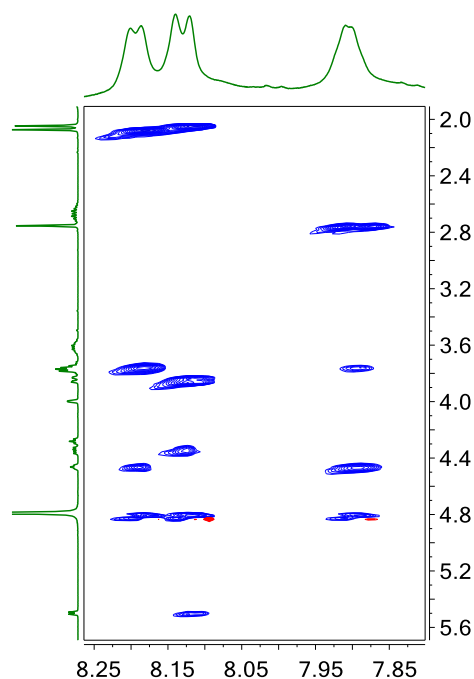


Figura 6.6 Experimento 2D-NOESY del compuesto **66**.

Las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones de amida se pudieron obtener de forma semicuantitativa, por integración de los correspondientes picos de cruce. La Tabla 6.2 muestra las distancias H-H experimentales y teóricas para el compuesto **66**.

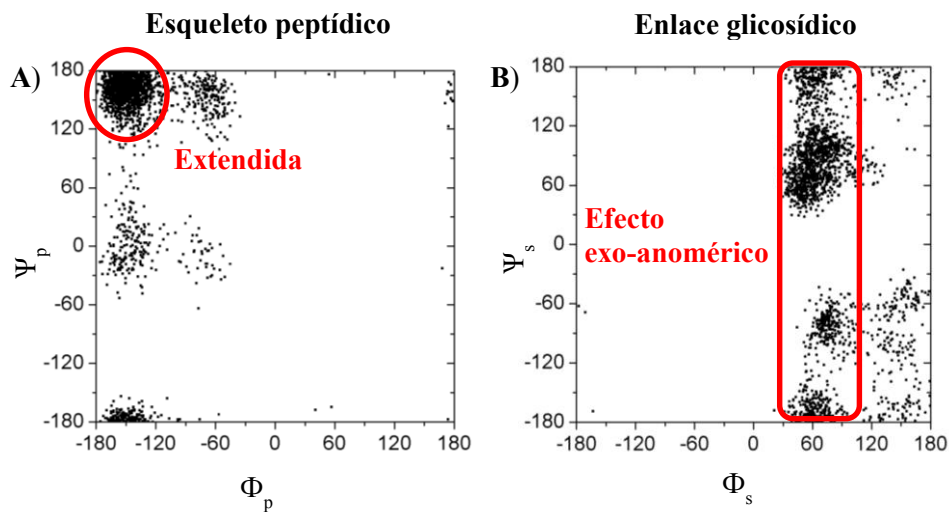
Con el fin de obtener una distribución de poblaciones para todos los compuestos capaces de reproducir las distancias H-H obtenidas por RMN, se realizaron cálculos de Dinámica Molecular (DM) con restricciones promediadas en el tiempo (DM-tar) utilizando como restricciones las propias distancias H-H. Las DM-tar se llevaron a cabo directamente en agua utilizando un modelo de disolvente explícito y empleando un tiempo de simulación de 20 ns. Para su realización, se utilizó el programa AMBER¹¹⁷ y el campo de fuerzas denominado también AMBER,¹¹⁸ complementado con GLYCAM-06¹¹⁹ para simular adecuadamente el comportamiento conformacional del carbohidrato. Como puede observarse en la Tabla 6.2, existe una buena correlación entre los datos teóricos y los experimentales, lo que valida las simulaciones realizadas.

Tabla 6.2 Distancias^a H-H experimentales y teóricas para **66**.

	Experimental	DM-tar ^b
NH1-NHMe	2.9	2.7
NH1-H1	3.0	3.2
NH1-H_α	2.8	2.9
NHMe-H_α	2.4	2.3
NHMe-Me_s^c	4.3	4.7
H1-H_ζ	2.6	2.8
H1-H_ε	2.8	3.3

^a Distancias dadas en Å. ^b DM-tar de 20 ns en disolvente explícito. ^c La letra “s” hace referencia al carbohidrato.

En la siguiente Figura, el diagrama de Ramachandran muestra la distribución Φ/Ψ , obtenida por cálculos de DM, tanto para el esqueleto peptídico modelo como para el carbohidrato (Figura 6.7).

**Figura 6.7** Valores Φ_p/Ψ_p (A) y Φ_s/Ψ_s (B) del compuesto **66**.

A la vista de estos valores, podemos concluir que la parte peptídica (gráfica A de la Figura 6.7) presenta una conformación muy mayoritaria, con

aproximadamente el 95% de la población, con valores aproximados de $\Phi_p = \Psi_p = 180^\circ$, que correspondería con una conformación tipo extendida.

Atendiendo a los ángulos diedros del carbohidrato, Φ_s/Ψ_s (gráfica **B** de la Figura 6.7), el ángulo diedro Φ_s es bastante rígido, adquiriendo un valor de 60° , en concordancia con el efecto exo-anomérico. Este hecho ha sido recientemente descrito por nuestro grupo para un derivado de cisteína glicosilado con GalNAc.^{99f} Sin embargo, se observan diferencias en el ángulo diedro Ψ_s , que adquiere valores que van de 60° a 180° . Comparando estos valores con los observados para los antígenos Tn, tanto de la serina como de la treonina (Figura 6.8), podemos concluir que el compuesto **66** presenta una disposición conformacional más próxima a la del Tn de treonina que a la del Tn de serina.^{16c}

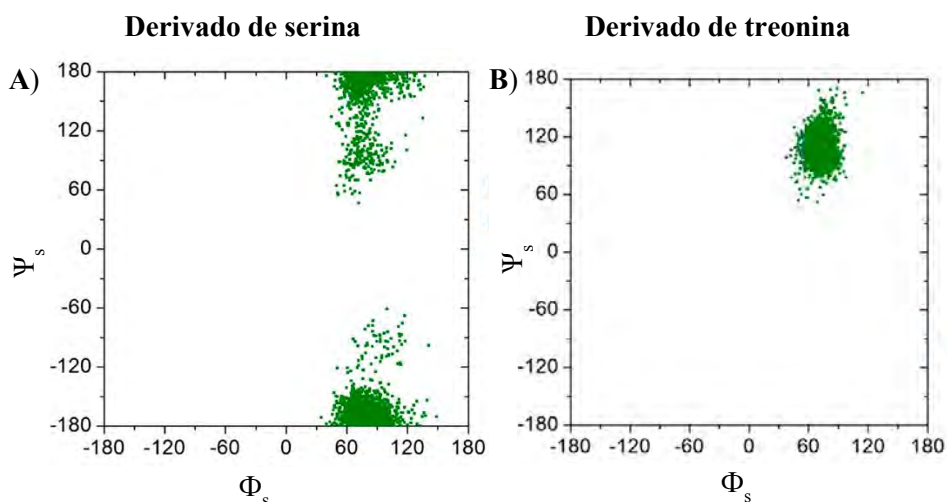


Figura 6.8 Valores Φ_s/Ψ_s para el antígeno Tn de Ser (**A**) y Thr (**B**).

Estos resultados nos muestran la alta flexibilidad que el átomo de azufre confiere al enlace glicosídico que, junto a la flexibilidad debida al espaciador, hace que el carbohidrato no adquiera una conformación rígida, como se puede ver en la Figura 6.9, donde en verde se representa el esqueleto peptídico y en azul la cadena lateral (tanto el espaciador como el carbohidrato). Este hecho es el objetivo buscado a la hora de introducir tanto el espaciador como el heteroátomo, forzar una alta flexibilidad.

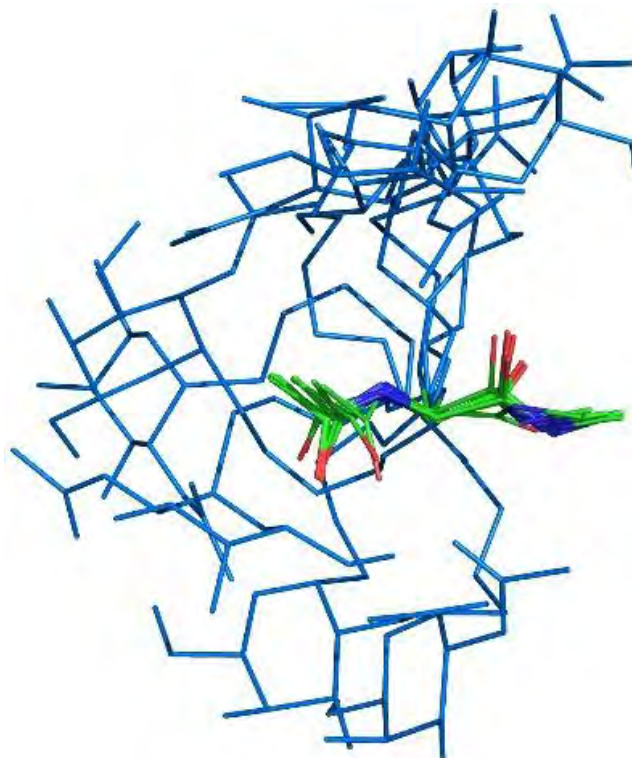


Figura 6.9 Conformaciones representativas del **66**.

De igual manera, se llevó a cabo el mismo estudio conformacional para los tioglicohexapéptidos **94** y **97**. En las Figuras 6.10 y 6.11 y en la Tabla 6.3 se recogen la designación atómica y la asignación de todos los protones para el compuesto **97**, así como las constantes de acoplamiento de los mismos.

Tabla 6.3 Asignación de los protones y constantes de acoplamiento ${}^nJ_{H,H}$ experimentales para el compuesto **97**.^a

δ (ppm)	protones	multiplicidad ^b	${}^nJ_{H,H}$ (Hz)
1.54	H β Ala	d (3H)	${}^3J_{H\beta, H\alpha} = 7.0$
1.58-1.80	H γ Arg, H β Arg H γ Pro, H γ Pro	m (6H)	-
1.81-2.10	NHCOCH ₃ , H β hhCys H γ hhCys, H β Pro, H β Pro, H γ Pro, H γ Pro	m (11H)	-
2.27-2.38	H β Pro, H β Pro	m (2H)	-
2.55-2.70	H δ hhCys	m (2H)	-
2.85	H β Asp	dd (1H)	${}^3J_{H\beta, H\beta} = 17.1$ ${}^3J_{H\beta, H\alpha} = 7.1$
2.95	H β Asp	dd (1H)	${}^3J_{H\beta, H\beta} = 17.0$ ${}^3J_{H\beta, H\alpha} = 6.5$
3.16-3.27	H δ Arg	m (2H)	-
3.58-3.81	H6, H δ Pro, H δ Pro	m (6H)	-
3.83	H3	dd (1H)	${}^3J_{H3, H2} = 11.4$ ${}^3J_{H3, H4} = 3.1$
3.98	H4	d (1H)	${}^3J_{H4, H3} = 2.8$
4.25	H5	t (1H)	${}^3J_{H5, H6} = 5.9$ ${}^3J_{H5, H6'} = 5.9$
4.30 - 4.41	H2, H α Pro H α Ala, H α hhCys	m (4H)	-
4.44 - 4.52	H α Pro	m (1H)	-
4.61 - 4.70	H α Asp, H α Arg	m (2H)	-
5.49	H1	d (1H)	${}^3J_{H1, H2} = 5.4$
6.67 ^c	NH ₂ η Arg	br s (1H)	-
7.00 ^c	CONH ₂	s (1H)	-
7.20 ^c	NH ϵ Arg	t (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 5.2$
7.69 ^c	CONH ₂	s (1H)	-
8.20 ^c	NHCOCH ₃	d (1H)	${}^3J_{NH, H2} = 8.1$
8.27 ^c	NHhhCys	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.1$
8.32 ^c	NHArg	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.3$
8.63 ^c	NHAsp	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.0$

^a Datos obtenidos del experimento ¹H RMN (400 MHz) en D₂O (25 °C). ^b s = singlete, d = doblete, t = triplete o pseudotriplete, dd = doblete doblete, m = multiplete, br s = singlete ancho. ^c Datos obtenidos del experimento ¹H RMN (400 MHz) en H₂O/D₂O (25 °C).

Como puede observarse en el espectro de la Figura 6.11, especialmente en la zona de las amidas, se ve un segundo juego de señales, mucho más pequeño (en torno a un 10%) que podría corresponderse con el derivado que presenta el enlace amida del residuo de prolina en disposición *cis*, como ya han reportado otros autores para péptidos y glicopéptidos similares.¹²

De igual manera que con el compuesto **66**, se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY en una mezcla H₂O/D₂O (9:1) para los tioglicopéptidos, pudiendo asignar así las señales de las amidas y extraer los datos necesarios para los cálculos de DM-tar (Figura 6.12).

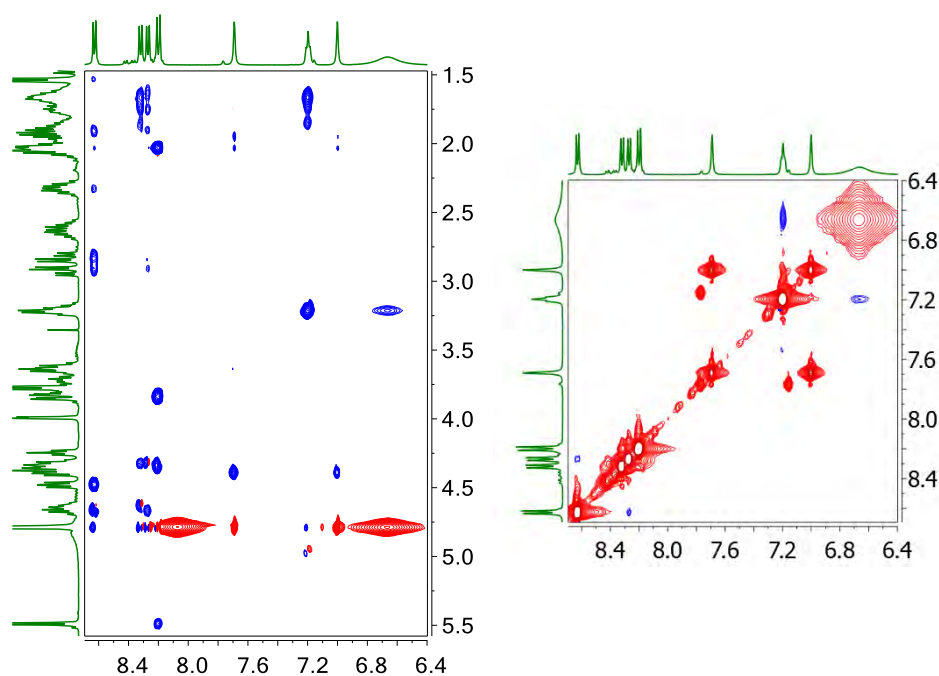


Figura 6.12 Experimento 2D-NOESY del compuesto **97**.

Las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones se pudieron obtener de forma semicuantitativa, por integración de los correspondientes picos de cruce. La Tabla 6.4 muestra las distancias H-H experimentales y teóricas para el compuesto **97**.

Tabla 6.4 Distancias^a H-H y constantes de acoplamiento ³J experimentales y teóricas para **97**.

	Experimental	DM-tar ^b
NH _{Asp3} - H _α Pro2	2.4	2.3
NH _{Asp3} - H _α Asp3	2.7	2.9
NH _{Arg5} - H _α hhCys4	3.0	3.1
³ J _{NH,HαhhCys4}	7.3	6.9

^a Distancias dadas en Å y acoplamientos ³J en Hz. ^b DM-tar de 20 ns en agua explícita. ^c La letra “s” hace referencia al carbohidrato.

En la siguiente figura se muestra la distribución Ramachandran Φ_s/Ψ_s , obtenida por cálculos de DM (Figura 6.13).

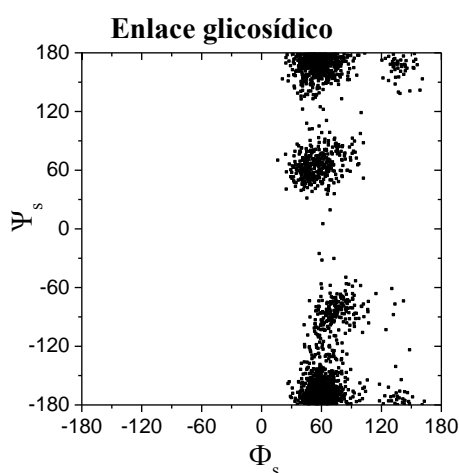


Figura 6.13 Valores Φ_s/Ψ_s del compuesto **97**.

A la vista de estos valores, atendiendo a los ángulos diedros del carbohidrato, Φ_s/Ψ_s , el ángulo diedro Φ_s es bastante rígido, adquiriendo un valor de 60°, en concordancia con el efecto exo-anomérico producido por el azufre. Sin embargo, se observan diferencias en el ángulo diedro Ψ_s , que adquiere valores próximos a 60°, 180 y -60°.

Atendiendo a los ángulos de torsión del esqueleto peptídico, Φ_p/Ψ_p , observamos diferencias en dicha estructura. Mientras que los residuos de Pro2 y Arg5 muestran mayoritariamente una conformación extendida, los residuos Asp3 y hhCys4 disponen una conformación plegada (Figura 6.14) y Pro6 muestra un reparto prácticamente equitativo de ambas conformaciones.

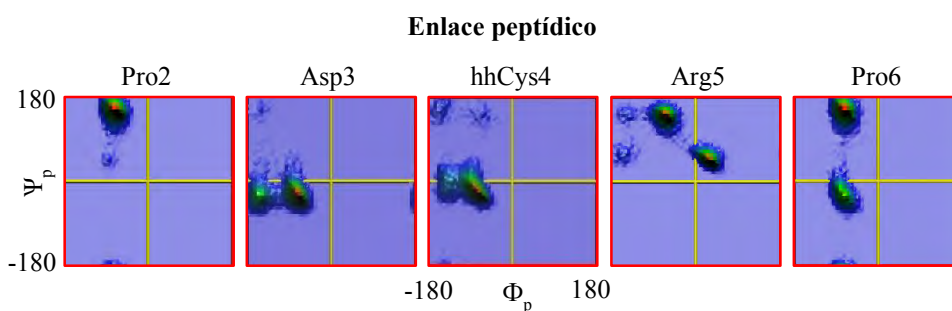


Figura 6.14 Valores Φ_p/Ψ_p de los residuos del compuesto **97**.

Si comparamos estos resultados con los epítomos naturales del antígeno Tn, tanto de serina como de treonina, **APDS*RP** y **APDT*RP** (A y B de la Figura 6.15, respectivamente),¹⁶⁰ en los que el carbohidrato fuerza al esqueleto peptídico a una disposición mayoritariamente extendida en todos los residuos, se observa que el espaciador dispone al carbohidrato de tal manera que no es capaz de mantener la conformación extendida de los aminoácidos más próximos.

¹⁶⁰ Martínez-Sáez, N.; Castro-López, J.; Valero-González, J.; Madariaga, D.; Compañón, I.; Somovilla, V. J.; Salvadó, M.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Bernardes, G. J. L.; Peregrina, J. M.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9830-9834.

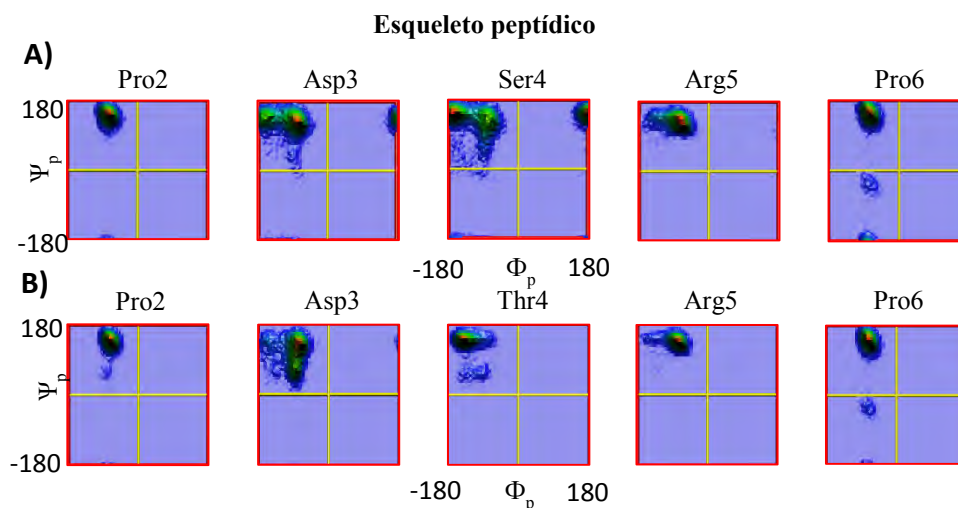


Figura 6.15 Φ_p/Ψ_p de los residuos de los compuestos APDS*RP y APDT*RP.

Si por el contrario atendemos a los ángulos diedros de la cadena lateral del espaciador de hhCys4, χ^n , se observa que salvo para χ^2 , estos ángulos no presentan una única disposición, sino que se encuentran repartidos en valores próximos a -60° , 60° y 180° (Figura 6.15).

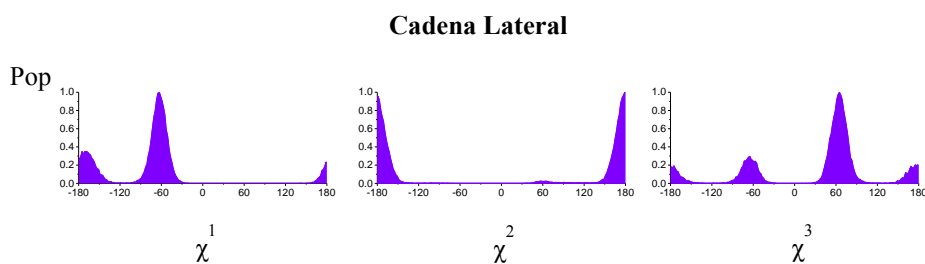


Figura 6.15 Valores χ^n de los residuos del compuesto **97**.

Estos resultados nos muestran la flexibilidad que el átomo de azufre confiere al enlace glicosídico, que junto a la flexibilidad debida al espaciador, hace que el carbohidrato no adquiera una conformación rígida, como se puede ver en la Figura 6.16, donde en verde se representa el esqueleto peptídico y en rosa la cadena lateral junto con el carbohidrato. Este hecho es el objetivo buscado a la hora de introducir tanto el espaciador como el heteroátomo, permitir un mayor grado de flexibilidad.

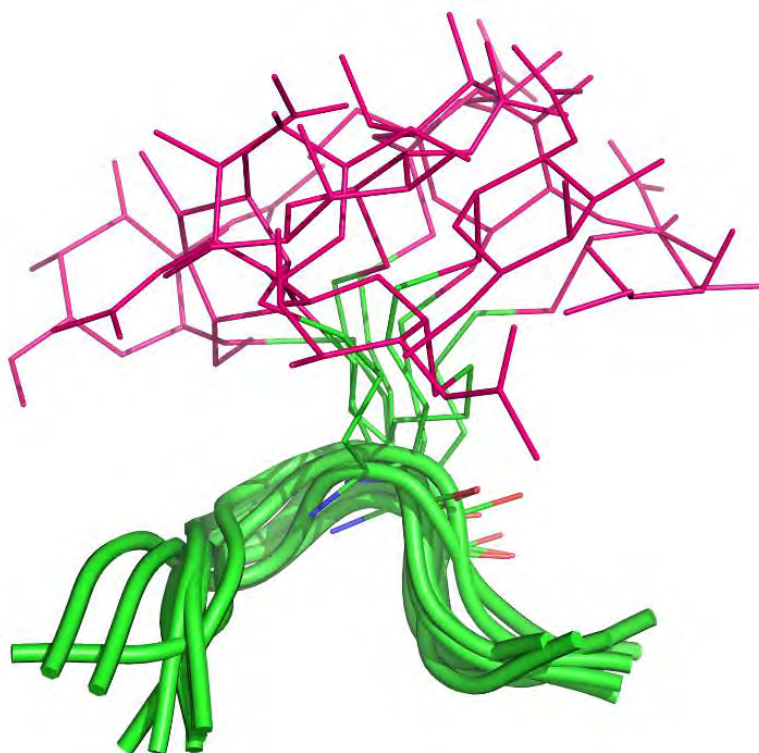


Figura 6.16 Conformaciones representativas del compuesto **97**.

De igual manera se han llevado a cabo los cálculos para el derivado **94**, que presenta un espaciador de mayor distancia y un segundo heteroátomo en dicho espaciador. En las Figuras 6.17 y 6.18 y en la Tabla 6.5 se recogen la designación atómica y la asignación de todos los protones para el compuesto **94**, así como las constantes de acoplamiento de los mismos.

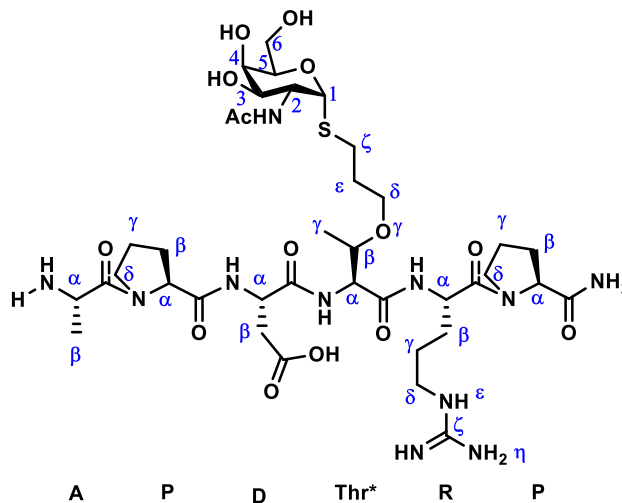


Figura 6.17 Designación atómica de la molécula 97.

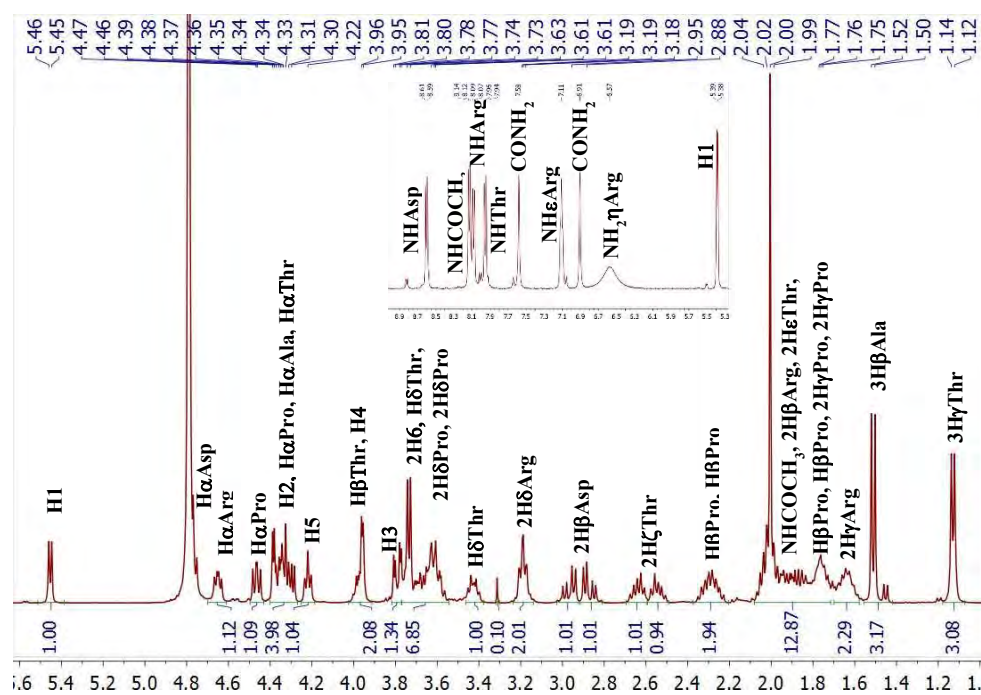


Figura 6.18

Tabla 6.5 Asignación de los protones y constantes de acoplamiento ${}^nJ_{H,H}$ experimentales para el compuesto **94**.^a

δ (ppm)	protones	multiplicidad ^b	${}^nJ_{H,H}$ (Hz)
1.13	H γ Thr	d (3H)	${}^3J_{H\gamma, H\beta} = 6.3$
1.51	H β Ala	d (3H)	${}^3J_{H\beta, H\alpha} = 7.0$
1.57-1.70	2H γ Arg	m (2H)	-
1.71-2.08	NHCOCH ₃ , 2H β Arg, 2H ϵ Thr, H β Pro, H β Pro, 2H γ Pro, 2H γ Pro	m (13H)	-
2.22-2.36	H β Pro, H β Pro	m (2H)	-
2.50-2.69	2H ζ Thr	m (2H)	-
2.87	H β Asp	dd (1H)	${}^3J_{H\beta, H\beta} = 17.1$ ${}^3J_{H\beta, H\alpha} = 6.6$
2.97	H β Asp	dd (1H)	${}^3J_{H\beta, H\beta} = 17.1$ ${}^3J_{H\beta, H\alpha} = 7.0$
3.15-3.23	2H δ Arg	m (2H)	-
3.38-3.46	H δ Thr	m (1H)	-
3.55-3.76	2H δ , 2H δ Pro, 2H δ Pro, H δ Thr	m (7H)	-
3.79	H3	dd (1H)	${}^3J_{H3, H2} = 11.4$ ${}^3J_{H3, H4} = 3.1$
3.94-4.01	H β Thr, H4	m (2H)	-
4.22	H5	t (1H)	${}^3J_{H5, H6} = 6.0$ ${}^3J_{H5, H6'} = 6.0$
4.28 - 4.40	H2, H α Pro, H α Ala, H α Thr	m (4H)	-
4.46	H α Pro	dd (1H)	${}^3J_{H\alpha, H\beta} = 8.1$ ${}^3J_{H\alpha, H\beta'} = 6.3$
4.65	H α Arg	dd (1H)	${}^3J_{H\alpha, H\beta} = 8.1$ ${}^3J_{H\alpha, H\beta'} = 5.3$
4.74 - 4.78	H α Asp	m (1H)	-
5.45	H1	d (1H)	${}^3J_{H1, H2} = 5.5$
6.67 ^c	NH η Arg	br s (1H)	-
7.01 ^c	CONH ₂	s (1H)	-
7.21 ^c	NH ϵ Arg	t (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 4.5$
7.68 ^c	CONH ₂	s (1H)	-
8.06 ^c	NHThr	d (1H)	${}^3J_{NH, H2} = 8.2$
8.18 ^c	NHArg	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.4$
8.23 ^c	NHCOCH ₃	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.9$
8.71 ^c	NHAsp	d (1H)	${}^3J_{NH, H\alpha} = 7.0$

^a Datos obtenidos del experimento ¹H RMN (400 MHz) en D₂O (25 °C). ^b s = singlete, d = doblete, t = triplete o pseudotriplete, dd = doblete doblete, m = multiplete, br s = singlete ancho. ^c Datos obtenidos del experimento ¹H RMN (400 MHz) en H₂O/D₂O (25 °C).

Al igual que ocurría en el compuesto anterior, en el espectro de la Figura 6.17, especialmente en la zona de las amidas, se ve un segundo juego de señales, mucho más pequeño (en torno a un 10%) que podría corresponderse con el derivado que presenta el enlace amida del residuo de prolina en disposición *cis*.¹²

Igualmente se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY en una mezcla H₂O/D₂O (9:1) para el compuesto **94**, pudiendo asignar así las señales de las amidas y extraer los datos necesarios para los cálculos de DM-tar (Figura 6.19).

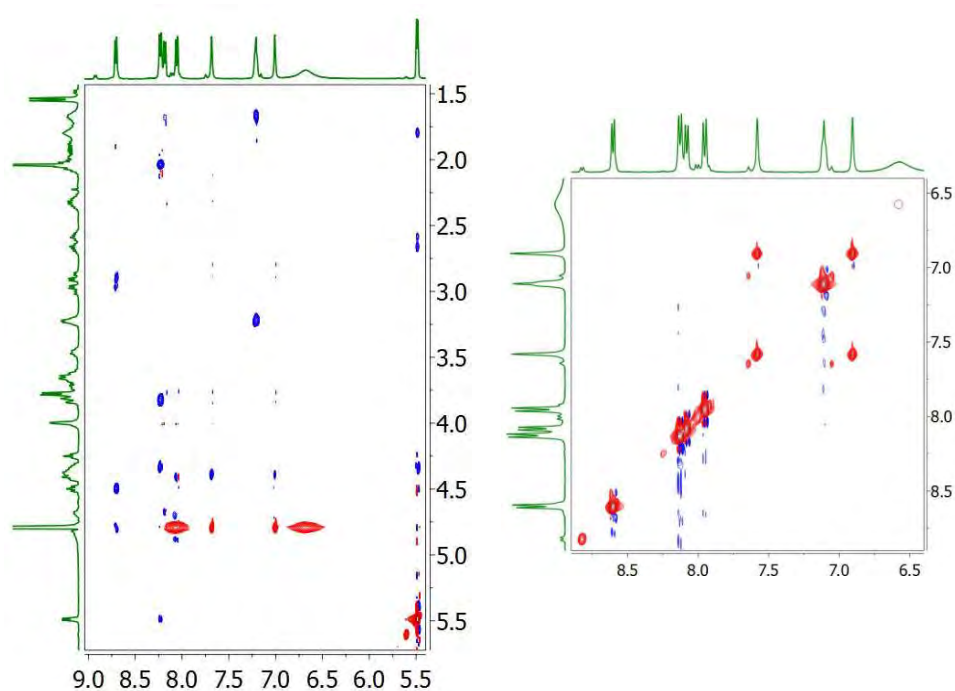


Figura 6.19 Experimento 2D-NOESY del compuesto **94**.

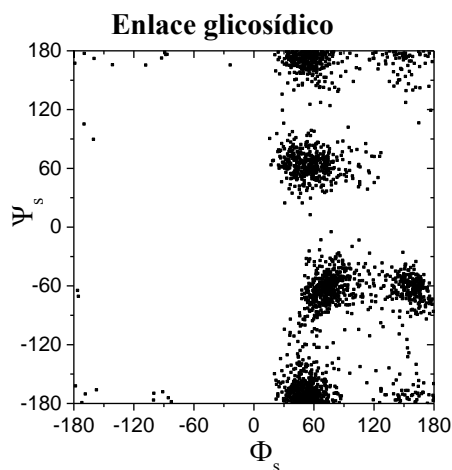
Las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones se pudieron obtener de forma semicuantitativa, por integración de los correspondientes picos de cruce. La Tabla 6.6 muestra las distancias H-H experimentales y teóricas para el compuesto **94**.

Tabla 6.6 Distancias^a H-H experimentales y teóricas para **94**.

	Experimental	DM-tar ^b
NH _{Asp3} -H _α Pro2	2.7	2.4
NH _{Thr4} -H _α Thr4	3.2	2.9
NH _{Arg5} -H _α Arg5	3.3	3.0

^a Distancias dadas en Å. ^b DM-tar de 20 ns en agua explícita.

En la siguiente Figura se muestra la distribución Φ_s/Ψ_s , obtenida por cálculos de DM (Figura 6.20) para dicho compuesto.

**Figura 6.20** Valores Φ_s/Ψ_s del compuesto **94**.

A la vista de estos valores, atendiendo a los ángulos diedros del carbohidrato, Φ_s/Ψ_s , el ángulo diedro Φ_s es bastante rígido, adquiriendo principalmente un valor de 60° , en concordancia con el efecto exo-anomérico producido por el azufre, aunque se observa también una pequeña proporción en torno al valor de 180° . Sin embargo, se observan mayores diferencias en el ángulo diedro Ψ_s , que adquiere valores de 60° , 180° y -60° .

Atendiendo a los ángulos de torsión del esqueleto peptídico, Φ_p/Ψ_p , observamos que pese a presentar un espaciador más largo, el comportamiento del compuesto **94** es similar al del compuesto **97**. Mientras que los residuos de Pro2 y Arg5 muestran mayoritariamente una conformación extendida, los residuos Asp3 y

Thr'4 disponen una conformación plegada y Pro6 muestra un reparto prácticamente equitativo de ambas conformaciones (Figura 6.21).

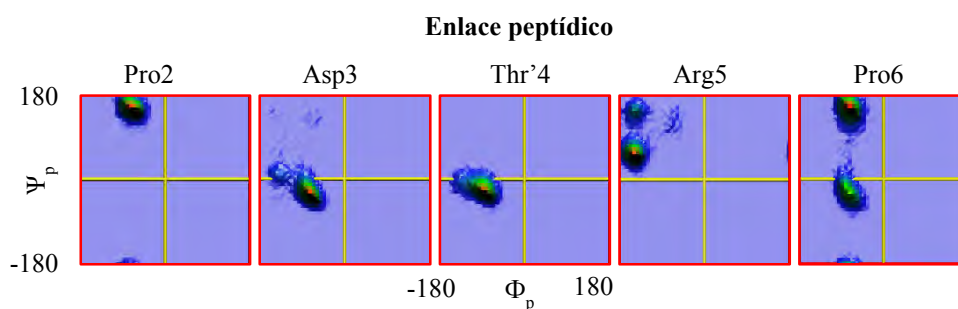


Figura 6.21 Valores Φ_p/Ψ_p de los residuos del compuesto **94**.

Por otro lado, comparando el compuesto **94** con el compuesto **97** (Figura 6.14), se observa que la elongación de la cadena lateral en dos átomos adicionales no afecta de forma notoria a la disposición de los residuos del esqueleto peptídica.

Si por el contrario atendemos a los ángulos diedros de la cadena lateral del residuo 4, χ^n ; en este caso, si se observan más diferencias. En el caso de los ángulos diedros más próximos al esqueleto peptídico, χ^1 y χ^2 , se observa que son bastante rígidos con valores próximos a 60° (χ^1) y 180° (χ^2), como ya se había observado en el antígeno Tn de treonina natural (considerando que χ^2 equivaldría a Ψ_s en el Tn-Thr natural). Por el contrario, el resto de ángulos diedros χ^n no presentan una única disposición, sino que se encuentran repartidos en valores próximos a -60° , 60° y 180° , debido a que corresponden al espaciador (Figura 6.22), lo que parece indicar que a medida que el enlace del espaciador se va alejando del esqueleto peptídico, éste se hace más flexible.

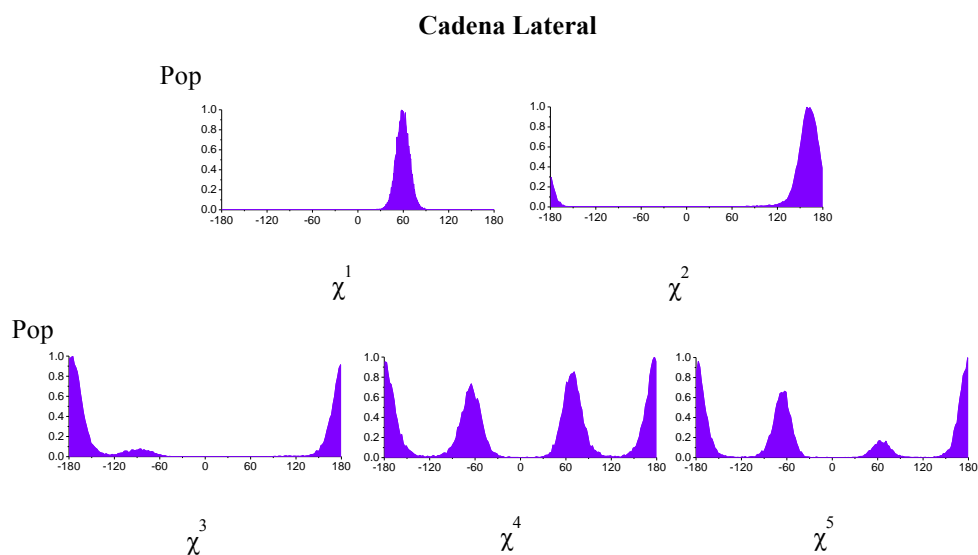


Figura 6.22 Valores χ^n de los residuos del compuesto **94**.

Estos resultados nos muestran, como en los ejemplos anteriores, la flexibilidad que el átomo de azufre confiere al enlace glicosídico, que junto a la flexibilidad debida al espaciador, hace que el carbohidrato no adquiera una conformación rígida, como se puede ver en la Figura 6.23, donde en verde se representa el esqueleto peptídico y en rosa la cadena lateral junto con el carbohidrato.

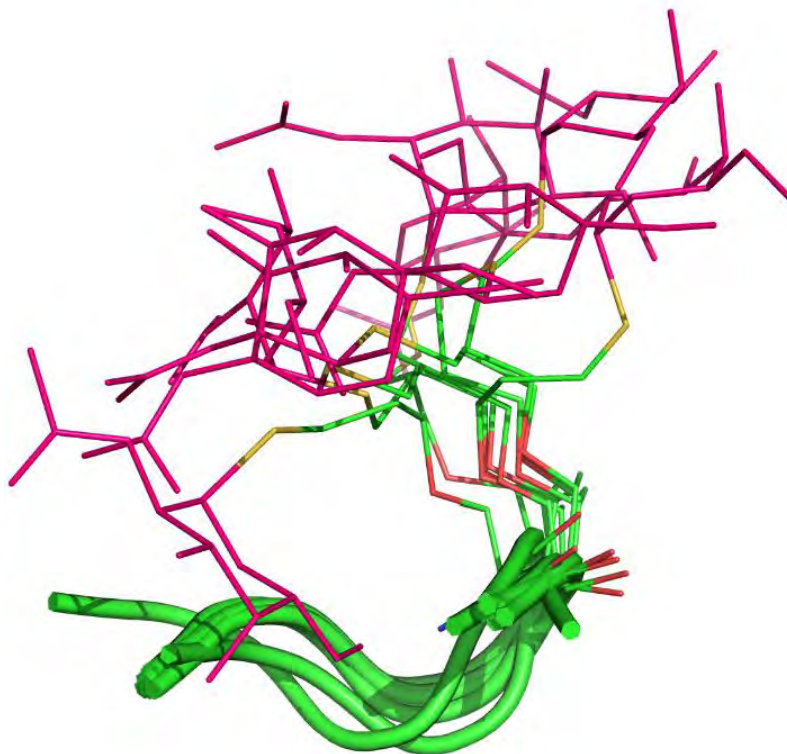


Figura 6.23 Conformaciones representativas del compuesto **94**.

6.3.3 Actividad biológica con lectinas

Una vez los compuestos estaban completamente caracterizados y realizados sus estudios conformacionales, el siguiente paso que se llevó a cabo fue el estudio de la afinidad que presentaban frente a lectinas. Mediante estos ensayos vamos a analizar como las diferencias conformacionales inferidas por el espaciador afectan al reconocimiento de estos compuestos por estas dianas biológicas.

En primer lugar, y para conocer la cantidad exacta de compuesto del que disponemos para los ensayos biológicos, se cuantificó mediante la adición de un patrón interno. El patrón debe presentar unas señales en RMN de ^1H que no interfieran con las señales propias del compuesto y a la vez debe ser fácilmente eliminable de la muestra sin ningún tratamiento especial. Por ello seleccionamos

EtOH como patrón interno, por presentar una señal triplete a 1.17 ppm,¹⁶¹ una zona libre de señales para la mayoría de los compuestos a cuantificar, y ser fácilmente eliminable mediante evaporación. En todos los casos, y para obtener un valor más exacto, se hizo un promedio de varias señales.

Una vez las muestras estaban cuantificadas se llevaron a cabo los diferentes ensayos de actividad. Para el compuesto **66**, se realizó un ensayo ELLA por competición mientras que para los tioglicohexapéptidos se realizó un ensayo ELLA convencional para comprobar la afinidad por lectinas.

ELLA por competición

Para el compuesto **66**, dado que no presenta su grupo amino terminal libre, y por tanto no puede ser anclado a los pocillos del ensayo, se realizó un ensayo ELLA por competición, siguiendo el siguiente protocolo.

Los pocillos de ensayo (*Pierce® Amine-binding, Maleic anhydride 96-well plate*) fueron cubiertos con 100 µL/pocillo de una solución de 70 nmol del glicopéptido APDT*R (*= -O-GalNAc) en un tampón carbonato/bicarbonato (0.2 M, pH 9.4) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. Los puntos libres fueron bloqueados por la adición de 200 µL/pocillo de un tampón bloqueante (*blocking buffer*). Tras una hora a 25 °C, el *blocking buffer* fue eliminado y la placa se sometió a lavado (3 x 200 µL/pocillo con PBST). La siguiente etapa consistió en dejar incubando los pocillos durante dos horas con 100 µL de una dilución 1/150 en tampón PBST de la lectina de la soja (Soybean Agglutinin o **SBA**) y cantidades crecientes de las moléculas de estudio. En nuestro caso se ensayó la diamida **66** y Ac-L-Ser(α-D-GalNAc)-NHMe como molécula de control (Figura 6.24), debido a que la parte peptídica es común, por lo que las diferencias esperables serán derivadas del espaciador y del átomo de azufre del tiocarbohidrato.

¹⁶¹ Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

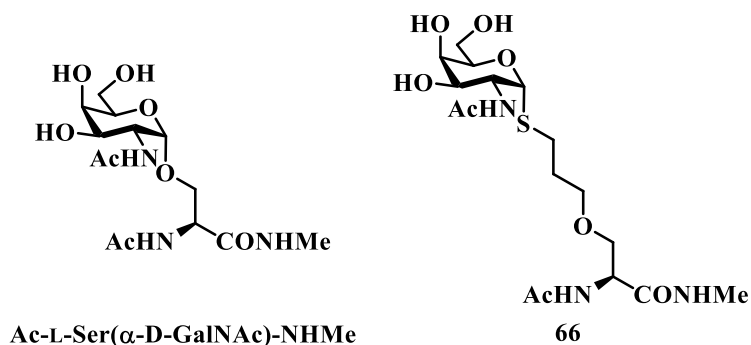


Figura 6.24 Moléculas de estudio mediante ELLA por competición.

Tras lavar nuevamente los pocillos con PBST (3 x 200 μ L/pocillo, 2 min/pocillo), éstos fueron tratados con 100 μ L de una dilución 1/4000 en tampón PBST de estreptavidina conjugada con la peroxidasa del rábano picante (*Horseradish Peroxidase* o HRP). Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos fueron nuevamente lavados con PBST (3 x 200 μ L/pocillo, 2 min/pocillo) y un último lavado con 350 μ L de agua/pocillo. El cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) fue entonces añadido sobre los pocillos (90 μ L/pocillo), y tras 10 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ L/pocillo de H₂SO₄ 1 M (*Stop solution*) (Figura 6.25). La absorbancia fue inmediatamente medida a 450 nm usando un lector de placas ELISA.

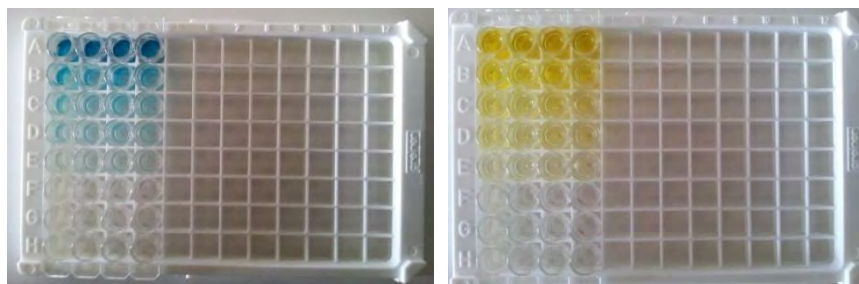


Figura 6.25 Coloraciones de los pocillos con TMB (izq.) y *Stop solution* (der.).

El fundamento de este tipo de ensayo consiste en cuantificar cuan afín es una molécula respecto de otra (anclada a los pocillos) mediante una competición por una misma lectina, ya que la lectina coordinada a la molécula no anclada será eliminada de los pocillos mediante los lavados. La disminución de la cantidad de lectina en los pocillos se traduce en menor cantidad de peroxidasa, y por tanto en menor coloración

al añadir el cromógeno. Ello significará que tiene lugar una competición efectiva de las moléculas a estudio por la lectina (Figura 6.26).

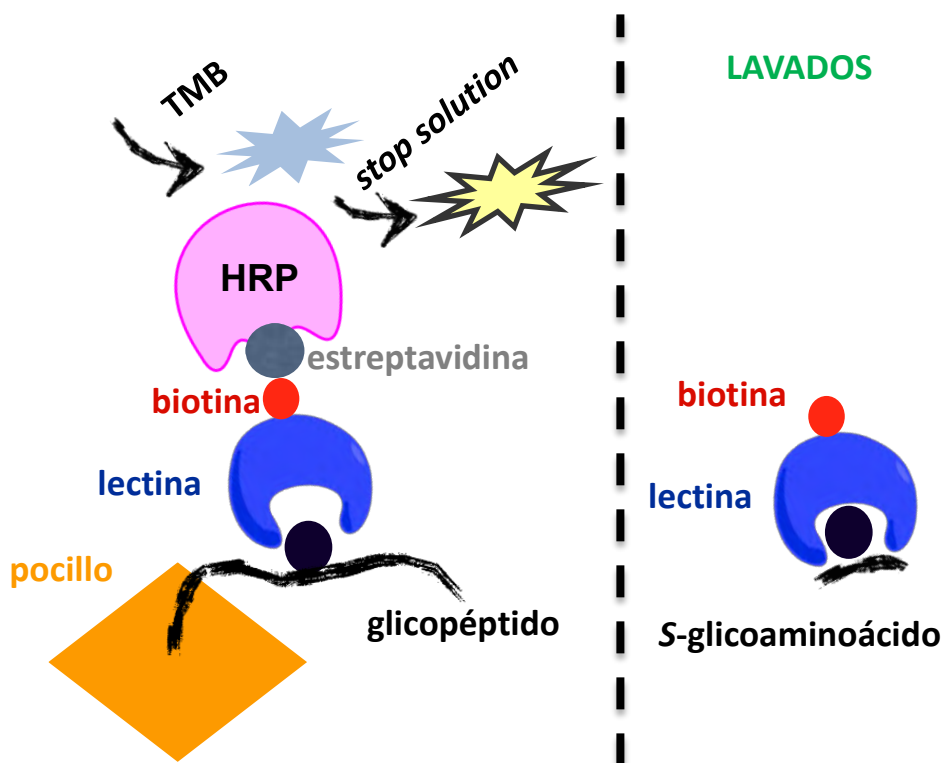


Figura 6.26 Esquema general para el ensayo ELLA por competición.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.27, donde podemos ver la densidad óptica obtenida a una misma concentración tanto para el compuesto **66** como para el compuesto de control. Se puede observar que a medida que aumentamos la concentración de las moléculas no ancladas a los pocillos, la respuesta del cromógeno es menor, lo que se traduce en que nuestras moléculas compiten eficientemente por la lectina. A la vista de estos resultados, podemos concluir que la competición del compuesto no natural **66** es del orden del compuesto natural Ac-L-Ser(α -D-GalNAc)-NHMe.

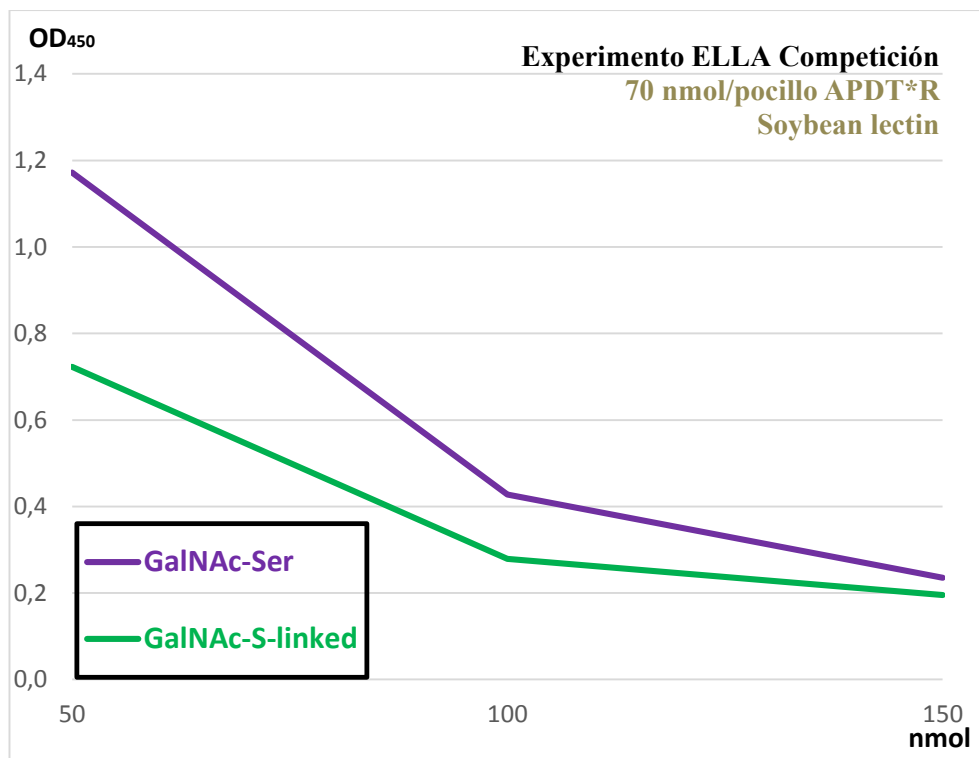


Figura 6.27 Gráfico de la densidad óptica observada.

Igualmente, se puede calcular el porcentaje de inhibición de estas moléculas, teniendo en cuenta la densidad óptica observada para el péptido anclado sin molécula de competición, es decir, con 0 nmol de molécula no anclada. Como puede observarse en la Figura 6.28, el compuesto **66** presenta una moderada inhibición para una concentración de 50 nmol/pocillo, llegando a ser casi total con 150 nmol/pocillo.

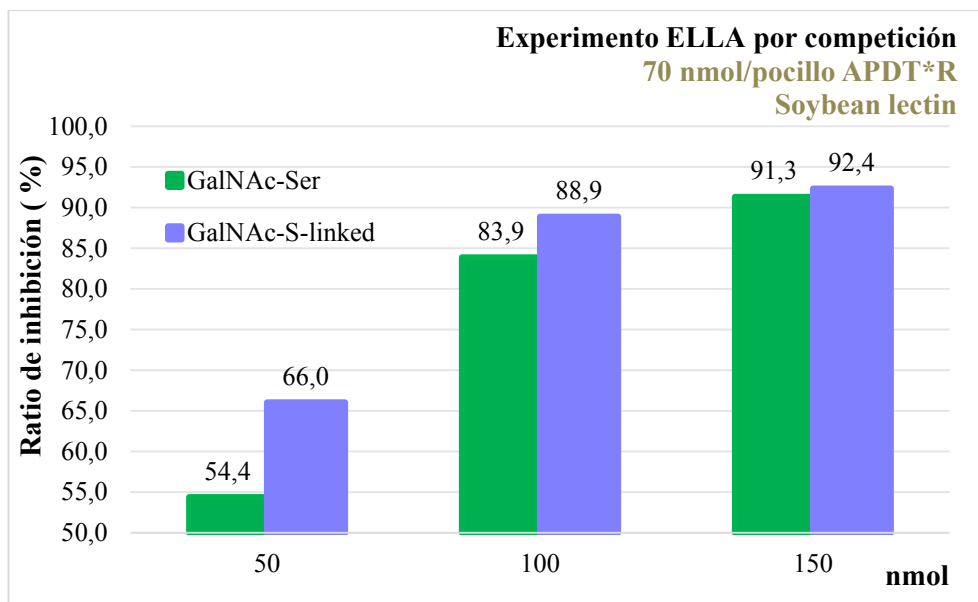


Figura 6.28 Inhibición vs. Concentración.

ELLA convencional

A diferencia del compuesto **66**, los tioglicopéptidos sí que presentan los residuos amino libres, de manera que éstos pueden reaccionar a través de su extremo *N*-terminal con el anhídrido maléico de los pocillos y quedar anclados a los mismos, por lo que las medidas se pueden hacer directamente sobre los pocillos. Mediante este ensayo, se estudiaron los tioglicohexapéptidos preparados en este capítulo, junto con los epítopos de la mucina MUC1 naturales **APDT**RP*** y **APDS**RP*** como moléculas de control.

El protocolo que se ha seguido es el siguiente:

Los pocillos de ensayo (*Pierce® Amine-binding, Maleic anhydride 96-well plate*) fueron cubiertos con 100 μ L/pocillo de los correspondientes tioglicopéptidos (0 - 300 nmol/pocillo) en un tampón carbonato/bicarbonato (0.2 M, pH 9.4) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. Los puntos libres fueron bloqueados por la adición de 200 μ L/pocillo de un tampón bloqueante (*blocking buffer*). Tras una hora a 25 °C, el *blocking buffer* fue eliminado y las placas se lavaron (3 x 200 μ L/pocillo con PBST). La siguiente etapa consistió en dejar incubando los pocillos durante dos horas con 100 μ L de una dilución 1/150 en tampón PBST de la lectina de la soja (Soybean Agglutinin o **SBA**) o la lectina del caracol romano (*Helix*

Pomatia Agglutinin o **HPA**). Tras lavar nuevamente los pocillos con PBST (3 x 200 μL /pocillo, 2 min/pocillo), éstos fueron tratados con 100 μL de una dilución 1/4000 en tampón PBST de estreptavidina conjugada con la peroxidasa HRP. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos fueron nuevamente lavados con PBST (3 x 200 μL /pocillo, 2 min/pocillo) y un último lavado con 350 μL de agua/pocillo. El TMB fue entonces añadido sobre los pocillos (90 μL /pocillo), y tras 10 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL /pocillo de *Stop solution* (Figura 6.29). La absorbancia fue inmediatamente medida a 450 nm usando un lector de placas ELISA.

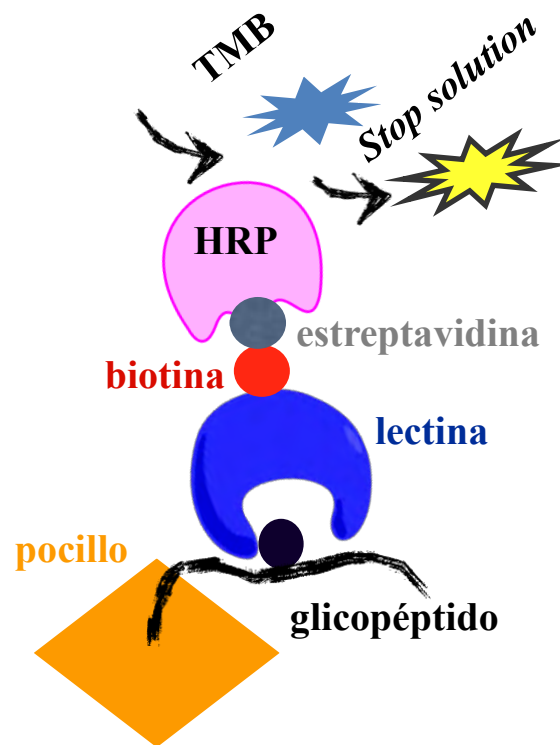


Figura 6.29 Esquema general para el ensayo ELLA.

Los resultados obtenidos para la SBA se muestran en la Figura 6.30, donde podemos ver las densidades ópticas obtenidas (OD_{450}) a distintas concentraciones de los glicopéptidos **93**, **94**, **95** y **97** y los glicopéptidos de control tanto con treonina como con serina, **APDT*RP** y **APDS*RP**. Se puede observar que esta lectina muestra una clara preferencia por el glicopéptido que contiene el antígeno natural **APDT*RP** (glicopéptido **APDT*RP**, amarillo en la Figura 6.30). Podemos concluir

que esta lectina presenta una alta afinidad por el péptido derivado del antígeno Tn de treonina y menor afinidad por el resto de glicopéptidos, como ya se había demostrado en nuestro grupo de investigación.¹⁶²

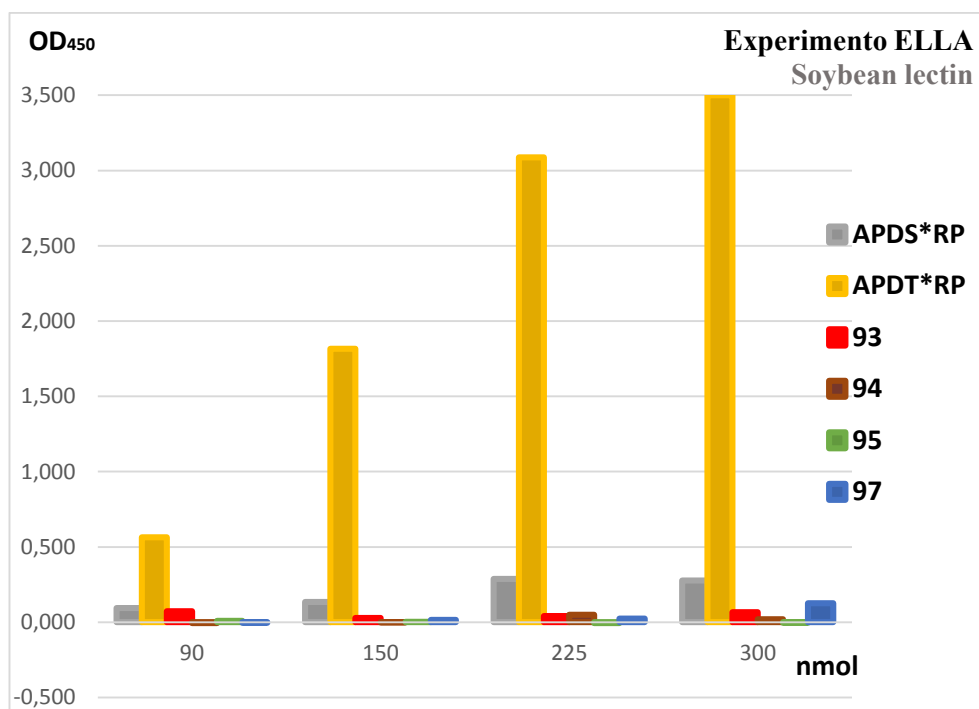


Figura 6.30 Gráfico de experimentos ELLA de glicopéptidos con SBA.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la HPA se muestran en la Figura 6.31 donde podemos ver las OD_{450} a distintas concentraciones de glicopéptidos **93**, **94**, **95** y **97** y el glicopéptido de control **APDS*RP**, ya que en trabajos previos se ha demostrado que dicha lectina no presenta una actividad tan marcada por el glicopéptido **Tn-Thr**.^{12,162} Se puede observar que esta lectina muestra preferencia por el glicopéptido que contiene el antígeno natural de Tn-Ser (glicopéptido **APDS*RP**, gris en la Figura 6.31), pero que los glicopéptidos no naturales **93**, **94**, **95** y **97** presentan una actividad similar por este tipo de lectina.

¹⁶² Tesis doctoral de David Madariaga Merino. Universidad de La Rioja, 2015.

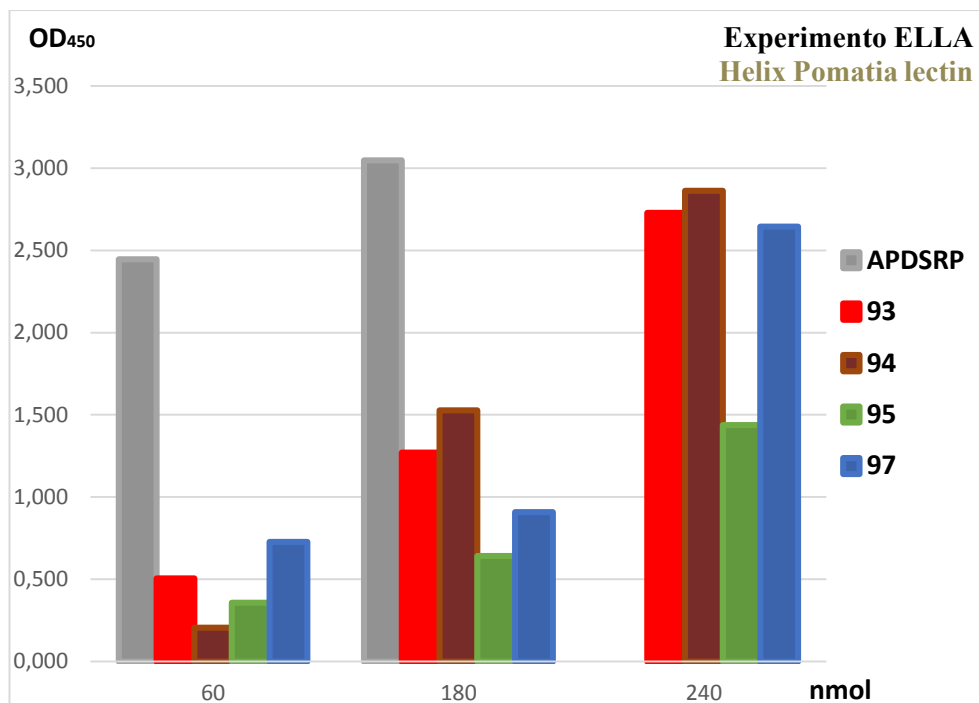


Figura 6.31 Gráfico de experimentos ELLA de glicopéptidos con HPA.

6.3.4 Actividad biológica con anticuerpos

Así como las lectinas reconocen preferentemente los residuos carbohidrato,¹⁵⁷ para conocer las interacciones responsables del reconocimiento molecular entre la parte peptídica y la diana biológica, se recurre a anticuerpos.^{13,163} En este sentido y para este estudio se seleccionó el anticuerpo monoclonal SM3 por ser comercial. Este anticuerpo interacciona con derivados de la MUC1 parcialmente glicosilados¹⁶⁴ presentes en más del 90% de las células cancerosas, lo que hace de él una herramienta muy útil para el diagnóstico y tratamiento de cánceres como el de pecho, colon u ovario.¹⁶⁵

De igual manera que con lectinas, se trató de hacer pruebas de afinidad entre los neotiglicohexapéptidos y el anticuerpo mediante ensayos tipo *ELISA*, pero

¹⁶³ Karsten, U.; Serttas, N.; Paulsen, H.; Danielczyk, A.; Goletz, S. *Glycobiology* **2004**, *14*, 681-692.

¹⁶⁴ Burchell, J.; Gendler, S.; Taylor-Papadimitriou, J.; Girling, A.; Lewis, A.; Millis, R.; Lampert, D. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476-5482

¹⁶⁵ Granowska, M.; Biassoni, L.; Carroll, M. J.; Howell, R.; Mather, S. J.; Ellison, D.; Granowski, A. Britton, K. E. *Acta Oncologica* **1996**, *35*, 319-321.

desafortunadamente, los estudios no fueron fructíferos, no obteniendo unos resultados concluyentes. Por ello, y visto la complejidad en la obtención de valores mediante estudios de afinidad, se ha recurrido a otras técnicas para reconocer las interacciones entre los neoglicopéptidos y el SM3. Además el elevado precio y las dificultades para asegurar la pureza del anticuerpo nos hizo buscar otras alternativas.

Una de las técnicas más concluyentes a la hora de determinar una estructura es acudir a la espectroscopia de difracción de rayos X. Hasta la fecha, sólo se había resuelto la estructura en el estado asociado de un fragmento de la MUC1 con el anticuerpo anti-MUC1 SM3, mediante difracción de rayos X.¹⁶⁶

Por ello, y gracias a una colaboración que nuestro grupo de investigación mantiene con el grupo de Ramón Hurtado-Guerrero, del instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de la Universidad de Zaragoza, se ha logrado obtener la estructura de rayos X de glicopéptido **94** asociado al anticuerpo scFV-SM3, de igual manera que se previamente nuestro grupo había obtenido la estructura de rayos X para el complejo con el antígeno Tn de cisteína.¹⁶⁰

Para ello se logró obtener y amplificar un fragmento monocatenario del anticuerpo SM3, el scFV-SM3 (*single chain fragment variable*), con un conector formado por residuos de serina y glicina, manteniendo la especificidad de la inmunoglobulina original.

Se logró la cristalización del neotioglicopéptido **94** asociado al mencionado anticuerpo scFV-SM3 empleando la técnica de difusión de vapor.¹⁶⁰ La estructura de rayos X se obtuvo a partir de datos obtenidos en el sincrotrón de Grenoble (Francia).

Curiosamente, todos los enlaces de hidrógeno, así como los contactos hidrófobos presentes en anteriores complejos de péptidos y glicopéptidos tipo MUC1 también se observan para el complejo **94** (Figura 6.32).

Observando en detalle, Pro2 interacciona con Trp91L, Trp96L y Tyr32L, mientras que las cadenas laterales de Asp3 y Arg5 se unen mediante contactos hidrofóbicos con Trp33H y Tyr32H, respectivamente. Además, el grupo NH de Ala1 y el grupo carbonilo de Thr4 están implicados en enlaces de hidrógeno con Tyr32L y Gln97H, respectivamente. También se observa un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral de Arg5 y el grupo carbonilo de Asn31H. La geometría del fragmento peptídico es casi idéntica a las observadas para **APDTRP** y su correspondiente glicopéptido con GalNAc, lo que indica el efecto de menor importancia que tanto el

¹⁶⁶ Dokurno, P.; Bates, P. A.; Band, H. A.; Stewart, L. M.; Lally, J. M.; Burchell, J. M.; Taylor-Papadimitriou, J.; Snary, D.; Sternberg, M. J.; Freemont, P. S. *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 713-728.

carbohidrato como el espaciador tienen sobre la conformación del péptido en el estado asociado. Por desgracia, no se logró resolver la estructura del espaciador y del resto glucídico del compuesto **94** en el complejo, debido presumiblemente al alto grado de flexibilidad del espaciador.

Para paliar esta falta de información, se llevó a cabo una simulación de DM de 100 ns con el complejo scFv-SM3:94. Es importante mencionar que la geometría general y las interacciones observadas en la estructura de rayos X de este complejo también se observan a través de las simulaciones. Los cálculos sugieren que el espaciador es bastante flexible y presenta los restos carbohidrato expuestos al disolvente.

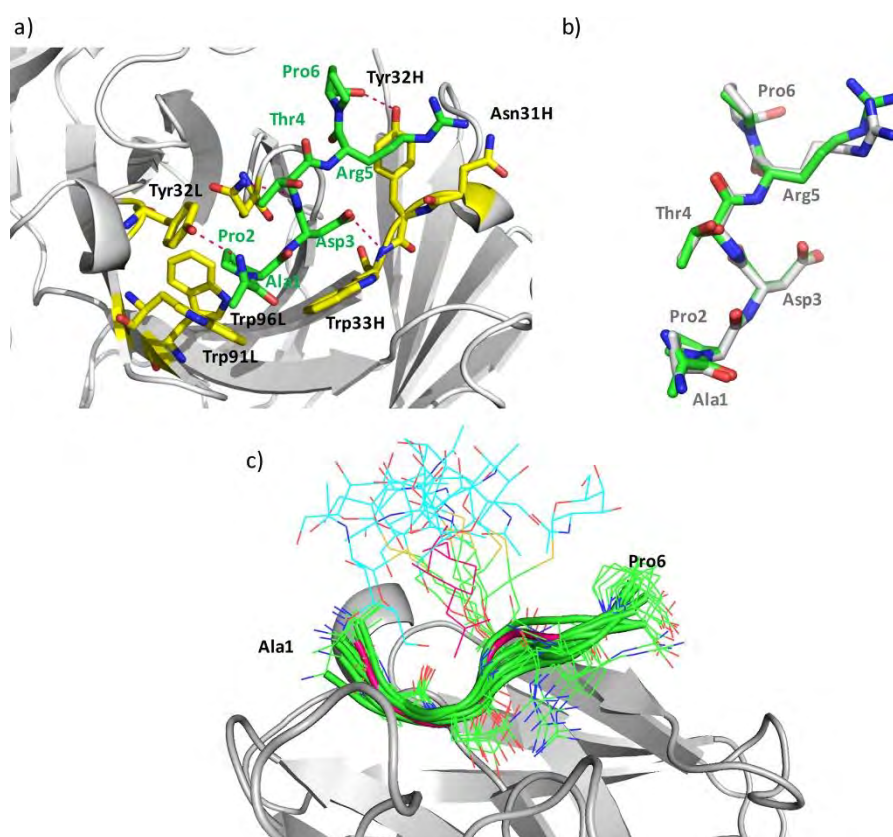


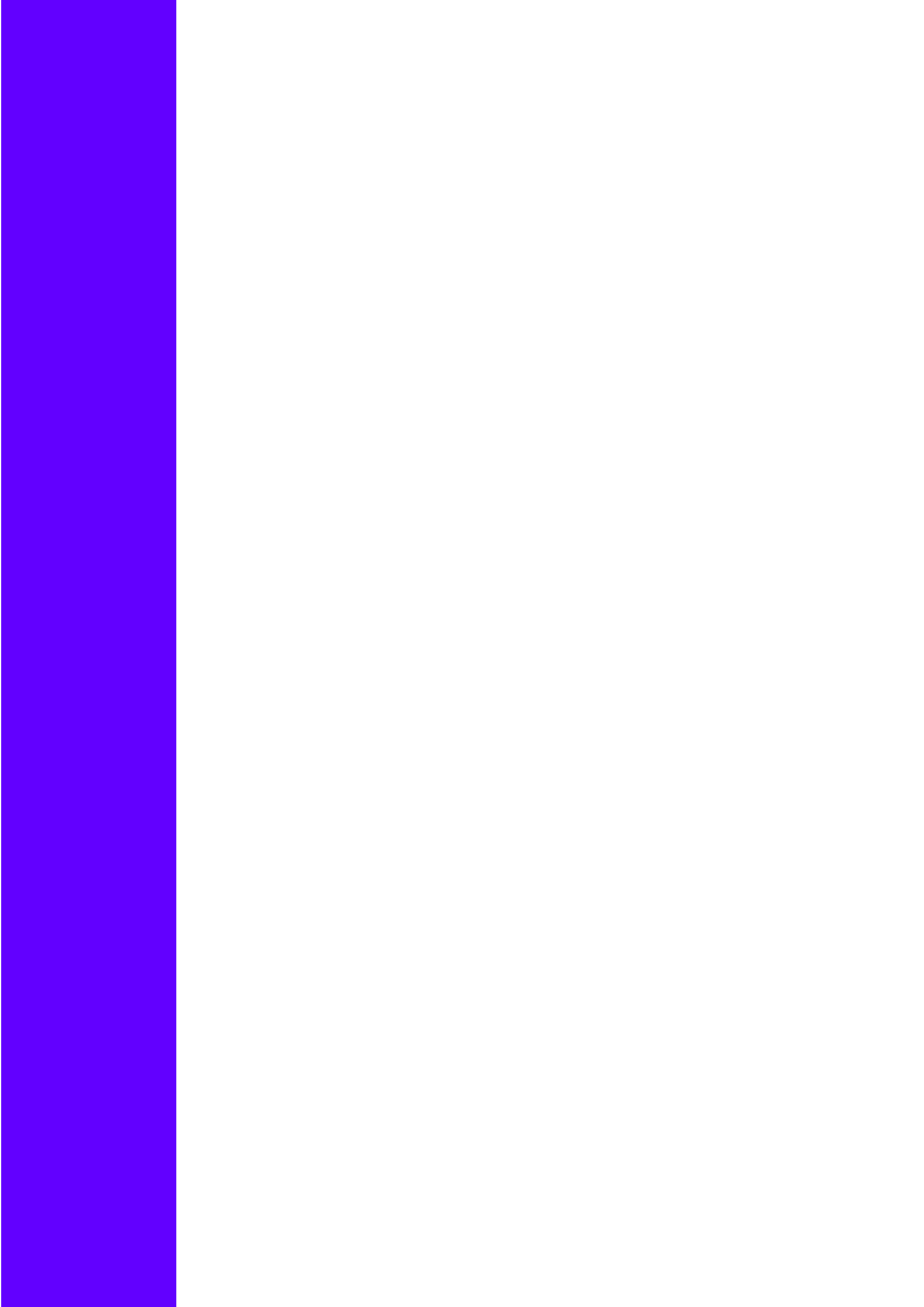
Figura 6.32. (a) Interacciones del glicopéptido **94** con scFV-SM3, como se observan en la estructura de rayos X. En verde se representa el esqueleto peptídico de **94** y en amarillo los residuos del SM3. Las interacciones entre el fragmento peptídico y la superficie del SM3 se representan en rosa. (b) Superposición del esqueleto peptídico

del péptido **APDTRP** y del compuesto **94** en el complejo con scFV-SM3. (c) Conformaciones derivadas de los cálculos de DM sin restricciones del complejo scFV-SM3:**94**. El anticuerpo es mostrado en bandas grises y el esqueleto peptídico del glicopéptido **94** es mostrado en verde. Las unidades de GalNAc se muestran en cian. La conformación del glicopéptido **APDT*RP** encontrada en estructuras de rayos X se muestra en rosa.

6.4 Conclusiones

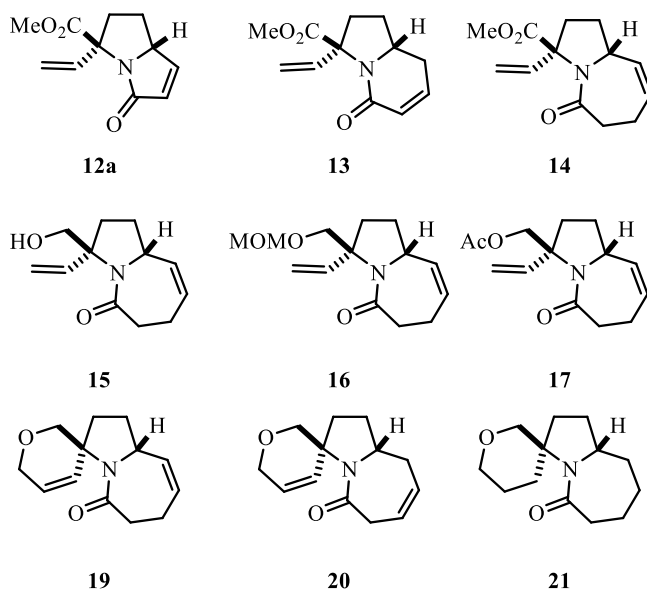
1. Se ha logrado la síntesis de 5 nuevos tioglicohexapéptidos, análogos al epítipo APDTRP de la mucina MUC1, que incorporan un aminoácido no natural que incluye un espaciador entre el esqueleto peptídico y la parte carbohidrato.
2. La inclusión del espaciador así como el tamaño extra del enlace glicosídico debido al átomo de azufre, tanto en el compuesto diamida como en los diferentes tioglicopéptidos, hace que los compuestos tengan un alto grado de flexibilidad conformacional.
3. Estos neotioglicoconjugados presentan una respuesta positiva en ensayos de actividad biológica frente a lectinas.
4. Se ha logrado cristalizar el complejo entre el anticuerpo scFV-SM3 y el neoglicoderivado **94** permitiendo, a través de su estudio de difracción de rayos X, describir las interacciones que estabilizan el estado asociado.
5. La flexibilidad extra parece no influir a la conformación del esqueleto peptídico de los neotioglicoderivados a la hora de interactuar con lectinas y anticuerpos anti-MUC1. La respuesta biológica de estos compuestos es del orden del compuesto natural APDS*RP.

7. Conclusiones



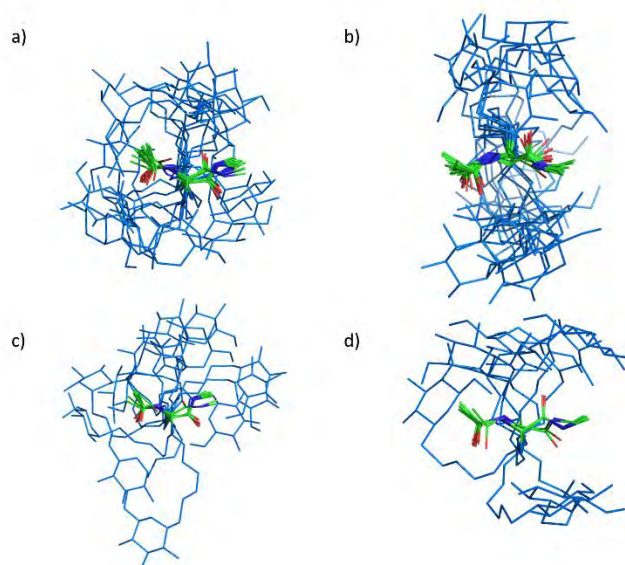
En este capítulo se resumen las conclusiones que se han obtenido durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

- En el trabajo desarrollado en el *Capítulo 2* se propone un proceso por metátesis de reorganización de anillo (RRM) de sistemas 7-azanorborneno que incorporan varios patrones de olefinas exocíclicas en la posición del nitrógeno como vía para la obtención de compuestos con subestructura pirrolizidina, indolizidina y pirrolo[1,2-a]azepina. De esta manera se han sintetizado una familia de nuevos azabiclos[n.3.0]alquenonas (**12a**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**), que incluyen derivados del pyrrolam. En todos los casos solo uno de los regioisómeros fue obtenido. Además, unos nuevos espirocompuestos de estructura tricíclica han sido sintetizados (**19**, **20**, **21**), utilizando un proceso de metátesis dominó que involucra una secuencia ROM/RCM/RCM. Este trabajo dio como fruto una publicación científica en la revista *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *18*, 3817-3824.

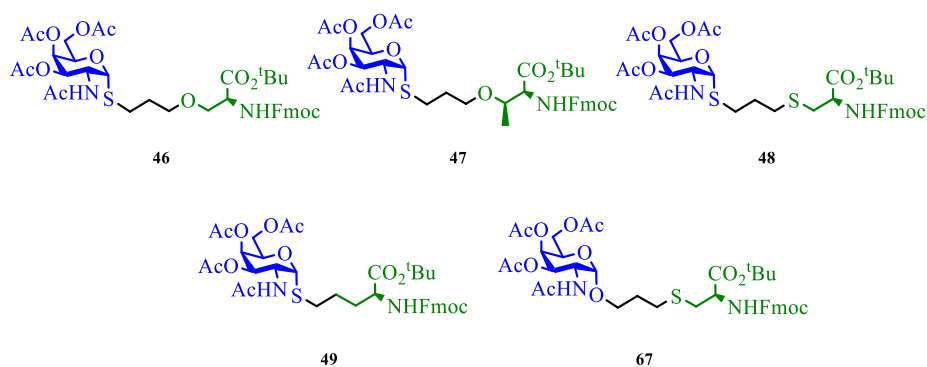


- En el *Capítulo 3* y tomando como reacción clave la metátesis de olefinas, se han sintetizado cuatro neoglicoconjugados (**22**, **23**, **24a**, **24b**), que incorporan α -D-glucosa, α -S-glucosa y β -S-glucosa como unidad carbohidrato y L-serina o L-cisteína como parte aminoácido, y se han analizado sus estructuras en disolución. El espaciador carbonado de cuatro átomos entre ambos residuos permite a los carbohidratos explorar un amplio rango del espacio conformacional. Nuevamente, este trabajo ha cristalizado

en una publicación científica en la revista *Carbohydrate Res.* **2013**, 373, 1-8.

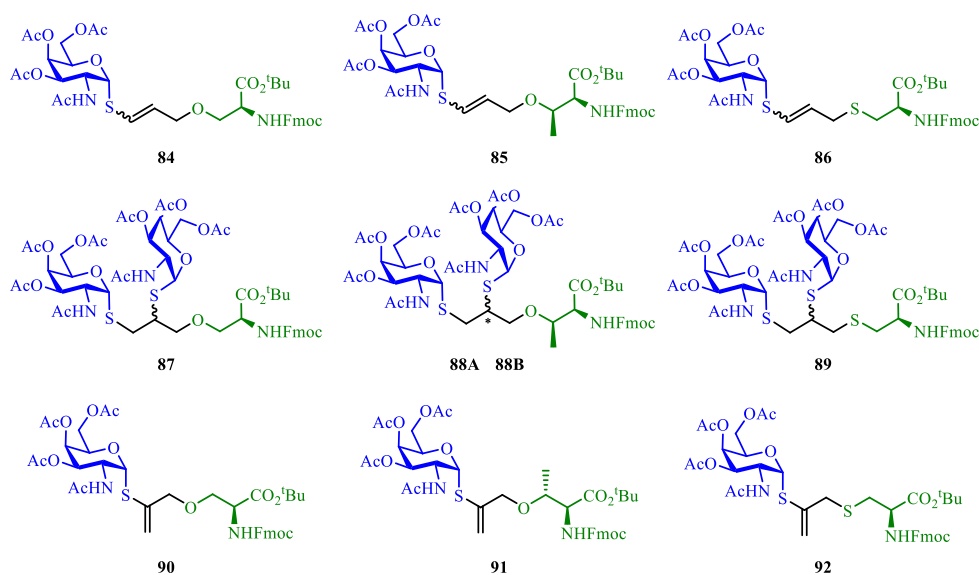


- En el *Capítulo 4* se ha llevado a cabo la síntesis y optimización de 5 neotioglicaminoácidos elongados análogos al antígeno Tn (**46**, **47**, **48**, **49**, **67**), mediante la reacción de hidrotiolación de alquenos (TEC) entre distintos alquenilaminoácidos y GalNAc- α -SH.

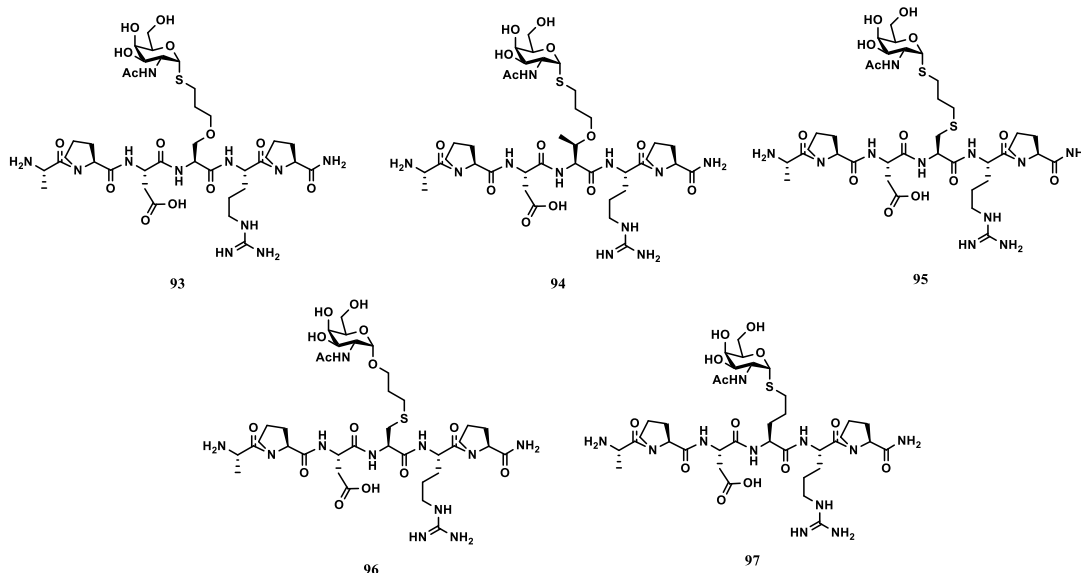


- En el *Capítulo 5* se han sintetizado 9 nuevos tioglicaminoácidos elongados. De éstos, 6 presentan una insaturación en su elongación en forma de doble enlace, mediante reacciones del tipo TYC (**84**, **85**, **86**) o por la reactividad

con metales de transición (**90**, **91**, **92**). Por otro lado, los otros tres presentan un segundo grupo carbohidrato (**87**, **88**, **89**) generado por la reactividad TYC-TEC.



- En el *Capítulo 6* se ha realizado la síntesis y el análisis conformacional de cinco tioglicopéptidos (**93** - **97**) que incorporan la secuencia del epítipo de reconocimiento APDT*RP de la mucina MUC1. Para ello, se ha sustituido la treonina glicosilada de dicha secuencia por los compuestos sintetizados en el *Capítulo 4*. Además, para los compuestos **94** y **97** se han determinado las estructuras mayoritarias en disolución acuosa. De este modo, se observó que dichas modificaciones en la secuencia peptídica producen cambios en la conformación del estado libre de estas moléculas. De igual manera, se han llevado a cabo ensayos para medir su afinidad con dos lectinas (SBA y HPA) mediante ensayos ELLA, pudiendo observar un comportamiento muy similar al del epítipo natural de serina. Se ha logrado resolver la estructura de rayos X para el complejo **94**:scFV-SM3; logrando así, por primera vez, un cristal del complejo glicopéptido:anticuerpo de un compuesto no natural elongado.



Comunicaciones en congresos científicos:

Todo este trabajo ha quedado recogido, además de en las citadas publicaciones, en las siguientes comunicaciones en congresos científicos.

1. V. Rojas, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenzoza, J. M. Peregrina. “**Synthesis of new glycoamino acids Tn antigen mimics using Thiol-ene (TEC) or Thiol-yne (TYC) reactions**”. XII Simposio de Investigadores Jóvenes, Barcelona (España). 3-9 Noviembre 2015 (Póster).
2. V. Rojas, F. Corzana, J. H. Busto, A. Avenzoza, J. M. Peregrina. “**Synthesis of new sulfa-glycopeptides with biologic interest**”. III Jornadas Doctorales G-9. Almagro (España). 5-7 Noviembre 2014 (Póster + Comunicación Oral). (**Premio del jurado al mejor trabajo en Ciencias. Universidad de Castilla-La Mancha**)
3. C. Aydillo, V. Rojas, I. Compañón, M. I. Gutiérrez-Jiménez, M. Ayala, F. Corzana, M. M. Zurbano, J. H. Busto, A. Avenzoza, J. M. Peregrina “**Glycopeptides incorporating sulfur-based Tn antigen mimics**”. XI Carbohydrate Symposium. Logroño (España). 28-30 Mayo 2014 (Póster)
4. I. Compañón, C. Aydillo, V. Rojas, F. Corzana, M. M. Zurbano, J. H. Busto, A. Avenzoza, J. M. Peregrina. “**Incorporation of Sulfa-Tn antigen mimics into**

- immunogenic epitope of tumour-associated glycopeptides**". 2nd Meeting of the RSEQ Chemical Biology Group. Bilbao (España). 4-6 Febrero 2014 (Póster)
5. V. Rojas, I. Compañón; F. Corzana, A. Avenoza, J.H. Busto, J.M. Peregrina. "**Synthesis, conformational study and bioactivity of new S-linked glycopeptides as Tn antigen mimics**". 27th International Carbohydrate Symposium. Bangalore (India). 12-17 Enero 2014 (Póster)
 6. V. Rojas, F. Corzana, A. Avenoza, J. H. Busto et J. M. Peregrina. "**Synthesis, conformational studies and activity of new S-linked GalNAc peptides**". VI Mediterranean Organic Chemistry Meeting. Granada (España). 19-21 Junio 2013 (Comunicación Oral)
 7. V. Rojas, J. Carreras, F. Corzana, A. Avenoza, J. H. Busto et J. M. Peregrina. "**Synthesis of new amino acids with biologic interest**". I Jornadas Doctorales G-9. Mieres (España). 13-14 Diciembre 2012 (Póster)
 8. V. Rojas, J. Carreras, A. Avenoza, J. H. Busto et J. M. Peregrina. "**Synthesis of new α -O-glycoamino acids by cross metathesis**". XXIV Biannual Meeting of Organic Chemistry of the Spanish Royal Society of Chemistry. Donostia (España). 11-13 Julio 2012 (Comunicación Oral)
 9. V. Rojas, J. Carreras, A. Avenoza, J. H. Busto et J. M. Peregrina. "**Sequences ROM-RCM metathesis in 7-azanorbornene-1-substituted systems**". XXXIII Biannual Meeting of the Spanish Royal Society of Chemistry. Valencia (España). 25-28 Julio 2011 (Comunicación Oral + Póster)

8. Experimental section

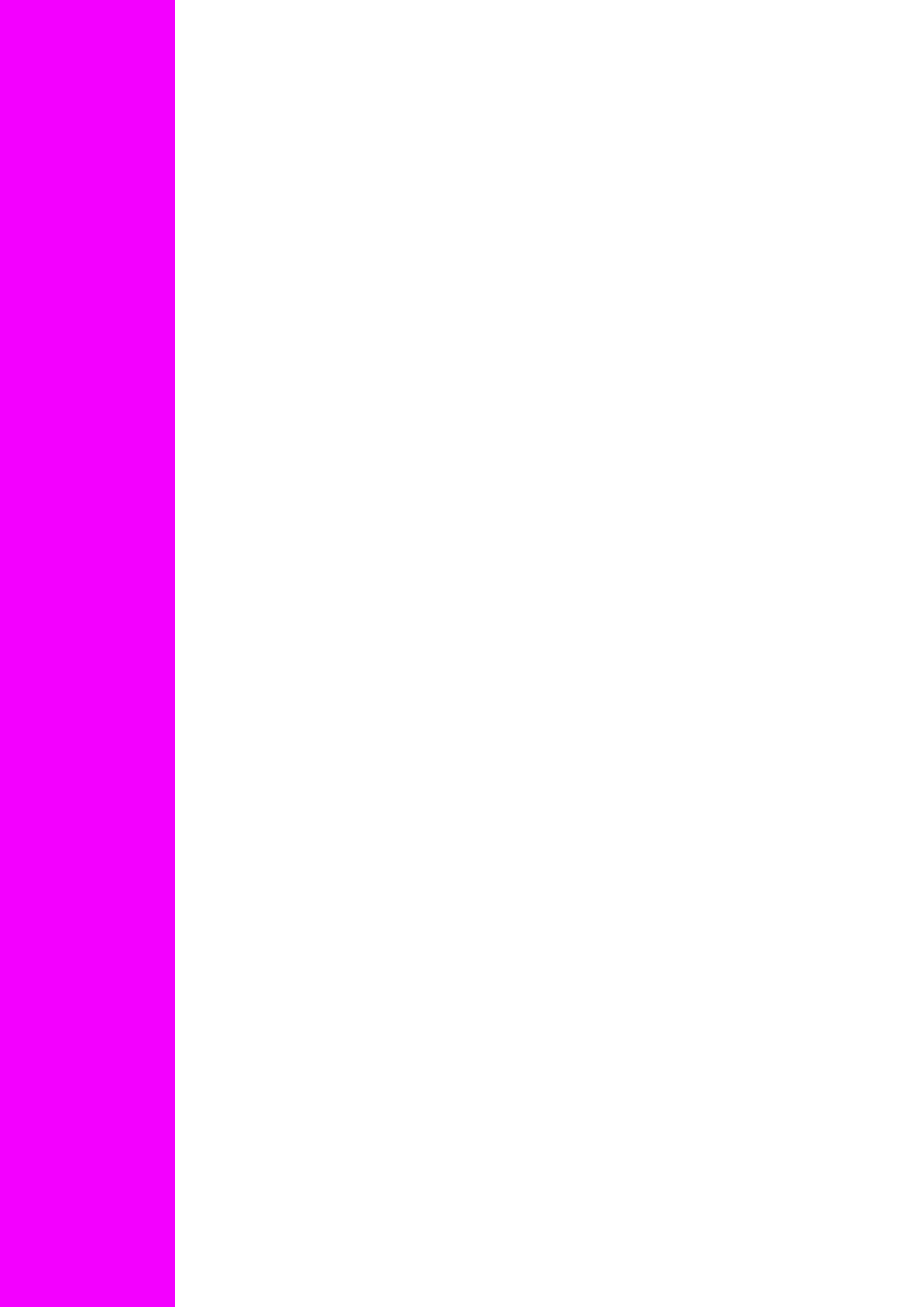
8.1 Experimental section of Chapter 2

8.2 Experimental section of Chapter 3

8.3 Experimental section of Chapter 4

8.4 Experimental section of Chapter 5

8.5 Experimental section of Chapter 6



The instrumentation used to characterize the compounds of all experimental part of this Thesis is as follows:

^1H and ^{13}C NMR spectra were performed on a Bruker Avance-400 and ARX-300. Chemical shifts are expressed in ppm on the δ scale and coupling constants in Hz. They were used as deuterated solvents CDCl_3 with TMS as an internal reference, MeOH-d_4 and D_2O , with the solvent itself as an internal reference. The acquisition temperature was 298 K.

High-resolution electrospray mass (ESI-MS) were performed on a BRUKER MicroTOF-Q with Mode Multi source, ESI ionization and were recorded in positive and negative ion mode. The accurate mass measurements were achieved by using sodium formate as an external reference.

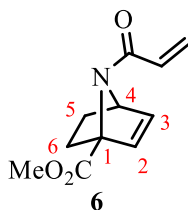
Thin layer chromatography was performed on silica gel plates (Alugram® SIL G / UV254) on aluminum support. The TLC plates were visualized with UV light and by staining with Hanessian solution (ceric sulfate and ammonium molybdate in aqueous sulfuric acid) or sulfuric acid ethanol solution.

Column chromatography was performed on silica gel from 0.04 to 0.06 mm (230-240 mesh).

The solid phase synthesis was performed on a Model 433A peptide synthesizer from Applied Biosystems, which data processing is done with the SynthAssist 2.0 software.

Purification of the building blocks and glycopeptides was performed by semipreparative HPLC (Waters Delta Prep.). Using a Phenomenex Luna C18 column with dimensions of 21.20 mm \times 250 mm. UV detection was at 212 and 254 nm.

8.1 Experimental section of Chapter 2

Methyl (1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-7-acryloyl-7-azabicyclo[2.2.1]hept-2-ene-1-carboxylate (**6**)

Trifluoroacetic acid (1.0 mL, 12.0 mmol) was added to a solution of azanorbornene **4** (100 mg, 0.40 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL). The mixture was stirred for 6 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (20 mL) and then evaporated to remove trifluoroacetic acid. This operation was repeated several times to obtain the corresponding compound, which was used directly in the next reaction.

This salt (0.40 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL) under an inert atmosphere and acryloyl chloride (60 μL, 0.79 mmol) was added in the presence of de Et₃N (165 μL, 1.18 mmol). The reaction was stirred for 24 h at room temperature. The product was purified by a silica gel column chromatography, eluting with hexane/ethyl acetate (3:7), to give 90 mg (92%) of compound **6** as a yellow oil.

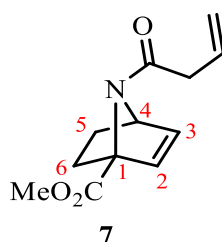
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 208.0958 [M+H]⁺; calcd. C₁₁H₁₄NO₃⁺: 208.0968.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.52 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H₂), 6.39-6.25 (m, 3H, H₃, H_{vin}, H_{trans}), 5.69 (dd, *J* = 9.1, 3.0 Hz, 1H, H_{cis}), 4.86 (dd, *J* = 3.5, 2.8 Hz, 1H, H₄), 3.87 (s, 3H, CH₃OCO), 2.35-2.27 (m, 1H, H_{6endo}), 2.08-2.00 (m, 1H, H_{5endo}), 1.53-1.46 (m, 1H, H_{6exo}), 1.40-1.31 (m, 1H, H_{5exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.8 (CO), 166.6 (CO), 136.1 (C₂), 134.1 (C₃), 129.0 (CH_{2vin}), 127.7 (CH_{vin}), 70.8 (C₁), 61.7 (C₄), 52.6 (CH₃OCO), 26.9 (C₆), 26.6 (C₅).

Methyl (1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-7-but-3-enoyl-7-azabicyclo[2.2.1]hept-2-ene-1-carboxylate (7)



Trifluoroacetic acid (1.0 mL, 12.0 mmol) was added to a solution of azanorbornene **4** (100 mg, 0.40 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL). The solution was stirred for 6 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (20 mL) and then evaporated to remove trifluoroacetic acid. This operation was repeated several times to obtain the corresponding compound, which was used directly in the next reaction.

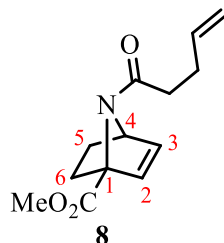
This salt (0.40 mmol) was dissolved in dry CH₃CN (10 mL) under an inert atmosphere and 3-butenic acid (50 μL, 0.59 mmol) was added in the presence of DIEA (344 μL, 1.97 mmol) and TBTU (0.25 mg, 0.79 mmol). The reaction was stirred for 24 h at room temperature and then evaporated to give a residue which was purified by a silica gel column chromatography, eluting with hexane/ethyl acetate (3:7), to give 77 mg (88%) of compound **7** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 222.1120 [M+H]⁺; calcd. C₁₂H₁₆NO₃⁺: 222.1125.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.51 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H₂), 6.32 (dd, *J* = 5.8, 2.2 Hz, 1H, H₃), 5.85 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.8 Hz, 1H, H_{vin}), 5.14 (dd, *J* = 17.1, 10.2 Hz, 2H, H_{2vin}), 4.79 (s, 1H, H₄), 3.86 (s, 3H, CH₃OCO), 3.11-2.90 (m, 2H, CH₂), 2.35-2.22 (m, 1H, H_{6endo}), 2.14-2.01 (m, 1H, H_{5endo}), 1.52-1.40 (m, 1H, H_{6exo}), 1.34-1.27 (m, 1H, H_{5exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (CO₂), 169.8 (CO), 136.2 (C₂), 134.2 (C₃), 130.6 (CH_{vin}), 118.6 (CH_{2vin}), 71.0 (C₁), 61.5 (C₄), 52.6 (CH₃OCO), 39.3 (CH₂), 27.5 (C₆), 26.5 (C₅).

Methyl (1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-7-pent-4-enoyl-7-azabicyclo[2.2.1]hept-5-ene-1-carboxylate (8)

Trifluoroacetic acid (1.0 mL, 12.0 mmol) was added to a solution of azanorbornene **4** (100 mg, 0.40 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL). The solution was stirred for 6 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (20 mL) and then evaporated to remove trifluoroacetic acid. This operation was repeated several times to obtain the corresponding compound, which was used directly in the next reaction.

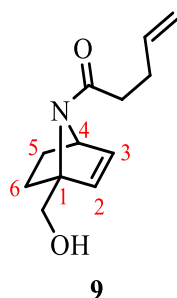
This salt (0.40 mmol) was dissolved in dry CH₃CN (10 mL), under an inert atmosphere, and 4-pentenoic acid (61 μL, 0.59 mmol) was added in the presence of DIEA (344 μL, 1.97 mmol) and TBTU (0.25 mg, 0.79 mmol). The reaction was stirred for 24 h at room temperature and then evaporated to give a residue which was purified by a silica gel column chromatography eluting with hexane/ethyl acetate (3:7), to give 88 mg (95%) of compound **8** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 236.1280 [M+H]⁺; calcd. C₁₃H₁₈NO₃⁺: 236.1281.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.51 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H₂), 6.32 (dd, *J* = 5.8, 2.1 Hz, 1H, H₃), 5.85-5.74 (m, 1H, H_{vin}), 5.02 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, H_{trans}), 4.97 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H_{cis}), 4.79 (s, 1H, H₄), 3.86 (s, 3H, CH₃OCO), 2.34-2.24 (m, 5H, H_{6endo}, CH₂, CH₂), 2.10-2.02 (m, 1H, H_{5endo}), 1.50-1.42 (m, 1H, H_{6exo}), 1.37-1.29 (m, 1H, H_{5exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.9 (CO₂), 169.9 (CO), 137.1 (CH_{vin}), 136.2 (C₂), 134.1 (C₃), 115.3 (CH_{2vin}), 70.9 (C₁), 61.5 (C₄), 52.5 (CH₃OCO), 33.3 (CH₂), 28.5 (CH₂), 27.5 (C₆), 26.5 (C₅).

(1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-1-(1-(Hydroxymethyl)-7-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-7-yl)pent-4-en-1-one (9)

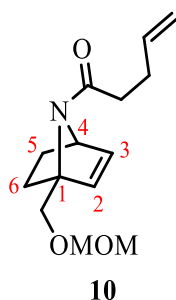
NaBH₄ (64.36 mg, 1.70 mmol) was added at 0 °C to a suspension of ester **8** (100 mg, 0.42 mmol) and CaCl₂ (94.41 mg, 0.85 mmol) in EtOH/THF (6:4, 10 mL). The reaction was stirred for 3 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate (20 mL) and it was washed with K₂CO₃ 5% (30 mL), HCl 0.5 N (30 mL), and brine (30 mL). The organic layer was dried, filtered, and concentrated. The product was purified by a silica gel column chromatography, eluting with hexane/ethyl acetate (1:9), to give 52 mg (59%) of compound **9** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 208.1333 [M+H]⁺; calcd. C₁₂H₁₈NO₂⁺: 208.1332.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.33 (dd, *J* = 6.0, 2.4 Hz, 1H, H3), 6.25 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H2), 5.88-5.77 (m, 1H, CH_{vin}), 5.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, OH), 5.05 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, H_{trans}), 5.00 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H_{cis}), 4.75-4.72 (m, 1H, H4), 4.17 (ddd, *J* = 44.6, 13.1, 7.1 Hz, 2H, CH₂OH), 2.37-2.28 (m, 4H, CH₂, CH₂), 2.03-1.90 (m, 2H, H6, H5), 1.36-1.28 (m, 1H, H5), 1.18-1.12 (m, 1H, H6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.3 (CO), 137.7 (C2), 136.7 (CH_{vin}), 134.1 (C3), 115.5 (CH_{2vin}), 74.1 (C1), 60.9 (C4), 60.5 (CH₂OH), 33.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 26.0 (C5), 25.7 (C6).

(1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-1-(1-(Methoxymethoxymethyl)-7-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-7-yl)pent-4-en-1-one (10)

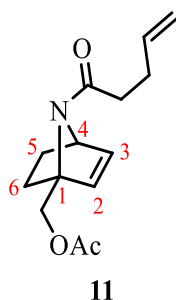
Chloromethyl methyl ether (79 μ L, 1.04 mmol) was added at 0 °C to a solution of alcohol **9** (41.6 mg, 0.20 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) under an inert atmosphere in the presence of DIEA (181 μ L, 1.04 mmol). The reaction was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was concentrated and then purified by a silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate to give 39.2 mg (78%) of compound **10** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI⁺) (m/z) 252.1600 [M+H]⁺; calcd. C₁₄H₂₂NO₃⁺: 252.1594.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.35 (d, J = 5.9 Hz, 1H, H2), 6.28 (dd, J = 5.9, 2.4 Hz, 1H, H3), 5.87-5.77 (m, 1H, H_{vin}), 5.03 (dd, J = 17.2, 1.4 Hz, 1H, H_{trans}), 4.97 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H_{cis}), 4.75 (q, J = 6.4 Hz, 2H, OCH₂O), 4.71-4.55 (m, 2H, H4, OCH₂), 4.36 (d, J = 10.2 Hz, 1H, OCH₂), 3.41 (s, 3H, OCH₃), 2.37-2.24 (m, 4H, CH₂, CH₂), 1.93-1.81 (m, 2H, H6, H5), 1.38-1.25 (m, 2H, H5, H6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.6 (CO), 137.9 (C2), 137.5 (CH_{vin}), 133.1 (C3), 115.1 (CH_{2vin}), 97.0 (OCH₂O), 71.0 (C1), 67.6 (OCH₂), 60.7 (C4), 55.4 (OCH₃), 33.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 27.3 (C5), 26.5 (C6).

(1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-7-Pent-4-enoyl-7-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-1-ylmethyl acetate (11**)**

Et₃N (117 μ L, 0.84 mmol) and acetyl chloride (60 μ L, 0.84 mmol) were added at 0 $^{\circ}$ C to a solution of alcohol **9** (87 mg, 0.42 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL). The reaction was stirred for 24 h at 0 $^{\circ}$ C, and was washed with saturated NaHCO₃ (15 mL) and water (15 mL). The organic layer was dried, filtered, and concentrated. The product was purified by a silica gel column chromatography, eluting with hexane/ethyl acetate (2:8), to give 33 mg (31%) of compound **11** as a yellow oil.

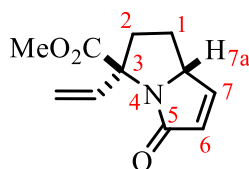
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 272.1259 [M+Na]⁺; calcd. C₁₄H₁₉NO₃Na⁺: 272.1257.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.29 (dd, *J* = 6.0, 2.4 Hz, 1H, H3), 6.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H2), 5.89-5.74 (m, 1H, CH_{vin}), 5.08-4.94 (m, 4H, OCH₂, CH_{2vin}), 4.71 (s, 1H, H4), 2.33-2.23 (m, 4H, CH₂, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.93-1.84 (m, 2H, H5, H6), 1.34-1.28 (m, 2H, H6, H5).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.8, 169.7 (CO), 137.4 (CH_{vin}), 137.3 (C3), 133.6 (C2), 115.2 (CH_{2vin}), 70.2 (C1), 63.6 (OCH₂), 60.7 (C4), 33.7 (CH₂), 28.7 (CH₂), 27.3 (C5), 26.4 (C6), 20.9 (CH₃).

Methyl (3*R*,7*aS*) and (3*S*,7*aR*)-5-oxo-3-vinyl-2,3,5,7*a*-tetrahydro-1*H*-pyrrolizine-3-carboxylate (12a**)**



12a

Method A:

A solution of ester **6** (65 mg, 0.31 mmol) and second generation Grubbs catalyst (13 mg, 0.016 mmol) in dry toluene (11 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 80 °C for 25 h and needed another additional 5% of catalyst (13 mg, 0.016 mmol) at 9 h of reaction. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography eluting with hexane/ethyl acetate (3:7), to give 41 mg (63%) of compound **12a** as a yellow oil.

Method B:

A solution of ester **6** (79 mg, 0.38 mmol) and second generation Grubbs catalyst (16 mg, 0.019 mmol) in dry CHCl₃ (12 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 55 °C for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (3:7) as an eluent, to give 46 mg (58%) of compound **12a** as a yellow oil.

Method C:

A solution of ester **6** (59 mg, 0.28 mmol) and second generation Hoveyda-Grubbs catalyst (9 mg, 0.014 mmol) in dry CHCl₃ (12 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 7 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (3:7) as an eluent, to give 26 mg (45%) of compound **12a** as a yellow oil.

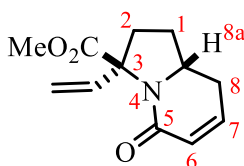
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 208.0962 [M+H]⁺; calcd. C₁₁H₁₄NO₃⁺: 208.0968.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.15 (dd, $J = 5.9, 1.6$ Hz, 1H, H₆), 6.40 (dd, $J = 17.5, 10.9$ Hz, 1H, H_{vin}), 6.11 (dd, $J = 5.9, 1.6$ Hz, 1H, H₇), 5.29 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H_{cis}), 5.18 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H, H_{trans}), 4.52 (ddd, $J = 11.5, 5.4, 1.6$ Hz, 1H, H_{7a}), 3.80 (s, 3H, CH₃), 2.75-2.56 (m, 2H, 2H₂), 2.13-2.06 (m, 1H, H₁), 1.56-1.45 (m, 1H, H₁).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.7 (CO), 170.7 (CO), 146.9 (C₆), 134.1 (CH_{vin}), 130.8 (C₇), 116.1 (CH_{2vin}), 69.2 (C_{7a}), 67.0 (C₃), 53.1 (CH₃), 42.4 (C₂), 27.2 (C₁).

Methyl (3*R*,8*aS*) and (3*S*,8*aR*)-5-oxo-3-vinyl-1,2,3,5,8,8*a*-hexahydroindolizine-3-carboxylate (13**)**



13

Method A:

A solution of ester **7** (62 mg, 0.28 mmol) and second generation Grubbs catalyst (12 mg, 0.014 mmol) in dry toluene (9 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 80 °C for 7 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (3:7) as an eluent, to give 39 mg (63%) of compound **13** as a yellow oil.

Method B:

A solution of ester **7** (77 mg, 0.35 mmol) and second generation Grubbs catalyst (12 mg, 0.014 mmol) in dry CHCl₃ (12 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 55 °C for 25 h. After stirring for 9 h, another 5% of catalyst (15 mg, 0.017 mmol) was added. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (3:7) as an eluent, to give 45 mg (58%) of compound **13** as a yellow oil.

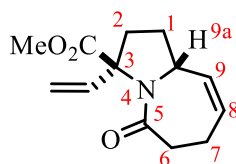
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 222.1124 [M+H]⁺; calcd. C₁₂H₁₆NO₃⁺: 222.1125.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.42 (dd, *J* = 17.3, 10.6 Hz, 1H, H_{vin}), 6.02-5.90 (m, 2H, H₆, H₇), 5.12 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, H_{cis}), 4.90 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, H_{trans}), 4.46-4.39 (m, 1H, H_{8a}), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.00-2.94 (m, 2H, H₈), 2.21-2.04 (m, 3H, 2H₂, H_{1endo}), 1.85-1.72 (m, 1H, H_{1exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.9 (CO₂), 166.9 (CO), 135.1 (CH_{vin}), 126.4 (C₆), 124.9 (C₇), 113.5 (CH_{2vin}), 68.8 (C₃), 59.8 (C_{8a}), 52.8 (CH₃), 36.7 (C₂), 34.0 (C₈), 28.2 (C₁).

Methyl (3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-5-oxo-3-vinyl-2,3,5,6,7,9*a*-hexahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepine-3-carboxylate (14**)**



14

Method A:

A solution of ester **8** (83 mg, 0.35 mmol) and second generation Grubbs catalyst (15 mg, 0.018 mmol) in dry toluene (12 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 80 °C for 7 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (3:7) as an eluent, to give 49 mg (59%) of compound **14** as a yellow oil.

Method B:

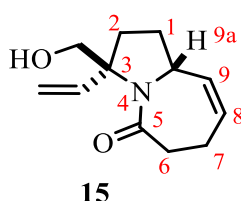
A solution of ester **8** (98 mg, 0.42 mmol) and second generation Grubbs catalyst (18 mg, 0.021 mmol) in dry CHCl₃ (14 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 55 °C for 23 h. After stirring for 9 h, another 5% of catalyst (18 mg, 0.021 mmol) was added. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (3:7) as an eluent, to give 52 mg (53%) of compound **14** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 236.1282 [M+H]⁺; calcd. C₁₃H₁₈NO₃⁺: 236.1281.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.29 (dd, *J* = 17.1, 10.5 Hz, 1H, H_{vin}), 5.83-5.76 (m, 1H, H₈), 5.56 (dd, *J* = 11.5, 1.9 Hz, 1H, H₉), 5.16 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H_{cis}), 5.04 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H_{trans}), 4.84-4.75 (m, 1H, H_{9a}), 3.76 (s, 3H, CH₃), 2.94-2.85 (m, 1H, H₆), 2.51-2.33 (m, 3H, 2H₇, H₆), 2.30-2.12 (m, 2H, H_{2endo}, H_{1endo}), 1.94-1.75 (m, 2H, H_{2exo}, H_{1exo}).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.8 (CO), 172.3 (CO), 135.2 (CH_{vin}), 129.6 (C8), 128.5 (C9), 114.1 ($\text{CH}_{2\text{vin}}$), 71.8 (C3), 57.1 (C9a), 52.7 (CH_3), 35.3 (C2), 34.4 (C6), 32.2 (C1), 24.7 (C7).

(3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-3-(Hydroxymethyl)-3-vinyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepin-5(9*aH*)-one (15)**Method A:**

A solution of alcohol **9** (52 mg, 0.25 mmol) and second generation Grubbs catalyst (11 mg, 0.013 mmol) in dry CHCl_3 (8.4 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. After stirring for 9 h, another 5% of catalyst (13 mg, 0.016 mmol) was added. The mixture was stirred at 55 °C for 25 h and needed another additional 5% of catalyst (10.7 mg, 0.013 mmol) at 9 h of reaction. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography twice, the first one using ethyl acetate and the second one $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1) as eluents, respectively, to give 22 mg (42%) of compound **15** as a yellow oil.

Method B:

To a solution of compound **17** (20 mg, 0.08 mmol) in MeOH (2 mL), MeONa (0.5 M, 1.5 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, Dowex® (40 mg) was added to the reaction and it was stirred for 10 min and then was filtered. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography twice, the first one using ethyl acetate and the second one $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1) as eluents, respectively, to give 16 mg (99%) of compound **15** as a yellow oil.

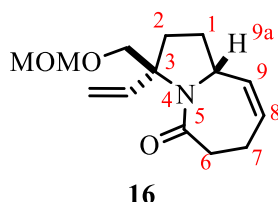
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 208.1337 [$\text{M}+\text{H}$]⁺; calcd. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2^+$: 208.1332.

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.83 (dd, $J = 17.1, 10.6$ Hz, 1H, H_{vin}), 5.79-5.74 (m, 2H, H8, OH), 5.51 (ddd, $J = 11.4, 4.3, 2.1$ Hz, 1H, H9), 5.22 (dd, $J = 10.6, 1.0$ Hz, 1H, H_{cis}), 5.04 (dd, $J = 17.1, 1.1$ Hz, 1H, H_{trans}), 4.73 (m, 1H, H9a), 3.80-3.65 (m, 2H, OCH_2), 2.98 (td, $J = 13.0, 4.3$ Hz, 1H, CH_2), 2.54-2.33 (m, 3H, CH_2, CH_2), 2.17-2.09 (m, 1H, CH_2), 1.74-1.62 (m, 3H, CH_2, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.7 (CO), 137.0 (CH_{vin}), 129.8 (C8), 129.8 (C9), 115.3 ($\text{CH}_{2\text{vin}}$), 74.7 (C3), 68.4 (OCH_2), 57.9 (C9a), 35.4 (C6), 34.3 (C2), 30.3 (C1), 24.7 (C7).

(3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-3-((Methoxymethoxy)methyl)-3-vinyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepin-5(9*aH*)-one (16)



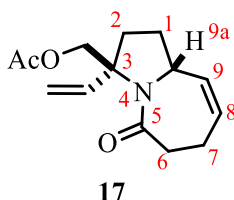
A solution of ether **10** (39 mg, 0.25 mmol) and second generation Grubbs catalyst (7 mg, 0.008 mmol) in dry CHCl₃ (5.4 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. After stirring for 9 h, another 5% of catalyst (13 mg, 0.016 mmol) was added. The mixture was stirred at 55 °C for 24 h and needed another additional 5% of catalyst (6.9 mg, 0.008 mmol) at 9 h of reaction. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using ethyl acetate as an eluent, to give 26 mg (65%) of compound **16** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 252.1596 [M+H]⁺; calcd. C₁₄H₂₂NO₃⁺: 252.1594.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.92 (dd, *J* = 17.2, 10.7 Hz, 1H, H_{vin}), 5.77-5.71 (m, 1H, H₈), 5.56-5.51 (m, 1H, H₉), 5.15-5.06 (m, 2H, H_{cis}, H_{trans}), 4.72-4.66 (m, 1H, H_{9a}), 4.63 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH₂O), 4.18 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, OCH₂), 3.83 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, OCH₂), 3.36 (s, 3H, OCH₃), 2.99-2.90 (m, 1H, H₆), 2.51-2.29 (m, 3H, 2H₇, H₆), 2.22-2.11 (m, 2H, H_{2endo}, H_{1endo}), 1.83-1.75 (m, 1H, H_{2exo}), 1.72-1.61 (m, 1H, H_{1exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.8 (CO), 137.9 (CH_{vin}), 130.3 (C₈), 129.8 (C₉), 114.0 (CH_{2vin}), 96.9 (OCH₂O), 70.4 (C₃), 70.0 (OCH₂), 57.5 (C_{9a}), 55.3 (OCH₃), 35.5 (C₆), 33.6 (C₂), 30.9 (C₁), 24.9 (C₇),

(3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-5-Oxo-3-vinyl-2,3,5,6,7,9*a*-hexahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepin-3-ylmethyl acetate (17**)**

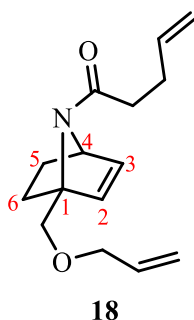
A solution of compound **11** (33 mg, 0.13 mmol) and second generation Grubbs catalyst (5.6 mg, 0.007 mmol) in dry toluene (4.4 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 80 °C for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (2:8) as an eluent, to give 17 mg (52%) of compound **17** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 250.1439 [*M*+*H*]⁺; calcd. C₁₄H₂₀NO₃⁺: 250.1438.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.92 (dd, *J* = 17.2, 10.7 Hz, 1H, H_{vin}), 5.78-5.71 (m, 1H, H₈), 5.57-5.50 (m, 1H, H₉), 5.18-5.10 (m, 2H, H_{cis}, H_{trans}), 4.71-4.65 (m, 2H, C_{9a}, OCH₂), 4.49 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, OCH₂), 2.99-2.91 (m, 1H, H₆), 2.51-2.29 (m, 3H, 2H₇, H₆), 2.19-2.11 (m, 1H, H_{1endo}), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.06-1.90 (m, 1H, H_{2endo}), 1.82-1.73 (m, 1H, H_{1exo}), 1.71-1.63 (m, 1H, H_{1exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.0 (CO), 170.8 (CO), 137.3 (CH_{vin}), 130.2 (C₈), 130.2 (C₉), 114.8 (CH_{2vin}), 69.5 (C₃), 65.9 (OCH₂), 57.6 (C_{9a}), 35.6 (C₆), 33.7 (C₂), 30.9 (C₁), 25.0 (C₇), 21.1 (CH₃).

(1*R*,4*R*) and (1*S*,4*S*)-1-(1-(Allyloxymethyl)-7-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-7-yl)pent-4-en-1-one (18)

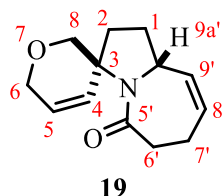
Sodium hydride (12 mg, 0.30 mmol) and allyl bromide (33 μ L, 0.38 mmol) were added to a solution of alcohol **9** (52 mg, 0.25 mmol) in dry DMF (3 mL). The mixture was stirred at room temperature for 6 h. The solution was diluted with saturated NH_4Cl (9 mL) and was then extracted with ethyl acetate (30 mL). The organic layer was washed with brine (30 mL), dried, filtered, and concentrated. The product was purified by a silica gel column chromatography, eluting with hexane/ethyl acetate (6:4), to give 44 mg (71%) of compound **18** as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (m/z) 248.1643 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_2^+$: 248.1645.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.40-6.33 (m, 1H, H2), 6.25-6.21 (m, 1H, H3), 5.97-5.89 (m, 1H, H_{vin}), 5.84-5.75 (m, 1H, H_{vin}), 5.28 (dd, $J = 17.2, 3.3$ Hz, 1H, H_{trans}), 5.17 (dd, $J = 10.3, 1.1$ Hz, 1H, H_{cis}), 5.05-4.90 (m, 2H, $\text{H}_{\text{trans}}, \text{H}_{\text{cis}}$), 4.65 (s, 1H, H9a), 4.46-4.36 (m, 1H, CCH_2O), 4.30-4.22 (m, 1H, CCH_2O), 4.14-4.08 (m, 2H, OCH_2), 2.35-2.20 (m, 4H, CH_2, CH_2), 1.88-1.75 (m, 2H, H5, H6), 1.41-1.37 (m, 1H, H6), 1.28-1.21 (m, 1H, H5).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.4 (CO), 138.1 (C2), 137.6 (CH_{vin}), 135.1 (CH_{vin}), 132.9 (C3), 117.0 ($\text{CH}_{2\text{vin}}$), 115.2 ($\text{CH}_{2\text{vin}}$), 72.6 (OCH_2), 71.1 (C1), 70.0 (CCH_2O), 60.7 (C9a), 33.7 (CH_2), 28.9 (CH_2), 27.8 (C6), 26.5 (C5).

(3*S*,9*a'R*) and (3*R*,9*a'**S*)-1',2,6,6',7',9*a'*-Hexahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (19)**

A solution of compound **18** (50 mg, 0.20 mmol) and second generation Grubbs catalyst (9 mg, 0.11 mmol) in dry CHCl_3 (7.5 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 55 °C for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using ethyl acetate as an eluent, to give 30 mg (68%) of compound **19** as a white solid.

Physical data:

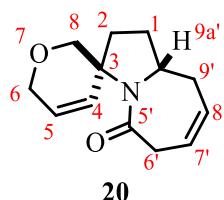
Mp: 100-102 °C.

HRMS (ESI+) (m/z) 220.1336 [$M+H$] $^+$; calcd. $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2^+$: 220.1332.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.76-5.62 (m, 3H, H4, H5, H8'), 5.57-5.51 (m, 1H, H9'), 4.78-4.69 (m, 1H, H9a'), 4.24-4.15 (m, 1H, H6), 4.10-4.01 (m, 2H, H6, H8), 3.49 (dd, $J = 10.4, 1.5$ Hz, 1H, H8), 3.11-3.00 (m, 1H, H6'), 2.50-2.25 (m, 3H, H6', 2H7'), 2.19-2.03 (m, 2H, H2_{endo}, H1_{endo}), 1.82-1.66 (m, 2H, H1_{exo}, H2_{exo}).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.6 (CO), 132.2, 132.0, 131.7 (C4, C8', C9'), 124.4 (C5), 66.5 (C8), 65.0 (C6), 62.3 (C3), 56.2 (C9a'), 35.7 (C6'), 34.6 (C2), 30.0 (C1), 25.2 (C7').

(3*S*,9*a'R*) and (3*R*,9*a'**S*)-1',2,6,6',9',9*a'*-Hexahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (20)**



A solution of compound **18** (47 mg, 0.19 mmol) and second generation Grubbs catalyst (8 mg, 0.09 mmol) in dry toluene (6.3 mL) was saturated with ethylene and left under an ethylene atmosphere. The mixture was stirred at 80 °C for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using ethyl acetate as an eluent, to give 14 mg (34%) of compound **20** as a white solid, and 16 mg of compound **19** (37%).

Physical data:

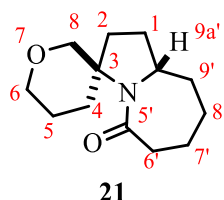
Mp: 130-132 °C

X-Ray: See Annex.7

HRMS (ESI+) (*m/z*) 220.1324 [*M*+*H*]⁺; calcd. C₁₃H₁₈NO₂⁺: 220.1332.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.78-5.67 (m, 2H, H7', H8'). 5.62-5.51 (m, 2H, H4, H5), 4.36-4.27 (m, 1H, H9a'), 4.20 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, H6), 4.14 (dd, *J* = 10.3, 1.8 Hz, 1H, H8), 4.04 (dd, *J* = 16.3, 2.4 Hz, 1H, H6), 3.58-3.49 (m, 1H, H6'), 3.47 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H8), 2.78-2.66 (m, 1H, H6'), 2.40-2.05 (m, 4H, 2H9a', H1_{endo}, H2_{endo}), 1.89-1.83 (m, 1H, H1_{exo}), 1.58 (dd, *J* = 12.6, 6.8 Hz, 1H, H2_{exo}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1 (CO), 132.1 (C7'), 128.1 (C5), 124.5 (C8'), 121.1 (C4), 66.1 (C8), 64.9 (C6), 62.4 (C3), 57.3 (C9a'), 38.0 (C6'), 36.0 (C9a'), 34.3 (C1), 28.6 (C2)

(3*S*,9*a*'*S*) and (3*R*,9*a*'*R*)-Decahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (21)**Method A:**

A solution of compound **19** (10 mg, 0.05 mmol) in MeOH (5 mL) was hydrogenated under atmospheric pressure and room temperature, using Pd/C 30% as a catalyst (3 mg). Hydrogenation was stirred for 24 h. The solution was filtered over celite and the solvent was removed under reduced pressure to give 10 mg (0.04 mmol, 99%) of compound **21** as a yellow oil.

Method B:

A solution of compound **20** (23 mg, 0.10 mmol) in MeOH (10 mL) was hydrogenated under atmospheric pressure and room temperature, using Pd/C 30% as a catalyst (7 mg). Hydrogenation was stirred for 72 h. The solution was filtered over celite and the solvent was removed under reduced pressure to give 23 mg (0.10 mmol, 99%) of compound **21** as a yellow oil.

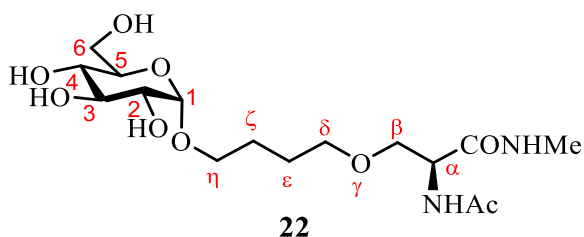
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 224.1645 [*M*+*H*]⁺; calcd. C₁₃H₂₂NO₂⁺: 224.1654.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.21 (dd, *J* = 10.6, 1.6 Hz, 1H, H8), 3.89-3.80 (m, 2H, H9a', H6), 3.47-3.37 (m, 1H, H6), 3.32 (dd, *J* = 10.6, 2.3 Hz, 1H, H8), 3.18 (td, *J* = 13.0, 4.8 Hz, 1H, CH₂), 2.56-2.46 (m, 1H, H6'), 2.44-2.34 (m, 2H, H6', CH₂), 2.14-2.01 (m, 1H, H1_{endo}), 1.96-1.88 (m, 1H, H2_{endo}), 1.86-1.40 (m, 10H, H1_{exo}, H2_{exo}, 2H5, CH₂, CH₂, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.7 (CO), 69.3 (C8), 67.7 (C6), 65.0 (C3), 61.5 (C9a'), 40.1 (C6'), 36.3 (CH₂), 33.6 (CH₂), 32.5 (CH₂), 30.6 (C1), 29.6 (C2), 24.9 (C5), 23.7 (C4).

8.2 Experimental section of Chapter 3

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosyloxy)butoxy)propanamide (22)

To a solution of compound **43** (30.0 mg, 0.04 mmol) in MeOH (2 mL), MeONa (0.5M, 1.5 mL) was added. The reaction was stirred for 2 h at room temperature. Dowex® (60 mg) was added over the reaction and stirred for 5 min, it was filtered and evaporate to reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (2 mL) and eluted through a reverse-phase Sep-pak C18 cartridge to obtain, after evaporation, compound **22** (10.5 mg, 72%) as a colorless oil.

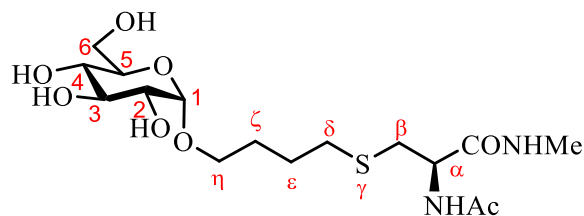
Physical data:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, H₂O): +40.7.

HRMS (ESI+) (m/z) 417.1829 [M+Na]⁺; calcd. C₁₆H₃₀N₂NaO₉⁺: 417.1844.

¹H NMR (400 MHz, H₂O) δ (ppm): 4.89 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H1), 4.44 (t, J = 5.3 Hz, 1H, H α), 3.84 (dd, J = 12.2, 2.2 Hz, 1H, H6), 3.77-3.62 (m, 6H, H3, H5, H6, 2H β , H δ), 3.60-3.46 (m, 4H, H2, H δ , 2H η), 3.43-3.34 (m, 1H, H4), 2.73 (s, 3H, NHCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 1.69-1.57 (m, 4H, 2H ϵ , 2H ζ).

¹³C NMR (100 MHz, H₂O) δ (ppm): 174.5, 172.1 (CO), 98.7 (C1), 73.2 (C3), 71.8 (C5), 71.3 (C2), 71.0 (C δ), 69.6 (C4), 69.2 (C β), 67.8 (C η), 60.6 (C6), 54.0 (C α), 25.9 (NHCH₃), 25.4, 25.3 (C ϵ , C ζ), 21.8 (COCH₃).

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosyloxy)butylthio)propanamide (23)**23**

To a solution of compound **44** (20 mg, 0.02 mmol) in MeOH (2 mL), MeONa (0.5 M, 1.5 mL) was added. The reaction was stirred for 2 h. at r.t. Dowex® (40mg) was added over the reaction and stirred for 5 min, it was filtered and evaporated at reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (0.5 mL) and the compound was purified by semipreparative HPLC to furnish **23** (5 mg, 51%) as a colorless oil.

Semi-preparative HPLC: $t_R = 18.7$ min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	05	95
30	10	20	80

Physical data:

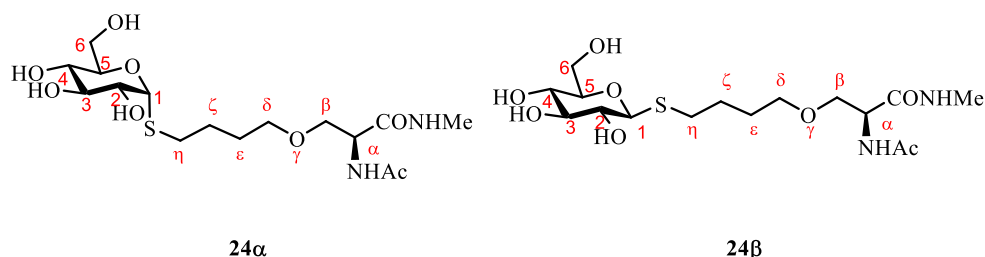
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, H₂O): +37.7.

HRMS (ESI+) (m/z) 433.1621 [M+Na]⁺; calcd. C₁₆H₃₀N₂NaO₈S⁺: 433.1615.

¹H NMR (400 MHz, H₂O) δ (ppm): 4.91 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H1), 4.43 (dd, $J = 7.7, 5.8$ Hz, 1H, H α), 3.88-3.82 (m, 1H, H6), 3.80-3.64 (m, 4H, H3, H5, H6, H η), 3.58-3.51 (m, 2H, H2, H η), 3.40 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H4), 3.00 (dd, $J = 14.0, 5.5$ Hz, 1H, H β), 2.87 (dd, $J = 14.0, 8.1$ Hz, 1H, H β), 2.75 (s, 3H, NHCH₃), 2.62 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 2H δ), 2.06 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.77-1.63 (m, 4H, 2H ϵ , 2H ζ).

¹³C NMR (100 MHz, H₂O) δ (ppm): 174.4, 172.8 (CO), 98.1 (C1), 73.1, 71.8 (C3, C5), 71.3 (C2), 69.6 (C4), 67.6 (C η), 60.5 (C6), 53.5 (C α), 32.7 (C β), 31.3 (C δ), 27.7 (C ζ), 25.9 (NHCH₃), 25.5 (C ϵ), 21.7 (NHCOCH₃).

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosylthio)butoxy)propanamide (24 α) and (S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(β -D-glucosylthio)butoxy)propanamide (24 β)



To a solution of compounds **45 α,β** (34.5 mg, 0.06 mmol) in MeOH (2 mL), MeONa (0.5 M, 1.5 mL) was added. The reaction was stirred for 2 hours at room temperature and Dowex® (60 mg) was then added over the reaction. After stirring for 5 min, the reaction mixture was filtered and evaporated. The residue was dissolved in H₂O (0.5 mL) and the mixture of compounds was separated by semipreparative HPLC to furnish **24 α** (1 mg, 4%, t_R 17.2 min) and **24 β** (10 mg, 40%, t_R 16.1 min) as colorless oils.

Semi-preparative HPLC: **24 α** t_R = 17.2 min and **24 β** t_R = 16.1 min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	05	95
30	10	20	80

Physical data:

Compound 24 α :

$[\alpha]_D^{20}$ (c=0.99, H₂O): +133.0.

HRMS (ESI+) (m/z) 433.1619 [M+Na]⁺; calcd. C₁₆H₃₀N₂NaO₈S⁺: 433.1615.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 5.40 (d, J = 5.5 Hz, 1H, H1), 4.45 (t, J = 5.4 Hz, 1H, H α), 4.03 (ddd, J = 9.9, 5.3, 2.2 Hz, 1H, H5), 3.87-3.72 (m, 5H, 2H6, H2, 2H β), 3.60-3.50 (m, 3H, H3, 2H δ), 3.39 (t, J = 9.5 Hz, 1H, H4), 2.74 (s, 3H, NHCH₃), 2.70-2.58 (m, 2H, 2H η), 2.06 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.71-1.61 (m, 4H, 2H ϵ , 2H ζ).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 174.5, 172.2 (CO), 85.5 (C1), 73.7 (C3), 72.3 (C5), 71.1 (C2), 70.8 (Cδ), 69.7 (C4), 69.2 (Cβ), 60.6 (C6), 54.0 (Cα), 29.8 (Cη), 27.6 (Cε), 26.0 (NHCH₃), 25.5 (Cζ), 21.8 (COCH₃).

Compound 24β:

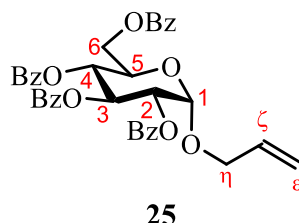
[α]_D²⁰ (c=1.00, H₂O): +37.7.

HRMS (ESI+) (m/z) 433.1598 [M+Na]⁺; calcd. C₁₆H₃₀N₂NaO₈S⁺: 433.1615.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 4.39 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H1), 4.33 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, Hα), 3.76 (dd, *J* = 12.4, 1.9 Hz, 1H, H6), 3.67-3.61 (m, 2H, 2Hβ), 3.57 (dd, *J* = 12.4, 5.6 Hz, 1H, H6), 3.47-3.38 (m, 2H, Hδ), 3.38-3.24 (m, 3H, H3, H4, H5), 3.22-3.14 (m, 1H, H2), 2.71-2.57 (m, 5H, NHCH₃, 2Hη), 1.93 (s, 3H, COCH₃), 1.60-1.47 (m, 4H, 2Hε, 2Hζ).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 174.5, 172.1 (CO), 85.4 (C1), 79.9, 77.2 (C3, C5), 72.3 (C2), 70.8 (Cδ), 69.6 (C4), 69.2 (Cβ), 60.9 (C6), 53.9 (Cα), 29.7 (Cη), 27.6 (Cε), 26.0 (Cζ, NHCH₃), 21.8 (COCH₃).

Allyl 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranoside (25)



Benzoyl chloride (3.0 mL, 21.80 mmol) was added over a solution of allyl D-glucopyranoside **27** (800 mg, 3.63 mmol) and triethylamine (2.5 mL, 21.80 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL). The solution was stirred for 12 h at r.t. and was then washed with HCl 2N (2x50 mL) and brine (2x50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (7:3) as an eluent, to give 816 mg (35%) of compound **25** as a white solid.

Physical data:

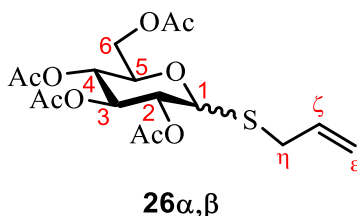
Mp: 103-105 °C.

[α]_D²⁰ (c=1.00, CHCl₃): +73.7.

HRMS (ESI+) (m/z) 659.1893 [M+Na]⁺; calcd. C₃₇H₃₂NaO₁₀⁺: 659.1888.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.08-7.84 (m, 8H, arom), 7.60-7.24 (m, 12H, arom), 6.22 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H₃), 5.88 (ddd, *J* = 22.2, 10.8, 5.6 Hz, 1H, H ζ), 5.69 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H₄), 5.39 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H₁), 5.35-5.26 (m, 2H, H₂, H ϵ_{trans}), 5.16 (dd, *J* = 10.4, 1.0 Hz, 1H, H ϵ_{cis}), 4.65-4.56 (m, 1H, H₆), 4.52-4.43 (m, 2H, H₆, H₅), 4.30 (dd, *J* = 13.1, 5.2 Hz, 1H, H η), 4.11 (dd, *J* = 13.1, 6.0 Hz, 1H, H η).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.3, 166.0, 165.9, 165.5 (CO), 133.6, 133.5, 133.4, 133.3, 133.2, 130.1, 130.0, 129.9, 129.8, 129.4, 129.2, 129.1, 128.6, 128.6, 128.4 (arom, C ζ), 118.2 (C ϵ), 95.4 (C₁), 72.1 (C₂), 70.7 (C₃), 69.8 (C₄), 69.2 (C η), 68.1 (C₅), 63.2 (C₆).

Allyl 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- α,β -D-glucopyranoside (26 α,β)

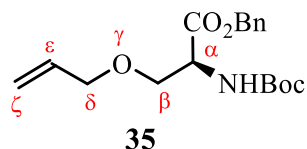
Allyl bromide (306 μL , 3.51 mmol) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (525 μL , 3.51 mmol) were added over a solution of 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-glucopyranose (1.0 g, 2.93 mmol) in THF (50 mL). The solution was stirred for 12 h at r.t. and was then concentrated and the residue purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4) as an eluent, to give 1.13 g (95%) of compound **26 α,β** as a colorless oil.

Physical data:

HRMS (ESI⁺) (m/z) 427.1015 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺; calcd. $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NaO}_9\text{S}^+$: 427.1033.

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.77-5.64 (m, 1H, H ζ), 5.16-5.01 (m, 3H, H ϵ , H2), 5.00-4.92 (m, 2H, H3, H4), 4.40 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H1), 4.13 (dd, $J = 12.3, 5.2$ Hz, 1H, H6), 4.03 (dd, $J = 12.3, 2.1$ Hz, 1H, H6), 3.58 (ddd, $J = 9.9, 5.1, 2.2$ Hz, 1H, H5), 3.29 (dd, $J = 13.5, 8.4$ Hz, 1H, H η), 3.13 (dd, $J = 13.5, 6.0$ Hz, 1H, H η), 2.00-1.88 (m, 12H, COCH_3).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.4, 170.0, 169.3, 169.2 (CO), 133.3 (C ζ), 117.8 (C ϵ), 81.7 (C1), 75.6 (C5), 73.8 (C2), 69.8 (C3), 68.3 (C4), 62.1 (C6), 32.7 (C η), 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (COCH_3).

Boc-L-Ser(allyl)-OBn (35)

Benzyl alcohol (1.2 mL, 11.56 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (377 mg, 3.08 mmol) were added to a solution of Boc-L-Ser(allyl)-OH **29** (945 mg, 3.85 mmol) in dry CH₂Cl₂ (50mL) under an inert atmosphere, and cooled in an ice bath to 0°C and stirred for 5 min. Dicyclohexylcarbodiimide (874 mg, 4.24 mmol) was added over the solution and stirred for 24h at r.t. The precipitated dicyclohexylurea was removed by filtration, and the solution was concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (7:3) as an eluent, to give 1.19 g (92%) of compound **35** as a colorless oil.

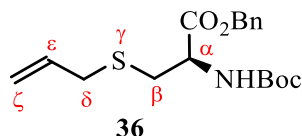
Physical data:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): -6.6.

HRMS (ESI+) (m/z) 358.1626 [M+Na]⁺; calcd. C₁₈H₂₅NNaO₅⁺: 358.1625.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.23 (m, 5H, arom), 5.75 (ddd, *J* = 22.6, 10.7, 5.5 Hz, 1H, H_ε), 5.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH), 5.29-5.08 (m, 4H, PhCH₂, H_{ζ(cis)}, H_{ζ(trans)}), 4.47 (dd, *J* = 5.5, 3.2 Hz, 1H, H_α), 3.96-3.82 (m, 3H, 2H_δ, H_β), 3.64 (dd, *J* = 9.4, 3.2 Hz, 1H, H_β), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.5 (CO), 155.4 (CO), 135.5 (C_{ipso}), 134.0 (C_ε), 128.4, 128.2, 128.0 (arom), 117.2 (C_ζ), 79.7 (C), 72.0 (C_δ), 69.8 (C_β), 66.9 (PhCH₂), 54.1 (C_α), 28.2 (CH₃).

Boc-L-Cys(allyl)-OBn (36)

Benzyl alcohol (731 μL , 7.03 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (229 mg, 1.87 mmol) were added to a solution of Boc-L-Cys(allyl)-OH **34** (612 mg, 2.34 mmol) in dry CH_2Cl_2 (30mL) under an inert atmosphere, and cooled in an ice bath to 0°C and stirred for 5 min. Dicyclohexylcarbodiimide (532 mg, 2.58 mmol) was added over the solution and this was stirred for 24h at r.t. The precipitated dicyclohexylurea was removed by filtration, and the solution was concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (7:3) as an eluent, to give 752 mg (91%) of compound **36** as a colorless oil.

Physical data:

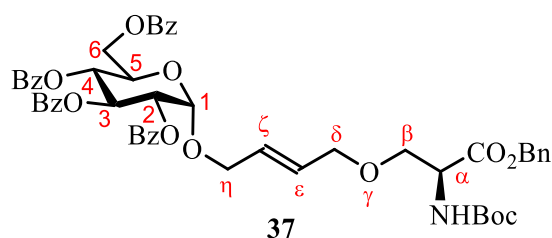
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl_3): +5.9.

HRMS (ESI+) (m/z) 374.1400 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4\text{S}^+$: 374.1397.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.41-7.27 (m, 5H, arom), 5.77-5.65 (m, 1H, H ϵ), 5.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, NH), 5.19 (m, 2H, PhCH_2), 5.11-5.02 (m, 2H, H ζ_{cis} , H ζ_{trans}), 4.56 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H α), 3.14-3.02 (m, 2H, 2H δ), 2.94 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H, H β), 2.85 (dd, $J = 13.7, 5.4$ Hz, 1H, H β), 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.1 (CO), 155.3 (CO), 135.3 (C_{ipso}), 133.8 (C ϵ), 128.7, 128.6, 128.5 (arom), 118.0 (C ζ), 80.2 (C), 67.5 (PhCH_2), 53.8 (C α), 35.3 (C δ), 33.0 (C β), 28.4 (CH_3).

Benzyl (*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(4-(α -D-tetra-*O*-benzoylglucosyloxy)-(*E*)-but-2-enyloxy)propanoate (37**)**



A solution of Boc-L-Ser(allyl)-OBn **35** (41 mg, 0.12 mmol), allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside **25** (156 mg, 0.24 mmol) and second generation Hoveyda-Grubbs catalyst (7.7 mg, 0.012 mmol) in dry toluene (3mL) was stirred at 80 °C for 24 h, needing another 10% of catalyst (7.7 mg, 0.012 mmol) and 2 additional equivalents of allyl α -D-glucopyranoside (156 mg, 0.24 mmol) at 9 hours of reaction. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4) as an eluent, to give 63 mg (55%) of compound **37** as a white solid.

Physical data:

Mp: 47-49 °C.

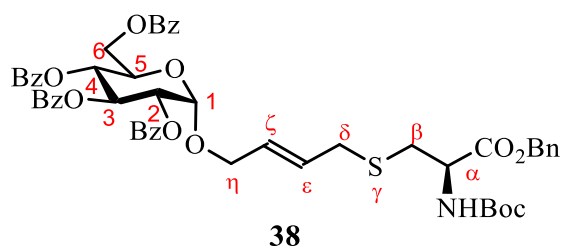
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +57.4.

HRMS (ESI+) (*m/z*) 966.3307 [M+Na]⁺; calcd. C₅₃H₅₃NNaO₁₅⁺: 966.3307.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.07-7.84 (m, 8H, arom), 7.58-7.26 (m, 17H, arom), 6.20 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H₃), 5.73-5.64 (m, 3H, H₄, H ζ , H ϵ), 5.42-5.28 (m, 3H, H₂, H₁, NH), 5.24 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 5.10 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.64-4.58 (m, 1H, H₆), 4.50-4.41 (m, 3H, H α , H₅, H₆), 4.28-4.23 (m, 1H, H δ), 4.07-4.01 (m, 1H, H δ), 3.83-3.75 (m, 3H, H β , 2H η), 3.56 (dd, *J* = 9.4, 3.2 Hz, 1H, H β), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.7, 166.3, 165.9, 165.9, 165.4, 155.7 (CO), 135.7, 133.6, 133.3, 133.3, 130.0, 130.0, 129.9, 129.9, 129.8, 129.3, 129.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0 (arom, C ϵ , C ζ), 95.4 (C₁), 80.1 (C), 72.1 (C₂), 71.1 (C η), 70.6 (C₃), 70.3 (C β), 69.7 (C₄), 68.1 (C₅, C δ), 67.2 (PhCH₂), 63.1 (C₆), 54.22 (C α), 28.5 (CH₃).

Benzyl (*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(4-(α -D-tetra-*O*-benzoylglucosyloxy)-(*E*)-but-2-enylthio)propanoate (38**)**



A solution of Boc-L-Cys(allyl)-OBn **36** (46 mg, 0.13 mmol), allyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside **25** (167 mg, 0.26 mmol) and second generation Hoveyda-Grubbs catalyst (8.2 mg, 0.013 mmol) in dry toluene (3.5 mL) was stirred at 80 °C for 24 h, needing another 10% of catalyst (8.2 mg, 0.013 mmol) and 2 additional equivalents of allyl α -D-glucopyranoside (167 mg, 0.26 mmol) at 9 h. of reaction. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4) as an eluent, to give 61 mg (49%) of compound **38** as a white solid.

Physical data:

Mp: 48-50 °C.

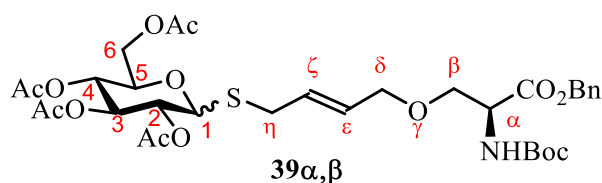
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +50.8.

HRMS (ESI+) (m/z) 982.3074 [M+Na]⁺; calcd. C₅₃H₅₃NNaO₁₄S⁺: 982.3079.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.08-7.85 (m, 8H, arom), 7.56-7.26 (m, 17H, arom), 6.24-6.17 (m, 1H, H₃), 5.70 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₄), 5.64-5.50 (m, 2H, H_ζ, H_ε), 5.38-5.28 (m, 3H, H₂, H₁, NH), 5.22-5.11 (m, 2H, CH₂Ph), 4.61 (m, 1H, H₆), 4.55-4.42 (m, 3H, H_α, H₅, H₆), 4.24 (dd, *J* = 13.0, 4.8 Hz, 1H, H_η), 4.02 (dd, *J* = 12.9, 5.8 Hz, 1H, H_η), 3.03-2.92 (m, 2H, 2H_δ), 2.87-2.76 (m, 2H, 2H_β), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 166.3, 165.9, 165.4, 155.2 (CO), 135.2, 133.5, 133.3, 130.0, 130.0, 129.8, 129.8, 129.3, 129.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4 (arom, C_ζ, C_ε), 95.1 (C₁), 80.2 (C), 72.1 (C₂), 70.6 (C₃), 69.7 (C₄), 68.1 (C₅), 67.9 (C_δ), 67.5 (CH₂Ph), 63.1 (C₆), 53.5 (C_α), 33.9 (C_δ), 33.2 (C_β), 28.4 (CH₃).

Benzyl (*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(4-(α,β -D-tetra-*O*-acetylglucosylthio)-(*E*)-but-2-enyloxy)propanoate (39 α,β**)**



A solution of Boc-L-Ser(allyl)-OBn **35** (50 mg, 0.15 mmol), allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α,β -D-1-thioglucofuranoside **26 α,β** (120 mg, 0.30 mmol) and second generation Hoveyda-Grubbs catalyst (9.4 mg, 0.015 mmol) in dry toluene (4 mL) was stirred at 80 °C for 24 h. After that, another 10% of catalyst (9.4 mg, 0.015 mmol) and 2 additional equivalents of allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α,β -D-1-thioglucofuranoside (120 mg, 0.30 mmol) were added and the resulting solution was stirred at the same temperature for 9 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4) as an eluent, to give 50 mg (47%) of compounds **39 α,β** as a yellow oil.

Physical data:

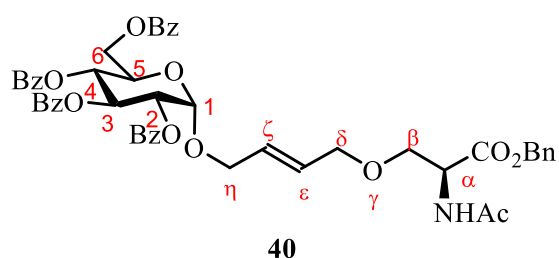
HRMS (ESI+) (m/z) 734.2481 [$M+Na$]⁺; calcd. C₃₃H₄₅NNaO₁₄S⁺: 734.2453.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.41-7.28 (m, 5H, arom), 5.65-5.51 (m, 2H, CH_{vin}, CH_{vin}), 5.43 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH), 5.35-5.21 (m, 2H, CH₂Ph, H3), 5.16-5.00 (m, 3H, CH₂Ph, H2, H4), 4.52-4.42 (m, 2H, H α , H1), 4.23 (dd, J = 12.4, 5.0 Hz, 1H, H6), 4.12 (dd, J = 12.3, 2.0 Hz, 1H, H6), 3.96-3.82 (m, 3H, H β , 2H δ), 3.71-3.55 (m, 2H, H5, H β), 3.35 (dd, J = 13.2, 7.5 Hz, 1H, H η), 3.19 (dd, J = 13.2, 5.6 Hz, 1H, H η), 2.09-1.97 (m, 12H, COCH₃, COCH₃, COCH₃, COCH₃), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.7, 170.6, 170.3, 169.6, 169.5, 155.6 (CO), 135.7, 129.8, 128.7, 128.5, 128.5, 128.2 (arom, C ϵ , C ζ), 82.0 (C1), 80.1 (C), 75.8 (C5), 74.0 (C3), 71.2 (C δ), 70.3 (C β), 70.1 (C2), 68.5 (C4), 67.2 (CH₂Ph), 62.3 (C6), 54.3 (C α), 31.4 (C η), 28.4 (CH₃), 20.9 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 20.7 (COCH₃).

Only the signals corresponding to the major compound are indicated in the ¹H and ¹³C spectra.

Benzyl (*S*)-2-acetamido-3-(4-(α -D-tetra-*O*-benzoylglucosyloxy)-(*E*)-but-2-enyloxy)propanoate (40**)**



Trifluoroacetic acid (2.0 mL, 26.0 mmol) was added to a solution of **37** (93 mg, 0.10 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL). The solution was stirred for 4 hours at r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (20 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain the corresponding compound that was used directly in the next reaction.

Acetic anhydride (1.5 mL) and pyridine (3 mL) were added over previous compound, and the solution was stirred for 12 h. at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (2:8) as an eluent, to give 63 mg (72%) of compound **40** as a white solid.

Physical data:

Mp: 42-44 °C.

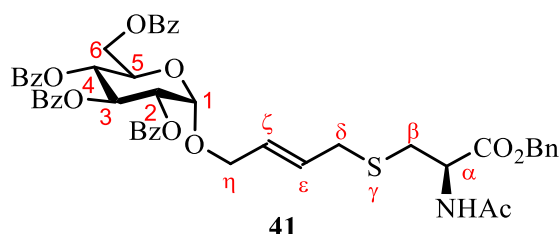
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +33.8.

HRMS (ESI+) (m/z) 908.2875 [M+Na]⁺; calcd. C₅₀H₄₇NNaO₁₄⁺: 908.2889.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.09-7.85 (m, 8H, arom), 7.59-7.27 (m, 17H, arom), 6.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 6.21 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H₃), 5.73 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₄), 5.66 (m, 2H, H ϵ , H ζ), 5.38 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H₁), 5.32-5.28 (m, 1H, H₂), 5.23 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH₂Ph), 5.11 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.81-4.75 (m, 1H, H α), 4.68-4.60 (m, 1H, H₆), 4.50-4.42 (m, 2H, H₅, H₆), 4.28-4.20 (m, 1H, H δ), 4.16-4.03 (m, 1H, H δ), 3.85-3.77 (m, 3H, 2H η , H β), 3.59 (dd, *J* = 9.5, 3.1 Hz, 1H, H β), 2.05 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3, 170.2, 166.3, 165.9, 165.9, 165.4 (CO), 135.5, 133.6, 133.5, 133.3, 130.0, 129.8, 129.8, 129.7, 129.2, 129.1, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2 (Cε, Cζ, arom), 95.4 (C1), 72.1 (C2), 71.0 (Cη), 70.5 (C3), 70.1 (Cβ), 69.5 (C4), 68.2 (Cδ), 68.0 (C5), 67.3 (CH₂Ph), 63.0 (C6), 52.8 (Cα), 23.2 (NHCOCH₃).

Benzyl (*S*)-2-acetamido-3-(4-(α -D-tetra-*O*-benzoylglucosyloxy)-(*E*)-but-2-enylthio)propanoate (41**)**



Trifluoroacetic acid (2.0 mL, 26.0 mmol) was added to a solution of **38** (120 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL). The solution was stirred for 3 hours at r.t and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (20 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain the corresponding compound that was used directly in the next reaction.

Acetic anhydride (1.5 mL) and pyridine (3 mL) were added over previous compound, and the solution was stirred for 12 hours at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (2:8) as an eluent, to give 110 mg (98%) of compound **41** as a white solid.

Physical data:

Mp: 48-50 °C.

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +61.0.

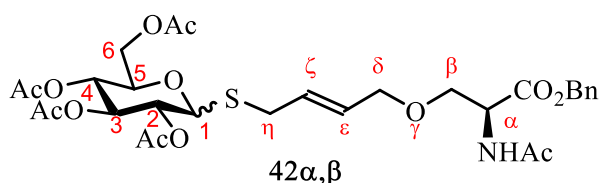
HRMS (ESI+) (m/z) 924.2663 [M+Na]⁺; calcd. C₅₀H₄₇NNaO₁₃S⁺: 924.2660.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.12-7.90 (m, 8H, arom), 7.63-7.29 (m, 17H, arom), 6.42 (dd, $J = 14.3, 7.7$ Hz, 1H, NH), 6.26 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H, H₃), 5.75 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H₄), 5.70-5.52 (m, 2H, H ζ , H ϵ), 5.41 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H₁), 5.35 (dd, $J = 10.2, 3.7$ Hz, 1H, H₂), 5.26-5.16 (m, 2H, CH₂Ph), 4.88-4.81 (m, 1H, H α), 4.70-4.63 (m, 1H, H₆), 4.56-4.47 (m, 2H, H₆, H₅), 4.28 (dd, $J = 13.0, 4.9$ Hz, 1H, H η), 4.07 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H, H η), 3.05-2.80 (m, 4H, 2H β , 2H δ), 2.06 (s, 3H, NHCOCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.8, 169.9, 166.3, 165.9, 165.9, 165.4 (CO), 135.1, 133.6, 133.5, 133.3, 130.0, 130.0, 129.8, 129.8, 129.7, 129.3, 129.1,

129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4 (arom, C ζ , C ϵ), 95.1 (C1), 72.1 (C2), 70.5 (C3), 69.6 (C4), 68.1 (C5), 67.8 (C η), 67.6 (CH₂Ph), 63.1 (C6), 52.0 (C α), 33.8 (C δ), 33.0 (C β), 23.2 (NHCOCH₃).

Benzyl (*S*)-2-acetamido-3-(4-(α,β -D-tetra-*O*-acetylglucosylthio)-(*E*)-but-2-enyloxy)propanoate ($42\alpha,\beta$)



To a solution of **39 α,β** (120 mg, 0.17 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL), trifluoroacetic acid (2.0 mL, 26.0 mmol) was added. The solution was stirred for 4 h. at r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et_2O (20 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain the corresponding mixture of compounds, which was used directly in the next reaction. Acetic anhydride (2 mL) and pyridine (5 mL) were added the previous mixture of compounds and the solution was stirred for 12 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/ EtOAc (1:9) as an eluent, to give 94 mg (86%) of compounds **42 α,β** as a yellow oil.

Physical data:

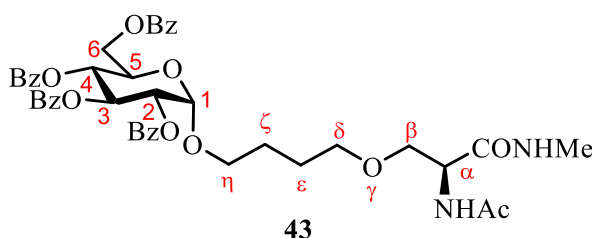
HRMS (ESI⁺) (m/z) 676.2046 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NNaO}_{13}\text{S}^+$: 676.2034.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.44-7.29 (m, 5H, arom), 6.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 5.65-5.50 (m, 2H, H_ϵ , H_ζ), 5.32-5.22 (m, 2H, CH_2Ph , H_3), 5.16 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.11-4.99 (m, 2H, H_2 , H_4), 4.81 (dt, $J = 7.9$, 2.7 Hz, 1H, H_α), 4.46 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H_1), 4.23-4.13 (m, 2H, 2H_6), 3.96-3.80 (m, 3H, H_β , 2H_δ), 3.69-3.62 (m, 2H, H_5 , H_β), 3.37 (dd, $J = 13.2$, 7.5 Hz, 1H, H_η), 3.19 (dd, $J = 13.3$, 5.6 Hz, 1H, H_η), 2.08-1.99 (m, 15H, COCH_3 , COCH_3 , COCH_3 , COCH_3 , COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.9, 170.3, 170.3, 170.2, 169.6, 169.5 (CO), 135.6, 129.6, 128.8, 128.6, 128.3 (arom, C_ϵ , C_ζ), 81.9 (C_1), 75.9 (C_5), 73.9 (C_3), 71.3 (C_δ), 70.3, 70.2 (C_2 , C_β), 68.6 (C_4), 67.3 (CH_2Ph), 62.5 (C_6), 52.9 (C_α), 31.4 (C_η), 23.2 (COCH_3), 20.9 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.7 (COCH_3 , COCH_3).

Only the signals corresponding to the major compound are indicated in the ^1H and ^{13}C spectra.

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-tetra-O-benzoylglucosyloxy)butoxy)propanamide (43)



A solution of compound **40** (63 mg, 0.07 mmol) in MeOH (5 mL) was hydrogenated for 24 h. at r.t. under atmospheric pressure, using Pd/C 50% as a catalyst (30 mg). The solution was filtered over celite and the compound was used directly in the next reaction.

Previous compound was dissolved in dry CH₃CN (8mL) under an inert atmosphere, and methylamine hydrochloride (6.2 mg, 0.09 mmol) was added in the presence of DIEA (62 μ L, 0.36 mmol) and TBTU (29.6 mg, 0.09 mmol). The reaction was stirred for 24 h. at r.t. The product was purified by a silica gel column chromatography, eluting with MeOH/EtOAc (2:98), to give 41 mg (71%) of compound **43** as a yellow oil.

Physical data:

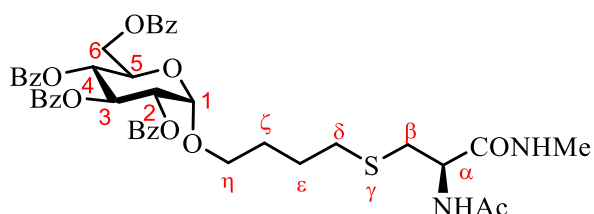
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +59.6.

HRMS (ESI+) (m/z) 833.2875 [M+Na]⁺; calcd. C₄₄H₄₆N₂NaO₁₃⁺: 833.2892.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.03-7.75 (m, 8H, arom). 7.54-7.17 (m, 12H, arom), 6.53-6.36 (m, 2H, NHAc, NHMe), 6.12 (t, J = 9.9 Hz, 1H, H3), 5.61 (td, J = 9.7, 3.2 Hz, 1H, H4), 5.29 (t, J = 4.1 Hz, 1H, H1), 5.25-5.15 (m, 1H, H2), 4.60-4.53 (m, 1H, H6), 4.45-4.33 (m, 3H, H5, H6, H α), 3.81-3.61 (m, 2H, H δ , H β), 3.48-3.40 (m, 1H, H δ), 3.38-3.24 (m, 3H, H β , 2H η), 2.72 (dd, J = 4.8, 1.2 Hz, 3H, NHCH₃), 1.96 (d, J = 13.0 Hz, 3H, NHCOCH₃), 1.63-1.46 (m, 4H, 2H ζ , 2H ϵ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.7, 170.4, 170.4, 166.3, 166.1, 165.9, 165.4 (CO), 133.6, 133.3, 130.0, 129.8, 129.8, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.6, 128.5 (arom), 96.0 (C1), 72.3 (C2), 71.2 (C η), 70.6 (C3), 69.9 (C β), 69.7 (C4), 68.6 (C δ), 67.9 (C5), 63.1 (C6), 52.6 (C α), 26.5 (NHCH₃), 26.2, 26.2 (C ϵ , C ζ), 23.4 (NHCOCH₃).

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-tetra-O-benzoylglucosyloxy)butylthio)propanamide (44)



44

A solution of compound **41** (110 mg, 0.12 mmol) in MeOH (5 mL) was hydrogenated for 36 h. at r.t. under atmospheric pressure, using Pd/C 70% as a catalyst (75 mg). The solution was filtered over celite and the compound was used directly in the next reaction.

Previous compound was dissolved in dry CH₃CN (20 mL) under inert atmosphere, and methylamine hydrochloride (25 mg, 0.37 mmol) was added in the presence of DIEA (150 μ L, 0.86 mmol) and TBTU (52 mg, 0.15 mmol). The reaction was stirred for 24 h. at r.t. The product was purified by a silica gel column chromatography, eluting with MeOH/CH₂Cl₂ (2:98), to give 31 mg (60%) of compound **44** as a yellow oil.

Physical data:

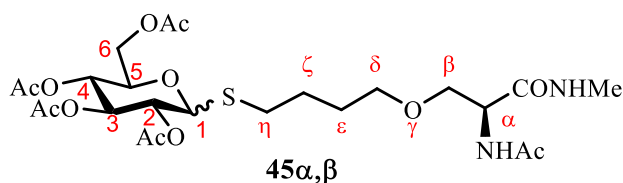
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +51.7.

HRMS (ESI+) (m/z) 849.2682 [M+Na]⁺; calcd. C₄₄H₄₆N₂NaO₁₂S⁺: 849.2664.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.14-7.86 (m, 8H, arom) 7.28-7.67 (m, 12H, arom), 6.64 (d, J = 6.0 Hz, 1H, NHAc), 6.57 (d, J = 4.3 Hz, 1H, NHMe), 6.22 (td, J = 9.8, 4.1 Hz, 1H, H3), 5.73 (t, J = 9.5 Hz, 1H, H4), 5.42-5.36 (m, 1H, H1), 5.36-5.31 (m, 1H, H2), 4.70-4.64 (m, 1H, H6), 4.55-4.46 (m, 3H, H5, H6, H α), 3.92-3.85 (m, 1H, H η), 3.54 (dd, J = 10.1, 5.8 Hz, 1H, H η), 2.98-2.89 (m, 1H, H β), 2.85 (t, J = 4.5 Hz, 3H, NHCH₃), 2.81-2.72 (m, 1H, H β), 2.62 (dd, J = 15.3, 7.0 Hz, 2H, 2H δ), 2.05 (d, J = 5.4 Hz, 3H, NHCOCH₃), 1.83-1.67 (m, 4H, 2H ζ , 2H ϵ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.9, 170.5, 166.4, 166.2, 166.0, 165.9, 165.5 (CO), 133.6, 133.4, 133.3, 130.0, 129.9, 129.8, 129.2, 129.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5 (arom), 96.2 (C1), 72.2 (C2), 70.8 (C3), 69.7 (C4), 68.5 (C η), 68.0 (C5),

63.2 (C6), 52.9 (C α), 34.0 (C β), 32.3 (C δ), 28.4 (C ζ), 26.6 (NHCH₃), 26.4 (C ϵ), 23.2 (COCH₃).

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α,β -D-tetra-O-acetylglucosylthio)butoxy)propanamide ($45\alpha,\beta$)

A solution of compounds $42\alpha,\beta$ (94 mg, 0.14 mmol) in MeOH (5 mL) was hydrogenated for 72 h. at r.t. under atmospheric pressure, using Pd/C 80% as a catalyst (76 mg). The solution was filtered over celite and the mixture of compounds was used directly in the next reaction. This mixture of compounds was dissolved in dry CH₃CN (15 mL) under an inert atmosphere and methylamine hydrochloride (29 mg, 0.43 mmol) was added in the presence of DIEA (175 μ L, 1.01 mmol) and TBTU (60 mg, 0.19 mmol). The reaction was stirred for 24 hours at room temperature. The crude reaction was purified by a silica gel column chromatography, eluting with MeOH/CH₂Cl₂ (2:98), to give 34.5 mg (41%) of compounds $45\alpha,\beta$ as a yellow oil.

Physical data:

HRMS (ESI+) (m/z) 601.2047 [M+Na]⁺; calcd. C₂₄H₃₈N₂NaO₁₂S⁺: 601.2038.

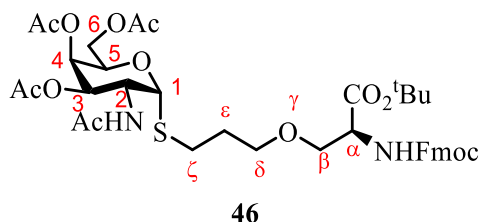
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.74 (d, J = 6.6 Hz, 1H, NHAc), 6.59 (s, 1H, NHMe), 5.23 (td, J = 9.4, 3.1 Hz, 1H, H3), 5.13-4.97 (m, 2H, H2, H4), 4.57-4.45 (m, 2H, H α , H1), 4.28-4.12 (m, 2H, 2H6), 3.79-3.70 (m, 2H, H β_2 , H5), 3.54-3.41 (m, 3H, H β , 2H δ), 2.85 (d, J = 4.8 Hz, 3H, NHCH₃), 2.74-2.65 (m, 2H, 2H η), 2.12-1.96 (m, 15H, COCH₃, COCH₃, COCH₃, COCH₃, COCH₃), 1.71-1.59 (m, 4H, 2H ϵ , 2H ζ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.6, 171.0, 170.9, 170.4, 169.7 (CO), 83.6, 83.4 (C1), 76.0 (C5), 74.0 (C3), 70.0 (C2), 69.8 (C β), 68.5 (C4), 62.3 (C6), 52.8 (C α), 29.6 (C η), 28.5 (C ϵ), 26.7 (NHCH₃), 26.4 (C ζ), 23.1 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 20.7 (COCH₃).

Only the signals corresponding to the major compound are indicated in the ¹H and ¹³C spectra.

8.3 Experimental section of Chapter 4

N-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-serine *tert*-butyl ester (**46**)



THERMAL WAY: A solution of **59** (195 mg, 0.46 mmol), compound **50** (284 mg, 0.78 mmol) and AIBN (46 mg, 0.28 mmol) in degasified CHCl₃ (5 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (46 mg, 0.28 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as eluent to give protected glycoamino acid **46** (253 mg, 70%) as a white solid.

PHOTOCHEMICAL WAY: A solution of compound **59** (232 mg, 0.55 mmol), compound **50** (240 mg, 0.66 mmol) and DPAP (30 mg, 0.11 mmol) in degasified CH₂Cl₂ (1.5 mL) was irradiated at λ_{\max} 365 nm. After stirring for 3 h, another portion of DPAP (30 mg, 0.11 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was then concentrated and the residue was chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as an eluent to give protected glycoamino acid **46** (227 mg, 53%) as a white solid.

REPAIRING WAY: A solution of compound **59** (205 mg, 0.48 mmol), compound **50** (352 mg, 0.97 mmol), catechol (64 mg, 0.58 mmol) and BEt₃ (84 μ L, 0.58 mmol) in CH₂Cl₂ (0.65 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt₃ (7 μ L) was added (until complete consumption of compound **59**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as an eluent, to give protected glycoamino acid **46** (265 mg, 70%) as a white solid.

Physical data:

Mp: 63-65 °C,

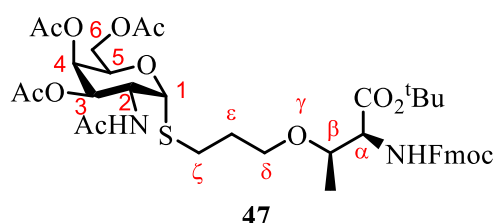
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +95.5.

HRMS (ESI+) (m/z) 787.3119 [M+H]⁺; calcd. C₃₉H₅₁N₂O₁₃S⁺: 787.3106.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78-7.74 (m, 2H, arom), 7.65-7.59 (m, 2H, arom), 7.42-7.37 (m, 2H, arom), 7.34-7.29 (m, 2H, arom), 5.70-5.60 (m, 2H, NHAc, NHFmoc), 5.49 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H1), 5.38 (s, 1H, H4), 5.04 (dd, *J* = 11.6, 2.6 Hz, 1H, H3), 4.82-4.72 (m, 1H, H2), 4.53 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H5), 4.46-4.33 (m, 3H, CH₂Fmoc, Hα), 4.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.17-4.03 (m, 2H, 2H6), 3.82 (dd, *J* = 9.4, 2.8 Hz, 1H, Hβ), 3.67 (dd, *J* = 9.3, 2.3 Hz, 1H, Hβ), 3.60-3.43 (m, 2H, 2Hδ), 2.75-2.57 (m, 2H, 2Hζ), 2.14 (s, 3H, COCH₃), 2.06-1.95 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.91-1.83 (m, 2H, 2Hε), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1, 170.4, 170.4, 170.2, 169.4, 156.1 (CO), 144.0, 144.0, 141.4, 127.8, 127.2, 125.3, 120.0 (arom), 85.2 (C1), 82.4 (C), 71.2 (Cβ), 69.7 (Cδ), 68.6 (C3), 67.5, 67.4 (C4, C5), 67.2 (CH₂Fmoc), 61.9 (C6), 55.0 (Cα), 48.5 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 29.8 (Cε), 28.1 (CH₃), 28.0 (Cζ), 23.4 (NHCOCH₃), 20.8, 20.8 (COCH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-threonine *tert*-butyl ester (**47**)**



THERMAL WAY: A solution of compound **60** (206 mg, 0.47 mmol), compound **50** (291 mg, 0.80 mmol) and AIBN (46 mg, 0.28 mmol) in degasified CHCl₃ (5 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (46 mg, 0.28 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **47** (268 mg, 71%) as a white solid.

PHOTOCHEMICAL WAY: A solution of compound **60** (160 mg, 0.37 mmol), compound **50** (159 mg, 0.44 mmol) and DPAP (20 mg, 0.07 mmol) in degasified CH₂Cl₂ (1.0 mL) was irradiated at λ_{max} 365 nm. After stirring for 3 h, another portion of DPAP (20 mg, 0.07 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was concentrated and the residue was chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **47** (181 mg, 62%) as a white solid.

REPAIRING WAY: A solution of compound **60** (242 mg, 0.55 mmol), compound **50** (402 mg, 1.11 mmol), catechol (73 mg, 0.66 mmol) and BEt₃ (96 μ L, 0.66 mmol) in CH₂Cl₂ (0.74 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt₃ (8 μ L, 0.05 mmol) was added (until complete consumption of compound **59**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **47** (322 mg, 73%) as a white solid.

Physical data:

Mp: 76-78 °C

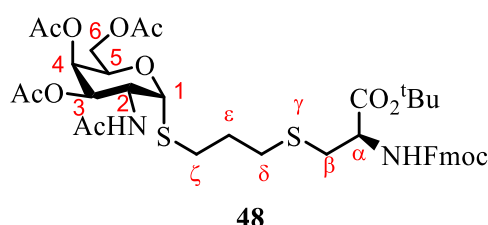
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +78.3.

HRMS (ESI+) (m/z) 801.3271 [M+H]⁺; calcd. C₄₀H₅₃N₂O₁₃S⁺: 801.3263.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76-7.73 (m, 2H, arom), 7.64-7.59 (m, 2H, arom), 7.40-7.35 (m, 2H, arom), 7.33-7.27 (m, 2H, arom), 5.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NHAc), 5.54-5.46 (m, 2H, H1, NHFmoc), 5.37 (s, 1H, H4), 5.04 (dd, *J* = 11.7, 2.7 Hz, 1H, H3), 4.71-4.82 (m, 1H, H2), 4.53 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H5), 4.43-4.34 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.20-4.19 (m, 2H, Hα, CH_{Fmoc}), 4.14-4.04 (m, 2H, 2H6), 3.98 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, Hβ), 3.62-3.54 (m, 1H, Hδ), 3.41-3.30 (m, 1H, Hδ), 2.74-2.55 (m, 2H, 2Hζ), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.02-1.95 (m, 9H, 3 COCH₃, NHCOCH₃), 1.89-1.78 (m, 2H, 2Hε), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.18 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.4, 170.3, 170.2, 169.8, 156.8 (CO), 144.0, 143.9, 141.4, 127.8, 127.1, 125.2, 120.0 (arom), 85.1 (C1), 82.1 (C), 75.6 (Cβ), 68.6 (C3), 67.4 (C4, C5, Cδ), 67.2 (CH₂Fmoc), 61.9 (C6), 59.1 (Cα), 48.4 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 30.2 (Cε), 28.2 (CH₃), 28.0 (Cζ), 23.3 (NHCOCH₃), 20.8, 20.8 (COCH₃), 16.4 (Me).

***N*-Fmoc-*S*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**48**)**



THERMAL WAY: A solution of compound **61** (191 mg, 0.43 mmol), compound **50** (268 mg, 0.74 mmol) and AIBN (44 mg, 0.26 mmol) in degasified CHCl_3 (5 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (44 mg, 0.26 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **48** (70 mg, 20%) as a white solid.

PHOTOCHEMICAL WAY: A solution of compound **61** (203 mg, 0.46 mmol), compound **50** (201 mg, 0.55 mmol) and DPAP (24 mg, 0.09 mmol) in degasified CH_2Cl_2 (1.2 mL) was irradiated at λ_{max} 365 nm. After stirring for 3 h, another portion of DPAP (20 mg, 0.08 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was concentrated and the residue was chromatographed on silica gel using $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **48** (111 mg, 30%) as a white solid.

REPAIRING WAY: A solution of compound **61** (310 mg, 0.71 mmol), compound **50** (513 mg, 1.41 mmol), catechol (93 mg, 0.85 mmol) and BEt_3 (123 μL , 0.85 mmol) in CH_2Cl_2 (0.94 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt_3 (10 μL , 0.088 mmol) was added (until complete consumption of compound **61**). The reaction mixture was then concentrated and the residue was chromatographed on silica gel using $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **48** (201 mg, 36%) as a white solid.

Physical data:

Mp: 69-71 °C

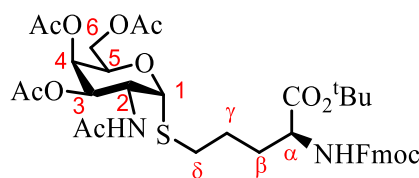
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl_3): +82.9.

HRMS (ESI+) (m/z) 803.2878 [M+H]⁺; calcd. C₃₉H₅₁N₂O₁₂S₂⁺: 803.2878.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.77-7.74 (m, 2H, arom), 7.62-7.58 (m, 2H, arom), 7.41-7.36 (m, 2H, arom), 7.33-7.28 (m, 2H, arom), 5.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, NHAc, NHFmoc), 5.49 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H1), 5.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H4), 5.02 (dd, *J* = 11.7, 3.1 Hz, 1H, H3), 4.79-4.71 (m, 1H, H2), 4.54-4.44 (m, 2H, H5, Hα), 4.43-4.34 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.15-4.03 (m, 2H, 2H6), 2.99 (dd, *J* = 13.7, 4.8 Hz, 1H, Hβ), 2.92 (dd, *J* = 13.7, 5.1 Hz, 1H, Hβ), 2.75-2.58 (m, 4H, 2Hζ, 2Hδ), 2.13 (s, 3H, COCH₃), 2.02-1.93 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.91-1.82 (m, 2H, 2Hε), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.4, 170.3, 170.2, 169.8, 155.8 (CO), 143.9, 143.9, 141.4, 127.8, 127.2, 125.2, 120.1 (arom), 85.2 (C1), 83.0 (C), 68.6 (C3), 67.5 (C5), 67.4 (C4), 67.2 (CH₂Fmoc), 61.9 (C6), 54.4 (Cα), 48.4 (C2), 47.2 (CH_{Fmoc}), 34.8 (Cβ), 31.7 (Cδ), 29.9 (Cζ), 29.3 (Cε), 28.1 (CH₃), 23.4 (NHCOCH₃), 20.8, 20.8 (COCH₃).

***N*-Fmoc-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-*L*-homohomocysteine *tert*-butyl ester (**49**)**



49

THERMAL WAY: A solution of *N*-Fmoc-*L*-allylglycine *tert*-butyl ester **62** (100 mg, 0.25 mmol), compound **50** (157 mg, 0.43 mmol) and AIBN (25 mg, 0.15 mmol) in degasified CHCl₃ (2.5 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (25 mg, 0.15 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as an eluent to give protected glycoamino acid **49** (140 mg, 70%) as a white solid.

PHOTOCHEMICAL WAY: A solution of compound **62** (142 mg, 0.36 mmol), compound **50** (156 mg, 0.43 mmol) and DPAP (19 mg, 0.07 mmol) in degasified CH₂Cl₂ (1.0 mL) was irradiated at λ_{max} 365 nm. After stirring for 3 h, another portion of DPAP (19 mg, 0.07 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was concentrated and the residue was chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as an eluent to give protected glycoamino acid **49** (137 mg, 50%) as a white solid.

REPAIRING TEC WAY: A solution of compound **62** (214 mg, 0.54 mmol), compound **50** (395 mg, 1.09 mmol), catechol (72 mg, 0.65 mmol) and BEt₃ (95 μ L, 0.65 mmol) in CH₂Cl₂ (0.72 mL) was stirred at r.t. After stirring for 1 h, another portion of BEt₃ (8 μ L, 0.05 mmol) was added (until complete consumption of compound **62**). The reaction mixture was concentrated and the residue chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **49** (288 mg, 70%) as a white solid.

Physical data:

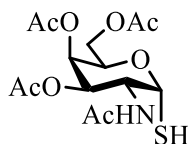
Mp: 59-61 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +85.5.

HRMS (ESI+) (m/z) 757.3012 [M+H]⁺; calcd. C₃₈H₄₉N₂O₁₂S⁺: 757.3001.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76-7.71 (m, 2H, arom), 7.61-7.56 (m, 2H, arom), 7.40-7.30 (m, 2H, arom), 7.33-7.27 (m, 2H, arom), 5.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NHAc), 5.54-5.48 (m, 2H, NHFmoc, H1), 5.35 (s, 1H, H4), 5.03 (dd, *J* = 11.6, 2.3 Hz, 1H, H3), 4.79-4.71 (m, 1H, H2), 4.51 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H5), 4.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂Fmoc), 4.29-4.18 (m, 2H, CH_{Fmoc}, Hα), 4.13-4.03 (m, 2H, H6), 2.66-2.54 (m, 2H, 2Hδ), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.01-1.85 (m, 10H, 2 COCH₃, NHCOCH₃, Hβ), 1.78-1.59 (m, 3H, Hβ, 2Hγ), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃).

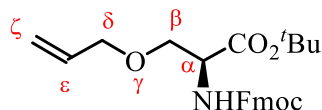
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.4, 171.2, 170.5, 170.4, 170.2, 156.1 (CO), 144.0, 141.4, 127.9, 127.2, 125.2, 120.1 (arom), 85.3 (C1), 82.6 (C), 68.7 (C3), 67.4, 67.4 (C4, C5), 67.1 (CH₂Fmoc), 61.8 (C6), 53.6 (Cα), 48.5 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 32.2 (Cβ), 30.9 (Cδ), 28.2 (CH₃), 25.7 (Cγ), 23.5 (NHCOCH₃), 20.9, 20.8 (COCH₃).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- α -D-galactopyranose (50)**50**

A stirred suspension of a mixture of α,β -anomers of 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-D-galactopyranose **51** (20.5 g, 52.6 mmol) and Lawesson's reagent (18.1 g, 44.7 mmol) in (1:1) toluene/1,2-dichloroethane solution (200 mL) was heated at 80 °C for 12 h. The reaction was then evaporated and the crude used directly in the next reaction. This crude was dissolved in 200 mL of methanol and stirred at 0 °C. TFA (10 mL) and water (10 mL) were then added, and the reaction was allowed to warm to r.t. and stirred for 4 h. The reaction was concentrated and the residue was purified by column chromatography using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as an eluent, to give compound **50** (9.55 g, 50%) as a white foam.

Spectroscopic data are consistent with the literature.^{133,167}

¹⁶⁷ Galonic, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5997

***N*-Fmoc-*O*-(allyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester (**59**)****59**

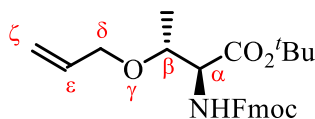
To a solution of compound Boc-Ser(allyl)-OH **29** (1.02 g, 4.16 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL), trifluoroacetic acid (5 mL) was added. The resulting solution was stirred for 2 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (10 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain a compound which was used directly in the next reaction. A solution of acetone/H₂O (1:1) (30 mL) was added to the previous compound and it was then treated with Na₂CO₃ (882 mg, 8.32 mmol) and FmocOSu (1.4 g, 4.16 mmol). The mixture was stirred for 18 h at r.t. and concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x20 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3x50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **55** (1.50 g, 98%) as a white solid, which was used directly in the next reaction. *t*-Butyl alcohol (1.6 mL, 16.7 mmol) was light protected added over DCC (2.72 g, 13.1 mmol) and CuCl (40 mg, 0.41 mmol) under an inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and dry CH₂Cl₂ (6 mL) was then added. After that, compound **55** (1.50 g, 4.08 mmol) dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL) was added over the previous solution and the mixture was stirred for 4 h. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with saturated NaHCO₃ (2x50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated, and the residue was purified by silica gel column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as an eluent, to give compound **59** (1.0 g, 58%) as a colorless oil.

Physical data:

[α]_D²⁰ (c=1.00, CHCl₃): +16.5.HRMS (ESI+) (m/z) 446.1943 [M+Na]⁺; calcd. C₂₅H₂₉NNaO₅⁺: 446.1938.¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.80-7.73 (m, 2H, arom), 7.65-7.59 (m, 2H, arom), 7.44-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 5.86 (m, 1H, H_ε), 5.67 (d,

$J = 8.3$ Hz, 1H, NH), 5.27 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, H ζ_{trans}), 5.20 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H ζ_{cis}), 4.47-4.33 (m, 3H, H α , CH_{2Fmoc}), 4.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.04 (dd, $J = 12.8, 5.3$ Hz, 1H, H δ), 3.96 (dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz, 1H, H δ), 3.86 (dd, $J = 9.4, 2.5$ Hz, 1H, H β), 3.69 (dd, $J = 9.3, 2.2$ Hz, 1H, H β), 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.5, 156.2 (CO), 144.1, 144.0, 141.4 (arom), 134.2 (C ϵ), 127.8, 127.2, 125.3, 120.1 (arom), 117.5 (C ζ), 82.4 (C), 72.4 (C δ), 70.4 (C β), 67.3 (CH_{2Fmoc}), 55.1 (C α), 47.3 (CH_{Fmoc}), 28.2 (CH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(allyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (**60**)****60**

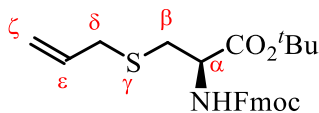
To a solution of compound Boc-Thr(allyl)-OH **54** (2.24 g, 8.64 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL), trifluoroacetic acid (10 mL) was added. The resulting solution was stirred for 2 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (20 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain a compound which was used directly in the next reaction. A solution of acetone/H₂O (1:1) (60 mL) was added to the previous compound and it was treated with Na₂CO₃ (1.83 g, 17.28 mmol) and FmocOSu (2.91 g, 8.64 mmol). The mixture was stirred for 18 h at r.t. and concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x20 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3x100 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **56** (3.00 g, 91%) as a white solid, which was used directly in the next reaction. *t*-Butyl alcohol (3.0 mL, 32.3 mmol) was light protected added over DCC (5.24 g, 25.2 mmol) and CuCl (78 mg, 0.79 mmol) under inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and dry CH₂Cl₂ (11 mL) was added. After that, compound **56** (3.0 g, 7.86 mmol) dissolved in dry CH₂Cl₂ (11 mL) was added over the previous solution and the mixture was stirred for 4 h. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2x50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as an eluent, to give compound **60** (2.03 g, 59%) as a white solid.

Physical data:

Mp: 58-60 °C.**[α]_D²⁰** (c=1.00, CHCl₃): -0.3.**HRMS (ESI+)** (m/z) 438.2292 [M+H]⁺; calcd. C₂₆H₃₂NO₅⁺: 438.2275.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78-7.74 (m, 2H, arom), 7.68-7.63 (m, 2H, arom), 7.43-7.38 (m, 2H, arom), 7.35-7.30 (m, 2H, arom), 5.94-5.82 (m, 1H, H ϵ), 5.60 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NH), 5.29 (d, J = 17.0 Hz, 1H, H ζ *trans*), 5.19 (d, J = 10.4 Hz, 1H, H ζ *cis*), 4.48-4.38 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.34 (dd, J = 9.6, 1.3 Hz, 1H, H α), 4.26 (t, J = 7.2 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.14-4.06 (m, 2H, H β , H δ), 3.91 (dd, J = 12.6, 5.5 Hz, 1H, H δ), 1.51 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.25 (d, J = 6.2 Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.6, 156.7 (CO), 144.0, 143.8, 141.2 (arom), 134.5 (C ϵ), 127.6, 127.0, 127.0, 125.1, 125.1, 119.9 (arom), 116.9 (C ζ), 81.8 (C), 74.7 (C β), 70.0 (C δ), 67.1 (CH₂Fmoc), 59.1 (C α), 47.1 (CH_{Fmoc}), 28.0 (CH₃), 16.2 (Me).

***N*-Fmoc-*S*-(allyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**61**)****61**

A solution of acetone/H₂O (1:1) (30 mL) was added to *S*-(allyl)-*L*-cysteine **57** (469 mg, 2.91 mmol) and it was then treated with Na₂CO₃ (616 mg, 5.82 mmol) and FmocOSu (0.98 g, 2.91 mmol). The mixture was stirred for 18 h at r.t. and concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x20 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3x50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **57** (1.10 g, 99%) as a white solid, which was used directly in the next reaction. *t*-Butyl alcohol (1.1 mL, 11.76 mmol) was light protected added over DCC (1.89 g, 9.18 mmol) and CuCl (28 mg, 0.29 mmol) under inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and CH₂Cl₂ (6 mL) was then added. After that, compound **57** (1.10 g, 2.87 mmol), dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL), was added over the previous solution and stirred for 4 h. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2x50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as an eluent, to give compound **61** (679 mg, 54%) as a white solid.

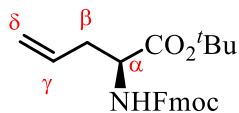
Physical data:

Mp: 61-63 °C.**[α]_D²⁰** (c=1.00, CHCl₃): -6.0.**HRMS (ESI+)** (m/z) 440.1896 [M+H]⁺; calcd. C₂₅H₃₀NO₄S⁺: 440.1890.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78-7.76 (m, 2H, arom), 7.64-7.60 (m, 2H, arom), 7.43-7.38 (m, 2H, arom), 7.35-7.29 (m, 2H, arom), 5.82-5.71 (m, 1H, H_ε), 5.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 5.16-5.08 (m, 2H, 2H_ζ), 4.55-4.46 (m, 1H, H_α), 4.40 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH₂Fmoc), 4.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 3.18-3.15 (m, 2H,

2H δ), 2.97 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H, H β), 2.87 (dd, $J = 13.8, 5.6$ Hz, 1H, H β), 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.9, 155.8 (CO), 144.0, 143.9, 141.4 (arom), 133.9 (C ϵ), 127.8, 127.2, 125.2, 120.1 (arom), 117.9 (C ζ), 82.9 (C), 67.2 (CH₂Fmoc), 54.2 (C α), 47.2 (CH_{Fmoc}), 35.5 (C δ), 33.3 (C β), 28.1 (CH₃).

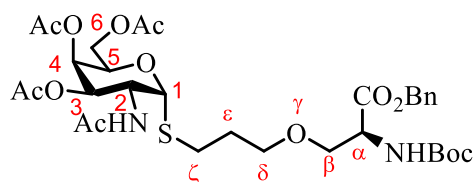
***N*-Fmoc-L-allylGlycine *tert*-butyl ester (62)****62**

A solution of acetone/H₂O (1:1) (30 mL) was added to **L-allylGlycine** (1.25 g, 10.9 mmol) and it was then treated with Na₂CO₃ (2.31 g, 21.8 mmol) and FmocOSu (3.68 g, 10.9 mmol). The mixture was stirred for 18 h at room temperature and concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O. The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3x50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **58** (3.4 g, 94%) as a white solid, which was used directly in the next reaction. *t*-Butyl alcohol (3.96 mL, 41.68 mmol) was added over DCC (6.78 g, 32.6 mmol) and CuCl (100 mg, 1.0 mmol) under inert atmosphere, light protected, and the resulting mixture was stirred for 5 days and CH₂Cl₂ (6 mL) was then added. After that, compound **58** (3.4 g, 10.2 mmol) dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL) was added over the previous solution and stirred for 4 h. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2x50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as eluent, to give compound **62** (3.0 g, 75%) as a white solid.

Spectroscopic data are consistent with the literature.¹⁶⁸

¹⁶⁸ O'Donnell, M. J.; Delgado, F. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6641-6650.

***N*-tert-Butoxycarbonyl-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-serine benzyl ester (**63**)**



63

A solution of *N*-Boc-L-Ser(*O*-allyl)-OBn **35** (90 mg, 0.27 mmol), 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- α -D-galactopyranose **50** (166 mg, 0.46 mmol) and AIBN (27 mg, 0.16 mmol) in degasified CHCl₃ (3 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (27 mg, 0.16 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated, and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (8:2) as an eluent to give compound **63** (104 mg, 57%) as a white foam.

Physical data:

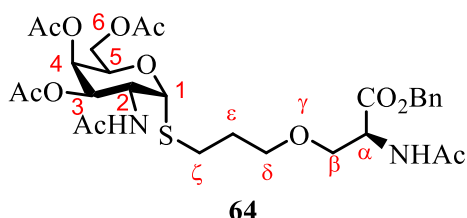
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +71.4.

HRMS (ESI+) (m/z) 699.2791 [M+H]⁺; calcd. C₃₂H₄₇N₂O₁₃S⁺: 699.2793.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.39-7.29 (m, 5H, arom), 5.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH sugar), 5.45 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H1), 5.41-5.34 (m, 2H, NH, H4), 5.25 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH₂Bn), 5.13 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH₂Bn), 5.03 (dd, *J* = 11.6, 2.7 Hz, 1H, H3), 4.81-4.71 (m, 1H, H2), 4.51 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H5), 4.49-4.43 (m, 1H, H α), 4.16-4.03 (m, 2H, 2H6), 3.84 (dd, *J* = 9.4, 2.6 Hz, 1H, H β), 3.64 (dd, *J* = 9.4, 3.2 Hz, 1H, H β), 3.51-3.35 (m, 2H, 2H δ), 2.67-2.47 (m, 2H, 2H ζ), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.03-1.95 (m, 9H, COCH₃, COCH₃, NHCOCH₃), 1.87-1.71 (m, 2H, 2H ϵ), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1, 170.7, 170.5, 170.4, 170.2, 155.6 (CO), 135.6, 128.7, 128.5, 128.3 (arom), 85.3 (C1), 80.2 (C), 71.0 (C β), 69.7 (C δ), 68.6 (C3), 67.5 (C4, C5), 67.2 (CH₂Bn), 62.0 (C6), 54.3 (C α), 48.5 (C2), 29.8 (C ϵ), 28.5 (CH₃), 28.0 (C ζ), 23.5 (NHCOCH₃), 20.8 (COCH₃).

***N*-Acetyl-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-serine benzyl ester (**64**)**



Trifluoroacetic acid (378 μ L, 4.91 mmol) was added over a solution of compound **63** (104 mg, 0.15 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL) and the resulting solution was stirred for 2 h at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et_2O (20 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain the corresponding compound, which was used directly in the next reaction. Acetic anhydride (2.0 mL) and pyridine (4 mL) were added to previous compound, and the solution was stirred for 12 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was chromatographed on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) as an eluent to give compound **64** (67 mg, 70%) as a white foam.

Physical data:

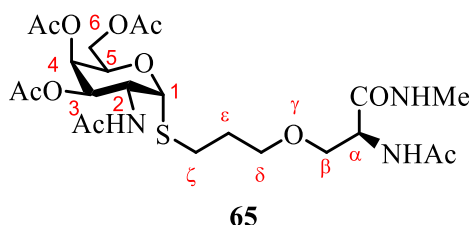
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.01, CHCl_3): +81.9.

HRMS (ESI+) (m/z) 641.2382 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd. $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}^+$: 641.2375.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.43-7.22 (m, 5H, arom), 6.42 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, NH), 5.57 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, NH sugar), 5.48 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, H1), 5.38 (s, 1H, H4), 5.25 (d, $J=12.3$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 5.16 (d, $J=12.3$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 5.04 (dd, $J=11.7, 2.5$ Hz, 1H, H3), 4.83-4.71 (m, 2H, H α , H2), 4.51 (t, $J=6.4$ Hz, 1H, H5), 4.17-4.05 (m, 2H, 2H6), 3.86 (dd, $J=9.3, 1.5$ Hz, 1H, H β), 3.69-3.63 (m, 1H, H β), 3.52-3.46 (m, 1H, H δ), 3.43-3.35 (m, 1H, H δ), 2.66-2.58 (m, 1H, H ζ), 2.55-2.48 (m, 1H, H ζ), 2.15 (s, 3H, COCH_3), 2.08-1.95 (m, 12H, COCH_3 , COCH_3 , NHCOCH_3 , NHCOCH_3), 1.86-1.72 (m, 2H, 2H ϵ).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.1, 170.5, 170.1, 170.2, 170.3 (CO), 135.5, 128.7, 128.5, 128.2 (arom), 85.1 (C1), 70.7 (C β), 69.4 (C δ), 68.5 (C3), 67.4 (C4, C5), 67.3 ($\text{CH}_{2\text{Bn}}$), 61.8 (C6), 52.8 (C α), 48.5 (C2), 29.7 (C ϵ), 27.6 (C ζ), 23.3 (NHCOCH_3), 23.2 (NHCOCH_3), 20.8, 20.8 (COCH_3).

***N*-Acetyl-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-serine methyl amide (**65**)**



A solution of compound **64** (67 mg, 0.10 mmol) in MeOH (10 mL) was treated with hydrogen for 24 h. at r.t. under atmospheric pressure, using Pd/C 80% as a catalyst (67 mg). The solution was then filtered over celite, evaporated and this crude was used directly in the next reaction. It was dissolved in dry CH₃CN (20 mL) under an inert atmosphere. Methylamine hydrochloride (21 mg, 0.31 mmol), TBTU (44 mg, 0.14 mmol) and DIEA (91 μ L, 0.52 mmol) were then added and the reaction was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation, the residue was purified by a silica gel column chromatography, eluting with CH₂Cl₂/MeOH (9:1), to give compound **65** (27 mg, 46%) as a yellow oil.

Physical data:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +101.4.

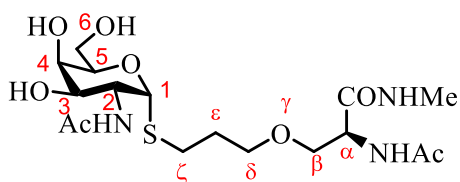
HRMS (ESI+) (m/z) 564.2234 [M+H]⁺; calcd. C₂₃H₃₈N₃O₁₁S⁺: 564.2222.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.71-6.60 (m, 2H, NHCOCH₃, NHCH₃), 6.00 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH sugar), 5.53 (dd, *J* = 8.0, 5.4 Hz, 1H, H1), 5.38-5.36 (m, 1H, H4), 5.04 (dt, *J* = 11.8, 3.1 Hz, 1H, H3), 4.75-4.66 (m, 1H, H2), 4.55-4.47 (m, 2H, H5, H α), 4.14-4.07 (m, 2H, 2H6), 3.77 (ddd, *J* = 14.4, 9.4, 4.6 Hz, 1H, H β), 3.61-3.43 (m, 3H, H β , 2H δ), 2.81 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, NHCH₃), 2.73-2.58 (m, 2H, 2H ζ), 2.14 (s, 3H, COCH₃), 2.06-1.95 (m, 12H, COCH₃, COCH₃, NHCOCH₃, NHCOCH₃), 1.92-1.77 (m, 2H, 2H ϵ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Duplication of signals are observed, probably due to the coexistence of various conformers, since when the spectra were registered at higher temperature some of them collapse in one signal): 171.2, 170.6, 170.6, 170.5, 170.3, 170.3 (CO), 85.4, 85.4 (C1), 70.1, 70.1 (C β), 69.3, 69.2 (C δ), 68.5 (C3), 67.6, 67.5, 67.4, 67.4 (C4, C5), 61.9, 61.9 (C6), 52.8, 52.8 (C α), 48.8,

48.7 (C2), 29.7, 29.6 (Cε), 28.0, 27.9 (Cζ), 26.5 (NHCH₃), 23.4, 23.4 (NHCOCH₃),
23.3, 23.3 (NHCOCH₃), 20.9, 20.8, 20.8 (COCH₃).

***N*-Acetyl-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-serine methyl amide (**66**)**



66

To a solution of compound **65** (27 mg, 0.05 mmol) in MeOH (2 mL), MeONa (0.5 M, 1.5 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature for 2 h. Then, dowex® (40 mg) was added to the reaction and it was stirred for 10 min, filtered and evaporated at reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (0.5 mL) and the compound was purified by semipreparative HPLC to furnish **66** (19.7 mg, 90%) as a white foam after lyophilization.

Semi-preparative HPLC: t_R = 25.3 min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	05	95
30	10	30	70

Physical data:

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +85.0.

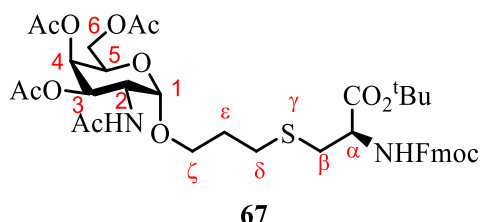
HRMS (ESI+) (m/z) 438.1911 [M+H]⁺; calcd. C₁₇H₃₂N₃O₈S⁺: 438.1905.

¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1) δ (ppm) amide protons: 8.20 (d, J = 5.5 Hz, 1H, NHCOCH₃), 8.13 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH sugar), 7.91 (s, 1H, NHCH₃).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 5.50 (d, J = 5.5 Hz, 1H, H1), 4.46 (t, J = 4.9 Hz, 1H, H α), 4.35 (dd, J = 11.4, 5.5 Hz, 1H, H2), 4.28 (t, J = 6.1 Hz, 1H, H5), 4.00 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H4), 3.84 (dd, J = 11.4, 3.1 Hz, 1H, H3), 3.80-3.71 (m, 4H, 2H6, 2H β), 3.69-3.55 (m, 2H, 2H δ), 2.75 (s, 3H, NHCH₃), 2.72-2.61 (m, 2H, 2H ζ), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 1.94-1.81 (m, 2H, 2H ϵ).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ (ppm): 174.6, 174.6, 172.2 (CO), 83.9 (C1), 71.7 (C5), 69.2 (C β , C δ), 68.6 (C4), 67.8 (C3), 61.3 (C6), 54.0 (C α), 50.3 (C2), 28.5 (C ϵ), 26.8 (C ζ), 26.1 (NHCH $_3$), 22.0 (NHCOCH $_3$), 21.9 (NHCOCH $_3$).

***N*-Fmoc-*S*-(*O*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)oxopropyl)-L-cysteine *tert*-butyl ester (**67**)**



REPAIRING WAY: A solution of compound **69** (198 mg, 0.51 mmol), compound **72** (409 mg, 1.02 mmol), catechol (68 mg, 0.61 mmol) and BEt_3 (89 μL , 0.61 mmol) in CH_2Cl_2 (0.68 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt_3 (9 μL) was added and the reaction stirred until complete consumption of compound **69**. The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (8:2) as an eluent, to give protected glycoamino acid **67** (290 mg, 72%) as a white foam.

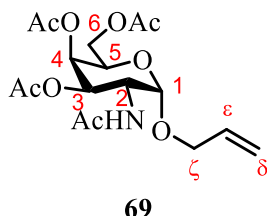
Physical data:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl_3): +87.5.

HRMS (ESI+) (m/z) 787.3102 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd. $\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}^+$: 787.3106.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.64-7.56 (m, 2H, arom), 7.44-7.37 (m, 2H, arom), 7.34-7.27 (m, 2H, arom), 5.94 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, NHAc), 5.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NHFmoc), 5.37 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H4), 5.17 (dd, $J = 11.4, 3.3$ Hz, 1H, H3), 4.87 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H1), 4.63-4.52 (m, 1H, H2), 4.54-4.44 (m, 1H, H α), 4.37 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2Fmoc), 4.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CHFmoc), 4.17-4.05 (m, 3H, H5, 2H6), 3.84-3.74 (m, 1H, H ζ), 3.54-3.43 (m, 1H, H ζ), 3.05-2.88 (m, 2H, 2H β), 2.67 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 2H δ), 2.15 (s, 3H, COCH_3), 2.02 (s, 3H, COCH_3), 1.97-1.92 (m, 6H, COCH_3 , NHCOCH_3), 1.92-1.86 (m, 2H, 2H ϵ), 1.50 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.9, 170.6, 170.5, 170.3, 170.0, 156.0 (CO), 143.9, 143.8, 141.5, 127.9, 127.2, 125.2, 120.2 (arom), 97.9 (C1), 83.2 (C), 68.5 (C3), 67.5 (C4), 67.3 (CH_2Fmoc), 66.9 (C5), 66.7 (C ζ), 62.1 (C6), 54.3 (C α), 47.9 (C2), 47.3 (CHFmoc), 34.9 (C β), 29.5 (C δ), 29.2 (C ϵ), 28.2 (CH_3), 23.4 (NHCOCH_3), 20.9, 20.9, 20.8 (COCH_3).

Allyl 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranose (**69**)

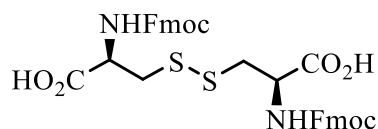
Acetic anhydride (3.5 mL, 37.00 mmol) was added over a solution of **68** (1.16 g, 4.43 mmol) in Py (7mL). The solution was stirred for 2 h at r.t. and was then concentrated and the residue purified by column chromatography using CH₂Cl₂/EtOAc (1:9) as an eluent, to give 1.54 g (90%) of compound **69** as a white solid.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 410.1450 [M+Na]⁺; calcd. C₁₇H₂₅NNaO₉⁺: 410.1422.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.91-5.80 (m, 1H, H ϵ), 5.75 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH), 5.33 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H₄), 5.26 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, H δ_{trans}), 5.20 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H δ_{cis}), 5.14 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, 1H, H₃), 4.89 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H₁), 4.58-4.49 (m, 1H, H₂), 4.18-4.10 (m, 2H, H₅, H ζ), 4.06 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 2H₆), 4.02-3.94 (m, 1H, H ζ), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.02-1.90 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃).

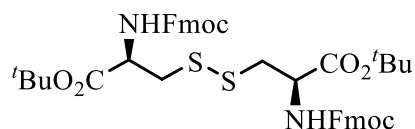
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.5, 170.4, 170.2 (CO), 133.3 (C ϵ), 118.4 (C δ), 97.0 (C₁), 68.8 (C ζ), 68.5 (C₃), 67.5 (C₄), 66.9 (C₅), 62.0 (C₆), 47.8 (C₂), 23.3 (NHCOCH₃), 20.89, 20.8, 20.7 (COCH₃).

Bis-Fmoc-L-cystine (70)**70**

Acetone/H₂O (1:1) (200 mL) was added to L-cystine (2.5 g, 10.4 mmol) and this solution was then treated with Na₂CO₃ (4.6 g, 43.8 mmol) and Fmoc-OSu (7.0 g, 20.9 mmol). The mixture was stirred for 24 h at room temperature and then concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x50 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CHCl₃/iPrOH (3:1) (3x50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **70** (6.79 g, 95%) as a white solid, which was used directly in the next reaction.

Spectroscopic data are consistent with the literature.¹⁶⁹

¹⁶⁹ Murahashi, S.I.; Zhang, D.; Iida, H.; Miyawaki, T.; Uenaka, M.; Muranoc, K.; Meguro, K. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 10295-10298.

Bis-Fmoc-L-cystine *tert*-butyl ester (71)**71**

t-Butyl alcohol (5.7 mL, 59.7 mmol) was light protected added over DCC (9.7 g, 46.59 mmol) and CuCl (144 mg, 1.45 mmol) under an inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and CH₂Cl₂ (30 mL) was then added. After that, compound **70** (6.7 g, 9.92 mmol) dissolved in dry CH₂Cl₂ (30 mL) was added over the previous solution and stirred for 4 h. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2 x 50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (7:3) as an eluent, to give compound **71** (3.92 g, 50%) as a white solid

Spectroscopic data are consistent with the literature.¹⁷⁰

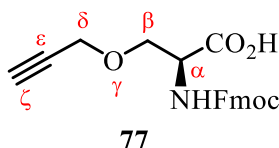
¹⁷⁰ Pattabiraman, V. R.; McKinnie, S. M. K. Vederas, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9472-9475.

***N*-Fmoc-L-cysteine *tert*-butyl ester (72)****72**

To a solution of **71** (2.10 g, 2.63 mmol) in THF (20 mL), P(n-Bu)₃ (700 μL, 2.79 mmol) was added and stirred for 2 minutes, followed by the addition of water (237 μL) and stirred for 2 additional hours. The crude product was purified by silica gel column chromatography using hexane/EtOAc (7:3) as an eluent, to give compound **72** (2.47 g, 94%) as a white solid.

Spectroscopic data are consistent with the literature.¹⁷⁰

8.4 Experimental section of Chapter 5

N-Fmoc-*O*-(propargyl)-*L*-serine-OH (**77**)

To a solution of Boc-*L*-Ser(propargyl)-OH **73** (3.8 g, 15.51 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL), trifluoroacetic acid (40 mL) was added. The resulting solution was stirred for 2 h at r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (80 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain a compound which was used directly in the next reaction. A solution of acetone/H₂O (1:1) (200 mL) was added to the previous compound and it was then treated with Na₂CO₃ (3.2 g, 30.19 mmol) and FmocOSu (5.06 g, 15.00 mmol). The mixture was stirred for 18 h at room temperature and concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x150 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3x150 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **77** (3.5 g, 67%) as a white foam.

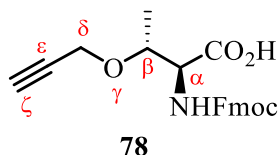
Physical data:

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, MeOH): +6.0.

HRMS (ESI+) (m/z) 366.1351 [M+H]⁺; calcd. C₂₁H₂₀NO₅⁺: 366.1336.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ (ppm): 7.81-7.76 (m, 2H, arom), 7.71-7.61 (m, 2H, arom), 7.41-7.35 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 4.42 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H, 1H, H_α), 4.39-4.31 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.19 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, 2Hδ), 3.92 (dd, *J* = 9.7, 5.1 Hz, 1H, H_β), 3.82 (dd, *J* = 9.6, 3.6 Hz, 1H, H_β), 2.86 (s, 1H, H_ζ).

¹³C NMR (100 MHz, Methanol-d₄) δ (ppm): 173.2, 158.6 (CO), 145.3, 145.2, 142.6, 128.8, 128.2, 128.1, 126.3, 120.9 (arom), 80.1 (C_ε), 76.3 (C_ζ), 70.4 (C_β), 68.2 (CH₂Fmoc), 59.2 (C_δ), 55.7 (C_α), 48.4 (CH_{Fmoc}).

***N*-Fmoc-*O*-(propargyl)-*L*-threonine-OH (**78**)**

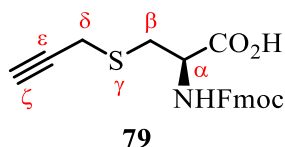
To a solution of Boc-*L*-Thr(propargyl)-OH **74** (7.1 g, 27.6 mmol) in CH₂Cl₂ (70 mL), trifluoroacetic acid (70 mL) was added. The resulting solution was stirred for 2 h at r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (160 mL) and then evaporated. This operation was repeated several times to obtain a compound, which was used directly in the next reaction. A solution of acetone/H₂O (1:1) (200 mL) was added to the previous compound and it was then treated with Na₂CO₃ (5.9 g, 55.2 mmol) and FmocOSu (9.3 g, 27.6 mmol). The mixture was stirred for 18 h at r.t. and concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x150 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution. This aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3x150 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **78** (3.4 g, 70%) as a white foam.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 380.1503 [M+H]⁺; calcd. C₂₂H₂₂NO₅⁺: 380.1492.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.84 (bs, 1H, CO₂H), 7.80-7.73 (m, 2H, arom), 7.68-7.59 (m, 2H, arom), 7.44-7.37 (m, 2H, arom), 7.36-7.29 (m, 2H, arom), 5.61 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NHFmoc), 4.57-4.34 (m, 4H, H_α, CH₂Fmoc), 4.31-4.00 (m, 3H, 2H_β, CH_{Fmoc}), 2.46 (s, 1H, H_ζ), 1.29 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.7, 157.0 (CO), 143.9, 143.8, 141.4, 127.8, 127.2, 127.2, 125.3, 125.2, 120.1 (arom), 79.1 (C_ε), 75.1 (C_ζ), 74.1 (C_β), 67.5 (CH₂Fmoc), 58.6 (C_α), 56.5 (C_δ), 47.2 (CH_{Fmoc}), 16.1 (Me).

***N*-Fmoc-*S*-(propargyl)-*L*-cysteine-OH (79)**

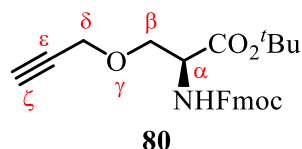
Acetone/H₂O (1:1) (150 mL) was added over ***S*-(propargyl)-*L*-Cys-OH** (2.1 g, 13.19 mmol) and the solution was treated with Na₂CO₃ (2.8 g, 26.38 mmol) and FmocOSu (4.45 g, 13.19 mmol). The mixture was stirred for 18 h at r.t. and then concentrated. The crude mixture was diluted with H₂O and extracted with Et₂O (3x50 mL). The aqueous layer was then acidified to pH 3-4 with a 10% KHSO₄ solution and extracted with CH₂Cl₂ (3x50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give compound **79** (4.88 g, 97%) as a white foam.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 382.1105 [M+H]⁺; calcd. C₂₁H₂₀NO₄S⁺: 382.1108.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.29 (bs, 1H, CO₂H), 7.80-7.73 (m, 2H, arom), 7.62-7.56 (m, 2H, arom), 7.47-7.36 (m, 2H, arom), 7.35-7.29 (m, 2H, arom), 5.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NHFmoc), 4.69 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H_α), 4.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂Fmoc), 4.23 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 3.34-3.22 (m, 3H, 2H_δ, H_β), 3.19-3.12 (m, 1H, H_β), 2.25 (s, 1H, H_ζ).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.3, 156.2 (CO), 143.8, 143.7, 141.5, 127.9, 127.3, 125.2, 120.2 (arom), 79.3 (C_ε), 72.4 (C_ζ), 67.5 (CH₂Fmoc), 53.5 (C_α), 47.2 (CH_{Fmoc}), 33.8 (C_β), 20.3 (C_δ).

***N*-Fmoc-*O*-(propargyl)-*L*-serine-*O*^tBu (**80**)**

^tButyl alcohol (2.1 mL, 21.88 mmol) was light protected added over DCC (3.5 g, 16.80 mmol) and CuCl (55 mg, 0.55 mmol) under an inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and CH₂Cl₂ (6 mL) was then added. After that, compound **77** (2.0 g, 5.47 mmol), dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL), was added over the previous solution and stirred for 4 additional hours. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2 x 50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as an eluent, to give compound **80** (1.54 g, 68%) as a white solid.

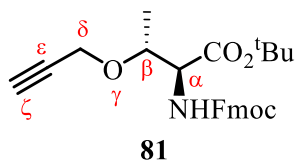
Physical data:

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +11.3.

HRMS (ESI+) (m/z) 422.1951 [M+H]⁺; calcd. C₂₅H₂₈NO₅⁺: 422.1962.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78-7.71 (m, 2H, arom), 7.67-7.56 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 5.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NHFmoc), 4.49 (dt, *J* = 8.6, 3.1 Hz, 1H, H_α), 4.46-4.35 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.21-4.05 (m, 2H, 2H_δ), 4.01 (dd, *J* = 9.4, 3.3 Hz, 1H, H_β), 3.76 (dd, *J* = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H_β), 2.47 (s, 1H, H_ζ), 1.51 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.9, 155.9 (CO), 143.8 143.7, 141.1, 127.5, 126.9, 125.1, 125.1, 119.8 (arom), 82.2 (C), 79.0 (C_ε), 75.1 (C_ζ), 69.7 (C_β), 67.0 (CH₂Fmoc), 58.3 (C_δ), 54.6 (C_α), 47.0 (CH_{Fmoc}), 27.8 (CH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(propargyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (**81**)**

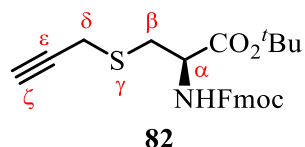
¹Butyl alcohol (3.5 mL, 36.7 mmol) was light protected added over DCC (5.8 g, 27.8 mmol) and CuCl (104 mg, 1.05 mmol) under an inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and CH₂Cl₂ (12 mL) was then added. After that, compound **78** (3.4 g, 8.96 mmol), dissolved in dry CH₂Cl₂ (12 mL), was added over the previous solution and stirred for 4 additional hours. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2x100 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as an eluent, to give compound **81** (3.3 g, 85%) as a white foam.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 436.2129 [M+H]⁺; calcd. C₂₆H₃₀NO₅⁺: 436.2118.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.80-7.74 (m, 2H, arom), 7.68-7.59 (m, 2H, arom), 7.44-7.37 (m, 2H, arom), 7.35-7.29 (m, 2H, arom), 5.51 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NHFmoc), 4.44-4.37 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.36-4.28 (m, 2H, H_α, H_β), 4.28-4.09 (m, 3H, 2H_δ, CH_{Fmoc}), 2.44 (s, 1H, H_ζ), 1.51 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.25 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.6, 156.9 (CO), 144.1, 143.9, 141.4, 127.8, 127.2, 127.1, 125.3, 125.3, 120.1, 120.0 (arom), 82.3 (C), 79.4 (C_ε), 74.8 (C_ζ), 74.1 (C_β), 67.3 (CH₂Fmoc), 59.1 (C_α), 55.9 (C_δ), 47.3 (CH_{Fmoc}), 28.1 (CH₃), 15.8 (Me).

***N*-Fmoc-*S*-(propargyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**82**)**

Butyl alcohol (2.1 mL, 21.88 mmol) was light protected added over DCC (3.5 g, 16.80 mmol) and CuCl (55 mg, 0.55 mmol) under an inert atmosphere, and the resulting mixture was stirred for 5 days and CH₂Cl₂ (6 mL) was then added. After that, compound **79** (2.1 g, 5.47 mmol), dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL), was added over the previous solution and stirred for 4 additional hours. The dicyclohexylurea byproduct was removed by filtration over celite, and the solution was washed with NaHCO₃ sat. (2x50 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) as an eluent, to give compound **82** (1.20 g, 50%) as a white solid.

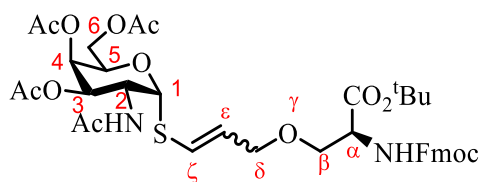
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 438.1731 [M+H]⁺; calcd. C₂₅H₂₈NO₄S⁺: 438.1734.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.66-7.56 (m, 2H, arom), 7.43-7.38 (m, 2H, arom), 7.36-7.28 (m, 2H, arom), 5.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NHFmoc), 4.60-4.50 (m, 1H, H_α), 4.48-4.34 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 3.37-3.18 (m, 3H, 2H_δ, H_β), 3.10 (dd, *J* = 14.0, 5.6 Hz, 1H, H_β), 2.25 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_ζ), 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.8, 155.9 (CO), 144.0, 143.9, 141.4, 127.9, 127.2, 125.2, 120.1 (arom), 83.2 (C), 79.5 (C_ε), 72.0 (C_ζ), 67.2 (CH₂Fmoc), 54.2 (C_α), 47.3 (CH_{Fmoc}), 34.2 (C_β), 28.1 (CH₃), 20.2 (C_δ).

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-serine *tert*-butyl ester (**84**)**



84

THERMAL WAY: A solution of **80** (101 mg, 0.24 mmol), compound **50** (148 mg, 0.41 mmol) and AIBN (48 mg, 0.29 mmol) in degasified CHCl₃ (5 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (48 mg, 0.29 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **84** (66 mg, 35%) as a white foam.

PHOTOCHEMICAL WAY: A solution of compound **80** (260 mg, 0.62 mmol), compound **50** (269 mg, 0.74 mmol) and DPAP (63 mg, 0.25 mmol) in degasified CH₂Cl₂ (1.7 mL) was irradiated at λ_{max} 365 nm. The reaction mixture was then concentrated and the residue was chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **84** (166 mg, 35%) as a white foam.

REPAIRING WAY: A solution of compound **80** (101 mg, 0.24 mmol), compound **50** (175 mg, 0.48 mmol), catechol (32 mg, 0.29 mmol) and BEt₃ (42 μ L, 0.29 mmol) in CH₂Cl₂ (0.32 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt₃ (4 μ L) was added (until complete consumption of compound **80**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (6:4) as an eluent, to give protected glycoamino acid **84** (28 mg, 15%) as a white foam.

Both isomers were quantified by ¹H NMR and HSQC experiments, and the ratio between *Z/E* isomers was **50/50**.

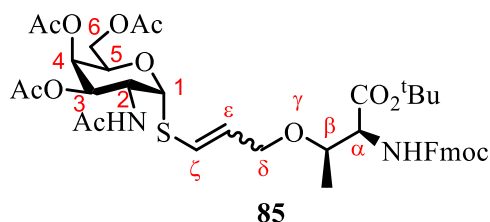
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 785.2950 [*M*+*H*]⁺; calcd. C₃₉H₄₉N₂O₁₃S⁺: 785.2955.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76-7.69 (m, 2H, arom), 7.63-7.55 (m, 2H, arom), 7.41-7.34 (m, 2H, arom), 7.32-7.26 (m, 2H, arom), 6.22-6.13 (m, 1H, H_ζ_{Z/E}), 5.89 (dd, *J* = 8.6, 3.8 Hz, 1H, NHAc), 5.86-5.76 (m, 1H, H_ε_{Z/E}), 5.78-5.64 (m, 1H, H₁, NHFmoc), 5.38 (s, 1H, H₄), 5.13-4.99 (m, 1H, H₃), 4.80-4.72 (m, 1H, H₂), 4.46-4.30 (m, 4H, H₅, CH₂_{Fmoc}, H_α), 4.22 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.16-3.97 (m, 4H, 2H₆, 2H_δ_{Z/E}), 3.88-3.76 (m, 1H, H_β), 3.72-3.61 (m, 1H, H_β), 2.13 (d, *J* = 5.3 Hz, 3H, COCH₃), 2.03-1.91 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.46 (d, *J* = 4.5 Hz, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.3, 170.3, 170.2, 156.0 (CO), 143.9, 143.9, 141.3 (arom), 129.0 (C_ε), 127.7 (arom), 127.6 (C_ε_Z), 127.1, 125.2 (arom), 123.7, 123.4 (C_ζ_Z, C_ζ_E), 120.0 (arom), 85.3 (C₁), 82.4 (C), 71.5 (C_δ_E), 70.5, 70.4 (C_β), 68.3 (C₃), 68.2 (C_δ_Z), 67.8 (C₅), 67.2, 67.1 (C₄, CH₂_{Fmoc}), 61.6 (C₆), 54.9 (C_α), 48.4 (C₂), 47.2 (CH_{Fmoc}), 28.1 (CH₃), 23.2 (NHCOCH₃), 20.8, 20.7, 20.7 (COCH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-threonine *tert*-butyl ester (**85**)**



THERMAL WAY: A solution of **81** (100 mg, 0.23 mmol), compound **50** (128 mg, 0.35 mmol) and AIBN (42 mg, 0.25 mmol) in degasified CHCl₃ (5 mL) was heated at reflux. After stirring for 3 h, another portion of AIBN (42 mg, 0.25 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 additional hours. The reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **85** (53 mg, 29%) as a white foam.

REPAIRING WAY: A solution of compound **81** (174 mg, 0.40 mmol), compound **50** (290 mg, 0.80 mmol), catechol (53 mg, 0.48 mmol) and BEt₃ (70 μ L, 0.48 mmol) in CH₂Cl₂ (0.65 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt₃ (7 μ L) was added (until complete consumption of compound **81**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (6:4) as an eluent, to give protected glycoamino acid **85** (39 mg, 12%) as a white foam.

Both isomers were quantified by ¹H NMR and HSQC experiments, and the ratio between *Z/E* isomers was **42/58**.

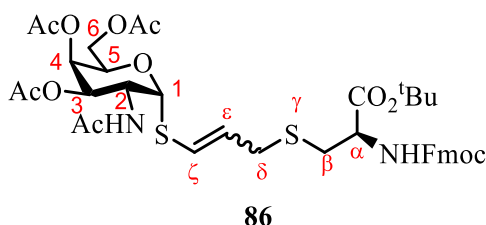
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 799.3097 [M+H]⁺; calcd. C₄₀H₅₁N₂O₁₃S⁺: 799.3106.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.77-7.71 (m, 2H, arom), 7.65-7.56 (m, 2H, arom), 7.41-7.35 (m, 2H, arom), 7.33-7.27 (m, 2H, arom), 6.22-6.08 (m, 1H, H _{ϵ / z / e}), 5.86-5.75 (m, 1H, H _{ζ / z / e}), 5.69 (dd, *J* = 11.4, 5.3 Hz, 1H, H1), 5.63-5.46 (m, 1H, NH), 5.40 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H4), 5.14-5.00 (m, 1H, H3), 4.83-4.72 (m, 1H, H2), 4.50-4.34 (m, 3H, H5, CH₂Fmoc), 4.29-4.20 (m, 2H, H α , CH_{Fmoc}), 4.20-3.83 (m, 5H, H β , 2H6, 2H δ), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.04-1.93 (m, 9H, COCH₃, NHCOCH₃), 1.47 (d, *J* = 7.6 Hz, 9H, C(CH₃)₃), 1.23 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, Me).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.1, 170.4, 170.4 170.3, 170.2, 169.8, 169.7, 156.8, 156.8 (CO), 144.1, 143.9, 141.4, 129.6, 128.1, 127.8, 127.1, 125.2, 123.2, 123.1, 120.0 (arom, $\text{C}\zeta_{\text{E/Z}}$, $\text{C}\varepsilon_{\text{E/Z}}$), 85.6 (C1), 82.2 (C), 75.1 (C β), 69.4 (C δ_{Z}), 68.4, 68.3 (C3), 68.0 (C5), 67.2, 67.1 (C4, $\text{CH}_{2\text{Fmoc}}$), 66.1 (C δ_{E}), 61.6 (C6), 59.1 (C α), 48.5 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 28.2 (CH_3), 23.3 (NHCOCH_3), 20.8, 20.8, 20.7, 20.7 (COCH_3), 16.6 (Me).

***N*-Fmoc-*S*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**86**)**



THERMAL WAY: A solution of **82** (55 mg, 0.13 mmol), compound **50** (69 mg, 0.19 mmol) and AIBN (25 mg, 0.15 mmol) in degasified CHCl₃ (1 mL) was heated at reflux. After stirring for 4 h, the reaction mixture was cooled, concentrated and then chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) as an eluent to give protected glycoamino acid **86** (29 mg, 28%) as a white foam.

REPAIRING WAY: A solution of compound **82** (100 mg, 0.23 mmol), compound **50** (166 mg, 0.46 mmol), catechol (30 mg, 0.28 mmol) and BEt₃ (40 μL, 0.28 mmol) in CH₂Cl₂ (0.31 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 1 h, another portion of BEt₃ (4 μL) was added (until complete consumption of compound **82**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (6:4) as an eluent, to give protected glycoamino acid **86** (15 mg, 8%) as a white foam.

Both isomers were quantified by ¹H NMR and HSQC experiments, and the ratio between *Z/E* isomers was **54/46**.

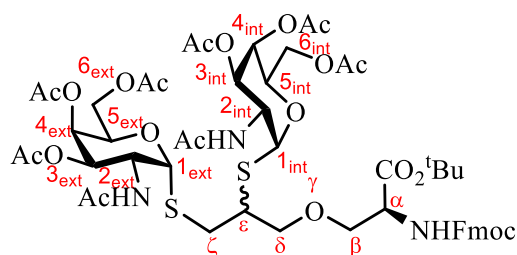
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 801.2727 [M+H]⁺; calcd. C₃₉H₄₉N₂O₁₂S₂⁺: 801.2721.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78-7.70 (m, 2H, arom), 7.64-7.57 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.33-7.27 (m, 2H, arom), 6.16-5.56 (m, 5H, H_ε/*Z/E*, H_ζ/*Z/E*, NHFmoc, NHAc, H1), 5.40 (s, 1H, H4), 5.15-4.94 (m, 1H, H3), 4.86-4.68 (m, 1H, H2), 4.55-4.50 (m, 1H, H_α), 4.47-4.35 (m, 3H, CH₂Fmoc, H5), 4.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.16-3.99 (m, 2H, 2H6), 3.35-2.79 (m, 4H, 2H_δ, 2H_β), 2.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 3H, COCH₃), 2.06-1.90 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.48 (d, *J* = 2.4 Hz, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.8, 170.4, 170.3, 170.1, 169.7, 169.6, 155.6 (CO), 143.8, 143.7, 141.2, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9 (arom, C_ζ_{Z/E}, C_ε_{Z/E}), 85.5 (C1), 82.9 (C), 68.1, 68.0, 67.7, 67.0 (C5, C4, C3, CH₂Fmoc), 61.5 (C6), 54.3 (C_α), 48.3 (C2), 47.1 (CH_{Fmoc}), 33.9, 29.6 (C_δ, C_β), 27.9 (CH₃), 23.2 (NHCOCH₃), 20.7, 20.6 (COCH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(bis-*S*-(2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-L-serine *tert*-butyl ester (**87**)**



87

A solution of compound **80** (250 mg, 0.59 mmol), compound **50** (711 mg, 1.95 mmol), catechol (98 mg, 0.71 mmol) and BEt_3 (103 μL , 0.71 mmol) in CH_2Cl_2 (0.79 mL) was stirred at room temperature. After stirring for 2 h, another portion of BEt_3 (10 μL , 0.07 mmol) was added (until complete consumption of compound **80**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) as an eluent to give protected dithiolglycoamino acid **87** (599 mg, 88%) as a white foam.

Both diastereomers were quantified by ^1H NMR and HSQC experiments, and the ratio between epimers was **50/50**.

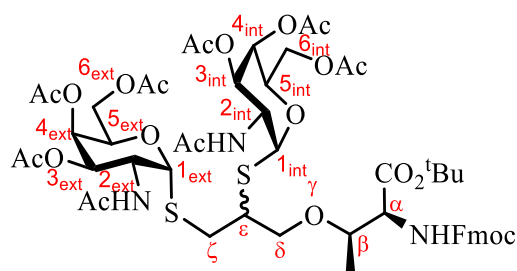
Physical data:

HRMS (ESI+) (m/z) 1148.3922 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calcd. $\text{C}_{53}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_{21}\text{S}_2^+$: 1148.3938.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.77-7.69 (m, 2H, arom), 7.67-7.55 (m, 2H, arom), 7.40-7.34 (m, 2H, arom), 7.32-7.26 (m, 2H, arom), 6.26 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NHAc_{int}), 6.13-6.03 (m, 1H, NHFmoc), 5.98 (dd, $J = 8.3, 4.2$ Hz, 1H, NHAc_{ext}), 5.82-5.72 (m, 1H, H1_{ext}), 5.60 (d, $J = 5.3$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, H1^*_{int}), 5.56 (d, $J = 5.4$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, H1^*_{int}), 5.45-5.32 (m, 2H, $\text{H4}^*_{\text{int}}, \text{H4}_{\text{ext}}$), 5.08-4.94 (m, 2H, $\text{H3}^*_{\text{int}}, \text{H3}_{\text{ext}}$), 4.79-4.63 (m, 2H, $\text{H2}^*_{\text{int}}, \text{H2}_{\text{ext}}$), 4.57-4.43 (m, 2H, $\text{H5}^*_{\text{int}}, \text{H5}_{\text{ext}}$), 4.44-4.30 (m, 3H, $\text{H}\alpha$, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 4.27-3.98 (m, 5H, $2\text{H6}^*_{\text{int}}, 2\text{H6}_{\text{ext}}, \text{CH}_{\text{Fmoc}}$), 3.92-3.81 (m, 1H, $\text{H}\beta$), 3.75-3.51 (m, 3H, $\text{H}\beta$, $2\text{H}\delta$), 3.22-3.10 (m, 1H, $\text{H}\epsilon^*$), 3.08-2.73 (m, 2H, $2\text{H}\zeta$), 2.16-2.06 (m, 6H, 2 COCH_3), 2.04-1.93 (m, 18H, 4 COCH_3 , 2 NHCOCH_3), 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.9, 170.7, 170.6, 170.5, 170.3, 170.3, 170.2, 169.0, 156.2 (CO), 144.0, 143.9, 141.3, 127.8, 127.2, 125.4, 125.3, 125.0, 120.1 (arom), 85.7, 85.2 (C1*_{int}), 84.7, 84.1 (C1_{ext}), 82.6 (C), 73.8, 73.1 (Cδ), 71.8, 71.6 (Cβ), 68.3, 68.2 (C3_{int}, C3_{ext}), 67.5, 67.4 (C5*_{int}, C5_{ext}), 67.2, 67.2, 67.1 (C4*_{int}, C4_{ext}, CH₂Fmoc), 61.8, 61.6 (C6*_{int}, C6_{ext}), 55.0 (Cα), 48.8, 48.6, 48.5 (C2*_{int}, C2_{ext}), 47.2 (CH_{Fmoc}), 46.0, 44.9 (Cε*), 33.8, 33.7 (Cζ), 28.1 (CH₃), 23.2, 23.1 (NHCOCH₃), 20.8, 20.7 (COCH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(bis-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-L-threonine *tert*-butyl ester (**88A** and **88B**)**



88A, 88B

A solution of compound **81** (190 mg, 0.44 mmol), compound **50** (490 mg, 1.35 mmol), catechol (57 mg, 0.52 mmol) and BEt_3 (76 μL , 0.52 mmol) in CH_2Cl_2 (0.58 mL) was stirred at r.t. After stirring for 2 h, another portion of BEt_3 (7 μL , 0.05 mmol) was added (until complete consumption of compound **81**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5:95) as an eluent to give protected dithioglycoamino acid **88** (432 mg, 85%) as a white foam.

Both diastereomers were quantified by ^1H NMR and HSQC experiments, and the ratio between epimers was **50/50** and was isolated after purification by reversed phase HPLC.

Semi-preparative HPLC: t_{R} A = 28.9 t_{R} B = 30.4 min. Isocratic method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	60	40
35	10	60	40

Physical data:

HRMS (ESI+) (m/z) 1162.4094 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calcd. $\text{C}_{54}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{O}_{21}\text{S}_2^+$: 1162.4095.

Compound **88A**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.77-7.72 (m, 2H, arom), 7.68-7.60 (m, 2H, arom), 7.41-7.35 (m, 2H, arom), 7.33-7.28 (m, 2H, arom), 6.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NHAc_{int}), 6.04 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, NHFmoc), 5.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NHAc_{ext}), 5.77 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H1_{ext}), 5.64 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H1_{int}), 5.45-5.34 (m, 2H, H4_{int}, H4_{ext}), 5.05 (dd, $J = 11.8, 3.3$ Hz, 2H, H3_{int}, H3_{ext}), 4.80-4.66 (m, 2H, H2_{int}, H2_{ext}), 4.58 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H5_{int} or H5_{ext}), 4.52 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H5_{int} or H5_{ext}), 4.39 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂Fmoc), 4.36-4.21 (m, 2H, H α , CH_{Fmoc}), 4.16-3.95 (m, 5H, 2H6_{int}, 2H6_{ext}, H β), 3.73 (dd, $J = 9.5, 5.9$ Hz, 1H, H δ), 3.47 (dd, $J = 9.4, 6.2$ Hz, 1H, H δ), 3.11 (dd, $J = 8.3, 5.6$ Hz, 1H, H ϵ), 2.95 (dd, $J = 13.0, 5.6$ Hz, 1H, H ζ), 2.74 (dd, $J = 13.1, 8.5$ Hz, 1H, H ζ), 2.13 (m, 6H, 2 COCH₃), 2.05-1.94 (m, 18H, 4 COCH₃, 2 NHCOCH₃), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.20 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, Me).

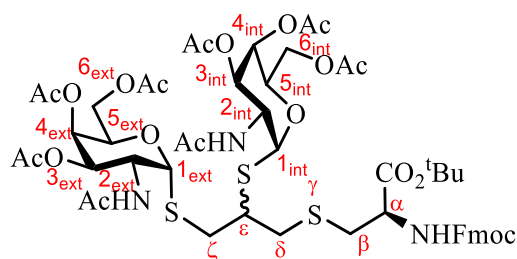
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.3, 171.1, 170.9, 170.9, 170.6, 170.3, 170.2, 169.6, 157.0 (CO), 144.1, 144.0, 141.4, 141.4, 127.8, 127.2, 127.1, 125.4, 125.4, 120.1 (arom), 85.8 (C1_{int}), 84.4 (C1_{ext}), 82.3 (C), 76.5 (C β), 72.2 (C δ), 68.4, 68.3 (C3_{int}, C3_{ext}), 67.4, 67.3, 67.1 (C4_{int}, C4_{ext}, C5_{int}, C5_{ext}, CH₂Fmoc), 61.8, 61.2 (C6_{int}, C6_{ext}), 59.2 (C α), 48.9, 48.5 (C2_{int}, C2_{ext}), 47.3 (CH_{Fmoc}), 45.3 (C ϵ), 33.7 (C ζ), 28.2 (CH₃), 23.2 (NHCOCH₃), 21.2, 20.9, 20.8, 20.8 (COCH₃), 16.3 (Me).

Compound 88B

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78-7.72 (m, 2H, arom), 7.66-7.57 (m, 2H, arom), 7.41-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 6.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NHAc_{ext}), 5.96 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NHAc_{int}), 5.87 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, NHFmoc), 5.79 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H1_{ext}), 5.57 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H1_{int}), 5.40 (s, 2H, H4_{int}, H4_{ext}), 5.07 (dd, $J = 11.7, 3.2$ Hz, 1H, H3_{int}), 5.01 (dd, $J = 11.8, 3.3$ Hz, 1H, H3_{ext}), 4.79-4.66 (m, 2H, H2_{int}, H2_{ext}), 4.56-4.47 (m, 2H, H5_{int}, H5_{ext}), 4.46-4.35 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.30-4.18 (m, 4H, H α , CH_{Fmoc}, 2H6), 4.08-3.97 (m, 3H, 2H6, H β), 3.68 (dd, $J = 9.9, 5.9$ Hz, 1H, H δ), 3.60 (dd, $J = 9.6, 4.1$ Hz, 1H, H δ), 3.15-3.05 (m, 2H, H ϵ , H ζ), 2.92-2.83 (m, 1H, H ζ), 2.11 (d, $J = 3.3$ Hz, 6H, 2 COCH₃), 2.06-1.93 (m, 18H, 4 COCH₃, 2 NHCOCH₃), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.3, 171.1, 171.0, 170.8, 170.5, 170.3, 169.7, 157.0 (CO), 144.1, 143.9, 141.4, 127.8, 127.2, 125.3, 120.1 (arom), 84.9 (C1_{int}), 84.6 (C1_{ext}), 82.4 (C), 76.1 (C β), 70.9 (C δ), 68.3, 68.2 (C3_{int}, C3_{ext}), 67.6, 67.5 (C5_{int}, C5_{ext}), 67.3, 67.2, 67.2 (C4_{int}, C4_{ext}, CH₂Fmoc), 61.5 (C6_{int}, C6_{ext}), 59.6 (C α), 48.9, 48.8 (C2_{int}, C2_{ext}), 47.3 (CH_{Fmoc}), 46.1 (C ϵ), 33.8 (C ζ), 28.2 (CH₃), 23.2 (NHCOCH₃), 20.8, 20.7 (COCH₃), 16.2 (Me).

***N*-Fmoc-*S*-(bis-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**89**)**



89

A solution of compound **82** (294 mg, 0.67 mmol), compound **50** (806 mg, 2.22 mmol), catechol (89 mg, 0.81 mmol) and BEt_3 (117 μL , 0.81 mmol) in CH_2Cl_2 (0.90 mL) was stirred at r.t. After stirring for 2 h, another portion of BEt_3 (11 μL , 0.08 mmol) was added (until complete consumption of compound **82**). The reaction mixture was then concentrated and the residue chromatographed on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) as an eluent to give protected dithioglycoamino acid **89** (563 mg, 72%) as a white foam.

Both diastereomers were quantified by ^1H NMR and HSQC experiments, and the ratio between epimers was **50/50**.

Physical data:

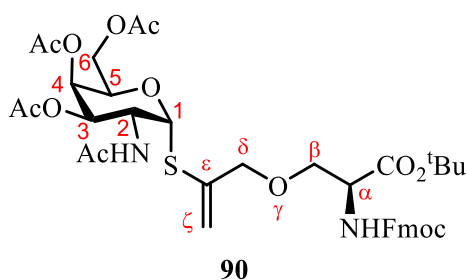
HRMS (ESI+) (m/z) 1164.3683 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calcd. $\text{C}_{53}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_{20}\text{S}_3^+$: 1164.3709.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.81-7.73 (m, 2H, arom), 7.70-7.61 (m, 2H, arom), 7.45-7.38 (m, 2H, arom), 7.37-7.31 (m, 2H, arom), 6.44-6.12 (m, 2H, NHAc_{int} , NHAc_{ext}), 6.06-5.84 (m, 2H, NHFmoc , H1_{ext}), 5.77 (d, $J = 5.6$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, H1^*_{int}), 5.67 (d, $J = 5.3$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, H1^*_{int}), 5.48-5.36 (m, 2H, H4^*_{int} , H4_{ext}), 5.16-5.00 (m, 2H, H3^*_{int} , H4_{ext}), 4.85-4.69 (m, 2H, H2^*_{int} , H2_{ext}), 4.62-4.46 (m, 3H, H5^*_{int} , H5_{ext} , $\text{H}\alpha$), 4.40 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2Fmoc), 4.33-4.02 (m, 5H, $2\text{H6}^*_{\text{int}}$, 2H6_{ext} , CH_{Fmoc}), 3.43-3.18 (m, 1H, $\text{H}\epsilon^*$), 3.14-2.89 (m, 6H, $2\text{H}\zeta$, $2\text{H}\beta$, $2\text{H}\delta$), 2.16 (d, $J = 3.5$ Hz, 6H, 2 COCH_3), 2.12-1.96 (m, 18H, 4 COCH_3 , 2 NHCOCH_3), 1.52 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.9, 170.7, 170.7, 170.6, 170.5, 170.5, 170.4, 170.4, 170.2, 170.2, 170.2, 170.1, 155.8 (CO), 143.8, 143.7, 141.2, 127.7,

127.1, 125.2, 125.1, 120.0 (arom), 85.7, 84.3 (C1*_{int}), 82.9 (C), 79.6 (C1_{ext}), 68.2 (C3_{int}, C3_{ext}), 67.8, 67.7 (C5*_{int}, C5_{ext}), 67.2, 67.2, 67.1 (C4*_{int}, C4_{ext}, CH₂Fmoc), 61.7, 61.6 (C6*_{int}, C6_{ext}), 54.7 (C α , C ϵ *), 48.3 (C2*_{int}, C2_{ext}), 47.0 (CH_{Fmoc}), 46.0 (C ϵ *), 38.1, 35.5 (C ζ , C β , C δ), 28.0 (CH₃), 23.1, 23.0 (NHCOCH₃), 20.9, 20.7, 20.6, 20.6, 20.6, 20.5 (COCH₃).

N-Fmoc-O-(S-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-O-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2-mercaptoprop-2-enyl)-L-serine tert-butyl ester (90**)**



A solution of **80** (123 mg, 0.29 mmol), compound **50** (160 mg, 0.44 mmol) and Pd(OAc)₂ (26 mg, 0.12 mmol) in CHCl₃ (5 mL) was heated at reflux and stirred for 17 h. Then, the reaction mixture was cooled, concentrated and chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (6:4) as an eluent to give protected glycoamino acid **90** (83 mg, 36%) as a white foam. The compound **84** (25 mg, 11%) was also found as a white foam.

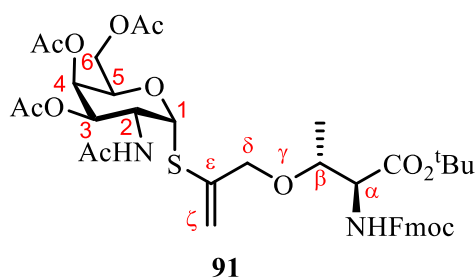
Physical data:

HRMS (ESI+) (m/z) 785.2950 [M+H]⁺; calcd. C₃₉H₄₉N₂O₁₃S⁺: 785.2955.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.66-7.57 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 5.82-5.75 (m, 3H, NHAc, NHFmoc, H1), 5.52 (s, 1H, H ζ), 5.44 (s, 1H, H ζ), 5.39 (s, 1H, H4), 5.05 (dd, J = 11.7, 2.8 Hz, 1H, H3), 4.85-4.77 (m, 1H, H2), 4.52 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H5), 4.44-4.34 (m, 3H, CH₂Fmoc, H α), 4.24 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.15-4.03 (m, 4H, 2H6, 2H δ), 3.88 (dd, J = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H β), 3.66 (dd, J = 9.3, 2.7 Hz, 1H, H β), 2.13 (s, 3H, COCH₃), 2.01-1.94 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.0, 170.4, 170.3, 169.2, 156.1 (CO), 144.0, 143.9, 141.4 (arom), 138.2 (C ϵ), 127.8, 127.2, 125.2, 120.1 (arom), 117.9 (C ζ), 85.0 (C1), 82.6 (C), 74.0 (C δ), 70.5 (C β), 68.5 (C3), 68.1 (C5), 67.3, 67.2 (C4, CH₂Fmoc), 61.7 (C6), 55.0 (C α), 48.6 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 28.1 (CH₃), 23.3 (NHCOCH₃), 20.8, 20.7 (COCH₃).

N-Fmoc-O-(S-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-O-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2-mercaptoprop-2-enyl)-L-threonine *tert*-butyl ester (91**)**



A solution of **81** (420 mg, 0.96 mmol), compound **50** (526 mg, 1.45 mmol) and Pd(OAc)₂ (87 mg, 0.39 mmol) in CHCl₃ (10 mL) was heated at reflux and stirred for 17 h. Then, the reaction mixture was cooled, concentrated and chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (6:4) as an eluent to give protected glycoamino acid **91** (236 mg, 31%) as a white foam. The compound **85** (58 mg, 8%) was also found as a white foam.

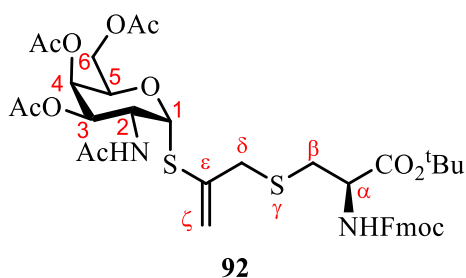
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 799.3106 [M+H]⁺; calcd. C₄₀H₅₁N₂O₁₃S⁺: 799.3097.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.67-7.61 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 5.82 (s, 1H, NHAc), 5.81-5.76 (m, 1H, H1), 5.65 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NHFmoc), 5.53 (s, 1H, H ζ), 5.43-5.38 (m, 2H, H4, H ζ), 5.05 (dd, *J* = 11.8, 3.3 Hz, 1H, H3), 4.84 (ddd, *J* = 11.7, 8.7, 5.3 Hz, 1H, H2), 4.54 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H5), 4.47-4.36 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.31-4.22 (m, 2H, H α , CH_{Fmoc}), 4.17-3.99 (m, 5H, 2H6, H β , 2H δ), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.06-1.95 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.22 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1, 170.5, 170.4, 169.8, 156.9 (CO), 144.1, 144.0, 141.4 (arom), 138.7 (C ϵ), 129.2, 128.4, 127.8, 127.2, 125.3, 120.1 (arom), 117.7 (C ζ), 85.3 (C1), 82.4 (C), 75.3 (C β), 72.1 (C δ), 68.5 (C3), 68.2 (C5), 67.3, 67.3 (C4, CH₂Fmoc), 61.7 (C6), 59.2 (C α), 48.6 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 28.2 (CH₃), 23.3 (NHCOCH₃), 20.8, 20.8 (COCH₃), 16.4 (Me).

N-Fmoc-O-(S-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-O-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2-mercaptoprop-2-enyl)-L-cysteine *tert*-butyl ester (92)



A solution of **82** (43 mg, 0.10 mmol), compound **50** (54 mg, 0.15 mmol) and Pd(OAc)₂ (9 mg, 0.04 mmol) in CHCl₃ (1 mL) was heated at reflux and stirred for 17 h. Then, the reaction mixture was cooled, concentrated and chromatographed on silica gel using EtOAc/CH₂Cl₂ (6:4) as an eluent to give protected glycoamino acid **92** (22 mg, 28%) as a white foam.

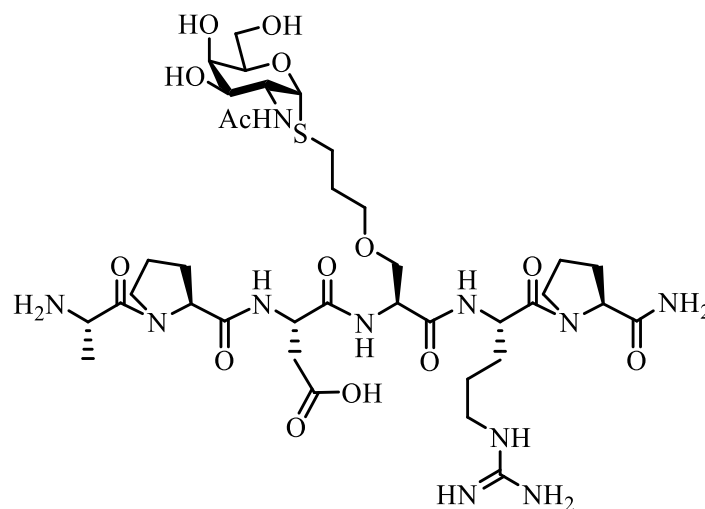
Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 801.2721 [M+H]⁺; calcd. C₃₉H₄₉N₂O₁₂S₂⁺: 801.2727.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.64-7.58 (m, 2H, arom), 7.43-7.37 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 5.76 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H1), 5.68 (dd, *J* = 14.6, 8.3 Hz, 1H NHAc, NHFmoc), 5.43-5.34 (m, 3H, H4, 2H ζ), 5.05 (dd, *J* = 11.8, 3.3 Hz, 1H, H3), 4.86-4.76 (m, 1H, H2), 4.54 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H5), 4.51-4.42 (m, 1H, H α), 4.40 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂Fmoc), 4.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.17-4.01 (m, 2H, 2H δ), 3.44-3.30 (m, 2H, 2H δ), 2.92 (dd, *J* = 13.9, 4.9 Hz, 1H, H β), 2.85 (dd, *J* = 14.0, 5.7 Hz, 1H, H β), 2.14 (s, 3H, COCH₃), 2.03-1.92 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1, 170.5, 170.1, 170.3, 169.7, 155.9 (CO), 143.9, 141.4 (arom), 138.7 (C ϵ), 127.9, 127.2, 125.2, 120.1 (arom), 118.9 (C ζ), 86.1 (C1), 83.1 (C), 68.5 (C3), 68.3 (C5), 67.3, 67.3 (C4, CH₂Fmoc), 61.8 (C6), 54.3 (C α), 48.7 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 40.0 (C δ), 33.6 (C β), 28.1 (CH₃), 23.4 (NHCOCH₃), 20.9, 20.8 (COCH₃).

8.5 Experimental section of Chapter 6

Ala-Pro-Asp-Ser(*O*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (**93**)**93**

Following SPPS methodology with Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (649 mg, 1 mmol), compound **98** (146 mg, 0.2 mmol), Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (412 mg, 1 mmol), Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), peptide **93** was obtained with a 67% yield after purification by reversed phase HPLC and lyophilization.

Semi-preparative HPLC: $t_R = 25.7$ min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	02	98
27	10	13	87

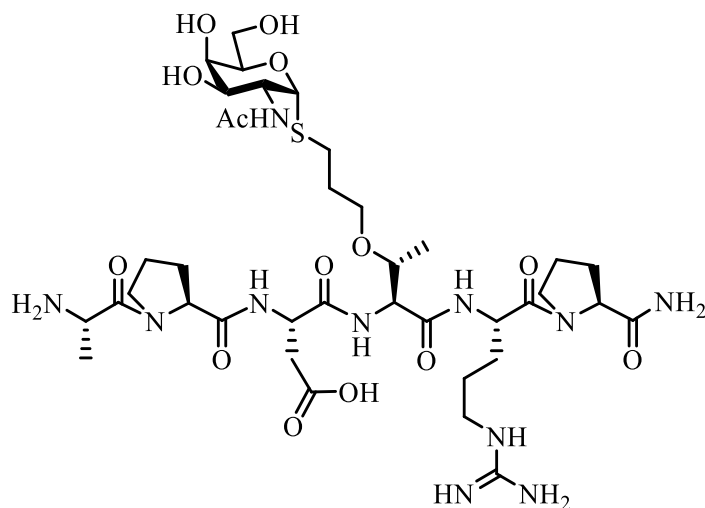
Physical data:

HRMS (ESI+) (m/z) 459.7210 [$M+2H$]²⁺; calcd. C₃₇H₆₅N₁₁O₁₄S²⁺: 459.7211.

¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1) δ (ppm) amide protons: 8.60 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, NHAsp), 8.31-8.20 (m, 3H, NHSer, NHArg, NHCOCH₃), 7.69 (s, 1H, CONH₂), 7.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, NHεArg), 7.01 (s, 1H, CONH₂), 6.68 (br s, 2H, NH₂ηArg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 5.50 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H1), 4.76-4.68 (m, 2H, HαAsp, HαArg), 4.53 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, HαSer), 4.51-4.47 (m, 1H, HαPro), 4.42-4.32 (m, 3H, H2, HαPro, HαAla), 4.26 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H5), 3.99 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 3.83 (dd, *J* = 11.4, 3.0 Hz, 1H, H3), 3.81-3.70 (m, 6H, 2H6, HδPro, HδPro, 2HβSer), 3.69-3.55 (m, 4H, HδPro, HδPro, 2HδSer), 3.27-3.17 (m, 2H, 2HδArg), 2.98 (dd, *J* = 17.1, 6.4 Hz, 1H, HβAsp), 2.89 (dd, *J* = 17.1, 6.9 Hz, 1H, HβAsp), 2.72-2.56 (m, 2H, HζSer), 2.39-2.26 (m, 2H, HβPro, HβPro), 2.11-1.80 (m, 12H, NHCOCH₃, 2HβArg, 2HεSer, HβPro, HβPro, 2HγPro, HγPro), 1.79-1.59 (m, 3H, HγPro, 2HγArg), 1.55 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 3HβAla).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 176.8, 174.5, 173.8, 173.6, 172.2, 171.1, 170.0, 169.3 (8 CO), 156.7 (CζArg), 83.9 (C1), 71.7 (C5), 69.5 (CδSer), 69.1 (CβSer), 68.5 (C4), 67.7 (C3), 61.2 (C6), 60.4 (CαPro), 60.4 (CαPro), 53.6 (CαSer), 51.0 (CαArg), 50.2 (C2), 50.0 (CαAsp), 48.1 (CαAla), 47.9 (CδPro), 47.8 (CδPro), 40.6 (CδArg), 35.2 (CβAsp), 29.6 (CβPro), 29.4 (CβPro), 28.7 (CεSer), 27.7 (CγPro), 26.9 (CζSer), 24.7, 24.6 (CβArg, CγPro), 24.0 (CγArg), 21.9 (NHCOCH₃), 15.1 (CβAla).

Ala-Pro-Asp-Thr(*O*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (94)**94**

Following SPPS methodology with Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (649 mg, 1 mmol), compound **99** (149 mg, 0.2 mmol), Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (412 mg, 1 mmol), Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), glycopeptide **94** was obtained with a 62% yield after purification by reversed phase HPLC and lyophilization.

Semi-preparative HPLC: $t_R = 29.7$ min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	02	98
27	10	13	87
32	10	70	30

Physical data:

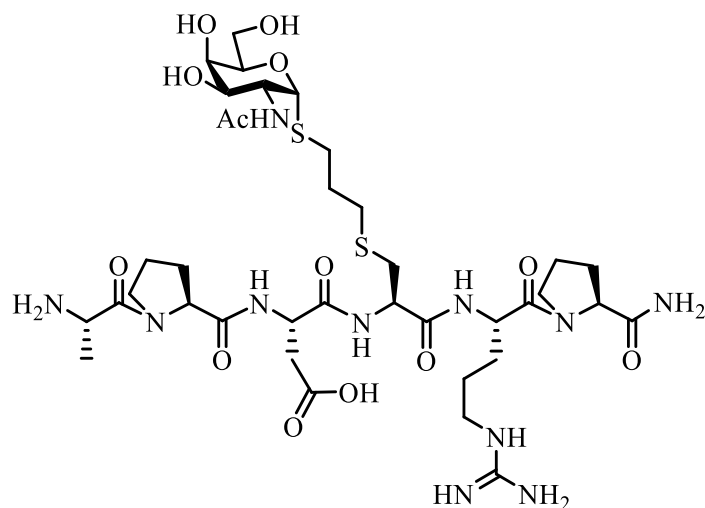
HRMS (ESI⁺) (m/z) 932.4506 [M+H]⁺; calcd. C₃₈H₆₆N₁₁O₁₄S⁺: 932.4506.

¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1) δ (ppm) amide protons: 8.71 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NHAsp), 8.23 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NHCOCH₃), 8.18 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NHArg),

8.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NHThr), 7.68 (s, 1H, CONH₂), 7.21 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, NH ϵ Arg), 7.01 (s, 1H, CONH₂), 6.67 (br s, 2H, NH₂ η Arg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 5.45 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H1), 4.78-4.74 (m, 1H, H α Asp), 4.65 (dd, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 1H, H α Arg), 4.46 (dd, $J = 8.1, 6.3$ Hz, 1H, H α Pro), 4.40-4.28 (m, 4H, H2, H α Thr, H α Pro, H α Ala), 4.22 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H5), 4.01-3.94 (m, 2H, H β Thr, H4), 3.79 (dd, $J = 11.4, 3.1$ Hz, 1H, H3), 3.76-3.55 (m, 7H, 2H6, 2H δ Pro, 2H δ Pro, H δ Thr), 3.46-3.38 (m, 1H, H δ Thr), 3.23-3.15 (m, 2H, 2H δ Arg), 2.97 (dd, $J = 17.1, 7.0$ Hz, 1H, H β Asp), 2.87 (dd, $J = 17.1, 6.6$ Hz, 1H, H β Asp), 2.69-2.50 (m, 2H, 2H ζ Thr), 2.36-2.22 (m, 2H, H β Pro, H β Pro), 2.08-1.71 (m, 13H, NHCOCH₃, 2H β Arg, 2H ϵ Thr, H β Pro, H β Pro, 2H γ Pro, 2H γ Pro), 1.70-1.57 (m, 2H, 2H γ Arg), 1.51 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 3H β Ala), 1.13 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, 3H γ Thr).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 176.7, 174.5, 173.8, 173.5, 172.5, 171.2, 171.1, 169.2 (8 CO), 156.7 (C ζ Arg), 83.9 (C1), 74.8 (C β Thr), 71.7 (C5), 68.4 (C4), 67.6 (C3), 67.4 (C δ Thr), 61.1 (C6), 60.2 (C α Pro, C α Pro), 57.8 (C α Thr), 51.1 (C α Arg), 50.2 (C2), 49.9 (C α Asp), 48.0 (C α Ala), 47.9 (C δ Pro), 47.6 (C δ Pro), 40.6 (C δ Arg), 35.0 (C β Asp), 29.6 (C β Pro), 29.4 (C β Pro), 29.0 (C ϵ Thr), 27.6 (C γ Pro), 26.9 (C ζ Thr), 24.7, 24.6 (C β Arg, C γ Pro), 24.1 (C γ Arg), 21.9 (NHCOCH₃), 15.7 (C γ Thr), 15.0 (C β Ala).

Ala-Pro-Asp-Cys(S-mercaptopropyl- α -S-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (95)**95**

Following SPPS methodology with Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (649 mg, 1 mmol), compound **100** (149 mg, 0.2 mmol), Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (412 mg, 1 mmol), Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), peptide **95** was obtained with a 63% yield after purification by reversed phase HPLC and lyophilization.

Semi-preparative HPLC: t_R = 30.3 min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	02	98
27	10	13	87
32	10	70	30

Physical data:

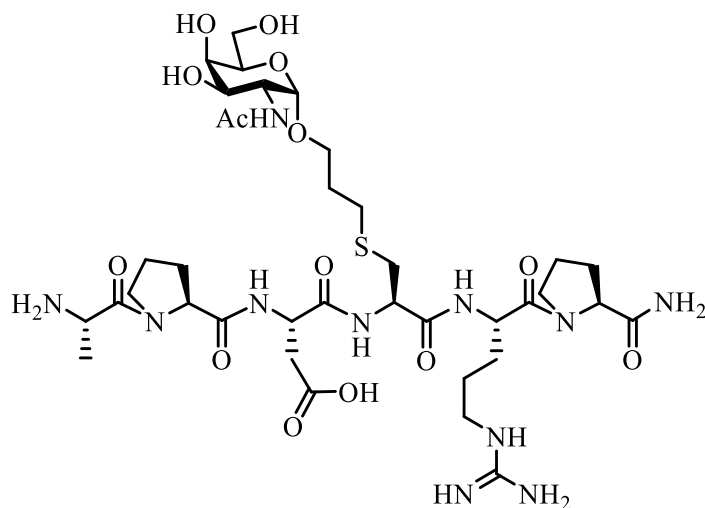
HRMS (ESI⁺) (m/z) 934.4123 [M+H]⁺; calcd. C₃₇H₆₄N₁₁O₁₃S₂⁺: 934.4121.

¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1) δ (ppm) amide protons: 8.56 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NHAsp), 8.31 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NHArg), 8.18 (d, J = 7.4 Hz, 1H, NHCys), 8.13

(d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NHCOCH₃), 7.59 (s, 1H, CONH₂), 7.09 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH ϵ Arg), 6.91 (s, 1H, CONH₂), 6.57 (br s, 1H, NH₂ η Arg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 5.51 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H1), 4.74-4.66 (m, 2H, H α Asp, H α Arg), 4.55-4.47 (m, 2H, H α Cys, H α Pro), 4.41-4.31 (m, 3H, H2, H α Pro, H α Ala), 4.26 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H5), 3.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H4), 3.86-3.79 (m, 2H, H3, H δ Pro), 3.77 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, 2H6), 3.75-3.69 (m, 1H, H δ Pro), 3.69-3.60 (m, 2H, 2H δ Pro), 3.26-3.18 (m, 2H, 2H δ Arg), 3.02-2.94 (m, 2H, H β Cys, H β Asp), 2.91-2.84 (m, 2H, H β Asp, H β Cys), 2.77-2.63 (m, 4H, 2H ζ Cys, 2H δ Cys), 2.39-2.27 (m, 2H, H β Pro, H β Pro), 2.10-1.92 (m, 9H, NHCOCH₃, 2H β Arg, 2H γ Pro, 2H β Pro), 1.91-1.82 (m, 3H, 2H ϵ Cys, H γ Pro), 1.80-1.61 (m, 3H, H γ Pro, 2H γ Arg), 1.54 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 3H β Ala).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 176.8, 174.5, 173.8, 173.5, 171.9, 171.5, 171.1, 169.3 (8 CO), 156.7 (C ζ Arg), 83.9 (C1), 71.7 (C5), 68.5 (C4), 67.6 (C3), 61.2 (C6), 60.4 (C α Pro), 60.3 (C α Pro), 52.9 (C α Cys), 51.1 (C α Arg), 50.2 (C2), 49.9 (C α Asp), 48.0 (C α Ala), 47.9 (C δ Pro), 47.7 (C δ Pro), 40.6 (C δ Arg), 35.1 (C β Asp), 32.5 (C β Cys), 30.3 (C δ Cys), 29.6 (C β Pro), 29.4 (C β Pro), 29.1 (C ζ Cys), 28.6 (C ϵ Cys), 27.6 (C γ Pro), 24.7, 24.6 (C β Arg, C γ Pro), 24.1 (C γ Arg), 21.9 (NHCOCH₃), 15.1 (C β Ala).

Ala-Pro-Asp-Cys(S-mercaptopropyl- α -O-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (96)**96**

Following SPPS methodology with Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (649 mg, 1 mmol), compound **102** (146 mg, 0.2 mmol), Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (412 mg, 1 mmol), Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), peptide **96** was obtained with a 40% yield after purification by reversed phase HPLC and lyophilization.

Semi-preparative HPLC: $t_R = 28.5$ min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	02	98
27	10	13	87
32	10	70	30

Physical data:

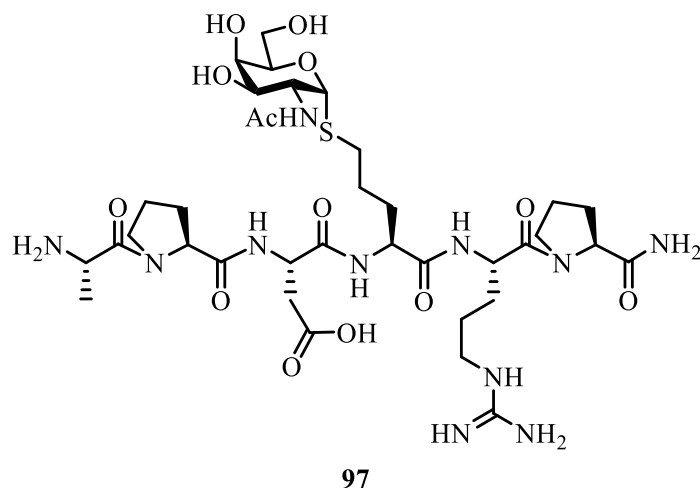
HRMS (ESI⁺) (m/z) 459.7219 [M+2H]²⁺; calcd. C₃₇H₆₅N₁₁O₁₄S²⁺: 459.7211.

¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1) δ (ppm) amide protons: 8.64 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NHAsp), 8.41 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NHArg), 8.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NHCys), 8.05

(d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NHCOCH₃), 7.70 (s, 1H, CONH₂), 7.22 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, NH ϵ Arg), 7.01 (s, 1H, CONH₂), 6.67 (s, 1H, NH₂ η Arg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 4.89 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H1), 4.71 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H α Asp, H α Arg), 4.52 (dt, $J = 18.7, 7.1$ Hz, 2H, H α Cys, H α Pro), 4.44-4.33 (m, 2H, H α Pro, H α Ala), 4.15 (dd, $J = 11.3, 3.4$ Hz, 1H, H2), 4.02-3.88 (m, 3H, H4, H5, H3), 3.86-3.60 (m, 7H, 2H δ Pro, 2H δ Pro, 2H6, H ζ Cys), 3.59-3.49 (m, 1H, H ζ Cys), 3.29-3.15 (m, 2H, 2H δ Arg), 3.06-2.80 (m, 4H, 2H β Asp, 2H β Cys), 2.73-2.60 (m, 2H, 2H δ Cys), 2.40-2.28 (m, 2H, H β Pro, H β Pro), 2.12-1.83 (m, 12H, NHCOCH₃, 2H β Arg, 2H ϵ Cys, H β Pro, H β Pro, 2H γ Pro, H γ Pro), 1.82-1.63 (m, 3H, H γ Pro, 2H γ Arg), 1.55 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 3H β Ala).

¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ (ppm): 176.8, 174.5, 174.5, 173.5, 172.2, 171.6, 171.2, 169.3 (8 CO), 156.7 (C ζ Arg), 97.0 (C1), 71.0 (C5), 68.5 (C4), 67.7 (C3), 66.3, (C ζ Cys), 61.3 (C6), 60.4 (C α Pro), 60.3 (C α Pro), 52.9 (C α Cys), 51.1 (C α Arg), 50.2 (C2), 50.0 (C α Asp), 48.0 (C α Ala), 47.9 (C δ Pro), 47.7 (C δ Pro), 40.5 (C δ Arg), 35.8 (C β Asp), 32.5 (C β Cys), 29.6 (C β Pro), 29.4 (C β Pro), 28.4 (C δ Cys), 28.3 (C ϵ Cys), 27.5 (C γ Pro), 24.7 (C β Arg, C γ Pro), 24.1 (C γ Arg), 22.0 (NHCOCH₃), 15.1 (C β Ala).

Ala-Pro-Asp-hhCys(α -S-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (**97**)

Following SPPS methodology with Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (649 mg, 1 mmol), compound **101** (140 mg, 0.2 mmol), Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (412 mg, 1 mmol), Fmoc-Pro-OH (337 mg, 1 mmol), Fmoc-Ala-OH (311 mg, 1 mmol), peptide **97** was obtained with a 59% yield after purification by reversed phase HPLC and lyophilization.

Semi-preparative HPLC: $t_R = 24.4$ min. Gradient method

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water + 0.1% TFA (%)
0	10	02	98
27	10	13	87

Physical data:

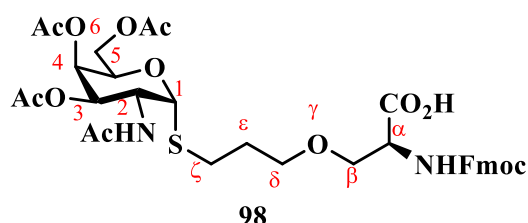
HRMS (ESI+) (m/z) 888.4251 [$M+H$]⁺; calcd. C₃₆H₆₂N₁₁O₁₃S⁺: 888.4249.

¹H NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1) δ (ppm) amide protons: 8.63 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NHAsp), 8.32 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NHArg), 8.27 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, NHhhCys), 8.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NHC(O)CH₃), 7.69 (s, 1H, CONH₂), 7.20 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH ϵ Arg), 7.00 (s, 1H, CONH₂), 6.67 (br s, 2H, NH₂ η Arg).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 5.49 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H1), 4.68-4.64 (m, 2H, HαAsp, HαArg), 4.50-4.46 (m, 1H, HαPro), 4.41-4.30 (m, 4H, H2, HαPro, HαAla, HαhhCys), 4.25 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H5), 3.98 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H4), 3.83 (dd, *J* = 11.4, 3.1 Hz, 1H, H3), 3.81-3.58 (m, 6H, 2H6, 2HδPro, 2HδPro), 3.27-3.16 (m, 2H, 2HδArg), 2.95 (dd, *J* = 17.0, 6.5 Hz, 1H, HβAsp), 2.85 (dd, *J* = 17.0, 7.1 Hz, 1H, HβAsp), 2.70-2.55 (m, 2H, 2HδhhCys), 2.38-2.27 (m, 2H, HβPro, HβPro), 2.10-1.81 (m, 11H, NHCOCH₃, 2HβhhCys, 2HγhhCys, HβPro, HβPro, HγPro, HγPro), 1.80-1.58 (m, 6H, 2HγArg, 2HβArg, HγPro, HγPro), 1.54 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 3HβAla).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 176.8, 174.5, 173.8, 173.5, 173.1, 172.0, 171.3, 169.2 (8 CO), 156.7 (CζArg), 83.6 (C1), 71.7 (C5), 68.5 (C4), 67.7 (C3), 61.2 (C6), 60.3 (CαPro), 60.3 (CαPro), 53.2 (CαhhCys), 51.0 (CαArg), 50.1 (CαAsp), 50.0 (C2), 48.0 (CαAla), 47.9 (CδPro), 47.7 (CδPro), 40.6 (CδArg), 35.1 (CβAsp), 30.0 (CγPro), 29.6 (CβPro, CβhhCys), 29.4 (CβPro), 29.4 (CδhhCys), 27.4 (CγPro), 25.0 (CβArg), 25.0 (CγhhCys), 24.1 (CγArg), 21.9 (NHCOCH₃), 15.1 (CβAla).

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-serine-OH (**98**)**



Trifluoroacetic acid (10 mL) was added over a solution of 282 mg (0.358 mmol) of **46** in 10 mL of dichloromethane and was stirred for 2 h and then concentrated. The residue was chromatographed on silica with 95:5:0.1 CH₂Cl₂/MeOH/AcOH as the eluent to give 234.4 mg (89%) of **98** as a white solid.

Physical data:

Mp: 79-81 °C.

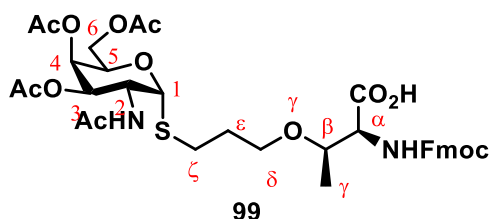
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +84.0.

HRMS (ESI+) (m/z) 731.2491 [M+H]⁺; calcd. C₃₅H₄₃N₂O₁₃S⁺: 731.2480.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.65-7.58 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 6.10 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH), 5.82 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 5.46 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H1), 5.38 (s, 1H, H4), 5.06 (dd, *J* = 11.6, 2.8 Hz, 1H, H3), 4.76-4.68 (m, 1H, H2), 4.58-4.46 (m, 2H, H α , H5), 4.45-4.35 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.23 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.12 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, 2H6), 3.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H β), 3.70 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H β), 3.61-3.51 (m, 2H, H δ), 2.72-2.61 (m, 2H, H ζ), 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.04-1.98 (m, 9H, CH₃, CH₃, CH₃), 1.94-1.82 (m, 2H, H ϵ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.3, 170.7, 170.4, 156.2 (CO), 143.8, 141.3, 127.8, 127.1, 125.2, 120.0 (arom), 85.5 (C1), 70.5 (C β), 69.3 (C δ), 68.5 (C3), 67.7 (C5), 67.3, 67.3, 67.2 (C4, CH₂Fmoc, C α), 61.8 (C6), 48.8 (C2), 47.2 (CH_{Fmoc}), 29.8 (C ϵ), 28.6 (C ζ), 23.2 (NHCOCH₃), 20.8, 20.7 (COCH₃).

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-threonine-OH (**99**)**



Trifluoroacetic acid (5 mL) was added over a solution of 268 mg (0.33 mmol) of **47** in 5 mL of CH₂Cl₂ and was stirred for 2 h and then concentrated. The residue was chromatographed on silica with 95:5:0.1 CH₂Cl₂/MeOH/AcOH as the eluent to give 196 mg (79%) of **99** as a white solid.

Physical data:

Mp: 74–76 °C.

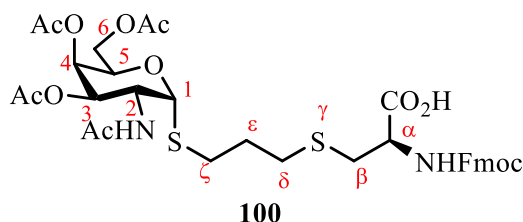
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +73.8.

HRMS (ESI+) (m/z) 745.2648 [M+H]⁺; calcd. C₃₆H₄₅N₂O₁₃S⁺: 745.2637.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.69 (br s, 1H, CO₂H), 7.78–7.72 (m, 2H, arom), 7.66–7.51 (m, 2H, arom), 7.41–7.35 (m, 2H, arom), 7.33–7.27 (m, 2H, arom), 6.37 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NHAc), 5.69 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH), 5.53 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H1), 5.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H4), 5.06 (dd, *J* = 11.8, 2.9 Hz, 1H, H3), 4.76–4.67 (m, 1H, H2), 4.53 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H5), 4.45–4.38 (m, 3H, H α , CH₂Fmoc), 4.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.17–4.06 (m, 3H, H β , 2H6), 3.68–3.55 (m, 1H, H δ), 3.47–3.34 (m, 1H, H δ), 2.70–2.54 (m, 2H, 2H ζ), 2.17–2.11 (m, 3H, CH₃), 2.04–1.96 (m, 9H, CH₃, CH₃, CH₃), 1.89–1.77 (m, 2H, 2H ϵ), 1.22 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, Me).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.5, 171.6, 171.1, 170.6, 170.4, 156.9 (CO), 144.0, 143.8, 141.3, 127.7, 127.1, 125.2, 120.0 (arom), 84.9 (C1), 75.1 (C β), 68.5 (C3), 67.4 (C5), 67.3 (C4), 67.3 (CH₂Fmoc), 67.1 (C δ), 61.9 (C6), 58.5 (C α), 48.7 (C2), 47.2 (CH_{Fmoc}), 30.0 (C ϵ), 27.8 (C ζ), 23.0 (NHCOCH₃), 20.7 (COCH₃), 16.2 (Me).

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-cysteine-OH (**100**)**



Trifluoroacetic acid (10 mL) was added over a solution of 105 mg (0.13 mmol) of **48** in 10 mL of CH₂Cl₂ and was stirred for 2 h and then concentrated. The residue was chromatographed on silica with 95:5:0.1 CH₂Cl₂/MeOH/AcOH as the eluent to give 62 mg (63%) of **100** as a white solid.

Physical data:

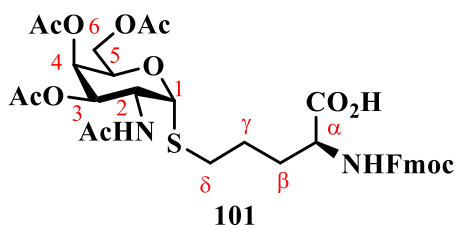
Mp: 83-85 °C.

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.00, CHCl₃): +103.2.

HRMS (ESI+) (m/z) 747.2252 [M+H]⁺; calcd. C₃₅H₄₃N₂O₁₂S₂⁺: 747.2252.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.79-7.73 (m, 2H, arom), 7.64-7.58 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.34-7.28 (m, 2H, arom), 6.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NHAc), 5.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NHFmoc), 5.68 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H1), 5.38 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H4), 5.07 (dd, *J* = 11.7, 3.3 Hz, 1H, H3), 4.71-4.59 (m, 2H, H2, H α), 4.51 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H5), 4.38 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂Fmoc), 4.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.17-4.04 (m, 2H, 2H6), 3.09 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, 2H β), 2.76-2.52 (m, 4H, 2H δ , 2H ζ), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.08-2.00 (m, 9H, 2 COCH₃, NHCOCH₃), 1.98-1.78 (m, 2H, 2H ϵ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.8, 172.5, 171.4, 170.7, 170.3 (CO), 143.9, 141.4, 127.9, 127.2, 125.3, 120.1 (arom), 83.4 (C1), 68.5 (C3), 67.4, 67.3, 67.3 (C5, C4, CH₂Fmoc), 62.0 (C6), 53.2 (C α), 49.4 (C2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 34.5 (C β), 31.1 (C δ), 29.6 (C ϵ), 29.1 (C ζ), 23.3 (NHCOCH₃), 20.9, 20.9, 20.8 (COCH₃).

(S)-N-Fmoc-5-(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-thio)-pentanoic acid (101)

Trifluoroacetic acid (10 mL) was added over a solution of 490 mg (0.647 mmol) of **49** in 10 mL of a CH_2Cl_2 and was stirred for 2 h and then concentrated. The residue was chromatographed on silica with 95:5:0.1 DCM/MeOH/AcOH as the eluent to give 364 mg (80%) of **101** as a white solid.

Physical data:

Mp: 68-70 °C.

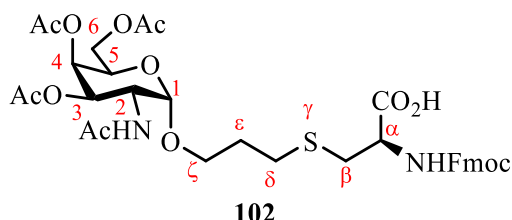
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c=1.00, CHCl_3): +102.9.

HRMS (ESI+) (m/z) 701.2368 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd. $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}^+$: 701.2375.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.75 (br s, 1H, CO_2H), 7.77-7.71 (m, 2H, arom), 7.63-7.52 (m, 2H, arom), 7.40-7.34 (m, 2H, arom), 7.32-7.26 (m, 2H, arom), 6.26 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NHAc), 5.84 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 5.56 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H1), 5.37 (s, 1H, H4), 5.04 (dd, $J = 11.8, 2.2$ Hz, 1H, H3), 4.76-4.69 (m, 1H, H2), 4.53 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H5), 4.45-4.33 (m, 3H, $\text{H}\alpha$, CH_2Fmoc), 4.20 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.15-4.04 (m, 2H, H6), 2.70-2.55 (m, 2H, $2\text{H}\delta$), 2.13 (s, 3H, CH_3), 2.04-1.95 (m, 10H, CH_3 , CH_3 , NHCOCH_3 , $\text{H}\beta$), 1.86-1.65 (m, 3H, $\text{H}\beta$, $2\text{H}\gamma$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.7, 171.6, 171.1, 170.8, 170.4, 156.3 (CO), 143.9, 143.7, 141.3, 127.8, 127.1, 125.1, 120.1 (arom), 84.9 (C1), 68.5 (C3), 67.3, 67.2, 67.1 (C4 , C5 , CH_2Fmoc), 61.8 (C6), 53.5 ($\text{C}\alpha$), 48.5 (C2), 47.6 (CH_{Fmoc}), 31.6 ($\text{C}\beta$), 30.6 ($\text{C}\delta$), 25.6 ($\text{C}\gamma$), 23.0 (NHCOCH_3), 20.8, 20.7, 20.7 (COCH_3).

***N*-Fmoc-*S*-(*O*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)propyl)-L-cysteine-OH (**102**)**



Trifluoroacetic acid (10 mL) was added over a solution of 272 mg (0.346 mmol) of **67** in 10 mL of CH₂Cl₂ and was stirred for 2 h and then concentrated. The residue was chromatographed on silica with 95:5:0.1 CH₂Cl₂/MeOH/AcOH as the eluent to give 219 mg (87%) of **102** as a white foam.

Physical data:

HRMS (ESI+) (*m/z*) 731.2486 [M+H]⁺; calcd. C₃₅H₄₃N₂O₁₃S⁺: 731.2480.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.53 (br s, 1H), 7.78-7.72 (m, 2H, arom), 7.65-7.59 (m, 2H, arom), 7.42-7.36 (m, 2H, arom), 7.33-7.27 (m, 2H, arom), 6.34 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NHAc), 6.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NHFmoc), 5.39 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H₄), 5.20 (dd, *J* = 11.4, 3.3 Hz, 1H, H₃), 4.88 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H₁), 4.73-4.64 (m, 1H, H₂), 4.63-4.52 (m, 1H, H α), 4.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂Fmoc), 4.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CHFmoc), 4.19-4.06 (m, 3H, H₅, 2H₆), 3.78-3.68 (m, 1H, H β), 3.53-3.36 (m, 1H, H β), 3.17-2.99 (m, 2H, 2H ζ), 2.78-2.59 (m, 2H, 2H δ), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.05-1.97 (m, 10H, 2 COCH₃, NHCOCH₃, H ϵ), 1.90-1.78 (m, 1H, H ϵ).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.8, 171.9, 171.3, 170.9, 170.5, 156.0 (CO), 143.9, 143.8, 141.4, 127.8, 127.8, 127.2, 125.2, 120.1, 120.0 (arom), 97.6 (C₁), 68.9 (C₃), 67.5 (C₄), 67.4 (CH₂Fmoc), 66.8 (C₅), 66.4 (C β), 62.0 (C₆), 53.4 (C₂), 48.0 (C α), 47.2 (CH_{Fmoc}), 34.0 (C ζ), 29.8 (C δ), 29.1 (C ϵ), 23.1 (NHCOCH₃), 21.0, 20.8 (COCH₃).

9. Annexes

Annex.1 NMR spectra of Chapter 2

Annex.2 NMR spectra of Chapter 3

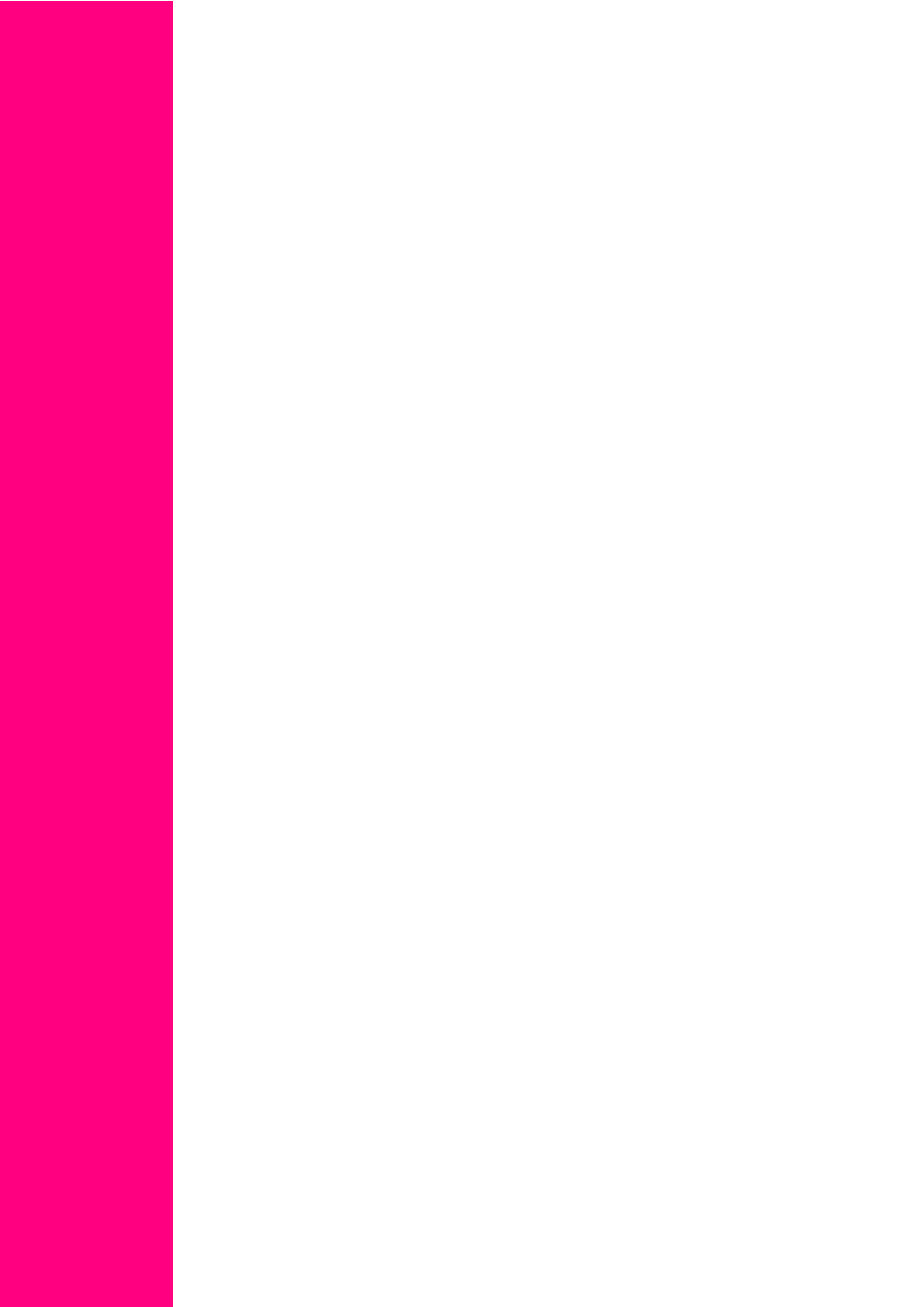
Annex.3 NMR spectra of Chapter 4

Annex.4 NMR spectra of Chapter 5

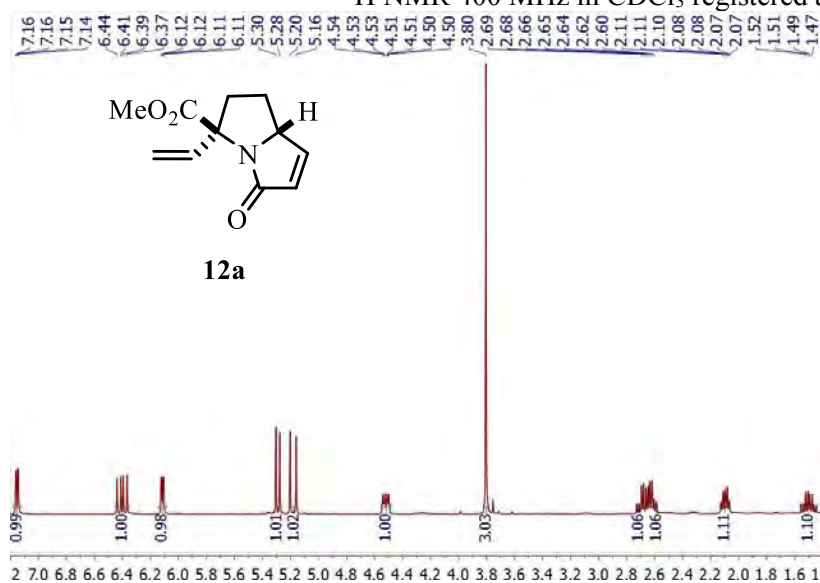
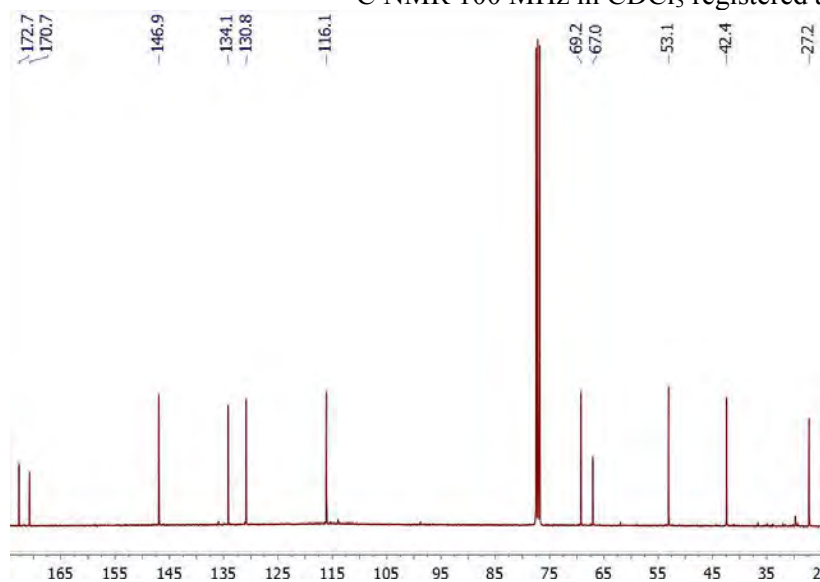
Annex.5 NMR spectra of Chapter 6

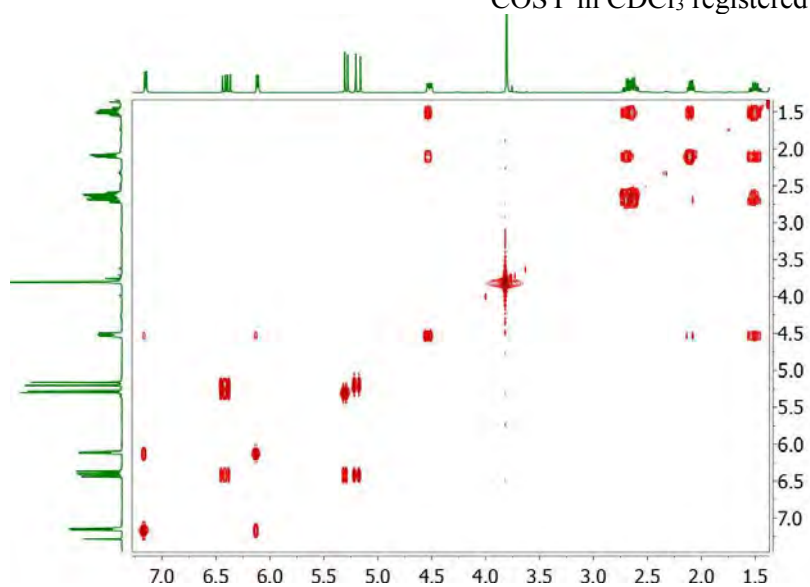
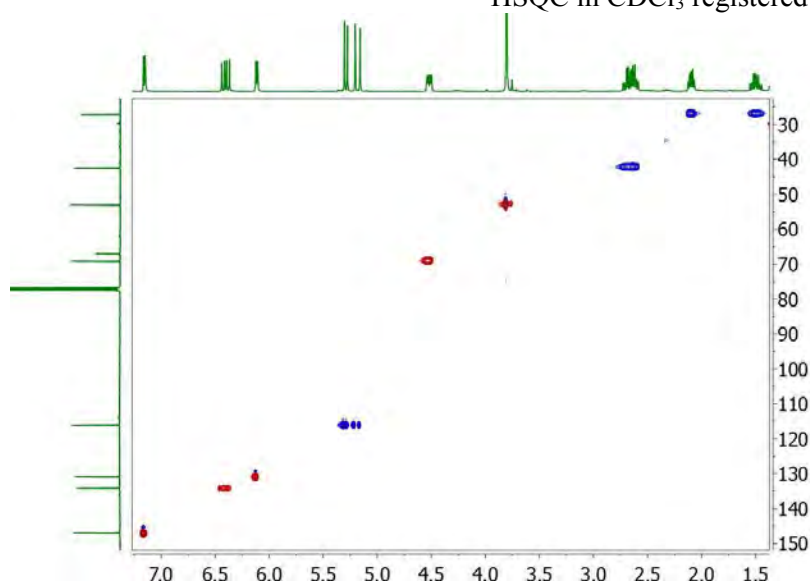
Annex.6 HPLC chromatograms

Annex.7 X-Ray diffraction

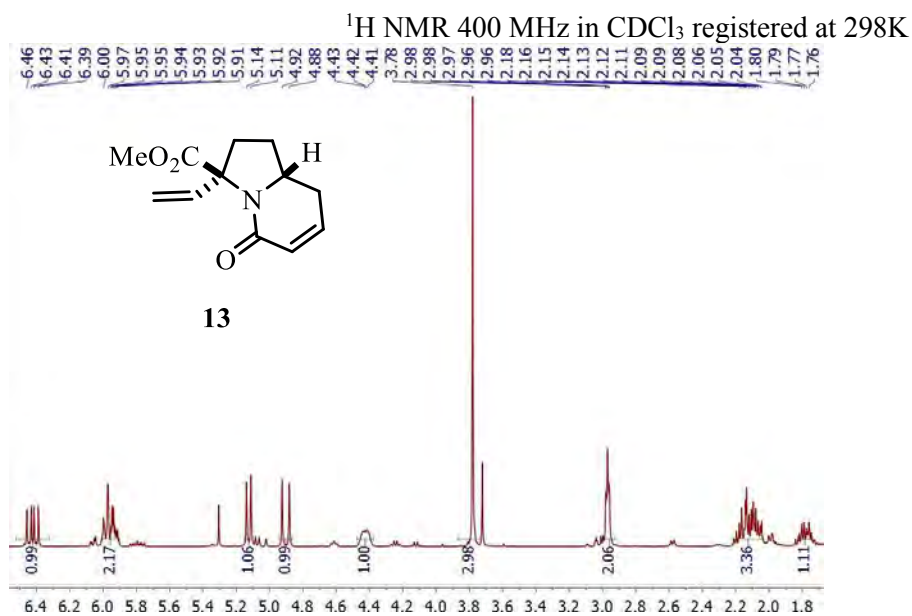


Annex.1 NMR spectra of chapter 2

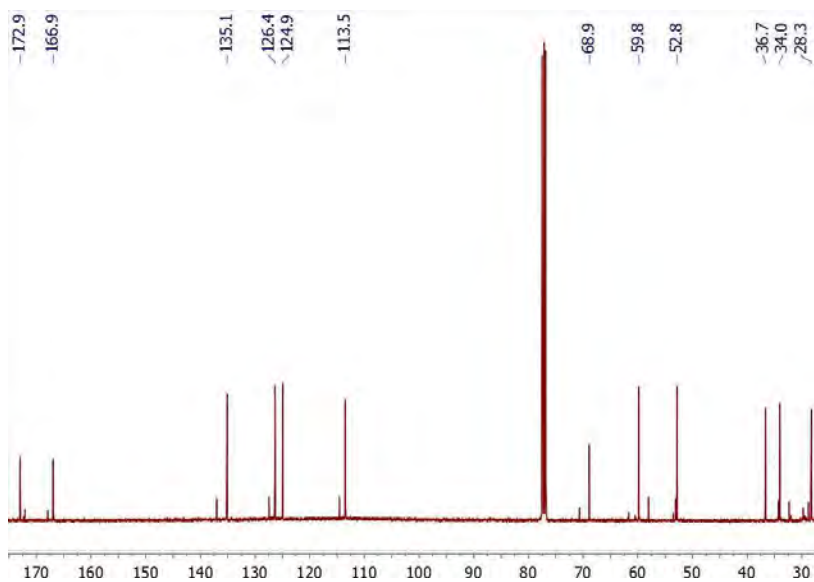
Methyl (3*R*,7*aS*) and (3*S*,7*aR*)-5-oxo-3-vinyl-2,3,5,7*a*-tetrahydro-1*H*-pyrrolizine-3-carboxylate (**12a**)¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

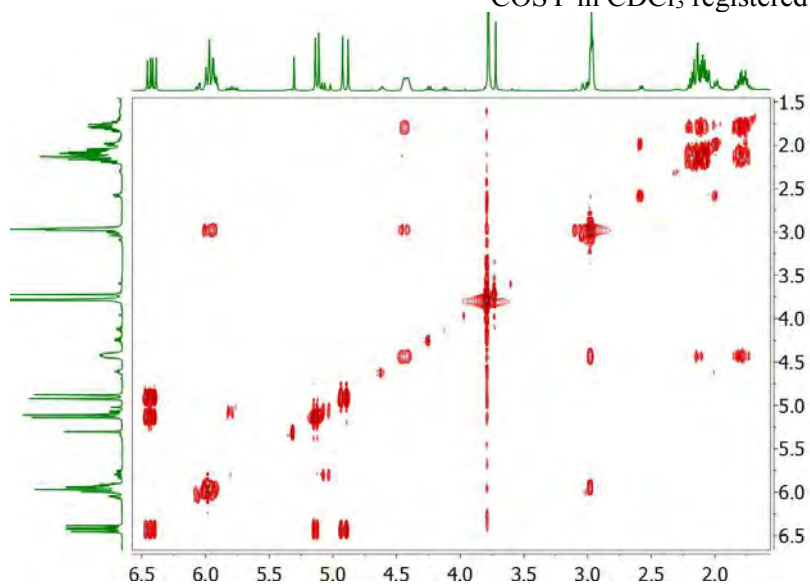
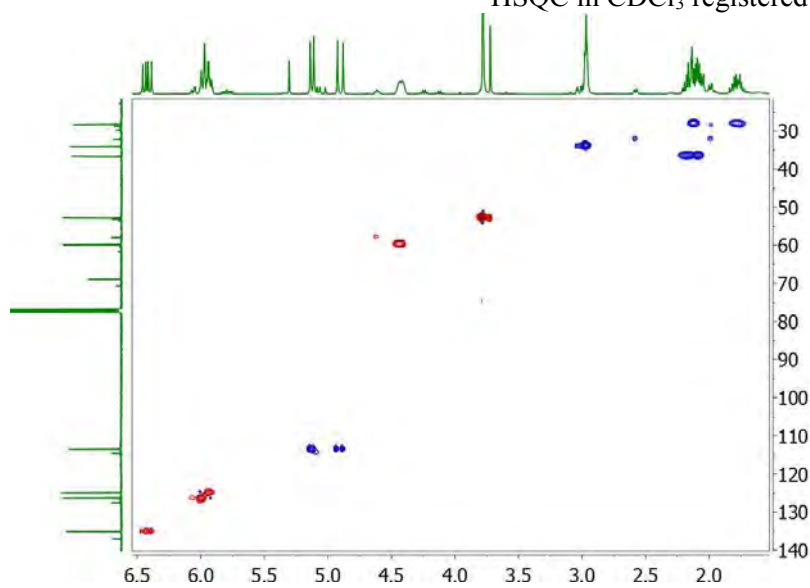
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

Methyl (3*R*,8*aS*) and (3*S*,8*aR*)-5-oxo-3-vinyl-1,2,3,5,8,8*a*-hexahydroindolizine-3-carboxylate (13)



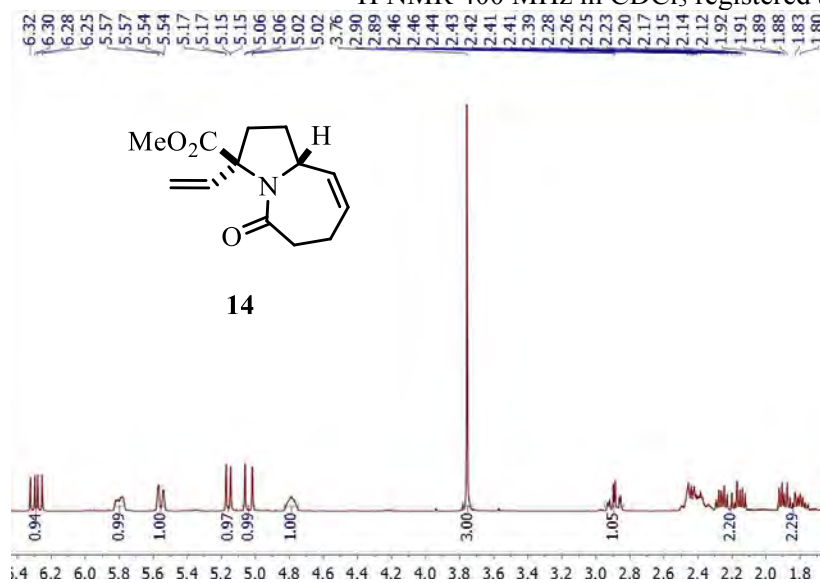
¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K



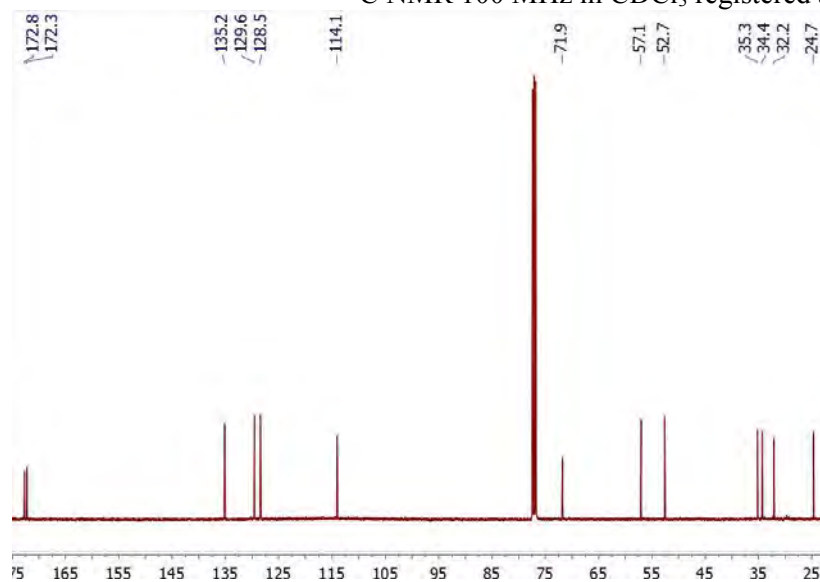
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

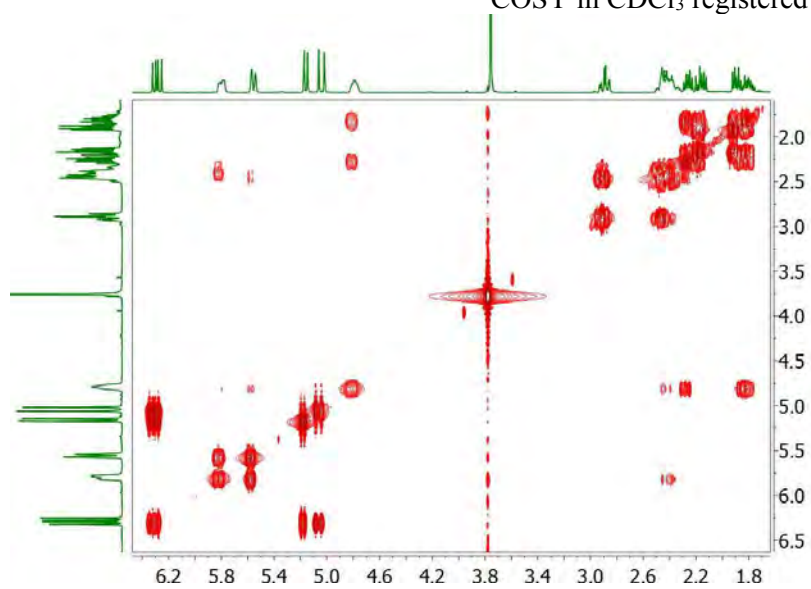
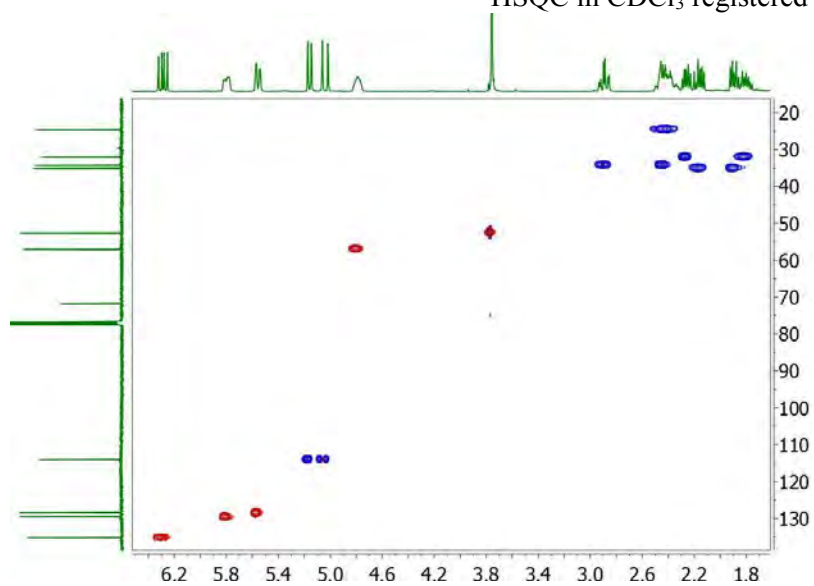
Methyl (3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-5-oxo-3-vinyl-2,3,5,6,7,9*a*-hexahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepine-3-carboxylate (14)

¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K



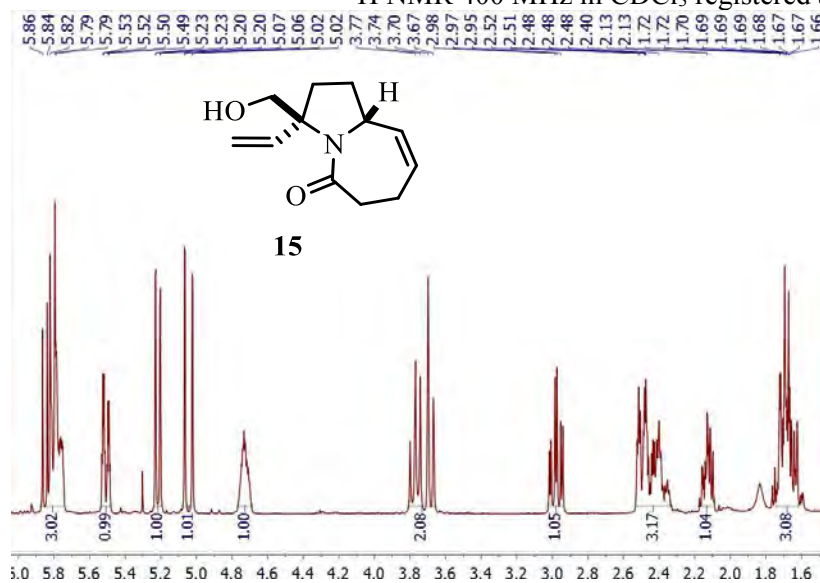
¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K



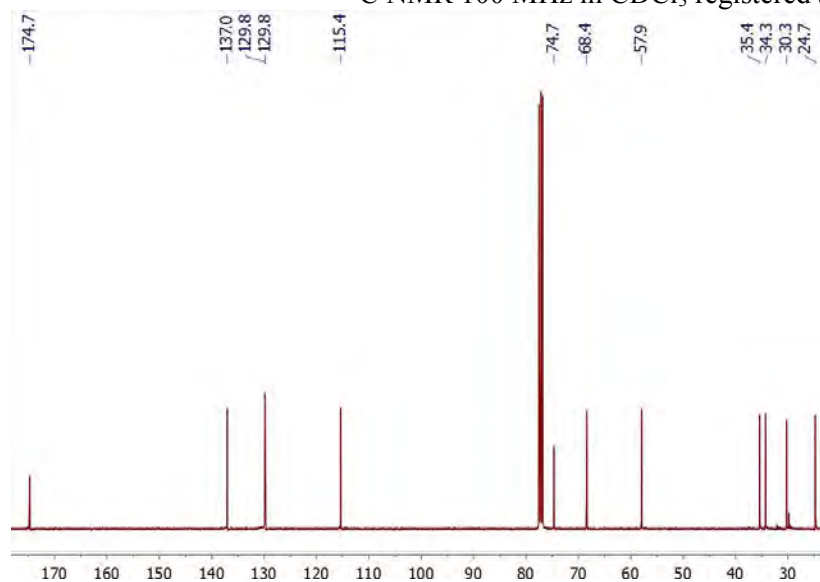
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

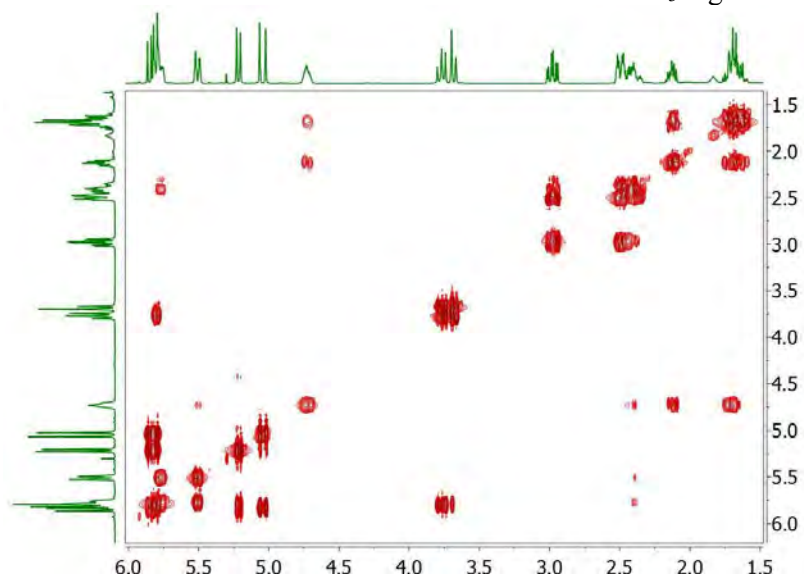
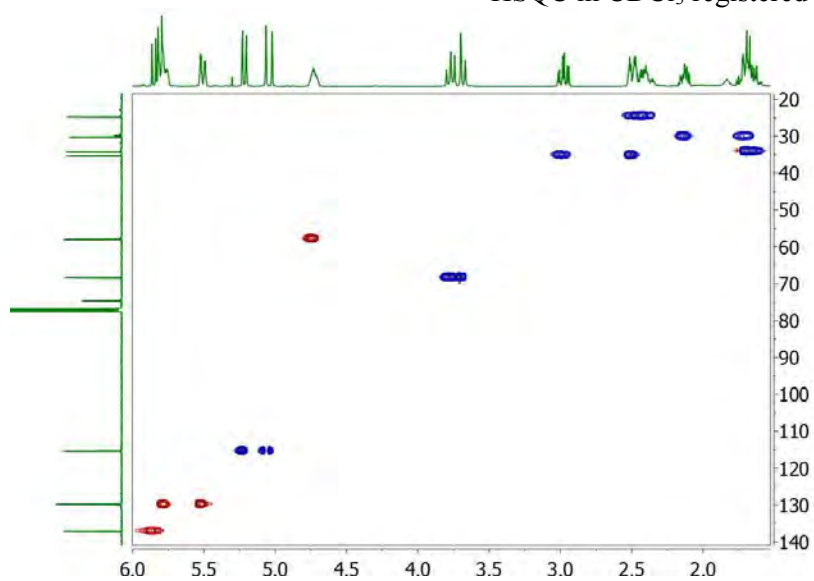
(3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-3-(Hydroxymethyl)-3-vinyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepin-5(9*aH*)-one (15)

¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K

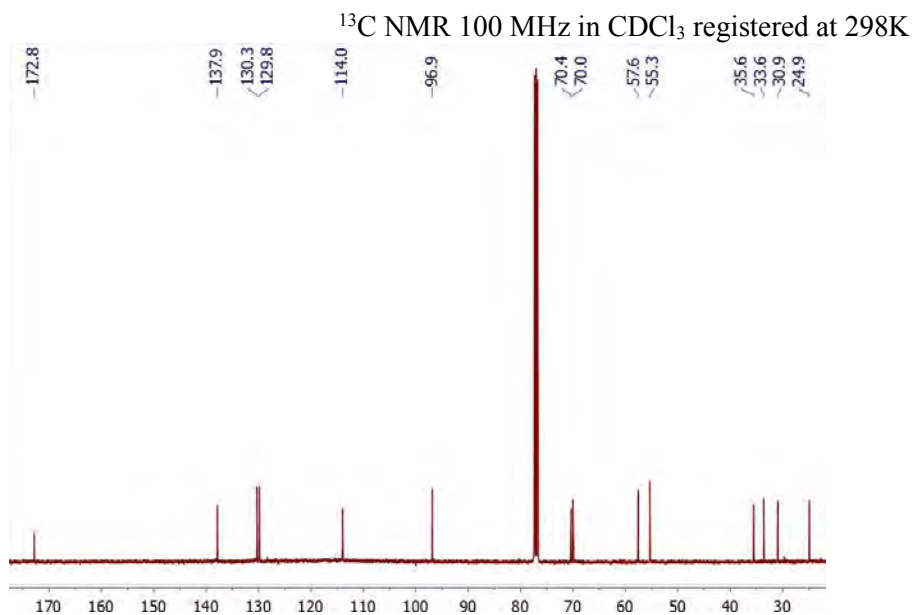
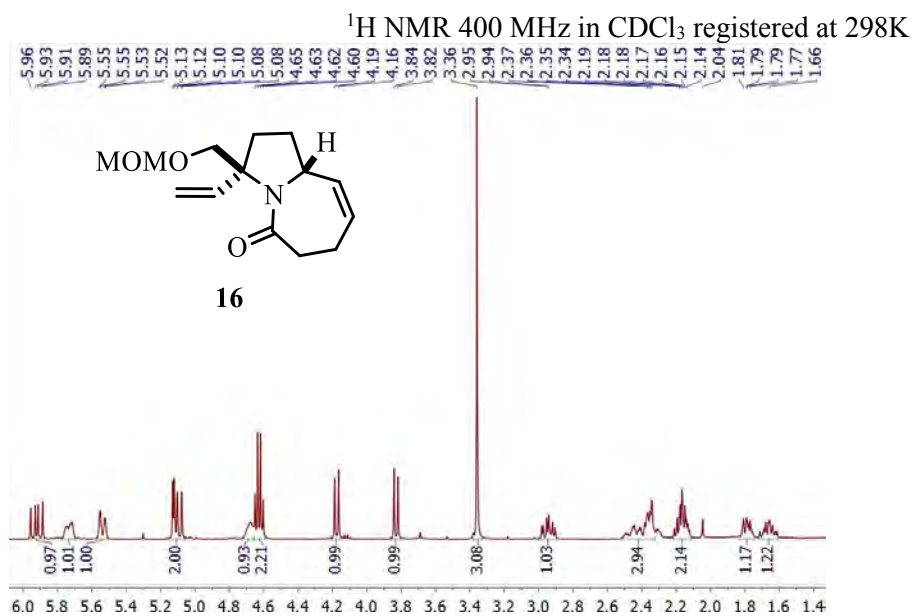


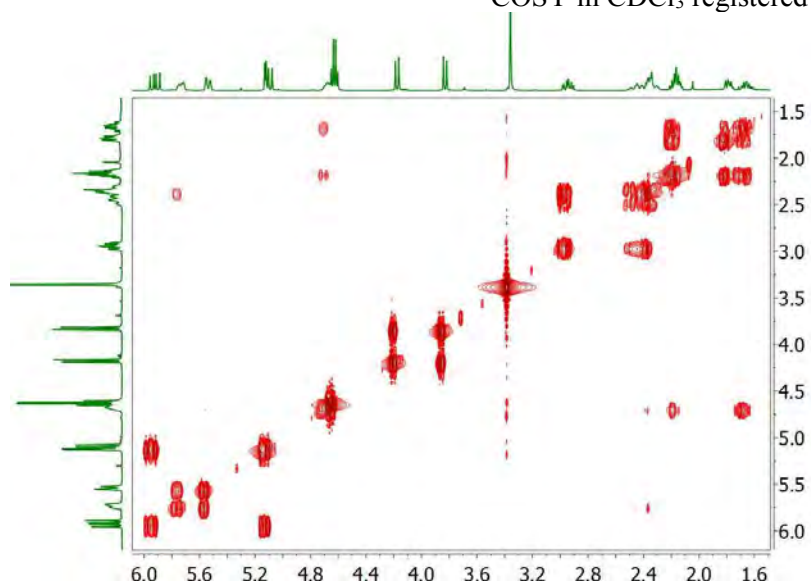
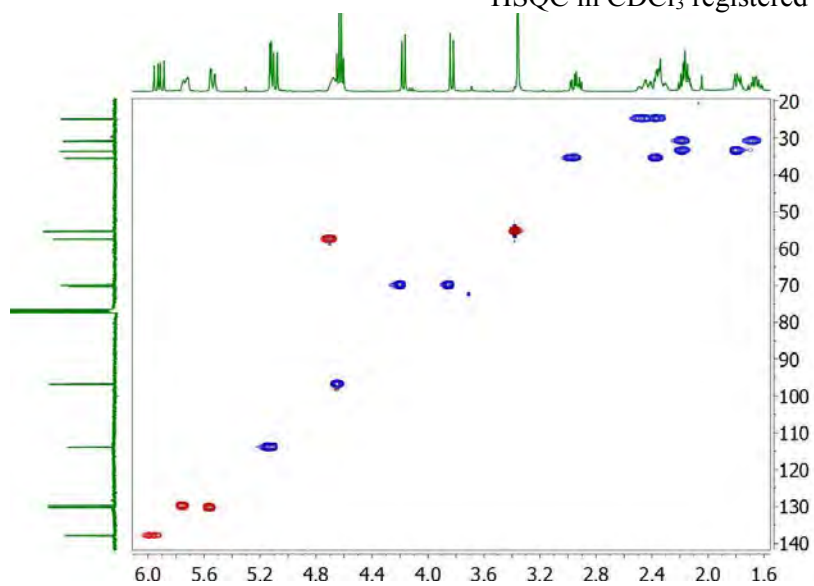
¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K



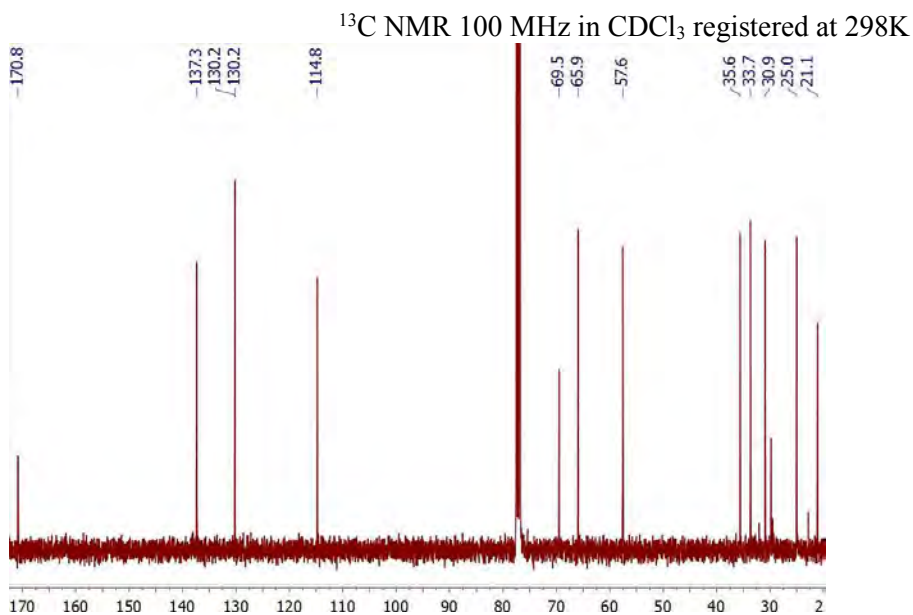
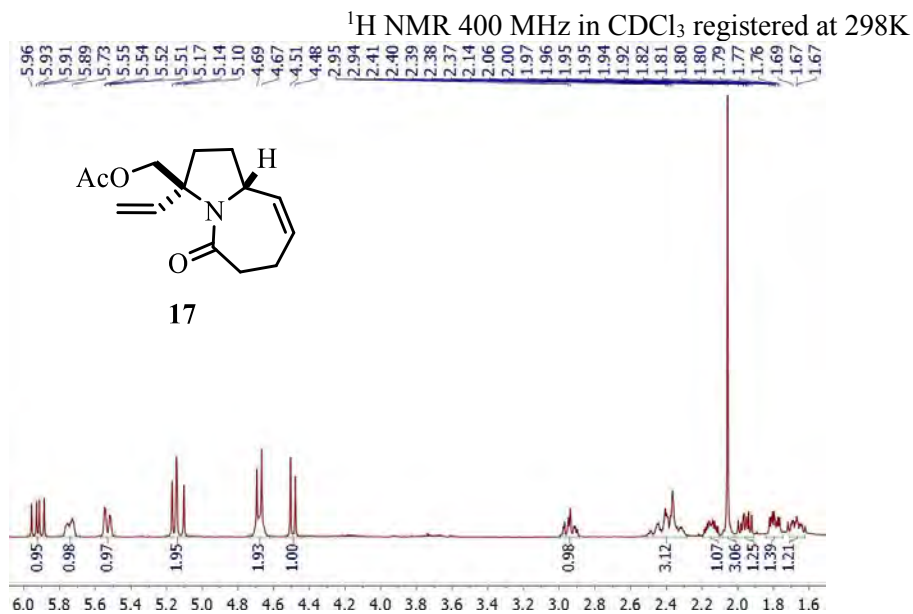
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

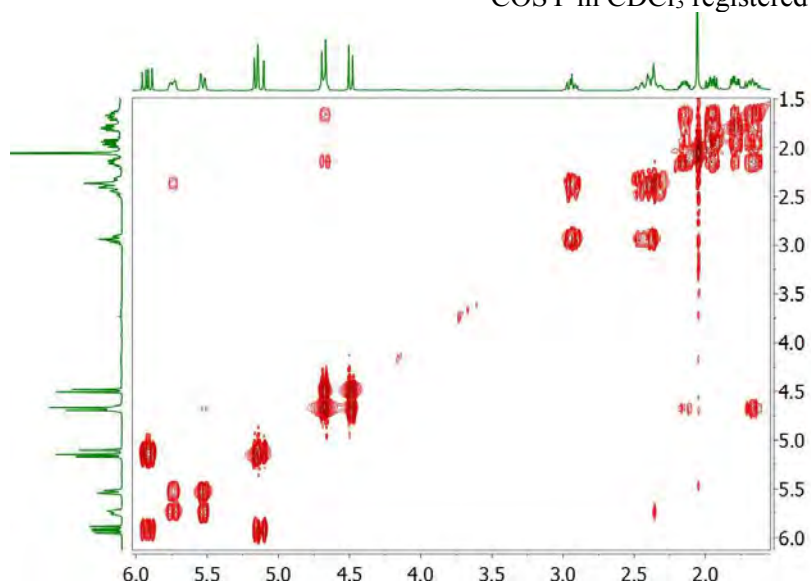
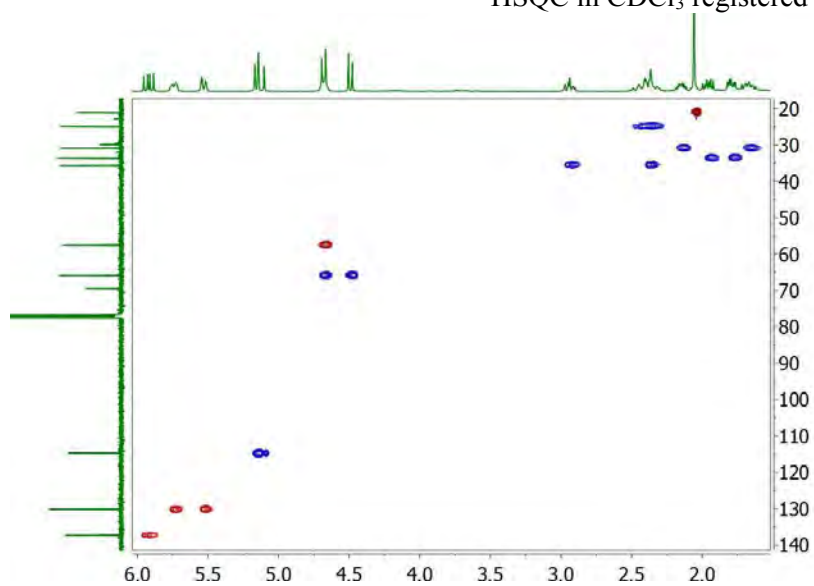
(3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-3-((Methoxymethoxy)methyl)-3-vinyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepin-5(9*aH*)-one (16)



COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

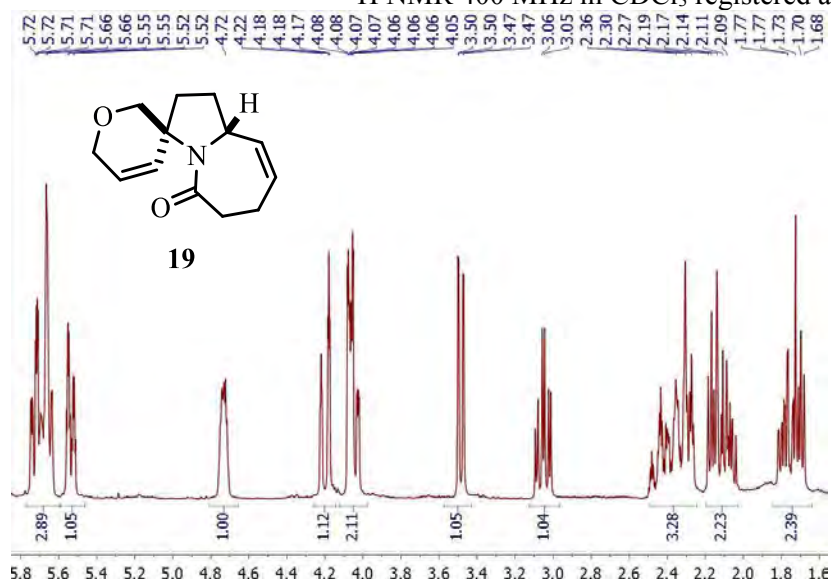
(3*R*,9*aS*) and (3*S*,9*aR*)-5-Oxo-3-vinyl-2,3,5,6,7,9a-hexahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*a*]azepin-3-ylmethyl acetate (17)



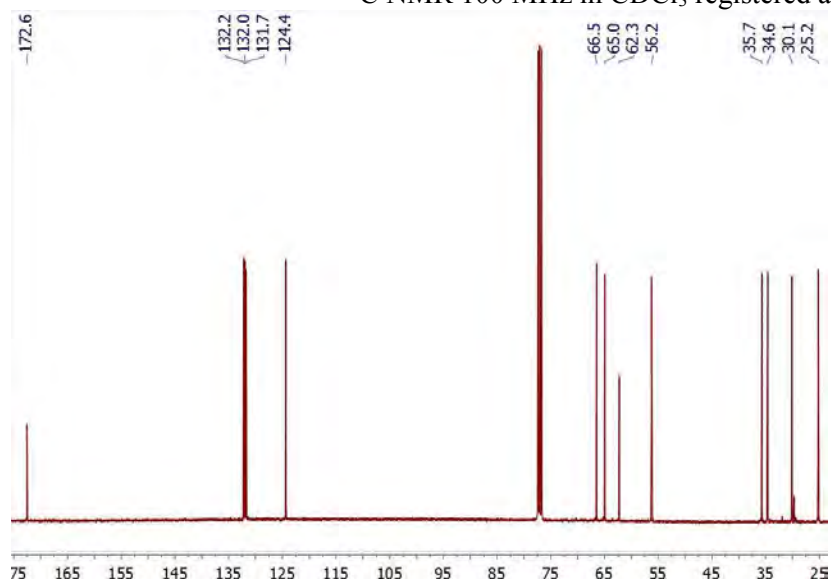
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

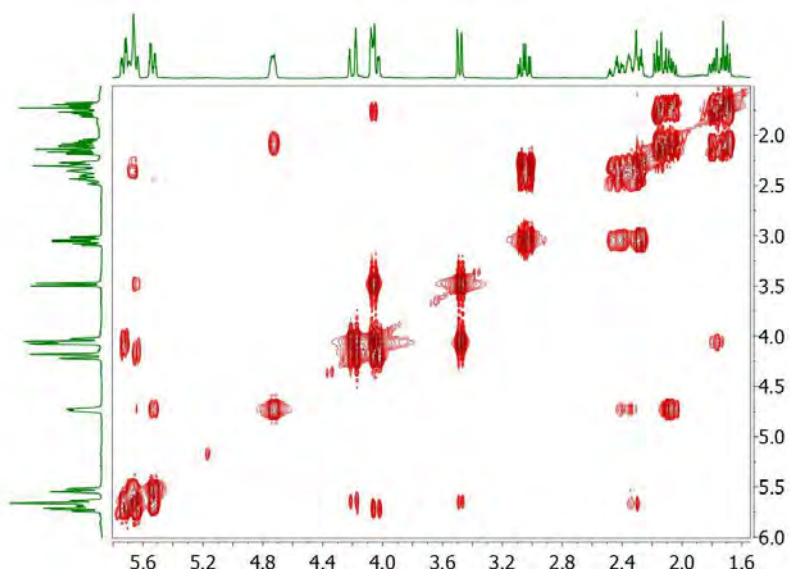
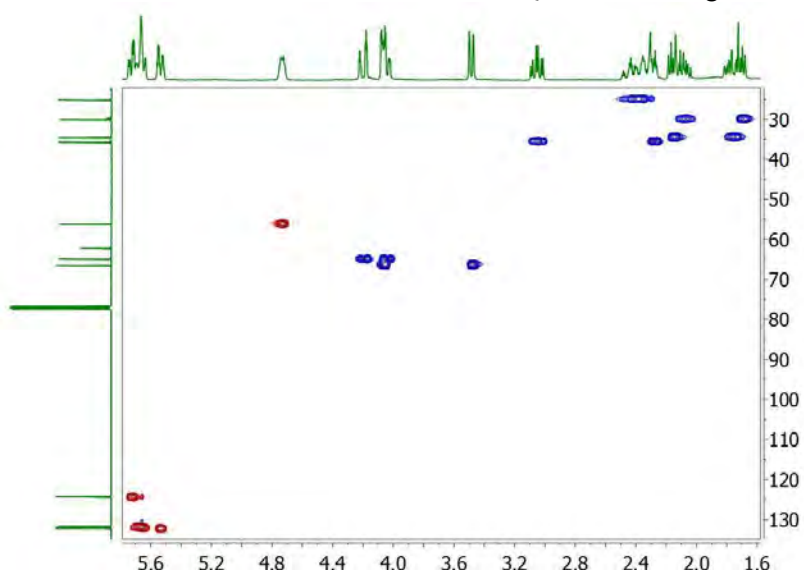
(3*S*,9*a'R*) and (3*R*,9*a'**S*)-1',2,6,6',7',9*a'*-Hexahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (19)**

¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K



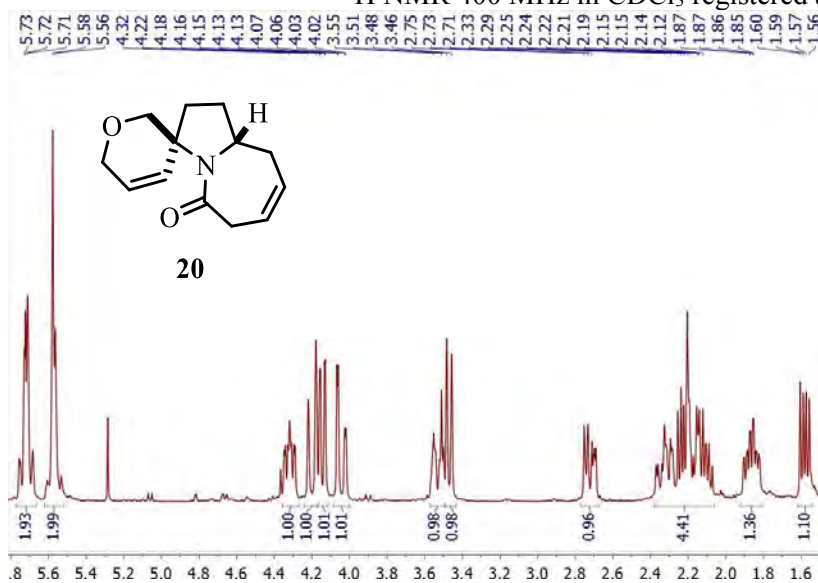
¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K



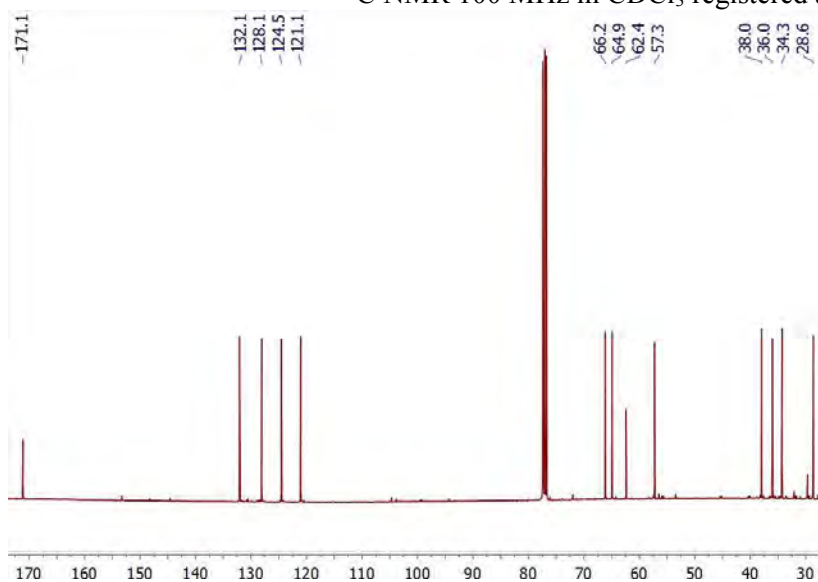
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

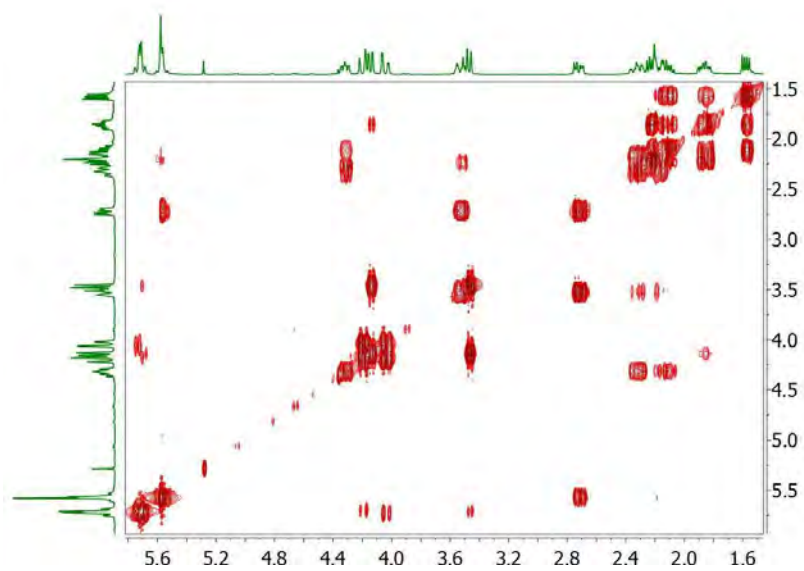
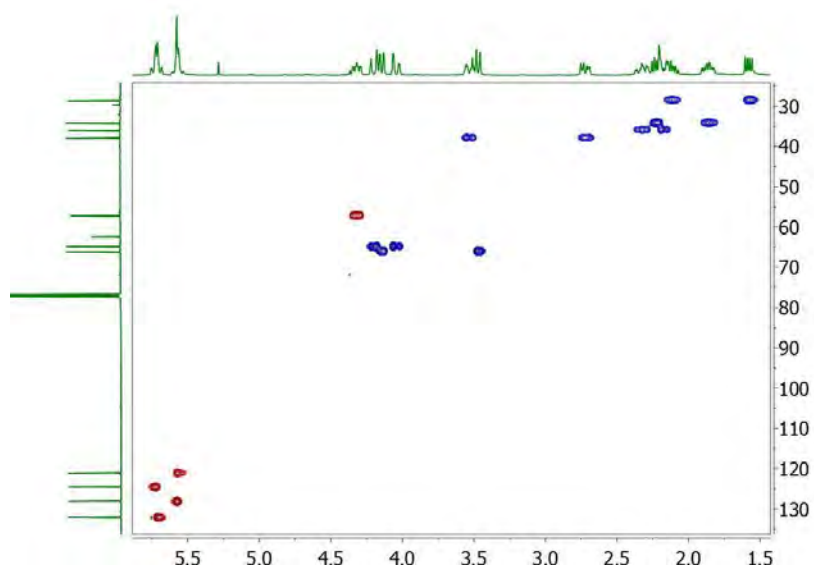
(3*S*,9*a'R*) and (3*R*,9*a'**S*)-1',2,6,6',9',9*a'*-Hexahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (20)**

¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K



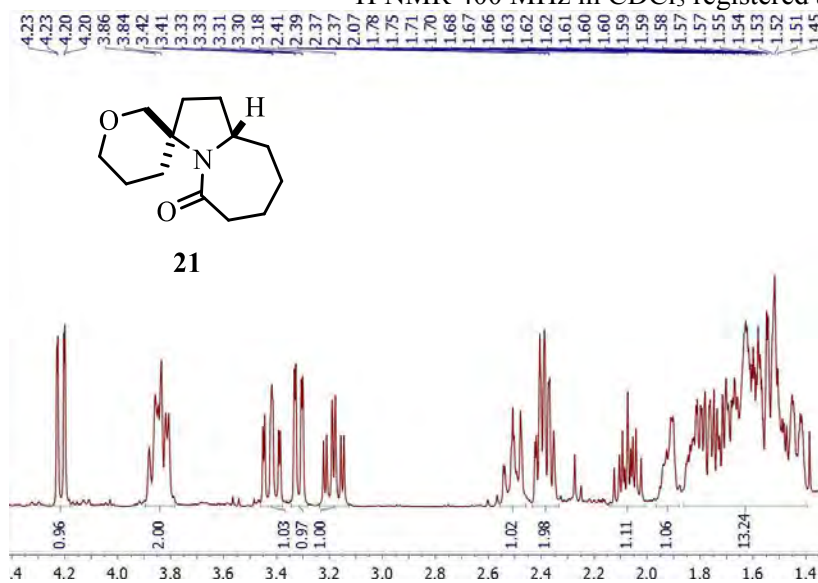
¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K



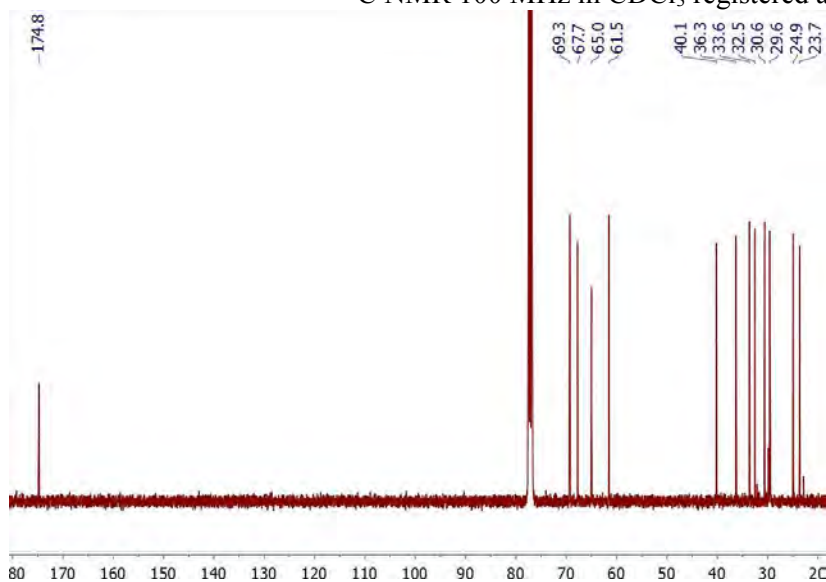
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

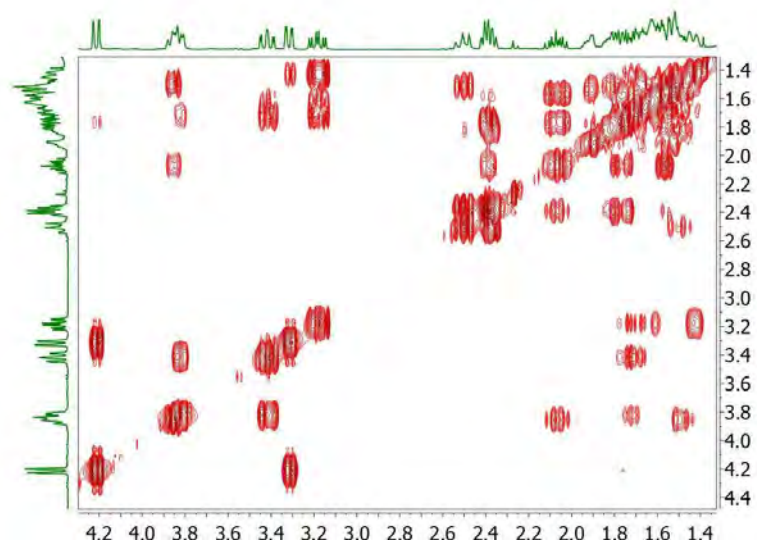
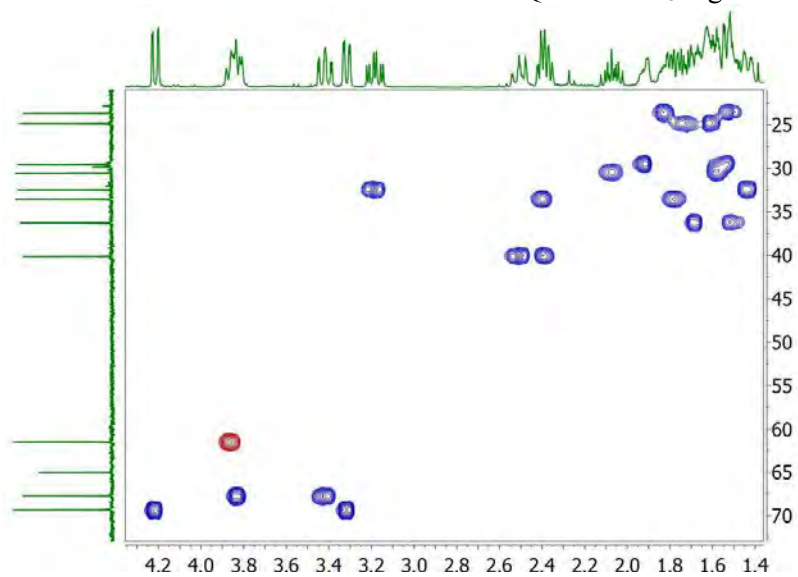
(3*S*,9*a'**S*) and (3*R*,9*a'**R*)-Decahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (21)

¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K

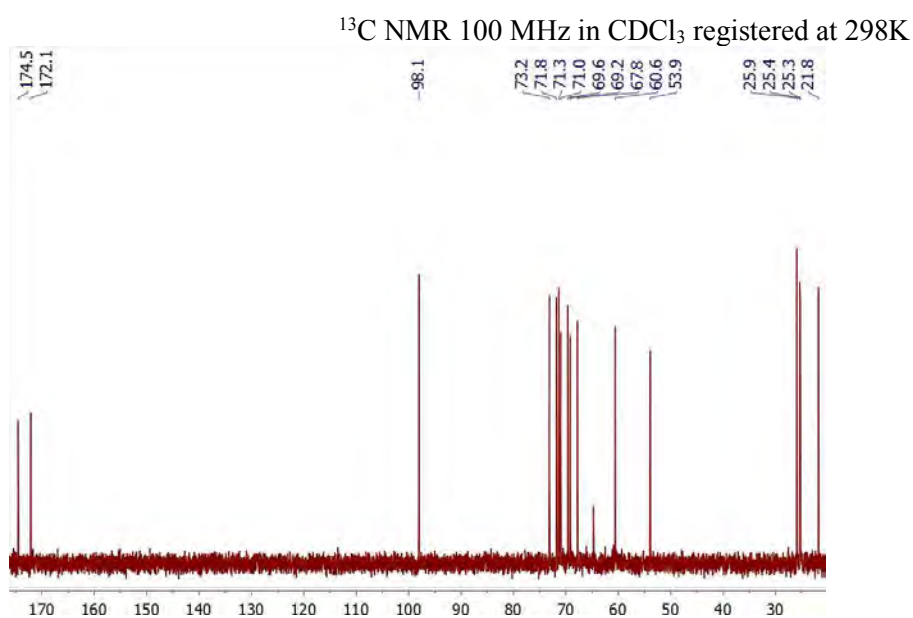
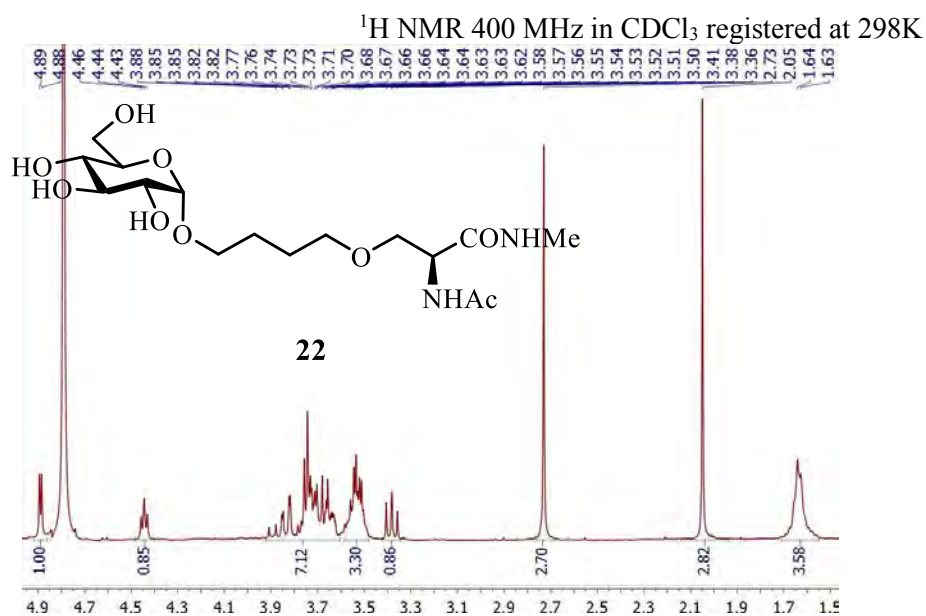


¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

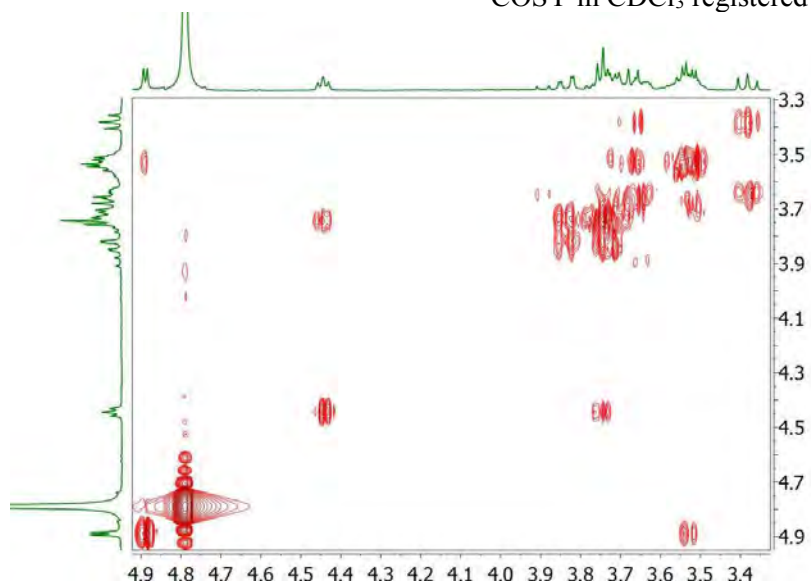


COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

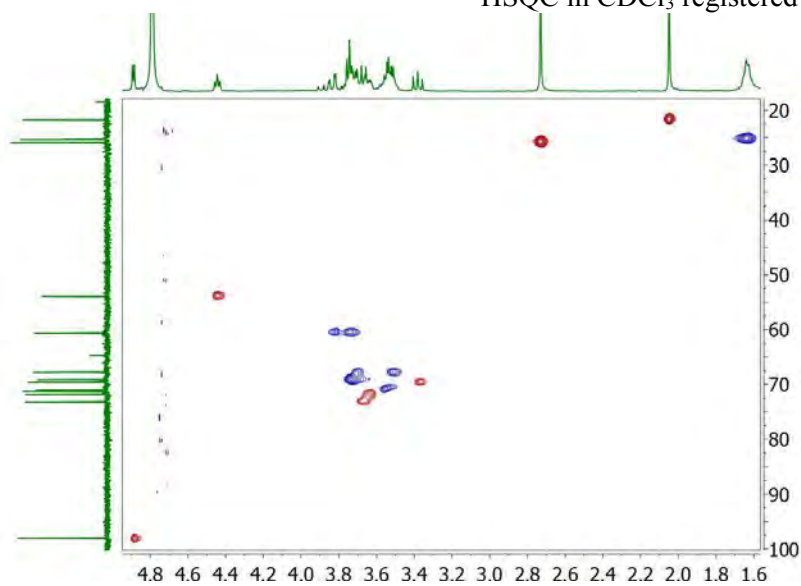
Annex.2 NMR spectra of chapter 3

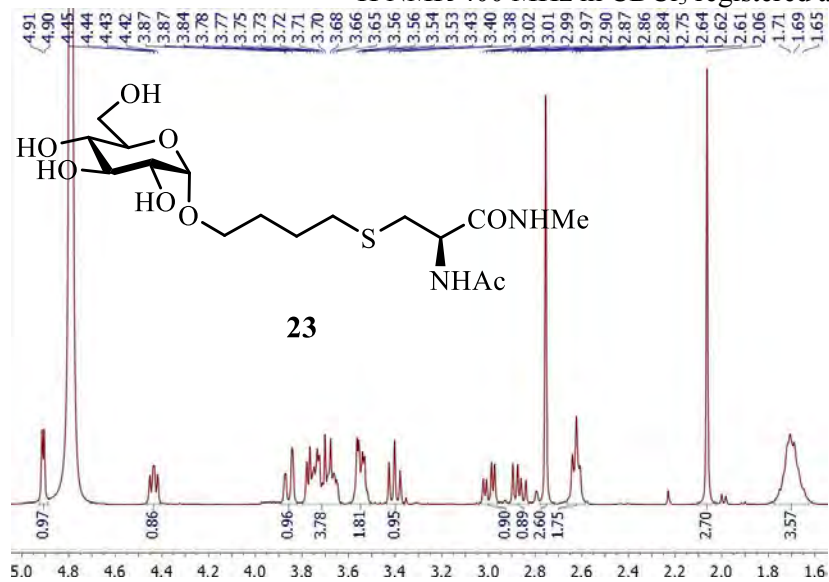
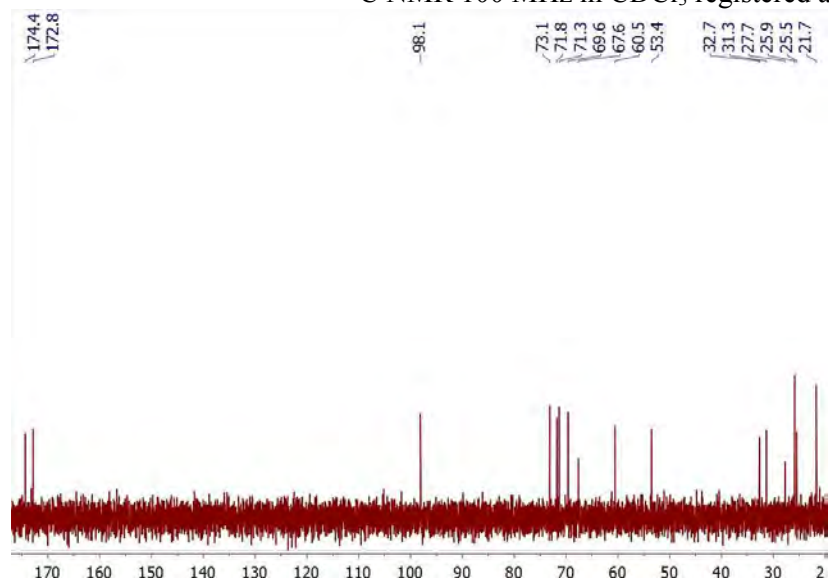
(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosyloxy)butoxy)propanamide (22)

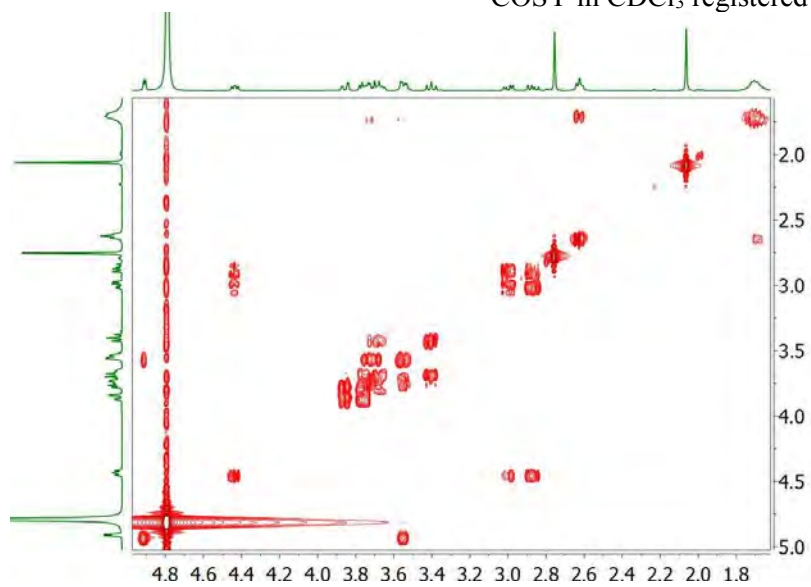
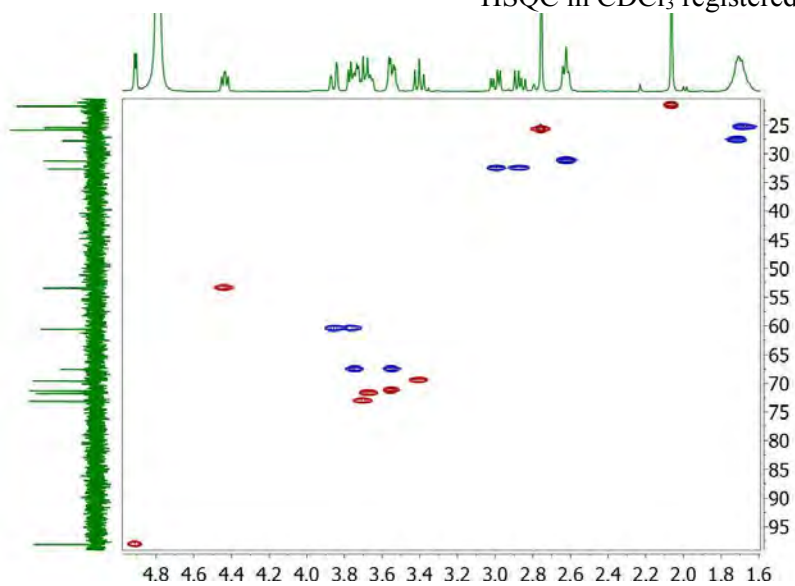
COSY in CDCl₃ registered at 298K

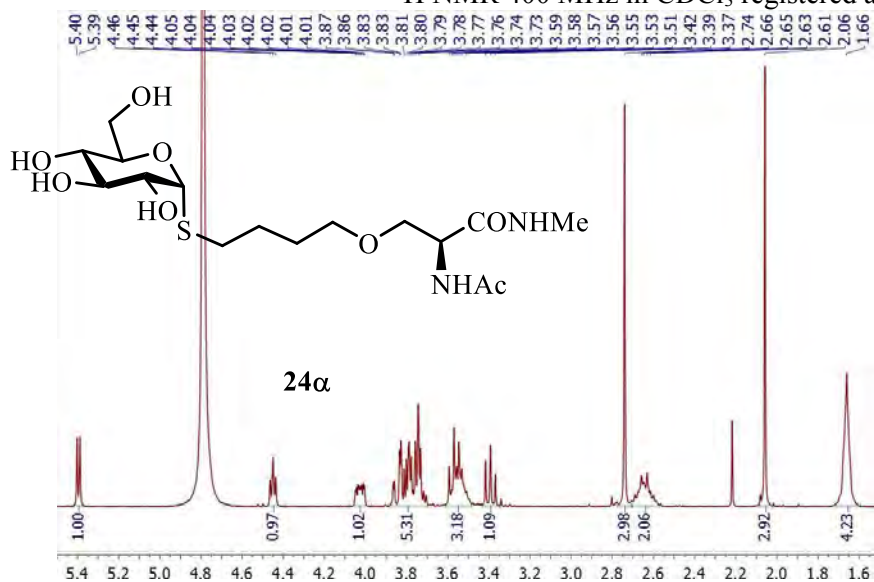
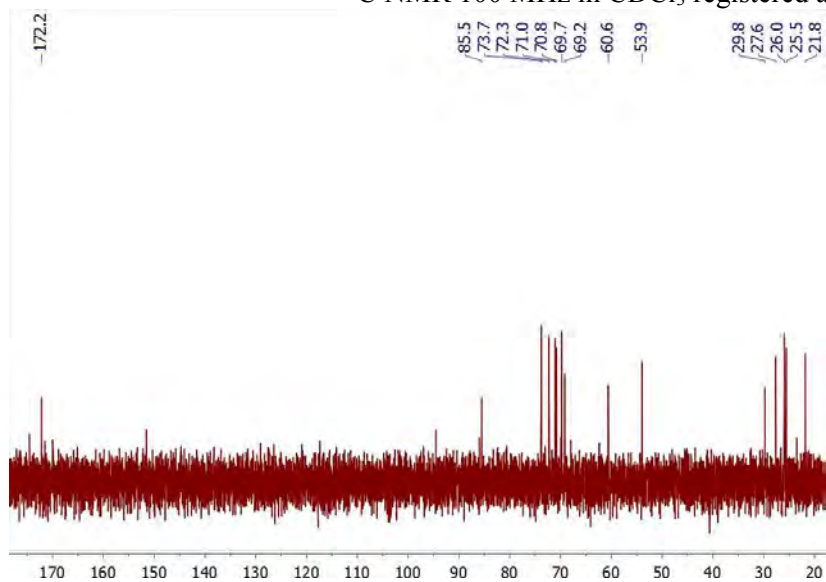


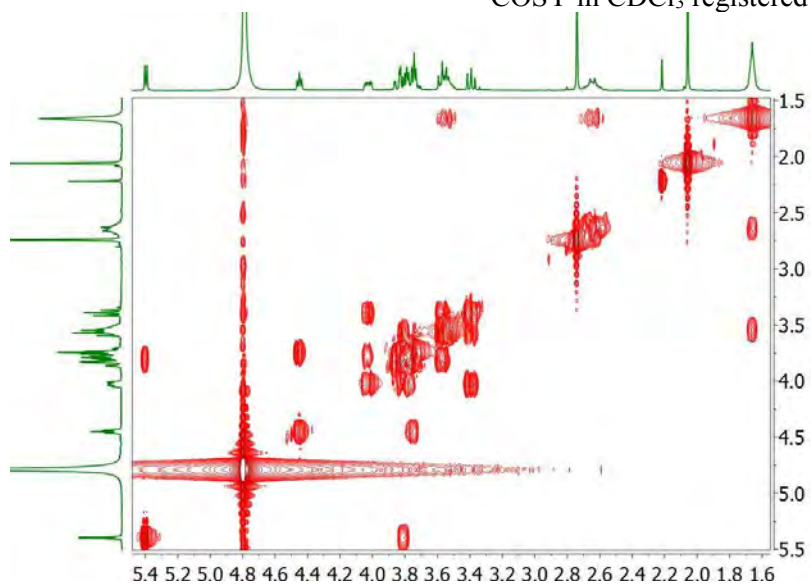
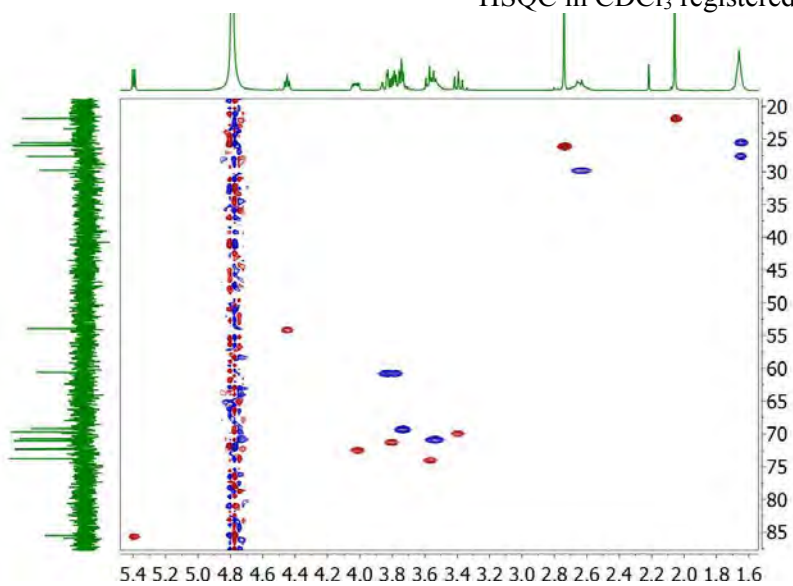
HSQC in CDCl₃ registered at 298K

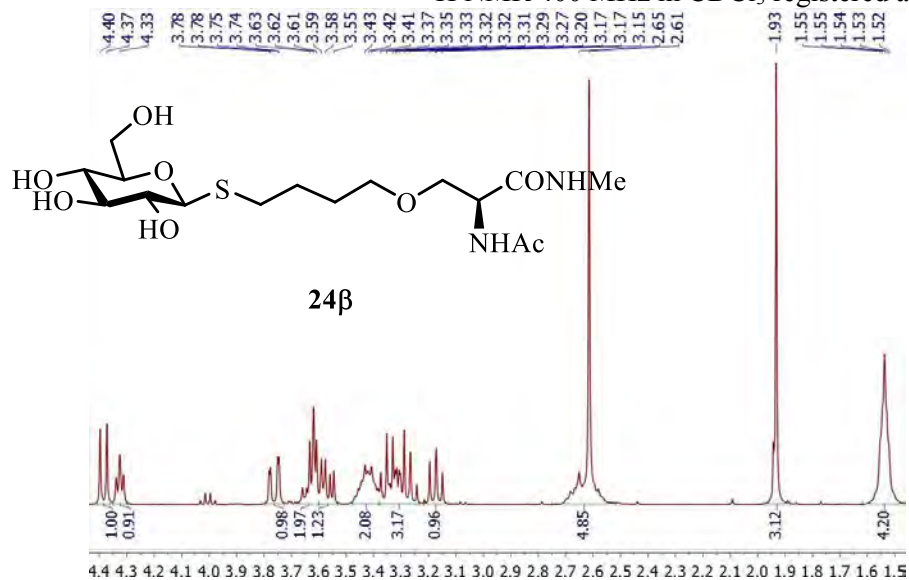
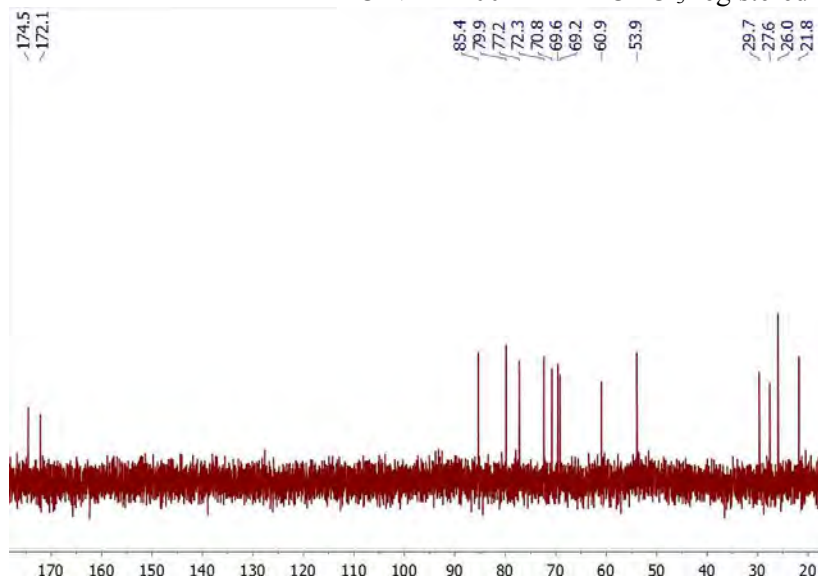


(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosyloxy)butylthio)propanamide (23) ^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K

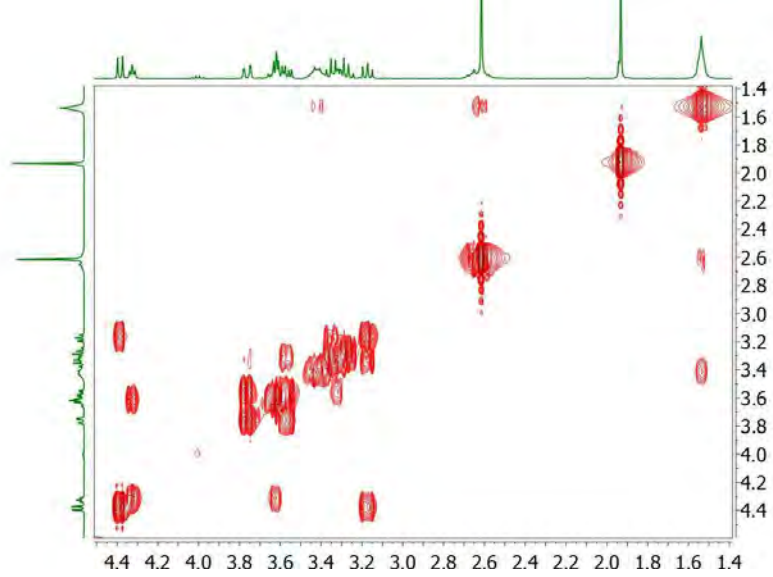
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosylthio)butoxy)propanamide (24 α) ^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K

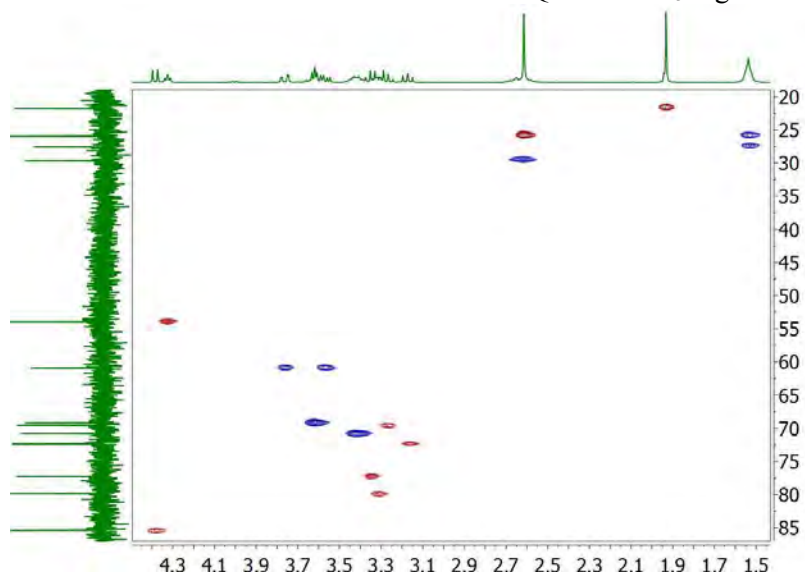
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(β -D-glucosylthio)butoxy)propanamide (24 β) ^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K

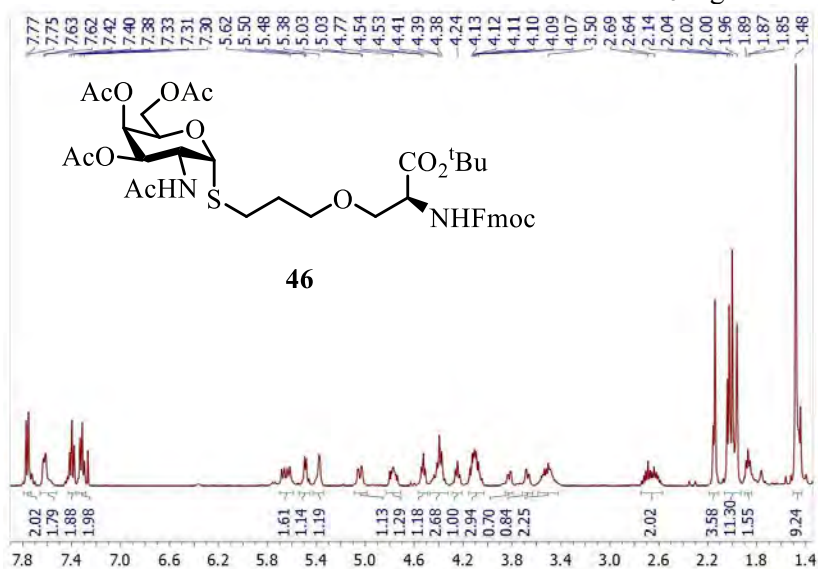
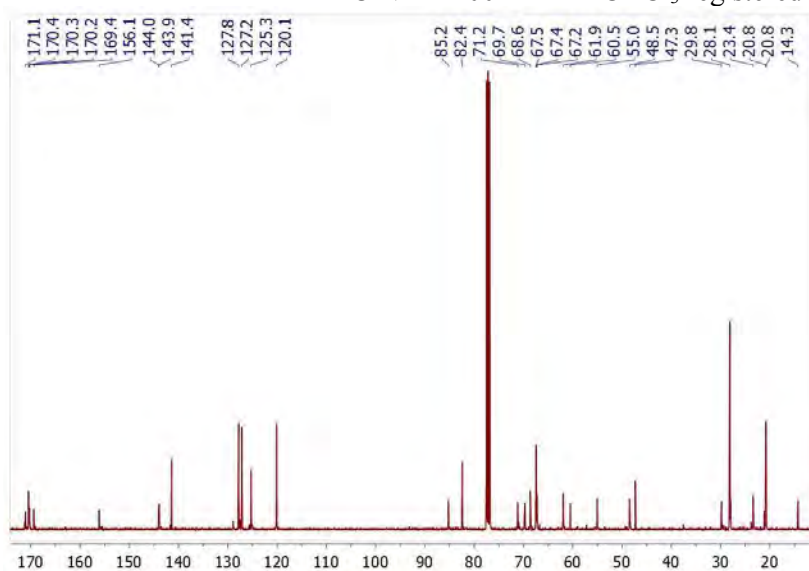
COSY in CDCl₃ registered at 298K

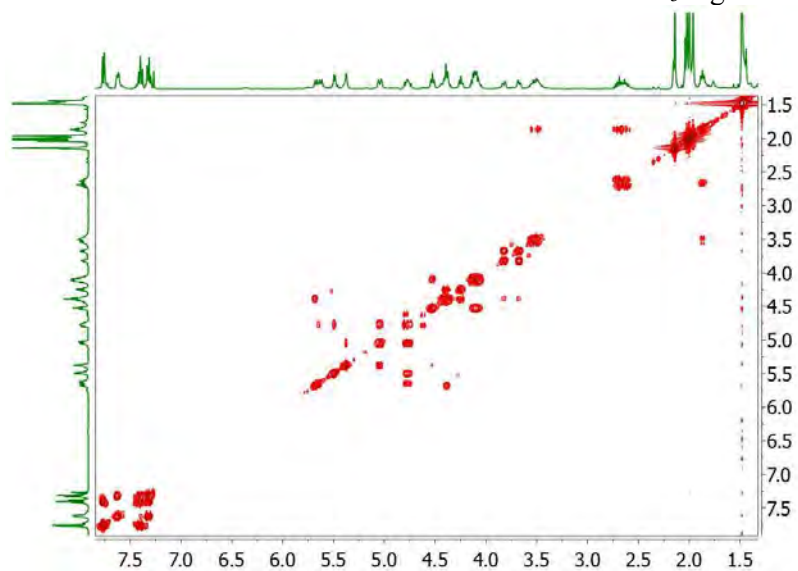
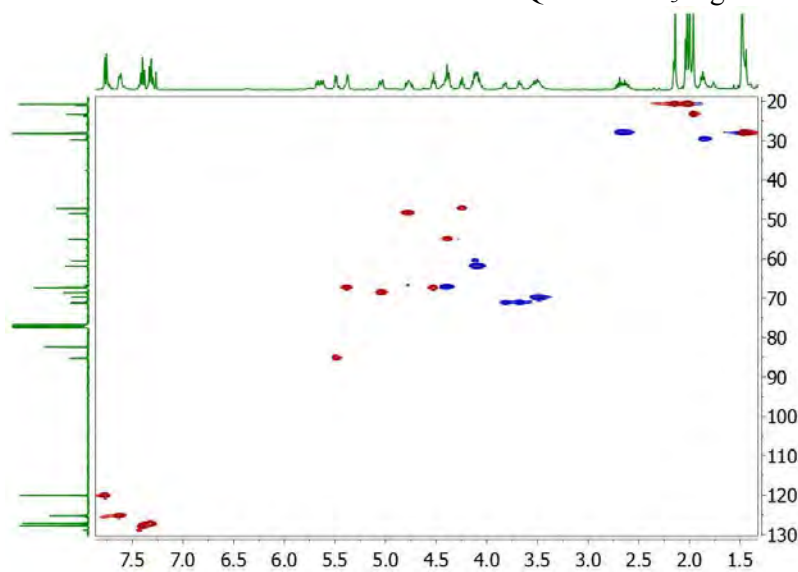


HSQC in CDCl₃ registered at 298K



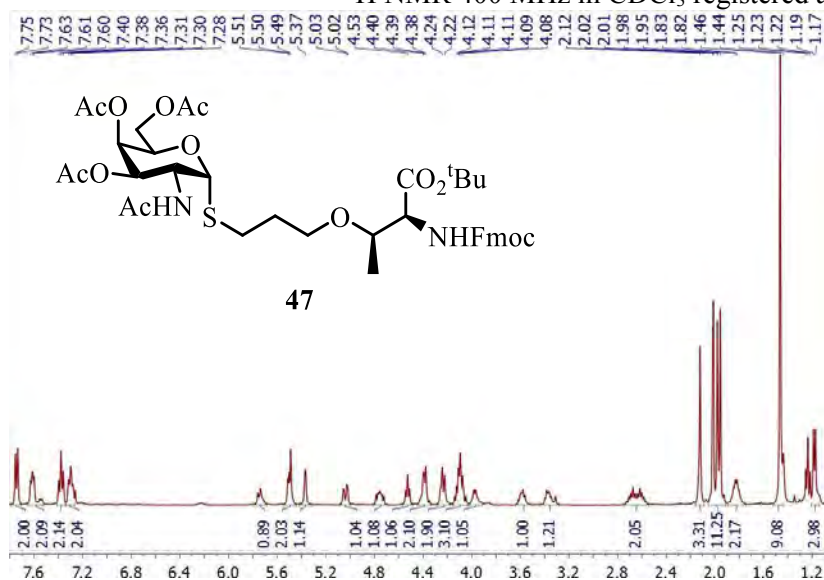
Annex.3 NMR spectra of chapter 4

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-serine *tert*-butyl ester (46)** ^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K ^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K

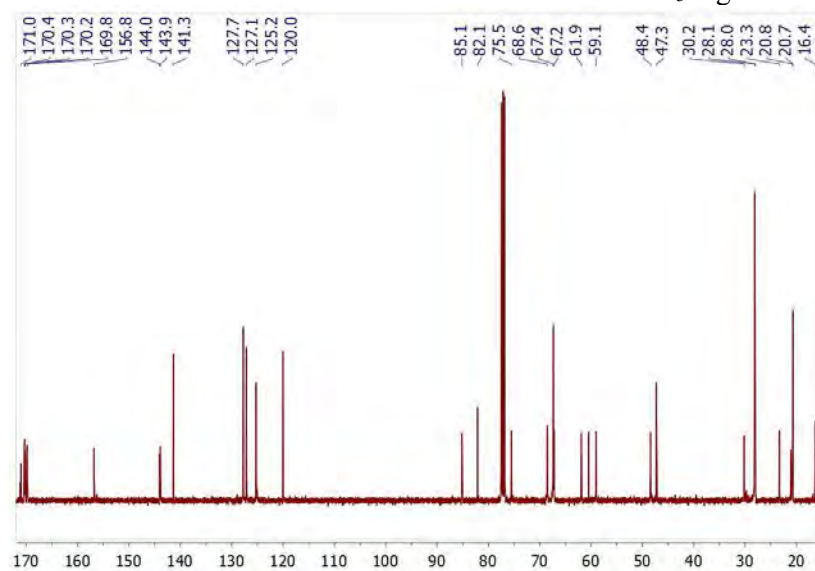
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

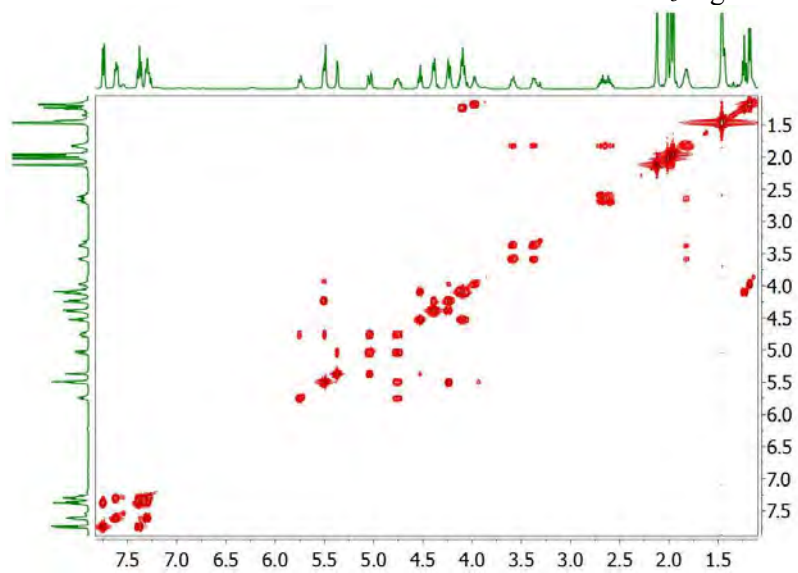
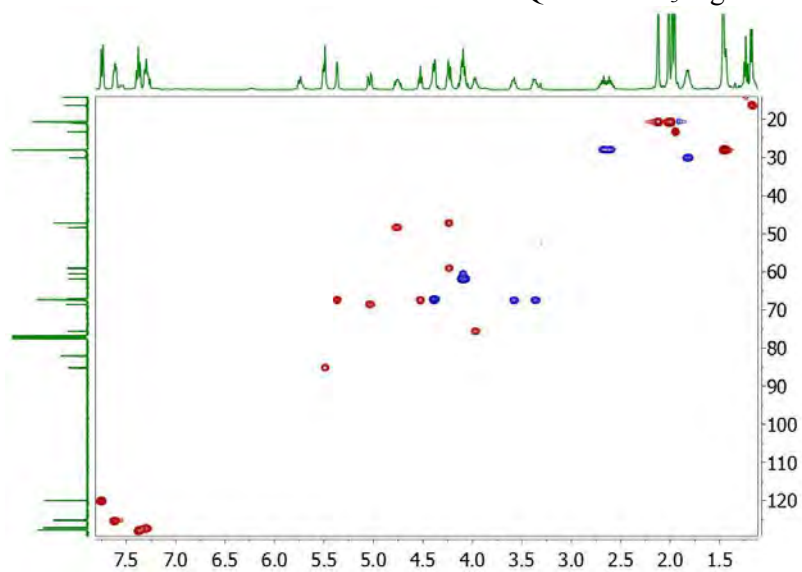
***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-threonine *tert*-butyl ester (47)**

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K



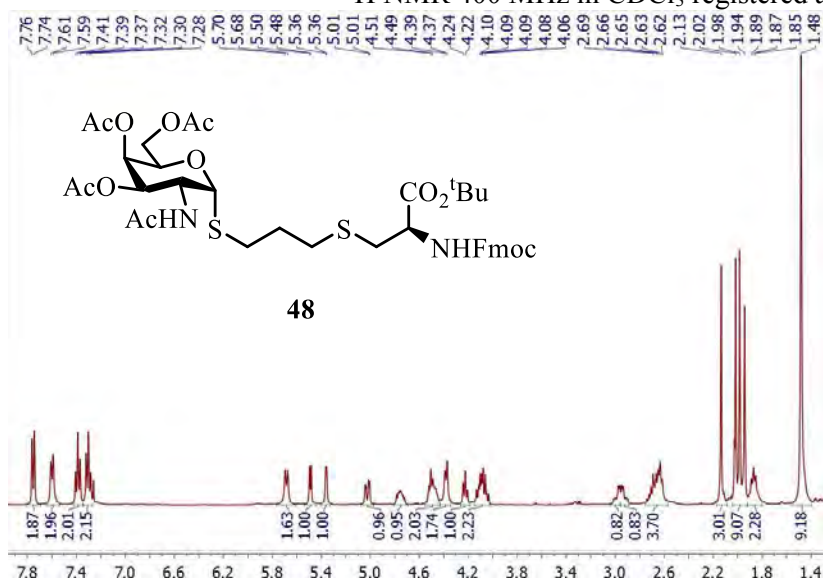
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



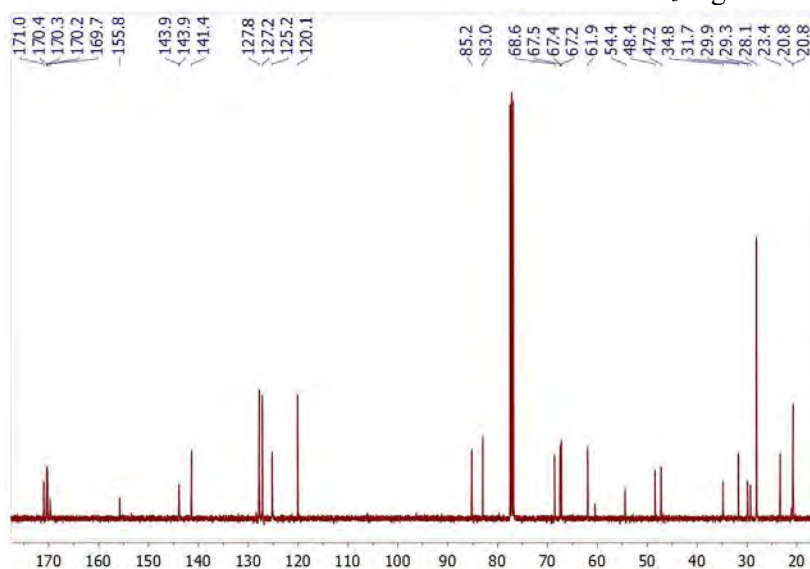
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

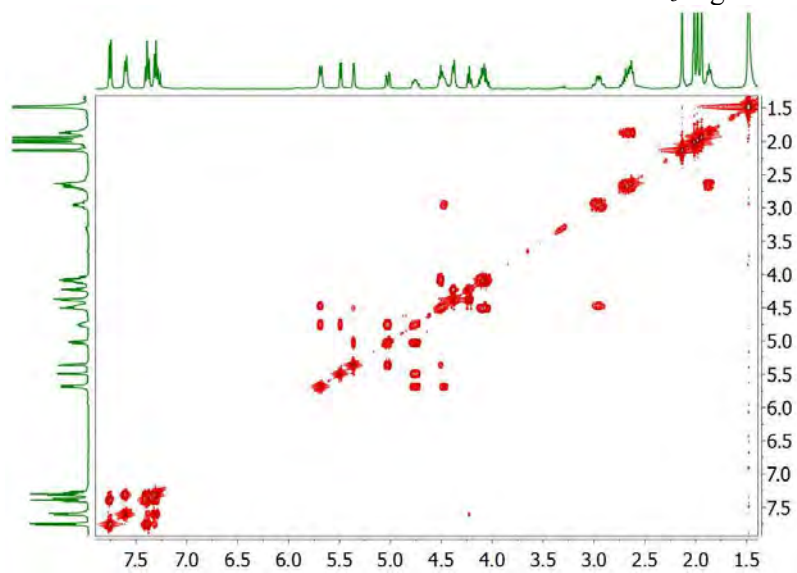
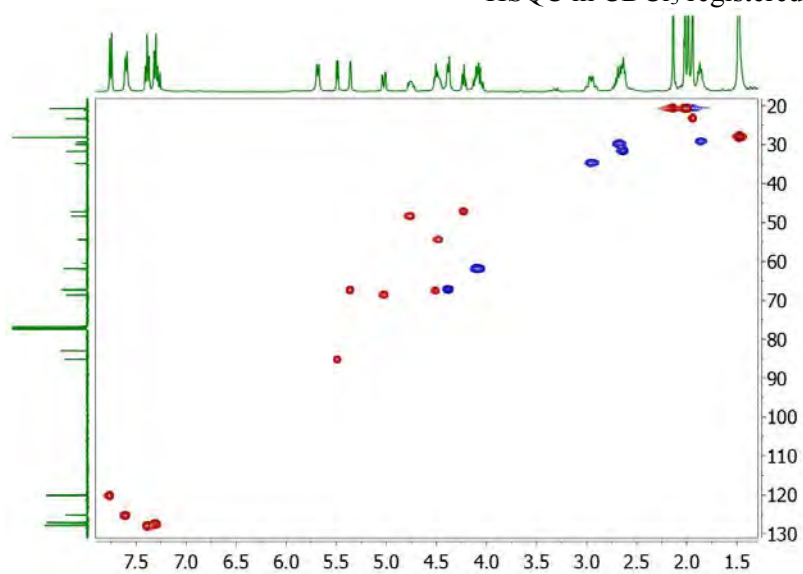
***N*-Fmoc-*S*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**48**)**

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K

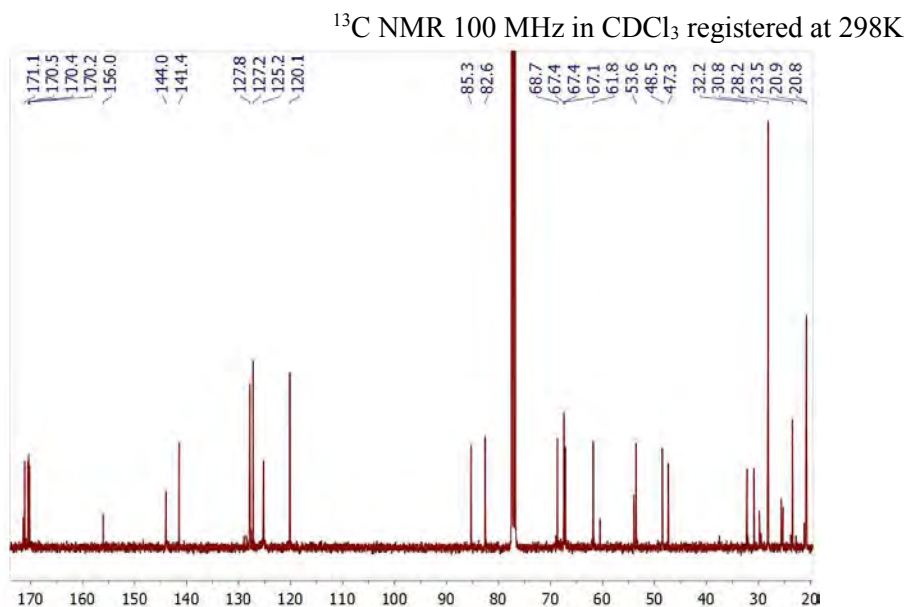
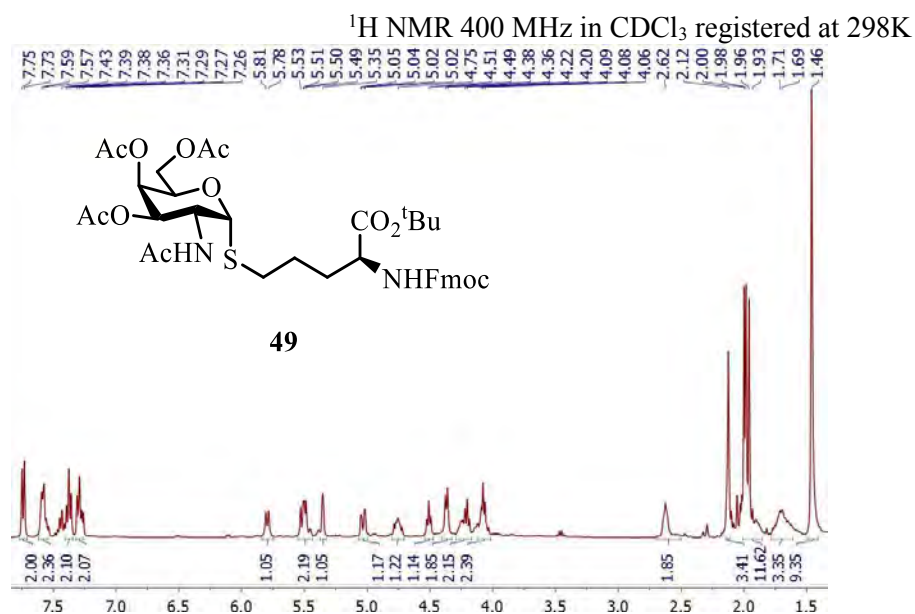


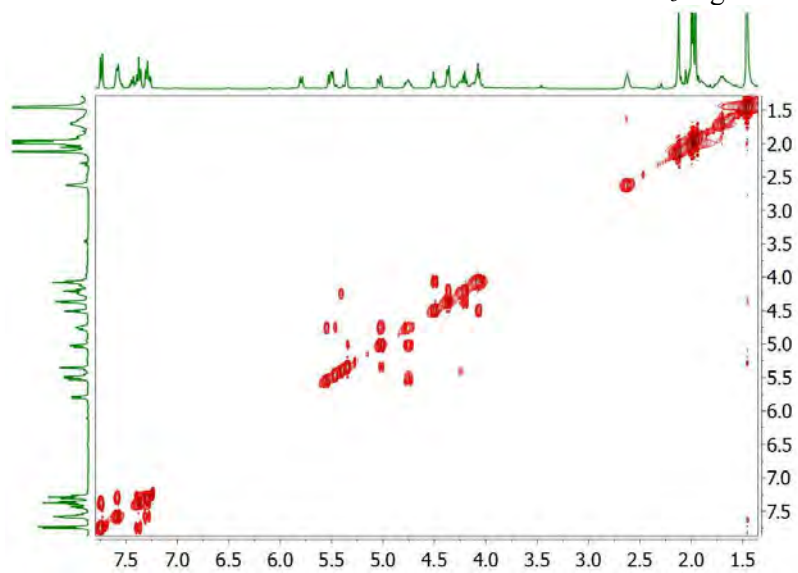
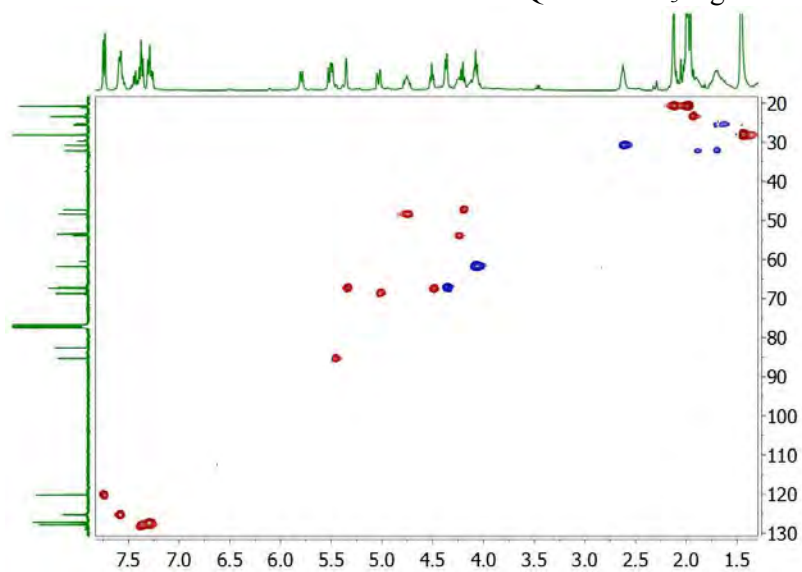
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



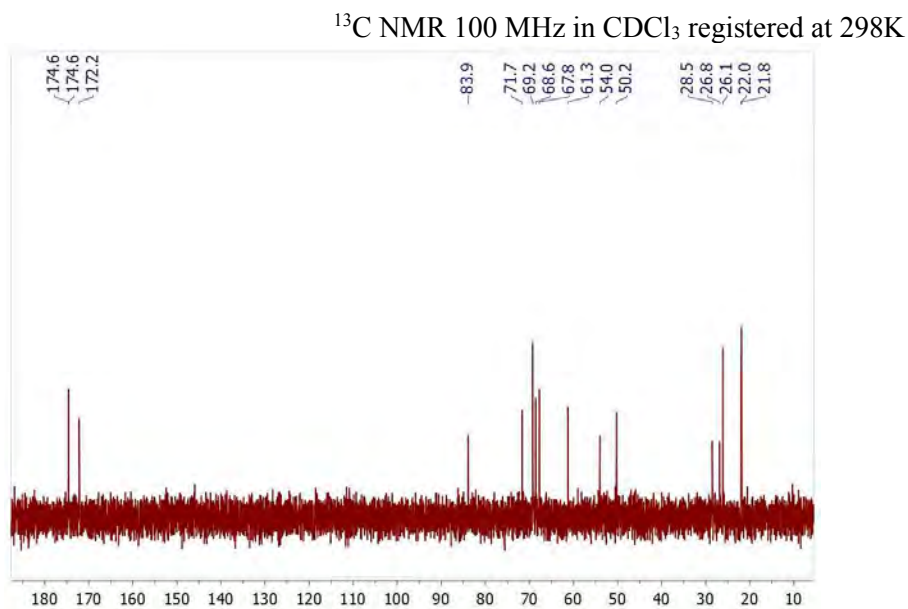
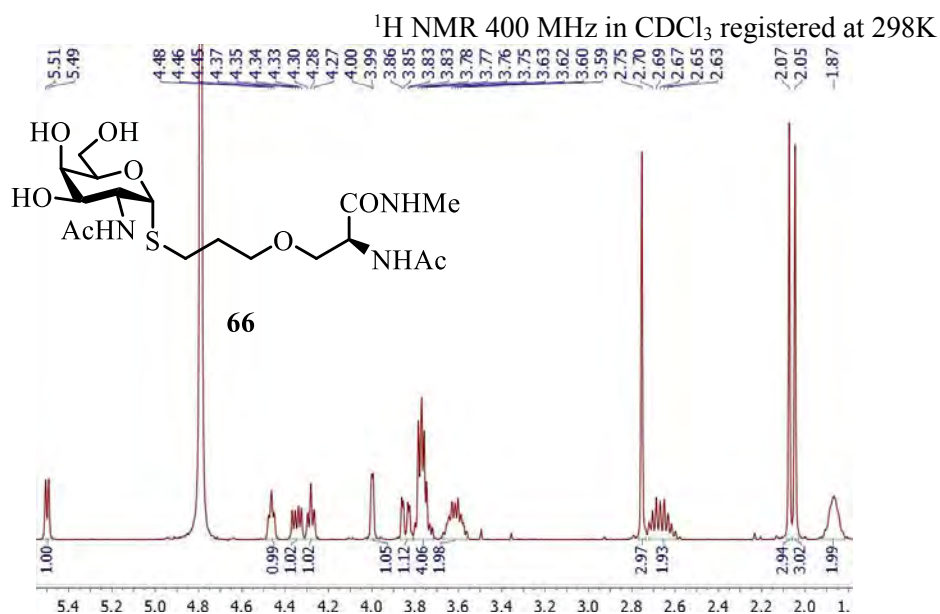
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

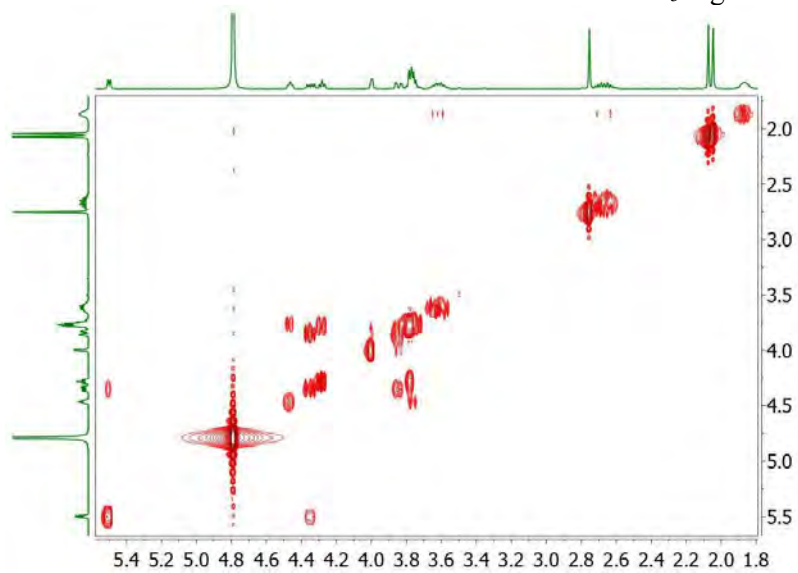
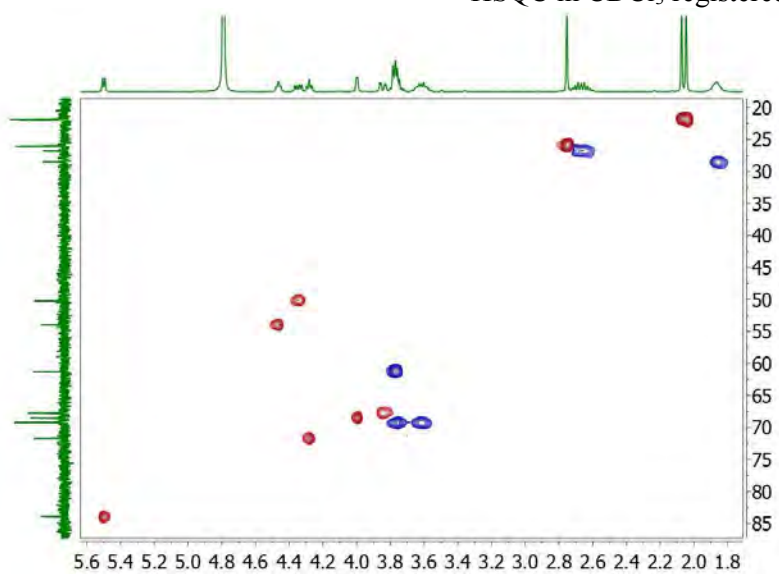
***N*-Fmoc-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-*L*-homohomocysteine *tert*-butyl ester (49)**



COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

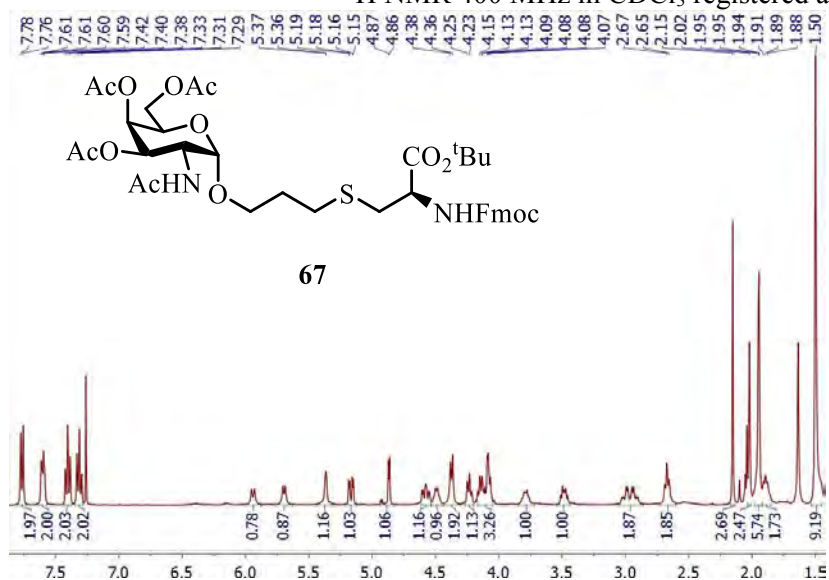
N-Acetyl-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-serine methyl amide (**66**)



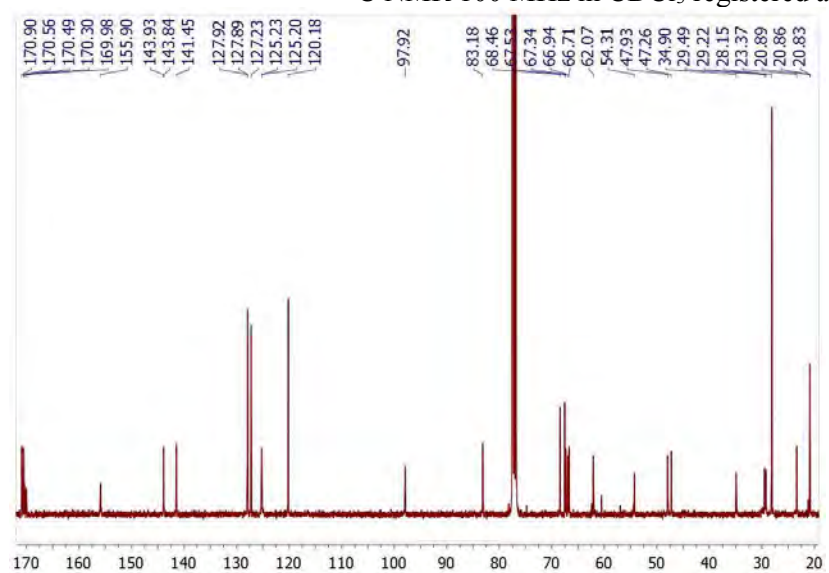
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

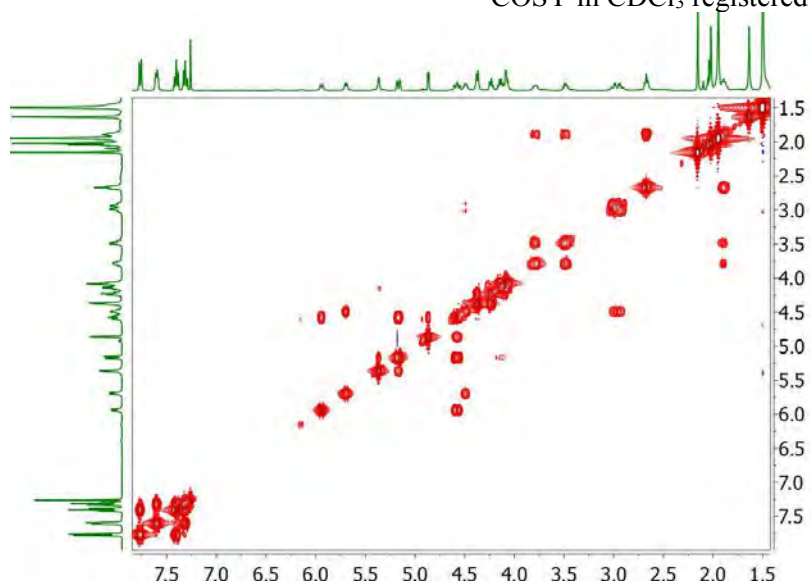
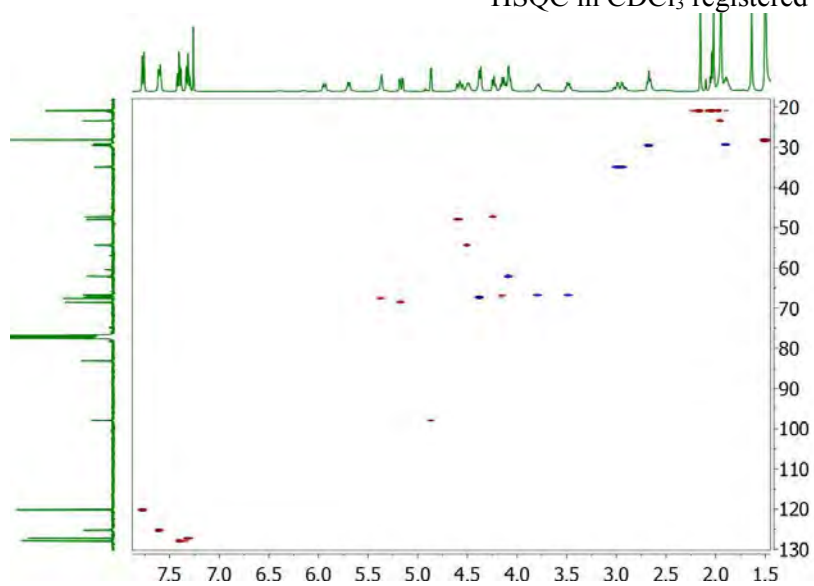
***N*-Fmoc-*S*-(*O*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)oxopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (67)**

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K

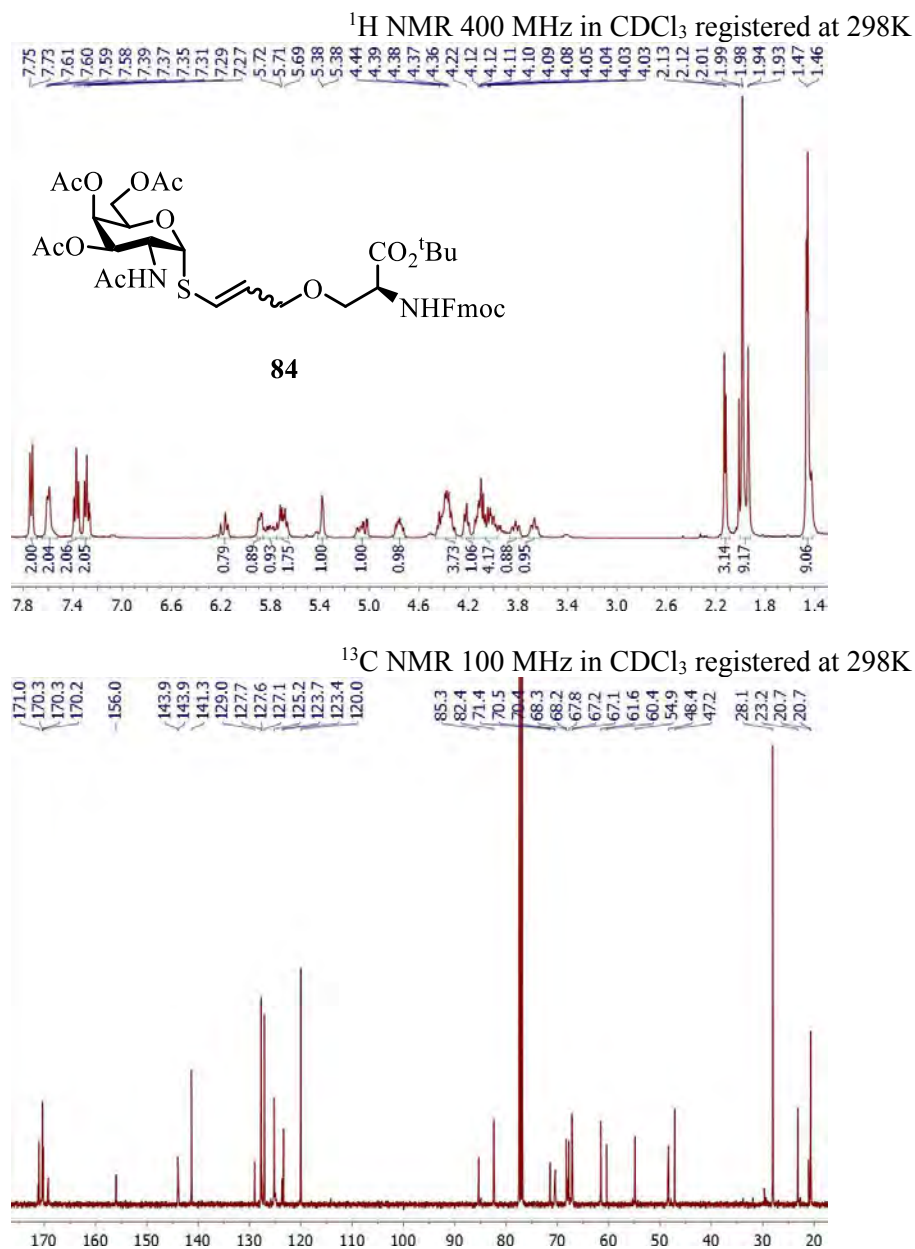


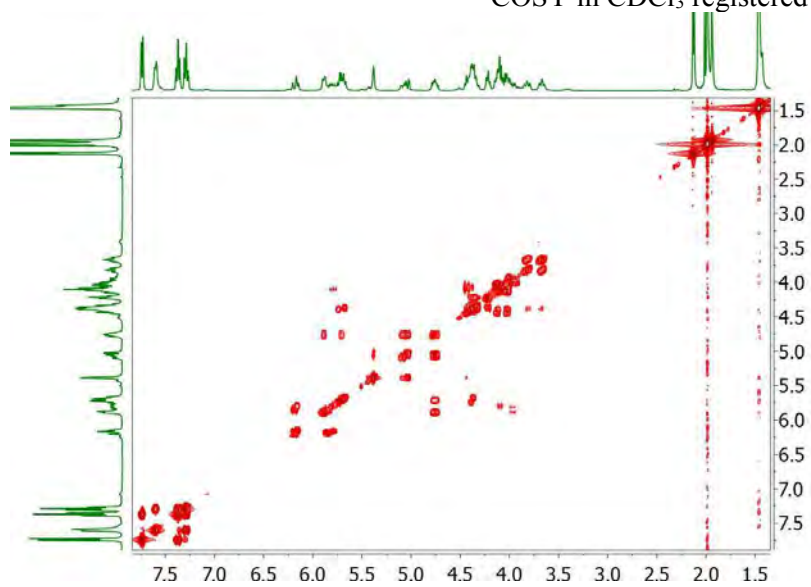
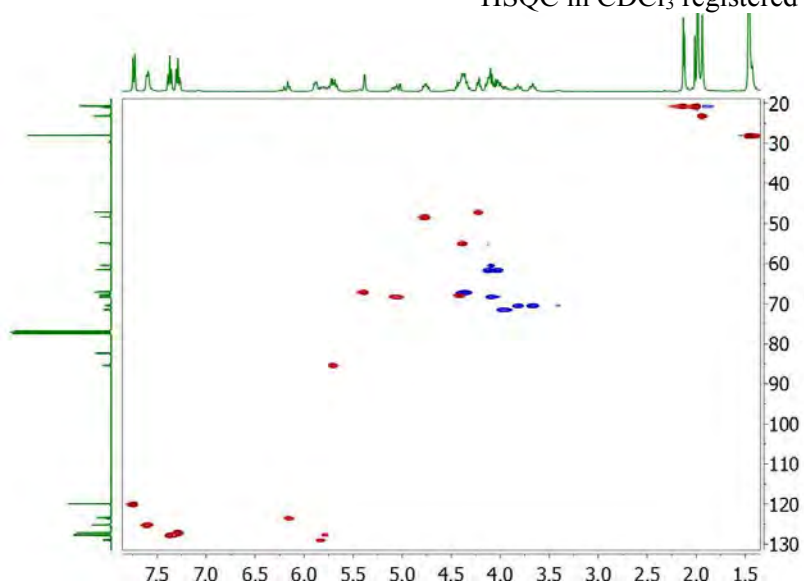
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

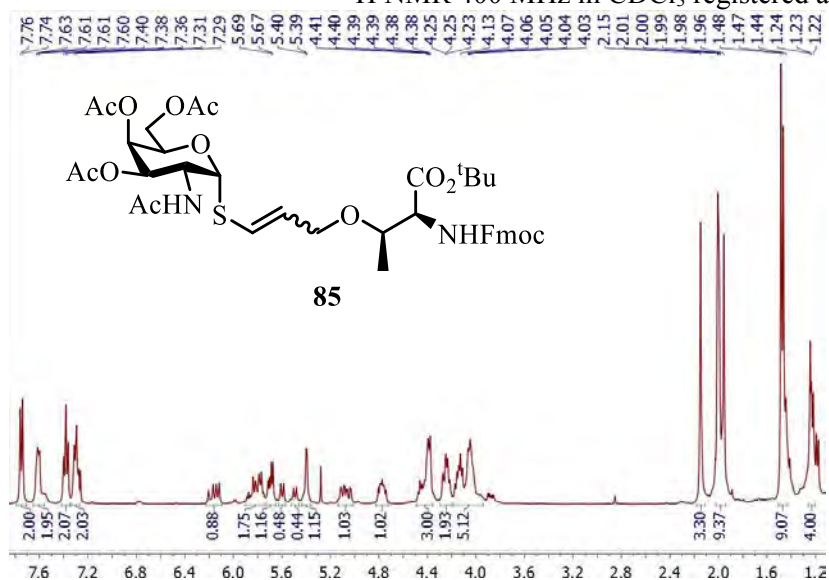
Annex.4 NMR spectra of chapter 5

***N*-Fmoc-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-L-serine *tert*-butyl ester (**84**)**

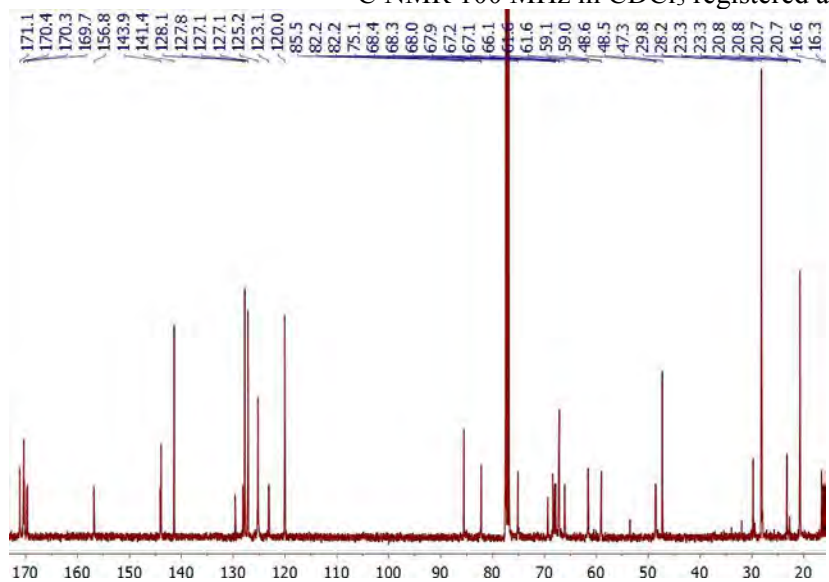
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

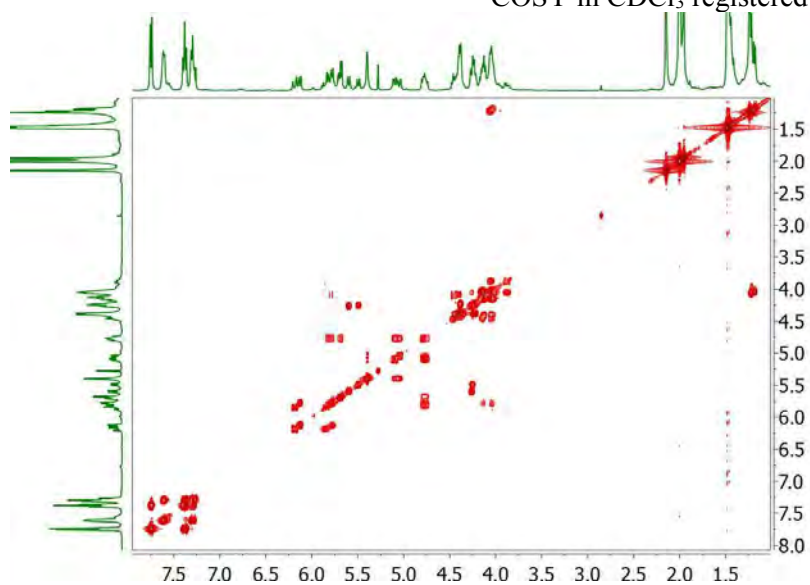
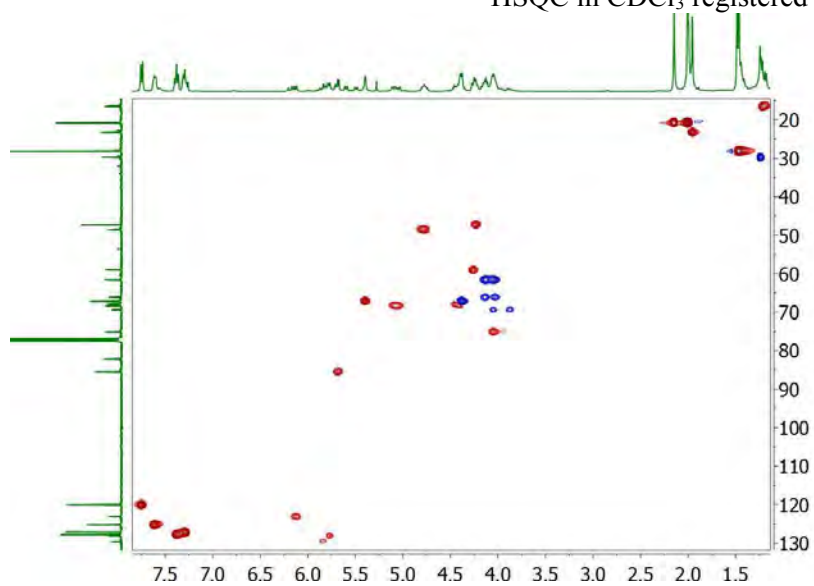
***N*-Fmoc-*O*-(*S*-(2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (**85**)**

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K



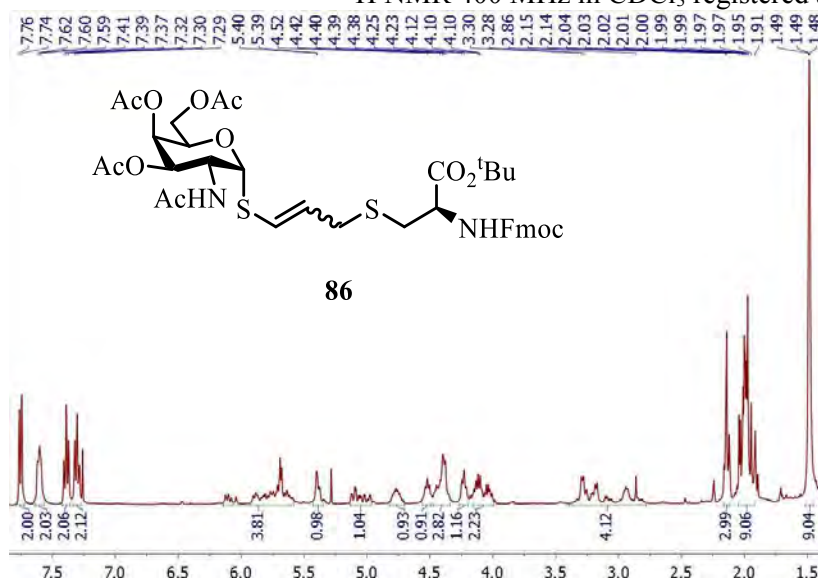
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



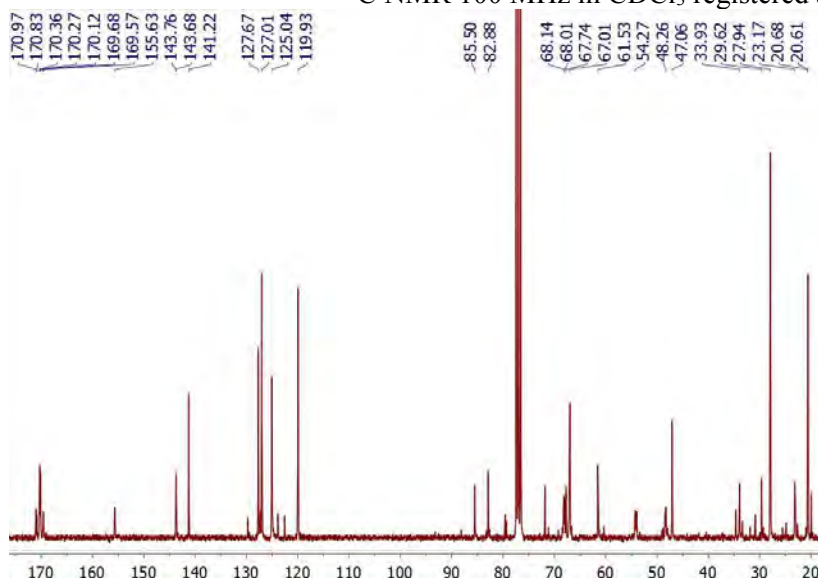
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

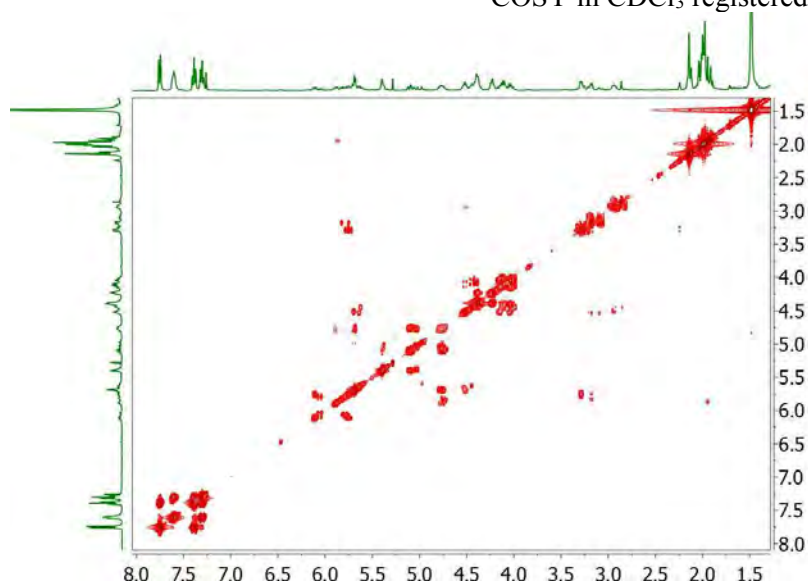
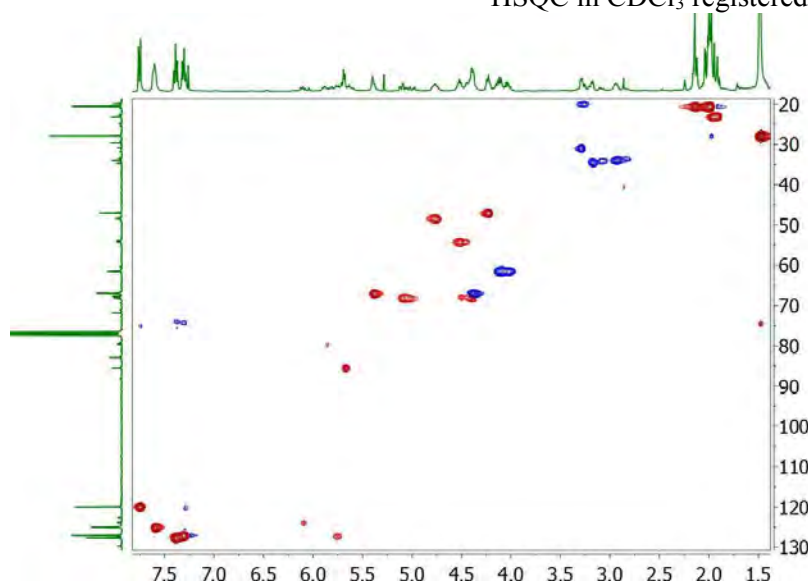
***N*-Fmoc-*S*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**86**)**

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K

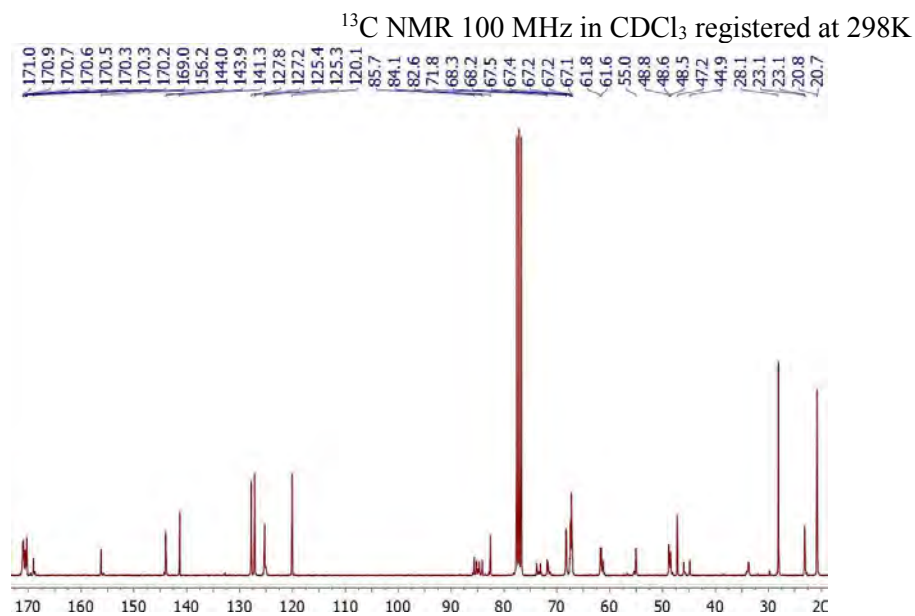
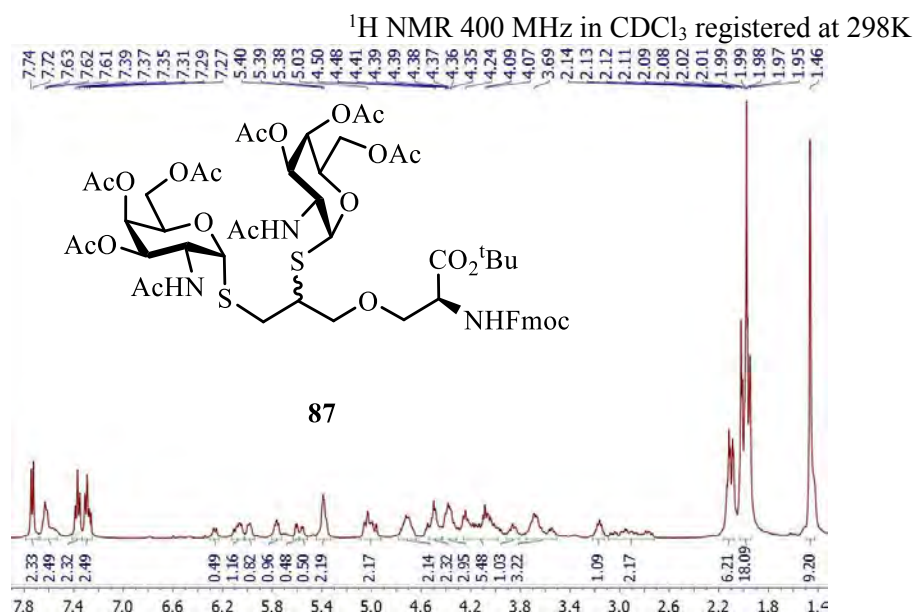


^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K

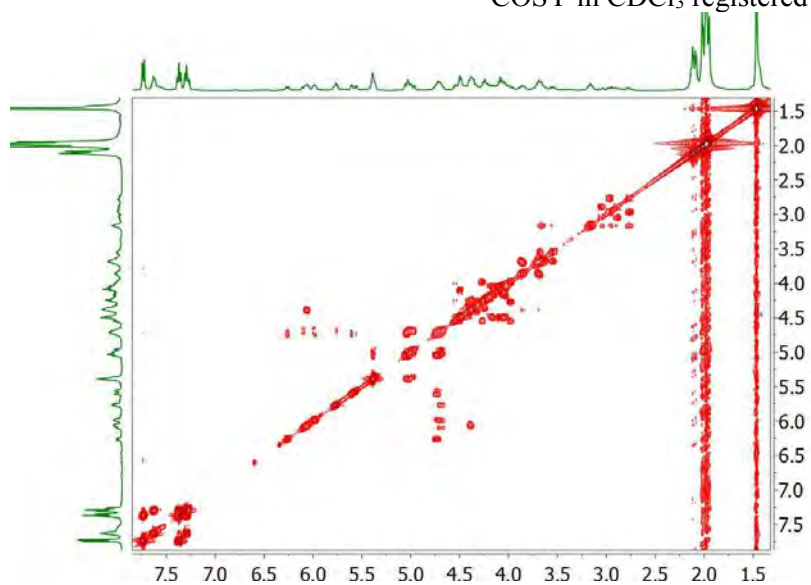


COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

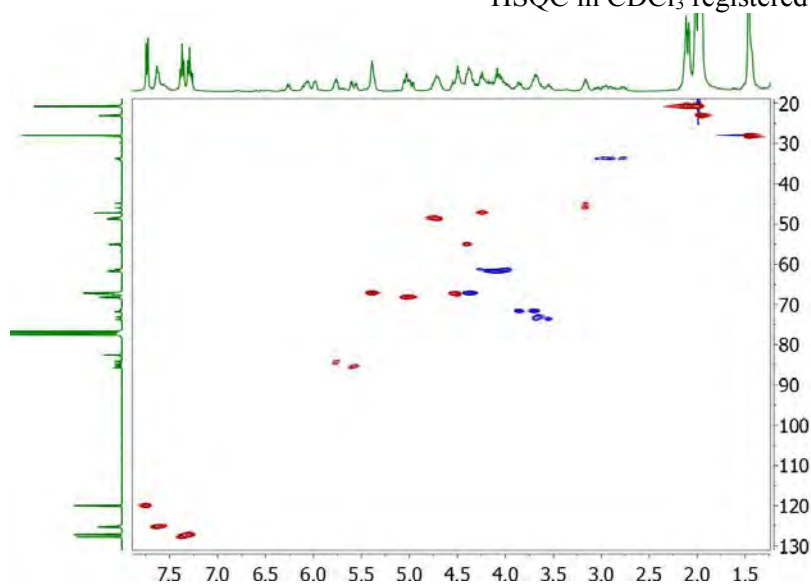
***N*-Fmoc-*O*-(bis-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester (**87**)**



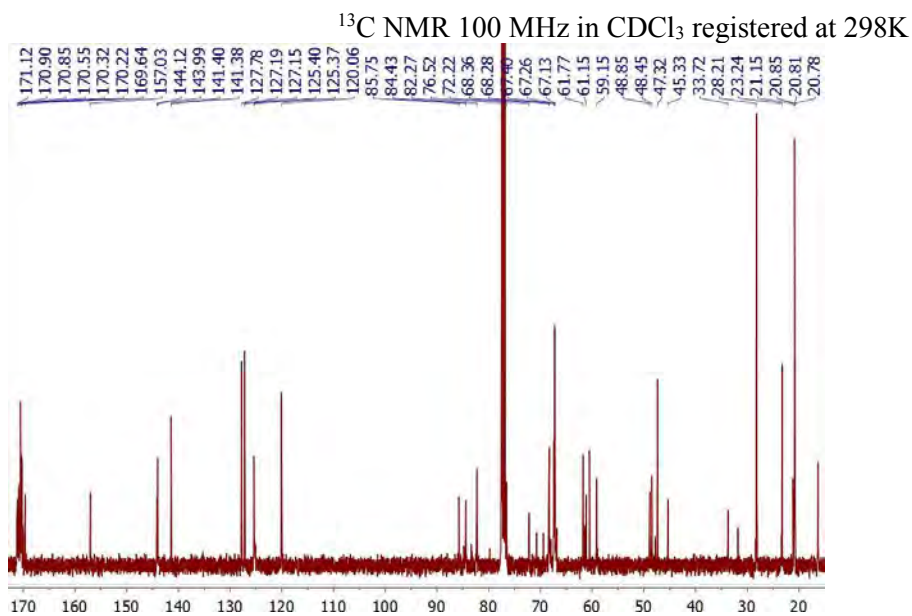
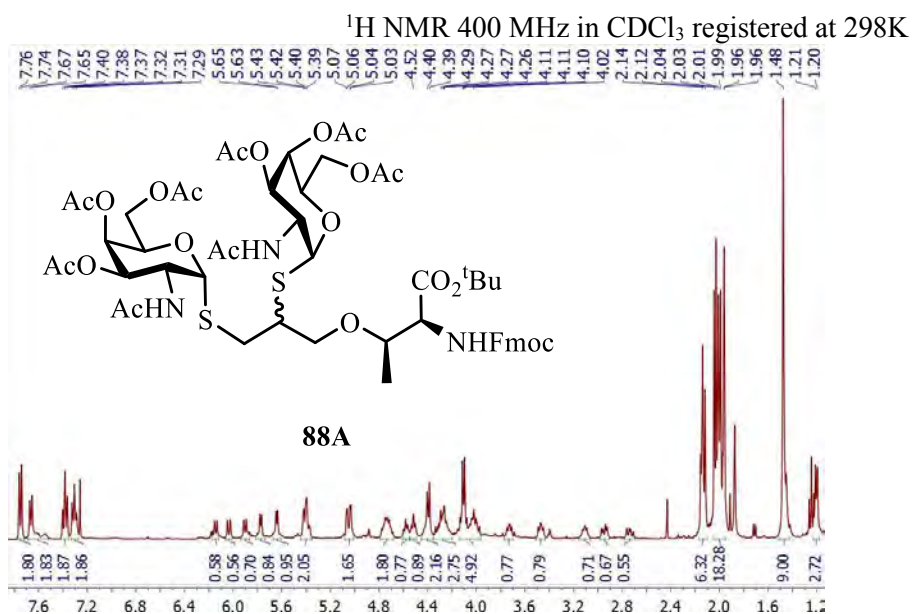
COSY in CDCl₃ registered at 298K

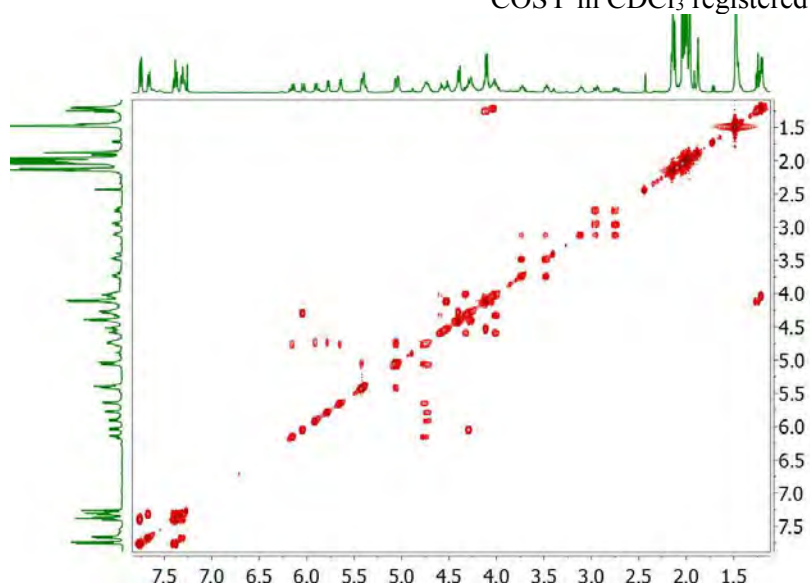
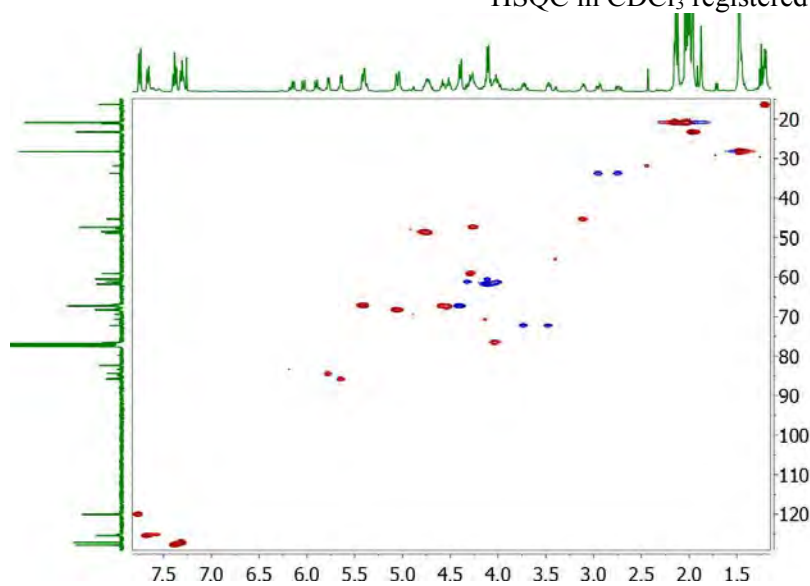


HSQC in CDCl₃ registered at 298K



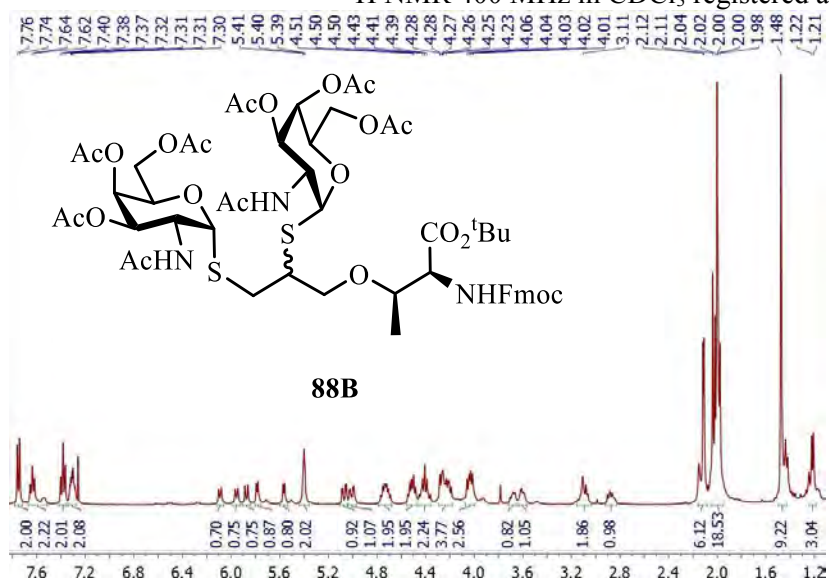
***N*-Fmoc-*O*-(bis-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (88A)**



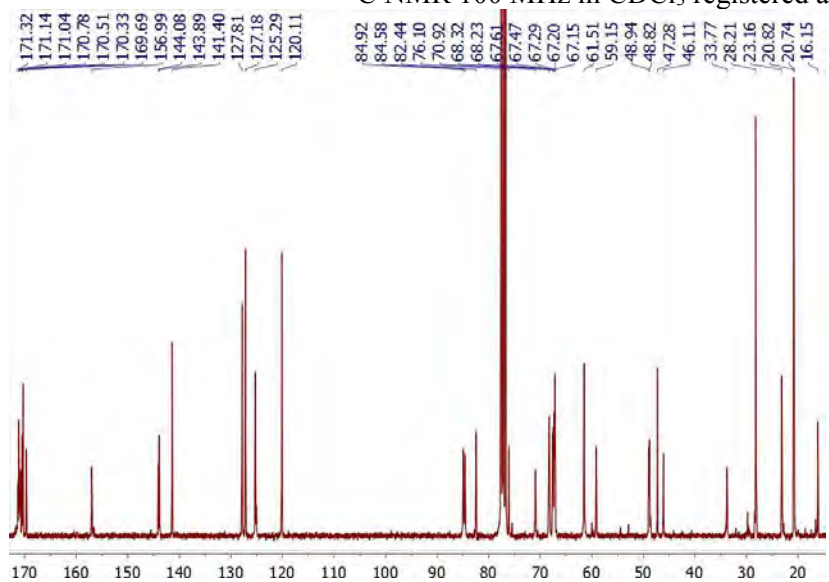
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

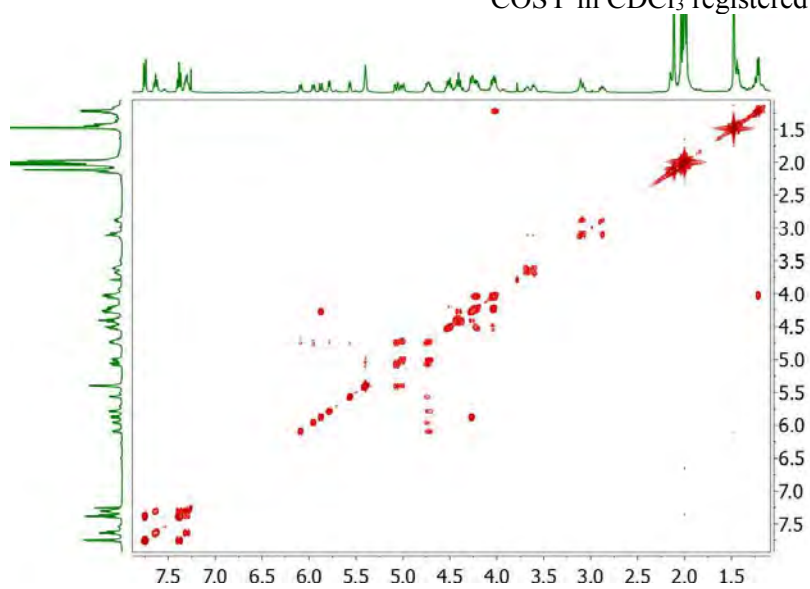
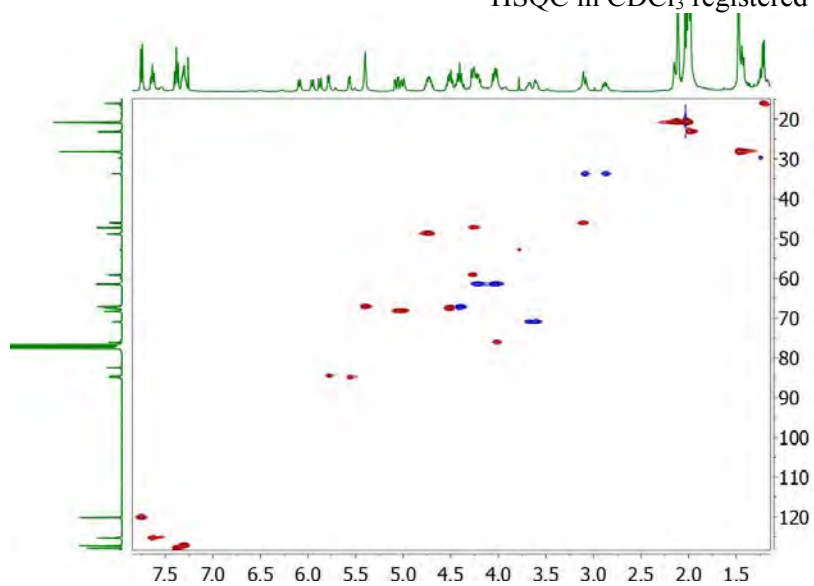
***N*-Fmoc-*O*-(bis-*S*-(2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (**88B**)**

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K

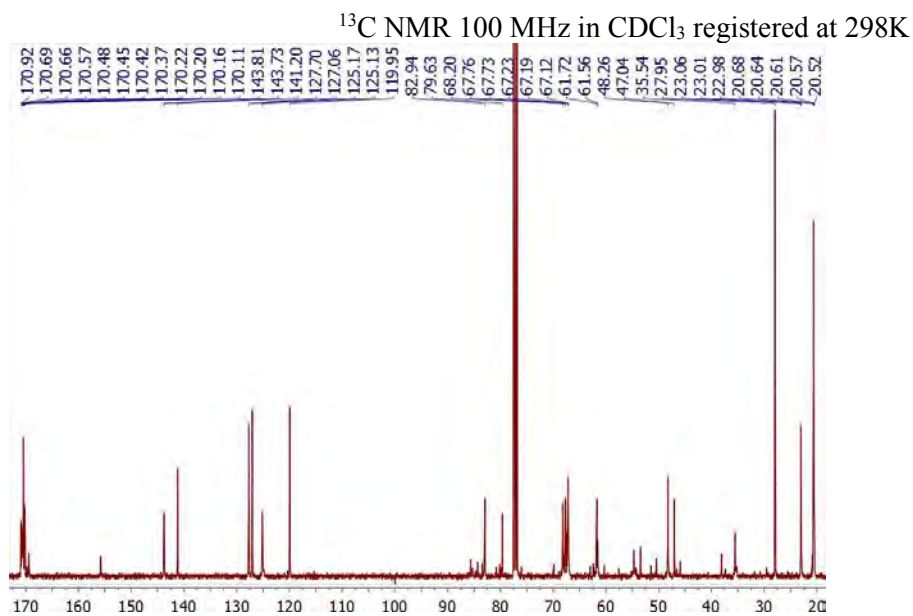
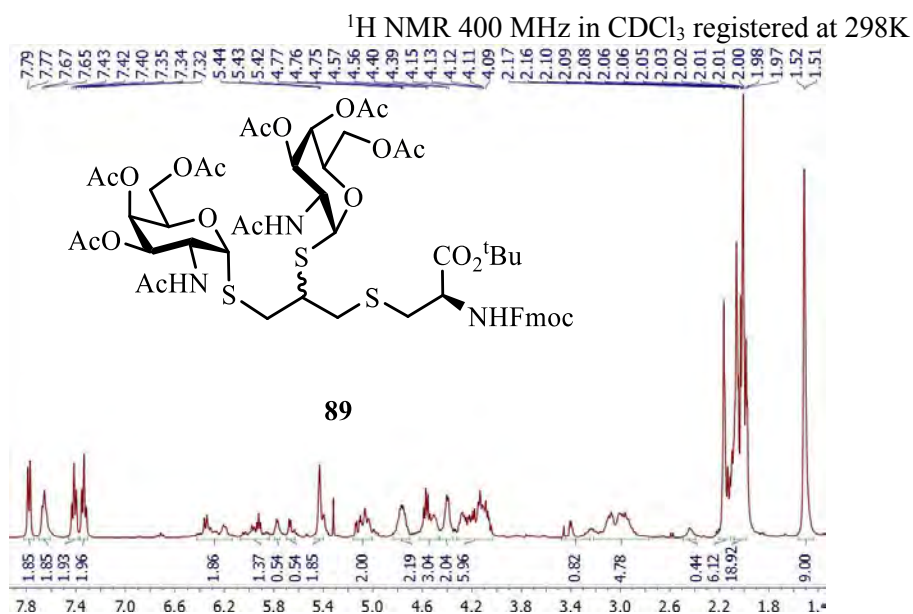


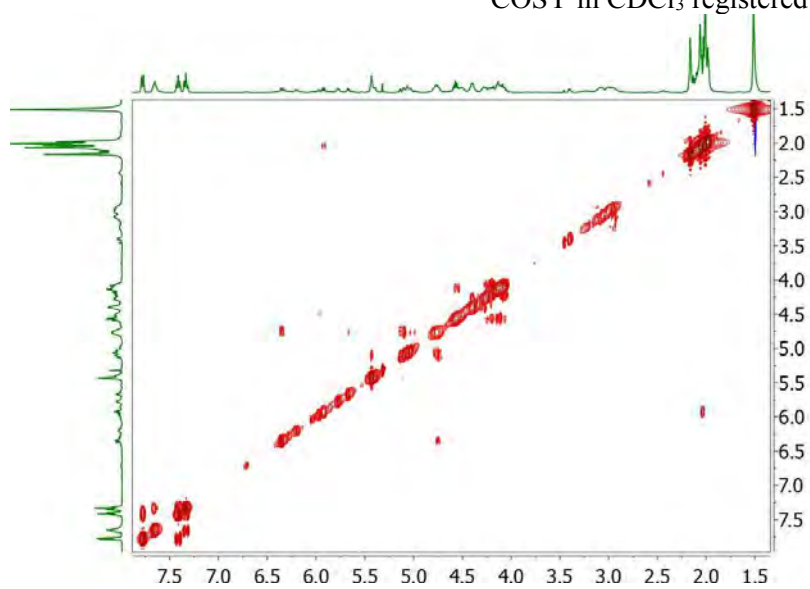
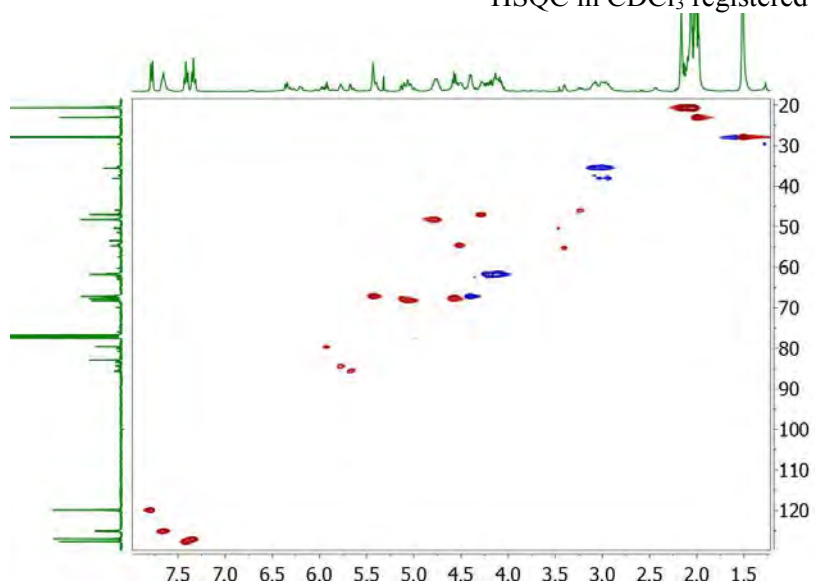
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

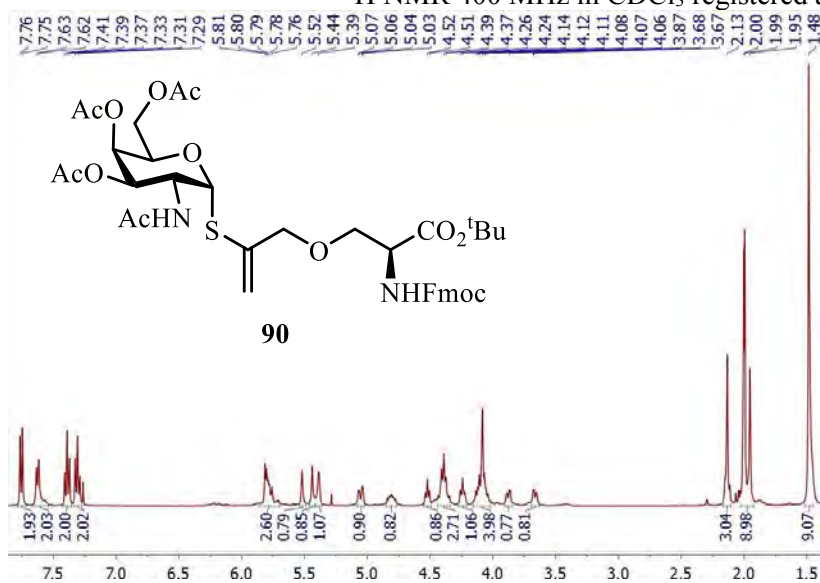
***N*-Fmoc-*S*-(bis-*S*-(2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester (**89**)**



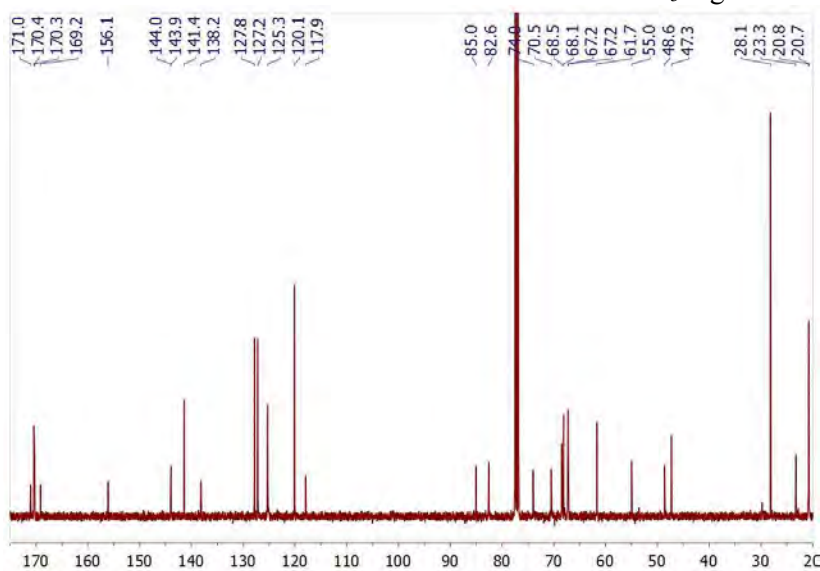
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

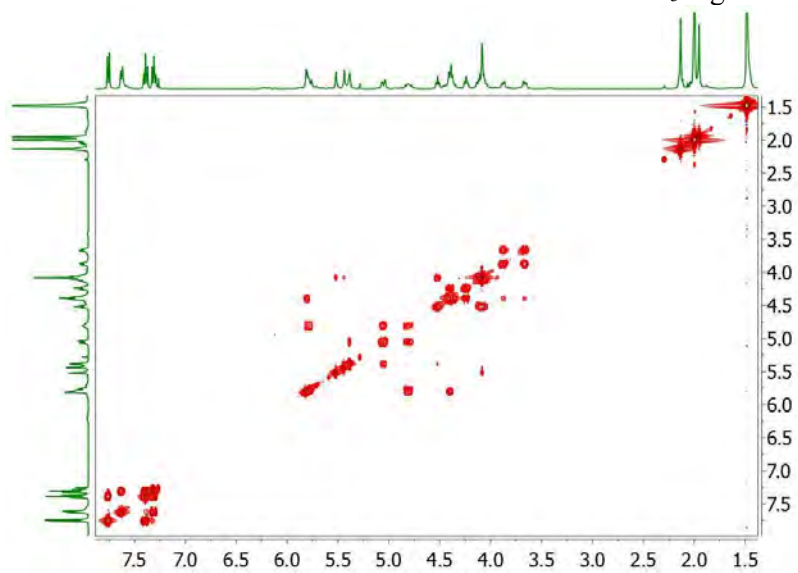
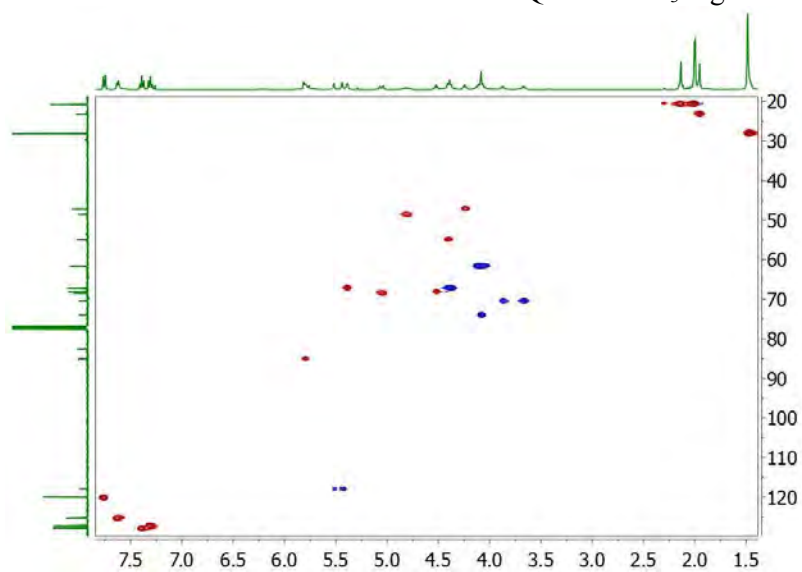
N-Fmoc-O-(S-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-O-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2-mercapto-prop-2-enyl)-L-serine tert-butyl ester (90)

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K



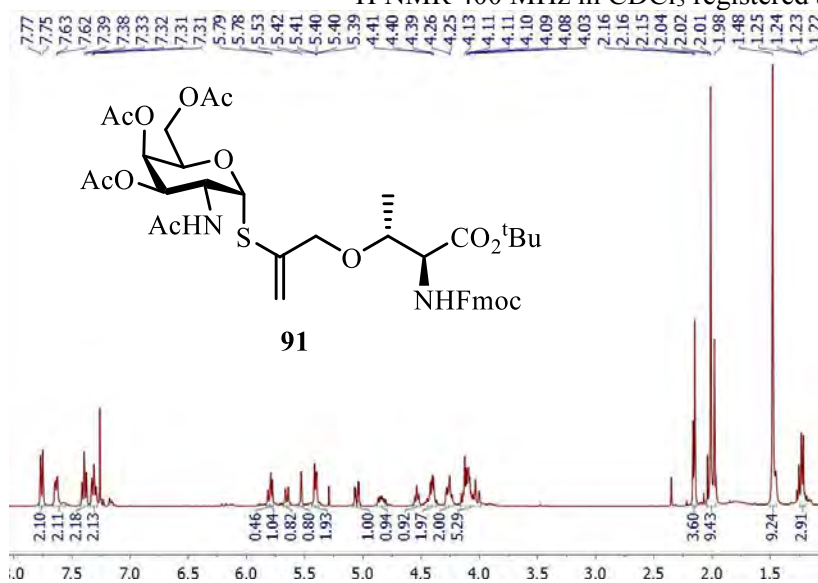
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



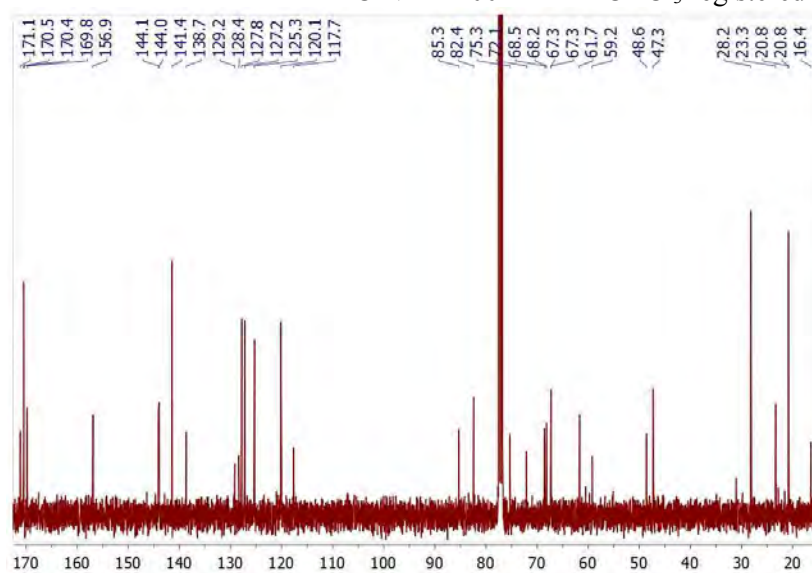
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

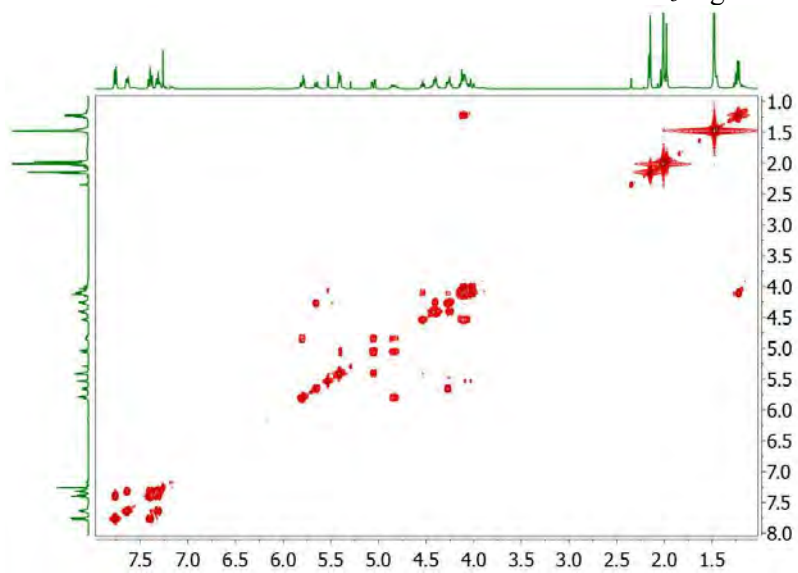
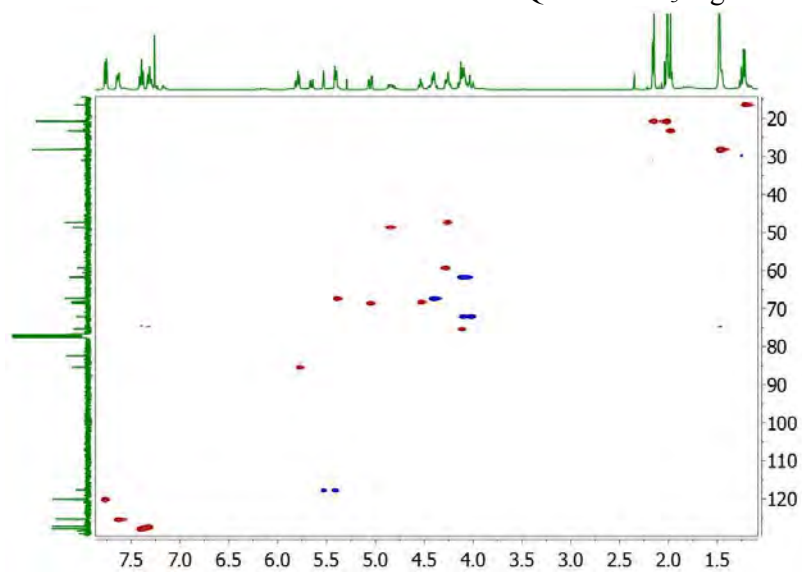
N-Fmoc-O-(S-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-O-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2-mercapto-prop-2-enyl)-L-threonine *tert*-butyl ester (91)

^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K



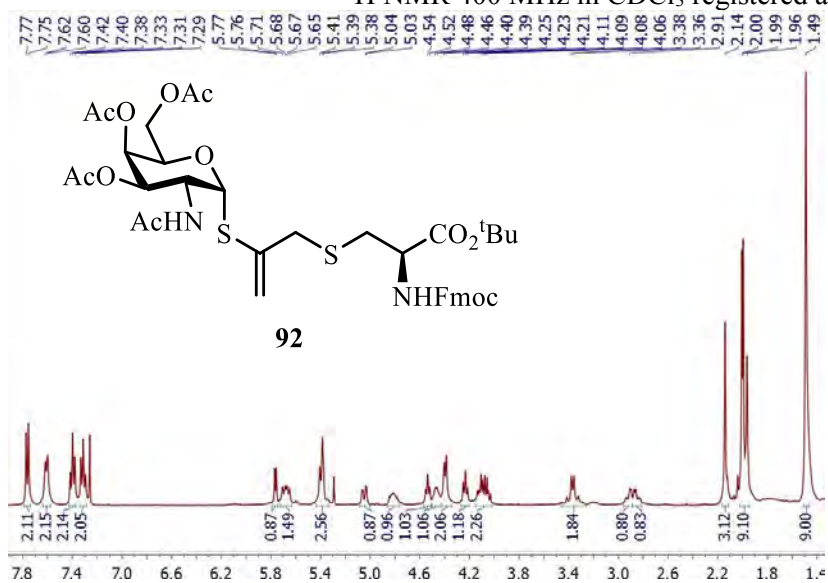
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



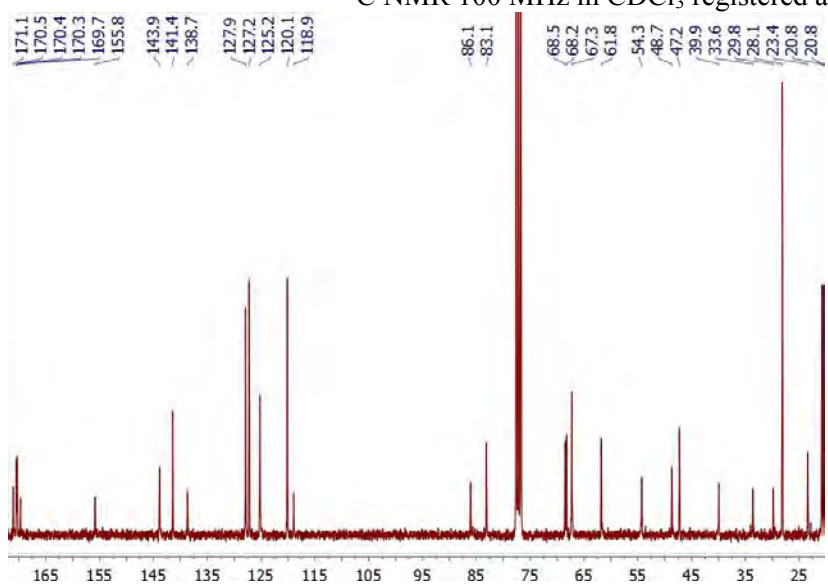
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

N-Fmoc-O-(S-(2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-O-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2-mercaptoprop-2-enyl)-L-cysteine *tert*-butyl ester (92)

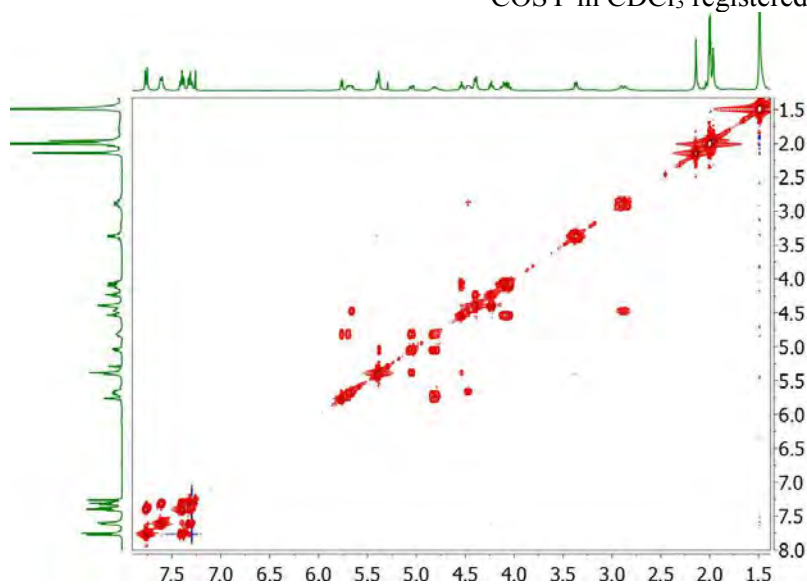
^1H NMR 400 MHz in CDCl_3 registered at 298K



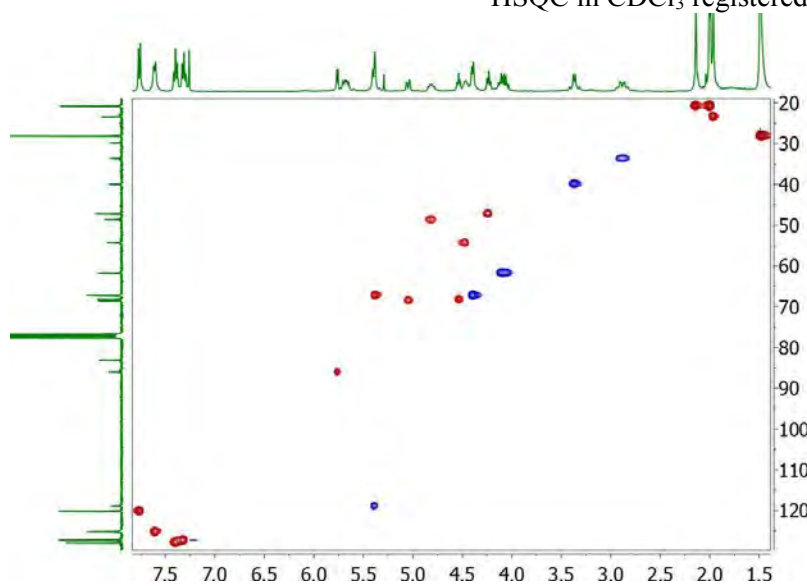
^{13}C NMR 100 MHz in CDCl_3 registered at 298K



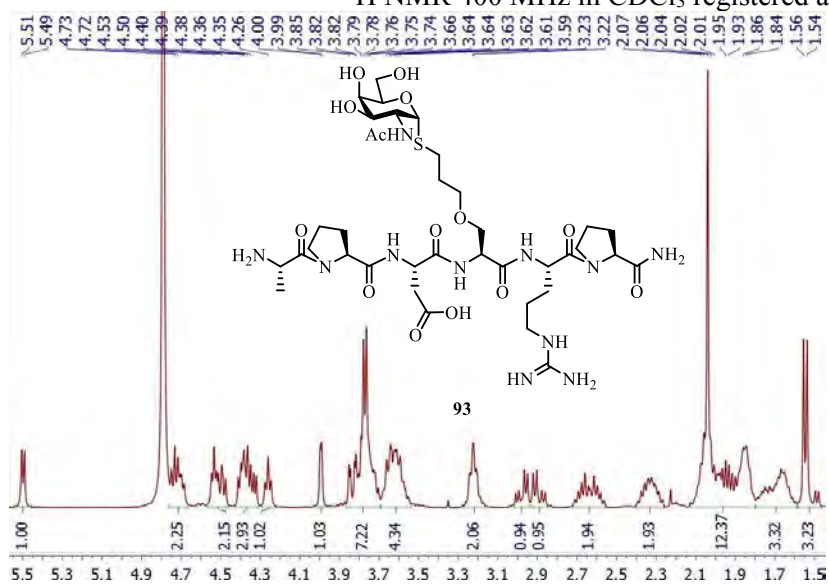
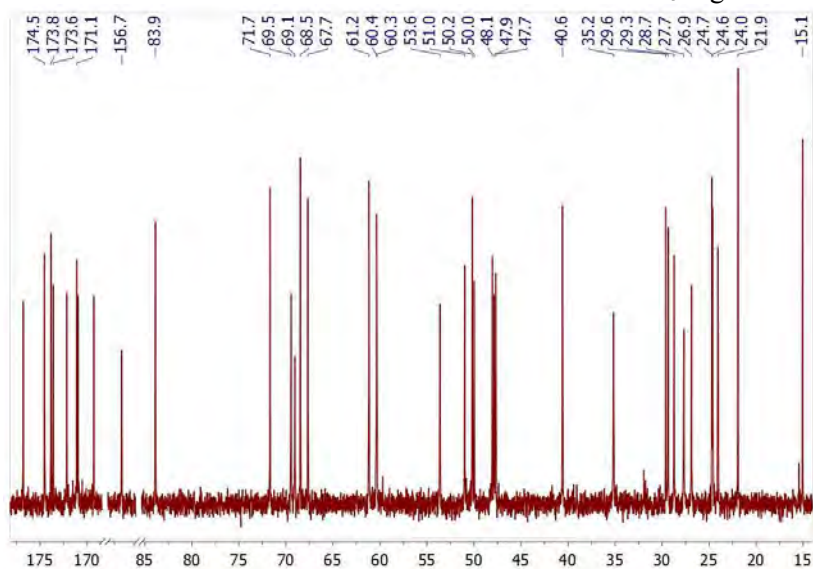
COSY in CDCl₃ registered at 298K

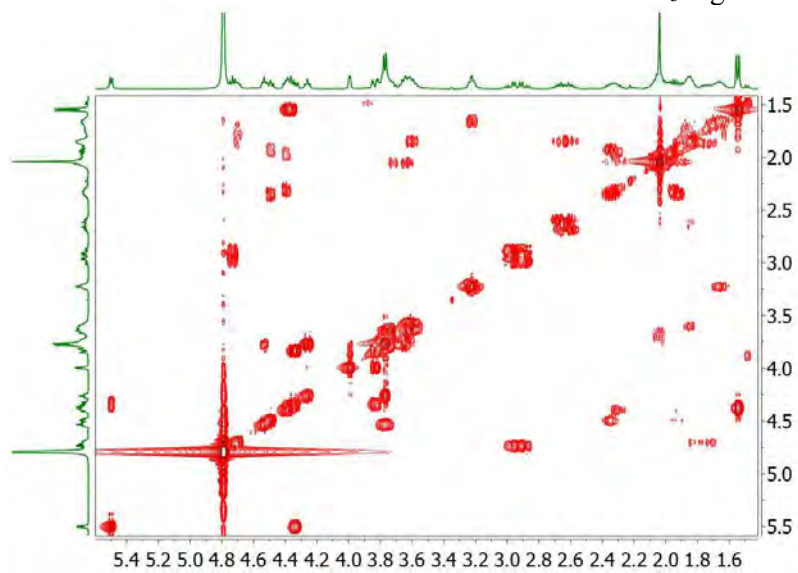
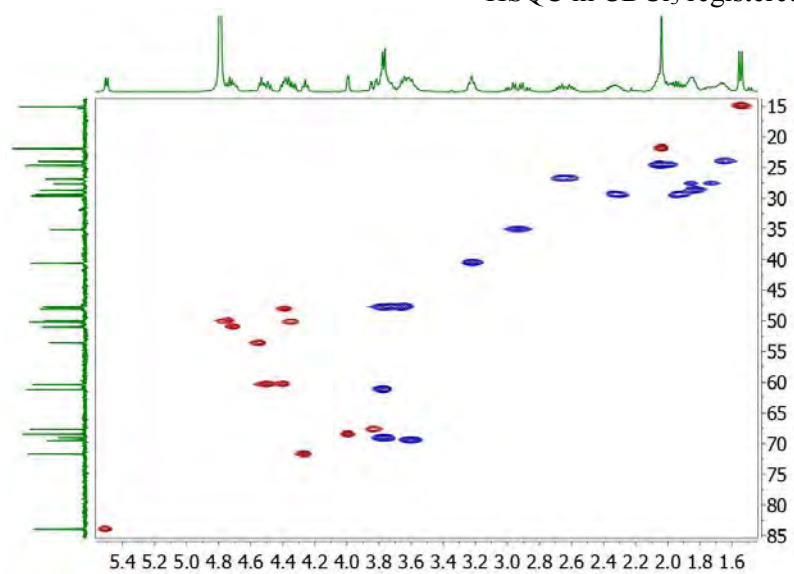


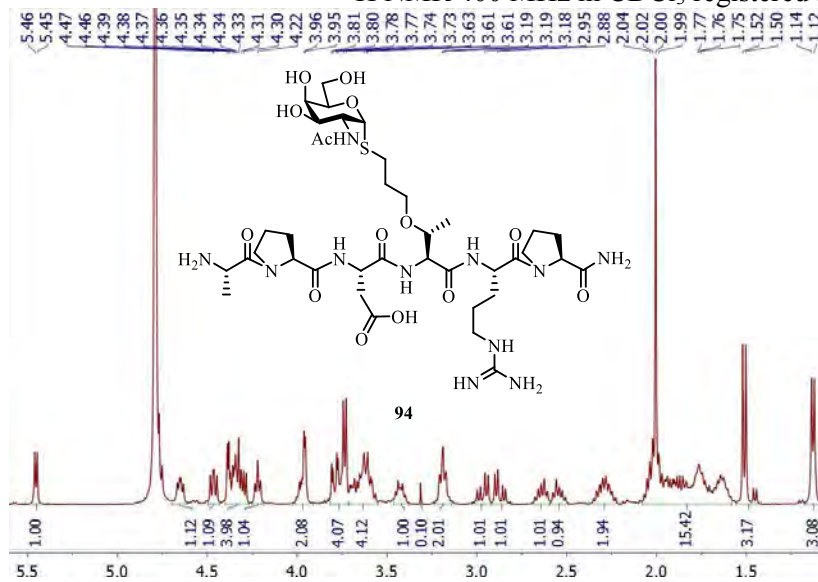
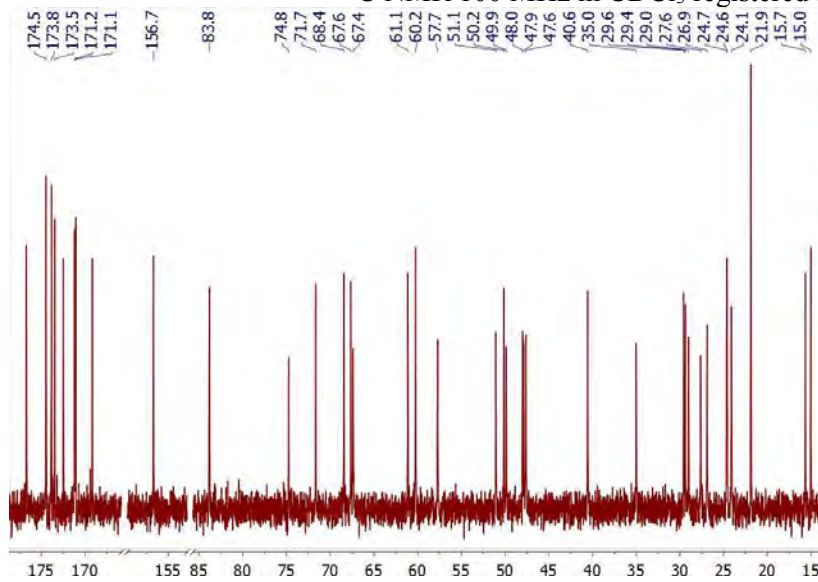
HSQC in CDCl₃ registered at 298K

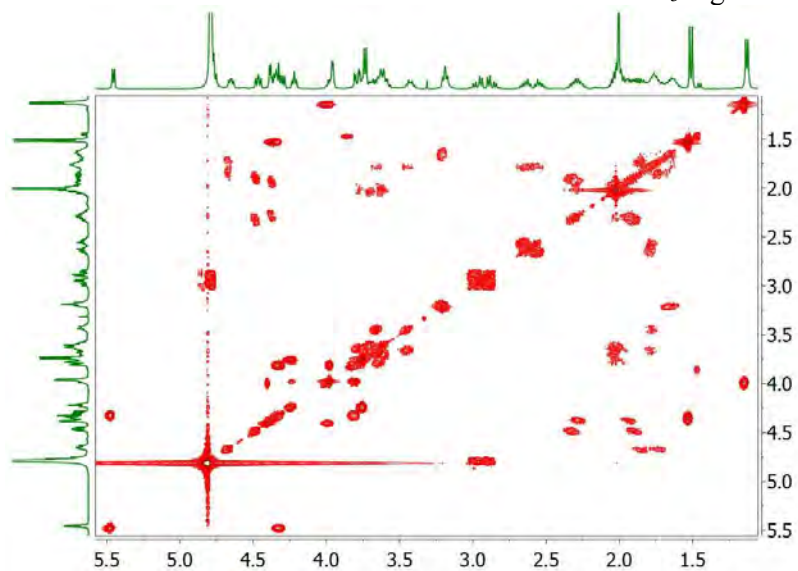
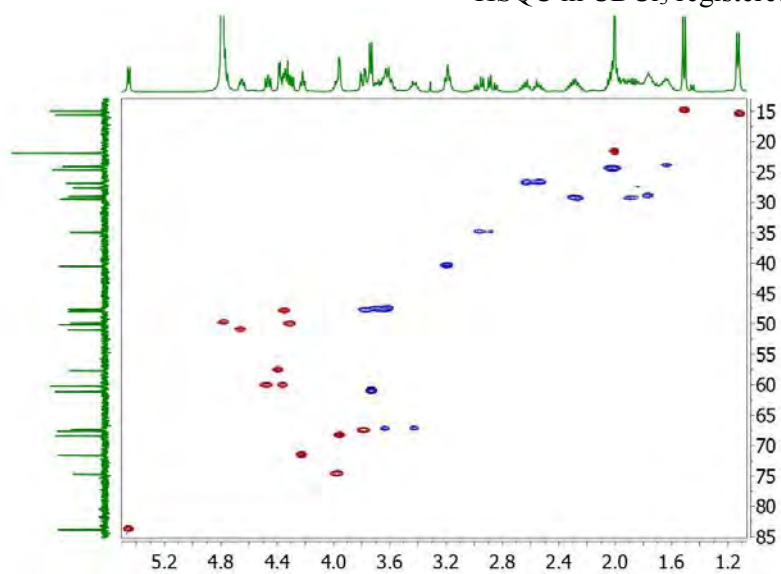


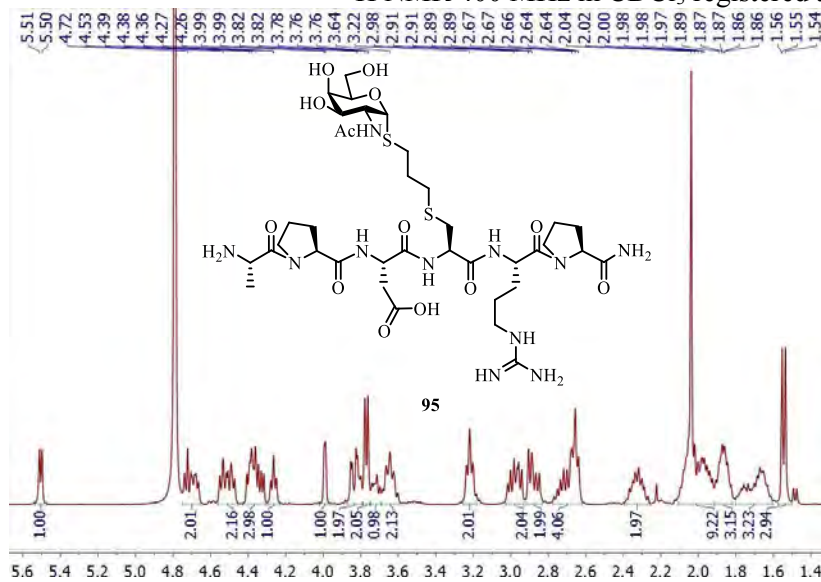
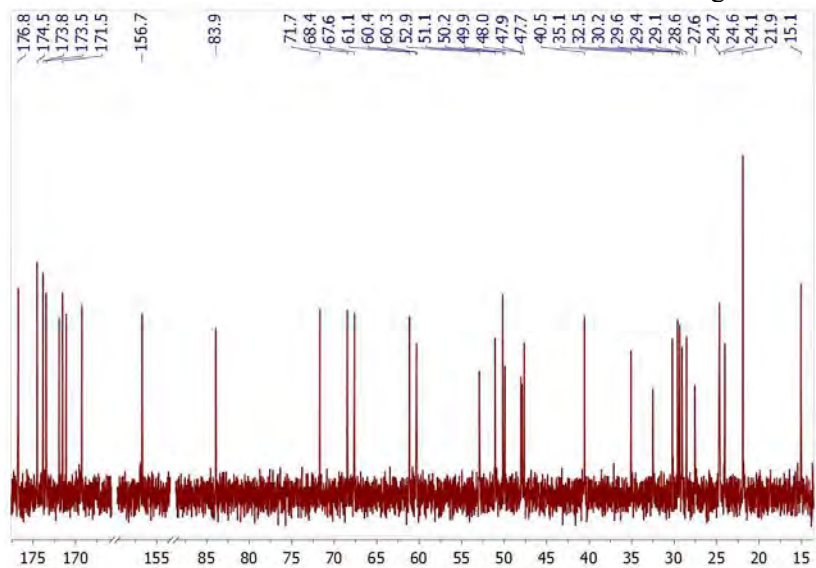
Annex.5 NMR spectra of chapter 6

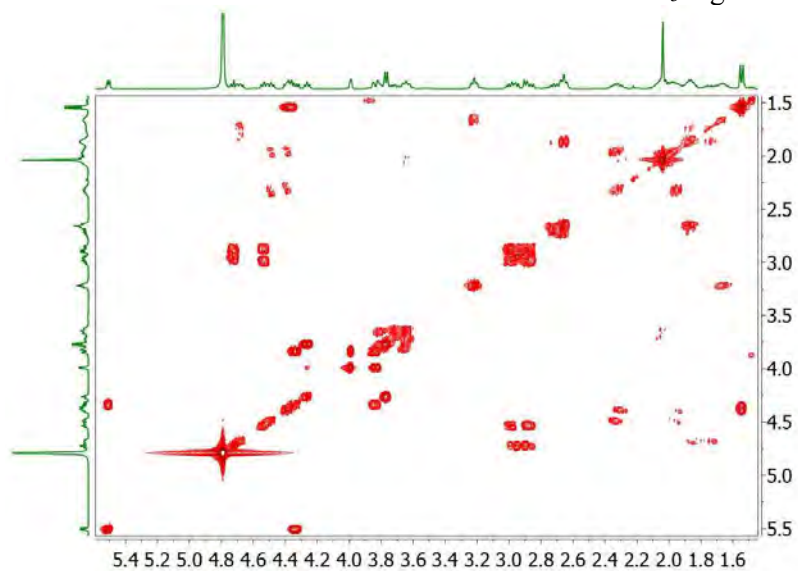
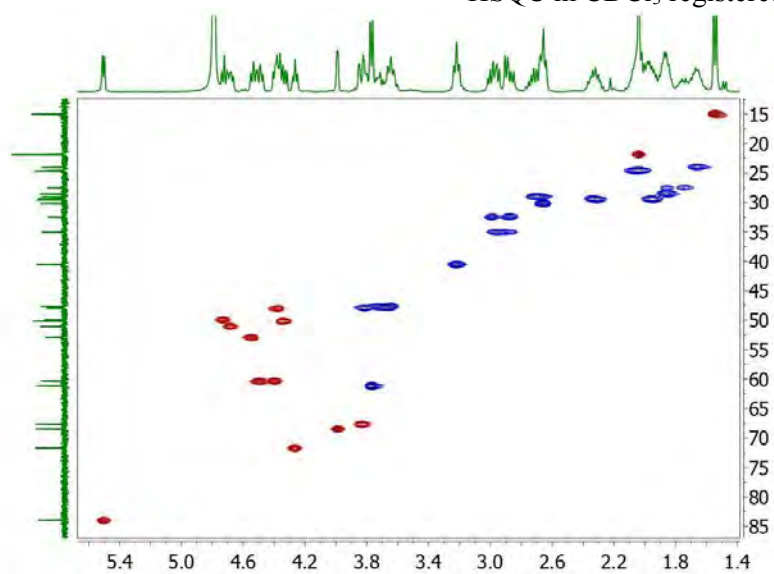
Ala-Pro-Asp-Ser(*O*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (93)¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

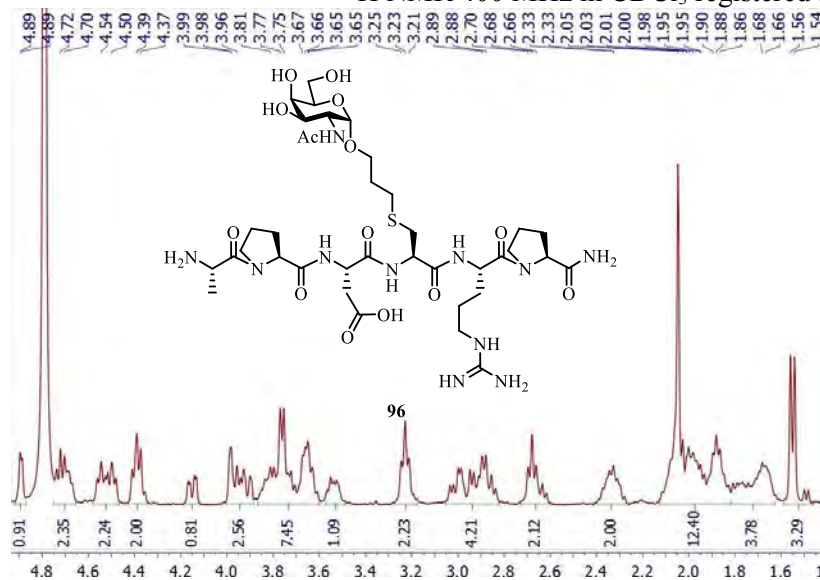
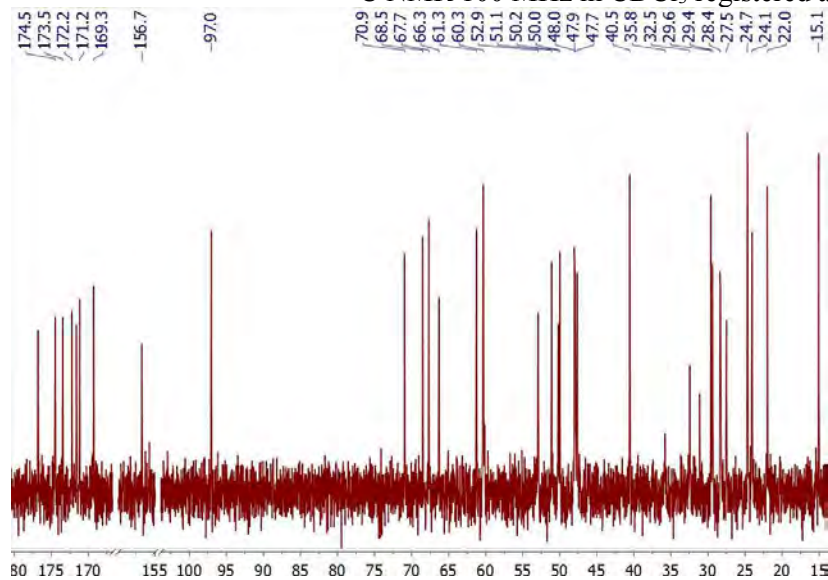
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

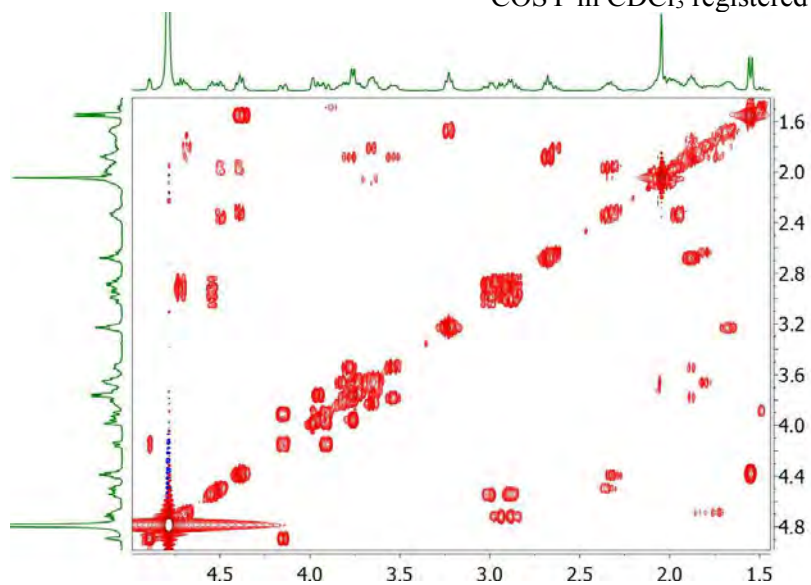
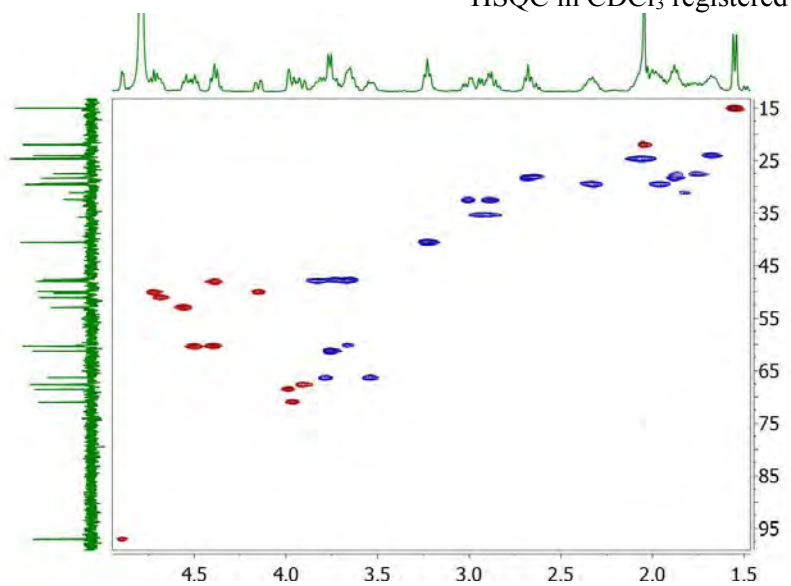
Ala-Pro-Asp-Thr(*O*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (94)¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

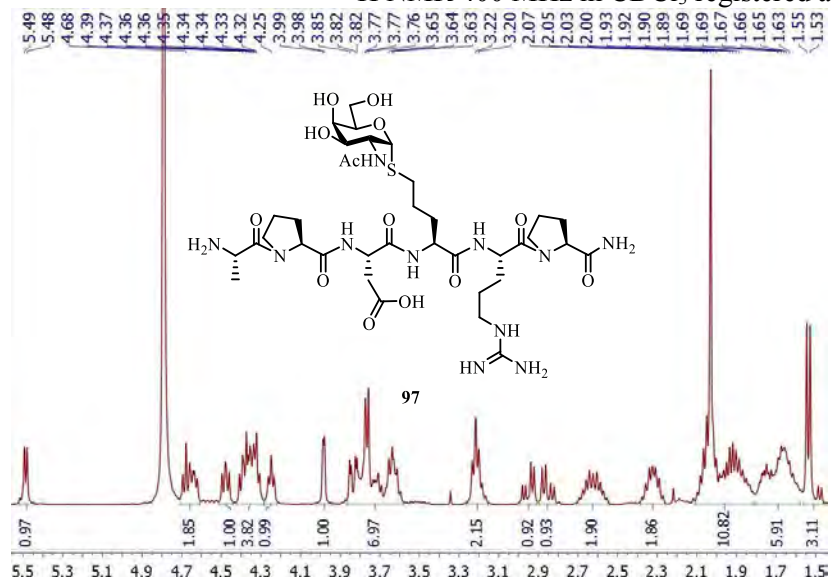
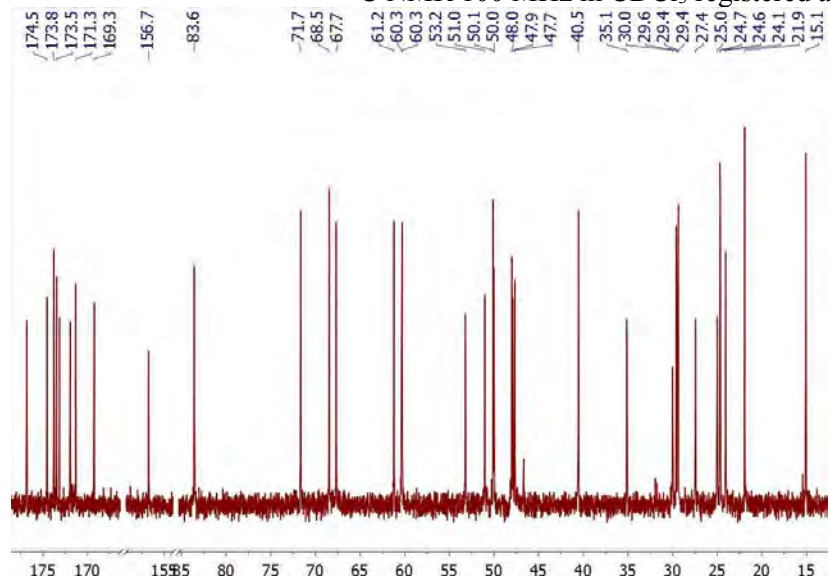
COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

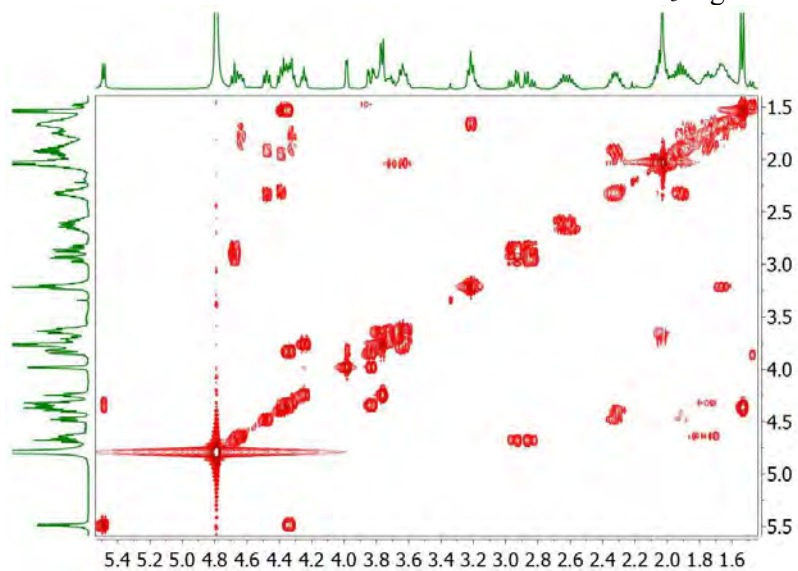
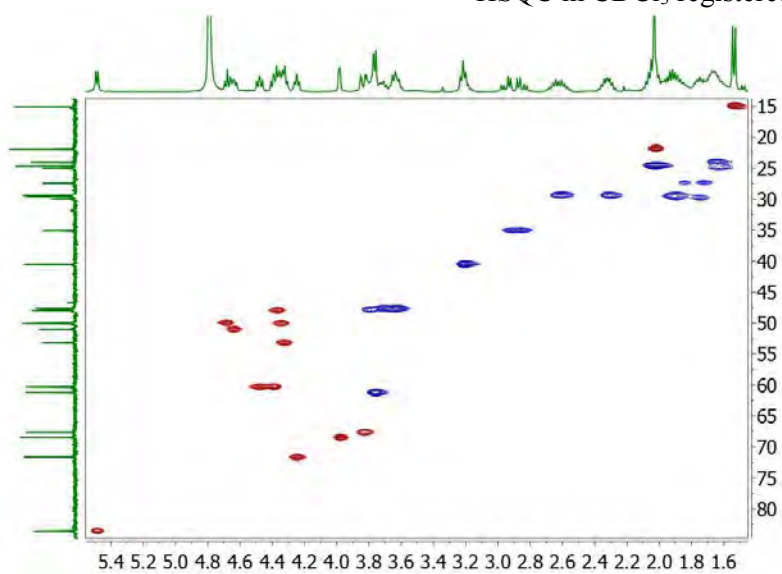
Ala-Pro-Asp-Cys(S-mercaptopropyl- α -S-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (95)¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

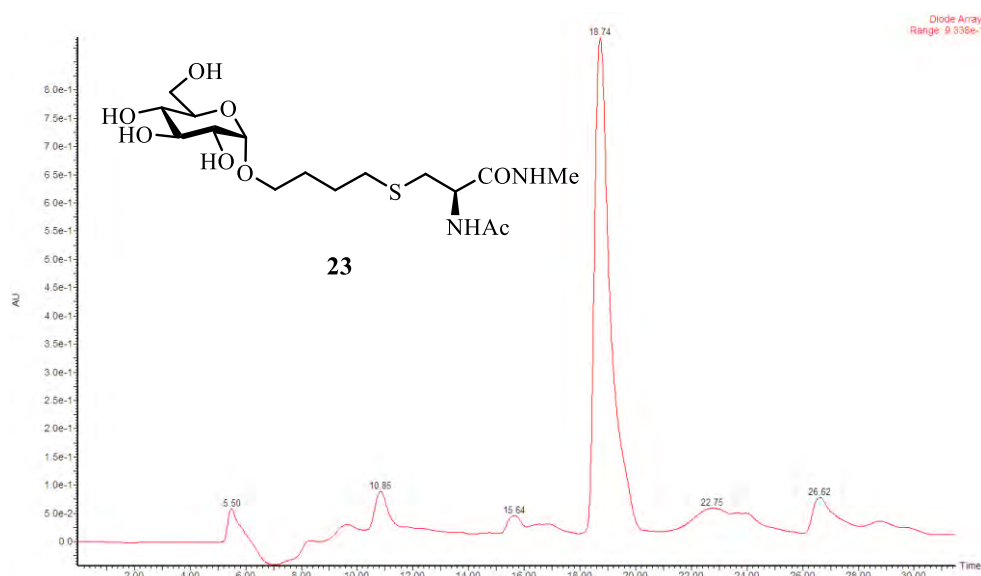
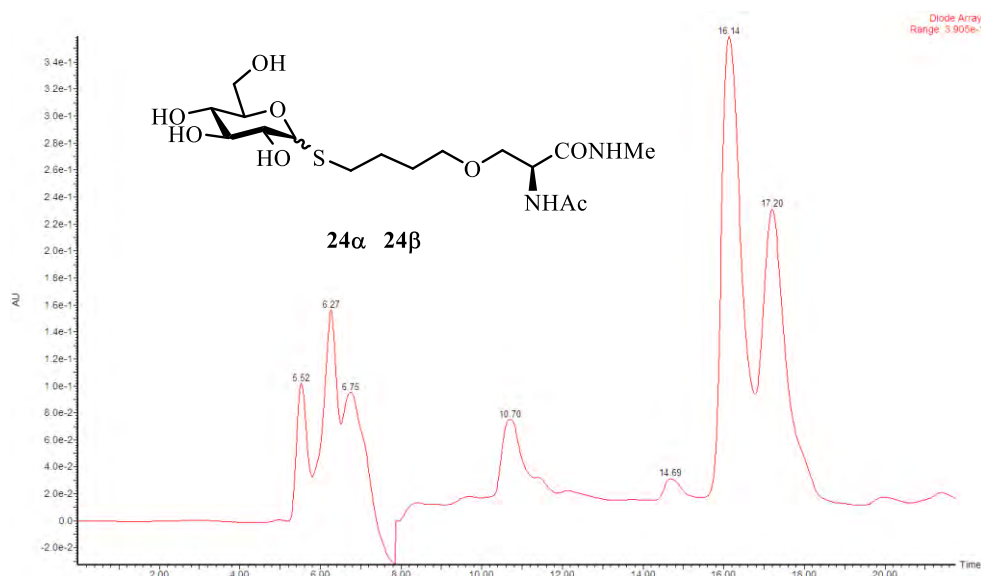
Ala-Pro-Asp-Cys(*S*-mercaptopropyl- α -*O*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (96)¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

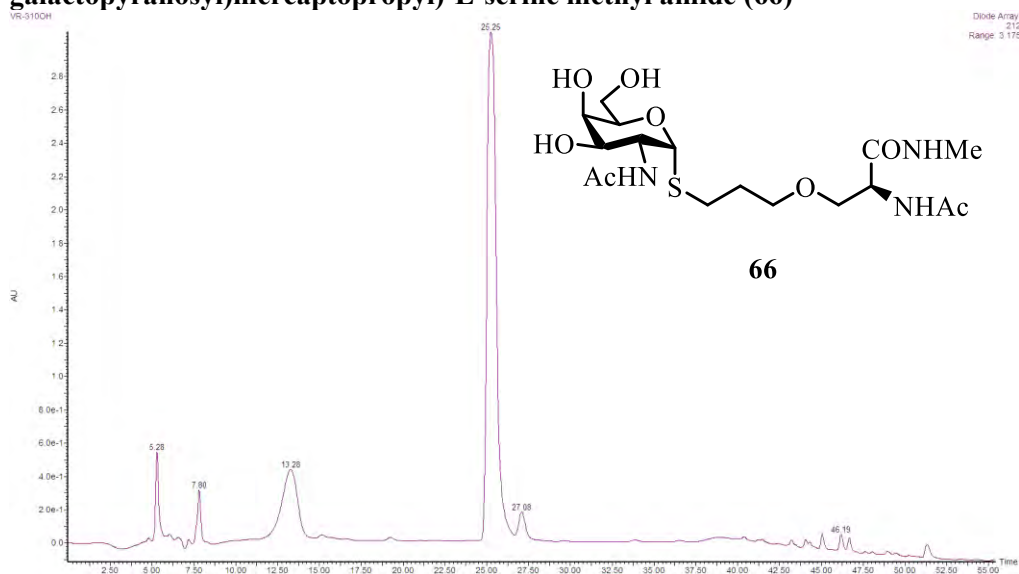
Ala-Pro-Asp-hhCys(α -S-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (97)¹H NMR 400 MHz in CDCl₃ registered at 298K¹³C NMR 100 MHz in CDCl₃ registered at 298K

COSY in CDCl₃ registered at 298KHSQC in CDCl₃ registered at 298K

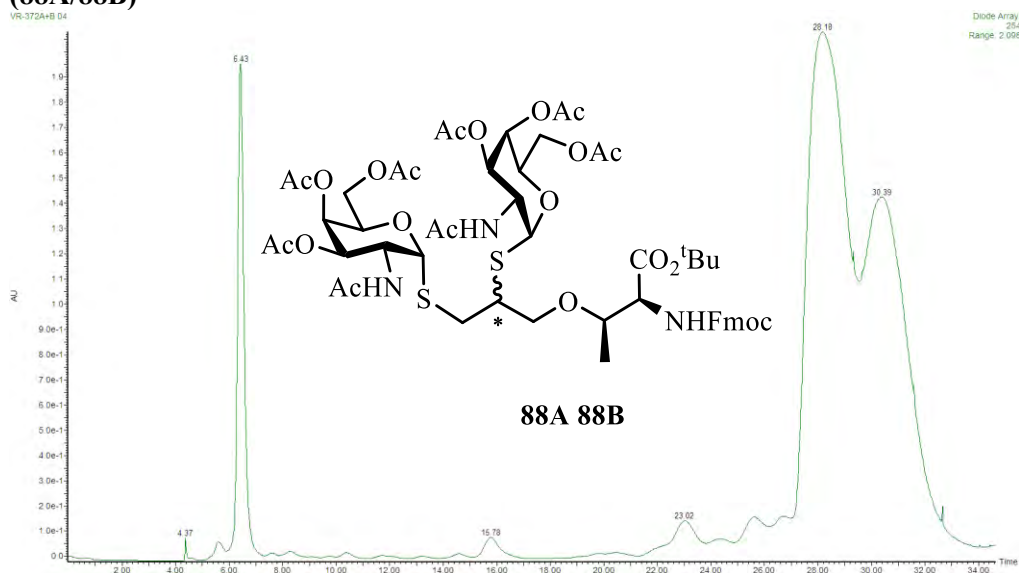
Annex.6 HPLC chromatograms

(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α -D-glucosyloxy)butylthio)propanamide (23)**(S)-2-Acetamido-N-methyl-3-(4-(α/β -D-glucosylthio)butoxy)propanamide (24 α /24 β)**

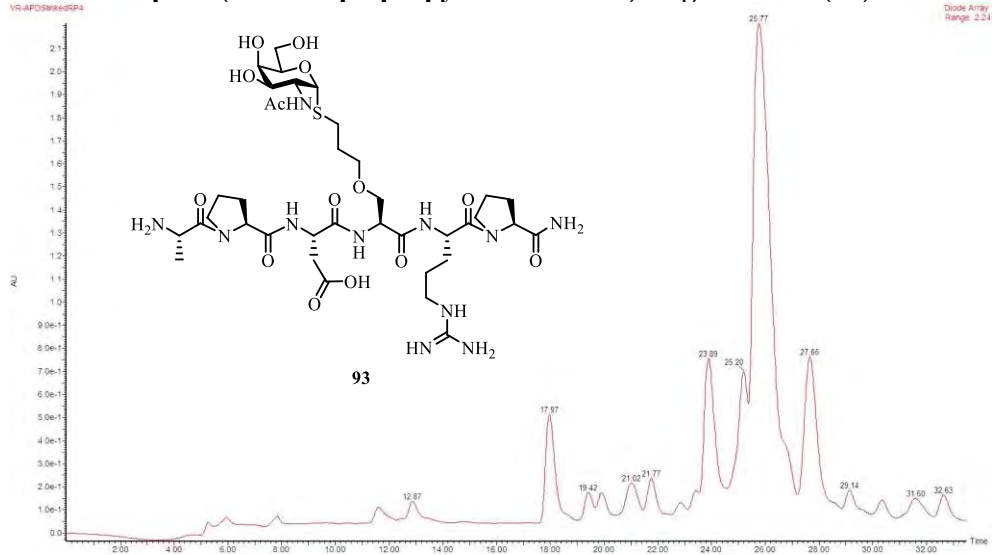
***N*-Acetyl-*O*-(*S*-((2-acetamido-2-deoxy)- α -D-galactopyranosyl)mercaptopropyl)-*L*-serine methyl amide (66)**



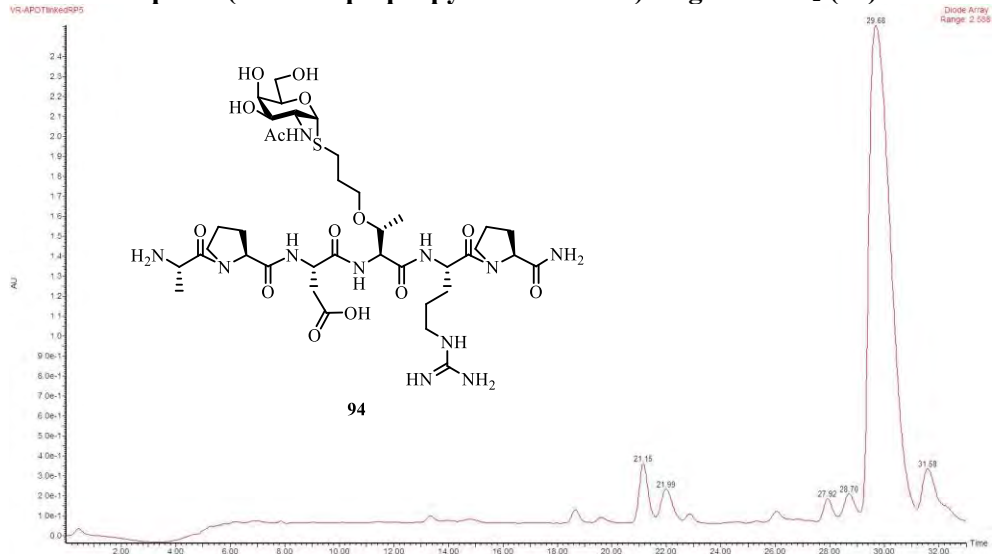
***N*-Fmoc-*O*-(bis-*S*-((2-acetamido-2-deoxy)-(3,4,6-tri-*O*-acetyl)- α -D-galactopyranosyl)-2,3-dimercaptopropyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (88A/88B)**



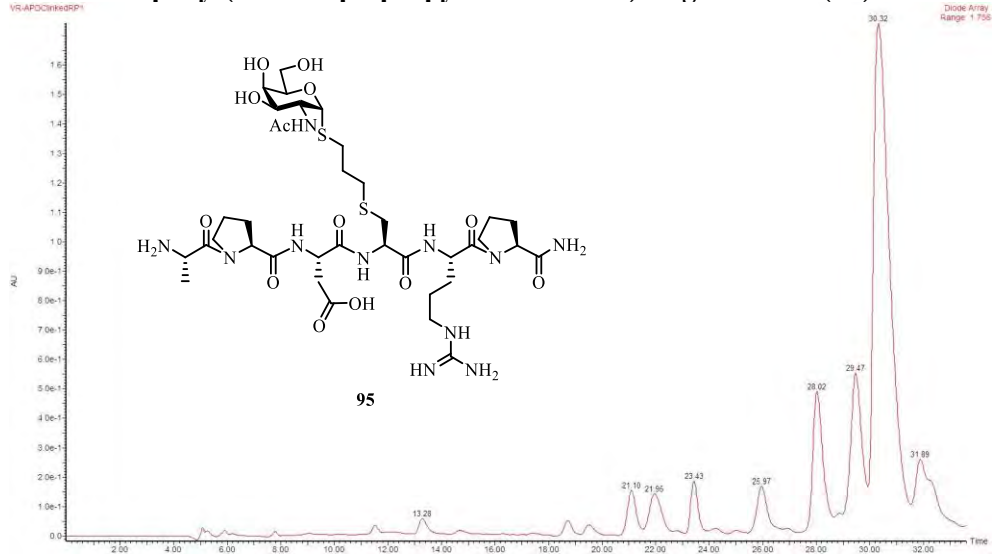
Ala-Pro-Asp-Ser(*O*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (93)



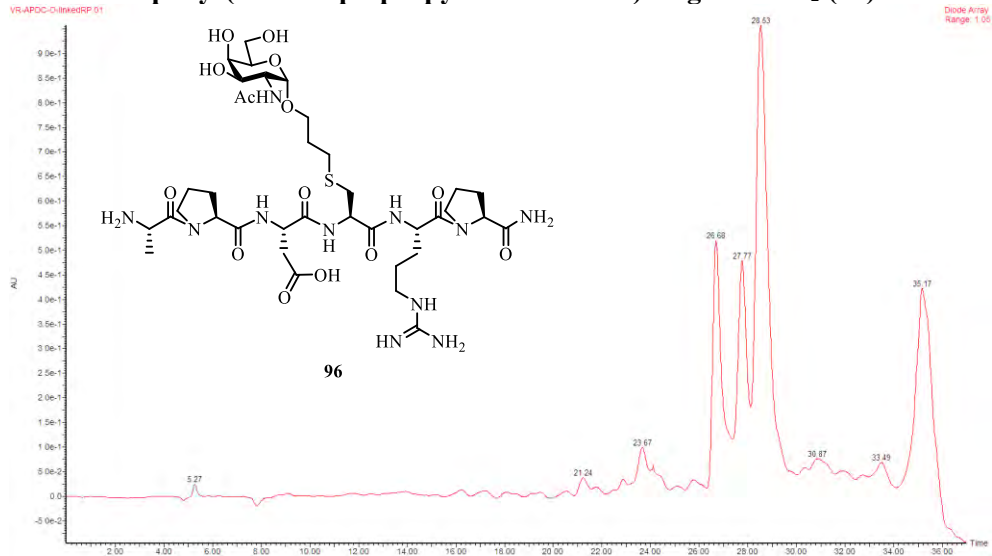
Ala-Pro-Asp-Thr(*O*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (94)

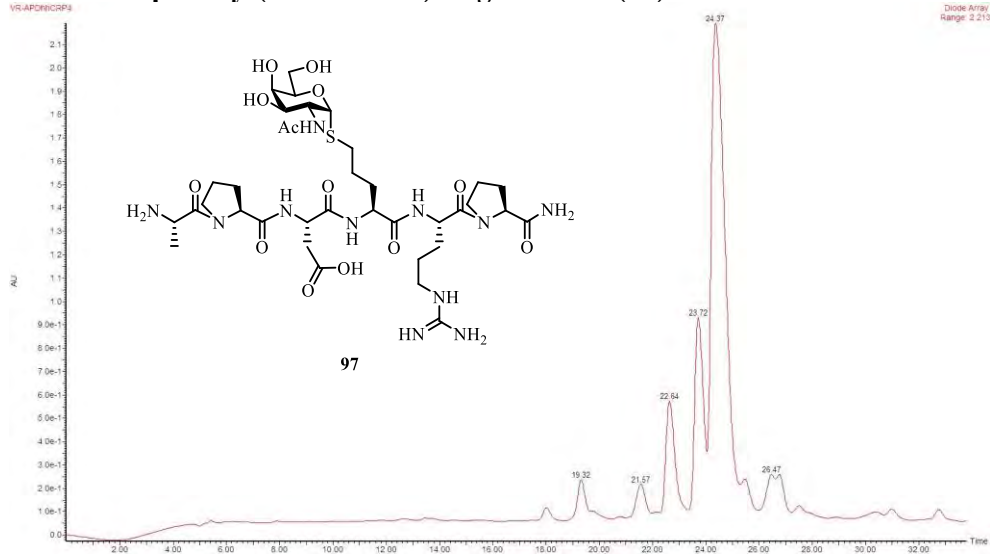


Ala-Pro-Asp-Cys(*S*-mercaptopropyl- α -*S*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (95)



Ala-Pro-Asp-Cys(*S*-mercaptopropyl- α -*O*-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (96)



Ala-Pro-Asp-hhCys(α -S-GalNAc)-Arg-Pro-NH₂ (97)

Annex.7 X-Ray diffraction

The crystal growth was carried out by diffusion of solvent (immiscible phases).

Data outlets were collected on a Bruker Nonius Kappa geometry and detector CDD. The resolution data and refining were performed using the programs SHELXS97, SHELXL97 and SIR2004.

The plot has been done by ORTEP-3 program (version 2014.1) from the CIF file obtained after refining. The image has been generated (*render*) using the program POV-Ray 3.7.

Hydrogen atoms were located in a theoretical way, its electron density and by combination of both (mixed methods).

Numbering of the atoms is random.

(3*S*,9*a'R*) and (3*R*,9*a'**S*)-1',2,6,6',9',9*a'*-Hexahydrospiro[pyran-3,3'-pyrrolo[1,2-*a*]azepin]-5'(2'*H*)-one (20)**

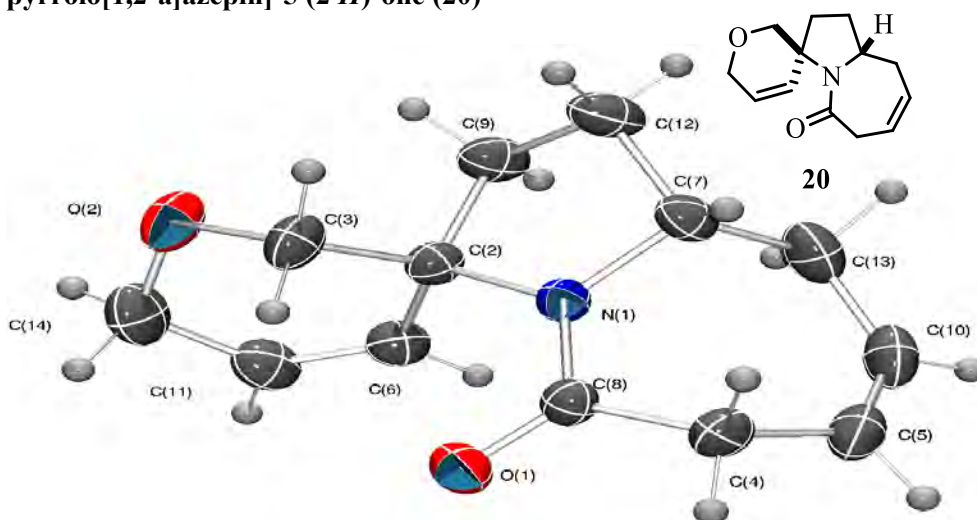


Table Annex.1 Crystal data and structure refinement for compound **20**.

Empirical formula	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂	
Formula weight	219.28	
Temperature	203(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C 2/c	
Unit cell dimensions	a = 24.865(5) Å	a = 90.000°
	b = 6.000(2) Å	b = 97.3850(10)°
	c = 15.224(4) Å	g = 90.000°
Volume	2252(2) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.293 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.087 mm ⁻¹	
Crystal size	0.475 x 0.25 x 0.25 mm	
Theta range for data collection	2.98 to 27.47°.	

Index ranges	-32<=h<=32, -7<=k<=7, -19<=l<=19
Reflections collected	8380
Independent reflections	2547 [R(int) = 0.0499]
Completeness to theta = 25.00°	98.5 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2547 / 0 / 213
Goodness-of-fit on F ²	1.017
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0412, wR2 = 0.0875
R indices (all data)	R1 = 0.0713, wR2 = 0.1016
Largest diff. peak and hole	0.162 and -0.141 e.Å ⁻³

Table Annex.2 Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **20**. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	6810(1)	-82(2)	1913(1)	43(1)
N(1)	6533(1)	-2614(2)	2861(1)	28(1)
O(2)	5610(1)	-4564(2)	886(1)	49(1)
C(2)	6009(1)	-3140(2)	2311(1)	30(1)
C(3)	6111(1)	-4334(3)	1458(1)	39(1)
C(4)	7387(1)	-669(3)	3283(1)	36(1)
C(5)	7274(1)	178(3)	4173(1)	41(1)
C(6)	5678(1)	-1075(3)	2077(1)	36(1)
C(7)	6626(1)	-3922(3)	3687(1)	35(1)
C(8)	6885(1)	-1083(2)	2623(1)	30(1)
C(9)	5739(1)	-4699(3)	2928(1)	40(1)
C(10)	6919(1)	-580(3)	4671(1)	45(1)
C(11)	5401(1)	-783(3)	1289(1)	44(1)
C(12)	6214(1)	-5798(3)	3501(1)	45(1)
C(13)	6549(1)	-2519(3)	4493(1)	48(1)
C(14)	5400(1)	-2466(3)	572(1)	51(1)

Table Annex.3 Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for compound **20**.

O(1)-C(8)	1.2306(16)	N(1)-C(2)-C(6)	111.79(11)
N(1)-C(8)	1.3494(17)	N(1)-C(2)-C(3)	110.34(10)
N(1)-C(7)	1.4746(17)	C(6)-C(2)-C(3)	109.18(12)
N(1)-C(2)	1.4888(16)	N(1)-C(2)-C(9)	101.81(10)
O(2)-C(14)	1.422(2)	C(6)-C(2)-C(9)	112.11(12)
O(2)-C(3)	1.4326(17)	C(3)-C(2)-C(9)	111.48(13)
C(2)-C(6)	1.505(2)	O(2)-C(3)-C(2)	109.49(12)
C(2)-C(3)	1.533(2)	C(5)-C(4)-C(8)	114.63(13)
C(2)-C(9)	1.540(2)	C(10)-C(5)-C(4)	128.20(16)
C(4)-C(5)	1.507(2)	C(11)-C(6)-C(2)	122.16(15)
C(4)-C(8)	1.5194(19)	N(1)-C(7)-C(13)	111.83(13)
C(5)-C(10)	1.316(2)	N(1)-C(7)-C(12)	101.97(12)
C(6)-C(11)	1.317(2)	C(13)-C(7)-C(12)	114.03(14)
C(7)-C(13)	1.521(2)	O(1)-C(8)-N(1)	122.53(12)
C(7)-C(12)	1.524(2)	O(1)-C(8)-C(4)	121.36(13)
C(9)-C(12)	1.525(2)	N(1)-C(8)-C(4)	116.11(12)
C(10)-C(13)	1.487(3)	C(12)-C(9)-C(2)	104.18(12)
C(11)-C(14)	1.486(2)	C(5)-C(10)-C(13)	127.62(15)
		C(6)-C(11)-C(14)	121.99(16)
C(8)-N(1)-C(7)	123.71(11)	C(7)-C(12)-C(9)	103.83(13)
C(8)-N(1)-C(2)	122.95(11)	C(10)-C(13)-C(7)	116.16(14)
C(7)-N(1)-C(2)	113.33(10)	O(2)-C(14)-C(11)	112.84(13)
C(14)-O(2)-C(3)	111.86(13)		

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms.

