



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**REACCIONES CLIC Y EVALUACIÓN *IN SITU* PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS**

**Valeria Pingitore**

**Sevilla, 2021**





**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**REACCIONES CLIC Y EVALUACIÓN *IN SITU* PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS**

Memoria presentada por la Licenciada  
Valeria Pingitore para  
optar al grado de Doctora en Química

Sevilla, 2021





DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**REACCIONES CLIC Y EVALUACIÓN *IN SITU* PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS**

Vº Bº de los Directores de la Tesis

Fdo. Dr. Antonio J. Moreno Vargas  
Profesor Titular de Universidad  
Depto. de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de Sevilla

Fdo. Dra. Ana T. Carmona Asenjo  
Profesora Titular de Universidad  
Depto. de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de Sevilla



*Per aspera sic itur ad astra*





## **AGRADECIMIENTOS**

El final de esta etapa de formación ha llegado y deseo agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, deseo agradecer a mis directores de tesis, la Prof. Ana T. Carmona Asenjo y el Prof. Antonio J. Moreno Vargas por haber sido los mejores profesores que pudiera desear. Vuestra profesionalidad junto con vuestra amabilidad han sido determinantes para que me sintiera acogida en un nuevo ambiente laboral y para que pudiera desarrollar mis competencias profesionales. Además de ser profesores sois amigos y, por esto, os quiero agradecer por vuestra amistad que siempre llevaré en mi corazón en cualquier parte del mundo donde me encuentre.

Muchísimas gracias a la Prof. Inmaculada Robina Ramírez por haberme acogido en su grupo de investigación. Gracias Inmaculada por tu cariño y por la sonrisa que te distingue.

Los tres sois Profesores con la P mayúscula y unas grandes personas. Os quiero mucho.

Gracias a Mari Jose por su simpatía y dulzura, a Macarena por su ayuda y precisión y a Enrique, Pili, Letizia y a todos mis compañeros de laboratorio por la ayuda y la alegría que día tras día me han empujado a seguir en este difícil camino.

Deseo agradecer a todos los Profesores, investigadores y estudiantes del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y en particular a los Profesores José María Fernández-Bolaños, Inés Maya, Oscar López López, Miguel Ángel Rodríguez Carvajal, Francisca Cabrera Escribano, José Luis Jiménez Blanco, María Isabel García Moreno, Gonzalo de Gonzalo Calvo y Elena Sánchez Fernández y, además, a Lidia Cuesta Berrio y al Profesor Agustín Galindo del Pozo del Departamento de Química Inorgánica de la US. Gracias a Manolo, Miguel Ángel, Belén y Encarna del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Sevilla y a todo el personal de la secretaría y de la conserjería de la facultad de Química de la US. Cada uno de vosotros me ha regalado momentos de alegría y, con su ayuda profesional o incluso solo con una palabra me hizo sentir bienvenida y a gusto. Gracias a la Universidad de Sevilla por la posibilidad de realizar mi sueño de defender esta Tesis Doctoral.

Deseo agradecer, además, a Rubén Díaz López, Joanna Wandycz-Mejías, María de los Reyes de La Vega y Matilde Revuelta González del Centro Universitario Internacional de la

UPO, a la Prof. Amy M. Deveau de la University of New England y a todos los estudiantes de Estados Unidos por la maravillosa experiencia de enseñanza en los cursos de Química Orgánica del CUI.

Muchas gracias también a mis amigos españoles Rosario de Castro Camero, Reyes y Ana Millán, Gonzalo Sanchez Blanco, Carmen Ramos Sotillo, Francisco Javier Viñuelas, Cayetano Rivera Ordóñez, Paco Lama de Góngora, Antonio Velázquez, María Jesús y José Enrique Moreno, Antonio y María Villegas, Antonio García Barbeito y Lola, Rosario y Emilio Franco, Pilar y Emilio Kabariti, Inma y Paco Rodríguez y además a mis amigos franceses Félicité, Andrés, Pedro Elias y Marguerite y a todos mis amigos de la Iglesia de la Magdalena y en particular a Paco y Amelia. Llevaré conmigo un trocito de cada sonrisa, palabra y momento que me habéis regalado. Sois la feria, los toros, los colores, los naranjos, el calor, la alegría, la dulzura, la amabilidad... sois mi España.

Cambio di lingua cambio di ringraziamenti!

Un grazie speciale ai miei amici di una vita Danilo, Maria, Luca, Valentina, Emy, Michele e Roberta. La lontananza nel nostro caso è azzerata dall'affetto.

Grazie al Prof. Giacinto Bagetta dell'Università della Calabria per la sua professionalità, competenza e quel briciolo di ironia degni di ammirazione.

Grazie alla Prof.ssa Teresa Cimino del Liceo Classico Gioacchino da Fiore di Rende per avermi fatta innamorare della chimica e per la sua dolcezza. Oggi ti avrei dato del tu e ti avrei detto che sei stata per me un esempio di dedizione e serietà.

Grazie agli zii Rina, Totò, Ilde, Vincenzo e a Carlo, Rosita, Giovanni e Gaietta. Vi voglio bene.

Grazie Gabri per avermi sempre sostenuta e spronata a non arrendermi mai e per essere la sorella migliore del mondo. Un grazie speciale ai miei genitori per il supporto affettivo ed economico. Grazie mamma per il tuo esempio di onestà, costanza e dedizione. Grazie papà per avermi fatta diventare una persona forte e indipendente. So che oggi saresti orgoglioso di me. Mi manchi papà.

Finally, I would like to thank my husband Samuel to have supported me during this very hard work always on my side. Thanks for your wonderful example of fortitude and tenacity. Thanks for transmitting everyday your love for life. I love you.

*A Samuel*



**ÍNDICE GENERAL**

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>4</b>
<b>RELACIÓN DE COMPUESTOS</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1: Síntesis y evaluación biológica <i>in situ</i> de iminoazúcares monovalentes como inhibidores de glicosidasas</b>	<b>36</b>
1.1. Antecedentes	<b>36</b>
1.1.1. Incorporación de restos aromáticos en iminoazúcares como estrategia para mejorar la capacidad de inhibición	<b>36</b>
1.1.2. Modificaciones estructurales en derivados pirrolidínicos, pirrolizidínicos e indolizidínicos	<b>44</b>
1.1.3. Iminoazúcares con estructura pirrolidínica como inhibidores de $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasas humanas	<b>51</b>
1.2. Objetivos	<b>65</b>
1.3. Resultados y discusión	<b>67</b>
1.3.1. Síntesis y evaluación <i>in situ</i> de pirrolizidín/indolizidín(tio)ureas como inhibidores monovalentes de $\alpha$ -galactosidasas	<b>67</b>
1.3.2. Síntesis y evaluación <i>in situ</i> de pirrolidín-triazoles y pirrolidín-(tio)ureas como inhibidores monovalentes de $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasas humanas	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO 2: Síntesis y evaluación biológica <i>in situ</i> de inhibidores multivalentes de glicosidasas derivados de iminoazúcares</b>	<b>99</b>
2.1. Antecedentes	<b>99</b>
2.2. Objetivos	<b>116</b>
2.3. Resultados y discusión	<b>117</b>
2.3.1. Síntesis y evaluación <i>in situ</i> de estructuras	

---

multivalentes derivadas de pirrolidín-triazoles como inhibidores de $\alpha$ -fucosidasas	117
2.3.2. Síntesis y evaluación biológica de pirrolizidín-tioureas como inhibidores divalentes de $\alpha$ -galactosidasas	137
2.3.3. Síntesis y evaluación <i>in situ</i> de pirrolidín-triazoles y pirrolidín-tioureas como inhibidores divalentes de $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas humanas	142
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
<b>EXPERIMENTAL SECTION</b>	<b>162</b>
1. Materials and methods	162
2. Synthetic procedures and characterization of the new compounds	166
<b>ANEXO I: Conceptos básicos sobre inhibición enzimática</b>	<b>253</b>
<b>ANEXO II: Espectros representativos</b>	<b>264</b>

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

$\delta$	Desplazamiento químico
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
Å	Ángstrom
Ac	Acetilo
anh.	Anhidro (del inglés, “ <i>anhydrous</i> ”)
ap.	Apariencia
aq.	Acuoso (del inglés, “ <i>aqueous</i> ”)
Asc	Ascorbato
br.	Ancho (del inglés, “ <i>broad</i> ”)
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
Bu	Butilo
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butilo
calc.	Calculado
cat.	Catalítico
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
cols.	Colaboradores



---

COSY	Espectroscopía de correlación (del inglés, “ <i>CO</i> related Spectroscopy”)
Cq	Carbono cuaternario
CuAAC	Cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por Cu(I)
Cuant.	Cuantitativo
d	Doblete
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMJ	1-Desoximanojirimicina
DMP	2,2-Dimetoxipropano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNJ	1-Desoxinojirimicina
dt	Doble triplete
ELLA	Ensayo competitivo enzima-lectina (del inglés, “ <i>Enzyme-Linked Lectin Assay</i> ”)
eq.	Equivalente

---

ESIMS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray (del inglés, " <i>ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry</i> ")
Et	Etilo
g	Gramo
h	Hora
HBTU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (del inglés, " <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> ")
HSQC	Correlación heteronuclear de nivel cuántico individual (del inglés, " <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> ")
Hz	Hercio (del inglés, " <i>Hertz</i> ")
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibidor necesaria para inhibir la actividad enzimática en un 50%
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
<i>K<sub>i</sub></i>	Constante de inhibición competitiva
<i>K'<sub>i</sub></i>	Constante de inhibición incompetitiva

LSD	Enfermedad de almacenamiento lisosomal (del inglés, " <i>Lysosomal Storage Disorder</i> ")
m	Multiplete
M	Molar
mayor.	Mayoritario
Me	Metilo
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Ms	Mesilo
MS	Espectrometría de masas (del inglés, " <i>Mass Spectrometry</i> ")
MW	Microondas (del inglés, " <i>MicroWave</i> ")
<i>n</i>	Valencia
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
Ph	Fenilo (del inglés, " <i>Phenyl</i> ")

---

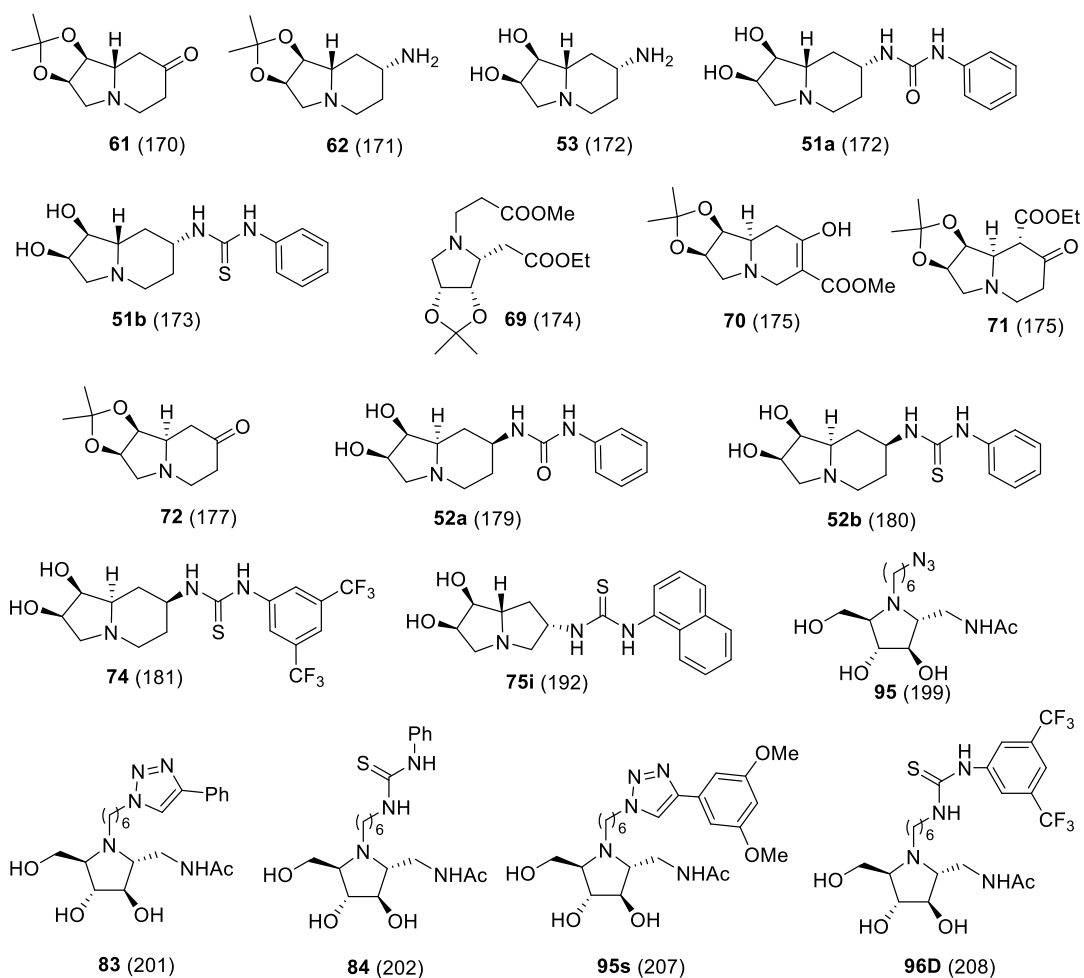
ppm	Partes por millón
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Py	Piridina (del inglés, “ <i>Pyridine</i> ”)
q	Cuartete (del inglés, “ <i>quartet</i> ”)
Quant.	Cuantitativo (del inglés, “ <i>quantitative</i> ”)
quint	Quintete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rp	Potencia relativa (del inglés, “ <i>relative potency</i> ”)
r.t.	Temperatura ambiente (del inglés, “ <i>room temperature</i> ”)
s	Singulete
sat.	Saturado
SAR	Relaciones estructura-actividad (del inglés, “ <i>Structure-Activity Relationship</i> ”)
S <sub>N</sub> 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
soln.	Disolución (del inglés, “ <i>solution</i> ”)
T	Temperatura
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDPS	<i>tert</i> -Butildifenilsililo
TBTA	Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina

td	Triple dobles
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
TMS	Trimetilsililo
Ts	Tosil
tt	Triple tripletes
v	Frecuencia
v	Velocidad
vs	<i>Versus</i>

**RELACIÓN DE COMPUESTOS**

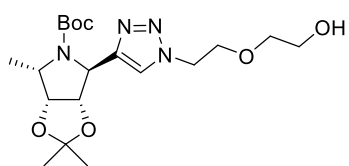
RELACIÓN DE COMPUESTOS<sup>1</sup>

## Capítulo 1

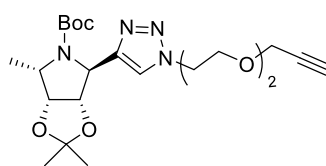


<sup>1</sup> En este índice se muestran todos los compuestos caracterizados en esta Tesis. El número entre paréntesis indica la página donde se puede encontrar la descripción del compuesto.

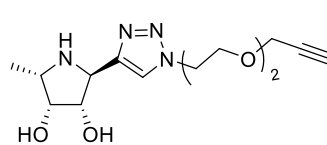
## Capítulo 2



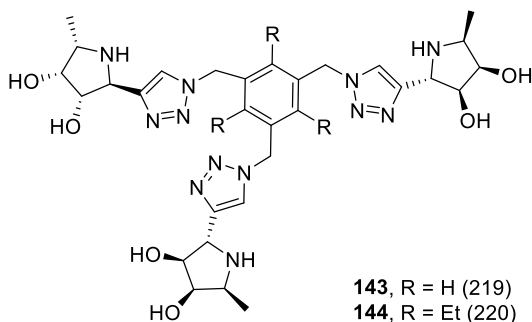
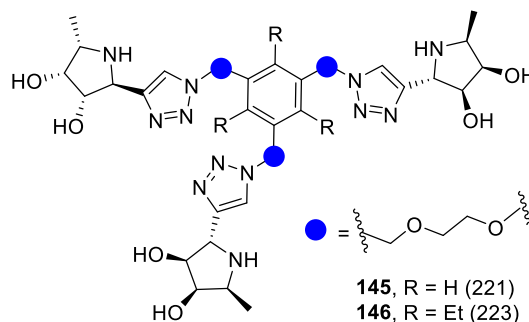
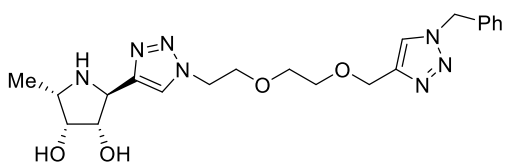
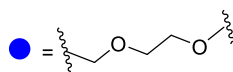
139 (215)



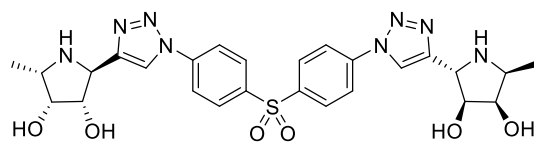
140 (216)



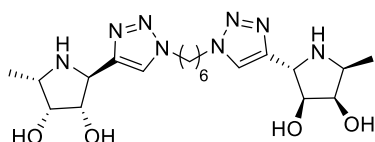
128' (217)

143, R = H (219)  
144, R = Et (220)145, R = H (221)  
146, R = Et (223)

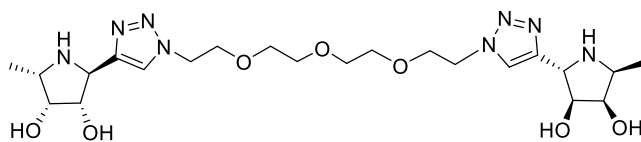
148 (224)



128i (228)



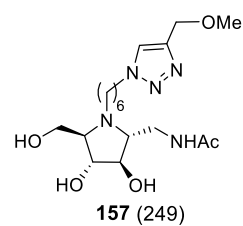
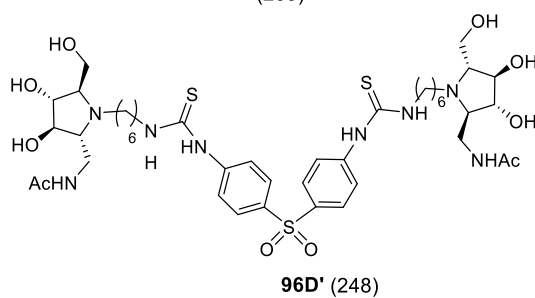
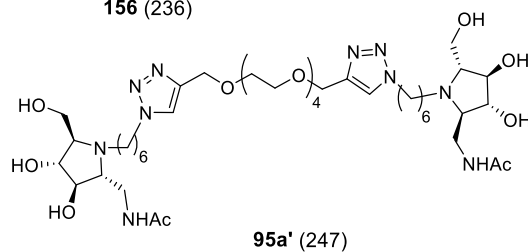
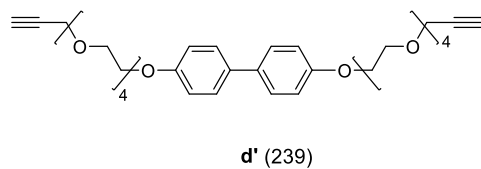
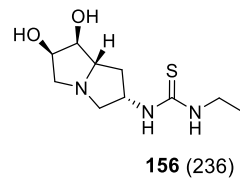
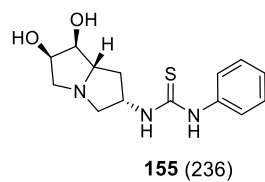
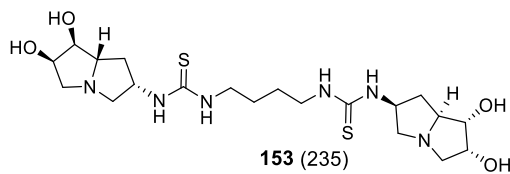
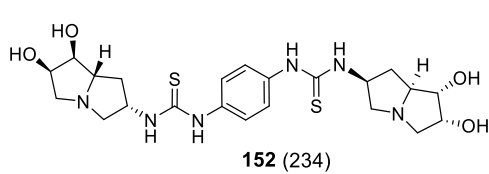
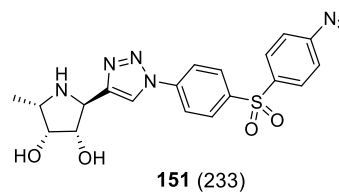
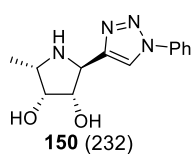
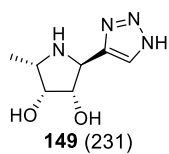
128b (229)



128j (230)



## Capítulo 2 (continuación)



**INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES**

## INTRODUCCIÓN

Las glicosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico presente en oligosacáridos y glicoconjugados. Sus funciones comprenden desde la degradación de polisacáridos como el almidón, glucógeno o quitina, hasta su participación en los procesos de biosíntesis de las glicoproteínas presentes en las membranas celulares. El estudio de los procesos bioquímicos en los que las glicosidasas se encuentran implicadas ha conducido a una comprensión más profunda del papel que desempeñan en los organismos vivos,<sup>2</sup> y es la base para el descubrimiento de potenciales agentes terapéuticos. Se ha observado que la inhibición de la acción de estas enzimas tiene un efecto relevante en procesos metabólicos así como en el procesado y maduración de *N*-glicoproteínas y en fenómenos de reconocimiento celular,<sup>3</sup> por lo que los inhibidores de glicosidasas se presentan como potenciales fármacos frente a enfermedades como el cáncer, diabetes o infecciones virales.<sup>4</sup>

Los iminoazúcares son alcaloides polihidroxilados estructuralmente relacionados con los carbohidratos donde el oxígeno endocíclico se ha reemplazado por un nitrógeno básico trivalente y constituyen el grupo más importante de inhibidores de glicosidasas.<sup>5</sup> La nojirimicina **1** fue el primer iminoazúcar aislado de una fuente natural, identificándose sus propiedades antibióticas, así como sus propiedades como inhibidor de  $\beta$ -D-glucosidasas.<sup>6</sup> Sin

---

<sup>2</sup> Davies, G. J.; Gloster, T. M.; Henrissat, B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 637-645.

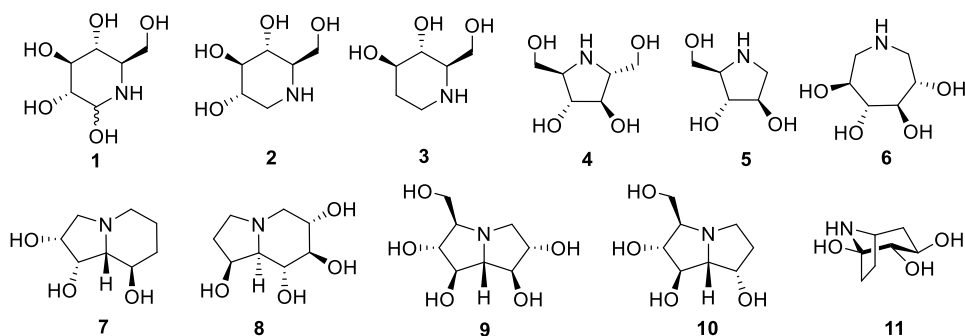
<sup>3</sup> Asano, N. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1479-1492.

<sup>4</sup> Asano, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **2003**, *102*, 93R.

<sup>5</sup> a) Compain, P.; Martin, O.R. Iminosugars: past, present and future, in: P. Compain, O.R. Martin (Eds.), *Iminosugars: from Synthesis to Therapeutic Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2007, pp. 1-6; b) López, O.; Merino-Montiel, P.; Martos, S.; González-Benjumea, A. Glycosidase inhibitors: versatile tools in glycobiology. *Carbohydr. Chem.* **2012**, *38*, 215-262; c) Wrodnigg, T.M.; Stütz, A. E. *Curr. Enzym. Inhib.* **2012**, *8*, 47-99.

<sup>6</sup> Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Niida, T. The structure of nojirimycin, a piperidinose sugar antibiotic. *J. Antibiot. Ser. A* **1966**, *19*, 288-292.

embargo, su limitada estabilidad impulsó la síntesis de nuevos derivados más estables, siendo la 1-desoxinojirimicina **2** (1-DNJ) el primer iminoazúcar sintético.<sup>7</sup> A nivel estructural, los iminoazúcares pueden clasificarse en varias familias entre las que se encuentran las piperidinas (nojirimicina **1**, 1-desoxinojirimicina **2**, isofagomina **3**), las pirrolidinas (2,5-didesoxi-2,5-imino-D-glucitol **4** y 1,4-didesoxi-1,4-L-arabinitol **5**) y los azepanos **6** como iminoazúcares monocíclicos (**Figura 1**). Entre las estructuras bicíclicas podemos destacar las indolizidinas (swainsonina **7**, castanospermina **8**), las pirrolizidinas (australina **9**, casuarina **10**) y los nortropanos (**11**).



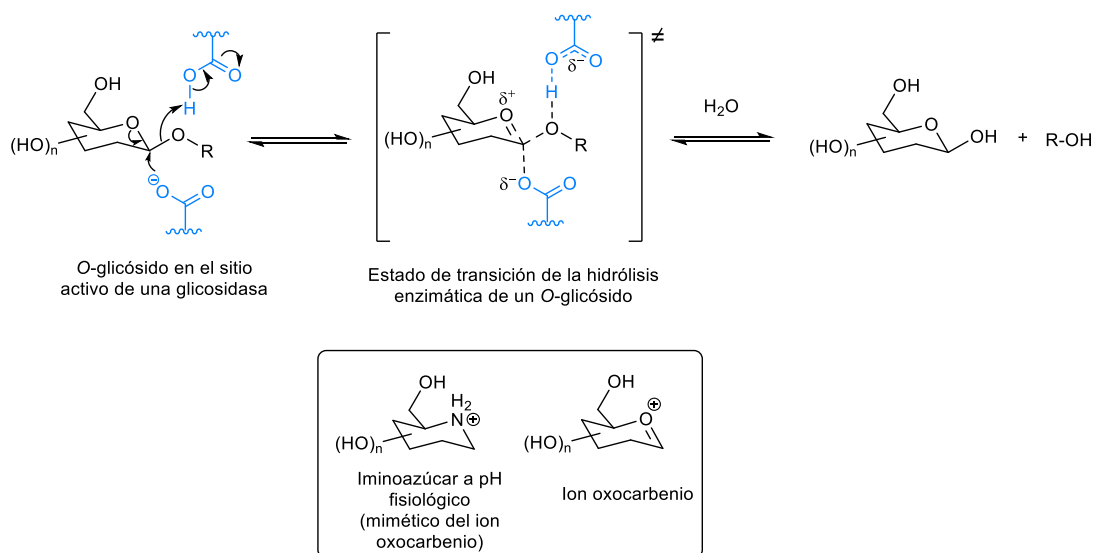
**Figura 1.** Principales estructuras de los iminoazúcares.

A partir de la preparación del primer iminoazúcar, se desarrollaron una gran variedad de rutas sintéticas para la obtención de nuevos derivados, convirtiéndose esta línea de investigación en un área relevante dentro de la química de los carbohidratos. Además, y dado que muchos iminoazúcares se han aislado de fuentes naturales como bacterias, hongos y

<sup>7</sup> Paulsen, H. Carbohydrates containing nitrogen or sulfur in the "hemiacetal" ring. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1966**, *5*, 495-511.

plantas, la elucidación estructural de muchos de estos compuestos ha representado todo un reto para los químicos dedicados a esta disciplina.<sup>8</sup>

La potente actividad biológica que presentan los iminoazúcares se encuentra relacionada con la capacidad que poseen para mimetizar el estado de transición de la hidrólisis enzimática de un *O*-glicósido.<sup>9</sup> A pH fisiológico, el nitrógeno endocíclico está mayoritariamente protonado, haciendo que estos compuestos imiten la configuración, forma y distribución de carga del catión oxocarbenio que se desarrolla en dicho estado de transición (**Esquema 1**).



**Esquema 1.** Mecanismo simplificado de la hidrólisis de un glicósido. Comparación entre el intermedio ion oxocarbenio y un iminoazúcar piperidínico.

<sup>8</sup> Asano, N. Iminosugars: the potential of carbohydrate analogs, in: Cipolla, L. (Ed.), Carbohydrate chemistry: state of the art and challenges for drug development (2016), 279-301.

<sup>9</sup> Gloster, T. M.; Davies, G. J. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305-320.

En los procesos de biosíntesis de glicoproteínas intervienen las glicosidasas y las glicosiltransferasas, estas últimas encargadas de la formación de los enlaces *O*-glicosídicos. Por ello, el diseño de inhibidores específicos de glicosidasas o de glicosiltransferasas que puedan ayudarnos a entender los complejos procesos vitales en los que éstas se encuentran implicadas o utilizarse como nuevos agentes terapéuticos, es hoy día un reto importante tanto en el mundo académico como en la industria farmacéutica.

Actualmente hay tres fármacos en el mercado derivados de iminoazúcares: el inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa (una glicosidasa) Miglitol (Glyset®),<sup>10</sup> el inhibidor de la glucosilceramida sintasa (una glicosiltransferasa) Miglustat (Zavesca®)<sup>11</sup> o la chaperona farmacológica Migalastat (Galafold®)<sup>12</sup> y se utilizan con éxito en el tratamiento de la diabetes, la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry, respectivamente (**Figura 2**). Adicionalmente existen estudios sobre aplicación de iminoazúcares en el tratamiento de la fibrosis quística, donde su actividad terapéutica se relaciona con la capacidad de inhibición de las glicosidasas presentes en el retículo endoplasmático (RE).<sup>13</sup> La inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas I y II del RE son también claves en los procesos de infección por virus, por ello los iminoazúcares que son capaces de inhibir estas enzimas han mostrado importante actividad antiviral,<sup>14</sup> destacando los resultados frente al virus del dengue, gripe,

---

<sup>10</sup> Scott L. J.; Spencer C. M. Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* **2000**, *59*, 521-549.

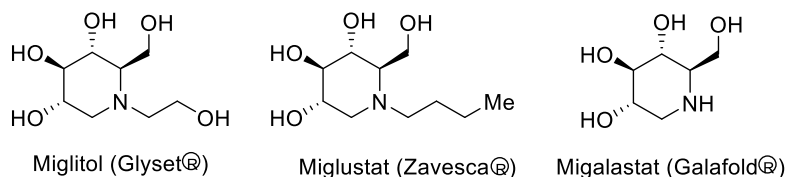
<sup>11</sup> McCormack, P. L.; Goa, K. L. Miglustat. *Drugs* **2003**, *63*, 2427-2434

<sup>12</sup> McCafferty, E. H.; Scott, L. J. Migalastat: A review in Fabry disease. *Drugs* **2019**, *79*, 543-554.

<sup>13</sup> Esposito, A.; D'Alonzo, D.; De Fenza, M.; De Gregorio, E.; Tamanini, A.; Lippi, G.; Dehecchi, M. C.; Guaragna, A. Synthesis and therapeutic applications of iminosugars in cystic fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3353-3387.

<sup>14</sup> Alonzi, D. S.; Scott, K. A.; Dwek, R. A.; Zitzmann, N. Iminosugar antivirals: the therapeutic sweet spot. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 571-582.

hepatitis C y VIH. Los inhibidores de glicosidasas, especialmente los de  $\alpha$ -manosidasas, también se han relacionado con su potente actividad como agentes anticáncer.<sup>15</sup>



**Figura 2.** Estructuras de los iminoazúcares aprobados para su uso como fármacos.

En los últimos quince años, la investigación en iminoazúcares para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs, del inglés *Lysosomal storage diseases*) ha tenido un enorme auge.<sup>16</sup> Este tipo de enfermedades están provocadas por un almacenamiento de lípidos, glicoproteínas y mucopolisacáridos en el lisosoma debido a deficiencias en las enzimas encargadas de metabolizar estas sustancias (ej. glicosidasas). Esta deficiencia en el funcionamiento de la enzima es consecuencia de una menor estabilidad debida a anomalías en su plegamiento, lo que se traduce en la formación de agregados proteicos que son retenidos y degradados en el retículo endoplasmático, impidiendo que la enzima llegue al lisosoma donde debería ejercer su acción. En la actualidad, los tratamientos más extendidos en las LSDs implican (i) terapia de reemplazo enzimático (aporte de la enzima deficiente),<sup>17</sup> limitado por su elevado coste para aplicación clínica y (ii) terapia de reducción de sustrato,<sup>18</sup> que consiste en inhibir la biosíntesis del correspondiente sustrato para así

<sup>15</sup> Goss, P. E.; Baker, M. A.; Carver, J. P.; Dennis, J. W. Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 935–944.

<sup>16</sup> a) García-Fernández, J. M.; Ortiz-Mellet, C. Novel Therapies for Orphan Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1020–1023. b) Sanchez-Fernández, E. M.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C. Glycomimetic-based pharmacological chaperones for lysosomal storage disorders: Lessons from Gaucher, GM1-gangliosidosis and Fabry diseases. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5497–5515.

<sup>17</sup> Brady, R. O. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 283–296.

<sup>18</sup> Coutinho, M. F.; Santos, J. I.; Alves, S. Less is more: substrate reduction therapy for lysosomal storage disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1065/1-1065/22.

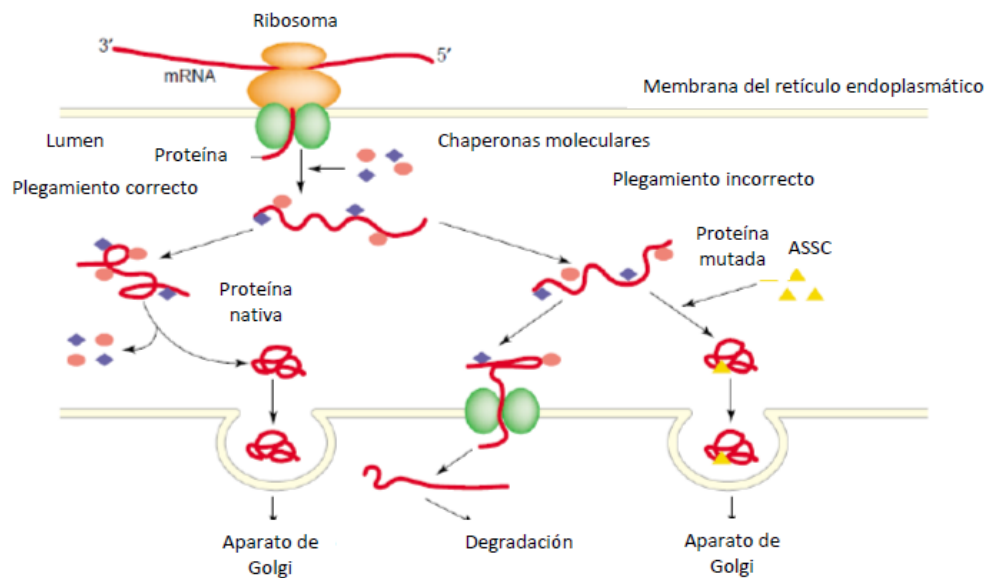
evitar su acumulación en los lisosomas. Así, el Miglustat, empleado en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (una de las LSDs de mayor prevalencia), actúa inhibiendo la glucosilceramida sintasa, enzima responsable de las primeras etapas de la síntesis de la mayoría de los glicosfingolípidos. Como alternativa a estos tratamientos se encuentra la terapia basada en el uso de chaperonas farmacológicas que implica el uso de pequeñas moléculas que se unen a la enzima aumentando su estabilidad termodinámica o induciendo el correcto plegamiento de la misma.<sup>19</sup> Aunque pudiera parecer contradictorio, se ha observado que inhibidores competitivos de las enzimas implicadas en las LSDs, a concentraciones sub-inhedoras, son capaces de actuar como chaperonas (ASSC, del inglés Active-Site Specific Chaperones, **Figura 3**). Estos compuestos, al unirse al sitio activo de la enzima, actúan como moldes para su plegamiento, logrando que la enzima adopte la estructura terciaria adecuada para una correcta función. El complejo inhibidor-enzima se traslada del retículo endoplasmático (RE) al lisosoma y una vez allí, se produce la disociación del complejo, quedando la enzima libre para hidrolizar el correspondiente sustrato, evitando así su acumulación en los lisosomas.<sup>20</sup>

---

<sup>19</sup> Parenti, G.; Andria, G.; Valenzano, K. J. Pharmacological chaperone therapy: preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 1138-1148.

<sup>20</sup> Fan, J. -Q. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355-360.





**Figura 3.** Sistema de control de calidad del RE y función de chaperonas específicas del sitio activo (figura adaptada de *Trends in Pharmacological Science*, **2013**, 24, 355-360).

El Migalastat,<sup>21</sup> uno de los tres iminoazúcares que se comercializan como fármacos, actúa como chaperona farmacológica de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A lisosomal, la cual se encuentra implicada en otra de las LSDs de mayor prevalencia, la enfermedad de Fabry.

Los iminoazúcares han mostrado además efectividad como chaperonas farmacológicas en otras enfermedades de almacenamiento lisosomal como la enfermedad de Gaucher, Gangliosidosis GM1,<sup>22</sup> Sandhoff y Tays-Sachs.<sup>23</sup> La primera de ellas está

<sup>21</sup> Markham, A. Migalastat: first global approval. *Drugs* **2016**, 76, 1147-1152.

<sup>22</sup> Sánchez Fernández, E. M.; García Fernández, J. M.; Ortiz-Mellet, C. Glycomimetic-based pharmacological chaperones for lysosomal storage disorders: lessons from Gaucher, GM1-gangliosidosis and Fabry diseases. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 5497-5515.

<sup>23</sup> a) Kato, A.; Nakagome, I.; Nakagawa, S.; Kinami, K.; Adachi, I.; Jenkinson, S. F.; Désiré, J.; Blériot, Y.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J.; Shuichi Hirono, S. *In silico* analyses of essential interactions of iminosugars with the Hex A active site and evaluation of their pharmacological chaperone effects for Tay-Sachs disease. *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 9297-9304. b) Tropak, M. B.; Reid, S. P.; Guiral, M.; Withers, S.

relacionada con la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa (una  $\beta$ -glucosidasa lisosomal), la segunda con la  $\beta$ -galactosidasa y la última con  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, su traslado a la clínica ha sido muy limitado debido, en parte, a su capacidad para inhibir la enzima en cuestión. Recientemente se han identificado chaperonas no inhibitoras capaces de aumentar la actividad de la enzima defectuosa actuando como ligandos de tipo alostérico.<sup>24</sup>

Otro de los problemas más comunes encontrados en la búsqueda de chaperonas farmacológicas derivadas de iminoazúcares y, en general, en la aplicación de estos compuestos como fármacos, se encuentra relacionado con la limitada permeabilidad a través de las membranas, así como con la falta de selectividad, lo que origina efectos secundarios no deseados.<sup>25</sup> Estudios estructura-actividad llevados a cabo por nuestro grupo de

---

G.; Mahuran, D. Pharmacological enhancement of  $\beta$ -hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff patients. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13478-13487.

<sup>24</sup> Jung, O.; Patnaik, S.; Marugan, J.; Sidransky, E.; Westbroek, W. Progress and potential of non-inhibitory small molecule chaperones for the treatment of Gaucher disease and its implications for Parkinson disease. *Expert Review of Proteomics* **2016**, *13*, 471-479.

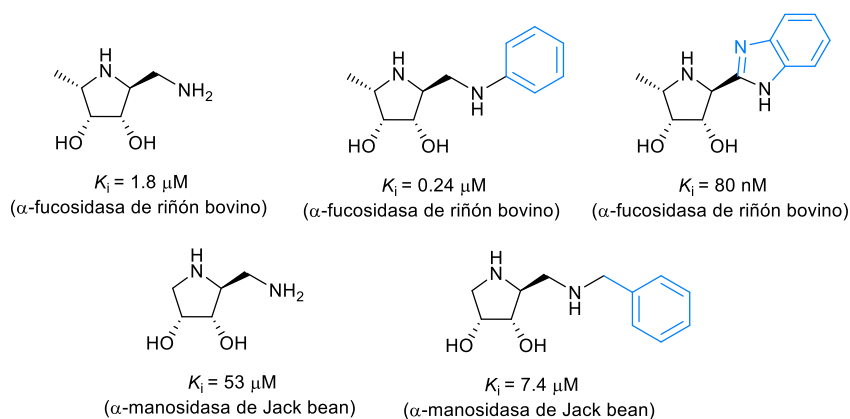
<sup>25</sup> Horne, G.; Wilson, F. X.; Tinsley, J.; Williams, D. H.; Storer, R. Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow. *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 107-118.

investigación<sup>26</sup> y otros<sup>27</sup> han mostrado que la selectividad de los iminoazúcares frente a una determinada glicosidasa puede aumentar mediante la inserción de restos aromáticos y/o alifáticos que favorezcan interacciones adicionales de tipo alostérico con la enzima. En la **Figura 4** se muestran algunos ejemplos de iminoazúcares procedentes de estos estudios, así como los correspondientes valores de la constante de inhibición  $K_i$  (ver anexo “*Conceptos generales sobre inhibición enzimática*”) que presentaron.

---

<sup>26</sup> a) Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I.; Demange, R.; Vogel, P. Synthesis and glycosidase inhibitory activities of 5-(1',4'-dideoxy-1',4'-imino-D-erythro-2-methyl-3-furoic acid (5-[(3S,4R)-3,4-dihydroxypyrrolidine-2-yl]-2-methylfuran-3-carboxylic acid) derivatives: new leads as selective  $\alpha$ -L-fucosidase and  $\beta$ -galactosidase inhibitors. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 1894-1913. b) Carmona, A. T.; Popowycz, F.; Gerber-Lemaire, S.; Rodríguez-García, E.; Schütz, C.; Vogel, P.; Robina, I. Synthesis and glycosidase inhibitory activities of 2-(aminoalkyl)pyrrolidine-3,4-diol derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4897-4911. c) Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Mora, F.; Vogel, P.; Robina, I. Stereoselective synthesis of (2S,3S,4R,5S)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol derivatives that are highly selective  $\alpha$ -L-fucosidase inhibitors. *Chem. Commun.* **2005**, 4949-4951. d) Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A.T.; Vera-Ayoso, Y.; Moreno-Vargas, A.J.; Bello, C.; Vogel, P.; Robina, I. Synthesis of novel pyrrolidine 3,4-diol derivatives as inhibitors of  $\alpha$ -L-fucosidases. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1192. e) Martínez-Bailén, M.; Carmona, A. T.; Patterson-Orazem, A. C.; Lieberman, R. L.; Ide, D.; Kubo, M.; Kato, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J. Exploring substituent diversity on pyrrolidine-aryltriazole iminosugars: Structural basis of  $\beta$ -glucocerebrosidase inhibition. *Bioorg. Chem.* **2019**, *82*, 652.

<sup>27</sup> a) Wu, C. -Y.; Chang, C. -F.; Chen, J. S. -Y.; Wong, C. -H.; Lin, C. -H. Rapid diversity-oriented synthesis in microtiter plates for *in situ* screening: discovery of potent and selective  $\alpha$ -fucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4661-4664. b) Ho, C. -W.; Popat, S. D.; Liu, T. -W.; Tsai, K. -C.; Ho, M. -J.; Chen, W. -H.; Yang, A. -S.; Lin, C. -H. Development of GlcNAc-inspired iminocyclitols as potent and selective *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase inhibitors. *Chem. Biol.* **2010**, *5*, 489-497. c) Kotland, A.; Accadbeld, F.; Robeyns, K.; Behr, J.-B. Synthesis and fucosidase inhibitory study of unnatural pyrrolidine alkaloid 4-epi-(+)-codonopsinine. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4094-4098. d) Hottin, A.; Wright, D. W.; Davies, G. J.; Behr, J.-B. Exploiting the hydrophobic terrain in fucosidases with aryl-substituted pyrrolidine iminosugars. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 277-283.



**Figura 4.** Ejemplos representativos de derivados de iminoazúcares sintetizados en el grupo de investigación. Influencia del resto aromático en la inhibición.

La síntesis de este tipo de derivados en ocasiones es compleja por lo que es deseable el desarrollo de estrategias sintéticas que puedan conducir de manera eficaz a inhibidores potentes y selectivos de glicosidasas que, además, posean características estructurales compatibles con una buena permeabilidad a través de las membranas biológicas.

Las reacciones de tipo clic resultan ser una aproximación sintética eficiente para la unión de dos bloques de síntesis y es muy adecuada para la generación rápida de librerías químicas de conjugados, lo que es de gran interés para el establecimiento de relaciones estructura-actividad (SAR).<sup>28</sup> El concepto de la *química clic* fue introducido por el Prof. Sharpless<sup>29</sup> y colaboradores para definir una nueva metodología sintética que utiliza exclusivamente las transformaciones químicas más eficaces, que implican condiciones de reacción sencillas (insensibles al oxígeno o al agua) y que originan los correspondientes productos de forma cuantitativa tras procesos de purificación sencillos. Esta metodología

<sup>28</sup> Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905-4979.

<sup>29</sup> Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

resulta adecuada para la identificación y posterior modificación estructural de moléculas con potencial actividad biológica. La posibilidad de generar quimiotecas de compuestos mediante reacciones clic y llevar a cabo la evaluación biológica *in situ*, sin necesidad de purificación de cada uno de los componentes individuales, ha permitido el descubrimiento rápido de moléculas bioactivas de diversa índole.<sup>30</sup>

La elección de la reacción clic a utilizar en este tipo de estrategias es crucial para el éxito de la metodología ya que los reactivos y subproductos que se generen no deben interferir en el posterior análisis biológico de los crudos de reacción. En este sentido, la reacción clic más utilizada ha sido la bien conocida reacción de cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos catalizada por Cu (I) (CuAAC)<sup>31</sup> desarrollada por Sharpless<sup>32</sup> y Meldal.<sup>33</sup> En el **Esquema 2** se muestra la estrategia basada en reacciones paralelas CuAAC seguido de análisis biológico *in situ* para la identificación de moléculas bioactivas.

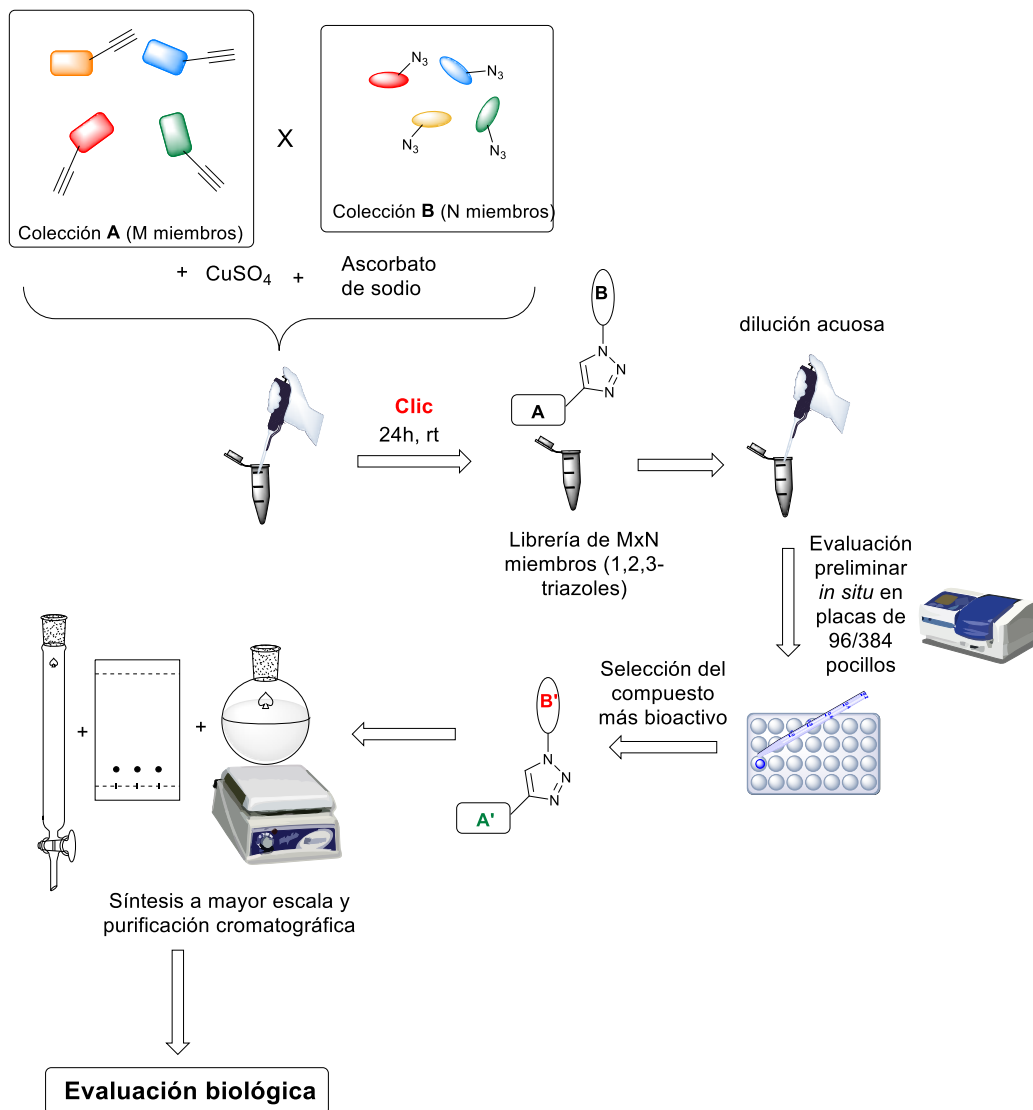
---

<sup>30</sup> Brik, A.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Microtiter plate based chemistry and *in situ* screening: a useful approach for rapid inhibitor discovery. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1446-1457.

<sup>31</sup> Wang, X.; Huang, B.; Liu, X.; Zhan, P. Discovery of bioactive molecules from CuAAC click-chemistry-based combinatorial libraries. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 118-132.

<sup>32</sup> Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

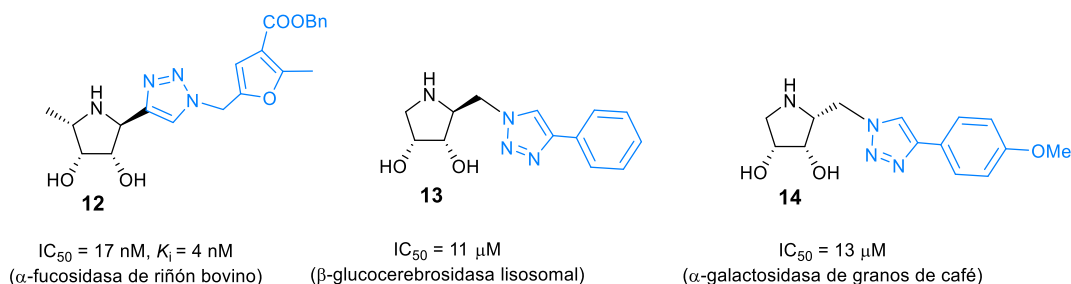
<sup>33</sup> Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.



**Esquema 2.** Esquema general para la identificación de moléculas bioactivas mediante la generación de librerías de triazoles mediante reacción CuAAC seguido de análisis biológico *in situ*.

Nuestro grupo de investigación ha utilizado esta estrategia en los últimos años para la preparación de inhibidores de glicosidasas con estructura de dihidroxipirrolidina. Las

pirrolidinas polihidroxladas son iminoazúcares con actividad biológica potente que, en comparación con las piperidinas polihidroxladas, poseen menor carácter hidrofílico. Además, la inserción de restos aromáticos contiguos a un núcleo de dihidroxipirrolidina aumenta el carácter hidrofóbico del iminoazúcar en conjunto, lo que facilitaría la permeabilidad a través de las membranas celulares. Esta estrategia nos ha permitido encontrar inhibidores potentes y selectivos de distintos tipos de  $\alpha$ -fucosidasas,<sup>34</sup>  $\beta$ -glucosidasas y  $\alpha$ -galactosidasas (compuestos **12**, **13**, **14**, **Figura 5**).<sup>35</sup> El aumento de potencia y selectividad en la inhibición puede deberse a interacciones no específicas en la proximidad del sitio activo por parte de los grupos aromáticos, algo que ya habíamos observado en un complejo cristalino  $\alpha$ -fucosidasa bacteriana/inhibidor.<sup>36</sup>



**Figura 5.** Estructuras de inhibidores de glicosidasas obtenidos en el grupo de investigación mediante evaluación *in situ* de una librería de compuestos.

<sup>34</sup> a) Moreno-Vargas, A.J.; Carmona, A. T.; Mora, F.; Vogel, P.; Robina, I. Stereoselective synthesis of (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol derivatives that are highly selective  $\alpha$ -L-fucosidase inhibitors. *Chem. Commun.* **2005**, 4949-4951. b) Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A.T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904.

<sup>35</sup> Martínez-Bailén, M.; Carmona, A. T.; Moreno-Clavijo, E.; Robina, I.; Ide, D.; Kato, A.; Moreno-Vargas, A. J. Tuning of  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase inhibition by generation and *in situ* screening of a library of pyrrolidine-triazole hybrid molecules. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 532-542.

<sup>36</sup> Wright, D. W.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Robina, I.; Davies, G. J. Three dimensional structure of a bacterial  $\alpha$ -L-fucosidase with a 5-membered iminocyclitol inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4751-4754.

Por otro lado, recientemente se ha observado que la presentación de múltiples copias de un iminoazúcar en plataformas multivalentes puede implementar considerablemente las propiedades de un inhibidor a través del fenómeno conocido como multivalencia.<sup>37</sup> Este concepto había sido ampliamente estudiado en los procesos de interacción carbohidrato-lectina,<sup>38</sup> observándose que los carbohidratos multivalentes lograban una afinidad extraordinaria en la interacción con lectinas, muy por encima de la esperada por simples efectos estadísticos. Aunque hay distintos mecanismos para explicar el efecto multivalente, el que origina los efectos más acusados es el conocido como “efecto quelato”, que consiste en la interacción simultánea de varios epítopos de un compuesto multimérico con distintos receptores adyacentes. Este efecto, factible en el caso de proteínas multiméricas como las lectinas, *a priori* no sería igual de factible con las glicosidasas que, en la mayoría de las ocasiones, solo poseen un sitio activo como receptor. Este hecho, unido a la dificultad sintética para la preparación de iminoazúcares multiméricos, retrasó enormemente el desarrollo de inhibidores multivalentes de glicosidasas, apareciendo el primer ejemplo representativo en el año 2009.<sup>39</sup> Sin embargo, a lo largo de la pasada década han sido numerosos los trabajos publicados relativos al estudio de inhibidores multivalentes de glicosidasas.<sup>40</sup> Los resultados más relevantes en términos de efecto multivalente

---

<sup>37</sup> Pieters, R. J. Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013–2025.

<sup>38</sup> a) Mueller, C.; Despras, G.; Lindhorst, T. K. Organizing multivalency in carbohydrate recognition. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 3275–3302. b) Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525–561.

<sup>39</sup> Diot, J.; García-Moreno, M. I.; Gouin, S. G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363.

<sup>40</sup> Revisiones destacadas: a) Compain, P.; Bodlenner, A. The multivalent effect in glycosidase inhibition: a new, rapidly emerging topic in glycoscience. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1239–1251; b) Gouin, S.G. Multivalent inhibitors for carbohydrate-processing enzymes: beyond the “lock-and-key” concept. *Chem. Eur J.* **2014**, *20*, 11616–11628; c) Zelli, R.; Longevial, J.-F.; Dumy, P.; Marra, A. Synthesis and biological properties of multivalent iminosugars. *New J. Chem.* **2015**, *30*, 5050–5074; d) Matassini, C.;



observado han sido frente a la  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack (JB $\alpha$ -man).<sup>41</sup> El efecto multivalente puede analizarse en base al parámetro conocido como  $rp/n$ ,<sup>42</sup> que se define como la potencia de inhibición relativa ( $rp$ ) por unidad monomérica, siendo  $n$  la valencia del multímero.

La JB $\alpha$ -man, recientemente cristalizada en complejo con un inhibidor multimérico,<sup>43</sup> es una enzima con más de un sitio activo situados en una cavidad muy abierta y accesible, lo que facilita el acceso a moléculas inhibitoras de un tamaño considerable. Este hecho justificaría los altos valores de  $rp/n$  observados en la inhibición de esta enzima por parte de inhibidores multivalentes. En el caso de glicosidasas con sitios activos menos accesibles (como la maltasa de levadura,  $\beta$ -glucosidasa de almendras y  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café), el efecto multivalente podría explicarse en base a interacciones con sitios no catalíticos

---

Parmeggiani, C.; Cardona, F.; Goti, A. Are enzymes sensitive to the multivalent effect? Emerging evidence with glycosidasas. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5407-5415. e) Compain, P. Multivalent effect in glycosidase inhibition: The end of the beginning. *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 10–22.

<sup>41</sup> Ejemplos seleccionados: a) Compain, P.; Decroocq, C.; lehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J. –F. Glycosidase inhibition with fullerene iminosugar balls: a dramatic multivalent effect. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756. b) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. The multivalent effect in glycosidase inhibition: probing the influence of architectural parameters with cyclodextrin-based iminosugar “click” clusters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831. c) Lepage, M. L.; Schneider, J. P.; Bodlenner, A.; Meli, A.; De Riccardis, F.; Schmitt, M.; Tarnus, C.; Nguyen- Huynh, N. –T.; Francois, Y. – N.; Leize-Wagner, E.; Birck, C.; Cousido-Siah, A.; Podjarny, A.; Izzo, I.; Compain, P. Iminosugar-cyclopeptoid conjugates raise multivalent effect in glycosidase inhibition at unprecedented high levels. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5151-5155. d) Mirabella, S.; D’Adamio, G.; Matassini, C.; Goti, A.; Delgado, S.; Gimeno, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J.; Šesták, S.; Jiménez-Barbero, J.; Cardona, F. Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to  $\alpha$ -mannosidasas. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 14585-14596

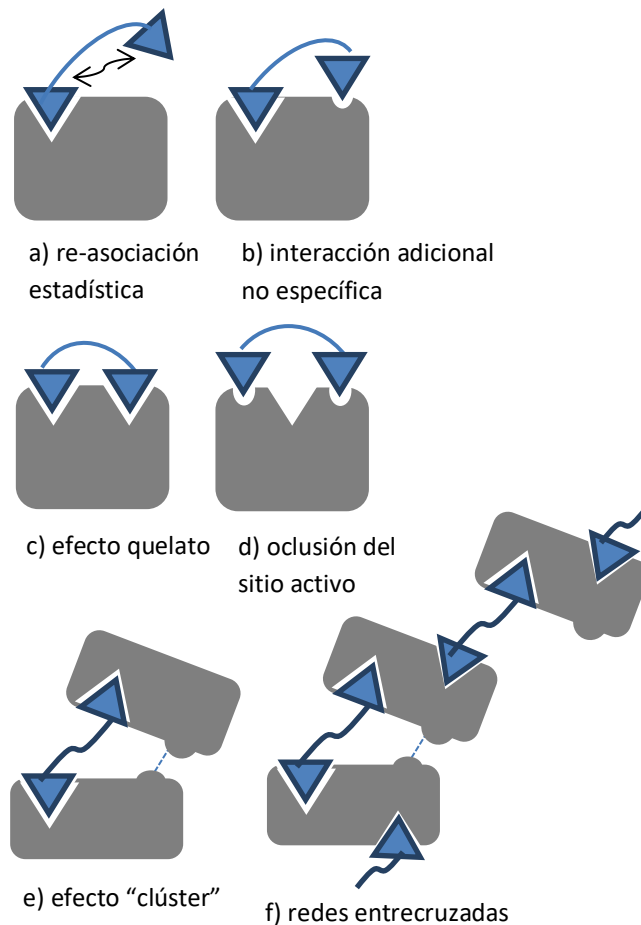
<sup>42</sup>  $rp$ : potencia relativa de inhibición de un compuesto multimérico respecto a la de su monómero de referencia. Se puede determinar en base a la constante de inhibición  $K_i$  o al valor del  $IC_{50}$  [ $K_i$  (monómero)/  $K_i$  (multímero)];  $rp/n$ , es la potencia relativa de inhibición corregida con la valencia del multímero. Se considera que hay multivalencia cuando  $rp/n > 1.0$ .

<sup>43</sup> Howard, E.; Cousido-Siah, A.; Lepage, M. L.; Schneider, J. P.; Bodlenner, A.; Mitschler, A.; Meli, A.; Izzo, I.; Alvarez, H. A.; Podjarny, A.; Compain, P. Structural basis of outstanding multivalent effects in Jack bean  $\alpha$ -mannosidase inhibition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 8002 –8006.

de la enzima. Los estudios llevados a cabo para elucidar los mecanismos responsables del efecto multivalente en la inhibición de glicosidasas han sido numerosos en los últimos años.<sup>44</sup> Considerando la estructura de un inhibidor divalente como modelo más sencillo de inhibidor multimérico, el efecto multivalente podría explicarse en base a los mecanismos representados en la **Figura 6**. Además del *efecto de re-asociación estadística (Figura 6a)*, donde el aumento de actividad se debe a la alta concentración local de inhibidor en las proximidades del sitio activo, y al *efecto quelato (Figura 6c)* donde el inhibidor interacciona con más de un sitio activo, pueden tener lugar otro tipo de interacciones. Así, el efecto multivalente puede explicarse también en base a *interacciones secundarias adicionales* con zonas no catalíticas de la enzima (**Figura 6b**) o por *oclusión del sitio activo* en presencia de ligandos voluminosos (**Figura 6d**). Finalmente, la multivalencia también podría deberse a la formación de agregados debido al *efecto clúster (Figura 6e)* o si la enzima posee naturaleza multimérica, a los *sistemas entrecruzados (Figura 6f)*.

---

<sup>44</sup> a) García-Moreno, M. I.; Ortega-Caballero, F.; Rísquez-Cuadro, R.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. The impact of heteromultivalency in lectin recognition and glycosidase inhibition: an integrated mechanistic study. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6295-6304. b) Stauffert, F.; Bodlenner, A.; Trinh, T. M. N.; García-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J. -F.; Compain, P. Understanding multivalent effects in glycosidase inhibition using C-glycoside “click” clusters as molecular probes. *New. J. Chem.* **2016**, *40*, 7421-7430. c) Abellán Flos, M.; García Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Nierengarten, J. -F.; Vincent, S. P. Potent glycosidase inhibition with heterovalent fullerenes: unveiling the binding modes triggering multivalent inhibition. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11450-11460. d) Mirabella, S.; D’Adamio, G.; Matassini, C.; Goti, A.; Delgado, S.; Gimeno, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J.; Šesták, S.; Jiménez-Barbero, J.; Cardona, F. Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to  $\alpha$ -mannosidasas. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 14585-14596. e) Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F.; García Fernández, J. M. Multivalency as an action principle in multimodal lectin recognition and glycosidase inhibition: a paradigm shift driven by carbon-based glyconanomaterials. *J. Mater. Chem. B*, **2017**, *5*, 6428-6436. f) González-Cuesta, M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. Carbohydrate supramolecular chemistry: beyond the multivalent effect. *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 5207-5222.



**Figura 6.** Propuesta de modelos de interacción entre un inhibidor divalente y enzimas con uno (c y f) o dos (a, b, d y e) sitios activos.

Todos estos mecanismos se caracterizan porque la interacción del primer inhibido<sup>45</sup> con la enzima reduce el peaje entrópico en la segunda y sucesivas interacciones con la

<sup>45</sup> Un epítipo es la zona de una macromolécula que es reconocida por un determinado receptor (por ej. una lectina). Por analogía, en el campo de la inhibición enzimática, donde este receptor será una enzima y la macromolécula sería el inhibidor, en lugar de epítipo usaremos el término inhítipo.

enzima, lo que resulta favorable desde el punto de vista termodinámico<sup>46</sup> y se traduce en un aumento considerable de la inhibición con respecto al inhibidor monovalente. Además, la estrategia de multimerización no solo ha sido efectiva para obtener inhibidores muy potentes, sino que también se ha conseguido modular la selectividad de los inhibidores, obteniéndose en muchas de las ocasiones inhibidores multivalentes claramente más selectivos que sus correspondientes derivados monovalentes.<sup>47</sup>

En el diseño de inhibidores multivalentes, se consideran tres aspectos fundamentales: (i) la estructura del inhibidor monovalente o inhítopo, (ii) la plataforma sobre la que se construye la estructura multivalente y que determina la valencia del inhibidor y (iii) el espaciador entre la plataforma y el inhítopo, lo que multiplica las posibilidades de diversificación de este tipo de compuestos. Es por ello que la preparación y purificación de quimiotecas de iminoazúcares multiméricos resulta ser un trabajo complejo. Aunque la utilización de la reacción CuAAC ha facilitado la síntesis de este tipo de estructuras, las múltiples posibilidades de variabilidad estructural unido a la complejidad relacionada con el proceso de síntesis/purificación limita el número de estructuras a analizar biológicamente.

---

<sup>46</sup> Pieters, R. J. Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013-2025.

<sup>47</sup> a) Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J. -F. Glycosidase inhibition with fullerene iminosugar balls: a dramatic multivalent effect. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756. b) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. The multivalent effect in glycosidase inhibition: probing the influence of architectural parameters with cyclodextrin-based iminosugar click clusters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.

Aparte de la JB $\alpha$ -man, solo se ha observado multivalencia relevante frente a enzimas como la  $\alpha$ -manosidasa II de Golgi,<sup>48</sup> maltasa,<sup>49</sup> N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)<sup>50</sup> y, muy recientemente, N-acetilhexosaminidasas humanas.<sup>51</sup> No obstante, son mucho menos numerosos los ejemplos de inhibidores multivalentes descritos y, además, el efecto multivalente encontrado es mucho menor al observado para la JB $\alpha$ -man. En nuestro grupo de investigación hemos explorado la existencia de efecto multivalente en la inhibición de otras glicosidasas, como la  $\alpha$ -galactosidasa y la  $\alpha$ -fucosidasa, encontrando resultados relevantes en la inhibición de la  $\alpha$ -galactosidasa humana, enzima implicada en la enfermedad de Fabry.<sup>52</sup>

## OBJETIVOS GENERALES

Como se ha indicado en la Introducción, los iminoazúcares constituyen la categoría más importante de inhibidores de glicosidasas, sin embargo, su escasa selectividad de inhibición y baja permeabilidad a través de las membranas biológicas, limitan su utilización a nivel terapéutico. Es por ello que, como objetivo principal de la presente Tesis Doctoral, nos planteamos la síntesis de nuevos derivados de iminoazúcares con propiedades mejoradas

---

<sup>48</sup> Mirabella, S.; D'Adamio, G.; Matassini, C.; Goti, A.; Delgado, S.; Gimeno, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J.; Šesták, S.; Jiménez-Barbero, J.; Cardona, F. Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to  $\alpha$ -mannosidases. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 14585-14596.

<sup>49</sup> Nierengarten, J.-F.; Schneider, J. P.; Trinh, T.M.N.; Joosten, A.; Holler, M.; Lepage, M. L.; Bodlener, A.; García-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. Giant glycosidase inhibitors: first- and second-generation fullerodendrimers with a dense iminosugar shell. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 2483-2492.

<sup>50</sup> Matassini, C.; Vanni, C.; Goti, A.; Morrone, A.; Marradi, M.; Cardona, F. Multimerization of DAB-1 onto Au GNPs affords new potent and selective N-acetylglactosamine-6-sulfatase (GALNS) inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8604-8612.

<sup>51</sup> Álvarez-Dorta, D.; King, D. T.; Legigan, T.; Ide, D.; Adachi, I.; Deniaud, D.; Desire, J.; Kato, A.; Vocadlo, D.; Gouin, S. G.; Bleriot, Y. Multivalency to inhibit and discriminate hexosaminidases. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9022-9025

<sup>52</sup> Martínez-Bailén, M.; Carmona, A. T.; Cardona, F.; Matassini, C.; Goti, A.; Kubo, M.; Kato, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J. Synthesis of multimeric pyrrolidine iminosugar inhibitors of human  $\beta$ -glucocerebrosidase and  $\alpha$ -galactosidase A: First example of a multivalent enzyme activity enhancer for Fabry disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *192*, 112173.

utilizando dos aproximaciones: (a) introducción de grupos adicionales en la estructura de un iminoazúcar monovalente que favorezcan interacciones secundarias con la enzima y (b) exploración de la aproximación multivalente para mejorar el perfil de actividad y selectividad de los correspondientes análogos monovalentes. En ambos casos se plantea la utilización de la metodología de síntesis paralela seguida de evaluación *in situ* para facilitar la identificación rápida del mejor inhibidor de una librería química de derivados.

Los objetivos expuestos se recogen en los siguientes capítulos:

1. Síntesis y evaluación biológica *in situ* de iminoazúcares monovalentes como inhibidores de glicosidasas.
2. Síntesis y evaluación biológica *in situ* de derivados de iminoazúcares para la búsqueda de inhibidores multivalentes de glicosidasas.

**CAPÍTULO 1**

***SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA IN SITU DE IMINOAZÚCARES MONOVALENTES  
COMO INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS.***

## **CAPÍTULO 1: Síntesis y evaluación biológica *in situ* de iminoazúcares monovalentes como inhibidores de glicosidasas.**

### **1.1 ANTECEDENTES**

#### **1.1.1. Incorporación de restos aromáticos en iminoazúcares como estrategia para mejorar la capacidad de inhibición.**

Una de las estrategias más utilizadas con el fin de mejorar las propiedades inhibitorias de los iminoazúcares consiste en la incorporación de restos aromáticos/alifáticos sobre el esqueleto pirrolidínico/piperidínico original. Estos restos permiten establecer nuevas interacciones alostéricas/secundarias con la enzima que frecuentemente mejoran la potencia y selectividad de inhibición.<sup>53</sup> En nuestro grupo de investigación, la incorporación de restos (hetero)aromáticos en núcleos de pirrolidina dihidroxilada ha permitido obtener inhibidores potentes y selectivos de diversas glicosidasas.<sup>54</sup> Esta estrategia permitió aumentar los valores de inhibición de estos derivados, mejorando la falta de selectividad típica de los inhibidores pirrolidínicos y, a la vez, aumentando el carácter lipofílico, y por lo

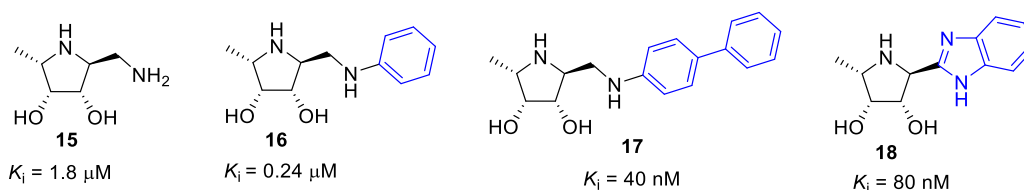
---

<sup>53</sup> a) Wu, C. -Y.; Chang, C. -F.; Chen, J. S. -Y.; Wong, C. -H.; Lin, C. -H. Rapid diversity-oriented synthesis in microtiter plates for *in situ* screening: discovery of potent and selective  $\alpha$ -fucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4661-4664. b) Ho, C. -W.; Popat, S. D.; Liu, T. -W.; Tsai, K. -C.; Ho, M. -J.; Chen, W. -H.; Yang, A. -S.; Lin, C. -H. Development of GlcNAc-inspired iminocyclitols as potent and selective *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase inhibitors. *Chem. Biol.* **2010**, *5*, 489-497. c) Hottin, A.; Wright, D.W.; Davies, G.J.; Behr, J.-B.; Exploiting the hydrophobic terrain in fucosidases with aryl-substituted pyrrolidine iminosugars. *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 277-283. b) Kotland, A.; Accadbled, F.; Robeyns, K.; Behr, J.-B. Synthesis and fucosidase inhibitory study of unnatural pyrrolidine alkaloid 4-epi-(+)-codonopsinine. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4094-4098.

<sup>54</sup> a) Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Vera-Ayoso, Y.; Moreno-Vargas, A. J.; Bello, C.; Vogel, P.; Robina, I. Synthesis of novel pyrrolidine 3,4-diol derivatives as inhibitors of  $\alpha$ -L-fucosidasas. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1192-1202. b) Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Mora, F.; Vogel, P.; Robina, I. Stereoselective synthesis of (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol derivatives that are highly selective  $\alpha$ -L-Fucosidase inhibitors. *Chem. Commun.* **2005**, 4949-4951.



tanto la permeabilidad a través de las membranas biológicas. Un ejemplo de lo expuesto puede observarse en los valores de inhibición frente a  $\alpha$ -fucosidasa de los derivados de dihidroxi pirrolidina **15-18** (*Figura 7*).



**Figura 7.** Efecto de la presencia de sustituyentes aromáticos en la inhibición de  $\alpha$ -fucosidasas.

La diamina **15** es un inhibidor potente y selectivo de  $\alpha$ -fucosidasa de epidídimo bovino ( $K_i = 1.8 \mu\text{M}$ ), sin embargo, sus propiedades inhibitoras mejoran sensiblemente gracias a la introducción de un grupo fenilo en el derivado **16** ( $K_i = 0.24 \mu\text{M}$ ). El efecto de la presencia de sustituyentes aromáticos resulta aún más beneficioso para los compuestos **17** ( $K_i = 40 \text{ nM}$ ) y **18** ( $K_i = 80 \text{ nM}$ ), obteniéndose valores para la constante de inhibición en el rango nanomolar.

En los últimos años las reacciones clic han captado notablemente la atención en el ámbito de la investigación farmacológica ya que representan una metodología eficiente para conectar dos bloques moleculares de manera estable y, por lo tanto, para la rápida preparación de librerías químicas de derivados útiles para estudios de relaciones estructura-actividad (SAR).<sup>55</sup> Entre las reacciones clic, la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada por Cu(I) (CuAAC), es la que, sin duda, ha sido más utilizada para la síntesis de moléculas biológicamente activas en el campo de la química médica y, también

<sup>55</sup> a) Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. "Click" chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979. b) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. "Click" chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

en la búsqueda de inhibidores de glicosidasas.<sup>56</sup> La importancia de la reacción CuAAC desde el punto de vista químico-biológico se traduce en la posibilidad de mejorar las propiedades inhibitoras de los iminoazúcares gracias a la incorporación de un grupo 1,2,3-triazol cuya estructura es un mimético no hidrolizable del enlace peptídico<sup>57</sup> capaz de establecer enlaces de hidrógeno con los aminoácidos del sitio activo de la enzima.<sup>58</sup>

En 2019 nuestro grupo de investigación ha publicado la síntesis de una quimioteca de pirrolidín-aryltriazoles obtenidos mediante reacción CuAAC entre dos azidometilpirrolidinas epiméricas dihidroxiladas y una colección de fenilacetilenos diferentemente sustituidos. Ambas familias de derivados epiméricos demostraron una elevada actividad de inhibición frente a la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa de lisosoma humano (GCase), siendo los compuestos 3,5-disustituidos **19** y **20** los más activos (**Figura 8**).<sup>59</sup>

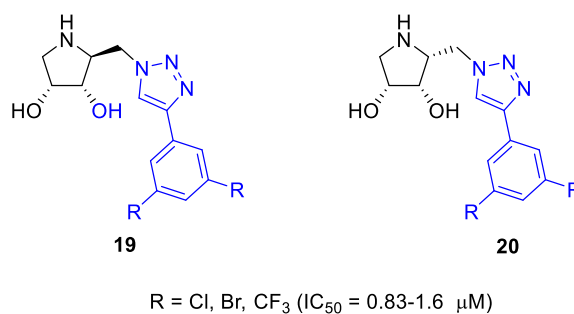
---

<sup>56</sup> Ver Introducción y objetivos generales, pág. 24.

<sup>57</sup> a) Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic peptide backbone modifications in an  $\alpha$ -helical coiled coil. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366-15367. b) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of "click" chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137.

<sup>58</sup> Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as amide bond mimics: triazole scan yields protease-resistant peptidomimetics for tumor targeting. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 8957-8960.

<sup>59</sup> Martínez-Bailén, M.; Carmona, A.T.; Patterson-Orazem, A. C.; Lieberman, R. L.; Ide, D.; Kubo, M.; Kato, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J. Exploring substituent diversity on pyrrolidine-aryltriazole iminosugars: Structural basis of  $\beta$ -glucocerebrosidase inhibition. *Bioorg. Chem.* **2019**, *86*, 652-664.



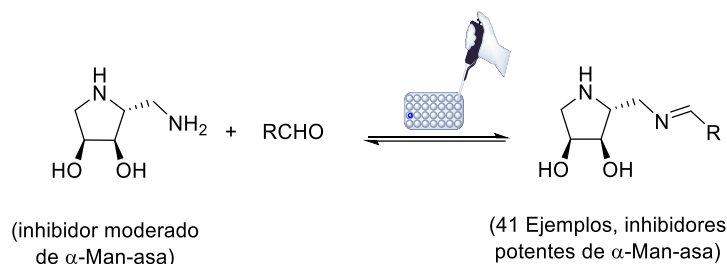
**Figura 8.** Pirrolidín-ariltriazoles epiméricos inhibidores de  $\beta$ -glucocerebrosidasa de lisosoma humano.

Los estudios de cristalización entre **20** (R= Cl) y la GCase han demostrado no sólo que la unidad de pirrolidina interacciona con los aminoácidos del sitio catalítico, sino también que el residuo de ariltriazol establece interacciones secundarias a lo largo de un surco superficial hidrofóbico de la enzima. Es importante destacar que algunos de estos compuestos actuaron como chaperonas farmacológicas aumentando la actividad enzimática de la GCase en fibroblastos de pacientes con enfermedad de Gaucher.

La posibilidad de generar quimiotecas de derivados de iminoazúcares mediante reacciones clic, y llevar a cabo la evaluación biológica *in situ*, sin necesidad de purificación de cada uno de los componentes individuales, ha permitido el descubrimiento rápido de potentes inhibidores de glicosidasas. El primer ejemplo de utilización de esta aproximación en la identificación de nuevos inhibidores de glicosidasas fue descrito por Vogel y cols., en colaboración con nuestro grupo de investigación.<sup>60</sup> En este trabajo se llevó a cabo la

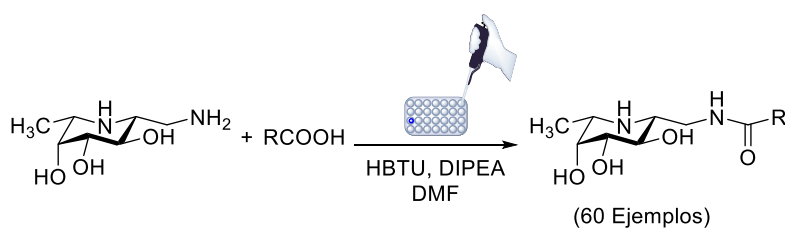
<sup>60</sup> Gerber-Lemaire, S.; Popowycz, F.; Rodríguez-García, E.; Carmona Asenjo, A. T.; Robina, I.; Vogel, P. An efficient combinatorial method for the discovery of glycosidase inhibitors. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 466-470.

formación y evaluación *in situ* de una librería química de iminas (**Esquema 3**), que presentaron inhibición frente a  $\alpha$ -manosidasas.



**Esquema 3.** Síntesis de iminas derivadas de dihidroxipirrolidinas como inhibidores de  $\alpha$ -manosidasas.

Posteriormente, C.-H. Wong llevó a cabo la reacción de amidación entre la 1-aminometilfuconojirimicina y una colección de ácidos carboxílicos comerciales seguido de evaluación biológica *in situ* de los crudos de reacción frente a  $\alpha$ -fucosidasas (**Esquema 4**).<sup>61</sup> Este estudio permitió concluir que la enzima interaccionaba mejor con derivados que incorporaban un aglicón aromático que aquellos que presentaban uno de tipo alquílico.



**Esquema 4.** Síntesis de amidas derivadas de la fuconojirimicina descrita por Wong y cols. como inhibidores de  $\alpha$ -fucosidasas.

Aunque ambas aproximaciones utilizan reacciones que no pueden considerarse estrictamente como reacciones clic, supusieron los primeros ejemplos de preparación de

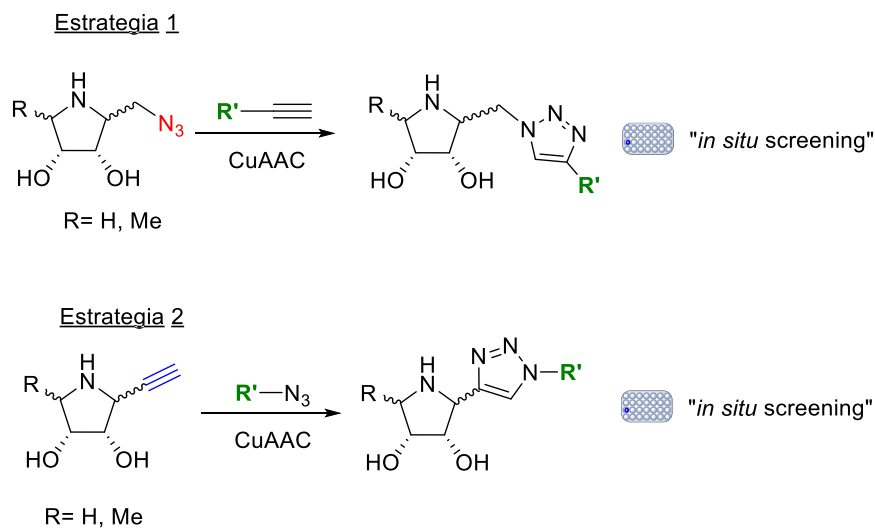
<sup>61</sup> Wu, C. -Y.; Chang, C. -F.; Chen, J. S. -Y.; Wong, C. -H.; Lin, C. -H. Rapid diversity-oriented synthesis in microtiter plates for *in situ* screening: discovery of potent and selective  $\alpha$ -fucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4661-4664.

librerías de compuestos seguido de evaluación *in situ* para la identificación de inhibidores potentes de glicosidasas.

La reacción CuAAC seguido de evaluación biológica *in situ* se ha utilizado en nuestro grupo de investigación para la identificación de forma rápida de inhibidores potentes de una serie de glicosidasas. La estrategia se basó en la reacción clic entre azidometilpirrolidinas o alquilpirrolidinas configuracionalmente diversas con una colección de alquinos o azidas comerciales (**Esquema 5**).<sup>62</sup> Esta aproximación permitió la identificación de los compuestos **12-14** (**Figura 5**, *pág.* 27) como inhibidores potentes de  $\alpha$ -fucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -galactosidasa.

---

<sup>62</sup> a) Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A.T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904. b) Martínez-Bailén, M.; Carmona, A. T.; Moreno-Clavijo, E.; Robina, I.; Ide, D.; Kato, A.; Moreno-Vargas, A. J. Tuning of  $\beta$ - glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase inhibition by generation and *in situ* screening of a library of pyrrolidine-triazole hybrid molecules. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 532–542.



**Esquema 5.** Estrategias sintéticas basadas en reacciones CuAAC seguidas de evaluación biológica *in situ* desarrolladas en el grupo de investigación.

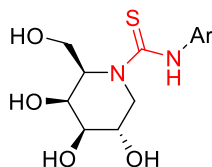
Aunque entre las ventajas de la reacción de CuAAC se encuentran los elevados rendimientos y la ausencia de subproductos que podrían interferir con la evaluación biológica,<sup>63</sup> no se puede ignorar que su principal limitación deriva del uso del catalizador de Cu (I) ya que los niveles permitidos en compuestos con potencial aplicación farmacológica son muy bajos (30 ppm).<sup>64</sup> Aunque el Cu(I) se utiliza de manera catalítica y los productos finales se purifican mediante técnicas convencionales, en ocasiones, las trazas de Cu(I)

<sup>63</sup> Lallana, E.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794–8804.

<sup>64</sup> a) Ostrovskis, P.; Volla, C. M. R.; Turks, M.; Markovic, D. Application of metal free click chemistry in biological studies. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 610–640. b) International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline for elemental impurities (December 2014). Véase: [www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D\\_Step\\_4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step_4.pdf).

pueden formar complejos con los propios productos bioactivos sintetizados dificultando su purificación.<sup>65</sup>

Aparte de la CuAAC, el uso de otro tipo de reacciones clic en el ámbito de la química médica ha sido muy limitado.<sup>66</sup> Un caso interesante está representado por la serie de 1-desoxigalactonojirimicina-ariltioureas (DGJ-ArTioureas) derivadas de la 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) descritas por Ortiz-Mellet y cols. en 2014 (**Figura 9**).<sup>67</sup>



**Figura 9.** Estructura general de la serie de DGJ-ArTioureas derivadas de la DGJ.

En el artículo se investiga la capacidad de las DGJ-ariltioureas sintetizadas para actuar como chaperonas farmacológicas frente a  $\alpha$ -galactosidasa A humana y se comparan los

<sup>65</sup> Billault, I.; Pessel, F.; Petit, A.; Turgis, R.; Scherrmann, M.-C. Investigation of the copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition reactions (CuAAC) in Molten PEG2000. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 1986–1995.

<sup>66</sup> a) Dondoni, A.; Marra, A. SuFEx: a metal-free click ligation for multivalent biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1549–1553. b) Petrelli, A.; Samain, E.; Pradeau, S.; Halila, S.; Fort, S. Efficient conjugation of oligosaccharides to polymer particles through furan/maleimide Diels-Alder reaction: application to the capture of carbohydrate-binding proteins. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 206–212. c) Kanfar, N.; Tanc, M.; Dumy, P.; Supuran, C. T.; Ulrich, S.; Winum, J.-Y. Effective access to multivalent inhibitors of carbonic anhydrases promoted by peptide bioconjugation. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 6788–6794. d) Ulrich, S.; Boturyn, D.; Marra, A.; Renaudet, O.; Dumy, P. Oxime ligation: a chemoselective click-type reaction for accessing multifunctional biomolecular constructs. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 34–41. e) Dondoni, A.; Marra, A. Recent applications of thiolene coupling as a click process for glycoconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 573–586.

<sup>67</sup> Yu, Y.; Mena-Barragán, T.; Higaki, K.; Johnson, J. L.; Drury, J. E.; Lieberman, R. L.; Nakasone, N.; Ninomiya, H.; Tsukimura, T.; Sakuraba, H.; Suzuki, Y.; Nanba, E.; Ortiz-Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Ohno, K.; Molecular basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human  $\alpha$ -galactosidase A: pharmacological chaperoning efficacy on Fabry disease mutants. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1460–1469.

resultados obtenidos con los datos relativos a la 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) que actualmente se comercializa con el nombre de Migalastat. Los estudios del complejo cristalino entre la 1-desoxigalactonojirimicina-*p*-fluorofeniltiourea (DGJ-pFPhT) y la  $\alpha$ -Gal A evidenciaron una interacción entre el protón del -NH de la tiourea y el residuo catalítico de ácido aspártico-D231, confirmando el importante papel desempeñado por la tiourea como fuerte donador de enlaces de hidrógeno. De este modo, con la introducción de este grupo, se logra aumentar la afinidad enzima-inhibidor y, a la vez, mejorar su carácter lipofílico lo que se traduce en una mejora del perfil farmacocinético.

### 1.1.2. Modificaciones estructurales en derivados pirrolidínicos, pirrolizidínicos e indolizidínicos.

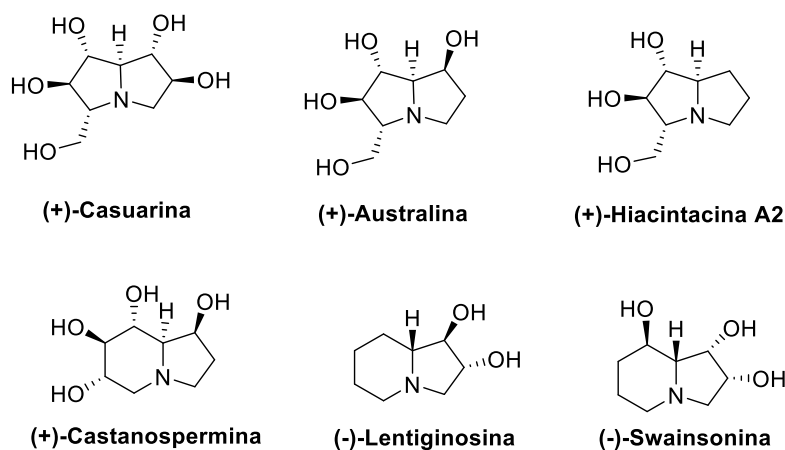
Las pirrolizidinas y las indolizidinas polihidroxiadas son alcaloides con estructura bicíclica pertenecientes a la familia de los iminoazúcares. Ambos tipos de estructuras han sido objeto de estudio debido a su actividad inhibidora frente a las glicosidasas y consecuentemente a su posible uso farmacológico.<sup>68</sup> En este sentido, pirrolizidinas polihidroxiadas de origen natural como la casuarina, la australina y las hiacintacinas han presentado actividad como inhibidores de varias glicosidasas. Esto mismo sucede con derivados polihidroxiados de indolizidinas, como la castanospermina, lentiginosina y swainsonina (**Figura 10**).<sup>69</sup>

---

<sup>68</sup> a) Compain, P.; Martin, O. R. Iminosugars: from synthesis to therapeutic applications. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2007**. b) Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. Polyhydroxylated alkaloids natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265–295.

<sup>69</sup> a) Robertson, J.; Stevens, K. Pyrrolizidine alkaloids: occurrence, biology, and chemical synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 62–89. b) Michael, J. P. Simple indolizidine and quinolizidine alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology* **2016**, *75*, 1–498. c) Kato, A.; Hirokami, Y.; Kinami, K.; Tsuji, Y.; Miyawaki, S.; Adachi, I.; Hollinshead, J.; Nash, R. J.; Kiappes, J. L.; Zitzmann, N.; Cha, J. K.; Molyneux, R.





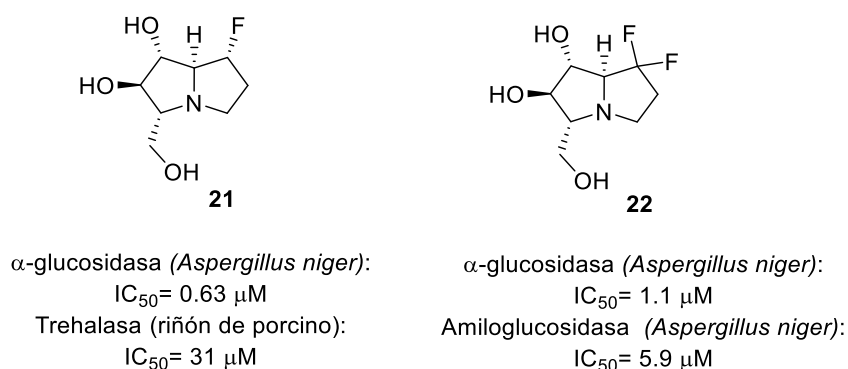
**Figura 10.** Ejemplos de pirrolizidinas e indolizidinas de origen natural con actividad como inhibidores de glicosidasas.

La mayoría de pirrolizidinas e indolizidinas carecen de selectividad en la inhibición de glicosidasas, además de una escasa permeabilidad a través de las membranas biológicas lo que limita su uso como potenciales fármacos. Con el objetivo de obtener inhibidores de tipo pirrolizidínico e indolizidínico más potentes y selectivos, muchos grupos de investigación han propuesto varias modificaciones estructurales, siendo las más comunes las relacionadas con el cambio en la configuración de los centros quirales y en el número de grupos hidroxilos de la molécula.<sup>70</sup> Ejemplos de modificaciones estructurales de otro tipo son más escasos

J.; Fleet, G. W. J.; Asano, N. Isolation and SAR studies of bicyclic iminosugars from castanospermum australe as glycosidase inhibitors. *Phytochemistry* **2015**, *111*, 124–131. d) Desvergnès, V.; Landais, Y. Structure, biological properties, and total synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidines of the hyacinthacines family. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2014**, *42*, 373–419. e) Ritthiwigrom, T.; Pyne, S. G. Stud. isolation, biological activities, and synthesis of the natural casuarines. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2012**, *36*, 1–26.

<sup>70</sup> a) Lieou Kui, E.; Kanazawa, A.; Behr, J.B.; Py, S. Ring-junction-substituted polyhydroxylated pyrrolizidines and indolizidines from ketonitrone cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *19*, 2178–2192. b) Martella, D.; D'Adamo, G.; Parmeggiani, C.; Cardona, F.; Moreno-Clavijo, E.; Robina, I.; Goti, A. Cycloadditions of sugar-derived-nitrones targeting polyhydroxylated indolizidines. *Eur. J. Org.*

aunque significativos.<sup>71</sup> En este sentido, en 2015, Fleet y cols. describieron la síntesis de las pirrolizidinas fluoradas **21** y **22** derivadas de la australina (**Figura 11**).<sup>72</sup>



**Figura 11.** Pirrolizidinas fluoradas derivadas de la australina.

El derivado monofluorado **21** además de ser un inhibidor más potente que la australina frente a  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger*, también presentó una inhibición moderada frente a la enzima trehalasa. Por otra parte, el derivado difluorado **22** mantuvo

---

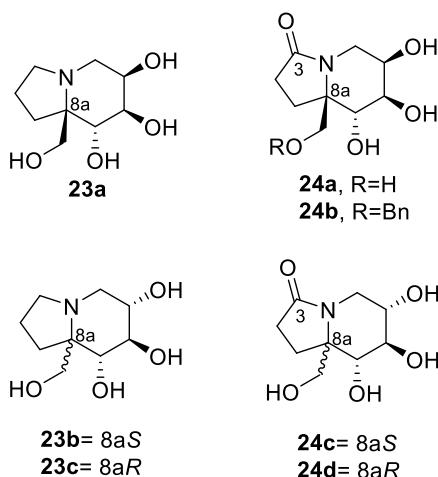
*Chem.* **2016**, *8*, 1588-1598. c) Lahiri, R.; Ansari, A. A.; Vankar, Y. D. Recent developments in design and synthesis of bicyclic azasugars, carbasugars and related molecules as glycosidase inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5102-5118. d) Rajender, A.; Rao, J. P.; Rao, B. V. A Divergent and stereoselective approach for the syntheses of some polyhydroxylated indolizidine and pyrrolizidine iminosugars. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1749-1757.

<sup>71</sup> a) Minehira, D.; Okada, T.; Iwaki, R.; Kato, A.; Adachi, I.; Toyooka, N. Enantiodivergent strategy for the synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidines and evaluation of their inhibitory activities against glycosidases. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 331-334. b) Xu, W.-Y.; Iwaki, R.; Jia, Y.-M.; Zhang, W.; Kato, A.; Yu, C.-Y. NHC-mediated cross-coupling of sugar-derived cyclic nitrones with enals: general and efficient synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidines and indolizidines. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4622-4639. c) Cheng, W.-C.; Guo, C.-W.; Lin, C.-K.; Jiang, Y.-R. Synthesis and inhibition study of bicyclic iminosugar-based alkaloids, scaffolds, and libraries towards glucosidase. *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 403-411.

<sup>72</sup> Li, Y.-X.; Shimada, Y.; Sato, K.; Kato, A.; Zhang, W.; Jia, Y.-M.; Fleet, G. W. J.; Xiao, M.; Yu, C.-Y. Synthesis and glycosidase inhibition of australine and its fluorinated derivatives. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 716-719.

una actividad inhibitoria similar frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger* y, adicionalmente, presentó inhibición frente a la amiloglucosidasa de la misma fuente. Es de destacar que los enantiómeros de **21** y de **22** no presentaron actividad inhibitoria frente a ninguna de las enzimas ensayadas.

Por otro lado, también resultan interesantes los resultados presentados en el mismo año por Dhavale y cols. sobre la síntesis y la evaluación biológica de varios análogos de castanospermina como inhibidores de glicosidasas (**Figura 12**).<sup>73</sup>



**Figura 12.** Indolizidinas e indolizidinonas derivadas de la castanospermina.

Los valores de  $IC_{50}$  y  $K_i$  tanto de las indolizidinas **23a-c** como de las indolizidinonas **24a-d**, están en el rango  $\mu$ M-nM frente a varias glicosidasas. En términos de potencia de inhibición, los mejores resultados se obtuvieron para las indolizidinonas **24c** ( $IC_{50}$ = 56 nM) y

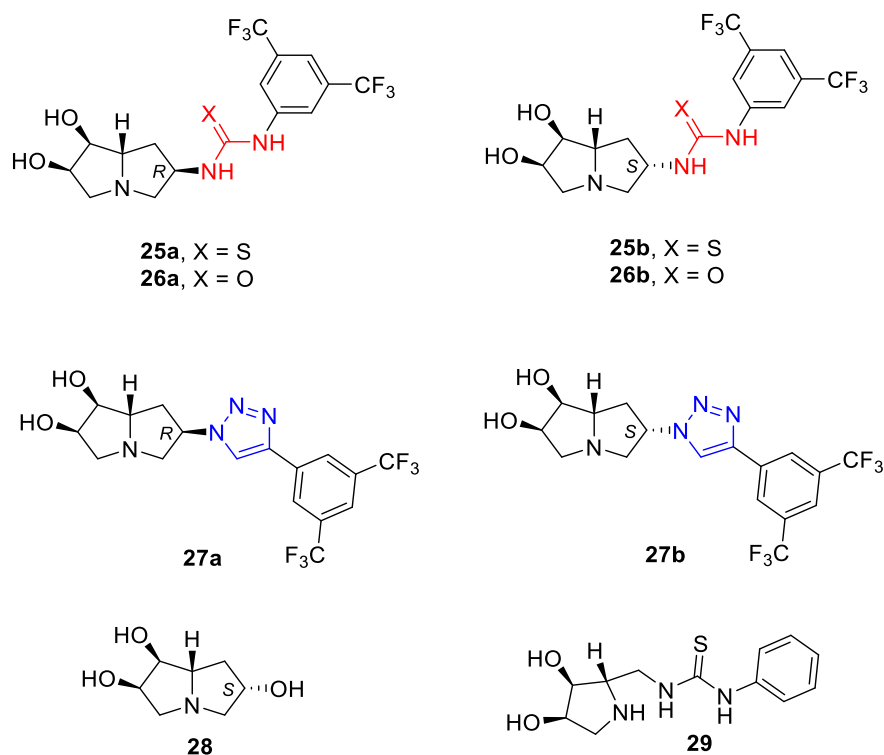
<sup>73</sup> Pawar, N. J.; Parihar, V. S.; Khan, A.; Joshi, R.; Dhavale, D. D. Quaternary indolizidine and indolizidinone iminosugars as potential immunostimulating and glycosidase inhibitory agents: synthesis, conformational analysis, biological activity, and molecular docking study. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7820–7832.

**24d** ( $IC_{50}$  = 75 nM) frente a la enzima  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack, sugiriendo que la presencia de un grupo carbonilo en C-3 es esencial para establecer las interacciones necesarias con el sitio activo de la enzima o en sitios alostéricos.

Como se ha comentado anteriormente, aunque la mayoría de derivados pirrolizidínicos presentan interesantes propiedades como inhibidores de glicosidasas, frecuentemente carecen de selectividad, lo que unido a un alto perfil de hidroxilación, dificulta su permeabilidad a través de las membranas biológicas, limitando su uso como fármacos. En este sentido, en nuestro grupo de investigación nos propusimos la síntesis de derivados pirrolizidínicos dihidroxilados que incorporaran un resto aromático a través de una unión de tipo urea, tiourea o triazol (compuestos **25 -27**, **Figura 13**).<sup>74</sup>

---

<sup>74</sup> Elías-Rodríguez, P.; Pingitore, V.; Carmona, A.T.; Moreno-Vargas, A.J.; Ide, D.; Miyawaki, S.; Kato, A.; Álvarez, E.; Robina, I. Discovery of a potent  $\alpha$ -galactosidase inhibitor by *in situ* analysis of a library of pyrrolizidine-(thio)urea hybrid molecules generated via click chemistry. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8863–8873.



**Figura 13.** Pirolozidin-(tio)urea/triazol aromáticas sintetizadas en el grupo de investigación.

En este análisis preliminar se analizó la influencia sobre los valores de inhibición enzimática tanto de la tipología de espaciador (urea, tiourea y triazol) como de la configuración en C-6 del núcleo pirolozidínico. La tiourea **25b** demostró ser potente y selectiva frente a  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café ( $IC_{50} = 3.1 \mu M$ ) siendo sólo débilmente activa frente a  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack ( $JB\alpha$ -man) ( $IC_{50} = 38 \mu M$ ) mientras que el análogo de tipo urea **26b** fue igualmente activo frente a la misma  $\alpha$ -galactosidasa vegetal ( $IC_{50} = 9.2 \mu M$ ) no mostrando prácticamente actividad frente a  $JB\alpha$ -man. El derivado de tipo triazol **27a** resultó ser poco selectivo, mostrando una actividad inhibitora moderada frente a  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón de bovino ( $IC_{50} = 46 \mu M$ ) y a  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café ( $IC_{50}$

= 53  $\mu\text{M}$ ) y una capacidad inhibidora considerable sobre JB $\alpha$ -man ( $\text{IC}_{50}$  = 9.1  $\mu\text{M}$ ). El derivado epimérico **27b** demostró ser un inhibidor moderado pero más selectivo de  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café ( $\text{IC}_{50}$  = 57  $\mu\text{M}$ ). Las (tio)ureas **25a** y **26a** mostraron una actividad inhibidora muy escasa sobre las enzimas ensayadas, lo que evidenció el papel fundamental desempeñado por la configuración *S* en C-6 en el proceso de inhibición por parte de este tipo de compuestos. Además, la escasa actividad inhibidora del alcohol **28**, confirmó que la incorporación de un resto aromático a través de un espaciador de tipo urea o tiourea mejora considerablemente la inhibición enzimática de estos derivados pirrolizidínicos (**Figura 13**). Finalmente, mientras que la pirrolidín-tiourea **29** (**Figura 13**), previamente sintetizada y evaluada por nuestro grupo de investigación,<sup>75</sup> demostró sólo una débil actividad inhibidora frente a  $\beta$ -glucosidasa, su análogo bicíclico rígido **25b**, a pesar de la similitud estructural, resultó ser un potente inhibidor de  $\alpha$ -galactosidasa, lo que demuestra la importancia que la restricción conformacional puede tener en el perfil de selectividad de inhibición.

Los resultados de inhibición enzimática obtenidos para los derivados de tipo **25b** frente a la  $\alpha$ -galactosidasa vegetal resultan particularmente interesantes si se tiene en cuenta la homología que presenta esta enzima con la  $\alpha$ -galactosidasa A lisosomal humana, enzima implicada en una enfermedad de almacenamiento lisosomal (LSD) conocida como enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry es una disfunción congénita relacionada con el cromosoma X y debida a una mutación en el gen que codifica para la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A lisosomal, enzima que cataliza la hidrólisis de los residuos terminales de  $\alpha$ -galactopiranosas en glicolípidos y glicoproteínas. Mutaciones en el gen GLA frecuentemente originan enzimas con anomalías en su plegamiento lo que lleva a una degradación prematura de las mismas en el retículo endoplasmático y por consiguiente, a un depósito progresivo de

---

<sup>75</sup> Martínez-Bailén, M.; Carmona, A. T.; Moreno-Clavijo, E.; Robina, I.; Ide, D.; Kato, A.; Moreno-Vargas, A. J. Tuning of  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase inhibition by generation and *in situ* screening of a library of pyrrolidine-triazole hybrid molecules. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 532–542.

glicosfingolípidos neutros, principalmente globotriaosilceramida, en fluidos y tejidos de los lisosomas.<sup>76</sup> En los casos mas graves, los primeros síntomas aparecen en la infancia o en la adolescencia y consisten en insuficiencia renal, trastornos cardiopáticos y cerebrovasculares, entre otros.<sup>77</sup> En los casos menos graves los pacientes son asintomáticos hasta la edad adulta.

### **1.1.3. Iminoazúcares con estructura pirrolidínica como inhibidores de $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasas humanas.**

Las  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasas humanas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los residuos terminales de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina de glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos. Estas enzimas son esenciales para el metabolismo humano debido a su importante papel en la degradación de los gangliósidos, una clase fundamental de glicolípidos de membrana especialmente abundantes en los tejidos nerviosos.

Desde el punto de vista estructural, las  $\beta$ -hexosaminidasas lisosomales humanas son enzimas diméricas compuestas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , cuya secuencia primaria es idéntica en un 60%.<sup>78</sup> Los genes HEXA y HEXB codifican respectivamente la versión precursora de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  cuyo posterior procesamiento y ensamblaje en el retículo endoplasmático produce tres isoformas de la enzima final:  $\beta$ -hexosaminidasa A ( $\alpha\beta$ , HexA),  $\beta$ -hexosaminidasa B ( $\beta\beta$ , HexB) y  $\beta$ -hexosaminidasa S ( $\alpha\alpha$ , HexS), pertenecientes todas ellas

---

<sup>76</sup> Motabar, O. Sidransky, E.; Goldin, E.; Zheng, W. Fabry disease-current treatment and new drug development. *Curr. Chem. Genom.* **2010**, *4*, 50-56.

<sup>77</sup> Linhart, A.; Elliott, P.M. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart* **2007**, *93*, 528-535.

<sup>78</sup> a) Proia, R. L. Gene encoding the human beta-hexosaminidase beta chain: extensive homology of intron placement in the alpha- and beta-chain genes. *Proc. Natl Acad. Sci.* **1988**, *85*, 1883-1887. b) Korneluk, R. G.; Mahuran, D. J.; Neote, K.; Klavins, M. H.; O'Dowd, B. F.; Tropak, M. et al. Isolation of cDNA clones coding for the alpha-subunit of human beta-hexosaminidase. Extensive homology between the alpha- and beta-subunits and studies on Tay-Sachs disease. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8407-8413.

a la familia CAZY GH20.<sup>79</sup> Cabe destacar que la dimerización es un requisito previo indispensable para la formación de hexosaminidasas lisosomales catalíticamente activas.<sup>80</sup> Una vez plegadas y ensambladas correctamente, las enzimas se transfieren rápidamente al aparato de Golgi y de aquí a los lisosomas donde el procesamiento final produce las enzimas maduras.<sup>81</sup> Mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para las dos subunidades de las  $\beta$ -hexosaminidasas pueden causar enfermedades neurológicas muy severas que se dividen en dos categorías: 1) mutaciones en el gen HEXA, que originan defecto de las isoformas HexA y HexS y provocan la enfermedad de Tay-Sachs; 2) mutaciones en el gen HEXB conducen a una deficiencia de isoformas HexA y HexB y provocan la enfermedad de Sandhoff. Ambos trastornos genéticos pertenecen al grupo de las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD)<sup>82</sup> y se caracterizan por una excesiva acumulación del gangliósido GM2 en los lisosomas neuronales que conduce a neurodegeneración grave y, en muchos casos, letal.<sup>83</sup>

Se ha observado que inhibidores competitivos de estas enzimas pueden actuar como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de estas LSDs.<sup>84</sup> A concentraciones

---

<sup>79</sup> CAZY (Carbohydrate-Active enZymes Database) es una base de datos donde las glicosidasas están clasificadas en base a las relaciones estructura-mecanismo catalítico o en base a los sustratos catalizados.

<sup>80</sup> a) Sonderfeld-Fresko, S.; Proia, R. L. Synthesis and assembly of a catalytically active lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase B, in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 13463–13469. b) Proia, R. L.; d'Azzo, A.; Neufeld, E. F.; Association of alpha- and beta subunits during the biosynthesis of beta-hexosaminidase in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3350–3354.

<sup>81</sup> Gravel, A.; Kaback, M.; Proia, R. L.; Sandhoff, K.; Suzuki, K. The GM2 gangliosidosis. In the metabolic and molecular bases of inherited diseases, 8<sup>th</sup> ed., **2001**, *3*, pp. 3827–3877, McGraw-Hill, New York.

<sup>82</sup> Ver Introducción y objetivos generales, pág. 19.

<sup>83</sup> a) Mark, B. L.; Mahuran, D. J.; Cherney, M. M.; Zhao, D.; Knapp, S.; James, M. N. G. Crystal structure of human  $\beta$ -hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay–Sachs disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 1093–1109. b) Maier, T.; Strater, N.; Schuette, C. G.; Klingenstein, R.; Sandhoff, K.; Saenger, W. The X-ray crystal structure of human  $\beta$ -hexosaminidase B provides new insights into Sandhoff disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 669–681.

<sup>84</sup> Kato, A.; Nakagome, I.; Nakagawa, S.; Kinami, K.; Adachi, I.; Jenkinson, S. F.; Desire, J.; Bleriot, Y.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J.; Hirono, S. *In silico* analyses of essential interactions of iminosugars with the



subinhibitorias, estas moléculas son capaces de unirse a las enzimas defectuosas, y favorecer su plegamiento adecuado solucionando el déficit de actividad enzimática.

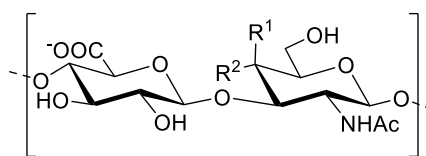
Por otro lado, la inhibición de estas enzimas también es relevante debido a la implicación de las mismas en trastornos articulares como la osteoartritis.<sup>85</sup> El cartílago articular de los pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide se caracteriza por una disminución de la concentración y del tamaño de proteoglicanos y glicosaminoglicanos (GAG), fuentes importantes de resistencia hidráulica de las cavidades sinoviales.<sup>86</sup> Los GAG son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos normalmente unidos a una proteína central para formar los proteoglicanos. Estructuralmente están representados por una unidad repetitiva de disacárido con la fórmula general (ácido urónico-aminoazúcar)<sub>n</sub> donde los aminoazúcares más habituales son la *N*-acetilglucosamina o la *N*-acetilgalactosamina. La unidad de aminoazúcar de los GAG puede estar sulfatada, como en el condroitín-sulfato, o no sulfatada como en el ácido hialurónico, uno de los GAG más conocido y abundante en el líquido sinovial (**Figura 14**).

---

Hex A active site and evaluation of their pharmacological chaperone effects for Tay-Sachs disease. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 9297-9304.

<sup>85</sup> a) Shikhman, A. R.; Brinson, D. C.; Lotz, M. Profile of glycosaminoglycan-degrading glycosidases and glycoside sulfatases secreted by human articular chondrocytes in homeostasis and inflammation. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 1307-1314. b) Lawrence, R. C.; Helmick, C. G.; Arnett, F. C.; Deo, R. A.; Felson, D. T.; Giannini, E. H.; Heyse, S. P.; Hirsch, R.; Hochberg, M. C.; Hunder, G. G.; Liang, M. H.; Pillemer, S. R.; Steen, V. D.; Wolfe, F. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 778-799.

<sup>86</sup> a) Inerot, S.; Heinegard, D.; Audell, L.; Olsson, S.E. Articular cartilage proteoglycan in aging and osteoarthritis. *Biochem. J.* **1978**, *169*, 143-156. b) Mankin, H. J.; Lippiello, L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *J. Bone Joint Surg. (Am.)*. **1970**, *52*, 424-434.



Condroitín sulfato:  $R^1 = \text{OSO}_3^-$ ,  $R^2 = \text{H}$

Ácido hialurónico:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OH}$

**Figura 14.** Estructuras del condroitín-sulfato y del ácido hialurónico.

El proceso de degeneración de la matriz del cartílago es un proceso multifactorial, debido en parte a un catabolismo anormalmente elevado de los GAG. Shikhman y cols.<sup>87</sup> demostraron que, de las glicosidasas implicadas en la degradación de los GAG y liberadas por los condrocitos<sup>88</sup> al compartimento extracelular, las hexosaminidasas, eran las enzimas más abundantes, además de ser las glicosidasas predominantes en el fluido sinovial de los pacientes con osteoartritis. Las hexosaminidasas, como se ha comentado, son las enzimas responsables de la hidrólisis de los residuos terminales de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina de proteoglicanos. Es por ello, que el desarrollo de inhibidores de hexosaminidasas se presenta como una aproximación de interés para la prevención de la degradación del cartílago y el tratamiento de la osteoartritis.<sup>89</sup>

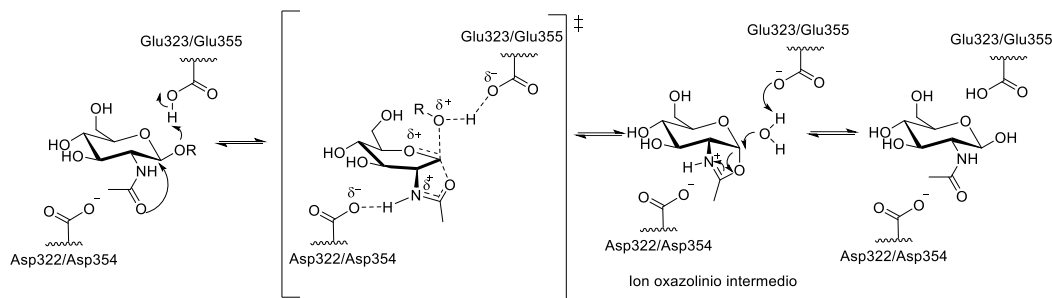
El mecanismo para la hidrólisis de *O*-glicósidos catalizado por las hexosaminidasas de la familia GH20 es el conocido como mecanismo de retención, en el que se puede apreciar la participación del grupo acetamido en C-2 del sustrato natural (**Esquema 6**).<sup>90</sup>

<sup>87</sup> Shikhman, A. R.; Brinson, D. C.; Lotz, M. Profile of glycosaminoglycan-degrading glycosidases and glycoside sulfatases secreted by human articular chondrocytes in homeostasis and inflammation. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 1307-1314

<sup>88</sup> Células del cartílago esenciales para la producción de colágeno y proteoglicanos, así como para el mantenimiento de la matriz cartilaginosa.

<sup>89</sup> Liu, J.; Shikhman, A. R.; Lotz, M. K.; Wong, C. H. Hexosaminidase inhibitors as new drug candidates for the therapy of osteoarthritis. *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 701-711.

<sup>90</sup> a) Lai, E. C. K.; Withers, S. G.; Stereochemistry and kinetics of the hydration of 2-acetamido-D-glucal by beta-*N*-acetylhexosaminidasas. *Biochemistry* **1994**, *33*, 14743–14749. b) Slámová, K.; Bojarová, P.;



**Esquema 6.** Mecanismo de retención correspondiente al proceso catalítico de la enzimas GH20.

El sustrato natural interactúa por un lado con el residuo de Glu355 de HexB (Glu323 en HexA), que actúa como residuo ácido-base, y por otro con el de Asp354 (Asp322 en HexA), que ayuda a orientar al grupo acetamido en C-2 para que ataque como nucleófilo. La evolución del estado de transición resulta en la formación de un ion oxazolinio intermedio cuya carga positiva resulta estabilizada por el residuo de Asp354.<sup>91</sup> Un mecanismo similar es el utilizado por la enzima *N*-acetilglucosaminidasa humana (OGA, GH84) presente en el citosol y responsable de la hidrólisis de residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) de glicoproteínas citoplasmáticas. La enzima OGA está implicada en una gran variedad de

Petrásková, L.; Křen, V.  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase: what's in a name...? *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 682–693.

<sup>91</sup> a) Mark, B. L.; Mahuran, D. J.; Cherney, M. M.; Zhao, D.; Knapp, S.; James, M. N. G. Crystal structure of human  $\beta$ -hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay–Sachs disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 1093–1109. b) Maier, T.; Strater, N.; Schuette, C. G.; Klingenstein, R.; Sandhoff, K.; Saenger, W. The X-ray crystal structure of human  $\beta$ -hexosaminidase B provides new insights into Sandhoff Disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 669–681. c) Rye, C. S.; Withers, S. G. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573–580. d) Sinnott, M. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171–1202. e) Vocadlo, D. J.; Davies, G. J.; Laine, R.; Withers, S. G. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **2001**, *412*, 835–838. f) Knapp, S.; Vocadlo, D. J.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G. NAG-thiazoline, an *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804–6805.

procesos celulares entre los que se encuentran el cáncer<sup>92</sup> y enfermedades neurodegenerativas.<sup>93</sup>

Aunque las hexosaminidasas lisosomales (HexA y HexB) y la OGA pertenecen a diferentes familias CAZy y se localizan en diferentes compartimentos celulares, todas ellas son responsables de la hidrólisis de residuos de GlcNAc, por lo que los inhibidores de HexA/B frecuentemente inhiben también a la OGA. A pesar de que estas enzimas presentan una alta homología del sitio activo, se observan ligeras diferencias, lo que podría permitir la identificación de inhibidores selectivos.<sup>94</sup>

Dentro de la diversidad de inhibidores de hexosaminidasas descritos en la bibliografía<sup>95</sup> centraremos nuestra atención en los iminoazúcares. Así, los iminoazúcares

---

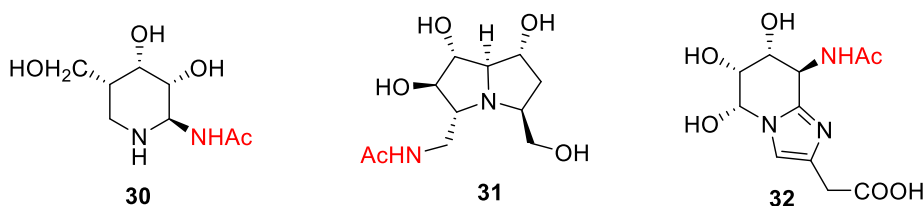
<sup>92</sup> Ferrer, C. M.; Lynch, T. P.; Sodi, V. L.; Falcone, J. N.; Schwab, L. P.; Peacock, D. L.; Vocadlo, D. J.; Seagroves, T. N.; Reginato, M. J. *O*-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol. Cell* **2014**, *54*, 820–831.

<sup>93</sup> a) Yuzwa, S. A.; Shan, X.; Macauley, M. S.; Clark, T.; Skorobogatko, Y.; Vosseller, K.; Vocadlo, D. J. Increasing *O*-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 393–399. b) Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J. *O*-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6839–6858.

<sup>94</sup> a) Cekic, N.; Heinonen, J. E.; Stubbs, K. A.; Roth, C.; He, Y.; Bennet, A. J.; McEachern, E. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J. Analysis of transition state mimicry by tight binding aminothiazoline inhibitors provides insight into catalysis by human *O*-GlcNAcase. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3742–3750. b) Ho, C.-W.; Popa, S. D.; Liu, T.-W.; Tsai, K.-C.; Ho, M.-J.; Chen, W.-H.; Yang, A.-S.; Lin, C.-H. Development of GlcNAc-inspired iminocyclitols as potent and selective *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 489–497.

<sup>95</sup> Liu, T.; Duan, Y.; Yang, Q. Revisiting glycoside hydrolase family 20  $\beta$ -*N*-acetyl-D-hexosaminidases: Crystal structures, physiological substrates and specific inhibitors. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1127–1138.

naturales siastatina B **30**,<sup>96</sup> pochonicina **31**<sup>97</sup> y nagstatina **32**,<sup>98</sup> (**Figura 15**) aislados de diversos cultivos bacterianos, son inhibidores de  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasas en el rango nanomolar.



**Figura 15.** Estructuras de siastatina B (**30**), pochonicina (**31**) y nagstatina (**32**).

En relación a los iminoazúcares sintéticos inhibidores de hexosaminidasas, tras la síntesis de la 2-acetamido-1,2-didesoxijirimicina (DNJNAc, **33**),<sup>99</sup> se han descrito una gran variedad de iminoazúcares de cuatro (azetidinas),<sup>100</sup> cinco (pirrolidinas),<sup>101</sup> seis

<sup>96</sup> Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Komiyama, T.; Morishima, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T. Purification and characterization of a sialidase inhibitor, siastatin, produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **1974**, *27*, 963–967.

<sup>97</sup> Usuki, H.; Toyo-oka, M.; Kanzaki, H.; Okuda, T.; Nitoda, T. Pochonidine, a polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloid from fungus *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA 87 as a potent  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7248–7253.

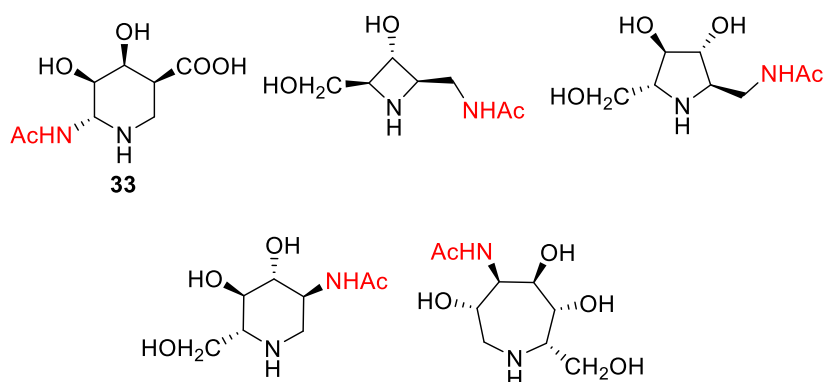
<sup>98</sup> Aoyama, T.; Naganawa, H.; Suda, H.; Uotani, K.; Aoyagi, T.; Takeuchi, T. The structure of nagstatin, a new inhibitor of *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1557–1558.

<sup>99</sup> Fleet, G. W. J.; Smith, P. W.; Nash, R. J.; Fellows, L. E.; Parekh, R. B.; Rademacher, T. W. Synthesis of 2-acetamido-1,5-imino-1,2,5-trideoxy-D-mannitol and of 2-acetamido-1,5-imino-1,2,5-trideoxy-D-glucitol, a potent and specific inhibitor of a number of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidasas. *Chem. Lett.* **1987**, *15*, 1051–1054.

<sup>100</sup> Ayers, B. J.; Glawar, A. F. G.; Martínez, R. F.; Ngo, N.; Liu, Z.; Fleet, G. W. J.; Butters, T. D.; Nash, R. J.; Yu, C.-Y.; Wormald, M. R.; Nakagawa, S.; Adachi, I.; Kato, A.; Jenkinson, S. F. Nine of 16 stereoisomeric polyhydroxylated proline amides are potent  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase inhibitors. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3398–3409.

<sup>101</sup> a) Tsou, E.-L.; Yeh, Y.-T.; Liang, P.-H.; Cheng, W.-C. A convenient approach toward the synthesis of enantiopure isomers of DMDP and ADMDP. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 93–100; b) Crabtree, E. V.; Martínez, R. F.; Nakagawa, S.; Adachi, I.; Butters, T. D.; Kato, A.; Fleet, G. W. J.; Glawar, A. F. G. Synthesis of the enantiomers of XYLNAc and LYXNAc: comparison of  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase inhibition by the 8

(piperidinas)<sup>102</sup> y siete (azepanos)<sup>103</sup> miembros, que incorporan un grupo acetamido en su estructura (**Figura 16**).



**Figura 16.** Estructuras de iminoazúcares sintéticos inhibidores de  $\beta$ -hexosaminidasas.

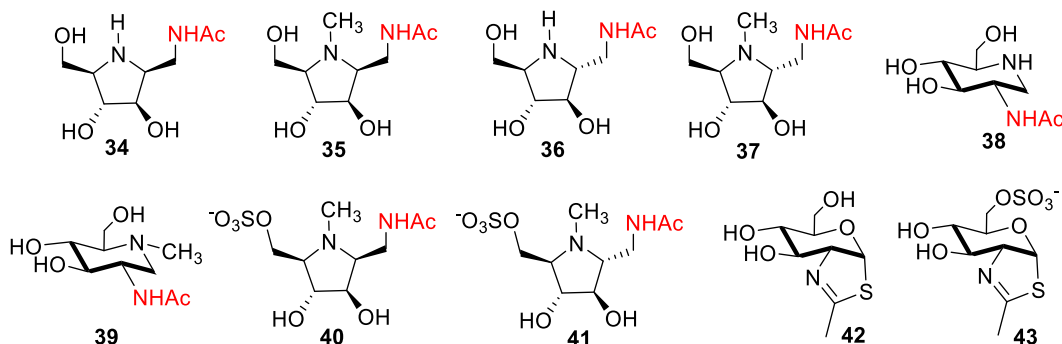
En el año 2001, Wong y cols. analizaron la inhibición de hexosaminidasas de los iminoazúcares **34-41** y las tiazolinas **42** y **43**, demostrando que el compuesto **37** era capaz de aumentar la concentración de GAG en cultivos de condrocitos y tejido cartilaginoso (**Figura 17**).<sup>104</sup>

stereoisomers of 2-*N*-acetyl-amino-1,2,4-trideoxy-1,4-iminopentitols. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 3932–3943

<sup>102</sup> Glawar, A. F. G.; Best, D.; Ayers, B.; Miyauchi, S.; Nakagawa, S.; Aguilar-Moncayo, M.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Crabtree, E. V.; Butters, T. D.; Wilson, F. X.; Kato, A.; Fleet, G. W. J. Scalable syntheses of both enantiomers of DNJNAC and DGJNAC from glucuronolactone: the effect of *N*-alkylation on hexosaminidase inhibition. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18*, 9341–9359.

<sup>103</sup> Li, H.; Marcelo, F.; Bello, C.; Vogel, P.; Butters, T. D.; Rauter, A. P.; Zhang, Y.; Sollogoub, M.; Blériot, Y. Design and synthesis of acetamido tri- and tetra-hydroxyazepanes: Potent and selective  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5598–5604.

<sup>104</sup> Liu, J.; Shikhman, A. R.; Lotz, M. K.; Wong, C. H. Hexosaminidase inhibitors as new drug candidates for the therapy of osteoarthritis. *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 701-711.



**Figura 17.** Inhibidores de  $\beta$ -hexosaminidasa descritos por Wong y cols.

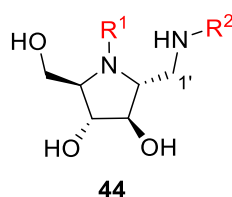
Todos los compuestos incorporan el grupo acetamido característico de los sustratos naturales de la enzima excepto las tiazolinas (neutra **42** y sulfatada **43**) que representan un mimético estructural del ion oxazolinio intermedio desarrollado durante el proceso catalítico de hidrólisis enzimática.<sup>105</sup> Todos los compuestos de la **Figura 17** demostraron ser inhibidores competitivos de las  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasas de placenta humana. En general, las pirrolidinas no sulfatadas demostraron ser mejores inhibidores, siendo el compuesto **37** ( $K_i = 24$  nM) el que más destacó por potencia de inhibición. Los autores destacaron que la potente actividad inhibidora de **37** podría atribuirse a la mayor flexibilidad y semejanza del anillo de cinco miembros con el ion oxazolinio intermedio de la hidrólisis enzimática respecto a los sistemas de seis eslabones.<sup>106</sup> Finalmente, el tratamiento de cultivos de condrocitos articulares humanos con el inhibidor **37** resultaron en la acumulación de ácido hialurónico y glicosaminoglicanos sulfatados en las células. De manera similar, la incubación de tejido de

<sup>105</sup> a) Mark, B. L.; Vocadlo, D. J.; Knapp, S.; Triggs-Raine, B. L.; Withers, S. G.; James, M. N. G. Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10330–10337 b) Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G. NAG-thiazoline, an *N*-acetyl-L-hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804–6805.

<sup>106</sup> Takebayashi, M.; Hitaruma, S.; Kanie, Y.; Kajimoto, T.; Kanie, O.; Wong, C. H.; A versatile synthetic strategy for the preparation and discovery of new iminocyclitols as inhibitors of glycosidases. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5280–5291.

cartílago humano con **37** resultó en una acumulación de glicosaminoglicanos en el compartimento pericelular. Estos datos confirman el papel fundamental desempeñado por las  $\beta$ -hexosaminidasas en la degradación de la matriz del cartílago y convierten las estructuras de este tipo en posibles fármacos para el tratamiento de la osteoartritis.

Como extensión de este estudio, estos autores publicaron en 2004 la síntesis de tres librerías químicas de derivados pirrolidínicos con objeto de estudiar la relación entre la inhibición de las  $\beta$ -hexosaminidasas y la presencia de sustituyentes estructuralmente diferentes en el nitrógeno endocíclico ( $R^1$ ) y en el nitrógeno en posición C-1' ( $R^2$ ) del núcleo de pirrolidina **44** (*Figura 18*).<sup>107</sup>



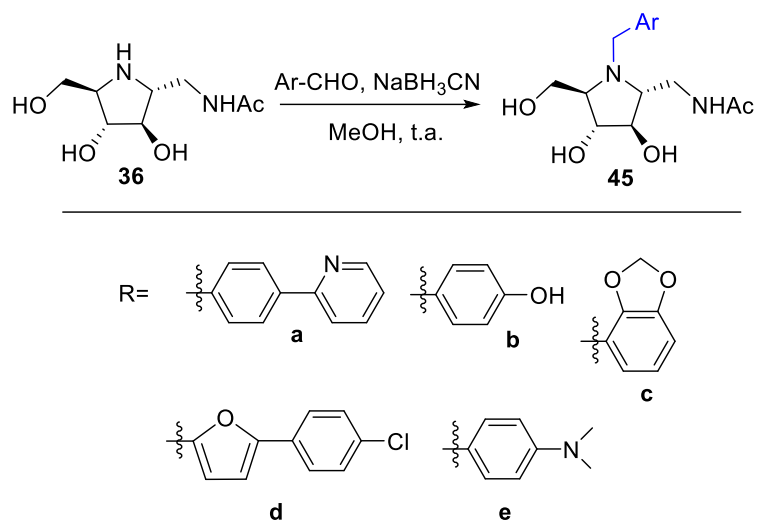
*Figura 18*

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de una familia de derivados donde las modificaciones estructurales en el nitrógeno endocíclico ( $R^1$ ) se introdujeron mediante reacción de aminación reductiva de **36** con un conjunto de aldehídos aromáticos (*Esquema 7*).

---

<sup>107</sup> Liu, J.; Numa, M. M. D.; Liu, H.; Huang, S. G.; Sears, P.; Shikhman, A. R.; Wong, C. H.; Synthesis and high-throughput screening of *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase inhibitor libraries targeting osteoarthritis. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6273-6283.

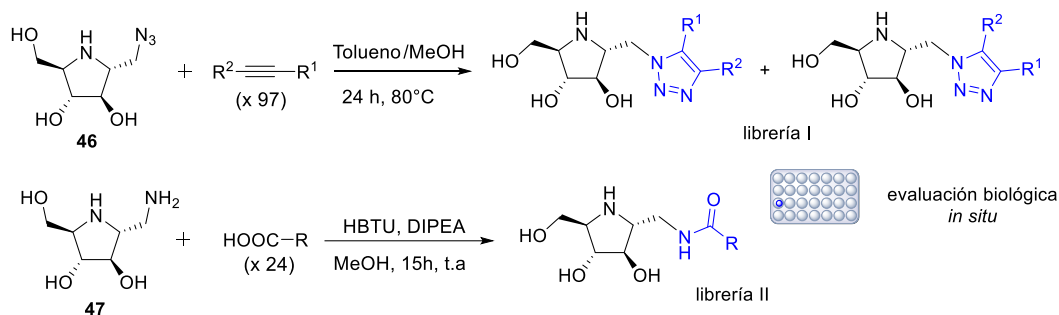




**Esquema 7.** Librería química obtenida por Wong y cols. por aminación reductiva entre **36** y un conjunto de aldehídos aromáticos.

Todos los compuestos resultaron ser peores inhibidores que **37** (**Figura 17**) con valores de  $IC_{50}$  en el rango micromolar bajo, indicando en este caso que la introducción de un resto aromático próximo al nitrógeno endocíclico disminuye la capacidad inhibidora. El mejor inhibidor de esta primera librería química fue **45b**, sugiriendo que la presencia de un grupo hidrofílico en esta posición podría mejorar la actividad inhibidora.

Las siguientes librerías químicas se prepararon mediante reacción de cicloadición de Huisgen entre la azida **46** con una batería de 97 alquinos, y por reacción de amidación entre la amina **47** y una colección de 24 ácidos carboxílicos. Tanto los alquinos como los ácidos carboxílicos se utilizaron en sus variantes alifáticas y aromáticas. Cabe destacar que en la reacción de formación de los pirrolidín-triazoles es necesario calentar a 80 °C, ya que transcurre sin catálisis de Cu(I), lo que conduce a una mezcla de los triazoles regioisoméricos 1,4- y 1,5-disustituidos (**Esquema 8**).

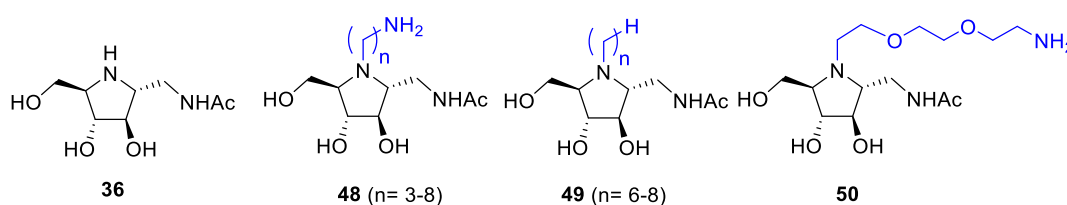


**Esquema 8.** Segunda y tercera librería química obtenida por Wong y cols. mediante síntesis en paralelo seguido de evaluación biológica *in situ*.

Los pirrolidín-triazoles y las pirrolidín-amidas obtenidas se evaluaron *in situ* frente a  $\beta$ -hexosaminidasa de placenta humana. Aunque ninguno de los nuevos inhibidores fue tan potente como el compuesto **37** (**Figura 17**), los autores concluyeron que la metodología basada en la preparación de una librería química seguida de evaluación biológica *in situ* era una estrategia adecuada para explorar rápidamente la diversidad estructural del derivado **36** de cara a la búsqueda de nuevos y potentes inhibidores pirrolidínicos de  $\beta$ -hexosaminidasas. De este estudio se deduce que la modificación del grupo acetamido en C-1' por otros grupos acilamidos, tanto aromáticos como alifáticos, disminuye la capacidad inhibidora de estos compuestos, mostrando la relevancia de tener un grupo acetamido en esta posición para mimetizar al sustrato natural. En este sentido, otros intentos de modificar la posición del grupo acetamido en el anillo de pirrolidina resultaron en una disminución o incluso en la eliminación de la capacidad inhibidora frente a  $\beta$ -hexosaminidasas.<sup>108</sup>

<sup>108</sup> a) Rountree, J. S. S.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Fleet, G. W. J. Enantiomeric 2-acetamido-1,4-dideoxy-1,4-iminoribitols as potential pyrrolidine hexosaminidase inhibitors. *C. R. Chimie*, **2011**, *14*, 126–133. b) Rountree, J. S. S.; Butters, T. D.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Asano, N.; Ikeda, K.; Evinson, E. L.; Nashd, R. J.; Fleet, G. W. J. Efficient synthesis from D-lyxonolactone of 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-L-arabinitol LABNAC, a potent pyrrolidine inhibitor of hexosaminidasas. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4287–429.

En 2006 Wong y cols. consiguieron finalmente mejorar las propiedades inhibitoras de **37** gracias a la inserción de un motivo de interacción adicional con la enzima en una posición distante del anillo pirrolidínico.<sup>109</sup> De esta forma, se prepararon los derivados **48-50** (**Figura 19**) por reacción de aminación reductiva de **36** con un conjunto de aldehídos alifáticos de diferente estructura y longitud.



**Figura 19.** Inhibidores de  $\beta$ -hexosaminidasa de placenta humana obtenidos por Wong. y cols. en 2006.

Los resultados de la evaluación biológica frente a  $\beta$ -hexosaminidasa de placenta humana mostraron una clara relación entre la inhibición enzimática y la longitud de la cadena alquílica ya que, aunque todas las estructuras de tipo **48** demostraron ser muy buenos inhibidores ( $K_i$  en el rango nanomolar bajo), los mejores resultados se obtuvieron para las pirrolidinas con una cadena alquílica en el N endocíclico entre 6 y 8 átomos de carbono. Por otro lado, la introducción de una cadena de etilenglicol (**50**) y de las cadenas alquílicas sin grupo amino terminal (**49**) tuvieron un efecto negativo en las propiedades inhibitoras. El modelo teórico del complejo entre **48** (n=7) y la estructura cristalina de la  $\beta$ -hexosaminidasa B reveló la presencia de una estrecha hendidura hidrofóbica en el sitio activo de la enzima en la que la cadena alquílica del inhibidor era lo suficientemente larga como para acomodarse. Esta disposición permitiría acercar el grupo amino terminal del inhibidor a aminoácidos específicos de un sitio alostérico secundario de la enzima donde se

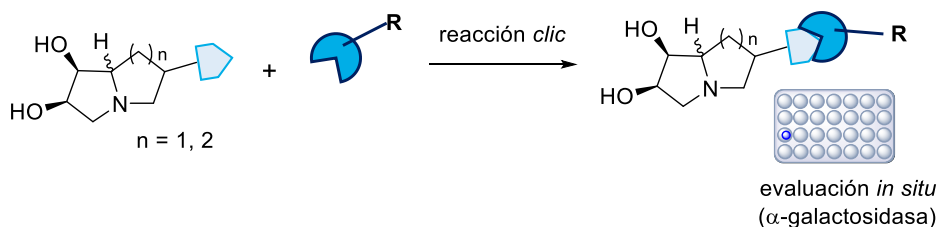
<sup>109</sup> Liang, P. H.; Cheng, W. C.; Lee, Y. L.; Yu, H. P.; Wu, Y. T.; Lin, Y. L.; Wong, C. H. Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors: new structures for antivirals and osteoarthritis. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 165-173.

establecerían interacciones de enlace de hidrógeno o interacciones iónicas (en caso de protonación del grupo amino). Finalmente, según este modelo teórico, el anillo de pirrolidina se acomodaría directamente en el sitio activo de la enzima gracias a interacciones específicas entre varios residuos de aminoácidos y los grupos hidroxilo, así como el grupo acetamido.

## 1.2. OBJETIVOS

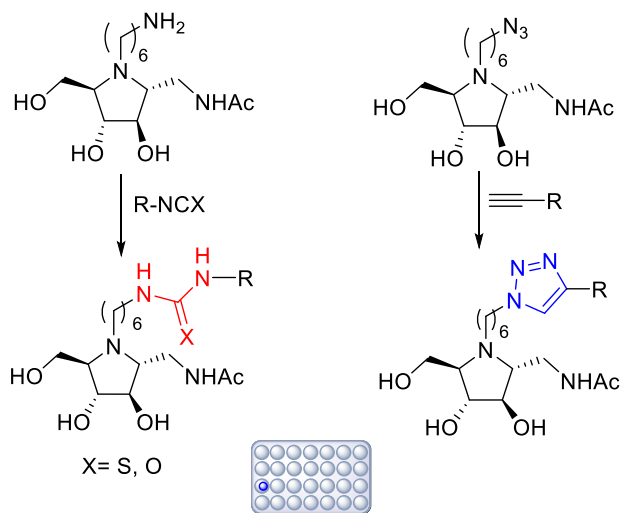
El trabajo que se desarrolla en este capítulo está relacionado con la búsqueda de inhibidores monoméricos de glicosidasas y tiene dos objetivos principales:

- Tras los resultados prometedores previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación en relación a los inhibidores de  $\alpha$ -galactosidasa **25b** y **26b** derivados de pirrolizidina (**Figura 13**, pág. 49), nos propusimos extender nuestros estudios a estructuras indolizídnicas. En este sentido, se plantea la síntesis de nuevos derivados de indolizidinas dihidroxiladas que incorporan un resto aromático unido al anillo del iminoazúcar mediante un enlace de tipo urea o tiourea seguido de evaluación biológica de sus propiedades como inhibidores de glicosidasas. El objetivo de este estudio preliminar será comparar la actividad inhibidora de los nuevos derivados indolizídnicos con los pirrolizídnicos, así como establecer relaciones entre la actividad inhibidora y la distinta configuración de los centros estereogénicos (si la hubiere). Una vez se realice este estudio preliminar, se elegirá el modelo más activo biológicamente, entre las pirrolizidinas y las indolizidinas, para posteriormente preparar una librería química de derivados mediante la metodología de síntesis en paralelo mediante reacciones de tipo clic seguido de evaluación biológica *in situ* (**Esquema 9**).



**Esquema 9.** Esquema general para la preparación de una librería química de nuevos inhibidores de  $\alpha$ -galactosidasa.

- La síntesis y el estudio preliminar de análogos de las estructuras de tipo **48** (**Figura 19**) nos permitirán elegir un compuesto modelo para la preparación de una quimioteca de nuevos inhibidores monovalentes de  $\beta$ -hexosaminidasa humana. Para la generación de dicha quimioteca se utilizarán dos reacciones de tipo clic: 1) la CuAAC entre un derivado de azidoalquil pirrolidina y una batería de alquinos terminales; 2) la reacción entre una aminoalquil pirrolidina y una colección de iso(tio)cianatos (**Esquema 10**).



Evaluación biológica *in situ* (HexB y OGA)

**Esquema 10.** Esquema general para para la preparación de quimiotecas de nuevos inhibidores de hexosaminidasas humanas.

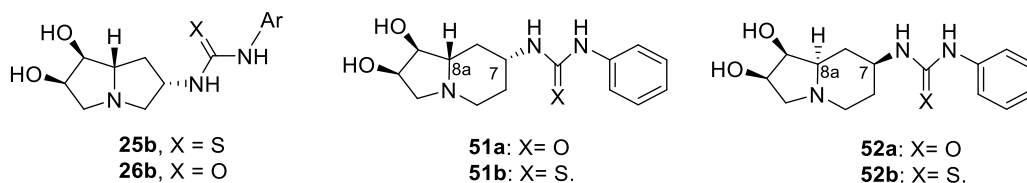
Esta estrategia de síntesis seguido de evaluación biológica *in situ* permitirá identificar de manera rápida los mejores inhibidores enzimáticos, que se prepararán a mayor escala para llevar a cabo un estudio completo de sus propiedades como inhibidores de glicosidasas.

### 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1.3.1. Síntesis y evaluación *in situ* de pirrolizidín/indolizidín(tio)ureas como inhibidores monovalentes de $\alpha$ -galactosidasas.

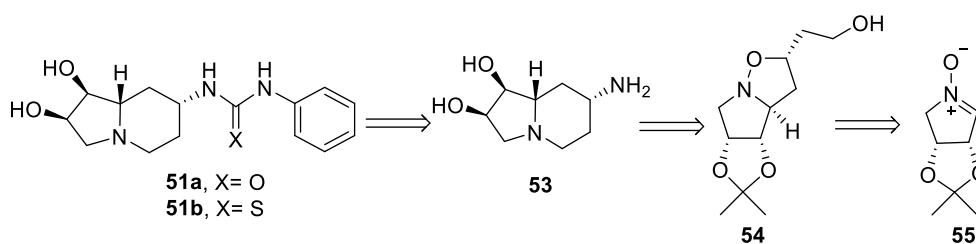
*Estudio preliminar. Síntesis y elección de los cabezas de serie.*

En este apartado se expone la síntesis de las indolizidinas dihidroxiladas **51a-b** y **52a-b** seguido de evaluación de sus propiedades como inhibidores de glicosidasas. Este estudio preliminar nos permitirá comparar la actividad inhibidora de las nuevas estructuras indolizidínicas con los valores de inhibición de las pirrolidizinas análogas **25b** y **26b** y, consecuentemente, elegir el mejor modelo para preparar una librería química de nuevos inhibidores de  $\alpha$ -galactosidasas. En este estudio preliminar también se estudiará la influencia de la configuración de C-7 y C-8a, y el tipo de funcionalidad (urea o tiourea) para conectar el esqueleto bicíclico con el resto aromático, en la actividad inhibidora (**Figura 20**). Como se ha comentado en el apartado de antecedentes, nos centraremos en la incorporación de restos aromáticos en la estructura del iminoazúcar, debido a los numerosos antecedentes de incremento en la actividad inhibidora que proporcionan este tipo de motivos estructurales.



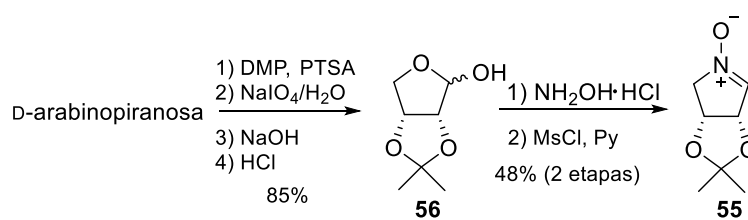
**Figura 20.** Indolizidín-(tio)ureas sintetizadas para el estudio preliminar de inhibición enzimática (**51a**, **51b**, **52a**, **52b**) y pirrolizidinas **25b** y **26b** previamente preparadas en el grupo de investigación.

La retrosíntesis de **51a** y **51b** se describe en el **Esquema 11**.



**Esquema 11**

La nitrona **55**<sup>110</sup> se sintetizó a partir de 2,3-*O*-isopropilidén-D-eritrosa (**56**),<sup>111</sup> la cual se puede preparar fácilmente a partir de D-arabinosa (**Esquema 12**).



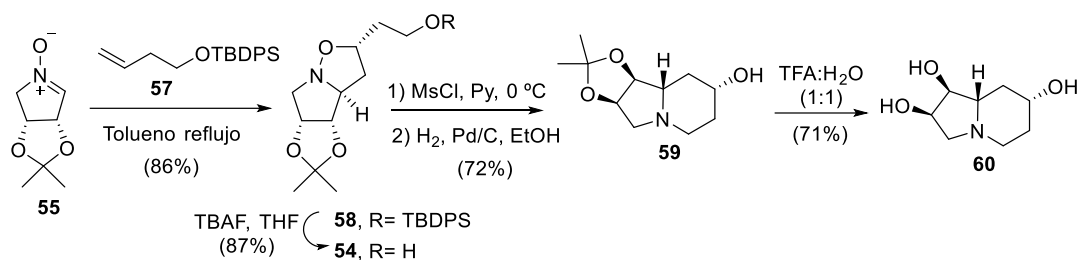
**Esquema 12**

<sup>110</sup> Cicchi, S.; Marradi, M.; Vogel, P.; Goti, A. One-pot synthesis of cyclic nitrones and their conversion to pyrrolizidines: 7a-*epi*-crotanecine inhibits  $\alpha$ -mannosidases. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1614-1619.

<sup>111</sup> Thompson, D. K.; Hubert, C. N.; Wightman, R. H. Hydroxylated pyrrolidines. Synthesis of 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-lyxitol, 1,4,5-trideoxy-1,4-imino-D- and L-lyxo-hexitol, 2,3,6-trideoxy-3,6-imino-D-glycero-L-altro- and D-glycero-L-galacto-octitols, and of a chiral potential precursor of carbapenem systems. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3827-3840.



La reacción de cicloadición 1,3-dipolar de la nitrona **55** con el alqueno **57**<sup>112</sup> siguiendo el procedimiento descrito por Wightman y cols.,<sup>113</sup> originó el cicloaducto **58** como único diastereoisómero con un rendimiento del 86%. La desprotección del silil éter **58** con TBAF/THF originó el alcohol **54** con un rendimiento del 87%. El posterior tratamiento con cloruro de mesilo seguido de reacción de hidrogenólisis permitió obtener la indolizidina **59** (rto. 72%, dos etapas). La eliminación del grupo isopropilideno mediante hidrólisis ácida y la posterior purificación por resina Dowex 50WX8 condujo al indolizidín-alcohol **60**, descrito previamente como clorhidrato por Wightman y cols. (**Esquema 13**).<sup>114</sup>



**Esquema 13**

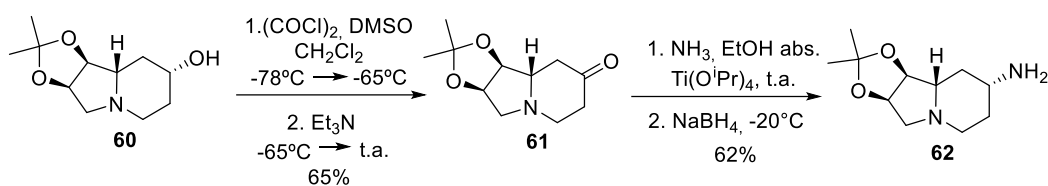
Posteriormente, la reacción de oxidación de Swern del alcohol **60** originó la cetona **61**, que tras reacción de aminación reductiva con amoníaco en presencia de Ti(O<sup>*i*</sup>Pr)<sub>4</sub> condujo a una mezcla de indolizidín-aminas epiméricas en proporción 5:1, que pudieron separarse por columna de cromatografía en gel de sílice para originar el derivado mayoritario **62** con

<sup>112</sup> Waser, J.; Gaspar, B.; Nambu, H.; Carreira, E. M. Hydrazines and azides via the metal-catalyzed hydrohydrazination and hydroazidation of olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11693-11712.

<sup>113</sup> McCaig, A. E.; Meldrum, K. P.; Wightman, R. H. Synthesis of trihydroxylated pyrrolidines and indolizidines using cycloaddition reactions of functionalized cyclic nitrones, and the synthesis of (+)- and (-)-lentiginosine. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9429-9446.

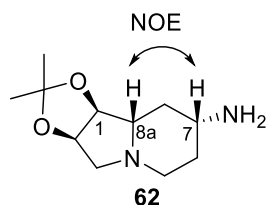
<sup>114</sup> Thompson, D. K.; Hubert, C. N.; Wightman, R. H. Hydroxylated pyrrolidines. Synthesis of 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-lyxitol, 1,4,5-trideoxy-1,4-imino-D- and L-lyxo-hexitol, 2,3,6-trideoxy-3,6-imino-D-glycero-L-altro- and D-glycero-L-galacto-octitols, and of a chiral potential precursor of carbapenem systems. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3827-3840.

un 62% de rendimiento. Con el objetivo de mejorar la diastereoselectividad de la reacción se llevaron a cabo ensayos de reducción a más baja temperatura, manteniéndose en todos los casos la proporción de diastereoisómeros previamente observada (**Esquema 14**).



**Esquema 14**

Las configuraciones de C-7 y C-8a de la amina mayoritaria **62** han sido confirmadas mediante espectroscopía de RMN (experimento TOCSY-NOESY SELECTIVE) confirmando la relación espacial existente entre H-7 y H-8a (**Figura 21**).

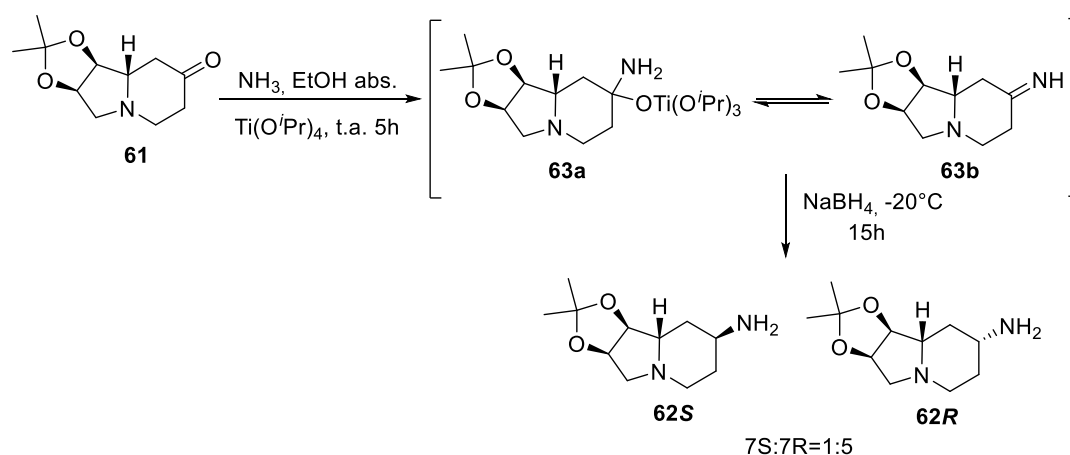


**Figura 21.** Estructura de **62** confirmada por TOCSY-NOESY SELECTIVE.

La reacción de aminación reductiva de la cetona **61** se realizó mediante el procedimiento desarrollado por Miriyala y cols.<sup>115</sup> y consiste en el tratamiento de **61** con  $\text{NH}_3$  en presencia de  $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ , seguida por reducción *in situ* con  $\text{NaBH}_4$ . Según el mecanismo propuesto por los autores, la reacción podría proceder a través de la reducción directa del

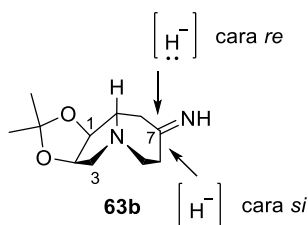
<sup>115</sup> Miriyala, B.; Bhattacharyya, S.; Williamson, J. S. Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of primary and symmetrical secondary amines. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1463-1471.

complejo de Ti (IV) (**63a**) o por reducción de la imina (**63b**) con la que el complejo se encuentra en equilibrio (**Esquema 15**).



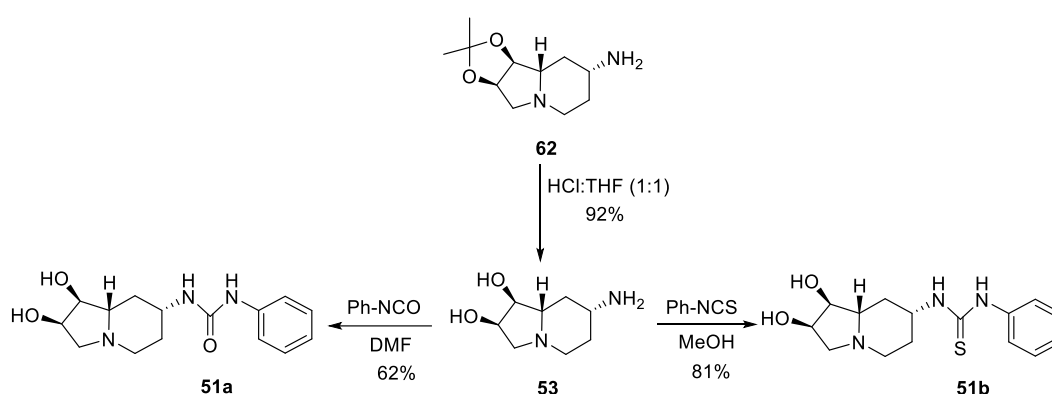
**Esquema 15.** Propuesta de mecanismo de la reacción de aminación reductiva de la cetona **61** según el procedimiento de Miriyala y cols.

En el caso en el que la reducción ocurriera a nivel de la imina intermedia, siendo ésta una estructura plana, el reductor atacaría preferentemente por la cara menos impedida estéricamente (en nuestro caso la cara *re*) obteniéndose mayoritariamente el diastereoisómero (*7R*)-**62** y minoritariamente el diastereoisómero (*7S*)-**62**, lo que podría justificar la proporción de diastereoisómeros obtenida (*7S*:*7R*=1:5) (**Figura 22**).



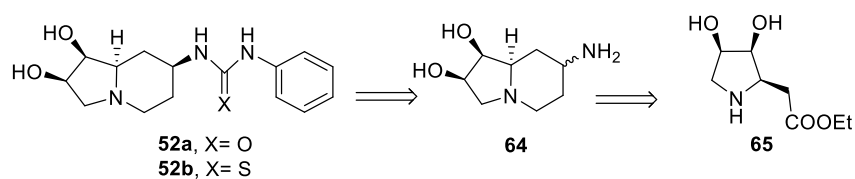
**Figura 22.** Ataque del agente reductor  $\text{NaBH}_4$  sobre la imina intermedia en la reacción de aminación reductiva.

Finalmente, tras la eliminación del grupo isopropilideno por hidrólisis ácida se obtuvo la indolizidín-amina **53**. Dicho compuesto se utilizó directamente para la reacción con fenilisocianato y feniltiocianato, originando respectivamente la indolizidín-urea **51a** y la indolizidín-tiourea **51b** con rendimientos de moderados a buenos (*Esquema 16*).



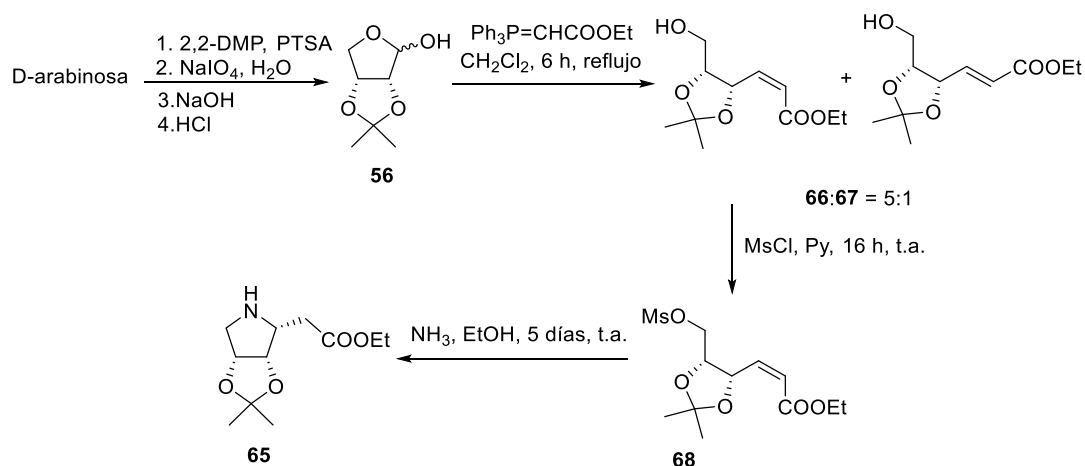
*Esquema 16.* Síntesis de las nuevas indolizidin-(tio)ureas **51a** y **51b**.

Por otro lado la estrategia retrosintética elegida para la preparación de las indolizidinas **52a** y **52b**, diastereoisómeras de **51a** y **51b**, se describe en el *Esquema 17*.



*Esquema 17*

La síntesis del derivado de pirrolidina **65** se llevó a cabo a partir de la D-arabinosa según una metodología desarrollada previamente.<sup>116</sup> Así, la reacción de la 2,3-O-isopropilidén-D-eritrosa **56** con etoxicarbonilmetiléntrifenilfosforano en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a reflujo origina la mezcla de alquenos **66** y **67** en una proporción **66:67** = 5:1. Posteriormente, la mesilación del grupo hidroxilo libre en **66** seguida de tratamiento con amoníaco en etanol, lleva a la correspondiente pirrolidina **65** a través de una adición conjugada al doble enlace y desplazamiento S<sub>N</sub>2 intramolecular del grupo mesilato (**Esquema 18**).



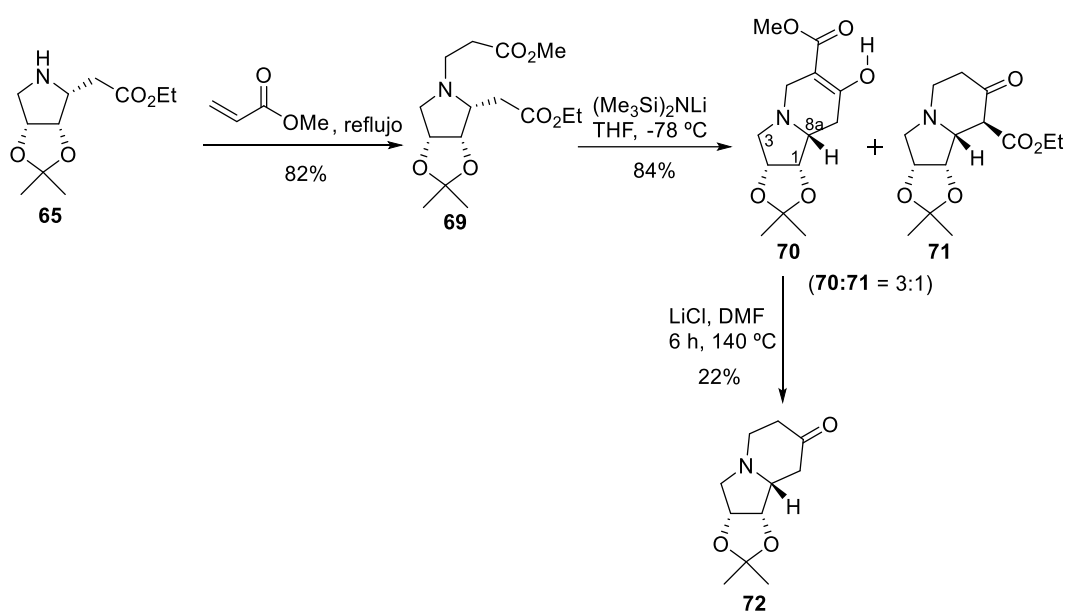
**Esquema 18**

La ruta sintética prosigue con la adición conjugada entre la pirrolidina **65** y el acrilato de metilo (**Esquema 19**) conduciendo a la formación de la *N*-alquil pirrolidina **69** que, posteriormente, se somete a una reacción de ciclación intramolecular *vía* condensación de Dieckmann en unas condiciones previamente optimizadas por el grupo de investigación.<sup>117</sup>

<sup>116</sup> a) Robina, I.; Gearing, R. P.; Buchanan, J. G.; Wightman, R. H. Diastereoselective conjugate addition of ammonia in the synthesis of chiral pyrrolidines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **1990**, 2622-2624.

<sup>117</sup> Trabajo Fin de Master "Preparación de nuevos catalizadores bifuncionales derivados de iminociclitos" (María Isabel Aguilar Téllez, Universidad de Sevilla 2012).

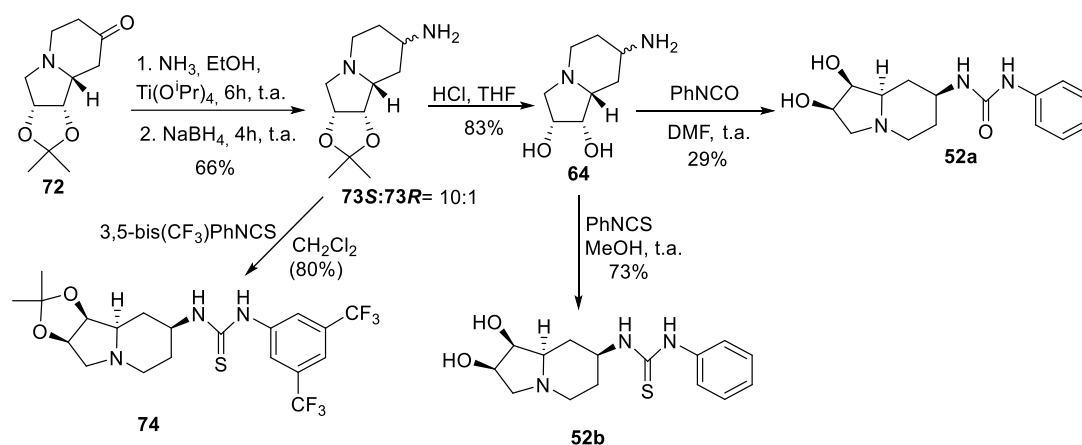
De este modo, el ataque del bis(trimetilsilil)amiduro de litio sobre las dos posiciones posibles en  $\alpha$  al grupo carbonilo origina una mezcla de las indolizidinonas **70** (mayoritariamente en forma enólica) y **71** en una proporción 3:1 que pudo separarse mediante columna de cromatografía. El siguiente paso en la secuencia sintética es la formación de la indolizidinona **72**, la cual podría obtenerse mediante descarboxilación del enol **70** o del  $\beta$ -cetoéster **71**. En base a los trabajos previos de optimización llevados a cabo en el grupo de investigación, el procedimiento más adecuado para obtener la indolizidinona **72** implicó la reacción de descarboxilación del enol **70**. Así, el tratamiento de **70** con LiCl en DMF a 140 °C durante 6 horas originó el derivado **72** con bajo rendimiento.



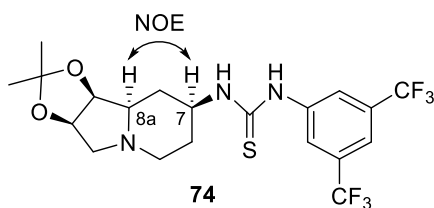
Esquema 19

La posterior reacción de aminación reductiva de la indolizidinona **72** con amoníaco en presencia de  $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$  seguido de reducción con  $\text{NaBH}_4$  permitió obtener la indolizidinamina **73** como una mezcla de diastereoisómeros no separables por columna cromatográfica

en una proporción aproximada 7S:7R= 10:1. Finalmente, tras hidrólisis ácida del grupo isopropilideno, la mezcla de aminas desprotegidas **64** se utilizó para la reacción con fenilisocianato en DMF y fenilisotiocianato en MeOH originando respectivamente la indolizidin-urea **52a** y la indolizidin-tiourea **52b** (*Esquema 20*), separables de los correspondientes diastereoisómeros minoritarios por columna cromatográfica.



Cabe destacar que la configuración en C-7 de los diastereoisómeros mayoritarios ha sido asignada en base a un experimento NOESY efectuado sobre la indolizidin-tiourea protegida **74**, donde se observa un NOE concluyente entre H-8a (dd, 3.75 ppm) y H-7 (dd, 3.75 ppm) (*Figura 23*).

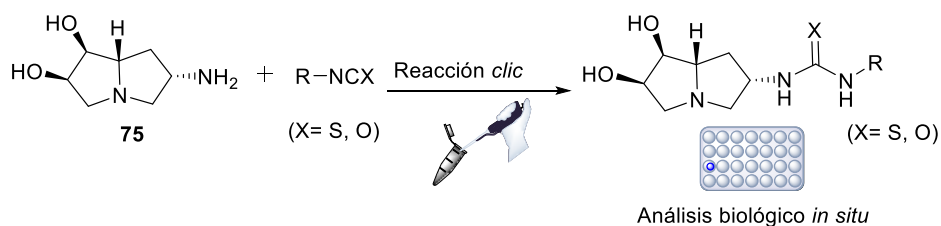


**Figura 23.** Estructura de **74** confirmada por NOESY.

*Evaluación biológica.*

Se ha realizado un estudio de la capacidad inhibidora (% Inhibición a 1 mM) de las indolizidín-(tio)ureas **51a** y **51b** y de sus diastereoisómeros **52a** y **52b** frente a once glicosidasas comerciales (Sigma-Aldrich y Megazyme):  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens*,  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café,  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -glucosidasa de levadura de pan y de arroz, amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*,  $\beta$ -glucosidasa de almendras,  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack,  $\beta$ -manosidasa de caracol y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack.

Los compuestos sintetizados no presentaron inhibición significativa frente a ninguna de las enzimas ensayadas. De este modo, se descartaron estas estructuras de tipo indolizidínico como modelos para la búsqueda de inhibidores potentes de glicosidasas. En este sentido, se eligieron como referencia los compuestos modelos de tipo pirrolizidínico que previamente habían sido identificados en nuestro grupo de investigación como potentes inhibidores de  $\alpha$ -galactosidasa, para la preparación de una librería química de pirrolizidín-(tio)ureas, utilizando la metodología de síntesis paralela seguido de evaluación biológica *in situ* (**Esquema 21**).

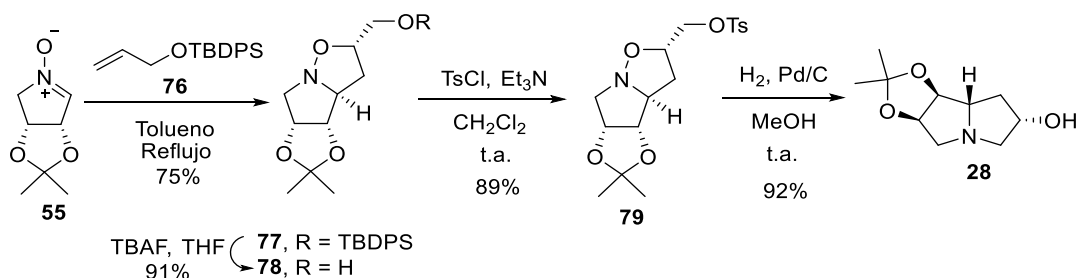


**Esquema 21.** Metodología a emplear para la búsqueda de inhibidores de  $\alpha$ -galactosidasas.



*Síntesis paralela de derivados pirrolizídnicos, seguida de evaluación biológica in situ.*

La ruta sintética para la preparación de la pirrolizidín-amina de partida **75** es análoga a la descrita para la preparación de la indolizidín-amina **62** (*Esquema 14*). Así, la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de la nitrona **55** con el alcohol alílico protegido **76**<sup>118</sup> en tolueno a reflujo origina el derivado **77**<sup>119</sup> como único diastereoisómero con un 75% de rendimiento. Posteriormente, el tratamiento de **77** con TBAF/THF proporciona el alcohol **78** con un rendimiento del 91%. La tosilación del grupo hidroxilo libre de **78** origina el compuesto **79** cuya hidrogenación en presencia de Pd/C (10%) conduce a la pirrolizidina **28** con un rendimiento del 92% (*Esquema 22*).

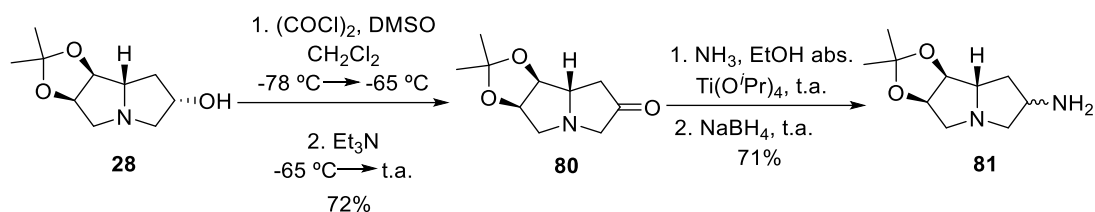


**Esquema 22**

La reacción de oxidación de Swern del alcohol **28** origina la cetona **80** que tras reacción de aminación reductiva con amoníaco en presencia de  $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ , da lugar a la mezcla de pirrolizidín aminas **81** en proporción 2:1 con un rendimiento del 71% (*Esquema 23*). Los ensayos de reducción con  $\text{NaBH}_4$  a baja temperatura no supusieron una mejora significativa de la estereoselectividad aunque sí una disminución drástica del rendimiento de la reacción.

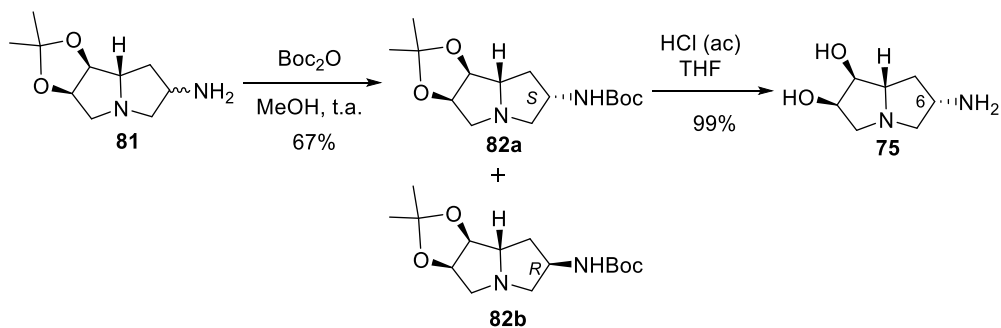
<sup>118</sup> Waser, J.; Gaspar, B.; Nambu, H.; Carreira, E. M. Hydrazines and azides via the metal-catalyzed hydrohydrazination and hydroazidation of olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11693-11712.

<sup>119</sup> McCaig, A. E.; Meldrum, K. P.; Wightman, R. H. Synthesis of trihydroxylated pyrrolizidines and indolizidines using cycloaddition reactions of functionalized cyclic nitrones, and the synthesis of (+)- and (-)-lentiginosine. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9429-9446.



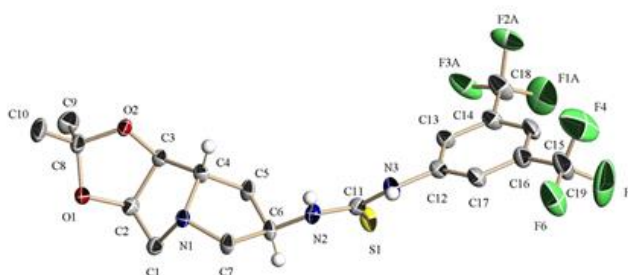
Esquema 23

La reacción de protección de la mezcla de aminas **81** con  $\text{Boc}_2\text{O}$  permitió la separación de ambos diastereoisómeros **82a** y **82b** mediante cromatografía en columna de gel de sílice. La posterior desprotección ácida de la amina mayoritaria **82a** permitió llegar a la pirrolizidín-amina **75** con rendimiento cuantitativo (*Esquema 24*).



Esquema 24

La configuración de C-7 pudo determinarse en base a la estructura de Rayos-X del isopropilidén derivado del compuesto **25a** (*Figura 13*, pág. 49), en un trabajo desarrollado en el grupo de investigación (*Figura 24*).<sup>120</sup>



**Figura 24.** Estructura de Rayos-X del isopropilidén derivado del compuesto **25a**.

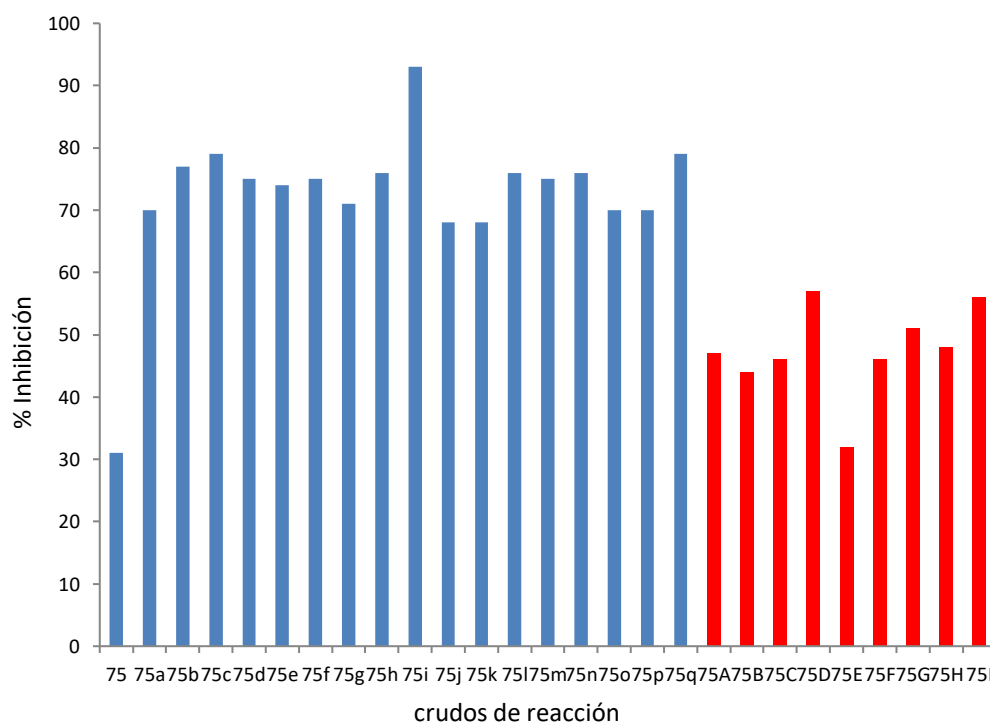
Las reacciones en paralelo entre la pirrolizidín-amina **75** (1.2 eq) y una batería de isotiocianatos **a–q** (1.0 eq) e isocianatos **A–I** (1.0 eq) para la formación de los derivados de (tio)urea (Librerías **IA** y **IB**) se llevaron a cabo utilizando DMSO como disolvente debido a la inestabilidad de los isocianatos en los disolventes polares próticos comunes (*Esquema 25*).

<sup>120</sup> Elías-Rodríguez, P.; Pingitore, V.; Carmona, A.T.; Moreno-Vargas, A.J.; Ide, D.; Miyawaki, S.; Kato, A.; Álvarez, E.; Robina, I. Discovery of a potent  $\alpha$ -galactosidase inhibitor by *in situ* analysis of a library of pyrrolizidine–(thio)urea hybrid molecules generated via click chemistry. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8863–8873.



fue posteriormente diluído con agua hasta alcanzar la concentración oportuna para realizar los ensayos enzimáticos, determinándose el porcentaje de inhibición frente a  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café (concentración final de inhibidor en pocillo 5.0  $\mu$ M).

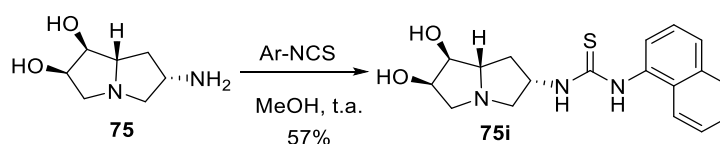
Del análisis preliminar de la librería de pirrolizidín-(tio)ureas que se representa en la **Figura 25** se puede concluir que la incorporación de un resto aromático/alifático en el esqueleto del iminoazúcar aumenta significativamente la inhibición enzimática en comparación con la pirrolizidín-amina **75** de partida.



**Figura 25.** Inhibición (%) frente a  $\alpha$ -galactosidasas de granos de café a concentración 5  $\mu$ M de las pirrolizidín-tioureas (**75a-q**) en azul y las pirrolizidin-ureas (**75A-I**) en rojo (pH 6, 37 °C).

El análisis de la **Figura 25** igualmente muestra que los derivados de tiourea (**75a-q**) son mejores inhibidores de la enzima que los equivalentes de tipo urea (**75A-I**) y que, en particular, la tiourea **75i** (93% de inhibición a 5.0  $\mu\text{M}$ ) destaca por potencia de inhibición entre todos los derivados evaluados.

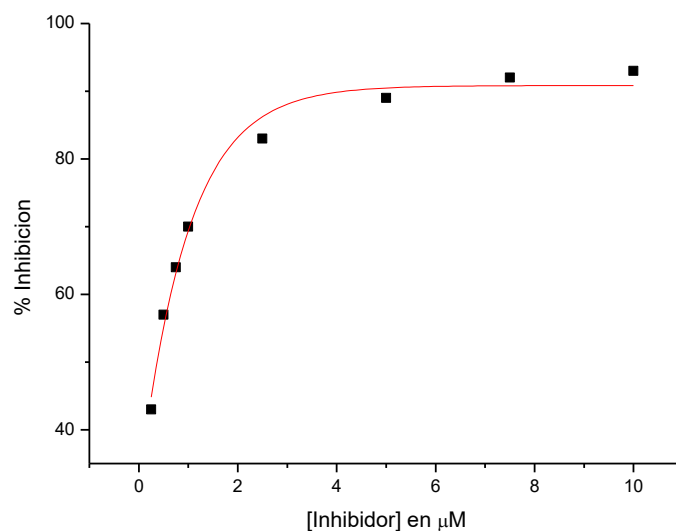
Para llevar a cabo un estudio de inhibición más completo, el compuesto **75i** se sintetizó convencionalmente a mayor escala y se purificó en columna de cromatografía (**Esquema 26**).



**Esquema 26**

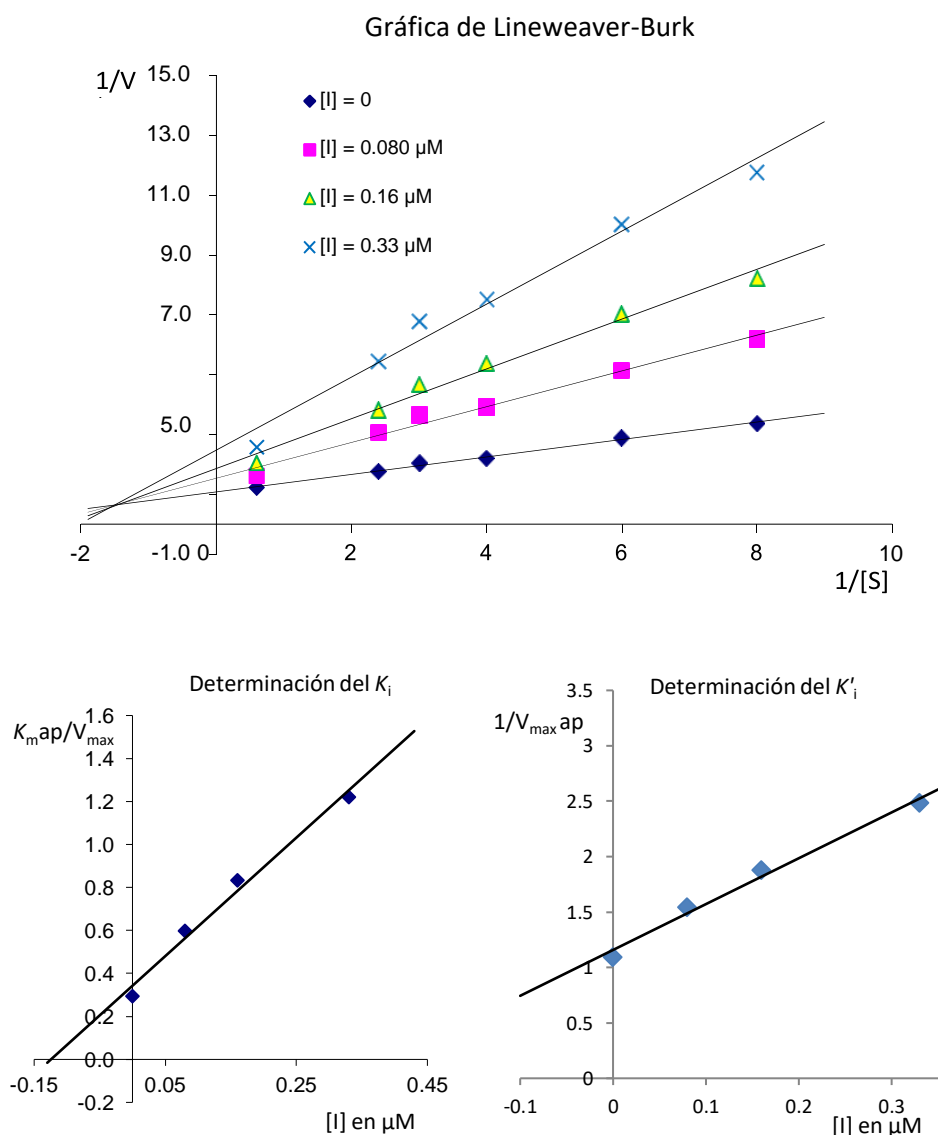
Además, el compuesto **75i** se evaluó frente a una colección de glicosidasas comerciales, con el objetivo de determinar la selectividad de la inhibición.<sup>121</sup> A una concentración de 0.1 mM, **75i** solo mostró una inhibición significativa de la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café ( $\text{IC}_{50} = 0.37 \mu\text{M}$ ) y una inhibición 200 veces menos potente frente a la  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack ( $\text{IC}_{50} = 79 \mu\text{M}$ ), confirmando ser un inhibidor no solo potente sino también selectivo. En la **Figura 26** se muestra la representación del porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café frente a la concentración de **75i** para la determinación del valor del  $\text{IC}_{50}$ .

<sup>121</sup>Colección de glicosidasas comerciales:  $\alpha$ -fucosidasa (riñón de bovino),  $\alpha$ -galactosidasa (granos de café),  $\beta$ -galactosidasa (hígado bovino),  $\alpha$ -glucosidasa (levadura de pan y de arroz, maltasa intestinal de rata), amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*),  $\beta$ -glucosidasa (almendras, hígado bovino),  $\alpha$ -manosidasa (guisantes de Jack),  $\beta$ -manosidasa (caracol),  $\alpha,\alpha$ -trehalasa (riñón porcino),  $\alpha$ -L-ramnosidasa (*Penicillium decumbens*),  $\beta$ -glucuronidasa (hígado bovino, *Escherichia coli*).



**Figura 26.** Representación correspondiente a la determinación del  $\text{IC}_{50}$  en la inhibición de  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café por **75i** ( $\text{IC}_{50} = 0.37 \mu\text{M}$ ).

En la **Figura 27** se muestra la representación de Lineweaver-Burk frente a  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café del compuesto **75i**, siendo la inhibición presentada de tipo mixto. Conceptualmente, una inhibición mixta sería aquella que se presenta cuando un inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre (inhibición competitiva que se rige por la  $K_i$ ) como al complejo enzima-sustrato (inhibición incompetitiva que se rige por la  $K'_i$ ), predominando uno de estos dos modos de inhibición sobre el otro (ver Anexo “Conceptos básicos sobre inhibición enzimática”). El valor determinado para la componente competitiva de la inhibición resultó ser  $K_i = 0.12 \mu\text{M}$  mientras que la componente incompetitiva presentó un valor de  $K'_i = 0.28 \mu\text{M}$ .



**Figura 27:** Efecto de la concentración de *p*-nitrofenil  $\alpha$ -galactósido [S] ( $1/[S]$  en  $\text{mM}^{-1}$ ) en la velocidad de reacción enzimática (la velocidad  $V$  está relacionada directamente con la absorbancia, Abs) de la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café en presencia de distintas concentraciones de **75i** (se incluyen los gráficos secundarios para la determinación de  $K_i$  ( $0.12 \mu\text{M}$ ) y  $K'_i = 0.28 \mu\text{M}$ ). [I] = concentración de inhibidor.



Con objeto de profundizar en el potencial inhibidor de **75i** frente glicosidasas de origen humano, se llevaron a cabo los correspondientes experimentos frente a la  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa lisosomales en colaboración con el grupo de investigación del Dr. A. Kato (Universidad de Toyama, Japón). Es importante subrayar que la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café presenta un 58% de homología con la  $\alpha$ -galactosidasa de lisosoma humano<sup>122</sup> cuya implicación en la enfermedad de Fabry se encuentra documentada desde 1967.<sup>123</sup> Ambas enzimas pertenecen a la familia GH27. La estructura de rayos X de la  $\alpha$ -Gal A humana se conoce desde 2004.<sup>124</sup> La enzima presenta una estructura homodimérica y cada unidad monomérica está compuesta por dos dominios.

Los resultados de inhibición del compuesto **75i** sobre las glicosidasas humanas indicaron actividad inhibidora solo frente a la  $\alpha$ -galactosidasa lisosomal, con un valor de  $IC_{50}$  de 5.3  $\mu$ M. El tipo de inhibición se determinó mediante el método de Lineweaver-Burk, mostrando una inhibición mixta y un valor de  $K_i$  de 4.2  $\mu$ M.<sup>125</sup>

Con el objetivo de confirmar la posible correlación entre la inhibición de la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café y de la  $\alpha$ -galactosidasa lisosomal, se procedió a determinar la inhibición de esta última enzima por el compuesto **25b** (**Figura 13**). La tiourea **25b**, que había sido elegida como modelo para la generación de la librería de inhibidores, había mostrado ser claramente peor inhibidor de la  $\alpha$ -galactosidasa vegetal que **75i**, tal y como se muestra en la **Figura 25**. La evaluación frente a la  $\alpha$ -galactosidasa

---

<sup>122</sup> Maranville, E.; Zhu, A. The carboxyl terminus of coffee bean  $\alpha$ -galactosidase is critical for enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 225–230.

<sup>123</sup> Brady, R. O.; Gal, A. E.; Bradley, R. M.; Martensson, E.; Warshaw, A. L.; Laster, L. Enzymatic defect in Fabry's disease. ceramidetrihexosidase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **1967**, *276*, 1163–1167.

<sup>124</sup> Garman, S. C.; Garboczi, D. N. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human  $\alpha$ -galactosidase. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 319–335.

<sup>125</sup> Evaluación biológica llevada a cabo en colaboración con el Prof. A. Kato del Departamento de Farmacia Hospitalaria, Universidad de Toyama, Japón.

lisosomal efectivamente indicó una menor inhibición de **25b** con respecto a **75i** ( $IC_{50}$  = 68  $\mu$ M vs  $IC_{50}$  = 5.3  $\mu$ M). Estos resultados parecen indicar que ambas enzimas responden en el mismo sentido frente a nuestros inhibidores, pudiendo establecerse cierta correspondencia entre la enzima vegetal y la humana. Por tanto, la metodología de síntesis paralela seguida de evaluación biológica *in situ* frente a la  $\alpha$ -galactosidasa vegetal resultó adecuada para la identificación de potentes inhibidores de  $\alpha$ -galactosidasa de lisosoma humano.

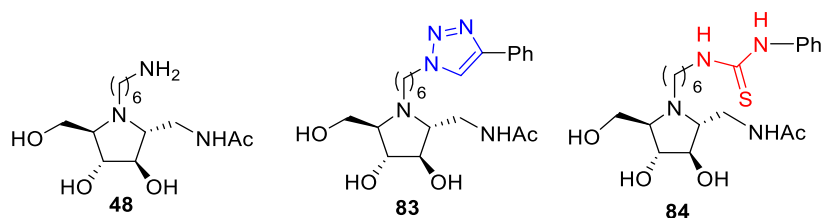
### 1.3.2. Síntesis y evaluación *in situ* de pirrolidín-triazoles y pirrolidín-(tio)ureas como inhibidores monovalentes de $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas humanas.

*Estudio preliminar. Síntesis y elección de los cabezas de serie.*

En este apartado se llevó a cabo la funcionalización del grupo amino primario del inhibidor de  $\beta$ -hexosaminidasa **48** (**Figura 28**),<sup>126</sup> con el objetivo de incorporar restos aromáticos/alifáticos a este sistema, y estudiar el efecto sobre la inhibición de la  $\beta$ -hexosaminidasa lisosomal humana (HexB) y de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa humana (OGA). Inicialmente se llevó a cabo la síntesis y evaluación biológica de los compuestos modelo **83** y **84** (**Figura 28**) para determinar si la incorporación de un resto aromático a través de una funcionalidad tipo triazol/tiourea mejoraba la inhibición enzimática de **48**. Se han elegido estos dos tipos de funcionalidades conectoras, por ser dos grupos funcionales cuya formación se podría adaptar fácilmente a la metodología de síntesis en paralelo seguida de análisis biológico *in situ*.

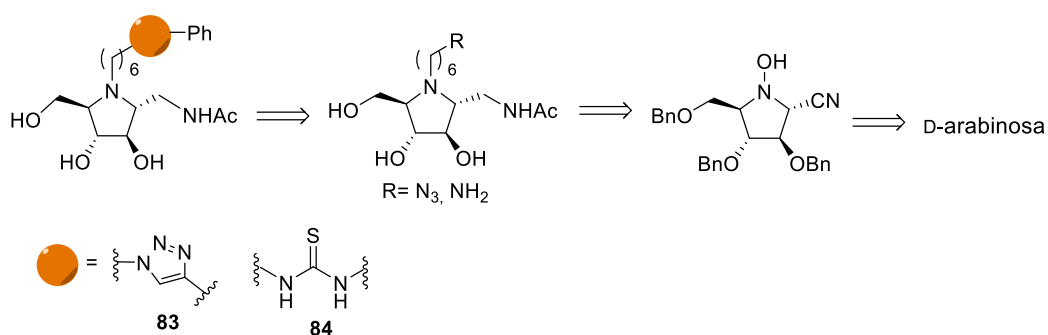
---

<sup>126</sup> Liang, P. H.; Cheng, W. C.; Lee, Y. L.; Yu, H. P.; Wu, Y. T.; Lin, Y. L.; Wong, C. H. Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors: new structures for antivirals and osteoarthritis. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 165-173.



**Figura 28.** Compuestos modelo sintetizados para el estudio preliminar de inhibición de HexB y OGA.

El análisis retrosintético de **83** y **84** se describe en el **Esquema 27**.



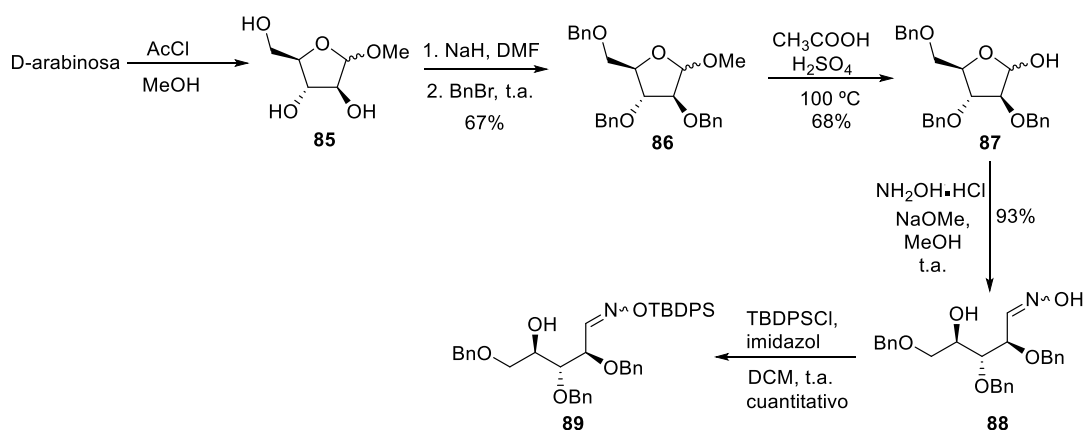
**Esquema 27**

La ruta sintética parte de la D-arabinosa que por tratamiento con AcCl en MeOH proporciona la mezcla de metil furanósidos **85** cuya perbenzilación permite obtener el derivado protegido **86**.<sup>127</sup> La posterior hidrólisis ácida a 100 °C condujo a la mezcla de anómeros **87**<sup>128</sup> que se convirtieron en la oxima **88** por reacción con el hidrocloreuro de

<sup>127</sup> Suthagar, K.; Polson, M. I. J.; Fairbanks, A. J. Unexpected furanose/pyranose equilibration of N-glycosyl sulfonamides, sulfamides and sulfamates. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6573-6579.

<sup>128</sup> RvanRijssel, E.; Goumans, T.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C. Chiral pyrroline-based Ugi-three-component reactions are under kinetic control. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 3026-3029.

hidroxilamina en medio básico, con un rendimiento del 93%.<sup>129</sup> Finalmente, la siliación selectiva del grupo hidroxilo de la oxima **88** permitió obtener el derivado **89** con un rendimiento cuantitativo (**Esquema 28**).



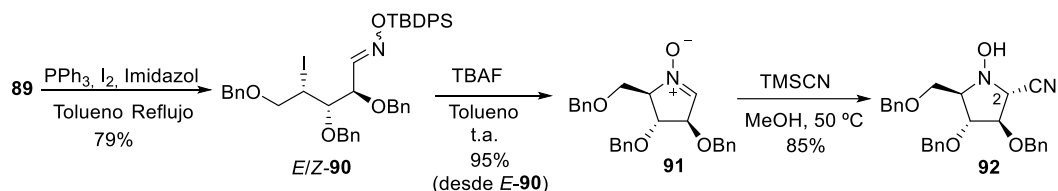
**Esquema 28**

La ruta sintética prosigue con la yodación del alcohol **89** en presencia de PPh<sub>3</sub> originando el yododerivado **90**, con un rendimiento global del 79%.<sup>130</sup> La nitrona **91**, obtenida a partir del yododerivado mayoritario (*E*)-**90** tras reacción con TBAF, se sometió a una reacción con cianuro de trimetilsililo en MeOH a 50 °C originando una mezcla diastereoisomérica de nitrilos (proporción 2*R*/2*S* = 19:1) cuya separación por columna cromatográfica permitió obtener el nitrilo mayoritario **92** con un rendimiento del 85% (**Esquema 29**).<sup>131</sup>

<sup>129</sup> Grant Buchanan, J.; Lombard, K. W.; Sturgeon, R. J.; Thompson, D. K.; Wightman, R. H. Potential glycosidase inhibitors: synthesis of 1,4-Dideoxy-1,4-imino derivatives of D-glucitol, D- and L-xylitol, D- and L-allitol, D- and L-talitol, and D-gulitol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1990**, 3, 699-706.

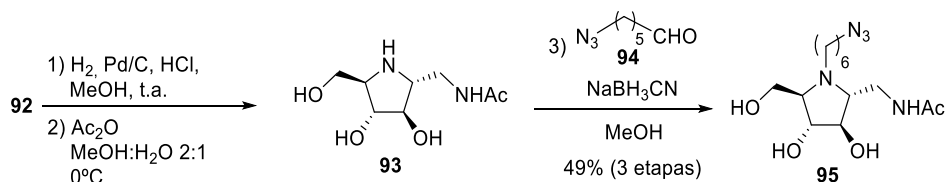
<sup>130</sup> Rössler, S. L.; Schreib, B. S.; Ginterseder, M.; Hamilton, J. Y.; Carreir, E. M.; Total synthesis and stereochemical assignment of (+)-broussonetine H. *Org. Lett.* **2017**, 19, 5533–5536.

<sup>131</sup> Tsou, E. L.; Yeh, Y. T.; Liang, P. H.; Cheng, W. C. A convenient approach toward the synthesis of enantiopure isomers of DMDP and ADMDP. *Tetrahedron* **2009**, 65, 93–100.



Esquema 29

El nitrilo **92** se sometió posteriormente a una reacción de hidrogenación catalítica en condiciones ácidas seguida de acetilación selectiva del grupo amino primario mediante tratamiento con anhídrido acético en MeOH:H<sub>2</sub>O a 0 °C para originar el derivado pirrolidínico **93**.<sup>132</sup> Finalmente, la aminación reductiva del crudo **93** con el 6-azidoheptanal **94**,<sup>133</sup> usando NaBH<sub>3</sub>CN como reductor, permitió obtener la *N*-azidopentilpirrolidina final **95** con un rendimiento del 49% para las tres etapas (Esquema 30). El 6-azidoheptanal pudo obtenerse de manera sencilla en dos pasos a partir del 6-bromohexan-1-ol comercial.

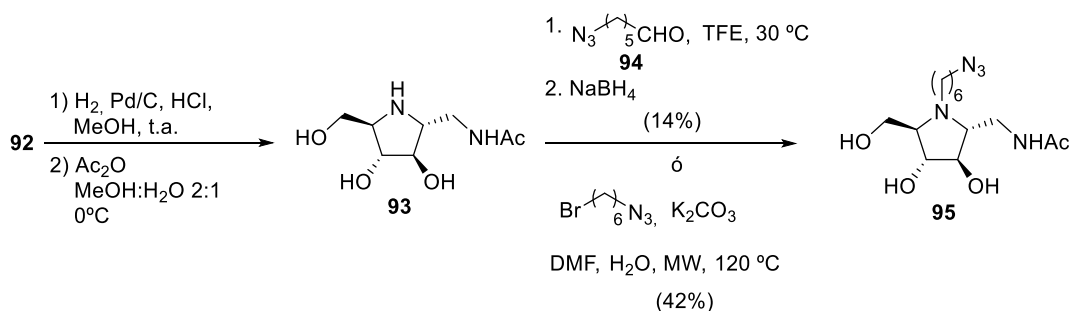


Esquema 30

<sup>132</sup> a) Merino, P.; Delso, I.; Tejero, T.; Cardona, F.; Marradi, M.; Faggi, E.; Parmeggiani, C.; Gotl, A. Nucleophilic additions to cyclic nitrones en route to iminocyclitols – total syntheses of DMDP, 6-deoxy-DMDP, DAB-1, CYB-3, nectrisine, and radicamine B. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2929–2947. b) Shih, H. W.; Chen, K. T.; Chen, S. K.; Huang, C. Y.; Cheng, T. J. R.; Ma, C.; Wong, C. H.; Cheng, W. C. Combinatorial approach toward synthesis of small molecule libraries as bacterial transglycosylase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2586–2593.

<sup>133</sup> a) Bühler, J.; Gietzen, S.; Reuter, A.; Kappel, C.; Fischer, K.; Decker, S.; Schäffel, D.; Koynov, K.; Bros, M.; Tubbe, I.; Grabbe, S.; Schmidt, M. Selective uptake of cylindrical poly (2-oxazoline) brush antiDEC205 antibody-OVA antigen conjugates into DEC-positive dendritic cells and subsequent T-Cell activation. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12405–12410.

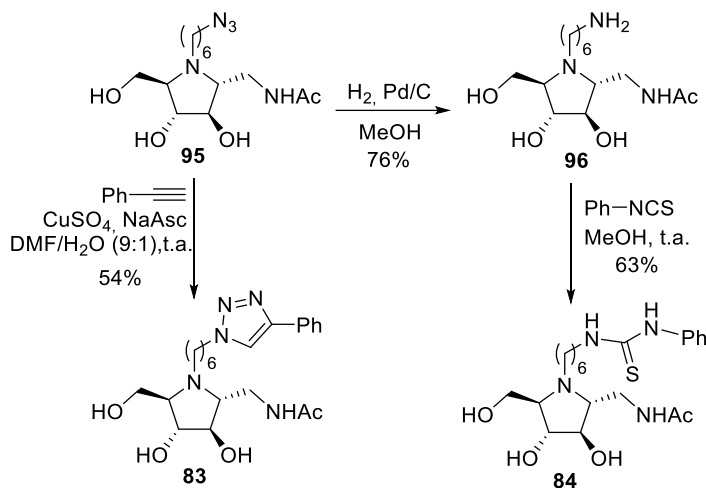
Con el objetivo de mejorar el rendimiento de la transformación de **93** en **95**, el compuesto **93** se sometió a varios ensayos que implicaban tanto condiciones distintas de aminación reductiva como de alquilación directa del *N*-endocíclico de la pirrolidina (**Esquema 31**). Como se puede apreciar en el **Esquema 31**, ni la aminación reductiva en trifluoroetanol según el procedimiento descrito por Tajbakhsh y cols.,<sup>134</sup> ni tampoco la alquilación directa con 1-azido-6-bromohexano consiguieron mejorar el rendimiento de **95** con respecto al procedimiento empleado en el **Esquema 30**.



**Esquema 31**

Finalmente, la hidrogenación catalítica de *N*-azidohexilpirrolidina **95** condujo al correspondiente aminoderivado **96** con buen rendimiento. Paralelamente, la azida **95** se sometió a una reacción CuAAC con fenilacetileno en presencia de CuSO<sub>4</sub> y ascorbato sódico para originar el pirrolidín-triazol **83** con un 54% de rendimiento. Por otra parte, la reacción de la *N*-aminohexilpirrolidina **96** con fenilisotiocianato en MeOH dio lugar a la pirrolidín-tiourea **84** con un 63% de rendimiento (**Esquema 32**).

<sup>134</sup> Tajbakhsh, M.; Hosseinzadeh, R.; Alinezhad, H.; Ghahari, S.; Heydari, A.; Khaksar, S.; Catalyst-free one-pot reductive alkylation of primary and secondary amines and *N,N*-dimethylation of amino acids using sodium borohydride in 2,2,2-trifluoroethanol. *Synthesis* **2011**, 3, 490-496.



Esquema 32

Evaluación biológica

Se ha realizado un estudio de la capacidad inhibidora de los derivados **83** y **84** frente a once glicosidasas comerciales (Sigma-Aldrich y Megazyme)<sup>135</sup> y dos humanas, la  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasa (HexB) y la  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa (OGA), ambas aisladas y purificadas en el grupo del Prof. V. Kren (Academia Checa de Ciencias de Praga). Tanto **83** como **84** presentaron inhibición potente y selectiva frente a las hexosaminidasas ensayadas (98-100% de inhibición a una concentración 1.0 mM). Adicionalmente se observó una inhibición débil de la amiloglucosidasa de *A. Niger*. Tras estos resultados preliminares, se eligieron los compuestos **83** y **84** como modelos para la síntesis paralela de una librería de

<sup>135</sup>  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens*,  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café,  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -glucosidasa levadura de pan y de arroz,  $\alpha$ -amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*,  $\beta$ -glucosidasa de almendras,  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack,  $\beta$ -manosidasa de caracol y  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack (JB-GlcNAc).

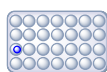
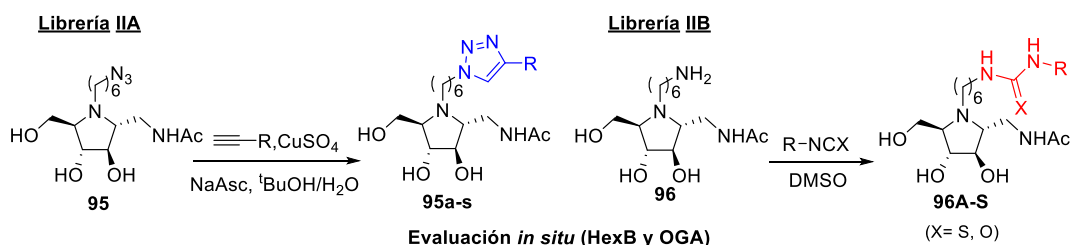
potenciales inhibidores de hexosaminidasa humana conteniendo estructuras de tipo triazol y (tio)urea.

#### *Síntesis paralela y evaluación biológica in situ*

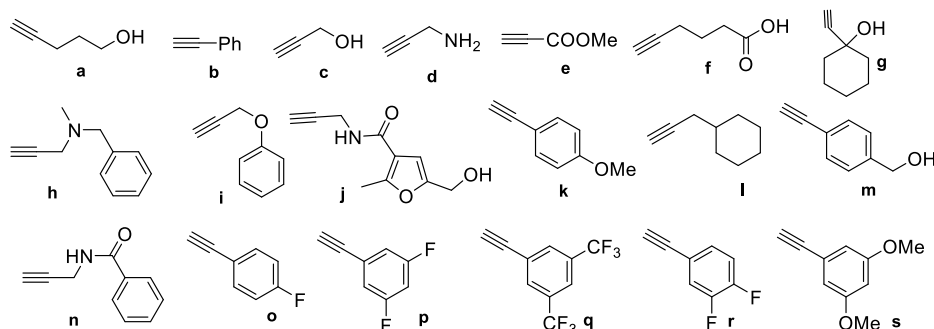
La estrategia utilizada para la identificación rápida de nuevos inhibidores selectivos de  $\beta$ -hexosaminidasa (HexB) basados en la estructura de los compuestos modelo **83** y **84** implicó la preparación de dos librerías químicas de compuestos (librería **IIA** y **IIB**). Así, la reacción CuAAC entre la *N*-azidohexilpirrolidina **95** y una colección de alquinos (a-s) originó la librería **IIA**, constituida por los pirrolidín-triazoles **95a-s**. Por otro lado, la reacción *clic* entre la *N*-aminohexilpirrolidina **96** y una batería de iso(tio)cianatos (A-S) permitió preparar la librería **IIB** de pirrolidín-(tio)ureas **96A-S**.

Las propiedades inhibidoras de ambas librerías se analizaron posteriormente mediante evaluación biológica *in situ* de los crudos de reacción frente a las enzimas humanas HexB y OGA (**Esquema 33**).

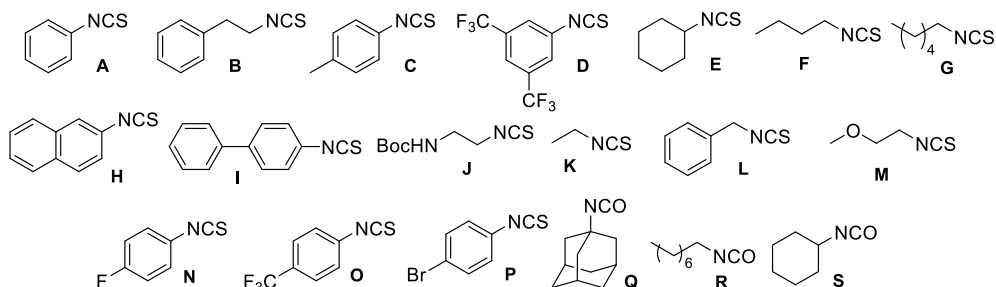




≡-R



R-NCX



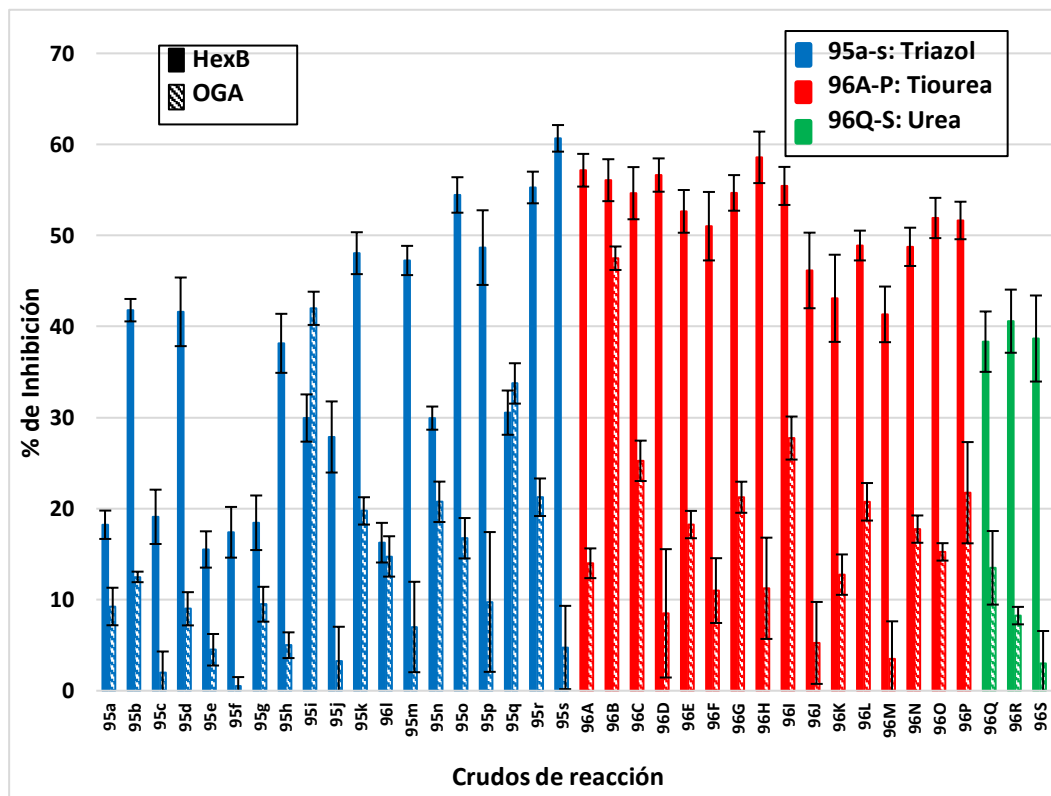
**Esquema 33.** Síntesis de las librerías IIA (95a-s) y IIB (96A-S).

La síntesis de la librería **IIA (95a-s)** se llevó a cabo mediante reacciones paralelas CuAAC entre la pirrolidín-azida **95** (1 eq) y una batería de alquinos terminales **a-s** (2.4 eq), utilizando  $\text{CuSO}_4$  (0.44 eq) y ascorbato sódico (0.14 eq), en una mezcla  $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$  como disolvente. Tras 21 horas calentando a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , se observó conversión completa por c.c.f. y espectrometría de masas. Por otro lado, la síntesis de la librería **IIB (96A-S)** se llevó a cabo

mediante reacciones paralelas entre la pirrolidín-amina **96** (1.2 eq) y una batería de iso(tio)cianatos **A-S** (1 eq) utilizando DMSO como disolvente. Tras 6 horas a temperatura ambiente, se observó conversión completa por c.c.f. y espectrometría de masas (ESI-MS). Los crudos de reacción obtenidos, sin purificación previa, se diluyeron con agua hasta la concentración necesaria (100 nM), se transfirieron a una placa multipocillos y se evaluaron *in situ* frente a HexB y OGA.

Es importante resaltar que se realizaron ensayos de control de cada alquino, CuSO<sub>4</sub> y ascorbato sódico tanto mezclados como por separado en las mismas condiciones de reacción (temperatura, tiempo de reacción y disolvente) y concentración para confirmar que su presencia en los crudos de reacción no afectaba a la inhibición enzimática. También se llevaron a cabo los ensayos de inhibición de las *N*-azido- y *N*-aminohexilpirrolidinas **95** y **96** en las mismas condiciones que las de los ensayos de generación de las librerías. La *N*-azidohexilpirrolidina **95** no mostró inhibición de las enzimas a la concentración de 100 nM, en cambio, la *N*-aminohexilpirrolidina **96** sí mostró cierta capacidad inhibidora de la enzima HexB a la concentración de 100 nM, aunque muy por debajo de la mostrada por los derivados **96A-S**. Como dicha pirrolidina se encontraba en exceso (exceso de 0.2 eq) en los crudos de reacción de la librería **IIB**, se evaluó lo que podría suponer este ligero exceso en términos de inhibición enzimática, teniendo en cuenta el nivel de concentración de los experimentos, lo que arrojó un valor del 21% de inhibición. Este porcentaje se encuentra sustraído de los valores presentados en las barras de la gráfica correspondientes a esta librería (**Figura 29**).

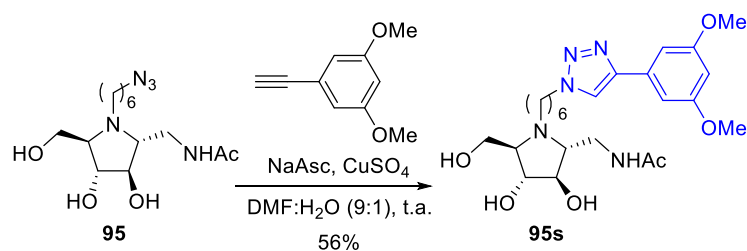
Los resultados obtenidos para cada compuesto de las librerías **IIA** y **IIB** se muestran en las **Figura 29**, representándose el porcentaje de inhibición frente a las enzimas HexB y OGA a una concentración 100 nM en pocillo, asumiendo una conversión 100% en todas las reacciones paralelas.



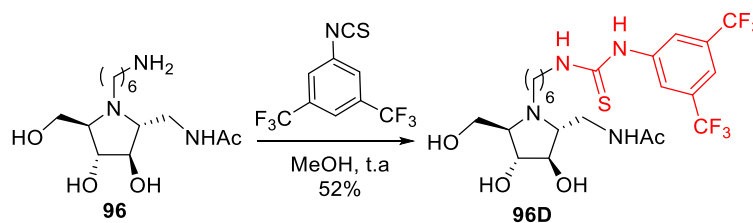
**Figura 29.** Inhibición (%) de los compuestos de las librerías IIA y IIB frente a HexB (pH 4, 37 °C) y OGA (pH 7, 37 °C) a 100 nM de inhibidor.<sup>136</sup>

Según el análisis de estos resultados, los inhibidores **95s** y **96D** se muestran como los más interesantes por ser los que presentan mayores valores de inhibición de la enzima HexB, a la vez que conservan la mayor selectividad HexB/OGA. Ambos derivados fueron sintetizados a mayor escala y purificados cromatográficamente con el objetivo de completar el estudio de su actividad inhibidora (*Esquemas 34 y 35*).

<sup>136</sup> En cada barra de la gráfica se considera la desviación estándar de las medidas realizadas por cuadruplicado.



**Esquema 34.** Síntesis del derivado **95s**.



**Esquema 35.** Síntesis del derivado **96D**.

Los compuestos **95s** y **96D** se evaluaron frente a las hexosaminidasas HexB, OGA y  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack (JB-GlcNAc), así como al resto de enzimas comerciales anteriormente indicadas, mostrándose los resultados en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) para los derivados **95s** y **96D** frente a distintas hexosaminidasas.

Compuesto	HexB	OGA	JB-GlcNAc
<b>95s</b>	0.073	0.422	0.280
<b>96D</b>	0.125	0.339	0.136

Los valores de IC<sub>50</sub> presentados en la **Tabla 1** muestran que:

A) Tanto el pirrolidín-triazol **95s** como la pirrolidín-tiourea **96D** resultaron ser inhibidores potentes de las hexosaminidasas ensayadas, con valores de  $IC_{50}$  en el rango nanomolar. Además, no presentaron inhibición significativa al resto de enzimas, a excepción de la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (27%-47% inhibición a una concentración 0.1 mM de inhibidor).

B) Aunque ambos compuestos son muy buenos inhibidores de HexB y algo menos de OGA, el derivado de tipo pirrolidín-triazol **95s** presenta un perfil de inhibición mejor, siendo casi seis veces más activo frente a HexB que frente a OGA. Por otro lado, si comparamos la actividad de los dos compuestos frente a HexB, observamos que el derivado de tipo pirrolidín-triazol **95s** es casi dos veces más potente que el análogo de tipo tiourea **96D**.

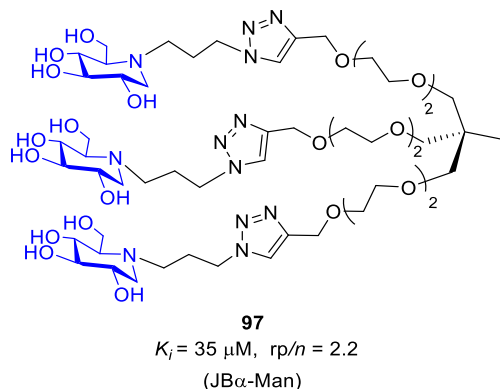
**CAPÍTULO 2**

***SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA IN SITU DE INHIBIDORES MULTIVALENTES DE  
GLICOSIDASAS DERIVADOS DE IMINOAZÚCARES.***

## Capítulo 2: Síntesis y evaluación biológica *in situ* de inhibidores multivalentes de glicosidasas derivados de iminoazúcares.

### 2.1. ANTECEDENTES

Los primeros ejemplos de estructuras multiméricas de iminoazúcares se describieron entre los años 1998-99.<sup>137</sup> Sin embargo, no fue hasta el año 2009 cuando apareció el término multivalencia aplicado a la inhibición de glicosidasas, tras la publicación por parte de Gouin, Kovensky y colaboradores<sup>138</sup> de inhibidores multivalentes de glicosidasas mediante reacciones CuAAC. La estrategia sintética se basó en el uso de la reacción CuAAC entre la 1-desoxinojirimicina (DNJ) azidoalquil funcionalizada y un molde trimérico con brazos derivados del dietilénglicol funcionalizado en sus extremos con grupos alquínilos (compuesto **97**, *Figura 30*).



**Figura 30.** Multímero derivado de la 1-desoxinojirimicina (DNJ) descrito por Gouin, Kovensky y cols.

<sup>137</sup> a) Lohse, A.; Jensen, K. B.; Lundgren, K.; Bols, M. Synthesis and deconvolution of the first combinatorial library of glycosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965-1971. b) Johns, B. A.; Johnson, C. R. Scaffolded bis-azasugars: a dual warhead approach to glycosidase inhibition. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749-752.

<sup>138</sup> Diot, J.; García-Moreno, M. I.; Gouin, S. G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidasas. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357-363.

El derivado **97** fue el primer multímero donde se cuantificó un efecto multivalente en la inhibición de glicosidasas (JB $\alpha$ -Man), con una potencia de inhibición relativa por unidad de iminoazúcar ( $rp/n$ ) de 2.2 ( $K_i = 35 \mu\text{M}$  de **97** frente a  $K_i = 230 \mu\text{M}$  del correspondiente monómero de referencia).

La JB $\alpha$ -Man ha sido desde entonces la glicosidasa más estudiada en el campo de los iminoazúcares multivalentes debido a su disponibilidad comercial, sus similitudes estructurales con las  $\alpha$ -manosidasas humanas de Golgi (GManII) y lisosomal (LManII), por su naturaleza multimérica y por tener sus sitios activos en una cavidad muy abierta. La JB $\alpha$ -Man es una metaloenzima dimérica de alto peso molecular (230 kDa) formada por dos heterodímeros (LH)<sub>2</sub> resultados de la asociación de monómeros de 49 (L) y 66 (H) kDa, respectivamente. Debido a la presencia de un bolsillo catalítico particularmente accesible, esta enzima interacciona fácilmente con estructuras multiméricas. El sitio activo se encuentra en la subunidad de tipo H.<sup>139</sup>

Con el paso de los años se empezaron a sintetizar inhibidores multivalentes con una estructura cada vez más compleja como, por ejemplo, derivados de fullereno, plataforma utilizada previamente para la preparación de derivados multivalentes de carbohidratos.<sup>140</sup>

En la **Figura 31** se representa la estructura del inhibidor multivalente de JB $\alpha$ -Man sintetizado por Compain, Ortiz-Mellet y cols.<sup>141</sup>

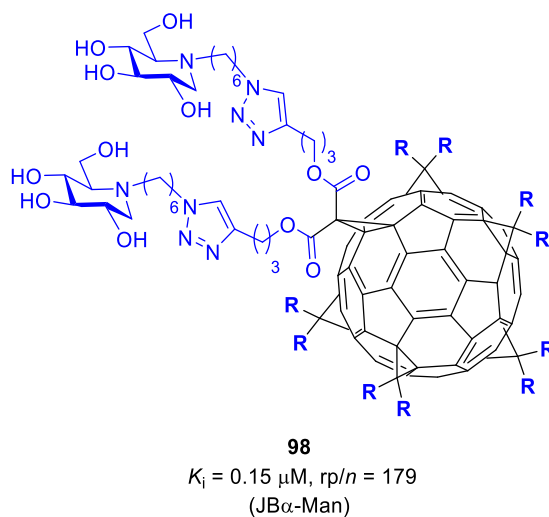
---

<sup>139</sup> Compain, P. Multivalent effect in glycosidase inhibition: the end of the beginning. *Chem. Rec.* **2020**, *20*,10–22.

<sup>140</sup> Nierengarten, J. –F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Muñoz, A.; Martín, N.; Rojo, J.; Sánchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Buffet, K.; Durka, M.; Vincent, S. P. Fullerene sugar balls. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3860-3862.

<sup>141</sup> Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J. –F. Glycosidase inhibition with fullerene iminosugar balls: a dramatic multivalent effect. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.



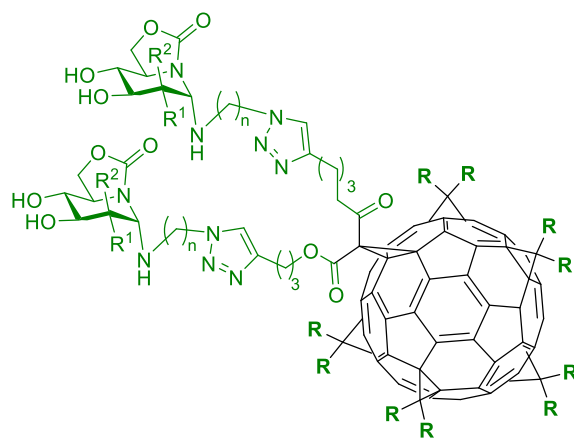


**Figura 31.** Fullerenos multiméricos sintetizados por Compain, Ortiz-Mellet y cols.

Los autores decidieron anclar la DNJ azidoalquil funcionalizada en una plataforma de fullereno dodecavalente *via* CuAAC. El compuesto **98** demostró no solo una elevada selectividad hacia JB $\alpha$ -Man sino también un elevado efecto multivalente ( $K_i = 0.15 \mu\text{M}$ ,  $rp = 2147$  y  $rp/n = 179$ ).

En el año 2013 los mismos autores sintetizaron los fullerenos multiméricos **99-102** mediante reacción CuAAC entre un fullereno funcionalizado con 12 grupos alquino y un iminoazúcar tipo  $sp^2$  con configuración DNJ, **99** y **100**, o DMJ (1-desoximanojirimicina) **101** y **102** (Figura 32).<sup>142</sup>

<sup>142</sup> Rísquez-Cuadro, R.; García Fernández, J. M.; Nierengarten, J. –F.; Ortiz Mellet, C. Fullerene- $sp^2$ -iminosugar balls as multimodal ligands for lectins and glycosidases: a mechanistic hypothesis for the inhibitory multivalent effect. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16791-16803.



- 99** ( $n = 6$ ,  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $K_i = 2.0 \mu\text{M}$ ,  $rp/n = 25$ )  
**100** ( $n = 9$ ,  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $K_i = 0.81 \mu\text{M}$ ,  $rp/n = 47$ )  
**101** ( $n = 6$ ,  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ,  $K_i = 0.085 \mu\text{M}$ ,  $rp/n = 4.4$ )  
**102** ( $n = 9$ ,  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ,  $K_i = 0.66 \mu\text{M}$ ,  $rp/n < 1$ )  
 (JB $\alpha$ -Man)

**Figura 32.** Fullerenos multiméricos derivados de iminoazúcares  $sp^2$ .

Aunque el efecto multivalente observado para estos derivados fue inferior al obtenido para el compuesto **98**, esta serie multimérica se utilizó para llevar a cabo ensayos competitivos enzima-lectina (ELLA, *enzyme-linked lectin assay*). Estos estudios fueron útiles para estudiar el mecanismo que origina el efecto multivalente observado y permitieron concluir que en la interacción inhibidor/enzima, además del sitio activo de la JB $\alpha$ -Man, también son relevantes las interacciones no específicas con otros sitios de la enzima de manera análoga a lo que ocurre en las interacciones carbohidrato/lectina.

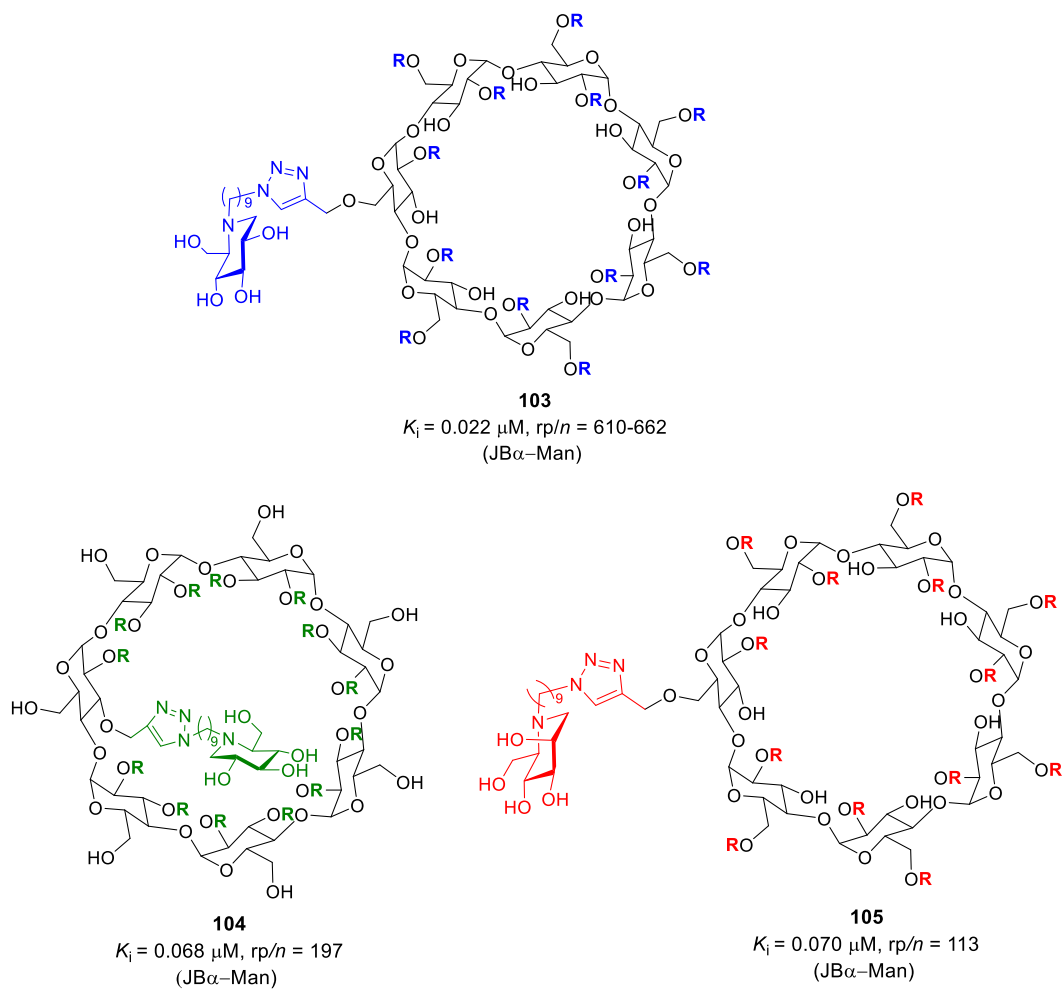
Otras plataformas particularmente adecuadas para la preparación de iminoazúcares multivalentes son las  $\beta$ -ciclodextrinas debido a la posibilidad de poder controlar la valencia y la orientación espacial de las estructuras sintetizadas. En este sentido, en 2011, estos autores llevaron a cabo la síntesis de inhibidores multivalentes de glicosidasas a partir de  $\beta$ -

ciclodextrinas utilizadas como plataformas funcionalizadas con unidades de DNJ.<sup>143</sup> De los nuevos inhibidores sintetizados, con valencia comprendida entre 7 y 14, los mejores resultados en términos de inhibición enzimática se obtuvieron para la ciclodextrina tetradecavalente **103** representada en la **Figura 33** (en azul). El multímero **103** es, de hecho, un inhibidor de JBA-Man con una  $K_i = 0.022 \mu\text{M}$  y un valor de  $rp/n$  comprendido entre 610 y 662, dependiendo del derivado monovalente utilizado como referencia. Con el objetivo de investigar el efecto de la configuración del iminoazúcar y su disposición en la plataforma sobre los valores de inhibición enzimática, los mismos autores sintetizaron otra serie de ciclodextrinas funcionalizadas con 14 unidades de DNJ (en verde) o DMJ (en rojo) (**Figura 33**).<sup>144</sup> Los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición enzimática hacia JBA-Man demostraron que tanto el cambio de la posición de las unidades de DNJ desde el exterior (compuesto **103**) hacia el interior (compuesto **104**) del anillo de ciclodextrina, así como el cambio de la configuración del iminoazúcar pasando de la DNJ (compuesto **103**) a la DMJ (compuesto **105**) resultaron en una disminución de los valores de  $rp/n$ . Estas observaciones confirmaron que, además de la valencia, también la configuración del iminoazúcar y su disposición en el molde tienen una influencia elevada en el efecto multivalente observado.

---

<sup>143</sup> Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. The multivalent effect in glycosidase inhibition: probing the influence of architectural parameters with cyclodextrin-based iminosugar “click” clusters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.

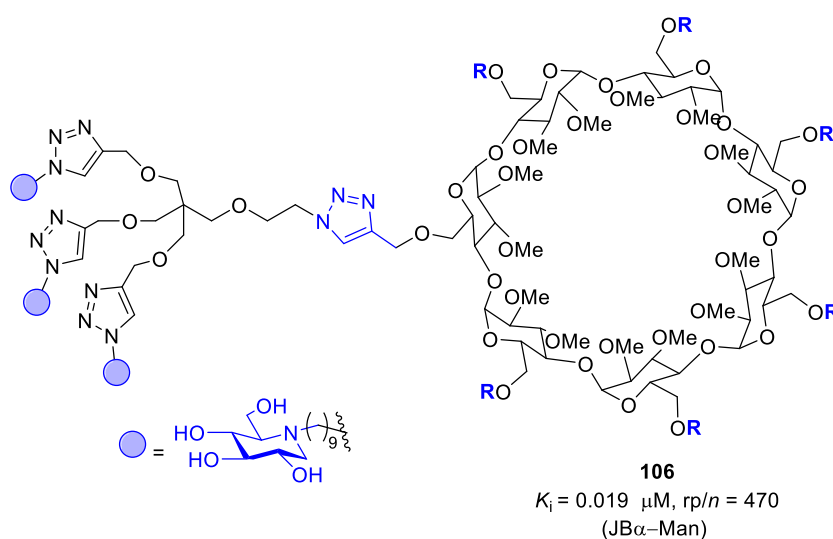
<sup>144</sup> Decroocq, C.; Joosten, A.; Sergent, R.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. The multivalent effect in glycosidase inhibition: probing the influence of valency, peripheral ligand structure, and topology with cyclodextrin-based iminosugar “click” clusters. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2038-2049.



**Figura 33.** Ciclodextrinas tetradecavalentes funcionalizadas con unidades de DNJ o DMJ.

En el año 2014, Compain y cols. sintetizaron el derivado de valencia 21 por reacción CuAAC entre una ciclodextrina funcionalizada en C-6 con grupos alquino y un dendrímero

trivalente derivado de DNJ. El compuesto **106** resultó ser un inhibidor potente de JB $\alpha$ -Man con un valor de  $K_i = 19$  nM y un valor de  $rp/n$  de 470 (**Figura 34**).<sup>145</sup>



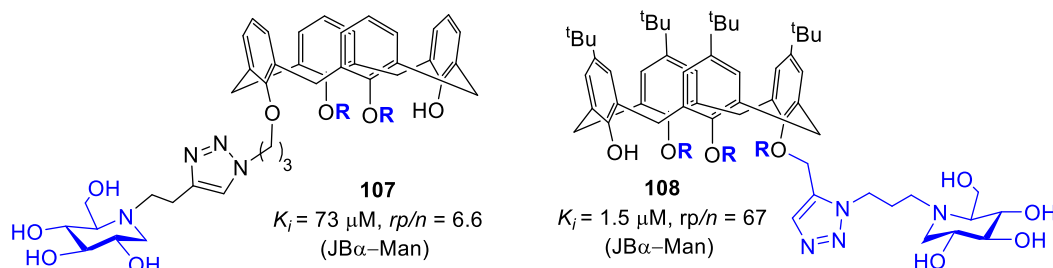
**Figura 34.** Iminoazúcar/ciclodextrina con valencia 21 descrita por Compain y cols.

Por otra parte, el grupo de Goti<sup>146</sup> y Gouin<sup>147</sup> utilizaron plataformas de calixarenos para la síntesis de inhibidores multivalentes derivados de la DNJ (**Figura 35**). Los derivados **107** y **108** resultaron ser inhibidores de JB $\alpha$ -Man en el rango micromolar.

<sup>145</sup> Joosten, A.; Schneider, J. P.; Lepage, M. L.; Tarnus, C.; Bodlener, A.; Compain, P. A convergent strategy for the synthesis of second-generation iminosugar clusters using “clickable” trivalent dendrons. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 1866-1872.

<sup>146</sup> Marradi, M.; Cicchi, S.; Sansone, F.; Casnati, A.; Goti, A. Low-generation dendrimers with a calixarene core and based on a chiral C<sub>2</sub>-symmetric pyrrolidine as iminosugar mimics. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 951-957.

<sup>147</sup> Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; García Moreno, M. I.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Šesták, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. Topological effects and binding modes operating with multivalent iminosugar-based glycoclusters and mannosidases. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18427-18435.

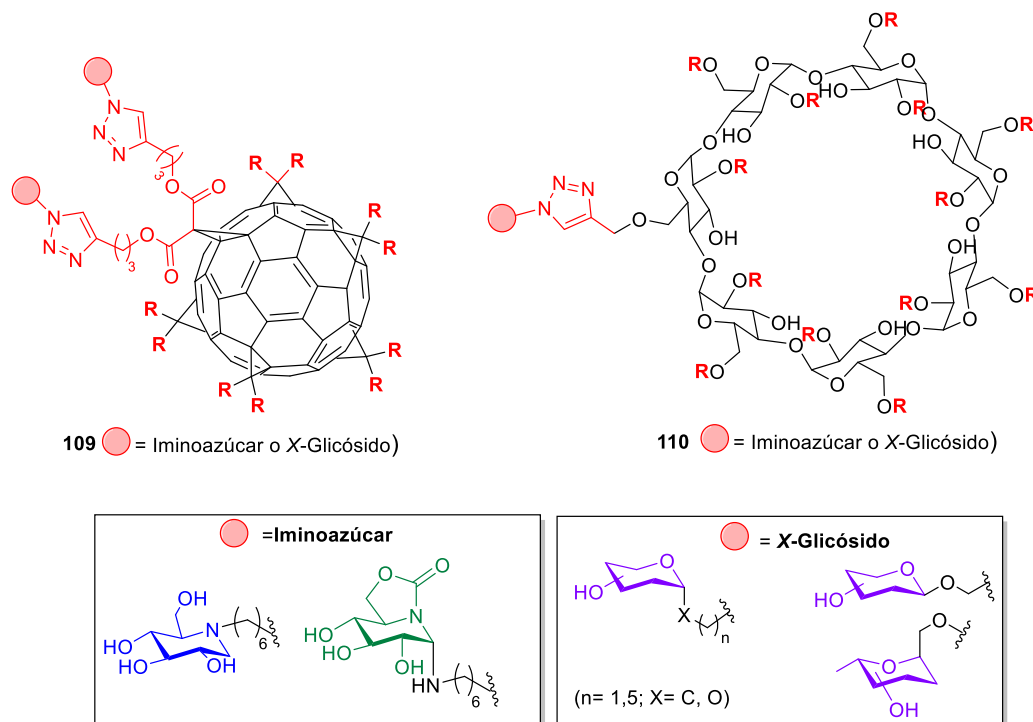


**Figura 35.** Ejemplo de calixarenos tetravalentes derivados de la DNJ.

Recientemente se ha descrito la síntesis de inhibidores multivalentes de glicosidasas basados en plataformas de fullereno (**109**) o ciclodextrinas (**110**) que incorporan iminoazúcares, glicósidos o una mezcla de ambos (heteromultímeros) (**Figura 36**).<sup>148</sup> Este estudio ha permitido comparar la afinidad de las glicosidasas hacia estructuras diferentes de los iminoazúcares como los *O/C*-glicósidos. Los resultados de inhibición enzimática han permitido concluir que, independientemente de la accesibilidad del sitio activo de la glicosidasa considerada, éstas siempre presentaron una mayor afinidad por los multímeros funcionalizados con iminoazúcares. En el caso de la JB $\alpha$ -Man, cuyo sitio activo es fácilmente accesible, el efecto multivalente observado puede ser debido a interacciones del multímero tanto con el sitio activo como con zonas no catalíticas de la enzima. Sin embargo, en glicosidasas cuyo sitio activo es menos accesible (como maltasa de levadura,  $\beta$ -glucosidasa

<sup>148</sup> a) García-Moreno, M. I.; Ortega-Caballero, F.; Rísquez-Cuadro, R.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. The impact of heteromultivalency in lectin recognition and glycosidase inhibition: an integrated mechanistic study. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6295-6304. b) Stauffert, F.; Bodlenner, A.; Trinh, T. M. N.; García-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J. -F.; Compain, P. Understanding multivalent effects in glycosidase inhibition using *C*-glycoside “click” clusters as molecular probes. *New. J. Chem.* **2016**, *40*, 7421-7430. c) Abellán Flos, M.; García Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Nierengarten, J. -F.; Vincent, S. P. Potent glycosidase inhibition with heterovalent fullerenes: unveiling the binding modes triggering multivalent inhibition. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11450-11460.

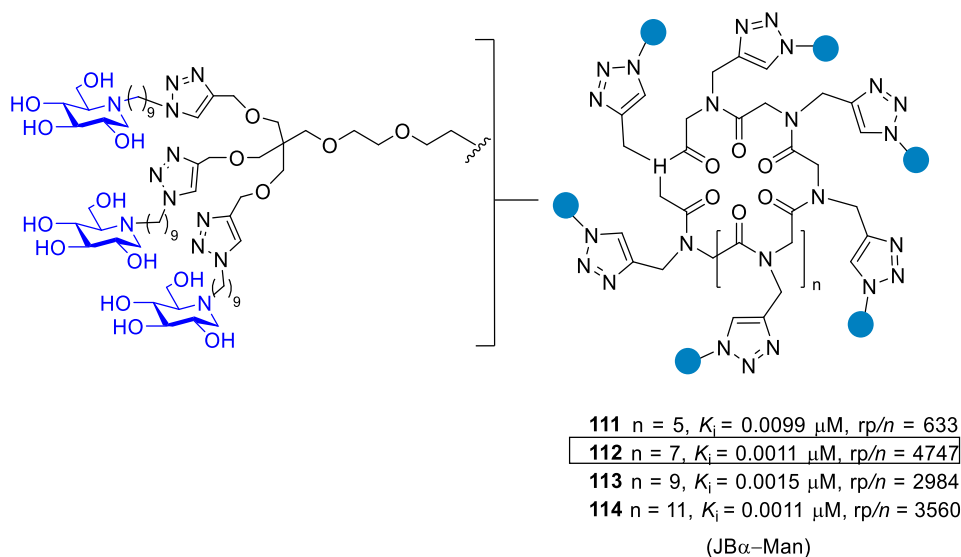
de almendras o  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café) dicho efecto se podría explicar en base a interacciones del multímero con sitios no catalíticos de la enzima.



**Figura 36.** Multímeros funcionalizados con iminoazúcares, glicósidos o una mezcla de ambos.

Compain y cols. han publicado la síntesis de multímeros obtenidos mediante reacción CuAAC entre un polialquínil-ciclopeptido y un azido-iminoazúcar trivalente derivado de la DNJ, originando inhibidores multivalentes de J $\beta$ -Man con valores excepcionales de rp/n (**Figura 37**).<sup>149</sup>

<sup>149</sup> Lepage, M. L.; Schneider, J. P.; Bodlenner, A.; Meli, A.; De Riccardis, F.; Schmitt, M.; Tarnus, C.; Nguyen-Huynh, N. -T.; Francois, Y. -N.; Leize-Wagner, E.; Birck, C.; Cousido-Siah, A.; Podjarny, A.; Izzo, I.; Compain, P. Iminosugar-cyclopeptoid conjugates raise multivalent effect in glycosidase inhibition at unprecedented high levels. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5151-5155.



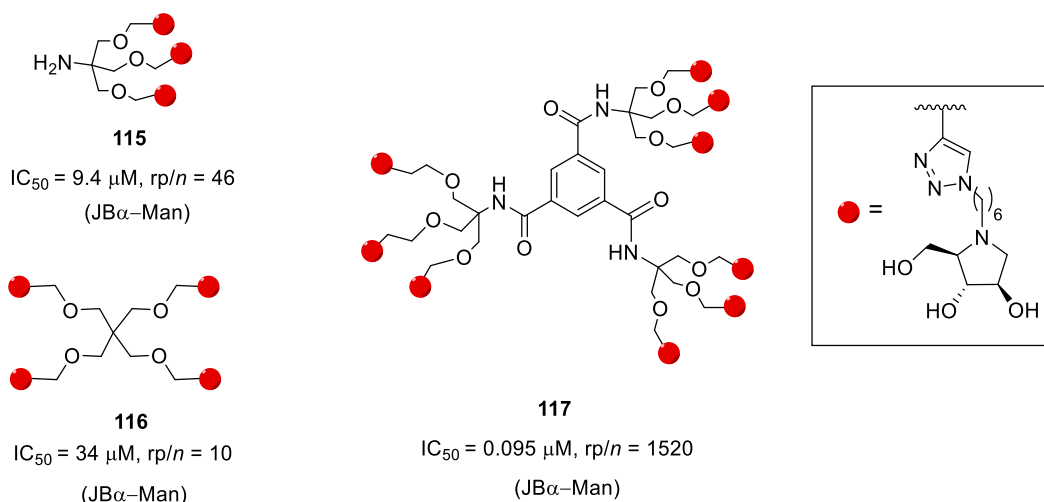
**Figura 37.** Ciclopéptidos multiméricos sintetizados por Compain y cols.

El compuesto **112** (valencia 36), con un valor de  $rp/n$  de 4747, demostró ser no solo un potente inhibidor de JB $\alpha$ -Man sino también el derivado con mayor efecto multivalente hacia una glicosidasa descrito hasta el momento. Cabe destacar que el aumento de la valencia en estos derivados (**112** vs **113-114**) no supuso una mejora de la actividad inhibidora.

Con el objetivo de explorar la actividad inhibidora de multímeros basados en iminoazúcares de tipo pirrolidínico, en 2017 Jiménez-Barbero, Cardona y cols.<sup>150</sup> sintetizaron multímeros derivados del 1,4-didesoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) con valencia 3, 4 y 9 (compuestos **115**, **116** y **117**, **Figura 38**).

<sup>150</sup> Mirabella, S.; D'Adamio, G.; Matassini, C.; Goti, A.; Delgado, S.; Gimeno, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J.; Šesták, S.; Jiménez-Barbero, J.; Cardona, F. Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to  $\alpha$ -mannosidases. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 14585-14596.



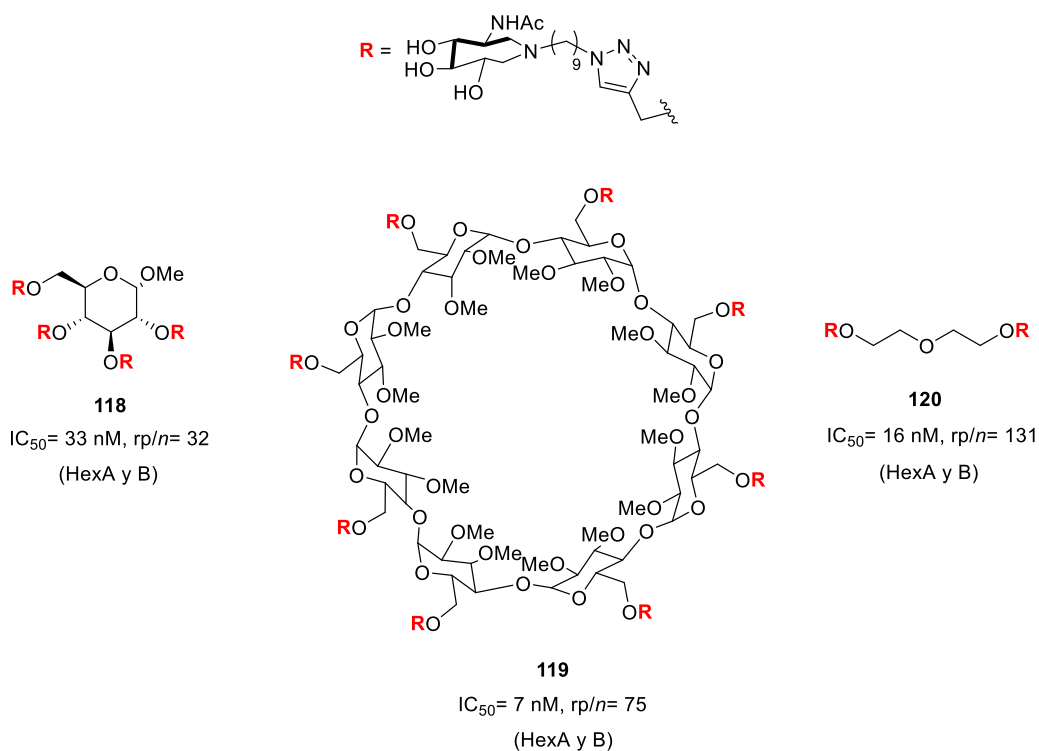


**Figura 38.** Iminoazúcares multivalentes derivados de DAB.

Todos los multímeros presentaron inhibición frente a JB $\alpha$ -Man, siendo el derivado nonavalente **117** el inhibidor más potente y con mayor efecto multivalente ( $rp/n = 1520$ ). La relación entre el aumento de la valencia y el efecto multivalente también se mantuvo para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -manosidasa II de Golgi (**115**  $rp/n = 42$ , **116**  $rp/n = 46$  y **117**  $rp/n = 78$ ). Este trabajo constituye el primer ejemplo de inhibición de JB $\alpha$ -Man por estructuras pirrolidínicas multiméricas en el que se observó un efecto multivalente considerable, pues hasta el momento siempre se habían utilizado derivados piperidínicos polihidroxilados como inhítopos.

A pesar de que la mayoría de ejemplos sobre multivalencia en la inhibición de glicosidasas se restringen a las  $\alpha$ -manosidasas, también hay que resaltar algún otro ejemplo sobre otras enzimas. Entre los más interesantes se encuentran los estudios de inhibición de hexosaminidasas con estructuras multiméricas, realizados por Bleriot, Gouin y cols. Estos autores publicaron en 2017 la síntesis de azepanos multiméricos que mostraron ser

inhibidores selectivos de  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasas lisosomales humanas (HexA y HexB).<sup>151</sup> Además de los buenos valores de inhibición enzimática (rango nanomolar), los compuestos **118-120** también mostraron efecto multivalente, siendo el *rp/n* presentado por el dímero **120** el mejor de la serie. Este derivado dimérico **120**, a pesar de su baja valencia, casi igualaba la potencia inhibidora del derivado octamérico de ciclodextrina **119** (**Figura 39**).



**Figura 39.** Azepanos multiméricos inhibidores selectivos de hexosaminidasas lisosomales humanas sintetizados por Bleriot, Gouin y cols.

<sup>151</sup> Álvarez-Dorta, D.; King, D. T.; Legigan, T.; Ide, D.; Adachi, I.; Deniaud, D.; Désiré, J.; Kato, A.; Vocadlo, D.; Gouin, S. G.; Blériot, Y. Multivalency to inhibit and discriminate hexosaminidasas. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9022-9025.

La aproximación multimérica también se ha abordado en el caso de las  $\alpha$ -fucosidasas. Estas enzimas se han convertido en los últimos años en un objetivo particularmente atractivo ya que sus inhibidores podrían ser utilizados en el control de procesos biológicos fundamentales como procesos infecciosos,<sup>152</sup> cancerosos,<sup>153</sup> así como en los procesos de fecundación.<sup>154</sup> Adicionalmente, se ha observado que la deficiencia de esta enzima origina una enfermedad de almacenamiento lisosomal conocida como fucosidosis que conduce a trastornos neuroviscerales.<sup>155</sup>

Nuestro grupo de investigación ha descrito la síntesis de iminoazúcares monovalentes derivados de dihidropirrolidinas y azafagominas polihidroxiladas, que presentaron inhibición de  $\alpha$ -fucosidasas en el rango bajo nM.<sup>156</sup> Como continuación de este trabajo, posteriormente se abordó el estudio de derivados di- y trivalentes, observándose un

---

<sup>152</sup> Hooper, L. V.; Gordon, J. I. Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*, **2001**, *11*, 1R–10R.

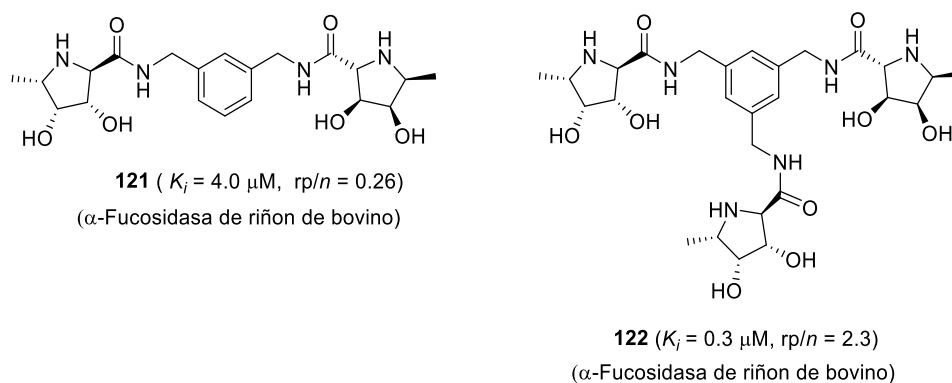
<sup>153</sup> a) Varriale, A.; Guardasole, V.; De Marco, G. Serum alpha-L-fucosidase activity and early detection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of patients with cirrhosis. *Cancer*, **1998**, *83*, 2468-2474. b) Fernández-Rodríguez, J.; Ayude, D.; De La Cadena, M. P.; Martínez-Zorzano, V. S.; De Carlos, A.; Caride-Castro, A.; De Castro, G.; Rodríguez-Berrocal, F. J.; Alpha-L-fucosidase enzyme in the prediction of colorectal cancer patients at high risk of tumor recurrence. *Cancer Detect. Prev.* **2000**, *24*, 143-149.

<sup>154</sup> Rao Veeramachaneni, D. N.; Smith, M. O.; Ellinwood, N. M. Deficiency of fucosidase results in acrosomal dysgenesis and impaired sperm maturation. *J. Androl.* **1998**, *19*, 444-449. b)

<sup>155</sup> Willems, P. J.; Seo, H. C.; Coucke, P.; Tonlorenzi, R.; O'Brien, J. S. Spectrum of mutations in fucosidosis. *Eur. J. Hum. Genet.* **1999**, *7*, 60-67.

<sup>156</sup> a) Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Mora, F.; Vogel, P.; Robina, I. Stereoselective synthesis of (2S,3S,4R,5S)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol derivatives that are highly selective  $\alpha$ -L-fucosidase inhibitors. *Chem. Commun.* **2005**, *39*, 4949-4951. b) Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Vera-Ayoso, Y.; Bello, C.; Vogel, P.; Robina, I. Synthesis of novel pyrrolidine 3,4-diol derivatives as inhibitors of  $\alpha$ -L-fucosidasas. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1192-1202. c) Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Alvarez, E.; Robina, I. Synthesis of novel 3-amino(hydroxy)methyl-L-fuco-azafagomines as leads for selective inhibitors of  $\alpha$ -L-fucosidasas. *Synlett*, **2010**, *9*, 1367-1370. d) Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Rodríguez-Carvajal, M. A.; Robina, I. Synthesis and inhibitory activities of novel C-3 substituted azafagomines: a new type of selective inhibitors of  $\alpha$ -L-fucosidasas. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4648-4660.

ligero efecto multivalente en el multímero **122** que presentaba una estructura pirrolidínica como inhítopo (**Figura 40**).<sup>157</sup>



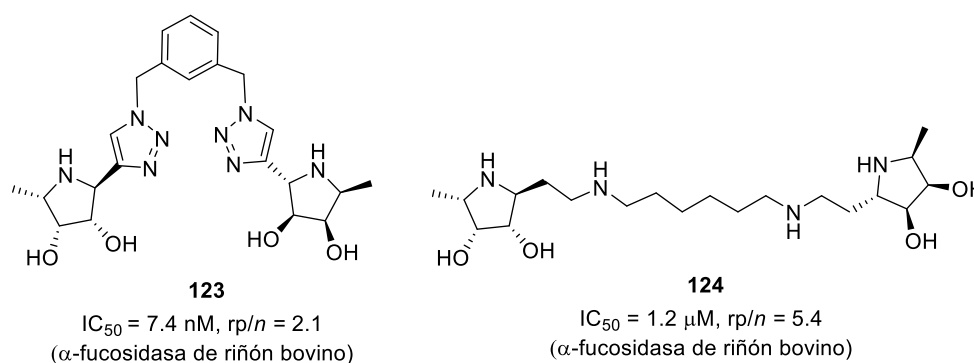
**Figura 40.** Inhibidores di- y trivalentes de  $\alpha$ -fucosidasa sintetizados por el grupo de investigación.

En un trabajo posterior del grupo, también orientado a la preparación de inhibidores divalentes de fucosidasas, se modificó el tipo de unión del inhítopo a la plataforma, incluyendo un triazol contiguo al núcleo pirrolidínico en lugar de una amida. La distancia entre el inhítopo y la plataforma se mantuvo corta, pues los indicios de multivalencia del trabajo previo mostraban mayor  $rp/n$  en estos casos que con espaciadores más largos.<sup>158</sup> De este modo, se preparó y evaluó el dímero **123** que, con un valor de  $K_i = 4 \text{ nM}$  ( $\text{IC}_{50} = 7.4 \text{ nM}$ ), se presentaba como uno de los inhibidores de  $\alpha$ -fucosidasa más potentes y selectivos basados en núcleos de pirrolidina sintetizados hasta la fecha. De la misma manera se preparó

<sup>157</sup> Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Molina, L.; Wright, D. W.; Davies, G. J.; Robina, I. Exploring a multivalent approach to  $\alpha$ -L-fucosidase inhibition. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 7328-7336.

<sup>158</sup> Hottin, A.; Carrión-Jiménez, S.; Moreno-Clavijo, E.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Robina, I.; Behr, J. B. Expanding the library of divalent fucosidase inhibitors with polyamino and triazole-benzyl bridged bispyrrolidines. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3212-3220.

y evaluó el dímero **124** cuyo valor de  $rp/n$  (5.4) lo convierte en el inhibidor de  $\alpha$ -fucosidasa con mayor efecto multivalente descrito hasta el momento (**Figura 41**).



**Figura 41.** Inhibidores de  $\alpha$ -fucosidasa diméricos basados en inhítopos pirrolidínicos: el más potente (**123**) y el de mayor efecto multivalente (**124**) descritos hasta el momento.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito la síntesis de una librería química de iminoazúcares multiméricos derivados de pirrolidinas dihidroxiladas y su evaluación biológica frente a  $\alpha$ -galactosidasa A humana ( $\alpha$ -Gal A) y a  $\beta$ -glucocerebrosidasa lisosomal (GCasa).<sup>159</sup> Algunas de las estructuras multivalentes descritas presentaron inhibición potente frente a la GCasa lisosomal ( $K_i = 0.77$ - $5.4 \text{ }\mu\text{M}$ ), sin embargo, el efecto multivalente observado en el mejor de los casos fue bajo ( $rp/n = 8.6$ ). Esto contrasta con los resultados encontrados frente a la  $\alpha$ -Gal A, donde el derivado noavalente **125** ( $K_i = 0.20 \text{ }\mu\text{M}$ ) mostró una inhibición 375 veces más potente que la del monómero de referencia **126** ( $K_i = 75 \text{ }\mu\text{M}$ ) y un valor de  $rp/n$  de 42. Es de destacar que el compuesto **125** constituye el primer

<sup>159</sup> Martínez-Bailen, M.; Carmona, A. T.; Cardona, F.; Matassini, C.; Goti, A.; Kubo, M.; Kato, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J. Synthesis of multimeric pyrrolidine iminosugar inhibitors of human  $\beta$ -glucocerebrosidase and  $\alpha$ -galactosidase A: First example of a multivalent enzyme activity enhancer for Fabry disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *192*, 112173.



aumentó 5.2 veces la actividad de  $\alpha$ -Gal A humana, constituyendo así el primer ejemplo de compuesto multivalente capaz de aumentar la actividad de esta enzima en fibroblastos de pacientes de Fabry.

## 2.2. OBJETIVOS

El trabajo que se desarrolla en este capítulo está relacionado con la puesta a punto de la metodología de síntesis en paralelo seguida de evaluación biológica *in situ* para la búsqueda rápida de inhibidores multivalentes de glicosidasas, y tiene tres objetivos principales:

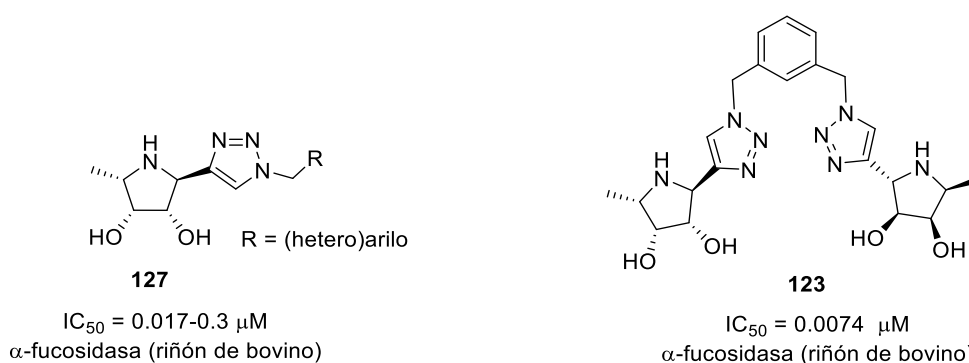
- Como extensión del trabajo previamente desarrollado en nuestro laboratorio sobre inhibidores monovalentes de  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino, en este capítulo se plantea la síntesis y el estudio preliminar de estructuras di- y trivalente modelo que nos permitan evaluar el posible efecto multivalente y plantear la creación de librerías químicas de nuevos inhibidores multivalentes de  $\alpha$ -fucosidasas. La metodología a emplear para la generación de las nuevas librerías se basará en reacciones en paralelo de CuAAC seguidas de evaluación *in situ* de los compuestos obtenidos. Los mejores inhibidores se prepararán a mayor escala para llevar a cabo un estudio más detallado de su actividad inhibidora.
- Siendo el compuesto **75i** descrito en el capítulo 1 el primer ejemplo de inhibidor de tipo pirrolizidínico no solo potente sino también selectivo frente a la  $\alpha$ -galactosidasa A humana, en este capítulo se plantea la síntesis de dos compuestos diméricos modelo análogos de **75i** para evaluar el posible efecto multivalente en la inhibición y plantear la posibilidad de generar una librería de dímeros divalentes que pudiera ser evaluada *in situ*.
- Con el objetivo de extender el estudio sobre los inhibidores monovalentes de HexB humana descrito en el capítulo 1, nos planteamos la síntesis de estructuras divalentes derivadas de pirrolidinas dihidroxiladas. La posterior generación de librerías químicas por reacciones *click*, seguido de evaluación *in situ* frente a dos hexosaminidasas humanas, HexB y OGA, permitirá identificar no solo los compuestos más potentes, sino también los que presenten una mayor selectividad en la inhibición HexB/OGA.



## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Síntesis y evaluación *in situ* de estructuras multivalentes derivadas de pirrolidín-triazoles como inhibidores de $\alpha$ - fucosidasas.

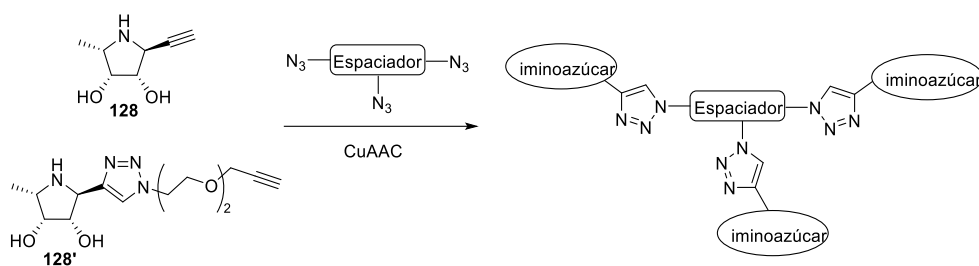
Los excelentes resultados previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación en relación a los inhibidores monovalentes de  $\alpha$ -fucosidasas y los resultados preliminares sobre inhibidores multivalentes de esta enzima son la base para abordar el trabajo que se presenta en este apartado sobre derivados di- y trivalentes estructuralmente relacionados con los compuestos de tipo pirrolidín-triazol **127** y **123** (Figura 43).<sup>160</sup>



**Figura 43.** Antecedentes relevantes de inhibidores de  $\alpha$ -fucosidasas sintetizados en el grupo de investigación.

<sup>160</sup> a) Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)-triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904. b) Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Molina, L.; Wright, D. W.; Davies, G. J.; Robina, I. Exploring a multivalent approach to  $\alpha$ -L-fucosidase inhibition. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 7328-7336. c) Hottin, A.; Carrión-Jiménez, S.; Moreno-Clavijo, E.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Robina, I.; Behr, J. B. Expanding the library of divalent fucosidase inhibitors with polyamino and triazole-benzyl bridged bispyrrolidines. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3212-3220.

Con el objetivo de analizar si los valores de inhibición mejoraban al aumentar la valencia del derivado multivalente, nos planteamos la síntesis de una pequeña librería preliminar de análogos trivalentes. La estrategia sintética implica reacciones de CuAAC entre las pirrolidinas-alquino **128** y **128'** y plataformas trivalentes funcionalizadas con grupos azido terminales (**Esquema 36**). La pirrolidina-alquino **128'** presenta un espaciador que incorpora una cadena de dietilenglicol para mejorar la solubilidad del compuesto en medios acuosos y que, a su vez, permitirá evaluar cómo afecta la distancia entre el inhibidor y la plataforma a los valores de inhibición.

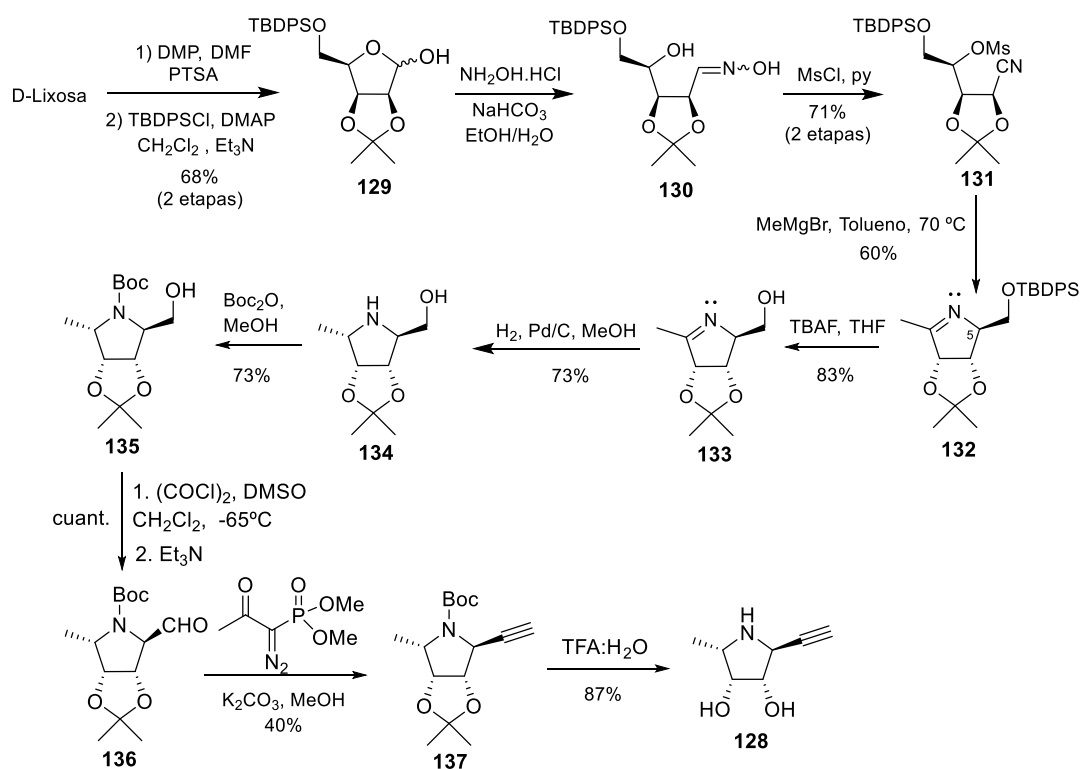


**Esquema 36.** Estrategia sintética para la preparación de iminoazúcares trivalentes.

La síntesis de la alquini-pirrolidina **128** se ha llevado a cabo siguiendo un procedimiento previamente descrito en el grupo de investigación.<sup>161</sup> Así, la reacción de acetona de la D-lixosa con 2,2-dimetoxipropano y PTSA catalítico seguida de tratamiento con cloruro de *tert*-butildifenilsililo originó el lactol protegido **129**. La posterior reacción con hidrocloreto de hidroxilamina en medio básico originó la mezcla de oximas **130**, las cuales se sometieron a un proceso de deshidratación/mesilación con cloruro de mesilo para originar

<sup>161</sup> Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)-triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904.

el compuesto **131** (*Esquema 37*). La reacción del compuesto organometálico MeMgBr con el nitrilo **131** transcurre mediante una adición nucleófila al grupo ciano seguida de ciclación mediante desplazamiento nucleofílico intramolecular que permite obtener la pirrolina **132**. El tratamiento de **132** con TBAF/THF originó el derivado 5-hidroximetílico **133** cuya hidrogenación a alta presión (220 psi) en presencia del sistema catalítico Pd/C (10%) condujo al compuesto **134** de manera totalmente estereoselectiva (*Esquema 37*).

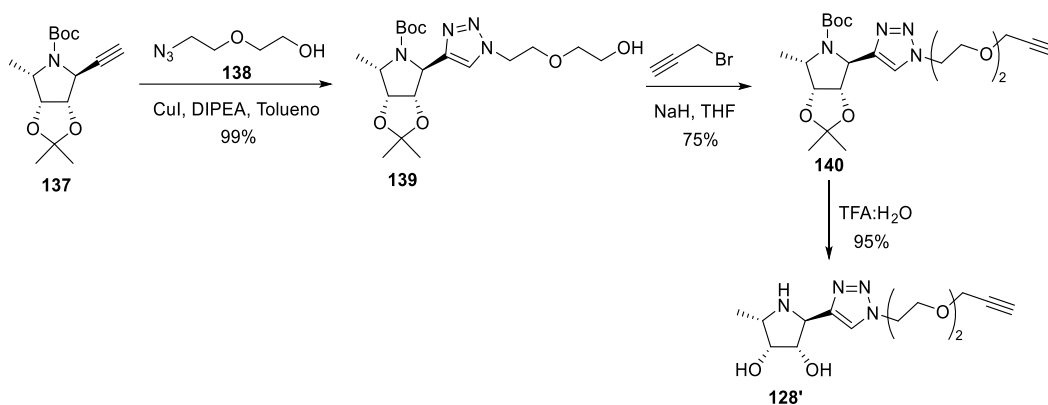


**Esquema 37.** Síntesis de la alquini-pirrolidina **128**.

La protección del derivado **134** con Boc<sub>2</sub>O en MeOH seguido de reacción de oxidación de Swern dio lugar al aldehído **136**, el cual, tras tratamiento con el reactivo de Bestmann-

Ohira, originó la alquilpirrolidina **137**. Finalmente, la reacción de desprotección con ácido trifluoroacético acuoso originó la pirrolidina **128**.

Por otra parte, la síntesis de la pirrolidina-alquino **128'** se llevó a cabo a partir del derivado protegido **137**. La reacción CuAAC con la azida **138**<sup>162</sup> seguido de reacción de propargilación originó el alquino derivado **140** que tras reacción de desprotección ácida dio lugar a **128'** (*Esquema 38*).

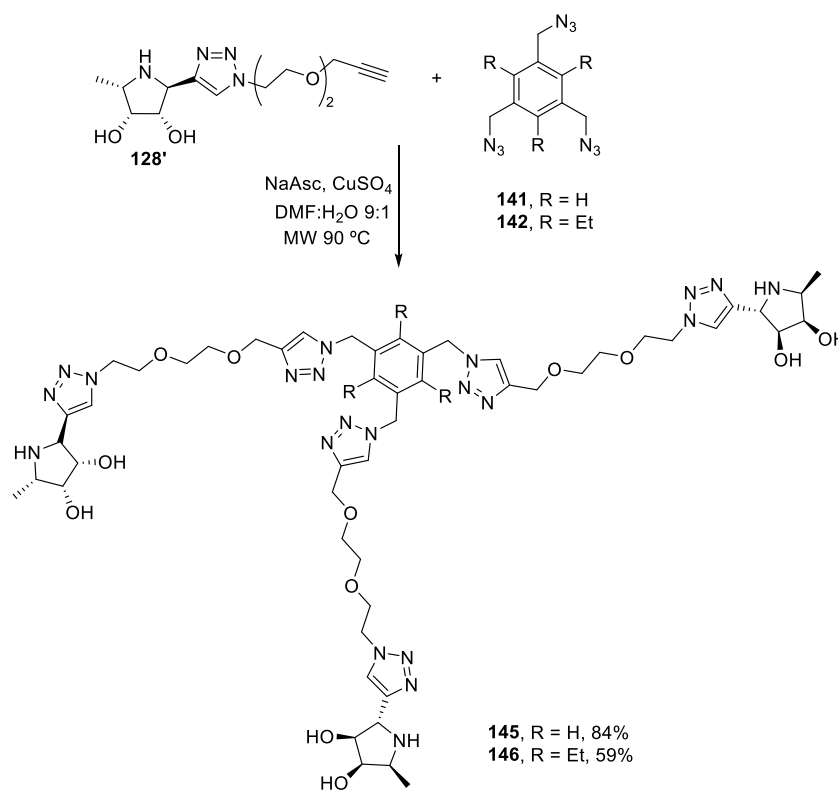


*Esquema 38.* Síntesis de la pirrolidina-alquino **128'**.

Para la síntesis de los derivados trivalentes se utilizaron como plataformas el 1,3,5-tris(azidometil)benceno **141** y el 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno **142**, preparados a partir de los correspondientes 1,3,5-tris(bromometil)-derivados comerciales por reacción con  $\text{NaN}_3$  (*Esquema 39*).

<sup>162</sup> Aucagne, V.; Valverde, I. E.; Marceau, P.; Galibert, M.; Dendane, N.; Delmas, A. F. Towards the simplification of protein synthesis: iterative solid-supported ligations with concomitant purifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11320-11324.





**Esquema 41.** Síntesis de los iminoazúcares trivalentes **145** y **146**.

Con el objetivo de evaluar la posible existencia de efecto multivalente en la inhibición de  $\alpha$ -fucosidasas, se tomaron como referencias el compuesto monovalente **147**, previamente preparado en el grupo de investigación,<sup>163</sup> y el derivado **148** (**Figura 44**).

<sup>163</sup> Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)-triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904.



acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack. Todos los compuestos evaluados presentaron una inhibición potente y selectiva frente a la  $\alpha$ -fucosidasa (>95% inhibición a una concentración 1 mM de inhibidor), no presentando inhibición significativa frente al resto de enzimas ensayadas. En la **Tabla 2** se muestran los valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos **143-148** frente a  $\alpha$ -fucosidasa de riñón de bovino. El monómero **147** se había preparado y evaluado con anterioridad en el grupo de investigación.<sup>164</sup>

**Tabla 2.** Valores de IC<sub>50</sub> (nM) para los derivados **143-148** frente a  $\alpha$ -fucosidasa de riñón de bovino.

Enzima	<b>143</b>	<b>144</b>	<b>145</b>	<b>146</b>	<b>147</b>	<b>148</b>
$\alpha$ -fucosidasa (riñón de bovino)	49	40	72	110	300 <sup>a</sup>	17

<sup>a</sup>Dato extraído de la ref. 164

Todos los compuestos evaluados presentaron valores de IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar. Si se tienen en cuenta los IC<sub>50</sub> determinados para las parejas de derivados triméricos **143/145** (49 y 72 nM respectivamente) y **144/146** (40 y 110 nM respectivamente), se puede concluir que no existe una diferencia significativa entre las dos plataformas utilizadas. Adicionalmente se observa que los derivados que presentan el fragmento de iminoazúcar más próximo a la plataforma aromática (**143** y **144**) resultaron ser ligeramente mejores inhibidores que sus análogos **145/146** (IC<sub>50</sub> = 49 y 40 nM vs IC<sub>50</sub> = 72 y 110 nM).

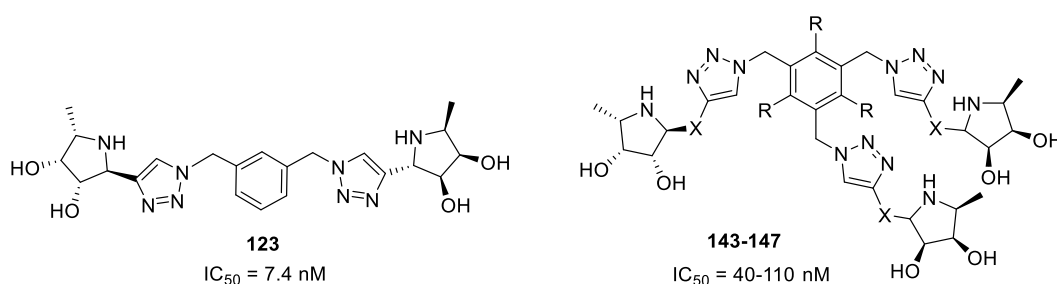
Considerando que el monómero **147** es el más adecuado para analizar la multivalencia en el caso de los derivados trivalentes **143** y **144**, obtendríamos unos valores

<sup>164</sup> Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)-triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904.



de  $rp/n$  de 2.0 y 2.5 respectivamente, lo que supone la existencia de un débil efecto multivalente ( $rp/n > 1$ ). En el caso de los trímeros **145** y **146**, la comparación con el derivado monovalente de referencia **148** muestra que este compuesto es 4-6 veces mejor inhibidor que los correspondientes derivados triméricos, lo que descarta la existencia de efecto multivalente.

Aunque los derivados trivalentes sintetizados resultaron ser inhibidores potentes y selectivos de  $\alpha$ -fucosidasas, los valores de  $IC_{50}$  presentados (40-110 nM) son superiores a los mostrados por el análogo divalente (compuesto **123**) previamente sintetizado en el grupo (**Figura 45**).<sup>165</sup>



**Figura 45.** Comparación de la actividad inhibitora frente a  $\alpha$ -fucosidasa de los derivados di- y trivalentes.

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar, que, en este caso, un aumento de la valencia del múltimero no conduce a un aumento de la potencia de inhibición. De este modo, con el objetivo de llevar a cabo el análisis estructura-actividad de una forma rápida y eficaz, decidimos utilizar la metodología de síntesis paralela seguida de evaluación biológica *in situ*, previamente utilizada en el grupo a nivel monovalente, para la preparación

<sup>165</sup> Hottin, A.; Carrión-Jiménez, S.; Moreno-Clavijo, E.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Robina, I.; Behr, J.-B. Expanding the library of divalent fucosidase inhibitors with polyamino and triazole-benzyl bridged bispyrrolidines. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3212-3220.

de una colección de inhibidores divalentes de  $\alpha$ -fucosidasa. Para ello, llevamos a cabo reacciones CuAAC entre las pirrolidinas-alquino **128** y **128'** y una colección de diazidas de diferente estructura (**a-I**, **Esquema 43**) a fin de evaluar el efecto de una amplia variedad de espaciadores sobre los valores de inhibición. Las diazidas **a-I** se sintetizaron en una etapa de reacción a partir de productos de partida comerciales siguiendo métodos convencionales.<sup>166</sup> La síntesis de las librerías **IIIA (128a-I)** y **IIIB (128'a-I)** se llevó a cabo mediante reacciones CuAAC en paralelo utilizando  $\text{CuSO}_4$ , ascorbato sódico y una mezcla  ${}^t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$  como disolvente. Tras 20 horas a t.a. se observó conversión completa por c.c.f. y espectrometría de masas (ESI-MS), detectándose la presencia de los correspondientes derivados diméricos. A continuación, los crudos de reacción se diluyeron con agua y se transfirieron a placas multipocillo para su evaluación como inhibidores de  $\alpha$ -fucosidasas tanto de riñón bovino como de *Homo sapiens*. En el caso de la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino, teniendo en cuenta que los monómeros análogos de tipo **127 (Figura 43)** habían mostrado previamente una inhibición muy potente a esta enzima,<sup>167</sup> las diluciones se hicieron de tal manera que resultara una concentración de inhibidor final en pocillo de solo  $0.12 \mu\text{M}$ , mientras que en el caso de la  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens*, la concentración final de inhibidor en cada pocillo fue de  $5.0 \mu\text{M}$ . Con estas concentraciones finales se llevó a cabo la medida del porcentaje de inhibición (**Esquema 43**).

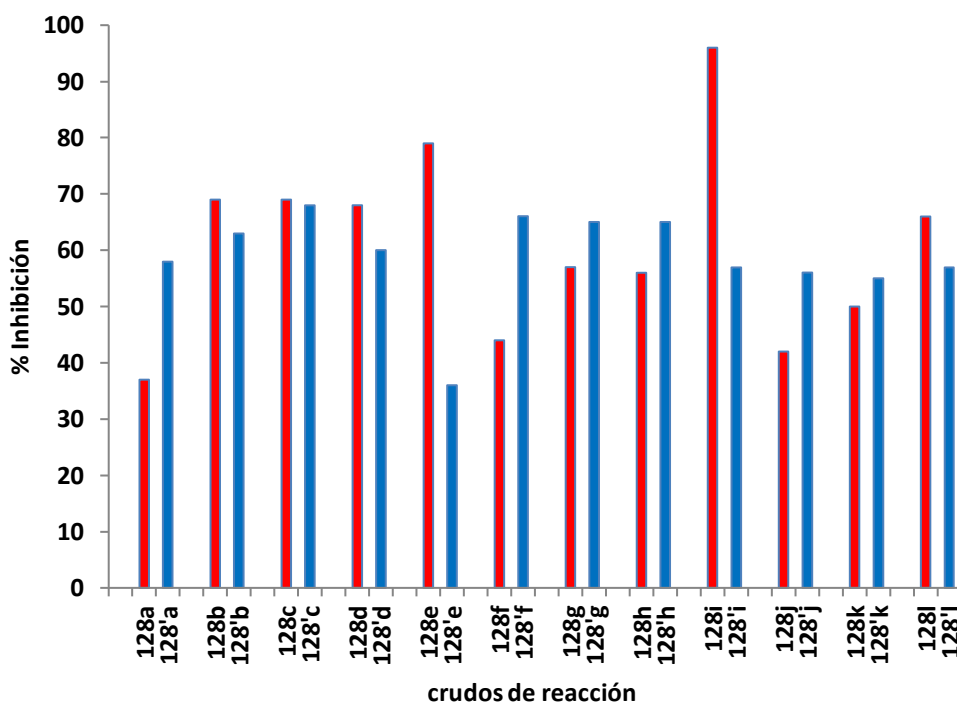
---

<sup>166</sup> Ver Experimental section.

<sup>167</sup> Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by in situ screening of a library of (pyrrolidin-2-yl)-triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898-5904.



Los resultados de inhibición obtenidos por los derivados de ambas librerías **IIIA** (**128a-l**) y **IIIB** (**128'a-l**) frente a  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino se muestran en la **Figura 46**, representándose el porcentaje de inhibición a una concentración 0.12  $\mu$ M de inhibidor en pocillo. La incorporación de los resultados obtenidos en ambas librerías en el mismo gráfico permite además evaluar la influencia de la longitud del espaciador presente en el iminoazúcar en la inhibición enzimática.



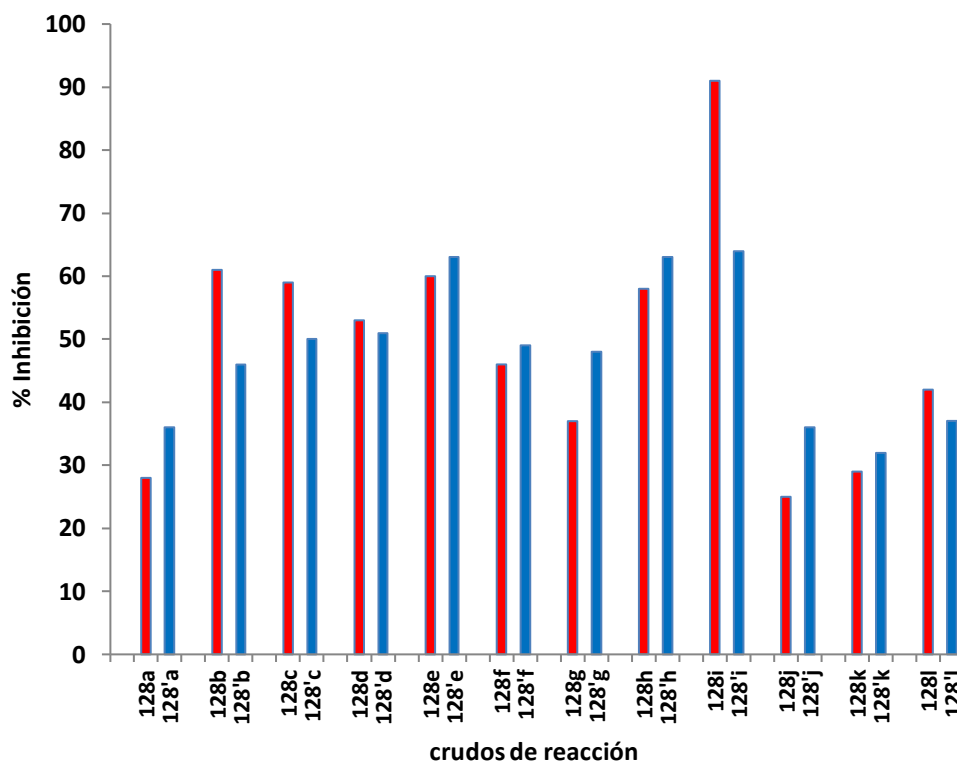
**Figura 46.** Inhibición (%) de los compuestos de las librerías **IIIA** (en rojo) y **IIIB** (en azul) frente a  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino (pH 6, 37 °C) a una concentración 0.12  $\mu$ M de inhibidor.

De los resultados de inhibición obtenidos se pueden hacer varias observaciones:

A) No se observan diferencias significativas entre miembros análogos de ambas librerías, a excepción de las parejas **128e/128'e** y **128i/128'i**. En ambos casos, los derivados con espaciadores más cortos (**128e** y **128i**) resultaron ser inhibidores mucho más potentes que sus homólogos con el espaciador más largo **128'e** y **128'i**.

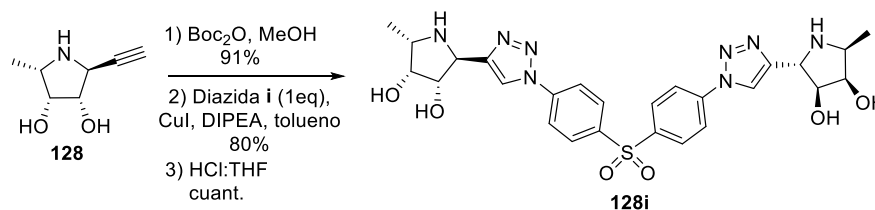
B) Los valores de porcentaje de inhibición muestran que en cada una de las dos librerías químicas no hay diferencias relevantes debidas a la naturaleza del espaciador proveniente de la diazida inicial (aromática/cadena alquímica larga/cadena de polietilenglicol) excepto para el compuesto **128i** que destaca claramente como el compuesto más activo (96% de inhibición a 0.12  $\mu\text{M}$ ).

En la **Figura 47** se muestran los porcentajes de inhibición de las dos librerías de compuestos diméricos frente a la  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens*. Como se ha mencionado anteriormente, la afinidad de estos compuestos hacia la  $\alpha$ -fucosidasa recombinante humana (*Homo sapiens*) fue menor que frente a la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino, por lo que los porcentajes de inhibición de ambas librerías químicas se midieron en este caso a una concentración final de inhibidor en pocillo de 5.0  $\mu\text{M}$ . En los valores de inhibición frente a la  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens* se observa una gran similitud con respecto a los obtenidos en la inhibición de la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón de bovino, destacando de nuevo el dímero **128i** como el inhibidor más potente (91% de inhibición a 5.0  $\mu\text{M}$ ).



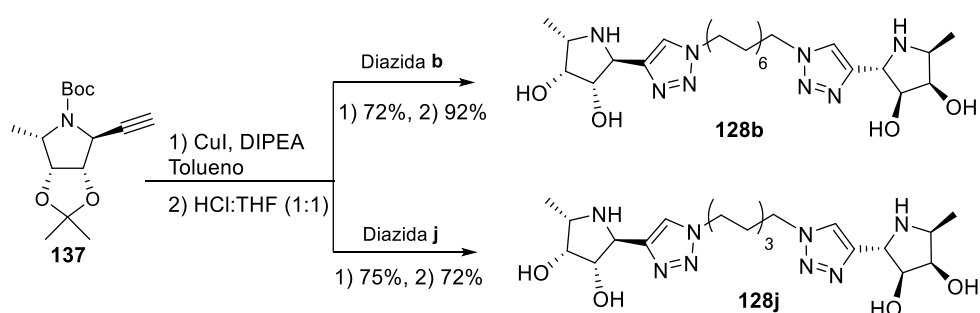
**Figura 47.** Inhibición (%) de los compuestos de las librerías IIIA y IIIB frente a  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens* (pH 4, 37 °C) a una concentración 5.0  $\mu$ M de inhibidor.

Para llevar a cabo un estudio de inhibición más completo, el derivado **128i** se sintetizó de manera convencional a mayor escala y se purificó cromatográficamente (**Esquema 44**).



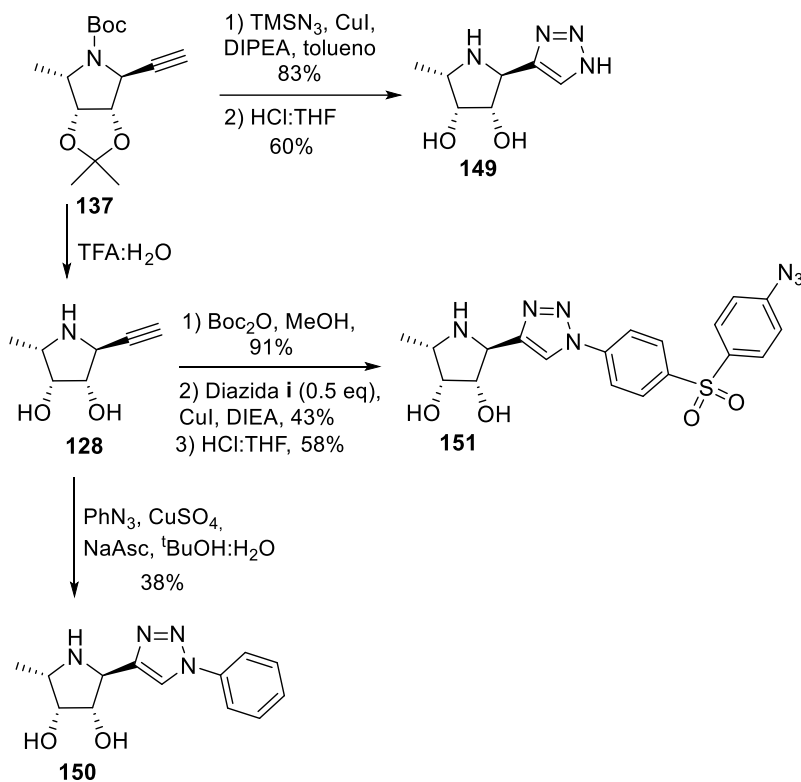
**Esquema 44.** Síntesis del derivado divalente **128i**.

Adicionalmente, y con el objetivo de comprobar la validez de la metodología, también se prepararon a mayor escala algunos de los dímeros que presentaron porcentajes de inhibición más bajos, en concreto los dímeros **128b** y **128j** (*Esquema 45*). Estos derivados se obtuvieron con buen rendimiento tras reacción CuAAC entre la alquínil pirrolidina **128** y las diazidas **b** y **j** respectivamente, seguido de desprotección ácida.



*Esquema 45.* Síntesis de los derivados divalentes **128b** y **128j**.

Además, con el objetivo de evaluar la posible existencia de efecto divalente, se sintetizaron también los derivados monovalentes **149**, **150** y **151**. La reacción CuAAC entre la alquínilpirrolidina **137** y  $\text{TMSN}_3$  en presencia de CuI y DIPEA seguido de desprotección ácida originó la triazolil pirrolidina **149** con buen rendimiento. Por otra parte, la síntesis de **150** se llevó a cabo por reacción de la alquínilpirrolidina desprotegida **128** con fenilazida en presencia de  $\text{CuSO}_4$  y ascorbato sódico en una mezcla  $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ . Finalmente, la reacción de protección de **128** con  $\text{Boc}_2\text{O}$  en MeOH seguido de reacción “monoclick” con la diazida **i** y desprotección ácida originó del derivado **151** (*Esquema 46*).



**Esquema 46.** Síntesis de los derivados monovalentes **149**, **150** y **151**.

Los derivados divalentes **128b**, **128j**, **128i** y los derivados monovalentes **149-151** se evaluaron frente a las dos  $\alpha$ -fucosidasas en estudio (riñón bovino y *Homo sapiens*) y frente a otras ocho glicosidasas comerciales con el objetivo de determinar la potencia y selectividad de inhibición (**Tabla 3**). Todos los derivados resultaron ser inhibidores selectivos de  $\alpha$ -fucosidasas con mayor afinidad frente a la proveniente de riñón de bovino ( $IC_{50}$  en el rango nM). Si se analizan los valores de  $IC_{50}$  de los derivados diméricos **128b**, **128j**, **128i** se puede confirmar la tendencia encontrada en las gráficas correspondientes a la evaluación *in situ* (**Figuras 46, 47**). Así, el dímero **128i** presentó un valor de  $IC_{50}$  de 0.48 nM, siendo un inhibidor 100 veces más potente que el dímero **128b** ( $IC_{50}$  = 47 nM) y 250 veces más potente que el



dímero **128j** ( $IC_{50} = 0.12 \mu M$ ), lo que confirma la validez de la metodología de análisis *in situ* utilizada para encontrar el mejor inhibidor dimérico.

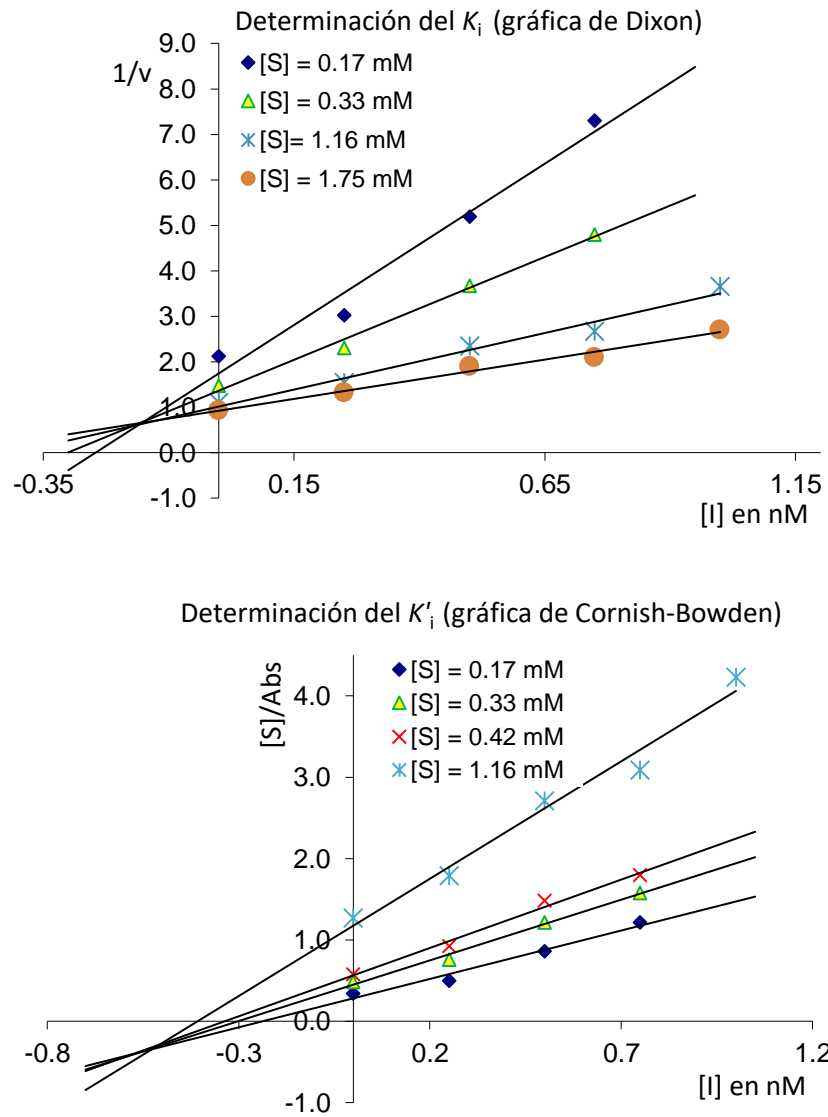
**Tabla 3.**  $IC_{50}$  (y  $K_i$ ) en  $\mu M$  para la inhibición de  $\alpha$ -fucosidasas por los dímeros **128b**, **128j**, **128i** y los derivados monovalentes **149-151** al pH óptimo de cada enzima y  $37^\circ C$ .<sup>168</sup>

Compuesto	$\alpha$ -fucosidasa (riñón bovino)	$\alpha$ -fucosidasa ( <i>Homo sapiens</i> )
Monómero <b>149</b>	1.0 ( $K_i = 0.30, K'_i = 4.2$ )	70 ( $K_i = 18, K'_i = 34$ )
Monómero <b>150</b>	0.019 ( $K_i = 0.0068, K'_i = 0.066$ )	4.2 ( $K_i = 0.86, K'_i = 5.5$ )
Monómero <b>151</b>	0.0011 ( $K_i = 0.0002, K'_i = 0.001$ )	0.54 ( $K_i = 0.073, K'_i = 0.58$ )
Dímero <b>128i</b>	0.00048 ( $K_i = 0.00015, K'_i = 0.00052$ )	0.21 ( $K_i = 0.060, K'_i = 0.15$ )
Dímero <b>128b</b>	0.047 ( $K_i = 0.015, K'_i = 0.240$ )	6.8 ( $K_i = 2.5, K'_i = 7.1$ )
Dímero <b>128j</b>	0.12 ( $K_i = 0.043, K'_i = 0.132$ )	26 ( $K_i = 4.8, K'_i = 11.1$ )

<sup>168</sup> a) No se detectó inhibición (a 0.1 mM de inhibidor) frente a  $\alpha$ -manosidasa (Jack bean),  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (Jack bean),  $\alpha$ -galactosidasa (granos de café), amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*),  $\alpha$ -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae*),  $\beta$ -glucosidasa (almendras y arroz) y  $\beta$ -manosidasa (caracol). b) Se observó inhibición mixta para la inhibición de ambas  $\alpha$ -fucosidasas de acuerdo con los gráficos de Lineweaver-Burk. Se representa la constante de inhibición ( $K_i$ ) correspondiente a la inhibición de tipo competitivo; para la inhibición de tipo no competitivo, también se representa la correspondiente constante de inhibición aparente ( $K'_i$ ).

Los derivados monovalentes **149** y **150** presentaron valores de  $IC_{50}$  frente a la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino de 1.0 y 0.019  $\mu$ M respectivamente, lo que confirma la influencia del residuo aromático presente en **150** en la inhibición de esta enzima. Considerando el derivado de *N*-feniltriazol **150** como la referencia más apropiada para determinar el efecto multivalente de **128i**, el valor de  $rp$  sería 39.6 ( $rp/n = 19.8$ ), lo que indicaría la existencia de efecto multivalente. Sin embargo, la elevada inhibición presentada por el monómero **151** ( $IC_{50} = 1.1$  nM) demuestra que el resto de sulfonildifenilo es fundamental en la inhibición de la enzima, siendo **151** 17 veces mejor inhibidor que el derivado monovalente **150**. Por ello, si se elige **151** como monómero referencia, se obtendría un valor de  $rp/n$  de 1.1, lo que descartaría la existencia de efecto multivalente en la inhibición del dímero **128i** (el efecto multivalente se observa para  $rp/n > 1$ ). Estos datos son un claro ejemplo de las discrepancias observadas en muchos casos en la determinación del efecto multivalente ya que los valores de  $rp/n$  dependen en gran medida de la estructura monovalente elegida como referencia ( $rp/n = 1.1$ , 19.8 o incluso 1042 eligiendo **151**, **150** ó **149**, respectivamente, como referencias). Aunque los derivados divalentes **128b**, **128j**, **128i** y los derivados monovalentes **149-151** presentaron valores de inhibición peores frente a la  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo Sapiens* (**Tabla 3**) que los mostrados frente a la enzima de riñón de bovino, se observa un paralelismo en los resultados obtenidos frente a ambas enzimas.

Con el objetivo de determinar el tipo de inhibición de estos compuestos, se procedió a la determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ) utilizando para ello las representaciones de Lineweaver-Burk o de Dixon/Cornish-Bowden. Todos los compuestos resultaron ser inhibidores de tipo mixto tanto de la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino como de la proveniente de *Homo sapiens*, predominando en todos los casos la componente competitiva. Como ejemplo de determinación del tipo de inhibición de los compuestos obtenidos se representan las gráficas de Dixon y Cornish-Bowden para el mejor dímero de la serie **128i** (**Figura 48**).



**Figura 48.** Representación de Dixon (arriba) y Cornish-Bowden (abajo) para la inhibición del dímero **128i** frente a  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino ([S] = concentración de sustrato; [I] = concentración de inhibidor; Abs = absorbancia; v = velocidad de la reacción enzimática).

En la gráfica superior (Dixon), el corte de las líneas en el cuadrante superior izquierdo es indicativo de una inhibición competitiva o mixta; de esta gráfica puede obtenerse el valor del  $K_i$  ( $K_i = 0.15$  nM). La gráfica inferior (Cornish-Bowden) nos permite distinguir entre una inhibición competitiva y una inhibición mixta. El hecho de que las líneas se corten en el cuadrante inferior izquierdo es indicativo de una inhibición mixta. De esta gráfica se puede obtener el valor de  $K'_i$  ( $K'_i = 0.52$  nM). Al tratarse de una inhibición mixta, la enzima debe presentar un sitio alostérico (distinto al sitio activo) donde el inhibidor pueda interaccionar cuando el sustrato ocupa el sitio activo.

Las  $\alpha$ -fucosidasas de riñón bovino y de *Homo sapiens* pertenecen a la misma familia CAZy (GH29), lo que explicaría el comportamiento análogo que presentan los inhibidores sintetizados frente a ambas enzimas. Además, también pertenecen a la misma familia que las fucosidasas humanas FUCA1 y FUCA2, enzimas implicadas en el trastorno de almacenamiento lisosomal fucosidosis y en la adhesión y crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*, respectivamente.

En relación a los dímeros **128i** y **128'i**, la mayor inhibición presentada por **128i** podría deberse a interacciones no específicas del espaciador difenilsulfona en la zona muy próxima al sitio activo de la enzima. Estas interacciones no serían posibles en el caso de **128'i**, que presenta dicho grupo más alejado de la unidad de iminoazúcar. Esta situación se ajustaría bastante bien con una interacción secundaria de tipo alostérica (**Figura 49**) asumiendo que el núcleo de pirrolidina interacciona con el sitio activo (inhibición competitiva) mientras que el resto aromático establece interacciones con un sitio alostérico cercano. Este tipo de interacciones secundarias se habían observado previamente en el grupo de investigación,

mediante la cristalización del complejo formado por un derivado de pirrolidina-bencimidazol y una  $\alpha$ -fucosidasa de origen bacteriano.<sup>169</sup>



Interacción adicional no específica

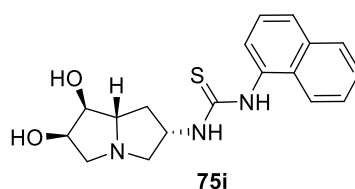
**Figura 49.** Uno de los posibles modos de interacción de un inhibidor divalente con la enzima.

Por otra parte, si se comparan los términos de inhibición competitiva del derivado divalente **128i** y el derivado monovalente **151** ( $K_i$  0.15 and 0.20 nM, respectivamente), se observa que no hay una diferencia significativa, lo que sugiere que la presencia de la segunda unidad de iminoazúcar no es relevante en este tipo de inhibición, aunque pudiera serlo en la componente incompetitiva ( $K'_i$  0.52 and 1.0 nM para **128i** y **151**, respectivamente).

### 2.3.1. Síntesis y evaluación biológica de pirrolizidín-tioureas como inhibidores divalentes de $\alpha$ -galactosidasas.

El estudio llevado a cabo en el capítulo anterior sobre inhibidores de glicosidasas con estructura pirrolizidínica permitió identificar al compuesto **75i** (**Figura 50**) como un inhibidor potente y selectivo de la  $\alpha$ -galactosidasa de origen vegetal y humana.

<sup>169</sup> a) Wright, D. W.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Robina, I.; Davies, G. J. Three dimensional structure of a bacterial  $\alpha$ -L-fucosidase with a 5-membered iminocyclitol inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4751-4754.



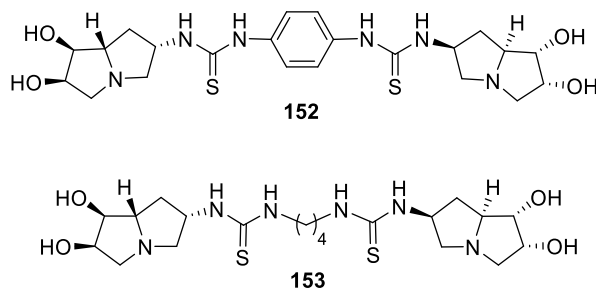
$\alpha$ -galactosidasa de granos de café	$\alpha$ -galactosidasa de lisosoma humano
$IC_{50} = 0.37 \mu M$	$IC_{50} = 5.3 \mu M$
$K_i = 0.12 \mu M$	$K_i = 4.2 \mu M$

**Figura 50.** Estructura del mejor inhibidor de  $\alpha$ -galactosidasa con estructura pirrolizidínica descrito en el capítulo 1.

La enzima  $\alpha$ -Gal A lisosomal es una glicosidasa que puede ser moderadamente sensible a los inhibidores multivalentes, como se demuestra en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación en el que se prepararon derivados multivalentes de pirrolidinas que mostraron efecto multivalente relevante en la inhibición de la  $\alpha$ -Gal A humana.<sup>170</sup>

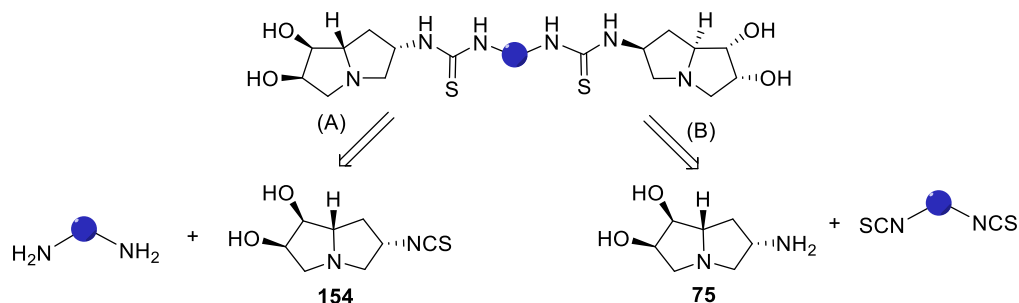
Con el objetivo de efectuar un estudio sobre la posible existencia de efecto multivalente en la inhibición de  $\alpha$ -Gal A por parte de derivados multiméricos de pirrolizidinas, se planteó la síntesis de los compuestos modelo diméricos **152** y **153** (**Figura 51**).

<sup>170</sup> Martínez-Bailen, M.; Carmona, A. T.; Cardona, F.; Matassini, C.; Goti, A.; Kubo, M.; Kato, A.; Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J. Synthesis of multimeric pyrrolidine iminosugar inhibitors of human  $\beta$ -glucocerebrosidase and  $\alpha$ -galactosidase A: First example of a multivalent enzyme activity enhancer for Fabry disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *192*, 112173.



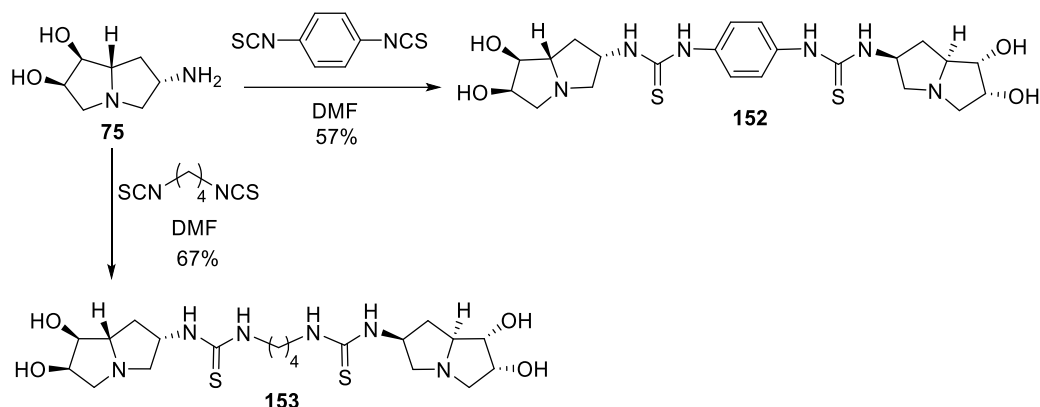
**Figura 51.** Compuestos diméricos modelo con estructura de pirrolizidín-ditiourea.

La síntesis de estos compuestos podría abordarse según dos estrategias, tal y como se muestra en el análisis retrosintético (**Esquema 47**): (A) reacción del isotiocianato del derivado de pirrolizidina **154** con una diamina o (B) reacción de la pirrolizidín-amina **75** con el diisotiocianato correspondiente.



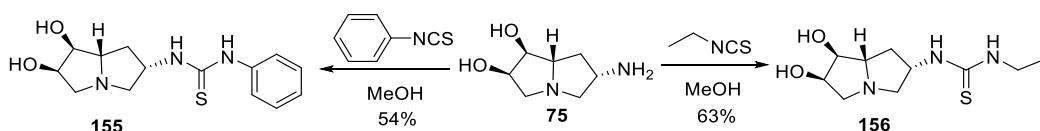
**Esquema 47.** Posibles análisis retrosintéticos para la preparación de pirrolizidín-ditioureas.

Los intentos de transformación del grupo amino de **75** en un grupo isotiocianato mediante distintos métodos no fueron efectivos para la obtención del pirrolizidín-isotiocianato **154**. Por este motivo, la síntesis de las pirrolizidín-ditioureas modelo **152** y **153** se realizó mediante reacción entre la pirrolizidín-amina **75** y los correspondientes diisotiocianatos utilizando como disolvente DMF (**Esquema 48**).



**Esquema 48.** Síntesis de los compuestos diméricos modelo **152** y **153**.

Con el objetivo de evaluar la posible existencia de un efecto multivalente en la inhibición de la  $\alpha$ -Gal A para los compuestos **152** y **153**, se han sintetizado los análogos monovalentes correspondientes (compuestos **155** y **156**, **Esquema 49**).



**Esquema 49.** Síntesis de los monómeros de referencia **155** y **156**.

Se ha realizado un estudio de la capacidad inhibidora de los compuestos divalentes modelo **152** y **153** y de los derivados monovalentes **155** y **156** frente a once glicosidasas comerciales (Sigma-Aldrich, Megazyme).<sup>171</sup>

<sup>171</sup>  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens*,  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café,  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y de hígado de bovino,  $\alpha$ -glucosidasa de levadura de pan y de arroz,  $\alpha$ -amiloglucosidasa de



En la **Tabla 4** se representan los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para los compuestos **152/153** y **155/156** frente a la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café y la  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack. La inhibición frente al resto de enzimas es baja o nula en todos los casos estudiados a una concentración 1 mM de inhibidor.

**Tabla 4.** Valores de  $IC_{50}$  (en  $\mu M$ ) para la inhibición de  $\alpha$ -galactosidasa y  $\alpha$ -manosidasa por las tioureas divalentes **152/153** y los derivados monovalentes **155/156** al pH óptimo de cada enzima y 37 °C.

Compuesto	$\alpha$ -galactosidasa (granos de café)	$\alpha$ -manosidasa (guisantes de Jack)
<b>152</b>	2.0	29
<b>153</b>	1.2	102
<b>155</b>	2.5	47
<b>156</b>	2.4	46% <sup>a</sup>

<sup>a</sup> % de inhibición a una concentración 1 mM de inhibidor; en este caso no se determina  $IC_{50}$ .

De los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición se pueden hacer las siguientes observaciones:

A) Los valores de  $IC_{50}$  de **152** y **153** demuestran que los compuestos divalentes modelo son inhibidores potentes de  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café y moderados de  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack, confirmando el elevado perfil de potencia y selectividad de inhibición previamente observado para los análogos monoméricos descritos en el Capítulo 1.

B) Los valores de  $IC_{50}$  de los derivados monoméricos **155** y **156** nos permiten cuantificar el posible efecto multivalente de los compuestos diméricos **152** y **153** mediante el cálculo del  $rp/n$ . Tanto para el compuesto **152** ( $rp/n = 0.63$ ) como para el compuesto **153** ( $rp/n = 1$ ) los

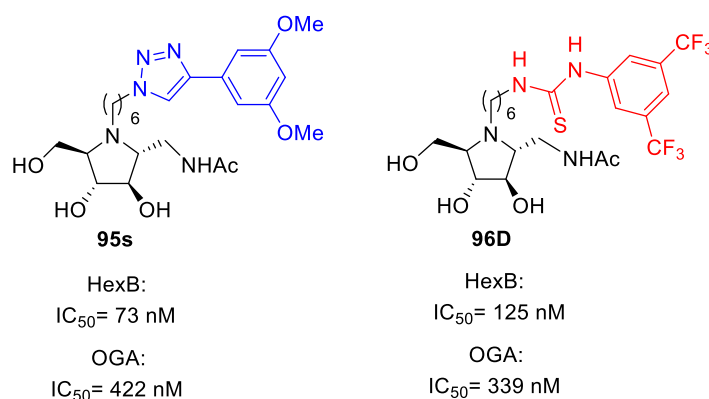
---

*Aspergillus niger*,  $\beta$ -glucosidasa de almendras,  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack,  $\beta$ -manosidasa de caracol,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack.

valores de  $rp/n$  demuestran que no hay ningún indicio de efecto multivalente, razón por la cual se descartó llevar a cabo la síntesis de una librería química de nuevos inhibidores diméricos de  $\alpha$ -galactosidasas basados en estructuras de tipo pirrolizidín-tioureas.

### 2.3.2. Síntesis y evaluación *in situ* de pirrolidín-triazoles y pirrolidín-tioureas como inhibidores divalentes de $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas humanas.

La investigación llevada a cabo en relación al descubrimiento de inhibidores monovalentes de hexosaminidasas (apartado 1.3.2) nos ha permitido identificar los compuestos **95s** (pirrolidín-triazol) y **96D** (pirrolidín-tiourea) como inhibidores potentes de la enzima HexB con cierto perfil de selectividad respecto a la OGA (**Figura 52**).



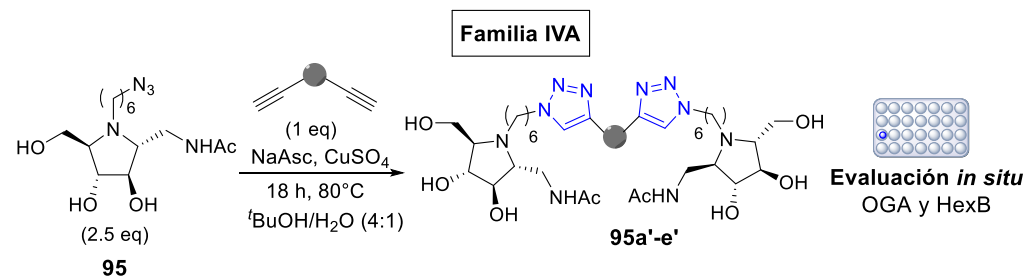
**Figura 52**

En base a estos resultados, y al antecedente reciente sobre inhibidores multivalentes de hexosaminidasas,<sup>172</sup> nos planteamos la síntesis de análogos divalentes que pudieran

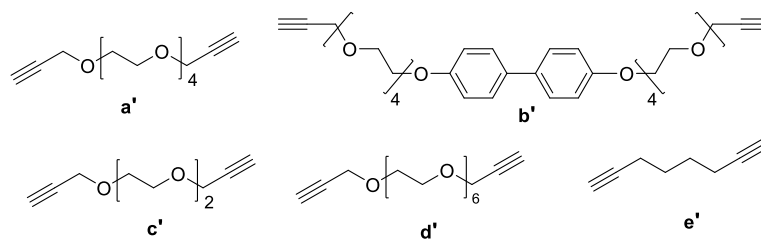
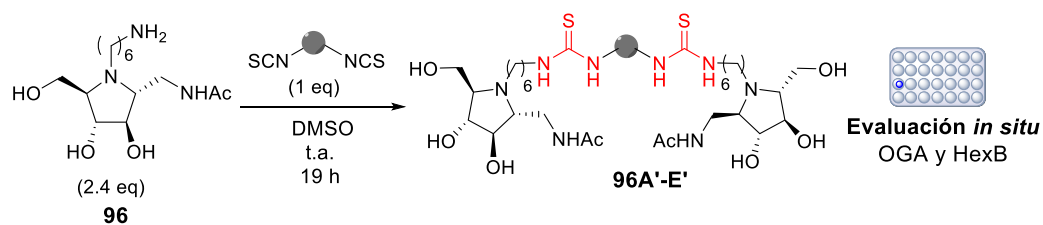
<sup>172</sup> Alvarez-Dorta, D.; King, D. T.; Legigan, T.; Ide, D.; Adachi, I.; Deniaud, D.; Desiré, J.; Kato, A.; Vocadlo, D.; Gouin, S. G.; Blériot, Y. Multivalency to inhibit and discriminate hexosaminidasas. *Chem. Eur.J.* **2017**, *23*,9022–9025.

mejorar los valores de inhibición en términos de potencia y selectividad entre las dos hexosaminidasas humanas en estudio (HexB y OGA).

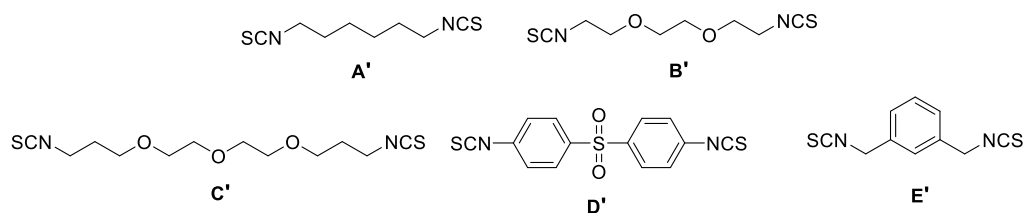
Para identificar inhibidores divalentes con un perfil de selectividad adecuado HexB/OGA es necesario determinar la naturaleza y longitud del espaciador óptimo entre ambos residuos de iminoazúcar. La metodología que proponemos para hacer esto de manera ágil y rápida es la síntesis paralela de librerías químicas de compuestos seguido de evaluación biológica *in situ*. En este sentido, nos planteamos la síntesis de dos tipos de derivados, por un lado, una primera familia **IVA** que se obtendría por reacción CuAAC entre la pirrolidín-azida **95** y una batería de dialquinos (**a'-e'**) y, por otro lado, los derivados **IVB**, que se obtendrían por reacción entre la *N*-aminohexilpirrolidina **96** y una colección de diisotiocianatos (**A'-E'**). Las propiedades inhibitoras de ambas familias de compuestos se evaluarán *in situ*, sin purificación previa, frente a las enzimas HexB y OGA. Con el objetivo de evaluar el efecto de de distintos espaciadores sobre los valores de inhibición se utilizarán dialquinos y diisotiocianatos de estructura variada (**Esquema 50**).



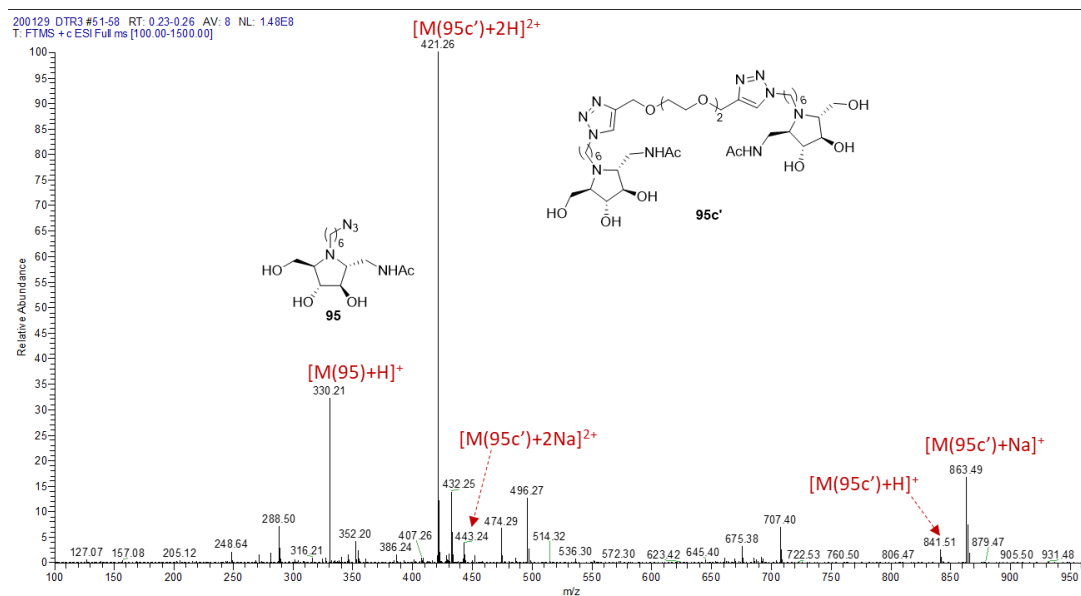
## Dialquinos

**Familia IVB**

## Diisotocianatos

**Esquema 50.** Síntesis de los derivados IVA (95a'-e') y IVB (96A'-E') mediante reacciones *clic*.

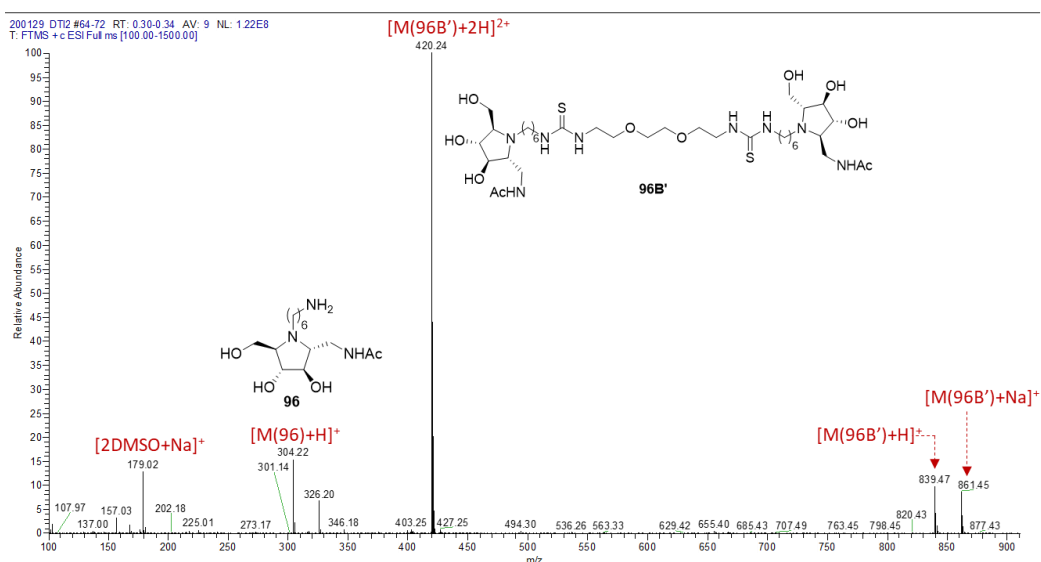
La síntesis de la familia **IVA** (**95a'-e'**) se llevó a cabo mediante reacciones en paralelo CuAAC entre la azida **95** (2.5 eq.) y una colección de dialquinos terminales (**a'-e'**) (1.0 eq.), utilizando CuSO<sub>4</sub>, ascorbato sódico y una mezcla <sup>t</sup>BuOH:H<sub>2</sub>O como disolvente. Tras 18 h calentando a 80 °C, se observó conversión completa por c.c.f. y espectrometría de masas (ESI-MS). El espectro de masas de cada crudo muestra la aparición del dímero buscado, así como el ligero exceso de la pirrolidina monomérica de partida. A modo de ejemplo, en la **Figura 53** se representa el ESI-MS del dímero de triazol **95c'**.



**Figura 53.** Espectro de masas (ESI-MS) del crudo resultante de la preparación del dímero **95c'**.

Por otro lado, la síntesis de la los compuestos **IVB** (**96'-E'**) se llevó a cabo mediante reacciones en paralelo entre la pirrolidín-amina **96** (2.4 eq.) y una batería de diisotiocianatos (**A'-E'**) (1.0 eq.), utilizando DMSO como disolvente. Tras 19 horas a temperatura ambiente, se observó conversión completa por c.c.f. y espectrometría de masas. En este caso, la espectrometría de masas se utilizó para confirmar la aparición de los dímeros deseados. Sin

embargo, no pudimos utilizarla para observar la desaparición de los diisotiocianatos de partida (reactivo limitante), ya que éstos no presentaban señales claras en los experimentos de control realizados. En el espectro de masas de cada crudo también se observa la señal correspondiente al ligero exceso de pirrolidina monomérica de partida. A modo de ejemplo, en la **Figura 54** se representa el espectro de masas del crudo de reacción de la preparación del dímero **96B'**.

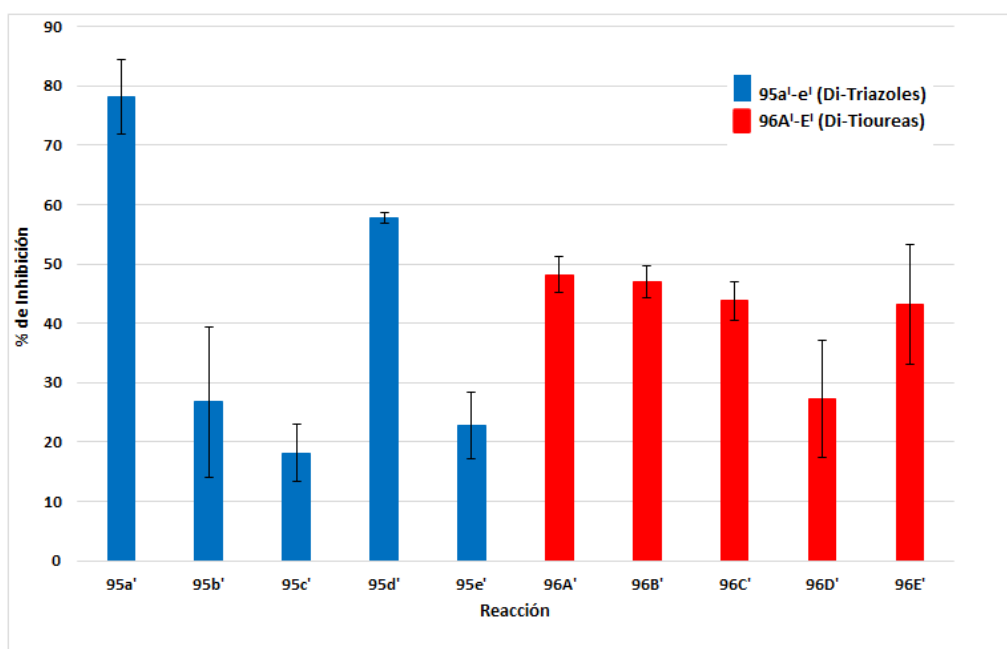


**Figura 54.** Espectro de masas (ESI) del crudo resultante de la preparación del dímero **96B'**.

Los crudos de reacción obtenidos de ambas librerías, se diluyeron con agua y se evaluaron *in situ* sin purificación previa frente a HexB y OGA en placas multipocillos. Es importante resaltar que también se llevaron a cabo experimentos de control con la *N*-azidohexilpirrolidina **95**,  $\text{CuSO}_4$  y ascorbato sódico, a la misma concentración en la que podrían encontrarse en los crudos de reacción evaluados para confirmar que su presencia no afectaba a la inhibición enzimática. Por otro lado, también se realizó un experimento de

control con la *N*-aminohexilpirrolidina **96** a la concentración 5 nM, no observándose inhibición frente a ninguna de las dos enzimas ensayadas.

Los resultados de inhibición obtenidos por los compuestos de las librerías **IVA** y **IVB** frente a HexB se muestran en la **Figura 55**, indicándose el porcentaje de inhibición a una concentración de dímero 5 nM en pocillo, considerando conversión completa de cada reacción.



**Figura 55.** Inhibición (%) de los compuestos de las librerías **IVA** y **IVB** frente a HexB (pH 4, 37 °C) a una concentración 5 nM de inhibidor (en cada barra de la gráfica se considera la desviación estándar de las medidas realizadas por cuadruplicado).

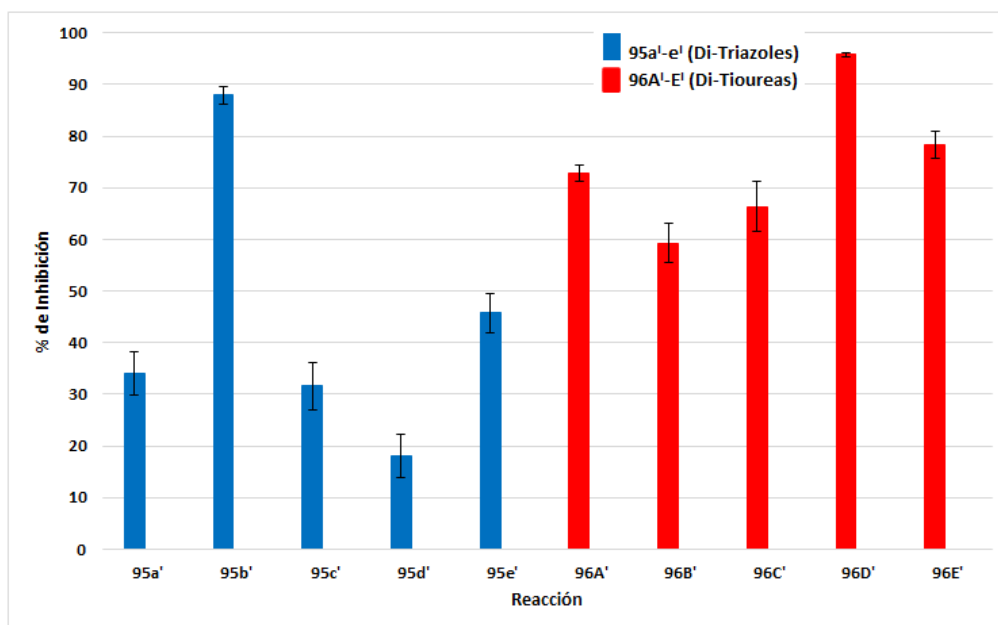
De los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición se pueden hacer varias observaciones:

A) A una concentración 5 nM, todos los compuestos presentaron actividad frente a HexB, siendo claramente el dímero de pirrolidín-triazol **95a'** el que más destaca por potencia de inhibición (78% a 5 nM).

B) Por otra parte, los compuestos de tipo di-tiourea (**96A'-E'**) presentaron en general buenos valores de inhibición (30-50% a 5 nM), no observándose diferencias significativas en función del espaciador.

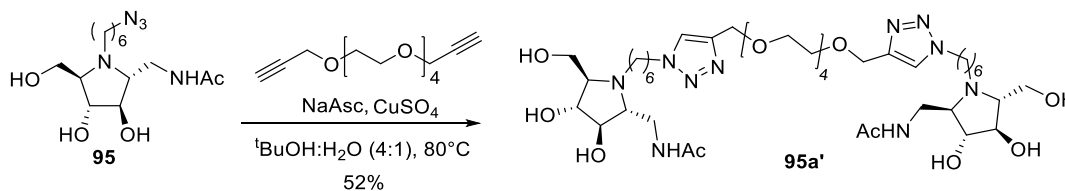
Considerando que la selectividad entre HexB y OGA es también un factor determinante en la identificación del inhibidor de HexB más interesante, se llevó a cabo la evaluación de estos derivados frente a la enzima OGA (**Figura 56**). Estos ensayos se hicieron a una concentración final de inhibidor en pocillo de 500 nM, debido a la menor afinidad que mostraron los correspondientes derivados monovalentes frente a la enzima OGA (ver apartado 1.3.2.). A esta concentración, los dímeros de tiourea **96A'-E'** fueron, en general, mejores inhibidores de OGA que los de tipo ditriazol (a excepción del ditriazol **95b'**). La presencia de un fragmento aromático en la estructura del espaciador parece ser un factor relevante en la inhibición de OGA, siendo el di-triazol **95b'** (88% inhibición) y las di-tioureas **96D'** (96% inhibición) y **96E'** (78% inhibición) los compuestos más activos de la serie. Análogamente a lo realizado para la inhibición de la HexB, se llevaron a cabo experimentos de control frente a la enzima OGA a la concentración de 500 nM, no observándose inhibición significativa por parte de los reactivos implicados.



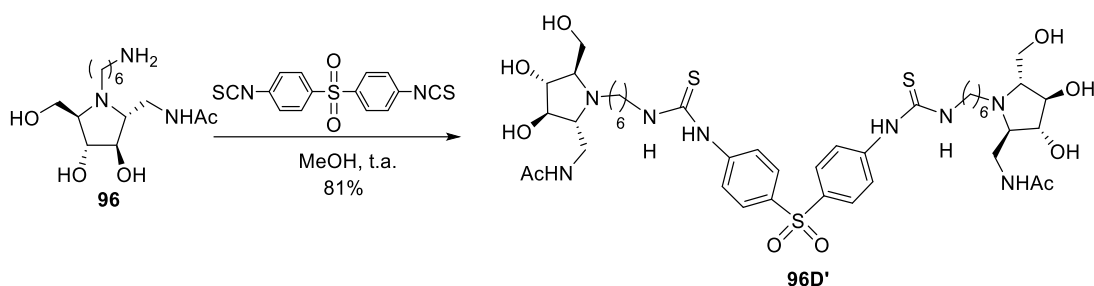


**Figura 56.** Inhibición (%) de los compuestos de las librerías **IVA** y **IVB** frente a OGA (pH 7, 37 °C) a 500 nM de inhibidor.

El derivado dimérico de tipo pirrolidín-triazol **95a'** (el más activo frente a HexB) y de pirrolidín-tiourea **96D'** (el más activo frente a OGA) fueron sintetizados convencionalmente a mayor escala y purificados cromatográficamente con el objetivo de llevar a cabo un estudio más detallado de su actividad inhibidora (*Esquemas 51 y 52*).



**Esquema 51.** Síntesis del mejor inhibidor de las familias **IVA** y **IVB** frente a HexB (Compuesto **95a'**).



**Esquema 52.** Síntesis del mejor inhibidor de las familias IVA y IVB frente a OGA (Compuesto **96D'**).

Se ha realizado un estudio de la capacidad inhibidora de los dímeros **95a'** y **96D'** frente a once glicosidasas comerciales (Sigma-Aldrich, Megazyme)<sup>173</sup> y dos hexosaminidasas humanas:  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasa lisosomal humana (HexB) y  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa humana (OGA).<sup>174</sup>

En la **Tabla 5** se representan los valores de  $IC_{50}$  obtenidos por los compuestos **95a'** y **96D'** frente a las hexosaminidasas HexB, OGA y  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack (JB-GlcNAc). Estos derivados no presentaron inhibición significativa frente al resto de enzimas ensayadas, a excepción de **96D'** que mostró cierta inhibición de la  $\alpha$ -manosidasa y amiloglicosidasa (72 y 66% respectivamente, a una concentración 0.1 mM).

<sup>173</sup>  $\alpha$ -fucosidasa de *Homo sapiens*,  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café,  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -glucosidasa de levadura de pan y de arroz,  $\alpha$ -amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*,  $\beta$ -glucosidasa de almendras,  $\alpha$ -manosidasa de guisantes de Jack,  $\beta$ -manosidasa de caracol y  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa de guisantes de Jack (JB-GlcNAc).

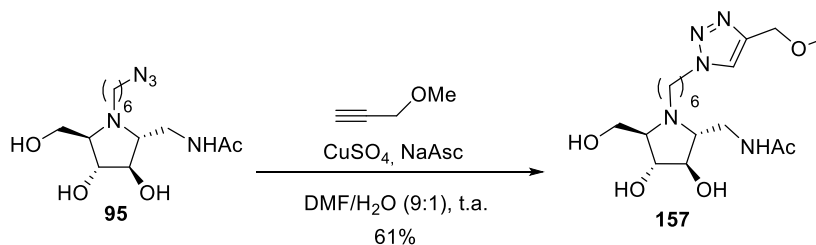
<sup>174</sup> El aislamiento y la purificación de HexB y de OGA fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. V. Kren (Academia Checa de Ciencias de Praga).

**Tabla 5.** IC<sub>50</sub> (μM) para la inhibición de las hexosaminidasas HexB, OGA y JB-GlcNAc por los dímeros **95a'** y **96D'** al pH óptimo de cada enzima y 37 °C.

Compuesto	HexB	OGA	JB-GlcNAc
<b>95a'</b>	0.0025	1.1	0.069
<b>96D'</b>	0.021	0.105	0.058

Las estructuras diméricas **95a'** y **96D'** presentaron valores de IC<sub>50</sub> frente a HexB en el rango nanomolar, siendo el ditriazol **95a'** aproximadamente ocho veces más activo frente a HexB que el derivado **96D'**. Por otro lado, la presencia del puente de tipo tiourea y de la porción aromática favorecen la capacidad inhibidora de la ditiourea **96D'** frente a OGA (IC<sub>50</sub> = 105 nM), confirmando los resultados observados para todas las ditioureas. Es de destacar que **95a'** resultó ser no sólo más activo sino también más selectivo que el derivado **96D'**, siendo 440 veces mejor inhibidor de HexB que de OGA. Ambos compuestos presentaron también inhibición potente frente a la JB-GlcNAc, lo que es debido a la semejanza estructural entre esta enzima y la humana, ambas de la misma familia CAZY (GH20).

El prometedor resultado de **95a'** como inhibidor de HexB, nos llevó a preparar un monómero de referencia para poder evaluar la posible existencia de efecto multivalente. De este modo, la reacción CuAAC entre la *N*-azidohexilpirrolidina **95** y el metil propargil éter, originó **157** con un 61% de rendimiento tras purificación cromatográfica (**Esquema 53**).



**Esquema 53.** Síntesis del derivado monovalente de referencia **157**.

La determinación del modo y la constante de inhibición ( $K_i$ ) del dímero **95a'** y del monómero **157** se llevó a cabo en base a las representaciones de Dixon y Cornish-Bowden. Como ejemplo, se muestran ambas gráficas para el caso del monómero **157** (**Figura 65**). A partir de estas representaciones, se deduce un modo de inhibición competitivo<sup>175</sup> para ambos compuestos, presentando el monómero **157** una  $K_i = 2.8 \mu\text{M}$  y el dímero **95a'** una  $K_i = 9.8 \text{ nM}$  (**Tabla 6**). A partir de los valores de  $K_i$ , se determina un  $rp/n = 143$  para el dímero **95a'**, siendo éste el segundo ejemplo descrito en la bibliografía sobre efecto multivalente apreciable en la inhibición de hexosaminidasas.<sup>176</sup> Este efecto divalente no se observa en el caso de la inhibición de la OGA. Con objeto de estudiar si la dimerización del inhibidor tenía efecto sobre la selectividad HexB vs OGA, también se evaluó la inhibición del monómero **157** frente a OGA, determinándose un valor de  $\text{IC}_{50} = 2.8 \mu\text{M}$ . De este modo, se observó que el dímero **95a'** era 440 veces mejor inhibidor de HexB que de OGA, mientras que el monómero **157** sólo era 5 veces mejor.

---

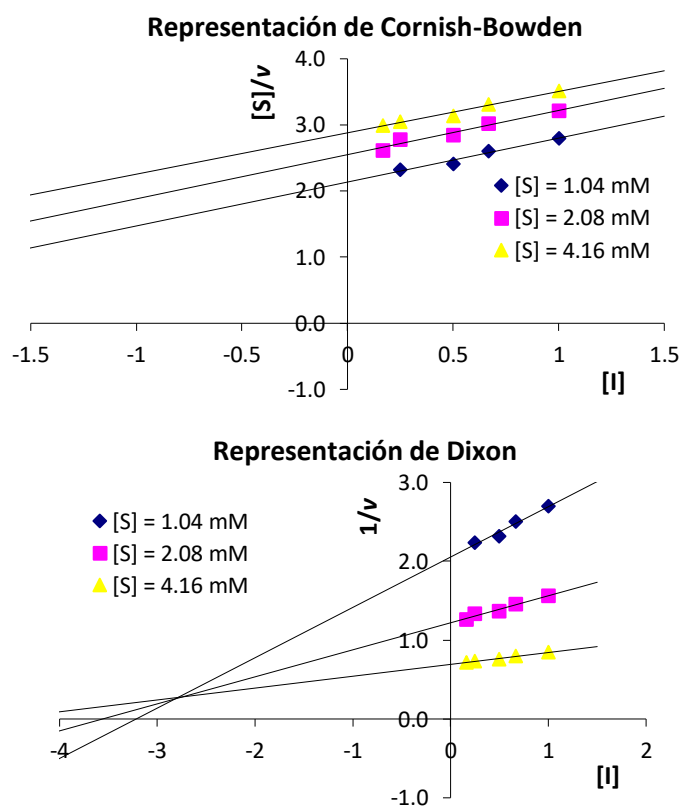
<sup>175</sup> En la representación de Dixon, el corte de las líneas en cuadrante superior izquierdo es indicativo de inhibición competitiva o mixta (ver Anexo "Conceptos básicos sobre inhibición enzimática". La posterior representación de Cornish-Bowden se realiza para discriminar entre ambas posibilidades. Cuando las líneas en esta representación son totalmente paralelas es indicativo de una inhibición competitiva, ver: A. Cornish-Bowden. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143-144.

<sup>176</sup> Álvarez-Dorta, D.; King, D. T.; Legigan, T.; Ide, D.; Adachi, I.; Deniaud, D.; Désiré, J.; Kato, A.; Vocadlo, D.; Gouin, S. G.; Blériot, Y. Multivalency to inhibit and discriminate hexosaminidasas. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9022-9025.

**Tabla 6.** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM), rp/n y selectividad HexB:OGA para la inhibición de las hexosaminidasas HexB y OGA por el monómero **157** y el dímero **95a'** al pH óptimo de cada enzima y 37 °C.

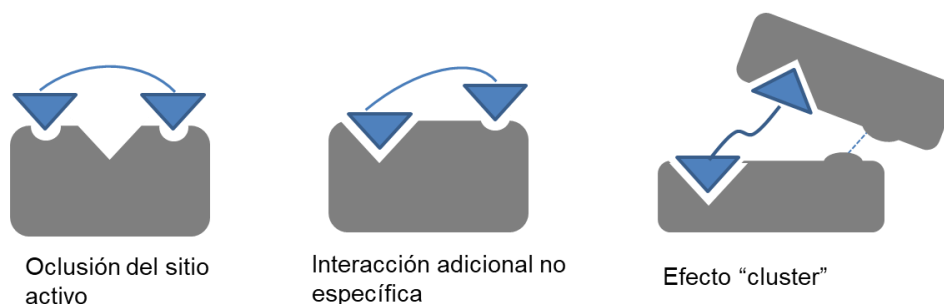
Compuesto	HexB	OGA	Selectividad HexB:OGA
Monómero <b>157</b>	0.54 K <sub>i</sub> = 2.8 <sup>a</sup>	2.8	5
Dímero <b>95a'</b>	0.0025 K <sub>i</sub> = 0.0098 <sup>a</sup> (rp/n = 143)	1.1	440

<sup>a</sup>Inhibición competitiva.



**Figura 57.** Representación de Dixon (arriba) y Cornish-Bowden (abajo) para la inhibición del monómero de referencia **157** frente a HexB ([S] = concentración de sustrato, [I] = concentración de inhibidor, v = velocidad de la reacción enzimática).

La enzima HexB es una enzima homodimérica compuesta por dos subunidades  $\beta$ , con sus sitios activos orientados hacia la misma cara. Estos dos sitios activos quedan separados uno del otro aproximadamente por unos 37 Å, aunque ambos no se encuentran enfrentados, sino rotados.<sup>177</sup> Por esta razón, la interacción simultánea de un inhibidor dimérico con ambos sitios activos (efecto quelato) requeriría una separación entre ambos inhítosos superior a 37 Å. Este requerimiento se cumpliría en el caso de los dímeros **95b'** y **95d'**, pero no precisamente en el dímero **95a'**, que es el más potente de todos. En el caso de este último, la máxima distancia entre los N endocíclicos de ambas pirrolidinas es ligeramente más corta (se estima en unos 34.7 Å). Por ello, debemos descartar el efecto quelato como origen de la multivalencia en este caso. Otros efectos multivalentes, como podría ser la unión del segundo inhítoso a algún sitio alostérico, oclusión del sitio activo o procesos de agregación sí podrían estar operando en este caso (**Figura 58**).



**Figura 58.** Propuesta de modelos de interacción entre el inhibidor divalente **95a'** y HexB.

Como se ha comentado en la sección de *Introducción*, los inhibidores (competitivos o alostéricos) de glicosidasas pueden actuar como chaperonas farmacológicas de enzimas defectuosas responsables de determinadas enfermedades de almacenamiento lisosomal

<sup>177</sup> Mark, B. L.; Mahuran, D. J.; Cherney, M. M.; Zhao D.; Knapp, S.; James, M. N. G. Crystal structure of human  $\beta$ -hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay–Sachs disease. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 1093–1109.

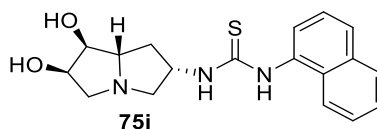
(LSD). Es por ello que los inhibidores diméricos **95a'** y **96D'** están siendo actualmente evaluados como chaperonas farmacológicas en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Tay-Sachs. Estos ensayos se están realizando en colaboración con el grupo de investigación del Prof. A. Kato (Depto. de Farmacia Hospitalaria, Universidad de Toyama, Japón).

## **CONCLUSIONES**

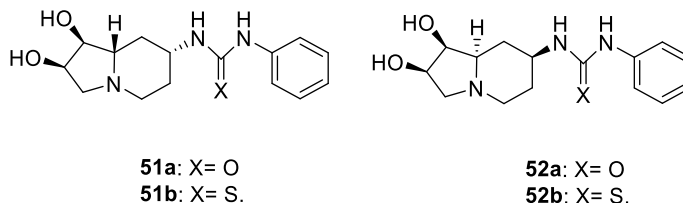


## CONCLUSIONES

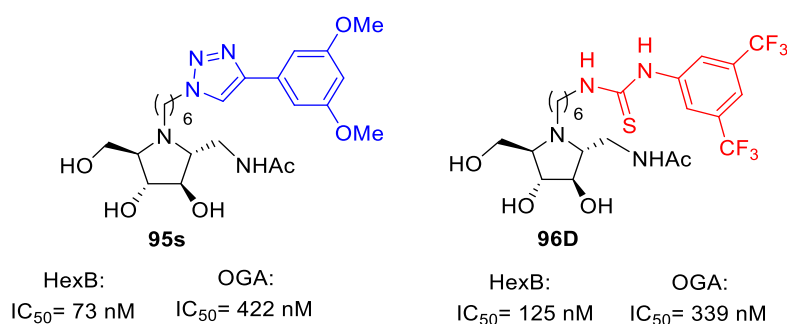
- La estrategia desarrollada en esta Tesis, que combina la síntesis paralela mediante reacción *clic* de formación de tioureas y evaluación biológica *in situ*, se ha utilizado por primera vez en la identificación de nuevos inhibidores potentes de glicosidasas. Dicha metodología ha permitido la identificación del iminoazúcar **75i** de estructura pirrolizidínica como un inhibidor potente y selectivo de  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café, con un valor de  $IC_{50}$  en el rango nanomolar. Adicionalmente, se ha observado una correlación en la inhibición de la enzima de origen vegetal con la inhibición de la  $\alpha$ -galactosidasa de lisosoma humano.



- La preparación y análisis biológico de indolizidín-tioureas (**51a-b** y **52a-b**) estructuralmente relacionadas con **75i** puso de manifiesto la importancia del esqueleto pirrolizidínico en la inhibición de  $\alpha$ -galactosidasas, no observándose inhibición en los homólogos de tipo indolizidínico.

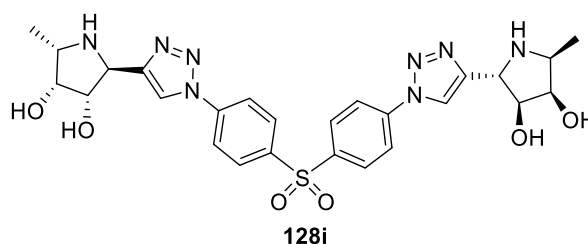


- La síntesis paralela de dos quimiotecas de iminoazúcares monovalentes con estructura pirrolidínica mediante reacciones tipo *clic* (CuAAC y formación de (tio)ureas), seguido de evaluación biológica *in situ* frente a dos hexosaminidasas humanas (HexB y OGA), ha permitido identificar de forma eficaz los mejores sustituyentes sobre el nitrógeno endocíclico para una inhibición potente y selectiva de HexB (valores de  $IC_{50}$  en el rango nanomolar).

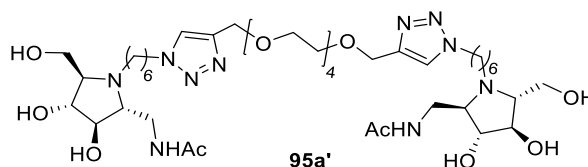


- Los derivados triméricos que incorporan un inhibidor de  $\alpha$ -fucosidasa con estructura de pirrolidín-triazol presentaron valores de  $IC_{50}$  comparables al mostrado por el correspondiente inhibidor divalente (previamente sintetizado en el grupo de investigación). En este tipo de estructuras, un aumento de la valencia del múltiplo no conduce a un aumento de la potencia de inhibición.
- Se ha utilizado por primera vez la metodología de síntesis paralela *vía* reacciones *clic* y evaluación biológica *in situ* para la identificación de inhibidores diméricos de glicosidasas. En el caso de la  $\alpha$ -fucosidasa, las dos quimiotecas de inhibidores divalentes preparados han mostrado un paralelismo en los resultados frente a la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón de bovino y de *Homo sapiens*, aunque de forma general han presentado mejores valores de inhibición en el caso de la primera. Se ha identificado el compuesto **128i** como uno de los inhibidores más potentes de  $\alpha$ -fucosidasa de riñón de bovino descrito hasta

la fecha ( $K_i = 0.15$  nM). No se ha podido determinar con precisión la magnitud del efecto multivalente de este inhibidor debido a la controversia en la elección del derivado monovalente de referencia para el cálculo del  $rp/n$ .



- Los dímeros de pirrolizidín-tiourea **152** y **153** no presentaron efecto multivalente frente a la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café
- La metodología de síntesis paralela y evaluación biológica *in situ* se ha utilizado con éxito en la identificación de inhibidores divalentes de hexosaminidasas humanas. El mejor inhibidor dimérico identificado (compuesto **95a'**) presentó una constante de inhibición  $K_i$  de 9.8 nM en la inhibición de hexosaminidasa B lisosomal, lo que supone una potencia de inhibición relativa al monómero precursor corregida por la valencia ( $rp/n$ ) de 143, encontrándose este valor entre los mejores publicados hasta el momento en la bibliografía para la inhibición de esta enzima.



- Se ha observado que la aproximación divalente mejora notablemente la selectividad en la inhibición de dos hexosaminidasas humanas (HexB y OGA), a menudo difíciles de discriminar por muchos inhibidores, obteniéndose para el derivado **95a'** una relación  $IC_{50}(\text{HexB})/IC_{50}(\text{OGA})$  de 440. En el caso del correspondiente inhibidor de referencia monovalente **157** se obtuvo un valor  $IC_{50}(\text{HexB})/IC_{50}(\text{OGA})$  de 5.

**EXPERIMENTAL SECTION**

## EXPERIMENTAL SECTION

### 1. Materials and methods

- ✓ Solvent *evaporations* were performed under reduced pressure at 25-40 °C.
- ✓ Small scale *microwave-assisted reactions* were carried out in an Anton Paar Monowave 300 microwave apparatus for synthesis.
- ✓ Reactions under *anhydrous atmosphere* were performed using commercial N<sub>2</sub> (“U” quality) and commercial Ar (“N-48” quality).
- ✓ *Thin layer chromatography (TLC)* was performed with qualitative purposes on aluminium silica gel plates (*Merck Silica gel 60 F<sub>254</sub>*) with detection by UV light ( $\lambda$  254 nm) and charring with *p*-anisaldehyde, KMnO<sub>4</sub>, ninhydrin, vanillin, phosphomolybdic acid, ethanolic H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) or with Pancaldi reagent [(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>4</sub>, Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O].
- ✓ Purifications were carried out by *chromatography column* using silica gel 60 (*Merck*, 40-63 and 63-200  $\mu$ m), Sephadex LH-20 (25-100  $\mu$ m) or Dowex 50WX8 hydrogen form (50-100 mesh), eluting by gravity with the solvent mixtures indicated in each case.
- ✓ Optical rotations ( $[\alpha]_D$ ) were measured in a *Jasco P-2000* spectropolarimeter in a 1.0 cm or 1.0 dm tube (Na,  $\lambda$  598 nm). Temperature and solvent are indicated in each case.

- ✓  **$^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR** spectra were recorded with a Bruker AMX300, AMX500 or Avance AV-300 spectrometer in the CITIUS of the University of Seville.  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  and  $\text{DMSO-}d_6$  were used as solvents at room temperature except when indicated. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm and coupling constants ( $J$ ) in Hz.  $J$  are assigned and not repeated. All the assignments were confirmed by 2D spectra (COSY and HSCQ). TOCSY and NOESY experiments were performed when necessary.
- ✓ **Mass spectra** (low and high resolution) were registered on a *Micromass AutoSpeQ*, *Orbitrap Elite* or *Q-Exactive* in the CITIUS of the University of Seville. Electrospray ionization (ESI) was used in *Orbitrap Elite* and *Q-Exactive*. For high resolution mass spectra,  $m/z$  is presented for the molecular ion, whose value is compared with the calculated one taking into account the most abundant isotopes.
- ✓ **Inhibition studies with commercial enzymes.** Enzymes were treated following the procedure reported<sup>178</sup> with the appropriate commercial *p*-nitrophenyl glycopyranoside (purchased from Aldrich or Megazyme). The % inhibition toward the corresponding glycosidase was determined in the presence of the inhibitor concentration (in the well) specified in each case. The typical enzyme assay (final volume 0.12 mL) contains 0.01–0.5 units/mL of the enzyme (previously calibrated) and 4.2 mM aqueous solution of the appropriate *p*-nitrophenyl glycopyranoside (substrate) buffered to the optimal pH of the enzyme. Enzyme and inhibitor were preincubated for 5 min at r.t., and the reaction was started by addition of the

---

<sup>178</sup> a) Brandi, A.; Cicchi, S.; Cordero, F. M.; Frignoli, B.; Goti, A.; Picasso, S.; Vogel, P. Assignment of the absolute configuration of natural lentiginosine by synthesis and enzymic assays of optically pure (+) and (-)-enantiomers. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6806-6812. b) Saul, R.; Chambers, J. P.; Molyneaux, R. J.; Elbein, A. D. Castanospermine, a tetrahydroxylated alkaloid that inhibits  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *221*, 593-597.

substrate. After 20 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by addition of 0.1 mL of sodium borate solution (pH 9.8). The amount of *p*-nitrophenolate formed was quantified by comparison with that of a control assay without inhibitor by visible absorption spectroscopy at 405 nM (Asys Expert 96 spectrophotometer). Under these conditions, the *p*-nitrophenolate released led to optical densities linear with both reaction time and concentration of the enzyme. The assays were always performed in duplicate or even quadruplicate and were expressed as the mean value of the measures (as long as the difference in measures did not exceed 10%).

The  $IC_{50}$  value (concentration of inhibitor required for 50% inhibition of enzyme activity) was determined from plots of % inhibition *versus* different inhibitor concentrations.

The mode of inhibition, expressed by the inhibition constant value ( $K_i$ ), was determined by measuring the enzymatic activity at different substrate concentrations keeping the inhibitor concentration unchanged. These experiments were represented by Lineweaver–Burk double-reciprocal plot which are linear representation of  $1/V$  *versus*  $1/[S]$  where  $V$  is the enzymatic reaction rate which is directly related to the absorbance (the same graphic can be represented as  $1/Abs$  *versus*  $1/[S]$ ). The mode of inhibition and the  $K_i$  depend on the features of at least three graphic lines obtained at two different concentrations of inhibitor ( $IC_{50}$ ,  $IC_{50}/2$ ) and in the absence of inhibitor ( $I_0$ ). Each experiment was performed by quadruplicate (see “Anexo I: Conceptos básicos sobre la inhibición enzimática”). In some cases, the mode of inhibition, and the values of  $K_i$  and  $K'_i$  were determined by the Dixon plot ( $1/V$  *versus*  $[I]$  at different substrate concentrations) and by the complementary Cornish-Bowden plot ( $[S]/V$  *versus*  $[I]$  at different substrate concentrations). In both cases, the intersection of lines gives  $K_i$  (in Dixon) and  $K'_i$  (in Cornish-Bowden).

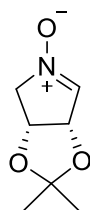


- ✓ **Inhibition studies with human lysosomal  $\alpha$ -galactosidase (Prof. Atsushi Kato, University of Toyama, Japan).** The inhibitory activity toward human lysosomal  $\alpha$ -galactosidase was measured with 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside as substrate. The reaction mixture consisted on 100 mM McIlvaine buffer (pH 5.2), 0.25% sodium taurocholate and 0.1% Triton X-100, and the appropriate amount of enzyme. The reaction mixture was pre-incubated at 0 °C for 45 min, and the reaction was started by adding 3 mM substrate solution, followed by incubation at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 1.6 mL of the solution of 400 mM glycine-NaOH solution (pH 10.6). The released 4-methylumbelliferone was measured (excitation 362 nm, emission 450 nm) with a F-4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). The IC<sub>50</sub> value (concentration of inhibitor required for 50% inhibition of enzyme activity) was determined from plots of % inhibition *versus* different inhibitor concentrations. Kinetic parameters were determined by the double-reciprocal plot method of Lineweaver-Burk at increasing substrate concentrations (see “Anexo I: Conceptos básicos sobre inhibición enzimática”).

## 2. Synthetic procedures and characterization of the new compounds.

### 2.1 Synthesis and *in situ* biological evaluation of monovalent iminosugars as glycosidase inhibitors.

#### (2*S*,3*R*)-2,3-*O*-Isopropylidenedioxy-1-pyrroline oxide (55).<sup>179</sup>

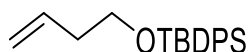


To a solution of D-arabinose (10.3 g, 68.6 mmol) in DMF (145 mL), 2,2-DMP (35.0 mL, 274 mmol) and PTSA (266 mg, 1.37 mmol) were added. After stirring for 5 h at r.t., the reaction mixture was neutralized with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, filtered and concentrated to dryness. The residue was dissolved in H<sub>2</sub>O, washed with cyclohexane (6x200 mL) and then NaIO<sub>4</sub> (17.5 g, 81.8 mmol) was added to the aqueous phase. After stirring for 2 h at r.t., NaOH 1M (80 mL) was added up to basic pH. The residue was stirred 1 h at r.t. and then it was neutralized with HCl (1N, 40 mL). The aqueous phase was extracted with AcOEt, the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O:Cyclohexane, 1:1) to obtain 2,3-*O*-isopropylidene-D-erythrose (9.3 g, 58 mmol, 85%) as a white solid. Then, hydroxylamine hydrochloride (4.8 g, 70 mmol) was added to a stirred solution of the previous product (9.3 g, 58 mmol) in anhydrous pyridine (115 mL) and using 3Å molecular sieves. After 15 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C and a 0.6 M solution of MsCl (5.4 mL, 70 mmol) in

<sup>179</sup> Cicchi, S.; Marradi, M.; Vogel, P.; Goti, A. One-pot synthesis of cyclic nitrones and their conversion to pyrrolizidines: 7*a*-*epi*-crotanecine inhibits α-mannosidases. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1614–1619.

anhydrous pyridine (96 mL) was quickly added. After stirring for 24 h at r.t., the reaction mixture was filtered through celite, washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and EtOAc and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:MeOH, 15:1) to give the product **55** (4.4 g, 28 mmol, 48%, 2 steps) as a yellow oil.

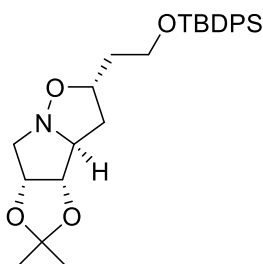
**But-3-enyloxy-*tert*-butyldiphenylsilane (57).**<sup>180</sup>



*Tert*-Butyldiphenylsilyl chloride (22 mL, 84 mmol) was added dropwise to a cooled (0 °C) solution of 3-buten-1-ol (5.3 mL, 76 mmol) and imidazole (11.5 g, 167 mmol) in anh. DMF (110 mL). After stirring for 24 h at r.t. under nitrogen atmosphere, the reaction mixture was cooled at 0 °C, quenched with water (50 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:50) to afford **57** (23 g, 74 mmol, 98%) as a colorless oil.

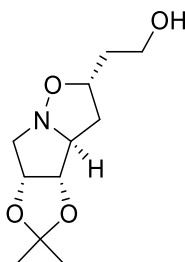
<sup>180</sup> Waser, J.; Gaspar, B.; Nambu, H.; Carreira, E. M. Hydrazines and azides via the metal-catalyzed hydrohydrazination and hydroazidation of olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11693-11712.

**(2*S*,3*aS*,4*S*,5*R*)-Hexahydro-2[2-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)ethyl]-4,5-isopropylidenedioxy-pyrrolo[1,2-*b*]isoxazole (58).**<sup>181</sup>



Compounds **55** (4.0 g, 25 mmol) and **57** (11.0 g, 36.0 mmol) were dissolved in toluene (240 mL) and the reaction was heated to reflux. After stirring 15 h, the reaction mixture was cooled to r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:5) to afford **58** (10.0 g, 21.4 mmol, 86%) as a yellow oil.

**(2*S*,3*aS*,4*S*,5*R*)-Hexahydro-2-(2-hydroxyethyl)-4,5-isopropylidenedioxy-pyrrolo[1,2-*b*]isoxazole (54).**<sup>181</sup>

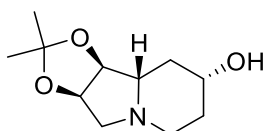


To a solution of silyl ether **58** (10.8 g, 23.1 mmol) in THF (110 mL) was slowly added tetra-*n*-butylammonium fluoride (25.4 mL, 1 M in THF, 25.4 mmol). After stirring for 1.5 h at r.t., the

<sup>181</sup> McCaig, A. E.; Meldrum, K. P.; Wightman, R. H. Synthesis of trihydroxylated pyrrolizidines and indolizidines using cycloaddition reactions of functionalized cyclic nitrones, and the synthesis of (+)- and (-)-lentiginosine. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9429-9446.

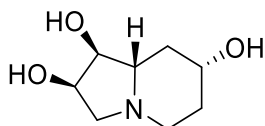
reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the product was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O→Et<sub>2</sub>O:MeOH, 9:1 ) to yield **54** (4.6 g, 20 mmol, 87%) as a yellow oil.

**(1S,2R,7R,8aS)-7-Hydroxy-1,2-isopropylidenedioxy-indolizidine (59).**<sup>181</sup>



To a stirred solution of alcohol **54** (1.5 g, 6.5 mmol) in anh. pyridine (50 mL) at 0 °C was added dropwise methanesulfonyl chloride (0.51 mL, 6.5 mmol). After 1.5 h, the reaction mixture was diluted with ethanol (75 mL) and hydrogenated at 1 atm using Pd/C (10%) as catalyst. After stirring for 48 h, the reaction mixture was filtered through celite, washed with methanol and the solvent was evaporated under vacuum. The residue was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 5:1) to give the indolizidine **59** (1.0 g, 4.7 mmol, 72%) as a yellow oil.

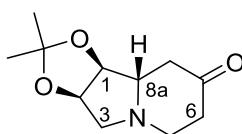
**(1S,2R,7R,8aS)-Octahydroindolizidine-1,2,7-triol (60).**<sup>181</sup>



Compound **59** (61 mg, 0.28 mmol) was dissolved in TFA:H<sub>2</sub>O (1:1, 2 mL) and the solution was stirred at r.t. for 5.5 h. The residue was concentrated under reduced pressure and purified

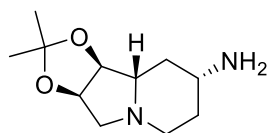
by Dowex 50WX8 resin eluting with MeOH, H<sub>2</sub>O, and NH<sub>4</sub>OH 25%, to afford **60** (39 mg, 0.20 mmol, 71%) as a colorless oil.

**(1*S*,2*R*,8*aS*)-1,2-*O*-Isopropylidendioxyindolizidin-7-one (**61**).**



Anhydrous DMSO (1.0 mL, 14 mmol) was added dropwise to a stirred solution of oxalyl chloride (0.6 mL, 7 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) at -78 °C. The mixture was stirred at -65 °C for 15 min, and then a solution of alcohol **59** (770 mg, 3.60 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added. The mixture was stirred for 5 h at -65 °C and then Et<sub>3</sub>N (2.5 mL, 18 mmol) was added. The mixture was warmed to r.t. and then evaporated. Chromatographic purification on silica gel (Et<sub>2</sub>O:Acetone, 7:1) afforded **61** (493 g, 2.33 mmol, 65%) as a yellow oil.

$[\alpha]_D^{22}$	-102.5 (c 0.97, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 4.79 (dt, 1H, <i>J</i> <sub>2,1</sub> = 6.6, <i>J</i> <sub>2,3</sub> = <i>J</i> <sub>2,3'</sub> = 4.5, H-2), 4.27 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1,8a</sub> = 5.1, H-1), 3.42 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>3,3'</sub> = 9.6, H-3), 3.25-3.19 (m, 1H, H-5), 2.64-2.44 (m, 5H, H-3', H-5', H-6', H-8, H-8a), 2.32-2.23 (m, 2H, H-6, H-8'), 1.48 (s, 3H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.48 (s, 3H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ ppm) δ 207.7 (C=O), 113.9 (C(CH) <sub>2</sub> ), 85.1 (C-1), 78.8 (C-2), 68.2 (C-8a), 58.3 (C-3), 49.5 (C-5), 44.5 (C-8), 39.7 (C-6), 27.0 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 25.1 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 212.1280, calc. for C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N [M+H] <sup>+</sup> : 212.1281.

**(1*S*,2*R*,7*R*,8*aS*)-7-Amino-1,2-*O*-isopropylidenedioxyindolizidine (62).**

A stirred solution of **61** (715 mg, 3.40 mmol) and  $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$  (2.0 mL, 6.8 mmol) in absolute EtOH (27 mL) was saturated with ammonia. After 5 h at r.t.,  $\text{NaBH}_4$  (200 mg, 5.07 mmol) was added and the mixture was stirred for 18 h. Then, 2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (35 mL) was added and the mixture was filtered through Celite and washed with EtOH and EtOAc. The filtrate was evaporated, and the crude of diastereoisomeric amines (7*S*:7*R*=1:5) was purified through chromatography column on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH: $\text{NH}_4\text{OH}$ , 5:1:0.05) to afford pure **62** (450 mg, 2.12 mmol, 62%) as a colorless oil.

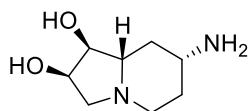
$[\alpha]_D^{23}$  -44.6 (c 0.88, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  4.71 (dt, 1H,  $J_{2,1} = 6.3$ ,  $J_{2,3} = J_{2,3'} = 3.9$ , H-2), 4.21 (dd, 1H,  $J_{1,8a} = 5.1$ , H-1), 3.35-3.27 (m, 1H, H-3), 2.98 (ddd, 1H  $J_{5,5'} = 12.0$ ,  $J_{5,6'} = 4.1$ ,  $J_{5,6} = 2.4$ , H-5), 2.77-2.66 (m, 1H, H-7), 2.41-2.29 (m, 3H, H-3', H-5', H-8a), 1.99 (m, 1H, H-8), 1.74 (m, 1H, H-6), 1.46 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.38 (qd, 1H,  $J_{6',6} =$ ,  $J_{6',7} = J_{6',5'} = 11.7$ ,  $J_{6',5} = 4.1$ , H-6'), 1.30 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.09 (q, 1H,  $J_{8,8'} = J_{8',8a} = J_{8',7} = 11.7$ , H-8').

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  114.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 85.2 (C-1), 79.4 (C-2), 68.3 (C-8a), 59.1 (C-3), 50.6 (C-5), 49.8 (C-7), 37.2 (C-8), 33.4 (C-6), 27.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ).

HRESIMS  $m/z$  found 213.1599, calc. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2$ [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ : 213.1598.

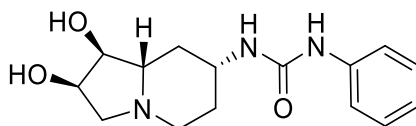
**(1*S*,2*R*,7*R*,8*aS*)-7-Aminooctahydroindolizidine-1,2-diol (53).**



Compound **62** (266 mg, 1.30 mmol) was dissolved in THF (7 mL) and 4 M HCl (7 mL) was added. The solution was stirred at r.t. for 6 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on Dowex 50WX8 eluting with MeOH, H<sub>2</sub>O, and NH<sub>4</sub>OH 25%, afforded **53** (207 mg, 1.20 mol, 92%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{22}$	-54.9 (c 1.83, MeOH).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, $\delta$ ppm, <i>J</i> Hz) $\delta$ 4.14 (q, 1H, $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,3'} = 6.9$ , H-2), 3.55 (dd, 1H, $J_{1,8a} = 8.4$ , H-1), 3.41 (dd, 1H, $J_{3,3'} = 9.9$ , H-3), 3.00 (ddd, 1H, $J_{5,5'} = 11.4$ , $J_{5,6'} = 4.2$ , $J_{5,6} = 2.4$ , H-5), 2.84-2.74 (m, 1H, H-7), 2.21-2.10 (m, 3H, H-3', H-5', H-8), 2.03-1.98 (m, 1H, H-8a), 1.88 (m, 1H, H-6), 1.42 (dq, 1H, $J_{6',6} = 12.0$ , $J_{6',5} = J_{6',5'} = J_{6',7} = 4.5$ , H-6'), 1.11 (q, 1H, $J_{8,8'} = J_{8,8a} = J_{8,7} = 11.7$ , H-8').
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, $\delta$ ppm) $\delta$ 74.5 (C-1), 67.6 (C-2), 66.2 (C-8a), 60.8 (C-3), 50.5 (C-5), 50.0 (C-7), 36.5 (C-8), 33.2 (C-6).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 173.1282, calc. for C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 173.1285.

**1-[(1S,2R,7R,8aS)-1,2-Dihydroxyoctahydroindolizin-7-yl]-3-phenylurea (51a).**

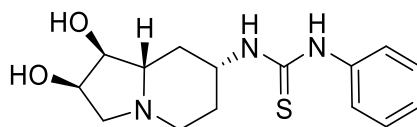


To a solution of amine **53** (44.5 mg, 0.260 mmol) in anh. DMF (1.7 mL) was added phenyl isocyanate (34  $\mu$ L, 0.31 mmol) and the mixture was stirred for 6.5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 10:1) to give **51a** (47.5 mg, 0.160 mmol, 62%) as a white solid.



$[\alpha]_D^{24}$	-23.8 (c 0.28, MeOH).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 8.41 (s, 1H, -NHPH), 7.37 (d, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.8$ Ph), 7.20 (m, 2H, Ph), 6.87 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 7.8$ , Ph), 6.20 (d, 1H, $J_{\text{NH},7} = 7.8$ , NH), 4.56 (s, 2H, -OH), 3.96 (br q, 1H, $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,3'} = 6.3$ , H-2), 3.49-3.35 (m, 2H, H-1, H-7), 3.27 (dd, 1H, $J_{3,3'} = 9.3$ , $J_{3,2} = 6.9$ , H-3), 2.88-2.85 (m, 1H, H-5), 2.12-1.95 (m, 3H, H-8, H-3', H-5'), 1.87-1.78 (m, 2H, H-8a, H-6), 1.35-1.23 (m, 1H, H-6'), 1.01 (q, 1H, $J_{8,8'} = J_{8',8a} = J_{8',7} = 11.4$ , H-8').
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) $\delta$ 155.0 (C=O), 141.0 (C <sub>q</sub> Ph), 129.1 (Ph), 121.4 (Ph), 117.9 (Ph), 75.1 (C-1), 67.8 (C-2), 67.1 (C-8a), 61.6 (C-3), 51.0 (C-5), 47.6 (C-7), 36.4 (C-8), 32.7 (C-6).
HRESIMS	$m/z$ found 292.1658, calc. for C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 292.1656.

**1-[(1S,2R,7R,8aS)-1,2-Dihydroxyoctahydroindolizin-7-yl]-3-phenylthiourea (51b).**

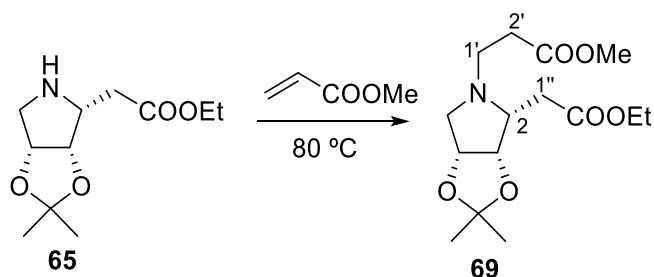


To a solution of amine **53** (46 mg, 0.27 mmol) in MeOH (2 mL) was added phenyl isothiocyanate (38  $\mu\text{L}$ , 0.32 mmol), and the mixture was stirred for 5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 10:1) to give **51b** (67 mg, 0.22 mmol, 81%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{23}$	-29.8 (c 0.65, MeOH).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 7.38-7.32 (m, 4H, Ph), 7.21-7.15 (m, 1H, Ph), 4.37-4.33 (m, 1H, H-7), 4.14 (td, 1H, $J_{2,1} = J_{2,3} = 6.9$ , $J_{2,3'} = 5.4$ , H-2), 3.55 (dd, 1H, $J_{1,8a} = 8.4$ , H-1), 3.43 (dd, 1H, $J_{3,3'} = 10.2$ , H-3), 3.03 (ddd, 1H, $J_{5,5'} =$

	11.3, $J_{5,6} = 4.3$ , $J_{5,6'} = 2.4$ , H-5), 2.41-2.34 (m, 1H, H-8), 2.26-2.13 (m, 2H, H-3', H-5'), 2.11-2.04 (m, 2H, H-6, H-8a), 1.48 (qd, 1H, $J_{6',6} = J_{6',7} = J_{6',5'} = 12.3$ , $J_{6',5} = 4.2$ , H-6'), 1.19 (q, 1H, $J_{8,8'} = J_{8,8a} = J_{8,7} = 11.6$ , H-8').
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm) $\delta$ 181.5 (C=S), 139.8 ( $\text{C}_q$ Ph), 130.1 (Ph), 126.6 (Ph), 125.5 (Ph), 75.9 (C-1), 68.9 (C-2), 67.8 (C-8a), 62.2 (C-3), 53.2 (C-7), 52.0 (C-5), 35.3 (C-8), 31.9 (C-6).
HRESIMS	$m/z$ found 308.1426, calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 308.1427.

**(2*R*,3*S*,4*R*)-2-Ethoxycarbonylmethyl-*N*-(2'-methoxycarbonylethyl)-3,4-*O*-isopropylidendioxy-pyrrolidine (69).**

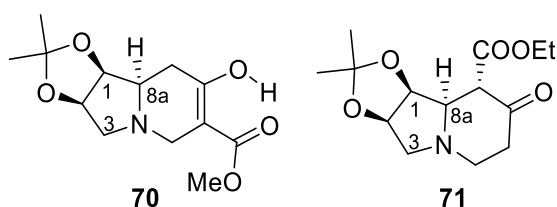


Compound **65**<sup>182</sup> (2.7 g, 12 mmol) was dissolved in methyl acrylate (18 mL) and the reaction was heated to reflux (80 °C). After stirring for 48 h, the reaction mixture was cooled to r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel ( $\text{Et}_2\text{O}$ :Cyclohexane, 1:1) to afford **69** (3.1 g, 9.8 mmol, 82%) as a yellow oil.

<sup>182</sup> Robina, I.; Gearing, R. P.; Buchanan, J. G.; Wightman, R. H. Diastereoselective conjugate addition of ammonia in the synthesis of chiral pyrrolidines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 2622-2624.

$[\alpha]_D^{28}$	-92.5 (c 0.99, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 4.67 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>3,4</sub> = 6.5, <i>J</i> <sub>3,2</sub> = 4.5, H-3), 4.63 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>4,5b</sub> = 4.5, H-4), 4.15 (q, 2H, <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 7.2, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.65 (s, 3H, -CO <sub>2</sub> Me), 3.19 (d, 1H, <i>J</i> <sub>5a,5b</sub> = 10.8, H-5a), 3.06 (dt, 1H, <i>J</i> <sub>1a',1b'</sub> = 12.2, <i>J</i> <sub>1a',2a'</sub> = <i>J</i> <sub>1a',2b'</sub> = 7.8, H-1'a), 2.72 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1a'',1b''</sub> = 17.5, <i>J</i> <sub>1a'',2</sub> = 9.7, H-1''a), 2.60-2.51 (m, 2H, H-1''b, H-2), 2.49-2.44 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.29 (m, 1H, H-1'b) 2.08 (dd, 1H, H-5b), 1.42, 1.29 (2s, 3H each, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.26 (t, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ ppm) δ 172.9, 172.4 (CO <sub>2</sub> Et, CO <sub>2</sub> Me), 111.4 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 80.9 (C-4), 78.2 (C-3), 64.0 (C-2), 60.5 (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 59.1 (C-5), 51.7 (-CO <sub>2</sub> Me), 48.3 (C-1), 33.2 (C-2'), 32.6 (C-1''), 26.3, 25.8 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 14.3 (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 316.1751, calc. for C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>6</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 316.1760.

**(1*S*,2*R*,8*aR*)-7-Hydroxy-1,2-*O*-isopropylidendioxy-6-methoxycarbonyl-indolizidine-6-ene (70) and (1*S*,2*R*,8*S*,8*aR*)-8-Ethoxycarbonyl-1,2-*O*- isopropylidendioxy-7-oxo-indolizidine (71).**



A solution of lithium bis(trimethylsilyl)amide 1.0 M in THF (20.0 mL, 19.7 mmol) was dropwise added to a cooled (-78 °C) and stirred solution of **69** (3.1 g, 9.8 mmol) in anh. THF (56 mL). After stirring for 2h at -78 °C, sat. aq. soln. of NH<sub>4</sub>Cl (80 mL) was added and the reaction mixture was warmed to r.t. Then, the mixture was extracted several times with Et<sub>2</sub>O and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography column on silica gel

(Et<sub>2</sub>O:Cyclohexane, 1:2 → 2:1) to obtain **70** (1.5 g, 5.3 mmol, 54%) and **71** (786 mg, 2.92 mmol, 30%) both as a yellow oils.

#### Compound 70.

$[\alpha]_D^{27}$  +76.6 (c 0.86, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, *J* Hz) δ 12.05 (s, 1H, -OH), 4.70 (dd, 1H, *J*<sub>2,1</sub> = 6.2, *J*<sub>2,3'</sub> = 4.5, H-2), 4.56 (dd, 1H, *J*<sub>1,8a</sub> = 4.7, H-1), 3.74 (s, 3H, -CO<sub>2</sub>Me), 3.73 (m, 1H, H-5), 3.28 (d, 1H, *J*<sub>3,3'</sub> = 11.0, H-3), 2.86-2.66 (m, 2H, H-5', H-8), 2.33-2.09 (m, 3H, H-3', H-8', H-8a), 1.49, 1.32 (2s, 3H each, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) δ 171.5, 171.3 (C=O, C-7), 111.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 96.4 (C-6), 79.9 (C-1), 79.1 (C-2), 62.9 (C-8a), 59.9 (C-3), 51.6 (CO<sub>2</sub>Me), 48.9 (C-5), 29.5 (C-8), 26.1, 24.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

HRESIMS *m/z* found 270.1330, calc. for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub>[M+H]<sup>+</sup>: 270.1341.

#### Compound 71.

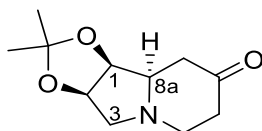
$[\alpha]_D^{28}$  -42.9 (c 0.63, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm, *J* Hz) δ 4.70 (dd, 1H, *J*<sub>2,1</sub> = 6.2, *J*<sub>2,3</sub> = 4.3, H-2), 4.59 (dd, 1H, *J*<sub>1,8a</sub> = 4.5, H-1), 4.31-4.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.75 (dd, 1H, *J*<sub>8,8a</sub> = 11.2, <sup>4</sup>*J*<sub>8,6</sub> = 0.5, H-8), 3.31-3.28 (m, 1H, H-5), 3.23 (d, 1H, *J*<sub>3,3'</sub> = 10.8, H-3), 2.68 (dddd, 1H, *J*<sub>6,6'</sub> = 19.2, *J*<sub>6,5</sub> = 12.2, *J*<sub>6,5'</sub> = 6.3, H-6), 2.54 (dd, 1H, H-8a), 2.41-2.33 (m, 2H, H-5', H-6'), 2.26 (dd, 1H, H-3'), 1.52, 1.28 (2s, 3H each, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.28 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) δ 204.2 (C-7), 168.1 (CO<sub>2</sub>Et), 111.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 79.7 (C-1), 79.5 (C-2), 68.7 (C-8a), 61.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 58.9 (C-3), 57.7 (C-8), 49.8 (C-5), 40.5 (C-6), 29.7, 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

HRESIMS  $m/z$  found 284.1486, calc. for  $C_{14}H_{22}NO_5[M+H]^+$ : 284.1498.

**(1*S*,2*R*,8*aR*)-1,2-*O*-Isopropylidendioxy-7-oxo-indolizidine (**72**).**



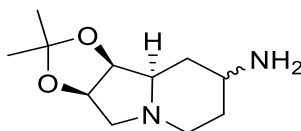
A solution of **70** (1.50 g, 5.57 mmol) and LiCl (472 mg, 11.1 mmol) in DMF (65 mL) was heated at 140 °C. After stirring for 6 h, the reaction mixture was cooled to r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in  $CH_2Cl_2$  and washed with brine. The organic phase was dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by chromatography column on silica gel ( $Et_2O$ :Pentane, 1:2→ 2:1) to afford **72** (254 mg, 1.20 mmol, 22%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{27}$  +15.7 (c 0.95,  $CH_2Cl_2$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  4.71 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 6.2$ ,  $J_{2,3'} = 4.4$ , H-2), 4.48 (dd, 1H,  $J_{1,8a} = 4.5$ , H-1), 3.29 (ddd, 1H,  $J_{5,5'} = 10.7$ ,  $J_{5,6} = 7.0$ ,  $J_{5,6'} = 1.2$ , H-5), 3.23 (d, 1H,  $J_{3,3'} = 10.9$ , H-3), 2.73 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 14.5$ ,  $J_{8,8a} = 12.8$ ,  $J_{8,6} = 0.6$ , H-8), 2.62 (dddd, 1H,  $J_{6,6'} = 19.5$ ,  $J_{6,5'} = 12.5$ , H-6), 2.40 (dt, 1H,  $J_{8',8a} = J_{8',6'} = 2.7$ , H-8'), 2.33-2.22 (m, 2H, H-5', H-6'), 2.18 (dd, 1H, H-3'), 2.12 (ddd, 1H, H-8a), 1.53, 1.33 (2s, 3H each,  $C(CH_3)_2$ ).

$^{13}C$ -NMR (125.7 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  209.5 (C-7), 111.7 ( $C(CH_3)_2$ ), 80.6 (C-1), 79.9 (C-2), 67.3 (C-8a), 59.4 (C-3), 49.9 (C-6), 41.9 (C-8), 40.6 (C-5), 26.2, 25.0 ( $C(CH_3)_2$ ).

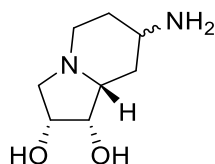
HRESIMS  $m/z$  found 211.1214, calc. for  $C_{11}H_{17}NO_3[M+H]^+$ : 211.1208.

**(1S,2R,7S,8aR) and (1S,2R,7R,8aR)-7-Amino-1,2-O-isopropylidenedioxyindolizidine (73).**

A solution of **72** (253 mg, 1.20 mmol) and  $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$  (0.7 mL, 2.4 mmol) in absolute EtOH (7 mL) was saturated with ammonia. After stirring for 5.5 h at r.t.,  $\text{NaBH}_4$  (71 mg, 1.8 mmol) was added and the mixture was stirred for 4 h. Then, 2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (6 mL) was added and the mixture was filtered through celite and washed with EtOH and EtOAc. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by chromatography column on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ , 7:1:0.05) to afford **73** (168 mg, 0.791 mmol, 66%, 10:1 mixture of diastereoisomers) as a yellow oil.

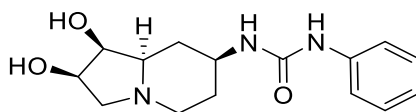
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz, data for major diastereoisomer)  $\delta$  4.63 (dd, 1H,  $J = 6.1$ ,  $J = 4.5$ ), 4.48 (dd, 1H,  $J = 5.9$ ,  $J = 4.3$ ), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.73-2.62 (m, 1H), 2.08 (dd, 1H,  $J = 10.8$ ,  $J = 4.5$ ), 2.04-1.81 (m, 3H), 1.51-1.36 (m, 2H), 1.45, 1.29 (2s, 3H each,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ).

**(1S,2R,7S,8aR) and (1S,2R,7R,8aR)-7-Amino-1,2-O-dihydroxyindolizidine (64).**



The mixture of diastereoisomeric amines **73** (62 mg, 0.29 mmol) was dissolved in THF (1 mL) and 4 M HCl (1 mL) was added. The solution was stirred at r.t. for 5.5 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on Dowex 50WX8 eluting with MeOH, H<sub>2</sub>O, and NH<sub>4</sub>OH 25%, afforded **64** (41 mg, 0.24 mmol, 83%) as a colorless oil that was used directly for the synthesis of the (thio)ureas **52a** and **52b**.

***N*-[Phenyl]-*N'*-[(1*S*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-*O*-dihydroxyindolizidine-7-yl]urea (**52a**).**



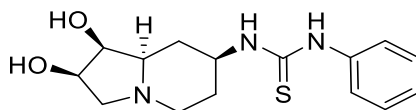
To a solution of diastereoisomeric amines **64** (41 mg, 0.24 mmol) in DMF (1.5 mL) was added phenyl isocyanate (33  $\mu$ L, 0.29 mmol) and the mixture was stirred for 4.5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 7:1:0.05) to give **52a** (20 mg, 0.07 mmol, 29%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{24}$  -80.2 (c 1.0, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm, *J* Hz)  $\delta$  7.35-7.32 (m, 2H, Ph), 7.26-7.21 (m, 2H, Ph), 6.96 (tt, 1H, *J*<sub>H,H</sub> = 7.2, *J*<sub>H,H</sub> = 1.1, Ph), 4.78 (td, 1H, *J*<sub>2,1</sub> = *J*<sub>2,3'</sub> = 7.2, *J*<sub>2,3</sub> = 1.8, H-2), 4.00 (dd, 1H, *J*<sub>1,8a</sub> = 3.9, H-1), 3.71-3.61 (m, 1H, H-7), 3.06 (dt, 1H,

	$J_{5,5'} = 11.4$ , $J_{5,6} = J_{5,6'} = 1.5$ , H-5), 2.92 (dd, 1H, $J_{3,3'} = 10.5$ , H-3), 2.40 (dd, 1H, H-3'), 2.15-1.92 (m, 4H, H-5', H-6, H-8, H-8a), 1.62-1.43 (m, 2H, H-6', H-8').
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm) $\delta$ 157.6 (C=O), 140.9 (Cq Ph), 129.8 (Ph), 123.4 (Ph), 120.1 (Ph), 72.5 (C-1), 70.6 (C-2), 68.7 (C-8a), 62.5 (C-3), 52.1 (C-5), 47.2 (C-7), 32.9 (C-8), 32.8 (C-6).
HRESIMS	$m/z$ found 292.1656, calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_3$ [M+H] $^+$ : 292.1656.

***N*-[Phenyl]-*N'*-[(1*S*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-*O*-dihydroxyindolizidine-7-yl]thiourea (52b).**



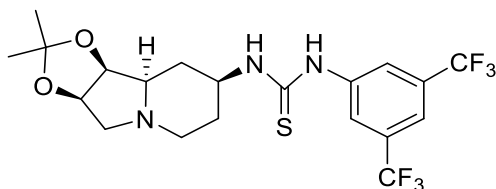
To a solution of diastereomeric amines **64** (38 mg, 0.22 mmol) in MeOH (2 mL) was added phenyl isothiocyanate (30  $\mu\text{L}$ , 0.26 mmol) and the mixture was stirred for 4 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH, 15:1) to give **52b** (48 mg, 0.16 mmol, 73%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{22}$	-50.3 (c 0.8, MeOH).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 7.39-7.33 (m, 4H, Ph), 7.22-7.15 (m, 1H, Ph), 4.40-4.33 (m, 1H, H-7), 4.27 (dt, 1H, $J_{2,1} = J_{2,3'} = 6.9$ , $J_{2,3} = 1.8$ , H-2), 4.00 (dd, 1H, $J_{1,8a} = 3.9$ , H-1), 3.08-3.03 (m, 1H, H-5), 2.90 (dd, 1H, $J_{3,3'} = 10.5$ , H-3), 2.37 (dd, H-3'), 2.13-2.00 (m, 4H, H-5', H-6, H-8, H-8a), 1.63-1.45 (m, 2H, H-6', H-8').



$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm) $\delta$ 181.4 (C=S), 139.8 (Cq Ph), 130.1 (Ph), 126.6 (Ph), 125.5 (Ph), 72.5 (C-1), 70.6 (C-2), 68.6 (C-8a), 62.6 (C-3), 53.3 (C-7), 52.0 (C-5), 31.7 (C-8), 31.6 (C-6).
HRESIMS	$m/z$ found 308.1427, calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ : 308.1427.

**N-[(3,5-Bis-(trifluoromethyl)phenyl)]-N'-[(1*S*,2*R*,7*S*,8*aR*)-1,2-*O* isopropylidendioxyindolizidin-7-yl]thiourea (**74**).**



To a solution of diastereomeric amines **73** (72 mg, 0.34 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) was added 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl isothiocyanate (75  $\mu\text{L}$ , 0.41 mmol) and the mixture was stirred for 2.5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH, 60:1) to give pure **74** (97 mg, 0.20 mmol, 59%) and a diastereoisomeric mixture 7*R*:7*S*=1:10 (32 mg, 0.07 mmol, 21%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{22}$	-53.8 (c 0.64, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 8.39 (s, 1H, NH), 7.85 (s, 2H, Ph), 7.69 (s, 1H, Ph), 6.30 (d, 1H, $J_{\text{NH},7} = 8.1$ , NH), 4.64 (dd, 1H, $J_{2,1} = 6.3$ , $J_{2,3} = 4.2$ , H-2), 4.49 (dd, 1H, $J_{1,8a} = 4.5$ , H-1), 3.38-3.34 (m, 1H, H-7), 3.11-3.05 (m, 2H, H-3, H-5), 2.25-1.88 (m, 4H, H-3', H-5', H-6, H-8), 1.93-1.88 (m, 1H, H-8a), 1.59-1.51 (m, 2H, H-6', H-8'), 1.48, 1.25 (2s, 3H each, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 179.9 (C=S), 139.2 (C-1'), 132.7 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 33.7$ , C-3', C-5'), 124.1-123.9 (m, C-2', C-6'), 122.8 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.4$ , $\text{CF}_3$ ),

119.3-119.1 (m, C-4'), 111.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 80.4 (C-1), 78.8 (C-2), 66.3 (C-8a),  
59.4 (C-3), 52.7 (C-7), 50.2 (C-5), 31.0, 30.9 (C-6, C-8), 25.7, 24.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).  
HRESIMS  $m/z$  found 484.1479, calc. for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F<sub>6</sub>S: 484.1488.

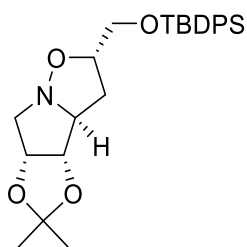
**Prop-2-enyloxy-*tert*-butyldiphenylsilane (76).**<sup>183</sup>



*Tert*- Butyldiphenylsilyl chloride (5.0 mL, 19 mmol) was added dropwise to a cooled (0 °C) solution of allyl alcohol (1.2 mL, 17 mmol) and imidazole (1.40 g, 20.7 mmol) in anh. DMF (23 mL). After stirring for 7 h at r.t. under nitrogen atmosphere, the reaction mixture was cooled to 0 °C, quenched with water (25 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed with water (3x30 mL) and brine (30 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:50) to afford **76** (3.90 g, 13.2 mmol, 69%) as a colorless oil.

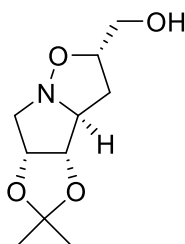
<sup>183</sup> Waser, J.; Gaspar, B.; Nambu, H.; Carreira, E. M. Hydrazines and azides via the metal-catalyzed hydrohydrazination and hydroazidation of olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11693-11712.

**(2*S*,3*aS*,4*S*,5*R*)-Hexahydro-2-*tert*-butyldiphenylsilyloxymethyl-4,5-isopropylidenedioxy-pyrrolo[1,2-*b*]isoxazole (77).**<sup>184</sup>



(2*S*,3*R*)-2,3-*O*-Isopropylidenedioxy-1-pyrroline oxide **55** (1.1 g, 7.1 mmol) and prop-2-enyloxy-*tert*-butyldiphenylsilane **76** (4.0 g, 14 mmol) were dissolved in toluene (90 mL) and the reaction was heated to reflux. After stirring for 7.5 h, the reaction mixture was cooled to r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:5) to afford **77** (2.4 g, 5.3 mmol, 75%) as a colorless oil.

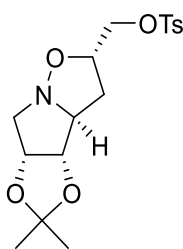
**(2*S*,3*aS*,4*S*,5*R*)-Hexahydro-2-hydroxymethyl-4,5-*O*-isopropylidenedioxy-pyrrolo[1,2-*b*]isoxazole (78).**<sup>184</sup>



<sup>184</sup> McCaig, A. E.; Meldrum, K. P.; Wightman, R. H. Synthesis of trihydroxylated pyrrolizidines and indolizidines using cycloaddition reactions of functionalized cyclic nitrones, and the synthesis of (+)- and (-)-lentiginosine. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9429-9446.

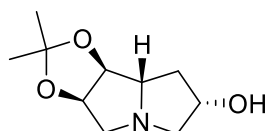
To a solution of **77** (4.8 g, 11 mmol) in THF (90 mL) was slowly added tetra-*n*-butylammonium fluoride (12 mL, 1 M in THF, 12 mmol). After stirring for 3 h at r.t., the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the product was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O→Et<sub>2</sub>O:MeOH, 9:1) to yield **78** (2.2 g, 10 mmol, 91%) as a white solid.

**(2*S*,3*aS*,4*S*,5*R*)-Hexahydro-4,5-*O*-isopropylidenedioxy-2-tosyloxymethyl-pyrrolo[1,2-*b*]isoxazole (**79**).**<sup>185</sup>

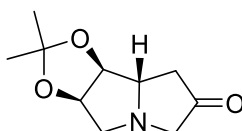


To a cooled (0 °C) solution of **78** (2.2 g, 10 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (83 mL) were added Et<sub>3</sub>N (7.0 mL, 51 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (5.8 g, 31 mmol). After stirring for 4.5 h at r.t., the solution was quenched with water (33 mL) and the aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:2→2:1) to afford **79** (3.3 g, 8.9 mmol, 89%) as a white solid.

<sup>185</sup> PhD thesis; "Preparación, aplicaciones y reactividad de nuevos derivados de imino-azúcares. Síntesis de análogos de FK866 con propiedades antitumorales." (María del Pilar Elías Rodríguez, University of Seville, 2017).

**(1*S*,2*R*,6*S*,7*aS*)-6-Hydroxy-1,2-*O*-isopropylidenedioxy-pyrrolizidine (**28**).<sup>186</sup>**

Pd/C (10%) was added to a solution of tosyl derivative **79** (3.3 g, 8.9 mmol) in MeOH (230 mL) and the reaction mixture was hydrogenated at 1 atm for 24 h. After the catalyst was filtered off using celite, the solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:MeOH, 2:1→1:3) obtaining the final product **28** (1.6 g, 8.2 mmol, 92%) as a white solid.

**(1*S*,2*R*,7*aS*)-1,2-*O*-Isopropylidendioxy-pyrrolizidin-6-one (**80**).<sup>187</sup>**

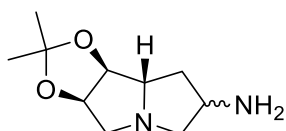
Anhydrous DMSO (1.3 mL, 18 mmol) was added dropwise to a stirred solution of oxalyl chloride (0.8 mL, 9 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11 mL) at -78 °C. The mixture was stirred at -65 °C for 15 min, and then a solution of alcohol **28** (917 mg, 4.60 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added. The mixture was stirred for 5 h at -65 °C, and then Et<sub>3</sub>N (3.2 mL, 23 mmol)

<sup>186</sup> McCaig, A. E.; Meldrum, K. P.; Wightman, R. H. Synthesis of trihydroxylated pyrrolizidines and indolizidines using cycloaddition reactions of functionalized cyclic nitrones, and the synthesis of (+)- and (-)-lentiginosine. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9429-9446.

<sup>187</sup> Elías-Rodríguez, P.; Pingitore, V.; Carmona, A.T.; Moreno-Vargas, A.J.; Ide, D.; Miyawaki, S.; Kato, A.; Álvarez, E.; Robina, I. Discovery of a potent  $\alpha$ -galactosidase inhibitor by *in situ* analysis of a library of pyrrolizidine-(thio)urea hybrid molecules generated via click chemistry. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8863-8873.

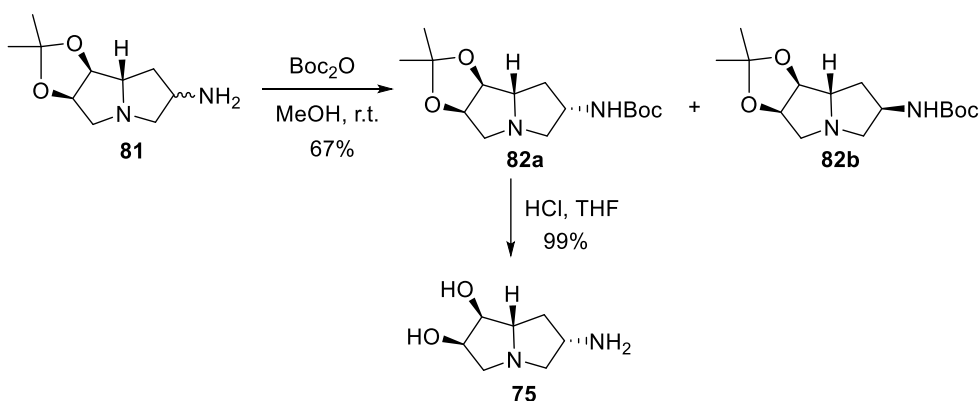
was added. The mixture was warmed to r.t. and then evaporated. Chromatographic purification on silica gel (Et<sub>2</sub>O:Acetone, 3:1) afforded **80** (650 mg, 3.29 mmol, 72%) as a pale orange solid.

**(1S,2R,6R,7aS) and (1S,2R,6S,7aS)-6-Amino-1,2-O-isopropylidendioxyppyrrrolizidine (81).**<sup>187</sup>



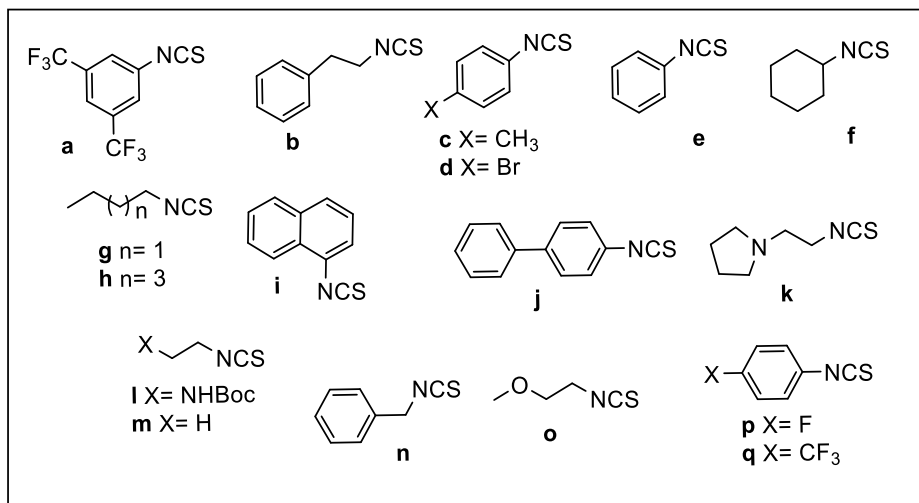
A stirred solution of **80** (756 mg, 3.90 mmol) and Ti(O<sup>*i*</sup>Pr)<sub>4</sub> (2.3 mL, 7.8 mmol) in absolute EtOH (26 mL) was saturated with ammonia. After 6 h at r.t., NaBH<sub>4</sub> (229 mg, 5.80 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 h. Then, 2 M NH<sub>4</sub>OH (25 mL) was added and the mixture was filtered through Celite and washed with EtOH and EtOAc. The filtrate was evaporated and the residue purified through chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 7:1:0.05 → 5:1:0.05) to afford **81** (545 mg, 2.75 mmol, 71%, 2:1 mixture of diastereoisomers) as a yellow oil.

**(1S,2R,6S,7aS)-6-Amino-1,2-O-dihydroxyppyrrrolizidine (75).**



Boc<sub>2</sub>O (509 mg, 2.33 mmol) was added to a solution of **81** (273 mg, 1.38 mmol) in MeOH (6.0 mL) and the mixture was stirred at r.t. for 8 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 30:1) afforded protected compounds **82a** (199 mg, 0.67 mmol, 49%) and **82b** (76 mg, 0.25 mmol, 18%) as white solids. Compound **82a** (90.9 mg, 0.30 mmol) was dissolved in THF (1.5 mL) and 4 M HCl (1.5 mL) was added. The solution was stirred at r.t. for 15 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on Dowex 50WX8 eluting with MeOH, H<sub>2</sub>O, and NH<sub>4</sub>OH 25%, afforded **75** (43 mg, 0.29 mmol, 99%) as a brown oil.

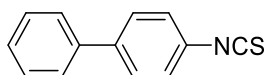
### Set of isothiocyanates (a-q)



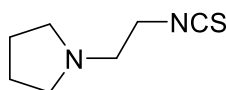
- ✓ All isothiocyanates are commercially available.
- ✓ **j**, **k** and **l** have been prepared following the general procedure described below, even if they are commercially available.

**General procedure for the synthesis of isothiocyanates j, k and l.**

To a solution of the appropriate amine (1 eq) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  1:1 (10 mL) was added  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3.2 eq) followed by thiophosgene (2 eq) and the reaction mixture was strongly stirred for 5 h at r.t. Then, the reaction mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and the organic phase was washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel obtaining the final product.

**4-Isothiocyanato-1,1'-biphenyl (j).<sup>188</sup>**

Starting from biphenylamine (200 mg, 1.18 mmol) and following the general procedure described above, followed by chromatography column on silica gel (cyclohexane), afforded isothiocyanate **j** (249 mg, 1.18 mmol, 100%) as a white solid.

**1-(2-Isothiocyanatoethyl)pyrrolidine (k).<sup>189</sup>**

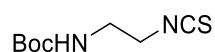
<sup>188</sup> Hua, Z.; Huang, X.; Bregman, B.; Chakka, N.; Di Mauro, E. F.; Doherty, E. M.; Goldstein, J.; Gunaydin, H.; Huang, H.; Mercede, S.; Newcomb, J.; Patel, V. F.; Turci, S. M.; Yan, J.; Wilson, C.; Martin, M. W. 2-Phenylamino-6-cyano-1H-benzimidazole-based isoform selective casein kinase 1 gamma (CK1c) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5392–5395.

<sup>189</sup> Papastaikoudil, T. S.; Tsotinis, A.; Raptopoulou, C. P.; Sambani, C.; Thomou, H. Synthesis of new alkylaminoalkyl thiosemicarbazones of 3-acetylindole and their effect on DNA synthesis and cell proliferation. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 107-114.



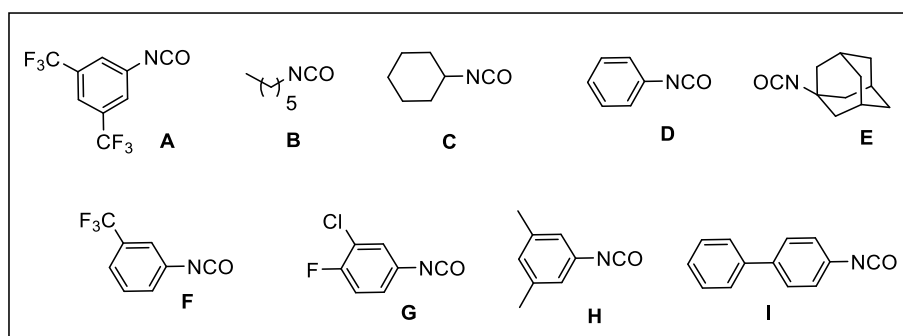
Starting from 2-(pyrrolidin-1-yl)ethan-1-amine (275 mg, 1.76 mmol) and following the general procedure described above, followed by chromatography column on silica gel (EtOAc:MeOH, 2:1), afforded isothiocyanate **k** (163 mg, 1.04 mmol, 59%) as a brown liquid.

***tert*-Butyl(2-isothiocyanatoethyl)carbamate (**l**).**<sup>190</sup>



Starting from *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (253 mg, 1.25 mmol) and following the general procedure described above, followed by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:4), afforded isothiocyanate **l** (250 mg, 1.24 mmol, 99%) as a yellow solid.

**Set of isocyanates (A-I)**



✓ All isocyanates are commercially available.

<sup>190</sup> Gondela, A.; Tomczyk, M. D.; Przypis, Q.; Walczak, K.; Versatile synthesis of 20-amino-20-deoxyuridine derivatives with a 20-amino group carrying linkers possessing a reactive terminal functionality. *Tetrahedron*. **2016**, *72*, 5626-5632.

**Generation of the monomeric libraries IA and IB followed by *in situ* biological screening (Figure 67).**

**Library IA:** To a solution of 300  $\mu\text{L}$  of the pyrrolizidine-amine **75** (28 mM in DMSO) in an eppendorf tube were added 100  $\mu\text{L}$  of a solution of the corresponding isothiocyanate (**a-q**) (70 mM in DMSO). The final concentration of the isothiocyanates (**a-q**) in each eppendorf was 17.5 mM. The resulting mixtures were shaken at r.t. for 6 h and monitored for completion by TLC (EtOAc:Cy, 1:1) and ESI-MS. Then the reaction mixtures were diluted with water to the desired concentration and placed in a 96-well microtiter plate to perform the inhibition assays towards coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. In the preliminary screening of the resulting crude pyrrolizidine thioureas (**75a-75q**), percentage of inhibition was determined at 5.0  $\mu\text{M}$  of the inhibitor on each well (assuming quantitative conversion in the reaction).

**Library IB:** To a solution of 300  $\mu\text{L}$  of the pyrrolizidine-amine **75** (28 mM in DMSO) in an eppendorf tube were added 100  $\mu\text{L}$  of a solution of the corresponding isocyanate (**A-I**) (70 mM in DMSO). The final concentration of the isocyanates (**A-I**) in each eppendorf was 17.5 mM. The resulting mixtures were shaken at r.t. for 6 h and monitored for completion by TLC (EtOAc:Cy, 1:1) and ESI-MS. Then the reaction mixtures were diluted with water to the desired concentration and placed in a 96-well microtiter plate to perform the inhibition assays towards coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. In the preliminary screening of the resulting crude pyrrolizidine ureas (**75A-75I**), percentage of inhibition was determined at 5.0  $\mu\text{M}$  of the inhibitor on each well (assuming quantitative conversion in the reaction).

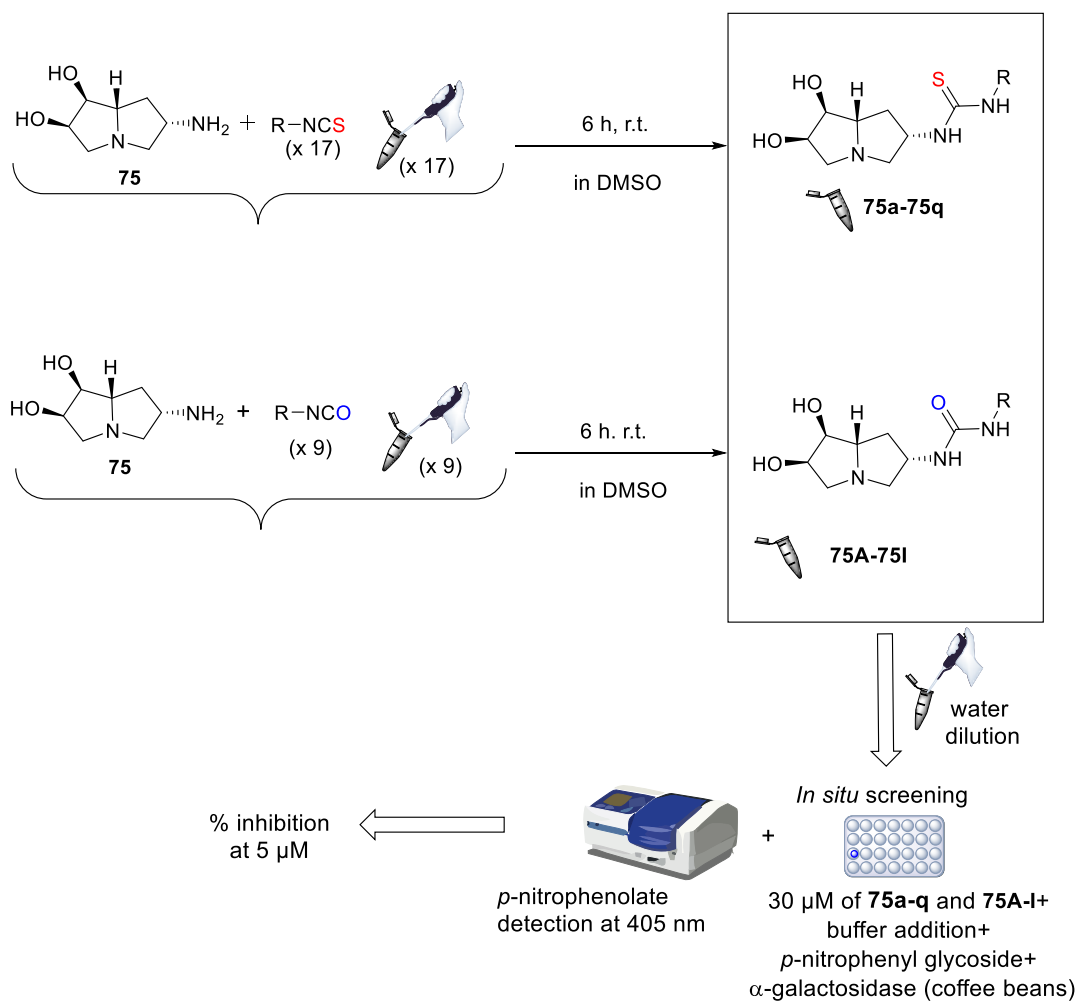
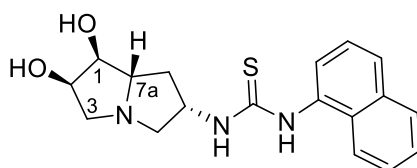


Figure 67

***N*-(2-Naphthyl)-*N'*-[(1*S*,2*R*,6*S*,7*aS*)-1,2-dihydroxypyrrolizidin-6yl]thiourea (**75i**).**

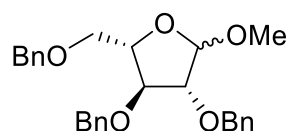
To a solution of amine **75** (41 mg, 0.26 mmol) in MeOH (2.0 mL) was added 2-naphthyl isothiocyanate (56 mg, 0.30 mmol) and the mixture was stirred for 5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 1:1) to give **75i** (51 mg, 0.15 mmol, 57%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{26}$  -16.8 (c 0.67, CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD=1:1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD =1:1, δ ppm, *J* Hz) δ 7.92–7.87 (m, 3H, Ph), 7.56–7.50 (m, 3H, Ph), 7.43 (dd, 1H, *J*<sub>H,H</sub> = 7.5, *J*<sub>H,H</sub> = 1.2, Ph) 5.06 (m, 1H, H-6) 4.13 (q, 1H, *J*<sub>2,1</sub> = *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>2,3'</sub> = 4.6, H-2), 3.72 (t, 1H, *J*<sub>1,7a</sub> = 4.6, H-1), 3.45–3.35 (m, 2H, H-5, H-7a), 2.99 (dd, 1H, *J*<sub>3,3'</sub> = 11.7, H-3), 2.69 (dd, 1H, H-3') 2.46–2.37 (m, 1H, H-7), 2.25 (t, 1H, *J*<sub>5',5</sub> = *J*<sub>5',6</sub> = 9.4, H-5'), 1.42 (q, 1H, *J*<sub>7',7</sub> = *J*<sub>7',6</sub> = *J*<sub>7',7a</sub> = 10.6, H-7').

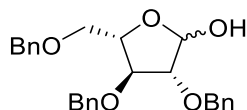
<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD =1:1, δ ppm) δ 182.4 (C=S), 135.3, 130.7, 129.0, 128.9, 127.5, 127.2, 126.2, 125.9, 123.1 (Ph), 78.1 (C-1), 72.9 (C-2), 67.7 (C-7a), 59.5 (C-5), 59.2 (C-3), 56.7 (C-6), 35.8 (C-7).

HRESIMS *m/z* found 344.1423, calc. for C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 344.1427.

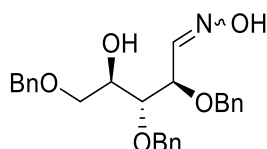
**Methyl-2,3,5-tri-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-arabinofuranoside (86).**<sup>191</sup>

To a solution of D-arabinose (5.0 g, 0.03 mol) in methanol (100 mL) under nitrogen atmosphere, acetyl chloride (3.0 mL, 0.04 mol) was added dropwise. After stirring for 4 h at r.t., the reaction mixture was neutralized by adding solid  $K_2CO_3$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was co-evaporated with toluene (3x50 mL) to afford a crude mixture of methyl  $\alpha,\beta$ -D-arabinofuranoside and  $\alpha,\beta$ -D-arabinopyranoside as a brown oil which was used in the next step without further purification. Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 8.2 g, 0.21 mol) was added dropwise to a solution of the above mixture (5.6 g, 0.030 mol) in anh. DMF (60 mL). After stirring for 1 h at r.t. under nitrogen atmosphere, the reaction mixture was cooled at 0 °C and then, benzyl bromide (24 mL, 0.21 mol) was added dropwise. The reaction mixture was warmed at r.t. and then stirred for 24 h. The reaction was cooled in an ice bath, quenched with methanol (90 mL) and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in  $Et_2O$  (50 mL) and washed with brine (3x50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:10) to afford **86** (9.9 g, 0.020 mol, 67%, 2 steps,  $\alpha:\beta$ , 3:1) as a colorless oil.

<sup>191</sup> Suthagar, K.; Polson, M. I. J.; Fairbanks, A. J. Unexpected furanose/pyranose equilibration of N-glycosyl sulfonamides, sulfamides and sulfamates. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6573-6579.

**2,3,5-Tri-O-benzyl-L-arabinofuranose (87).**<sup>192</sup>

To a solution of acetic acid (82 mL) and sulphuric acid (3M aq., 22 mL) was added **86** (6.0 g, 14 mmol). The mixture was heated at 100 °C for 1 h and then it was cooled to r.t. The residue was neutralized with saturated aqueous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and then extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:10→1:8) to obtain **87** (4.0 g, 9.5 mmol, 68%,  $\alpha$ : $\beta$ = 2:1) as a white solid.

**(2R,3R,4R)-2,3,5-Tris(benzyloxy)-4-hydroxypentanaloxime (88).**<sup>193</sup>

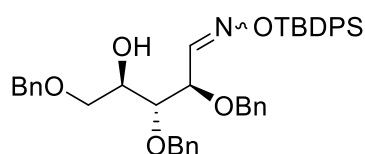
Hydroxylamine hydrochloride (3.5 g, 50 mmol) and **87** (4.8 g, 10 mmol) were added to a stirred solution of sodium methoxide (2.8 g, 50 mmol) in methanol (30 mL) under nitrogen

<sup>192</sup> RvanRijssel, E.; Goumans, T.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Van der Marel, G.A.; Codée, J. D. C. Chiral pyrroline-based ugi-three-component reactions are under kinetic control. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3026-3029.

<sup>193</sup> Grant Buchanan, J.; Lumbard, K. W.; Sturgeon, R. J.; Thompson, D. K.; Wightman, R. H. Potential glycosidase inhibitors: synthesis of 1,4-Dideoxy-1,4-imino derivatives of D-glucitol, D- and L-xylitol, D- and L-allitol, D- and L-talitol, and D-gulitol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1990**, *3*, 699-706.

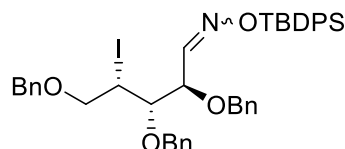
atmosphere and using 3Å molecular sieves. After 16 h, the residue was filtered through celite and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and washed with water (3x50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:2) to give the oxime **88** (4.05 g, 9.3 mmol, 93%) as a colorless oil.

**(2R,3R,4R)-2,3,5-Tris(benzyloxy)-4-hydroxypentanal-O-(tert-butylidiphenylsilyl)oxime (89).**<sup>194</sup>

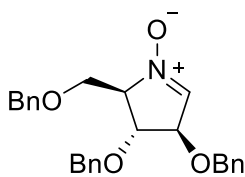


To a solution of **88** (4.6 g, 11 mmol) in anh. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (14 mL), imidazole (1.2 g, 20 mmol) was added followed by TBDPSCI (3.6 mL, 10 mmol). After stirring for 1.5 h at r.t., the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with water and brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O:Cyclohexane, 1:6 → 1:4) to give **89** (7.4 g, 11 mmol, quantitative) as a yellow oil.

<sup>194</sup> Carmona, A.T.; Whigtman, R. H.; Robina, I.; Vogel, P. Synthesis and glycosidase inhibitory activity of 7-deoxycasuarine. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3066-3073.

**(2*R*,3*S*,4*S*)-2,3,5-Tris(benzyloxy)-4-iodopentanal-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)oxime (**90**).<sup>195</sup>**

To a solution of **89** (3.8 g, 6.0 mmol) in toluene (200 mL) under nitrogen atmosphere was added imidazole (1.2 g, 17 mmol), I<sub>2</sub> (2.9 g, 11 mmol) and triphenylphosphine (4.5 g, 17 mmol). The reaction was heated to reflux. After stirring for 2.5 h, the reaction mixture was cooled to r.t. and quenched with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (100 mL). I<sub>2</sub> was added in portions until the organic layer became turbid. The excess of iodine was quenched by addition of sat. aq. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (100 mL), the organic phase was separated and washed with water (50 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O:Cyclohexane, 1:15) to give (*E*)-**90** (2.25 g, 2.87 mmol, 48%) and (*E/Z*)-**90** (1.45 g, 1.85 mmol, 31%) as viscous colorless oils.

**(2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-Bis(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole-1-oxide (**91**).<sup>196</sup>**

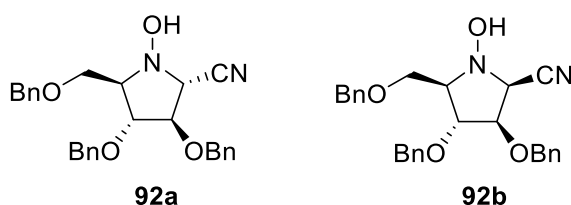
<sup>195</sup> Rössler, S. L.; Schreib, B. S.; Ginterseder, M.; Hamilton, J. Y.; Carreir, E. M.; Total synthesis and stereochemical assignment of (+)-broussonetine H. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5533–5536.

<sup>196</sup> Tsou, E. L.; Yeh, Y. T.; Liang, P. H.; Cheng, W. C. A convenient approach toward the synthesis of enantiopure isomers of DMDP and ADMDP. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 93–100.



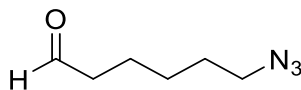
To a solution of (*E*)-**90** (3.3 g, 4.0 mmol) in toluene (200 mL) under nitrogen atmosphere was slowly added tetra-*n*-butylammonium fluoride (6.0 mL, 1 M in THF, 6.0 mmol). After stirring for 24 h at r.t., the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the product was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O:MeOH, 50:1) to give **91** (1.6 g, 3.8 mmol, 95%) as a white solid.

**(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-and (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-Bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-1-hydroxypyrrolidine-2-carbonitrile (**92a** and **92b**).**<sup>197</sup>



A mixture of **91** (1.9 g, 4.6 mmol) and trimethylsilyl cyanide (1.5 mL, 0.012 mol) in anh. methanol (80 mL) was stirred at 50 °C for 4 h. The reaction mixture was cooled to r.t. and the solvent was removed under vacuum. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane 1:5→1:4) to give **92a** (1.7 g, 3.9 mol, 85%) and **92b** (98 mg, 0.22 mmol, 5%) both as white solids.

**6-Azidohexanal (**94**).**<sup>198</sup>



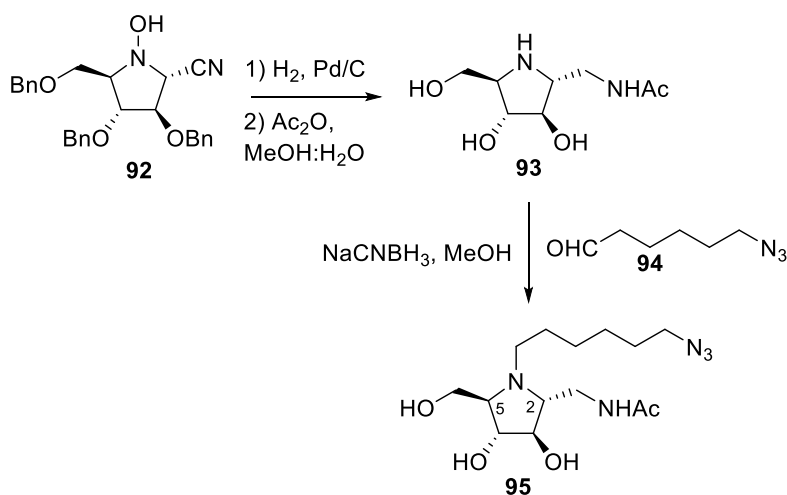
<sup>197</sup> Tsou, E. L.; Yeh, Y. T.; Liang, P. H.; Cheng, W. C. A convenient approach toward the synthesis of enantiopure isomers of DMDP and ADMDP. *Tetrahedron*. **2009**, *65*, 93–100.

<sup>198</sup> Shaikh, T. M.; Sudalai, A. Enantioselective synthesis of (+)- $\alpha$ -conhydrine and (–)-sedamine by L-proline-catalysed  $\alpha$ -aminoxylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3437–3444.

6-Bromo-1-hexanol (1.5 mL, 11 mmol) was dissolved in anh. DMF (45 mL) and then sodium azide (1.8 g, 28 mmol) was added. The reaction was stirred overnight at 70°C. The reaction mixture was cooled to r.t. and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was dissolved in EtOAc and washed with H<sub>2</sub>O (2x50 mL). The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to afford 6-azido-1-hexanol.<sup>199</sup> DMSO (1.8 mL, 25 mmol) was added to a solution of oxalyl chloride (1.4 mL, 17 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 mL) and the mixture was stirred at -78 °C under nitrogen atmosphere. After 20 min, a solution of crude 6-azido-1-hexanol (1.2 g, 8.4 mmol) in anh. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11 mL) was added and, after stirring for 1.5 h at -65 °C, the reaction mixture was treated with Et<sub>3</sub>N (4.7 mL, 34 mmol), warmed to r.t. and diluted with water (60 mL). The organic layer was separated and the aqueous phase extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x60 mL). The combined organic layers were washed with water (3x30 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography column on silica gel (Et<sub>2</sub>O:Pentane, 1:10) to obtain the final product **94** (978 mg, 6.93 mmol, 63% two steps) as a yellow oil.

---

<sup>199</sup> Bühler, J.; Gietzen, S.; Reuter, A.; Kappel, C.; Fischer, K.; Decker, S.; Schäffel, D.; Koynov, K.; Bros, M.; Tubbe, I.; Grabbe, S.; Schmidt, M. Selective uptake of cylindrical poly (2-oxazoline) brush antiDEC205 antibody-OVA antigen conjugates into DEC-positive dendritic cells and subsequent T-cell activation. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12405–12410.

***N*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-1-(6-Azidohexyl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)acetamide (**95**).**

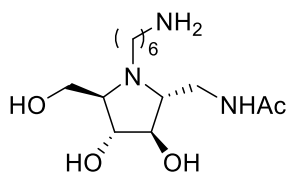
Pd/C (cat.) and HCl (37%, 0.7 mL) were added to a solution of **92** (615 mg, 1.39 mmol) in methanol (35 mL) and the reaction mixture was hydrogenated at 1 atm for 24 h. After the catalyst was filtered off using celite, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1, 6 mL), cooled at 0 °C and acetic anhydride (160 μL, 2.20 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 5 min and then the excess of acetic anhydride was neutralized with Ambersep 900 (hydroxide form). After stirring for 30 min, the resin was removed and the solvent was eliminated under reduced pressure to afford **93**.<sup>200</sup> To a solution of this residue (290 mg, 1.42 mmol) in MeOH (16 mL) was added 6-azido-hexanal **94** (500 mg, 3.55 mmol). The reaction mixture was stirred for 20 min at r.t. and then sodium cyanoborohydride (280 mg, 4.49 mmol) was added. After stirring for 24 h, the solvent was eliminated under reduced pressure and the product was purified by

<sup>200</sup> Shih, H. W.; Chen, K. T.; Chen, S. K.; Huang, C. Y.; Cheng, T. J. R.; Ma, C.; Wong, C. H.; Cheng, W. C. Combinatorial approach toward synthesis of small molecule libraries as bacterial transglycosylase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 2586–2593.

chromatography column on silica gel (EtOAc → EtOAc:MeOH, 8:1) to give the final product **95** (224 mg, 0.681 mmol, 49% three steps) as a yellow oil.

$[\alpha]_D^{27}$	-25.6 (c 0.67, MeOH).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 3.96 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 2.0$ , H-3 or H-4), 3.78-3.77 (m, 1H, H-4 or H-3), 3.75-3.63 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.50 (dd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.6$ , $J_{\text{H,2}} = 3.2$ , $-\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 3.29-3.26 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3.19 (dd, 1H, $J_{\text{H,2}} = 6.9$ , $-\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 3.05-2.98 (m, 2H, H-2, H-5), 2.81-2.60 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{N-}$ ), 1.95 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ ) 1.65-1.51 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N-}$ , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.48-1.34 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm) $\delta$ 173.4 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 81.2, 81.0 (C-3, C-4), 70.2, 69.2 (C-2, C-5), 60.7 ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 52.4 ( $-\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 47.7 ( $-\text{CH}_2\text{N-}$ ), 39.4 ( $-\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 29.9, 29.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N-}$ , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 28.0, 27.7 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 22.7 ( $-\text{CH}_3$ ).
HRESIMS	$m/z$ found 330.2134, calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 330.2136.

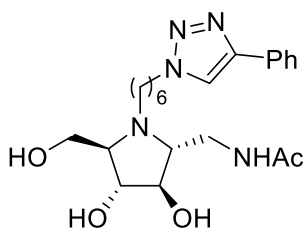
***N*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-1-(6-Aminohexyl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyrrolidin-2-yl)methylacetamide (**96**).<sup>201</sup>**



<sup>201</sup> Liang, P. H.; Cheng, W. C.; Lee, Y. L.; Yu, H. P.; Wu, Y. T.; Lin, Y. L.; Wong, C.H. Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors: new structures for antivirals and osteoarthritis. *ChemBioChem*. **2006**, *7*, 165–173.

Pd/C (cat.) was added to a solution of **95** (108 mg, 0.328 mmol) in methanol (7 mL) and the reaction mixture was hydrogenated at 1 atm for 1 h. After the catalyst was filtered off using celite, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 2:1:0.1 → 1:1:0.1) obtaining the final product **96** (77 mg, 0.25 mmol, 76%) as a yellow solid.

**N-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-1-(6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)acetamide (83).**



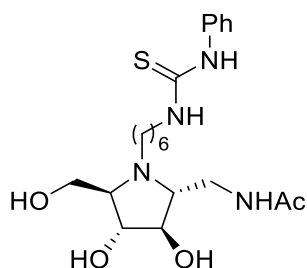
To a solution of pyrrolidin-azide **95** (53 mg, 0.16 mmol) in DMF:H<sub>2</sub>O 9:1 (2 mL), phenylacetylene (24 μL, 0.21 mmol), sodium ascorbate (4.8 mg, 0.024 mmol) and CuSO<sub>4</sub> (1.9 mg, 0.012 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. for 22 h. After the solvent was removed under reduced pressure, the crude product was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 7:1) obtaining the final product **83** (37 mg, 0.086 mmol, 54%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{24}$  -33.5 (c 0.58, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm, *J* Hz) δ 8.33 (s, 1H, *H* triazol), 7.83-7.80 (m, 2H, Ph), 7.45-7.40 (m, 2H, Ph), 7.36-7.31 (m, 1H, Ph), 4.44 (t, 2H, *J*<sub>H,H</sub> = 7.1, -CH<sub>2</sub>-triazol), 3.96 (br. s, 1H, H-3 or H-4), 3.78 (br. s, 1H, H-4 or H-3), 3.76-3.72 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>OH), 3.66 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.4, *J*<sub>H,5</sub> = 3.4, -CH<sub>2</sub>OH), 3.49 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 13.6, *J*<sub>H,2</sub> = 3.1, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.18 (dd, 1H, *J*<sub>H,2</sub> = 7.0, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.06-

	2.98 (m, 2H, H-2, H-5), 2.80-2.60 (m, 2H, -CH <sub>2</sub> N-), 2.01-1.94 (m, 5H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -triazol, -CH <sub>3</sub> ), 1.57-1.38 (m, 6H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) δ 173.5 (-C=O), 148.8 (Cq triazol), 131.8 (Cq Ph), 130.0 (Ph), 129.3 (Ph), 126.6 (Ph), 122.2 (CH triazol), 81.0, 80.9 (C-3, C-4), 70.3, 69.2 (C-2, C-5), 60.7 (-CH <sub>2</sub> OH), 51.4 (-CH <sub>2</sub> -triazol), 47.8 (-CH <sub>2</sub> N-), 39.3 (-CH <sub>2</sub> NHAc), 31.2 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -triazol), 28.9, 27.7, 27.3 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 22.7 (-CH <sub>3</sub> ).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 432.2597, calc. for C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> N <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 432.2605.

***N*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-1-(6-(3-phenylthioureido)hexyl)pyrrolidin-2-yl)methylacetamide (**84**).**



To a solution of pyrrolidine-amine **96** (30 mg, 0.099 mmol) in MeOH (2 mL) was added phenyl isothiocyanate (15 μL, 0.12 mmol) and the mixture was stirred for 5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude product was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:MeOH, 5:1) to give **84** (27 mg, 0.062 mmol, 63%) as a yellow oil.

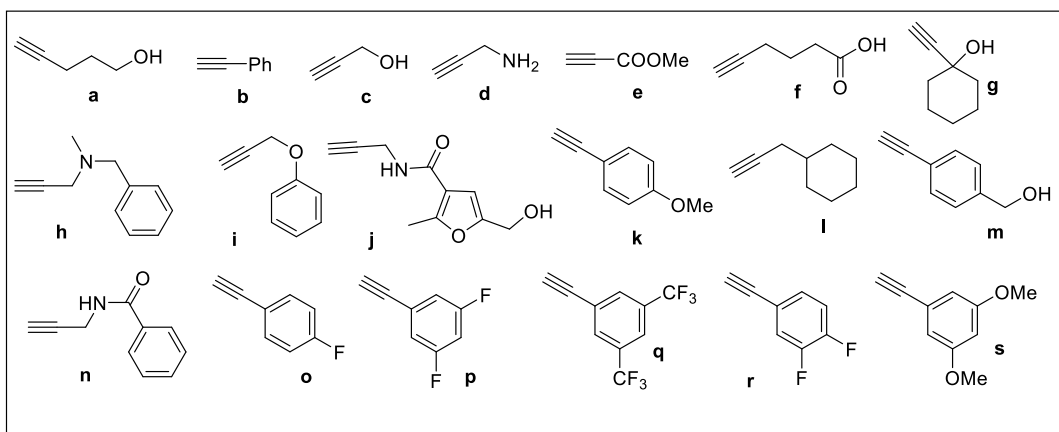
$[\alpha]_D^{24}$	-36.7 (c 0.72, MeOH).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 7.40-7.30 (m, 4H, Ph), 7.23-7.17 (m, 1H, Ph), 3.97 (t, 1H, <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 2.1, H-3 or H-4), 3.80-3.75 (m, 2H, H-4 or H-3, -CH <sub>2</sub> OH), 3.69 (dd, 1H, <sup>2</sup> <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 11.4, <i>J</i> <sub>H,5</sub> = 3.5, -CH <sub>2</sub> OH), 3.58-3.48 (m, 3H, -CH <sub>2</sub> NH-, -

$\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 3.22 (dd, 1H,  $^2J_{\text{H,H}} = 13.6$ ,  $J_{\text{H,2}} = 6.9$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 3.09-3.03 (m, 2H, H-2, H-5), 2.84-2.65 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{N}-$ ), 1.95 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.65-1.58 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ), 1.41-1.36 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  182.0 ( $-\text{C}=\text{S}$ ), 173.6 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 130.3-125.7 (Cq Ph, Ph), 81.0, 80.8 (C-3, C-4), 70.4, 69.4 (C-2, C-5), 60.6 ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), 48.0 ( $-\text{CH}_2\text{N}-$ ), 45.7 ( $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ), 39.3 ( $-\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 30.0, 29.0 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ), 28.1, 27.7 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 22.7 ( $-\text{CH}_3$ ).

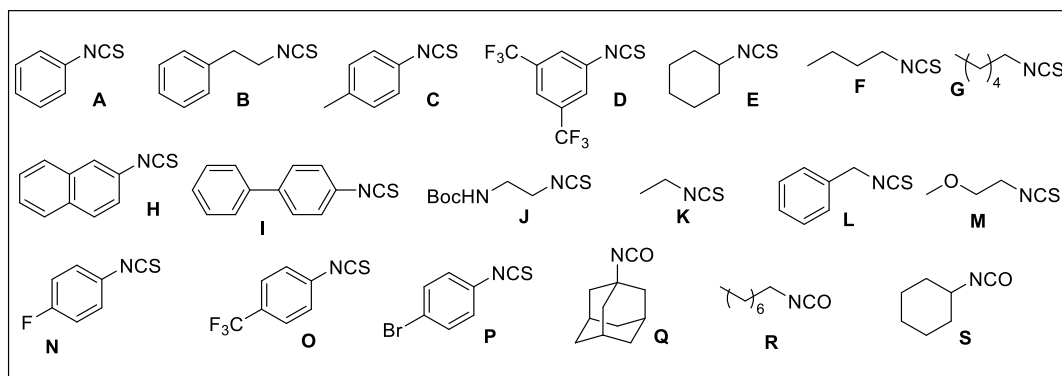
HRESIMS  $m/z$  found 439.2366, calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 439.2374.

### Set of alkynes (a-s)



- ✓ Alkynes **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **h**, **k**, **l**, **o**, **p**, **q**, **r** and **s** are commercially available.
- ✓ Alkynes **i**, **j**, **m** and **n** have been prepared following the procedures described in the literature.<sup>202</sup>

<sup>202</sup> a) For alkyne **i**, see: Nocentini, A.; Ferraroni, M.; Carta, F.; Ceruso, M.; Gratteri, P.; Lanzi, C.; Masini, E.; Supuran C.T. Benzenesulfonamides incorporating flexible triazole moieties are highly effective carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and kinetic, crystallographic, computational, and intraocular pressure lowering investigations. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10692-10704. b) For alkyne **j**, see: Martínez-Bailen, M.; Carmona, A.T.; Moreno-Clavijo, E.; Robina, I.; Ide, D.; Kato, A.; Moreno-Vargas, A.J. Tuning

**Set of iso(thio)cyanates (A-S)**

- ✓ All the iso(thio)cyanates are commercially available.
- ✓ For the synthesis of I and J see the synthesis described for j and I (Experimental section, pg. 90.)

**Generation of the monomeric libraries IIA and IIB followed by *in situ* biological screening (Figure 68).**

**Library IIA:** To a solution of 300  $\mu\text{L}$  of the pyrrolidine-azide **95** (37.5 mM in  ${}^t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O} = 2:1$ ) in an eppendorf were added 100  $\mu\text{L}$  of a solution of the corresponding alkyne (**a-s**) (270 mM in  ${}^t\text{BuOH}$ ) followed by 25  $\mu\text{L}$  of a solution of sodium ascorbate (198 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) and 25  $\mu\text{L}$  of a solution of  $\text{CuSO}_4$  (62 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ). The final concentration of the pyrrolidine-azide **95** in each eppendorf was 25 mM. The resulting mixtures were shaken at 50  $^\circ\text{C}$  for 21 h and monitored for completion by TLC (EtOAc:MeOH, 3:1) and ESI-MS. Then, the reactions were diluted with water to the desired concentration (600 nM) and placed in a 96-well microtiter

of  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase inhibition by generation and *in situ* screening of a library of pyrrolidine-triazole hybrid molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**, *138*, 532-542. c) For alkyne **m**, see: Liu, Z.; Caner, J.; Kudo, A.; Naka, H.; Saito, S.; Redox-selective generation of aldehydes and  $\text{H}_2$  from alcohols under visible light. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9452-9456. d) For alkyne **n**, see: Sinai, A.; Vangel, D.; Gáti, T.; Bombicz, P.; Novák, Z.; Utilization of copper-catalyzed carboarylation-closure for the synthesis of new oxazoline derivatives. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4163-4139.



plate in order to perform the enzymatic assays against human hexosaminidase type OGA (O-GlcNAcase) and HexB ( $\beta$ -*N*-acetyl-hexosaminidase). In the preliminary screening of the resulting crude (**95a-s**), the percentage of inhibition was determined at 100 nM of the corresponding pyrrolidine-triazole on each well (assuming quantitative conversion in the click reaction).

**Library IIB:** To a solution of 250  $\mu$ L of the pyrrolidine-amine **96** (28 mM in DMSO) in an eppendorf, were added 83  $\mu$ L of a solution of the corresponding iso(thio)cyanate (**A-S**) (70 mM in DMSO). The final concentration of the iso(thio)cyanates (**A-S**) in each eppendorf was 17.5 mM. The resulting mixtures were shaken at r.t. for 6 h and monitored for completion by TLC (EtOAc:Cyclohexane, 1:1) and ESI-MS. Then, the reactions were diluted with water to the desired concentration (600 nM) and placed in a 96-well microtiter plate in order to perform the enzymatic assays against human hexosaminidase type OGA (O-GlcNAcase) and HexB ( $\beta$ -*N*-acetyl-hexosaminidase). In the preliminary screening of the resulting crude (**96A-P** and **96Q-S**), the percentage of inhibition was determined at 100 nM of the corresponding pyrrolidine-(thio)urea on each well (assuming quantitative conversion in the click reaction).

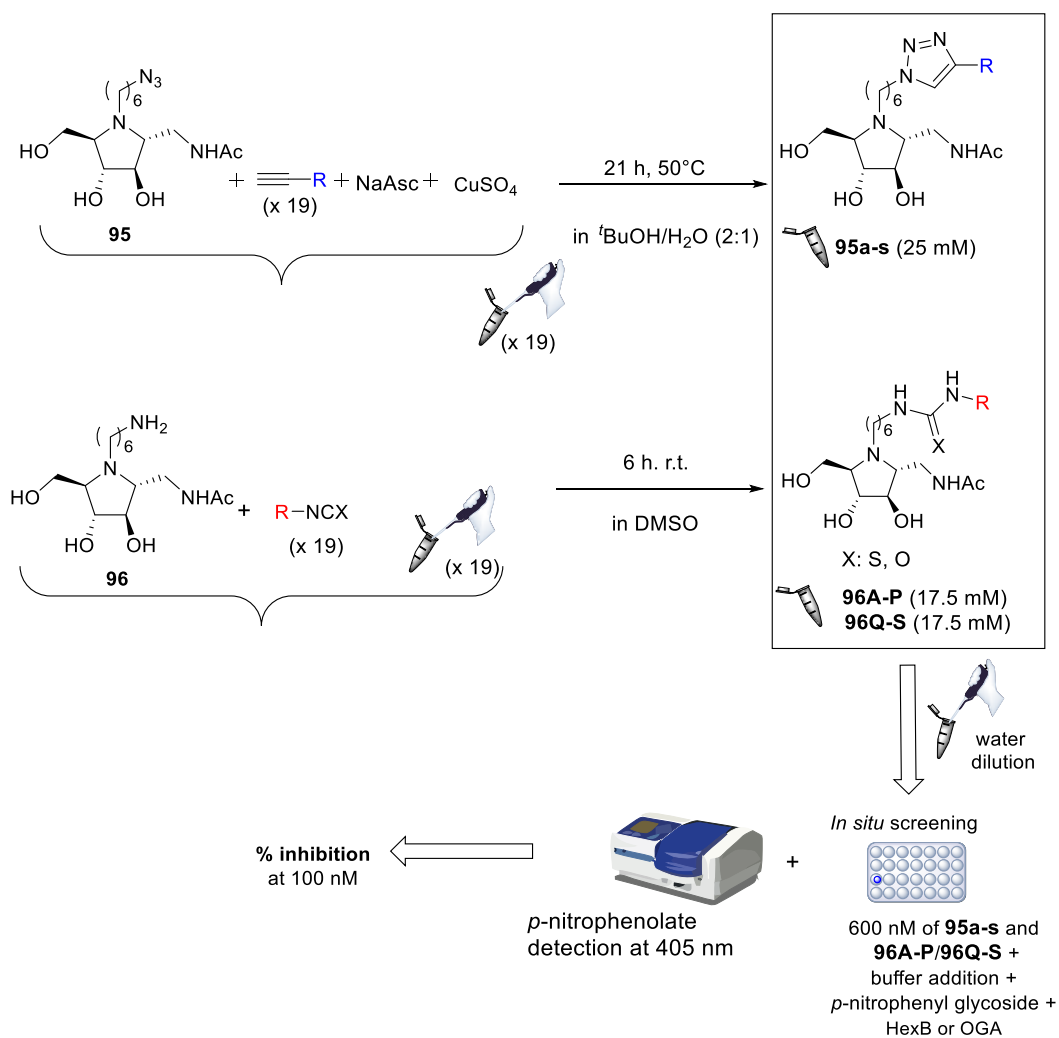
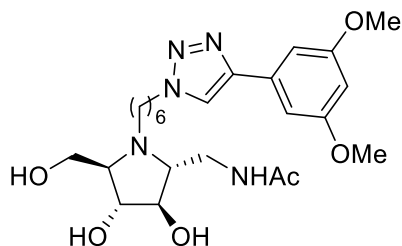


Figure 68

***N*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-1-(6-(4-(3,5-Dimethoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)acetamide (**95s**).**



To a solution of pyrrolidin-azide **95** (65 mg, 0.19 mmol) in DMF:H<sub>2</sub>O 9:1 (2 mL), 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene (43 mg, 0.26 mmol), sodium ascorbate (6 mg, 0.03 mmol) and CuSO<sub>4</sub> (2.4 mg, 0.015 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. for 24 h. After the solvent was removed under reduced pressure, the crude product was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 10:1) obtaining the final product **95s** (52.3 mg, 0.106 mmol, 56%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{24}$  -30.4 (c 0.87, MeOH).

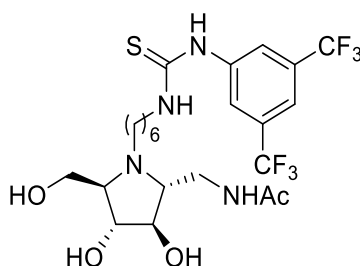
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm, *J* Hz) δ 8.32 (s, 1H, *H* triazol), 6.99 (d, 2H, *J*<sub>H,H</sub> = 2.3, Ph), 6.46 (t, 1H, Ph), 4.41 (t, 2H, *J*<sub>H,H</sub> = 7.1, -CH<sub>2</sub>-triazol), 3.96 (t, 1H, *J*<sub>H,H</sub> = 2.0, H-3 or H-4), 3.81 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.79-3.77 (m, 1H, H-4 or H-3), 3.75-3.72 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>OH), 3.66 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.3, *J*<sub>H,5</sub> = 3.4, -CH<sub>2</sub>OH), 3.49 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 13.6, *J*<sub>H,2</sub> = 3.2, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.18 (dd, 1H, *J*<sub>H,2</sub> = 7.0, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.06-3.00 (m, 2H, H-2, H-5), 2.79-2.59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>N-), 1.99-1.94 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-triazol, -CH<sub>3</sub>), 1.56-1.36 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) δ 173.5 (-C=O), 162.8 (Cq Ph), 148.7 (Cq triazol), 133.4 (Ph), 122.5 (CH triazol), 104.6 (Ph), 101.3 (Ph), 81.0, 80.9 (C-3, C-4), 70.3, 69.2 (C-2, C-5), 60.6 (-CH<sub>2</sub>OH), 55.9 (-OCH<sub>3</sub>), 51.4 (-CH<sub>2</sub>-triazol), 47.8 (-

CH<sub>2</sub>N-), 39.3 (-CH<sub>2</sub>NHAc), 31.2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-triazol), 28.8, 27.7, 27.3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 22.7 (-CH<sub>3</sub>).

HRESIMS  $m/z$  found 492.2807, calc. for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 492.2817.

***N*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-1-(6-(3-(3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl)thioureido)hexyl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)acetamide (96D).**



To a solution of pyrrolidine-amine **96** (45 mg, 0.15 mmol) in MeOH (3 mL) was added 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl isothiocyanate (0.03 mL, 0.18 mmol) and the mixture was stirred for 24 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude product was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:MeOH, 10:1) to give **96D** (44.5 mg, 0.078 mmol, 52%) as a colorless oil.

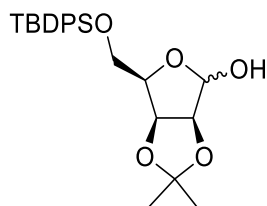
$[\alpha]_D^{24}$  -30.2 (c 0.92, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm, *J* Hz) δ 8.18 (s, 2H, Ph), 7.62 (s, 1H, Ph), 3.97 (t, 1H, *J*<sub>H,H</sub> = 2.0, H-3 or H-4), 3.80-3.75 (m, 2H, H-4 or H-3, -CH<sub>2</sub>OH), 3.68 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.3, *J*<sub>H,5</sub> = 3.3, -CH<sub>2</sub>OH), 3.61-3.57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>NH-), 3.51 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 13.6, *J*<sub>H,2</sub> = 3.2, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.20 (dd, 1H, *J*<sub>H,2</sub> = 7.0, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.07-3.01 (m, 2H, H-2, H-5), 2.83-2.63 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>N-), 1.96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.69-1.60 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.43-1.41 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$	(75.4 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ppm, $J$ Hz) $\delta$ 182.6 (-C=S), 173.5 (-C=O), 143.2 (C-1'), 132.6 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 33.1$ , C-3'), 124.7 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 271.6$ , C-5'), 123.7-122.9 (m, Ph), 117.8-117.5 (m, Ph), 81.1, 80.9 (C-3, C-4), 70.3, 69.2 (C-2, C-5), 60.7 (- $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 47.8 (- $\text{CH}_2\text{N}$ -), 45.4 (- $\text{CH}_2\text{NH}$ -), 39.4 (- $\text{CH}_2\text{NHAc}$ ), 29.7, 29.1 (- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ -), 28.1, 27.8 (- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 22.7 (- $\text{CH}_3$ ).
HRESIMS	$m/z$ found 575.2112, calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_4\text{F}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 575.2121.

## 2.2 Synthesis and *in situ* biological evaluation of multivalent iminosugars as glycosidase inhibitors.

### 5-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-2,3-*O*-isopropyliden-D-lyxofuranose (129).<sup>203</sup>

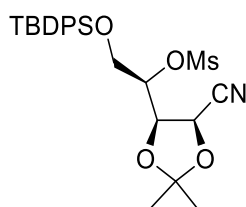


To a solution of D-lyxose (8.54 g, 56.8 mmol) in DMF (200 mL), DMP (14.9 mL, 112 mmol) and PTSA (391 mg, 0.17 mmol) were added. After stirring for 22 h at r.t.,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (422 mg, 3.98 mmol) was added and the reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. Then, a solution of this residue in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL) was cooled at 0 °C and  $\text{Et}_3\text{N}$  (8.7 mL, 63 mmol), TBDPSCI (16 mL, 63 mmol) and DMAP (693 mg, 5.68 mmol) were added. The reaction was stirred overnight at 0 °C and then washed with water (3 x 100 mL) and brine (2x100 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography

<sup>203</sup> Cheng, X.; Khan, N.; Mootoo, D. R. Synthesis of the C-glycoside analogue of a novel Sialyl Lewis X mimetic. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2544-2547.

column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:10) to give **129** (16.6 g, 38.6 mmol, 68%, 2 steps) as an oil.

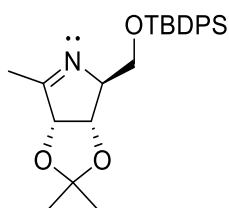
**5-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-2,3-*O*-isopropylidene-4-*O*-methanesulfonyl-D-lyxononitrile (**131**).**<sup>204</sup>



NaHCO<sub>3</sub> (14.66 g, 0.175 mol) was slowly added to a stirred solution of hydroxylamine hydrochloride (12.4 g, 0.179 mol) in EtOH:H<sub>2</sub>O 1:1 (260 mL). After stirring for 15 min at r.t., a solution of **129** (16.6 g, 0.039 mol) in EtOH (120 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 72 h at r.t. Then, the solvent was removed under vacuum and the reaction mixture was extracted twice with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. MsCl (24.0 mL, 0.31 mol) was slowly added to a stirred and cooled (0 °C) solution of the previously obtained oxime in anhyd. pyridine (100 mL). After stirring for 7 h at r.t, the reaction mixture was cooled to 0 °C, quenched with water (35 mL) and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (120 mL) and washed thrice with water. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:6) to give **131** (14.0 g, 27.6 mmol, 71%, 2 steps) as a yellow oil.

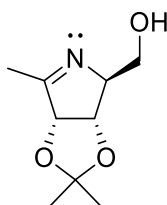
<sup>204</sup> Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent  $\alpha$ -fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl) triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898–5904.

**(3*R*,4*S*,5*S*)-5-[(*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl)hydroxymethyl]-3,4-isopropylidene-2-methylpyrroline-3,4-diol (132).**<sup>204</sup>



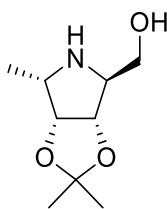
MeMgBr (12.0 mL, 0.036 mol) was added dropwise to a stirred solution of the mesylate **131** (14.0 g, 0.028 mol) in anh. toluene (115 mL) and the mixture was stirred for 8 h at 70 °C. Then, the reaction mixture was cooled to 0 °C, diluted with Et<sub>2</sub>O (50 mL) and NH<sub>4</sub>Cl (sat. aq. soln., 100 mL) was added. The aqueous phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography column on silica gel (Toluene:Acetone, 20:1) to give **132** (7.0 g, 0.016 mol, 60%) as a yellow oil.

**(3*R*,4*S*,5*S*)-5-Hydroxymethyl-3,4-*O*-isopropylidene-2-methyl-1-pyrroline-3,4-diol (133).**<sup>204</sup>



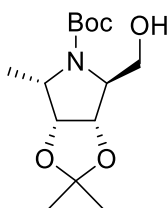
To a solution of **132** (6.0 g, 14 mmol) in THF (60 mL) was slowly added tetra-*n*-butylammonium fluoride (14 mL, 1 M in THF, 14 mmol). After stirring for 2.5 h at r.t., the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the product was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 15:1 ) to give **133** (2.15 g, 11.6 mmol, 83%) as a colorless oil.

**(2S,3S,4R,5S)-2-Hydroxymethyl-3,4-O-isopropylidene-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (134).**<sup>204</sup>



Pd/C (10%) was added to a solution of the pyrrolidine **133** (2.15 g, 11.6 mmol) in MeOH (65 mL) and the reaction mixture was hydrogenated at 200 psi for 24 h. After the catalyst was filtered off using celite, the solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 15:1) obtaining the final product **134** (1.62 g, 8.66 mmol, 73%) as a white solid.

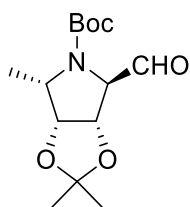
**(2S,3S,4R,5S)-N-tert-Butoxycarbonyl-2-hydroxymethyl-3,4-O-isopropylidene-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (135).**<sup>204</sup>





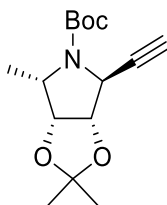
Boc<sub>2</sub>O (1.96 g, 8.98 mmol) was added to a solution of **134** (1.17 g, 6.25 mmol) in MeOH (37 mL) and the mixture was stirred at r.t. for 6 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:2) afforded **135** (1.32 g, 4.59 mmol, 73%) as a yellow oil.

**(2S,3S,4R,5S)-N-tert-Butoxycarbonyl-2-formyl-3,4-O-isopropylidene-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (136).**<sup>204</sup>



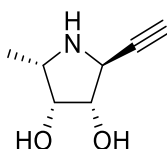
Anhydrous DMSO (1.3 mL) was dropwise added to a stirred solution of oxalyl chloride (780  $\mu$ L, 9.2 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11 mL) at -78 °C. The mixture was stirred at -65 °C for 15 min, and then a solution of alcohol **135** (1.32 g, 4.59 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added. The mixture was stirred for 6 h at -65 °C and then Et<sub>3</sub>N (1.8 mL) was added. The mixture was warmed to r.t., diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and washed with HCl 1M (20 mL), NaHCO<sub>3</sub> (sat. aq. soln., 20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure obtaining **136** (1.32 g, 4.59 mmol, quant.) as a white solid.

**(2S,3S,4R,5S)-N-tert-Butoxycarbonyl-2-ethynyl-3,4-O-isopropylidene-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (137).**<sup>204</sup>



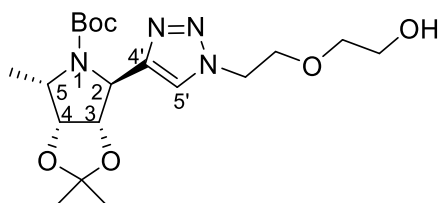
Dimethyl-2-oxopropylphosphonate (0.95 mL, 6.9 mmol) was added to a stirred and cooled (0 °C) solution of *p*-acetamidobenzenesulfonyl azide (1.77 g, 7.36 mmol) and  $K_2CO_3$  (3.6 g, 26 mmol) in anh.  $CH_3CN$  (58 mL) and the mixture was stirred for 7 h at r.t. A solution of the aldehyde **136** (1.32 g, 4.59 mmol) in anh. MeOH (57 mL) was added to the previous solution and the reaction mixture was stirred overnight at r.t. Then, the reaction mixture was diluted with  $Et_2O$  (60 mL), filter through celite and concentrated under vacuum. Purification by chromatography column on silica gel ( $EtOAc:Cyclohexane$ , 1:7) afforded **137** (522 mg, 1.85 mmol, 40%) as a white solid.

**(2S,3S,4R,5S)-2-Ethynyl-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (**128**).**<sup>204</sup>



Compound **137** (44.7 mg, 0.16 mmol) was dissolved in TFA: $H_2O$  (4:1, 0.5 mL) and the mixture was stirred at r.t. for 2.5 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on Dowex 50WX8 eluting with MeOH (50 mL),  $H_2O$  (50 mL) and  $NH_4OH$  (10%), afforded **128** (19.2 mg, 0.14 mmol, 87%) as a yellow solid.

**(2S,3S,4R,5S)-N-tert-Butoxycarbonyl-3,4-O-isopropylidene-2-(1-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (**139**).**



To a solution of **137** (702 mg, 2.50 mmol) and 2-(2-azidoethoxy)ethan-1-ol<sup>205</sup> (360 mg, 2.75 mmol) in toluene (20 mL), DIPEA (1.7 mL, 9.5 mmol) and CuI (143 mg, 0.75 mmol) were added. After stirring at r. t. for 10 h, sat aq. soln. of NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) was added and the aqueous phase was extracted with EtOAc (4 x 10 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The resulting residue was purified by chromatography column on silica gel (Toluene:Acetone, 3:1→2:1) to give **139** (1.02 g, 2.47 mmol, 99%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{25}$  +3.5 (c 0.6, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

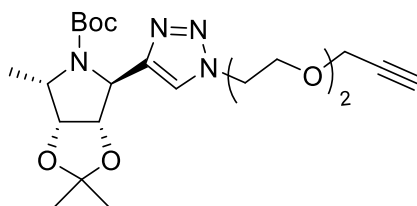
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz) δ 8.00 (s, 1H, H-triazol), 4.93 (br s, 1H, H-2), 4.78 (t, 1H, *J*<sub>4,5</sub> = *J*<sub>4,3</sub> = 6.1, H-4), 4.61-4.58 (m, 2H, H-3, OH), 4.50 (t, 2H, *J*<sub>H,H</sub> = 5.1, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.96 (br s, 1H, H-5), 3.78 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.46-3.39 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.43-1.19 (m, 18H, Me-5, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) δ 154.4 (C=O), 146.1, (Cq triazol), 122.7 (CH triazol), 110.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 82.8 (C-3), 80.1 (C-4), 78.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 72.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 68.8 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 60.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 59.2 (C-2), 56.5 (C-5), 49.4 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 27.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9, 24.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 15.0 (Me-5).

<sup>205</sup> This azide was prepared as described in: Vincent, A.; Valverde, I. E.; Marceau, P.; Mathieu, G.; Dendane, N.; Delmas, A. F. Towards the simplification of protein synthesis: iterative solid-supported ligations with concomitant purifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *45*, 11320-11324.

HRESIMS  $m/z$  found 435.2208, calcd. for  $C_{19}H_{32}O_6N_4Na$   $[M+Na]^+$ : 435.2214

**(2S,3S,4R,5S)-N-tert-Butoxycarbonyl-3,4-O-isopropylidene-5-methyl-2-(1-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pyrrolidine-3,4-diol (140).**



To a solution of **139** (218 mg, 0.53 mmol) in anhydrous THF (4 mL), NaH (21 mg, 0.8 mmol) was added at 0 °C under Ar. After 15 min, propargyl bromide (86  $\mu$ L, 0.8 mmol) was added and the mixture stirred at r.t. for 3 d. The crude was filtered through celite, washed with MeOH and the solvent removed in vacuo. The resulting residue was purified by chromatography column on silica gel (Toluene:Acetone, 3:1 $\rightarrow$ 2:1) to give **140** (180 mg, 0.40 mmol, 75%) as a yellow solid.

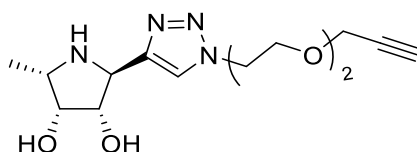
$[\alpha]_D^{25}$  +38.9 (c 0.4,  $CH_2Cl_2$ ).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  7.98 (s, 1H, H-triazol), 4.93 (br s, 1H, H-2), 4.78 (t, 1H,  $J_{4,5}=J_{4,3}=6.1$ , H-4), 4.62 (br s, 1H, H-3), 4.50 (t, 2H,  $J_{H,H}=5.1$ , N- $CH_2-CH_2-O$ ), 4.10 (d, 2H,  $^4J_{H,H}=2.4$ ,  $CH_2-C\equiv CH$ ), 3.96 (br s, 1H, H-5), 3.78 (t, 2H, N- $CH_2-CH_2-O$ ), 3.53 (s, 4H, O- $CH_2-CH_2-O$ ), 3.41 (t, 1H,  $CH_2-C\equiv CH$ ), 1.43-1.19 (m, 18 H, Me-5,  $C(CH_3)_2$ ,  $C(CH_3)_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (75.4 MHz,  $DMSO-d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  154.3 (CO), 146.0 (Cq triazol), 122.6 (CH triazol), 110.6 ( $C(CH_3)_2$ ), 82.8 (C-3), 80.2 (C-4), 78.8 ( $C\equiv CH$ ,  $C(CH_3)_3$ ), 77.1 ( $C\equiv CH$ ), 69.3, 68.8, 68.3 (O- $CH_2-CH_2-O$ , N- $CH_2-CH_2-O$ ), 59.2 (C-2), 57.5 ( $CH_2-C\equiv CH$ ), 56.5 (C-5), 49.3 (N- $CH_2-CH_2-O$ ), 28.0 ( $C(CH_3)_3$ ), 25.9, 24.7 ( $C(CH_3)_2$ ), 15.0 (Me-5).

ESIMS  $m/z$  451 [34%, (M+H)<sup>+</sup>], 473 [100 %, (M+Na)<sup>+</sup>], 489 [27 %, (M+K)<sup>+</sup>].

**(2S,3S,4R,5S)-5-Methyl-2-(1-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pyrrolidine-3,4-diol (128')**



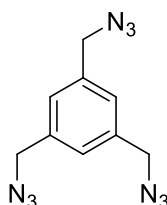
A solution of **140** (175 mg, 0.39 mmol) in TFA:H<sub>2</sub>O (4:1, 4.0 mL), was stirred at r.t. for 3 h. Evaporation of the solvent and chromatographic purification on Dowex 50WX8 eluting with MeOH, H<sub>2</sub>O and NH<sub>4</sub>OH 25%, afforded **128'** (120 mg, 0.39 mmol, quant.) as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{24}$  -30.6 (c 0.5, CH<sub>3</sub>OH).

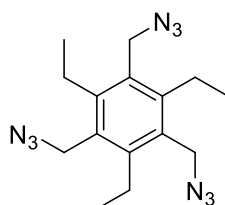
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  8.00 (s, 1H, H-triazol), 4.57 (t, 2H,  $J_{H,H}$ = 5.0, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.37 (dd, 1H,  $J_{3,2}$ = 7.8,  $J_{3,4}$ = 4.2, H-3), 4.28 (br s, 1H, H-2), 4.16 (d, 2H,  $^4J_{H,H}$ =2.3, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 3.98 (br t, 1H, H-4), 3.88 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.67-3.60 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.46 (br s, 1H, H-5), 2.88 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 1.21 (d, 3H,  $J_{Me,5}$ =6.6, Me-5).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm)  $\delta$  149.8 (Cq triazol), 124.6 (CH triazol), 80.6 (C $\equiv$ CH), 80.2 (C-3), 76.0 (C-4), 75.2 (C $\equiv$ CH), 71.2, 70.4, 70.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 59.0 (CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 58.7 (C-2), 56.6 (C-5), 51.3 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 15.0 (Me-5).

HRESIMS  $m/z$  found 311.1706, calc. for C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 311.1714

**1,3,5-Tris(azidomethyl)benzene (141).**<sup>206</sup>

To a solution of 1,3,5-tris(bromomethyl)benzene (2.0 g, 5.6 mmol) in DMF (50 mL), NaN<sub>3</sub> (1.66 g, 25.2 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 h. After evaporation of the solvent, the residue was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with H<sub>2</sub>O. The organic phase was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated. Chromatography column on silica gel (AcOEt:Cyclohexane 1:15) afforded **141** (1.32 g, 5.41 mmol, 97%) as a colorless oil.

**1,3,5-Tris(azidomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (142).**<sup>207</sup>

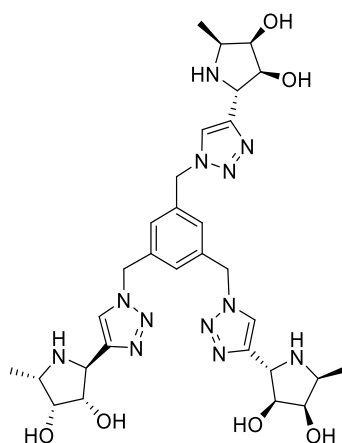
To a solution of 1,3,5-tris(bromomethyl)-2,4,6-triethylbenzene (500 mg, 1.11 mmol) in DMF (8 mL), NaN<sub>3</sub> (241 mg, 3.67 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. for

<sup>206</sup> Wu, W.; Ye, C.; Qin, J.; Li, Z. Dendrimers with large nonlinear optical performance by introducing isolation chromophore, utilizing the Ar/Ar<sup>F</sup> self-assembly effect, and modifying the topological structure *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2013**, *5*, 7033–7041.

<sup>207</sup> Saha, S.; Moorthy, J. N. C3-symmetric proline-functionalized organocatalysts: enantioselective Michael addition reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *33*, 6359-6365.

24 h. After evaporation of the solvent, the residue was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and washed with  $\text{H}_2\text{O}$ . The organic phase was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated. Chromatography column on silica gel (AcOEt:Cyclohexane 1:30) afforded **142** (330 mg, 1.01 mmol, 90%).

### Trimer **143**.



To a solution of **128** (21.3 mg, 0.15 mmol) in DMF:H<sub>2</sub>O 9:1 (0.7 mL), were added  $\text{CuSO}_4$  (0.84 mg, 3.4  $\mu\text{mol}$ ), sodium ascorbate (6.7 mg, 34  $\mu\text{mol}$ ) and **141** (10.2 mg, 0.042 mmol). The reaction mixture was heated in a MW reactor (90 °C, 2 h). Then, Quadrasil<sup>®</sup>MP was added to the reaction solution and stirred for 30 min at rt. After that, the mixture was filtered through celite and the solvent evaporated. The resulting crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH) to yield **143** (20.1 mg, 0.030 mmol, 72%) as a brown solid.

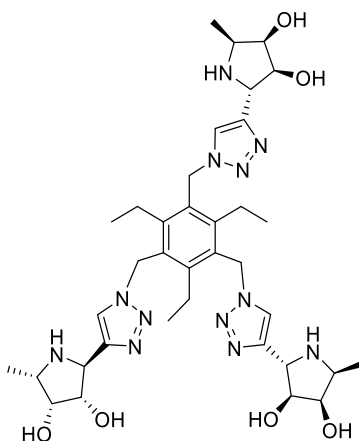
$[\alpha]_D^{27}$  -27.3 (c 0.5,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm, *J* Hz)  $\delta$  7.97 (s, 1H, H-triazol), 7.26 (s, 3H, H-Arom), 5.58 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 4.42-4.31 (m, 2H, H-3, H-2), 3.98 (br s, 1H, H-4), 3.58-3.52 (m, 1H, H-5), 1.24 (d, 3H,  $J_{\text{Me},5}=6.3$ , Me-5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  149.1 (C<sub>q</sub> triazol), 138.6 (C<sub>q</sub> Ph), 128.8 (C Arom), 124.4 (CH triazol), 79.7 (C-3), 74.8 (C-4), 58.2 (C-2), 57.1 (C-5), 54.2 (CH<sub>2</sub>-Ph), 14.5 (Me-5).

HRESIMS  $m/z$  found 667.3415, calc. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_6\text{N}_{12}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 667.3423.

#### Trimer **144**.

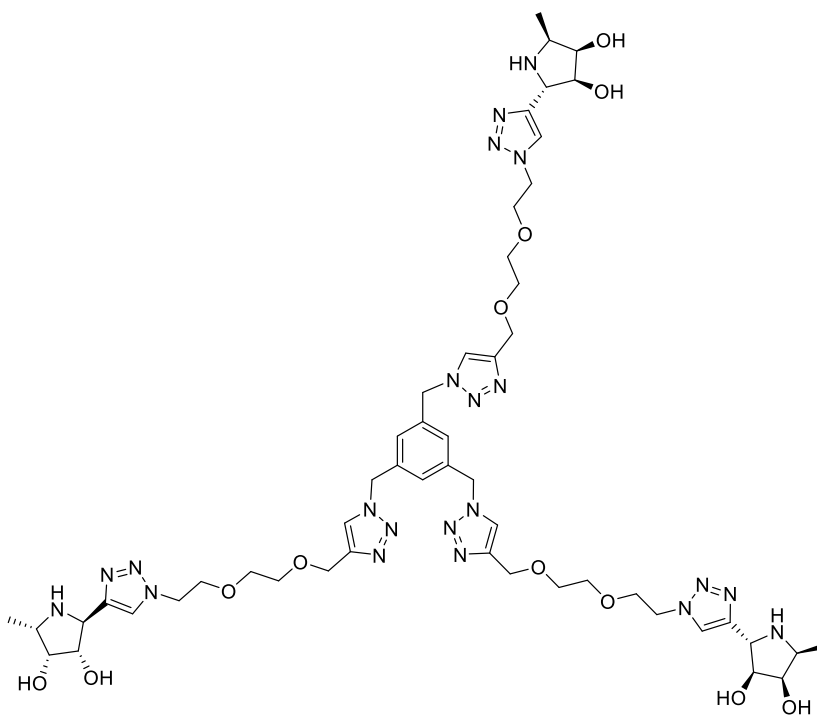


To a solution of **128** (24.8 mg, 0.18 mmol) in  $\text{DMF:H}_2\text{O}$  9:1 (1.0 mL), were added  $\text{CuSO}_4$  (1.1 mg, 4.4  $\mu\text{mol}$ ), sodium ascorbate (8.7 mg, 0.044 mmol), TBTA (7.8 mg, 0.015 mmol) and **142** (16.0 mg, 0.049 mmol). The reaction mixture was heated in a MW reactor (90 °C, 2 h). Then, Quadrasil<sup>®</sup>MP was added to the reaction solution and stirred for 30 min at rt. After that, the mixture was filtered through celite and the solvent evaporated. The resulting crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH) followed by a chromatography column on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ , 3:1:0.1) to afford **144** (27.4 mg, 0.037 mmol, 75%) as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{26}$  -34.3 (c 0.5,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

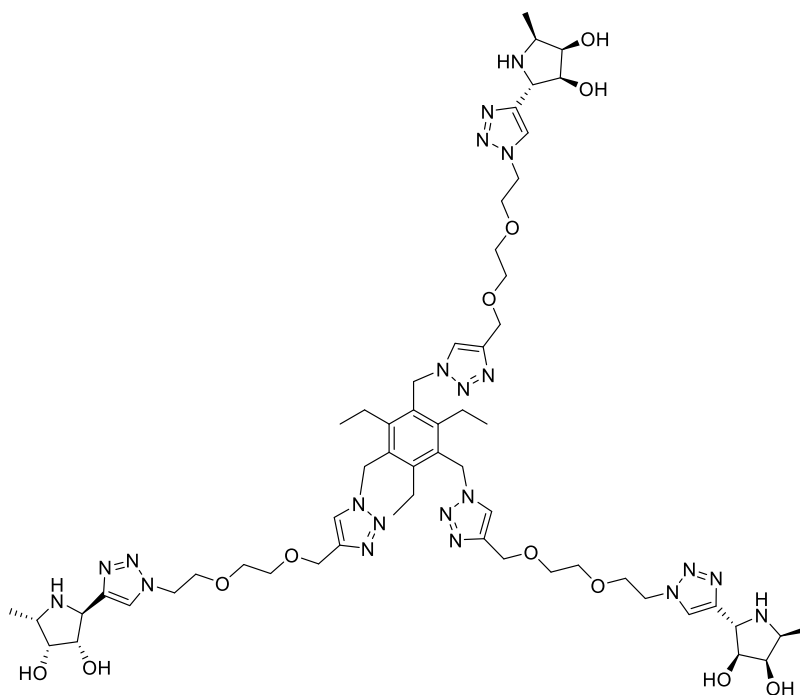


<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 7.70 (s, 1H, H-triazol), 5.74 (s, 2H, CH <sub>2</sub> -Ph), 4.31 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>3,2</sub> = 8.1, <i>J</i> <sub>3,4</sub> = 3.9, H-3), 4.25 (d, 1H, H-2), 3.95 (ap t, 1H, <i>J</i> <sub>4,5</sub> = 3.7, H-4), 3.47-3.44 (m, 1H, H-5), 2.84 (q, 2H, <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 7.2, CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 1.20 (d, 3H, <i>J</i> <sub>Me,5</sub> =6.6, Me-5), 1.00 (t, 3H, CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) δ 149.5, 148.0, (C <sub>q</sub> Ph, C <sub>q</sub> triazol), 131.1 (C <sub>q</sub> Ph), 123.5 (CH triazol), 80.0 (C-3), 75.0 (C-4), 58.4 (C-2), 56.8 (C-5), 49.9-48.2 (under MeOD, CH <sub>2</sub> -triazol), 24.4 (CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 15.7 (CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 14.8 (Me-5).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 751.4353, calc. for C <sub>36</sub> H <sub>55</sub> O <sub>6</sub> N <sub>12</sub> Na [M+H] <sup>+</sup> : 751.4362

**Trimer 145.**

To a solution of **128'** (47.7 mg, 0.15 mmol) in DMF:H<sub>2</sub>O 9:1 (1.0 mL), were added CuSO<sub>4</sub> (0.64 mg, 2.6 μmol), sodium ascorbate (5.1 mg, 26 μmol) and **141** (10.2 mg, 0.041 mmol). The reaction mixture was heated in a MW reactor (90 °C, 2 h). Then, Quadrasil®MP was added to the reaction solution and stirred for 30 min at rt. After that, the mixture was filtered through celite and the solvent evaporated. The resulting crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH) to afford **145** (40.5 mg, 0.034 mmol, 84%) as a brown solid.

$[\alpha]_D^{26}$	-15.3 (c 0.5, CH <sub>3</sub> OH).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 8.14 (s, 3H, H-triazol), 7.98 (s, 3H, H-5'), 7.28 (s, 3H, H-Arom), 5.61 (s, 6H, CH <sub>2</sub> -Ph), 4.57-4.55 (m, 18H, H-2, H-3, O-CH <sub>2</sub> -triazol, N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O), 4.11 (br s, 3H, H-4), 3.86-3.78 (m, 9H, H-5, N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O), 3.61 (br s, 12H, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O), 1.35 (d, 9H, <i>J</i> <sub>Me,5</sub> =6.6, Me-5).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) δ 146.3, 145.0, 138.6 (C <sub>q</sub> Ph, C <sub>q</sub> triazol), 128.9 (CH Ph), 125.8, 125.4 (2 CH triazol), 78.7 (C-3), 73.8 (C-4), 71.4, 70.7, 70.2 (C-5, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O), 64.9 (O-CH <sub>2</sub> -triazol), 58.1, 57.6 (C-2, O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -triazol), 54.2 (CH <sub>2</sub> -Ph), 51.5 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> O), 13.2 (Me-5).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 1196.5780, calc. for C <sub>51</sub> H <sub>75</sub> O <sub>12</sub> N <sub>21</sub> Na [M+Na] <sup>+</sup> : 1196.5796

Trimer **146**.

To a solution of **128'** (32.0 mg, 0.10 mmol) in DMF:H<sub>2</sub>O 9:1 (1.0 mL), were added CuSO<sub>4</sub> (0.43 mg, 1.7 μmol), sodium ascorbate (3.4 mg, 17 μmol) and **142** (9.4 mg, 0.029 mmol). The reaction mixture was heated in a MW reactor (90 °C, 3 h). Then, Quadrasil<sup>®</sup>MP was added to the reaction solution and stirred for 30 min at rt. After that, the mixture was filtered through celite and the solvent evaporated. The resulting crude was purified by size-exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH) to afford **146** (21.1 mg, 0.017 mmol, 59%) as a brown solid.

$[\alpha]_D^{23}$  -24.7 (c 0.5, CH<sub>3</sub>OH).

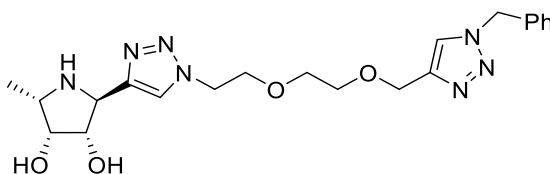
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm, *J* Hz) δ 7.97 (s, 3H, H-triazol), 7.82 (s, 3H, H-5'), 5.75 (s, 6H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.55-4.51 (m, 12H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-triazol), 4.37 (dd, 3H,

$J_{3,2}=7.9$ ,  $J_{3,4}=4.1$ , H-3), 4.28 (d, 3H, H-2), 3.98 (ap t, 3H,  $J_{4,5}=3.7$ , H-4), 3.83 (t, 6H,  $J_{H,H}=5.0$ , N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.58 (br s, 12H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.49-3.46 (m, 3H, H-5), 2.84 (q, 6H,  $J_{H,H}=7.4$ , CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.20 (d, 9H,  $J_{Me,5}=6.7$ , Me-5), 0.90 (t, 9H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm)  $\delta$  149.4, 148.0, 146.1, 131.1 (C<sub>q</sub> Ph, C<sub>q</sub> triazol), 125.0, 124.6 (2 CH triazol), 80.1 (C-3), 75.0 (C-4), 71.4, 70.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 70.4 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 64.9 (O-CH<sub>2</sub>-triazol), 58.6 (C-2), 56.8 (C-5), 51.3 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O), 49.8-48.1 (under MeOD, CH<sub>2</sub>-Ph), 24.5 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 15.5 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 14.9 (Me-5).

HRESIMS  $m/z$  found 1280.6728, calc. for C<sub>57</sub>H<sub>87</sub>O<sub>12</sub>N<sub>21</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 1280.6735

**(2S,3S,4R,5S)-2-(1-(2-(2-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (148).**



To a solution of **128'** (39 mg, 0.13 mmol) in <sup>t</sup>BuOH:H<sub>2</sub>O 2:1 (3.3 mL), benzyl azide (14 mg, 0.11 mmol), sodium ascorbate (4.6 mg, 23  $\mu$ mol) and CuSO<sub>4</sub> (1.8 mg, 7.2  $\mu$ mol) were added and the solution was stirred at r.t. overnight. The solvent was evaporated and the resulting residue was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 2:1) to afford **148** (29.5 mg, 0.067 mmol, 63%).

$[\alpha]_D^{26}$  -22.3 (c 0.6, CH<sub>3</sub>OH).

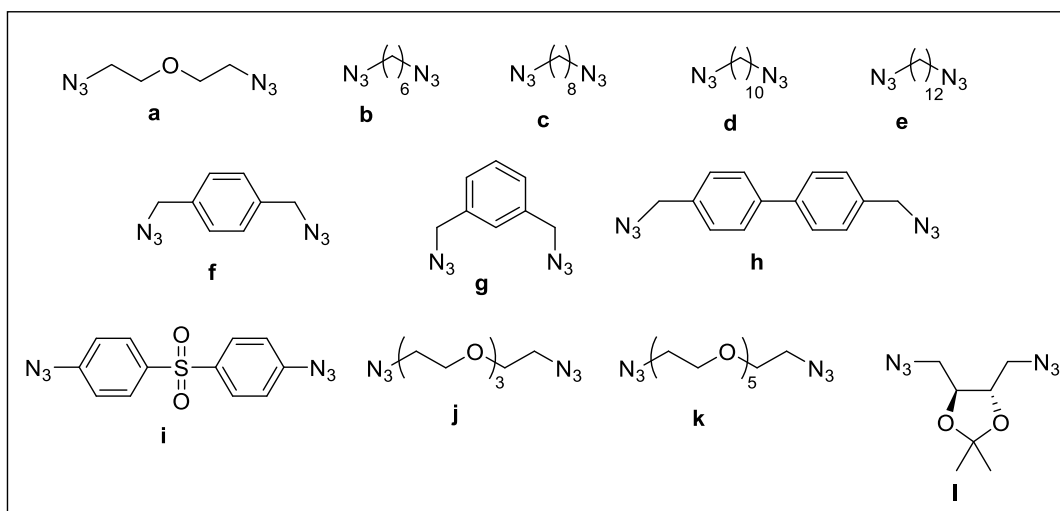
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  7.97 (s, 1H, H-triazol), 7.96 (s, 1H, H-5'), 7.37-7.31 (m, 5H, H-Arom), 5.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.57 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-triazol),

4.53 (t, 2H,  $J_{H,H} = 4.9$ , N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.37 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 8.0$ ,  $J_{3,4} = 4.0$ , H-3), 4.28 (d, 1H, H-2), 3.98 (ap t, 1H,  $J_{4,5} = 3.7$ , H-4), 3.83 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.67-3.60 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.51-3.47 (m, 1H, H-5), 1.21 (d, 3H,  $J_{Me,5} = 6.7$ , Me-5).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) δ 149.1, 146.3, 136.8 (C<sub>q</sub> Ph, C<sub>q</sub> triazol), 130.0, 129.6, 129.1 (C Arom), 125.1, 124.7 (2 CH triazol), 80.0 (C-3), 75.0 (C-4), 71.4, 70.7, 70.3, 64.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-triazol), 58.5 (C-2), 56.9 (C-5), 54.9 (CH<sub>2</sub>-Ph), 51.3 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 14.7 (Me-5).

HRESIMS  $m/z$  found 444.2340, calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>N<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 444.2354

### Set of diazides (a-l).



✓ All the diazides were prepared following the procedures described in the literature.<sup>208</sup>

<sup>208</sup> a) For the synthesis of diazides **a-i**, see: Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. Size-specific ligands for RNA hairpin loops. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12434-12435; b) For the synthesis of diazides **j** and **k**, see: Goswami, L. N.; Houston, Z. H.; Sarma, S. J.; Jalisatgi, S. S.; Hawthorne, M. F. Efficient synthesis of diverse heterobifunctionalized clickable oligo(ethylene glycol) linkers: potential applications in bioconjugation and targeted drug delivery. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1116-1126; c)

**Generation of the dimeric libraries IIIA and IIIB followed by *in situ* biological screening (Figure 69).**

**Library IIIA and IIIB:** To 200  $\mu\text{L}$  of a solution (90 mM in  $t\text{BuOH-H}_2\text{O}$  2: 1) of alkynyl pyrrolidine **128** (for library IIIA) or **128'** (for library IIIB) in an eppendorf, 100  $\mu\text{L}$  of a solution of the corresponding diazide (**a-I**) (86 mM in  $t\text{BuOH}$ ) was added followed by 20  $\mu\text{L}$  of a solution of sodium ascorbate (200 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) and 20  $\mu\text{L}$  of a solution of  $\text{CuSO}_4$  (60 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ). The final concentration of the alkyne **128** or **128'** in each eppendorf was 53 mM. The resulting mixtures were shaken at r.t for 24 h and monitored for completion by TLC and ESI-MS. Then, the reactions were diluted with water to the desired concentration and placed in a 96-well microtiter plate in order to perform the enzymatic assays. In the preliminary screening of the resulting crude dimers **128a-I** (Library IIIA) and **128'a-I** (Library IIIB), the percentage of inhibition towards  $\alpha$ -fucosidases from bovine kidney and from *Homo sapiens* were determined at 0.12  $\mu\text{M}$  and 5.0  $\mu\text{M}$ , respectively, of the pyrrolidine dimer on each well (assuming quantitative conversion in the click reaction).

---

For the synthesis of diazide I, see: Yang, F.; Zhao, J.; Tang, X.; Zhou, G.; Song, W.; Meng, Q. Enantioselective  $\alpha$ -hydroxylation by modified salen-zirconium(IV)-catalyzed oxidation of  $\beta$ -keto esters. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 448-451.

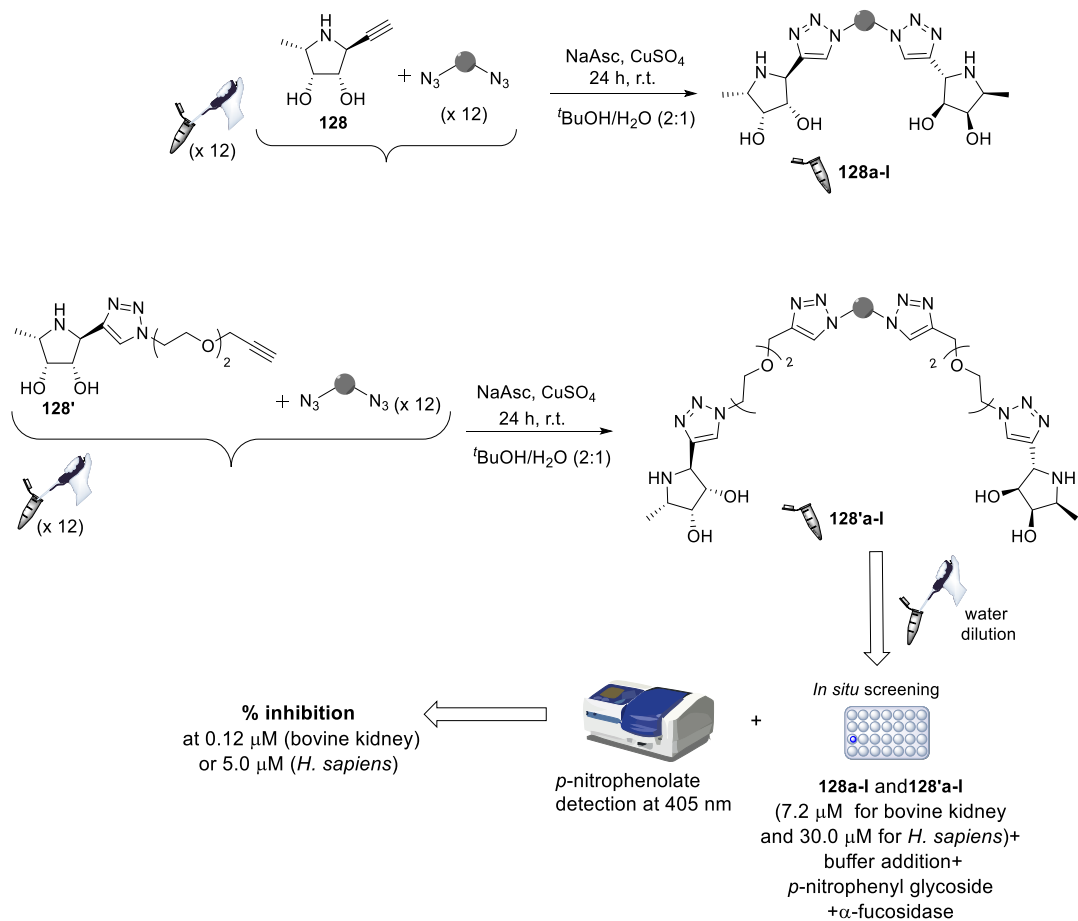
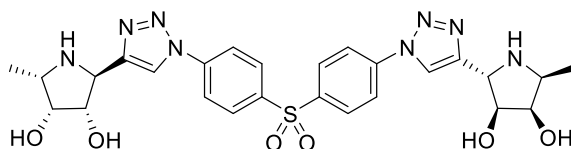


Figure 69

**Dimer 128i.**

Boc<sub>2</sub>O (310 mg, 4.12 mmol) was added to a solution of **128** (100 mg, 0.71 mmol) in MeOH (4 mL). After stirring at r.t. for 5 h, the mixture was evaporated and the residue purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 10:1) to afford the corresponding protected amine (155 mg, 0.64 mmol, 91%) as a white solid. To a solution of this compound (52 mg, 0.22 mmol) and diazide **i** (29 mg, 0.1 mmol) in toluene (3.5 mL), DIPEA (65 μL, 0.37 mmol) and CuI (6.0 mg, 0.03 mmol) were added. The reaction mixture was heated in a MW reactor (200W, 80 °C, 6 h). Purification of the crude was performed by stirring with Quadrasil MP followed by chromatographic purification on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 30:1 → 10:1). The corresponding protected dimer (61 mg, 0.078 mmol, 80%) was obtained as a white solid. A solution of this compound (48 mg, 0.061 mmol) in 4M HCl:THF (1:1, 3.0 mL) was stirred overnight at r.t. Evaporation of the solvent and precipitation with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gave **128i** (40.4 mg, 0.061 mmol, quant.).

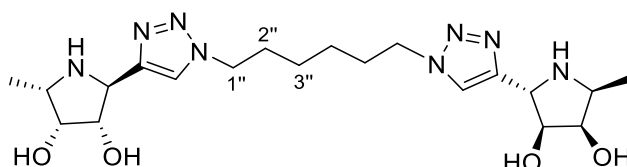
$[\alpha]_D^{23}$  -42.0 (c 0.5, H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H- NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, δ ppm, *J* Hz) δ 8.83 (s, 2H, H-triazol), 8.25 (d, 4H, *J*<sub>H,H</sub> = 8.8, Ph), 8.10 (d, 4H, Ph), 4.92-4.85 (m, 4H, H-2, H-3), 3.38 (t, 2H, *J*<sub>4,5</sub> = *J*<sub>4,3</sub> = 2.8, H-4), 4.10 (qd, *J*<sub>5,Me</sub> = 6.8, 2H, H-5), 1.48 (d, 6H, Me-5).

<sup>13</sup>C- NMR (75.4 MHz, D<sub>2</sub>O, δ ppm) δ 141.8, 140.2, 139.8 (Cq triazol, C<sub>q</sub>(Ph)), 129.7 (Ph), 124.2 (CH triazol), 121.9 (Ph), 75.6 (C-3), 71.6 (C-4), 57.8 (C-5), 54.7 (C-2), 11.2 (Me-5).

HRESIMS *m/z* found 583.2078, calc. for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>O<sub>6</sub>N<sub>8</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 583.2082.



**Dimer 128b.**

Iminosugar **137** (110 mg, 0.39 mmol), DIPEA (240  $\mu$ L, 1.39 mmol) and CuI (20 mg, 0.11 mmol) were added to a solution of diazide **b**<sup>209</sup> (30 mg, 0.18 mmol) in toluene (2 mL). After 24 h at r. t., the mixture was diluted with EtOAc (15 mL), sat. aq. sol. of NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) was added and the phases separated. After extraction with EtOAc, the organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and evaporated. Column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 60:1) afforded the protected dimeric derivative (93 mg, 0.13 mmol, 72%) as a white solid. This compound was dissolved in HCl (4 M):THF (1:1, 3 mL), the mixture stirred for 3 h at r. t. and then evaporated. The residue was dissolved in MeOH, basified with NH<sub>4</sub>OH and concentrated. Column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 3:1:0.15) afforded **128b** (54 mg, 0.12 mmol, 92%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{27}$  -18.0 (c 0.8, DMSO).

<sup>1</sup>H- NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm, *J* Hz)  $\delta$  8.40 (s, 2H, H-triazol), 5.70 (d, 2H, *J*<sub>OH,H</sub>= 2.3, -OH), 5.65 (d, 2H, *J*<sub>OH,H</sub>= 3.7, -OH), 4.46-4.40 (br s, 4H, H-2, H-3), 4.38 (m, 4H, H-1''), 3.99 (d, 2H, *J*<sub>4,5</sub>= 2.0, H-4), 3.79 (qd, *J*<sub>5,Me</sub>= 7.2, H-5), 1.81 (q, 4H, *J*<sub>2'',3''</sub>= *J*<sub>2'',1''</sub>= 6.3, H-2''), 1.32-1.20 (m, 10 H, Me-5, H-3'').

<sup>13</sup>C- NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm)  $\delta$  141.4 (Cq triazol), 124.5 (CH-triazol), 76.1 (C-3), 71.1 (C-4), 56.1 (C-5), 54.7 (C-2), 49.3 (C-1''), 29.3 (C-2''), 24.9 (C-3''), 12.0 (Me-5).

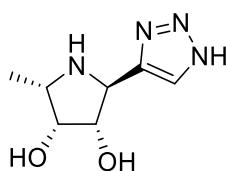
<sup>209</sup> Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. Size-specific ligands for RNA hairpin loops. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12434-12435



<sup>13</sup>C- NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) δ 149.3 (Cq triazol), 124.4 (CH triazol), 79.9 (C-3), 74.9 (C-4), 71.3 (C-3'', C-4''), 70.2 (C-1''), 58.4 (C-2), 56.6 (C-5), 51.2 (C-2''), 14.7 (Me-5).

HRESIMS *m/z* found 527.2914, calc. for C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>O<sub>7</sub>N<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 527.2936.

**(2S,3S,4R,5S)-2-(1H-1,2,3-Triazol-4-yl)-5-methyl-pyrrolidine-3,4-diol (149).**



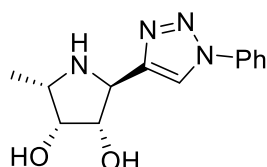
To a solution of **137** (88.1 mg, 0.30 mmol) in DMF:MeOH (9:1, 1.0 mL), TMSN<sub>3</sub> (62 μL, 0.47 mmol) and CuI (2.9 mg, 0.015 mmol) were added. After heating at 100 °C under Ar in a sealed tube for 20 h, the mixture was filtered through Florisil and the solvent was removed under vacuum. Purification through column chromatography on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:3 → 1:2), afforded the corresponding protected pyrrolidine triazole (81 mg, 0.25 mmol, 83%) as a white solid. Acidic deprotection (HCl (4 M):THF 1:1, 6.6 mL) and subsequent chromatographic purification on Dowex 50WX8 resin (MeOH → H<sub>2</sub>O → NH<sub>4</sub>OH) afforded **149** (27 mg, 0.15 mmol, 60%) as a colorless oil.

[α]<sub>D</sub><sup>27</sup> -35.4 (*c* 0.9, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm, *J* Hz) δ 7.73 (s, 1H, H-triazol), 4.40 (br s, 2H, H-2, H-3), 4.00 (br s, 1H, H-4), 3.58-3.53 (m, 1H, H-5), 1.25 (d, 3 H, *J*<sub>Me,5</sub> = 6.7, Me).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) δ 146.2 (Cq triazol), 129.4 (CH triazol), 79.9 (C-3 or C-2), 74.8 (C-4), 58.3 (C-3 or C-2), 57.0 (C-5), 14.4 (Me-5).

HRESIMS *m/z* found. 185.1032, calc. for C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 185.1033.

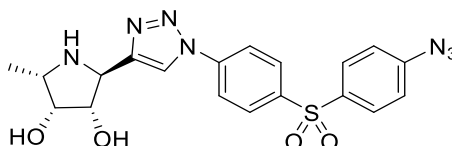
**(2S,3S,4R,5S)-2-(1-Phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (150).**<sup>211</sup>

To a solution of **128** (30 mg, 0.21 mmol) in <sup>t</sup>BuOH:H<sub>2</sub>O (2:1, 2.4 mL), a 0.5 M solution of PhN<sub>3</sub> in *tert*-butyl methyl ether (1.3 mL), sodium ascorbate (16 mg, 0.09 mmol) and CuSO<sub>4</sub> (6.5 mg, 0.03 mmol) were added in portions. After stirring at r.t. for 24 h, the mixture was treated with Quadrasil MP resin for 1 h. Filtration and evaporation afforded a residue that after chromatographic purification on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 10:1 →5:1) gave **150** (19.7 mg, 0.08 mmol, 38%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{24}$	-25.0 (c 0.7, MeOH).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 8.46 (s, 1H, H-triazol), 7.86-7.82 (m, 2H, Ph), 7.61-7.58 (m, 2H, Ph), 7.56-7.49 (m, 1H, Ph), 4.45 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>3,2</sub> = 7.9, <i>J</i> <sub>3,4</sub> = 4.1, H-3), 4.36 (d, 1H, H-2), 4.00 (t, 1H, <i>J</i> <sub>4,5</sub> = 3.7, H-4), 3.57-3.45 (m, 1H, H-5), 1.24 (t, 1H, <i>J</i> <sub>Me,5</sub> = 6.6, Me-5).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) δ 150.6 (Cq triazol), 138.5 (Cq Ph), 130.9, 130.0 (Ph), 122.1 (CH triazol), 121.5 (Ph), 80.2 (C-3), 75.1 (C-4), 58.7 (C-2), 56.9 (C-5), 14.8 (Me-5).
HRESIMS	<i>m/z</i> found. 261.1348, calc. for C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 261.1346.

<sup>211</sup> Elías-Rodríguez, P.; Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I. Rapid discovery of potent α-fucosidase inhibitors by *in situ* screening of a library of (pyrrolidin-2-yl) triazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5898–5904.

**(2S,3S,4R,5S)-2-(1-(4-((4-Azidophenyl)sulfonyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-5-methylpyrrolidine-3,4-diol (**151**).**



Boc<sub>2</sub>O (310 mg, 4.12 mmol) was added to a solution of **128** (100 mg, 0.71 mmol) in MeOH (4 mL). After stirring at r.t. for 5 h, the mixture was evaporated and the residue purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 10:1) to afford the corresponding protected amine (155 mg, 0.64 mmol, 91%) as a white solid. To a solution of this compound (47.8 mg, 0.20 mmol) and diazide **i** (297 mg, 0.99 mmol) in toluene (8 mL), DIPEA (105 μL, 0.60 mmol) and CuI (15 mg, 0.05 mmol) were added. The reaction mixture was heated in a MW reactor (200W, 80 °C, 6 h) and the solvent was then evaporated. Purification of the crude was performed by stirring with Quadrasil MP followed by chromatographic purification on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 30:1) to afford the corresponding “monoclick” derivative (46 mg, 0.085 mmol, 43%) as a yellow solid. Acidic deprotection (4M HCl:THF 1:1, 3.0 mL) and subsequent column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 20:1:0.05) gave **151** (22 mg, 0.049 mmol, 58%) as a yellow solid.

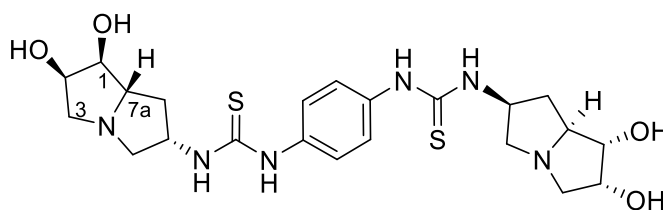
$[\alpha]_D^{24}$  -27.0 (*c* 0.5, DMSO).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J* Hz) δ 8.78 (s, 1H, H-triazol), 8.16 (br s, 4H, Ph), 8.01 (d, 2H, *J*<sub>H,H</sub> = 8.8, Ph), 7.34 (d, 2H, Ph), 4.86 (d, 1H, *J*<sub>OH,3</sub> = 6.1, OH-3), 4.51 (d, 1H, *J*<sub>OH,4</sub> = 4.6, OH-4), 4.16-4.14 (m, 2H, H-2, H-3), 3.78-3.77 (m, 1H, H-4), 3.31-3.26 (m, 2H, H-5, NH), 1.04 (d, 3H, *J*<sub>H,H</sub> = 7.0, Me-5)

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) δ 152.0 (Cq triazol), 145.4, 140.4, 140.1, 136.6 (Cq Ph), 129.6 (Ph), 129.4 (Ph), 120.63, 120.58, 120.4 (Ph, CH triazol), 79.2 (C-3), 73.5 (C-4), 57.8 (C-2), 55.1 (C-5), 14.4 (Me-5).

HRESIMS  $m/z$  found. 442.1284, calc. for  $C_{19}H_{20}O_4N_7S$   $[M+H]^+$ : 442.1292.

### Dimer 152.



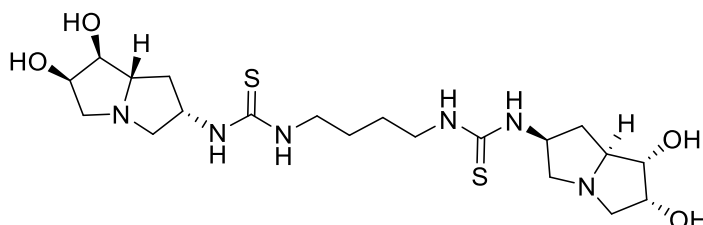
To a solution of amine **75** (50 mg, 0.32 mmol) in DMF (4 mL) was added 1,4-diisothiocyanatobenzene (27.6 mg, 0.14 mmol) and the mixture was stirred for 24 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column ( $CH_2Cl_2$ :MeOH: $NH_4OH$ , 3:1:0.2→2:1:0.2) to give **152** (42 mg, 0.08 mmol, 57%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{21}$  -24.8 (c 1.53, DMSO).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  9.80 (br s, 2H, NH), 8.12 (br s, 2H, -NH), 7.36 (br s, 4H, Ph), 4.75 (br s, 4H, OH), 4.14 (q, 2H,  $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,3'} = 2.6$ , H-2), 3.80-3.78 (m, 2H, H-1), 3.43-3.37 (m, 6H, H-5, H-7a), 3.00 (dd, 2H,  $J_{3,3'} = 6.8$ , H-3), 2.86 (dd, 2H, H-3'), 2.53-2.49 (m, 4H, H-5', H-6), 2.38-2.33 (m, 2H, H-7), 1.63-1.58 (m, 2H, H-7').

$^{13}C$ -NMR (75.4 MHz,  $DMSO-d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  180.3 (C=S), 13.5 (Cq Ph), 124.0, 123.2 (Ph), 76.7 (C-1), 71.7 (C-2), 67.2 (C-7a), 58.5 (C-5, C-3), 54.8 (C-6), 34.5 (C-7).

HRESIMS  $m/z$  found 509.1991, calc. for  $C_{22}H_{33}O_4N_6S_2$   $[M+H]^+$ : 509.1999.

**Dimer 153.**

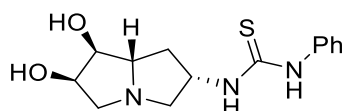
To a solution of amine **75** (34 mg, 0.22 mmol) in DMF (4 mL) was added 1,4-butane diisothiocyanate (17 mg, 0.09 mmol) and the mixture was stirred for 4.5 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH: $\text{NH}_4\text{OH}$ , 3:1:0.2 $\rightarrow$ 1:1:0.2) to give **153** (27 mg, 0.06 mmol, 67%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{24}$  -19.9 (c 1.34, DMSO).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz)  $\delta$  7.73 (br s, 4H, -NH), 4.90 (br s, 2H, OH), 4.61 (br s, 2H, OH), 4.15 (q, 2H,  $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,3'} = 4.2$ , H-2), 3.81 (ap t, 2H,  $J_{1,7a} = 4.8$ , H-1), 3.46–3.36 (m, 8H, H-5, H-7a,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.03 (dd, 2H,  $J_{3,3'} = 11.4$ , H-3), 2.90 (dd, 2H, H-3'), 2.51–2.40 (m, 6H, H-7, H-5', H-6), 1.58–1.38 (m, 6H, H-7',  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  181.9 (C=S), 76.6 (C-1), 71.6 (C-2), 67.2 (C-7a), 58.6 (C-5), 58.3 (C-3), 54.3 (C-6), 43.4 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 34.6 (C-7), 26.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

HRESIMS  $m/z$  found 489.2311, calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_6\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 489.2312.

***N*-Phenyl-*N'*-[(1*S*,2*R*,6*S*,7*aS*)-1,2-dihydroxypyrrolizidin-6yl]thiourea (155).**

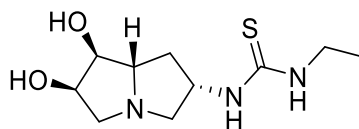
To a solution of amine **75** (41 mg, 0.26 mmol) in MeOH (2.0 mL) was added phenyl isothiocyanate (37  $\mu$ L, 0.31 mmol) and the mixture was stirred for 6 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 7:1:0.1) to give **155** (41 mg, 0.14 mmol, 54%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{30}$  -20.6 (c 0.37, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm, *J* Hz)  $\delta$  7.39-7.32 (m, 4H, Ph), 7.22-7.16 (m, 1H, Ph), 4.99 (br s, 1H, H-6), 4.27 (q, 1H,  $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,3'} = 4.5$ , H-2), 3.89 (ap t, 1H,  $J_{1,7a} = 4.5$ , H-1), 3.54-3.44 (m, 2H, H-5, H-7a), 3.10 (dd, 1H,  $J_{3,3'} = 11.7$ , H-3), 2.85 (dd, 1H, H-3'), 2.57-2.39 (m, 2H, H-7, H-5'), 1.64-1.54 (m, 1H, H-7').

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm)  $\delta$  182.5 (C=S), 139.7 (C<sub>q</sub> Ph), 130.1 (Ph), 126.7 (Ph), 125.5 (Ph), 78.8 (C-1), 73.6 (C-2), 68.4 (C-7a), 59.8 (C-3), 59.7 (C-5), 56.9 (C-6), 36.0 (C-7).

HRESIMS *m/z* found 294.1270, calc. for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 294.1271.

***N*-Ethyl-*N'*-[(1*S*,2*R*,6*S*,7*aS*)-1,2-dihydroxypyrrolizidin-6yl]thiourea (156)**

To a solution of amine **75** (43 mg, 0.27 mmol) in MeOH (2.0 mL) was added ethyl isothiocyanate (30  $\mu$ L, 0.32 mmol) and the mixture was stirred for 2 h at r.t. After evaporation



to dryness, the crude was purified by chromatography column (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 5:1:0.1) to give **156** (41 mg, 0.17 mmol, 63%) as a white solid.

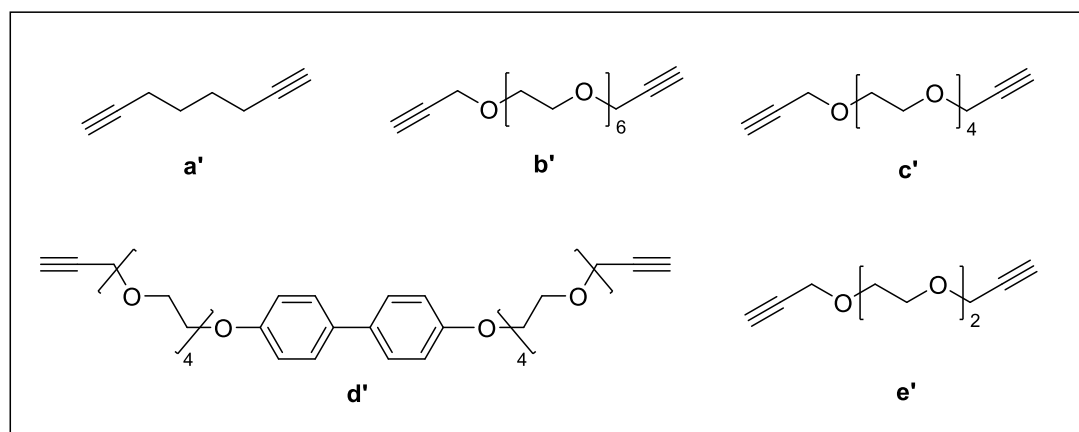
$[\alpha]_D^{30}$  -37.3 (c 1, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD:CDCl<sub>3</sub>=1:1,  $\delta$  ppm, *J* Hz)  $\delta$  4.78 (s, 1H, H-6), 4.29 (q, 1H,  $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,3'} = 4.2$ , H-2), 3.93 (dd, 1H,  $J_{1,7a} = 5.2$ , H-1), 3.55–3.45 (m, 4H, H-5, H-7a, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.14 (dd, 1H,  $J_{3,3'} = 11.7$ , H-3), 2.88 (dd, 1H, H-3'), 2.57–2.40 (m, 2H, H-7, H-5'), 1.61–1.51 (m, 1H, H-7'), 1.16 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD:CDCl<sub>3</sub>=1:1,  $\delta$  ppm)  $\delta$  182.3 (C=S), 77.9 (C-1), 73.0 (C-2), 67.8 (C-7a), 59.7 (C-3), 59.3 (C-5), 55.6 (C-6), 39.7 (NHCH<sub>2</sub>), 35.9 (C-7), 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

HRESIMS *m/z* found 246.1269, calc. for C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 246.1271.

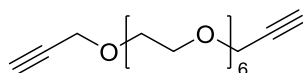
### Set of dialkynes (a'-e')



✓ **a'** is commercially available.

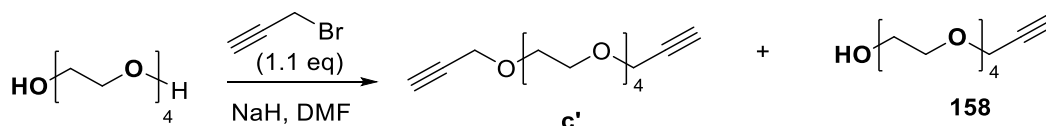
- ✓ **b'**, **c'** and **e'** have been synthesized following the procedures described below even if they are commercially available.
- ✓ **d'** is a new compound.

#### 4,7,10,13,16,19,22-Heptaioxapentacos-1,24-diyne (**b'**).<sup>212</sup>



To a cooled (0 °C) solution of hexaethylene glycol (1.25 g, 4.29 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) was slowly added NaH (325 mg, 12.9 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and then propargyl bromide (1.4 mL, 13 mmol) was dropwise added. The reaction mixture was stirred overnight. Then, the reaction mixture was filtered through celite, washed with Et<sub>2</sub>O and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 40:1) to give **b'** (1.32 g, 3.66 mmol, 85%) as a yellow oil.

#### 4,7,10,13,16-Pentaoxanonadeca-1,18-diyne (**c'**) and 2,5,8,11,14-pentaoxaheptadec-16-yn-1-ol (**158**).<sup>213</sup>

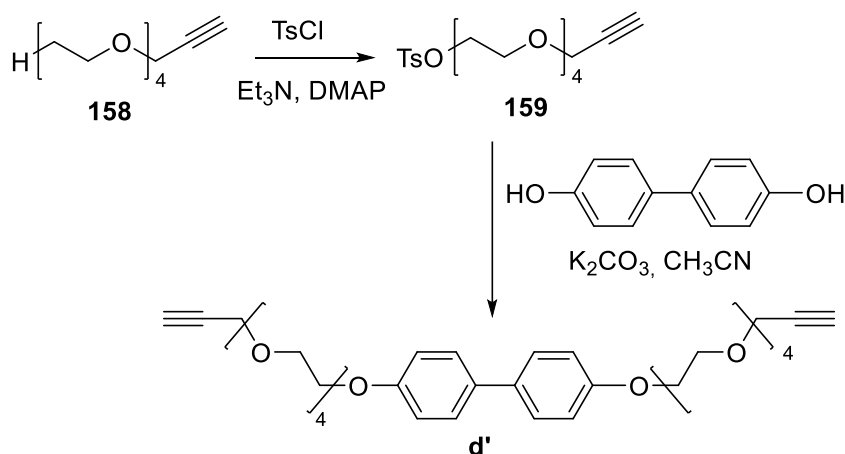


<sup>212</sup> McPhee, M. M; Kerwin, S. M. Synthesis, DNA cleavage, and cytotoxicity of a series of bis(propargylic) sulfone crown ethers. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2809–2818.

<sup>213</sup> Feng, Y.; Li, J.; Jiang, L.; Gao, Z.; Huang, W.; Jiang, F.; Luo, N.; Han, S.; Zeng, R.; Yang, D.; Efficient syntheses and complexation studies of diacetylene-containing macrocyclic polyethers. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 562–568.

To a cooled (0 °C) solution of tetraethylene glycol (1.0 g, 5.0 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was slowly added NaH (143 mg, 5.67 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min and then propargyl bromide (0.6 mL, 6 mmol) was dropwise added. The reaction mixture was stirred for 48 h and then was filtered through celite, washed with AcOEt and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:1→ EtOAc) to give **158** (609 mg, 2.62 mmol, 52%) and **c'** (196 mg, 0.725 mmol, 15%) as colorless liquids.

**4,4'-Bis((3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl)oxy)-1,1'-biphenyl (d')**.

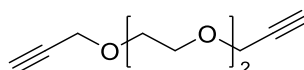


To a cooled (0 °C) solution of **158** (608 mg, 2.62 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) were added Et<sub>3</sub>N (1.8 mL, 13 mmol), *p*-toluenesulfonyl chloride (1 g, 5 mmol) and DMAP (8 mg, 0.06 mmol). After 4 h, the solution was quenched with water and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (3x20 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:1) to yield **159**

(804 mg, 2.08 mmol, 79%) as a colorless oil. Then, to a cooled (0 °C) solution of [1,1'-biphenyl]-4,4'-diol (151 mg, 0.810 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (336 mg, 2.43 mmol) in anhydrous CH<sub>3</sub>CN (20 mL) was slowly added **159** (780 mg, 2.02 mmol). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 24 h and then was filtered through celite, washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane:MeOH, 1:1:0.1 → 1:1:1) to give **d'** (371 mg, 0.604 mmol, 75%) as a white solid.

<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 7.47-7.42 (m, 4H, Ph), 6.98-6.93 (m, 4H, Ph), 4.19 (d, 4H, <sup>4</sup> <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 2.4, HC≡C-CH <sub>2</sub> -O-), 4.16 (ap. t, 4H, -CH <sub>2</sub> -O-), 3.87 (ap. t, 4H, -CH <sub>2</sub> -O-), 3.75-3.66 (m, 24H, -CH <sub>2</sub> -O-), 2.41 (t, 2H, HC≡C-CH <sub>2</sub> -O).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ ppm) δ 158.1, 133.7 (C <sub>q</sub> Ph), 127.8, 115.0 (Ph), 79.8 (HC≡C-CH <sub>2</sub> -O-), 74.6 (HC≡C-CH <sub>2</sub> -O-), 71.0, 70.7, 70.5, 69.9, 69.2, 67.7 (-CH <sub>2</sub> -O-), 58.5 (HC≡C-CH <sub>2</sub> -O-).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 637.2928, calc. for C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> O <sub>10</sub> [M+Na] <sup>+</sup> : 637.2983.

### 3-(2-(2-(Prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-yne (**e'**).<sup>214</sup>

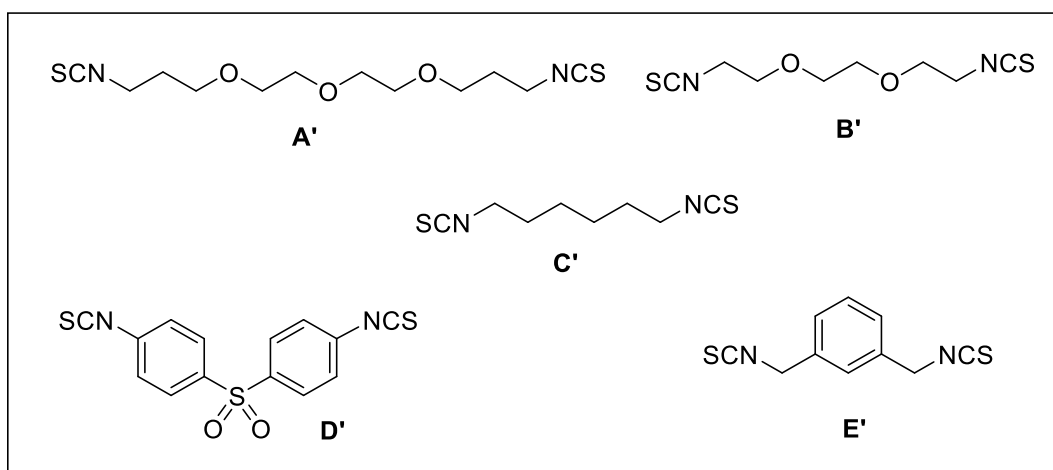


To a cooled (0 °C) solution of diethylene glycol (360 μL, 3.77 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was slowly added NaH (600 mg, 15.1 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min and then a 80% solution of propargyl bromide in toluene (2.0 mL, 19 mmol) was dropwise

<sup>214</sup> André, S.; Lahmann, M.; Gabius, H. J.; Oscarson, S. Glycocluster design for improved avidity and selectivity in blocking human lectin/plant toxin binding to glycoproteins and cells. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 2270–2279.

added. The reaction mixture was stirred overnight and excess of NaH was then quenched by careful addition of MeOH (20 mL). The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed twice with water. The organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by chromatography column on silica gel (Toluene → Toluene: EtOAc, 5:1) to yield **e'** (680 mg, 3.73 mmol, 99%) as a yellow liquid.

**Set of diisothiocyanates (A', B', C', D', E')**



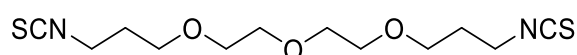
- ✓ Diisothiocyanates **A'**, **B'**, **C'**, **D'**, **E'** have been synthesized following the general procedure described below even if they are commercially available.

**General procedure for the synthesis of diisothiocyanates A', B', C', D', E'.**

To a solution of the appropriate diamine (1 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O 1:1 (15-25 mL) was added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.4 eq) followed by thiophosgene (4 eq) and the reaction mixture was vigorously stirred for 5 h at r.t. Then, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic phase was

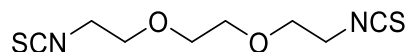
washed with H<sub>2</sub>O, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography column on silica gel obtaining the final product.

**1-Isothiocyanato-3-(2-(2-(3-isothiocyanatopropoxy)ethoxy)ethoxy)propane (A').**<sup>215</sup>



Reaction of 3,3'-((oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(propan-1-amine) (414 mg, 1.36 mmol) following the general procedure and purification by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:5) afforded **A'** (372 mg, 1.22 mmol, 90%) as a yellow oil.

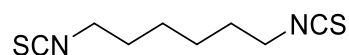
**1,2-Bis(2-isothiocyanatoethoxy)ethane (B').**<sup>216</sup>



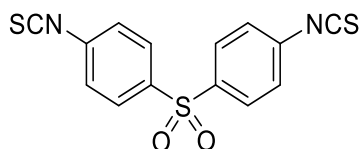
Reaction of 2,2'-(ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethan-1-amine) (314 mg, 1.35 mmol) following the general procedure and purification by chromatography column on silica gel (EtOAc:Cyclohexane, 1:20) afforded **B'** (225 mg, 0.97 mmol, 72%) as a yellow oil.

<sup>215</sup> Munch, h.; Hansen, J.S.; Pittelkow, M.; Christensen, J. B.; Boas, U. A new efficient synthesis of isothiocyanates from amines using di-*tert*-butyl dicarbonate. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *19*, 3117-3119.

<sup>216</sup> Lukyanenko, N. G.; Kirichenko, T. I.; Scherbakov, S. V.; Novel cryptands containing thiourea units as a part of the macrocyclic framework. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 2347-2351.

**1,6-Diisothiocyanatohexane (C').**<sup>217</sup>

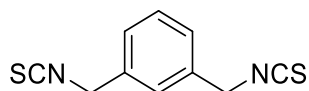
Reaction of hexane-1,6-diamine (258 mg, 1.29 mmol) following the general procedure and purification by chromatography column on silica gel (Cyclohexane → EtOAc:Cyclohexane, 1:20) afforded **C'** (221 mg, 1.10 mmol, 85%) as a yellow oil.

**4,4'-Sulfonylbis(isothiocyanatobenzene) (D').**<sup>218</sup>

Reaction of 4,4'-sulfonyldianiline (300 mg, 1.21 mmol) following the general procedure and purification by chromatography column on silica gel (Cyclohexane → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Cyclohexane, 1:1) afforded **D'** (150 mg, 0.45 mmol, 37%) as a yellow oil.

<sup>217</sup> Janczewska, L.; Gajda, A.; Frankowska, S.; Goszczyński, T. M.; Gajda, T. A Benign desulfurating reagent in the synthesis of isothiocyanates. *Synthesis*, **2018**, *50*, 1141–1151.

<sup>218</sup> Ghorab, M. M.; Taha, N. M. H.; Radwan, M. A. A.; Amin, N. E.; Shehab, M. A.; Faker, I. M. I. Dapson in heterocyclic chemistry, part I: novel synthesis of sulfone biscompounds for antimicrobial and antitumor activities. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*. **2008**, *183*, 2891-2905.

**1,3-Bis(isothiocyanatomethyl)benzene (E').**<sup>219</sup>

Reaction of 1,3-phenylenedimethanamine (485 mg, 2.20 mmol) following the general procedure and purification by chromatography column on silica gel (Cyclohexane → EtOAc:Cyclohexane, 1:40) afforded **E'** (480 mg, 2.18 mmol, 99%) as a yellow solid.

**Generation of the dimeric libraries IVA and IVB followed by *in situ* biological screening (Figure 70).**

**Library IVA:** To a solution of 84  $\mu\text{L}$  of the pyrrolidine-azide **95** (90 mM in  $t\text{BuOH}$ ) in an eppendorf were added 35  $\mu\text{L}$  of a solution of the corresponding dialkyne (**a'-e'**) (86 mM in  $t\text{BuOH}$ ) followed by 15  $\mu\text{L}$  of a solution of sodium ascorbate (200 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) and 14  $\mu\text{L}$  of a solution of  $\text{CuSO}_4$  (60 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ). The final concentration of the dialkynes (**a'-e'**) in each eppendorf was 20 mM. The resulting mixtures were shaken at 80  $^\circ\text{C}$  for 18 h and monitored for completion by TLC (AcOEt/Cy 2:1) and ESI-MS. Then, the reactions were diluted with water to the desired concentration and placed in a 96-well microtiter plate in order to perform the enzymatic assays against human hexosaminidase type OGA (*O*-GlcNAcase) and HexB ( $\beta$ -*N*-acetyl-hexosaminidase). In the preliminary screening of the resulting crude **95a'-e'**, the percentage of inhibition was determined at 5 nM (HexB) and at 500 nM (OGA) of the corresponding dimeric compound on each well (assuming quantitative conversion in the click reaction).

<sup>219</sup> Zepik, H. H., Benner, S. A.; Catalysts, anticatalysts, and receptors for unactivated phosphate diesters in water. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8080-8083.



**Library IVB:** To a solution of 100  $\mu$ L of the pyrrolidine-amine **96** (90 mM in DMSO) in an eppendorf, were added 88  $\mu$ L of a solution of the corresponding isothiocyanates (**A'-E'**) (43 mM in DMSO). The final concentration of the diisothiocyanates (**A'-E'**) in each eppendorf was 20 mM. The resulting mixtures were shaken at r.t. for 19 h and monitored for completion by TLC (AcOEt/Cy 1:2) and ESI-MS. Then, the reactions were diluted with water to the desired concentration and placed in a 96-well microtiter plate in order to perform the enzymatic assays against human hexosaminidase type OGA (*O*-GlcNAcase) and HexB ( $\beta$ -*N*-acetyl-hexosaminidase). In the preliminary screening of the resulting crude **96A'-E'**, the percentage of inhibition was determined at 5 nM (HexB) and at 500 nM (OGA) of the corresponding dimeric compound on each well (assuming quantitative conversion in the click reaction).

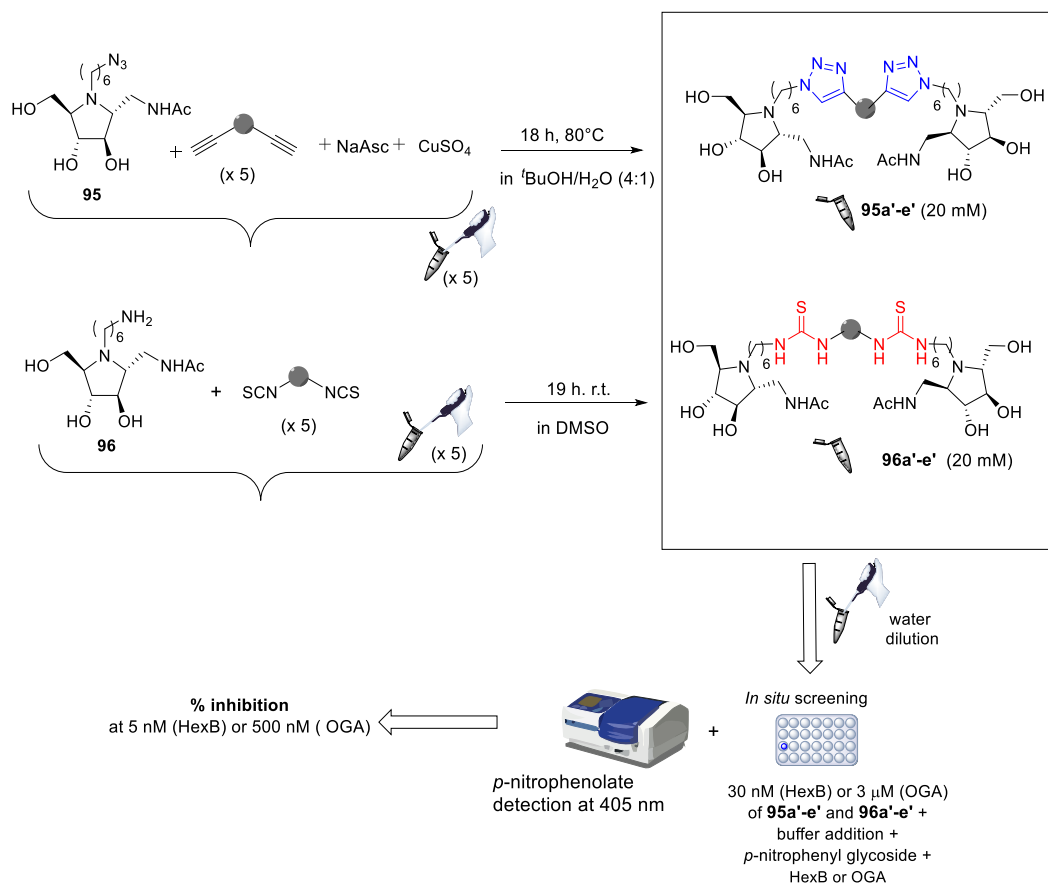
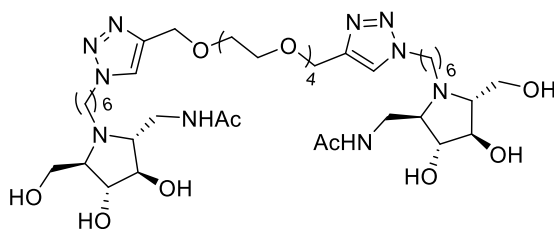


Figure 70

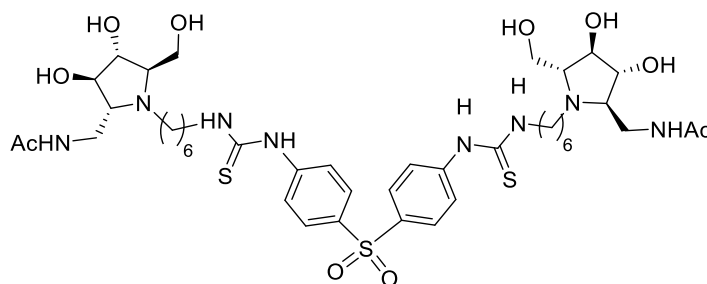
**Dimer 95a'.**

Pyrrolidin-azide **95** (43 mg, 0.13 mmol) was added to a solution of the dialkyne **a'** (14.6 mg, 0.054 mmol) in <sup>t</sup>BuOH:H<sub>2</sub>O 4:1 (2.6 mL) followed by sodium ascorbate (10 mg, 0.05 mmol) and CuSO<sub>4</sub> (2.4 mg, 0.015 mmol) and the reaction mixture was heated at 80°C for 24 h. After the solvent was removed under vacuum, the crude product was purified by chromatography column on silica gel (DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 3:1:0.05 → 3:1:0.1) obtaining the final product **95a'** (25.9 mg, 0.028 mmol, 52%) as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{29}$	-17.5 (c 0.86, MeOH).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm, <i>J</i> Hz) δ 7.98 (s, 2H, <i>H</i> triazol), 4.62 (s, 4H, triazol-CH <sub>2</sub> -O-), 4.40 (t, 4H, <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 7.0, -CH <sub>2</sub> -triazol), 3.98 (br. t, <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 2.0, H-3 or H-4), 3.82 (br. t, 2H, H-4 or H-3), 3.77 (dd, 2H, <sup>2</sup> <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 11.5, <i>J</i> <sub>H,5</sub> = 4.8, -CH <sub>2</sub> OH), 3.69 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>H,5</sub> = 3.7, -CH <sub>2</sub> OH), 3.67-3.62 (m, 16H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-), 3.51 (dd, 2H, <sup>2</sup> <i>J</i> <sub>H,H</sub> = 13.7, <i>J</i> <sub>H,2</sub> = 3.4, -CH <sub>2</sub> NHAc), 3.24 (dd, 2H, <i>J</i> <sub>H,2</sub> = 6.9, -CH <sub>2</sub> NHAc), 3.10-3.05 (m, 4H, H-2, H-5), 2.86-2.68 (m, 4H, -CH <sub>2</sub> N-), 1.95-1.87 (m, 10H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -triazol, -CH <sub>3</sub> ), 1.59-1.31 (m, 12H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) δ 173.7 (-C=O), 145.9 (Cq triazol), 125.0 (CH triazol), 80.7, 80.6 (C-3, C-4), 71.5, 71.4 (-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-), 70.7, 69.9 (C-2, C-5), 65.0 (triazol-CH <sub>2</sub> -O-), 60.5 (-CH <sub>2</sub> OH), 51.3 (-CH <sub>2</sub> -triazol), 48.2 (-CH <sub>2</sub> N-), 39.2 (-CH <sub>2</sub> NHAc), 31.2 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -triazol), 28.6, 27.7, 27.2 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 22.7 (-CH <sub>3</sub> ).

HRESIMS  $m/z$  found 951.5477, calc. for  $C_{42}H_{76}O_{13}N_{10}$   $[M+Na]^+$ : 951.5486.

### Dimer 96D'.



Pyrrolidine-amine **96** (30 mg, 0.099 mmol) was added to a solution of the diisothiocyanate **D'** (14 mg, 0.042 mmol) in DCM:MeOH 1:10 (2.3 mL) and the mixture was stirred for 24 h at r.t. After evaporation to dryness, the crude was purified by chromatography column on silica gel (DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH, 3:1:0.03) obtaining the final product **96D'** (32.1 mg, 0.034 mmol, 81%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{29}$  -21.0 (*c* 0.88, MeOH).

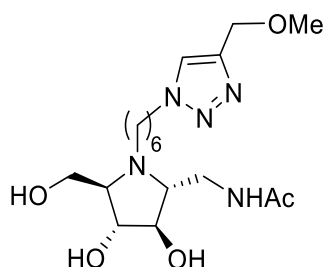
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm, *J* Hz)  $\delta$  7.85 (d, 4H,  $J_{H,H}$  = 8.8, Ph), 7.70 (d, 4H, Ph), 3.99-3.96 (m, 2H, H-3 or H-4), 3.83-3.76 (m, 4H, H-4 or H-3, -CH<sub>2</sub>OH), 3.70 (dd, 2H,  $^2J_{H,H}$  = 11.5,  $J_{H,5}$  = 3.6, -CH<sub>2</sub>OH), 3.57-3.49 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.25 (dd, 2H,  $^2J_{H,H}$  = 13.7,  $J_{H,2}$  = 6.8, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.14-3.08 (m, 4H, H-2, H-5), 2.87-2.70 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>N-), 1.95 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>), 1.65-1.58 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.43-1.33 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm)  $\delta$  182.0 (-C=S), 173.8 (-C=O), 145.6 (Cq Ph), 137.3 (Cq Ph), 129.4 (Ph), 123.2 (Ph), 80.7, 80.6 (C-3, C-4), 70.6, 69.6 (C-2, C-5),

60.5 (-CH<sub>2</sub>OH), 48.3 (-CH<sub>2</sub>N-), 45.5 (-CH<sub>2</sub>NH-), 39.2 (-CH<sub>2</sub>NHAc), 29.7, 28.7 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 28.0, 27.7 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 22.7 (-CH<sub>3</sub>).

HRESIMS  $m/z$  found 939.4127, calc. for C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>O<sub>10</sub>N<sub>8</sub>S<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 939.4128.

***N*-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-1-(6-(4-(methoxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)acetamide (157).**



To a solution of pyrrolidin-azide **95** (45.7 mg, 0.14 mmol) in DMF:H<sub>2</sub>O 9:1 (2 mL), methyl propargyl ether (0.016 mL, 0.18 mmol), sodium ascorbate (4 mg, 0.02 mmol) and CuSO<sub>4</sub> (2 mg, 0.01 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. for 19 h. After the solvent was removed under reduced pressure, the crude product was purified by chromatography column on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 10:1 → 5:1) obtaining the final product **157** (34 mg, 0.085 mmol, 61%) as a yellow oil.

$[\alpha]_D^{25}$  -32.4 (c 0.83, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm, *J* Hz) δ 7.98 (s, 1H, *H* triazol), 4.53 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 4.41 (t, 2H, *J*<sub>H,H</sub> = 7.1, -CH<sub>2</sub>-triazol), 3.96 (t, 1H, *J*<sub>H,H</sub> = 2.0, H-3 or H-4), 3.80-3.72 (m, 2H, H-4 or H-3, -CH<sub>2</sub>OH), 3.67 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.4, *J*<sub>H,5</sub> = 3.5, -CH<sub>2</sub>OH), 3.50 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 13.6, *J*<sub>H,2</sub> = 3.2, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.37 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.19 (dd, 1H, *J*<sub>H,2</sub> = 6.9, -CH<sub>2</sub>NHAc), 3.07-3.01 (m, 2H, H-2, H-5), 2.81-

---

	2.62 (m, 2H, -CH <sub>2</sub> N-), 1.97-1.88 (m, 5H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -triazol, -CH <sub>3</sub> ), 1.59-1.34 (m, 6H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.4 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ ppm) δ 173.6 (-C=O), 145.8 (Cq triazol), 125.0 (CH triazol), 81.0, 80.9 (C-3, C-4), 70.4, 69.3 (C-2, C-5), 66.3 (-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ), 60.6 (-CH <sub>2</sub> OH), 58.4 (-OCH <sub>3</sub> ), 51.3 (-CH <sub>2</sub> -triazol), 47.8 (-CH <sub>2</sub> N-), 39.3 (-CH <sub>2</sub> NHAc), 31.2 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -triazol), 28.8, 27.7, 27.2 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-), 22.7 (-CH <sub>3</sub> ).
HRESIMS	<i>m/z</i> found 400.2546, calc. for C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> N <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 400.2554.

**ANEXO I**

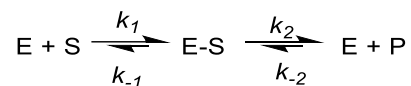
***Conceptos básicos sobre inhibición enzimática***

### ANEXO I: Conceptos básicos sobre la inhibición enzimática

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica capaces de catalizar los procesos biológicos. De forma análoga a los catalizadores, también las enzimas son capaces de disminuir la energía de activación ( $E_a$ ) de una reacción acelerando su velocidad de una manera consistente. Una de las características peculiares de las enzimas en comparación con otros catalizadores está representada por su elevada especificidad por el sustrato.

La actividad enzimática puede verse afectada por varios factores como el pH, la temperatura, la concentración del sustrato o por la presencia de sustancias químicas que interfieren en el proceso (inhibidores enzimáticos).<sup>220</sup>

Gracias al modelo cinético de Michaelis-Menten, somos capaces de describir el comportamiento de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima al variar la concentración de sustrato (S) y enzima (E). Recordando que el modelo en cuestión es válido sólo para las enzimas no alostéricas, podemos describir el modelo cinético de Michaelis-Menten con el siguiente esquema:



En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato (E-S) y en la segunda, el complejo E-S da lugar a la formación del producto (P), liberando la enzima libre (E). La velocidad de reacción se describe por la siguiente ecuación:

---

<sup>220</sup> Waldrop, G. L. A qualitative approach to enzyme inhibition. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2009**, *37*, 11-15.

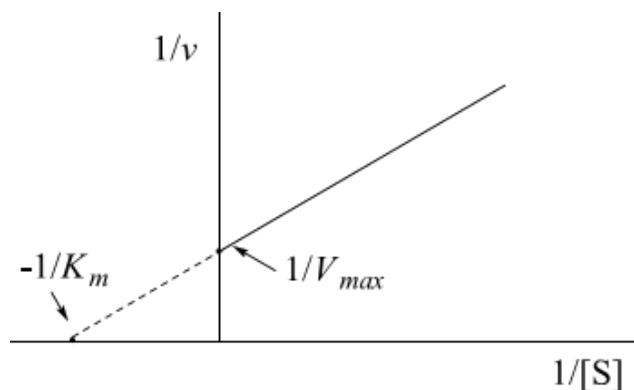


$$v = V_{m\acute{a}x} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Donde [S] es la concentración de sustrato y  $V_{m\acute{a}x}$  es la velocidad máxima que describe el valor límite de velocidad alcanzable con una elevada concentración de sustrato.  $K_m$  es la constante de Michaelis. La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v frente a [S]) es una hipérbola. La  $V_{m\acute{a}x}$  corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la  $K_m$  corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la  $V_{m\acute{a}x}$ . Reordenando los términos de la ecuación anterior se obtiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Utilizando esta nueva ecuación, se puede establecer un método gráfico más adecuado para el cálculo de  $K_m$ . Al representa  $1/v$  frente a  $1/[S]$  se obtiene una recta de pendiente  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , que corta al eje de ordenadas en  $1/V_{m\acute{a}x}$  y extrapolando, al eje de abscisas en  $-1/K_m$ . Este es el método denominado de los dobles inversos o de Lineweaver-Burk (**Figura 59**).



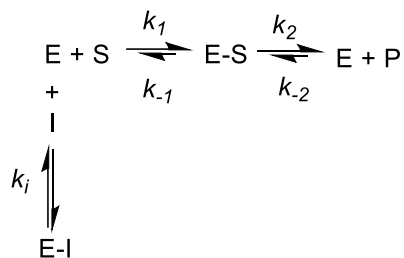
**Figura 59.** Representación de Lineweaver-Burk.

El fenómeno de la inhibición enzimática se puede dividir en dos grandes categorías: la *inhibición irreversible* y la *inhibición reversible*.

El inhibidor irreversible se une covalentemente a la enzima y puede inhibir de forma permanente su actividad, mientras que, el inhibidor reversible se une a la enzima a través de interacciones no covalentes.

La inhibición reversible puede ser de tres tipos: inhibición competitiva, incompetitiva y mixta. Cada uno de estos tipos se puede describir gráficamente con el método de Lineweaver-Burk.

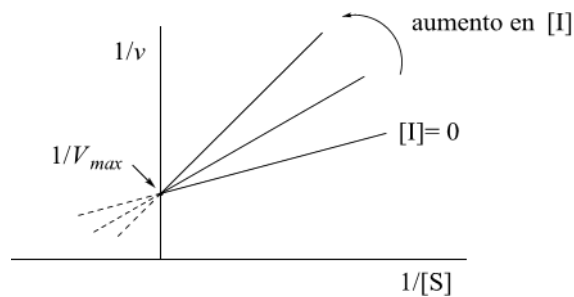
En la inhibición competitiva, el inhibidor compite con el sustrato por la unión al sitio activo de la enzima, evitando, de hecho, la interacción enzima-sustrato y por lo tanto disminuyendo la velocidad de la reacción catalizada por la enzima. El proceso se describe por el siguiente equilibrio:



Siendo la constante de inhibición  $k_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]}$  donde [E], [I] y [EI] son las concentraciones de enzima libre, de inhibidor y de complejo enzima-inhibidor respectivamente.

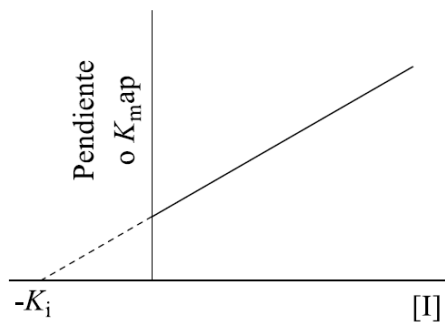
El valor de  $k_i$  representa la afinidad del inhibidor por la enzima, y, cuanto menor sea dicho valor mayor es la eficacia del inhibidor sobre la enzima.

En la inhibición competitiva, las representaciones de Lineweaver-Burk para diferentes concentraciones de inhibidor se cortan en eje de las ordenadas (**Figura 60**).



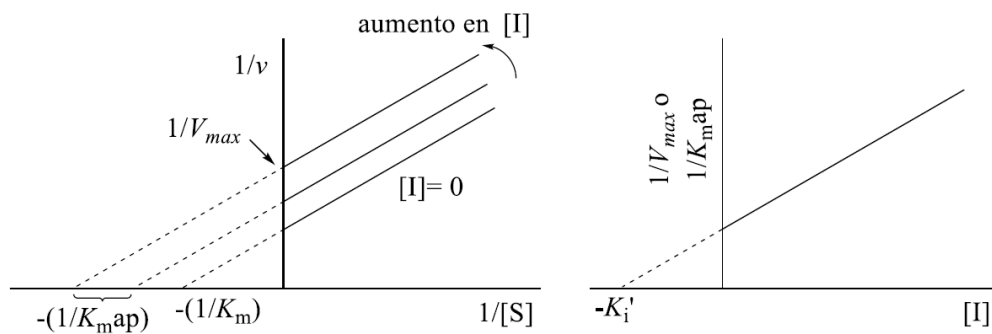
**Figura 60.** Representación de Lineweaver-Burk en una inhibición competitiva.

El valor de  $K_i$  se puede obtener de una representación gráfica derivada de la representación de Lineweaver-Burk, donde la representación de las pendientes de las rectas de la gráfica anterior frente a la concentración de inhibidor  $[I]$ , genera una recta cuya abscisa en origen corresponde al valor de  $K_i$  (**Figura 61**).



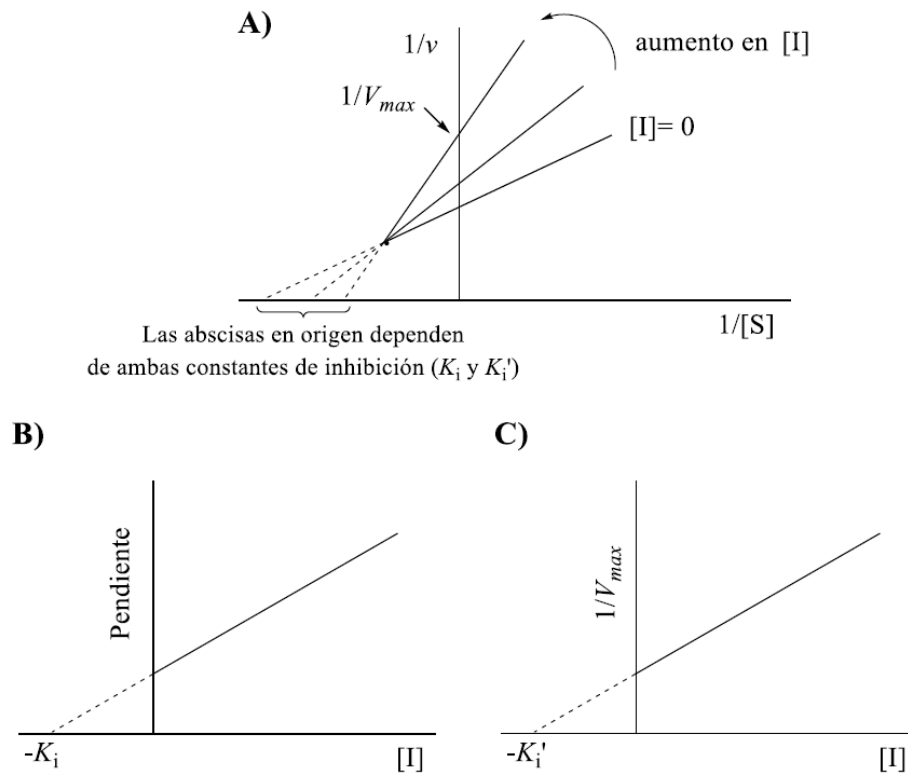
**Figura 61.** Determinación del valor de  $K_i$  a partir de una representación secundaria a partir de la de Lineweaver-Burk.

En la *Inhibición incompetitiva* (también conocida como incompetitiva), el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato pero no a la enzima libre, por tanto, esta unión tiene lugar en un sitio alostérico al sitio activo de la enzima. Para este tipo de inhibición las diferentes rectas de una representación Lineweaver-Burk son paralelas entre sí y cortan al eje de abscisas en su zona negativa y la constante de inhibición para un inhibidor incompetitivo se denota en este caso como  $K_i'$ . A partir de una representación secundaria de las ordenadas en origen de las rectas anteriores frente a la concentración de inhibidor  $[I]$ , se podría obtener  $K_i'$  (**Figura 62**).



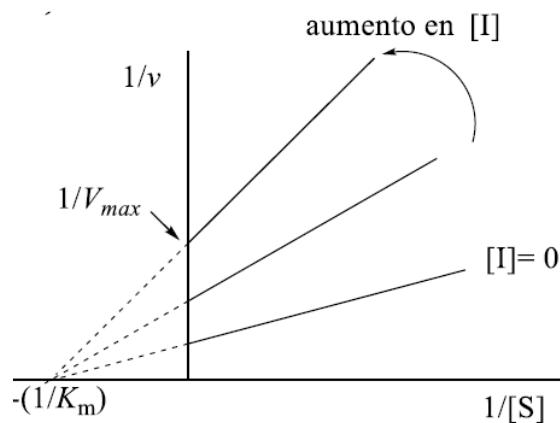
**Figura 62.** Representación de Lineweaver-Burk y secundaria para una inhibición incompetitiva.

El último tipo de inhibición reversible es la inhibición mixta. En este tipo de inhibición el inhibidor se puede unir al complejo enzima-sustrato así como a la enzima libre, aunque la afinidad por estas especies es diferente. Se trata de una combinación de inhibición competitiva e inhibición incompetitiva (**Figura 63C**). El corte de las rectas en la representación de Lineweaver-Burk tiene lugar en el segundo cuadrante a la izquierda del eje de ordenadas. Por analogía a lo comentado anteriormente,  $K_i$  y  $K_i'$  se obtienen de las gráficas secundarias B y C (**Figura 63**).



**Figura 63.** Representación de Lineweaver-Burk y secundarias para una inhibición mixta.

Existe un tipo particular de inhibición mixta, que se conoce como inhibición no competitiva. En este caso particular, la afinidad del inhibidor por la enzima libre es exactamente igual que por el complejo enzima-sustrato, es decir,  $K_i = K_i'$ . En este caso, las rectas de la representación de Lineweaver-Burk se cortan en un punto de la zona negativa del eje de abscisas. El valor de  $K_i$  ( $= K_i'$ ) se puede obtener de una representación secundaria similar a las comentadas anteriormente (**Figura 64**).

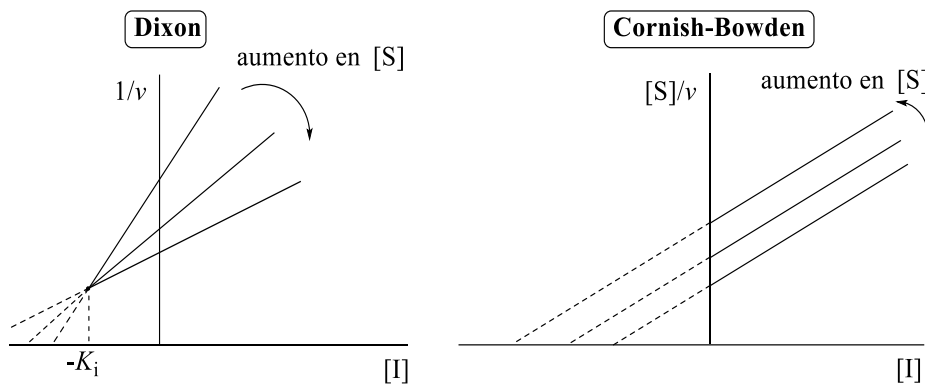


**Figura 64.** Representación de Lineweaver-Burk para una inhibición no competitiva.

Otro método utilizado en esta Tesis para la determinación del tipo de inhibición y el  $K_i$  es el conocido como método de Dixon. Este método permite calcular la constante de inhibición mediante la representación de  $1/v$  frente a la concentración de inhibidor  $[I]$  a distintos valores de concentración de sustrato  $[S]$ . Para diferentes valores de  $[S]$  se obtiene una serie de líneas rectas que puede ser paralelas entre sí o cruzarse en un punto en función del tipo de inhibición del compuesto en estudio. En el caso de inhibidores competitivos y mixtos, las gráficas obtenidas con el método de Dixon son similares, por lo que resulta necesario realizar una representación adicional, que se conoce como la representación de Cornish-Bowden. En esta última se representa el cociente  $[S]/v$  frente a la concentración de inhibidor  $[I]$  para distintos valores de  $[S]$  y permite distinguir sin dudas entre los inhibidores competitivos y mixtos. Según los métodos de Dixon y Cornish-Bowden, las gráficas obtenidas para cada tipo de inhibición se describen como:<sup>221</sup>

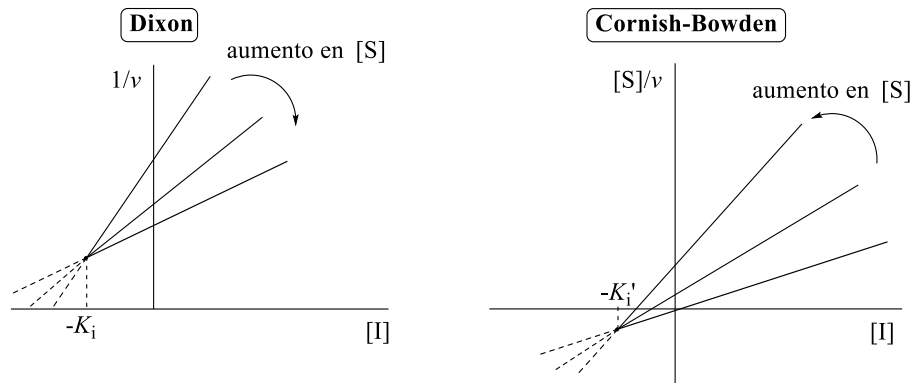
<sup>221</sup> Cornish-Bowden, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143-144.

1. *Inhibición competitiva*: las líneas rectas de la representación de Dixon se cortan en el segundo cuadrante (abscisa negativa). En la representación de Cornish-Bowden las rectas resultantes son paralelas entre sí (**Figura 65**). La proyección en el eje de abscisas del punto de corte de las rectas obtenidas en la representación de Dixon, indica el valor de la constante de inhibición ( $K_i$ ).



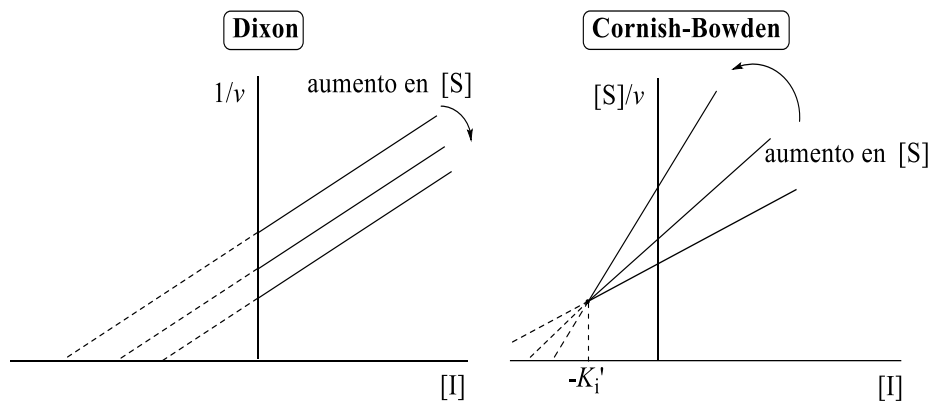
**Figura 65.** Representación de Dixon y Cornish-Bowden en una inhibición de tipo competitiva.

2. *Inhibición mixta*: en este caso, la representación de Dixon obtenida es similar a la de una inhibición de tipo competitiva, mientras que en la representación de Cornish-Bowden las rectas se cortan en el tercer cuadrante (abscisas y ordenadas negativas) (**Figura 66**). La constante de inhibición correspondiente a la parte competitiva ( $K_i$ ) se obtiene de la representación de Dixon. El gráfico de Cornish-Bowden proporciona la  $K'_i$  de la componente incompetitiva.



**Figura 66.** Representación de Dixon y Cornish-Bowden en una inhibición de tipo mixta.

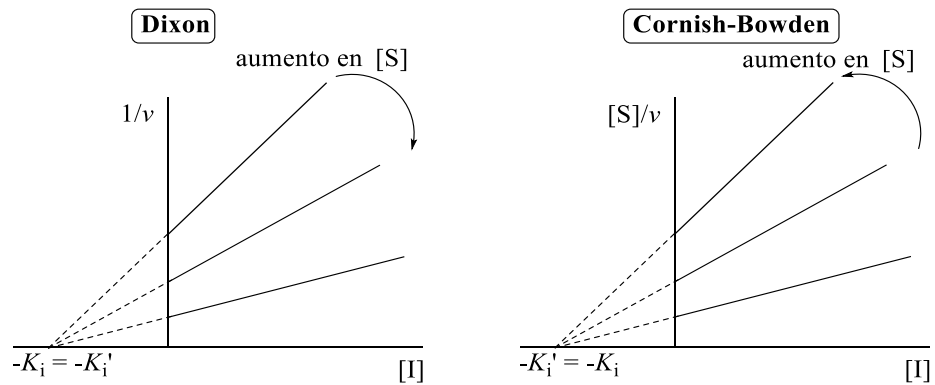
3. *Inhibición incompetitiva o acompetitiva*: para la inhibición incompetitiva las diferentes rectas de una representación de Dixon son paralelas entre sí, mientras que en la representación de Cornish-Bowden se cortan en el segundo cuadrante (abscisa negativa) (**Figura 67**). En este caso, el valor de  $K_i'$  se obtiene a partir del punto de corte de las rectas de la representación de Cornish-Bowden.



**Figura 67.** Representación de Dixon y Cornish-Bowden en una inhibición de tipo incompetitiva o acompetitiva.



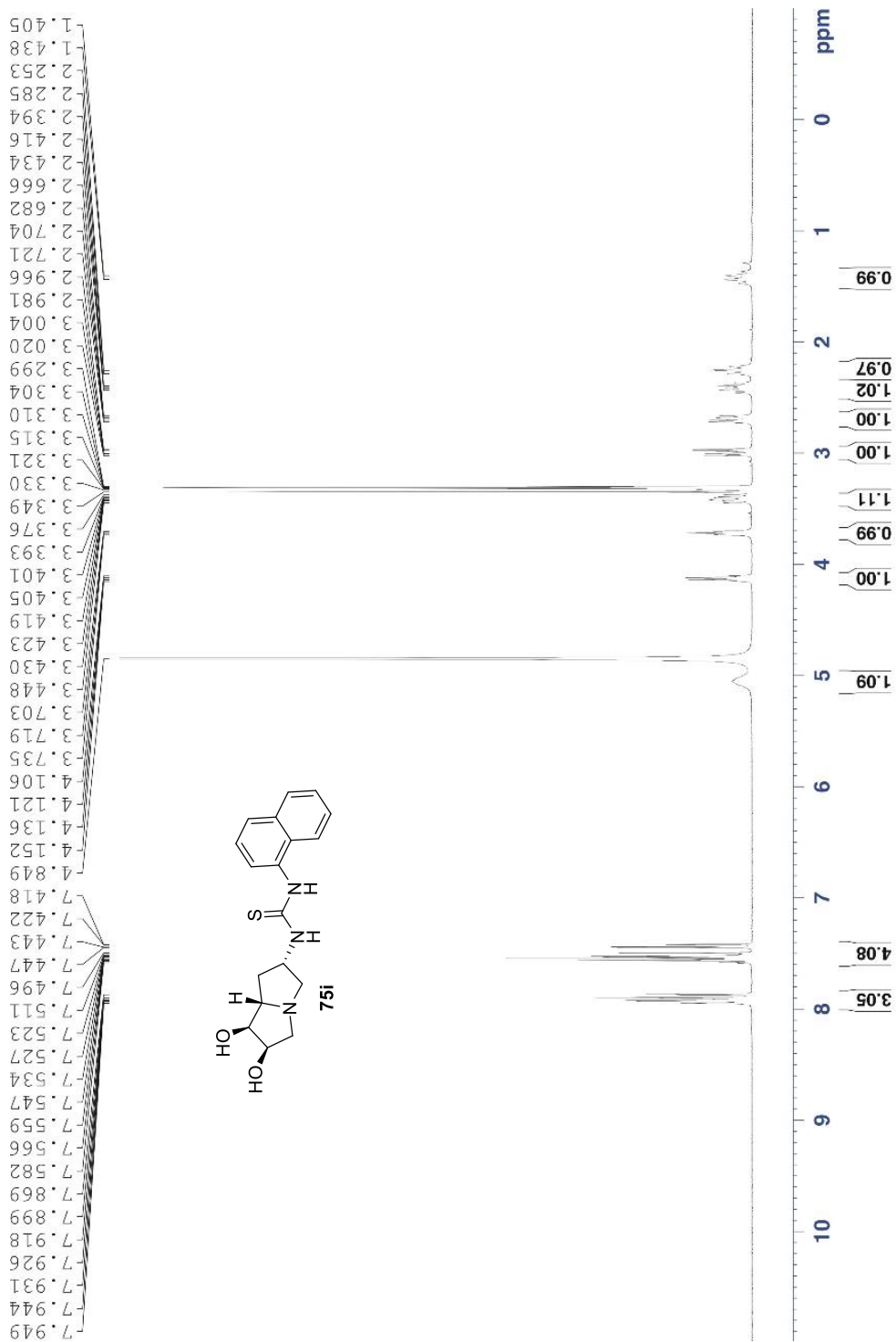
4. Inhibición no competitiva: en este tipo particular de inhibición mixta, las representaciones de Dixon y Cornish-Bowden conducen a gráficas análogas, en las que las rectas obtenidas se cortan en la zona negativa del eje de abscisas (**Figura 68**). En este caso, la constante de inhibición se puede obtener de ambas representaciones.



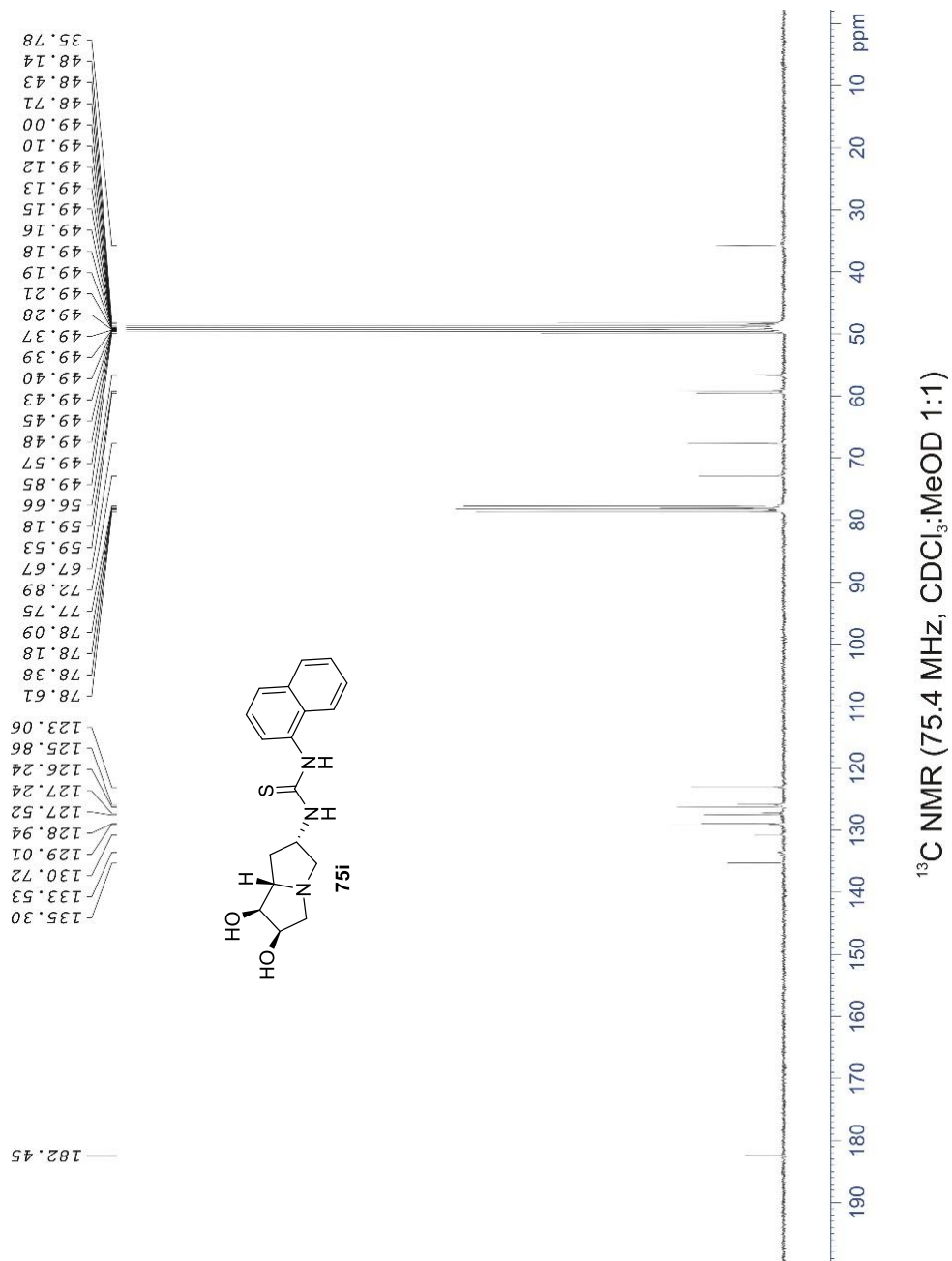
**Figura 68.** Representación de Dixon y Cornish-Bowden en una inhibición de tipo no competitiva.

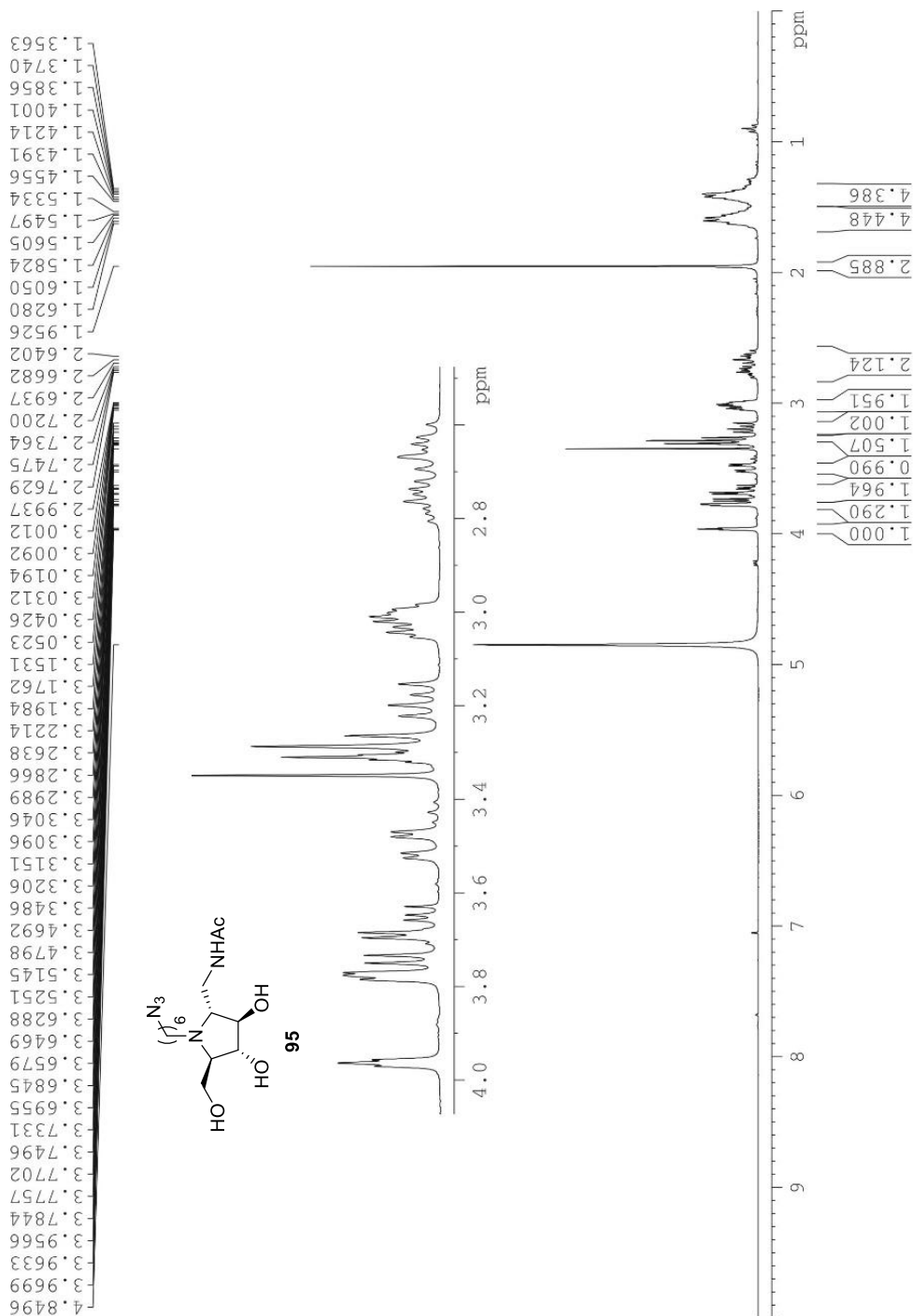
**ANEXO II**

***Espectros representativos***

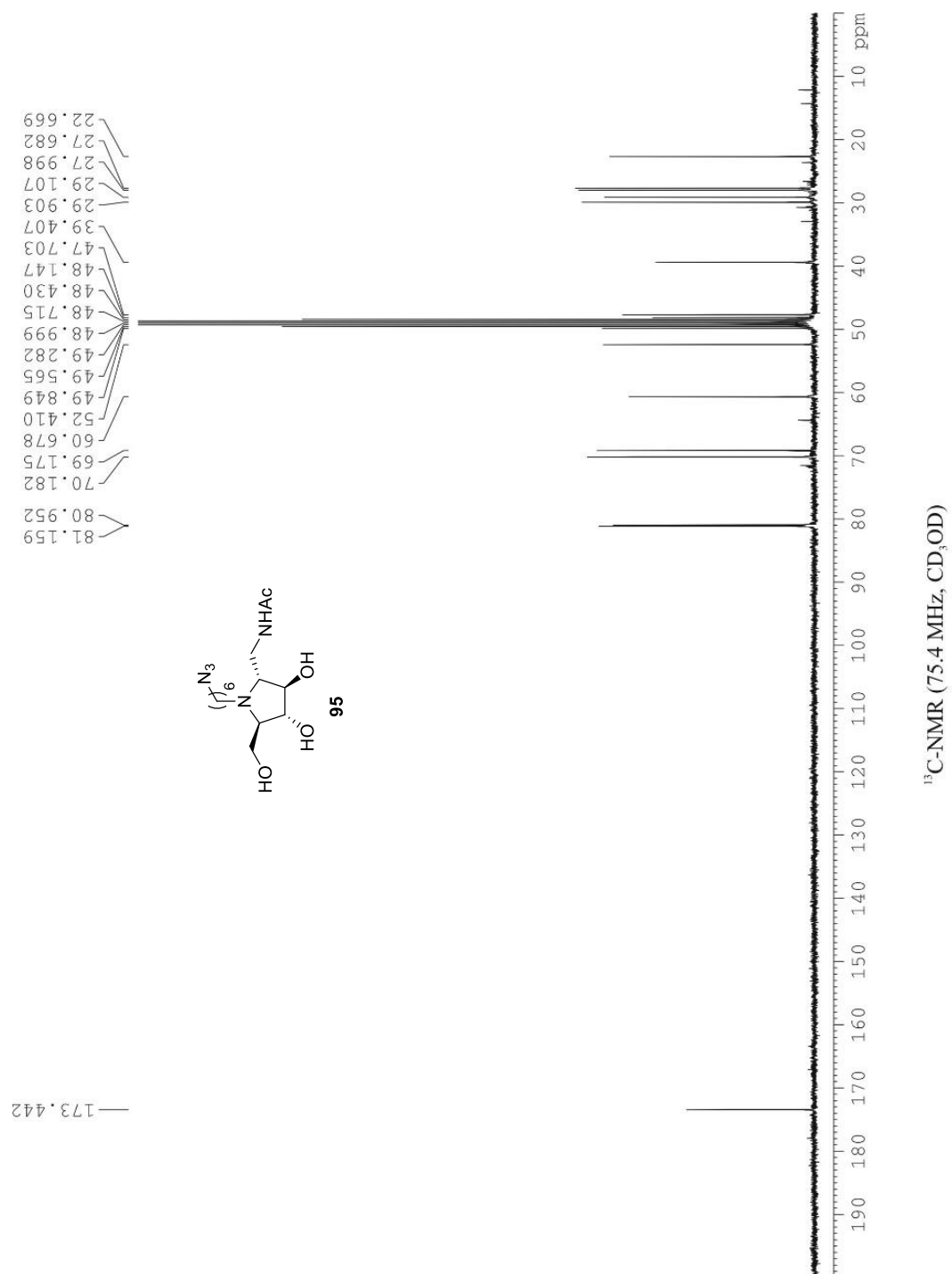


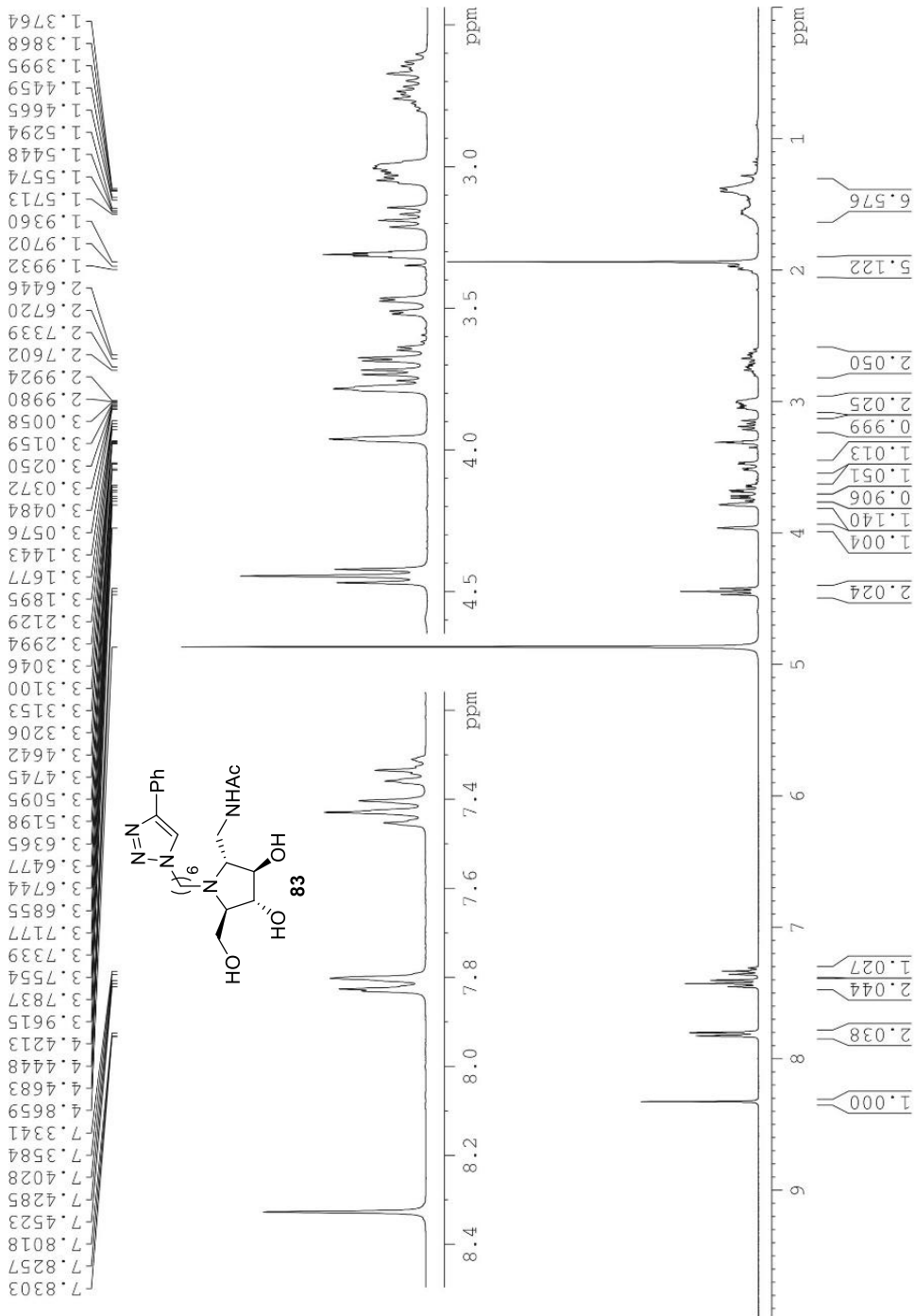
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>:MeOD 1:1)



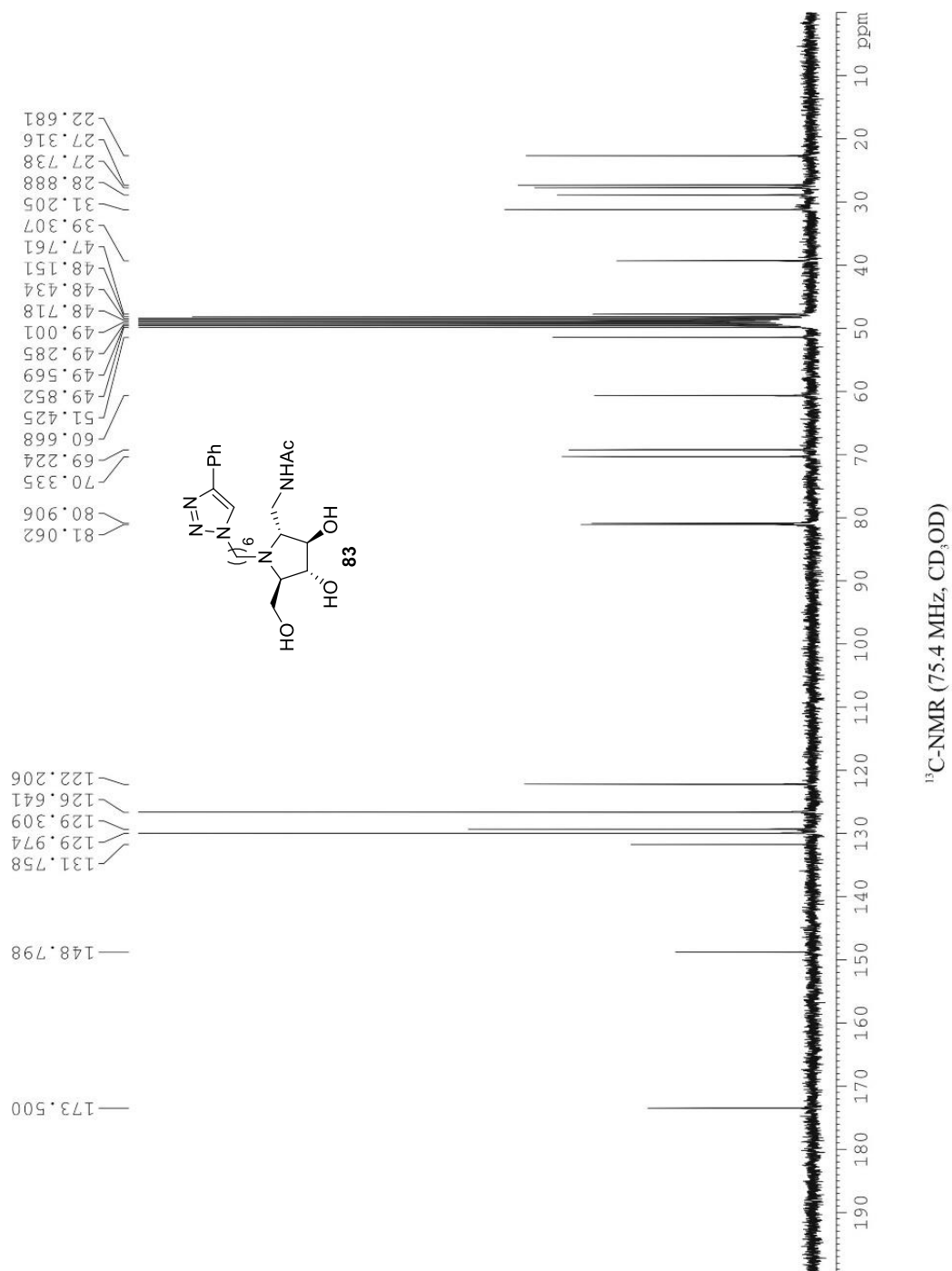


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

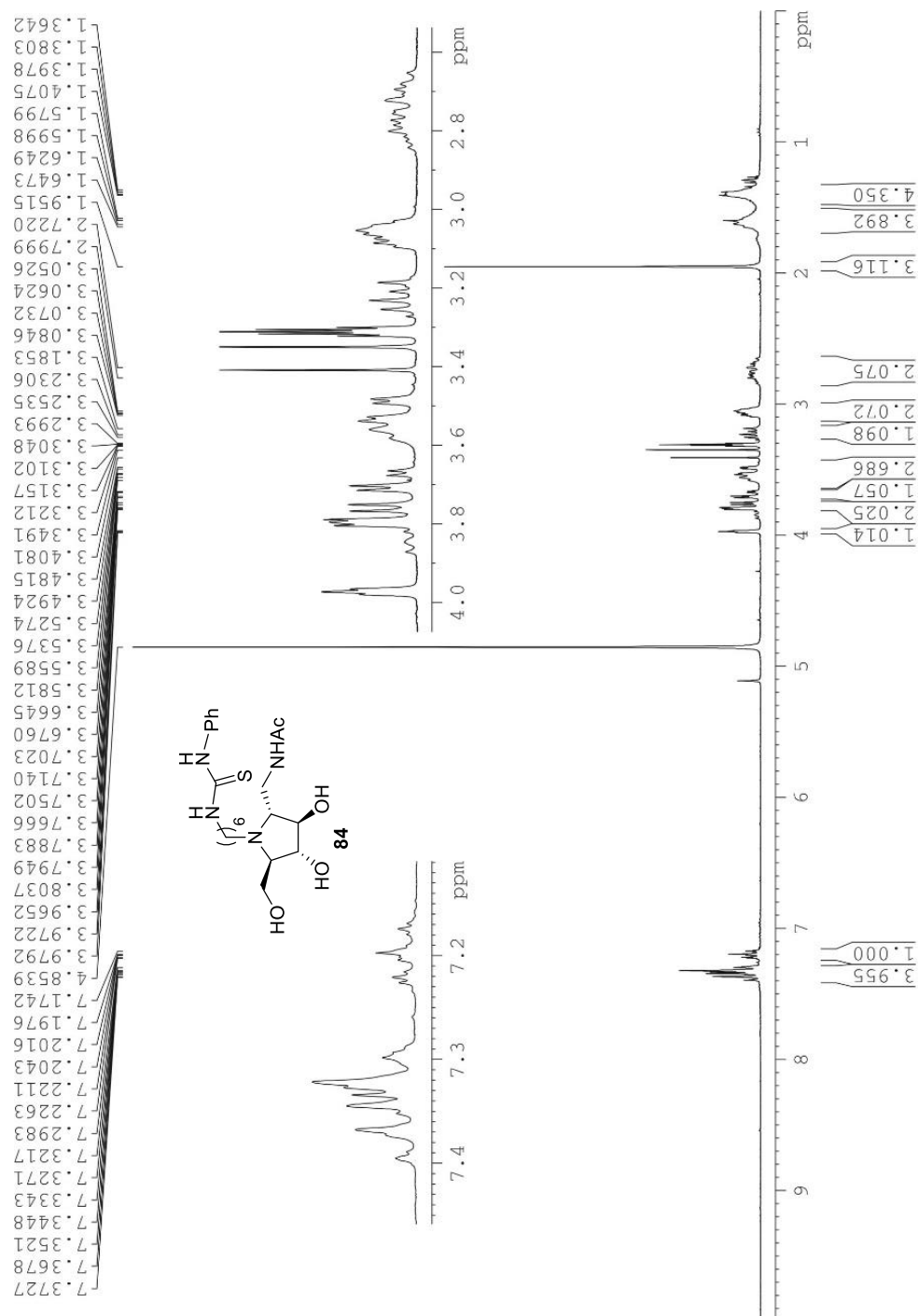




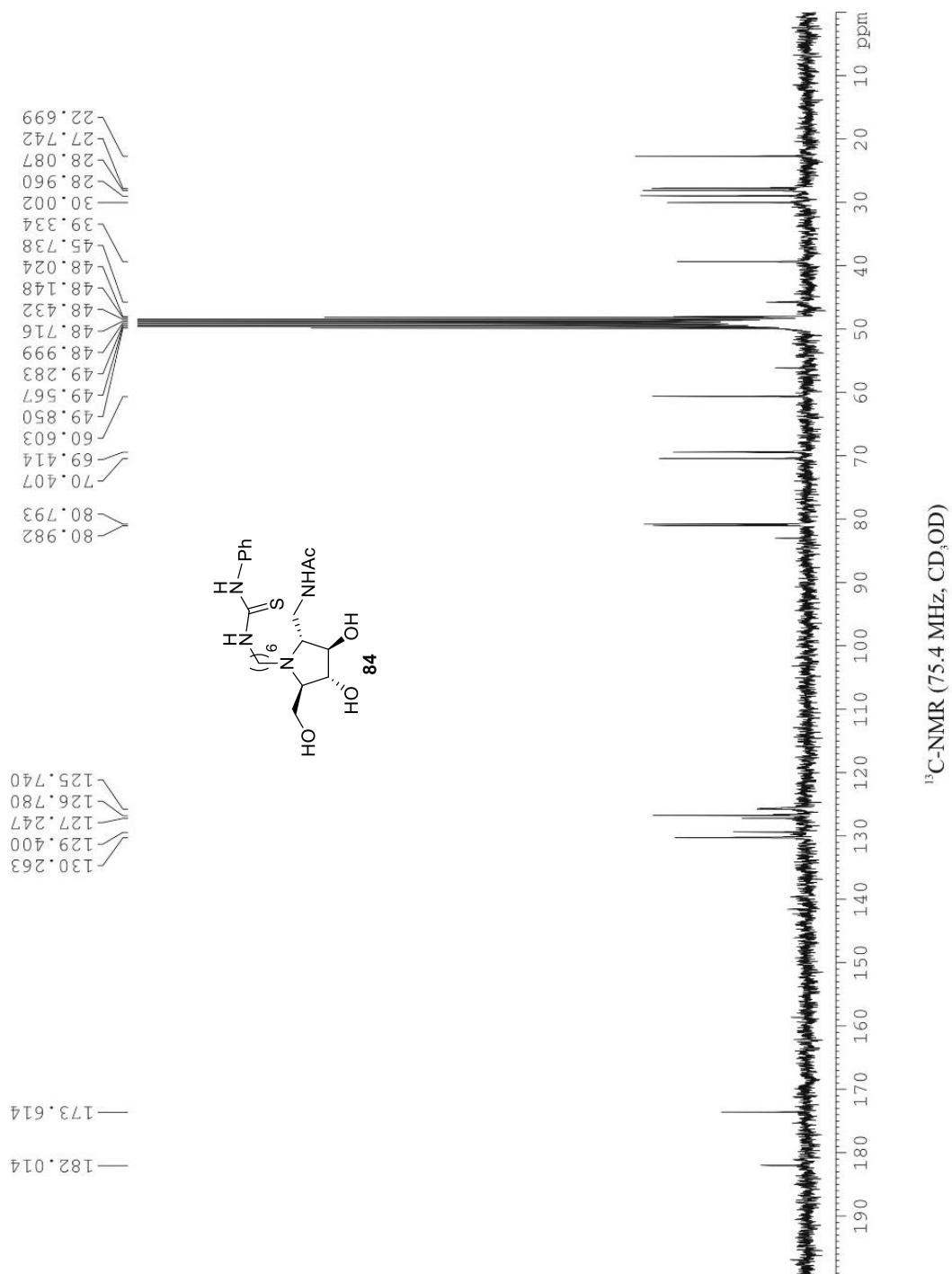
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

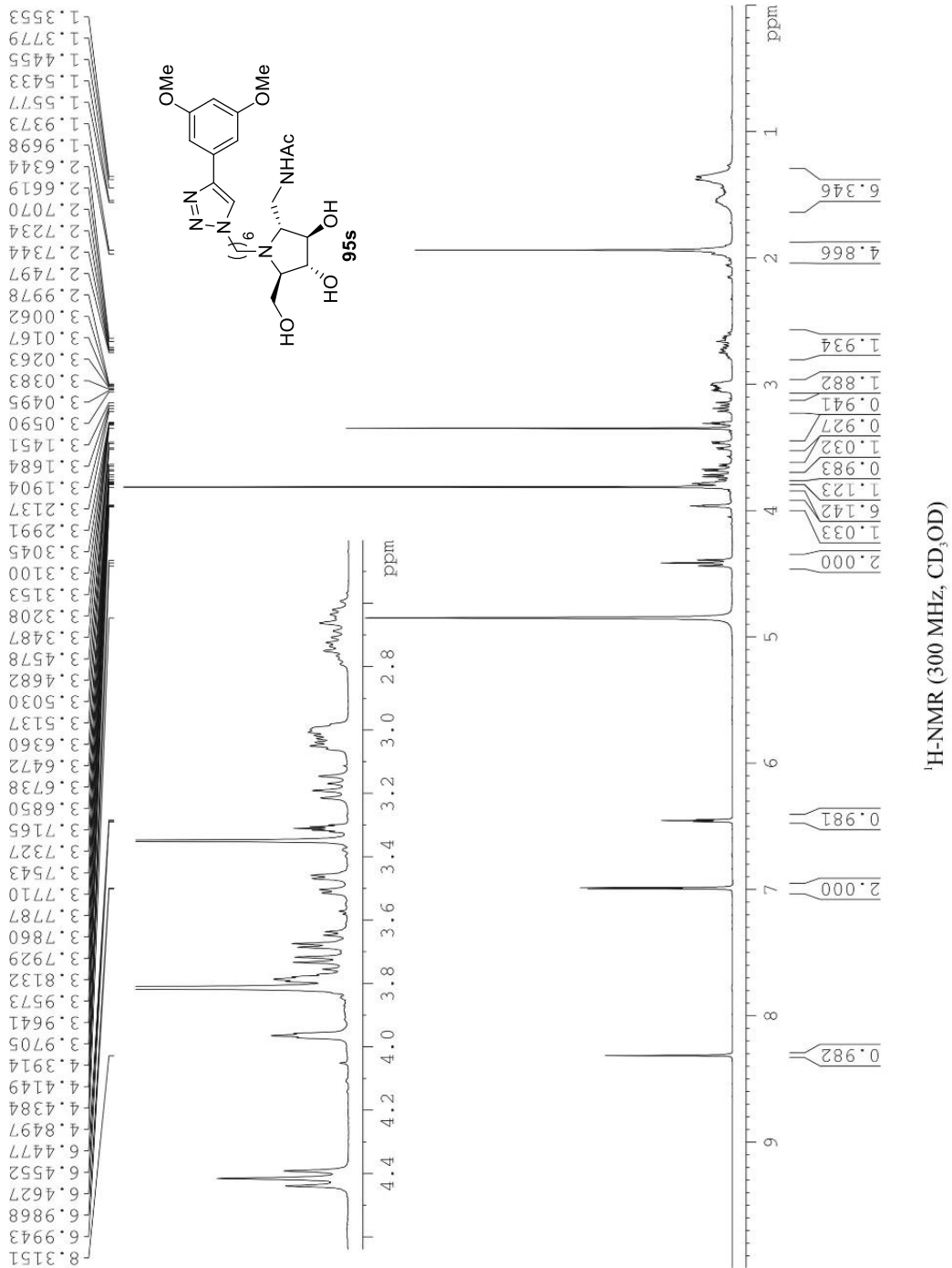


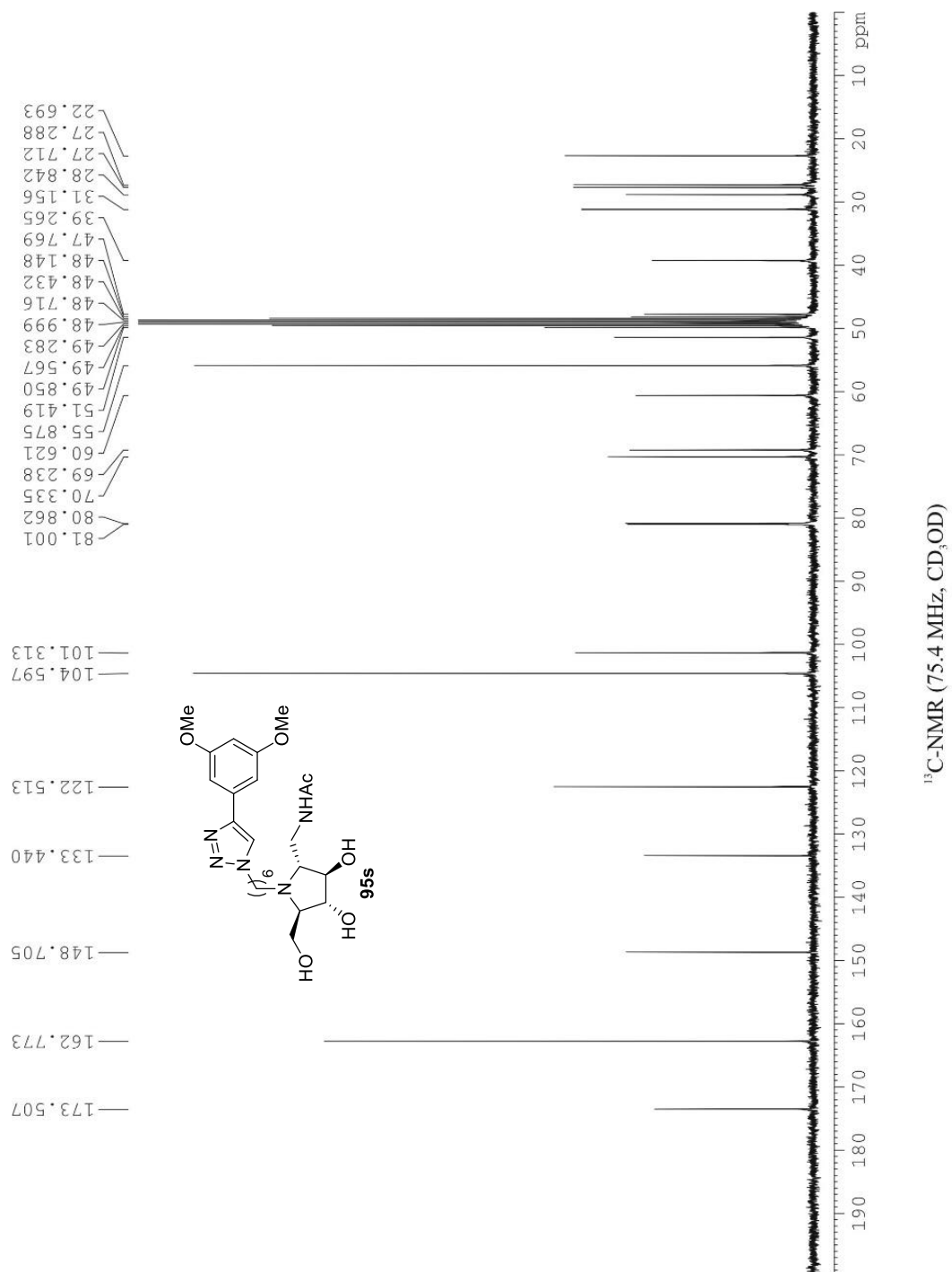


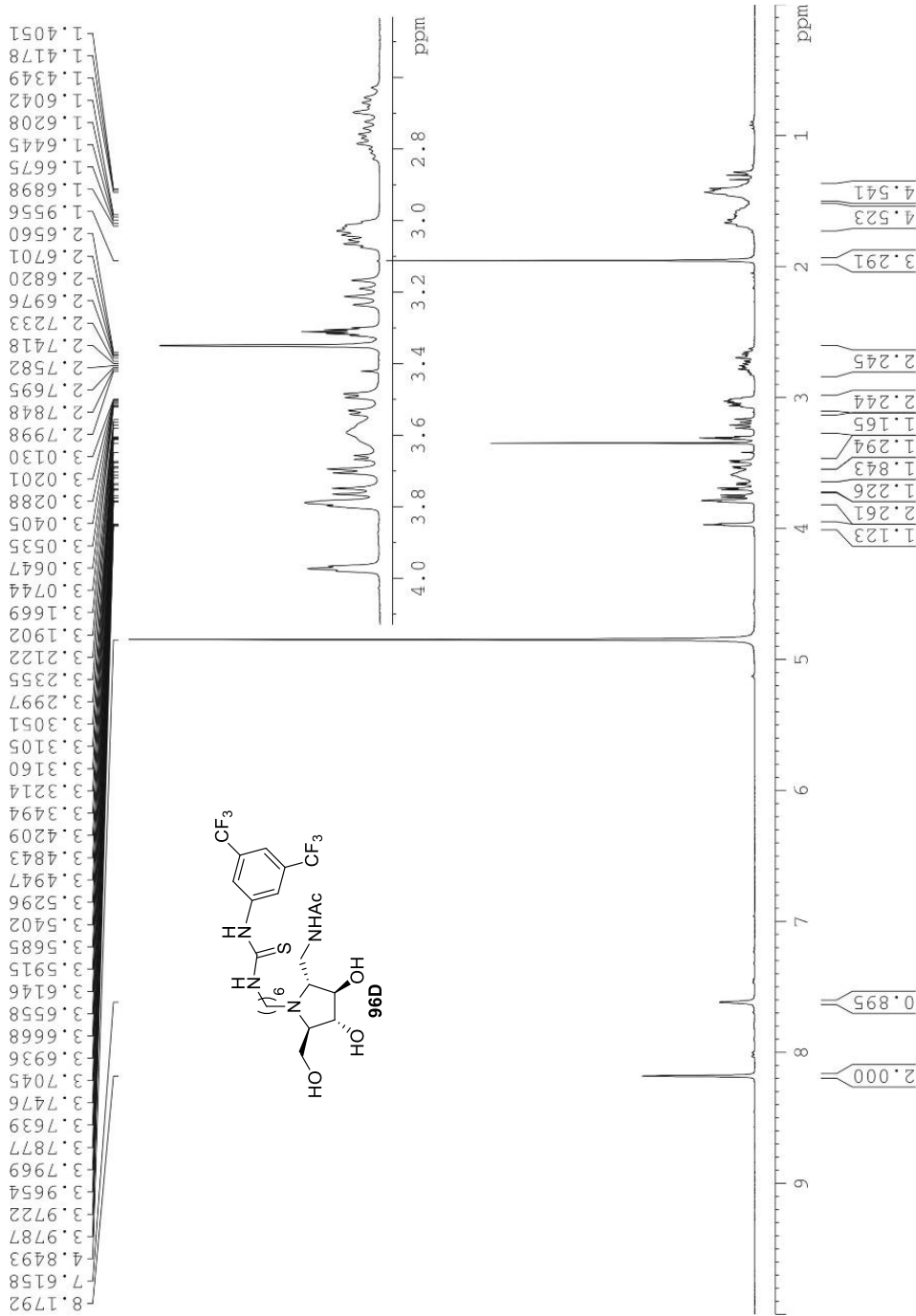


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

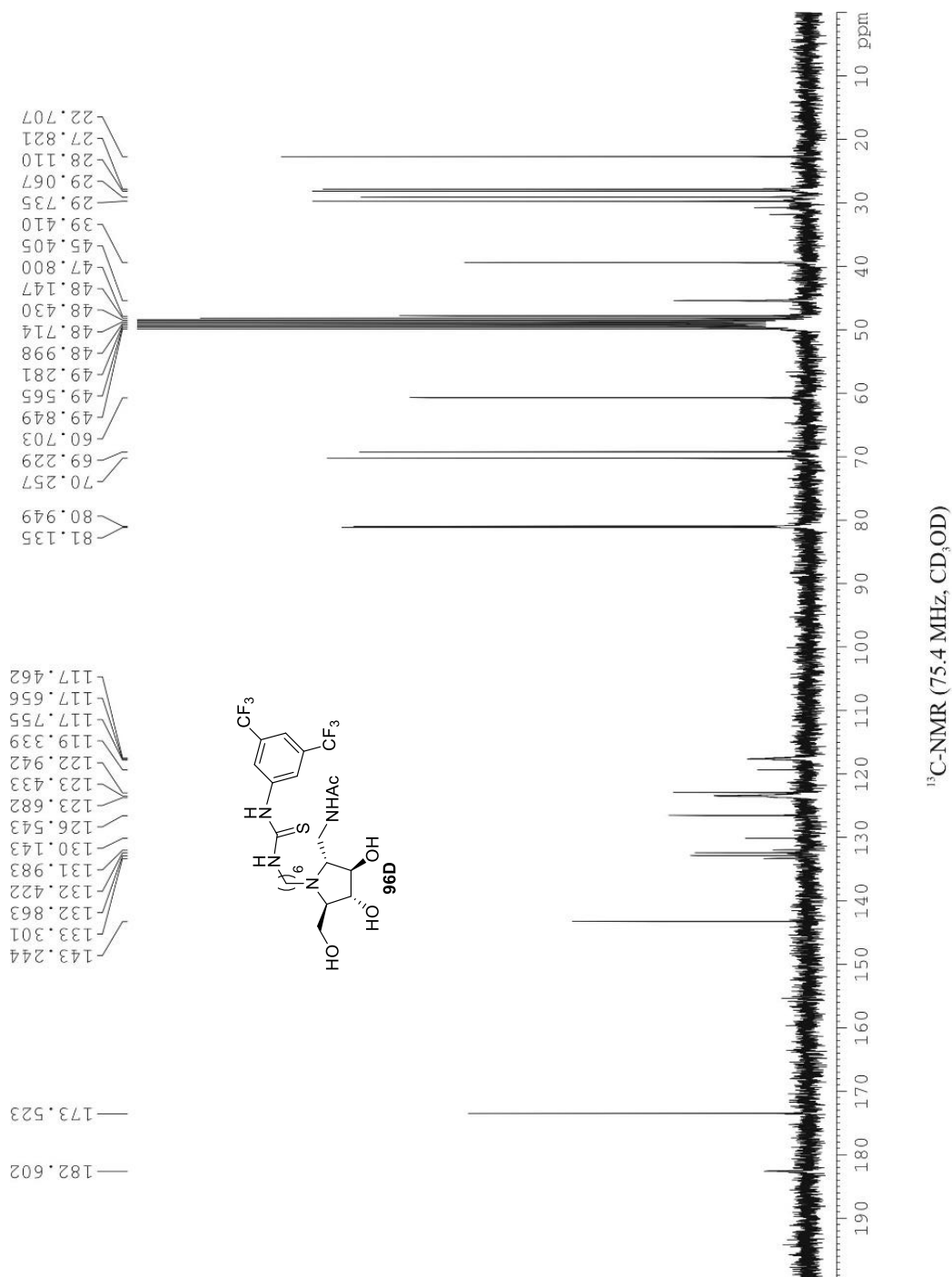


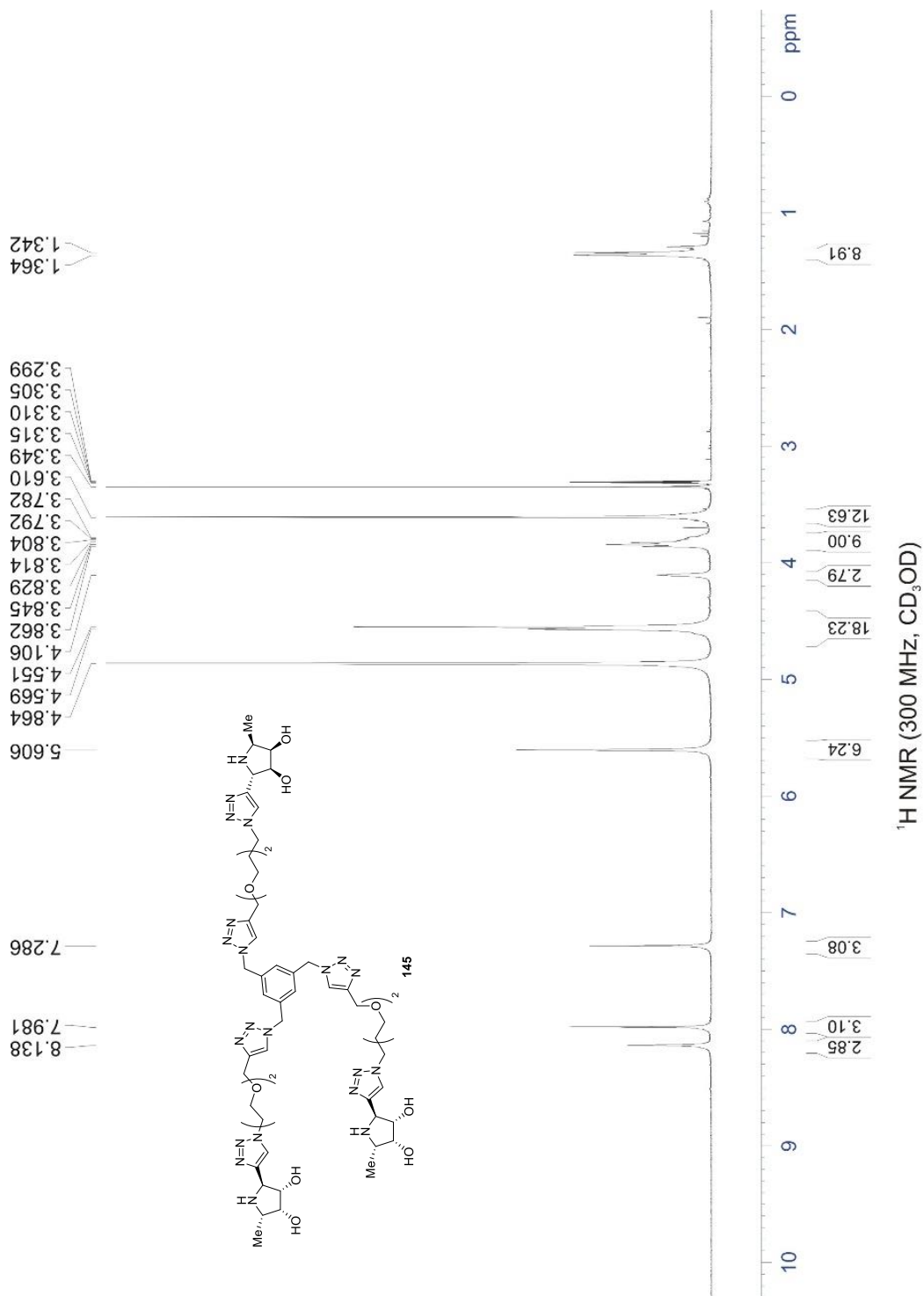


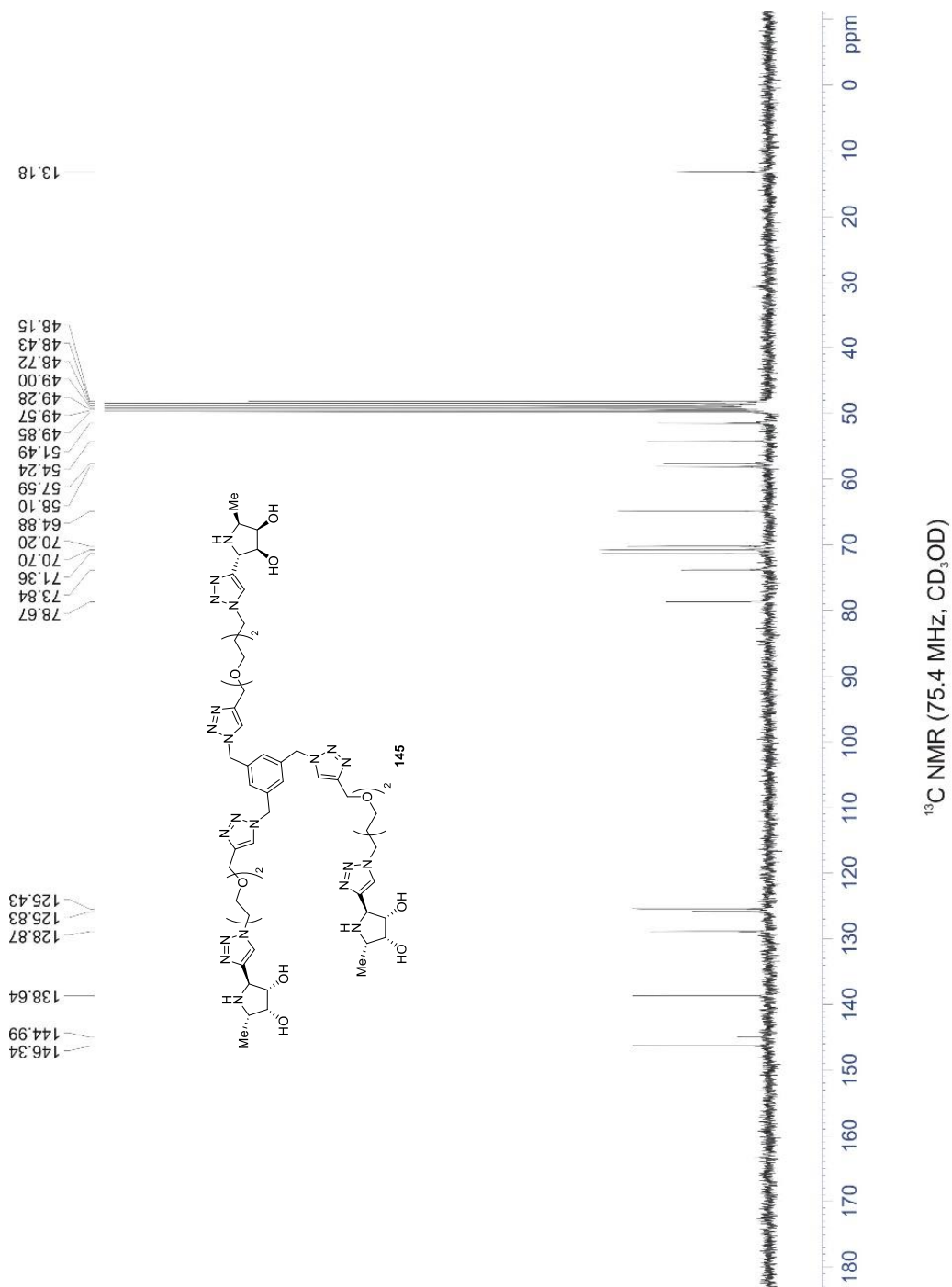




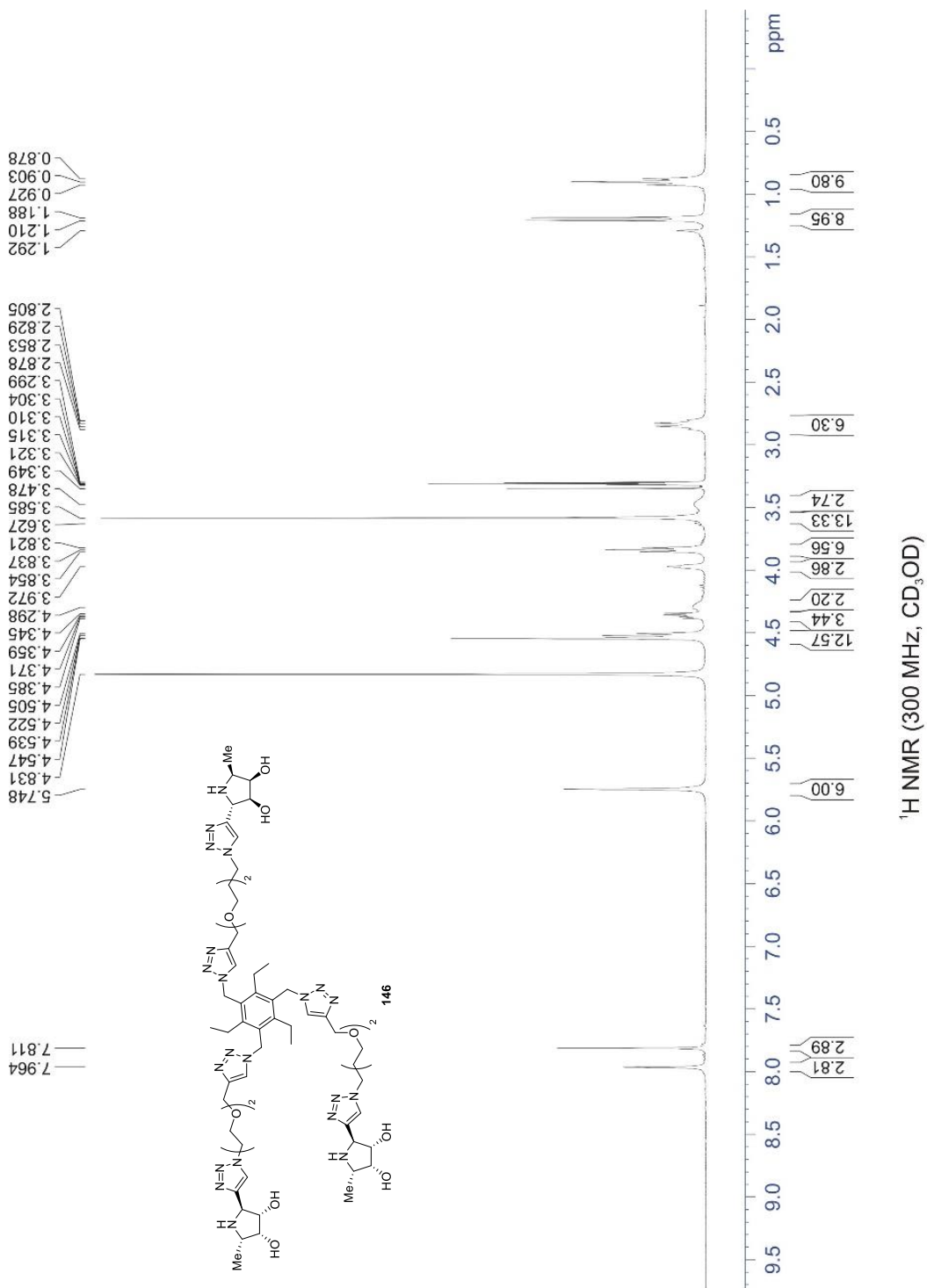
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

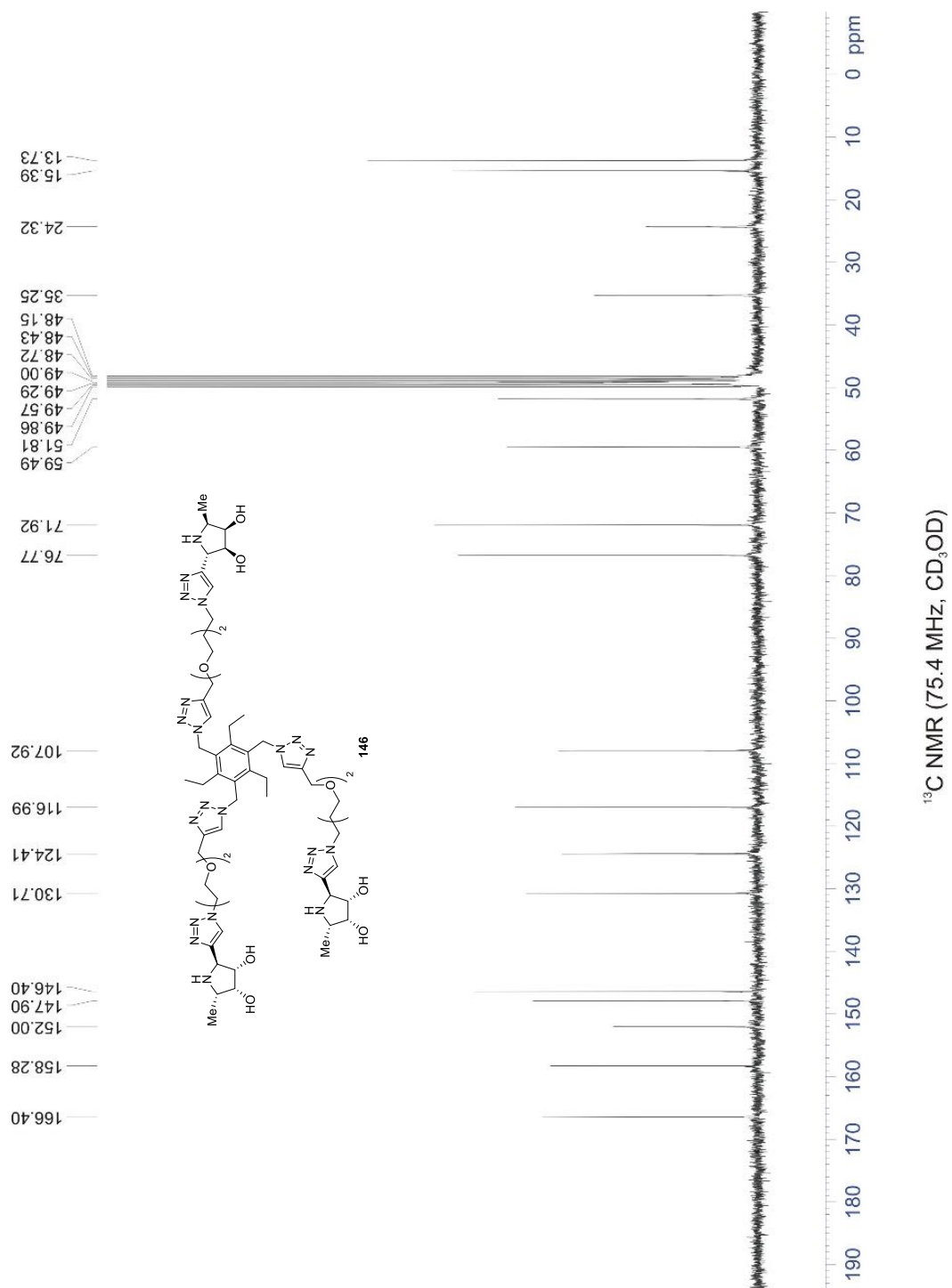


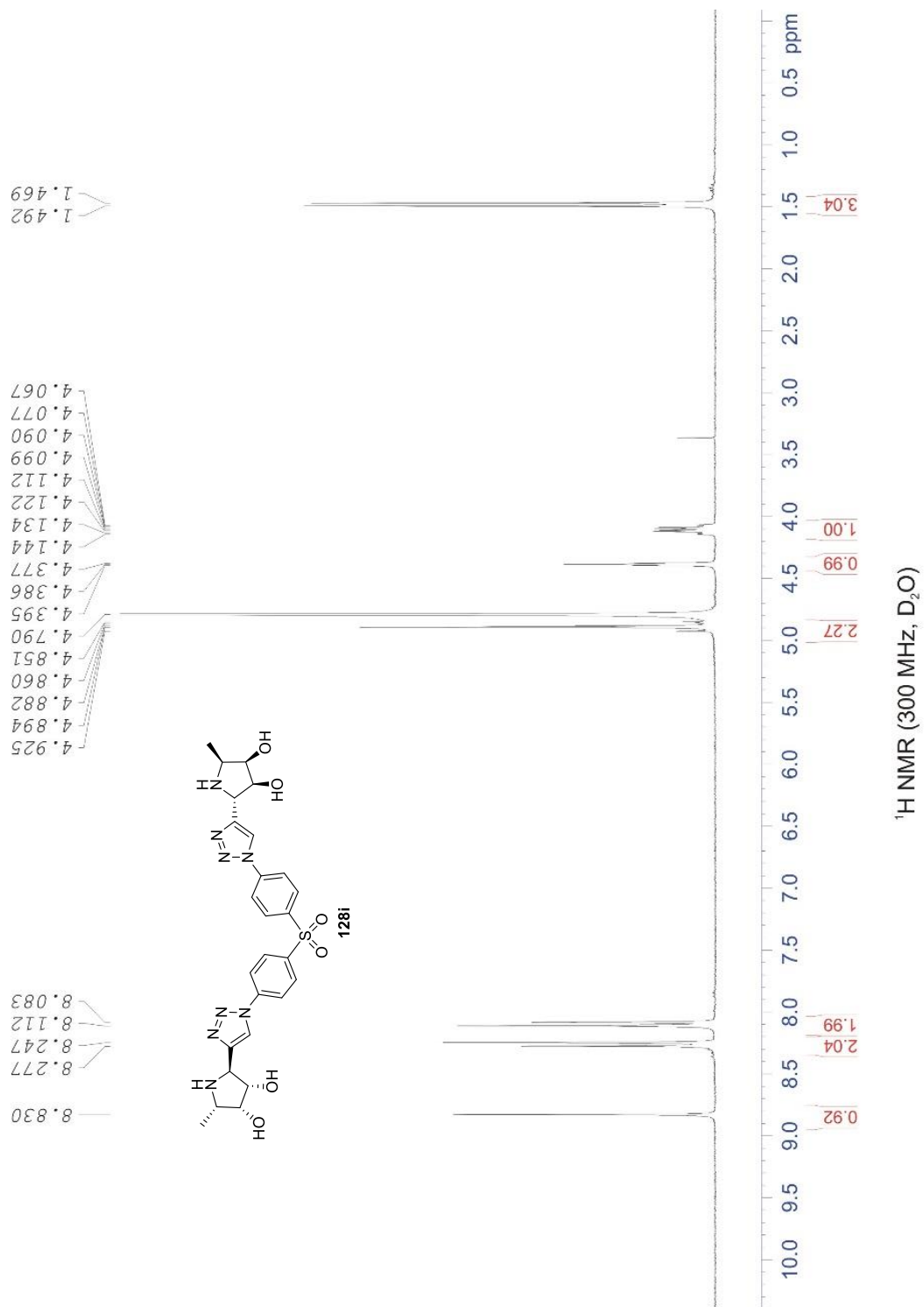


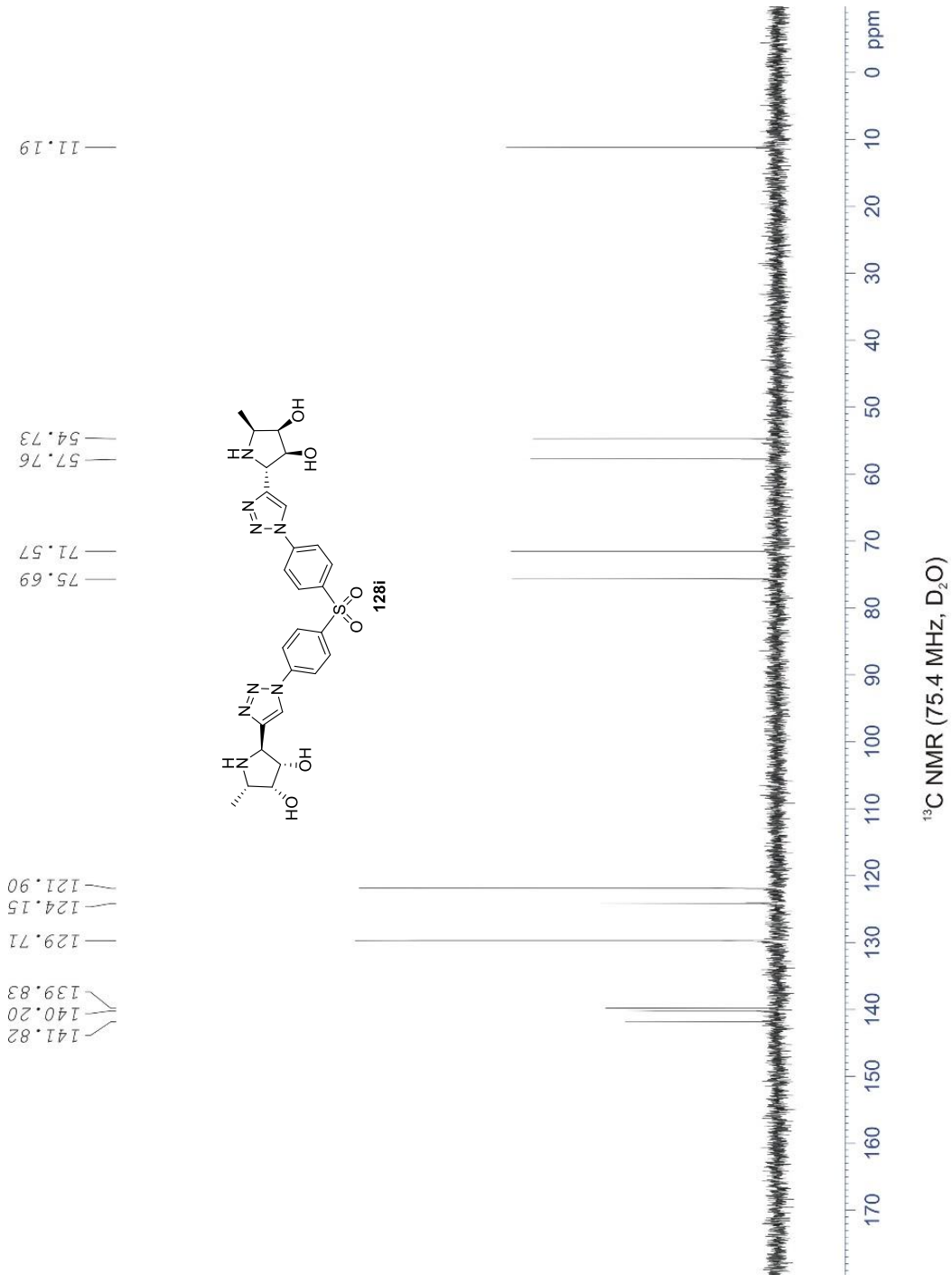


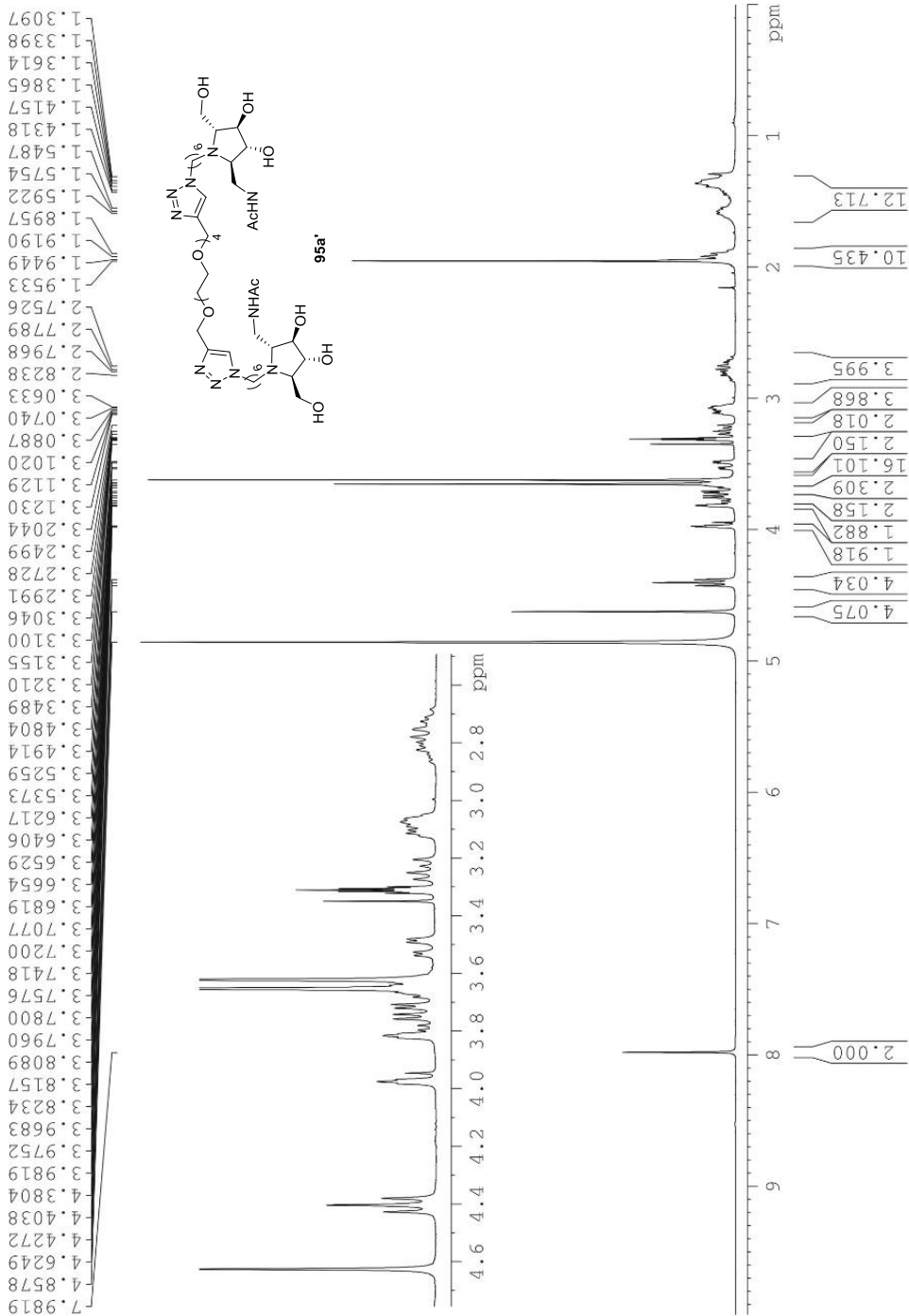












<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

