



Facultad de Química

Departamento de Química Orgánica

Iminoazúcares sp^2 en inmunoterapias contra el cáncer

Trabajo Fin de Máster

Máster en Estudios Avanzados en Química

Pablo Adrián Guillén Poza

Sevilla, Julio de 2016

Iminoazúcares sp^2 en inmunoterapias contra el cáncer

El presente trabajo ha sido realizado por Pablo Adrián Guillén Poza en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, bajo la supervisión de la Dra. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de la Universidad de Sevilla, y la Dra. Elena Matilde Sánchez Fernández, Investigadora Contratada post-doctoral.

Fdo. : Pablo Adrián Guillén Poza

VºBº de la directora:

VºBº de la directora:

Fdo.: Carmen Ortiz Mellet.

Fdo.: Elena Matilde Sánchez Fernández

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES.....	9
4. OBJETIVOS	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
6. CONCLUSIONES	25
7. EXPERIMENTAL SECTION	26
7.1 General Methods	26
7.2 Starting materials.....	26
7.3 New compounds.....	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	35
9. ANEXO	

ABREVIATURAS

^{13}C RMN	Resonancia magnética nuclear de ^{13}C
^{19}F RMN	Resonancia magnética nuclear de ^{19}F
^1H RMN	Resonancia magnética nuclear de ^1H
2-D COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOH	Ácido acético
aq	Acuoso
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BF₃.Et₂O	Trifluoruro de boro eterato
BzCl	Cloruro de benzoílo
CAN	Nitrato de cerio y amonio
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CH₃CN	Acetonitrilo
Cp₂TiCl₂	Cloruro de Titanoceno
Cp₂Ti^{III}Cl	Monocloruro de Titanoceno
CS	Castanospermina
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DNJ	Desoxinojirimicina
ESI	Ionización por electrospray
Et₂O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
Gal	Galactosa
GalNAc	2-Acetamido-2-desoxigalactosa
Glc	Glucosa
GlcNAc	2-Acetamido-2-desoxiglucosa
HBr/AcOH	Ácido bromhídrico en ácido acético
HF-Py	Ácido fluorhídrico en piridina
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear

Trabajo Fin de Máster

IR	Espectroscopía infrarroja
J	Constante de acoplamiento
m/z	Relación masa carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahercio
Mn	Manganeso
NaN₃	Azida sódica
NaNO₂	Nitrito de sodio
NaOH	Hidróxido sódico
NaOMe	Metóxido sódico
NJ	Nojirimicina
Pd/C	Paladio en carbono
pM	Picomolar
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
p-TsOH	Ácido <i>p</i> -toluénsulfónico
py	Piridina
rdto	Rendimiento
SBA	Soybean agglutinin
Ser	Serina
ta	Temperatura ambiente
TACAs	Antígenos de tipo carbohidrato asociados a tumores
TACAs	Tumor-Associated Carbohydrate Antigens
^tBu	<i>terc</i> -Butilo
Tf₂O	Anhídrido trifluorometansulfónico
TFA-H₂O	Ácido trifluoroacético-Agua
TFH	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina
TrCl	Cloruro de tritilo
UV	Ultravioleta
VVA	<i>Vicia villosa</i> -B-4 agglutinin
δ	Desplazamiento químico
ν	Número de onda

1. RESUMEN

En la actualidad, los tratamientos más utilizados para combatir el cáncer se basan en el uso de quimioterapia, radioterapia y cirugía. El principal inconveniente que presentan estas terapias es la escasa selectividad que presentan, lo que implica que afectan también a células sanas, producen severos efectos secundarios y además, no evitan la posibilidad de metástasis. Por estos motivos, en este trabajo se plantea el uso de inmunoterapia como tratamiento antitumoral específico.

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento que persigue estimular las defensas naturales con el fin de tratar el cáncer, entre otras enfermedades. En el caso del cáncer, es necesario generar una respuesta inmunológica potente y selectiva frente a células tumorales. Con el fin de alcanzar este objetivo, una de las estrategias más exitosas se basa en el desarrollo de vacunas que emplean antígenos de tipo carbohidrato asociados a tumores. Estos antígenos, denominados TACAs (Tumor-Associated Carbohydrate Antigens), se encuentran expuestos en mucinas de la superficie de un gran número de células. En las células sanas, los TACAs están enmascarados por el alto nivel de glicosilación que presentan las mucinas, mientras que en células tumorales la glicosilación, debido al mal funcionamiento de glicosidasas y glicosiltransferasas, está reducida significativamente, dejando expuestos estos antígenos, que pueden usarse como biomarcadores tumorales (Figura 1).

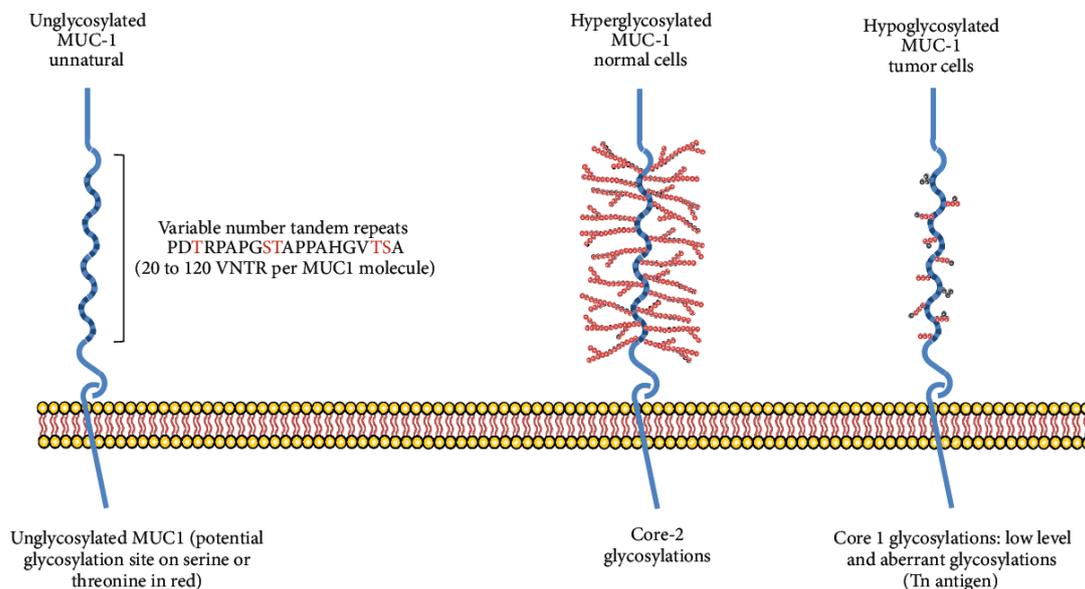


Figura 1. De izquierda a derecha, estructura de la MUC-1 no glicosilada, estructura de la MUC-1 en células normales y estructura de la MUC-1 en células tumorales. ¹

Aunque estos TACAS son candidatos para el desarrollo de vacunas antitumorales, en el organismo son detectados como auto-antígenos por el sistema inmune, impidiendo la activación de la respuesta inmune dependiente de células T y la consecuente producción de anticuerpos de alta afinidad.

Por este motivo, en este trabajo se plantea la sustitución de la unidad monosacárida del antígeno Tn por un glicomimético con estructura de iminoazúcar sp^2 , con el objetivo de producir una respuesta inmune suficiente para activar la producción de anticuerpos de alta afinidad frente a células tumorales. Concretamente se aborda la síntesis de un glicomimético del antígeno tumoral Tn (α -O-GalNAc-Ser/Thr) (Figura 2A) con estructura de iminoazúcar sp^2 bicíclico (Figura 2B).

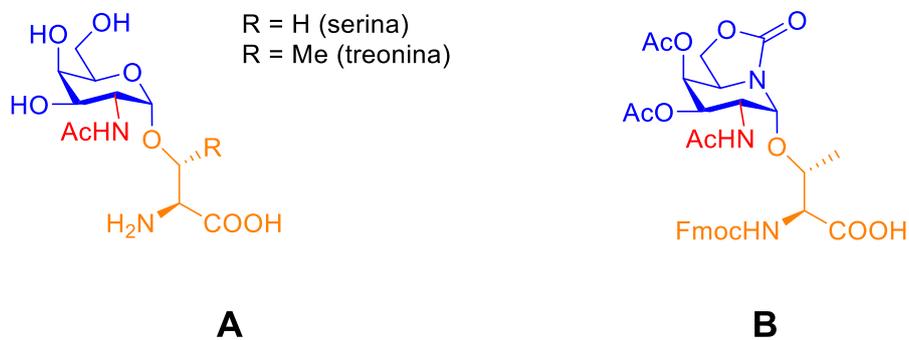


Figura 2. A) Estructura del antígeno Tn; B) Estructura del glicomimético con estructura de iminoazúcar sp^2 bicíclico.

2. INTRODUCCIÓN

Se conoce como cáncer a un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por la división celular descontrolada y su posterior diseminación a tejidos cercanos. Estas células pueden dividirse sin interrupción y formar masas denominadas tumores. Cuando estos tumores crecen, además de invadir tejidos cercanos, pueden formar nuevos tumores alejados del original. Este fenómeno es conocido como metástasis y se produce debido al desprendimiento que sufren algunas células del tumor y a su posterior diseminación a través del sistema circulatorio o del sistema linfático.^{2,3}

Los tratamientos terapéuticos clásicos contra el cáncer consisten en el uso de cirugía, quimioterapia o radioterapia. El principal problema de estas técnicas es la falta de selectividad que presentan, lo que hace que produzcan severos efectos secundarios y no sean capaces de neutralizar las células tumorales que han sufrido metástasis.^{4,5}

Con el fin de superar estos problemas, una de las estrategias planteadas consiste en aumentar la propia capacidad inmunogénica del sistema inmune con el objetivo de eliminar selectivamente células tumorales.⁶ Para ello, los anticuerpos necesarios se pueden obtener vía inmunización pasiva, introduciendo los anticuerpos directamente, o vía inmunización activa, generando una cascada inmunológica a partir de antígenos específicos que desencadenen la producción de anticuerpos (Figura 3).⁷

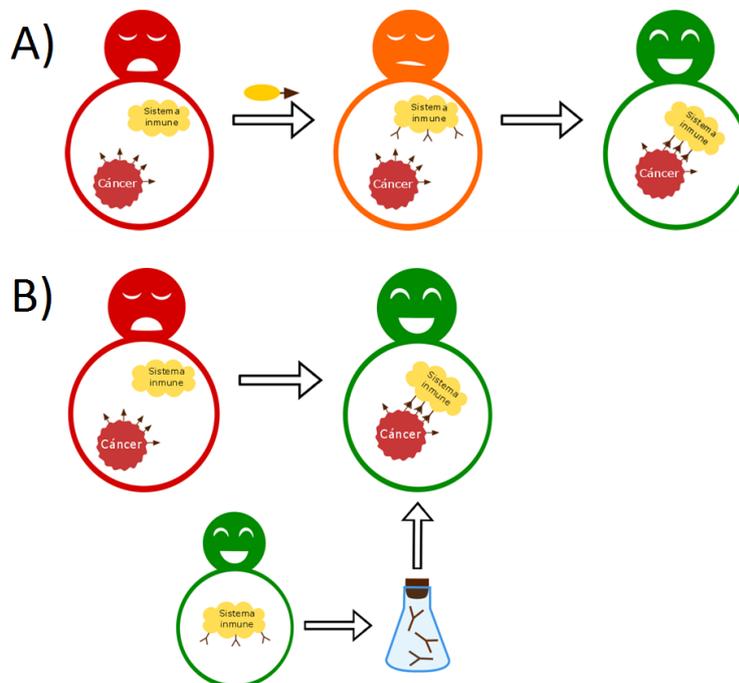


Figura 3. Tipos de inmunización: A) Inmunización activa con cascada inmune; B) Inmunización pasiva con introducción de anticuerpos.

Las vacunas clásicas son empleadas de manera profiláctica para aportar protección frente a enfermedades infecciosas. En cambio, la mayoría de vacunas experimentales contra el cáncer funcionan de forma terapéutica, produciendo una respuesta inmune capaz de erradicar una enfermedad ya existente.^{8,9} Por este motivo, estas vacunas también pueden ser utilizadas por pacientes que han sido tratados con cirugía, quimioterapia o radioterapia para evitar que el tumor tratado vuelva a proliferar.¹⁰

Entre las moléculas que participan tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, las glicoproteínas representan el grupo mayoritario. Entre las más representativas se pueden destacar: las inmunoglobulinas, las citoquinas y receptores de citoquinas, los receptores de células T o las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, entre otras.¹¹ Las glicoproteínas se definen como aquellas cadenas peptídicas unidas mediante enlace covalente de tipo glicosídico a uno o varios oligosacáridos. En el ser humano, las glicoproteínas se clasifican en dos tipos dependiendo de su estructura (Figura 4):¹²

- *N*-Glicoproteínas: presentan un enlace *N*-glicosídico entre el oligosacárido y la cadena lateral de un residuo de asparagina, *N*-GlcNAc.
- *O*-Glicoproteínas: presentan un enlace *O*-glicosídico entre el oligosacárido y el grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina, *O*-GalNAc.

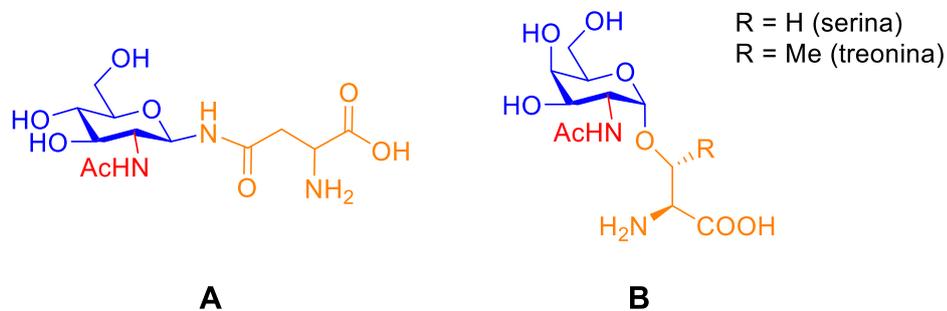


Figura 4. A) Unidad terminal de las *N*-glicoproteínas; B) Unidad terminal de las *O*-glicoproteínas.

La glicosilación de proteínas es considerada como la modificación post-translacional más común, así como la más compleja, jugando un papel imprescindible en multitud de procesos fisiológicos. Entre estos procesos, cabe destacar el correcto plegamiento de proteínas, las interacciones célula-célula y célula-entorno celular, la diferenciación celular y la respuesta inmune.^{13,14}

Como cabe esperar, la unión del carbohidrato a la región peptídica modifica las características originales de ésta, aportando una gran variedad de funciones biológicas, entre las que destacan: la participación en el correcto plegamiento de nuevos polipéptidos sintetizados en el retículo endoplasmático, el control que ejercen sobre la transducción de señal, regulando el desarrollo y la diferenciación celular y el aporte de epítomos de reconocimiento, los cuales influyen de forma clave en la respuesta inmunológica.¹⁵

Las mucinas pertenecen a una familia de glicoproteínas altamente glicosiladas de alto peso molecular implicadas en procesos tumorales epiteliales. Concretamente, la MUC-1 es una *O*-glicoproteína unida a membranas celulares que se encuentra sobreexpresada en tumores, por lo que puede ser usada como herramienta de diagnóstico.¹⁶

La característica más significativa que presenta la MUC-1 es que en tejidos sanos se encuentra envuelta por una densa capa oligosacáridica, mientras que en células tumorales esta cobertura se ve significativamente reducida debido a una glicosilación incompleta, fruto de errores en las glicosidasas y glicosiltransferasas. Como resultado de esta pérdida de complejidad en la naturaleza de los oligosacáridos que envuelven a la MUC-1, quedan expuestas regiones inaccesibles al sistema inmune en células sanas (Figura 1 y Figura 5).

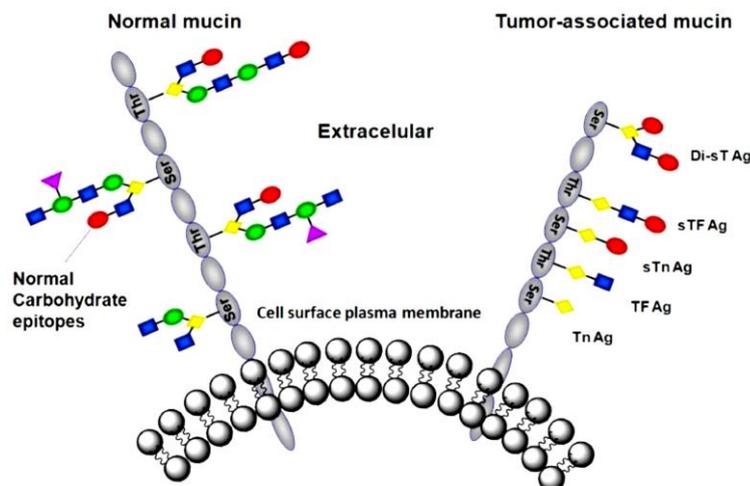


Figura 5. De izquierda a derecha, estructura de la MUC-1 en células normales y estructura de la MUC-1 en células tumorales.¹⁷

A este fenómeno se lo conoce como glicosilación aberrante y tiene gran importancia en los procesos de proliferación, adhesión y motilidad de las células tumorales, así como en la angiogénesis y la metástasis.¹⁸ Debido a todas estas características, la glicosilación aberrante es considerada como un proceso determinante en la oncogénesis y en la progresión tumoral.¹⁹

En estas regiones se disponen los antígenos de tipo carbohidrato asociados a tumores (TACAs). Los TACAs, al encontrarse en la superficie de las células tumorales, actúan como importantes biomarcadores y debido a la capacidad que tienen de ser reconocidos por el sistema inmune, pueden ser empleados para el desarrollo de vacunas terapéuticas en inmunoterapia. Entre los diferentes TACAs, nos hemos centrado en el antígeno Tn (α -O-GalNAc-Ser/Thr), que presenta una unidad de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a un residuo de serina o treonina, que será objeto de estudio en este trabajo (Figura 6).^{20, 21, 22}

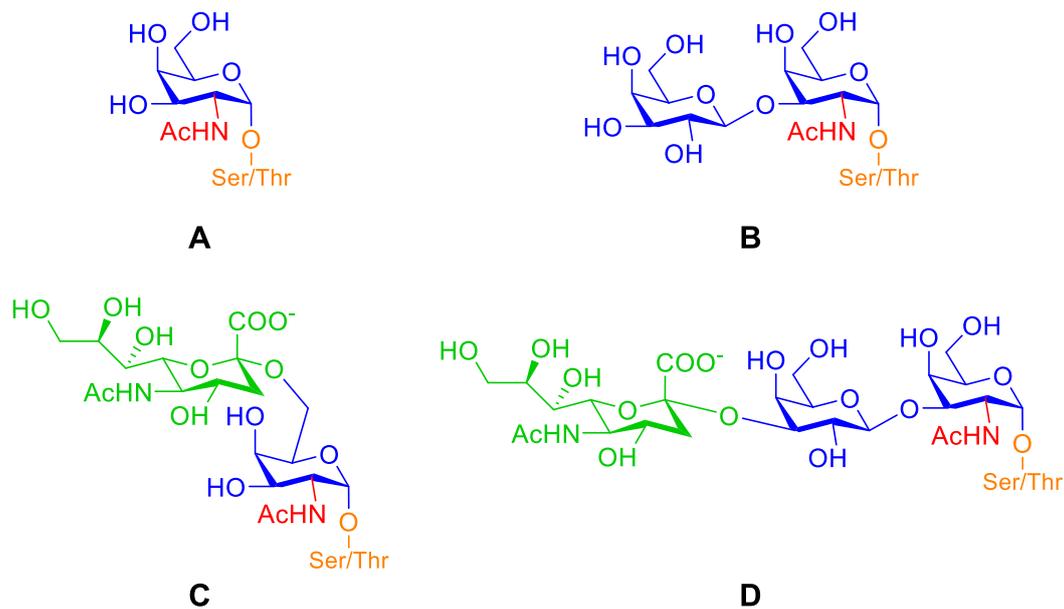


Figura 6. Estructuras de los diferentes TACAs: **A)** Antígeno Tn; **B)** Antígeno T (TF); **C)** Antígeno sialil Tn; **D)** Antígeno sialil T (TF)

El antígeno Tn actúa como biomarcador del cáncer y puede ser reconocido tanto por anticuerpos como por lectinas, proteínas capaces de unirse de forma altamente específica a carbohidratos. Mediante estudios previos de afinidad por las lectinas SBA (Soybean agglutinin) y VVA (*Vicia villosa*-B-4 agglutinin), se corroboró la capacidad del antígeno Tn como epítipo inmunológico. Así mismo, se observó que el antígeno Tn unido a la MUC-1 presenta mayor afinidad por las lectinas cuando está asociado al fragmento oligopeptídico Pro-Asp-Tn(Thr)-Arg (PDTR), conformando un mejor dominio inmunológico (Figura 7).^{23,24}

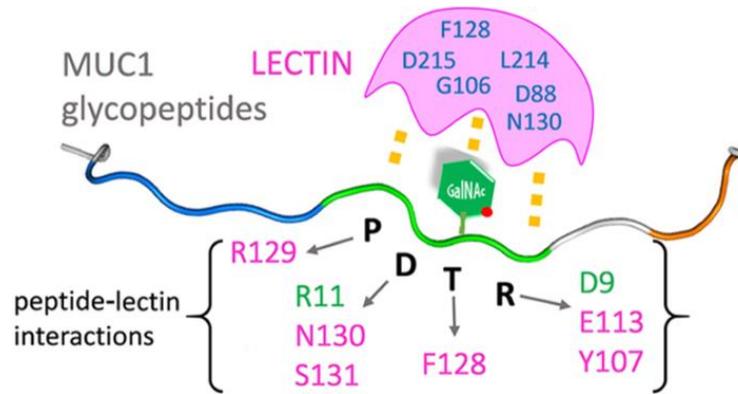


Figura 7. Dominio inmunológico PDTR reconocido por lectinas.²⁵

Así mismo, existe una gran variedad de anticuerpos monoclonales anti-MUC-1 capaces de reconocer la secuencia PDTR (Tabla 1).

Anticuerpo	Epítipo de reconocimiento
Ma552	GVTSAPDTRRAP
SM3	APDTRP
BC2	APDTR
214D4	PDTR

Tabla 1. Diferentes anticuerpos monoclonales anti-MUC-1 y sus respectivos epítipos de reconocimiento.^{26, 27}

La activación del sistema inmune destinada a generar un efecto terapéutico ha sido siempre una de las principales metas en disciplinas como la inmunología o la oncología.²⁸ Sin embargo, aunque el uso de TACAs como antígenos para activar la respuesta inmune parece muy prometedor, hasta la fecha no se han conseguido superar los ensayos clínicos.²⁹

Aunque se ha descrito que los anticuerpos producidos frente a los TACAs tienen capacidad antitumoral, el sistema inmune reconoce a los TACAs naturales como auto-antígenos, produciendo la activación de una respuesta inmune independiente de células T.^{30, 31} Esta respuesta no es suficiente para generar una inmunoterapia eficaz, ya que produce exclusivamente anticuerpos de baja afinidad. En cambio, si la respuesta inmune se produce mediada por células T, los anticuerpos producidos serán de alta afinidad y serán capaces de atacar selectivamente a células tumorales (Figura 8).^{32, 33}

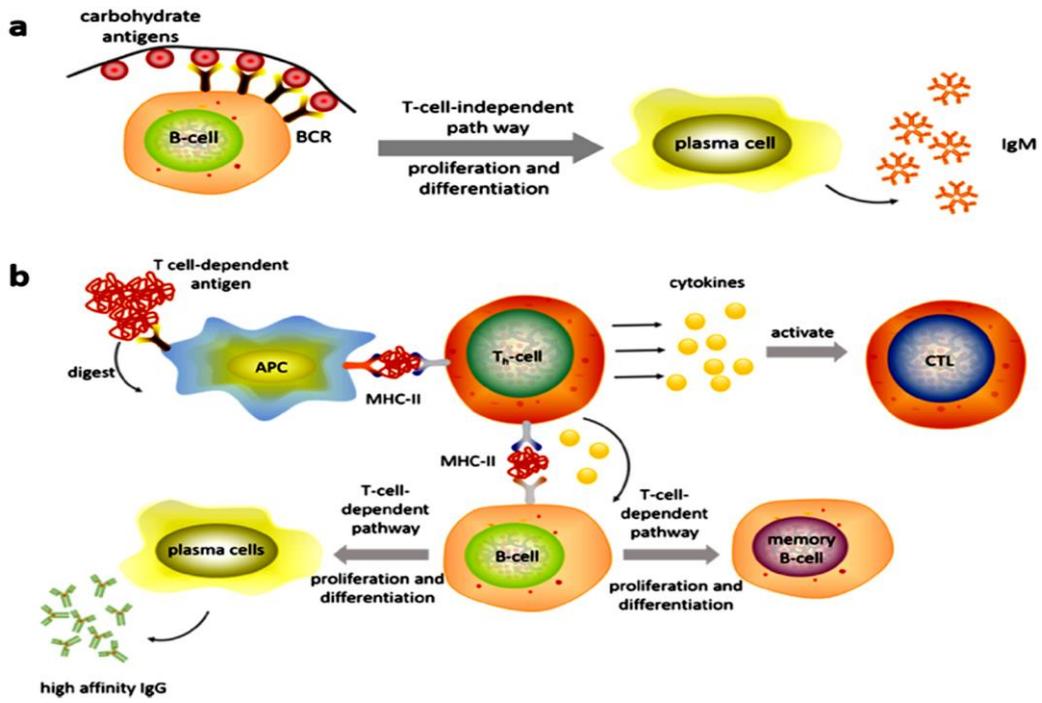


Figura 8. Tipos de respuesta inmune frente a TACAs. a) Independiente de células T; b) Dependiente de células T. ³²

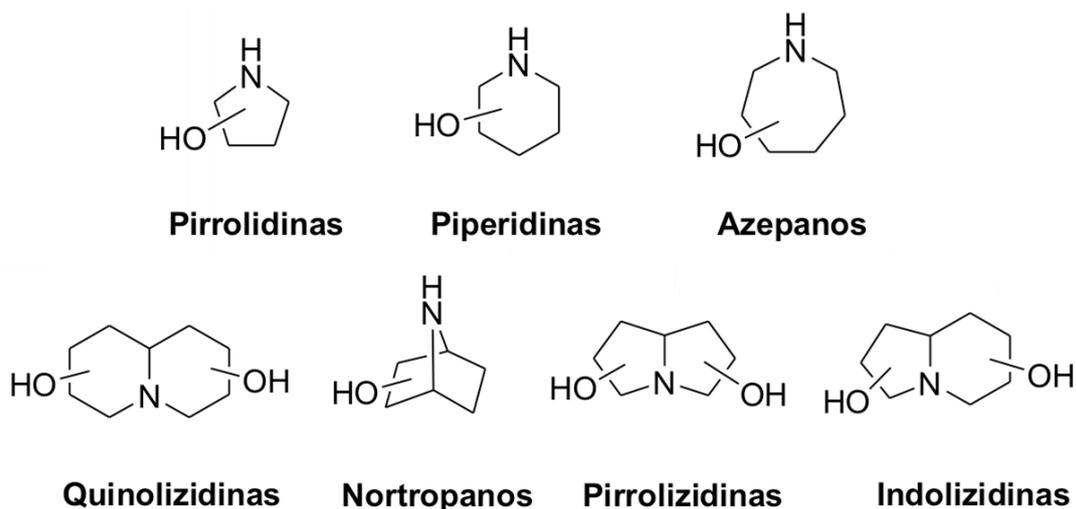


Figura 10. Clasificación de los iminoazúcares clásicos en función de su estructura monocíclica (arriba) o bicíclica (abajo).

Entre los iminoazúcares clásicos más frecuentemente usados, se encuentran la nojirimicina (NJ) y la 1-desoxinojirimicina (DNJ), de estructura análoga a la D-glucosa, junto a la castanospermina (CS), que presenta una estructura bicíclica de tipo indolizidina. Estos iminoazúcares de tipo sp^3 no presentan una configuración definida del centro pseudoanomérico.³⁵ Debido a la importancia del centro pseudoanomérico en la actividad biológica, no se han empleado este tipo de iminoazúcares como materia prima en este estudio (Figura 11).

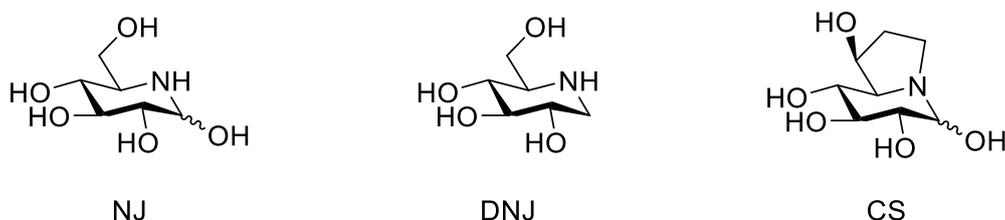


Figura 11. Estructura de los iminoazúcares nojirimicina (NJ), 1-desoxinojirimicina (DNJ) y castanospermina (CS).

Los iminoazúcares sp^2 son compuestos estructuralmente relacionados con los carbohidratos, que incorporan un átomo de nitrógeno de tipo pseudoamida (urea, tiourea, carbamato, tiocarbamato, guanidina, etc), en lugar de uno de tipo amina (sp^3) en la posición análoga al oxígeno endocíclico de los glicopiranosidos. En estos compuestos la localización del par de electrones no compartido del átomo de nitrógeno en un orbital con un fuerte carácter sp^2 , de simetría π , favorece un solapamiento muy eficaz con el orbital antienlazante σ^* del enlace entre el carbono pseudoanomérico y un sustituyente heteroatómico (C–X) y, consecuentemente, una fuerte contribución orbitalica al efecto anomérico (Figura 12).³⁶

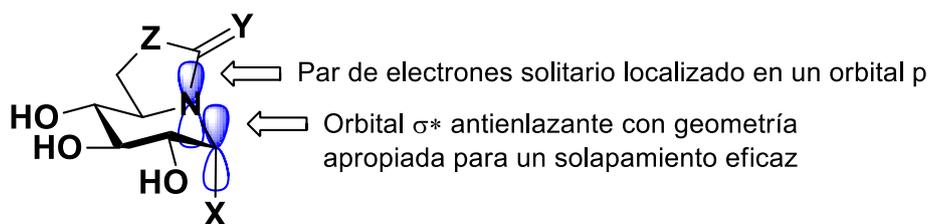


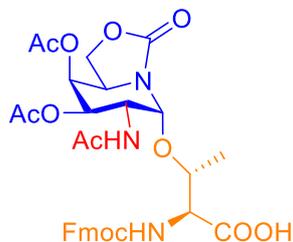
Figura 12. Estructura general de los iminoazúcares sp^2 que muestra los orbitales clave involucrados en el efecto anomérico.

Considerando que el efecto anomérico favorece la disposición axial del sustituyente pseudoaglicónico, impartiendo estabilidad configuracional y conformacional, esta nueva aproximación está especialmente adaptada al desarrollo de miméticos de glicoconjugados con configuración anomérica α .³⁷ La configuración *galacto* del iminoazúcar sp^2 , la presencia del grupo acetamido (NHAc) en posición 2 y el enlace α -O-glicosídico con el aminoácido treonina fijarían los rasgos necesarios desde el punto de vista estructural para ser mimético del antígeno tumoral Tn.

Entre las propiedades terapéuticas que presentan los iminoazúcares sp^2 , se pueden destacar las siguientes: actividad leishmanicida, la cual fue evaluada en una serie de iminoazúcares sp^2 S-glicosilados, presentando actividad antiparasitaria frente a las formas intracelulares amastigotas de *Leishmania donovani*.³⁸ Actividad antiproliferativa evaluada en diferentes tipos de cáncer, en el caso de los derivados con grupos S-octilo y C-octilo en la posición pseudoanomérica.^{39, 40, 41} Así mismo, también tienen capacidad para actuar como chaperonas farmacológicas en enfermedades de almacenamiento lisosomal tales como la enfermedad de Gaucher, Fabry y gangliosidosis GM₁.⁴²

4. OBJETIVOS

Con el fin de producir una respuesta inmune efectiva que active la producción de anticuerpos de alta afinidad, el principal objetivo de este Trabajo Fin de Máster consiste en la síntesis de un nuevo glicomimético del antígeno tumoral Tn.



La molécula propuesta contiene la estructura bicíclica de iminoazúcar sp^2 con configuración *galacto*. Además, se deben fijar los rasgos estructurales característicos del antígeno Tn, los cuales implicarán abordar los siguientes pasos sintéticos:

- Introducción de un sustituyente nitrogenado (N_3) que permita acceder a la formación del grupo acetamido (NHAc) en posición 2.
- Incorporación del aminoácido treonina, a través de la formación de un α -*O*-glicosídico, que conduzca a la formación del correspondiente α -*O*-glicosilaminoácido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis retrosintético presentado en la Figura 13 muestra cómo puede obtenerse la molécula objetivo, (1*R*)-1-*O*-(FmocThr)-2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2-desoxi-5*N*,6*O*-oxometilidéngalactonojirimicina (**20**) a partir del iminoazúcar *sp*² reductor de configuración *galacto* **12**, tras la formación clave de un enlace α -*O*-glicosídico con el aminoácido treonina adecuadamente protegido. Para ello se activará la posición pseudoanomérica en forma de fluoruro tras la funcionalización de la posición 2 del iminoazúcar con el grupo azido (N₃) como precursor nitrogenado del grupo acetamido (NHAc) a partir del correspondiente galactal derivado **14**.

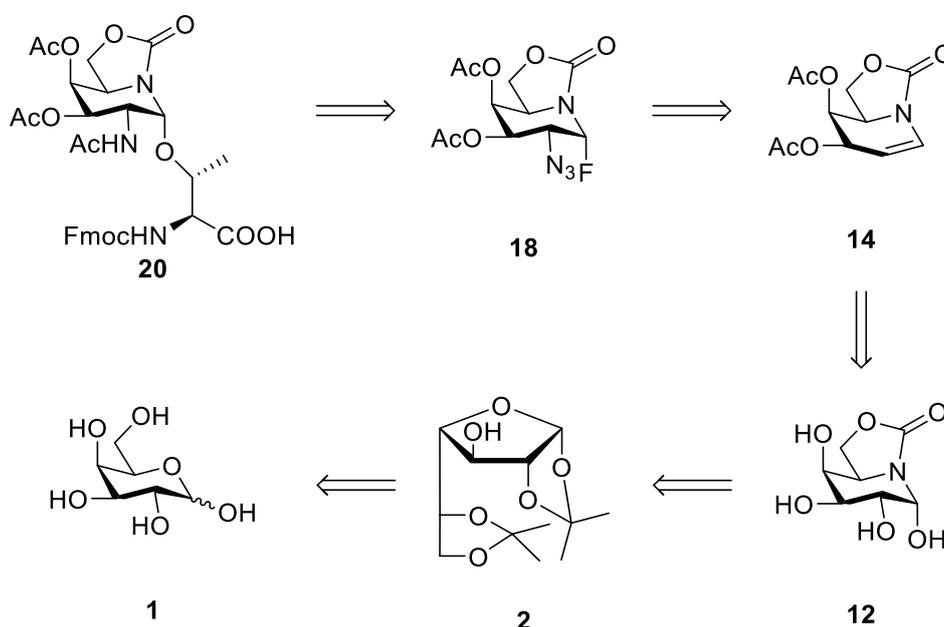
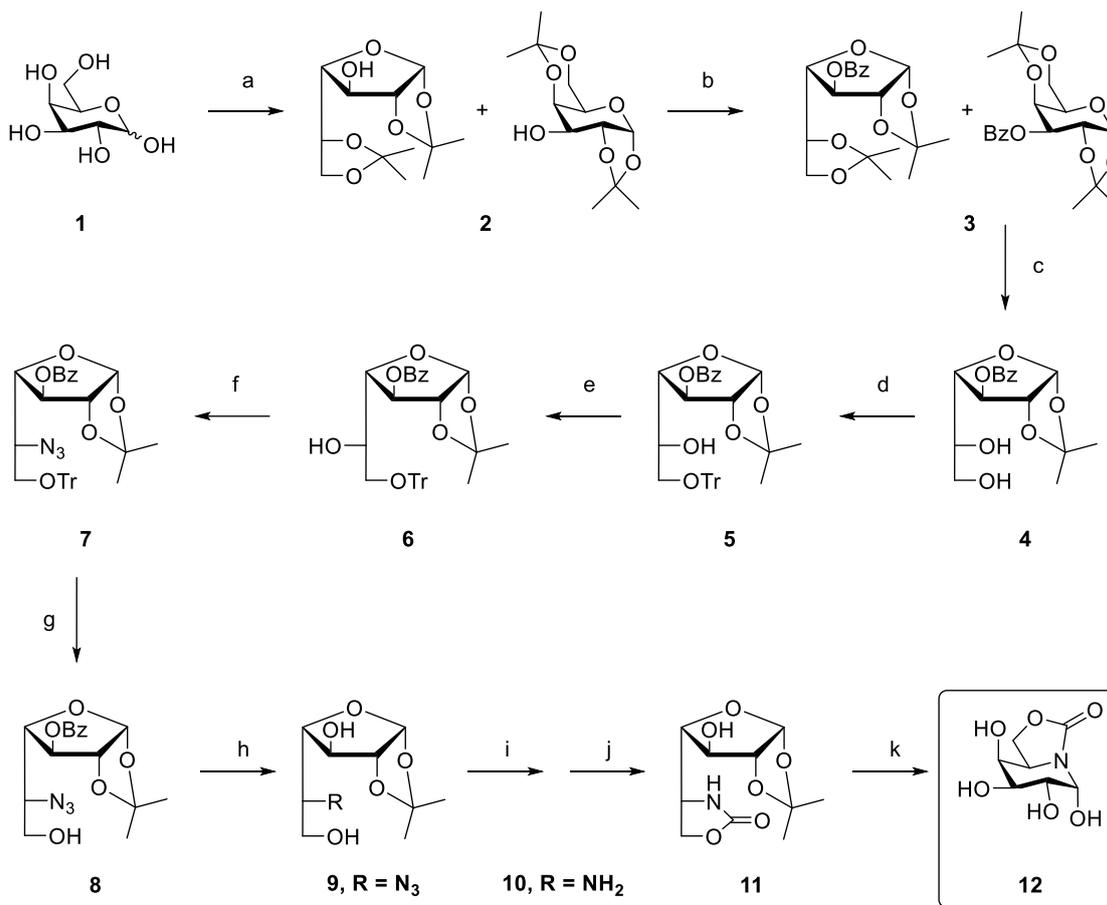


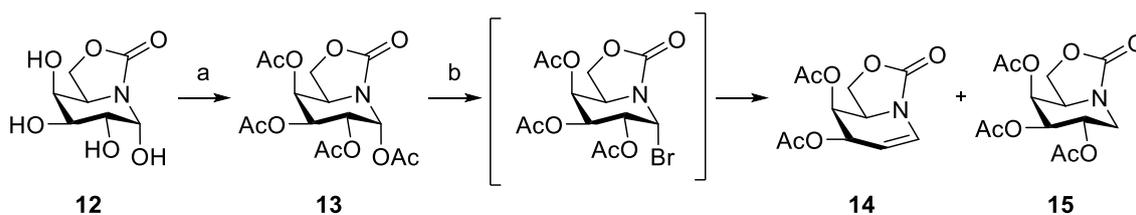
Figura 13. Esquema retrosintético propuesto para la preparación del mimético del antígeno Tn (**20**) a partir de D-galactosa.

El iminoazúcar bicíclico (1*R*)-5*N*,6*O*-oxometilidéngalactonojirimicina **12** se ha preparado siguiendo una ruta sintética (Esquema 1) que consta de 11 etapas y en la que se parte de D-galactosa comercial **1**.⁴³ Caben destacar como etapas clave la introducción del grupo amino en la posición 5 de la D-galactosa dando lugar al compuesto **10**, la formación del carbamato cíclico **11** mediante reacción de carbonilación con trifosgeno y, finalmente, la desprotección ácida empleando una mezcla TFA-H₂O del 1,2-acetal que protege al carbono anomérico del azúcar y que permite la reacción de ciclación intramolecular dando lugar al compuesto **12** con la formación exclusiva del anómero α .



Esquema 1. Síntesis del iminozúcar sp^2 (1R)-5N,6O-oxometilidéngalactonojirimicina (12). Reactivos y condiciones: a) Acetona, *p*-TsOH, 2,2-dimetoxipropano, DMF, 90 °C, 24 h, 99%; b) BzCl, py, 0 °C, 24 h, 99%; c) AcOH 60%, 60 °C, 4 h, 39%; d) TrCl, DCM, py, DMAP, 40 °C, 24 h, 57%; e) i: Tf₂O, DCM, py, -25 °C, 30 min; ii: NaNO₂, DMF, ta, 24 h, 40%; f) i: Tf₂O, DCM, py, -25 °C, 30 min, ii: 2: NaN₃, DMF, ta, 24 h, 75%; g) BF₃.Et₂O, MeOH, DCM, 0 °C, 2 h, 63%; h) NaOMe, MeOH, ta, 1 h, 83%; i) H₂ Pd/C, MeOH, ta, 3 h, 95%; j) Trifosgeno, DIPEA, DCM, 0 °C, 30 min, 61%; k) i: TFA-H₂O 90%, 0 °C, 2 h, ii: NaOH, ta, 81%.

Una vez preparado el iminozúcar bicíclico de partida **12** se abordó la preparación del pseudo-galactal derivado **14** siguiendo la secuencia de reacciones que se presenta en el Esquema 2.



Esquema 2. Preparación del galactal derivado 14. Reactivos y condiciones: a) Ac_2O , py, t.a., 24 h, 76%; b) i: HBr/AcOH (33%), DCM, 0 °C, 15 min; ii: Cp_2TiCl_2 , Mn, THF, t.a., 3 h, 97% rdto. global.

La síntesis comenzó con la preparación del derivado per-*O*-acetilado **13** mediante una reacción de acetilación con anhídrido acético (Ac_2O) y piridina a temperatura ambiente durante 24 h. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente una mezcla AcOEt -ciclohexano (1:1 \rightarrow 2:1), condujo al compuesto peracetilado con un 76% de rendimiento. A continuación, se llevó a cabo la activación de la posición pseudoanomérica mediante la formación del 1-bromo derivado utilizando HBr/AcOH (33%) en DCM anhidro a 0 °C durante 15 minutos. El crudo obtenido se utilizó directamente en la reacción de formación del doble enlace. Para ello el bromo-derivado se hizo reaccionar con $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{III}}\text{Cl}$ (monocloruro de titanoceno)⁴⁴ (disolución de color verde), preparado *in situ* a partir de una mezcla de Cp_2TiCl_2 (disolución de color rojo) y Mn, en THF (previamente desoxigenado) a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera inerte. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente AcOEt -ciclohexano (3:1 \rightarrow 2:1) condujo al galactal derivado **14** (59% de rendimiento) y al correspondiente 1-desoxi-derivado **15** (38% de rendimiento).

El galactal derivado **14** se obtuvo de manera satisfactoria mediante un proceso de eliminación reductora a través de un mecanismo de tipo radicalario a partir del bromo-derivado. La abstracción del átomo de bromo origina un intermedio radical que es atrapado por $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{III}}\text{Cl}$ para dar el complejo de glicosiltitanio que tras eliminación de $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{IV}}\text{Cl}(\text{OAc})$ conduce a **14** (Figura 14).

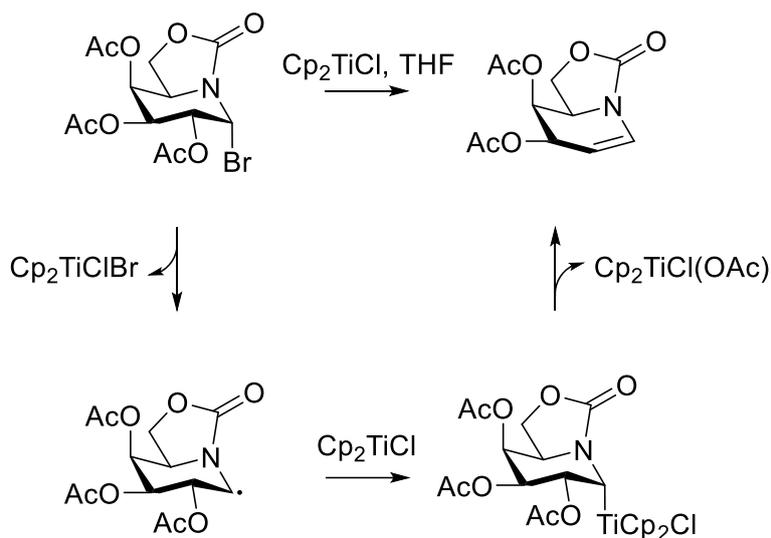


Figura 14. Mecanismo propuesto para la formación del galactal derivado a partir del 1-bromo derivado en presencia de Ti(III).

La formación del galactal derivado **14** se confirmó mediante espectroscopía de ^1H y ^{13}C RMN, espectrometría de masas y análisis elemental. Así, en su espectro de ^1H RMN registrado en 300 MHz se observa la presencia de solo dos singuletes para los grupos metilo de acetato (δ 2.15 y 2.03 ppm). Además, las señales correspondientes a los H-1 y H-2 aparecen a campo bajo en la región de los protones de alqueno (δ 6.73 y 4.85 ppm), del mismo modo que las señales en el espectro de ^{13}C RMN a δ 123.9 ppm y 104.8 ppm respectivamente, confirmando la presencia del doble enlace entre las posiciones 1,2 del iminoazúcar (Figura 15).

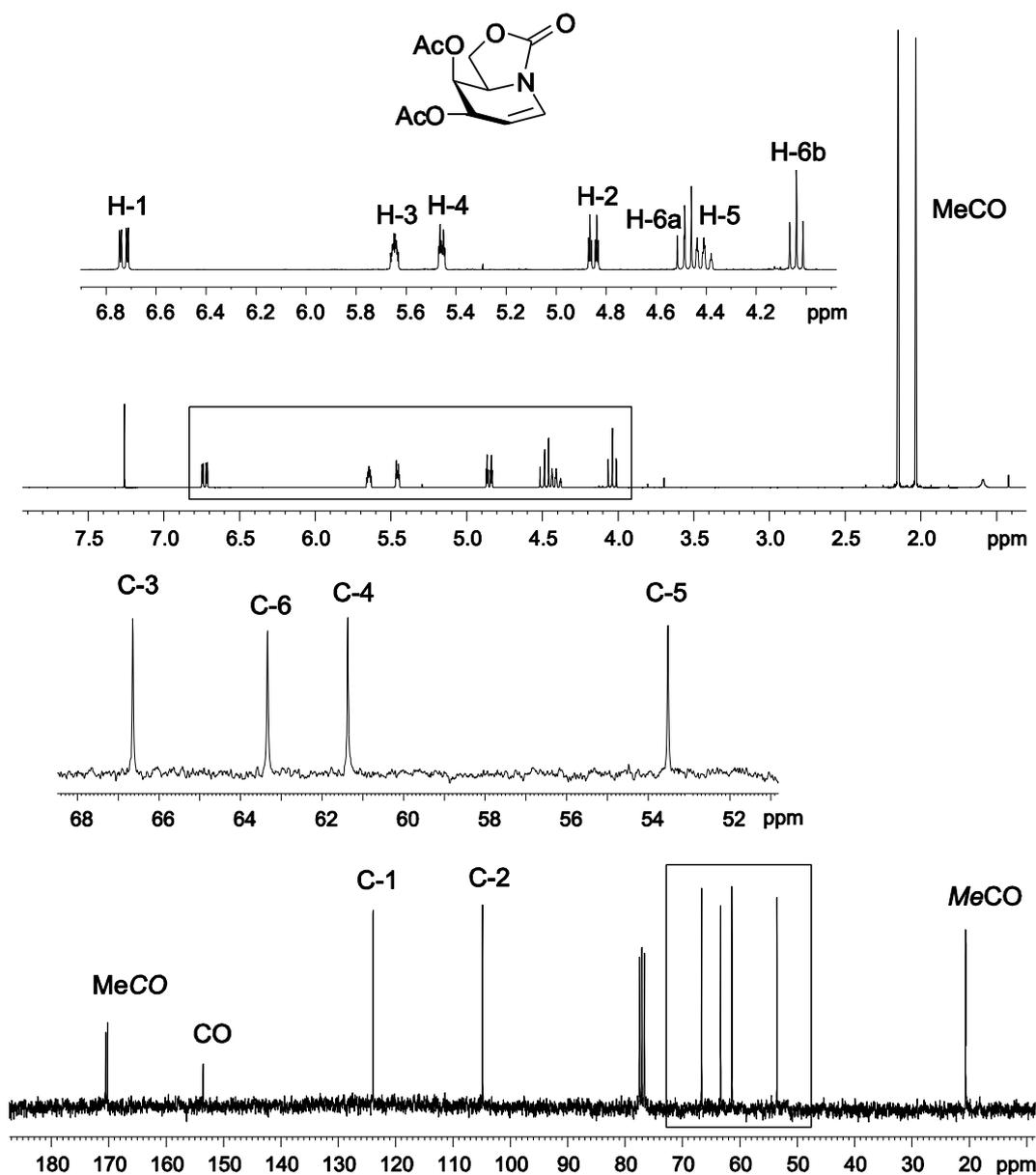
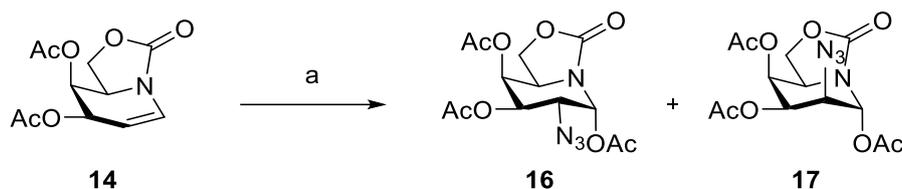


Figura 15. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz y 75.5 MHz, CDCl_3) del galactal derivado **14**.

A continuación se procedió a la introducción selectiva del grupo azido⁴⁵ en posición 2 del derivado **14**. Para ello se disolvió **14** en acetonitrilo (CH_3CN) y se trató con nitrato de cerio y amonio (CAN) y azida sódica (NaN_3) a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 horas bajo atmósfera inerte (Esquema 3). El crudo obtenido se acetiló directamente con Ac_2O y piridina a temperatura ambiente durante 24 horas para obtener la mezcla de 1,3,4-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi derivados de configuración *galacto* **16** y configuración *talo* **17** en proporción relativa 6:1 (^1H RMN del crudo de reacción).



Esquema 3. Preparación de los 1,3,4-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi derivados de configuración *galacto* (16**) y *talo* (**17**). Reactivos y condiciones:** a) i: CAN, NaN₃, CH₃CN, -20 °C, 5 h; ii: Ac₂O, py, t.a., 2 h, 73% rdto. global.

Ambos diastereoisómeros se pudieron separar mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente una mezcla AcOEt-ciclohexano (2:1 → 1:1 → 1:2), obteniéndose **16** y **17** con rendimientos del 65% y 8% respectivamente.

La presencia del grupo azido en posición 2 se confirmó mediante la presencia de una banda a ν 2119 (N₃) cm⁻¹ en su espectro de infrarrojo (Figura 16).

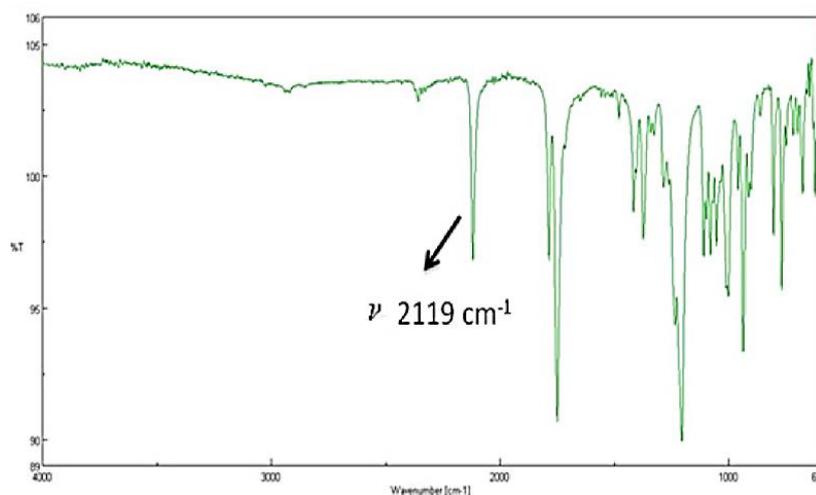
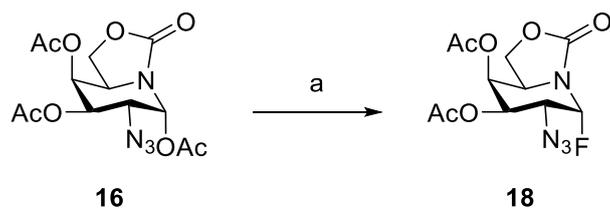


Figura 16. Espectro de IR del 1,3,4-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-derivado **16**.

En la siguiente etapa sintética y continuando con el compuesto obtenido mayoritariamente 2-azido-2-desoxi derivado de configuración *galacto* se llevó a cabo la activación de la posición anomérica haciendo reaccionar **16** con una mezcla de fluoruro de hidrógeno al 70% en piridina (HF-Py)⁴⁶ a -40 °C durante 90 minutos (Esquema 4). En este caso es muy importante tener un control cuidadoso de temperatura y tiempo para evitar desacetilaciones parciales. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente 1:1 AcOEt-ciclohexano nos permitió aislar el derivado fluorado **18** con un 80% de rendimiento.



Esquema 4. Preparación del 1-desoxi-1-fluoro derivado (18). Reactivos y condiciones: a) HF-Py (70%), -40 °C, 90 min, 80%.

La presencia del átomo de flúor pseudoanomérico en la estructura de **18** se confirmó mediante espectroscopía de ^{19}F , ^1H y ^{13}C RMN. Así por ejemplo, en el espectro de ^1H RMN registrado en 300 MHz en CDCl_3 se observa el acoplamiento tanto del H-1 como del H-2 con el átomo de flúor (dd, $J_{1,\text{F}} = 50.1$ Hz, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), y (ddd, $J_{2,\text{F}} = 24.3$ Hz, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-2). En el espectro de ^{13}C RMN las señales tanto de C-1 como de C-2 aparecen como dobletes debido también al acoplamiento con el átomo de flúor ($J_{\text{C}1,\text{F}} = 208.3$ Hz y $J_{\text{C}2,\text{F}} = 24.6$ Hz) (Figura 17).

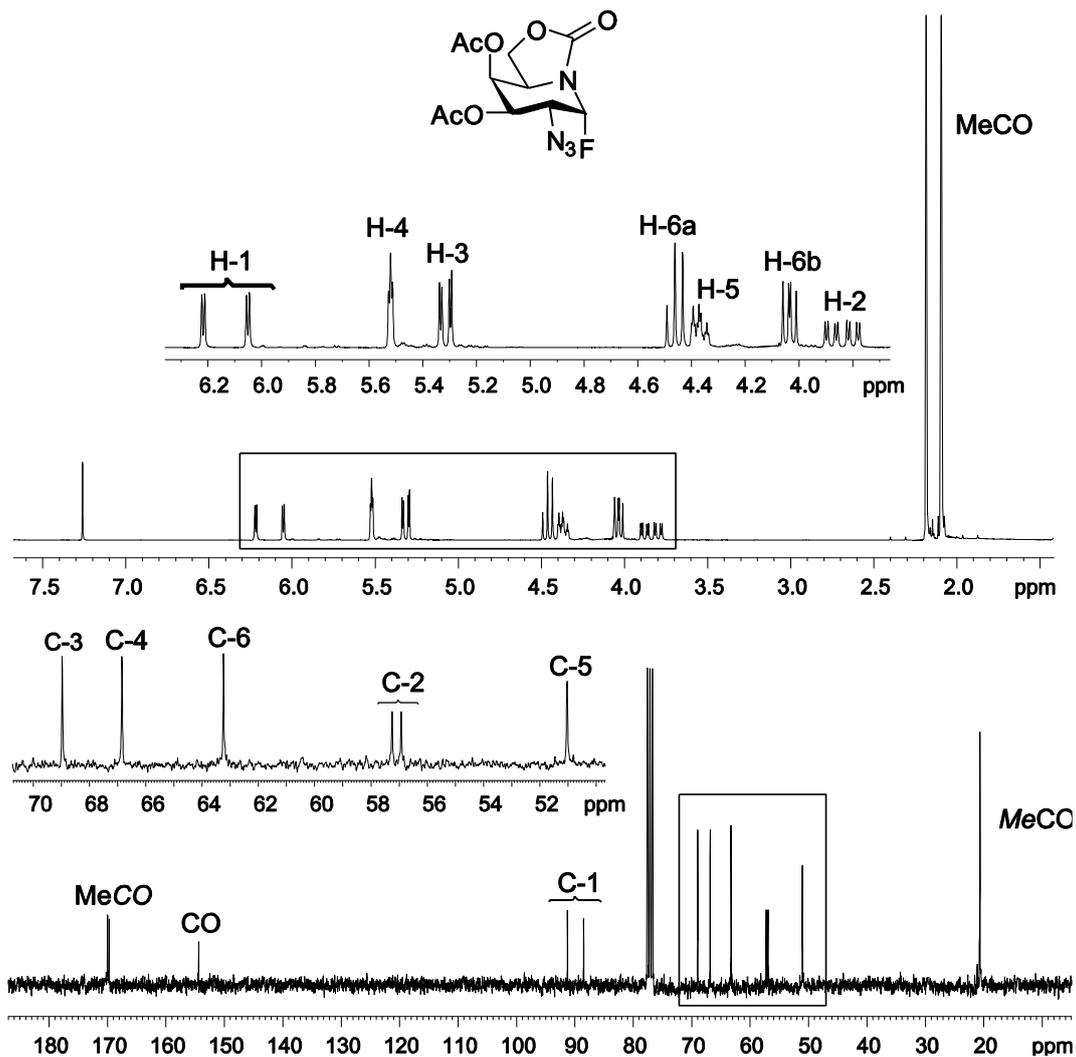


Figura 17. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, CDCl_3) de **18**.

Asimismo, en el espectro de ^{19}F RMN desacoplado se observa una única señal a δ -164.1 ppm (Figura 18 (A)). Por su parte en el espectro de ^{19}F RMN acoplado (Figura 18 (B)) se pudieron observar los acoplamientos del átomo de flúor con los H-1 y H-2 confirmándose lo observado en el espectro de ^1H RMN.

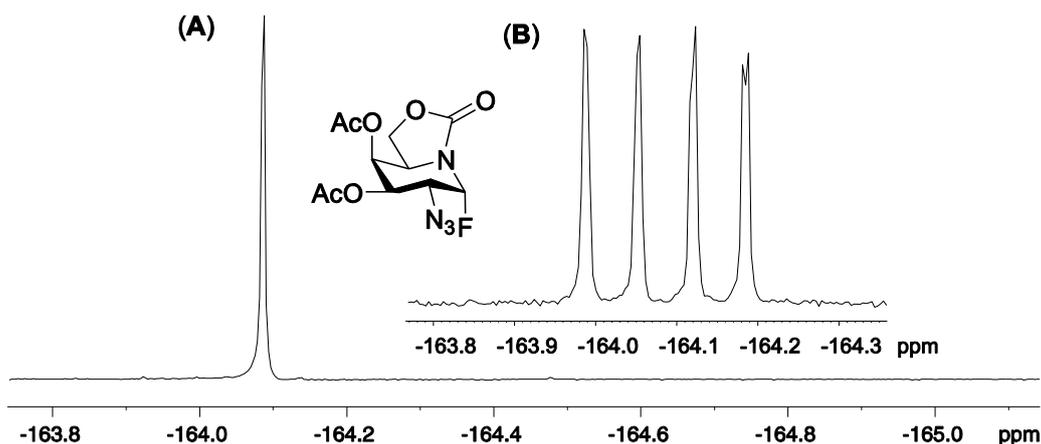


Figura 18. Espectros de ^{19}F RMN (A) desacoplado y (B) acoplado (376 MHz, CDCl_3) del fluoro derivado **18**.

Una vez activada la posición anomérica se llevó a cabo la reacción de *O*-glicosidación entre **18** y el aminoácido treonina adecuadamente protegido con el grupo protector Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) en el caso de la función amina y como éster *tert*-butílico en el caso del ácido carboxílico (Figura 19).

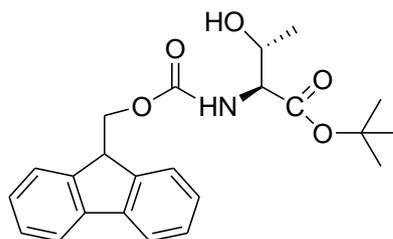
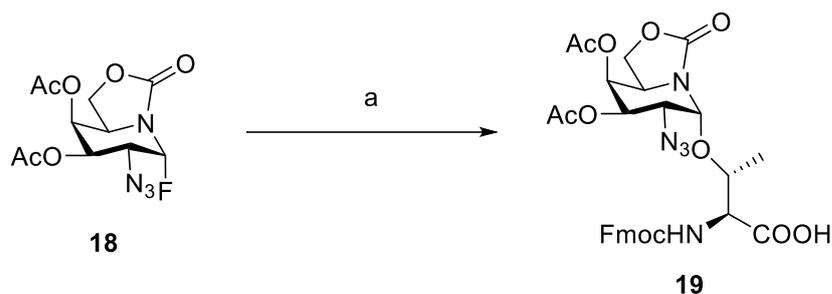


Figura 19. Estructura del aminoácido treonina convenientemente protegido.

La reacción se llevó a cabo en DCM anhidro a $0\text{ }^\circ\text{C}$, bajo atmósfera inerte, y en presencia de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) como promotor de la reacción. Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (1:1 AcOEt-ciclohexano \rightarrow AcOEt \rightarrow 5:1 AcOEt-MeOH) se aisló el glicosilaminoácido **19** con un 73% de rendimiento (Esquema 5). En esta reacción la salida del grupo pseudoanomérico y el ataque del nucleófilo tienen lugar bajo control estricto del efecto anomérico, aislándose exclusivamente el anómero α .



Esquema 5. Preparación del pseudo- α -O-glicosilaminoácido (19). Reactivos y condiciones: a) Fmoc-Thr-O^tBu, BF₃·Et₂O, DCM, 0 °C, 1 h, 73%.

Esta etapa transcurrió con la hidrólisis simultánea del éster *tert*-butílico como se confirma en su espectro de masas donde se observa un ión pseudomolecular m/z 636.1 [M – H]⁻ que nos confirmó tanto la reacción de acoplamiento entre el iminoazúcar y la treonina para formar el *O*-glicósido **19** como la desprotección del éster *tert*-butílico (Figura 20).

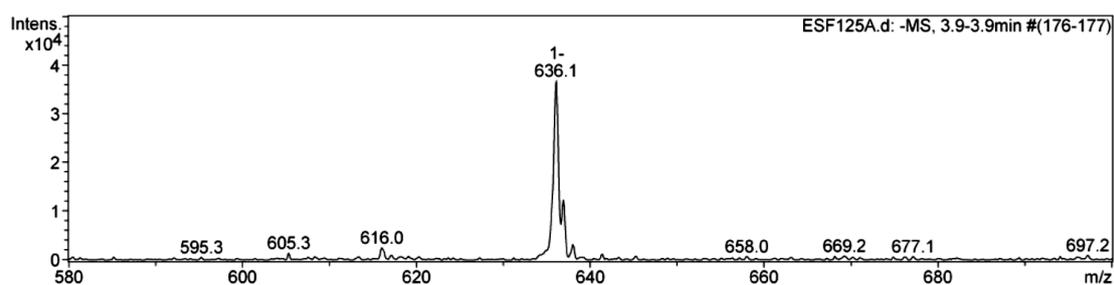


Figura 20. Espectro de tipo ESI-MS del compuesto **19**.

La ausencia de señales correspondientes al grupo *tert*-butilo se confirma también en los espectros de ¹H y ¹³C RMN realizados en CD₃OD y registrados en 300 y 75.5 MHz respectivamente (Figura 21). Asimismo, en el espectro de ¹³C RMN se observa la señal del grupo carbonilo del ácido carboxílico a δ 174.1 ppm. La presencia del grupo Fmoc de la treonina se observa en su espectro de ¹H RMN como un multiplete (δ 7.85 - 7.25 ppm) correspondiente a los 8 protones aromáticos con sus correspondientes átomos de carbono en el espectro de ¹³C RMN a δ 145.3 – 120.9 ppm. Por otro lado, la constante de acoplamiento del H-1 (d, $J_{1,2}$ = 4.0 Hz) nos confirma la orientación del enlace *O*-glicosídico en disposición axial.

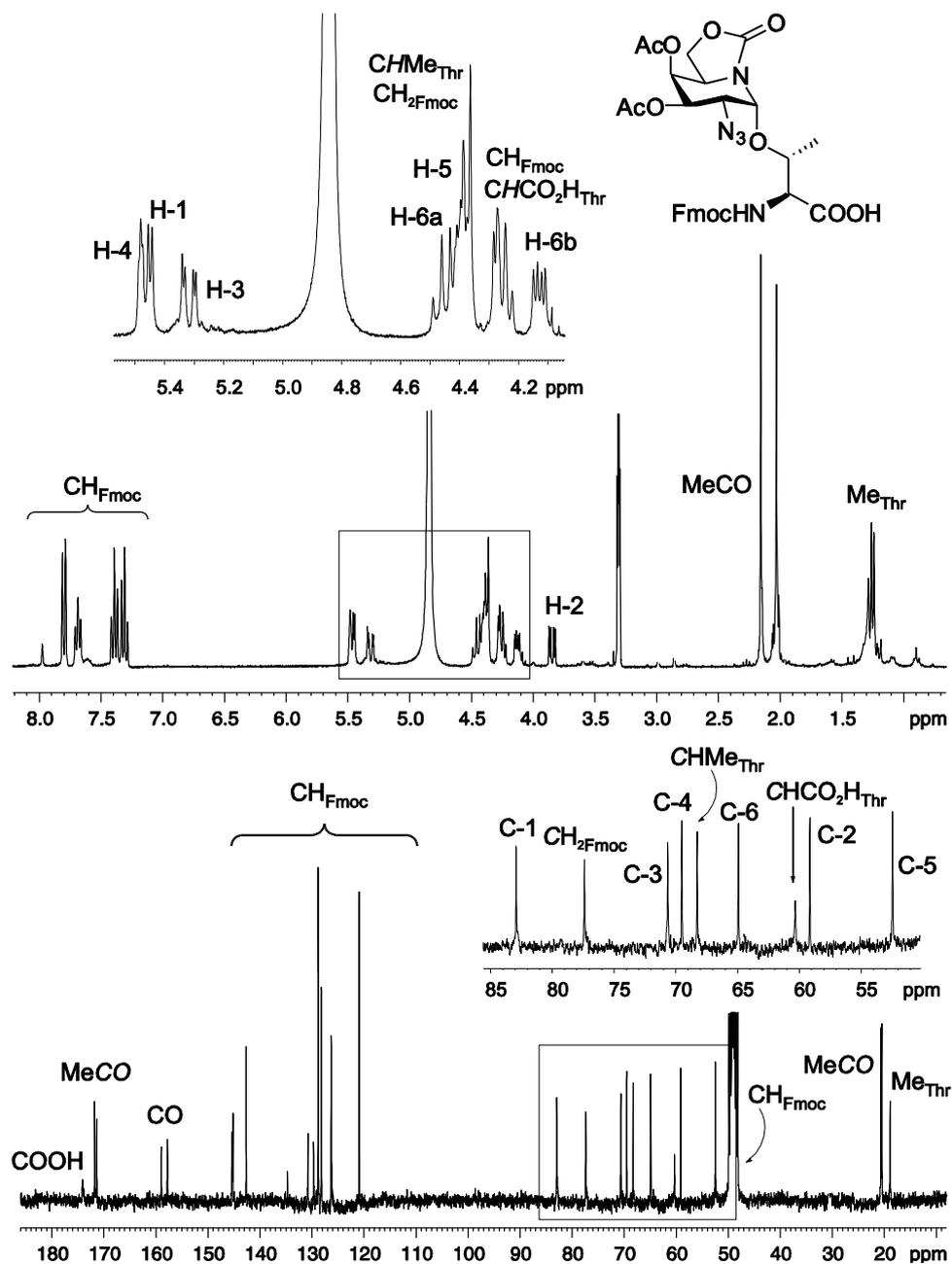


Figura 21. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz y 75.5 MHz, CD_3OD) del pseudo- α -O-glicosilaminoácido **19**.

Finalmente, con vistas a continuar esta investigación se propone la transformación del grupo azido introducido en posición 2 del α -*O*-glicosilaminoácido en el grupo acetamido fijando así los rasgos estructurales del antígeno Tn, junto a la posterior introducción de los aminoácidos prolina, ácido aspártico y arginina mediante síntesis en fase sólida con el fin de formar un α -*O*-glicopéptido que contenga el dominio inmunológico PDTR presente en la MUC-1, para de esta forma generar una respuesta inmune dependiente de células T y la consecuente producción de anticuerpos de alta afinidad (Figura 22).

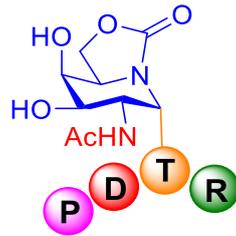


Figura 22. α -*O*-Glicopéptido mimético del antígeno Tn conteniendo el dominio PDTR

6. CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha sintetizado de manera satisfactoria un nuevo glicomimético del antígeno Tn conteniendo como esqueleto un iminoazúcar sp^2 bicíclico a partir de D-galactosa. Para ello se han llevado a cabo las siguientes etapas clave en general todas ellas con buenos rendimientos:
 - Introducción del átomo de bromo en la posición pseudoanomérica del derivado (1*R*)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetil-5*N*,6*O*-oxometilidéngalactonojirimicina seguido de una reacción de eliminación en presencia de $Cp_2Ti^{III}Cl$ para generar el galactal derivado.
 - Incorporación del grupo azido, como precursor del grupo acetamido, en la posición dos del iminoazúcar mediante tratamiento con CAN y NaN_3 .
 - Activación de la posición pseudoanomérica mediante la formación del 1-fluoro-derivado usando HF-Py.
 - Reacción de *O*-glicosilación con el aminoácido treonina, adecuadamente protegido, empleando $BF_3 \cdot Et_2O$ como promotor de la reacción obteniendo exclusivamente el α -*O*-glicosilaminoácido. El fuerte efecto anomérico en este sistema dirige la reacción totalmente hacia el anómero α con disposición axial del sustituyente pseudoglicosídico, aspecto crucial para la síntesis de miméticos del antígeno Tn.
- 2) Se propone la continuación de la síntesis con introducción del grupo acetamido usando como precursor la función azida introducida previamente.
- 3) Así mismo, también se propone la incorporación de los aminoácidos prolina, ácido aspártico y arginina al α -*O*-glicosilaminoácido sintetizado con el objetivo de conformar un α -*O*-glicopéptido que contenga el dominio de reconocimiento PDTR presente en la MUC-1.

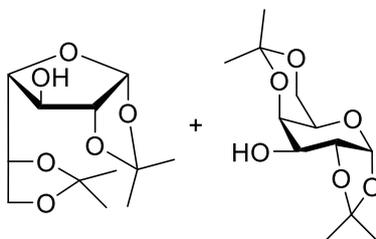
7. EXPERIMENTAL SECTION

7.1 General Methods

Reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. Optical rotations were measured with a JASCO P-2000 polarimeter, using a sodium lamp ($\lambda = 589$ nm) at 22 °C in 1 cm or 1 dm tubes. IR spectra were recorded on a JASCO FTIR-410 instrument. NMR experiments were performed at 300 (75.5), 400 (100.6) and 500 (125.7) MHz. 2-D COSY and HSQC experiments were carried out to assist on signal assignment. For ESI mass spectra, 0.1 pM sample concentrations were used, the mobile phase consisting of 50% aq CH₃CN at 0.1 mL min⁻¹. Thin-layer chromatography was performed on precoated TLC plates, silica gel 30F-245, with visualization by UV light and by carrying with 10% H₂SO₄ or 0.2% w/v cerium (IV) sulphate-5% ammonium molybdate in 2 M H₂SO₄. Column chromatography was performed on Chromagel (sílice 60 AC.C 70-200 μ m). Elemental analyses were performed at the Servicio de Microanálisis del Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla, Spain.

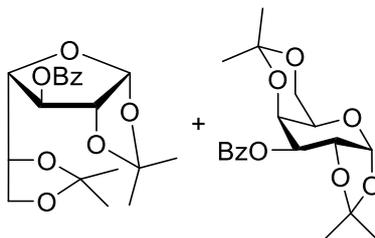
7.2 Starting materials

1,2:5,6-Di-*O*-isopropylidene- α -D-galactofuranose and 1,2:4,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranose (2):



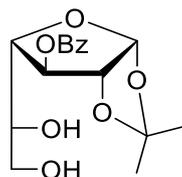
To a solution of the commercially available D-galactose (**1**) (12.0 g, 66.6 mmol) in dry DMF (120 mL), acetone (258 mL), 2,2-dimethoxypropane (28.8 mL), molecular sieves (6.0 g) and *p*-toluenesulfonic acid (3.6 g) were added and the reaction mixture was stirred at 90 °C for 24 h under argon atmosphere, neutralized by adding CaCO₃ (12 g), stirred for 15 min (pH = 7) and filtered through a pad of Celite using DCM. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane) to give a mixture of the corresponding furanose and pyranose forms in a \approx 1:1 ratio (**2**). Yield: 17.1 g (99%). R_f 0.51 (1:1 EtOAc-cyclohexane).

3-*O*-Benzoyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactofuranose and 3-*O*-benzoyl-1,2:4,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranose (3):



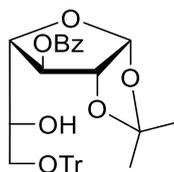
To a solution of the mixture of compounds (2) (17.3 g, 66.6 mmol) in pyridine (80 mL) at 0 °C, benzoyl chloride (10.84 mL, 93.3 mmol) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 24 h from 0 °C to rt, then poured into water/ice and extracted with DCM (2 x 20 mL), washed with aq H₂SO₄ 2 N (2 x 20 mL) and saturated aq solution of NaHCO₃ (2 x 20 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated to give the benzoylated mixture (3). Yield: 24.0 (99%). R_f 0.78 (1:1 EtOAc-cyclohexane).

3-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactofuranose (4):



The crude resulting from the previous procedure (3) (24.0g, 65.9 mmol) dissolved in 89 mL of AcOH (60%) was heated at 60 °C for 4 h. Then AcOH was removed under reduced pressure and the resulting residue diluted with EtOAc (20 mL), washed with saturated aq solution of NaHCO₃ (2 x 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated. Purification by column chromatography (1:3 → 1:1 → 2:1 EtOAc-cyclohexane) afforded 4. Yield: 8.4 g (39%). R_f 0.27 (1:1 EtOAc-cyclohexane).

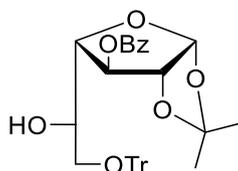
3-*O*-Benzoyl-1,2-*O*-isopropylidene-6-*O*-trityl- α -D-galactofuranose (5):



To a solution of 3-*O*-benzoyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactofuranose (4) (8.01 g, 24.72 mmol) in anhydrous DCM (15 mL), pyridine (40 mL), trityl chloride (10.3 g, 37.09 mmol) and DMAP (604 mg, 4.94 mmol) were added under N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 24 h, diluted with DCM, washed with cold AcOH (10%) (20

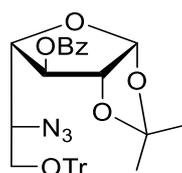
mL) and finally washed with saturated aq solution of NaHCO₃ (20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (1:8 → 1:6 → 1:2 → 1:1 EtOAc-cyclohexane) to afford the tritylated derivative **5**. Yield: 7.97 g (57%). R_f 0.8 (1:1 EtOAc-cyclohexane).

3-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidene-6-O-trityl- α -D-altrofuranose (6):

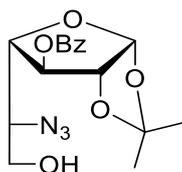


Pyridine (2.2 mL, 27.9 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (3 mL, 18.6 mmol) were added, under nitrogen atmosphere, to a solution of 3-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidene-6-O-trityl- α -D-galactofuranose (**5**) (4.6 g, 8.1 mmol) in anhydrous DCM (50 mL) at -25 °C. After stirring for 30 min, the mixture was diluted with DCM (20 mL), washed with cold saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated. The resulting crude triflate was dissolved in DMF (21 mL), NaNO₂ (2.5 g, 36.3 mmol) was added under Ar atmosphere and the reaction mixture was stirred at rt for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in DCM (20 mL), washed with water (2 x 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated. The residue was purified by column chromatography (1:20 EtOAc-toluene) to give (**6**). Yield: 1.85 g (40%). R_f 0.38 (1:4 EtOAc-cyclohexane).

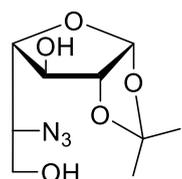
5-Azido-5-deoxy-3-O-benzoyl-1,2-O-isopropylidene-6-O-trityl- α -D-galactofuranose (7):



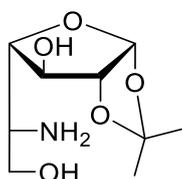
Pyridine (2.0 mL, 24.8 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (2.9 mL, 17.2 mmol) were added under nitrogen atmosphere to a solution of (**6**) (6.36 g, 11.23 mmol) in DCM (34 mL) at -25 °C. After stirring for 30 min, the mixture was diluted with DCM (20 mL), washed with cold saturated aqueous NaHCO₃ (2 x 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated. The resulting crude triflate was dissolved in DMF (30 mL), NaN₃ (3.6 g, 55.4 mmol) was added under Ar atmosphere and the reaction mixture was stirred at rt for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in DCM (20 mL) and washed with water (2 x 20 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and concentrated to give (**7**). Yield: 4.98 g (75%). R_f 0.60 (1:4 EtOAc-cyclohexane).

5-Azido-5-deoxy-3-O-benzoyl-1,2-O-isopropylidene- α -D-galactofuranose (8):

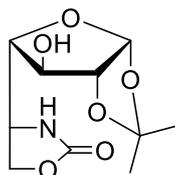
$\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ complex (2.7 mL) and MeOH (12.5 mL) were added to a solution of the tritylated azido derivative (**7**) (4.98 g, 8.41 mmol) in DCM (65 mL) at 0 °C, under argon atmosphere. The reaction mixture was allowed to reach rt and stirred for 2 h, diluted with DCM (20 mL), then washed with saturated aqueous NaHCO_3 (2 x 20 mL), dried (MgSO_4) and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (1:5 \rightarrow 1:4 EtOAc-cyclohexane) to give **8**. Yield: 1.83 g (63% global yield). R_f 0.33 (1:3 EtOAc-cyclohexane).

5-Azido-5-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-galactofuranose (9):

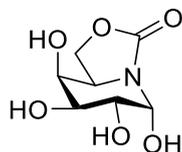
To a stirred solution of the azide **8** (639 mg, 1.83 mmol) in MeOH (17 mL), NaOMe (1 M in MeOH) (183 μL) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h, diluted with MeOH (20 mL), neutralized with acid resin (Amberlite IRA-120, pH = 7), filtered and concentrated. Then, the resulting residue was purified by column chromatography (1:2 \rightarrow 1:1 \rightarrow 2:1 EtOAc-cyclohexane) to give **9**. Yield: 372 mg (83%). R_f 0.36 (2:1 EtOAc-cyclohexane).

5-Amino-5-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-galactofuranose (10):

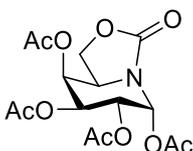
A solution of the azido derivative (**9**) (1.06 g, 4.34 mmol) and 10% Pd/C (426 mg) in MeOH (39 mL) was hydrogenated under an atmospheric pressure of hydrogen. The mixture was stirred for 3 h at rt, filtered through celite and concentrated to give **10** which was used in the next step without further purification. Yield: 903 mg (95%).

5-Amino-5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactofuranose-5,6-(Cyclic carbamate) (11):

To a solution of the amino derivative (**10**) (950 mg, 4.33 mmol) in DCM (64 mL) at 0 °C, *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (7.6 mL, 43.4 mmol) and triphosgene (1.93 g, 6.51 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 30 minutes and then concentrated. The residue was purified by column chromatography (9:1 → 5:1 EtOAc-EtOH) to give the cyclic carbamate (**11**). Yield: 643 mg (61%). R_f 0.46 (20:1 EtOAc-EtOH).

(1*R*)-5*N*,6*O*-oxomethylidene galactonojirimycin (12):

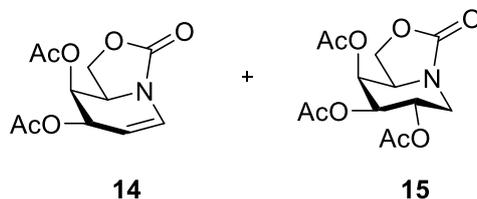
The cyclic carbamate (**11**) (783 mg, 3.19 mmol) was deprotected by treatment with 90% TFA-H₂O (5 mL) at 0 °C and stirred for 2 h. The reaction mixture was concentrated and the residue was coevaporated several times with water and neutralized with NaOH 0.1 N. The resulting mixture was purified by column chromatography (40:10:1 DCM-MeOH-H₂O) to give (**12**). Yield: 534 mg (81%). R_f 0.35 (40:10:1 DCM-MeOH-H₂O).

(1*R*)-1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene galactonojirimycin (13):

To a solution of the iminosugar (**12**) (534 mg, 2.65 mmol) dissolved in pyridine (5.5 mL), Ac₂O (5.5 mL) was added. The reaction was stirred at rt for 24 h, then poured into water/ice and extracted with DCM (20 mL), washed with 1N HCl (2 x 20 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (2 x 20 mL), then dried (MgSO₄) and concentrated. Purification by column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane) afforded the *per*-acetylated sp²-iminosugar (**13**). Yield: 743 mg (76%). R_f 0.50 (2:1 EtOAc-cyclohexane).

7.3 New compounds

Preparation of 3,4-di-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin galactal analogue (14) and 2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (15):



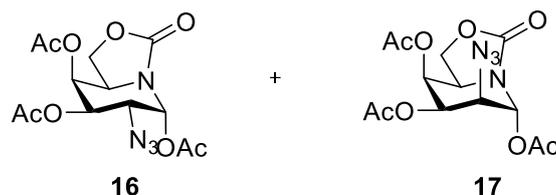
To a solution of 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (**13**) (515 mg, 1.38 mmol) in 10 mL of anhydrous DCM, HBr/AcOH (30%, 0.86 mL) were dropwise added at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 10 min, coevaporated several times with toluene, diluted with DCM (50 mL) and washed with saturated aq NaHCO₃ (2 x 15 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure to yield the glycosyl bromide derivative which was used without further purification in the next step. A mixture of Cp₂TiCl₂ (344 mg, 1.38 mmol) and Mn dust (197 mg, 3.59 mmol) in deoxygenated THF (4mL) was stirred at rt until the red solution turned green. Then, the glycosyl bromide derivative in deoxygenated THF (12 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 3 h (TLC monitoring). The solvent was removed under reduced pressure, diluted with EtOAc (40 mL), quenched with 1N HCl (2 x 15 mL), washed with brine (10 mL), and dried (MgSO₄). The resulting crude was purified by column chromatography (1:3 → 1:2 → 1:1 EtOAc-cyclohexane) to afford the galactal analogue **14** and the 1-deoxy derivative **15**.

3,4-Di-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin galactal analogue (14): Yield: 207 mg (59%). R_f 0.38 (1:1 EtOAc:cyclohexane). [α]_D +57.6 (*c* 1.0 in DCM). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.73 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 8.1 Hz, *J*_{1,3} = 2.4 Hz, H-1), 5.67-5.63 (m, 1 H, H-3), 5.46 (dt, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 3.9 Hz, *J*_{2,4} = 1.8 Hz, H-4), 4.85 (dt, 1 H, *J*_{2,3} = 1.8 Hz, H-2), 4.50 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 8.1 Hz, H-6a), 4.46-4.37 (m, 1 H, H-5), 4.04 (t, 1 H, *J*_{5,6b} = 7.8 Hz, H-6b), 2.15-2.03 (2 s, 6 H, MeCO). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.5-170.2 (CO ester), 153.6 (CO carbamate), 123.9 (C-1), 104.8 (C-2), 66.6 (C-3), 63.3 (C-6), 61.4 (C-4), 53.5 (C-5), 20.7-20.6 (MeCO). ESIMS: *m/z* 277.9 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₁H₁₃NO₆: C, 51.77; H, 5.13; N, 5.49. Found: C, 51.85; H, 5.28; N, 5.35.

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (15): Yield: 167 mg (38%). R_f 0.57 (3:1 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +70.9 (*c* 1.0 in DCM). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.40 (t, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 2.2 Hz, H-4), 5.15 (td, 1 H, *J*_{1b,2} = *J*_{2,3} = 10.3 Hz, *J*_{1a,2} = 6.3 Hz, H-2), 4.98 (dd, 1 H, H-3), 4.34 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 8.7 Hz, H-6a), 4.27 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 13.2 Hz, H-1a), 4.05 (ddd, 1 H, *J*_{5,6b} = 4.0 Hz, H-5), 3.97 (dd, 1 H, H-6b), 2.85 (dd, 1 H, H-1b), 2.17-

1.94 (3 s, 9 H, MeCO). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.4-169.5 (CO ester), 156.5 (CO carbamate), 71.7 (C-3), 68.4 (C-4), 64.8 (C-2), 62.6 (C-6), 54.6 (C-5), 42.2 (C-1), 20.6 (MeCO). ESIMS: m/z 338.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_8$: C, 49.53; H, 5.44; N, 4.44. Found: C, 49.60; H, 5.51; N, 4.28.

Preparation of (1R)-1,3,4-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (16) and (1R)-1,3,4-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenetalonojirimycin (17):

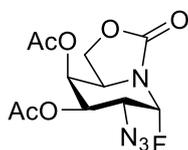


A solution of the galactal analogue **14** (207 mg, 0.81 mmol,) in CH_3CN (14.5 mL) was added, under Ar atmosphere at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, to a mixture of NaN_3 (79 mg, 1.2 mmol) and ceric ammonium nitrate (CAN) (1.34 g, 2.43 mmol). The reaction mixture was stirred at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 h. Then cold Et_2O (30 mL) and H_2O (10 mL) were added. The organic layer was separated and washed with cold H_2O (2 x 10 mL), dried (MgSO_4), filtered and concentrated. The crude 2-azido-2-deoxy-1-hydroxy sp^2 -iminosugar derivatives with *galacto* and *talo* configuration were obtained in a 6:1 ratio (^1H NMR integration). The corresponding crude mixture (237 mg, 0.75 mmol) was acetylated in Ac_2O -Py (1:1, 4 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h, then poured into water/ice (20 mL) and extracted with DCM (2 x 40 mL). The organic layer was washed with 1N HCl (20 mL), saturated aq solution of NaHCO_3 (20 mL), then dried (MgSO_4) and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane) to give **16** and **17**.

(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (16): Yield: 175 mg (65%). R_f 0.51 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +75.1$ (c 1.0 in DCM). IR ν_{max} 2119 (N_3) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.75 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, H-1), 5.47 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.2$ Hz, H-4), 5.23 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3), 4.39 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.25 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-5), 4.02 (dd, 1 H, H-6b), 3.96 (dd, 1 H, H-2), 2.17-2.07 (3 s, 9 H, MeCO). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.1-168.3 (CO ester), 154.4 (CO carbamate), 73.5 (C-1), 69.5 (C-3), 67.6 (C-4), 63.1 (C-6), 56.8 (C-2), 51.4 (C-5), 20.6 (MeCO). ESIMS: m/z 379.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8$: C, 43.82; H, 4.53; N, 15.73. Found: C, 44.07; H, 4.63; N, 15.49.

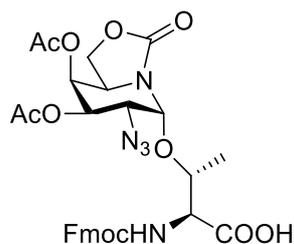
(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenetalonojirimycin (17): Yield: 19.8 mg (8%). R_f 0.32 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+89.2}$ (c 1.1 in DCM). IR ν_{\max} 2114 (N_3) cm^{-1} . 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.35 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.1$ Hz, H-1), 5.43 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-4), 5.33 (t, 1 H, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, H-3), 4.42 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.28 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.9$ Hz, H-5), 4.11 (dd, 1 H, , H-6b), 4.07-4.03 (m, 1 H, H-2), 2.23-2.10 (3 s, 9 H, MeCO). ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 170.6-168.1 (CO ester), 155.0 (CO carbamate), 76.1 (C-1), 68.2 (C-3), 65.4 (C-4), 62.7 (C-6), 57.1 (C-2), 51.8 (C-5), 20.6-20.3 (MeCO). ESIMS: m/z 379.1 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{13}H_{16}N_4O_8$: C, 43.82; H, 4.53; N, 15.73. Found: C, 43.88; H, 4.67; N, 15.64.

(1R)-3,4-Di-O-acetyl-2-azido-1,2-dideoxy-1-fluoro-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (18):



Compound **16** (175 mg, 0.49 mmol) was placed in a polyethylene vessel and cooled at -40 °C. Then poly(hydrogen fluoride)pyridinium complex (70% HF, 0.9 mL) was added. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 90 min (TLC monitoring), diluted with Et_2O (25 mL), washed with saturated aq KF (15 mL) and extracted with Et_2O (3 x 20 mL). The organic layer was washed with saturated $NaHCO_3$ (15 mL), dried ($MgSO_4$) and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane) to afford the glycosyl fluoride derivative **18**. Yield: 125 mg (80%). R_f 0.50 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+63.7}$ (c 1.0 in DCM). IR ν_{\max} 2117 (N_3) cm^{-1} . 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.13 (dd, 1 H, $J_{1,F} = 50.1$ Hz, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), 5.52 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.1$ Hz, H-4), 5.31 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3), 4.46 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.41-4.33 (m, 1 H, H-5), 4.03 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.3$ Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1 H, $J_{2,F} = 24.3$ Hz, H-2), 2.18-2.09 (2 s, 6 H, MeCO). ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 169.9-169.6 (CO ester), 154.3 (CO carbamate), 89.8 (C-1, d, $J_{C1,F} = 208.3$ Hz), 68.9 (C-3), 66.8 (C-4), 63.1 (C-6), 57.0 (C-2, d, $J_{C2,F} = 24.6$ Hz), 50.9 (C-5), 20.5 (MeCO). ^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -164.1 (dd, $^2J_{F,H} = 50.4$ Hz, $^3J_{F,H} = 24.3$ Hz, F). ESIMS: m/z 339.2 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{11}H_{13}FN_4O_6$: C, 41.78; H, 4.14; N, 17.72. Found: C, 41.94; H, 4.22; N, 17.56.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-Di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (19):



To a stirred solution of the corresponding fluoro-derivative **18** (125 mg, 0.4 mmol), $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (26 μL , 0.21 mmol) and Fmoc-Thr-O^tBu (157 mg, 0.40 mmol) in anhydrous DCM (3 mL) at 0 °C, under nitrogen atmosphere, were added. The mixture was stirred for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc \rightarrow 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 185 mg (73%). R_f 0.56 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D^{25} +51.8$ (c 1.3 in MeOH). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.85-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.48 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-4), 5.45 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 5.32 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3), 4.46 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.6$ Hz, H-6a), 4.43-4.34 (m, 4 H, H-5, $\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$, OCH_2Fmoc), 4.30-4.20 (m, 2 H, CH_{Fmoc} , CHCO_2HThr), 4.13 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.9$ Hz, H-6b), 3.84 (dd, 1 H, H-2), 2.16-2.03 (2 s, 6 H, MeCO), 1.25 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, Me_{Thr}). $^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD) δ 174.1 (COOH), 171.8-171.3 (MeCO), 158.9-157.8 (CO), 145.3-120.9 (Fmoc), 82.9 (C-1), 77.4 (OCH_2Fmoc), 70.6 (C-3), 69.5 (C-4), 68.3 ($\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$), 64.9 (C-6), 60.3 (CHCO_2HThr), 59.1 (C-2), 52.4 (C-5), 48.4 (CH_{Fmoc}), 20.6-20.5 (MeCO), 18.9 (Me_{Thr}). ESIMS: m/z 636.1 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_{11}$: C, 56.51; H, 4.90; N, 10.98. Found: C, 56.16; H, 4.70; N, 10.60.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Roulois, D.; Grégoire, M.; Fonteneau, J. F. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1-10.
- 2 Instituto Nacional del cancer. <http://www.cancer.gov/espanol>
- 3 World Health Organization. <http://www.who.int/cancer/en/>
- 4 Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G.-J. *Chem. Commun.* **2009**, 5335-5349.
- 5 Chen, D. S.; Mellman, I. *Immunity*, **2013**, *39*, 1-10.
- 6 Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. *Nature*, **2011**, *480*, 480-489.
- 7 Melero, I.; Gaudernack, G.; Gerritsen, W.; Huber, C.; Parmiani, G.; Scholl, S.; Thatcher, N.; Wagstaff, J.; Zielinski, C.; Faulkner, I.; Mellstedt, H. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2014**, *11*, 509-524.
- 8 Finn, O. J. *Nat. Rev. Immunol.*, **2003**, *3*, 630-41.
- 9 Giarelli, E. *Oncology (Williston Park)* **2007**, *21*, 11.
- 10 Krüger, C.; Greten, T. F.; Korangy, F. *Histol. Histopathol.*, **2007**, *22*, 687-696.
- 11 Zhang, X.-L. *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 1141-1147.
- 12 Avenozza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, M. *An. Quím.*, **2008**, *104*, 23-30.
- 13 Tuccillo, F. M.; De Laurentiis, A.; Palmieri, C.; Fiume, G.; Bonelli, P.; Borrelli, A.; Scala, G. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1-13.
- 14 Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Stanley, P.; Stanley, P.; Hart, G. in *Essentials of glycobiology, 2nd edition*, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2009**, Chapter 6.
- 15 Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A. *Science*, **2001**, *291*, 2370-2376.
- 16 Lakshminarayanan, V.; Thompson, P.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Bradley, J. M.; Pathangey, L. B.; Madsen, C. S.; Cohen, P.A.; Gendler, S. J.; Boons, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 261-266.
- 17 Roy, R.; Shiao, T. C.; Rittenhouse-Olson, K. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 85-108.
- 18 Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Stanley, P.; Stanley, P.; Hart, G. in *Essentials of glycobiology, 2nd edition*, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2009**, Chapter 44.
- 19 Hakomori, S. *Adv. Cancer Res.*, **1989**, *52*, 257-331.
- 20 Ju, T.; Otto, V. I.; Cummings, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2011**, *50*, 1770-1791.

- 21 Martínez-Sáez, N.; Castro-López, J.; Valero-González, J.; Madariaga, D.; Compañón, I.; Somovilla, V. J.; Salvadó, M.; Asensio, J. L.; Avenzoa, A.; Busto, J. H.; Bernardes, G. J.; Peregrina, J. M.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 9830-9834.
- 22 Martínez-Sáez, N.; Supekar, N. T.; Wolfert, M. A.; Bermejo, I. A.; Hurtado Guerrero, R.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Busto, J. H.; Avenzoa, A.; Boons, G. -J.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Sci.*, **2016**, 2294-2301.
- 23 Madariaga, D.; Martínez-Sáez, N.; Somovilla, V. J.; García-García, L.; Berbis, M. Á.; Valero-González, J.; Martín-Santamaría, S.; Hurtado-Guerrero, R.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Avenzoa, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 12616-12627.
- 24 Ardá, A.; Bosco, R.; Sastre, J.; Cañada, F. J.; André, S.; Gabius, H. J.; Richichi, B.; Jiménez-Barbero, J.; Nativi, C. *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 6823-6831.
- 25 Madariaga, D.; Martínez-Sáez, N.; Somovilla, V. J.; Coelho, H.; Valero-González, J.; Castro-López, J.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Busto, J. H.; Avenzoa, A.; Marcelo, F.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F.; Peregrina, J. M. *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *10*, 747-756.
- 26 Sáez, N. M. Tesis doctoral, Universidad de La Rioja, **2013**
- 27 Dokurno, P.; Bates, P. A.; Band, H. A.; Stewart, L. M.; Lally, J. M.; Burchell, J. M.; Taylor-Papadimitriou, J.; Snary, D.; Sternberg, M. J. E.; Freemont, P. S. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *284*, 713-728.
- 28 Topalian, S. L.; Weiner, G. J.; Pardoll, D. M. *J. Clin. Oncol.*, **2011**, *29*, 4828-4836.
- 29 Guo, Z.; Wang, Q. *Opin. Chem. Biol.*, **2009**, *13*, 608-617.
- 30 Dranoff, G. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 11-22.
- 31 Melvold, R. W.; Sticca, R. P. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, **2007**, *16*, 711-735.
- 32 Feng, D.; Shaikh, A. S.; Wang, F. *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*, 850-863.
- 33 Slovin, S. F.; Keding, S. J.; Ragupathi, G. *Immunol. Cell Biol.*, **2005**, *83*, 418-428.
- 34 Nash, R. J.; Kato, A.; Yu, C.-Y.; Fleet, G. W. *Future Med. Chem.*, **2011**, *3*, 1513-1521.
- 35 Díaz Pérez, V. M.; García Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Fuentes, J.; Díaz Arribas, J. C.; Cañada, F. J.; García Fernández, J. M. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 136-143.
- 36 García-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 4271-4275.
- 37 Sanchez-Fernández, E. M.; Rísquez-Cuadro, R.; Aguilar-moncayo, M.; García-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; García-Fernández, J. M. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 4547-4550.

- 38 Sánchez-Fernández, E. M.; Gómez-Pérez, V.; García-Hernández, R.; García Fernández, J. M.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Castanys, S.; Gamarro, F. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 21812-21822.
- 39 Sánchez-Fernández, E. M.; Rísquez-Cuadro, R.; Chasseraud, M.; Ahidouch, A.; Ortiz Mellet, C.; Ouadid-Ahidouch, H.; García Fernández, J. M. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5328-5330.
- 40 Allan, G.; Ouadid-Ahidouch, H.; Sanchez-Fernandez, E. M.; Rísquez-Cuadro, R.; García Fernández, J. M.; Ortiz-Mellet, C.; Ahidouch, A. *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e76411.
- 41 Sánchez-Fernández, E. M.; Gonçalves-Pereira, R.; Rísquez-Cuadro, R.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C. *Carbohydr. Res.*, **2016**, *429*, 113-122.
- 42 Sánchez-Fernández, E. M.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C. *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 5497-5515.
- 43 Pérez, P. D.; García-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2903-2913.
- 44 Spencer, R. P.; Cavallaro, C. L.; Schwartz, J. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 3987-3995.
- 45 Trahanovsky, W. S.; Robbins, M. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 5256-5258.
- 46 Hayashi, M.; Hashimoto, S.; Noyori, R. *Chem. Lett.*, **1984**, 1747-1750