



**Departamento
de Química Orgánica**

**Glicoterapias contra el cáncer, la leishmania y enfermedades de
depósito lisosomal.**

Rita Alexandra Gonçalves Pereira
Sevilla, 2016



**Departamento
de Química Orgánica**

**Glicoterapias contra el cáncer, la leishmania y enfermedades de
depósito lisosomal.**

Memoria presentada por la
Licenciada Rita Alexandra Gonçalves Pereira
para optar al grado de Doctor en Química

Sevilla, 2016

El presente trabajo ha sido realizado por la Lcda. Rita Alexandra Gonçalves Pereira en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de la Dra. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, del Dr. José Manuel García Fernández, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Químicas del CSIC y de la Dra. Elena Matilde Sánchez Fernández, Investigadora postdoctoral Marie Curie (Reintegration Grant) de la Universidad de Sevilla.

Los directores del trabajo:

Fdo.: Dra. Carmen Ortiz Mellet

Fdo.: Dr. José Manuel García Fernández

Fdo.: Dra. Elena Matilde Sánchez Fernández

FINANCIACIÓN

El trabajo desarrollado para la realización de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el grupo de investigación Química Bioorgánica de Carbohidratos (FQM308) con el soporte económico del proyecto concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad titulado *Chaperonas, Inhibidores y Nutracéuticos Basados en Carbohidratos para Aplicaciones Biomédicas: Desórdenes de Depósito Lisosomal, Cáncer y Enfermedad de Crohn* (Referencia SAF2013-44021-R), así como del proyecto europeo *Glycodrugs: new strategies for controlling the activity of glycosidase enzymes and their application in therapies for lysosomal storage diseases and cancer* (Referencia: 333594 GLYCODRUGS).

1. Introducción General.....	3
1.1. Iminoazúcares.....	3
1.2. Glicomiméticos para el tratamiento del cáncer y de la leishmaniasis.....	6
1.3. 2-Acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 : chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Tay-Sachs.....	14
1.4. Miméticos del antígeno Tn.....	19
2. Objetivos.	35
3. Pseudo-glicoconjugados derivados de iminoazúcares sp^2: síntesis y estudios de relaciones de estructura-actividad.....	49
3.1. Síntesis y caracterización estructural de pseudo- <i>N</i> -, <i>S</i> -, <i>O</i> - y <i>C</i> -glicósidos de iminoazúcares sp^2	49
3.2. Evaluación de la actividad como inhibidores de glicosidasas.....	70
3.3. Evaluación in vitro de la actividad antiproliferativa.....	82
3.4. Evaluación in vitro de la actividad leishmanicida.....	87
4. Miméticos de hexoaminas con estructura de iminoazúcares sp^2 como inhibidores/efectores de hexosaminidasas.....	99
4.1. Síntesis de iminoazúcares sp^2 reductores análogos de la <i>N</i> -acetilglucosamina y de la <i>N</i> -acetilgalactosamina.....	99
4.2. Evaluación de la actividad como inhibidores de glicosidasas.....	114

4.3. Evaluación del potencial como chaperonas farmacológicas en enfermedades de depósito lisosomal dependientes de hexosaminidasas.....	116
4.4. Actividad chaperona de los derivados 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 derivados de ONJ, OMJ y OGJ en fibroblastos de pacientes de Tay-Sachs.....	119
5. Pseudo-α-O-glicosilaminoácidos y α-O-glicopéptidos derivados de iminoazúcares sp^2 como miméticos del antígeno tumoral Tn.....	127
5.1. Síntesis y caracterización estructural de iminoazúcares sp^2 con estructura de glicosilaminoácidos y glicopéptidos.....	127
5.2. Evaluación de la actividad como inhibidores de glicosidasas	143
5.3. Estudio de las propiedades conformacionales de los α -O-glicohexapéptidos mediante RMN y dinámica molecular.....	145
5.4. Evaluación de la afinidad de los glicopéptidos frente a lectinas y anticuerpos.....	150
6. Conclusiones.....	161
7. Experimental Part.....	165
7.1. General Methods.....	167
7.2. New Compounds.....	178

A

Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOH	Acido acético
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
AmBisome®	Anfotericina B liposomal
Asp	Aspargato
Arg	Arginina
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i>
ATR	Attenuated Total Reflectance

B

β-GlcNAcasas	β-N-acetilglucosaminidasas
BLI	Bio-Layer Interferometry
BF ₃ .OEt ₂	Trifluoruro de Boro Eterato
Bn	Bencilo
^t Bu	terc-butilo

C

°C	Grados Celsius
¹³ C RMN	Espectroscopia de ¹³ C
CAC	Concentración de Agregación Crítica
CAN	Nitrato de Cerio y Amonio

CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformio deuterado
CI	Combination index
CS	D-(+)-Castanospermina
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
Cp ₂ Ti ^{III} Cl	monocloruro de Titanoceno
Cp ₂ TiCl ₂	Cloruro de Titanoceno
CTL	Células T citotóxicas

D

δ	Desplazamiento químico
Δδ	Variación del desplazamiento químico
ΔG	Energía libre
D ₂ O	Agua deuterada
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de dobletes de dobletes
DAJNAc	2-acetamido-1,2-didesoxi-alonojirimicina
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindolo dihydrochloride
DCM	Diclorometano
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DGJ	1-Desoxigalactonojirimicina
DGJNAc	2-Acetamido-1,2-didesoxi-D-galactonojirimicina
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>N, N</i> -Dimetilformamida
DMJNAc	2-Acetamido-1,2-didesoxi-D-manonojirimicina
DMSO	Dimetilsulfóxido

DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNJ	1-Desoxinojirimicina
DNJNAc	2-acetamido-1,2-didesoxi-D-nojirimicina
DolP	Dolicolfosfato

E

EC 3.2.1.52	β - <i>N</i> -acetil-D-glucosaminidasa
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELLA	Ensayo con lectina ligada a una enzima/Enzyme-Linked Lectin Assay
EM	Espectrometría de masas
Eq.	Equivalente/s
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
ERT	<i>Enzyme Replacement Therapy</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
Et ₂ O	Éter dietílico

F

¹⁹ F RMN	Espectroscopia de Fluor 19
FAB	Bombardeo rápido de átomos
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
FT/IR	Fourier Transform/ Infrared

G

g	gramo
G269S	Mutaciones de pacientes afectados con a forma tardía o adulta de la enfermedad de Tay-Sachs
GAE	Efecto anomérico generalizado
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
Galasa	Galactosidasa
GI ₅₀	<i>growth inhibition 50%</i>
GJ	Galactonojirimicina
Glc	Glucosa
Glcasa	Glucosidasa
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GlcNAc-TV	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa V
GM2	Gangliosidosis G _{M2}

H

¹ H RMN	Espectroscopia de ¹ H
HBTU	<i>2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate</i>
HexA	Hexosaminidasa A o α - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa
HexB	Hexosaminidasa B o β -hexosaminidasa
HMQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear
HPA	<i>Helix pomatia agglutinin</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Experiment</i>
HRMS-ESI	Espectroscopía de RMN y EM de alta resolución en modo electrospray
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

Hz Hertz

I

IC₅₀ Concentración inhibitoria del 50%

iFBS *Inactivated fetal bovine*

IgG Inmunoglobulina G

IgM Inmunoglobulina M

IR Espectroscopía infrarroja

J

J Constante de acoplamiento

K

K_{app} Constante aparente

K_D Constante de afinidad

K_i Constante de inhibición

KLH *keyhole-limpet-hemocyanin*

K_M Constante de Michaelis-Menten

L

LC Leishemianiasis cutánea

Leu Leucina

LSDs	Enfermedades de almacenamiento lisosomal
LDH	Lactate dehydrogenase
LM	Leishemiasis mucocutánea
LV	Leishemiasis visceral

M

m	Multiplete
Man	Manosa
ManNAc	<i>N</i> -acetilmanosamina
<i>Manasa</i>	Manosidasa
MCF-7	Línea celular tumoral no invasiva modelo del carcinoma de mama humano
MCF-10A	Línea celular sana de tejido epitelial de mama humano
<i>mCPBA</i>	Ácido metacloroperbenzoico
MDA-MB-231	Línea celular tumoral invasiva modelo del carcinoma de mama humano
MD-tar	<i>Molecular Dynamics with time-averaging of restraints</i>
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MJ	Manojiramicina
mL	Mililitro
mmol	milimol
MRC-5	Línea celular humana de pulmón/ <i>Human fetal lung fibroblast cell</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5difeniltetrazólico

MUC1	Mucina 1
<i>m/z</i>	Relación masa/carga

N

NaCl	Cloruro de Sodio
NAG	<i>N</i> -acetil glucosamina
NaOH	Hidróxido Sódico
NaOMe	Metóxido sódico
NBO	<i>Natural Bond Orbital</i>
NGT	<i>N</i> -acetilglucosamina-tiazolina
NJ	Nojirimicina
NMR	Resonancia magnética nuclear
NMR/MD-tar	Simulaciones de dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo
NMP	<i>N-Methyl-2-pyrrolidone</i>
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
Novabiochem®	Resina Polimérica Rink Amide MBHA

O

OD	Optical density
OGJ	5 <i>N</i> ,6- <i>O</i> -oxometilidengalactonojirimicina
OGJNAc	2-acetamido-2-desoxi-5 <i>N</i> ,6- <i>O</i> -oxometilidengalactonojirimicina
OMJ	5 <i>N</i> ,6- <i>O</i> -oxometilidenmanonojirimicina
OMS	Organización Mundial de la Salud

ONJ	5 <i>N</i> ,6- <i>O</i> -oxometilidennojirimicina
ONJNAc	2-acetamido-2-desoxi-5 <i>N</i> ,6- <i>O</i> -oxometilidenonnojirimicina
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>

P

P ₃ CS	Tripalmitoil-S-glicerilcistinilserina
Pam3Cys	Tripalmitoilado de cisteína
Pdb	Protein Data Bank
PBS	Tampón de fosfato salino
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline Tween-20</i>
PC	<i>Pharmacological Chaperone</i>
PDTR	Glicopeptidomiméticos de dominio inmunogénico
Phe	Grupo fenilo
pK _a	logaritmo de la constante de disociación ácida
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
Py	Piridina
PYR	Pirimetamina
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>

R

R252L	Mutación de pacientes afectados con la forma temprana o infantil de la enfermedad de Tay-Sachs
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

rt *Room temperature*

S

s Singlete
SBA *Soybean agglutinin lectin*
SD *Standard deviation*
Ser Serina
SM3 Anticuerpo SM3
SPPS *Solid Phase Peptide Synthesis*
SRB *Sulforhodamine B*

T

t Triplete
TACAs *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*
t.a. Temperatura ambiente
TCA 2,2,2-Acido tricloroacetico
TB *Trypan Blue*
TFA Ácido trifluoroacético
Th células T auxiliares (*T-helpers*)
THF Tetrahidrofurano
THP-1 línea celular humana monocítica en leucemia
Thr Treonina
TIS Triisopropilsilano
TLC Cromatografía en capa fina
TLRs *Toll Like Receptors*

TMB	3,3,5,5-tetramethylbenzidine
TS	<i>Transition state</i>
TSD-GS	Forma tardía o adulta de la enfermedad de Tay-Sachs
TSD-RL	Forma temprana o infantil de la enfermedad de Tay-Sachs
TOCSY	Espectroscopía de correlación total
t_R	Tiempo de retención

U

UV/vis	Espectroscopía ultravioleta/visible
--------	-------------------------------------

V

$V_{\text{máx}}$	Velocidad máxima
VVA	<i>Vicia villosa agglutinin</i>
GlcNAc-T V	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa

Relación de Figuras de la Tesis

Capítulo 1

Figura 1.1. Estructuras generales de las diferentes familias de iminoazúcares.

Figura 1.2. Cation oxocarbenio (A) y sal de amonio de iminoazúcar (B).

Figura 1.3. Estructura de los iminoazúcares DNJ y CS.

Figura 1.4. Estructura general de los iminoazúcares sp^2 que muestra los orbitales clave involucrados en el efecto anomérico.

Figura 1.5. Representación esquemática de la biosíntesis de *N*-glicoproteínas con indicación de las etapas en que intervienen las α -glucosidasas y α -manosidasas susceptibles de bloqueo específico con sp^2 -iminoazúcares. DolP: dolicolfosfato.

Figura 1.6. Estructura de los pseudo-*S*- y *C*-octil glicósidos con estructura de iminoazúcar sp^2 bicíclico y gráfico comparativo de los valores de IC_{50} y de mortalidad con respecto a doxorubicina (fármaco de referencia) frente a las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231.

Figura 1.7. Ciclo de vida del parásito *Leishmania*.

Figura 1.8. Mapa mundial donde se representan las zonas endémicas de la LC, LM y LV.

Figura 1.9. Estructura de diferentes fármacos leishmanicidas: el antimonial pentavalente estibogluconato de sodio, el antibiótico anfotericina B y el fosfolípido miltefosina.

Figura 1.10. Prevalencia de las enfermedades de almacenamiento lisosomal.

Figura 1.11. Estructura de los gangliósidos G_{M2} y G_{M3} con indicación de la unidad de GalNAc de cuya hidrólisis es responsable la HexA.

Figura 1.12. Estructura del iminoazúcar natural nagstatina y de la *N*-acetilglucosamina-tiazolina (NGT).

Figura 1.13. Representación de la superficie celular donde se observan las mucinas.

Figura 1.14. Representación de una célula normal frente a una célula tumoral.

Figura 1.15. Secuencia de repetición de MUC1 donde se muestran en distinto color las tres regiones capaces de generar anticuerpos que la constituyen.

Figura 1.16. Representación de la glicosilación de la MUC1 en una célula sana frente a una célula tumoral.

Figura 1.17. Estructuras de los TACAs más relevantes presentes en la MUC1.

Figura 1.18. Estructura del conjugado formado por el antígeno Tn dimérico y el lipopéptido P3CS.

Figura 1.19. Diseño de vacunas con diferentes epítomos de reconocimiento.

Figura 1.20. Vacuna de tres componentes desarrollada por Boons y colaboradores.

Capítulo 3

Figura 3.1. Estructura química de los pseudo *N*-, *S*-, *O*- y *C*-glicósidos preparados en la Tesis.

Figura 3.2. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) de **5**.

Figura 3.3. Determinación del valor de $\text{p}K_a$ de la *gem*-diamina **134** derivada de ONJ. (a) Superposición de los espectros de ^1H RMN de **134** a diferentes valores de pH; (b) Variación del desplazamiento químico de la señal del grupo CH_2NH en función del pH; (c) Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos para todas las señales del espectro que se desplazan significativamente con el pH.

Figura 3.4. Determinación del valor de $\text{p}K_a$ de la *gem*-diamina **135** derivada de OMJ. (a) Superposición de los espectros de ^1H RMN de **135** a diferentes valores de pH; (b) Variación del desplazamiento químico de la señal de CH_2NH con el pH; (c) Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos para todas las señales del espectro que se desplazan significativamente con el pH.

Figura 3.5. Determinación del valor de pK_a de la *gem*-diamina **5** derivada de OGJ. (a) Superposición de los espectros de ^1H RMN de **5** a diferentes valores de pH; (b) Variación del desplazamiento químico de la señal de CH_2NH con el pH; (c) Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos para todas las señales del espectro que se desplazan significativamente con el pH.

Figura 3.6. Mecanismo propuesto para la preparación de pseudoalquil-*S*-glicósidos derivados de iminoazúcares sp^2 .

Figura 3.7. Mecanismo propuesto para la formación de los glicosilsulfóxidos actuando el azufre como nucleófilo frente al ácido mCPBA.

Figura 3.8. Espectros de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de los pseudo glicosilsulfóxidos **23** y **29**.

Figura 3.9. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD , 313 K) de **70**.

Figura 3.10. Espectros de ^{19}F RMN de **71**: (A) desacoplado, (B) acoplado (376 MHz, CDCl_3).

Figura 3.11. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CDCl_3) de **71**.

Figura 3.12. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de K_i (0.26 μM) de la *gem*-diamina **1** frente a α -glucosidasa (levadura).

Figura 3.13. Determinación de la CAC del compuesto **3**. (a) Espectros de excitación de la fluorescencia de la molécula de pireno (λ_{em} 375 nm) en agua en presencia de **3**; (b) Determinación de CAC de **3**.

Figura 3.14. Efecto de la combinación de **23**-miltefosina sobre la viabilidad de formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* en células THP-1 infectadas. Los datos de IC_{50} corresponden a la media de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron utilizando el test *t* Student (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$).

Figura 3.15. Análisis isoblográfico correspondiente a las combinaciones **23**-miltefosina. La línea indica sinergismo, aditividad o antagonismo cuando los

puntos están localizados por debajo, en la línea o por encima de la línea respectivamente. (■) **23** + 0.1 μ M miltefosina, (▲) **23** + 0.2 μ M miltefosina, (●) **23** + 0.3 μ M miltefosina.

Capítulo 4

Figura 4.1. Estructuras de NJNAc, DNJNAc, DGJNAc, DMJNAc y DAJNAc.

Figura 4.2. Esquema retrosintético de preparación de la DAJNAc.

Figura 4.3. Estructura de derivados de DAJNAc con carácter de iminoazúcar sp^2 (R = n-Bu, n-Oct, Ph, Bn).

Figura 4.4. Esquema retrosintético para acceder a los 2-amino y 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 a partir de los precursores ONJ y OGJ.

Figura 4.5. Formación de monocloruro de titanoceno $Cp_2Ti^{III}Cl$ en presencia de Mn.

Figura 4.6. Espectros de 1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, $CDCl_3$) del galactal-derivado **82**.

Figura 4.7. Espectro de IR de la hidroxí-azida **79**.

Figura 4.8. Representación ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) del compuesto **76**.

Figura 4.9. Detalles de la celda unidad de un cristal del compuesto **76**, mostrando los puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares.

Figura 4.10. Representación ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) del compuesto **80**.

Figura 4.11. Espectros de 1H y ^{13}C RMN (300, 75.5 MHz, D_2O) de **95**.

Figura 4.12. Espectros de 1H y ^{13}C RMN (300, 75.5 MHz, D_2O) de **94**.

Figura 4.13. Representación de Dixon para la determinación de K_i ($28 \pm 3 \mu M$) de **90** frente a la β -*N*-acetilglucosaminidasa de placenta humana.

Figura 4.14. Actividad enzimática de la α -*N*-acetilglucosaminidasa y β -hexosaminidasa a pH 5 (izquierda) y pH 7 (derecha) en presencia de concentraciones crecientes del

derivado OGJ **97**.

Figura 4.15. Inhibición de la actividad enzimática de la α -N-acetilglucosaminidasa y la β -hexosaminidasa a pH 5 (izquierda) y pH 7 (derecha) en presencia de concentraciones crecientes del derivado OGJNAc **94**.

Figura 4.16. Influencia de la concentración del derivado OGJ **94** en la actividad de la β -hexosaminidasa lisosomal en condiciones térmicas (48 °C).

Figura 4.17. Perfil de inhibición de los derivados **90**, **92** y **94** frente a la HexA.

Figura 4.18. Efecto chaperona de los derivados **90**, **92** y **94** (0.2-20 μ M) en fibroblastos humanos sanos (a) y de pacientes de Tay-Sachs con las mutaciones G269S (b) y R252L (c). Cada barra representa la media de tres determinaciones.

Capítulo 5

Figura 5.1. Estructura de los pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de ONJ (**98-101**) y 2-acetamido-2-desoxi-ONJ (**105-106**).

Figura 5.2. Reacciones modelo de glicosilación del iminoazúcar sp^2 (I) con metanol. Las energías libre (ΔG) y las interacciones de hiperconjugación ($nN \rightarrow \sigma^*CO$) se expresan en kcal mol⁻¹, y las distancias en Angstrom.

Figura 5.3. Espectros de ¹H y ¹³C RMN (400 MHz, 100.6 MHz, CD₃OD) de **101**.

Figura 5.4. Espectros de ¹H y ¹³C RMN (400 MHz, 100.6 MHz, CD₃OD) de **108**.

Figura 5.5. Estructura de la resina Rink Amide MBHA usada en la SPPS.

Figura 5.6. Estructuras de los pseudoglicopeptidomiméticos (**121-130**) preparados mediante SPPS.

Figura 5.7. Espectros de ¹H RMN (400 MHz, 1:9 D₂O/H₂O) de **127**.

Figura 5.8. Espectro de ¹³C RMN (75.5 MHz, D₂O) del glicopeptidomimético **128**.

Figura 5.9. Superposición de las simulaciones de dinámica molecular del complejo de la β -galactosidasa:**128*** y la estructura cristalina de la lactosa (en azul) con esta galactosidasa.

Figura 5.10. Representación del ángulo χ que define la disposición de la cadena lateral para el α -*O*-glicopéptido **128**.

Figura 5.11. Superposición de las 20 ns MD-tar simulaciones para los α -*O*-glicopéptidos con residuo de treonina **128** (izquierda) o de serina **127** (derecha).

Figura 5.12. Geometría del enlace glicosídico y distribuciones de los ángulos ψ y ϕ para los los glicopéptidos **128** y **127**.

Figura 5.13. Estructura de la lectina SBA y de sus interacciones con glicopéptidos de serina y treonina.

Figura 5.14. Estructura del antígeno natural APDT(α -*O*-GalNAc)RP (**V**).

Figura 5.15. Afinidad de los iminoazúcares sp² α -*O*-glicopéptidos **121**, **122**, **127** y **128** (250 nmol) (expresada en % respecto al péptido natural **V**) hacia la lectina SBA.

Figura 5.16. Superposiciones de las simulaciones del glicopéptido **128** en estado asociado con la lectina SBA y el residuo GalNAc (en azul) de la estructura cristalina del complejo SBA:**V**. Interacciones mediante enlaces de hidrógeno de **128** con los aminoácidos del sitio activo de SBA.

Figura 5.17. Representación esquemática de la técnica de interferometría de bio-capa (BLI).

Figura 5.18. Estructuras empleadas para la cristalización con el anticuerpo SM3 y superposición del esqueleto peptídico de los glicoconjugados y del péptido SAPDTRPAP.

Figura 5.18. Valores de K_D (M) para los iminoazúcares sp²-MUC1 con el anticuerpo scFv-SM3.

Relación de Tablas de la Tesis

Capítulo 1

Tabla 1.1. Clasificación de algunas de las LSDs de mayor prevalencia.

Capítulo 3

Tabla 3.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para las *gem*-diaminas derivadas de ONJ (134, 1, y 2), OMJ (135, 3, y 4) y OGJ (5, 6, y 7).

Tabla 3.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los pseudo-*S*-glicósidos derivados de ONJ (140, 142, y 9), OMJ (144, 11, y 13) y OGJ (15, 17, y 19).

Tabla 3.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los pseudo α -glicosilsulfóxidos (21, 27, 23, 29, 25, 31) derivados de ONJ.

Tabla 3.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para las pseudo α -glicosilsulfonas (57, 59, 61) derivados de ONJ.

Tabla 3.5. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los *O*- y *C*-octilglicósidos derivados de ONJ (148, 152), OMJ (150, 154) y OGJ (72, 74).

Tabla 3.6. Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50}) de los derivados de ONJ.

Tabla 3.7. Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50}) de los derivados de OMJ.

Tabla 3.8. Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50}) de los derivados de OGJ.

Tabla 3.9. Ensayos de sensibilidad y toxicidad en formas promastigotas y amastigotas de *L. donovani* de los iminoazúcares sp² derivados de ONJ.^a

Tabla 3.10. Ensayos de uso combinado de **23**-miltefosina en presencia de amastigotes intracelulares de *L. donovani*.

Tabla 3.11. Ensayos de sensibilidad y toxicidad en formas amastigotas de *L. donovani* de los iminoazúcares sp² derivados de OGJ.^a

Capítulo 4

Tabla 4.1. Ángulos de enlace y ángulos diedros más representativos del compuesto **76**.

Tabla 4.2. Ángulos de enlace y ángulos diedros más representativos del compuesto **80**.

Tabla 4.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) de las acetamidas (**90, 92, 94**) e hidroclouros de amina (**95, 96, 97**).

Tabla 4.4. Comparación de la actividad como inhibidores de N-acetil- β -glucosaminidasas (K_i , μM) para los derivados ONJ (**95, 90**), OMJ (**96, 92**) y OGJ (**97, 94**).

Tabla 4.5. Valores de inhibición IC_{50} (μM) de **90, 92, 94** y pirimetamina frente a la hexosaminidasa A.

Capítulo 5

Tabla 5.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) de los gliconjugados derivados de OGJ (**109, 127, 110, 128**) y de ONJ (**100, 121, 101, 122**).

Relación de Esquemas de la Tesis

Capítulo 3

Esquema 3.1. Síntesis de las *gem*-diaminas derivadas de ONJ (134, 1, 2), OMJ (135, 3, 4) y OGJ (5-7).

Esquema 3.2. Síntesis de los pseudo *S*-glicósidos derivados de ONJ (140, 142, 9), OMJ (144, 11, 13) y OGJ (15, 17, 19).

Esquema 3.3. Síntesis de los pseudo α -glicosilsulfóxidos derivados de ONJ, OMJ y OGJ.

Esquema 3.4. Síntesis de las pseudo α -glicosilsulfonas derivadas de ONJ (57, 59, 61), de OMJ (63, 65, 67) y de OGJ (68-70).

Esquema 3.5. Síntesis de los 1-fluoroderivados de OMJ, ONJ y OGJ y su transformación en pseudo *O*- y *C*-octil glicósidos.

Capítulo 4

Esquema 4.1. Preparación del glical derivado de configuración *gluco* 75 y de configuración *galacto* (82).

Esquema 4.2. Mecanismo para la síntesis de glicales a partir de los correspondientes bromuros de glicosilo.

Esquema 4.3. Preparación de los 1-hidroxi-2-azido-2-desoxi derivados de configuración *gluco* (76), *mano* (79), *galacto* (85) y *talo* (87).

Esquema 4.4. Preparación de los hidrocioruros de 2-amino-2-desoxi- y de 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 derivados de ONJ (95, 90), OMJ (96, 92) y OGJ (97, 94).

Capítulo 5

Esquema 5.1. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de ONJ **98-101**.

Esquema 5.2. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de 2-acetamido-2-desoxi-ONJ (**103-106**).

Esquema 5.3. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de OGJ (**107-110**).

Esquema 5.4. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de 2-acetamido-2-desoxi-OMJ (**114 y 115**).

Esquema 5.5. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de 2-acetamido-2-desoxi-OGJ (**119 y 120**).

Esquema 5.6. Preparación del α -*O*-pseudoglicosilpeptidomimético **122** mediante síntesis en fase sólida.

El trabajo desarrollado en esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

1. *Influence of the configurational pattern of sp^2 -iminosugar pseudo N-, S-, O- and C-glycosides on their glycoside inhibitory and antitumor properties.* Elena M. Sánchez-Fernández, Rita Gonçalves-Pereira, Rocío Rísquez-Cuadro, Gabriela B. Plata, José M. Padrón, José M. García Fernández, Carmen Ortiz Mellet, *Carbohydrate Research*, **2016**, en prensa (doi:10.1016/j.carres.2016.01.006).

Comunicaciones en congresos científicos:

1. Título: *Antitumor activity of new sp^2 -iminosugars: Influence of the configurational pattern and the aglycone nature.* POSTER. 11th International Meeting of the Portuguese Carbohydrate Group – GLUPOR 11 and 6th Iberian Carbohydrate Meeting. Viseu (Portugal), 6-10 Septiembre 2015.
2. Título: *Novel Tn antigen mimics from sp^2 iminosugar α -O-glycopeptides.* COMUNICACIÓN ORAL. 11th International Meeting of the Portuguese Carbohydrate Group – GLUPOR 11 and 6th Iberian Carbohydrate Meeting. Viseu (Portugal), 6-10 Septiembre 2015.
3. 18th European Carbohydrate Symposium , que tuvo lugar en Moscow (Russia) de 2-6 Agosto del 2015, mediante una comunicación en poster titulada *Multifaceted lectin and glycosidase ligands.*
4. 7th Spanish Portuguese Japanese Organic Chemistry Symposium, que tuvo lugar en Sevilla (España), del 23-26 Junio del 2015, mediante una participacion

tipo póster titulada *Aminoacetal-type α -O-glycopeptides: Synthesis and receptor binding properties of tumor-associated Tn antigen mimics.*

5. 10º Encontro Nacional de Química Orgânica/1º Simpósio Luso-Brasileiro de Química Orgânica, que tuvo lugar en Lisboa (Portugal), del 4-6 septiembre de 2013, mediante una participación tipo póster titulada *Synthesis of N-, S-, and C-glycoside 8-epi-castanospermine analogues as glycosidase inhibitors.*

Resumen

RESUMEN

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral titulada *Glicoterapias contra el cáncer, la leishmaniasis y enfermedades de depósito lisosomal*, se ha centrado en el desarrollo de tres objetivos concretos:

1. Síntesis de compuestos susceptibles de aplicación como agentes leishmanicidas y antitumorales.
2. Desarrollo de chaperonas farmacológicas para la enfermedad de Tay-Sachs.
3. Elaboración de miméticos del antígeno Tn que estimulen y/o potencien la respuesta inmune y su aplicación en la inmunoterapia del cáncer.

La flexibilidad del método de síntesis de los iminoazúcares sp² de partida y la variabilidad estructural que presentan, así como la elevada estereoselectividad de la reacción de glicosilación observada en estudios previos del grupo de investigación justifica la síntesis de los compuestos propuestos en estos tres objetivos y proporciona una herramienta única para el desarrollo de los mismos.

En primer lugar se han implementado nuevas estrategias de síntesis que han permitido la preparación de derivados anfífilicos que incorporan sustituyentes pseudoanoméricos de distinta naturaleza con configuración α - sobre iminoazúcares sp² bicíclicos de configuración D-*gluco*, D-*mano* y D-*galacto*, accediendo así a una colección de pseudoglicósidos para el estudio de relaciones estructura-actividad que, a su vez, ha posibilitado en colaboración con los grupos del Dr. F. Gamarro-Conde (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, IPBLN-CSIC, Granada) y del Dr. J. M. Padrón (Universidad de la Laguna), la identificación mediante ensayos in vitro de fármacos leishmanicidas-anticancerosos eficaces frente a formas amastigotas de *L. donovani* y frente a diferentes líneas celulares humanas de tumores sólidos. Los resultados obtenidos en esta línea de actuación han proporcionado las primeras evidencias

de la actividad leishmanicida de los iminoazúcares sp^2 y la posibilidad de usarlos en terapia combinada. Los mejores candidatos resultantes se han seleccionado para el estudio de sus mecanismos de acción.

En relación al segundo objetivo de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la preparación de iminoazúcares sp^2 reductores análogos de la *N*-acetilglucosamina y de la *N*-acetilgalactosamina, que en colaboración con los grupos del Dr. K. Higaki (Universidad de Tottori, Japón) y del Dr. J. A. Sánchez Alcázar (Universidad Pablo de Olavide, Sevilla), nos ha permitido el acceso a nuevos inhibidores específicos de la hexosaminidasa A y a la identificación de nuevos candidatos como chaperonas farmacológicas evaluados en fibroblastos de pacientes afectados de Tay-Sachs, enfermedad lisosomal relacionada con la deficiencia en el funcionamiento de esta enzima originando la acumulación del gangliósido GM₂.

Con respecto al tercer y último objetivo se ha abordado la preparación de miméticos del antígeno natural tumoral Tn (α -*O*-GalNAc-Thr, una de las estructuras más específicas asociadas a tumores) y de α -*O*-glicopeptidomiméticos del dominio inmunogénico de la glicoproteína MUC1 presente en el 90% de los tumores de mama. La elevada estereoselectividad de la reacción de glicosilación nos ha permitido llevar a cabo la síntesis de α -*O*-glicosilaminoácidos con estructura de iminoazúcar sp^2 que se han empleado como "building blocks" para la síntesis de los correspondientes α -*O*-glicopeptidomiméticos que contienen la secuencia prolina-aspartico-treonina-arginina (PDTR) reconocida por distintos anticuerpos del tipo anti-MUC1. Estudios frente a la lectina SBA y el anticuerpo SM3 en colaboración con el grupo del Profesor J. M. Peregrina (Universidad de la Rioja) nos han permitido determinar la capacidad de estos α -*O*-glicopeptidomiméticos de imitar las propiedades de bioreconocimiento del dominio inmunogénico de esta glicoproteína proporcionando en algunos casos valores de afinidad superiores al glicopéptido natural.

1. Introducción General

1.1. Iminoazúcares

Los iminoazúcares son alcaloides polihidroxlados, naturales o sintéticos, que poseen un átomo de nitrógeno ocupando una posición equivalente al oxígeno endocíclico de los monosacáridos.¹ Atendiendo a su estructura se pueden clasificar en siete familias: pirrolidinas, piperidinas, pirrolizidinas, indolizidinas, nortropanos, azepanos y quinolizidinas (Figura 1.1.).

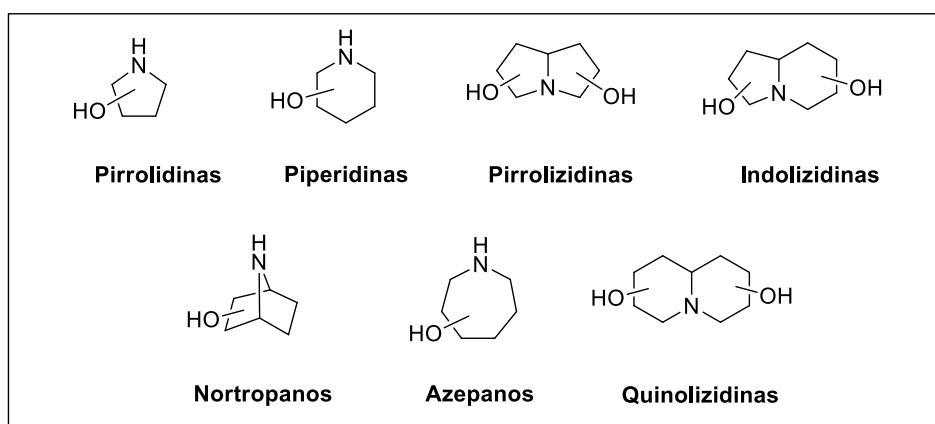


Figura 1.1. Estructuras generales de las diferentes familias de iminoazúcares.

Muchos de estos compuestos se comportan como inhibidores de glicosidasas e intervienen en diferentes procesos biológicos de interés médico.² La actividad como inhibidores de glicosidasas se atribuye a su analogía con la parte glicónica del sustrato natural (glicomiméticos) y a su capacidad de imitar, en forma protonada de sal de amonio, el catión oxocarbenio postulado como intermedio en la coordenada de reacción de la hidrólisis enzimática (Figura 1.2.).



Figura 1.2. Cation oxocarbenio (A) y sal de amonio de iminozúcar (B).

Ejemplos característicos de glicomiméticos de tipo iminozúcar son el derivado de tipo piperidina 1-desoxinojirimicina (DNJ) y el de tipo indolizidina castanospermina (CS; Figura 1.3.). Estos compuestos presentan un perfil de hidroxilación complementario al de la D-glucosa y, consecuentemente, se comportan como inhibidores de glucosidasas. Sin embargo, presentan escasa selectividad anomérica e inhiben simultáneamente α - y β -glucosidasas, lo que supone una limitación importante para sus posibles aplicaciones clínicas.³ Esta falta de selectividad es comprensible considerando que ambos compuestos carecen de una configuración definida en el centro pseudoanomérico. La inestabilidad de la función aminoacetálica impide, de hecho, la preparación de iminoazúcares capaces de imitar apropiadamente la unión glicosídica de los glicósidos naturales.

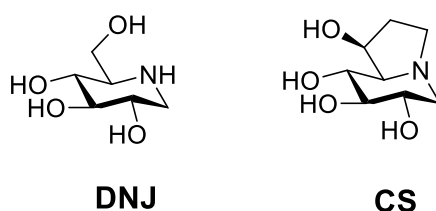


Figura 1.3. Estructura de los iminoazúcares DNJ y CS.

Un requisito imprescindible para el uso terapéutico de los glicomiméticos es el desarrollo de candidatos con una mayor selectividad frente la glicosidasa diana. Con este objetivo, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral ha desarrollado el concepto de iminozúcar sp^2 (Figura 1.4.). Los iminoazúcares sp^2

incorporan un átomo de nitrógeno de tipo pseudoamida (urea, tiourea, carbamato, tiocarbamato, guanidina, etc), en lugar de uno de tipo amina (sp^3) como los iminoazúcares, en la posición análoga al oxígeno endocíclico de los glicopiranosidos.⁴ A diferencia de otras familias de glicomiméticos, los iminoazúcares sp^2 no sólo reproducen el perfil de glicosidación de los monosacáridos naturales, sino que además pueden incorporar una función aminoacetálica químicamente equivalente a la función acetálica de los glicoconjugados.

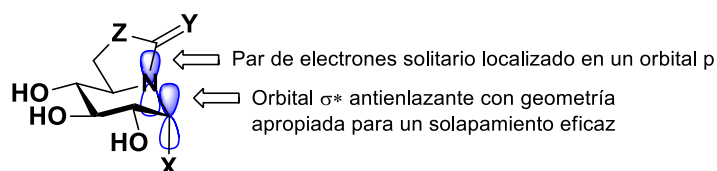


Figura 1.4. Estructura general de los iminoazúcares sp^2 que muestra los orbitales clave involucrados en el efecto anomérico.

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. Por una parte, la presencia del grupo pseudoamida facilita la incorporación de diferentes sustituyentes exocíclicos no glicónicos, lo que puede aprovecharse para generar diversidad molecular y modular así su actividad biológica. Por otra, la posibilidad de acceder a análogos de glicósidos estables abre la puerta a la preparación de miméticos de glicoconjugados que imiten no sólo la parte glicónica, sino también el sustituyente aglicónico del derivado natural. Considerando que el efecto anomérico favorece la disposición axial de este sustituyente, impartiendo estabilidad configuracional y conformacional, esta nueva aproximación está especialmente adaptada, en principio, al desarrollo de inhibidores de α -glicosidasas y, en general, de miméticos de glicoconjugados con configuración

anomérica α . Dado que los glicoconjugados pueden interactuar, además de con glicosidasas, con receptores específicos como lectinas o anticuerpos, el abanico de procesos biológicos susceptibles de responder a derivados de iminoazúcares sp^2 convenientemente diseñados es muy amplio. El potencial para el desarrollo de nuevos glicofármacos es mucho extenso para los iminoazúcares sp^2 que para los iminoazúcares clásicos. Una ventaja adicional es que estos compuestos pueden obtenerse mediante metodologías de síntesis compatibles con la preparación de colecciones de compuestos para estudios de relaciones de estructura/actividad y optimización de propiedades farmacológicas.⁵

En esta Tesis nos hemos propuesto explorar el potencial de los iminoazúcares sp^2 en tres direcciones. Un primer bloque de tareas se ha dirigido a la síntesis de compuestos con estructura de pseudo-*O*-, *N*-, *S*- o *C*-glicósidos como posibles inhibidores de las α -glicosidasas neutras del retículo endoplasmático y a la evaluación de sus propiedades como agentes anticancerosos y leishmanicidas. En una segunda línea de trabajo se ha abordado la preparación de 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Tay-Sachs. Finalmente, un tercer eje de la Tesis se ha dirigido a la preparación de miméticos pseudo- α -*O*-glicopeptídicos análogos del antígeno Tn y a la evaluación de su afinidad por lectinas y anticuerpos que reconocen al antígeno natural, con miras a su posible incorporación en vacunas para la inmunoterapia del cáncer.

1.2. Glicomiméticos para el tratamiento del cáncer y de la leishmaniasis.

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes, siendo los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama los que causan un mayor número anual de muertes. Un conjunto creciente de evidencias sustenta que los glicanos desempeñan un papel esencial en varias etapas

patofisiológicas implicadas en la progresión de tumores, incluyendo la proliferación, la invasión, y la angiogénesis, lo que los convierte en dianas terapéuticas muy atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerosos.⁶ La glicosidación aberrante de glicoproteínas y glicolípidos es una característica molecular típica de transformaciones malignas. Por ejemplo, en cánceres de mama, colon y melanomas se sobreexpresa la *N*-acetilglucosaminiltransferasa V (GlcNAc-T V), que introduce una unidad de *N*-acetilglucosamina como ramificación en oligosacáridos de *N*-glicoproteínas, originando así el precursor de las cadenas de polilactosamina. Estas cadenas polisacarídicas están implicadas en los procesos de migración celular y metástasis. Hay datos que apoyan que la inhibición de esta enzima puede ser útil para el tratamiento de tumores. Sin embargo, la síntesis de inhibidores potentes y permeables a las barreras celulares resulta complicada.

Una estrategia alternativa es bloquear la biosíntesis de las cadenas de polilactosamina en *N*-glicoproteínas en una etapa anterior.⁷ La mayoría de los esfuerzos se han centrado en las glucosidasas I y II del retículo endoplasmático y la manosidasa II del aparato de Golgi (Figura 1.5.). De hecho inhibidores de estas enzimas de tipo iminoazúcar, como la castanospermina y la 1-desoxinonojirimicina para las α -glucosidasas o la 1-desoximanojirimicina y la swansonina para la α -manosidasa II, han demostrado reducir la progresión de tumores, la metástasis y la angiogénesis. Actualmente se piensa que esta actividad resulta de la combinación de varios mecanismos de acción, además de la interferencia ya comentada con la biosíntesis de *N*-glicanos, especialmente la estimulación del sistema inmunológico. Sin embargo, un estudio clínico en fase II para el uso de la swainsonina en el tratamiento de cáncer renal fue desalentador. El problema con estos iminoazúcares es que afectan, además de a la biosíntesis de *N*-glicanos, a la degradación de sustratos en los lisosomas, por lo que pueden presentar muchos efectos secundarios. El reto que se plantea es diseñar compuestos capaces de discriminar entre las enzimas del retículo endoplasmático o de Golgi y las enzimas lisosomales.

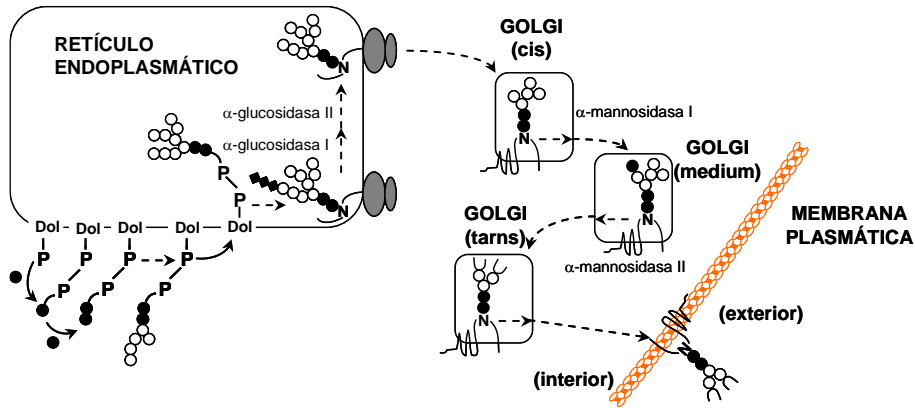


Figura 1.5. Representación esquemática de la biosíntesis de *N*-glicoproteínas con indicación de las etapas en que intervienen las α -glucosidasas y α -mannosidasas susceptibles de bloqueo específico con iminoazúcares sp^2 . DolP: dolicolfosfato.

Las enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular en células tumorales, un evento que tiene lugar en varios estadios del proceso metastático, se han identificado también como dianas de algunos iminoazúcares. Ejemplos de algunas de estas glicosidasas son la heparanasa,⁸ la heparánulfato 2-*O*-sulfotransferasa,⁹ las metaloproteinasas¹⁰ y algunas hexosaminidasas como la β -*N*-acetilglucosaminidasa o la α -*N*-acetilgalactosaminidasa.¹¹ Los inhibidores de estas enzimas han demostrado un efecto anticanceroso significativo.¹²

Se ha sugerido que la enzima fucosidasa también participa en la degradación de la matriz celular subendotelial en el carcinoma humano invasivo. Consecuentemente, determinados patrones de fucosilación están asociados a procesos metastáticos. Iminoazúcares que inhiben la fucosidasa y la fucosiltransferasa tienen así un fuerte potencial para inhibir la metástasis de cánceres. En este sentido, el grupo de P. Clapés ha publicado recientemente que derivados *N*-alquilados del 2,5-didesoxi-2,5-imino-L-fucitol y de la D-fagomina son capaces de inducir citotoxicidad en varias líneas celulares de cáncer humano.¹³

Trabajos previos a esta Tesis mostraron que miméticos de α -glicósidos con estructura de iminoazúcares sp^2 pseudo-*N*-, *S*- o *C*-glicósido tienen actividad antitumoral. Por ejemplo, los pseudo-*S*- y *C*-octilglicósidos de la Figura 1.6. presentaron actividad antiproliferativa en cultivos celulares humanos siendo capaces de detener el ciclo celular y de inducir apoptosis en líneas de cáncer de mama tanto invasivas como no invasivas (MCF-7 y MDA-MB-231) sin afectar a células normales (MCF-10A).¹⁴

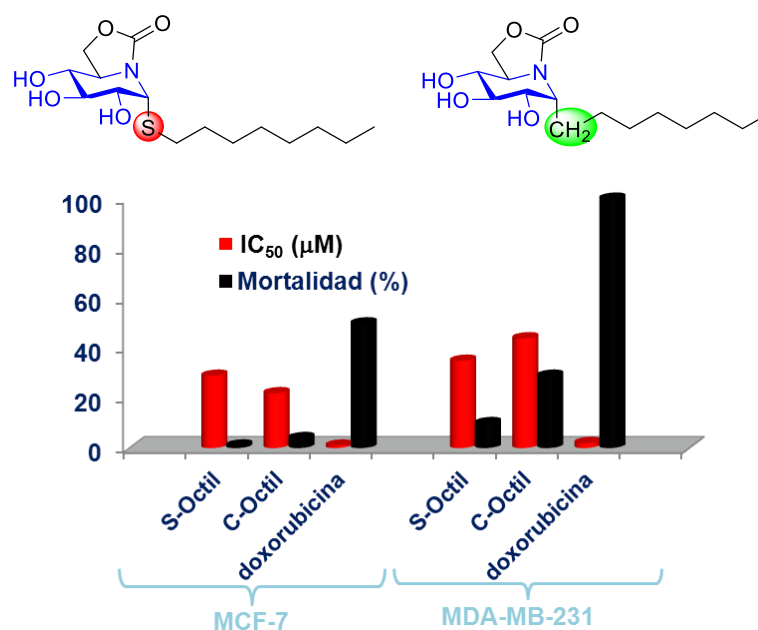


Figura 1.6. Estructura de los pseudo-*S*- y *C*-octil glicósidos con estructura de iminoazúcar sp^2 bicíclico y gráfico comparativo de los valores de IC_{50} y de mortalidad con respecto a doxorubicina (fármaco de referencia) frente a las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231.

Los derivados anteriores se seleccionaron tras comprobar que se comportaban como inhibidores potentes de la α -glucosidasa neutra del retículo endoplasmático de levadura, avanzándose la hipótesis de que podrían inhibir las glicosidasas neutras del retículo en humanos y modular la biosíntesis de *N*-glicoproteínas. Sin embargo, no ha podido confirmarse que las glucosidasas neutras sean realmente su diana primaria. En

este sentido, nos propusimos ampliar el rango de estructuras de análogos α -glicosídicos disponibles, establecer si existe realmente una correlación entre propiedades de inhibición de glicosidasas y propiedades antitumorales, identificar las características estructurales óptimas para la actividad anticancerígena y avanzar en el conocimiento de posibles rutas de señalización de cáncer en las que estos compuestos puedan interferir.

La actividad antiapoptótica está en muchos casos relacionada con la actividad antiparasitaria; compuestos que presentan actividad antiparasitaria, frecuentemente activan también rutas apoptóticas en células tumorales.¹⁵ Además, los parásitos y las células tumorales comparten similitudes bioquímicas que afectan al metabolismo del ADN y de las poliaminas, a las enzimas implicadas en el catabolismo de la glucosa así como a la ruta de las quinasas. Es más, el crecimiento de parásitos y de células tumorales muestran rasgos comunes relacionados con la capacidad que presentan frente a la rápida división celular así como el desarrollo de estrategias de defensa y de evasión del sistema inmune. Por ello, en esta Tesis Doctoral hemos extendido la estrategia basada en la síntesis estereoselectiva de derivados anfifílicos al desarrollo de nuevos fármacos con actividad antiprotozoaria, en paralelo a la evaluación de su actividad antitumoral. En concreto, nos hemos centrado en la identificación de nuevos compuestos con actividad frente a la leishmaniasis.

La leishmaniasis, segunda enfermedad parasitaria más relevante después de la malaria, es un grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*.¹⁶ Estos parásitos presentan un ciclo de vida con dos formas diferentes, la forma promastigota extracelular que es la forma infectiva y se desarrolla en el intestino de las moscas hembra, y, la forma amastigota intracelular que se desarrolla en el interior de las células del huésped (Figura 1.7.). Actualmente se estima que 12 millones de personas están infectadas a nivel mundial y 350 millones están en riesgo de contraer la enfermedad, provocando alrededor de 40 mil muertes al año.¹⁷ Sin embargo, y a pesar de estos datos tan devastadores, es una de las enfermedades más olvidadas y descuidadas. En muchas partes de España la leishmaniasis canina es endémica, siendo los perros los principales

reservorios de estos parásitos para el hombre. El calentamiento global, entre otros factores, ha provocado que el porcentaje de incidencia de leishmaniasis se dispare a una velocidad alarmante, causando un aumento de casos en zonas donde prevalece y su aparición en áreas donde no se había presentado antes, colocándose a la cabeza de las enfermedades emergentes.

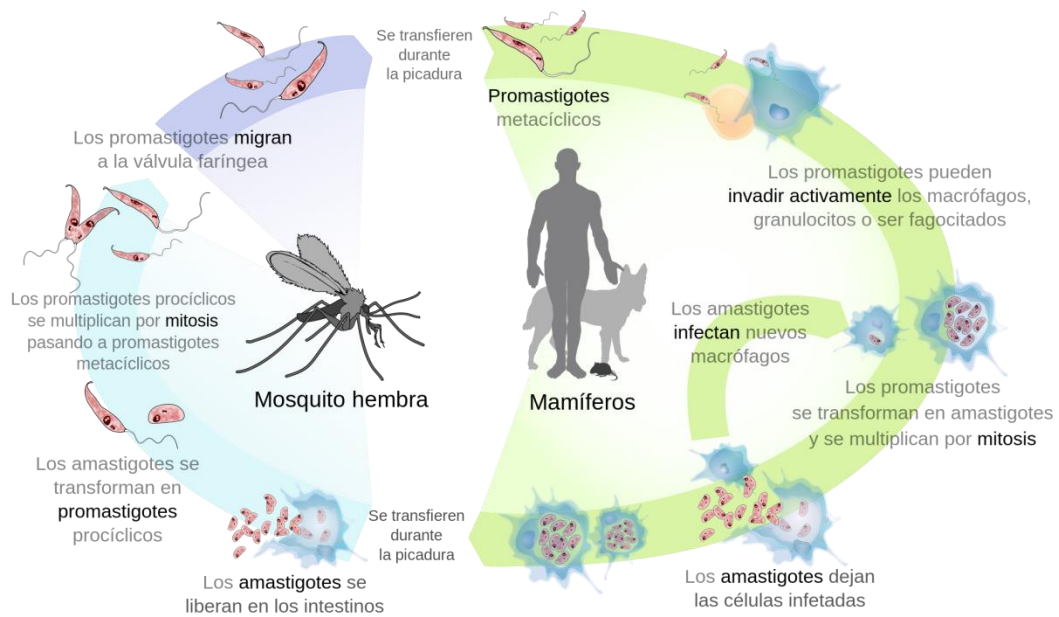


Figura 1.7. Ciclo de vida del parásito *Leishmania*.

Dependiendo de la especie y del estado inmunológico del huésped, la enfermedad presenta diferentes formas clínicas relevantes: leishmaniasis cutánea (LC), mucocutánea (LM) y visceral (LV), siendo ésta última mortal si no se trata. Aunque la leishmaniasis visceral afecta a más de 65 países en todo el mundo, el 90% de los casos se presenta en India, Nepal, Bangladesh, Sudán, Brasil y Etiopía (Figura 1.8.).¹⁸

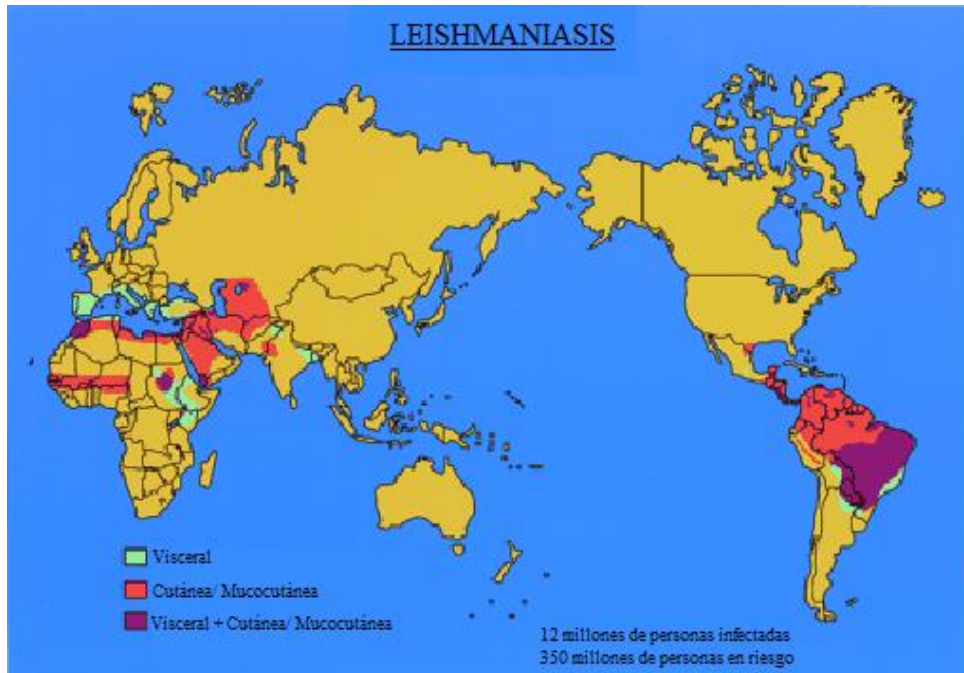


Figura 1.8. Mapa mundial donde se representan las zonas endémicas de la LC, LM y LV.

El tratamiento de la enfermedad es complicado y la ausencia de vacunas efectivas para prevenirla hace de la quimioterapia la única herramienta de lucha frente a la misma.

Entre los fármacos más usados se encuentran los antimoniales pentavalentes como el estibogluconato de sodio (Figura 1.9.) que viene usándose por vía parenteral en países donde no se han desarrollado resistencias.¹⁹ Sin embargo, el tratamiento de larga duración provoca acumulación en hígado y bazo dando lugar a arritmias, pancreatitis y otros efectos adversos.²⁰ El antibiótico poliénico anfotericina B (Figura 1.9.), con una excelente actividad leishmanicida, es uno de los fármacos más prometedores, pero da lugar a diferentes efectos indeseados que pueden inducir muerte celular por apoptosis.²¹ Se han realizado esfuerzos para minimizarlos modificando la formulación clínica como, por ejemplo, la anfotericina B liposomal (AmBisome®). La miltefosina (Figura 1.9.), una alquilfosfolina desarrollada inicialmente como anticanceroso, está proporcionando

resultados muy favorables frente a la leishmaniasis visceral en India²² y África.²³ El tratamiento oral con miltefosina es generalmente bien tolerado, salvo efectos gastrointestinales no deseados, pero es potencialmente teratogénico y, en general, la quimioresistencia adquirida del parásito ha ido disminuyendo la eficacia de la medicación convencional,²⁴ por lo que el desarrollo de fármacos nuevos y eficaces se ha convertido en una prioridad.

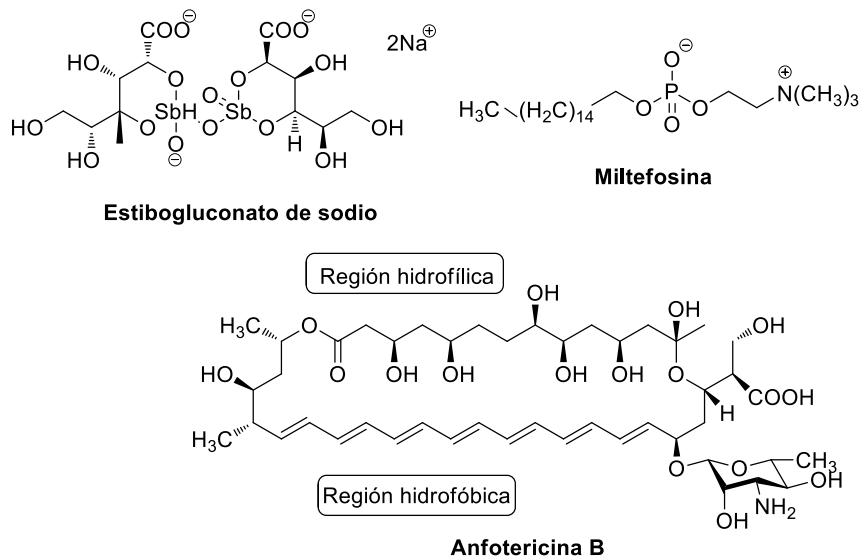


Figura 1.9. Estructura de diferentes fármacos leishmanicidas: el antimonial pentavalente estibogluconato de sodio, el antibiótico anfotericina B y el fosfolípido miltefosina.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de terapias combinadas utilizando fármacos de distinta naturaleza para frenar esa resistencia.²⁵ La combinación de fármacos puede acortar la duración del tratamiento, reducir la dosis requerida y por consiguiente los efectos tóxicos y el coste de los mismos. Además, la terapia combinada prolonga la vida efectiva de los medicamentos al reducir la

probabilidad de adquirir resistencia.²⁶ Estos resultados apoyan la necesidad de identificar nuevas moléculas activas frente a la leishmaniasis que puedan ampliar las opciones de formulación multifármaco. Para ello es fundamental localizar dianas farmacológicas y enzimáticas que afecten a las rutas metabólicas esenciales tanto del parásito como de los mamíferos.

1.3. 2-Acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp²: chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Tay-Sachs.

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (*Lysosomal Storage Disorders*, LSDs) son un grupo de errores innatos del metabolismo que afectan al correcto funcionamiento de alguna de las enzimas lisosomales. En 1881 se describió la primera LSD, la enfermedad de Tay Sachs,²⁷ y en la actualidad se han caracterizado más de 50 desórdenes diferentes de este tipo (Figura 1.10.).

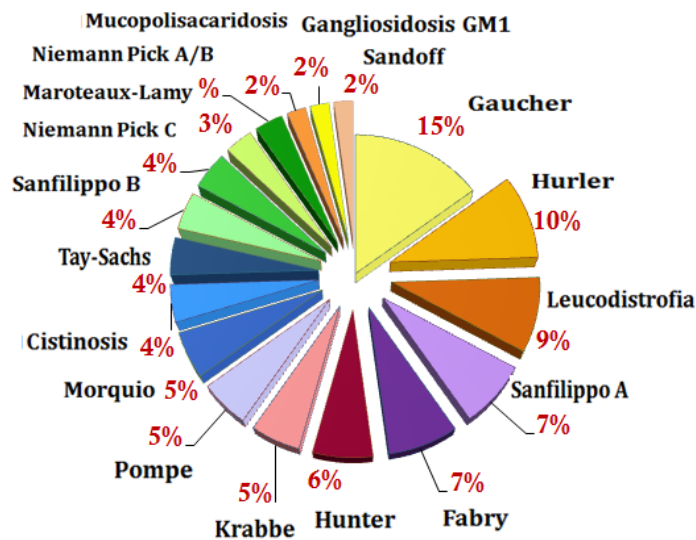


Figura 1.10. Prevalencia de las enfermedades de almacenamiento lisosomal.

Una deficiencia parcial o completa de la actividad de la enzima lisosomal, consecuencia de un defecto de plegamiento, origina la acumulación progresiva de los correspondientes sustratos en los distintos órganos y tejidos causando diversas manifestaciones clínicas, muchas de ellas de carácter progresivo e irreversible incluyendo disfunciones neurológicas (Tabla 1.1.). Aunque cada una de las LSDs de manera individual tiene baja frecuencia, como grupo presentan una incidencia estimada de 1 en 1.500 a 7.000 nacidos vivos.²⁸

Tabla 1.1. Clasificación de algunas de las LSDs de mayor prevalencia.²⁹

DESORDEN	DEFICIENCIA ENZIMÁTICA	MATERIAL ACUMULADO
Depósito de lípidos (esfingolipidosis)		
Fabry	α -Galactosidasa A	Globotriaosilceramida
Gaucher	β -Glucosidasa ácida	Glucosilceramida
Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Gangliosidosis GM ₁	β -Galactosidasa	Gangliósido GM ₁
Enfermedad de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa A y B	Gangliósido GM ₂

En esta Tesis nos centraremos principalmente en el estudio de las enfermedades lisosomales relacionadas con deficiencias en el funcionamiento de las hexosaminidasas, más concretamente de la hexosaminidasa A, que originan la acumulación del gangliósido GM₂ dando lugar a la enfermedad de Tay-Sachs.

Las hexosaminidasas pertenecen a la familia de las glicosilhidrolasas (EC 3.2.1.52) y se comportan como exo-enzimas que catalizan la hidrólisis de unidades de β -D-GlcNAc y β -D-GalNAc en oligosacáridos y glicoconjugados que las contienen, desempeñando un papel clave en numerosos procesos biológicos.³⁰ Las deficiencias de su funcionamiento

en humanos se relacionan con trastornos severos como la osteoartritis,³¹ alergia,³² o las enfermedades de Alzheimer,³³ Sandhoff, Tay-Sachs, y Schindler-Kanzaki.³⁴ En los mamíferos hay varios tipos diferentes de β -N-acetilhexosaminidasas, con diferentes estructuras y funciones biológicas: las HexA y HexB lisosomales y una O-GlcNacasa citoplasmática. Recientemente, Guttering ha descrito otra hexosaminidasa, la HexD, que emplea como sustrato los glicósidos de la N-acetilgalactosamina.³⁵

La O-GlcNacasa es una enzima que presenta una especificidad estricta hacia la N-acetilglucosamina, revertiendo el papel de la glucosaminiltransferasa. El empleo de inhibidores específicos de esta enzima permite ralentizar el progreso de la enfermedad de Alzheimer, asociada con una hiperfosforilación patológica de la proteína tau.³⁶ Por su parte, las β -N-acetilhexosaminidasas lisosomales son enzimas diméricas de la familia GH20 compuestas por dos unidades, α y β , codificadas por los genes HEXA y HEXB y que muestran una secuencia de aminoácidos idéntica en un 60%. En el retículo endoplasmático, el procesado de estas subunidades origina tres isoformas: HexA ($\alpha\beta$), HexB ($\beta\beta$) y HexS ($\alpha\alpha$), capaces de hidrolizar β -GlcNAc y β -GalNAc. Sin embargo, sólo la subunidad α de la HexA participa en el metabolismo del gangliósido GM₂ y, a diferencia de la HexB, también hidroliza unidades sulfatadas de GlcNAc. Mutaciones en los genes HEXA y HEXB son responsables de enfermedades lisosomales severas, consecuencia del acúmulo de los glicolípidos no metabolizados, que se conocen como enfermedad de Tay-Sachs y Sandhoff, respectivamente.³⁷

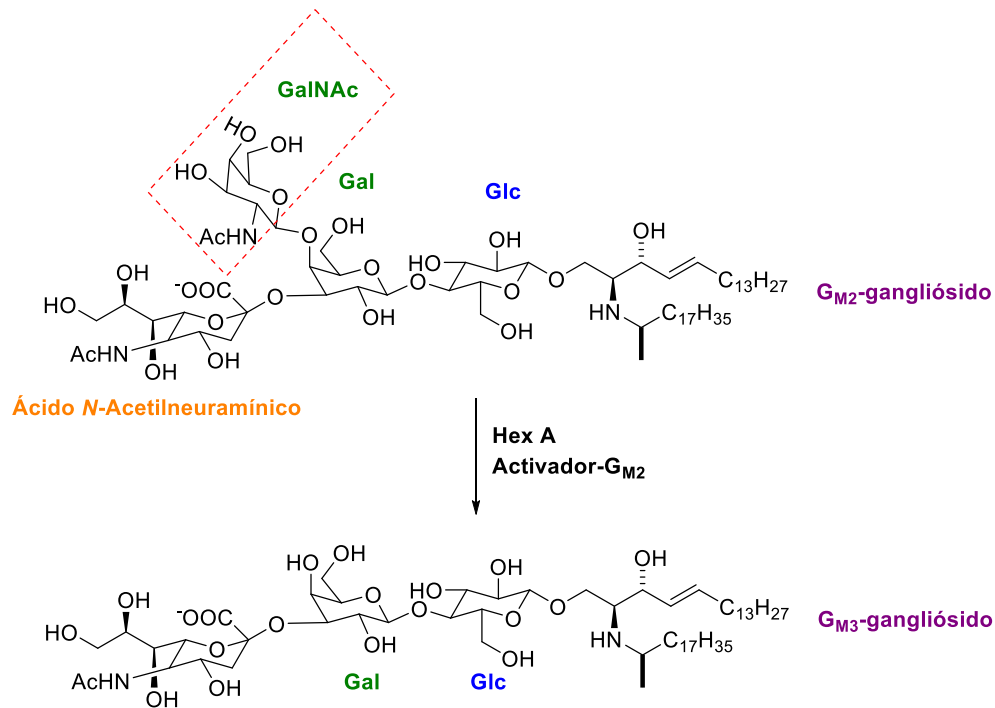


Figura 1.11. Estructura de los gangliósidos G_{M2} y G_{M3} con indicación de la unidad de GalNAc de cuya hidrólisis es responsable la HexA.

Algunas de las mutaciones en el origen de estas enfermedades dan lugar a enzimas que presentan defectos de plegamiento y que, aun siendo funcionales, son eliminadas por el sistema de control de calidad del retículo endoplasmático y no alcanzan el lisosoma. Una de las estrategias terapéuticas en estudio consiste en el empleo de chaperonas farmacológicas capaces de rescatar la enzima endógena mutada y restablecer el tráfico al lisosoma.³⁸ Compuestos que se unen al sitio activo y que, por tanto, se comportan como inhibidores competitivos de la enzima nativa pueden desempeñar esta función. Entre los ejemplos descritos están la nagstatina, un inhibidor potente de β -hexosaminidasa ($K_i = 4.0$ nM frente a la β -hexosaminidasa de hígado de buey), y la *N*-acetilglucosamina-tiazolina

(NGT) (Figura 1.12.). Ambas moléculas actúan como chaperonas de HexA con mutaciones asociadas a la enfermedad de Tay-Sachs.³⁹

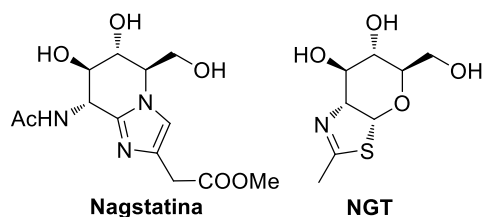


Figura 1.12. Estructura del iminoazúcar natural nagstatina y de la N-acetilglucosamina-tiazolina (NGT).

En 2007, como resultado de la evaluación de una colección de 1040 moléculas pequeñas aprobadas por la FDA de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos, se identificó un inhibidor de tipo no glicomimético con propiedades prometedoras como chaperona farmacológica para el tratamiento de la enfermedad de Tay-Sachs, la pirimetamina (PYR).⁴⁰ PYR se comportó como un inhibidor competitivo de la HEXA, con una K_i de 13 μM a pH 4.5 y con IC_{50} de tan sólo 2 μM a pH 6.5, lo que sugiere que se uniría más fuertemente a la enzima en el retículo endoplasmático que en el lisosoma. De hecho, PYR se mostró como una chaperona eficaz en ensayos con fibroblastos de enfermos de las formas juvenil y crónica de la enfermedad de Tay-Sachs. Sin embargo, los resultados de un estudio piloto con pacientes no permitieron poner de manifiesto beneficios médicamente relevantes.⁴¹

Es necesario por tanto desarrollar candidatos mejores para su posible aplicación como chaperonas farmacológicas. Dada su analogía con la parte glicónica del sustrato natural, los glicomiméticos con estructura de 2-acetamido-1,2-dideoxiiminoazúcares han despertado también gran interés en los últimos años para su posible aplicación en patologías relacionadas con la disfunción de hexosaminidasas.⁴² Las ventajas ya comentadas que presentan los iminoazúcares sp^2 en relación con los iminoazúcares

clásicos, nos han llevado a desarrollar metodología que nos permitan a acceder a derivados que incorporan un grupo acetamido en C-2 y a evaluar su actividad como chaperonas en fibroblastos de enfermos de Tay-Sachs.

1.4. Miméticos del antígeno Tn.

Las opciones actuales para el tratamiento del cáncer son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Estos tratamientos son eficaces en muchos casos, pero todavía presentan inconvenientes significativos. Por ejemplo, la falta de selectividad de la quimioterapia y la radioterapia contra las células tumorales conduce a efectos secundarios graves para el paciente. Aunque en los últimos años se han realizado avances notables en su tratamiento, sobre todo mediante el uso combinado de la cirugía con quimioterapia o con radioterapia, la búsqueda de nuevas terapias más selectivas y con menos efectos secundarios sigue siendo una prioridad en salud pública.

El desarrollo del cáncer está asociado a perturbaciones en el ciclo celular que conducen a una proliferación ilimitada y a una extraordinaria resistencia a la apoptosis de las células cancerosas. Estos cambios están acompañados de la sobreexpresión de numerosas proteínas, tanto enzimas como receptores, que en muchos casos presentan modificaciones postraduccionales aberrantes, por lo que constituyen dianas potenciales para el sistema inmune. Entre estas se encuentran las mucinas, una familia de *O*-glicoproteínas de alto peso molecular producidas por las células de los tejidos epiteliales que han despertado un interés creciente en relación con el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer (Figura 1.13.).

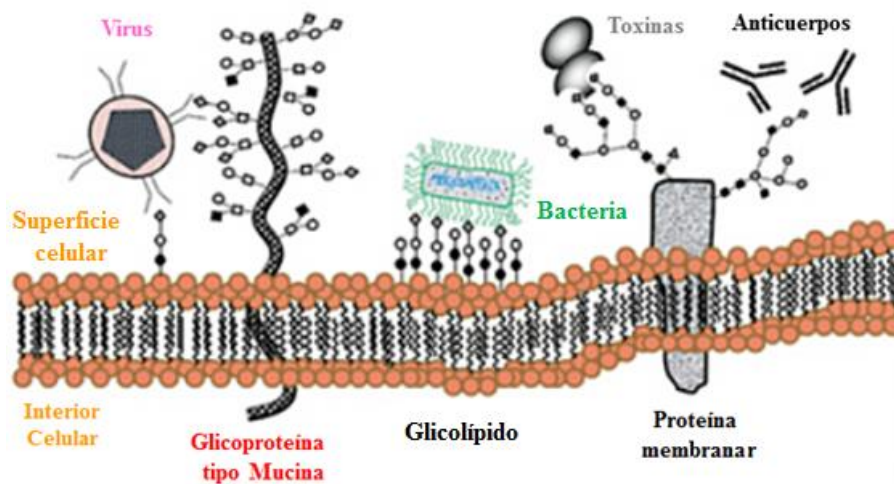


Figura 1.13. Representación de la superficie celular donde se observan las mucinas.

Las mucinas están involucradas en la protección celular frente a bacterias y virus y participan en procesos de inflamación y de respuesta inmunológica. En las células tumorales, las mucinas presentan cambios en la glicosilación como consecuencia del mal funcionamiento de algunas glicosiltransferasas, exhibiendo glicanos más cortos y menos complejos de lo normal. Esto hace que algunos fragmentos glicopeptídicos, que en células normales quedarían enmascarados, en células tumorales queden expuestos en la superficie celular (Figura 1.14.) pudiendo ser reconocidos por el sistema inmune y elicitar la formación de anticuerpos. Los antígenos asociados al cáncer en las mucinas constituyen, por tanto, una característica diferenciadora entre células cancerosas y sanas que puede ser aprovechada para conseguir nuevas terapias dirigidas específicamente contra las primeras.

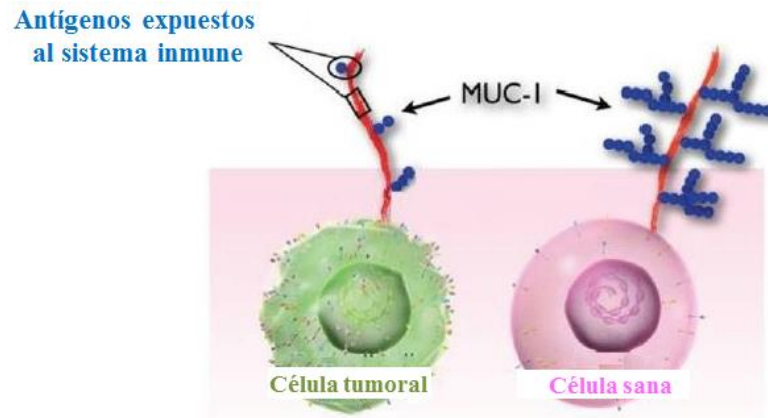


Figura 1.14. Representación de una célula normal frente a una célula tumoral.

Una de las mucinas más estudiadas en relación con el diseño de vacunas para tratar el cáncer es la MUC1. Esta *O*-glicoproteína se encuentra presente en el 90% de los tumores de mama, además de estar asociada a otros tipos de cáncer como ovario, pulmón, colon y páncreas. La MUC1, es una glicoproteína transmembranar expresada en la superficie apical de células epiteliales. Está constituida por un dominio extracelular formado por la repetición de 25 a 125 secuencias de 20 aminoácidos, histidina-glicina-valina-treonina-serina-alanina-prolina-aspartico-treonina-arginina-glicina-serina-treonina-alanina-prolina-prolina-alanina (HGVTSA PDTRPAGSTAPPA) (Figura 1.15.). Este dominio presenta 5 puntos de *O*-glicosilación (3 treoninas y 2 serinas). Además presenta 3 epítomos de reconocimiento frente a anticuerpos monoclonales, la región GVTSA, PDTRP y GSTAP.⁴³

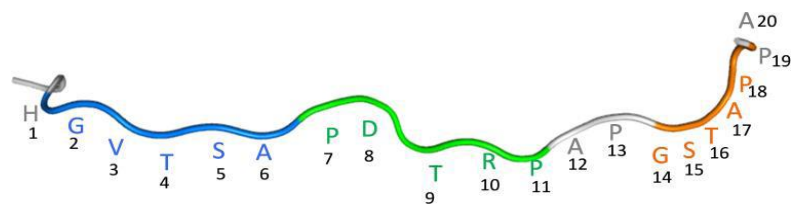


Figura 1.15. Secuencia de repetición de MUC1 donde se muestran en distinto color las tres regiones capaces de generar anticuerpos que la constituyen.

De las tres regiones de reconocimiento que presenta la mucina MUC1 destacamos la secuencia **PDTR** (prolina-aspartico-treonina-arginina), reconocida por distintos anticuerpos del tipo anti-MUC1. Una gran variedad de anticuerpos monoclonales anti-MUC1 reconocen esta secuencia y se unen específicamente a células tumorales. En los últimos años se ha tratado de conocer en profundidad el efecto que produce la incorporación de carbohidratos sobre la estructura de dichas moléculas y se ha observado que este reconocimiento generalmente se ve favorecido cuando la treonina se encuentra glicosilada con el carbohidrato *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).⁴⁴

En esta Tesis nos proponemos explotar la oportunidad que ofrece la glicosidación aberrante de las mucinas en las células tumorales para el desarrollo de vacunas aplicables en inmunoterapia contra el cáncer. La función de una vacuna consiste en mostrar un antígeno al sistema inmune, de tal forma que éste lo reconozca como extraño y provoque una respuesta inmunitaria hacia todas aquellas células que lo expresen. La identificación de los antígenos tumorales, que en el caso de las mucinas tienen carácter glicopeptídico, es por tanto fundamental para el desarrollo de posibles vacunas.

En las células cancerosas la MUC1 se encuentra parcialmente glicosilada y con glicanos más cortos y menos complejos de lo normal (Figura 1.16.). Esto determina que algunos antígenos que en las células normales están enmascarados por la presencia de hidratos de carbono más ramificados quedan expuestos en la superficie de las células tumorales resultando en la formación de nuevos antígenos de carbohidratos asociados al tumor (*Tumour Associated Carbohydrate Antigens*, TACAs)⁴⁵ (Figura 1.17.). Tales TACAs incluyen el antígeno Tn, el antígeno TF y el antígeno sTn, que surge de la sobreexpresión de las sialiltransferasas.

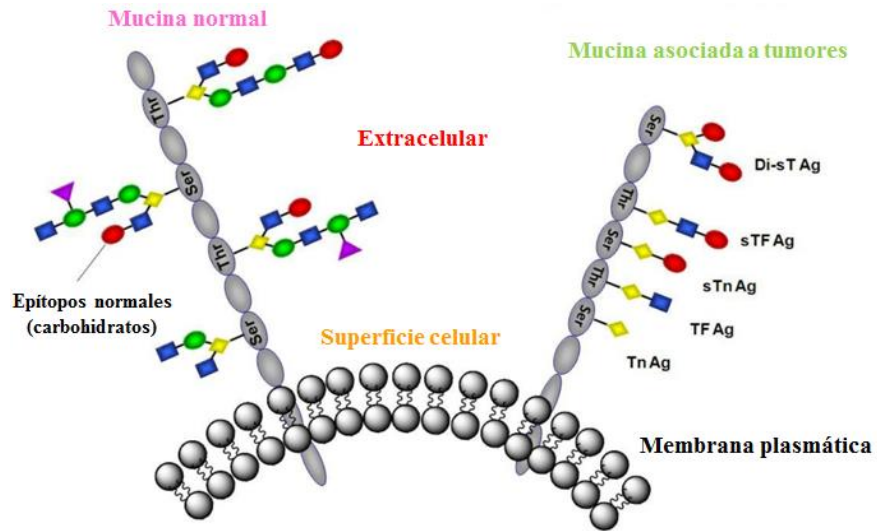


Figura 1.16. Representación de la glicosilación de la MUC1 en una célula sana frente a una célula tumoral.

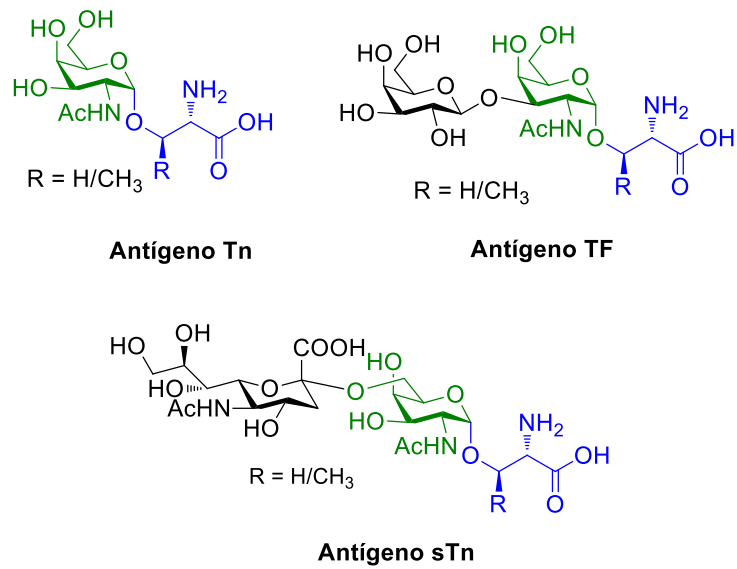


Figura 1.17. Estructuras de los TACAs más relevantes presentes en la MUC1.

Los primeros ejemplos de vacunas sintéticas basadas en carbohidratos antigénicos asociados a tumores se basaron en un sistema formado por un conjugado dimérico sintético del antígeno Tn y un lipopéptido (tripalmitoil-S-glicerilcistinilserina, P₃CS), unidos mediante un espaciador sencillo.⁴⁶ Este sistema fue capaz de producir una respuesta inmune importante en ratones, generando altos niveles de IgM y niveles medibles de IgG, sin necesidad de incorporar una macromolécula transportadora o un coadyuvante (Figura 1.18.).

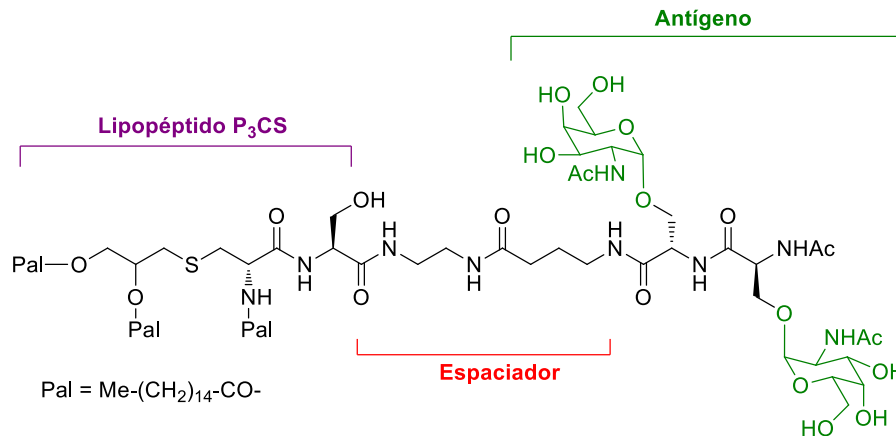


Figura 1.18. Estructura del conjugado formado por el antígeno Tn dimérico y el lipopéptido P₃CS.

Livingston y Danishefsky propusieron la proteína KLH (keyhole-limpet-hemocyanin) como el portador de TACAs más eficaz,⁴⁷ lo que condujo a nuevos diseños de vacunas con diferentes epítomos de reconocimiento como los que se muestran en la Figura 1.19.

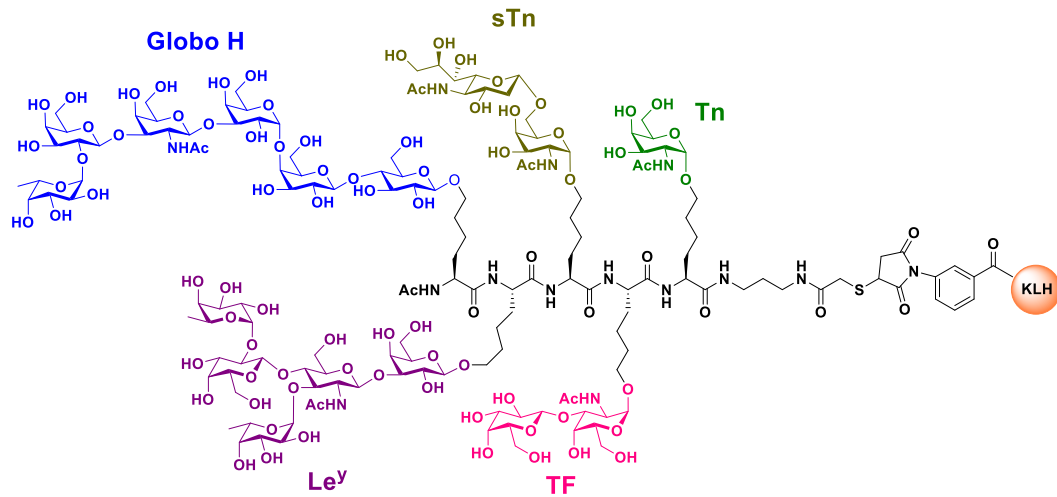


Figura 1.19. Diseño de vacunas con diferentes epítomos de reconocimiento.

También se ha demostrado que el espaciador utilizado para unir los TACAs a proteínas puede tener un impacto importante en las propiedades inmunológicas de los conjugados resultantes. Así, algunos espaciadores pueden activar anticuerpos, mientras que otros pueden suprimir esta respuesta inmune al antígeno diana. Por lo tanto, es importante utilizar espaciadores inmunológicamente inactivos para este tipo de vacunas.

Con el fin de activar correctamente las células presentadoras de antígeno (Antigen Presenting Cells, APCs), tales como las células dendríticas y los macrófagos para iniciación de la respuesta de las células T citotóxicas (CTL) y células T auxiliares (T-helpers, Th), han surgido vacunas que incorporan un adyuvante para estimular las APCs. Por ejemplo, las vacunas contra el cáncer que incorporan TACAs agrupados y un agonista de los Toll Like Receptors (TLRs), como el derivado tripalmitoilado de cisteína (Pam3Cys), inducen una respuesta de IgM. La inclusión de un epítomo Th por su parte conduce a la inducción de anticuerpos IgG. Sin embargo, ninguno de ellos produce inmunidad anticáncer celular al no presentar epítomos de células T CD8+. Para combatir la tolerancia inmunogénica (inducir producción de anticuerpos IgG de alta afinidad) el grupo del Profesor Boons ha desarrollado las vacunas de 3 componentes.⁴⁸ Estas vacunas

incorporan el agonista TLR2, un epítipo de las células T derivado del virus de la polio y un epítipo de la MUC1, donde se encuentra el antígeno Tn (Figura 1.20.).

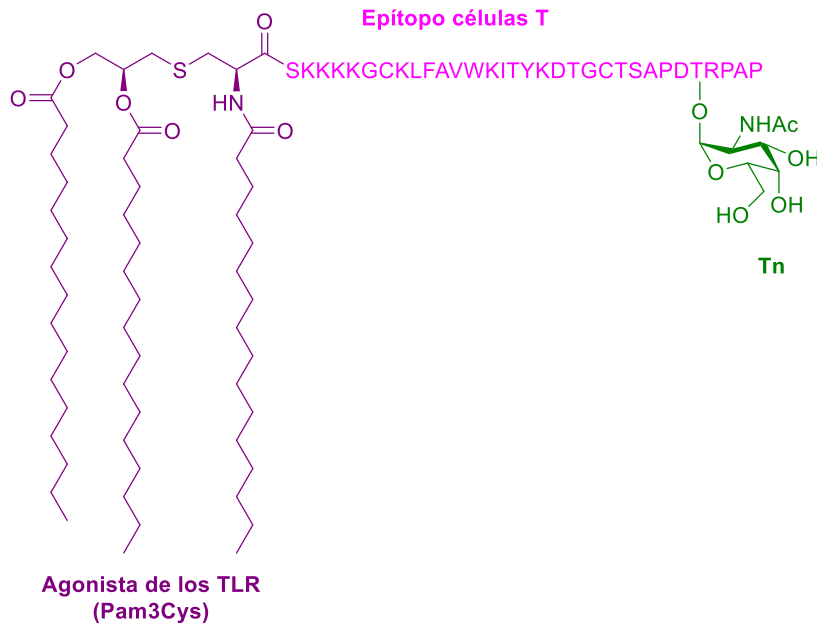


Figura 1.20. Vacuna de tres componentes desarrollada por Boons y colaboradores.

A pesar del potencial de las vacunas contra el cáncer basadas en TACAs y de que muchas de éstas hayan entrado en ensayos clínicos, ninguna de ellas ha sido aprobada para su uso clínico hasta la fecha. El principal problema sigue siendo la insuficiente respuesta inmunitaria mediada por células T.

Los resultados en este campo demuestran inequívocamente que el residuo de GalNAc es esencial para la respuesta inmune. La práctica totalidad de los trabajos dirigidos al diseño de miméticos del antígeno Tn con el objeto de incrementar esta respuesta se han centrado en el fragmento peptídico al que se une, probablemente porque la síntesis de análogos de carbohidratos plantea mayor dificultad. De hecho, no hay disponibles metodologías que permitan acceder a miméticos de glicosilaminoácidos en

los que el fragmento monosacárido sea un glicomimético. El interés de explorar esta línea de actuación es evidente: la presencia de un análogo no natural de la GalNAc debe de intensificar significativamente la respuesta inmune.

En esta Tesis nos planteamos abordar el diseño y síntesis de los primeros ejemplos de análogos del antígeno tumoral Tn incorporando un glicomimético en su estructura, en concreto un iminoazúcar sp^2 bicíclico que emularía el resto de GalNAc presente en el antígeno Tn natural. Estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis, avalan que la estructura de iminoazúcar sp^2 está especialmente bien adaptada a la preparación de α -O-glicósidos. Por tanto, deben de poder incorporarse en estructuras de tipo glicopeptídico que imiten fielmente la del antígeno Tn. Estos pseudoglicopéptidos servirían de base para la construcción de miméticos de las regiones inmunoestimulantes de la MUC1 presentes en células tumorales. Partimos así de la hipótesis de que la flexibilidad del método de síntesis de los iminoazúcares sp^2 y la variabilidad estructural que presentan, así como la elevada estereoselectividad de la reacción de glicosilación, constituyen herramientas únicas para el desarrollo tanto de miméticos del antígeno Tn como de glicopeptidomiméticos del dominio inmunogénico (PDTR) de la glicoproteína MUC1.

Referencias

- ¹ *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, ed. A. E. Stutz, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **1999**, ISBN: 3-527-29544-5.
- ² T. M. Wrodnigg, F. K. Sprenger, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 437-459.
- ³ C. W. Ekhart, M. H. Fechter, P. Hadwiger, E. Mlaker, A. E. Stutz, A. Tauss, T. M. Wrodnigg, in *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*, ed. A. E. Stutz, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **1999**, p. 253.
- ⁴ (a) J. L. Jiménez Blanco, V. M. Díaz Pérez, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.*, **1997**, 1969-1970; (b) M. I. García-Moreno, P. Díaz-Pérez,

C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 8890-8901; (c) M. I. García-Moreno, D. Rodríguez-Lucena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 3578-3581; (d) M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 1803-1819; (e) M. Aguilar-Moncayo, T. M. Gloster, J. P. Turkenburg, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, G. J. Davies, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2738; (f) B. Brumshtein, M. Aguilar-Moncayo, J. M. Benito, J. M. García Fernández, I. Silman, Y. Shaaltiel, D. Aviezer, J. L. Sussman, A. H. Futerman, C. Ortiz Mellet, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 4160-4167; (g) M. Aguilar-Moncayo, P. Díaz-Pérez, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, M. I. García-Moreno, *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 681-689.

⁵ (a) P. Díaz Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2903-2913; (b) V. M. Díaz Pérez, M. I. García Moreno, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. C. Díaz Arribas, F. J. Cañada, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 136-143; (c) M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. Trapero, M. Egido-Gabás, A. Llebaria, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 3698-3713.

⁶ (a) M. M. Fuster, J. D. Esko, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 526-542. (b) D. Durantel, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2009**, *10*, 860-870.

⁷ T. M. Wrodnigg, A. J. Steiner, B. J. Ueberbacher, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2008**, *8*, 77-85.

⁸ (a) S. Simizu, K. Ishida, H. Osada, *Cancer science*, **2004**, *95*, 553-558; (b) I. Vlodaysky, Y. Friedmann, M. Elkin, H. Aingorn, R. Atzmon, R. Ishai-Michaeli, M. Bitan, O. Pappo, T. Peretz, I. Michal, I. Speckers, *Nat. Med.*, **1999**, *5*, 793-802.

⁹ J. R. Brown, Y. Nishimura, J. D. Esko, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 532-536.

¹⁰ (a) H. Moriyama, T. Tsukida, Y. Inoue, K. Yokota, K. Yoshino, H. Kondo, N. Miura, S.-I. Nishimura, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1930-1938; (b) Y. Chikaraishi, M. Shimazawa, K. Yokota, K. Yoshino, H. Hara, *Curr. Neurovascular Res.*, **2009**, *6*, 140-147.

-
- ¹¹ M. Greco, M. D. Mitri, F. Chiriaco, G. Leo, E. Brienza, M. Maffia, *Cancer Lett.*, **2009**, *283*, 222-229.
- ¹² (a) Y. Nishimura, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 575-591, (b) Y. Nishimura, in *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, ed. P. Compain and O. R. Martin, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2007**, p. 269.
- ¹³ M. Padró, J. Castillo, L. Gómez, J. Joglar, P. Clapés, C. de Bolós, *Glycoconj. J.*, **2010**, *27*, 277-285.
- ¹⁴ E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Chasseraud, A. Ahidouch, C. Ortiz Mellet, H. Ouadid-Ahidouch, J. M. García Fernández. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5328-5330.
- ¹⁵ M. Liu, S. Wang, Y.-D. Zhou, T. Xiang, H. Dong, K. Yang and X.-L. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 564-570.
- ¹⁶ P. Desjeux, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **2004**, *27*, 305-318.
- ¹⁷ J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, *PLoS One*, **2012**, *7*, e35671.
- ¹⁸ H. C. Maltezou, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, *2010*, 617521.
- ¹⁹ R. K. Singh, H. P. Pandey, S. Sundar. *Indian J. Med. Res.*, **2006**, *123*, 331-344.
- ²⁰ C. P. Thakur, S. Narayan, A. Ranjan, *Indian J. Med. Res.*, **2004**, *120*, 166-172.
- ²¹ H. Ramos, E. Valdivieso, M. Gamargo, F. Dagger, B. E. Cohen, *J. Membr. Biol.*, **1996**, *152*, 65-75.
- ²² (a) S. Sundar, P. K. Sinha, M. Rai, D. K. Verma, K. Nawin, S. Alam, J. Chakravarty, M. Vaillant, N. Verma, K. Pandey, P. Kumari, C. S. Lal, R. Arora, B. Sharma, S. Ellis, N. Strub-Wourgaft, M. Balasegaram, P. Olliaro, P. Das, F. Modabber, *Lancet.*, **2011**, *377*, 477-486; (b) S. Sundar, M. Rai, J. Chakravarty D. Agarwal, N. Agrawal, M. Vaillant, P. Olliaro, H. W. Murria, *Clin. Infect. Dis.*, **2008**, *47*, 1000-1006.

-
- ²³ R. Omollo, N. Alexander, T. Edwards, E. A. Khalil, B. M. Younis, A. A. Abuzaid, M. Wasunna, N. Njoroge, D. Kinoti, T. P. Dorlo, S. Eliis, M. Balasegaram, A. M. Musa, *Trials*, **2011**, *12*, 166-176.
- ²⁴ S. L. Croft, S. Sundar, A. H. Fairlamb, *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111-126.
- ²⁵ Control of the Leishmaniases, Geneva, World Health Organization, **2010**, WHO Technical Report Series, no. 949.
- ²⁶ J. Van Griensven, M. Balasegaram, F. Meheus, J. Alvar, L. Lynen, M. Boelaert, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 184-194.
- ²⁷ S. Hindle, S. Hebbar, S. T. Sweeney, *Invert. Neurosci.* **2011**, *11*, 59-71.
- ²⁸ O. Staretz-Chacham, T. C. Lang, M. E. LaMarca, D. Krasnewich, E. Sidransky, *Pediatrics* **2009**, *123*, 1191-1207.
- ²⁹ *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Eds.: A. S. Fauci, D. L. Kasper, D. L. Longo, E. Braunwald, S. L. Hauser, J. L. Jamenson, J. Loscalzo), McGraw-Hill, USA, **2008**, p. 2452-2456.
- ³⁰ Q. Cheng, H. Li, K. Merdek, J. T. Park, *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, 4836-4840.
- ³¹ J. Liu, M. M. D. Numa, H. Liu, S. Huang, P. Sears, A. R. Shikhman, C. J. Wong, *Org. Chem.*, **2004**, *69*, 6273-6283.
- ³² T. A. Reese, H. Liang, A. M. Tager, A. D. Luster, R. Van, D. Voehringer, R. M. Locksley, *Nature*, **2007**, *447*, 92-96.
- ³³ F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart, C. Gong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 10804-10809.
- ³⁴ (a) M. B. Tropak, J. E. Blanchard, S. G. Withers, E. D. Brown, D. Mahuran, *Chem. Biol.*, **2007**, *14*, 153-164; (b) I. B. Tomasic, M. C. Metcalf, A. I. Guce, N. E. Clark, S. C. Garman, *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 21560-21566; (c) N. E. Clark, M. C. Metcalf, D. Best, G. W. J. Fleet, S. C. Garman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2012**, *109*, 17400-17405.
- ³⁵ M. Gutternigg, D. Rendić, R. Voglauer, T. Iskratch, I. B. H. Wilson, *Biochem. J.*, **2009**, *419*, 83-90.

-
- ³⁶ S. A. Yuzwa, D. J. Vocadlo, *Curr. Alzheimer Res.*, **2009**, *6*, 451-454.
- ³⁷ D. J. Mahuran, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1455*, 105-138.
- ³⁸ M. B. Tropak, D. Mahuran, *FEBS J.*, **2007**, *274*, 4951-4961.
- ³⁹ M. B. Tropak, S. P. Reid, M. Guiral, S. G. Withers, D. Mahuran, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 13478-13487.
- ⁴⁰ G. H. B. Maegawa, M. Tropak, J. Buttner, T. Stockley, F. Kok, J. T. R. Clarke, D. J. Mahuran, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 9150-9161.
- ⁴¹ E. Osher, A. Fattal-Valevski, L. Sagie, N. Urshanski, N. Sagiv, L. Peleg, T. Lerman-Sagie, A. Zimran, D. Elstein, R. Navon, A. Valevski, N. Stern, *Orphanet J. Rare Dis.*, **2015**, *10*, 45.
- ⁴² R. E. Boyd, G. Lee, P. Rybczynski, E. R. Benjamin, R. Khanna, B. A. Wustman, K. J. Valenzano, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2705-2725.
- ⁴³ S. Muller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, F. G. Hanisch, *J Biol Chem*, **1997**, *272*, 24780-24793.
- ⁴⁴ D. Madariaga, N. Martínez-Saáez, V. J. Somovilla, H. Coelho, J. Valero-González, J. Castro-López, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. H. Busto, A. Avenoza, F. Marcelo, R. Hurtado-Guerrero, F. Corzana, J. M. Peregrina, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, 747-756.
- ⁴⁵ S. Hakomori, Y. Zhang, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 97-104.
- ⁴⁶ T. Toyokuni, B. Dean, S. Cai, D. Boivin, S. Hakomori, A. K. Singha, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 395-396.
- ⁴⁷ E. Kagan, G. Ragupathi, S. S. Yi, C. A. Reis, J. Gildersleeve, D. Kahne, H. Clausen, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston. *Cancer Immunol. Immunother.*, **2005**, *54*, 424-30.
- ⁴⁸ V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, *109*, 261-266.

2. Objetivos

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea “Glicoterapias contra el cáncer, la leishmania y enfermedades de depósito lisosomal” que se desarrolla en el grupo de investigación Química Bioorgánica de Carbohidratos. La estrategia general consiste en el diseño de glicomiméticos capaces de interactuar con biomoléculas que reconocen o procesan carbohidratos (lectinas, anticuerpos, enzimas) y que son capaces de modular estas interacciones y corregir procesos patológicos. En concreto, en esta Tesis hemos perseguido el desarrollo de nuevas chaperonas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal como la enfermedad de Tay-Sachs, de compuestos con actividad frente al parásito causante de la leishmaniasis y de candidatos para el desarrollo de vacunas para la inmunoterapia del cáncer. Para ello, hemos explotado las propiedades únicas de los iminoazúcares sp^2 como miméticos estructurales y químicos de monosacáridos. A diferencia de los iminoazúcares clásicos, los iminoazúcares sp^2 permiten acceder a conjugados mediante procedimientos análogos a los utilizados en química de azúcares y emular así a los glicoconjugados naturales. Además, pueden obtenerse mediante estrategias compatibles con aproximaciones dirigidas a introducir diversidad molecular con un coste sintético relativamente bajo, lo que les hace muy adecuados para la realización de estudios de estructura-actividad. La síntesis, la caracterización estructural y los estudios de evaluación de actividad iniciales de los compuestos incluidos en esta Tesis frente a un panel de glicosidasas comerciales se han realizado por la doctoranda en el seno del grupo de investigación, mientras que el resto de ensayos biológicos se han llevado a cabo en colaboración con otros laboratorios.

Los siguientes objetivos concretos que se han abordado se enumeran a continuación:

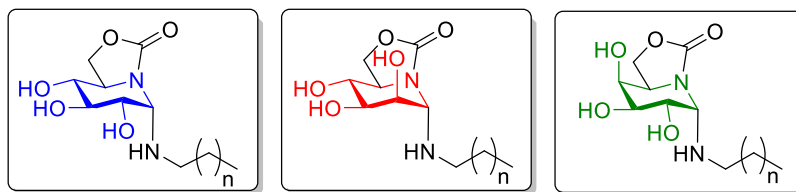
1. Síntesis estereoselectiva de una colección de compuestos (quimioteca) de iminoazúcares sp^2 bicíclicos derivados de nojirimicina, galactonojirimicina y manojirimicina con sustituyentes pseudoanoméricos de distinta naturaleza y evaluación de su actividad como inhibidores de glicosidasas.

2. Evaluación in vitro de la actividad antiproliferativa frente a diferentes líneas celulares tumorales humanas.
3. Evaluación in vitro de la actividad leishmanicida frente a formas promastigotas y amastigotas de *Leishmania donovani*.
4. Síntesis y evaluación de chaperonas químicas para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal (LSDs).
5. Síntesis de miméticos del antígeno natural tumoral Tn con estructura de iminoazúcar sp^2 . Análisis conformacional y estudios de afinidad de los mismos con lectinas y anticuerpos.

Las estructuras de los nuevos derivados preparados en el curso de este trabajo y de los correspondientes precursores se presentan a continuación:

- a) Pseudo *N*-, *S*-, *O*- y *C*-glicósidos derivados de iminoazúcares sp^2 .

Derivados de ONJ, OMJ y OGJ pseudo-N-glicosídicos.

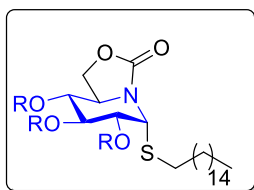


1, n = 10
2, n = 14

3, n = 10
4, n = 14

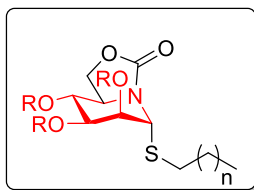
5, n = 6
6, n = 10
7, n = 14

Derivados de ONJ pseudo-S-glicosídicos.

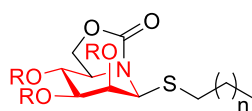


8, R = Ac
9, R = H

Derivados de OMJ pseudo-S-glicosídicos.

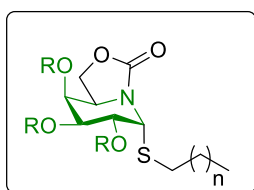


10, R = Ac, n = 10
11, R = H, n = 10
12, R = Ac, n = 14
13, R = H, n = 14

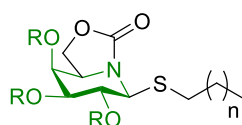


10β, R = Ac, n = 10
12β, R = Ac, n = 14

Derivados de OGJ pseudo-S-glicosídicos.

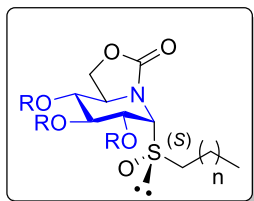


14, R = Ac, n = 6
15, R = H, n = 6
16, R = Ac, n = 10
17, R = H, n = 10
18, R = Ac, n = 14
19, R = H, n = 14

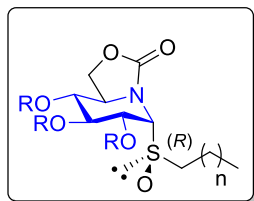


14β, R = Ac, n = 6
15β, R = H, n = 6
16β, R = Ac, n = 10

Derivados de ONJ pseudo-glicosilsulfoxídicos.

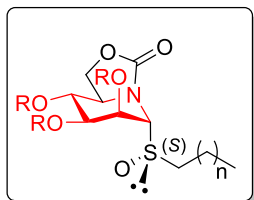


- 20**, R = Ac, n = 6
21, R = H, n = 6
22, R = Ac, n = 10
23, R = H, n = 10
24, R = Ac, n = 14
25, R = H, n = 14

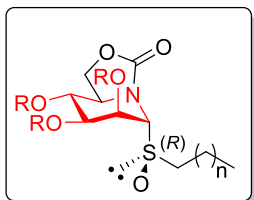


- 26**, R = Ac, n = 6
27, R = H, n = 6
28, R = Ac, n = 10
29, R = H, n = 10
30, R = Ac, n = 14
31, R = H, n = 14

Derivados de OMJ pseudo-glicosilsulfoxídicos.

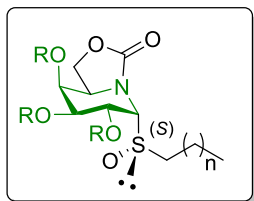


- 32**, R = Ac, n = 6
33, R = H, n = 6
34, R = Ac, n = 10
35, R = H, n = 10
36, R = Ac, n = 14
37, R = H, n = 14

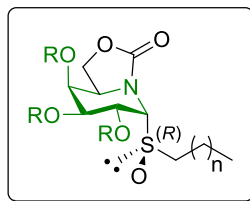


- 38**, R = Ac, n = 6
39, R = H, n = 6
40, R = Ac, n = 10
41, R = H, n = 10
42, R = Ac, n = 14
43, R = H, n = 14

Derivados de OGJ pseudo-glicosilsulfoxídicos.

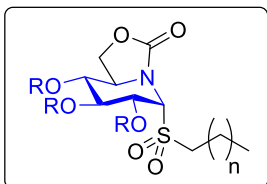


- 44, R = Ac, n = 6
 45, R = H, n = 6
 46, R = Ac, n = 10
 47, R = H, n = 10
 48, R = Ac, n = 14
 49, R = H, n = 14

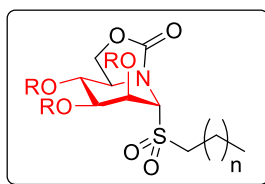


- 50, R = Ac, n = 6
 51, R = H, n = 6
 52, R = Ac, n = 10
 53, R = H, n = 10
 54, R = Ac, n = 14
 55, R = H, n = 14

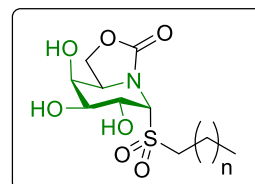
Derivados de ONJ, OMJ y OGJ con estructura de pseudo-glicosilsulfonas.



- 56, R = Ac, n = 6
 57, R = H, n = 6
 58, R = Ac, n = 10
 59, R = H, n = 10
 60, R = Ac, n = 14
 61, R = H, n = 14

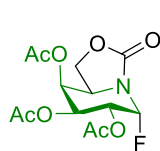


- 62, R = Ac, n = 6
 63, R = H, n = 6
 64, R = Ac, n = 10
 65, R = H, n = 10
 66, R = Ac, n = 14
 67, R = H, n = 14

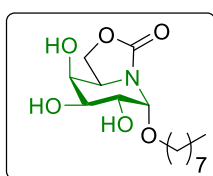


- 68, n = 6
 69, n = 10
 70, n = 14

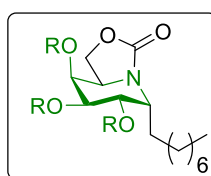
Derivados de OGJ pseudo-O- y C-glicosídicos.



71



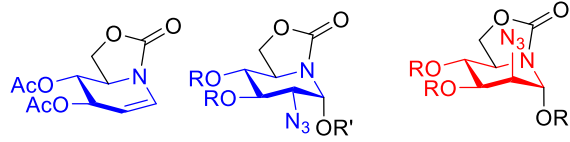
72



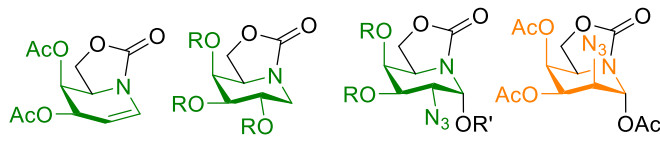
- 73, R = Ac
 74, R = H

b) Miméticos de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa, D-manosa y D-galactosa con estructura de iminoazúcar sp^2 .

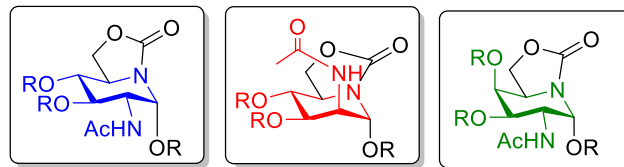
Derivados de configuración D-gluco (ONJ).



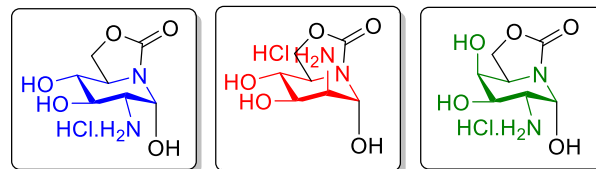
75 **76**, R = Ac, R' = H **79**, R = Ac, R' = H
77, R = R' = Ac **80**, R = R' = Ac
78, R = R' = H **81**, R = R' = H



82 **83**, R = Ac **85**, R = Ac, R' = H **87**
84, R = H **86**, R = R' = Ac
88, R = R' = H



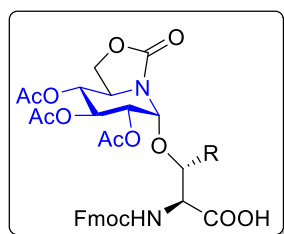
89, R = Ac **91**, R = Ac **93**, R = Ac
90, R = H **92**, R = H **94**, R = H



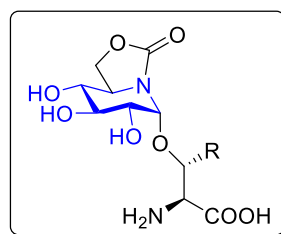
95 **96** **97**

c) Glicohexapéptidos miméticos del antígeno natural tumoral Tn.

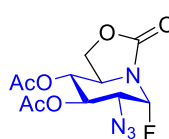
Pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de ONJ y 2-acetamido-2-desoxi-ONJ.



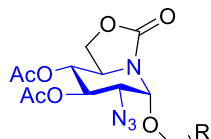
98, R = H
99, R = CH₃



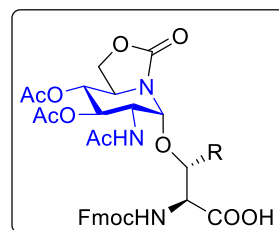
100, R = H
101, R = CH₃



102

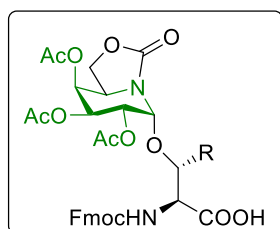


103, R = H
104, R = CH₃

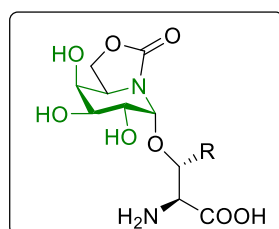


105, R = H
106, R = CH₃

Pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de OGJ y 2-acetamido-2-desoxi-OGJ.

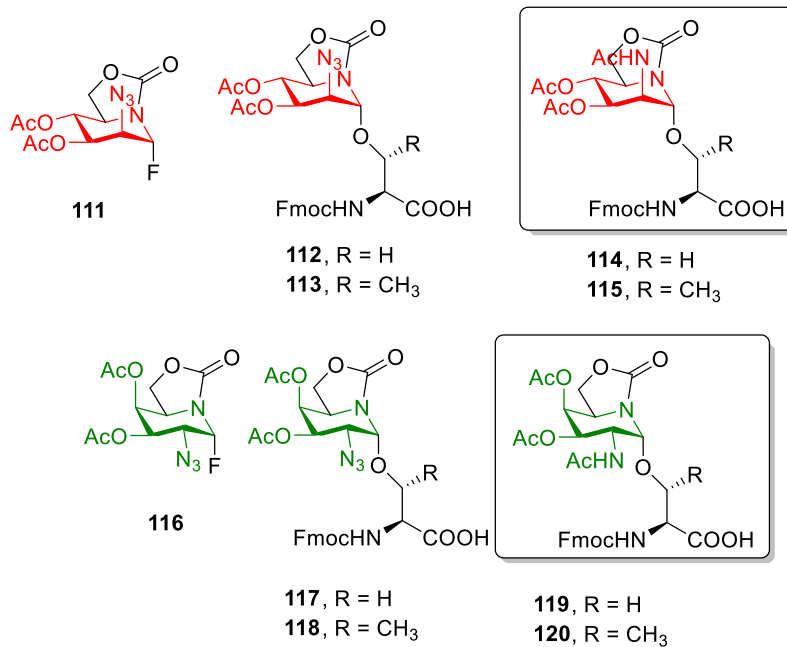


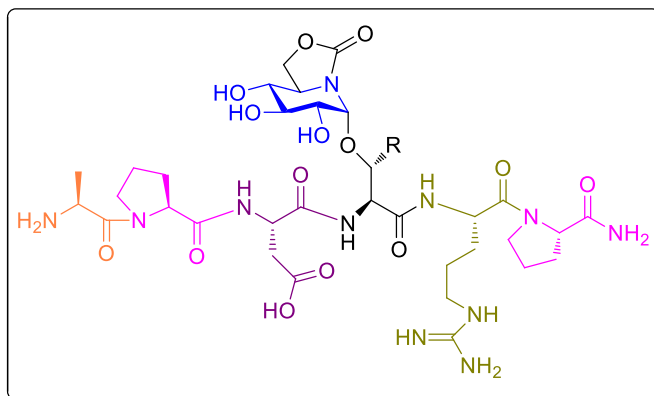
107, R = H
108, R = CH₃



109, R = H
110, R = CH₃

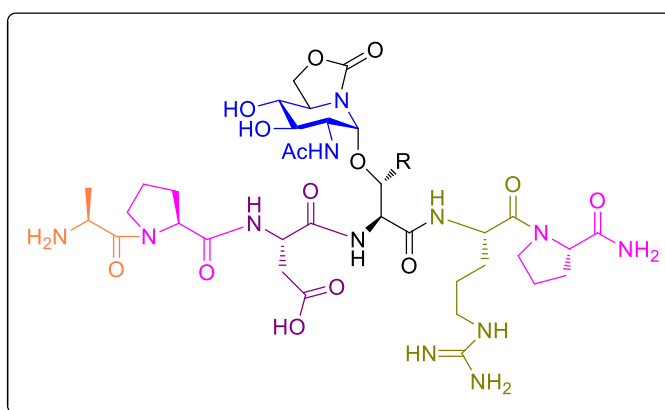
Pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de OMJ y 2-acetamido-2-desoxi-OMJ.



*Pseudoglicohexapéptidos derivados de ONJ, OGJ y OMJ.**Derivados de ONJ y 2-acetamido-2-desoxi-ONJ.*

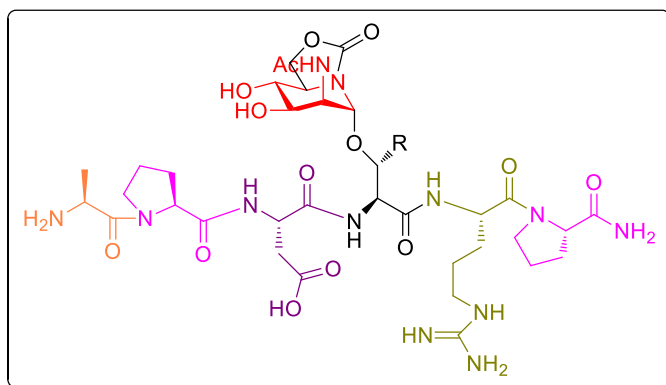
121, APDS(α -sp²-Glc)RP, R = H

122, APDT(α -sp²-Glc)RP, R = CH₃

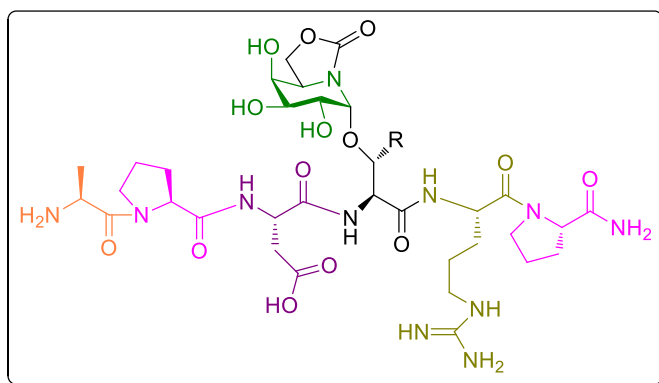


123, APDS(α -sp²-GlcNAc)RP, R = H

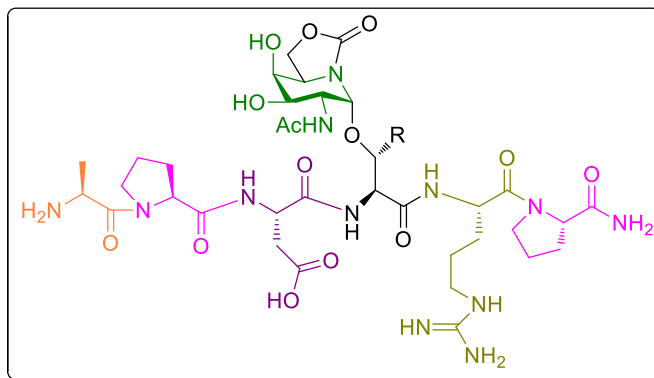
124, APDT(α -sp²-GlcNAc)RP, R = CH₃

Derivados de 2-acetamido-2-desoxi-OMJ.

- 125**, APDS(α -sp²-ManNAc)RP, R = H
126, APDT(α -sp²-ManNAc)RP, R = CH₃

Derivados de OGJ y 2-acetamido-2-desoxi-OGJ.

- 127**, APDS(α -sp²-Gal)RP, R = H
128, APDT(α -sp²-Gal)RP, R = CH₃



129, APDS(α -sp²-GalNAc)RP, R = H

130, APDT(α -sp²-GalNAc)RP, R = CH₃

3. Pseudo-glicoconjugados derivados de iminoazúcares sp^2 : síntesis y estudios de relaciones de estructura- actividad.

Abstract: The results reported in this chapter highlight the capabilities of sp^2 -iminosugars to undergo glycosylation-type reactions by methodologies currently used in carbohydrate chemistry. This unique chemical mimic feature has been exploited to access a library of amphiphilic glycoside mimics for evaluation of glycosidase inhibitory, antiproliferative and antileishmanial activities. The body of data suggests a relationship between anticancer and antileishmanial activity in this family of glycomimetics. However, no direct relationship between these biological activities and the inhibition of glycosidases has been established so far. Indeed, targets other than glycosidases, such as molecular chaperones or ion channels, or even the ability to interact with biological membranes, have been already postulated to account for some of the observed biological activities of amphiphilic derivatives of classical iminosugars and could be also at the origin of the antiproliferative/antileishmanial activity profile and ranking observed for the amphiphilic sp^2 -iminosugar conjugates here reported.

3. Pseudo-glicoconjugados derivados de iminoazúcares sp^2 : síntesis y estudios de relaciones de estructura-actividad.

3.1. Síntesis y caracterización estructural de pseudo-*N*-, *S*-, *O*- y *C*-glicósidos de iminoazúcares sp^2 .

La versatilidad sintética de los iminoazúcares sp^2 los hace especialmente adecuados para el desarrollo de estrategias dirigidas a la generación de diversidad estructural. Esto ha permitido, por ejemplo, identificar buenos candidatos como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal tales como Gaucher, Fabry y gangliosidosis GM₁. Por otra parte, algunos iminoazúcares sp^2 con estructura de pseudo-*N*-, *S*- y *C*-glicósidos que se comportan como inhibidores potentes y selectivos de la α -glucosidasa neutra de levadura, pero no de la α -glucosidasa ácida lisosomal o de las α -glucosidasas intestinales, presentan propiedades anticáncer que podrían estar relacionadas con la capacidad de inhibir selectivamente las α -glucosidasas del retículo endoplasmático implicadas en la biosíntesis de proteínas.

Exceptuando los pseudo-*C*-glicósidos, los conjugados de tipo glicosídico no son accesibles en el caso de los iminoazúcares clásicos debido a la inestabilidad de los grupos funcionales *gem*-diamina, aminoacetal y aminotioacetal, respectivamente. Los pseudoglicósidos de iminoazúcares sp^2 constituyen por tanto una familia original de glicomiméticos cuyo potencial en el desarrollo de nuevas glicoterapias y su mecanismo de acción están por explorar. En la presente Tesis Doctoral hemos abordado dos cuestiones importantes en este sentido: por una parte, nos hemos propuesto obtener evidencias que permitan confirmar o descartar la hipótesis inicial de que los pseudoglicósidos de iminoazúcares sp^2 actúan a nivel de las glicosidasas del retículo endoplasmático y, por otra, determinar si además de actividad antitumoral estos compuestos presentan actividad antiparasitaria, dado que en muchos casos se ha observado una relación directa entre ambos tipos de actividades. Con este fin, se ha

sintetizado una serie amplia de derivados que difieren en el perfil configuracional (*gluco/mano/galacto*) y en la naturaleza de los sustituyentes pseudoanómicos, y se han evaluado sus propiedades como inhibidores de glicosidasas, como inhibidores de la proliferación celular y como agentes leishmanicidas.

Los compuestos preparados incorporan un esqueleto bicíclico derivado de nojirimicina (NJ), de manonojirimicina (MJ) o de galactonojirimicina (GJ), en el que el anillo de piperidina está condensado con un anillo de cinco miembros que incorpora una función carbamato. La parte glicónica tiene por tanto estructura de 5*N*,6*O*-(oxometilideno)-NJ (ONJ), -MJ (OMJ) o -GJ (OGJ) respectivamente. Como grupos aglicónicos se han seleccionado cadenas alquílicas de distinta longitud (octilo, dodecilo, hexadecilo) unidas al iminoazúcar mediante diferentes heteroátomos (N, S, O) o a través de un enlace carbono-carbono (Figura 3.1.).

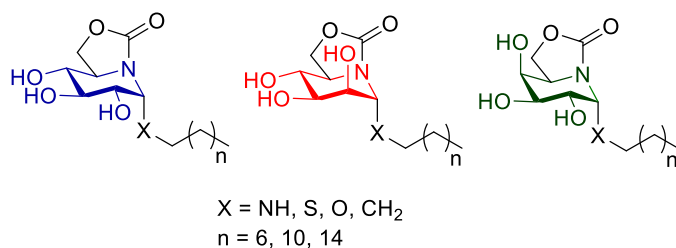
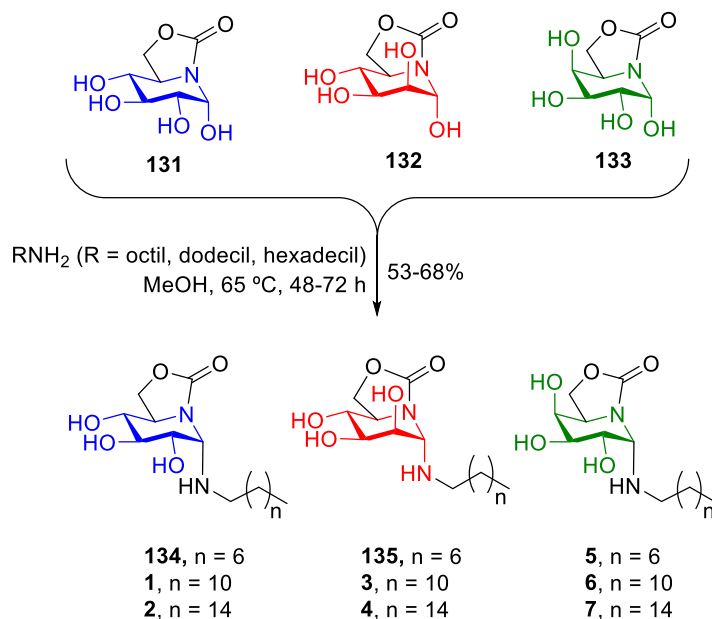


Figura 3.1. Estructura química de los pseudo *N*-, *S*-, *O*- y *C*-glicósidos preparados en la Tesis.

Los derivados pseudo-*N*-glicosídicos (**134**, **1** y **2**; **135**, **3** y **4**; **5-7**) se han preparado con rendimientos de moderados a buenos (53-68%) a partir de los correspondientes precursores hemiaminálícos reductores ONJ (**131**),¹ OMJ (**132**)² y OGJ (**133**)² por incubación con la correspondiente alquilamina (octil, dodecil o hexadecilamina) en metanol durante 48-72 h a 65 °C (Esquema 3.1.).^{3,4,5} El efecto anomérico generalizado (GAE) asociado a los iminoazúcares sp², responsable de su reactividad y estabilidad, favorece la orientación axial (α) de los sustituyentes pseudoaglicónicos. Únicamente en el caso de la *gem*-diamina de octilo de configuración *gluco* **134**, se detectó la presencia de una pequeña proporción del anómero β en el

espectro de ^1H RMN del crudo de reacción, en proporción relativa $\alpha:\beta \sim 6:1$.



Esquema 3.1. Síntesis de las *gem*-diaminas derivadas de ONJ (**134**, **1**, **2**), OMJ (**135**, **3**, **4**) y OGJ (**5-7**).

Los espectros de ^1H y de ^{13}C RMN de las *gem*-diaminas, así como sus espectros de masas y los datos de análisis elemental, confirmaron de manera inequívoca la estructura de tipo *N*-glicosídica. En todos los casos se observa el apantallamiento de la señal del H-1 a δ 4.48-4.67 ppm y la del C-1 a δ 69.5-72.1 ppm, respectivamente, con respecto a sus precursores ONJ, OMJ y OGJ. A modo de ejemplo, en la Figura 3.2. se muestran los espectros de ^1H y ^{13}C RMN, registrados a 500 MHz y a 125.7 MHz respectivamente en CD_3OD , del derivado de OGJ **5**.

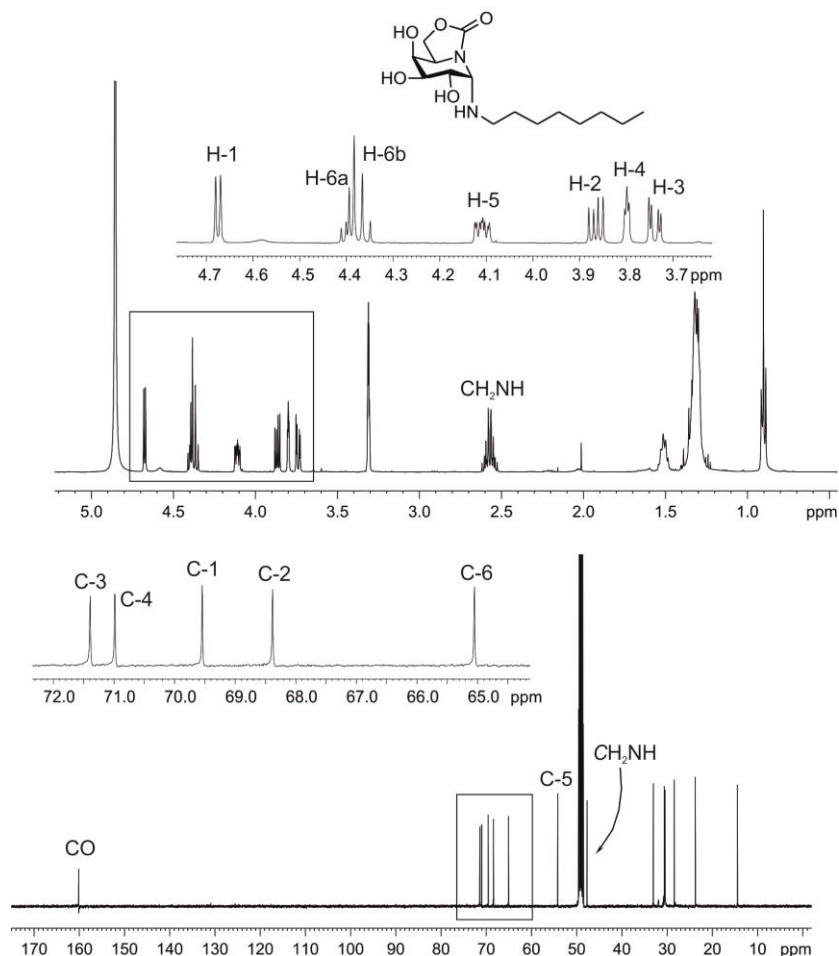


Figura 3.2. Espectros de ¹H y ¹³C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD₃OD) de **5**.

Para determinar la basicidad de los iminoazúcares y su potencial influencia en el comportamiento inhibitorio se han determinado los valores de pK_a de las *gem*-diaminas de octilo **134**, **135** y **5** mediante experimentos de valoración ácido-base, empleando la espectroscopía de ¹H RMN, en los que la variable a medir es el desplazamiento químico de las señales de protón a diferentes valores de pH. En los 3 casos se han empleado disoluciones 2 mM del iminoazúcar (**134**, **135**, **5**) en una mezcla H₂O-D₂O-DMSO-*d*₆ 85:5:10. Con objeto de mantener constante la fuerza iónica del medio se añadió NaCl 100

mM. Tras registrar un espectro inicial, se añadieron alícuotas de una disolución de NaOH (10 mM) al tubo de RMN de modo que la concentración del iminoazúcar se mantuviera constante, al igual que la concentración de NaCl.

En todos los casos se comenzó la valoración a un valor de pH fuertemente ácido: pH 2.06 para **134** (Figura 3.3.), pH 2.03 para **135** (Figura 3.4.) y pH 2.33 para **5** (Figura 3.5.). Para el tratamiento matemático se ha considerado el desplazamiento químico relativo de las señales correspondientes a los protones metilénicos del grupo CH_2NH . Representando los valores de desplazamiento químico de cualquiera de las señales en función del pH, se obtiene una línea sigmoideal cuyo punto de inflexión corresponde al valor experimental de pK_a (Figuras 3.3b, 3.4b y 3.5b). Para una mayor exactitud, es conveniente obtener dicho valor de la representación lineal que resulta de la expresión logarítmica del cociente de los incrementos de desplazamientos químicos. En este caso, es posible determinar el valor de pK_a por interpolación, cuando el logaritmo se hace cero (Figuras 3.3c, 3.4c y 3.5c). En esta gráfica, las rectas correspondientes a los diferentes protones sensibles al pH se superponen casi a la perfección por lo que todas las señales que se desplazan, independientemente de que se muevan más o menos, resultan apropiadas para estimar el valor de pK_a del compuesto.

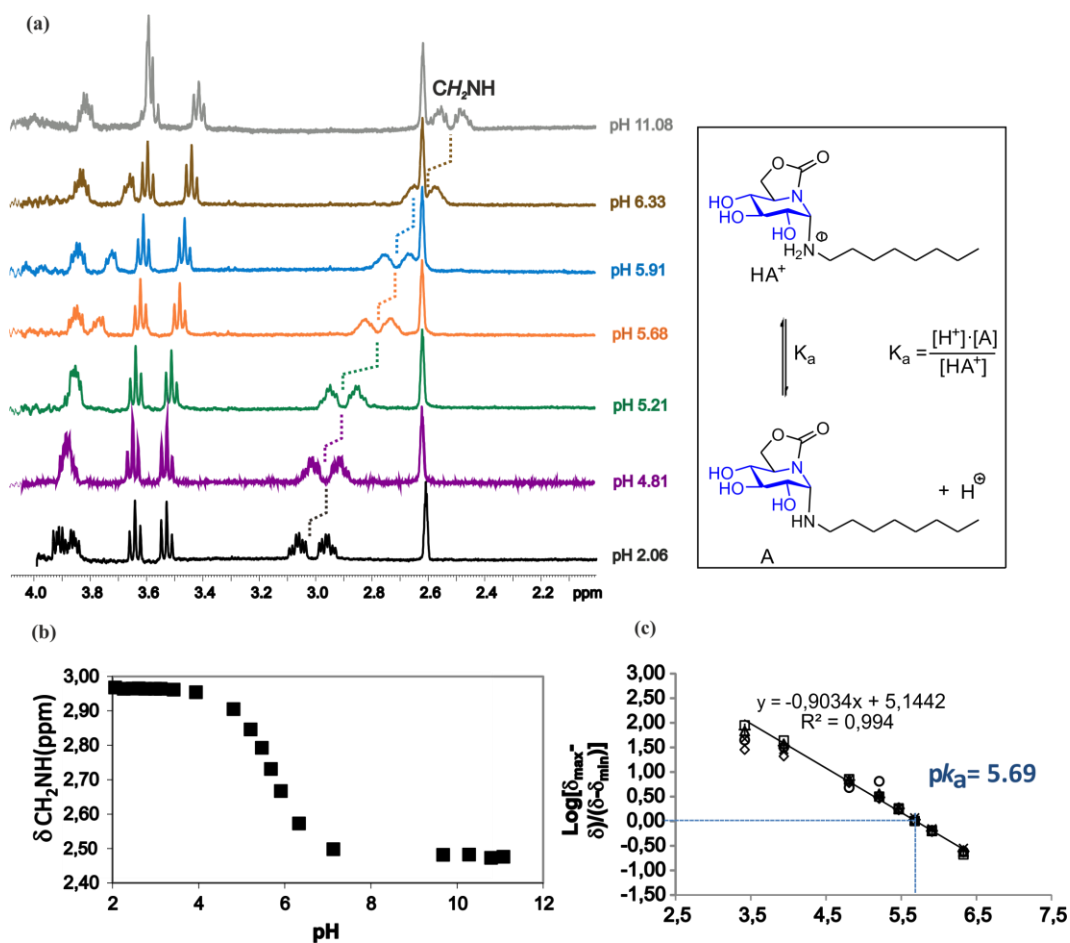


Figura 3.3. Determinación del valor de pK_a de la *gem*-diamina **134** derivada de ONJ.

(a) Superposición de los espectros de ^1H RMN de **134** a diferentes valores de pH; (b) Variación del desplazamiento químico de la señal del grupo CH_2NH en función del pH; (c) Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos para todas las señales del espectro que se desplazan significativamente con el pH.

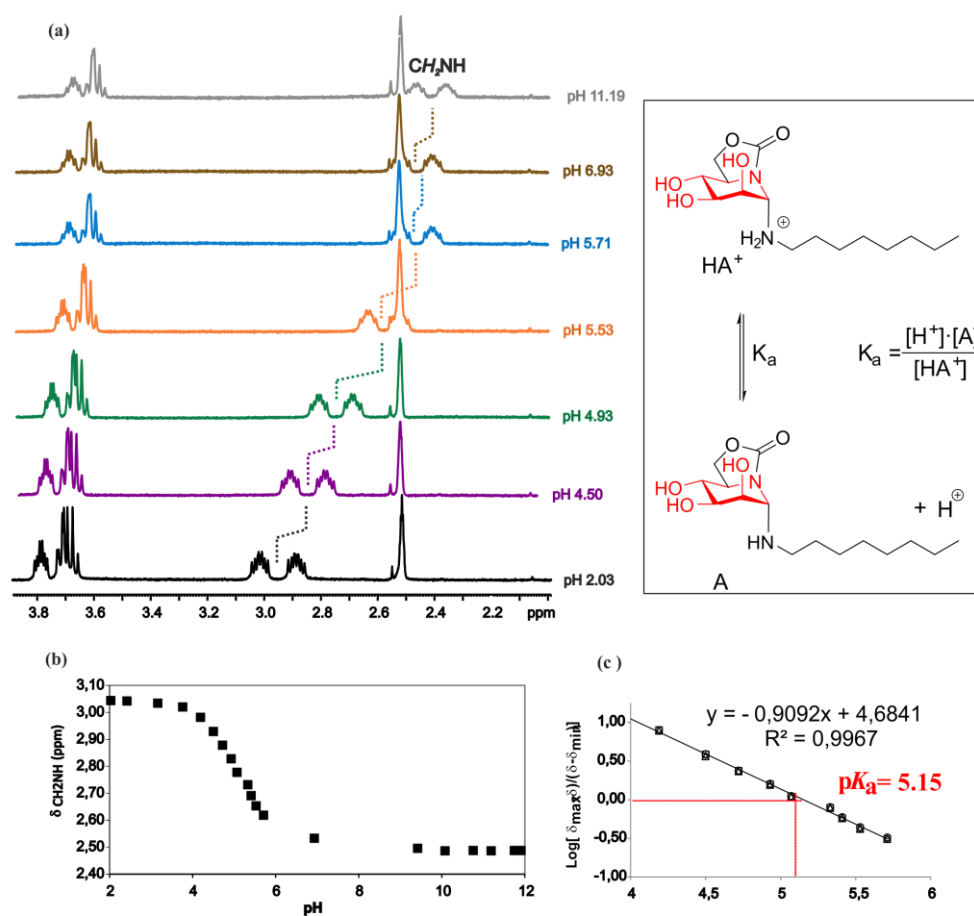


Figura 3.4. Determinación del valor de pK_a de la *gem*-diamina **135** derivada de OMJ. (a) Superposición de los espectros de ^1H RMN de **135** a diferentes valores de pH; (b) Variación del desplazamiento químico de la señal de CH_2NH con el pH; (c) Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos para todas las señales del espectro que se desplazan significativamente con el pH.

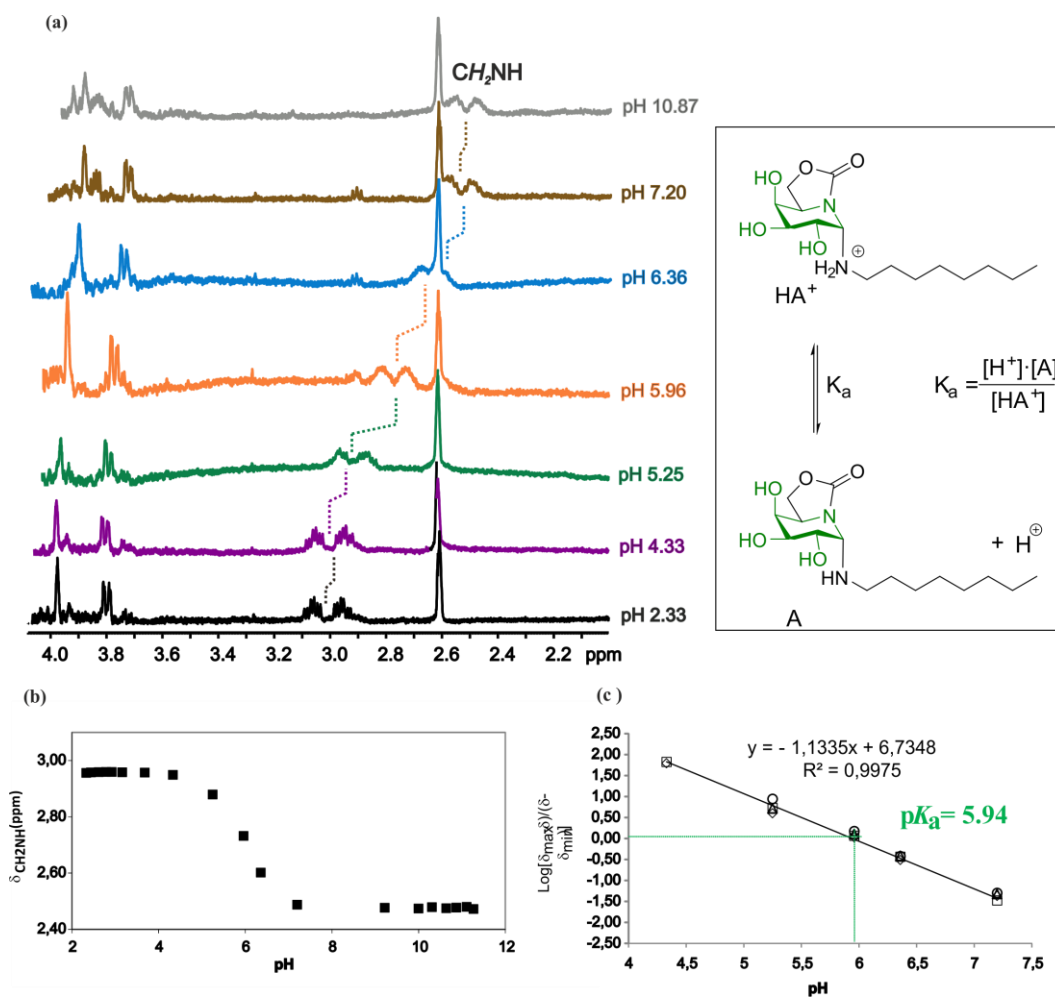


Figura 3.5. Determinación del valor de pK_a de la *gem*-diamina **5** derivada de OGJ. (a) Superposición de los espectros de ^1H RMN de **5** a diferentes valores de pH; (b) Variación del desplazamiento químico de la señal de CH_2NH con el pH; (c) Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos para todas las señales del espectro que se desplazan significativamente con el pH.

Como se observa en la superposición de los espectros representados en las figuras los protones más sensibles al pH han sido los del grupo metileno (CH_2NH). Los

valores de pK_a obtenidos han sido 5.69 para la *gem*-diamina **134** (Figura 3.3.), 5.15 para la *gem*-diamina **135** (Figura 3.4.), y 5.94 para la *gem*-diamina **5**, respectivamente (Figura 3.5.).

A continuación se ha abordado la síntesis de los pseudo-*S*-glicósidos empleando como donadores de glicosilo los correspondientes iminoazúcares sp^2 peracetilados derivados de ONJ (**136**), OMJ (**137**) y OGJ (**138**) y trifluoruro de boro eterato ($BF_3 \cdot Et_2O$) como promotor de tioglicosidación. La reacción con 1-octanotiol, 1-dodecanotiol o 1-hexadecanotiol implica la coordinación del ácido de Lewis al carbonilo del grupo acetoxi de la posición pseudoanomérica, generando in situ el ión aciliminio que sufre la adición nucleófila del átomo de azufre. Se obtuvieron así los pseudo-tioglicósidos triacetilados (**139**, **141** y **8**; **143**, **10** y **12**; **14**, **16** y **18**) con excelentes rendimientos (Figura 3.6. y Esquemas 3.2., 3.3. y 3.4.).

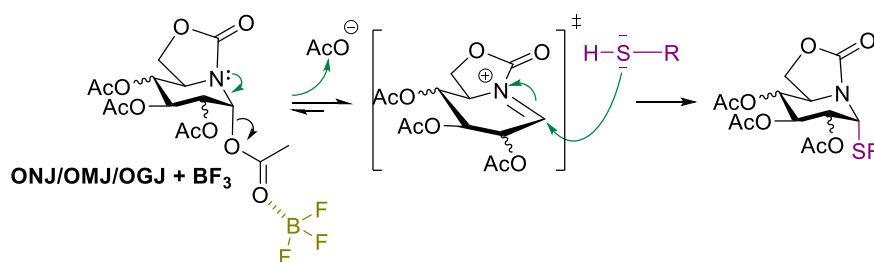
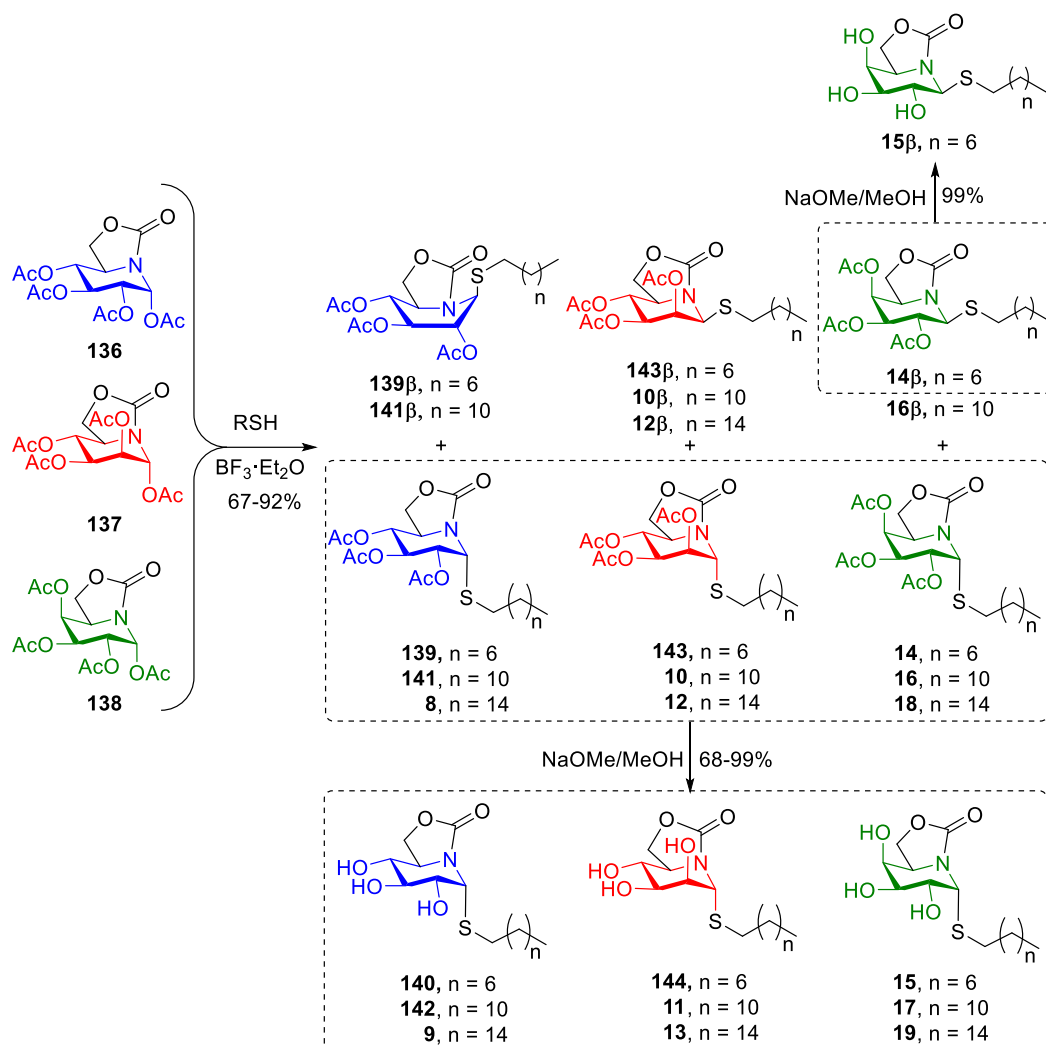


Figura 3.6. Mecanismo propuesto para la preparación de pseudoalquil-*S*-glicósidos derivados de iminoazúcares sp^2 .

En principio, cabría esperar que las reacciones de tioglicosidación condujesen preferentemente a tioglicósidos con disposición relativa 1,2-*trans*, dado el carácter participante del grupo acetilo sobre la posición O-2. En la serie OMJ esto es compatible con la configuración anomérica α de los productos obtenidos, pero en las series ONJ y OGJ este razonamiento predice que el anómero β se formaría de manera preferente,

contrariamente a lo observado experimentalmente. Este resultado pone una vez más de manifiesto la influencia decisiva del efecto anomérico generalizado en la reactividad de los iminoazúcares.

Para los derivados de ONJ, el análisis de los espectros de ^1H RMN de los crudos de reacción con octanotiol y dodecanotiol (\rightarrow **139**, **141**) indicó la formación de una mezcla de anómeros α y β en proporción relativa 20:1.⁶ La relación relativa fue de 8:1 cuando se utilizó hexadecanotiol. En todos los casos el anómero mayoritario (α) se pudo separar mediante cromatografía en columna de gel de sílice. La desacetilación convencional con metilato sódico en metanol condujo a los α -pseudo-*S*-glicósidos desprotegidos **140**, **142** y **9** (Esquema 3.2.). Los isómeros minoritarios con estructura de β -tioglicósido **139 β** y **141 β** pudieron también obtenerse en forma pura tras purificación. Los correspondientes espectros de ^1H -RMN indicaron que adoptan una conformación de bote 1_4B , con el sustituyente pseudoanomérico alquiltio en disposición quasi-axial para satisfacer el efecto anomérico.



Esquema 3.2. Síntesis de los pseudo *S*-glicósidos derivados de ONJ (**140**, **142**, **9**), OMJ (**144**, **11**, **13**) y OGJ (**15**, **17**, **19**).

En el caso de los derivados de OMJ (**143**,¹¹ **10**, **12**) la proporción relativa de los anómeros α y β , determinada por integración de señales de H-1 y H-5 en los espectros de ^1H RMN, resultó ser de 10:1, 14:1 y 5:1 para las cadenas de *S*-octilo, *S*-dodecilo y *S*-hexadecilo, respectivamente. Por su parte, en el caso de los derivados de OGJ **14**, **16** y **18**

se obtuvieron los anómeros $\alpha:\beta$ en proporción relativa 3:1 (*S*-octilo), 12:1 (*S*-dodecilo) y 5:1 (*S*-hexadecilo; Esquema 3.2.). A diferencia de los derivados de ONJ, los anómeros minoritarios β -*S*-glicósidos derivados de OMJ y OGJ presentan espectros de ^1H RMN compatibles con la conformación de silla $^4\text{C}_1$. Los anómeros α se desacetilaron para obtener los derivados desprotegidos finales **144**,¹¹ **11**, **13** y **15**, **17**, **19**, respectivamente (Esquema 3.2.)

Con objeto de ampliar la serie de derivados de tipo *S*-glicosídicos, se abordó seguidamente la oxidación del átomo de azufre pseudoanomérico de los pseudoalquiltioglicósidos preparados con ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*CPBA). Este reactivo nos permitió acceder a dos nuevas familias de compuestos, con estructura de pseudo- α -glicosilsulfóxidos y pseudo- α -glicosilsulfonas. Para la formación de los α -glicosilsulfóxidos se llevó a cabo la reacción empleando 1 equivalente de *m*CPBA⁷ a 0 °C durante 10 min. El mecanismo de oxidación implica el ataque nucleofílico del azufre sobre el perácido (Figura 3.7.). Conviene señalar que dado que el átomo de azufre en los sulfóxidos presentan una geometría tetraédrica, con dos de los cuatro vértices ocupados por sustituyentes carbonados y los otros dos por un átomo de oxígeno y un par de electrones, cuando los dos sustituyentes carbonados no son equivalentes el sulfóxido es quiral.

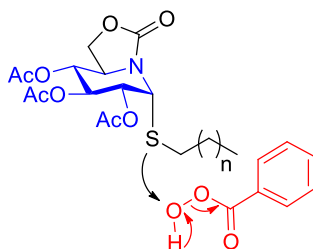
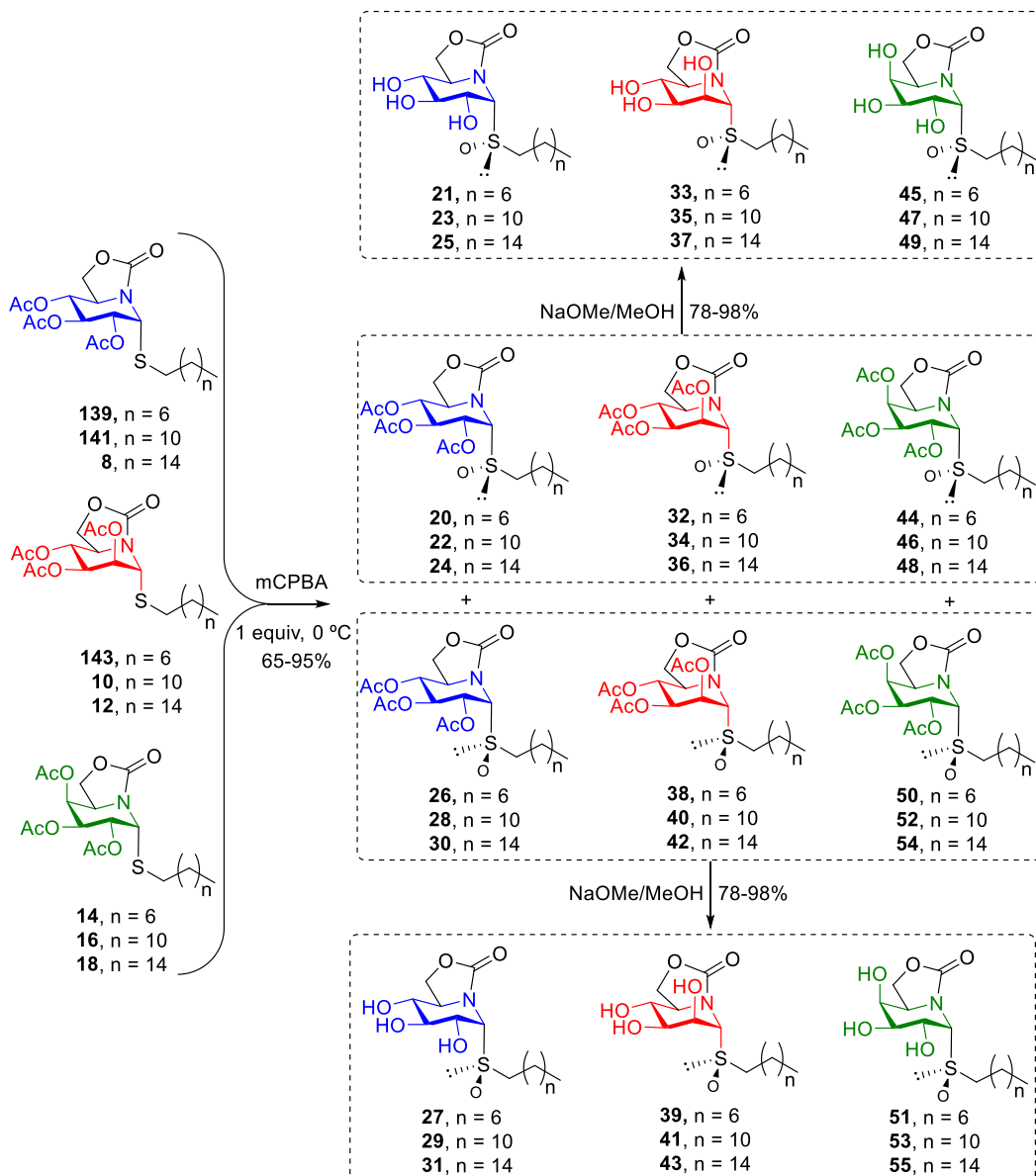


Figura 3.7. Mecanismo propuesto para la formación de los glicosilsulfóxidos actuando el azufre como nucleófilo frente al ácido *m*CPBA.

En las condiciones de reacción empleadas se obtuvieron los correspondientes sulfinil derivados como una mezcla de diastereoisómeros (S_s) y (R_s) en proporción relativa 1:1, independientemente del perfil configuracional del iminoazúcar sp^2 de partida. Los diastereoisómeros ópticamente puros se pudieron separar y aislar mediante cromatografía en columna de gel de sílice, y su posterior desacetilación condujo a los pseudo α -glicosilsulfóxidos libres derivados de ONJ, OMJ y OGJ con excelentes rendimientos (Esquema 3.3.).



Esquema 3.3. Síntesis de los pseudo α -glicosulfóxidos derivados de ONJ, OMJ y OGJ.

La oxidación de sulfuros a sulfóxidos se puede detener en este estadio, ya que la oxidación del sulfóxido a la sulfona es generalmente de 100 a 1000 veces más lenta que

la oxidación de sulfuro a sulfóxido.⁸ Esta diferencia de reactividad se pone de manifiesto con oxidantes electrofílicos como el *m*CPBA debido a que los sulfóxidos son menos nucleófilos que sus análogos sulfuros.

Dada la importancia de la quiralidad en los fármacos, la necesidad de determinar la estereoquímica del átomo de azufre en compuestos que contienen el grupo sulfóxido es importante ya que los dos diastereoisómeros pueden presentar propiedades químicas y farmacológicas muy diferentes.⁹ Desafortunadamente, no se pudieron obtener cristales de ninguno de los compuestos obtenidos adecuados para ser analizados mediante difracción de rayos-X. No obstante, sí se observaron diferencias significativas en los desplazamientos químicos de algunas de las señales en sus espectros de ¹H RMN que nos permitieron asignar tentativamente la configuración absoluta de cada pareja de diastereoisómeros obtenida. Así, por ejemplo, el protón H-5 aparece desapantallado aproximadamente 0.2 ppm en los derivados **21**, **23**, **25**, **33**, **35**, **37**, **45**, **47** y **49** en comparación con sus correspondiente pares **27**, **29**, **31**, **39**, **41**, **43**, **51**, **53** y **55**. En la Figura 3.8. se incluyen a modo de ejemplo los espectros de ¹H RMN de los diastereoisómeros **23** y **29**, que incorporan una cadena de dodecilo, donde se observa como la señal del protón H-5 se desplaza desde 4.06 ppm para el glicosilsulfóxido de configuración (*S*) a 3.91 ppm para el de configuración (*R*). Este dato, junto con la mayor inequivalencia magnética ($\Delta\delta$) de los protones del metileno vecinal al átomo de azufre quiral (SOCH₂) para los derivados **27**, **29**, **31**, **39**, **41**, **43**, **51**, **53** y **55**, comparados con sus respectivos diastereoisómeros, permitió asignarles la configuración absoluta (*S_S*) y (*R_S*), respectivamente (Figura 3.8.) de acuerdo con las propiedades de RMN descritas en la bibliografía para los alquil α -D-glicosil sulfóxidos.¹⁰

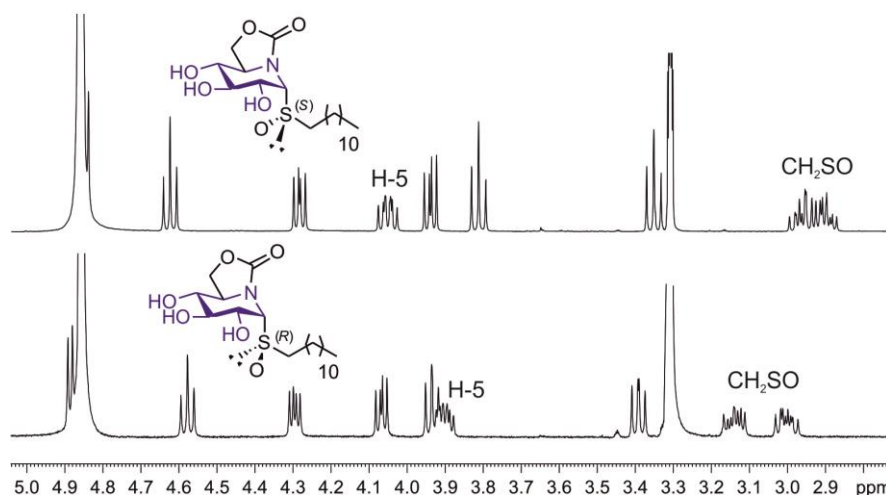
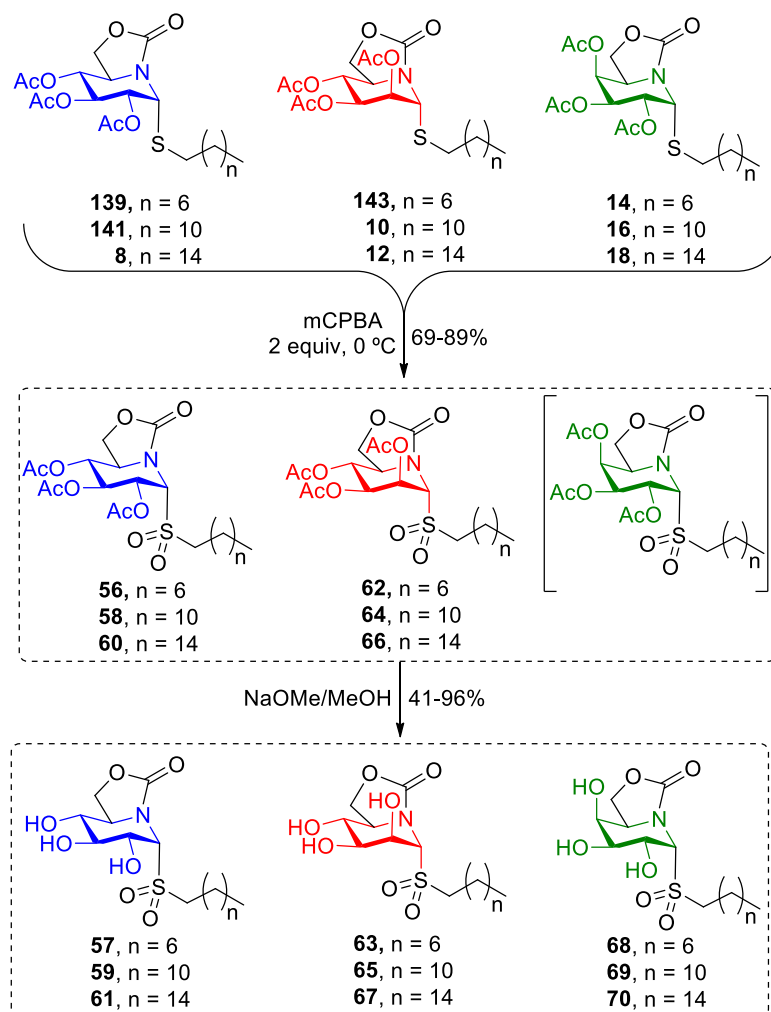


Figura 3.8. Espectros de ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) de los pseudo glicosilsulfóxidos **23** y **29**.

Cuando la reacción de oxidación de los pseudo-tioglicósidos (**139**, **141**, **8**; **143**, **10**, **12**; **14**, **16**, **18**) se realizó con 2 equivalentes de *m*CPBA, se obtuvieron las correspondientes pseudo-glicosilsulfonas acetiladas con configuración anomérica α (Esquema 3.4.), que se pudieron caracterizar en el caso de los derivados de ONJ (**56**, **58**, **60**) y OMJ (**62**, **64**, **66**). En el caso de los derivados de OGJ se observó desacetilación parcial. La posterior desacetilación convencional condujo a los sulfonil derivados deprotegidos **57**, **59**, **61**, **63**, **65**, **67** y **68-70** con excelentes rendimientos, siendo todos ellos estables química y configuracionalmente.



Esquema 3.4. Síntesis de las pseudo α -glicosulfonas derivadas de ONJ (**57**, **59**, **61**), de OMJ (**63**, **65**, **67**) y de OGJ (**68-70**).

La presencia del grupo sulfonilo en la estructura de los compuestos preparados se confirmó en los espectros de ^1H y de ^{13}C RMN de todas las α -glicosulfonas sintetizadas por la presencia de la señal del grupo CH_2SO_2 a valores de δ 3.2-3.4 ppm y 52-56 ppm, respectivamente. En la Figura 3.9. se incluyen los espectros de ^1H y ^{13}C RMN

de la pseudoglicosilsulfona **70**, de configuración *galacto* que incorpora una cadena de hexadecilo donde se observan las señales comentadas.

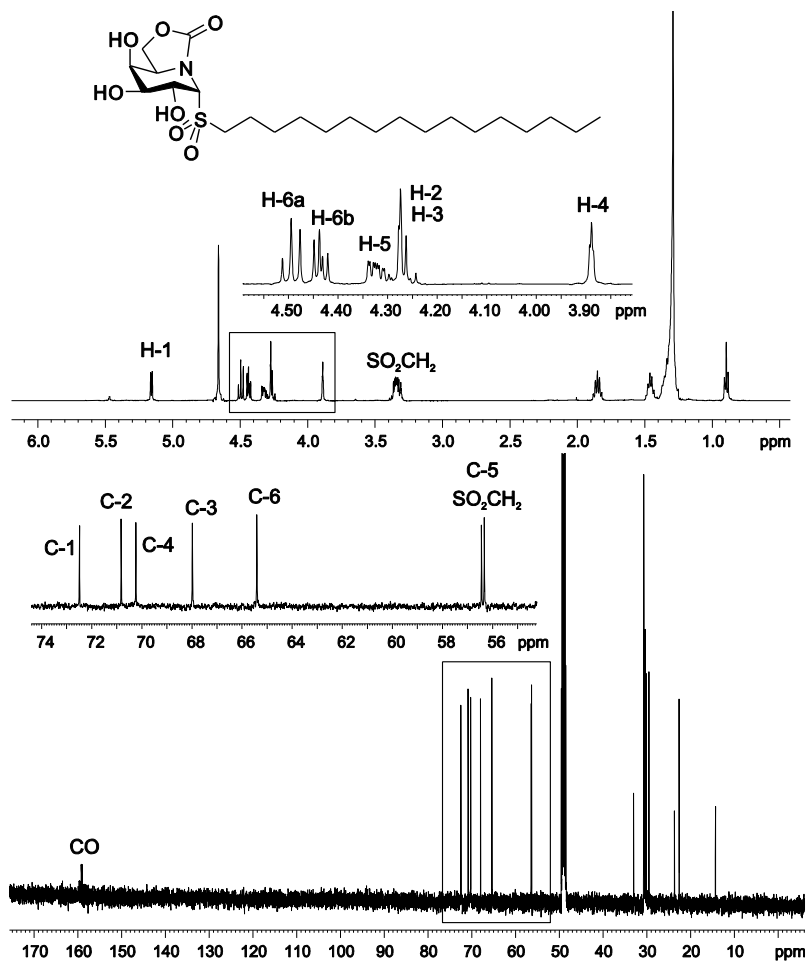
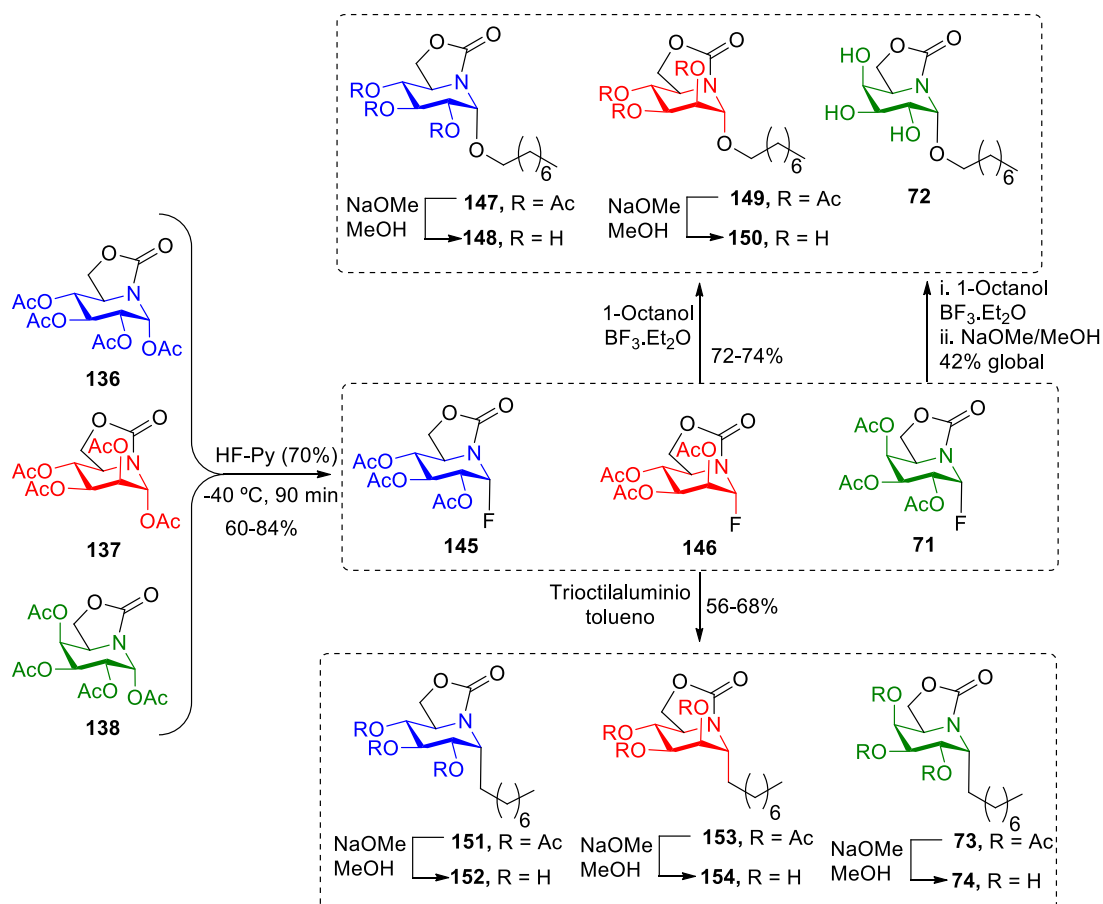


Figura 3.9. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD , 313 K) de **70**.

A continuación se abordó la preparación de los pseudo-*O*- y *C*-glicósidos (Esquema 3.5.) incorporando una cadena de *n*-octilo con objeto de evaluar la influencia de la naturaleza del átomo unido a la posición pseudoanómica en las propiedades farmacológicas de estos glicomiméticos. En ambos casos se partió de los correspondientes derivados 1-fluorados **145**,⁴ **146**¹¹ y **71** como donadores de glicosilo.

Estos intermedios se obtienen a partir de los precursores peracetilados **136**, **137** y **138** por reacción con el complejo poli(flúoruro de hidrógeno)piridinio (70% HF)¹² a -40 °C durante 90 min (Esquema 3.5.). Para evitar desacetilaciones parciales del derivado 1-fluorado, en esta etapa es necesario un control cuidadoso del tiempo y de la temperatura de reacción.



Esquema 3.5. Síntesis de los 1-fluoroderivados de OMJ, ONJ y OGJ y su transformación en pseudo-*O*- y *C*-octil glicósidos. Las reacciones de desacetilación transcurrieron con rendimientos del 84-97%.

La presencia del átomo de flúor pseudoanomérico en las estructuras **145**, **146** y **71** se confirmó mediante espectroscopía de ^{19}F , ^1H y ^{13}C RMN. Así, por ejemplo, en el espectro de ^{19}F RMN desacoplado del derivado de configuración *galacto* **71** se observa una única señal a δ -166.3 ppm (Figura 3.10. (A)). Por su parte, en el espectro de ^{19}F RMN acoplado (Figura 3.10. (B)) se pudieron observar los acoplamientos del átomo de flúor con los protones H-1 y H-2 ($J_{\text{H},\text{F}} = 51.6$ Hz y 22.4 Hz, respectivamente).

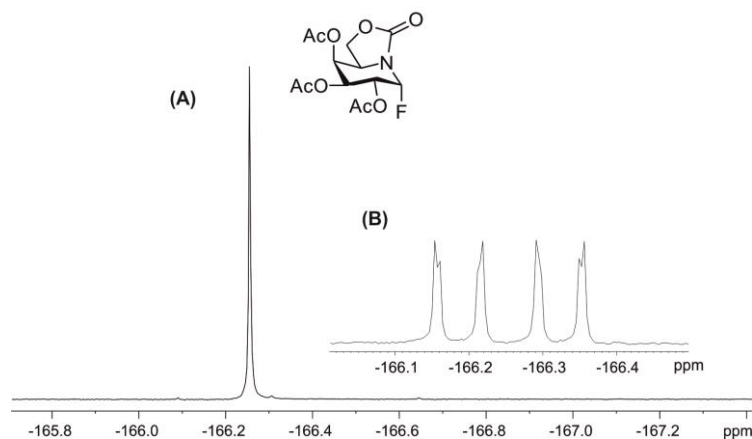


Figura 3.10. Espectros de ^{19}F RMN de **71**: (A) desacoplado, (B) acoplado (376 MHz, CDCl_3).

En el espectro de ^1H RMN de **71** registrado a 500 MHz se confirmaron las constantes de acoplamiento de los protones H-1 y H-2 con el átomo de flúor. Así, las señales de H-1 ($J_{1,\text{F}} = 51.6$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz) y H-2 ($J_{2,\text{F}} = 22.4$ Hz, $J_{2,3} = 10.8$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz) se observaron como doble doblete (H-1) y doble duplete duplo (H-2), respectivamente. Por su parte, en el espectro de ^{13}C RMN las señales de C-1 y de C-2 aparecen desdobladas debido al acoplamiento de ambos carbonos con el átomo de flúor ($J_{\text{C}1,\text{F}} = 208.7$ Hz, $J_{\text{C}2,\text{F}} = 24.6$ Hz) (Figura 3.11.).

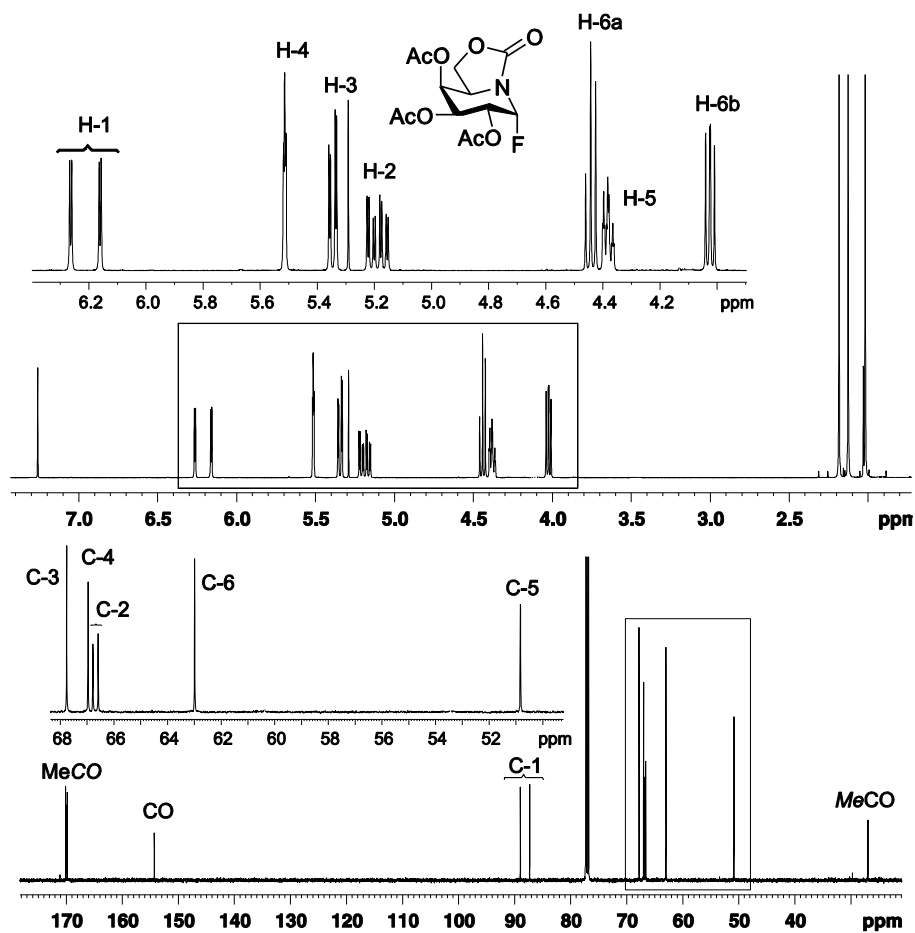


Figura 3.11. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CDCl_3) de 71.

La posterior reacción de *O*-glicosidación a partir de los 1-fluoro derivados se llevó a cabo en diclorometano a 0 °C en presencia de trifluoruro de boro.³ En estas reacciones, la salida del grupo pseudoanomérico para formar el correspondiente catión azacarbenio intermedio está asistida por el par de electrones sin compartir del nitrógeno endocíclico con hibridación sp^2 y el ataque del 1-octanol tiene lugar bajo control estricto del efecto anomérico, aislándose exclusivamente el anómero α (147, 149; Esquema 3.5.). En la reacción de *O*-glicosidación del derivado de configuración *galacto* se observó

desacetilación parcial y no se aisló el derivado triacetilado puro. En cualquier caso, la desacetilación total condujo a los derivados libres deseados **148**, **150** y **72**.

La preparación de los pseudo-*C*-octilglicósidos de configuración *gluco*,⁴ *mano*¹¹ y *galacto* se llevó a cabo por reacción del derivado 1-fluorado correspondiente con trioctilaluminio en tolueno¹³ a 0 °C (Esquema 3.5.). El anómero α fue el único compuesto detectado en el caso del derivado de OMJ (**153**) y fue el producto mayoritario en los otros dos casos, con proporciones relativas α : β 4:1 (ONJ) y 6:1 (OGJ). En ambos casos se separó el anómero α puro (**151** o **73**) mediante cromatografía HPLC semipreparativa. La desacetilación de los triacetatos condujo a los correspondientes derivados libres **152**, **154** y **74**.

3.2. Evaluación de la actividad como inhibidores de glicosidasas.

Estudios previos llevados a cabo con los *S*- y *C*-octil derivados de ONJ **140** y **152** frente a dos líneas celulares tumorales de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) sugerían una relación entre la capacidad de estos compuestos de inhibir a la enzima α -glucosidasa neutra y su actividad antiproliferativa y pro-apoptótica.¹⁴ Con el fin de establecer si el comportamiento como inhibidores de glicosidasas podría ser usado como criterio preliminar para seleccionar candidatos susceptibles de actuar como fármacos antitumorales, se consideró interesante evaluar la actividad inhibitoria de los iminoazúcares sp² bicíclicos sintetizados en el apartado anterior frente a un panel de glicosidasas comerciales, incluyendo α - (levadura) y β -glucosidasas (almendra), α - (Jack bean) y β -manosidasas (*Helix pomatia*), y α - (green coffee beans) y β -galactosidasas (*E. coli*). En los casos en los que se detectó actividad inhibitoria, el modo de inhibición fue reversible y competitivo y los valores de las constantes de inhibición (K_i , μM) se determinaron mediante la representación de dobles inversos o de Lineweaver-Burk. Esta representación constituye un método robusto y reproducible para determinar constantes

de inhibición enzimática cuando la unión enzima-inhibidor es reversible. Las dos variables del experimento son las concentraciones de sustrato y de inhibidor. La primera se establece en un rango que viene dado por el valor de la constante K_M de la enzima. El rango de concentraciones de inhibidor se calcula en función de un valor de K_i pre-estimado mediante una evaluación previa a una concentración fija de sustrato. De la gráfica de Lineweaver-Burk se extrae una amplia información que va desde la confirmación de los parámetros cinéticos característicos de cada enzima (K_m y V_{max}), hasta la determinación inequívoca del tipo de mecanismo de inhibición y su constante.

El hecho de que todas las rectas en las representaciones de Lineweaver-Burk corten en un punto del eje de ordenadas ($1/V_{max}$) confirma el mecanismo de tipo competitivo, esto es, el sustrato y el inhibidor se unen ambos al sitio catalítico de la enzima. En un mecanismo competitivo, la velocidad de reacción disminuye afectando al valor de K_{app} . La representación de los valores de K_{app} experimentales frente a la concentración de inhibidor ([I]) nos lleva a un valor de K_i más preciso que el estimado previamente. Cada experiencia se repite una serie de veces de manera independiente para el cálculo del error asociado al valor de K_i .

En la Figura 3.12. se muestra la representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la K_i del compuesto **1** frente a la α -glucosidasa de levadura.

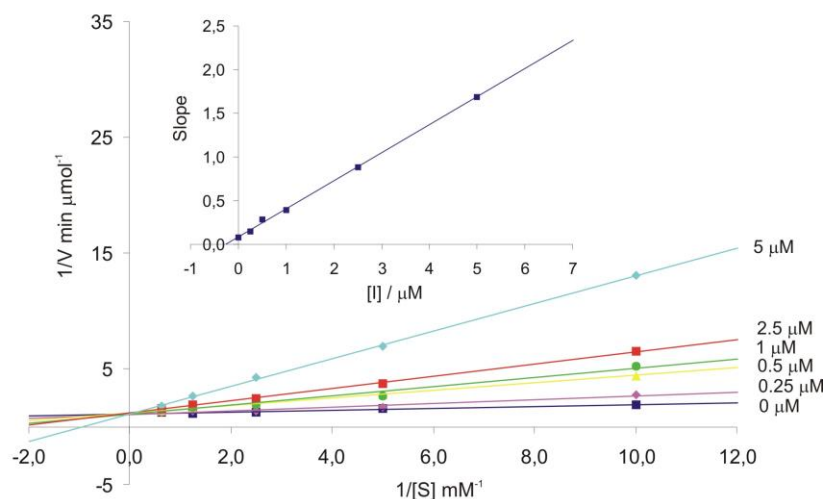
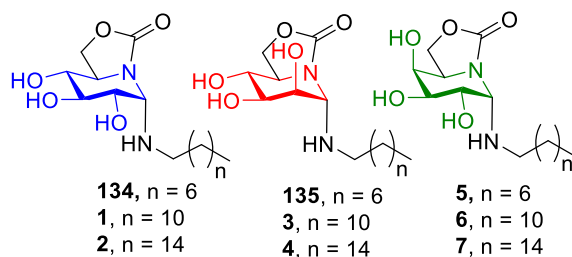


Figura 3.12. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de K_i ($0.26 \mu\text{M}$) de la *gem*-diamina **1** frente a α -glucosidasa (levadura).

Los iminoazúcares sp^2 bicíclicos reductores **131**, **132** y **133** se incluyeron en el estudio como controles para determinar el efecto de la parte aglicónica en los pseudoglicósidos. Los tres compuestos presentaron una afinidad débil frente a las enzimas ensayadas.² En primer lugar se evaluaron las *gem*-diaminas derivadas de ONJ, OMJ y OGJ con cadenas de octilo, dodecilo y hexadecilo cuyos valores de constantes de inhibición (K_i , μM) se recogen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para las *gem*-diaminas derivadas de ONJ (**134**, **1**, y **2**), OMJ (**135**, **3**, y **4**) y OGJ (**5**, **6**, y **7**).^a



	α -Glucasa (Levadura)	β -Glucasa (Almendra)	β -Glucasa (Hígado buey) ^b	α -Manasa (Judías Jack)	α -Galasa (Café verde)
134	0.54 ± 0.1	236 ± 24	21 ± 2	500 ± 53	ni
1	0.26 ± 0.03	ni	11.5 ± 2.0	ni	ni
2	25.4 ± 3	ni	14 ± 2	ni	ni
135	ni	ni	260 ± 29	3.2 ± 0.4	ni
3	437 ± 44	ni	77 ± 8	120 ± 12	ni
4	ni	ni	54 ± 5.5	763 ± 76	ni
5	ni	0.38 ± 0.04	8.8 ± 0.9	498 ± 50	175 ± 18
6	63 ± 7	2.9 ± 0.3	4.9 ± 0.5	ni	ni
7	284 ± 28	186 ± 19	33 ± 3	ni	ni

ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2mM. ^a Ninguno de los compuestos mostró actividad frente a las enzimas β -Manasa (*Helix pomatia*), y β -Galasa (*E. Coli*).

^b Esta enzima hidroliza β -glucopiranosidos y β -galactopiranosidos con la misma eficiencia aproximadamente.

Las *gem*-diaminas de configuración *gluco* (**134**, **1**, **2**) se comportaron como inhibidores potentes de α -glucosidasa (levadura), de acuerdo con su perfil configuracional, con constantes de inhibición en el rango submicromolar para las cadenas C₈ y C₁₂ ($K_i = 0.54$ y $0.26 \mu\text{M}$ para **134** y **1**), observándose un incremento en el valor de K_i de un orden de magnitud (K_i , $25.4 \pm 3 \mu\text{M}$) al incorporar un cadena C₁₆. Además, los compuestos **134** y **1**, mostraron selectividad anomérica α/β relevante con valores de K_i frente a β -glucosidasa un orden de magnitud mayor que para α -glucosidasa.

En el caso de las *gem*-diaminas derivadas de OMJ se observa una evidente influencia negativa de la longitud de la cadena alquílica con respecto a la inhibición frente a la α -manosidasa (judías Jack). Así, el compuesto **135** (NH-C₈) resultó ser un potente inhibidor de esta enzima (K_i , $3.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$), mientras que el derivado con cadena de NH-C₁₂ (**3**) mostró un valor de K_i hasta dos órdenes de magnitud superior (K_i , $120 \pm 12 \mu\text{M}$), resultando prácticamente inactiva la *gem*-diamina con cadena C₁₆ (**4**). Con objeto de

analizar la disminución de la potencia de inhibición observada a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica se llevó a cabo la determinación de la concentración de agregación crítica (CAC) de **135**, **3** y **4** empleando un método que usa pireno como sonda fluorescente.¹⁵ En medio acuoso la molécula de pireno se incorpora en el interior hidrófobo del agregado induciendo cambios en su espectro de fluorescencia al emplear una λ_{em} de 375 nm. El aumento de la longitud de la cadena alquílica, de 8 a 12-16 átomos de carbono produce una disminución significativa de la CAC, desde $400 \pm 65 \mu\text{M}$ para la *gem*-diamina de octilo (**135**) hasta 72 ± 8 y $113 \pm 15 \mu\text{M}$ para las cadenas de dodecilo y hexadecilo respectivamente. La representación gráfica de la relación de intensidades de fluorescencia a 339 y 335 nm frente a la concentración empleada permite determinar la CAC de cada compuesto. En la Figura 3.13. se representan los espectros de excitación del pireno en presencia de la *gem*-diamina de dodecilo **3** (CAC $72 \pm 8 \mu\text{M}$).

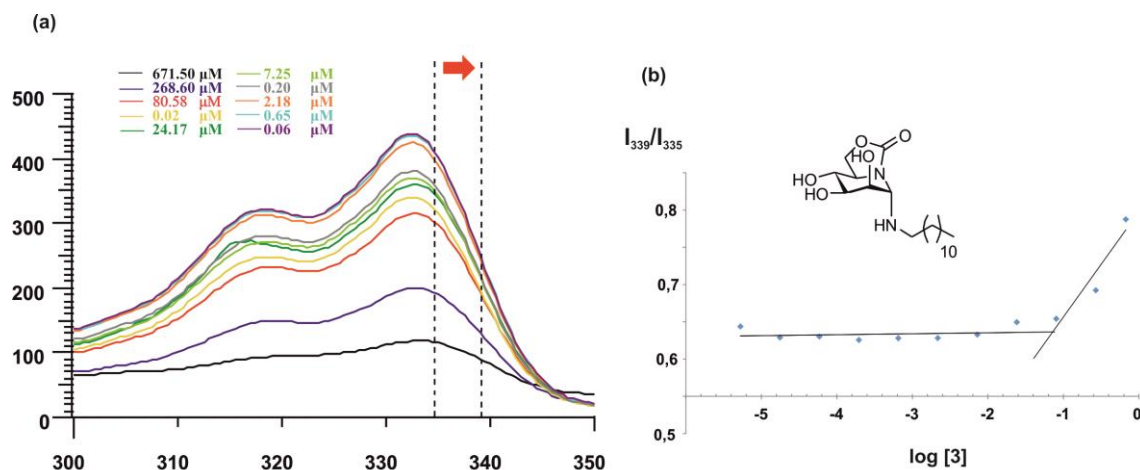
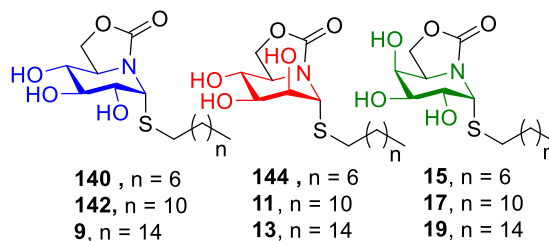


Figura 3.13. Determinación de la CAC del compuesto **3**. (a) Espectros de excitación de la fluorescencia de la molécula de pireno (λ_{em} 375 nm) en agua en presencia de **3**; (b) Determinación de CAC de **3**.

Por su parte las *gem*-diaminas de configuración *galacto* no se comportaron como inhibidores de α - o β -galactosidasas como cabría esperar atendiendo a su perfil configuracional. Únicamente el derivado de *MH-C*₈ (**5**) mostró una inhibición moderada frente a α -galactosidasa (café verde, K_i , $175 \pm 18 \mu\text{M}$). En cambio, se comportó como inhibidor potente frente a β -glucosidasas (tanto de almendras como de hígado de buey) con constantes de inhibición en el rango submicromolar (K_i , $0.38 \pm 0.04 \mu\text{M}$) y micromolar (K_i , $8.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$) respectivamente.

Los resultados de la evaluación de los pseudo-*S*-glicósidos derivados de ONJ, OMJ y OGJ se recogen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los pseudo-*S*-glicósidos derivados de ONJ (**140**, **142**, y **9**), OMJ (**144**, **11**, y **13**) y OGJ (**15**, **17**, y **19**).^a



	α -Glucasa (Levadura)	β -Glucasa (Hígado buey) ^b	α -Galasa (Café verde)
140	3.4 ± 0.4	60 ± 6	ni
142	1.3 ± 0.1	79 ± 8	ni
9	112 ± 11	173 ± 18	ni
144	456 ± 46	317 ± 32	ni
11	ni	ni	ni
13	537 ± 54	241 ± 24	ni
15	ni	81 ± 8	75 ± 8
17	216 ± 22	82 ± 8	348 ± 35

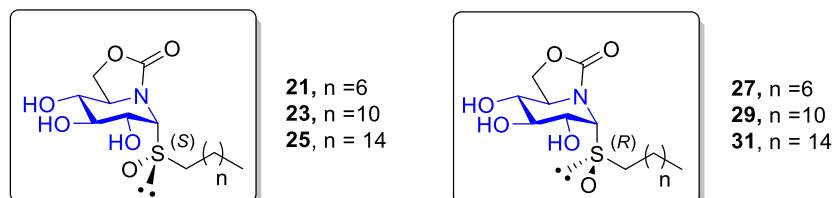
19	865 ± 87	935 ± 94	ni
-----------	----------	----------	----

ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2 mM. ^aNinguno de los compuestos mostró actividad frente a las enzimas β -Glcasa (*almendras*), α -Manasa (*Jack bean*), β -Manasa (*Helix pomatia*), y β -Galasa (*E. Coli*). ^bEsta enzima hidroliza β -glucopiranosidos y β -galactopiranosidos con la misma eficiencia aproximadamente.

Los derivados de configuración *gluco* con cadenas *S*-C₈ y *S*-C₁₂ (**140** y **142**) se comportaron como inhibidores potentes de α -glucosidasa con valores de constante de inhibición en el rango micromolar bajo (K_i , 3.4 ± 0.4 μ M, K_i , 1.3 ± 0.1 μ M, respectivamente), sin embargo cuando la longitud de la cadena alquílica aumenta hasta 16 átomos de carbono (**9**), el valor de K_i se incrementa hasta dos órdenes de magnitud (K_i , 112 ± 11 μ M). Con respecto a los tioglicósidos de OGJ se observó una inhibición moderada frente a α -galactosidasa con el derivado de octilo (K_i , 75 ± 8 μ M), sin embargo el aumento de la longitud de la cadena alquílica afectó negativamente a la afinidad de la enzima, siendo este efecto mucho más drástico en presencia de la cadena C₁₆ (**19**). Los tioglicósidos derivados de OMJ no mostraron afinidad por la α -manosidasa en ningún caso, la sustitución de *MH*-octilo (K_i , 3.2 ± 0.4 μ M) por *S*-octilo ocasionó una pérdida total de afinidad por esta enzima.

Los resultados obtenidos con los pseudo α -glicosilsulfóxidos y α -glicosilsulfonas ponen de manifiesto la importancia del estado de oxidación del átomo de azufre en la actividad inhibitoria. Los resultados más significativos se recogen en las Tablas 3.3.-3.4.

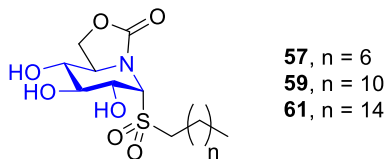
Tabla 3.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los pseudo α -glicosilsulfóxidos (**21**, **27**, **23**, **29**, **25**, **31**) derivados de ONJ.^a



Glicosilsulfóxidos derivados ONJ						
Enzimas	21	27	23	29	25	31
α -Glucasa (Levadura)	44 \pm 5	14 \pm 2	272 \pm 27	447 \pm 45	282 \pm 28	309 \pm 31
Isomaltasa	84 \pm 9	18 \pm 2	636 \pm 64	487 \pm 50	ni	ni
β -Glucasa (Hígado buey) ^b	37 \pm 4	214 \pm 22	290 \pm 30	443 \pm 45	190 \pm 20	905 \pm 80

ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2 mM. ^aNinguno de los compuestos mostró actividad frente a las enzimas α -Manasa (Judía Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*), α -Galasa (granos de café verde) y β -Galasa (*E. Coli*). ^bEsta enzima hidroliza β -glucopiranosidos y β -galactopiranosidos con la misma eficiencia aproximadamente.

Tabla 3.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para las pseudo α -glicosilsulfonas (**57**, **59**, **61**) derivados de ONJ.^a



Glicosilsulfonas derivadas ONJ			
Enzimas	57	59	61
α -Glcasa (Levadura)	12 \pm 2	6.4 \pm 1	356 \pm 36
Isomaltasa	16.5 \pm 2	382 \pm 40	ni
β -Glcasa (Hígado buey) ^b	126 \pm 13	240 \pm 24	527 \pm 53

ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2 mM. ^aNinguno de los compuestos mostró actividad frente a las enzimas α -Manasa (Judía Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*), α -Galasa (granos de café verde) y β -Galasa (*E. Coli*). ^bEsta enzima hidroliza β -glucopiranosidos y β -galactopiranosidos con la misma eficiencia aproximadamente.

Los análogos oxidados con cadena de sulfinilo mostraron diferencias significativas no solo en la actividad inhibitoria sino también en la selectividad anomérica dependiendo del nuevo centro estereogénico generado después de la oxidación del átomo de azufre. Por ejemplo, el octilsulfóxido de configuración R_S (**27**) (K_i , 14 \pm 2.0 μM) resultó tres veces más potente frente a α -glucosidasa que su diastereoisómero de configuración S_S (**21**) (K_i , 44 \pm 5 μM), el cual por el contrario fue más potente frente a β -glucosidasa (K_i , 37 \pm 4 y K_i , 214 \pm 22 μM para **21** y **27**, respectivamente). Sorprendentemente, la actividad inhibitoria disminuyó drásticamente en el caso de los glicosilsulfóxidos de dodecilo (**23**, **29**) y de hexadecilo (**25**, **31**).

En cuanto a las α -glicosilsulfonas la introducción de la cadena C_{16} (**61**) provocó una pérdida notable de actividad (K_i , 356 \pm 36 μM) en comparación con sus análogos de

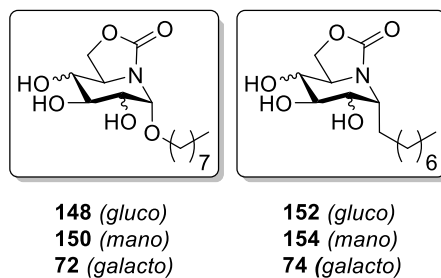
cadenas C₈ y C₁₂ (**57** y **59**), los cuales se comportaron como potentes inhibidores de esta enzima (K_i , 12 ± 2 y K_i , 6.4 ± 1 μM , respectivamente).

La oxidación del átomo de azufre en los iminoazúcares de la serie *mano* y de la serie *galacto* hasta sulfóxidos y sulfonas proporcionó resultados similares a los obtenidos con sus pseudo-*S*-glicósidos de partida. En ningún caso se observó inhibición significativa frente a las enzimas α -manosidasa y α -galactosidasa.

Por último se evaluaron los pseudo-*O*-octilglicósidos y *C*-octilglicósidos de las series *gluco*, *mano* y *galacto*. En el caso de los pseudo-*O*-octilglicósidos se llevaron a cabo previamente experimentos control (mediante EM) para descartar su comportamiento como sustratos de las correspondientes enzimas que hidrolizan glicósidos de configuración *gluco*, *mano* o *galacto*. Los resultados más relevantes se resumen en la Tabla 3.5.

Los derivados de la serie *gluco* se comportaron como inhibidores muy potentes frente a la α -glucosidasa de levadura independientemente del átomo unido a la posición pseudoanómica (K_i , 1.3 ± 0.14 μM , K_i , 0.87 ± 0.09 μM , respectivamente) mostrando una selectividad anomérica α/β que llega a superar los dos órdenes de magnitud en ambos casos.

Tabla 3.5. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los *O*- y *C*-octilglicósidos derivados de ONJ (**148**, **152**), OMJ (**150**, **154**) y OGJ (**72**, **74**).^a



Enzimas	Derivados ONJ		Derivados OMJ		Derivados OGJ	
	148	152	150	154	72	74
α -Glucasa (Levadura)	1.3 \pm 0.1	0.87 \pm 0.09	ni	272 \pm 28	166 \pm 17	ni
β -Glucasa (Hígado buey) ^b	413 \pm 43	253 \pm 26	322 \pm 33	179 \pm 18	233 \pm 23	126 \pm 13
α -Galasa (Café verde)	ni	ni	ni	ni	772 \pm 77	ni

ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2 mM. ^aNinguno de los compuestos mostró actividad frente a las enzimas α -Manasa (*Jack beans*), β -Manasa (*Helix pomatia*) y β -Galasa (*E. Coli*). ^bEsta enzima hidroliza β -glucopiranosidos y β -galactopiranosidos con la misma eficiencia aproximadamente.

En resumen, del conjunto de datos obtenidos en este estudio podemos extraer las siguientes conclusiones:

(a) Los derivados de ONJ se comportan como potentes inhibidores de α -glucosidasa (levadura), con valores de K_i en el rango submicromolar y micromolar, independientemente del tipo de unión glicosídica. El efecto de la longitud de la cadena alquílica aglicónica es notable, observándose una caída de uno a dos órdenes de magnitud en la potencia de inhibición al pasar de la cadena de C_{12} a la cadena de C_{16} o, en el caso de los α -glicosilsulfóxidos, al pasar de la cadena de C_8 a la cadena de C_{12} .

(b) De entre los derivados de OMJ, solamente el pseudo-*N*-glicósido con cadena de C₈ **135** presentó potente actividad inhibitoria frente a α -manosidasa (K_i , $3.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$). El aumento de la longitud de la cadena alquílica o la sustitución del grupo amino glicosídico por un grupo neutro redujo drásticamente o canceló por completo la capacidad de inhibir la enzima.

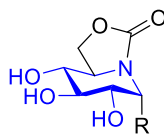
(c) Ninguno de los compuestos de la serie OGJ preparados inhibió significativamente la α -galactosidasa, a pesar de la complementaridad configuracional con los sustratos naturales de esta enzima. Los derivados de tipo *N*-glicosídico **5-7**, básicos, se comportaron como inhibidores potentes de β -glucosidasas. En cualquier caso, no se observó inhibición significativa de α -glucosidasa o α -manosidasa.

Con objeto de determinar si la selectividad de los derivados de ONJ hacia la α -glucosidasa de levadura entre las glicosidasas comerciales estudiadas se extiende a otras α -glucosidasas de origen humano, estos compuestos fueron evaluados también frente a la α -glucosidasa ácida lisosomal humana en colaboración con los profesores Y. Suzuki y H. Katsumi (Universidad de Tottori, Japón) y frente a las α -glucosidasas neutras I y II del retículo endoplasmático en colaboración con el Dr. Terry Butters (Universidad de Oxford, Reino Unido). En ninguno de los casos se observó inhibición a concentraciones por debajo de 1 mM. No obstante, en el caso de las glucosidasas del retículo endoplasmático el ensayo es indirecto, consistente en detectar oligosacáridos modificados como consecuencia de la inhibición de las enzimas, lo que puede plantear alguna duda. En cualquier caso, el conjunto de estructuras preparado es suficientemente amplio como para proporcionar información directa sobre la influencia de la configuración del glicomimético y su actividad frente a glicosidasas en su posible actividad antitumoral.

3.3. Evaluación in vitro de la actividad antiproliferativa.

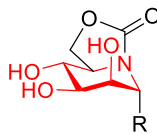
Para analizar el potencial de los iminoazúcares sp^2 anfifílicos derivados de ONJ, OMJ y OGJ como agentes antitumorales se ha evaluado, en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, Tenerife), la capacidad antiproliferativa de todos los compuestos sintetizados frente a un panel de seis líneas celulares humanas de tumores sólidos: A549 (pulmón), SW1573 (pulmón), HBL-100 (mama), T-47D (mama), HeLa (útero) y WiDr (colon). Los resultados, expresados como la concentración necesaria para inhibir el crecimiento un 50% (GI_{50}), se recogen en las Tablas 3.6., 3.7. y 3.8. Únicamente valores de GI_{50} inferiores a 100 μM se consideraron significativos.

De los datos experimentales obtenidos podemos extraer conclusiones acerca de la relación estructura-actividad antiproliferativa de las tres familias de compuestos ensayados donde analizamos tanto el efecto de la naturaleza del aglicón como el perfil configuracional del iminoazúcar sp^2 .

Tabla 3.6. Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50}) de los derivados de ONJ.^a

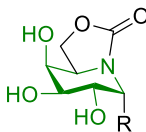
R	Líneas celulares tumorales						
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	
131	OH	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134	NHC₈H₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
1	NHC₁₂H₂₅	18 (±4.4)	23 (±7.0)	23 (±7.7)	30 (±0.4)	23 (±5.5)	22 (±7.6)
2	NHC₁₆H₃₃	>100	>100	>100	>100	>100	>100
140	SC₈H₁₇	58 (±7.1)	73 (±38)	92 (±12)	>100	95 (±7.2)	89 (±15)
142	SC₁₂H₁₇	16 (±2.0)	17 (±3.7)	17 (±2.2)	18 (±1.2)	18 (±1.9)	18 (±0.2)
9	SC₁₆H₃₃	47 (±17)	23 (±8.9)	39 (±9.8)	>100	48 (±13)	32 (±3.3)
21	SOC₈H₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
27	SOC₈H₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
57	SO₂C₈H₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
23	SOC₁₂H₂₅	29 (±2.6)	20 (±2.1)	23 (±1.4)	29 (±6.6)	23 (±0.1)	22 (±2.8)
29	SOC₁₂H₂₅	41 (±8.5)	52 (±29)	40 (±11)	58 (±6.3)	52 (±14)	48 (±6.6)
59	SO₂C₁₂H₂₅	22 (±3.9)	19 (±1.8)	18 (±1.5)	20 (±1.3)	21 (±0.9)	21 (±0.6)
25	SOC₁₆H₃₃	23 (±6.3)	30 (±5.7)	18 (±1.2)	54 (±2.4)	20 (±0.6)	42 (±7.5)
31	SOC₁₆H₃₃	46 (±3.0)	56 (±10)	27 (±0.2)	83 (±9.0)	40 (±3.1)	97 (±4.8)
61	SO₂C₁₆H₃₃	15 (±2.8)	21 (±4.2)	11 (±2.5)	22 (±4.4)	14 (±2.5)	21 (±1.6)
148	OC₈H₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
152	C₈H₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100

^aValores de GI_{50} (μM) correspondientes a la media de dos a tres experimentos. Las desviaciones standard aparecen en paréntesis.

Tabla 3.7. Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50}) de los derivados de OMJ.^a

R		Líneas celulares tumorales					
		A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
132	OH	>100	>100	>100	>100	>100	>100
135	NHC ₈ H ₁₇	91 (±16)	43 (±14)	68 (±24)	62 (±23)	88 (±21)	>100
3	NHC ₁₂ H ₂₅	47 (±6.1)	45 (±5.5)	18 (±2.2)	77 (±3.1)	28 (±1.4)	41 (±1.1)
4	NHC ₁₆ H ₃₃	30 (±4.5)	31 (±4.2)	25 (±2.7)	94 (±8.7)	41 (±6.7)	36 (±11)
144	SC ₈ H ₁₇	72 (±16)	87 (±18)	80 (±6.6)	>100	84 (±7.7)	>100
11	SC ₁₂ H ₁₇	18 (±3.4)	26 (±3.4)	19 (±0.4)	25 (±1.0)	25 (±1.5)	23 (±1.8)
13	SC ₁₆ H ₃₃	19 (±5.1)	22 (±2.2)	15 (±4.1)	24 (±4.0)	17 (±1.9)	29 (±3.0)
33	SOC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
39	SOC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
63	SO ₂ C ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
35	SOC ₁₂ H ₂₅	29 (±3.7)	29 (±4.1)	22 (±4.6)	60 (±1.4)	24 (±3.7)	28 (±0.5)
41	SOC ₁₂ H ₂₅	29 (±0.6)	27 (±6.9)	26 (±1.6)	37 (±20.0)	25 (±2.0)	21 (±3.5)
65	SO ₂ C ₁₂ H ₂₅	18 (±2.7)	25 (±3.1)	12 (±4.3)	20 (±1.0)	23 (±1.3)	37 (±15.0)
37	SOC ₁₆ H ₃₃	9.4 (±1.6)	11 (±0.6)	14 (±3.7)	11 (±7.4)	11 (±0.2)	14 (±4.9)
43	SOC ₁₆ H ₃₃	15 (±3.2)	19 (±3.2)	23 (±8.0)	20 (±0.6)	16 (±0.7)	21 (±6.3)
67	SO ₂ C ₁₆ H ₃₃	21 (±15)	17 (±3.8)	21 (±7.4)	23 (±1.3)	16 (±0.2)	19 (±10.0)
150	OC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
154	C ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100

^aValores de GI_{50} (μ M) correspondientes a la media de dos a tres experimentos. Las desviaciones standard aparecen en paréntesis.

Tabla 3.8. Comparación de la actividad antiproliferativa (GI_{50}) de los derivados de OGJ.^a

	R	Líneas celulares tumorales					
		A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
133	OH	>100	>100	>100	>100	>100	>100
5	NHC ₈ H ₁₇	34 (±1.6)	42 (±12)	30 (±2.1)	50 (±9.7)	47 (±18)	44 (±14)
6	NHC ₁₂ H ₂₅	12 (±2.1)	16 (±4.3)	17 (±4.5)	36 (±2.5)	18 (±3.3)	22 (±8.7)
7	NHC ₁₆ H ₃₃	>100	>100	>100	>100	>100	>100
15	SC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	SC ₁₂ H ₁₇	21 (±4.3)	19 (±1.4)	16 (±1.6)	38 (±8.1)	18 (±3.7)	22 (±4.4)
19	SC ₁₆ H ₃₃	13 (±1.8)	18 (±3.0)	21 (±6.6)	29 (±7.6)	19 (±0.5)	28 (±6.3)
45	SOC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
51	SOC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
68	SO ₂ C ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
47	SOC ₁₂ H ₂₅	30 (±12)	45 (±11)	26 (±8.1)	62 (±21)	38 (±4.1)	39 (±1.8)
53	SOC ₁₂ H ₂₅	25 (±5.4)	32 (±7.4)	21 (±5.9)	38 (±8.7)	28 (±6.2)	30 (±4.5)
69	SO ₂ C ₁₂ H ₂₅	21 (±9.4)	23 (±7.6)	19 (±4.8)	35 (±6.3)	20 (±8.0)	25 (±8.0)
49	SOC ₁₆ H ₃₃	>100	>100	>100	>100	>100	>100
55	SOC ₁₆ H ₃₃	28 (±5.8)	46 (±10)	25 (±6.6)	98 (±2.9)	44 (±15)	71 (±10)
70	SO ₂ C ₁₆ H ₃₃	94 (±10)	>100	50 (±8.5)	>100	88 (±18)	>100
72	OC ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100
74	C ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100

^aValores de GI_{50} (μM) correspondientes a la media de dos a tres experimentos. Las desviaciones standard aparecen en paréntesis.

Los iminoazúcares sp^2 reductores (**131**, **132** y **133**), resultaron inactivos ($GI_{50} > 100 \mu M$) frente a todas las líneas celulares tumorales ensayadas independientemente del perfil configuracional del azúcar. Los derivados de tipo pseudo-*O*-octil (**148**, **150**, **72**) y -*C*-octil glicósidos (**152**, **154**, **74**) tampoco presentaron actividad. En la serie de las *gem*-diaminas se observó un efecto crítico de la longitud de la cadena alquílica en la actividad antiproliferativa. Por ejemplo, el derivado de ONJ con una cadena de *N*-dodecilo (**1**) mostró valores de GI_{50} comprendidos entre 18-30 μM frente a todas las líneas ensayadas, en tanto que los derivados de *N*-octilo (**134**) y *N*-hexadecilo (**2**) fueron inactivos. En el caso de los *N*-glicósidos derivados de OGJ se obtuvieron valores de GI_{50} comprendidos entre 12-50 μM para los derivados de C_8 y C_{12} (**5** y **6**), siendo inactivo el derivado de C_{16} (**7**). Por su parte los tres derivados de OMJ (**135**, **3** y **4**) inhibieron el crecimiento de las líneas tumorales ensayadas.

En los conjugados con uniones de tipo *S*-glicosídica también se observó dependencia de la actividad antiproliferativa con la longitud de la cadena del aglicón. Por ejemplo, los derivados de ONJ y OMJ con cadena *S*- C_8 (**140** y **144**) inhibieron moderadamente el crecimiento celular, siendo el efecto antiproliferativo más fuerte para los derivados con cadenas de *S*- C_{12} y *S*- C_{16} . En el caso de sus análogos oxidados en el átomo de azufre, se observó de nuevo una clara dependencia de la longitud de la cadena alifática. Así, los sulfóxidos y sulfonas de cadena C_8 no mostraron actividad en ninguno de los casos, en tanto que sus homólogos C_{12} y C_{16} mostraron potente actividad antiproliferativa en las tres familias de compuestos evaluados, exceptuando el sulfóxido de hexadecilo de configuración S_s derivado de OGJ (**49**) y su correspondiente sulfona (**70**), los cuales exhibieron una pérdida drástica de actividad frente a todas las líneas celulares tumorales ensayadas.

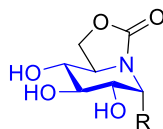
En términos generales se observa una mayor actividad antiproliferativa en aquellos derivados que presentan cadenas de dodecilo o hexadecilo frente a aquellos que portan cadenas de octilo. El que no solo compuestos de la serie ONJ, sino también derivados de OMJ (configuración *D-mano*) y sobre todo OGJ (configuración *D-galacto*)

presenten una actividad antiproliferativa destacable, sugiere fuertemente que ésta no está directamente asociada a la inhibición de las α -glucosidasas neutras (I, II) del retículo endoplasmático. De hecho, no se observa una relación directa entre la actividad antitumoral y la inhibición de glicosidasas. En principio, los glicomiméticos pueden interactuar con un rango de enzimas y receptores adicionales, tales como glicosiltransferasas,¹⁶ lectinas¹⁷ y chaperonas,¹⁸ que también pueden interferir en la proliferación y muerte celular. Por una parte, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en el estudio del mecanismo de acción para identificar la diana sobre la que actúan. Por otra, el hecho de que la biosíntesis de N-glicoproteínas no parezca ser la ruta que se afecta está de acuerdo con la baja toxicidad observada en células sanas. Dado que algunas de las rutas de señalización de cáncer son comunes con otros procesos patológicos, tales como la infección por algunos parásitos como la leishmania o la inflamación, el estudio de la actividad de los conjugados de iminoazúcares sp² en estas patologías es de interés.

3.4. Evaluación in vitro de la actividad leishmanicida.

Para analizar el potencial leishmanicida de la colección de iminoazúcares sp² bicíclicos sintetizados en este capítulo, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Francisco Gamarro Conde (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, IPBLN-CSIC, Granada). En primer lugar se evaluaron los derivados de la serie ONJ frente a formas promastigotas (extracelulares) y amastigotas (intracelulares) de la especie *Leishmania donovani* (*L. donovani*), determinándose la concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de los parásitos al 50% (IC₅₀). En la Tabla 3.9. se resumen los resultados obtenidos. Como control positivo se usó el fármaco leishmanicida miltefosina.

Tabla 3.9. Ensayos de sensibilidad y toxicidad en formas promastigotas y amastigotas de *L. donovani* de los iminoazúcares sp² derivados de ONJ.^a



R		Promastigotes <i>L. donovani</i> Dd8	Amastigotes intracelulares Dd8	Línea celular THP-1 ^b	Línea celular MRC-5 ^b
134	NHC ₈ H ₁₇	>100	47.00 (±8.80)	208.69 (±10.32)	154.52 (±5.30)
1	NHC ₁₂ H ₂₅	----	>20	122.50 (±13.30)	49.6 (±4.2)
2	NHC ₁₆ H ₃₃	----	18.7 (±2.9)	71.7 (±8.3)	70.8 (±9.4)
152	C ₈ H ₁₇	>100	>100	203.18 (±23.56)	54.76 (±6.24)
140	SC ₈ H ₁₇	>100	73.31 (±1.97)	122.33 (±5.79)	58.14 (±12.62)
142	SC ₁₂ H ₁₇	87.79 (±3.47)	20.48 (±3.59)	70.46 (±3.75)	43.07 (±9.83)
9	SC ₁₆ H ₃₃	----	>20	74.30 (±1.40)	42.2 (± 3.1)
21	SOC ₈ H ₁₇	>100	>100	218.74 (±0.45)	175.54 (±14.79)
27	SOC ₈ H ₁₇	>100	>100	161.79 (±20.27)	190.10 (±0.14)
57	SO ₂ C ₈ H ₁₇	>100	>100	285.26 (±55.14)	159.79 (±11.75)
23	SOC ₁₂ H ₂₅	>100	10.80 (±0.27)	118.83 (±3.37)	94.35 (±20.93)
29	SOC ₁₂ H ₂₅	>100	33.29 (±7.36)	68.41 (±6.79)	119.40 (±17.91)
59	SO ₂ C ₁₂ H ₂₅	>100	19.08 (±0.84)	99.58 (±12.47)	60.23 (±2.86)
25	SOC ₁₆ H ₃₃	-----	13.30 (±2.80)	107.20 (±19.80)	121.9 (±3.8)
31	SOC ₁₆ H ₃₃	-----	>20	>200	53.6 (±7.7)
61	SO ₂ C ₁₆ H ₃₃	-----	18.60 (±1.10)	72.30 (±1.9)	38.1 (±4.9)
Miltefosina ^c		6.60 (±1.57)	0.44 (±0.08)	26.86 (±3.08)	57.58 (±6.38)

^aValores de IC₅₀ (μM) correspondientes a las medias de tres experimentos independientes. Las desviaciones standard aparecen entre paréntesis. Los parásitos se crecen durante 72 h a 28 °C (promastigotes) o 37 °C (amastigotes) en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos ensayados. ^bLas células correspondientes a las líneas THP-1 y MRC-5 se crecieron durante 72 h a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos ensayados. ^cMiltefosina se usó como agente leishmanicida de referencia (control de sensibilidad).

Ninguno de los compuestos ensayados presentaron actividad frente a las formas extracelulares promastigotas, exceptuando el pseudo-*S*-glicósido con cadena de dodecilo

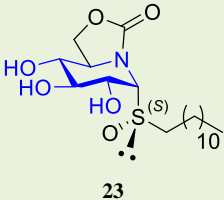
(**142**), que inhibió levemente su crecimiento (IC_{50} , $87.79 \pm 3.47 \mu M$). Sin embargo, sí se detectó actividad inhibitoria destacable con alguno de los derivados evaluados frente a las formas amastigotas intracelulares, siendo en general más potentes los derivados de cadena más larga C_{12} y C_{16} , con valores de IC_{50} comprendidos entre 10.80 ± 0.27 y $33.29 \pm 7.36 \mu M$. Este resultado sugiere que la actividad leishmanicida de esta familia de compuestos está asociada a la forma clínicamente relevante del parásito. La influencia de la longitud de la cadena alifática presente en los α -glicosilsulfóxidos y α -glicosilsulfonas es crítica en la actividad leishmanicida de esta serie de compuestos, ya que no se detectó inhibición del crecimiento con ninguno de los derivados de octilo frente a las formas amastigotas ($IC_{50} > 100 \mu M$). Considerando que estas formas del parásito residen y se multiplican dentro de las células del mamífero hospedador infectado, las diferencias observadas podrían resultar de una mayor permeabilidad celular de los derivados más lipofílicos. En cualquier caso, el conjunto de datos acumulados descarta una relación directa entre la potencia de inhibición de α -glucosidasa y su actividad leishmanicida. Sin embargo, sí que se observa que en la mayoría de los casos los compuestos con mayor actividad antiproliferativa frente al panel de líneas celulares tumorales humanas ensayadas son también los más activos frente a leishmania, lo que sugiere que actúen sobre una ruta de señalización común.

La citotoxicidad de estos compuestos se evaluó frente a la línea celular humana de pulmón MRC-5 y la monocítica de leucemia THP-1, célula hospedadora usada en el ensayo con amastigotes intracelulares. En general, las células MRC-5 son más susceptibles que las células THP-1, mostrando la mayoría de los compuestos toxicidad celular moderada frente a la línea MRC-5, con valores de IC_{50} comprendidos entre 40 y 190 μM . Teniendo en cuenta los resultados de actividad y citotoxicidad, el dodecilsulfóxido de configuración (S_S) **23** fue el candidato más prometedor por su notable actividad frente a las formas intracelulares de *L. donovani* Dd8 (IC_{50} , $10.80 \pm 0.27 \mu M$) y

su relativamente baja toxicidad frente a las líneas THP-1 y MRC-5 (IC_{50} , $118.83 \pm 3.37 \mu\text{M}$ y $94.35 \pm 20.93 \mu\text{M}$, respectivamente; Tabla 3.9.).

Teniendo en cuenta las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) relativas a la conveniencia del uso de combinaciones de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis,¹⁹ nos pareció interesante investigar el efecto de la combinación del iminoazúcar sp^2 más activo de la serie (**23**) y la miltefosina,²⁰ un fármaco oral usado contra leishmaniasis. Para ello se trataron amastigotes intracelulares de *L. donovani* con diferentes concentraciones del α -glicosilsulfóxido **23** (2, 4, 8 y 16 μM) frente a concentraciones fijas de miltefosina (0.1, 0.2 y 0.3 μM). Las curvas dosis-respuesta obtenidas de este ensayo mostraron que el tratamiento combinado de **23** con miltefosina es más efectivo para inhibir el crecimiento del parásito que el uso del compuesto **23** sólo (Tabla 3.10., Figura 3.14.). La combinación del compuesto **23** con 0.1, 0.2 y 0.3 μM de miltefosina disminuyó los valores de IC_{50} desde 10.8 μM hasta 6.4, 3.6 y 1.3 μM , respectivamente (Tabla 3.10.).

Tabla 3.10. Ensayos de uso combinado de **23**-miltefosina en presencia de amastigotes intracelulares de *L. donovani*.

	[Miltefosina] ^b (μM)	IC_{50} (μM) ^a
 <p>23</p>	0	10.80 (± 0.27)
	0.1	6.44 (± 1.05)
	0.2	3.56 (± 0.16)
	0.3	1.31 (± 0.19)
Miltefosina^b		0.44 (± 0.08)

^aLos datos de IC_{50} corresponden a la media de tres experimentos independientes. Las desviaciones standard aparecen entre paréntesis.

^bMiltefosina se usa como control de sensibilidad.

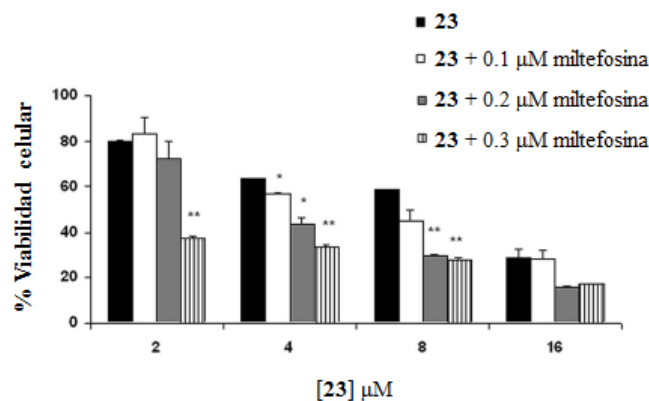


Figura 3.14. Efecto de la combinación de **23**-miltefosina sobre la viabilidad de formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* en células THP-1 infectadas. Los datos de IC_{50} corresponden a la media de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron utilizando el test *t* Student (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$).

Posteriormente se determinó el efecto de la combinación de ambos (sinergismo, aditividad o antagonismo) usando el análisis isobolográfico²¹ y el índice de combinación para cada combinación de **23**-miltefosina. Los valores de los índices de combinación de **23** con 0.1, 0.2 y 0.3 μM de miltefosina resultaron menores que la unidad: 0.78, 0.76 y 0.80, respectivamente, indicando un sinergismo moderado²² (Figura 3.15.). El estudio de la toxicidad de las diferentes combinaciones de **23**-miltefosina con la línea celular THP-1 demostró que ninguna de las combinaciones fueron citotóxicas a las concentraciones usadas.

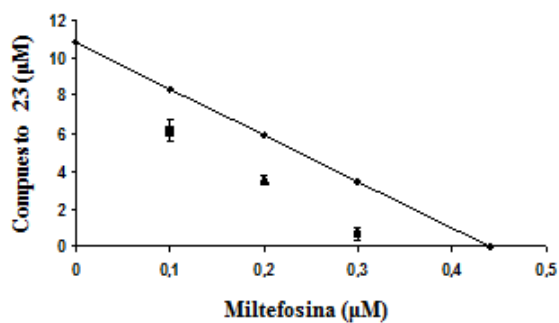
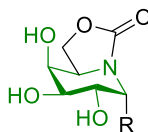


Figura 3.15. Análisis isoblográfico correspondiente a las combinaciones **23**-miltefosina. La línea indica sinergismo, aditividad o antagonismo cuando los puntos están localizados por debajo, en la línea o por encima de la línea respectivamente. (■) **23** + 0.1 µM miltefosina, (▲) **23** + 0.2 µM miltefosina, (●) **23** + 0.3 µM miltefosina.

Los resultados obtenidos de este estudio nos proporcionan las primeras evidencias de la actividad leishmanicida de los iminoazúcares sp^2 . La posibilidad de usar estos compuestos en terapia combinada junto a miltefosina es interesante a la vista del efecto sinérgico observado. Tanto la actividad leishmanicida como la selectividad hacia la forma intracelular del parásito son claramente dependientes de la naturaleza del sustituyente aglicónico, destacando positivamente las cadenas de dodecilo y hexadecilo frente a las cadenas de octilo. Con el fin de estudiar también el efecto en la actividad leishmanicida de la parte glicónica de esta familia de compuestos, el paso siguiente consistió en evaluar los derivados de la serie OGJ frente a formas amastigotas de *L. donovani*. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Ensayos de sensibilidad y toxicidad en formas amastigotas de *L. donovani* de los iminoazúcares sp² derivados de OGJ.^a



	R	Amastigotes intracelulares Dd8	Línea celular THP-1 ^b	Línea celular MRC-5 ^b
5	NHC ₈ H ₁₇	>20	90.50 (±5.10)	14.3 (±1.4)
6	NHC ₁₂ H ₂₅	19.90 (±1.90)	87.90 (±7.50)	95.3 (±12.9)
7	NHC ₁₆ H ₃₃	15.40 (±4.90)	49.60 (±1.40)	18.1 (±1.8)
17	SC ₁₂ H ₁₇	15.50 (±2.30)	117.20 (±28.70)	58.6 (±3.1)
19	SC ₁₆ H ₃₃	17.70 (±2.30)	79.10 (±0.60)	62.4 (±2.2)
47	SOC ₁₂ H ₂₅	4.10 (±0.50)	135.90 (±8.40)	108.3 (±6.1)
53	SOC ₁₂ H ₂₅	>20	150.90 (±4.70)	126.6 (±2.3)
69	SO ₂ C ₁₂ H ₂₅	14.90 (±2.10)	142.40 (±11.10)	102.8 (±2.0)
49	SOC ₁₆ H ₃₃	12.20 (±2.10)	>200	55.7 (±14.4)
55	SOC ₁₆ H ₃₃	>20	>200	49.9 (±6.3)
70	SO ₂ C ₁₆ H ₃₃	17.10 (±2.50)	>200	52.6 (±6.4)
Miltefosina ^c		0.44 (±0.08)	26.86 (±3.08)	57.58 (±6.38)

^aValores de IC₅₀ (μM) correspondientes a las medias de tres experimentos independientes. Las desviaciones standard aparecen entre paréntesis. ^bLas células correspondientes a la línea THP-1 y MRC-5 se crecieron durante 72 h a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos ensayados. ^cMiltefosina se usó como agente leishmanicida de referencia (control de sensibilidad).

En términos generales los pseudo-*S*-glicósidos de configuración *galacto* y sus análogos oxidados glicosilsulfóxidos y glicosilsulfonas también presentaron actividad leishmanicida significativa, destacando el sulfóxido de configuración (*S_S*) **46** (IC₅₀, 4.10 ± 0.50 μM), con actividad leishmanicida del mismo orden que su análogo de ONJ **23** (IC₅₀, 10.80 ± 0.27 μM). El compuesto **46** se ha seleccionado para realizar ensayos adicionales sobre el mecanismo de acción en estos parásitos y, en la medida de lo posible, poder

establecer la diana sobre la que actúan, paso determinante para el diseño racional de nuevas estructuras leishmanicidas optimizadas.

Aunque por cuestiones de tiempo no se ha podido disponer de los resultados para los derivados OMJ en esta Tesis, los resultados obtenidos con los derivados ONJ y OGJ parecen indicar que el perfil configuracional del iminoazúcar sp^2 no es tan crítico en la actividad leishmanicida como lo es la naturaleza del aglicón, mostrando un paralelismo claro con lo observado para la actividad antitumoral.

Referencias

- ¹ V. M. Díaz Pérez, M. I. García Moreno, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. C. Díaz Arribas, J. Cañada, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 136-143.
- ² P. Díaz Pérez, M. Isabel García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2903-2913.
- ³ E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3306-3309.
- ⁴ E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Chasseraud, A. Ahidouch, C. Ortiz Mellet, H. Ouadid-Ahidouch, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5328-5330.
- ⁵ E. M. Sánchez-Fernández, E. Álvarez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, **2014**, 11722-11728.
- ⁶ E. M. Sánchez-Fernández, V. Gómez-Pérez, R. García-Hernández, J. M. García Fernández, G. B. Plata, J. M. Padrón, C. Ortiz Mellet, S. Castanys, F. Gamarro, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 21812-21822.
- ⁷ E. M. Sánchez, J. F. Arteaga, V. Domingo, J. F. Quílez del Moral, M. M. Herrador, A. F. Barrero, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 5111-5118.
- ⁸ *Oxidation and Reduction in Organic Synthesis*, ed. T. J. Donohoe, Oxford University Press, Eastbourne Great Britain, **2000**.

-
- ⁹ (a) M. Gorman, C. W. Ryan, in *Cephalosporins and Penicilins: Chemistry and Biology*, ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, **1972**, 540. b) W. J. Gottstein, C. U. Kim, K. M. Shih and D. N. McGregor, *J. Med. Chem.*, **1978**, *21*, 240-242.
- ¹⁰ (a) N. Khair, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 9059-9063. b) C. A. Sanhueza, A. C. Arias, R. L. Dorta, J. T. Vásquez, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, *21*, 1830-1832.
- ¹¹ R. Rísquez Cuadro. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 2013.
- ¹² M. Hayashi, S. Hashimoto, R. Noyori, *Chem. Lett.*, **1984**, 1747-1750.
- ¹³ K. C. Nicolau, A. Chucholowski, R. E. Dolle, J. L. Randall, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**, 1155-1156.
- ¹⁴ G. Allan, H. Ouadid-Ahidouch, E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Ahidouch, *PLoS One*, **2013**, e76411.
- ¹⁵ A. M. Hoffmann, F. Worm, H. Frey, *Macromolecules* **2011**, *44*, 4648-4657.
- ¹⁶ T. M. Gloster, D. Vocadlo, *Nat. Chem. Biol.*, 2012, **8**, 683-694.
- ¹⁷ R. Rísquez-Cuadro, J. M. García Fernández, J. F. Nierengarten, C. Ortiz Mellet, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 16791-16803.
- ¹⁸ F. Dal Piaz, A. Vassallo, M. G. Chini, F. M. Cordero, F. Cardona, C. Pisano, G. Bifulco, N. D. Tommasi, A. Brandi, *PLOS ONE*, **2012**, *7*, e43316.
- ¹⁹ Control of the Leishmaniasis. Geneva, World Health Organization, **2010**. WHO Technical Report Series, No. 949.
- ²⁰ K. Seifert, S. Matu, F. J. Pérez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, S. L. Croft, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **2003**, *22*, 380-387.
- ²¹ (a) T. C. Chou, P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, **1984**, *22*, 27-55; (b) J. Topaly, W. J. Zeller, S. Fruehauf, *Leukemia*, **2001**, *15*, 342-347.
- ²² T. C. Chou, *Pharmacol. Rev.*, **2006**, *58*, 621-681.

4. Miméticos de hexoaminas con estructura de iminoazúcares sp² como inhibidores/efectores de hexosaminidasas.

Abstract: We report in this chapter an approach for the synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-D-*gluco*, D-*manno* and D-*galacto* sp²-iminosugar mimics. This methodology has allowed us to access to new specific inhibitors of the enzyme β -hexosaminidase A and the identification of candidates as pharmacological chaperones evaluated in fibroblasts from patients suffering from Tay-Sachs disease. The most potent representative, (1*R*)-2-acetamido-2-deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (**94**), displayed a remarkable enhancement of the mutant enzyme 1.3-fold increase at 20 μ M against G269S mutation (TSD-GS) over untreated cells.

4.1. Síntesis de iminoazúcares sp^2 reductores análogos de la *N*-acetilglucosamina y de la *N*-acetilgalactosamina.

Existen pocos antecedentes de preparación de iminoazúcares con estructura piridínica y función acetamido. En 1986, Fleet *et al.*¹ describieron la primera síntesis de la 2-acetamido-1,2-didesoxi-D-nojirimicina (DNJNAc), que se comporta como un inhibidor potente y específico de las β -*N*-acetilglucosaminidasas (β -GlcNAcasas). Posteriormente, el mismo grupo ha publicado varias modificaciones estructurales de este iminoazúcar.² El diastereoisómero de configuración *galacto* DGJNAc³ y sus derivados⁴ se comportan también como inhibidores de β -GlcNAcasas y α -GalNAcasa mientras que el isómero de configuración *mano* DMJNAc no inhibe las hexosaminidasas (Figura 4.1.).⁵

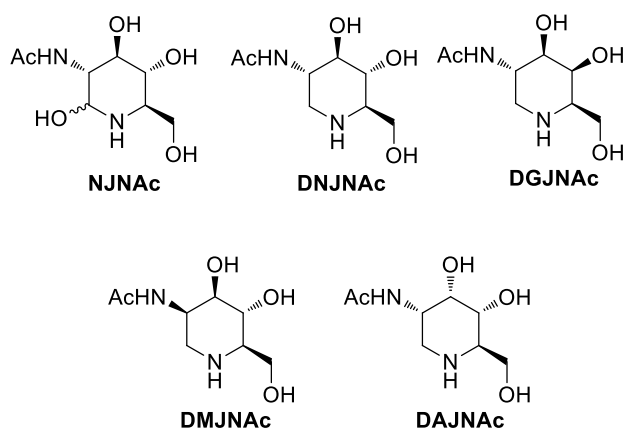


Figura 4.1. Estructuras de NJNAc, DNJNAc, DGJNAc, DMJNAc y DAJNAc.

El grupo del Prof. A. Riera (Instituto de Investigaciones Biomédicas, IRB, Barcelona) ha desarrollado una metodología sintética muy eficaz para la preparación del intermedio **A** en escala multigramo.⁶ A partir de este intermedio se han explorado diferentes rutas para acceder a 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares, como la formación de epóxidos, sulfitos y sulfatos cíclicos y su apertura regioselectiva.⁷ Por ejemplo, utilizando la

sustitución alílica catalizada por paladio como procedimiento para introducir de modo estereoselectivo un equivalente sintético del amoníaco en C2, se puso a punto una síntesis asimétrica muy eficaz del isómero de configuración *alo* (DAJNAc) (Figura 4.2.).

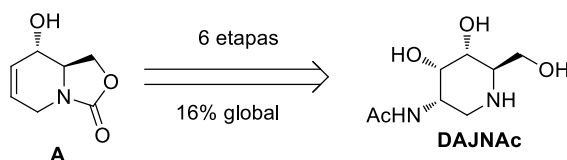


Figura 4.2. Esquema retrosintético de preparación de la **DAJNAc**.

Los estudios *in vitro* de inhibición de glicosidasas, llevados a cabo en el marco de una colaboración entre nuestro grupo y el grupo del Prof. A. Riera, mostraron que la DAJNAc es el inhibidor competitivo más potente de β -GlcNAcasas de la serie epimérica, con valores de K_i del orden 5.6-2.6 μM frente a β -hexosaminidasas de hígado de buey, Jack bean y placenta humana.⁸ Además, la transformación del grupo imino en una función ureido permitió acceder a una serie de derivados de tipo iminoazúcar sp^2 que se comportaron como inhibidores potentes de β -hexosaminidasas. El carácter anfifílico y la menor basicidad de las DAJNAc-ureas les hace especialmente adecuados para la optimización de su comportamiento como chaperonas.⁹ Motivados por estos resultados, se prepararon dos nuevas series de conjugados de DAJNAc con carácter de iminoazúcar sp^2 con esqueletos monocíclicos y bicíclicos, que mostraron potencias de inhibición superiores a la de la DAJNAc (Figura 4.3.). Estos compuestos han sido evaluados como chaperonas farmacológicas, en colaboración con el Dr. K. Higaki (Universidad de Tottori, Japón) en fibroblastos humanos con la mutación G269S en la subunidad α de la β -hexosaminidasa A, una de las mutaciones más frecuentes en pacientes con la enfermedad de Tay-Sachs.¹⁰

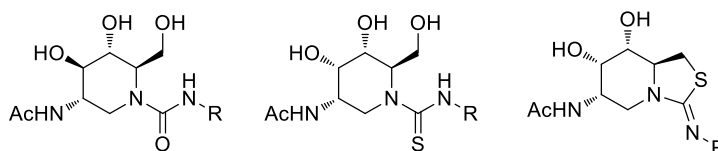


Figura 4.3. Estructura de derivados de DAJNAc con carácter de iminoazúcar sp^2 (R = n-Bu, n-Oct, Ph, Bn).

El estudio de las propiedades de inhibición de los iminoazúcares sp^2 derivados de DAJNAc frente a la hexosaminidasa de placenta humana mostró que estos compuestos se comportan en general como inhibidores potentes de la enzima, con valores de K_i en el rango μM . Se observan, no obstante, variaciones en la potencia de inhibición en función de la naturaleza del sustituyente exocíclico que son atribuibles a diferencias en las interacciones aglicónicas. Sorprendentemente, la potencia de inhibición de hexosaminidasas determinada en lisados de fibroblastos sanos fue mucho menor, con valores de IC_{50} superiores a $100 \mu\text{M}$ para HexA. En ambos casos la hexosaminidasa evaluada es de origen lisosomal. La discrepancia en las medidas se atribuyó a que en el caso de la hexosaminidasa de placenta la enzima aislada se encuentra en su forma madura, en tanto que en los lisados de fibroblastos hay una proporción elevada de enzima en forma inmadura o precursora. La evaluación de los compuestos como chaperonas en fibroblastos heterocigóticos con la mutación p.G269S/c.1278insTACT de un paciente de Tay-Sachs, después de cultivo durante 4 días con diferentes concentraciones de iminoazúcar, indicó recuperaciones modestas de los niveles de actividad de la enzima, con aumentos de entre el 20 y 30% respecto al control. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el fenotípico clínico sólo se desarrolla cuando los niveles de actividad de la enzima están por debajo del 10% del normal, con lo que incluso incrementos modestos pueden ser médicamente relevantes. Los resultados sugieren que modificaciones en el núcleo de DAJNAc puede ser de hecho una estrategia interesante para el desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades relacionadas con la β -GlcNAcasa.

Dada la importante actividad biológica de los glicomiméticos funcionalizados en la posición C2 con un grupo nitrogenado, en esta Tesis nos propusimos sintetizar 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 reductores de configuración *gluco* (ONJNAc) y configuración *galacto* (OGJNAc). No existen ejemplos en la bibliografía de miméticos de acetamidoazúcares que conserven el hidroxilo pseudoanomérico. La estabilización del grupo funcional hemiaminal en iminoazúcares sp^2 ofrece una oportunidad única en este sentido. Además, estos compuestos serían precursores de conjugados pseudoglicosídicos, ampliando considerablemente el abanico de estructuras accesibles. El análisis retrosintético esquematizado en la Figura 4.4. indica cómo podrían prepararse los compuestos objetivo a partir de los precursores ONJ y OMJ, utilizando como intermedios clave los correspondientes derivados 2-azido-2-desoxi, que pueden obtenerse a su vez a partir del pseudoglucal de configuración adecuada (pseudoglucal o pseudogalactal).

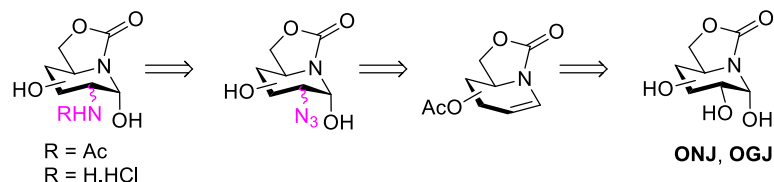


Figura 4.4. Esquema retrosintético para acceder a los 2-amino y 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp^2 a partir de los precursores ONJ y OGJ.

Para la preparación de los pseudoglucos (75, 82) se siguió una ruta sintética en dos etapas que se presenta en el Esquema 4.1. El primer paso consistió en la preparación de los correspondientes bromuros de glicosilo peracetilados mediante tratamiento de los peracetatos de ONJ ó OGJ (136, 138) con una mezcla comercial de HBr/AcOH (33%) en diclorometano a 0 °C durante 15 min. El crudo de reacción se utilizó directamente en la siguiente etapa. Para ello se puso a reaccionar 1.0 equivalente de cloruro de titanoceno (Cp_2TiCl_2) y 2.6 equivalentes de Mn disueltos en THF desoxigenado a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. Tras la aparición del color verde en la disolución, que nos

indica la presencia de monocloruro de titanoceno $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{III}}\text{Cl}$ (Figura 4.5.), se añadió el correspondiente bromoderivado, originándose así los pseudoglicales **75** y **82** con rendimientos del 86% y 61%, respectivamente (Esquema 4.1.).

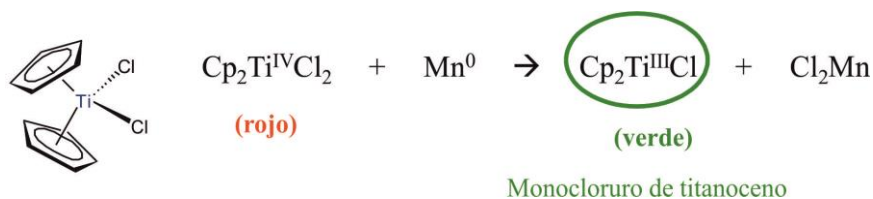
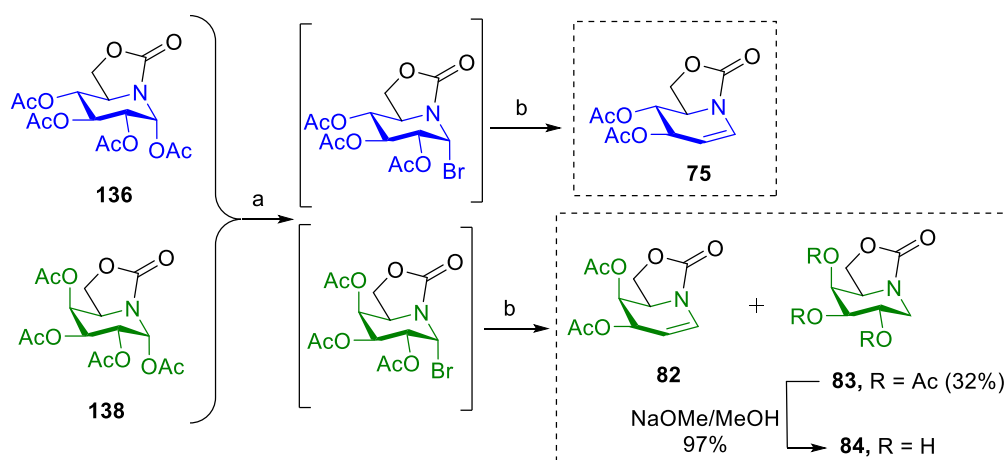


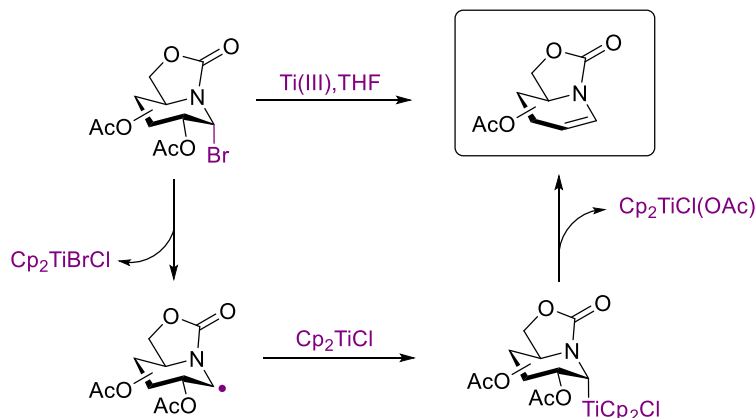
Figura 4.5. Formación de monocloruro de titanoceno $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{III}}\text{Cl}$ en presencia de Mn.



Esquema 4.1. Preparación del glicol derivado de configuración *gluco* (**75**) y de configuración *galacto* (**82**). Reactivos y condiciones: a. HBr/AcOH (33%), 0 °C, 15 min. b. $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2/\text{Mn}$, THF, t.a., 60 min, 61-86% (rendimiento global).

La metodología empleada se basa en la capacidad que tiene el Ti(III) para abstraer átomos de halógeno originando radicales carbonados.¹¹ La abstracción del átomo de bromo en este caso origina un intermedio radical que es atrapado por $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{III}}\text{Cl}$ generado in situ, dando el complejo de glicosiltitania (IV) que tras β -eliminación de $\text{Cp}_2\text{Ti}^{\text{IV}}\text{Cl}(\text{OAc})$ conduce al glicol deseado (Esquema 4.2.). En el caso del derivado de

configuración *galacto* **82** el rendimiento obtenido fue más bajo que en el caso de configuración *gluco* **75** debido a la formación simultánea del derivado 1-desoxi **83**, que se aisló con un 32% de rendimiento.



Esquema 4.2. Mecanismo para la síntesis de glicales a partir de los correspondientes bromuros de glicosilo.

La estructura de los pseudoglicales **75** y **82** se confirmó mediante espectroscopía de 1H y ^{13}C RMN además de por espectrometría de masas y análisis elemental. Así, en los espectros de 1H RMN se observa la presencia de tan solo dos singuletes para metilos de acetatos. Las señales de ^{13}C RMN entre δ 123.9 (C-1) y 104.8 (C-2) ppm se corresponden con la presencia del doble enlace entre las posiciones 1 y 2 del iminoazúcar sp^2 . A modo de ejemplo, en la Figura 4.6. se muestran los espectros de 1H y ^{13}C RMN, registrados en $CDCl_3$ a 300 y 75.5 MHz respectivamente, del pseudoglicol derivado de OGJ **82**.

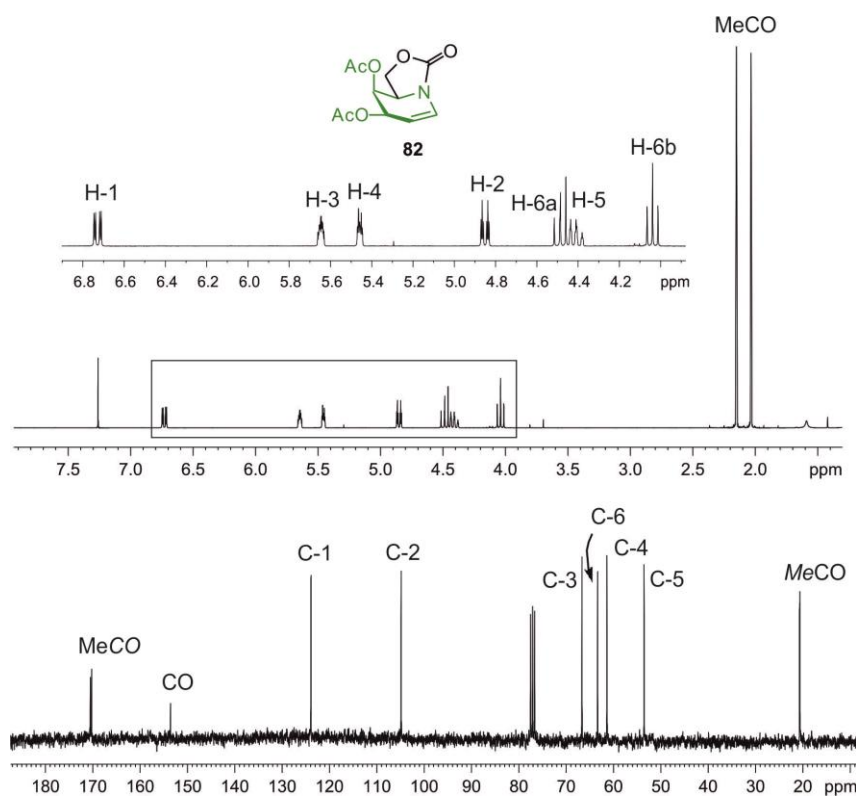
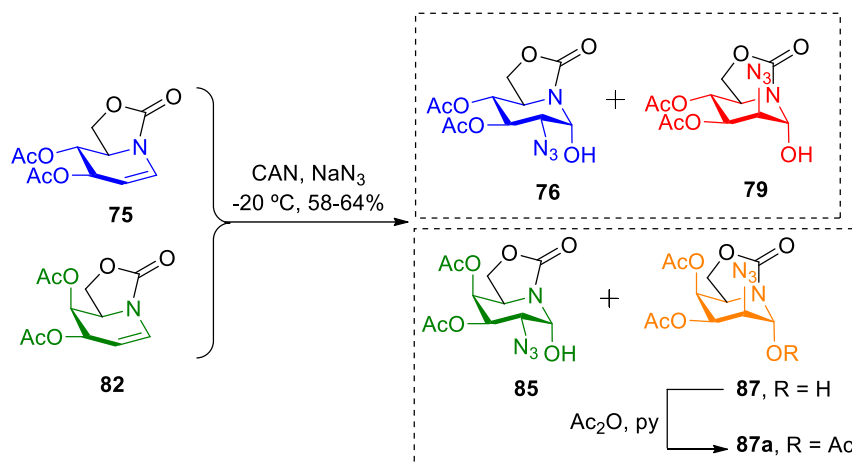


Figura 4.6. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, CDCl_3) del galactal-derivado **82**.

Para la introducción del grupo azido en posición C2 de los pseudoglicales **75** y **82** se intentó en primer lugar la reacción con FeCl_3 , NaN_3 y H_2O_2 a diferentes temperaturas (t.a., $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y $-30\text{ }^\circ\text{C}$),¹² pero en ningún caso se consiguió aislar el cloruro de 2-azido-2-desoxiglicosilo esperado. El método de azidonitración descrito por Lemieux y Ratcliffe¹³ sí resultó apropiado. Así, el tratamiento de una disolución de **75** o **82** en acetonitrilo con nitrato de cerio y amonio (CAN) y NaN_3 , bajo atmósfera inerte, a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 h condujo a las correspondientes hidroxi-azidas con rendimientos comprendidos entre el 58-64% (Esquema 4.3.).



Esquema 4.3. Preparación de las 1-hidroxi-2-azido-2-desoxi derivados de configuración *gluco* (**76**), *mano* (**79**), *galacto* (**85**) y *talo* (**87**).

En el caso del derivado de ONJ, el espectro de ¹H RMN del crudo de reacción mostró la formación de la correspondiente hidroxi-azida como una mezcla de dos diastereoisómeros con configuración *gluco* (**76**) y *mano* (**79**) en proporción relativa 1.5:1. Ambos diastereoisómeros pudieron separarse mediante purificación por columna cromatográfica en gel sílice. En el caso del derivado OGJ la proporción relativa *galacto/talo* aumentó hasta 7:1, aislándose el derivado **85** en forma pura. El diastereoisómero de configuración *talo* fue aislado como triacetato tras acetilación de la posición pseudoanomélica (**87a**). La presencia del grupo azido se pudo confirmar por la banda a ν 2101-2111 (N₃) cm⁻¹, respectivamente, en los correspondientes espectros de infrarrojo. En la Figura 4.7. se muestra a modo de ejemplo el espectro de IR del compuesto (1*R*)-3,4-di-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-5*N*,6*O*-oxometilidénmanonojirimicina (**79**).

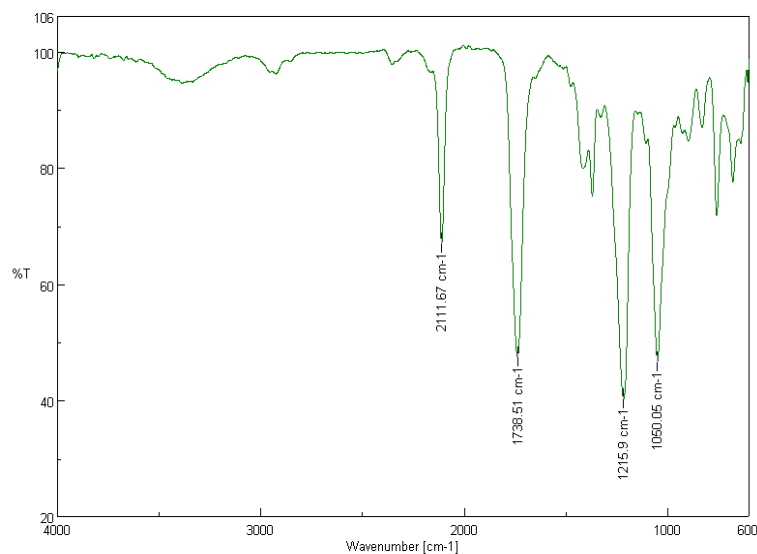


Figura 4.7. Espectro de IR de la hidroxi-azida **79**.

En los espectros de ^1H y ^{13}C RMN de los nuevos derivados **76** y **79** se observan las señales correspondientes al protón H-2 a δ 3.51 ppm (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{1,2} = 3.3$ Hz) y δ 4.18 ppm (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 3.0$ Hz), respectivamente, confirmando que la reacción de adición al doble enlace del glicial precursor **75** ha tenido lugar, así como la configuración α -gluco y α -mano, respectivamente, de los compuestos formados.

El derivado de configuración *gluco* **76** cristalizó de una disolución en DCM/MeOH, lo que permitió obtener su estructura en estado sólido mediante difracción de rayos X (Figura 4.8.). Los datos cristalográficos confirman la configuración *1R* del carbono C-1 (anómero α). La conformación de silla del anillo de piperidina, análoga a la silla $^4\text{C}_1$ de los monosacáridos, se encuentra ligeramente distorsionada en el vértice que ocupa el átomo de nitrógeno endocíclico, con un ángulo C(1)-N(1)-C(5) de 122.5° lo que está de acuerdo con una hibridación sp^2 de dicho átomo. El resto de los ángulos entre los átomos del anillo (107.6° - 112.7°) se encuentran próximos al valor teórico esperado de 109.5° (Tabla 4.1.).

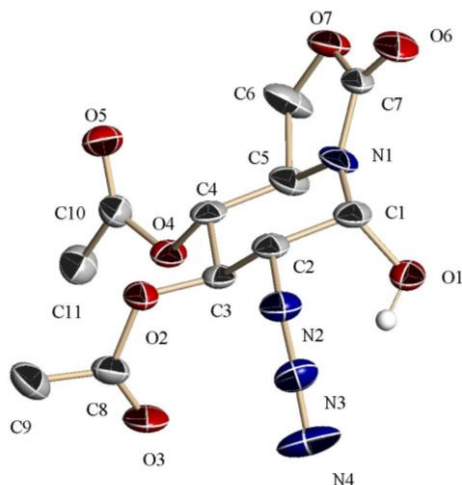


Figura 4.8. Representación ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) del compuesto **76**.

Tabla 4.1. Ángulos de enlace y ángulos diedros más representativos del compuesto **76**.

Ángulos de enlace		Ángulos diedros	
C(1)-N(1)-C(5)	122.5(3)	O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-75.5(4)
N(1)-C(1)-C(2)	107.6(3)	C(4)-C(5)-C(6)-O(7)	113.0(4)
N(1)-C(5)-C(4)	109.4(3)	N(1)-C(5)-C(6)-O(7)	-5.3(5)
C(3)-C(2)-C(1)	112.7(3)	C(7)-N(1)-C(5)-C(6)	5.2(4)
C(3)-C(4)-C(5)	111.0 (3)	C(7)-O(7)-C(6)-C(5)	4.1(5)
C(4)-C(3)-C(2)	111.5(2)	C(6)-O(7)-C(7)-N(1)	-0.9(4)
N(4)-N(3)-N(2)	172.0(4)	N(3)-N(2)-C(2)-C(3)	45.1(4)

En el cristal, el empaquetamiento de la molécula está probablemente favorecido por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el átomo de oxígeno carbonílico y el grupo hidroxilo de la posición pseudo anomérica e intramoleculares entre el mismo hidroxilo y el átomo de nitrógeno intermedio del grupo azido (Figura 4.9.).

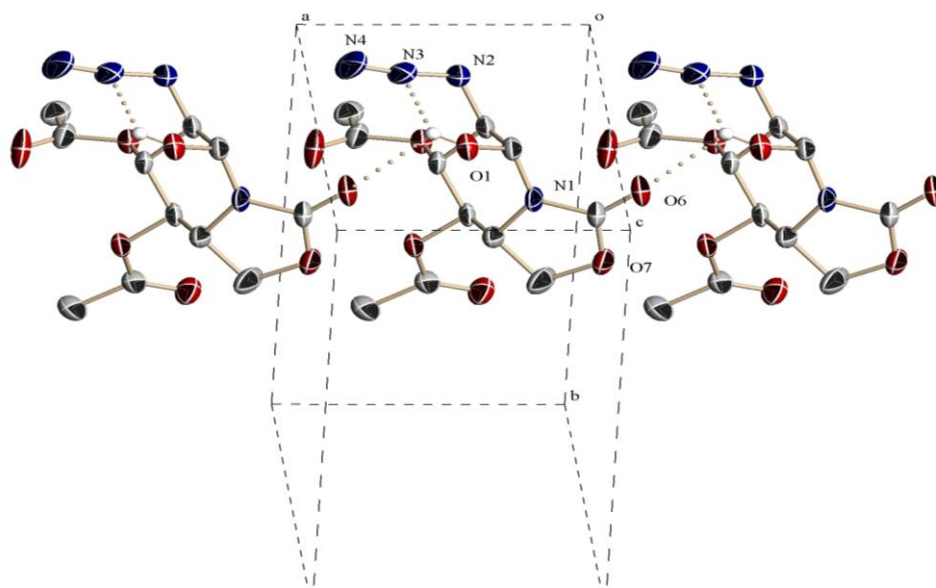


Figura 4.9. Detalles de la celda unidad de un cristal del compuesto **76**, mostrando los puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares.

En el caso de la azida derivada de OMJ, se obtuvieron cristales adecuados para estudios de difracción de rayos X tras acetilación y cristalización del correspondiente triacetato **80** de una disolución de DCM/MeOH. Los datos confirmaron igualmente la configuración anomérica α y la hibridación sp^2 del átomo de nitrógeno (Figura 4.10. y Tabla 4.2.).

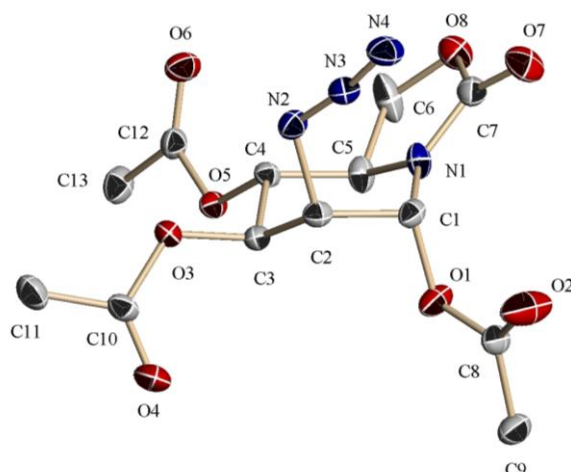


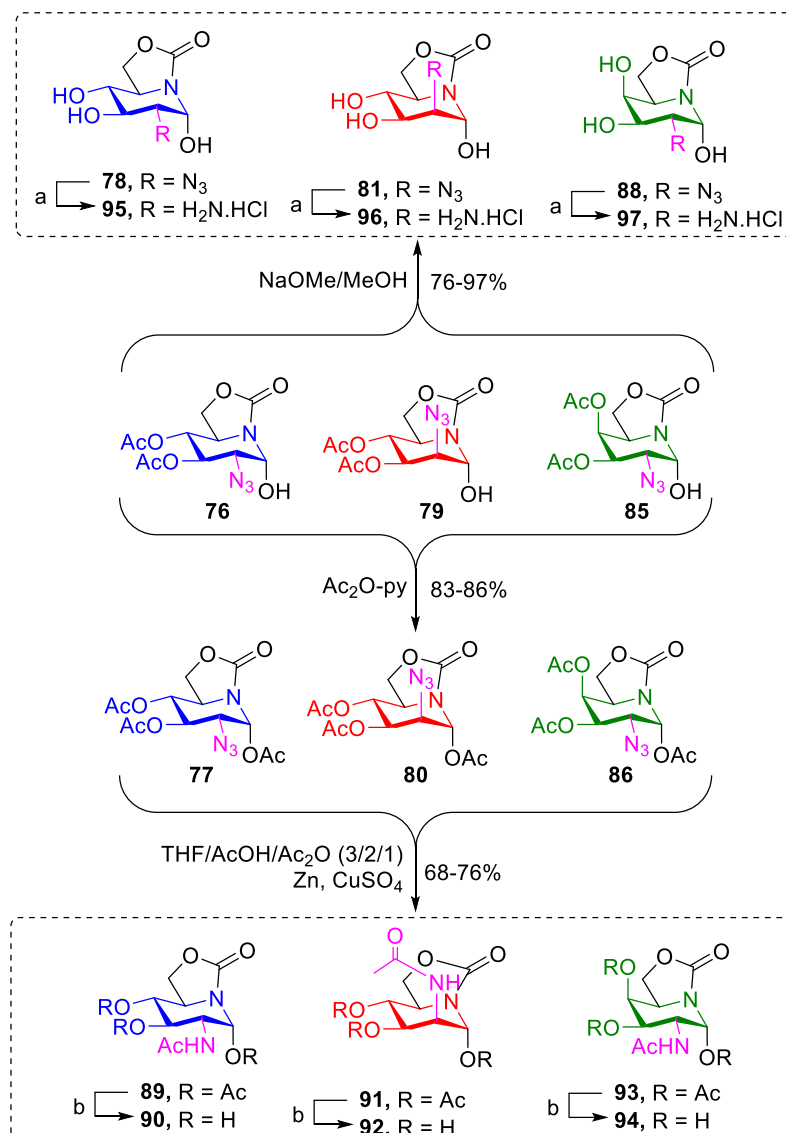
Figura 4.10. Representación ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) del compuesto **80**.

Tabla 4.2. Ángulos de enlace y ángulos diedros más representativos del compuesto **80**.

Ángulos de enlace		Ángulos diedros	
C(1)-N(1)-C(5)	120.6(3)	C(8)-O(1)-C(1)-C(2)	-113.7(3)
N(1)-C(1)-C(2)	109.7(3)	C(4)-C(5)-C(6)-O(8)	118.8(4)
N(1)-C(5)-C(4)	109.9(3)	N(1)-C(5)-C(6)-O(8)	0.7(4)
C(3)-C(2)-C(1)	109.7(3)	C(7)-N(1)-C(5)-C(6)	-0.8(4)
C(3)-C(4)-C(5)	109.5(3)	C(7)-O(8)-C(6)-C(5)	-0.3(5)
C(4)-C(3)-C(2)	111.0(2)	C(6)-O(8)-C(7)-N(1)	-0.2(4)
N(4)-N(3)-N(2)	171.9(4)	N(3)-N(2)-C(2)-C(3)	-168.9(3)

Dado que en la reacción de azidonitración a partir del pseudoglucal derivado de ONJ (**75**) se obtuvieron las azidas de configuración *gluco* y *mano* en cantidades apropiadas y, aunque no estaba planteado como objetivo inicial la formación de derivados de configuración *mano*, se siguió la secuencia sintética con las tres configuraciones (*gluco*, *mano* y *galacto*). Se abordó así la formación de los correspondientes

hidrocloruros de 2-amino-2-desoxi- y los 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp² de los derivados de ONJ, OMJ y OGJ (Esquema 4.4.).



Esquema 4.4. Preparación de los hidrocloruros de 2-amino-2-desoxi- y de 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp² derivados de ONJ (**95**, **90**), OMJ (**96**, **92**) y OGJ (**97**, **94**). Reactivos y condiciones: a, H₂, Pd/C, t.a., 60-97%; b, NaOMe (1 M), MeOH, t.a., 30 min, 76-100%.

La desacetilación de las posiciones 3 y 4 de las hidroxiazidas **76**, **79** y **85** y la posterior reducción del grupo azido mediante hidrogenación condujo a las correspondientes aminas, que fueron acidificadas con HCl 0.1 N hasta pH 5 y liofilizadas para obtener los hidroclouros **95**, **96** y **97**. Por su parte, las acetamidas **90**, **92** y **94** se prepararon tras acetilación del grupo hidroxilo de la posición pseudoanomélica (\rightarrow **77**, **80** y **86**) seguida de reducción-acetilación del grupo azido hasta acetamido (\rightarrow **89**, **91** y **93**) y finalmente desacetilación de las posiciones 1, 3 y 4 del iminoazúcar. La reacción de transformación del grupo azido en posición 2 en grupo acetamido se efectuó en un solo paso mediante reducción-acetilación por tratamiento de una disolución de la azida **77**, **80** o **86** en una mezcla de THF-AcOH-AC₂O en proporción 3:2:1 con Zn y una disolución saturada de CuSO₄.¹⁴

La ausencia de la banda de azida en los espectros de IR de **95-97** junto con sus espectros de masas y de RMN confirmaron la eficacia de la reacción de reducción a amina. En la Figura 4.11. se muestran los espectros de ¹H y ¹³C RMN, registrados en D₂O a 300 y 75.5 MHz respectivamente, del derivado de ONJ **95**.

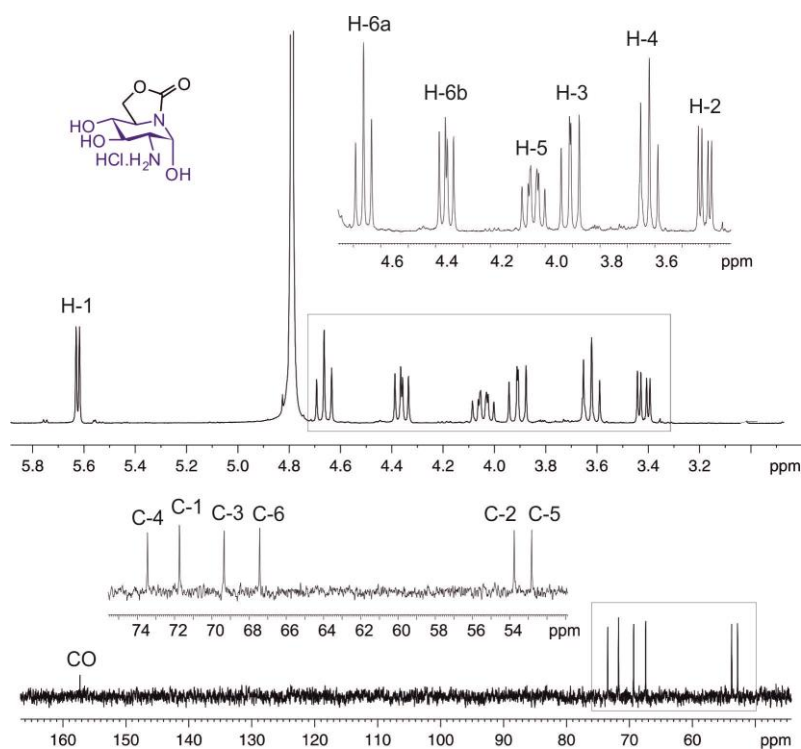


Figura 4.11. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300, 75.5 MHz, D_2O) de **95**.

En el caso de los compuestos **90**, **92** y **94**, la presencia de un singulete en los espectros de ^1H RMN aproximadamente a δ 2 ppm que integra para 3 H junto con las señales en ^{13}C RMN aproximadamente a δ 20 ppm (NHCOMe) y a δ 175 ppm (NHCOMe) confirmaron la presencia del grupo acetamido en posición 2. En la Figura 4.12. se muestran los espectros de ^1H y ^{13}C RMN, registrados en D_2O a 300 y 75.5 MHz respectivamente, del derivado de OGJNAc **94**.

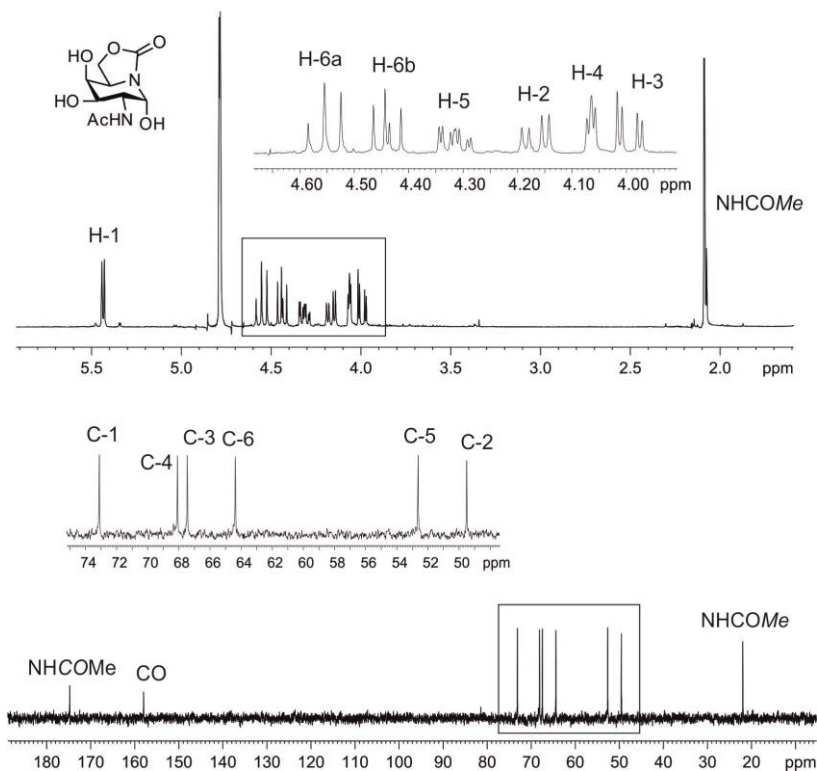
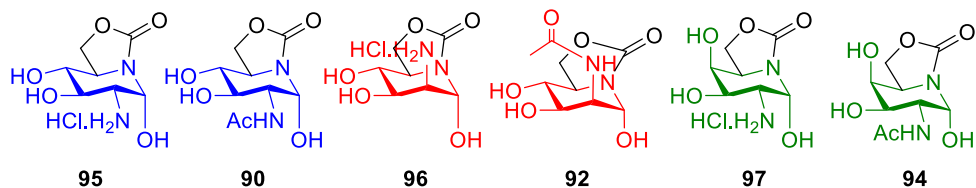


Figura 4.12. Espectros de ¹H y ¹³C RMN (300, 75.5 MHz, D₂O) de **94**.

4.2. Evaluación de la actividad como inhibidores de glicosidasas.

Con objeto de seleccionar los mejores candidatos para su posterior estudio como chaperonas farmacológicas para la enfermedad de Tay-Sachs, se ha llevado a cabo la evaluación de la actividad inhibitoria de los 2-amino- y 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares **95-97** y **90, 92, 94** frente a un panel de glicosidasas comerciales, incluyendo α - y β -glucosidasas, α - y β -manosidasas, α - y β -galactosidasas, además de tres β -*N*-acetilglucosaminidasas (de placenta humana, riñón de buey y judía Jack). Los valores de K_i obtenidos se recogen en la Tablas 4.3. y 4.4.

Tabla 4.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) de las acetamidas (**90**, **92**, **94**) e hidroclocloruros de amina (**95**, **96**, **97**)^a.



Enzimas	Derivados de ONJ		Derivados de OMJ		Derivados de OGJ	
	95	90	96	92	97	94
α -Glucasa (Levadura)	219 \pm 26	388 \pm 40	295 \pm 29	128 \pm 14	ni	ni
β -Glucasa (Hígado buey) ^b	483 \pm 50	ni	447 \pm 45	227 \pm 22	489 \pm 50	283 \pm 29
α -Galasa (Café verde)	ni	ni	ni	ni	101 \pm 9	ni

^aNinguno de los compuestos mostró actividad frente a las enzimas α -Manasa (Judías Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*) y β -Galasa (*E. Coli*). ^bEsta enzima hidroliza β -glucopiranosidos y β -galactopiranosidos con la misma eficiencia aproximadamente. ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2 mM.

Tabla 4.4. Comparación de la actividad como inhibidores de *N*-acetil- β -glucosaminidasas (K_i , μM) para los derivados ONJ (**95**, **90**), OMJ (**96**, **92**) y OGJ (**97**, **94**).

<i>N</i> -Acetil- β - glucosaminidasas	Derivados de ONJ		Derivados de OMJ		Derivados de OGJ	
	95	90	96	92	97	94
Placenta humana	ni	28 \pm 3	222 \pm 22	157 \pm 12	ni	141 \pm 15
Hígado de buey	ni	54 \pm 6	223 \pm 25	258 \pm 27	ni	269 \pm 27
Judías Jack	ni	24 \pm 2	291 \pm 30	88 \pm 10	ni	ni

ni: No se detectó inhibición a concentraciones hasta 2 mM.

Ninguno de estos compuestos inhibió significativamente las glicosidasas que no

actúan sobre derivados de hexosaminas ($K_i > 100 \mu\text{M}$). En cuanto a las hexosaminidasas evaluadas sólo el derivado de configuración *gluco* (ONJNAc, **90**) mostró constantes de inhibición por debajo de $100 \mu\text{M}$ frente a las tres *N*-acetil- β -glucosaminidasas ensayadas (K_i 24-54 μM). En la Figura 4.13. se muestra la representación de Dixon para la determinación de la K_i del derivado ONJNAc **90** frente a la *N*-acetil- β -glucosaminidasa de placenta humana.

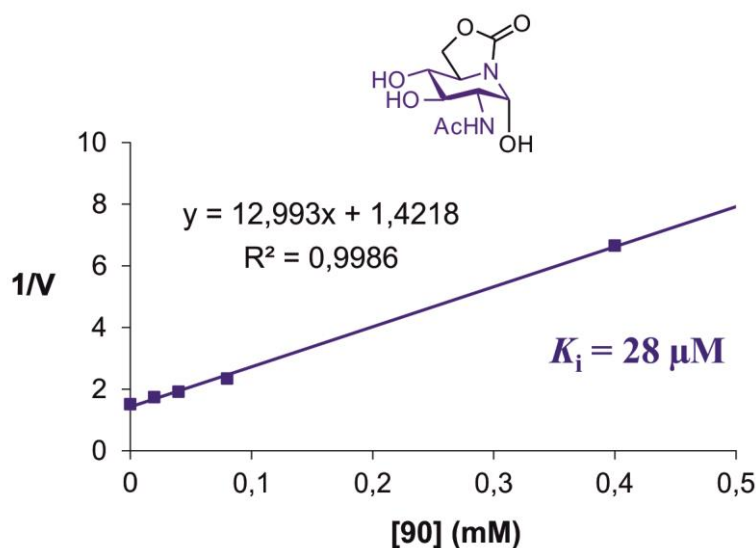


Figura 4.13. Representación de Dixon para la determinación de K_i ($28 \pm 3 \mu\text{M}$) de **90** frente a la β -*N*-acetilglucosaminidasa de placenta humana.

Los análogos de configuración *mano* (OMJNAc, **92**) y *galacto* (OGJNAc, **94**) se comportaron como inhibidores débiles, con valores de K_i alrededor de un orden de magnitud superiores. De los tres hidroclouros de amina, sólo el derivado de OMJ **96** mostró una cierta afinidad por las tres hexosaminidasas evaluadas con valores de K_i comprendidos entre 200-300 μM .

4.3. Evaluación del potencial como chaperonas farmacológicas en enfermedades de depósito lisosomal dependientes de hexosaminidasas.

En colaboración con el grupo del Dr. José A. Sánchez Alcázar de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla) se han llevado a cabo ensayos de inhibición enzimática de los derivados descritos en este capítulo frente a la α -N-acetilglucosaminidasa y la β -hexosaminidasa lisosomales, enzimas deficitarias en la enfermedad de Sanfilippo y Tay-Sachs respectivamente, a dos valores diferentes de pH (5 y 7). La determinación de las actividades enzimáticas se realizaron mediante ensayos fluorimétricos utilizando el correspondiente sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil N-acetil- α -D- o β -D-glucosaminido.¹⁵ Los ensayos se han llevado a cabo en fibroblastos control, y los valores de actividad se han obtenido tras incubación durante 2 horas con concentraciones crecientes de los iminoazúcares sp^2 (0.0001 a >100 μ M) y posterior adición del sustrato junto con el tampón a pH 5 o a pH 7.

En el caso de los iminoazúcares de la serie *gluco* (**95**, **90**) y de la serie *mano* (**96**, **92**), el grado de inhibición de las enzimas α -N-acetilglucosaminidasa y β -hexosaminidasa es muy pequeño independientemente del valor de pH (5 o 7). En contraste, los derivados de configuración *galacto* (**97**, **94**) muestran una marcada diferencia en la inhibición de la β -hexosaminidasa en función del pH. En el caso del hidrocloreuro de amina **97** el valor de IC_{50} es próximo a 50 μ M a pH neutro, mientras que cuando se emplea un pH ácido se incrementa hasta valores superiores a 100 μ M (Figura 4.14.).

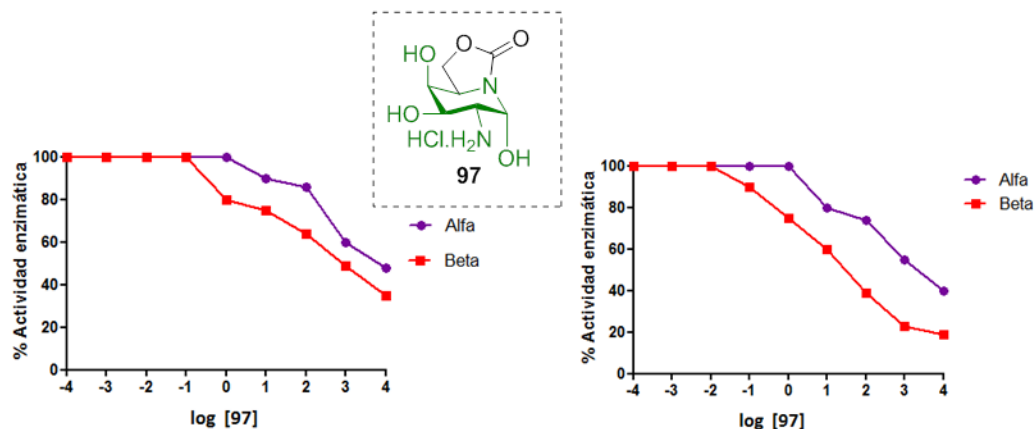


Figura 4.14. Actividad enzimática de la α -*N*-acetilglucosaminidasa y β -hexosaminidasa a pH 5 (izquierda) y pH 7 (derecha) en presencia de concentraciones crecientes del derivado OGI **97**.

El efecto es aún más marcado para el derivado OGJNac **94**, que se comporta como un inhibidor potente de la β -hexosaminidasa a pH 7 ($IC_{50} \approx 1.2 \mu M$) y cuya potencia de inhibición disminuye en dos órdenes de magnitud a pH 5 (Figura 4.15.).

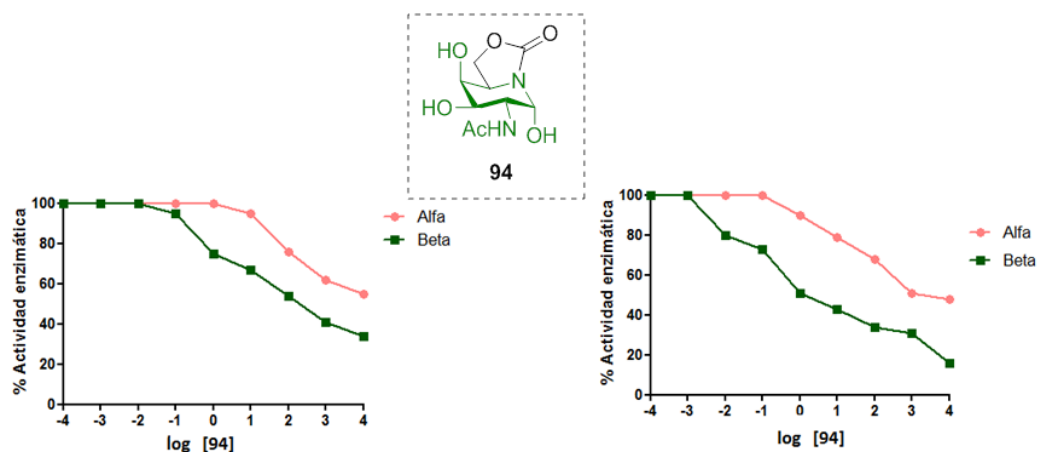


Figura 4.15. Inhibición de la actividad enzimática de la α -*N*-acetilglucosaminidasa y la β -hexosaminidasa a pH 5 (izquierda) y pH 7 (derecha) en presencia de concentraciones crecientes del derivado OGJNac **94**.

La diferencia observada en la potencia de inhibición frente a hexosaminidasas a pH neutro (retículo endoplasmático) con respecto a pH ácido (lisosoma) hace del compuesto **94** un buen candidato a chaperona farmacológica para el tratamiento de la enfermedad de Tay-Sachs, ocasionada por la disfunción de la β -hexosaminidasa A. Además, el estudio comparativo de la inhibición de β -hexosaminidasa y α -N-acetilglucosaminidasa indicó una alta selectividad hacia la primera enzima tanto a pH ácido como a pH neutro (Figura 4.15.).

La capacidad de un compuesto de proteger la enzima lisosomal de la desnaturalización térmica se considera una indicación del potencial del mismo para estabilizar la forma correctamente plegada y, por tanto, actuar como chaperona farmacológica.¹⁶ Con objeto de evaluar el efecto del compuesto **94** en la estabilización de la β -hexosaminidasa en ensayos de desnaturalización inducida a 48 °C se ha llevado a cabo la determinación de la actividad de la enzima en presencia de concentraciones crecientes de **94** (10, 30, 60 μ M) y distintos tiempos de incubación (20, 40, 60 min). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.16. donde se observa que a medida que aumenta la concentración de **94** la actividad enzimática se conserva incluso tras 60 minutos de incubación a 48 °C, lo que demuestra su función protectora.

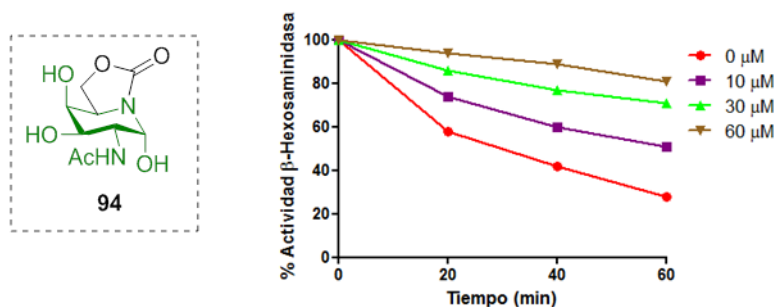


Figura 4.16. Influencia de la concentración del derivado OGJ **94** en la actividad de la β -hexosaminidasa lisosomal en condiciones térmicas (48 °C).

4.4. Actividad chaperona de los derivados 2-acetamido-2-desoxiiminoazúcares sp² derivados de ONJ, OMJ y OGJ en fibroblastos de pacientes de Tay-Sachs.

Antes de proceder a la evaluación de los 2-acetamido-2-desoxi derivados de configuración *gluco* (**90**), *mano* (**92**) y *galacto* (**94**) como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Tay-Sachs, en colaboración con el Dr. Higaki se ha estudiado el efecto in vitro de su inhibición frente a la hexosaminidasa A. La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante ensayos fluorimétricos utilizando el sustrato 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosaminido-6-sulfato-potásico y células de fibroblastos control. Los valores de actividad se han obtenido tras incubación durante 30 min a 37 °C con concentraciones crecientes de los iminoazúcares sp² **90**, **92**, **94** (Figura 4.17.). Los valores de IC₅₀ de los compuestos ensayados y de la pirimetamina, inhibidor competitivo de esta enzima, aparecen recogidos en la Tabla 4.5. Podemos observar que los derivados de configuración *gluco* **90** y *galacto* **94** presentaron valores de IC₅₀ muy similares, resultando el de configuración *mano* **92** el menos activo de los tres. 35.65, 88.49, y 36.33 μ M.

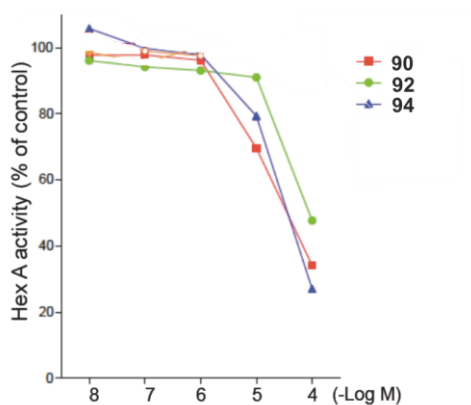
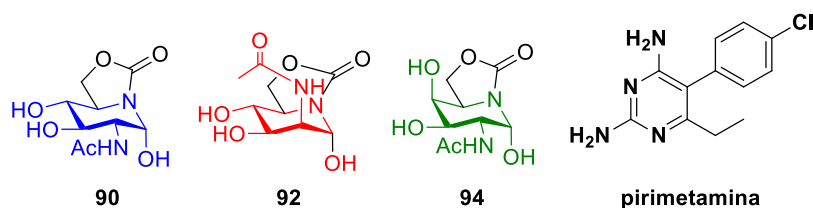


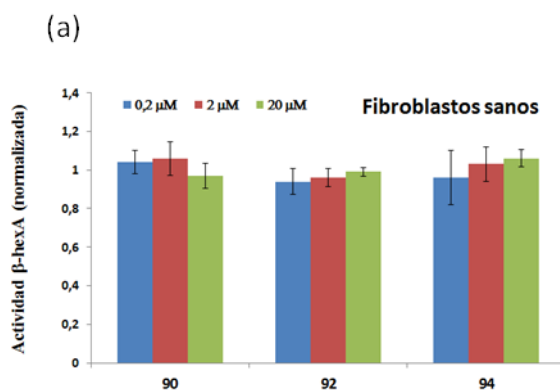
Figura 4.17. Perfil de inhibición de los derivados **90**, **92** y **94** frente a la HexA. Los valores son relativos a la actividad enzimática en ausencia de chaperona como 100%.

Tabla 4.5. Valores de inhibición IC_{50} (μM) de **90**, **92**, **94** y pirimetamina frente a la hexosaminidasa A.

Iminoazúcares	IC_{50} (μM)
90	35.7
92	88.5
94	36.3
Pirimetamina	12.7

La actividad como chaperonas de los tres derivados de configuración *gluco*, *mano* y *galacto* (**90**, **92** y **94**) se ha evaluado en fibroblastos humanos sanos (Figura 4.18. (a)) y en fibroblastos de pacientes afectados de Tay-Sachs con las mutaciones G269S (TSD-GS;

forma tardía o adulta de la enfermedad) (Figura 4.18. (b)), y R252L (TSD-RL; forma temprana o infantil de la enfermedad) (Figura 4.18. (c)), empleando concentraciones en el rango de 0.2, 2 y 20 μM . Los resultados indican un aumento de la actividad enzimática para la mutación TSD-GS modesto, pero estadísticamente significativo, a concentraciones de 20 μM de los tres acetamidoiminoazúcares sp^2 . Este incremento llega a ser mayor del 30% en el caso del derivado de OGJNAc **94**. De hecho, este compuesto mostró un efecto chaperona significativo incluso a la concentración de 2 μM con un aumento del 15% en la actividad de la β -hexosaminidasa A mutada. Sin embargo, ninguno de los compuestos produjo un aumento significativo de la actividad de la enzima a las concentraciones estudiadas en el caso de la mutación TSD-RL, que tampoco responde a la pirimetamina. No obstante, en el caso del compuesto **94** a la concentración de 20 μM llega a observarse un ligero incremento del 5%, lo que nos hace pensar que esta mutación requiere concentraciones más elevadas de chaperona. Los ensayos correspondientes para confirmar este punto se encuentran en curso en el momento de la redacción de esta Tesis (Figura 4.18.).



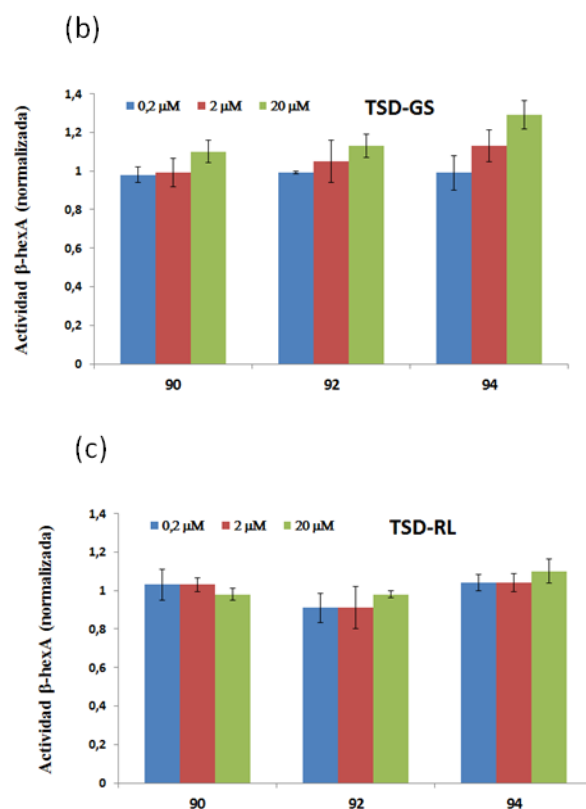


Figura 4.18. Efecto chaperona de los derivados **90**, **92** y **94** (0.2-20 μM) en fibroblastos humanos sanos (a) y de pacientes de Tay-Sachs con las mutaciones G269S (b) y R252L (c). Cada barra representa la media de tres determinaciones.

Referencias

¹ (a) G. W. J. Fleet, P. W. Smith, R. J. Nash, L. E. Fellows, R. B. Parekh, T. W. Rademacher, *Chem. Lett.*, **1986**, 1051-1054; (b) G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 979-990.

² G. Gradnig, G. Legler, A. E. Stuetz, *Carbohydr. Res.*, **1996**, *287*, 49-57.

-
- ³ D. Best, P. Chairatana, A. F. G. Glawar, E. Crabtree, T. D. Butters, F. X. Wilson, C. -Y. Yu, W. -B. Wang, Y. -M. Jia, I. Adachi, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 2222-2224.
- ⁴ A. F. G. Glawar, D. Best, B. J. Ayers, S. Miyauchi, S. Nakagawa, M. Aguilar-Moncayo, J. M. García-Fernández, C. Ortiz Mellet, E. V. Crabtree, T. D. Butters, F. X. Wilson, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 9341-9359.
- ⁵ T. Kajimoto, K. K. C. Liu, R. L. Pederson, Z. Zhong, Y. Ichikawa, J. A. Porco Jr., C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6187-6196.
- ⁶ A. de la Fuente, T. Mena-Barragán, R. A. Farrar-Tobar, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6500-6510.
- ⁷ (a) H. Byun, L. He, R. Bittman, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 7051-7091; (b) B. B. Lohray, *Synthesis*, **1992**, 1035-1052; (c) H. Han, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 1567-1569; (d) O. V. Singh, H. Han, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 2387-2391.
- ⁸ A. De la Fuente, R. Martin, T. Mena-Barragán, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 3638-3641.
- ⁹ A. De la Fuente, T. Mena-Barragán, R. A. Farrar-Tobar, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6500-6510.
- ¹⁰ A. De la Fuente, R. Rísquez Cuadro, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, E. Nanba, K. Higaki, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, en prensa.
- ¹¹ R. P. Spencer, C. L. Cavallaro, J. Schwartz, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 3987-3995.
- ¹² C. Plattner, M. Höfener, N. Sewald, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 545-547.
- ¹³ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.*, **1979**, *57*, 1244-1251.
- ¹⁴ H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3685-3689.
- ¹⁵ V. Mauri, P. Lotfi, L. Segatori, M. Sardiello, *PLoS One*, **2013**, *8*, 1-9.
- ¹⁶ A. R. Sawkar, W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002**, *99*, 15428.

5. Pseudo- α -O-glicosilaminoácidos y α -O-glicopéptidos derivados de iminoazúcares sp^2 como miméticos del antígeno tumoral Tn.

Abstract: An efficient methodology allowing the synthesis of glycomimetic-peptide conjugates has been developed in this chapter and applied to the preparation of functional Tn antigen mimics (one of the most specific tumor-associated structures). These novel compounds emulate the binding mode of the Tn antigen to the lectin SBA and also behave as inhibitors of glycosidases, with selectivity patterns that depend on both the glycone and aglycon moieties. The superior performance of Thr- over Ser-containing derivatives reinforces the key role of the underlying amino acid in the molecular recognition of glycopeptides. These compounds will find broad application as probes to explore the influence of subtle structural changes on the molecular recognition processes with biologically relevant proteins, including antibodies, lectins and glycosidases.

5. Síntesis de pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos y de α -*O*-glicopéptidos de iminoazúcares sp^2 bicíclicos como miméticos del antígeno tumoral Tn.

5.1. Síntesis y caracterización estructural de iminoazúcares sp^2 con estructura de glicosilaminoácidos y glicopéptidos.

Dada la marcada preferencia de los iminoazúcares sp^2 por la incorporación de sustituyentes pseudoaglicónicos orientados axialmente tal y como se observa en el Capítulo 3 de esta Tesis, anticipamos que estos compuestos se comportarían como estructuras prometedoras para el diseño de análogos de α -*O*-glicopéptidos, entre los cuales destaca el antígeno natural tumoral Tn. Este antígeno, constituido por un residuo de α -*N*-acetilgalactosamina unido a través de un enlace α -*O*-glicosídico a los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina/treonina (α -GalNAc-Ser/Thr), es uno de los principales antígenos asociados a tumores formados por carbohidratos (TACAs) implicado en procesos de reconocimiento de células cancerosas, siendo una de las estructuras más específicas asociadas a tumores. Sin embargo su poder antigénico es débil, por lo que se requiere la preparación de análogos capaces de provocar una respuesta inmune efectiva.

Con objeto de preparar glicósidos de iminoazúcares sp^2 con un aglicón peptídico análogos del antígeno tumoral Tn, nuestro primer objetivo ha sido la síntesis de cuatro pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos con un perfil configuracional análogo a la D-glucosa (α - sp^2 -Glc, ONJ) y la 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (α - sp^2 -GlcNAc) y los aminoácidos serina y treonina en su forma protegida (**98**, **99**, **105** y **106**) como *building blocks* aptos para incorporarlos posteriormente en la cadena peptídica de los glicopéptidos objetivo, y en su forma desprotegida (**100**, **101**) (Figura 5.1.).

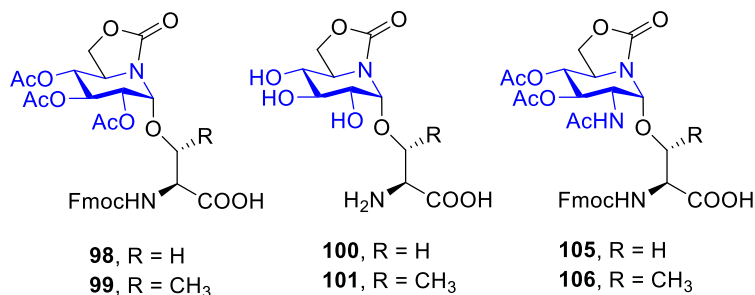
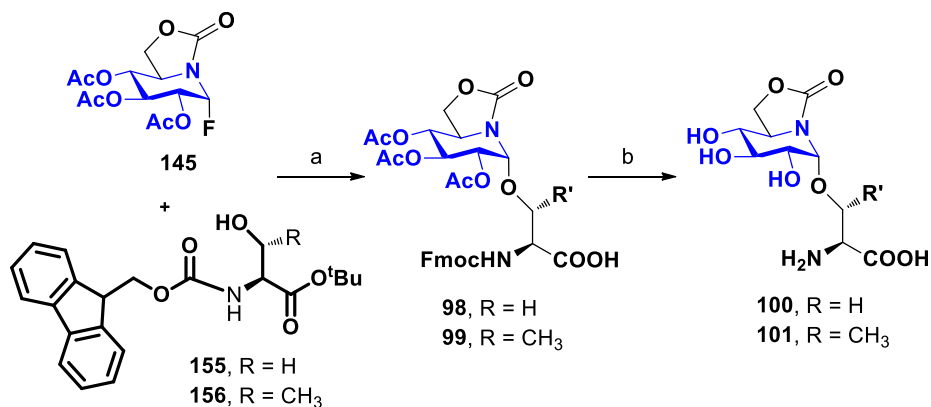


Figura 5.1. Estructura de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de ONJ (**98-101**) y 2-acetamido-2-desoxi-ONJ (**105-106**).

Las reacciones clave de *O*-glicosidación se llevaron a cabo partiendo del fluoruro de pseudoglicosilo **145** en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como promotor de la reacción y los aminoácidos serina y treonina convenientemente protegidos con Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) y éster *tert*-butílico (**155** y **156**)¹ en diclorometano anhidro a 0 °C. Esta etapa transcurió con la rotura simultánea del éster *tert*-butílico y permitió aislar los derivados *N*-protegidos **98** y **99** con 71-72% de rendimiento. Posteriormente, la eliminación del grupo Fmoc con piperidina seguida de desacetilación convencional con metilato sódico permitió aislar los α -glicosilaminoácidos desprotegidos **100** y **101** miméticos del antígeno tumoral Tn (Esquema 5.1.).



Esquema 5.1. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de ONJ 98-101. Reactivos y condiciones: a. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, DCM, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 60 min, 71-72%. b. Piperidina (20% en MeOH), DCM, t.a., 5 h; NaOMe, MeOH, t.a., 5 h (64 y 54%, respectivamente, global dos etapas).

Es interesante destacar que en esta etapa de glicosidación, usando el fluoruro de glicosilo únicamente se detectó el anómero α -, aunque cabría esperar que el carácter participante del grupo protector acetilo en O-2 favoreciera la formación del anómero β -. Con objeto de tener una visión más profunda acerca de esta reactividad, se ha llevado a cabo un estudio teórico acerca de los perfiles de reacción del catión imino intermedio hacia la α - y β -glicosilación (Figura 5.2.) usando metanol como nucleófilo.

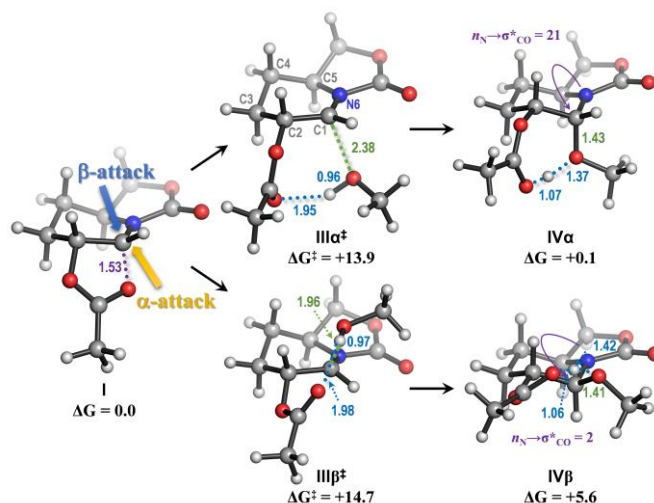


Figura 5.2. Reacciones modelo de glicosilación del iminoazúcar sp^2 (I) con metanol. Las energías libre (ΔG) y las interacciones de hiperconjugación ($n_N \rightarrow \sigma^*_{CO}$) se expresan en kcal mol⁻¹, y las distancias en Angstrom.

La aproximación por la cara *Re* del doble enlace de tipo iminio está cinéticamente favorecida en *ca.* 1 kcal mol⁻¹ (Figura 5.2.) debido a la menor tensión estérica alrededor de los enlaces C1–C2 y C2–C3 en el estado de transición incipiente (TS) III α [‡].² Además,

el efecto anomérico superior para el product **IV α** (conformación de silla, OMe en disposición axial) con respecto a **IV β** (conformación de silla, OMe en disposición ecuatorial), se confirma mediante cálculos NBO (natural bond orbital) de las interacciones hiperconjugativas $n_N \rightarrow \sigma^*_{CO}$.³ Esta falta de estabilización determina que la adición β - sea endotérmica y reversible, mientras que la adición α - esté favorecida termodinámicamente. Es interesante que además, de acuerdo con cálculos teóricos, el anómero β - tiende a adoptar una conformación de bote torcido, de acuerdo con observaciones previas para β -tioglicósidos derivados de iminoazúcares sp^2 mediante espectroscopía de RMN.⁴ En resumen, el anómero α - es más estable en > 4 kcal mol⁻¹. Estos cálculos demuestran el completo estereocontrol de los iminoazúcares sp^2 en las reacciones de glicosilación, evitando las separaciones cromatográficas de anómeros α - y β - inherentes a la mayoría de los métodos de glicosilación, particularmente en la síntesis de α -O-glicopéptidos.

Los espectros de ¹H, ¹³C RMN y EM, así como los datos de análisis elemental, permitieron confirmar la estructura de los nuevos glicosilaminoácidos. Por ejemplo, en la Figura 5.3. se muestra el espectro de ¹H RMN en D₂O de **101** donde se observa la presencia de un único anómero (H-1: 5.26 ppm, d, $J_{1,2} = 4.5$ Hz), así como la señal del grupo metilo de la treonina a δ 1.37 ppm (d, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz). En el espectro de ¹³C RMN se observa la señal del grupo carbonilo del ácido carboxílico a 171.8 ppm y la señal del carbono pseudoanomérico a 82.4 ppm y del grupo metilo del residuo de treonina a 18.2 ppm.

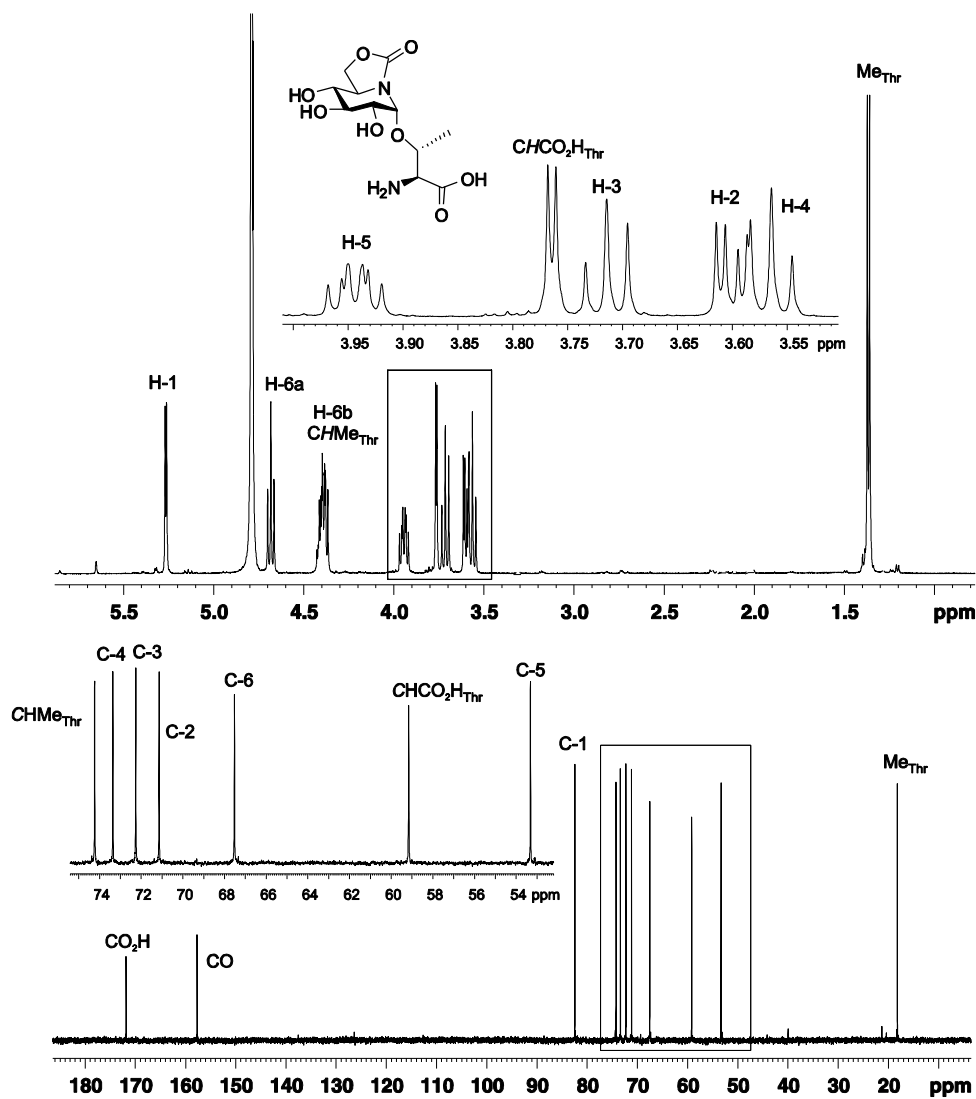
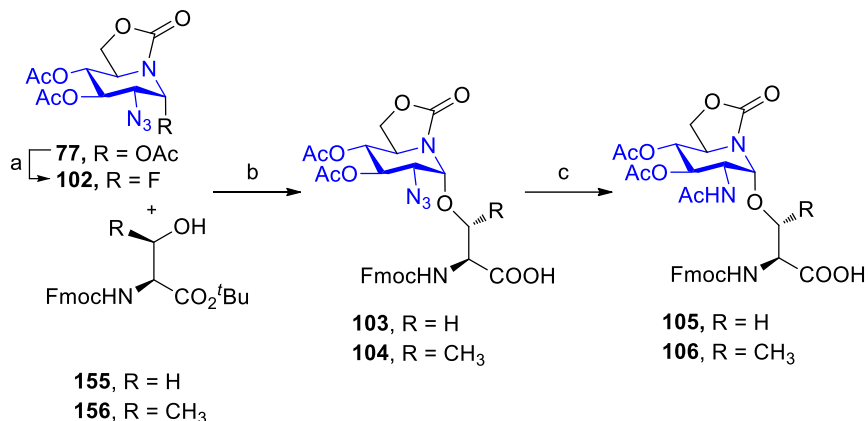


Figura 5.3. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, D_2O) de **101**.

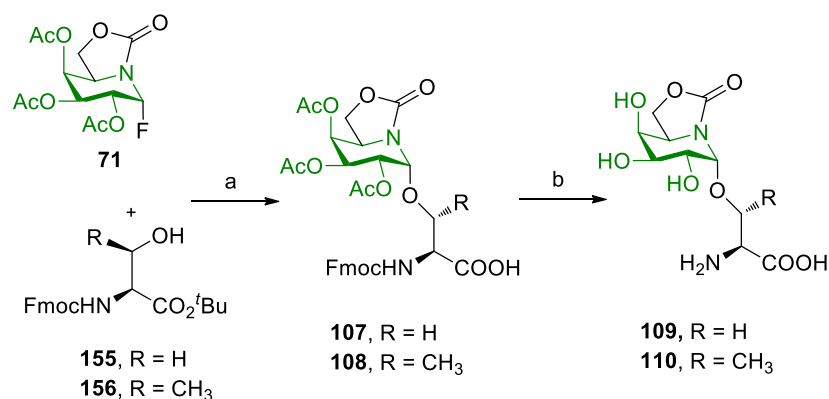
Para la preparación de los α -*O*-glicosilaminoácidos de configuración GlcNAc (**105**, **106**) se partió del 2-azido-2-desoxi-derivado (**77**) que por reacción con HF-py (70%) condujo al pseudoglicosilfluoro derivado **102** (90% de rendimiento), el cual sometido a las condiciones de glicosidación indicadas en el Esquema 5.1. con los

aminoácidos serina y treonina **155** y **156**, condujo a los derivados **103** y **104** con un 75-80% de rendimiento, con la formación exclusiva en ambos casos del anómero α -. La reducción del grupo azido de la posición C-2 se llevó a cabo simultáneamente con la acetilación del grupo amino resultante utilizando una mezcla de THF-AcOH-Ac₂O en proporción (3:2:1) en presencia de Zn y una disolución saturada de CuSO₄⁵ obteniéndose los correspondientes derivados de 2-acetamido-2-desoxi-ONJ (**105** y **106**) (73-93% de rendimiento global de las dos etapas) (Esquema 5.2.).



Esquema 5.2. Preparación de los pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de 2-acetamido-2-desoxi-ONJ (103-106). Reactivos y condiciones: a. HF-piridina (70%), -40 °C, 90 min, 90%. b. BF₃·Et₂O, DCM, 0 °C, 2 h, 75-80%. c. THF-AcOH-Ac₂O, Zn, CuSO₄ sat, 0 °C, 2 h 30 min, (73-93%, global dos etapas).

Una secuencia de reacciones paralela a la descrita anteriormente en el Esquema 5.1. para los derivados α -Glc-sp² permitió obtener los pseudo- α -O-glicosilaminoácidos con perfil configuracional análogo a la galactosa (α -sp²-Gal) **107** y **108**, con rendimientos del 73% y 91%, en forma protegida como *building blocks* para su posterior incorporación en la cadena peptídica, y los correspondientes derivados desprotegidos **109** y **110** con rendimientos de moderados a buenos (49-67%) (Esquema 5.3.).



Esquema 5.3. Preparación de los pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de OGJ (107-110). Reactivos y condiciones: a. BF₃-Et₂O, DCM, 0 °C → t.a., 60 min, 73-91%. b. Piperidina (20% en MeOH), DCM, t.a., 5 h; NaOMe, MeOH, t.a., 5 h, (49-67%, global dos etapas).

En la Figura 5.4. se recogen los espectros de ¹H y ¹³C RMN en CD₃OD, registrados en 500 y 75.5 MHz respectivamente, del derivado de galactosa **108** apreciándose de nuevo la presencia de un único anómero (C-1 a 81.5 ppm) así como la presencia de las señales aromáticas correspondientes al grupo protector Fmoc del aminoácido (7.83-7.25 en ¹H RMN y 145.3-120.9 ppm en ¹³C RMN).

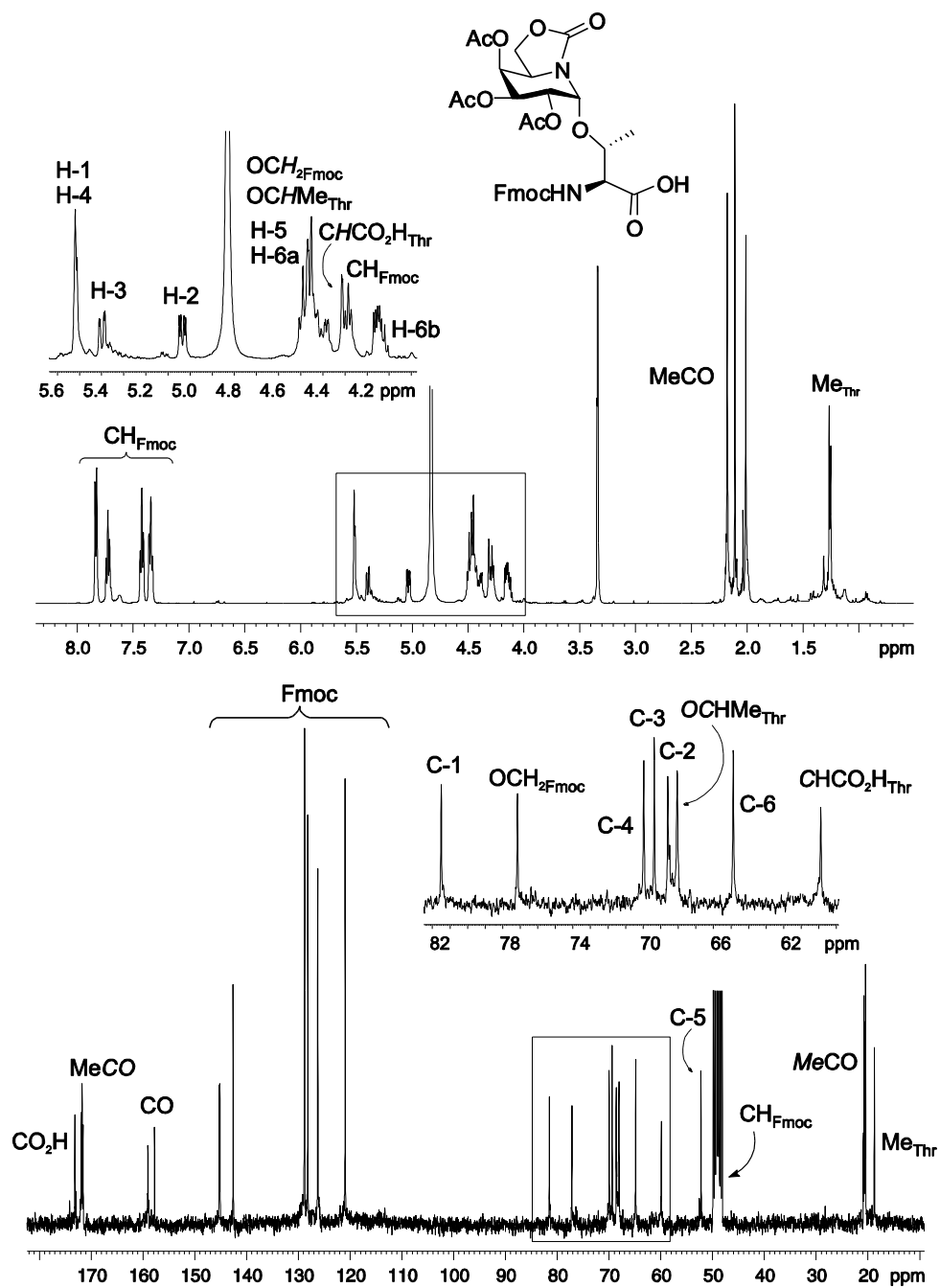
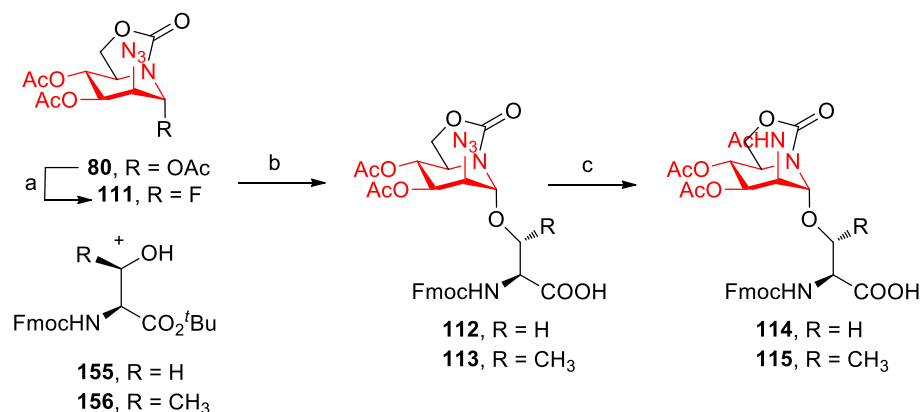
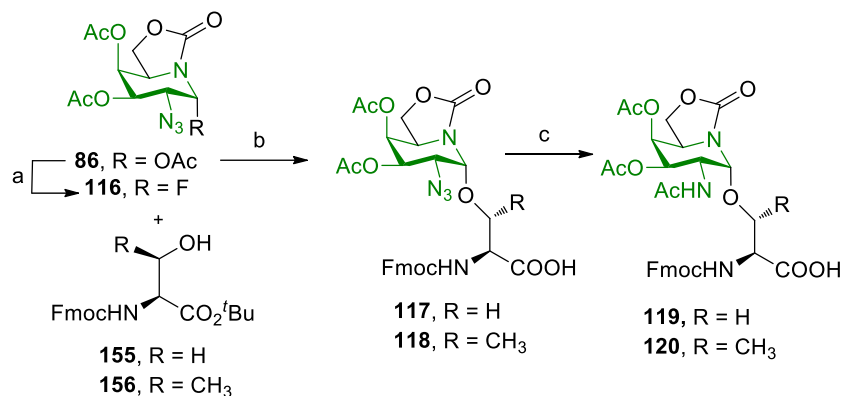


Figura 5.4. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 75.5 MHz, CD_3OD) de 108.

En los Esquemas 5.4. y 5.5. se recogen las condiciones de reacción y los rendimientos obtenidos en la obtención de los α -*O*-pseudoglicosilaminoácidos de configuración ManNAc (**114** y **115**) y GalNAc (**119** y **120**). Las reacciones se llevaron a cabo de manera análoga a la descrita anteriormente y los rendimientos de los productos obtenidos fueron de buenos a excelentes. La estructura de los nuevos pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos se confirmó mediante espectroscopía de ^1H , ^{13}C RMN, masas, y análisis elemental.



Esquema 5.4. Preparación de los pseudo- α -*O*-glicosilaminoácidos derivados de 2-acetamido-2-desoxi-OMJ (114** y **115**).** Reactivos y condiciones: a. HF-piridina (70%), $-40\text{ }^\circ\text{C}$, 1,5 h, 77%. b. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, DCM, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 60 min, 83 y 65%, respectivamente. c. THF-AcOH-Ac₂O, Zn, CuSO₄ sat., $0\text{ }^\circ\text{C}$, t.a., 2 h 30 min., 78 y 90%, respectivamente.



Esquema 5.5. Preparación de los pseudo- α -O-glicosilaminoácidos derivados de 2-acetamido-2-desoxi-OGJ (119** y **120**).** Reactivos y condiciones: a. 70% HF-piridina, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1,5 h, 83%. b. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, DCM, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 60 min, 87 y 72%, respectivamente. c. THF-AcOH-Ac₂O, Zn, CuSO₄ sat., $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, t.a., 2 h 30 min, 87 y 74%, respectivamente.

Una vez preparados los α -O-pseudoglicosilaminoácidos miméticos del antígeno natural Tn de configuración *gluco*, *mano* y *galacto*, se utilizaron para la preparación de los correspondientes glicopeptidomiméticos que incorporan los aminoácidos del fragmento (Ala-Pro-Asp-Thr/Ser-Arg-Pro; APDT(S)RP) de la glicoproteína MUC1, que es un epítipo peptídico reconocido por anticuerpos del tipo anti-MUC1. Para ello se hizo uso de la síntesis en fase sólida (solid phase peptide synthesis, SPPS) y la estrategia Fmoc. En todos los casos la incorporación del α -O-pseudoglicosilaminoácido derivado del iminoazúcar sp² se llevó a cabo de manera manual fuera del sintetizador, aumentando el tiempo de reacción y reduciendo el número de equivalentes. La purificación final de los pseudoglicopeptidomiméticos se llevó a cabo mediante HPLC.

Para la síntesis en fase sólida, la resina polimérica elegida ha sido la Rink Amide MBHA (Novabiochem®) (Figura 5.5.) que permite obtener el extremo C-terminal en forma de amida. Los aminoácidos, convenientemente protegidos, que se incorporaron de modo secuencial, son comerciales. En todos los acoplamientos se utilizó hexafluoruro de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1H-benzotriazolil)uronio (HBTU) y diisopropiletilamina

(DIPEA) como agente de acoplamiento y base, respectivamente, y el acoplamiento con el pseudo- α -*O*-glicosilaminoácido con estructura de iminoazúcar sp^2 se realizó en DMF.

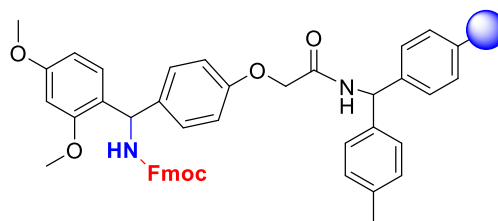
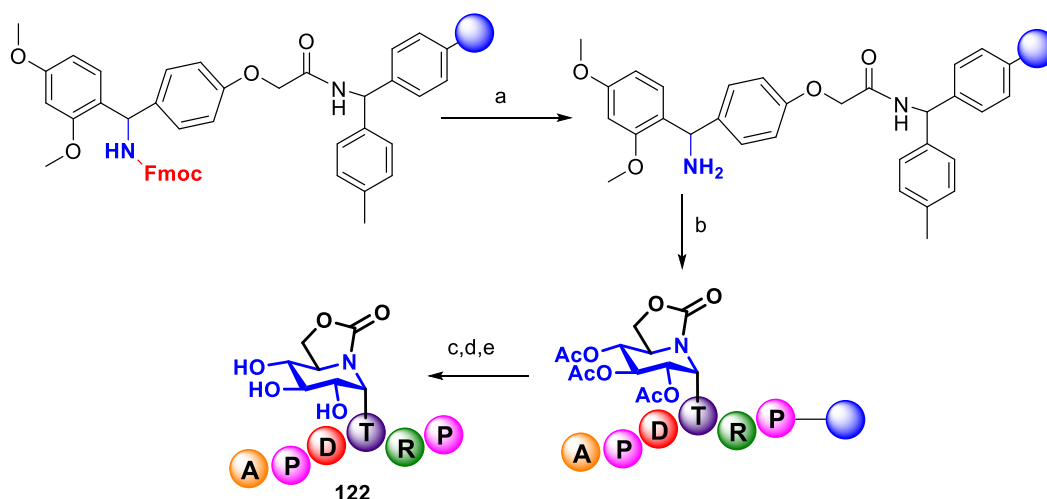


Figura 5.5. Estructura de la resina Rink Amide MBHA usada en la SPPS.

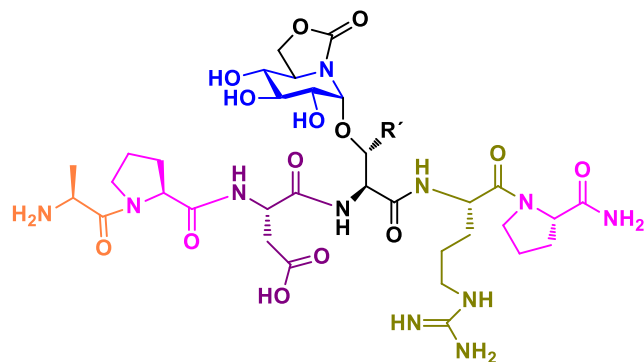
La desprotección de los grupos acetilos del iminoazúcar sp^2 se llevó a cabo empleando una mezcla de hidracina en metanol y la liberación del pseudoglicopéptido resultante de la resina tuvo lugar con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) y agua, que provocó la desprotección de todos los grupos protectores sensibles a ácido. Tras precipitación con éter, la purificación final se llevó a cabo mediante cromatografía HPLC preparativa en fase reversa empleando una columna Phenomenex Luna C18(2) (10 μ m, 21.20 mm x 250 mm) y un gradiente de acetonitrilo-agua-TFA y posterior liofilización. En el Esquema 5.6. se detallan las etapas de preparación del glicopeptidomimético derivado de ONJ **122** empleando SPPS.



- a - Desprotección del Fmoc (20% piperidina en DMF)
 b- Acoplamiento con Fmoc aminoácidos/glicosil aminoácidos (HBTU, DIPEA)
 c- Desprotección de grupos acetilo ($\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{MeOH}$ 7:3)
 d- Liberación de la resina y eliminación de grupos protectores (TFA/TIS/ H_2O , 2 h)
 e- Purificación por HPLC preparativa

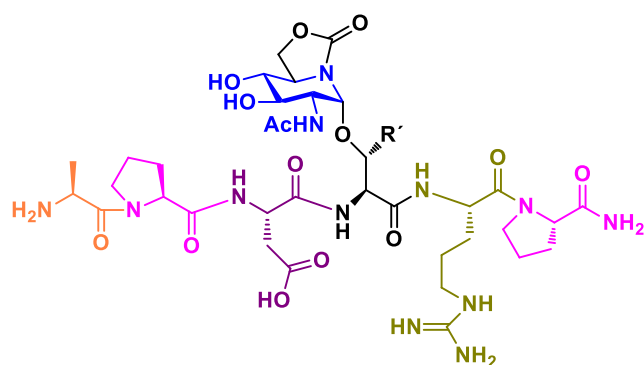
Esquema 5.6. Preparación del α -O-pseudoglicosilpeptidomimético **122** mediante SPPS.

Siguiendo una estrategia análoga se han preparado los α -O-glicopéptidos de configuración Glc (**121**, **122**), GlcNAc (**123**,**124**), ManNAc (**125**, **126**), Gal (**127**, **128**) y GalNAc (**129**, **130**), cuyas estructuras y correspondientes valores de tiempo de retención (t_R) para la purificación por HPLC se recogen en la Figura 5.6. Por cuestiones de tiempo no se ha podido disponer de los t_R de los glicopeptidomiméticos **125** y **126**, los cuales están siendo actualmente purificados por HPLC.



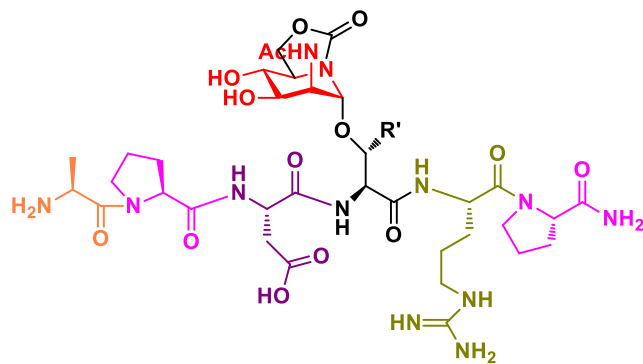
121, APDS(α -sp²-Glc)RP, R' = H, t_R = 24.97 min

122, APDT(α -sp²-Glc)RP, R' = CH₃, t_R = 34.92 min



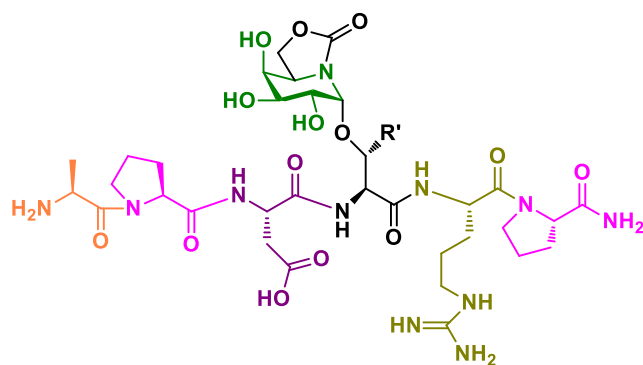
123, APDS(α -sp²-GlcNAc)RP, R' = H, t_R = 29.0 min

124, APDT(α -sp²-GlcNAc)RP, R' = CH₃, t_R = 34.7 min



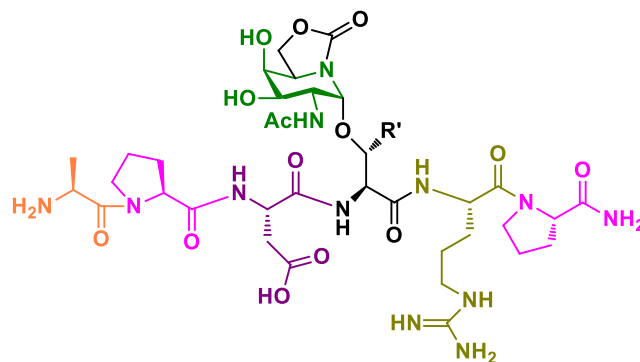
125, APDS(α -sp²-ManNAc)RP, R' = H

126, APDT(α -sp²-ManNAc)RP, R' = CH₃



127, APDS(α -sp²-Gal)RP, R' = H, t_R = 27.45 min

128, APDT(α -sp²-Gal)RP, R' = CH₃, t_R = 34.05 min



129, APDS(α -sp²-GalNAc)RP, R' = H, t_R = 29.1 min

130, APDT(α -sp²-GalNAc)RP, R' = CH₃, t_R = 34.6 min

Figura 5.6. Estructuras de los pseudoglicopeptidomiméticos (**121-130**) preparados mediante SPPS.

Los nuevos glicopéptidos sintetizados se caracterizaron mediante espectroscopía de RMN y EM de alta resolución en modo electrospray (HRMS-ESI). En la Figura 5.7. se muestra el espectro de ¹H RMN del glicopeptidomimético derivado de Gal-sp² que incorpora el residuo de serina (**127**) registrado a 400 MHz en una mezcla 1:9 de D₂O-H₂O. En la ampliación de la región correspondiente a los protones NH de amida (8.7-7.0 ppm) se observan siete señales que corresponden a los protones NH_{Asp}, NH_{Arg}, NH_{Ser} (doblete a 8.38 ppm), y los grupos NH₂ terminales.

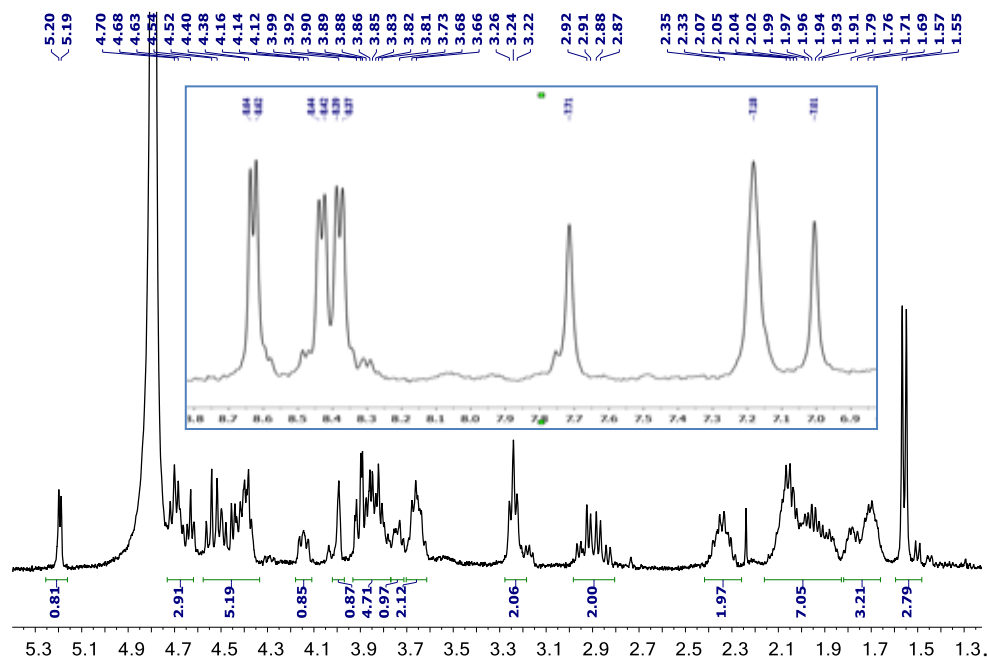


Figura 5.7. Espectros de ^1H RMN (400 MHz, 1:9 $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$) de **127**.

La Figura 5.8. muestra el espectro de ^{13}C RMN, registrado a 75 MHz en D_2O , del glicopéptido incorporando treonina (**128**) observándose 7 señales a campo bajo correspondientes a los grupos carbonilo de amida y ácido, una señal a 158.3 ppm correspondiente al carbonilo del grupo carbamato del iminoazúcar sp^2 y una señal a 156.7 ppm que corresponde al grupo imino del residuo de arginina.

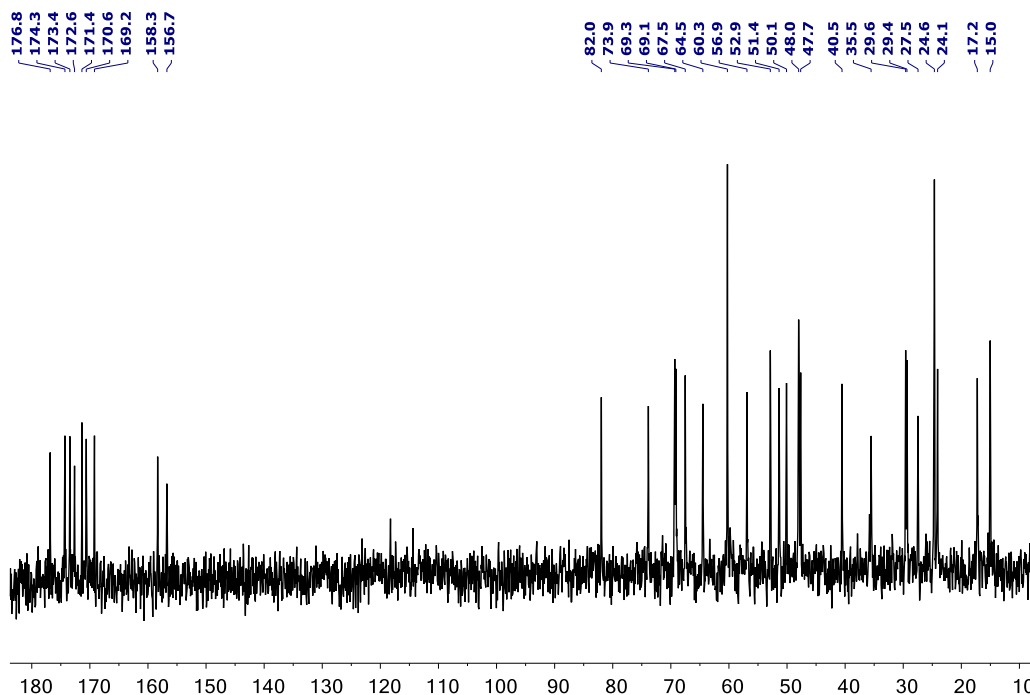


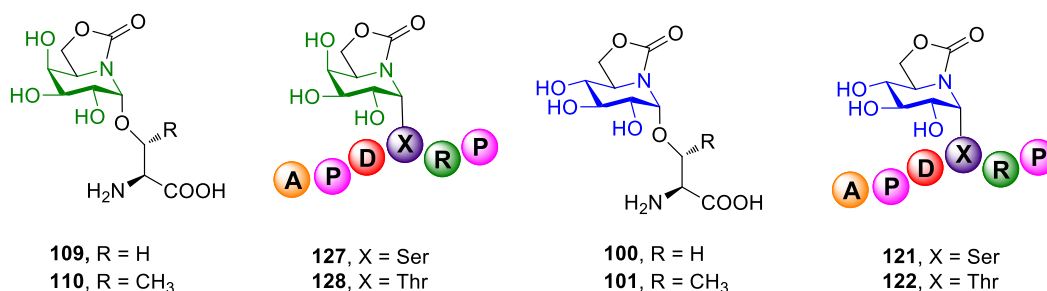
Figura 5.8. Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O) del glicopeptidomimético **128**.

5.2. Evaluación de la actividad inhibitoria frente a glicosidasas.

Considerando la presencia de una unidad de iminoazúcar sp^2 en todos los pseudo- α -O-glicopéptidos sintetizados y con objeto de evaluar la influencia de la presencia de la cadena peptídica en sus propiedades como inhibidores de glicosidasas se ha evaluado la actividad inhibitoria frente a cuatro enzimas comerciales seleccionadas con actividad α/β glucosidasa y galactosidasa. Los valores de las constantes de inhibición (K_i , Tabla 5.1.) mostraron que mientras que los glicosilaminoácidos (**100-101**, **109-110**) no inhiben o inhiben sólo débilmente a las enzimas ensayadas (100-300 μM), los correspondientes pseudoglicopéptidos relacionados con la MUC1 (**127-128**, **121-122**) se comportan como inhibidores de moderados a potentes de las mismas enzimas. En general, los derivados que incorporan el aminoácido treonina presentan mayor actividad inhibitoria que los de

serina siendo destacable el valor de K_i ($17 \pm 2 \mu\text{M}$) que presenta el glicohexapéptido **128** frente a la β -galactosidasa de *E. coli* con respecto a su análogo de serina **127** cuya inhibición se vió reducida en un orden de magnitud frente a dicha enzima (K_i , $134 \pm 12 \mu\text{M}$). Este resultado pone de manifiesto el impacto de la cadena peptídica en la inhibición de glicosidasas.

Tabla 5.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) de los gliconjugados derivados de OGJ (**109**, **127**, **110**, **128**) y de ONJ (**100**, **121**, **101**, **122**).^{a,b}



Enzima	109	127	110	128	100	121	101	122
β -Galasa (Hígado buey)	284 \pm 25	48 \pm 5	ni	72 \pm 6	ni	ni	ni	ni
β -Galasa (<i>E. coli</i>)	ni	134 \pm 12	ni	17 \pm 2	ni	ni	ni	n.i.
Isomaltasa (Levadura)	ni	110 \pm 10	ni	43 \pm 4	ni	287 \pm 29	ni	91 \pm 8
α -Glucasa (Levadura)	ni	544 \pm 55	ni	191 \pm 15	129 \pm 13	330 \pm 30	ni	266 \pm 27

^aModo de inhibición competitivo en todos los casos. ^bni: No se detectó inhibición a concentraciones 1 mM.

Los estudios de modelización molecular llevados a cabo sobre el complejo entre la β -galactosidasa de *E. coli* y una versión simplificada de **128** (sp²-Gal *N*-acetildiamida de **110**) indican que la disposición del residuo de iminoazúcar difiere ligeramente de la

encontrada en estado sólido⁶ para el residuo de galactosa de la lactosa en el complejo con la misma enzima. Sin embargo, se conservan varios contactos como los enlaces de hidrógeno de OH4 con Asp201 y OH3 con His391, Glu537 y Asp201. Además, el grupo carbonilo del iminoazúcar presenta un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de Asn102 y el grupo metilo del residuo de treonina muestra un contacto hidrofóbico con Trp999. Esta última interacción podría ser responsable de la mayor afinidad de los derivados de treonina frente a los de serina. Además, la cadena peptídica presenta algunos contactos estabilizantes con la enzima que podrían explicar el aumento de afinidad del glicopéptido **128** (K_i , $17 \pm 2 \mu\text{M}$) en comparación con el pseudoglicoaminoácido **110**. En resumen, estas observaciones confirman el potencial que presentan las modificaciones de la cadena peptídica para mejorar las propiedades de interacción con glicosidasas.

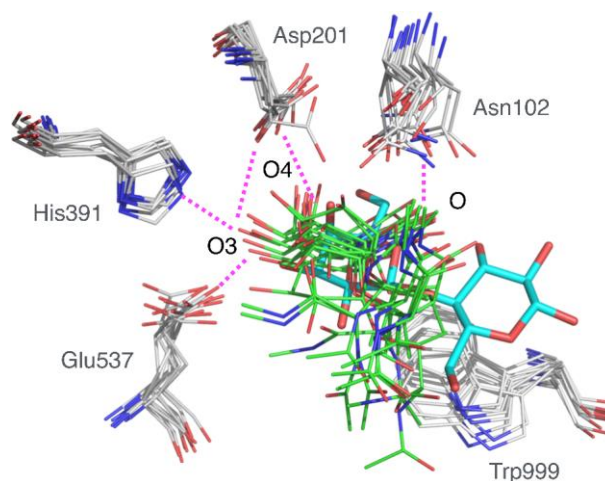


Figura 5.9. Superposición de las simulaciones de dinámica molecular del complejo de la β -galactosidasa:**128*** y la estructura cristalina de la lactosa (en azul) con esta galactosidasa.

5.3. Estudio de las propiedades conformacionales de los α -*O*-glicohexapéptidos mediante RMN y dinámica molecular.

Dado que el diseño de vacunas anticáncer eficaces implica un conocimiento a nivel atómico de las interacciones moleculares en juego, en esta Tesis se ha abordado un estudio exhaustivo de las propiedades conformacionales de los glicopéptidos de configuración sp^2 -Glc (Ser, Thr; **121** y **122**) y sp^2 -Gal (Ser, Thr; **127** y **128**) en estado libre y en agua. Con este objetivo se ha seguido el protocolo NMR/MD-tar (simulaciones de dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo),⁷ que combina datos experimentales de RMN y simulaciones de dinámica molecular. Este tipo de análisis que emplea los valores de constantes de acoplamiento 3J y distancias interprótonicas obtenidas a partir de experimentos NOESY, ha sido aplicado previamente por el grupo del Prof. Jesús Peregrina de la Universidad de la Rioja para el análisis de las diferencias de reconocimiento molecular de glicopéptidos frente a las lectinas SBA (Soybean agglutinin), VVA (*Vicia villosa* agglutinin) y HPA (Helix pomatia agglutinin).⁸

Para los glicopéptidos analizados, se observó una flexibilidad alta de la cadena peptídica, adoptando fundamentalmente conformaciones extendidas en disolución. En el caso del derivado sp^2 -Gal-Thr (**128**) se observó una conformación con un giro γ , poblada en un 40%, que involucra al grupo carbonilo y el grupo amino de los residuos de Asp y Arg, respectivamente. En todos los casos, la cadena lateral del aminoácido glicosilado es bastante rígida y adopta valores del ángulo χ de, aproximadamente, 60° . El ángulo de rotación χ se define como el ángulo alrededor del enlace $C\alpha-C\beta$ y define la disposición de la cadena lateral (Figura 5.10.).

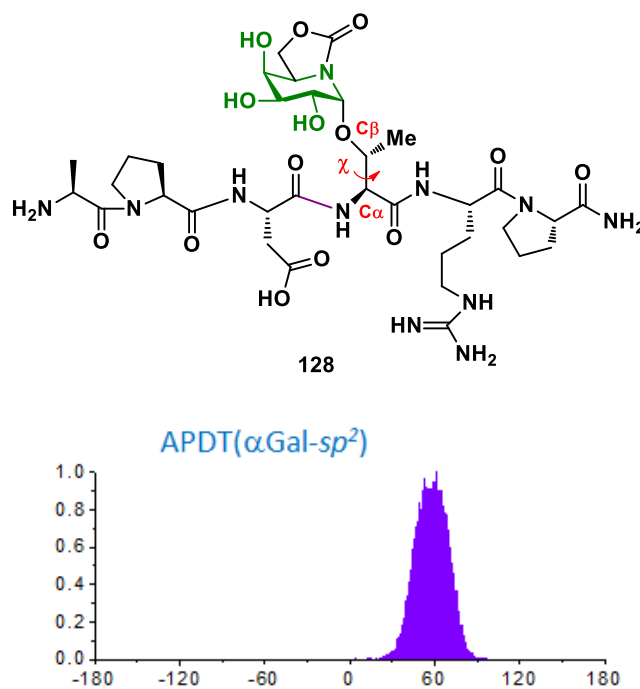


Figura 5.10. Representación del ángulo χ que define la disposición de la cadena lateral para el α -O-glicopéptido **128**.

De acuerdo con la tendencia descrita en sistemas similares, los derivados de Ser y Thr mostraron propiedades conformacionales muy diferentes en la región del enlace pseudoglicosídico. Particularmente, el ángulo diedro de torsión, ψ , que define la rotación en torno al enlace C β y el O glicosídico (C1-O1-C β -C α), adopta valores de 120-140° en el caso de los derivados de Thr (**122**, **128**) y cercanos a 180° en el de los derivados de Ser (**121**, **127**), para minimizar la repulsión entre el iminoazúcar sp² y la cadena peptídica. Posiblemente, la diferencia de conformación se debe a la presencia del grupo β -metilo de la Thr que fuerza a una orientación casi perpendicular del iminoazúcar sp² y el aminoácido unido directamente, mientras que en el caso de la Ser se observa una disposición paralela respecto al péptido (Figura 5.11.).

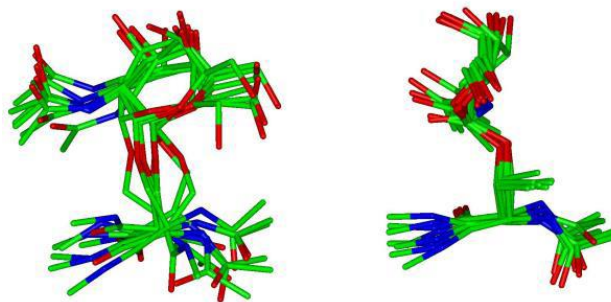


Figura 5.11. Superposición de las 20 ns MD-tar simulaciones para los α -*O*-glicopéptidos con residuos de treonina **128** (izquierda) o de serina **127** (derecha).

Estudios previos sobre las propiedades conformacionales de glicopéptidos han mostrado las mismas diferencias para los dos aminoácidos señalando que se deben a diferencias en la primera esfera de hidratación de estos derivados.⁹ De acuerdo con resultados previamente descritos acerca de la selectividad en el reconocimiento molecular por lectinas de diferentes glicopéptidos,¹⁰ estas diferencias podían estar en el origen del comportamiento diferente de los α -*O*-glicopéptidos con residuos de treonina o serina frente a la lectina SBA a pesar de presentar el mismo iminoazúcar sp^2 .

La rotación alrededor del enlace entre el O glicosídico y el C anomérico del carbohidrato viene definida por el ángulo ϕ y suele ser bastante rígido, con valores de ϕ cercanos a 60° , debido al efecto exo-anomérico.¹¹ El efecto exo-anomérico se debe a la interacción entre pares de electrones no enlazantes del O anomérico con el orbital vacío antienlazante σ^* del carbono anomérico (Figura 5.12.).

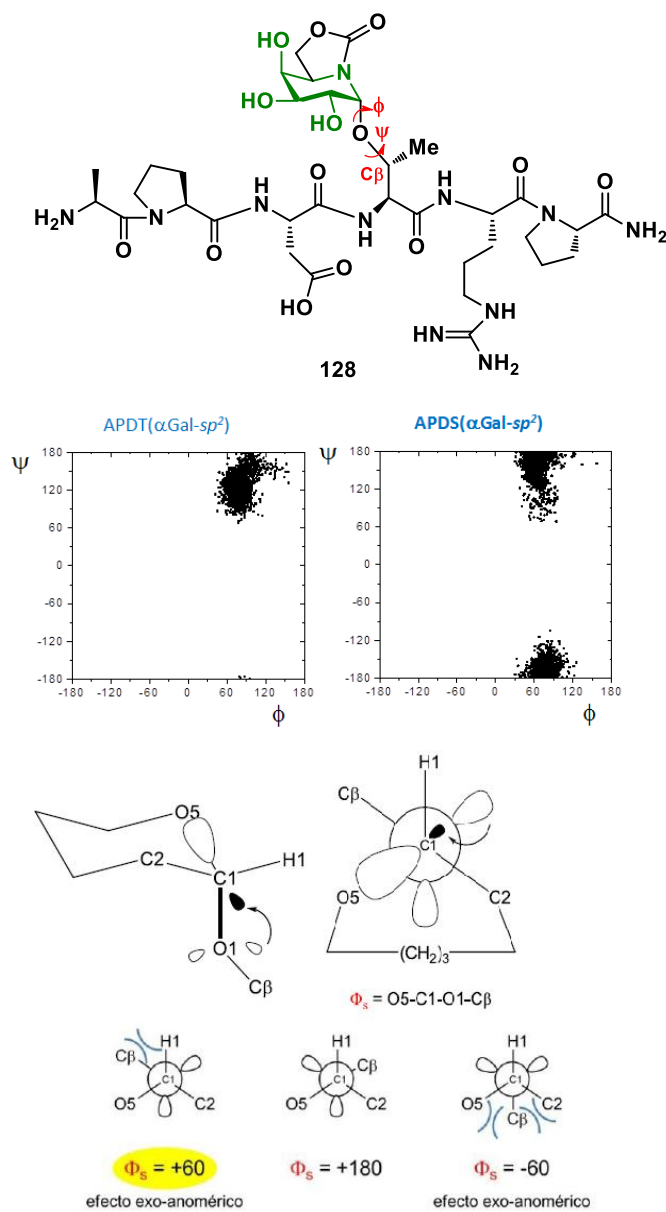


Figura 5.12. Geometría del enlace glicosídico y distribuciones de los ángulos ψ y ϕ para los glicopéptidos **128** y **127**.

5.4. Evaluación de la afinidad de los α -O-glicohexapéptidos frente a lectinas y anticuerpos.

Las lectinas constituyen herramientas valiosas para la detección del antígeno Tn ya que algunas de ellas tienen la capacidad de unirse a estructuras que presenten el motivo de carbohidrato presente en el antígeno tanto en su forma libre como unido a péptidos.¹² En el proceso de interacción glicopéptido-lectina influye tanto la naturaleza del azúcar unido a la cadena peptídica¹³ como la del péptido.¹⁴ Existen dos lectinas vegetales comerciales que muestran capacidad de reconocimiento de la GalNAc: la aglutinina de soja (SBA) y la de *Vicia villosa*-B4 (VVA) cuya estructura tridimensional está descrita.¹⁵

El sitio de unión de ambas lectinas es muy similar y las interacciones implican tanto enlaces de hidrógeno como interacciones hidrófobas. La lectina SBA muestra una afinidad alta hacia la α -GalNAc, la galactosa, el antígeno Tn y estructuras relacionadas.¹⁶ Forma una red de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar y presenta una interacción de tipo $\text{CH}\cdots\pi$ entre la cara α de la unidad de GalNAc y el residuo de fenilalanina 128 (Figura 5.13.).

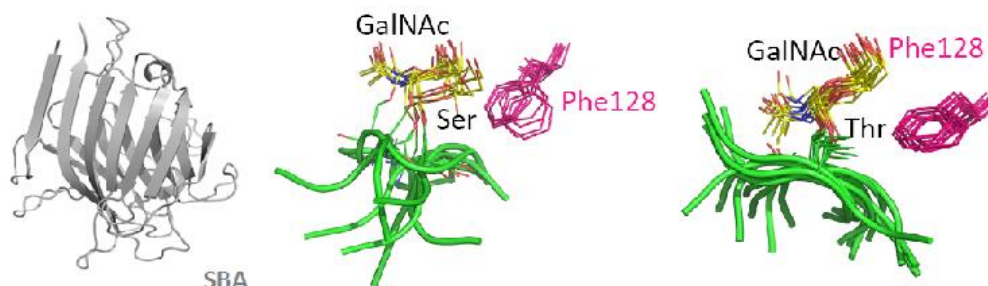


Figura 5.13. Estructura de la lectina SBA y de sus interacciones con glicopéptidos de serina y treonina.¹⁷

En esta Tesis Doctoral, con objeto de evaluar la capacidad de los nuevos α -O-

glicopéptidos preparados para imitar las propiedades de reconocimiento de la región inmunogénica de la MUC1, se ha evaluado su afinidad hacia la aglutinina de soja marcada con biotina (biotinylated soybean agglutinin, SBA), que se une débil aunque específicamente al monosacárido GalNAc del antígeno Tn cuando no forma parte de un glicopéptido. Los estudios de afinidad se han llevado a cabo empleando la técnica ELLA (*Enzyme-linked lectin assay*), un ensayo comparativo en el que se cuantifica la interacción de los compuestos frente a la lectina tomando como control positivo el antígeno natural Ala-Pro-Asp-Thr(α -O-GalNAc)-Arg-Pro (**V**, Figura 5.14.).

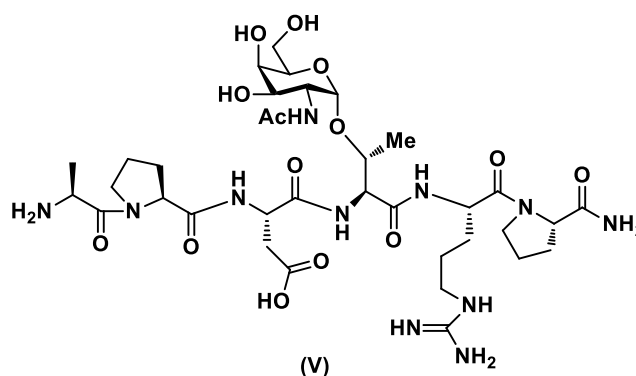


Figura 5.14. Estructura del antígeno natural APDT(α -O-GalNAc)RP (**V**).

Como sistema de detección se usó el sistema peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase)/TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) que permite medir la absorbancia a 450 nm. Los datos obtenidos indicaron que, para la misma concentración de glicopéptido, los conjugados unidos a Thr (**122**, **128**) son ligandos más eficaces que los unidos a Ser (**121**, **127**), estando estos resultados de acuerdo con los previamente descritos para la serie de glicopéptidos.^{18,19} Además, los conjugados de tipo α -sp²-Gal (**127**, **128**), con un perfil configuracional análogo al del antígeno natural Tn, son reconocidos más eficazmente que los epímeros α -sp²-Glc con la misma secuencia de aminoácidos (**121**, **122**). Es interesante destacar que el derivado **128** se comporta como un mimético del antígeno Tn con cerca de un 80% de afinidad relativa en comparación con

V (Figura 5.15.), y constituye el primer ejemplo de ligando de la lectina SBA de naturaleza no glucídica.

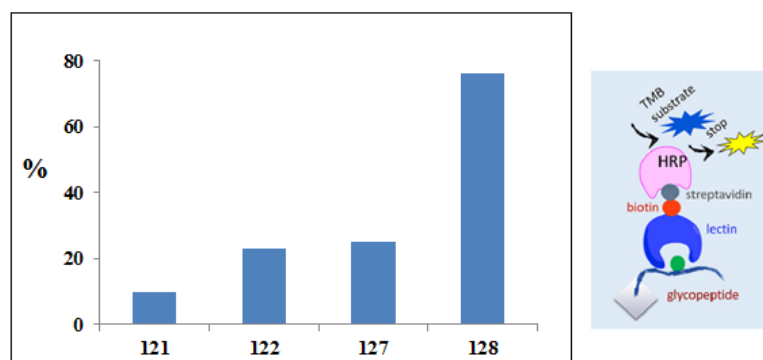


Figura 5.15. Afinidad de los iminoazúcares sp^2 α -O-glicopéptidos **121**, **122**, **127** y **128** (250 nmol) (expresada en % respecto al péptido natural **V**) hacia la lectina SBA.

Para obtener información adicional a nivel molecular de la afinidad del glicopéptido Gal- sp^2 -Thr (**128**) por la lectina SBA, se ha llevado a cabo el análisis conformacional del estado asociado del mismo con la lectina. En la Figura 5.16. se muestra la superposición de las imágenes obtenidas de las simulaciones 20 ns MD-tar.

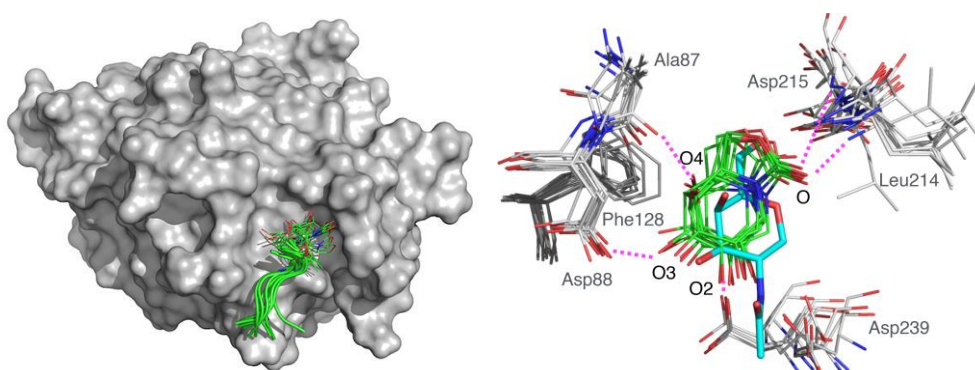


Figura 5.16. Superposiciones de las simulaciones del glicopéptido **128** en estado asociado con la lectina SBA y el residuo GalNAc (en azul) de la estructura cristalina del complejo SBA:V. Interacciones mediante enlaces de hidrógeno de **128** con los aminoácidos del sitio activo de SBA.

Aunque algunas de las propiedades estructurales no coinciden con las descritas previamente para el glicopéptido en la estructura cristalina,²⁰ se conservan algunos contactos análogos. En concreto se observa una interacción de tipo π entre la cara α del resto aglicónico y el residuo Phe128 de la proteína y los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo OH3 y OH4 del iminoazúcar sp^2 y la cadena lateral de Asp88. Adicionalmente, el grupo carbonilo del iminoazúcar sp^2 está implicado en la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos NH de Leu214 y Asp215. El esqueleto peptídico, en particular los residuos de Asp y Arg, son también reconocidos mediante enlaces de hidrógeno por los numerosos grupos amino de la lectina.

Con objeto de estudiar la capacidad de los nuevos derivados de MUC1 que incorporan iminoazúcares sp^2 preparados en esta Tesis Doctoral de ser reconocidos por anticuerpos anti-MUC1, se ha seleccionado el anticuerpo monoclonal scFv-SM3 y la técnica de interferometría de bio-capa. La interferometría de bio-capa (Bio-Layer Interferometry, BLI) es una técnica analítica óptica que permite detectar la unión de biomoléculas en tiempo real. Esta técnica presenta la ventaja adicional respecto a otras técnicas de que sólo detecta la unión en la superficie, por lo que hay una interferencia mínima de los medios en los que se encuentre una muestra biológica. Las proteínas pueden ensayarse incluso en los medios de cultivo de células o en lisados crudos sin que se observen interferencias. En esta técnica se emplea luz blanca que se hace incidir en un biosensor donde se encuentra inmovilizada la proteína y se analiza el modelo de interferencia de la luz reflejada desde dos superficies diferentes: la del biosensor y otra superficie de referencia interna. Cualquier modificación en el número de moléculas unidas al biosensor origina un desplazamiento en el modelo de interferencia que puede medirse en tiempo real. Los resultados se presentan en forma de una gráfica en la que se representa la variación de la intensidad frente a la longitud de onda empleada con un perfil característico de picos y valles.

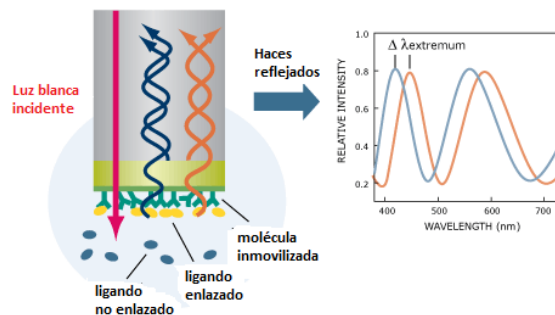


Figura 5.17. Representación esquemática de la técnica de interferometría de bio-capas (BLI).

El grupo del Prof. Peregrina ha publicado recientemente un estudio estructural a nivel atómico de las interacciones de una serie de glicopéptidos de tipo MUC1 que incorporan o no el antígeno Tn (α -O-GalNAc-Ser/Thr) asociados con un anticuerpo anti-MUC1 que muestra tanto la influencia de la glicosilación como la diferencia de reconocimiento del anticuerpo en función de la presencia de serina o treonina como punto de glicosilación.²¹ Como anticuerpo anti-MUC1 se ha seleccionado el anticuerpo scFv-SM3, producido y purificado por los autores, ya que presenta un modo de reconocimiento del epítipo análogo al de otros anticuerpos anti-MUC1 y, además, por su potencial para la diagnosis y el tratamiento del cáncer de mama.²² Los estudios de rayos X de los complejos de los diferentes glicopéptidos con el anticuerpo SM3 indican que la conformación global del fragmento peptídico es casi idéntica en todos los casos y no se afecta por la presencia de la unidad de GalNAc (Fig 5.18.).

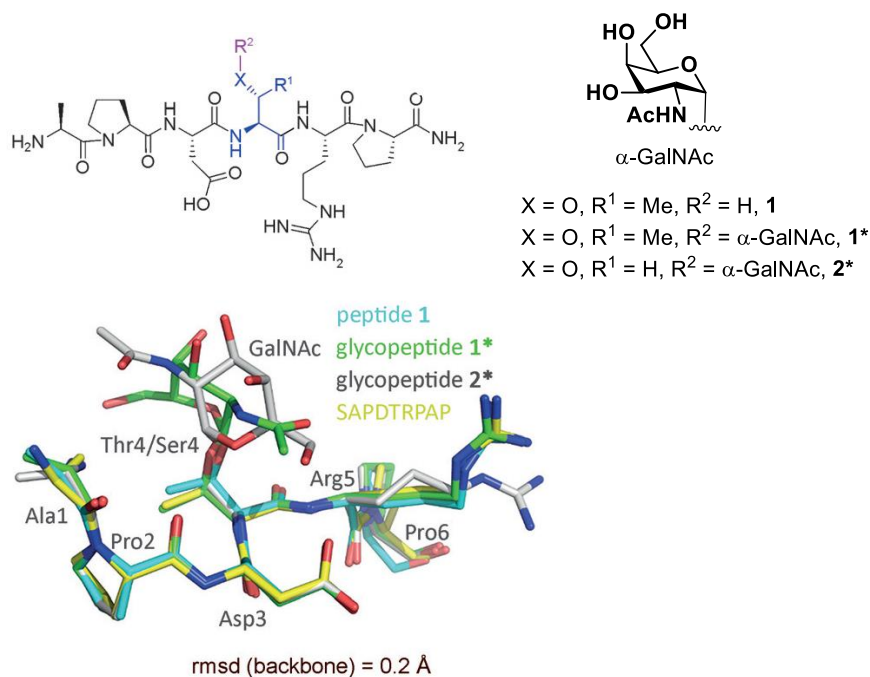


Figura 5.18. Estructuras empleadas para la cristalización con el anticuerpo SM3 y superposición del esqueleto peptídico de los glicoconjugados y del péptido SAPDTRPAP.

Los valores de las constantes cinéticas de afinidad K_D de los glicopéptidos análogos de la MUC-1 que incorporan la secuencia de repetición de 20 aminoácidos se han determinado usando la interferometría BLI y se han confirmado mediante ensayos de tipo ELISA. Los valores obtenidos indican una influencia positiva de la glicosilación frente al péptido no glicosilado así como una afinidad menor para los derivados de serina. Estos resultados son acordes con resultado de RMN previos que señalan que el residuo de azúcar ayuda a fijar la conformación bioactiva del fragmento peptídico.²³ Por otra parte, los experimentos de RMN y estudios teóricos de dinámica molecular indican que mientras que el derivado α -O-GalNAc-Ser es capaz de adoptar una conformación de alta energía, estabilizada mediante enlaces de hidrógeno entre el azúcar y el fragmento peptídico, en el caso del glicopéptido α -O-GalNAc-Thr la presencia del metilo limita la

flexibilidad de la cadena lateral. Estas diferencias podrían explicar la diferente afinidad de los derivados que incorporan serina frente a los de treonina.

A la vista de los resultados anteriores, hemos determinado las constantes de afinidad K_D para los pseudoglicopéptidos que incorporan iminoazúcares sp^2 con diferente configuración (Glc (**121**, **122**), Gal (**127**, **128**), GlcNAc (**123**, **124**) y GalNAc (**129**, **130**)) y la secuencia peptídica de reconocimiento APDT(S)RP frente al anticuerpo monoclonal scFv-SM3 incluyendo además como referencia el antígeno natural APDT(α -O-GalNAc)RP (**V**). Ninguno de los glicopéptidos que incorporan el aminoácido serina son reconocidos por el anticuerpo a diferencia de los que incorporan treonina. En la Figura 5.18. se representan los valores de K_D (M) obtenidos. Como se observa, se obtienen afinidades en el mismo orden de magnitud para los derivados que incorporan GlcNAc (**124**, $K_D = 2.0 \times 10^{-6} \pm 3.0 \times 10^{-7}$ M) y GalNAc (**130**, $K_D = 1.6 \times 10^{-6} \pm 1.6 \times 10^{-7}$ M), siendo éste el que presenta mejores resultados, superiores incluso al glicopéptido natural **V** ($K_D = 3.3 \times 10^{-6} \pm 8.4 \times 10^{-7}$ M). El derivado de configuración *galacto* sin grupo acetamido en posición 2 (**128**) también presenta afinidad por SM3 ($K_D = 4.1 \times 10^{-6} \pm 1.1 \times 10^{-6}$ M) a diferencia del glicopéptido de configuración *gluco* (**122**), el cual no mostró un valor aceptable lo que pone de manifiesto la importancia de la configuración del iminoazúcar unido a la secuencia de reconocimiento APDTRP.

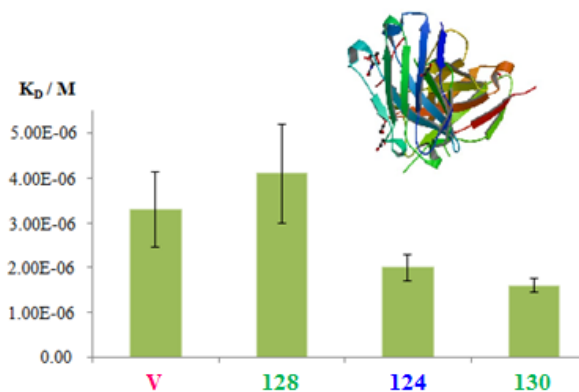


Figura 5.18. Valores de K_D (M) para los iminoazúcares sp^2 -MUC1 con el anticuerpo monoclonal scFv-SM3.

Referencias

- ¹ H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1989**, 8, 751-769.
- ² H. Wang, K. N. Houk, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 462-470.
- ³ L. Carballeira, I. Pérez-Juste, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, 104, 9362-9369.
- ⁴ E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Chasseraud, A. Ahidouch, C. Ortiz Mellet, H. Ouadid-Ahidouch, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 5328-5330.
- ⁵ H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3685-3689.
- ⁶ D. H. Juers, T. D. Heightman, A. Vasella, J. D. McCarter, L. Mackenzie, S. G. Withers, B. W. Matthews, *Biochemistry*, **2001**, 40, 14781-14794.
- ⁷ D. A. Pearlman, *J. Biomol. NMR*, **1994**, 4, 279-299.
- ⁸ F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 7864-7871.
- ⁹ F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 14640-14648.

-
- ¹⁰ F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9458-9467.
- ¹¹ C. Altona. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*. Ed. G. R. J. Thatcher, American Chemical Society, Washington DC, **1993**.
- ¹² D. Clark, L. Mao, *Dis. Markers*, **2012**, *33*, 1-10.
- ¹³ T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 387-429.
- ¹⁴ F. Corzana, J. H. Busto, F. Marcelo, M. García de Luis, J. L. Asensio, S. Martín-Santamaría, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 3105-3110.
- ¹⁵ (a) A. Babino, D. Tello, A. Rojas, S. Bay, E. Osinaga, P. M. Alzari, *FEBS Lett.* **2003**, *536*, 106-110; (b) L. R. Olsen, A. Dessen, D. Gupta, S. Sabesan, J. C. Sacchettini, C. F. Brewer, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 15073-15080.
- ¹⁶ C. Aydillo, C. D. Navo, J. H. Busto, F. Corzana, M. M. Zurbano, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 10968-10977.
- ¹⁷ V. J. Somovilla Justo. Tesis Doctoral. Universidad de la Rioja, **2014**.
- ¹⁸ D. Madariaga, N. Martínez-Saez, V. J. Somovilla, L. García-García, M. A. Berbis, J. Valero-González, S. Martín-Santamaría, R. Hurtado-Guerrero, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. H. Busto, F. Corzana, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 12616-12627.
- ¹⁹ F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9458-9647.
- ²⁰ D. Madariaga, N. Martínez-Sáez, V. J. Somovilla, H. Coelho, J. Valero-González, J. Castro-López, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. H. Busto, A. Avenoza, F. Marcelo, R. Hurtado-Guerrero, F. Corzana, J. M. Peregrina, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, 747-756.
- ²¹ N. Martínez-Sáez, J. Castro-López, J. Valero-González, D. Madariaga, I. Compañón, V. J. Somovilla, M. Salvadó, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. H. Busto, G.

J. L. Bernardes, J. M. Peregrina, R. Hurtado-Guerrero, F. Corzana, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 9830-9834.

²² P. Dokurno, P. A. Bates, H. A. Band, L. M. Stewart, J. M. Lally, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, D. Snary, M. J. Sternberg, P. S. Freemont, *J. Mol. Biol.*, **1998**, *284*, 713-728.

²³ H. Mçller, N. Serttas, H. Paulsen, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, B. Meyer, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 1444-1455.

6. Conclusiones

6. Conclusiones.

El conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La adición de diferentes nucleófilos de nitrógeno, azufre, oxígeno o carbono en posición pseudoanomérica sobre iminoazúcares sp^2 bicíclicos ha permitido la síntesis estereoselectiva de derivados con estructura de pseudo-*N*-, *S*-, *O*- y *C*-glicósidos con configuración *D-gluco*, *D-mano* y *D-galacto*. El control del efecto anomérico generalizado en este tipo de estructura dirige la reacción mayoritariamente hacia la formación del anómero α . La oxidación del átomo de azufre ha conducido a su vez a la formación de dos nuevas familias de compuestos, los correspondientes pseudoglicosilsulfóxidos y sulfonas.

2. La diversidad estructural que permite la estrategia de preparación de los iminoazúcares sp^2 tanto en lo que se refiere a modificaciones en el perfil configuracional como al tipo de sustituyente pseudoaglicónico ha permitido la identificación de nuevos candidatos como inhibidores potentes y selectivos de glicosidasas, agentes antitumorales y agentes leishmanicidas. La posibilidad de usar estos compuestos en terapia combinada junto a miltefosina resulta interesante a la vista del efecto sinérgico observado. La ausencia de inhibición de esta colección de glicomiméticos frente a las α -glucosidasas de origen humano (α -glucosidasas neutras tipo I y II presentes fundamentalmente en el retículo endoplasmático) pone de manifiesto que la inhibición de la proliferación tumoral no está directamente asociada a la inhibición de las mismas.

3. El diseño de derivados funcionalizados en la posición 2 del iminoazúcar sp^2 mediante la incorporación del grupo funcional acetamido se ha llevado a cabo utilizando como intermedio clave el 2-azido derivado, obtenido a su vez a partir del pseudoglicol de

configuración adecuada (glucal/galactal). Esta estrategia sintética ha permitido el acceso a nuevos inhibidores específicos de la hexosaminidasa A y a la identificación de nuevos candidatos como chaperonas farmacológicas para la enfermedad de Tay-Sachs.

4. En colaboración con el Prof. J. Peregrina de la Universidad de la Rioja se ha llevado a cabo la síntesis de análogos de glicopéptidos derivados de iminoazúcares sp^2 y relacionados con la glicoproteína MUC1 que incorporan un análogo del antígeno tumoral Tn (α -O-GalNAc-Ser/Thr) y el dominio de reconocimiento PDS(T)RP.

El uso de la metodología descrita anteriormente seguida de posterior activación de la posición pseudoanomérica y reacción de O-glicosidación con los aminoácidos serina/treonina permitió el acceso a pseudo- α -O-glicosilaminoácidos empleados *building blocks* para su incorporación en el dominio de reconocimiento (PDTRP) de la glicoproteína MUC1, dando lugar a los glicopeptidomiméticos del antígeno tumoral Tn de configuración *gluco*, *mano* y *galacto*.

5. Los valores de afinidad (K_D) obtenidos mediante interferometría de bio-capa para los α -O-glicopeptidomiméticos derivados de iminoazúcares sp^2 de configuración *gluco* y de configuración *galacto*, unidos mediante un residuo de treonina al dominio APDTRP, con el anticuerpo antitumoral SM3 han resultado ser superiores a los del glicopéptido natural APDT(α -O-GalNAc)RP.

7. Experimental part

7. EXPERIMENTAL PART.

7.1. General Methods.

Reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification.

Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum sheets coated with *Silica Gel 60 F₂₅₄ Merck* (0.25 mm), with visualization by UV light (λ 254 nm) and by carrying with 10% H₂SO₄; ninhydrin 0.1% in ethanol; Mostain (20 g of ammonium (VI) molybdate·4 H₂O; 0.4 g of Ce(SO₄)₂·H₂O and 10% H₂SO₄ in 400 mL of H₂O) and heating at 100 °C.

Column chromatography was performed on *Chromagel* (SDS silice 60 A.C.C 35-70 μ m or 70-200 μ m).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Semi-preparative HPLC was carried out on Agilent Series 1100 instrument and on a Waters TA instrument. A Spherisorb column (5 μ m, 10 x 250 mm), flow rate of 2.0 mL/min and 1100 Series refractive index detector-model number G1362A (Agilent Technologies) were used.

Semi-preparative HPLC used for purification of final glycopeptides was carried out on a Waters Delta Prep chromatograph [Phenomenex Luna C18 (2) column (10 μ , 21.20 mm x 250 mm)], with UV detection at 212 nm.

Optical rotations were measured at 20 ± 2 °C in 1 cm or 1 dm tubes on a Jasco P-2000 polarimeter using Na D line (λ 589 nm), 0.2-1% (w/v) solutions and 1 cm cells.

Elemental analyses were performed using an elemental analyser *Leco CHNS-932* or *Leco TruSpec CHN*.

IR spectra were recorded on a Jasco FT/IR-4100 (Fourier Transform/Infrared) ATR (Attenuated Total Reflectance) spectrometer.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 500 (125.7), 400 (100.6) and 300 (75.5) MHz with, respectively, *Bruker AVANCE DRX 500* (500 MHz), *Bruker AVANCE 400* (400 MHz) and *Bruker AVANCE 300* (300 MHz) spectrometers. 2D COSY (*Correlated Spectroscopy*), 1D TOCSY (*Totally Correlated Spectroscopy*) and ¹H-¹³C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence experiment*) experiments were used to assist on NMR assignments. **¹⁹F NMR spectra** were recorded at 376 MHz on a *Bruker AVANCE 400* spectrometer. CDCl₃, CD₃OD, (CD₃)₂CO, DMSO-*d*₆ and D₂O have been used as solvents.

FAB mass spectra were obtained with a Kratos MS-80 RFA instrument. The operating conditions were the following: the primary beam consisted of Xe atoms with a maximum energy of 8 keV; the samples were dissolved in thioglycerol, and the positive ions were separated and accelerated over a potential of 7 keV; NaI was added as cationizing agent. **ESI mass spectra** were recorded in the positive mode on an Esquire 3000 ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH). Typically, samples were dissolved in appropriate volumes of deionised water, MeCN, MeOH or H₂O-MeOH to give sample concentrations of 50 mg/L. Aliquots were mixed with 25:25:1 deionised water-methanol-trifluoroacetic acid, generally in a ratio of 1:10, to give a total volume of 200 µL. Samples were introduced by direct infusion, using a Cole-Parmer syringe at a flow rate of 2 µL/min. Ions were scanned between 300 and 3000 Da with a scan speed of 13000 Da/s at unit resolution using resonance ejection at the multipole resonance of one-third of the radio frequency ($\Omega = 781.25$ kHz). Calibration of the mass spectrometer was

performed using Electrospray ionization (ESI) tuning mix (Hewlett Packard). Recorded data were processed using Bruker Daltonics Esquire 5.0 software (Bruker).

Glycosidase and hexosaminidase inhibition assays. Inhibitory potencies were determined by spectrophotometrically measuring the residual hydrolytic activities of the glycosidases and hexosaminidases against the respective *o*- (for β -glucosidase from bovine liver and β -galactosidase from *E. coli*), *p*-nitrophenyl α - or β -D-glycopyranoside and *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide in the presence of the corresponding compound. Each assay was performed in phosphate buffer at the optimal pH for each enzyme. The Michaelis-Menten constant (K_m) values for the different glycosidases and hexosaminidases used in the tests and the corresponding working pHs are listed herein: α -glucosidase (from yeast), $K_m = 0.35$ mM (pH 6.8); isomaltase (yeast) $K_m = 1.0$ mM (pH 6.8); β -glucosidase (from almonds), $K_m = 3.5$ mM (pH 7.3); β -glucosidase (from bovine liver), $K_m = 2.0$ mM (pH 7.3); β -galactosidase (*E. coli*), $K_m = 0.12$ mM (pH 7.3); α -galactosidase (from coffee beans), $K_m = 2.0$ mM (pH 6.8); amyloglucosidase (from *Aspergillus niger*), $K_m = 3.0$ mM (pH 5.5); β -mannosidase (*Helix pomatia*), $K_m = 0.6$ mM (pH 5.5); α -mannosidase (from jack bean), $K_m = 2.0$ mM (pH 5.5); β -*N*-acetylglucosaminidase (β -NAG) (from human placenta), $K_m = 0.34$ mM (pH 5.5); β -NAG (from bovine kidney), $K_m = 0.48$ mM (pH 5.5); β -NAG (from Jack bean), $K_m = 0.49$ mM (pH 5.5). The reactions were initiated by addition of enzyme to a solution of the substrate in the absence or presence of various concentrations of inhibitor. After the mixture was incubated for 10-30 min at 37 °C or 55 °C (for amyloglucosidase) the reaction was quenched by addition of 1 M Na_2CO_3 . The absorbance of the resulting mixture was determined at 405 nm. Each experiment was performed in duplicate using $[\text{I}] = 2, 0.4, 0.08, 0.04$ y 0.02 μM and $[\text{S}]$ nearly K_m value. The K_i value and enzyme inhibition mode were determined from the slope of Lineweaver-Burk plots and double reciprocal analysis.

Hexosaminidase inhibition assays and the influence of pH. Control fibroblasts were used in all inhibition measurements of the enzymes α -NAG and β -hexosaminidase. The cells were treated with increasing concentrations of sp²-iminosugars (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.10, 100, and > 100 μ M) and incubated for 2 h. Then, the corresponding substrate was added in buffer (pH 5/pH 7). The activity measurement protocol as described previously. 4-Methylumbelliferyl (4 MU) *N*-acetyl- α -D-glucosaminide and 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide were the substrates applied to measure the inhibition of α -NAG and β -hexosaminidase activities, respectively.

Thermal stability assay of lysosomal β -hexosaminidase in the presence of sp²-iminosugars.

Control fibroblast cells were treated with different concentrations of sp²-iminosugars (0, 10, 30 and 60 μ M) and incubated for 4 days at 37 °C and 5% of CO₂. The lysosomal β -hexosaminidase activity was measured at different time points: 0, 20, 40 and 60 min after incubation at 48 °C with sodium acetate (NaAc) (50 μ L) and buffer (0.2 M, pH 7),

Cell culture and chaperone treatment. Human skin fibroblasts from unaffected subject were cultured as described.^{1,2} Skin fibroblasts from an unaffected individual were obtained from Invitrogen (HDFn) and from Lonza (NHDF). Human fibroblasts from Tay-Sachs disease patients were obtained from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ). Samples were collected after obtaining written informed consent according to the institute's regulations for using human cells. For measurement of chaperone effects, cells were cultured in the medium with or without compounds for 4 days and then the cell lysates were subjected for the lysosomal enzyme assay as described above. The enzyme activities were normalized with protein concentrations measured by protein assay rapid kit (Wako, Tokyo, Japan).

Total hexosaminidases and HexA inhibition analysis. 4-MU *N*-acetyl- β -D-glucosaminide (from Sigma, St. Louis, MO) was used for total hexosaminidase and 4-MU *N*-acetyl- β -D-glucosaminide-6-sulphate-potassium salt (from Slater Frith Ltd., Norwich, UK) was used for β -hexosaminidase A (Hex A). For inhibition assay, cell lysates in 0.1% Triton X-100 in dH₂O from cultured normal skin fibroblasts were used as below. Lysates were mixed with 4-MU total Hex or Hex A substrates in the absence or presence of increasing concentrations of pharmacological chaperone candidate compounds. They were then incubated at 37 °C for 30 min and the reaction was terminated by adding 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 10.7). The liberated 4-MU was measured with a fluorescence plate reader (excitation at 340 nm and emission at 460 nm; Infinite F500, TECAN Japan, Kawasaki, Japan).

Statistical analysis. GraphPad Prism (version 5.00 for Windows; GraphPad Software, USA) was used for statistical analysis. Data are reported as means \pm SD. SigmaStat was used to interpret the results. The Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA) are used to compare group means. A significance level of $P \leq 0.05$ was used.

General procedure for p*K*_a determination by NMR titration. The p*K*_a value of selected sp² iminosugars was determined by NMR titration. A 2 mM solution of the corresponding iminosugar (H₂O-D₂O-DMSO-*d*₆ 85:5:10) containing HCl (10 mM) and NaCl (100 mM) was used an initial volume of 0.5 mL. NMR titration was performed by injecting aliquot of 10 mM NaOH solution containing **134**, **135** and **5** (2 mM) and NaCl (100 mM) so that the concentration of inhibitors remained constant during the experiment, until a total volume of 1.2 mL.

Determination of CAC via pyrene fluorescence measurements. The critical aggregation concentration (CAC) of some derivatives has been determined using an established fluorescence technique based on pyrene.³ The onset of aggregate formation

can be observed in a shift of the fluorescence excitation spectra of the samples at an emission wavelength of 372 nm. In the concentration range of aqueous aggregated solutions, a shift of the excitation band in the 335 nm region toward higher wavelengths confirms the incorporation of pyrene in the hydrophobic interior of aggregates. The ratio of the the fluorescence intensities at 339 and 335 nm was used to quantify the shift of the broad excitation band. The critical aggregation concentrations were determined from the crossover point in the low concentration range. Fluorescence spectra were recorded with an F-2500 Hitachi spectrofluorophotometer and conventional 1-cm quartz cuvettes at 37 ± 0.1 °C, using 2.5 mm excitation and emission slits.

General procedure for antiproliferative assays. All reagents were used as purchased from commercial suppliers without further purification. The human solid tumor cell lines A549 (lung), HBL-100 (breast), HeLa (cervix), SW1573 (lung), T-47D (breast) and WiDr (colon). These cell lines were a kind gift from Prof. G. J. Peters (VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands).

Chemosensitivity testing. Cells were inoculated onto 96-well microtiter plates in a volume of 100 μ L per well at densities of 2 500 (A549, HBL-100 and HeLa) and 5 000 (SW1573, T-47D and WiDr) cells per well, based on their doubling times. Compounds were initially dissolved in DMSO at 400 times the desired final maximum test concentration. Control cells were exposed to an equivalent concentration of DMSO (0.25% v/v, negative control). Each agent was tested in triplicate at different dilutions in the range of 1-100 μ M. The drug treatment started on day 1 after plating. Drug incubation times were 48 h, then cells were precipitated with 25 μ L ice-cold 2,2,2-trichloroacetic acid (TCA) (50% w/v) and fixed for 60 min at 4 °C. Then the sulforhodamine B (SRB) assay was performed. The optical density (OD) of each well was measured at 530 nm, using BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader. Values were corrected

for background OD from wells only containing medium. The antiproliferative activity for each compound was expressed as GI₅₀ value (50% growth inhibition).

***Leishmania* culture conditions.** For the biological assays, stock solutions of the sp²-iminosugars in DMSO at 10 mM were prepared. Triton X-100, paraformaldehyde, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), resazurin and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Miltefosine, used as standard antileishmanial agent, was purchased from Zentaris GmbH (Frankfurt am Main, Germany). DMNPE-luciferin {D-luciferin-1[-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl ester]}, hygromycin B, and 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Kit Luciferase Assay System was purchased from Promega. L-Glutamine and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco. Promastigotes of *L. donovani* MHOM/IND/80/Dd8 (from India) used in this study were grown at 28 °C in RPMI 1640-modified medium (Invitrogen) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Invitrogen). Additionally, *L. donovani* MHOM/IND/80/Dd8 with luciferase gene integrated into the parasite genome (*L. donovani*-LUC) was grown under the same conditions with 100 µg/ml of hygromycin B.

Susceptibility analysis in *Leishmania* promastigotes. In drug susceptibility assays, log phase *L. donovani* promastigotes were incubated at 28 °C for 72 h in the presence of increasing concentrations of compounds. Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay, as described previously.⁴

Cell lines culture and determination of cellular toxicity. Human myelomonocytic cell line THP-1 were grown at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI-1640 media (Sigma) supplemented with 10% iFBS, 2 mM glutamate, 100 U/mL penicillin and 100

$\mu\text{g/mL}$ streptomycin. 3×10^4 cells/well in 96-well plates were differentiated to macrophages with 20 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment for 48 h followed by 24 h of culture in fresh medium. MRC-5 cells, a SV-40 transformed human fetal lung fibroblast cell line, were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in D-MEM supplemented with 10% iFBS, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin. Cells were harvested by treatment with 0.05% (w/v) trypsin plus 0.48 mM EDTA for 5 min, diluted to 4×10^4 cell/ml in 96-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO₂ before toxicity assay. Cellular toxicity of all compounds was determined using the colorimetric MTT based assay after incubation at 37 °C for 72 h in the presence of increasing concentrations of compounds. The results are expressed as IC₅₀ values, as the concentration of compound that reduce cell growth by 50% versus untreated control cells.

Susceptibility analysis in intracellular *Leishmania amastigotes*. Macrophage-differentiated-THP-1 cells, which are considered a suitable model for human macrophages, were plated at a density of 3×10^4 or 3×10^5 macrophages/well in 96-well white polystyrene microplates or 24-well tissue culture chamber slides, respectively, and were infected at a macrophage/parasite ratio of 1:10 with *L. donovani* promastigotes. 24 h after infection at 35 °C and 5% CO₂, extracellular parasites were removed by washing with serum-free medium. Infected cell cultures were then incubated at different compound concentrations in RPMI 1640 medium plus 10% iFBS at 37 °C with 5% CO₂ for 72 h. To determine the susceptibility of *L. donovani*-LUC amastigotes, infected macrophages maintained in 96-well plates were lysed and then luminescence intensity was measured as indicative of the intracellular parasite growth, using the Luciferase Assay System Kit (Promega, Madison, Wis.) according to the instructions of the supplier.

Drug interaction analysis. To analyse the combination of miltefosine with compound **23**, intracellular amastigotes of *L. donovani* were treated with increasing concentrations of the compound at fixed concentrations of miltefosine (0.1, 0.2 and 0.3

μM) and cell viability was evaluated by luciferase assay as described above. A classical isobologram was constructed by plotting two drugs concentrations on the X-axis and Y-axis respectively in a two-coordinate plot.⁵ The line connecting the concentration of both drugs required to produce a certain dose-response is the line of additivity. The concentrations of the two drugs used in combination are placed in the same plot, indicating synergy, additivity or antagonism when they are located below, on or above that line, respectively. The combination index (CI) was used to express synergism ($\text{CI} < 1$), additivity ($\text{CI} = 1$) or antagonism ($\text{CI} > 1$) and was calculated according to the classic isobologram equation.⁶

Statistical analysis. All assays were performed in triplicates. Data are presented as the mean \pm SD for three independent experiments. Statistical significance was calculated using Student's *t*-test. Differences were considered significant at a level of $p < 0.01$.

Synthesis of glycopeptides by using solid phase peptide synthesis (SPPS). Rink Amide MBHA resin (178 mg, 0.1 mmol of NH_2) was put into a vessel reactor. Convenient protected amino acids were put into cartridges (1 mmol). Automatic synthesis started with piperidine washing during 7 min. Then, the starting cartridge was expelled and the first amino acid was dissolved in *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (3 mL of 2 M solution in *N*-methyl-2-pyrrolidone, NMP), 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (0.9 mmol of 0.45 M solution in DMF) and DMF (2 mL) were added to the reactor for 10 min. Consecutive washes for Fmoc deprotection with piperidine and DMF were also made during 30 min. The process followed expelling the cartridge and starting the process again with the next cartridge. These steps were repeated as many times as amino acids were needed to couple. When a glycosylated building block (**98**, **99**, **105-108**, **114**, **115**, **119**, **120**) was coupled, the synthesis was carried out manually, obtaining better yields and reducing the equivalents

from 10 to 2. The process was as follows: 1.1 equivalents of HBTU, 0.5 mL of DIEA 2.0 M and 2 mL of DMF were added to the glycosylamino acid and this mixture was added to the resin. The reaction was stirred until the coupling was completed as deduced by Kaiser test. The resin was washed with DMF and DCM and placed again in the synthesizer to obtain the complete sequence of the desired glycopeptide. As a next step, the resin was taken out from the synthesizer and acetate groups of the carbohydrate were deprotected with 10 mL of hydrazine/MeOH (7:3) solution 3 times of 45 min each one. Several washes with DMF and DCM were needed. Finally, TFA (1.90 mL), TIS (50 mL) and H₂O (50 mL) were added for the cleavage reaction and removal of the side chain protecting groups. The mixture was stirred for 2 h. At this point, Et₂O (10 mL) was added producing a precipitate that was filtered and redissolved in water. Glycopeptides were purified by reverse phase HPLC.

Enzyme-linked lectin assay (ELLA). The plate (Pierce aminebinding, maleic anhydride 96-well plate) was coated with 100 μ L/well of a solution of the corresponding glycopeptide varying from 0 to 350 nmol/well in carbonate/bicarbonate buffer (0.2 M, pH 9.4) and incubated overnight at 25 °C. As the next step, the wells were incubated with biotin-conjugated Soybean agglutinin lectin (SBA) (100 mL, diluted 1/150 in Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) buffer for 2 h. After washing with PBST (3 \times 200 mL/well, 2 min/well), the wells were treated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin (100 mL, diluted 1/3000 in PBST buffer) for 1 h at 25 °C. The wells were again washed first with PBST (3 \times 200 mL/well, 2 min/well) and then with 350 mL of water. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) was added (90 mL/well) and after incubation for 10 min, the reaction was terminated with the addition of 50 mL/well of stop solution (1 M H₂SO₄). Absorbance detection of the wells was immediately performed at 450 nm using an ELISA plate reader (Bio-rad, iMark plat reader).

Unrestrained molecular dynamics simulations. Starting geometries for complexes were generated from the available data deposited in the Protein Data Bank (pdb code: 4D69 for SBA lectin and pdb code: 1JYN for β -galactosidase) and modified accordingly. Each model complex was immersed in a 10 Å-sided cube with preequilibrated TIP3P water molecules. To equilibrate the system, a protocol consisting of 10 steps was followed. Firstly, only the water molecules are minimized, and then heated to 300 K. The water box, together with Na⁺ ions, was then minimized, followed by a short MD simulation. At this point, the system was minimized in the four following steps with positional restraints imposed on the solute, decreasing the force constant step by step from 20 to 5 kcal·mol⁻¹. Finally, a non-restraint minimization was performed. The production dynamics simulations were accomplished at a constant temperature of 300 K (by applying the Berendsen coupling algorithm for the temperature scaling) and constant pressure (1 bar). Particle Mesh Ewald Method, to introduce long-range electrostatic effects, and periodic boundary conditions were also used. SHAKE algorithm for hydrogen atoms, which allows using a 2 fs time step, was also employed. Finally, a 9Å cutoff was applied for the Lennard-Jones interactions. MD simulations were performed with the sander module of AMBER 11.0 (parm99 force field), which was implemented with GLYCAM 06 parameters to accurately simulate the corresponding glycopeptides. A simulation length of 100 ns and the trajectory coordinates were saved each 0.5 ps.

Bio-layer Interferometry (BLI). Binding assays were performed on an Octet Red Instrument (fortéBIO). Ligand immobilization, binding reactions, regeneration and washes were conducted in wells of black polypropylene 96-well microplates. The mucin-type sp²-glycosylhexapeptidomimetics were immobilized on amine-reactive biosensors (AR2G biosensors) in 10 mM NaAc pH 5.5 buffer, using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide and N-hydroxysuccinimide for 10 min at 1000 rpm at 25 °C. All biosensors were subsequently modified by a solution of ethanolamine hydrochloride (1 M, pH 8.5), followed by regeneration and wash. Binding analysis were

carried out at 25 °C, 1000 rpm in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, with a 120 s of association followed by a 180 s of dissociation. The surface was thoroughly washed with the running buffer without regeneration solution. Data was analyzed using Data Analysis (fortéBIO), with Savitzky-Golay filtering. Binding was fitted to a 2:1 Heterogeneous ligand model, steady state analysis were performed to obtain the binding kinetic constants (K_D).

General Methods in Homogeneous Synthesis.

Acetylation was carried out by dissolving the compound in a mixture of Ac₂O-Py (1:1, 10 mL/g) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature (rt), then poured into water/ice and extracted with DCM. Organic layer was washed with H₂SO₄ 2 N and saturated aqueous solution of NaHCO₃, then dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by chromatography.

Deacetylation was carried out by using Zemplén procedure.⁷ Addition of NaOMe (0.1 equiv. per mol of acetate) in MeOH at rt, followed by neutralization with solid CO₂, evaporation of the solvent and purification by column chromatography.

The following compounds were prepared as reported:

- (1*R*)-5*N*,6*O*-Oxomethylidenenojirimycin (**131**).⁸
(1*R*)-5*N*,6*O*-Oxomethylidenemannonojirimycin (**132**).⁹
(1*R*)-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (**133**).⁹
(1*S*)-1-Amino-*N*-octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (**134**).¹⁰
(1*S*)-1-Amino-*N*-octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (**135**).¹¹
(1*R*)-1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (**136**).⁸
(1*R*)-1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenemannonojirimycin (**137**).⁹
(1*R*)-1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (**138**).⁹
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-octylthio-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (**139**).¹⁰
(1*R*)-1-Octylthio-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (**140**).¹⁰
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-dodecylthio-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (**141**).¹²
(1*R*)-1-Dodecylthio-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (**142**).¹²
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-octylthio-5*N*,6*O*-oxomethylidenemannonojirimycin (**143**).¹³
(1*R*)-1-Octylthio-5*N*,6*O*-oxomethylidenemannonojirimycin (**144**).¹³
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-fluoro-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (**145**).¹⁰
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-fluoro-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (**146**).¹³
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-*O*-octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (**147**).¹³
(1*R*)-1-*O*-Octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (**148**).¹³
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-*O*-octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (**149**).¹³
(1*R*)-1-*O*-Octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (**150**).¹³
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (**151**).¹⁰
(1*R*)-1-Octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (**152**).¹⁰
(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (**153**).¹³

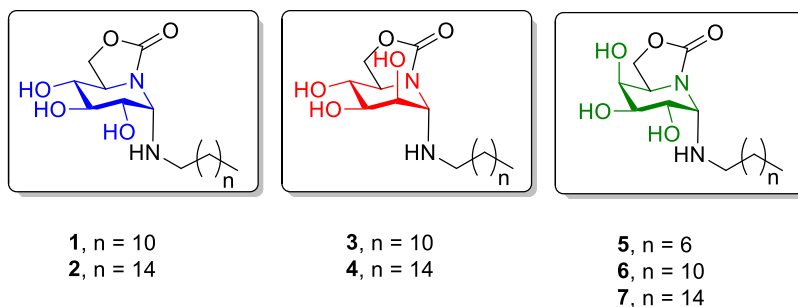
(1*R*)-1-Octyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (**154**).¹³

Fmoc-Ser-O^tBu (**155**).¹⁴

Fmoc-Thr-O^tBu (**156**).¹⁴

7.2. New Compounds.

Preparation of pseudo-*N*-glycoside derivatives of ONJ, OMJ and OGJ.



General procedure for the preparation of pseudo-*N*-glycosides of ONJ, OMJ and OGJ. A solution of 5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin, 5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin or 5*N*,6*O*-oxomethylidenemannonojirimycin (**131**, **132**, **133**) (0.29 mmol) and the corresponding *n*-alkylamine (0.29 mmol) in MeOH (3 mL) was stirred at 65 °C for 24-48 h (TLC monitoring). The solvent was eliminated under reduced pressure and the resulting residue was purified by column chromatography using the solvent indicated in each case to afford the corresponding glycosylamines.

(1*S*)-1-Amino-*N*-dodecyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxynojoirimycin (1).

Column chromatography (20:1 DCM-MeOH). Yield: 60 mg (67%). R_f 0.69 (50:10:1 DCM-MeOH-H₂O). $[\alpha]_D^{25} +59.8$ (c 0.9 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.63 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1), 4.48 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.27 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$

Hz, H-5), 3.61 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.47 (dd, 1 H, H-2), 3.26 (t, 1 H, H-4), 2.63-2.53 (m, 2 H, NHCH_2), 1.58-1.20 (m, 20 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.2 (CO), 75.6 (C-4), 74.5 (C-3), 72.3 (C-2), 69.6 (C-1), 67.9 (C-6), 54.6 (C-5), 47.5 (CH_2NH), 33.1-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 395.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 61.26; H, 9.74; N, 7.52. Found: C, 61.14; H, 9.58; N, 7.33.

(1S)-1-Amino-N-hexadecyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxynojirimycin (2).

Column chromatography (20:1 DCM-MeOH). Yield: 50 mg (53%). R_f 0.61 (50:10:1 DCM-MeOH- H_2O). $[\alpha]_{\text{D}} +45.9$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.64 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1), 4.48 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.27 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-5), 3.61 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.48 (dd, 1 H, H-2), 3.26 (t, 1 H, H-4), 2.66-2.50 (m, 2 H, NHCH_2), 1.60-1.20 (m, 28 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.2 (CO), 75.6 (C-4), 74.5 (C-3), 72.3 (C-2), 69.5 (C-1), 68.0 (C-6), 54.6 (C-5), 47.5 (CH_2NH), 33.1-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 429.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 64.45; H, 10.35; N, 6.54. Found: C, 64.11; H, 10.18; N, 6.20.

(1S)-1-Amino-N-dodecyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin

(3). Column chromatography (20:1 \rightarrow 10:1 DCM-MeOH). Yield: 73 mg (67%). R_f 0.88 (40:10:1 DCM-MeOH- H_2O). $[\alpha]_{\text{D}} +15.7$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 333 K): δ 4.60 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.46 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.27 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.6$ Hz, H-6b), 3.94 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2), 3.76-3.66 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 2.65-2.54 (m, 2 H, CH_2N), 1.56-1.43 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.33 (m, 18 H, CH_2), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD , 333 K): δ 160.2 (CO), 73.2 (C-2), 72.7 (C-3), 72.1 (C-1, C-4), 67.9 (C-6), 55.7 (C-5), 47.2 (CH_2N), 33.0-23.6 (CH_2), 14.3 (CH_3).

ESIMS: m/z 395.2 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{19}H_{36}N_2O_5$: C, 61.26; H, 9.74; N, 7.52. Found: C, 61.19; H, 9.73; N, 7.19.

(1S)-1-Amino-N-hexadecyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxymannonojirimycin (4). Column chromatography (20:1 \rightarrow 10:1 DCM-MeOH). Yield: 70 mg (57%). R_f 0.75 (40:10:1 DCM-MeOH-H₂O). $[\alpha]_D +16.9$ (c 1.0 in MeOH).

1H NMR (400 MHz, CD₃OD, 323 K): δ 4.48 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.29 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.4$ Hz, H-6b), 3.96 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.2$ Hz, H-2), 3.77-3.64 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 2.65-2.53 (m, 2 H, CH₂N), 1.59-1.42 (m, 2 H, CH₂CH₂N), 1.40-1.20 (m, 26 H, CH₂), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 323 K): δ 158.8 (CO), 71.8 (C-2), 71.2 (C-3), 70.6 (C-1, C-4), 66.6 (C-6), 54.3 (C-5), 45.8 (CH₂N), 31.6-22.2 (CH₂), 12.9 (CH₃).

ESIMS: m/z 451.5 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{23}H_{44}N_2O_5$: C, 64.45; H, 10.35; N, 6.54. Found: C, 64.27; H, 10.29; N, 6.23.

(1S)-1-Amino-N-octyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxygalactonojirimycin (5). Column chromatography (20:1 \rightarrow 10:1 DCM-MeOH). Yield: 58 mg (64%). R_f 0.47 (7:1 DCM-MeOH). $[\alpha]_D +25.5$ (c 1.0 in MeOH).

1H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 4.67 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.3$ Hz, H-1), 4.42-4.36 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.11 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 7.2$ Hz, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, $J_{4,5} = 2.2$ Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.80 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-4), 3.74 (dd, 1 H, H-3), 2.63-2.51 (m, 2 H, CH₂NH), 1.55-1.46 (m, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.38-1.28 (m, 10 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ 160.0 (CO), 71.4 (C-3), 70.9 (C-4), 69.5 (C-1), 68.3 (C-2), 65.0 (C-6), 54.1 (C-5), 47.7 (CH₂NH), 33.0-23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 315.0 $[M - H]^-$. Anal. Calcd for $C_{15}H_{28}N_2O_5$: C, 56.94; H, 8.92; N, 8.85. Found: C, 56.57; H, 8.77; N, 8.54.

(1S)-1-Amino-N-dodecyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxygalactonojirimycin

(6). Column chromatography (20:1 DCM-MeOH). Yield: 50 mg (56%). R_f 0.73 (40:10:1 DCM-MeOH-H₂O). $[\alpha]_D +41.9$ (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.67 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.3$ Hz, H-1), 4.43-4.32 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.11 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 7.9$ Hz, $J_{5,6b} = 5.6$ Hz, $J_{4,5} = 2.3$ Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.79 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.3$ Hz, H-4), 3.73 (dd, 1 H, H-3), 2.64-2.50 (m, 2 H, CH₂NH), 1.57-1.45 (m, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.40-1.23 (m, 18 H, CH₂), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 160.0 (CO), 71.3 (C-3), 70.9 (C-4), 69.5 (C-1), 68.3 (C-2), 65.0 (C-6), 54.1 (C-5), 47.6 (CH₂NH), 33.1-23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 395.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₃₆N₂O₅: C, 61.26; H, 9.74; N, 7.52. Found: C, 60.89; H, 9.66; N, 7.19.

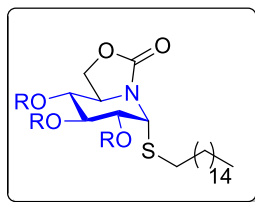
(1S)-1-Amino-N-hexadecyl-5N,6O-oxomethylidene-1-

deoxygalactonojirimycin (7). Column chromatography (20:1 → 10:1 DCM-MeOH). Yield: 48 mg (57%). R_f 0.77 (40:10:1 DCM-MeOH-H₂O). $[\alpha]_D +53.1$ (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.67 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.2$ Hz, H-1), 4.43-4.32 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.11 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 7.9$ Hz, $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-5), 3.87 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2), 3.80 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-4), 3.74 (dd, 1 H, H-3), 2.65-2.49 (m, 2 H, CH₂NH), 1.58-1.44 (m, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.40-1.22 (m, 26 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 160.0 (CO), 71.3 (C-3), 70.9 (C-4), 69.5 (C-1), 68.3 (C-2), 65.0 (C-6), 54.1 (C-5), 47.6 (CH₂NH), 33.0-23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 451.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₄₄N₂O₅: C, 64.45; H, 10.35; N, 6.54. Found: C, 64.13; H, 10.39; N, 6.25.

Preparation of pseudo-S-glycoside derivatives of ONJ.

8, R = Ac
9, R = H

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylthio-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin

(8). To a stirred solution of 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (**136**) (0.41 mmol) in anhydrous DCM (8 mL) at 0 °C, BF₃·OEt₂ (188 μL, 1.53 mmol) and hexadecanethiol (0.86 mmol) were added under argon atmosphere. The mixture was stirred for 30 min (TLC monitoring), diluted with DCM (50 mL) and washed with water (10 mL), aq NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure to afford **8**. (α:β ratio 8:1, H-1 integration). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 110 mg (92%). R_f 0.75 (1:1 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +67.5 (*c* 1.3 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.64 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.7 Hz, H-1), 5.39 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.6 Hz, H-3), 4.94 (dd, 1 H, H-2), 4.92 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 9.6 Hz, H-4), 4.42 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 9.0 Hz, H-6a), 4.25 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 6.6 Hz, H-6b), 4.13 (ddd, 1 H, H-5), 2.57 (ddd, 1 H, ²*J*_{H,H} = 12.7 Hz, ³*J*_{H,H} = 8.0 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, SCH₂), 2.44 (ddd, 1 H, SCH₂), 2.05-2.00 (3 s, 9 H, MeCO), 1.64-1.13 (m, 28 H, CH₂), 0.84 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.0-169.5 (MeCO), 155.3 (CO), 72.6 (C-4), 70.2 (C-2), 69.8 (C-3), 66.2 (C-6), 57.6 (C-1), 51.2 (C-5), 31.9-22.6 (CH₂), 20.6-20.5 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 594.4 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₉H₄₉NO₈S: C, 60.92; H, 8.64; N, 2.45; S, 5.61. Found: C, 61.14; H, 8.79; N, 2.49; S, 5.53.

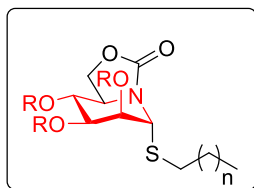
(1R)-1-Hexadecylthio-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (9). Compound **9** was obtained from **8** (45 mg, 0.08 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (9:1 DCM-MeOH). Yield: 35 mg (97%). R_f 0.45 (9:1 DCM-MeOH). $[\alpha]_D^{25} +65.5$ (*c* 1.0 in DMSO).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 5.56 (d, 1 H, $J_{\text{OH},4} = 5.6$ Hz, OH), 5.50 (d, 1 H, $J_{\text{OH},2} = 4.2$ Hz, OH), 5.14 (d, 1 H, $J_{\text{OH},3} = 4.8$ Hz, OH), 5.06 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.4$ Hz, H-1), 4.45 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.14 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.7$ Hz, H-6b), 3.52-3.43 (m, 1 H, H-2), 3.31 (td, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 3.15 (td, 1 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 2.45-2.30 (m, 2 H, SCH_2), 1.60-1.10 (m, 28 H, CH_2), 0.82 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

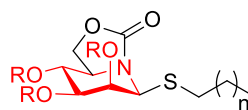
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 156.1 (CO), 74.1 (C-4), 73.7 (C-3), 71.2 (C-2), 66.8 (C-6), 60.9 (C-1), 53.1 (C-5), 31.6-22.5 (CH_2), 14.3 (CH_3).

ESIMS: m/z 468.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{S}$: C, 61.99; H, 9.73; N, 3.14; S, 7.20. Found: C, 61.76; H, 9.72; N, 3.07; S, 6.93.

Preparation of pseudo-*S*-glycoside derivatives of OMJ.



10, R = Ac, n = 10
11, R = H, n = 10
12, R = Ac, n = 14
13, R = H, n = 14



10 β , R = Ac, n = 10
12 β , R = Ac, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-*S*-glycosides of OMJ. To a stirred solution of 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenemannonojirimycin (**137**) (0.29 mmol) in anhydrous DCM (4 mL) at 0 °C, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (134 μL , 1.09 mmol) and the corresponding thiol (0.61 mmol) were added under argon atmosphere. The mixture was

stirred for 30 min (TLC monitoring), diluted with DCM (50 mL) and washed with water (10 mL), aq NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography using the solvent indicated in each case to afford the corresponding pseudothioglycosides of OMJ.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylthio-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (10). (α : β ratio 14:1, H-1 integration). Both anomers were separated by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 EtOAc-cyclohexane).

Data for α anomer: Yield: 198 mg (68%). R_f 0.72 (1:1 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +18.2 (c 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.33-5.28 (m, 2 H, H-2, H-3), 5.22 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-4), 5.15 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.41 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.1$ Hz, $J_{5,6a} = 8.2$ Hz, H-6a), 4.32 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.1$ Hz, H-6b), 4.08 (ddd, 1 H, H-5), 2.73-2.51 (m, 2 H, CH₂S), 2.10-1.99 (3 s, 9 H, MeCO), 1.67-1.51 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 1.41-1.17 (m, 18 H, CH₂), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3-169.6 (MeCO), 156.3 (CO), 70.8, 69.1 (C-2, C-3), 69.5 (C-4), 66.1 (C-6), 58.3 (C-1), 52.8 (C-5), 31.9-28.7 (CH₂), 20.8-20.6 (MeCO), 14.2 (CH₃).

ESIMS: m/z 538.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₄₁NO₈S: C, 58.23; H, 8.01; N, 2.72; S, 6.22. Found: C, 58.32; H, 8.20; N, 2.60; S, 6.04.

Data for β anomer: Yield: 13 mg (4%). R_f 0.55 (1:1 EtOAc-cyclohexane). [α]_D -21.8 (c 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.52 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{1,2} = 1.3$ Hz, H-2), 5.28 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 5.03 (dd, 1 H, H-3), 4.36 (d, 1 H, H-1), 4.29 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6a} = 7.2$ Hz, H-6a), 4.16 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.7$ Hz, H-6b), 3.70 (ddd, 1

H, H-5), 2.65 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, SCH₂), 2.17-2.01 (3 s, 9 H, MeCO), 1.63-1.53 (m, 2 H, SCH₂CH₂), 1.38-1.19 (m, 18 H, CH₂), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.2-170.0 (MeCO), 155.7 (CO), 71.9 (C-3), 70.3 (C-2), 67.7 (C-4), 64.4 (C-6), 60.9 (C-1), 58.9 (C-5), 33.6-22.8 (CH₂), 20.7 (MeCO), 14.2 (CH₃).

ESIMS: m/z 538.2 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₄₁NO₈S: C, 58.23; H, 8.01; N, 2.72; S, 6.22. Found: C, 58.29; H, 8.14; N, 2.62, S, 5.99.

(1R)-1-Dodecylthio-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (11).

Compound **11** was obtained from **10** (40 mg, 0.08 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 31 mg (99%). R_f 0.43 (EtOAc). $[\alpha]_D +46.8$ (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 5.09 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.55 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.6$ Hz, H-6a), 4.30 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-6b), 4.00 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2), 3.86 (td, 1 H, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, H-5), 3.70 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-4), 3.61 (dd, 1 H, H-3), 2.65 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, SCH₂), 2.55 (ddd, 1 H, CH₂S), 1.72-1.52 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 1.46-1.23 (m, 18 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 159.5 (CO), 73.4 (C-2), 73.0 (C-3), 72.1 (C-4), 68.2 (C-6), 62.5 (C-1), 55.6 (C-5), 33.1-23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 412.2 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₃₅NO₅S: C, 58.58; H, 9.06; N, 3.60; S, 8.23. Found: C, 58.69; H, 9.20; N, 3.51; S, 7.86.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylthio-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (12). (α : β ratio 5:1, H-1 integration). Both anomers were separated by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:3 EtOAc-cyclohexane).

Data for α anomer: Yield: 48 mg (73%). R_f 0.81 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +15.9$ (c 1.0 in DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.35-5.30 (m, 2 H, H-2, H-3), 5.23 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, H-4), 5.16 (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.9$ Hz, H-1), 4.42 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.33 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.1$ Hz, H-6b), 4.09 (ddd, 1 H, H-5), 2.73-2.53 (m, 2 H, CH_2S), 2.11-2.01 (3 s, 9 H, MeCO), 1.66-1.55 (m, 2 H, CH_2), 1.40-1.17 (m, 26 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.3-169.6 (MeCO), 156.4 (CO), 70.8, 69.1 (C-2, C-3), 69.6 (C-4), 66.1 (C-6), 58.3 (C-1), 52.8 (C-5), 32.0-28.8 (CH_2), 20.8-20.6 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 594.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_8\text{S}$: C, 60.92; H, 8.64; N, 2.45; S, 5.61. Found: C; 61.14; H, 8.77; N, 2.39; S, 5.33.

Data for β anomer: Yield: 10 mg (20%). R_f 0.64 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} -14.0$ (c 1.0 in DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.52 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{1,2} = 1.3$ Hz, H-2), 5.29 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-4), 5.03 (dd, 1 H, H-3), 4.36 (d, 1 H, H-1), 4.30 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6a} = 7.3$ Hz, H-6a), 4.17 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.8$ Hz, H-6b), 3.70 (ddd, 1 H, H-5), 2.65 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, CH_2S), 2.17-2.01 (3 s, 9 H, MeCO), 1.63-1.53 (m, 2 H, SCH_2CH_2), 1.42-1.18 (m, 26 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.2-170.0 (MeCO), 155.7 (CO), 71.9 (C-3), 70.3 (C-2), 67.7 (C-4), 64.4 (C-6), 60.8 (C-1), 58.9 (C-5), 33.6-22.8 (CH_2), 20.7-20.6 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 594.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_8\text{S}$: C, 60.92; H, 8.64; N, 2.45; S, 5.61. Found: C, 60.83; H, 8.50; N, 2.14; S, 5.28.

(1R)-1-Hexadecylthio-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (13).

Compound **13** was obtained from **12** (26 mg, 0.04 mmol) by conventional *O*-

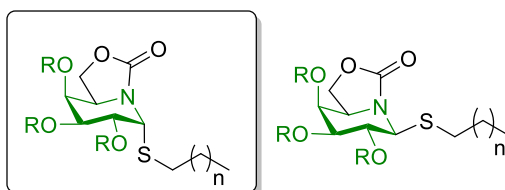
deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 16 mg (80%). R_f 0.37 (EtOAc). $[\alpha]_D +48.6$ (c 1 in MeOH).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 323 K): δ 5.09 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.53 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.29 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.8$ Hz, H-6b), 4.00 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2), 3.86 (td, 1 H, $J_{4,5} = 8.8$ Hz, H-5), 3.70 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-4), 3.63 (dd, 1 H, H-3), 2.66 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, SCH₂), 2.56 (ddd, 1 H, CH₂S), 1.72-1.55 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 1.46-1.22 (m, 26 H, CH₂), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD , 323 K): δ 159.4 (CO), 73.5 (C-2), 73.1 (C-3), 72.2 (C-4), 68.2 (C-6), 62.7 (C-1), 55.6 (C-5), 33.0-23.6 (CH₂), 14.3 (CH₃).

ESIMS: m/z 468.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{S}$: C, 61.99; H, 9.73; N, 3.14; S, 7.19. Found: C, 61.70; H, 9.67; N, 3.28; S, 6.78.

Preparation of pseudo-S-glycoside derivatives of OGJ.



14, R = Ac, n = 6
15, R = H, n = 6
16, R = Ac, n = 10
17, R = H, n = 10
18, R = Ac, n = 14
19, R = H, n = 14

14 β , R = Ac, n = 6
15 β , R = H, n = 6
16 β , R = Ac, n = 10

General procedure for the preparation of pseudo-S-glycosides of OGJ. To a stirred solution of 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (**138**) (0.41 mmol) in anhydrous DCM (8 mL) at 0 °C, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (188 μL , 1.53 mmol) and the

corresponding thiol (0.86 mmol) were added under argon atmosphere. The mixture was stirred for 30 min (TLC monitoring), diluted with DCM (50 mL) and washed with water (10 mL), aq NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography using the solvent indicated in each case to afford the corresponding pseudothioglycosides of OGJ.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octylthio-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (14). (α : β ratio 3:1, H-1 integration). Both anomers were separated by column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane).

Data for α anomer: Yield: 128 mg (67%). R_f 0.62 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +57.9$ (c 0.7 in DCM).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.77 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1), 5.42 (bs, 1 H, H-4), 5.24-5.15 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.42-4.35 (m, 2 H, H-5, H-6a), 4.04 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, $J_{5,6b} = 10.0$ Hz, H-6b), 2.56 (ddd, 1 H, $^2J_{H,H} = 13.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 8.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, SCH₂), 2.43 (ddd, 1 H, SCH₂), 2.16-1.98 (3 s, 9 H, MeCO), 1.70-1.45 (m, 2 H, SCH₂CH₂), 1.40-1.20 (m, 10 H, CH₂), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.4-169.8 (MeCO), 155.7 (CO), 68.9 (C-3), 68.3 (C-4), 67.2 (C-2), 62.8 (C-6), 58.1 (C-1), 50.3 (C-5), 31.8-22.7 (CH₂), 30.3 (SCH₂), 20.8-20.7 (MeCO), 14.2 (CH₃).

ESIMS: m/z 482.3 [M + Na]⁺. HRFABMS Calcd for C₂₁H₃₃NO₈SNa [M + Na]⁺ 482.1825, found 482.1812.

Data for β anomer: Yield: 41 mg (21%). R_f 0.43 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +23.1$ (c 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.41 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.0$ Hz, $J_{4,5} = 1.7$ Hz, H-4), 5.29 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.2$ Hz, H-2), 4.99 (dd, 1 H, H-3), 4.29 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.3$ Hz, H-6a), 4.20 (d, 1 H, H-1), 4.03 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-5), 3.92 (dd, 1 H, H-6b),

2.73 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, SCH₂), 2.17-1.98 (3 s, 9 H, MeCO), 1.67-1.51 (m, 2 H, SCH₂CH₂), 1.42-1.18 (m, 10 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.5-169.2 (MeCO), 155.0 (CO), 72.4 (C-3), 68.6 (C-2), 67.6 (C-4), 62.2-62.1 (C-1, C-6), 57.2 (C-5), 33.6 (SCH₂), 31.2-22.7 (CH₂), 20.8-20.6 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: m/z 482.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃NO₈S: C, 54.88; H, 7.24; N, 3.05; S, 6.98. Found: C, 54.96; H, 7.13; N, 2.91; S, 6.67.

(1R)-1-Octylthio-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (15a). Compound **15a** was obtained from **14a** (30 mg, 0.07 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Yield: 20 mg (94%). R_f 0.25 (EtOAc). $[\alpha]_D +92.4$ (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.33 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.9$ Hz, H-1), 4.34 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 8.5$ Hz, $J_{5,6a} = 5.9$ Hz, H-6a), 4.31 (t, 1 H, $J_{5,6b} = 8.5$ Hz, H-6b), 4.22 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 4.05 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.83 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4), 3.68 (dd, 1 H, H-3), 2.55 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, SCH₂), 2.45 (ddd, 1 H, SCH₂), 1.70-1.22 (m, 12 H, SCH₂CH₂), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ 159.1 (CO), 72.2 (C-3), 70.4 (C-4), 68.5 (C-2), 64.9 (C-6), 62.6 (C-1), 54.0 (C-5), 33.1-23.7 (CH₂), 31.0 (SCH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 356.2 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₅H₂₇NO₅S: C, 54.03; H, 8.16; N, 4.20; S, 9.62. Found: C, 53.74; H, 8.03; N, 3.98; S, 9.37.

(1S)-1-Octylthio-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (15b). Compound **15b** was obtained from **14b** (33 mg, 0.07 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc). Yield: 23 mg (99%). R_f 0.17 (EtOAc). $[\alpha]_D -9.3$ (*c* 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.31-4.26 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.02 (d, 1 H, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, H-1), 3.94 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 7.1$ Hz, $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, $J_{4,5} = 1.7$ Hz, H-5), 3.85 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-4), 3.67 (t, 1 H, $J_{2,3} = 9.0$ Hz, H-2), 3.48 (dd, 1 H, H-3), 2.77 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, SCH_2), 1.70-1.56 (m, 2 H, SCH_2CH_2), 1.48-1.24 (m, 10 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 158.6 (CO), 76.3 (C-3), 71.8 (C-2), 70.6 (C-4), 65.5 (C-1), 64.1 (C-6), 60.7 (C-5), 34.4 (SCH_2), 33.0-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 356.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{S}$: C, 54.03; H, 8.16; N, 4.20; S, 9.62. Found: C, 53.85; H, 7.90; N, 3.96; S, 9.29.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylthio-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (16). ($\alpha:\beta$ ratio 12:1, H-1 integration). Both anomers were separated by column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane).

Data for α anomer: Yield: 214 mg (79%). R_f 0.68 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_{\text{D}} +161.7$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.78 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1), 5.43 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 1.6$ Hz, H-4), 5.26-5.16 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.43-4.34 (m, 2 H, H-5, H-6a), 4.04 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, $J_{5,6b} = 10.0$ Hz, H-6b), 2.57 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, SCH_2), 2.43 (ddd, 1 H, SCH_2), 2.17-2.00 (3 s, 9 H, MeCO), 1.70-1.20 (m, 20 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.4-169.8 (MeCO), 155.7 (CO), 68.9 (C-3), 68.4 (C-4), 67.2 (C-2), 62.8 (C-6), 58.1 (C-1), 50.4 (C-5), 32.0-22.8 (CH_2), 30.4 (SCH_2), 20.8-20.7 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 538.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRFABMS Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_8\text{SNa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 538.2451, found 538.2444.

Data for β anomer: Yield: 19 mg (7%). R_f 0.48 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_{\text{D}} +10.6$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.42 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.0$ Hz, $J_{4,5} = 1.6$ Hz, H-4), 5.31 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.5$ Hz, H-2), 5.00 (dd, 1 H, H-3), 4.30 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.1$ Hz, H-6a), 4.20 (d, 1 H, H-1), 4.01 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-5), 3.94 (dd, 1 H, H-6b), 2.75 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, SCH_2), 2.19-2.00 (3 s, 9 H, MeCO), 1.70-1.20 (m, 20 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.5-169.2 (MeCO), 154.9 (CO), 72.4 (C-3), 68.6 (C-2), 67.5 (C-4), 62.2-62.0 (C-1, C-6), 57.2 (C-5), 33.7 (SCH_2), 32.0-22.8 (CH_2), 20.8-20.6 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 538.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_8\text{S}$: C, 58.23; H, 8.01; N, 2.72; S, 6.22. Found: C, 58.40; H, 8.22; N, 2.55; S, 6.03.

(1R)-1-Dodecylthio-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (17 α).

Compound **17 α** was obtained from **16 α** (26 mg, 0.05 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (9:1 EtOAc-MeOH). Yield: 18 mg (93%). R_f 0.23 (EtOAc). $[\alpha]_D^{+69.1}$ (*c* 1.0 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 5.33 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.9$ Hz, H-1), 4.46-4.38 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.22 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 8.2$ Hz, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, $J_{4,5} = 1.8$ Hz, H-5), 4.05 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2), 3.83 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4), 3.67 (dd, 1 H, H-3), 2.55 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, SCH_2), 2.47 (ddd, 1 H, SCH_2), 1.70-1.52 (m, 2 H, SCH_2CH_2), 1.45-1.22 (m, 18 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ 159.1 (CO), 72.2 (C-3), 70.4 (C-4), 68.5 (C-2), 64.9 (C-6), 62.5 (C-1), 54.0 (C-5), 33.1-23.8 (CH_2), 14.5 (CH_3).

ESIMS: m/z 412.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}_5\text{S}$: C, 58.58; H, 9.06; N, 3.60; S, 8.23. Found: C, 58.37; H, 8.79; N, 3.44; S, 8.08.

(1R)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-hexadecylthio-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (18). (α : β ratio 5:1, H-1 integration). α Anomer was separated by

column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane). Yield: 54 mg (89%). R_f 0.60 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +57.4$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.77 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, H-1), 5.42 (bs, 1 H, H-4), 5.23-5.14 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.42-4.35 (m, 2 H, H-5, H-6a), 4.04 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.0$ Hz, $J_{5,6b} = 10.2$ Hz, H-6b), 2.55 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, SCH_2), 2.43 (ddd, 1 H, SCH_2), 2.17-2.00 (3 s, 9 H, MeCO), 1.69-1.43 (m, 2 H, SCH_2CH_2), 1.40-1.13 (m, 26 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.4-169.8 (MeCO), 155.7 (CO), 68.9 (C-3), 68.3 (C-4), 67.1 (C-2), 62.8 (C-6), 58.0 (C-1), 50.3 (C-5), 32.0-28.9 (CH_2), 30.3 (SCH_2), 20.8-20.7 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 594.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_8\text{S}$: C, 60.92; H, 8.64; N, 2.45; S, 5.61. Found: C, 61.25; H, 8.57; N, 2.29; S, 5.33.

(1R)-1-Hexadecylthio-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (19).

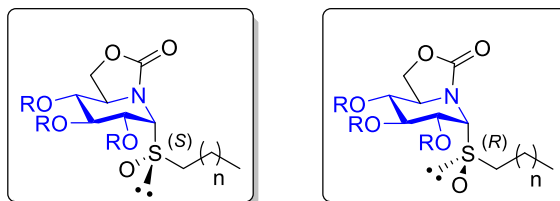
Compound **19** was obtained from **18** (40 mg, 0.07 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (6:1 DCM-MeOH). Yield: 30 mg (95%). R_f 0.56 (9:1 DCM-MeOH). $[\alpha]_D +103.4$ (c 1.0 in DMSO).

^1H NMR (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 5.26 (bt, 1 H, $J_{\text{OH},2} = J_{\text{OH},4} = 4.5$ Hz, OH), 5.15 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.8$ Hz, H-1), 4.91 (d, 1 H, $J_{\text{OH},3} = 5.4$ Hz, OH), 4.32 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.24 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.03-3.95 (m, 1 H, H-5), 3.85 (ddd, 1 H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2), 3.69-3.66 (m, 1 H, H-4), 3.48 (ddd, 1 H, H-3), 2.45-2.25 (m, 2 H, SCH_2), 1.60-1.15 (m, 28 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 156.1 (CO), 70.1 (C-3), 68.7 (C-4), 66.5 (C-2), 63.0 (C-6), 60.7 (C-1), 52.1 (C-5), 31.3-22.1 (CH_2), 13.9 (CH_3).

ESIMS: m/z 468.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{S}$: C, 61.99; H, 9.73; N, 3.14; S, 7.19. Found: C, 61.71; H, 9.72; N, 3.08; S, 6.97.

Preparation of pseudo-glycosylsulfinyl derivatives of ONJ.



20, R = Ac, n = 6
21, R = H, n = 6
22, R = Ac, n = 10
23, R = H, n = 10
24, R = Ac, n = 14
25, R = H, n = 14

26, R = Ac, n = 6
27, R = H, n = 6
28, R = Ac, n = 10
29, R = H, n = 10
30, R = Ac, n = 14
31, R = H, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-glycosylsulfinyl derivatives from pseudo-glycosylsulfide precursors of ONJ. To a solution of corresponding pseudo-S-glycoside (131 mg, 0.23 mmol) in DCM (6 mL), *m*CPBA (70%, 40 mg, 0.23 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 10 min (TLC monitoring), diluted with DCM (50 mL), washed with aqueous NaHCO₃ (10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography using the solvent indicated in each case to afford the corresponding sulfoxides.

(1R)-1-Octylsulfinyl-2,3,4-tri-O-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin

(20). Column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 33 mg (30%). *R_f* 0.55 (3:2 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +38.6 (c 0.8 in DCM).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.85 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 10.0 Hz, H-3), 5.25 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 7.1 Hz, H-2), 4.98 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 9.0 Hz, H-4), 4.91 (d, 1 H, H-1), 4.66 (td, 1 H, *J*_{5,6a} = 9.0 Hz, *J*_{5,6b} = 5.1 Hz, H-5), 4.44 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = 9.0 Hz, H-6a), 4.22 (dd, 1 H, H-6b), 2.79 (ddd, 1 H, ²*J*_{H,H} = 13.2 Hz, ³*J*_{H,H} = 9.0 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, SOCH₂), 2.62 (ddd, 1 H, SOCH₂), 2.07-1.97 (3 s, 9 H, MeCO), 1.80-1.10 (m, 12 H, CH₂), 0.81 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.1-169.2 (CO ester), 156.6 (CO carbamate), 71.6 (C-4), 69.6 (C-3), 69.4 (C-2), 66.5 (C-6, C-1), 54.5 (C-5), 49.7 (SOCH_2), 31.7-22.5 (CH_2), 20.6-20.5 (MeCO), 14.0 (CH_3).

ESIMS: m/z 498.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_9\text{S}$: C, 53.04; H, 6.99; N, 2.95; S, 6.74. Found: C, 52.78; H, 6.67; N, 2.63; S 6.53.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (21). Compound **21** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **20** (29 mg, 0.06 mmol). Yield: 18 mg (85%). R_f 0.78 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +63.5$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 4.62 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.28 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.4$ Hz, H-6b), 4.06 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-5), 3.94 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{1,2} = 6.6$ Hz, H-2), 3.82 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.35 (t, 1 H, H-4), 2.97 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SO_2CH_2), 2.90 (ddd, 1 H, SO_2CH_2), 1.87-1.72 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.55-1.27 (m, 10 H, CH_2), 0.91 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ 159.4 (CO), 75.7 (C-3), 74.8 (C-4), 72.5 (C-1), 71.6 (C-2), 68.7 (C-6), 57.5 (C-5), 52.3 (SOCH_2), 32.9-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 372.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{S}$: C, 51.56; H, 7.79; N, 4.01; S, 9.18. Found: C, 51.33; H, 7.54; N, 3.79; S 8.85.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (22). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 37 mg (30%). R_f 0.38 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +42.3$ (c 1.2 in DCM).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.92 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 5.39 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.1$ Hz, H-2), 5.10 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, H-4), 4.99 (d, 1 H, H-1), 4.71 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 9.0$ Hz, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-5), 4.50 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.29 (dd, 1 H, H-6b), 2.85 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, SOCH_2), 2.69 (ddd, 1 H, SOCH_2), 2.14-2.04 (3 s, 9 H, MeCO), 1.86-1.67 (m, 2 H, SOCH_2CH_2), 1.50-1.20 (m, 18 H, CH_2), 0.88 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.1-169.2 (CO ester), 156.7 (CO carbamate), 71.6 (C-4), 69.6 (C-3), 69.2 (C-2), 66.5 (C-6, C-1), 54.5 (C-5), 49.5 (SOCH₂), 31.8-22.6 (CH₂), 20.5 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: m/z 554.4 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₄₁NO₉S: C, 56.48; H, 7.77; N, 2.63; S, 6.03. Found: C, 56.14; H, 7.55; N, 2.58; S, 6.38.

(1R)-1-Dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (23). Compound **23** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **22** (32 mg, 0.06 mmol). Yield: 23 mg (93%). R_f 0.63 (9:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +58.1$ (*c* 1.3 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 4.62 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.28 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.4$ Hz, H-6b), 4.05 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-5), 3.94 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{1,2} = 6.6$ Hz, H-2), 3.81 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.35 (t, 1 H, H-4), 2.97 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, $3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, SOCH₂), 2.90 (ddd, 1 H, SOCH₂), 1.86-1.74 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.56-1.24 (m, 18 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.4 (CO), 75.6 (C-3), 74.8 (C-4), 72.5 (C-1), 71.6 (C-2), 68.7 (C-6), 57.4 (C-5), 52.3 (SOCH₂), 33.1-23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 428.4 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₃₅NO₆S: C, 56.27; H, 8.70; N, 3.45; S, 7.91. Found: C, 55.92; H, 8.63; N, 3.17; S, 7.54.

(1R)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-nojirimycin (24). Column chromatography (1:2 → 2:3 → 1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 57 mg (42%). R_f 0.34 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +47.7$ (*c* 1.5 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.90 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 5.33 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 6.9$ Hz, H-2), 5.05 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 4.97 (d, 1 H, H-1), 4.71 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 8.5$ Hz, $J_{5,6b} = 5.1$ Hz, H-5), 4.49 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.27 (dd, 1 H, H-6b), 2.83 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, SOCH₂), 2.62 (ddd, 1 H, SOCH₂), 2.12-2.03 (3 s, 9 H, MeCO), 1.85-1.17 (m, 28 H, CH₂), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.1-169.3 (MeCO), 156.6 (CO), 71.6 (C-4), 69.6 (C-3), 69.3 (C-2), 66.5-66.4 (C-6, C-1), 54.5 (C-5), 49.6 (SOCH₂), 31.9-22.6 (CH₂), 20.5 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: m/z 610.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_9\text{S}$: C, 59.26; H, 8.40; N, 2.38; S, 5.46. Found: C, 59.40; H, 8.52; N, 2.20; S, 5.41.

(1R)-1-Hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (25). Compound **25** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **24** (32 mg, 0.05 mmol). Yield: 22 mg (95%). R_f 0.40 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{+59.6}$ (c 0.7 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.62 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.28 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.3$ Hz, H-6b), 4.05 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-5), 3.94 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{1,2} = 6.6$ Hz, H-2), 3.81 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.35 (t, 1 H, H-4), 3.03-2.85 (m, 2 H, SOCH₂), 1.85-1.72 (m, 2 H, SOCH₂CH₂), 1.58-1.20 (m, 26 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 156.7 (CO), 73.5 (C-3), 73.0 (C-4), 70.3 (C-1), 70.1 (C-2), 66.8 (C-6), 55.6 (C-5), 50.1 (SOCH₂), 31.3-22.1 (CH₂), 14.0 (CH₃).

ESIMS: m/z 484.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{S}$: C, 59.84; H, 9.39; N, 3.03; S, 6.95. Found: C, 59.52; H, 9.10; N, 2.74; S, 6.68.

(1R)-1-Octylsulfinyl-2,3,4-tri-O-acetyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (26). Column chromatography (1:1 EtOAc:cyclohexane). Yield: 44 mg (39%). R_f 0.40 (3:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+33.5}$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.50 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 7.0$ Hz, $J_{3,4} = 5.0$ Hz, H-3), 5.45 (bt, 1 H, H-2), 4.98 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.5$ Hz, H-1), 4.85 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 8.3$ Hz, H-4), 4.40 (d, 2 H, $J_{5,6} = 5.5$ Hz, H-6a, H-6b), 3.99 (dt, 1 H, H-5), 2.88 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SOCH₂), 2.75 (ddd, 1 H, SOCH₂), 2.08-2.00 (3 s, 9 H, MeCO), 1.90-1.66 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.46-1.15 (m, 10 H, CH₂), 0.81 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ 169.8-168.5 (CO ester), 156.3 (CO carbamate), 72.2 (C-4), 68.8 (C-3), 67.4 (C-1), 67.3 (C-6), 67.1 (C-2), 54.4 (C-5), 50.5 (SO_2CH_2), 31.7-22.5 (CH_2), 20.5-20.4 (MeCO), 14.0 (CH_3).

ESIMS: m/z 498.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_9\text{S}$: C, 53.04; H, 6.99; N, 2.95; S, 6.74. Found: C, 53.11; H, 7.08; N, 2.79; S, 6.52.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (27). Compound **27** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **26** (33 mg, 0.07 mmol). Yield: 21 mg (87%). R_f 0.67 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +53.6$ (c 0.5 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 4.89 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.9$ Hz, H-1), 4.58 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.30 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.07 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.0$ Hz, H-2), 3.94 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 3.91 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-5), 3.39 (dd, 1 H, H-4), 3.14 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SOCH_2), 3.00 (ddd, 1 H, SOCH_2), 1.90-1.72 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.58-1.27 (m, 10 H, CH_2), 0.91 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ 158.6 (CO), 75.4 (C-3), 75.1 (C-4), 72.9 (C-2), 72.3 (C-1), 68.6 (C-6), 56.9 (C-5), 50.8 (SOCH_2), 32.9-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 372.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRFABMS Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{SNa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 372.1457, found 372.1452.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (28). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 54 mg (44%). R_f 0.33 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +25.1$ (c 1.1 in DCM).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.54 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 7.6$ Hz, $J_{3,4} = 5.7$ Hz, H-3), 5.46 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 5.7$ Hz, H-2), 5.00 (d, 1 H, H-1), 4.93 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 8.6$ Hz, H-4), 4.44-4.37 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.05-3.99 (m, 1 H, H-5), 2.90 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, SOCH_2), 2.76 (ddd, 1 H, SOCH_2), 2.10-1.98 (3 s, 9 H,

MeCO), 1.85-1.65 (m, 2 H, SOCH₂CH₂), 1.46-1.14 (m, 18 H, CH₂), 0.81 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ 168.9-168.0 (CO ester), 155.3 (CO carbamate), 71.1 (C-4), 67.9 (C-3), 66.4 (C-1, C-2), 66.2 (C-6), 53.2 (C-5), 49.4 (SOCH₂), 30.9-21.6 (CH₂), 19.5 (MeCO), 13.1 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 554.4 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₄₁NO₉S: C, 56.48; H, 7.77; N, 2.63; S, 6.03. Found: C, 56.55; H, 7.81; N, 2.44; S, 5.79.

(1R)-1-Dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (29). Compound **29** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **28** (52 mg, 0.10 mmol). Yield: 35 mg (88%). *R_f* 0.63 (9:1 EtOAc-MeOH). [α]_D +60.5 (*c* 0.8 in DMSO).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.57 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.7 Hz, H-1), 4.47 (t, 1 H, *J*_{5,6a} = *J*_{6a,6b} = 8.3 Hz, H-6a), 4.15 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 4.7 Hz, H-6b), 3.91 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 8.4 Hz, H-2), 3.76 (ddd, 1 H, *J*_{4,5} = 9.5 Hz, H-5), 3.73 (bt, 1 H, *J*_{3,4} = 7.5 Hz, H-3), 3.24 (dd, 1 H, H-4), 2.96-2.84 (m, 2 H, SOCH₂), 1.73-1.57 (m, 2 H, SOCH₂CH₂), 1.45-1.19 (m, 10 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.3 (CO), 73.5 (C-3), 73.3 (C-4), 71.0 (C-1), 70.9 (C-2), 66.7 (C-6), 55.2 (C-5), 48.7 (SOCH₂), 31.3-22.1 (CH₂), 13.9 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 428.4 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₃₅NO₆S: C, 56.27; H, 8.70; N, 3.45; S, 7.91. Found: C, 56.14; H, 8.67; N, 3.21; S, 7.60.

(1R)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (30). Column chromatography (1:2 → 2:3 → 1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 71 mg (53%). *R_f* 0.31 (1:1 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +28.7 (*c* 1.1 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.55 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 7.0 Hz, *J*_{3,4} = 4.5 Hz, H-3), 5.50 (bt, 1 H, H-2), 5.03 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.4 Hz, H-1), 4.89 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 8.5 Hz, H-4), 4.45 (d, 2 H, *J*_{5,6} = 5.7 Hz, H-6a, H-6b), 4.04 (dt, 1 H, H-5), 2.93 (ddd, 1 H, ²J_{H,H} = 13.0 Hz, ³J_{H,H} = 9.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, SOCH₂), 2.79 (ddd, 1 H, SOCH₂), 2.13-2.05 (3 s, 9 H,

MeCO), 1.93-1.66 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.50-1.15 (m, 26 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.8-168.9 (MeCO), 156.4 (CO), 72.2 (C-4), 68.7 (C-3), 67.4 (C-1), 67.3 (C-6), 67.0 (C-2), 54.4 (C-5), 50.5 (SOCH₂), 31.9-22.5 (CH₂), 20.5 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 610.5 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₉H₄₉NO₉S: C, 59.26; H, 8.40; N, 2.38; S, 5.46. Found: C, 59.11; H, 8.24; N, 2.04; S, 5.13.

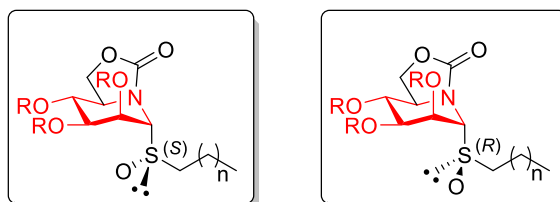
(1R)-1-Hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (31). Compound **31** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **30** (42 mg, 0.07 mmol). Yield: 30 mg (93%). *R_f* 0.35 (5:1 EtOAc-MeOH). [α]_D +33.5 (*c* 0.8 in DMSO).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.73 (d, 1 H, *J*_{OH,2} = 5.4 Hz, OH), 5.53 (d, 1 H, *J*_{OH,4} = 5.1 Hz, OH), 5.32 (d, 1 H, *J*_{OH,3} = 4.2 Hz, OH), 4.57 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.4 Hz, H-1), 4.47 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 8.4 Hz, H-6a), 4.17 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 4.5 Hz, H-6b), 3.92 (dt, 1 H, *J*_{2,3} = 8.4 Hz, H-2), 3.82-3.69 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.25 (ddd, 1 H, *J*_{3,4} = 9.3 Hz, *J*_{4,5} = 7.0 Hz, H-4), 2.95-2.84 (m, 2 H, SOCH₂), 1.72-1.58 (m, 2 H, SOCH₂CH₂), 1.45-1.20 (m, 26 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.3 (CO), 73.5 (C-3), 73.3 (C-4), 71.1 (C-1), 70.9 (C-2), 66.7 (C-6), 55.2 (C-5), 48.6 (SOCH₂), 31.3-22.1 (CH₂), 13.9 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 484.4 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₄₃NO₆S: C, 59.84; H, 9.39; N, 3.03; S, 6.95. Found: C, 59.60; H, 9.21; N, 2.76; S, 6.75.

Preparation of pseudo-glycosylsulfinyl derivatives of OMJ.



32, R = Ac, n = 6
 33, R = H, n = 6
 34, R = Ac, n = 10
 35, R = H, n = 10
 36, R = Ac, n = 14
 37, R = H, n = 14

38, R = Ac, n = 6
 39, R = H, n = 6
 40, R = Ac, n = 10
 41, R = H, n = 10
 42, R = Ac, n = 14
 43, R = H, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-glycosylsulfinyl derivatives from pseudo-glycosylsulfide precursors of OMJ. To a solution of corresponding pseudo-*S*-glycoside (0.34 mmol) in DCM (9 mL), *m*CPBA (70%, 58 mg, 0.34 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 10 min (TLC monitoring), diluted with DCM (50 mL), washed with aqueous NaHCO₃ (10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography using the solvent indicated in each case to afford the corresponding pseudo-glycosylsulfinyl derivatives.

(1*R*)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-octylsulfinyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-mannonojirimycin (32). Column chromatography (Et₂O). Yield: 55 mg (34%). *R*_f 0.72 (Et₂O). [α]_D -5.7 (*c* 0.8 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.73 (t, 1 H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 2.5 Hz, H-2), 5.61 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 9.5 Hz, H-3), 5.26 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 9.5 Hz, H-4), 4.62 (d, 1 H, H-1), 4.60-4.53 (m, 1 H, H-5), 4.52 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 8.2 Hz, H-6a), 4.37 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 3.7 Hz, H-6b), 2.93 (ddd, 1 H, ²*J*_{H,H} = 13.0 Hz, ³*J*_{H,H} = 8.1 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.4 Hz, SOCH₂), 2.76 (ddd, 1 H,

SOCH₂), 2.13-2.03 (3 s, 9 H, MeCO), 1.80-1.20 (m, 12 H, CH₂), 0.87 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3-169.4 (MeCO), 157.7 (CO), 69.6 (C-2), 69.0 (C-3), 68.8 (C-4), 68.4 (C-1), 66.9 (C-6), 55.8 (C-5), 50.8 (SOCH₂), 31.6-22.4 (CH₂), 20.7-20.5 (MeCO), 14.0 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 498.36 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃NO₉S: C, 53.04; H, 6.99; N, 2.95; S, 6.74. Found: C, 53.16; H, 7.10; N, 2.78; S, 6.39.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (33).

Compound **33** was obtained from **32** (23 mg, 0.05 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH → 3:1 EtOAc-MeOH). Yield: 15 mg (88%). R_f 0.60 (1:5 MeOH-EtOAc). [α]_D +11.3 (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.67 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 2.0 Hz, H-1), 4.63 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 9.0 Hz, H-6a), 4.38 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 2.8 Hz, H-2), 4.34 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 5.0 Hz, H-6b), 4.12 (td, 1 H, *J*_{4,5} = 9.0 Hz, H-5), 3.90 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 9.2 Hz, H-3), 3.75 (t, 1 H, H-4), 3.00-2.80 (m, 2 H, SOCH₂), 1.83-1.70 (m, 2 H, SOCH₂CH₂), 1.55-1.26 (m, 10 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 160.4 (CO), 73.6 (C-1), 73.0 (C-3), 72.0 (C-2), 71.1 (C-4), 68.6 (C-6), 58.8 (C-5), 51.0 (SOCH₂), 32.9-23.6 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 372.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₅H₂₇NO₆S: C, 51.56; H, 7.79; N, 4.01; S, 9.18. Found: C, 51.33; H, 7.54; N, 3.79; S, 8.85.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (34). Column chromatography (Et₂O). Yield: 71 mg (39%). R_f 0.59 (Et₂O). [α]_D - 4.1 (*c* 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.73 (t, 1 H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 2.5 Hz, H-2), 5.61 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 9.0 Hz, H-3), 5.27 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 9.0 Hz, H-4), 4.62 (d, 1 H, H-1), 4.60-4.50 (m, 1

H, H-5), 4.52 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.3$ Hz, H-6a), 4.38 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.7$ Hz, H-6b), 2.98-2.87 (m, 1 H, SOCH₂), 2.81-2.69 (m, 1 H, SOCH₂), 2.16-2.01 (3 s, 9 H, MeCO), 1.79-1.18 (m, 20 H, CH₂), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3-169.4 (MeCO), 157.7 (CO), 69.6 (C-2), 69.0 (C-3), 68.8 (C-4), 68.4 (C-1), 66.9 (C-6), 55.8 (C-5), 50.8 (SOCH₂), 31.9-22.4 (CH₂), 20.7-20.6 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: m/z 554.5 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₄₁NO₉S: C, 56.48; H, 7.77; N, 2.63; S, 6.03. Found: C, 56.13; H, 7.44; N, 2.29; S, 5.76.

(1R)-1-Dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenemannojirimycin (35).

Compound **35** was obtained from **34** (20 mg, 0.04 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 14 mg (86%). R_f 0.52 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +23.8$ (*c* 0.6 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.67 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.63 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.38 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2), 4.34 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.9$ Hz, H-6b), 4.11 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, H-5), 3.90 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3), 3.75 (t, 1 H, H-4), 2.98-2.81 (m, 2 H, SOCH₂), 1.82-1.71 (m, 2 H, SOCH₂CH₂), 1.52-1.24 (m, 18 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 160.5 (CO), 73.6-73.0 (C-1, C-3), 71.9-71.2 (C-2, C-4), 68.7 (C-6), 58.9 (C-5), 51.1 (SOCH₂), 33.1-23.6 (CH₂), 14.5 (CH₃).

ESIMS: m/z 428.3 [M + Na]⁺. HRFABMS Calcd for C₁₉H₃₅NO₆SNa [M + Na]⁺ 428.2077, found 428.2081.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-mannojirimycin (36). Column chromatography (Et₂O). Yield: 82 mg (41%). R_f 0.57 (Et₂O). $[\alpha]_D +53.6$ (*c* 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.72 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 2.6$ Hz, H-2), 5.60 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3), 5.26 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, H-4), 4.61 (d, 1 H, H-1), 4.58-4.55 (m, 1 H, H-5), 4.51 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.1$ Hz, H-6a), 4.37 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.7$ Hz, H-6b), 2.97-2.88 (m, 1 H, SOCH_2), 2.79-2.70 (m, 1 H, SOCH_2), 2.12-2.03 (3 s, 9 H, MeCO), 1.75-1.19 (m, 28 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.4-169.6 (MeCO), 157.8 (CO), 69.7 (C-2), 69.2 (C-3), 68.9 (C-4), 68.6 (C-1), 67.0 (C-6), 55.9 (C-5), 50.9 (SOCH_2), 32.0-22.5 (CH_2), 20.8-20.7 (MeCO), 14.3 (CH_3).

ESIMS: m/z 610.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_9\text{S}$: C, 59.26; H, 8.40; N, 2.38; S 5.45. Found: C, 59.33; H, 8.49; N, 2.21; S 5.17.

(1R)-1-Hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylenemannonojirimycin (37).

Compound **37** was obtained from **36** (46 mg, 0.08 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 29 mg (79%). R_f 0.5 (1:9 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +5.2$ (c 0.7 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 323 K): δ 4.66 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.61 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.37 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2) 4.33 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.11 (td, 1 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-5), 3.90 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.1$ Hz, H-3), 3.75 (t, 1 H, H-4), 2.96-2.83 (m, 2 H, SOCH_2), 1.81-1.72 (m, 2 H, SOCH_2CH_2), 1.54-1.24 (m, 24 H, CH_2), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD , 323 K): δ 160.3 (CO), 73.6 (C-1), 73.1 (C-3), 71.8 (C-2), 71.2 (C-4), 68.5 (C-6), 58.7 (C-5), 51.2 (SOCH_2), 32.9-23.5 (CH_2), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 484.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{S}$: C, 59.84; H, 9.39; N, 3.03; S, 6.94. Found: C, 59.55; H, 9.45; N, 2.77; S, 6.60.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (38). Column chromatography (Et₂O). Yield: 46 mg (29%). R_f 0.63 (Et₂O). [α]_D -4.2 (c 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.82 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 2.6$ Hz, H-2), 5.62 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3), 5.29 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 4.80 (d, 1 H, H-1), 4.78 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6a} = 8.2$ Hz, H-6a), 4.37 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.6$ Hz, H-6b), 4.34-4.24 (m, 1 H, H-5), 3.10-2.87 (m, 2 H, SOCH₂), 2.13-2.04 (3 s, 9 H, MeCO), 1.50-1.19 (m, 12 H, CH₂), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3-169.5 (MeCO), 156.6 (CO), 69.4 (C-3), 68.7-68.6 (C-1, C-4), 66.7-66.5 (C-2, C-6), 54.8 (C-5), 51.3 (SOCH₂), 31.6-22.6 (CH₂), 20.7-20.5 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: m/z 498.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃NO₉S: C, 53.04; H, 6.99; N, 2.95; S, 6.74. Found: C, 53.19; H, 7.20; N, 2.83; S, 6.51.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (39). Compound **39** was obtained from **38** (24 mg, 0.05 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc). Yield: 16 mg (91%). R_f 0.39 (1:9 MeOH-EtOAc). [α]_D +34.7 (c 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.82 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.61-4.53 (m, 1 H, H-6a), 4.47 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2), 4.35-4.30 (m, 1 H, H-6b), 3.80-2.93 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.01 (ddd, 1 H, $^2J_{H,H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 9.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, SOCH₂), 2.82 (ddd, 1 H, SOCH₂), 1.92-1.72 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.55-1.24 (m, 10 H, CH₂), 0.92 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 159.3 (CO), 74.4 (C-1), 72.6-70.7 (C-3, C-4), 68.5 (C-6), 67.8 (C-2), 57.6 (C-5), 51.4 (SOCH₂), 32.9-23.0 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 372.2 [M + Na]⁺. HRFABMS Calcd for C₁₅H₂₇NO₆SNa [M + Na]⁺ 372.1451, found 372.1446.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-mannojirimycin (40). Column chromatography (Et₂O). Yield: 66 mg (36%). R_f 0.56 (Et₂O). [α]_D -6.0 (*c* 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.82 (t, 1 H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 2.6 Hz, H-2), 5.63 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 9.6 Hz, H-3), 5.30 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 9.6 Hz, H-4), 4.80 (d, 1 H, H-1), 4.48 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 9.1 Hz, *J*_{5,6a} = 8.0 Hz, H-6a), 4.37 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 4.5 Hz, H-6b), 4.30 (ddd, 1 H, H-5), 3.10-2.88 (m, 2 H, SOCH₂), 2.14-2.04 (3 s, 9 H, MeCO), 1.86-1.23 (m, 20 H, CH₂), 0.88 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 6.7 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3-169.5 (MeCO), 156.6 (CO), 69.4 (C-3), 68.7-68.6 (C-1, C-4), 66.7-66.5 (C-2, C-6), 54.8 (C-5), 51.3 (SOCH₂), 31.9-22.7 (CH₂), 20.7-20.6 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 554.4 [M + Na]⁺. HRFABMS Calcd for C₂₅H₄₁NO₉SNa [M + Na]⁺ 554.2394, found 554.2382.

(1R)-1-Dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenemannojirimycin (41).

Compound **41** was obtained from **40** (8.0 mg, 0.01 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 6 mg (98%). R_f 0.71 (5:1 EtOAc-MeOH). [α]_D +42.3 (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 4.82 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 2.1 Hz, H-1), 4.61-4.53 (m, 1 H, H-6a), 4.47 (t, 1 H, *J*_{2,3} = 2.1 Hz, H-2), 4.39-4.30 (m, 1 H, H-6b), 3.79-3.71 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.00 (ddd, 1 H, ²*J*_{H,H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H,H} = 9.2 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.9 Hz, SOCH₂), 2.83 (ddd, 1 H, SOCH₂), 1.90-1.75 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.55-1.22 (m, 18 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 6.7 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 159.3 (CO), 74.4 (C-1), 72.6-70.6 (C-3, C-4), 68.4 (C-6), 67.8 (C-2), 57.6 (C-5), 51.4 (SOCH₂), 33.0-23.0 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 428.4 $[M + Na]^+$. HRFABMS Calcd for $C_{19}H_{35}NO_6SNa$ $[M + Na]^+$ 428.2077, found 428.2068.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (42). Column chromatography (Et_2O). Yield: 49 mg (25%). R_f 0.60 (Et_2O). $[\alpha]_D +6.6$ (c 1.0 in DCM).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.79 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 2.6$ Hz, H-2), 5.61 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 5.28 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 4.78 (d, 1 H, H-1), 4.46 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 8.8$ Hz H-6a), 4.35 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-6b), 4.31-4.23 (m, 1 H, H-5), 3.10-2.86 (m, 2 H, $SOCH_2$), 2.11-2.02 (3 s, 9 H, MeCO), 1.93-1.13 (m, 28 H, CH_2), 0.85 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 170.2-169.4 (MeCO), 156.5 (CO), 69.4 (C-3), 68.6-68.5 (C-1, C-4), 66.7-66.4 (C-2, C-6), 54.8 (C-5), 51.3 ($SOCH_2$), 31.9-22.7 (CH_2), 20.7-20.5 (MeCO), 14.1 (CH_3).

ESIMS: m/z 610.5 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{29}H_{49}NO_9S$: C, 59.26; H, 8.40; N, 2.38; S, 5.45. Found: C, 59.08; H, 8.22; N, 2.04; S, 5.09.

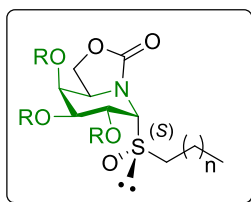
(1R)-1-Hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (43). Compound **43** was obtained from **42** (13 mg, 0.02 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 10 mg (98%). R_f 0.53 (1:9 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +22.4$ (c 0.7 in MeOH).

1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 4.82 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.58-4.54 (m, 1 H, H-6a), 4.47 (t, 1 H, $J_{2,3} = 2.0$ Hz, H-2), 4.33 (d, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.1$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-6b), 3.80-3.70 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.00 (ddd, 1 H, $^2J_{H,H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 9.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, $SOCH_2$), 2.82 (ddd, 1 H, $SOCH_2$), 1.90-1.73 (m, 2 H, $SO_2CH_2CH_2$), 1.55-1.20 (m, 24 H, CH_2), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH_3).

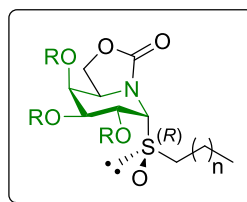
^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 159.7 (CO), 74.5 (C-1), 72.8-70.8 (C-3, C-4), 68.6 (C-6), 68.0 (C-2), 57.8 (C-5), 51.6 (SOCH_2), 33.2-23.2 (CH_2), 14.6 (CH_3).

ESIMS: m/z 484.41 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{S}$: C, 59.84; H, 9.39; N, 3.03; S, 6.94. Found: C, 59.49, H, 9.26, N, 2.67, S, 6.54.

Preparation of pseudo-glycosylsulfinyl derivatives of OGJ.



- 44**, R = Ac, n = 6
45, R = H, n = 6
46, R = Ac, n = 10
47, R = H, n = 10
48, R = Ac, n = 14
49, R = H, n = 14



- 50**, R = Ac, n = 6
51, R = H, n = 6
52, R = Ac, n = 10
53, R = H, n = 10
54, R = Ac, n = 14
55, R = H, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-glycosylsulfinyl derivatives from pseudo-glycosylsulfide precursors of OGJ. To a solution of corresponding pseudo-S-glycoside (0.28 mmol) in DCM (7 mL), *m*CPBA (70%, 48 mg, 0.28 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 10 min (TLC monitoring), diluted with DCM (50 mL), washed with aqueous NaHCO_3 (10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography using the solvent indicated in each case to afford the corresponding pseudo-glycosylsulfinyl derivatives.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (44). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 50 mg (38%). R_f 0.44 (3:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +79.4$ (c 0.8 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.72 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.7$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 5.49 (t, 1 H, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-4), 5.44 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-2), 5.06 (d, 1 H, H-1), 4.96 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 9.2$ Hz, $J_{5,6b} = 3.8$ Hz, H-5), 4.50 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.2$ Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1 H, H-6b), 2.83 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, SOCH_2), 2.65 (ddd, 1 H, SOCH_2), 2.17-2.01 (2 s, 9 H, MeCO), 1.72-1.23 (m, 12 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.2-169.5 (MeCO), 157.2 (CO), 68.8-68.6 (C-3, C-4), 66.9-66.7 (C-1, C-2), 63.8 (C-6), 54.2 (C-5), 49.2 (SOCH_2), 31.7-22.6 (CH_2), 20.7 (MeCO), 14.1 (CH_3).

ESIMS: m/z 498.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_9\text{S}$: C, 53.04; H, 6.99; N, 2.95; S, 6.74. Found: C, 53.17; H, 7.20; N, 2.70; S, 6.39.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (45)

Compound **45** was obtained from **44** (25 mg, 0.05 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc). Yield: 15 mg (86%). R_f 0.56 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +34.9$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.87 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, H-1), 4.51 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.6$ Hz, H-6a), 4.42 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-6b), 4.35 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 4.29 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2), 3.99 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 3.88 (t, 1 H, H-4), 3.00-2.82 (m, 2 H, SOCH_2), 1.88-1.70 (m, 2 H, SOCH_2CH_2), 1.58-1.21 (m, 10 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 160.2 (CO), 72.8-72.5 (C-1, C-3), 70.1 (C-4), 67.7 (C-2), 65.4 (C-6), 57.3 (C-5), 51.9 (SOCH_2), 32.9-23.6 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 372.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{S}$: C, 51.56; H, 7.79; N, 4.01; S, 9.18. Found: C, 51.33; H, 7.54; N, 3.79; S, 8.85.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (46). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 54 mg (35%). R_f 0.53 (3:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +68.4$ (c 0.8 in DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.72 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.7$ Hz, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3), 5.49 (t, 1 H, $J_{4,5} = 2.6$ Hz, H-4), 5.45 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-2), 5.05 (d, 1 H, H-1), 4.96 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 9.2$ Hz, $J_{5,6b} = 3.8$ Hz, H-5), 4.50 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.2$ Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1 H, H-6b), 2.84 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, SOCH_2), 2.65 (ddd, 1 H, SOCH_2), 2.17-2.01 (2 s, 9 H, MeCO), 1.78-1.20 (m, 20 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.3-169.5 (MeCO), 157.3 (CO), 68.9-68.7 (C-3, C-4), 67.0-66.8 (C-1, C-2), 63.9 (C-6), 54.2 (C-5), 49.3 (SOCH_2), 32.0-22.8 (CH_2), 20.7 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 554.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_9\text{S}$: C, 56.48; H, 7.77; N, 2.63; S, 6.03. Found: C, 56.63; H, 7.90; N, 2.44; S, 5.79.

(1R)-1-Dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (47).

Compound **47** was obtained from **46** (30 mg, 0.06 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc). Yield: 24 mg (98%). R_f 0.09 (EtOAc). $[\alpha]_D +64.1$ (c 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 4.51 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.6$ Hz, H-6a), 4.42 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-6b), 4.35 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 4.29 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, H-2), 3.99 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 3.88 (t, 1 H, H-4), 3.00-2.82 (m, 2 H, SOCH_2), 1.84-1.73 (m, 2 H, SOCH_2CH_2), 1.58-1.21 (m, 18 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 160.2 (CO), 72.8-72.4 (C-1, C-3), 70.1 (C-4), 67.7 (C-2), 65.5 (C-6), 57.3 (C-5), 51.9 (SOCH_2), 33.0-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 428.2 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{19}H_{35}NO_6S$: C, 56.27; H, 8.70; N, 3.45; S, 7.91. Found: C, 56.16; H, 8.65; N, 3.13; S, 7.60.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (48). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 81 mg (49%). R_f 0.47 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +53.6$ (c 1.0 in DCM).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.61 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.7$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 5.39 (t, 1 H, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-4), 5.33 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-2), 4.95 (d, 1 H, H-1), 4.85 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 9.2$ Hz, $J_{5,6b} = 3.8$ Hz, H-5), 4.39 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.2$ Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1 H, H-6b), 2.74 (ddd, 1 H, $^2J_{H,H} = 13.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 8.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, $SOCH_2$), 2.54 (ddd, 1 H, $SOCH_2$), 2.10-1.87 (2 s, 9 H, MeCO), 1.70-1.06 (m, 28 H, CH_2), 0.76 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 170.3-169.5 (MeCO), 157.3 (CO), 68.8-68.7 (C-3, C-4), 67.0-66.8 (C-1, C-2), 63.9 (C-6), 54.2 (C-5), 49.3 ($SOCH_2$), 32.0-22.6 (CH_2), 20.7 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 610.5 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{29}H_{49}NO_9S$: C, 59.26; H, 8.40; N, 2.38; S 5.45. Found: C, 59.35; H, 8.48; N, 2.25; S 5.31.

(1R)-1-Hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (49). Compound **49** was obtained from **48** (46 mg, 0.08 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 29 mg (79%). R_f 0.55 (1:4 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +29.2$ (c 1.0 in MeOH).

1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 4.85 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.9$ Hz, H-1), 4.50 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.42 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, H-6b), 4.36 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.1$ Hz, H-5), 4.29 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.99 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.1$ Hz, H-3), 3.88 (t, 1 H, H-4), 2.96-2.83 (m, 2 H, $SOCH_2$), 1.88-1.73 (m, 2 H, $SOCH_2CH_2$), 1.55-1.25 (m, 24 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD , 323 K): δ 160.2 (CO), 72.9-72.6 (C-1, C-3), 70.2 (C-4), 67.9 (C-2), 65.4 (C-6), 57.3 (C-5), 52.1 (SOCH₂), 33.0-23.5 (CH₂), 14.3 (CH₃).

ESIMS: m/z 484.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{S}$: C, 59.84; H, 9.39; N, 3.03; S, 6.94. Found: C, 59.56, H, 9.10, N, 2.82, S, 6.68.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (50). Column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 49 mg (37%). R_f 0.36 (3:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +73.9$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.65 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.8$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 5.54 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-2), 5.50 (t, 1 H, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-4), 5.23 (d, 1 H, H-1), 4.42 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.1$ Hz, H-6a), 4.28 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.1$ Hz, H-5), 4.07 (dd, 1 H, H-6b), 2.98 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, SOCH₂), 2.71 (ddd, 1 H, SOCH₂), 2.18-2.02 (3 s, 9 H, MeCO), 1.90-1.20 (m, 12 H, CH₂), 0.88 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.3-169.8 (MeCO), 155.8 (CO), 68.7 (C-3), 68.1 (C-4), 67.4 (C-1), 66.7 (C-2), 63.3 (C-6), 52.8 (C-5), 50.7 (SOCH₂), 31.8-22.6 (CH₂), 20.8-20.7 (MeCO), 14.2 (CH₃).

ESIMS: m/z 498.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_9\text{S}$: C, 53.04; H, 6.99; N, 2.95; S, 6.74. Found: C, 53.23; H, 7.20; N, 2.64; S, 6.51.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (51)

Compound **51** was obtained from **50** (24 mg, 0.05 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc). Yield: 16 mg (92%). R_f 0.62 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +48.3$ (c 0.5 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H-1), 4.52-4.40 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.37 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 4.16 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 8.7$ Hz, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, $J_{4,5} = 2.1$ Hz, H-5), 4.05 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 3.90 (t, 1 H, H-4), 3.10

(ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, SOCH₂), 2.98 (ddd, 1H, SOCH₂), 1.88-1.70 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.57-1.23 (m, 10 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 159.2 (CO), 73.0-72.3 (C-1, C-3), 70.0 (C-4), 69.5 (C-2), 65.3 (C-6), 56.4 (C-5), 50.8 (SOCH₂), 32.8-23.6 (CH₂), 14.3 (CH₃).

ESIMS: m/z 372.2 [M + Na]⁺. Calcd for C₁₅H₂₇NO₆S: C, 51.56; H, 7.79; N, 4.01; S, 9.17. Found: C, 51.27; H, 7.58; N, 3.69; S, 8.77.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (52). Column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 47 mg (32%). R_f 0.47 (3:2 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +75.4 (*c* 1.0 in DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.65 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.8$ Hz, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3), 5.58-5.48 (m, 2 H, H-2, H-4), 5.23 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-1), 4.42 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.29 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.1$ Hz, $J_{4,5} = 1.6$ Hz, H-5), 4.07 (dd, 1 H, H-6b), 2.98 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, SOCH₂), 2.71 (m, 1 H, SOCH₂), 2.18-2.02 (3 s, 9 H, MeCO), 1.90-1.18 (m, 20 H, CH₂), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3-169.5 (MeCO), 157.3 (CO), 68.9 (C-3), 68.7 (C-4), 67.0 (C-1), 66.8 (C-2), 63.9 (C-6), 52.2 (C-5), 49.3 (SOCH₂), 32.0-22.7 (CH₂), 20.7 (MeCO), 14.2 (CH₃).

ESIMS: m/z 554.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₄₁NO₉S: C, 56.48; H, 7.77; N, 2.63; S, 6.03. Found: C, 56.55; H, 7.63; N, 2.31; S, 5.67.

(1R)-1-Octylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (53). Compound **53** was obtained from **52** (29 mg, 0.04 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc). Yield: 14 mg (96%). R_f 0.09 (EtOAc). [α]_D +65.0 (*c* 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.96 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H-1), 4.50-4.40 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.37 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 4.16 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 8.7$ Hz, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 4.05 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 3.90 (t, 1 H, H-4), 3.12 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, SOCH_2), 2.98 (ddd, 1H, SOCH_2), 1.87-1.70 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.60-1.21 (m, 18 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.2 (CO), 73.1-72.3 (C-1, C-3), 70.0 (C-4), 69.5 (C-2), 65.3 (C-6), 56.5 (C-5), 50.8 (SOCH_2), 33.1-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 428.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}_6\text{S}$: C, 56.27; H, 8.70; N, 3.45; S, 7.91. Found: C, 56.30; H, 8.90; N, 3.17; S, 7.75.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (54). Column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 54 mg (32%). R_f 0.43 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +66.9$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.64 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.8$ Hz, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3), 5.51 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-2), 5.49 (t, 1 H, $J_{4,5} = 2.7$ Hz, H-4), 5.21 (d, 1 H, H-1), 4.41 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.27 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.2$ Hz, H-5), 4.06 (dd, 1 H, H-6b), 2.97 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, SOCH_2), 2.70 (ddd, 1 H, SOCH_2), 2.18-1.98 (3 s, 9 H, MeCO), 1.87-1.16 (m, 28 H, CH_2), 0.85 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.3-169.8 (MeCO), 155.8 (CO), 68.6 (C-3), 68.1 (C-4), 67.3 (C-1), 66.7 (C-2), 63.3 (C-6), 52.8 (C-5), 50.7 (SOCH_2), 32.0-22.5 (CH_2), 20.8-20.6 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 610.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_9\text{S}$: C, 59.26; H, 8.40; N, 2.38; S, 5.45. Found: C, 59.41; H, 8.53; N, 2.17; S, 5.19.

(1R)-1-Hexadecylsulfinyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (55). Compound **55** was obtained from **54** (31 mg, 0.05 mmol) by conventional *O*-

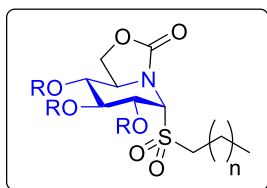
deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 20 mg (87%). R_f 0.60 (1:4 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D^{25} +42.3$ (c 0.10 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.96 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H-1), 4.51-4.40 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.36 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 4.16 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 9.0$ Hz, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, $J_{4,5} = 2.2$ Hz, H-5), 4.05 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-3), 3.89 (t, 1 H, H-4), 3.12 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, SOCH_2), 2.97 (ddd, 1H, SOCH_2), 1.87-1.70 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.56-1.23 (m, 26 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.3 (CO), 73.1-72.3 (C-1, C-3), 70.1-69.6 (C-4, C-2), 65.3 (C-6), 56.5 (C-5), 50.8 (SOCH_2), 33.0-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 484.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{S}$: C, 59.84; H, 9.39; N, 3.03; S, 6.94. Found: C, 59.50, H, 9.09, N, 2.77, S, 6.63.

Preparation of pseudo-glycosylsulfonyl derivatives of ONJ.



- 56**, R = Ac, n = 6
57, R = H, n = 6
58, R = Ac, n = 10
59, R = H, n = 10
60, R = Ac, n = 14
61, R = H, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-glycosylsulfonyl derivatives from pseudo-glycosulfide precursors of ONJ. To a solution of the corresponding pseudo-S-glycoside (**139**, **141** and **8**) (51 mg, 0.09 mmol) in DCM (3 mL), *m*CPBA (70%, 31 mg, 0.18 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 20 min,

diluted with DCM (50 mL), washed with aqueous NaHCO₃ (10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography using the solvent indicated in each case yielded the peracetylated pseudo-glycosylsulfonyl derivatives.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin

(56). Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 40 mg (90%). R_f 0.56 (1:1 EtOAc-cyclohexane). [α]_D +26.6 (*c* 0.8 in DCM).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.83 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.0 Hz, H-3), 5.36 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 6.7 Hz, H-1), 5.23 (dd, 1 H, H-2), 4.94 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 9.0 Hz, H-4), 4.50-4.43 (m, 1 H, H-6a), 4.36-4.29 (m, 2 H, H-6b, H-5), 3.02-2.89 (m, 2 H, SO₂CH₂), 2.06-1.98 (3 s, 9 H, MeCO), 1.86-1.67 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.38-1.15 (m, 10 H, CH₂), 0.81 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.1-169.1 (CO ester), 155.5 (CO carbamate), 71.8 (C-4), 68.9 (C-3), 68.1 (C-2), 66.8 (C-6), 65.6 (C-1), 52.9 (SO₂CH₂), 52.7 (C-5), 31.6-21.1 (CH₂), 20.6-20.5 (MeCO), 14.0 (CH₃).

ESIMS: *m/z* 514.1 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃NO₁₀S: C, 51.31; H, 6.77; N, 2.85; S, 6.52. Found: C, 51.23; H, 6.64; N, 2.71; S, 6.49.

(1R)-1-Octylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (57). Compound **57**

was obtained by conventional *O*-deacetylation of **56** (37 mg, 0.07 mmol) followed by purification by column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 23 mg (90%). R_f 0.31 (EtOAc). [α]_D +30.1 (*c* 0.6 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.12 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 6.5 Hz, H-1), 4.63 (t, 1 H, *J*_{5,6a} = *J*_{6a,6b} = 8.8 Hz, H-6a), 4.28 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 6.2 Hz, H-6b), 4.14 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.5 Hz, H-3), 4.03 (td, 1 H, *J*_{4,5} = 9.5 Hz, H-5), 3.82 (dd, 1 H, H-2), 3.40-3.32 (m, 3 H, H-4, SO₂CH₂), 1.85 (quint., 2 H, *J*_{H,H} = 7.5 Hz, SO₂CH₂CH₂), 1.50-1.25 (m, 10 H, CH₂), 0.91 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ 158.4 (CO), 75.4 (C-4), 74.1 (C-3), 72.0 (C-1), 71.9 (C-2), 68.7 (C-6), 56.5 (C-5), 56.3 (SO_2CH_2), 32.9-22.5 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 388.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{S}$: C, 49.30; H, 7.45; N, 3.83; S, 8.77. Found: C, 49.04; H, 7.20; N, 3.56; S, 8.44.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-dodecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (58). Column chromatography (1:4 EtOAc-cyclohexane). Yield: 40 mg (81%). R_f 0.50 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +32.6$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.83 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.37 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.7$ Hz, H-1), 5.23 (dd, 1 H, H-2), 4.94 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 4.44-4.50 (m, 1 H, H-6a), 4.37-4.29 (m, 2 H, H-6b, H-5), 2.98 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, SO_2CH_2), 2.93 (ddd, 1 H, SO_2CH_2), 2.07-1.98 (3 s, 9 H, MeCO), 1.87-1.67 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.38-1.14 (m, 18 H, CH_2), 0.81 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.2-169.1 (CO ester), 155.5 (CO carbamate), 71.8 (C-4), 68.9 (C-3), 68.1 (C-2), 66.8 (C-6), 65.6 (C-1), 52.9 (SO_2CH_2), 52.7 (C-5), 31.9-21.1 (CH_2), 20.6-20.5 (MeCO), 14.1 (CH_3).

ESIMS: m/z 570.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRFABMS Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_{10}\text{SNa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 570.2349, found 570.2369.

(1R)-1-Dodecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (59). Compound **59** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **58** (33 mg, 0.06 mmol) followed by purification by column chromatography (15:1 EtOAc-MeOH). Yield: 21 mg (83%). R_f 0.56 (9:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +13.5$ (c 1.0 in DMSO).

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 4.94 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.4$ Hz, H-1), 4.57 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.15 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.1$ Hz, H-6b), 3.92 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 3.84-3.78 (m, 1 H, H-5), 3.77 (dd, 1 H, H-2), 3.40-3.20 (m, 3 H, H-4, SO_2CH_2), 1.75-1.65 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.40-1.20 (m, 18 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ 155.6 (CO), 73.6 (C-4), 71.9 (C-3), 70.6 (C-1), 70.1 (C-2), 66.8 (C-6), 54.7 (C-5), 54.4 (SO₂CH₂), 31.3-23.0 (CH₂), 13.9 (CH₃).

ESIMS: m/z 444.3 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₃₅NO₇S: C, 54.13; H, 8.37; N, 3.32; S, 7.61. Found: C, 53.81; H, 8.15; N, 3.01; S, 7.36.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidene-nojirimycin (60). Column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 45 mg (84%). R_f 0.50 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+35.2}$ (c 1.2 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.88 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.42 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.6$ Hz, H-1), 5.27 (dd, 1 H, H-2), 4.98 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 4.58-4.47 (m, 1 H, H-6a), 4.44-4.33 (m, 2 H, H-6b, H-5), 3.10-2.90 (m, 2 H, SO₂CH₂), 2.12-2.03 (3 s, 9 H, MeCO), 1.93-1.70 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.46-1.17 (m, 26 H, CH₂), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.1-169.1 (MeCO), 155.5 (CO), 71.8 (C-4), 68.8 (C-3), 68.1 (C-2), 66.8 (C-6), 65.5 (C-1), 52.9-52.7 (SO₂CH₂, C-5), 31.9-21.1 (CH₂), 20.6-20.5 (MeCO), 14.1 (CH₃).

ESIMS: m/z 626.6 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₉H₄₉NO₁₀S: C, 57.69; H, 8.18; N, 2.32; S, 5.31. Found: C, 57.73; H, 8.25; N, 2.19; S, 5.11.

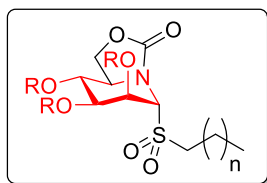
(1R)-1-Hexadecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidene-nojirimycin (61). Compound **61** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **60** (30 mg, 0.05 mmol) followed by purification by column chromatography (9:1 EtOAc-MeOH). Yield: 23 mg (96%). R_f 0.48 (9:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{+38.2}$ (c 0.7 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 5.12 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.6$ Hz, H-1), 4.63 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.29 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.3$ Hz, H-6b), 4.14 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 4.10-3.98 (m, 1 H, H-5), 3.92 (dd, 1 H, H-2), 3.40-3.31 (m, 3 H, H-4, SO₂CH₂), 1.92-1.78 (m, 2 H, SO₂CH₂CH₂), 1.50-1.20 (m, 26 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 155.7 (CO), 73.6 (C-4), 71.9 (C-3), 70.6 (C-1), 70.1 (C-2), 66.8 (C-6), 54.7 (C-5), 54.5 (SO_2CH_2), 31.3-21.0 (CH_2), 14.0 (CH_3).

ESIMS: m/z 500.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_7\text{S}$: C, 57.83; H, 9.07; N, 2.93; S, 6.71. Found: C, 57.58; H, 8.91; N, 2.69; S, 6.48.

Preparation of pseudo-glycosylsulfonyl derivatives of OMJ.



- 62**, R = Ac, n = 6
63, R = H, n = 6
64, R = Ac, n = 10
65, R = H, n = 10
66, R = Ac, n = 14
67, R = H, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-glycosylsulfonyl derivatives from pseudo-glycosylsulfide precursors of OMJ. To a solution of the corresponding pseudo-S-glycoside (**143**, **10** and **12**) (0.11 mmol) in DCM (3 mL), *m*CPBA (70%, 36 mg, 0.22 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 20 min, diluted with DCM (50 mL), washed with aqueous NaHCO_3 (10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography using the solvent indicated in each case yielded the peracetylated pseudo-glycosylsulfonyl derivatives.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (62). Column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane). Yield: 34 mg (89%). R_f 0.47 (EtOAc). $[\alpha]_D$ -7.45 (*c* 1.2 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.92 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 2.6$ Hz, H-2), 5.53 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3), 5.21 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4), 5.00 (d, 1 H, H-1), 4.59-4.47 (m, 1 H, H-6a), 4.45-4.34 (m, 2 H, H-5, H-6b), 3.19-2.99 (m, 2 H, SO_2CH_2), 2.15-1.99 (3 s, 9 H, MeCO), 1.94-1.80 (m, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.48-1.19 (m, 10 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.4-169.2 (MeCO), 156.6 (CO), 69.4 (C-1), 69.0 (C-4), 68.9 (C-3), 67.2 (C-6), 65.0 (C-2), 54.1 (C-5), 52.2 (CH_2SO_2), 31.8-21.6 (CH_2), 20.8-20.6 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 514.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_{10}\text{S}$: C, 51.31; H, 6.77; N, 2.85; S, 6.52. Found: C, 51.45; H, 6.86; N, 2.71; S, 6.36.

(1R)-1-Octylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (63).

Compound **63** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **62** (30 mg, 0.06 mmol) followed by purification by column chromatography (1:1 \rightarrow 3:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 14 mg (64%). R_f 0.47 (EtOAc). $[\alpha]_D^{+14.9}$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 5.02 (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1), 4.65-4.59 (m, 2 H, H-2, H-6a), 4.36 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 8.8$ Hz, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.08 (td, 1 H, $J_{4,5} = J_{5,6a} = 9.6$ Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-3), 3.72 (t, 1 H, H-4), 3.25-3.05 (m, 2 H, SO_2CH_2), 1.89-1.75 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.48-1.29 (m, 10 H, CH_2), 0.91 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.4 (CO), 74.0 (C-1), 72.9 (C-3), 70.7 (C-4), 68.6 (C-6), 66.9 (C-2), 57.0 (C-5), 52.0 (CH_2SO_2), 32.9-22.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 388.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{S}$: C, 49.30; H, 7.45; N, 3.83; S, 8.77. Found: C, 49.11; H, 7.24; N, 3.51; S, 8.49.

(1R)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-dodecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (64). Column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane). Yield: 41 mg (71%). R_f 0.66 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{-6.5}$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.93 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 2.6$ Hz, H-2), 5.54 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.21 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 5.06 (d, 1 H, H-1), 4.56-4.49 (m, 1 H, H-6a), 4.43-4.37 (m, 2 H, H-5, H-6b), 3.17-2.99 (m, 2 H, SO_2CH_2), 2.13-2.02 (3 s, 9 H, MeCO), 1.95-1.78 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.46-1.19 (m, 18 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.4-169.2 (MeCO), 156.6 (CO), 69.4 (C-1), 69.0 (C-4), 68.9 (C-3), 67.2 (C-6), 65.0 (C-2), 54.1 (C-5), 52.2 (CH_2SO_2), 32.0-21.7 (CH_2), 20.8-20.6 (MeCO), 14.2 (CH_3).

ESIMS: m/z 570.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_{10}\text{S}$: C, 54.83; H, 7.55; N, 2.56; S, 5.85. Found: C, 55.01; H, 7.69; N, 2.29; S, 5.62.

(1R)-1-Dodecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (65).

Compound **65** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **64** (40 mg, 0.07 mmol) followed by purification by column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc). Yield: 18 mg (59%). R_f 0.20 (EtOAc). $[\alpha]_D^{+23.2}$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 5.03 (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1), 4.65-4.59 (m, 2 H, H-2, H-6a), 4.36 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.08 (td, 1 H, $J_{4,5} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-3), 3.73 (t, 1 H, H-4), 3.25-3.06 (m, 2 H, SO_2CH_2), 1.89-1.73 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.47-1.26 (m, 18 H, CH_2), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.5 (CO), 74.0 (C-1), 73.0 (C-3), 70.7 (C-4), 68.6 (C-6), 66.9 (C-2), 57.0 (C-5), 52.0 (CH_2SO_2), 32.0-22.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 444.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}_7\text{S}$: C, 54.14; H, 8.37; N, 3.32; S, 7.61. Found: C, 53.88; H, 8.12; N, 3.04; S, 7.32.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hexadecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (66). Column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane). Yield: 62 mg (84%). R_f 0.54 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D -11.8$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.93 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 2.2$ Hz, H-2), 5.53 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3), 5.21 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 5.05 (d, 1 H, H-1), 4.56-4.49 (m, 1 H, H-6a), 4.43-4.35 (m, 2 H, H-5, H-6b), 3.16-2.99 (m, 2 H, SO_2CH_2), 2.12-2.01 (3 s, 9 H, MeCO), 1.92-1.80 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.43-1.18 (m, 26 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.2-169.0 (MeCO), 156.4 (CO), 69.2 (C-1), 68.8 (C-4), 68.7 (C-3), 67.0 (C-6), 64.8 (C-2), 53.9 (C-5), 52.0 (CH_2SO_2), 31.8-21.5 (CH_2), 20.5-20.4 (MeCO), 14.0 (CH_3).

ESIMS: m/z 626.57 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{NO}_{10}\text{S}$: C, 57.69; H, 8.18; N, 2.32; S, 5.31. Found: C, 57.81; H, 8.34; N, 2.18; S, 5.03.

(1R)-1-Hexadecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (67).

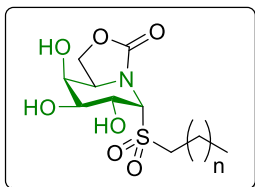
Compound **67** was obtained by conventional *O*-deacetylation of **66** (56 mg, 0.09 mmol) followed by purification by column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 4:1 EtOAc-MeOH). Yield: 25 mg (58%). R_f 0.65 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_{\text{D}} -5.57$ (c 0.7 in MeOH).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 5.02 (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H-1), 4.64-4.58 (m, 2 H, H-2, H-6a), 4.36 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.08 (td, 1 H, $J_{4,5} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-3), 3.73 (t, 1 H, H-4), 3.23-3.08 (m, 2 H, SO_2CH_2), 1.89-1.74 (m, 2 H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.45-1.24 (m, 26 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 159.5 (CO), 74.0 (C-1), 73.0 (C-3), 70.7 (C-4), 68.7 (C-6), 66.9 (C-2), 57.0 (C-5), 52.0 (CH_2SO_2), 33.1-22.8 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 500.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_7\text{S}$: C, 57.84; H, 9.07; N, 2.93; S, 6.71. Found: C, 57.59; H, 8.81; N, 2.61; S, 6.46.

Preparation pseudo-glycosylsulfonyl derivatives of OGJ.



68, n = 6
69, n = 10
70, n = 14

General procedure for the preparation of pseudo-glycosylsulfonyl derivatives from pseudo-glycosylsulfide precursors of OGJ. To a solution of the corresponding pseudo-S-glycoside (**14**, **16** and **18**) (0.11 mmol) in DCM (3 mL), *m*CPBA (70%, 38 mg, 0.22 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 20 min, diluted with DCM (50 mL), washed with aqueous NaHCO₃ (10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was *O*-deacetylated following the procedure described in general methods. Purification by column chromatography using the solvent indicated in each case yielded the corresponding deprotected pseudo-glycosylsulfonyl derivatives.

(1R)-1-Octylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (68). Column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → 3:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 23 mg (57% global yield). *R*_f 0.65 (6:1 EtOAc-MeOH). [α]_D +12.5 (*c* 1.0 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.16 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.9 Hz, H-1), 4.50 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 8.6 Hz, H-6a), 4.43 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 5.3 Hz, H-6b), 4.32 (ddd, 1 H, *J*_{4,5} = 1.8 Hz, H-5), 4.28-4.23 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.88 (t, 1 H, *J*_{3,4} = 1.8 Hz, H-4), 3.40-3.33 (m, 2 H, SO₂CH₂), 1.85 (m, 2 H, ³*J*_{H,H} = 7.5 Hz, SO₂CH₂CH₂), 1.50-1.25 (m, 10 H, CH₂), 0.91 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ 159.3 (CO), 72.4 (C-1), 70.7 (C-2), 70.2 (C-4), 67.8 (C-3), 65.4 (C-6), 56.3 (C-5, CH₂SO₂), 32.9-22.6 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 388.2 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{15}H_{27}NO_7S$: C, 49.30; H, 7.45; N, 3.83; S, 8.77. Found: C, 48.97; H, 7.38; N, 3.57; S, 8.41.

(1R)-1-Dodecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (69).

Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc). Yield: 22 mg (47% global yield). R_f 0.20 (EtOAc). $[\alpha]_D^{+23.2}$ (c 1.0 in MeOH).

1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 5.16 (d, 1 H, $J_{1,2} = 6.0$ Hz, H-1), 4.50 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.42 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, H-6b), 4.31 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 1.7$ Hz, H-5), 4.28-4.24 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.88 (t, 1 H, $J_{3,4} = 1.7$ Hz, H-4), 3.39-3.34 (m, 2 H, SO_2CH_2), 1.84 (m, 2 H, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, $SO_2CH_2CH_2$), 1.48-1.29 (m, 18 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.2 (CO), 72.3 (C-1), 70.7 (C-2), 70.2 (C-4), 67.8 (C-3), 65.4 (C-6), 56.3 (C-5, CH_2SO_2), 33.0-22.5 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 444.2 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{19}H_{35}NO_7S$: C, 54.14; H, 8.37; N, 3.32; S, 7.61. Found: C, 53.90; H, 8.18; N, 3.11; S, 7.28.

(1R)-1-Hexadecylsulfonyl-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (70).

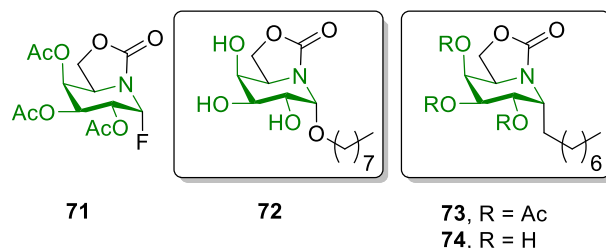
Column chromatography (4:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 4:1 EtOAc-MeOH). Yield: 37 mg (70% global yield). R_f 0.65 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{-8.9}$ (c 1.0 in MeOH).

1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 5.15 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.6$ Hz, H-1), 4.49 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.8$ Hz, H-6a), 4.43 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.3$ Hz, H-6b), 4.32 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.1$ Hz, H-5), 4.28-4.24 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.88 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.1$ Hz, H-4), 3.38-3.30 (m, 2 H, SO_2CH_2), 1.85 (m., 2 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, $SO_2CH_2CH_2$), 1.49-1.25 (m, 26 H, CH_2), 0.89 (t, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 159.3 (CO), 72.5 (C-1), 70.8 (C-2), 70.2 (C-4), 68.0 (C-3), 65.4 (C-6), 56.4-56.3 (C-5, CH_2SO_2), 33.0-22.6 (CH_2), 14.3 (CH_3).

ESIMS: m/z 500.4 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{23}H_{43}NO_7S$: C, 57.84; H, 9.07; N, 2.93; S, 6.71. Found: C, 57.58; H, 8.81; N, 2.64; S, 6.47.

Preparation of pseudo-*O*- and *C*-glycoside derivatives of OGJ.



(1R)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-deoxy-1-fluoro-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxygalactonojirimycin (71). 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidene-1-deoxygalactonojirimycin (**138**) (166 mg, 0.45 mmol) was placed in a polyethylene vessel cooled at -40 °C and treated with poly(hydrogen fluoride)pyridinium complex (70% HF; 0.9 mL). The reaction mixture was stirred at this temperature for 90 min (TLC monitoring), diluted with Et_2O (20 mL), washed with saturated aq KF (15 mL) and extracted with Et_2O (3 x 30 mL). The organic layer was washed with saturated aq $NaHCO_3$ (10 mL), dried and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 124 mg (84%). R_f 0.62 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+25} +75.1$ (c 1.0 in DCM).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6.19 (dd, 1 H, $J_{1,F} = 51.6$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 5.51 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-4), 5.35 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.8$ Hz, H-3), 5.19 (ddd, 1 H, $J_{2,F} = 22.4$ Hz, H-2), 4.44 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.8$ Hz, H-6a), 4.41-4.35 (m, 1 H, H-5), 4.02 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.0$ Hz, H-6b), 2.18-2.02 (3 s, 9 H, MeCO).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.1-169.8 (MeCO), 154.3 (CO), 88.1 (C-1, d, $J_{\text{C1,F}} = 208.7$ Hz), 67.8 (C-3), 67.0 (C-4), 66.7 (C-2, d, $J_{\text{C2,F}} = 24.6$ Hz), 63.0 (C-6), 50.8 (C-5), 20.6-20.5 (MeCO).

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -166.3 (dd, $^2J_{\text{F,H}} = 51.5$ Hz, $^3J_{\text{F,H}} = 23.7$ Hz, F).

ESIMS: m/z 356.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_8\text{F}$: C, 46.85; H, 4.84; N, 4.20. Found: C, 46.91; H, 4.90; N, 4.11.

(1R)-1-O-octyl-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (72). To a stirred solution of the 1-fluoro-derivative **71** (40 mg, 0.12 mmol) in anhydrous DCM (1.2 mL) at 0 °C, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (8 μL) and 1-octanol (19 μL) were added, under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 2 h. A saturated solution of NaHCO_3 (10 mL) was added and extracted with DCM (50 mL), dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure. Compound **72** was obtained from the crude mixture by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Yield: 25 mg (42% global yield). R_f 0.61 (5:1 EtOAc-MeOH); $[\alpha]_{\text{D}} +54.9$ (c 1.0 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 5.05 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.2$ Hz, H-1), 4.41 (d, 2 H, $J_{5,6} = 7.5$ Hz, H-6a, H-6b), 4.03 (td, 1 H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 3.84 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.0$ Hz, H-4), 3.80-3.75 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.62-3.42 (m, 2 H, CH_2O), 1.70-1.55 (m, 2 H, CH_2), 1.45-1.20 (m, 10 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3);

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 159.5 (CO), 83.3 (C-1), 71.4, 69.2 (C-2, C-3), 70.5 (C-4), 69.7 (CH_2O), 65.1 (C-6), 54.4 (C-5), 33.0-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3);

ESIMS: m/z 340.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_6$: C, 56.77; H, 8.57; N, 4.41. Found: C, 56.46; H, 8.28; N, 4.09.

(1R)-2,3,4-Tri-O-acetyl-1-octyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxygalactonojirimycin (73). A solution of the corresponding 1-fluoro-derivative **71** (61 mg, 0.18 mmol) in dry toluene (2.0 mL) under nitrogen atmosphere was cooled to 0 °C. Then, trioctylaluminum (0.8 mL, 0.33 mmol) was added and the reaction mixture was

stirred for 2 h. A saturated solution of NH_4Cl (5 mL) was added and extracted with EtOAc (3 x 10 mL), dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure. (α : β anomers, 6:1 ratio, H-1 integration). Column chromatography (1:3 EtOAc-cyclohexane). The α -anomer was purified by HPLC following the procedure described in general methods (1:2 EtOAc-cyclohexane). Retention time: 8 min. Yield: 52 mg (67%). R_f 0.54 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +49.5$ (c 0.8 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.39 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.3$ Hz, Hz, H-4), 5.31 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.9$ Hz, $J_{1,2} = 6.3$ Hz, H-2), 5.13 (dd, 1 H, H-3), 4.35 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.8$ Hz, H-6a), 4.42-4.30 (m, 1 H, H-1), 4.07-4.00 (m, 2 H, H-5, H-6b), 2.18-2.00 (3 s, 9 H, MeCO), 1.70-1.20 (m, 14 H, CH_2), 0.88 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.5-169.4 (MeCO), 156.8 (CO), 69.1 (C-4), 68.5 (C-3), 66.7 (C-2), 62.7 (C-6), 51.3-51.1 (C-1, C-5), 31.8-22.7 (CH_2), 20.8-20.6 (MeCO), 14.1 (CH_3).

ESIMS: m/z 450.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRFABMS Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{NO}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 428.2284, found 428.2288.

(1R)-1-Octyl-5N,6O-oxomethylidene-1-deoxygalactonojirimycin (74).

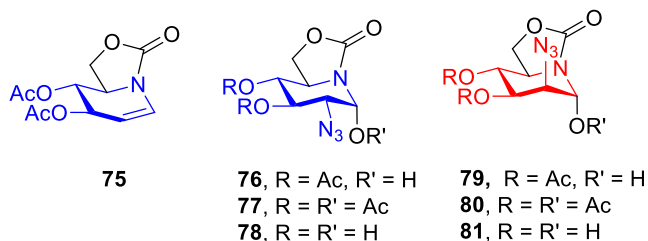
Compound **74** was obtained from **73** (32 mg, 0.08 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Yield: 22 mg (93%). R_f 0.75 (9:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +23.0$ (c 0.7 in MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 4.40 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, H-6a), 4.35 (t, 1 H, $J_{5,6b} = 9.0$ Hz, H-6b), 3.99-3.88 (m, 3 H, H-1, H-2, H-5), 3.77 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-4), 3.60 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-3), 1.50-1.20 (m, 14 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 160.5 (CO), 71.5 (C-3), 71.2 (C-4), 68.2 (C-2), 64.8 (C-6), 55.5 (C-1), 54.6 (C-5), 33.0-23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 324.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRFABMS Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 324.1787, found 324.1792.

Preparation of 2-azido-2-deoxy-D-gluco, D-manno and D-galacto sp^2 -iminosugar mimics.



3,4-Di-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylideneojirimycin glucal analogue (75). To a solution of (1*R*)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylideneojirimycin (**136**) (1.16 g, 3.11 mmol) in anhydrous DCM (5 mL), HBr/AcOH (33%, 2.0 mL) were dropwise added at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 15 min, diluted with DCM (50 mL) and washed with saturated aq NaHCO₃ (10 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure to yield the corresponding 1-bromo derivative. This product was used without further purification in the next step. A mixture of Cp₂TiCl₂ (774 mg, 3.11 mmol) and Mn dust (445 mg, 8.1 mmol) in deoxygenated THF (10 mL) was stirred under Ar atmosphere at rt until the red solution turned green. Then, the pseudoglycosyl bromide derivative (1.22 g, 3.11 mmol) in deoxygenated THF (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 40 min. The solvent was removed under reduced pressure and the residue diluted with EtOAc (60 mL), quenched with 1N HCl (2 x 10 mL), washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated. The resulting crude was purified by column chromatography (1:3 → 1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 682 mg (86% global yield). R_f 0.42 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D -31.8$ (c 1.0 in DCM).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.67 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $J_{1,3} = 2.0$ Hz, H-1), 5.63 (dt, 1 H, $J_{3,4} = 7.5$ Hz, $J_{2,3} = 2.5$ Hz, H-3), 5.16 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 10.5$ Hz, H-4), 4.93 (dd, 1 H, H-2), 4.49 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.0$ Hz, H-6a), 4.25 (t, 1 H, $J_{5,6b} = 9.0$ Hz, H-6b), 4.16 (bq, 1 H, H-5), 2.08-2.05 (2 s, 6 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.5-170.1 (CO ester), 153.0 (CO carbamate), 123.4 (C-1), 105.8 (C-2), 71.0 (C-4), 70.1 (C-3), 67.0 (C-6), 53.9 (C-5), 20.8-20.6 (MeCO).

ESIMS: m/z 278.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_6$: C, 51.77; H, 5.13; N, 5.49. Found: C, 51.89; H, 5.33; N, 5.40.

(1R)-3,4-Di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin

(76). A solution of the glucal analogue **75** (378 mg, 1.48 mmol) in MeCN (10 mL) was added, under Ar atmosphere at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, to a mixture of NaN_3 (144 mg, 2.22 mmol) and ceric ammonium nitrate (CAN) (2.43 g, 4.44 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 under reduced pressure. Purification by column chromatography yielded the corresponding 2-azido derivatives **76** and **79** (ratio 1.5:1, H-1 and H-4 integration).

Column chromatography (1:3 \rightarrow 1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 162 mg (35%). R_f 0.42 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +38.5$ (c 1.0 in DCM). IR: ν 2101 (N_3) cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.62 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), 5.57 (t, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 4.93 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.43 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6a} = 7.8$ Hz, H-6a), 4.27-4.08 (m, 2 H, H-5, H-6b), 3.51 (dd, 1 H, H-2), 2.13-2.08 (2 s, 6 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.2-169.7 (CO ester), 155.4 (CO carbamate), 74.4 (C-1), 72.6 (C-4), 69.9 (C-3), 66.8 (C-6), 61.9 (C-2), 51.8 (C-5), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 337.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 42.04; H, 4.49; N, 17.83. Found: C, 42.04; H, 4.44; N, 17.51.

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

mannonojirimycin (79). Column chromatography (1:3 \rightarrow 1:2 EtOAc-cyclohexane).

Yield: 108 mg (23%). R_f 0.36 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +12.7$ (c 1.1 in DCM). IR: ν_{\max} 2110 (N_3) cm^{-1} .

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.51 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, H-3), 5.42 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1), 5.18 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 4.41 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.30 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.5$ Hz, H-6b), 4.18 (t, 1 H, H-2), 4.13-4.01 (m, 1 H, H-5), 2.12-2.07 (2 s, 6 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 170.3-169.7 (CO ester), 156.4 (CO carbamate), 75.4 (C-1), 70.2 (C-3, C-4), 67.2 (C-6), 62.1 (C-2), 52.6 (C-5), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 337.0 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{11}H_{14}N_4O_7$: C, 42.04; H, 4.49; N, 17.83. Found: C, 42.38; H, 4.58; N, 17.54.

(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin

(77). Compound **77** was obtained from **76** (100 mg, 0.32 mmol) by conventional acetylation following the procedure described in general methods. The resulting residue was purified by column chromatography (1:2 \rightarrow 2:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 97 mg (86%). R_f 0.61 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +48.6$ (c 1.0 in DCM).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.75 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1), 5.44 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 4.98 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.44 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.3$ Hz, $J_{5,6a} = 8.1$ Hz, H-6a), 4.25 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.6$ Hz, H-6b), 4.01 (ddd, 1 H, H-5), 3.73 (dd, 1 H, H-2), 2.17-2.08 (3 s, 9 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 169.9-168.1 (CO ester), 154.0 (CO carbamate), 73.0 (C-1), 72.1 (C-4), 70.3 (C-3), 66.3 (C-6), 60.8 (C-2), 52.3 (C-5), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 379.0 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{13}H_{16}N_4O_8$: C, 43.82; H, 4.53; N, 15.73. Found: C, 44.18; H, 4.55; N, 15.63.

(1R)-2-Azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (78). Compound **78** was obtained from **76** (36 mg, 0.11 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the

procedure described in general methods. Yield: 20 mg (76%). R_f 0.59 (EtOAc). $[\alpha]_D^{25} +33.1$ (c 0.8 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 5.37 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1), 4.52 (t, 1H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.22 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.6$ Hz, H-6b), 3.91-3.81 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.37 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-4), 3.17 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 157.8 (CO), 76.2-76.0 (C-1, C-4), 72.6 (C-3), 68.4 (C-6), 65.1 (C-2), 54.7 (C-5).

ESIMS: m/z 252.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRESIMS Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 253.0543, found 253.0536.

(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (80). Compound **80** was obtained from **79** (100 mg, 0.32 mmol) by conventional acetylation following the procedure described in general methods. Yield: 97 mg (86%). R_f 0.38 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +33.0$ (c 1.0 in DCM).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.33 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1), 5.35 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, H-3), 5.23 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 4.42 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.31 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.0$ Hz, H-6b), 4.16 (t, 1 H, H-2), 3.94 (bq, 1 H, H-5), 2.13-2.07 (3 s, 9 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 170.0-168.4 (CO ester), 154.8 (CO carbamate), 75.5 (C-1), 70.0-69.4 (C-3, C-4), 66.7 (C-6), 60.4 (C-2), 53.3 (C-5), 20.7-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 379.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. 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, 44.03; H, 4.49; N, 15.48.

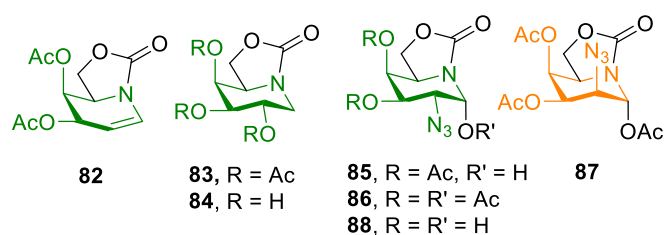
(1R)-2-Azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (81). Compound **81** was obtained from **79** (45 mg, 0.12 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Yield: 32 mg (97%). R_f 0.59 (EtOAc). $[\alpha]_D^{25} +27.8$ (c 0.9 in MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 5.27 (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, H-1), 4.50 (t, 1H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.4$ Hz, H-6a), 4.25 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, H-6b), 4.02-3.96 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.79 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, H-5), 3.62 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-4).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 158.5 (CO), 77.1 (C-1), 72.2 (C-4), 72.0 (C-3), 68.2 (C-6), 66.9 (C-2), 55.4 (C-5).

ESIMS: m/z 252.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 36.53; H, 4.38; N, 24.34. Found: C, 36.15; H, 4.06; N, 23.99.

Preparation of 2-azido-2-deoxy-D-galacto sp^2 -iminosugar mimics.



3,4-Di-O-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenogalactonojirimycin galactal analogue (82). To a solution of (1*R*)-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (**138**) (400 mg, 1.07 mmol) in anhydrous DCM (2 mL), HBr/AcOH (33%, 0.7 mL) were dropwise added at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 15 min, diluted with DCM (50 mL) and washed with saturated aq NaHCO_3 (10 mL). The organic layer was dried (MgSO_4) and concentrated under reduced pressure to yield the corresponding 1-bromo derivative. This product was used without further purification in the next step. A mixture of Cp_2TiCl_2 (266 mg, 1.07 mmol) and Mn dust (153 mg, 2.8 mmol) in deoxygenated THF (8 mL) was stirred under Ar atmosphere at rt until the red solution turned green. Then, the pseudoglycosyl bromide derivative in deoxygenated THF (18 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 60 min. The solvent was removed under reduced pressure, the residue diluted with EtOAc (30 mL), quenched with 1N HCl (2 x 10 mL), washed with brine, dried (MgSO_4), filtered and concentrated. The resulting

crude was purified by column chromatography (1:2 → 1:1 EtOAc-cyclohexane) to give **82** and **83**.

Data for compound 82. Yield: 167 mg (61%). R_f 0.38 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +57.6$ (c 1.0 in DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.73 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{1,3} = 2.2$ Hz, H-1), 5.67-5.62 (m, 1 H, H-3), 5.46 (dt, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 4.0$ Hz, $J_{2,4} = 1.7$ Hz, H-4), 4.85 (dt, 1 H, $J_{2,3} = 1.7$ Hz, H-2), 4.48 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.0$ Hz, H-6a), 4.46-4.37 (m, 1 H, H-5), 4.04 (t, 1 H, $J_{5,6b} = 8.0$ Hz, H-6b), 2.15-2.03 (2 s, 6 H, MeCO).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 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 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_6$: C, 51.77; H, 5.13; N, 5.49. Found: C, 51.85; H, 5.28; N, 5.35.

Data for compound 83. Yield: 115 mg (32%). R_f 0.57 (3:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{25} +70.9$ (c 1.0 in DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 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, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 8.7$ 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).

$^{13}\text{C NMR}$ (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.

1-Deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactojirimycin (84). Compound **84** was obtained from **83** (52 mg, 0.16 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Yield: 30 mg (97%). R_f 0.48 (5:1 EtOAc-

MeOH). $[\alpha]_D +34.8$ (*c* 1.0 in H₂O).

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 4.51 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.39 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-6b), 4.09 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.2$ Hz, H-5), 4.00 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-4), 3.94 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 12.7$ Hz, $J_{1a,2} = 6.2$ Hz, H-1a), 3.83 (td, 1 H, $J_{1b,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.61 (dd, 1 H, H-3), 2.85 (dd, 1 H, H-1b).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O): δ 159.1 (CO), 73.7 (C-3), 69.1 (C-4), 65.1 (C-2), 64.0 (C-6), 56.7 (C-5), 44.1 (C-1).

ESIMS: *m/z* 212.2 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₇H₁₁NO₅: C, 44.45; H, 5.86; N, 7.40. Found: C, 44.25; H, 5.73; N, 7.14.

3,4-Di-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactojirimycin (**85**).

A solution of the galactal analogue **82** (245 mg, 0.96 mmol) in MeCN (17 mL) was added, under Ar atmosphere at -20 °C, to a mixture of NaN₃ (94 mg, 1.44 mmol) and CAN (1.58 g, 2.88 mmol). The reaction mixture was stirred at -20 °C for 5 h. Then cold Et₂O (20 mL) and H₂O (10 mL) were added. The organic layer was separated and washed with cold H₂O (2 x 5 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated. Purification by column chromatography yielded the corresponding pure 2-azido derivative of *D*-galacto-configuration **85**. Conventional acetylation of the crude mixture allowed, after purification by column chromatography, to isolate the diastereomeric peracetylated *D*-talo analogue **87**.

Data for compound 85. Yield: 180 mg (60%). *R_f* 0.26 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +62.2$ (*c* 1.0 in DCM). IR: ν 2115 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.65 (bt, 1 H, $J_{1,2} = J_{1,OH} = 3.0$ Hz, H-1), 5.46 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.6$ Hz, H-4), 5.36 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.7$ Hz, H-3), 4.45-4.32 (m, 2 H, H-5, H-6a), 4.22 (bd, 1 H, OH), 4.00 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.4$ Hz, $J_{5,6a} = 10.5$ Hz, H-6b), 3.78 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-2), 2.17-2.07 (2 s, 6 H, MeCO).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.2-170.0 (CO ester), 155.6 (CO carbamate), 74.6 (C-1), 69.2 (C-3), 67.7 (C-4), 63.3 (C-6), 58.0 (C-2), 50.8 (C-5), 20.6 (MeCO).

ESIMS: m/z 337.0 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{11}H_{14}N_4O_7$: C, 42.04; H, 4.49; N, 17.83. Found: C, 41.85; H, 4.30; N, 17.74.

Data for compound 87. Yield: 21 mg (10%). R_f 0.32 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+89.2}$ (c 1.1 in DCM). IR: ν 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)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (86). Compound **86** obtained from **85** (192 mg, 0.61 mmol) by conventional acetylation following the procedure described in general methods. Yield: 185 mg (85%). R_f 0.44 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+75.1}$ (c 1.0 in DCM). IR ν 2119 (N_3) cm^{-1} .

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.74 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, H-1), 5.46 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.1$ Hz, H-4), 5.22 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3), 4.38 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.28 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-5), 4.05 (dd, 1 H, H-6b), 3.98 (dd, 1 H, H-2), 2.20-2.10 (3 s, 9 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1-168.3 (CO ester), 154.4 (CO carbamate), 73.6 (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 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{13}H_{16}N_4O_8$: C, 43.82; H, 4.53; N, 15.73. Found: C, 44.07; H, 4.63; N, 15.49.

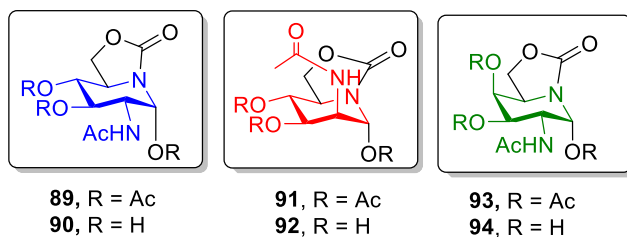
(1R)-2-Azido-2-deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenegalactonojirimycin (88).

Compound **88** was obtained from **85** (49 mg, 0.15 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Yield: 27 mg (76%). R_f 0.36 (EtOAc). $[\alpha]_D^{25} +40.1$ (c 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 5.42 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1), 4.42-4.33 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.17 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 8.4$ Hz, $J_{5,6b} = 6.8$ Hz, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-5), 4.03 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 3.88 (t, 1 H, H-4), 3.49 (dd, 1 H, H-2).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 158.4 (CO), 76.1 (C-1), 70.4 (C-4), 69.5 (C-3), 65.1 (C-6), 61.4 (C-2), 54.1 (C-5).

ESIMS: m/z 253.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 36.53; H, 4.38; N, 24.34. Found: C, 36.24; H, 4.23; N, 24.02.

Preparation of 2-acetamido-2-deoxy-*D*-gluco, *D*-manno and *D*-galacto sp^2 -iminosugar mimics.

General procedure for the reduction-acetylation reaction. To a stirred solution of the corresponding 2-azido-2-deoxy derivative (**77**, **80**, **86**) (69 mg, 0.18 mmol) in THF-AcOH-Ac₂O (5.4 mL, 3:2:1), cooled at 0 °C, Zn (165 mg, 2.55 mmol) and saturated aq CuSO₄ (345 μL) were added. The reaction mixture was stirred for 2 h 30 min, filtered through Celite and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography to yield the 2-acetamido-2-deoxy derivatives **89**, **91** and **93**.

(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-nojirimycin (89). Column chromatography (EtOAc). Yield: 45 mg (68%). R_f 0.31 (EtOAc). $[\alpha]_D^{+53.3}$ (*c* 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 6.47 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1), 5.32 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 5.14 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.50 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6a} = 8.1$ Hz, H-6a), 4.49 (dd, 1 H, H-2), 4.30 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.9$ Hz, H-6b), 4.14 (ddd, 1 H, H-5), 2.18-2.02 (MeCO), 1.92 (NHCOMe).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 173.7 (NHCOMe), 171.8-170.7 (CO ester), 156.5 (CO carbamate), 74.7 (C-1), 73.7 (C-4), 71.1 (C-3), 68.1 (C-6), 53.7 (C-5), 51.8 (C-2), 22.2 (NHCOMe), 20.6-20.4 (MeCO).

ESIMS: m/z 395.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9$: C, 48.39; H, 5.41; N, 7.52. Found: C, 48.46; H, 5.55; N, 7.39.

(1R)-2-Acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-nojirimycin (90). Compound **90** was obtained from **89** (36 mg, 0.09 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (4:1 EtOAc-MeOH). Yield: 21 mg (95%). R_f 0.33 (4:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{+47.6}$ (*c* 1.0 in H_2O).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 5.50 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.67 (t, 1H, $J_{6a,6b} = 8.8$ Hz, H-6a), 4.38 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.0$ Hz, H-6b), 4.02 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-5), 3.96 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, H-2), 3.79 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.64 (t, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, D_2O): δ 174.5 (NHCOMe), 157.5 (CO), 74.0 (C-4), 73.2 (C-1), 70.4 (C-3), 67.6 (C-6), 53.7-53.2 (C-2, C-5).

ESIMS: m/z 268.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 43.90; H, 5.73; N, 11.38. Found: C, 43.57; H, 5.50; N, 11.07.

(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-mannonojirimycin (91). Column chromatography (EtOAc). Yield: 48 mg (71%). R_f 0.34 (EtOAc). $[\alpha]_D -11.1$ (*c* 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 6.19 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.4$ Hz, H-1), 5.30-5.18 (m, 2 H, H-3, H-4), 4.72 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 3.6$ Hz, H-2), 4.55 (t, 1H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.38 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.8$ Hz, H-6b), 4.13 (bq, 1 H, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-5), 2.15-1.99 (4 s, 12 H, NHCOMe , 3 MeCO).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 173.7 (NHCOMe), 171.9-170.1 (CO ester), 157.2 (CO carbamate), 76.7 (C-1), 70.9-70.4 (C-3, C-4), 68.7 (C-6), 54.4 (C-5), 50.1 (C-2), 22.3 (NHCOMe), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 394.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9$: C, 48.39; H, 5.41; N, 7.52. Found: C, 48.50; H, 5.60; N, 7.42.

(1R)-2-Acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (92). Compound **92** was obtained from **91** (36 mg, 0.09 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 29 mg (91%). R_f 0.25 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D -9.6$ (*c* 1.3 in H_2O).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 5.29 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.1$ Hz, H-1), 4.70 (t, 1H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.44 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 4.5$ Hz, H-2), 4.39 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.9$ Hz, H-6b), 4.09 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 4.07-3.98 (m, 1 H, H-5), 3.78 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 2.06 (s, 3 H, NHCOMe).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, D_2O): δ 175.0 (NHCOMe), 158.1 (CO), 75.7 (C-1), 70.8 (C-4), 68.5 (C-3), 67.7 (C-6), 53.4 (C-2, C-5), 21.9 (NHCOMe).

ESIMS: m/z 268.8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 43.90; H, 5.73; N, 11.38. Found: C, 43.65; H, 5.59; N, 11.13.

(1R)-1,3,4-Tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (93). Column chromatography (9:1 EtOAc-MeOH). Yield: 51 mg (76%). R_f 0.51 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +72.1$ (c 1.0 in acetone).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 6.63 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 5.50 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.2$ Hz, H-4), 5.18 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.8$ Hz, H-3), 4.62-4.49 (m, 2 H, H-5, H-2), 4.45 (dd, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.12 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-6b), 2.16-1.94 (3 s, 9 H, MeCO), 1.85 (s, 3 H, NHCOMe).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 170.9-170.6 (CO ester), 169.5 (NHCOMe), 155.3 (CO carbamate), 75.0 (C-1), 69.4 (C-3), 68.5 (C-4), 64.1 (C-6), 52.3 (C-2), 47.4 (C-5), 21.7 (NHCOMe), 20.8-20.7 (MeCO).

ESIMS: m/z 395.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9$: C, 48.39; H, 5.41; N, 7.52. Found: C, 48.51; H, 5.57; N, 7.31.

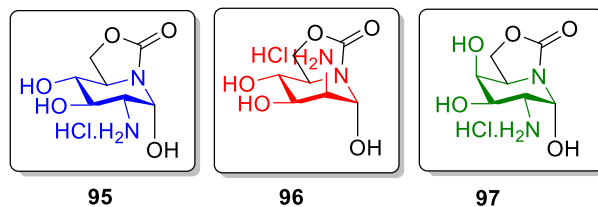
(1R)-2-Acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (94). Compound **94** was obtained from **93** (45 mg, 0.12 mmol) by conventional *O*-deacetylation following the procedure described in general methods. Column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 28 mg (95%). R_f 0.12 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +48.8$ (c 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 5.44 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 4.56 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.44 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.4$ Hz, H-6b), 4.23 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-5), 4.08 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.8$ Hz, H-2), 4.07 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-4), 4.00 (dd, 1 H, H-3), 2.09 (s, 3 H, NHCOMe).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, D_2O): δ 174.7 (NHCOMe), 157.9 (CO), 73.1 (C-1), 68.1 (C-4), 67.5 (C-3), 64.4 (C-6), 52.6 (C-5), 49.5 (C-2), 22.0 (NHCOMe).

ESIMS: m/z 269.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 43.90; H, 5.73; N, 11.38. Found: C, 43.59; H, 5.61; N, 11.03.

Preparation of 2-amino hydrochloride-2-deoxy-D-gluco, D-manno and D-galacto sp^2 -iminosugar mimics.



General procedure for the preparation of 2-amino-2-deoxy sp^2 -iminosugar derivatives. A solution of the corresponding 2-azido-2-deoxy derivative (**78**, **81**, **88**) (42 mg, 0.18 mmol) and Pd/C (21 mg) in MeOH (2 mL) was hydrogenated under an atmospheric pressure of hydrogen. The suspension was stirred for 2 h at rt, filtered through Celite and concentrated under reduced pressure to yield the amino derivative. Then, 0.1N HCl was added to an aqueous solution of the residue until pH 5.0, and the resulting solution was freeze-dried.

(1R)-2-Amino-2-deoxy-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin hydrochloride (95). Yield: 35 mg (96%). $[\alpha]_D +29.6$ (*c* 0.9 in H₂O).

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 5.62 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1), 4.66 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.36 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.0$ Hz, H-6b), 4.04 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-5), 3.91 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.62 (t, 1 H, H-4), 3.42 (dd, 1 H, H-2).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O): δ 157.3 (CO), 73.5 (C-4), 71.7 (C-1), 69.3 (C-3), 67.4 (C-6), 53.8 (C-2), 52.8 (C-5).

ESIMS: m/z 204.9 [M + H]⁺. Anal. Calcd for C₇H₁₃N₂O₅Cl: C, 34.94; H, 5.45; N, 11.64. Found: C, 34.69; H, 5.31; N, 11.24.

(1R)-2-Amino-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin

hydrochloride (96). Yield: 36 mg (97%). $[\alpha]_D +7.5$ (*c* 0.9 in H₂O).

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 5.54 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.1$ Hz, H-1), 4.72 (t, 1H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.34 (t, 1 H, $J_{5,6b} = 8.5$ Hz, H-6b), 4.17 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.9$ Hz, $J_{2,3} = 4.5$ Hz, H-3), 4.07 (bq, 1 H, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-5), 3.80 (dd, 1 H, H-2), 3.72 (t, 1 H, H-4).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O): δ 157.8 (CO), 73.0 (C-1), 70.3 (C-4), 68.0 (C-6), 67.1 (C-3), 54.6 (C-2), 52.8 (C-5).

ESIMS: m/z 204.9 [M + H]⁺. Anal. Calcd for C₇H₁₃N₂O₅Cl: C, 34.94; H, 5.45; N, 11.64. Found: C, 34.60; H, 5.22; N, 11.13.

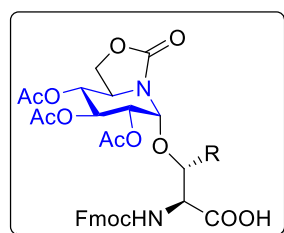
(1R)-2-Amino-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin

hydrochloride (97). Yield: 22 mg (60%). $[\alpha]_D +37.5$ (*c* 1.0 in H₂O).

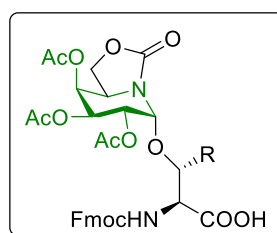
¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 5.68 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, H-1), 4.58 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.9$ Hz, H-6a), 4.49-4.31 (m, 2 H, H-5, H-6b), 4.16 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3), 4.08 (t, 1 H, $J_{4,5} = 2.6$ Hz, H-4), 3.56 (dd, 1 H, H-2).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O): δ 157.8 (CO), 71.8 (C-1), 67.9 (C-4), 66.5 (C-3), 64.4 (C-6), 52.5 (C-5), 50.4 (C-2).

ESIMS: m/z 205.2 [M + H]⁺, 227.2 [M + Na]⁺. HRESIMS Calcd for C₇H₁₂N₂O₅Na [M + Na]⁺ 227.0638, found 227.0647.

Preparation of Tn antigen mimic derivatives of ONJ and OGJ.

98, R = H
99, R = CH₃



107, R = H
108, R = CH₃

General Procedure for the preparation of pseudoglycoside sp^2 -iminosugar derivatives of ONJ and OGJ. To a stirred solution of the corresponding 1-fluoro-derivative (**145** and **71**) (0.30 mmol), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (20 μL , 0.15 mmol) and Fmoc-Ser-O^tBu (**155**)/Fmoc-Thr-O^tBu (**156**) were added (0.30 mmol) in anhydrous DCM (4 mL) at 0 °C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 60 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue subjected to column chromatography to afford the corresponding α -*O*-glycosyl derivatives with *gluco* configuration (**98**, **99**) and *galacto* configuration (**107**, **108**).

(1R)-1-O-(FmocSer)-2,3,4-tri-O-acetyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin

(98). Purification by column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 142 mg (72%). R_f 0.67 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D +36.7$ (c 1.4 in MeOH).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.85-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.50 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 5.43 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 5.08 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.90 (dd, 1 H, H-2), 4.42 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.38-4.31 (m, 3 H, OCH_2Fmoc , CH_{Ser}), 4.28-4.18 (m, 2 H, H-6b, CH_{Fmoc}), 4.15-4.05 (m, 1 H, H-5), 3.97 (dd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, OCH_2Ser), 3.86 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, OCH_2Ser), 2.03-1.99 (3 s, 9 H, MeCO).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 174.9 (CO_2H), 171.8-171.4 (MeCO), 158.4 (CO), 157.9 (CO), 145.3-120.9 (Fmoc), 80.8 (C-1), 73.5 (C-4), 71.7 (C-2), 70.6 (C-3, OCH_2Ser), 68.1 (C-6, OCH_2Fmoc), 56.7 ($\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Ser}}$), 52.9 (C-5), 48.3 (CH_{Fmoc}), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 639.3 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{13}$: C, 58.12; H, 5.04; N, 4.37. Found: C, 58.42; H, 5.04; N, 4.21.

(1R)-1-O-(FmocThr)-2,3,4-tri-O-acetyl-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin

(99). Purification by column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane → 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 140 mg (71%). R_f 0.70 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{+45.0}$ (*c* 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.90-7.30 (m, 8 H, Fmoc), 5.50 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3), 5.47 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 5.10 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 4.88 (dd, 1 H, H-2), 4.54 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.0$ Hz, H-6a), 4.46-4.36 (m, 3 H, OCH_2Fmoc , $\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$), 4.35-4.24 (m, 3 H, H-6b, CH_{Fmoc} , $\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$), 4.10 (bq, 1 H, H-5), 2.07-2.04 (3 s, 9 H, MeCO), 1.22 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, Me_{Thr}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CD_3OD): δ 173.1 (CO_2H), 171.8-171.6 (MeCO), 159.1 (CO), 157.6 (CO), 145.3-120.9 (Fmoc), 81.1 (C-1), 77.3 (OCH_2Fmoc), 73.6 (C-4), 71.6 (C-2), 70.5 (C-3), 68.3 (C-6), 68.1 ($\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$), 59.9 ($\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$), 53.2 (C-5), 48.4 (CH_{Fmoc}), 20.7-20.5 (MeCO), 19.0 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 653.3 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{13}$: C, 58.71; H, 5.24; N, 4.28. Found: C, 58.40; H, 5.53; N, 4.08.

(1R)-1-O-(FmocSer)-2,3,4-tri-O-acetyl-5N,6O-oxomethylidene-

galactonojirimycin (107). Purification by column chromatography (5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 141 mg (73%). R_f 0.23 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{+61.8}$ (*c* 1.1 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.85-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.50-5.40 (m, 2 H, H-1, H-4), 5.36 (bd, 1 H, $J_{2,3} = 10.7$ Hz, H-3), 4.99 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, H-2), 4.40-4.29 (m, 5 H, H-5, H-6a, CH_{Ser} , OCH_2Fmoc), 4.23 (t, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH_{Fmoc}), 4.15-4.02 (m, 1 H, H-6b), 3.94 (dd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, OCH_2Ser), 3.83 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, OCH_2Ser), 2.14-1.97 (3 s, 9 H, MeCO).

$^{13}\text{C NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): δ 173.4 (CO_2H), 172.0-171.5 (MeCO), 158.5 (CO), 158.3 (CO), 145.4-120.9 (Fmoc), 81.4 (C-1), 70.2 (OCH_2Ser), 70.0 (C-4), 69.6 (C-3), 68.9 (C-2), 68.2 (OCH_2Fmoc), 65.0 (C-6), 52.1 (C-5), 48.4 (CH_{Fmoc}), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 679.3 $[M + K]^+$. Anal. Calcd for $C_{31}H_{32}N_2O_{13}$: C, 58.12; H, 5.04; N, 4.37. Found: C, 57.85; H, 5.11; N, 4.10.

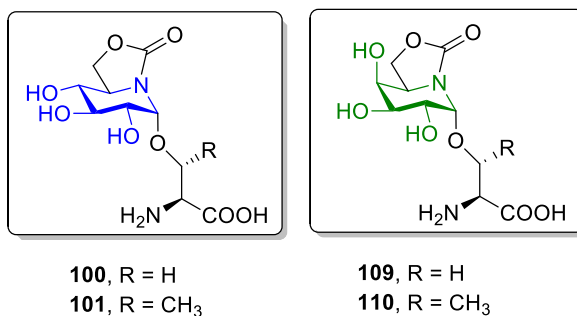
(1R)-1-O-(FmocThr)-2,3,4-tri-O-acetyl-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (108). Purification by column chromatography (9:1 \rightarrow 5:1 EtOAc-MeOH). Yield: 178 mg (91%). R_f 0.34 (5:1 EtOAc-MeOH). $[\alpha]_D^{+50.5}$ (c 1.3 in MeOH).

1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 7.83-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.51-5.46 (m, 2 H, H-1, H-4), 5.37 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 5.00 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-2), 4.50-4.33 (m, 5 H, H-6a, H-5, OCH_2Fmoc , $OCHMe_{Thr}$), 4.30-4.26 (m, 2 H, $CHCO_2H_{Thr}$, CH_{Fmoc}), 4.17-4.07 (m, 1 H, H-6b), 2.15-1.98 (3 s, 9 H, $MeCO$), 1.23 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, Me_{Thr}).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 173.1 (CO_2H), 171.9-171.6 ($MeCO$), 159.0 (CO), 157.7 (CO), 145.3-120.9 (Fmoc), 81.5 (C-1), 77.1 (OCH_2Fmoc), 70.0 (C-4), 69.4 (C-3), 68.6 (C-2), 68.0 ($OCHMe_{Thr}$), 64.9 (C-6), 59.9 ($CHCO_2H_{Thr}$), 52.2 (C-5), 47.0 (CH_{Fmoc}), 20.8-20.5 ($MeCO$), 18.7 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 693.3 $[M + K]^+$. Anal. Calcd for $C_{32}H_{34}N_2O_{13}$: C, 58.71; H, 5.24; N, 4.28. Found: C, 58.37; H, 5.41; N, 4.16.

Preparation of fully deprotected Tn antigen mimic derivatives of ONJ and OGJ.



General procedure for deprotection reaction. To a stirred solution of the protected precursors (**98**, **99**, **107** and **108**) (0.19 mmol) in DCM (3 mL), 20% piperidine-

MeOH (180 μ L) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting crude was filtered through a pad of SiO₂ (2:1 \rightarrow 1:2 EtOAc-MeOH). After conventional *O*-deacetylation, the target deprotected compounds were isolated.

(1R)-1-O-Ser-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (100). Yield: 35 mg (64%, global yield). R_f 0.35 (4:1:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D +52.2$ (*c* 1.0 in H₂O).

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 5.24 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 4.74 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.44 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-6b), 4.15 (dd, 1 H, $^2J_{H,H} = 10.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.0$ Hz, OCH₂Ser), 4.06 (dd, 1 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CHCO₂H_{Ser}), 4.00 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-5), 3.90 (dd, 1 H, OCH₂Ser), 3.81 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 3.72 (dd, 1 H, H-2), 3.63 (t, 1 H, H-4).

¹³C NMR (125.7 MHz, D₂O): δ 171.7 (CO₂H), 158.2 (CO), 81.9 (C-1), 73.5 (C-4), 72.4 (C-3), 71.0 (C-2), 67.7 (C-6), 66.5 (OCH₂Ser), 54.7 (CH_{Ser}), 53.1 (C-5).

ESIMS: m/z 290.9 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₁₀H₁₆N₂O₈: C, 41.10; H, 5.52; N, 9.59. Found: C, 40.82; H, 5.60; N, 9.22.

(1R)-1-O-Thr-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (101). Yield: 29 mg (50%, global yield). R_f 0.39 (4:1:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D +37.4$ (*c* 0.9 in H₂O).

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 5.26 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, H-1), 4.68 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.44-4.35 (m, 2 H, H-6b, CHMe_{Thr}), 3.94 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-5), 3.76 (d, 1 H, $^3J_{H,H} = 3.5$ Hz, CHCO₂H_{Thr}), 3.72 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 3.60 (dd, 1 H, H-2), 3.56 (t, 1 H, H-4), 1.37 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, Me_{Thr}).

¹³C NMR (125.7 MHz, D₂O): δ 171.8 (CO₂H), 157.7 (CO), 82.4 (C-1), 74.2 (CH_{Thr}), 73.4 (C-4), 72.3 (C-3), 71.1 (C-2), 67.5 (C-6), 59.2 (CHCO₂H_{Thr}), 53.3 (C-5), 18.2 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 329.1 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₁H₁₈N₂O₈: C, 43.14; H, 5.92; N, 9.15. Found: C, 42.79; H, 5.94; N, 8.82.

(1R)-1-O-Ser-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (109). Yield: 27 mg (49%, global yield). R_f 0.38 (6:3:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D +20.1$ (c 1.0 in MeOH).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.07 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 4.46 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 4.09 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 8.0$ Hz, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 3.85 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.0$ Hz, H-4), 3.84-3.79 (m, 2 H, H-3, OCH₂Ser), 3.80 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.48 (t, 1 H, $^3J_{H,H} = ^2J_{H,H} = 7.8$ Hz, OCH₂Ser), 3.43-3.39 (m, 1 H, CHCO₂H_{Ser}).

¹³C NMR (100.6 MHz, D₂O): δ 178.6 (CO₂H), 158.7 (CO), 81.8 (C-1), 69.7 (OCH₂Ser), 69.3-69.1 (C-3, C-4), 67.6 (C-2), 64.5 (C-6), 55.5 (CH_{Ser}), 52.7 (C-5).

ESIMS: m/z 290.8 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₁₀H₁₆N₂O₈: C, 41.10; H, 5.52; N, 9.59. Found: C, 40.89; H, 5.34; N, 9.28.

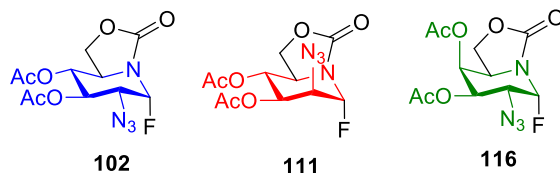
(1R)-1-O-Thr-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (110). Yield: 39 mg (67%, global yield). R_f 0.4 (4:1:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D +28.9$ (c 1.0 in H₂O).

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 5.30 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.2$ Hz, H-1), 4.55 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-6a), 4.41 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.7$ Hz, H-6b), 4.39-4.30 (m, 1 H, CHMe_{Thr}), 4.23 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 4.00 (t, 1 H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4), 3.88 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-3), 3.78 (dd, 1 H, H-2), 3.73 (d, 1 H, $^3J_{H,H} = 3.9$ Hz, CHCO₂H_{Thr}), 1.35 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, Me_{Thr}).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O): δ 171.8 (CO₂H), 158.1 (CO), 82.6 (C-1), 74.0 (CHMe_{Thr}), 69.2 (C-3), 69.0 (C-4), 67.7 (C-2), 64.5 (C-6), 59.1 (CHCO₂H_{Thr}), 52.9 (C-5), 18.1 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 304.9 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₁₁H₁₈N₂O₈: C, 43.14; H, 5.92; N, 9.15. Found: C, 42.87; H, 5.88; N, 8.80.

Preparation of the 2-azido-1,2-dideoxy-1-fluoro sp^2 -iminosugar derivatives of ONJ, OMJ and OGJ.



General procedure. The corresponding peracetylated 2-azido-2-deoxy derivatives (**77**, **80** and **86**) (160 mg, 0.44 mmol) was placed in a polyethylene vessel, cooled at -40 °C, and treated with poly(hydrogen fluoride)pyridinium complex (70% HF, 0.8 mL). The reaction mixture was stirred at -40 °C for 90 min, diluted with Et₂O (50 mL), washed with saturated aq KF (15 mL) and extracted with Et₂O (3 x 25 mL). The organic layer was washed with saturated aq NaHCO₃ (15 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography using the solvent indicated in each case yielded the corresponding 1-fluoro derivatives.

(1R)-3,4-Di-O-acetyl-2-azido-1,2-dideoxy-1-fluoro-5N,6O-oxomethylidene-nojirimycin (102). Purification by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 126 mg (90%). R_f 0.48 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D^{+47.7}$ (c 1.0 in DCM). IR: ν 2101 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.10 (dd, 1 H, $J_{1,F} = 51.0$ Hz, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), 5.52 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3), 4.96 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 4.49 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.0$ Hz, $J_{5,6b} = 8.0$ Hz, H-6a), 4.27 (t, 1 H, H-6b), 4.16-4.04 (m, 1 H, H-5), 3.55 (ddd, 1 H, $J_{2,F} = 24.0$ Hz, H-2), 2.13-2.08 (2 s, 6 H, MeCO).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.0-169.4 (CO ester), 154.0 (CO carbamate), 89.5 (C-1, d, $J_{C1,F} = 211.4$ Hz), 72.1 (C-4), 69.3 (C-3), 67.1 (C-6), 60.9 (C-2, d, $J_{C2,F} = 24.9$ Hz), 52.0 (C-5), 20.5-20.4 (MeCO).

¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃OD): δ -164.0 (dd, $^2J_{F,H} = 51.2$ Hz, $^3J_{F,H} = 24.5$ Hz, F).

ESIMS: m/z 339.0 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{11}H_{13}FN_4O_6$: C, 41.78; H, 4.14; N, 17.72. Found: C, 41.99; H, 4.31; N, 17.44.

(1R)-3,4-Di-O-acetyl-2-azido-1,2-dideoxy-1-fluoro-5N,6O-oxomethylidene-mannojirimycin (111). Purification by column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 108 mg (77%). R_f 0.56 (1:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +17.8$ (c 1.0 in DCM).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.90 (dd, 1 H, $J_{1,F} = 48.5$ Hz, $J_{1,2} = 2.7$ Hz, H-1), 5.41 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, H-3), 5.19 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 4.47 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.6$ Hz, H-6a), 4.38-4.25 (m, 2 H, H-2, H-6b), 3.99 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.0$ Hz, H-5), 2.16-2.04 (2 s, 6 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1-169.5 (MeCO), 154.7 (CO), 89.6 (C-1, d, $J_{C1,F} = 205.8$ Hz), 69.7-69.3 (C-4, C-3), 67.3 (C-6), 60.0 (C-2, d, $J_{C2,F} = 38.5$ Hz), 52.8 (C-5), 20.5-20.4 (MeCO).

^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$): δ -150.7 (d, $^2J_{F,H} = 48.5$ 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; F, 6.01; N, 17.72. Found: C, 41.90; H, 4.00; N, 17.38.

(1R)-3,4-Di-O-acetyl-2-azido-1,2-dideoxy-1-fluoro-5N,6O-oxomethylidene-galactonojirimycin (116). Purification by column chromatography (2:3 EtOAc-cyclohexane). Yield: 116 mg (83%). R_f 0.80 (2:1 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D +63.7$ (c 1.0 in DCM). IR: ν 2117 (N_3) cm^{-1} .

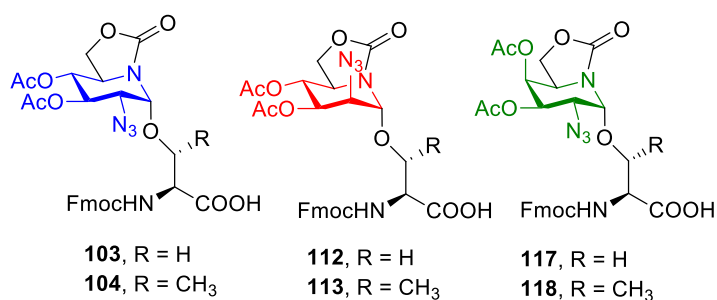
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.13 (dd, 1 H, $J_{1,F} = 50.0$ Hz, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), 5.52 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-4), 5.31 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3), 4.46 (t, 1 H, $J_{6a,6a} = J_{5,6a} = 8.8$ Hz, H-6a), 4.41-4.33 (m, 1 H, H-5), 4.03 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.4$ Hz, H-6b), 3.84 (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 170.0-169.7 (CO ester), 154.4 (CO carbamate), 89.9 (C-1, d, $J_{\text{C1,F}} = 208.3$ Hz), 69.0 (C-3), 66.8 (C-4), 63.2 (C-6), 57.1 (C-2, d, $J_{\text{C2,F}} = 24.6$ Hz), 51.0 (C-5), 20.6 (MeCO).

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -164.1 (dd, $^2J_{\text{F,H}} = 50.4$ Hz, $^3J_{\text{F,H}} = 24.3$ Hz, F).

ESIMS: m/z 339.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}_6$: C, 41.78; H, 4.14; F, 6.01; N, 17.72. Found: C, 41.94; H, 4.22; N, 17.56.

Preparation of Tn antigen mimic derivatives of 2-azido-2-deoxy-ONJ, -OMJ and -OGJ.



General procedure for the glycosylaminoacid derivatives of 2-azido-2-deoxy-ONJ, -OMJ and -OGJ. To a stirred solution of the corresponding pseudoglycosyl fluoro derivative (**102**, **111** and **116**) (76 mg, 0.24 mmol), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (15 μL , 0.12 mmol) and Fmoc-Ser-O^tBu (**155**)/Fmoc-Thr-O^tBu (**156**) (0.24 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 using the solvent indicated in each case to yield the corresponding 2-azido-2-deoxy glycosylaminoacids.

(1R)-1-O-(FmocSer)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (103). Purification by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 112 mg (75%). R_f 0.42 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +50.8$ (c 0.9 in MeOH). IR: ν 2106 (N_3) cm^{-1} .

1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.82-7.20 (m, 8 H, Fmoc), 5.48 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 5.33 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 5.04 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.46-4.16 (m, 6 H, H-6a, H-6b, OCH_2Fmoc , CH_{Ser} , $CHFmoc$), 4.16-4.07 (m, 1 H, H-5), 4.03 (dd, 1 H, $^2J_{H,H} = 10.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.6$ Hz, OCH_2Ser), 3.91 (dd, 1 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, OCH_2Ser), 3.51 (dd, 1 H, H-2), 2.04-1.99 (2 s, 6 H, MeCO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 176.1 (COOH), 171.7-171.3 (MeCO), 158.4-157.7 (CO), 145.3-120.9 (Fmoc), 82.9 (C-1), 73.7 (C-4), 71.2 (C-3), 70.8 (OCH_2Ser), 68.1 (C-6, OCH_2Fmoc), 62.0 (C-2), 57.6 ($CHCO_2H_{Ser}$), 53.1 (C-5), 48.3 ($CHFmoc$), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 646.3 $[M + Na]^+$. Anal. Calcd for $C_{29}H_{29}N_5O_{11}$: C, 55.86; H, 4.69; N, 11.23. Found: C, 55.57; H, 4.38; N, 10.86.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (104). Purification by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 127 mg (80%). R_f 0.56 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +48.4$ (c 1.0 in MeOH). IR: ν 2111 (N_3) cm^{-1} .

1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.90-7.20 (m, 8 H, Fmoc), 5.50-5.40 (m, 2 H, H-1, H-3), 5.08 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-4), 4.53 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.6$ Hz, H-6a), 4.47-4.18 (m, 6 H, H-6b, OCH_2Fmoc , $CHFmoc$, CH_{Thr} , $CHCO_2H_{Thr}$), 4.14-4.03 (m, 1 H, H-5), 3.65 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-2), 2.04 (s, 6 H, MeCO), 1.24 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, Me_{Thr}).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 171.7-171.4 (MeCO), 158.8-157.5 (CO), 145.2-120.9 (Fmoc), 82.3 (C-1), 77.2 ($OCHMe_{Thr}$), 73.7 (C-4), 71.2 (C-3), 68.2-68.1 (C-

6, OCH₂Fmoc), 62.5 (C-2), 60.5 (CHCO₂H_{Thr}), 53.2 (C-5), 48.3 (CH_{Fmoc}), 20.6-20.5 (MeCO), 19.3 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 660.5 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₀H₃₁N₅O₁₁: C, 56.51; H, 4.90; N, 10.98. Found: C, 56.39; H, 4.87; N, 10.76.

(1R)-1-O-(FmocSer)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-

oxomethylidenemannonojirimycin (112). Purification by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 127 mg (83%). R_f 0.28 (1:5 MeOH-EtOAc). [α]_D +30.7 (*c* 1 in MeOH). IR: ν 2110 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.83-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.42 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 10.0 Hz, *J*_{2,3} = 3.0 Hz, H-3), 5.21-5.12 (m, 2 H, H-1, H-4), 4.50-4.33 (m, 4 H, H-6a, OCH₂Fmoc, CHCO₂H_{Ser}), 4.31 (t, 1 H, *J*_{1,2} = 3.0 Hz, H-2), 4.29-4.20 (m, 2 H, H-6b, CH_{Fmoc}), 4.10-3.96 (m, 1 H, H-5), 3.96-3.82 (m, 2 H, OCH₂Ser), 2.04-2.00 (2 s, 6 H, MeCO).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 173.0 (COOH), 171.8-171.0 (MeCO), 158.5-158.4 (CO), 145.2-120.9 (Fmoc), 83.5 (C-1), 71.4 (C-3), 70.6 (C-4), 69.8 (OCH₂Ser), 68.1-68.0 (C-6, OCH₂Fmoc), 62.9 (C-2), 56.1 (CHCO₂H_{Ser}), 53.8 (C-5), 48.2 (CH_{Fmoc}), 20.5-20.4 (MeCO).

ESIMS: m/z 622.1 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₂₉H₂₉N₅O₁₁: C, 55.86; H, 4.69; N, 11.23. Found: C, 55.74; H, 4.48; N, 10.93.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-

oxomethylidenemannonojirimycin (113). Purification by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 105 mg (65%). R_f 0.40 (1:5 MeOH-EtOAc). [α]_D +30.5 (*c* 1 in MeOH). IR: ν 2156 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.89-7.20 (m, 8 H, Fmoc), 5.44 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 10.0 Hz, *J*_{2,3} = 3.0 Hz, H-3), 5.25 (bs, 1 H, H-1), 5.19 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 10.0 Hz, H-4), 4.52 (t, 1 H, *J*_{6a,6b} = *J*_{5,6a} = 8.7 Hz, H-6a), 4.49-4.32 (m, 3 H, OCH₂Fmoc, OCHMe_{Thr}), 4.32-4.20

(m, 4 H, H-2, H-6b, CH_{Fmoc}, CHCO₂H_{Thr}), 4.10-4.00 (m, 1 H, H-5), 2.07-2.05 (2 s, 6 H, MeCO), 1.23 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, Me_{Thr}).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 171.9-171.2 (MeCO), 158.9-158.1 (CO), 145.2-120.9 (Fmoc), 83.4 (C-1), 77.6 (OCHMe_{Thr}), 71.5 (C-3), 70.8 (C-4), 68.1-68.0 (C-6, OCH₂Fmoc), 63.1 (C-2), 60.5 (CHCO₂H_{Thr}), 54.0 (C-5), 48.3 (CH_{Fmoc}), 20.6-20.5 (MeCO), 18.7 (Me_{Thr}).

ESIMS: *m/z* 636.1 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₃₀H₃₁N₅O₁₁: C, 56.51; H, 4.90; N, 10.98. Found: C, 56.63; H, 4.96; N, 10.67.

(1R)-1-O-(FmocSer)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-

oxomethylidenegalactonojirimycin (117): Column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 130 mg (87%). R_f 0.53 (1:5 MeOH-EtOAc). [α]_D +52.7 (*c* 1.3 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ 7.90-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.47 (t, 1 H, J_{3,4} = J_{4,5} = 2.4 Hz, H-4), 5.37 (d, 1 H, J_{1,2} = 4.0 Hz, H-1), 5.34 (dd, 1 H, J_{2,3} = 11.1 Hz, H-3), 4.65-4.53 (m, 2 H, H-5, CH_{Ser}), 4.49-4.20 (m, 4 H, H-6a, OCH₂Fmoc, CH_{Fmoc}), 4.14-4.01 (m, 3 H, H-6b, OCH₂Ser), 3.84 (dd, 1 H, H-2), 2.14-2.00 (2 s, 6 H, MeCO).

¹³C NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ 171.7 (COOH), 170.8-170.2 (MeCO), 157.1-156.6 (CO), 145.1-120.8 (Fmoc), 82.7 (C-1), 69.6-69.5 (C-3, OCH₂Ser), 68.9 (C-4), 67.5 (OCH₂Fmoc), 64.1 (C-6), 57.9 (C-2), 55.1 (CHCO₂H_{Ser}), 51.5 (C-5), 47.9 (CH_{Fmoc}), 20.6 (MeCO).

ESIMS: *m/z* 622.0 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₂₉H₂₉N₅O₁₁: C, 55.86; H, 4.69; N, 11.23. Found: C, 55.71; H, 4.76; N, 10.99.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-

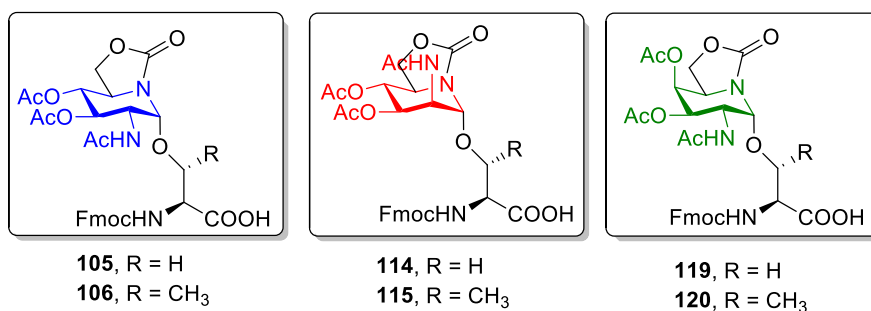
oxomethylidenegalactonojirimycin (118): Column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 116 mg (72%). R_f 0.56 (1:5 MeOH-EtOAc). [α]_D +51.8 (*c* 1.3 in MeOH).

^1H 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} , $\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$), 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}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 ($\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$), 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.

Preparation of Tn antigen mimic derivatives of 2-acetamido-2-deoxy-ONJ, -OMJ and -OGJ.



General procedure for the reduction-acetylation reaction. To a stirred solution of the corresponding 2-azido-2-deoxy glycoaminoacids (**103**, **104**, **112**, **113**, **117**, and **118**) (50 mg, 0.08 mmol) in THF-AcOH-Ac₂O (1.8 mL, 3:2:1), cooled at 0 °C, Zn (68 mg, 1.04 mmol) and saturated aq CuSO₄ (125 μL) were added. The reaction mixture was stirred for 2 h 30 min, filtered through Celite, and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography to afford the

corresponding 2-acetamido-2-deoxy glycoaminoacid derivatives with *gluco* configuration (**105**, **106**), *manno* configuration (**114**, **115**), and *galacto* configuration (**119**, **120**).

(1R)-1-O-(FmocSer)-3,4-di-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (105). Purification by column chromatography (1:5 MeOH-EtOAc). Yield: 37.5 mg (73%). R_f 0.33 (1:2 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +33.9$ (c 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.83-7.28 (m, 8 H, Fmoc), 5.28 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{2,3} = 9.5$ Hz, H-3), 5.14 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 5.06 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.52-4.21 (m, 6 H, H-6a, H-6b, OCH_2Fmoc , CH_{Ser} , CH_{Fmoc}), 4.32 (dd, 1 H, H-2), 4.08 (bq, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, 1 H, H-5), 3.94-3.89 (m, 2 H, OCH_2Ser), 2.03-2.01 (2 s, 6 H, MeCO), 1.96 (s, 3 H, NHCOMe).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 173.4 (COOH), 171.8-171.7 (MeCO), 158.4-157.9 (CO), 145.2-120.9 (Fmoc), 82.4 (C-1), 73.8 (C-4), 71.6 (C-3), 70.1 (OCH_2Ser), 68.1 (C-6, OCH_2Fmoc), 55.1 ($\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Ser}}$), 53.1 (C-5), 52.4 (C-2), 48.3 (CH_{Fmoc}), 22.6 (NHCOMe), 20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 638.2 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{12}$: C, 58.21; H, 5.20; N, 6.57. Found: C, 57.87; H, 4.83; N, 6.21.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-di-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenenojirimycin (106). Purification by column chromatography (1:5 MeOH-EtOAc). Yield: 49 mg (93%). R_f 0.2 (1:3 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +38.9$ (c 1.0 in MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.90-7.24 (m, 8 H, Fmoc), 5.32-5.22 (m, 2 H, H-1, H-3), 5.08 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 4.59-4.16 (m, 8 H, H-6a, H-6b, H-2, OCH_2Fmoc , CH_{Fmoc} , $\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$, $\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$), 4.12-4.02 (m, 1 H, H-5), 2.05-1.98 (3 s, 9 H, NHCOMe , 2 MeCO), 1.17 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, Me_{Thr}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ 173.6 (COOH), 171.9-171.7 (MeCO), 158.8-157.6 (CO), 145.4-120.9 (Fmoc), 82.3 (C-1), 77.6 ($\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$), 73.7 (C-4), 71.8 (C-3),

68.2-67.7 (C-6, OCH₂Fmoc), 60.4 (CHCO₂H_{Thr}), 53.3 (C-5), 52.4 (C-2), 49.8 (CH_{Fmoc}), 22.9-20.5 (NHCOMe, 2 MeCO), 18.8 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 652.2 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₃₂H₃₅N₃O₁₂: C, 58.80; H, 5.40; N, 6.43. Found: C, 58.73; H, 5.50; N, 6.34.

(1R)-1-O-(FmocSer)-3,4-di-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (114). Purification by column chromatography (1:5 MeOH-EtOAc). Yield: 40 mg (77.5%). R_f 0.50 (1:2 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +17.6$ (c 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.85-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.33 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, $J_{2,3} = 4.0$ Hz, H-3), 5.20 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 5.03 (bs, 1 H, H-1), 4.70 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-2), 4.50-4.18 (m, 6 H, H-6a, H-6b, OCH₂Fmoc, CH_{Ser}, CH_{Fmoc}), 4.15-4.02 (m, 1 H, H-5), 3.98-3.80 (m, 2 H, OCH₂Ser), 1.98-1.96 (2 s, 9 H, 2 MeCO, NHCOMe).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 173.8 (COOH), 171.9-171.4 (MeCO), 158.8-158.2 (CO), 145.3-120.9 (Fmoc), 83.5 (C-1), 71.3 (C-4), 70.4 (C-3, OCH₂Ser), 68.7-68.1 (C-6, OCH₂Fmoc), 57.7 (CHCO₂H_{Ser}), 53.8 (C-5), 51.1 (C-2), 48.4 (CH_{Fmoc}), 22.3 (NHCOMe), 20.6-20.5 (MeCO).

ESIMS: m/z 638.2 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₃₁H₃₃N₃O₁₂: C, 58.21; H, 5.20; N, 6.57. Found: C, 57.93; H, 5.31; N, 6.34.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-di-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenemannonojirimycin (115). Purification by column chromatography (1:5 MeOH-EtOAc). Yield: 47 mg (90%). R_f 0.46 (1:2 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +5.9$ (c 1.0 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.85-7.20 (m, 8 H, Fmoc), 5.36 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, $J_{2,3} = 4.2$ Hz, H-3), 5.28 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 5.21 (bs, 1 H, H-1), 4.65-4.58 (m, 1 H, H-2), 4.56 (t, 1 H, $J_{6a,6b} = J_{5,6a} = 8.5$ Hz, H-6a), 4.50-4.10 (m, 6 H, H-6b,

OCH₂Fmoc, CH_{Fmoc}, OCHMe_{Thr}, CHCO₂H_{Thr}), 4.07 (bq, 1 H, $J_{5,6b} = 8.5$ Hz, H-5), 2.06-1.98 (2 s, 9 H, NHCOMe, 2 MeCO), 1.19 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, Me_{Thr}).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ 174.8 (COOH), 172.0-171.8 (MeCO), 158.9-158.6 (CO), 145.4-120.9 (Fmoc), 83.7 (C-1), 78.6 (OCHMe_{Thr}), 71.2 (C-4), 70.1 (C-3), 68.8 (C-6), 68.0 (OCH₂Fmoc), 61.7 (CHCO₂H_{Thr}), 54.1 (C-5), 52.0 (C-2), 22.4-20.5 (NHCOMe, 2 MeCO), 19.1 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 652.1 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₃₂H₃₅N₃O₁₂: C, 58.80; H, 5.40; N, 6.43. Found: C, 58.56; H, 5.20; N, 6.13.

(1R)-1-O-(FmocSer)-3,4-di-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (119). Column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 8:1 EtOAc-MeOH). Yield: 43 mg (87%). R_f 0.53 (1:5 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +52.7$ (*c* 1.3 in MeOH).

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ 7.90-7.25 (m, 8 H, Fmoc), 5.47 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 2.4$ Hz, H-4), 5.37 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 5.34 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.1$ Hz, H-3), 4.65-4.53 (m, 2 H, H-5, CH_{Ser}), 4.49-4.20 (m, 4 H, H-6a, OCH₂Fmoc, CH_{Fmoc}), 4.14-4.01 (m, 3 H, H-6b, OCH₂Ser), 3.84 (dd, 1 H, H-2), 2.14-2.00 (2 s, 6 H, MeCO).

¹³C NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ 171.7 (COOH), 170.8-170.2 (MeCO), 157.1-156.6 (CO), 145.1-120.8 (Fmoc), 82.7 (C-1), 69.6-69.5 (C-3, OCH₂Ser), 68.9 (C-4), 67.5 (OCH₂Fmoc), 64.1 (C-6), 57.9 (C-2), 55.1 (CHCO₂H_{Ser}), 51.5 (C-5), 47.9 (CH_{Fmoc}), 20.6 (MeCO).

ESIMS: m/z 622.0 [M - H]⁻. Anal. Calcd for C₂₉H₂₉N₅O₁₁: C, 55.86; H, 4.69; N, 11.23. Found: C, 55.71; H, 4.76; N, 10.99.

(1R)-1-O-(FmocThr)-3,4-di-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-5N,6O-oxomethylidenegalactonojirimycin (120). Column chromatography (1:5 → 1:3 → 1:1 MeOH-EtOAc). Yield: 32 mg (74%). R_f 0.37 (1:2 MeOH-EtOAc). $[\alpha]_D +41.6$ (*c* 1.0 in MeOH).

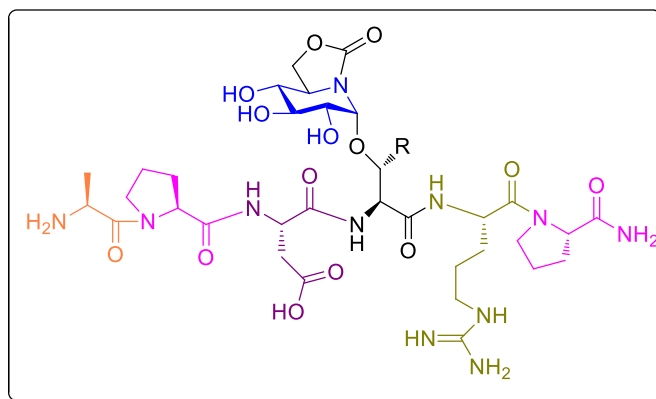
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.86-7.24 (m, 8 H, Fmoc), 5.45 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 2.5$, Hz, H-4), 5.34 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1), 5.13 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3), 4.60-4.30 (m, 6 H, H-2, H-5, H-6a, H-6b, CHMe_{Thr} , OCH_2Fmoc), 4.23 (t, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, CH_{Fmoc}), 4.16-4.07 (m, 2 H, $\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$, OCH_2Fmoc), 2.14-1.95 (3s, 9 H, 2 MeCO, NHCOMe).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 174.1 (COOH), 171.8 (MeCO), 158.9-158.1 (CO), 145.4-120.9 (Fmoc), 82.6 (C-1), 77.3 ($\text{OCHMe}_{\text{Thr}}$), 70.3 (C-3), 69.4 (C-4), 67.7 (C-6), 65.0 (OCH_2Fmoc), 60.9 ($\text{CHCO}_2\text{H}_{\text{Thr}}$), 52.6 (C-5), 48.5 (C-2, CH_{Fmoc}), 23.0-20.4 (MeCO, NHCOMe), 18.9 (Me_{Thr}).

ESIMS: m/z 652.1 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_{12}$: C, 58.80; H, 5.40; N, 6.43. Found: C, 58.91; H, 5.32; N, 6.19.

Preparation of mucin-type sp^2 -glycosylhexapeptidomimetics by using SPPS.

Preparation of ONJ derivatives.



121, APDS(α - sp^2 -Glc)RP, R = H

122, APDT(α - sp^2 -Glc)RP, R = CH_3

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Ser(α -O-sp²Glc)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (121). The glycosylated amino acid building block **98** (82 mg, 0.13 nmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **121** was obtained, purified by reverse-phase HPLC (*t_R* 24.97 min) and freeze-dried.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/H₂O (1:9), amide region): δ 8.55 (d, 1 H, *J* = 6.7 Hz, NH_{Asp}), 8.47 (d, 1 H, *J* = 7.3 Hz, NH_{Arg}), 8.36 (d, 1 H, *J* = 7.4 Hz, NH_{Ser}), 7.70 (s, 1 H, NH_{2term.}), 7.27 (t, 1 H, *J* = 5.8 Hz, NH_{Arg}), 7.00 (s, 1 H, NH_{2term.}), 6.57-6.77 (bs, 2 H, NH_{2Arg}).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.16 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, H_{1S}), 4.63-4.74 (m, 4 H, H_{6S}, H _{α Asp}, H _{α Arg}, H _{α Ser}), 4.50-4.54 (m, 1 H, H _{α Pro}), 4.36-4.48 (m, 3 H, H _{α Ala}, H _{α Pro}, H_{6S}), 3.77-3.92 (m, 5 H, 2H _{δ Pro}, 2H _{β Ser}, H_{5S}), 3.61-3.73 (m, 4 H, 2H _{δ Pro}, H_{2S}, H_{3S}), 3.55 (t, 1 H, *J* = 9.3 Hz, H_{4S}), 3.26 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz, 2H _{δ Arg}), 2.71-2.90 (m, 2 H, 2H _{β Asp}), 2.29-2.42 (m, 2 H, 2H _{β Pro}), 1.86-2.16 (m, 7 H, H _{β Arg}, 2H _{β Pro}, 4H _{γ Pro}), 1.66-1.83 (m, 3 H, 2H _{γ Arg}, H _{β Arg}), 1.58 (d, 3 H, *J* = 7.0 Hz, CH_{3Ala}).

¹³C NMR (100.6 MHz, D₂O): δ 176.9, 174.3, 173.5, 172.8, 171.3, 170.9, 169.4, (CO), 158.2 (NCO_{2Glc}), 156.8 (C=N_{Arg}), 81.8 (C_{1S}), 73.5 (C_{4S}), 72.4 (C_{3S}), 70.9 (C_{2S}), 67.7 (C_{6S}), 66.9 (C _{α Ser}), 60.5 (C _{α Pro}), 60.3 (C _{α Pro}), 53.2 (C_{5S}), 53.0 (C _{α Ser}), 51.2 (C _{α Arg}), 50.9 (C _{α Asp}), 48.1 (C _{α Ala}), 47.9 (C _{δ Pro}), 47.7 (C _{δ Pro}), 40.6 (C _{δ Arg}), 37.2 (C _{β Asp}), 29.6 (C _{β Pro}), 29.3 (C _{β Pro}), 27.6 (C _{β Arg}), 24.7 (2C _{γ Pro}), 24.0 (C _{γ Arg}), 15.1 (CH_{3Ala}).

HRFABMS Calcd for C₃₅H₅₄N₁₁O₁₄⁺ [M + H]⁺ 828.3838, found 428.2068.

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Thr(α -O-sp²Glc)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (122). The glycosylated amino acid building block **99** (82 mg, 0.13 eq.) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **122** was obtained, purified by reverse-phase HPLC (*t_R* 34.92 min) and freeze-dried.

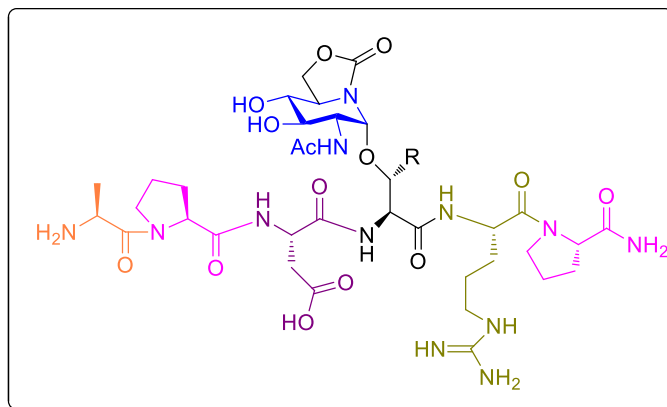
^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (1:9), amide region): δ 8.61 (d, 1 H, $J = 6.9$ Hz, NH_{Asp}), 8.53 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, NH_{Thr}), 8.29 (d, 1 H, $J = 6.8$ Hz, NH_{Arg}), 7.69 (s, 1 H, $\text{NH}_{2\text{term.}}$), 7.35 (t, 1 H, $J = 5.2$ Hz, NH_{Arg}), 6.99 (s, 1 H, $\text{NH}_{2\text{term.}}$).

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.23 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, $\text{H}_{1\text{S}}$), 4.63-4.74 (m, 3 H, $\text{H}_{6\text{S}}$, $\text{H}_{\beta\text{Asp}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Arg}}$), 4.55 (d, 1 H, $J = 2.6$ Hz, $\text{H}_{\alpha\text{Thr}}$), 4.50 (dd, 1 H, $J = 7.6$, $J = 6.8$ Hz, $\text{H}_{\alpha\text{Pro}}$), 4.30-4.45 (m, 4 H, $\text{H}_{\beta\text{Thr}}$, $\text{H}_{6\text{S}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Pro}}$), 3.83-3.95 (m, 2 H, $\text{H}_{\delta\text{Pro}}$, $\text{H}_{5\text{S}}$), 3.62-6.79 (m, 4 H, $\text{H}_{3\text{S}}$, $3\text{H}_{\delta\text{Pro}}$), 3.50-3.58 (m, 2 H, $\text{H}_{2\text{S}}$, $\text{H}_{4\text{S}}$), 3.19-3.29 (m, 2 H, $2\text{H}_{\delta\text{Arg}}$), 2.68-2.90 (m, 2 H, $2\text{H}_{\beta\text{Asp}}$), 2.26-2.38 (m, 2 H, $2\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 1.69-2.10 (m, 10 H, $2\text{H}_{\gamma\text{Arg}}$, $2\text{H}_{\beta\text{Arg}}$, $2\text{H}_{\beta\text{Pro}}$, $4\text{H}_{\gamma\text{Pro}}$), 1.56 (d, 3 H, $J = 7.0$ Hz, CH_3Ala), 1.19 (d, 3 H, $J = 6.4$ Hz, CH_3Thr).

^{13}C NMR (100.6 MHz, D_2O): δ 176.9, 173.5, 173.4, 171.6, 170.9, 169.2163.2, (CO), 157.9 ($\text{NCO}_{2\text{Glc}}$), 156.8 ($\text{C}=\text{N}_{\text{Arg}}$), 82.0 ($\text{C}_{1\text{S}}$), 74.2 ($\text{C}_{\beta\text{Thr}}$), 73.4 ($\text{C}_{4\text{S}}$), 72.4 ($\text{C}_{3\text{S}}$), 71.1 ($\text{C}_{2\text{S}}$), 67.5 ($\text{C}_{6\text{S}}$), 60.3 ($2\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 57.1 ($\text{C}_{\alpha\text{Thr}}$), 53.5 ($\text{C}_{5\text{S}}$), 51.7 ($\text{C}_{\alpha\text{Asp}}$), 51.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Arg}}$), 48.1 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 47.9 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 47.7 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 40.6 ($\text{C}_{\delta\text{Arg}}$), 37.8 ($\text{C}_{\beta\text{Asp}}$), 29.6 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 29.4 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 27.3 ($\text{C}_{\beta\text{Arg}}$), 24.7 ($2\text{C}_{\gamma\text{Pro}}$), 24.0 ($\text{C}_{\gamma\text{Arg}}$), 17.4 (CH_3Thr), 15.1 (CH_3Ala).

HRFABMS Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{O}_{14}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 842.4003, found 842.3992.

Preparation of 2-acetamido-2-deoxy-ONJ derivatives.



123, APDS(α -sp²-GlcNAc)RP, R = H

124, APDT(α -sp²-GlcNAc)RP, R = CH₃

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Ser-(α -O-D-GlcNAc)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (123). The glycosylated amino acid building block **105** (82 mg, 0.13 mmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **123** was obtained and then purified by reverse phase HPLC (t_R 29.0 min), and freeze-dried.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/H₂O (1:9), amide region): δ 8.61 (d, 1 H, $J = 6.9$ Hz, NH_{Asp}), 8.48 (d, 1 H, $J = 7.4$ Hz, NH_{Arg}), 8.31 (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz, NH_{Ser}), 8.11 (d, 1 H, $J = 9.3$ Hz, NHAc), 7.69 (s, 1 H, NH_{2term.}), 7.14-7.20 (m, 1 H, NH_{Arg}), 7.00 (s, 1 H, NH_{2term.}).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.10 (d, 1 H, $J = 3.8$ Hz, H_{1S}), 4.68-4.72 (m, 2 H, H_{Arg}, H_{Asp}), 4.60-4.67 (m, 3 H, H_{Ser}, H_{6S}), 4.34-4.53 (m, 2 H, 2H_{Pro}, H_{Ala}, H_{6S}), 4.01 (dd, 1 H, $J = 10.1, 3.8$ Hz, H_{2S}), 3.58-3.87 (m, 9 H, 4H_{Pro}, 2H_{Ser}, H_{3S}, H_{4S}, H_{5S}), 3.24 (t, 2 H, $J = 6.7$ Hz, 2H_{Arg}), 2.83-3.00 (m, 2 H, 2H_{Asp}), 2.27-2.40 (m, 2 H, 2H_{Pro}), 1.86-2.13 (m, 10 H, H_{Arg}, 2H_{Pro}, 4H_{Pro}, NHCOCH₃), 1.65-1.81 (m, 3 H, 2H_{Arg}, H_{Arg}), 1.55 (d, 3 H, $J = 7.0$ Hz, CH_{3Ala}).

¹³C NMR (100.6 MHz, D₂O): δ 176.8, 174.3, 174.1, 173.6, 172.1, 171.2, 170.6, 169.3, 158.0 (NCO₂), 156.8 (C=NH_{Arg}), (CO), 80.5 (C_{1S}), 73.8 (C_{4S}), 70.7 (C_{3S}), 67.7 (C_{6S}), 66.7 (C_{Ser}), 60.4 (C_{Pro}), 60.3 (C_{Pro}), 53.2 (C_{5S}), 52.9 (C_{Ser}), 52.8 (C_{2S}), 51.1 (C_{Arg}), 50.1 (C_{Asp}), 48.0 (C_{Ala}), 47.9 (C_{Pro}), 47.7 (C_{Pro}), 40.5 (C_{Arg}), 35.4 (C_{Asp}), 29.6 (C_{Pro}), 29.3 (C_{Pro}), 27.7 (C_{Arg}), 24.7 (2C_{Pro}), 24.1 (C_{Arg}), 22.0 (NHCOCH₃), 15.1 (CH_{3Ala}).

HRFABMS Calcd for C₃₅H₅₇N₁₂O₁₄⁺ [M + H]⁺ 869.4112, found 869.4109.

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Thr-(α -O-D-GlcNAc)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (124). The glycosylated amino acid building block **106** (82 mg, 0.13 mmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the

automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **124** was obtained and then purified by reversed-phase HPLC (t_R 34.7 min) and freeze-dried.

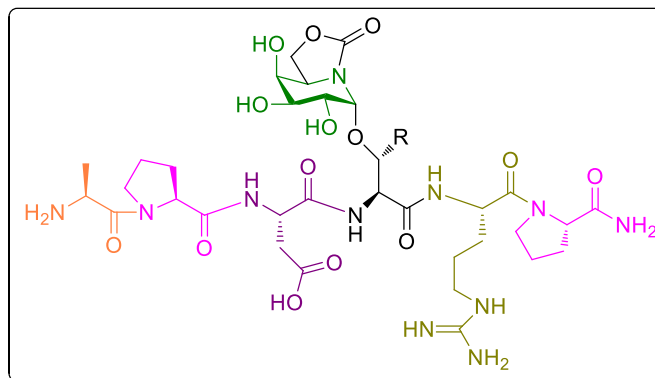
^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (1:9), amide region): δ 8.70 (d, 1 H, $J = 7.1$ Hz, NH_{Asp}), 8.50 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, NH_{Thr}), 8.33 (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz, NH_{Arg}), 8.01 (d, 1 H, $J = 9.5$ Hz, NH_{Ac}), 7.69 (s, 1 H, $\text{NH}_{2\text{term.}}$), 7.19 (t, 1 H, NH_{Arg}), 6.98 (s, 1 H, $\text{NH}_{2\text{term.}}$).

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.10 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, $\text{H}_{1\text{S}}$), 4.87 (t, 1 H, $J = 7.0$ Hz, $\text{H}_{\alpha\text{Asp}}$), 4.63-4.70 (m, 2 H, $\text{H}_{\alpha\text{Arg}}$, $\text{H}_{6\text{S}}$), 4.48-4.56 (m, 2 H, $\text{H}_{\alpha\text{Pro}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Thr}}$), 4.36-4.43 (m, 3 H, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Pro}}$, $\text{H}_{6\text{S}}$), 4.28-4.34 (m, 1 H, $\text{H}_{\beta\text{Thr}}$), 3.87-3.97 (m, 2 H, $\text{H}_{2\text{S}}$, $\text{H}_{5\text{S}}$), 3.59-3.79 (m, 6 H, $4\text{H}_{\delta\text{Pro}}$, $\text{H}_{3\text{S}}$, $\text{H}_{4\text{S}}$), 3.23 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz, 2 $\text{H}_{\delta\text{Arg}}$), 2.84-3.04 (m, 2 H, 2 $\text{H}_{\beta\text{Asp}}$), 2.26-2.40 (m, 2 H, 2 $\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 1.85-2.12 (m, 10 H, $\text{H}_{\beta\text{Arg}}$, 2 $\text{H}_{\beta\text{Pro}}$, 4 $\text{H}_{\gamma\text{Pro}}$, NHCOCH_3), 1.64-1.79 (m, 3 H, 2 $\text{H}_{\gamma\text{Arg}}$, $\text{H}_{\beta\text{Arg}}$), 1.56 (d, 3 H, $J = 7.0$ Hz, CH_3Ala), 1.19 (d, 3 H, $J = 6.4$ Hz, CH_3Thr).

^{13}C NMR (100.6 MHz, D_2O): δ 176.8, 174.3, 173.8, 173.4, 172.8, 171.0, 170.8, 169.2 (CO), 157.6 (NCO_2), 156.8 ($\text{C}=\text{NH}_{\text{Arg}}$), 81.1 ($\text{C}_{1\text{S}}$), 74.9 ($\text{C}_{\beta\text{Thr}}$), 73.4 ($\text{C}_{4\text{S}}$), 71.0 ($\text{C}_{3\text{S}}$), 67.5 ($\text{C}_{6\text{S}}$), 60.3 ($\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 60.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 57.1 ($\text{C}_{\alpha\text{Thr}}$), 53.4 ($\text{C}_{5\text{S}}$), 52.9 ($\text{C}_{2\text{S}}$), 51.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Arg}}$), 50.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Asp}}$), 48.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 47.8 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 47.7 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 40.5 ($\text{C}_{\delta\text{Arg}}$), 35.5 ($\text{C}_{\beta\text{Asp}}$), 29.6 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 29.5 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 27.7 ($\text{C}_{\beta\text{Arg}}$), 24.7 (2 $\text{C}_{\gamma\text{Pro}}$), 24.2 ($\text{C}_{\gamma\text{Arg}}$), 22.2 (NHCOCH_3), 18.1 (CH_3Thr), 15.1 (CH_3Ala).

HRFABMS Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_{12}\text{O}_{14}^{2+}$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^+$ 442.2170, found 442.2170.

Preparation of OGJ derivatives.



127, APDS(α -sp²-Gal)RP, R = H

128, APDT(α -sp²-Gal)RP, R = CH₃

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Ser(α -O-sp²Gal)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (127). The glycosylated amino acid building block **107** (84 mg, 0.13 mmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **127** was obtained and then purified by reversed-phase HPLC (t_R 27.45 min) and freeze-dried.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/H₂O (1:9), amide region): δ 8.63 (d, 1 H, J = 6.9 Hz, NH_{Asp}), 8.43 (d, 1 H, J = 7.2 Hz, NH_{Arg}), 8.38 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, NH_{Ser}), 7.71 (s, 1 H, NH_{2 term.}), 7.13-7.22 (m, 1 H, NH_{Arg}), 7.00 (s, 1 H, NH_{2 term.}).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.19 (d, 1 H, J = 4.1 Hz, H_{1S}), 4.60-4.72 (m, 3 H, H α _{Ser}, H α _{Asp}, H α _{Arg}), 4.35-4.57 (m, 5 H, 2 H α _{Pro}, H α _{Ala}, 2 H_{6S}), 4.14 (t, 1 H, J = 7.8 Hz, H_{5S}), 3.99 (s, 1 H, H_{4S}), 3.78-3.93 (m, 5 H, H δ _{Pro}, 2 H β _{Ser}, H_{2S}, H_{3S}), 3.71-3.76 (m, 1 H, H δ _{Pro}), 3.62-3.69 (m, 2 H, 2 H δ _{Pro}), 3.24 (t, 2 H, J = 6.9 Hz, H δ _{Arg}), 2.80-2.97 (m, 2 H, 2 H β _{Asp}), 2.29-2.40 (m, 2 H, 2 H β _{Pro}), 1.85-2.12 (m, 7 H, H β _{Arg}, 2 H β _{Pro}, 4 H γ _{Pro}), 1.64-1.81 (m, 3 H, 2 H γ _{Arg}, H β _{Arg}), 1.56 (d, 3 H, J = 7.0 Hz, CH₃_{Ala}).

^{13}C NMR (100.6 MHz, D_2O): δ 176.8, 174.7, 174.4, 173.5, 172.2, 170.8, 169.3 (CO), 156.7 ($\text{C}=\text{N}_{\text{Arg}}$), 82.0 ($\text{C}_{1\text{S}}$), 69.3 ($\text{C}_{3\text{S}}$), 69.0 ($\text{C}_{4\text{S}}$), 67.5 ($\text{C}_{2\text{S}}$), 67.0 ($\text{C}_{\text{b Ser}}$), 64.5 ($\text{C}_{6\text{S}}$), 60.4 ($\text{C}\alpha_{\text{Pro}}$), 60.3 ($\text{C}\alpha_{\text{Pro}}$), 53.1 ($\text{C}\alpha_{\text{Ser}}$), 52.7 ($\text{C}_{5\text{S}}$), 51.3 ($\text{C}\alpha_{\text{Asp}}$), 50.2 ($\text{C}\alpha_{\text{Arg}}$), 48.1 ($\text{C}\alpha_{\text{Ala}}$), 47.9 ($\text{C}\delta_{\text{Pro}}$), 47.6 ($\text{C}\delta_{\text{Pro}}$), 40.5 ($\text{C}\delta_{\text{Arg}}$), 35.7 ($\text{C}\beta_{\text{Asp}}$), 29.5 ($2\text{C}\beta_{\text{Pro}}$), 27.5 ($\text{C}\beta_{\text{Arg}}$), 24.7 ($2\text{C}\gamma_{\text{Pro}}$), 24.1 ($\text{C}\gamma_{\text{Arg}}$), 15.1 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

HRFABMS Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{N}_{11}\text{O}_{14}^{2+}$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^+$ 414.6959, found 414.6964.

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Thr(α -O-sp 2 Gal)-L-Arg-L-Pro-NH $_2$) (128). The glycosylated amino acid building block **108** (81 mg, 0.13 mmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **128** was obtained and then purified by reversed-phase HPLC (t_{R} 34.05 min), and freeze-dried.

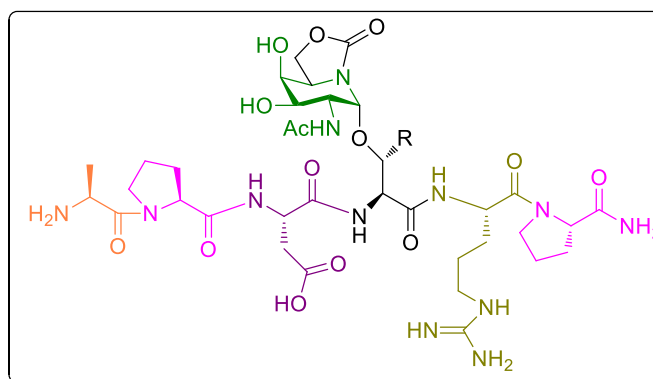
^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (1:9), amide region): δ 8.69 (d, 1 H, $J = 7.1$ Hz, NH_{Asp}), 8.52 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz, NH_{Thr}), 8.23 (d, 1 H, $J = 7.2$ Hz, NH_{Arg}), 7.69 (s, 1 H, $\text{NH}_{2\text{term}}$), 7.14-7.20 (m, 1 H, NH_{Arg}), 6.69 (s, 1 H, $\text{NH}_{2\text{term}}$).

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.28 (d, 1 H, $J = 4.5$ Hz, $\text{H}_{1\text{S}}$), 4.79 (m, 1 H, $\text{H}\alpha_{\text{Asp}}$), 4.67-4.72 (m, 1 H, $\text{H}\alpha_{\text{Arg}}$), 4.53-4.59 (m, 2 H, $\text{H}\alpha_{\text{Thr}}$, $\text{H}_{6\text{S}}$), 4.50 (t, 1 H, $J = 7.4$ Hz, $\text{H}\alpha_{\text{Pro}}$), 4.35-4.46 (m, 3 H, $\text{H}\alpha_{\text{Pro}}$, $\text{H}\alpha_{\text{Ala}}$, $\text{H}_{6\text{S}}$), 4.21-4.31 (m, 2 H, $\text{H}_{5\text{S}}$, $\text{H}\beta_{\text{Thr}}$), 4.02 (s, 1 H, $\text{H}_{4\text{S}}$), 3.94 (dd, 1 H, $J = 10.2, 2.6$ Hz, $\text{H}_{3\text{S}}$), 3.78-3.89 (m, 2 H, $\text{H}\delta_{\text{Pro}}$, $\text{H}_{2\text{S}}$), 3.61-3.76 (m, 3 H, 3 $\text{H}\delta_{\text{Pro}}$), 3.25 (t, 2 H, $J = 7.1$ Hz, 2 $\text{H}\delta_{\text{Arg}}$), 2.84-3.04 (m, 2 H, 2 $\text{H}\beta_{\text{Asp}}$), 2.28-2.40 (m, 2 H, 2 $\text{H}\beta_{\text{Pro}}$), 1.86-2.13 (m, 7 H, $\text{H}\beta_{\text{Arg}}$, 2 $\text{H}\beta_{\text{Pro}}$, 4 $\text{H}\gamma_{\text{Pro}}$), 1.67-1.84 (m, 3 H, 2 $\text{H}\gamma_{\text{Arg}}$, $\text{H}\beta_{\text{Arg}}$), 1.56 (d, 3 H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 1.17 (d, 3 H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_{3\text{Thr}}$).

^{13}C NMR (75.5 MHz, D_2O): δ 176.8, 174.3, 173.4, 172.6, 171.4, 170.6, 169.2 (CO), 158.3 ($\text{NCO}_{2\text{Gal}}$), 156.7 ($\text{C}=\text{N}_{\text{Arg}}$), 82.0 ($\text{C}_{1\text{S}}$), 73.9 ($\text{C}\beta_{\text{Thr}}$), 69.3 ($\text{C}_{3\text{S}}$), 69.1 ($\text{C}_{4\text{S}}$), 67.5 ($\text{C}_{2\text{S}}$), 64.5 ($\text{C}_{6\text{S}}$), 60.3 ($2\text{C}\alpha_{\text{Pro}}$), 56.9 ($\text{C}\alpha_{\text{Thr}}$), 52.9 ($\text{C}_{5\text{S}}$), 51.4 ($\text{C}\alpha_{\text{Arg}}$), 50.1 ($\text{C}\alpha_{\text{Asp}}$), 48.0 ($\text{C}\alpha_{\text{Ala}}$), 47.9 ($\text{C}\delta_{\text{Pro}}$), 47.7 ($\text{C}\delta_{\text{Pro}}$), 40.5 ($\text{C}\delta_{\text{Arg}}$), 35.5 ($\text{C}\beta_{\text{Asp}}$), 29.6 ($\text{C}\beta_{\text{Pro}}$), 29.4 ($\text{C}\beta_{\text{Pro}}$), 27.5 ($\text{C}\beta_{\text{Arg}}$), 24.6 ($2\text{C}\gamma_{\text{Pro}}$), 24.1 ($\text{C}\gamma_{\text{Arg}}$), 17.2 ($\text{CH}_{3\text{Thr}}$), 15.0 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

HRFABMS Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{N}_{11}\text{O}_{14}^{2+}$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^+$ 421.7038, found 421.7047.

Preparation of 2-acetamido-2-deoxy-OGJ derivatives.



129, APDS(α -sp²-GalNAc)RP, R = H

130, APDT(α -sp²-GalNAc)RP, R = CH₃

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Ser-(α -O-D-GalNAc)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (129). The glycosylated amino acid building block **119** (82 mg, 0.13 mmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **129** was obtained and then purified by reversed-phase HPLC (t_R 29.1 min), and freeze-dried.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/H₂O (1:9), amide region): δ 8.54 (d, 1 H, J = 6.7 Hz, NH_{Asp}), 8.48 (d, 1 H, J = 6.9 Hz, NH_{Arg}), 8.41 (d, 1 H, J = 7.2 Hz, NH_{Ser}), 8.08 (d, 1 H, J = 9.3 Hz, NH_{Ac}), 7.72 (s, 1 H, NH_{2term.}), 7.25-7.32 (m, 1 H, NH_{Arg}), 7.02 (s, 1 H, NH_{2term.}).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.10 (d, 1 H, J = 4.2 Hz, H_{1S}), 4.63-4.72 (m, 2 H, H _{α Arg}, H _{α Asp}), 4.59 (t, 1 H, J = 5.6 Hz, H _{α Ser}) 4.40-4.56 (m, 3 H, H _{α Pro}, 2 H_{6S}), 4.32-4.39 (m, 2 H, H _{α Pro}, H _{α Ala}), 4.21 (dd, 1 H, J = 10.8, 4.2 Hz, H_{2S}), 4.09-4.15 (m, 1 H, H_{5S}), 3.98 (s, 1 H, H_{4S}), 3.89 (dd, 1 H, J = 11.0, 2.1 Hz, H_{3S}), 3.58-3.86 (m, 6 H, 4 H _{δ Pro}, 2 H _{β Ser}), 3.21 (t, 2 H, J = 6.7 Hz, 2 H _{δ Arg}), 2.83-3.00 (m, 2 H, 2 H _{β Asp}), 2.25-2.38 (m, 2 H, 2 H _{β Pro}),

1.83-2.11 (m, 10 H, H_{βArg}, 2 H_{βPro}, 4 H_{γPro}, NHCOCH₃), 1.63-1.79 (m, 3 H, 2 H_{γArg}, H_{βArg}), 1.52 (d, 3 H, *J* = 7.0 Hz, CH_{3Ala}).

¹³C NMR (100.6 MHz, D₂O): δ 176.8, 174.5, 173.8, 173.6, 172.1, 171.2, 170.6, 169.3 (CO), 158.4 (NCO₂), 156.8 (C=NH_{Arg}), 80.7 (C_{1S}), 68.3 (C_{4S}), 67.8 (C_{3S}), 67.0 (C_{βSer}), 64.6 (C_{6S}), 60.4 (C_{αPro}), 60.3 (C_{αPro}), 53.1 (C_{αSer}), 52.7 (C_{5S}), 51.2 (C_{αArg}), 50.1 (C_{αAsp}), 48.7 (C_{2S}), 48.1 (C_{αAla}), 47.9 (C_{δPro}), 47.7 (C_{δPro}), 40.5 (C_{δArg}), 35.2 (C_{βAsp}), 29.6 (C_{βPro}), 29.4 (C_{βPro}), 27.6 (C_{βArg}), 24.7 (2C_{γPro}), 24.1 (C_{γArg}), 22.1 (NHCOCH₃), 15.1 (CH_{3Ala}).

HRFABMS Calcd for C₃₅H₅₇N₁₂O₁₄²⁺ [M + 2H]⁺ 869.4112, found 869.4109.

(L-Ala-L-Pro-L-Asp-L-Thr-(α-O-D-GalNAc)-L-Arg-L-Pro-NH₂) (130). The glycosylated amino acid building block **120** (82 mg, 0.13 mmol) was coupled manually following the SPPS methodology, while the other Fmoc-amino acids were coupled in the automated mode. After deprotection and cleavage from the resin, compound **130** was obtained and then purified by reversed-phase HPLC (*t_R* 34.6 min) and freeze-dried.

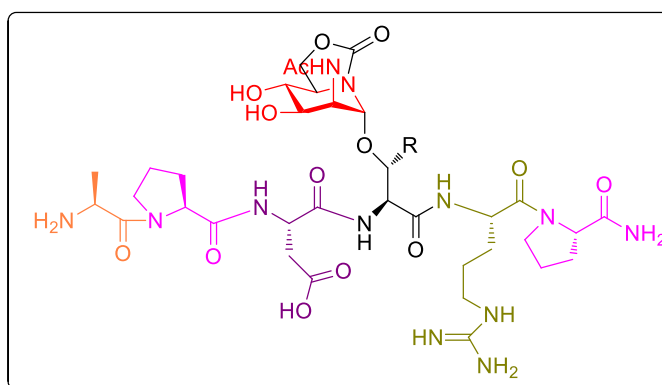
¹H NMR (400 MHz, D₂O/H₂O (1:9), amide region): δ 8.69 (d, 1 H, *J* = 7.0 Hz, NH_{Asp}), 8.53 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, NH_{Thr}), 8.31 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, NH_{Arg}), 7.99 (d, 1 H, *J* = 9.8 Hz, NH_{Ac}), 7.71 (s, 1 H, NH_{2term}), 7.16-7.24 (m, 1 H, NH_{Arg}), 6.99 (s, 1 H, NH_{2term}).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.10 (d, 1 H, *J* = 4.1 Hz, H_{1S}), 4.86-4.90 (m, 1 H, H_{αAsp}), 4.64-4.70 (m, 1 H, H_{αArg}), 4.34-4.59 (m, 6 H, H_{αAla}, 2 H_{αPro}, H_{αThr}, 2 H_{6S}), 4.26-4.32 (m, 1 H, H_{βThr}), 4.14-4.25 (m, 2 H, H_{2S}, H_{5S}), 4.02 (s, 1 H, H_{4S}), 3.93 (d, 1 H, *J* = 10.9 Hz, H_{3S}), 3.59-3.77 (m, 4 H, 4H_{δPro}), 3.22 (t, 2 H, *J* = 6.4 Hz, 2 H_{δArg}), 2.84-3.05 (m, 2 H, 2 H_{βAsp}), 2.25-2.40 (m, 2 H, 2H_{βPro}), 1.83-2.12 (m, 10 H, H_{βArg}, 2 H_{βPro}, 4 H_{γPro}, NHCOCH₃), 1.61-1.78 (m, 3 H, 2H_{γArg}, H_{βArg}), 1.54 (d, 3 H, *J* = 7.0 Hz, CH_{3Ala}), 1.18 (d, 3 H, *J* = 6.4 Hz, CH_{3Thr}).

^{13}C NMR (100.6 MHz, D_2O): δ 176.8, 174.0, 173.9, 173.5, 172.7, 171.0, 170.8, 169.3, (CO), 158.1 (NCO_2), 156.8 ($\text{C}=\text{NH}_{\text{Arg}}$), 81.2 ($\text{C}_{1\text{S}}$), 74.5 ($\text{C}_{\beta\text{Thr}}$), 68.5 ($\text{C}_{4\text{S}}$), 68.2 ($\text{C}_{3\text{S}}$), 64.5 ($\text{C}_{6\text{S}}$), 60.3 ($\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 60.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 57.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Thr}}$), 53.0 ($\text{C}_{5\text{S}}$), 51.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Arg}}$), 49.9 ($\text{C}_{\alpha\text{Asp}}$), 48.7 ($\text{C}_{2\text{S}}$), 48.1 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 47.9 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 47.7 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 40.6 ($\text{C}_{\delta\text{Arg}}$), 35.2 ($\text{C}_{\beta\text{Asp}}$), 29.6 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 29.5 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 27.8 ($\text{C}_{\beta\text{Arg}}$), 24.7 ($2\text{C}_{\gamma\text{Pro}}$), 24.2 ($\text{C}_{\gamma\text{Arg}}$), 22.3 (NHCOCH_3), 18.1 (CH_3Thr), 15.1 (CH_3Ala).

HRFABMS Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_{12}\text{O}_{14}^{2+}$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^+$ 442.2170, found 442.2161.

Preparation of 2-acetamido-2-deoxy-OMJ derivatives. The glycopeptides **125** and **126** with *manno* configuration are currently being purified by HPLC.



125, APDS(α - sp^2 -ManNAc)RP, R = H

126, APDT(α - sp^2 -ManNAc)RP, R = CH_3

References

- ¹ T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Molecular Therapy*, **2013**, *21*, 526-532.
- ² K. Higaki, L. Li, U. Bahrudin, S. Okuzawa, A. Takamuram, K. Yamamoto, K. Adachi, R. C. Paraguison, T. Takai, H. Ikehata, L. Tominaga, I. Hisatome, M. Iida, S. Ogawa, J.

Matsuda, H. Ninomiya, Y. Sakakibara, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Nanba, *Hum Mutat.*, **2011**, *32*, 843-852.

³ A. M. Hofmann, F. Wurm, H. Frey, *Macromolecules*, **2011**, *44*, 4648-4657.

⁴ V. Gómez-Pérez, J. I. Manzano, R. García-Hernández, S. Castanys, J. M. Campos Rosa, F. Gamarro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, *58*, 4103-4112.

⁵ S. Wagenpfeil, U. Treiber, A. Lehmer, *Artif. Intell. Med.*, **2006**, *37*, 65-71.

⁶ K. Seifert, S. Matu, F. J. Pérez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, S. L. Croft, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2003**, *22*, 380-387.

⁷ G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **1929**, *62*, 1613-1614.

⁸ V. M. Díaz Pérez, M. I. García Moreno, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. C. Díaz Arribas, J. Cañada, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 136-143.

⁹ M. I. García-Moreno, P. Díaz-Pérez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2903-2913.

¹⁰ E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Chasseraud, A. Ahidouch, C. Ortiz Mellet, H. Ouadid-Ahidouch J. M. García Fernández, *Chem. Commun.*, **2010**, 5328-5330.

¹¹ E. M. Sánchez-Fernández, E. Álvarez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 11722-11728.

¹² E. M. Sánchez-Fernández, V. Gómez-Pérez, R. García-Hernández, J. M. García Fernández, G. B. Plata, J. M. Padrón, C. Ortiz Mellet, S. Castanys, F. Gamarro, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 21812-21822.

¹³ E. M. Sánchez Fernández, R. Gonçalves-Pereira, R. Rísquez Cuadro, G. B. Plata, T. Butters, J. M. García Fernández, J. M. Padrón, C. Ortiz Mellet, *Carbohydr. Res.*, **2016**, in press.

¹⁴ H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1989**, *8*, 751-769.