



Síntesis estereoselectiva de azúcares y *N*-acetil iminoazúcares relacionados con enfermedades de depósito lisosomal

Àlex de la Fuente Cebrián

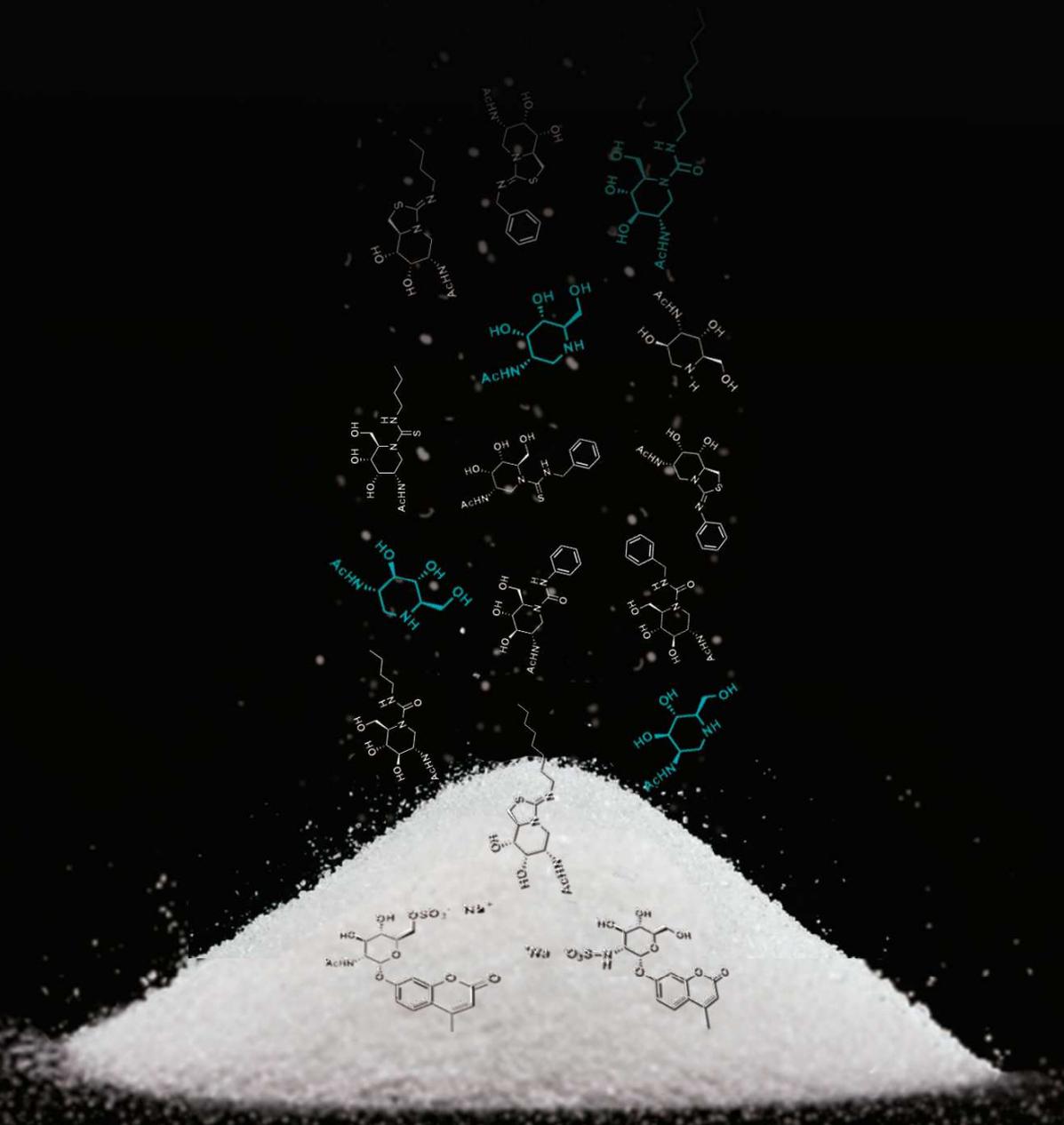
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Síntesis estereoselectiva de azúcares y N-acetil iminoazúcares relacionados con enfermedades de depósito lisosomal

Àlex de la Fuente Cebrián



Síntesis estereoselectiva de azúcares y *N*-acetil iminoazúcares relacionados con enfermedades de depósito lisosomal

Àlex de la Fuente Cebrián

Programa de doctorado de Química Orgánica

Director de tesis: Dr. Antoni Riera Escalé

Departamento de Química Orgánica

Universitat de Barcelona



INSTITUTE
FOR RESEARCH
IN BIOMEDICINE



Memoria presentada por Àlex de la Fuente Cebrián para optar al grado de DOCTOR en ciencias químicas por la Universitat de Barcelona

Àlex de la Fuente Cebrián

Revisada por:

Dr. Antoni Riera Escalé

Barcelona, Diciembre de 2014

Este trabajo se ha realizado con el soporte económico del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte mediante una beca predoctoral del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) y del IRB Barcelona con una beca predoctoral durante el curso 2010-2011. El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2011-23620), la Generalitat de Catalunya (2009SGR-00901) y el soporte económico del IRB Barcelona.

El trabajo experimental se ha desarrollado en el laboratorio de la Unitat de Recerca en Síntesis Asimétrica (URSA) perteneciente al Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB Barcelona) ubicada en el Parc Científic de Barcelona.

Índice general

Capítulo 1. Introducción y objetivos.	1
Capítulo 2. Antecedentes.	11
Capítulo 3. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc) y derivados mediante apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos.	39
Capítulo 4. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc) y derivados mediante aplicación de la sustitución alílica catalizada por paladio.	97
Capítulo 5. Enfermedad de Sanfilippo: síntesis de sustratos para la diagnosis de las variantes A y D.	155
Capítulo 6. Cáncer de próstata: síntesis de los estereoisómeros de EPI001.	183
Capítulo 7. Conclusiones	201
Capítulo 8. Experimental Part	205
Anexo 1. Selección de espectros.	311
Anexo 2. Datos de Rayos X.	321
Anexo 3. Valores de inhibición de iminoazúcares vs glicosidasas	329
Anexo 4. Índice de estructuras	337
Índice detallado.	347

Abreviaturas

4MU	4-metilumbeliferil	DIBALH	Hidruro de diisobutil aluminio
Ac	Acetilo	DIPEA	Diisopropiletil amina
Ac ₂ O	Anhídrido acético	DIPT	Tartrato de diisopropilo
ACN	Acetonitrilo	DGJ	1-desoxigalactonojirimicina
AcOEt	Acetato de etilo	DGJNAc	2-acetamido-1,2-didesoxigalactonojirimicina
Aq.	Acuoso	DMAP	4-N,N-dimetilaminopiridina
AR	Receptor androgénico	DMDP	2,5-desoxi-2,5-imino-D-manitol
Bn	Bencilo	DME	dimetoxietano
Boc	<i>Terc</i> -butoxicarbonilo	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Boc ₂ O	Dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo	DMJ	1-desoximanojirimicina
Bu	Butilo	DMJNAc	2-acetamido-1,2-didesoximanojirimicina
Bz	Benzoato	DMP	2,2'-dimetoxipropano
Bzh	Bencidrilo, difenilmetilo	DMSO	Dimetilsulfóxido
CAN	Nitrato de amonio y cerio	DNJ	1-desoxinojirimicina
Cat.	Catalizador	DNJNAc	2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina
Cbz	Benciloxycarbonilo	dppe	difenilfosfoetano
Cl	Ionización química	d.r.	Relación diastereoisomérica
CRPC	cáncer de próstata resistente a castración	ee	Exceso enantiomérico
DAJNAc	2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina	EI	Impacto electrónico
DAST	Trifluoruro de dietilaminoazufre	ES	Electrospray
DBU	1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno	Et ₂ O	Éter dietílico
DBTO	Óxido de dibutilestaño	EtOH	Etanol
DCE	dicloroetano	FGI	Intercambio de grupos funcionales
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo	Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonilo
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo	GAG	glicosaminoglicanos

h	Hora	r.r.	Relación regioisomérica
HNJ	Homonojirimicina	r.t.	Temperatura ambiente
HS	Heparan sulfato	SAD	Dihidroxilación Asimétrica de Sharpless
HTS	<i>High throughput screening</i>	SAE	Epoxidación Asimétrica de Sharpless
IPA	Isopropanol	STD	Diferencia de transferencia de saturación
LABNAc	2-acetamido-1,4-imino-1,3,4-tridesoxi-L-arabinitol	t.a.	Temperatura ambiente
LSD	Enfermedades de depósito lisosomal	TBABz	tetrabutilamonio benzoato
MCPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico	^t Bu	<i>Terc</i> -butilo
MPS	Mucopolisacaridosis	TBS	<i>Terc</i> -butildimetilsililo
MeOH	Metanol	TBDPS	<i>Terc</i> -butildifenilsililo
MIBK	Metilisobutilcetona	TIPS	triisopropilsililo
MsCl	Cloruro de metansulfonilo	TEA / Et ₃ N	Trietilamina
n.d.	No determinado	TFA	Ácido trifluoroacético
n.i.	No inhibición	THF	Tetrahidrofurano
NJ	Nojirimicina	Tf ₂ O	Anhídrido trifluorometansulfónico
NMO	N-óxido de metilmorfolina	TMS	Trimetilsililo o trimetilsilano
Nu	Nucleófilo	TMA	Trimetilamina
n-Oct	octilo	TPAP	Perrutenoato de tetrapropilamonio
PCC	Clorocromato de piridinio	TsCl	Cloruro de tosilo
Ph	Fenilo	TTMPP	Tris(2,4,6-trimetoxifenil) phosphine
PhSH	Tiofenol	URSA	Unitat de Recerca en Síntesis Asimétrica
PNB	<i>para</i> -nitrobenzoato		
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico		
pyr	Piridina		
RCM	Ring closing metathesis		
RMN	Resonancia magnética nuclear		
r.d.	Relación diastereoisomérica		

1

Introducción y objetivos

1. Introducción y objetivos

Uno de los grandes objetivos y aplicaciones de la química orgánica consiste en desarrollar metodologías sintéticas para obtener compuestos naturales o nuevos que se puedan aplicar para el tratamiento de distintas enfermedades. Las biomoléculas constituyentes de los organismos vivos se pueden clasificar en cinco grandes grupos: lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y otras moléculas pequeñas donde se incluyen hormonas, vitaminas, etc. Históricamente, los químicos sintéticos han centrado su actividad científica en la síntesis de moléculas pequeñas con gran complejidad estructural que representaran un reto sintético. Por otro lado, la bioquímica se ha centrado más en el estudio de proteínas y ácidos nucleicos para entender los procedimientos de reconocimiento con dichas moléculas pequeñas. Por ello, lípidos y carbohidratos se han visto históricamente relegados a un segundo plano. Sin embargo, en las últimas décadas el interés por la glicobiología se ha visto incrementado exponencialmente. De hecho, los carbohidratos son constituyentes de un gran número de conjugados como glicoproteínas, glicolípidos o proteoglicanos y participan de muchos procesos biológicos, entre ellos, procesos de reconocimiento celular. En consecuencia, existen familias de enzimas que participan del metabolismo de productos glicosídicos siendo las más estudiadas las glicosidasas, principalmente en la hidrólisis de enlaces glicosídicos en polisacáridos, y las glicosiltransferasas, básicamente en la biosíntesis de diversos tipos de productos glicosídicos.

Las glicosidasas participan del metabolismo de oligosacáridos y de los mecanismos de control de la biosíntesis de glicoproteínas. Por ello, la inhibición de estas enzimas puede tener importantes efectos en los mecanismos de control biosintético, maduración de proteínas, transporte de proteínas y procesos de reconocimiento celular. Este principio junto con la elevada participación de estas enzimas en procesos biológicos las convierte en objetivos para el tratamiento de distintos tipos de enfermedades de naturaleza genética, vírica o procesos de metástasis. Por lo tanto, los inhibidores de glicosidasas son candidatos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades y el análisis de su modo de unión permite realizar estudios para elucidar el mecanismo de funcionamiento de las glicosidasas. Esta información permite ampliar el conocimiento sobre las glicosidasas generando puertas de entrada para la síntesis de nuevas moléculas con mayor selectividad y capacidad de inhibición. ^[1]

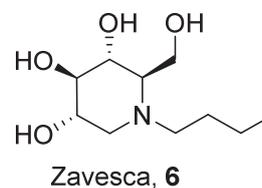
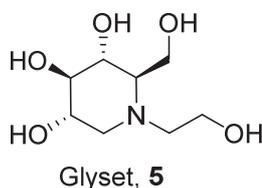
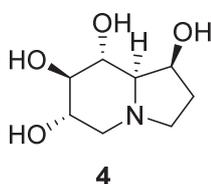
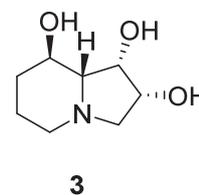
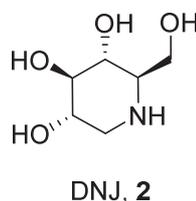
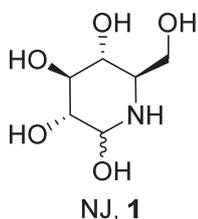
En los años 60, se aisló por primera vez de varias especies del género *Streptomyces* la nojirimicina (**1**), un alcaloide polihidroxilado que demostró ser un buen inhibidor de α y β -glucosidasas. La determinación de su estructura reveló que se trataba de una especie mimética a la glucosa, en la que un átomo de nitrógeno se situaba sustituyendo al oxígeno endocíclico. Aparentemente, esta diferencia estructural le aportaba unas propiedades inhibitorias muy interesantes. En la misma década, la interconversión del oxígeno endocíclico de los azúcares por otros elementos como el nitrógeno era un reto sintético que se tradujo en la publicación de metodologías sintéticas para obtener este tipo de productos. Sin embargo, los compuestos con una funcionalidad hemiaminoacetal presentaban problemas de estabilidad dificultando tanto su síntesis como los análisis biológicos posteriores. Por ello

1. Introducción y objetivos

se diseñaron y aislaron derivados desoxigenados como la 1-desoxinojirimicina (**2**)^[2] que permitieron solucionar este problema manteniendo las propiedades inhibitorias de los compuestos originales. Estos compuestos se denominaron iminoazúcares o aza-azúcares.

Inicialmente, el desarrollo en el campo de los iminoazúcares no fue muy rápido. La elevada polaridad y solubilidad en agua de estos compuestos no permitía aislarlos de fuentes naturales y revelar nuevas estructuras con propiedades inhibitorias. Sin embargo, a partir de la década de los 90 se produce un cambio de tendencia. Las nuevas técnicas permiten descubrir cientos de nuevos iminoazúcares provenientes de fuentes naturales con propiedades inhibitorias frente a glicosidasas. Así, se descubren iminoazúcares con estructuras más complejas como la swainsonina (**3**) o la castanospermina (**4**). La elevada complejidad estructural de los nuevos iminoazúcares así como el desarrollo de la química sintética en las últimas décadas ha convertido a estos productos en auténticos retos sintéticos para los químicos orgánicos. Además, se aumenta el ámbito de aplicación de los iminoazúcares que ya no se limita únicamente a inhibidores de glicosidasas sino también a glicosiltransferasas, glicógeno fosforilasas, enzimas procesadores de nucleósidos, azúcar nucleótido mutasas y metaloproteinasas. Además, una de sus aplicaciones más relevantes ha sido su aplicación como chaperonas químicas.^[3]

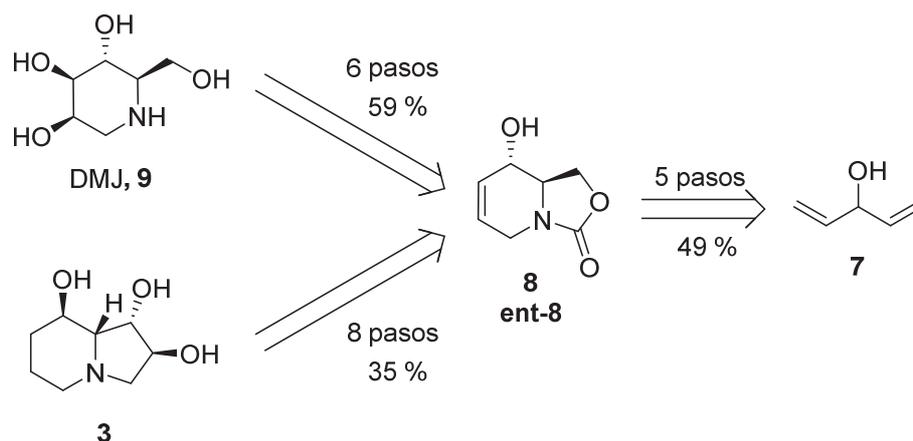
El elevado alcance terapéutico de los iminoazúcares juntamente con el desarrollo de técnicas para la obtención de nuevos fármacos que permiten un mejor conocimiento del *target* (cristalización de proteínas, estudios computacionales, técnicas de RMN, etc) y la aparición de nuevas herramientas sintéticas que permiten obtener productos estructuralmente complejos ha hecho que el campo de los iminoazúcares haya presentado un crecimiento exponencial. Incluso se pueden hallar ejemplos de iminoazúcares que se utilizan actualmente como fármacos como es el caso de Glyset (**5**), para el tratamiento de diabetes tipo II, o Zavesca (**6**) para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.^[4]



Des de un punto de vista químico, los iminoazúcares presentan una gran complejidad estructural. Se trata de moléculas pequeñas con un esqueleto polihidroxlado, distintos tamaños del anillo que contiene el nitrógeno, número variable de centros quirales (cuyo control es clave para obtener compuestos enantioméricamente puros) y distintos tipos de sustituyentes. Todos estos factores determinan su selectividad y potencia frente a las glicosidasas.^[5]

Generalmente, la síntesis de iminoazúcares se basa en el *chiral pool*. Se acostumbra a tomar como productos de partida otros azúcares como glucosa o manosa y se introduce el nitrógeno del anillo en transformaciones posteriores. Sin embargo, estos procedimientos acostumbran a ser largos, tediosos con bajos rendimientos globales y donde se requiere la aplicación de extensiva de grupos protectores. Además, estos procedimientos permiten obtener un único iminoazúcar. Actualmente, el enfoque del desarrollo de metodologías sintéticas de iminoazúcares se encara más hacia estrategias que se basan en el uso de un *scaffold* base para la obtención de diversos iminoazúcares utilizando métodos sintéticos similares. De este modo, se pueden obtener bibliotecas de compuestos que pueden ser evaluados biológicamente.^[6]

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado en la última década en la síntesis de iminoazúcares. Aprovechando el conocimiento del grupo en la síntesis asimétrica se desarrolló una síntesis para la obtención del carbamato cíclico **8** partiendo del 1,4-pentadien-3-ol **7**.^[7] Este intermedio se había descrito anteriormente y se había aplicado para la síntesis de diversos iminoazúcares. Concretamente, en nuestro grupo de investigación se versatilizó su uso desarrollando metodología sintética para obtener la 1-desoximanojirimicina (DMJ, **9**) y la swainsonina (**3**), iminoazúcares ya conocidos con buenas propiedades como inhibidores de glicosidasas.^[8]

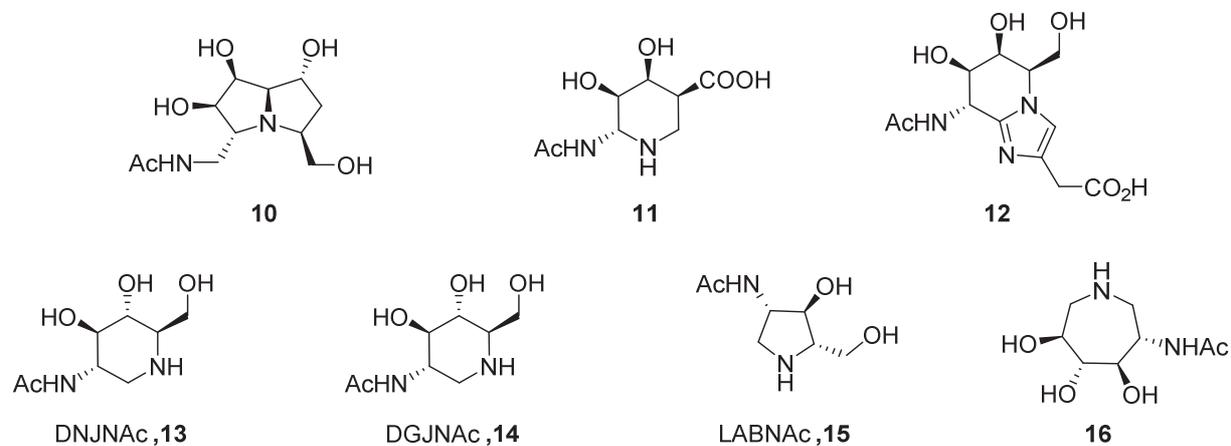


Al empezar esta tesis doctoral se planteó como utilizar el conocimiento previo de nuestro grupo de investigación para obtener nuevos iminoazúcares que plantearan un reto sintético y, al mismo tiempo, tuvieran un interés biológico. El proyecto se ha realizado en colaboración con los grupos del Prof. García-Fernández del IIQ-CSIC en Sevilla y de la Profra. Ortiz Mellet de la Facultad de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla. Esta colaboración ha permitido evaluar biológicamente los iminoazúcares de interés obtenidos en nuestro grupo de investigación.

Un análisis de los iminoazúcares inhibidores de glicosidasas permitió observar que ciertos inhibidores de hexosaminidasas incluían en su estructura una acetamida. Se pueden hallar ejemplos de productos naturales como la pochonicina (**10**), nagstatina (**11**) o siastatina B (**12**) y sintéticos como la 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc, **13**) y su versión *galacto* (DGJNAc, **14**), LABNAc (**15**) o azepanos (**16**)^[9,10] que incluyen en sus estructura esta funcionalidad y que presentan valores de inhibición entre micromolares y nanomolares. Se trata de productos que además tienen una elevada selectividad por hexosaminidasas lo que los convierte en moléculas con buenas perspectivas para el

1. Introducción y objetivos

tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal como el síndrome de Tay-Sachs o el síndrome de Sandhoff^[11,12], Alzheimer^[13] y, en menor medida, diabetes, Parkinson, osteoartritis y determinados tipos de cáncer^[14-16].



Sorprendentemente, la síntesis de acetamido iminoazúcares piperidínicos no ha sido muy explorada. De hecho, Fleet *et al.*^[17,18] publicaron en los 80 la primera síntesis de DNJNAc y su versión *mano* y, durante los años siguientes, han salido publicaciones esporádicas sobre la síntesis de algunos derivados *gluco* y *mano* así como sobre el estudio de sus propiedades biológicas.^[19-22] En 2010, de nuevo Fleet y colaboradores^[23,24] publicaron la síntesis de la versión *galacto* así como *N*-derivados que resultaron tener buenas propiedades para su cómo chaperonas químicas en tratamiento del síndrome de Fabry^[25]. En general, las metodologías sintéticas para la obtención de estos productos son siempre basadas en el *chiral pool*.

De acuerdo a estos precedentes, nos planteamos utilizar el carbamato cíclico **8**, para desarrollar metodologías para insertar una 2-acetamida en el esqueleto piperidínico del iminoazúcar y obtener compuestos ya descritos como **13** y también otras configuraciones estereoquímicas. Además, planteamos diseñar rutas sintéticas que permitiesen la síntesis de derivados modificando la amina en C2 o la amina endocíclica para construir pequeñas bibliotecas de compuestos que pudieran ser evaluados biológicamente como inhibidores de glicosidasas con especial interés en su aplicación en enfermedades de depósito lisosomal.

Así se plantearon tres rutas posibles para la inserción de la funcionalidad amina de forma estereoselectiva en la posición C2: 1) síntesis y apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y/o sulfatos cíclicos; 2) reordenamiento de Overman; 3) sustitución alílica catalizada por paladio. Una vez realizada esta acción el siguiente paso consistiría en la interconversión de grupos funcionales o bien en utilizar las olefinas libres insertando dioles mediante dihidroxilaciones o apertura de epóxidos para obtener los productos deseados (figura 1).

La exploración de la apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y/o sulfatos cíclicos para obtener DNJNAc constituye el primer objetivo de la presente tesis doctoral. La utilización de las otras metodologías para obtener 2-acetamido iminoazúcares con otras configuraciones estereoquímicas constituye el segundo objetivo.

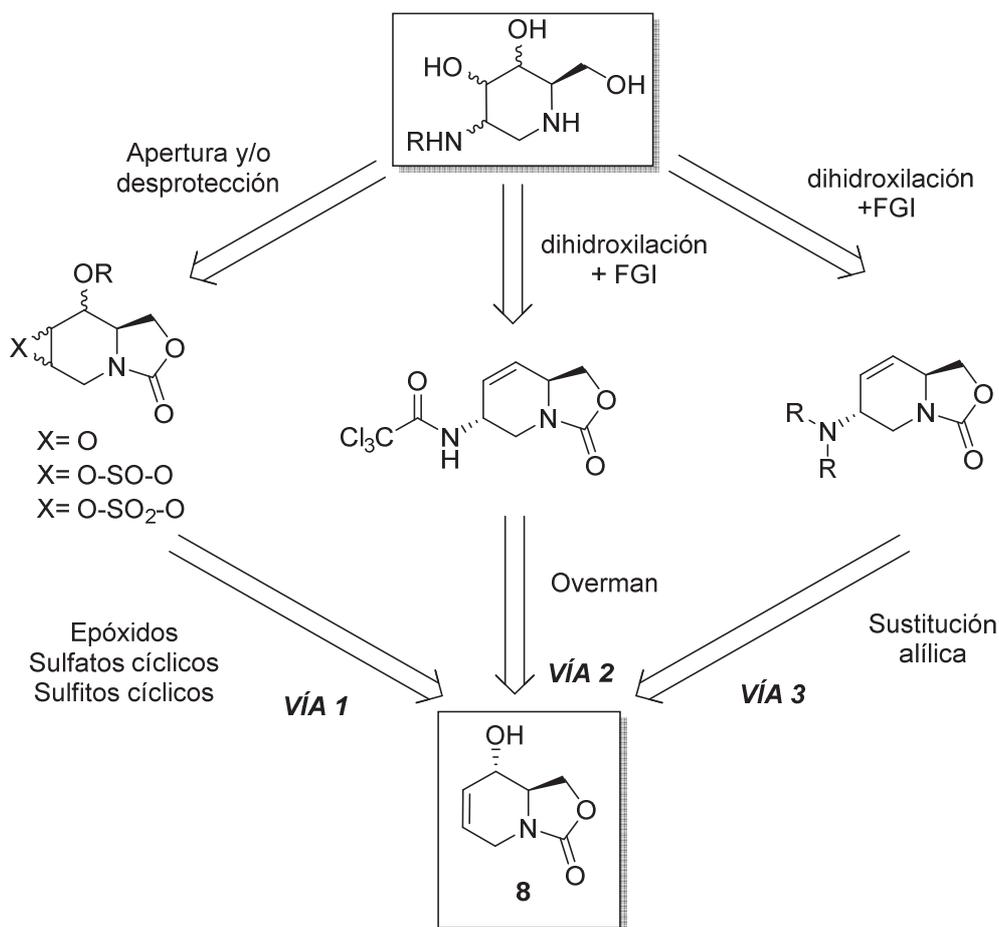
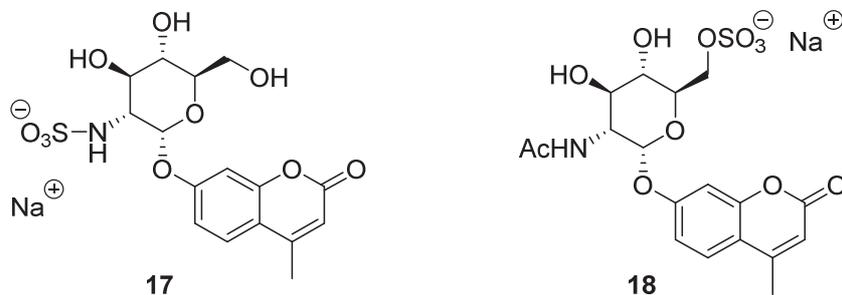


Figura 1. Esquema retrosintético para la obtención de iminoazúcares partiendo de **8**

La enfermedad de Sanfilippo, que agrupa cuatro subtipos, es una enfermedad de depósito lisosomal variante de la familia de las mucopolisacaridosis. Se han descrito varios iminoazúcares que se podrían aplicar en un futuro para su uso como chaperonas químicas en el tratamiento de esta enfermedad. La investigación de las distintas terapias para la enfermedad de Sanfilippo requiere de metodologías analíticas para el control de la actividad de las enzimas sulfatasas cuya falta de actividad es responsable de esta enfermedad. La técnica más común consiste en el uso de ensayos enzimáticos fluorimétricos utilizando sustratos que mimetizan al sustrato natural y que incluyen en su estructura una unidad fluorimétrica. Dichos sustratos han sido comercializados en los últimos años por la empresa Moscerdam[®], pero actualmente se han descatalogado varios de ellos. Por ello, en colaboración con la Dra. Fátima Bosch, directora del CBATEG (Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica, Universitat Autònoma de Barcelona) y la Dra. Antònia Ribes, responsable del departamento de Enfermedades Metabólicas Hereditarias del IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona) se planteó desarrollar metodologías sintéticas para la obtención de los sustratos aptos para la diagnosis de Sanfilippo A (**17**) y Sanfilippo D (**18**). Cabe destacar que los

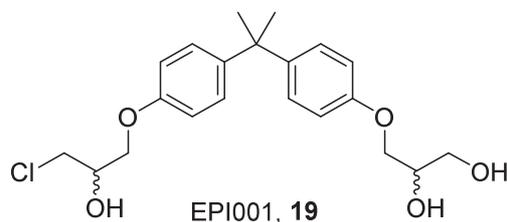
ensayos son extraordinariamente sensibles y que el nivel de pureza de los sustratos debe ser elevado para poder llevar a cabo los ensayos satisfactoriamente.



La síntesis de los sustratos para el diagnóstico de las enfermedades de Sanfilippo A y D constituye el tercer objetivo de la presente tesis doctoral.

El cáncer de próstata (segundo tipo de cáncer más común en el sexo masculino) se ha identificado en los últimos años el receptor androgénico (AR) como el principal *target* para atacar la enfermedad. Este receptor está constituido por cuatro dominios entre los que destacan el dominio de unión de ligando (LBD) y el denominado NTD, que es una secuencia de aminácidos sin estructura terciaria.^[26,27] La mayoría de terapias aplicadas en la actualidad se basan en actuar sobre el LBD. Sin embargo, en un porcentaje de los casos el cáncer es capaz de reproducirse incluso cuándo se ha producido la castración del paciente generando el llamado cáncer de próstata resistente a castración (*Castration-resistant prostate cancer*, CRPC). Por ello, actualmente se están desarrollando estudios para actuar sobre el NTD e intentar inhibir la acción del AR evitando la proliferación de las células cancerosas. Recientemente, se ha descubierto mediante técnicas de *high-throughput screening* una molécula capaz de unirse al NTD e inhibir la acción del receptor denominada EPI001 (**19**)^[28]. Las primeras pruebas ADME-tox también han determinado la baja toxicidad de dicha molécula.

EPI001 es un compuesto que presenta dos centros quirales no resueltos en su estructura. El grupo del Dr. Salvatella, en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona, está estudiando la estructura, dinámicas y interacciones del NTD del AR humano y nos propuso desarrollar una metodología sintética para obtener los cuatro posibles estereoisómeros de EPI001 para su análisis con el NTD del AR. Es bien conocido que la quiralidad de las moléculas es a menudo clave para la interacción proteína-sustrato y constituye un primer paso para obtener compuestos más activos.



La síntesis estereoselectiva de los cuatro diastereómeros de EPI001 constituye el cuarto objetivo de la presente tesis doctoral.

En conclusión, los objetivos planteados en la presente tesis doctoral y que configuran cada uno de sus capítulos son:

1. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxijirimicina (DNJNAc) y derivados mediante apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos.

Exploración de la apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos con azida sódica para la introducción enantioselectiva de la funcionalidad acetamido en C2 del esqueleto piperidínico partiendo del carbamato cíclico **8**. Una vez obtenidos intermedios válidos se proseguirá con la síntesis de DNJNAc así como derivados *N*-ureicos para su evaluación biológica como inhibidores de glicosidasas relacionadas con enfermedades de depósito lisosomal.

2. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxialojirimicina (DAJNAc) y derivados mediante aplicación de la sustitución alílica catalizada por paladio.

Exploración de la aminación alílica y el reordenamiento de Overman como metodologías para la introducción enantioselectiva de la funcionalidad acetamida en C2 del esqueleto piperidínico partiendo del carbamato cíclico **8**. A continuación, se aprovecharán estos intermedios para desarrollar metodología sintética que permita obtener los diastereómeros *alo*, *galacto* y *gulo* de la DNJNAc así como la síntesis de derivados tioureicos y 2-iminotiazolidínicos de la estereoquímica *alo*. Los iminoazúcares obtenidos serán evaluados como inhibidores de glicosidasas relacionadas con enfermedades de depósito lisosomal

3. Enfermedad de Sanfilippo: síntesis de sustratos para la diagnosis de las variantes A y D

Desarrollo de una metodología sintética para la obtención de **17** y **18** con los requerimientos de pureza adecuados para su aplicación en la diagnosis de la enfermedad de Sanfilippo A y D mediante análisis enzimáticos fluorimétricos.

4. Síntesis de los estereoisómeros de EPI001

Desarrollo de una metodología sintética para la obtención de los cuatro posibles estereoisómeros del compuesto EPI001 para determinar mediante análisis por RMN si la quiralidad es clave en la unión con el receptor androgénico.

Referencias

- [1] N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R–104R.
- [2] P. Compain, O. R. Martin, Eds., *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2007**.
- [3] E. Borges de Melo, A. Gomes da Silveira, I. Carvalho, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10277–10302.
- [4] G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 107–118.
- [5] K. Afarinkia, A. Bahar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1239–1287.
- [6] M. S. M. Pearson, M. Mathe-Allainmat, V. Fargeas, J. Lebreton, *European J. Org. Chem.* **2005**, 2159–2191.
- [7] R. Martín, A. Moyano, M. A. Pericàs, A. Riera, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 93–95.
- [8] R. Martín, C. Murruzzu, M. A. Pericàs, A. Riera, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2325–2328.
- [9] B. J. Ayers, A. F. G. Glawar, R. F. Martínez, N. Ngo, Z. Liu, G. W. J. Fleet, T. D. Butters, R. J. Nash, C.-Y. Yu, M. R. Wormald, S. Nakagawa, I. Adachi, A. Kato, S. F. Jenkinson, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3398–3409.
- [10] J.-S. Zhu, S. Nakagawa, W. Chen, I. Adachi, Y.-M. Jia, X.-G. Hu, G. W. J. Fleet, F. X. Wilson, T. Nitoda, G. Horne, R. van Well, A. Kato, C.-Y. Yu, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10298–10309.
- [11] M. B. Tropak, S. P. Reid, M. Guiral, S. G. Withers, D. Mahuran, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13478–13487.
- [12] P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1356–1359.
- [13] J. S. S. Rountree, T. D. Butters, M. R. Wormald, S. D. Boomkamp, R. A. Dwek, N. Asano, K. Ikeda, E. L. Evinson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 378–392.
- [14] J. Liu, A. R. Shikhman, M. K. Lotz, C. H. Wong, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 701–711.
- [15] I. B. Tomasic, M. C. Metcalf, A. I. Guce, N. E. Clark, S. C. Garman, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21560–21566.
- [16] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart, C.-X. Gong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10804–10809.
- [17] G. W. J. Fleet, P. W. Smith, R. J. Nash, L. E. Fellows, R. B. Parekh, T. W. Rademacher, *Chem. Lett.* **1986**, 1051–1054.
- [18] G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 979–990.
- [19] I. K. Khanna, F. J. Koszyk, M. A. Stealey, R. M. Weier, J. Julien, R. A. Mueller, S. N. Rao, L. Swenton, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 843–878.
- [20] G. Gradnig, G. Legler, A. E. Stuetz, *Carbohydr. Res.* **1996**, *287*, 49–57.
- [21] S. Al-Rawi, S. Hinderlich, W. Reutter, A. Giannis, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2004**, *43*, 4366–4370.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] A. F. G. Glawar, D. Best, B. J. Ayers, S. Miyauchi, S. Nakagawa, M. Aguilar-Moncayo, J. M. Garcia-Fernandez, 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.
- [25] 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.
- [26] Y. N. S. Wong, R. Ferraldeschi, G. Attard, J. de Bono, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 365–376.
- [27] L. Callewaert, N. Van Tilborgh, F. Claessens, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 543–553.
- [28] R. J. Andersen, N. R. Mawji, J. Wang, G. Wang, S. Haile, J.-K. Myung, K. Watt, T. Tam, Y. C. Yang, C. A. Bañuelos, D. E. Williams, I. J. McEwan, Y. Wang, M. D. Sadar, *Cancer Cell* **2010**, *17*, 535–546.

2

Antecedentes

2.1. Glicosidasas: definición y mecanismo

Los carbohidratos son un grupo de biomoléculas con una gran diversidad. A la variedad estereoquímica de los monosacáridos se une su capacidad para formar distintos tipos de enlaces entre ellos generando oligosacáridos y su capacidad de unirse con otras biomoléculas formando glicoconjugados tales como glicoproteínas o glicolípidos. Los carbohidratos participan de una gran variedad de procesos metabólicos que incluyen desde su metabolismo hasta procesos de reconocimiento celular. Por ello, la evolución natural ha dado lugar al desarrollo de una gran variedad de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos: las glicosidasas.

Los mecanismos de hidrólisis de las glicosidasas fueron propuestos por Koshland^[1] en 1953 y, aunque se han revisado y modificado durante los años, el mecanismo general se sigue considerando válido^[2-4]. La hidrólisis del enlace glicosídico se produce mediante catálisis ácida/básica y requiere de dos residuos esenciales: un dador de protones (generalmente ácido) y un nucleófilo (generalmente base). La hidrólisis puede producirse mediante dos mecanismos distintos: con retención o inversión de la configuración del carbono anomérico. Los residuos catalíticos que actúan son los grupos carboxílicos de los aminoácidos de tipo aspártico y/o glutámico.

En ambos mecanismos el primer paso de reacción es común. En él, el residuo ácido protona el oxígeno glicosídico iniciándose simultáneamente el ataque nucleófilo. El ataque nucleófilo es el punto de diferenciación entre ambos mecanismos.

En el caso de inversión de la configuración (figura 1) es una molécula de agua la que lleva a cabo este ataque. El carácter nucleófilo de la molécula de agua se ve aumentado por la interacción con un residuo básico. La situación de los residuos para este mecanismo es de 10,5 Å, distancia suficiente para acomodar el sustrato y una molécula de agua en el centro activo. En este caso, el mecanismo transcurre a través de un estado de transición de ión oxocarbonio.

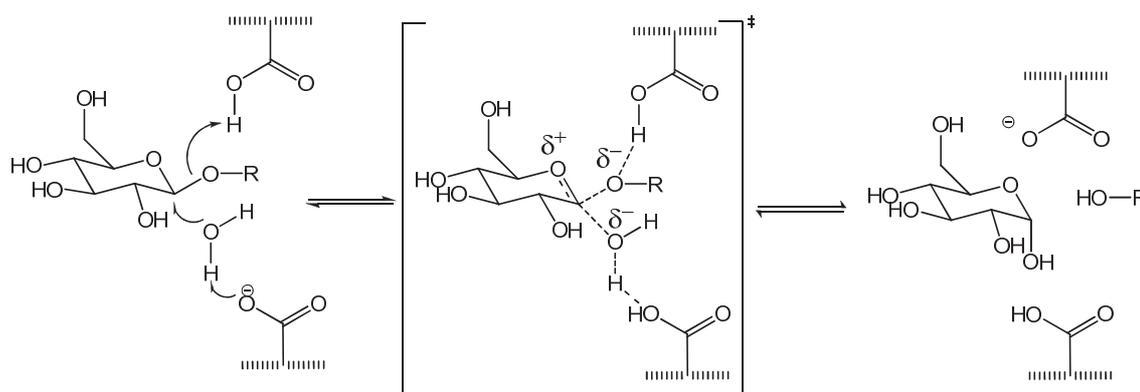


Figura 1. Mecanismo de hidrólisis del enlace glicosídico con inversión de la configuración.

En cambio, en el mecanismo con retención de la configuración (figura 2), es un aminoácido aspártico o glutámico que actúa como nucleófilo sobre el carbono anomérico. En este caso los residuos

2. Antecedentes

catalíticos se sitúan a 5.5 Å, que es consistente con un mecanismo de doble desplazamiento que implica un intermedio covalente enzima-sustrato. Una vez realizado el ataque nucleófilo se da una segunda etapa en que el grupo carboxilato, ahora desprotonado y actuando como base general, aumenta el carácter nucleófilo de una molécula de agua para que ésta ataque al carbono anomérico por el lado opuesto al enlace enzima-sustrato. Así, se desplaza la unión del sustrato al enzima liberando el azúcar resultante. Ambas etapas se llevan a cabo a través de estados de transición con carácter de ión oxocarbonio.^[5]

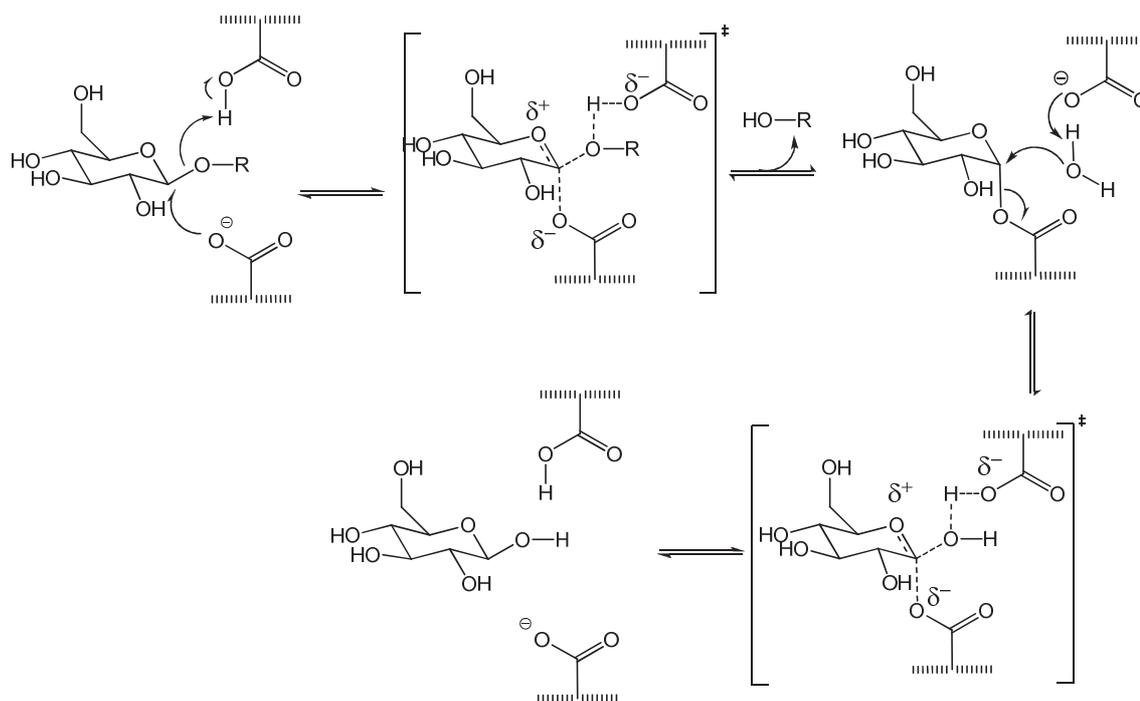


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis del enlace glicosídico con retención de la configuración

Asumiendo como válido este mecanismo de hidrólisis, un compuesto que mimetice el estado de transición, tanto a nivel conformacional como a nivel de carga formal, debería ser un inhibidor de glicosidasas. La disposición espacial de los grupos hidroxilo es clave para el reconocimiento enzimático. Generalmente, los inhibidores son muy estereoespecíficos con lo que deberán presentar una analogía estructural elevada para actuar como tales. En cuanto a la carga formal, el pH jugará un papel fundamental y la estructura deberá estar cargada adecuadamente a pH fisiológico para presentar un cierto grado de inhibición. Concretamente, a pH superiores a 7 se observa un mejor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática, debido a la asociación con residuos aminoácidos en el centro activo de forma análoga a cómo actúa el ión oxocarbonio.^[6,7]

Otro punto a remarcar es que las glicosidasas presentan una elevada selectividad tanto para el tipo de glicósido (*gluco*, *galacto*, *mano*, etc.) como por la configuración del carbono anomérico de éstos (α o β). De hecho, esta selectividad se traduce en pequeñas diferencias con respecto a la distribución de la carga en los estados de transición de tipo ión oxocarbonio en función de si la glicosidasa es α o β .^[8] Así,

en las α -glicosidasas el estado de transición está próximo al ión oxocarbonio con la densidad de carga positiva localizada fundamentalmente sobre el oxígeno endocíclico (figura 3).

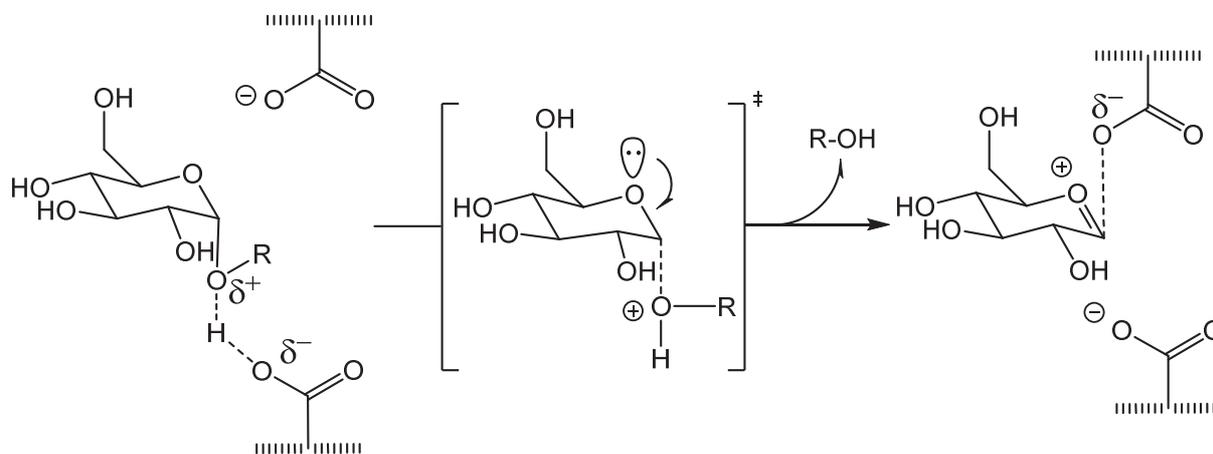


Figura 3. Estado de transición en α -glicosidasas

En cambio, para las β -glicosidasas el estado de transición estaría más próximo a un carbocatión anomérico con la densidad de carga positiva localizada fundamentalmente sobre C1 (figura 4). De hecho, se ha observado que los iminoazúcares donde el átomo de nitrógeno ocupa la posición correspondiente al carbono anomérico, como la isofagomina, son inhibidores selectivos de β -glicosidasas.

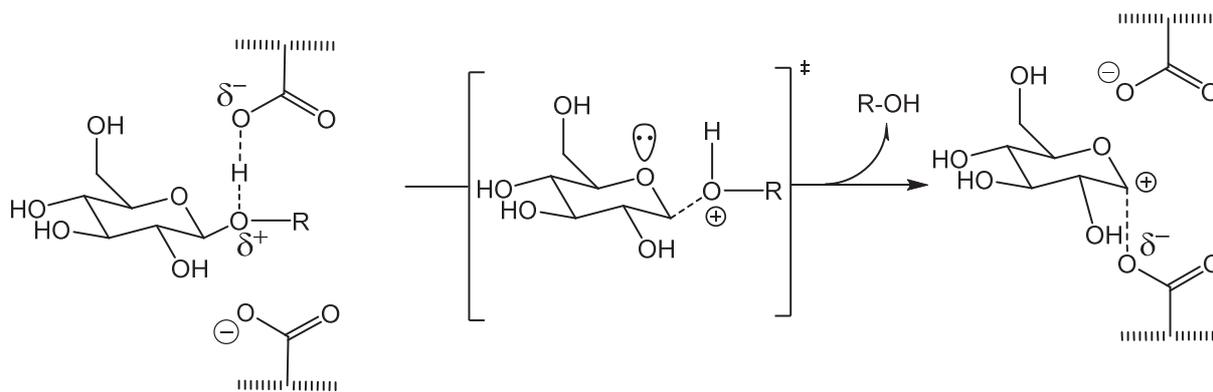


Figura 4. Estado de transición en β -glicosidasas

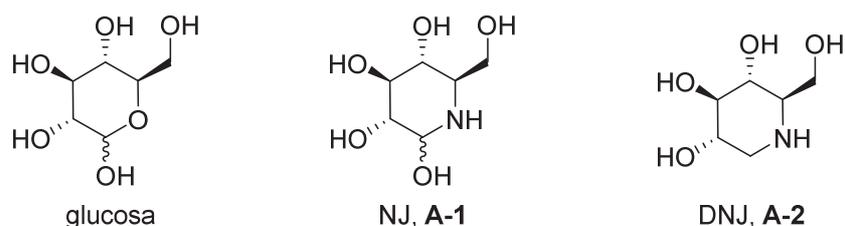
Por lo tanto, el diseño de inhibidores de glicosidasas debe procurar obtener compuestos capaces de mimetizar el estado de transición de tipo ión oxocarbonio por lo que, además de los distintos factores que se han comentado, se deberán tener en cuenta otros como la complementariedad de los grupos hidroxilo con el sustrato del enzima, la disposición de los distintos centros quirales de los inhibidores, la configuración del carbono anomérico y la posible existencia de bolsillos hidrofóbicos o hidrofílicos en el enzima que puedan establecer interacciones complementarias con el inhibidor.

2.2. Iminoazúcares

2.2.1. Definición y mecanismo de acción

Los iminoazúcares son estructuras análogas a los azúcares convencionales en los que un nitrógeno ocupa la posición del oxígeno endocíclico. Este aparentemente simple cambio conlleva que los nuevos iminoazúcares sean candidatos para una gran variedad de aplicaciones terapéuticas. La enorme diversidad de enzimas con los que son capaces de interactuar promete buenas perspectivas para su uso en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades como diabetes, infecciones virales, enfermedades de depósito lisosomal o cáncer.

El estudio en el campo de los iminoazúcares empezó a raíz del aislamiento en la década de los 60 de la nojirimicina (NJ, **A-1**), el primer mimético de la glucosa con un nitrógeno en el anillo. La funcionalidad hemiacetal N,O de este compuesto le aportaba poca estabilidad dificultando la realización de ensayos enzimáticos. Este problema quedó resuelto con la aparición de la 1-desoxinojirimicina (DNJ, **A-2**). A partir de aquí, el descubrimiento de nuevos iminoazúcares con estructuras distintas así como el estudio de sus propiedades biológicas no ha parado de crecer.



Los iminoazúcares son capaces de mimetizar la conformación y la carga del intermedio oxocarbonio y/o del carbocatión generado durante la ruptura del enlace glicosídico. Considerando que la ruptura inicial del enlace glicosídico aumenta la carga positiva en el oxígeno o en el carbono anómero de un azúcar natural, la sustitución de uno de estos átomos por nitrógeno protonado mimetizará, en el estado de transición, la carga de estos centros. De nuevo se confirma que la forma y la carga son factores clave en la inhibición de glicosidasas debido a la hibridación y conformación que adquieren los anillos piranósicos en sustratos naturales o piperidínicos en inhibidores de síntesis. Además, los inhibidores en su forma básica natural podrían estar protonados generando interacciones de tipo iónico con algunos de los residuos aspárticos del sitio activo. Esta capacidad de mimetización queda representada en la figura 5.^[9]

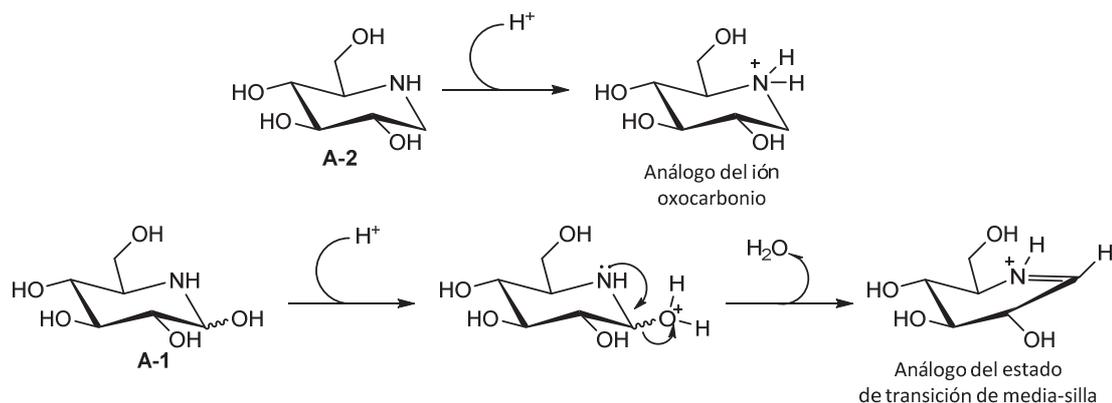


Figura 5. Mecanismo de inhibición de α -glicosidasas por NJ (A-1) y DNJ (A-2)

2.2.2. Clasificación estructural

La diversidad estructural de los iminoazúcares es enorme. La gran variedad de estructuras viene dada por el tamaño del anillo que contiene el nitrógeno, el número y disposición de los centros quirales que pueden configurar una gran cantidad de esteroquímicas distintas y la presencia de otros grupos funcionales que modifican o sustituyen los hidroxilos y también el nitrógeno endocíclico. Se pueden definir 6 tipos de estructuras base distintas (figura 6).^[10] Obviamente, la variedad de estructuras es increíblemente elevada y en este apartado sólo se pretende dar una visión global de ellas y de cómo pequeñas variaciones en las estructuras dan mayor selectividad y/o potencia para un tipo de enzima. Por ello se presentaran algunos ejemplos de cada tipo de estructura.

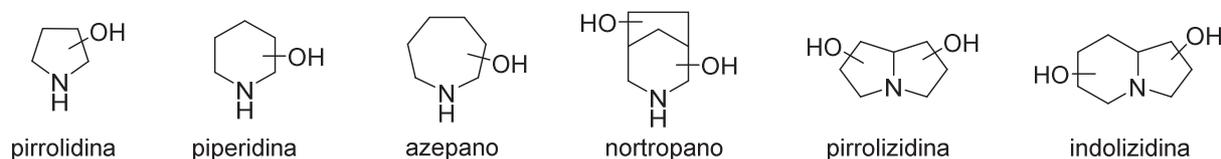


Figura 6. Estructuras clásicas de iminoazúcares

En primer lugar, cabe comentar que los azúcares comunes hallados en la naturaleza presentan estructura furanósica o piranósica por lo que los compuestos pirrolidínicos y piperidínicos son los que han sido más ampliamente estudiados.

Los inhibidores con estructura de pirrolidina polihidroxilada son compuestos muy versátiles. Se postula que este tipo de compuestos presenta una conformación análoga al catión oxocarbonio de piranosa lo que les confiere buena inhibición de glicosidasas. A menudo se pueden hallar ejemplos donde estos compuestos son mejores inhibidores que los análogos con estructura piperidínica. Se postula que puede ser debido a una mayor semejanza en la orientación de los grupos hidroxilo en las estructuras de furanosa de media silla con el estado de transición oxocarbonio de los análogos de la 1-DNJ. Sin embargo no está claro cuál es el patrón de sustitución responsable de esta potencia de inhibición.

Entre todos los compuestos descritos de este tipo destaca el 2,5-desoxi-2,5-imino-D-manitol (DMDP, **A-3**)^[11,12] es un análogo de la β -fructofuranosa aislado por primera vez de *Derris elliptica* y presente en varios microorganismos. Se trata de un potente inhibidor de α -glucosidasas, β -glucosidasas, β -galactosidasas, etc. Otros compuestos a destacar son el 1,4-didesoxi-1,4-imino-D-ribitol (DRB1, **A-4**)^[13] que es un potente inhibidor de α -glucosidasas, α -manosidasas y β -galactosidasas; el 1,4-didesoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB1, **A-5**)^[14] excelente inhibidor de α -glucosidasas, α -manosidasas e isomaltasas intestinales; la nectrisina (**A-6**)^[15] aislado del hongo *Nectria lucida* y con una elevada potencia de inhibición frente α -glucosidasas (figura 7).

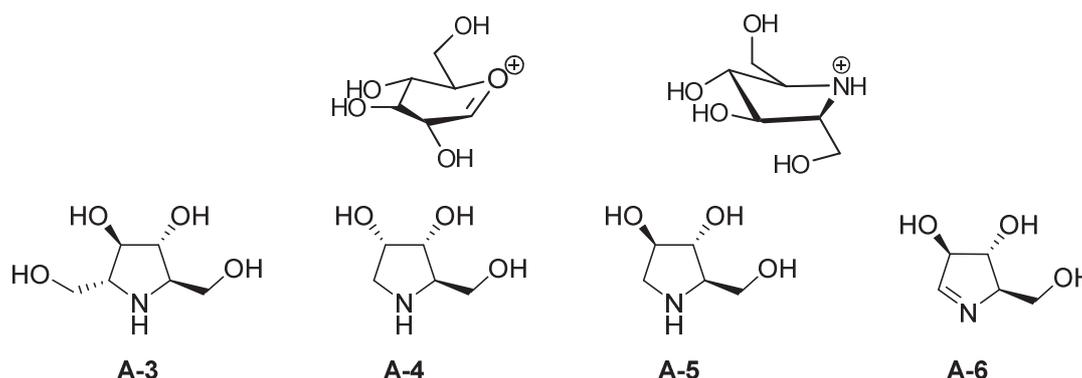


Figura 7. Mecanismo de inhibición y estructuras de iminoazúcares pirrolidínicos

Los compuestos piperidínicos (figura 8) han sido históricamente los más estudiados. Desde la NJ hasta los fármacos comerciales Glyset (**A-7**) y Zavesca (**A-8**) existen gran cantidad de otros productos con buenas propiedades como inhibidores de glicosidasas. Como se ha comentado anteriormente, los iminoazúcares que incluyen en su estructura un hidroxilo en C1 son difíciles de aislar y de trabajar con ellos debido a su inestabilidad. Los 1-desoxi derivados como la DNJ (**A-2**) o la DMJ (**A-9**) se han aislado también de fuentes naturales y no presentan esta tendencia a la descomposición.

Existen también otros tipos de iminoazúcares piperidínicos que incluyen en su estructura polihidroxilada otros sustituyentes. La familia de las homonojirimicina incluye hidroximetilenos en la posición C1 (**A-10**). Las fagominas se caracterizan por ser 1,2-didesoxi derivados siendo la fagomina (**A-11**) el representante clásico. Las isofagominas son capaces de mimetizar el intermedio carbocatiónico del estado de transición, convirtiéndose en mejores inhibidores de las β -glicosidasas. El principal representante de esta familia de compuestos es la isofagomina (**A-12**) donde se sustituye el carbono anomérico y el oxígeno endocíclico por un nitrógeno y un carbono respectivamente. Aunque el C2-OH está ausente en **A-12**, el resto de grupos hidróxilo sigue manteniendo la configuración de la D-glucosa. La isofagomina es 440 veces más potente que **A-2** contra β -glucosidasas mientras que su actividad contra α -glucosidasas es sólo moderada. Otras familias menos comunes incluyen las glucono- δ -lactamas como **A-13** o las amidinas como **A-14**.^[16]

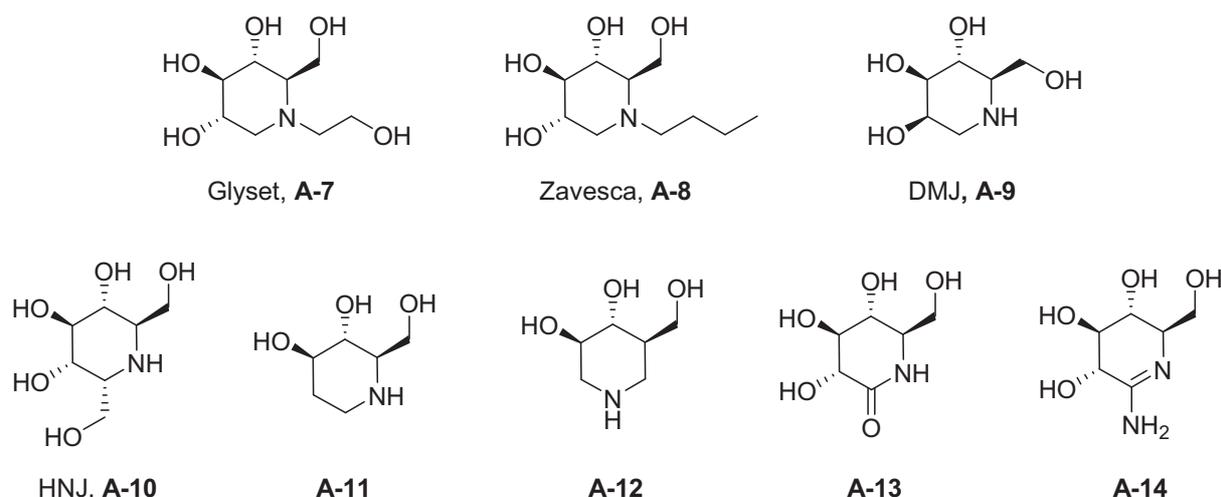


Figura 8. Iminoazúcares de estructura piperidínica

La tercera gran familia de iminoazúcares es la constituida por las aminas bicíclicas polihidroxladas y está compuesta por tres tipos de compuestos: indolizidina, pirrolizidina y nortropanos. Esta familia de compuestos no presenta una similitud estructural con los azúcares naturales tan obvia como las vistas anteriormente. Sin embargo, la configuración de los grupos hidroxilo en su estructura es comparable con determinados azúcares, así como su basicidad por lo que las interacciones con el centro activo de muchas glicosidasas es similar. De hecho, se han documentado casos de mayor inhibición de compuestos bicíclicos que monocíclicos debidos probablemente a una similitud mayor de la disposición de los grupos hidroxilo en el estado de transición y a factores entrópicos que resultan de la estructura más rígida de estos compuestos.

Los compuestos más representativos de esta familia, tanto por su diversidad como por sus aplicaciones terapéuticas, son las indolizidinas polihidroxladas. De entre ellos los ejemplos más clásicos son la swainsonina (**A-15**) y la castanospermina (**A-16**). La swainsonina es un inhibidor de manosidasas aunque destaca por su capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales y estimular la respuesta inmunitaria. La castanospermina es un inhibidor de α y β -glucosidasas tanto en plantas como en mamíferos, y es un inhibidor muy específico de la α -glucosidasa I, diana terapéutica contra el virus del VIH. Referente a las pirrolizidinas polihidroxladas, el compuesto más representativo es la australina (**A-17**). Se trata de un excelente inhibidor de amiloglucosidasas y de la glucosidasa I, lo que le confiere actividad antivírica y anti VIH. Por otro lado, los compuestos con estructura de nortropano polihidroxlado se denominan calisteginas y presentan la característica común de ser inhibidores de β -glucosidasas. Estructuralmente todas comparten la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono de unión entre ambos anillos en α del nitrógeno. De entre estas destaca las calisteginas B₁ (**A-18**).^[9]

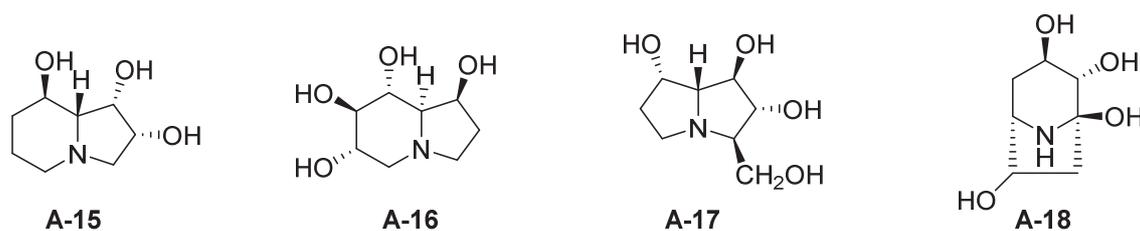


Figura 9. Iminoazúcares de estructura bicíclica

2.2.3. Aplicaciones medicinales potenciales de los iminoazúcares^[16-18]

La aplicación de los iminoazúcares como agentes terapéuticos para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades implica que deben ser accesibles desde un punto de vista sintético y, al mismo tiempo, tener interés desde un punto de vista clínico y farmacéutico. Muchos de los iminoazúcares conocidos son simplemente alcaloides extraídos de fuentes naturales u obtenidos sintéticamente. En general, su característica común para que tengan actividad biológica es que deben presentar una estructura polihidroxilada pero hay un largo camino para que puedan tener aplicaciones terapéuticas.

Los carbohidratos participan de una gran variedad de procesos biológicos. Su rol más conocido es como fuente de energía pero los roles biológicos de los carbohidratos son mucho más diversos. Por ejemplo, forman parte de glicoconjugados presentes en las membranas celulares que participan de procesos comunicación celular con el entorno. No es pues sorprendente que defectos en su biosíntesis y funcionalidad se relacionen con diversas patologías que van desde enfermedades neurodegenerativas hasta cáncer.

La capacidad de mimetización del estado de transición de los sustratos glicosídicos naturales confiere a los iminoazúcares la capacidad de actuar como inhibidores de la actividad de las glicosidasas. Sin embargo, la clave para su aplicación reside en conseguir derivados que presenten especificidad para un *target* concreto inhibiéndolo selectivamente en un lugar concreto del organismo. Precisamente esta falta de selectividad, a menudo observada *in vivo* en etapas avanzadas del desarrollo del fármaco, provoca graves efectos secundarios provocando su descarte como posible agente terapéutico.

De forma general, los iminoazúcares presentan las siguientes aplicaciones potenciales medicinales:

- Como inhibidores de glicosidasas: con elevado potencial de actuar en el metabolismo de glicoconjugados en el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y otros orgánulos intracelulares.
- Como inhibidores de glicosiltransferasas: claves en la biosíntesis de importantes y complejos glicoconjugados como, por ejemplo, los glicoesfingolípidos.
- Como chaperonas químicas: ayudando a mantener las glicosidasas y otras proteínas en su forma activa mediante unión en su sitio activo evitando su degradación prematura.
- Como modificadores de *rafts* lipídicos (balsas lipídicas): uniéndose a dominios ricos en carbohidratos de estos *rafts* lipídicos para influenciar en las funciones receptoras y de transporte de proteínas transmembrana. También pueden actuar modificando la composición de los *rafts* restringiendo la biosíntesis de glicoesfingolípidos.

La primera aplicación terapéutica moderna de los iminoazúcares ha sido como agentes antidiabéticos. Se conocen muchos inhibidores de α -glucosidasas, entre ellos la DNJ (**A-2**) o la castenosparmina (**A-16**) que actúan inhibiendo disacaridasas intestinales y reduciendo la hiperglucemia confiriéndoles potencial antidiabético y para el tratamiento de la obesidad. Como se ha comentado en la introducción, uno de sus derivados, el Glyset (**A-7**), se utiliza para el tratamiento de la diabetes tipo II.

Otra aplicación terapéutica de los iminoazúcares es como agentes antivíricos y antibacterianos. La inhibición específica de enzimas expresados en un organismo infectivo pero no en el huésped constituye un *target* ideal. Por ejemplo estudios recientes han demostrado que los agentes causantes de la tuberculosis y la lepra contienen en su pared celular L-rampiranosas. Dado que la ramnosa no tiene ningún rol en el metabolismo de mamíferos, inhibidores específicos de su metabolismo no tendrían efecto sobre el huésped y podrían actuar inactivando el virus. Sustratos como **A-19** o **A-20** análogos de la ramnosa y inhibidores de la naringinasa son un buen punto de partida. Otro ejemplo similar sería la inhibición de α -D-manosilfosfato transferasas como *target* para el tratamiento de la leishmaniasis. Este enzima se relaciona con la síntesis de los fosfoglicanos de la superficie celular del parásito y no se expresa en los mamíferos. Se pueden hallar aplicaciones de iminoazúcares en otros tipos de virus como hepatitis B y C, HIV, influenza, dengue o herpes simple.

Los iminoazúcares también tienen como posible diana terapéutica algunos tipos de cánceres. Se ha demostrado que la glicosilación es parte esencial de la formación y migración de células cancerígenas y que éstas muestran elevados niveles de glicosidasas así como glicosilaciones anormales debido a la presencia de glicosiltransferasas alteradas. Además, también se ha observado que los oligosacáridos presentes en la membrana celular de las células cancerígenas son remarcablemente diferentes respecto células sanas. Así, una posible línea terapéutica podría consistir en la inhibición específica de ciertas glicosidasas asociadas a las células cancerígenas. En este sentido la swainsonina (**A-15**) ha demostrado ser un excelente inhibidor de α -manosidasas II con baja toxicidad y elevada biodisponibilidad oral. Lamentablemente, los análisis en fase 2 mostraron graves efectos secundarios debido a su falta de selectividad. Otros compuestos como la castenosparmina (**A-16**) o la N-MeDNJ (**A-21**) han mostrado problemas similares.

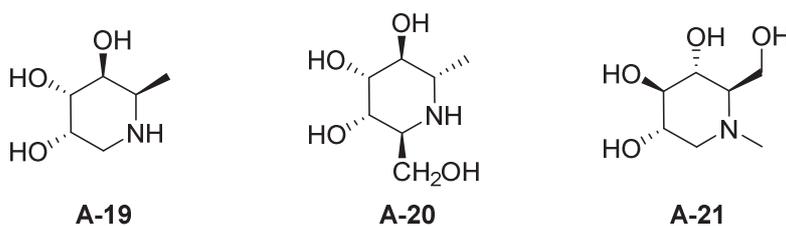


Figura 10. Ejemplos de iminoazúcares con aplicaciones antivíricas y anticancerígenas

Otra diana terapéutica menos común para iminoazúcares son las *N*-ribosiltransferasas. La inhibición específica de estos enzimas puede ser útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de nucleótidos. La deficiencia de purina nucleósido fosforilasa provoca la apoptosis de linfocitos T. Por ello, el desarrollo de un sustrato que provoque deficiencia de esta enzima puede ser efectivo para el tratamiento de enfermedades donde la activación de linfocitos T juega un papel esencial, como por ejemplo, el rechazo de trasplantes.

2.2.4. Enfermedades de depósito lisosomal: chaperonas químicas ^[19–23]

Las enfermedades de depósito lisosomal (*Lisosomal storage diseases*, LSD) son un tipo de enfermedades relacionadas con el metabolismo anormal de macrosustancias como glucógeno, glicosfingolípidos, mucopolisacáridos y glicoproteínas.

El lisosoma es un orgánulo celular capaz de degradar estos sustratos gracias a la presencia en su interior de enzimas glicosídicos y proteolíticos capaces de funcionar correctamente en el pH ácido del lisosoma. Estos enzimas se biosintetizan en el retículo endoplasmático (pH neutro) y se transportan a través del aparato de Golgi hasta llegar al lisosoma donde actúan facilitando el metabolismo de glicoconjugados para obtener productos más pequeños y poder así excretarlos de la célula o reutilizarlos en otras rutas biosintéticas. La detención de una de estas rutas provoca la imposibilidad de degradar un determinado tipo de sustancia acumulándose esta en la célula dando lugar a una LSD.

Existen más de 50 tipos distintos de LSD. La prevalencia aproximada del conjunto de LSD en la población es de 1-2 por cada 100000 nacimientos por lo que cada tipo distinto de LSD se considera una enfermedad minoritaria siendo el síndrome de Gaucher la LSD más conocida y con mayor afectación. Los efectos de cada LSD varían en función del metabolito acumulado pero, en general, se produce un deterioro progresivo e imparable del sistema nervioso central.

Actualmente no existe una cura definitiva para ningún tipo de LSD. Sin embargo, si existen distintas líneas de investigación para hallar soluciones terapéuticas:

- Terapias de reemplazamiento enzimático (ERT): consisten en la infusión de la enzima inactiva generada artificialmente. Esta terapia es extraordinariamente cara y no es efectiva en las LSD que afectan al sistema nervioso central ya que la enzima no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Este tipo de terapia puede producir rechazo inmunológico provocando una degradación rápida de la enzima en sangre sin que pueda llegar a las células objetivo.
- Terapias de inhibición de la producción de sustrato (SRT): consiste en el suministro de inhibidores de las enzimas que biosintetizan el producto que se acumula. Presentan un coste menor y la ventaja de una administración oral del fármaco con respecto a la ERT. El ejemplo más claro es el Zavesca® (**A-8**) capaz de inhibir la glucosilceramida sintasa, enzima clave de la biosíntesis de glucosilceramida, y que se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.
- Trasplante de médula ósea: el objetivo es volver a generar enzimas de forma correcta. Aunque en algunos casos puede revertir la enfermedad también se han detectado casos donde con los años el problema se reproduce. Se pueden aplicar terapias similares de trasplante en otros órganos según el tipo de LSD. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Fabry se ha aplicado el trasplante de riñón o la diálisis con buenos resultados.
- Terapia génica: consiste en la introducción de vectores de DNA para una producción correcta de la enzima. No se han conseguido resultados satisfactorios en humanos hasta la fecha.

- Chaperonas químicas. Se trata de un nuevo tipo de terapia que utiliza moléculas pequeñas para el tratamiento de enfermedades lisosomales y que se explica con detenimiento a continuación.

Ciertas mutaciones en las enzimas responsables de la acumulación de metabolitos en las LSD conllevan un plegamiento incorrecto de su estructura y que no pueden generar la actividad estimada. En consecuencia, estas enzimas son degradadas por los procedimientos de control de la célula. Sin embargo, en caso de lograr un correcto plegamiento dichas enzimas se podrán transportar a través del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi para llegar a los lisosomas. Por otro lado, se ha detectado que no se requiere una actividad total de los enzimas relacionados con las LSD para prevenir la acumulación de los metabolitos. A menudo una actividad parcial es suficiente para que no haya efectos fisiológicos remarcables. Estos valores mínimos de actividad dependen de cada subtipo de LSD.

Las chaperonas químicas son moléculas pequeñas con alta biodisponibilidad oral y con capacidad de acceso a la mayoría de células (incluso en el sistema nervioso central) que pueden unirse al lugar de unión de dichas proteínas ayudando a su correcto plegamiento y permitiendo su transporte al lisosoma. Generalmente, se trata de inhibidores competitivos que se unen al sitio activo de la proteína y que, una vez la proteína se sitúa en el lisosoma, son desplazados por la elevada concentración de sustrato natural permitiendo el funcionamiento normal de la enzima (figura 11).

Los iminoazúcares son reconocidos inhibidores de glicosidasas y, al actuar como inhibidores reversibles, son buenos candidatos para su uso como chaperonas químicas. En los últimos años se han publicado muchos trabajos sobre el uso de iminoazúcares como chaperonas para el tratamiento de distintas LSD como el síndrome de Tay-Sachs, Sandhoff, Fabry o Gaucher.^[24-26]

El primer paso para determinar si un compuesto puede actuar como chaperona es medir los valores de inhibición de dicho sustrato con la enzima de interés. Se considera que productos con valores de inhibición menores a 10 μ M pueden ser candidatos para este tipo de terapias. En la tabla 1, se presenta una lista de compuestos que se han determinado como eficientes para su uso como chaperonas químicas y en la tabla 2 se presentan otros que se consideran candidatos. Estas listas se consideran un buen punto de partida para encontrar nuevas chaperonas químicas para el tratamiento de LSD.

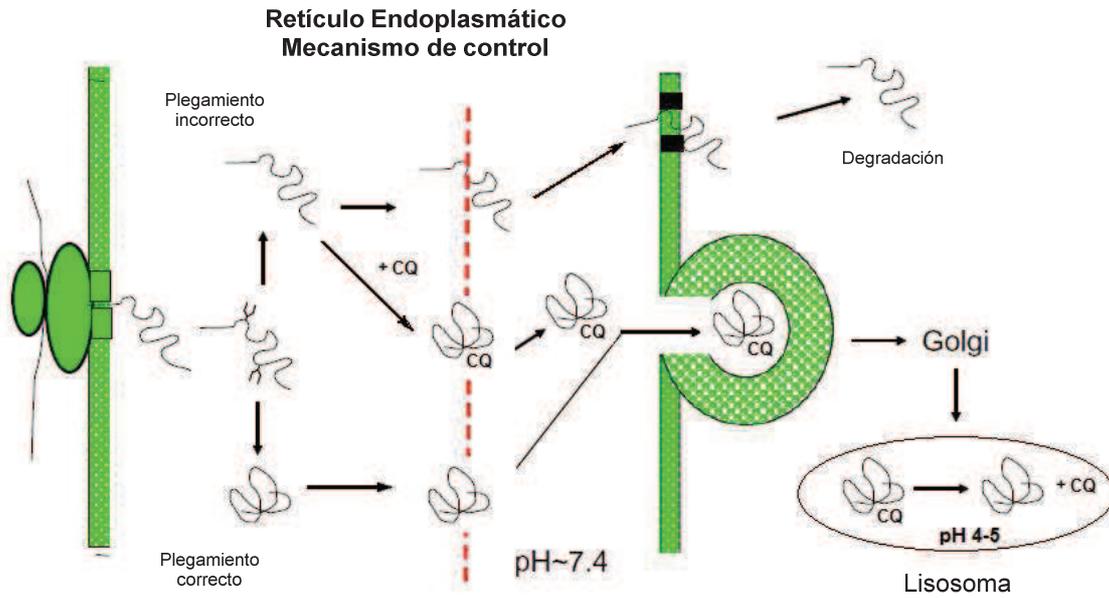


Figura 11. Mecanismo de funcionamiento de una chaperona química (CQ)

Tabla 1. Chaperonas químicas para LSD

Enfermedad	Enzima deficiente	Chaperonas químicas
Gaucher	Glucocerebrosidasa	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ)
		α -galacto-homonojirimicina
		α -alo-homonojirimicina
		β -1-butil-desoxigalactonojirimicina
		N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ)
		N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol
		N-octil-isofagomina
Fabry	α -galactosidasa A	N-octil- β -valienamina
		isofagomina
		calisteginas A ₃ , B ₁ (A-18), B ₂ , C ₁
		1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX)
		α -1-C-nonil-DIX
		α -1-C-octil-1-DNJ
Tay-Sachs and Sandhoff	β -Hexosaminidasa A y B	N-acetil-glucosamina-thiazolina (NGT, A-29)
		6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS, A-30)
GM1-gangliosidosis	Acid β -galactosidasa	N-octil-4-epi- β -valienamina

Tabla 2. Resumen de iminoazúcares que pueden actuar como posibles chaperonas químicas

Enfermedad	Enzima deficiente	Inhibidores competitivos
Pompe	α -glucosidasa	1-deoxynojirimicina (DNJ, A-2) α -homonojirimicina (α -HNJ, A-10) castanospermina (A-16) Isofagomine (A-12) N-dodecil-DNJ
Gaucher	Glucocerebrosidasa	calisteginas A ₃ , B ₁ (A-18), B ₂ , C ₁ 6-nonil-isofagomina N-octil- β -valienamina 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) α - <i>allo</i> -homonojirimicina α - <i>galacto</i> -homonojirimicina β -1-C-butyl-desoxinojirimicina calisteginas A ₃ , B ₂ 4- <i>epi</i> -isofagomina
Fabry	α -galactosidasa A	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) 4- <i>epi</i> -isofagomina
GM1-gangliosidosis	Acid β -galactosidasa	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) 4- <i>epi</i> -isofagomina
Krabbe	Galactocerebrosidasa	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) 4- <i>epi</i> -isofagomine
Morquio B	Acid β -galactosidasa	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) 1-desoximannojirimicina (DMJ, A-9)
α -Mannosidosis	Acid α -mannosidasa	Swainsonina (A-15) Mannostatina A
β -Mannosidosis	Acid β -mannosidasa	2-hidroxi-isofagomina 1-desoxifuconojirimicina β -homofuconojirimicina
Fucosidosis	Acid α -L-fucosidasa	2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol
SanfilippoB Schindler-Kanzaki	α -N-Acetilglucosaminidasa α -N-Acetylgalactosaminidasa	DNJNAc (A-22) DGJNAc 2- acetilamido-isofagomina
Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A	DNJNAc (A-22) Nagstatina (A-28) 2- acetilamido-isofagomina
Sandhoff	β -Hexosaminidasa B	DNJNAc (A-22) Nagstatina (A-28) 1-desoxi-L-idronojirimicina
Hurler-Scheie	α -L-Iduronidasa	Ácido 3,4,5-tridroxipipecolico
Sly	β -Glucuronidasa	Ácido 4,5-dihidroxipiperidin-3-carboxilico
Sialidosis	Sialidasa	Ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-sialico Siaastatin B (A-27)

2.3. Acetamido iminoazúcares

Los acetamido iminoazúcares (figura 12) se han revelado como una familia de iminoazúcares que presentan una elevada selectividad como inhibidores de hexosaminidasas. Las primeras referencias de este tipo de productos son los análogos sintéticos de la glucosamina DNJNAc (**A-22**) y DMJNAc (**A-32**) publicados por Fleet *et al.*^[27,28] en la década de los 80. Posteriormente, han ido apareciendo en la literatura multitud de compuestos que incluyen en sus estructuras una función acetamida. Estos sustratos presentan una gran variedad estructural. Se pueden hallar compuestos pirrolidínicos naturales como **A-23** o **A-24** y sintéticos como LABNAc (**A-25**)^[29]. También se pueden hallar estructuras bicíclicas naturales más complejas como la pochonicina (**A-26**), la nagstatina (**A-28**), la siastatina B (**A-27**) y sintéticas como la 6-acetamido-6-deoxycastanospermine (**A-30**), la *N*-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT, **A-29**) o azepanos como **A-31**.^[30,31]

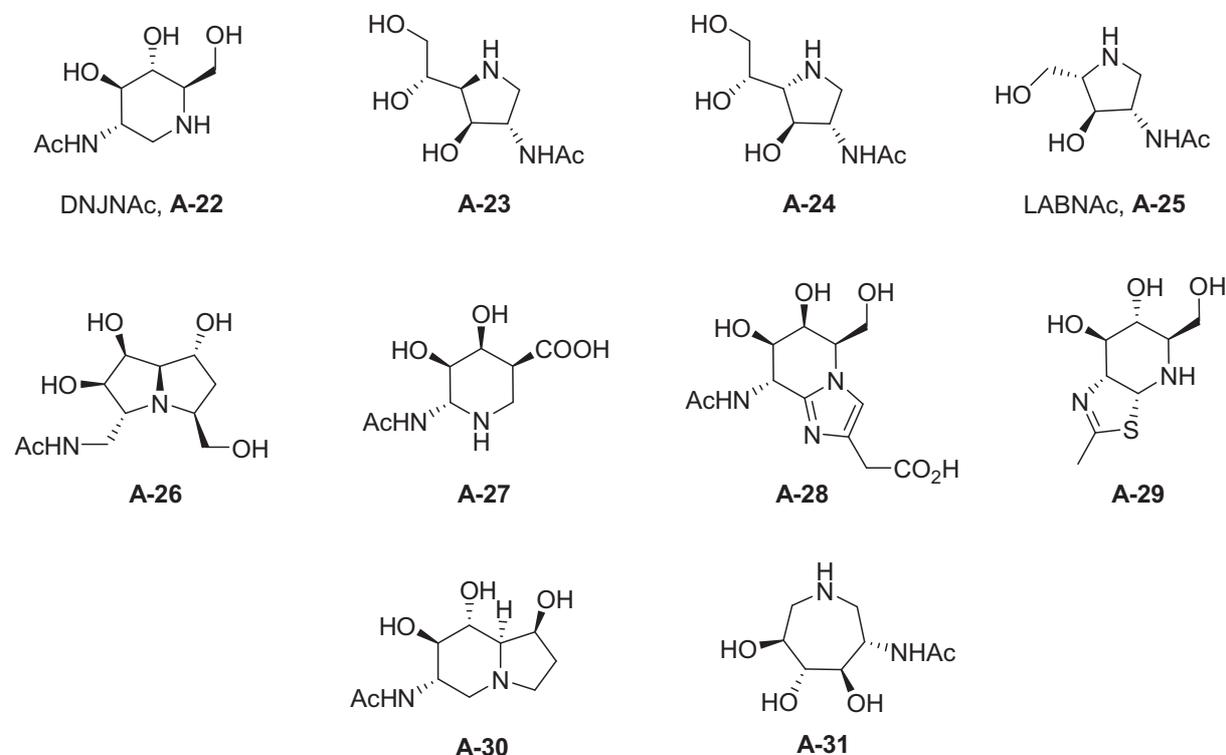


Figura 12. Ejemplos de varios acetamido iminoazúcares

Todos estos compuestos son en mayor o menor grado inhibidores selectivos de hexosaminidasas. Algunos de ellos como **A-29** o **A-30** son conocidos ejemplos de sustratos que pueden actuar como chaperonas químicas en el tratamiento de los síndromes de Tay-Sachs y Sandhoff (tabla 1)^[25,32], mientras que el resto pueden ser un buen punto de partida para hallar nuevos compuestos que puedan actuar de forma similar. Además, los inhibidores de hexosaminidasas se han revelado como sustratos con buenas perspectivas para aplicar en otras enfermedades lisosomales como el síndrome de Sanfilippo B o Shindler-Kanzaki^[33], Alzheimer^[29] y, en menor medida, diabetes, Parkinson, osteoartritis y determinados tipos de cáncer^[34-38].

2.3.1. Mecanismo de acción de β -*N*-acetilhexosaminidasas

Dentro de las hexosaminidasas una de las familias más estudiadas han sido las β -*N*-acetilhexosaminidasas (EC 3.2.1.52). Esta subfamilia de hidrolasas participa de la rotura de los enlaces con las unidades β -*N*-acetilglucosamina y β -*N*-acetilgalactosamina en oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas. De las 113 familias de glicosidasas hidrolasas las β -*N*-acetilhexosaminidasas están presentes en 3: GH 3, 20 y 84.^[39]

Esta familia de enzimas se ha analizado ampliamente mediante estudios de cristalización con varios inhibidores y utilizando estudios computacionales para conocer su mecanismo de acción y poder diseñar inhibidores más potentes.^[40,41] Así, se han podido determinar dos tipos de mecanismos: a través de un intermedio covalente o a través de un intermedio cíclico.^[42] La diferencia entre ambos mecanismos radica en que en el primer caso es un residuo carboxilato el que realiza el ataque nucleófilo inicial formando un intermedio covalente que es posteriormente desplazado por una molécula de agua activada (figura 13A). En el otro caso, es el mismo sustrato el que actúa como catalizador ya que el carbonilo de la acetamida actúa como nucleófilo formando un intermedio cíclico (figura 13B). Cabe destacar que la familia de las GH 20 y 84 funcionan con el mecanismo B mientras que las GH 3 lo hacen con el A. Otros estudios han demostrado que el lugar de unión del enzima es un bolsillo hidrofóbico con varios aminoácidos capaces de generar varios puentes de hidrógeno con el inhibidor. En este fenómeno participan tanto la estructura polihidroxilada, como la acetamida y el nitrógeno endocíclico de los iminoazúcares.^[43]

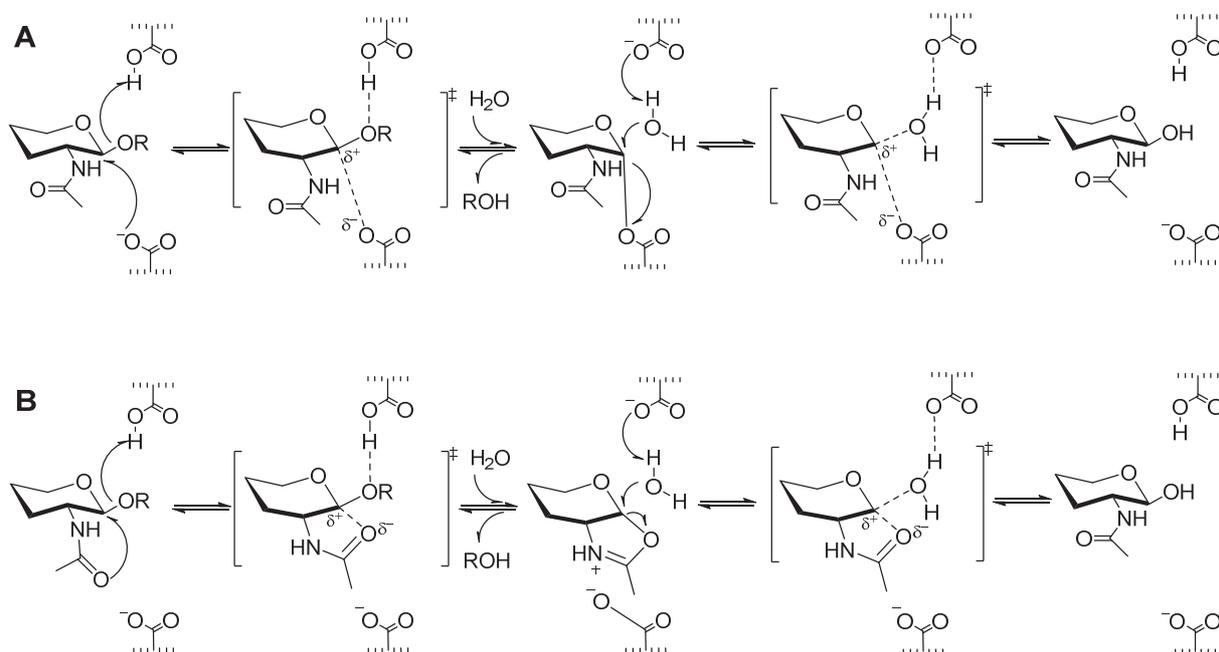


Figura 13. Mecanismos de hidrólisis de β -*N*-acetilhexosaminidasas. A) Ataque nucleófilo del enzima. Típico de GH 3 B) Ataque nucleófilo promovido por el NHAc. Típico de GH 20 y 84.

2.3.2. Síntesis de iminoazúcares ^[16,44–46]

Las distintas y amplias aplicaciones terapéuticas de los iminoazúcares han provocado un creciente interés en la comunidad científica por el desarrollo de metodologías sintéticas que permitan obtener tanto compuestos naturales como nuevos análogos con perspectivas de actuar como inhibidores de un gran rango de enzimas. Si a esto se suma la gran variedad estructural de iminoazúcares, la variedad de aproximaciones sintéticas para su obtención es inabarcable.

Generalmente, la mayor parte de síntesis de iminoazúcares se basa en el *chiral pool*, es decir, en partir de productos naturales enantioméricamente puros. En la mayoría de aproximaciones las síntesis se inician partiendo de otros azúcares aunque también existen ejemplos partiendo de aminoácidos o ácidos tartáricos. La elección depende obviamente del producto final deseado. Este tipo de aproximaciones acostumbran a conducir a la obtención de una única configuración estereoquímica requiriendo el uso de química de grupos protectores y un elevado número de etapas sintéticas conllevando síntesis largas y con rendimientos globales bajos. Además, se debe asegurar que no se producen problemas de epimerización a lo largo de las distintas etapas sintéticas.

En los últimos años, los químicos sintéticos han trabajado en el desarrollo de metodologías enfocadas a la obtención de librerías de sustratos que pudieran ser evaluados biológicamente. Dichas metodologías están planteadas para conseguir, mediante un solo procedimiento, compuestos con varias configuraciones estereoquímicas más que en el desarrollo de síntesis paralelas para obtener un único compuesto en cada caso.

Los iminoazúcares presentan una elevada complejidad estructural: distintos tamaños del anillo; número, posición y configuración de los grupos hidroxilos; funcionalización selectiva de dichos hidroxilos; introducción de sustituyentes de forma selectiva en posiciones libres del esqueleto glicosídico o sustituyendo uno de los alcoholes. Por ello, hallar intermedios sintéticos a partir de los que se puedan obtener varios sustratos con configuraciones y estructuras distintas es sintéticamente muy interesante.

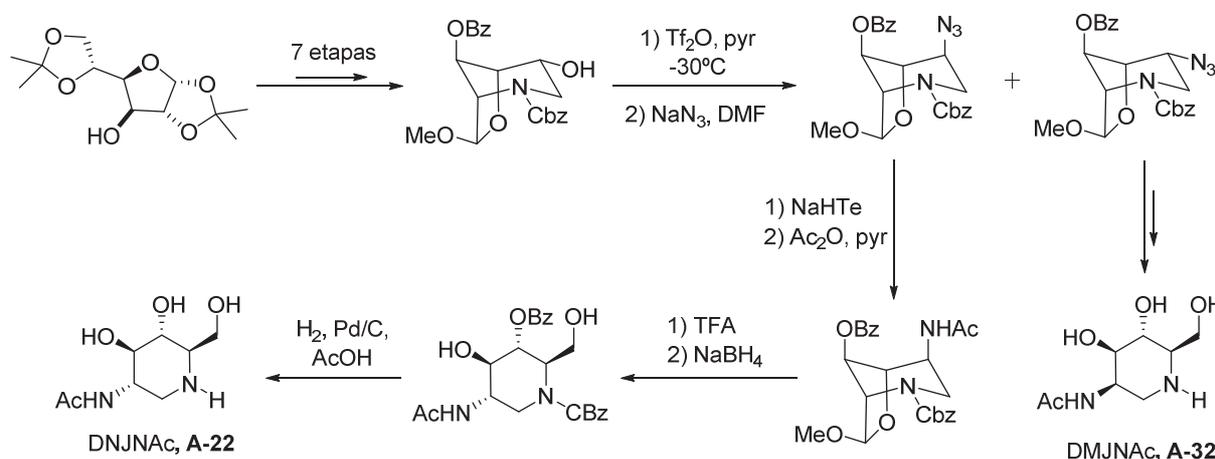
De las muchas aproximaciones sintéticas para obtener iminoazúcares, el presente apartado, se centrará únicamente en las síntesis de acetamido iminoazúcares y, especialmente, en la síntesis de sustratos 2-acetamido-1,2-didesoxipiperidínicos.

2.3.2.1. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxi iminoazúcares piperidínicos

La síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxi iminoazúcares de estructura piperidínica no ha sido muy explorada y no se hallan demasiados ejemplos de metodologías sintéticas de estos productos en la literatura.

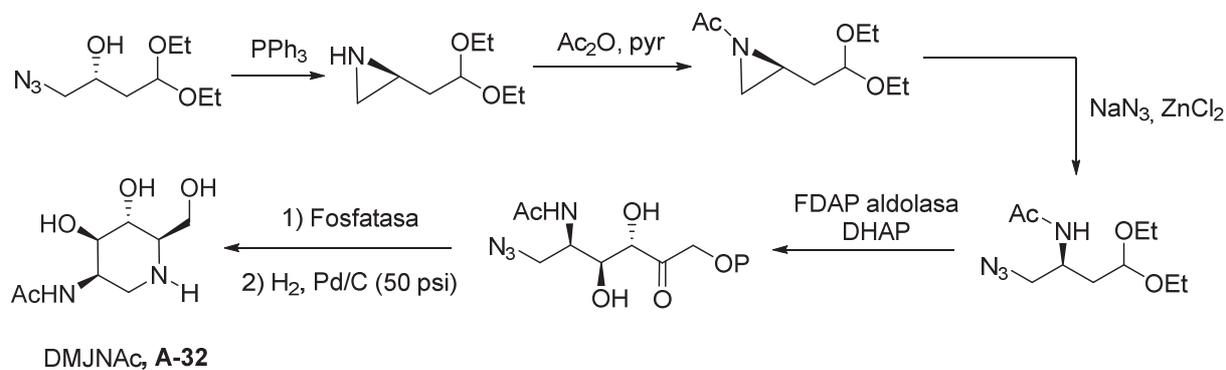
La primera síntesis descrita fue publicada por Fleet *et al.* ^[27,28] en 1986 (esquema 1) y en ella se describe la síntesis de la DNJNAc (**A-22**), al análogo de la DNJ pero incluyendo una acetamida en la posición C2. La obtención de un estereoisómero minoritario también permitió la obtención por primera vez del epímero *mano*: DMJNAc (**A-32**). Los análisis de inhibición de estos compuestos mostraron una elevada

selectividad de **A-22** por β -*N*-acetilglucosaminidasas mientras que **A-32** no mostró inhibición en la mayoría de glicosidasas ensayadas.



Esquema 1. Síntesis de Fleet et al. para obtención de **A-22** [27,28]

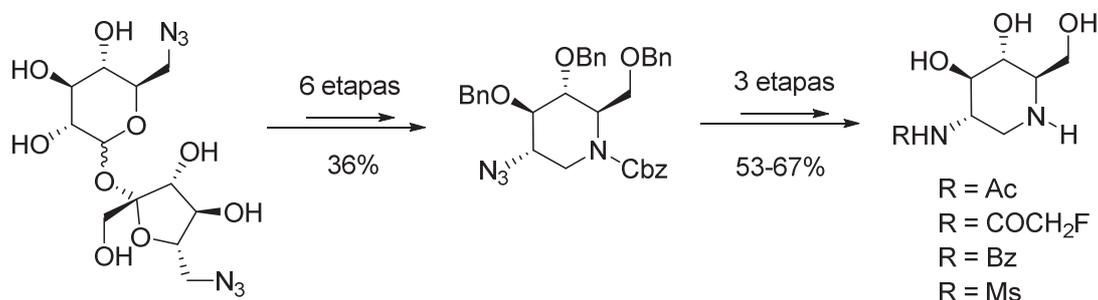
En la década de los 90, se publicaron algunos trabajos para la síntesis de este tipo de productos. En 1991, Kajimoto *et al.* [47] publicaron una síntesis enzimática basada en el uso de fosfatasas que permitía obtener **A-32** con un rendimiento global del 8% (esquema 2). El mismo procedimiento sintético se podía aplicar partiendo del enantiómero contrario para obtener **A-22** aunque con rendimientos globales menores debido a la baja selectividad de las reacciones enzimáticas. En el mismo año, Kiso *et al.* [48] publicaron la síntesis de los mismos productos partiendo de DNJ.



Esquema 2. Síntesis enzimática de Kajimoto *et al.* [47]

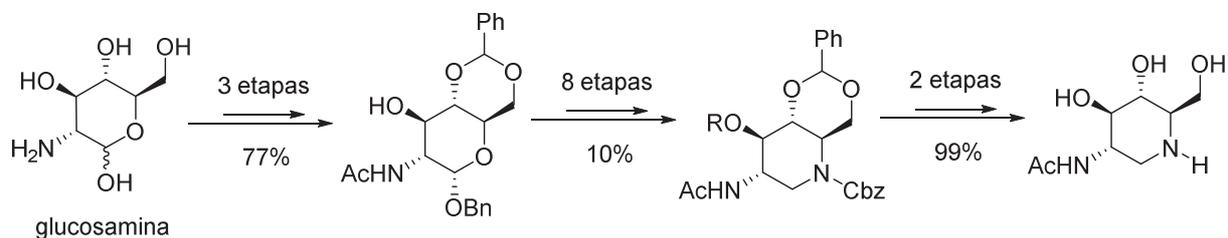
También cabe destacar el trabajo de Gradnig *et al.* [49] (esquema 3) donde partiendo de un disacárido, que anteriormente habían utilizado como *scaffold* base en la síntesis de DMJ, sintetizaron un precursor de la DNJNAc. Este precursor presentaba un diseño elegante en el uso de los grupos protectores para permitir realizar modificaciones en la amina situada en C2 de forma selectiva. Así, el objetivo de la investigación residía en obtener derivados de DNJNAc con variaciones en la 2-acetamida. Los estudios de inhibición con los sustratos sintetizados mostraron que la variación de esta funcionalidad provocaba una

bajada notable de la capacidad de inhibición. Incluso la presencia de una fluoroacetamida en vez de la acetamida implicaba una pérdida de 100 veces capacidad de inhibición con respecto a la DNJNac original.



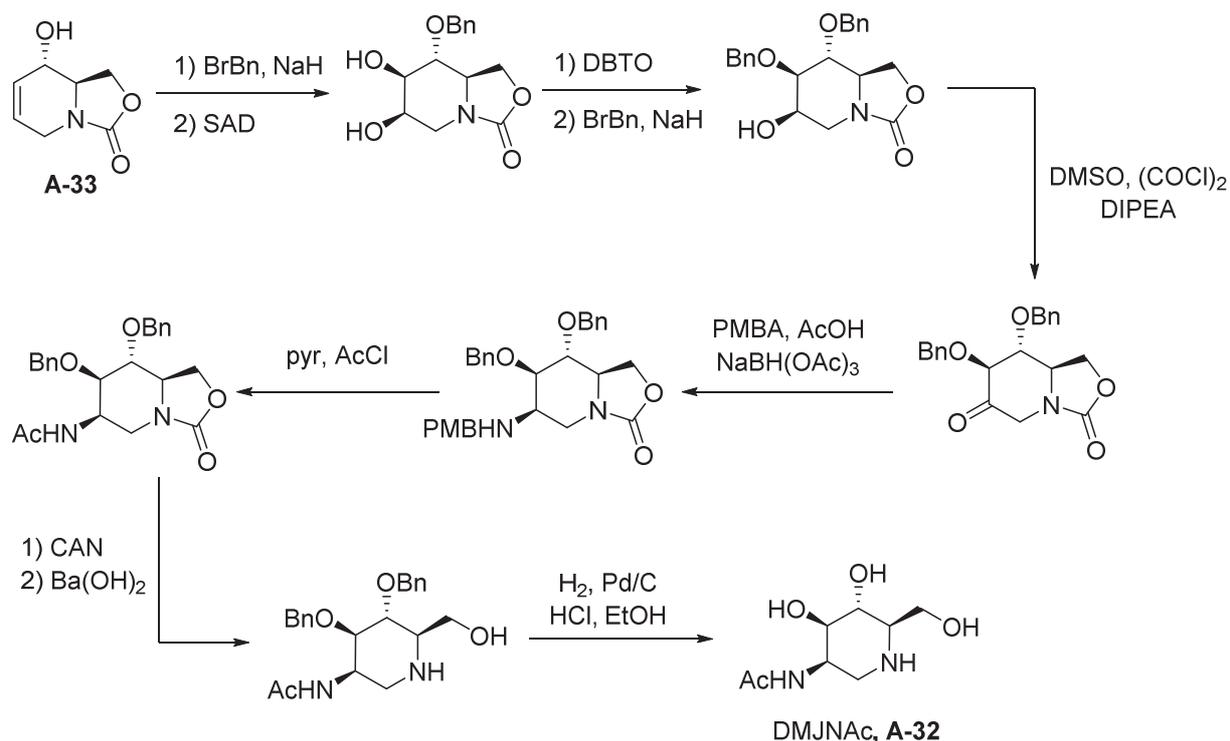
Esquema 3. Síntesis según Gradnig *et al.* [49]

En los últimos años, el interés por los 2-acetamido imino azúcares se ha visto exponencialmente incrementado. Probablemente, el factor determinante para este aumento se deba a la posible aplicación de estos productos como chaperonas química en distintas áreas terapéutica ya que se han hecho importantes avances en este campo. En concreto, se han publicado gran cantidad de derivados sintéticos de DNJNac con distintos tipos de modificaciones en la amina endocíclica buscando inhibiciones selectivas para distintos tipos de enzimas. [50,51] Por ejemplo, Yamaguchi *et al.* [52] (esquema 4) han publicado recientemente la síntesis de varios peptidoglicanos derivados de DNJNac partiendo de la glucosamina para el estudio de transglicosilasas líticas que participan del reciclado de las paredes celulares de bacterias gram-negativas. La síntesis se realiza en 13 etapas con un 7,5% de rendimiento global.



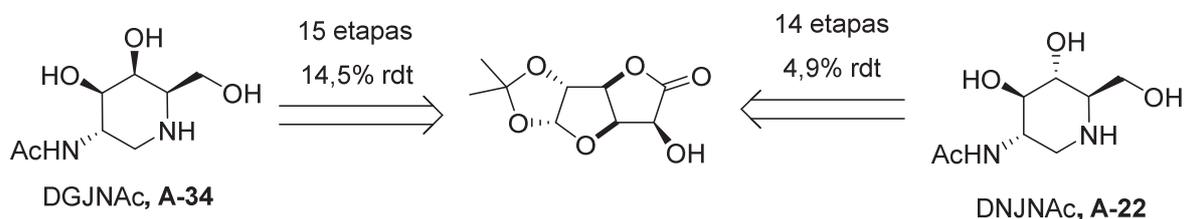
Esquema 4. Aproximación a DNJNac partiendo de glucosamina [52]

En la última década se han reportado también síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxi iminoazúcares con configuraciones distintas a *gluco*. Una de las pocas síntesis totales de este tipo de productos no basadas en el *chiral pool* es la aproximación a la DMJNac publicada por Giannis y colaboradores [53] en 2004 (esquema 5). En este caso, los derivados de DMJNac se utilizan como inhibidores de UDP-*N*-acetilglucosamina, un enzima relacionado con interacciones célula – virus. Esta síntesis se basa en la utilización del carbamato cíclico **A-33** obtenido de acuerdo al procedimiento sintético publicado por nuestro grupo de investigación [54] y permite obtener la DMJNac en 8 pasos sintéticos.

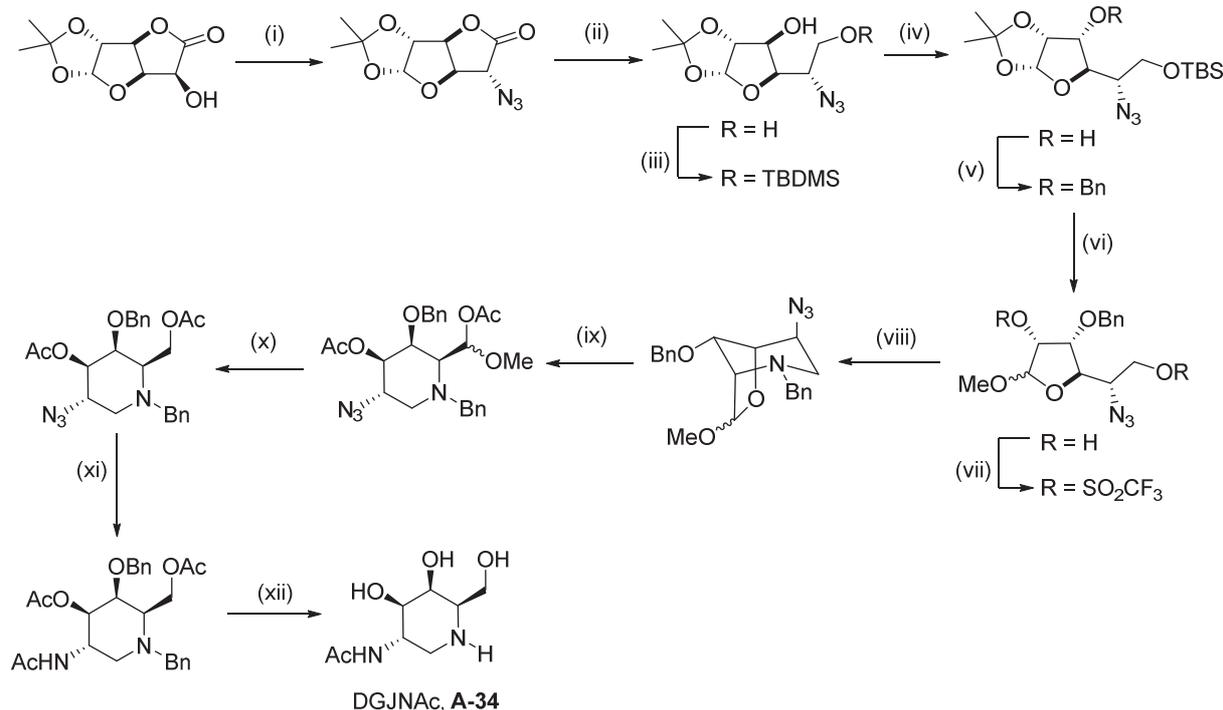


Esquema 5. Síntesis de DMJNAc según Giannis y colaboradores ^[53]

El último ejemplo a destacar en este campo es la síntesis de DGJNAc (**A-34**), el diastereómero *galacto* de los 2-acetamido-1,2-didesoxi iminozúcares. La única síntesis de este producto fue publicada por Best *et al.* en 2010 (esquemas 6 y 7) ^[55]. Dicho procedimiento fue ampliado en 2012^[56] mediante la síntesis de DNJNAc (**A-22**) utilizando una metodología paralela y partiendo del mismo producto inicial. Además, dicha metodología permitió la síntesis de diversos *N*-alquil derivados así como el análisis de sus propiedades inhibitorias. Dicho análisis permitió determinar una sorprendente selectividad de DGJNAc (**A-34**) y derivados frente a α -*N*-acetilglucosaminidasas confiriéndoles buenas perspectivas para su uso como chaperonas químicas en el tratamiento del síndrome de Schindler-Kanzaki, una variedad de enfermedad de depósito lisosomal.^[33]



Esquema 6. Aproximación sintética a DNJNAc y DGJNAc desarrollada por Glawar *et al.* ^[55,56]

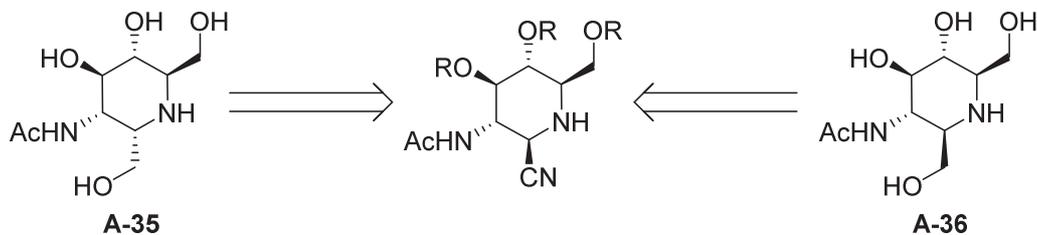


Esquema 7. Condiciones (i) $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , piridina; después NaN_3 , DMF, 92%; (ii) DIBALH, CH_2Cl_2 , ; después NaBH_4 , MeOH, 72%; (iii) $\text{tBuMe}_2\text{SiCl}$, piridina, 88%; (iv) PCC, CH_2Cl_2 , tamices moleculares; después NaBH_4 , EtOH, H_2O , 73%; (v) PhCH_2Br , NaH, DMF, 89%; (vi) MeOH, HCl, 93%; (vii) $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , piridina; (viii) PhCH_2NH_2 , THF, 61% (2 pasos); (ix) $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$, Ac_2O , 93%; (x) DIBALH, CH_2Cl_2 ; después NaBH_4 , MeOH; then Ac_2O , piridina, 83%; (xi) Zn, CuSO_4 (aq), THF/ $\text{AcOH}/\text{Ac}_2\text{O}$, 79%; (xii) MeONa, MeOH; then H_2 , Pd (10% on C), HCl, 1,4-dioxane, H_2O , 98% [55]

2.3.2.2. Síntesis de otros acetamido iminoazúcares

En la última década, el creciente interés por los acetamido iminoazúcares como posibles inhibidores de glicosidasas ha generado la aparición de otros tipos de iminoazúcares tanto piperídnicos como con otras estructuras.

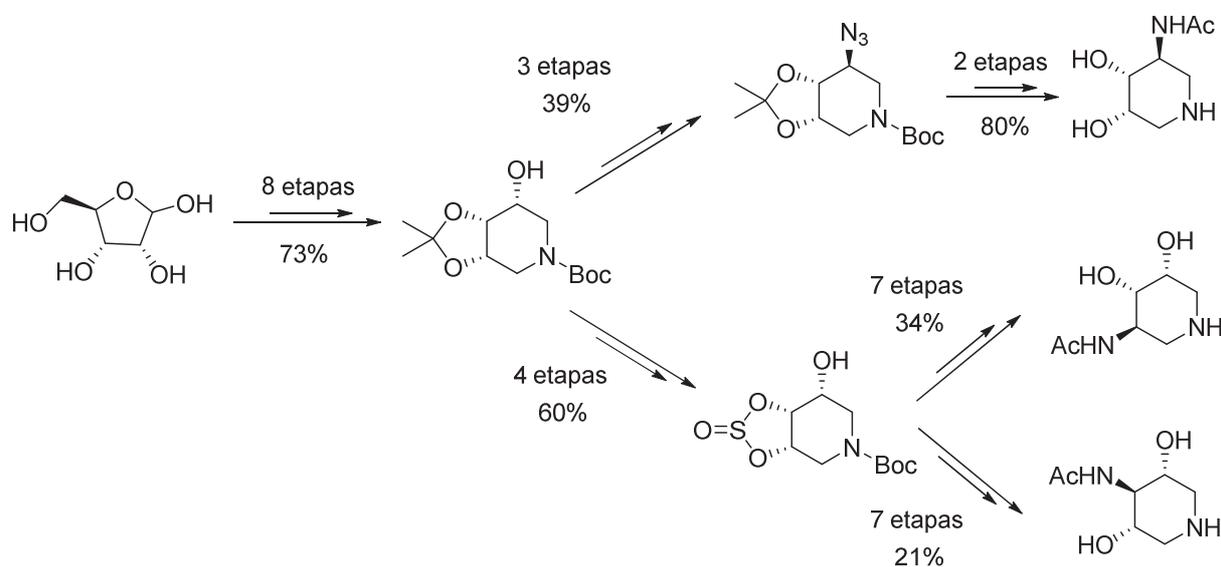
Así, es de destacar la reciente aparición de derivados de homonijirimicina (HNJ, **A-10**) que presentan una 2-acetamida como **A-35** y **A-36**.^[57] Estos compuestos, a diferencia de la HNJ original, presentan una extraordinaria selectividad por β -N-acetilhexosaminidasas. Además, ensayos preliminares han permitido determinar su utilidad como posible tratamiento en la enfermedad de Sanfilippo B.



Esquema 8. 2-acetamido-HNJ

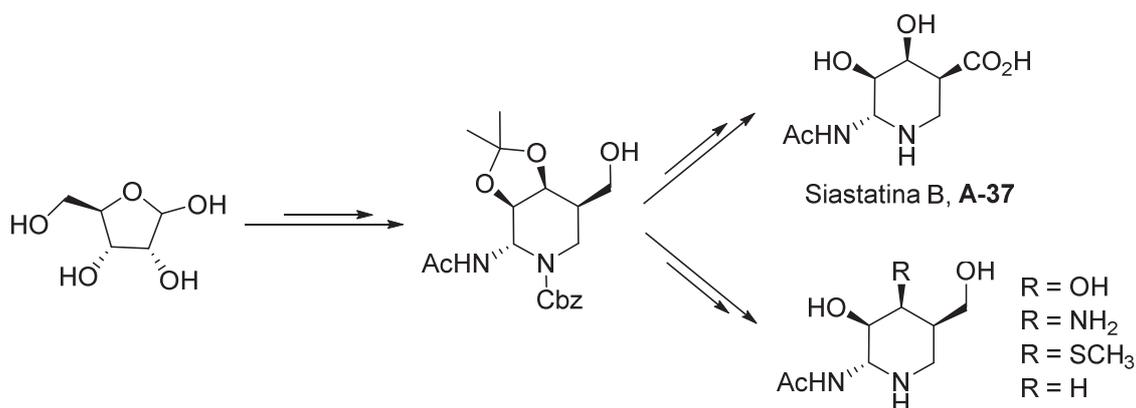
Dentro de los iminoazúcares piperidínicos, los 1-*N*-iminoazúcares son una variedad donde el nitrógeno endocíclico se sitúa en la posición análoga al carbono anomérico de los azúcares convencionales. Compuestos como la isofagomina (**A-12**) y sus derivados pertenecen a esta familia y se pueden hallar compuestos análogos que presenten una funcionalidad *N*-acetilo en su estructura sustituyendo a algunos de los hidroxilos.

Los compuestos de la familia de la isofagomina que incluyen una función *N*-acetilo se habían descrito en la década de los 80 aunque con escasa repercusión^[58]. En el 2011 se publicó una aproximación sintética donde partiendo de arabinosa se sintetizaban varios análogos de isofagomina (esquema 9).^[59] Para ello, se introducía la funcionalidad amino mediante reacciones S_N2 con azidas sobre tosilotos y apertura regioselectiva de sulfitos cíclicos con azida. Actualmente, no existen datos de inhibición para estos compuestos.

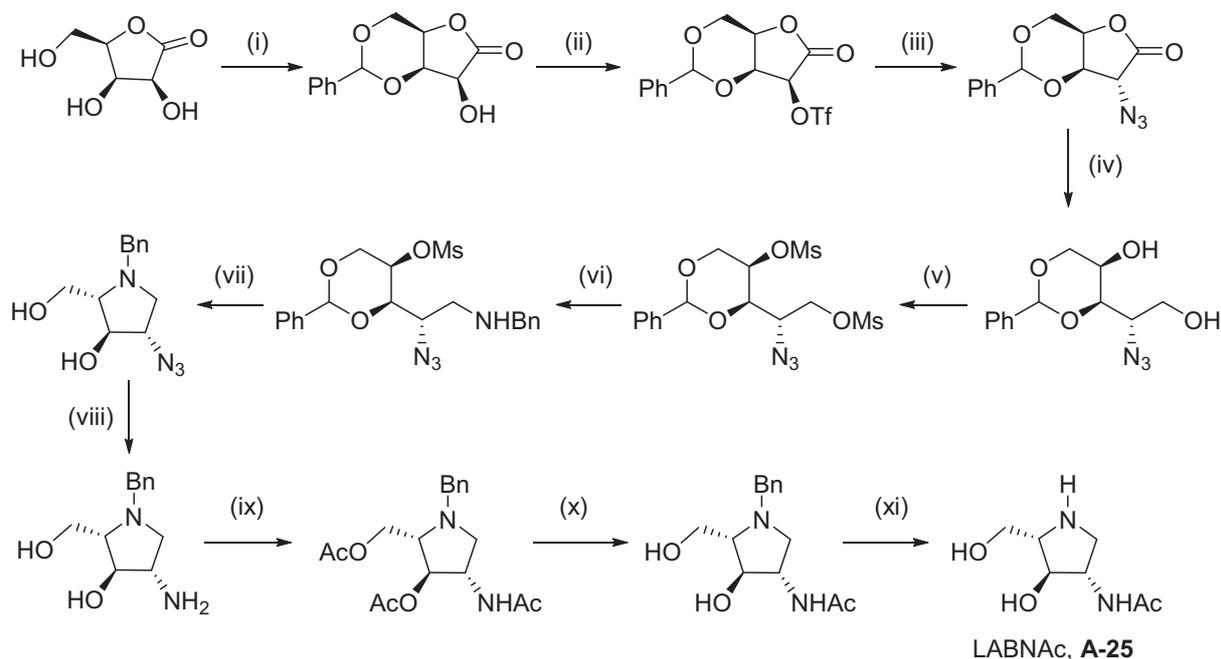


Esquema 9. Síntesis de acetamido iminoazúcares análogos a isofagomina ^[59]

La siastatina B (**A-37**), otro ejemplo de 1-*N*-iminoazúcar, es un inhibidor selectivo de β -glucuronidasa con configuración *galacto* que incluye un *N*-acetilo. Nishimura *et al.* ^[60] describieron la síntesis de siastatina B a partir de ribosa y aprovecharon dicha metodología para sintetizar varios derivados sustituyendo el grupo ácido en C5 por un hidroximetileno y variando la funcionalidad en C4 por azidas, alcoholes, tioles, etc. (esquema 10). Los valores de inhibición de dichos sustratos mostraron una pérdida de inhibición contra β -glucuronidasa y una elevada selectividad por hexosaminidasas.

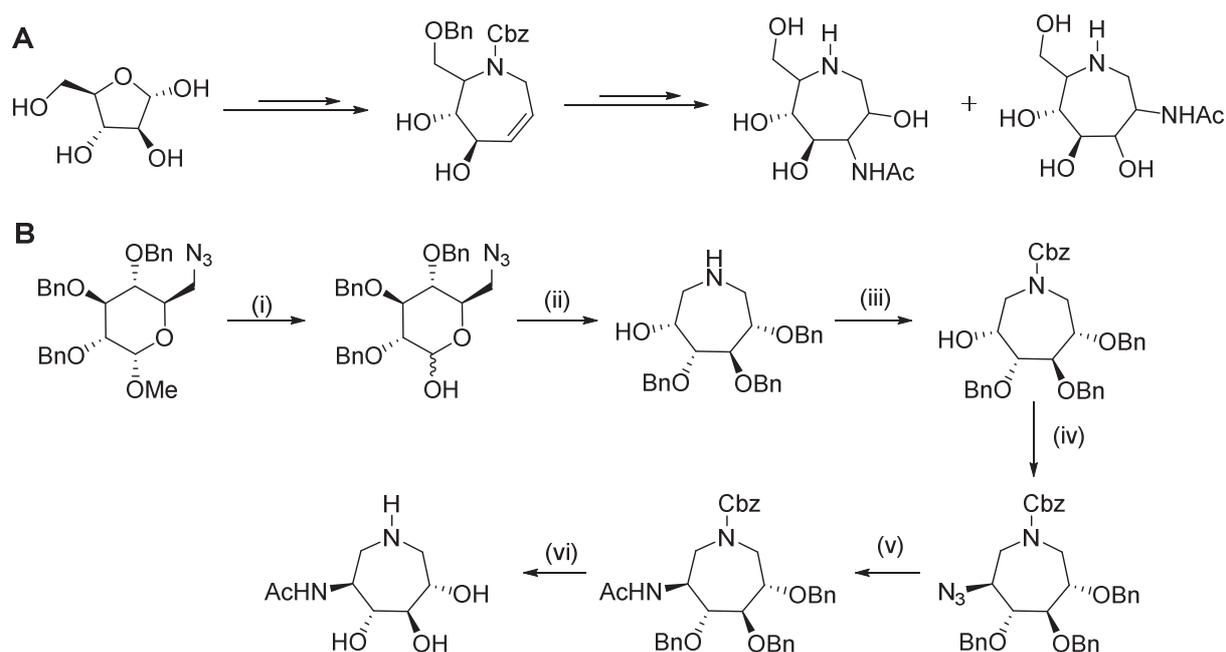


Dentro de los iminoazúcares pirrolidínicos también se pueden hallar sustratos con una acetamida. En el año 2009, Rountree *et al.*^[29] publicaron la primera síntesis de LABNAc (**A-25**) con un rendimiento global del 25% en 11 etapas sintéticas (esquema 11). La metodología aplicada era similar a la utilizada en el caso de la DGJNAc (esquema 7) y permitió sintetizar el enantiómero contrario DABNAc aplicando la misma metodología sintética pero partiendo del enantiómero contrario. Además, también se sintetizaron los *N*-Bn derivados de ambos productos. Los ensayos de inhibición de estos sustratos mostraron una total selectividad contra β -*N*-acetilglucosaminidasas y ensayos posteriores mostraron su aplicabilidad como chaperones químicas para el tratamiento de los síndromes de Tay-Sachs y Sandhoff.



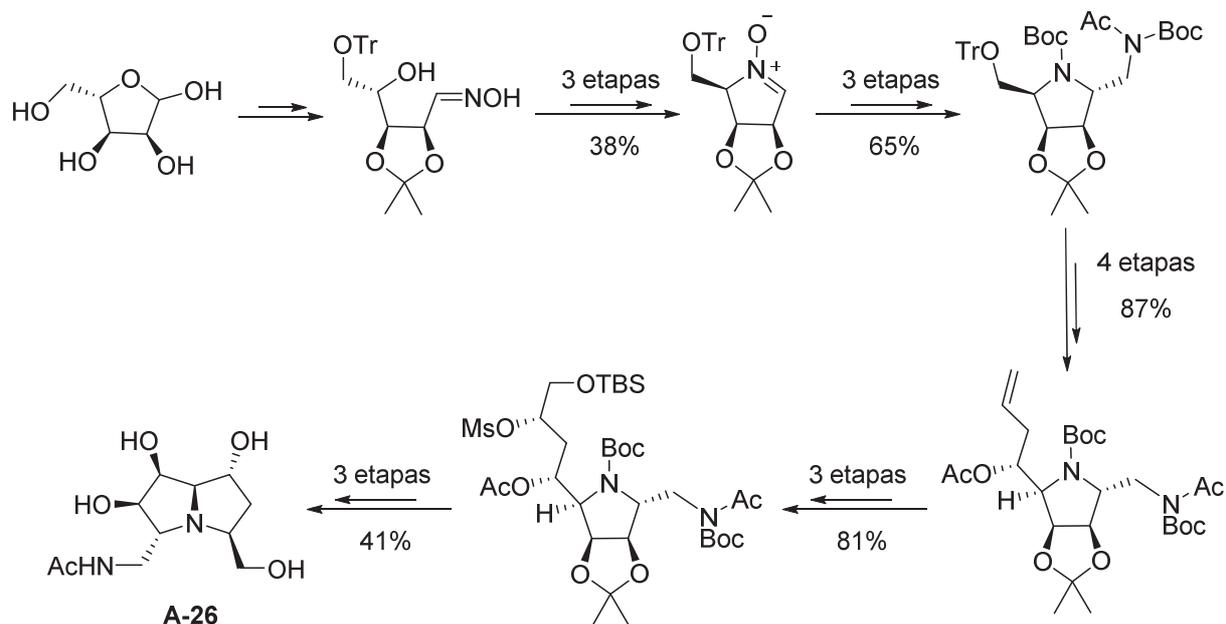
Esquema 11. Condiciones LABNAc (**A-25**): (i) PhCHO, HCl (concd), rt, 24 h, 90%; (ii) Tf₂O, piridina, -30°C, 3 h, 100%; (iii) NaN₃, DMF, rt, 60 min, 83%; (iv) LiBH₄, THF, -30°C, 3 h, 97%; (v) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 2.5 h, 81%; (vi) BnNH₂, 95°C, 14 h, 81%; (vii) Amberlyst®, 1,4-dioxano/H₂O (50% v/v), 85°C, 20 h, 89%; (viii) H₂/Pd-C (10% wt), THF, rt, 3 h, 100%; (ix) Ac₂O, piridina, rt, 16 h, 73 %; (x) NaOMe, MeOH, rt, 1 h, 84%; (xi) H₂/Pd black, 1,4-dioxano, H₂O, rt, 20 h, 100 % ^[29]

Finalmente, también se pueden hallar ejemplos de acetamido iminoazúcares con estructuras menos comunes. Así, se puede destacar el trabajo de Li *et al.* ^[61] donde se describe la obtención de una familia de acetamido azepanos. En este caso, los productos intermedios se obtienen mediante epoxidación, apertura posterior del epóxido con azida sódica y separación de los diastereómeros formados (esquema 12A) ^[62] o bien por una expansión del anillo con una reacción tándem Staudinger aza-Wittig (esquema 12B). ^[63] En el primer caso, la síntesis no es estereoselectiva sino que el objetivo radica en obtener varias configuraciones para evaluar las propiedades inhibitorias de cada una de ellas. Los valores de inhibición de estos sustratos mostraron una elevada selectividad por hexosaminidasas.



Esquema 12. Síntesis de acetamido azepanos ^[61]. Condiciones: (i) Ac₂O, H₂SO₄, CH₂Cl₂, 0 °C después CH₃ONa, CH₃OH, 90% (2 pasos); (ii) PPh₃, THF; (iii) NaBH₃CN, HCl 1M en CH₃OH, 4 Å MS, CH₃OH, 67% (2 pasos); (iv) MsCl, DMAP, piridina, NaN₃, DMF, 90°C, 80%; (v) PPh₃, THF/H₂O, 50°C después Ac₂O, piridina, 72% (2 pasos); (vi) H₂, 10% Pd/C, CH₃OH, 1 M aq HCl, 99%

Otro trabajo destacable, es la síntesis de acetamido iminoazúcares de estructura pirrolizidínica publicada recientemente por Zhu *et al.* ^[31] La pochonicina (**A-26**) es el primer iminoazúcar pirrolizidínico natural en contener una funcionalidad *N*-acetilo en su estructura. Aislado de *Pochonia suchlasporia* en 2009, se trata de un inhibidor nanomolar de hexosaminidasas. En el 2013 se publicó la síntesis de varios de sus estereoisómeros (esquema 11). Este trabajo permitió determinar que el estereoisómero D así como sus epímeros son activos en el rango nanomolar frente a hexosaminidasas, mientras que los enantiómeros L presentan actividades en el rango alto micromolar y en algunos epímeros incluso se pierde completamente la actividad.



Esquema 13. Síntesis de la pochonicina (A-26) según Zhu *et al.* [31]

En conclusión, en el presente apartado se ha dado una visión global de la síntesis de acetamido iminoazúcares que muestra la elevada variedad de estructuras y complejidad sintética de estos compuestos. En general, estas aproximaciones se basan en el *chiral pool* e implican un elevado número de etapas sintéticas. Además, se puede observar que los acetamido iminoazúcares son inhibidores selectivos de hexosaminidasas con potencias variables que pueden llegar a alcanzar el rango bajo nanomolar.

Referencias

- [1] D. E. Koshland, *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416–436.
- [2] M. I. Sinnott, Ed., *Enzyme Mechanisms*, Royal Society Of Chemistry, London, **1987**.
- [3] D. L. Zechel, S. G. Withers, *Accounts Chem. Res.* **2000**, *33*, 11–18.
- [4] T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1999**, *38*, 750–770.
- [5] T. M. Gloster, G. J. Davies, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305–20.
- [6] R. L. Lieberman, J. A. D'aquino, D. Ringe, G. A. Petsko, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4816–27.
- [7] H. H. Jensen, L. Lyngbye, M. Bols, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2001**, *40*, 3447–3449.
- [8] V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515–553.
- [9] E. Borges de Melo, A. da Silveira Gomes, I. Carvalho, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10277–10302.
- [10] G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 107–118.
- [11] N. Asano, K. Oseki, H. Kizu, K. Matsui, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3701–3706.
- [12] G. W. J. Fleet, N. G. Ramsden, R. J. Molyneus, G. S. Jacobs, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*.
- [13] N. Asano, K. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 243–255.
- [14] A. Kato, I. Adachi, S. Miyauchi, K. Ikeda, T. Komae, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash, M. R. Wormald, G. W. J. Fleet, N. Asano, *Carbohydr. Res.* **1999**, *316*, 95–103.
- [15] E. Tsuji, M. Muroi, N. Shiragami, A. Takatsuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 459–466.
- [16] K. Afarinkia, A. Bahar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1239–1287.
- [17] P. Compain, O. R. Martin, Eds., *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2007**.
- [18] B. G. Winchester, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 645–651.
- [19] 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.
- [20] A. H. Futerman, G. van Meer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 554–565.
- [21] T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4683–4696.
- [22] O. Meijer, N. van Vlies, F. A. Wijburg, *Expert Opin. Orphan Drugs* **2013**, *1*, 717–730.
- [23] P. Compain, O. R. Martin, *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2007**.
- [24] M. B. Tropak, S. P. Reid, M. Guiral, S. G. Withers, D. Mahuran, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13478–13487.
- [25] P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1356–1359.
- [26] L. Yu, K. Ikeda, A. Kato, I. Adachi, G. Godin, P. Compain, O. Martin, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736–7744.
- [27] G. W. J. Fleet, P. W. Smith, R. J. Nash, L. E. Fellows, R. B. Parekh, T. W. Rademacher, *Chem. Lett.* **1986**, 1051–1054.
- [28] G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 979–990.
- [29] J. S. S. Rountree, T. D. Butters, M. R. Wormald, S. D. Boomkamp, R. A. Dwek, N. Asano, K. Ikeda, E. L. Evinson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 378–392.
- [30] B. J. Ayers, A. F. G. Glawar, R. F. Martínez, N. Ngo, Z. Liu, G. W. J. Fleet, T. D. Butters, R. J. Nash, C.-Y. Yu, M. R. Wormald, S. Nakagawa, I. Adachi, A. Kato, S. F. Jenkinson, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3398–3409.
- [31] J.-S. Zhu, S. Nakagawa, W. Chen, I. Adachi, Y.-M. Jia, X.-G. Hu, G. W. J. Fleet, F. X. Wilson, T. Nitoda, G. Horne, R. van Well, A. Kato, C.-Y. Yu, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10298–10309.
- [32] M. B. Tropak, S. P. Reid, M. Guiral, S. G. Withers, D. Mahuran, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13478–13487.
- [33] 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.

- [34] J. Liu, A. R. Shikhman, M. K. Lotz, C. H. Wong, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 701–711.
- [35] I. B. Tomasic, M. C. Metcalf, A. I. Guce, N. E. Clark, S. C. Garman, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21560–21566.
- [36] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart, C.-X. Gong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10804–10809.
- [37] R. J. Nash, A. Kato, C.-Y. Yu, G. W. Fleet, *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1513–1521.
- [38] T. M. Wrodnigg, A. J. Steiner, B. J. Ueberbacher, **2008**, 77–85.
- [39] K. Slámová, P. Bojarová, L. Petrásková, V. Kren, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 682–693.
- [40] T. Sumida, K. A. Stubbs, M. Ito, S. Yokoyama, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2607–2612.
- [41] B. L. Mark, D. J. Vocadlo, S. Knapp, B. L. Triggs-Raine, S. G. Withers, M. N. James, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10330–10337.
- [42] S. Knapp, D. Vocadlo, Z. Gao, B. Kirk, J. Lou, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804–6805.
- [43] B. L. Mark, D. J. Vocadlo, D. Zhao, S. Knapp, S. G. Withers, M. N. James, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42131–42137.
- [44] B. G. Davis, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 652–671.
- [45] I. Dragutan, V. Dragutan, A. Demonceau, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 719–736.
- [46] M. S. M. Pearson, M. Mathé-Allainmat, V. Fargeas, J. Lebreton, *European J. Org. Chem.* **2005**, 2159–2191.
- [47] 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.
- [48] M. Kiso, M. Kitagawa, H. Ishida, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 25–45.
- [49] G. Gradnig, G. Legler, A. E. Stuetz, *Carbohydr. Res.* **1996**, *287*, 49–57.
- [50] C. Ho, S. D. Popat, T. Liu, K. Tsai, M. Ho, W. Chen, A. Yang, C. Lin, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 489–497.
- [51] A. J. Steiner, G. Schitter, A. E. Stütz, T. M. Wrodnigg, C. A. Tarling, S. G. Withers, D. J. Mahuran, M. B. Tropak, *Tetrahedron. Asymmetry* **2009**, *20*, 832–835.
- [52] T. Yamaguchi, B. Blázquez, D. Heseck, M. Lee, L. I. Llarrull, B. Boggess, A. G. Oliver, J. F. Fisher, S. Mobashery, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 238–242.
- [53] S. Al-Rawi, S. Hinderlich, W. Reutter, A. Giannis, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2004**, *43*, 4366–4370.
- [54] R. Martín, A. Moyano, M. A. Pericàs, A. Riera, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 93–95.
- [55] 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.
- [56] A. F. G. Glawar, D. Best, B. J. Ayers, S. Miyauchi, S. Nakagawa, M. Aguilar-Moncayo, J. M. Garcia-Fernandez, 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.
- [57] M. Sollogoub, Y. Blériot, G. Prencipe, N. Auburger, *Imino-Sugar C-Glycosides, Preparation and Use Thereof*, **2013**, WO 2013/011098 A1.
- [58] R. C. Bernotas, B. Ganem, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 312–316.
- [59] D. Rejman, R. Pohl, M. Dračinský, *European J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 2172–2187.
- [60] Y. Nishimura, T. Satoh, T. Kudo, S. Kondo, T. Takeuchi, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 91–96.
- [61] H. Li, F. Marcelo, C. Bello, P. Vogel, T. D. Butters, A. P. Rauter, Y. Zhang, M. Sollogoub, Y. Blériot, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5598–5604.
- [62] H. Li, Y. Blériot, J.-M. Mallet, E. Rodriguez-Garcia, P. Vogel, Y. Zhang, P. Sinaÿ, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 313–319.
- [63] H. Li, Y. Zhang, P. Vogel, P. Sinaÿ, Y. Blériot, *Chem. Commun.* **2007**, 183–185.

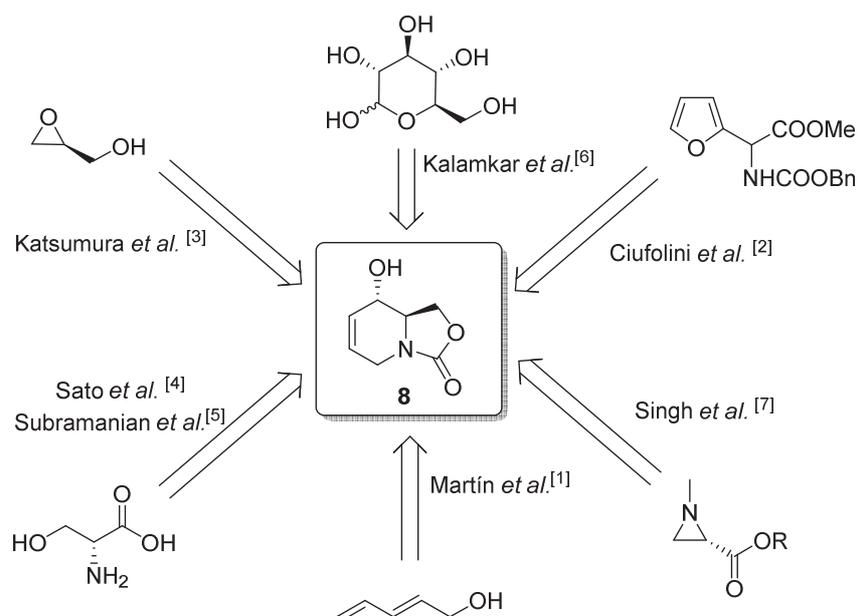
3

Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc) y derivados mediante apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos

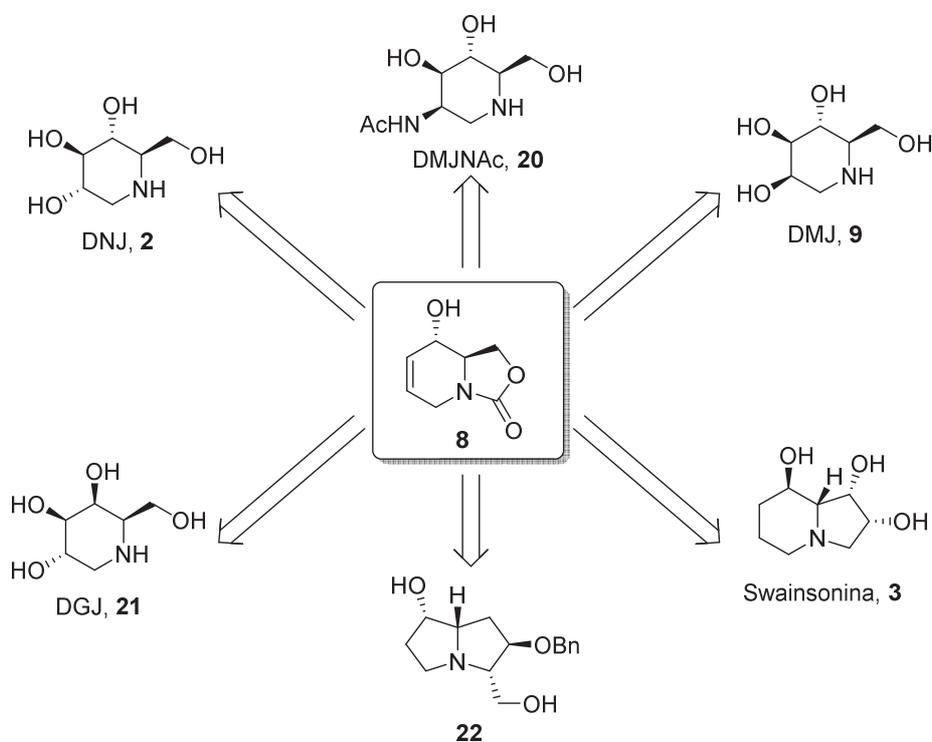
3.1. Introducción y objetivos

Históricamente, la síntesis de iminoazúcares se ha basado en el *chiral pool* utilizando azúcares como productos de partida. Sin embargo, en nuestro grupo de investigación, la síntesis de estos productos se ha realizado partiendo del carbamato cíclico **8**. Este compuesto presenta la ventaja de mantener el hidroxilo en C6 protegido de forma conjunta con la amina endocíclica, formando el correspondiente carbamato cíclico, dejando libre una olefina para realizar química sobre ella permitiendo obtener distintos iminoazúcares partiendo de un mismo producto base. La variedad de procedimientos que se pueden plantear para obtener distintos iminoazúcares da una gran versatilidad a este intermedio.

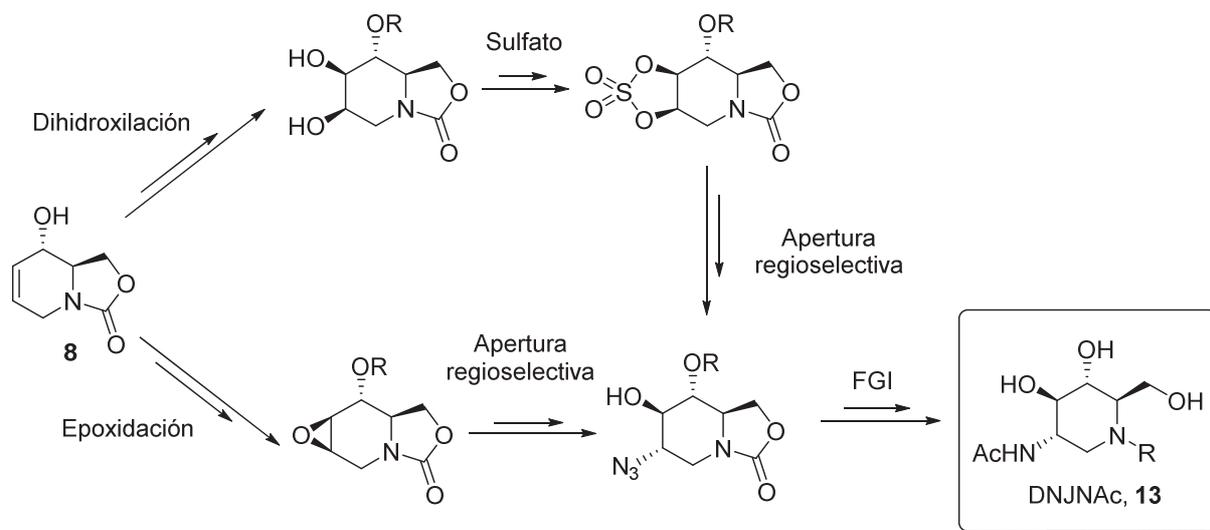
En nuestro grupo de investigación se desarrolló a finales de los 90 una metodología sintética para obtener el carbamato **8** en 5 etapas, con un 51% de rendimiento global y con excelentes *ee* basada en la reacción de epoxidación de Sharpless y la reacción de metátesis.^[1] En el mismo período de tiempo, se desarrollaron otras metodologías sintéticas que permitían obtener dicho compuesto. Así, Ciufolini *et al.*^[2] desarrollaron en 1998 una síntesis en 12 etapas partiendo de un derivado de furilglicina y, en 1999, Katsumura *et al.*^[3] presentaron una síntesis partiendo de glicidol en 11 etapas y con un 19% de rendimiento global. Poco después Sato *et al.*^[4] publicó una nueva síntesis partiendo de D-Serina que permitía obtener **8** en 12 etapas y con un 30% de rendimiento global. Posteriormente, han aparecido otras aproximaciones como la síntesis de Subramanian *et al.*^[5] partiendo también de D-serina aunque con una metodología mucho más elegante que la de Sato *et al.* para obtener **8** en 6 etapas y con un 21% de rendimiento global. Más recientemente se han desarrollado metodologías sintética para obtener **8** partiendo de D-glucosa^[6], en 10 etapas sintéticas y con un 25% de rendimiento global, y también de aziridinas quirales^[7].



La versatilidad de **8** se ha visto ampliamente confirmada por su uso en la síntesis de varios iminoazúcares. Las primeras aproximaciones permitieron obtener iminoazúcares de estructura piperídínica como 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ, **21**) o 1-desoximanojirimicina (DMJ, **9**)^[3]. Es de destacar el trabajo de Singh *et al.*^[7] donde se sintetizan 6 configuraciones distintas de la DNJ (**2**) partiendo del carbamato **8**. En el contexto de iminoazúcares piperídínicos también destaca la síntesis de DMJNAc (**20**)^[8], donde se consigue introducir de forma estereoselectiva una acetamida en C2. Sin embargo, la versatilidad de **8** no se limita únicamente a la síntesis de compuestos de estructura piperídínica sino que también se ha aplicado a la síntesis de compuestos pirrolizidínicos e indozilidínicos^[5]. En lo referente a nuestro grupo de investigación se ha empleado **8** para la síntesis de DMJ (**9**), como ejemplo de estructura piperídínica, y de la Swainsonina, como ejemplo de estructura indozilidínica^[9].



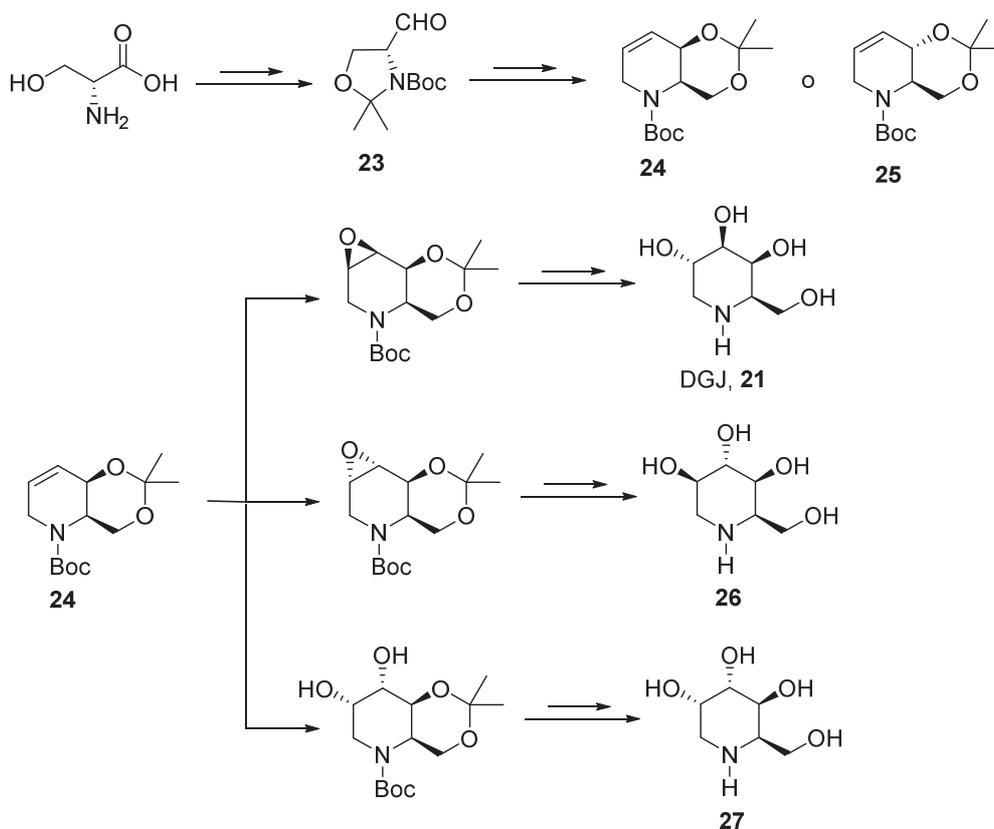
En el presente capítulo nos planteamos explorar la obtención de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos de forma estereoselectiva a partir del carbamato cíclico **8** para llevar a cabo reacciones de apertura nucleófila utilizando azida sódica. De este modo, se podría conseguir introducir un equivalente sintético del amoníaco estereoselectivamente en la posición C2 del esqueleto glicosídico. Este sería el paso determinante para conseguir llegar, mediante una interconversión adecuada de los grupos funcionales, a la 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc, **13**). Una vez obtenido este producto, el objetivo se centrará en la obtención de derivados mediante modificación de la acetamida y de la amina endocíclica con la esperanza de mejorar los valores de inhibición frente a glicosidasas. En el esquema 1 se presenta la síntesis inicial planteada.



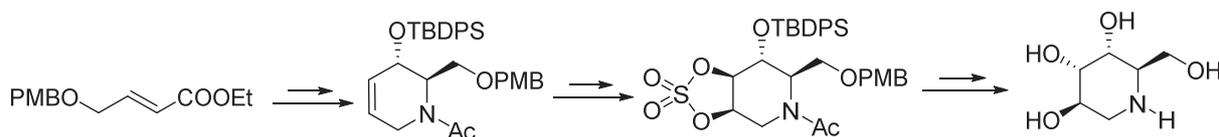
Esquema 1. Síntesis de DNJNAc

Existen precedentes del uso de intermedios similares a **8** que dejan una olefina libre para realizar diversas transformaciones sintéticas como, por ejemplo, la epoxidación y posterior apertura regioselectiva de éstos para obtener nuevos iminoazúcares. Esta técnica combinada con la dihidroxilación directa de las olefinas ha permitido la síntesis de una gran variedad de estereoquímicas posibles partiendo de un mismo producto de partida. Probablemente, el ejemplo más representativo sean los trabajos de Takahata y colaboradores^[10,11] (esquema 2). Su grupo de investigación consiguió partiendo del aldehído de Garner (**23**), accesible a partir de D-serina, obtener los intermedios **24** y su epímero **25**. Estos intermedios presentaban un elevado valor sintético para llegar a derivados de DNJ con distintas configuraciones estereoquímicas. Así, consiguió sintetizar la DNJ y varios de sus estereoisómeros (como **21**, **26** o **27**) basándose en el uso de epoxidaciones y dihidroxilaciones. El mismo grupo de investigación siguió una metodología similar para obtener epímeros de fagomina.

En menor medida, también se pueden hallar ejemplos del uso de sulfatos cíclicos como equivalentes sintéticos de los epóxidos. Esta variante se utiliza en casos donde las epoxidaciones no funcionan o bien cuando las diastereoselectividades son pobres. A modo de ejemplo, Han *et al.*^[12] sintetizaron un sulfato cíclico partiendo de una olefina aquiral mediante el cual obtuvieron las versiones *altro* y *iodo* de la DNJ (esquema 3).



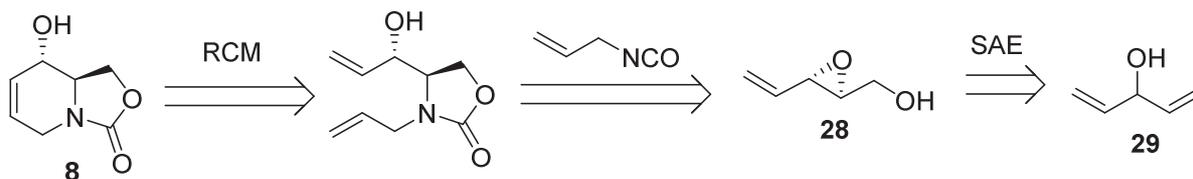
Esquema 2. Aproximación a iminoazúcares de Takahata y colaboradores



Esquema 3. Síntesis de iminoazúcares de Han *et al.* [12] basada en la apertura de sulfatos cíclicos

3.2. Síntesis del carbamato cíclico **8**

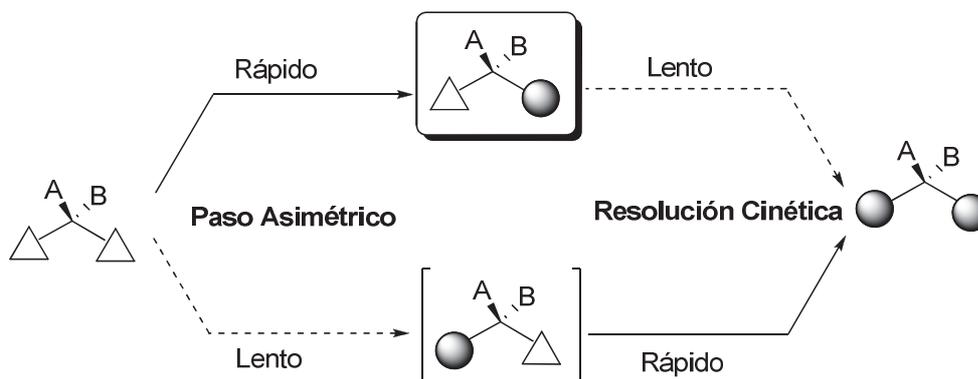
El planteamiento inicial realizado para introducir una acetamida de forma estereoselectiva mediante la apertura de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos requería como primera fase del proyecto la síntesis de **8**. Inicialmente se decidió aplicar el mismo procedimiento ya descrito en nuestro grupo de investigación^[1] basado en la obtención del epoxialcohol **28** por epoxidación asimétrica de Sharpless sobre el 1,4-pentadien-3-ol (**29**) seguido de condensación con alil isocianato, apertura intermolecular del epóxido y reacción de metátesis para obtener el producto final deseado (esquema 4). Sin embargo, al escalar el proceso se observaron problemas que no hacían rentable la aplicación de este procedimiento. Por ello, se ha desarrollado un proceso alternativo basado en la obtención de **28** a partir del 2,4-pentadien-1-ol (**31**).

Esquema 4. Retrosíntesis de **8** partiendo del alcohol (**29**)

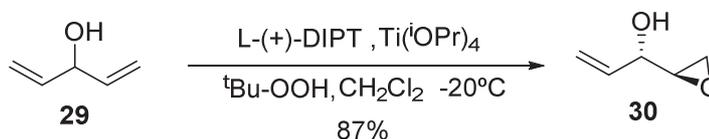
3.2.1. Síntesis del epoxialcohol **28** a partir de 1,4-pentadien-3-ol (**29**)

En primer lugar se sintetizó el epoxialcohol **28** mediante dos pasos sintéticos utilizando la epoxidación asimétrica de Sharpless sobre el 1,4-pentadien-3-ol **29**, ruta que fue descrita por Jäger *et al.*^[13,14] como alternativa a la obtención del mismo producto partiendo de 2,4-pentadien-1-ol (**31**).

En este tipo de reacciones uno de los grupos enantiotópicos reacciona más rápidamente que el otro en un paso totalmente asimétrico originando la denominada *selectividad del grupo enantiotópico*^[15]. Por otro lado, el estereoisómero que se forma lentamente reacciona más rápido que su homólogo (resolución cinética) dando lugar al producto de doble adición que se separa con facilidad del producto deseado. Así, se pueden lograr elevadas conversiones obteniendo excesos enantioméricos cercanos al 100% siempre que el tiempo de reacción sea el adecuado.



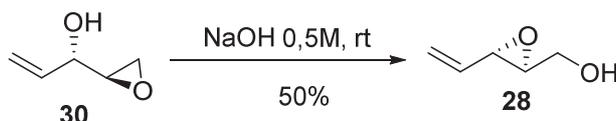
De acuerdo con este precedente se planteó la reacción de epoxidación de Sharpless utilizando L-(+)-DIPT como fuente de quiralidad y ^tBu-OOH como oxidante sobre el alcohol **29**, obteniéndose tras 4 días de reacción el epoxialcohol **30** con un 87% de rendimiento.



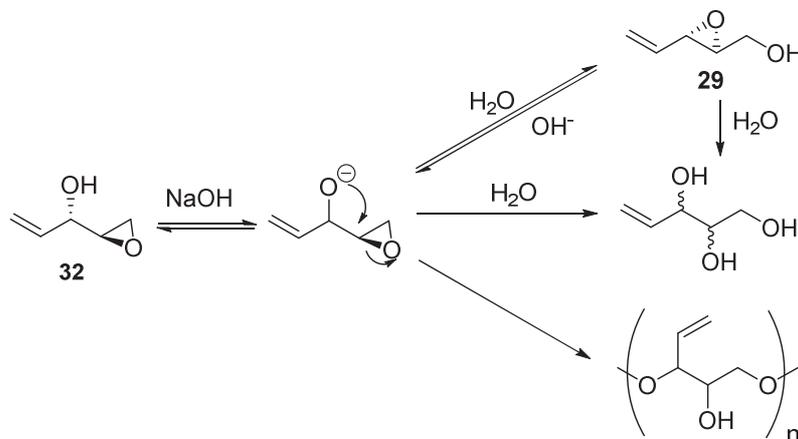
Se obtuvo como subproducto el diepóxido correspondiente que se pudo separar fácilmente del producto **30** por cromatografía. Se postula, de acuerdo con el precedente explicado, que la mayor parte de este diepóxido proviene del paso asimétrico lento, eliminando así el epóxido no deseado. Estudios realizados en nuestro grupo de investigación mediante el análisis por ésteres de Moscher de **30** permitieron determinar que el *ee* obtenido en estas condiciones es superior al 98%. Cabe destacar que

mayores tiempos de reacción conllevarían, seguramente, mejores excesos enantioméricos pero rendimientos menores por lo que se ha de tomar un compromiso entre ambos parámetros que sea adecuado a los objetivos planteados. Por otro lado, la elevada inestabilidad de **30** implica que se deban realizar rápidamente las etapas consiguientes.

A continuación, se llevó a cabo la transposición de Payne^[16] sobre el epoxialcohol **30** en medio básico acuoso para dar lugar al epoxialcohol **28** sin necesidad de purificación posterior. Esta reacción se basa en el ataque intramolecular del hidroxilo secundario sobre el epóxido terminal, conduciendo a la formación del epóxido insaturado de interés. Se trata de una reacción de equilibrio reversible por lo que el desplazamiento se verá influenciado por la estabilidad relativa de los dos epoxialcoholes.



No obstante, el rendimiento de esta reacción es pobre (50 %). Este bajo rendimiento puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, la elevada volatilidad de **28** dificulta su aislamiento. En segundo lugar, el epoxialcohol presenta una elevada solubilidad en agua. En tercer lugar, pueden darse reacciones secundarias de apertura o autocondensación generando productos secundarios por lo que el control del tiempo y de la temperatura en esta reacción es clave para minimizar la formación de estos productos secundarios. Además, el epóxido **28** presenta una cierta tendencia a la polimerización.

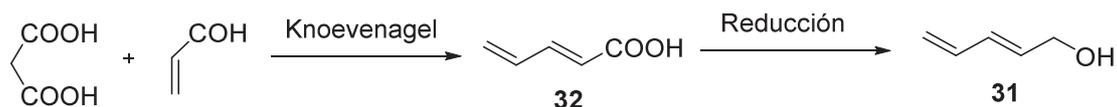


Para minimizar estos problemas se realizaron pruebas a distintas temperaturas, concentraciones de NaOH aq y variando el orden de adición de reactivo y sustrato, pero en ningún caso se consiguió mejorar el 50% de rendimiento inicial sino que en general se obtuvieron rendimientos mucho menores. Además, se observó que al incrementar la escala de la reacción los rendimientos eran cada vez menores. Aunque el reordenamiento de Payne sobre **28** se ha descrito en la literatura con excelentes rendimientos^[17,18], en nuestras manos no fue posible reproducir estos resultados a escala multigramo.

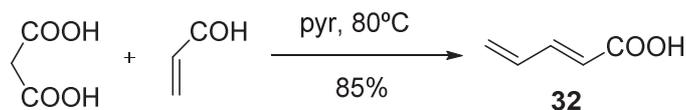
3.2.2. Síntesis del epoxialcohol 28 a partir de 2,4-pentadien-1-ol (31)

La síntesis de **28** a partir de **29** resultó ser un procedimiento poco escalable a raíz de las dificultades halladas en la transposición de Payne. Sin embargo presentaba una serie de ventajas remarcables. En primer lugar, la resolución cinética del epoxialcohol **30** permite obtener *ee* del orden del 98% mientras que las epoxidaciones asimétricas de Sharpless generan habitualmente *ee* en el margen del 92-94%. Además el producto de partida es comercial.

Ante la problemática surgida con la reacción de Payne, se plantearon vías alternativas para obtener el epoxialcohol **28**. Con este objetivo la alternativa más lógica era realizar la epoxidación asimétrica de Sharpless sobre el 2,4-pentadien-1-ol (**31**). Aunque **31** no es un producto comercial, Schneider *et al.*^[19] describieron su síntesis mediante reacción de Knoevenagel entre el ácido malónico y acroleína y posterior reducción del ácido **32** con alano. Este procedimiento se había aplicado en nuestro grupo de investigación pero se había abandonado su uso por varias razones: a) dificultad en el aislamiento por sublimación de **32**; b) dificultades en la reducción de **32** debido a reacciones secundarias de sobrerreducción; c) elevada tendencia a la polimerización del 2,4-pentadien-1-ol (**31**).



Nos propusimos recuperar el procedimiento de Schneider y explorarlo de nuevo para obtener **31**. Se decidió añadir una etapa extra en el proceso y esterificar **32** para evitar su aislamiento por sublimación y, al mismo tiempo, facilitar la etapa de reducción posterior. Aunque el ácido (*E*)-2,4-pentadienoico (**32**) es comercial se decidió sintetizarlo mediante la reacción de Knoevenagel. Así pues, se hizo reaccionar el ácido malónico con acroleína en piridina a 80°C. El aislamiento de **32** se realiza mediante precipitación y posterior sublimación del ácido. Sin embargo, se observó que una simple extracción con Et₂O permitía obtener un producto suficientemente puro como para usar en las siguientes etapas con un 85% de rendimiento.



A continuación se ensayaron las reacciones de esterificación. En la literatura se describe la formación de los correspondientes ésteres de **32** mediante formación del cloruro de ácido y posterior reacción con el alcohol correspondiente^[20]. Se planteó realizar la transformación en una única etapa utilizando la esterificación de Fischer. Debido a la elevada volatilidad de los ésteres se planteó realizar la esterificación con 1-propanol para conseguir un producto menos volátil. Se realizaron también pruebas a varias escalas para optimizar el proceso de cara al escalado (tabla 1).

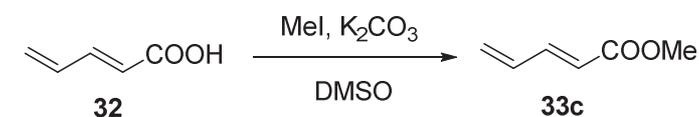
La esterificación de Fischer es una reacción de equilibrio. Se observó que utilizando el alcohol deseado como disolvente y a reflujo se podía llevar a cabo la reacción con conversión completa. Sin embargo, el aislamiento de **33a** fue tremendamente difícil. Su volatilidad no permitía separarlo del

propanol en exceso por evaporación y mediante destilación se arrastraba gran cantidad de propanol. Se planteó extraerlo con disolventes apolares como éter de petróleo o pentano, cuya miscibilidad con alcoholes es baja y que tienen puntos de ebullición muy bajos, de modo que se podrían evaporar los disolventes dejando el éster correspondiente. Lamentablemente, al escalar la reacción no se consiguió aislar **33a**. Sin embargo, se planteó que un éster de cadena alifática más corta quizás sí permitiría realizar este procedimiento. Por ello se sintetizaron los ésteres **33b** y **33c** con conversiones completas. Mientras que **33b** dio problemas similares a **33a**, el éster metílico **33c** se pudo separar fácilmente del MeOH por extracción con pentano. La simple eliminación del pentano a baja presión permitió aislar **33c** con buenos rendimientos. Lamentablemente, a escalas mayores de 30g los rendimientos obtenidos se vieron drásticamente reducidos debido a la elevada polimerización de **33c** durante la reacción y a las pérdidas en su aislamiento. Además la pureza del producto aislado no era adecuada para llevar a cabo las siguientes etapas.

Tabla 1. Exploración de la esterificación de Fischer sobre **32**

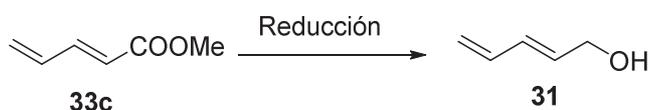
Entrada	R	Condiciones	Escala	Rdto / %
1	n-Pr	PrOH, H ₂ SO ₄ (cat), rt	< 1g	-
2	n-Pr	PrOH, H ₂ SO ₄ (cat), reflux	< 1g	87
3	n-Pr	PrOH, H ₂ SO ₄ (cat), reflux	1 – 5 g	-
4	Et	EtOH, H ₂ SO ₄ (cat), reflux	1 – 5 g	60
5	Me	MeOH, H ₂ SO ₄ (cat), reflux	< 1g	90
6	Me	MeOH, H ₂ SO ₄ (cat), reflux	1 – 5 g	79
7	Me	MeOH, H ₂ SO ₄ (cat), reflux	50 g	47

Se decidió variar la estrategia sintética para obtener **33c** y se ensayó la metilación usando MeI en condiciones básicas reacción que se ha aplicado satisfactoriamente en reacciones a gran escala^[21] (tabla 2). En estas condiciones se obtuvieron a pequeña escala rendimientos cuantitativos realizando la reacción en DMSO. El éster **33c** se pudo aislar fácilmente mediante extracción con pentano. A escala multigramo se produjo una reducción considerable del rendimiento pero se evitaron los problemas de polimerización que se observaban en la esterificación de Fischer.

Tabla 2. Exploración de la esterificación con MeI sobre **32**

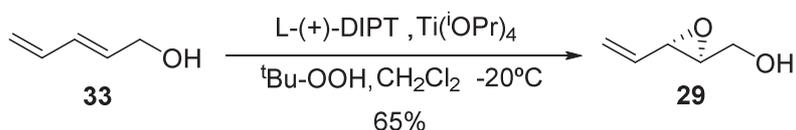
Entrada	Condiciones	Escala	Rdto / %
1	MeI, K ₂ CO ₃ , DMF, rt	< 1g	-
2	MeI, K ₂ CO ₃ , DMSO, rt	< 1g	99
3	MeI, K ₂ CO ₃ , DMSO, rt	1 – 5 g	81
4	MeI, K ₂ CO ₃ , DMSO, rt	75g	56

El siguiente paso consistía en la reducción del éster para obtener el 2,4-pentadien-1-ol (**31**). En nuestro grupo de investigación, la reducción de **32** con LiAlH₄ y alano habían dado lugar a productos de sobrerreducción sobre el sistema bisalílico. Por esta razón se exploró el uso de reductores menos agresivos como el DIBALH o Red-Al^[22–24] (tabla 3, entradas 1-4). En ambos casos la reacción procedió de forma limpia. Sin embargo, la destilación de las reacciones con Red-Al no permitieron obtener el producto puro, mientras que en el caso del DIBALH si se pudo aislar **31** aunque con rendimientos moderados. El empleo de DIBALH implicaba utilizar grandes cantidades de disolvente dado que en su forma comercial es una disolución 1M en disolventes orgánicos. Por esta razón, se planteó explorar el uso de LiBH₄ y LiAlH₄ (tabla 3, entradas 5-8). En el primer caso, no se observó reactividad y se recuperó íntegramente el producto de partido. Sorprendentemente, la reducción con LiAlH₄ no generó productos de sobrerreducción, como en el caso de **32**, sino que procedió de forma muy limpia. La elevada polimerización de **31** dificultó extraordinariamente su purificación por destilación pero aun así se consiguió aislar con rendimientos aceptables.

Tabla 3. Exploración de la reducción de **33c**

Entrada	Reductor	Escala / g	Rdto / %
1	DIBALH	1 – 5	48
2	DIBALH	25	57
3	DIBALH	50	38
4	Red-Al	1	nd
5	LiBH ₄	< 1	-
6	LiAlH ₄	< 1	nd
7	LiAlH ₄	1-5	46
8	LiAlH ₄	50	68

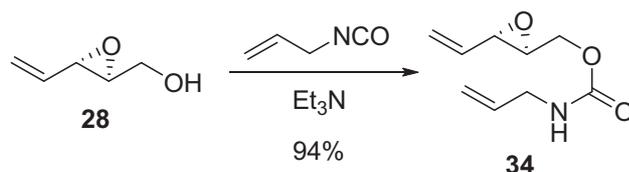
Una vez obtenido el 2,4-pentadien-1-ol (**31**), se realizó la reacción de epoxidación asimétrica de Sharpless utilizando L-(+)-DIPT como fuente de quiralidad y ^tBu-OOH como oxidante obteniéndose el epoxialcohol **28** con un 65% de rendimiento.



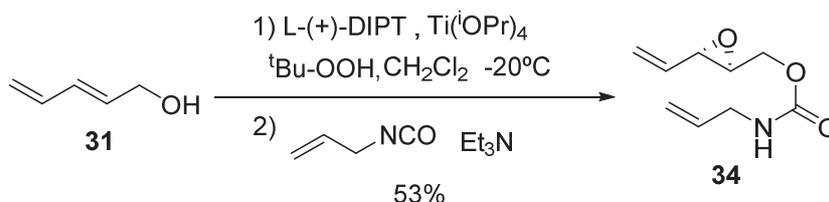
Esta alternativa sintética permitía obtener **28** sin utilizar el reordenamiento de Payne y, por lo tanto, escalar de forma más óptima el proceso de obtención del carbamato cíclico **8**. Por esta razón se descartó el uso del 1,4-pentadien-3-ol como producto de partida para la obtención de **8**.

3.2.3. Síntesis del carbamato cíclico **8** a partir del epoxialcohol **28**

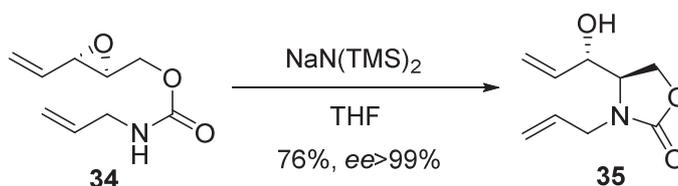
Una vez optimizada la síntesis del epoxialcohol **28**, el siguiente paso consistía en la formación del epoxicarbamato **34** mediante reacción con isocianato de alilo en presencia de Et₃N y a reflujo. La elección del isocianato de alilo responde a la necesidad de introducir una olefina terminal que permita posteriormente realizar la reacción de metátesis. En este caso, se obtiene un producto estable y no volátil de fácil aislamiento por cromatografía con un 94% de rendimiento.



El epoxialcohol **28** presenta cierta tendencia a la polimerización haciendo imposible su almacenamiento incluso bajo atmósfera inerte y a baja temperatura. Además, se trata de un producto muy volátil por lo que se producían pérdidas inevitables durante su aislamiento, especialmente significativas, al trabajar a escala multigramo. Para intentar solucionar este problema se decidió hacer una reacción *one-pot* para obtener el epoxicarbamato **34** en una sola etapa sintética evitándose así el aislamiento del epoxialcohol. Para ello, una vez acabada la epoxidación de Sharpless, se añadió ácido cítrico para acomplejar el $\text{Ti}(\text{OPr})_4$ y un reductor para reducir el exceso de $^t\text{BuOOH}$. Inicialmente, se escogió la PPh_3 pero el correspondiente óxido generaba problemas durante la purificación del carbamato. En cambio, el uso de $\text{P}(\text{OMe})_3$ permitía eliminar el $\text{PO}(\text{OMe})_3$ en el *work-up* acuoso posterior a la formación del carbamato. De este modo, tras purificar por cromatografía, se obtuvo **34** con un 53% de rendimiento y un *ee* del 94%.

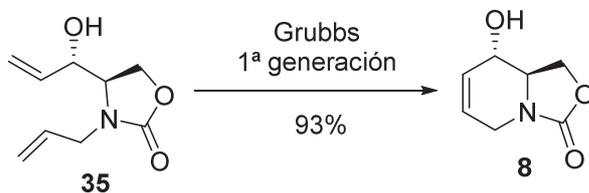


Posteriormente, se prosiguió con la formación del carbamato cíclico **35** mediante un proceso de ciclación intramolecular por ataque nucleófilo del nitrógeno a la posición C2 del epóxido. Esta reacción se realiza utilizando como base $\text{NaN}(\text{TMS})_2$ y THF como disolvente, permitiendo una reacción regioespecífica con tiempos de reacción cortos y rendimientos excelentes, a diferencia de con el uso de otras bases como el NaH o DBU . El aislamiento de **35** se puede realizar fácilmente por cromatografía obteniéndolo con rendimientos del 87%. Sin embargo, en nuestro proceso de escalado se decidió explorar si se podía enriquecer mediante cristalización para conseguir un producto final con un *ee* similar al obtenido mediante el proceso de resolución cinética que se daba sobre el alcohol **29**. Tras varias pruebas se observó que cristalizando en una solución de heptano enriquecida en tolueno se podía obtener **35** con un 76% de rendimiento y *ee* superior al 99%. Las aguas madres se cromatografiaron y se recrystalizaron permitiendo enriquecer de un 73% a un 87% de *ee*. Este proceso de cristalización se pudo realizar satisfactoriamente a escala multigramo.



De acuerdo con el esquema retrosintético presentado al inicio del presente apartado, el último paso sintético consiste en la realización de la reacción de “ring closing metathesis” (RCM) para

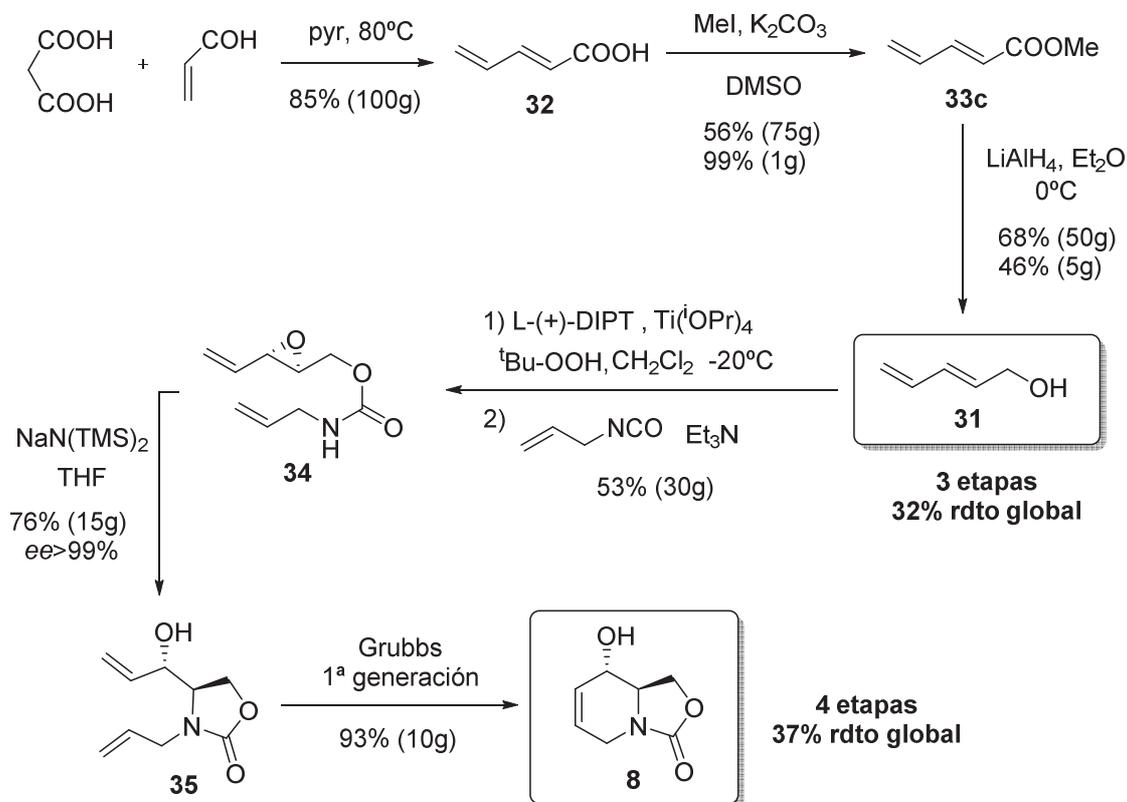
conseguir la estructura piperidínica deseada y llegar al intermedio **8**. En este caso, se utilizó el catalizador de Grubbs de primera generación y se obtuvo **8** con excelentes rendimientos a escala multigramo.



Algunos aspectos remarcables para intentar mejorar la síntesis fueron distintas pruebas que se realizaron para evitar el aislamiento por cromatografía de **34**. Para ello se ensayó la formación del carbamato cíclico directamente con el crudo extraído del paso anterior. Sin embargo, se arrastraban impurezas que no permitían aislar por cristalización **35**. Se exploró como alternativa seguir adelante realizando la metátesis y cristalizando **8**. Aunque en este caso si se consiguió cristalizar el producto, no se observó enriquecimiento y, por lo tanto, se descartó esta opción.

En conclusión se sintetizó **8** a escala multigramo partiendo del 2,4-pentadien-1-ol (**31**) con un rendimiento global del 37% en 4 etapas sintéticas.

3.2.4. Resumen general de la síntesis del carbamato cíclico **8** a escala multigramo



3.3. Introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2 mediante aperturas regioselectivas de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos

De acuerdo a los objetivos planteados en el inicio del capítulo, nos propusimos explorar la apertura regioselectiva de epóxidos como vía para introducir 2-acetamidas en el esqueleto piperidínico de nuestro intermedio base (figura 2). El punto clave para llevar a cabo este procedimiento consistía en conseguir que la epoxidación procediera con buena diastereoselectividad. Inicialmente, se planteó que según el tamaño del grupo protector que se situara en el hidroxilo secundario se podría dirigir sensiblemente la diastereoselectividad de la reacción. Además, se consideró también la opción de trabajar sobre intermedios con ausencia de carbamato cíclico lo que daría lugar a un intermedio menos rígido y, probablemente, a un cambio tanto en la dirección de la epoxidación como en la regioselectividad de su apertura.

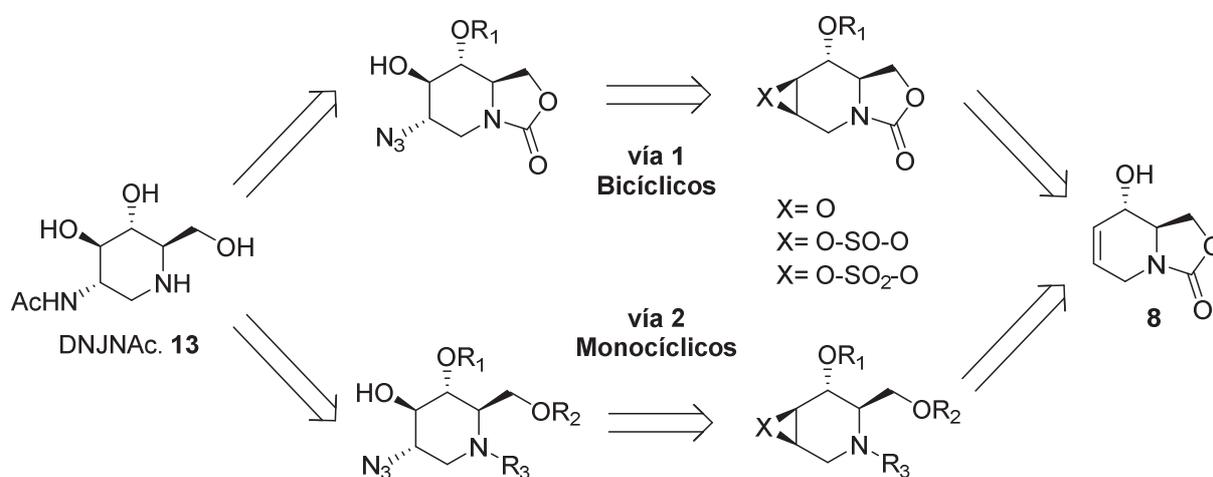


Figura 1. Esquema para la obtención de 13 vía apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos

Por otro lado, se propuso seguir el mismo planteamiento pero utilizando sulfitos y sulfatos cíclicos. Este tipo de funcionalidades son equivalentes a los epóxidos pero su obtención requiere mayor número de etapas ya que en primer lugar se requiere dihidroxilar la olefina y después formar el correspondiente sulfito/sulfato. Las consideraciones *a priori* fueron las mismas que para los epóxidos.

3.3.1. Epoxidaciones

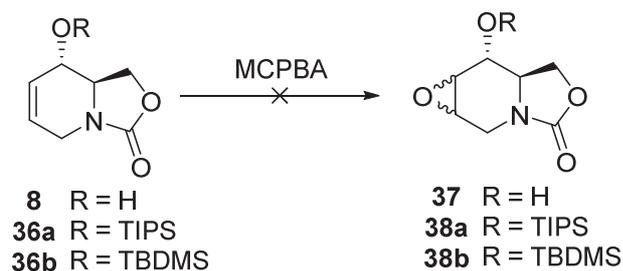
3.3.1.1. Antecedentes en el grupo de investigación¹

Las reacciones de epoxidación como vía para realizar reacciones de apertura y obtener nuevos inhibidores de glicosidasas piperidínicos habían sido previamente estudiadas en nuestro grupo de investigación.

¹ a) Rubén Martín Romo. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona 2003; b) Caterina Murruzzu. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona 2005

Las condiciones típicas de epoxidación, usando MCPBA como agente oxidante, sobre **8** no habían permitido epoxidar la olefina. Aunque se ensayaron otros oxidantes como ^tBu-OOH o H₂O₂ no se consiguió en ningún caso epoxidar la olefina inicial. Estos resultados fueron sorprendentes dado que la epoxidación de alcoholes alílicos es bien conocida y se ha aplicado satisfactoriamente en distintos sustratos. Además, la reacción ha sido descrita con anterioridad sobre el mismo sustrato^[25], pero en nuestras manos no fue posible reproducir estos resultados.

Como alternativa se habían ensayado reacciones de epoxidación con el hidroxilo secundario protegido en forma de silil éteres. De nuevo, aunque se ensayaron varias condiciones no se consiguió epoxidar los sustratos correspondientes.



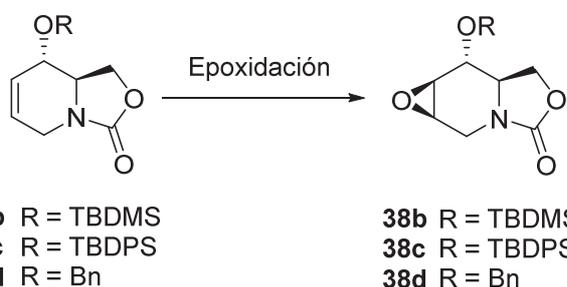
3.3.1.2. Epoxidaciones vía intermedios bicíclicos (vía 1)

En los últimos años se ha ampliado el rango de agentes oxidantes para realizar epoxidaciones y además se han aplicado satisfactoriamente en la síntesis de varios iminoazúcares. Así es de destacar el trabajo realizado por Bagal *et al.*^[26,27] que generan el perácido del ácido trifluoroacético mediante reacción de TFA con H₂O₂ o el de Singh *et al.*^[25] donde se genera *in situ* dimetildioxirano mediante reacción de acetona con oxone. También se han aplicado otros métodos de epoxidación basados en el uso de trifluoroacetona^[28,29], que se puede oxidar en presencia de oxone para genera dioxiranos con más capacidad oxidante.

Aunque en nuestro grupo de investigación no se había conseguido epoxidar estructuras bicíclicas, se planteó usar este tipo de agentes oxidantes como alternativas a los ya explorados. Además, se planteó variar el tamaño del grupo protector del hidroxilo secundario para dirigir la diastereoselectividad de la reacción.

Los resultados obtenidos (tabla 4) mostraron que la mayor parte de las metodologías comentadas permitían epoxidar la olefina con tiempos de reacción cortos e incluso con excelentes rendimientos en algunos casos. Lamentablemente, prácticamente no había diastereoselectividad y los diastereómeros no se pudieron separar en ningún caso por lo que se descartó esta vía de investigación.

Tabla 4. Exploración de epoxidación de estructuras bicíclicas



Entrada	Sustrato	R	Oxidante	Rdto / %	r. d.
1	36d	Bn	Acetone/oxone	44	1.4 : 1
2	36d	Bn	CF ₃ CO ₃ H / CF ₃ CO ₂ H	68	1.7 : 1
3	36b	TBDMS	Acetone/oxone	82	1.3 : 1
4	36c	TBDPS	Acetone/oxone	76	1.4 : 1

3.3.1.3. Epoxidaciones vía intermedios monocíclicos (vía 2)

Las distintas metodologías de epoxidación citadas en el apartado anterior se habían aplicado satisfactoriamente en estructuras similares a las resultantes de eliminar el carbamato cíclico de nuestro intermedio clave **8**. Incluso trabajando con grupos protectores como bencilos o acetatos, los resultados obtenidos en la mayoría de casos reflejaban buenos rendimientos y elevadas diastereoselectividades. Por ello, se planteó explorar las mismas metodologías con sustratos monocíclicos con la esperanza de conseguir resultados similares.^[26,28]

Se sintetizaron varios intermedios introduciendo grupos Boc o Cbz como protectores de la amina endocíclica y bencilos o TBS en el hidroxilo secundario. Además, se exploró también la epoxidación de compuestos monocíclicos con el hidroxilo secundario libre usando agentes oxidantes clásicos.

Los resultados obtenidos (tabla 5) mostraron sorprendentemente que las olefinas monocíclicas presentaban mayor reactividad al tratarse con MCPBA. Sin embargo, las reacciones eran extraordinariamente lentas y tras una semana de reacción se consiguieron rendimientos muy pobres. Cabe destacar que el sustrato **22**, cuyo hidroxilo secundario no estaba protegido, presentó una diastereoselectividad elevada mientras que en el caso de **23** no se observó selectividad alguna. Se ensayaron otros sustratos y varios tipos de oxidantes pero en todos los casos se obtuvieron resultados similares a los compuestos bicíclicos. A la luz de los resultados obtenidos, hubiera sido una buena alternativa realizar epoxidaciones sobre sustratos monocíclicos con el hidroxilo secundario desprotegido pero los intentos para sintetizar sustratos con esta característica resultaron infructuosos.

y conllevaban demasiadas etapas sintéticas por lo que se decidió explorar la ruta de los sulfitos y sulfatos cíclicos como alternativa a los epóxidos.

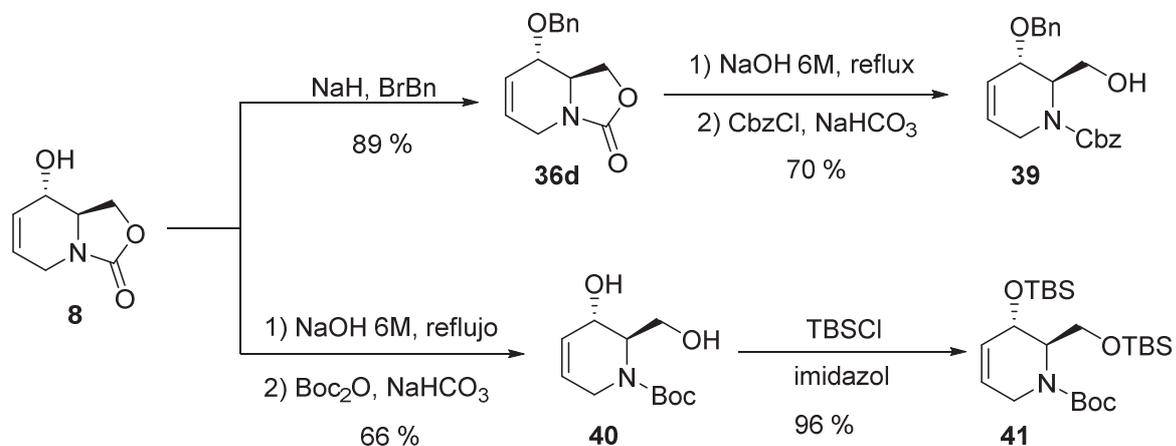
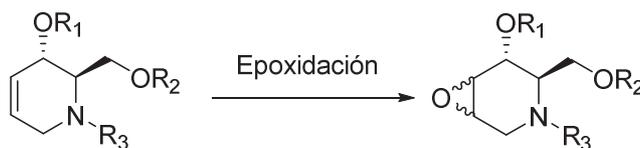


Tabla 5. Epoxidaciones de estructuras monocíclicas



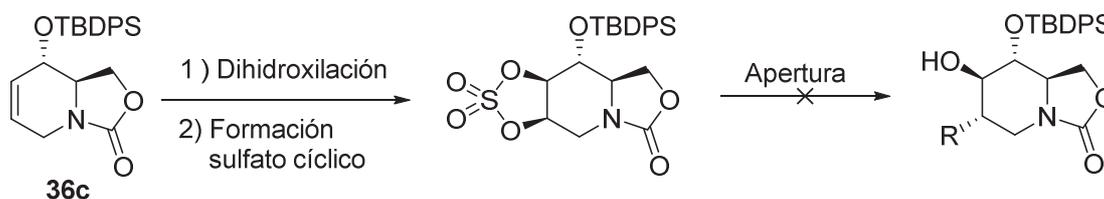
Entrada	Sustrato	R ₁	R ₂	R ₃	Oxidante	r. d. ^a	Rdto / %
1	40	H	H	Boc	MCPBA	10 : 1	18
2	41	TBS	TBS	Boc	MCPBA	1 : 1	36
3	41	TBS	TBS	Boc	CF ₃ COCH ₃ / oxone	-	-
4	41	TBS	TBS	Boc	Acetona/oxone	2 : 1	44
5	39	Bn	H	Cbz	CF ₃ CO ₃ H / CF ₃ CO ₂ H	1.6 : 1 ^b	58

Notas. a) r.d. determinada por ¹H-RMN.
b) r.d. determinado por HPLC-MS

3.3.2. Introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2 mediante aperturas regioselectivas de sulfitos y sulfatos cíclicos

3.3.2.1. Antecedentes en el grupo de investigación ²

En nuestro grupo de investigación se había explorado el uso de sulfatos cíclicos como alternativa a las epoxidaciones. En concreto, se habían sintetizado sulfatos cíclicos utilizando silil éteres como grupos protectores en el alcohol secundario. Lamentablemente, este tipo de sulfatos resulto ser inerte ante las reacciones de apertura con varios nucleófilos tales como azida, hidruros y benzoatos.



Así pues, nos planteamos retomar estos procedimientos como metodología para sintetizar DNJNAc (**13**) utilizando otros grupos protectores menos voluminosos en el alcohol secundario.

3.3.2.2. Síntesis y apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos vía intermedios bicíclicos (vía 1)

3.3.2.2.1. Síntesis de sulfitos y sulfatos cíclicos (vía 1)

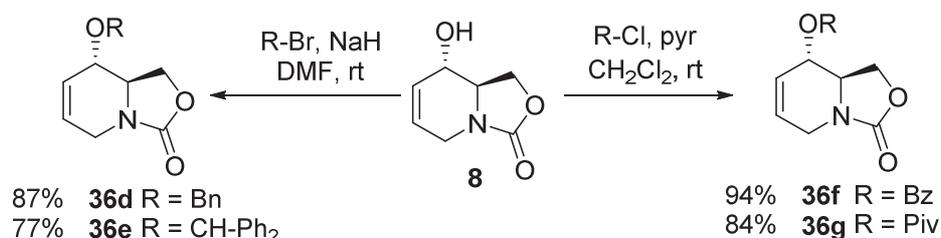
Ante los resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación, se planteó que la falta de reactividad de la apertura de los sulfatos podía deberse al elevado volumen de los grupos silil éteres presentes en el hidroxilo secundario. Por lo tanto, se decidió explorar la apertura de sustratos que incluyeran en su estructura grupos protectores de menor tamaño llegando a un compromiso para poder obtener buenas regioselectividades. Además, el tipo de grupos protectores utilizado debía permitir eliminarlos en etapas posteriores para recuperar los hidroxilos libres. Así pues, se eligieron éteres (bencilo y benzihidrido) y ésteres (pivaloato y benzoato).

Por otro lado, el uso de esta metodología permitía obtener tanto sulfitos como sulfatos cíclicos. En general, los sulfatos cíclicos presentan varias ventajas frente a los sulfitos^[30,31]: a) son muy reactivos frente a numerosos nucleófilos (más incluso que los correspondientes epóxidos); b) pueden activar el ataque nucleófilo en una posición y servir de grupo protector para la segunda posición; c) a menudo son más estables que los correspondientes sulfitos; d) las reacciones de sulfatos cíclicos no quirales puede dar lugar a dos estereocentros contiguos; e) su obtención a partir de sulfitos es una reacción sencilla que se lleva a cabo generalmente empleando RuCl_3 y NaIO_4 como oxidantes. Ambas funcionalidades son

² a) Rubén Martín Romo. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona 2003; b) Caterina Murruzzu. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona 2005

equivalentes sintéticos de los epóxidos y se pueden obtener fácilmente a partir de los mismos intermedios incrementando así las posibilidades de sustratos para explorar las reacciones de apertura.

Inicialmente, se sintetizaron los productos de protección del carbamato cíclico **8** utilizando los procedimientos clásicos y obteniendo los productos deseados con excelentes rendimientos en todos los casos.



La síntesis de sulfitos y sulfatos cíclicos requiere de la formación previa de los correspondientes dioles. Por ello se ensayaron las reacciones de dihidroxilación sobre **36d-g** (tabla 6). Inicialmente, se aplicaron las condiciones clásicas sobre **36d** utilizando OsO₄, o bien K₂OsO₄, con NMO como cooxidante y se obtuvieron los dioles deseados con buenos rendimientos y relaciones diastereoméricas. Aunque no fue posible aislar el diol mayoritario debido a la elevada polaridad de los productos formados, los análisis por NOESY confirmaron que éste se correspondía con una estereoquímica *mano*. Se postuló que la formación del sulfito permitiría separar el diastereómero mayoritario ya que los productos formados deberían ser más apolares facilitando su aislamiento. Para comprobarlo se derivatizó **42a** protegiendo el diol mediante reacción con DMP/PTSA y se pudo aislar el correspondiente acetal por cromatografía como un único diastereómero.

Aunque los resultados obtenidos eran satisfactorios, se planteó aplicar la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless ya que se ha descrito que sobre este sustrato permite obtener mejores resultados^[8]. Efectivamente su uso permitió obtener el diol deseado con rendimientos y d.r. excelentes (tabla 6, entrada 3).

A continuación se ensayaron las reacciones de dihidroxilación sobre el resto de sustratos. En el caso de **36e** los resultados obtenidos fueron similares a **36d** si bien en este caso sólo se observó la formación de un diastereómero por ¹H-RMN (tabla 6, entrada 4). En cambio, los productos **36f** y **36g** protegidos con ésteres no permitieron llevar a cabo la dihidroxilación (tabla 6, entradas 5 a 7). En ningún caso se apreció avance de la reacción independientemente de la metodología usada. Por ello, se descartó el uso de estos sustratos como vía para obtener los sulfitos cíclicos.

Tabla 6. Exploración de la reacción de dihidroxilación

Dihidroxilación

36e R = Bn
36f R = CHPh₂
36g R = Bz
36h R = Piv

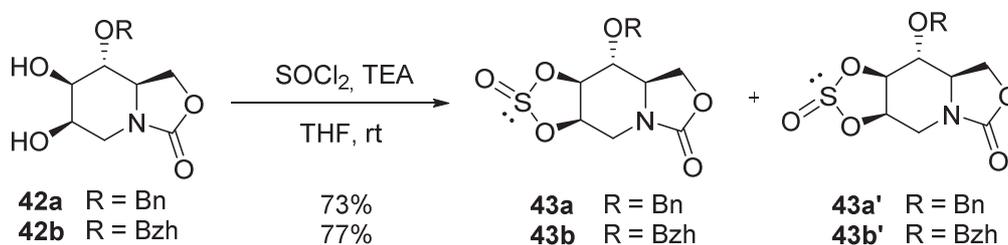
42a R = Bn
42b R = CHPh₂
42c R = Bz
42d R = Piv

Entrada	Sustrato	R	Condiciones	Rdto / %	r. d. ^a
1	36e	Bn	OsO ₄ , NMO	74	6 : 1
2	36e	Bn	K ₂ OsO ₄ , NMO	78	8 : 1
3	36e	Bn	AD-mix β ^b	94	18 : 1
4	36f	-CHPh ₂	AD-mix β ^b	86	>95 : 5
5	36g	Bz	K ₂ OsO ₄ , NMO	-	-
6	36g	Bz	AD-mix β ^b	-	-
7	36h	Piv	K ₂ OsO ₄ , NMO	-	-

Notas. a) r.d. determinada por ¹H-RMN.

b) Condiciones Dihidroxilación de Sharpless: (DHQD)₂Phal (1%), K₂OsO₄·2H₂O (0.4%), K₃[Fe(CN)₆] (3 eq), K₂CO₃ 3eq), CH₃SO₂NH₂ (1 eq), ^tBuOH:H₂O 1:1, t.a.

La siguiente etapa sintética consistía en la formación de los sulfitos y sulfatos cíclicos. Para la formación del sulfito se trataron los dioles **42a** y **42b** con SOCl₂/TEA obteniendo en ambos casos una mezcla de diastereómeros en relación 1:1, como consecuencia de la formación de un nuevo centro quiral en el átomo de azufre, con buenos rendimientos. En ambos casos se pudieron aislar estos diastereómeros fácilmente por cromatografía.



La formación de los sulfatos se puede realizar con la metodología típica que consiste en sintetizar previamente el sulfito y oxidarlo posteriormente con RuCl₃/NaIO₄. Sin embargo, también existen otras metodologías que permiten obtener sulfatos en un único paso sintético utilizando

$\text{SO}_2\text{Cl}_2/\text{TEA}^{[32]}$. En este caso, se ensayaron ambos procedimientos sobre el diol **42a** (tabla 7). Se observó que la metodología clásica permitía obtener el sulfato **44a** con mejores rendimientos que utilizando SO_2Cl_2 . Por ello, se aplicó esta metodología para sintetizar también el sulfato **44b**. En ambos casos, se obtuvieron los sulfatos deseados con buenos rendimientos y se aislaron en forma de un único diastereómero.

Tabla 7. Síntesis de sulfatos cíclicos

Entrada	Sustrato	R	Condiciones	Rdto / %
1	42a	Bn	1) SOCl_2 , TEA 2) $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$	80
2	42a	Bn	SO_2Cl_2 , TEA	58
3	42a	Bn	SO_2Cl_2 , DIPEA	32
4	42b	-CHPh ₂	1) SOCl_2 , TEA 2) $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$	86

3.3.2.2. Apertura de sulfitos cíclicos vía sustratos bicíclicos (vía 1)

Tras obtener los correspondientes sulfitos y sulfatos cíclicos se prosiguió con los intentos de apertura utilizando como nucleófilo NaN_3 . Debido al impedimento estérico que aporta la presencia del grupo protector en C4, se postuló que el ataque de la azida debería ser mayoritariamente en la posición C2. No obstante, también era posible el ataque en C3 (figura 2). El hecho de haber obtenido un único diastereómero utilizando la dihidroxilación de Sharpless permitió eliminar otros productos derivados del otro diastereómero facilitando el trabajo de identificación de los productos formados.

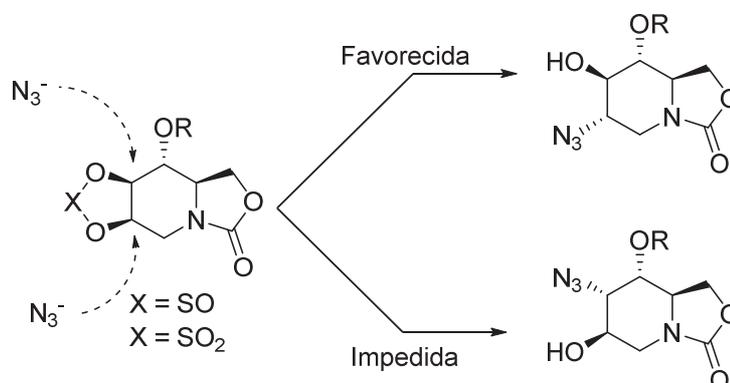
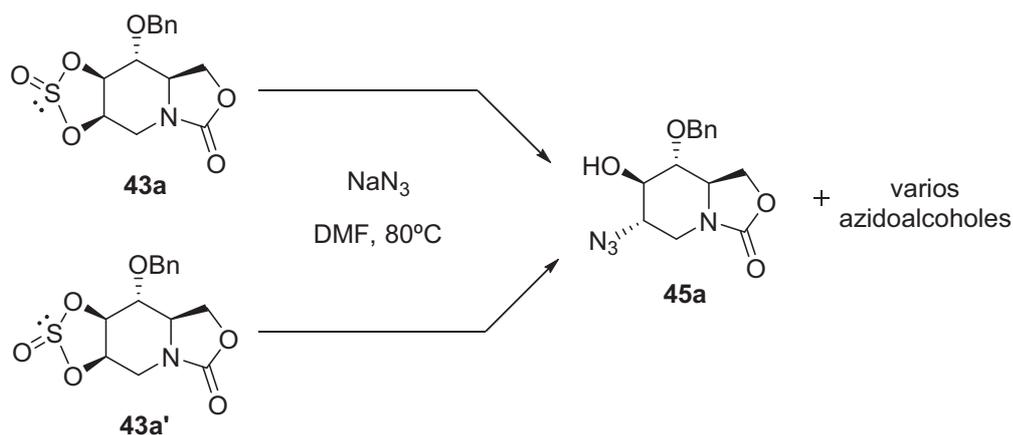
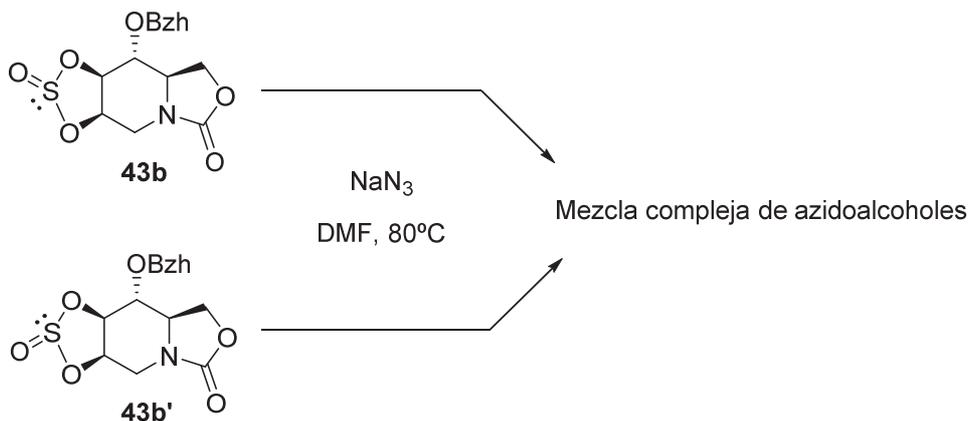


Figura 2. Hipótesis reacción de apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos

En primer lugar, se ensayó la reacción de apertura sobre los sulfitos **43a** y **43a'** por separado para comprobar que no había diferencias en cuanto a su reactividad. En ambos casos, la metodología usada fue calentando a 80°C en DMF, y el perfil tanto por capa fina como por ¹H-RMN del crudo de ambas reacciones fue el mismo. En ambos casos, se observó la formación de una mezcla compleja de azidoalcoholes y se consiguió identificar y aislar con un 25% de rendimiento el correspondiente a la configuración *gluco*.



A continuación se realizó el mismo procedimiento con los sulfitos **43b** y **43b'**. De nuevo la reactividad de ambos sulfitos fue la misma. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el caso anterior, se requirió de un tratamiento acuoso ácido para hidrolizar el grupo sulfito residual que se mantenía como un grupo protector. En cuanto a los resultados se obtuvieron mezclas complejas de azidoalcoholes donde no se consiguió identificar los productos formados. Se realizaron ensayos en otras condiciones utilizando mezclas de acetona: H_2O y distintas temperaturas sin éxito.

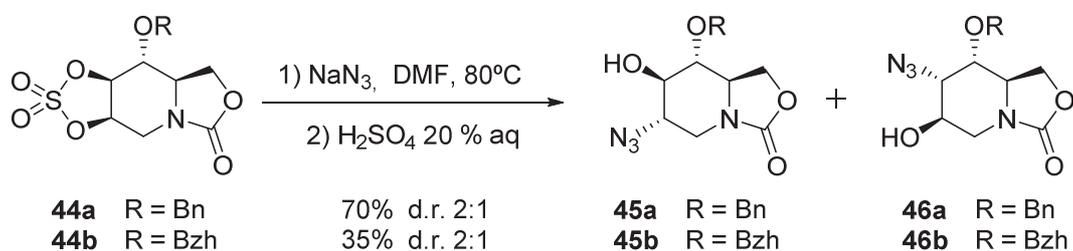


Ante los malos resultados obtenidos en la apertura de los sulfitos se desestimó esta ruta y se pusieron esperanzas en las reacciones de apertura de los sulfatos cíclicos.

3.3.2.2.3. Apertura de sulfatos cíclicos vía sustratos bicíclicos (vía 1)

La apertura de los sulfatos **44a** y **44b** se realizó inicialmente en las mismas condiciones utilizadas para los sulfitos. Las reacciones de apertura de sulfatos generan un hidroxilo protegido como sulfato, por lo que se requiere de un tratamiento ácido acuoso posterior para hidrolizarlo y dar lugar al hidroxilo libre.

Las reacciones de apertura de ambos sulfatos fueron más rápidas y limpias que los sulfitos. En ambos casos se apreció la formación de dos únicos regioisómeros fácilmente aislables por cromatografía. Estos productos se postularon como los diastereómeros *gluco* y *altro* respectivamente. En el caso de **44a** se obtuvo una mezcla 2:1 con un rendimiento del 70% mientras que para **44b** se obtuvo la misma relación pero con un rendimiento global de sólo el 35%. Ante los bajos rendimientos obtenidos en el segundo caso se centraron los esfuerzos en trabajar con el sulfato **44a** desde dos puntos de vista: mejorar la regioisomería de la reacción y verificar la estereoquímica de los productos formados.



3.3.2.2.3.1. Exploración de la regioselectividad de la apertura de **44a**

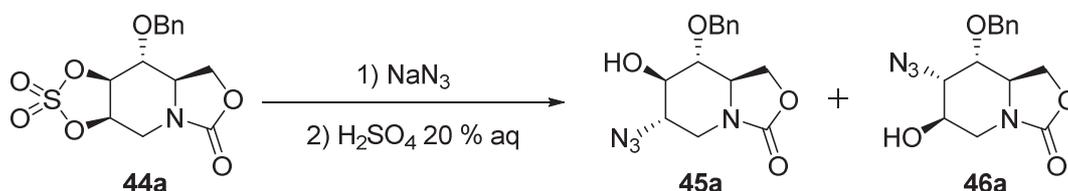
Las reacciones de apertura de sulfatos y sulfitos cíclicos se realizan generalmente en disolventes polares como acetona, DMF, acetonitrilo, agua, THF y mezclas de éstos. Generalmente las regioselectividades se pueden mejorar ligeramente en función del disolvente, la temperatura aplicadas y los equivalentes de nucleófilo utilizados^[33–36].

Así pues se realizó una primera exploración variando estos factores y se observó que la reacción no avanzaba en ACN independientemente de la temperatura, mientras que en DMF y mezclas de acetona:H₂O se obtenían resultados muy similares aunque para el segundo caso se requerían temperaturas menores. Se realizaron varios ensayos manteniendo una mezcla de acetona:H₂O como disolvente y variando temperatura, tiempos de reacción y equivalentes de NaN₃ observando que se requería un mínimo de temperatura (50°C) y que a tiempos de reacción menores, las relaciones regioisoméricas mejoraban pero se producía una disminución drástica del rendimiento ya que restaba mucho producto de partida por reaccionar. Así, utilizando 3 eq de NaN₃, a 50°C se conseguían conversiones completas obteniendo una mezcla 2:1 de regioisómeros y un rendimiento global del 70%.

Después de esta primera exploración se decidió escalar la reacción aplicando las mejores condiciones halladas y, sorprendentemente, no se obtuvo selectividad en la apertura y se obtuvo una mezcla 1:1 de regioisómeros. Ante este resultado, se realizó una segunda exploración (tabla 8) a una escala de aproximadamente 1g buscando recuperar la relación 2:1 anterior. Se realizaron pruebas con menos temperatura y equivalentes de azida sódica incrementando en consecuencia los tiempos de

reacción sin observar mejora en la regioselectividad. En cambio, simplemente utilizando menos equivalentes de azida y manteniendo el resto de condiciones se logró recuperar la regioselectividad observada anteriormente. También se exploraron condiciones con adición lenta de NaN₃, reacciones bifásicas o forzando las condiciones sin mejorar los resultados.

Tabla 8. Exploración de la apertura del sulfato **44a** a escala de 1g



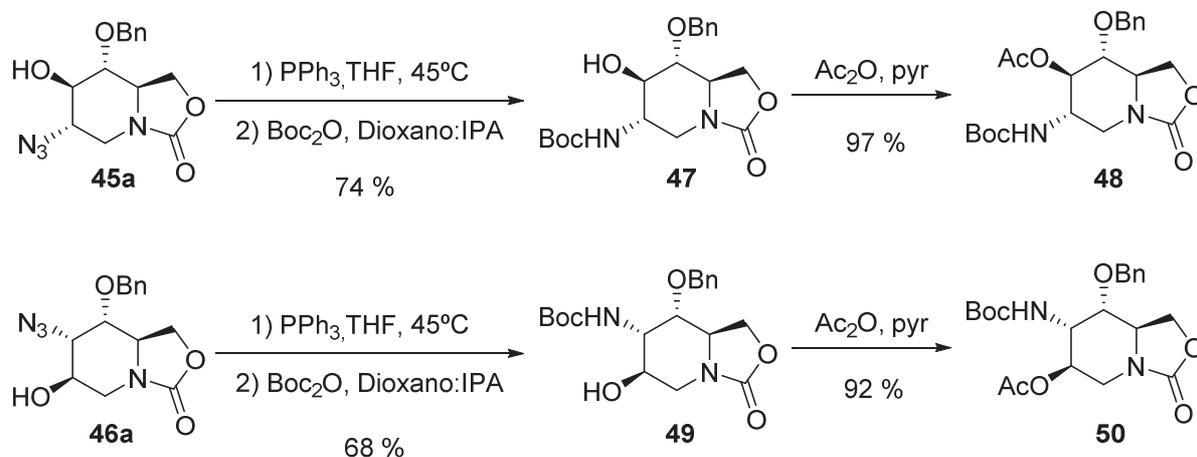
Entrada	Disolvente	T / °C	t / h	Eq. NaN ₃	Rdto / %	d.r.
1	Acetona/H ₂ O 2:1	50	3	3	68	1.1 : 1
2	Acetona/H ₂ O 2:1	40	14	2	86	1 : 1
3	Acetona/H ₂ O 2:1	40	15	1.2	81	1 : 1
4	Acetona/H ₂ O 2:1	50	5	2	71	1.1 : 1
5	Acetona/H ₂ O 2:1	50	6	2	62	1.8 : 1
6 ^a	Acetona/H ₂ O 2:1	50	6	3	43	3 : 1
7	DMF	120	1	4	30	0.9 : 1
8	MIBK:H ₂ O 20:1 *	100	4	4	88	1.5 : 1

Notas. a) Se añadió inicialmente 1 eq y 0,5 eq más cada 60 min hasta completar los 3 eq.

3.3.2.2.3.2. Determinación de la estereoquímica de los azidoalcoholes **45a** y **46a**

Previamente a seguir el camino sintético para llegar a los acetamido iminoazúcares, era necesario verificar la estereoquímica de los productos **45a** y **46a**. Para ello se planteó resolver la estructura mediante el empleo de experimentos de NOESY. El principal inconveniente para llevar a cabo este objetivo era que el desplazamiento de los protones de interés era muy similar con lo que no se podían diferenciar ni evaluar adecuadamente. Por ello, se decidió modificar los azidoalcoholes mediante derivatización de la azida y el hidroxilo secundario libre esperando una mejor resolución del espectro. Con este objetivo se realizó la reducción de la azida utilizando PPh₃ y se protegió la amina primaria formada con un grupo Boc. Por otro lado, el alcohol secundario se acetiló utilizando condiciones clásicas. Se sintetizaron los compuestos **48** y **50** cuyos espectros de ¹HRMN mostraban una resolución adecuada

de las señales del anillo piperidínico permitiendo así la realización del análisis mediante experimentos de NOESY de su estereoquímica.



El análisis del regioisómero mayoritario **48** permitió determinar claramente la obtención de una estereoquímica *gluco* (figura 3). En lo referente al análisis de **50**, se observaron NOE positivos entre los hidrógenos H3-H4 y H3-H2 (figura 3). En el primer caso, el resultado era coherente con la hipótesis inicial según la cual se debería obtener una estereoquímica *altro*. Sin embargo, el segundo NOE era más sorprendente. La formación de una estereoquímica *altro* implica que los sustituyentes en C2 y C3 se sitúan en posición axial de modo que los hidrógenos se sitúan en posición ecuatorial. Dichos hidrógenos están en caras opuestas pero su posición espacial es suficientemente próxima como para observarse un NOE positivo entre ellos. Para confirmar esta hipótesis se realizaron cálculos computacionales a nivel HF 6-31G* de la molécula **50** y se calcularon las distancias entre los protones de interés. Se observó que la distancia entre los hidrógenos H2-H3 era de 2.51 Å corroborando el NOE positivo observado.

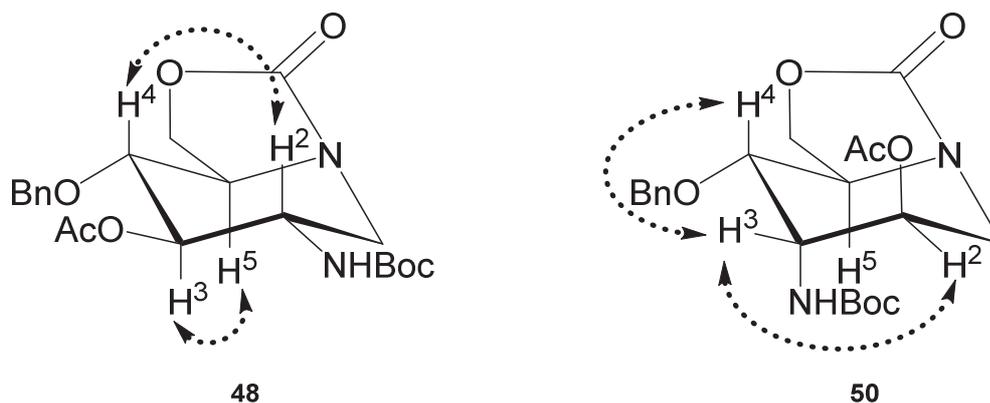
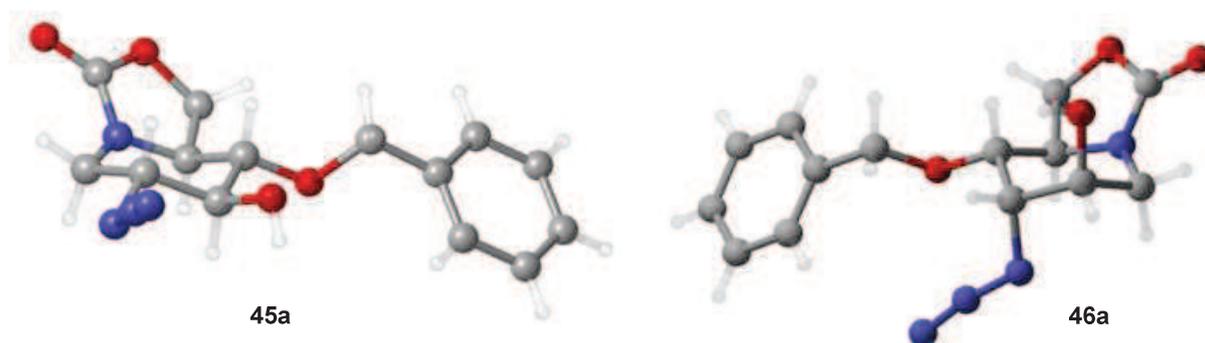


Figura 3. Análisis por NOESY de **48** y **50**

Además, la elevada cristalinidad de los azidoalcoholes **45a** y **46a** permitió también la obtención de una estructura de Rayos X de ambos compuestos que confirmó los resultados de los experimentos de NOESY (figura 4).

Figura 4. Estructura de Rayos X de **45a** y **46a**

3.3.2.3. Síntesis y apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos vía intermediarios monocíclicos (vía 2)

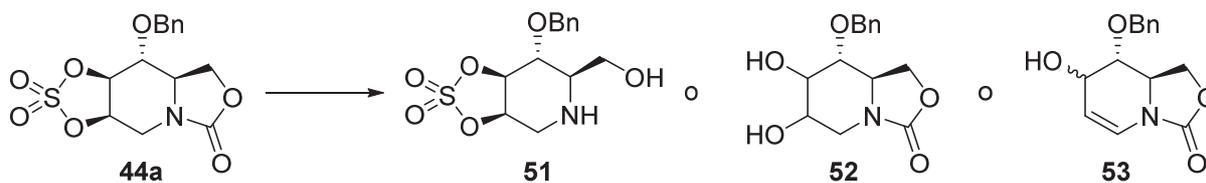
El trabajo realizado con las reacciones de apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos había permitido determinar que la apertura de los sulfatos era más fácil de realizar que los correspondientes sulfitos así como que las regioselectividades en la apertura eran muy moderadas. Por ello y, de forma paralela a lo realizado con las epoxidaciones, se planteó sintetizar compuestos sin el carbamato cíclico y explorar del mismo modo la apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos con la esperanza de mejorar la regioselectividad.

La exploración de esta vía requería de una elección apropiada de los grupos protectores a ubicar en el hidroxilo primario y la amina endocíclica. Por otro lado, la ruptura del anillo de 2-oxazolidona requiere de un tratamiento básico fuerte que limita el tipo de grupos protectores presentes en el resto de la molécula. Por ello, esta etapa se debía realizar en el inicio de las síntesis.

A continuación se presentaron las distintas metodologías ensayadas para obtener los sulfatos deseados.

3.3.2.3.1. Intentos de desprotección del anillo de 2-oxazolidona sobre el sulfato **44a**

Iniciamente, se planteó que la forma más rápida para obtener los sulfatos deseados era hidrolizar directamente el anillo de 2-oxazolidona de **44a**. La apertura de este tipo de funcionalidades se realiza generalmente mediante tratamientos básicos a reflujo durante varias horas^[37,38]. Se ensayaron estas condiciones pero lamentablemente con estas condiciones el sulfato se abría preferentemente con respecto al carbamato cíclico. Se realizaron pruebas utilizando Cs_2CO_3 y MeOH observando idénticos resultados. Las pruebas realizadas con disolventes apróticos como THF o dioxano prácticamente no mostraron avance aunque si se consiguió identificar la formación del alcohol alílico **53**. En cualquier caso, estas pruebas demostraron que el sulfato era mucho más reactivo que el carbamato cíclico y se descartó esta vía.

Tabla 9. Intentos de hidrólisis selectiva del carbamato cíclico **44a**

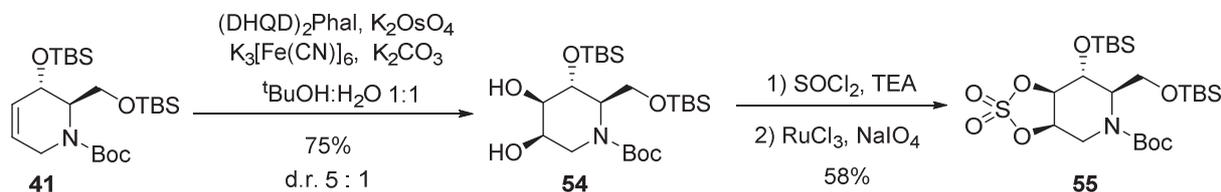
Entrada	Base	Disolvente	Resultados
1	NaOH 6M	MeOH : H ₂ O 9:1	52
2	Cs ₂ CO ₃	MeOH	52
3	Cs ₂ CO ₃	THF	53
8	Cs ₂ CO ₃	dioxano	53

Notas. Todas las reacciones se han realizado a reflujo 20h.

3.3.2.3.2. Síntesis y apertura de sulfatos *N*-Boc

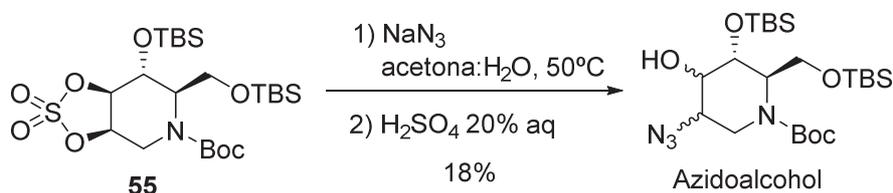
La imposibilidad de eliminar el anillo de 2-oxazolidona en presencia del sulfato cíclico obligó a plantear la hidrólisis inicial del carbamato cíclico e introducir posteriormente el sulfato cíclico. Inicialmente se planteó utilizar el sustrato **41** para comprobar si la reactividad de la olefina se mantenía y si se podía llegar a sintetizar el correspondiente sulfato. Además, cabe recordar que anteriormente se había observado que la apertura de compuestos con silil éteres en el hidroxilo secundario en C4 no era posible. Por lo tanto, aún a sabiendas que el tratamiento ácido para eliminar el sulfato desprotegería parcialmente los grupos protectores, se podría comprobar fácilmente si en compuestos monocíclicos la reactividad en la apertura era mayor.

De este modo, se realizó la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless sobre **41** y se observó que la diastereoselectividad de la reacción era mucho menor (5:1) que la observada en los compuestos bicíclicos (18:1). En cualquier caso, se consiguió aislar **54** como un único diastereómero con un 75% de rendimiento. A continuación se sintetizó el sulfato por tratamiento con SOCl₂/TEA seguido de oxidación con NaIO₄/RuCl₃ obteniendo el sulfato **55** con un 58% de rendimiento.



El siguiente paso consistió en la apertura del sulfato **55** por tratamiento con NaN₃ a 50°C. A diferencia de lo observado anteriormente en el grupo, el sulfato reaccionó por completo tras 18h de reacción. Lamentablemente, tras el tratamiento ácido para eliminar el grupo sulfato residual se desprotegeron parcialmente los grupos protectores. Sin embargo, se consiguió aislar un azidoalcohol

con un 18% de rendimiento. La poca cantidad de producto obtenida no permitió confirmar la estereoquímica del producto obtenido pero, en cualquier caso, se demostraba que era posible realizar esta metodología.



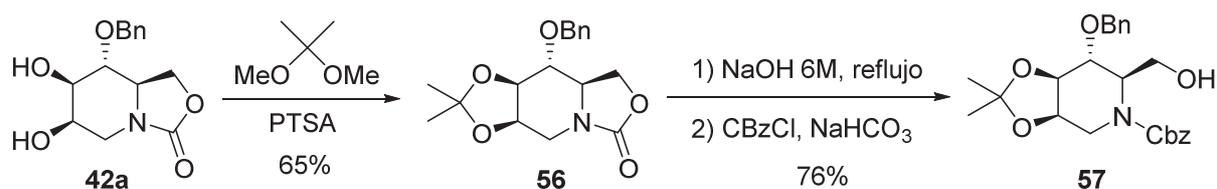
3.3.2.3.3. Síntesis y apertura de sulfitos y sulfatos N-Cbz

3.3.2.3.3.1. Aproximación A

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indicaban que la utilización de grupos como TBDMS o Boc no resultaba práctica puesto que se desprotegían parcialmente durante los tratamientos ácidos de desprotección del sulfato residual. Por esta razón, se planteó una nueva estrategia sintética utilizando un grupo Cbz en la amina endocíclica. En lo referente a los grupos protectores en el hidroxilo secundario, se decidió mantener el grupo bencilo para poder valorar únicamente el efecto de la presencia/ausencia de anillo de 2-oxazolidona en las regioselectividades.

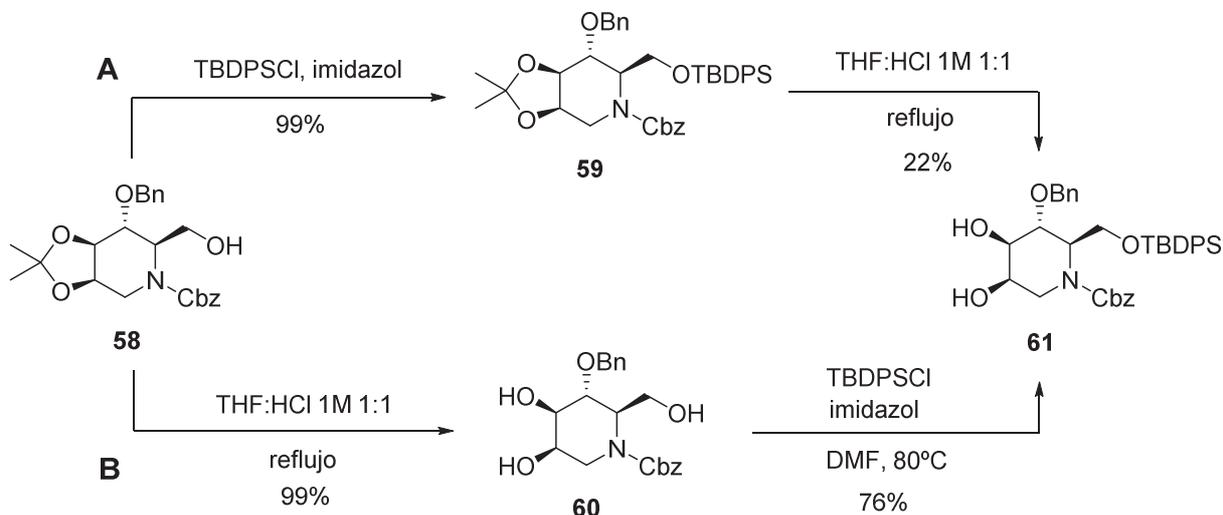
La dihidroxilación de la olefina **41** había resultado bastante distinta con respecto a **36d** y **36e**: tiempos de reacción más largos, menor rendimiento y menor diastereoselectividad. Por esta razón, se planteó partir del diol **17** (obtenido con anterioridad) y protegerlo para realizar la hidrólisis del anillo de 2-oxazolidona e introducir posteriormente el sulfito/sulfato. De este modo se aumenta el número de etapas sintéticas pero se mantienen buenos rendimientos y diastereoselectividades.

Se tomó el diol **42a** y se protegió por tratamiento con DMP/PTSA obteniendo el acetal **56**. Tras realizar la hidrólisis del carbamato cíclico y proteger selectivamente la amina endocíclica con un grupo Cbz se obtuvo **57** con buenos rendimientos.

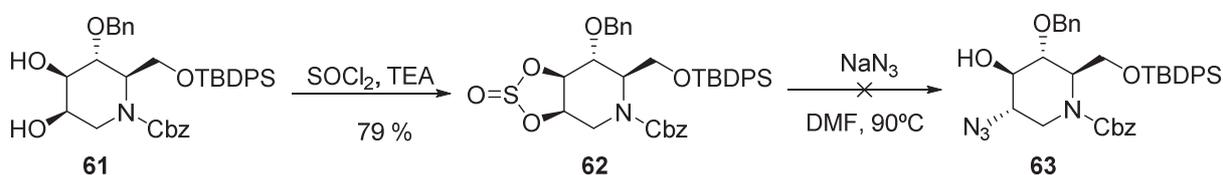


Llegados a este punto se plantearon dos posibles vías: a) protección del alcohol primario, desprotección del acetal y formación del sulfito; b) desprotección del acetal, protección del alcohol primario y formación del sulfito. Inicialmente, se ensayó la primera opción. Se decidió utilizar un grupo TBDPS cuya introducción fue fácil y cuantitativa dando lugar a **59**. Sin embargo, la desprotección selectiva del acetal **59** fue muy difícil de lograr. Aunque se probaron diversas condiciones variando el ácido y la temperatura sólo se logró aislar **61** con un rendimiento del 22%. En cambio, la segunda vía fue mucho más sencilla de realizar. La desprotección del acetal con un tratamiento ácido permitió obtener

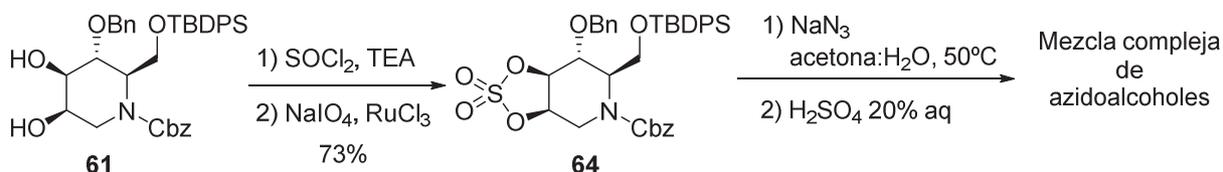
el diol **60** de modo cuantitativo y la protección del alcohol primario por tratamiento con TBDPSCI/imidazol prosiguió con una elevada selectividad obteniendo **61** con un 76% de rendimiento.



A continuación, se obtuvo el sulfito **62** por tratamiento con SOCl_2/TEA con un 79% de rendimiento. En este caso, no fue posible separar los dos diastereómeros formados y dado que en los casos anteriores no se había detectado diferencias en la reactividad, se trató la mezcla de sulfitos con NaN_3 a 50°C recuperando íntegramente el producto de partida. Aunque se forzaron las condiciones realizando pruebas en DMF a 90 y 130°C no se observó la formación de azidoalcoholes y se recuperó en ambos casos el producto de partida intacto.



El sulfato **64** se sintetizó de forma paralela o lo realizado en los otros casos y se aisló con un 73% de rendimiento como un único diastereómero. La apertura con NaN_3 de dicho sulfato seguido del tratamiento acuoso ácido permitió determinar la formación de una mezcla compleja de azidoalcoholes donde por HPLC-MS se identificaron productos con y sin presencia del TBDPS. Lamentablemente, ninguno de los productos se consiguió aislar y, por lo tanto, no se pudo determinar la regioselectividad de la reacción.



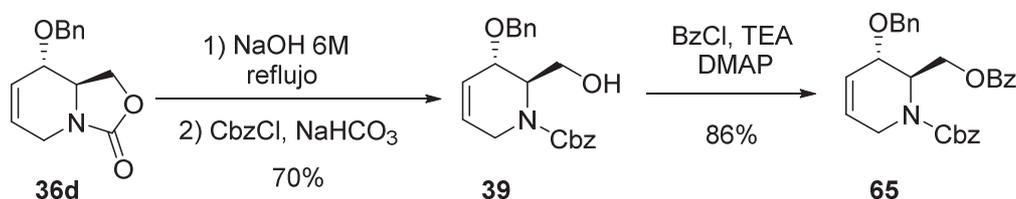
En conclusión, se observó que la apertura de sulfatos de compuestos abiertos era factible pero lamentablemente los rendimientos eran pobres y la desprotección parcial de grupos protectores no permitía cuantificar la regioselectividad de forma satisfactoria. Por esta razón se decidió repetir el

proceso pero variando el grupo protector en C6 y optando por trabajar con un OBz cuya desprotección se realiza en medio básico.

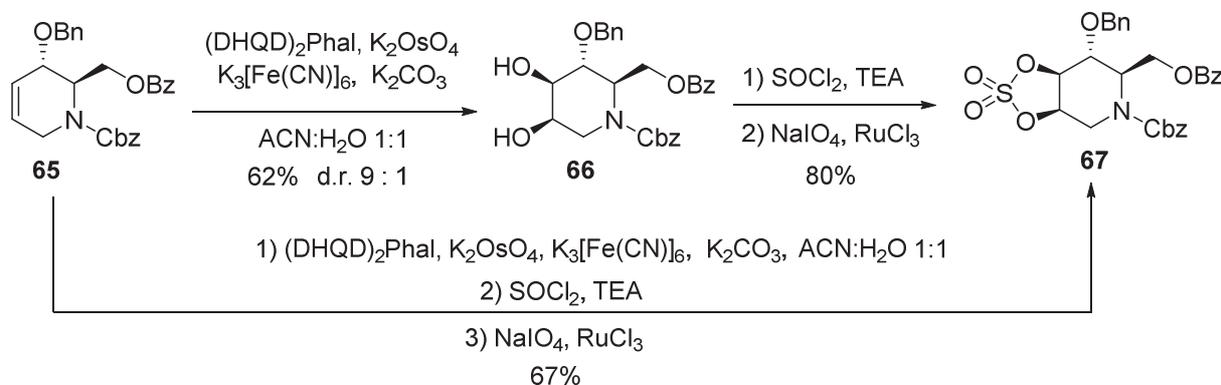
3.3.2.3.3.2. Aproximación B

La aproximación A se caracterizaba tanto por el grupo protector empleado en C6 como por partir del diol **42a** cuya estereoquímica era conocida. En esta segunda aproximación se planteó hidrolizar directamente el anillo de 2-oxazolidona y ensayar la reacción de dihidroxilación sobre un sustrato monocíclico.

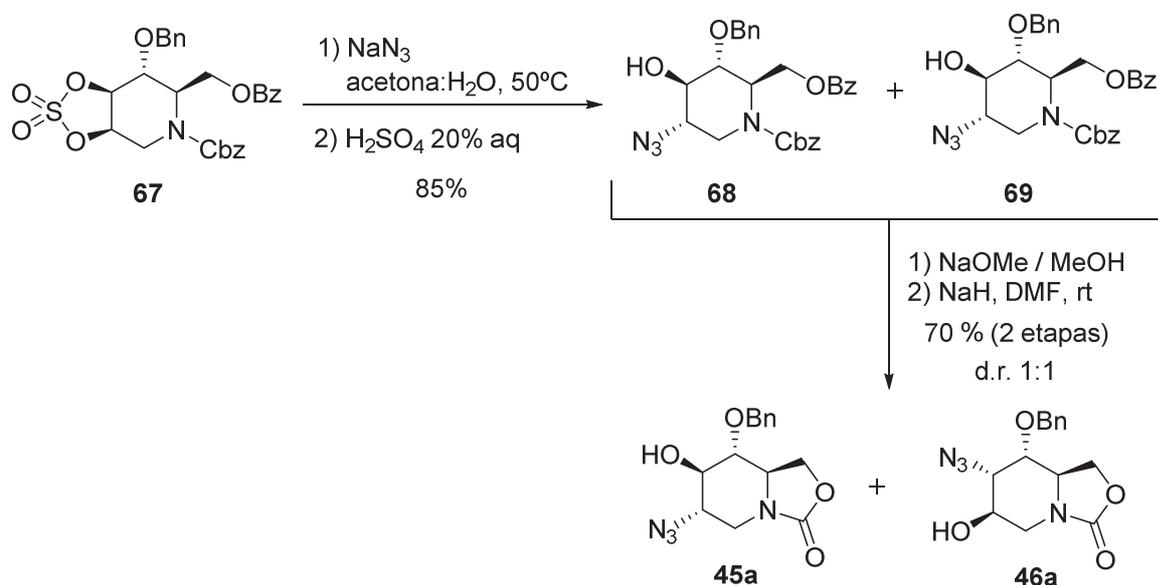
Así pues, se hidrolizó el anillo de 2-oxazolidona de **36d** por tratamiento con NaOH 6M a reflujo seguido de la protección selectiva *in situ* de la amina endocíclica con un grupo Cbz obteniendo **39** con un 70% de rendimiento. Luego, se protegió el alcohol primario como un OBz. Mientras que el tratamiento con BzCl/Pyr permitió aislar **65** con un 58% de rendimiento, utilizando BzCl/TEA/DMAP se consiguió mejorar el rendimiento hasta un 86%.



La etapa siguiente consistía en la dihidroxilación de la olefina **65**. Inicialmente se aplicaron las condiciones clásicas de dihidroxilación asimétrica de Sharpless empleadas anteriormente y se consiguió aislar el diol **66** con un 30% de rendimiento. La reacción no presentaba conversión completa y, por ello, se exploró realizar la reacción en mezclas de ACN:H₂O en vez de ^tBuOH:H₂O utilizando un 4% de catalizador y un 8% auxiliar quiral. Con estas condiciones se consiguieron conversiones completas y una relación diastereomérica de 9:1 consiguiendo aislar el diol **66** con un 62% de rendimiento como un único diastereómero. Lamentablemente, la observación de rotámeros no permitió confirmar por NOESY la estereoquímica de **66**. En lo referente al rendimiento obtenido, parecía que se producía una descomposición parcial del producto durante la purificación. Por ello, se decidió realizar la formación del sulfato cíclico directamente sobre el crudo de la reacción de dihidroxilación y así se consiguió aislar el sulfato **67** como un único diastereómero con un 67% de rendimiento global en 3 etapas.



Una vez obtenido el sulfato **67** se prosiguió con la reacción de apertura utilizando NaN_3 como nucleófilo. En este caso, la reacción procedió con conversión total y se obtuvo una mezcla de regioisómeros no separable por cromatografía. La observación de rotámetros en los experimentos de RMN no permitió determinar la relación. Tampoco mediante experimentos de RMN realizados a temperatura (ya que no se consiguió observar coalescencia de las señales) ni mediante HPLC. Ante este resultado se optó por aprovechar una reacción secundaria observada durante la síntesis de derivados de DNJNAc (apartado 3.4.3.2.1.). En esta reacción, el tratamiento de un producto con el hidroxilo en C6 libre con NaH genera de nuevo el anillo de 2-oxazolidona por ataque intramolecular de éste al carbamato presente en la amina endocíclica. Así, se trató la mezcla obtenida en la reacción de apertura con NaOMe/MeOH para desproteger el benzoato y, a continuación, se hizo reaccionar con NaH obteniendo una mezcla de los productos **45a** y **46a** anteriormente descritos. El análisis por $^1\text{HRMN}$ permitió determinar que se había obtenido una mezcla de regioisómeros en relación 1:1. Por lo tanto, en este caso, no se observó selectividad.

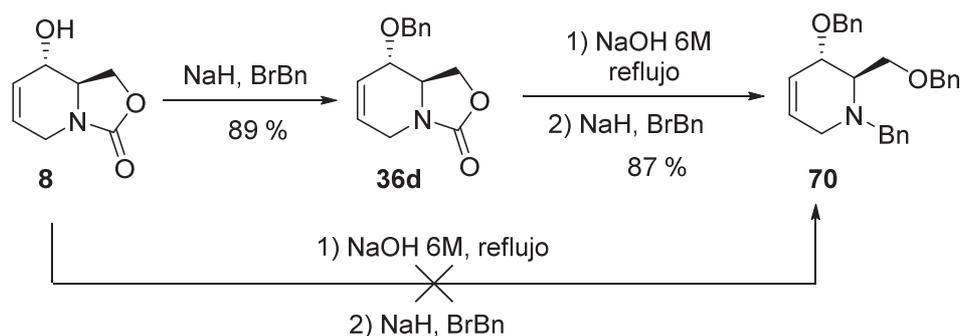


En definitiva, este resultado demostró, sin lugar a dudas, que la reacción de apertura de sulfatos mediante derivados monocíclicos (vía 2 de nuestro esquema inicial) manteniendo el mismo grupo protector en C4 y un carbamato en la amina endocíclica no presentaba selectividad en la reacción de apertura.

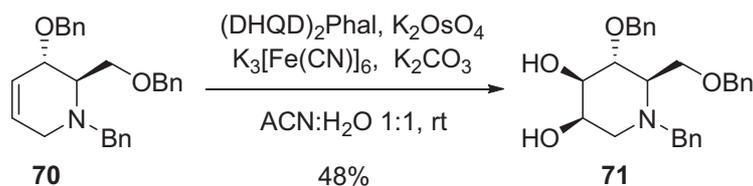
3.3.2.3.4. Síntesis y apertura de sulfitos y sulfatos N-Bn

Paralelamente a la exploración de la apertura de sulfitos y sulfatos monocíclicos se sintetizó un compuesto donde el carácter básico de la amina endocíclica se mantuviera para determinar si la presencia de una amina podía variar la regioselectividad de la reacción manteniendo el grupo O-bencilo en C4 constante.

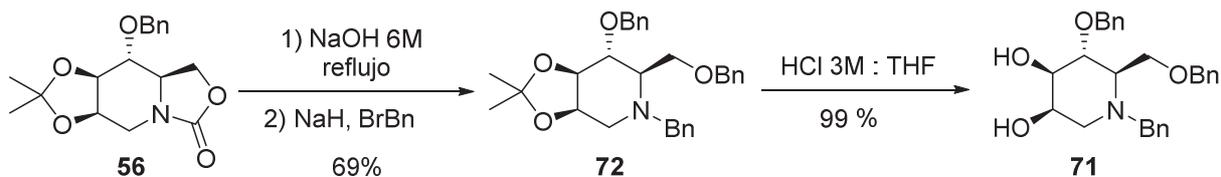
Se decidió proteger esta amina endocíclica como un *N*-bencilo ya que era sintéticamente más sencillo. Simplemente por hidrólisis del anillo de 2-oxalidona de **8** y protección posterior de los alcoholes y amina por tratamiento con BrBn/NaH se debería obtener **70**. Lamentablemente, el producto de hidrólisis de **8** resultó ser extraordinariamente polar y se mantenía en la fase acuosa al realizar el *work-up*. Como alternativa, se planteó sintetizar **36d** cuya hidrólisis genera un producto más apolar que se puede aislar por extracción para realizar una segunda etapa donde poder proteger los grupos funcionales en forma de bencilos. Así, se obtuvo **70** con un 87% de rendimiento.



A continuación, se realizó la dihidroxilación asimétrica de Sharpless con la olefina **70** pero utilizando las condiciones clásicas la reacción resultó ser extraordinariamente lenta. El producto de partida presentaba poca solubilidad en ^tBuOH por lo que se realizaron pruebas utilizando ACN. Además se realizó la reacción a temperatura ambiente y se aumentaron las cantidades de K₂OsO₄ al 4% y de auxiliar quiral al 8%. Con estas condiciones se consiguió una conversión total en tiempos de reacción de 6-8h obteniendo el diol **71** como un único diastereómero. Lamentablemente, el producto mostraba cierta tendencia a la descomposición durante su aislamiento. Aunque se probaron varias condiciones cromatográficas variando la fase estacionaria no se consiguió aislar con más de un 48% de rendimiento.

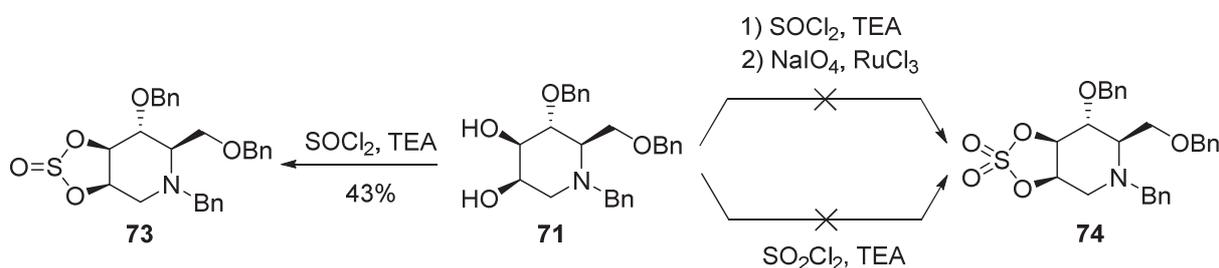


Por otro lado, la disposición de las señales de **71** no permitió comprobar por NOESY la configuración del diol. Para verificar que se trataba del diol deseado se decidió modificar el intermedio **56** cuya configuración estaba comprobada y se sintetizó **71** en tres etapas. Tras la hidrólisis del carbamato cíclico, protección con BrBn/NaH y desprotección del grupo acetal, el diol formado coincidió con el obtenido por la otra vía demostrando que la dihidroxilación procedía en el sentido esperado.



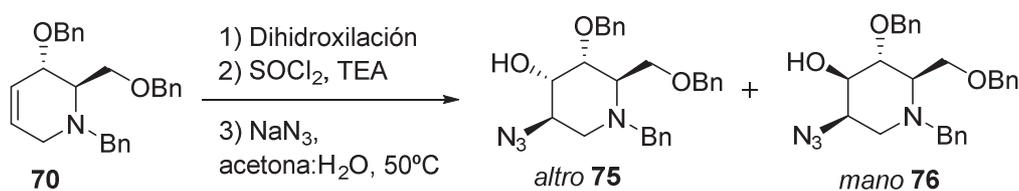
Para la preparación de los sulfitos y sulfatos cíclicos se utilizó la metodología habitual. Así la reacción de **71** con SOCl_2/TEA dio lugar a la formación del sulfito **73** como una mezcla de diastereómeros. Igual que se había observado en el caso del diol, el sulfito **73** también presentó tendencia a la descomposición durante su purificación y sólo se consiguió aislar con un rendimiento del 43%.

En lo referente a los sulfatos, las condiciones típicas de formación del sulfito y posterior oxidación no permitieron formar **74**. El análisis de los crudos obtenidos mostró que se producía oxidación parcial de las posiciones bencílicas dando lugar a mezclas compleja de donde no se consiguió aislar **74**. Como alternativa, se ensayó la formación del sulfato con $\text{SO}_2\text{Cl}_2/\text{TEA}$ pero tampoco se consiguió obtener el producto deseado. Por esta razón se descartó la formación del sulfato.



Una vez obtenido el sulfito **73** se exploró su apertura con NaN_3 (tabla 10). Debido a la tendencia a la descomposición de los intermedios **71** y **73**, se decidió evitar su purificación y trabajar directamente con los crudos partiendo de la olefina **70**. Así, se obtuvo una mezcla de los azidoalcoholes **75/76** en proporción 2:1 con un rendimiento global del 34% en 3 etapas. Los azidoalcoholes obtenidos se postularon inicialmente como los diastereómeros *gluco* y *altro* como se había observado en los casos anteriores. Sin embargo, sorprendentemente los estudios realizados para determinar la estereoquímica de esos dos azidoalcoholes reveló que se trataba de los compuestos con configuración *altro* (**75**) y *mano* (**76**).

A continuación se realizaron pruebas para intentar mejorar la regioselectividad de la reacción (tabla 10). Para verificar que las impurezas provenientes de las reacciones anteriores no afectan significativamente en los resultados de la reacción de apertura se tomó el sulfito **73** aislado y se realizó la reacción de apertura en las mismas condiciones obteniendo la misma mezcla y proporción de azidoalcoholes con un 71% de rendimiento global. Así, se comprobó que las impurezas arrastradas no afectaban significativamente y, además, se observó que se lograban rendimientos alrededor del 35% en tres etapas mientras que con el aislamiento de los intermedios los rendimientos globales bajaban hasta el 15%. Referente a la optimización de la regioselectividad, los resultados obtenidos mostraban que a menor temperatura y equivalentes de NaN_3 se mejoraba la relación obtenida llegando a obtener relaciones 3:1 y rendimientos del 47% en 3 etapas.

Tabla 10. Exploración de la apertura del sulfito **73**

Entrada	Eq NaN ₃	T / °C	Rdto / % ^a	r.r.
1	4	50	34	2 : 1
2	3	45	31	2,1 : 1
3	2	35	35	3 : 1
4 ^b	1.2	35	47	3 : 1

Notas. a) Rendimiento calculado en tres etapas partiendo de **66**

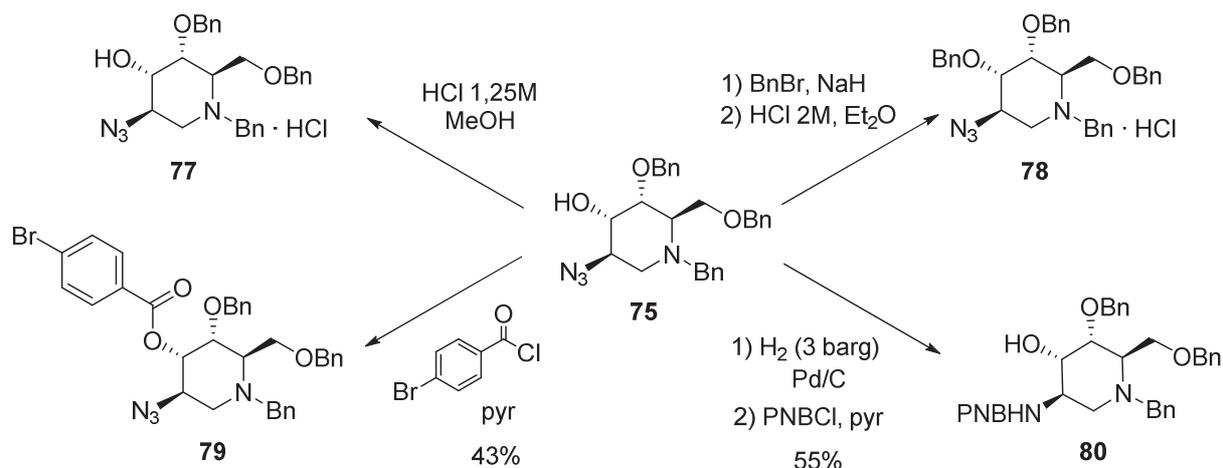
b) Reacción realizada con 1g de sustrato

c) Tiempo de reacción entre 18-24h

La verificación de la estereoquímica de los azidoalcoholes obtenidos se realizó mediante experimentos de RMN. En primer lugar, dichos análisis revelaron que en ambos sustratos la azida se situaba en la posición C2. Este resultado indicaba que el patrón de apertura del sulfito **73** no era igual que el observado para el sulfato **49a** o **67**. Lamentablemente, la disposición de las señales de ambos productos no permitía realizar su análisis por NOESY ni tampoco por constantes de acoplamiento ya que varias de las señales de interés se solapaban entre ellas. Ante este hecho se plantearon dos soluciones: a) síntesis de derivados para obtener una estructura de rayos X; b) síntesis de los acetamido iminoazúcares finales y comparación con los productos descritos en la literatura y los obtenidos en la presente tesis.

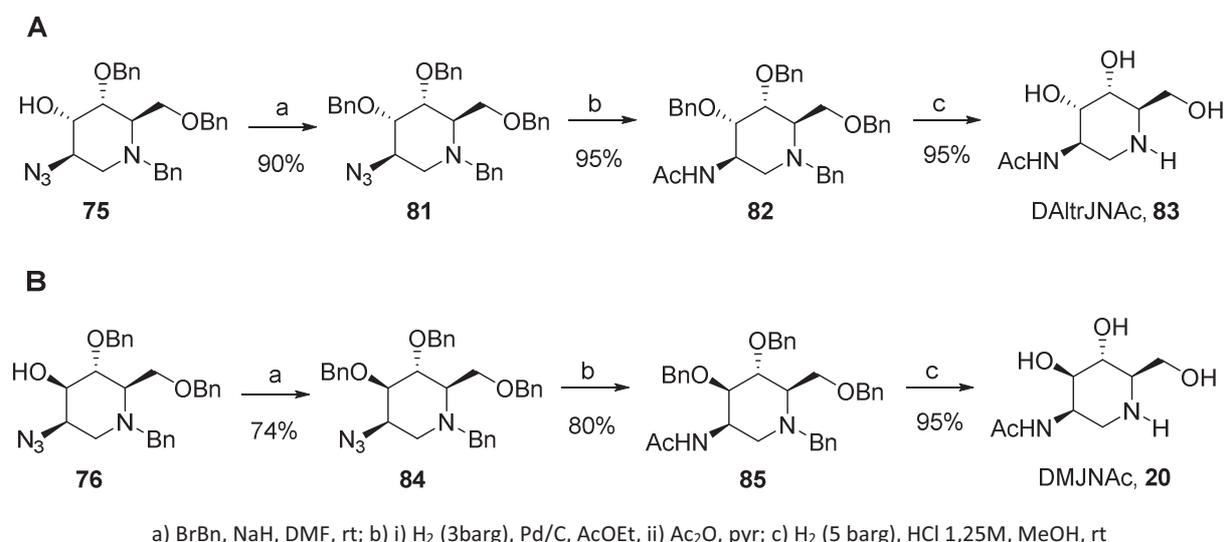
3.3.2.3.4.1. Síntesis de acetamido iminoazúcares derivados del sulfito **73**

Para determinar la estereoquímica de **75**, se intentó obtener una estructura de rayos X. En este caso, el compuesto resultó ser un aceite por lo que se intentó derivatizarlo buscando la obtención de un producto cristalino. Así, se sintetizaron los clorhidratos **76** y **77** que resultaron ser inestables. También se intentaron añadir grupos como *p*-nitrobenzoatos o *p*-bromobenzoatos en el hidroxilo secundario o sobre la amina para conseguir compuestos sólidos pero los productos obtenidos resultaron ser aceites en todos los casos. Así pues, no se consiguió obtener una estructura de rayos X para determinar la estereoquímica del azidoalcohol mayoritario.



Los azidoalcoholes obtenidos se caracterizaban por tener la mayor parte de sus grupos funcionales protegidos con grupos bencilos. Por ello, se planteó proteger del mismo modo el hidroxilo libre para poder transformar selectivamente la azida en acetamida y, finalmente, desproteger todos los grupos bencilos obteniendo los iminoazúcares finales.

La transformación del azidoalcohol minoritario **76** (ruta B) permitió identificar **20** como la DMJNAc (**20**), el análogo con configuración *mano*, por comparación con el descrito en la literatura.^[8] En cambio, el compuesto mayoritario **83** (ruta A) no coincidía con ninguno de los diastereómeros publicados ni con los que se han sintetizado en la presente tesis doctoral. Los análisis mediante NOESY y el análisis de las constantes de acoplamiento (figura 5) permitieron determinar que se trataba de una estereoquímica *altro*. Así, se observó un acoplamiento *eq-ax* entre H3-H4 ($J = 4.5$ Hz) y *eq-eq* entre H2-H3 ($J = 2.0$ Hz). Por lo tanto, se determinó que se había obtenido la 2-acetamido-1,2-didesoxialtronojirimicina (DAItrJNAc, **83**).



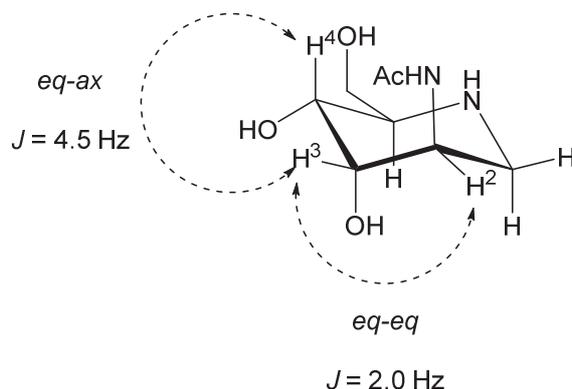


Figura 5. Análisis de las constantes de acoplamiento de los protones H2-H3-H4 en **83**

3.3.2.3.4.2. Justificación mecanística para la obtención de **83** y **20**

Los resultados obtenidos con la apertura del sulfito **73** fueron completamente inesperados. Los azidoalcoholes obtenidos mostraban la inserción de la azida en la posición C2 pero con retención de la configuración estereoquímica inicial. Para explicar este fenómeno se postuló que la amina endocíclica tiene un efecto anquimérico y es capaz de atacar al sulfito de forma intramolecular formando una sal de aziridinio intermedia. Esta sal de aziridinio es posteriormente atacada por el nucleófilo, en este caso azida, dando lugar a la misma configuración estereoquímica en C2 observada en ambos azidoalcoholes. Por lo tanto, se producen dos S_N2 consecutivas que implican un proceso de retención de configuración (figura 6).

Este tipo de efectos no son desconocidos.^[39,40] De hecho Cossy *et al.*^[41-43] han utilizado ampliamente estos efectos anquiméricos de aminas como metodología para expansión de anillos pirrolidínicos a piperidínicos y lo han aplicado en la obtención de algunos iminoazúcares como la swainsonina.^[44]

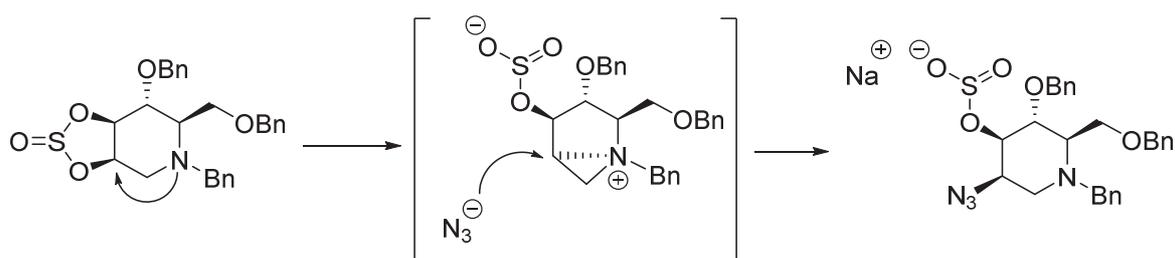


Figura 6. Retención de la configuración en C2 por efecto anquimérico de la amina endocíclica

En el alcohol secundario, el sulfito que queda como grupo protector tras la apertura se hidroliza en el enlace S-O dando lugar a **76** en un proceso en el que la configuración estereoquímica se mantiene constante (figura 7B). Sin embargo, el agua también puede actuar atacando en la posición C3 mediante una reacción S_N2 lo que provoca una inversión de la configuración. Este proceso alternativo genera el azidoalcohol mayoritario **75** (figura 7A).

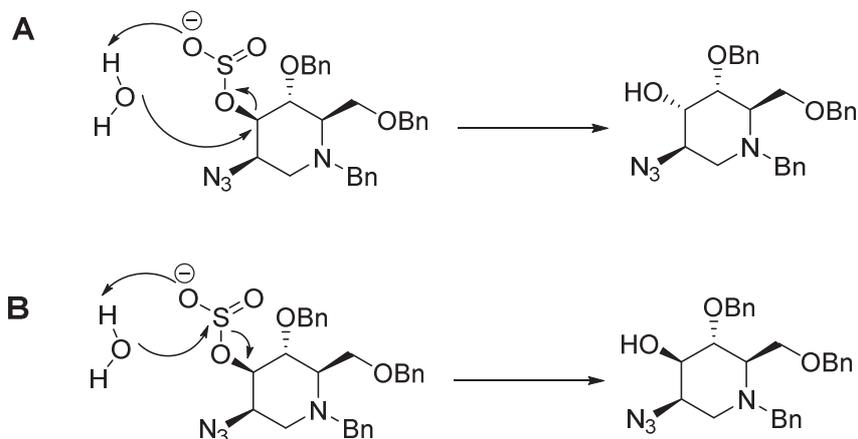


Figura 7. Hidrólisis del grupo sulfato: A) ataque nucleófilo del agua, inversión de la configuración; B) hidrólisis del enlace S-O, retención de la configuración

3.3.3. Resumen de la introducción selectiva de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2.

De entre las tres funcionalidades analizadas (epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos) como vía para obtener 2-acetamido iminoazúcares, únicamente los sulfatos cíclicos han permitido obtener azidoalcoholes con la configuración estereoquímica *gluco* deseada para obtener la DNJNAc (**13**). Dichos sustratos han mostrado una regioselectividad moderada en el caso de compuestos bicíclicos como **44a** o **44b** y ninguna selectividad en sustratos monocíclicos como **67**.

Las epoxidaciones se descartaron debido a: a) dificultad de epoxidación de las olefinas obtenidas; b) baja diastereoselectividad y rendimiento de la reacción; c) imposibilidad de aislar por separado los diastereómeros obtenidos. Por otro lado, los sulfitos bicíclicos resultaron dar lugar a mezclas complejas de azidoalcoholes mientras que en el caso de los intermedios monocíclicos resultaron ser inertes a las reacciones de apertura. Mención aparte merece el caso del *N*-Bn sulfito **73**. En este caso, el efecto anquimérico de la amina endocíclica permite la apertura de esta estructura debido a la formación de una sal de aziridinio intermedia. Sin embargo, ninguna de las configuraciones estereoquímicas resultantes es de interés para la obtención de nuevos inhibidores de glicosidasas ya que se ha observado que la variación en la quiralidad de la acetamida con respecto a DNJNAc provoca una pérdida total de la capacidad de inhibición.

Por lo tanto, se decidió tomar la apertura regioselectiva del sulfato **44a** como la mejor vía para la síntesis de nuevos 2-acetamido iminoazúcares con buenas perspectivas para actuar como inhibidores de glicosidasas.

3.4. Síntesis de acetamido iminoazúcares con estereoquímica gluco

Se han descrito las diferentes aproximaciones utilizadas para introducir un equivalente sintético del amoníaco en C2 de la estructura piperidínica de los iminoazúcares finales. Se han explorado las aperturas regioselectivas de sulfatos cíclicos con NaN_3 y, aunque en el mejor de los casos se han conseguido regioselectividades moderadas, los intermedios obtenidos presentan una gran valor sintético para obtener tanto 2-acetamido azúcares conocidos como para sintetizar nuevas moléculas que puedan ser evaluadas biológicamente.

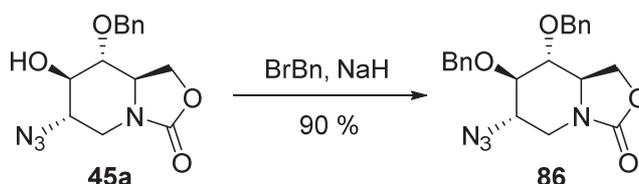
De acuerdo con esto, en el presente apartado se detallaran las metodologías utilizadas para obtener este tipo de compuestos.

3.4.1. Síntesis de acetamido iminoazúcares

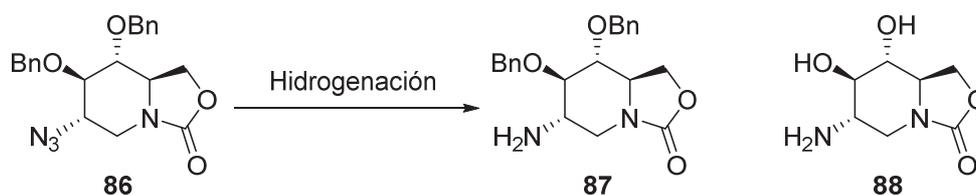
3.4.1.1. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNac, 13)

El primer objetivo debía ser obtener la DNJNac (**13**) partiendo del azidoalcohol **45a**. De este modo, se garantizaría que no se generan problemas de epimerización durante la síntesis y se podría utilizar el mismo intermedio para sintetizar otros derivados.

La síntesis de **13** se planteó realizando una protección del hidroxilo libre, seguido de formación de la acetamida, hidrólisis del carbamato cíclico y eliminación de los grupos protectores. Se decidió emplear como grupo protector un OBn para poder desproteger ambos grupos protectores conjuntamente en la etapa final. Así, se trató **45a** con BnBr/NaH obteniendo **86** con un 90% de rendimiento.

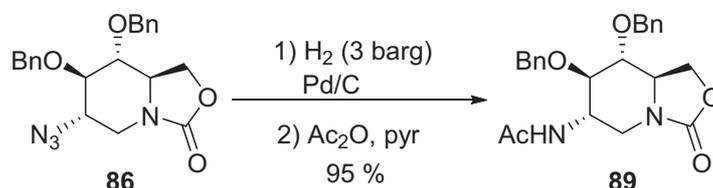


A continuación se introdujo la funcionalidad acetamida. Anteriormente, se había empleado PPh_3 como agente reductor para reducir la azida. En este caso se decidió emplear la hidrogenación ya que la reacción debería ser más limpia y cuantitativa. El inconveniente residía en una posible desprotección de los grupos protectores de los alcoholes. Por ello, se realizaron varias pruebas de hidrogenación sobre **86** (tabla 11) observando que la hidrogenólisis del grupo bencilo requería condiciones muy drásticas (55 barg, 60°) mientras que la azida se reducía selectivamente en el resto de condiciones de forma cuantitativa. Se observó también que la hidrogenólisis del bencilo era independiente de la fuente de paladio utilizada. Probablemente, la razón para justificar la dificultad en la desprotección del bencilo se halle en que la formación de una amina desactiva el catalizador.

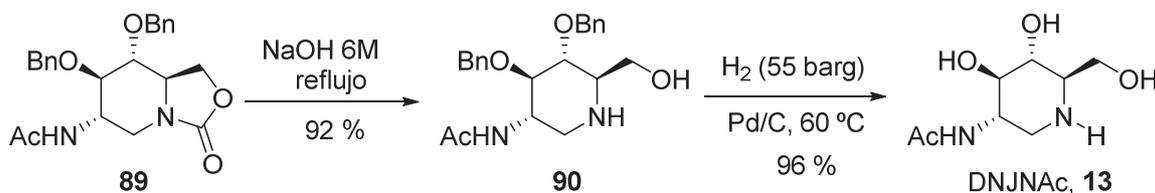
Tabla 11. Exploración de la hidrogenólisis de **86**

Entrada	P /barg	t / °C	Catalizador	Disolvente	Producto
1	3	rt	Pd / C	MeOH	87
2	25	rt	Pd / C	MeOH	87
3	55	rt	Pd / C	MeOH	87
4	55	rt	Pd(OH) ₂	MeOH	87
5	55	60	Pd / C	MeOH	88
6	55	60	Pd(OH) ₂	MeOH	88

En cualquier caso, se determinó que la reducción selectiva de la azida era fácil de realizar. De modo, que se aplicaron las condiciones más suaves para reducir **86** y se acetiló *in situ* la amina primaria obtenida dando lugar a **89** con rendimientos excelentes.

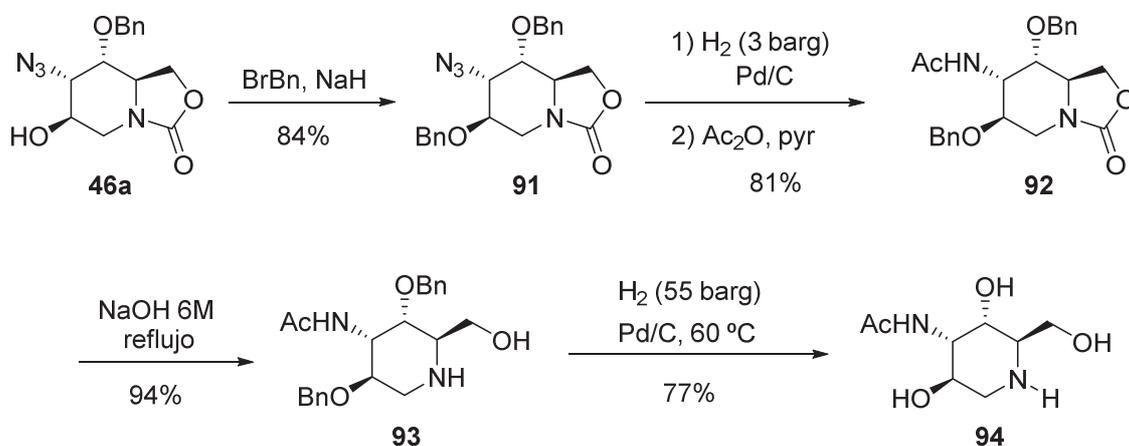


La siguiente etapa consistió en la hidrólisis del anillo de 2-oxazolidona mediante tratamiento con NaOH 6M a reflujo generando el aminoalcohol **90** con un 92% de rendimiento. Finalmente, la desprotección de los grupos bencilo se llevó a cabo por hidrogenólisis a 55barg y 60°C de temperatura obteniendo la DNJNac (**13**) con un 96% de rendimiento. Los datos espectroscópicos del compuesto obtenido coincidían con los descritos^[45-47].



3.4.1.2. Síntesis de 3-acetamido-1,3-didesoxialtronojirimicina (**94**) y análisis de su capacidad de inhibición frente a glicosidasas

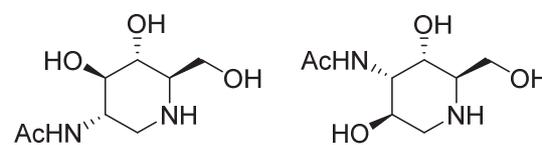
Una vez obtenido **13** se planteó que, aplicando el mismo procedimiento sintético sobre el regioisómero minoritario con configuración altro **46a**, se obtendría el 3-acetamido-1,3-didesoxialtronojirimicina (**94**) que podría actuar también como inhibidor de glicosidasas. En la literatura, únicamente se pueden hallar tres referencias sobre 3-acetamido derivados de nojirimicina y, en ninguno de ellos, los compuestos obtenidos se evaluaron como inhibidores de glicosidasas.^[48-50] Se trata de procedimientos sintéticos con un elevado número de etapas y rendimientos globales bajos. Por ello, se planteó que podría ser interesante utilizar el intermedio **46a** y evaluar sus propiedades como inhibidor de glicosidasas. Con esta perspectiva se aplicó la misma metodología y se obtuvo la 3-acetamido-1,3-didesoxialtronojirimicina (**94**) con buenos rendimientos globales.

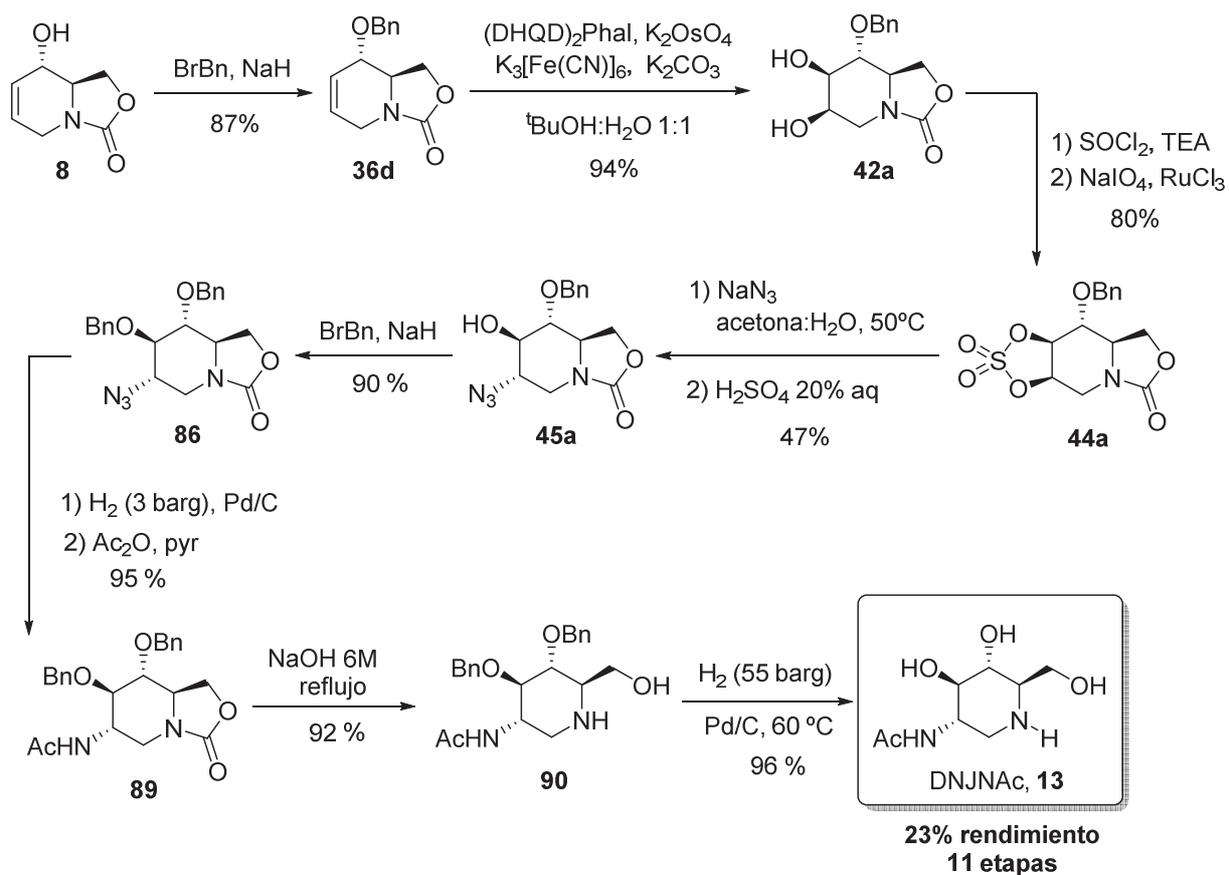


Una vez obtenido **94** se analizaron sus propiedades como inhibidor de glicosidasas³. Los valores obtenidos (tabla 12, anexo 3) mostraron que el compuesto presentaba una elevada selectividad frente a β -N-acetilglucosaminidasas pero, a diferencia de DNJNAc (**13**), con una potencia muy débil. Estos valores confirman la elevada selectividad que aporta la presencia de una acetamida hacia hexosaminidasas. Sin embargo, la baja potencia del sustrato provocó que se descartara la síntesis de derivados con esta configuración.

³ Estudios realizados en: a) Instituto de Investigaciones Científicas (IIQ), CSIC, Sevilla, España; b) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España

Tabla 12. Estudio comparativo de los valores de inhibición de DNJNAc y **94** frente a β -N-acetilglucosaminidasas

$K_i / \mu M$			
	Enzima	DNJNAc ^[46,51]	94
	β -N-Acetilglucosaminidasa (Human Placenta)	7,0	427
	β -N-Acetilglucosaminidasa (Bovine Kidney)	7,4	524
	β -N-Acetilglucosaminidasa (Jack Bean)	2,9	130

3.4.1.3. Resumen sintético de DNJNAc (**13**)

3.4.2. Síntesis de sustratos protegidos ortogonalmente para modificación selectiva de las funcionalidades amina

Uno de los objetivos de la presente tesis era obtener derivados DNJNac para su evaluación biológica como inhibidores de glicosidasas. El proyecto se realiza en colaboración con los grupos del Dr. García-Fernández (Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Sevilla) y Dra. Ortiz Mellet (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla) que poseen una amplia experiencia en la síntesis y evaluación biológica de la actividad como inhibidores de glicosidasas de varios tipos de iminoazúcares^[52-55]. Tras desarrollar una metodología que permitía obtener satisfactoriamente **13**, se planteó sintetizar un sustrato con protección ortogonal de las funcionalidades amina para modificarlas selectivamente y sintetizar nuevos sustratos que pudieran ser evaluados biológicamente. De este modo, se podría variar independientemente tanto la 2-acetamida como la amina endocíclica y realizar un estudio profundo estructura-actividad. Se planteó utilizar grupos protectores de tipo Boc, Cbz y Fmoc cuya desprotección selectiva entre ellos es plausible para llegar a obtener sustratos tipo como los presentados en la figura 8.

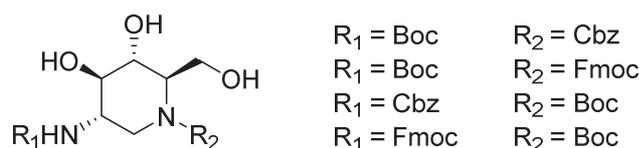
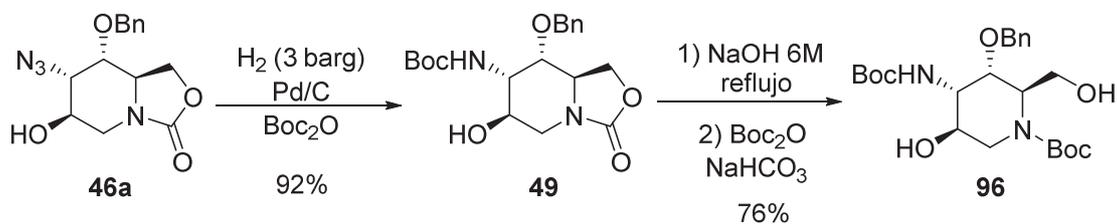


Figura 8. Sustratos protegidos ortogonalmente

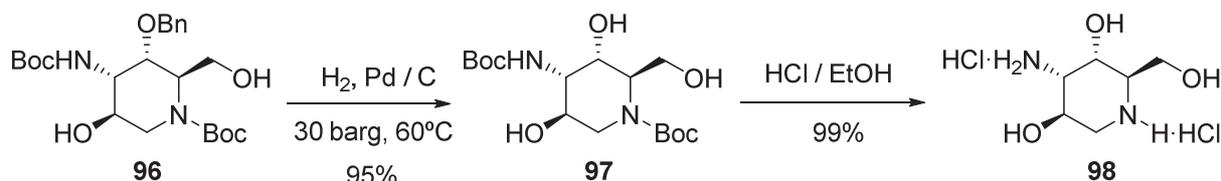
Debido a que la síntesis de los acetamido iminoazúcares había funcionado de forma satisfactoria con ambos regioisómeros se planteó utilizar el sustrato *altro* para optimizar los procesos de síntesis y, posteriormente, aplicarlo a los sustratos con configuración *gluco*.

Inicialmente, se planteó explorar la introducción de dos grupos Boc en ambas aminas. Esto no daba lugar al tipo de sustratos objetivo pero si permitía explorar la reactividad de los compuestos. La reducción selectiva de la azida ya se había realizado anteriormente, por lo que se planteó realizar el mismo procedimiento pero en presencia de Boc_2O ya que se ha observado que en estas condiciones la amina formada reacciona *in situ* dando lugar al *N*-Boc en una reacción *one-pot*. Con esta metodología se aisló **95** con 92% de rendimiento. A continuación, se hidrolizó el carbamato cíclico y se protegió la amina endocíclica por reacción con $\text{Boc}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$ dando lugar a **96** con un 76% de rendimiento.

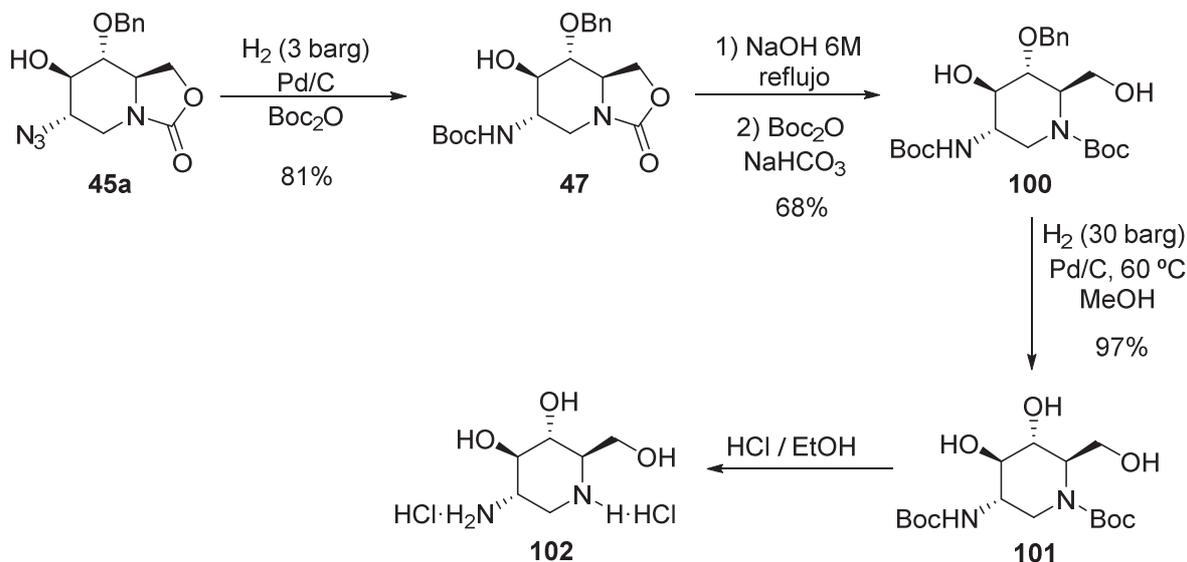


El último paso consistía en la desprotección del bencilo. En este caso, dado que no había aminas libres que pudiesen desactivar el catalizador, se ensayaron condiciones de hidrogenólisis a presiones

más bajas y se observó que trabajando a 30 barg y 60°C de temperatura se obtenía una conversión completa pudiendo aislar **97** con excelente rendimiento. La presencia de rotámeros no permitía obtener espectros limpios de **97**. Por ello, se trató con HCl/EtOH obteniendo el diclorhidrato **98**, producto que además se ha evaluado biológicamente mostrando una actividad inhibitora muy débil pero selectiva frente a β -N-Acetilglucosaminidasas (anexo 3).⁴



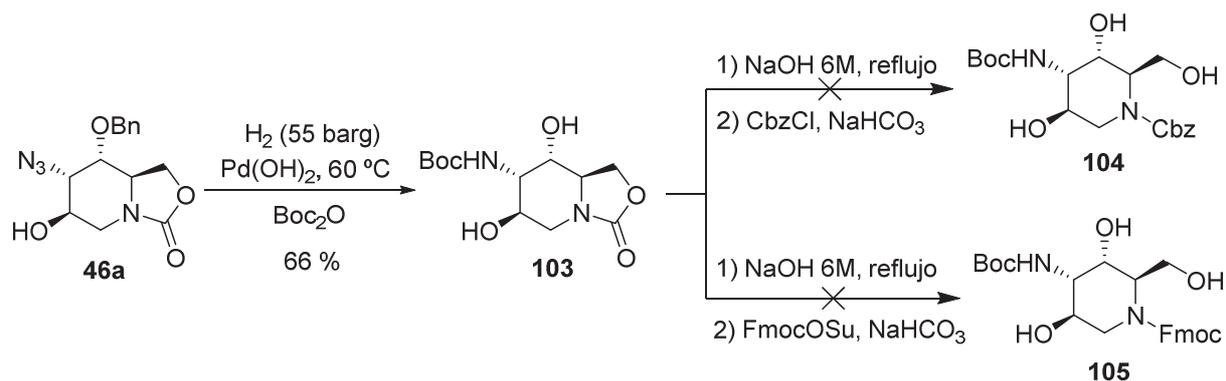
Una vez optimizado el proceso, se aplicó de forma paralela con el sustrato *gluco* obteniendo de forma satisfactoria el diclorhidrato **102**. Los valores de inhibición de este sustrato mostraron una actividad inhibitora débil, en el orden de la centena micromolar, pero selectiva frente a β -N-Acetilglucosaminidasas (anexo 3).



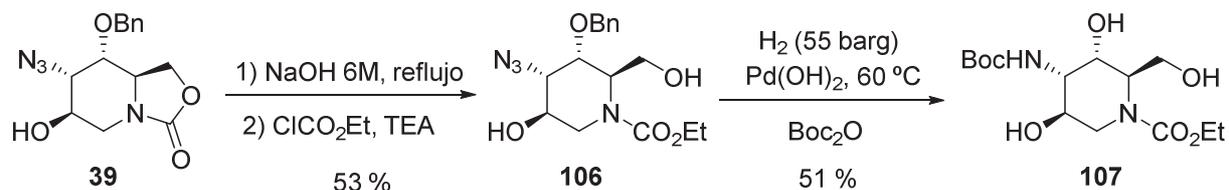
Estos resultados nos llevaron a mantener constante la introducción del grupo Boc en la amina en C2 e introducir el grupo diferencial en la amina endocíclica. Se escogieron como opciones un grupo Cbz o un Fmoc. Ambos grupos se podrían eliminar selectivamente por hidrogenación con respecto al Boc. Sin embargo, para poder obtener el producto final deseado se requería eliminar previamente el grupo bencilo antes de introducir el grupo Cbz o Fmoc, ya que en caso contrario se eliminarían ambos grupos en la etapa final. Para lograrlo, se hidrogenó **46a** con Pd/C en presencia de Boc₂O a alta presión y se obtuvo **103** con un 66% de rendimiento. A continuación, se realizó la hidrólisis del carbamato cíclico y se hizo reaccionar el aminoalcohol directamente con CbzCl/NaHCO₃, ya que su elevada polaridad no

⁴ Estudios realizados en: a) Instituto de Investigaciones Científicas (IIQ), CSIC, Sevilla, España; b) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España

permitía su aislamiento. Sorprendentemente, no se observó la formación del producto deseado. Se pensó que el CbzCl podía estar en mal estado. Tras destilarlo e intentar la reacción de nuevo tampoco se consiguió el producto deseado. Se realizaron pruebas utilizando FmocCl y FmocOSu pero el resultado fue el mismo. En ningún caso se consiguió introducir el segundo grupo protector. Estos resultados fueron bastante inesperados. Se planteó que probablemente la elevada polaridad de los aminoalcoholes limitaba su reactividad o bien que las impurezas arrastradas de la etapa de hidrólisis no permitían llevar a cabo la reacción.

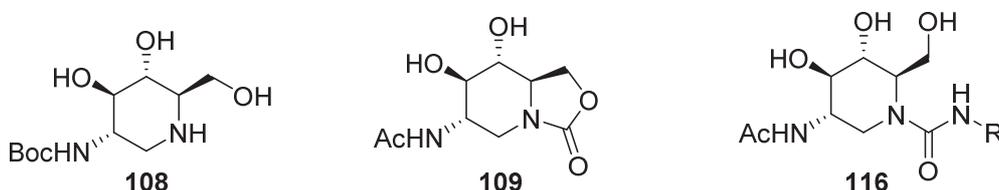


Como alternativa se pensó en volver a la ruta sintética aplicada con los grupos Boc y cambiar el segundo tipo de grupo protector por un carbamato etílico que se puede desproteger selectivamente del Boc por tratamiento en medio básico o con N_2H_2 . Se realizaron pruebas con el producto de hidrólisis de **46a** utilizando cloroformiato de etilo. Lamentablemente, aunque se ensayaron varias condiciones de temperatura, concentración y velocidades de adición, no se consiguió una protección selectiva de la amina endocíclica. El máximo rendimiento obtenido fue del 53% ya que el hidroxilo primario reaccionaba preferentemente y se obtenían mezclas complejas donde era complicado aislar **106**. Además, la etapa posterior de inserción del Boc y eliminación del bencilo procedía con bajos rendimientos y era poco reproducible. Por esta razón se desestimó la síntesis de sustratos con protección diferencial de las funcionalidades amino y se centraron los esfuerzos en sintetizar otros derivados con interés biológico.



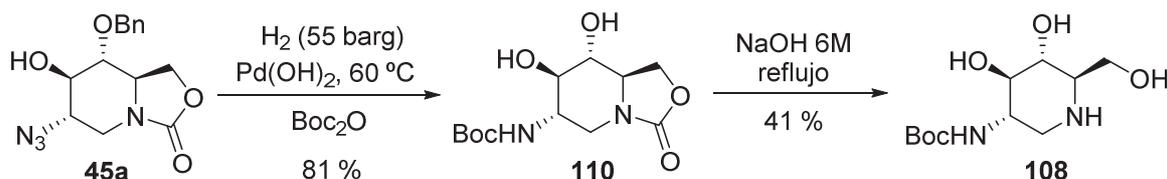
3.4.3. Síntesis de nuevos inhibidores de glicosidasas

La síntesis de derivados de DNJNAc se abordó desde dos vertientes. En primer lugar, se decidió aprovechar la ruta sintética de la DNJNAc para obtener fácilmente algunos compuestos que podían tener interés como inhibidores de glicosidasas como **108** a **109**. En segundo lugar, se propuso la síntesis de derivados donde se introdujera una funcionalidad urea en la amina endocíclica manteniendo un *N*-Acetilo en la amina en C2 (**116**). Es de destacar que únicamente se han publicado y evaluado *N*-alquil derivados de DNJNAc por lo que estos compuestos representaban una nueva variedad de sustratos. Además, este tipo de compuestos serían un buen punto de partida para sintetizar derivados 2-iminooxalínicos. Derivados de nojirimicina con este tipo de sustituyentes han demostrado tener actividades submicromolares frente a β -glucosidasas.^[56]

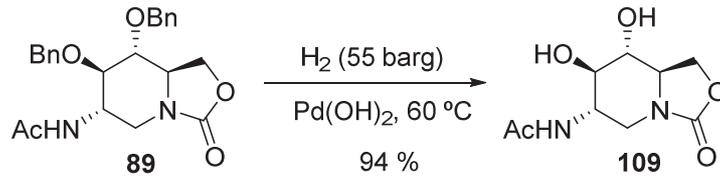


3.4.3.1. Síntesis de derivados no ureicos

La metodología desarrollada para la obtención de productos protegidos ortogonalmente se utilizó para sintetizar un análogo de DNJNAc donde el *N*-Acetilo fuera substituido por un *N*-Boc. Simplemente hidrogenando **45a** con Pd(OH)₂ en presencia de Boc₂O se obtuvo **110** con un 81% de rendimiento. A continuación, se hidrolizó el anillo de 2-oxazolidona y se consiguió aislar el *N*-Boc derivado **108** con un 41% de rendimiento. Los análisis de inhibición con este sustrato mostraron una pérdida de la actividad como inhibidor de glicosidasas (anexo 3). Por ello, se decidió mantener constante el *N*-Ac en el resto de sustratos sintetizados.

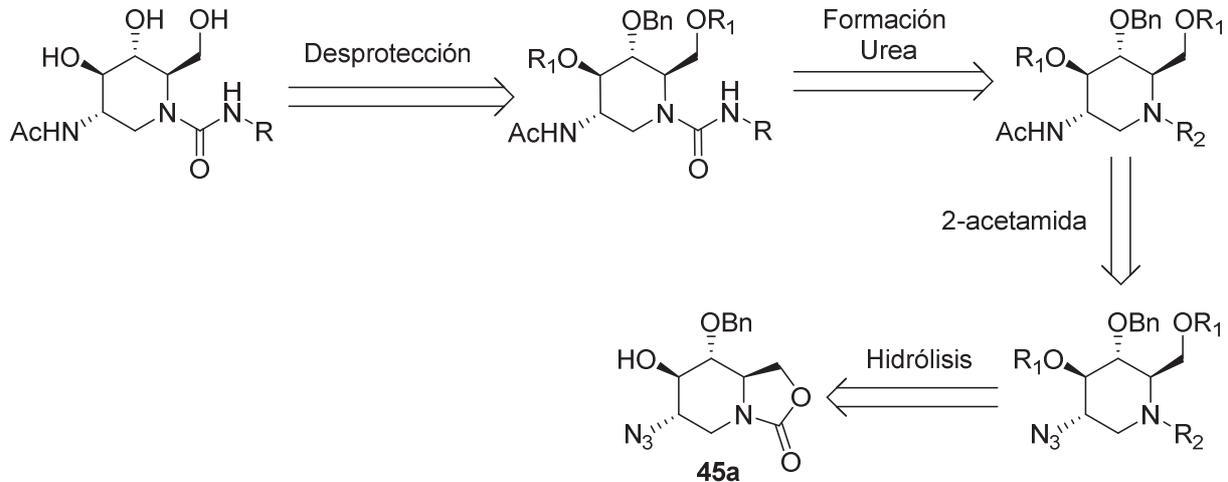


En la literatura se pueden hallar varios ejemplos de inhibidores de glicosidasas análogos a la nojirimicina que incluyen en su estructura un anillo de 2-oxazolidona^[57,58]. Por ello, se planteó que aprovechando la metodología desarrollada para obtener la DNJNAc, se podría obtener fácilmente un compuesto análogo que mantuviera el anillo. De hecho, la simple desprotección de los grupos protectores de **89** permitiría obtener dicho compuesto. Así, se hidrogenó **89** con Pd(OH)₂ a 60°C a 55 barg y se aisló **109** con un 94% de rendimiento. Lamentablemente, el compuesto **109** también mostró una pérdida de actividad notable (anexo 3) respecto a la DNJNAc. Por esta razón, se descartó sintetizar nuevos sustratos que mantuvieran el anillo de 2-oxazolidona.



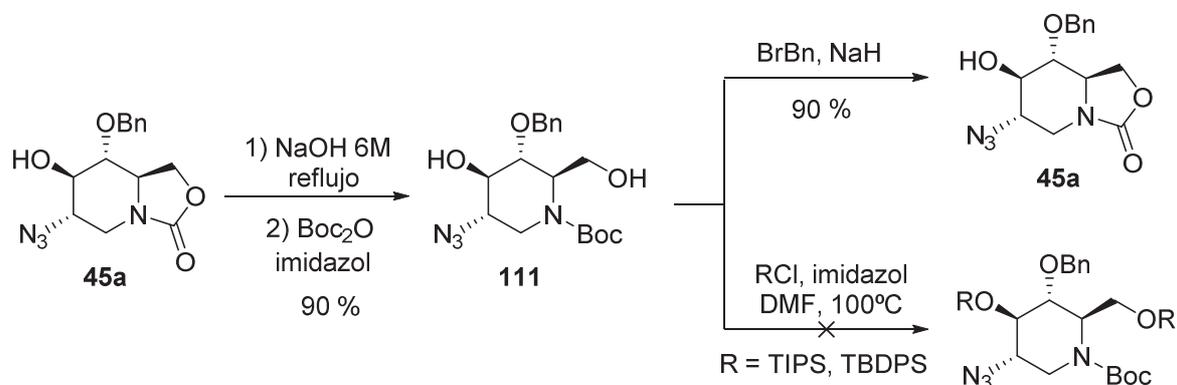
3.4.3.2. Síntesis de derivados ureicos

Para la obtención de derivados *N*-ureicos se planteó un esquema retrosintético donde se hidrolizará en primer lugar el anillo de 2-oxazolidona, ya que esta hidrólisis requiere condiciones muy drásticas y limita el tipo de grupos protectores a utilizar, y se protegiera la amina formada. A continuación, se protegen los hidroxilos libres y se introduce la 2-acetamida. La desprotección selectiva de la amina endocíclica permitirá la formación de las ureas utilizando isocianatos. Finalmente la desprotección de los grupos protectores dará lugar a los compuestos deseados. Obviamente, la elección de los grupos protectores no podía ser arbitraria ya que se requieren de varias desprotecciones selectivas. En concreto, es destacable que R_2 se debe desproteger fácilmente con respecto a los grupos protectores de los hidroxilos. Inicialmente, se decidió utilizar un grupo Boc como protector para la amina ya que se había observado que se podía introducir fácilmente. En lo referente a los grupos a situar en los hidroxilos se planteó utilizar bencilos, silil éteres o acetatos.

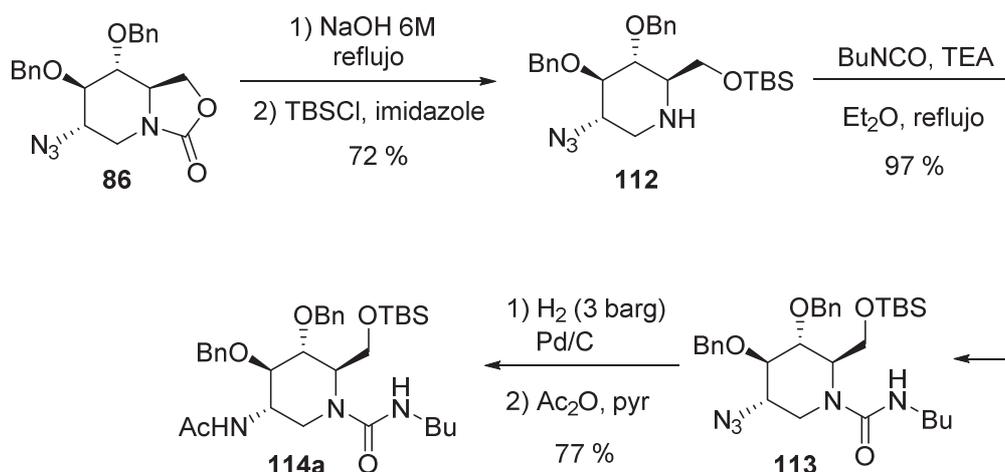


3.4.3.2.1. Aproximaciones a la síntesis de derivados ureicos usando bencilos y silil éteres como grupos protectores

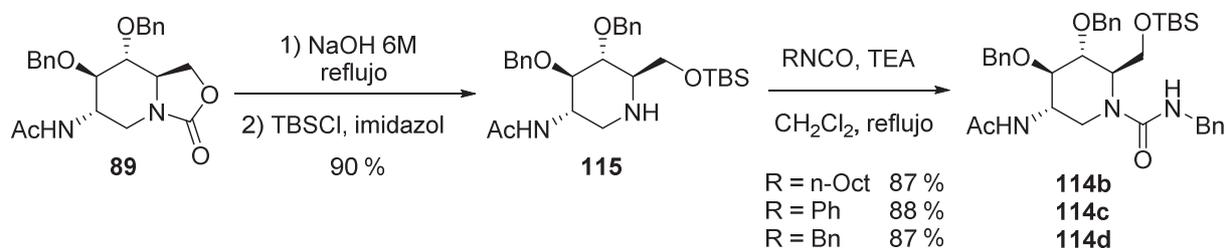
La primera etapa consistía en la hidrólisis del carbamato cíclico y protección de la amina endocíclica con un grupo Boc. Así, se obtuvo fácilmente **111** con un 90% de rendimiento. Luego se intentó proteger los hidroxilos libres haciéndolos reaccionar con BrBn/NaH pero sorprendentemente se recuperó el producto **45a**. Esto se debe a que el hidroxilo primario es capaz de reaccionar con el grupo Boc regenerando el carbamato cíclico. Ante este resultado se intentó proteger los hidroxilos con silil éteres resistentes a medios ácidos débiles. Lamentablemente, no se consiguió introducir en ningún caso este tipo de grupos. Aunque se forzaron las condiciones sólo se recuperó el producto de partida intacto. Probablemente, los grupos TBDPS o TIPS eran demasiado voluminosos para dicha protección.



Descartada esta vía, se planteó tomar **86** (que ya incluía los hidroxilos secundarios protegidos), hidrolizar el anillo de 2-oxazolidona y ensayar la protección *in situ* del aminoalcohol obtenido con TBSCl/imidazole. La protección selectiva de alcoholes respecto a aminas con grupos sililos es conocida ya que, en general, el enlace N-Si es muy lábil y aunque se formen se hidrolizan durante los *work-up* acuosos. Así pues, se trató **86** con NaOH 6M y a continuación se hizo reaccionar con TBSCl/imidazole obteniendo la amina **112** con un 72% de rendimiento. Este sustrato permitía introducir la funcionalidad urea deseada en la amina endocíclica simplemente por reacción con un isocianato en presencia de base ya que el resto de funcionalidades se hallan protegidas. De modo que se hizo reaccionar con butil isocianato utilizando TEA como base y se aisló la urea butílica **113** con rendimiento excelente. A continuación, se introdujo la acetamida mediante reducción de la azida con H₂ seguido de acetilación *in situ* con Ac₂O/pyr obteniendo **114** con un 77% de rendimiento. De este modo, se disponía de una metodología para introducir tanto la acetamida como las ureas deseadas en el esqueleto del iminoazúcar dejando como última etapa la desprotección de los grupos protectores de los hidroxilos.



Paralelamente, se desarrolló un procedimiento similar en el que se pudiera introducir la acetamida en primer lugar y a continuación hidrolizar el anillo de 2-oxazolidona y sintetizar la urea. Dado que se requería realizar varios derivados variando el tipo de urea, se podría trabajar hasta las últimas etapas sintéticas con el mismo intermedio facilitando el trabajo a realizar. Al mismo tiempo, también se podría determinar cuál de las dos rutas permitía obtener mejores rendimientos globales. Así pues, se hidrolizó el carbamato cíclico **89** seguido de protección del alcohol primario con TBSCl/imidazol obteniendo la amina **115** con un 90% de rendimiento. A continuación, se introdujeron el resto de ureas deseadas por reacción con los correspondientes isocianatos obteniendo **114b-d** con excelentes rendimientos. De este modo, se observó que esta segunda ruta permitía obtener mejores resultados que la anterior llegando exactamente a los mismos sustratos.



La última etapa para obtener los 2-acetamido iminoazúcares finales consistía en la desprotección de los grupos protectores de los hidroxilos. Las distintas metodologías ensayadas se presentan en la tabla 13. Inicialmente, se planteó utilizar BCl_3 como reactivo para eliminar los distintos grupos protectores. El BCl_3 se ha aplicado ampliamente como una alternativa a la hidrogenólisis para la desprotección de grupos bencilos.^[59,60] Su aplicación genera HCl como subproducto (figura 9). Por ello, se planteó que aplicándolo sobre nuestros sustratos se conseguiría en una única etapa sintética desproteger tanto los bencilos como el TBS. Dicha metodología se aplicó sobre el sustrato **114a** observándose la desprotección de todos los grupos protectores. Sin embargo se formaron varios subproductos de entre los que se identificaron **116a** y productos de ciclación intramolecular. El aislamiento de **116a** resultó ser extraordinariamente difícil debido a la elevada polaridad del producto y las impurezas por lo que se intentó realizar la purificación en fase reversa aunque sin resultados

satisfactorios. Ante los resultados obtenidos se planteó utilizar la misma metódica sobre **114d** para determinar si con una urea aromática se minimizaban las reacciones de ciclación secundarias. Lamentablemente, en este caso también se obtuvo una mezcla de varios productos y no fue posible aislar el producto deseado.

Las reacciones secundarias observadas se atribuyeron a la elevada presencia de medio ácido en la reacción ya que se requiere un equivalente de BCl_3 por cada átomo de oxígeno presente en la molécula y se generan tres de cloruro de hidrógeno. Para confirmar esta hipótesis se intentó realizar la desprotección de **114a** hidrogenando en baja presión en una disolución ácida. Se ha descrito que la hidrogenólisis de grupos bencilos en medios ácidos como HCl 1M en MeOH o HCl 2-4M en dioxano permite llevar a cabo la hidrogenólisis sin necesidad de recurrir a altas presiones.^[26,45,61,62] Aplicando estas condiciones no sólo se observó que los bencilos no se desprotegían sino que se formaron mezclas complejas donde se identificaron los productos de ciclación intramolecular. Ante los resultados obtenidos se planteó utilizar métodos alternativos que permitieran trabajar en condiciones neutras.

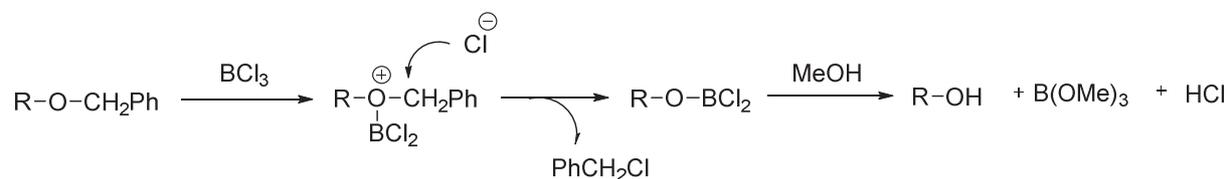
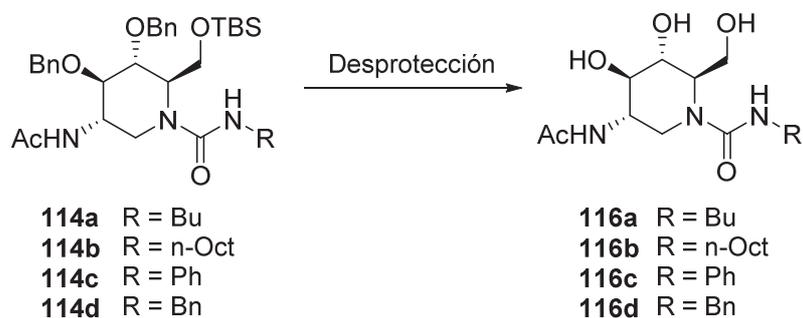


Figura 9. Desprotección de O-Bencilos utilizando BCl_3

En primer lugar, se planteó desproteger el silil éter utilizando condiciones más suaves y se escogió el $\text{HF}\cdot\text{py}$ como reactivo para llevar a cabo dicha reacción^[63,64]. En estas condiciones se observó la formación del producto deseado (sin presencia de TBS), de forma cuantitativa y evitándose las reacciones secundarias de formación de los productos de ciclación intramolecular. A continuación, se intentó desproteger los grupos bencilos por hidrogenólisis con catalizador de paladio. En este caso, se requirieron elevadas presiones de entre 50-55 barg para conseguir conversiones completas. Lamentablemente, a dichas presiones se observaba la desprotección de las ureas aromáticas tanto en **114c** como en **114d**. Por otro lado, en el caso de los derivados ureicos alifáticos esta metodología permitió obtener **116b** con un rendimiento del 76%. Se intentó llevar a cabo la desprotección de los bencilos de las ureas aromáticas utilizando Li/NH_3 a -78°C , seguido de un tratamiento con $\text{HF}\cdot\text{py}$ para eliminar el TBS del alcohol primario. Sin embargo, los rendimientos obtenidos con esta metodología fueron pobres.

Tabla 13. Desprotección de los grupos protectores en 114a-d



Sustrato	Condiciones	Rdto / %	Subproductos / Observaciones
114a	BCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , -78°C	36	 109
114a	H ₂ (5 bar), Pd/C, HCl 4M dioxano	n.d.	 89
114d	BCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , -78°C	n.d.	 109
114d	1) HF·py 2) H ₂ (55 bar), Pd(OH) ₂ , 60°C	n.d.	Desprotección de la urea bencílica
114c	1) HF·py 2) H ₂ (55 bar), Pd(OH) ₂ , 60°C	n.d.	Desprotección de la urea fenílica
114c	1) Li, NH ₃ 2) HF·py	22	-
114b	1) HF·py 2) H ₂ (55 bar), Pd(OH) ₂ , 60°C	76	-

3.4.3.2.2. Aproximaciones a síntesis de derivados ureicos usando acetatos como grupos protectores

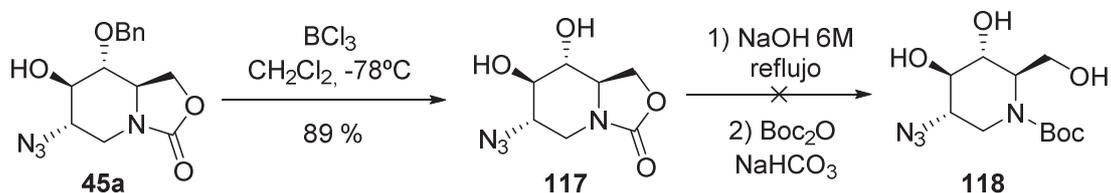
Los resultados presentados en el apartado anterior no permitían obtener todos los derivados deseados. Debido al interés de poder analizar y comparar los valores de inhibición de sustratos que

incluyeran en su estructura ureas alifáticas y aromáticas, se decidió explorar nuevas rutas que permitieran la obtención de los cuatro sustratos inicialmente planteados.

En la presente tesis (apartado 4.5.) se presenta como el uso de acetatos como grupos protectores en la síntesis de azúcares ha dado muy buenos resultados para la obtención de derivados de DAJNAc. Este tipo de grupos protectores son fáciles de introducir incluso en alcoholes contiguos y sustratos polares mediante tratamientos con $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pyr}$. Además, su desprotección se puede realizar fácilmente en condiciones suaves usando NaOMe/MeOH o NH_3/MeOH .^[65-68] Por ello, se planteó utilizar este tipo de grupos protectores para desarrollar una metodología que permitiera obtener tanto los derivados ureicos alifáticos como aromáticos.

El principal punto a tener en cuenta para su uso era que antes de introducirlos se debía hidrolizar el anillo de 2-oxazolidona ya que el tratamiento básico necesario para llevar a cabo la hidrólisis desprotegería fácilmente los acetatos presentes en la molécula.

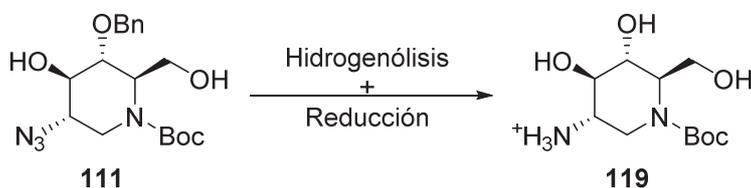
La primera dificultad que se halló fue la necesidad de eliminar el OBn en C4 presente en **45a** sin modificar la azida. En primer lugar, se planteó utilizar de nuevo el BCl_3 . Con este tratamiento se consiguió aislar **117** con excelente rendimiento. A continuación, se hidrolizó el anillo de 2-oxazolidona y se intentó proteger la amina endocíclica con un grupo Boc para proteger los hidroxilos posteriormente. Sorprendentemente, en este caso no se consiguió obtener **118**. Los análisis por HPLC-MS mostraron que la hidrólisis del carbamato era cuantitativa pero el sustrato no reaccionó con Boc_2O . Se realizaron pruebas forzando las condiciones y aumentando los equivalentes de Boc_2O pero tampoco se consiguió formar el producto deseado.



Se planteó como alternativa invertir el orden de los pasos e hidrolizar primero el carbamato cíclico y eliminar a continuación el bencilo. La aplicación de BCl_3 sobre **111** quedaba totalmente descartada ya que su uso implicaría una segura desprotección del Boc. De modo, que se planteó hidrogenar este sustrato para eliminar el bencilo y, al mismo tiempo, reducir la azida a amina. Para llevar a cabo esta reacción se realizaron varias pruebas observándose que la hidrogenólisis no se producía incluso a presiones elevadas (tabla 14, entradas 1 y 2). Se planteó, que la amina primaria formada como consecuencia de la reducción de la azida podía estar actuando como un *scavenger* del catalizador. Para evitarlo, se planteó añadir al medio de reacción ácido acético que actuaría protonando dicha amina primaria sin desproteger el *N*-Boc observándose una desprotección parcial del OBn (tabla 14, entrada 3). Para conseguir conversiones completas se decidió desgasar el disolvente durante 30 min. Con estas condiciones, se consiguieron conversiones completas trabajando a t.a. Se realizaron varios ensayos más trabajando a presiones inferiores hallando que con una presión de 15 bar y 60°C de temperatura se conseguían conversiones completas. Así, se dispuso de un método para desproteger

satisfactoriamente el bencilo y reducir la azida al mismo tiempo que se mantenía la amina endocíclica protegida.

Tabla 14. Ensayos de hidrogenólisis sobre **111**



Entrada	P / barg	Aditivos	T / °C	Desprotección O-Bn
1	30	-	60	No
2	55	-	60	No
3	30	CH ₃ COOH	60	Parcial
4 ^a	30	CH ₃ COOH	r.t.	Total
5 ^a	15	CH ₃ COOH	r.t.	Parcial
6 ^a	15	CH ₃ COOH	60	Total
7 ^a	5	CH ₃ COOH	60	No

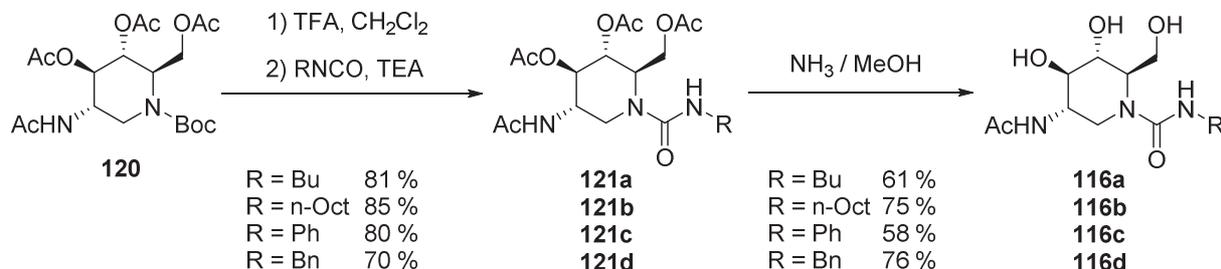
Notas. a) Entradas realizadas con disolvente desgasado
b) Tiempos de reacción de 20h
c) 5 equivalentes de ácido acético

El compuesto **119** resultó ser extraordinariamente polar por lo que no se pudo llevar a cabo su aislamiento. Alternativamente, se decidió realizar la protección *in situ* de **119** tratándolo con Ac₂O/pyr. Así, mientras que se forma la acetamida se protegen también los hidroxilos como acetatos. De este modo se obtuvo **120** con un 83% de rendimiento.



Se prosiguió con la desprotección selectiva del *N*-Boc para introducir la funcionalidad urea. Se realizaron diversas pruebas trabajando con HCl de distintas molaridades en MeOH y dioxano. En estas condiciones se observó una desprotección parcial de los acetatos además de la del *N*-Boc. Para evitar estas reacciones secundarias se decidió utilizar TFA/CH₂Cl₂, condiciones que se ha demostrado permiten la desprotección selectiva de forma cuantitativa del *N*-Boc respecto a OAc.^[69] Aplicando estas condiciones sobre nuestro sustrato se obtuvieron los resultados deseados. Seguidamente, sin necesidad de aislar la amina intermedia, se hizo reaccionar con isocianatos en presencia de TEA obteniendo las

ureas **121a-d** con buenos rendimientos. Finalmente, se desprotegeron los acetatos con NH_3/MeOH dando lugar a los productos finales **116a-d** sin observarse reacciones secundarias. El aislamiento de dichos productos resulto ser complejo debido a su elevada polaridad pero se pudieron aislar con buena pureza y rendimientos entre aceptables y buenos obteniendo los derivados deseados.⁵



3.4.3.2.3. Ensayos de inhibición frente a glicosidasas de 116a-d

Una vez obtenidos los distintos productos deseados, se realizaron los análisis de inhibición frente al panel comercial de glicosidasas⁶ (tabla 15, anexo 3). Todos ellos mostraron una elevada selectividad por β -N-acetilglucosaminidasas con valores en la decena micromolar excepto en el caso de **116a** que mostró también actividad frente a β -galactosidasas. Únicamente **116c** presentó valores en la unidad micromolar. Los valores obtenidos representaban un buen punto de partida para obtener compuestos con mejores valores de inhibición. De hecho, en estudios posteriores se ha observado que compuestos análogos con tioureas en vez de ureas permiten mejorar en un orden de magnitud los valores de inhibición llegando incluso a valores submicromolares para el caso de la tiourea fenólica.

Tabla 15. Valores de inhibición de los derivados ureicos frente a β -N-acetilglucosaminidasas

$K_i / \mu\text{M}$ Enzima				
	R = Bu 116a	R = Octilo 116b	R = Ph 116c	R = Bn 116d
β -N-Acetilglucosaminidasa (Human Placenta)	56	33	2.1	20
β -N-Acetilglucosaminidasa (Bovine Kidney)	138	82	4.1	24
β -N-Acetilglucosaminidasa (Jack Bean)	26	19	1.1	10

⁵ Ronald Farrar Tobar. *Master en Química Orgánica*. Universidad de Barcelona 2014

⁶ Estudios realizados en: a) Instituto de Investigaciones Científicas (IIQ), CSIC, Sevilla, España; b) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España

3.5. Conclusiones

Se ha escalado la síntesis del carbamato cíclico **8** desarrollando un procedimiento que permite obtenerlo a escala multigramo y con una pureza óptica superior al 99%.

Se ha explorado la epoxidación sobre productos bicíclicos (vía 1) y monocíclicos (vía 2) consiguiendo llevar a cabo la reacción pero con bajos rendimientos y diastereoselectividades.

Se han sintetizado sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos en productos bicíclicos (vía 1) y monocíclicos (vía 2). Se ha ensayado la reacción de apertura de estas funcionalidades utilizando azida sódica como nucleófilo y se han observado regioselectividades moderadas mediante la vía 1 dando lugar a los regioisómeros *gluco* y *altro*. La vía 2 no ha producido ningún tipo de selectividad. Por otro lado, en el caso de *N*-Bn sulfitos se ha observado un efecto anquimérico de la amina que ha conllevado la formación de las estereoquímicas *altro* y *mano* con la amina en la posición C2 en ambos casos.

Se ha sintetizado la DNJNAc (**13**) en 11 etapas y con un 23% de rendimiento global.

Se ha sintetizado la 3-acetamido-1,3-didesoxialtrojirimicina (**94**). El análisis de sus propiedades como inhibidor de glicosidasas ha mostrado que tiene una elevada selectividad por β -*N*-acetilglucosaminidasas si bien con una potencia débil.

Se han sintetizado varios derivados de DNJNAc con interés biológico de entre los que destacan los derivados **116a-d**. Se han evaluado frente a glicosidasas observándose una buena selectividad y potencia frente a β -*N*-acetilglucosaminidasas.

Referencias

- [1] R. Martín, A. Moyano, M. A. Pericàs, A. Riera, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 93–95.
- [2] M. A. Ciufolini, C. Y. W. Hermann, Q. Dong, T. Shimizu, S. Swaminathan, N. Xi, *Synlett* **1998**, 105–114.
- [3] K. Asano, T. Hakogi, S. Iwama, S. Katsumura, *Chem. Commun. (Camb)*. **1999**, 41–42.
- [4] M. Shirai, S. Okamoto, F. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5331–5332.
- [5] T. Subramanian, C. Lin, C. Lin, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4079–4082.
- [6] N. B. Kalamkar, D. D. Dhavale, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6363–6365.
- [7] A. Singh, B. Kim, W. K. Lee, H.-J. Ha, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1372–80.
- [8] S. Al-Rawi, S. Hinderlich, W. Reutter, A. Giannis, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2004**, *43*, 4366–4370.
- [9] R. Martín, C. Murruzzu, M. A. Pericàs, A. Riera, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2325–2328.
- [10] H. Takahata, Y. Banba, M. Sasatani, H. Nemoto, A. Kato, I. Adachi, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8199–8205.
- [11] H. Takahata, Y. Banba, H. Ouchi, H. Nemoto, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2527–2529.
- [12] O. V Singh, H. Han, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2387–2391.
- [13] V. Jäger, D. Schroter, B. Koppenhoefer, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2195–2210.
- [14] V. Jäger, U. Stahl, W. Hummer, *Synthesis (Stuttg)*. **1991**, 776–782.
- [15] S. L. Schreiber, T. S. Schreiber, D. B. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1525–1529.
- [16] C. H. Behrens, S. Y. Ko, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5687–5678.
- [17] D. Díez, A. B. Antón, J. Peña, P. García, N. M. Garrido, I. S. Marcos, F. Sanz, P. Basabe, J. G. Urones, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 786–793.
- [18] A. Romero, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8264–8268.
- [19] M. P. Schneider, M. Goldbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6114–6116.
- [20] J. P. Idoux, H. Ghane, *J. Chem. Eng. Data* **1979**, *24*, 157–158.
- [21] M. Brenner, L. La Vecchia, T. Leutert, D. Seebach, *Org. Synth.* **2009**, *80*, 57–65.
- [22] S. Yoshida, A. Ohigashi, Y. Morinaga, N. Hashimoto, T. Takahashi, S. Ieda, M. Okada, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1252–1260.
- [23] H. Harada, A. Fujii, O. Odai, S. Kato, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 238–245.
- [24] T. Hida, S. Mitsumori, T. Honma, Y. Hiramatsu, H. Hashizume, T. Okada, M. Kakinuma, K. Oda, A. Hasegawa, T. Masui, H. Nogusa, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 1413–1418.
- [25] A. Singh, B. Kim, W. K. Lee, H.-J. Ha, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1372–1380.
- [26] S. K. Bagal, S. G. Davies, J. A. Lee, P. M. Roberts, A. J. Russell, P. M. Scott, J. E. Thomson, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 136–139.
- [27] S. K. Bagal, S. G. Davies, J. a Lee, P. M. Roberts, P. M. Scott, J. E. Thomson, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8133–8146.
- [28] A. Guaragna, S. D. Errico, D. D. Alonzo, S. Pedatella, G. Palumbo, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3473–3476.
- [29] D. Yang, M.-K. Wong, Y.-C. Yip, *J. Org. Chem.* **1996**, *60*, 3887–3889.
- [30] B. B. Lohray, *Synthesis (Stuttg)*. **1992**, *11*, 1035–1052.
- [31] H. Byun, L. He, R. Bittman, **2000**, *56*, 7051–7091.
- [32] M. Alonso, A. Riera, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3908–3912.
- [33] T. Yamagishi, K. Fujii, S. Shibuya, T. Yokomatsu, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 54–65.
- [34] A. Yasuhara, K. Sakagami, R. Yoshikawa, S. Chaki, M. Nakamura, A. Nakazato, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3405–3420.
- [35] J. Oldendorf, G. Haufe, *European J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 4463–4472.

- [36] B. V. Joshi, H. R. Moon, J. C. Fettinger, V. E. Marquez, K. A. Jacobson, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 439–447.
- [37] F. C. Gaenzler, C. Guo, Y.-W. Zhang, M. E. Azab, M. A. I. Salem, D. P. Fan, M. B. Smith, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8781–8785.
- [38] D. A. Evans, T. C. Britton, J. A. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6141–6144.
- [39] A. A. Accurso, S. Cho, A. Amin, V. A. Potapov, S. V. Amosova, M. G. Finn, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4392–4395.
- [40] I. V. Alabugin, M. Manoharan, T. A. Zeidan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14014–14031.
- [41] D. Gomez Pardo, J. Cossy, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4516–4525.
- [42] A. Cochi, D. G. Pardo, J. Cossy, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4442–4445.
- [43] J. Cossy, *Chem. Rec.* **2005**, *5*, 70–80.
- [44] I. Déchamps, D. G. Pardo, J. Cossy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9082–9091.
- [45] 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.
- [46] A. F. G. Glawar, D. Best, B. J. Ayers, S. Miyauchi, S. Nakagawa, M. Aguilar-Moncayo, J. M. Garcia-Fernandez, 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.
- [47] G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 979–990.
- [48] O. Simák, J. Stanek, J. Moravcová, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 966–971.
- [49] I. K. Khanna, F. J. Koszyk, M. A. Stealey, R. M. Weier, J. Julien, R. A. Mueller, S. N. Rao, L. Swenton, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 843–878.
- [50] M. Kiso, M. Kitagawa, H. Ishida, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 25–45.
- [51] A. de la Fuente, R. Martin, T. Mena-Barragán, X. Verdager, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3638–3641.
- [52] Y. Yu, T. Mena-Barragán, K. Higaki, J. L. Johnson, J. E. Drury, R. L. Lieberman, N. Nakasone, H. Ninomiya, T. Tsukimura, H. Sakuraba, Y. Suzuki, E. Nanba, C. O. Mellet, J. M. García Fernández, K. Ohno, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1460–1469.
- [53] 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.
- [54] M. Benlifa, M. I. García Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, A. Wadouachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2805–2808.
- [55] M. I. García-Moreno, M. Aguilar, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 297–299.
- [56] M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. Trapero, M. Egado-Gabás, A. Llebaria, J. M. G. Fernández, C. O. Mellet, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3698–3713.
- [57] 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.
- [58] P. Díaz Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *European J. Org. Chem.* **2005**, 2903–2913.
- [59] A. Arcelli, V. Cere, F. Peri, S. Pollicino, A. Ricci, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3439–3444.
- [60] M. Egado-Gabás, P. Serrano, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1195–1201.
- [61] O. K. Karjalainen, M. Passiniemi, A. M. P. Koskinen, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1145–1147.
- [62] O. K. Karjalainen, A. M. P. Koskinen, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1231–1236.
- [63] Y. Matsushima, H. Itoh, T. Nakayama, S. Horiuchi, T. Eguchi, K. Kakinuma, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 949–958.
- [64] K. Kong, Z. Moussa, C. Lee, D. Romo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19844–19856.

- [65] S. Ogawa, H. Aoyama, T. Sato, *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 1979–1992.
- [66] S.-L. Liu, X.-X. Shi, Y.-L. Xu, W. Xu, J. Dong, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 78–83.
- [67] A. Baran, S. Çambul, M. Nebioglu, M. Balci, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 5086–5097.
- [68] B. Pluinage, M. G. Ghinet, R. Brzezinski, A. B. Boraston, K. a Stubbs, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4169–4172.
- [69] M. Heuckendorff, C. M. Pedersen, M. Bols, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 13982–13994.

4

Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc) y derivados mediante aplicación de la sustitución alílica catalizada por paladio.

4.1. Introducción y objetivos

Una ruta alternativa a la apertura regioselectiva de epóxidos o equivalentes sintéticos derivados de **8** utilizando nucleófilos nitrogenados consistiría en la introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco de forma estereoselectiva en la posición C2 del esqueleto glicosídico de nuestros compuestos mediante la utilización del reordenamiento de Overman o la aminación alílica. Ambas metodologías se aplican sobre alcoholes alílicos y se han utilizado ampliamente en la síntesis de diversos productos naturales y sintéticos. Nuestro intermedio clave **8** era un buen sustrato de partida para su utilización. En caso de tener éxito se generarían aminos alílicas susceptibles de ser dihidroxiladas para generar la estructura polihidroxilada de los azúcares finales. Por otro lado, también se podrían ensayar reacciones de epoxidación que permitieran no sólo generar dicha estructura polihidroxilada sino también insertar de forma estereoselectiva otros nucleófilos aumentando la versatilidad de los intermedios para la obtención de nuevos 2-acetamido iminoazúcares.

De acuerdo con este análisis se planteó una posible ruta sintética que nos permitiera obtener 2-acetamido iminoazúcares de forma estereoselectiva partiendo del intermedio **8** y basándose en la aplicación de dichas metodologías. (figura 1).

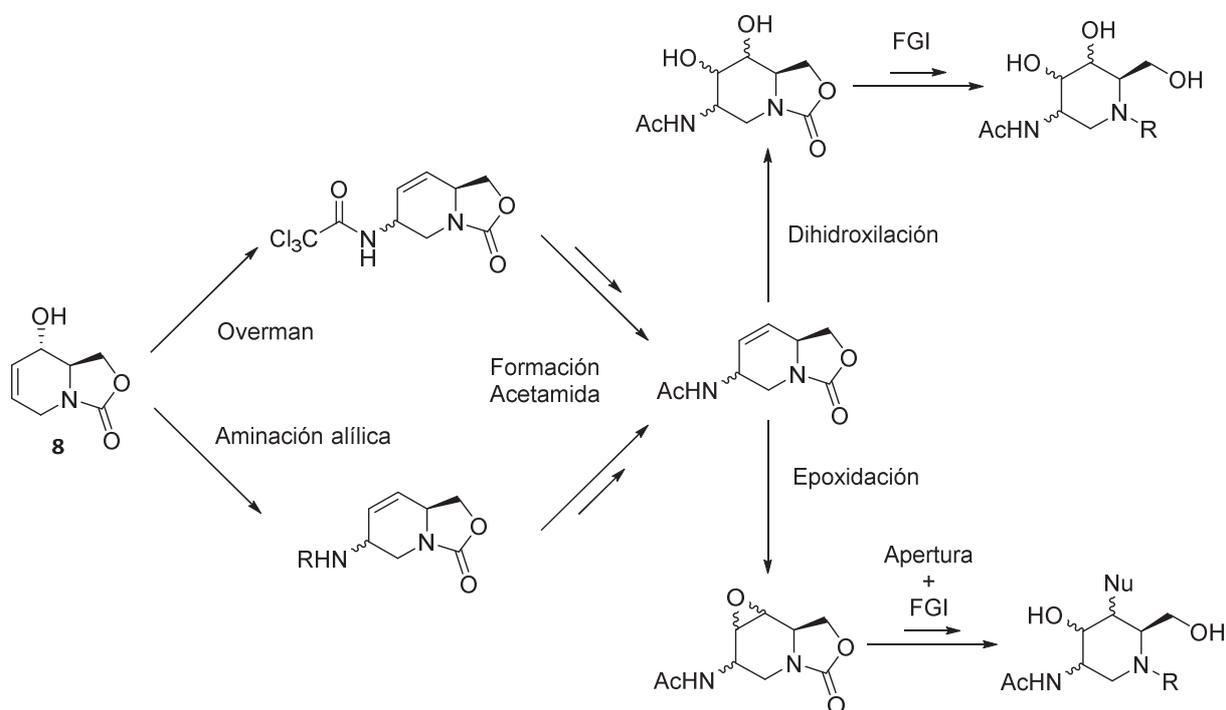


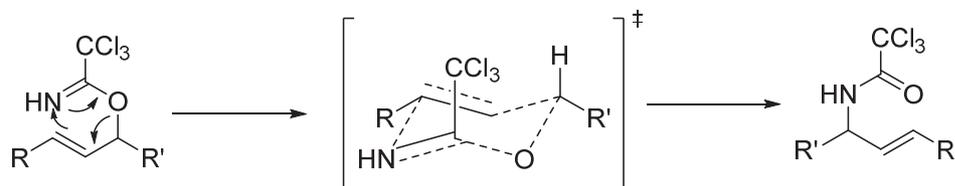
Figura 1. Síntesis para la obtención de 2-acetamido iminoazúcares

4.2. Reordenamiento de Overman

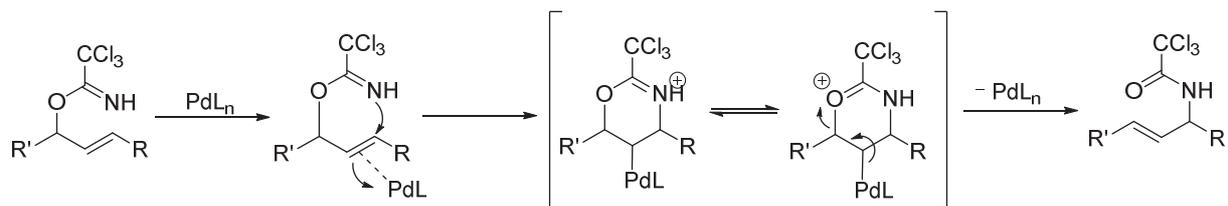
El reordenamiento de Overman consiste en un reordenamiento sigmatrópico [3+3] que permite crear un nuevo enlace carbono-nitrógeno dando lugar a una amida mediante la pérdida de un enlace carbono-oxígeno. Fue observado por primera vez en 1974 por L.E. Overman quien describió el reordenamiento térmico y catalizado por mercurio de alil tricloroacetimidatos para dar lugar a tricloroacetamidas. Se trata de una reacción que se ha utilizado ampliamente en la síntesis de diversos tipos de productos como aminoácidos^[1], iminoazúcares^[2], esfingosinas^[3] y otros productos naturales^[4,5].

Las principales ventajas del reordenamiento de Overman son: a) síntesis sencilla y con altos rendimientos de los tricloroacetimidatos de partida mediante reacción de alcoholes alílicos con tricloroacetoniitrilo en presencia de una base; b) rendimientos elevados de reacción; c) fácil obtención de las aminas correspondientes por desprotección en medio básico y condiciones suaves de las tricloroacetamidas formadas; d) el reordenamiento de alcoholes alílicos secundarios presenta gran estereoselectividad hacia olefinas *trans*; e) elevado rango de aplicabilidad. Por otro lado, la desventaja principal son las condiciones térmicas drásticas que se deben utilizar para llevarla a cabo ya que típicamente se realiza en xileno a temperaturas entre 100-140°C durante varias horas.^[6]

El mecanismo de la reacción de Overman consiste en un reordenamiento sigmatrópico concertado [3+3], que ocurre vía un estado de transición donde se forma un ciclo de seis miembros con configuración próxima a silla. La reacción es reversible pero se ve desplazada debido a la fuerza motriz asociada a la formación de la amida.



La versión catalítica del reordenamiento de Overman se puede realizar con varios metales. Históricamente se ha utilizado el mercurio pero debido a su toxicidad también se han desarrollado versiones con oro, platino^[7] y paladio^[8] siendo éste último el más comúnmente aplicado. Las versiones catalíticas de Overman se realizan con cargas de entre el 5-10% de catalizador y permiten condiciones mucho más suaves de trabajo. Sin embargo, cabe destacar que su aplicación acostumbra a funcionar correctamente sólo sobre alcoholes secundarios.

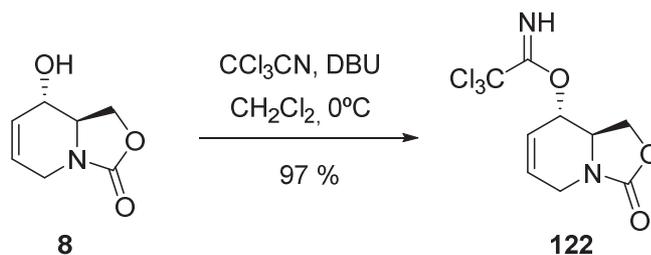


De acuerdo con estos precedentes y siguiendo el esquema sintético de la figura 1 se decidió abordar la exploración del reordenamiento de Overman.

4.2.1. Reacciones de Overman sobre el intermedio 8

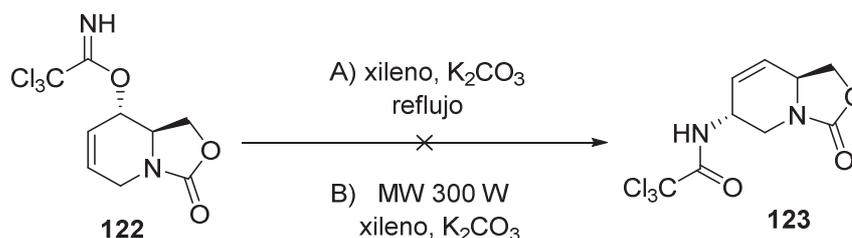
4.2.1.1. Reordenamientos térmicos de Overman

Para llevar a cabo la reacción de Overman se sintetizó el trichloroacetimidato correspondiente por reacción de condensación de **8** con trichloroacetoniitrilo y DBU como base a 0°C obteniendo **122** con un 97% de rendimiento.



Las condiciones para realizar el reordenamiento de Overman varían según la estructura del trichloroacetimidato. Generalmente, los derivados de alcoholes terciarios proceden más rápidamente que los primarios y permiten realizar las reacciones en condiciones menos drásticas. Inicialmente, se reprodujeron las condiciones típicas para llevar a cabo el reordenamiento mediante tratamiento en xileno a reflujo durante 16h recuperando sólo parte del producto de partida y sin observar la formación de ninguna especie nueva. En la literatura se pueden hallar ejemplos de reordenamientos de Overman donde la presencia de K_2CO_3 ^[9,10] permite que el reordenamiento proceda con mejores rendimientos. Lamentablemente en nuestro caso estas condiciones tampoco permitieron obtener el compuesto **123**.

Se planteó como hipótesis que las condiciones drásticas de la reacción junto con los elevados tiempos de reacción provocaban la descomposición parcial del producto de partida antes de que se produjera el reordenamiento. Por ello, se planteó como alternativa el uso de microondas. Esta técnica se ha descrito previamente^[11] y ha demostrado ser adecuada puesto que los tiempos de reacción se reducen de horas a minutos incrementando de forma notable los rendimientos finales para varios sustratos. Se aplicaron estas condiciones al compuesto **122** sin éxito. Aunque se realizaron pruebas a 120 y 150°C a tiempos de 15 min y 30 min en ningún caso se identificó la formación de **123**.

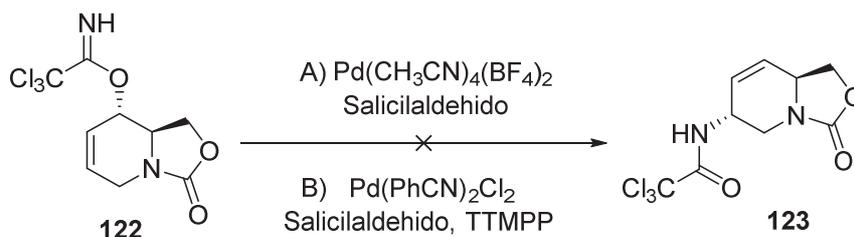


4.2.2. Reordenamientos catalíticos de Overman

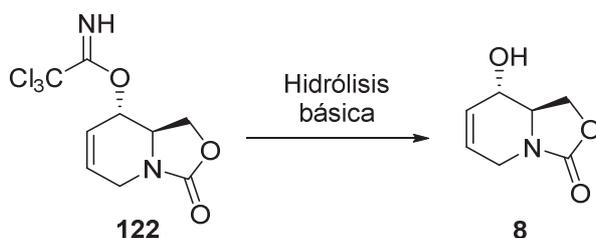
La falta de reactividad en los reordenamiento térmicos se podrían justificar por la elevada rigidez del intermedio **122**. La presencia del anillo de 2-oxazolidona restringiría la movilidad de la silla impidiendo la formación del estado de transición necesario para que se dé el reordenamiento. Ante esta hipótesis nos planteamos como alternativa utilizar versiones catalíticas del reordenamiento de Overman.

Históricamente se han utilizado sales de mercurio para llevar a cabo este tipo de reacciones^[12]. Posteriormente se han desarrollado versiones con Pt, Au y Pd siendo estas últimas las más comunes^[8]. Concretamente, Nguyen *et al.*^[13,14], describieron la aplicación del reordenamiento de Overman catalizado por Pd para realizar diastereoselectivamente la introducción de la tricloroacetamida sobre el carbono anomérico de sustratos glicosídicos. La diastereoselectividad de la reacción se ve influenciada según la especie de Pd(II) utilizada sea neutra o catiónica.

Siguiendo este precedente, se ensayaron las condiciones de Nguyen *et al.* sobre el compuesto **122** utilizando como fuentes de paladio $Pd(CH_3CN)_4(BF_4)_2$ o $Pd(PhCN)_2Cl_2$ y salicilaldehído como aditivo. En las pruebas realizadas a temperatura ambiente se recuperó el producto de partida intacto mientras que forzando las condiciones se producía descomposición parcial de éste. En ningún caso se detectó la formación de **123**.



El escaso éxito obtenido con las pruebas catalíticas junto con los precedentes en la literatura hizo plantearnos la posibilidad de repetir el reordenamiento de Overman sobre un sustrato que no poseyera el anillo de 2-oxazolidona. Así, el sustrato estaría menos restringido y posiblemente sería más fácil llevar a cabo la reacción. Se realizó la hidrólisis del anillo de 2-oxazolidona de **122** mediante tratamiento con NaOH 6M a reflujo. En estas condiciones se obtuvo **8** con un rendimiento del 62%. Tratamientos básicos menos drásticos usando NaOMe catalíticamente permitieron recuperar **8** con rendimientos cuantitativos demostrando la imposibilidad de hidrolizar el carbamato sin actuar sobre el tricloroacetimidato.



La alternativa de hidrolizar el anillo de 2-oxazolidona de **8** y proteger selectivamente la amina endocíclica y el alcohol primario parecía complicada de acuerdo a los resultados obtenidos para otros sustratos en la presente tesis doctoral. Además incrementaba notablemente el número de etapas sintéticas. Por ello se descartó y se decidió explorar las sustituciones alílicas como alternativa sintética para la introducción de una funcionalidad amina en C2 sobre nuestros compuestos.

4.3. Sustituciones alílicas catalizadas por paladio

4.3.1. Introducción

Las reacciones químicas catalizadas por paladio se han utilizado ampliamente en la síntesis de gran cantidad de productos. Entre las reacciones químicas más comunes que utilizan paladio destacan las reacciones de Heck, oxidaciones de Wacker y las sustituciones alílicas.

La sustitución alílica catalizada por paladio es una reacción muy versátil para la síntesis de nuevos compuestos ya que se puede realizar sobre una gran cantidad de sustratos y permite utilizar una gran variedad de nucleófilos pudiendo formar no sólo enlaces C-O (nucleófilos oxigeandos) sino también enlaces C-C (derivados de dietil malonato), C-N (nucleófilos nitrogenados), C-S (nucleófilos sulfurados), etc. La sustitución alílica estequiométrica se publicó por primera vez en 1965 por Tsuji y la versión catalítica apareció en 1970. La primera sustitución alílica asimétrica fue desarrollada por Trost en 1977. Durante su exploración a lo largo de los años también se ha demostrado que puede llevarse a cabo con otros metales de transición como rodio, rutenio, molibdeno y, especialmente, iridio. Se trata de una reacción muy útil no sólo desde un punto de vista sintético sino también para explorar la eficiencia de nuevos ligandos quirales.^[15]

El mecanismo de la reacción consiste en una coordinación inicial del paladio (0) al alqueno de forma *anti* al grupo saliente y dando lugar a un complejo intermedio **A**. La adición oxidativa a este complejo genera el complejo η^3 -alilpaladio(II) **B**. La adición nucleófila sobre **B** se produce de modo *anti* al metal generando el correspondiente Pd(0) alil complejo **C** que se disocia generando el producto final y recuperando la especie catalítica (figura 2).^[16]

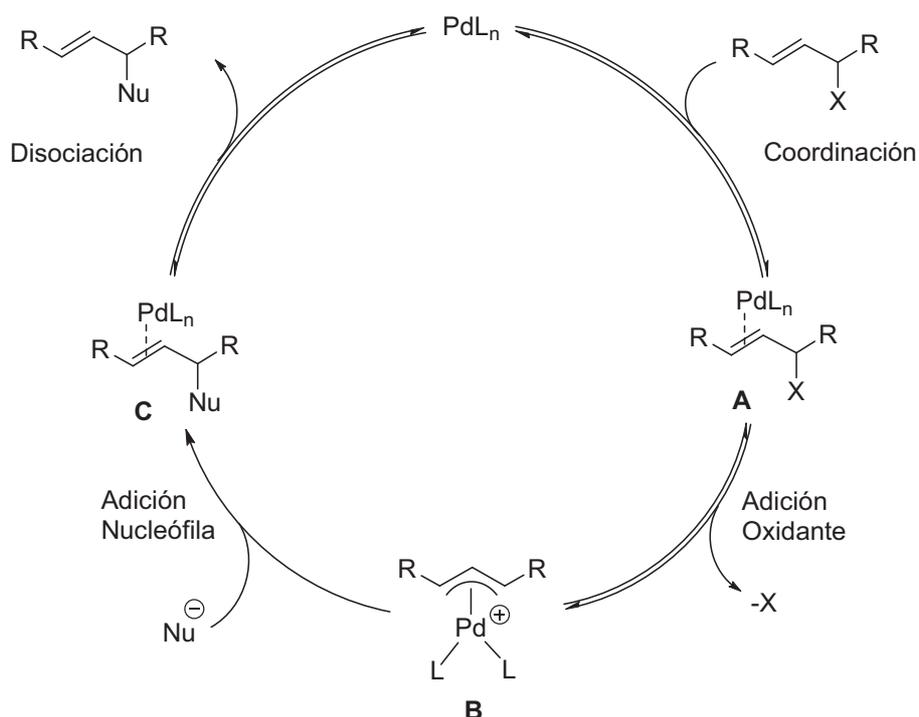


Figura 2. Mecanismo de la sustitución alílica catalizada por paladio

Algunas consideraciones sobre esta reacción son: a) las distintas etapas del proceso son reversibles siendo la adición nucleófila la única irreversible; b) generalmente, las etapas limitantes del proceso son la adición oxidante o la adición nucleófila; c) nucleófilos débiles (nitrogenados, sulfurados, etc.) tienden a atacar uno de los carbonos terminales del sistema alílico presentando una retención neta de la estereoquímica mientras que nucleófilos fuertes (organometálicos, etc.) atacan directamente sobre el paladio generando una inversión estereoquímica; d) en este tipo de reacciones la presencia de fosfinas que actúan como ligandos σ -dadores es clave para enriquecer la carga en el paladio facilitando que se dé la adición nucleófila; e) la regioselectividad del ataque nucleófilo está mayormente gobernada por efectos estéricos relativos a la aproximación del nucleófilo al sistema alílico; f) el rango de grupos salientes para dar lugar a la etapa de coordinación es muy amplio (acetatos, carbonatos, haluros, sulfonas, carbamatos, etc.); g) las reacciones se acostumbran a realizar en disolventes polares como THF para obtener buenos rendimientos.

4.3.2. Antecedentes en el grupo de investigación¹

La introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2 utilizando la sustitución alílica catalizada por paladio había sido explorada anteriormente en nuestro grupo de investigación. Se había explorado la realización de dicha reacción sobre el acetato **124a** permitiendo determinar unas condiciones adecuadas en cuanto a catalizador (cloruro de alil paladio), ligando (dppe) y disolventes

¹ Ruben Martín Romo, Tesis doctoral 2003, Universitat de Barcelona.

(THF). Además se habían realizado *screenings* en busca de nucleófilos nitrogenados, oxigenados y sulfurados que permitieran obtener los compuestos deseados (figura 3). De la batería de nucleófilos utilizados sólo se observó reactividad con algunas aminas secundarias con rendimientos pobres y las aminas secundarias cíclicas con rendimientos excelentes.

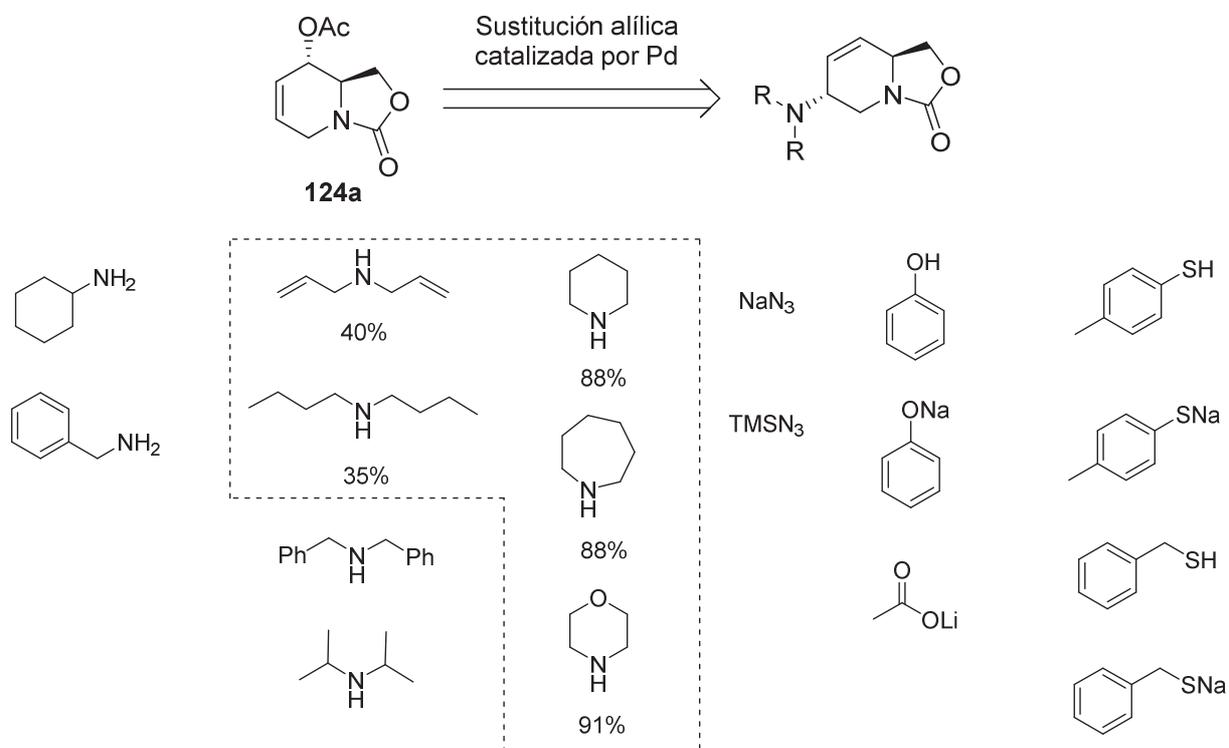


Figura 3. Nucleófilos explorados en la sustitución alílica catalizada por paladio. Se remarcan los que presentan reactividad

Más allá de la sorprendente dependencia de la reacción en función del tipo de nucleófilo, el aspecto más destacado de los resultados obtenidos era la estereoselectividad de la reacción. La sustitución alílica puede dar lugar a cuatro compuestos distintos en función de la cara donde se coordine el catalizador y del lugar de ataque del nucleófilo. Sin embargo, en todos los casos se observó la formación de un único diastereómero. El análisis por NOESY de los productos obtenidos con las aminas secundarias cíclicas permitió comprobar que el diastereómero obtenido correspondía a **A** (figura 4). Además, se consiguió obtener una estructura de Rayos X del derivado piperidínico corroborando las conclusiones obtenidas por NOESY.

La estereoselectividad de la reacción se puede explicar por dos factores. En primer lugar, la coordinación del paladio a la olefina se da en *anti* al grupo saliente OAc y, en segundo lugar, el ataque nucleófilo se produce en por la cara contraria al paladio y en la posición menos impedida dando lugar a la configuración **A**. Aparentemente, no se produce isomerización del complejo μ -alil paladio ni tampoco ataque nucleófilo sobre el centro metálico ya que en ningún caso se observó la formación de **C** ni **D**.

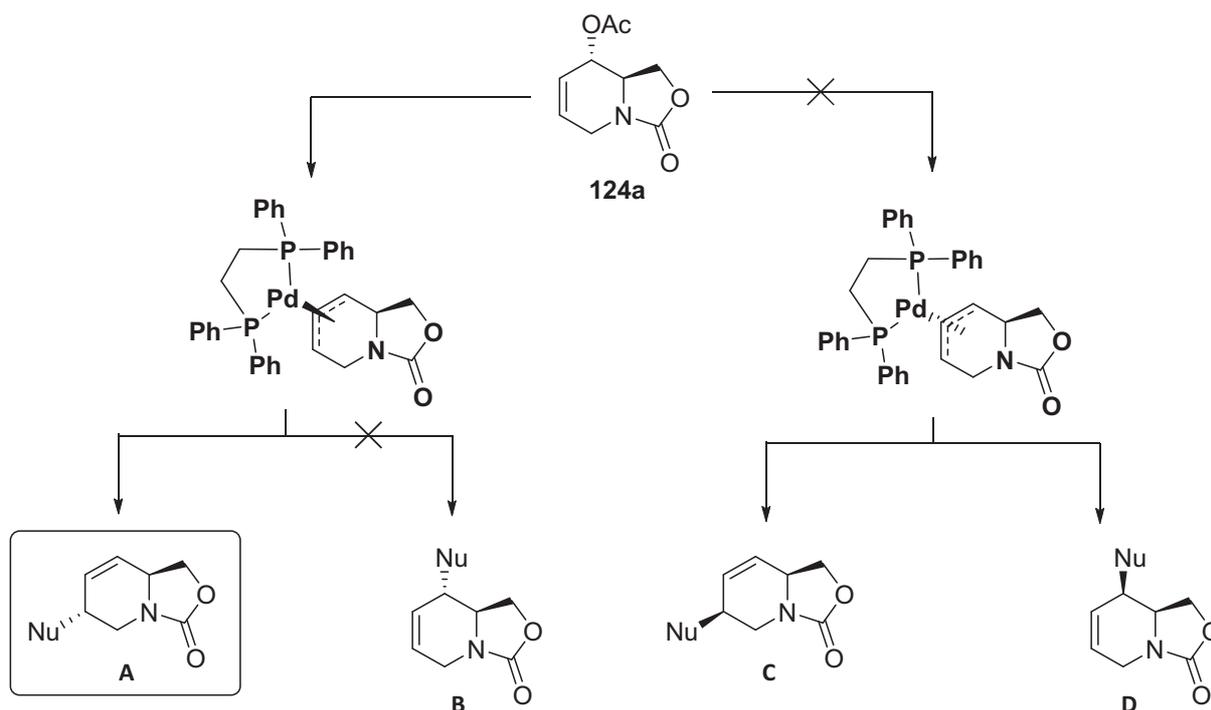


Figura 4. Estereoselectividad de la sustitución alílica catalizada por paladio

Aunque los resultados eran prometedores, la introducción de aminas secundarias cíclicas no permitió la posterior derivatización hacia la acetamida. Por otro lado, los intentos de dihidroxilación de los compuestos tipo **A** para obtener nuevos inhibidores de glicosidasas resultaron ser infructuosos.

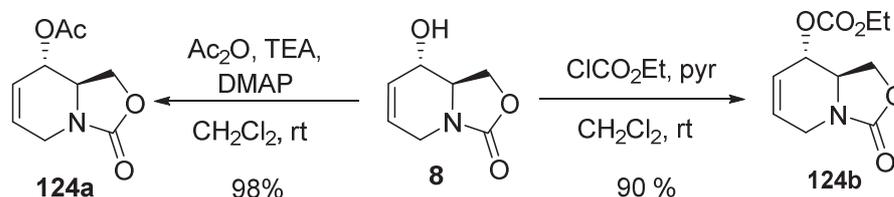
4.3.3. Exploración de la sustitución alílica catalizada por paladio

De acuerdo a los resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación, la elevada estereoselectividad de la sustitución alílica catalizada por paladio constituía un valioso precedente para obtener nuevos inhibidores de glicosidasas. Sin embargo, las aminas secundarias cíclicas no resultaban útiles. Por lo tanto, se debían hallar nuevos nucleófilos que fueran equivalentes sintéticos del amoníaco y que se pudieran desproteger fácilmente para introducir posteriormente una acetamida.

Clásicamente los equivalentes sintéticos del amoníaco más comúnmente empleados en las sustituciones alílicas son las aminas (primarias y secundarias) y azidas^[17]. Sin embargo, en los últimos años se pueden hallar multitud de trabajos en los que se emplean sulfonamidas, imidas, anilinas y, especialmente, *N,N*-diacilaminas como nucleófilos^[18–20]. Estas familias de compuestos pueden ser desprotegidos mediante distintos tratamientos obteniendo las aminas correspondientes. Además, las *N,N*-diacilaminas pueden usarse como sales o como productos neutros variando así su nucleofilia y regulando la regioselectividad y conversiones de la reacción^[21].

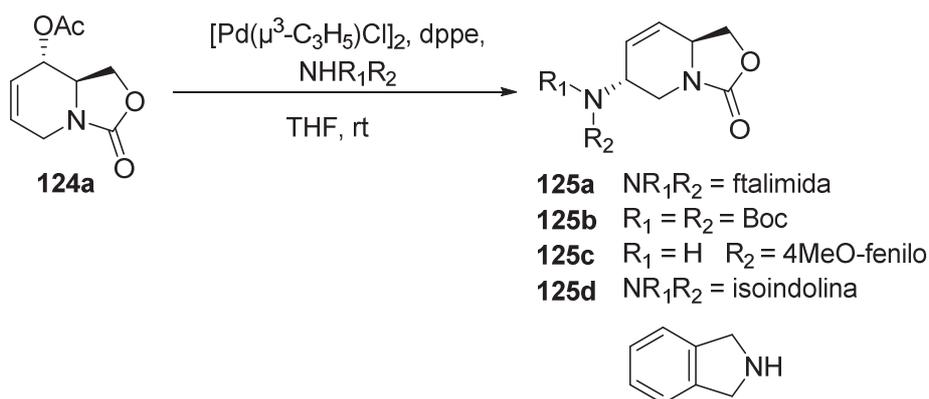
De acuerdo con esto se exploró el uso de este tipo de nucleófilos para llevar a cabo la reacción de sustitución alílica catalizada por paladio. Para ello se sintetizaron el acetato **124a**, mediante reacción

de **8** con Ac₂O, TEA y DMAP con excelente rendimiento, y el carbonato **124b** con cloroformiato de etilo y piridina con un 90% de rendimiento. Inicialmente se ensayó la sustitución sobre el acetato **124a**.



En un primer *screening* con varios nucleófilos con las condiciones previamente optimizadas en nuestro grupo de investigación se ensayaron la NH(Boc)₂, ftalimida y 4-metoxianilina (tabla 1). Además se añadió la isoindolina, una amina secundaria cíclica con dos posiciones benzílicas que se pensó que podría eliminarse con facilidad dando lugar a una amina primaria en etapas posteriores. De hecho, la isoindolina se comportó como el resto de aminas secundarias cíclicas rindiendo **125d** como un único diastereómero con un rendimiento del 74%. Por otro lado la ftalimida y la 4-metoxianilina dieron resultados esperanzadores, mientras que la NH(Boc)₂ no reaccionó.

Tabla 1. *Screening* inicial sustitución alílica catalizada por paladio



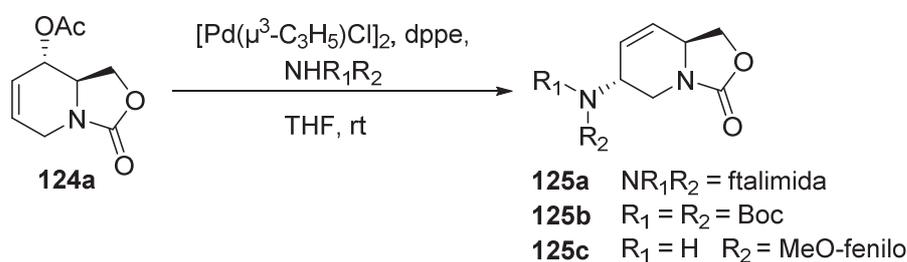
Nucleófilo	t / h	Conversión	Producto	Rdto/ %
Ftalimida	20	100	125a	25
NH(Boc) ₂	20	0	125b	-
4OMe-Anilina	2	100	125c	30
Isoindolina	3	100	125d	74

En un segundo *screening* más ampliado se utilizaron las sales de *N,N*-diacilaminas para aumentar la nucleofilia de estos productos y además se exploraron otras metoxianilinas (tabla 2). Debido a los problemas de solubilidad de los productos iónicos a menudo se tuvo que cambiar el disolvente y trabajar con DMF. En los casos donde aun así se observó falta de reactividad también se

exploró variar la fuente de paladio. A la luz de los resultados obtenidos se pudo concluir que tanto las metoxianilinas disustituidas como las sales de *N,N*-diacilaminas no reaccionaban y se descartaron como nucleófilos.

La falta de reactividad de la ftalimida se atribuyó inicialmente tanto a su nucleofilia como a su carácter insoluble en THF. Las primeras pruebas usando disolvente más polares y temperatura no mejoraron los resultados iniciales. Sin embargo se pueden hallar ejemplos en la literatura donde tanto los problemas de solubilidad como de nucleofilia se solucionan utilizando su sal potásica^[22] o de cesio^[23]. En nuestro caso la sal de cesio permitió obtener **125a** como un solo diastereómero con un 48% de rendimiento.

Tabla 2. Screening sustitución alílica catalizada por paladio



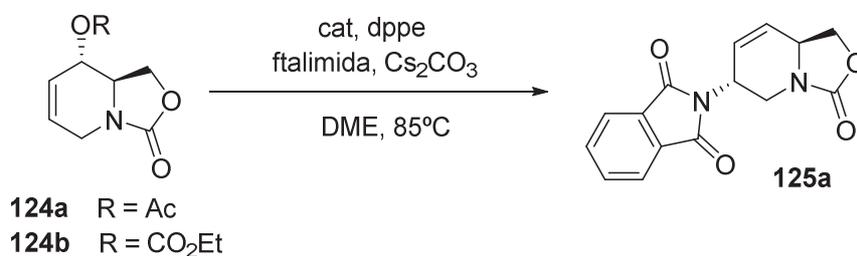
Nucleófilo	Catalizador	Disolvente	T / °C	t / h	Conv / %	Producto	Rdto
Ftalimida	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	DMF	50	20	0	125a	-
Ftalimida	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	THF	rt	20	0	125a	-
Ftalimida potásica	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	THF	rt	20	0	125a	-
Ftalimida potásica	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	DMF	100	48	0	125a	-
Ftalimida de cesio	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	DME	85	0.5	100	125a	48
$\text{NaN}(\text{Boc})_2$	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	DMF	50	20	100	125b	n.d. ^a
$\text{NaN}(\text{Boc})_2$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	DMF	50	3	100	125b	n.d. ^a
3,5-dimetoxianilina	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	THF	rt	20	0	125c	-
2,4-dimetoxianilina	$[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$	THF	rt	20	0	125c	-

Notas. a) No se observó la formación de **125b**

Una vez descartados la mayoría de nucleófilos se decidió explorar la reacción con ftalimida de cesio. Se plantearon dos posibles variaciones: sustrato y catalizador. En la literatura son comunes los trabajos en los que se explora la sustitución alílica utilizando compuestos de iridio como catalizadores^[24,25] y donde se utilizan carbonatos como sustratos^[26].

Los resultados obtenidos (tabla 3) mostraron que mientras el iridio no permitía mejorar los resultados previos, el cambio de sustrato permitió obtener **125a** con un 75% de rendimiento.

Tabla 3. Screening sustitución alílica con ftalimida de cesio

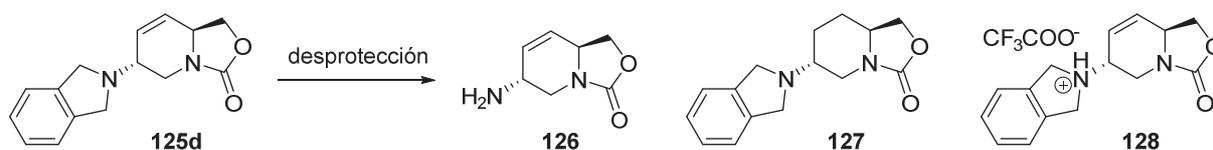


Nucleófilo	Sustrato	Catalizador	t / h	Rdto / %
Ftalimida de cesio	124a	[Pd(μ^3 -C ₃ H ₅)Cl] ₂	0.5	48
Ftalimida de cesio	124a	[Ir(cod)Cl] ₂	0.5	< 10
Ftalimida de cesio	124b	[Pd(μ^3 -C ₃ H ₅)Cl] ₂	0.5	75

4.3.4. Intentos de desprotección de **125a** y **125d**

La exploración de la sustitución alílica catalizada por paladio dio como resultado la obtención con buenos rendimientos de los productos **125a** y **125d** que constituían candidatos para la introducción de la funcionalidad acetamida en C2.

Inicialmente, se valoró la posibilidad de tratar **125d** como un derivado bencílico común y se ensayaron varias condiciones de desprotección típicas para obtener la amina primaria correspondiente **126** (tabla 4). Las hidrogenólisis se realizaron en presencia de Boc₂O para obtener un producto más apolar y fácil de aislar. Aunque se ensayaron varias fuentes de paladio, disolventes y temperaturas en todos los casos se obtuvo el producto de reducción de la olefina **127** manteniéndose intacta la isoindolina. En segundo lugar se intentaron romper las posiciones benzílicas por tratamiento con Li/NH₃. Se realizaron pruebas a -78° y -33° pero en ningún caso se consiguió identificar el producto deseado. Se ensayaron también las condiciones de desprotección de grupos benzihidrilos con Et₃SiH/TFA^[27-29] que no deben afectar a la olefina. Sin embargo sólo se identificó la formación del trifluoroacetato de **128**.

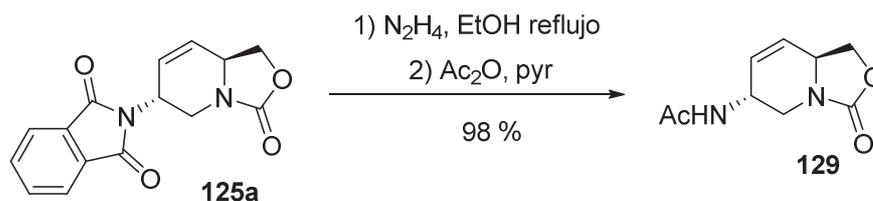
Tabla 4. Intentos de desprotección de la isoindolina **125d**

Reacción	Condiciones	Producto
	H ₂ (55barg), Pd/C, Boc ₂ O, AcOEt, 60°	127
Hydrogenólisis	H ₂ (55barg), Pd(OH) ₂ /C, Boc ₂ O, AcOEt, 60°	127
	H ₂ (55barg), Pd/C, HCl 1,25M (MeOH), 60°	127
Birch	Li / NH ₃ , ^t BuOH, dioxano, -33°C, 10 min	-
	Li / NH ₃ , ^t BuOH, dioxano, -78°C, 10 min	-
Hidrosilanos	Et ₃ SiH, TFA, CH ₂ Cl ₂ , 0°C	128
	Et ₃ SiH, TFA, dioxano, reflujo	128

Ante la imposibilidad de obtener el producto de desprotección, nos planteamos oxidar las posiciones benzílicas de **125d** para obtener **125a**. Se exploraron varios oxidantes como RuCl₃/NaIO₄, CAN o PCC y aunque se consiguió identificar el producto deseado los rendimientos obtenidos eran inferiores al 20% en todos los casos. Por ello se descartó el producto **125d** como vía para la formación de una acetamida.



La desprotección de derivados ftalimídicos se realiza mediante tratamiento con N₂H₄ en EtOH o MeOH a reflujo^[30-32]. Aplicando estas condiciones a **125a** se consiguió obtener fácilmente la amina primaria que se acetiló *in situ* mediante reacción con Ac₂O y piridina para obtener **129** con un 98% de rendimiento. De este modo se consiguió obtener un producto con la funcionalidad acetamida introducida de forma estereoselectiva y con altos rendimientos.



4.4. Aproximaciones sintéticas a 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc, 130)

Una vez explorados las distintas metodologías planteadas para la introducción de la funcionalidad acetamida en C2 de forma estereoselectiva, el siguiente paso consistía en ensayar la reacción de dihidroxilación de la olefina. La introducción de un diol permitiría obtener una estructura análoga a azúcar y generar intermedios muy próximos a los inhibidores de glicosidasas planteados como objetivos en el presente capítulo.

Siguiendo la exploración realizada con los sulfitos y sulfatos cíclicos (capítulo 3), nos planteamos también la posibilidad de explorar las reacciones de dihidroxilación sobre intermedios que mantuviesen la presencia del anillo de 2-oxazolidona (intermedios bicíclicos, *vía 1*) y otros sin ella (monocíclicos, *vía 2*). Inicialmente, nos planteamos que la presencia de este carbamato cíclico permitiría dirigir la dihidroxilación hacia sustratos con configuración *alo* debido a impedimento estérico. La ausencia de dicho carbamato cíclico daría lugar a un intermedio menos rígido donde la direccionalidad de la dihidroxilación es más difícil de prever. Presumiblemente la relación diastereomérica en la *vía 2* debería tener un porcentaje mayor de forma *galacto* que en la *vía 1*.

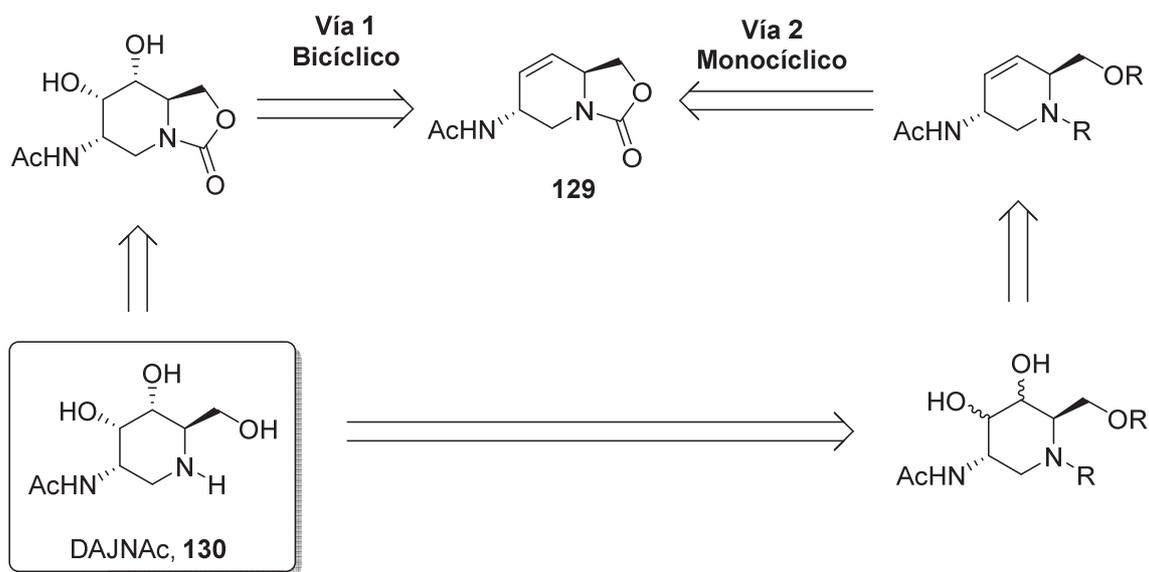
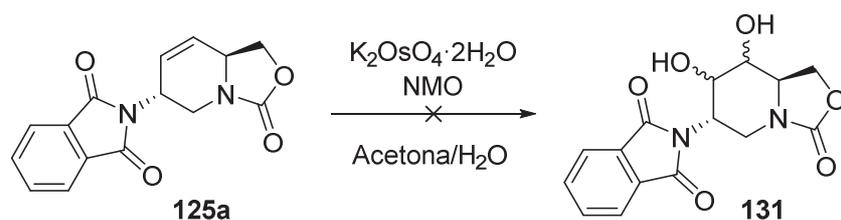


Figura 5. Análisis retrosintético para DAJNAc (130)

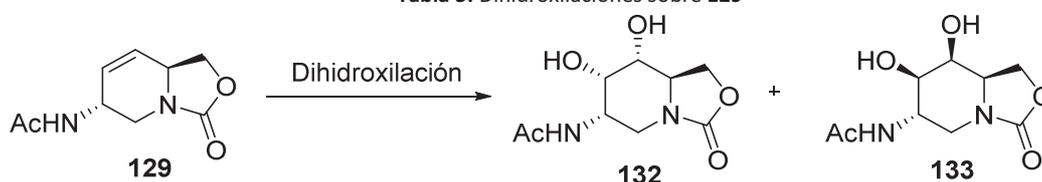
4.4.1. Aproximaciones sintéticas a DAJNAc vía intermedios bicíclicos (*vía 1*)

4.4.1.1. Reacciones de dihidroxilación

Inicialmente nos planteamos realizar la dihidroxilación de **125a**. Se realizaron varias pruebas con OsO_4 y $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y utilizando NMO como cooxidante. En el primer caso, se consiguió identificar la formación de un diol tras 3 días de reacción aunque con un rendimiento muy pobre (16%). Las pruebas realizadas con $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no permitieron identificar la formación de ningún diol y se recuperó el producto de partida intacto. Estos resultados no fueron sorprendentes ya que la molécula está muy impedida estéricamente por ambas caras debido a la presencia del carbamato cíclico y de la ftalimida.



Se prosiguió la exploración ensayando la dihidroxilación de **129**. La dihidroxilación con $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / NMO (tabla 5, entrada 1) permitió obtener una mezcla de diastereómeros con un ratio 4:1 fácilmente separables por cromatografía. A continuación se exploraron las condiciones de Sharpless. Como se ha observado en ejemplos presentados en el capítulo anterior, a menudo, la aplicación de las condiciones de Sharpless sobre sustratos quirales puede mejorar tanto las relaciones diastereoméricas como los rendimientos. En el caso que el ligando dirija la dihidroxilación en el mismo sentido que el sustrato estaremos ante lo que se conoce como un proceso “*matched*”. En caso contrario hablaremos de “*miss-matched*”. En primer lugar, se ensayaron las condiciones de Sharpless con ligandos de primera generación^[33] (tabla 5, entradas 2 y 3). Se observó que las reacciones procedían muy lentamente y que además las relaciones diastereoméricas eran menores que con las condiciones clásicas. Existen otros ligandos de Sharpless como las formas IND^[34], DPP^[35] y AQN^[36], siendo estos últimos los que han demostrado obtener mejores excesos enantioméricos sobre olefinas *cis* cíclicas. La aplicación de estos últimos (tabla 5, entradas 4 y 5) resultaron en unos valores muy similares a los obtenidos con los Phal. De nuevo las reacciones eran extremadamente lentas y las relaciones diastereoméricas no mejoraban las obtenidas con anterioridad.

Tabla 5. Dihidroxilaciones sobre **129**

Entrada	Condiciones	t / d	Tipo proceso	r.d.(132:133) ^a	Rdto (132) / %
1	$\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NMO	1	-	4 : 1	53
2	SAD con $(\text{DHQ})_2\text{Pyr}$ ^b	2	<i>matched</i>	2,5 : 1	n.d.
3	SAD con $(\text{DHQD})_2\text{Phal}$ ^b	2	<i>miss-matched</i>	1 : 2	n.d.
4	SAD con $(\text{DHQ})_2\text{AQN}$ ^b	7	<i>matched</i>	2 : 1	25
5	SAD con $(\text{DHQD})_2\text{AQN}$ ^b	7	<i>miss-matched</i>	1 : 2,3	31

Notas. a) r.d. determinada por ^1H -RMN.

b) Condiciones Sharpless: Ligando (1%), $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1%), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (3 eq), K_2CO_3 3eq), $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ (1 eq), $^t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1, ta

En este caso la disposición de las señales de **132** y **133** no permitió analizar su estereoquímica por experimentos de NOESY. Sin embargo, si se consiguieron obtener cristales de ambos productos y, mediante difracción de rayos X, se pudo determinar su estereoquímica. Como se puede observar en las figura 6, el diastereómero mayoritario **132** se corresponde con la configuración *alo* mientras que el minoritario **133** es *galacto*. Este resultado coincidía con lo inicialmente previsto.

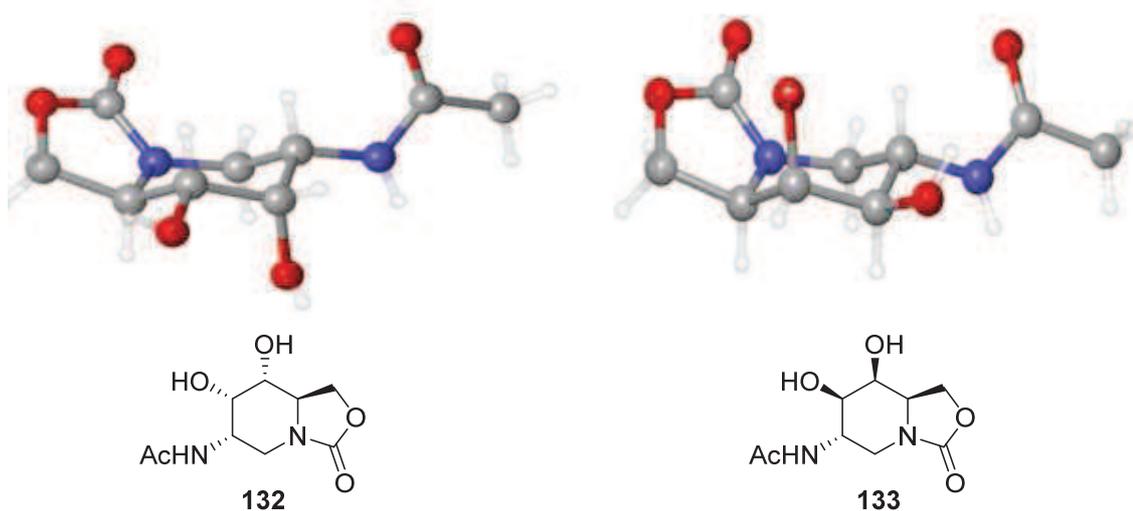
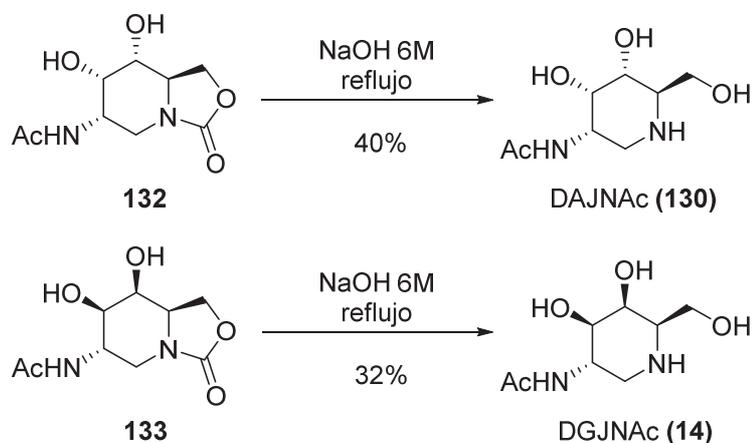


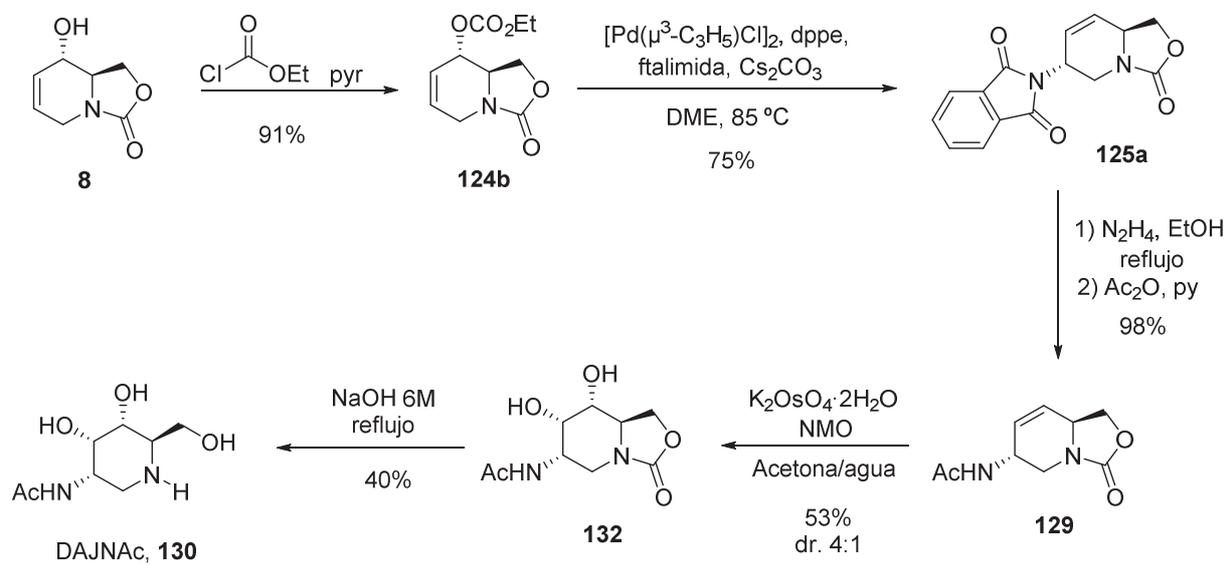
Figura 6. Estructuras de Rayos X de **132** y **133**

4.4.1.2. Obtención de 2-acetamido-1,2-didesoxialonjirimicina (DAJNAc, **130**)

Una vez obtenidos los productos **132** y **133**, el último paso de síntesis para obtener los productos finales consistía en la hidrólisis del carbamato cíclico. Así pues se trataron ambos productos con NaOH 6M a reflujo overnight y se aislaron el nuevo DAJNAc (**130**) con un rendimiento del 40% y el ya conocido DGJNAc (**14**)^[37,38] con un 32%. Las condiciones drásticas de desprotección junto con la elevada polaridad de los productos finales que dificultó extraordinariamente su purificación por lo que los rendimientos de esta última etapa fueran pobres. En cualquier caso, se consiguió obtener satisfactoriamente **130** con un 14% de rendimiento global en 5 pasos sintéticos.



4.4.1.3. Resumen de la síntesis de DAJNAc (130) vía intermedio bicíclico (vía 1)



5 etapas (vía 1) \longrightarrow 14% Rdto global

4.4.2. Aproximaciones sintéticas a DAJNAc (**130**) vía intermedios monocíclicos (vía 2)

4.4.2.1. Hipótesis de la dihidroxilación en sustratos monocíclicos

Una vez sintetizado e identificado por primera vez DAJNAc (**130**), nos planteamos explorar la dihidroxilación de sustratos monocíclicos de acuerdo al esquema retrosintético de la figura 5. En el caso de la vía 1 se había observado una selectividad hacia la dihidroxilación *syn* a la acetamida debido al impedimento estérico que aporta el anillo de 2-oxazolidona. Por el contrario, la vía 2 era *a priori* más difícil de preveer.

Con la intención de tener una referencia de cómo podría ser la diastereoselectividad de la dihidroxilación se realizaron cálculos computacionales de **129** y se compararon con una molécula tipo donde la amina endocíclica estuviera protegida con un grupo Boc y el hidroxilo primario con un acetato (**137b**). Los resultados obtenidos (figura 7) mostraron que en el compuesto **129** el anillo piperídínico tenía una conformación de sofá con la oxazolidinona en posición *pseudo*-axial generando un impedimento estérico que favorece la dihidroxilación *syn* a la acetamida mientras que está se sitúa en una posición *pseudo*-ecuatorial generando menos impedimento. En el caso de **137b**, se observó que la acetamida era capaz de generar un puente de hidrógeno con el carbamato de la amina endocíclica (distancia 2.1 Å) que fuerza la conformación del anillo hacia bote torcido. Como consecuencia la acetamida se sitúa en posición *pseudo*-axial y el sustituyente en C6 cobra mayor importancia ya que actúa dando un impedimento estérico mayor que el que aportaba el anillo de 2-oxazolidona. Por lo tanto, dicho análisis nos planteó la dihidroxilación podría ser más diastereoselectiva que en el caso de la vía 1.

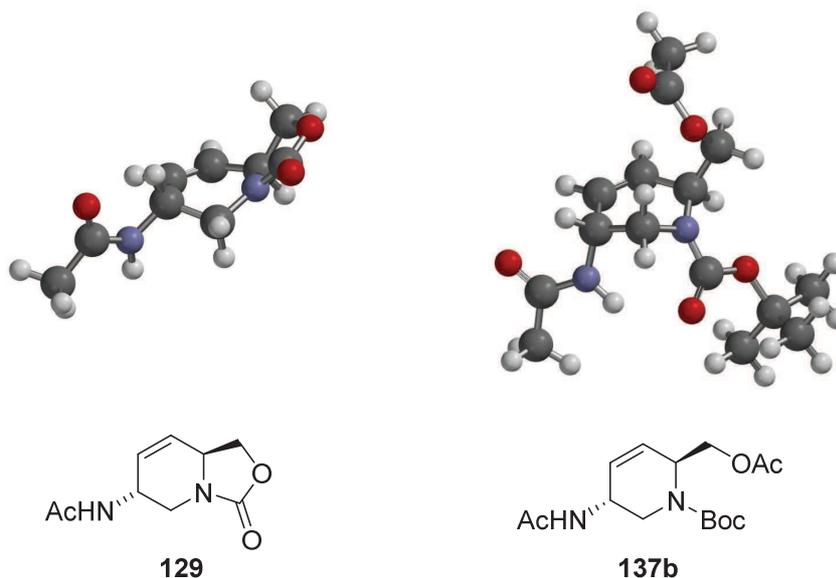
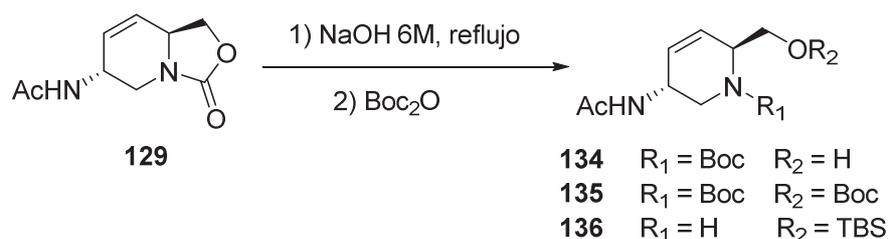


Figura 7. Cálculos computacionales DFT RB3LYP 6-31G**

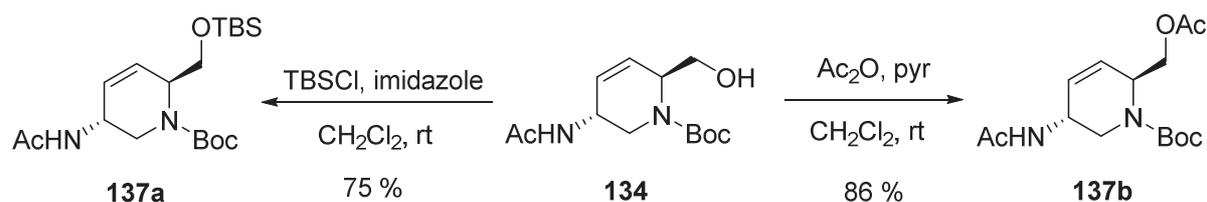
4.4.2.2. Síntesis de sustratos monocíclicos

Para obtener productos monocíclicos donde ensayar las reacciones de dihidroxilación, se debía empezar por hidrolizar el carbamato cíclico mediante tratamiento básico y proteger la amina endocíclica y el alcohol primario. Se escogió proteger selectivamente la amina con un grupo Boc ya que en anteriores ocasiones había dado buenos resultados. Inicialmente se planteó utilizar una mezcla de THF y agua, para conseguir condiciones de reacción homogéneas, a temperatura ambiente. Sorprendentemente, con estas condiciones, se observó la formación no sólo de **134** sino también de **135** (tabla 6, entrada 1). Se planteó trabajar a 0°C para intentar minimizar la formación de **135** sin éxito. Ante la elevada reactividad de ambas funcionalidades alcohol y amina se plantearon dos posibilidades: a) proteger el alcohol primario de forma selectiva utilizando un silil éter; b) realizar pruebas usando sistemas bifásicos con agua y acetato de etilo esperando minimizar la formación de **135**. En el primer caso, aunque se ensayaron condiciones con TBSCl/imidazol y TBSOTf/2,6-lutidina, no se consiguió identificar la formación de **136**. En cambio, las pruebas con sistemas bifásicos permitieron evitar la formación de **135** (entradas 3 y 4). Una vez eliminada la formación del subproducto se forzaron las condiciones trabajando a reflujo y con más equivalentes de Boc₂O para conseguir obtener el producto **134** con buenos rendimientos (entrada 4).

Tabla 6. Hidrólisis y protección del carbamato **129**

Entrada	Disolvente	Eq Boc ₂ O	T / °C	Productos	Rdto (134) / %
1	THF : NaHCO ₃ aq 1:1	1,5	rt	134 + 135	52
2	THF : NaHCO ₃ aq 1:1	1,1	0	134 + 135	n.d.
3	EtOAc : NaHCO ₃ aq 1:1	1,1	rt	134	27
4	EtOAc : NaHCO ₃ aq 3:1	2,2	Reflujo	134	80

La elevada polaridad de **134** desaconsejaba la exploración de las dihidroxilaciones con él, ya que los correspondientes trioles que se obtuvieran serían presumiblemente productos muy polares de difícil purificación. Por ello, se protegió el alcohol primario utilizando un grupo TBS y un acetato. En ambos casos se obtuvieron los productos deseados con rendimientos excelentes aplicando las condiciones clásicas de protección para cada caso.



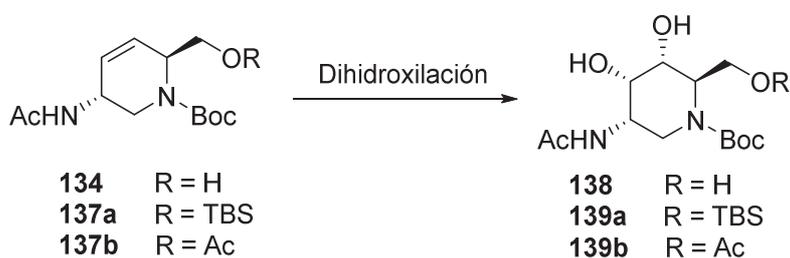
4.4.2.3. Exploración de las reacciones de dihidroxilación

En primer lugar, se realizaron pruebas con **134** en condiciones no asimétricas utilizando $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (tabla 7, entrada 1) obteniendo una mezcla 7:1 de dioles. Lamentablemente el aislamiento del triol obtenido fue difícil de realizar debido a su elevada polaridad, tal y como se había previsto anteriormente, logrando rendimientos inferiores al 50%.

A continuación, se trabajó sobre el sustrato **137a** ensayando las condiciones clásicas utilizando OsO_4 y $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (tabla 7, entradas 2 y 3) y se observó que los tiempos de reacción eran largos y los rendimientos poco robustos y reproducibles. Sin embargo, las relaciones diastereoméricas eran sorprendentemente elevadas observándose por $^1\text{HRMN}$ un único producto. Se decidió explorar también las condiciones de Sharpless (tabla 7, entradas 4 a 7) del mismo modo que se había realizado con **129**. Para los catalizadores de primera generación, independientemente del ligando quiral, se observó que la diastereoselectividad de la reacción era muy alta. El mismo patrón se repitió para los catalizadores de cuarta generación, si bien en este caso la relación bajó ligeramente para el proceso *miss-matched*. En cualquier caso, las condiciones de Sharpless tampoco mejoraban los resultados previos ya que los rendimientos eran más bajos para los mismos tiempos de reacción. Además, se podía observar que la diastereoselectividad del proceso venía dada sobre todo por la quiralidad del producto de partida y no por el ligando.

Aunque los resultados obtenidos eran satisfactorios, las reacciones eran poco robustas y la estabilidad de los dioles no era muy elevada. Se planteó ensayar las dihidroxilaciones sobre **137b** como alternativa. Aplicando las condiciones clásicas (tabla 7, entrada 8), se observó un rendimiento elevado con tiempos de reacción menores y dando lugar a un producto más estable. La reacción también resultó ser mucho más reproducible. Por lo que refiere a la relación diastereomérica se obtuvo un valor de 11 : 1 que, aunque era peor que lo obtenido con **137a**, seguía siendo excelente. Se decidió ensayar las condiciones de Sharpless con el ligando *matched* (tabla 7, entrada 9) y se observó un incremento del r.d. pero con un descenso del rendimiento. Se decidió seguir adelante con las condiciones clásicas sobre **137b**, ya que la reacción era reproducible, con tiempos de reacción cortos y elevados rendimientos y r.d.

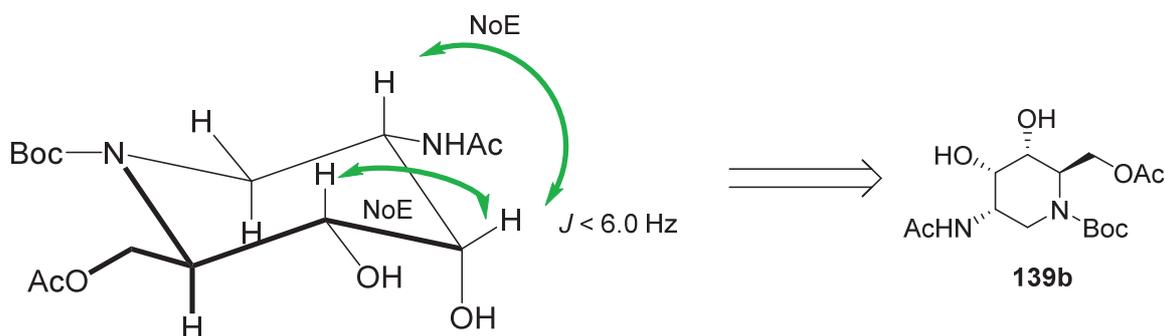
Tabla 7. Dihidroxiaciones compuestos monocíclicos



Entrada	Sustrato	Condiciones	t / d	Tipo proceso	r.d. ^a	Rdto / % ^b
1	134	K ₂ OsO ₄ ·2H ₂ O, NMO	1	-	7 : 1	50
2	137a	OsO ₄ , NMO	2,5	-	> 95 : 5	65
3	137a	K ₂ OsO ₄ ·2H ₂ O, NMO	2,5	-	> 95 : 5	74
4	137a	SAD con (DHQ) ₂ Pyr ^c	2	<i>miss-matched</i>	> 95 : 5	56
5	137a	SAD con (DHQD) ₂ Phal ^d	4	<i>matched</i>	> 95 : 5	79
6	137a	SAD con (DHQ) ₂ AQN ^c	2	<i>miss-matched</i>	8 : 1	46
7	137a	SAD con (DHQD) ₂ AQN ^d	2	<i>matched</i>	> 95 : 5	48
8	137b	K ₂ OsO ₄ ·2H ₂ O, NMO	1	-	11 : 1	90
9	137b	SAD con (DHQD) ₂ Phal ^d	1	<i>matched</i>	17 : 1	51

Notas. a) r.d. determinada por ¹H-RMN.
 b) rdto correspondiente al diastereómero mayoritario
 c) Condiciones Sharpless 1^a generación: Ligando (1%), K₂OsO₄·2H₂O (1%), K₃[Fe(CN)₆] (3 eq), K₂CO₃ 3eq), CH₃SO₂NH₂ (1 eq), ^tBuOH:H₂O 1:1, ta
 d) Condiciones Sharpless 4^a generación: Ligando (1%) , K₂OsO₄·2H₂O (1%), K₃[Fe(CN)₆] (3 eq), K₂CO₃ 3eq), CH₃SO₂NH₂ (1 eq), ACN:H₂O 1:1, ta

Para la determinación de la estereoquímica del diol mayoritario se analizó **139b** mediante experimentos de NOESY. En este caso, no se pudieron realizar experimentos en 2D ya que la elevada intensidad de las señales del grupo Boc y el TBS no permitía observar con claridad las señales del resto de protones de la molécula. Como alternativa, se realizaron experimentos de 1D-NOESY irradiando H3 y se observaron NOE positivos con H4 y H2. El análisis de las constantes de acoplamiento tampoco se pudo realizar completo debido a la mala resolución del espectro. Sin embargo, las constantes de acoplamiento de H3 eran inferiores a 6Hz descartando un posible acoplamiento *axial-axial* y sugiriendo la posición del diol en *anti* a la acetamida. La combinación de ambos análisis permitió determinar que la estereoquímica plausible para el diol mayoritario obtenido era *alo* (figura 8). Se intentó confirmar el resultado y obtener una estructura de rayos X de **139b** pero finalmente no fue posible.

Figura 8. Determinación estereoquímica **139b**

4.4.2.4. Efectos de la acetamida en la dihidroxilación

La elevada diastereoselectividad observada en la dihidroxilación de los compuestos monocíclicos coincidía con la hipótesis de trabajo inicial realizada con los cálculos computacionales. Además, se pudo comprobar cómo según el tamaño del grupo protector en C6 la dihidroxilación era más o menos dirigida. Así, el alcohol libre daba lugar a una relación 7:1, mientras que la presencia de una acetato o un TBS generaba relaciones 11:1 o >95:5 respectivamente. Por lo tanto, se pudo comprobar como en ambas rutas se obtenía preferentemente el compuesto en configuración *alo* (figura 9).

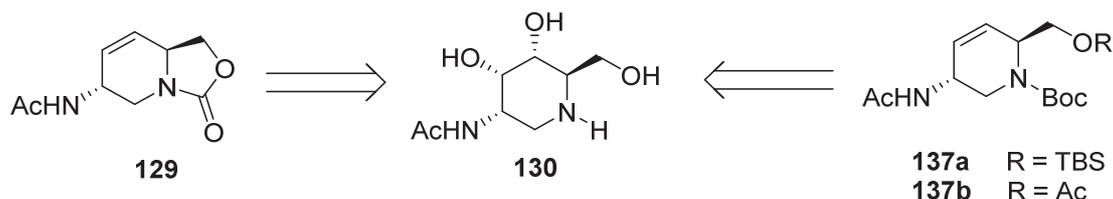
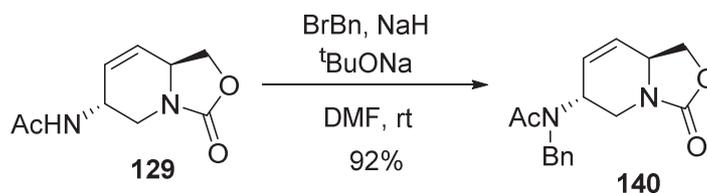


Figura 9. Diastereoselectividad en reacciones de dihidroxilación

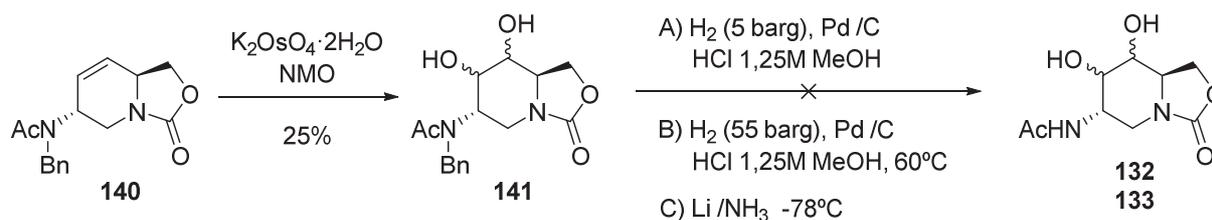
Ante ello, nos planteamos si era posible que no sólo fuera la conformación de los compuestos lo que dirigía la dihidroxilación sino también que la acetamida tuviera una cierta función coordinante con el osmio ayudando a dirigirla. En este contexto, es conocido que grupos dadores de puente de hidrógeno como alcoholes y amidas en posiciones alílicas^[39-41] o homoalílicas^[42,43] son capaces de coordinarse con el osmio en las dihidroxilaciones actuando como grupos directores. Este fenómeno se ha aprovechado en la síntesis de diversos compuestos.^[44,45] Además, se ha demostrado que en el caso de eliminar esta capacidad de coordinación mediante funcionalización del alcohol o la amida la relación *syn:anti* de la dihidroxilación varía considerablemente hasta poder incluso invertirse según el sustrato y se ha observado que la cinética de la reacción acostumbra a ser mucho más lenta.^[46]

En consecuencia, se planteó la posibilidad de explorar las reacciones de dihidroxilación sobre un compuesto en el que la acetamida estuviera modificada como *N*-alquil acetamida. De este modo, al perder la acetamida su capacidad de coordinación, se debería observar una pérdida en la reactividad y la diastereoselectividad de la reacción.

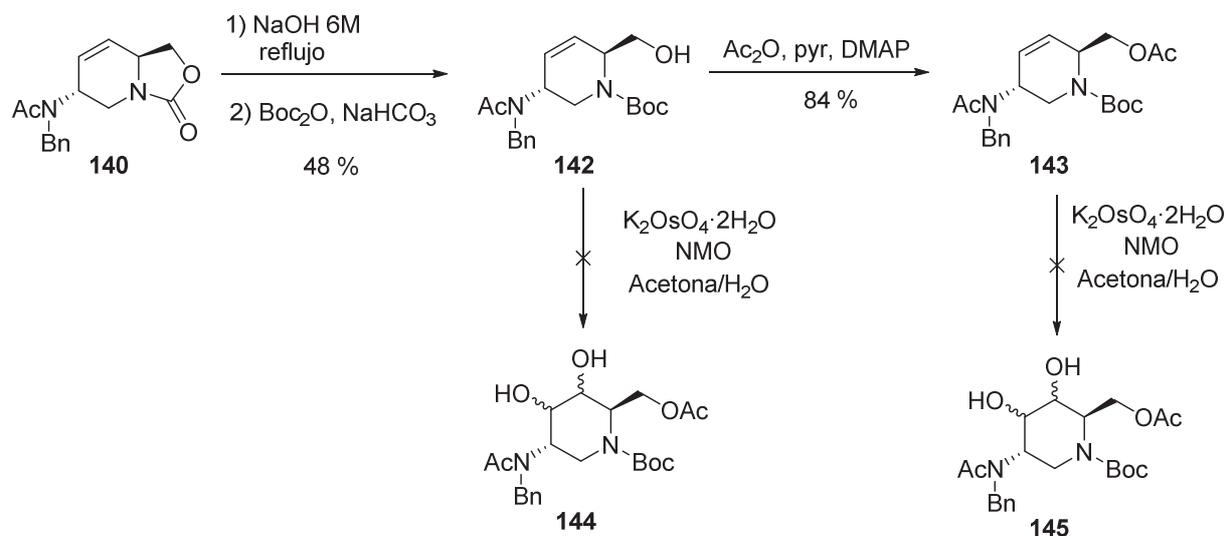
Se decidió escoger un grupo que pudiera ser eliminado en etapas posteriores para recuperar la acetamida libre. Con esta idea se ensayaron varias opciones utilizando grupos Boc, Bz y Bn sobre los intermedios **129** y **137a**. En el caso de **137a** se realizaron varias pruebas para introducir este tipo de grupos sin éxito. En el caso de **129** sólo se consiguió introducir un *N*-bencilo aunque con excelente rendimiento.



A continuación se realizó la reacción de dihidroxilación de **140** con $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{NMO}$. La reacción presentó un avance muy lento y tras 3 días se detuvo y se aisló **141** con un 25 % de rendimiento como una mezcla de diastereómeros cuya relación no pudo ser determinada ni por $^1\text{HRMN}$ ni por HPLC-MS. Se planteó pues desproteger el bencilo para poder determinarla por comparación con los productos obtenidos en anteriores etapas. Aunque se ensayaron hidrogenaciones a presiones elevadas (55 barg) y reducciones con Li/NH_3 no se consiguió identificar la formación de los productos deseados.



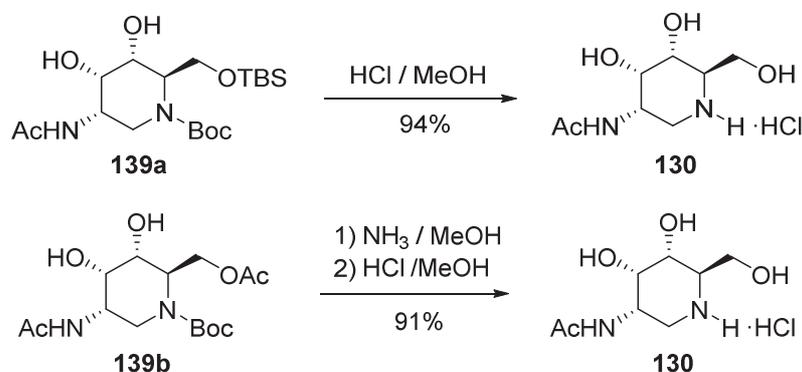
Ante la baja reactividad de la olefina **140** se decidió intentar la dihidroxilación de compuestos monocíclicos con una *N*-bencilacetamida. De forma paralela a lo realizado anteriormente, se hidrolizó el carbamato cíclico de **140** y se protegió la amina endocíclica con un grupo Boc dando lugar a **142**. A continuación, se protegió el alcohol primario con un acetato para generar **143**, producto análogo a **137b** pero con la acetamida “protegida”. Llegados a este punto se ensayó la dihidroxilación tanto sobre **142** como sobre **143**. Aunque se realizaron ensayos con 10%, 30% y cantidades equimolares de $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en ningún caso se observó la formación de los correspondientes dioles.



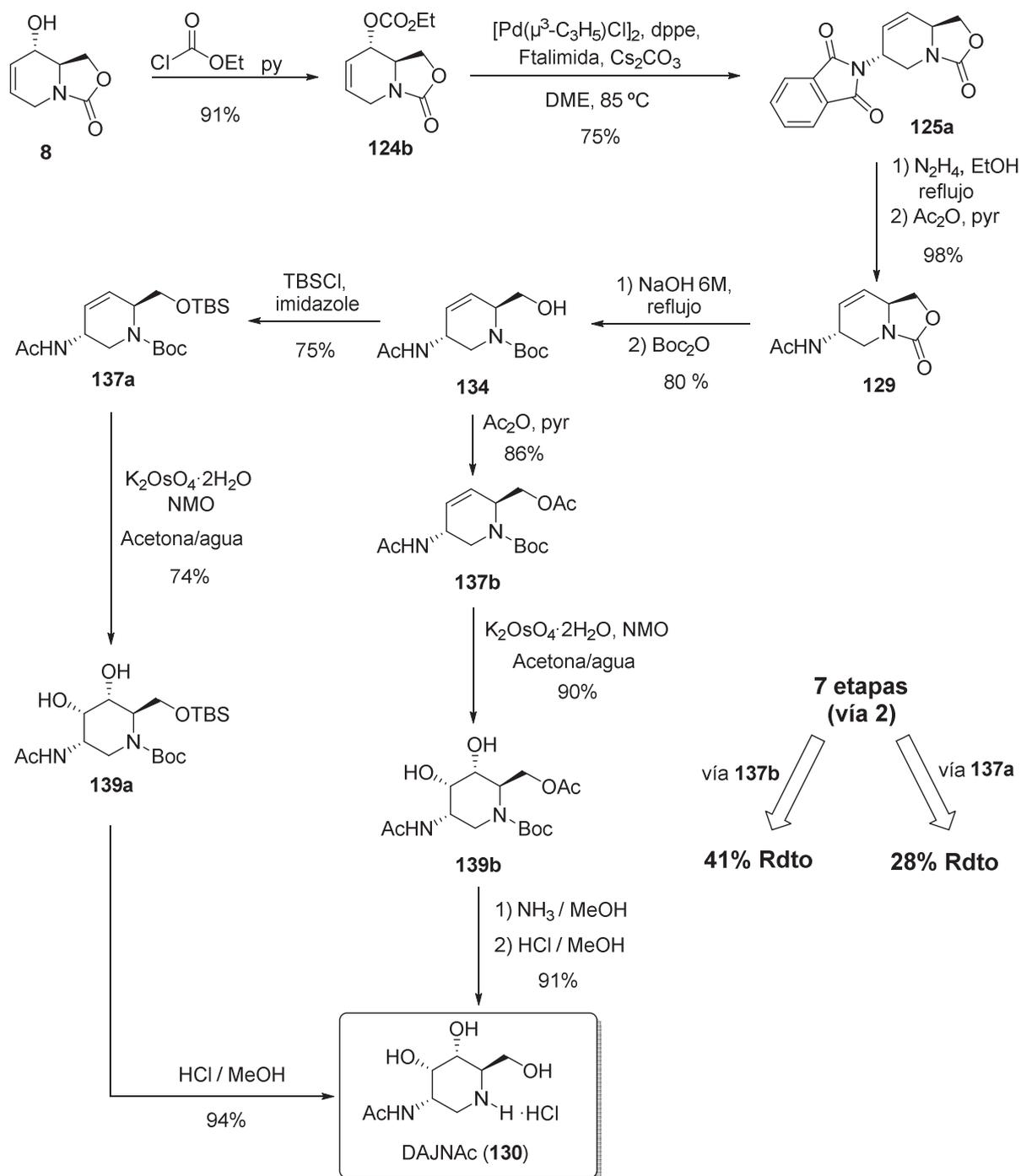
En resumen, se puede observar que sustratos con un grupo NHAc dihidroxilan fácilmente con buenas relaciones diastereoméricas independientemente de si son monocíclicos (**137a/b**) o bicíclicos (**129**). En el caso de sustratos monocíclicos, el NHAc provoca efectos conformacionales que ayudan a mejorar la diastereoselectividad de la reacción. En cambio, sustratos con una *N*-alquil acetamida tanto monocíclicos (**142** y **143**) como bicíclicos (**140**) presentan una falta de reactividad parcial o total en las reacciones de dihidroxilación. Esta falta de reactividad también se observa en compuestos como **125a** o análogos con aminas cíclicas en C2 (trabajo previo desarrollado en el grupo de investigación). Por lo tanto, se puede determinar que la presencia de un grupo dador de puente de hidrógeno como la acetamida es clave para la reacción de dihidroxilación probablemente por su efecto coordinante con el catalizador.

4.4.2.5. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc, **130**)

Con la estereoquímica del diol mayoritario **139b** determinada, el siguiente paso consistía en la desprotección de los grupos protectores de la amina endocíclica y el alcohol primario para llegar a la DAJNAc (**130**). Con esta idea se desprotegeron **139a** y **139b** con excelentes rendimientos confirmando en ambos casos su obtención por comparación con el producto obtenido por la vía 1. De este modo se había desarrollado una vía alternativa para la obtención de DAJNAc con un rendimiento global del 41% en 7 etapas sintéticas.



4.4.2.6. Resumen de la síntesis de DAJNAc vía intermedios monocíclicos (vía 2)

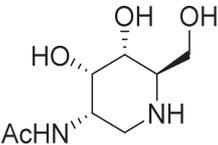
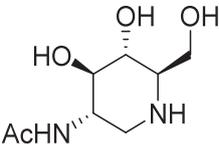
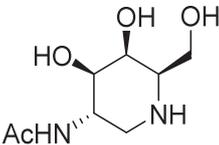


4.4.3. Estudios de inhibición de DAJNAc (**130**) frente a glicosidasas

En la literatura existen precedentes de familias de iminoazúcares con configuraciones estereoquímicas distintas que siguen siendo activos frente a las mismas u otras glicosidasas que sus estereoisómeros. Dado que la enzima reconoce un tipo de sustrato natural con una configuración determinada no deja de ser sorprendente que sustratos con configuraciones distintas también puedan interactuar con ella y, a menudo, hacerlo con más potencia o especificidad. De hecho es común encontrar trabajos en que se sintetizan varias configuraciones y se testan por separado para determinar cuál es la más activa o específica.

Nuestro nuevo compuesto DAJNAc (**130**) constituía un nuevo diastereómero que añadir a las versiones *gluco* y *galacto* previamente descritas con buenas perspectivas como inhibidor de glicosidasas. Por ello se analizó frente a un panel de glicosidasas comercial para evaluar sus propiedades de inhibición.² En un primer *screening* se ensayó **130** frente a distintas glucosidasas mostrando una elevada selectividad por β -N-acetilglucosaminidasas (ver Anexo 3). En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos con β -N-acetilglucosaminidasas en comparación con los valores descritos para los análogos *gluco* y *galacto*. Como se puede observar los valores de inhibición se sitúan en la misma escala y son ligeramente mejores demostrando que este tipo de enzimas acepta modificaciones en la estereoquímica de los hidroxilos en C3 y C4 y abriendo una puerta para la síntesis de nuevos inhibidores de glicosidasas derivados de DAJNAc.

Tabla 8. Estudio comparativo de los valores de inhibición de DAJNAc (**130**) con DNJNAc (**13**) y DGJNAc (**14**) frente a β -N-acetilglucosaminidasas

$K_i / \mu M$			
<i>Enzima</i>	<i>DAJNAc</i>	<i>DNJNAc</i> ^[37]	<i>DGJNAc</i> ^[37]
β -N-Acetilglucosaminidasa (Human Placenta)	5,6	7,0	8,3
β -N-Acetilglucosaminidasa (Bovine Kidney)	2,6	7,4	4,2
β -N-Acetilglucosaminidasa (Jack Bean)	2,6	2,9	1,8

² Estudios realizados en: a) Instituto de Investigaciones Científicas (IIQ), CSIC, Sevilla, España; b) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España

4.4.4. Estudio de estructura-actividad mediante STD-RMN de DAJNAc (130)

En el campo de la química médica, el análisis de las interacciones entre proteína y inhibidor aporta una gran información sobre su unión y ésta, a su vez, puede aplicarse para el desarrollo sintético de nuevas moléculas. La detección del epítipo de un inhibidor permite sintetizar nuevas moléculas minimizando el número de candidatos a sintetizar y siguiendo un diseño racional de inhibidores. Generalmente este conocimiento se acostumbra a obtener por cristalización conjunta de la proteína con el inhibidor y posterior análisis por difracción en rayos X o mediante estudios computacionales de *docking*. Sin embargo, en los últimos años se han empezado a utilizar también distintas técnicas de RMN para obtener este tipo de información. Concretamente, las técnicas de STD-RMN se han revelado como una técnica muy adecuada para el análisis de la interacción proteína-ligando.

El hecho que los valores de inhibición de las distintas *N*-acetilhexosas se mantenga en el rango bajo micromolar sugiere que la configuración de los hidroxilos en C3 y C4 no es clave para la unión proteína ligando. Para confirmar esta hipótesis nos planteamos usar técnicas de STD-RMN.

4.4.4.1. Introducción al STD-RMN: Definición y aplicaciones

La resonancia magnética nuclear se ha revelado como una técnica útil para el análisis de las interacciones específicas entre receptor y ligando en disolución a través de fuerzas no covalentes. En la última década se han desarrollado experimentos con notable éxito en sistemas de interés biológico. Se pueden considerar de forma genérica dos grandes aproximaciones para el estudio por RMN de estas interacciones:^[47]

- Detección y caracterización de las señales del receptor
- Monitorización de las señales del ligando

En el segundo caso, la espectroscopia por diferencia de transferencia de saturación (STD-NMR por sus siglas en inglés) se ha usado ampliamente. El aumento de su aplicación en el estudio de distintos sistemas así como la evolución de sus metodologías en la última década ha sido exponencial demostrando su aplicabilidad y versatilidad.

El STD es un técnica de RMN que consiste en^[48,49]:

- a) Espectro “*off-resonance*”: realización de un experimento de ¹H-RMN de control para la magnetización de ¹H todas las especies presentes que se realiza mediante irradiación en un desplazamiento lejano a proteína y ligando (generalmente alrededor de 30 ppm).
- b) Espectro “*on-resonance*”: realización de un experimento de ¹H-RMN en el que la proteína es irradiada selectivamente mediante un pulso selectivo generalmente entre 0 y -1 ppm de modo que el ligando no es excitado.
- c) STD: La diferencia entre ambos espectros genera el denominado espectro por diferencia de transferencia de saturación.

En el espectro *on resonance*, la saturación producida en ciertos residuos de la proteína será transferida por toda la red proteica debido al efecto de difusión spin. Por otro lado, todas las moléculas

pequeñas que interactúen específicamente con la proteína tendrán todos o parte de sus protones a distancias muy cortas de los de la proteína. Los protones situados a distancias cortas ($d < 4-5 \text{ \AA}$) recibirán transferencia debido al Efecto Nuclear Overhauser (NOE). Así, en caso que la cinética de la unión proteína-ligando sea suficientemente rápida, la moléculas de ligando que reciban dicho NOE se acumularán en disolución. Dado que el NOE intermolecular es de signo negativo, se producirá una reducción en la señales de los protones que lo reciban. Por lo tanto, la diferencia entre ambos espectros revelará aquellos protones que hayan recibido NOE observándose los NOE intermoleculares entre proteína y ligando. En otras palabras, la diferencia entre *on* y *off-resonance* cancela todas aquellas señales pertenecientes a moléculas que no se asocian con la proteína.

La población de ligando excitado dependerá no sólo de la cinética de la unión sino también de otros factores entre los que destaca el tiempo de saturación. Para solucionar este problema se acostumbra a realizar experimentos a distintos tiempos de saturación y se aplica posteriormente un factor corrector.

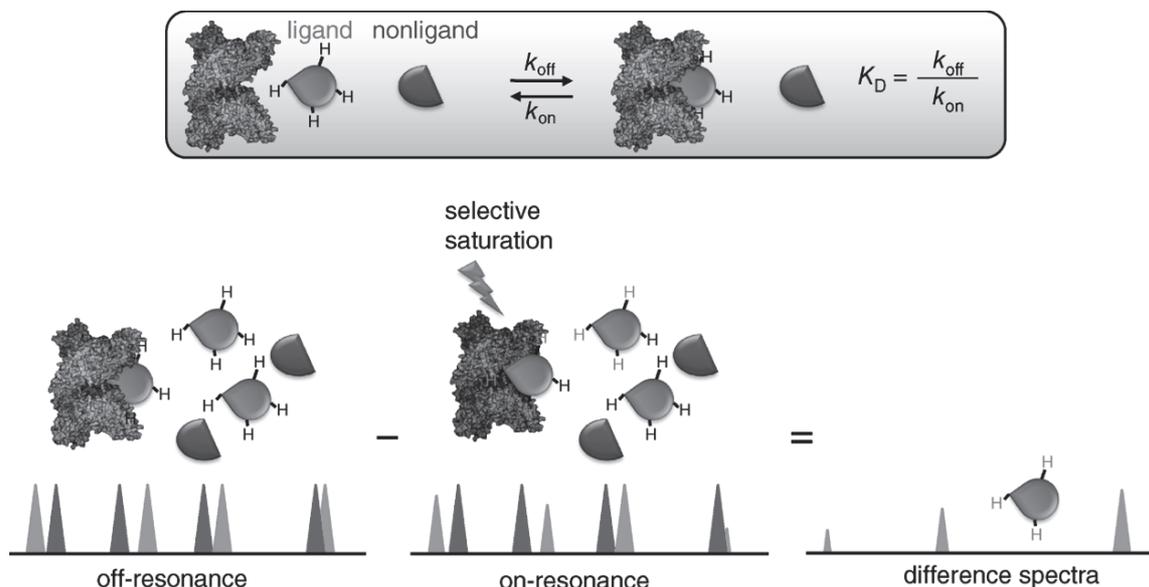


Figura 10. Representación esquemática de un espectro de STD ^[50]

Las principales ventajas del STD respecto otras técnicas para el estudio de las interacciones proteína-ligando son: a) se requieren cantidades pequeñas de proteína (μM) y ligando (mM); b) no se requieren productos marcados isotópicamente; c) no se requiere conocer la estructura de la proteína; d) se puede aplicar a un margen amplio de K_D . En contrapartida las desventajas más comunes son: a) la calibración y optimización del experimento puede ser dificultosa según el caso; b) se necesita solubilidad total de los compuestos. ^[51]

Existen diversas aplicaciones del STD entre las que destacan el cribado de ligandos ^[52] y la detección del mapa del epítipo (*Group Epitope Mapping*, GEM). El GEM se basa en la detección de aquellos protones más cercanos al receptor. Como se ha comentado anteriormente, el ligando que

interacciona específicamente con el receptor recibirá efecto NOE. La intensidad de señal de los protones del ligando será más intensa cuando más cercanos estén a la proteína. De este modo, mediante un experimento de STD, se puede reconocer que partes de la molécula interactúan con la proteína e incluso se puede cuantificar en qué grado lo hacen. Para ello se normaliza la señal más intensa y se recalcula la integral del resto en función de ella. En la literatura se hallan distintos ejemplos de STD para la detección del epítipo en sustratos glicosídicos^[53-55], péptidos^[56] y azúcares^[57].

4.4.4.2. Experimentos de STD-RMN con DAJNAc (130)

Las constantes de inhibición de los compuestos DNJNAc (**13**), DGJNAc (**14**) y DAJNAc (**130**) con respecto a β -N-Acetilglucosaminidasas se mantienen en el mismo orden de magnitud. Este hecho sugiere que la influencia de los hidroxilos en C3 y C4 en la interacción con la proteína no es determinante. Por otro lado, los sustratos con ausencia de NHAc (**108**), estereoquímica inversa de la NHAc (DMJNAc, **20**) o presencia de anillo de 2-oxazolidinona (**109**) presentan una pérdida de la actividad. Por ello, nos pareció interesante realizar experimentos de STD-NMR con la intención de hallar el epítipo del sustrato y poder comprobar la importancia de la acetamida y el metileno en C1 en la interacción ligando-proteína.

De acuerdo a los parámetros necesarios para realizar un STD, la DAJNAc presenta una K_i en el margen adecuado y su solubilidad en agua es total. De modo que se disponía de unas características adecuadas para llevar a cabo el experimento. Además los experimentos de Berteau *et al.*^[58], en el que se analiza por STD la interacción entre DMJ (**9**) y α -fucosidasa, constituían un precedente esperanzador para nosotros.

Se realizaron pues los experimentos de STD usando DAJNAc como ligando y β -N-acetilglucosaminidasa (*Jack Bean*) como enzima con relaciones 1:50 y 1:100. Desgraciadamente, en ninguno de los dos casos se observaron señales positivas en el STD. Inicialmente se pensó en la posibilidad de que la proteína hubiera desnaturizado durante el proceso de purificación dada la baja experiencia de nuestro grupo en purificación de proteínas. Se realizaron nuevos experimentos con proteína purificada por otro grupo de investigación³ y tras verificar mediante el ensayo espectrofotométrico de Bradford que no había desnaturización. De nuevo, no se observaron señales de STD.

Ante este resultado, nos planteamos que posiblemente la afinidad de nuestro sustrato era demasiado elevada y, en consecuencia, la población de ligando que recibía el efecto NOE no era suficiente para reflejarse en el STD. Por ello realizamos experimentos utilizando **148b** cuya K_i es de 75 μ M. Sin embargo tampoco se observaron señales positivas de STD.

³ Purificación realizada en Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España

Dado los resultados negativos obtenidos en los análisis de STD, una posible explicación sería que la cinética de la interacción proteína/ligando es muy lenta y que probablemente estos compuestos se comportan como *slow binding inhibitors*.^[59–61]

4.5. Aproximaciones sintéticas a derivados de DAJNAc (130)

Los valores de inhibición obtenidos para la DAJNAc constituían un buen punto de partida para la síntesis de derivados que pudieran mejorar los valores de inhibición. Además las estrategias sintéticas desarrolladas generan intermedios con un gran valor sintético para generar nuevos derivados.

Teniendo en cuenta estudios anteriores se decidió desarrollar derivados que incluyeran tioureas^[62,63] en la amina endocíclica y derivados iminotiazolidínicos^[64–66], ya que se había observado una mejora notable de la actividad en derivados *gluco* y *galacto* de otros iminoazúcares permitiendo realizar estudios para sus uso como chaperonas químicas en algunas enfermedades de depósito lisosomal. Concretamente, se planteó la síntesis de tioureas con restos n-butilo, n-octilo, fenilo y bencilo.



4.5.1. Síntesis de derivados N-tioureicos

La síntesis de derivados se decidió abordar partiendo de **139b**, un compuesto obtenido a través de intermedios monocíclicos (vía 2) que se podía obtener fácilmente y que ya incluía la estereoquímica de toda la molécula así como la 2-acetamida. Se abordó la síntesis de acuerdo al esquema retrosintético de la figura 11.

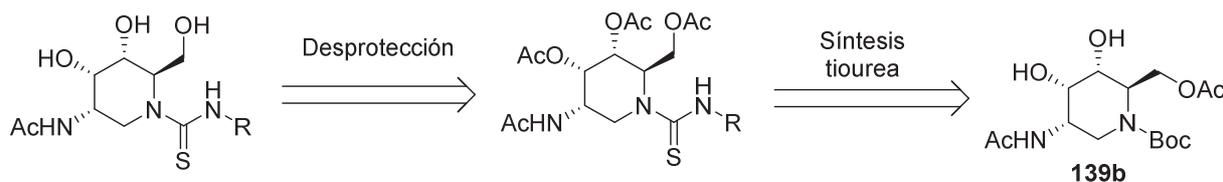
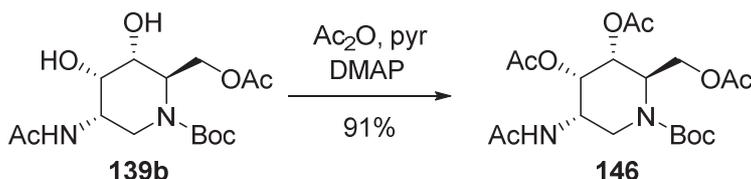
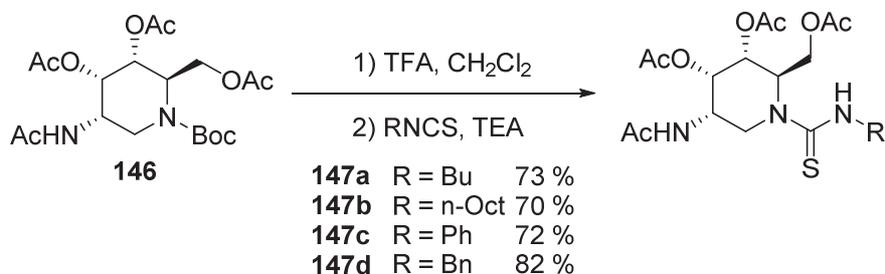


Figura 11. Esquema retrosintético para derivados N-tioureicos

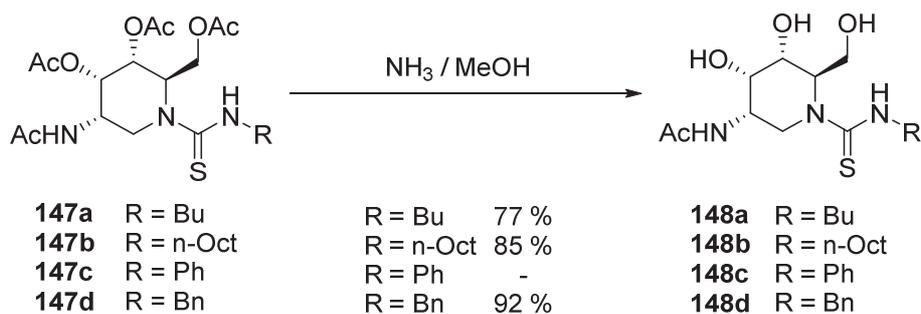
Inicialmente, se protegieron los hidroxilos secundarios de **139b** como acetilos utilizando $\text{Ac}_2\text{O}/\text{TEA}/\text{DMAP}$ y $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pyr}$ obteniendo en ambos casos **146** como un único diastereómero con rendimientos del 86% y 91% respectivamente.



A continuación, se desprotegió selectivamente el grupo Boc mediante tratamiento con TFA en CH_2Cl_2 y se sintetizaron *in situ* las tioureas, sobre la consiguiente amina secundaria, mediante tratamiento con el isotiocianato correspondiente en presencia de TEA a reflujo en CH_2Cl_2 obteniéndose las tioureas **147a-d** con buenos rendimientos en todos los casos.



Para la desprotección de los acetilos de los hidroxilos se trataron los productos **147a-d** con una disolución de metanol saturada de NH_3 y se obtuvieron los derivados **148a**, **148b** y **148d** con buenos rendimientos. Lamentablemente no se consiguió obtener el derivado **148c** debido a la formación de productos secundarios de ciclación intramolecular.



4.5.2. Síntesis de derivados iminotiazolidínicos

La síntesis de los derivados iminotiazolidínicos era más compleja. La mayoría de procedimientos para formar una iminotiazolidina se basan en el ataque intramolecular del tiocarbonilo a C6 donde previamente se ha situado un buen grupo saliente como un tosilato, un mesilato o un triflato^[67,68]. Esto implicaba realizar una cuidadosa química de grupos protectores para introducir selectivamente la tiourea en la amina endocíclica y posteriormente desproteger el acetilo en C6 e introducir el correspondiente tosilato o similar. Así pues se planteó un esquema retrosintético para obtener los derivados iminotiazolidínicos (figura 12).

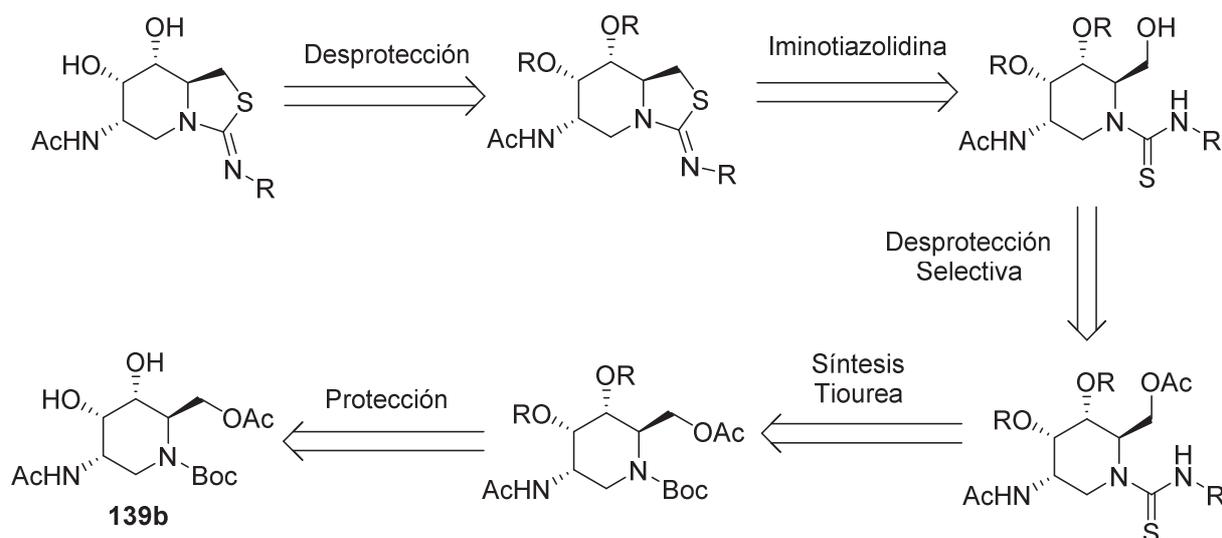
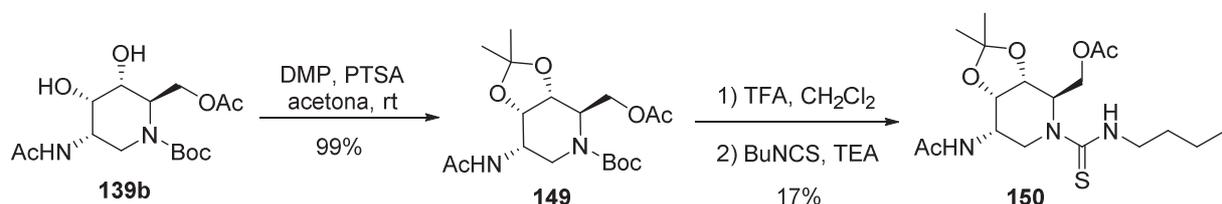


Figura 12. Esquema retrosintético para derivados iminotiazolidínicos

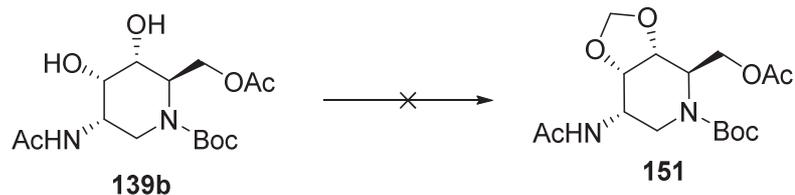
4.5.2.1. Intentos de formación selectiva de tioureas

Para construir la iminotiazolidina, se debía proteger los alcoholes secundarios de **139b** de modo que se pudiera desproteger el Boc selectivamente del resto de grupos funcionales. Además debía tenerse en cuenta que el acetilo primario debería poderse desproteger selectivamente respecto los grupos protectores de los alcoholes secundarios. Por lo tanto la elección no era sencilla.

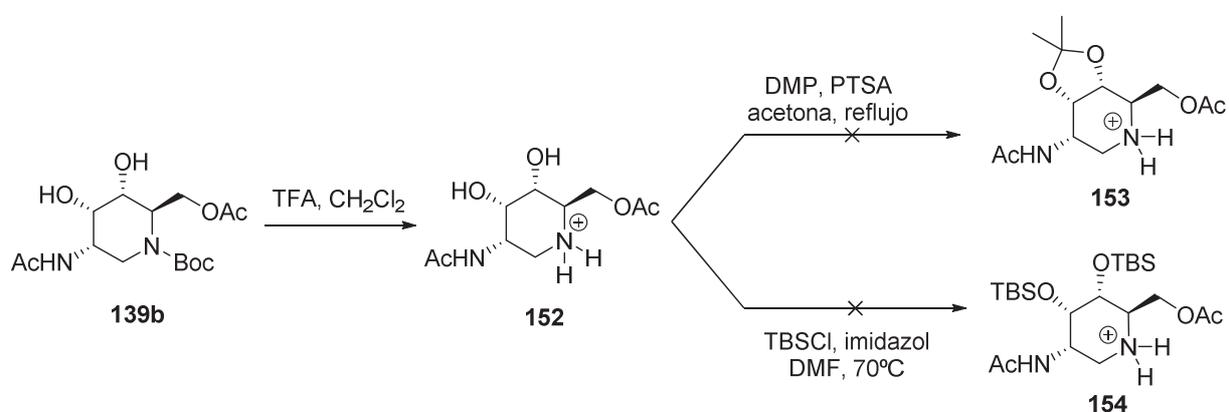
Inicialmente, nos decantamos por el acetal como grupo protector de los hidroxilos secundarios. Se planteó que la desprotección del Boc utilizando TFA en condiciones anhidras debería ser selectiva con respecto al acetal. De acuerdo con ello se trató **139b** con DMP/PTSA en acetona y se obtuvo el acetal **149** de forma cuantitativa. A continuación, se ensayó la desprotección selectiva del Boc con TFA y se trató el producto formado con isotiocianato de butilo para obtener productos más apolares y, por lo tanto, fáciles de aislar. En este caso se identificaron mezclas de productos ya que se producía una desprotección parcial del acetal. Aunque se consiguió aislar **150** con un 17% de rendimiento, la desprotección del Boc no resultó ser lo suficientemente selectiva.



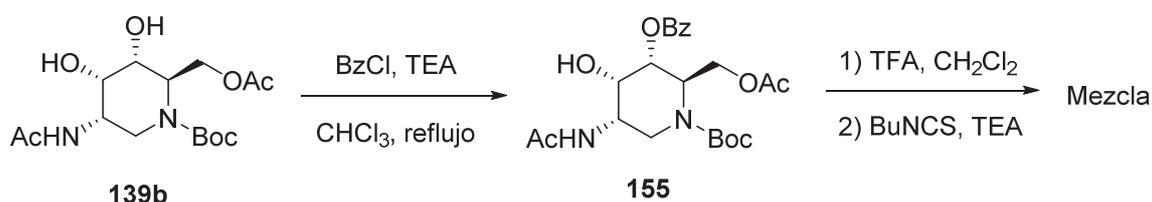
Ante ese resultado nos planteamos utilizar acetales más resistentes al medio ácido y se escogió el metiliden acetal. Se ensayaron varios métodos para obtener este tipo de acetales: a) dimetoximetano/LiBr^[69]; b) TMSOTf, 2,6-lutidine, dimetoximetano^[70]; c) DMSO, POCl₃^[71,72]. Sin embargo, en ningún caso se consiguió obtener el producto **151**.



Debido a las dificultades de desprotección selectiva del Boc, se planteó desproteger directamente el Boc de **139b** e intentar proteger los alcoholes posteriormente. El aminoalcohol **152** resultó ser un producto extraordinariamente polar que no consiguió aislar. Aunque se realizaron las reacciones de protección directamente sobre él, no se consiguió aislar en ningún caso los productos protegidos **153** ni **154**.



Los malos resultados obtenidos aconsejaban variar el rumbo de la aproximación. Así pues nos planteamos proteger los hidroxilos como benzoatos para buscar selectividad en la desprotección del acetilo con respecto a los benzoatos. Se trató **139b** con BzCl/TEA a reflujo pero sólo se consiguió introducir un único Bz, dando lugar a **155**. Probablemente el alcohol en C3 era menos reactivo. Basándonos en esta hipótesis se ensayó la reacción con BuSCN pensando que podría haber selectividad por la amina endocíclica. No obstante, tal selectividad no se observó y tanto el alcohol secundario como la amina reaccionaron por igual con el isotiocianato dando lugar a mezclas de productos.



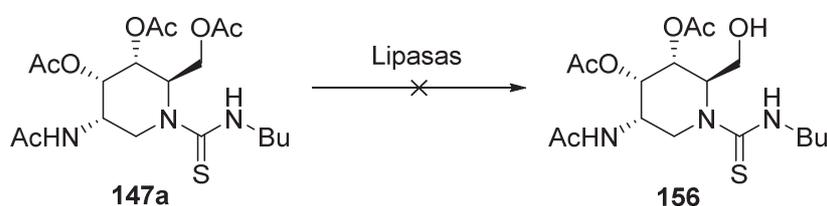
4.5.2.2. Intentos de desprotección selectiva de acetilos primarios con lipasas

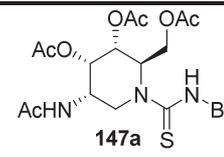
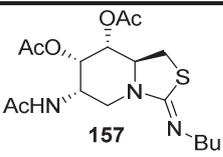
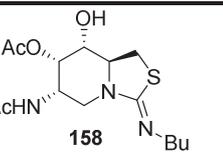
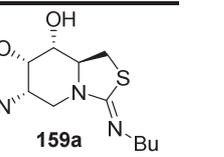
Los resultados obtenidos hasta el momento hacían pensar que las desprotecciones selectivas serían difíciles de realizar. Por lo tanto, se planteó la opción de utilizar desprotecciones enzimáticas cuya eficiencia está altamente contrastada. En este contexto, se pueden hallar en la literatura muchos ejemplos de utilización de lipasas^[73,74] para la desprotección selectiva de acetilos primarios respecto secundarios y de acetilos anoméricos respecto a primarios y secundarios en azúcares^[75]. La gran

variedad de lipasas comerciales junto con el hecho de que su selectividad acostumbra a ser modulable en función del pH, co-disolventes, aditivos y temperatura^[76,77] genera una gran variedad de opciones para conseguir buenos resultados en la desprotección selectiva.

Aunque no se hallaron ejemplos de aplicación de lipasas con iminoazúcares, se planteó que podía ser una buena opción dado que los intermedios **147a-d** se podían obtener con facilidad. Así pues, se realizó un primer *screening* de aplicación de lipasas sobre **147a** y se analizaron los crudos de reacción por HPLC-MS (tabla 9). Si bien los cromatogramas obtenidos eran prácticamente idénticos para todos los casos, sorprendentemente no se observó en ninguno de ellos la formación de **156**. El producto mayoritario resultó ser **157**, un compuesto en el que se había formado la iminotiazolidina. Además, se identificaron como productos minoritarios **158** y **159a**, es decir, productos donde se había formado la iminotiazolidina y además se habían desprotegido los acetilos secundarios total o parcialmente.

Tabla 9. Análisis por HPLC-MS de la desprotección enzimática de hidroxilos primarios



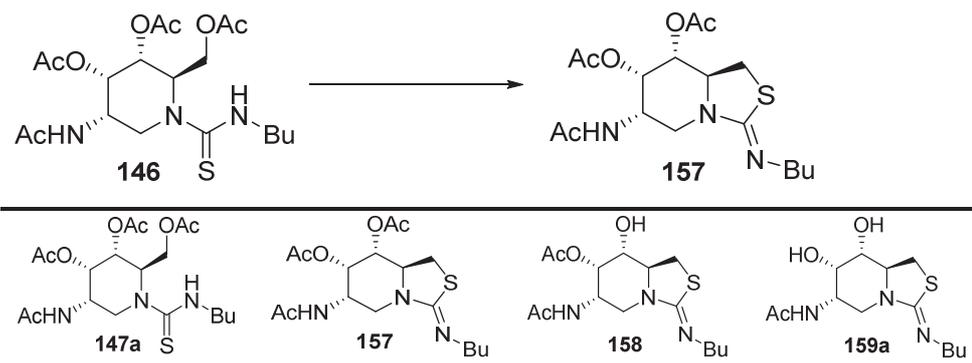
Lipasa				
<i>Candida antarctica</i>	7,7	83,5	6,6	2,1
<i>Candida rugosa</i>	8,9	86,7	4,4	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	7,9	83,3	6,8	2,0
<i>Rhizopus arrhizus</i>	7,4	86,3	6,2	-
<i>Rhizopus niveus</i>	7,5	86,5	6,0	-
<i>Porcine pancreas</i>	7,8	85,2	5,3	1,7
Condiciones.	ACN : tampón fosfato (pH 7.6; 10 mM) 7:3, 40°C, 24h			

La ausencia de formación de **156** sugería que la lipasa no estaba realizando la función prevista sino que más bien se debía estar produciendo un ataque intramolecular del tiocarbonilo a C6, actuando el acetato como grupo saliente, y dando lugar a la formación de la iminotiazolidina. Este ataque se estaría viendo favorecido debido a la aplicación de temperatura y sugería que la presencia de la lipasa no era necesaria. Por ello, se decidió realizar un segundo *screening* en ausencia de lipasas y, simplemente, calentando en presencia de varias mezclas de disolventes.

4. Síntesis de DAJNAc y derivados

Los resultados obtenidos (tabla 10) mostraron que simplemente calentando a 60°C en mezclas de ACN:H₂O o dioxano:H₂O se podía formar con gran selectividad **157**. Si la reacción se realizaba en presencia de MeOH como codisolvente se identificó la formación de **159a** como producto mayoritario. La desprotección de los acetilos se podría explicar por una reacción de transesterificación debido al gran exceso de MeOH y a la aplicación de temperatura. Así pues la obtención de **159a** se produce por un mecanismo como el presentado en la figura 13.

Tabla 10. Formación de iminotiazolidinas



Disolventes	147a	157	158	159a
ACN : H ₂ O 1 : 1	3,9	94,1	2	-
dioxano : H ₂ O 1 : 1	3,7	94,7	1,6	-
MeOH : H ₂ O 1 : 1	1,5	2	2	94,5

Condiciones. T = 60°C; t = 24h

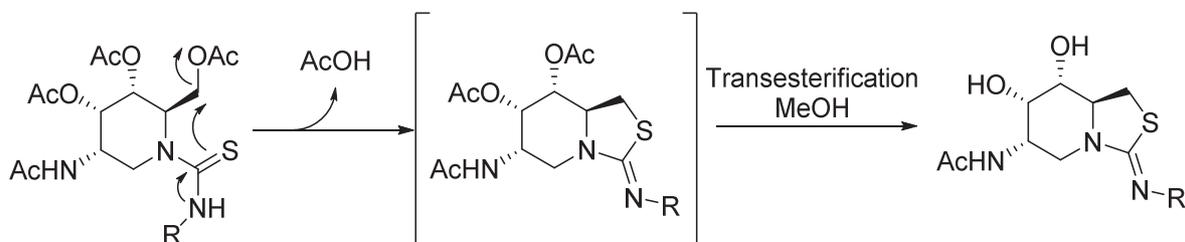
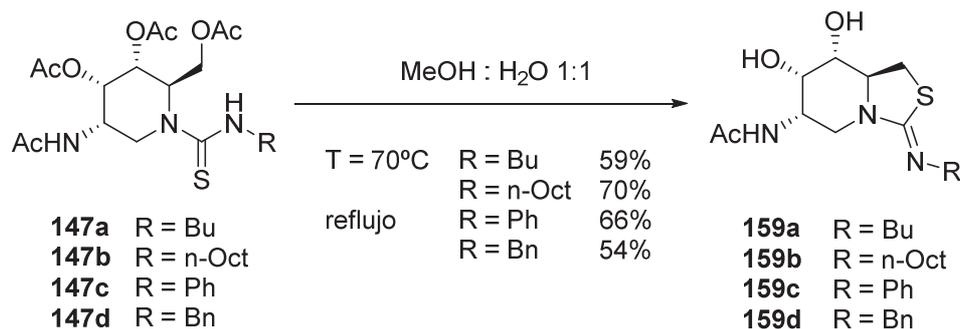


Figura 13. Mecanismo para la formación de iminotiazolidinas

Este resultado era sorprendente y permitía obtener el producto final deseado en un solo paso sintético utilizando simplemente mezclas de agua y MeOH reduciendo considerablemente el número de etapas y la dificultad sintética planteada inicialmente. Para comprobar la robustez del proceso se decidió aplicar las condiciones halladas con los sustratos **147a-d** y se pudieron aislar con buenos rendimientos las iminotiazolidinas **159a-d**. Cabe destacar que para las tioureas aromáticas fue necesario calentar a reflujo para poder desproteger los acetilos secundarios ya que las reacciones a 60°C sólo produjeron intermedios análogos a **157**.



4.5.3. Estudios de inhibición de tioureas y iminotiazolidinas frente a glicosidasas

Una vez obtenidos los distintos productos deseados, se realizaron los análisis de inhibición frente al panel comercial de glicosidasas⁴ (tabla 11, anexo 3). Los derivados **148a-d** presentaron una pérdida de actividad frente a β -*N*-acetilglucosaminidasas con respecto a DAJNac, especialmente marcada en el caso de las ureas alquílicas. Además, también se observó una pérdida de selectividad ya que presentaron una actividad modesta frente a β -glucosidasa (bovine liver) y β -galactosidasa (bovine liver).

En cambio, los resultados obtenidos con las iminotiazolidinas **159a-d** fueron mucho más satisfactorios (tabla 12, anexo 3). Las iminotiazolidinas butílica (**159a**) y fenílica (**159c**) mostraron unos valores de inhibición frente a β -*N*-acetilglucosaminidasas ligeramente peores que la DAJNac. En cambio, la iminotiazolidina benzílica **159d** se mantuvo en el mismo orden de magnitud y para la octílica **159b** se obtuvieron valores de inhibición submicromolares. La selectividad de las iminotiazolidinas también fue bastante elevada mostrando únicamente una modesta respuesta frente a β -galactosidasa (bovine liver).

Los resultados obtenidos para estos compuestos se aplicarán en el desarrollo de un estudio estructura-actividad con compuestos análogos pero en configuraciones *gluco* y *galacto*. Se ha observado que entre las tres configuraciones las iminotiazolidinas *galacto* llegan a presentar valores de inhibición en la decena nanomolar convirtiéndolos en los inhibidores con mayor potencia de la serie.⁵

⁴ Estudios realizados en: a) Instituto de Investigaciones Científicas (IIQ), CSIC, Sevilla, España; b) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España

⁵ Resultados pendientes de publicación

4. Síntesis de DAJNAc y derivados

Tabla 11. Valores de inhibición de derivados tioureicos frente a β -N-acetilglucosaminidasas

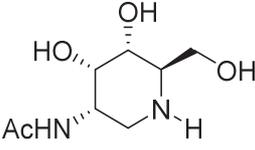
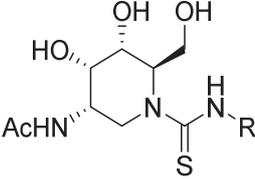
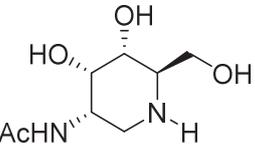
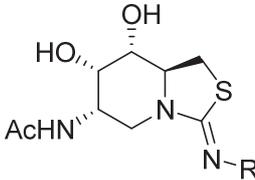
						
	DAJNAc	R = Bu	R = n-Oct	R = Ph	R = Bn	
	130	148a	148b	148c	148d	
β -N-Acetilglucosaminidasa (Human Placenta)	5,6	118	909	-	8,6	
β -N-Acetilglucosaminidasa (Bovine Kidney)	2,6	88	n.i.	-	5,9	
β -N-Acetilglucosaminidasa (Jack Bean)	2,6	75	363	-	13,4	

Tabla 12. Valores de inhibición de derivados iminotiazolidínicos frente a β -N-acetilglucosaminidasas

						
	DAJNAc	R = Bu	R = n-Oct	R = Ph	R = Bn	
	130	159a	159b	159c	159d	
β -N-Acetilglucosaminidasa (Human Placenta)	5,6	4,9	0,61	27	4,9	
β -N-Acetilglucosaminidasa (Bovine Kidney)	2,6	2,9	0,65	38	11	
β -N-Acetilglucosaminidasa (Jack Bean)	2,6	23,6	2,3	20	9,5	

4.6. Aproximaciones sintéticas a 2-acetamido-1,2-didesoxigalactonojirimicina (DGJNAc, 14)

En el punto anterior de este capítulo se ha descrito una nueva metodología para sintetizar DAJNAc (**130**), un nuevo diastereómero de las formas *gluco* y *galacto* previamente descritas.^[37,38,78,79] Las configuraciones *alo* no son muy comunes en la naturaleza y, por ello, la mayoría de síntesis de acetamido iminoazúcares que se han abordado se han diseñado hacia la obtención de estereoquímicas de tipo *gluco*, *galacto* o *mano*.

Se ha demostrado que la configuración *mano* con una 2-Acetamida muestra una pérdida de actividad como inhibidor de glicosidasas^[78,80], por lo que los esfuerzos se han centrado en la síntesis de las versiones *gluco* y *galacto*. En este contexto, sólo existen los precedentes descritos por Fleet y colaboradores quienes han descrito la síntesis y ensayos de inhibición de los estereoisómeros *gluco* y *galacto*^[37,38,79].

Varios de los intermedios desarrollados en nuestra síntesis de la DAJNAc constituían buenos sustratos de partida para intentar obtener las estereoquímicas *gluco* y *galacto*. Por ello, se planteó utilizarlos para explorar nuevas vías sintéticas que pudieran llevar a la obtención de estos compuestos.

Inicialmente nos planteamos abordar la síntesis de DGJNAc, (**14**). Como se ha demostrado anteriormente, las dihidroxilaciones de las distintas olefinas sintetizadas anteriormente, como por ejemplo **129** o **137b**, presentaban elevadas diastereoselectividades hacia la estereoquímica *alo* descartando esta metodología como vía para obtener la configuración *galacto*. Sin embargo, se planteó utilizar los compuestos *alo* obtenidos e invertir la estereoquímica de los grupos hidroxilos.

Se han descrito varios métodos para la inversión de grupos hidroxilo: a) Reacción de Mitsunobu; b) sustituciones nucleófilas con acetatos; c) procesos de oxidación seguidos de reducciones. En la literatura existen aplicaciones de estas metodologías para diversos tipos de azúcares y, aunque no se hallaron precedentes de inversión de dos hidroxilos contiguos, se decidió explorar estas vías para llegar a la configuración *galacto* (figura 14)

Por otro lado, de entre los compuestos que se disponía para explorar dichas metodologías se decidió trabajar con los dioles monocíclicos **139a** y **139b** ya que el diol bicíclico **132**, es un compuesto muy polar y de baja solubilidad en la mayor parte de disolventes orgánicos dando poco margen para realizar algunas de las reacciones planteadas.

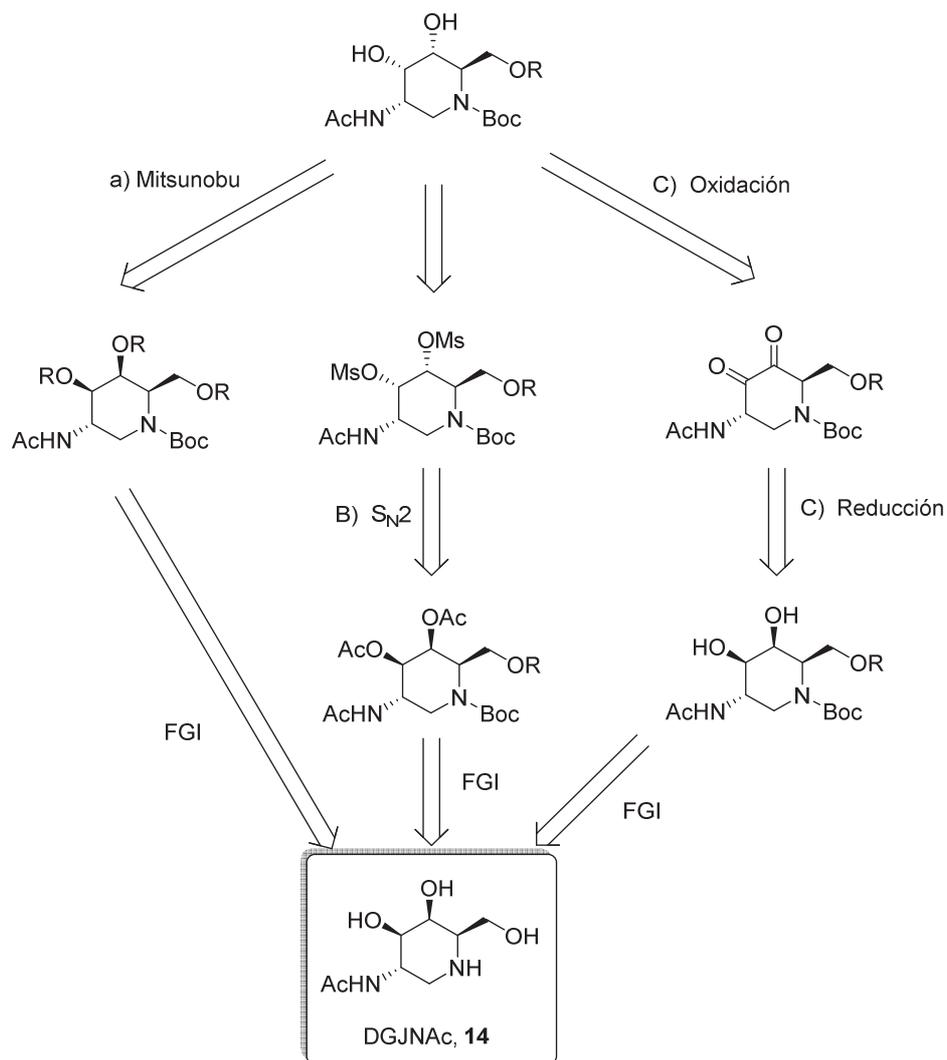
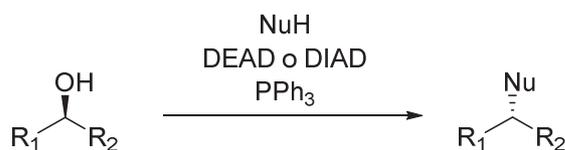


Figura 14. Esquema retrosintético para la obtención de DGJNAc

4.6.1. Inversión mediante reacción de Mitsunobu.

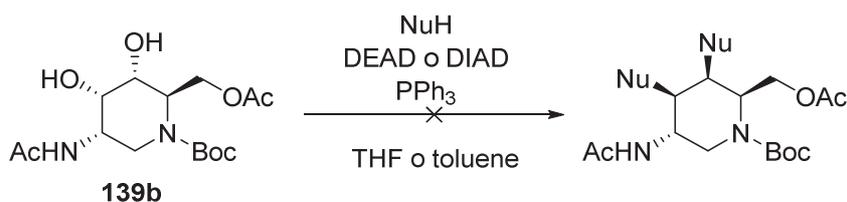
La reacción de Mitsunobu consiste en la sustitución de alcoholes primarios o secundarios con nucleófilos en presencia de azadicarboxilatos de dialquilo, típicamente DEAD o DIAD, y trialquil o triarilfosfinas, típicamente trifenilfosfina. La reacción permite invertir con excelentes resultados la configuración de alcoholes primarios y secundarios en una gran variedad de sustratos.



La reacción se puede llevar a cabo con una gran variedad de nucleófilos: a) ácidos dando lugar a ésteres; b) alcoholes y/o fenoles generando éteres; c) tioles para obtener tioéteres; d) distintos tipo de nucleófilos nitrogenados como imidas, *N*-heterociclos, etc.; e) compuestos metilénicos activos para

generar enlaces C-C. La condición generalmente aceptada para llevar a cabo esta reacción es que el nucleófilo sea relativamente ácido ($pK_a \leq 15$). La reacción de Mitsunobu se acostumbra a realizar en THF y en condiciones suaves (de 0°C a t.a.), aunque sustratos muy impedidos requieren a menudo de temperaturas elevadas. El orden de adición de los reactivos puede ser clave según el sustrato. Aunque generalmente se añade el azadicarboxilato de dialquilo en último lugar, se ha observado que formar la betaína intermedia haciendo reaccionar el azadicarboxilato de dialquilo con PPh_3 y añadir el alcohol y el nucleófilo sucesivamente puede mejorar los resultados considerablemente.^[81]

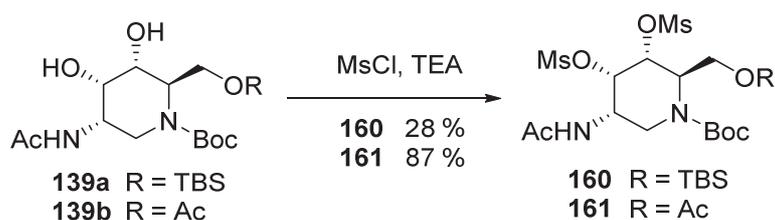
La reacción de Mitsunobu se aplicó extensivamente en la inversión de hidroxilos secundarios en azúcares^[82,83]. Generalmente, los nucleófilos usados para llevar a cabo la reacción son el ácido cloroacético o el ácido *p*-nitrobenzoico^[84]. Inicialmente nos planteamos explorar la aplicación de la reacción de Mitsunobu sobre **139b** usando el ácido cloroacético como nucleófilo. Se realizaron varias pruebas variando el orden de adición de los reactivos, disolventes y forzando las condiciones pero en todos los casos sólo se recuperó el producto de partida. Se decidió explorar también el ácido *p*-nitrobenzoico como nucleófilo. Aunque también se ensayaron varias condiciones, en este caso tampoco se observó la formación del producto deseado. Dado que en ningún caso se observó la introducción en la molécula de ningún grupo nucleófilo se decidió abandonar esta vía de investigación.



4.6.2. Inversión mediante sustituciones nucleófilas con acetatos

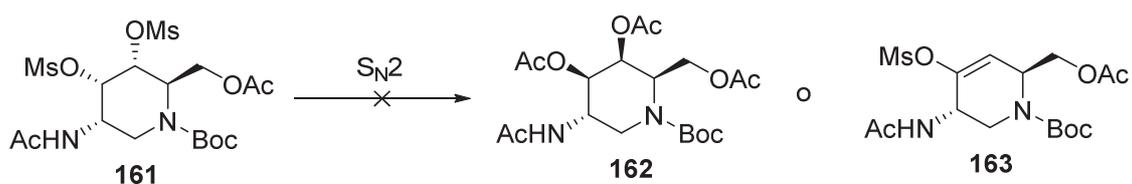
La inversión de hidroxilos mediante sustituciones nucleófilas con nucleófilos oxigenados es una de las alternativas a la reacción de Mitsunobu. Se trata de un método indirecto en el que inicialmente se deben modificar los hidroxilos sintetizando los correspondientes sulfonatos o triflatos convirtiéndolos de este modo en buenos electrófilos para llevar a cabo la sustitución nucleófila^[85,86]. Los nucleófilos utilizados acostumbran a ser sales alcalinas de ácidos carboxílicos siendo los acetatos potásico, sódico y de cesio los más comunes. Este tipo de reacciones requiere trabajar a altas temperaturas lo que implica utilizar disolventes como DMF o DMSO. En consecuencia, a menudo se generan como subproductos los derivados de la β -eliminación de los sulfonatos dando lugar a alquenos.^[87]

De acuerdo con estos precedentes se sintetizaron los derivados adecuados para llevar a cabo la S_N2 . Así, se trató **139a** y **139b** con $MsCl/TEA$ obteniendo los correspondientes sulfonatos **160** y **161** con un 28% y 87% de rendimiento respectivamente. El compuesto **160** resultó ser inestable así que se descartó su uso para ensayar las sustituciones nucleófilas. Se intentó también introducir triflatos en los hidroxilos secundarios pero aunque se ensayaron condiciones con $TfCl$ /piridina y Tf_2O /piridina sobre el diol **139b** no se consiguió en ningún caso observar la formación del producto deseado.



En cualquier caso, **161** constituía un buen candidato para explorar las sustituciones nucleófilas (tabla 13). Las reacciones realizadas con NaOAc resultaron ser muy heterogéneas y sólo se recuperó el producto de partida, por lo que se decidió trabajar con el CsOAc cuya solubilidad es mayor en disolventes orgánicos^[88,89]. Aunque se realizaron pruebas con distintos aditivos como DMAP o 18-crown-6^[90] y con varios disolventes, en todos los casos se observó la formación del producto de eliminación **163** y no se identificó la formación de **162** (tabla 13, entradas 2-5). Se ensayaron también las condiciones desarrolladas por Goss *et al.*^[91] (tabla 13, entrada 6) que permiten realizar este tipo de reacciones en condiciones mucho más suaves pero no se consiguió obtener el producto deseado. Ante la facilidad con la que se generaban los productos de eliminación se decidió abandonar esta ruta sintética.

Tabla 13. Exploración de S_N2 con acetatos sobre **161**



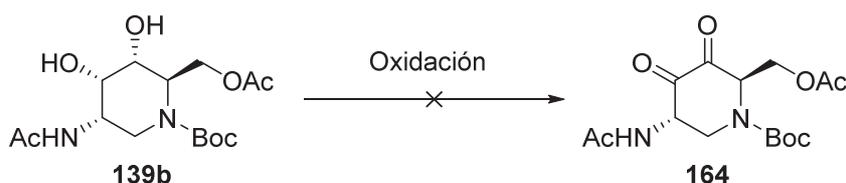
Entrada	Condiciones	Disolvente	t / h	T / °C	Producto
1	NaOAc	Toluene	24	100	161
2	CsOAc, 18-crown-6	Toluene	2	100	163
3	CsOAc, DMAP	Toluene	72	100	163
4	CsOAc	DMF	3	110	163
5	CsOAc	DMSO	3	110	163
6	TBABz	toluene	20	rt	161

4.6.3. Inversión por oxidación/reducción

La inversión de hidroxilos en dos etapas mediante una oxidación a cetona y posterior reducción invirtiendo su estereoquímica es un método conocido y ampliamente utilizado en la inversión de alcoholes de productos glicosídicos. Generalmente, el éxito de la inversión es difícil de prever y acostumbra a ser muy dependiente del sustrato. Por otro lado, la reducción de la cetona puede ser más

favorable a una u otra estereoquímica según el reductor utilizado. Sin embargo, existen algunas normas empíricas que se pueden aplicar para prever la estereoquímica del producto formado.^[92,93]

Nos decidimos a explorar esta tercera vía para obtener un sustrato con configuración *galacto*. Inicialmente se ensayaron varias condiciones para oxidar los alcoholes secundarios de **139b** a cetonas. Aunque se exploraron las oxidaciones con Dess-Martin, condiciones de Swern, TPAP/NMO y PCC, en ningún caso se consiguió aislar el producto de oxidación ni parcial ni total. Dado que no se consiguieron oxidar los hidroxilos se decidió descartar esta ruta como vía para la obtención de un sustrato de configuración *galacto*.



4.7. Aproximaciones sintéticas a 2-acetamido-1,2-dideoxigulonojirimicina (DGulJNac)

En el presente capítulo se han utilizado las reacciones de dihidroxilación sobre distintas olefinas como método para la formación de dioles dando lugar a las estructuras de 2-acetamido iminoazúcares. Se ha explorado el uso de reacciones asimétricas para la introducción del diol en *syn* o *anti* con respecto la acetamida y se ha observado la tendencia a la formación del diol en *syn* debido al efecto director de la acetamida para dar lugar a la estereoquímica *alo* como mayoritaria y la *galacto* como minoritaria.

Una vez analizada esta vía se planteó la opción de utilizar dichas olefinas para realizar otras configuraciones ampliando así la versatilidad de nuestros intermedios. Para ello, se planteó utilizar las reacciones de epoxidación. Los epóxidos permiten realizar un elevado número de variaciones posteriores ya que se pueden abrir con una gran variedad de nucleófilos (oxigenados, nitrogenados, sulfurados) y, además, generalmente se puede controlar la regioselectividad de las reacciones según el medio de reacción. Además se disponía de varios intermedios aptos para ensayar las reacciones de epoxidación (figura 15). De este modo, se pensó que no sólo se podrían obtener productos ya conocidos sino que también se podrían generar nuevos sustratos con propiedades como inhibidores de glicosidasas.

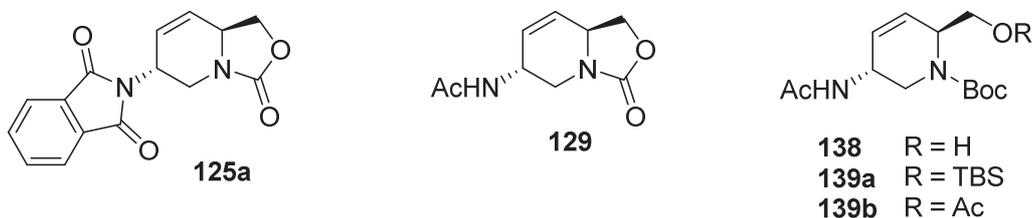


Figura 15. Sustratos candidatos a epoxidación

Se planteó explorar las reacciones de epoxidación y su apertura de acuerdo al esquema retrosintético de la figura 16. Los productos obtenidos serían candidatos para obtener los acetamido iminoazúcares con configuración estereoquímica *gluco* o *gulo* y derivados de estos.

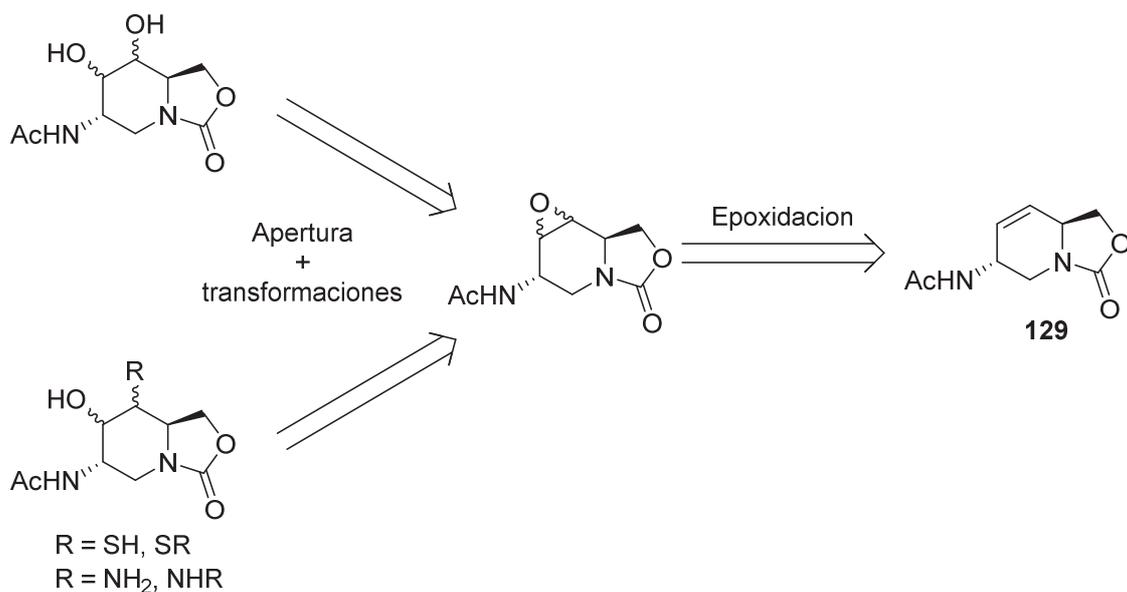


Figura 16. Esquema retrosintético basado en epoxidaciones y apertura regioselectivas

4.7.1. Reacciones de epoxidación

4.7.1.1. Grupos directores en la epoxidación con MCPBA

Las reacciones de epoxidación sobre compuestos ciclohexénicos se han estudiado ampliamente. En 1957 Henbest *et al.*^[94] describieron por primera vez epoxidaciones dirigidas de alcoholes alílicos usando MCPBA dando lugar a epóxidos *syn*. Este fenómeno fue justificado debido a la acción directora del alcohol alílico que actúa generando un puente de hidrógeno con el MCPBA (figura 17). La diastereoselectividad de la reacción acostumbra a ser elevada aunque puede variar según el sustrato ya que a menudo los factores estéricos también juegan un papel importante.

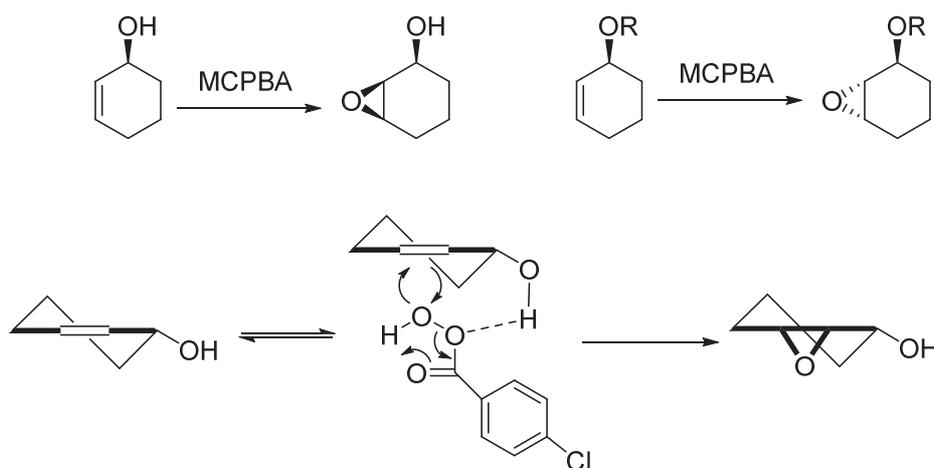


Figura 17. Dirección de la epoxidación con MCPBA por alcoholes alílicos ^[94]

En 1989, Kocovsky *et al.*^[95] observaron que este efecto director también podía darse con otros grupos capaces de formar puentes de hidrógeno como carbamatos o amidas (figura 18). En este trabajo se planteaba que la razón de la elevada diastereoselectividad observada en la mayoría de sustratos era debida a varios factores. En primer lugar, la presencia de un grupo dador de puente de hidrógeno como es el NH, actúa coordinándose con el MCPBA de modo similar a lo descrito por Henbest *et al.* En segundo lugar, debido a que sustratos sin presencia de NH también podían dirigir las epoxidaciones en *syn*, se planteó que podía existir un efecto cooperativo donde los carbonilos de las funcionalidades amido o carbamato actuaran como aceptores de puente de hidrógeno con el MCPBA dirigiendo la epoxidación. Estudios posteriores^[96,97] han demostrado que, en general, una vez desactivada la capacidad del NH de actuar como dador de puente de hidrógeno, la diastereoselectividad de la reacción está gobernada por efectos estéricos.

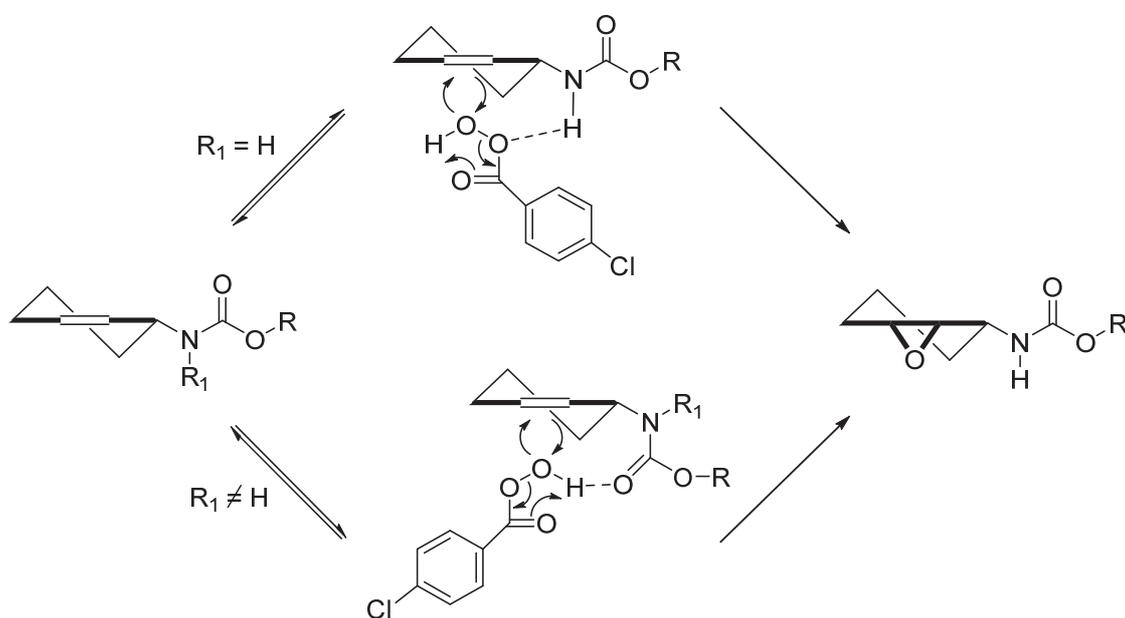


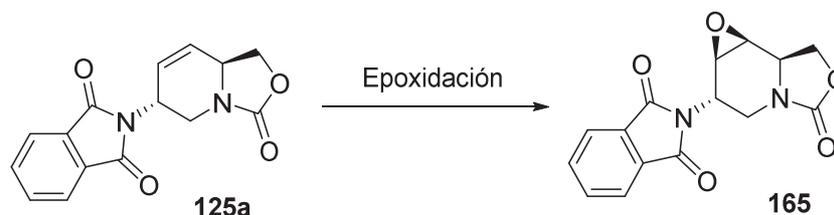
Figura 18. Dirección de la epoxidación con MCPBA por amidas y carbamatos ^[95]

4.7.1.2. Exploración de las epoxidaciones

Basándose en los antecedentes comentados en el apartado anterior, se planteó la hipótesis según la cual la epoxidación con MCPBA de los sustratos como **129** o **138** debería ser dirigida hacia la formación de un epóxido *syn* mientras que en el caso de **125a** debería dirigirse hacia un epóxido *anti*. En el primer caso, la presencia de una acetamida permitiría la coordinación del MCPBA con el NH actuando así como un grupo director. En el caso de **125a**, la ausencia de dicha acetamida provocaría que la dirección de la reacción fuera gobernada por factores estéricos.

Así pues, se ensayaron en primer lugar las epoxidaciones sobre **125a** (tabla 14). Se emplearon como agentes oxidantes MCPBA y oxone y, en ambos casos, se observó por ¹H-RMN la formación de un único y mismo diastereómero. Cabe destacar que las reacciones fueron muy lentas. De hecho se requirieron 3 días de reacción usando 5eq de MCPBA para conseguir conversiones completas. En el caso

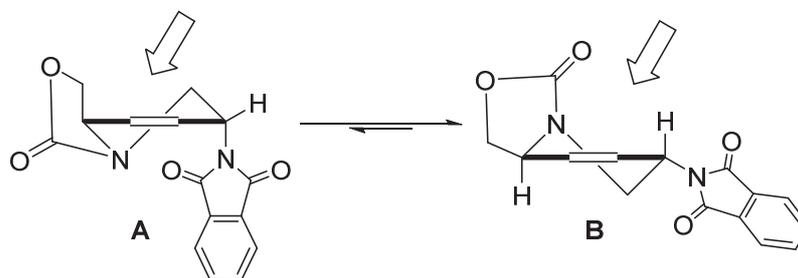
del oxone, utilizando el mismo número de equivalentes, sólo se consiguió un 52% de conversión tras 4 días de reacción. Por otro lado, el aislamiento del epóxido obtenido fue difícil debido a que presentaba cierta tendencia a descomponer. Aun así, se logró aislar **165** como un único diastereómero con un 53% de rendimiento. Su posterior análisis por NOESY confirmó que el epóxido formado era *anti* a la ftalimida.

Tabla 14. Epoxidaciones de **125a**

Oxidante	t / d	Conv / %	Purificación	Rdto / %
MCPBA	3	100	SiO ₂ ·TEA (2.5% v/v)	53
MCPBA	3	100	Al ₂ O ₃	32
Oxone	4	52	-	n.d.

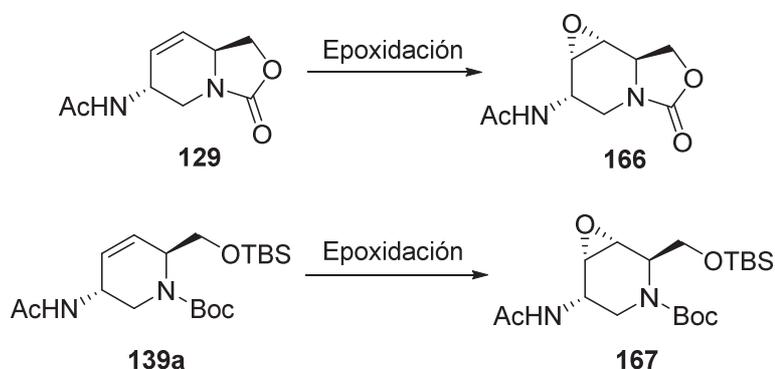
Notas. a) En todos los casos sólo se observó la formación de un único diastereómero ¹H-RMN.
b) reacciones realizadas a r.t.

Para justificar la elevada diastereoselectividad de la reacción se puede atender a varios factores. En primer lugar, la ftalimida es un grupo más voluminoso que el anillo de 2-oxazolidona e impide la epoxidación en su misma cara. Por otro lado, atendiendo a las conformaciones, la menos estable **A** mostraría un impedimento estérico mayor mientras que, en la conformación más estable **B**, el mismo anillo de 2-oxazolidona podría estar actuando como un grupo aceptor de puente de hidrógeno de acuerdo a lo postulado por Kocovsky^[95] (figura 19). En cualquier caso, el hecho de que con oxone la reacción muestre también la formación de un único diastereómero hace pensar que los factores estéricos gobiernan la epoxidación y que, ambas caras, están bastante impedidas ya que la cinética de reacción es lenta. Así, el uso de MCPBA simplemente permite que la reacción sea más rápida corroborando un posible efecto coordinante con el carbamato cíclico.

Figura 19. Epoxidación de **125a**, la flecha indica la dirección de la epoxidación en *anti* a la ftalimida

Una vez obtenido el epóxido **165**, se prosiguió con los intentos de epoxidación de **129** y **139a** (tabla 15). En el caso de **129**, las epoxidaciones con MCPBA mostraron la formación de un único

diastereómero mientras que trabajando con oxone se obtuvo una mezcla 3:1. Lamentablemente, aunque se intentaron diferentes medios cromatográficos, no se consiguió aislar en ningún caso el epóxido **166**. Además, el solapamiento de las señales en los RMN tampoco permitió analizarlo mediante experimentos de NOESY para poder confirmar la estereoquímica del producto obtenido. Por lo que refiere a **139a**, las pruebas realizadas con MCPBA también mostraron la formación de un único diastereómero, mientras que con oxone se obtuvieron mezclas complejas donde no se identificó el epóxido **167**. El epóxido obtenido también mostró cierta tendencia a la descomposición durante su aislamiento pero se consiguió aislar con un 67% de rendimiento. Lamentablemente, la disposición de las señales en los espectros de RMN tampoco permitió analizar por NOESY **167**. En cualquier caso, las diferencias observadas entre oxone y MCPBA permitían concluir que en el segundo caso se produce un efecto director de la acetamida por coordinación con el oxidante.

Tabla 15. Epoxidaciones sobre **129** y **139a**

Sustrato	Oxidante	t / d	d.r. ^a	Purificación	Producto	Rdto / %
129	MCPBA	1	>95 : 5	SiO ₂ ·TEA (2.5% v/v)	166	n.d. ^b
129	MCPBA	1	>95 : 5	Al ₂ O ₃	166	n.d. ^b
129	Oxone	1	3 : 1	-	166	n.d. ^b
139a	MCPBA	1,5	>95 : 5	SiO ₂ ·TEA (2.5% v/v)	167	56
139a	MCPBA	1,5	>95 : 5	Al ₂ O ₃	167	67
139a	Oxone	1,5	-	-	167	n.d.

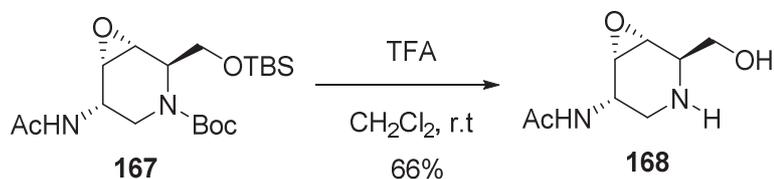
Notas. a) Determinado por ¹H-RMN.

b) Conversión completa. Descomposición del producto durante el aislamiento

c) reacciones realizadas a r.t.

Para poder comprobar la estereoquímica de **167**, se planteó eliminar los grupos protectores ya que, en general, los productos finales acostumbran a presentar una disposición de señales adecuada para su análisis por NOESY. Así, se trató **167** con TFA/CH₂Cl₂ a t.a. y se aisló el epóxido **168** con un 66% de rendimiento. Los análisis por NOESY de dicha estructura permitieron determinar que el epóxido era

syn a la acetamida. De este modo, se corroboró que la acetamida actúa como un grupo director gracias a su capacidad de coordinación con el MCPBA.



4.7.2. Apertura regioselectiva de epoxiciclohexanos

La apertura de epoxiciclohexanos se ha estudiado ampliamente. En general, se ha determinado que la apertura de este tipo de compuestos sigue la regla de Fürst-Plattner^[98], según la cual el producto mayoritario de la reacción de apertura es el compuesto de configuración *trans*-diaxial^[99]. En sistemas con flexibilidad conformacional se obtiene el producto correspondiente a la apertura *trans*-diaxial a partir de la conformación termodinámicamente más estable. El mecanismo se adjunta en la figura 20. Como se puede observar, el conformero **B** es más estable que **A** ya que R se sitúa en posición *pseudo*-ecuatorial. El ataque nucleófilo se puede dar tanto por la vía 1 como por la vía 2 pero, siguiendo la regla de Fürst-Plattner, la vía 1 genera un intermedio con conformación de silla **C** que es alrededor de 5Kcal/mol más estable que el intermedio con conformación de bote torcido **D** que se genera por la vía 2. Por esta razón, se genera mayoritariamente el intermedio *trans*-diaxial **C** que luego equilibra hacia la conformación más estable **E**.

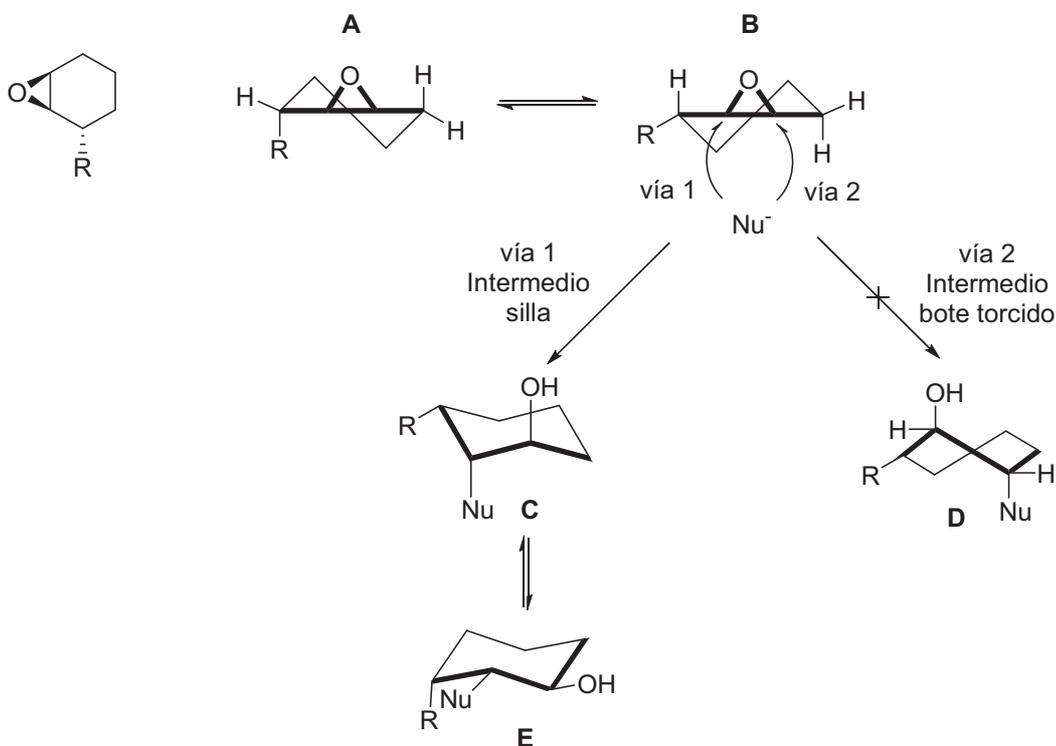


Figura 20. Regioselectividad de la apertura de epoxiciclohexanos según reglas de Fürst-Plattner.^[98]

Se debe añadir que, a menudo, se puede controlar la regioquímica de la reacción de apertura utilizando diferentes aditivos. Así, por ejemplo, destacan los trabajos desarrollados por Chini *et al.*^[100,101] donde se utilizan ácidos de Lewis como el LiClO_4 que actúa como agente quelante activando el epóxido y uniéndose también al resto de átomos de oxígeno presentes en la molécula, forzando la conformación y permitiendo mejorar la regioquímica de la apertura. Otros ejemplos son el uso de NH_4Cl ^[102,103] para promover la apertura de epóxidos ya que su carácter ácido actúa protonando el epóxido aumentando su electrofilia. Con estos precedentes se decidió abordar la apertura de los epóxidos obtenidos.

4.7.2.1. Apertura regioselectiva del epóxido 165

En el momento de abordar la apertura del epóxido **165** se realizaron hipótesis sobre la conformación más probable de obtener de acuerdo a las reglas de Fürst-Plattner. De este modo, se observó que la conformación más probable de obtener era la forma *gulo* (figura 21). La conformación más estable es **B** debido a que los sustituyentes se sitúan en posición *pseudo*-ecuatorial. A continuación, el ataque sobre la posición C3 genera el intermedio *trans*-diaxial con conformación de silla que conllevaría una conformación *gulo*. En caso de actuar sobre la conformación menos estable **A**, se generaría mayoritariamente la conformación *gluco*.

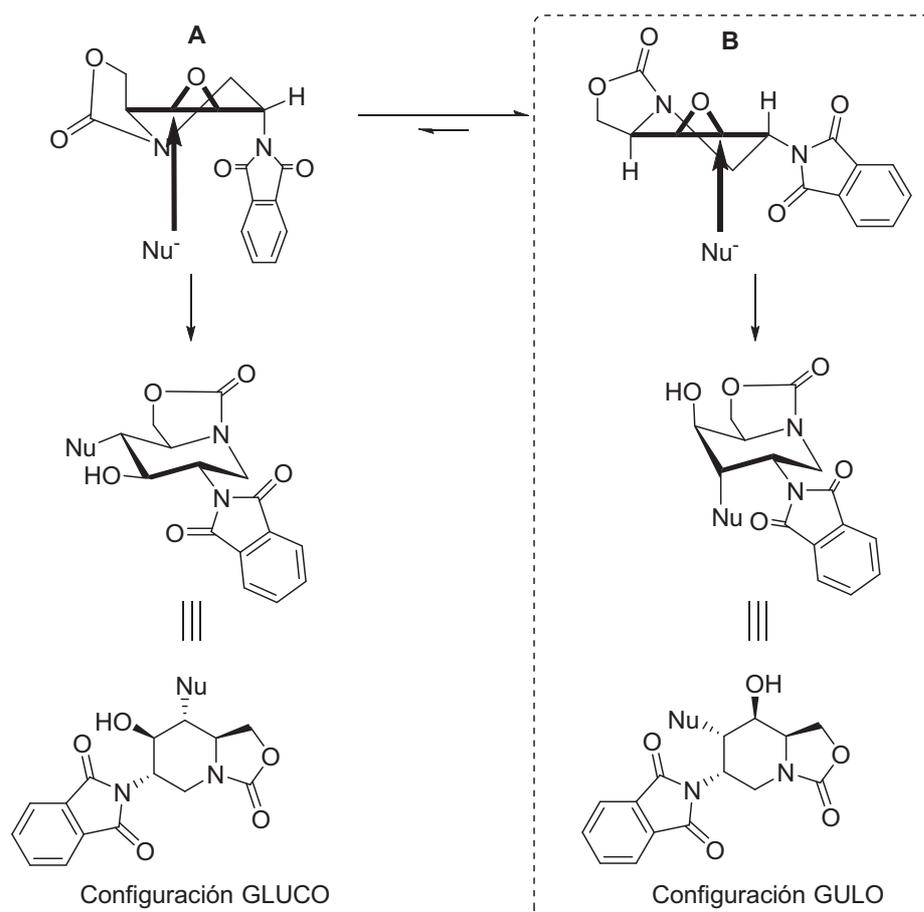
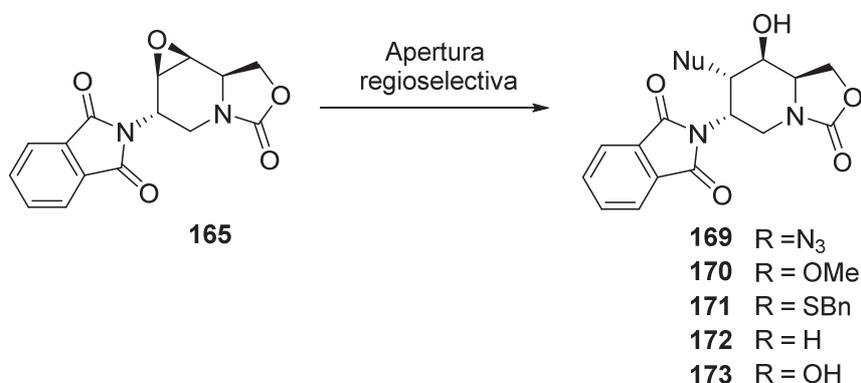


Figura 21. Hipótesis de la apertura de **165**

Con esta hipótesis se exploró la apertura del epóxido **165** (tabla 16). Se decidió utilizar NaN_3 como y se observó una falta total de reactividad tanto a t.a. como a reflujo. La falta de reactividad de estos compuestos se puede atribuir a la presencia de nitrógenos que desactivan el epóxido y también al elevado impedimento estérico que generan los sustituyentes. Por ello, se decidió añadir distintos ácidos de Lewis como BF_3 , NH_4Cl y también LiClO_4 con la esperanza de activar el epóxido y facilitar su apertura. Estos procedimientos han dado buenos resultados en una gran cantidad de sustratos^[104–107]. Sin embargo, aunque se aplicaron dichas condiciones, se recuperó el producto de partida en todos los casos excepto en las condiciones de la entrada 5 donde, sorprendentemente, se observó la formación de **170** (por efecto del MeOH) como un único diastereómero y con un 63% de rendimiento. Aunque la azida es un buen nucleófilo se decidió variar y ensayar un nucleófilo sulfurado para lo que se escogió el bencilmercaptano. Lamentablemente, tampoco se observó reactividad.

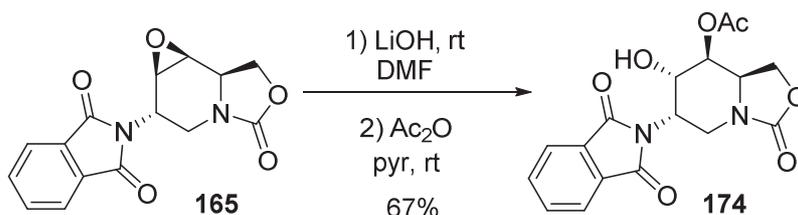
Tabla 16. Exploración de la apertura de **165**

Entrada	Nucleófilo	Aditivo	Disolvente	T / °C	Producto	d.r. ^a	Rdto / %
1	NaN_3	-	Acetona : H_2O	rt	169	-	-
2	NaN_3	-	Acetona : H_2O	reflujo	169	-	-
3	NaN_3	LiClO_4	ACN	70	169	-	-
4	NaN_3	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	DMF	80	169	-	-
5	NaN_3	NH_4Cl	MeOH: H_2O	80	170	100 : 0	63
6	BnSH	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	DMF	rt	171	-	-
7	BnSH	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	DMF	80	171	-	-
8	LiBH_4	-	THF	rt	172	-	-
9	LiBH_4	-	THF	reflujo	172	1,5 : 1	n.d.
10	LiOH	-	DMF	rt	173	100 : 0	n.d.

Notas. a) Determinado por $^1\text{H-RMN}$ y/o HPLC-MS

Ante estos resultados nos planteamos que el problema podía ser el impedimento estérico. De hecho, la formación de **170** implicaba que quizás el problema se hallaba en el tamaño del nucleófilo ya que el grupo metoxi proveniente del MeOH si podía actuar abriendo el epóxido. Por ello, se ensayaron reacciones de apertura utilizando LiBH₄. El hidruro, es el grupo de menor tamaño que se puede usar para la apertura de epóxidos y, al mismo tiempo, la presencia de litio puede activar el epóxido favoreciendo su apertura. En este caso, se consiguió una conversión total trabajando a reflujo. Por el contrario, la regioselectividad de la reacción fue muy baja. Por lo tanto, estaba claro que se podía abrir el epóxido y se decidió buscar un nucleófilo intermedio. Se ensayó la apertura con LiOH a t.a. y en estas condiciones se consiguió una conversión total y se observó la formación de un único diastereómero. Lamentablemente, la elevada polaridad del diol **173** no permitió su asilamiento

La determinación de la estereoquímica de **170** y **173** se antojaba clave para poder comprobar nuestra hipótesis inicial. En el primer caso, el análisis por RMN determinó que el nucleófilo había atacado a la posición C3 mientras que el análisis por NOESY permitió determinar la formación de un producto con configuración *gulo*. En el segundo caso, el diol **173** no se pudo aislar satisfactoriamente. Por ello, se decidió realizar la apertura con LiOH de **165** y derivatizar *in situ* el diol mediante acetilación de los hidroxilos secundarios para obtener un producto más apolar facilitando su aislamiento. Se realizó dicho procedimiento y se consiguió aislar el producto de monoacetilación **174** con un 67% de rendimiento.



El posterior análisis por NOESY de **174** determinó que su configuración estereoquímica era *gulo*. Además la elevada cristalinidad del sustrato permitió obtener su estructura de rayos X que corroboró lo observado por RMN (figura 22).

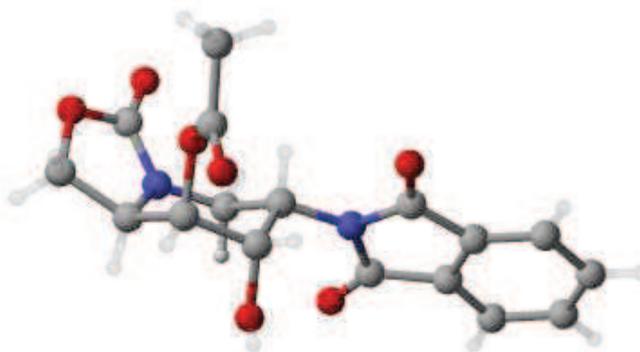


Figura 22. Estructura de rayos X de **174**

De este modo, se comprobó la hipótesis inicial según la cual el producto mayoritario a obtener debería tener configuración *gulo*. Además, se ha obtenido un intermedio valioso para realizar la síntesis

estereoselectiva de la 2-acetamido-1,2-didesoxigulonojirimicina (DGulJNAc). Actualmente, se está desarrollando una metodología para obtener dicho compuesto y poder evaluar sus propiedades como inhibidor de glicosidasas.

4.7.2.2. Apertura regioselectiva de los epóxidos **166** y **167**

Una vez estudiada la apertura del epóxido **165**, se abordó la misma exploración sobre los epóxidos **166** y **167** de configuración *syn* a la acetamida. De nuevo, se realizó una hipótesis sobre los sustratos mayoritarios más posibles de obtener con este tipo de epóxidos (figura 23). En este caso, la conformación más estable es **B** y, sobre ella, el ataque nucleófilo debería darse preferencialmente sobre C4 dando lugar a un conformero *gulo*. La configuración resultante de la apertura de ambos tipos de epóxidos es *gulo* y la diferencia radicaría en la situación del nucleófilo. Mientras que para **165**, éste se situaría en C3, en el caso de **166** y **167** lo haría en C4.

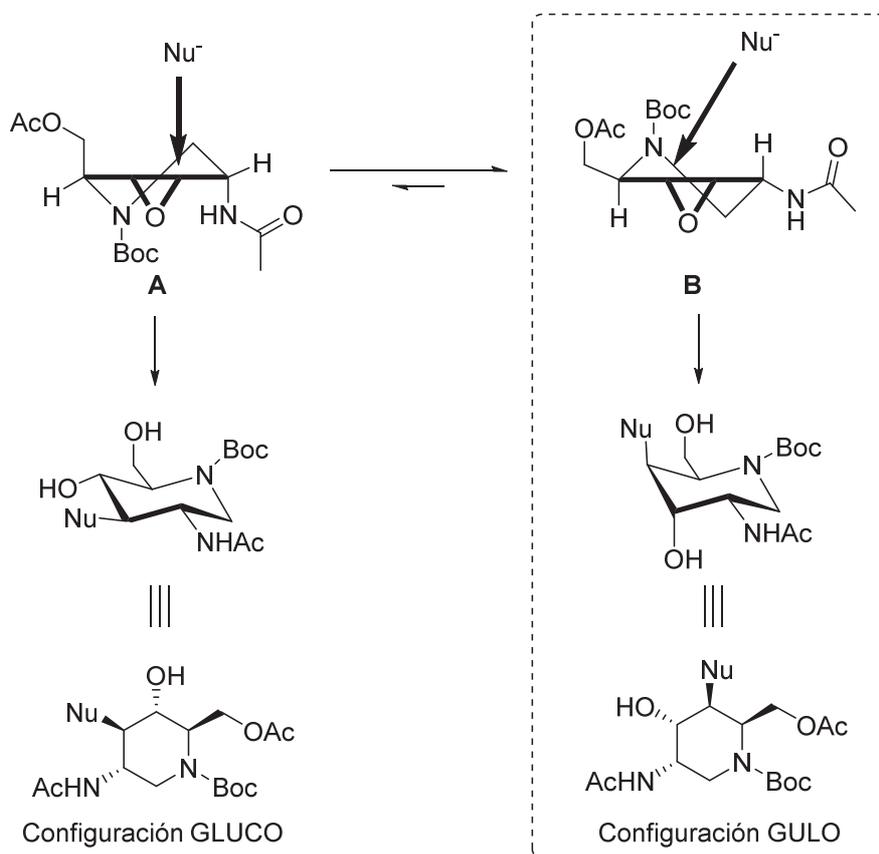


Figura 23. Hipótesis de la apertura del epóxido **167**

Una vez realizada la hipótesis, se decidió abordar la apertura del epóxido **166**. En este caso, tal y como se ha explicado anteriormente, el aislamiento de **166** no se pudo llevar a cabo. Sin embargo, los crudos de reacción eran completamente limpios observándose únicamente el epóxido final y productos derivados del MCPBA. Por ello, se decidió explorar las reacciones de apertura directamente con los crudos de las epoxidaciones.

En la literatura se hallaron aperturas de epóxidos sobre esqueletos con anillos de 2-oxazolidona.^[108,109] Estos precedentes se realizaban sobre compuestos 2-desoxi con sustituyentes en C1 y mostraban que la apertura de estos epóxidos era difícil y se requerían condiciones muy drásticas de reacción. Así se empleaban ácido acético o derivados como nucleófilos trabajando a reflujo durante 10-24h. Inicialmente, se aplicaron las condiciones descritas sobre **166** (tabla 17) pero no se observó reactividad en ningún caso. A continuación, se realizaron ensayos con acetatos con idéntico resultado. Finalmente, se decidió cambiar el tipo de nucleófilo y se realizaron pruebas con NaN_3 y BnSH consiguiendo abrir el epóxido en ambos casos. El análisis de los crudos obtenidos permitió determinar que se habían formado mezclas de regioisómeros en proporciones 4:1 y 9:1 respectivamente. Lamentablemente, no se pudieron separar los regioisómeros mayoritarios y, por lo tanto, no se pudieron determinar sus estereoquímicas. Además, las cantidades de productos obtenidas eran pobres. Por ello, se decidió descartar la apertura de este epóxido como vía para obtener DGulJNac.

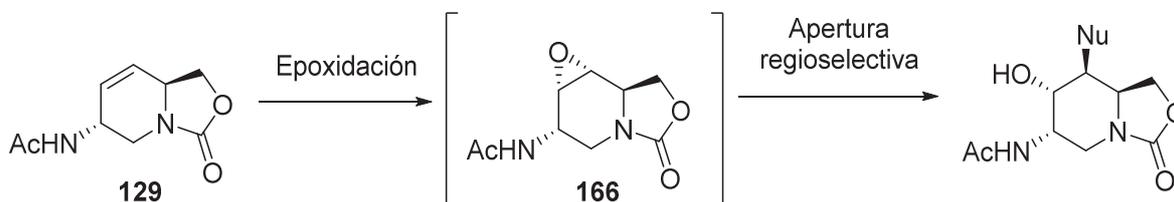


Tabla 17. Exploración de la apertura regioselectiva del epóxido **166**

Entrada	Nucleófilo	Aditivo	Disolvente	T / °C	d.r.	Rdto / %
1	Ácido tricloroacético	-	ACN	70	-	-
2	Ácido acético	-	ACN	70	-	-
3	KOAc	-	DMF	80	-	-
4	BnSH	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	DMF	rt	9 : 1 ^a	n.d.
5	NaN_3	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	DMF	80	5 : 1 ^b	n.d.

Notas. a) Determinado por HPLC-MS

b) Determinado por ^1H -RMN

Actualmente, se están reanudando los esfuerzos con la exploración de la apertura del epóxido **167** que se puede aislar con buenos rendimientos como un único diastereómero con la esperanza de conseguir derivados *gulo* con distintos sustituyentes en C4.

4.8. Conclusiones

Se ha explorado la inserción de una 2-acetamida sobre el intermedio **8** mediante el uso del reordenamiento de Overman y la sustitución alílica catalizada por paladio siendo ésta última la que ha permitido llevarlo a cabo con buenos rendimientos y de forma diastereoselectiva.

Se ha sintetizado el nuevo compuesto DAJNAc (**130**) por dos vías distintas con rendimientos globales del 16% y 41% en 5 y 7 etapas sintéticas respectivamente. Se han evaluado sus propiedades como inhibidor de glicosidasas reconociéndolo como un inhibidor específico de β -*N*-acetilglucosaminidasas en el rango bajo micromolar.

Se han sintetizado derivados de DAJNAc incluyendo tioureas en la amina endocíclica (**148a-d**) y iminotiazolidinas entre el alcohol primario y la amina endocíclica (**159a-d**). Se han evaluado sus propiedades como inhibidores de glicosidasas llegando a obtener valores de inhibición submicromolares frente a β -*N*-acetilglucosaminidasas.

Se ha analizado la interacción entre DAJNAc y β -*N*-acetilglucosaminidasa (*Jack bean*) mediante el uso de técnicas de STD-NMR sin éxito.

Se ha explorado la inversión de hidroxilos contiguos como metodología para obtener la DGJNAc.

Se han explorado las reacciones de epoxidación así como su apertura regioselectiva como método para obtener DGuJNAc. Se ha conseguido obtener intermedios con alto valor sintético para llegar a este producto final.

Referencias

- [1] L. J. Drummond, A. Sutherland, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5349–5356.
- [2] Y. S. Reddy, P. K. Kancharla, R. Roy, Y. D. Vankar, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2760–73.
- [3] N. Hama, T. Aoki, S. Miwa, M. Yamazaki, T. Sato, N. Chida, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 616–619.
- [4] A. Porzelle, M. D. Woodrow, N. C. O. Tomkinson, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1492–1495.
- [5] A. M. Zaed, A. Sutherland, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8030–8037.
- [6] L. Kürti, B. Czakó, in *Strateg. Appl. Named React. Org. Synth.* (Ed.: J. Hayhurst), Elsevier Academic Press, San Diego, **2005**, pp. 322–323.
- [7] I. Jaunzeme, A. Jirgensons, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5794–5799.
- [8] C. E. Anderson, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12412–12413.
- [9] K. Csillag, L. Németh, T. A. Martinek, Z. Szakonyi, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 144–150.
- [10] K. Majumdar, T. Bhattacharyya, B. Chattopadhyay, B. Sinha, *Synthesis (Stuttg.)* **2009**, *2009*, 2117–2142.
- [11] E. Gajdosíková, M. Martinková, J. Gonda, P. Conka, *Molecules* **2008**, *13*, 2837–2847.
- [12] L. E. Overman, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1984**, *23*, 579–586.
- [13] J. Yang, G. J. Mercer, H. M. Nguyen, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4231–4234.
- [14] G. J. Mercer, J. Yang, M. J. McKay, H. M. Nguyen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11210–11218.
- [15] L. Milhau, P. J. Guiry, *Top. Org. Chem.* **2012**, *38*, 95–154.
- [16] G. Poli, G. Prestat, F. Liron, C. Kammerer-pentier, *Top. Org. Chem.* **2012**, *38*, 1–64.
- [17] B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2921–2943.
- [18] B.-H. Zheng, C.-H. Ding, X.-L. Hou, *Synlett* **2011**, *2011*, 2262–2264.
- [19] C. Gnamm, G. Franck, N. Miller, T. Stork, K. Broedner, G. Helmchen, *Synthesis (Stuttg.)* **2008**, 3331–3350.
- [20] R. Weihofen, O. Tverskoy, G. Helmchen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5546–5549.
- [21] M. Gärtner, R. Weihofen, G. Helmchen, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7605–7622.
- [22] J. W. Faller, J. C. Wilt, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 633–636.
- [23] B. M. Trost, C. B. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3687–3696.
- [24] M. Lafrance, M. Roggen, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 3470–3473.
- [25] J. F. Hartwig, L. M. Stanley, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1461–1475.
- [26] M. J. Pouy, A. Leitner, D. J. Weix, S. Ueno, J. F. Hartwig, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3949–3952.
- [27] L. Yang, G. Morriello, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197–8200.
- [28] J. R. Porter, W. G. Wirschun, K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 2657–2658.
- [29] E. Vedejs, A. Klapars, D. L. Warner, A. H. Weiss, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7542–7546.
- [30] C. J. Crump, C. W. am Ende, T. E. Ballard, N. Pozdnyakov, M. Pettersson, D.-M. Chau, K. R. Bales, Y.-M. Li, D. S. Johnson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2997–3000.
- [31] M. Więcek, T. Kottke, X. Ligneau, W. Schunack, R. Seifert, H. Stark, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2850–2858.
- [32] D. Sahu, H. Padhy, D. Patra, J.-F. Yin, Y.-C. Hsu, J.-T. Lin, K.-L. Lu, K.-H. Wei, H.-C. Lin, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 303–311.
- [33] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. I. Bennani, G. A. Crispinio, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768–2771.
- [34] L. Wang, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *20*, 7568–7570.

- [35] H. Becker, S. B. King, M. Taniguchi, K. P. M. Vanhessche, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3940–3941.
- [36] H. Becker, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1996**, *35*, 448–451.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] T. J. Donohoe, *Synlett* **2002**, 1223–1232.
- [40] T. J. Donohoe, K. Blades, M. Helliwell, *Chem. Commun.* **1999**, *4*, 1733–1734.
- [41] T. J. Donohoe, K. Blades, P. R. Moore, M. J. Waring, J. J. G. Winter, M. Helliwell, N. J. Newcombe, G. Stemp, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7946–7956.
- [42] T. J. Donohoe, L. Mitchell, M. J. Waring, M. Helliwell, A. Bell, N. J. Newcombe, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2173–2186.
- [43] T. J. Donohoe, L. Mitchell, M. J. Waring, M. Helliwell, A. Bell, N. J. Newcombe, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8951–8954.
- [44] M. T. Crimmins, C. O. Hughes, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2168–2171.
- [45] S. Ahmad, L. H. Thomas, A. Sutherland, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2801–2808.
- [46] T. J. Donohoe, K. Blades, M. Helliwell, P. R. Moore, J. J. G. Winter, G. Stemp, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2980–2981.
- [47] J. Angulo, P. M. Nieto, *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 1357–1369.
- [48] R. Cedex, *J. Chem. Educ.* **2012**, *89*, 1071–1073.
- [49] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
- [50] A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega, E. J. Cabrita, *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 990–994.
- [51] J. L. Wagstaff, S. L. Taylor, M. J. Howard, *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 571–577.
- [52] S. Castro, M. Duff, N. L. Snyder, M. Morton, C. V Kumar, M. W. Pecuh, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3869–3872.
- [53] K. Lycknert, M. Edblad, A. Imberty, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9647–9654.
- [54] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
- [55] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- [56] M. Kaszowska, A. S. Norgren, P. I. Arvidson, C. Sandström, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2577–80.
- [57] M. Vogtherr, T. Peters, R. Allee, D.-Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6093–6099.
- [58] O. Berteau, C. Sandström, J. Bielicki, D. S. Anson, L. Kenne, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15296–15297.
- [59] A. Bülow, I. W. Plesner, M. Bols, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1545*, 207–215.
- [60] A. Lohse, T. Hardlei, A. Jensen, I. W. Plesner, M. Bols, *Biochem. J.* **2000**, *349*, 211–215.
- [61] J. Zhou, J. Zhou, Y. Meng, M. Chen, *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 157–165.
- [62] Y. Yu, T. Mena-Barragán, K. Higaki, J. L. Johnson, J. E. Drury, R. L. Lieberman, N. Nakasone, H. Ninomiya, T. Tsukimura, H. Sakuraba, Y. Suzuki, E. Nanba, C. O. Mellet, J. M. García Fernández, K. Ohno, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1460–1469.
- [63] P. Alfonso, V. Andreu, A. Pino-Angeles, A. A. Moya-García, M. I. García-Moreno, J. C. Rodríguez-Rey, F. Sánchez-Jiménez, M. Pocoví, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. Giraldo, *Chembiochem* **2013**, *14*, 943–949.
- [64] M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. Trapero, M. Egidio-Gabás, A. Llebaria, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3698–3713.
- [65] 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, *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 526–532.

- [66] M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6514–6516.
- [67] M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. Trapero, M. Egido-Gabás, A. Llebaria, J. M. G. Fernández, C. O. Mellet, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3698–3713.
- [68] 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*, 2738–2747.
- [69] R. Nouguier, V. Mignon, J.-L. Gras, *Carbohydr. Res.* **1995**, *277*, 339–345.
- [70] B. M. Trost, J. Dudash, E. J. Hembre, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1619–1629.
- [71] M. Guiso, C. Procaccio, M. Rosaria, F. Piccioni, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4291–4294.
- [72] G. Chu, Y. Zhang, C. Li, Y. Zhang, *Synthesis (Stuttg.)* **2009**, *2009*, 3828–3832.
- [73] A. Hietanen, L. T. Kanerva, *European J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 2729–2737.
- [74] J. M. Palomo, M. Filice, R. Fernandez-Lafuente, M. Terreni, J. M. Guisan, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1969–1976.
- [75] M. Filice, J. M. Palomo, P. Bonomi, T. Bavaro, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, M. Terreni, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9286–9292.
- [76] M. Terreni, R. Salvetti, L. Linati, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernández-Lorente, A. Bastida, J. M. Guisan, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1615–1621.
- [77] T. Rodríguez-Pérez, I. Lavandera, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, V. Gotor, *European J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 2769–2778.
- [78] G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 979–990.
- [79] G. W. J. Fleet, P. W. Smith, R. J. Nash, L. E. Fellows, R. B. Parekh, T. W. Rademacher, *Chem. Lett.* **1986**, 1051–1054.
- [80] 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.
- [81] L. Kürti, B. Czakó, in *Strateg. Appl. Named React. Org. Synth.* (Ed.: J. Hayhurst), Elsevier Academic Press, San Diego, **2005**, pp. 294–295.
- [82] K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, K. V. P. P. Kumar, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.
- [83] M. Kim, B. Grzeszczyk, A. Zamojski, *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 244–249.
- [84] A. Tatibouët, M. Lefoix, J. Nadolny, O. R. Martin, P. Rollin, J. Yang, D. Holman, *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 327–334.
- [85] H. Dong, Z. Pei, M. Angelin, S. Byström, O. Ramström, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3694–3701.
- [86] H. Dong, Z. Pei, O. Ramström, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3306–3309.
- [87] X.-X. Shi, C.-L. Shen, J.-Z. Yao, L.-D. Nie, N. Quan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 277–284.
- [88] T. Shimizu, ayoko Hiranuma, T. Nakat, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6145–6148.
- [89] D. O. Arbelo, L. Castro-Rosario, J. a. Prieto, *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 3211–3223.
- [90] N. A. Hawryluk, B. B. Snider, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8379–8380.
- [91] R. J. M. Goss, S. Lanceron, A. Deb Roy, S. Sprague, M. Nur-E-Alam, D. L. Hughes, B. Wilkinson, S. J. Moss, *Chembiochem* **2010**, *11*, 698–702.
- [92] R. F. Kaltenbach, D. a Nugiel, P. Y. Lam, R. M. Klabe, S. P. Seitz, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5113–5117.
- [93] C.-W. T. Chang, Y. Hui, B. Elchert, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7019–7023.
- [94] H. B. Henbest, R. A. Wilson, *J. Chem. Soc.* **1957**, 1958–1965.
- [95] P. Kocovsky, I. Stary, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3236–3243.
- [96] P. O'Brien, A. C. Childs, G. J. Ensor, C. L. Hill, J. P. Kirby, M. J. Dearden, S. J. Oxenford, C. M. Rosser, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4955–4957.
- [97] L. Ji, D. Zhang, Q. Zhao, S. Hu, C. Qian, X.-Z. Chen, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7031–7037.

- [98] A. Fürst, P. A. Plattner, *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 275–283.
- [99] B. Rickborn, D. K. Murphy, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3209–3210.
- [100] M. Chini, P. Crotti, L. Favero, F. Macchia, M. Pineschi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7583–7586.
- [101] M. Chini, P. Crotti, L. A. Flippin, F. Macchia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7043–7048.
- [102] S. Ogawa, N. Chida, T. Suami, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1203–1207.
- [103] J. R. Mccarthy, P. E. Wiedeman, A. J. Schuster, J. P. Whitten, R. J. Barbuch, J. C. Huffman, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3095–3103.
- [104] P. Serrano, A. Llebaria, J. Vázquez, J. de Pablo, J. M. Anglada, A. Delgado, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4465–4472.
- [105] P. Serrano, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Org. Chem.* **2005**, 7829–7840.
- [106] M. Egido-Gabás, D. Canals, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 992–994.
- [107] L. Díaz, J. Casas, J. Bujons, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2069–2079.
- [108] M. S. M. Pearson, R. O. Saad, T. Dintinger, H. Amri, M. Mathé-Allainmat, J. Lebreton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3262–3267.
- [109] F.-X. Felpin, K. Boubekeur, J. Lebreton, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1497–1503.

5

**Enfermedad de Sanfilippo: síntesis
de sustratos para la diagnosis de las
variantes A y D**

5.1. Introducción

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un conjunto de siete enfermedades metabólicas caracterizadas por la ausencia o deficiencia de una de las enzimas relacionadas con el catabolismo de glicosaminoglicanos (GAGs). Las MPS son un tipo de enfermedad que se clasifica dentro de las enfermedades de depósito lisosomal (*Lysosomal Storage Diseases*, LSD). Por otro lado, los GAGs son polisacáridos formados por unidades repetidas de disacáridos que consisten en la unión entre *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina con un azúcar urónico (ácido glucurónico o ácido idurónico). Entre los GAGs más comunes se hallan la heparina, el heparan sulfato, la condroitina sulfato, el dermatan sulfato y el queratan sulfato.

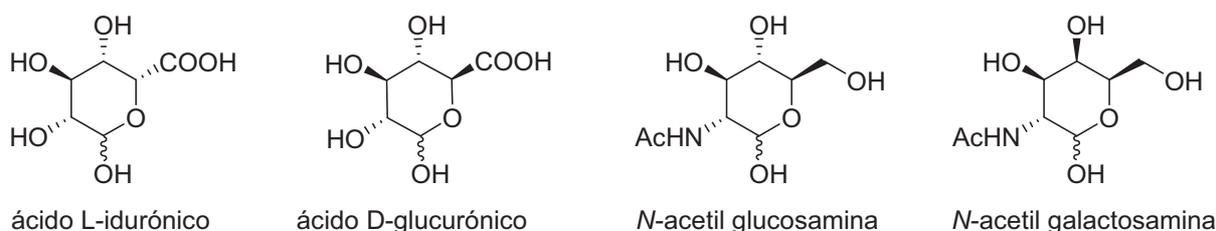


Figura 1. Unidades estructurales básicas de los GAG

Las MPS se caracterizan por mutaciones genéticas en los enzimas responsables de la degradación de los GAGs^[1] (la enzima que se relaciona con cada una de las MPS se presenta en la tabla 1), produciendo una acumulación de GAGs en células, sangre y/o tejidos que provoca un daño celular permanente y progresivo dando lugar a daños en el sistema nervioso y motor, deformaciones físicas, problemas de desarrollo mental y deterioro de órganos vitales.^[2] Los distintos tipos de MPS comparten patología y síntomas aunque el grado de severidad así como el avance de la enfermedad varían. Por ejemplo, el síndrome de Scheie o Maroteux-Lamy presenta una clínica con severos problemas de desarrollo físico pero no afecta al sistema cerebral. En cambio, los síndromes de Hurler o Hunter afectan al sistema nervioso central provocando graves problemas de desarrollo mental y provocando la muerte del paciente durante la niñez o adolescencia. Generalmente, los primeros síntomas de las MPS se detectan a los 2 años de vida del paciente y se agravan a medida que éste va creciendo hasta provocar su muerte a una edad más o menos temprana según el tipo de MPS. Se trata de enfermedades minoritarias con poca afectación a nivel poblacional. Actualmente no existe cura definitiva, si bien existen tratamientos para minimizar los efectos de la enfermedad.^[3] Un diagnóstico temprano, que incluso se puede realizar en fetos por análisis de la acumulación de GAGs en el líquido amniótico, es clave para minimizar los efectos de la enfermedad.

La MPSIII se conoce coloquialmente como enfermedad o síndrome de Sanfilippo y presenta 4 subvariedades (A, B, C y D) según la deficiencia o ausencia de las enzimas relacionadas con la

degradación del GAG heparan sulfato (HS). El HS es un polisacárido lineal formado por la unión de diversas unidades de los disacáridos ácido glucurónico-($\alpha 1 \rightarrow 4$)-N-Acetil-glucosamina y ácido idurónico-($\alpha 1 \rightarrow 4$)-glucosamina. Estas unidades pueden presentar diversos patrones de unión y sustitución, con modificaciones de tipo N-sulfato y O-sulfato, dando lugar a una gran variedad de HS según el tipo de célula donde se haya generado^[4]. El catabolismo del HS se presenta en la figura 2. La enfermedad se diagnostica a la edad de 1-2 años. Se caracteriza por una primera fase en la que se detecta una falta de desarrollo mental. La segunda fase conlleva problemas de conducta severos seguidos de un progresivo deterioro mental que puede llevar a demencias severas. En la última etapa los problemas de conducta se rebajan pero aparecen problemas graves del sistema motor y deterioro del sistema nervioso. La muerte del paciente se produce de media entre los 20 y 30 años, si bien la afectación es de entre 1,52 y una 1,89 personas por cada 100.000 habitantes.^[5] Actualmente no existe ninguna terapia que permite curar la enfermedad aunque existen perspectivas esperanzadoras en distintos trabajos para la detención y ralentización del avance de la enfermedad y minimización de deterioro mental y del sistema motor de los pacientes. Entre estos avances destacan la terapia de reemplazamiento enzimático, la inhibición de la producción de sustrato, la terapia génica o el uso de chaperonas químicas.

Tabla 1. Mucopolisacaridosis y enzimas deficientes relacionadas

Tipo	Nombre	Enzima deficiente	Producto acumulado
MPS I	Huler, Hurler-Scheie, Scheie	α -L-iduronidasa	DS, HS
MPS II	Hunter	Iduronate-2-sulfatasa	DS,HS
MPS III A	Sanfilippo A	Heparan-N-sulfatasa (SGSH)	HS
MPS III B	Sanfilippo B	N-acetil- α -glucosaminidasa (NAGLU)	HS
MPS III C	Sanfilippo C	Acetil-CoA- α -glucosaminida-N-acetiltransferasa (HGSNAT)	HS
MPS III D	Sanfilippo D	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa (GNS)	HS
MPS IV A	Morquio A	Galactosa-6-sulfatasa	KS, CS
MPS IV B	Morquio B	β -galactosidasa	KS
MPS VI	Maroteux-Lamy	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa	DS
MPS VII	Sly	β -glucuronidasa	DS, HS, CS
MPS IX		Hialuronidasa	Ácido hialurónico

Notas: CS: Condroitina sulfato; DS: Dermatan sulfato; HS: Heparan Sulfato; KS:Keratan sulfato

El diagnostico precoz de la enfermedad es clave para avanzarse a sus efectos y minimizarlos permitiendo una calidad de vida mejor para el paciente. La diagnosis de MPSIII se realiza inicialmente por detección de cantidades elevadas de HS en orina.^[6] Sin embargo, para confirmar y distinguir el tipo de MPSIII se requiere la realización de ensayos enzimáticos. Los ensayos con marcadores radioactivos,

espectrofotométricos y de fluorescencia han sido desarrollados en los últimos veinte años siendo éstos últimos los más utilizados por ser más robustos.^[7-10] La compañía Moscerdam (<http://www.moscerdam.com/>) comercializa los sustratos fluorescentes para realizar dichos ensayos dando respuesta a la necesidad de grupos de investigación y hospitales. En los últimos años se han desarrollado métodos para el diagnóstico de MPS basados en espectroscopía de masas pero sus resultados son aún preliminares.^[11]

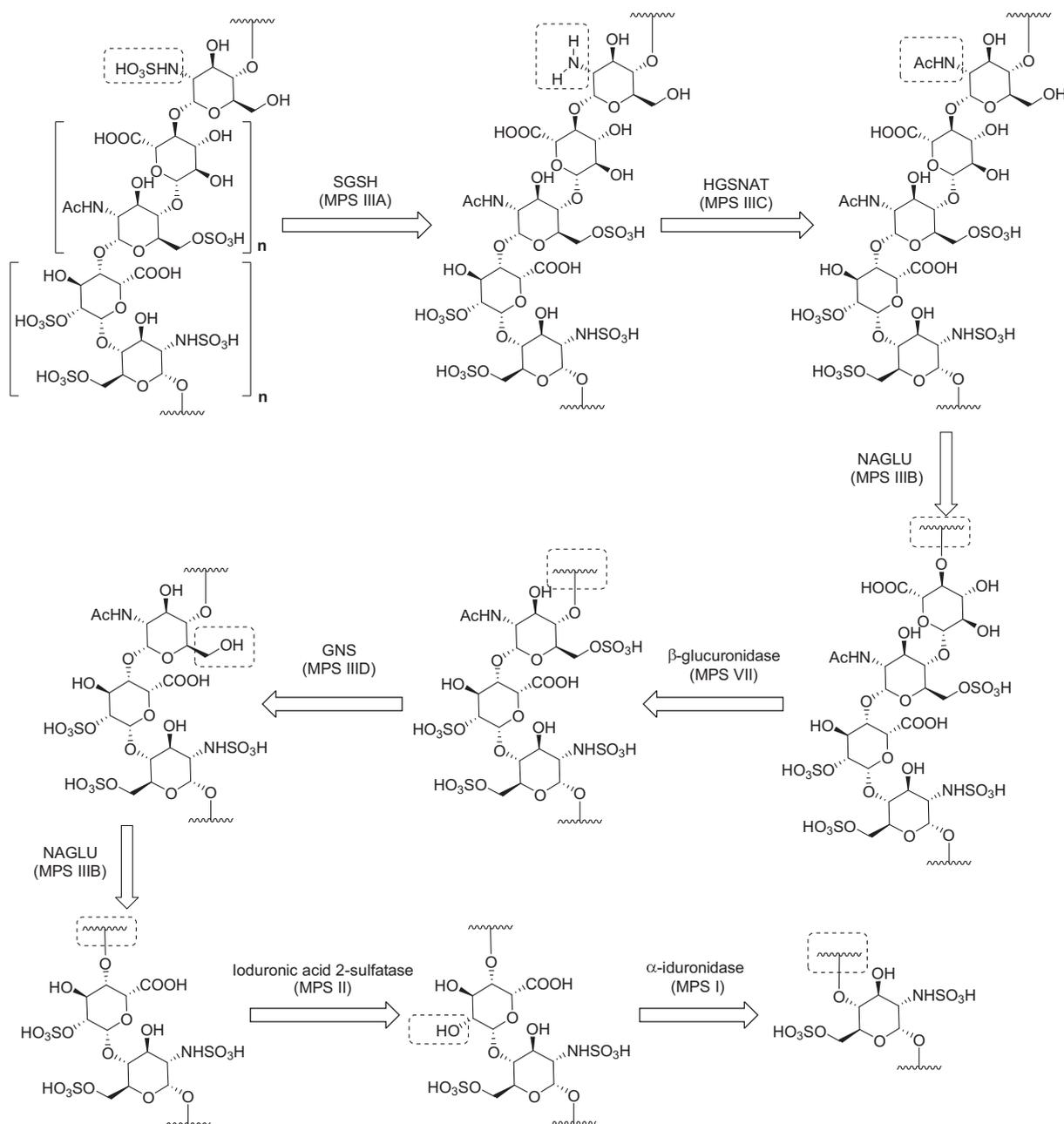


Figura 2. Catabolismo de HS. En cada etapa se ha destacado el punto de actuación de la enzima

5.2. Objetivos

En la actualidad, aunque las distintas variedades de Sanfilippo no tienen cura, su diagnóstico precoz es clave para mitigar sus efectos. En este contexto, la empresa Moscerdam es uno de los suministradores principales de los productos usados para el diagnóstico de las distintas subvariedades de Sanfilippo mediante ensayos enzimáticos fluorimétricos. Sin embargo, recientemente se han descatalogado los productos necesarios para la diagnosis de Sanfilippo A y D.

La enfermedad de Sanfilippo A o MPSIIIA se caracteriza por una ausencia o funcionamiento incorrecto de Heparan-*N*-sulfatasa (SGSH) que se traduce en una acumulación de HS. El gen responsable de la biosíntesis de SGSH fue identificado en 1995 y localizado en el cromosoma 17q25.3. Desde entonces se han reseñado hasta 68 mutaciones de este enzima. La correlación fenotípica geográfica resulta difícil de establecer para este tipo de enfermedad.

La enfermedad de Sanfilippo D o MPSIIID es el subtipo de Sanfilippo menos abundante y constituye una enfermedad muy minoritaria. Se relaciona con la ausencia de *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa (GNS) cuyo gen responsable de su biosíntesis fue identificado en 1988. Hasta el momento sólo se han detectado 6 mutaciones distintas. Sus síntomas son muy comunes al resto de Sanfilippo y se caracterizan por una primera fase de comportamiento agresivo e hiperactividad seguidos de un daño irreversible en el sistema nervioso. ^[12,13]

Debido al interés de la comunidad científica en dichos productos, la Dra. Fátima Bosch, directora del CBATEG (Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica, Universitat Autònoma de Barcelona) y la Dra. Antònia Ribes, responsable del departamento de Enfermedades Metabólicas Hereditarias del IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona), propusieron a nuestro grupo de investigación la síntesis del compuesto para la diagnosis de Sanfilippo A. Por otro lado, aprovechando la síntesis nos planteamos también la síntesis del producto para la Sanfilippo D.

Así nos planteamos como objetivos del presente capítulo:

- Síntesis de la sal sódica de 4-Metilumbeliferil- α -*N*-sulpho-D-glucosaminida (4MU- α -GlcNS, **17**) para su uso en el diagnóstico de Sanfilippo A
- Síntesis de la sal sódica de 4-Metilumbeliferil- α -*N*-acetyl-D-glucosaminida-6-sulfato (4MU- α -GlcNAc-6S, **18**) para su en el diagnóstico de Sanfilippo D.

5.3. Análisis retrosintético

Las síntesis de productos similares a las moléculas objetivo planteadas son escasas. Se conocen aproximaciones sintéticas de productos β -glucosídicos 4-metilumbilferínicos^[14,15] o flavonoides^[16,17]. Sin embargo, las aproximaciones para derivados α son muy escasas. De hecho se acostumbran hallar referencias de dichos derivados obtenidos como productos secundarios en las síntesis de los β -derivados. En 2002, Dasgupta *et al.*^[18] desarrollaron una síntesis de **17** en 6 etapas y con un 7.5 % de rendimiento global. La descripción de la metodología es escasa y difícil de reproducir pero constituían un buen punto de partida para nuestras investigaciones. Así, nos propusimos basarnos en el trabajo de

Dasgupta *et al.* para sintetizar **17** y **18** de acuerdo al esquema retrosintético planteado a continuación (figura 3).

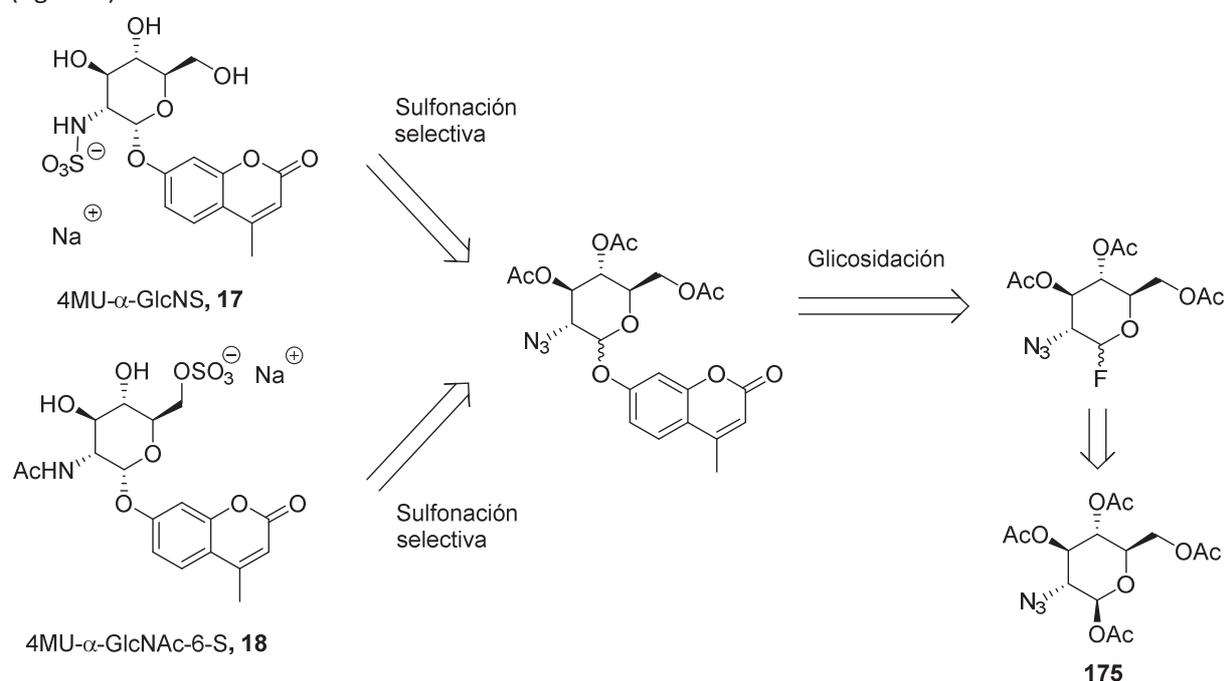
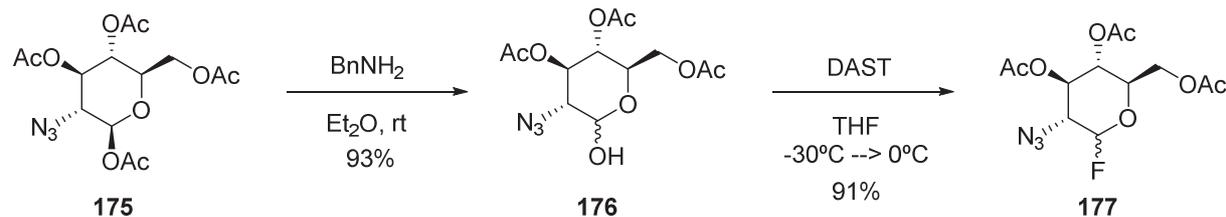


Figura 3. Esquema retrosintético para la obtención de **17** y **18**

5.4. Síntesis de 4MU-α-GlcNS, (**17**)

Se empezó por llevar a cabo el procedimiento descrito por Dasgupta *et al.*^[18] partiendo del producto comercial **175**. En primer lugar, se llevó a cabo la desprotección del OAc anómérico mediante tratamiento con BnNH_2 rindiendo **176** con un 93% de rendimiento y como una mezcla de diastereómeros. A continuación se realizó la fluoración del alcohol anómérico por reacción con DAST (trifluoruro dietilaminoazufre) a -30°C obteniendo el fluoro azúcar **177** con un 91% de rendimiento como una mezcla de diastereómeros 1:5 (α/β) analizado por ^{19}F -RMN.



Se prosiguió con la glicosidación del compuesto **177** con 4-metilumbeliferona (4MU). La reacción de glicosidación se da entre un aceptor, en nuestro caso la 4MU, y un donador, el azúcar, formándose un nuevo centro estereogénico correspondiente al carbono anomérico. El donador se acostumbra a activar mediante la inserción de un halógeno, un tiol o un tricloroacetimidato. La reacción está catalizada por un ácido de Lewis lo que permite una gran variedad de reactivos para llevar a cabo la reacción aunque el más común es $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Un factor clave para el correcto desarrollo de la reacción es

disponer de condiciones anhidras. En la literatura se pueden encontrar gran cantidad de ejemplos de glicosidaciones entre fluoroazúcares y flavonoides^[19-21], otros azúcares^[22], y también con 4MU^[23].

Nuestros esfuerzos para realizar la reacción de glicosidación entre **177** y 4MU fueron infructuosos. Se realizaron pruebas con varios disolventes e incluso trabajando en condiciones anhidras y utilizando tamices moleculares no se observó avance en la reacción. Dado que los precedentes de glicosidaciones con fluoroazúcares son abundantes en la literatura nos planteamos que el problema debía situarse sobre el aceptor. En la literatura, se pueden hallar ejemplos de glicosidaciones entre fluoroazúcares y 4TMS-MU^[24]. Se puede suponer que en estos casos el ácido de Lewis es capaz de desproteger el TMS y éste, a su vez, actúa captando el flúor del donador activándolo. De este modo, la 4MU desprotegida es capaz de atacar al donador y dar lugar a la glicosidación en un proceso cinéticamente favorecido.

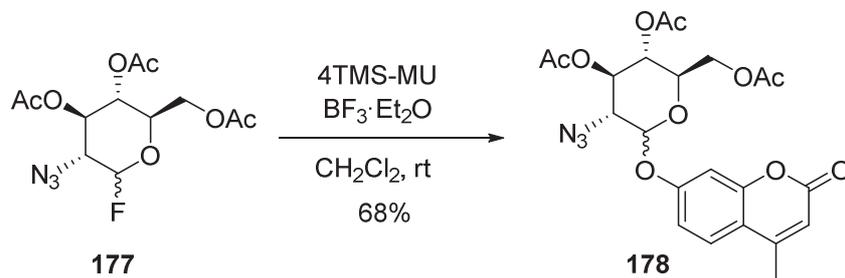
Para poder llevar a cabo este proceso se requería obtener la 4TMS-MU. La obtención de este producto no estuvo exenta de dificultad (tabla 2) logrando su obtención por reacción con TMS₂(NH) catalizada por LiClO₄ de forma cuantitativa. Sin embargo, el aislamiento del producto resultó ser muy difícil debido a la gran labilidad del TMS. Por ello se decidió utilizar el crudo de reacción directamente en las glicosidaciones.

Tabla 2. Síntesis 4TMS-MU

Sililación

Condiciones	Disolvente	T / °C	Rdto / %
TMSCl, imidazole	CH ₂ Cl ₂	rt	-
TMSCl, NaH	THF	rt	-
TMSCl, TEA, DMAP	CH ₂ Cl ₂	reflujo	-
(TMS) ₂ NH, TMSCl _{cat}	THF	50	-
(TMS) ₂ NH, LiClO _{4 cat}	CH ₂ Cl ₂	rt	cuant

Así, se prosiguió en la exploración de la reacción de glicosidación (tabla 3) determinando que un exceso de BF₃·Et₂O permitía llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente obteniendo **178** con un 68% de rendimiento como una mezcla 1:1 de los correspondientes anómeros. La separación de los anómeros resultó ser extraordinariamente difícil consiguiendo separar únicamente un 10% del anómero α de forma satisfactoria. Por ello, y a diferencia del procedimiento descrito, se decidió seguir adelante en la ruta sintética esperando que en alguna de las etapas posteriores su separación fuera más fácil.

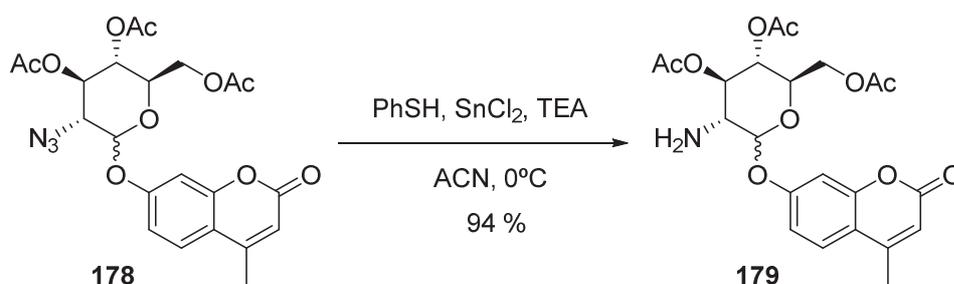
Tabla 3. Exploración de glicosidación de **177** utilizando 4TMS-MU

Entradas	Disolvente	Condiciones	T / °C	Producto	d.r.	Rdto / %
1	CH ₂ Cl ₂	-	0 → rt	177	PP	-
2	CH ₂ Cl ₂	tamices 4Å	rt	177	PP	-
3	CH ₂ Cl ₂	-	rt	178	54 : 46**	68

*Todas las reacciones de han realizado con 1,2-1,5 eq de BF₃·Et₂O excepto la entrada 3 donde se han usado 3 eq.

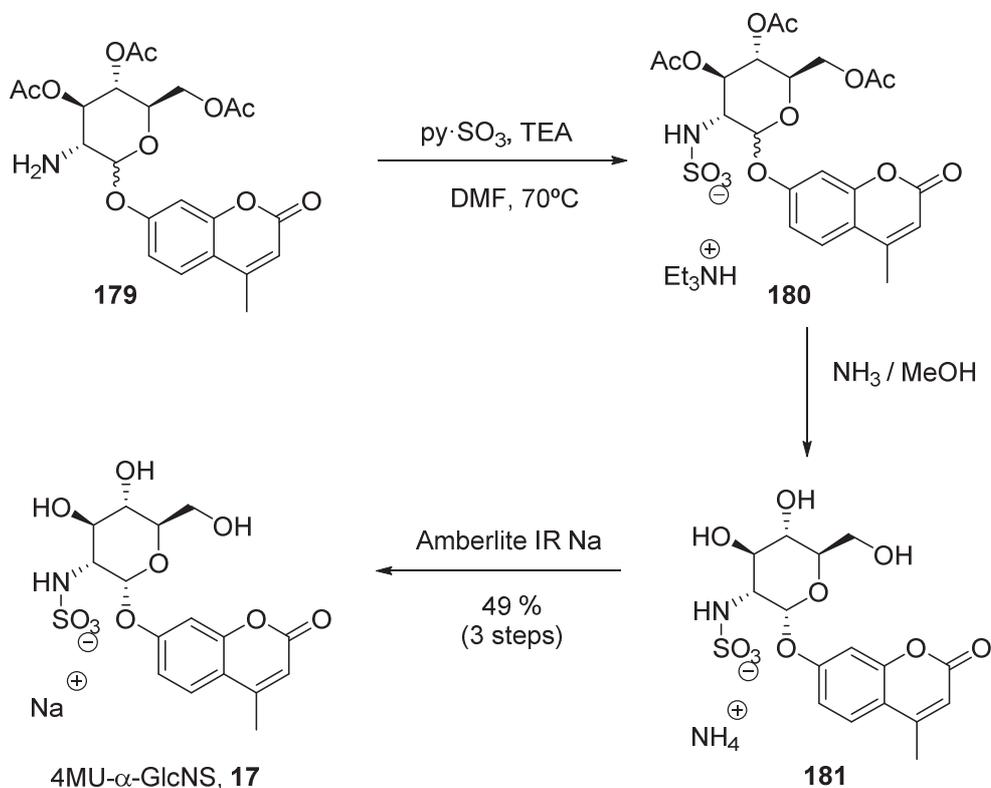
** Relación determinada por HPLC-MS

Una vez realizada la reacción de glicosidación, la siguiente etapa consistía en la reducción de la azida de **178**. Inicialmente, se exploró la hidrogenación a 3 barg con Pd/C. Se obtuvo el producto de reducción con una conversión total pero se observó epimerización en C2. Por ello, se decidió utilizar el procedimiento ya descrito consistente en la reducción con tiofenol y SnCl₂ que permite realizar la reacción en condiciones muy suaves y a baja temperatura. Así, se obtuvo **179** con un 94% de rendimiento sin apreciarse epimerización. Los α/β anómeros de **179** resultaron imposibles de separar por cromatografía.



A continuación, debido a la elevada polaridad de **179** y siguiendo el procedimiento descrito se intentó realizar la sulfonación directamente sobre el crudo de reacción. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que con este procedimiento la sulfonación no funcionaba correctamente. Se prosiguió pues con la sulfonación de la amina primaria previamente aislada mediante reacción con py·SO₃ en DMF. Los correspondientes anómeros de **180** tampoco pudieron ser separados por cromatografía. Además el aislamiento de **180** resultó ser difícil de realizar debido a su polaridad, por lo que, tras una filtración en SiO₂, se realizó la desprotección por tratamiento con NH₃/MeOH obteniendo la sal de amonio de α/β **181**. La mezcla de anómeros de **181** se pudo separar completamente mediante

cromatografía en fase reversa C18 aislando ambos anómeros por separado. A continuación se realizó un intercambio iónico de α -**181** con Amberlite IR-120 Na para obtener la correspondiente sal sódica de **17** con un 49% de rendimiento en 3 etapas.



El uso de **17** para el diagnóstico de la enfermedad de Sanfilippo A mediante ensayos enzimáticos fluorimétricos requiere que el producto tenga una elevada pureza y, concretamente, que la presencia de 4MU libre sea inferior al 0.1%. El análisis por HPLC del producto obtenido mostró la ausencia total de 4MU así como un nivel de pureza superior al 99%. En conclusión, se ha obtenido **17** con un rendimiento global del 25% en 7 etapas sintéticas y con una pureza adecuada para su uso en el diagnóstico de Sanfilippo A.

5.4.1. Ensayos enzimáticos fluorimétricos

Los ensayos enzimáticos fluorimétricos de control realizados según la metodología descrita por Karpova *et al.*^[10] permitieron comprobar que nuestro producto era adecuado para su uso en el diagnóstico de Sanfilippo A. Los pacientes de Sanfilippo A dan una respuesta negativa al ensayo dado que al no tener el enzima SGSH no son capaces de romper el enlace glicosídico de **17**, no se libera 4MU y, por lo tanto, no se observa fluorescencia. En cambio, los pacientes control que poseen el enzima SGSH dan respuesta positiva. El margen de control se sitúa entre 50-170 nmol/h para un positivo y se exige una respuesta de menos de 0,5 nmol/h para un negativo.

Se realizaron 2 *batches* de 4MU- α -GlcNS (**17**) y se realizaron los ensayos en paralelo con ambos¹. Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico 1. En él, se puede observar claramente que ambos *batches* no dan respuesta para pacientes de Sanfilippo A mientras que todos los controles son positivos. Además, también se puede observar que nuestro producto presenta un comportamiento muy similar al registrado con Moscerdam®, demostrando así su aplicabilidad para el diagnóstico de Sanfilippo A.

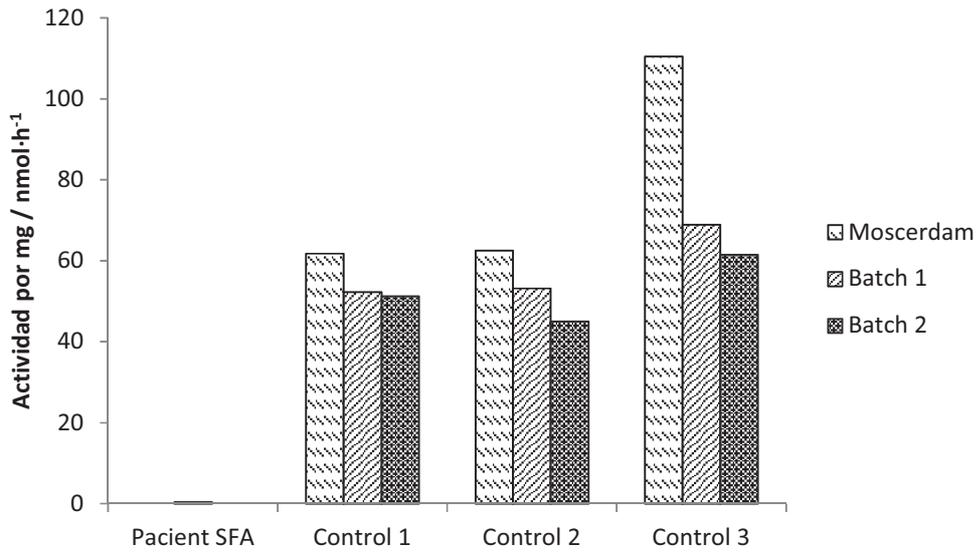
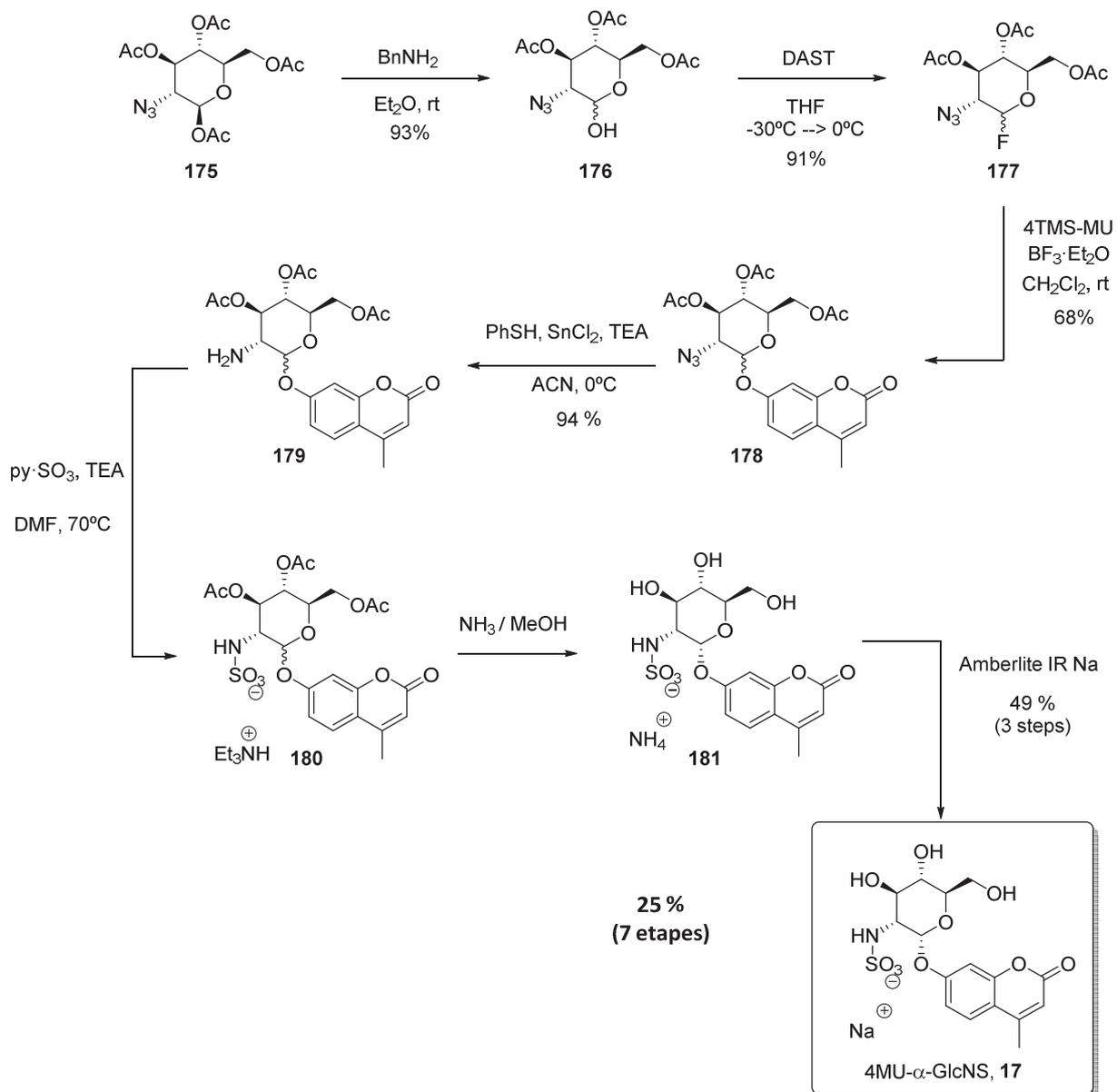


Gráfico 1. Ensayos enzimáticos comparativos de **17** con respecto al sustrato comercial de Moscerdam® frente a 3 pacientes control y un enfermo de Sanfilippo A

¹ Departamento de Enfermedades Metabólicas Hereditarias. IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic), Barcelona

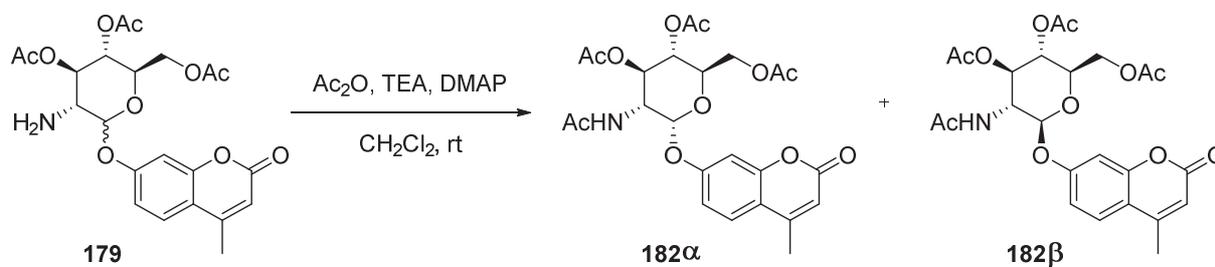
5.4.2. Resumen general de la ruta sintética de 4MU- α -GlcNS, (17)



5.5. Síntesis de 4MU- α -GlcNAc-6S, 18

Los precedentes sintéticos de **18** son prácticamente inexistentes. Sólo se pudieron hallar referencias a su síntesis ^[25,26] partiendo de intermedios ya muy avanzados y sin referencias a las caracterizaciones de los distintos intermedios por lo que seguir estas metodologías no resultaba plausible. Ante este hecho, se planteó aprovechar la metodología utilizada en la síntesis de **17**. De este modo se podía partir del intermedio **179** como mezcla de dos diastereómeros e intentar sintetizar **18** tomando como etapa clave la desprotección selectiva del hidroxilo primario (figura 3).

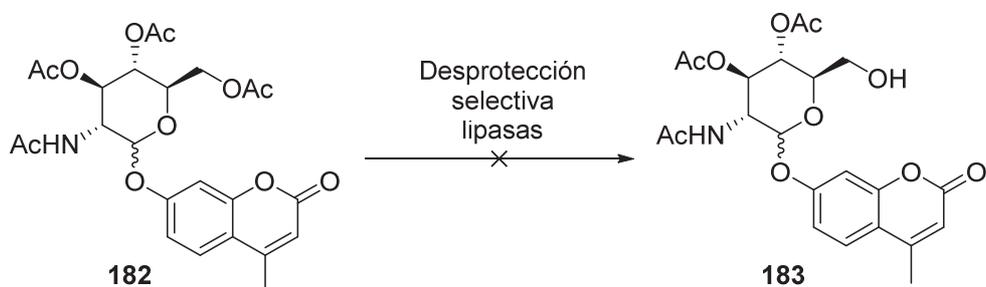
Así pues, la primera etapa sintética consistía en realizar la acetilación de **179**. Para ello, se trató **179** con Ac₂O en presencia de TEA y DMAP y se obtuvo la acetamida **182** correspondiente con un 96% de rendimiento como una mezcla de anómeros α/β 1:1. Tras explorar varias fases estacionarias, disolventes y gradientes se pudieron separar de forma cuantitativa ambos anómeros obteniendo el anómero α de interés con un 52% de rendimiento.



La etapa siguiente consistía en la desprotección selectiva del acetilo en C6. En la literatura se pueden hallar gran cantidad de ejemplos de aplicación de lipasas para la desprotección selectiva de acetilos en azúcares. Generalmente, se acostumbra a observar una tendencia hacia la desprotección selectiva de acetilos en el hidroxilo primario o bien en hidroxilos en la posición anomérica manteniendo los hidroxilos secundarios protegidos^[27,28]. Dicha selectividad se puede regular en función de varios factores^[29,30]: a) el enzima: existen una gran variedad de lipasas asequibles comercialmente; b) el disolvente: se utilizan generalmente agua o mezclas de agua con acetonitrilo o dioxano; c) el pH: regulado través de tampones cuya concentración también se puede variar; d) la temperatura: generalmente se incubaba a temperaturas entre 25 y 50°C; e) el tiempo de reacción; f) inmovilización de la lipasa sobre resinas: se han hecho estudios sobre la influencia de trabajar con lipasas inmovilizadas sobre distintos tipos de soportes observándose importantes mejoras en los rendimientos y selectividades según el tipo de soporte utilizado.^[31,32]

Dado que nuestro sustrato **182** era un azúcar común, se decidieron ensayar las desprotecciones selectivas enzimáticas (tabla 4). Para ello se realizó un primer *screening* con 8 lipasas distintas utilizando unas condiciones de pH 7,6 en un tampón fosfato e incubación a 40°C. Sorprendentemente, los análisis por HPLC-MS mostraron únicamente el producto de partida intacto. Se decidió hacer algunas pruebas más variando la temperatura y cambiando a pH ligeramente ácido pero con idéntico resultado. Ante estos resultados se decidió abandonar esta vía y buscar otros métodos de desprotección.

Tabla 4. Desprotección selectiva enzimática con lipasas



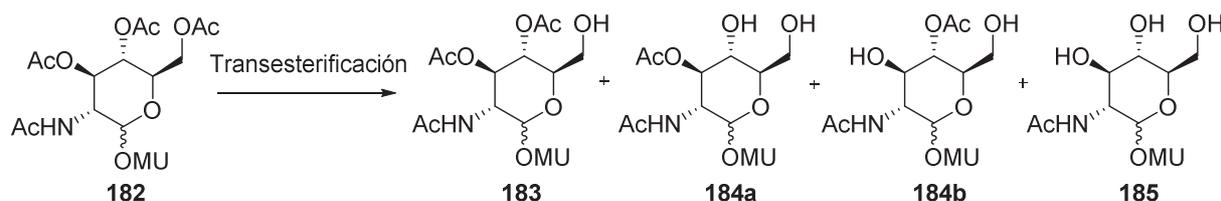
Entrada	Lipasa	Disolvente	pH	T / °C
1	<i>Aspergillus</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
2	<i>Candida antarctica</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
3	<i>Candida rugosa</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
4	<i>Mucor miehei</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
5	<i>Pseudomonas cepacia</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
6	<i>Rhizopus arrhizus</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
7	<i>Rhizopus niveus</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
8	<i>Porcine pancreas</i>	ACN : tampón 1 : 1	7.6	40
9	<i>Candida antarctica</i>	ACN : tampón 1 : 1	5.2	40
10	<i>Mucor miehei</i>	ACN : tampón 1 : 1	5.2	40
11	<i>Pseudomonas cepacia</i>	ACN : tampón 1 : 1	5.2	t.a.
12	<i>Rhizopus arrhizus</i>	ACN : tampón 1 : 1	5.2	t.a.

Notas. a) Entradas 1-8 tampón fosfato 10mM
b) Entradas 9-12 tampón fosfato 25 mM

Se planteó como alternativa para desproteger el acetilo primario explorar reacciones de transesterificación utilizando distintos alcoholes. En capítulos anteriores se había observado que trabajando a reflujo de MeOH se conseguían desproteger los acetilos secundarios de los acetamido iminoazúcares. Por ello, se pensó en aplicar el mismo método (tabla 5). Inicialmente se comprobó que en ausencia de alcohol no había reacción. A continuación, se observó que en presencia de MeOH ya se

conseguía una mezcla de productos donde se había eliminado parcialmente los acetilos aunque sin selectividad. La similitud en tiempo de retención no permitía aislar ninguno de los productos por cromatografía. En consecuencia, se planteó utilizar alcoholes de mayor tamaño buscando una mayor selectividad. Los experimentos realizados con etanol mostraron una alta selectividad aunque con poca conversión mientras que el 1-propanol o el IPA no mostraron reactividad. Cabe destacar que en ningún caso se llegó a observar la formación de **185**. Sin embargo, dado que no se consiguieron selectividades y conversiones aceptables se decidió abandonar esta vía.

Tabla 5. Desprotección selectiva por transesterificación.

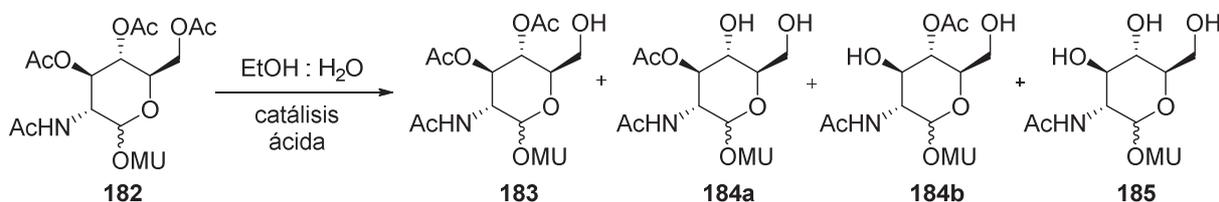


Entrada	Disolvente	T / °C	182	183	184a/b
1	ACN:H ₂ O 1:1	40	100	0	0
2	MeOH:H ₂ O 1:1	rt	47,7	36,4	15,8
3	MeOH:H ₂ O 1:1	40	43,9	34,6	21,4
4	EtOH:H ₂ O 1:1	70	87,4	12,6	0
5	PrOH:H ₂ O 1:1	70	100	0	0
6	IPA:H ₂ O 1:1	70	100	0	0

Notas. a) análisis de los resultados por HPLC-MS
b) tiempo de reacción 24h en todos los casos

Aunque los resultados anteriores no eran satisfactorios, el hecho de que con etanol como disolvente se consiguiera desproteger selectivamente el acetilo en C6 hizo pensar que posiblemente en las mismas condiciones pero con catálisis ácida se podría aumentar el ratio **182** : **183** sin desproteger los acetilos secundarios. Con dicha finalidad se exploró esta posibilidad utilizando varios ácidos de Lewis (BF₃·Et₂O, Ti(ⁱOPr)₄ y SnCl₂) y variando temperaturas (tabla 6). Los resultados obtenidos mostraban claramente como en presencia de un ácido de Lewis las desprotecciones se aceleraban considerablemente. Lamentablemente, se perdía totalmente la selectividad. Por ejemplo, trabajando con BF₃ a t.a. se obtenía una elevada selectividad pero con poca conversión. Al forzar las condiciones aumentando la temperatura se observó una desprotección cada vez mayor de los acetilos secundarios. El patrón se repitió con SnCl₂. En el caso del Ti(ⁱOPr)₄ no se observó avance de la reacción lo que se atribuyó a un mal estado del reactivo.

Tabla 6. Desprotección selectiva en EtOH con catálisis ácida.

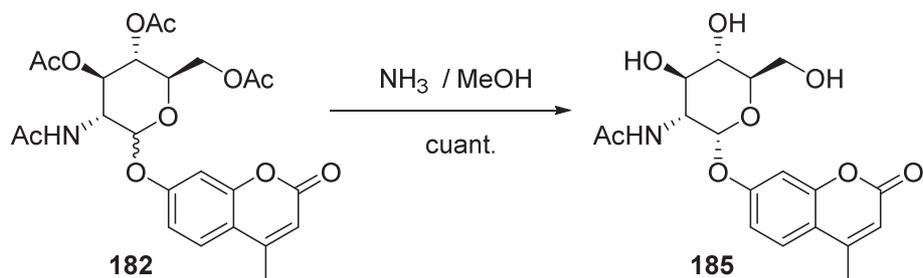


Entrada	Disolvente	Ácido	T / °C	182	183	184a/b	185
1	EtOH:H ₂ O 1:1	HCl 1M	40	0	0	29,5	70,5
2	EtOH:H ₂ O 1:1	BF ₃ ·Et ₂ O	t.a.	77,6	22,4	0	0
3	EtOH:H ₂ O 1:1	BF ₃ ·Et ₂ O	50	6,4	29,1	51,8	12,5
4	EtOH:H ₂ O 1:1	BF ₃ ·Et ₂ O	80	0	11,9	37,0	51,0
5	EtOH:H ₂ O 1:1	SnCl ₂	t.a.	100	0	0	0
6	EtOH:H ₂ O 1:1	SnCl ₂	50	67,5	22,7	9,7	0
7	EtOH:H ₂ O 1:1	SnCl ₂	80	0	9,6	34,2	56,2
8	EtOH:H ₂ O 1:1	Ti(ⁱ OPr) ₄	80	100	0	0	0

Notas. a) análisis de los resultados por HPLC-MS
b) tiempo de reacción 24h en todos los casos

Dado que en ningún caso se consiguió obtener **183** de manera mayoritaria, se planteó cambiar la ruta sintética. La alternativa planteada consistía en desproteger todos los grupos acetilo obteniendo **185** y explorar la sulfonación selectiva del alcohol primario. La sulfonación selectiva de alcoholes primarios respecto secundarios y terciarios se ha descrito tanto para azúcares como para otros compuestos^[33,34]. Generalmente se utiliza py·SO₃^[35,36] o TMA·SO₃^[37,38] como agentes sulfonantes o bien también se pueden realizar mediante reacciones enzimáticas^[39,40]. Cabe destacar que en todos los casos se acostumbra a detectar la formación de productos de sobresulfonación aunque se pueden minimizar. Por ello los rendimientos obtenidos oscilan entre el 40 y 80% dependiendo del sustrato y las condiciones aplicadas.

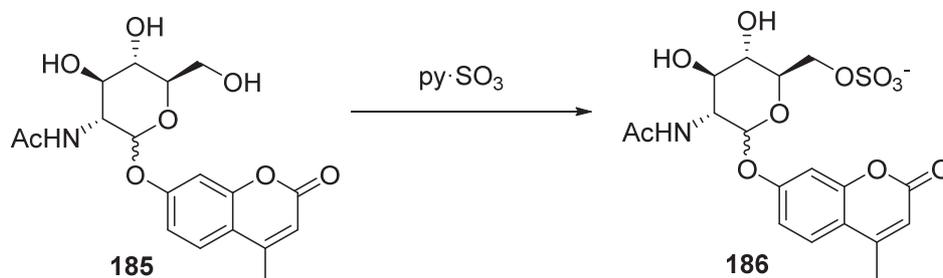
Con estos precedentes se trató **182** con NH₃/MeOH a t.a. y se obtuvo **185** de forma cuantitativa. El mismo procedimiento se aplicó a cada uno de los anómeros por separado obteniendo los mismos resultados.



Una vez obtenido el producto desprotegido se exploró la sulfonación selectiva utilizando $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ como agente sulfonante. Las pruebas iniciales (tabla 7, entradas 1-5) se realizaron siguiendo los procedimientos típicos hallados en la literatura, es decir, únicamente con $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ en DMF y se observó que a mayor temperatura se favorecía la formación de productos de sobresulfonación, mientras que a temperaturas entre 40 y 60°C se obtenían bajas conversiones incluso aumentando los tiempos de reacción. Por otro lado, no era posible seguir la reacción por TLC debido a la elevada polaridad de los intermedios. Se realizaron intentos de seguimiento con TLC de fase reversa pero dado que las reacciones se realizaban en DMF no se conseguía obtener resultados claros. Alternativamente, se intentó realizar las reacciones en otros disolventes como dioxano, acetonitrilo o agua pero el compuesto **185** resultó ser insoluble en todos ellos. Se intentó también seguir la reacción por ^1H -RMN sin éxito. Ante estos problemas, únicamente se podían tomar como valores seguros los resultados obtenidos mediante análisis por HPLC-MS.

A continuación, se decidió añadir al medio una base en exceso ya que en el caso de *N*-sulfonaciones mejora considerablemente el avance de la reacción. Cabe comentar que el exceso de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ puede dar lugar a la formación de trazas de ácido sulfúrico ya que el SO_3 liberado puede reaccionar con agua en caso de que las condiciones no sean completamente anhidras. Estas trazas de ácido pueden actuar hidrolizando el enlace *O*-*S*. La adición de una base en exceso minimiza este problema. Se escogió TEA y se realizaron pruebas a varias temperaturas (tabla 7, entradas 7 y 8) observándose que se llegaba a una relación 1:1 entre **185** y **186**. Aunque se añadió exceso de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ al medio no se consiguió mayor avance de la reacción.

Inicialmente, se planteó que posiblemente el complejo de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ se descomponía en piridina y SO_3 demasiado rápido. Para minimizar este hecho se preparó una disolución de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ y se añadió lentamente sobre la reacción mediante una bomba de jeringa con el objetivo de que el SO_3 se liberará lentamente. Además, los últimos resultados sugerían que la reacción llegaba a un equilibrio y simplemente no avanzaba más. Posiblemente, pequeñas cantidades de agua producían este efecto ya que esta pueda actuar hidrolizando el sulfato^[41]. Para eliminar este problema se decidió trabajar en presencia de tamiz molecular (tabla 7, entrada 9). Otra posibilidad era que la sal de trietilamonio formada no fuera suficientemente estable. Por ello, se decidió trabajar en presencia de NaHCO_3 lo que daría lugar a la formación de la sal sódica (tabla 7, entrada 10). En ningún caso, se mejoraron los resultados anteriores.

Tabla 7. Sulfonación de **185** con $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ 

Entrada	Base	T / °C	t / h	185 : 186	Sobresulfonación
1	-	40	6	80 : 20	No
2	-	60	6	75 : 25	No
3	-	60	24	75 : 25	No
4	-	80	24	70 : 30	Si
5	-	100	24	-	Si
6	TEA	60	6	40 : 60	No
7	TEA	80	24	50 : 50	No
8	TEA ^{a, b}	60	6	80 : 20	No
9	NaHCO_3 ^a	60	6	90 : 10	No

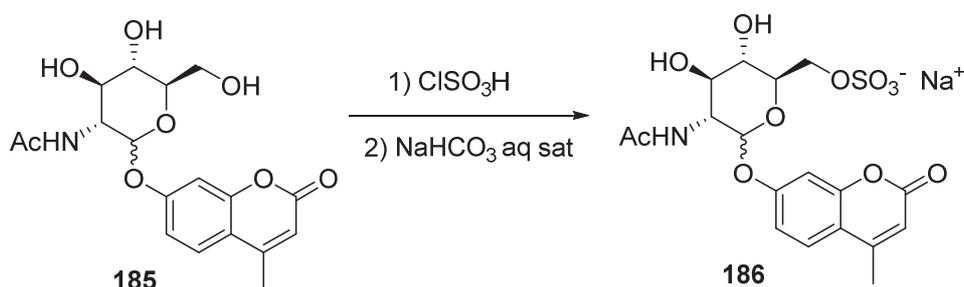
- Notas.** a) adición lenta de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ durante 4h
 b) tamiz molecular en polvo
 c) todas las reacciones se han realizado con 3 eq de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$
 d) análisis de los resultados por HPLC-MS

Los resultados obtenidos hasta el momento no eran suficientemente satisfactorios como para realizar la última etapa sintética. Por un lado, las conversiones no superaban en ningún caso el 50% y, por otro, la purificación del producto parecía realmente difícil de realizar ya que **185**, **186** y los productos de sobresulfonación tenían tiempos de retención muy similares haciendo difícil su separación por cromatografía en fase reversa. Por ello, se decidió explorar el uso de otros agentes sulfonantes menos comunes.

En primer lugar, se decidió utilizar ácido clorosulfónico (ClSO_3H) que se ha utilizado para la sulfonación de alcoholes de productos no glicosídicos especialmente en casos en que $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ o $\text{TMA}\cdot\text{SO}_3$ no han dado buenos resultados. ^[42] Se trata de un reactivo que reacciona extraordinariamente rápido. Dado su carácter ácido es capaz de romper fácilmente el mismo enlace O-S formado, por lo que las

reacciones se realizan en minutos y los crudos se neutralizan rápidamente con NaOH o NaHCO₃ para generar las sales sódicas correspondientes. [43–45] Se realizaron varias pruebas utilizando este agente sulfonante pero lamentablemente no se consiguieron resultados satisfactorios. En general, se requerían varios equivalentes de ClSO₃H para conseguir conversiones adecuadas y eso daba lugar a la formación de productos de sobresulfonación y a la descomposición parcial de los productos formados (tabla 8, entradas 1-3). Se planteó utilizar ClSO₃H en presencia de base en el medio esperando que reaccionará más rápido con el alcohol primario que con la base (tabla 8, entrada 5). Con estas condiciones se igualaron los mejores resultados obtenidos con py-SO₃. Sin embargo, estos resultados no se consiguieron reproducir. Por lo tanto, se descartó el uso de ClSO₃H como agente sulfonante.

Tabla 8. Exploración de ClSO₃H como agente sulfonante



Entrada	Eq ClSO ₃ H	t / min	185 : 186	Sobresulfonación
1	6	30	-	Si
2	1,2	15	100 : 0	No
3	3	20	68 : 32	Si
4	10 ^a	20	50 : 50	Si

Notas. a) reacción realizada en presencia de 10 eq de NaHCO₃
b) análisis de los resultados por HPLC-MS

En segundo lugar, se planteó que el equivalente sintético más lógico para insertar un sulfato era el cloruro de sulfurilo. En la presente tesis, se ha utilizado dicho reactivo para sintetizar sulfatos cíclicos en una única etapa sintética. Además, los estudios realizados en el grupo indicaban que el cloruro de sulfurilo reacciona con hidroxilos generando el cloruro de sulfonilo correspondiente cuya hidrólisis generaría el ácido.[46] Por lo tanto, se planteó que hidrolizando con una disolución básica se podría obtener directamente un sulfonato sódico (figura 4). Cabe destacar, que no se hallaron precedentes del uso de este reactivo como agente sulfonante en la literatura.

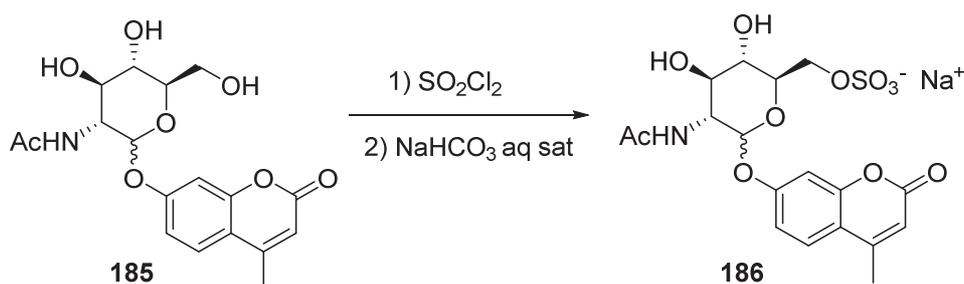


Figura 4. Reacción de SO₂Cl₂ con alcoholes para la formación de sulfatos

Los primeros ensayos realizados con SO₂Cl₂ mostraron que se generaban gran cantidad de productos de sobresulfonación y productos secundarios (tabla 9, entrada 1). Se realizaron pruebas

añadiendo el SO_2Cl_2 diluido en 1mL de DMF y de forma lenta mediante una bomba de jeringa (tabla 9, entradas 2-4). Mientras que la adición lenta resultó en una conversión nula, la adición del reactivo en forma de disolución permitió obtener una conversión elevada con baja generación de productos de sobresulfonación. Se decidió aplicar dichas condiciones sobre los anómeros α y β (tabla 9, entradas 5-6) pero lamentablemente en ambos casos se obtuvieron mezclas complejas de productos de sobresulfonación de donde resultó imposible aislar **186 α** o **186 β** . De nuevo la reproducibilidad de la reacción no era adecuada por lo que se descartó el uso de SO_2Cl_2 .

Tabla 9. Exploración de SO_2Cl_2 como agente sulfonante



Entrada	Sustrato	Eq SO_2Cl_2	t / min	185 : 186	Sobresulfonación
1	185	6	30	0 : 100	Si
2	185	1,2	60	95 : 5	No
3	185	3,5	40	15 : 85	Si
4	185^a	3,5	60	100 : 0	No
5	185β	3,5	40	n.d.	Si
6	185α	3,5	40	n.d.	Si

Notas. a) adición lenta durante 1h
b) análisis de los resultados por HPLC-MS

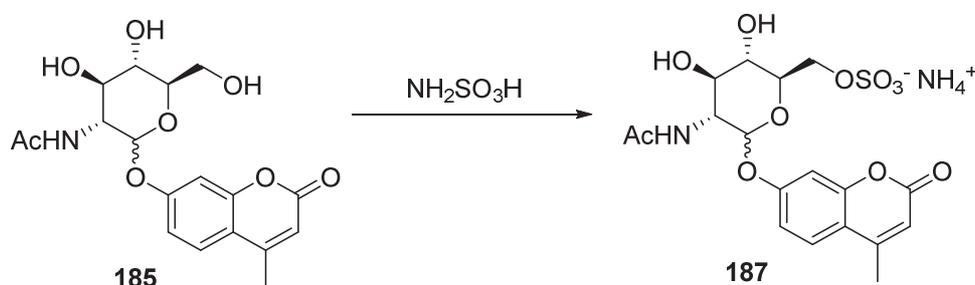
El último agente sulfonante utilizado fue el ácido sulfámico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$). El ácido sulfámico es un reactivo barato que se utiliza en la industria para sintetizar sulfonatos. Reacciona únicamente generando sulfonatos sobre alcoholes no aromáticos y presenta la particularidad de generar la sal amónica correspondiente de modo que no se necesita adicionar bases extras. Las reacciones se realizan simplemente calentando en un disolvente apropiado^[47].



Se decidió explorar el uso de ácido sulfámico como agente sulfonante realizando las reacciones en piridina.^[41] En este caso, se trabajó directamente con los anómeros **185 α** y **185 β** por separado, de este modo la cuantificación de los resultados por HPLC-MS era más fácil de realizar. En primer lugar, se

observó que en condiciones idénticas a las mejores obtenidas con $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ los resultados obtenidos eran muy similares (tabla 10, entrada 1). Además, aunque se añadiera exceso de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ la reacción no mostraba un avance mayor. En este caso, nos planteamos que posiblemente el problema radicaba en que el SO_3 generado por efecto de descomposición del $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ se perdía en la atmósfera del balón. Para comprobarlo se realizó una prueba en un tubo de presión cerrado con 10eq de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ y se observó una conversión total y la formación únicamente de productos de sobresulfonación (tabla 10, entrada 2). Por lo tanto, estaba claro que para conseguir conversiones totales era necesario trabajar en tubo de presión. Para minimizar el problema de los productos de sobresulfonación se realizaron varias pruebas variando tiempos de reacción y equivalentes de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ (tabla 10, entradas 3-5) y se determinó que era necesario un mínimo de 3 equivalentes de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ y trabajar a tiempos de reacción cortos. En caso de aumentar los tiempos de reacción se aumenta el porcentaje de productos de sobresulfonación.

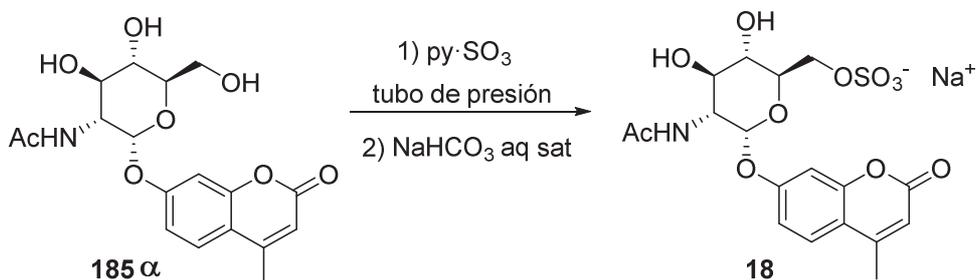
Tabla 10. Exploración de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ como agente sulfonante



Entrada	Sustrato	Eq $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}^a$	T / °C	t / h	Conv / %	187 / %	Otros / %
1	185β	3	60	3	67	55	12
2	185β	10	60	4	100	0	100
3	185β	3	60	4	87	61	26
4	185β	2	60	16	11	11	-
5	185α	3	60	7	78	16	62

Notas. a) reacciones en tubo de presión excepto entrada 1
 b) análisis de los resultados por HPLC-MS
 c) otros se refiere a productos de sobresulfonación

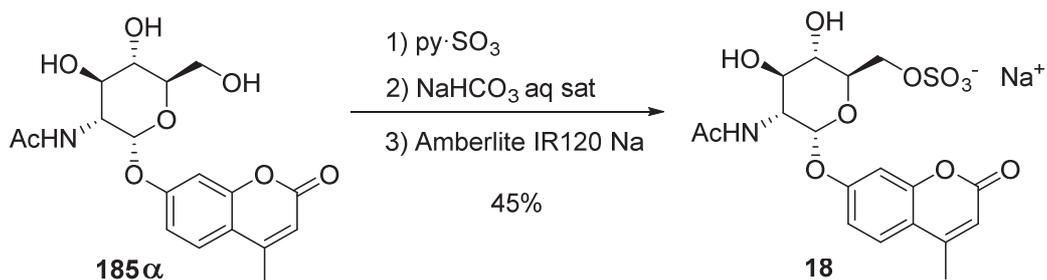
Dado que en los experimentos con $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ era clave trabajar en tubos de presión para obtener conversiones completas se decidió explorar de nuevo la $\text{py}\cdot\text{SO}_3$ como agente sulfonante pero trabajando en un tubo de presión y con **185 α** como sustrato de partida (tabla 11). Estos nuevos resultados permitieron observar que se podían conseguir conversiones completas pero que ello conllevaba la formación de productos secundarios de sobresulfonación. Aunque se realizaron diversas pruebas variando los equivalentes de $\text{py}\cdot\text{SO}_3$, los tiempos de reacción y la temperatura no se consiguieron obtener conversiones completas y, al mismo tiempo, minimizar la formación de productos secundarios.

Tabla 11. Sulfonación con py-SO₃ sobre **185α**

Entrada	Sustrato	Eq py-SO ₃	T / °C	t / h	Conv / %	18 / %	Otros / %
1	185α	5	60	3	100	43	57
2	185α	3	60	3	78	52	26
3	185α	3	35-40	24	48	42	6
4	185α	3	35-40	48	69	45	24
5	185α	5	35-40	24	100	38	62
6	185α	1,5	60	3	35	28	5

Notas. a) reacciones en tubo de presión
 b) análisis de los resultados por HPLC-MS
 c) otros se refiere a productos de sobresulfonación

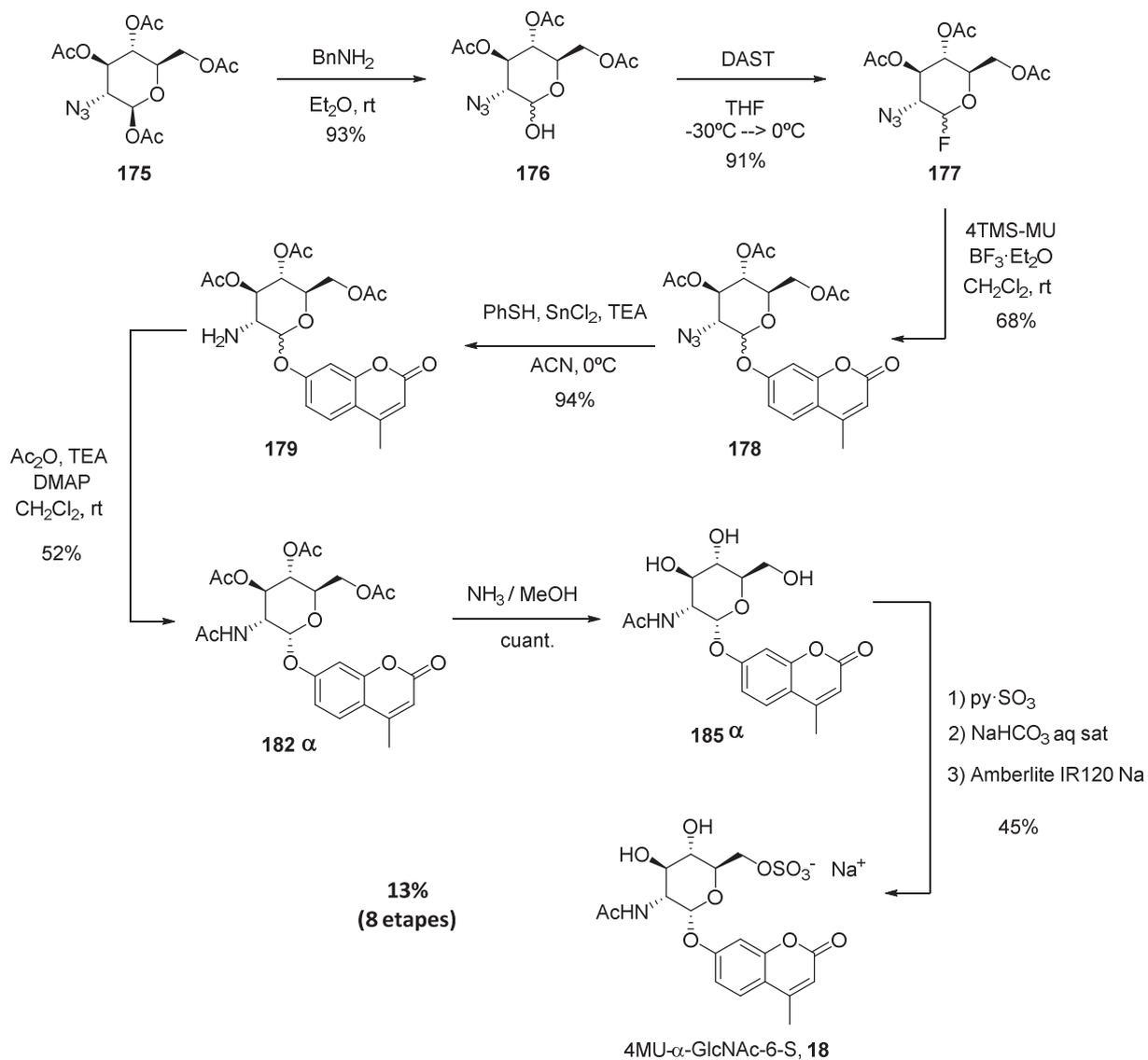
En este momento, se habían explorado varios agentes sulfonantes y multitud de distintas condiciones. La conclusión principal es que no se podía obtener conversiones completas evitando la formación de productos de sobresulfonación. Por lo tanto, era necesario llegar a un compromiso y escoger unas condiciones que permitieran la obtención de **18** de forma satisfactoria. Además la elección de estas condiciones no debía obedecer únicamente a los parámetros analizados sino que también debían ser adecuadas para la purificación posterior. Cabe recordar que los criterios de pureza para poder utilizar **18** en ensayos enzimáticos son elevados. Debido a las propiedades de **18** y analizando los HPLC de los crudos, el método de purificación a utilizar era necesariamente la cromatografía por fase reversa con MPLC o bien un HPLC preparativo. Lamentablemente, actualmente no se dispone de HPLC preparativo en nuestro grupo de investigación de modo que se optó por utilizar el MPLC. En este sentido, trabajar en unas condiciones donde no se generaran productos de sobresulfonación resultaba muy adecuado ya que el MPLC presenta una baja resolución en mezclas complejas. Por esta razón, se escogió aplicar las condiciones de la entrada 7 en la tabla 7 que permitían obtener una mezcla 50:50 entre **185**:**186** sin observarse la formación de productos de sobresulfonación. Además, en este caso se podía recuperar **185** para volver a realizar la reacción. Así pues, se aplicaron dichas condiciones sobre **185α** y tras una cuidadosa optimización de las condiciones de purificación con un MPLC se consiguió aislar la sal amónica de **18**. Tras pasar dicho producto a través de una resina de intercambio catiónico Amberlite IR-120 Na se consiguió obtener **18** con un 45% de rendimiento.



De este modo se sintetizó 4MU- α -GlcNS-6S (**18**) en 8 etapas sintéticas con un rendimiento global del 13%. En lo referente a los ensayos enzimáticos fluorométricos y, del mismo modo que ocurría con el sustrato **17**, se requieren unos valores de pureza elevados para su uso y concretamente que la presencia de 4MU libre sea inferior al 0.1%. El análisis por HPLC de **18** mostró la ausencia total de 4MU así como un nivel de pureza superior al 98%. Actualmente, se están realizando los ensayos fluorimétricos enzimáticos para validar el sustrato. ²

² Departamento de Enfermedades Metabólicas Hereditarias. IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), Barcelona

5.5.1. Resumen de la secuencia sintética para 4MU- α -GlcNS-6S, 18



5.6. Conclusiones

Se ha sintetizado la sal sódica de 4-Metilumbeliferil- α -N-sulpho-D-glucosaminida (4MU- α -GlcNS, **17**) en 7 etapas sintéticas y con un 25% de rendimiento global. La elevada pureza del producto ha permitido su validación como sustrato para la diagnosis de la enfermedad de Sanfilippo A y actualmente se está utilizando tanto en investigación (Dra. Fátima Bosch, Universitat Autònoma de Barcelona) como para el diagnóstico de la enfermedad (Dra. Antonia Ribes, Hospital Clínic de Barcelona).

Se ha sintetizado la sal sódica de 4-Metilumbeliferil- α -N-acetyl-D-glucosaminida-6-sulfato (4MU- α -GlcNAc-6S, **18**) en 8 etapas sintéticas, con un rendimiento global del 13% y con una elevada pureza. Actualmente se están realizando los estudios de validación para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de SanfilippoD.

Referencias

- [1] O. Meijer, N. van Vlies, F. A. Wijburg, *Expert Opin. Orphan Drugs* **2013**, *1*, 717–730.
- [2] C. A. Pennock, I. C. Barnes, *J. Med. Genet.* **1976**, *13*, 169–181.
- [3] R. Giugliani, A. Federhen, A. A. Silva, C. Matzenbacher, C. F. Moura, C. Brinckmann, O. Netto, F. Quos Mayer, G. Baldo, U. Matte, *Res. Reports Endocr. Disord.* **2012**, *2*, 53–64.
- [4] D. L. Rabenstein, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 312–331.
- [5] M. J. Valstar, G. J. G. Ruijter, O. P. van Diggelen, B. J. Poorthuis, F. A. Wijburg, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2008**, *31*, 240–252.
- [6] J. de Ruijter, L. Ijlst, W. Kulik, H. van Lenthe, T. Wagemans, N. van Vlies, F. A. Wijburg, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2013**, *36*, 271–279.
- [7] J. Marsch, A. H. Fensom, *Clin. Genet.* **1985**, *27*, 258–262.
- [8] Y. V. Voznyi, E. A. Karpova, T. V. Duduknika, I. V. Tsvetkova, A. M. Boer, H. C. Janse, O. P. van Diggelen, *J. Inherit. Metab. Dis.* **1993**, *16*, 465–472.
- [9] H. Wang, Y. V. Voznyi, A. M. Boer, W. J. Kleijer, O. P. van Diggelen, *J. Inherit. Metab. Dis.* **1993**, *16*, 935–941.
- [10] E. A. Karpova, Y. V. Voznyi, J. L. Keulemans, A. T. Hoogeveen, B. Winchester, I. V. Tsvetkova, O. P. van Diggelen, *J. Inherit. Metab. Dis.* **1996**, *19*, 278–285.
- [11] B. J. Wolfe, F. Ghomashchi, T. Kim, C. A. Abam, M. Sadilek, R. Jack, J. N. Thompson, C. R. Scott, M. H. Gelb, F. Turecek, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 557–564.
- [12] M. Jones, J. Alroy, J. Rutledge, D. Sillence, K. Cavanagh, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1997**, *56*, 1158–1167.
- [13] C. Beesley, D. Burke, M. Jackson, A. Vellodi, B. Winchester, E. Young, *J. Med. Genet.* **2003**, *40*, 192–195.
- [14] C. Malet, J. L. Viladot, A. Ochoa, G. Belen, C. Brosa, A. Planas, *Carbohydr. Res.* **1995**, *274*, 285–301.
- [15] C. Malet, A. Planas, *Biochemistry* **1997**, *2960*, 13838–13848.
- [16] D. Liang, H. Luo, Y.-F. Liu, Z.-Y. Hao, Y. Wang, C.-L. Zhang, Q.-J. Zhang, R.-Y. Chen, D.-Q. Yu, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2093–2097.
- [17] Y. L. Garazd, M. M. Garazd, V. P. Khilya, *Chem. Nat. Compd.* **2005**, *41*, 546–550.
- [18] F. Dasgupta, R. I. Masada, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1055–1058.
- [19] J. T. Zacharia, M. Hayashi, *Carbohydr. Res.* **2012**, *348*, 91–94.
- [20] L. Pang, S. Kleeb, K. Lemme, S. Rabbani, M. Scharenberg, A. Zalewski, F. Schädler, O. Schwardt, B. Ernst, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1404–1422.
- [21] K.-I. Oyama, T. Kondo, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5240–5246.
- [22] S. S. Iyer, S. M. Rele, S. Baskaran, E. L. Chaikof, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 631–638.
- [23] R. Hoss, J. Huixin, A. Vasella, P. Weiss, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1757–1784.
- [24] N. A. Markina, Y. V. Voznyi, *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2008**, *34*, 475–479.
- [25] Y. V. Voznyi, S. V. Afanasyeva, I. S. Kalicheva, A. A. Galoyan, *Bioorganicheskaya Khimia* **1991**, *17*, 1251–1257.
- [26] W. He, Y. V. Voznyi, A. M. Boer, W. J. Kleijer, O. P. van Diggelen, *J. Inherit. Metab. Dis.* **1993**, *16*, 935–941.
- [27] M. Filice, J. M. Palomo, P. Bonomi, T. Bavaro, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, M. Terreni, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9286–9292.
- [28] M. Terreni, R. Salvetti, L. Linati, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernández-Lorente, A. Bastida, J. M. Guisan, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1615–1621.

- [29] T. Rodríguez-Pérez, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Detorio, R. F. Schinazi, V. Gotor, M. Ferrero, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2239–2249.
- [30] T. Rodríguez-Pérez, I. Lavandera, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, V. Gotor, *European J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 2769–2778.
- [31] A. Hietanen, L. T. Kanerva, *European J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 2729–2737.
- [32] J. M. Palomo, M. Filice, R. Fernandez-Lafuente, M. Terreni, J. M. Guisan, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1969–1976.
- [33] A. G. Gonçalves, M. D. Nosedá, M. E. R. Duarte, T. B. Grindley, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2245–2250.
- [34] S. Ikegawa, K. Nagae, T. Mabuchi, R. Okihara, M. Hasegawa, T. Minematsu, T. Iida, K. Mitamura, *Steroids* **2011**, *76*, 1232–1240.
- [35] T. A. Duffey, T. Khaliq, C. R. Scott, F. Turecek, M. H. Gelb, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5994–5996.
- [36] A. G. Pearson, M. J. Kiefel, V. Ferro, M. von Itzstein, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4614–4625.
- [37] K. Sasaki, Y. Nishida, M. Kambara, H. Uzawa, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1367–1375.
- [38] K. Sasaki, Y. Nishida, H. Uzawa, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2821–2823.
- [39] H. Uzawa, T. Nagatsuka, H. Hiramatsu, Y. Nishida, *Chem. Commun.* **2006**, 1381–1383.
- [40] H. Uzawa, Y. Nishida, K. Sasaki, T. Nagatsuka, H. Hiramatsu, K. Kobayashi, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1597–1602.
- [41] D. R. Edwards, D. C. Lohman, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 525–531.
- [42] D. K. Bedke, G. M. Shibuya, A. Pereira, W. H. Gerwick, T. H. Haines, C. D. Vanderwal, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7570–7572.
- [43] W.-J. Chung, J. S. Carlson, C. D. Vanderwal, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2226–2241.
- [44] C. Nilewski, R. W. Geisser, E. M. Carreira, *Nature* **2009**, *457*, 573–576.
- [45] T. Umezawa, M. Shibata, K. Kaneko, T. Okino, F. Matsuda, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 904–907.
- [46] M. Alonso, A. Riera, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3908–3912.
- [47] W. Spillane, J.-B. Malaubier, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2507–2586.

6

**Cáncer de próstata: síntesis de los
estereoisómeros de EPI001**

6.1. Introducción y objetivos

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más común en hombres. Los tratamientos típicos para el cáncer de próstata incluyen quimioterapia, radioterapia y cirugía. Los andrógenos producidos en los testículos, principalmente testosterona, promueven el crecimiento de las células cancerosas de la próstata. Cuando los niveles de andrógenos son bajos, los cánceres de próstata se reducen y los tumores crecen más lentamente. Este hecho ha permitido relacionar el avance del cáncer de próstata con el receptor androgénico (*Androgen receptor, AR*) por lo que los tratamientos de bloqueo hormonal acostumbran a constituir siempre las primeras opciones de tratamiento en cánceres poco avanzados o bien se usa como complemento de los mencionados anteriormente. Aunque inicialmente, el tratamiento hormonal frena el avance del cáncer, después de un tiempo alrededor del 30% de los pacientes de cáncer de próstata muestran un aumento del tamaño del tumor. En estos casos, se prosigue con la extirpación de la próstata conllevando la ausencia de la hormona y, por lo tanto, una disminución gradual del tumor. El conjunto de esas técnicas acostumbra a resultar efectivo en el 70% de los casos. Sin embargo, el 30% restante desarrolla el denominado cáncer de próstata resistente a castración (*Castration-resistant prostate cancer, CRPC*) dando un tiempo de vida media al paciente de entre 18-24 meses y actualmente sin tratamiento terapéutico. ^[1]

La comprensión del mecanismo de funcionamiento del AR es clave para poder desarrollar terapias que permitan curar tanto el cáncer de próstata como el CRPC. Por ello, en los últimos años se ha producido un creciente interés en conocer el mecanismo de acción de este receptor.

El AR es un receptor de 919 residuos que se expresa en la mayor parte de tejidos y que es clave en el desarrollo del fenotipo sexual masculino. Se compone de 4 dominios (figura 1): el dominio de unión del DNA (*DNA binding domain, DBD*), dominio de unión de ligando (*Ligand binding domain, LBD*), una conexión flexible entre ambas y el dominio N-terminal (*N-terminal domain, NTD*). A diferencia del DBD y el LBD, cuyas estructuras son conocidas y están determinadas, el dominio N-terminal, que constituye el 60% de la proteína, no presenta estructura terciaria. Por ello ha resultado imposible determinar su estructura mediante técnicas de rayos X. Sin embargo, se ha determinado que el NTD tiene un papel crucial en varios procesos biológicos. ^[2,3]

El AR presenta dos sitios de activación que se sitúan en el NTD (AF1) y LBD (AF2). Los tratamientos de bloqueo hormonal consisten en la aplicación de moléculas antagonistas de la testosterona que actúan sobre AF2. De hecho se conocen varias moléculas que actúan como antagonistas sobre este dominio. ^[4] En cambio, utilizar AF1 como target en vez de AF2 buscando nuevos tratamientos para el cáncer de próstata es una de las alternativas que no se ha estudiado ampliamente. El principal problema radica en la falta de información estructural y dinámica de esta parte de AR que ha provocado que hasta el momento sea una línea de investigación poco explorada.

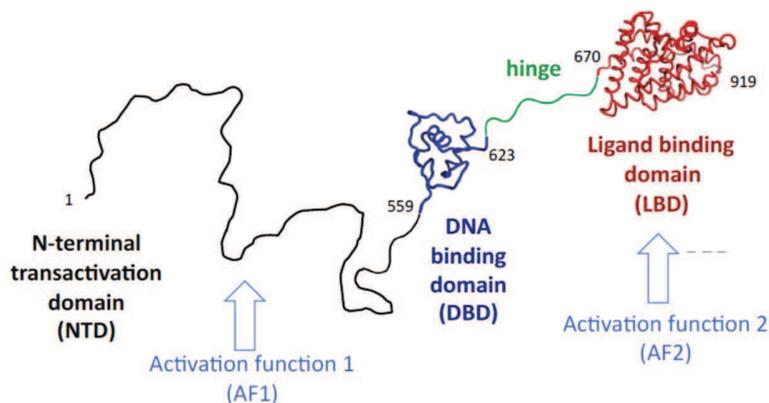


Figura 1. Estructura del AR

En los últimos años, los estudios sobre el NTD han permitido determinar que posee dos pequeños dominios estructurados denominados Tau1 y Tau5. Estos dos dominios son suficientes y necesarios para la completa actividad del AR.^[5] Con este descubrimiento se ha postulado que el NTD es clave en el desarrollo del cáncer de próstata ya que, aunque se actúe sobre AF2, la proteína puede seguir actuando provocando el desarrollo del cáncer incluso sin presencia de hormonas que la activen.

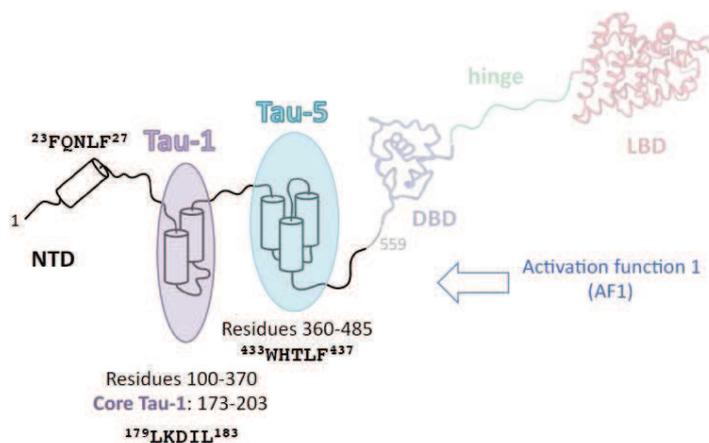
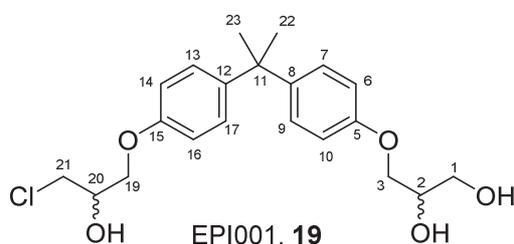


Figura 2. Localización de Tau1 y Tau5 en el NTD

En este contexto, hallar inhibidores del NTD se ha convertido en un reto. En el año 2010, se descubrió mediante *High throughput screening* una molécula denominada EPI001 capaz de interactuar específicamente con el NTD inhibiendo la actividad de la proteína incluso en presencia de testosterona. Además, EPI001 no presenta interacción con otros receptores esteroidales. La alta especificidad de esta molécula juntamente con su baja toxicidad en los primeros estudios preclínicos con animales la convierten en un buen punto de partida para el desarrollo de inhibidores más potentes así como para aumentar el conocimiento sobre el mecanismo de la enfermedad. Este compuesto y derivados suyos se han aislado de la esponja marina *Geodia lindgreni* y presenta similitud estructural con BADGE (Bisphenol A Diglycidic Ether) lo que presumiblemente indicaría que se trata de metabolitos resultantes de la degradación del Bisfenol A de origen industrial que se acumula en el agua marina.^[6-8]

EPI001 se presenta como una mezcla de cuatro estereoisómeros. Un paso importante para conocer el mecanismo de la enfermedad y las características de AF1 reside en determinar si la quiralidad de EPI001 es un factor clave en el *ratio* de unión del compuesto a AF1. ^[9] Es conocido que, a menudo, sólo uno de los diastereómeros es activo o uno es más activo que el resto, de modo que el compuesto usado en los análisis realizados hasta el momento podría tener hasta un 75% de impurezas.

El grupo del Dr. Xavier Salvatella, en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona, está estudiando la estructura, dinámicas y interacciones del NTD del AR humano utilizando técnicas biofísicas como la resonancia magnética nuclear, simulaciones moleculares y herramientas bioinformáticas. En colaboración con ellos, se ha marcado como objetivo el desarrollo de una metodología sintética que permita la obtención de los 4 estereoisómeros de EPI001 y evaluar la inhibición de cada uno de ellos contra AR. En caso de progreso satisfactorio se procederá con el desarrollo de nuevas moléculas que puedan actuar como inhibidores de AF1 y que presenten mejores características para ser consideradas candidatas reales a fármacos.



6.2. Análisis retrosintético

La síntesis de EPI001 ha sido descrito por Sadar *et al.* ^[10,11] aunque no de forma estereoselectiva. Para obtener los distintos estereoisómeros se planteó una síntesis paralela donde partiendo de bisfenol A (**188**) se funcionaliza selectivamente un alcohol con glicidol y posteriormente el siguiente con epiclorhidrina generando un epóxido que se abre con un agente clorante. La quiralidad se introducirá mediante el uso de reactivos quirales. Este método plantea como dificultad principal la funcionalización selectiva de un fenol respecto del otro.

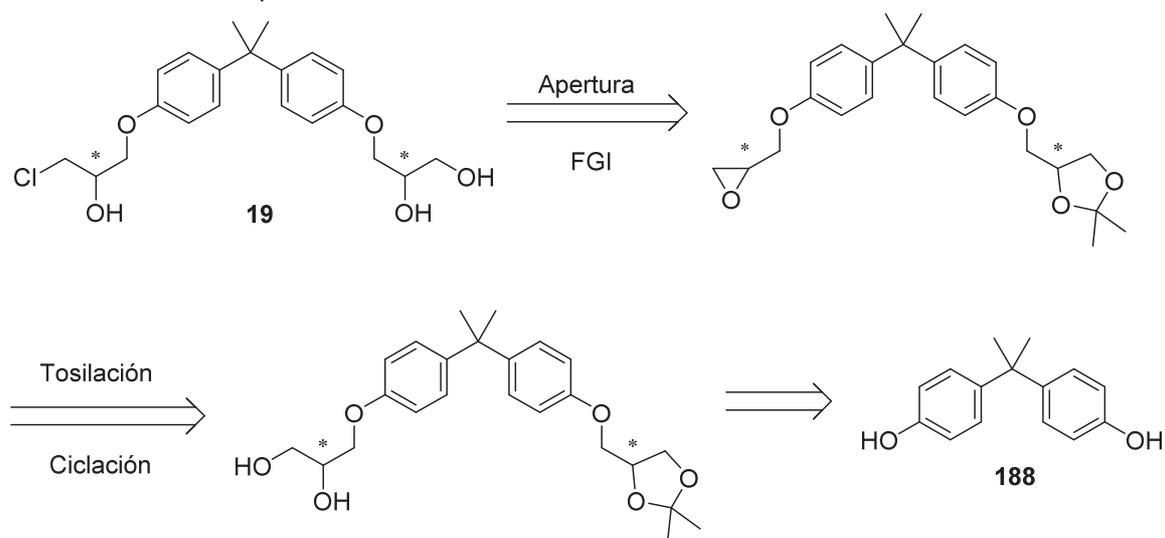


Figura 3. Retrosíntesis para la obtención de EPI001 (**19**)

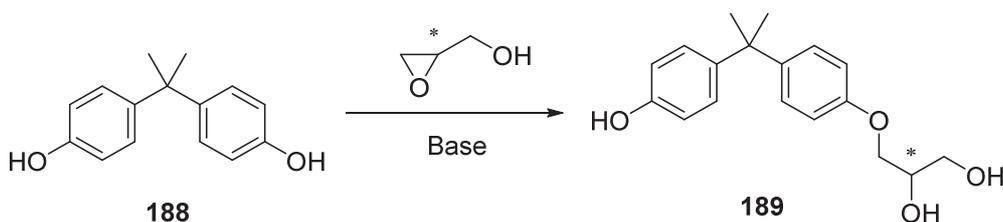
6.3. Síntesis de los estereoisómeros de EPI001

6.3.1. Aproximación mediante formación del epóxido utilizando epíclorhidrina

Para la funcionalización selectiva de un hidróxilo de **188** se hizo reaccionar el bisfenol A con glicidol en presencia de una base. Se realizaron diferentes pruebas para conseguir un rendimiento aceptable de la reacción (tabla 1). En primer lugar, se observó que el uso de bases como el K_2CO_3 o el NaH permitían generar el fenóxido correspondiente pero éste presentaba una baja solubilidad en DMF incluso a altas temperaturas. Se planteó usar el Cs_2CO_3 y MIBK como disolvente consiguiendo solubilizar el fenóxido formado y pudiendo aislar así el producto deseado aunque con rendimientos pobres y poco reproducibles. Se determinó que la temperatura era un factor clave en el avance de la reacción y que trabajar en un tubo a presión mejoraba el rendimiento final debido al bajo punto de ebullición que presenta el glicidol.

El problema residía en la completa inexistencia de diferenciación de reactividad entre los dos hidroxilos debido a la simetría de la molécula. Así, se obtuvieron mezclas de **188**, **189** y producto bisfuncionalizado en todas las pruebas realizadas aunque en proporciones distintas. Este problema se ha observado en otros productos similares.^[12] Como alternativa, se planteó usar las condiciones descritas por Schum *et al.*^[13] que utilizan una base orgánica en cantidad catalítica con un disolvente polar. En estas condiciones se lograron rendimientos aceptables y reproducibles.

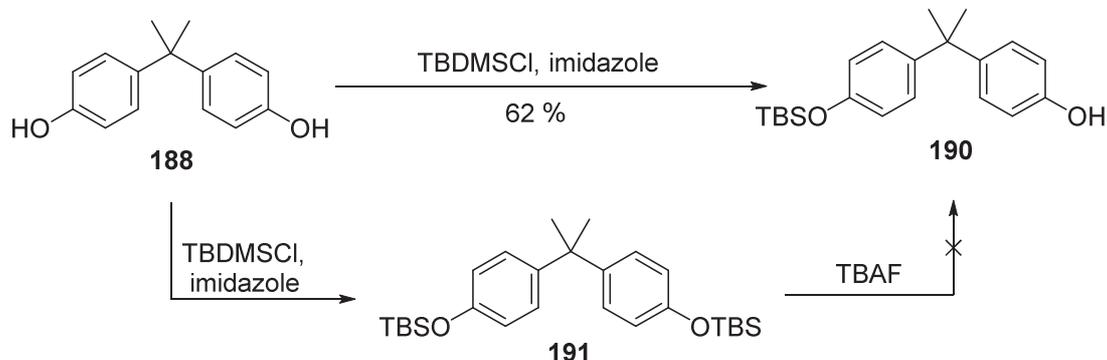
Tabla 1. Funcionalización selectiva de un alcohol con glicidol



Base	Eq Base	Glicidol	Eq glicidol	Disolvente	T / °C	Rdto / %
K_2CO_3	1.5	(R)	1.1	DMF	60	n.d.
NaH	1.5	(R)	2.2	DMF	100	n.d.
Cs_2CO_3	1.2	(R)	2.2	MIBK	80	27
Cs_2CO_3	3	(S)	1.2	MIBK	80	28
Cs_2CO_3	1.1	(S)	3	MIBK ^a	80	42
Cs_2CO_3	1.1	(S)	1.1	MeOH ^a	50	48
TEA	0.4	(S)	1.3	EtOH ^a	100	52

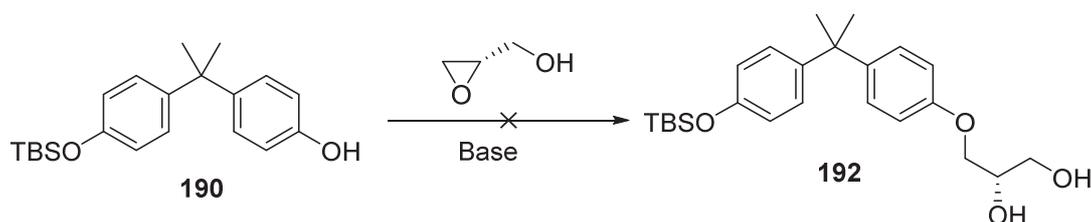
Notas. a) experimentos realizados en un tubo de presión

Ante la dificultad en la funcionalización selectiva del hidroxilo se planteó la posibilidad de proteger selectivamente uno de los alcoholes y realizar posteriormente la reacción con el glicidol. Se propuso usar un grupo TBS por ser éste de fácil desprotección posterior. Se realizó tanto la síntesis selectiva como la protección de ambos alcoholes y desprotección selectiva de uno de los grupos protectores, resultando la protección selectiva el único método para obtener **190**.



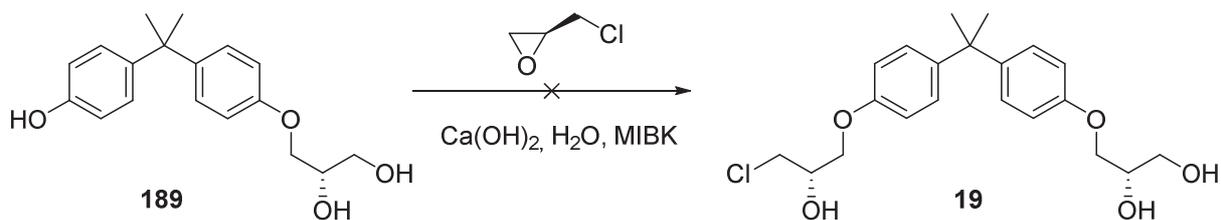
A continuación se ensayó la introducción del 1,2-diol mediante reacción con glicidol y base. Sin embargo, el grupo TBS resultó ser sorprendentemente lábil incluso en condiciones básicas resultando imposible aislar **192** y obteniendo de nuevo mezclas de **188**, **189** y producto bisfuncionalizado. Por ello, se descartó esta vía y se decidió trabajar directamente con **189**.

Tabla 2. Funcionalización de **190** con glicidol

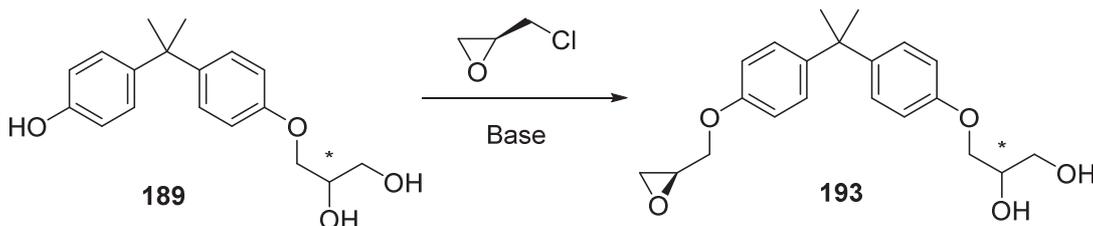


Base	Eq Base	Eq glicidol	Disolvente	T / °C
NaH	1.5	1.1	THF	50
NaH	2	1.1	DMF	70
Cs ₂ CO ₃	1.4	1.1	MeOH	60

Inicialmente, se planteó seguir el método descrito por Sadar *et al.*^[10,11], utilizando epichlorhidrina y Ca(OH)₂ como base, para llegar directamente al producto final. Los óxidos de calcio que se forman en la reacción catalizan el proceso de modo que el ataque nucleófilo del fenóxido se da preferentemente sobre C3 en la epichlorhidrina rindiendo el producto final.^[14] Sin embargo, en nuestras manos, no fue posible obtener el producto deseado. Aunque se realizaron pruebas a distintas temperaturas (rt, 50 °C y 80 °C) y con cantidades catalíticas (10, 25 y 30 %) y equimolares de Ca(OH)₂, no se consiguió obtener **19** y se recuperó íntegramente el producto de partida.

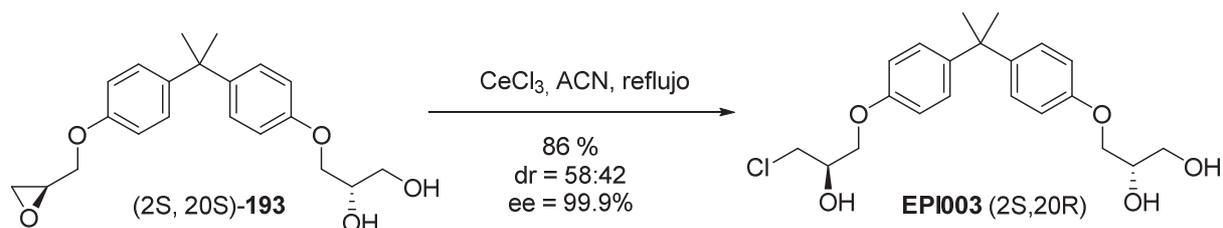


La alternativa que se planteó fue realizar la reacción de funcionalización del segundo alcohol con epichlorhidrina en presencia de base obteniendo el epóxido **193** y a continuación abrir el epóxido con un agente clorante para obtener **19**. Se realizaron varias pruebas para obtener el epóxido **193** (tabla 3). Inicialmente se planteó el uso de Cs_2CO_3 como base y MeOH como disolvente por haber dado buenos resultados en la funcionalización de **188**. Sin embargo, el uso de MeOH provocaba la apertura del epóxido generando subproductos no deseados. Se decidió usar DMF evitando el problema aunque en contrapartida las reacciones resultaron ser más largas. Además, se observó que la temperatura era un factor que disminuía el tiempo de reacción disminuyendo también el rendimiento final. Llegando a un compromiso entre estos factores se consiguió aislar **193** con un 71% de rendimiento.

Tabla 3. Síntesis del epóxido **190**

Base	Eq Base	Epichlorhidrina	Disolvente	T / °C	Rdto / %
Cs_2CO_3	2	S	MeOH	70	7
Cs_2CO_3	2	S	MeOH	40	21
Cs_2CO_3	2	S	MeOH	rt	9
Cs_2CO_3	2	S	DMF	rt	71
Cs_2CO_3	2	R	DMF	50	55

A continuación se ensayó la reacción de apertura del epóxido utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a reflujo en ACN obteniendo el producto deseado con buenos rendimientos.



La gran distancia existente entre ambos centros quirales de estos compuestos provoca que los diastereómeros no se diferencien por técnicas de $^1\text{H-RMN}$. El análisis de la pureza óptica de los compuestos obtenidos se realizó mediante HPLC quiral y se comparó con el EPI001 comercial observándose un *ee* excelente pero una relación diastereomérica muy baja. Esto indicaba que en alguno de los pasos sintéticos se había producido una epimerización de uno de los centros estereogénicos. Para dar una explicación a este fenómeno se formuló la hipótesis de que en la reacción con epíclorhidrina se produce una epimerización del centro quiral debido a que el ataque nucleófilo del fenóxido se realiza tanto en C1 como en C3 (figura 4).

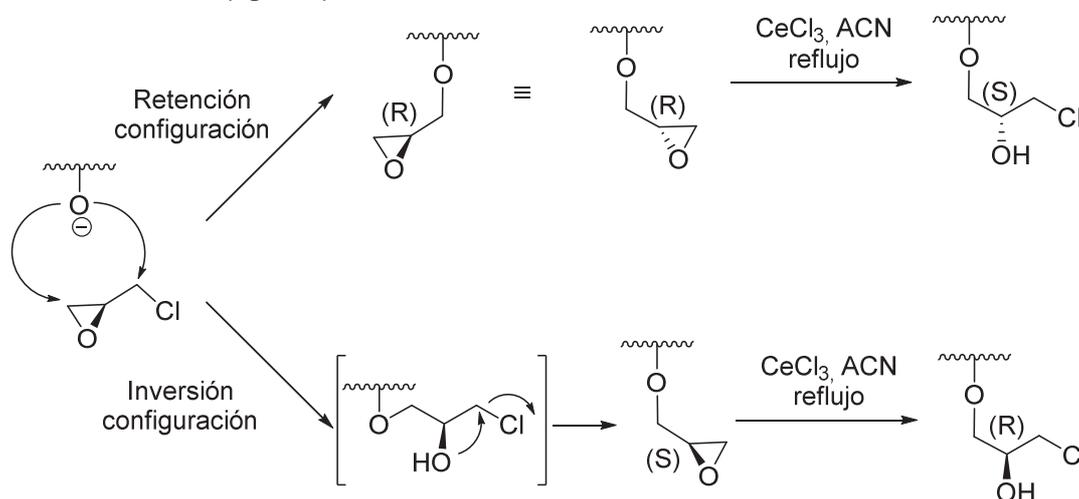


Figura 4. Epimerización en la formación del epóxido

6.3.2. Aproximación mediante formación del epóxido utilizando glicidol

La epimerización observada obligó a replantearse la síntesis y realizar un nuevo análisis retrosintético evitando el uso de la epíclorhidrina. Se decidió empezar la síntesis de igual modo y proteger el 1,2-diol con un grupo acetal para realizar de nuevo la introducción de un segundo grupo 1,2-diol utilizando glicidol quiral. Posteriormente, se propuso tosilar selectivamente el alcohol primario y realizar una reacción de ciclación intramolecular para obtener el epóxido deseado como un único diastereómero. Después, se planteó abrir el epóxido con un agente clorante y desproteger el acetal obteniendo los compuestos deseados. Aunque la ruta planteada tenía mayor número de pasos sintéticos, debía permitir obtener los compuestos con mejores d.r. y, al mismo tiempo, disminuir la polaridad de los intermedios facilitando su aislamiento (figura 5).

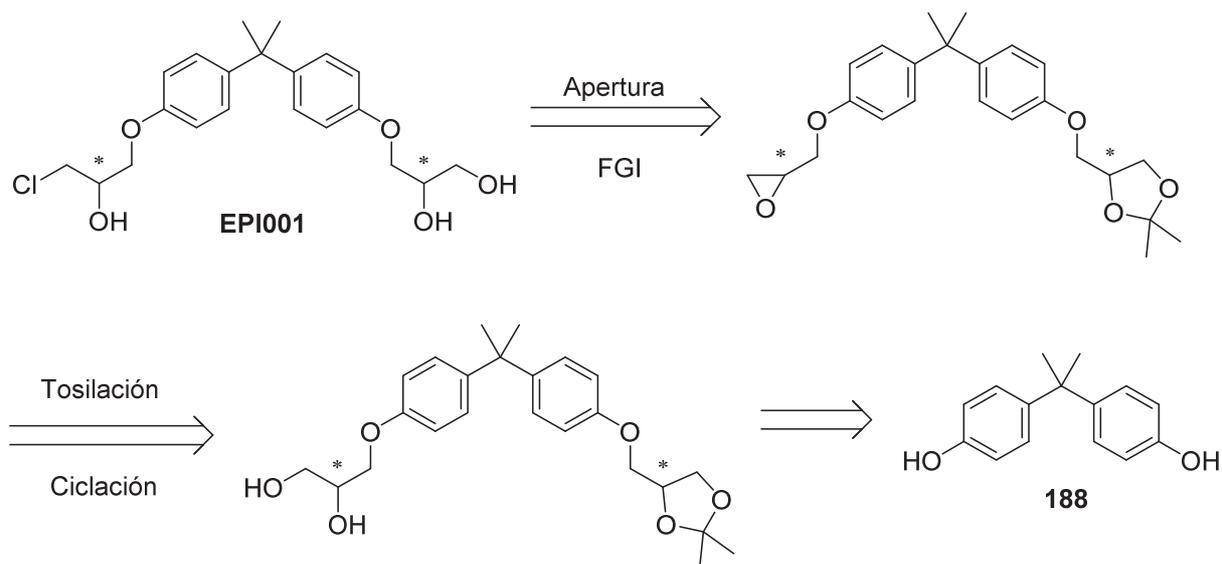
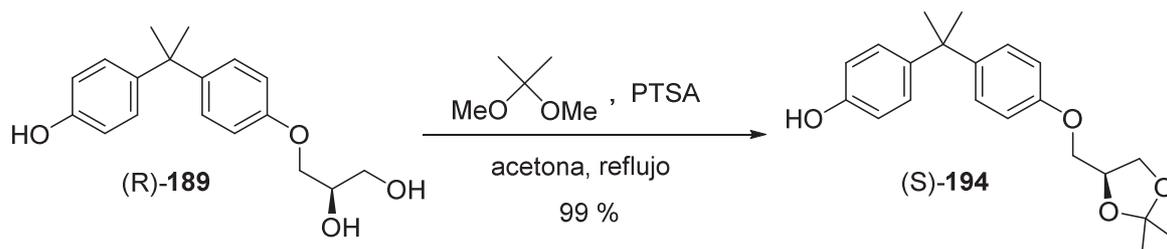
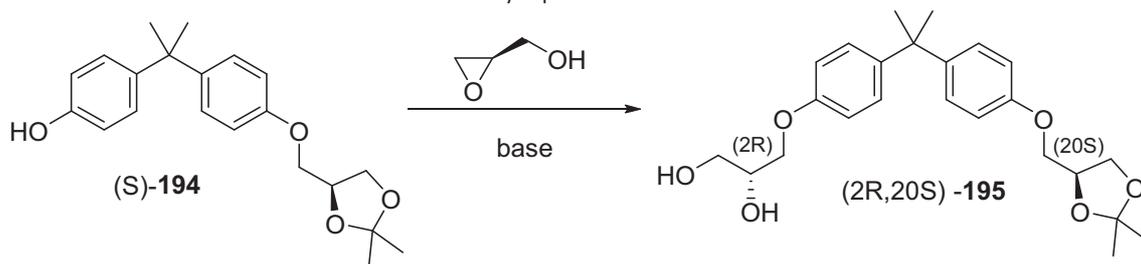


Figura 5. Retrosíntesis para la obtención de estereoisómeros de EPI001

En la primera etapa se hizo reaccionar el triol **189** con 2,2'-dimetoxipropano (DMP) en presencia de PTSA para obtener el acetal **194**. Se realizaron pruebas a t.a. y a reflujo obteniendo, en el último caso, el compuesto **194** con excelente rendimiento y sin necesidad de purificación extra.



El siguiente paso consistía en repetir la reacción con glicidol para funcionalizar con un 1,2-diol el segundo alcohol de la estructura. En este caso, el producto **194** sólo presentaba una funcionalidad libre y además era más apolar que los anteriores por lo que se pensó que la reacción se podría llevar a cabo con NaH en DMF de forma rápida y con buenos rendimientos. Sin embargo, no se consiguió obtener el producto deseado. Se ensayaron distintas condiciones (tabla 4) y se halló que las mejores condiciones eran utilizando TEA como base y etanol como disolvente en un tubo a presión. Con estas condiciones se obtuvo **195** como un único diastereómero y con un 79 % de rendimiento.

Tabla 4. Ensayos para la obtención de **195**

Base	Eq Base	Eq Glicidol	Disolvente	T / °C	t / h	Rdto / %
NaH	2	1.3	DMF	50	16	-
Cs ₂ CO ₃	1.5	1.3	MeOH:THF 1:1	reflux	20	31
Cs ₂ CO ₃	1.5	1.3	MeOH:THF 1:1 ^a	70	20	52
Cs ₂ CO ₃	1.5	2	MeOH:Et ₂ O 1:1 ^a	60	20	23
TEA	0.5	1.1	EtOH ^a	90	20	79

Notas. a) experimentos realizados en un tubo de presión

A continuación se realizó la tosilación selectiva del alcohol primario y una reacción de ciclación intramolecular para obtener el epóxido **196**. Los alcoholes primarios son generalmente más fáciles de tosilar que los secundarios pero, dada la importancia de la tosilación para obtener el compuesto final como un único diastereómero, se planteó utilizar óxido de dibutilestaniato (*dibutyltin oxide*, DBTO) como catalizador. Existen varios precedentes en la literatura del uso de DBTO para la funcionalización selectiva de 1,2-dioles con excelentes selectividades.^[15,16] El mecanismo de la reacción ha sido descrito^[17,18] y ocurre a través de la coordinación inicial del DBTO con el diol dando lugar a un monómero (figura 6). A continuación se genera un equilibrio entre el monómero y el dímero donde se produce una adición de TsCl. La correspondiente disociación genera el producto protegido y permite entrar en el ciclo una segunda molécula de producto inicial. La regeneración del catalizador se produce por efecto de neutralización con TEA de una molécula de HCl.

Con estos precedentes se ensayó la reacción de tosilación sobre **195** a diferentes temperaturas para intentar aumentar la selectividad de la tosilación (tabla 5). En la primera prueba, realizada a temperatura ambiente, no se obtuvo la selectividad esperada y se obtuvo un pequeño porcentaje de producto tosilado en el alcohol secundario. Los productos de tosilación en el alcohol primario y secundario no se consiguieron separar por cromatografía. Por lo tanto, al realizar la formación del epóxido por ataque intramolecular del hidroxilo libre al tosilato, se obtuvieron mezclas de diastereómeros. Para poder cuantificar dichas mezclas se requirió llegar a los productos finales y comparar por HPLC con el EPI001 comercial. De este modo, se comprobó que a t.a. se obtenían excelentes *ee* y *d.r.* 89:11.

Para intentar mejorar esta relación se planteó trabajar a bajas temperaturas intentando obtener una mayor tosilación selectiva sobre el alcohol primario. Se pudo comprobar que a menor temperatura el porcentaje de producto tosilado en el alcohol primario era cada vez mayor. En consecuencia el tiempo de reacción también y esto permitía que se formara como producto secundario el producto de bistosilación reduciendo el rendimiento. De acuerdo con el estado del proyecto, donde se requería buen rendimiento y no un *d.r.* excelente, se decidió tomar un compromiso y realizar la síntesis de cada uno de los estereoisómeros a 0°C.

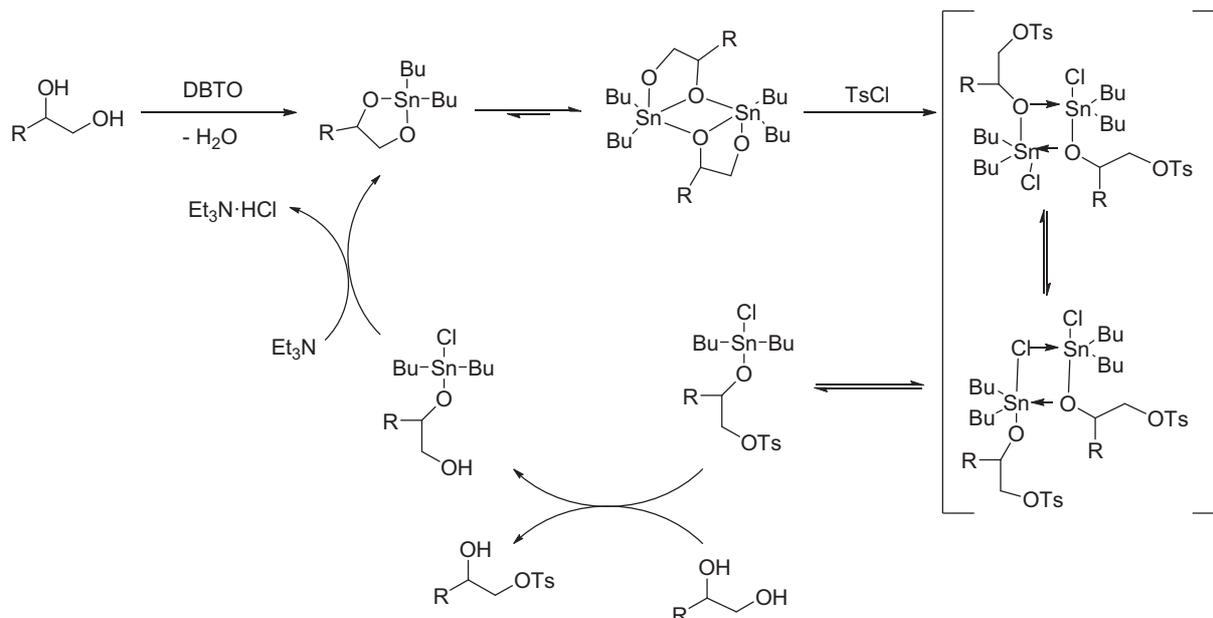
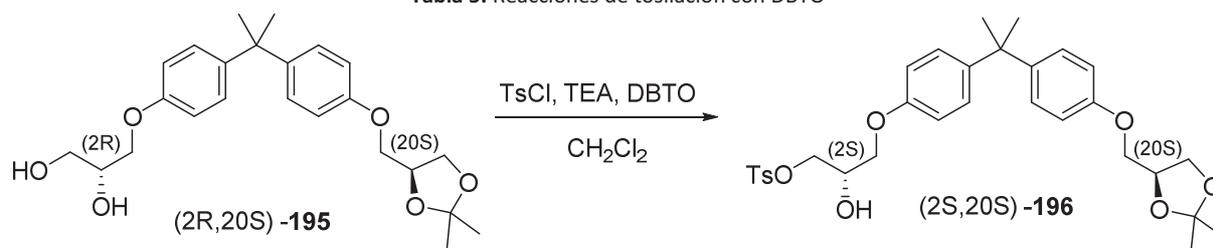


Figura 6. Mecanismo de protección selectiva utilizando DBTO como catalizador

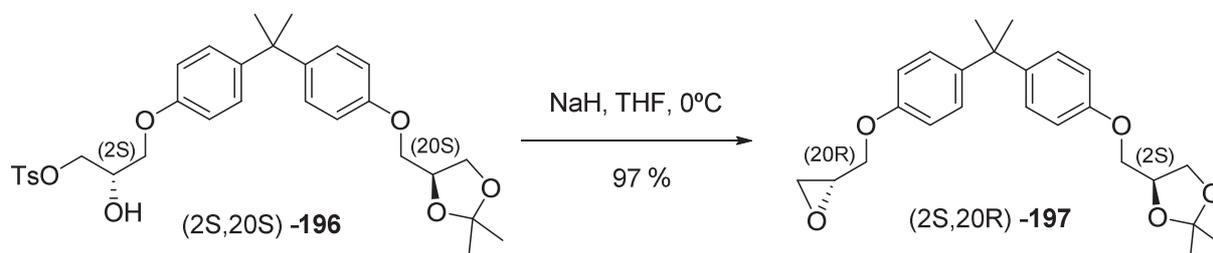
Tabla 5. Reacciones de tosilación con DBTO



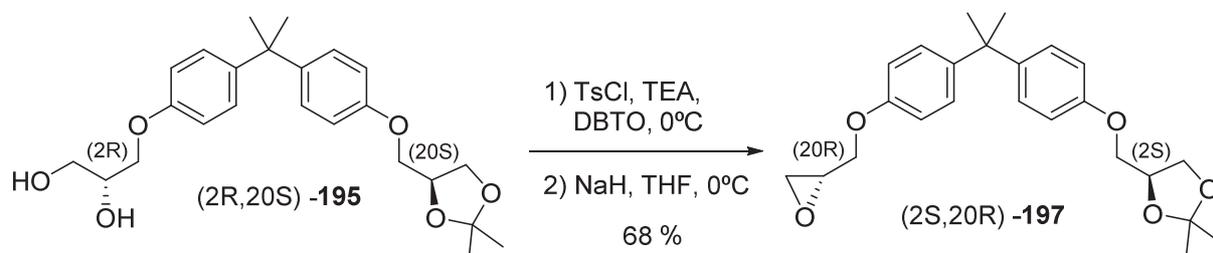
Entrada	T / °C	t / h	Rdto / %	ee / %	d.r.
1	r.t.	4	72	99	89 : 11
2	0	15	67	99	95.5 : 4.5
3	-5	18	65	99	96 : 4
4	-10	23	52	99	98 : 2

Notas. a) *ee* y *dr* obtenidos por HPLC quiral sobre el producto final EPI002 (2R, 20S)

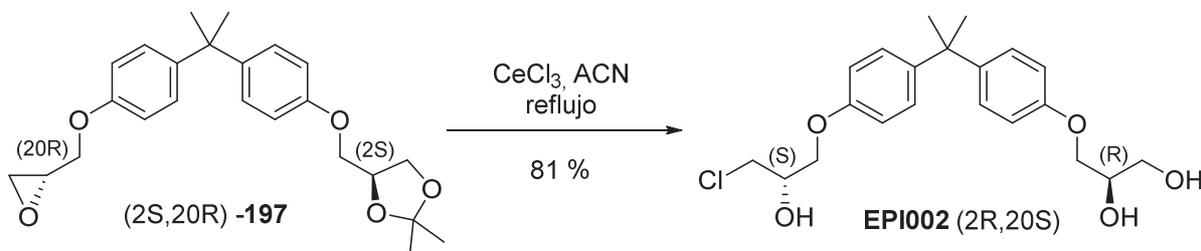
A continuación se realizó la reacción de ciclación intramolecular por tratamiento de **196** con NaH en THF a 0°C aislando **197** con excelentes rendimientos y sin necesidad de purificación extra.



Debido a los buenos resultados obtenidos con la reacción de formación del epóxido se ensayó la reacción sobre el crudo de la reacción de tosilación consiguiendo aislar **197** con un rendimiento del 68 % en dos pasos.

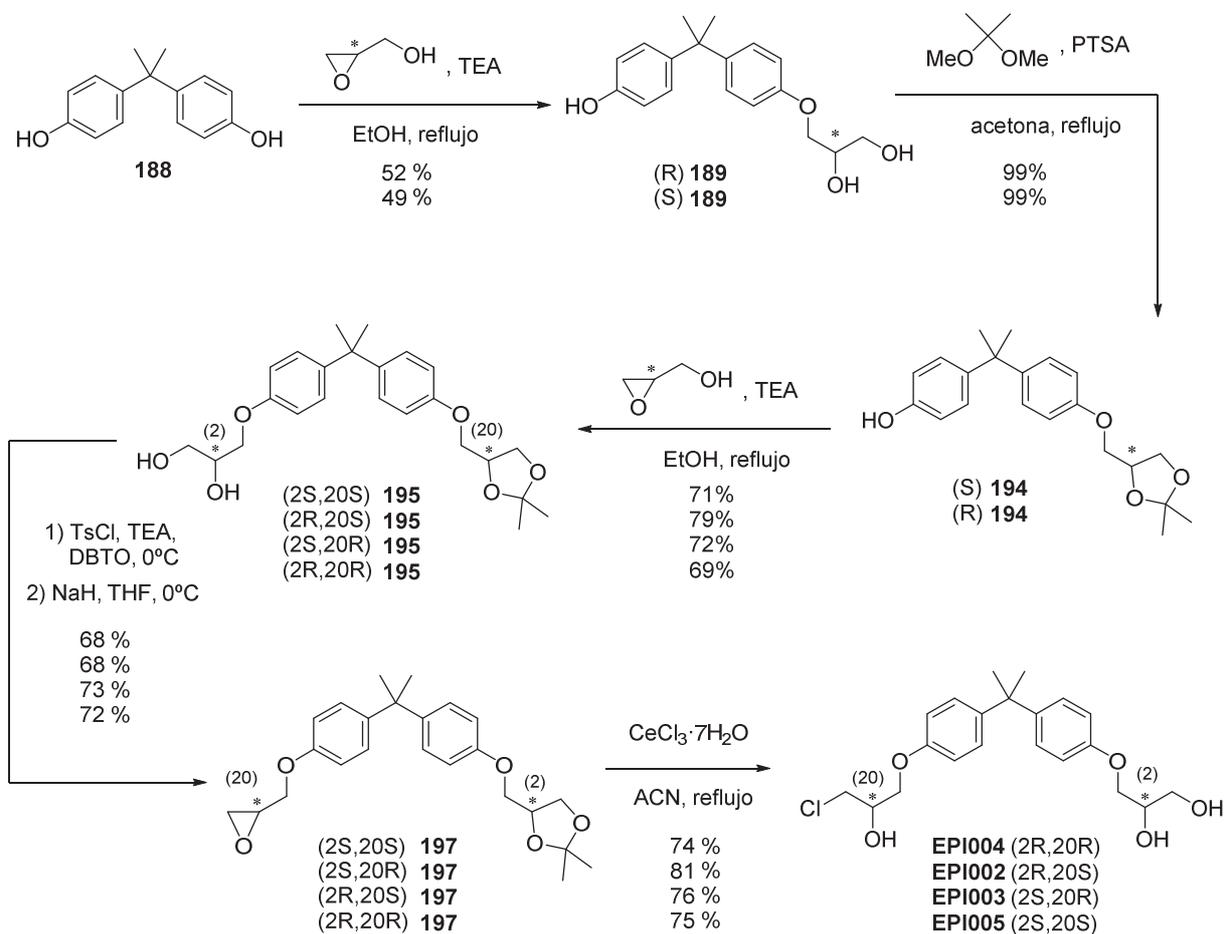


La apertura del epóxido se realizó utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a reflujo en ACN. Sorprendentemente, el carácter levemente ácido de este reactivo unido a la alta labilidad del acetal permitió obtener el producto final **EPI002 (2R,20S)** en un solo paso sintético y con excelentes rendimientos.



Una vez desarrollada una ruta sintética que permitía obtener uno de los estereoisómeros de EPI001 con excelentes *ee* y *dr*, se aplicó la misma metodología para obtener el resto de estereoisómeros simplemente variando la quiralidad del glicidol utilizado. Con esto se consiguieron sintetizar los 4 productos deseados con un rendimiento global de entre el 17 y el 24% en 6 etapas sintéticas.

6.3.3. Resumen de la secuencia sintética para obtener los estereoisómeros de EPI001



6.4. Ensayos biológicos con los estereoisómeros de EPI001

Los diferentes estereoisómeros de EPI001 han sido utilizados en el grupo de investigación del Dr. Xavier Salvatella en el estudio del mecanismo de interacción de estas moléculas con el NTD del AR. Mediante experimentos de resonancia magnética nuclear y espectroscopia de masas han podido determinar que EPI001 interacciona específicamente con la unidad Tau 5 del NTD y que concretamente lo hace con el residuo cisteína 404 comportándose como un inhibidor irreversible.

Recientemente, Myung *et al.* [9] han propuesto un mecanismo para la interacción de EPI001 con la proteína consistente en la formación de un epóxido como consecuencia de la interacción de la halohidrina con un residuo básico de la proteína. Dicho epóxido se abre por efecto de un nucleófilo dando lugar a un enlace covalente (figura 7). El trabajo desarrollado en el grupo del Dr. Salvatella demuestra que es la cisteína 404 la que realiza dicha función y descarta que puedan ser otras cisteínas, lisinas, tirosinas o histidinas.

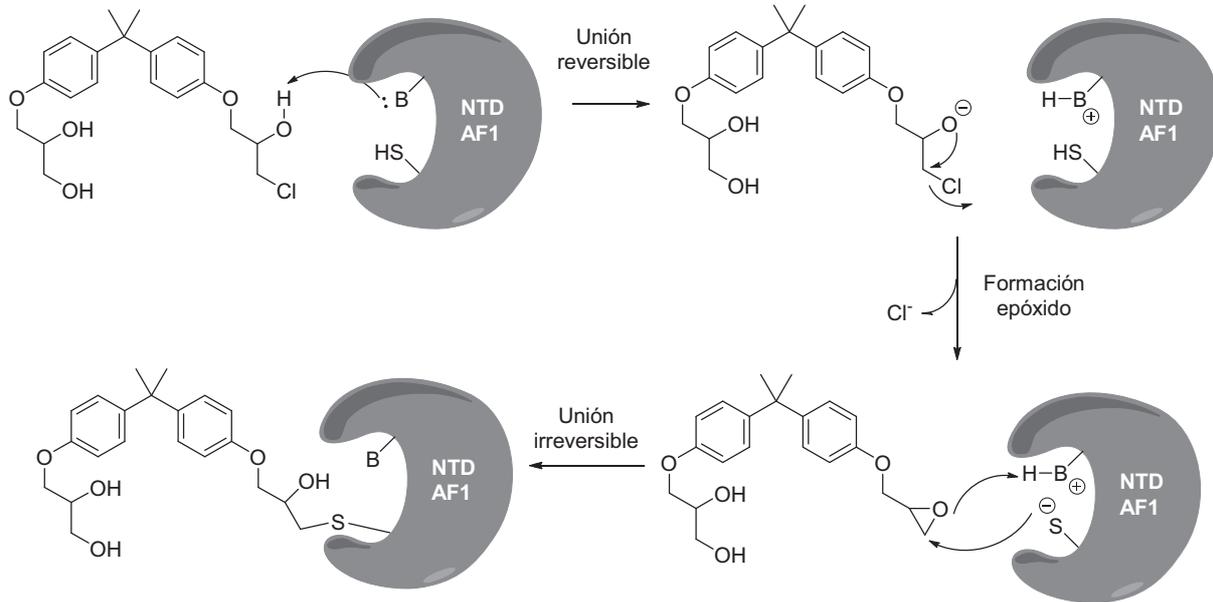


Figura 7. Mecanismo de acción NTD vs EPI001

Por otro lado, también se han realizado experimentos de STD-RMN con EPI001 (figura 8) así como con los distintos estereoisómeros sintetizados junto con el NTD del receptor androgénico. Dichos experimentos han mostrado que los protones que constituyen el epítipo de la molécula son la clorhidrina y los protones aromáticos. Los análisis realizados con los cuatros estereoisómeros no han mostrado diferencias significativas confirmando que en este caso la quiralidad no es clave para la unión enzima-sustrato.

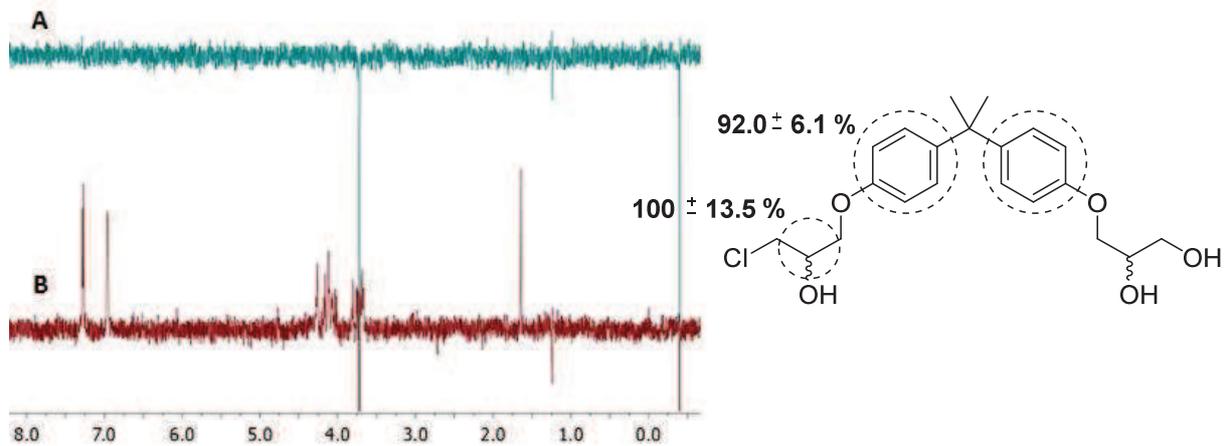


Figura 8. Experimentos de STD con EPI001: A) EPI001 30 μM; B) AF-1 3 μM + EPI001 30 μM

Los avances en la comprensión del mecanismo de interacción entre EPI001 y el NTD se están utilizando activamente en nuestro grupo de investigación para el diseño racional de nuevas moléculas que puedan ser activas contra el cáncer de próstata.

6.5. Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología sintética para la obtención de los cuatro estereoisómeros de EPI001 que ha permitido su obtención con excelentes *ee* y buenas relaciones diastereoméricas y con rendimientos globales medios del 20% en 6 etapas sintéticas.

Los estereoisómeros de EPI001 se han aplicado para el estudio de su mecanismo de unión con el NTD del AR. Lamentablemente, no se han observado diferencias significativas en la unión de los distintos diastereómeros. Sin embargo, el estudio ha permitido aumentar el conocimiento sobre el funcionamiento de la proteína y el conocimiento generado se está utilizando para el desarrollo racional de nuevos inhibidores.

Referencias

- [1] Y. N. S. Wong, R. Ferraldeschi, G. Attard, J. de Bono, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 365–376.
- [2] E. P. Gelmann, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3001–3015.
- [3] D. N. Lavery, I. J. Mcewan, *Biochemistry* **2008**, *47*, 3360–3369.
- [4] M. D. Sadar, *World J. Urol.* **2012**, *30*, 311–318.
- [5] L. Callewaert, N. Van Tilborgh, F. Claessens, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 543–553.
- [6] R. J. Andersen, N. R. Mawji, J. Wang, G. Wang, S. Haile, J.-K. Myung, K. Watt, T. Tam, Y. C. Yang, C. A. Bañuelos, D. E. Williams, I. J. McEwan, Y. Wang, M. D. Sadar, *Cancer Cell* **2010**, *17*, 535–546.
- [7] T. C. Thompson, *Cancer Cell* **2010**, *17*, 525–526.
- [8] M. D. Sadar, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1208–1213.
- [9] J. Myung, C. A. Banuelos, J. G. Fernandez, N. R. Mawji, J. Wang, A. H. Tien, Y. C. Yang, S. Haile, K. Watt, I. J. Mcewan, S. Plymate, R. J. Andersen, M. D. Sadar, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2948–2960.
- [10] M. D. Sadar, N. R. Mawji, J. Wang, R. J. Andersen, D. E. Williams, M. Leblanc, *Diglycidic Ether Derivative Therapeutics and Methods for Their Use*, **2011**, US 2011/0230556 A1.
- [11] M. D. Sadar, N. R. Mawji, J. Wang, R. J. Andersen, D. E. Williams, M. Leblanc, *Diglycidic Ether Derivative Therapeutics and Methods for Their Use*, **2010**, WO 2010/000066 A1.
- [12] K. Maruyama, T. Noguchi-Yachide, K. Sugita, Y. Hashimoto, M. Ishikawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6661–6666.
- [13] J. Chen, W. Shum, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2379–2380.
- [14] O. L. Davis, H. S. Knight, J. R. Skinner, *Production of Halohydrin Ethers of Phenols*, **1951**, US2571217A.
- [15] Y. Shimada, K. Usuda, H. Okabe, T. Suzuki, K. Matsumoto, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2802–2808.
- [16] L. Toom, P. Villo, I. Liblikas, L. Vares, *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 4295–4313.
- [17] M. Guillaume, Y. Lang, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 579–582.
- [18] M. J. Martinelli, R. Vaidyanathan, J. M. Pawlak, N. K. Nayyar, U. P. Dhokte, C. W. Doecke, L. M. H. Zollars, E. D. Moher, V. Van Khau, B. Kosmrlj, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3578–3585.

7

Conclusiones

1. Se ha desarrollado una metodología sintética para obtener el intermedio **8** a escala multigramo basada en la obtención del 2,4-pentadien-1-ol a partir de ácido malónico y posterior aplicación de la epoxidación asimétrica de Sharpless y reacción de metátesis. Este procedimiento permite obtener el compuesto deseado con excelente pureza óptica y rendimientos globales aceptables. El procedimiento ha resultado ser mucho más escalable que el desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación.
2. Se ha explorado la formación de epóxidos, sulfitos y sulfatos cíclicos así como su apertura regioselectiva como vía para la obtención de 2-acetamido iminoazúcares. Dicha exploración se ha realizado sobre sustratos bicíclicos (vía 1) y monocíclicos (vía 2). Los mejores resultados se han obtenido con el sulfato **44a** que ha permitido obtener una relación 2:1 *gluco:altro* de regioisómeros siguiendo el esquema previsto. Por otro lado, el sulfito **73** ha permitido obtener una relación 3:1 *altro:mano* con retención de configuración en C2 debido al efecto anquimérico de la amina endocíclica.
3. Se ha sintetizado la DNJNAc (**13**) en 11 etapas sintéticas y con un 23% de rendimiento global. Aplicando metodología sintética similar se han sintetizado nuevos acetamido iminoazúcares piperidínicos como lo 1,3-didesoxi-3-acetamidoaltrojirimicina (**94**) o la DA_ltrJNAc (**83**) y compuestos conocidos como la DMJNAc (**20**).
4. Aprovechando los intermedios obtenidos en la síntesis de DNJNAc, se han sintetizado distintos derivados con ureas en la amina endocíclica (**116a-d**) y se han evaluado sus propiedades como inhibidores de glicosidasas.
5. Se ha explorado el uso de la sustitución alílica catalizada por paladio como método para la introducción estereoselectiva de equivalentes sintéticos del amoníaco en la posición C2 del esqueleto glicosídico de nuestros compuestos. Concretamente, se ha conseguido introducir una ftalimida de forma estereoselectiva utilizando la aminación alílica con buenos rendimientos para, posteriormente, situar una acetamida.
6. Se ha sintetizado la DAJNAc (**130**) mediante dos vías distintas. En el primer caso se ha conseguido aislar con un 14% de rendimiento global en 5 etapas sintéticas. La segunda vía, basada en estudios computacionales previos, ha permitido obtenerla con un 41% de rendimiento global en 7 etapas sintéticas. El estudio de la dihidroxilación ha permitido determinar que la acetamida tiene un papel clave en la elevada diastereoselectividad de la reacción. Por otro lado, los estudios de inhibición de la DAJNAc han revelado que se trata de un inhibidor selectivo de β -N-acetilglucosaminidasas con unos valores de inhibición similares a los diastereómeros *gluco* y *galacto*. Se han realizado estudios de STD-RMN con DAJNAc y β -N-acetilglucosaminidasas para valorar la interacción proteína-ligando sin éxito.

7. Se ha construido una pequeña biblioteca de compuestos derivados de DAJNAc incluyendo tioureas en la amina endocíclica (**148a-d**) y 2-iminotiazolidinas (**159a-d**) y se han evaluado sus propiedades como inhibidores de glicosidasas. Los datos obtenidos se utilizarán en la realización de un estudio SAR con compuestos análogos en configuración *gluco* y *galacto*.
8. Se han explorado varias metodologías sobre los intermedios de la síntesis de DAJNAc como vía para la obtención de otras configuraciones de 2-acetamido azúcares. Se han obtenido de forma estereoselectiva intermedios válidos para la obtención de DGulJNAc mediante el uso de epoxidaciones y apertura regioselectivas de éstos. No se han conseguido resultados satisfactorios en el caso de las aproximaciones hacia DGJNAc.
9. Se ha desarrollado una metodología sintética para la obtención de 4MU- α -GlcNS, **17** en 7 etapas sintéticas y con un 25% de rendimiento global. Dicho producto se ha aplicado satisfactoriamente en la diagnosis de la enfermedad de SanfilippoA en el IDIBAPS (Hospital clínic de Barcelona). También se ha sintetizado 4MU- α -GlcNAc-6S, **18** con un 13% de rendimiento en 8 etapas sintéticas. Actualmente, se está validando para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de SanfilippoD.
10. EPI001 es un inhibidor selectivo del AF1 del receptor androgénico (AR) cuya actividad se relaciona con el cáncer de próstata. Se han sintetizado los 4 estereoisómeros de EPI-001 de forma estereoselectiva. El análisis de la interacción entre dichos compuestos y el NTD del AR por STD-RMN y espectroscopia de masas ha permitido determinar que la quiralidad no es clave para la unión con la proteína y ha permitido ampliar el conocimiento sobre esta proteína responsable del CPR. La química desarrollada se está aplicando en el diseño racional de nuevos inhibidores más potentes contra el NTD.

8

Experimental Part

General information

Non-aqueous reactions were carried out under nitrogen atmosphere. Dry THF, Et₂O and CH₂Cl₂ were obtained from a Solvent Purification System (SPS PS-MD-3). The rest anhydrous solvents were purchased from Aldrich. Commercially available reagents were purchased from Aldrich, TCI America, Strem Chemicals and/ or Acros Organics and were used with no further purification. All reactions were monitored by TLC analysis using Merck 60 F₂₅₄ silica gel on aluminum sheets. Silica gel chromatography was performed by using 35-70 mm silica or an automated chromatography system (Combiflash®, Teledyne Isco) with hexane/ethyl acetate gradients as eluent unless noted otherwise.

Aluminum Sheets of Merck Silica gel 60 F₂₅₄ were used for Thin Layer Chromatography. Used revelators were:

- UV 254 nm
- Anisaldehyde: 92 ml of 4-methoxybenzaldehyde, 3.8 ml of glacial acetic acid, 338 ml of ethanol (98%) and 12.5 ml of H₂SO₄ (98%)
- Phosphomolybdic: 23 g of Phosphomolybdic acid in 400 ml of ethanol (98%)
- KMnO₄: 3 g of KMnO₄, 20 g of K₂CO₃, 300 ml of H₂O and 5 ml of NaOH 5 % aqueous.

Molecular Sieves activation (both powder and pellets) was carried out by heating in sand bath (300-350 °C) under high vacuum during 7-10 hours. Then the sieves were kept under vacuum in an oven at 140°C.

For low temperature baths, mixtures of CO₂/acetone have been used for -78° to -30°C, NaCl/ice/water for -10°C and ice-water for 0°C. For more than 5 hours reactions Cryocool CC-100 system and IPA as solvent have been used.

Reactions in high H₂ pressure have been done using Büchi Glas Uster AG - miniclave. For low H₂ pressure glass pressure tube from Sigma were used.

NMR spectra were recorded at room temperature on a Varian Mercury 400 or a Bruker 300. ¹H and ¹³C-NMR spectra were referenced to the residual peaks of the deuterated solvent. The following abbreviations were used to define the multiplicities: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; p, quintuplet; m, multiplet; br s, broad signal. The chemical shifts (δ) are expressed in ppm and the coupling constants (J), in hertz (Hz). ¹⁹F-NMR spectra were referenced by the spectrometer without any external pattern.

IR spectra were recorded in a Thermo Nicolet Nexus FT-IR apparatus, either by preparing a KBr pastille or by depositing a film of the product on a NaCl window. Absorptions are given in wavenumbers (cm⁻¹).

Melting points were recorded either in a Büchi M-540 apparatus or by DSC in a Mettler-Toledo DSC-30 without recrystallization of the final solids

Optical rotations were measured at room temperature (25°C) using a Jasco P-2000 iRM-800 polarimeter. Concentration is expressed in g/100 mL and solvent is expressed for each case in brackets. The cell sized 10 cm long and had 1 mL of capacity. Measuring λ was 589 nm, which corresponds to a sodium lamp.

Mass spectrometry were recorded in a Hewlett-Packard 5988 A using EI, CI or ES techniques and High Resolution Mass Spectrometry were recorded in a LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific) using Nanoelectrospray technique at the Mass Spectrometry Core Facility from the IRB Barcelona.

Elemental analysis were done in a EA-1108 CE Instruments (Thermo Fisher) at the SCT-UB core facility in the Parc Científic de Barcelona (PCB)

HPLC analysis have been done using a Hewlett-Packard 1050 equipment. Conditions of each analysis are specified in each case.

Reactions under microwaves were done in a CEM Discover Microwave Reactor at the Unitat de Química Combinatòria of the PCB.

8.1. Synthesis of 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc) and derivatives using regioselective opening reactions of epoxides, cyclic sulphites and cyclic sulphates

General Procedure for Dihydroxylation

To a solution of starting material (1 eq) in acetone : H₂O 10:1 was added *N*-Methylmorpholine-*N*-Oxide (2.5 eq) and OsO₄ (0,1 eq) or K₂OsO₄·2H₂O (0,1 eq) and the reaction was stirred until no starting material was observed by TLC. The crude was treated adding Na₂S₂O₃ and stirring vigorously for 30 min. After that, MgSO₄ was added and the crude was filtrated through Celite, washed with acetone and the solvent removed under reduced pressure. Purification was realized by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂:MeOH 95:5 except otherwise indicated.

General Procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation (SAD)

(DHQD)₂Phal (0.01 eq), K₂OsO₄ (0.005 eq), K₂CO₃ (3 eq) and K₃[Fe(CN)₆] (3 eq) were dissolved in ^tBuOH:H₂O 1:1 mixture. The crude was cooled to 0°C and then a solution of CH₃SO₂NH₂ (1 eq) in ^tBuOH:H₂O 1:1 was added. After 15 min, a solution of starting material (1 eq) in ^tBuOH:H₂O 1:1 was added. Then the crude was left to warm to room temperature and stirred until no starting material was observed by TLC. The crude was treated with Na₂S₂O₃ and stirred for 60 min. Then it was extracted with EtOAc and the organic phase was washed with KOH 2M and brine, dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂:MeOH except otherwise indicated.

General Procedure for Sulphite synthesis

To a solution of starting material (1 eq) in THF cooled at 0°C was added TEA (4.2 eq) and SOCl₂ (3.6 eq) dropwise. The reaction was stirred at 0°C until no starting material was observed by TLC, treated with H₂O, extracted with CH₂Cl₂ and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced. Purification was realized by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate except otherwise indicated.

General Procedure for Sulphate synthesis with SO₂Cl₂

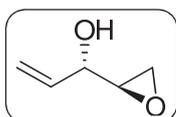
To a solution of starting material (1 eq) in EtOAc cooled at 0°C was added TEA (15 eq) and SO₂Cl₂ (5 eq) dropwise. The reaction was stirred at 0°C until no starting material was observed by TLC, treated with H₂O, extracted with CH₂Cl₂ and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced. Purification was realized by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate except otherwise indicated.

General Procedure for Sulphate synthesis via oxidation of sulphite

To a solution of starting material (1 eq) in THF cooled at 0°C was added TEA (4.2 eq) and SOCl₂ (3.6 eq) dropwise. The reaction was stirred at 0°C until no starting material was observed by TLC, treated with H₂O, extracted with CH₂Cl₂ and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced and the obtained oil was redissolved in ACN:CCl₄:H₂O 1:1:1 mixture and cooled at 0°C. Then, RuCl₃ (0.1 eq) and NaIO₄ (2 eq) were added and the reaction was allowed to stir

at 0°C until no starting material was observed by TLC. Treatment consisted in the addition of Et₂O and H₂O. The organic phase was washed with NaHCO₃ and brine, dried with MgSO₄ and solvent removed under reduced pressure. Purification was realized by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate except otherwise indicated.

8.1.1. (S)-1-((R)-Oxiran-2-yl)prop-2-en-1-ol (**30**)



A two-neck 1 L flask was charged with 4 g of 3 Å powder molecular sieves. Then 60 mL of anhydrous CH₂Cl₂ were added under N₂ atmosphere. The flask was allowed to cool to -20°C using a Cryocool system.

Then a solution of L-(+)-DIPT (3.96 g, 16.77 mmol) in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂ and previously dried over 4 Å molecular sieves beads during 24 h was added via cannula. At that point, Ti(iOPr)₄ (3.88 mL, 12.64 mmol) was added via syringe. Next a 3M solution of tBu-OOH in isooctane (80 mL, 240.30 mmol) previously dried over 4 Å molecular sieves beads during 1h was added via cannula. At this point, the crude was allowed to stir during 1 h and then a solution of 1,4-pentadien-3-ol (**29**) (10.03 g, 119.20 mmol) in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂ and previously dried over 4 Å molecular sieves beads during 24 h was added via cannula. The crude was allowed to stir at -20°C during 4.5 days.

The crude was treated adding 10 mL of saturated aqueous Na₂SO₄ and 50 mL of Et₂O. After 1 h of stirring, it was filtrated through Celite® and washed with Et₂O to obtain a yellow solution. The solvent was eliminated at low pressure in an ice-bath to minimize the loss of the final epoxide. The crude was purified on silica-Et₃N (2,5% v/v) using pentane/Et₂O and increasing polarity ratio to yield **30** as a yellow oil (10.42 g, 87%).

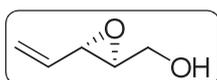
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.83 (ddd, *J*=17.0, 10.5, 6.0 Hz, 1H), 5.38 (d, *J*=17.0 Hz, 1H), 5.25 (d, *J*=10.5 Hz, 1H), 4.33 (m, 1H), 3.09 (dd, *J*=6.5, 3.0 Hz, 1H), 2.77 (m, 2H), 2.05 (br, 1H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 135.4 (CH), 117.7 (CH), 70.2 (CH), 53.9 (CH), 43.5 (CH₂)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3443, 2969, 1622, 1492, 1277, 1181, 1170, 1099, 1013

EM (Cl-NH₃, *m/z*): 99 (M-1, 31%), 100 (M, 11%), 101 (M+1, 100%), 118 (M+18, 46%)

8.1.2. (2S,3S)-2,3-Epoxy-4-pentenol (**28**)



Compound **30** (9.9 g, 119 mmol) was disposed in a 250 mL round flask and 200 mL of NaOH 0,5 M (100 mmol) were added drop by drop with vigorous stirring during 30 minutes at room temperature. The crude was treated with 25 mL of CH₂Cl₂. The aqueous phase was separated and extracted with CH₂Cl₂ (3x40 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and the solvent removed under reduced pressure using an ice-bath to minimize the loss of the final epoxide yielding **28** (4.95 g, 50%) as a yellow oil.

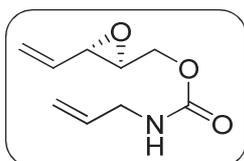
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.61-5.54 (m, 1H), 5.49 (dd, *J*=17.5, 1.5 Hz, 1H), 5.29 (dd, *J*=10.5, 1.5 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J*=13.0, 1.5 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J*=13.0, 3.0 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J*=7.5, 2.5 Hz, 1H), 3.06 (m, 1H), 2.53 (br, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 134.6 (CH), 120.0 (CH), 61.3 (CH₂), 60.2 (CH), 55.9 (CH)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3413, 2939, 1634, 1512, 1478, 1212, 1190, 1077

EM (Cl-NH₃, *m/z*): 100 (M, 52%), 101 (M+1, 33%), 118 (M+18, 100%)

8.1.3. (2*S*,3*S*)-2,3-Epoxy-4-pentenyl-*N*-allylcarbamate (**34**)



Method A: starting from **28**

To a solution of **28** (4.62 g, 46.14 mmol) in anhydrous Et₂O (85 mL) was added NEt₃ (13.4 mL, 96.46 mmol) and the resulting solution was stirred at room temperature. After 30 min, allyl isocyanate (6.0 mL, 67.10 mmol) was added to the solution and the clear colorless solution was stirred at 65°C until TLC showed complete conversion (2.5 h). The reaction mixture was diluted with Et₂O and quenched with saturated aqueous NH₄Cl (20 mL). The aqueous phase was extracted with Et₂O (3x15mL) and dried with MgSO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to yield **34** as colorless oil (11.20 g, 94%).

Method B: starting from **31**

A 3-neck 2 L flask provided with mechanic stirring was charged with 11.3 g of 3 Å powder molecular sieves. Then 560 mL of anhydrous CH₂Cl₂ were added under N₂ atmosphere and the flask was allowed to cool to -20°C.

Then a solution of L-(+)-DIPT (10.71 g, 45.26 mmol) in 10 mL of anhydrous CH₂Cl₂ and previously dried over 4 Å molecular sieves beads during 24 h was added via cannula. At that point, Ti(iOPr)₄ (10.6 mL, 34.47 mmol) was added via syringe. Next a 3M solution of ^tBu-OOH in isooctane (215 mL, 645.0 mmol) previously dried over 4 Å molecular sieves beads during 1h was added via cannula. The crude was allowed to stir during 1 h and then a solution of **31** (27.0 g, 321.0 mmol) in 20 mL of anhydrous CH₂Cl₂ and previously dried over 4 Å molecular sieves beads during 24 h was added via cannula. The crude was allowed to stir at -20°C during 4h until no starting material was observed by TLC. Then P(OMe)₃ (40.2 mL, 337 mmol) was added and the mixture was stirred at -20°C for 30min followed by the addition of a citric acid (3.09 g, 14.56 mmol) solution in Et₂O (200 mL). The reaction was stirred 30min more and then it was allowed to go to r.t. After that, TEA (79 mL, 562 mmol) and allyl isocyanate (40.15 mL, 449.7 mmol) were added and the mixture was heated at reflux for 6h. After cooling to r.t., NH₄Cl sat aq. (100 mL) was added and the mixture was stirred during 30min. The crude was filtered through Celite washing with Et₂O and the resulting mother liquors were extracted with EtOAc (3x 200mL), washed with H₂O (3x 100mL), reextracted with Et₂O (3x 100 mL) and dried over MgSO₄ to get a red oil. The crude was purified on silica-Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc and increasing polarity ratio from 100:0 to 90:10 to yield **34** as a yellow oil (31.2 g, 53%).

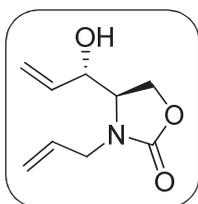
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.82 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.29 (m, 2H), 5.18 (m, 2H), 5.05 (br, 1H), 4.42 (1H, dd, *J*=10.0, 3.33 Hz), 3.98 (1H, dd, *J*=10.0, 6.5 Hz), 3.81 (m, 2H), 3.27 (1H, dd, *J*=6.5, 2.5 Hz), 3.13 (m, 1H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 155.8 (CO), 134.3 (CH), 134.2 (CH), 120.1 (CH₂), 115.9 (CH₂), 64.5 (CH₂), 57.4 (CH), 56.3 (CH), 43.4 (CH₂)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3344, 2989, 1717, 1646, 1532, 1150, 1105, 1082, 880

HRMS (ES): calcd. for C₉H₁₃NO₃: 183.0895, found 183.0887

8.1.4. (4R)-4-[(1'S)-1'-Hydroxy-2'-propenyl]-3-allyl-1,3-oxazolidin-2-one (35)



Method A: Purification by column chromatography

A solution of sodium bis(trimethylsilyl)amide (4.18 g, 21.70 mmol) in anhydrous THF (60 mL) was added via canula to a solution of carbamate **34** (4.37 g, 24.38 mmol) in anhydrous THF (30 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature until TLC showed completion of the reaction (50 min). The yellow solution was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (40 mL) and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3x30 mL). The combined organic phases were dried with MgSO₄ and solvents were removed at low pressure. The product was precipitated adding hexane yielding **35** (3.70 g, 85%) as a slightly yellow solid with 94% *ee*.

Method B: Purification by crystallization

A solution of sodium bis(trimethylsilyl)amide (14.09 g, 73.01 mmol) in anhydrous THF (150 mL) was added via cannula to a solution of carbamate **34** (17.37 g, 94.81 mmol) in anhydrous THF (60 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature until TLC showed completion of the reaction (40 min). The yellow solution was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (200 mL) and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3x 50 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and solvents were removed at low pressure. HPLC analysis showed a 93% *ee*. Crystallization was realized heating a suspension of the crude in 0.5V of heptane at 60°C and adding toluene until a clear solution was obtained. After filtration, **35** (13.3 g, 76%) was obtained as a slightly yellow solid with 99% *ee*.

$[\alpha]_D^{20} = -8.3$ (c= 0.9, CH₂Cl₂)

Mp: 60-62°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.82 (m, 2H), 5.40 (m, 4H), 4.45 (br, 1H), 4.25 (m, 4H), 3.88 (m, 1H)

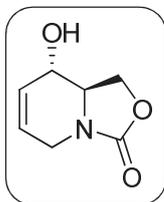
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 168.7 (CO), 134.6 (CH), 132.2 (CH), 119.0 (CH₂), 118.2 (CH₂), 69.3 (CH), 62.3 (CH₂), 58.3 (CH), 45.3 (CH₂)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3411, 2925, 1737, 1262, 1075, 994

HRMS (ES): calcd. for C₉H₁₃NO₃: 183.0895, found 183.0888

HPLC: Column Chiralpak IA; heptane : IPA 90:10; 1 mL/min; $\lambda = 210$ nm; t_R **35** = 11.05 min, t_R **ent-35** = 15.45 min

8.1.5. (4R)-4-[(1'S)-1'-Hydroxy-2'-propenyl]-3-allyl-1,3-oxazolidin-2-one (**8**)



A solution of Grubbs's catalyst (0.66 g, 4% mol, 0.81 mmol) in anhydrous dichloromethane (20 mL) was added via canula to a solution of **35** (3.68 g, 20.10 mmol) in anhydrous dichloromethane (100 mL). The resulting mixture was briefly stirred for 3.5 h, by which time the reaction was complete. The black solution was then concentrated and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio yielding **8** as a grey solid (3.08 g, 99%).

$[\alpha]_D^{20} = -16.7$ ($c=1.2$, CHCl_3)

Mp (DSC) : 86.5°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 5.75 (m, 2H), 4.52 (dd, $J=8.5$, 8.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, $J=8.5$, 4.5 Hz, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.06 (1H, dd, $J=16.5$, 2.0 Hz), 3.62 (1H, dd, $J=16.5$, 2 Hz), 3.48 (m, 1H), 3.23 (br, 1H).

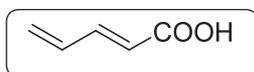
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 157.5 (CO), 130.2 (CH), 124.0 (CH), 67.6 (CH), 67.3 (CH_2), 56.4 (CH), 40.7 (CH_2)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3377, 1765, 1648, 1210, 1170, 925, 852

EA : Anal. calcd. for $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_3$: C, 54.19%; H, 5.85%; N, 9.03%; found C, 54.02%; H, 5.77%; N, 9.08%

GC: Column Beta-DEX 30m; 180°C (40 min); 1.5 mL/min; $T_{\text{det}} = 250^\circ\text{C}$; $T_{\text{inj}} = 250^\circ\text{C}$; t_R **8** = 29.92 min, t_R **ent-8** = 28.44 min

8.1.6. (E)-Penta-2,4-dienoic acid (**32**)



Malonic acid (100.8 g, 0.97 mol) was dissolved in pyridine (161 mL) in a 3-necked flask fitted with condenser, dropping funnel and a gas exit. Piperidine (2.6 mL, 0.025 mol) was added and the mixture was stirred at 50°C. Acrolein (88.6 mL, 1.26 mol) was added dropwise during 60-90 min and the crude was stirred at 80°C for 2h until no generation of $\text{CO}_2(\text{g})$ was observed. After cooling the reaction, the crude was poured into a mixture of ice (282 g) and H_2SO_4 (117 mL) and extracted with Et_2O (3x150 mL), washed with NaHCO_3 sat aq. (1x150 mL) and dried over MgSO_4 . The solvent was eliminated at low pressure in an ice-bath to minimize the loss of the final acid giving **32** as a yellow solid (80.9 g, 85%) pure enough to use in next steps.

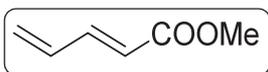
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.35 (dd, $J = 15.5$, 10.5 Hz, 1H), 6.49 (dt, $J = 17.0$, 10.5 Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.66 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 5.55 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 172.3 (CO), 147.0 (CH), 134.5 (CH), 126.7 (CH), 121.3 (CH_2)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3013, 2963, 1719, 1634, 1600, 1276, 1007

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$: 99.04406, found 99.04399

8.1.7. Methyl (*E*)-penta-2,4-dienoate (**33c**)



Method A: Fisher esterification

To a solution of **32** (50.5 g, 0.51 mol) in methanol (625 mL) was added H_2SO_4 (4.29 mL, 15%) and the resulting mixture was heated at reflux for 3h. NaHCO_3 aq sat. was added until pH 7-8 and the crude was extracted with pentane (6x50 mL), washed with brine (1x5 mL) and dried over MgSO_4 . Removal of the solvent at low pressure (200 mbar) and 0°C yielded **33c** (27.3 g, 47%) as a yellow oil.

Method B: esterification with MeI / K_2CO_3

K_2CO_3 (86.9 g, 0.62 mol) was placed in a 3-necked flask fitted with a dropping funnel and a gas exit. A solution of **32** (76.4 g, 0.78 mol) in DMSO (320 mL) was added via cannula followed by dropwise addition of MeI (51.4 mL, 0.82 mol) during 30 min. The reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Remaining K_2CO_3 was filtered and the resulting crude was extracted with petroleum ether (5x100 mL), dried over MgSO_4 and the solvent was removed at 200mbar pressure and 0°C to minimize the loss of the final ester yielding **33c** (46.3 g, 56%) as a yellow oil.

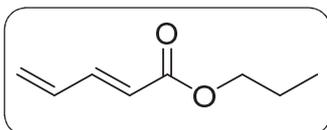
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.28 (m, $J = 15.5, 11.0$ Hz 1H), 6.46 (m, $J = 17.0, 11.0$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.61 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 5.50 (m, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 167.3 (CO), 144.9 (CH), 134.7 (CH), 125.6 (CH_2), 121.7 (CH), 51.6 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 2949, 1726, 1424, 1200, 1167, 1104

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4$: 225.11214, found 225.11208

8.1.8. (*E*)-Propyl penta-2,4-dienoate (**33a**)



To a solution of **32** (102 mg, 1.04 mmol) in 1-propanol (3 mL) was added H_2SO_4 (2 drops) and the resulting mixture was heated at reflux for 3h. NaHCO_3 aq sat. (5 mL) was added and the crude was extracted with pentane (3x5 mL), washed with brine (1x5 mL) and dried over MgSO_4 . Removal of the solvent at low pressure (200 mbar) and 0°C yielded **33a** (126 mg, 87%) as a yellow oil.

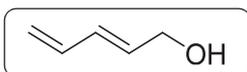
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.26 (t, $J = 13.0$, 1H), 6.46 (dt, $J = 17.0, 10.5$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.61 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 5.49 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.12 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.69 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 0.97 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 166.9 (CO), 144.6 (CH), 134.8 (CH), 125.4 (CH₂), 122.25 (CH), 66.02 (CH₂), 22.04 (CH₂), 10.40 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2962, 2936, 1719, 1264, 1168

HRMS (ES): calcd. for C₈H₁₃O₂: 141.09101, found 141.09088

8.1.9. (*E*)-Penta-2,4-dien-1-ol (**31**)



Method A: Reduction using DIBALH

A 3-necked flask provided with mechanic stirring was charged with a solution of **33c** (51.35 g, 0.46 mol) in Et₂O (500 mL) and cooled at -20°C. Then DIBALH 1M solution in CH₂Cl₂ (0.91 L, 0.91 mol) was added via cannula and the resulting mixture was stirred at -20°C for 3h. HCl 1M aq. was added dropwise and carefully until pH 5-6 was achieved. The resulting salts were filtered on vacuum through Celite washing them with Et₂O and recovering the mother liquors in a cooled flask at 0°C. After drying over MgSO₄, solvent was removed at low pressure (200 mbar) and 0°C. The resulting oil was vacuum distilled (14 mmHg, 58-62°C) yielding **31** (14.7 g, 38%) as a yellow oil.

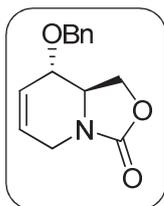
Method B: Reduction using LiAlH₄

A 1L flask provided of mechanic stirring was charged with LiAlH₄ (11.4 g, 0.28 mol). Et₂O (360 mL) was added and the suspension was cooled at 0°C. A solution of **33c** (45.9 g, 0.41 mol) in Et₂O (80 mL) was added via cannula and the reaction was stirred at 0°C for 2h. Then water (20 mL) followed by HCl 1M (until pH 5-6 is achieved) were added and the mixture was stirred for 2h more. The resulting salts were filtered on vacuum through Celite washing them with Et₂O and recovering the mother liquors in a cooled flask at 0°C. After drying over MgSO₄, solvent was removed at low pressure (200 mbar) and 0°C. The resulting oil was vacuum distilled (14 mmHg, 58-62°C) yielding **31** (27.0 g, 78%) as a yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.43 – 6.21 (m, 2H), 5.85 (dt, *J* = 15.0, 5.5 Hz, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.23 – 4.16 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 139.1 (CH), 133.9 (CH), 131.0 (CH), 118.5 (CH₂), 62.8 (CH₂)

8.1.10. (8*S*,8*aR*)-8-(Benzyloxy)-8,8*a*-dihydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (**36d**)



To a stirred suspension of NaH (262 mg, 10.36 mmol) in 10 mL of DMF at 0°C was added via cannula a solution of compound **8** (748 mg, 4.82 mmol) in 7 mL of DMF. After 10 min, benzyl bromide (0.61 mL, 5.06 mmol) was added via syringe and the temperature was left to warm to room temperature. After 4 h of vigorous stirring the crude was treated with 10 mL of water, extracted with EtOAc (3x20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **36d** as a slight grey solid (1.21 g, 89%).

$[\alpha]_D^{20} = +64.8$ ($c=1.8$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.41 – 7.29 (m, 5H), 5.97 (dq, $J = 10.5, 1.5$ Hz, 1H), 5.82 (dq, $J = 10.5, 2.5$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.46 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H), 4.15 – 4.06 (m, 2H), 3.94 (m, 1H), 3.70 – 3.58 (m, 2H).

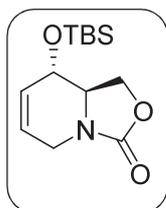
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 157.0 (CO), 137.2 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 126.3 (CH), 124.7 (CH), 73.9 (CH), 71.0 (CH_2), 67.3 (CH_2), 54.4 (CH), 40.8 (CH_2)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3033, 2911, 1761, 1478, 1454, 1420, 1389, 1204, 1082, 1030

EM (Cl- NH_3 , m/z): 246 (M+1, 64%), 263 (M+18, 100%)

EA : Anal. calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$: C, 68.56%; H, 6.16%; N, 5.71%; found C, 68.85%; H, 6.01%; N, 5.64%

8.1.11. (8*S*,8*aR*)-8-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1,5,8,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (36*b*)



Imidazole (105 mg, 2.05 mmol), TBDMSCl (177 mg, 1.6 mmol) and **8** (114 mg, 0.74 mmol) were dissolved in CH_2Cl_2 (15 mL) and the reaction was stirred at reflux 7h. H_2O (5 mL) was added and the crude was extracted with EtOAc (3x 10 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **36b** as a white solid (60 mg, 30%).

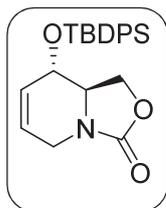
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 5.70 (m, 2H), 4.49 (dt, $J = 9.0, 1.0$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, 1H), 4.14 (m, 1H), 4.05 (d, $J = 18.0$ Hz, 1H), 3.63 (m, $J = 18.0$ Hz, 1H), 3.49 (td, $J = 8.0, 4.0$ Hz, 1H), 0.88 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 157.2 (CO), 130.5 (CH), 123.8 (CH), 68.4 (CH), 67.2 (CH_2), 56.4 (CH), 40.8 (CH_2), 25.6 (CH_3), 17.9 (C), -4.21 (CH_3), -4.68 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 2952, 2929, 2857, 1787, 1428, 1259, 1098, 1077

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_3\text{Si}$: 270.15200, found 270.15255

8.1.12. (8*S*,8*aR*)-8-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-1,5,8,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (36*c*)

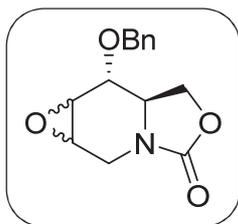


To a solution of imidazole (110 mg, 1.61 mmol) in DMF (5 mL) was added via cannula a solution of **8** (100 mg, 0.64 mmol) in DMF (3 mL). After 10 min, TBDPSCl (0.2 mL, 0.21 mmol) was added and the reaction was stirred for 18h at r.t. H_2O (5 mL) was added and the crude was extracted with EtOAc (3x 10 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **36c** as a colorless oil (200 mg, 80%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.64 (m, 4H), 7.43 (m, 6H), 5.74 (m, 1H), 5.65 (m, 1H), 4.29 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.97 (dq, *J* = 18.5, 2.5 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 8.0, 5.0 Hz, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.59 (dq, *J* = 18.5, 2.5 Hz, 1H), 1.06 (s, 9H).

Complete characterization at Caterina Murruzzu, Phd Thesis, Universitat de Barcelona 2005

8.1.13. (6*aR*,7*R*)-7-(Benzyloxy)hexahydro-4H-oxazolo[3,4-*a*]oxireno[2,3-*d*]pyridin-4-one (38d)



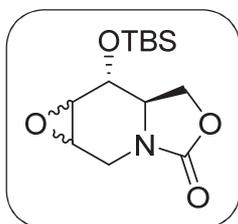
Method A: Epoxidation with oxone

NaHCO₃ (1.39 g, 16.53 mmol) and **36d** (270 mg, 1.1 mmol) were suspended in a mixture of acetone (27 mL) and H₂O (13.5 mL). Oxone (3.39g, 5.51 mmol) was added in portions during 15 min and the reaction was allowed to stir at r.t. for 1h. After filtration of the salts, the crude was extracted with EtOAc (3x 25mL), dried over MgSO₄ and was purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to yield **38d** (125 mg, 44%) as a white solid 1.4:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

Method B: Epoxidation with oxone

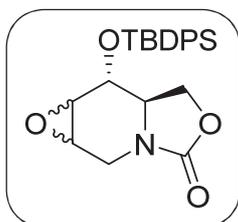
To a solution of H₂O₂ (0.1 mL, 1.2 mmol) in CH₂Cl₂ (1.2 mL) at 0°C was added trifluoroacetic anhydride (0.41 mL, 2.45 mmol) and the mixture was allowed to stir at r.t. for 1.5h. After cooling it to 0°C, a solution of **36d** (123 mg, 0.51 mmol) and TFA (95 μL, 1.25 mmol) in CH₂Cl₂ (2.5 mL) was added and the reaction was allowed to stir at r.t. during 4h until no starting material was observed by TLC. Na₂SO₃ (300 mg) was added and the crude was stirred for 1h. The reaction was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL), washed with NaOH 1M (1x 10 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3x 10mL), dried over MgSO₄ and purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to yield **38d** (89 mg, 68%) as a white solid 1.7:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

8.1.14. (6*aR*,7*R*)-7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)hexahydro-4H-oxazolo[3,4-*a*]oxireno[2,3-*d*]pyridin-4-one (38b)



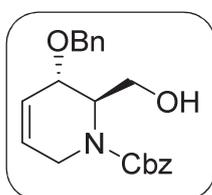
NaHCO₃ (257 mg, 3.06 mmol) and **36b** (55 mg, 0.21 mmol) were suspended in a mixture of acetone (5.5 mL) and H₂O (2.75 mL). Oxone (628 mg, 1.02 mmol) was added in portions during 15 min and the reaction was allowed to stir at r.t. for 2h. After filtration of the salts, the crude was extracted with EtOAc (3x 25mL), dried over MgSO₄ and was purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to yield **38b** (48 mg, 82%) as a white solid 1.3:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

8.1.15. (6*aR*,7*R*)-7-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)hexahydro-4*H*-oxazolo[3,4-*a*]oxireno[2,3-*d*]pyridin-4-one (38c)



NaHCO₃ (169 mg, 2.02 mmol) and **36c** (53 mg, 0.13 mmol) were suspended in a mixture of acetone (5.3 mL) and H₂O (2.7 mL). Oxone (414 mg, 0.67 mmol) was added in portions during 15 min and the reaction was allowed to stir at r.t. for 5h. After filtration of the salts, the crude was extracted with EtOAc (3x 25mL), dried over MgSO₄ and was purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to yield **38c** (47 mg, 76%) as a white solid 1.4:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

8.1.16. Benzyl (2*R*,3*S*)-3-(benzyloxy)-2-(hydroxymethyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (39)

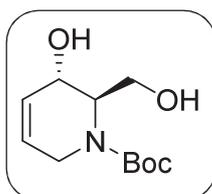


To a solution of **36d** (421 mg, 1.71 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (18 mL) was added NaOH 6M (2.86 mL, 17.10 mmol) and the reaction was heated at reflux for 20h. Solvents were removed at low pressure. The resulting white solid was redissolved in THF (30 mL) and H₂O (3 mL) and cooled at 0°C. NaHCO₃ (432 mg, 5.14 mmol) and CBzCl (0.39 mL, 2.57 mmol) were added and the reaction was stirred at 0°C during 4h. then H₂O (10 mL) was added and the crude was extracted with EtOAc (3x 15mL), dried over MgSO₄ and purified on SiO₂ using hexane/EtOAc to yield **39** (427 mg, 70%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.32-7.25 (m, 10H), 5.91 (m, 2H), 5.18 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 4.78 (m, 2H), 4.52 (m, 2H), 4.40 (d, *J* = 18.5 Hz, 2H), 3.96 (s, 1H), 3.55 (m, 2H), 1.67 (br, 1H)

Complete characterization at Caterina Murruzzu, Phd Thesis, Universitat de Barcelona 2005

8.1.17. *tert*-Butyl (2*R*,3*S*)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (40)



To a solution of **8** (308 mg, 1.98 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (14 mL) was added NaOH 6M (3.3 mL, 19.80 mmol) and the reaction was heated at reflux for 4h. Solvents were removed at low pressure and the resulting white solid was redissolved in EtOAc (10 mL) and NaHCO₃ sat. aq. (10 mL). Boc₂O (813 mg, 3.69 mmol) was added and the reaction was stirred at r.t. during 16h. The crude was extracted with EtOAc (3x 10 mL), dried over MgSO₄ and purified on SiO₂ using hexane/EtOAc to yield **40** (320 mg, 62%) as a colorless oil.

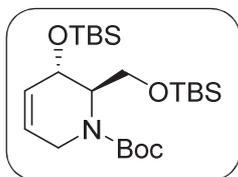
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.95 (m, 1H), 5.88 (m, 1H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.34 - 4.07 (m, 2H), 3.61 – 3.43 (m, 3H), 1.47 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.4 (CO), 127.4 (CH), 124.7 (CH), 80.5 (C), 63.1 (CH), 61.0 (CH₂), 58.2 (CH), 41.0 (CH₂), 28.4 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3388, 2962, 2930, 1674, 1418, 1365, 1171

HRMS (ES): calcd. for C₁₁H₂₀NO₄: 230.13868, found 230.13886

8.1.18. *tert*-Butyl (2*R*,3*S*)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (41)



Imidazole (226 mg, 3.29 mmol), TBDMSCl (496 mg, 3.29 mmol) and **40** (252 mg, 1.09 mmol) were dissolved in 25 mL of CH₂Cl₂ and the reaction was stirred at r.t. 18h. Solvent was removed under low pressure and the obtained crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **41** (483 mg, 96%) as a colorless oil.

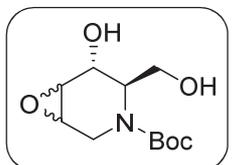
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.79 (m, 2H), 4.27 (m, 3H), 3.46 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.1-0.01 (m, 12H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 155.4 (CO), 126.9 (CH), 124.6 (CH), 79.6 (C), 63.7 (CH), 61.7 (CH₂), 58.6 (CH), 40.2 (CH₂), 28.4 (CH₃), 25.9 (CH₃), 25.6 (CH₃), 18.2 (C), 18.0 (C), -3.6 (CH₃), -4.4 (CH₃), -4.6 (CH₃), -5.5 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2955, 2929, 2857, 1699, 1405, 1367, 1255, 1063

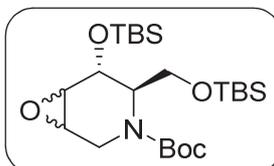
HRMS (ES): calcd. for C₂₃H₄₈NO₄Si₂: 458.3122, found 458.3120

8.1.19. *tert*-Butyl (4*R*,5*R*)-5-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-7-oxa-3-azabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylate (38d)



A solution of MCPBA (173 mg, 0.77 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) previously washed with NaHCO₃ sat. aq. was added to a flask in which **40** (71 mg, 0.31 mmol) was placed. The resulting mixture was stirred during 7d. Then NaHCO₃ sat. aq (10 mL) was added and the crude was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **38d** (14 mg, 18%) as a colorless oil 10:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

8.1.20. *tert*-Butyl (4*R*,5*R*)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-7-oxa-3-azabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylate (38f)



Method A: Epoxidation with MPCBA

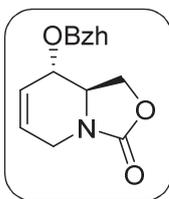
A solution of MCPBA (70 mg, 0.41 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) previously washed with NaHCO₃ sat. aq. was added to a flask in which **41** (60 mg, 0.13 mmol) was placed. The resulting mixture was stirred during 7d. Then NaHCO₃ sat. aq (10 mL) was added and the crude was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **38f** (23 mg, 36%) as a colorless oil 1:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

Method B: Epoxidation with Oxone/Acetone

NaHCO₃ (168 mg, 2.01 mmol) and **41** (61 mg, 0.13 mmol) were suspended in a mixture of acetone (6 mL) and H₂O (3 mL). Oxone (409 mg, 0.67 mmol) was added in portions during 15 min and the reaction was allowed to stir at r.t. for 5h. After filtration of the salts, the crude was extracted with EtOAc (3x 25mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to yield **38f** (25 mg, 44%) as a colorless oil 2:1 non-separable mixture of diastereoisomers.

Method C: Epoxidation with Oxone/trifluoroacetone

To a solution of **41** (105 mg, 0.23 mmol) in ACN (3 mL) at 0°C were added EDTA (0.2%) and trifluoroacetone (0.21 mL, 2.27 mmol). Then oxone (630 mg, 1.02 mmol) and NaHCO₃ (134 mg, 1.58 mmol) were added in portions during 1h and the reaction was stirred at 0°C using a cryocool system for 24h. Then H₂O (5 mL) was added and the crude was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL) and dried over MgSO₄ recovering the starting material.

8.1.21. ((8*S*,8*aR*)-8-(Benzhydryloxy)-8,8a-dihydro-1H-oxazolo[3,4-a]pyridin-3(5H)-one (26)

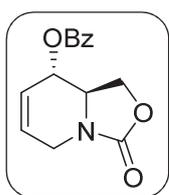
NaH (73 mg, 2.90 mmol) was suspended in a 50 mL round bottom flask with DMF (6 mL) and cooled to 0°C. A solution of **8** (250 mg, 1.61 mmol) in DMF (3.5 mL) was added via cannula. After 30 minutes, (bromomethylene)dibenzene (620 mg, 2.38 mmol) dissolved in DMF (3.5 mL) was added via cannula. The reaction was left to warm to room temperature and stirred for 20 h. The crude was treated by adding 13 mL of a Et₂O:H₂O 1:1 mixture, extracted with Et₂O (3x15 mL), washed with water (2x10 mL), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **36e** as a yellow oil (408 mg, 79 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.36 (m, 10H), 5.96 (m, 1H), 5.79 (m, 1H), 5.54 (s, 1H), 4.38 (dd, *J*=8.0, 7.5 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J*=16.5, 2.5 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.84 (dd, *J*=15.5, 5.5 Hz, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.61 (m, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 157.6 (CO), 142.2 (C), 140.8 (C), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 126.5 (CH), 124.6 (CH), 82.1 (CH), 72.7 (CH), 67.9 (CH₂), 54.3 (CH), 40.8 (CH₂)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2991, 1761, 1356, 1178, 1089

HRMS (ES): calcd. for C₂₀H₁₉NO₃ : 321.1365, found 321.1371

8.1.22. ((8*S*,8*aR*)-3-Oxo-1,5,8,8a-tetrahydro-3H-oxazolo[3,4-a]pyridin-8-yl benzoate (36f)

DMAP (24mg, 0,19 mmol) and **8** (200 mg, 1.29 mmol) were dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL). Then, TEA (0.36 mL, 2.58 mmol) and BzCl (0.38, 3.22 mmol) were added and the reaction was stirred for 6h. After treatment with H₂O (5 mL), the crude was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **36f** as a yellow oil (240 mg, 94 %)

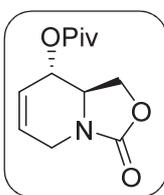
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.03 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.98 (m, *J* = 10.5, 4.0, 2.0 Hz, 1H), 5.86 (ddd, *J* = 10.5, 4.0, 2.0, 1H), 5.52 (m, 1H), 4.56 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 9.0, 5.5 Hz, 1H), 4.20 (ddd, *J* = 18.5, 5.5, 2.5 Hz, 1H), 3.86 (td, *J* = 8.0, 5.5 Hz, 1H), 3.73 (ddd, *J* = 18.5, 5.0, 2.5 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 166.0 (CO), 157.0 (CO), 133.7 (CH), 129.8 (CH), 129.1 (C), 128.6 (CH), 126.4 (CH), 125.4 (CH), 69.7 (CH), 67.8 (CH₂), 54.6 (CH), 40.6 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2911, 2840, 1761, 1719, 1450, 1422, 1263, 1111

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₁₄NO₄: 260.09173, found 260.09235

8.1.23. (8*S*,8*aR*)-3-Oxo-1,5,8,8*a*-tetrahydro-3H-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-8-yl pivalate (**36g**)



DMAP (12 mg, 0.15 mmol) and **8** (100 mg, 0.64 mmol) were dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL). After that, TEA (0.18 mL, 1.29 mmol) and PivCl (0.12, 0.97 mmol) were added and the reaction was stirred for 8h. After treatment with H₂O (5 mL), the crude was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to give **36g** as a yellow oil (129 mg, 84 %)

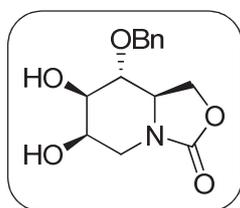
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.89 (m, 1H), 5.65 (dd, *J* = 10.5, 2.0 Hz, 1H), 5.19 (m, 1H), 4.47 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 9.0, 5.5 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.68 (m, 2H), 1.20 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 178.0 (CO), 156.9 (CO), 126.0 (CH), 125.4 (CH), 69.0 (CH), 67.6 (CH₂), 54.4 (CH), 40.6 (CH₂), 38.8 (CH), 27.0 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2974, 1766, 1730, 1480, 1421, 1276, 1151

HRMS (ES): calcd. for C₁₂H₁₈NO₄: 240.12303, found 240.12326

8.1.24. (6*R*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(Benzyloxy)-6,7-dihydroxyhexahydro-3H-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (**42a**)



General procedure for dihydroxylation was carried out with **36d** (28 mg, 0.11 mmol), NMO (33 mg, 0.28 mmol) and K₂OsO₄ (3 mg, 0.009 mmol) in acetone:H₂O 10:1 (1.6 mL). After treatment with Na₂S₂O₃ (30 mg), the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂:MeOH 95:5 to give **42a** (25 mg, 78%) as a white solid mixture of diastereoisomers in a 8:1 relation.

General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using (DHQD)₂Phal (17 mg, 0.02 mmol), K₂OsO₄ (5 mg, 0.013 mmol), K₂CO₃ (855 mg, 6.19 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (2.03 g, 6.12 mmol), CH₃SO₂NH₂ (203 mg, 2.05 mmol) and **36d** (501 mg, 2.04 mmol) in ^tBuOH:H₂O 1:1 (25 mL). After treatment with Na₂SO₃ (3 g) and corresponding work-up the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂:MeOH 95:5 to give **42a** (536 mg, 94%) as a white solid mixture of diastereoisomers in a 18:1 relation.

$[\alpha]_D^{20} = +70.4$ (c=0.5, MeOH)

Mp: 101-102°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.42 – 7.30 (m, 5H), 4.90 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.09 (sa, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.55 (ddd, *J* = 4.5, 8.0, 9.0 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 1.5, 14.0 Hz, 1H), 2.66 (br, 1H), 2.61 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H).

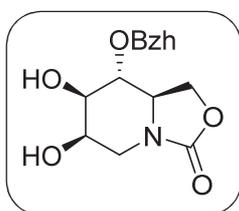
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO, δ/ppm): 7.36 (m, 5H), 4.99 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 8.0, 8.7 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.05 (sa, 1H), 3.98 (m, 2H), 3.77 (dd, *J* = 14.0, 2.0 Hz, 1H), 3.75 – 3.70 (m, 1H), 3.67 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.09 (dd, *J* = 14.0, 2.0 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO, δ/ppm): 156.7 (CO), 140.0 (C), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 128.3 (CH), 79.0 (CH), 75.9 (CH), 74.9 (CH₂), 70.2 (CH), 66.4 (CH₂), 57.6 (CH), 46.0 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3354, 1433, 1724, 1110, 1091

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₁₇NO₅: 279.1107, found 279.1139

8.1.25. (6*R*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(Benzhydryloxy)-6,7-dihydroxyhexahydro-3H-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (42b)



General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using (DHQD)₂Phal (13 mg, 0.016 mmol), K₂OsO₄ (2.4 mg, 0.006 mmol), K₂CO₃ (628 mg, 4.54 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (1.496 g, 4.487 mmol), CH₃SO₂NH₂ (148 mg, 1.51 mmol) and **36e** (481 mg, 1.496 mmol) in ^tBuOH:H₂O 1:1 (24 mL). After treatment with Na₂SO₃ (2.9 g) and corresponding work-up the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂:MeOH 95:5 to give **42b** (455 mg, 85 %) as a one diastereoisomer with white solid aspect.

$[\alpha]_D^{20} = +68.6$ (c=0.44, CHCl₃)

Mp: 71-73 °C

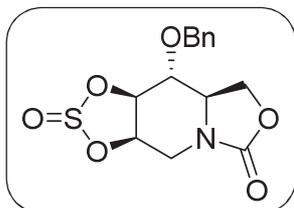
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.40 – 7.27 (m, 10H), 5.83 (s, 1H), 4.09 (dd, *J* = 8.5, 7.0 Hz, 1H), 4.03 (q, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 14.5, 2.5 Hz, 1H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.61-3.54 (m, 2H), 2.99 (dd, *J* = 14.5, 1.5 Hz, 1H), 2.94 (br, 1H), 2.66 (br, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 158.0 (CO), 142.1 (C), 141.6 (C), 128.8 (CH), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 126.6 (CH), 84.7 (CH), 77.3 (CH), 75.1 (CH), 68.6 (CH), 65.9 (CH₂), 57.0 (CH), 45.0 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3406, 2919, 1741, 1448, 1081

HRMS (ES): calcd. for C₂₀H₂₁NO₅ : 356.14925, found 356.14894

8.1.26. Sulphite of (6*R*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(benzyloxy)-6,7-dihydroxytetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (43a)



General procedure for sulphite synthesis was carried out using **42a** (60 mg, 0.21 mmol), TEA (0.13 mL, 0.91 mmol) and SOCl₂ (50 μL, 0.77 mmol) in THF (3 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **43a** (51mg, 73%) and allowed to obtain both diastereoisomers separately.

Spectral data corresponds to each of both diastereomers while IR and HRMS corresponds to the mixture

Sulphite 43a

[α]²⁰_D = +6.6 (c=0.285, CHCl₃)

Mp: 155-158°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.43 – 7.29 (m, 5H), 5.10 (m, 1H), 4.96 – 4.91 (m, 2H), 4.66 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, 1H), 3.97 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 3.56 – 3.48 (m, 2H), 3.33 (dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.67 (CO), 136.66 (C), 128.92 (CH), 128.84 (CH), 128.46 (CH), 84.54 (CH), 77.63 (CH), 75.07 (CH), 73.85 (CH₂), 65.80 (CH₂), 54.70 (CH), 39.45 (CH₂).

Sulphite 43a'

[α]²⁰_D = +12.1 (c=0.265, CHCl₃)

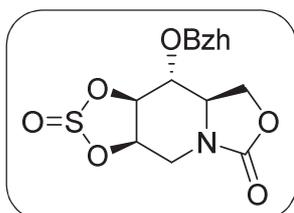
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.45 – 7.28 (m, 5H), 4.95 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.66 (m, 3H), 4.44 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J* = 9.1, 8.1 Hz, 1H), 4.22 (m, *J* = 9.9, 7.7 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 9.1, 4.6 Hz, 1H), 3.53 – 3.47 (m, 1H), 3.37 (dd, *J* = 15.9, 2.6 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.8 (CO), 137.3 (C), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 83.3 (CH), 80.7 (CH), 78.6 (CH), 74.6 (CH₂), 66.0 (CH₂), 55.4 (CH), 40.5 (CH₂).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2978, 1760, 1440, 1201, 1101, 1063, 951

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₁₇NO₅: 326.06928, found 326.06958

8.1.27. Sulphite of (6*R*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(benzhydryloxy)-6,7-dihydroxytetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (43b)



General procedure for sulphite synthesis was carried out using **42b** (94 mg, 0.27 mmol), TEA (0.15 mL, 1.11 mmol) and SOCl₂ (70 μL, 0.95 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **43b** (82mg, 77%) and allowed to obtain both diastereoisomers separately.

Spectral data corresponds to each of both diastereomers while IR and HRMS corresponds to the mixture

Sulphite 43b

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +38.4$ ($c=0.13$, CHCl_3)

Mp: 63-65 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.42 – 7.27 (m, 10H), 5.92 (s, 1H), 5.08 (m, 1H), 5.00 (dd, $J = 7.0$, 5.0 Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.33 (dd, $J = 9.0$, 8.0 Hz, 1H), 3.74 (dd, $J = 9.0$, 5.0 Hz, 1H), 3.64 (ddd, $J = 9.0$, 8.0, 5.0 Hz, 1H), 3.47 (dd, $J = 16.0$, 3.0 Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 9.0$, 7.0 Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 156.5 (CO), 141.2 (C), 139.9 (C), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 126.3 (CH), 84.5 (CH), 82.8 (CH), 75.8 (CH), 75.0 (CH), 65.7 (CH_2), 54.6 (CH), 39.2 (CH_2).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 2904, 1764, 1428, 1204, 1096, 1063

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}$: 402.10058, found 402.10138

Sulphite 43b'

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +46.7$ ($c=0.06$, CHCl_3)

Mp: 102-103 °C

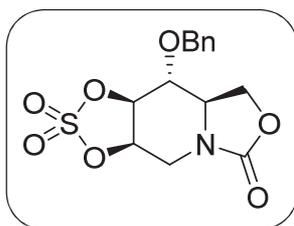
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.42 – 7.23 (m, 10H), 5.91 (s, 1H), 4.72 (dd, $J = 8.0$, 5.0 Hz, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.41 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.30 (dd, $J = 9.5$, 8.0 Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 9.0$, 8.0 Hz, 1H), 3.56 (ddd, $J = 9.5$, 8.0, 5.0 Hz, 1H), 3.39 – 3.28 (m, $J = 16.0$, 14.5, 3.0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 156.5 (CO), 141.5 (C), 140.5 (C), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 127.4 (CH), 126.4 (CH), 83.8 (CH), 83.1 (CH), 80.3 (CH), 77.2 (CH), 65.8 (CH_2), 55.2 (CH), 40.2 (CH_2)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 2971, 1763, 1425, 1215, 1095, 1063

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}$: 402.10058, found 402.10102

8.1.28. Sulphate of (6R,7R,8R,8aR)-8-(benzyloxy)-6,7-dihydroxytetrahydro-1H-oxazolo[3,4-a]pyridin-3(5H)-one (44a)



General procedure for sulphate synthesis via oxidation was carried out using **42a** (3.18 g, 11.38 mmol), TEA (6.66 mL, 47.81 mmol), SOCl_2 (2.5 mL, 38.72 mmol), RuCl_3 (35 mg, 0.17 mmol) and NaIO_4 (4.87 g, 22.77 mmol) in THF (120 mL) and $\text{CCl}_4:\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (90 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **44a** (3.12 g, 80%) as a white solid.

General procedure for sulphate synthesis with sulfonyl chloride was carried out using **42a** (46 mg, 0.17 mmol), TEA (0.28 mL, 1.98 mmol) and SO₂Cl₂ (270 μL, 0.826 mmol) in EtOAc (6 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **44a** (32 mg, 58%) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = +47.6$ (c=0.5, CHCl₃)

Mp: 157°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.45 – 7.31 (m, 5H), 5.18 (m, 1H), 4.95 (dd, *J* = 8.0, 4.5 Hz, 1H), 4.91 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H), 3.84 (dd, *J* = 9.5, 4.5 Hz, 1H), 3.59 – 3.50 (m, 1H), 3.36 (dd, *J* = 16.0, 3.0 Hz, 1H).

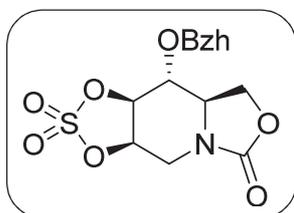
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.1 (CO), 136.1 (C), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 86.7 (CH), 79.1 (CH), 75.2 (CH), 74.4 (CH₂), 65.4 (CH₂), 54.3 (CH), 39.9 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2902, 1755, 1439, 1389, 1214, 1070, 1014

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₁₆NO₇S: 342.06420, found 342.06516

EA : Anal. calcd. for C₁₄H₁₅NO₇S: C, 49.26%; H, 4.43%; N, 4.10%; S, 9.39%; found C, 48.92%; H, 4.48%; N, 4.25%; S, 9.41%

8.1.29. Sulphate of (6*R*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(benzhydryloxy)-6,7-dihydroxytetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (**44b**)



General procedure for sulphate synthesis via oxidation was carried out using **42b** (103 mg, 0.29 mmol), TEA (0.16 mL, 1.16 mmol), SOCl₂ (77 μL, 1.04 mmol), RuCl₃ (2 mg, 0.009 mmol) and NaIO₄ (124 mg, 0.58 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) and CCl₄:ACN:H₂O (6 mL). No extra purification was needed to obtain **44b** (104 mg, 86 %) as a white

solid.

$[\alpha]^{20}_D = +73.5$ (c=0.31, CHCl₃)

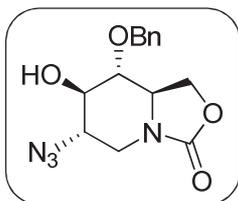
Mp: 160-162°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.43-7.27 (m, 10H), 5.79 (s, 1H), 5.16 (m, 1H), 5.03 (dd, *J* = 8.0, 5.0 Hz, 1H), 4.39 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H), 3.63 (ddd, *J* = 9.5, 8.0, 5.0 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 9.0, 5.0 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 16.0, 3.0 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.0 (CO), 140.8 (C), 139.8 (C), 129.1 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (CH), 126.3 (CH), 86.8 (CH), 84.2 (CH), 79.1 (CH), 74.2 (CH), 65.58 (CH₂), 54.3 (CH), 39.9 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2917, 1763, 1391, 1207, 1068, 1021

HRMS (ES): calcd. for C₂₀H₁₉NO₇S : 418.09550, found 418.09578

8.1.30. (6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6-Azido-8-(benzyloxy)-7-hydroxytetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (45a)


NaN₃ (1.06 g, 16.31 mmol) and **44a** (2.78 g, 8.16 mmol) were dissolved in acetone : H₂O 2:1 (135 mL) and heated at 50°C for 6h. After elimination of acetone at low pressure, Et₂O (80 mL) and aq H₂SO₄ 20% (60 mL) were added and the mixture was stirred at r.t. for 24 h. The reaction was diluted with H₂O (30 mL), extracted with EtOAc (3x 50 mL), washed with aqueous NaHCO₃ (2x15 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio to obtain **45a** (971 mg, 39%) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = +74.0$ (c=0.37, CHCl₃)

Mp: 194-197°C

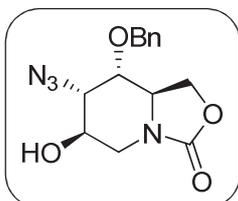
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.44 – 7.29 (m, 5H), 4.89 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 13.5, 6.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.59 (dt, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 3.53 (ddd, *J* = 9.5, 8.0, 4.5 Hz, 1H), 3.44 (ddd, *J* = 11.0, 9.5, 6.0 Hz, 1H), 3.29 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 2.76 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 13.5, 11.0 Hz, 1H),

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.4 (CO), 137.3 (C), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 80.1 (CH), 77.6 (CH), 75.1 (CH₂), 65.6 (CH₂), 60.6 (CH), 56.5 (CH), 42.6 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3366, 2919, 2118, 1709, 1438, 1253, 1108, 1085

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₁₇N₄O₄: 305.12443, found 305.12464

EA : Anal. calcd. for C₁₄H₁₆N₄O₄: C, 55.26%; H, 5.30%; N, 18.41%; found C, 55.35%; H, 5.35%; N, 18.51%

8.1.31. (6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-7-Azido-8-(benzyloxy)-6-hydroxytetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (46a)


Following procedure 8.1.30, **44a** (596 mg, 24%) was obtained as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = +51.2$ (c=0.43, CHCl₃)

Mp: 148-152°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.44 – 7.32 (m, 5H), 4.74 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 3.0, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.92 (m, 2H), 3.68 (d, *J* = 14.5 Hz, 2H), 3.25 (dd, *J* = 14.5, 1.5 Hz, 1H).

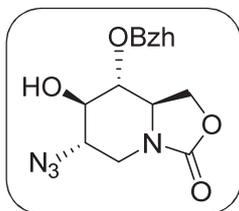
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 158.7 (CO), 136.8 (C), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 74.8 (CH), 71.8 (CH₂), 67.5 (CH), 65.9 (CH₂), 59.9 (CH), 53.2 (CH), 42.7 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3294, 2919, 2099, 1727, 1447, 1088, 1067

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₁₇N₄O₄: 305.12443, found 305.12450

EA : Anal. calcd. for $C_{14}H_{16}N_4O_4$: C, 55.26%; H, 5.30%; N, 18.41%; found C, 55.48%; H, 5.40%; N, 18.42%

8.1.32. (6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6-Azido-8-(benzhydryloxy)-7-hydroxytetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (46a)



In a 10 mL round bottom flask **44b** (120 mg, 0.29 mmol) and NaN_3 (75 mg, 1.15 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (1.5 mL). Then the reaction was heated at 80°C during 4 hour and was allowed to cool to room temperature. Anhydrous THF (1.5 mL) and H_2SO_4 20% aq (0.9 mL) were added and the reaction was stirred vigorously at 80°C for 3 h.

The crude was treated adding 5 mL of H_2O and was extracted with EtOAc (3x5 mL), washed with aqueous $NaHCO_3$ (2x5 mL) and brine (1x5 mL), dried with $MgSO_4$ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio. Both regioisomers were obtained separately in a 2:1 relation as white solids. Specifically, compound **46a** was obtained in a 31 % yield (18 mg).

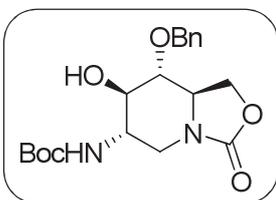
1H -NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ /ppm): 7.41 – 7.19 (m, 10H), 6.00 (s, 1H), 4.24 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.66 (m, 3H), 3.46 (m, 1H), 3.28 (m, 3H), 2.69 (dd, $J = 12.5, 11.0$ Hz, 1H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ /ppm): 155.6 (CO), 142.5 (C), 142.0 (C), 128.5 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.9 (CH), 126.9 (CH), 126.4 (CH), 82.5 (CH), 77.7 (CH), 77.0 (CH), 65.5 (CH_2), 60.5 (CH), 55.5 (CH), 41.8 (CH_2).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3333, 2111, 1717, 1441, 1274, 1111, 1097

HRMS (ES): calcd. for $C_{20}H_{20}N_4O_4$: 381.15573, found 381.15617

8.1.33. tert-Butyl ((6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(benzyloxy)-7-hydroxy-3-oxohexahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)carbamate (47)



Method A

Compound **45a** (58 mg, 0.19 mmol) was dissolved in THF (1.5 mL) and water (0.27 μ l). PPh_3 (85 mg, 0.32 mmol) was added and the reaction was allowed so stir for 2 h.

Solvent was removed under reduced pressure and the white solid obtained was redissolved in 1,4-dioxane (0.6 mL) and isopropyl alcohol (0.2 mL). Boc_2O (46 mg, 0.21 mmol) was added and the reaction was stirred for 18 h. The crude was treated adding 5 mL of H_2O , extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), washed with brine (1x 5 mL) and dried with $MgSO_4$. Purification by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio give **47** (46 mg, 66 %) as a white solid.

Method B

Compound **45a** (23 mg, 0.08 mmol) was dissolved in EtOAc (3 mL). Boc_2O (20 mg, 0.09 mmol) and Pd/C (8 mg, 10 % mol) were added and the reaction was stirred under H_2 at 3 barg during

22 h. The crude was filtered through celite and purified on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio give **47** (22 mg, 81 %) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = +49.6$ (c=0.14, CHCl₃)

Mp: 172-176 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.41 – 7.29 (m, 5H), 4.97 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 9.0, 8.5 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 13.0, 5.5 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.65 – 3.46 (m, 4H), 3.30 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.70 (t, *J* = 11.5 Hz, 1H), 1.78 (br, 1H), 1.46 (s, 9H).

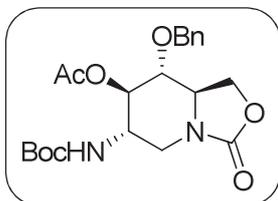
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.6 (CO), 156.4 (CO), 137.7 (C), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 80.8 (CH), 74.8 (CH₂), 65.8 (CH₂), 56.5 (CH), 52.0 (CH), 43.1 (CH₂), 28.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3370, 2960, 1733, 1683, 1512, 1440, 1173, 1124

HRMS (ES): calcd. for C₁₉H₂₇N₂O₆: 379.18636, found 379.18669

EA : Anal. calcd. for C₁₉H₂₆N₂O₆: C, 60.30%; H, 6.93%; N, 7.40%; found C, 60.24%; H, 6.79%; N, 7.38%

8.1.34. (6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-8-(Benzyloxy)-6-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-oxohexahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-7-yl acetate (**48**)



To a solution of product **47** (20 mg, 0.05 mmol) in pyridine (1 mL) was added acetic anhydride (20 μ l, 0.21 mmol) and the solution was allowed to stir at room temperature for 18 h. The crude was treated adding 5 mL of H₂O, extracted with EtOAc (3x 5 mL), washed with NaHCO₃ aqueous saturated solution (2x 5 mL) and brine (1x 5 mL), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing polarity ratio give **48** as a white solid (21.5 mg, 98 %)

$[\alpha]^{20}_D = +38.8$ (c=0.4, CHCl₃)

Mp: 199-201 °C

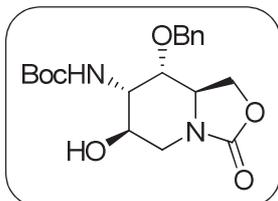
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.41 – 7.30 (m, 3H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 4.99 (dd, *J* = 10.5, 9.0 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.26 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 13.0, 5.0 Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.59 (ddd, *J* = 9.5, 8.0, 5.0 Hz, 1H), 3.46 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 13.0, 11.0 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.42 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.1 (CO), 156.1 (CO), 154.9 (CO), 137.1 (C), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 127.9 (CH), 80.1 (C), 78.5 (CH), 76.4 (CH), 74.8 (CH₂), 65.4 (CH₂), 56.7 (CH), 50.2 (CH), 43.4 (CH₂), 28.2 (CH₃), 20.9 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3351, 2977, 1738, 1534, 1239

HRMS (ES): calcd. for C₂₁H₂₈N₂O₇Na : 443.17887, found 443.17918

8.1.35. *tert*-Butyl (6*S*,7*R*,8*S*,8*aR*)-8-(benzyloxy)-6-hydroxy-3-oxohexahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-7-ylcarbamate (49)



Same procedure 8.1.33. using method A, starting from product **46a** (34 mg, 0.11 mmol), **49** is obtained as a white solid (20 mg, 47 %). Using method B, from product **46a** (275 mg, 0.91 mmol), **49** is obtained as a white solid (286 mg, 92 %).

$[\alpha]_D^{20} = +71.7$ ($c=0.53$, CHCl_3)

Mp: 189-192 °C

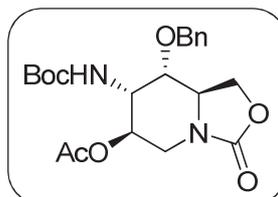
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.40 – 7.28 (m, 5H), 4.80 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.44 – 4.36 (m, $J = 11.0, 8.5$ Hz, 2H), 4.34 – 4.24 (m, $J = 3.5$ Hz, 2H), 4.07 (dd, $J = 8.5, 4.0$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.76 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 3.67 – 3.58 (ddd, $J = 10.0, 8.5, 4.0$ Hz, 1H), 3.23 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 2.69 (sa, 1H), 1.46 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 158.3 (CO), 156.0 (CO), 136.9 (C), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 80.4 (C), 72.5 (CH), 70.8 (CH_2), 67.2 (CH), 66.3 (CH_2), 53.1 (CH), 49.9 (CH), 42.6 (CH_2), 28.3 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3404, 3342, 2977, 2927, 1742, 1700, 1247, 1168

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$: 379.18574, found 379.18597

8.1.36. (6*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-(Benzyloxy)-7-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-oxohexahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl acetate (50)



Same procedure 8.1.34. Starting from product **49** (103 mg, 0.27 mmol), **50** is obtained as a white solid (93 mg, 81 %).

$[\alpha]_D^{20} = +42.7$ ($c=0.48$, CHCl_3)

Mp: 46-49 °C

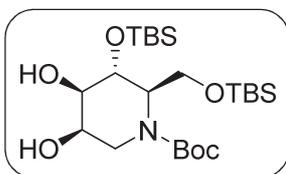
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.39 – 7.29 (m, 5H), 5.21 (m, 1H), 4.67 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H), 4.28 (br, 1H), 4.09 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.25 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 169.4 (CO), 157.5 (CO), 155.6 (CO), 136.5 (C), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 80.6 (C), 72.1 (CH), 70.7 (CH_2), 68.7 (CH), 65.7 (CH_2), 52.8 (CH), 48.1 (CH), 39.6 (CH_2), 28.2 (CH_3), 20.8 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3335, 2977, 2931, 1749, 1713, 1368, 1163

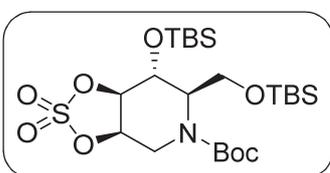
HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7$: 421.19693, found 421.19653

8.1.37. *tert*-Butyl-(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4,5-dihydropiperidine-1-carboxylate (54**)**



General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using (DHQD)₂Phal (4.3 mg, 0.005 mmol), K₂OsO₄ (1.2 mg, 0.003 mmol), K₂CO₃ (228 mg, 1.65 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (1.63 g, 1.64 mmol), CH₃SO₂NH₂ (53 mg, 0.55 mmol) and **41** (249 mg, 0.55 mmol) in ^tBuOH:H₂O 1:1 (7 mL). After treatment with Na₂SO₃ (1 g) and corresponding work-up the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane:EtOAc to give **54** (201 mg, 75%) as a white solid mixture of diastereoisomers in a 5:1 relation.

8.1.38. Sulphate of *tert*-butyl-(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4,5-dihydropiperidine-1-carboxylate (55**)**



General procedure for sulphate synthesis via oxidation was carried out using **54** (207 mg, 0.42 mmol), TEA (0.26 mL, 1.76 mmol), SOCl₂ (0.1 mL, 1.51 mmol), RuCl₃ (1.3 mg, 0.006 mmol) and NaIO₄ (180 mg, 0.84 mmol) in THF (20 mL) and CCl₄:ACN:H₂O (9 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **55** (133 mg, 58%) as a one diastereoisomer with colorless oil aspect.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.01 (m, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.58 (br, 1H), 4.42 (m, 1H), 3.90 (dd, *J* = 38.0, 9.0 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 10.5, 3.0 Hz, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.37 (m, *J* = 13.5 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H), 0.90 (s, 18H), 0.17 (s, 3H), 0.14 (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.04 (s, 3H)

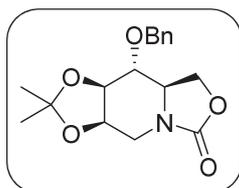
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 154.3 (CO), 82.9 (CH), 82.3* (CH), 81.3 (C), 74.6 (CH), 74.4* (CH), 65.8 (CH), 60.5 (CH₂), 60.1* (CH₂), 58.7 (CH), 57.9* (CH), 41.4 (CH₂), 39.7* (CH₂), 28.3 (CH₃), 25.8 (CH₃), 15.7 (CH₃), -4.5 (CH₃), -5.1 (CH₃), -5.5 (CH₃), -5.6 (CH₃).

* Rotamers

IR (film, ν_{max}/cm⁻¹): 2955, 1699, 1398, 1256, 1213, 1146, 1030

HRMS (ES): calcd. for C₂₃H₄₈NO₈SSi₂: 554.26337, found 554.26431

8.1.39. (3*aR*,8*aR*,9*R*,9*aR*)-9-(Benzyloxy)-2,2-dimethylhexahydro-6*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*d*]oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-one (56**)**

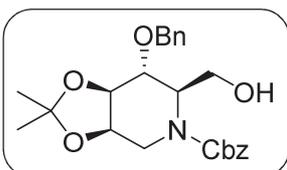


To a solution of **42a** (468 mg, 1.68 mmol) and PTSA (26 mg, 0.13 mmol) in acetone (13 mL) was added 2,2'-dimethoxypropane (0.53 mL, 4.19 mmol) and the reaction was stirred at r.t during 18h. Solvent was removed at low pressure and the crude was purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **56** as a colorless oil (342 mg, 63%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.46 – 7.28 (m, 5H), 4.92 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, 1H), 4.30 – 4.26 (m, 1H), 4.25 – 4.16 (m, 2H), 4.02 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.54 – 3.43 (m, 2H), 3.26 (dd, *J* = 15.0, 3.5 Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

Complete characterization at Caterina Murruzzu, Phd Thesis, Universitat de Barcelona 2005

8.1.40. Benzyl (3*a*R,6*R*,7*R*,7*a*R)-7-(benzyloxy)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridine-5(4*H*)-carboxylate (57)

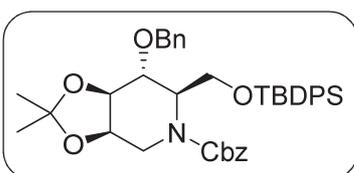


To a solution of **56** (392 mg, 1.22 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (18 mL) was added NaOH 6M (4.1 mL, 24.5 mmol) and the reaction was stirred at reflux during 16h. Solvent was removed at low pressure and the obtained white solid was redissolved in THF (40 mL) and H₂O (4 mL). After cooling the reaction to 0°C, NaHCO₃ (427 mg, 5.09 mmol) and benzyl chloroformate (0.28 mL, 1.84 mmol) were added and the reaction was allowed to stir at this temperature for 4h. Then it was extracted with EtOAc (3x 10 mL), dried over MgSO₄ and purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **57** as a colorless oil (401 mg, 76%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.37-7.25 (m, 10H), 5.13 (s, 2H), 4.80(d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.23 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.94 (m, 5H), 3.31 (s, 1H), 1.59 (br, 2H), 1.51 (s, 3H), 1.34 (s, 3H).

Complete characterization at Caterina Murruzzu, Phd Thesis, Universitat de Barcelona 2005

8.1.41. (3*a*R,6*R*,7*R*,7*a*R)-Benzyl 7-(benzyloxy)-6-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridine-5(6*H*)-carboxylate (59)



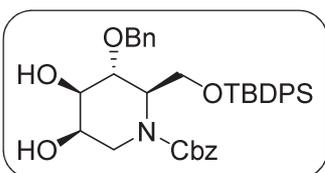
To a solution of **58** (153 mg, 0.36 mmol) and imidazole (74 mg, 1.07 mmol) in DMF (5 mL) was added TBDPSCI (0.12 mL, 0.46 mmol) and the reaction was heated at 80°C during 16h. Then H₂O (5 mL) was added and the crude was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **59** as a colorless oil (238 mg, 99%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.72 (m, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 2H), 7.44 – 7.22 (m, 14 H), 7.12 (m, 1H), 5.02 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.56 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.36 – 4.01 (m, 4H), 3.89 (m, 2H), 3.75 (m, 1H), 3.08 (m, 1H), 1.48 (d, *J* = 12.5 Hz, 3H), 1.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.04 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 155.5 (CO), 138.1 (C), 135.6 (CH), 135.5 (CH), 133.1 (C), 129.8 (CH), 129.7 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 109.8 (C), 78.4 (CH), 75.4 (CH), 75.2* (CH), 73.6 (CH₂), 73.3* (CH₂), 71.5 (CH), 71.3* (CH), 67.5 (CH₂), 67.2* (CH₂), 62.0 (CH₂), 61.6* (CH₂), 56.2 (CH), 43.2 (CH₂), 42.9* (CH₂), 27.4 (CH₃), 26.9 (CH₃), 26.6 (CH₃), 19.2 (C)

* Rotamers

HRMS (ES): calcd. for C₄₀H₄₈NO₆Si: 666.32454, found 666.32437

8.1.42. (3aR,6R,7R,7aR)-Benzyl 7-(benzyloxy)-6-((tert-butylidiphenylsilyloxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyridine-5(6H)-carboxylate (61)


To a solution of **57** (122 mg, 0.31 mmol) in THF (12.5 mL) was added HCl 1M (12.5 mL) and the reaction was heated at reflux during 4h. The crude was extracted with EtOAc (3x 10 mL) and the resulting oil was redissolved in DMF (3 mL). Imidazole (41 mg, 0.61 mmol) and TBDPSCI (0.09 mL, 0.33 mmol) were added and the reaction was heated at 80°C for 4h. Solvent was removed under low pressure and the crude purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **61** as a colorless oil (144 mg, 76%) in two steps.

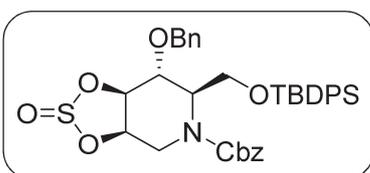
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.70 – 7.12 (m, 20H), 5.14 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.96 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.12 (s, 1H), 3.95-3.75 (m, 4H), 3.68 (s, 1H), 2.90 (s, 1H), 1.03 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.2 (CO), 155.7* (CO), 137.7 (C), 136.5 (CH), 135.6 (CH), 135.5 (CH), 133.0 (C), 132.78 (C), 129.83 (CH), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.3 (CH), 76.3 (CH), 71.3 (CH₂), 69.3 (CH), 67.4 (CH₂), 64.7 (CH), 63.3 (CH), 62.2* (CH₂), 54.9 (CH), 53.7* (CH), 41.4 (CH₂), 40.3* (CH₂), 26.7 (CH₃), 19.1 (C).

* Rotamers

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3417, 2923, 2989, 1671, 1427, 1112, 1066

HRMS (ES): calcd. for C₃₇H₄₄NO₆Si: 626.29324, found 626.29385

8.1.43. Sulphite of (3aR,6R,7R,7aR)-benzyl-7-(benzyloxy)-6-((tert-butylidiphenylsilyloxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyridine-5(6H)-carboxylate (62)


General procedure for sulphite synthesis was carried out using **61** (94 mg, 0.15 mmol), TEA (0.09 mL, 0.63 mmol) and SOCl₂ (35 μ L, 0.54 mmol) in CH₂Cl₂ (9 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **62** (80 mg, 79%) as a mixture of two diastereoisomers with colorless oil aspect.

Characterization is referred to the mixture of diastereoisomers

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Not described because is a mixture of diastereoisomers and rotamers of each diastereoisomer are observed

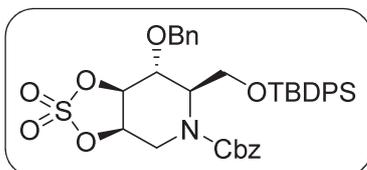
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 155.3 (CO), 154.3 (CO), 135.6 (CH), 135.5 (CH), 135.5 (CH), 132.9 (C), 132.8 (C), 132.7 (C), 129.9 (CH), 129.8 (CH), 129.8 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 86.3 (CH), 81.0 (CH), 77.9 (CH), 76.2 (CH), 76.0* (CH), 74.9 (CH₂), 74.7* (CH₂), 74.5 (CH), 73.8 (CH₂), 73.4 (CH), 73.2* (CH), 67.8 (CH₂), 67.6* (CH₂), 61.9 (CH₂), 61.4 (CH₂), 61.0 (CH₂), 57.1 (CH), 55.9 (CH), 55.7* (CH), 44.5 (CH₂), 44.2* (CH₂), 41.5 (CH₂), 41.2 (CH₂), 26.9 (CH₃), 19.1 (C).

* Rotamers

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2955, 2917, 1706, 1426, 1214, 1112, 991, 700

HRMS (ES): calcd. for C₃₇H₄₂NO₇SSi: 672.24458, found 672.24552

8.1.44. Sulphate of (3aR,6R,7R,7aR)-benzyl-7-(benzyloxy)-6-((tert-butylidiphenylsilyloxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyridine-5(6H)-carboxylate (64)



General procedure for sulphate synthesis via oxidation was carried out using **61** (138 mg, 0.22 mmol), TEA (0.13 mL, 0.93 mmol), SOCl₂ (51 μL, 0.79 mmol), RuCl₃ (4.5 mg, 0.01 mmol) and NaIO₄ (94 mg, 0.44 mmol) in THF (10 mL) and CCl₄:ACN:H₂O (6 mL). Purification by chromatography on silica gel gives **64** (112 mg, 73%) as a one diastereoisomer with colorless oil aspect.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.58 (m, 4H), 7.45 - 7.05 (m, 16H), 5.09 (s, 1H), 5.05 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 4.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.78 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.84 (m, 2H), 3.49 (dd, *J* = 14.0, 10.0 Hz, 1H), 1.05 (s, 9H).

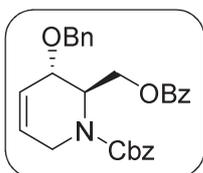
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 155.0 (CO), 154.4* (CO), 136.7 (C), 135.5 (CH), 135.4 (CH), 132.6 (C), 130.0 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 82.3 (CH), 74.6 (CH), 74.5 (CH₂), 74.2* (CH₂), 72.1 (CH), 71.8* (CH), 68.1 (CH₂), 67.9* (CH₂), 61.5 (CH₂), 61.1* (CH₂), 56.4 (CH), 56.1* (CH), 41.1 (CH₂), 40.7* (s), CH₂), 26.8 (CH₃), 19.2 (C).

* Rotamers

IR (film, ν_{max}/ cm⁻¹): 2931, 2857, 1707, 1418, 1398, 1212, 1112

HRMS (ES): calcd. for C₃₇H₄₁NO₈SSiNa : 710.22144, found 710.22192

8.1.45. Benzyl (2R,3S)-2-((benzoyloxy)methyl)-3-(benzyloxy)-3,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate (65)



To a solution of **39** (288 mg, 0.82 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was added DMAP (10 mg, 0.08 mmol), TEA (0.29 mL, 2.04 mmol) and benzoyl chloride (0.19 mL, 1.63 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **65** (313 mg, 84 %) as a colorless oil.

[α]_D²⁰ = +15.6 (c=1.05, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.55 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.39 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 2H), 7.33 - 7.17 (m, 10H), 6.00 (br, 1H), 5.94 (m, 1H), 5.17 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.02 (br, 2H), 4.65 (br, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.46 (m, *J* = 14.0, 8.0 Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.95 (s, 1H), 3.71 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H).

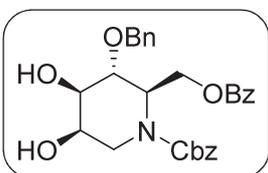
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 166.1 (CO), 166.0* (CO), 156.0 (CO), 155.8* (CO), 137.8 (C), 136.4 (C), 133.1 (C), 133.1* (C), 129.6 (CH), 129.6 (CH), 129.1 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 122.6 (CH), 122.3* (CH), 70.4 (CH₂), 70.3* (CH₂), 69.3 (CH), 69.1* (CH), 67.3 (CH₂), 67.2* (CH₂), 62.5 (CH₂), 62.2* (CH₂), 52.0 (CH), 51.0* (CH), 40.9 (CH₂), 40.5* (CH₂).

*Rotamers

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3039, 2943, 1720, 1702, 1421, 1414, 1272, 1068

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$: 480.1781, found 480.1781

8.1.46. Benzyl (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-((benzyloxy)methyl)-3-(benzyloxy)-4,5-dihydropiperidine-1-carboxylate (**66**)



General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using $(\text{DHQD})_2\text{Phal}$ (46 mg, 0.06 mmol), K_2OsO_4 (10 mg, 0.03 mmol), K_2CO_3 (288 mg, 2.08 mmol), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (693 g, 2.08 mmol), $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ (69 mg, 0.69 mmol) and **65** (318 mg, 0.69 mmol) in $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (12 mL). After treatment with Na_2SO_3 (1.6 g) and corresponding work-up the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane:EtOAc to give **66** (212 mg, 62%) as a one diastereoisomer with sticky white foam aspect.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -20.0$ ($c=0.76$, CHCl_3)

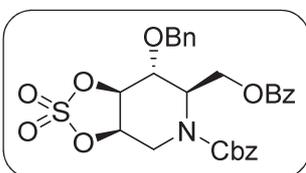
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.93 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.54 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.32 – 7.11 (m, 10H), 5.07 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.94 (br, 1H), 4.86 (br, 1H), 4.76 (dd, $J = 11.5, 9.5$ Hz, 1H), 4.59 (br, 1H), 4.47 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.41 (dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, 1H), 4.17 (br, 1H), 4.07 (s, 1H), 4.03 (br, 1H), 3.75 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 13.0, 11.0$ Hz, 1H), 2.95 (br, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 166.4 (CO), 156.2 (CO), 137.4 (C), 136.2 (C), 133.0 (C), 129.8 (CH), 129.6 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 75.5 (CH), 71.3 (CH_2), 69.5 (CH), 67.5 (CH_2), 64.7 (CH), 61.7 (CH_2), 52.3 (CH), 39.4 (CH_2).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3428, 2911, 1719, 1699, 1450, 1429, 1274, 1068

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{NO}_7$: 492.2017, found 492.2024

8.1.47. Benzyl (3*aR*,6*R*,7*R*,7*aS*)-6-((benzyloxy)methyl)-7-(benzyloxy)tetrahydro-[1,3,2]dioxathio[4,5-*c*]pyridine-5(4*H*)-carboxylate 2,2-dioxide (**67**)



General procedure for sulphate synthesis via oxidation was carried out using **66** (211 mg, 0.43 mmol), TEA (0.25 mL, 1.80 mmol), SOCl_2 (100 μL , 1.54 mmol), RuCl_3 (9 mg, 0.04 mmol) and NaIO_4 (184 mg, 0.86 mmol) in THF (12 mL) and $\text{CCl}_4:\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mL). Purification by chromatography on silica gel gave **67** (180 mg, 75%) as a one diastereoisomer with colorless oil aspect.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -16.3$ ($c=0.63$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.87 (dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 2H), 7.58 (tt, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.34 – 7.24 (m, 9H), 7.19 (tt, $J = 6.0, 1.5$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H),

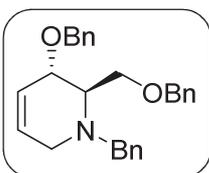
5.08 (br, 2H), 5.02 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.65 (m, 2H), 4.55 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.40 (br, 1H), 4.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.41 (br, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 165.8 (CO), 154.9 (CO), 135.9 (C), 135.3 (C), 133.4 (CH), 129.6 (CH), 129.2 (C), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 81.7 (CH), 74.5 (CH), 73.7 (CH_2), 70.8 (CH), 68.4 (CH_2), 61.7 (CH_2), 53.9 (CH), 40.1 (CH_2).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 1714, 1397, 1271, 1212, 1112, 1098, 982, 712, 699

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$: 571.1745, found 571.1747

8.1.48. (2R,3S)-1-Benzyl-3-(benzyloxy)-2-(benzyloxymethyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (70)



To a solution of **36d** (165 mg, 0.67 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (7 mL) was added NaOH 6M (1.12 mL, 6.73 mmol) and the reaction was stirred at reflux during 16h. The reaction was quenched with HCl 1M until pH 8, extracted with EtOAc (3x 10 mL), washed with brine (1x 10 mL) and dried over MgSO₄. Solvent was removed under low pressure obtaining a white solid, which was redissolved in DMF (4 mL) and added via cannula to a suspension of NaH (68 mg, 2.69 mmol) in DMF (2 mL) cooled at 0°C. After 10 min, benzyl bromide (0.21 mL, 6.73 mmol) was added and the reaction was allowed to stir at r.t. for 16h. H₂O (10 mL) was added and the crude was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **70** (233 mg, 87%) as a yellow oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +12.7$ (c=0.2, CHCl_3)

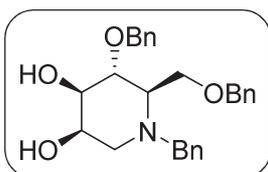
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.42 – 7.20 (m, 15H), 5.86 (m, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.97 (m, 2H), 3.77 (d, $J = 14.5$ Hz), 3.75 (dd, $J = 10.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.17 (dd, $J = 10.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.08 (s, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 139.2 (C), 138.8 (C), 138.3 (C), 129.4 (CH), 128.9 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.6 (CH), 127.4 (CH), 126.9 (CH), 124.1 (CH), 73.2 (CH_2), 72.3 (CH), 70.5 (CH_2), 66.5 (CH_2), 59.3 (CH), 58.2 (CH_2), 48.8 (CH_2).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3028, 2857, 1494, 1452, 1098, 1069, 735, 696

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{NO}_2$: 400.22711, found 400.22695

8.1.49. (3R,4R,5R,6R)-1-Benzyl-5-(benzyloxy)-6-(benzyloxymethyl)piperidine-3,4-diol (71)



Method A: Starting from **70**

General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using (DHQD)₂Phal (21 mg, 0.03 mmol), K₂OsO₄ (6 mg, 0.01 mmol), K₂CO₃ (135 mg, 0.97 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (322 g, 0.97 mmol), CH₃SO₂NH₂ (32 mg, 0.32 mmol) and **70** (129 mg, 0.32 mmol) in ACN:H₂O 1:1 (4 mL). After treatment with Na₂SO₃ (0.6 g) and corresponding work-up the crude was purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **71** (72 mg, 48%) as a yellow oil.

Method B: Starting from 72

Compound **72** (69 mg, 0.15 mmol) was dissolved in a THF:HCl 3M 1:1 mixture (3 mL) and stirred at r.t. for 18h. Then sat. NH₃/MeOH solution (3 mL) was added and the reaction was stirred for 30min. Extraction with EtOAc (3x 5mL) and purification on silica-Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc give **71** (62 mg, 99%) as a yellow oil.

$[\alpha]^{20}_D = -7.2$ (c=0.15, CHCl₃)

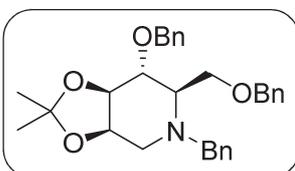
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.34 – 7.24 (m, 15H), 4.90 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.17 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.83 (dd, *J* = 10.5, 2.5 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 10.5, 3.0 Hz, 2H), 3.64 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.57 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 3.27 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 12.5, 4.5 Hz, 1H), 2.38 (dt, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 2.22 (dd, *J* = 12.5, 1.5 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 138.6 (C), 138.5 (C), 137.8 (C), 128.9 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.2 (CH), 78.4 (CH), 75.9 (CH), 74.7 (CH₂), 73.3 (CH₂), 68.1 (CH), 66.8 (CH₂), 64.8 (CH), 56.6 (CH₂), 54.7 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3406, 2911, 2859, 1452, 1097, 1066, 734, 697

HRMS (ES): calcd. for C₂₇H₃₂NO₄: 434.23259, found 434.23314

8.1.50. (3*a*R,6*R*,7*R*,7*a*R)-5-Benzyl-7-(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-2,2-dimethylhexahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridine (72)



To a solution of **56** (114 mg, 0.36 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (6 mL) was added NaOH 6M (0.6 mL, 3.6 mmol) and the reaction was stirred at reflux during 16h. The reaction was extracted with EtOAc (3x 10 mL), washed with brine (1x 10 mL) and dried over MgSO₄. Solvent was removed under low pressure obtaining a yellow oil, which was redissolved in DMF (3 mL) and added via cannula to a suspension of NaH (38 mg, 1.51 mmol) in DMF (1 mL) at 0°C. After 10 min, benzyl bromide (0.11 mL, 0.89 mmol) was added and the reaction was allowed to stir at r.t. for 16h. Then H₂O (10 mL) was added and the crude was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified on silica-Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **72** (117 mg, 69%) as a slightly yellow oil.

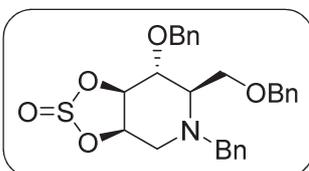
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.35 – 7.21 (m, 15H), 4.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.00 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.75 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 2.90 (dd, *J* = 13.0, 3.0 Hz, 1H), 2.83 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 13.0, 3.0 Hz, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.33 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 139.30 (C), 138.4 (C), 138.4 (C), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.5 (CH), 126.8 (CH), 109.0 (C), 77.1 (CH), 75.9 (CH), 73.1 (CH₂), 73.0 (CH), 72.1 (CH₂), 69.1 (CH₂), 61.4 (CH), 58.1 (CH₂), 49.9 (CH₂), 27.4 (CH₃), 25.5 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2923, 2867, 1453, 1368, 1214, 1073, 1027, 734, 697

HRMS (ES): calcd. for $C_{30}H_{36}NO_4$: 474.26389, found 474.26377

8.1.51. Sulphite of (3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-benzyl-5-(benzyloxy)-6-(benzyloxymethyl)piperidine-3,4-diol (**73**)



General procedure for sulphite synthesis was carried out using **71** (115 mg, 0.27 mmol), TEA (0.16 mL, 1.14 mmol) and $SOCl_2$ (61 μ L, 0.95 mmol) in CH_2Cl_2 (9 mL). Purification by chromatography on silica gel gave **73** (55 mg, 43%) as a mixture of two diastereoisomers with colorless oil aspect.

Characterization is referred to the mixture of diastereoisomers

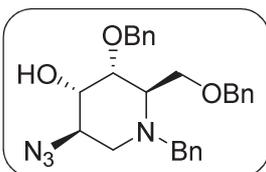
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 7.37 – 7.21 (m, 30H), 5.01 (m, 1H), 4.95 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.84 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.68 – 4.55 (m, 4H), 4.47 (s, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.33 (dd, $J = 8.0, 6.5$ Hz, 1H), 4.06 (t, $J = 14.0$ Hz, 2H), 3.90 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.78 (dd, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.74 – 3.65 (m, 4H), 3.47 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 14.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 14.0, 3.0$ Hz, 1H), 2.83 – 2.70 (m, 4H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 138.9 (C), 138.2 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 137.9 (C), 137.6 (C), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.2 (CH), 127.1 (CH), 84.7 (CH), 81.1 (CH), 80.3 (CH), 77.2 (CH), 76.7 (CH), 75.3 (CH), 73.8 (CH_2), 73.3 (CH_2), 73.2 (CH_2), 72.9 (CH_2), 67.8 (CH_2), 67.4 (CH_2), 62.2 (CH_2), 62.1 (CH_2), 57.4 (CH_2), 56.1 (CH_2), 49.8 (CH_2), 49.2 (CH_2).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 2911, 2868, 1495, 1453, 1210, 1102, 1066, 736, 697

HRMS (ES): calcd. for $C_{27}H_{30}NO_5S$: 480.18392, found 480.18315

8.1.52. (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-Azido-1-benzyl-3-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-4-ol (**75**)



General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using $(DHQD)_2Phal$ (121 mg, 0.15 mmol), K_2OsO_4 (27 mg, 0.07 mmol), K_2CO_3 (882 mg, 6.38 mmol), $K_3[Fe(CN)_6]$ (2.1 g, 6.38 mmol), $CH_3SO_2NH_2$ (208 mg, 2.11 mmol) and **70** (842 mg, 2.11 mmol) in $ACN:H_2O$ 1:1 (21 mL). After treatment with Na_2SO_3 (0.6 g) and corresponding work-up the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 (35 mL) and general procedure for sulphite synthesis was carried out using TEA (1.23 mL, 8.84 mmol) and $SOCl_2$ (490 μ L, 7.58 mmol). After the corresponding work-up, the resulting oil was redissolved in acetone:water 2:1 (66 mL) and NaN_3 (164 mg, 2.52 mmol) was added. The mixture was stirred at 40°C overnight to give **75** (345 mg, 35%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = +35.0$ ($c=0.80$, $CHCl_3$)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 7.37 – 7.21 (m, 15H), 4.60 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.10 (dd, $J = 11.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.89 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 3.81 (s, 1H), 3.71 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.60 (dd,

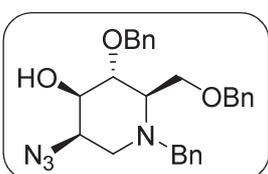
$J = 11.5, 8.5$ Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz, 1H), 3.27 – 3.16 (m, $J = 4.5$, 2H), 3.08 – 3.01 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 139.6 (C), 137.9 (C), 137.2 (C), 128.5 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 127.2 (CH), 86.0 (CH), 73.7 (CH_2), 73.6 (CH), 71.32 (CH_2), 71.0 (CH), 70.8 (CH_2), 67.1 (CH), 58.6 (CH_2), 50.2 (CH_2).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3410, 2930, 2859, 2099, 1453, 1090, 1021

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_3$: 459.23907, found 459.23863

8.1.53. (2R,3R,4R,5R)-5-Azido-1-benzyl-3-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-4-ol (76)



Same procedure as 8.1.52 give **76** (110 mg, 11%) as a colorless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19.3$ ($c=0.75$, CHCl_3)

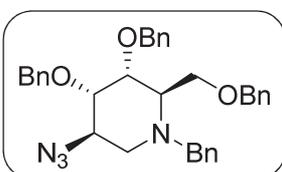
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.37 – 7.22 (m, 15H), 4.68 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.10 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.80 (m, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.86 – 3.66 (m, 5H), 3.46 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 12.5, 5.5$ Hz, 1H), 2.78 (br, 1H), 2.61 (m, $J = 3.5$ Hz, 1H), 2.37 (dd, $J = 12.5, 2.5$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 138.6 (C), 138.1 (C), 137.7 (C), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.0 (CH), 78.3 (CH), 73.9 (CH_2), 73.3 (CH_2), 73.2 (CH), 67.7 (CH_2), 62.8 (CH), 59.0 (CH), 57.6 (CH_2), 50.6 (CH_2).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3423, 2917, 2099, 1452, 1270, 1097, 1027

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_3$: 459.23907, found 459.23833

8.1.54. (2R,3R,4S,5R)-5-Azido-1-benzyl-3,4-bis(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidine (81)



To a suspension of NaH (27 mg, 1.05 mmol) in DMF (1 mL) cooled at 0°C was added via cannula a solution of **75** (161 mg, 0.35 mmol) in DMF (4 mL). After 10 min, benzyl bromide (64 μL , 0.52 mmol) was added dropwise and the reaction was allowed to stir at r.t. until no starting material was observed by TLC. Then, H_2O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **81** (172 mg, 89%) as a colorless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.5$ ($c=1.55$, CHCl_3)

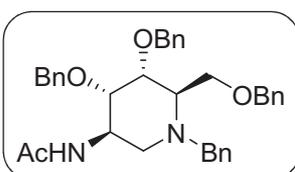
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.35 – 7.15 (m, 20H), 4.57 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.37 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.00 – 3.96 (m, 2H), 3.89 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.83 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 11.5, 8.5$ Hz, 1H), 3.37 (m, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.20 – 3.12 (m, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 139.3 (C), 138.4 (C), 138.2 (C), 137.8 (C), 129.00 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 127.2 (CH), 82.5 (CH), 82.0 (CH), 72.9 (CH₂), 71.9 (CH₂), 71.8 (CH₂), 71.1 (CH₂), 68.9 (CH), 65.9 (CH), 59.9 (CH₂), 50.4 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2923, 2861, 2099, 1453, 1093, 1059

HRMS (ES): calcd. for C₃₄H₃₇N₄O₃: 549.28602, found 549.28552

8.1.55. *N*-((3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-1-Benzyl-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)piperidin-3-yl)acetamide (**82**)



To a solution of **81** (133 mg, 0.24 mmol) in EtOAc (5 mL) was added Pd/C (13 mg, 0.01 mmol) and was charged with H₂ (5 barg) and stirred at r.t. for 20h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (2 mL) and Ac₂O (48 μL, 0.39 mmol) was added. The reaction was stirred at 40°C for 16h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **82** (110 mg, 80%) as a slightly yellow oil.

[α]_D²⁰ = +24.8 (c=1.21, CHCl₃)

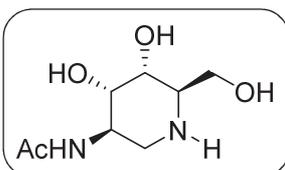
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38 – 7.20 (m, 20H), 5.81 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.98 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.89 (m, *J* = 13.5 Hz, 2H), 3.72 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.42 (ddd, *J* = 13.5, 5.5, 3.5 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* = 9.5, 7.5 Hz, 1H), 3.28 (m, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.19 (m, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 2H), 3.09 (m, *J* = 3.5 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.7 (CO), 138.9 (C), 138.3 (C), 138.2 (C), 137.8 (C), 129.2 (CH), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.6 (CH), 127.2 (CH), 83.1 (CH), 81.7 (CH), 73.0 (CH₂), 71.7 (CH₂), 71.3 (CH₂), 70.7 (CH₂), 67.9 (CH), 63.4 (CH), 58.5 (CH₂), 38.0 (CH₂), 23.0 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3295, 2861, 1652, 1453, 1098, 1066, 735, 697

HRMS (ES): calcd. for C₃₆H₄₁N₂O₄: 565.30608, found 565.30538

8.1.56. *N*-((3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (**83**)



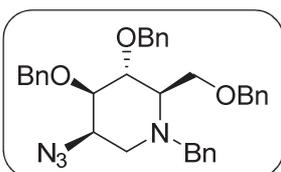
To a solution of **82** (74 mg, 0.13 mmol) in HCl 1,25 M MeOH (3 mL) was added Pd/C (12 mg, 0.01 mmol) and the reaction was charged with H₂ (5 barg) and stirred at r.t. for 20h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 90:8:2 to give **83** (23 mg, 85%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ/ppm): 4.09 (dd, *J* = 4.5, 2.5 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 4.5, 2.5 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 3.03 (m, 1H), 2.08 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, δ/ppm): 177.0(CO), 81.6(CH), 79.8(CH), 67.7(CH), 64.6(CH₂), 61.8 (CH), 41.1 (CH₂), 24.3 (CH₃).

HRMS (ES): calcd. for C₈H₁₆N₂O₄: 205.11828, found 205.11812

8.1.57. (2R,3R,4R,5R)-5-Azido-1-benzyl-3,4-bis(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidine (84)



To a suspension of NaH (17 mg, 0.67 mmol) in DMF (1 mL) cooled at 0°C was added via cannula a solution of **76** (102 mg, 0.22 mmol) in DMF (4 mL). After 10 min, benzyl bromide (41 μL, 0.34 mmol) was added dropwise and the reaction was allowed to stir at r.t. until no starting material was observed by TLC. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica-Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **84** (90 mg, 74%) as a slightly yellow oil.

[α]_D²⁰ = -30.1 (c=0.59, CHCl₃)

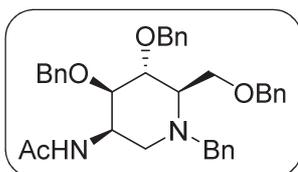
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38 – 7.17 (m, 20H), 4.77 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.12 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.74 (qt, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 2.96 (dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.27 (dd, *J* = 12.5, 3.0 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 138.7 (C), 138.3 (C), 138.2 (C), 137.8 (C), 128.7 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 126.9 (CH), 81.6 (CH), 75.4 (CH), 74.2 (CH₂), 73.0 (CH₂), 72.3 (CH₂), 67.6 (CH₂), 63.4 (CH), 57.7 (CH₂), 56.7 (CH), 50.6 (CH₂).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2853, 2096, 1452, 1102, 1066

HRMS (ES): calcd. for C₃₄H₃₇N₄O₃: 549.2860, found 549.2855

8.1.58. (2R,3R,4R,5R)-5-Azido-1-benzyl-3,4-bis(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidine (85)



To a solution of **84** (90 mg, 0.16 mmol) in EtOAc (4 mL) was added Pd/C (17 mg, 0.01 mmol) and the reaction was charged with H₂ (5 barg) and stirred at r.t. for 20h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (2 mL) and Ac₂O (24 μL, 0.23 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 16h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and

purified on silica·Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **85** (74 mg, 80%) as a slightly yellow oil.

$[\alpha]_D^{20} = -8.1$ (c=0.79, CHCl₃)

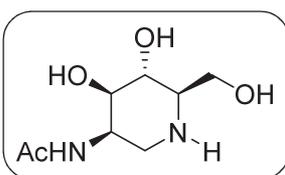
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.37 – 7.20 (m, 20H), 6.19 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.53 (m, *J* = 9.0, 4.5, 2.0 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.42 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.81 (m, 2H), 3.71 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 8.5, 4.5 Hz, 1H), 3.29 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz, 1H), 2.47 (dt, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 2.22 (dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, 1H), 1.93 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.8 (CO), 138.7 (C), 138.5 (C), 138.1 (C), 137.9 (C), 128.9 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 81.7 (CH), 77.0 (CH), 74.8 (CH₂), 73.3 (CH₂), 71.1 (CH₂), 66.5 (CH₂), 64.5 (CH), 56.7 (CH₂), 52.8 (CH₂), 44.3 (CH), 23.5 (CH₃)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2860, 1674, 1496, 1452, 1011

HRMS (ES): calcd. for C₃₄H₃₈N₄O₃: 565.3061, found 565.3050

8.1.59. *N*-((3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (**20**)



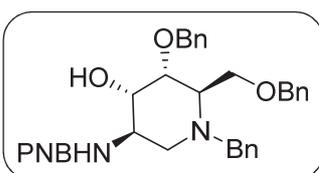
A solution of **85** (20 mg, 0.04 mmol) in HCl 1,25 M MeOH (3 mL) was added Pd/C (espatula tip) and was charged with H₂ (5 barg) and stirred at r.t. for 20h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 90:8:2 to give **20** (7 mg, 95%) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.21 (s, 1H), 3.82 (dd, *J* = 11.0, 3.0 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, 1H), 3.60 (dd, *J* = 9.5, 4.5 Hz, 1H), 3.45 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 13.0, 3.0 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J* = 13.0, 2.5 Hz, 1H), 2.47 (ddd, *J* = 9.5, 5.5, 3.0 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H).

HRMS (ES): calcd. for C₈H₁₆N₂O₄: 205.11828, found 205.11830

Consistent with Kajimoto, T.; Wong, C. *JACS*, **1991**, *113*, 6187-6196

8.1.60. *N*-((3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-1-Benzyl-5-(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-4-hydroxypiperidin-3-yl)-4-nitrobenzamide (**80**)



To a a solution of **75** (25 mg, 0.05 mmol) in EtOAc (3 mL) was added Pd/C (6 mg, 10%) and the reaction was charged with H₂ (3 barg) and stirred at r.t. for 20h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (2 mL) and p-nitrobenzoyl chloride (31 mg, 0.16 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 16h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL),

dried over MgSO_4 and purified on silica- Et_3N (2,5% v/v) using hexane/ EtOAc to give **80** (17 mg, 55%) as a white solid.

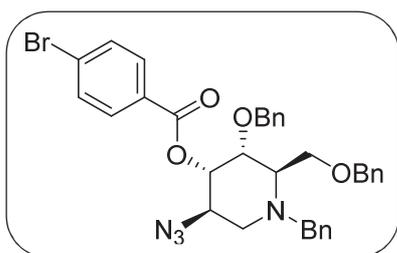
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 8.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.35 – 7.11 (m, 15H), 4.60 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.29 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 4.02 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.75 – 3.60 (m, 3H), 3.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.28 (dd, $J = 8.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.17 – 3.07 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 165.4 (CO), 149.4 (C), 140.2 (C), 139.2 (C), 137.9 (C), 137.1 (C), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 123.7 (CH), 85.2 (CH), 75.7 (CH), 73.7 (CH_2), 71.4 (CH_2), 70.8 (CH_2), 69.5 (CH), 65.2 (CH), 57.8 (CH_2), 38.7 (CH_2).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3358, 2860, 1643, 1600, 1524, 1345, 1093, 736, 698

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_5$: 582.25986, found 582.26022

8.1.61. (2R,3R,4S,5R)-5-Azido-1-benzyl-3-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-4-yl-4-bromobenzoate (**79**)



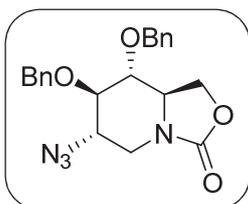
To a solution of **75** (40 mg, 0.09 mmol) in pyridine (2 mL) was added p-bromobenzoyl chloride (50 mg, 0.13 mmol) and DMAP (espatula tip) and the reaction was stirred at 50°C for 20h. Then, H_2O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO_4 and purified on silica- Et_3N (2,5% v/v) using hexane/ EtOAc to give **79** (24 mg, 43%) as a colorless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.37 – 7.23 (m, 10H), 7.17 (m, 3H), 7.11 (m, 2H), 5.50 (dd, $J = 5.5, 3.0$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.01 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.37 (dd, $J = 9.5, 7.5$ Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 9.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.23 (m, 2H), 3.15 (dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 164.8 (CO), 138.8 (C), 138.0 (C), 138.9 (C), 131.9 (CH), 131.1 (CH), 129.0 (CH), 128.5 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 127.4 (CH), 82.8 (CH), 77.4 (CH), 73.0 (CH_2), 71.7 (CH_2), 71.3 (CH_2), 68.8 (CH), 64.5 (CH), 59.3 (CH_2), 50.5 (CH_2).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 2930, 2100, 1772, 1589, 1268, 1101, 1011

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{BrN}_4\text{O}_4$: 641.17579, found 641.17623

8.1.62. (6*S*,7*R*,8*R*)-6-Azido-7,8-bis(benzyloxy)tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (86)


To a suspension of NaH (40 mg, 1.62 mmol) in DMF (8.5 mL) cooled at 0°C was added via cannula a solution of **45a** (330 mg, 1.08 mmol) in DMF (8 mL). After 10 min, benzyl bromide (0.18 mL, 1.52 mmol) was added dropwise and the reaction was allowed to stir at r.t. until no starting material was observed by TLC. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **86** (384 mg, 90%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = +53.4$ (c=0.49, CHCl₃)

Mp: 110 - 112 °C

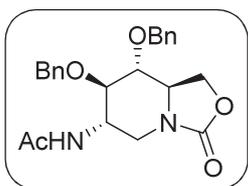
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.43 – 7.22 (m, 10H), 4.91 (dt, *J* = 10.5, 9.5 Hz, 3H), 4.61 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 13.5, 5.5 Hz, 1H), 3.70 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.60 – 3.40 (m, 3H), 3.34 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 13.5, 10.5 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.4 (CO), 137.3 (C), 137.2 (C), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 85.1 (CH), 80.0 (CH), 76.1 (CH₂), 75.1 (CH₂), 65.4 (CH₂), 60.7 (CH), 56.8 (CH), 43.0 (CH₂).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2917, 2110, 1761, 1425, 1091

HRMS (ES): calcd. for C₂₁H₂₃N₄O₄: 395.1714, found 395.1706

EA : Anal. calcd. for C₂₁H₂₂N₄O₄: C, 63.95%; H, 5.62%; N, 14.20%; found C, 63.85%; H, 5.50%; N, 14.06%

8.1.63. *N*-((6*S*,7*R*,8*R*)-7,8-Bis(benzyloxy)-3-oxohexahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (89)


To a solution of **86** (111 mg, 0.28 mmol) in EtOAc (5 mL) was added Pd/C (18 mg, 0.02 mmol) and the reaction was charged with H₂ (5 barg) and stirred at r.t. for 20h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (2 mL) and Ac₂O (48 μL, 0.39 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 16h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **89** (110 mg, 95%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = +106.5$ (c=0.31, CHCl₃)

Mp: 212 – 216 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.44 – 7.28 (m, 10H), 5.33 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 4.66 (dd, *J* = 13.0, 11.5 Hz, 2H), 4.25 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 13.0, 5.0 Hz, 1H), 3.76 – 3.52 (m, 4H), 3.39 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 1.78 (s, 3H).

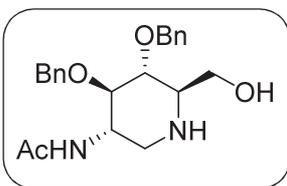
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.4 (CO), 156.4 (CO), 137.9 (C), 137.4 (C), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 81.9 (CH), 81.2 (CH), 75.0 (CH₂), 74.9 (CH₂), 65.6 (CH₂), 56.9 (CH), 50.5 (CH), 42.7 (CH₂), 23.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3299, 2946, 1749, 1652, 1521, 1088

HRMS (ES): calcd. for C₂₃H₂₇N₂O₅: 411.19145, found 411.19214

EA : Anal. calcd. for C₂₃H₂₆N₂O₅+ ½H₂O : C, 65.86%; H, 6.49%; N, 6.68%; found C, 65.85%; H, 6.13%; N, 6.50%

8.1.64. *N*-((3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5-Bis(benzyloxy)-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (**90**)



A solution of **89** (87 mg, 0.21 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (8 mL) was added NaOH 6M (0.35 mL, 2.11 mmol) and the reaction was stirred at reflux during 4h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **90** (75 mg, 92%) as a white solid.

[α]_D²⁰ = -19.7 (c=0.08, CH₃OH)

Mp: 210-212 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.34 – 7.24 (m, 10H), 4.81 (dd, *J* = 11.0, 1.5 Hz, 2H), 4.73 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.79 (dd, *J* = 11.0, 2.5 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.04 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.44 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.88 (s, 3H).

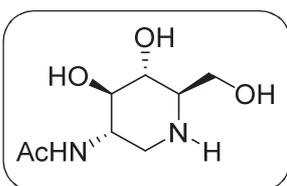
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 173.1 (CO), 140.2 (C), 139.8 (C), 129.4 (CH), 129.3 (CH), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 86.4 (CH), 81.5 (CH), 76.0 (CH₂), 62.6 (CH), 62.2 (CH₂), 53.3 (CH), 49.3 (CH₂), 22.9 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3275, 2933, 1650, 1554, 1072, 1027

HRMS (ES): calcd. for C₂₂H₂₉N₂O₄: 385.21218, found 385.21223

EA : Anal. calcd. for C₂₂H₂₈N₂O₄+ 3/2 H₂O : C, 64.21%; H, 7.59%; N, 6.81%; found C, 64.52%; H, 7.08%; N, 6.42%

8.1.65. *N*-((3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (**13**)



To a solution of **90** (20 mg, 0.05 mmol) in MeOH (4 mL) was added Pd/C (9 mg, 0.008 mmol) and the reaction was charged with H₂ (55 barg) and stirred at 60°C for 20h. Then, palladium was filtrated over Celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 72.5:25:2.5 to give **13** (12 mg, 96%) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = +7.9$ ($c=0.15$, H_2O)

Mp: 210-212 °C

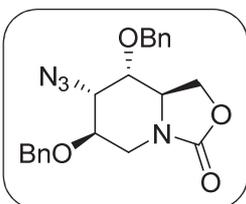
1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 3.81 (dd, $J = 11.0, 3.0$ Hz, 1H), 3.73 (ddd, $J = 11.0, 9.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.24 (m, 2H), 3.11 (dd, $J = 12.5, 5.0$ Hz, 1H), 2.46 (ddd, $J = 9.5, 6.0, 3.0$ Hz, 1H), 2.38 (dd, $J = 12.5, 11.0$ Hz, 1H), 1.96 (s, 3H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 173.6 (CO), 77.7 (CH), 73.9 (CH), 62.8 (CH_2), 62.7 (CH), 53.9 (CH), 49.1 (CH_2), 22.7 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3287, 2917, 1638, 1559, 1437, 1373, 1096, 1040

HRMS (ES): calcd. for $C_8H_{17}N_2O_4$: 205.11828, found 205.11784

8.1.66. (6*R*,7*S*,8*R*)-7-Azido-6,8-bis(benzyloxy)tetrahydro-1H-oxazolo[3,4-a]pyridin-3(5H)-one (91)



To a suspension of NaH (51 mg, 2.01 mmol) in DMF (5 mL) cooled at 0°C was added via cannula a solution of **46a** (278 mg, 0.91 mmol) in DMF (5 mL). After 10 min, benzyl bromide (0.17 mL, 1.37 mmol) was added dropwise and the reaction was allowed to stir at r.t. until no starting material was observed by TLC. Then, H_2O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), dried over $MgSO_4$ and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **91** (306 mg, 84%) as a colorless oil.

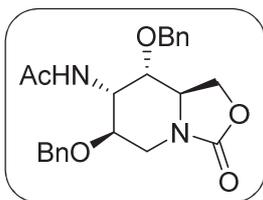
$[\alpha]^{20}_D = +31.4$ ($c=0.64$, $CHCl_3$)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm): 7.40 – 7.27 (m, 10H), 4.73 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 4.07 – 4.00 (m, 1H), 3.94 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 3.06 (dd, $J = 15.0, 1.5$ Hz, 1H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm): 157.7 (CO), 137.1 (C), 136.7 (s), 128.7 (s), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 75.0 (CH), 73.6 (CH), 71.9 (CH_2), 70.9 (CH_2), 65.4 (CH_2), 59.3 (CH), 52.9 (CH), 38.0 (CH_2).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3031, 2912, 2107, 1755, 1454, 1418, 1235, 1070

HRMS (ES): calcd. for $C_{21}H_{23}N_4O_4$: 395.17138, found 395.17222

8.1.67. (6*S*,7*R*,8*R*)-6-Azido-7,8-bis(benzyloxy)tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(5*H*)-one (92)

To a solution of **91** (305 mg, 0.77 mmol) in EtOAc (7 mL) was added Pd/C (49 mg, 0.05 mmol) and the reaction was charged with H₂ (5 barg) and stirred at r.t. for 4h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (2 mL) and Ac₂O (122 μL, 1.16 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 16h.

Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **92** (258 mg, 81%) as a white foam.

$[\alpha]^{20}_D = +19.5$ (c=0.2, CHCl₃)

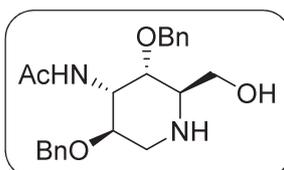
Mp: 70-72 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38-7.22 (m, 10H), 5.86 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.61 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.5, 1H), 4.45 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.05 (m, 2H), 3.95 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 10.0, 4.5 Hz, 1H), 3.67 (ddd, *J* = 10.0, 8.0, 4.5 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 14.5, 1.5 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.1 (CO), 157.7 (CO), 137.5 (C), 136.7 (C), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 73.0 (CH), 72.5 (CH), 71.3 (CH₂), 70.7 (CH₂), 66.2 (CH₂), 52.9 (CH), 48.0 (CH), 38.7 (CH₂), 23.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3325, 2918, 1758, 1658, 1547, 1104, 1071

HRMS (ES): calcd. for C₂₃H₂₇N₂O₅: 411.19145, found 411.19126

8.1.68. *N*-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,5-Bis(benzyloxy)-2-(hydroxymethyl)piperidin-4-yl)acetamide (93)

To a solution of **92** (63 mg, 0.15 mmol) in MeOH : H₂O 9:1 (5 mL) was added NaOH 6M (0.25 mL, 1.53 mmol) and the reaction was stirred at reflux during 4h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **93** (56

mg, 94%) as a colorless oil.

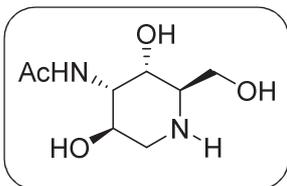
$[\alpha]^{20}_D = -5.4$ (c=0.55, CH₃OH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.40 – 7.25 (m, 10H), 4.65 (m, 3H), 4.54 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.93 (m, *J* = 6.5 Hz, 3H), 3.74 (dd, *J* = 11.5, 6.5 Hz, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.27 (dd, *J* = 13.5, 2.0 Hz, 1H), 3.17 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 1.99 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 173.8 (CO), 138.9 (C), 138.5 (CH), 129.5 (CH), 129.4 (CH), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 73.7 (CH), 73.0 (CH₂), 72.0 (CH₂), 70.6 (CH), 59.6 (CH₂), 57.0 (CH), 47.5 (CH), 43.9 (CH₂), 22.6 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3641, 3212, 3065, 1653, 1454, 1247, 1169, 1030

HRMS (ES): calcd. for C₂₂H₂₉N₂O₄: 385.2122, found 385.2111

8.1.69. *N*-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,5-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-4-yl)acetamide (94**)**

To a solution of **93** (200 mg, 0.52 mmol) in previously degassed MeOH (10 mL) was added Pd/C (44 mg, 0.04 mmol). The reaction was charged with H₂ (20 barg) and stirred at 60°C for 20h. Then, palladium was filtered through Celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 72.5:25:2.5 to give **94** (82 mg, 77%) as a slightly yellow sticky foam.

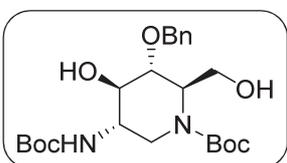
$[\alpha]_D^{20} = -16.5$ (c=0.42, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ/ppm): 4.13 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 7.5, 4.0 Hz, 1H), 3.88 (td, *J* = 6.0, 3.0 Hz, 1H), 3.82 – 3.74 (m, 2H), 3.04 – 2.89 (m, 2H), 2.78 (dd, *J* = 14.0, 6.0 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, δ/ppm, d⁶-DMSO internal reference): 176.1 (CO), 68.6 (CH), 66.8 (CH), 61.4 (CH₂), 58.7 (CH), 54.5 (CH), 46.4 (CH₂), 23.6 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3311, 2930, 1650, 1549, 1376, 1299, 1068

HRMS (ES): calcd. for C₈H₁₇N₂O₄: 205.11828, found 205.11806

8.1.70. (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-*tert*-Butyl-3-(benzyloxy)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-hydroxy-2-(hydroxyl methyl)piperidine-1-carboxylate (100**)**

To a solution of compound **47** (31 mg, 0.082 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (5 mL) was added NaOH 6M (0.32 mL, 1.89 mmol) and the reaction was heated at reflux for 15 h. Then, solvent was removed under low pressure and the crude was redissolved in EtOAc:NaHCO₃ aqueous saturated 1:1 mixture (3.5 mL). After 30 min of stirring, Boc₂O (33 mg, 0.15 mmol) was added and the crude was allowed to stir for 24 h. The crude was treated with water (3 mL), extracted with EtOAc (3x5 mL), washed with brine (1x5 mL), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **100** as white solid (26 mg, 68 %)

$[\alpha]_D^{20} = +3.3$ (c=0.16, CHCl₃)

Mp: 48-52 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.36-7.28 (m, 5H), 4.73 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 11.5 Hz, 3H), 4.31 (br, 1H), 3.97 (q, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.87 (m, 3H), 3.62 (m, 2H), 3.47 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.26 (br, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.41 (s, 9H).

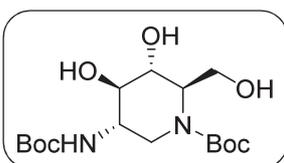
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.3 (CO), 155.6 (CO), 137.5 (C), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 80.3 (C), 79.4 (C), 76.6 (CH), 71.4 (CH₂), 67.4 (CH), 62.3 (CH₂), 54.3 (CH), 49.9 (CH), 40.3 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.3 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3410, 2976, 2930, 1689, 1508, 1366, 1171

HRMS (ES): calcd. for $C_{23}H_{37}N_2O_7$: 453.25953, found 453.25917

EA : Anal. calcd. for $C_{23}H_{36}N_2O_7$: C, 61.04%; H, 8.02%; N, 6.19%; found C, 61.01%; H, 7.82%; N, 6.14%

8.1.71. (2R,3R,4R,5S)-tert-Butyl-5-(tert-butoxycarbonylamino)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl) piperidine-1-carboxylate (101)



Compound **100** (15 mg, 0.04 mmol) was dissolved in MeOH (3 mL). Pd/C (8 mg, 10 % mol) was added and the reaction was charged with H_2 (30 barg) and 60°C during 22 h. The crude was filtered through celite to give **101** as a white solid (12 mg, 99 %)

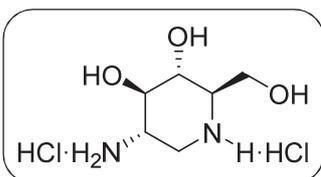
1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 4.25 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.98 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 11.5, 7.5$ Hz, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.72 (dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.54 (br, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 9H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm): 157.9 (CO), 82.4 (C), 81.3 (C), 73.4 (CH), 70.8 (CH), 62.8 (CH₂), 60.8 (CH), 53.2 (CH), 43.9 (CH₂), 29.9 (CH₃), 29.8 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3395, 2977, 2930, 1669, 1508, 1366, 1162, 1047

HRMS (ES): calcd. for $C_{16}H_{31}N_2O_7$: 363.21258, found 363.21252

8.1.72. (3S,4R,5R,6R)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-aminium hydrogen chloride (102)



Compound **101** (64 mg, 0.176 mmol) was stirred in HCl 1,25M ethanol solution (8 mL) during 5 hours. Solvent was removed under vacuum and the obtained white solid was carefully washed with Et_2O (2x3mL) to obtain compound **102** as a white solid (45 mg, 99 %)

$[\alpha]^{20}_D = +29.9$ (c=0.11, H_2O milliQ)

Mp: 259-264 °C

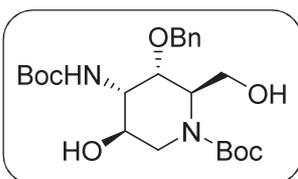
1H -NMR (400 MHz, D_2O , δ/ppm): 3.97 (m, 2H), 3.78 (m, 3H), 3.58 (dt, $J = 4.5, 12.0$ Hz, 1H), 3.34 (m, 2H).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O , δ/ppm): 73.2 (CH), 68.9 (CH), 61.1 (CH), 58.3 (CH₂), 47.7 (CH), 43.7 (CH₂).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3291, 2911, 1578, 1506, 1392, 1300, 1083, 1028, 988

HRMS (ES): calcd. for $C_6H_{15}N_2O_3$: 163.10772, found 163.10770

8.1.73. (2R,3R,4R,5S)-tert-Butyl-3-(benzyloxy)-5-(tert-butoxycarbonylamino)-4-hydroxy-2-(hydroxyl methyl)piperidine-1-carboxylate (96)



Following procedure 8.1.70 with **49** (275 mg, 0.73 mmol), NaOH 6M (2.8 mL, 16.7 mmol) and Boc₂O (297 mg, 1.35 mmol) in MeOH:water 9:1 (25 mL), EtOAc (15mL) and aq. NaHCO₃ (15 mL), **96** was obtained as a white solid (286 mg, 76 %).

$[\alpha]^{20}_D = -68.0$ (c=0.64, CHCl₃)

Mp: 50-54 °C

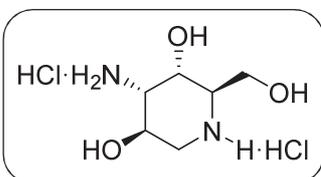
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38-7.27 (m, 5H), 5.15 (br, 1H), 4.74 (m, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.76 (m, 5H), 2.76 (m, 2H), 2.50 (br, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.42 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 157.6 (CO), 155.5 (CO), 137.5 (C), 128.5 (CH), 127.9 (CH), 127.6 (CH), 80.5 (C), 75.6 (CH), 71.1 (CH₂), 68.1 (CH), 59.9 (CH₂), 54.5 (CH), 53.0 (CH), 45.4 (CH₂), 28.3 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3430, 2976, 2931, 1692, 1419, 1360, 1157

HRMS (ES): calcd. for C₂₃H₃₇N₂O₇: 453.25953, found 453.25903

8.1.74. (2R,3S,4S,5R)-3,5-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-4-aminium hydrogen chloride (98)



Following procedure 8.1.71 and 8.1.72 with **96** (210 mg, 0.46 mmol), Pd/C (23mg, 0.02 mmol) and HCl 1,25M ethanol solution (8 mL), **87** is obtained as a white solid (95 mg, 86 %).

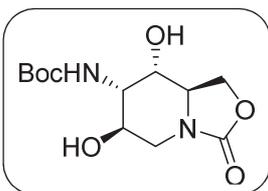
$[\alpha]^{20}_D = -10.2$ (c=0.22, H₂O milliQ)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.31 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.24 (dt, *J* = 9.5, 5.0 Hz, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.57 (m, 1H), 3.53 (dd, *J*=9.5, 3.0 Hz, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.20 (dd, *J* = 13.0, 9.5 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 65.2 (CH), 63.3 (CH), 60.9 (CH), 58.2 (CH₂), 54.7 (CH), 44.9 (CH₂).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3287, 2923, 1576, 1506, 1456, 1100, 1059, 1029

HRMS (ES): calcd. for C₆H₁₅N₂O₃: 163.10772, found 163.10774

8.1.75. *tert*-Butyl ((6*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-6,8-dihydroxy-3-oxohexahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-7-yl)carbamate (103)


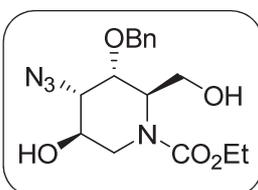
A suspension of **46a** (47 mg, 0.16 mmol), Boc₂O (43 mg, 0.19 mmol) and Pd(OH)₂/C (10 mg, 0.01 mmol) in MeOH (4 mL) was charged with H₂ (55 barg) and heated at 60°C for 20h. Palladium was filtered through celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **103** (389 mg, 74%) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.46 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 8.5, 4.5 Hz, 1H), 4.04 – 3.94 (m, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.60 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 14.0, 1.5 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 160.3 (CO), 158.5 (CO), 80.6 (C), 69.2 (CH), 67.9 (CH₂), 67.2 (CH), 55.6 (CH), 55.4 (CH), 43.4 (CH₂), 28.7 (CH₃).

IR (film, *v*_{max} / cm⁻¹): 3391, 2974, 2931, 1733, 1681, 1249, 1169

HRMS (ES): calcd. for C₁₂H₂₁N₂O₆: 289.13941, found 289.14000

8.1.76. (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-Ethyl-4-azido-3-(benzyloxy)-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (106)


To a solution of compound **49** (98 mg, 0.32 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (6.5 mL) was added NaOH 6M (0.54 mL, 3.22 mmol) and the reaction was heated at reflux for 15 h. Then HCl 1M was added until neutral pH. The crude was extracted with EtOAc (3x 5mL) and dried over MgSO₄. The obtained white solid was redissolved in THF (8 mL) and cooled at 0°C. After addition of DMAP (1 mg, 2.5%) and TEA (90 μL, 0.64 mmol), ethyl chloroformate (63 μL, 0.64 mmol) was added dropwise and the reaction was stirred 5h. The crude was extracted with EtOAc (3x5 mL), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **106** (56 mg, 53%) as a colorless oil.

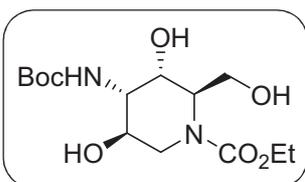
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38 – 7.27 (m, 5H), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.61 (br, 1H), 4.53 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.0 Hz, 3H), 3.89 (s, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.33 (dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 13.0, 11.0 Hz, 1H), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.7 (CO), 137.2 (C), 128.4 (CH), 127.9 (CH), 75.4 (CH), 71.9 (CH₂), 65.4 (CH), 63.8 (CH), 62.2 (CH₂), 59.7 (CH₂), 55.1 (CH), 44.8 (CH₂), 14.4 (CH₃).

IR (film, *v*_{max} / cm⁻¹): 3396, 2930, 2104, 1672, 1436, 1224, 1072, 1052

HRMS (ES): calcd. for C₁₆H₂₃N₄O₅: 351.16630, found 351.16608

8.1.77. (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-Ethyl 4-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (107)



A suspension of **106** (52 mg, 0.15 mmol), Boc₂O (47 mg, 0.21 mmol) and Pd(OH)₂/C (5 mg, 5%) in MeOH (4 mL) was charged with H₂ (55 barg) and heated at 60°C for 20h. Palladium was filtered through celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **107** (21 mg, 51%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.35 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.96 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 3.69 (m, 3H), 3.57 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

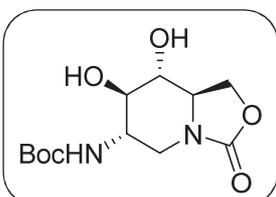
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 158.6 (CO), 158.3 (CO), 158.1* (CO), 80.4 (C), 69.1 (CH), 66.2 (CH), 66.0* (CH), 62.9 (CH₂), 61.4 (CH), 60.9* (CH), 59.9 (CH₂), 56.2 (CH), 46.7 (CH₂), 46.3* (CH₂), 28.7 (CH₃), 14.9 (CH₃).

*Rotamers

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3396, 2975, 1675, 1428, 1168, 1136, 1067

HRMS (ES): calcd. for C₁₄H₂₆N₂O₇Na: 357.16322, found 357.16408

8.1.78. *tert*-Butyl (6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-7,8-dihydroxy-3-oxohexahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-ylcarbamate (110)



A suspension of **45a** (79 mg, 0.26 mmol), Boc₂O (71 mg, 0.31 mmol) and Pd(OH)₂/C (18 mg, 0.03 mmol) in MeOH (3 mL) was charged with H₂ (55 barg) and heated at 60°C for 20h. Palladium was filtered through celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **110**

(61 mg, 81%) as a white solid.

[α]_D²⁰ = +15.7 (c=0.14, CH₃OH)

Mp: 227-229 °C

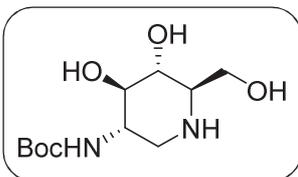
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.45 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.26 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 13.0, 5.5 Hz, 1H), 3.56 (ddd, *J* = 13.0, 8.0, 4.5 Hz, 1H), 3.39 (br, 1H), 3.29 (m, 2H), 2.74 (dd, *J* = 13.0, 11.0 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 159.0 (CO), 158.1 (CO), 80.4 (C), 76.1 (CH), 75.3 (CH), 67.3 (CH₂), 58.9 (CH), 52.8 (CH), 44.4 (CH₂), 28.7 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3348, 1987, 1734, 1676, 1366, 1163, 1070

HRMS (ES): calcd. for C₁₂H₂₀N₂O₆Na: 311.12136, found 311.12099

EA : Anal. calcd. for C₁₂H₂₀N₂O₆: C, 49.99%; H, 6.99%; N, 9.72%; found C, 50.23%; H, 6.79%; N, 9.70%

8.1.79. tert-Butyl (3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-ylcarbamate (108)


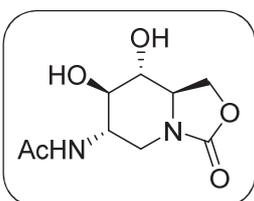
To a solution of **110** (57 mg, 0.23 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (4 mL) was added NaOH 6M (0.33 mL, 1.97 mmol) and the reaction was heated at reflux for 5 h. The crude was filtered through celite washing with MeOH and the resulting white solid was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 72.5:25:2.5 to give **108** (57 mg, 41%) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 3.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.65 (br, 1H), 3.41 (s, 1H), 3.23 (br, 2H), 3.15 (dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz, 1H), 2.50 (br, 1H), 2.42 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 158.1 (CO), 80.2 (C), 77.6 (CH), 73.6 (CH), 62.7 (CH), 62.5 (CH₂), 54.6 (CH), 49.4 (CH₂), 28.7 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3344, 3282, 2930, 1675, 1541, 1437, 1035

HRMS (ES): calcd. for C₁₁H₂₃N₂O₅: 263.16015, found 263.16013

8.1.80. N-((6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-7,8-Dihydroxy-3-oxohexahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (109)


A suspension of **89** (89 mg, 0.22 mmol) and Pd(OH)₂/C (16 mg, 0.02 mmol) in MeOH (8 mL) was charged with H₂ (55 barg) and heated at 60°C for 20h. Palladium was filtered through celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **109** (46 mg, 92%) as a white solid.

[α]_D²⁰ = +24.0 (c=0.12, CH₃OH)

Mp: 231-233°C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.46 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 13.0, 6.0 Hz, 1H), 3.72 (ddd, *J* = 11.0, 10.0, 6.0 Hz, 1H), 3.59 (ddd, *J* = 9.0, 8.0, 4.5 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 10.0, 9.0 Hz, 1H), 3.28 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 13.0, 11.0 Hz, 1H), 1.98 (s, 3H).

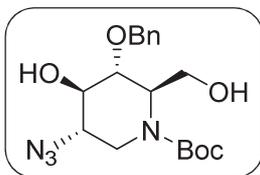
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 173.7 (CO), 159.0 (CO), 76.0 (CH), 75.3 (CH), 67.3 (CH₂), 58.9 (CH), 51.7 (CH), 43.8 (CH₂), 22.7 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3301, 2917, 1742, 1657, 1432, 1076

HRMS (ES): calcd. for C₉H₁₄N₂O₅Na: 253.07949, found 253.07990

EA : Anal. calcd. for C₉H₁₄N₂O₅: C, 46.95%; H, 6.13%; N, 12.17%; found C, 47.23%; H, 6.05%; N, 12.29%

8.1.81. (2R,3R,4S,5R)-tert-Butyl-4-azido-3-(benzyloxy)-5-hydroxy-2-hydroxymethylpiperidine-1-carboxylate (111)



To a solution of compound **45a** (301 mg, 0.99 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (20 mL) was added NaOH 6M (2 mL, 11.89 mmol) and the reaction was heated at reflux for 15 h. Then, solvent was removed under low pressure and the crude was redissolved in EtOAc:NaHCO₃ aqueous saturated 1:1 (14 mL). After 30 min of stirring, Boc₂O (436 mg, 1.91 mmol) was added and the crude was allowed to stir for 24 h. The crude was treated with water (6 mL), extracted with EtOAc (3x5 mL), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate to give **111** (334 mg, 90%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = -36.1$ (c=0.67, CHCl₃)

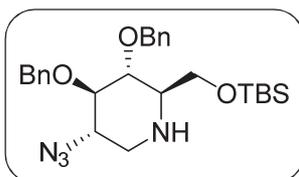
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38 – 7.28 (m, 5H), 4.83 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.97 - 3.87 (br, 2H), 3.84 (dd, *J* = 14.0, 4.5 Hz, 1H), 3.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.57 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.53 (br, 1H), 3.39 (td, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 3.29 (s, 1H), 3.18 (dd, *J* = 14.0, 7.5 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 154.9 (CO), 138.0 (C), 128.6 (CH), 128.0 (CH), 128.0 (CH), 81.5 (s), 77.7 (C), 75.4 (CH), 74.1 (CH₂), 60.8 (CH), 60.7 (CH₂), 60.6 (CH), 45.7 (CH₂), 28.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3404, 2968, 2107, 1668, 1422, 1367, 1250, 1162

HRMS (ES): calcd. for C₁₈H₂₇N₄O₅: 379.19760, found 379.19777

8.1.82. (2R,3R,4R,5S)-5-Azido-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)methylpiperidine (112)



To a solution of compound **86** (85 mg, 0.22 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (10 mL) was added NaOH 6M (0.43 mL, 2.58 mmol) and the reaction was heated at reflux for 15 h. The reaction was neutralized with HCl 1M until pH 6-7 and solvents were removed under low pressure giving a white solid. Imidazole (44 mg, 0.64 mmol), DMAP (2 mg, 0.02 mmol) and TBSCl (78 mg, 0.49 mmol) were added and the whole mixture was suspended in CH₂Cl₂ (10 mL) and stirred for 16h. The crude was treated with water (6 mL), extracted with EtOAc (3x5 mL), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica-Et₃N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **112** (74 mg, 72%) as a colorless oil.

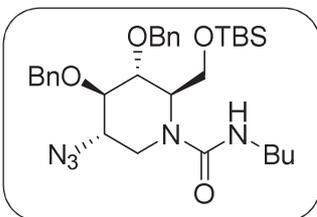
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.43 – 7.28 (m, 10H), 4.90 (m, 3H), 4.61 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, 1H), 3.70 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.42 (m, 3H), 3.23 (dd, *J* = 13.0, 5.0 Hz, 1H), 2.59 (ddd, *J* = 8.0, 5.0, 3.0 Hz, 1H), 2.48 (dd, *J* = 13.0, 10.5 Hz, 1H), 1.77 (br, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 138.2 (C), 137.9 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 86.3 (CH), 80.2 (CH), 75.7 (CH₂), 75.1 (CH₂), 64.1 (CH), 62.6 (CH₂), 61.0 (CH), 48.2 (CH₂), 25.9 (CH₃), 18.2 (C), -5.4 (CH₃), -5.5 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3346, 2949, 2104, 1254, 1117, 1088, 1040

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_3\text{Si}$: 483.27859, found 483.27822

8.1.83. (2R,3R,4R,5S)-5-Azido-3,4-bis(benzyloxy)-N-butyl-2-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)methyl)piperidine-1-carboxamide (113)



To a solution of **112** (70 mg, 0.15 mmol) in Et_2O (5 mL) was added TEA (40 μL , 0.29 mmol) and butyl isocyanate (25 μL , 0.22 mmol) and the reaction was heated at reflux for 4h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica- Et_3N (2,5% v/v) using hexane/ EtOAc to give **113** (82 mg, 97%) as a colorless oil.

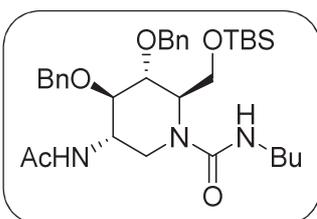
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.39 – 7.27 (m, 10H), 5.24 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 3.91 (m, 2H), 3.70 – 3.62 (m, 5H), 3.59 (m, 1H), 3.31 (dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 1.46 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.02 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 158.7 (CO), 137.6 (C), 137.4 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 127.9 (CH), 127.9 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 80.3 (CH), 75.0 (CH), 73.2 (CH_2), 72.9 (CH_2), 63.3 (CH_2), 60.8 (CH), 58.7 (CH), 40.7 (CH_2), 40.5 (CH_2), 32.3 (CH_2), 25.8 (CH_3), 20.1 (CH_2), 18.2 (C), 13.8 (CH_3), -5.5 (CH_3), -5.6 (CH_3).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3353, 2955, 2929, 2105, 1631, 1537, 1255, 1098

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}$: 582.34701, found 582.34752

8.1.84. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-3,4-bis(benzyloxy)-N-butyl-2-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)methyl)piperidine-1-carboxamide (114a)



To a solution of **113** (85 mg, 0.15 mmol) in EtOAc (4 mL) was added Pd/C (9 mg, 0.01 mmol) and the reaction was charged with H_2 (3 barg) and stirred at r.t. for 4h. Palladium was filtered through Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (2 mL) and Ac_2O (21 μL , 0.21 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 16h. Then, H_2O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 /MeOH to give **114a** (67 mg, 77%) as a yellow oil.

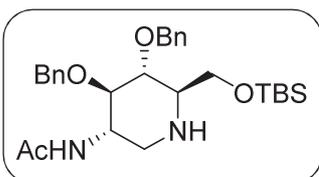
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.37 – 7.23 (m, 10H), 6.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.67 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.33 (br, 1H), 4.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.68 (m, 2H), 3.62 (s, 1H), 3.23 (m, 2H), 3.14 (m, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.45 (m, 2H), 1.33 (m, 2H), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), 0.01 (s, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.8 (CO), 159.9 (CO), 137.6 (C), 137.4 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 73.7 (CH), 72.0 (CH₂), 71.5 (CH₂), 61.1 (CH₂), 57.1 (CH), 45.8 (CH), 40.6 (CH₂), 38.4 (CH₂), 32.4 (CH₂), 25.8 (CH₃), 23.4 (CH₃), 20.1 (CH₂), 18.2 (C), 13.8 (CH₃), -5.38 (CH₃), -5.55 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3378, 2928, 1650, 1642, 1531, 1254, 1096

HRMS (ES): calcd. for C₃₃H₅₂N₃O₅Si: 598.36708, found 598.36768

8.1.85. *N*-((3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5-bis(Benzyloxy)-6-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)piperidin-3-yl)acetamide (115**)**



To a solution of compound **89** (232 mg, 0.57 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (20 mL) was added NaOH 6M (1.13 mL, 6.78 mmol) and the reaction was heated at reflux for 6 h. The reaction was neutralized with HCl 1M until pH 6-7 and solvents were removed under low pressure giving a white solid. Imidazole (116 mg, 1.70 mmol) and TBSCl (206 mg, 1.31 mmol) were added and the whole mixture was suspended in CH₂Cl₂ (10 mL) and stirred for 16h. The crude was treated with water (6 mL), extracted with EtOAc (3x5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica-Et₃N (2,5% v/v) using CH₂Cl₂/MeOH to give **115** (255 mg, 90%) as a slightly yellow oil.

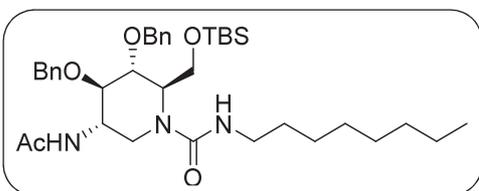
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.41 – 7.27 (m, 10H), 5.08 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.87 (dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz, 2H), 4.65 (dd, *J* = 11.5, 4.5 Hz, 2H), 3.86 (dd, *J* = 10.0, 4.5 Hz, 1H), 3.74 (dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.28 (dd, *J* = 12.5, 10.0 Hz, 1H), 1.73 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.0 (CO), 138.4 (C), 138.2 (C), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 82.7 (CH), 80.2 (CH), 74.9 (CH₂), 74.2 (CH₂), 62.0 (CH₂), 60.8 (CH), 52.5 (CH), 47.9 (CH₂), 25.9 (CH₃), 23.3 (CH₃), 18.2 (C), -5.41 (CH₃), -5.46 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3276, 2928, 1650, 1554, 1453, 1097, 836, 697

HRMS (ES): calcd. for C₂₈H₄₃N₂O₄: 499.29866, found 499.29864

8.1.86. (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-5-Acetamido-3,4-bis(benzyloxy)-2-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)-*N*-octylpiperidine-1-carboxamide (114b**)**



To a solution of **115** (92 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TEA (35 μL, 0.28 mmol) and octyl isocyanate (51 μL, 0.37 mmol) and the reaction was heated at reflux for 4h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **114b** (95 mg, 82%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.38 – 7.22 (m, 10H), 6.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.04 (br, 1H), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.33 (br, 1H), 4.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.96 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.68

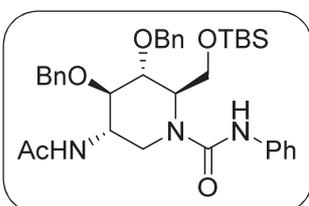
(m, 2H), 3.62 (s, 1H), 3.23 (m, $J = 14.5, 5.5$ Hz, 2H), 3.13 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.47 (m, 2H), 1.28 (m, 10H), 0.88 (m, 12H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 169.7 (CO), 159.9 (CO), 137.6 (C), 137.4 (C), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 73.6 (CH), 73.6 (CH), 71.9 (CH₂), 71.4 (CH₂), 61.1 (CH₂), 57.2 (CH), 45.7 (CH), 40.9 (CH₂), 38.4 (CH₂), 31.7 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.97 (CH₂), 25.8 (CH₃), 23.3 (CH₃), 22.6 (CH₂), 18.2 (C), 14.0 (CH₃), -5.41 (CH₃), -5.59 (CH₃).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3386, 2927, 2855, 1651, 1623, 1537, 1097, 1066

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{74}\text{H}_{119}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{Si}_2$: 1307.85338, found 1307.85207

8.1.87. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butylidimethylsilyloxy)methyl)-N-phenylpiperidine-1-carboxamide (114c)



To a solution of **115** (84 mg, 0.17 mmol) in CH_2Cl_2 (4 mL) was added TEA (47 μL , 0.34 mmol) and phenyl isocyanate (37 μL , 0.34 mmol) and the reaction was heated at reflux for 4h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **114c** (92 mg, 88%) as a colorless oil.

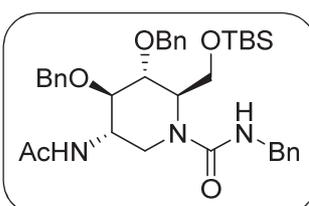
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.40 – 7.22 (m, 14H), 7.02 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.44 (br, 1H), 4.25 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 4.08 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.77 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.71 (dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.33 (dd, $J = 14.0, 2.5$ Hz, 1H), 1.84 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 170.0 (CO), 157.3 (CO), 139.4 (C), 137.5 (C), 137.1 (C), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 122.5 (CH), 119.2 (CH), 73.8 (CH), 73.3 (CH), 72.1 (CH₂), 71.7 (CH₂), 61.4 (CH₂), 58.4 (CH), 45.6 (CH), 38.2 (CH₂), 25.9 (CH₃), 23.4 (CH₃), 18.4 (C), -5.3 (CH₃), -5.4 (CH₃).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3391, 2923, 2846, 1659, 1535, 1443, 1095

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$: 618.33578, found 618.33715

8.1.88. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-N-benzyl-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butylidimethylsilyloxy)methyl)piperidine-1-carboxamide (114d)



To a solution of **115** (92 mg, 0.18 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added TEA (51 μL , 0.37 mmol) and benzyl isocyanate (35 μL , 0.28 mmol) and the reaction was heated at reflux for 4h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **114d** (95 mg, 82%) as a colorless oil.

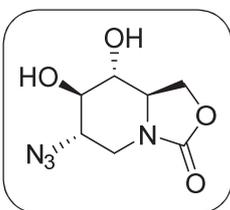
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.42 – 7.26 (m, 15H), 6.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.49 (br, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.49 (m, *J* = 15.0, 11.5 Hz, 2H), 4.39 (dt, *J* = 15.0, 5.5 Hz, 2H), 4.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.07 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.78 – 3.64 (m, 3H), 3.33 (m, 1H), 1.78 (s, 3H), 0.86 (m, 9H), 0.02 (s, 3H), 0.01 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.8 (CO), 159.8 (CO), 139.5 (C), 137.6 (C), 137.3 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 127.1 (CH), 73.7 (CH), 73.5 (CH), 72.0 (CH₂), 71.6 (CH₂), 61.1 (CH₂), 57.3 (CH), 45.6 (CH), 44.8 (CH₂), 38.5 (CH₂), 25.8 (CH₃), 23.2 (CH₃), 18.12 (C), -5.49 (CH₃), -5.65 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3393, 2949, 2927, 1652, 1532, 1256, 1096

HRMS (ES): calcd. for C₃₆H₅₀N₃O₅Si: 632.35143, found 632.35205

8.1.89. (6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6-Azido-7,8-dihydroxyhexahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (117)**

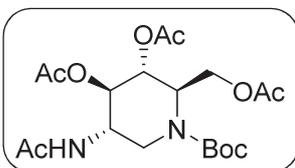


To a solution of **45a** (70 mg, 0.23 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) cooled at -78°C was added BCl₃ (0.97 mL, 0.97 mmol) and the reaction was stirred at this temperature for 2 h and then allowed to go to r.t. and stirred 16 h. Then it was cooled again at -78°C and MeOH (10 mL) was added dropwise. Solvents were removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **117** (44 mg, 89%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.41 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.34 (m, 2H), 3.25 (m, 1H), 2.71 (m, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 159.0, 78.2, 74.6, 67.3, 62.0, 58.7, 49.0, 43.7.

8.1.90. (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (120)



To a solution of **111** (571 mg, 1.51 mmol) in degassed MeOH (15 mL) was added Pd/C (160 mg, 0.15 mmol) and acetic acid (0.43 mL, 7.55 mmol) and the reaction was charged with H₂ (15 barg) and stirred at 60°C for 16 h. Palladium was filtered over Celite washing with MeOH and solvents were removed under low pressure. The obtained colorless oil was redissolved in pyridine (10 mL) and Ac₂O (1.58 mL, 15.02 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 16 h. Then, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane/EtOAc to give **120** (538 mg, 83%) as a colorless oil.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -7.2$ (c=2.3, CHCl₃)

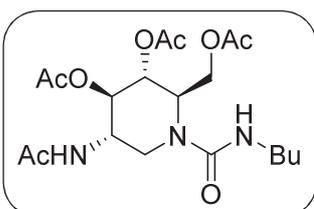
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 6.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.94 (m, 1H), 4.92 (m, 1H), 4.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 11.5, 8.5 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 11.5, 6.5 Hz, 1H), 4.14 – 4.05 (m, 2H), 3.32 (dd, *J* = 15.0, 3.0 Hz, 1H), 2.11 (s, 6H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 170.4 (CO), 168.9 (CO), 168.6 (CO), 168.2 (CO), 155.5 (CO), 80.8 (C), 67.8 (CH), 67.0 (CH), 59.9 (CH₂), 46.1 (CH), 39.3 (CH₂), 28.2 (CH₃), 23.3 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.7 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3333, 2975, 1745, 1687, 1369, 1223, 1046

HRMS (ES): calcd. for C₁₉H₃₁N₂O₉ : 431.20241, found 431.20239

8.1.91. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(butylcarbamoyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (**121a**)



To a solution of **120** (90 mg, 0.21 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added TFA (0.48 mL, 6.31 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ (8 mL). TEA (0.23 mL, 1.64 mmol) and butyl isocyanate (71 μL, 0.63 mmol) were added and the reaction was heated at reflux for 4h. After that, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **121a** (73 mg, 81%) as a colorless oil.

[α]_D²⁰ = -63.5 (c=2.31, CHCl₃)

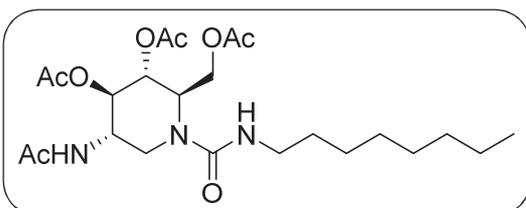
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.04 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.99 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.43 (dd, *J* = 11.0, 7.5 Hz, 1H), 4.24 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 11.0, 7.5 Hz, 1H), 4.03 (q, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 15.0, 3.0 Hz, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.47 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), (h, *J* = 7.0 Hz, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.0 (CO), 169.6 (CO), 168.8 (CO), 168.7 (CO), 159.0 (CO), 68.0 (CH), 67.0 (CH), 61.0 (CH₂), 54.0 (CH), 47.0 (CH), 40.8 (CH₂), 39.1 (CH₂), 32.1 (CH₂), 23.2 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.0 (CH₂), 13.7 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3364, 2958, 2932, 1749, 1652, 1539, 1370, 1225, 1043.

HRMS (ES): calcd. for C₁₉H₃₂N₃O₈ : 430.21819, found 430.21839

8.1.92. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(octylcarbamoyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (**121b**)



To a solution of **120** (99 mg, 0.23 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added TFA (0.53 mL, 6.92 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under low pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ (8 mL). TEA (0.25 mL, 1.79 mmol) and octyl isocyanate (122 μL, 0.69 mmol) were added and the reaction was heated at reflux for 4h. After that, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with

CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **121b** (71 mg, 85%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = -57.2$ (c=2.01, CHCl₃)

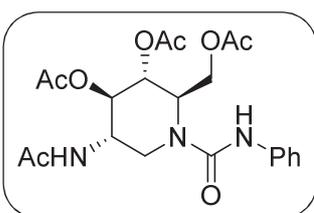
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.10 – 4.98 (m, 2H), 4.91 (m, 1H), 4.47 (dd, *J* = 11.0, 7.5 Hz, 1H), 4.26 (td, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 1H), 4.20 – 4.11 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.98 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 14.5, 3.0 Hz, 1H), 3.22 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.29 (m, 10H), 0.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.0 (CO), 169.6 (CO), 168.8 (CO), 168.7 (CO), 159.1 (CO), 68.1 (CH), 67.0 (CH), 61.0 (CH₂), 53.9 (CH), 46.6 (CH), 41.1 (CH₂), 39.1 (CH₂), 31.7 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.19 (CH₂), 26.8 (CH₂), 23.2 (CH₃), 22.5 (CH₂), 20.8 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.7 (CH₃), 14.0 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3359, 2936, 2846, 1758, 1649, 1521, 1373, 1213, 1040

HRMS (ES): calcd. for C₂₃H₄₀N₃O₈: 486.28099, found 486.28081

8.1.93. (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(phenylcarbamoyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (**121c**)



To a solution of **120** (75 mg, 0.17 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added TFA (0.41 mL, 5.18 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ (8 mL). TEA (0.19 mL, 1.35 mmol) and phenyl isocyanate (56 μL, 0.52 mmol) were added and the reaction was

heated at reflux for 4h. After that, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **121c** (63 mg, 80%) as a white solid.

Mp: 79-82 °C

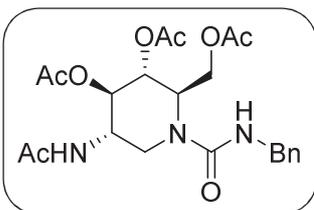
$[\alpha]_D^{20} = -73.0$ (c=0.24, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.44 (m, 2H), 7.30 (m, 3H), 7.07 (tt, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.07 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.97 (m, 1H), 4.54 (dd, *J* = 11.5, 7.0 Hz, 1H), 4.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.24 (dd, *J* = 11.5, 7.5 Hz, 1H), 4.17 (dt, *J* = 14.5, 1.5 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 14.5, 3.0 Hz, 1H), 2.15 (s, 6H), 2.07 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.7 (CO), 170.0 (CO), 169.0 (CO), 168.8 (CO), 156.4 (CO), 138.9 (C), 129.1 (CH), 123.6 (CH), 119.7 (CH), 68.2 (CH), 67.3 (CH), 61.5 (CH₂), 54.1 (CH), 46.8 (CH), 39.4 (CH₂), 23.5 (CH₃), 21.1 (CH₃), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3333, 3013, 2928, 1746, 1662, 1537, 1444, 1370, 1232

HRMS (ES): calcd. for C₂₁H₂₈N₃O₈: 450.18709, found 450.18715

8.1.94. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(benzylcarbamoyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (121d)


To a solution of **120** (74 mg, 0.17 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added TFA (0.39 mL, 5.15 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under low pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ (8 mL). TEA (0.19 mL, 1.33 mmol) and benzyl isocyanate (63 μL, 0.52 mmol) were added and the reaction was heated at reflux for 4h. After that, H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5 mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **121d** (56 mg, 70%) as a colorless oil.

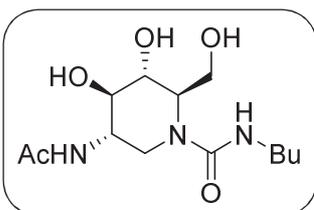
$[\alpha]^{20}_D = -55.0$ (c=1.30, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.36 – 7.25 (m, 5H), 6.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.40 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.01 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.50 – 4.42 (m, 2H), 4.36 (dd, *J* = 15.0, 5.0 Hz, 2H), 4.14 (dd, *J* = 11.5, 6.5 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 7.0, 3.5 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 15.0, 3.5 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.91 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.0 (CO), 168.8 (CO), 168.0 (CO), 168.0 (CO), 159.0 (CO), 138.3 (C), 127.7 (CH), 126.7 (CH), 126.5 (CH), 67.2 (CH), 66.2 (CH), 60.0 (CH₂), 53.2 (CH), 45.7 (CH), 44.1 (CH₂), 38.4 (CH₂), 22.3 (CH₃), 19.9 (CH₃), 19.9 (CH₃), 19.7 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3359, 2927, 1746, 1651, 1532, 1370, 1225, 1043

HRMS (ES): calcd. for C₂₂H₃₀N₃O₈ : 464.20270, found 464.20274

8.1.95. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-N-butyl-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxamide (116a)

Method A

To a solution of **114a** (67 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) cooled at -78°C was added BCl₃ (0.56 mL, 0.56 mmol) and the reaction was stirred at this temperature for 2h and then allowed to go to r.t. and stirred 16h. Then it was cooled again at -78°C and MeOH (10 mL) was added. Solvents were removed under low pressure and the reaction was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116a** (12 mg, 36%) as a slightly yellow solid.

Method B

121a (73 mg, 0.17 mmol) was dissolved in NH₃ saturated MeOH solution (4 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116a** (32 mg, 61%) as a slightly yellow solid.

$[\alpha]^{20}_D = +25.0$ (c=1.63, CH₃OH)

Mp: 70-72 °C

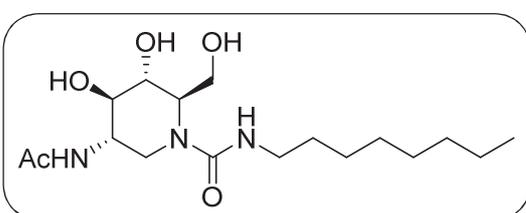
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 3.94 (m, 1H), 3.91 – 3.81 (m, 3H), 3.76 (dd, *J* = 11.0, 4.5 Hz, 1H), 3.72 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.60 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* = 13.5, 3.0 Hz, 1H), 3.24 – 3.07 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.48 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 172.7 (CO), 161.8 (CO), 71.7 (CH), 70.3 (CH), 61.9 (CH), 61.8 (CH₂), 51.6 (CH), 41.6 (CH₂), 41.0 (CH₂), 33.3 (CH₂), 22.9 (CH₃), 21.1 (CH₂), 14.2 (CH₃)

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3353, 2923, 1623, 1540, 1469, 1418, 1021

HRMS (ES): calcd. for C₁₃H₂₆N₃O₅: 304.18670, found 304.18727

8.1.96. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-*N*-octylpiperidine-1-carboxamide (116b)



Method A

To a solution of **114b** (48 mg, 0.07 mmol) in THF (1 mL) was added HF-pyridine (19 μL, 0.73 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvents were removed under low pressure and the

obtained solid was redissolved in MeOH. Pd(OH)₂/C (8 mg, 0.01 mmol) was added and the reaction was charged with H₂ (55 barg) and heated at 60°C for 20h. Palladium was filtered through celite washing with MeOH and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116b** (20 mg, 76%) as a slightly yellow solid.

Method B

121b (71 mg, 0.20 mmol) was dissolved in NH₃ saturated MeOH solution (4 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116b** (47 mg, 75%) as a slightly yellow solid.

[α]²⁰_D = +26.9 (c=2.0, CH₃OH)

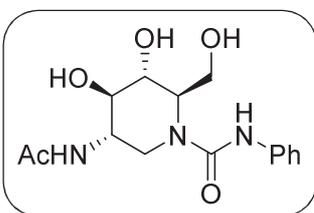
Mp: 57-59 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 3.95 (m, 1H), 3.92 – 3.80 (m, 3H), 3.79 – 3.70 (m, 2H), 3.61 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* = 14.0, 3.0 Hz, 1H), 3.21 – 3.05 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.49 (m, 2H), 1.35 – 1.27 (m, 10H), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 172.6 (CO), 161.7 (CO), 71.6 (CH), 70.2 (CH), 61.9 (CH), 61.7 (CH₂), 51.6 (CH), 41.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 33.0 (CH₂), 31.1 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 28.0 (CH₂), 23.7 (CH₃), 22.9 (CH₂), 14.4 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3333, 2917, 2853, 1623, 1533, 1373

HRMS (ES): calcd. for C₁₇H₃₄N₃O₅: 360.24930, found 360.24925

8.1.97. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-N-phenylpiperidine-1-carboxamide (116c)
*Method A*

Li (s) was added in excess to NH₃(l) (10 mL) at -78°C until achieving an intense blue color solution. Then, a solution of **114c** (42 mg, 0.07 mmol) in THF (1 mL) was added followed by Li(s) until the blue color of the solution was kept permanently. At this point, the reaction was stirred at -78°C for 2h. MeOH (10 mL) was added to quench the reaction. H₂O (20 mL) was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x 5 mL), dried over MgSO₄ to give an orange oil which was redissolved in THF (2 mL). HF·pyridine (14 μL, 0.54 mmol) was added and the reaction was stirred at r.t. 24h. Solvents were removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116c** (5 mg, 22%).

Method B

121c (60 mg, 0.13 mmol) was dissolved in NH₃ saturated MeOH solution (4 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116c** (25 mg, 58%) as a slightly yellow solid.

[α]_D²⁰ = +21.5 (c=1.2, CH₃OH)

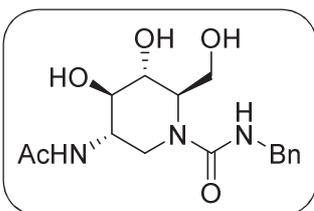
Mp: 61-63 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.33 – 7.22 (m, 4H), 7.02 – 6.96 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.04 – 3.97 (m, 2H), 3.92 (q, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz, 1H), 3.73 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.66 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.42 (dd, *J* = 14.0, 3.5 Hz, 1H), 1.97 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 172.87 (CO), 159.6 (CO), 140.9 (C), 129.6 (CH), 123.8 (CH), 121.4 (CH), 71.5 (CH), 70.4 (CH), 62.5 (CH), 61.9 (CH₂), 51.7 (CH), 40.8 (CH₂), 22.9(CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3227, 2923, 1636, 1533, 1444

HRMS (ES): calcd. for C₁₅H₂₂N₃O₅: 324.15540, found 324.15551

8.1.98. (2R,3R,4R,5S)-5-Acetamido-N-benzyl-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxamide (116d)


121d (56 mg, 0.12 mmol) was dissolved in NH₃ saturated MeOH solution (4 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Solvent was removed under low pressure and the crude was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH to give **116d** (31 mg, 76%) as a slightly yellow solid.

$[\alpha]^{20}_D = +39.5$ (c=1.4, CH₃OH)

Mp: 56-58 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.35 – 7.26 (m, 4H), 7.21 (m, 1H), 4.35 (dd, *J* = 15.0 Hz, 2H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 3.94 – 3.85 (m, 3H), 3.80 – 3.71 (m, 2H), 3.63 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.40 (dd, *J* = 15.0, 4.0 Hz, 1H), 1.89 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 172.6 (CO), 161.6 (CO), 141.3(C), 129.3 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 71.4 (CH), 70.2 (CH), 61.8 (CH), 61.6 (CH₂), 51.5 (CH), 45.3 (CH₂), 40.8 (CH₂), 22.9 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3353, 2917, 1617, 1533, 1450, 1264, 1059

HRMS (ES): calcd. for C₁₆H₂₄N₃O₅: 338.17105, found 338.17116

8.2. Synthesis of 2-acetamido-1,2-dideoxialonjirimicina (DAJNAc) and derivatives using palladium allylic substitution

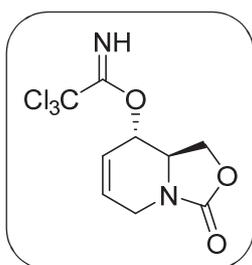
General Procedure for Allylic palladium substitution

To in a flame-dried Schlenk flask was added a solution of starting material (1 eq) in THF. Then a solution of $[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5\text{Cl})_2]$ (7.5 %) and dppe (15 %) in THF prepared in a flame-dried round bottom flask was added via cannula. After 5 min, the nucleophile (3 eq) was added in one portion via syringe or as solid depending on the reagent. The mixture was stirred for 1-20h until no starting material was detected by TLC. The solvent was eliminated in vacuo and the obtained crude products purified by flash column chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing the polarity ratio.

General Procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation (SAD)

DHQ or DHQD ligand (0.01 eq), $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.01 eq), K_2CO_3 (3 eq) and $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (3 eq) were dissolved in $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 mixture. The crude was cooled to 0°C and then a solution of $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ (1 eq) in $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 was added. After 15 min, a solution of starting material (1 eq) in $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 was added. Then the crude was left to warm to room temperature and stirred until no starting material was observed by TLC. The crude was treated with Na_2SO_3 and stirred for 60 min. Then it was extracted with EtOAc and the organic phase was washed with KOH 2M and brine, dried with MgSO_4 and purified by chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ except otherwise indicated.

8.2.1. (8*S*,8*aR*)-3-Oxo-1,5,8,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-8-yl 2,2,2-trichloroacetimidate (**122**)



To a solution of **8** (367 mg, 2.36 mmol) in CH_2Cl_2 (16 mL) cooled at 0°C was added DBU (0.47 mL, 3.08 mmol) and trichloroacetonitrile (0.4 mL, 3.78 mmol) and the reaction was stirred at this temperature for 2h. Then, aq. NH_4Cl sat. (10 mL) was added and the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 10 mL), dried over MgSO_4 and purified on silica- Et_3N (2,5% v/v) using hexane/EtOAc to give **122** as a white solid (684 mg, 97%).

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +23.5$ ($c=1.0$, CHCl_3)

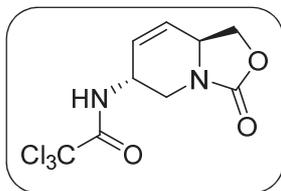
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 8.54 (s, 1H), 5.99 – 5.93 (m, 1H), 5.93 – 5.88 (m, 1H), 5.43 (m, 1H), 4.55 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H), 4.44 (dd, $J = 9.0, 5.0$ Hz, 1H), 4.23 – 4.13 (m, 1H), 3.87 (td, $J = 8.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.77 – 3.66 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 162.3 (CN), 157.3 (CO), 126.8 (CH), 127.8 (CH), 91.6 (C), 73.6 (CH), 67.8 (CH_2), 54.4 (CH), 41.0 (CH_2)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3215, 2976, 1779, 1661, 1615, 1333, 1271, 1192

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 297.9679, found 297.9683

8.2.2. 2,2,2-Trichloro-*N*-((6*R*,8*aS*)-3-oxo-1,5,6,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (**123**)



Method A

To a solution of **122** (30 mg, 0.1 mmol) in xylene (4 mL) was added K_2CO_3 (17 mg, 0.12 mmol) and the reaction was heated at reflux for 16h. Solvents were removed under low pressure recovering the starting material.

Method B

A suspension of **122** (63 mg, 0.21 mmol) and K_2CO_3 (43 mg, 0.32 mmol) in xylene (2.5 mL) was subjected to microwave irradiation (power: 300W; temperature: 120°C; time: 30 min). Solvents were removed under low pressure recovering starting material.

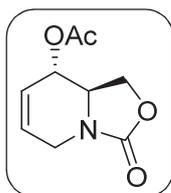
Method C

A flamed dried Schlenk tube was charged with a solution of **122** (50 mg, 0.17 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL). Then a solution of $Pd(CH_3CN)_4(BF_4)_2$ (2 mg, 0.004 mmol) and salicaldehyde (2 μ L, 0.02 mmol) was added via cannula and the reaction was stirred at r.t. for 24 h with no advance on the reaction.

Method D.

A flamed dried Schlenk tube was charged with a solution of **122** (75 mg, 0.25 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL). Then a solution of $Pd(PhCN)_2Cl_2$ (2.4 mg, 0.006 mmol), *Tris*(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine (3.4 mg, 0.006 mmol) and salicaldehyde (2 μ L, 0.02 mmol) was added via cannula and the reaction was stirred at r.t. for 24 h with no advance on the reaction.

8.2.3. (8*S*,8*aR*)-3-Oxo-1,5,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-8-yl acetate (**7**)



To a solution of **8** (600 mg, 3.86 mmol) and DMAP (72 mg, 0.58 mmol) in CH_2Cl_2 (24 mL) was added TEA (1.1 mL, 7.73 mmol) and acetic anhydride (0.92 mL, 9.66 mmol) dropwise and the reaction was stirred for 8h at r.t. Then, HCl 1M (10 mL) was added. The reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 10 mL), dried over $MgSO_4$ and purified by chromatography on silica gel using hexane /ethyl acetate to give **124a** (322 mg, 98 %) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = -34.9$ (c=0.5, $CHCl_3$)

Mp: 56.2 °C (DSC)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 5.92 (m, 1H), 5.75 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 4.50 (dd, $J = 9.5, 8.0$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J = 9.5, 5.0$ Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.70 (m, 2H), 2.11 (s, 3H).

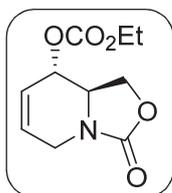
^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 170.3 (CO), 156.4 (CO), 126.1 (CH), 125.3 (CH), 69.1 (CH), 67.5 (CH_2), 54.2 (CH), 40.5 (CH_2), 20.8 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 2921, 1752, 1653, 1478, 1420, 1389, 1371, 1234

MS (Cl-NH₃, m/z): 197 (M, 20%), 198 (M+1, 17%), 215 (M+18, 100%)

EA: Anal. Calcd. For C₇H₉NO₃: C, 54.82%; H, 5.62%; N, 7.10%; found C, 54.59%; H, 5.55%; N, 7.17%.

8.2.4. Ethyl ((8*S*,8*aR*)-3-oxo-1,5,8,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-8-yl) carbonate (124b)



To a solution of compound **8** (754 mg, 4.8 mmol) in CH₂Cl₂ (28 mL) was added pyridine (1.60 ml, 19.9 mmol) and ethyl chloroformate (1.17 ml, 12.1 mmol) dropwise. The solution was allowed to stir for 5 h and then was treated with H₂O (10 ml), extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 ml), dried over MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane /ethyl acetate and increasing the polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **124b** (988 mg, 90 %) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_D^{20} = -2.34$ (c=0.5, CHCl₃)

Mp: 82 - 83 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.87 (m, 1H), 5.80 (dq, *J* = 10.0, 2.0 Hz, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.50 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 9.0, 5.0 Hz, 1H), 4.20 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.10 (dq, *J* = 19.0, 3.0 Hz, 1H), 3.72 (dt, *J* = 8.0, 5.0 Hz, 1H), 3.65 (dq, *J* = 19.0, 3.0 Hz, 1H), 1.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

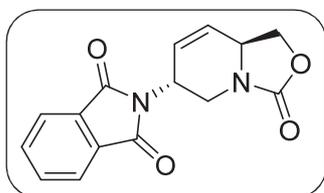
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 156.8 (CO), 154.4 (CO), 126.4 (CH), 124.9 (CH), 72.1 (CH), 67.3 (CH₂), 64.6 (CH₂), 53.9 (CH), 40.5 (CH₂), 14.0 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 1744, 1422, 1370, 1252, 1082, 1007

HRMS (ES): calcd. for C₁₀H₁₄NO₅: 228.08665, found 228.08663

EA: Anal. Calcd. For C₁₀H₁₃NO₅: C, 52.86%; H, 5.77%; N, 6.16%; found C, 53.03%; H, 5.91%; N, 6.12%.

8.2.5. 2-((6*R*,8*aS*)-3-Oxo-3,5,6,8*a*-tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)isoindoline-1,3-dione (125a)



Method A

General procedure for allylic palladium substitution was carried out with **124a** (51 mg, 0.3 mmol), [Pd(μ³-C₃H₅)Cl] (7.2 mg, 7.5 %), dppe (16 mg, 15 %) phthalimide (115 mg, 0.8 mmol) and THF (3 ml). After 8 h, workup and purification in silica gel hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio **125a** (18 mg, 25%) was obtained

as a white solid.

Method B

A solution of **124b** (406 mg, 2.1 mmol), [Pd(μ³-C₃H₅)Cl] (58 mg, 0.15 mmol) and dppe (124 mg, 0.3 mmol) in dimethoxyethane (6 ml) was added via cannula over a flame dried Scklenk

previously charged with phthalimide (489 mg, 3.3 mmol), Cs₂CO₃ (1 g, 3.1 mmol) and dimethoxyethane (6 ml). The mixture was heated at 85 °C for 30 minutes. The crude was treated by adding H₂O (10 ml), extracted with EtOAc (3 x 10 ml), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio to give **125a** (256 mg, 44%) as a white solid.

Method C

A solution of **124b** (3.25 g, 14.3 mmol), [Pd(μ³-C₃H₅)Cl] (267 mg, 0.7 mmol) and dppe (576 mg, 1.4 mmol) in dimethoxyethane (50 ml) was added via cannula over a flame dried Schlenk previously charged with phthalimide (3.40 g, 22.9 mmol), Cs₂CO₃ (6.99 g, 21.5 mmol) and dimethoxyethane (36 ml). The mixture was heated at 85 °C for 45 minutes. The crude was treated by adding HCl 1M (15 ml), extracted with EtOAc (3 x 20 ml), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **125a** (3.07 g, 75%) as a white solid.

[α]_D²⁰ = -73.5 (c=0.5, CHCl₃)

Mp: 163 - 166 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.86 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 7.76 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 5.92 (ddd, *J* = 10.5, 2.5, 1.0 Hz, 1H), 5.83 (dd, *J* = 10.5, 1.0 Hz, 1H), 5.07 (ddd, *J* = 7.0, 6.0, 2.5 Hz, 1H), 4.57 (m, 2H), 4.07 (ddd, *J* = 13.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 4.03 (dd, *J* = 13.0, 10.5 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 13.0, 10.5 Hz, 1H).

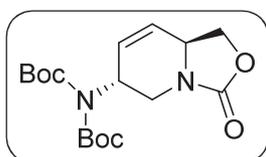
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 167.5 (CO), 157.2 (CO), 134.3 (CH), 131.6 (C), 128.6 (CH), 127.2 (CH), 123.5 (CH), 67.7 (CH₂), 51.8 (CH), 43.1 (CH), 39.9 (CH₂).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 1753, 1713, 1385, 1063, 719

HRMS (ES): calcd. for C₁₅H₁₃N₂O₄ : 285.0875, found 285.0872

EA: Anal. Calcd. For C₁₅H₁₂N₂O₄: C, 63.38%; H, 4.26%; N, 9.85%; found C, 63.24%; H, 4.43%; N, 9.80%.

8.2.6. di-*tert*-Butyl((6*R*,8*aS*)-3-oxo-1,5,6,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)carbamate (**125b**)



Method A

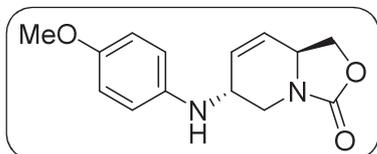
General procedure for allylic palladium substitution was carried out with **124a** (55 mg, 0.28 mmol), [Pd(μ³-C₃H₅)Cl] (8 mg, 0.02 mmol), dppe (17 mg, 0.04 mmol), di-*tert*-butyl-iminodicarboxylate (186 mg, 0.84 mmol) and THF (4 ml). After 3 h, workup and purification using SiO₂.TEA (2.5 % v/v) with hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate, just starting material was recovered.

Method B

To a suspension of NaH (17 mg, 0.66 mol) in DMF (1.5 mL) was added di-*tert*-butyl-iminodicarboxylate (117 mg, 0.53 mmol) and the mixture was heated at 50°C. Then, a solution

of **124a** (52 mg, 0.27 mmol), $[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]$ (8 mg, 0.02 mmol) and dppe (16 mg, 0.04 mmol) in DMF (3 mL) was added via cannula and the solution was stirred at 50°C for 16h with no advance.

8.2.7. (6*R*,8*aS*)-6-((4-Methoxyphenyl)amino)-5,6-dihydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(8*aH*)-one (**125c**)



General procedure for allylic palladium substitution was carried out with **124a** (45 mg, 0.23 mmol), $[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]$ (6.5 mg, 0.02 mmol), dppe (14 mg, 0.03 mmol), 4-methoxyaniline (85 μl , 0.68 mmol) and THF (6 ml). After 3 h, workup and purification using $\text{SiO}_2\cdot\text{TEA}$ (2.5 % v/v) with hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate, **125c** (18 mg, 30%) was obtained as a slightly yellow oil.

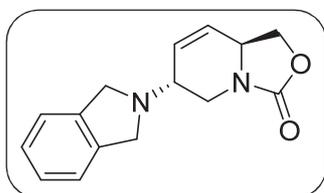
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 6.79 (m, 2H), 6.64 (m, 2H), 5.96 (dq, $J = 10.5, 2.0$ Hz, 1H), 5.78 (dt, $J = 10.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.45 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.33 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.98 (dd, $J = 8.5, 6.0$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.73 (dd, $J = 13.0, 10.0$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 157.5 (CO), 152.9 (C), 139.8 (C), 131.7 (CH), 126.8 (CH), 115.2 (CH), 115.1 (CH), 67.7 (CH_2), 55.7 (CH_3), 52.5 (CH), 47.3 (CH), 44.3 (CH_2)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3340, 1744, 1512, 1418, 1233

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: 261.1234, found 261.1232

8.2.8. (6*R*,8*aS*)-6-(Isoindolin-2-yl)-5,6-dihydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(8*aH*)-one (**125d**)



General procedure for allylic palladium substitution was carried out with **124a** (302 mg, 1.5 mmol), $[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]$ (42 mg, 0.1 mmol), dppe (92 mg, 0.2 mmol), isoindoline (356 μl , 3.0 mmol) and THF (12 ml). After 3 h, workup and purification using $\text{SiO}_2\cdot\text{TEA}$ (2.5 % v/v) with hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate, **125d** (310 mg, 79%) was obtained

as a white solid.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -45.7$ ($c=0.8$, CHCl_3)

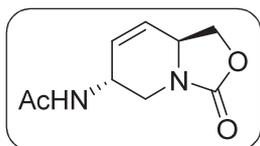
Mp: 69 - 71 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.22 (s, 4H), 6.09 (dq, $J = 10.5, 2.0$ Hz, 1H), 5.84 (dt, $J = 10.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.50 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.18 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H), 4.15 - 4.06 (m, 4 H), 3.97 (dd, $J = 8.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.02 (dd, $J = 13.0, 10.0$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 157.6 (CO), 139.1 (C), 130.0 (CH), 127.2 (CH), 126.9 (CH), 122.4 (CH), 67.7 (CH_2), 55.5 (CH_2), 54.8 (CH), 52.5 (CH), 41.7 (CH_2).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 1734, 1417, 1235, 1061, 998

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: 257.12845, found 257.12837

8.2.9. *N*-((6*R*,8*aS*)-3-Oxo-3,5,6,8*a*-tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (129**)**

To a solution of **125a** (903 mg, 3.2 mmol) in ethanol (25 ml) was added hydrazine monohydrate (470 μ l, 9.5 mmol). The mixture was heated at reflux for 1h. Solvent was removed under reduced pressure and the crude redissolved in 2:1 mixture of CH_2Cl_2 :pyridine (20 ml). Acetic anhydride (1.44 ml, 10.2 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 16 h. Then solvent was removed in vacuo and the crude purified in silica gel using CH_2Cl_2 /methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% CH_2Cl_2 to give **129** (614 mg, 98%) as a white solid

$[\alpha]_D^{20} = -54.4$ ($c=0.585$, CH_3OH)

Mp: 147-150 $^\circ$

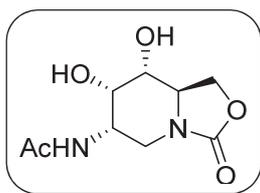
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ /ppm): 5.89 (ddd, $J = 10.5, 2.5, 2.0$ Hz, 1H), 5.77 (ddd, $J = 10.5, 2.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.53 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 4.06 (ddd, $J = 13.0, 6.5, 1.0$ Hz, 1H), 4.00 (dd, $J = 8.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.0, 10.0$ Hz, 1H), 1.96 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ /ppm): 173.0 (CO), 159.8 (CO), 130.7 (CH), 128.9 (CH), 69.4 (CH_2), 53.7 (CH), 43.9 (CH), 43.5 (CH_2), 22.5 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 2923, 1742, 1660, 1494, 1380, 1079

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$: 197.09207, found 197.09217

EA: Anal. Calcd. For $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 55.09%; H, 6.16%; N, 14.28%; found C, 54.82%; H, 6.13%; N, 14.26%.

8.2.10. *N*-((6*S*,7*S*,8*R*,8*aR*)-7,8-Dihydroxy-3-oxohexahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (132**)****Method A: Non-Asymmetric Dihydroxylation**

To a solution of **129** (98 mg, 0.5 mmol) in acetone: H_2O 10:1 (8 ml) was added *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (150 mg, 1.2 mmol) and $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (18 mg, 10 %) and the solution was stirred at room temperature until no starting material was observed. Then $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (130 mg, 0.8 mmol) was added and the crude was stirred for 30 minutes. MgSO_4 was added to the crude and then filtered through Celite and washed with acetone. The crude was purified in silica gel using CH_2Cl_2 /methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% CH_2Cl_2 to give **132** (61 mg, 53%) as a white solid.

Method B: Sharpless Asymmetric Dihydroxylation

General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using $(\text{DHQD})_2\text{Phal}$ (2 mg, 1%), K_2OsO_4 (1 mg, 1%), K_2CO_3 (106 mg, 0.76 mmol), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (254 mg, 0.76 mmol), $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ (25 mg, 0.25 mmol) and **129** (50 mg, 0.25 mmol) in $^t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (4 mL). After treatment with Na_2SO_3 (0.3 g) and corresponding work-up NRM analysis showed a 2.5:1 *allo:galacto* mixture of diols.

Same procedure using (DHQ)₂AQN instead of (DHQ)₂Phal gave a 2:1 *allo:galacto* mixture of diols were major compound could be isolated (14 mg, 25%).

$[\alpha]^{20}_D = -12.6$ (c=0.26, CH₃OH)

Mp: 219-222°C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.47 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 8.5, 4.5 Hz, 1H), 3.95 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.87 (m, 2H), 3.61 (dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 10.0, 2.5 Hz, 1H), 3.05 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H), 1.98 (s, 3H).

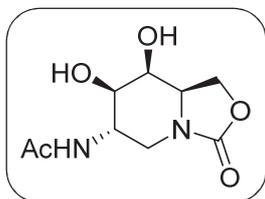
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 173.0 (CO), 159.4 (CO), 72.3 (CH), 71.4 (CH), 67.5 (CH₂), 54.5 (CH), 49.4 (CH), 39.5 (CH₂), 22.6 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3386, 1737, 1715, 1630, 1426, 1244, 1079, 1017

HRMS (ES): calcd. For C₉H₁₅N₂O₅: 231.09755, found 231.09762

EA: Anal. Calcd. For C₉H₁₄N₂O₅: C, 46.95%; H, 6.13%; N, 12.17%; found C, 47.03%; H, 6.21%; N, 12.21%.

8.2.11. *N*-((6*S*,7*R*,8*S*,8*aR*)-7,8-Dihydroxy-3-oxohexahydro-3H-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (**133**)



Method A: Non-Asymmetric Dihydroxylation

To a solution of **129** (98 mg, 0.5 mmol) in acetone:H₂O 10:1 (8 ml) was added *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (150 mg, 1.2 mmol) and K₂OsO₄·2H₂O (18 mg, 10 %) and the solution was stirred at room temperature until no starting material was observed. Then Na₂S₂O₃ (130 mg, 0.8 mmol) was added and the crude was stirred for 30 minutes. MgSO₄ was added to the crude and then filtered over Celite and washed with acetone. The crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% CH₂Cl₂ to give **133** (15 mg, 13%) as a white solid.

Method B: Sharpless Asymmetric Dihydroxylation

General procedure for Sharpless Asymmetric Dihydroxylation was carried out using (DHQD)₂Phal (2 mg, 1%), K₂OsO₄ (1 mg, 1%), K₂CO₃ (106 mg, 0.76 mmol), K₃[Fe(CN)₆] (254 mg, 0.76 mmol), CH₃SO₂NH₂ (25 mg, 0.25 mmol) and **129** (50 mg, 0.25 mmol) in ^tBuOH:H₂O 1:1 (4 mL). After treatment with Na₂SO₃ (0.3 g) and corresponding work-up NRM analysis showed a 1:2 *allo:galacto* mixture of diols.

Same procedure using (DHQD)₂AQN instead of (DHQ)₂Phal gave a 1:2.3 *allo:galacto* mixture of diols were major compound could be isolated (20 mg, 30%).

$[\alpha]^{20}_D = +24.3$ (c=0.13, H₂O)

Mp: 282-284°C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.37 (s, 1H), 4.36 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.82 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 10.5, 2.0 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 13.0, 11.0 Hz, 1H), 1.98 (s, 3H).

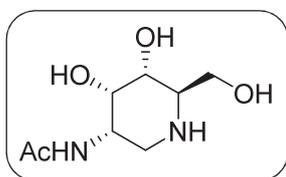
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 174.8 (CO), 159.9 (CO), 72.8 (CH), 69.9 (CH), 64.9 (CH₂), 57.9 (CH), 47.3 (CH), 43.4 (CH₂), 22.9 (CH₃)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3314, 1733, 1655, 1533, 1456, 1437, 1104

HRMS (ES): calcd. For C₉H₁₅N₂O₅: 231.09755, found 231.09753

EA: Anal. Calcd. For C₉H₁₄N₂O₅: C, 46.95%; H, 6.13%; N, 12.17%; found C, 47.02%; H, 6.25%; N, 11.83%.

8.2.12. *N*-((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (**130**)



To a solution of **132** (47 mg, 0.2 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (5 ml) was added NaOH 6M (0.34 ml, 2.0 mmol) and the solution was heated at reflux until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol/NH₃ 73:25:2 to give **130** (17 mg, 40%) as a white solid.

[α]²⁰_D = + 24.4 (c=0.14, CH₃OH)

Mp: 170-172 °C

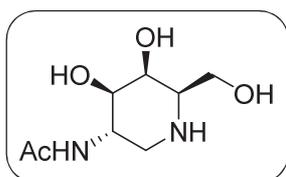
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.03 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.81 (dd, *J* = 11.0, 3.0 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, 1H), 3.17 (ddd, *J* = 11.0, 5.5, 2.5 Hz, 1H), 3.00 – 2.85 (m, 3H), 1.92 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 179.2 (CO), 70.00 (CH), 69.8 (CH), 61.9 (CH₂), 56.7 (CH), 51.2 (CH), 43.4 (CH₂), 23.4 (CH₃)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3270, 2930, 1560, 1409, 1078, 1014

HRMS (ES): calcd. For C₈H₁₇N₂O₄: 205.11828, found 205.11832

8.2.13. *N*-((3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (**14**)



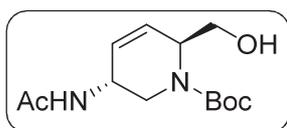
To a solution of **133** (10 mg, 0.04 mmol) in MeOH:H₂O 9:1 (5 ml) was added NaOH 6M (0.072 ml, 0.43 mmol) and the solution was heated at reflux until no starting material was observed. Solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol/NH₃ 73:25:2 to give **14** (3.5 mg, 38%) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ/ppm): 4.08 (s, 1H), 4.02 (dt, *J* = 11.0, 4.0 Hz, 1H), 3.67 (m, 4H), 3.15 (dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz, 1H), 2.81 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.43 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H).

HRMS (ES): calcd. For C₈H₁₇N₂O₄: 205.11828, found 205.11829

Spectral data consistent with the already published at *Chemistry Eur. J.* **2012**, *18*, 9341-9359

8.2.14. (2*S*,5*R*)-*tert*-Butyl-5-acetamido-2-(hydroxymethyl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**134**)



To a solution of **129** (320 mg, 1.63 mmol) in acetone:water 10:1 (25 mL) was added NaOH 6M (2.72 mL, 16.3 mmol) and the mixture was heated at reflux for 7h. After cooling to rt, the crude was neutralized with HCl(c) until pH 8 and solvents were removed *in vacuo* to give a white solid that was redissolved in EtOAc:aqueous saturated NaHCO₃ 3:1 (20 mL). Boc₂O (791 mg, 3.58 mmol) was added and the mixture heated at reflux 16h. The mixture was extracted with EtOAc (3x15 mL), washed with water (1x 20mL), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% MeOH to give **134** (361 mg, 80%) as a white solid.

[α]_D²⁰ = -115.5 (c=0.215, CHCl₃)

Mp: 65 -68 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.08 – 5.87 (m, 2H), 5.68 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.33 (m, 1H), 4.22 (dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.13 (dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

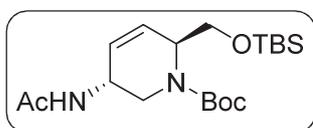
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.5 (CO), 156.3 (CO), 129.7 (CH), 126.4 (CH), 80.6 (C), 63.5 (CH₂), 53.9 (CH), 43.2 (CH) 43.2 (CH₂), 28.4 (CH₃), 23.1 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3288, 2968, 2917, 1675, 1653, 1422, 1366, 1173, 1133

HRMS (ES): calcd. For C₁₃H₂₃N₂O₄: 271.16523, found 271.16505

EA: Anal. Calcd. For C₁₃H₂₂N₂O₄·²/₃H₂O: C, 55.30%; H, 8.33%; N, 9.92%; found C, 55.25%; H, 8.01%; N, 10.07%.

8.2.15. *tert*-Butyl (3*R*,6*S*)-3-acetamido-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**137a**)



Compound **134** (70 mg, 0.26 mmol), TBSCl (61 mg, 0.39 mmol) and imidazole (35 mg, 0.52 mmol) were disposed in a 25 mL round bottom flask, dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and the reaction stirred at rt for 2 h. Solvents were removed *in vacuo* and the crude was

purified in SiO₂-TEA (2,5 % v/v) using hexane/ethyl acetate 30:70 to obtain **137a** (75 mg, 74 %) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = -150.3$ (c=0.11, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.95 (m, 2H), 4.52 (br, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.18 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.18 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.02 (s, 6H).

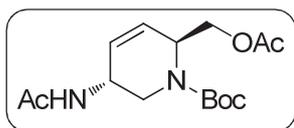
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.3 (CO), 155.4 (CO), 154.9* (CO), 131.4 (CH), 129.6* (CH), 126.0 (CH), 125.4* (CH), 80.1 (C), 79.7* (C), 63.6 (CH₂), 53.9 (CH), 52.9* (CH), 44.1 (CH₂), 43.3 (CH), 28.4 (CH₃), 25.8 (CH₃), 23.1 (CH₃), 18.1 (C), -5.6 (CH₃)

*Rotamer signal

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2962, 2929, 1693, 1656, 1421, 1365, 1133, 1104

HRMS (ES): calcd. For C₁₉H₃₆N₂O₄Si: 385.25171, found 385.25145

8.2.16. *tert*-Butyl (3*R*,6*S*)-3-acetamido-6-(acetoxymethyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**137b**)



To a solution of **134** (578 mg, 2.14 mmol) in CH₂Cl₂ (32 mL) was added pyridine (0.45 mL, 5.34 mmol) and acetic anhydride (0.61 mL, 5.77 mmol) and the solution was stirred at rt for 3 h. Then water (10 mL) was added and the crude extracted with CH₂Cl₂ (3x15 mL), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 10% MeOH to give **137b** (572 mg, 86%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = -171.1$ (c=0.35, CHCl₃)

Mp: 142-143 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.02 (m, 1H), 5.88 (m, 1H), 5.53 (d, 1H), 4.74 (d, 1H), 4.39 (m, 1H), 4.22 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.11 (dd, *J* = 13.5, 3.0 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.6 (CO), 169.3 (CO), 154.8 (CO), 129.2 (CH), 127.6 (CH), 126.8* (CH), 80.5 (C), 80.1* (C), 63.3 (CH₂), 63.1* (CH₂), 51.2 (CH), 50.2* (CH), 43.1 (CH), 42.1 (CH₂), 28.3 (CH₃), 23.0 (CH₃), 20.7 (CH₃)

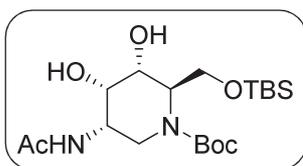
*Rotamer signal

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2968, 1751, 1693, 1661, 1418, 1367, 1239, 1136

HRMS (ES): calcd. For C₁₅H₂₅N₂O₅: 313.17580, found 313.17587

EA: Anal. Calcd. For C₁₅H₂₄N₂O₅: C, 57.68%; H, 7.74%; N, 8.97%; found C, 57.77%; H, 7.82%; N, 8.81%.

8.2.17. *tert*-Butyl-(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-5-Acetamido-2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydropiperidine-1-carboxylate (**139a**)



Method A: Non-Asymmetric Dihydroxylation

To a solution of **137a** (55 mg, 0.14 mmol) in acetone:water 10:1 (4 mL) was added *N*-Methylmorpholine-*N*-oxide (43 mg, 0.36 mmol) and $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$ (6.3 mg, 12%) and the solution was stirred 2.5 d at rt. $Na_2S_2O_3$ (40 mg) and $MgSO_4$ was added and the reaction was stirred for 1 h and filtered over Celite. Solvents were removed *in vacuo* and the crude was purified in silica gel using CH_2Cl_2 /methanol increasing polarity ratio from 0 to 10% MeOH to give **139a** (44 mg, 74%) as a 26:1 diastereomers mixture with colorless oil aspect.

Method B: Sharpless Asymmetric Dihydroxylation

(DHQD)₂AQN (1.5 mg, 1%), $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$ (0.5 mg, 1%), $K_3[Fe(CN)_6]$ (140 mg, 0.42 mmol) and K_2CO_3 (58 mg, 0.42 mmol) were dissolved in water (1.5 mL) and cooled at 0°C. Methanesulfonamide (14 mg, 0.14 mmol) was added in one portion. After 5 min, a solution of **137a** (54 mg, 0.14 mmol) in ACN (1.5 mL) was added. The mixture was vigorously stirred at 0°C for 20 min, then allowed to warm to rt and stirred 2d. $Na_2S_2O_3$ (150 mg) was added. After 30 min, the crude was extracted with EtOAc (3 x 5 mL), dried over $MgSO_4$ and purified in silica gel using CH_2Cl_2 /methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% MeOH to give **139a** (22 mg, 48%) as a colorless oil with more than 95:5 diastereoisomeric ddiastereoisomeric ratio.

Same procedure using (DHQ)₂AQN instead of (DHQD)₂AQN gave a 8:1 *allo:galacto* mixture of diols were major compound **139a** could be isolated (24 mg, 42%).

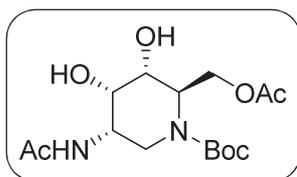
¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 6.92 (br, 1H), 4.42 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 1H), 4.16 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.97 (t, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.72 (m, 2H), 3.13 (dd, $J = 14.0, 2.5$ Hz, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 6H).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): 171.4 (CO), 156.2 (CO), 80.4 (C), 69.7 (CH), 67.1 (CH), 62.4 (CH₂), 58.2 (CH), 48.8 (CH), 44.1 (CH₂), 28.3 (CH₃), 25.8 (CH₃), 23.5 (CH₃), 18.1 (C), -5.58 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3373, 2929, 1693, 1653, 1420, 1155, 1103

HRMS (ES): calcd. For $C_{19}H_{39}N_2O_6Si$: 419.25719, found 419.25686

8.2.18. *tert*-butyl-(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-3,4-dihydropiperidine-1-carboxylate (**139b**)



Method A: Non-Asymmetric Dihydroxylation

To a solution of **137b** (925 mg, 2.96 mmol) in acetone:water 10:1 (27 mL) was added *N*-Methylmorpholine-*N*-oxide (751 mg, 6.21 mmol) and $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$ (110 mg, 10%) and the solution was stirred 1 d at rt. $Na_2S_2O_3$ (500 mg) and $MgSO_4$ was added and the reaction was stirred for 1 h and filtered over Celite. Solvents were removed *in*

vacuo and the crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% MeOH to give **139b** (1.01 g, 97%) as a 12:1 diastereoisomers mixture with white solid aspect.

Method B: Sharpless Asymmetric Dihydroxylation

(DHQD)₂Phal (6.1 mg, 5%), K₂OsO₄·2H₂O (1.4 mg, 2.5 %), K₃[Fe(CN)₆] (153 mg, 0.46 mmol) and K₂CO₃ (64 mg, 0.46 mmol) were dissolved in water (1.5 mL) and cooled at 0°C. Methanosulfonamide (15 mg, 0.15 mmol) was added in one portion. After 5 min, a solution of **137b** (48 mg, 0.15 mmol) in ^tBu-OH (1.5 mL) was added. The mixture was vigorously stirred at 0°C for 20 min, then allowed to warm to rt and stirred 1d. Na₂S₂O₃ (150 mg) was added. After 30 min, the crude was extracted with EtOAc (3 x 5mL), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% MeOH to give **139b** (27 mg, 51%) as a 17:1 diastereoisomers mixture with white solid aspect.

[α]²⁰_D = +13.5 (c=0.25, CHCl₃)

Mp: 47 - 49 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.02 (br, 1H), 4.75 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.20 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 4.17 (s, 1H), 4.15 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 1H), 3.82 (dd, *J* = 4.5, 3.0 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 14.5, 2.5 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

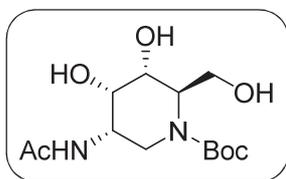
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.4 (CO), 170.6 (CO), 156.1 (CO), 80.7 (C), 68.9 (CH), 66.6 (CH), 60.7 (CH₂), 55.8 (CH), 48.8 (CH), 42.9 (CH₂), 28.3 (CH₃), 23.4 (CH₃), 20.8 (CH₃)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3377, 2968, 1741, 1689, 1431, 1366, 1254, 1146

HRMS (ES): calcd. For C₁₅H₂₇N₂O₇: 347.18128, found 347.18134

EA: Anal. Calcd. For C₁₅H₂₆N₂O₇·H₂O: C, 49.44%; H, 7.75%; N, 7.69%; found C, 49.75%; H, 7.71%; N, 7.74%.

8.2.19. tert-Butyl (2R,3R,4S,5S)-5-acetamido-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (138)



To a solution of **134** (50 mg, 0.18 mmol) in acetone:water 10:1 (5 mL) was added *N*-Methylmorpholine-*N*-oxide (47 mg, 0.39 mmol) and K₂OsO₄·2H₂O (8.2 mg, 12%) and the solution was stirred 1 d at rt. Na₂S₂O₃ (45 mg) and MgSO₄ was added and the reaction was stirred for 1 h and filtered over Celite. Solvents were remove *in vacuo* and the crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 20% MeOH to give **138** (27 mg, 48%) as a white solid and one diastereoisomer.

$[\alpha]_D^{20} = +28.6$ (c=0.31, CH₃OH)

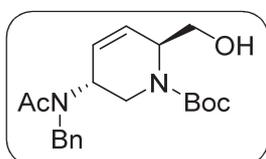
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.45 (tt, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 4.24 (ddd, *J* = 14.0, 3.0, 2.0 Hz, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.84 (dd, *J* = 4.5, 3.0 Hz, 1H), 3.63 (m, 2H), 3.01 (dd, *J* = 14.0, 2.0 Hz, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.45 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 173.0 (CO), 158.0 (CO), 81.2 (C), 70.3 (CH), 66.6 (CH), 60.5 (CH, CH₂), 51.4 (CH), 43.9 (CH₂), 28.6 (CH₃), 23.3 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3367, 2975, 1658, 1425, 1366, 1147

HRMS (ES): calcd. For C₁₃H₂₅N₂O₆: 305.17071, found 305.17062

8.2.20. *tert*-Butyl (3*R*,6*S*)-3-(*N*-benzylacetamido)-6-(hydroxymethyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**142**)



To a suspension of NaH (18 mg, 0.71 mmol), ^tBuONa (3.4 mg, 0.03 mmol) and **129** (70 mg, 0.35 mmol) in DMF (3 mL) was added BnBr (108 μL, 0.89 mmol) and the crude was stirred 4h at rt. After water (3mL) addition, the crude was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5mL) and solvents were removed *in vacuo*. The obtained yellow oil was redissolved in MeOH:H₂O 9:1 (8mL) and NaOH 6M (0.85 mL, 5.09 mmol) was added. The mixture was stirred at reflux for 16h. After cooling to rt, HCl(c) was added until a pH of 7-8 was achieved. Solvents were removed *in vacuo* and the obtained white solid was redissolved in EtOAc:aq NaHCO₃ sat (12 mL). Boc₂O (247 mg, 1.12 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 4h. The crude was extracted with EtOAc (3x 5mL), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **142** (65 mg, 48%) as a colorless oil in 3 steps.

$[\alpha]_D^{20} = -169.7$ (c=0.18, CH₃OH)

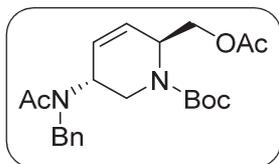
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.91 (dd, *J* = 10.5, 4.0 Hz, 1H), 5.79 (br, 1H), 5.09 (br, 1H), 4.64 (br, 1H), 4.53 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.23 (dd, *J* = 14.5, 4.0 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 171.9 (CO), 138.4 (C), 131.0 (CH), 128.8 (CH), 127.1 (CH), 125.6 (CH), 125.4 (CH), 80.6 (C), 63.6 (CH₂), 54.0 (CH), 48.9 (CH₂), 47.8 (CH), 43.6 (CH₂), 28.4 (CH₃), 22.4 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3404, 1691, 1648, 1450, 1365, 1170, 1027

HRMS (ES): calcd. For C₂₀H₂₉N₂O₄: 361.2122, found 361.2122

8.2.21. *tert*-Butyl (3*R*,6*S*)-6-(acetoxymethyl)-3-(*N*-benzylacetamido)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**143**)



To a solution of **142** (63 mg, 0.17 mmol) and DMAP (8 mg, 0.07 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) was added pyridine (37 μL, 0.44 mmol) and Ac₂O (40 μL, 0.38 mmol) and the solution was allowed to stir overnight. Then water (2 mL) was added and the crude was extracted with CH₂Cl₂ (3x5 mL), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **143** (51 mg, 72%) as a colourless oil.

$[\alpha]_D^{20} = -177.6$ (c=0.2, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.86 (m, 2H), 5.08 (br, 1H), 4.83 (br, 1H), 4.52 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 4.30 (m, 1H), 4.13 (s, 2H), 3.22 (dd, *J* = 14.5, 4.0 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

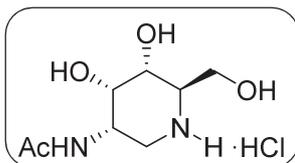
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 172.0 (CO), 170.7 (CO), 154.5 (CO), 138.4 (C), 130.8 (CH), 129.8* (CH), 128.7 (CH), 127.1 (CH), 126.3 (CH), 126.0* (CH), 125.4 (CH), 80.1 (C), 63.3 (CH₂), 51.0 (CH), 50.3* (CH), 49.0 (CH₂), 48.5* (CH₂), 47.8 (CH), 46.6* (CH), 43.7 (CH₂), 42.8* (CH₂), 28.4 (CH₃), 22.4 (CH₃), 20.8 (CH₃).

* Rotamers signals

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 2975, 1744, 1694, 1649, 1417, 1365, 1237, 1171

HRMS (ES): calcd. For C₂₂H₃₁N₂O₅: 403.2227, found 403.2228

8.2.22. *N*-((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide hydrochloride (**130**·HCl)



Starting from **139b**:

139b (39 mg, 0.11 mmol) was dissolved in a saturated methanol solution of NH₃ (2 mL) and stirred for 2h. Solvent was removed *in vacuo* and the crude redissolved in HCl 1,25M MeOH solution (2.5 mL) and stirred for 3h. Solvent was removed *in vacuo* and the crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂/methanol/NH₃ increasing polarity ratio from 99:0:1 to 85:13:2 to give **130**·HCl (21 mg, 91%) as a white solid.

Starting from **139a**:

139a (19 mg, 0.06 mmol) was dissolved in HCl 1,25M MeOH solution (2.5 mL) and stirred 3h. Solvent was removed under low pressure to give **130**·HCl (11 mg, 94%) with no need of extra purification.

$[\alpha]_D^{20} = +3.0$ (c=0.13, CH₃OH)

Mp: 45 -48 °C

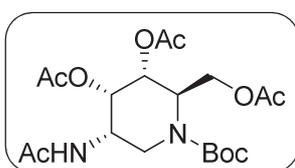
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.21 (dt, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 10.5, 3.0 Hz, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.13 (s, 1H), 3.11 (s, 1H), 2.02 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 173.4 (CO), 69.7 (CH), 67.4 (CH), 59.0 (CH₂), 56.7 (CH), 47.8 (CH), 41.5 (CH₂), 22.4 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3308, 2936, 1652, 1546, 1533, 1367, 1079, 1034

HRMS (ES): calcd. For C₈H₁₇N₂O₄: 205.11828, found 205.11832

8.2.23. (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (**146**)



To a solution of compound **139b** (380 mg, 1.1 mmol) in CH₂Cl₂ (13 mL) was added pyridine (0.27 mL, 3.3 mmol) and acetic anhydride (0.28 mL, 2.4 mmol) dropwise. The solution was allowed to stir for 16 h. Solvents were removed in vacuo and the crude purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/methanol increasing polarity ratio from 0 to 10% MeOH to give **146** (432 mg, 91%) as a

sticky white foam.

$[\alpha]_D^{20} = +14.1$ (c=0.35, CHCl₃)

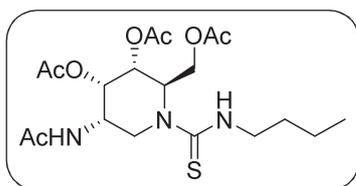
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.33 (br, 1H), 5.25 (m, 1H), 5.14 (dd, *J* = 4.5, 3.5 Hz, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.31 (m, 2H), 4.18 (dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 14.5, 2.0 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.2 (CO), 169.5 (CO), 169.4 (CO), 168.7 (CO), 155.3 (CO), 80.9 (C), 68.9 (CH), 66.0 (CH), 60.6 (CH₂), 53.9 (CH), 46.2 (CH), 43.2 (CH₂), 28.2 (CH₃), 23.4 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.6 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 2975, 1747, 1691, 1412, 1368, 1228, 1152, 1059

HRMS (ES): calcd. for C₁₉H₃₁N₂O₉: 431.20241, found 431.20283

8.2.24. (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(butylcarbamothioyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (**147a**)



To a solution of **146** (63 mg, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added TFA (0.35 mL) and the solution was stirred at rt for 1h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL) and TEA (164 μL, 1.17 mmol) and butyl isothiocyanate (54 μL, 0.44 mmol) were added. The solution was stirred at reflux for 4h. After removal of solvents, the crude was purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **147a** (47 mg, 73%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = -74.6$ ($c=0.25$, CHCl_3)

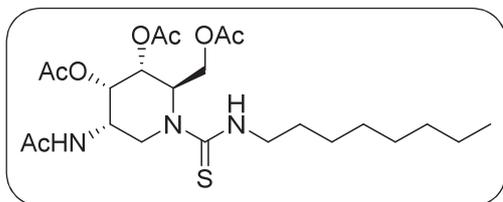
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 6.65 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 5.35 (br, 1H), 5.25 (m, 2H), 4.89 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J = 11.5, 7.0$ Hz, 2H), 4.19 (dd, $J = 11.5, 7.0$ Hz, 1H), 3.64 (m, 2H), 3.30 (dd, $J = 15.0, 3.0$ Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.61 (m, 2H), 1.39 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 185.4 (CS), 170.9 (CO), 170.3 (CO), 169.6 (CO), 169.2 (CO), 68.8 (CH), 66.4 (CH), 61.4 (CH_2), 57.7 (CH), 47.0 (CH), 46.5 (CH_2), 45.5 (CH_2), 30.9 (CH_2), 23.4 (CH_3), 20.9 (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.6 (CH_3), 20.0 (CH_2), 13.7 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3327, 2957, 1747, 1666, 1530, 1369, 1222, 1058

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: 446.19555, found 446.19593

8.2.25. (2R,3R,4S,5S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(octylcarbamothioyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (**147b**)



To a solution of **146** (110 mg, 0.26 mmol) in CH_2Cl_2 (4 mL) was added TFA (0.61 mL) and the solution was stirred at rt for 2h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) and TEA (213 μL , 1.53 mmol) and octyl isothiocyanate (128 μL , 0.64 mmol) were added.

The solution was stirred at reflux for 4h. After removal of solvents, the crude was purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **147b** (90 mg, 70%) as a colorless oil.

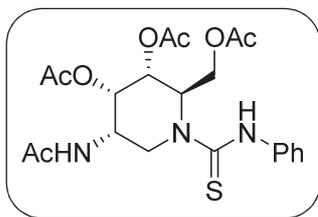
$[\alpha]_D^{20} = -66.4$ ($c=0.11$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 6.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 5.34 (br, 1H), 5.25 (m, 2H), 4.89 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J = 12.0, 7.0$ Hz, 2H), 4.19 (dd, $J = 12.0, 7.0$ Hz, 1H), 3.62 (m, 2H), 3.29 (dd, $J = 15.0, 3.0$ Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.61 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.30 (m, 10H), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 185.4 (CS), 170.9 (CO), 170.3 (CO), 169.6 (CO), 169.2 (CO), 68.8 (CH), 66.4 (CH), 61.4 (CH_2), 57.8 (CH), 47.0 (CH), 46.9 (CH_2), 45.5 (CH_2), 31.7 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.9 (CH_2), 26.9 (CH_2), 23.4 (CH_3), 22.6 (CH_2), 20.9 (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.6 (CH_3), 14.0 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3359, 2917, 1747, 1661, 1529, 1368, 1229, 1053

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: 502.2581, found 502.2586

8.2.26. (2R,3R,4S,5S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(phenylcarbamothioyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (147c)


To a solution of **146** (120 mg, 0.28 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TFA (0.65 mL) and the solution was stirred at rt for 2h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and TEA (186 μL, 1.36 mmol) and phenyl isothiocyanate (103 μL, 0.83 mmol) were added. The solution was stirred at reflux for 4h. After removal of solvents, the crude was purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **147c** (92 mg, 72%) as a colorless oil.

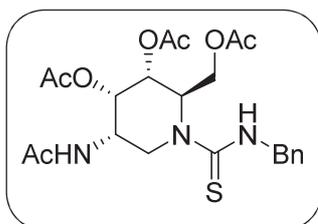
$[\alpha]^{20}_D = -41.4$ (c=0.6, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.26 (s, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 4H), 7.20 (dt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.62 (br, 1H), 5.29 (m, 2H), 4.90 (m, 1H), 4.45 (m, 2H), 4.29 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 15.0, 3.0 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 185.9 (CS), 170.6 (CO), 170.3 (CO), 169.5 (CO), 169.1 (CO), 139.6 (C), 128.8 (CH), 125.8 (CH), 124.6 (CH), 69.0 (CH), 66.2 (CH), 61.5 (CH₂), 58.3 (CH), 47.3 (CH), 46.3 (CH₂), 23.4 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.6 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3346, 1747, 1665, 1523, 1369, 1230, 1060

HRMS (ES): calcd. for C₂₁H₂₈N₃O₇S : 466.1642, found 466.1648

8.2.27. (2R,3R,4S,5S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-1-(benzylcarbamothioyl)piperidine-3,4-diyl diacetate (147d)


To a solution of **146** (96 mg, 0.22 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TFA (0.5 mL) and the solution was stirred at rt for 1h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and TEA (186 μL, 1.36 mmol) and benzyl isothiocyanate (90 μL, 0.67 mmol) were added. The solution was stirred at reflux for 5h. After removal of solvents, the crude was purified in silica gel using hexane/ethyl acetate increasing polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **147d** (88 mg, 82%) as a colourless oil.

$[\alpha]^{20}_D = -61.8$ (c=0.25, CHCl₃)

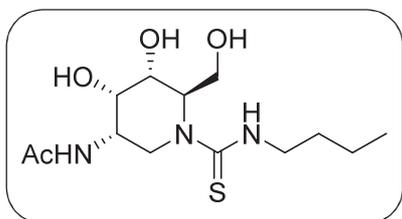
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.39 – 7.28 (m, 5H), 6.63 (m, 2H), 5.46 (br, 1H), 5.24 (m, 2H), 4.98 (dd, *J* = 14.5, 5.5 Hz, 1H), 4.79 (dd, *J* = 14.5, 5.0 Hz, 2H), 4.42 (m, 2H), 4.19 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 15.0, 3.0 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.89 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 185.8 (CS), 170.6 (CO), 170.3 (CO), 169.5 (CO), 169.2 (CO), 137.6 (C), 128.7 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 68.9 (CH), 66.4 (CH), 61.4 (CH₂), 58.3 (CH), 50.4 (CH₂), 47.1 (CH), 45.5 (CH₂), 23.3 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.6 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3308, 1748, 1668, 1532, 1370, 1226, 1059, 1027

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7\text{SNa}$: 502.1618, found 502.1621

8.2.28. *N*-((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1-(Butylcarbamothioyl)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (148a)



Compound **147a** (47 mg, 0.11 mmol) was dissolved in a saturated solution of NH_3 in MeOH (3.5 mL) and was stirred at rt for 20h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography in silica gel using CH_2Cl_2 /methanol increasing polarity ratio from 0 to 15% MeOH to give **148a** (26 mg, 77%) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +2.0$ ($c=0.21$, CH_3OH)

Mp: 57-58 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ /ppm): 5.03 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.99 (dt, $J = 3.0, 1.0$ Hz, 1H), 3.88 (dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 1H), 3.74 (m, 2H), 3.64 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.20 (dd, $J = 14.0, 3.0$ Hz, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.58 (m, 2H), 1.38 (m, 2H), 0.95 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

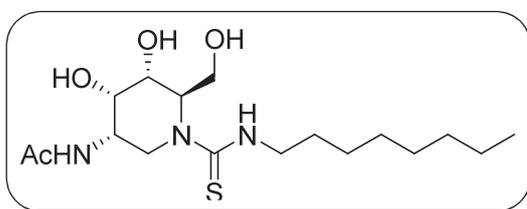
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ /ppm): 186.8 (CS), 173.5 (CO), 70.6 (CH), 67.2 (CH), 65.3 (CH), 60.7 (CH_2), 51.3 (CH), 47.5 (CH_2), 46.9 (CH_2), 32.3 (CH_2), 23.3 (CH_3), 21.1 (CH_2), 14.2 (CH_3).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3341, 2923, 1652, 1538, 1360, 1328, 1085, 1008

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 320.1639, found 320.1640

EA: Anal. Calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 46.27%; H, 8.07%; N, 12.45%; found C, 46.47%; H, 8.25%; N, 12.12%.

8.2.29. *N*-((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-1-(octylcarbamothioyl)piperidin-3-yl)acetamide (148b)



Compound **147b** (72 mg, 0.14 mmol) was dissolved in a saturated solution of NH_3 in MeOH (4 mL) and was stirred at rt for 20h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography in silica gel using CH_2Cl_2 /methanol increasing polarity ratio from 0 to 20% MeOH to give **148b** (46 mg, 85%) as a

white solid.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +3.3$ ($c=0.25$, CH_3OH)

Mp: 84 -86 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.42 – 7.15 (m, 5H), 5.09 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 15.0 Hz, 2H), 4.79 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.01 (td, *J* = 3.0, 2.0 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.25 (dd, *J* = 14.0, 2.0 Hz, 1H), 1.92 (s, 3H).

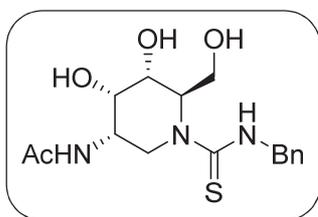
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 187.3 (CS), 173.5 (CO), 140.3 (C), 129.4 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 70.6 (CH), 67.2 (CH), 65.4 (CH), 60.6 (CH₂), 51.4 (CH), 50.5 (CH₂), 47.7 (CH₂), 23.3 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3346, 2924, 1657, 1636, 1535, 1367, 1085

HRMS (ES): calcd. For C₁₇H₃₃N₃O₄S: 376.2265, found 376.2264

EA: Anal. Calcd. For C₁₇H₃₃N₃O₄S: C, 54.37%; H, 8.86%; N, 11.19%; found C, 54.05%; H, 8.88%; N, 11.23%.

8.2.30. *N*-((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1-(Benzylcarbamothioyl)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)piperidin-3-yl)acetamide (148d)



Compound **147d** (88 mg, 0.18 mmol) was dissolved in a saturated solution of NH₃ in MeOH (3.5 mL) and stirred at rt for 20h. Solvent was removed *in vacuo* to give **148d** (92 mg, 92%) as a white solid without extra purification.

[α]_D²⁰ = +11.6 (c=0.22, CH₃OH)

Mp: 164-165 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 5.03 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.99 (td, *J* = 3.0, 1.0 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 4.5, 3.0 Hz, 1H), 3.74 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 3.20 (dd, *J* = 14.5, 2.5 Hz, 1H), 1.60 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.33 (m, 10H), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

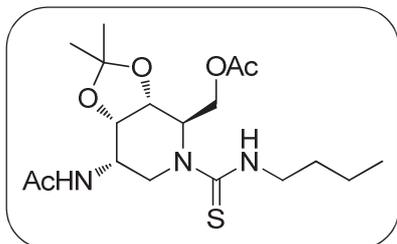
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 186.7 (CS), 173.4 (CO), 70.6 (CH), 67.2 (CH), 65.3 (CH), 60.7 (CH₂), 51.3 (CH), 47.5 (CH₂), 47.2 (CH₂), 33.0 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 30.1 (CH₂), 28.0 (CH₂), 23.7 (CH₂), 23.4 (CH₃), 14.4 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3333, 1661, 1636, 1553, 1531, 1373, 1085, 1002

HRMS (ES): calcd. For C₁₆H₂₄N₃O₄S: 354.1482, found 354.1481

EA: Anal. Calcd. For C₁₆H₂₃N₃O₄S· $\frac{2}{3}$ H₂O: C, 52.59%; H, 6.71%; N, 11.50%; found C, 52.56%; H, 7.06%; N, 11.27%.

8.2.31. ((3a*R*,4*R*,7*S*,7a*S*)-7-Acetamido-5-(butylcarbamothioyl)-2,2-dimethylhexahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridin-4-yl)methyl acetate (150)



To a solution of **149** (57 mg, 0.13 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added TFA (0.31 μL, 3.90 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvents were removed under low pressure and the obtained oil was redissolved in CH₂Cl₂ (4 mL). Then, TEA (110 μL, 0.79 mmol) and butyl isocyanate (49 μL, 0.39 mmol) were added and the reaction was heated at reflux for 4h. H₂O (5 mL) was added and the reaction was

extracted with EtOAc (3x 5mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography in SiO₂.TEA (2.5 % v/v) using hexane/ethyl acetate to give **150** (10 mg, 17%) as a colorless oil.

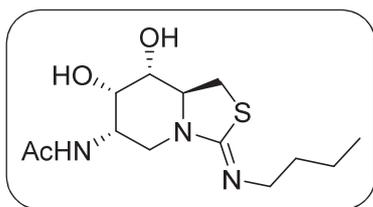
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.84 (br, 1H), 4.55 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 4.45 (m, 2H), 4.39 (dd, *J* = 12.0, 3.5 Hz, 1H), 4.06 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.87 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.66 (m, 2H), 3.19 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.65 (m, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.38 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 182.9 (CS), 169.7 (CO), 109.0 (C), 73.8 (CH), 70.7 (CH), 63.6 (CH₂), 54.3 (CH), 46.4 (CH₂), 45.4 (CH), 43.3 (CH₂), 30.9 (CH₂), 26.1 (CH₃), 23.9 (CH₃), 23.3 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.2 (CH₂), 13.8 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3327, 2925,, 1739, 1661, 1531, 1372, 1219

HRMS (ES): calcd. For C₁₈H₃₂N₃O₅S: 402.2057, found 402.2064

8.2.32. *N*-((6*S*,7*S*,8*R*,8a*S*,*E*)-3-(Butylimino)-7,8-dihydroxyhexahydro-3*H*-thiazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (159a)



Compound **147a** (40 mg, 0.10 mmol) was dissolved in MeOH:H₂O 1:1 mixture (4 mL) and stirred at 70°C for 24h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography in silica gel using CH₂Cl₂/methanol/NH₄OH increasing polarity ratio from 99:1:1 to 80:18:2 to give **159a** (16 mg, 59%) as a white solid.

[α]²⁰_D = +16.4 (c=0.11, CH₃OH)

Mp: 188-190°C

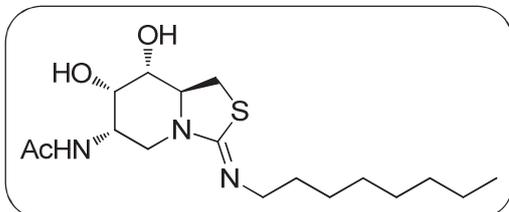
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 3.95 (m, 2H), 3.76 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.45 (dd, *J* = 10.0, 2.5 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J* = 10.5, 6.5 Hz, 1H), 3.15 (m, 2H), 3.06 (dd, *J* = 10.5, 7.5 Hz, 1H), 2.89 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.52 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 172.9 (CO), 162.7 (CN), 72.6 (CH), 71.5 (CH), 61.3 (CH), 55.6 (CH₂), 49.0 (CH), 43.1 (CH₂), 34.3 (CH₂), 31.2 (CH₂), 22.6 (CH₃), 21.5 (CH₂), 14.3 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3319, 2925, 1621, 1547, 1373, 1056

HRMS (ES): calcd. For $C_{13}H_{24}N_3O_3S$: 302.1533, found 302.1532

8.2.33. *N*-((6*S*,7*S*,8*R*,8*aS*,*E*)-3-(Octylimino)-7,8-dihydroxyhexahydro-3*H*-thiazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (159b)



Compound **147b** (54 mg, 0.11 mmol) was dissolved in MeOH:H₂O 1:1 mixture (4 mL) and stirred at 70°C for 24h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography in silica gel using CH₂Cl₂/methanol/NH₄OH increasing polarity ratio from 99:1:1 to 80:18:2 to give **159b** (27 mg, 70%) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = +11.5$ (c=0.13, CH₃OH)

Mp: 180-181°C

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 3.95 (m, 2H), 3.76 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.46 (dd, *J* = 9.5, 2.5 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 10.5, 6.5 Hz, 1H), 3.15 (m, 2H), 3.07 (dd, *J* = 11.0, 7.5 Hz, 1H), 2.90 (dd, *J* = 12.0, 11.0 Hz, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.30 (m, 10H), 0.90 (m, 3H).

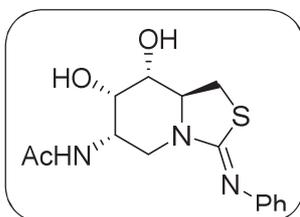
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 172.9 (CO), 162.9 (CN), 72.6 (CH), 71.5 (CH), 61.4 (CH), 55.7 (CH₂), 49.0 (CH), 43.1 (CH₂), 33.0 (CH₂), 32.0 (CH₂), 31.2 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 28.3 (CH₂), 23.7 (CH₂), 22.6 (CH₃), 14.5 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3315, 2923, 1621, 1546, 1443, 1303, 1226, 1057

HRMS (ES): calcd. For $C_{17}H_{32}N_3O_3S$: 358.2159, found 358.2158

EA: Anal. Calcd. For $C_{17}H_{31}N_3O_3S \cdot H_2O$: C, 54.37%; H, 8.86%; N, 11.19%; found C, 54.76%; H, 9.23%; N, 8.18%.

8.2.34. *N*-((6*S*,7*S*,8*R*,8*aS*,*Z*)-7,8-Dihydroxy-3-(phenylimino)hexahydro-3*H*-thiazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (159c)



Compound **147c** (59 mg, 0.13 mmol) was dissolved in MeOH:H₂O 1:1 mixture (5 mL) and stirred at reflux for 24h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography in silica gel using CH₂Cl₂/methanol/NH₄OH increasing polarity ratio from 99:1:1 to 80:18:2 to give **159c** (22 mg, 54%) as a white solid.

$[\alpha]^{20}_D = -11.7$ (c=0.16, CH₃OH)

Mp: 229-231°C

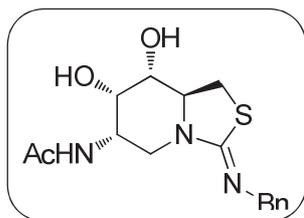
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 7.24 (m, 2H), 7.03 (m, 1H), 6.88 (m, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.96 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.53 (dd, *J* = 10.0, 2.5 Hz, 1H), 3.36 (dd, *J* = 10.0, 6.5 Hz, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.00 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 172.9 (CO), 163.0 (CN), 152.8 (C), 129.8 (CH), 124.5 (CH), 123.3 (CH), 72.7 (CH), 71.5 (CH), 61.4 (CH), 49.0 (CH), 43.0 (CH_2), 31.3 (CH_2), 22.6 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3304, 1616, 1586, 1375, 1250, 1137, 762

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: 322.12199, found 322.12175

8.2.35. *N*-((6*S*,7*S*,8*R*,8*aS*,*Z*)-3-(Benzylimino)-7,8-dihydroxyhexahydro-3*H*-thiazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (**159d**)



Compound **147d** (56 mg, 0.12 mmol) was dissolved in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 mixture (5 mL) and stirred at reflux for 24h. Solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography in silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{methanol}/\text{NH}_4\text{OH}$ increasing polarity ratio from 99:1:1 to 90:9:1 to give **159d** (26 mg, 66%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = +6.8$ ($c=0.2$, CH_3OH)

Mp: 191-192°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 7.28 (m, 4H), 7.20 (m, 1H), 4.41 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.87 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.49 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 11.0, 7.5$ Hz, 1H), 2.98 (m, 1H), 1.97 (s, 3H).

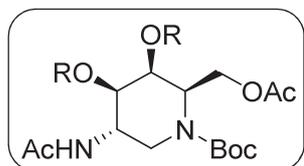
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ/ppm): 172.9 (CO), 164.4 (CN), 141.3 (C), 129.3 (CH), 128.5 (CH), 127.8 (CH), 72.5 (CH), 71.5 (CH), 61.7 (CH), 58.7 (CH_2), 49.0 (CH), 43.1 (CH_2), 31.4 (CH_2), 22.6 (CH_3).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3327, 1612, 1540, 1450, 1380, 1213, 1046, 752

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: 336.13764, found 336.13739

EA: Anal. Calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 57.29%; H, 6.31%; N, 12.53%; found C, 57.73%; H, 6.38%; N, 12.21%.

8.2.36. Attempts for hydroxyl inversion using the Mitsunobu reaction

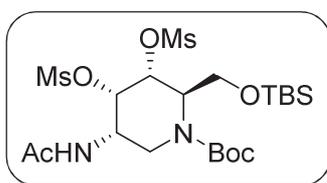


Method A: Classical conditions

A solution of **139b** (1 eq), PPh_3 (4 eq) and either chloroacetic acid or *p*-nitrobenzoic acid (3.8 eq) in THF or toluene was cooled at 0°C. After 10 min, diethyl azodicarboxylate 40% solution in toluene (4 eq) was added dropwise and the reaction was allowed to stir at r.t. or reflux. H_2O was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x) and dried over MgSO_4 and purified in silica gel using hexane/ethyl acetate recovering **139b**.

Method B: Betaine pre-formation

PPh₃ (4 eq) was charged in a previously flamed Schlenk, dissolved in THF and cooled at 0°C. Then, DEAD (4 eq) was added dropwise and the reaction was allowed to stir for 15 min. After that, **139b** (1 eq) was added and the reaction was stirred 15 min more at 0°C followed by the addition of either chloroacetic acid or *p*-nitrobenzoic acid (3.8 eq). The reaction was stirred at 0°C 15 min and then at r.t. or reflux. H₂O was added and the reaction was extracted with EtOAc (3x), dried over MgSO₄ and purified in silica gel using hexane/ethyl acetate recovering **139b**.

8.2.37. tert-butyl (2R,3R,4S,5S)-5-acetamido-2-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3,4-bis((methylsulfonyl)oxy)piperidine-1-carboxylate (160)


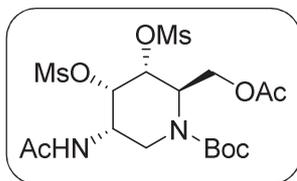
To a solution of **139a** (44 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TEA (44 μL, 0.32 mmol) followed by methanesulfonyl chloride (18 μL, 0.23 mmol) and the reaction was stirred at r.t. during 18h. The reaction was treated with H₂O (5 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3x 5mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography in SiO₂.TEA (2.5 % v/v) using hexane/ethyl acetate to give **160** (17 mg, 28%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.12 (dd, *J* = 4.5, 3.0 Hz, 1H), 4.90 (br, 1H), 4.49 (br, 2H), 4.37 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.25 (dt, *J* = 14.0, 2.5 Hz, 1H), 3.82 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.35 (dt, *J* = 14.0, 2.5 Hz, 1H), 3.11 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), 0.08 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.1 (CO), 155.7 (CO), 80.7 (C), 76.3 (CH), 69.9 (CH), 63.8 (CH₂), 58.5 (CH), 46.8 (CH), 45.2 (CH₂), 43.4 (CH₃), 39.2 (CH₃), 28.3 (CH₃), 25.8 (CH₃), 23.5 (CH₃), 18.0 (C), -5.69 (CH₃), -5.78 (CH₃)

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3372, 2930, 1700, 1660, 1332, 1176, 1151, 839

HRMS (ES): calcd. For C₂₁H₄₂N₂O₁₀S₂SiNa: 597.20949, found 597.20939

8.2.38. tert-Butyl (2R,3R,4S,5S)-5-acetamido-2-(acetoxymethyl)-3,4-bis((methylsulfonyl)oxy)piperidine-1-carboxylate (161)


To a solution of **139b** (68 mg, 0.20 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TEA (104 μL, 0.75 mmol) followed by methanesulfonyl chloride (53 μL, 0.69 mmol) and the reaction was stirred at r.t. during 18h. The reaction was treated with H₂O (5 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3x 5mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography in SiO₂.TEA (2.5 % v/v) using hexane/ethyl acetate

to give **161** (86 mg, 87%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.05 (dd, *J* = 5.0, 3.5 Hz, 1H), 4.97 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.35 (ddd, *J* = 14.5, 2.0 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J*

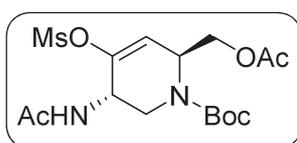
= 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.20 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.16 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.48 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 170.3 (CO), 170.0 (CO), 155.0 (CO), 81.8 (C), 77.4 (CH), 72.3 (CH), 60.8 (CH_2), 55.4 (CH), 46.5 (CH), 43.1 (CH_2), 39.2 (CH_3), 38.7 (CH_3), 28.1 (CH_3), 23.4 (CH_3), 20.6 (CH_3)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 2975, 1745, 1693, 1417, 1365, 1178

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_2$: 503.13638, found 503.13696

8.2.39. *tert*-Butyl (3*S*,6*S*)-3-acetamido-6-(acetoxymethyl)-4-((methylsulfonyl)oxy)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**163**)



A solution of **161** (45 mg, 0.09 mmol), CsOAc (104 mg, 0.54 mmol) and DMAP (11 mg, 0.09 mmol) in toluene (3 mL) was heated at reflux until no starting material was observed by TLC. Solvents were removed under low pressure and the crude was purified by chromatography in SiO_2 .TEA (2.5 % v/v) using hexane/ethyl acetate

to give **163** (21 mg, 57%) as a colorless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 5.91 (d, 1H), 5.85 (br, 1H), 5.02 (br, 1H), 4.82*, 4.66*, 4.50 (br, 1H), 4.31 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 4.22 (dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 6.5, 3.5$ Hz, 1H), 3.24 (dd, $J = 13.5, 3.5$ Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05*, 2.00 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.46*
*Rotámeros

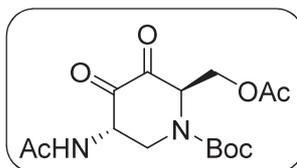
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 170.8 (C), 170.6 (CO), 170.0 (CO), 154.4 (CO), 119.1 (CH), 118.0* (CH), 80.1 (C), 63.4 (CH_2), 63.1* (CH_2), 50.7 (CH), 49.8* (CH), 46.8 (CH), 45.8* (CH), 44.2 (CH_2), 43.6* (CH_2), 38.9 (CH_3), 28.3 (CH_3), 23.1 (CH_3), 20.8 (CH_3).

*Rotámeros

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3288, 1743, 1697, 1367, 1183, 1104

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$: 407.14826, found 407.14843

8.2.40. Attempts for *tert*-Butyl (2*R*,5*S*)-5-acetamido-2-(acetoxymethyl)-3,4-dioxopiperidine-1-carboxylate (**164**)



Method A: Dess-Martin oxidation

A previously flamed Schlenk flask was charged with Dess-Martin periodinane (151 mg, 0.35 mmol) and suspended with CH_2Cl_2 (2 mL). After stirring during 15 min, a solution of **139b** (48 mg, 0.14 mmol) was added via cannula and the reaction was stirred at r.t. overnight. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (110 mg) was added and the reaction was stirred 30 min. After adding aq. NaHCO_3 sat. (5 mL), the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography in silica gel using hexane/ethyl acetate recovering **139b**.

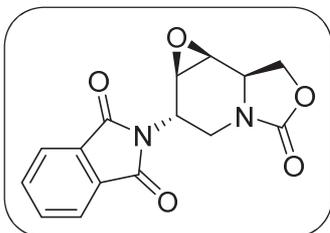
Method B: Swern oxidation

DMSO (87 μ L, 1.11 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.5 mL) in a previously flamed flask and cooled at -78°C . Then, oxalyl chloride (49 μ L, 0.55 mmol) was added. After 30 min, a solution of **139b** (48 mg, 0.14 mmol) in CH_2Cl_2 (1.5 mL) was added via cannula followed by dropwise addition of TEA (91 μ L, 0.84 mmol). The reaction was stirred at -78°C for 3h and then at r.t. 3h more. Aqueous NH_4Cl sat. (3 mL) was added and the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography in silica gel using hexane/ethyl acetate recovering **139b**.

Method C: TPAP oxidation

A previously flamed flask was charged with 4Å powder molecular sieves (50 mg). Then, **139b** (50 mg, 0.14 mmol), *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (52 mg, 0.43 mmol) and Tetrapropylammonium perruthenate (5 mg, 0.01 mmol) were added and the whole mixture was suspended in CH_2Cl_2 (5 mL). The reaction was stirred at r.t. during 4h. After filtration of the sieves, the reaction was extracted with CH_2Cl_2 (3x 5 mL), dried over MgSO_4 and purified by chromatography in silica gel using hexane/ethyl acetate recovering **139b**.

8.2.41. 2-((1*aR*,2*S*,7*aR*,7*bS*)-5-Oxohexahydro-5*H*-oxazolo[3,4-*a*]oxireno[2,3-*c*]pyridin-2-yl)isoindoline-1,3-dione (**165**)



To a solution of **125a** (309 mg, 1.09 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added MCPBA (1.09 g, 4.88 mmol) and the reaction was stirred at r.t. during 3 d until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under low pressure and the resulting solid was purified by chromatography in SiO_2 .TEA (2.5 % v/v) using hexane/ethyl acetate to give **165** (173 mg, 53%) as a one diastereoisomer white solid.

$[\alpha]_D^{20} = -13.5$ ($c=0.23$, CHCl_3)

Mp: 194-196°C

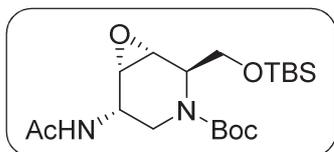
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.88 (m, 2H), 7.77 (m, 2H), 4.71 (dd, $J = 10.5, 8.0$ Hz, 1H), 4.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.45 – 4.34 (m, 2H), 3.92 (ddd, $J = 13.5, 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 3.40 – 3.35 (m, 2H), 3.19 (dd, $J = 13.5, 10.5$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 167.3 (CO), 157.0 (CO), 134.6 (CH), 131.5 (C), 123.7 (CH), 64.8 (CH_2), 55.4 (CH), 51.8 (CH), 51.0 (CH), 39.9 (CH), 38.2 (CH_2).

IR (film, $\text{vmax} / \text{cm}^{-1}$): 1754, 1713, 1387, 1066, 719

HRMS (ES): calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$: 301.08190, found 301.08190

8.2.42. *tert*-Butyl (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*)-5-acetamido-2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-7-oxa-3-azabicyclo[4.1.0]heptane-3-carboxylate (167)



To a solution of **137a** (107 mg, 0.28 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added MCPBA (187 mg, 0.83 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under low pressure and the resulting solid was purified by chromatography in Al₂O₃ using hexane/ethyl acetate to give **167** (75 mg, 67%) as a one diastereoisomer slightly yellow oil.

$[\alpha]_D^{20} = -34.2$ (c=0.95, CHCl₃)

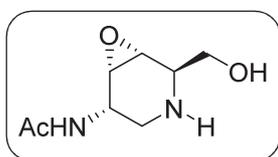
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 6.06 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.32 (s, 1H), 3.88 – 3.76 (m, 3H), 3.46 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.14 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 169.6 (CO), 155.3 (CO), 80.3 (C), 62.8 (CH₂), 53.4 (CH), 51.9 (CH), 51.0 (CH), 42.9 (CH₂), 41.7 (CH), 28.3 (CH₃), 25.8 (CH₃), 23.1 (CH₃), 18.1 (C), -5.5 (CH₃), -5.6 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3330, 2955, 1694, 1540, 1390, 1367, 1108, 1173

HRMS (ES): calcd. For C₁₉H₃₇N₂O₅Si: 401.24663, found 401.24649

8.2.43. *N*-((1*S*,2*R*,5*S*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-7-oxa-3-azabicyclo[4.1.0]heptan-5-yl)acetamide (168)



To a solution of **167** (49 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) was added TFA (115 μL, 1.46 mmol) and the reaction was stirred at r.t. until no starting material was observed by TLC. Solvent was removed under low pressure and the resulting solid was purified by chromatography in silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ to give **168** (15 mg, 66%) as a one diastereoisomer slightly yellow oil.

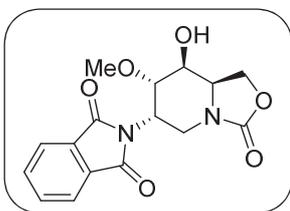
$[\alpha]_D^{20} = -53.3$ (c=0.27, CH₃OH)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 4.30 (ddd, *J* = 10.0, 5.5, 1.0 Hz, 1H), 3.67 (qd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, 2H), 3.29 (m, 2H), 3.00 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz, 1H), 2.41 (dd, *J* = 12.5, 10.0 Hz, 1H), 1.97 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 171.8 (CO), 62.4 (CH₂), 55.4 (CH), 54.3 (CH), 52.5 (CH), 45.9 (CH), 41.7 (CH₂), 21.0 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3280, 2930, 1652, 1557, 1238, 1464, 1367, 1072, 1040

HRMS (ES): calcd. For C₈H₁₅N₂O₃: 187.10772, found 187.10758

8.2.44. 2-((6S,7S,8S,8aR)-8-Hydroxy-7-methoxy-3-oxohexahydro-3H-oxazolo[3,4-a]pyridin-6-yl)isoindoline-1,3-dione (170)


To a solution of **165** (20 mg, 0.07 mmol) in MeOH:H₂O 4:1 (2.5 mL) was added NaN₃ (43 mg, 0.66 mmol) and the reaction was stirred at 80°C for 4h. Solvent was removed under low pressure and the resulting solid was purified by chromatography in silica gel using CH₂Cl₂:MeOH to give **170** (14 mg, 63%) as a one diastereoisomer colorless oil.

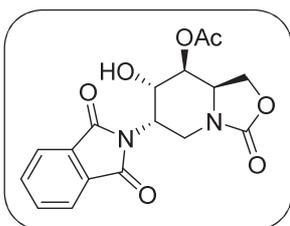
$[\alpha]^{20}_D = -45.7$ (c=0.49, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.76 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 4.81 (dd, *J* = 9.5, 2.0 Hz, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.44 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 8.5, 6.0 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.82 – 3.69 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 168.1 (CO), 160.0 (CO), 132.5 (C), 131.2 (CH), 131.0 (CH), 129.9 (CH), 128.9 (CH), 126.6 (C), 78.6 (CH), 66.6 (CH), 64.8 (CH₂), 61.8 (CH), 52.7 (CH₃), 51.4 (CH), 41.7 (CH₂).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3369, 1725, 1658, 1294, 1271, 1100, 1054

HRMS (ES): calcd. For C₁₆H₁₇N₂O₆: 333.10811, found 333.10797

8.2.45. (6S,7S,8S,8aR)-6-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)-7-hydroxy-3-oxohexahydro-3H-oxazolo[3,4-a]pyridin-8-yl acetate (174)


To a solution of **165** (40 mg, 0.13 mmol) in DMF (3 mL) was added LiOH (22 mg, 0.53 mmol) and the reaction was stirred at r.t. for 4h. Then, pyridine (1 mL) and acetic anhydride (70 μL, 0.66 mmol) were added and the reaction was stirred at r.t. during 16h. H₂O (5 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (3x 5mL), dried over MgSO₄ and purified by chromatography in silica gel using hexane/ethyl acetate to give **174** (32 mg, 67%) as a one diastereoisomer white solid.

$[\alpha]^{20}_D = -8.6$ (c=0.12, CHCl₃)

Mp: 124-126°C

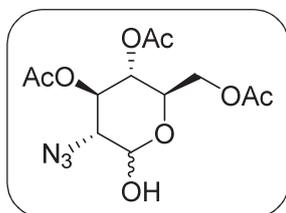
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.95 – 7.84 (m, 2H), 7.84 – 7.72 (m, 2H), 5.16 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 5.14 (dd, *J* = 4.5, 2.0 Hz, 1H), 4.67 (ddd, *J* = 11.5, 6.0, 2.0 Hz, 1H), 4.52 (ddd, *J* = 9.0, 4.5, 2.0 Hz, 1H), 4.39 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.27 – 4.21 (m, 1H), 4.09 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 3.91 – 3.78 (m, 2H), 2.20 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.1 (CO), 169.0 (CO), 157.0 (CO), 134.9 (CH), 131.2 (C), 123.9 (CH), 69.7 (CH), 68.3 (CH), 62.8 (CH₂), 51.0 (CH), 48.3 (CH), 37.4 (CH₂), 20.9 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3375, 2922, 1743, 1713, 1432, 1383, 1227, 1065, 1024

HRMS (ES): calcd. For C₁₇H₁₇N₂O: 361.10303, found 361.10324

8.3. Sanfilippo disease: synthesis of substrates for the diagnosis of A and D subtypes

8.3.1. (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(Acetoxymethyl)-5-azido-6-hydroxytetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (**176**)

To a solution of **175** (960 mg, 2.57 mmol) in diethyl ether (12 mL) was added benzylamine (0.52 mL, 4.62 mmol) and the solution was stirred at rt overnight. After work-up and purification, **176** (798 mg, 93 %) was obtained as a non-separable 2:1 mixture of diastereoisomers.

Spectral data corresponds to 2:1 mixture of diastereoisomers.

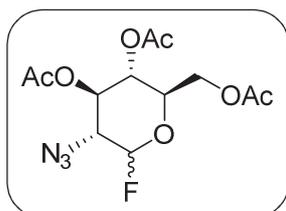
* Refers to distinguishable signal of diastereoisomers

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.53 (dd, *J* = 10.5, 9.0 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.04 (m, 2H), 4.74* (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.30* (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.25* (m, 1H), 4.22* (m, 1H), 3.86 (br, 1H), 3.71* (m, 1H), 3.49* (m, 2H), 3.43 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H), 2.10 (m, 12H), 2.05 (s, 3H), 2.03*(s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.9, 170.8, 170.1, 170.1, 169.8, 169.7, 96.1, 92.0, 72.5, 71.9, 70.4, 68.5, 68.3, 67.5, 64.8, 62.0, 61.4, 20.7, 20.7, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5.

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3442, 2949, 2112, 1748, 1368, 1231, 1048

HRMS (ES): calcd. for C₁₂H₁₇ N₃O₈Na: 354.0908, found 354.0909

8.3.2. (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(Acetoxymethyl)-5-azido-6-fluorotetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (**177**)

To a solution of **176** (897 mg, 2.70 mmol) in THF (7 mL) cooled at -30°C was added DAST (0.43 mL, 3.24 mmol) dropwise and was stirred until no starting material was observed. After work-up and purification, **177** (889 mg, 91 %) was obtained as a non-separable 5:1 mixture of diastereoisomers.

Spectral data corresponds to 5:1 mixture of diastereoisomers.

*Refers to distinguishable signal of diastereoisomers

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 5.79* (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.66* (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.48 (dd, *J* = 10.5, 9.5 Hz, 2H), 5.17 – 5.03 (m, *J* = 13.0, 7.5 Hz, 3H), 4.33* (m, 1H), 4.33 (m, 1H), 4.22* (dd, *J* = 4.0, 2.0 Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.12* (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.55* (dd, *J* = 10.5, 2.5 Hz, 1H), 3.48* (dd, *J* = 10.5, 2.5 Hz, 0H), 2.10 (s, 9H), 2.06* (s, 6H), 2.03 (s, 3H).

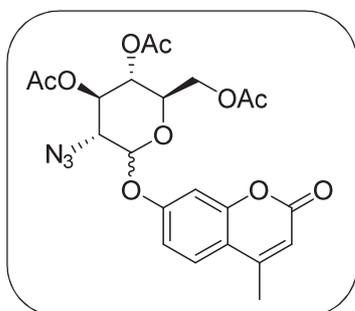
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 170.4, 170.4, 169.8, 169.7, 169.5, 169.4, 108.6, 106.4, 72.0, 72.0, 71.9, 71.8, 70.1, 70.1, 70.0, 67.6, 67.3, 63.7, 63.5, 61.4, 61.1, 60.9, 20.6, 20.6, 20.5, 20.5.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃, δ/ppm): -138.9 (dd, *J* = 51.5, 12.5 Hz), -146.81 (dd, *J* = 51.5, 25.5 Hz).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 2116, 1754, 1368, 1227, 1160, 1101, 1049

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{FN}_4\text{O}_7$: 351.13105, found 351.13120

8.3.3. (2R,3S,4R,5R)-2-(Acetoxymethyl)-5-azido-6-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (**178**)



To a solution at 0°C of **177** (3.13 g, 9.38 mmol) in CH_2Cl_2 was added 4-trimethylsilylmethylumbelliferone (3.08 g, 17.45 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.7 mL, 20.61 mmol). Then it was stirred until no starting material was observed. After work-up and purification, **178** (3.13 g, 68 %) as a non-separable 1:1 mixture of diastereoisomers.

Spectral data corresponds to 1:1 mixture of diastereoisomers.

*Refers to distinguishable signal of diastereoisomers

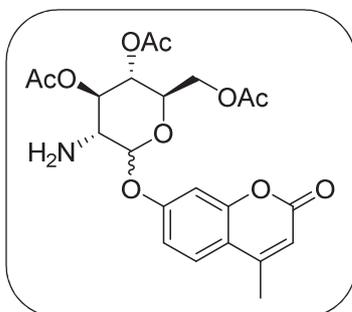
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.57 (m, 2H), 7.14* (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.08* (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 7.00* (m, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 2H), 6.20 (m, 2H), 5.70 (m, 2H), 5.12 (m, 4H), 4.30 (m, 2H), 4.18* (dd, $J = 12.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.12* (m, 1H), 4.05* (dd, $J = 12.5, 2.0$ Hz, 1H), 3.96* (m, 1H), 3.86* (dd, $J = 10.0, 8.0$ Hz, 1H), 3.61* (dd, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H), 2.43 (s, 6H), 2.14 (3s, 9H), 2.06 (3s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 170.4 (CO), 170.2* (CO), 169.8 (CO), 169.6* (CO), 169.4 (CO), 169.4* (CO), 160.5 (CO), 158.7 (C), 158.2* (C), 154.7 (C), 154.6* (C), 152.0 (C), 152.0* (C), 125.8 (CH), 125.7* (CH), 115.5 (C), 115.5* (C), 113.7 (CH), 113.5* (CH), 113.1 (CH), 113.1* (CH), 104.2 (CH), 103.9* (CH), 99.4 (CH), 96.5* (CH), 72.1 (CH), 72.1* (CH), 70.0 (CH), 68.6 (CH), 68.0* (CH), 63.2 (CH), 61.6 (CH_2), 61.3* (CH_2), 60.4* (CH), 20.5 (CH_3), 20.5* (CH_3), 20.5 (CH_3), 20.4* (CH_3), 20.4 (CH_3), 18.5 (CH_3).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 2113, 1751, 1615, 1388, 1367, 1227, 1158, 1035

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Na}$: 512.1276, found 512.1282

8.3.4. (2R,3S,4R,5R)-2-(Acetoxymethyl)-5-amino-6-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (**179**)



To a solution of **178** (764 mg, 1.56 mmol) in ACN was added thiophenol (0.7 mL, 6.24 mmol), triethylamine (0.66 mL, 4.68 mmol) and SnCl_2 (59 mg, 0.31 mmol) and the reaction was stirred until no starting material was observed. After work-up and purification, **179** (660 mg, 91 %) was obtained as a non-separable 1:1 mixture of diastereoisomers.

Spectral data corresponds to 1:1 mixture of diastereoisomers.

*Refers to distinguishable signal of diastereoisomers

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.54 (m, 2H), 7.12* (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.06* (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 6.98* (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 6.19 (m, 2H), 5.62* (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 5.35* (t, $J = 10.5$ Hz, 1H), 5.10 (m, 3H), 4.96* (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.30* (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 2H), 4.16* (dd, $J = 12.0,$

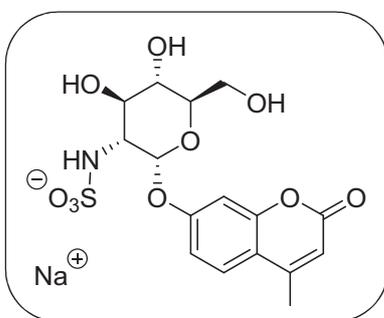
2.0 Hz, 1H), 4.02 (m, 3H), 3.92 (m, 1H), 3.26* (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.17* (dd, $J = 10.5, 3.5$ Hz, 1H), 2.42 (m, 6H), 2.13 (3s, 9H), 2.04 (3s, 9H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 170.8 (CO), 170.5* (CO), 170.5 (CO), 170.4* (CO), 169.6 (CO), 169.6* (CO), 160.7 (CO), 159.3 (C), 158.8* (C), 154.7 (C), 154.7* (C), 152.1 (C), 152.1* (C), 125.6 (CH), 125.5* (CH), 115.2 (C), 115.2* (C), 113.5 (CH), 113.3* (CH), 113.0 (CH), 112.9* (CH), 104.3 (CH), 103.9* (CH), 101.4 (CH), 98.4* (CH), 74.7 (CH), 74.2* (CH), 72.2 (CH), 68.7 (CH), 68.3* (CH), 62.0 (CH₂), 61.7* (CH₂), 55.7 (CH), 54.4* (CH), 20.8 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.5 (CH₃), 18.5 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 1742, 1614, 1392, 1368, 1229, 1072, 1039, 854

HRMS (ES): calcd. for C₂₂H₂₅NO₁₀Na: 464.15512, found 464.15594

8.3.5. Sodium ((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)sulfamate (17)



To a solution of **179** (349 mg, 0.75 mmol) in DMF was added py-SO₃ (360 mg, 2.26 mmol) and triethylamine (0.41 mL, 2.93 mmol) and the reaction was heated at 70°C until no starting material was observed. Then ammonia saturated MeOH solution was added and the reaction was stirred overnight. After work-up and purification, the resulting product was filtered through IR-120 (Na⁺) to give **17** (160 mg, 49% yield) as one diastereoisomer with crystalline white solid appearance.

HPLC analysis showed purity higher than 96% and no presence of free methylumbelliferone

$[\alpha]_D^{20} = +113.4^{\circ}$ (c=0.23, H₂O)

Mp: 230 - 232 °C

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, d⁶-acetone internal reference, δ /ppm): 7.61 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.15 – 7.02 (m, 2H), 6.12 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 5.88 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.75 (dd, $J = 10.4, 8.8$ Hz, 1H), 3.64 (m, 2H), 3.57 (m, 1H), 3.49 (dd, $J = 10.0, 9.0$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H), 2.31 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, d⁶-acetone internal reference, δ /ppm): 164.5 (CO), 159.9 (C), 156.5 (C), 154.3 (C), 127.0 (CH), 115.4 (CH), 114.9 (CH), 111.5 (CH), 104.6 (CH), 96.6 (CH), 73.2 (CH), 71.7 (CH), 70.0 (CH), 60.7 (CH₂), 57.9 (CH), 18.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3425, 1691, 1612, 1194, 1040, 1015

HRMS (ES, negative ionization): calcd. for C₁₆H₁₇NO₁₀S : 416.0657, found 416.0657

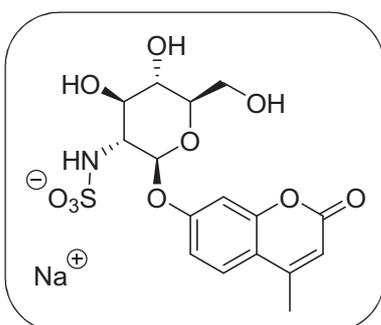
EA: Anal. Calcd. For C₁₆H₁₈NNaO₁₀S·H₂O: C, 42.02%; H, 4.41%; N, 3.06%; found C, 41.76%; H, 4.38%; N, 3.12%.

HPLC (Column xTerra 5um 4.6x250mm; 1mL/min; H₂O 0,1%HCOOH / ACN (98:2)---15min---(5:95)---5min---(5:95)): 7.87 min

HPLC (Column Poroshell 120 EC-1C8 50x4.6mm 2.7µm; 1mL/min; H₂O-0.1% HCOOH / ACN (98:2)---15min---(5:95)---5min---(5:95); λ = 320 nm): 3.49 min

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5µm; 2mL/min; NH₄CO₃ pH8 / ACN (95:5)---0.5min---(95:5)---6.5min---(0:100);λ = 210 nm): 1.61 min

8.3.6. Sodium ((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)sulfamate (17β)



Same procedure as 8.3.5 give also the β anomer.

$[\alpha]_D^{20} = -34.6^\circ$ (c=0.44, H₂O)

Mp: 180-182 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, δ/ppm): 7.69 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 6.97 (m, 2H), 6.22 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.00 (m, 3H), 4.54 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.72 – 3.64 (m, 1H), 3.57 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.14 (td, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H),

3.04 (m, 1H), 2.39 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H).

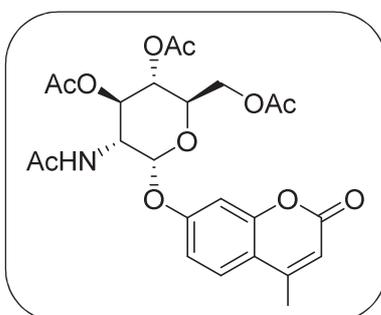
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, δ/ppm): 160.3 (CO), 160.1 (C), 154.4 (C), 153.3 (C), 126.3 (CH), 113.9 (CH), 113.7 (C), 111.6 (CH), 103.2 (CH), 98.6 (CH), 77.1 (CH), 76.5 (CH), 69.9 (CH), 60.7 (CH), 59.8 (CH₂), 39.5 (CH), 18.1 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3293, 1722, 1612 1424, 1390, 1071, 1038

HRMS (ES, negative ionization): calcd. for C₁₆H₁₇NO₁₀S : 416.06569, found 416.06461

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5µm; 2mL/min; NH₄CO₃ pH8 / ACN (95:5)---0.5min---(95:5)---6.5min---(0:100);λ = 210 nm): 0.94 min

8.3.7. (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (182α)



To a solution **179** (541 mg, 1.16 mmol) was added DMAP (15 mg, 0.11 mmol), TEA (358 µL, 2.57 mmol) and acetic anhydride (245 µL, 2.33 mmol) and the reaction was stirred at r.t. for 4h. Then, H₂O (10 mL) was added and the reaction was extracted with CH₂Cl₂ (2x 20 mL) and dried over MgSO₄. The crude was purified by chromatography on SiO₂ gel using CHCl₃:MeOH 97 : 3 to obtain **182α** (429 mg, 52 %) and **182β** (368 mg, 44 %) as single diastereoisomers white solids products.

$[\alpha]_D^{20} = +146.4$ ($c=0.13$, CHCl_3)

Mp: 77-79°

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.11 – 7.00 (m, 2H), 6.18 (q, $J = 1.0$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.64 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 5.42 (dd, $J = 11.0, 9.5$ Hz, 1H), 5.22 (dd, $J = 10.5, 9.5$ Hz, 1H), 4.54 (ddd, $J = 11.0, 9.0, 3.5$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 12.5, 5.0$ Hz, 1H), 4.07 – 3.95 (m, 2H), 2.40 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 6H), 1.97 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 171.5 (CO), 170.5 (CO), 170.3 (CO), 169.2 (CO), 160.7 (CO), 158.4 (C), 154.8 (C), 152.0 (C), 125.8 (CH), 115.5 (C), 113.3 (CH), 112.8 (CH), 104.7 (CH), 95.9 (CH), 70.7 (CH), 68.8 (CH), 67.7 (CH), 61.5 (CH_2), 51.9 (CH), 23.0 (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.6 (CH_3), 20.5 (CH_3), 18.6 (CH_3).

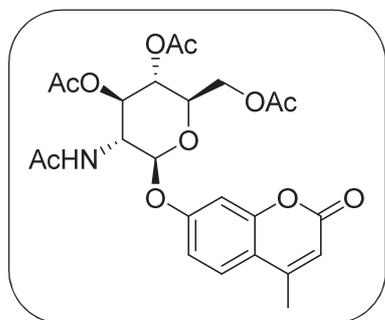
IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3314, 1743, 1725, 1614, 1368, 1229, 1039

HRMS: calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{Na}$: 528.14763, found 528.14737

EA: Anal. Calcd. For $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 55.07%; H, 5.58%; N, 2.68%; found C, 55.38%; H, 5.42%; N, 2.75%.

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5 μm ; 2mL/min; NH_4CO_3 pH8 / ACN (95:5)---0.5min---(95:5)---6.5min---(0:100); $\lambda = 210$ nm): 3.25 min

8.3.8. (2R,3S,4R,5R,6S)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate (182 β)



Following procedure 8.3.7.

$[\alpha]_D^{20} = -14.9$ ($c=0.27$, CHCl_3)

Mp: 246-247°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.47 (m, 1H), 6.97 – 6.89 (m, 2H), 6.14 (m, 1H), 6.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.50 – 5.36 (m, 2H), 5.14 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H), 4.24 – 4.14 (m, 2H), 3.95 (ddd, $J = 10.0, 6.0, 2.5$ Hz, 1H), 2.38

(d, $J = 1.0$ Hz, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.96 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 170.8 (CO), 170.6 (CO), 170.5 (CO), 169.4 (CO), 160.9 (CO), 159.5 (C), 154.7 (C), 152.3 (C), 125.6 (CH), 115.2 (C), 114.0 (CH), 112.9 (CH), 103.8 (CH), 98.2 (CH), 72.3 (CH), 71.9 (CH), 68.4 (CH), 62.0 (CH_2), 54.5 (CH), 23.3 (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.6 (CH_3), 18.7 (CH_3).

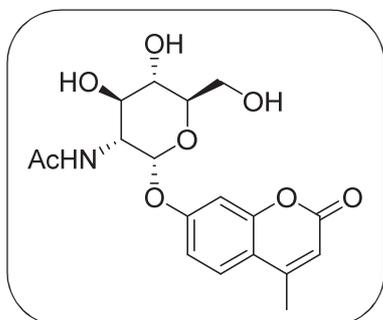
IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3276, 1748, 1725, 1664, 1613, 1222, 1085, 1044

HRMS: calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{Na}$: 528.14763, found 528.14789

EA: Anal. Calcd. For $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 55.07%; H, 5.58%; N, 2.68%; found C, 55.44%; H, 5.44%; N, 2.80%.

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5 μ m; 2mL/min; NH₄CO₃ pH8 / ACN (95:5)---0.5min--(95:5)---6.5min---(0:100); λ = 210 nm): 3.12 min

8.3.9. *N*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide (185 α**)**



182 α (306 mg, 0.61 mmol) was dissolved in a saturated NH₃ solution in MeOH (12 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Removal of the solvent at low pressure yielded **185 α** (228 mg, 99%).

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +194.1$ (c=0.21, CH₃OH)

Mp: 144-145°C

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ /ppm): 7.51 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.65 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 10.5, 3.5 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 10.5, 9.0 Hz, 1H), 3.86 – 3.78 (m, 2H), 3.78 – 3.71 (m, 1H), 3.63 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.08 (s, 3H).

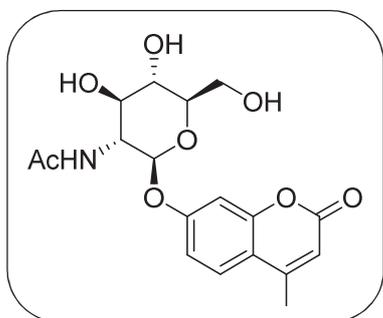
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, δ /ppm): 174.4 (CO), 164.0 (C), 158.9 (C), 155.7 (C), 153.6 (C), 126.3 (CH), 114.7 (C), 113.9 (CH), 111.0 (CH), 103.6 (CH), 95.8 (CH), 72.9 (CH), 70.7 (CH), 69.6 (CH), 60.2 (CH₂), 53.3 (CH), 21.8 (CH₃), 17.8 (CH₃).

IR (film, ν_{max} / cm⁻¹): 3324, 1700, 1652, 1615, 1390, 1103, 1066, 1016

HRMS: calcd. for C₁₈H₂₂NO₈ : 380.13399, found 380.13408

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5 μ m; 2mL/min; NH₄CO₃ pH8 / ACN (95:5)---0.5min--(95:5)---6.5min---(0:100); λ = 210 nm): 2.05 min

8.3.10. *N*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide (185 β**)**



182 β (201 mg, 0.40 mmol) was dissolved in a sat. NH₃ solution in MeOH (10 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Removal of the solvent at low pressure yielded **185 β** (149 mg, 99%).

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +32.5$ (c=0.13, H₂O)

Mp: 167-169°C

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ /ppm): 7.31 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.06 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.01 – 3.81 (m, 2H), 3.70 (dd, J = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 3.65 – 3.53 (m, 2H), 3.47 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.95 (s, 3H).

¹H-NMR (400 MHz, d⁶-DMSO, δ/ppm): 7.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.77 – 3.63 (m, 2H), 3.53 – 3.36 (m, 3H), 3.19 (dd, *J* = 9.5, 8.5 Hz, 1H), 2.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 1.81 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, d⁶-DMSO, δ/ppm): 169.3 (CO), 160.1 (CO), 160.0 (C), 154.4 (C), 153.3 (C), 126.5 (CH), 114.3 (C), 113.5 (CH), 111.8 (CH), 103.2 (CH), 98.8 (CH), 77.3 (CH), 73.9 (CH), 70.2 (CH), 60.6 (CH₂), 55.3 (CH), 23.1 (CH₃), 18.1 (CH₃).

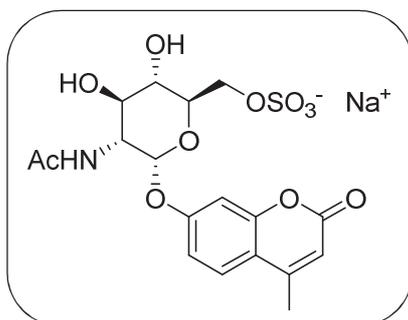
IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3306, 1737, 1624, 1389, 1162, 1076, 1040

HRMS: calcd. for C₁₈H₂₂NO₈ : 380.13399, found 380.13408

EA: Anal. Calcd. For C₁₈H₂₁NO₈·H₂O: C, 54.41%; H, 5.83%; N, 3.52%; found C, 54.77%; H, 5.86%; N, 3.56%.

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5μm; 2mL/min; NH₄CO₃ pH8 / ACN (95:5)---0.5min---(95:5)---6.5min---(0:100);λ = 210 nm): 1.94 min

8.3.11. Sodium ((3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-5-Acetamido-3,4-dihydroxy-6-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl sulfate (**18**)



To a solution of **185α** (54 mg, 0.14 mmol) in DMF (3 mL) was added py·SO₃ (68 mg, 0.43 mmol) and TEA (80 μL, 0.7 mmol) and the reaction was stirred at 70°C for 16h. Then, aq. NaHCO₃ sat. solution was added dropwise until pH 8 was achieved. Solvents were removed under low pressure and the crude was purified by C18 reverse phase separation using milliQ H₂O (0.8 g NH₄HCO₃/1L) : ACN from 100:0 to 50 : 50 to isolate the ammonium salt of **18**.

The product was redissolved in 1 mL of milliQ H₂O and filtered over a 10 mL bed of IR-120 (Na⁺) resin washing with H₂O. Lyophilisation of the corresponding filtrate give **18** (31 mg, 45% yield) as one diastereoisomer with crystalline white solid appearance.

HPLC analysis showed purity higher than 98% and no presence of free methylumbelliferone

$[\alpha]^{20}_D = +144.6$ (c=0.25, H₂O)

Mp: 209-210°C

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ/ppm): 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.96 (m, 1H), 5.60 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 4.18 (dd, *J* = 10.0, 3.5 Hz, 1H), 4.04 – 3.93 (m, 2H), 3.67 (dd, *J* = 10.0, 9.0 Hz, 1H), 2.21 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H), 2.09 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, δ/ppm): 174.4 (CO), 163.7 (CO), 158.9 (C), 155.4 (C), 153.3 (C), 126.3 (CH), 114.7 (C), 113.8 (CH), 111.0 (CH), 103.8 (CH), 95.9 (CH), 71.0 (CH), 70.6 (CH), 69.4 (CH), 66.8 (CH₂), 53.2 (CH), 21.9 (CH₃), 17.8 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm^{-1}): 3335, 1706, 1649, 1614, 1557, 1390, 1270, 1068, 1008, 821

HRMS: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_{11}\text{S}$: 458.07625, found 458.07534

EA: Anal. Calcd. For $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NNaO}_{11}\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C, 40.38%; H, 4.89%; N, 2.62%; S, 5.99%; found C, 40.39%; H, 4.63%; N, 2.67%; S, 5.75%.

HPLC (Column XBridge C18 XP 30x4.6mm 2.5 μm ; 2mL/min; NH_4CO_3 pH8 / ACN (95:5)---0.5min---(95:5)---6.5min---(0:100); $\lambda = 210$ nm): 1.78 min

HPLC (Column Poroshell 120 EC-1C8 50x4.6mm 2.7 μm ; 1mL/min; H_2O -0.1% HCOOH / ACN (98:2)---15min---(5:95)---5min---(5:95); $\lambda = 320$ nm): 3.90 min

HPLC (Column xTerra 5 μm 4.6x250mm; 1mL/min; H_2O 0,1% HCOOH / ACN (98:2)---15min---(5:95)---5min---(5:95)): 7.55 min

8.4. Prostate cancer: Synthesis of EPI001 stereoisomers

General procedure 8.4.A. for diol formation

Starting material (1 eq) was dissolved in EtOH in a pressure tube. Then triethylamine (0.5 eq) and glycidol (1.2 eq) were added and the mixture was heated at reflux for 16h. After that, solvent was removed *in vacuo* and the crude was purified by flash column chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing the polarity ratio from 60:40 to 0:100.

General procedure 8.4.B. for diol formation

Starting material (1 eq) and Cs₂CO₃ (1.1 eq) were placed in a pressure tube and dissolved in EtOH. Then glycidol (1.2 eq) was added and the mixture was heated at reflux for 16h. The crude was treated with HCl 1M, extracted with EtOAc, dried with MgSO₄ and purified by flash column chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate and increasing the polarity ratio from 60:40 to 0:100.

General procedure 8.4.C. for acetal formation

Starting material (1 eq) and PTSA (0.15 eq) were dissolved in acetone. Dimethoxypropane (2 eq) was added and the mixture stirred at reflux for 8h. The reaction was treated with aq NaHCO₃ sat. and organic solvent was removed *in vacuo*. The resulting aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3x5 mL), dried over MgSO₄ and solvents removed *in vacuo*. Compounds were used without further purification.

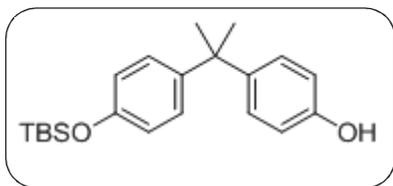
General procedure 8.4.D. for epoxide formation

To a solution of starting material (1 eq) and dibutyltin oxide (DBTO, 0.02 eq) in CH₂Cl₂ at 0°C was added triethylamine (2.2 eq) and tosyl chloride (2.2 eq). The mixture was stirred at 0°C until no starting material was observed by TLC. Aq. NaHCO₃ sat was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ and dried over MgSO₄ to obtain a pale yellow oil.

The oil was dissolved in THF and added via cannula over a THF suspension of NaH (1.5 eq) at 0°C. After 1h no starting material was observed by TLC. The reaction crude was treated with H₂O. THF was removed *in vacuo* and the aqueous phase extracted with CH₂Cl₂, dried over MgSO₄ and purified by flash column chromatography on silica-TEA (2,5 % v/v) using hexane/ethyl acetate and increasing the polarity ratio from 100:0 to 70:30.

General procedure 8.4.E. for clorhydrin formation and acetal removal

To a solution of starting material (1 eq) in acetonitrile was added CeCl₃·7H₂O (1.4 eq) and the mixture stirred for 18h at reflux. Solvent was removed *in vacuo* and the crude purified by flash column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH increasing the polarity ratio from 100:0 to 85:15. Chiral HPLC analysis showed *ee* > 99 % and *dr* 95 : 5.

8.4.1. (4-(2-(4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)phenyl)propan-2-yl)phenol (190)

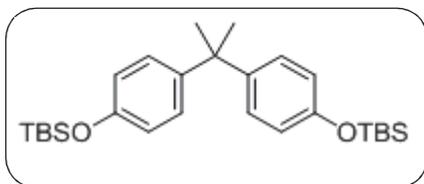
To a solution of imidazole (36 mg, 0.4 mmol) and TBDMSCl (68 mg, 0.45 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added via cannula a solution of bisphenol A (102 mg, 0.45 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) and the resulting mixture was stirred at r.t. for 3h. Then, H_2O (5 mL) was added and the crude was extracted with CH_2Cl_2 (3x5 ml), dried over MgSO_4 and purified by flash column chromatography on silica-TEA (2,5 % v/v) using hexane/ethyl acetate and increasing the polarity ratio to give **190** (97 mg, 62 %) as a colorless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.08 (m, 4H), 6.73 (m, 4H), 4.67 (br, 1H), 1.63 (s, 6H), 0.98 (s, 9H), 0.20 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 153.3 (C), 153.2 (C), 143.5 (C), 143.4 (C), 127.9 (CH), 127.6 (CH), 119.2 (CH), 114.6 (CH), 41.7 (C), 31.1 (CH₃), 25.7 (CH₃), 18.2 (C), -4.40 (CH₃).

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 3376, 2960, 1607, 1510, 1361, 1262, 1176

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{Si}$: 343.20878, found 343.20913

8.4.2. (4,4'-(Propane-2,2-diyl)bis(4,1-phenylene))bis(oxy)bis(*tert*-butyldimethylsilane) (191)

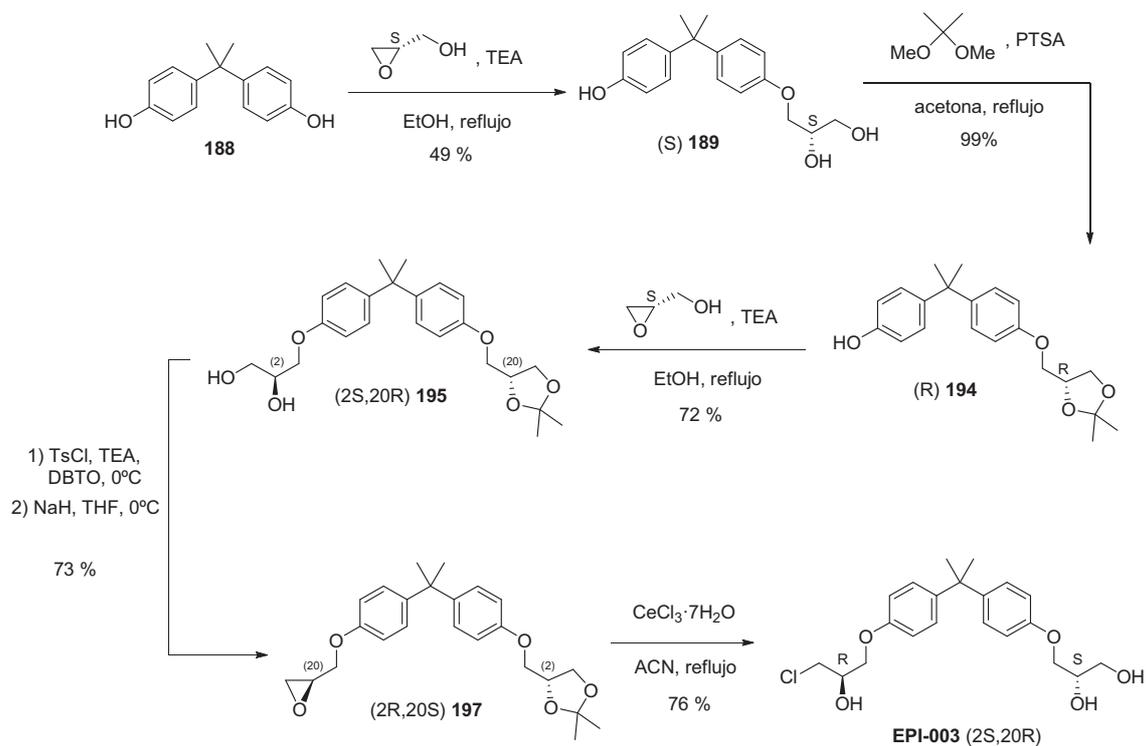
Bisphenol A (198 mg, 0.87 mmol), imidazole (179 mg, 2.60 mmol) and TBDMSCl (293 mg, 1.90 mmol) were dissolved in CH_2Cl_2 (15 mL) and the reaction was stirred at r.t. 18h. Then, H_2O (5 mL) was added and the crude was extracted with CH_2Cl_2 (3x5 ml), dried over MgSO_4 and purified by flash column chromatography on silica-TEA (2,5 % v/v) using hexane/ethyl acetate and increasing the polarity ratio to give **191** (304 mg, 77 %) as a colorless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 7.11 (dt, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 4H), 6.76 (dt, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 4H), 1.66 (s, 6H), 1.03 (m, 18H), 0.24 (s, 12H).

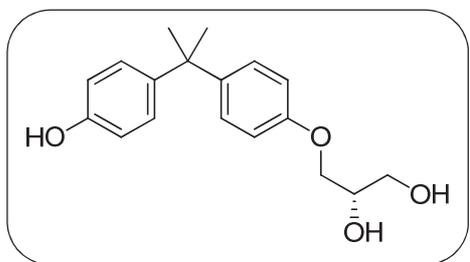
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 153.2 (C), 143.7 (C), 127.7 (CH), 119.2 (CH), 41.7 (C), 31.1 (CH₃), 25.7 (CH₃), 18.2 (C), -4.4 (CH₃)

IR (film, $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$): 2957, 2930, 1603, 1508, 1263, 1175

HRMS (ES): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_2\text{Si}_2\text{Na}$: 479.27721, found 479.27749



8.4.3. (S)-3-(4-(2-(4-Hydroxyphenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol ((S)-189)



General procedure 8.4. A was carried out with **188** (400 mg, 1.75 mmol), TEA (122 μ L, 0.88 mmol), and (S)-glycidol (144 μ L, 2.1 mmol) in EtOH (5.5 mL) to give (S)-**189** (256 mg, 49%) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.15 (m, 2H), 7.09 (m, 2H), 6.81 (m, 2H), 6.72 (m, 2H), 4.09 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.84 (apt dd, $J = 11.5, 3.5$

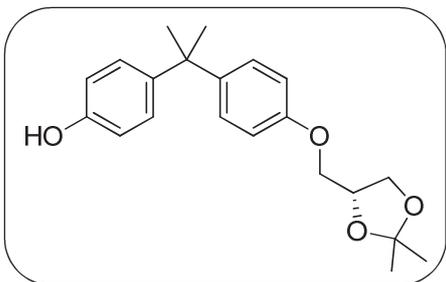
Hz, 1H), 3.75 (apt dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, 1H), 1.62 (s, 6H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 156.2 (C), 153.3 (C), 143.9 (C), 143.1 (C), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 114.7 (CH), 113.9 (CH), 70.4 (CH), 69.2 (CH₂), 63.7 (CH₂), 41.7 (C), 31.0 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3353 (OH), 2962, 2936, 1510, 1246, 1179

HRMS (ES): calculated for C₁₈H₂₂O₄Na: 325.14103, found 325.14103

8.4.4. (*R*)-4-(2-(4-((2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)propan-2-yl)phenol ((*R*)-194)



General procedure 8.4.C was carried out with (*S*)-**189** (391 mg, 1.29 mmol), PTSA (37 mg, 0.19 mmol) and dimethoxypropane (0.32 μ L, 2.58 mmol) in acetone (14 mL) to give (*R*)-**194** (441 mg, 99%) as a pale yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.13 (m, 2H), 7.08 (m, 2H), 6.81 (m, 2H), 6.73 (m, 2H), 4.48 (apt p, J = 6.0 Hz, 1H), 4.17 (apt dd, J = 8.5, 6.0 Hz, 1H), 4.05 (apt dd, J = 9.5, 6.0 Hz, 1H), 3.92 (m, 2H), 1.63 (s, 6H), 1.47 (s, 3H),

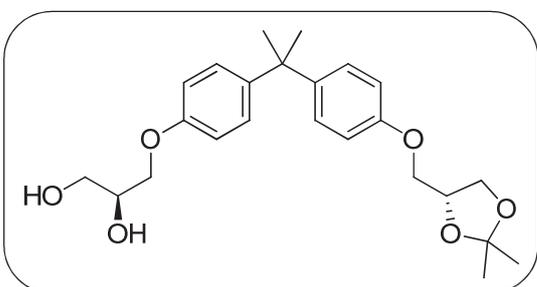
1.41 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 156.3 (C), 153.4 (C), 143.6 (C), 143.1 (C), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 114.7 (CH), 113.8 (CH), 109.8 (C), 74.0 (CH), 68.7 (CH₂), 66.9 (CH₂), 41.7 (C), 31.0 (CH₃), 26.8 (CH₃), 25.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3393 (OH), 2962, 1510, 1233, 1045, 829

HRMS (ES): calculated for C₂₁H₂₇O₄: 343.19039, found 343.19073

8.4.5. (*S*)-3-(4-(2-(4-(((*R*)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol ((2*S*,20*R*)-195)



General procedure 7.4.A was carried out with (*R*)-**194** (233 mg, 0.68 mmol), TEA (47 μ L, 0.34 mmol), and (*S*)-glycidol (60.5 μ L, 0.88 mmol) in EtOH (3.5 mL) to give (2*S*,20*R*)-**195** (180 mg, 72%) as a pale yellow oil.

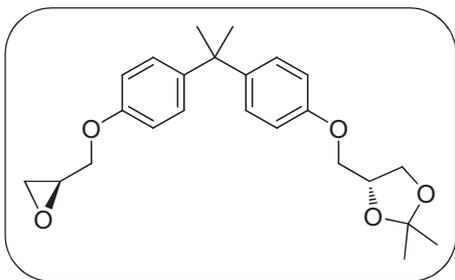
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.11 (m, 4H), 6.80 (m, 4H), 4.45 (apt p, J = 6.0 Hz, 1H), 4.15 (apt dd, J = 8.5, 6.5 Hz, 1H), 4.08 (m, 1H),

4.04 – 3.99 (m, 3H), 3.89 (m, 2H), 3.83 (apt dd, J = 11.5, 4.0 Hz, 1H), 3.74 (apt dd, J = 11.5, 5.5 Hz, 1H), 3.17 (br, 1H), 2.74 (br, 1H), 1.62 (s, 6H), 1.45 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 156.3 (C), 156.2 (C), 143.7 (C), 143.4 (C), 127.75 (CH), 127.70 (CH), 113.8 (CH), 109.7 (C), 74.0 (CH), 70.4 (CH), 69.1 (CH₂), 68.7 (CH₂), 66.9 (CH₂), 63.6 (CH₂), 41.7 (C), 31.0 (CH₃), 26.7 (CH₃), 25.3 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3368 (OH), 2968, 2931, 1607, 1510, 1249, 1042, 828

HRMS (ES): calculated for C₂₄H₃₃O₆: 417.22717, found 417.22763

8.4.6. (R)-2,2-Dimethyl-4-((4-(2-(4-((S)-oxiran-2-ylmethoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)methyl)-1,3-dioxolane ((2R,20S)-197)


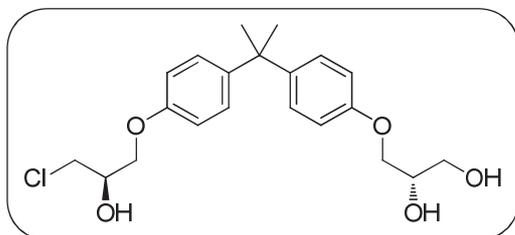
General procedure 7.4.D was carried out with (2S,20R)-**195** (200 mg, 0.48 mmol), DBTO (4 mg, 3%), TEA (84 μ L, 0.6 mmol), NaH (18 mg, 0.72 mmol) and TsCl (98 mg, 0.51 mmol) in CH_2Cl_2 (4 mL) and THF (6 mL) to give (2R,20S)-**197** (139 mg, 73%) as a colorless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.13 (m, 4H), 6.82 (m, 4H), 4.46 (apt p, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.20 – 4.12 (m, 2H), 4.03 (apt dd, $J = 9.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.94 (apt dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, 1H), 3.92 – 3.86 (m, 2H), 3.34 (m, , 1H), 2.89 (apt dd, $J = 5.0, 4.0$ Hz, 1H), 2.74 (apt dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 1H), 1.63 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.40 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 156.35 (C), 156.30 (C), 143.6 (C), 143.5 (C), 127.75 (CH), 127.70 (CH), 113.9 (CH), 113.8 (CH), 109.6 (C), 74.00 (CH), 68.7 (CH_2), 68.7 (CH_2), 66.9 (CH_2), 50.1 (CH), 44.7 (CH_2), 41.7 (C), 31.0 (CH_3), 26.8 (CH_3), 25.3 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 2966, 1607, 1509, 1248, 1183, 1038, 829

HRMS (ES): calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_5$: 399.21660, found 399.21776

8.4.7. (S)-3-(4-(2-(4-((R)-3-Chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol (EPI003 (2S,20R))


General procedure 8.4.E was carried out with (2R,20S)-**197** (140 mg, 0.35 mmol) and $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (183 mg, 0.49 mmol) in ACN (6 mL) to give **EPI003** (2S,20R) (105 mg, 76%, $ee > 99\%$, dr. 95 : 5) as colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = +2.9$ ($c=0.24$, CH_3OH)

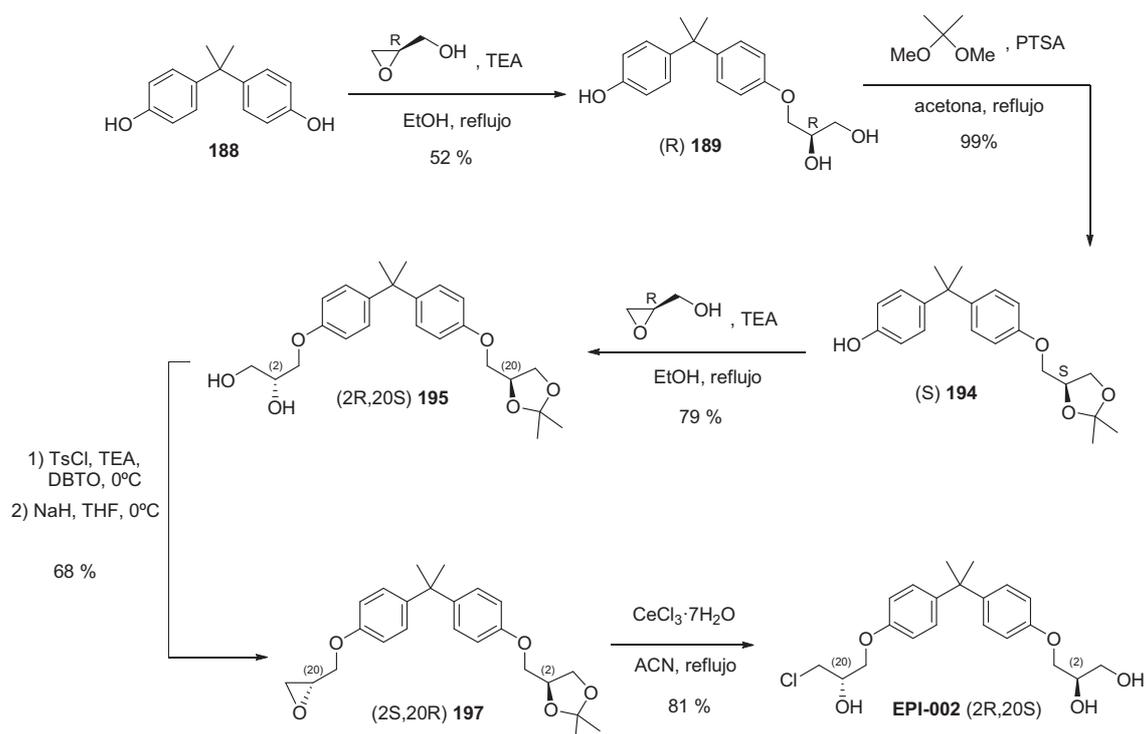
Chiral-HPLC: Column Chiralpak IA; heptane : IPA : EtOH 50:25:25; 0.5 mL/min; $\lambda = 254$ nm; t_R **EPI003** (2S, 20R) = 16.5 min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.13 (m, 4H), 6.81 (m, 4H), 4.20 (apt p, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.06 (apt dd, $J = 5.0, 3.5$ Hz, 2H), 4.02 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 3.78 (apt dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, 2H), 3.70 (apt dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, 1H), 2.90 (br, 1H), 2.79 (br, 1H), 2.41 (br, 1H), 1.63 (s, 6H).

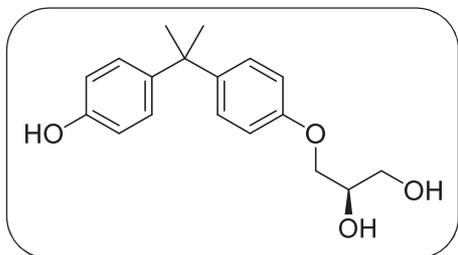
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 156.2 (C), 156.0 (C), 143.9 (C), 143.7 (C), 127.85 (CH), 127.80 (CH), 113.95 (CH), 113.90 (CH), 70.4 (CH), 69.9 (CH), 69.1 (CH_2), 68.4 (CH_2), 63.6 (CH_2), 45.9 (CH_2), 41.7 (C), 31.0 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3365 (OH), 2964, 1509, 1247, 1182, 1041, 828

HRMS (ES): calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClO}_5\text{Na}$: 417.14392, found 417.14405



8.4.8. (R)-3-(4-(2-(4-Hydroxyphenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol ((R)-189)

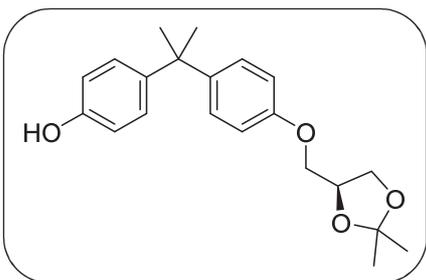


General procedure 8.4.A was carried out with **188** (224 mg, 0.98 mmol), TEA (68 μ L, 0.49 mmol), and (R)-glycidol (70.5 μ L, 1.0 mmol) in EtOH (3 mL) to give (R)-**189** (152 mg, 52%) as a colorless oil.

General procedure 8.4.B was carried out with **188** (298 mg, 1.3 mmol), Cs₂CO₃ (467 mg, 1.43 mmol), and (R)-glycidol (107 μ L, 1.57 mmol) in MeOH (6 mL) to give (R)-**189** (193 mg, 48%) as a colorless oil.

Spectroscopic data is consistent with (S)-**189**.

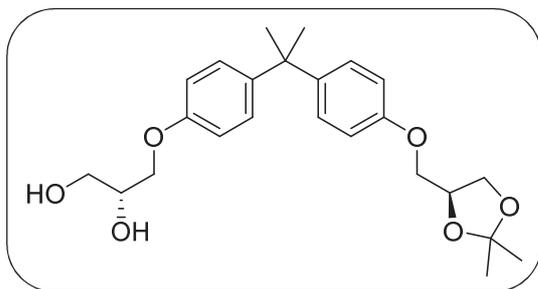
8.4.9. (S)-4-(2-(4-((2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)propan-2-yl)phenol ((S)-194)



General procedure 8.4.C was carried out with (R)-**189** (264 mg, 0.87 mmol), PTSA (25 mg, 0.13 mmol) and dimethoxypropane (220 μ L, 1.74 mmol) in acetone (12 mL) to give (S)-**194** (44 mg, 99%) as a colorless oil.

Spectroscopic data is consistent with (R)-**194**.

8.4.10. (R)-3-(4-(2-(4-((S)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol ((2R,20S)-195)



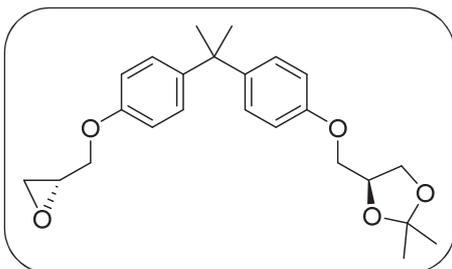
General procedure 8.4.A was carried out with (S)-**194** (52 mg, 0.15 mmol), TEA (11 μ L, 0.08 mmol), and (R)-glycidol (11 μ L, 0.17 mmol) in EtOH (2 mL) to give (2R,20S)-**195** (49 mg, 79%) as pale colourless oil.

General procedure 8.3.B was carried out with (S)-**194** (76 mg, 0.22 mmol), Cs₂CO₃ (108 mg, 0.33 mmol), and (R)-glycidol (30 μ L, 0.44 mmol)

in MeOH (3 mL) to give (2R,20S)-**195** (21 mg, 23%) as a colorless oil.

Spectroscopic data is consistent with (2S,20R)-**195**.

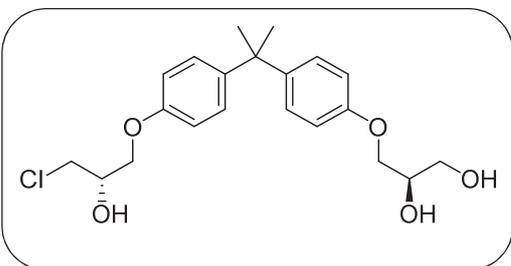
8.4.11. (S)-2,2-Dimethyl-4-((4-(2-(4-((R)-oxiran-2-ylmethoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)methyl)-1,3-dioxolane ((2S,20R)-197)



General procedure 8.4.D was carried out with (2R,20S)-**195** (205 mg, 0.49 mmol), DBTO (4 mg, 3%), TEA (76 μ L, 1.1 mmol), TsCl (104 mg, 1.1 mmol) and NaH (18 mg, 0.72 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) and THF (3 mL) to give (2S,20R)-**197** (134 mg, 68%) as a colorless oil.

Spectroscopic data is consistent with (2R,20S)-**197**.

8.4.12. (R)-3-(4-(2-(4-((S)-3-Chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol (EPI002 (2R,20S))

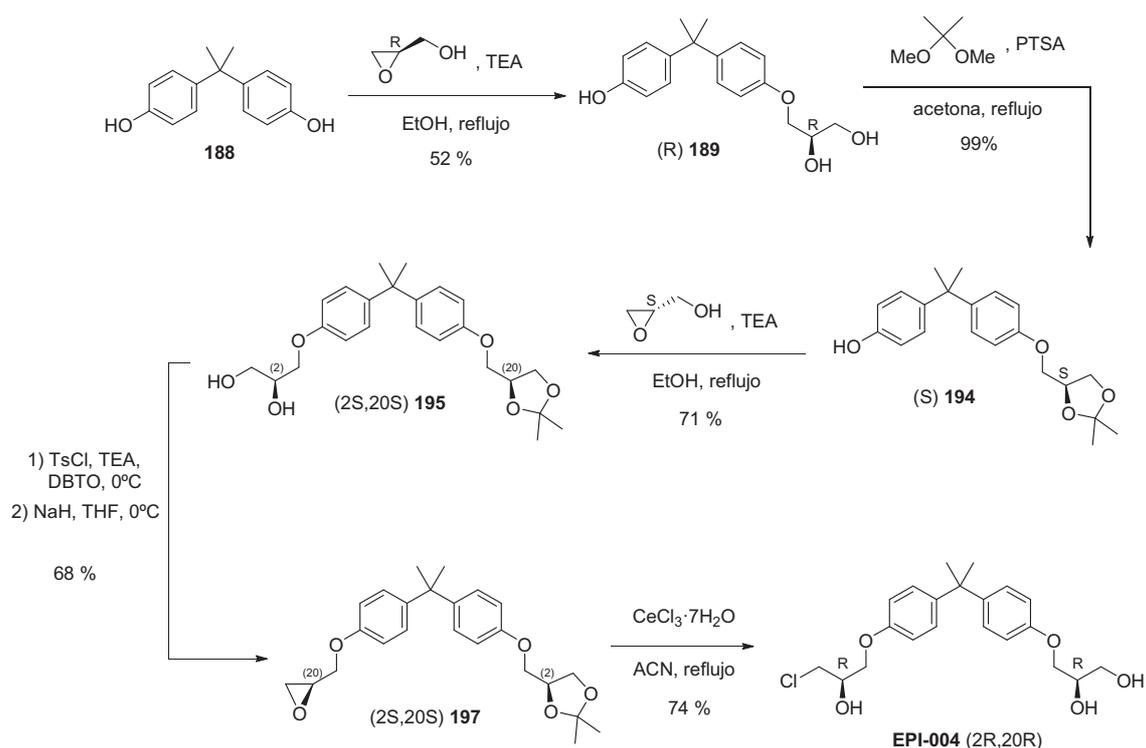


General procedure 8.4.E was carried out with (2S,20R)-**197** (86 mg, 0.21 mmol) and CeCl₃·7H₂O (112 mg, 0.3 mmol) in ACN (3 mL) to give **EPI002** (2R,20S) (69 mg, 81%, *ee* > 99%, *dr*. 90 : 10) as a colorless oil.

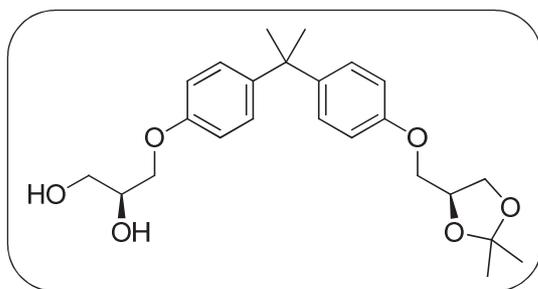
$[\alpha]_D^{20} = -4.5$ (c=0.21, CH₃OH)

Chiral-HPLC: Column Chiralpak IA; heptane : IPA : EtOH 50:25:25; 0.5 mL/min; $\lambda = 254$ nm; *t_R* **EPI002** (2R, 20S) = 24.2 min

Spectroscopic data is consistent with **EPI003** (2S,20R).



8.4.13. (S)-3-(4-(2-(4-(((S)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol ((2S,20S)-**195**)



General procedure 8.4.A was carried out with (S)-**194** (121 mg, 0.35 mmol), TEA (24.5 μ L, 0.18 mmol), and (S)-glycidol (31 μ L, 0.46 mmol) in EtOH (2 mL) to give (2S,20S)-**195** (105 mg, 71%) as a pale yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 7.13 (m, 4H), 6.81 (m, 4H), 4.45 (apt p, J = 6.0 Hz, 1H), 4.15 (apt dd, J = 8.5, 6.0 Hz, 1H), 4.08 (m, 1H),

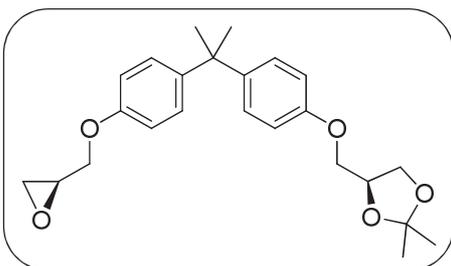
4.06 – 4.01 (m, 3H), 3.90 (m, 2H), 3.83 (apt dd, J = 11.5, 4.0 Hz, 1H), 3.74 (apt dd, J = 11.5, 5.5 Hz, 1H), 2.65 (br, 1H), 2.10 (br, 1H), 1.63 (s, 6H), 1.45 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 156.4 (C), 156.2 (C), 143.8 (C), 143.5 (C), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 113.9 (CH), 109.7 (C), 74.0 (CH), 70.3 (CH), 69.2 (CH₂), 68.8 (CH₂), 66.9 (CH₂), 63.7 (CH₂), 41.7 (C), 31.0 (CH₃), 26.8 (CH₃), 25.4 (CH₃).

IR (film, ν_{\max} / cm⁻¹): 3404 (OH), 2975, 2932, 1510, 1249, 1045, 829

HRMS (ES): calculated for C₂₄H₃₃O₆: 417.22717, found 417.22689

8.4.14. (S)-2,2-Dimethyl-4-((4-(2-(4-((S)-oxiran-2-ylmethoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)methyl)-1,3-dioxolane ((2S,20S)-197)



General procedure 8.4.D was carried out with (2S,20S)-**195** (59 mg, 0.14 mmol), DBTO (2 mg, 5%), TEA (22 μ L, 0.15 mmol), TsCl (30 mg, 0.15 mmol) and NaH (5 mg, 0.21 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) and THF (2 mL) to give (2S,20S)-**197** (38 mg, 68%) as a colorless oil.

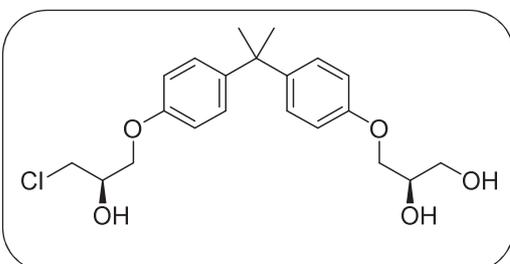
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.12 (m, 4H), 6.81 (m, 4H), 4.46 (apt p, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.20 – 4.12 (m, 2H), 4.03 (apt dd, $J = 9.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.94 (apt dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, 1H), 3.92 – 3.86 (m, 2H), 3.33 (m, 1H), 2.89 (apt dd, $J = 5.0, 4.0$ Hz, 1H), 2.74 (apt dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 1H), 1.63 (s, 6H), 1.45 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 156.4 (C), 156.3 (C), 143.6 (C), 143.5 (C), 127.75 (CH), 127.70 (CH), 113.9 (CH), 113.8 (CH), 109.7 (C), 74.00 (CH), 68.75 (CH_2), 68.70 (CH_2), 66.9 (CH_2), 50.2 (CH), 44.8 (CH_2), 41.7 (C), 31.0 (CH_3), 26.8 (CH_3), 25.3 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 2968, 1508, 1248, 1183, 1038, 829

HRMS (ES): calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_5$: 399.21660, found 399.21672

8.4.15. (R)-3-(4-(2-(4-((R)-3-Chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol (EPI004 (2R,20R))



General procedure 8.4.E was carried out with (2S,20S)-**197** (30 mg, 0.08 mmol) and $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (39 mg, 0.11 mmol) in ACN (3 mL) to give **EPI004** (2R,20R) (22 mg, 74%, $ee > 99\%$, $dr. 97 : 3$) as a colorless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.4$ ($c=0.21$, CH_3OH)

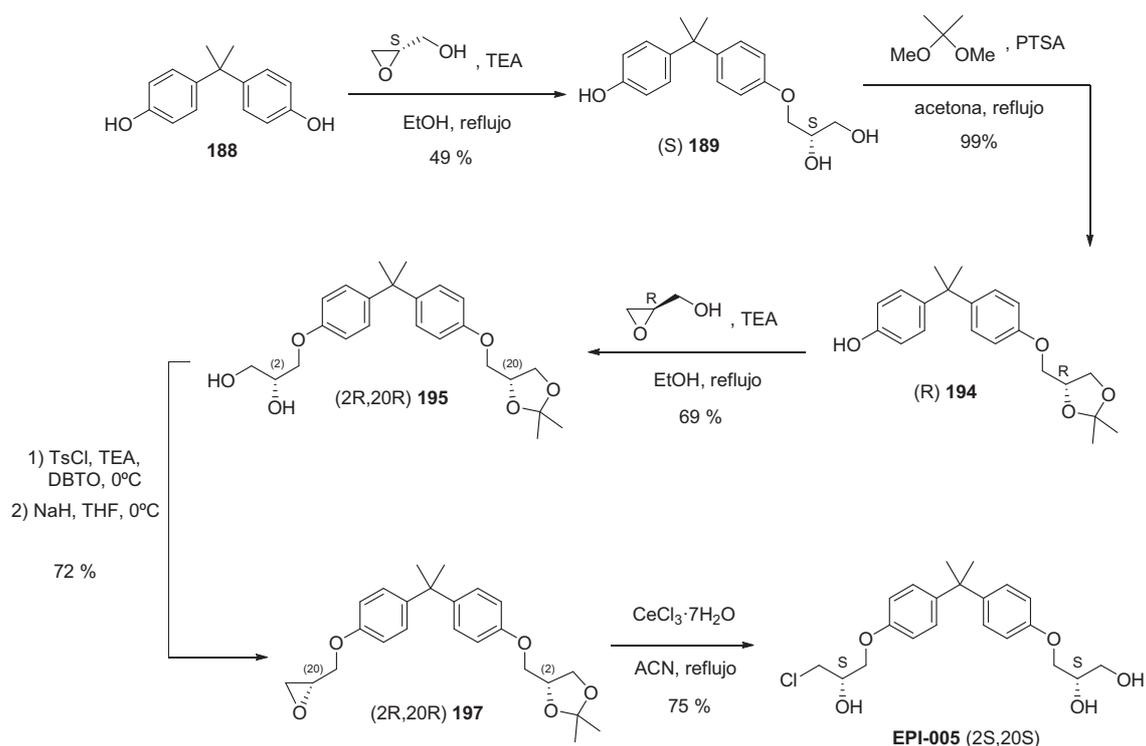
Chiral-HPLC: Column Chiralpak IA; heptane : IPA : EtOH 50:25:25; 0.5 mL/min; $\lambda = 254$ nm; t_{R} **EPI002** (2R, 20S) = 25.7 min

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 7.13 (m, 4H), 6.81 (m, 4H), 4.20 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.06 (m, 2H), 4.02 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 3.78 (apt dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, 2H), 3.70 (apt dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, 1H), 2.64 (br, 1H), 2.58 (br, 1H), 2.11 (br, 1H), 1.63 (s, 6H).

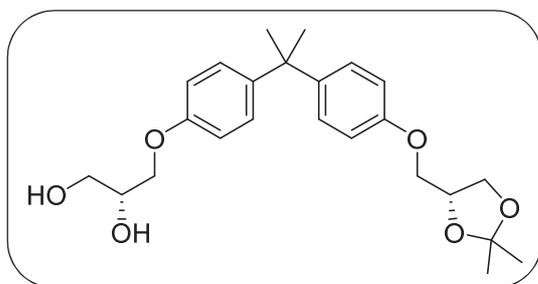
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 156.2 (C), 156.0 (C), 143.9 (C), 143.7 (C), 127.85 (CH), 127.80 (CH), 113.95 (CH), 113.90 (CH), 70.3 (CH), 69.9 (CH), 69.2 (CH_2), 68.4 (CH_2), 63.7 (CH_2), 45.9 (CH_2), 41.7 (C), 31.0 (CH_3).

IR (film, ν_{max} / cm^{-1}): 3362 (OH), 2962, 1607, 1509, 1247, 1182, 1041, 828

HRMS (ES): calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClO}_5\text{Na}$: 417.14392, found 417.14424



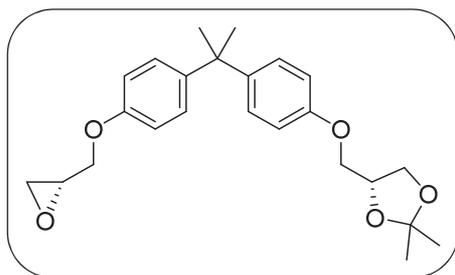
8.4.16. (R)-3-(4-(2-(4-(((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol ((2R,20R)-195)



General procedure 8.4.A was carried out with (R)-**194** (204 mg, 0.60 mmol), TEA (42 μL , 0.30 mmol), and (R)-glycidol (53 μL , 0.77 mmol) in EtOH (2 mL) to give (2R,20R)-**195** (172 mg, 69%) as pale yellow oil.

Spectroscopic data is consistent with (2S,20S)-**195**.

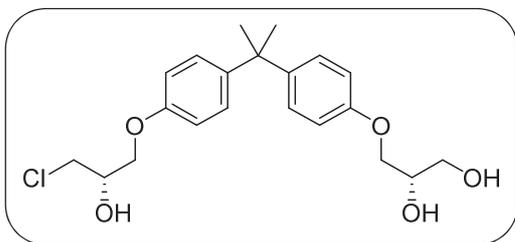
8.4.17. (R)-2,2-dimethyl-4-((4-(2-(4-((R)-Oxiran-2-ylmethoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)methyl)-1,3-dioxolane ((2R,20R)-197)



General procedure 8.4.D was carried out with (2R,20R)-**195** (174 mg, 0.42 mmol), DBTO (3.5 mg, 2%), TEA (76 μL , 0.54 mmol), TsCl (89 mg, 0.46 mmol) and NaH (13 mg, 0.49 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) and THF (7 mL) to give (2R,20R)-**197** (139 mg, 72%) as a colorless oil.

Spectroscopic data is consistent with (2S,20S)-**197**

8.4.18. (S)-3-(4-(2-(4-((S)-3-Chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol (EPI005 (2S,20S))



General procedure 8.4.E was carried out with (2R,20R)-**197** (122 mg, 0.31 mmol) and CeCl₃·7H₂O (160 mg, 0.43 mmol) in ACN (5 mL) to give **EPI005** (2S,20S) (90 mg, 75%, *ee* > 99%, *dr.* 95 : 5) as a colorless oil.

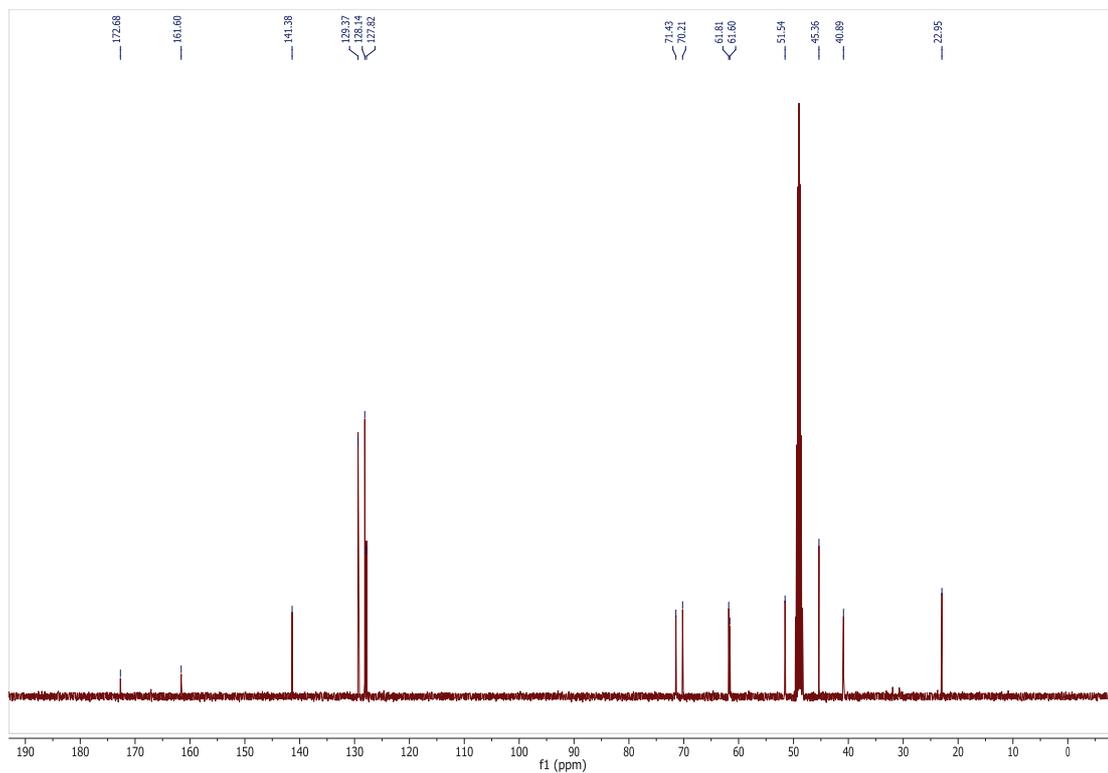
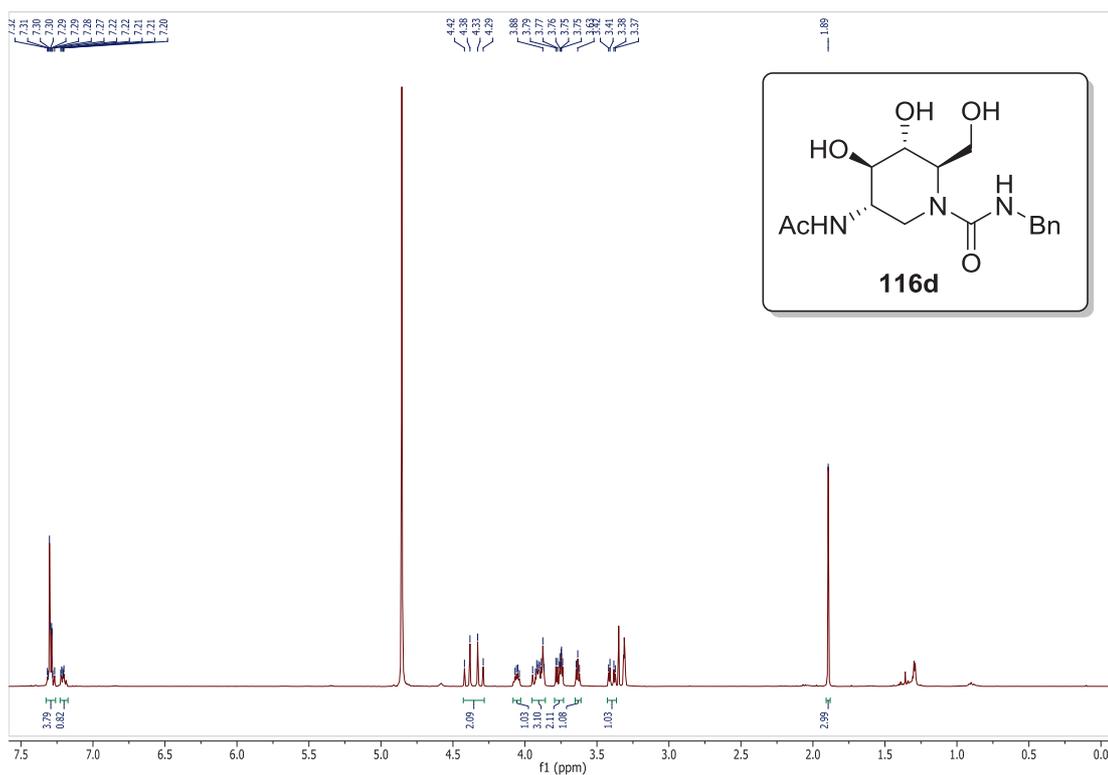
$[\alpha]_D^{20} = +4.3$ (c=0.245, CH₃OH)

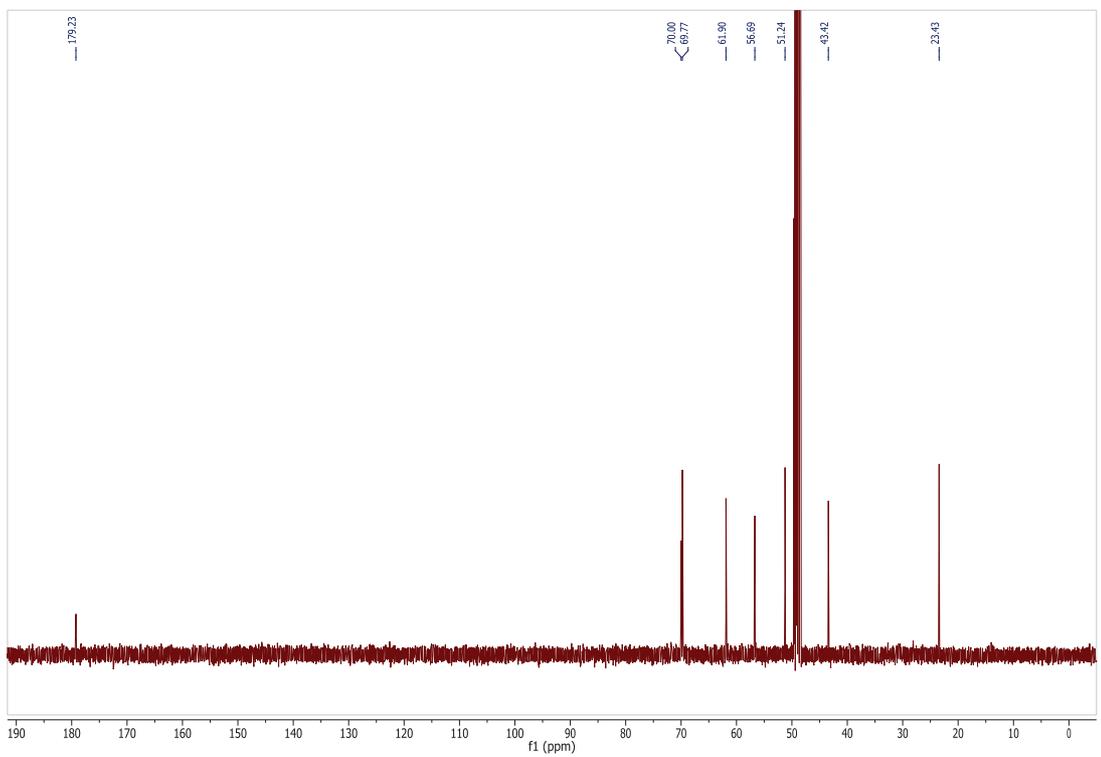
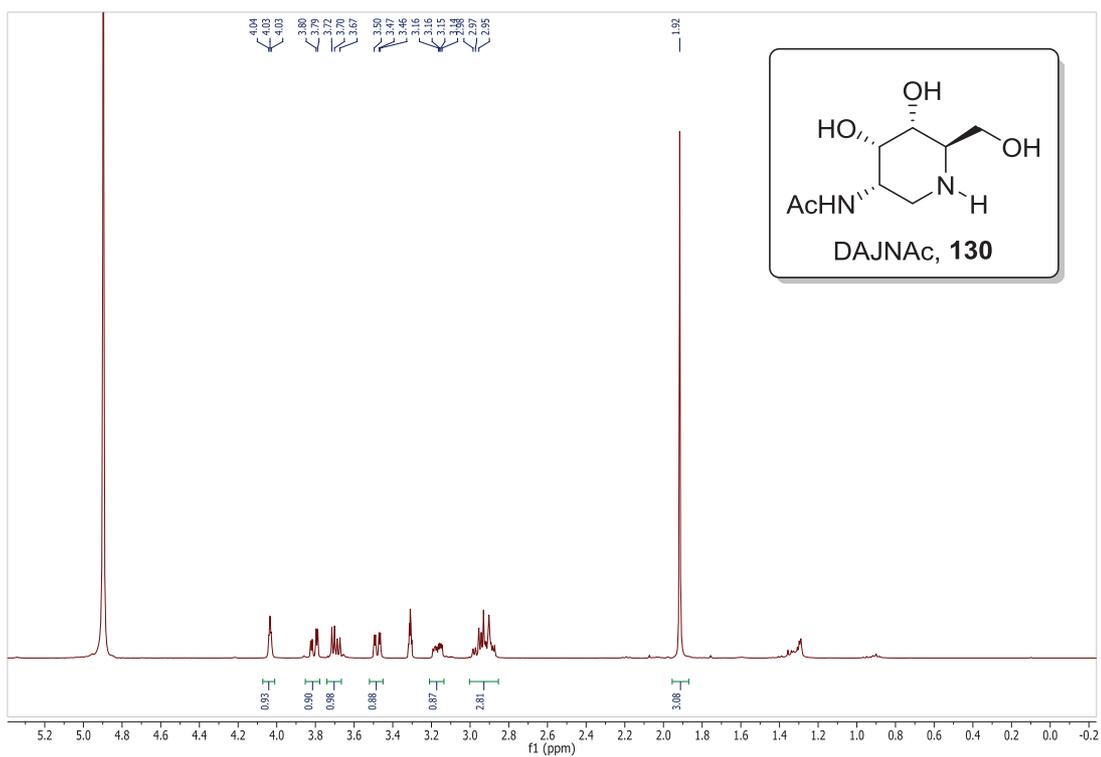
Chiral-HPLC: Column Chiralpak IA; heptane : IPA : EtOH 50:25:25; 0.5 mL/min; $\lambda = 254$ nm; t_R **EPI002** (2R, 20S) = 15.6 min

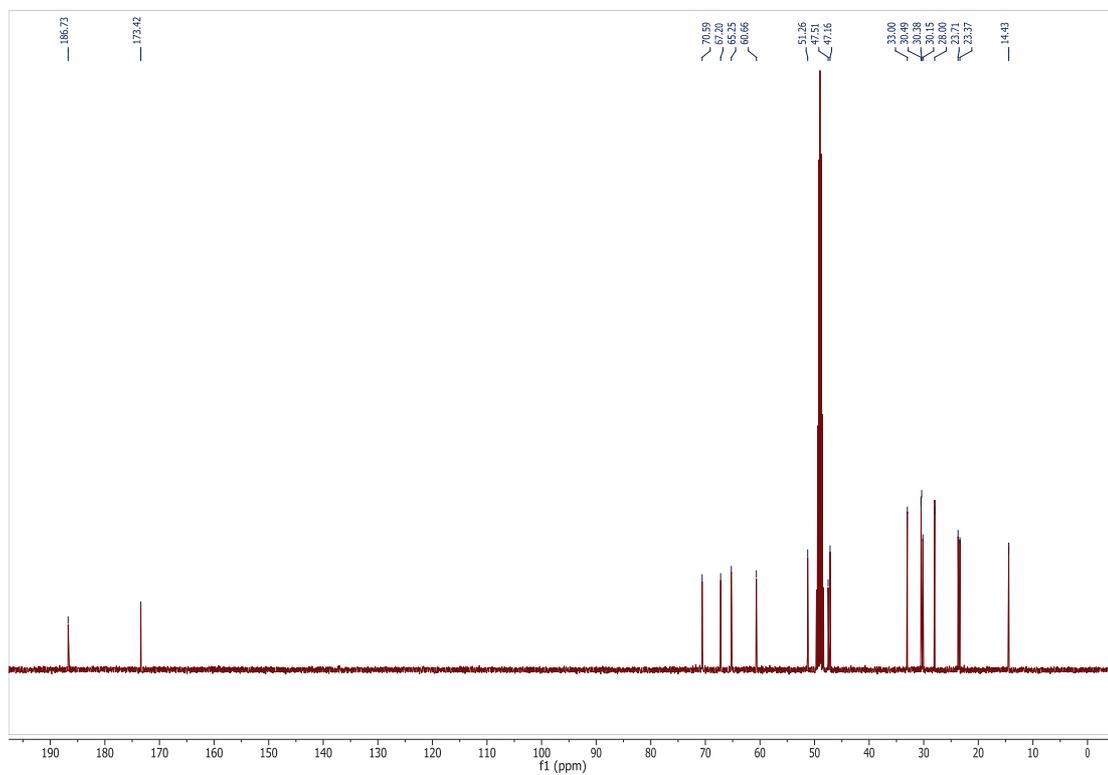
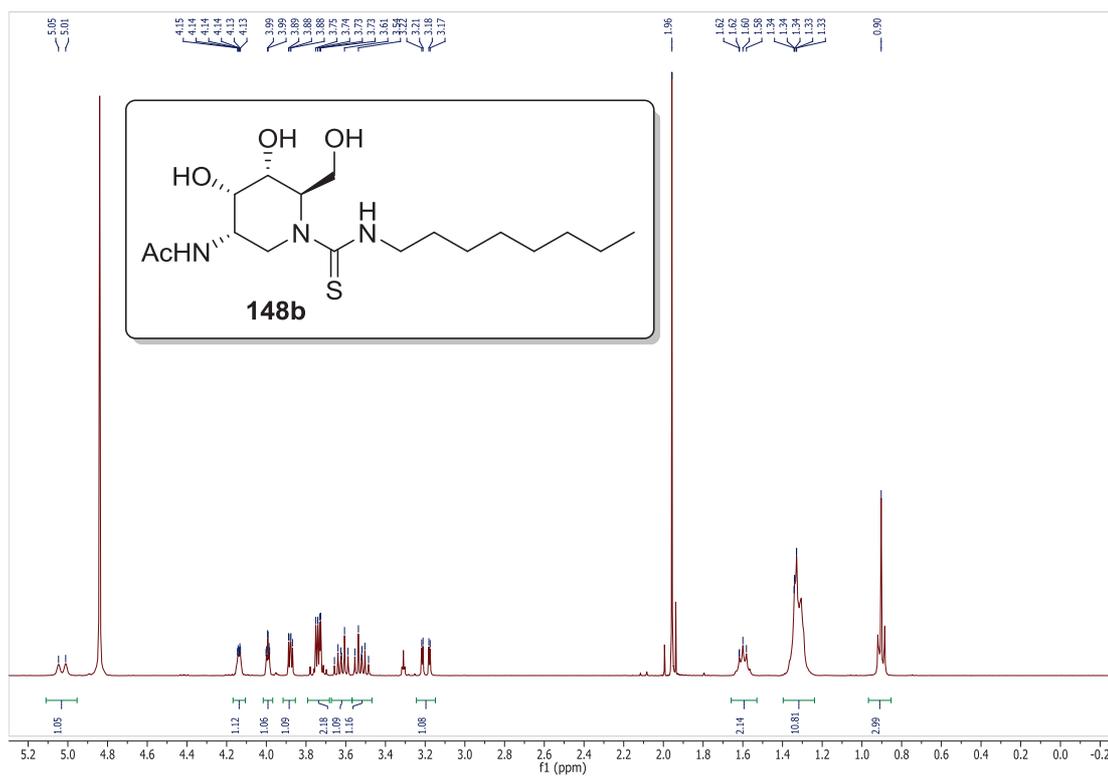
Spectroscopic data is consistent with **EPI004** (2R,20R).

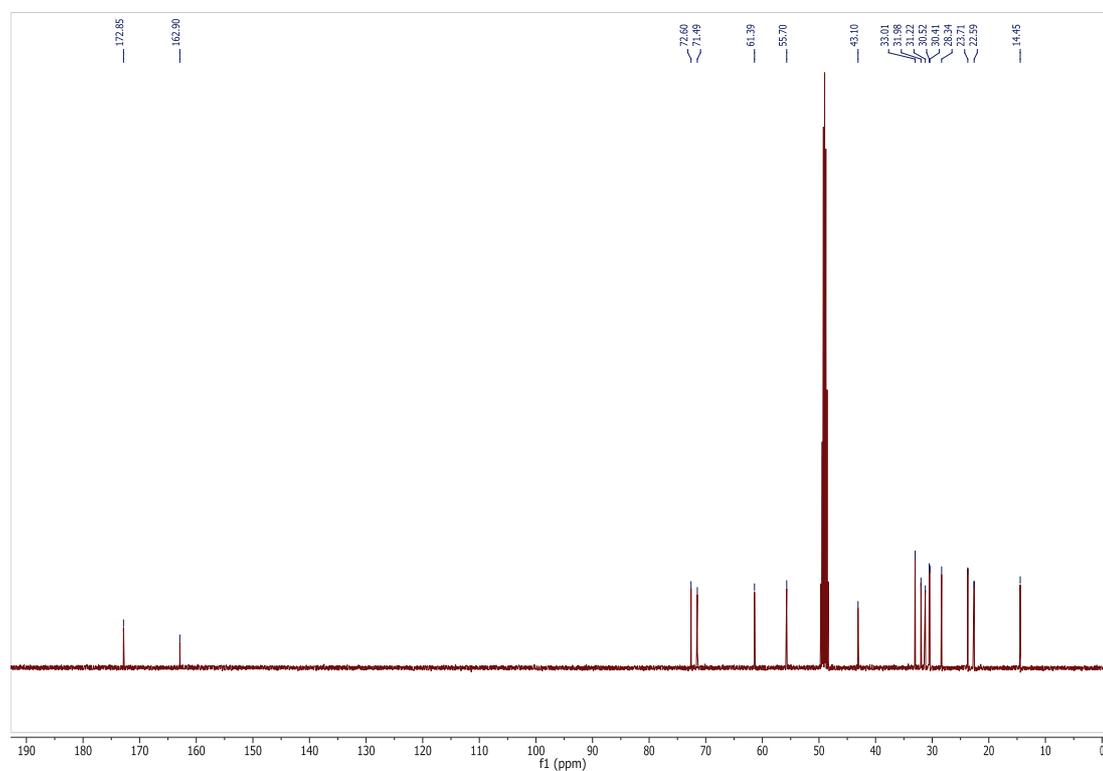
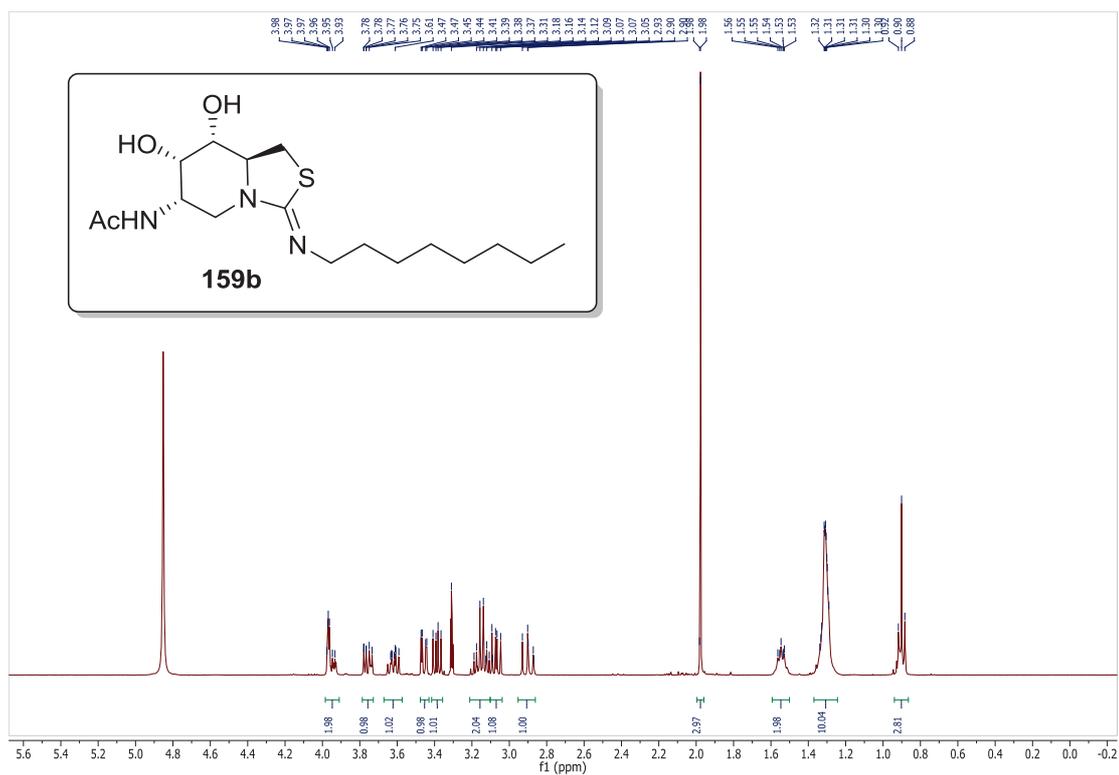
Anexo 1

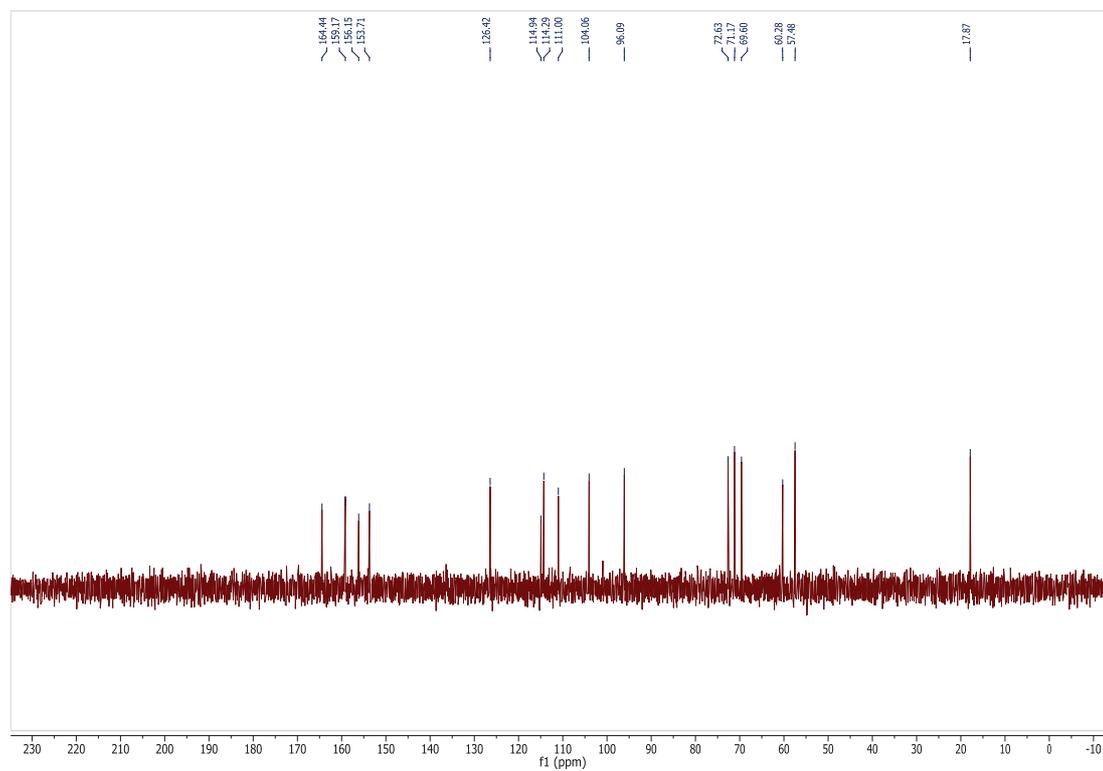
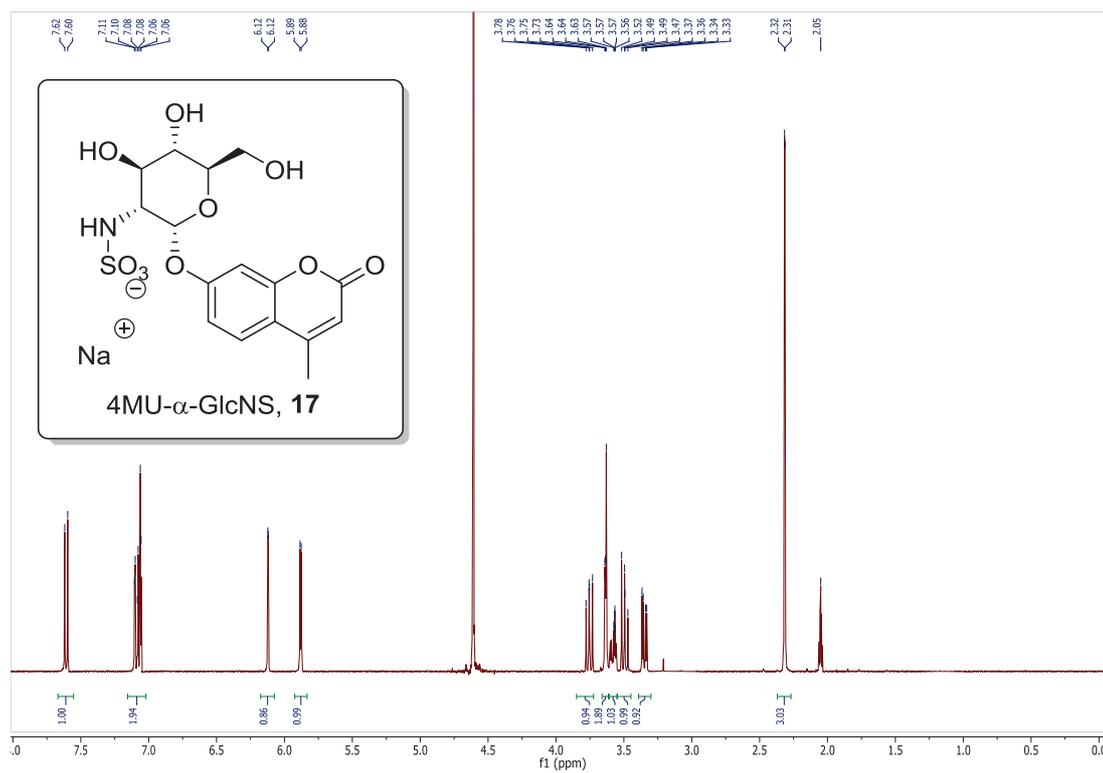
Selección de espectros

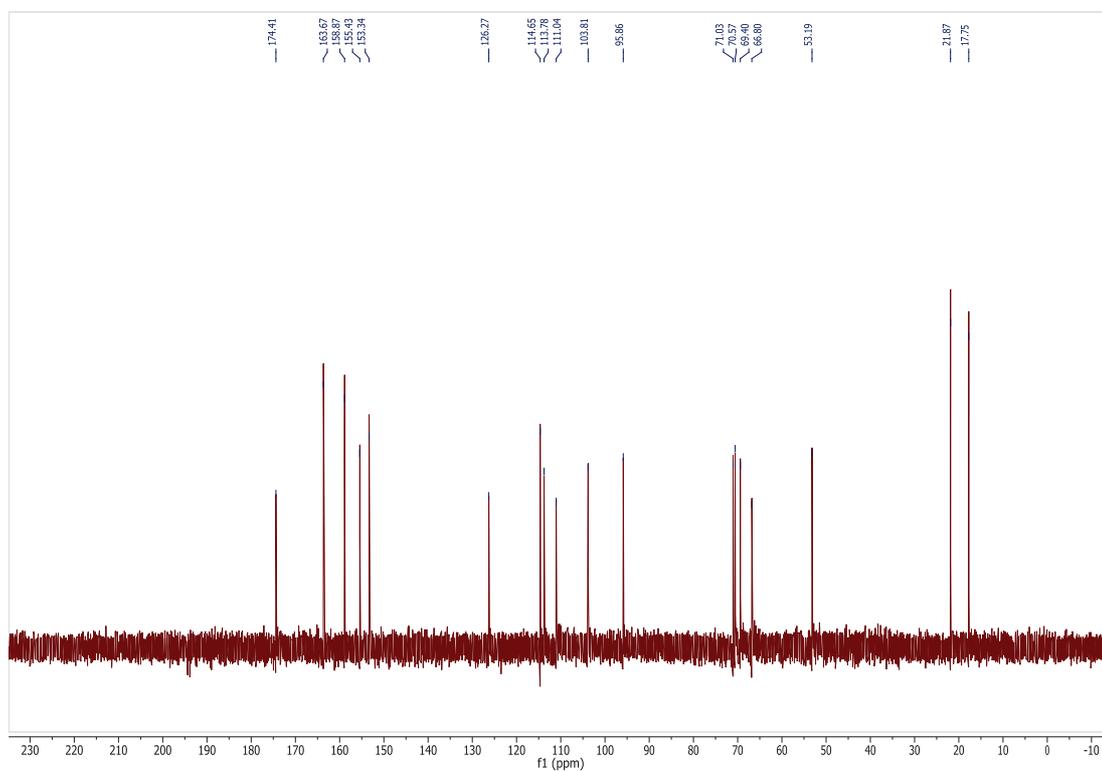
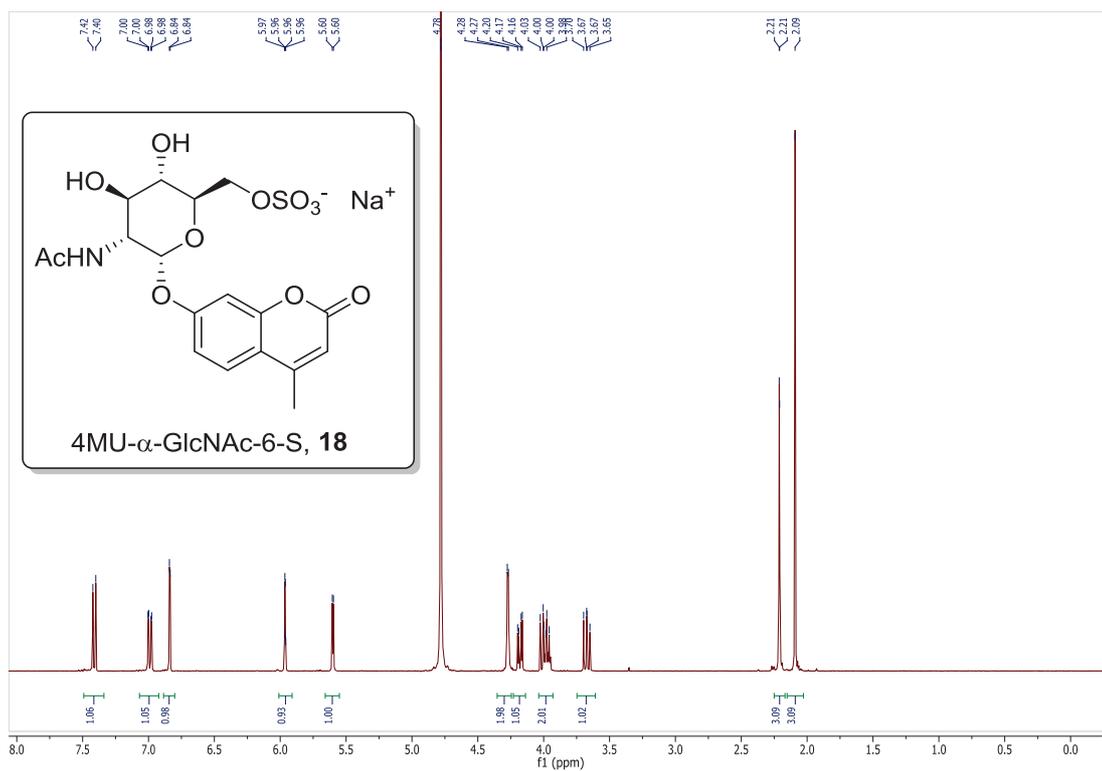


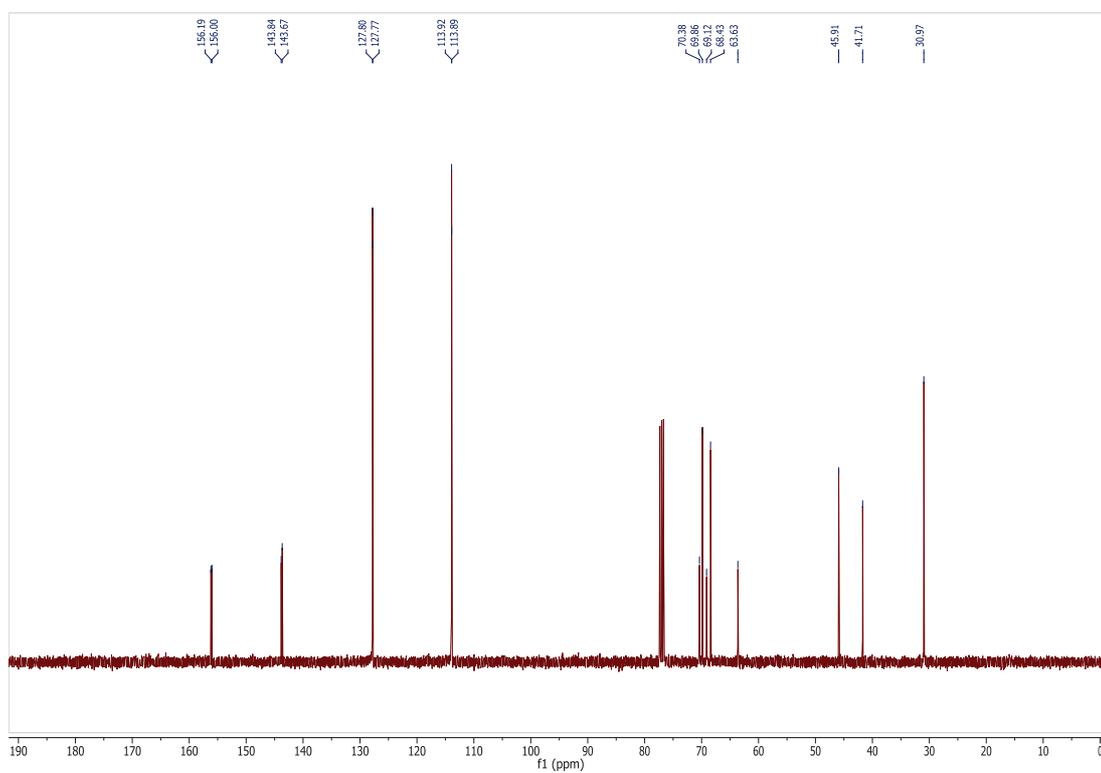
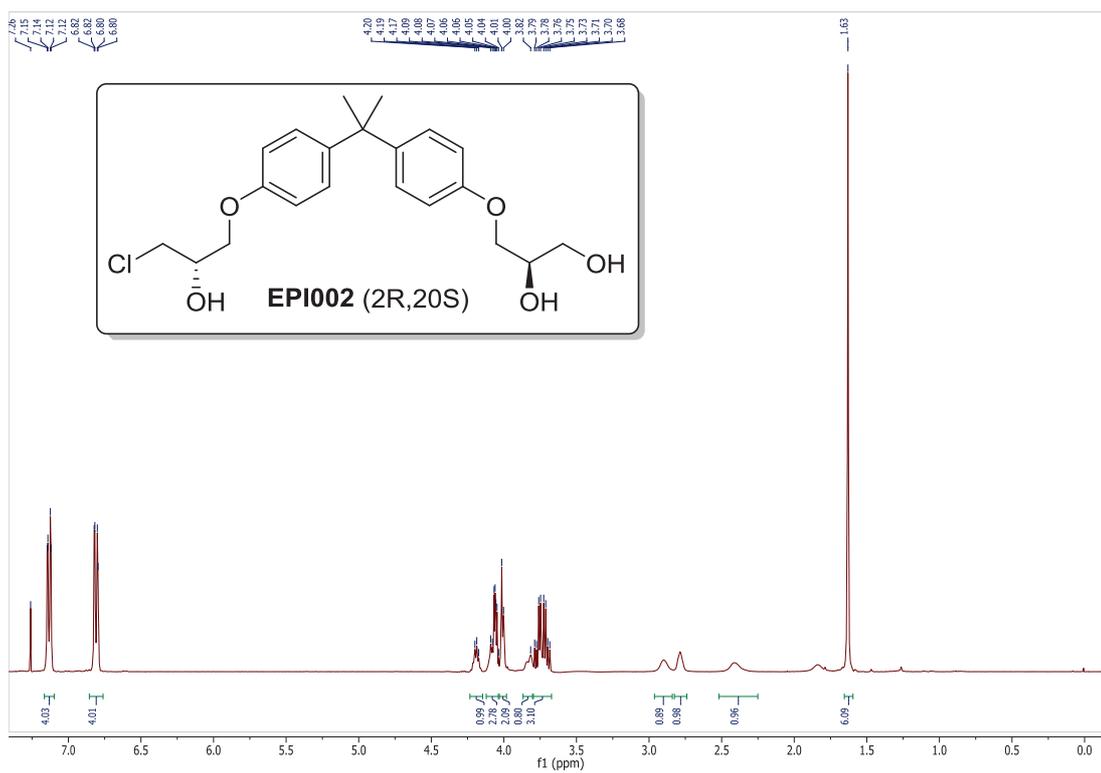








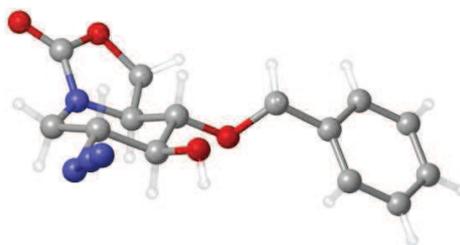
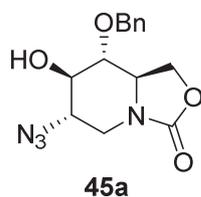




Anexo 2

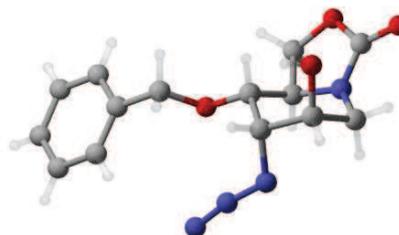
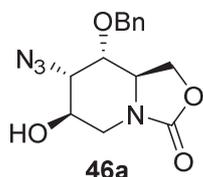
Datos de Rayos X

Anexo 2.1. Datos de cristalización de 45a



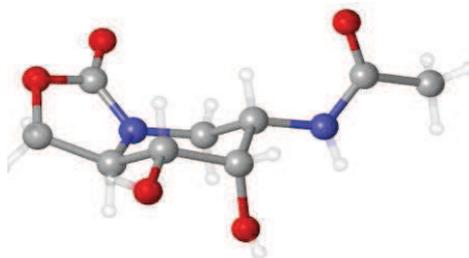
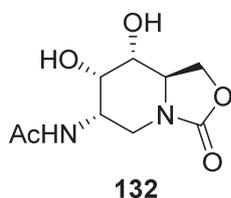
Empirical formula	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄	
Formula weight	304.31	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2(1)2(1)2(1)	
Unit cell dimensions	a = 8.1008(19) Å	α = 90.00 °.
	b = 9.745(2) Å	β = 90.00 °.
	c = 18.180(4) Å	γ = 90.00 °.
Volume	1435.2(6) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.408 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.106 mm ⁻¹	
F(000)	640	
Crystal size	0.30 x 0.20 x 0.20 mm ³	
Theta range for data collection	2.24 to 36.57 °.	
Index ranges	-13 ≤ h ≤ 13, -16 ≤ k ≤ 16, -22 ≤ l ≤ 30	
Reflections collected	17453	
Independent reflections	7016 [R(int) = 0.0481]	
Completeness to theta = 36.57 °	0.992 %	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.9792 and 0.9690	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	7016 / 0 / 200	
Goodness-of-fit on F ²	0.973	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0463, wR2 = 0.1326	
R indices (all data)	R1 = 0.0555, wR2 = 0.1420	
Absolute Structure Flack parameter	x = -0.4(6)	
Largest diff. peak and hole	0.507 and -0.309 e.Å ⁻³	

Anexo 2.2. Datos de cristalización de **46a**



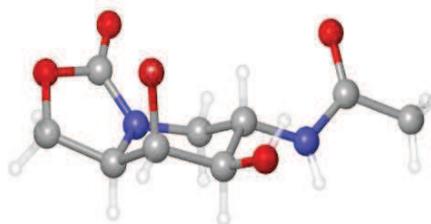
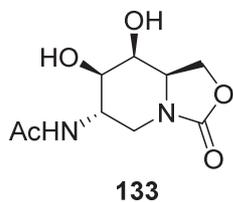
Empirical formula	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄	
Formula weight	304.31	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2(1)2(1)2(1)	
Unit cell dimensions	a = 9.6858(9)Å	α = 90°.
	b = 9.9838(6)Å	β = 90°.
	c = 15.1087(10)Å	γ = 90°.
Volume	1461.03(19) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.383 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.104 mm ⁻¹	
F(000)	640	
Crystal size	0.03 x 0.02 x 0.02 mm ³	
Theta range for data collection	2.445 to 31.581°.	
Index ranges	-6<=h<=13,-14<=k<=7,-22<=l<=19	
Reflections collected	9047	
Independent reflections	4568[R(int) = 0.0630]	
Completeness to theta =31.581°	95.9%	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.998 and 0.603	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4568/ 0/ 199	
Goodness-of-fit on F ²	1.143	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0576, wR2 = 0.1555	
R indices (all data)	R1 = 0.0617, wR2 = 0.1614	
Flack parameter	x =0.6(8)	
Largest diff. peak and hole	0.423 and -0.354 e.Å ⁻³	

Anexo 2.3. Datos de cristalización de 132



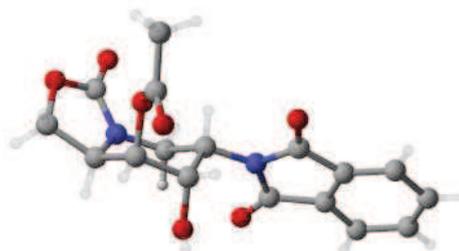
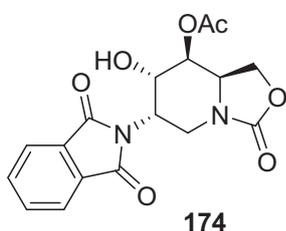
Empirical formula	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₅	
Formula weight	230.22	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2(1)2(1)2(1)	
Unit cell dimensions	a = 8.1709(5) Å	α = 90.00 °.
	b = 8.5167(5) Å	β = 90.00 °.
	c = 14.6277(9) Å	γ = 90.00 °.
Volume	1017.93(11) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.502 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.123 mm ⁻¹	
F(000)	488	
Crystal size	0.20 x 0.12 x 0.08 mm ³	
Theta range for data collection	2.77 to 30.26 °.	
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 11, -11 ≤ k ≤ 11, -20 ≤ l ≤ 18	
Reflections collected	11603	
Independent reflections	2769 [R(int) = 0.0274]	
Completeness to theta = 30.26 °	94.0%	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.9902 and 0.9757	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2769 / 0 / 148	
Goodness-of-fit on F ²	1.054	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0323, wR2 = 0.0859	
R indices (all data)	R1 = 0.0330, wR2 = 0.0865	
Flack parameter	x = 0.5(7)	
Largest diff. peak and hole	0.316 and -0.270 e.Å ⁻³	

Anexo 2.4. Datos de cristalización de 133



Empirical formula	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₅	
Formula weight	230.22	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2(1)2(1)2(1)	
Unit cell dimensions	a = 9.0351(5) Å	α = 90.00 °.
	b = 9.8044(5) Å	β = 90.00 °.
	c = 11.3371(6) Å	γ = 90.00 °.
Volume	1004.28(9) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.523 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.125 mm ⁻¹	
F(000)	488	
Crystal size	0.20 x 0.10 x 0.10 mm ³	
Theta range for data collection	2.88 to 34.46 °.	
Index ranges	-14 ≤ h ≤ 13, -15 ≤ k ≤ 13, -17 ≤ l ≤ 16	
Reflections collected	7856	
Independent reflections	3805 [R(int) = 0.0140]	
Completeness to theta = 34.46 °	93.4%	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.9876 and 0.9754	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3805 / 0 / 201	
Goodness-of-fit on F ²	1.070	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0257, wR2 = 0.0684	
R indices (all data)	R1 = 0.0262, wR2 = 0.0689	
Flack parameter	x = 0.0(4)	
Largest diff. peak and hole	0.399 and -0.183 e.Å ⁻³	

Anexo 2.5. Datos de cristalización de 174

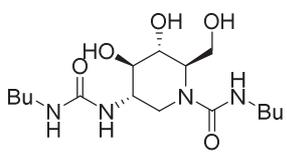
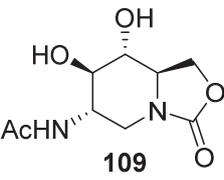
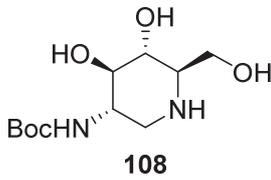


Empirical formula	C _{17.5} H ₁₇ ClN ₂ O ₇	
Formula weight	402.78	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2(1)	
Unit cell dimensions	a = 10.7978(8)Å	α = 90°.
	b = 14.4957(11)Å	β = 91.9758(19)°.
	c = 11.4071(7)Å	γ = 90°.
Volume	1784.4(2) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.499 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.259 mm ⁻¹	
F(000)	836	
Crystal size	0.06 x 0.06 x 0.01 mm ³	
Theta range for data collection	1.786 to 32.065°.	
Index ranges	-15<=h<=15,-21<=k<=21,-16<=l<=9	
Reflections collected	18799	
Independent reflections	18799[R(int) = ?]	
Completeness to theta =32.065°	94.1%	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.997 and 0.738	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	18799/ 1/ 501	
Goodness-of-fit on F ²	1.045	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0512, wR2 = 0.1370	
R indices (all data)	R1 = 0.0555, wR2 = 0.1412	
Flack parameter	x =0.12(7)	
Largest diff. peak and hole	0.876 and -0.747 e.Å ⁻³	

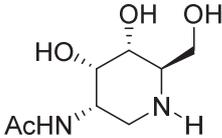
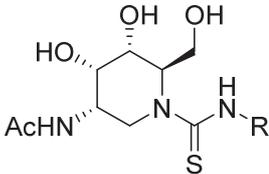
Anexo 3

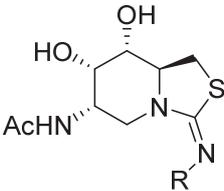
**Valores de inhibición de
iminoazúcares vs glicosidasas**

K_i / μM			
Enzyme	94	102	98
β -galactosidase (bovine liver)	n.d.	336	949
β -galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	n.i.	n.i.	n.i.
β -glucosidase (bovine liver)	504	n.d.	n.d.
β -glucosidase (almonds pH 7.3)	n.i.	n.i.	n.i.
β -glucosidase (almonds pH 5.5)	n.i.	n.i.	n.i.
α -glucosidase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.
α -galactosidase (green coffee)	n.i.	n.i.	n.i.
isomaltase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.
trehalase (bovine kidney)	n.d.	n.d.	n.i.
α -mannosidase (jack bean)	n.i.	368	n.i.
β -mannosidase (helix pomatia)	n.i.	n.i.	n.i.
Naringinase (<i>penicilium decumbens</i>)	n.i.	n.i.	n.d.
Amiloglucosidase (<i>Aspergillus Niger</i>)	n.d.	667	n.i.
β -N-Acetylglucosaminidase (Human Placenta)	427	164	327
β -N-Acetylglucosaminidase (Bovine Kidney)	524	223	596
β -N-Acetylglucosaminidase (Jack Bean)	130	599	656

K_i / μM			
Enzyme			
β -galactosidase (bovine liver)	n.d.	n.i.	n.i.
β -galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	n.i.	n.i.	n.i.
β -glucosidase (bovine liver)	n.i.	n.d.	n.d.
β -glucosidase (almonds pH 7.3)	n.i.	n.i.	n.i.
β -glucosidase (almonds pH 5.5)	n.i.	n.i.	n.i.
α -glucosidase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.
α -galactosidase (green coffee)	n.i.	n.i.	n.i.
isomaltase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.
trehalase (bovine kidney)	n.i.	n.d.	n.d.
α -mannosidase (jack bean)	n.i.	n.i.	n.i.
β -mannosidase (<i>helix pomatia</i>)	n.i.	n.i.	n.i.
Naringinase (<i>penicilium decumbens</i>)	n.d.	n.i.	n.i.
Amiloglucosidase (<i>Aspergillus Niger</i>)	n.i.	n.i.	n.i.
β -N-Acetylglucosaminidase (Human Placenta)	n.i.	492	499
β -N-Acetylglucosaminidase (Bovine Kidney)	n.i.	284	680
β -N-Acetylglucosaminidase (Jack Bean)	n.i.	365	599

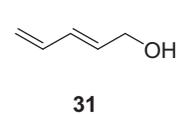
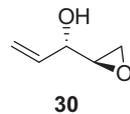
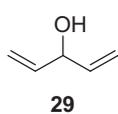
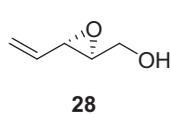
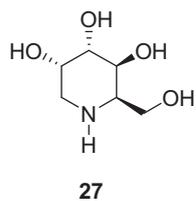
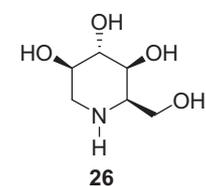
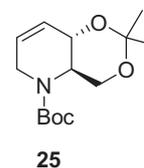
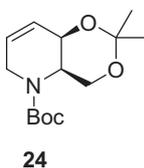
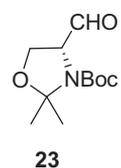
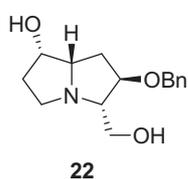
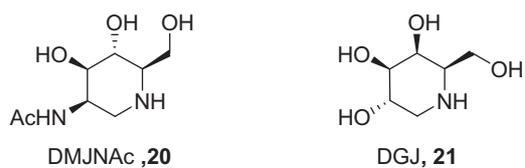
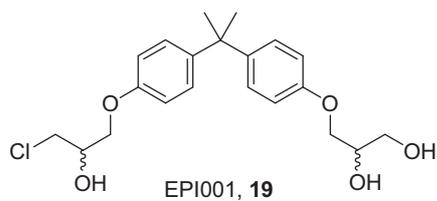
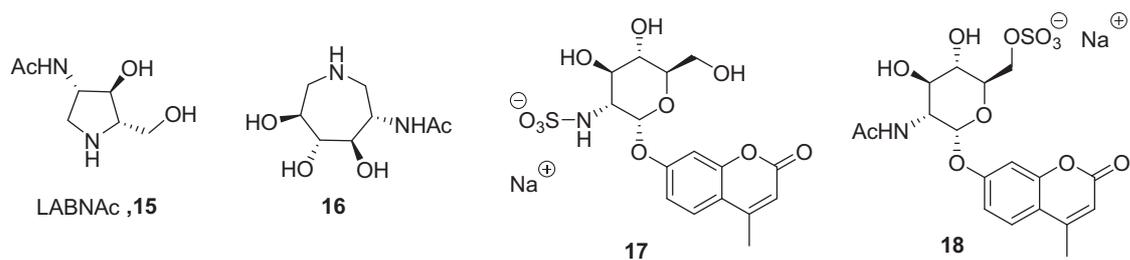
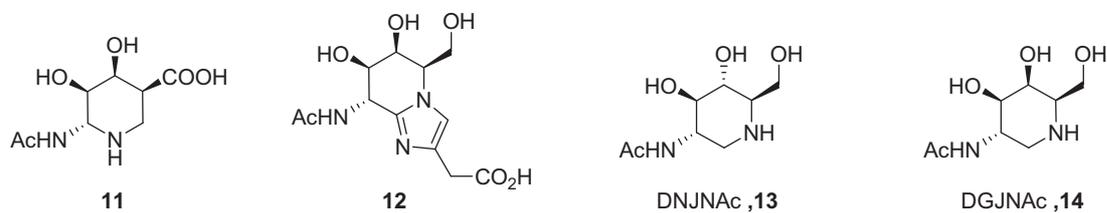
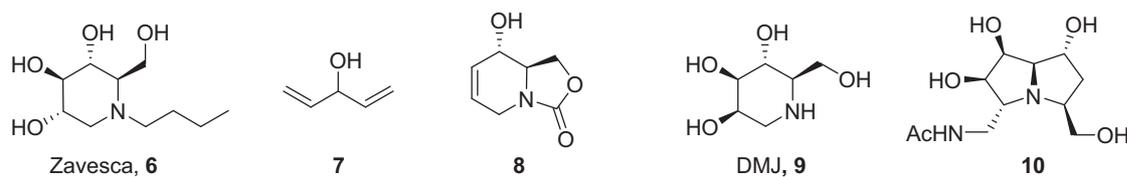
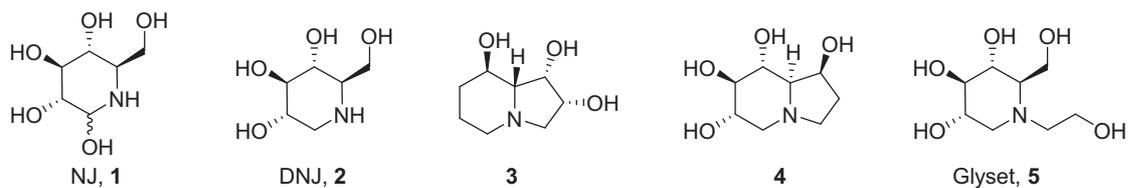
Enzyme	K _i / μM			
	R = Bu (116a)	R = n-Oct (116b)	R = Ph (116c)	R = Bn (116d)
α-glucosidase (baker's yeast)	548	n.i.	n.i.	n.i.
Isomaltase (baker yeast)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Amyloglucosidase (<i>Asp. niger</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β-glucosidase (bovine liver)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β-glucosidase (almonds pH 7.3)	152	n.i.	n.i.	n.i.
β-glucosidase (almonds pH 5.5)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Naringinase (<i>penicilium decumbens</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β-galactosidase (bovine liver)	11.9	n.d.	n.d.	n.d.
β-galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α-galactosidase (green coffee)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α-mannosidase (jack bean)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β-mannosidase (helix pomatia)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β-N-Acetylglucosaminidase (Human Placenta)	56	33	2.1	20
β-N-Acetylglucosaminidase (Bovine Kidney)	138	82	4.1	24
β-N-Acetylglucosaminidase (Jack Bean)	26	19	1.1	10

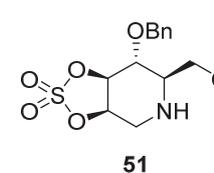
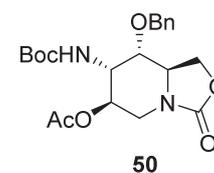
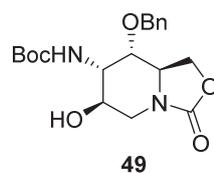
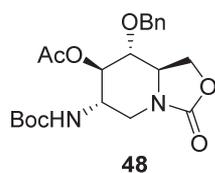
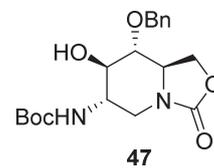
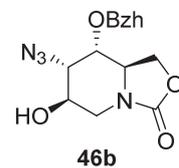
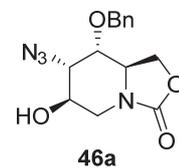
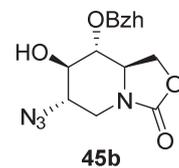
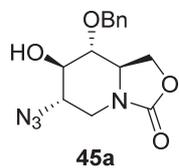
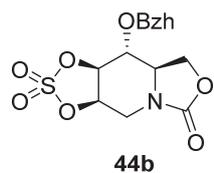
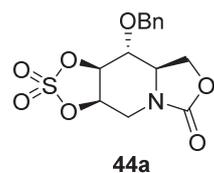
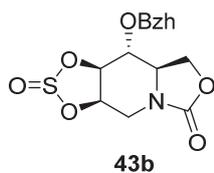
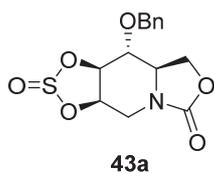
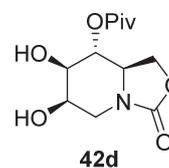
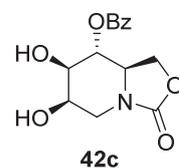
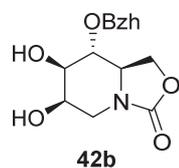
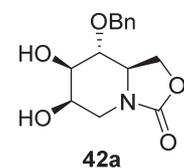
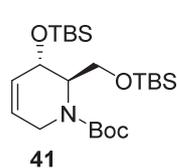
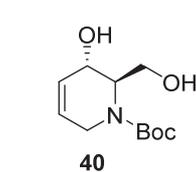
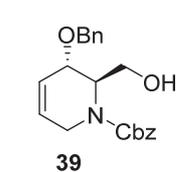
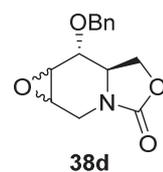
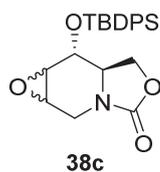
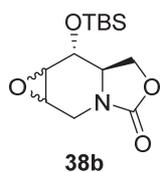
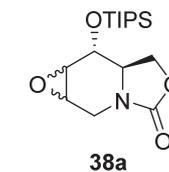
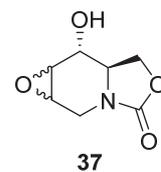
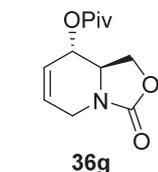
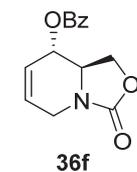
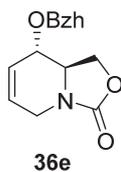
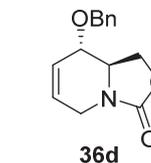
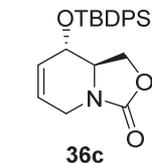
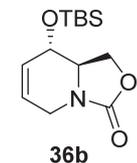
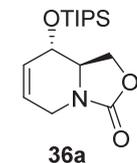
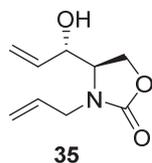
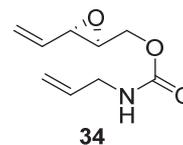
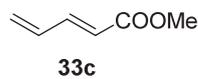
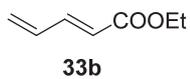
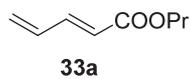
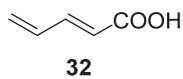
Enzyme					
	DAJNAc (130)	R = Bu (148a)	R = n-Oct (148b)	R = Bn (148d)	
α -glucosidase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
Isomaltase (baker yeast)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Amyloglucosidase (<i>Asp. niger</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
β -glucosidase (bovine liver)	n.i.	231 (341)	110 (189)	131 (110)	
β -glucosidase (almonds pH 7.3)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
Naringinase (<i>penicilium decumbens</i>)	n.i.	n.d.	n.d.	n.d.	
β -galactosidase (bovine liver)	n.i.	292 (286)	218 (280)	396 (305)	
β -galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
α -galactosidase (green coffee)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
α -mannosidase (jack bean)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
β -mannosidase (helix pomatia)	150 (163)	n.i.	n.i.	n.i.	
β -N-Acetylglucosaminidase (Human Placenta)	5.6	118	909	8.5	
β -N-Acetylglucosaminidase (Bovine Kidney)	2.6	88	n.i.	7.7	
β -N-Acetylglucosaminidase (Jack Bean)	2.6	75	363	15.1	
α -glucosidase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	

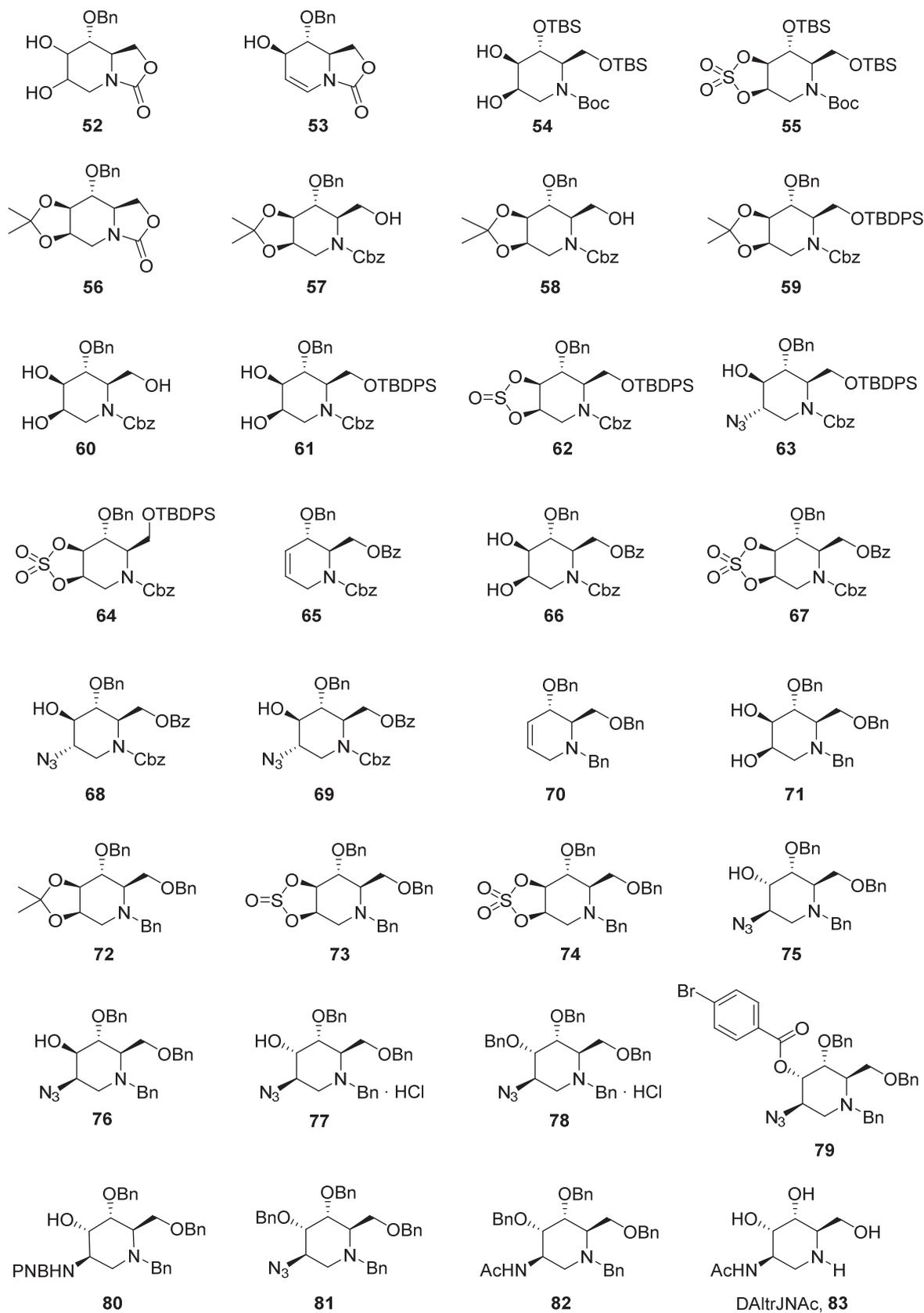
K_i / μM				
	Enzyme	R = Bu (159a)	R = n-Oct (159b)	R = Ph (159c)
α -glucosidase (baker's yeast)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Isomaltase (baker yeast)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amyloglucosidase (<i>Asp. niger</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β -glucosidase (bovine liver)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β -glucosidase (almonds pH 7.3)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Naringinase (<i>penicilium decumbens</i>)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β -galactosidase (bovine liver)	464	169	438	695
β -galactosidase (<i>Escherichia coli</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -galactosidase (green coffee)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -mannosidase (jack bean)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β -mannosidase (<i>helix pomatia</i>)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase (Human Placenta)	4.9	0.61	27.0	4.9
β - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase (Bovine Kidney)	2.9	0.65	38.0	11.9
β - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase (Jack Bean)	23.6	2.3	20.0	9.5

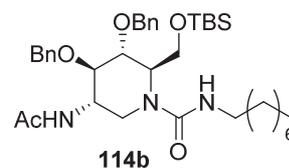
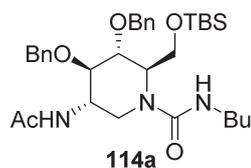
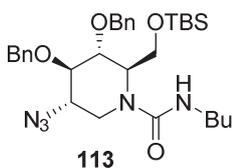
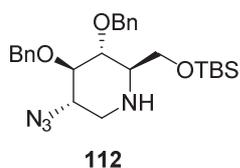
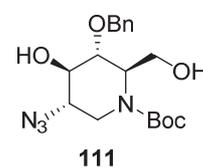
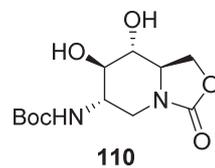
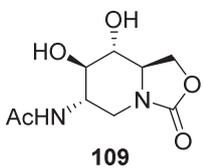
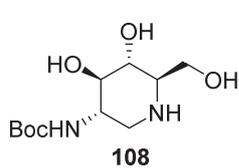
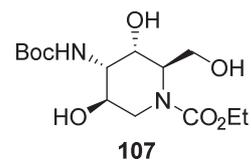
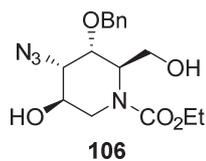
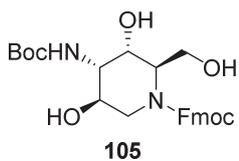
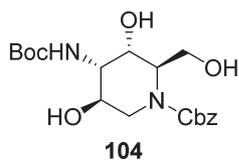
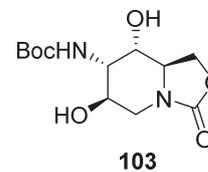
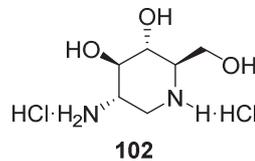
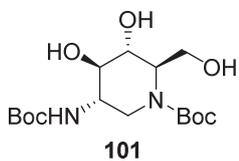
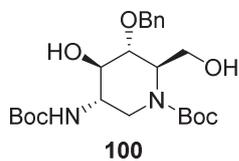
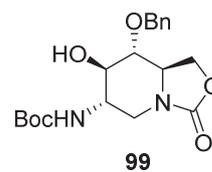
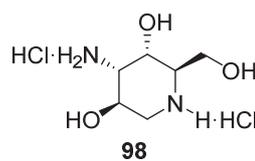
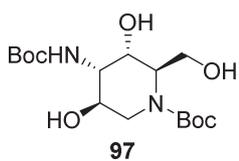
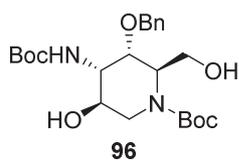
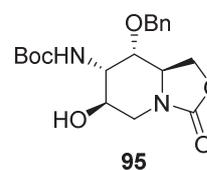
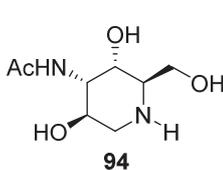
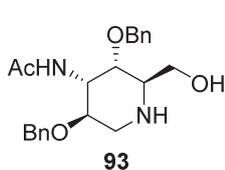
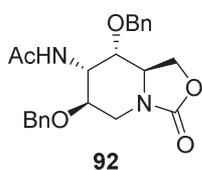
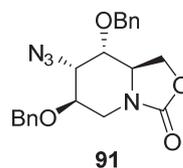
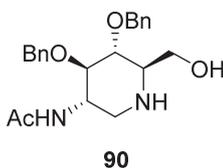
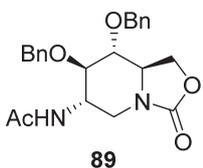
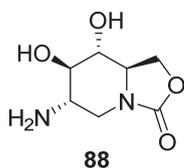
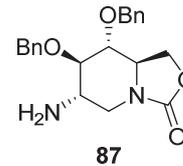
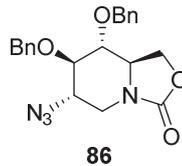
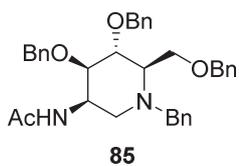
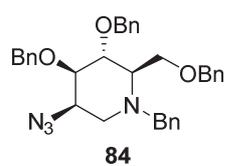
Anexo 4

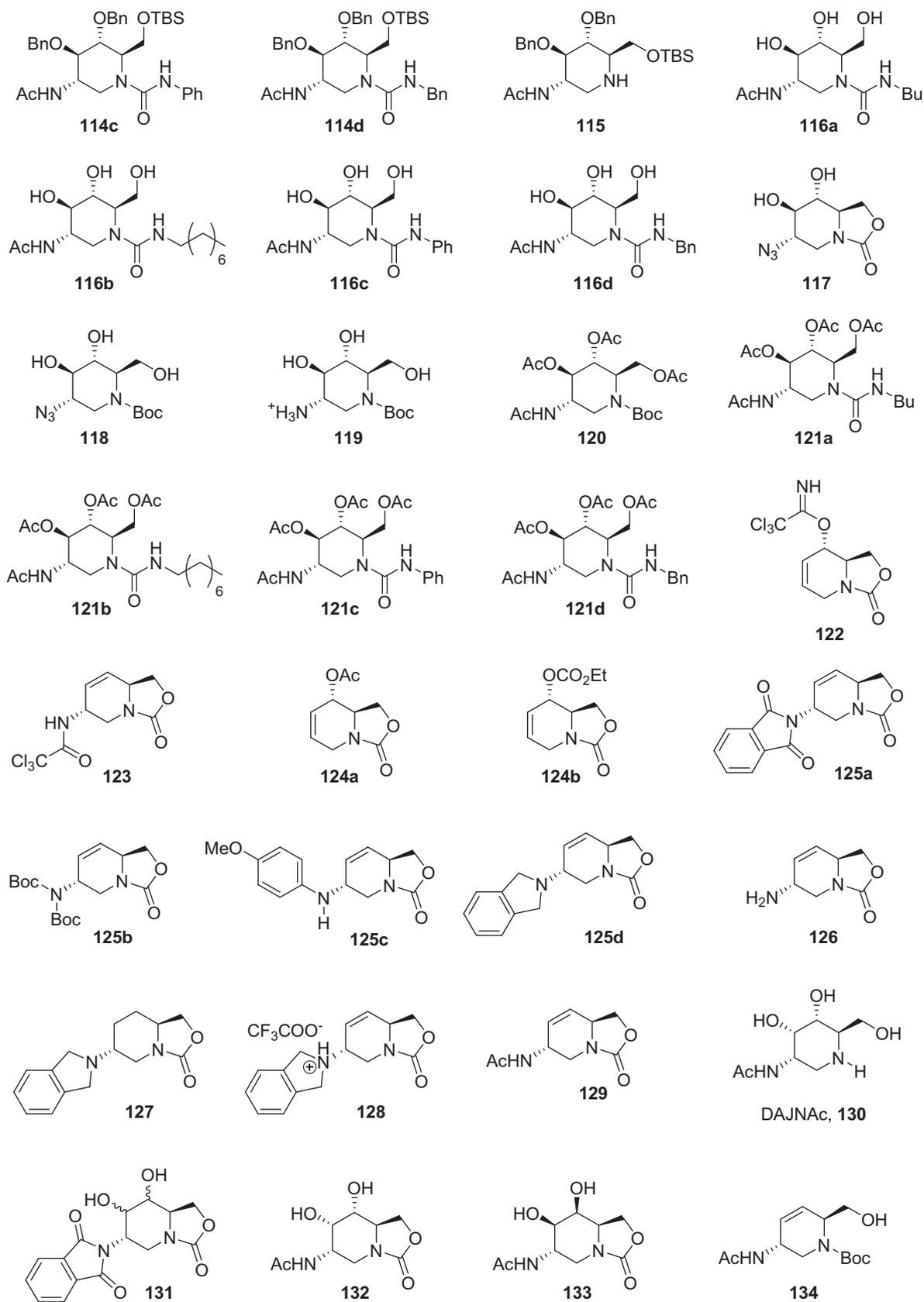
Índice de estructuras

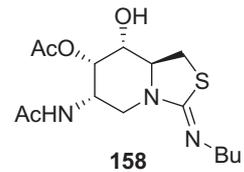
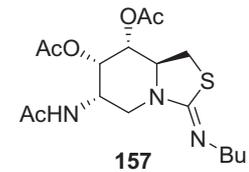
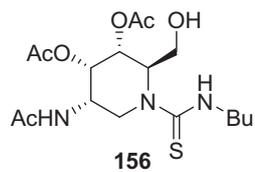
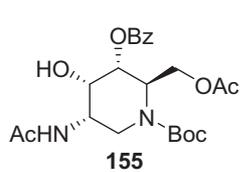
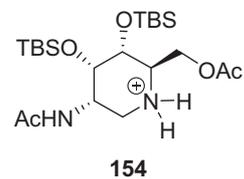
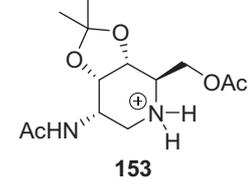
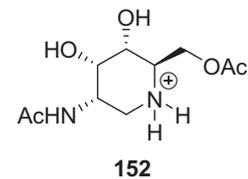
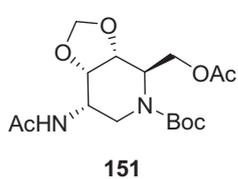
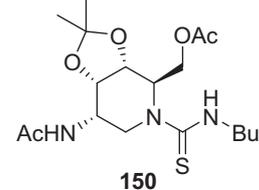
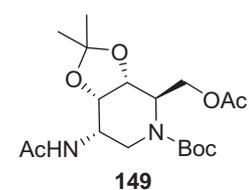
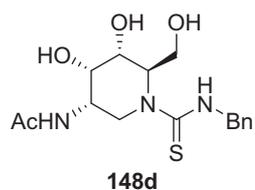
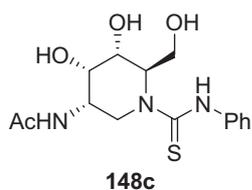
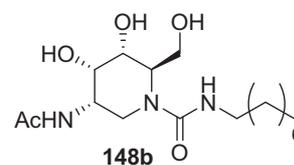
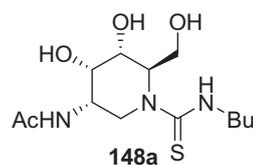
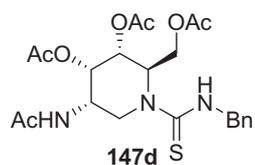
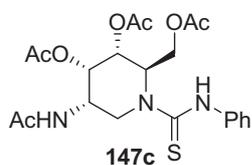
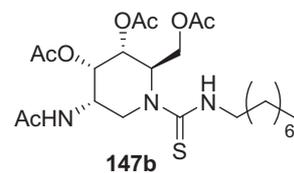
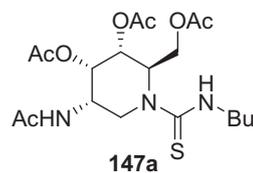
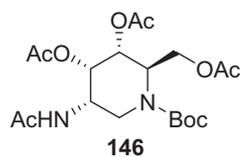
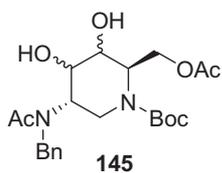
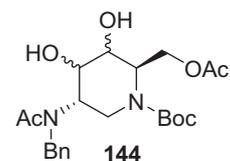
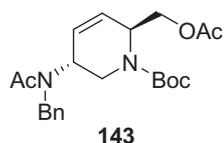
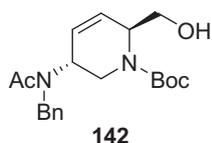
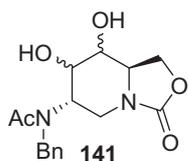
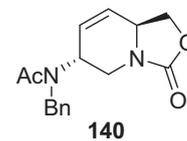
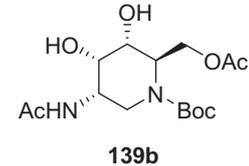
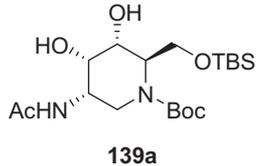
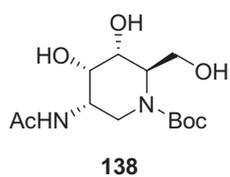
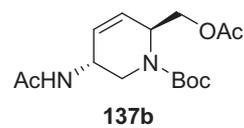
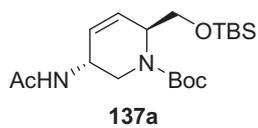
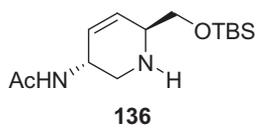
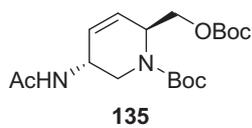


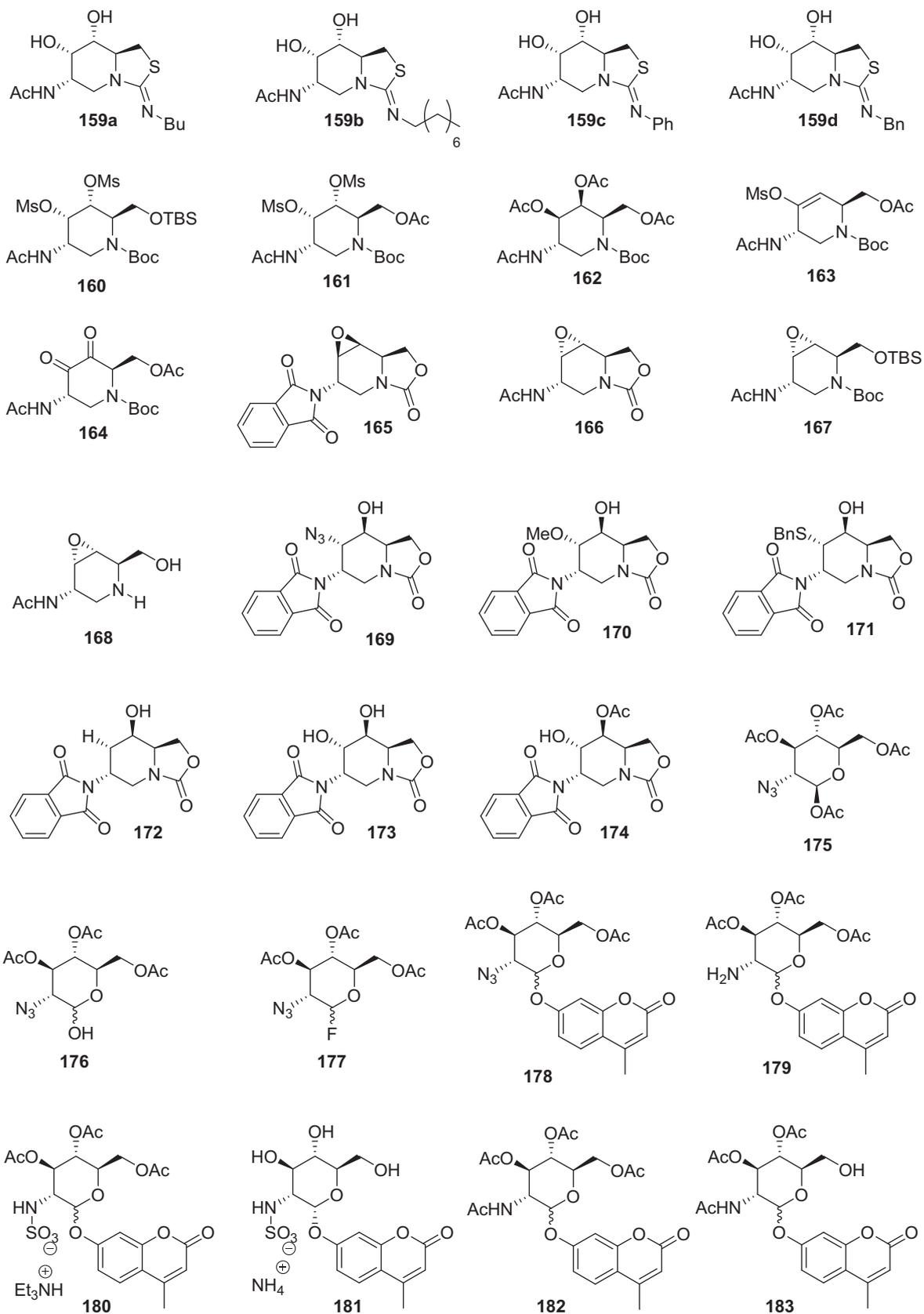


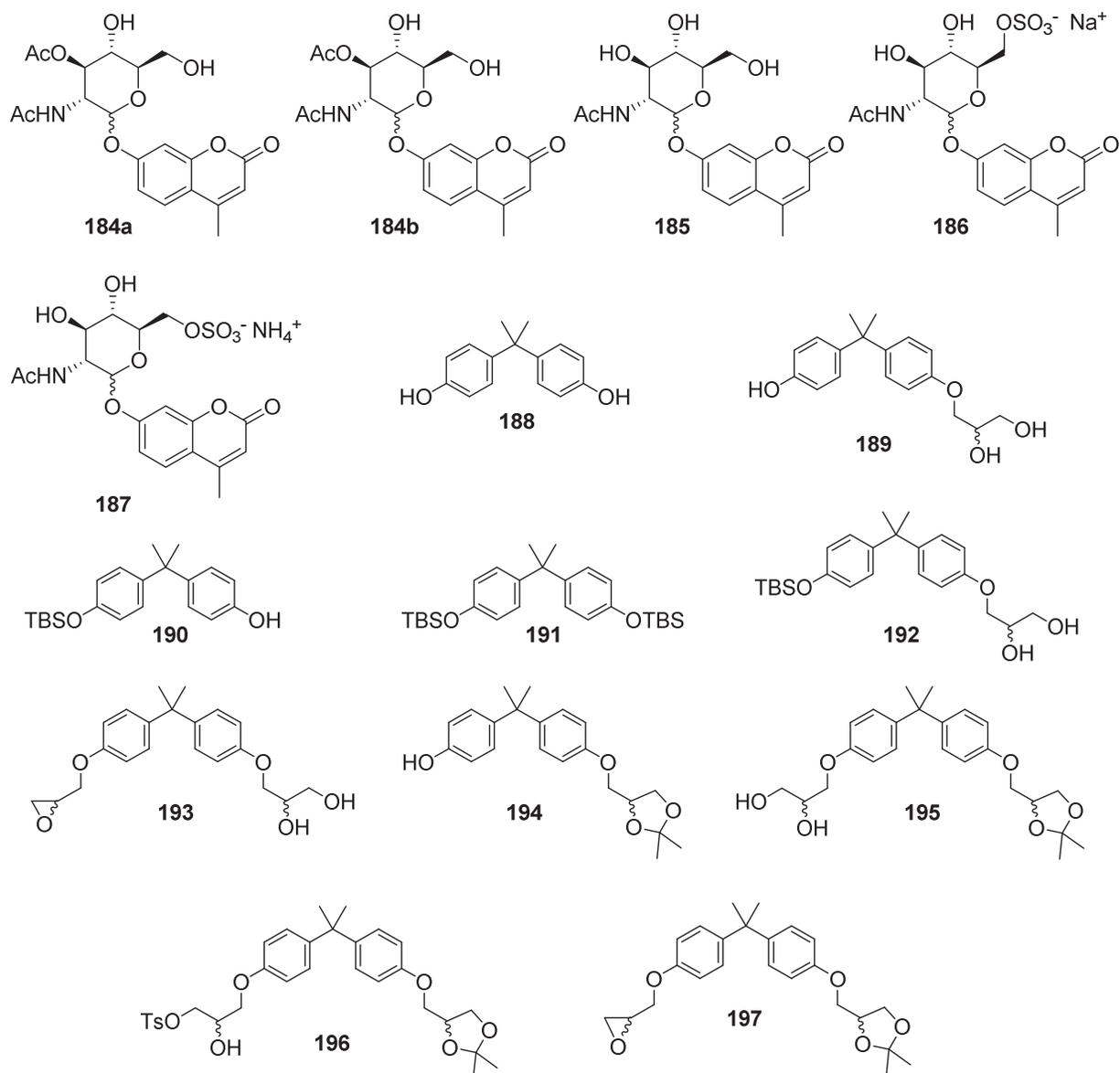












Índice detallado

Índice detallado

1. Introducción y objetivos	1
2. Antecedentes	
2.1. Glicosidasas: definición y mecanismo	11
2.2. Iminoazúcares.	14
2.2.1. Definición y mecanismo de acción.	14
2.2.2. Clasificación estructural.	15
2.2.3. Aplicaciones medicinales potenciales de iminoazúcares.	18
2.2.4. Enfermedades de depósito lisosomal: chaperonas químicas.	20
2.3. Acetamido iminoazúcares.	24
2.3.1. Mecanismo de acción de β -N-acetilhexosaminidasas.	25
2.3.2. Síntesis de iminoazúcares.	26
2.3.2.1. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxi iminoazúcares piperidínicos	26
2.3.2.2. Síntesis de otros acetamido iminoazúcares	30
3. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc) y derivados mediante apertura regioselectiva de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos	
3.1. Introducción y objetivos	39
3.2. Síntesis del carbamato cíclico 8	42
3.2.1. Síntesis del epoxialcohol 28 a partir de 1,4-pentadien-3-ol (29).	43
3.2.2. Síntesis del epoxialcohol 28 a partir de 2,4-pentadien-1-ol.	45
3.2.3. Síntesis del carbamato cíclico 8 a partir del epoxialcohol 28	48
3.2.4. Resumen general de la síntesis del carbamato cíclico 8 a escala multigramo.	50
3.3. Introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2 mediante aperturas regioselectivas de epóxidos, sulfitos cíclicos y sulfatos cíclicos	51

3.3.1.Epoxidaciones.	51
3.3.1.1. Antecedentes en el grupo de investigación.	51
3.3.1.2. Epoxidaciones vía intermedios bicíclicos (vía 1).	52
3.3.1.3. Epoxidaciones vía intermedios monocíclicos (vía 2)	53
3.3.2.Introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2 mediante aperturas regioselectivas de sulfitos y sulfatos cíclicos	55
3.3.2.1. Antecedentes en el grupo de investigación	55
3.3.2.2. Síntesis y apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos vía intermedios bicíclicos (vía 1)	55
3.3.2.2.1. Síntesis de sulfitos y sulfatos cíclicos (vía 1).	55
3.3.2.2.2. Apertura de sulfitos cíclicos vía sustratos bicíclicos (vía 1).	58
3.3.2.2.3. Apertura de sulfatos cíclicos vía sustratos bicíclicos (vía 1).	60
3.3.2.2.3.1. Exploración de la regioselectividad de la apertura de 44a	60
3.3.2.2.3.2. Determinación de la estereoquímica de los azidoalcoholes 45a y 46a	61
3.3.2.3. Síntesis y apertura de sulfitos y sulfatos cíclicos vía intermedios monocíclicos (vía 2)	63
3.3.2.3.1. Intentos de desprotección del anillo de 2-oxazolidona sobre el sulfato 44a	63
3.3.2.3.2. Síntesis y apertura de sulfatos <i>N</i> -Boc	64
3.3.2.3.3. Síntesis y apertura de sulfatos <i>N</i> -Cbz	65
3.3.2.3.3.1. Aproximación A	65
3.3.2.3.3.2. Aproximación B	67
3.3.2.3.4. Síntesis y apertura de sulfato <i>N</i> -Bn.	68
3.3.2.3.4.1. Síntesis de acetamido iminoazúcares derivados del sulfato 73	71
3.3.2.3.4.2. Justificación mecanística para la obtención de 83 y 20	73
3.3.3. Resumen de la introducción de equivalentes sintéticos del amoníaco en C2	74
3.4. Síntesis de acetamido iminoazúcares con estereoquímica <i>gluco</i>	75

3.4.1. Síntesis de acetamido iminoazúcares	75
3.4.1.1. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (DNJNAc, 13).	75
3.4.1.2. Síntesis de 3-acetamido-1,3-didesoxialtronojirimicina (94) y análisis de su capacidad de inhibición frente a glicosidasas.	77
3.4.1.3. Resumen sintético de DNJNAc (13).	78
3.4.2. Síntesis de sustratos protegidos ortogonalmente para modificación selectiva de las funcionalidades amina	79
3.4.3. Síntesis de nuevos inhibidores de glicosidasas.	82
3.4.3.1. Síntesis de derivados no ureicos	82
3.4.3.2. Síntesis de derivados ureicos.	83
3.4.3.2.1. Aproximaciones a síntesis de derivados ureicos usando bencilos y silil éteres como grupos protectores.	84
3.4.3.2.2. Aproximaciones a síntesis de derivados ureicos usando acetatos como grupos protectores	87
3.4.3.2.3. Ensayos de inhibición frente a glicosidasas de 116a-d	90
3.5. Conclusiones.	91

4. Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc) y derivados mediante aplicación de la sustitución alílica catalizada por paladio

4.1. Introducción y objetivos	97
4.2. Reordenamiento de Overman.	98
4.2.1. Exploración del reordenamiento de Overman sobre 8	99
4.2.1.1. Reordenamientos térmicos de Overman.	99
4.2.1.2. Reordenamientos catalíticos de Overman.	100
4.3. Sustituciones alílicas catalizadas por paladio.	101
4.3.1. Introducción	101
4.3.2. Antecedentes en el grupo de investigación.	102
4.3.3. Exploración de la sustitución alílica catalizada por paladio	104
4.3.4. Intentos de desprotección de 125a y 125d	107
4.4. Aproximaciones sintéticas a 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc, 130).	109
4.4.1. Aproximaciones sintéticas a DAJNAc vía intermedios bicíclicos (vía 1).	109

4.4.1.1.	Reacciones de dihidroxilación	109
4.4.1.2.	Obtención de 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc, 130).	111
4.4.1.3.	Resumen de la síntesis de DAJNAc (130) vía intermedio bicíclico (vía 1)	112
4.4.2.	Aproximaciones sintéticas a DAJNAc vía intermedios monocíclicos (vía 2)	113
4.4.2.1.	Hipótesis de la dihidroxilación en sustratos monocíclicos	113
4.4.2.2.	Síntesis de sustratos monocíclicos	114
4.4.2.3.	Exploración de las dihidroxilaciones	115
4.4.2.4.	Efecto de la acetamida en la dihidroxilación	117
4.4.2.5.	Síntesis de 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc, 130).	119
4.4.2.6.	Resumen de la síntesis de DAJNAc vía intermedios monocíclicos (vía 2)	120
4.4.3.	Estudios de inhibición de DAJNAc (130) frente a glicosidasas.	121
4.4.4.	Estudio de estructura-actividad mediante STD-RMN de DAJNAc (130)	122
4.4.4.1.	Introducción al STD-RMN: Definición y aplicaciones.	122
4.4.4.2.	Experimentos de STD-RMN con DAJNAc (130).	124
4.5.	Aproximaciones sintéticas a derivados de DAJNAc.	125
4.5.1.	Síntesis de derivados <i>N</i> -tioureicos	125
4.5.2.	Síntesis de derivados iminotiazolidínicos.	126
4.5.2.1.	Intentos de introducción selectiva de tioureas	127
4.5.2.2.	Intentos de desprotección selectiva de acetilos primarios con lipasas.	128
4.5.3.	Estudios de inhibición de tioureas y iminotiazolidinas frente a glicosidasas.	131
4.6.	Aproximaciones sintéticas a 2-acetamido-1,2-didesoxigalactonojirimicina (DGJNAc, 14).	133
4.6.1.	Inversión mediante reacción de Mitsunobu	134
4.6.2.	Inversión mediante sustituciones nucleófilas con acetatos.	135
4.6.3.	Inversión por oxidación/reducción.	136

4.7. Aproximaciones sintéticas a 2-acetamido-1,2-didesoxigulonojirimicina (DGulJNAc)	137
4.7.1.Reacciones de epoxidación.	138
4.7.1.1. Grupos directores en la epoxidación con MCPBA	138
4.7.1.2. Exploración de las epoxidaciones	139
4.7.2.Apertura regioselectiva de epoxiciclohexanos	142
4.7.2.1. Apertura regioselectiva del epóxido 165	143
4.7.2.2. Apertura regioselectiva de los epóxidos 166 y 167	146
4.8. Conclusiones.	148
5. Enfermedad de Sanfilippo: síntesis de sustratos para la diagnosis de las variantes A y D	
5.1. Introducción.	155
5.2. Objetivos.	158
5.3. Análisis retrosintético	158
5.4. Síntesis de 4MU- α -GlcNS, (17)	159
5.4.1.Ensayos enzimáticos fluorimétricos.	162
5.4.2.Resumen general de la ruta sintética de 4MU- α -GlcNS, (17).	164
5.5. Síntesis de 4MU- α -GlcNAc-6S (18)	165
5.5.1.Resumen general de la ruta sintética de 4MU- α -GlcNAc-6S (18)	176
5.6. Conclusiones.	177
6. Cáncer de próstata: síntesis de los estereoisómeros de EPI001	
6.1. Introducción y objetivos	183
6.2. Análisis retrosintético	185
6.3. Síntesis de los estereoisómeros de EPI001	186
6.3.1.Aproximación mediante formación del epóxido utilizando epiclorhidrina. . .	186
6.3.2.Aproximación mediante formación del epóxido utilizando glicidol	189
6.3.3.Resumen de la secuencia sintética para obtener los estereoisómeros de EPI001.	194
6.4. Ensayos biológicos con los estereoisómeros de EPI001	194

6.5. Conclusiones.....	196
7. Conclusiones.....	201
8. Experimental Part.....	205
Anexos	
Anexo 1: Selección de espectros.....	311
Anexo 2: Datos de Rayos X.....	321
Anexo 3: Valores de inhibición de iminoazúcares vs glicosidasas.....	329
Anexo 4: Índice de estructuras.....	337
Índice detallado.....	347

