



# Nous ciclitols com a inhibidors de la glucocerebrosidasa

## Aplicació al disseny de xaperones farmacològiques per al tractament de la malaltia de Gaucher

Ana Trapero Puig

**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](http://www.tdx.cat)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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](http://www.tdx.cat)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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](http://www.tdx.cat)) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

**NOUS CICLITOLS COM A INHIBIDORS  
DE LA GLUCOCEREBROSIDASA**

**APLICACIÓ AL DISSENY DE XAPERONES FARMACOLÒGIQUES  
PER AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA DE GAUCHER**

**TESI DOCTORAL**

**Ana Trapero Puig**





UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Química Orgànica  
Facultat de Química



Departament de Química Biomèdica  
Institut de Química Avançada de Catalunya (CSIC)

Programa de Doctorat de Química Orgànica. Bienni 2005-2007

## **NOUS CICLITOLS COM A INHIBIDORS DE LA GLUCOCEREBROSIDASA**

**APLICACIÓ AL DISSENY DE XAPERONES FARMACOLÒGIQUES  
PER AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA DE GAUCHER**

Memòria presentada per Ana Trapero Puig per a optar al Grau de Doctor per la  
Universitat de Barcelona

Director:

Tutor:

Amadeu LLebaria Soldevila

Investigador Científic  
Departament de Química Biomèdica  
IQAC-CSIC

Ángel Montaña Pedrero

Professor titular de Química Orgànica  
Departament de Química Orgànica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona

Doctoranda:

Ana Trapero Puig

Barcelona, 2011



Aquest treball d'investigació ha estat finançat pel Ministeri espanyol de Ciència i Innovació (projectes CTQ2005-00175/BQU i CTQ2008-01426/BQU) i per la Generalitat de Catalunya (projectes 2005-SGR-01063 i 2009-SGR-1072). Per a la realització de la present Tesi Doctoral he gaudit d'una beca pre-doctoral de Formació de Personal Investigador (BES-2006-14097) concedida pel Ministeri d'Educació i Ciència.

El treball experimental s'ha dut a terme en el grup d'investigació Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM) del Departament de Química Biomèdica de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC).



## CADA DIA

*No conquerim cap mot debades.*

*Tot*

*s'inscriu en l'ordre clar d'aquell projecte  
que va creixent a poc a poc dins nostre  
si sabem tenaçment perfer-lo sempre.  
Així el gran risc de viure se'ns proposa  
com un repte constant, com una fita  
que allunyem amb el gest i la mirada  
tan bon punt l'assolim, no per refús  
del que hem aconseguit, sinó pel goig  
de posar-nos a prova cada dia.*

Miquel Martí i Pol, Els bells camins





# Agraïments

---

Una vegada conclosa la redacció d'aquesta memòria, arriba el moment d'agrair a totes les persones que, en major o menor grau, han col·laborat en la seva realització. Encara que aquesta part de la tesi és sempre el que es deixa pel final, és un apartat especialment important ja que saps del cert que aquestes tres pàgines són les que llegiran més gent.

En primer lloc, vull agrair al meu director de tesi, el Dr. Amadeu Llebaria, per haver-me donat l'oportunitat de dur a terme la meva Tesi en el seu grup d'investigació i per la seva dedicació i pel seu suport que han fet possible aquest treball.

També vull donar les gràcies al Dr. Antonio Delgado, que a més de donar bons consells en els seminaris de grup, sempre ha tingut un moment per donar un toc diferent a les coses amb el seu "humor" que el caracteritza. Així com als altres membres del grup, a la Dra. Gemma Fabriàs, per la seva gran vitalitat i per intentar sempre transmetre el seu entusiasme per la ciència; a la Dra. Josefina Casas, per aquestes frases d'ànim que a tots ens ajuden tant; al Dr. José Luís Abad (JLAS), pels seus consells i per les seves llargues explicacions.

Seguidament una menció especial a tots els companys amb qui he coincidit al laboratori 211 durant tots aquests anys, el Santi, el Xavier, el Laurent, la Patricia i la Lucía, amb els qui dia a dia he compartit o vaig compartir alegries, moments d'estrès, de nerviosisme, desesperacions, èxits, llàgrimes,...en definitiva bones i no tan bones estones. Com també he d'agrair a tots els companys dels altres laboratoris del grup, amb qui també he compartit bons moments i heu estat part de l'aventura d'aquesta tesi. Als del 213, a la Maria, la més veterana i a les noves incorporacions, l'Íngrid, la Sílvia i el Cristobal, per l'ambient que creen en aquest laboratori (no em refereixo als seus famosos tiols i amines); a les del 216, l'Anna Alcaide, la Núria i les del Servei de Síntesi, la Carme Serra, la Marina i la Maria Rosa, per estar sempre disposades a donar un cop de mà i per la paciència que han tingut en els moments difícils d'aquest últim any; als del laboratori de Biologia, el Jose (l'informàtic del RUBAM), el Fabio, el Pedro, la Luz, la Carmen Bedia i la Francesca per tots els consells durant aquests anys en el món de la Biologia, l'Eva per la realització de les masses exactes i la Meri, de qui he après una infinitat de biologia i per la seva contribució a aquesta tesi.

Tampoc em puc oblidar de tots els companys que han passat per aquest grup i que han continuat el seu propi camí: el David, el Dani, el Mirek, la Marta, la Isabel, la Montse, la Neus, la Laura...i tots aquells amb els quals he compartit la meva estança a l'IQAC.

També vull agrair al Dr. Ignacio Alfonso, la seva dedicació en la realització dels estudis de RMN i els càlculs teòrics dels sistemes bicíclics, així com la seva paciència i disponibilitat sempre que vaig tenir problemes amb el MestReNova.

Voldria expressar també la meva gratitud al Dr. Terry D. Butters, per l'oportunitat que em va donar de treballar en el seu grup d'investigació, per tot el que vaig aprendre al seu laboratori i durant els seminaris del grup i del departament i per les seves correccions, així com a la seva dona, la Dra. Linda Butters per la seva càlida acollida. Agrair també les bones estones passades amb els companys del grup i per aquella tarda, encara que una mica accidentada, a l'*Oxford Canal* i especialment a la Gabi, la meva professora de cultius cel·lulars, per la seva dedicació i la seva admirable disciplina. Així mateix, el meu agraïment a la gent del laboratori de Bioquímica de l'IQS, especialment al Dr. Antoni Planas i a la Dra. Magda Faijes, per la col·laboració que m'han brindat en matèria de biologia molecular.

També vull donar les gràcies al Dr. Àngel Montaña per haver acceptat ser el tutor d'aquesta tesi i per oferir-me l'oportunitat de conèixer el món de la recerca. També recordar als companys de laboratori, el Jordi, la Marina, l'Stefano, el Frank i el Joan, gràcies per la vostra ajuda i supervisió en aquells inicis.

Com tampoc no puc oblidar-me dels companys de carrera, amb els quals vaig iniciar l'aventura química i vaig compartir bones estones a les aules i als laboratoris de pràctiques de la facultat, el Francesc, el Cristian, l'Albert, la Charo, la Leticia, l'Anna, la Diana, l'Ariadna, la Raquel, la Susanna... però especialment a la Isabel amb qui he compartit i ho seguim fent, moltes penes i alegries i espero que ho continuem fent tota la vida.

Dins d'aquest apartat, també he de dedicar unes línies a la meva família pel seu suport i ajut incondicional i per haver-me recolzat durant aquest temps. Als meus avis (la Magdalena i als qui ja no hi són, l'Emili, la Carmen i el Jose), a la meva mare (la Maria Teresa), als

meus tres germans (el Jose, el Jordi i el David), a les meves cunyades (la Mercè i l'Svetlana) i als meus dos nebots (el Niki i el Pep).

Per últim voldria dedicar aquesta tesi al meu pare (el José), que ens va deixar just al començament d'aquest projecte, si bé no l'ha pogut veure finalitzat, l'omplia de satisfacció que em dediqués a ell i l'enorgullirà aquest estudi.



# Abreviatures

---

A-C9	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>r</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>s</i> )-6-(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4,5-pentaol
Ac	Acetil
AcOEt	Acetat d'etil
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonil
Bu	Butil
Bn	Benzil
BSA	Albúmina de sèrum boví
Bz	Benzoil
cat.	catalític
CCF	Cromatografia en Capa Fina
CBE	Èpoxid de conduritol B
CC50	Concentració citotòxica 50
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
<i>ee</i>	Excés enantiomèric
Et	Etil
FBS	Sèrum fetal boví
ERT	Teràpia de substitució enzimàtica ( <i>Enzyme Replacement Therapy</i> )
GBA	Gen que codifica la glucocerebrosidasa
GBAP	Pseudogèn de GBA
GD	Malaltia de Gaucher ( <i>Gaucher Disease</i> )
gDQCOSY	Experiment bidimensional de correlació $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ( <i>gradient Double Quantum COrrrelation SpectroscopY</i> )
gHSQC	Experiment bidimensional de correlació heteronuclear amb gradient ( <i>gradient Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> )
GCase	Glucocerebrosidasa
GCS	Glucosilceramida sintasa
GlcCer	Glucosilceramida
GSLs	Glicoesfingolípid
h	Hores
HMBC	Correlació heteronuclear a llarga distància ( <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i> )
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució

IC <sub>50</sub>	Concentració d'inhibidor que produeix un 50% inhibició
IR	Infrarroig
K <sub>i</sub>	Constant d'inhibició
k <sub>i</sub>	Constant de velocitat d'inactivació
K <sub>m</sub>	Constant de Michaelis-Menten
K <sub>obs</sub>	Constant de velocitat aparent de primer ordre
LSDs	Malalties d'acumulació lisosòmica ( <i>Lysosomal Storage Disorders</i> )
MeOH	Metanol
MCPBA	Àcid <i>m</i> -cloroperbenzoic
min	Minuts
MOM	Metoximetil
Ms	Mesil
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
NBD	Nitrobenzodiazol
NN-DNJ	<i>N</i> -nonil-deoxinojirimicina
NOESY	Espectroscòpia d'efecte nuclear Overhauser ( <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )
Nu.	Nucleòfil
PBS	Solució amortidora salina de fosfats
Piv	Pivaloïl
Ph	Fenil
PCT	Teràpia basada en la utilització de xaperones ( <i>Pharmacological Chaperone Therapy</i> )
SAP	Saposina, proteïna activadora d'esfingolípids ( <i>Sphingolipid Activator Protein</i> )
SLs	Esfingolípids
SRT	Teràpia de reducció de substrat ( <i>Substrate Reduction Therapy</i> )
t.a.	Temperatura ambient
TBAF	Fluorur de tetrabutilamoni
Tf	Trifluorometansulfonil
TFA	Àcid trifluoroacètic
TBDPS	<i>tert</i> -Butildifenilsilil
THF	Tetrahidrofurà
Tr	Tritil
Tris-HCl	Hidrocloreur de tris-(hidroximetil)aminometà
UDP-Glucosa	Difosfat d'uridina i glucosa
V <sub>max</sub>	Velocitat màxima
wt	Tipus salvatge ( <i>wild-type</i> )







# Índex

---

<b>1. Introducció general .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Els esfingolípid i els glicoesfingolípid .....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Biosíntesis dels glicoesfingolípid .....	7
1.1.2 Catabolisme dels glicoesfingolípid .....	9
<b>1.2 Malalties d'acumulació lisosòmica .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 El lisosoma .....	11
1.2.2 Malalties d'acumulació lisosòmica (LDSs): Esfingolipidosis .....	13
<b>1.3 La malaltia de Gaucher (GD) .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Aspectes històrics i clínics .....	14
1.3.2 El substrat glucosilceramida (GlcCer) .....	17
1.3.3 L'enzim $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCCase) .....	17
1.3.4 Teràpies per a la malaltia Gaucher .....	20
1.3.4.1 Teràpia de suport .....	20
1.3.4.2 Transplantament de medul·la òssia .....	21
1.3.4.3 Transferència gènica .....	21
1.3.4.4 Teràpia de substitució enzimàtica (ERT) .....	21
1.3.4.5 Teràpia de reducció de substrat (SRT) .....	23
1.3.4.6 Teràpia basada en la utilització de xaperones farmacològiques .....	25
1.3.5 Diagnòstic de la malaltia de Gaucher .....	27
1.3.5.1 Diagnòstic morfològic .....	27
1.3.5.2 Diagnòstic enzimàtic .....	27
1.3.5.3 Diagnòstic genètic .....	28
1.3.5.4 Diagnòstic prenatal .....	28
<b>1.4 Mutacions en el gen GBA .....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Distribució poblacional de les mutacions més freqüents .....	30
1.4.2 Relacions genotip-fenotip (mutacions N370S i L444P) .....	31
<b>1.5 Les glicosidases .....</b>	<b>32</b>
<b>1.6 Inhibidors de la <math>\beta</math>-glucocerebrosidasa (GCCase) .....</b>	<b>36</b>
<b>1.7 Situació actual del tractament de les LDSs amb xaperones farmacològiques .....</b>	<b>45</b>

<b>2. Objectius .....</b>	<b>49</b>
<b>Resultats i Discussió .....</b>	<b>57</b>
<b>3. Ciclofelitol i (1R,6S)-epi-ciclofelitol .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Introducció i objectius .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2 Síntesi dels epòxids ciclofelitol (1) i (1R,6S)-epi-ciclofelitol (2) .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3 Estudis d'inhibició enzimàtica dels epòxids 1, 2 i el CBE .....</b>	<b>71</b>
3.3.1 Inhibició de la imiglicerasa i la $\beta$ -glucosidasa BgI <sub>3</sub> d' <i>Streptomyces</i> sp. pels epòxids 1,2 i el CBE .....	72
3.3.2 Inhibició de diverses glicosidases pels epòxids 1 i 2 .....	76
<b>4. Aminociclitols C<sub>7</sub>N .....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 Introducció i objectius .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Síntesi dels aminociclitols C<sub>7</sub>N .....</b>	<b>86</b>
4.2.1 Síntesi de l'epòxid tetra- <i>O</i> -benzil- <i>epi</i> -ciclofelitol (+)- <b>19</b> .....	86
4.2.2 Reaccions d'obertura dels epòxids <b>18</b> i <b>19</b> .....	88
4.2.3 Assignació de l'estereoquímica dels compostos <b>20-23</b> .....	93
4.2.4 Obtenció dels aminociclitols C <sub>7</sub> N ( <b>24-27</b> ) .....	94
<b>4.3 Estudis d'inhibició enzimàtica dels aminociclitols C<sub>7</sub>N .....</b>	<b>95</b>
<b>5. Amino- i diaminociclitols com a xaperones farmacològiques de la GCCase .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Introducció i objectius .....</b>	<b>105</b>
<b>5.2 Síntesi dels amino- i 1,2-diaminociclitols .....</b>	<b>107</b>
5.2.1 Síntesi dels aminociclitols <b>28-36</b> .....	109
5.2.2 Síntesi dels ciclitols <b>37-42</b> .....	112
<b>5.3 Assaigs biològics dels compostos 28-42 .....</b>	<b>115</b>
5.3.1 Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos <b>28-42</b> .....	115
5.3.2 Inhibició de la GCCase pels compostos <b>28-40</b> i <b>A-C9</b> en fibroblasts wt d'humans .....	121
5.3.3 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglicerasa en presència dels compostos <b>28-40</b> , <b>A-C9</b> i NN-DNJ .....	124
5.3.4 Estudi de l'activitat xaperona dels ciclitols en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P .....	126

<b>6. Isooures i guanidines bicíclics com a xaperones farmacològiques de la GCCase .....</b>	<b>135</b>
<b>6.1 Introducció i objectius .....</b>	<b>139</b>
<b>6.2 Síntesi i assignació estructural de les isooures i guanidines bicíclics 86-90 .....</b>	<b>144</b>
6.2.1 Síntesi de les isooures i guanidines bicíclics 86-90 .....	144
6.2.2 Assignació estructural per RMN de les isooures i guanidines bicíclics .....	149
<b>6.3 Assaigs biològics dels compostos 86-90, 105 i 106 .....</b>	<b>153</b>
6.3.1 Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos 86-90, 105 i 106 .....	153
6.3.2 Inhibició de la GCCase pels compostos 86-90 en fibroblasts wt d'humans .....	160
6.3.3 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa en presència dels compostos 86c-90c, 86d, 89d, 90e i l'imosucre NN-DNJ .....	162
6.3.4 Estudi de l'activitat xaperona de les isooures i guanidines bicíclics en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P .....	165
<b>7. Resum i Conclusions .....</b>	<b>171</b>
<b>8. Part experimental .....</b>	<b>179</b>
<b>8.1 Síntesi i caracterització dels productes .....</b>	<b>181</b>
8.1.1 Instrumentació i mètodes generals .....	181
8.1.2 Síntesi del ciclofelitol (1) i l'(1 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )- <i>epi</i> -ciclofelitol (2) .....	182
8.1.2.1 Síntesi de l'(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-6-(hidroximetil)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (10) .....	182
8.1.2.2 Síntesi dels compostos 11-14 a partir del tetraol 10 .....	185
8.1.2.3 Síntesi dels epòxids 1 i 2 a partir del tetraol 10 .....	188
8.1.3 Síntesi dels aminociclitols C <sub>7</sub> N .....	192
8.1.3.1 Síntesi de l'(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptà (19) .....	192
8.1.3.2 Reaccions d'obertura dels epòxids 18 i 19 amb nucleòfils en presència de LiClO <sub>4</sub> .....	193
8.1.3.3 Reaccions d'obertura de l'epòxid 19 amb nucleòfils utilitzant condicions àcides .....	200
8.1.3.4 Reducció de les azides 20d/21d i 22d/23d: síntesi de les amines 20e/21e i 22e/23e .....	202
8.1.3.5 Reaccions d' <i>O</i> -desbenzilació amb BCl <sub>3</sub> : síntesi dels aminociclitols 24a-c,e - 25a-c,e, 26e i 27a-c,e .....	204
8.1.3.6 Síntesi dels aminociclitols 26a-c per hidrogenòlisi utilitzant com a catalitzador Pd/C .....	211

8.1.4 Síntesi dels amino- i diaminociclitols .....	212
8.1.4.1 Síntesi de les <i>O</i> -alquil azides <b>54-57</b> per alquilació dels azidoalcohols <b>44</b> i <b>46</b> .....	213
8.1.4.2 Reducció de les azides <b>54-57</b> : síntesi de les amines <b>58-61</b> .....	215
8.1.4.3 Procediment general per a l'aminació reductora: Síntesi de <b>62-69</b> .....	217
8.1.4.4 Síntesi de l'azidoamina <b>74</b> a partir de l'aminoalcohol <b>70</b> .....	221
8.1.4.5 Síntesi de la (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxi- <i>N</i> - nonilciclohexanamina ( <b>75</b> ) .....	223
8.1.4.6 Síntesi de les diamines <b>79</b> i <b>80</b> a partir del conuritol B .....	224
8.1.4.7 Síntesi de la (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-3,4,5,6-tetrabenziloxi- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>2</sup> - dinonilciclo- hexan-1,2-diamina ( <b>83</b> ) i la (3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i> )-4,5,6,7-tetrabenziloxi-1,3- dinonil-hexahidro-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol-2(3 <i>H</i> )-ona ( <b>82</b> ) .....	227
8.1.4.8 Síntesi de la (3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i> )-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidro-1 <i>H</i> - benzo[ <i>d</i> ]imidazol-2(3 <i>H</i> )-ona ( <b>84</b> ) .....	228
8.1.4.9 Síntesi de l'(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-1,2,3,4-tetrabenziloxi-5,6-bis(noniloxi)- ciclohexà ( <b>85</b> ) .....	229
8.1.4.10 Síntesi dels compostos <b>28-39</b> , <b>41</b> i <b>42</b> per hidrogenòlisi utilitzant com a catalitzador Pd/C .....	230
8.1.4.11 Síntesi del dihidroclorur de l'(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-5,6-diaminociclohexan- 1,2,3,4-tetraol ( <b>40</b> ) .....	236
8.1.5 Síntesi de les isourees i guanidines bicíclics .....	237
8.1.5.1 Síntesi de l'aminoalcohol (-)- <b>53</b> a partir de l'aminoalcohol (+)- <b>49</b> .....	237
8.1.5.2 Procediment general per a l'aminació reductora: Síntesi de (-)- <b>62</b> i (+)- <b>92</b> .....	239
8.1.5.3 Síntesi de les tiourees (±)- <b>93a,c</b> , (+)- <b>93c</b> , (-)- <b>93d</b> , (±)- <b>94c</b> , (+)- <b>94c,d</b> , (±)- <b>95a-c</b> , (+)- <b>95c</b> , (-)- <b>95d</b> , (±)- <b>96a-c</b> , (+)- <b>96c,d</b> , <b>101c,e</b> i <b>102c,e</b> .....	240
8.1.5.4 Síntesi de l'1-octil-3-((1 <i>RS</i> ,2 <i>SR</i> ,3 <i>RS</i> ,4 <i>RS</i> ,5 <i>SR</i> ,6 <i>RS</i> )-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6- hidroxiciclohexil)urea ((±)- <b>104</b> ) .....	249
8.1.5.5 Síntesi de les isourees bicíclics (±)- <b>97a,c</b> , (-)- <b>97c,d</b> , (±)- <b>98c</b> , (+)- <b>98c,d</b> , (±)- <b>99a-c</b> , (-)- <b>99c,d</b> , (±)- <b>100a-c</b> , (-)- <b>100c,d</b> i les guanidines bicíclics (-)- <b>103c,e</b> .....	250
8.1.5.6 Síntesi de l' <i>N</i> -((3 <i>aSR</i> ,4 <i>SR</i> ,5 <i>RS</i> ,6 <i>SR</i> ,7 <i>SR</i> ,7 <i>aRS</i> )-4,5,6,7-tetrabenziloxi- hexahidrobenczo[ <i>d</i> ]oxazol-2(3 <i>H</i> )-iliden)octan-1-amina ((±)- <b>97b</b> ) .....	260
8.1.5.7 Síntesi de les isourees bicíclics (±)- <b>86a-c</b> per hidrogenòlisi utilitzant com a catalitzador Pd(OH) <sub>2</sub> .....	260
8.1.5.8 Reaccions d' <i>O</i> -desbenzilació amb BCl <sub>3</sub> : síntesi de les isourees bicíclics (-)- <b>86d</b> , <b>87-89</b> i les guanidines bicíclics <b>90c,e</b> .....	263
8.1.5.9 Síntesi del (3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i> )-3-nonil-2-(nonilimino)- octahidrobenczo[ <i>d</i> ]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((-)- <b>88d</b> ) .....	274

<b>8.2 Estudis biològics .....</b>	<b>275</b>
8.1.1 Materials i mètodes en cèl·lules .....	275
8.2.2 Estudis d'inactivació amb el CBE, el ciclofelitol i l'1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> -epi-ciclofelitol .....	276
8.2.2.1 Inactivació de la imiglucerasa pels epòxids .....	276
8.2.2.2 Inactivació de la $\beta$ -glucosidasa Bgl <sub>3</sub> d' <i>Streptomyces</i> sp .....	277
8.2.3 Determinació de l'activitat GCase recombinant (imiglucerasa) .....	277
8.2.4 Determinació de les activitats de diverses glicosidases comercials .....	278
8.2.5 Determinació de l'activitat glucosilceramida sintasa (GCS) .....	279
8.2.6 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa .....	280
8.2.7 Determinació de les activitats de diverses glicosidases en homogenats de cèl·lules (fibroblasts wt) .....	281
8.2.8 Estudis de citotoxicitat en fibroblasts wt d'humans .....	282
8.2.9 Determinació de l'activitat GCase en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) d'humans .....	282
8.2.10 Determinació de les activitats de diverses glicosidases en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) d'humans .....	283
8.2.11 Estudis de citotoxicitat en limfoblasts de malalts de Gaucher .....	283
8.2.12 Estudi de l'activitat xaperona en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P .....	284
 <b>9. Bibliografia .....</b>	 <b>287</b>
 <b>10. Índex de compostos .....</b>	 <b>313</b>



# 1. Introducció general

---

- 1.1 Els esfingolípid i els glicoesfingolípid
  - 1.1.1 Biosíntesi dels glicoesfingolípid
  - 1.1.2 Catabolisme dels glicoesfingolípid
- 1.2 Malalties d'acumulació lisosòmica
  - 1.2.1 El lisosoma
  - 1.2.2. Malalties d'acumulació lisosòmica (LSDs): Esfingolipidosis
- 1.3 La malaltia de Gaucher (GD)
  - 1.3.1 Aspectes històrics i clínics
  - 1.3.2 El substrat glucosilceramida (GlcCer)
  - 1.3.3 L'enzim  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCCase)
  - 1.3.4 Teràpies per a la malaltia de Gaucher
    - 1.3.4.1 Teràpia de suport
    - 1.3.4.2 Transplantament de medul·la òssia
    - 1.3.4.3 Transferència gènica
    - 1.3.4.4 Teràpia de substitució enzimàtica (*Enzyme Replacement therapy, ERT*)
    - 1.3.4.5 Teràpia de reducció de substrat (*Substrate Reduction Therapy, SRT*)
    - 1.3.4.6 Teràpia basada en la utilització de xaperones farmacològiques
  - 1.3.5 Diagnòstic de la malaltia de Gaucher
    - 1.3.5.1 Diagnòstic morfològic
    - 1.3.5.2 Diagnòstic enzimàtic
    - 1.3.5.3 Diagnòstic genètic
    - 1.3.5.4 Diagnòstic prenatal
- 1.4 Mutacions en el gen GBA
  - 1.4.1 Distribució poblacional de les mutacions més freqüents
  - 1.4.2 Relacions genotip-fenotip (mutacions N370S i L444P)
- 1.5 Les glicosidases
- 1.6 Inhibidors de la  $\beta$ -Glucocerebrosidasa (GCCase)
- 1.7 Situació actual del tractament de les LSDs amb xaperones farmacològiques





Gaucher disease (GD), the most common lysosomal storage disorder, is caused by mutations in acid  $\beta$ -glucosidase (glucocerebrosidase, GCase), a peripheral membrane protein that catalyzes the hydrolysis of glucosylceramide to  $\beta$ -glucose and ceramide in the presence of the modulator protein saposin C.

Mutations in GCase lead to diminished biological activity because of impaired trafficking, altered enzyme stability and/or defective intrinsic activity. Consequently, the accumulation of glucosylceramide in macrophages leads to proinflammatory responses and altered glycosphingolipid distribution, which results in hepatosplenomegaly, abnormal bone turnover, pulmonary hypertension and, in some cases, central nervous system (CNS) disease.

The main treatment for GD is enzyme replacement therapy (ERT) using recombinant human GCase (imiglucerase, Cerezyme<sup>®</sup>).

The disadvantages of ERT include the need of regular intravenous infusions, the poor effect on the CNS-affected variants of GD and its high cost.

An alternative to ERT, the substrate reduction therapy (SRT), is based in the inhibition of glucosylceramide synthesis with *N*-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ, miglustat, Zavesca<sup>®</sup>) but has a low therapeutic index. In addition, NB-DNJ results in several adverse side effects.

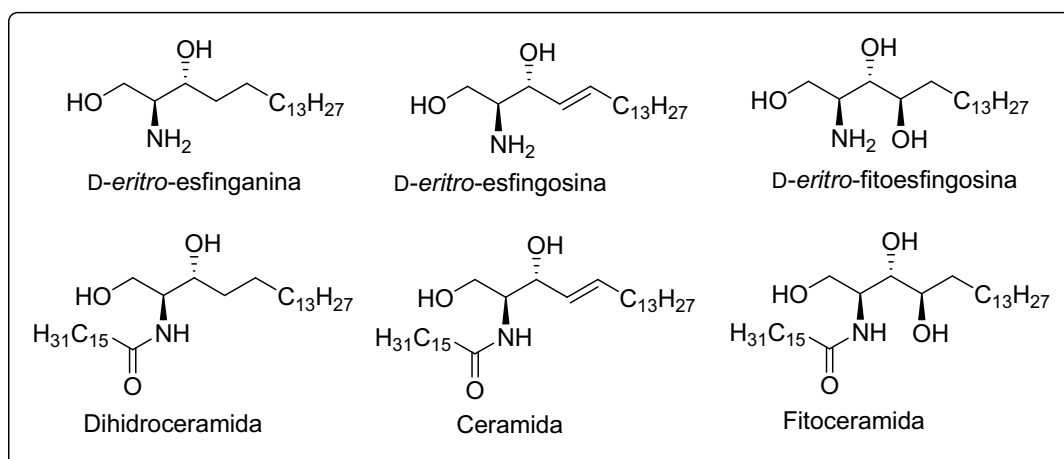
An emerging strategy for GD therapy is the use of small molecules that stabilize mutant GCase and consequently restore trafficking and activity. This approach, known as pharmacological chaperone therapy, has also been extended as a therapeutic strategy to other lysosomal enzymes, such as  $\alpha$ -galactosidase A (Fabry disease),  $\alpha$ -glucosidase A (Pompe disease) or  $\beta$ -hexosaminidase (Tay-Sachs/Sandhoff disease).



## 1.1 Els esfingolípid i els glicoesfingolípid

Els esfingolípid (SLs) constitueixen una família extensa de lípid cel·lulars amb una gran varietat de funcions. Si bé en un principi es pensava que el seu paper en la cèl·lula era només estructural, la recerca duta a terme en les últimes dues dècades ha evidenciat la gran importància que tenen per a la supervivència i el funcionament cel·lular. Els SLs formen estructures especialitzades, són mediadors d'interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-substrat, modulen el comportament de proteïnes cel·lulars i receptors i participen en la transducció de senyals cel·lulars.<sup>1,2</sup>

Des del punt de vista estructural, els SLs són derivats de bases esfingoides, que estan formades per una cadena alquílica insaturada amb una regió polar que conté un grup 2-amino-1,3-diol (normalment 2*S*, 3*R*) i una regió apolar consistent en una cadena alquílica de longitud variable. En els teixits dels mamífers, les bases esfingoides més habituals tenen 18 carbonis i són l'esfinganina ((2*S*,3*R*)-2-amino-1,3-octadecandiol, comunament *D-eritro*-esfinganina), l'esfingosina ((2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-octadec-4-en-1,3-diol, comunament *D-eritro*-esfingosina); i la fitoesfingosina ((2*S*,3*S*,4*R*)-2-amino-1,3,4-octadecantriol, comunament *D-eritro*-fitoesfingosina). Aquestes bases esfingoides poden existir en la seva forma lliure o bé formant part d'SLs més complexos. Així doncs, l'esfinganina, l'esfingosina i la fitoesfingosina unides a un àcid gras a través d'un enllaç amida esdevenen la dihidroceramida, la ceramida i la fitoceramida, respectivament (Figura 1.1).



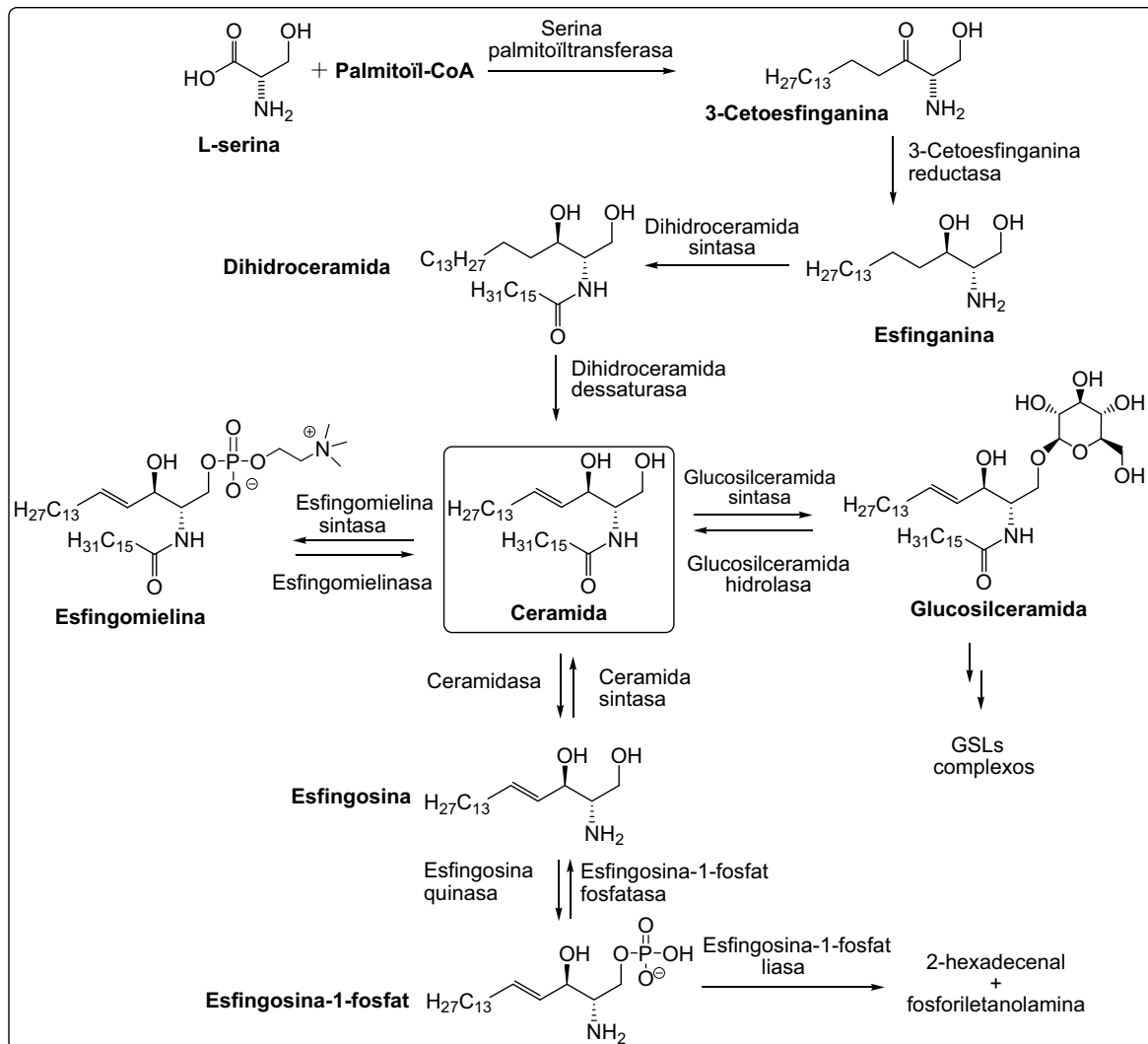
**Figura 1.1.** Estructura química de l'esfinganina, l'esfingosina, la fitoesfingosina, la dihidroceramida, la ceramida i la fitoceramida.

Els **glicoesfingolípid**s (GSLs) són molècules formades per una part lipídica (ceramida) que actua com a ancoratge a la membrana i un carbohidrat (com per exemple glucosa o galactosa) orientat extracel·lularment.<sup>3</sup> La diversitat de composició d'aquest darrer fragment és molt gran i permet classificar els GSLs en:

- GSLs neutres, que presenten una o més unitats de carbohidrats neutres (glucosa, galactosa, *N*-acetilgalactosamina, etc.) units a la ceramida a través d'un enllaç glicosídic al grup hidroxil en C1. Els cerebròsids són els membres més simples del grup, amb un únic monosacàrid (com per exemple la glucosilceramida (GlcCer) i la galactosilceramida).
  
- GSLs àcids o gangliòsids, que contenen una o més unitats d'àcid siàlic a la part glicídica. Aquests són especialment abundants en les neurones.

Els GSLs estan implicats en processos de transducció de senyal i apoptosi, però també influeixen en altres processos fisiològics, com són l'embriogènesi, la diferenciació i l'adhesió cel·lular.<sup>4</sup> Els GSLs, per formar part de la capa externa de la cèl·lula, són un lloc d'unió de toxines, virus i bacteris.

El metabolisme dels GSLs, tant la síntesi com la degradació, té una funció important en la regulació dels nivells de ceramida. La ceramida és el substrat per a la formació dels GSLs, concretament és el substrat de l'enzim glucosilceramida sintasa (GCS) per a formar GlcCer, i el producte de la seva degradació, mitjançant la glucosilceramida hidrolasa. L'equilibri entre aquestes dues rutes, la de síntesi i de degradació de GSLs, influeix directament en els nivells de ceramida, com es pot veure a la Figura 1.2.



**Figura 1.2.** Esquema del metabolisme dels esfingolípids: biosíntesi *de novo* i catabolisme de la ceramida.

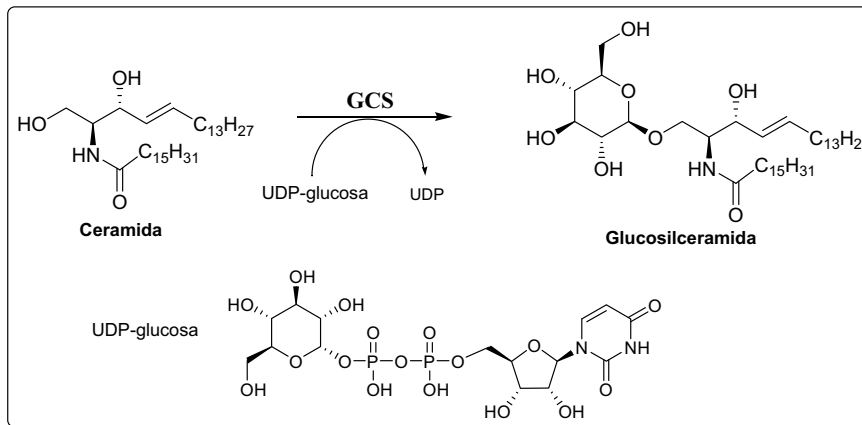
### 1.1.1 Biosíntesi dels glicoesfingolípids

La via de biosíntesi *de novo* dels GSLs comença amb la formació de la ceramida, on es van afegint sucres individualment durant un procés que comporta diferents passos catalitzats per diferents glicosiltransferases. La síntesi de ceramida està catalitzada per enzims de membrana del reticle endoplasmàtic encarats al citosol, i un cop sintetitzada es glucosila en l'aparell de Golgi.

La via de biosíntesi dels GSLs requereix un primer pas d'addició d'un residu carbohidrat a la ceramida. Aquest carbohidrat pot ser glucosa o galactosa, formant així GlcCer o galactosilceramida. La formació de galactosilceramida és catalitzada per l'enzim galactosilceramida sintasa (*N*-acilesfingosina galactosiltransferasa).

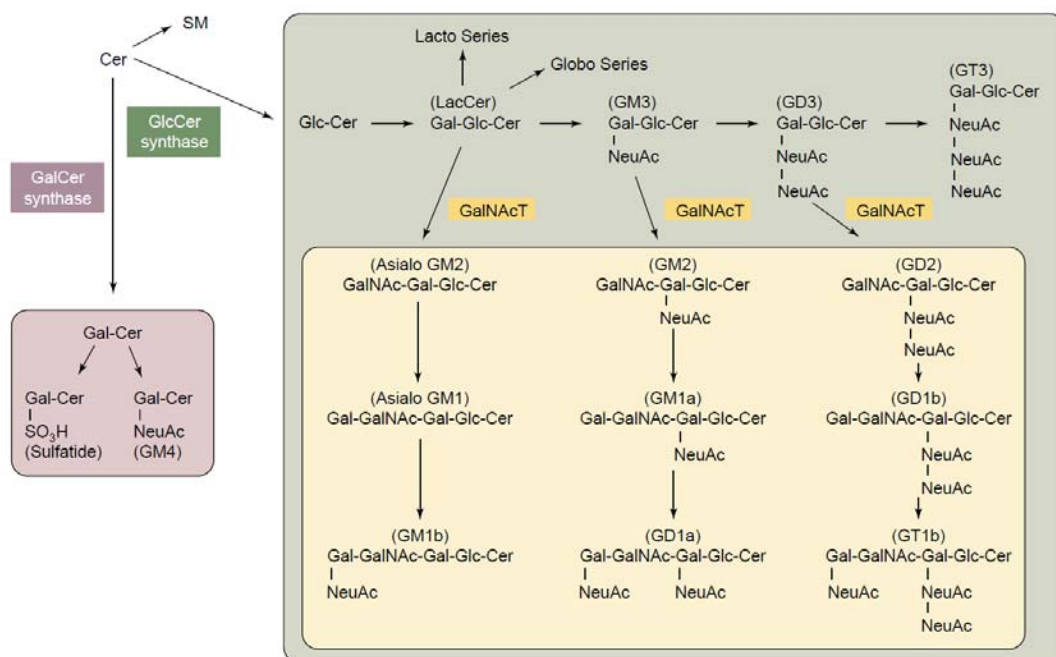
El primer pas de la via de formació de GlcCer, l'addició d'una glucosa a la ceramida, és catalitzat per acció d'una glicosiltransferasa que utilitza UDP-glucosa com a donador de

glucosa, la GCS o UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa i té lloc a la cara citosòlica de l'aparell de Golgi (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Biosíntesi de la GlcCer.

Des de l'aparell de Golgi,<sup>5</sup> la GlcCer pot ser transportada directament a la membrana plasmàtica o bé pot migrar a la cara luminal del complex de Golgi per a posteriors addicions d'altres carbohidrats a la cadena. La introducció d'un residu de galactosa està catalitzada per la galactosiltransferasa I, donant lloc a la lactosilceramida, un precursor comú de molts GSLs complexos en vertebrats, com ara els gangliòsids. A la Figura 1.4 es descriu la ruta de síntesi dels GSLs i la formació dels diferents gangliòsids a partir de lactosilceramida.



**Figura 1.4.** Via de biosíntesi dels principals GSLs. Figura extreta d'un article d'Ichikawa i col·laboradors.<sup>6</sup>

### 1.1.2 Catabolisme dels glicoesfingolípidis

El catabolisme dels GSLs consisteix en l'eliminació seqüencial de les hexoses del polisacàrid, començant pels GSLs més complexos fins arribar a la GlcCer, la ceramida i, al final, l'esfingosina.

La degradació constitutiva dels GSLs es dona en els compartiments àcids de la cèl·lula, com són els endosomes tardans i lisosomes. Aquí les estructures de membrana són dirigides per hidrolases solubles ajustades per proteïnes activadores també solubles. Els fragments de la membrana que contenen GSLs per degradar són endocitats i transportats pels compartiments endosomals fins arribar al lisosoma, on passen a ser estructures de membrana lisosomal.

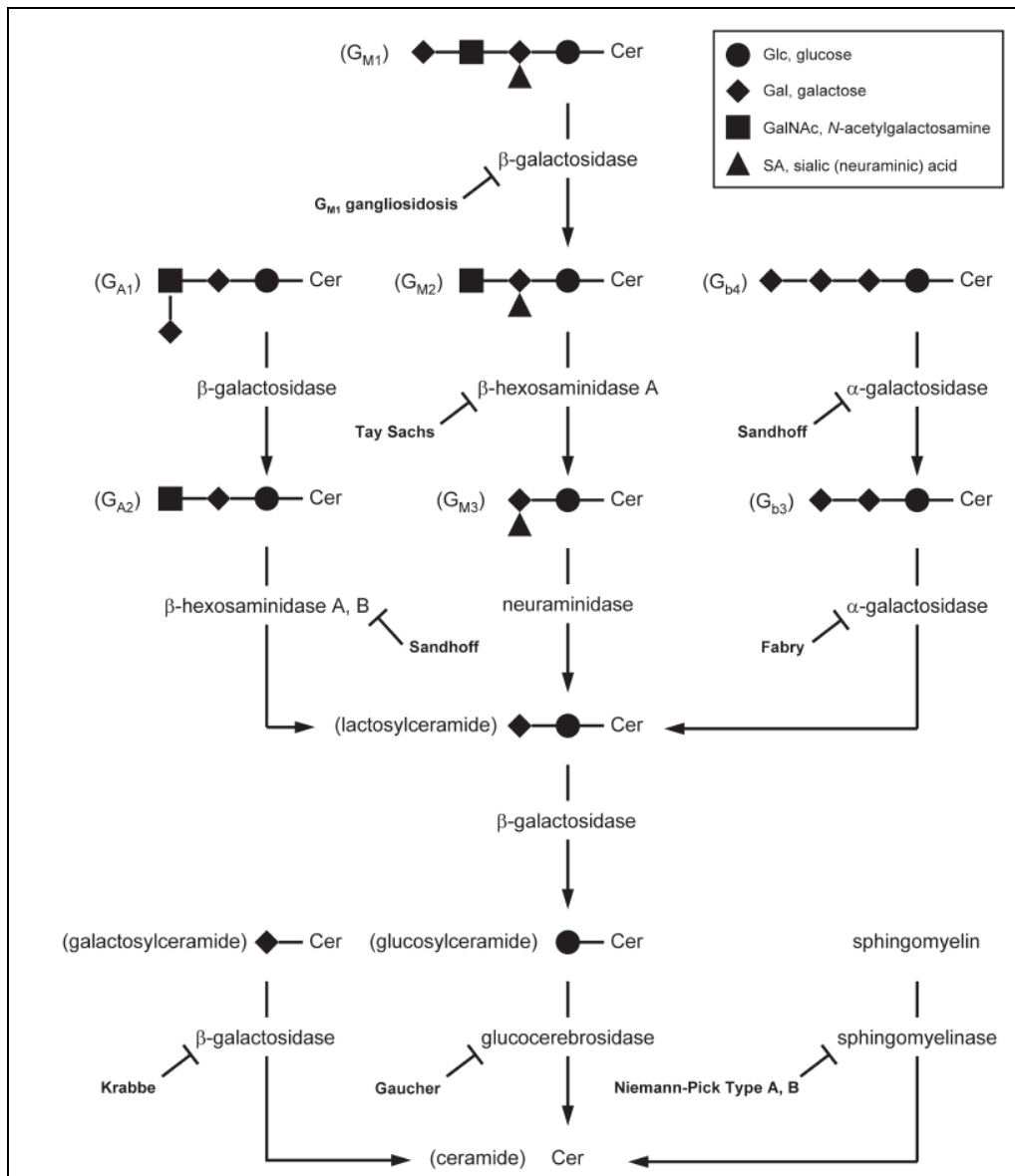
Un cop als lisosomes les diferents reaccions de degradació són catalitzades per hidrolases que tenen un pH òptim àcid. Molts d'aquests enzims necessiten cofactors, com les saposines, per catalitzar les hidròlisis.

Aquestes glicosidases tallen els polisacàrids seqüencialment fins obtenir ceramida, que s'acaba degradant a esfingosina per una ceramidasa àcida. Els fragments eliminats, tant els sucres com els àcid grassos, poden tornar a reincorporar-se a la via de biosíntesi, reciclant-se per a formar nous GSLs o continuar degradant-se.

Els intermediaris lipídics que es van formant durant el procés de degradació queden atrapats en els compartiments lisosomals i no participen en processos de senyalització de la cèl·lula.

L'alteració dels nivells dels GSLs provoca les anomenades esfingolipidosis. Es tracta de malalties poc freqüents degudes a acumulacions de GSLs com a resultat de deficiències enzimàtiques específiques. A la Figura 1.5 es mostra la via de degradació dels GSLs amb les malalties associades a les deficiències enzimàtiques en les glicosidases corresponents.





**Figura 1.5.** Catabolisme dels GSLs i malalties d'acumulació lisosòmica associades. Figura extreta d'un article de Sawkar i col·laboradors.<sup>7</sup>

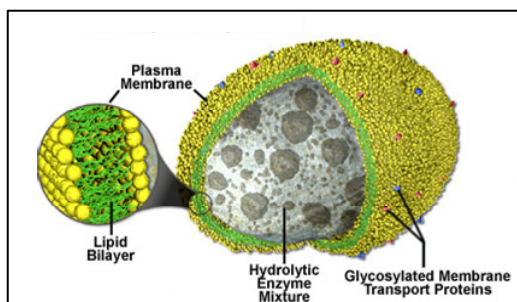
## 1.2 Malalties d'acumulació lisosòmica

Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSDs, '*lysosomal storage diseases*') són, com el seu nom indica, un conjunt de malalties en les que una disfunció en el lisosoma acaba provocant l'acumulació d'algun producte que en condicions normals hi seria degradat. És per això que, abans de començar a explicar aquestes malalties, es descriurà breument quin és el paper del lisosoma a la cèl·lula.

### 1.2.1 El lisosoma

Els lisosomes són uns orgànuls limitats per una membrana que contenen una gran varietat d'enzims hidrolítics (Figura 1.6), que funcionen a pH àcid per a la digestió intracel·lular controlada de macromolècules. El lisosoma fou descobert al 1955 per de Duve i col·laboradors<sup>8</sup> i van ser definits en base a dos criteris: l'existència d'una membrana que els limita i la presència dins de l'orgànul d'hidrolases àcides.

Els lisosomes són fonamentalment orgànuls rics en enzims hidrolítics que són els responsables de la degradació de macromolècules extracel·lulars (via fagocitosi o endocitosi) o del citosol (via autofàgia). Contenen diferents enzims hidrolítics capaços de degradar

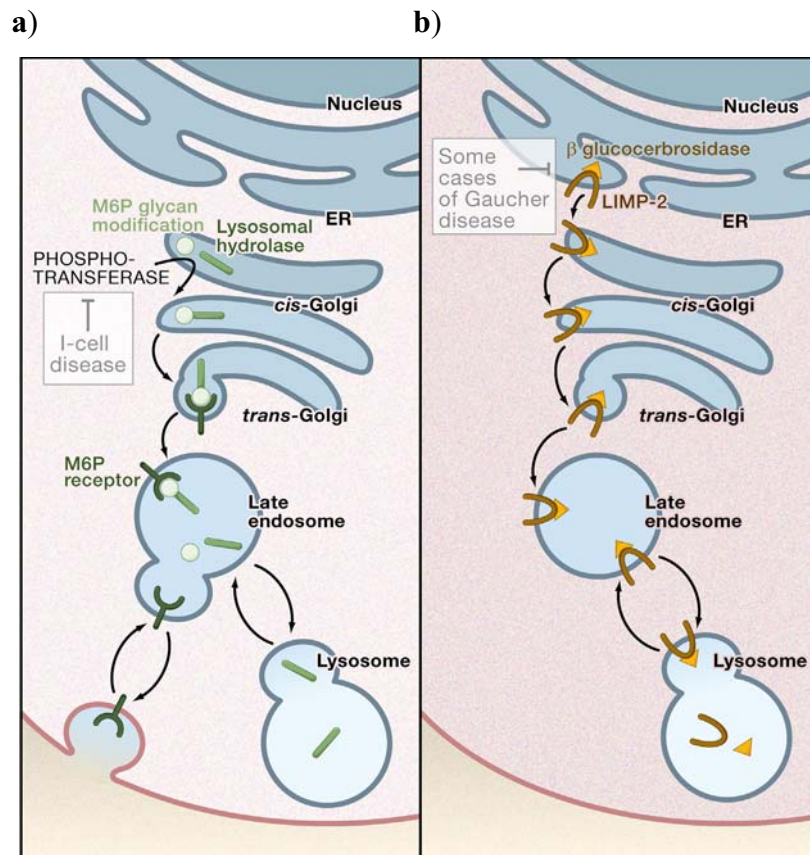


proteïnes, lípids i diferents polisacàrids. En aquest aspecte, els lisosomes són la destinació final de molts materials cel·lulars que s'han de destruir i que es contenen en diferents vesícules que es fusionen amb els lisosomes per tal de transferir el seu contingut.

**Figura 1.6.** Estructura d'un lisosoma.

La principal característica bioquímica dels lisosomes rau en el baix pH que hi ha al seu lumen. Aquest baix pH s'aconsegueix gràcies a una bomba ATPasa protònica que amb el consum d'adenina trifosfat (ATP) permet mantenir el pH àcid necessari per al correcte funcionament enzimàtic. Els enzims lisosòmics són glicoproteïnes que es mantenen inactives durant el seu procés de síntesi ja que només són actives al pH del lisosoma. La seva síntesi es realitza en el reticle endoplasmàtic rugós i després passa al lumen del reticle endoplasmàtic, i un cop allà el pèptid-senyal dels enzims lisosòmics és eliminat i uns residus asparagina són específicament glicosilats. Aquestes glicoproteïnes són plegades i exportades al *cis*-Golgi, on específicament alguns dels seus oligosacàrids són marcats amb una manosa-6-fosfat i són empaquetades en vesícules prelisosòmiques. En el *trans*-Golgi aquestes proteïnes marcades són reconegudes pel receptor de manosa-6-fosfat, que els dirigeix cap a l'endosoma tardà on el baix pH fa que el receptor i l'enzim es separin (Figura 1.7 a). No tots els enzims lisosòmics requereixen aquest marcatge de manosa-6-fosfat. Per exemple, la glucocerebrosidasa (GCase), que està associada a la membrana lisosòmica, no adquireix aquesta manosa-6-fosfat.<sup>9</sup> En estudis recents s'ha descrit que la GCase és transportada fins al

lisosoma per una proteïna integral de membrana lisosomal (LIMP-2), com es mostra a la Figura 1.7 b.<sup>10,11</sup>

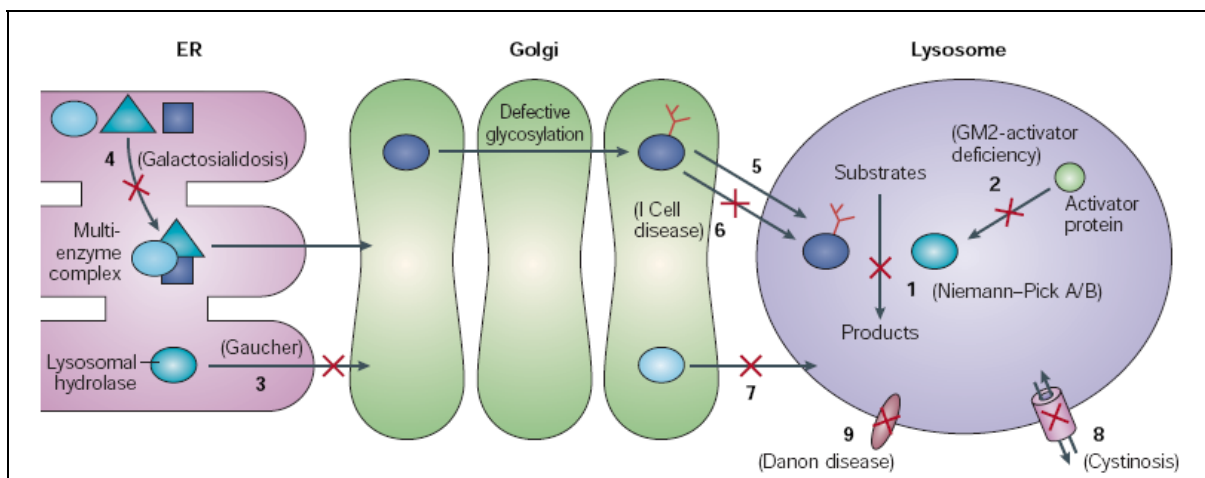


**Figura 1.7.** Esquema de la síntesi dels enzims lisosòmics via receptor de manosa-6-fosfat (a) i via LIMP-2 per a la GCase (b). a) Els enzims lisosòmics interaccionen amb els receptors de manosa-6-fosfat (M6P) en el *trans*-Golgi que els dirigeix cap a l'endosoma tardà on el baix pH fa que el receptor i l'enzim es separin. b) La GCase interacciona amb la LIMP-2 en el reticle endoplasmàtic i és transportada fins al lisosoma on es separen la GCase del LIMP-2. Figura extreta d'un article de Griffiths.<sup>11</sup>

Els darrers passos en la maduració dels enzims lisosòmics impliquen processos proteolítics, de correcte plegament i d'agregació amb altres proteïnes. Amb tot això, s'aconsegueix dirigir els enzims cap al lisosoma així com una inactivitat de tots aquells que no arribin al lisosoma ja sigui per l'absència de pH baix, per la manca de la maduració específica o per l'absència de cofactors específics que són en molts casos necessaris per a que els enzims siguin funcionals.<sup>12</sup> En quant a l'origen de les substàncies que són degradades pels enzims del lisosoma, es pot dividir bàsicament entre productes intracel·lulars i extracel·lulars. En el cas dels primers s'anomena autofàgia, mentre que en el cas dels extracel·lulars es pot distingir entre endocitosi i fagocitosi en funció de la molècula degradada.

### 1.2.2 Malalties d'acumulació lisosòmica (LSDs): Esfingolipidosis

Les LSDs constitueixen un grup d'aproximadament 50 malalties hereditàries degudes a defectes fisiològics del lisosoma.<sup>13</sup> Moltes d'aquestes malalties són degudes a la deficiència d'un enzim lisosòmic específic donant com a resultat l'acumulació lisosòmica del substrat no metabolitzat. Però hi ha altres possibilitats com que l'enzim no pugui ni tan sols arribar al lisosoma, o que no pugui formar el complex multienzimàtic necessari per al seu correcte funcionament, o que hi hagi errors en el procés de maduració o, fins i tot, que el que falli sigui algun cofactor necessari per a l'activitat enzimàtica (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Bases bioquímiques de les malalties d'acumulació lisosòmica. La presència de mutacions provoca que l'enzim tingui una activitat reduïda en els lisosomes per poder degradar el substrat (1), o perquè l'enzim requereix d'una proteïna activadora que és deficient (2). També pot ser que l'enzim no pugui arribar al lisosoma per un defecte de plegament (3) o perquè necessiti acompanyar-se amb altres enzims per sortir del reticle endoplasmàtic (4). En l'aparell de Golgi també poden haver-hi problemes de glicosilació, que redueixen la capacitat hidrolítica de l'enzim (5) o que si no es marca amb manosa-6-fosfat no pugui arribar al lisosoma (6) o problemes de transport del Golgi al lisosoma (7). Les LSDs també poden estar causades per defectes en proteïnes de membrana, tant transportadors (8) com altres proteïnes reguladores (9). Figura extreta d'un article de Futerman i col·laboradors.<sup>14</sup>

La incidència d'aquestes malalties a la població general és baixa, fet que fa que siguin classificades dintre del grup de les malalties rares o poc freqüents, tot i que en conjunt presenten una incidència global del grup de 1:5000-1:10.000 naixement,<sup>15</sup> segons la població. Per altra banda, les incidències individuals de cada malaltia, tot i ser baixes, poden ser molt variables en funció de les poblacions estudiades, de manera que algunes malalties poden arribar a tenir una freqüència d'aparició elevada en determinades poblacions.

Les LSDs són classificades segons l'enzim deficient o el substrat acumulat. En classificar-les en funció del substrat acumulat va resultar que algunes malalties foren agrupades erròniament perquè es va conèixer abans el substrat acumulat que l'enzim que mancava. Tanmateix, la classificació en funció del substrat acumulat té l'avantatge que moltes LSDs presenten similituds clíniques quan el substrat acumulat és similar i això ens permet fer grups de LSDs amb semblances clíniques. La classificació es veu encara més complicada pel fet que un mateix enzim lisosòmic pot tenir diferents substrats. El grup més prevalent de les LSDs són les esfingolipidosis, que es caracteritzen per acumular GSLs concrets com a resultat de deficiències enzimàtiques determinades, i d'aquestes, la malaltia de Gaucher (GD) és la més freqüent (Taula 1.1).

**Taula 1.1.** Esfingolipidosis més freqüents (modificada de Futerman i col·laboradors).<sup>14</sup>

<b>Esfingolipidosis</b>	<b>Proteïna o enzim deficient</b>	<b>Principal substrat acumulat</b>
Fabry	$\alpha$ -galactosidasa A	Globotriasilceramida
Lipogranulomatosi de Farber	Ceramidasa	Ceramida
<b>Gaucher I/II/III</b>	<b><math>\beta</math>-Glucocerebrosidasa</b>	<b>Glucosilceramida</b>
Niemann-Pick A i B	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Deficiència de l'activador d'esfingolípidis	Proteïna activadora d'esfingolípidis (SAP)	Glicolípidis
Gangliosidosi GM1	$\beta$ -Galactosidasa	Gangliòsid GM1
Gangliosidosi GM2 (Tay-Sachs)	$\beta$ -Hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (Sandhoff)	$\beta$ -Hexosaminidasa A i B	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (deficiència de l'activador de GM2)	Proteïna activadora de GM2	Gangliòsid GM2
Krabbe	$\beta$ -Galactosidasa	Galactosilceramida
Leucodistròfia metacromàtica	Arilsulfatasa A	Glicolípidis sulfatats

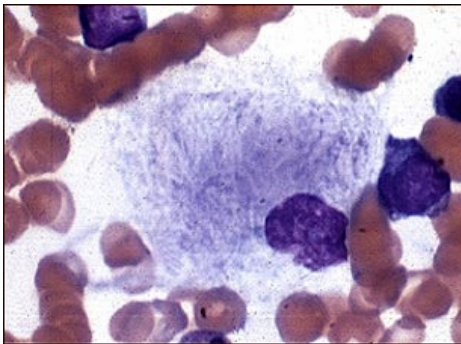
## 1.3 La malaltia de Gaucher (GD)

### 1.3.1 Aspectes històrics i clínics

A l'any 1882, Philippe Charles Ernest Gaucher, en la seva tesi doctoral, va descriure per primera vegada les manifestacions clíniques del que després es va anomenar malaltia de

Gaucher (GD). En la seva tesi doctoral, va descriure una esplenomegàlia massiva (augment simultani de la mida del fetge i la melsa) en una dona de 32 anys com un neoplasma esplènic primari. Després de vint anys, es va corregir aquest error de diagnòstic i es va donar a aquesta afectació el nom de GD.<sup>16</sup> Al cap d'uns anys, es va descriure que la naturalesa bioquímica d'aquesta malaltia era deguda a l'acumulació del substrat GlcCer.

Els malalts de Gaucher manquen de l'activitat normal de l'enzim lisosomal glucocerebrosidasa (GCCase), una  $\beta$ -glucosidasa que hidrolitza l'enllaç glicosídic entre la glucosa i la ceramida, i són incapaçs de metabolitzar la GlcCer, que s'acumula a l'interior



dels lisosomes dels macròfags impedit que aquests funcionin correctament. En conseqüència, els macròfags augmenten de volum formant les anomenades cèl·lules de Gaucher (Figura 1.9), que s'acumulen sobretot en la melsa, el fetge, els pulmons, en la medul·la òssia, en el sistema nerviós central i en altres teixits.<sup>17,18</sup>

**Figura 1.9.** Cèl·lula de Gaucher.

Les manifestacions clíniques de la malaltia són molt heterogènies. Els trets més característics són: augment de la mida del fetge i de la melsa (hepatoesplenomegàlia), substitució progressiva de la medul·la òssia per macròfags carregats de GlcCer (cèl·lules de Gaucher) que comprometen la producció d'eritròcits i de plaquetes (anèmia, trombocitopènia), degeneracions òssies i, en una minoria de pacients, es produeix una degeneració progressiva del sistema nerviós central.

La GD s'ha classificat tradicionalment en tres tipus clínics diferenciats per l'absència (tipus I) o presència i progressió (tipus II i III) de complicacions neurològiques:

- **Tipus I:** no neuronopàtic (forma adulta): És el més freqüent i presenta una elevada prevalença en la població jueva asquenasa (1/400-1/600), però es troba també present en molt grups ètnics (1/40.000-1/60.000).<sup>19</sup> Es caracteritza per una hepatoesplenomegàlia massiva i la manca de manifestacions neurològiques. Aquest engrandiment del volum del fetge i la melsa causa la seva disfunció així com el desplaçament del moll de l'ós sa i la pèrdua de l'ós provocant, com a conseqüència, deformacions i fractures. Malgrat que la majoria de pacients amb tipus I són adults,

també ha estat descrit en nens, els quals presenten un fenotip més greu amb hepatoesplenomegàlia associada amb una disfunció hepàtica severa i nombroses anormalitats esquelètiques.<sup>20</sup> En adults, on l'edat d'aparició i la severitat dels símptomes són molt variats, es poden trobar des de casos asimptomàtics fins a casos realment greus. La supervivència és variable, des de pocs anys (~6 anys) fins a més de 80 anys. És freqüent l'existència de pacients de GD de tipus I no diagnosticats per la manca de manifestacions clíniques.

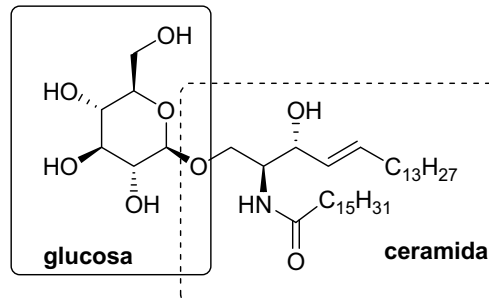
- **Tipus II:** neuronopàtic agut (forma infantil): És la forma més severa de la malaltia que es caracteritza per l'aparició molt prematura i la ràpida progressió de l'afectació neurològica. Aquesta forma, és molt poc freqüent (1/500.000 naixements).<sup>19</sup> La majoria dels casos apareixen al voltant dels 6 mesos d'edat. L'afectació neuronal és predominant i normalment sol ser diagnòstica. Els nens amb el tipus II moren durant els primers 2 anys de vida, amb un deteriorament psicomotor greu.
- **Tipus III:** neuronopàtic subagut (forma juvenil): Es caracteritza per una lenta progressió neurològica de la malaltia. La seva incidència és d'1/50.000 a 1/100.000 naixements vius.<sup>19</sup> En aquest tipus, els signes i símptomes de la malaltia apareixen en l'edat infantil o juvenil, en funció dels casos, amb afectació neurològica juntament amb una afectació visceral indiscernible de l'observada en pacients de tipus I. L'afectació neurològica és menys greu i ràpida que la dels pacients de tipus II. Els malalts amb el tipus III que arriben a l'adolescència poden sobreviure fins a la tercera o quarta dècada de vida.

**Taula 1.2.** Clínica de la malaltia de Gaucher (Taula modificada d'un article de Grabowski).<sup>21</sup>

<b>Característiques clíniques</b>	<b>Tipus I</b>	<b>Tipus II</b>	<b>Tipus III</b>
Inici de la malaltia	Infància/adulta	Infància	Infància/adolescència
Hepatoesplenomegàlia	+ → +++	+ → +++	+ → ++++
Hiperesplenisme	+ → +++	+	+ → +++
Manifestacions òssies/fractures	+ → +++	--	+ → ++++
Afectació del sistema nerviós central	--	++++	+ → +++
Supervivència	>6-80 anys	<2 anys	10-40 anys

### 1.3.2 El substrat glucosilceramida (GlcCer)

El principal substrat de la GCase és un GSL que rep el nom de glucosilceramida (GlcCer) o glucocerebròsid i està format per una unitat de ceramida i una de  $\beta$ -glucosa (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Estructura de la GlcCer.

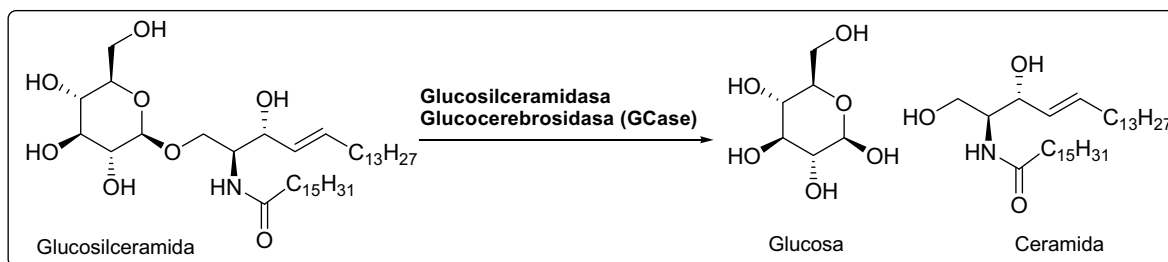
Com s'ha comentat anteriorment, la GlcCer es sintetitza en la cara citosòlica de l'aparell de Golgi i una gran part d'aquesta passa a formar part d'uns 300 GSLs complexos.<sup>6,22</sup> La GlcCer s'ha descrit no només com a intermediari de la ruta de síntesi i degradació dels GSLs, sinó que també és un component de les membranes implicat en diferents processos cel·lulars, com són proliferació,<sup>1</sup> transformació oncogènica i metastasi tumoral,<sup>23</sup> i diferenciació.<sup>24</sup> També està implicada en trombosi venosa i en l'activitat anticoagulant de la proteïna C.<sup>25</sup>

En una sèrie d'estudis van intentar avaluar la relació entre les elevades concentracions de GlcCer i diferents paràmetres de la fisiologia neuronal. Segons aquests estudis, l'acumulació de GlcCer es correlaciona amb un increment de la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular via receptor de rianodina<sup>26</sup> i amb un increment de la síntesi de fosfatidilcolina<sup>27</sup> provocant canvis en la funcionalitat neuronal. Calen, però, més estudis per tal de conèixer com l'acumulació del substrat provoca aquests increments i com aquests, i de quina manera, afecten el normal desenvolupament de les neurones.

### 1.3.3 L'enzim $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCase)

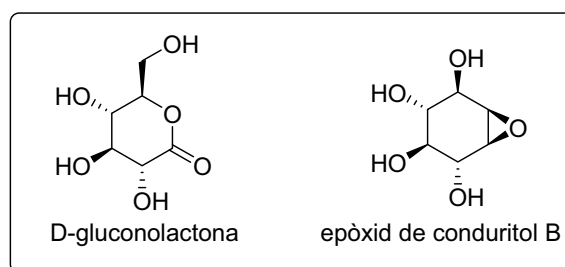
La  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCase) o  $\beta$ -glucosidasa àcida és una hidrolasa àcida lisosòmica que catalitza la hidròlisi de la GlcCer<sup>28</sup> a glucosa i ceramida en presència d'una proteïna activadora de baix pes molecular (8.5 kDa i 80 aminoàcids) anomenada saposina C<sup>29</sup> (SAP-C). Així mateix, la GCase requereix agents hidrofòbics, com per exemple detergents o lípids carregats negativament (com per exemple fosfatidilserina) i pH àcid per a una òptima hidròlisi enzimàtica del substrat.<sup>30</sup>





**Figura 1.11.** Hidròlisi de la GlcCer.

També existeix una glucosilceramida hidrolasa present en el citosol, a prop de la membrana plasmàtica, anomenada glucosilceramidasa, que funciona a pH neutre.<sup>31,32</sup> Aquest enzim presenta diferències d'especificitat pel substrat i sensibilitat als inhibidors respecte a l'enzim lisosomal.<sup>33</sup> La D-gluconolactona (Figura 1.12) és un inhibidor selectiu i competitiu de la glucosilceramidasa,<sup>32</sup> en canvi no és inhibida per l'epòxid de conuritol B (CBE), que és un inhibidor irreversible de la GCCase.<sup>34</sup>



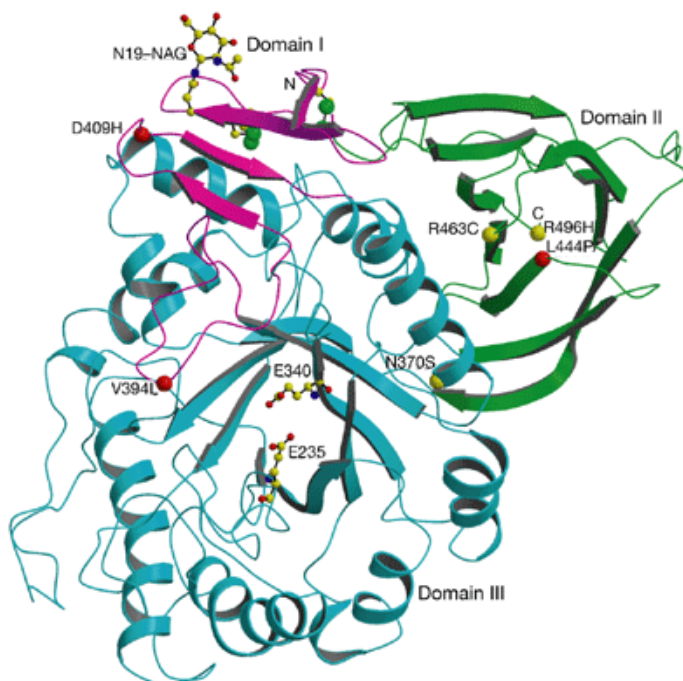
**Figura 1.12.** Estructures de la D-gluconolactona i l'epòxid de conuritol B.

La GCCase, que és una glicosidasa que actua amb retenció de configuració, hidrolitza l'enllaç glicosídic de la GlcCer mitjançant un mecanisme en dos passos, on cada pas resulta en una inversió de la configuració del carboni (veure apartat 1.5) i requereix dos aminoàcids d'àcid glutàmic del centre actiu que actuen, un com a catalitzador àcid/base (E235) i, l'altre, com a nucleòfil (E340)<sup>35,36</sup> que forma un intermedi de tipus èster amb la glucosa, que és hidrolitzat en un segon pas.

La GCCase madura humana té 497 aminoàcids i un pes molecular de 56 kDa. Conté un pèptid senyal que pot tenir 19 o 39 aminoàcids degut a la presència de dos inicis de traducció funcionals<sup>37</sup> i que li permet a la proteïna translocar-se al lumen del reticle endoplasmàtic. La forma glicosilada de la proteïna té un pes molecular aproximat de 63 kDa.

La seqüència de la GCase presenta cinc posicions per a l'*N*-glicosilació. Estudis de digestió en fibroblasts humans han demostrat que únicament són utilitzats quatre dels llocs potencials de glicosilació. També s'ha vist que aquesta glicosilació és essencial per al desenvolupament de l'activitat catalítica de l'enzim.<sup>38</sup>

A l'any 2003 es va establir l'estructura de la GCase mitjançant cristal·lografia de raigs X.<sup>39</sup> S'ha demostrat que el plegament de la proteïna genera 3 dominis diferents, que a la Figura 1.13, es marquen en blau, verd i rosa.

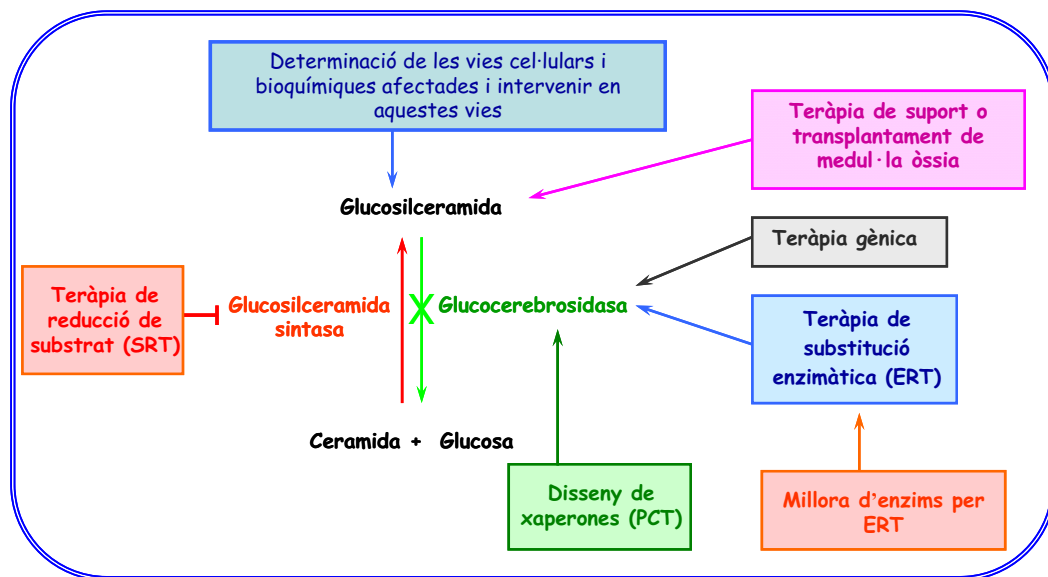


**Figura 1.13.** Estructura de raigs X de la GCase (Figura extreta d'un article de Dvir i col·laboradors).<sup>39</sup> L'enzim s'estructura en tres dominis diferents. Domini I (rosa): conté dos ponts disulfur i el primer lloc d'*N*-glicosilació (N19). Domini II (verd): conté l'aminoàcid L444 i és un domini semblant a una immunoglobulina. Domini III (blau): domini catalític format per 8 làmines β i 8 hèlix α. Els aminoàcids E235 i E340 actuen com a catalitzador àcid/base i nucleòfil, respectivament. Amb boles es marquen les posicions de les mutacions més freqüents de la GD (grogues: lleus, vermelles: severes).

El primer domini (rosa), s'estén des del residu 1 al 27 i del 383 al 414, i es troba estructurat en 3 làmines β antiparal·leles i una perpendicular a elles on es situa el grup amino terminal i un *loop*. Conté també dos ponts disulfurs (residus 4-16 i 18-23), que es creu que poden ser necessaris per al correcte plegament de la proteïna. El segon domini (verd), comprès entre els residus 30-75 i 431-497, està format per dues làmines β estretament associades que recorden una immunoglobulina (Ig). El tercer domini (blau), comprès entre els residus 76-381 i 416-430, conté el domini catalític, el qual es troba estructurat formant un *TIM barrel* que conté 8 hèlix α, 8 làmines β i tres cisteïnes lliures (Cys126, 248 i 342).

### 1.3.4 Teràpies per a la malaltia de Gaucher

Malgrat la poca incidència de la GD en la població, s'està treballant en la recerca d'un tractament efectiu, especialment en el cas dels malalts de tipus II i III amb afectació neurològica on es requereix, a més, un fàrmac capaç de travessar la barrera hematoencefàlica. S'han desenvolupat diferents teràpies per a la GD i les malalties lisosòmiques en general.<sup>7,40-42</sup> A la Figura 1.14 es representa un esquema de les diferents teràpies desenvolupades per a la GD indicant els punts on s'està treballant per millorar-les. Aquestes teràpies es centren en la recuperació total o parcial de l'activitat de la GCCase en els lisosomes o bé en la disminució del substrat (GlcCer) acumulat.



**Figura 1.14.** Diferents estratègies terapèutiques utilitzades en la GD. Figura modificada d'un article de Futerman i col·laboradors.<sup>42</sup>

#### 1.3.4.1 Teràpia de suport

Els primers tractaments que es van utilitzar en la GD van ser les teràpies de suport mèdiques o quirúrgiques amb la finalitat de pal·liar els símptomes que provocava la malaltia. Actualment s'utilitzen en alguns casos o com a complement d'altres teràpies, com pot ser l'enzimàtica.

Un dels tractaments que s'han utilitzat és l'esplenectomia, o extracció de la melsa, que està molt indicat en aquells casos on l'augment de la melsa és molt gran i interfereix amb el desenvolupament i el creixement normal dels pacients. Resulta eficient per al tractament de les trombocitopènies greus.<sup>43</sup> Així mateix, per als problemes ossis s'utilitza la implantació de pròtesis, amb intervencions ortopèdiques, o per substituir la part afectada,<sup>44</sup> encara que

aquest tipus d'intervencions no són molt aconsellades en nens perquè pot interferir en el creixement.

Totes aquestes mesures així com altres es basen en pal·liar els símptomes, però no curen als pacients perquè no resolen el problema primordial d'aquesta malaltia, la manca d'activitat en l'enzim GCCase.

#### **1.3.4.2 Transplantament de medul·la òssia**

Els pacients amb un fenotip més sever de la malaltia (tipus III) poden beneficiar-se del trasplantament de medul·la òssia que ha donat bons resultats en alguns casos.<sup>45</sup> Tot i que és una teràpia permanent que no obliga als pacients a estar sotmesos a infusions de l'enzim periòdiques i és més econòmica que d'altres, presenta un elevat risc ja que comporta una elevada mortalitat (10% dels pacients), fins i tot quan el donant és totalment compatible.

#### **1.3.4.3 Transferència gènica**

La gran majoria de les tècniques estudiades en teràpia gènica fins al moment van encaminades a la introducció del gen de la GCCase en cèl·lules mare del malalt provinents de sang perifèrica o de la medul·la òssia per corregir un defecte genètic i tornar a introduir aquestes cèl·lules, que ara expressen l'enzim funcional, en el malalt.<sup>41,46,47</sup> Encara que aquesta aproximació ha estat explorada durant uns quants anys, encara no s'ha trobat una teràpia gènica efectiva per a la GD.<sup>46</sup>

#### **1.3.4.4 Teràpia de substitució enzimàtica (*Enzyme Replacement Therapy, ERT*)**

Aquest tractament per a la GD es basa en l'administració de l'enzim GCCase lleugerament modificat per tal que pugui incorporar-se als macròfags i actuar en la degradació del substrat acumulat.

La idea que les LSDs es podien tractar reemplaçant l'enzim que era defectiu per un enzim actiu va ser suggerit per primera vegada per de Duve l'any 1964.<sup>48</sup>

Els primers treballs encaminats a l'obtenció d'una ERT daten dels anys 70,<sup>49</sup> on es va utilitzar GCCase de placenta no modificada quan van descobrir que era un dels teixits més rics en l'enzim. Es va aconseguir reduir la quantitat de GlcCer, però es necessitava molta quantitat d'enzim per a que fes el seu efecte en els macròfags i era difícil obtenir-ne grans quantitats purificant-lo a partir de teixit placentari humà.

El descobriment de que les glicoproteïnes lisosomals sintetitzades *de novo* eren dirigides al lisosoma via receptors de manosa-6-fosfat va permetre dirigir la GCCase als macròfags, millorant els efectes de la teràpia i establint la base del tractament de les malalties lisosomals per ERT.<sup>50</sup> En el cas de la GCCase per dirigir-la als macròfags, que eren les cèl·lules afectades, es va modificar la glicosilació de l'enzim per a que quedessin els residus manosa exposats a l'exterior, per tal que la proteïna pogués ser reconeguda per receptors específics dels macròfags permetent la seva internalització selectiva.<sup>51</sup> Aquesta modificació augmentava 50 vegades la captació de l'enzim pels macròfags.<sup>52</sup> A l'any 1991 es va aprovar aquesta teràpia pel tractament de la GD i el primer fàrmac administrat va ser la Ceredase<sup>®</sup> (aglucerasa, Genzyme Corporation), que s'obtenia a partir de la GCCase placentària humana mitjançant un complex procés d'extracció química i posterior modificació de les cadenes d'oligosacàrids, quedant els residus de manosa exposats per a que fossin reconeguts pels macròfags. Aquest enzim té 497 aminoàcids i el seu contingut en carbohidrats és del 6% (un 12% en l'enzim natural).<sup>53</sup>

A l'any 1994, es va aprovar el fàrmac Cerezyme<sup>®</sup> (Genzyme Corporation), que té com a principi actiu la imiglucerasa, que és la GCCase recombinant obtinguda per enginyeria genètica a partir d'un cultiu de cèl·lules de mamífer (cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès, CHO, *Chinese hamster ovary cells*) i a la que també s'ha modificat la glicosilació per a que quedin els residus de manosa exposats. La imiglucerasa difereix de l'aglucerasa en un aminoàcid localitzat en la posició 495 on la histidina es troba substituïda per arginina. Les propietats farmacocinètiques són similars per als dos fàrmacs.<sup>54</sup>

Al 2010, la Food and Drug Administration (FDA) ha aprovat dos nous fàrmacs per al tractament de la GD. Un d'ells és el VPRIV<sup>™</sup> (Velaglucerasa alfa, Shire Human Genetic Therapies, Cambridge, MA, USA), que es produeix a partir d'una línia cel·lular humana de fibrosarcoma per activació gènica i té la mateixa seqüència d'aminoàcids que la GCCase humana.<sup>55</sup> En els estudis fets han vist que amb aquest nou fàrmac els pacients poden desenvolupar anticossos en menys de l'1% dels casos, mentre que amb la imiglucerasa, que s'obté a partir de cultius de cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès, la probabilitat de desenvolupar anticossos augmenta fins al 15%.

L'altre fàrmac aprovat per la FDA a l'any 2010 és l'Uplyso (taliglucerasa alfa, Protalix Biotherapeutics), el qual s'obté a partir de cèl·lules transgèniques de pastanaga i té una estructura 3D i una activitat biològica molt semblant a la imiglucerasa.<sup>56</sup>

Aquest tipus de teràpia és adequada sobretot per a malalts de tipus I,<sup>57</sup> que no tenen afectació del sistema nerviós central, perquè l'enzim administrat no pot creuar la barrera hematoencefàlica.<sup>58</sup> Bàsicament actua reduint l'acumulació de GlcCer, el que comporta una disminució de la mida del fetge i la melsa dels malalts, augmentant els nivells d'hemoglobina i plaquetes i millorant la mineralització de l'ós. En malalts de tipus II i III s'utilitza amb l'esperança de frenar l'evolució de les formes cròniques o millorar la qualitat de vida de les formes agudes.

La resposta al tractament és variable en cada pacient segons la manifestació de la malaltia. S'han descrit també alguns efectes secundaris, com nàusees, vòmits, diarrea, febre i dolor abdominal. Com s'ha descrit anteriorment, per al cas de la imiglucerasa, aproximadament el 15% dels pacients desenvolupen anticossos contra l'enzim administrat. Per tots aquests motius el tractament es fa sota un estricte control mèdic. Els principals desavantatges d'aquesta teràpia són l'elevat preu del tractament (430.000 dòlars per any),<sup>7</sup> s'administra per via intravenosa, requereix que el pacient vagi a l'hospital cada 15 dies i no és una cura definitiva, sinó que implica un tractament per a tota la vida.

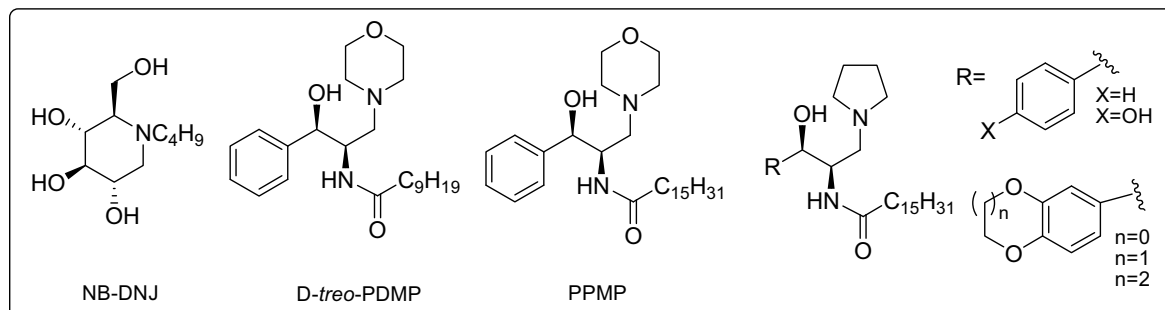
#### 1.3.4.5 Teràpia de reducció de substrat (*Substrate Reduction Therapy, SRT*)

Aquest tractament per a la GD es basa en l'administració d'un inhibidor de la glucosilceramida sintasa (GCS), que és l'enzim que catalitza el primer pas de la síntesi dels GSLs, és a dir, la transferència de glucosa (utilitzant UDP-glucosa) a la ceramida per a formar la GlcCer.<sup>59</sup>

Per tant, es vol aconseguir una reducció de la síntesi de GlcCer fins al nivell que l'activitat residual de l'enzim GCase permeti degradar la GlcCer que entra en el lisosoma, és a dir, igualar la síntesi a la degradació per a que així no s'acumuli el substrat no degradat.<sup>60</sup> Els inhibidors del primer pas de la síntesi dels GSLs poden ser utilitzats potencialment com a teràpia de malalties que acumulen productes derivats de la GlcCer. Això permet que aquests inhibidors es puguin utilitzar no només com a teràpia de la GD, sinó també en altres malalties on el substrat que s'acumula forma part d'aquesta via, com per exemple Fabry, Tay-Sachs, Sandhoff o gangliosidosi GM1.

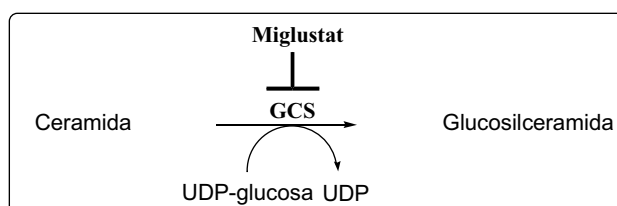
Fins al moment s'han identificat dos grans grups d'inhibidors de la GCS. El primer grup d'inhibidors (anàlegs de la ceramida) és el format pel PDMP (D,L-*treo*-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol) i els seus derivats, com el PPMP (D,L-*treo*-1-fenil-2-hexadecanoilamino-3-morfolino-1-propanol)<sup>61</sup> (Figura 1.15). Actualment es troba en fase

clínica III<sup>62</sup> un anàleg del PDMP (Eliglustat tartrate, Genz-112638) que és un potent i selectiu inhibidor de la GCS *in vitro*. A més, s'ha vist que aquest compost fa disminuir els nivells de GlcCer en models animals de la malaltia.<sup>63</sup>



**Figura 1.15.** Inhibidors de la GCS.

El segon grup d'inhibidors identificats són els iminosucres. Fins al moment la majoria d'estudis per avaluar la SRT s'han fet utilitzant com a inhibidor la NB-DNJ (*N*-butil-deoxinojirimicina).<sup>64</sup> Aquests compostos també actuen competint amb la ceramida, però a més, sembla que pot evitar els canvis conformacionals de la GCS que requereix per a ser activa.<sup>65</sup> La NB-DNJ no té efecte citotòxic en cèl·lules en cultiu i s'excreta pels ronyons intacte *in vivo*.<sup>66</sup> Aquest iminosucres es va provar en cultius cel·lulars de cèl·lules model per a la GD i en animals model per a les malalties de Tay-Sachs,<sup>67</sup> Sandhoff,<sup>68</sup> Fabry,<sup>69</sup> gangliosidosi GM1<sup>70</sup> i Niemann-Pick tipus C.<sup>71</sup> En tots els casos s'aconseguia reduir els nivells del substrat acumulat. A més, en el cas dels animals model també s'aconseguia reduir aquest nivell en el sistema nerviós central, ja que aquest compost pot travessar la barrera hematoencefàlica. L'any 2002 es va aprovar el fàrmac per al tractament de la GD Tipus I<sup>72,73</sup> i al 2008 per al tractament de les manifestacions neurològiques en nens i adults de malaltia de Niemann-Pick tipus C.<sup>74</sup> El nom genèric del fàrmac és OGT918 o miglustat (Zavesca<sup>®</sup>, Actelion Pharmaceuticals). L'administració d'aquest fàrmac és per via oral, fet que representa un benefici pràctic i econòmic.

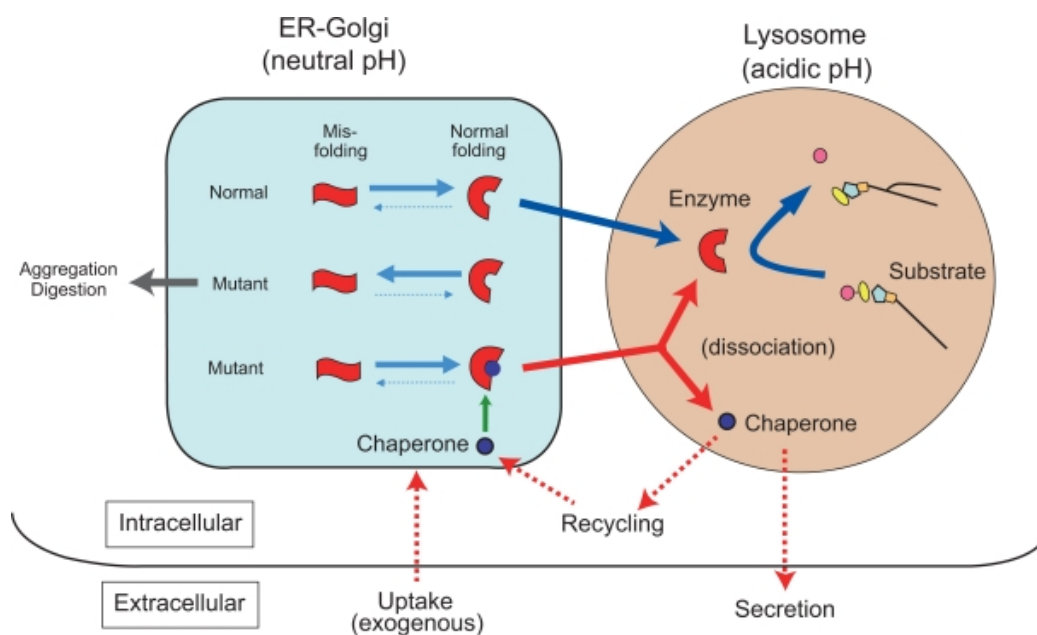


**Figura 1.16.** Inhibició de la GCS amb miglustat.

La NB-DNJ no presenta una bona selectivitat per la GCS, ja que també és un inhibidor de l' $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50}=0.36 \mu\text{M}$  per a l' $\alpha$ -glucosidasa tipus I i II o endoglucosidasa,  $IC_{50}=1.9 \mu\text{M}$  per a l' $\alpha$ -glucosidasa àcida lisosomal i  $IC_{50}=4.5 \mu\text{M}$  per a l' $\alpha$ -1,6-glucosidasa.)<sup>75</sup> Això fa que el fàrmac provoqui un gran nombre d'efectes secundaris (diarrea, pèrdua de pes, marejos, pèrdua d'apetit, dolor o malestar estomacal, nàusees o vòmits, diarrea) en els malalts de Gaucher i només es recomana en pacients adults en els quals la ERT resulta inadequada.<sup>73</sup>

### 1.3.4.6 Teràpia basada en la utilització de xaperones farmacològiques

Degut a que totes les anteriors teràpies descrites presenten certes limitacions, en els últims anys s'ha treballat en la recerca de noves estratègies per al tractament de la GD i les altres LSDs. Entre elles, la teràpia basada en la utilització de xaperones farmacològiques (*pharmacological chaperone therapy*, PCT o teràpia d'estímul enzimàtic, *enzyme enhancement therapy*) ha despertat un gran interès per al tractament de les LSDs.<sup>7,76-80</sup> En moltes d'aquestes malalties, la manca d'activitat enzimàtica és deguda a la presència de mutacions en el gen precursor de l'enzim que provoca un plegament incorrecte de la proteïna i impedeixen el seu transport al lisosoma on hidrolitza el substrat i, per tant, aquest últim s'acumula en els lisosomes (Figura 1.17). Per altra banda, l'enzim és degradat en el mateix reticle endoplasmàtic o en l'aparell de Golgi pels proteasomes.

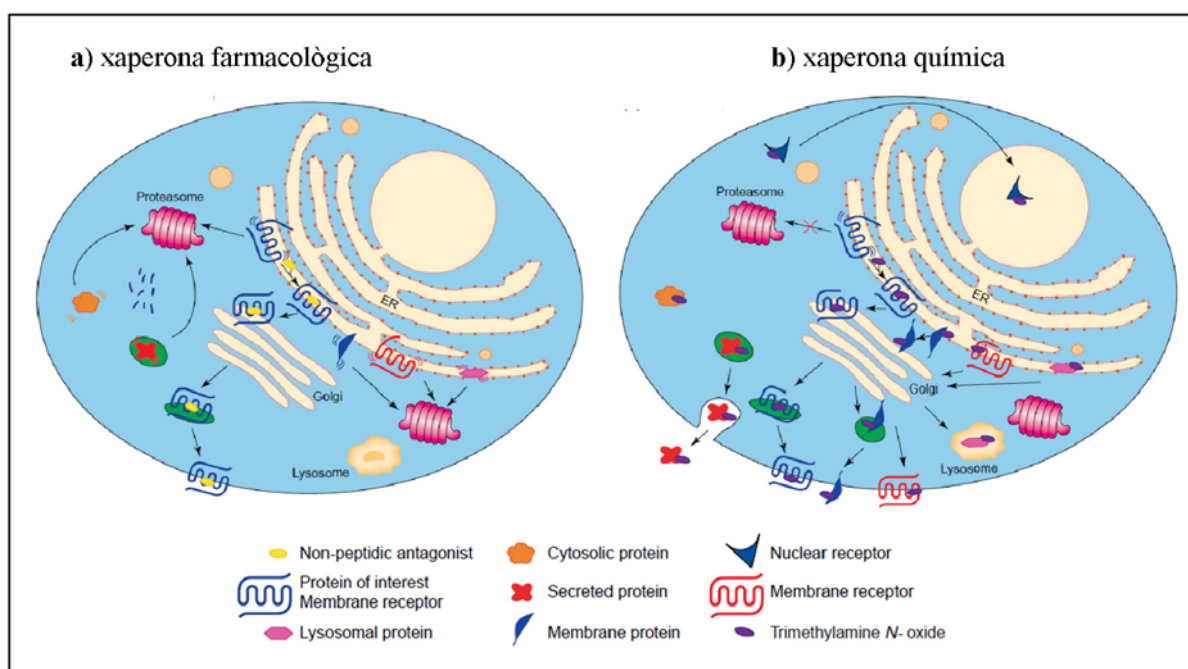


**Figura 1.17.** Esquema de com actua una xaperona farmacològica des de que s'uneix a l'enzim mutant en el reticle endoplasmàtic fins que arriba al lisosoma. Figura extreta d'un article de Suzuki i col·laboradors.<sup>79</sup>



En la PCT s'utilitzen inhibidors de l'enzim deficient que a concentracions subinhibitòries actuen com a xaperones farmacològiques i s'uneixen en el reticle endoplasmàtic a l'enzim mutant per a formar un complex que l'estabilitza, facilita el seu correcte plegament i transport al lisosoma, on en presència del substrat, el compost es separa de l'enzim i aquest pot ser actiu enzimàticament.

Els termes xaperona química i xaperona farmacològica s'han utilitzat a la bibliografia de forma indistinta, però recentment s'han establert unes diferències entre ells (Figura 1.18).<sup>81</sup> Una xaperona química és un compost amb un baix pes molecular, com per exemple el glicerol i l'*N*-òxid de trimetilamina, que s'uneix i facilita el correcte plegament de qualsevol proteïna mutant i normalment no tenen un lloc d'unió específic. Degut a això, són necessàries unes concentracions molt elevades d'aquests compostos per aconseguir un efecte i no s'ha trobat cap xaperona química que sent activa en cultius cel·lulars es pugui utilitzar en assaigs clínics. En canvi, les xaperones farmacològiques són inhibidors de l'enzim deficient dissenyats per a que s'uneixin de forma específica amb aquest enzim, facilitar el seu correcte plegament i posterior transport al lisosoma.



**Figura 1.18.** Comparació dels modes d'acció de xaperones farmacològiques (a) i químiques (b). Figura extreta d'un article de Bernier i col·laboradors.<sup>81</sup>

Un factor a tenir en compte per al disseny de xaperones farmacològiques és que l'inhibidor s'ha d'unir millor a l'enzim a pH neutre (condicions del reticle endoplasmàtic), que al pH àcid que hi ha en els lisosomes. D'aquesta forma es facilita el desplaçament de

l'inhibidor, el qual es troba a concentracions subinhibitòries, pel substrat un cop arriba el complex al lisosoma.

Fins al moment no hi ha cap fàrmac per als malalts de Gaucher on s'utilitzi aquesta aproximació. Cal esmentar que la Plicera<sup>TM</sup> (isofagomine tartrate, Amicus Therapeutics) és l'única xaperona farmacològica que ha arribat fins la fase II de l'assaig clínic per a aquesta malaltia.<sup>82-85</sup> Malauradament, no es van obtenir bons resultats i el desenvolupament d'aquest fàrmac es va aturar per falta d'eficàcia. Actualment s'està estudiant la teràpia combinada de Plicera<sup>TM</sup> amb la ERT. Val a dir que la companyia farmacèutica Amicus Therapeutics està fent els estudis preclínics per examinar l'ús de Plicera<sup>TM</sup> per al tractament de la malaltia de Parkinson.

Els avantatges d'aquesta teràpia front la ERT serien la possibilitat d'administrar el fàrmac per via oral i la capacitat que tenen aquestes molècules de travessar la barrera hematoencefàlica i, per tant, servir com a fàrmac per als malalts de Gaucher amb afectació del sistema nerviós central (tipus II i III).

### **1.3.5 Diagnòstic de la malaltia de Gaucher**

#### **1.3.5.1 Diagnòstic morfològic**

Tradicionalment el diagnòstic de la GD s'ha basat en la detecció específica de les cèl·lules que acumulen la GlcCer (cèl·lules de Gaucher) en la medul·la òssia, el fetge o la melsa. Però s'han descrit cèl·lules molt similars en altres malalties, que s'han anomenat cèl·lules pseudo-Gaucher. Això ha fet que s'utilitzin altres tècniques bioquímiques i moleculars que són més específiques i menys invasives.

#### **1.3.5.2 Diagnòstic enzimàtic**

El diagnòstic enzimàtic es basa en la mesura de l'activitat de la GCase a partir de cèl·lules. Els leucòcits de sang perifèrica tenen normalment una activitat elevada de GCase que es veu disminuïda en cèl·lules de malalts. Per a mesurar aquesta activitat s'utilitzen substrats sintètics de la GCase, com el 4-metilumbel·liferil- $\beta$ -D-glucopiranosid. També es poden utilitzar fibroblasts, líquid amniòtic o vellositats coriòniques per a mesurar l'activitat. La demostració de la reducció en l'activitat enzimàtica de la GCase determina el diagnòstic de la malaltia. Pel que fa al diagnòstic de portadors, en leucòcits i fibroblasts trobem la meitat d'activitat normal de l'enzim en els heterozigots, tot i que hi ha solapament entre valors normals i valors de portadors. Aquest diagnòstic no pot distingir entre els tipus neuronopàtics (tipus II i III) i no neuronopàtic (tipus I), ja que hi ha també solapament dels

valors d'activitat entre els diferent tipus. En general, en adults malalts trobem que l'enzim té entre el 10-30% de l'activitat normal i en nens el 10% o menys. En el plasma de pacients de la GD es troben augmentades les activitats d'alguns enzims, com són la fosfatasa àcida, altres enzims lisosomals com l'hexosaminidasa, l'enzim convertidor d'angiotensina i la quitotriosidasa. Sobretot la quitotriosidasa s'ha establert com un bon marcador per a seguir la progressió de la malaltia i l'efecte de la teràpia, ja que correlacionen molt bé els seus nivells amb la severitat de la malaltia.<sup>86</sup>

### 1.3.5.3 Diagnòstic genètic

El diagnòstic basat en l'anàlisi del DNA té importants avantatges respecte al diagnòstic enzimàtic: les mostres són més estables i permet distingir perfectament malalts de portadors.<sup>21</sup> S'han desenvolupat diferents tècniques basades en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per facilitar la detecció de mutacions i s'han establert protocols moleculars rutinaris per a les mutacions més freqüents. L'anàlisi mutacional pot tenir un valor predictiu per a determinar la progressió de la malaltia, ja que s'han establert algunes correlacions genotip-fenotip clares, com es veurà en l'apartat 1.4.

### 1.3.5.4 Diagnòstic prenatal

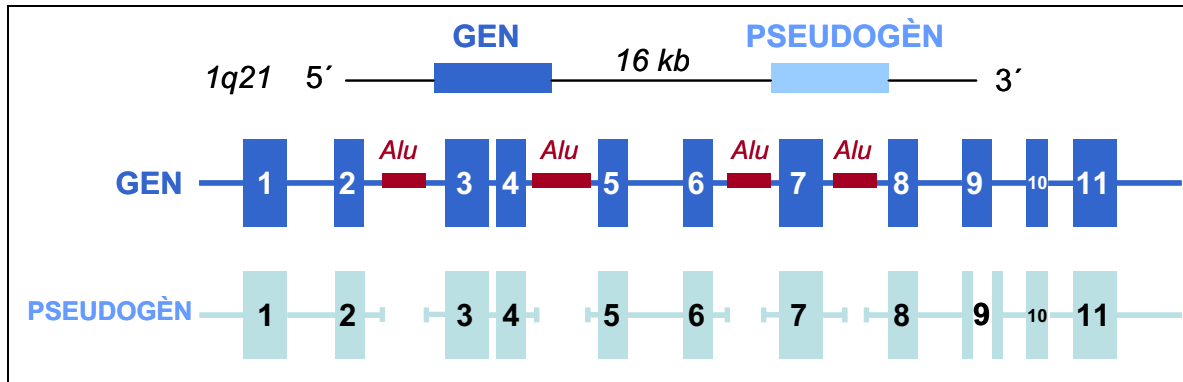
El diagnòstic prenatal de la GD pot ser realitzat a partir de teixits fetals fàcilment assequibles, com són els amniòcits, les vellositats coriòniques o les cèl·lules cultivades procedents d'ambdues.<sup>87</sup> La necessitat d'un diagnòstic prenatal apareix en aquelles famílies que presenten algun antecedent amb la malaltia.

El diagnòstic, com hem vist amb anterioritat, pot ser realitzat per mètodes enzimàtics i/o moleculars. En el darrer cas, caldrà conèixer les mutacions causants de la malaltia en la família subjecta a estudi o, en cas contrari, emprar marcadors altament polimòrfics per a realitzar un diagnòstic indirecte. Només en alguns dels casos en els quals s'arribi a identificar el genotip del fetus, serà possible determinar el tipus de la malaltia.

## 1.4 Mutacions en el gen GBA

El gen que codifica la GCase és el gen GBA, que està situat en el cromosoma 1, en la banda q21.<sup>88</sup> Té una longitud de 7.6 kb i conté 11 exons i 10 introns (Figura 1.19). Els introns 2, 4, 6 i 7 contenen seqüències *Alu* (seqüències repetides distribuïdes pel genoma). S'ha identificat un pseudogèn (GBAP) localitzat a 16 kb en direcció 3' respecte al gen

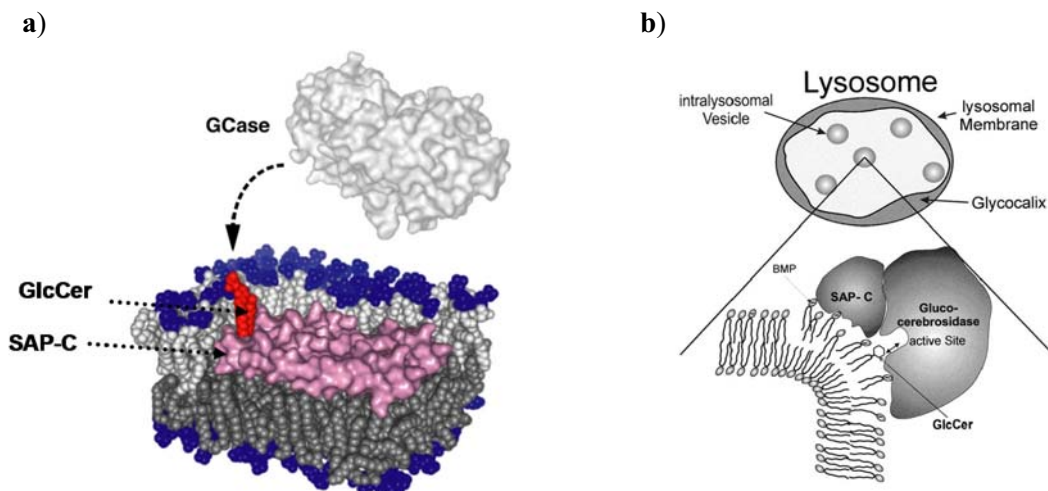
funcional GBA,<sup>89</sup> que es transcriu però no es tradueix a proteïna per falta d'una pauta de lectura oberta. El pseudogèn té una longitud de 5.7 kb i una estructura d'exons i introns semblant al gen però no conté les seqüències *Alu* i presenta diverses mutacions que impossibiliten la síntesi d'una proteïna funcional.



**Figura 1.19.** Estructura del gen de la GCcase (GBA) i el seu pseudogèn (GBAP).

Com s'ha descrit anteriorment, en la majoria dels casos la GD és deguda a mutacions en el gen GBA i en el pseudogèn GBAP. Només en 7 malalts s'ha trobat alguna mutació en el gen que codifica la proteïna activadora (SAP-C) de la GCcase.<sup>90</sup>

La SAP-C s'uneix a la GCcase facilitant la degradació de la GlcCer (Figura 1.20) i li confereix a la GCcase més resistència a les proteases de la cèl·lula.<sup>91</sup> Aquesta proteïna està codificada pel gen prosaposina (PSAP) localitzat al cromosoma 10, a la banda q21-22.<sup>92</sup> L'absència de SAP-C activa aboleix completament l'activitat de la GCcase, produint el fenotip característic de la GD.



**Figura 1.20.** a) Model esquemàtic de l'associació de la GCcase a la membrana per a degradar la GlcCer. Figura modificada d'un article d'Alattia i col·laboradors.<sup>93</sup> b) Model per al mecanisme de degradació de la GlcCer per la GCcase i SAP-C. Figura extreta d'un article de Wilkening i col·laboradors.<sup>94</sup>

A l'any 1987, es va identificar la primera mutació en el gen de la GCCase<sup>95</sup> (L444P) responsable de la GD i, fins el moment, s'han descrit gairebé 300 mutacions diferents<sup>96</sup> en aquest gen que donen lloc a la GD.

**Segons la seva base molecular**, les mutacions poden ser substitucions nucleotídiques que provoquen canvis d'aminoàcid, mutacions sense sentit, aparició de codons *stop*, alteracions en el procés d'*splicing*, insercions o delecions que impliquen canvis en la pauta de lectura, i reordenacions entre el gen funcional i el pseudogèn per processos de recombinació o conversió gènica que normalment originen al·lels complexos, és a dir, que contenen diverses mutacions.

**Segons els seus efectes fenotípics**, les mutacions es poden dividir, en tres grups: mutacions letals, severes i lleus. Les mutacions letals són aquelles que impedeixen la formació de l'enzim (mutació 84GG i mutació IVS2+1); es consideren letals perquè no s'han trobat mai en homozigosi; les mutacions severes poden produir enzim, però aquest sol ésser poc estable i normalment van lligades amb els tipus neuronopàtics de la malaltia (tipus II o III) (mutació L444P); les mutacions lleus estan només associades amb el tipus I (forma no neuronopàtica) de la malaltia, com la mutació N370S.

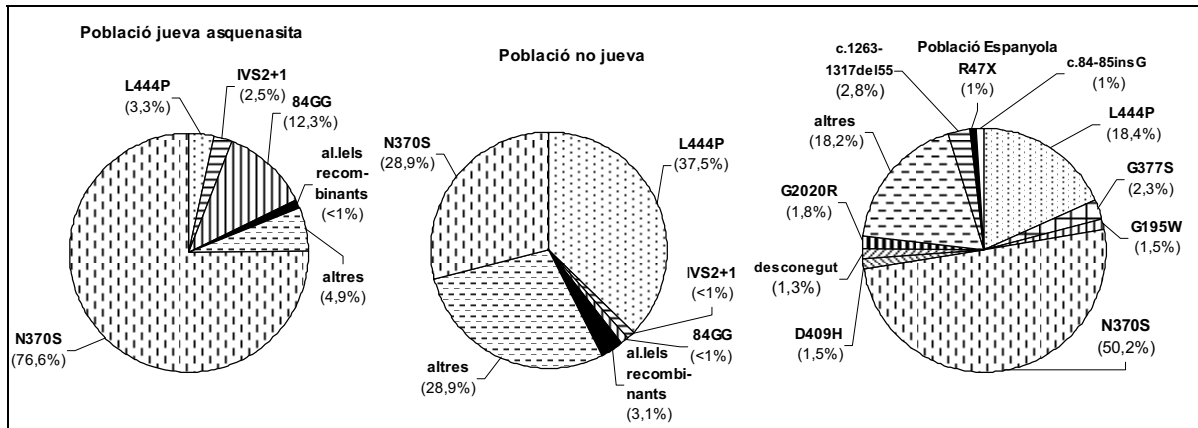
#### 1.4.1 Distribució poblacional de les mutacions més freqüents

La GD és especialment prevalent en la població jueva asquenasa on presenta una incidència d'1/800-1/1000 naixements.<sup>97</sup> En la població general, aquesta incidència s'eleva fins a 1 de cada 40000-50000 naixements.<sup>21</sup> En la població espanyola, la incidència d'aquesta malaltia és encara més baixa (1 de cada 300000 naixements).<sup>98</sup>

De totes les mutacions que s'han identificat en el gen GBA, poques tenen una prevalença elevada, però la seva freqüència relativa varia segons el grup ètnic.

En la **població de jueus asquenases**, la mutació N370S, una substitució d'asparagina per serina en l'aminoàcid 370, és la més freqüent i està present en un 77% dels al·lels mutants. La segona mutació més freqüent és una inserció d'una guanina en la posició 84 (84GG), que representa un 12%. Només quatre mutacions (N370S, 84GG, L444P i IVS2+1) expliquen el 95% de les mutacions responsables de la malaltia en aquesta població (Figura 1.21).<sup>7,99</sup>

En la **població general no jueva** les mutacions més freqüents són la N370S, que representa un 29% dels al·lels mutants i la L444P (37%, substitució de leucina per prolina en la posició 444) (Figura 1.21).<sup>7,99</sup>



**Figura 1.21.** Freqüències de les mutacions responsables de la GD en les poblacions següents: jueva asquenasa,<sup>7,99</sup> no jueva<sup>7,99</sup> i espanyola.<sup>100</sup>

Pel que fa a la **població espanyola**, les mutacions més freqüents són la N370S, que representa el 50% del total de mutacions, seguida per la L444P, en un 18% dels al·lels mutants (Figura 1.21). Juntament amb la D409H, G377S, c.1263-1317del55, R47X, G195W G202R i c.84-85insG representen el 80% de les mutacions.<sup>100</sup>

#### 1.4.2 Relacions genotip-fenotip (mutacions N370S i L444P)

La GD es manifesta de forma diferent en individus amb diferent genotip, però també es pot manifestar de forma diferent en individus amb el mateix genotip. Els genotips més estudiats afecten les mutacions més freqüents en les diferents poblacions. Això permet que, en alguns casos, es pugui deduir el procés que seguirà la malaltia segons la mutació causant d'aquesta. En aquest sentit, la presència de la mutació N370S, tant en homozigosi com en heterozigosi, va invariablement associada a un diagnòstic no neuronopàtic i, per tant, al tipus I de la malaltia. Tsuji i col·laboradors<sup>101</sup> varen ser els primers en descriure aquesta mutació, la més prevalent en malalts de Gaucher. Amb la resolució de l'estructura de la proteïna, s'ha pogut determinar que la mutació N370S es troba localitzada a l'hèlix  $\alpha$ -7, situada a la interfase entre els dominis II i III, allunyada, per tant, del centre actiu (Figura 1.13).<sup>39</sup> D'altra banda, els al·lels recombinants (al·lels que provenen de la seqüència del pseudogèn i normalment agrupen més d'una mutació) en homozigosi o juntament amb un al·lel L444P, són particularment prevalents entre els pacients amb el tipus II de la malaltia<sup>102</sup> i la mutació L444P en homozigosi indica normalment el tipus III.<sup>99</sup> Els malalts amb aquesta mutació presenten una clínica més severa, generalment associada amb manifestacions neurològiques.

Amb la resolució de l'estructura de la proteïna, s'ha pogut determinar que la mutació L444P es troba localitzada en el domini II (Figura 1.13).<sup>39</sup>

Tot i aquestes correlacions, hi ha variacions considerables de fenotip entre pacients amb un mateix genotip, que poden ser degudes a la influència de factors ambientals com infeccions, mutacions puntuals o la influència de gens pròxims com el pseudogèn GBAP.<sup>18,99</sup>

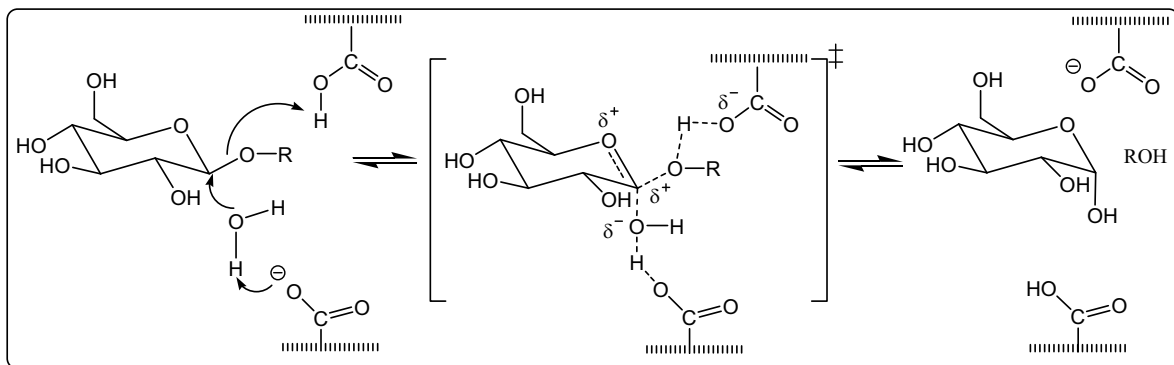
## 1.5 Les glicosidases

La gran varietat estereoquímica dels carbohidrats unida als diferents possibles tipus d'unió que poden donar-se entre ells, fa dels oligo- i polisacàrids un grup d'una elevada biodiversitat,<sup>103</sup> amb gran varietat de funcionalitats. Mentre que els polisacàrids poden actuar com a components d'emmagatzemament, elements estructurals (són la part integrant de la majoria d'estructures vegetals) o de reconeixement; els oligosacàrids, solen esdevenir reservoris energètics i elements de reconeixement. A més, també es troben formant part de gran nombre de glicoconjugats com són els glicolípid, glicoproteïnes o saponines. Com a conseqüència, a la natura s'ha desenvolupat una gran varietat d'enzims capaços d'hidrolitzar enllaços glicosídics, les glicosidases. Aquests enzims són especialment eficients ja que l'enllaç glicosídic és l'enllaç més estable entre els biopolímers naturals,<sup>104</sup> i les glicosidases aconseguen augmentos de velocitat fins a  $10^{17}$  vegades en relació als de les respectives reaccions no catalitzades.<sup>105</sup>

La *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) va proposar la classificació dels enzims depenent de l'activitat enzimàtica que realitzaven (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>). Amb aquesta classificació es van agrupar les glicosidases dins del grup EC 3.2.a.b; el primer dígit correspon al tipus d'activitat enzimàtica (3 correspon a activitat hidrolítica), i el segon dígit correspon al tipus de substrat (2 significa que actuen sobre carbohidrats). El tercer dígit correspon en aquest cas al tipus d'àtom que forma l'enllaç glicosídic; normalment és oxigen (-O-), però també hi ha enllaços *N*- i *S*-glicosídics. El quart dígit es va reservar pel tipus de substrat, de vegades un mateix substrat és hidrolitzat de diferent manera, per l'extrem (exoglicosidases) o per qualsevol punt de la cadena polisacàridica (endoglicosidases).

La hidròlisi de l'enllaç glicosídic té lloc gairebé sempre mitjançant catàlisi àcida/bàsica i requereix dos residus essencials: un donador de protons (àcid general), i un nucleòfil (base general). La hidròlisi de l'enllaç glicosídic pot portar-se mitjançant dos mecanismes diferents: amb retenció o inversió de la configuració del carboni anomèric. Aquests

mecanismes van ser proposats per Koshland<sup>106</sup> a l'any 1953, i encara que després s'han revisat i modificat, l'esquema general original segueix sent vàlid. Els residus catalítics de les glicosidases són generalment els grups carboxil d'un residu aspàrtic o glutàmic. Ambdós mecanismes comparteixen el primer pas de reacció, en el que el residu àcid general protona l'oxigen glicosídic i simultàniament s'inicia l'atac nucleòfil, que precisament és el que diferencia els mecanismes. En les glicosidases amb retenció de configuració (com la GCase), és el mateix residu nucleòfil el que perpetua l'atac nucleofilic sobre el carboni anomèric del substrat, formant un intermedi de tipus èster enzim-sacàrid. En canvi, en les glicosidases que actuen amb inversió de configuració, és una molècula d'aigua la que porta a terme l'atac nucleofilic sobre el carboni anomèric. El caràcter nucleòfil de la molècula d'aigua es veu augmentada per la interacció amb el residu base general. En tots dos mecanismes, la posició relativa del residu àcid general és idèntica, mentre que la del nucleòfil és diferent. En enzims que actuen amb retenció de configuració, el nucleòfil es situa pròxim al carboni anomèric ( $\sim 5.5 \text{ \AA}$ ), mentre que aquesta distància es fa més gran ( $\sim 10.5 \text{ \AA}$ ) en enzims que actuen amb inversió de configuració degut a la necessitat d'acomodar una molècula d'aigua entre el nucleòfil i el substrat (Figura 1.22).

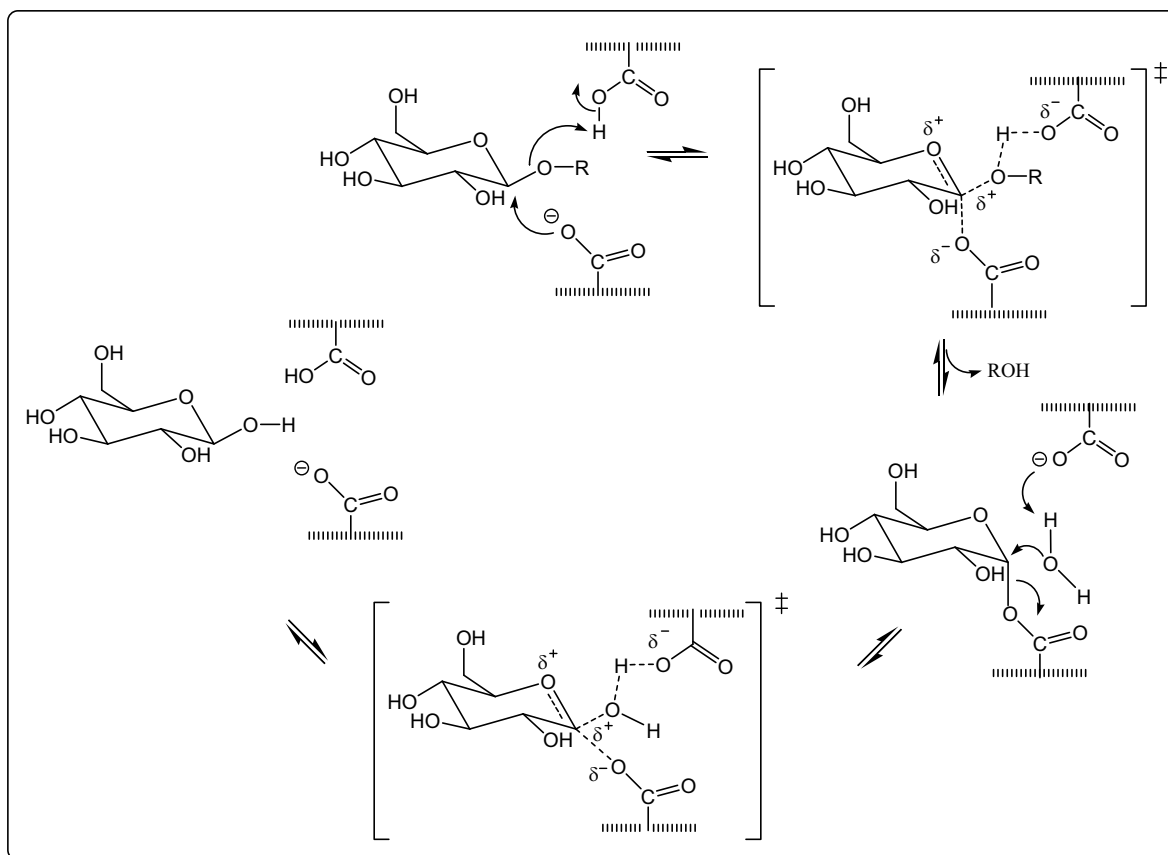


**Figura 1.22.** Mecanisme catalític per a glicosidases que actuen amb inversió de configuració.

La catàlisi àcida i l'atac nucleòfil simultanis resulten en un estat de transició de tipus oxocarbocatiònic comú per ambdós mecanismes. Per a les glicosidases amb inversió de configuració, la reacció prossegueix cap al producte final. Mentre que per a les glicosidases amb retenció de la configuració, es forma un intermedi covalent glicosil-enzim i s'allibera la unitat no reductora del substrat hidrolitzat, que és el primer producte de reacció. En una segona etapa, el residu àcid/base general, ara desprotonat i actuant com a base general, augmenta el caràcter nucleòfil d'una molècula d'aigua que ataca al carboni anomèric per la banda oposada a l'enllaç glicosil-enzim, aconseguint així desplaçar la unió del substrat a



l'enzim, i alliberant el segon producte de reacció (Figura 1.23). Aquesta etapa també té lloc a través d'un estat de transició de tipus oxocarbatiònic.

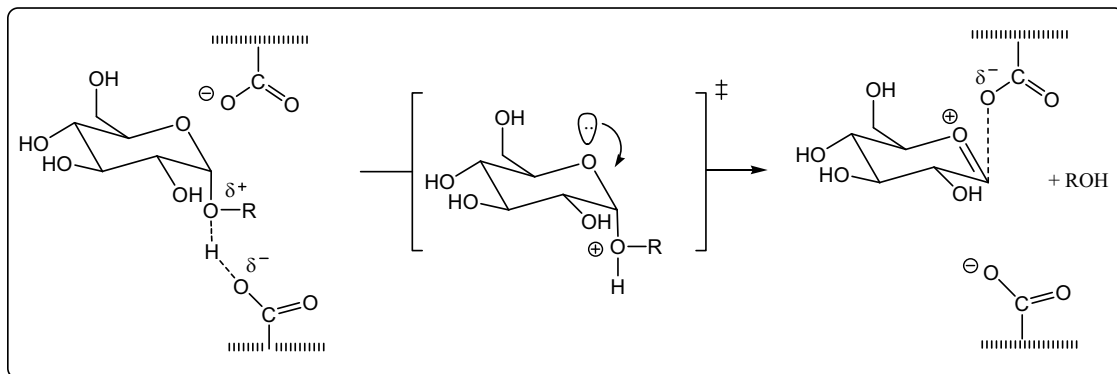


**Figura 1.23.** Mecanisme catalític per a glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

Donat que la ruptura de l'enllaç *O*-glicosídic implica la protonació de l'àtom d'oxigen exocíclic, l'estat de transició té una càrrega positiva considerable en aquest àtom. Una de les aproximacions que s'utilitzen per al disseny d'inhibidors de glicosidases es basa en la preparació de compostos que mimetitzin la càrrega en l'estat de transició del substrat natural: del catió oxocarbeni o de l'àcid conjugat del glicòsid.<sup>107</sup> Els compostos que tenen un grup amino enlloc de l'àtom d'oxigen exocíclic són els anàlegs més comuns d'aquest estat de transició. Els compostos d'aquest tipus presenten una alta selectivitat, com per exemple la trehazolina, que és un potent inhibidor de la trehalasa, o l'alosamidina, que és un inhibidor de diverses quitinases.

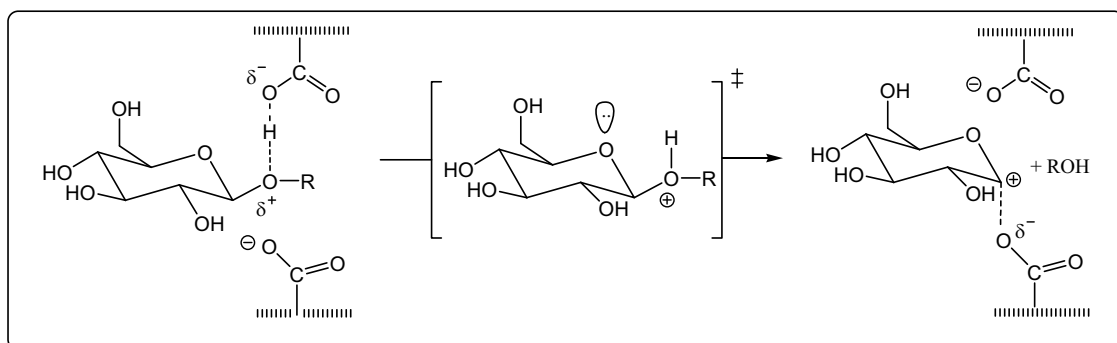
La utilització farmacològica dels inhibidors de glicosidases requereix una alta selectivitat tant pel que fa a la configuració del substrat de la glicosidasa (*gluco*, *galacto*, *mano*, etc.) com a la configuració anomèrica ( $\alpha$  o  $\beta$ ). Estudis recents han posat de manifest petites diferències en la distribució de la càrrega en l'estat de transició de les  $\alpha$ - i  $\beta$ -glicosidases.

Aquestes diferències han permès millorar el coneixement sobre els perfils estructurals adequats dels inhibidors per a la inhibició específica d'aquests enzims. Així, en les  $\alpha$ -glicosidases l'estat de transició està pròxim al catió oxocarbeni amb la densitat de càrrega positiva localitzada fonamentalment sobre l'oxigen endocíclic O-5 (Figura 1.24).<sup>108</sup>



**Figura 1.24.** Primer estat de transició proposat per a les  $\alpha$ -glicosidases.

En el cas de les  $\beta$ -glicosidases aquest estat de transició estaria més pròxim a un carbocatió anomèric, amb la densitat de càrrega positiva localitzada fonamentalment sobre C-1 (Figura 1.25).<sup>108</sup> De fet, en els iminosucres on l'àtom de nitrogen ocupa la posició corresponent al carboni anomèric, com la isofagomina, són inhibidors selectius de  $\beta$ -glicosidases.



**Figura 1.25.** Primer estat de transició proposat per a les  $\beta$ -glicosidases.

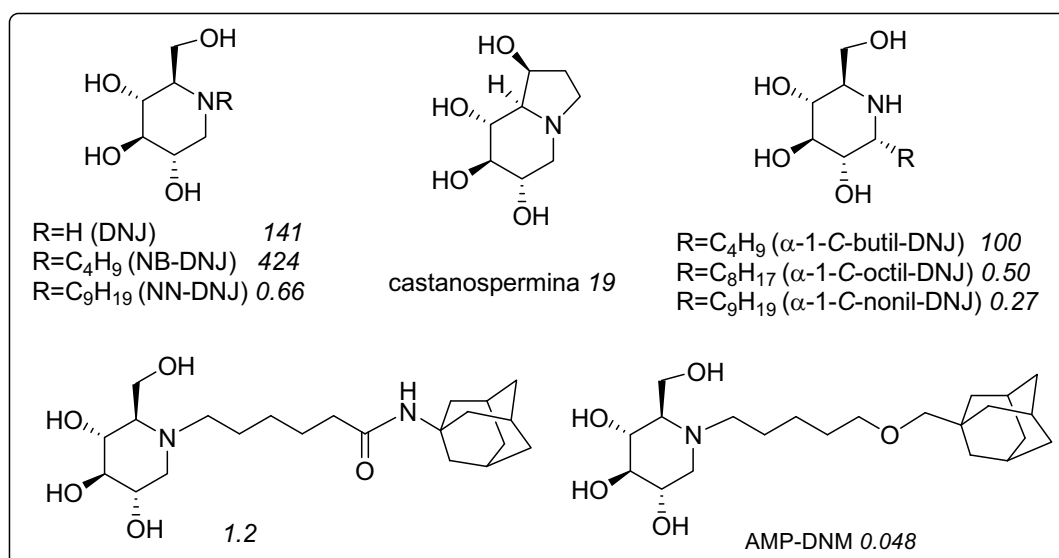
En el disseny d'inhibidors específics de glicosidases, s'han de tenir en compte també altres factors, com la complementarietat dels grups hidroxil amb el substrat de l'enzim, l'estructura de l'aglicó, la configuració del centre anomèric (alfa o beta) i la possible existència de butxaques hidrofòbiques o hidròfiles en l'enzim que puguin establir interaccions complementàries amb l'inhibidor.<sup>109</sup>

## 1.6 Inhibidors de la $\beta$ -Glucocerebrosidasa (GCCase)

Entre els inhibidors de la GCCase més estudiats, es troben els **iminosucre**s (coneguts també com iminociclitols o azasucre)s, que són compostos estructuralment relacionats amb els sucres on l'àtom d'oxigen endocíclic s'ha substituït per un àtom de nitrogen.

Els primers iminosucre descrites a la literatura com a inhibidors de la GCCase van ser la castanospermina<sup>110</sup> i la desoxinojirimicina (DNJ) (Figura 1.26).<sup>111</sup>

Uns anys més tard, Overkleeft i col·laboradors<sup>33</sup> van descriure una sèrie d'*N*-alquil derivats de la DNJ i alguns d'ells, especialment aquells compostos amb l'àtom de nitrogen substituït amb cadenes alquílques llargues o grups hidrofòbics voluminosos, van presentar una forta inhibició de la GCCase amb valors de IC<sub>50</sub> de l'ordre nanomolar (Figura 1.26). Cal destacar que aquests compostos no presenten una bona selectivitat per la GCCase<sup>112</sup> i molts d'ells són bons inhibidors de la glucosilceramidasa (GCCase no lisosomal).<sup>33</sup>



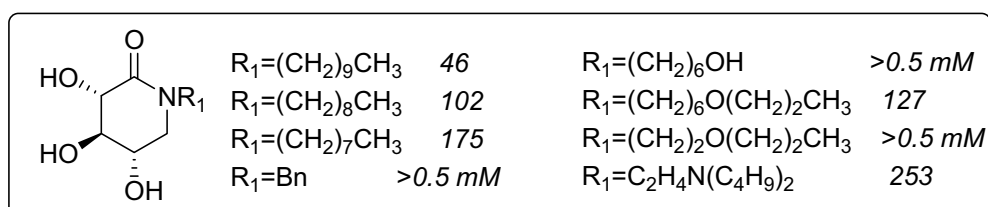
**Figura 1.26.** Inhibició (en cursiva, valors de IC<sub>50</sub>/μM) de la GCCase (Ceredase<sup>®</sup>) per derivats de la DNJ i la castanospermina.

Així mateix, s'ha descrit una altra família de derivats de la DNJ<sup>113</sup> amb diferents cadenes alquílques en la posició C-1 $\alpha$  ( $\alpha$ -1-C-alquil-DNJ) i aquells iminosucre amb cadenes alquílques llargues van presentar valors de IC<sub>50</sub> de l'ordre nanomolar (Figura 1.26).

En diferents estudis cel·lulars s'ha trobat que els iminosucre NB-DNJ,<sup>114</sup> NN-DNJ,<sup>115</sup> *N*-alquil derivats de la DNJ amb grups voluminosos al final de la cadena (com l'AMP-DNM),<sup>116</sup> i l' $\alpha$ -1-C-alquil-DNJ<sup>113</sup> presenten activitat xaperona. Cal destacar que el compost  $\alpha$ -1-C-octil-DNJ és capaç d'augmentar l'activitat de la GCCase amb la mutació

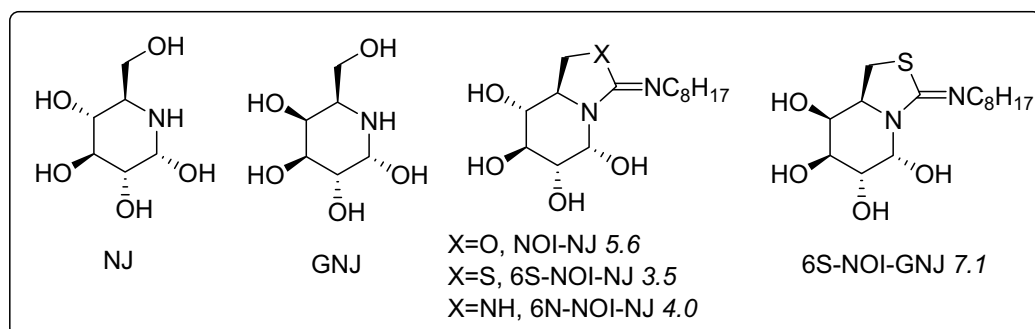
N370S fins a 2 cops a una concentració de 20  $\mu\text{M}$  i és un dels pocs compostos descrits fins al moment que augmenta l'activitat d'aquest enzim amb la mutació L444P fins a 1.2 cops a 5  $\mu\text{M}$  després de 4 dies d'incubació.

També s'ha dissenyat una sèrie de  $\delta$ -lactames anàlegs a la DNJ però amb un grup carbonil en lloc del grup hidroximetil i amb l'àtom de nitrogen substituït (Figura 1.27).<sup>117</sup> Encara que aquestes  $\delta$ -lactames no van resultar ser bons inhibidors de la GCCase, van presentar una important activitat xaperona en limfoblasts de malalts de Gaucher amb la mutació N370S (alguns d'ells augmenten entre 3 i 6 vegades l'activitat de la GCCase a 50  $\mu\text{M}$ ) i després de 3 dies d'incubació.<sup>117</sup>



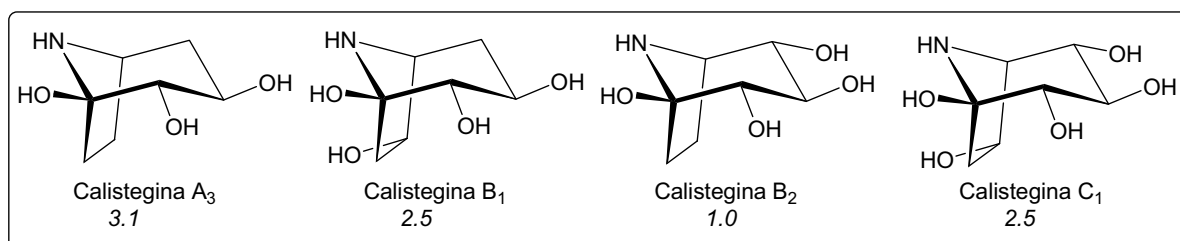
**Figura 1.27.** Inhibició (en cursiva, valors de  $\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$ ) de la GCCase per  $\delta$ -lactames *N*-substituïdes.

Una nova família d'minosucres amb estructura bicíclica i relacionats estructuralment amb la nojirimicina (NJ) o la galactanojirimicina (GNJ) han estat descrits recentment com a inhibidors de la GCCase (Figura 1.28).<sup>118</sup> En aquests compostos bicíclics, formats per un cicle de sis baules condensat amb un de cinc baules, l'àtom de nitrogen que ocupa la posició de cap de pont té un elevat caràcter  $\text{sp}^2$ . En conseqüència, aquests compostos tenen una gran estabilitat conformacional i configuracional en dissolució aquosa i fa que els inhibidors presentin una alta selectivitat per a l'enzim, a diferència de lo que passa amb alguns iminosucres de tipus  $\text{sp}^3$ . Cal destacar que aquests bicicles presenten activitat xaperona i augmenten l'activitat de la GCCase en fibroblasts de malalts de Gaucher per a les mutacions F213I/F213I (70-100% d'increment), N188S/G193W (25-45% d'increment), G202R/L444P (125-175% d'increment), N370S/N370S (40-165% d'increment) i F213I/L444P (40-120% increment) a unes concentracions entre 3 i 30  $\mu\text{M}$  i després de 4 dies d'incubació. D'altra banda, no es van observar increments en l'activitat de la GCCase per a la mutació L444P/L444P.<sup>119</sup>



**Figura 1.28.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCCase per iminosucres  $sp^2$  amb estructura bicíclica.

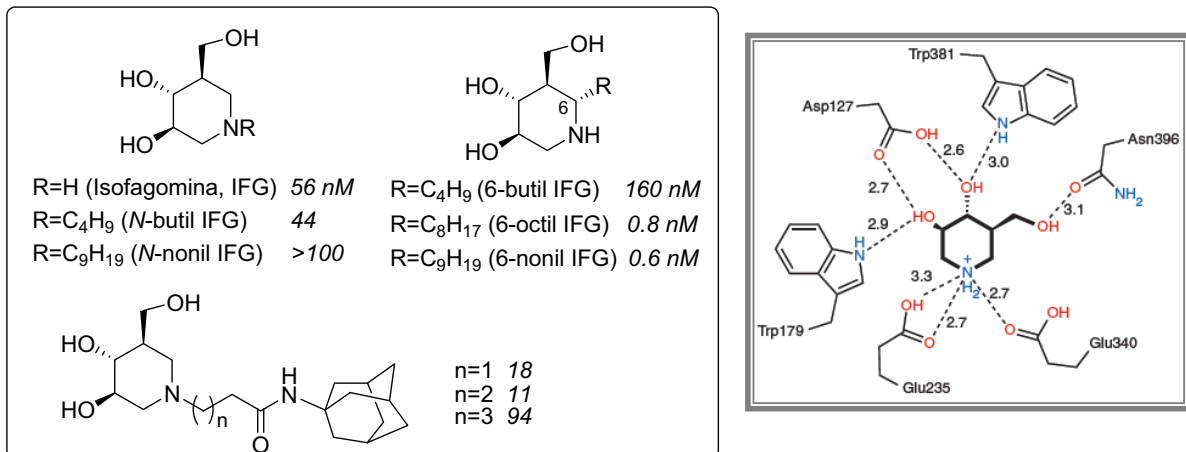
Un altre grup d'iminosucres amb estructura bicíclica i que són inhibidors de la GCCase el formen algunes calistegines.<sup>120</sup> Aquests compostos tenen un grup hidroxil terciari en el cap de pont del sistema bicíclic i es divideixen en diferents grups, en funció del nombre d'hidroxils que tenen en la seva estructura: A (3 grups hidroxil), B (4 grups hidroxil) i C (5 grups hidroxil). A la Figura 1.29 es mostren les estructures de les calistegines amb més activitat inhibidora.



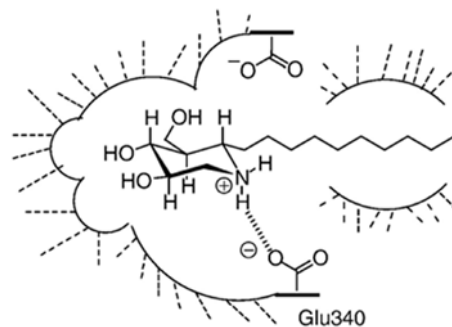
**Figura 1.29.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCCase (ceredase) per calistegines.

Una de les millors famílies d'iminosucres descrites fins al moment com a inhibidors de la GCCase és la formada per la isofagomina ( $IC_{50}=56$  nM i  $K_i=25$  nM), els *N*-alquil derivats de la isofagomina (com el *N*-butil, el *N*-nonil) i els derivats de la isofagomina alquilats en la posició C6 (Figura 1.30).<sup>120-122</sup> Entre aquests anàlegs de la isofagomina, els *N*-alquil derivats (*N*-butil i *N*-nonil IFG) van presentar una inhibició lleugerament més baixa que la isofagomina amb valors de  $IC_{50}$  de l'ordre micromolar. En canvi, l'altra família d'anàlegs de la isofagomina descrites que estan substituïts amb una cadena alquílica en la posició C6 van presentar, alguns d'ells, una inhibició de la GCCase més potent que la isofagomina amb valors de  $IC_{50}$  de l'ordre subnanomolar.<sup>121</sup> Amb aquests resultats, els autors van proposar l'existència d'un domini hidrofòbic pròxim al centre actiu de l'enzim, tal i com es mostra a la Figura 1.31. Segons aquest model, la presència d'una cadena alquílica en l'àtom de

nitrogen interfereix en la formació de l'enllaç iònic amb l'aminoàcid Glu340 del centre actiu i per això aquests inhibidors són pitjors.<sup>121</sup> Així mateix, s'ha resolt l'estructura cristal·lina per difracció de raigs X de la isofagomina amb la GCCase i, a diferència dels iminosucre NB-DNJ i NN-DNJ, el grup imino presenta interaccions amb els dos residus catalítics (Glu-340 i Glu-235).<sup>123</sup>



**Figura 1.30.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCCase (imiglucerasa) per alguns derivats de la isofagomina i interaccions de la isofagomina amb els residus del centre actiu de la GCCase (Figura extreta d'un article de Lieberman i col·laboradors).<sup>123</sup>



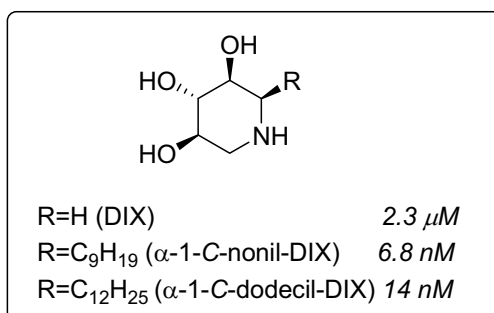
**Figura 1.31.** Interaccions proposades pel compost 6-nonil IFG amb la GCCase. Figura extreta d'un article de Zhu i col·laboradors.<sup>121</sup>

Per altra banda, la isofagomina ha presentat una important activitat xaperona en cèl·lules de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S (fins un 200% d'increment en l'activitat de la GCCase a 30  $\mu M$  en fibroblasts) i L444P (fins un 251% d'increment a 20  $\mu M$  en limfoblasts) després de 5 dies d'incubació.<sup>82,85</sup> Cal destacar que hi ha una gran variabilitat en els augments d'activitat en funció del tipus de cèl·lula i del pacient, especialment en el cas de la mutació L444P.<sup>82</sup> Com s'ha comentat anteriorment, aquest iminosucre ha arribat a la

Fase II de l'assaig clínic per al tractament de la GD, però malauradament no s'han obtingut bons resultats.

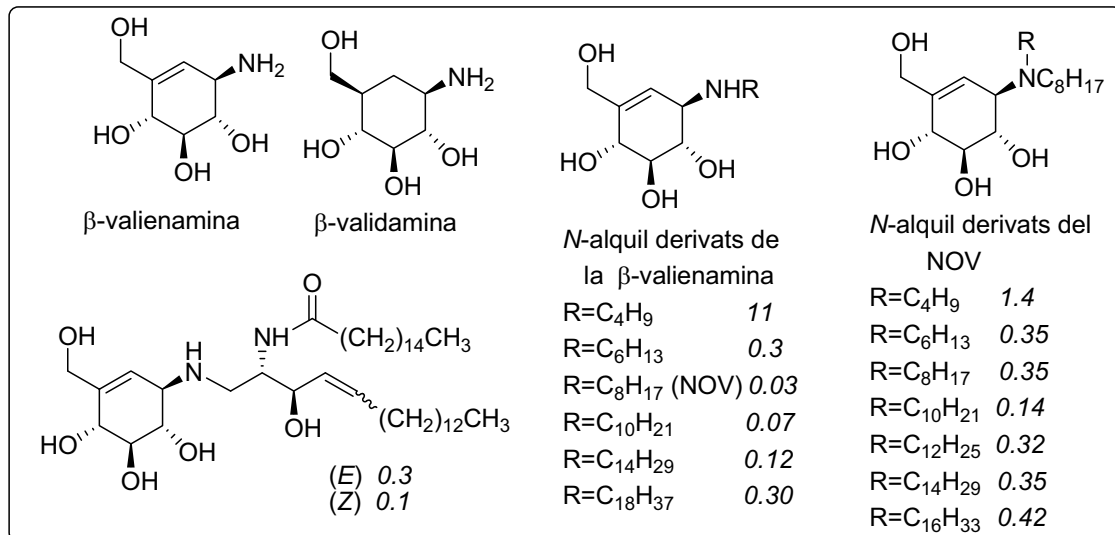
Així mateix, s'ha descrit<sup>122</sup> una altra família d'anàlegs de la isofagomina amb l'àtom nitrogen substituït amb una cadena alquíllica, la qual conté a l'extrem un grup adamantil voluminos i una amida (Figura 1.30). Encara que compostos van resultar ser pitjors inhibidors que la isofagomina, van presentar una important activitat xaperona en fibroblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S (90-150% increment a concentracions entre 50 i 75  $\mu\text{M}$ ) i G202R (410-620% increment a 150  $\mu\text{M}$ ).<sup>122</sup>

Una altra família d'iminosucre descrita recentment està formada pel compost 1,5-dideoxi-1,5-imino-D-xilitol (DIX) i els  $\alpha$ -1-alquil derivats d'aquest (Figura 1.32).<sup>124</sup> El derivat  $\alpha$ -1-C-nonil-DIX, a més de ser un bon inhibidor de la GCCase amb un valor de  $K_i$  de 2.2 nM, és un dels millors compostos descrits fins al moment amb activitat xaperona, ja que és capaç d'augmentar un 80% l'activitat de la GCCase a una concentració de 10 nM en fibroblasts amb la mutació N370S després de 4 dies d'incubació.<sup>124</sup>



**Figura 1.32.** Inhibició (en cursiva, valors de  $\text{IC}_{50}$ ) de la GCCase pel compost DIX i els derivats  $\alpha$ -1-C-alquil-DIX.

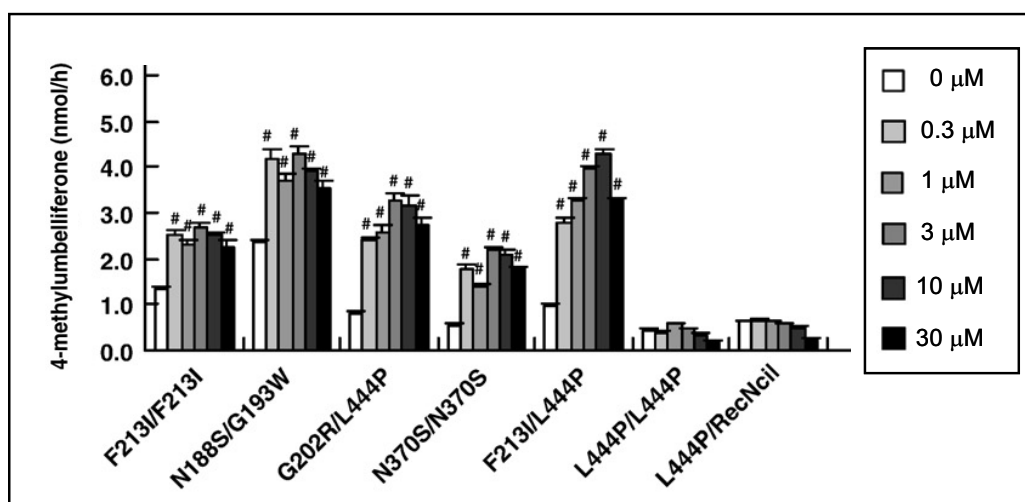
A més dels iminosucre, els **aminociclitol**s són una important família de productes naturals que han estat descrits com a inhibidors de la GCCase. Els alcaloides polihidroxilats  $\beta$ -valienamina i el seu anàleg  $\beta$ -validamina són un exemple representatiu (Figura 1.33). Els primers derivats de la  $\beta$ -valienamina descrits van ser aquells resultants de l'alquilació de la  $\beta$ -valienamina amb l'isòmer *Z* o *E* de la ceramida i el dos isòmers van resultar ser bons i selectius inhibidors de la GCCase (Figura 1.33).<sup>125</sup>



**Figura 1.33.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCase per derivats de la  $\beta$ -valienamina.

En un treball posterior, es va descriure una sèrie d'*N*-alquil derivats de la  $\beta$ -valienamina (Figura 1.33) i el més potent com a inhibidor de la GCase va ser el NOV (*N*-octil- $\beta$ -valienamina).<sup>126</sup> Així que, més tard, el mateix grup va sintetitzar *N*-alquil i *N*-acil derivats de l'aminociclitol NOV, però van resultar ser pitjors inhibidors que el NOV (Figura 1.33).<sup>127</sup>

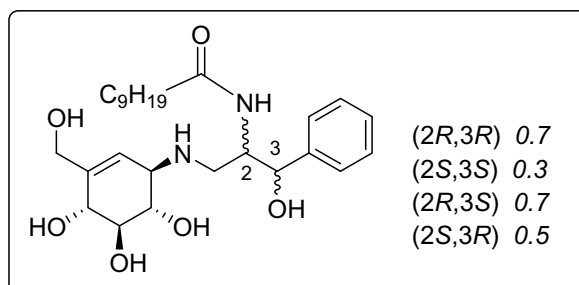
Recentment, s'ha descrit que l'aminociclitol NOV presenta activitat xaperona en fibroblasts de malats de Gaucher amb les mutacions F213I/F213I, N188S/G193W, G202R/L444P, N370S/N370S i F213/L444P (Figura 1.34).<sup>128</sup>



**Figura 1.34.** Efecte de l'aminociclitol *N*-octil- $\beta$ -valienamina (NOV) sobre l'activitat de la GCase en fibroblasts de malats de Gaucher amb diverses mutacions després d'una incubació de 4 dies. Figura modificada d'un article de Luan i col·laboradors.<sup>128</sup>

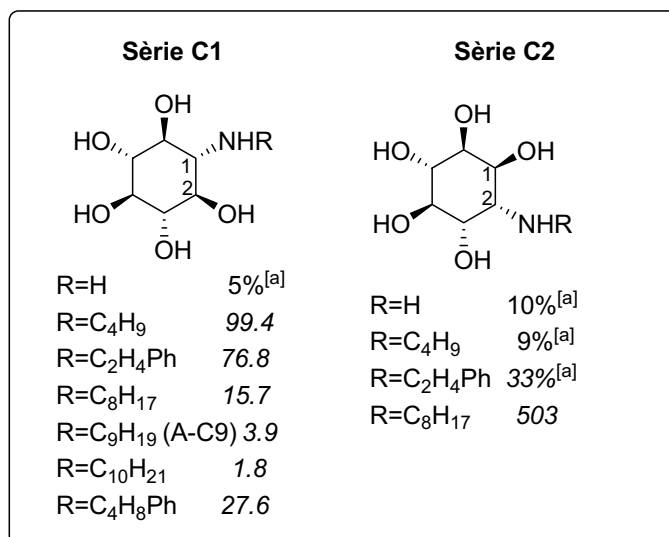


Els mateixos autors que van sintetitzar els anteriors aminociclitols, han estudiat l'activitat d'una sèrie de compostos formats per PDMP anàlegs i els aminociclitols  $\beta$ -valienamina o la  $\beta$ -validamina. Alguns d'ells van presentar una forta inhibició de la GCCase, com els que es mostren a la Figura 1.35.<sup>129</sup>



**Figura 1.35.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCCase per derivats de la  $\beta$ -valienamina i PDMP.

Per altra banda, el nostre grup de recerca ha descrit una sèrie d'aminociclitols de tipus inosamina (Figura 1.36) com a inhibidors selectius de la GCCase.<sup>130-132</sup> Es va trobar que dins de les dues sèries diastereomèriques, només els compostos de la sèrie C1 (*scyllo*-inosamines) van presentar una significant inhibició de la GCCase.

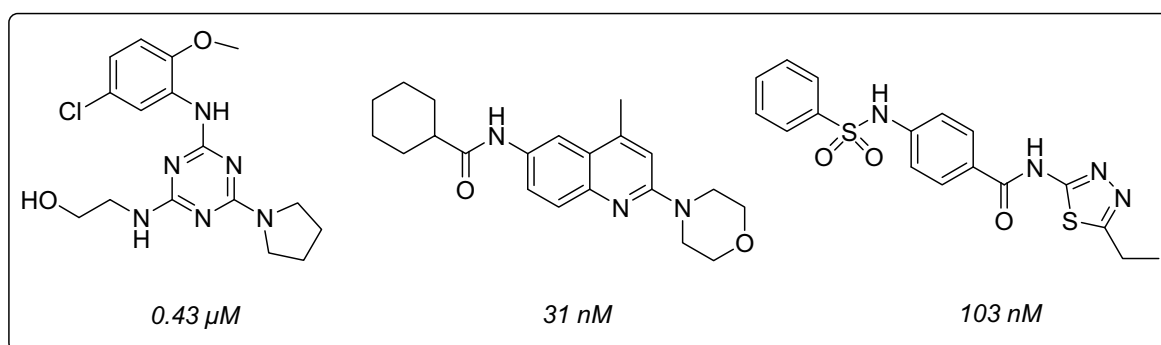


**Figura 1.36.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCCase (imiglucerasa) per aminociclitols de tipus inosamina. [a]: % Inhibició a 1 mM.

Algunes de les anteriors inosamines han estat estudiades com a xaperones en cultius de fibroblasts i de cèl·lules COS (cèl·lules renals de *Cercopithecus aethiops*). El compost de la sèrie C1 amb R=C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> va presentar activitat xaperona en fibroblasts amb les mutacions

L444P/G202R (augment de l'activitat fins 1.5 cops a 25  $\mu\text{M}$ ), L444P; E326K/G202R (augment de l'activitat fins 1.5 cops a 20  $\mu\text{M}$ ). Així mateix, el compost de la mateixa sèrie amb  $\text{R}=\text{C}_4\text{H}_8\text{Ph}$  va presentar activitat xaperona en cèl·lules COS transfectades amb les mutacions N188S (augment de l'activitat fins 1.4 cops a 20  $\mu\text{M}$ ), N370S (augment de l'activitat fins 1.15 cops a 20  $\mu\text{M}$ ).<sup>133</sup>

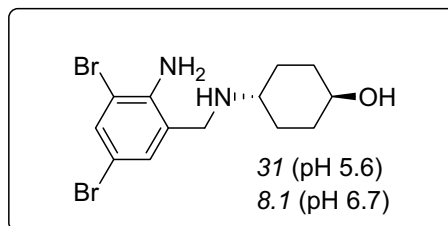
Zheng i col·laboradors han descrit tres nous compostos heteroaromàtics estructuralment no relacionats amb el substrat ni amb anàlegs polihidroxilats de sucres (Figura 1.37) com a inhibidors de la GCase en un cribatge d'una biblioteca de 59815 compostos.<sup>134</sup> A més aquests tres compostos presenten activitat xaperona en fibroblasts de malalts de Gaucher amb la mutació N370S (el primer i el segon compost de la Figura 1.37, a una concentració de 40  $\mu\text{M}$ , augmenten l'activitat de la GCase un 40% i 90 %, respectivament; el tercer compost de la Figura 1.37 augmenta l'activitat un 20% a 13.3  $\mu\text{M}$ ).<sup>134</sup>



**Figura 1.37.** Inhibició (en cursiva, valors de  $\text{IC}_{50}$ ) de la GCCase (imiglucerasa) pels tres millors inhibidors de la biblioteca.

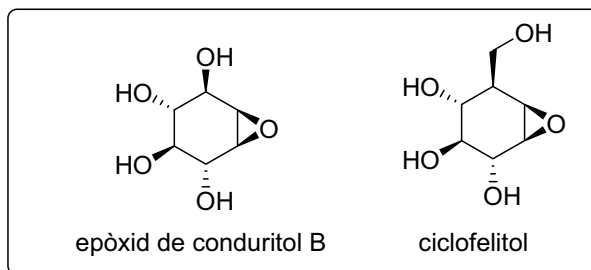
Maegawa i col·laboradors han descrit recentment l'ambroxol (Figura 1.38), que és un mucolític, com a inhibidor de la GCCase.<sup>135</sup> Van trobar que la inhibició de la GCCase recombinant per aquest fàrmac depenia del pH, sent màxima a pH neutre ( $\text{IC}_{50}= 8.1 \mu\text{M}$ ), i estabilitza l'activitat d'aquest enzim en condicions de desnaturalització tèrmica.

L'ambroxol va presentar activitat xaperona en fibroblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S (a una concentració de 60  $\mu\text{M}$  va incrementar al voltant d'un 100% l'activitat de la GCCase) i, a més, s'ha descrit recentment que aquest fàrmac, a una concentració entre 50 i 200  $\mu\text{M}$ , incrementa al voltant del 30% l'activitat de la GCCase amb la mutació L444P.<sup>136</sup>



**Figura 1.38.** Inhibició (en cursiva, valors de  $IC_{50}/\mu M$ ) de la GCase (imiglucerasa) per l'ambroxol.

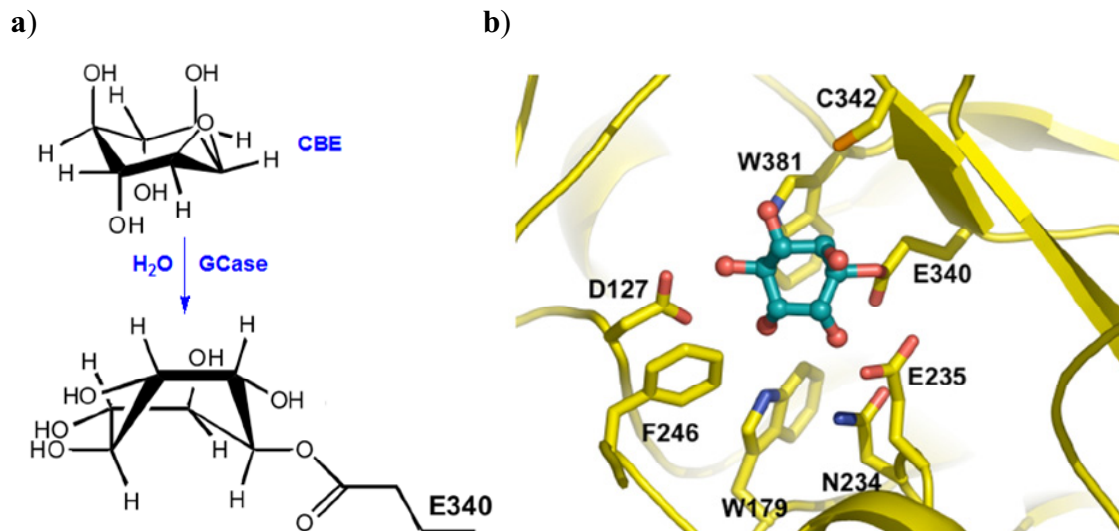
Una altra sèrie d'inhibidors de la GCase que s'han descrit a la literatura són els **irreversibles**, entre els quals hi ha el ciclofelitol (**1**) i l'epòxid de conuritol B (CBE) (Figura 1.39).<sup>137</sup>



**Figura 1.39.** Estructures d'inhibidors irreversibles de la GCase.

Com s'ha comentat anteriorment, el CBE és un inhibidor irreversible i selectiu de la GCase (lisosomal), però no de la glucosilceramidasa (no lisosomal). A més aquest epòxid i el ciclofelitol s'han utilitzat per induir l'acumulació de GlcCer per inactivació de la GCase i així tenir models animals que presentin cèl·lules de Gaucher.<sup>138,139</sup>

A l'any 2005, es va descriure<sup>36</sup> l'estructura cristal·lina resolta per difracció de raigs X del CBE unit mitjançant un enllaç covalent a l'enzim GCase i això va permetre obtenir informació sobre l'estructura i el centre actiu de l'enzim. A més, es va poder confirmar que els dos aminoàcids del centre actiu que actuen com a catalitzador àcid/base i com a nucleòfil són el Glu235 (E235) i el Glu340 (E340), respectivament (Figura 1.40).<sup>36</sup> Així mateix, s'ha resolt l'estructura cristal·lina per difracció de raigs X de la  $\beta$ -glucosidasa *Thermotoga maritima* (TmGH1) amb el ciclofelitol i ha permès identificar els residus d'aminoàcids que formen el centre actiu d'aquest enzim.<sup>140</sup>



**Figura 1.40.** a) Esquema de la reacció de l'epòxid condiritol B amb la GCCase; b) Lloc actiu de la GCCase amb el ciclohexitol unit (l'anell del ciclohexitol en color blau clar i els grups hidroxil en vermell). Figures extretes d'un article de Premkumar i col·laboradors.<sup>36</sup>

## 1.7 Situació actual del tractament de les LSDs amb xaperones farmacològiques

A l'any 1999, Fan i col·laboradors van demostrar per primer cop l'activitat xaperona d'un iminosucre en limfoblasts de malalts de Fabry.<sup>141</sup> Des de llavors, s'han descrit altres estudis amb la finalitat d'utilitzar xaperones farmacològiques per al tractament d'altres LSDs, incloent la GD, la Gangliosidosi GM1 i GM2 i les malalties de Pompe i Fabry.

Per moltes raons les LSDs es poden considerar unes excel·lents candidates a la teràpia basada en la utilització de xaperones farmacològiques. Per una banda, s'ha vist que només un augment del 10% en l'activitat enzimàtica és suficient per tal d'evitar l'acumulació del substrat en les LSDs.<sup>142</sup> Com s'ha comentat en l'apartat 1.3.4.6, la utilització de xaperones farmacològiques presenta molts avantatges sobre la ERT. A part de la reducció del preu del tractament que en principi comporta, aquest fàrmac es pot administrar per via oral i evitaria l'administració del fàrmac per via intravenosa que requereix l'hospitalització del pacient. Però probablement, el major avantatge que presenta sobre la ERT és la millor distribució cel·lular i tissular que tenen les xaperones farmacològiques respecte als enzims recombinants. A més, aquests compostos poden travessar la barrera hematoencefàlica i es podrien utilitzar com a tractament d'aquelles malalties amb afectació del sistema nerviós central. Per a la Gangliosidosi GM1, una LSD, Suzuki i col·laboradors han descrit que en

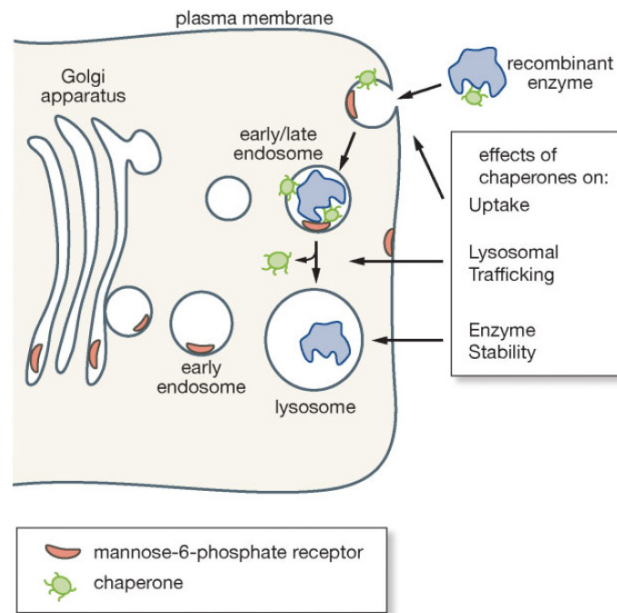
ratolins model el compost *N*-octil-4-*epi*- $\beta$ -valienamina és capaç d'augmentar l'activitat de la  $\beta$ -galactosidasa en el cervell i disminueix l'acumulació del substrat en aquest òrgan.<sup>143</sup>

Actualment hi ha tres xaperones farmacològiques que es troben en fase clínica per al tractament de les LSDs: els iminosucres deoxinojirimicina (AT2220, malaltia de Pompe), desoxigalactonojirimicina (AT1001, DGJ, malaltia de Fabry) i isofagomina (AT2101, GD).

En la malaltia de Fabry, que es caracteritza per una deficiència en l'activitat de l' $\alpha$ -galactosidasa, l'iminosucre DGJ (Migalastat, AT1001, Amigal) és capaç d'augmentar l'activitat enzimàtica en limfoblasts de malalts de Fabry. A més, l'administració oral d'aquest iminosucre a ratolins transgènics (R301Q) durant 7 dies va produir un augment de l'activitat de l' $\alpha$ -galactosidasa en diversos òrgans com el cor, el ronyó, la melsa i el fetge.<sup>141,144</sup> S'han obtingut uns bons resultats en els estudis clínics de fase II i actualment aquest fàrmac es troba en fase clínica III.

En la GD, la isofagomina (AT2101, Amicus Therapeutics) és l'única xaperona farmacològica que ha arribat fins a la fase II de l'assaig clínic. Com s'ha comentat en l'apartat anterior, aquest iminosucre és un bon inhibidor de la GCCase recombinant amb una IC<sub>50</sub> de 56 nM i augmenta l'activitat de la GCCase en fibroblasts i limfoblasts de malalts de Gaucher amb diverses mutacions. Cal mencionar que només s'observa un increment en l'activitat de la GCCase per a les dues mutacions més freqüents (N370S i L444P) quan s'utilitza una concentració alta d'aquest iminosucre (10-100  $\mu$ M).<sup>82,85</sup> Això està d'acord amb que l'eficàcia d'una xaperona farmacològica no només depèn de la seva afinitat per l'enzim, sinó que la seva biodisponibilitat és molt important. Aquest aspecte és probablement responsable de les elevades dosis i la falta d'eficàcia de la isofagomina tartrat (AT2101). Durant els estudis clínics de fase II del fàrmac AT2101, es van administrar 225 mg (durant 3 dies i quatre dies de descans o bé durant 7 dies i 7 dies de descans) a 30 malalts de Gaucher de tipus I durant 6 mesos. En 20 pacients es va observar un augment de l'activitat de la GCCase, però únicament en 1 pacient es van observar millores clíniques significatives. Per tant, nous estudis i compostos, seguint aquesta línia, són necessaris per tal de trobar noves xaperones farmacològiques per al tractament de la GD.

Tenint en compte les limitacions que presenten totes les aproximacions terapèutiques per al tractament de les LSDs, s'ha descrit recentment una sèrie d'estudis per tal de millorar l'eficàcia de la ERT utilitzant xaperones farmacològiques.<sup>80</sup>



**Figura 1.41.** Efecte d'una xaperona farmacològica sobre un enzim recombinant. Figura extreta d'un article de Parenti.<sup>80</sup>

Un estudi fet en animals model de la GD van trobar que després de l'administració de l'aglucerasa (Ceredase<sup>®</sup>), només recuperaven una part d'aquesta (50-70%) en el fetge i en la melsa.<sup>145</sup> Això està d'acord amb que una part de l'enzim es desnatura durant el seu transport cap al lisosoma i podria afectar a l'eficàcia de la ERT. Per tant, si es protegeix d'alguna forma a la GCCase recombinant enfront les condicions desnaturaents es podria augmentar l'eficàcia de la ERT i no seria necessari administrar unes dosis tan elevades del fàrmac (Figura 1.41).

Encara que la teràpia basada en la utilització de xaperones farmacològiques es relacioni amb l'efecte estabilitzador que tenen les xaperones a l'unir-se amb l'enzim mutant, s'ha vist que també poden tenir un efecte en enzims wt (wild-type, tipus salvatge). En estudis recents han vist que en la pre-incubació de la GCCase recombinant amb la isofagomina augmenta l'estabilitat de l'enzim en presència de condicions desnaturaents com el pH neutre o la desnaturaent tèrmica.<sup>83,146</sup>



## *2. Objectius*

---





The objectives of the present thesis are the following:

(1) The synthesis and biological evaluation of two cyclohexane epoxides, cyclophellitol (**1**) and its epoxide diastereomer, (1*R*,6*S*)-*epi*-cyclophellitol (**2**).

(2) The synthesis of four families of C<sub>7</sub>N aminocyclitols, having different degrees of structural similarity with the natural substrate GluCer.

(3) The synthesis of new aminocyclitols based in the structure of the previously described aminocyclitol A-C9. These include the compounds resulting from the inversion of the configuration at C1 position or C2 position and the replacement of hydroxyl at C2 position with an alkoxy group. Depending on the results of the biological testing of these compounds, new analogues will be designed and synthesized, and their effect on recombinant GCCase will be evaluated.

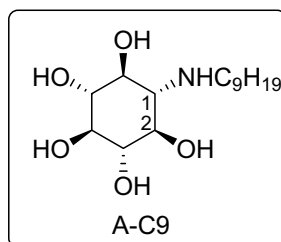
(4) The synthesis of new families of bicyclic isoureas and guanidines derivatives having a relative *trans* or *cis* disposition between the C3a and C7a substituents to explore their effects on GCCase activity.

(5) Evaluation of these compounds as inhibitors of recombinant GCCase, other glycosidases, and GCS. Study the effect of the active compounds on the stabilization of recombinant GCCase activity against thermal denaturation, to assess the potential of these compounds as pharmacological chaperones.

(6) Evaluation of selected compounds as inhibitors of GCCase in wild-type human fibroblasts and exploration of the therapeutic potential as pharmacological chaperones in human lymphoblasts derived from Gaucher patients homozygous for N370S or L444P variants by determining the GCCase activity enhancement after intact cell incubation with the compounds.

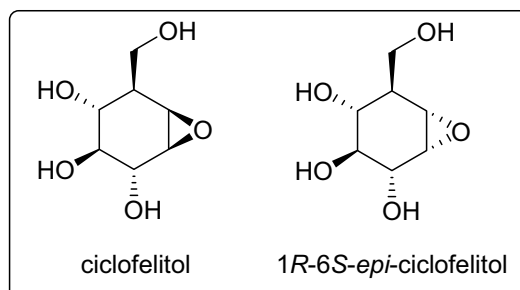


Amb els precedents presentats al capítol d'Introducció i a partir de dades conegudes anteriorment en el nostre grup de recerca que mostraven que les *scyllo*-inosamines, com el A-C9, són uns inhibidors selectius de la GCCase i presenten una activitat xaperona prometedora, l'objectiu principal d'aquest treball és el disseny i la síntesi de nous potencials inhibidors de la GCCase que actuïn com a xaperones farmacològiques, especialment sobre variants neuronopàtiques.

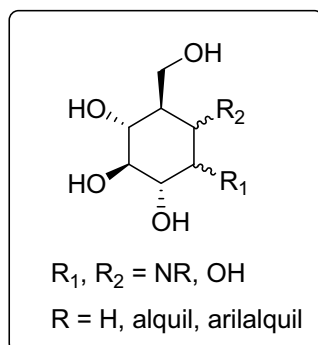


Per aquestes raons, els objectius i l'estructuració del treball van ser els següents:

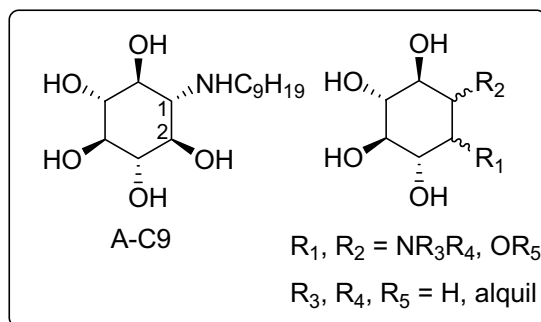
1. Síntesi dels epòxids ciclofelitol i (1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol i avaluació com a inhibidors irreversibles de la GCCase recombinant (imiglucerasa) i la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. wt.



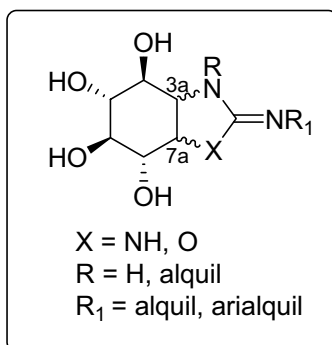
2. Síntesi d'una família d'aminociclitols C<sub>7</sub>N, relacionats estructuralment amb la GlcCer, el substrat natural de la GCCase.



3. Síntesi d'una sèrie d'anàlegs de l'aminociclitol A-C9 per tal de millorar la seva activitat inhibidora. S'estudiarà la importància que té la configuració dels centres C1 i C2 en la inhibició de la imiglicerasa i s'intentarà millorar la seva activitat inhibidora amb la substitució del grup hidroxil de la posició C2 per un grup *O*-alquil. En funció de les activitats obtingudes amb aquests aminociclitols es sintetitzaran nous anàlegs.



4. Disseny i síntesi d'una nova família de ciclitols amb estructura bicíclica formats per un anell polihidroxilat de 6 baules fusionat amb una isourea o una guanidina cíclica de 5 baules. S'estudiarà la importància que té la configuració dels centres C3a i C7a en l'activitat inhibidora de la imiglicerasa.



5. Estudi de l'activitat de tots els compostos sintetitzats sobre la GCase recombinant (imiglicerasa), així com la seva selectivitat per aquest enzim. D'alguns dels compostos que presentin una activitat inhibidora significativa sobre la GCase recombinant, s'estudiarà el seu efecte sobre la pèrdua de l'activitat d'aquest enzim en condicions de desnaturalització tèrmica.

6. Determinació de la inhibició de la GCCase en fibroblasts wt (en cèl·lules intactes) i exploració del potencial terapèutic dels inhibidors de la GCCase identificats. En concret es durà a terme l'estudi del comportament com a xaperones farmacològiques d'alguns dels compostos en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les dues mutacions més freqüents en el gen que codifica la GCCase (N370S i L444P).



# *Resultats i Discussió*

---





## *3. Ciclofelitol i (1R,6S)-epi-ciclofelitol*

---

3.1 Introducció i objectius

3.2 Síntesi dels epòxids ciclofelitol (**1**) i (1R,6S)-epi-ciclofelitol (**2**)

3.3 Estudis d'inhibició enzimàtica dels epòxids **1, 2** i el CBE

3.3.1 Inhibició de la imiglucerasa i la  $\beta$ -glucosidasa Bgl<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp.  
pels epòxids **1,2** i el CBE

3.3.2 Inhibició de diverses glicosidases pels epòxids **1 i 2**



Covalent inactivators of glycosidases are a class of molecules that ablate the enzyme activity through the formation of a covalent bond between the enzyme and some functionality on the inactivator. In this way, some cyclohexane epoxides may act as specific inhibitors of glycosidases because of their resemblance to true sugars and by the irreversible formation of bonds at the active site of the enzyme.

(+)-Cyclophellitol (**1**) is a cyclitol isolated from the culture filtrate of the mushroom *Phellinus* sp. It has been found to be a highly specific and an effective irreversible inactivator of  $\beta$ -glucosidases and also to inhibit human GCCase.

Interestingly, the unnatural (+)-(1*R*,6*S*)-*epi*-isomer **2**, which has an  $\alpha$ -epoxide configuration, displays potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity.

The synthesis of a  $\beta$ -glucosidase inhibitor cyclophellitol (**1**) and its epoxide diastereomer, (1*R*,6*S*)-*epi*-cyclophellitol (**2**) is described from a common intermediate ((-)-1-*O*-Pivaloyl-conduritol B).

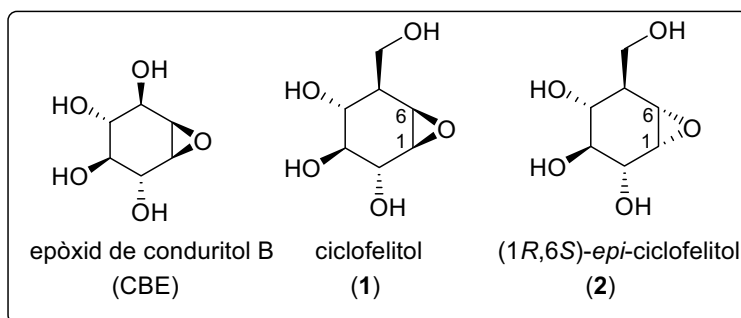
Epoxide **1** has been shown to be a potent irreversible inhibitor of imiglucerase and  $\beta$ -glucosidase BgI<sub>3</sub> from *Streptomyces* sp. according to pseudo-first-order kinetics with inactivation constants of  $K_i=2 \mu\text{M}$ ,  $k_i=1.2 \text{ min}^{-1}$  for imiglucerase and  $K_i=360 \mu\text{M}$ ,  $k_i=0.79 \text{ min}^{-1}$  for the  $\beta$ -glucosidase BgI<sub>3</sub> from *Streptomyces* sp. The irreversibility of the inhibition by these compounds was evidenced by the lack of reactivation upon dialysis of the inactivated enzyme.



### 3.1 Introducció i objectius

El ciclofelitol (**1**) és un carbasucre anàleg de la  $\beta$ -D-glucopiranososa amb una funció  $\beta$ -epòxid entre les posicions C1 i C6 (Figura 3.1).<sup>147</sup> Aquest epòxid va ser aïllat del cultiu d'un fong, *Phellinus sp.*, en el 1989 per Atsumi i col·laboradors<sup>148</sup> i s'ha descrit com un dels més potents i selectius inhibidors irreversibles de l'enzim  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla.<sup>149</sup> També es comporta com un potencial agent terapèutic contra el virus HIV i contra determinats processos de metastàsis.<sup>150</sup>

Per altra banda, el seu diastereoisòmer no natural, l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**) és un potent inhibidor irreversible de l' $\alpha$ -glucosidasa de llevat ( $IC_{50}=23 \mu\text{g/mL}$ ), però també inhibeix la  $\beta$ -glucosidasa (15% d'inhibició a una concentració de  $80 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>151-153</sup> Així mateix, s'ha trobat que aquest epòxid és un inhibidor de metastàsis experimental, mentre que el ciclofelitol no va ser actiu sota les mateixes condicions.<sup>154</sup>

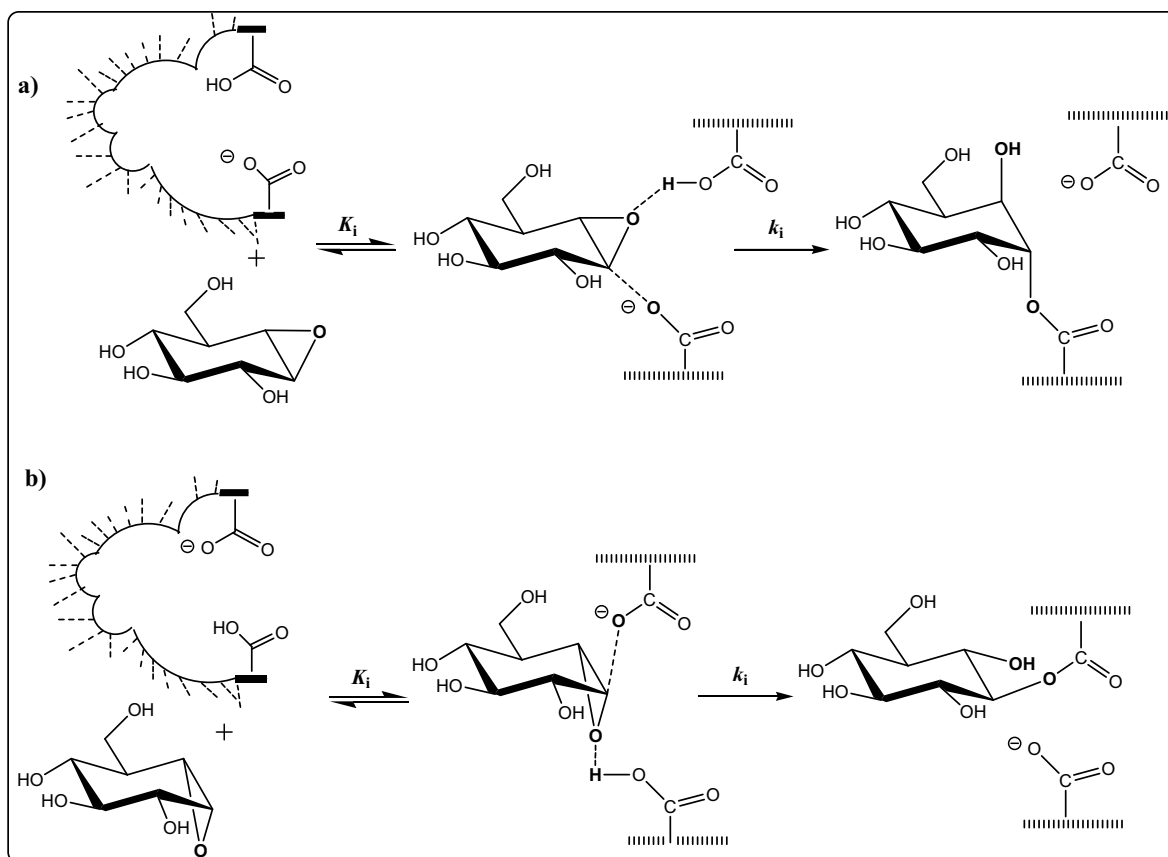


**Figura 3.1.** Estructures dels epòxids **1**, **2** i CBE.

L'epòxid de condiritol B (CBE) també s'ha descrit com a inhibidor irreversible de  $\beta$ -glucosidases, però la simetria que presenta aquest compost fa que sigui un inhibidor tant d' $\alpha$ -glucosidases com de  $\beta$ -glucosidases.<sup>155</sup> Per aquest motiu, es va pensar que un derivat del CBE amb un grup hidroximetil, anàleg al grup hidroximetil en C5 de la glucosa, seria més selectiu i millor inhibidor de les  $\beta$ -glucosidases. Efectivament, el ciclofelitol va resultar ser un inhibidor més potent i selectiu de les  $\beta$ -glucosidases que el CBE.<sup>149</sup>

El mecanisme proposat per a aquests tipus d'inhibidors irreversibles es mostra a la Figura 3.2.<sup>151,152</sup> En la primera etapa té lloc la formació d'un complex no covalent enzim-inhibidor amb una constant d'equilibri  $K_i$ . A continuació, l'epòxid és protonat per un residu àcid del centre actiu de l'enzim i alhora rep l'atac nucleofílic per part del residu

carboxilat que actua com a nucleòfil en el centre actiu. Aquest procés condueix a la formació d'un intermedi covalent enzim-inhibidor amb una constant de velocitat  $k_i$ .



**Figura 3.2.** Mecanisme proposat per a la inactivació (a) de la  $\beta$ -glucosidasa pel ciclofelitol i (b) de l' $\alpha$ -glucosidasa per l'(1R,6S)-epi-ciclofelitol.<sup>151,152</sup>

A la Taula 3.1 s'indiquen alguns dels paràmetres cinètics per a la inactivació de diverses glucosidases descrits per a aquests epòxids.<sup>34,140,151</sup>

Si comparem els valors del quocient  $k_i/K_i$ , el qual permet estimar l'eficàcia que presenta un inhibidor irreversible, el ciclofelitol és 92 cops més potent que el CBE davant la  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla i l'(1R,6S)-epi-ciclofelitol és 2400 cops més potent que el CBE davant l' $\alpha$ -glucosidasa de llevat.

**Taula 3.1.** Paràmetres d'inactivació descrits dels epòxids **1**, **2** i CBE sobre diversos enzims.<sup>34,140,151</sup>

Inhibidor irreversible	Enzim	$K_i$ (mM)	$k_i$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_i / K_i$ ( $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )
CBE	$\alpha$ -glucosidasa (llevat)	25	0.16	$6.4 \times 10^{-3}$
	$\beta$ -glucosidasa (ametlla)	1.7	0.13	$7.6 \times 10^{-2}$
	GCCase (placenta)	0.16	0.05	$3.1 \times 10^{-1}$
Ciclofelitol ( <b>1</b> )	$\beta$ -glucosidasa (ametlla)	0.34	2.38	7
	$\beta$ -glucosidasa ( <i>Thermotoga maritima</i> )	0.015	0.26	17.3
	$\beta$ -glucosidasa ( <i>Agrobacter sp.</i> )	0.055	1.26	23
(1R, 6S)-epi-ciclofelitol ( <b>2</b> )	$\alpha$ -glucosidasa (llevat)	0.027	0.40	15.4

Com es podrà veure en el següent capítol d'aquesta memòria, l'(1R,6S)-epi-ciclofelitol va ser un dels intermedis necessaris per a la preparació d'una nova família d'aminociclitols C<sub>7</sub>N. Així mateix, un precursor del ciclofelitol també ho va ser. Per aquest motiu, es va decidir sintetitzar-los per al posterior estudi de les seves activitats sobre la imiglucerasa i una  $\beta$ -glucosidasa intracel·lular (BgI<sub>3</sub>) d'*Streptomyces sp.*

Així mateix, es va avaluar la selectivitat que presentaven, especialment en el cas del ciclofelitol, per l'enzim  $\beta$ -glucosidasa en fibroblasts wt d'humans (cèl·lules intactes) i en homogenats de lisats de cèl·lules.

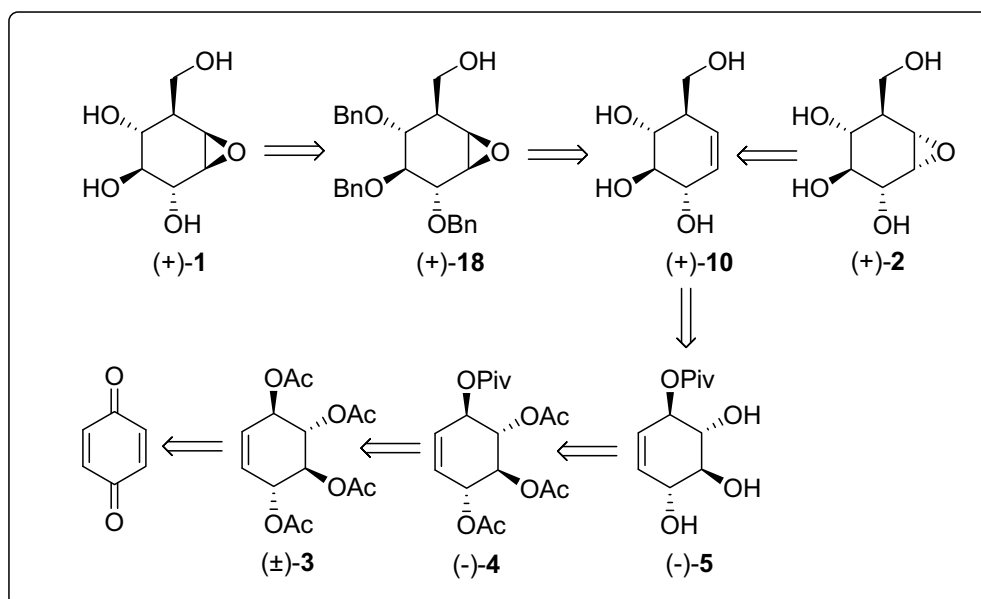
### 3.2 Síntesi dels epòxids ciclofelitol (**1**) i (1R,6S)-epi-ciclofelitol (**2**)

A la literatura s'han descrit diverses metodologies per a la preparació del ciclofelitol<sup>147,156-163</sup> i de l'(1R,6S)-epi-ciclofelitol.<sup>152,153,158,160,164,165</sup>

En la síntesi del ciclofelitol, segons la bibliografia, s'utilitzen dues estratègies per a la formació de l'epòxid: una substitució nucleofílica intramolecular o bé l'epoxidació de l'alquè precursor. Ara bé, només l'última estratègia ens permet obtenir els dos epòxids amb poques modificacions en la ruta sintètica. D'aquesta forma, l'accés selectiu a cada diastereòmer a partir d'un mateix intermedi és possible si s'escullen les condicions apropiades i els grups protectors dels grups hidroxil per tal de controlar l'estereoquímica de l'epoxidació.

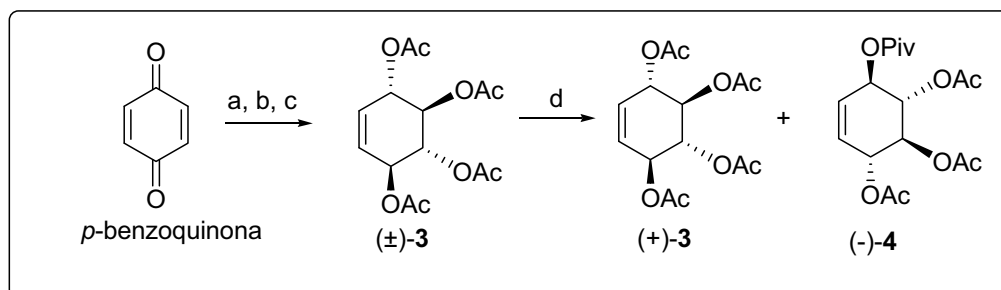
D'altra banda, en el nostre grup de recerca s'havia optimitzat<sup>166</sup> les primeres etapes de la ruta sintètica descrita per Trost i col·laboradors<sup>163</sup> i es va decidir utilitzar-la per tal de preparar els dos epòxids. L'esquema retrosintètic dissenyat seguint aquesta metodologia queda resumit a la Figura 3.3.





**Figura 3.3.** Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció del ciclofelitol (**1**) i de l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**).

El tetraacetat racèmic (**±**)-**3**, es va obtenir a partir de la *p*-benzoquinona en tres passos sintètics (Figura 3.4) segons la metodologia descrita per Guo i col·laboradors,<sup>167</sup> però amb les modificacions que van descriure després Trost i col·laboradors<sup>163</sup> en el darrer pas sintètic.

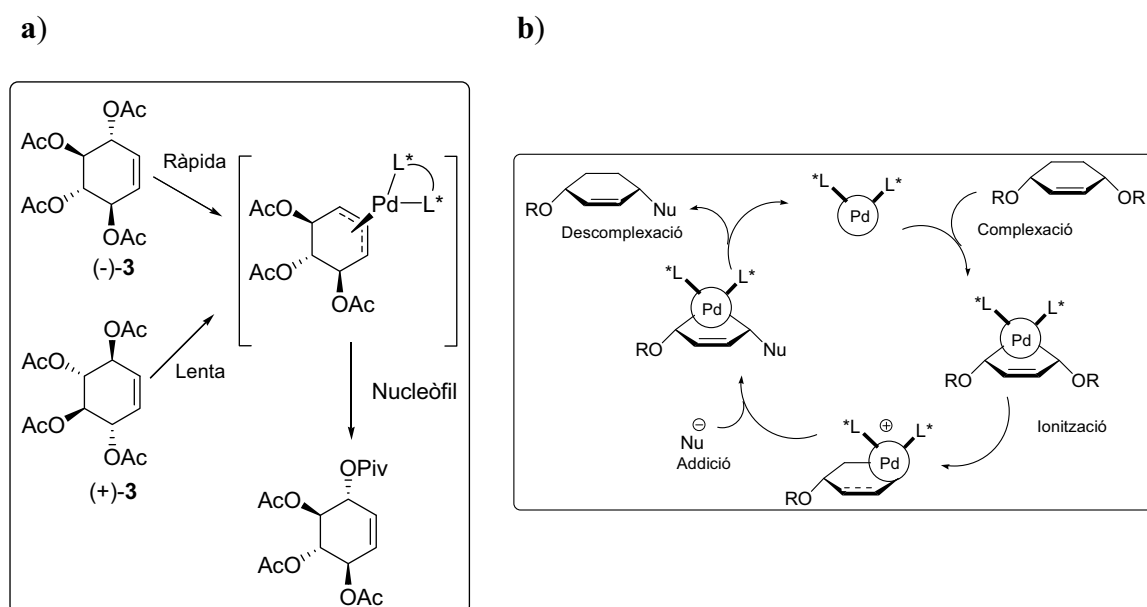


a)  $\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , 64%; c)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $170^\circ\text{C}$ , 69%; d) lligand (*R*, *R*),  $[\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5\text{PdCl}]_2$ , THAB,  $t\text{C}_4\text{H}_9\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 44%, >96% *ee*.

**Figura 3.4.** Síntesi del pivalat (-)-**4** a partir de la *p*-benzoquinona.<sup>163,166-168</sup>

En l'actualitat, la resolució d'una mescla racèmica és el mètode més utilitzat per a l'obtenció a gran escala de productes òpticament purs. Malauradament, té una limitació important que és el baix grau de conversió que es pot arribar a assolir, com a màxim un 50% de l'enantiòmer desitjat, a partir d'una mescla racèmica. La resolució cinètica és un dels mètodes que hi ha de resolució on un agent quiral reacciona amb els dos enantiòmers de la mescla racèmica amb velocitats diferents i, al final, l'enantiòmer que s'obté com a producte és el qui tingui una velocitat de reacció més ràpida.

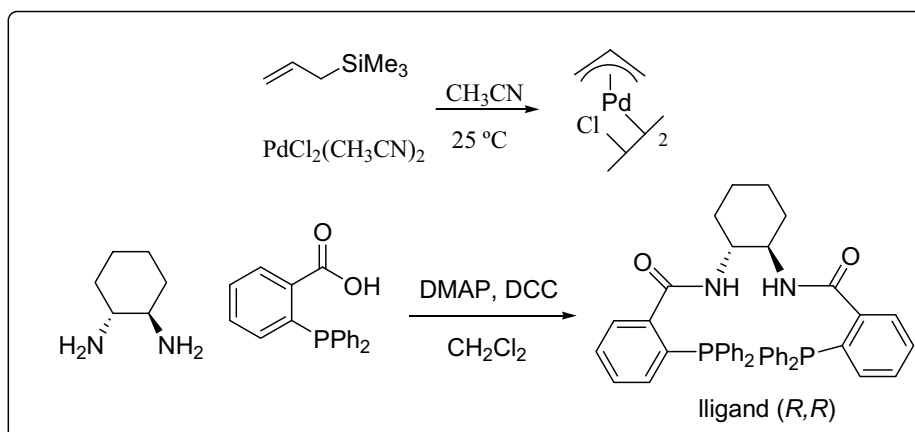
El pivalat (-)-**4** es va obtenir per resolució cinètica del tetraacetat racèmic ( $\pm$ )-**3** (Figura 3.4 a) segons la metodologia descrita per Trost i col·laboradors,<sup>163,168</sup> però amb algunes modificacions que s'havien fet en el nostre grup de recerca.<sup>166</sup> Aquesta reacció pot racionalitzar-se a través d'un procés cíclic format per quatre etapes ben diferenciades: complexació del Pd(0) a l'olefina, ionització d'un bon grup sortint (grup acetil) per la cara oposada a la del complex de Pd formant-se un intermedi  $\pi$ -al·lilpal·ladi (II), addició del nucleòfil sobre l'intermedi  $\pi$ -al·lilic per la cara oposada al Pd i la descomplexació del Pd donant lloc al producte i al complex inicial de pal·ladi que retorna al cicle catalític, tal i com es mostra a la Figura 3.5 b.



**Figura 3.5.** a) Obtenció del pivalat (-)-**4** per resolució cinètica (KAT, *kinetic asymmetric transformation*) del tetraacetat ( $\pm$ )-**3**. b) Mecanisme de la KAT.

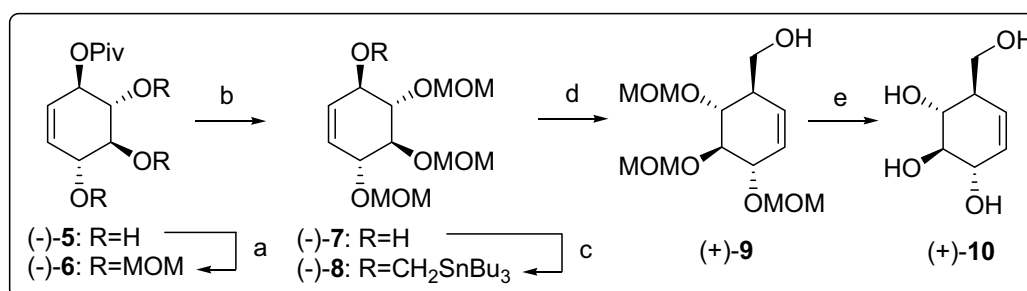
Com es pot veure a la Figura 3.5 i d'acord amb Trost i col·laboradors,<sup>163,168</sup> segons el lligand utilitzat (en aquest cas la diamida *R,R*, veure Figura 3.6) la velocitat de formació del complex olefina-catalitzador i de reacció d'aquest complex amb el nucleòfil serà diferent per als dos enantiòmers.

Així doncs, per dur a terme la resolució cinètica del tetraacetat racèmic ( $\pm$ )-**3** es va sintetitzar el lligand (*R,R*) i el catalitzador  $[\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5\text{PdCl}]_2$ <sup>169</sup> es va preparar *in situ* (Figura 3.6), obtenint així un millor rendiment en la reacció. A més, es va utilitzar com a nucleòfil l'àcid pivàlic i l'avenç de la reacció es va seguir per HPLC en fase quiral.



**Figura 3.6.** Síntesi del catalitzador  $[\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5\text{PdCl}]_2$  i el lligand  $(R,R)$ .

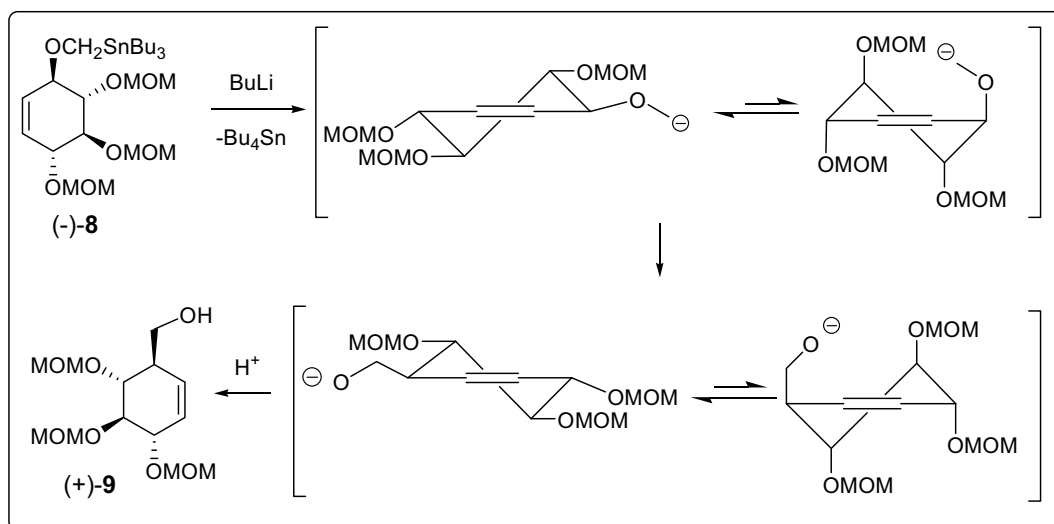
Un cop separats el pivalat (-)-**4** i l'enantiòmer (+) del tetraacetat **3** que queda sense reaccionar per cromatografia en columna *flash*, es van hidrolitzar els grups acetil del compost (-)-**4** amb hidròxid amònic i es va obtenir el triol (-)-**5** amb un rendiment quantitatiu (Figura 3.7).<sup>163</sup> Malauradament, la protecció dels tres alcohols del compost (-)-**5** en forma d'èter benzílic, tal i com ho descriuen Trost i col·laboradors ( $\text{Bu}_4\text{NI}$ ,  $\text{BnBr}$ ,  $\text{KH}$ , dimetoxietà),<sup>163</sup> no va ser possible degut a la labilitat del grup pivaloïl en aquestes condicions. Cal destacar que es van provar altres condicions de reacció ( $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{BnOC}(=\text{NH})\text{CCl}_3$ , tamís molecular,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o dioxà com a dissolvent;  $\text{BnBr}$ ,  $\text{Ni}(\text{acac})_2$ ,  $\text{DMF}$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{Bu}_4\text{NI}$ ,  $\text{BnBr}$ ,  $\text{KH}$ ,  $\text{DMF}$ , tamís molecular), però no es va obtenir el producte desitjat en cap cas. En aquest punt, es va optar per canviar de grup protector i es van protegir els alcohols del triol (-)-**5** en forma d'èter metoximetílic (MOM) i es va continuar amb la ruta sintètica que descriu Trost i col·laboradors<sup>163</sup> amb el compost (-)-**6** (Figura 3.7).



a)  $\text{MOMBr}$ ,  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $75\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 h, 73%; b)  $\text{NaOCH}_3$ ,  $\text{MeOH}$ , 14 h, 94%; c)  $\text{KH}$ ,  $\text{Bu}_3\text{SnCH}_2\text{I}$ , dimetoxietà, 2 h, 79%; d) 1.  $n\text{BuLi}$  (1.5 eq),  $\text{THF}$ ,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min; 2.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat.,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 86%; e)  $\text{CH}_3\text{COCl}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h, 99%.

**Figura 3.7.** Síntesi del tetraol (+)-**10** a partir del pivalat (-)-**5**.

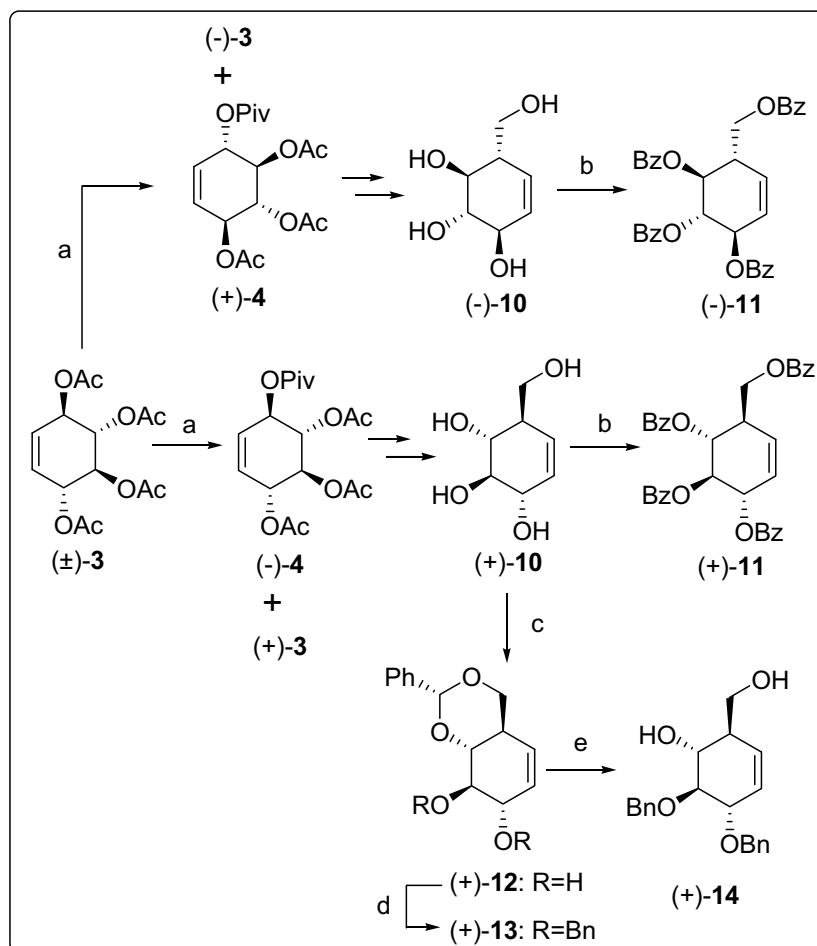
Un cop hidrolitzat el grup pivaloïl del compost (-)-**6**, es va fer protegir l'alcohol del producte resultant i es va obtenir el compost (-)-**8** (veure Figura 3.7). En l'etapa següent, es va dur a terme una transposició 2,3-sigmatròpica<sup>170</sup> (transposició de Wittig) utilitzant 1.5 equivalents d'*n*-BuLi i es va obtenir l'alcohol (+)-**9** (veure Figura 3.8) d'acord amb la metodologia descrita per Still que utilitza l'èter tributilstannilmetílic de l'alcohol com a precursor de l'intermedi aniónic actiu en la transposició (reacció d'Still-Wittig).<sup>171</sup> Cal afegir que, per tal d'evitar la formació de subproductes, s'han d'extremar els controls de temperatura i temps de reacció. A més, es va utilitzar la meitat d'equivalents d'*n*-BuLi que descriuen Trost i col·laboradors en la seva ruta sintètica.<sup>163</sup> Finalment, l'eliminació dels grups MOM en medi àcid va conduir a l'obtenció del tetraol (+)-**10** (veure Figura 3.7).



**Figura 3.8.** Obtenció de l'alcohol homoal·lílic (+)-**9** a partir de (-)-**8** per transposició 2,3-sigmatròpica.

Les dades espectroscòpiques del tetraol (+)-**10** coincideixen amb les descrites a la literatura,<sup>162,172</sup> però el número i el signe del poder rotatori eren diferents als que hi havien descrits ( $[\alpha]_D +120.9$  (*c* 1.1, MeOH); lit<sup>162</sup>  $[\alpha]_D -13.4$  (*c* 1.1, MeOH)). Per aquest motiu, abans de continuar amb la ruta sintètica, es va plantejar la síntesi dels compostos **11-14**, els qual estaven descrits també a la literatura<sup>162,163,173</sup> a partir del tetraol (+)-**10** (Figura 3.9), per tal de comprovar si algun procés imprevist havia donat lloc a un producte inesperat i diferent del descrit per Hansen i col·laboradors.<sup>162</sup> Així mateix, es va considerar interessant sintetitzar el compost (-)-**11** seguint la mateixa seqüència que pel compost (+)-**11** i, d'aquesta forma, determinar la puresa enantiomèrica del producte final. Per a la síntesi de l'enantiòmer (-)-**11**, es va utilitzar el lligand (*S,S*) en la resolució cinètica i es va obtenir el pivalat (+)-**4**, a partir del qual, es va preparar el tetraol enantiomèric (-)-**10**. Amb la síntesi d'aquests compostos es

va determinar l'excés enantiomèric (97% ee) i es va confirmar l'estereoquímica del compost (+)-**10** donat que estan descrites les condicions de separació dels dos enantiòmers per HPLC en fase quiral.<sup>163</sup>



a) Ref. <sup>163,168</sup> lligand (*R,R*) per a (-)-**4** i lligand (*S,S*) per a (+)-**4**; b) BzCl, piridina, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, 64% ((+)-**11**), 66% ((-)-**11**); c) PhCH(OMe)<sub>2</sub>, àcid *p*-toluensulfònic, DMF, 60 °C / 15-20 mm Hg, 5 h, 78%; d) NaH, BnBr, DMF, 1 h, 77%; e) 80% aq. CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 40 °C, 90 min, 74%.

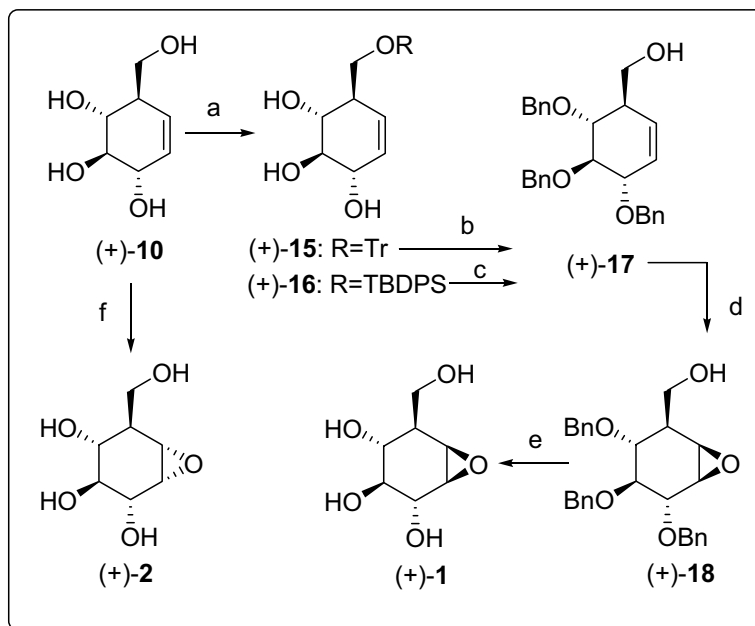
**Figura 3.9.** Compostos sintetitzats per tal de confirmar l'estereoquímica del tetraol (+)-**10**.

Un cop confirmada l'estereoquímica del tetraol (+)-**10**, es continuà amb la ruta sintètica a partir d'aquest intermedi per a l'obtenció del ciclofelitol i l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol.

Per una banda, es va protegir selectivament l'alcohol primari del tetraol (+)-**10** com a TBDPS o tritil èter (compostos **15** i **16**) i, a continuació, els tres alcohols restants es van protegir en forma d'èter benzílic (Figura 3.10). Un cop desprotegit l'alcohol primari, l'epoxidació de l'alquè resultant (+)-**17**,<sup>156,157,163</sup> seguint les condicions descrites a la literatura,<sup>157,163,168</sup> donà majoritàriament l'epòxid (+)-**18** degut a l'efecte director del grup

hidroxil homoal·lílic en la formació d'aquest epòxid. Finalment, la desprotecció de tots els grups benzil de l'epòxid (+)-**18** per hidrogenòlisi donà el ciclofelitol (**1**).<sup>157,161,163</sup>

Per altra banda, l'epoxidació del tetraol (+)-**10** utilitzant les condicions descrites a la literatura (MCPBA i com a dissolvent àcid acètic), ens va permetre obtenir l'epòxid **2** ((1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol, Figura 3.10).<sup>153,160</sup>



a) Tetrafluoroborat d'*N*-trilpiridina, CH<sub>3</sub>CN/DMF (20/1), 12 h, 77% (**15**); TBDPS-Cl, imidazole, DMAP, DMF, 45 °C, 2 h, 83% (**16**); b) 1. BnBr, NaH, DMF, 0 °C, 2 h; 2. Àcid *p*-toluensulfònic, DCM/MeOH, (1/4), 2 h, 88%; c) 1. BnBr, NaH, DMF, 0 °C, 86%, 2. TBAF, THF, 40 °C, 2 h, 90%; d) MCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 h, 70%; e) H<sub>2</sub> (1 atm), Pd/C, THF, 14 h, 91%; f) MCPBA, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 16 h, 78%.

**Figura 3.10.** Obtenció dels epòxids **1** (ciclofelitol) i **2** ((1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol) a partir del tetraol (+)-**10**.

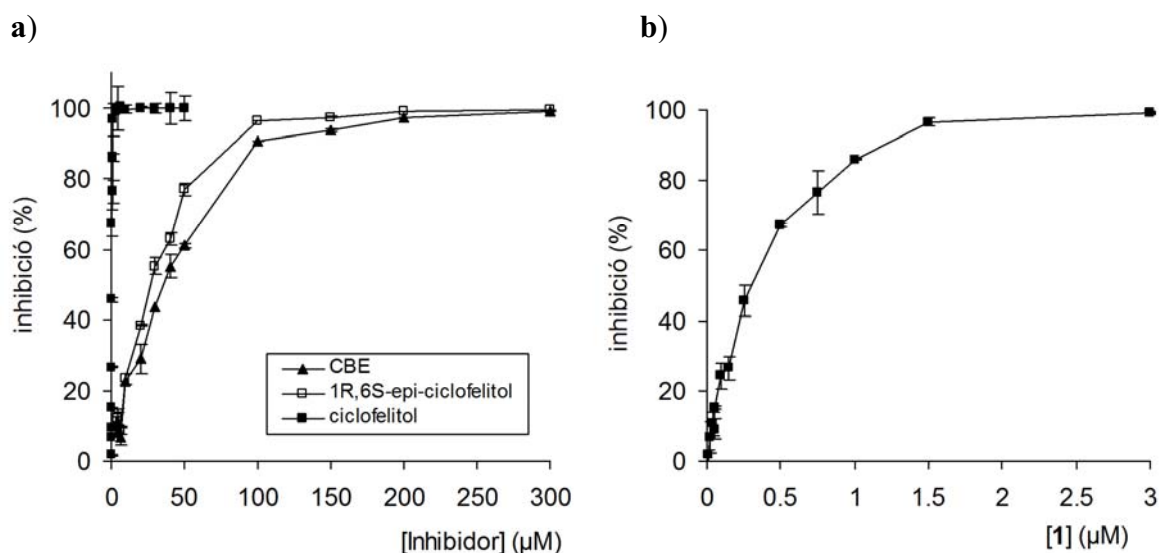
### 3.3 Estudis d'inhibició enzimàtica dels epòxids **1**, **2** i el CBE

Com ja s'ha esmentat a la introducció d'aquesta memòria, el ciclofelitol (**1**) i l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**) han estat descrits com a inhibidors irreversibles de β- i α-glucosidases, respectivament. No obstant, el ciclofelitol és molt més selectiu que el seu diastereòmer, el qual ha estat descrit com a inhibidor irreversible de l'α-glucosidasa de llevat (IC<sub>50</sub>=23 μg/mL), però també presenta activitat inhibidora de la β-glucosidasa (15% d'inhibició a una concentració de 80 μg/mL).<sup>151-153</sup>

### 3.3.1 Inhibició de la imiglucerasa i la $\beta$ -glucosidasa Bgl<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp. pels epòxids **1**, **2** i el CBE

Es va estudiar la inhibició de la imiglucerasa pels epòxids **1** (ciclofelitol), **2** ((1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol) i el CBE (epòxid de conuritol B). L'últim epòxid ha estat descrit com a inhibidor irreversible de  $\beta$ -glucosidases, però és menys potent i selectiu que el ciclofelitol.<sup>149,155,174</sup>

En primer lloc es va fer una pre-incubació durant 5 minuts de la imiglucerasa amb diferents concentracions de cadascun dels inhibidors. A continuació, es va afegir el substrat (4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranòsid), es va fer una altra incubació durant 10 min i, per últim, es va mesurar l'activitat enzimàtica (veure part experimental).



Inhibidor	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>1</b>	0.3
<b>2</b>	24.1
CBE	33.1

**Figura 3.11.** Inhibició de la imiglucerasa després de 5 min de pre-incubació amb a) ciclofelitol, (1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol i l'epòxid de conuritol B i b) ciclofelitol.

Com es pot observar a la Figura 3.11, tal i com era d'esperar, el ciclofelitol a concentracions de l'ordre nM inhibeix la imiglucerasa i es va obtenir una IC<sub>50</sub> de 304 nM, que és 80 i 110 cops més petita que la de l'epòxid **2** i el CBE, respectivament.

Els inhibidors irreversibles donen lloc a una inhibició dependent del temps i, per aquest motiu, la seva potència no pot ser caracteritzada mitjançant la determinació del valor de  $IC_{50}$ . Això és degut a que la quantitat d'enzim actiu a una concentració donada d'inhibidor irreversible serà diferent dependent del temps de pre-incubació de l'inhibidor amb l'enzim.

Tenint en compte l'assaig anterior, es va realitzar una incubació de la imiglucerasa amb quatre concentracions diferents de cadascun dels epòxids on s'havia observat entre un 30 i 70% d'inhibició. Es van agafar alíquotes a diferents temps d'incubació (0, 1, 2, 3, 4, 5 i 9 min) i, després d'incubar-les amb el substrat (4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid), es va quantificar la 4-metilumbel·liferona formada per tal de mesurar la pèrdua d'activitat enzimàtica amb el temps (veure part experimental).

Aquests inhibidors segueixen una cinètica de primer ordre amb la següent equació:<sup>138,150</sup>

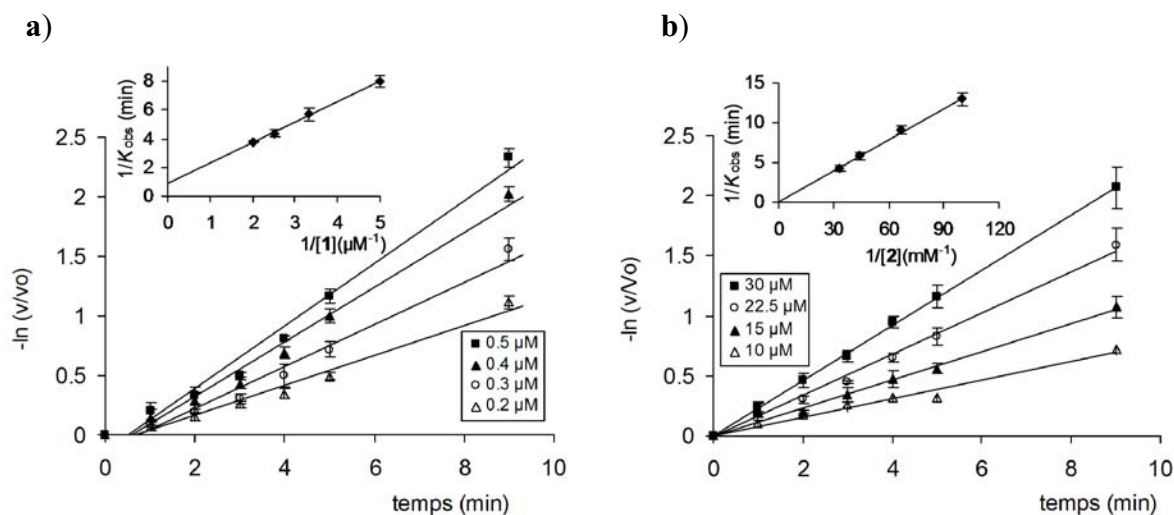
$$\frac{1}{K_{obs}} = \frac{K_i}{k_i [I]} + \frac{1}{k_i}$$

$K_i$  (constant d'inhibició): indica l'afinitat de l'inhibidor per l'enzim  
 $k_i$  (constant de velocitat d'inactivació)  
 $K_{obs}$  (constant de velocitat aparent de primer ordre)

Els valors de les  $K_{obs}$  s'obtenen de la representació del logaritme de l'activitat residual ( $-\ln(v/v_0)$ ) en funció del temps d'incubació a una concentració constant d'inhibidor. Segons l'equació anterior, si representem l'invers de la  $K_{obs}$  front l'invers de la concentració d'inhibidor, s'obté una recta que permet determinar els valors de la constant d'inhibició i la velocitat de desactivació. La intersecció de la recta representada amb l'eix de les ordenades donà el valor d' $1/k_i$  i el valor de la intersecció amb l'eix de les abscisses donà el valor de  $-1/K_i$ . El quocient entre les dues constants ( $k_i/K_i$ ) permet estimar l'eficàcia que presenta un inhibidor irreversible. Quant més gran és aquest quocient, més efectiu és l'inhibidor.

A la Figura 3.12 es mostren les gràfiques obtingudes per a la determinació de les constants cinètiques per al ciclofelitol i l'(1R,6S)-epi-ciclofelitol.





**Figura 3.12.** a) Inactivació de la imiglucerasa pel ciclofelitol (1); b) Inactivació de la imiglucerasa per l'(*1R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (2).

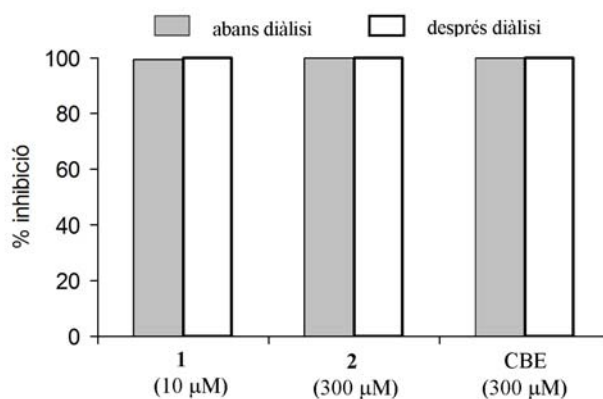
Com es pot veure a la Taula 3.2, el ciclofelitol és un inhibidor irreversible molt efectiu de la imiglucerasa amb un valor del quocient  $k_i/K_i$  de  $703 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Si comparem els valors dels quocients  $k_i/K_i$  obtinguts pels tres inhibidors, el ciclofelitol és quasi 90 cops més efectiu que els altres dos epòxids.

**Taula 3.2.** Paràmetres cinètics per a la inactivació de la imiglucerasa i la  $\beta$ -glucosidasa Bgl<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp. pels epòxids 1 (ciclofelitol), 2 ((*1R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol) i el CBE.

Inhibidor	Imiglucerasa				$\beta$ -glucosidasa Bgl <sub>3</sub> d' <i>Streptomyces</i> sp.		
	IC <sub>50</sub> (μM)	$k_i$ (min <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)	$k_i/K_i$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$k_i$ (min <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)	$k_i/K_i$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
1	0.3	1.2±0.2	0.002±0.0004	703±66	0.794	0.36	2.22
2	24.1	8.3±0.9	1.1±0.1	7.7±0.5	0.26	7.12	0.036
CBE	33.1	0.52±0.15	0.07±0.02	7.9±0.6	0.028	2.21	0.012

Per tal de confirmar que aquests inhibidors són irreversibles, es va estudiar l'efecte que tenia l'eliminació de l'inhibidor després d'un temps d'incubació amb l'enzim. En el cas d'inhibidors irreversibles la inhibició es manté un cop retirat l'inhibidor, mentre que en el cas dels inhibidors reversibles es recupera l'activitat inicial de l'enzim no inhibit. Això es va dur a terme mitjançant una diàlisi posterior a la inhibició de la imiglucerasa en presència dels epòxids. Per a fer la diàlisi es van utilitzar filtres Centricon (Ultracel<sup>®</sup> YM-30) i com es pot veure a la Figura 3.13, els percentatges d'inhibició tant abans com després de la diàlisi són

del 100%. Per tant, es pot concloure que els inhibidors són irreversibles i que probablement formen un enllaç covalent amb l'enzim.



**Figura 3.13.** Efecte de la diàlisi sobre la inhibició de la imiglucerasa pels epòxids.

Un altre mètode que és àmpliament utilitzat per confirmar la irreversibilitat dels inhibidors és l'espectrometria de masses amb ionització per desorció làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol (MALDI-TOF). En el cas d'un inhibidor irreversible, la diferència entre la massa molecular de l'enzim amb l'inhibidor unit covalentment i la massa molecular de l'enzim sense l'inhibidor (Imiglucerasa: 60430 Da) ens dona l'augment de massa causat per la unió covalent de l'inhibidor a l'enzim. Es va intentar fer amb el ciclofelitol, però va ser impossible veure una diferència tant petita (176 Da) degut a la baixa sensibilitat de l'espectròmetre utilitzat a masses tan altes.

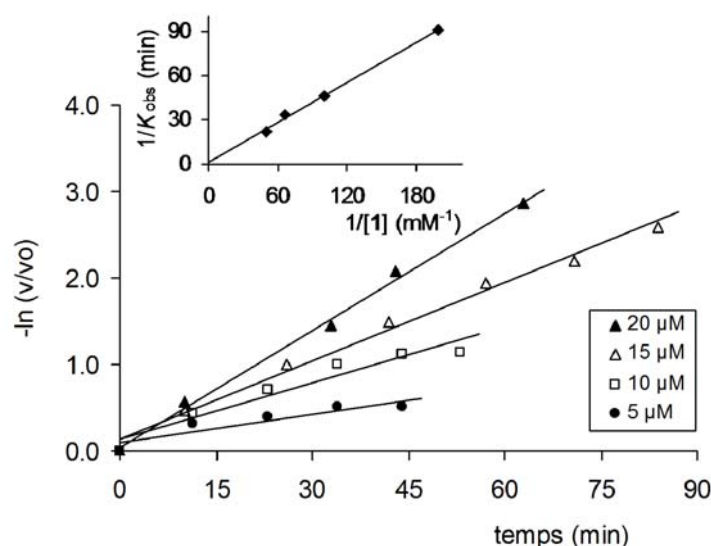
D'altra banda es va estudiar la inhibició de la  $\beta$ -glucosidasa BgI<sub>3</sub> pels mateixos epòxids. Aquest treball va ser realitzat al departament de Bioenginyeria de l'Institut Químic de Sarrià sota la supervisió del Dr. Antoni Planas.

La  $\beta$ -glucosidasa BgI<sub>3</sub> d'*Streptomyces sp.* és una proteïna amb un pes molecular de 52.6 kDa que actua amb retenció de configuració, pot hidrolitzar diversos disacàrids i oligosacàrids i dur a terme reaccions de transglicosidació.<sup>175</sup> L'expressió i purificació d'aquest enzim es va fer seguint el procediment que descriuen Vallmitjana i col·laboradors.<sup>176</sup>

Un cop purificat l'enzim, es van fer uns estudis similars als que havíem fet per a la imiglucerasa, però en aquest cas es van agafar alíquotes de la mescla enzim-inhibidor i després d'incubar-les amb el substrat ( $\beta$ -D-glucopiranòsid de *p*-nitrofenil), es va mesurar el

*p*-nitrofenol format durant 5 min a 405 nm per tal de mesurar la pèrdua d'activitat enzimàtica amb el temps.

A la Figura 3.14, es mostra la gràfica obtinguda per a la determinació de les constants cinètiques per al ciclofelitol. Així mateix, també es va comprovar que l'enzim roman inactiu després d'una diàlisi i, per tant, els inhibidors són irreversibles.



**Figura 3.14.** Inactivació de la  $\beta$ -glucosidasa BgI<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp. pel ciclofelitol (**1**).

Com es pot comprovar a la Taula 3.2, el ciclofelitol també és l'inhibidor més efectiu de la  $\beta$ -glucosidasa BgI<sub>3</sub> amb el quocient  $k_i/K_i$  de 2.2 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>. Si comparem els valors dels quocients  $k_i/K_i$  obtinguts pels tres inhibidors, el ciclofelitol és aproximadament 183 i 61 cops més efectiu que el CBE i l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol, respectivament.

### 3.3.2 Inhibició de diverses glicosidases pels epòxids **1** i **2**

Es va estudiar la selectivitat que presentaven el ciclofelitol (**1**) i el seu diastereòmer (**2**) per la  $\beta$ -glucosidasa en cèl·lules intactes (fibroblasts wt d'humans) i en homogenats de lisats de cèl·lules (fibroblasts wt d'humans). Aquests assaigs van ser realitzat en els nostres laboratoris per la Dra. Meritxell Egido-Gabás.

Els resultats, que es recullen a la Taula 3.3, mostren que l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**) inhibeix tant  $\alpha$ - com  $\beta$ -glucosidases en cèl·lules intactes i en homogenats, però no va presentar una inhibició destacable sobre els altres enzims. En canvi, el ciclofelitol (**1**) donà una major selectivitat i inhibició de la  $\beta$ -glucosidasa. Aquest resultat està d'acord amb el que hi ha descrit a la literatura.<sup>149,150</sup>

Cal destacar que en cèl·lules intactes, el ciclofelitol a una concentració de 100 nM va presentar unes inhibicions del 92 i 68% sobre la  $\beta$ -glucosidasa lisosomal i la  $\beta$ -glucosidasa citosòlica, respectivament. A més, en homogenats de cèl·lules aquest epòxid a una concentració de 100  $\mu$ M va inhibir completament la  $\beta$ -glucosidasa.

**Taula 3.3.** Inhibició de diverses glicosidases en cèl·lules intactes i en homogenats de lisats de cèl·lules pels epòxids **1** (ciclofelitol) i **2** ((1*R*,6*S*)-epi-ciclofelitol).

		Ciclofelitol	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-epi-ciclofelitol
<b>Cèl·lules intactes</b>	$\alpha$ -Glucosidasa	22 <sup>[a]</sup> 14 <sup>[b]</sup>	90 <sup>[a]</sup> 21 <sup>[b]</sup>
	$\beta$ -Glucosidasa lisosomal	99,8 <sup>[a]</sup> 92 <sup>[b]</sup>	81 <sup>[a]</sup> 14 <sup>[b]</sup>
	$\beta$ -Glucosidasa citosòlica	82 <sup>[a]</sup> 68 <sup>[b]</sup>	40 <sup>[a]</sup> 19 <sup>[b]</sup>
	$\alpha$ -Galactosidasa	0 <sup>[a]</sup> 0 <sup>[b]</sup>	0 <sup>[a]</sup> 0 <sup>[b]</sup>
	$\beta$ -Galactosidasa	8 <sup>[a]</sup> 2 <sup>[b]</sup>	4 <sup>[a]</sup> 0 <sup>[b]</sup>
<b>Homogenats</b>	$\alpha$ -Glucosidasa	13 <sup>[c]</sup>	80 <sup>[c]</sup>
	$\beta$ -Glucosidasa	100 <sup>[c]</sup>	100 <sup>[c]</sup>
	$\alpha$ -Galactosidasa	18 <sup>[c]</sup>	18 <sup>[c]</sup>
	$\beta$ -Galactosidasa	0 <sup>[c]</sup>	0 <sup>[c]</sup>
MTT (1 dia) (fibroblasts)		NT <sup>[d]</sup>	NT <sup>[d]</sup>

[a] % Inhibició a 10  $\mu$ M. [b] % Inhibició a 0.1  $\mu$ M. [c] % Inhibició a 100  $\mu$ M. [d] No presenten citotoxicitat a 300  $\mu$ M.



# 4. *Aminociclitols C<sub>7</sub>N*

---

4.1 Introducció i objectius

4.2 Síntesi dels aminociclitols C<sub>7</sub>N

4.2.1 Síntesi de l'epòxid tetra-O-benzil-*epi*-ciclofelitol (+)-**19**

4.2.2 Reaccions d'obertura dels epòxids **18** i **19**

4.2.3 Assignació de l'estereoquímica dels compostos **20-23**

4.2.4 Obtenció dels aminociclitols C<sub>7</sub>N (**24-27**)

4.3 Estudis d'inhibició enzimàtica dels aminociclitols C<sub>7</sub>N



Aminocyclitols are a family of compounds characterized by the presence of a cyclohexane moiety with amino and three or more hydroxyl substituents. These compounds have found diverse applications in medicinal chemistry as antibiotics, glycosidase inhibitors, modulators of sphingolipid metabolism, and are used as pharmacological tools for the study of inositol-related cellular processes. In addition, the aminocyclitol ring skeleton constitutes a structural subunit of complex natural products such as validamycins. In the naturally occurring aminocyclitols, the presence of hydroxymethyl side chain is common and characteristic making them to be designated as C<sub>7</sub>N-aminocyclitols.

A series of sixteen C<sub>7</sub>N aminocyclitol derivatives belonging to four different families were synthesized and evaluated as glycosidase inhibitors. Their configuration is governed by the regio- and stereocontrolled epoxide opening of hydroxyl protected forms of cyclophellitol (**1**) and (1*R*,6*S*)-*epi*-cyclophellitol (**2**).

Compounds **24a** and **24b**, analogues of valienamine, were found to be potent inhibitors of the  $\alpha$ -glucosidase from baker's yeast with  $K_i$  near to 2  $\mu$ M. On the other hand, compounds **26b** and **27b** exhibit a selective inhibition against recombinant GCCase with  $K_i$  values of 8.3 and 9.1  $\mu$ M, respectively.

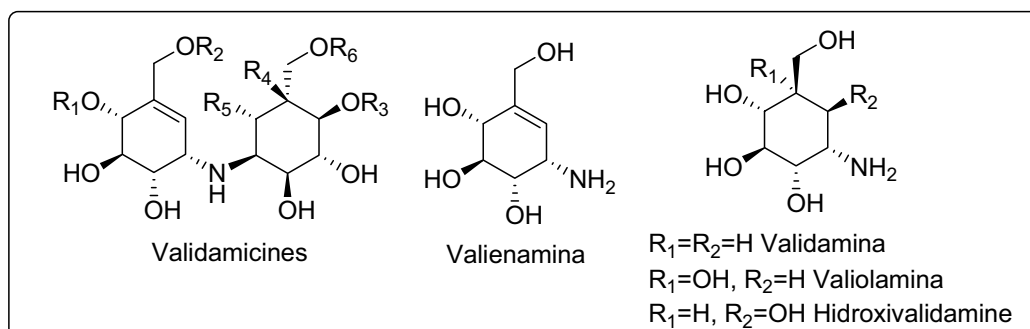




## 4.1 Introducció i objectius

Els aminociclitols són una família de compostos amb unes interessants propietats biològiques.<sup>177</sup> Des d'un punt de vista estructural, els aminociclitols són compostos cíclics amb tres o més grups hidroxil i amb un o més grups amino i són presents en diverses famílies de productes naturals i sintètics. Aquests compostos tenen aplicacions en química mèdica com a antibiòtics,<sup>178</sup> inhibidors de glicosidases,<sup>179</sup> i moduladors del metabolisme d'esfingolípids.<sup>180</sup>

Els aminociclitols naturals són metabòlits secundaris que, en general, es troben com a subunitats estructurals en alguns productes naturals més complexos. Com a derivats de ciclitol, a més de tenir un o més grups amino, han de tenir present tres grups hidroxil en cadascun dels cicles. Dins d'aquesta classe de productes naturals, es troben els aminociclitols C<sub>7</sub>N,<sup>181</sup> els quals tenen present un grup hidroximetil sobre un dels carbonis del sistema de ciclitol, com per exemple les validamicines,<sup>182</sup> que estan formades per una valienamina unida a una validamina, valiolumina o hidroxivalidamina (Figura 4.1).<sup>183</sup>

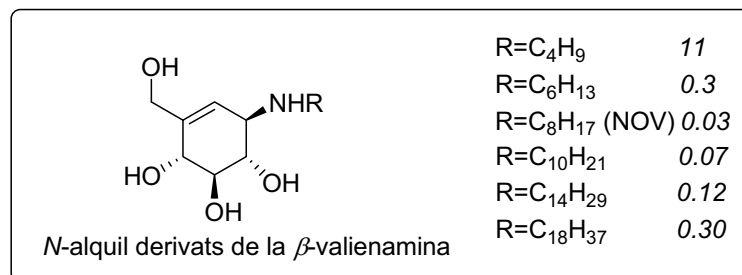


**Figura 4.1.** Aminociclitols C<sub>7</sub>N aïllats de fonts naturals.

Durant els últims vint anys, la síntesi de nous aminociclitols C<sub>7</sub>N i els estudis de les seves activitats biològiques han estat objecte de molt interès donant lloc a un gran nombre de treballs científics.<sup>181</sup> Entre d'altres, podem destacar la síntesi d'anàlegs nitrogenats de diversos productes naturals,<sup>184</sup> d'anàlegs de substrat<sup>185</sup> o d'inhibidors d'enzims.<sup>186</sup> Dins d'aquest camp de recerca, un gran nombre de famílies d'aminociclitols s'han sintetitzat durant les últimes dècades i s'han estudiat les seves activitats biològiques.<sup>131,187</sup>

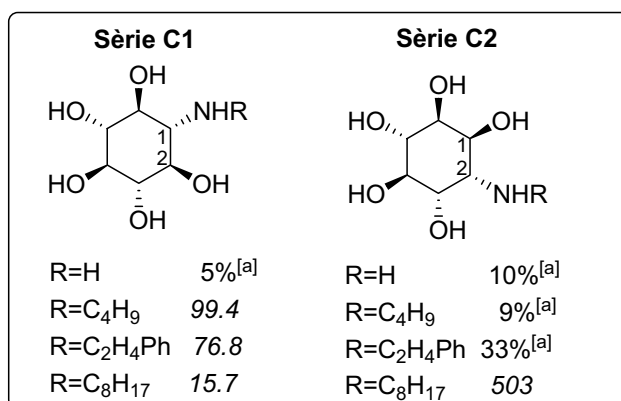
A l'any 1996, Ogawa i col·laboradors van descriure<sup>126</sup> una sèrie d'*N*-alquil derivats de la β-valienamina com a inhibidors de la GCCase (Figura 4.2). L'inhibidor més potent

d'aquesta sèrie va ser l'*N*-octil- $\beta$ -valienamina (NOV) amb un valor de IC<sub>50</sub> de 0.03  $\mu$ M. A més aquest compost presenta activitat xaperona en fibroblasts de malalts de Gaucher amb diverses mutacions.<sup>128,188</sup>



**Figura 4.2.** Inhibició (en cursiva, valors de IC<sub>50</sub>/ $\mu$ M) de la GCase recombinant per *N*-alquil derivats de la  $\beta$ -valienamina.

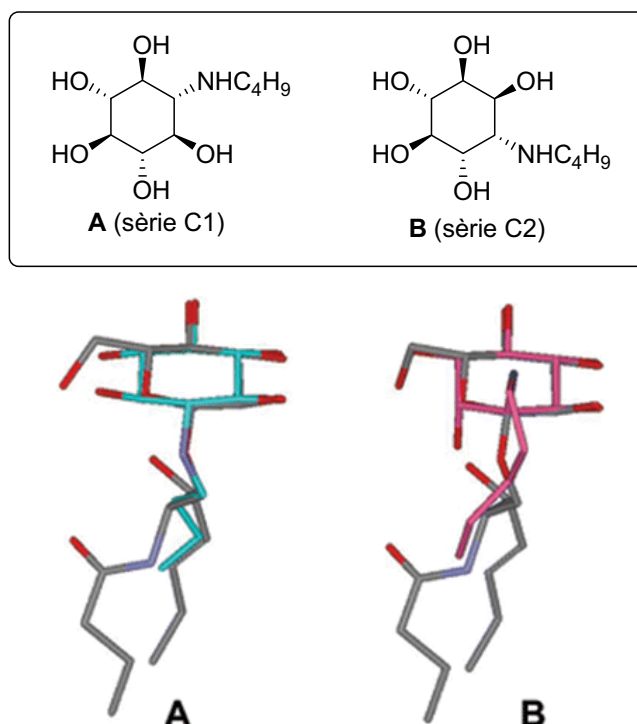
Com s'ha explicat a la Introducció general d'aquesta memòria, el nostre grup de recerca ha descrit diverses sèries d'inosamines com a inhibidors específics de la GCase recombinant (Figura 4.3).<sup>130,131</sup> A més, alguns d'ells tenen un efecte protector sobre la imiglicerasa en condicions de desnaturalització tèrmica i presenten una activitat xaperona prometedora en fibroblasts de malalts de Gaucher.<sup>130,133</sup> Dins de les dues sèries diastereomèriques (sèries C1 i C2) descrites en aquests treballs, només amb els anàlegs que tenien els grups hidroxil i amino en disposició equatorial (sèrie C1) es van obtenir uns resultats d'inhibició destacables amb valors de IC<sub>50</sub> entre 1.2 i 99  $\mu$ M, en funció del substituent R.



**Figura 4.3.** Inhibició (en cursiva, valors de IC<sub>50</sub>/ $\mu$ M) de la imiglicerasa per aminociclitols de tipus inosamina. [a]: % Inhibició a 1 mM.<sup>131,189</sup>

D'altra banda, les inosamines més actives de la sèrie C1 van resultar ser les que contenen amines alquilades i es va observar que el caràcter inhibitor depenia de la longitud de la cadena alquíllica, sent directament proporcional a la longitud d'aquesta. A més, es va veure que els compostos que tenien una cadena alquíllica entre 8 i 10 carbonis eren els que presentaven el millor balanç entre la toxicitat i l'activitat enzimàtica. Així mateix, aquells compostos de la sèrie C1 amb un grup aromàtic present en el substituent R també van presentar una certa inhibició de la imiglucerasa, encara que no es va observar una correlació estructura-activitat tan clara.

Tenint en compte l'estructura de raigs X de l'enzim i la conformació que adopta la GlcCer quan s'uneix al centre actiu de la GCCase,<sup>39,42</sup> es va comparar l'estructura tridimensional de la GlcCer amb les inosamines de les sèries C1 i C2 (Figura 4.4).<sup>131</sup>

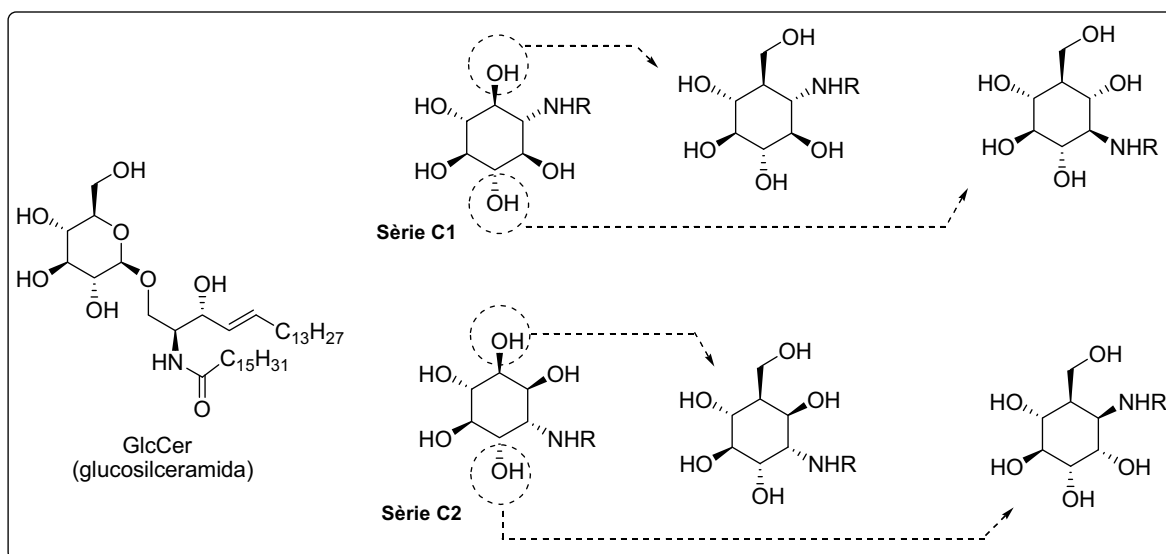


**Figura 4.4.** Superposició de les inosamines de les sèries C1 i C2 (en color) amb la GlcCer (en gris). Figura extreta d'un article d'Egido-Gabás i col·laboradors.<sup>131</sup>

Es va observar que en les inosamines de la sèrie C1, tres dels grups hidroxil, els quals adopten una disposició equatorial, es superposen amb els de l'anell de piranòsid del substrat, excepte el grup hidroximetil, que es superposa amb un dels grups hidroxil de la inosamina. Així mateix, el grup amino de la inosamina adopta una disposició espacial equivalent a la de l'àtom d'oxigen de la posició anomèrica del substrat. Per altra banda,

en la sèrie C2, el grup amino adopta una disposició axial, i això comporta una menor capacitat d'aquests anàlegs per mimetitzar al substrat natural de la GCCase. Això estaria d'acord amb la manca d'activitat inhibidora trobada en aquesta última sèrie de compostos.

Per tal d'intentar millorar l'activitat inhibidora d'aquests compostos, va semblar interessant sintetitzar quatre famílies d'aminociclitols C<sub>7</sub>N (on R=H, *N*-butil, *N*-octil i 2-feniletíl) amb una estructura similar a les inosamines que s'havien descrit prèviament, però substituint un grup hidroxil (encerclat a la Figura 4.5) per un grup hidroximetil.



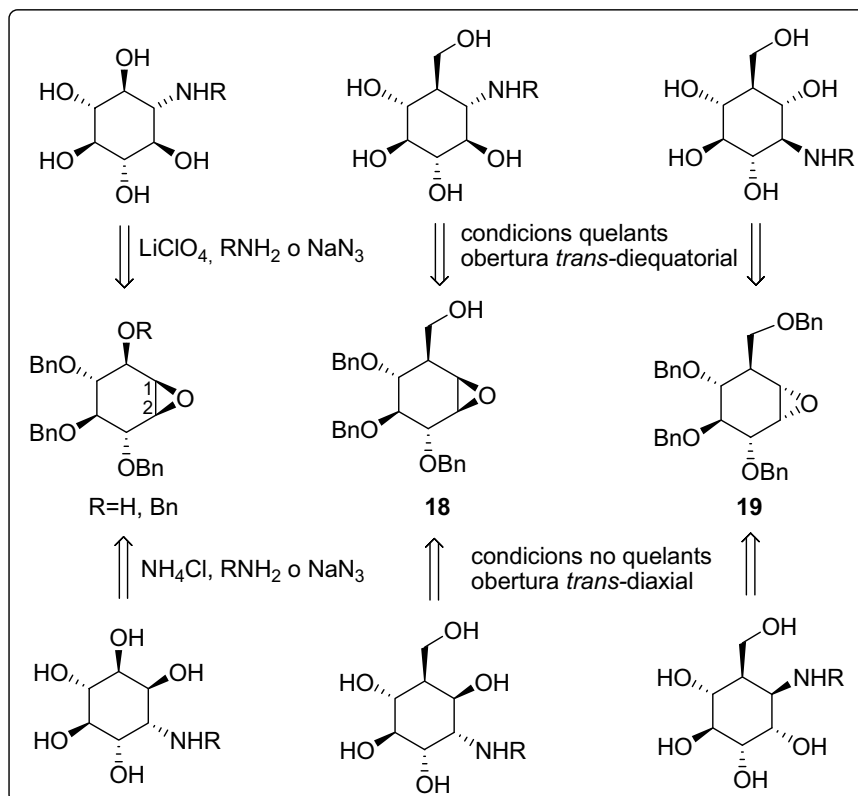
**Figura 4.5.** Estructures dels aminociclitols C<sub>7</sub>N i la seva relació amb aminociclitols descrits prèviament en el grup de recerca.

Atenent als precedents que s'han comentat, s'esperaria que aquests compostos, al tenir una estructura més semblant a la del substrat natural (GlcCer), fossin reconeguts més eficientment per la GCCase i, per tant, presentessin una millor activitat inhibidora que les inosamines prèviament descrites pel nostre grup de recerca.<sup>130,131</sup>

## 4.2 Síntesi dels aminociclitols C<sub>7</sub>N

### 4.2.1 Síntesi de l'epòxid tetra-*O*-benzil-*epi*-ciclofelitol (+)-19

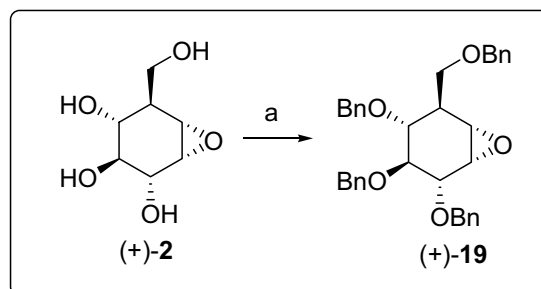
La síntesi d'aquests nous aminociclitols es va plantejar a partir de reaccions d'obertura regio- i estereoselectives dels epòxids tri-*O*-benzilciclofelitol (**18**) i tetra-*O*-benzil-*epi*-ciclofelitol (**19**) estudiades prèviament en el nostre grup de recerca amb derivats del CBE (tri- i tetra-*O*-benzilats) (veure Figura 4.6).<sup>131,190,191</sup>



**Figura 4.6.** Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció dels aminociclitols C<sub>7</sub>N.

Tal i com s'ha indicat en el capítol 3, l'epòxid tri-*O*-benzilciclofelitol (**18**) es va preparar a partir del (-)-1-*O*-Pivaloïl-conduritol B ((-)-**5**) seguint una ruta sintètica descrita per Trost i col·laboradors<sup>163</sup> amb lleugeres modificacions.

Per a l'obtenció de l'epòxid (+)-**19** (tetra-*O*-benzil-*epi*-ciclofelitol), es van protegir els quatre grups hidroxil de l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**) (síntesi descrita en el capítol 3) en forma d'èters benzílics utilitzant les condicions descrites a la literatura<sup>192</sup> (Figura 4.7).



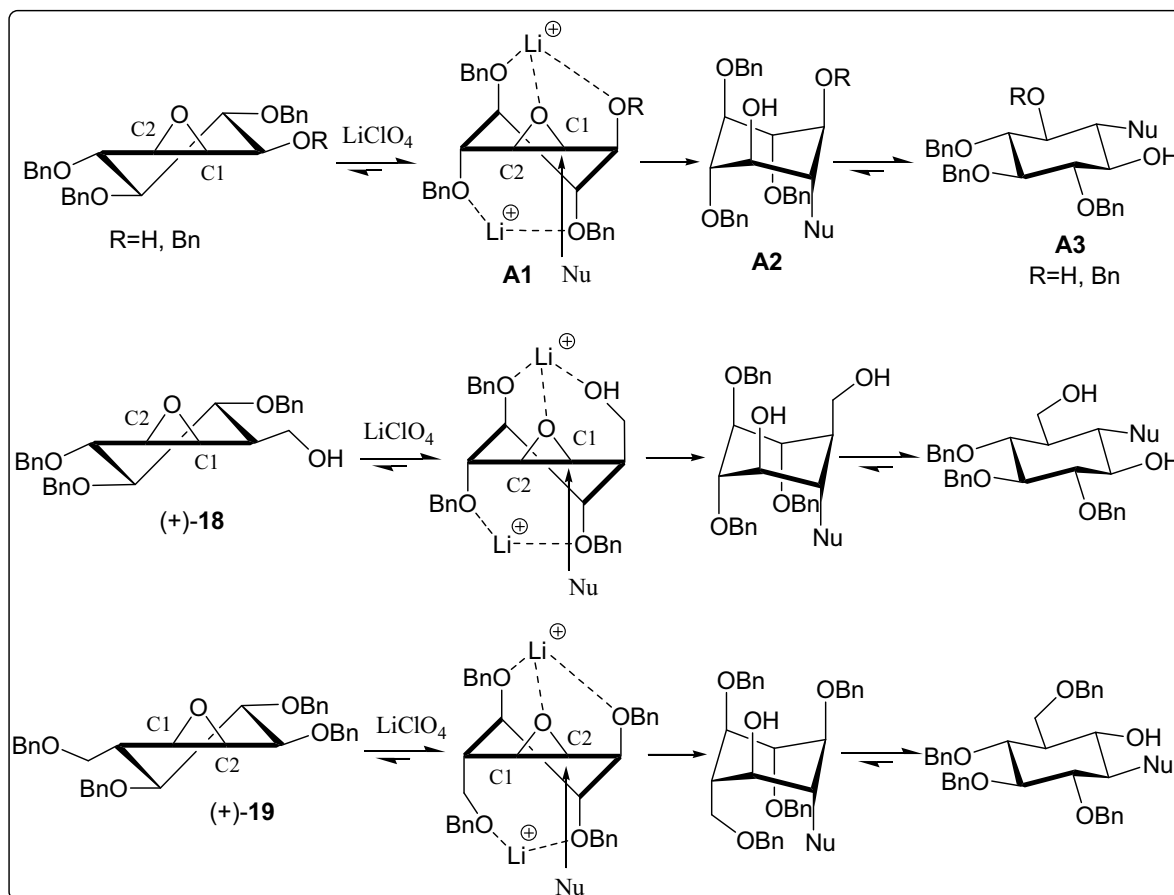
a) NaH, BnBr, DMF, 52%.

**Figura 4.7.** Síntesi del tetra-*O*-benzil-*epi*-ciclofelitol (**19**) a partir de l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**).

Amb els epòxids (+)-**18** i (+)-**19** a les nostres mans, es van dur a terme les obertures regio- i estereoselectives per a l'obtenció dels aminociclitols C<sub>7</sub>N.

#### 4.2.2 Reaccions d'obertura dels epòxids **18** i **19**

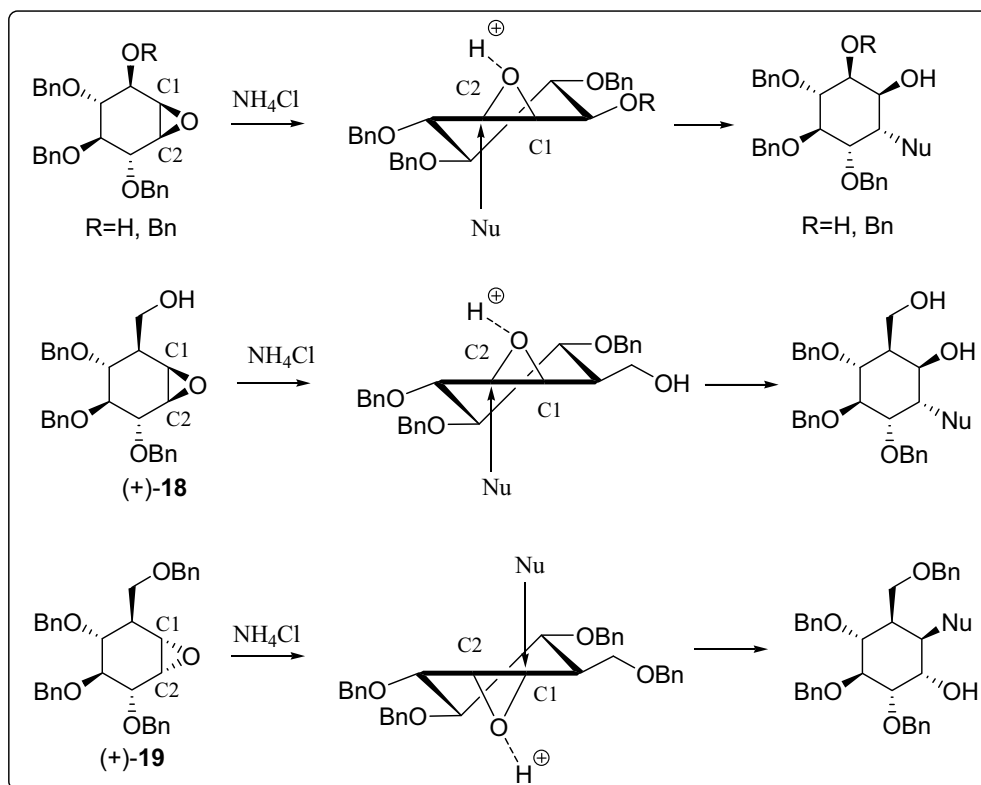
La reactivitat d'epoxiciclohexans, com per exemple el *cis*-4-benziloxi-1,2-epoxiciclohexà, amb nucleòfils ha estat molt estudiada per Chini i col·laboradors.<sup>193,194</sup> En general, l'obertura en aquests tipus de sistemes segueix la regla de Fürst-Plattner,<sup>195</sup> segons la qual el producte majoritari és el d'obertura *trans*-diaxial de l'epòxid.<sup>196</sup> En sistemes amb flexibilitat conformacional, en absència d'altres efectes externs, s'obté, de forma majoritària o exclusiva, els productes d'obertura *trans*-diaxial a partir de la conformació més estable termodinàmicament. No obstant, la regio- i estereoquímica de l'obertura dels epòxids pot ser controlada de diferents formes. En estudis duts a terme al nostre grup de recerca<sup>191</sup> sobre derivats *O*-benzilats del CBE, es va aplicar un concepte desenvolupat prèviament per Chini i col·laboradors<sup>193</sup> que es basa en l'activació de l'epòxid i la restricció conformacional del ciclohexà de manera simultània mitjançant l'ús d'àcids de Lewis com el LiClO<sub>4</sub> (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Obertura dels epòxids **18**, **19** i derivats *O*-benzilats del CBE en presència d'un àcid de Lewis.

D'aquesta manera, s'aprofita la capacitat del catió  $\text{Li}^+$  per a formar quelats amb els àtoms d'oxigen de l'epòxid, dels èters benzílics i dels OH presents a la molècula, afavorint-se la conformació on els grups benziloxi es troben en disposició axial (**A1**). En aquesta conformació de l'epòxid, l'obertura és *trans*-diaxial i s'obté el producte amb tots els substituents en disposició axial (**A2**), que s'equilibra amb el conformer més estable, el qual té els substituents en disposició equatorial (**A3**). D'aquesta manera, s'obté formalment una obertura *trans*-diequatorial de l'epòxid inicial.<sup>191</sup> Així doncs, si es pot aplicar una aproximació semblant en l'obertura dels epòxids **18** i **19**, seria raonable esperar l'obtenció dels productes que s'indiquen a la Figura 4.8.

La capacitat del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  per promoure l'obertura d'epòxids per nucleòfils és ben coneguda<sup>197,198</sup> i el nostre grup d'investigació ha descrit l'obertura de derivats *O*-benzilats del CBE utilitzant unes condicions àcides (un excés de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  i emprant com a dissolvent barreges  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>131,199</sup> En general, la protonació de l'oxigen de l'epòxid afavoreix l'obertura *trans*-diaxial passant per la conformació més estable on tots els substituents es troben en disposició equatorial. Així doncs, en l'obertura dels epòxids **18** i **19**, seria raonable esperar l'obtenció dels productes que s'indiquen a la Figura 4.9.

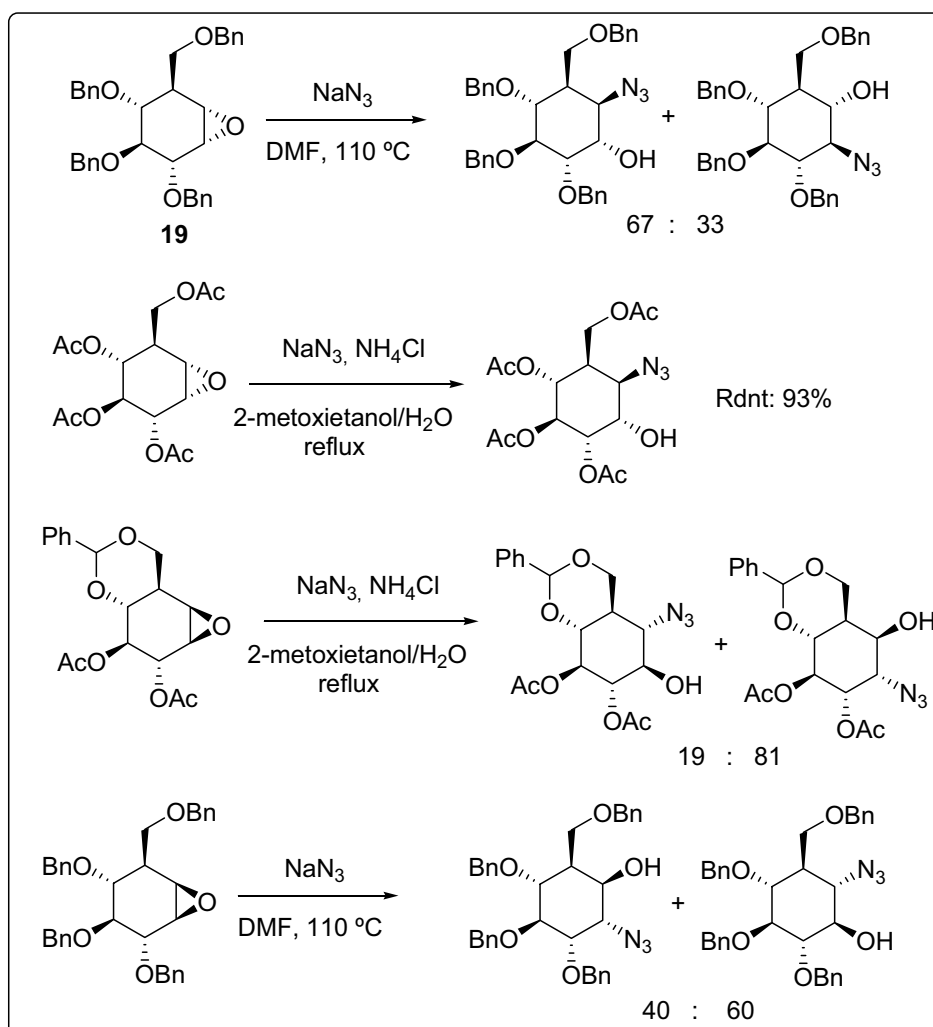


**Figura 4.9.** Obertura dels epòxids **18**, **19** i derivats *O*-benzilats del CBE en presència d'un àcid pròtic.



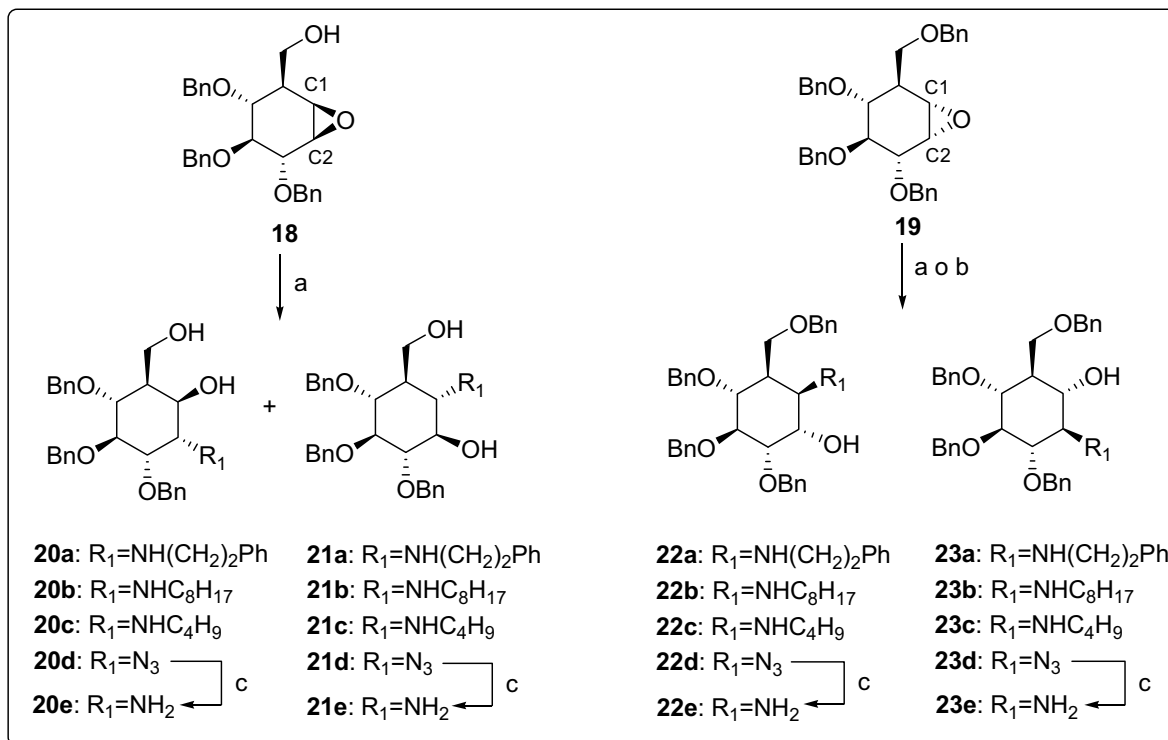
Tal i com s'ha comentat en aquest apartat, l'obertura d'epoxiciclitols amb nucleòfils nitrogenats ja ha estat estudiada.<sup>190,191,200</sup> En canvi, l'obertura de derivats del ciclofelitol, únicament s'ha descrit amb azida sòdica (Figura 4.10).<sup>164,192,197</sup>

Tatsuta i col·laboradors van descriure que en l'obertura de l'epòxid **19** amb azida sòdica a 110 °C, s'obtenen els corresponents azidoalcohols amb una baixa regioselectivitat.<sup>192</sup> Els mateixos autors van descriure també que en l'obertura del tetra-*O*-benzilciclofelitol, utilitzant les mateixes condicions de reacció, s'obté una mescla de pràcticament 1:1 dels dos possibles regioisòmers.<sup>164</sup> D'altra banda, Ogawa i col·laboradors van descriure que en l'obertura del tetra-*O*-acetil-(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol amb NaN<sub>3</sub> i un excés de NH<sub>4</sub>Cl s'obté el producte d'obertura *trans*-diaxial amb total regioselectivitat.<sup>197</sup>



**Figura 4.10.** Obertures de derivats del ciclofelitol amb NaN<sub>3</sub> descrites a la literatura.<sup>164,192,197</sup>

D'acord amb aquests precedents, es va dur a terme l'obertura dels epòxids **18** i **19** utilitzant un excés de LiClO<sub>4</sub> i azida sòdica o una amina primària (10 equivalents/mol d'epòxid) a 80 °C i utilitzant com a dissolvent acetonitril (condicions a, Taula 4.1) o bé utilitzant amines primàries (10 equivalents/mol d'epòxid) i condicions àcides (un excés de NH<sub>4</sub>Cl i com a dissolvent una mescla MeOH:H<sub>2</sub>O, condicions b, Taula 4.1) a 100 °C (veure també Figura 4.11). Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 4.1.



a) Nucleòfil (10 equivalents), 2N LiClO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 80 °C, 18 h; b) Nucleòfil (10 equivalents), NH<sub>4</sub>Cl, MeOH:H<sub>2</sub>O (8:1), 100 °C, (48-72 h); c) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 2 h, 78-89%.

**Figura 4.11.** Obtenció dels aminoalcohols **20a-c,e** – **23a-c,e** a partir dels epòxids **18** i **19**.

En l'obertura de l'epòxid **18** amb azida sòdica es van obtenir els azidoalcohols **20d** i **21d** amb una baixa regioselectivitat (entrada 4, condicions a). En canvi, quan es van utilitzar com a nucleòfils amines primàries sota condicions quelants, es van obtenir els corresponents aminoalcohols amb més alta regioselectivitat (entrades 1-3, condicions a) i s'obtingué com a producte majoritari el d'obertura en la posició C1 (**21a-c**). Els regioisòmers minoritaris **20a-c** es van separar per cromatografia en columna i es van caracteritzar.

En les reaccions de l'epòxid **19** amb amines primàries sota condicions quelants es van obtenir els corresponents productes d'obertura en la posició C2 (**23a-c**) amb total regioselectivitat (entrades 5-7, condicions a). D'altra banda, quan es va utilitzar com a nucleòfil NaN<sub>3</sub> (entrada 8, condicions a) o sota condicions àcides (entrades 9-11, condicions b) va resultar en una mescla de pràcticament 1:1 entre els dos possibles regioisòmers (**22** i **23**).

Taula 4.1. Reaccions d'obertura dels epòxids **18** i **19** amb amines i NaN<sub>3</sub>.

Entrada	Epòxid	Nucleòfil	Condicions	Productes	rr <sup>[a]</sup>	Rdnt. <sup>[b]</sup> (%)
1	<b>18</b>	PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>21a / 20a</b>	91:9	83
2	<b>18</b>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NH <sub>2</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>21b / 20b</b>	83:17	82
3	<b>18</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>21c / 20c</b>	87:13	85
4	<b>18</b>	NaN <sub>3</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>21d / 20d</b>	75:25	82
5	<b>19</b>	PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>23a</b>	únic	74
6	<b>19</b>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NH <sub>2</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>23b</b>	únic	76
7	<b>19</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>23c</b>	únic	72
8	<b>19</b>	NaN <sub>3</sub>	a <sup>[c]</sup>	<b>22d / 23d</b>	56:44	85
9	<b>19</b>	PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	b <sup>[d]</sup>	<b>22a / 23a</b>	59:41	82
10	<b>19</b>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NH <sub>2</sub>	b <sup>[d]</sup>	<b>22b / 23b</b>	59:41	85
11	<b>19</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH <sub>2</sub>	b <sup>[d]</sup>	<b>22c / 23c</b>	55:45	79

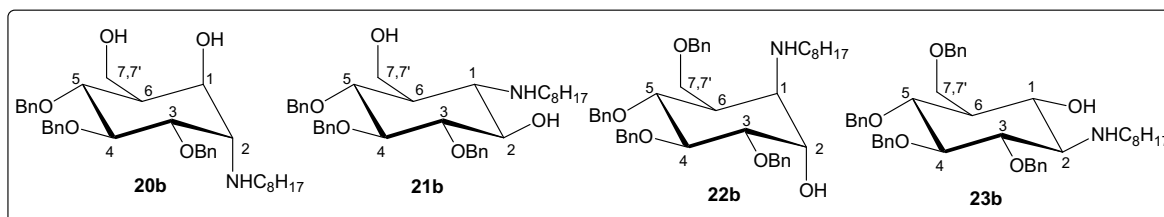
[a] Relació regioisomèrica calculada a partir dels espectres de RMN de <sup>1</sup>H. [b] Rendiments globals. [c] Condicions a: nucleòfil (10 equivalents), 2N LiClO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 80 °C, 18 h. [d] Condicions b: nucleòfil (10 equivalents), NH<sub>4</sub>Cl, MeOH:H<sub>2</sub>O (8:1), 100 °C, 48-72 h.

Per tant, en molts dels casos no es va obtenir una alta regioselectivitat com s'havia observat anteriorment en el nostre grup de recerca en l'obertura d'altres epòxids semblants utilitzant les mateixes condicions de reacció.<sup>131,191,199</sup> La diferent naturalesa d'aquests epòxids amb els que s'havien utilitzat prèviament en el grup de recerca podria ser una raó per a aquesta baixa regioselectivitat obtinguda, però els resultats obtinguts en les obertures de l'epòxid **19** amb amines i en presència de LiClO<sub>4</sub> no recolzaria aquesta justificació.

Les amines primàries **20e-23e** es van obtenir amb bons rendiments mitjançant la reducció dels corresponents azidoalcohols **20d-23d** amb LiAlH<sub>4</sub> (Figura 4.11).

### 4.2.3 Assignació de l'estereoquímica dels compostos 20-23

L'assignació de l'estereoquímica dels productes obtinguts en les obertures es va fer mitjançant els experiments de RMN bidimensionals gDQCOSY i gHSQC. A la Figura 4.12 es mostra l'assignació dels senyals dels espectres de RMN de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C per als compostos **20b-23b**.



20b			21b		
posició	$\delta(^1\text{H})$ (m, <i>J</i> , Hz)	$\delta(^{13}\text{C})$	posició	$\delta(^1\text{H})$ (m, <i>J</i> , Hz)	$\delta(^{13}\text{C})$
1	4.15-4.18 (m)	72.5	1	2.74-2.88 (m) <sup>[c]</sup>	61.0
2	3.04 (t <sup>[b]</sup> , 3.8)	60.3	2	3.65 (t <sup>[b]</sup> , 9.8)	71.8
3	3.98 (dd, 8.5, 4.1)	80.3	3	3.33 (t <sup>[b]</sup> , 9.3)	83.4
4	3.90 (t <sup>[b]</sup> , 8.5)	83.8	4	3.58 (t <sup>[b]</sup> , 9.3)	85.3
5	3.87 (t <sup>[b]</sup> , 8.5)	75.9	5	3.24 (t <sup>[b]</sup> , 9.9)	79.0
6	2.12-2.20 (m)	41.6	6	1.95-2.01 (m)	41.8
7	3.75 (dd, 10.9, 2.1)	63.5	7	3.70 (dd, 10.7, 8.2)	63.7
7'	4.06 (dd, 10.9, 3.3)	63.5	7'	4.07 (dd, 10.5, 2.7)	63.7

22b			23b		
posició	$\delta(^1\text{H})$ (m, <i>J</i> , Hz)	$\delta(^{13}\text{C})$	posició	$\delta(^1\text{H})$ (m, <i>J</i> , Hz)	$\delta(^{13}\text{C})$
1	3.05 (t <sup>[b]</sup> , 2.5)	61.7	1	3.50 (t <sup>[b]</sup> , 10.2)	66.8
2	3.97-4.00 (m) <sup>[c]</sup>		2	2.47 (t <sup>[b]</sup> , 10.2)	65.1
3	3.97-4.00 (m) <sup>[c]</sup>		3	3.47 (t <sup>[b]</sup> , 9.2)	80.5
4	3.83 (t <sup>[b]</sup> , 9.1)	84.6	4	3.63-3.69 (m) <sup>[c]</sup>	
5	3.97-4.00 (m) <sup>[c]</sup>		5	3.63-3.69 (m) <sup>[c]</sup>	
6	2.27-2.30 (m)	40.0	6	1.70 (t, 10.0)	47.3
7	3.65 (dd, 9.1, 1.1)	70.4	7	3.79 (dd, 8.9, 2.9)	65.9
7'	3.97-4.00 (m) <sup>[c]</sup>	70.4	7'	3.90 (d, 8.8)	65.9

[a] Els espectres de RMN de <sup>1</sup>H es van enregistrar en dissolució de CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  en ppm i *J* en Hz.  
 [b] Multiplicitat aparent: t  $\equiv$  dd amb  $J_1 \approx J_2$ . [c] Els senyals d'aquests protons apareixen solapades.

**Figura 4.12.** Dades dels espectres de RMN dels compostos **20b-23b** (500 MHz per <sup>1</sup>H i 100 MHz per <sup>13</sup>C RMN).<sup>[a]</sup>

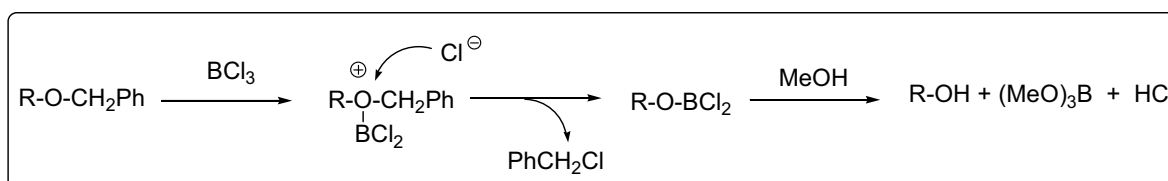
A l'espectre de RMN de <sup>1</sup>H de l'aminoalcohol **21b**, el protó H2 apareix com a triplet amb una constant d'acoblament gran ( $J=9.8$  Hz), que és típica d'un acoblament axial/axial. Per contra, el mateix protó en el compost **20b** apareix com a triplet amb una constant d'acoblament petita ( $J=3.8$  Hz), que és típica d'un acoblament equatorial/axial o equatorial/equatorial.

Per altra banda, en el compost **23b**, els protons H1 i H2 apareixen com a triplets amb constants d'acoblament grans ( $J=10.2$  Hz). Això està d'acord amb l'obertura *trans*-diaxial de l'epòxid **19**. En el cas del compost **22b**, els protons H2, H3, H5 i H7' apareixen solapats a l'espectre de RMN de <sup>1</sup>H formant un multiplet entre 3.97 i 4.00 ppm. Per aquest motiu, va ser impossible obtenir els valors de les constants d'acoblament entre aquests protons. En canvi, en el compost **22b**, el protó H1 apareix com a triplet amb una constant d'acoblament petita ( $J=2.5$  Hz), que és típica d'un acoblament equatorial/axial o equatorial/equatorial.

Per últim, les constants d'acoblament grans (8.5-10.0 Hz) observades entre els protons H3/H4, H4/H5 i H5/H6 en tots els compostos confirmaria la relació *trans*-diaxial entre aquests protons.

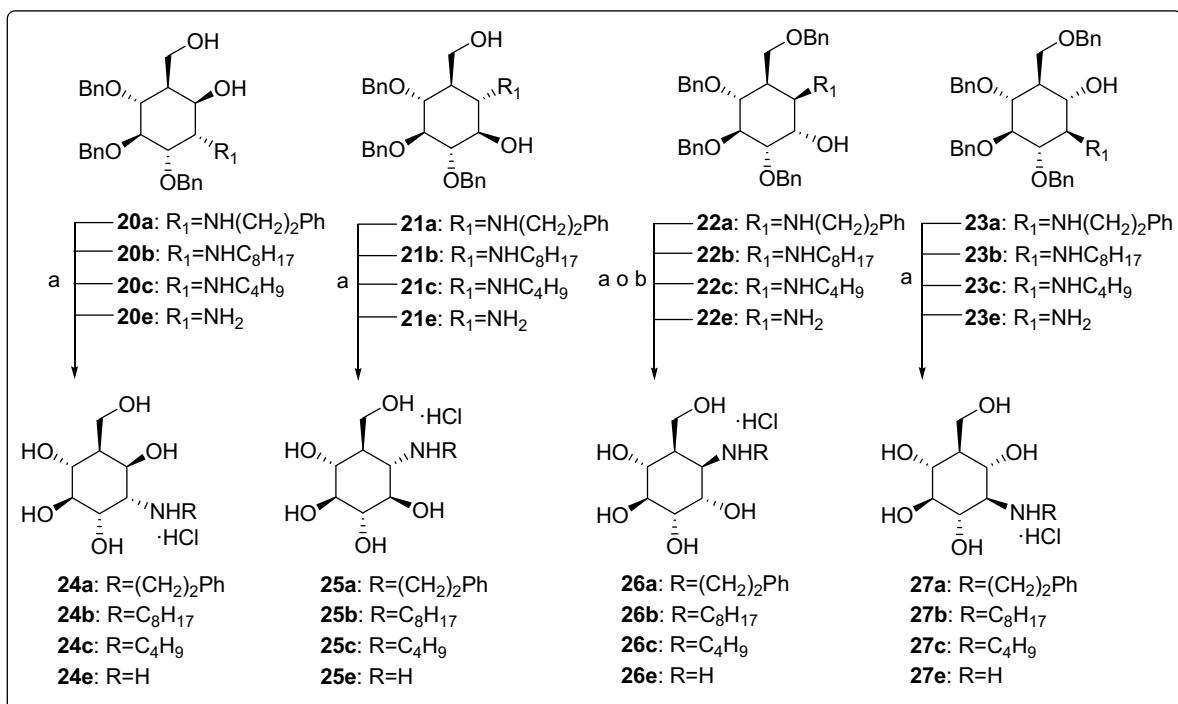
#### 4.2.4 Obtenció dels aminociclitols C<sub>7</sub>N (24-27)

Un cop amb tots els precursors dels aminociclitols C<sub>7</sub>N a les nostres mans, es va dur a terme la desprotecció dels grups benzil amb BCl<sub>3</sub> a -78 °C en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Figura 4.13).<sup>131,201</sup>



**Figura 4.13.** Desprotecció dels grups *O*-benzil amb BCl<sub>3</sub>.

Es van obtenir els productes desitjats en totes les desproteccions dels grups benzil amb BCl<sub>3</sub>, excepte en la desprotecció dels compostos **22a-c**, on es van obtenir mescles molt complexes. En canvi, la desprotecció d'aquests compostos per hidrogenació catalítica utilitzant Pd/C com a catalitzador, va permetre obtenir els aminociclitols desitjats (**26a-c**) amb bons rendiments (Figura 4.14).

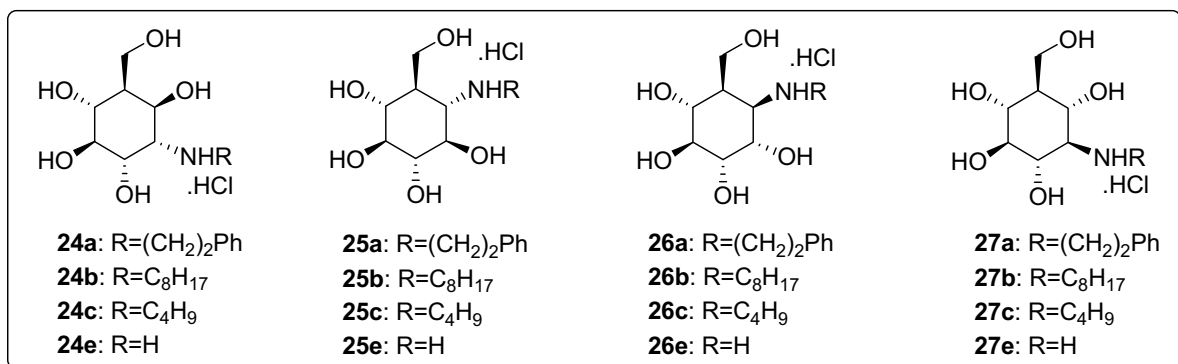


a) BCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C → t.a., 16 h, 77-94%; b) H<sub>2</sub> (2 atm), Pd/C, HCl, THF, t.a., 14 h, 92-93%.

**Figura 4.14.** Obtenció dels aminociclitols **24a-c,e** – **27a-c,e**.

### 4.3 Estudis d'inhibició enzimàtica dels aminociclitols C<sub>7</sub>N

Els aminociclitols **24-27** (Figura 4.15) van ser estudiats com a inhibidors de les α-glucosidases (de llevat del pa i d'arròs), l'α-galactosidasa de gra de cafè verd, la β-glucosidasa d'ametlla, la GCase recombinant (imiglucerasa, Cerezyme<sup>®</sup>) i la GCS (veure Taules 4.2 i 4.3). Aquests assaigs, excepte l'estudi de la inhibició de la imiglucerasa, van ser realitzats en els nostres laboratoris per la Dra. Meritxell Egido-Gabás.



**Figura 4.15.** Estructura dels aminociclitols C<sub>7</sub>N.

Com s'ha comentat anteriorment, alguns d'aquests aminociclitols C<sub>7</sub>N es van preparar amb l'objectiu d'obtenir inhibidors més potents de la GCCase que les inosamines que s'havien sintetitzat anteriorment en el nostre grup de recerca.<sup>130,131</sup> De les quatre sèries de compostos sintetitzades, els aminociclitols **27a-c,e** són els que mimetitzen millor a la GlcCer i, per tant, caldria esperar que aquests fossin els més actius.

Com es pot observar a la Taula 4.2, molts d'aquests aminociclitols C<sub>7</sub>N són molt poc efectius com a inhibidors de la imiglucerasa. Els compostos **24b**, **26a**, **26b** i **27b** van ser els únics que van presentar una certa inhibició sobre aquest enzim. D'altra banda, s'observa una correlació entre la lipofília i l'activitat inhibidora, ja que els *N*-octil derivats **24b-27b** van ser més actius que els *N*-butil o les amines lliures. Aquesta correlació també s'ha observat en altres compostos descrits a la literatura.<sup>33,121,124,126,131,202</sup>

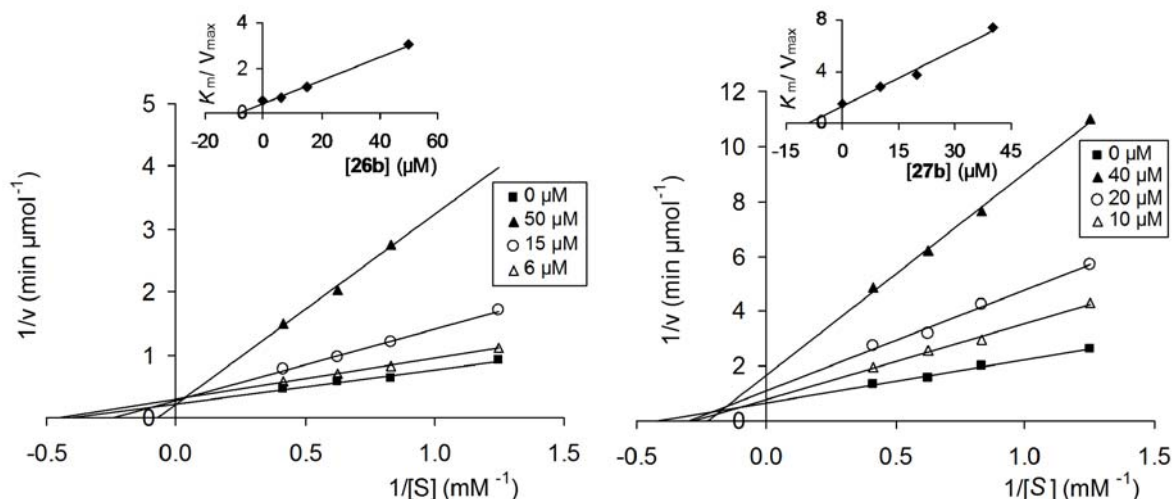
**Taula 4.2.** Inhibició de la  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla i la imiglucerasa pels aminociclitols C<sub>7</sub>N.

Compost	$\beta$ -Glucosidasa (d'ametlla)		Imiglucerasa		
	% Inhibició (800 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	% Inhibició (200 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)
<b>24a</b>	3	ND <sup>[a]</sup>	48	257.6	
<b>24b</b>	18	ND	86	43.9	16.7 <sup>[b]</sup>
<b>24c</b>	16	ND	7	ND	
<b>24e</b>	15	ND	43	ND	
<b>25a</b>	13	ND	17	ND	
<b>25b</b>	23	ND	41	400	
<b>25c</b>	12	ND	9	ND	
<b>25e</b>	16	ND	33	ND	
<b>26a</b>	70	63.1	61	138	34.5 <sup>[c]</sup>
<b>26b</b>	78	147.3	94	17.3	8.3 <sup>[c]</sup>
<b>26c</b>	56	ND	17	ND	
<b>26e</b>	15	ND	21	ND	
<b>27a</b>	13	ND	24	ND	
<b>27b</b>	30	ND	78	22.7	9.1 <sup>[b]</sup>
<b>27c</b>	20	ND	7	ND	
<b>27e</b>	14	ND	22	ND	

[a] ND: no determinat. [b] Tipus d'inhibició: no competitiva. [c] Tipus d'inhibició: competitiva.

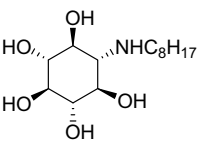
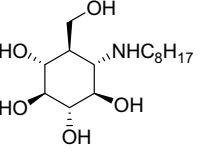
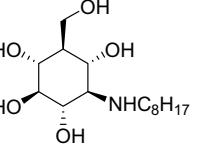
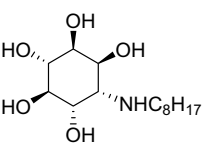
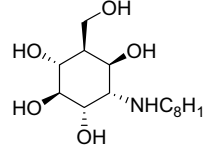
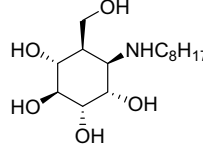
Es va estudiar el tipus d'inhibició de la imiglucerasa pels compostos **24b**, **26a**, **26b** i **27b**. Es va trobar que els compostos **24b** i **27b** (Figura 4.16) es comportaven com a inhibidors no competitius amb uns valors de la K<sub>i</sub> de 16.7 i 9.1  $\mu$ M, respectivament, i per tant no s'uneixen al centre actiu. Aquest resultat confirma el baix reconeixement dels inhibidors pel centre

actiu de l'enzim i, per tant, podria explicar la baixa activitat inhibidora d'aquesta família d'aminociclitols C<sub>7</sub>N. D'altra banda, els compostos **26a** i **26b** (Figura 4.16), que tenen els grups hidroximetil i amino en carbonis contigus i, per tant, no es superposen bé amb el substrat natural GlcCer i en principi no haurien de ser reconeguts pel centre actiu de l'enzim, van resultar ser inhibidors competitius amb valors de la  $K_i$  de 34.5 i 8.3  $\mu\text{M}$ , respectivament.



**Figura 4.16.** Inhibició de la imiglucerasa pels aminociclitols **26b-27b**. Representacions de Lineweaver-Burk i càlcul de la  $K_i$ .

A la Figura 4.17 es mostra un resum dels resultats obtinguts per a la inhibició de la imiglucerasa pels *N*-octil aminociclitols C<sub>7</sub>N i les inosamines de les sèries C1 i C2 descrites anteriorment pel nostre grup de recerca.

	 C1- <i>N</i> -octil	 25b	 27b
<b>IC<sub>50</sub> / <math>\mu\text{M}</math></b>	15.7 <sup>[a]</sup>	400	22.7
<b><math>K_i</math> / <math>\mu\text{M}</math></b>	2.4 <sup>[a]</sup>	ND <sup>[b]</sup>	9.1
<b>Tipus d'inhibició</b>	competitiva <sup>[a]</sup>	ND <sup>[b]</sup>	no competitiva
	 C2- <i>N</i> -octil	 24b	 26b
<b>IC<sub>50</sub> / <math>\mu\text{M}</math></b>	503 <sup>[a]</sup>	43.9	17.3
<b><math>K_i</math> / <math>\mu\text{M}</math></b>	158 <sup>[a]</sup>	16.7	8.3
<b>Tipus d'inhibició</b>	competitiva <sup>[a]</sup>	no competitiva	competitiva <sup>[a]</sup>

**Figura 4.17.** Inhibició de la imiglucerasa pels *N*-octil aminociclitols. [a] Ref. <sup>131</sup> [b] ND: no determinat.



Si comparem el valor de la  $K_i$  obtingut per a l'aminociclitol C<sub>7</sub>N **27b** amb el que hi ha descrit per a la inosamina C1-*N*-octil, es pot veure clarament com la nostra hipòtesi inicial no era del tot correcta. Encara que aquest aminociclitol C<sub>7</sub>N té una estructura més semblant a la del substrat natural (GlcCer), és un inhibidor no competitiu de la GCCase recombinant. Així mateix, l'aminociclitol **25b** no va presentar una millor activitat inhibidora de la GCCase recombinant que la inosamina C1-*N*-octil. D'altra banda, l'aminociclitol **26b** és un inhibidor competitiu de la imigluçerasa més potent que la inosamina C2-*N*-octil.

Així mateix, els aminociclitols **26a** i **26b**, a una concentració de 800 µM, van ser els únics que van presentar un percentatge d'inhibició de la β-glucosidasa d'ametlla superior al 70%.

Un cop estudiades les inhibicions de la imigluçerasa i la β-glucosidasa d'ametlla pels aminociclitols C<sub>7</sub>N **24-27**, es van determinar les seves activitats com a inhibidors de les α-glucosidases de llevat del pa i d'arròs i la glucosilceramida sintasa (GCS). Les activitats obtingudes s'indiquen a la Taula 4.3.

**Taula 4.3.** Inhibició de les α-glucosidases (de llevat del pa i d'arròs) i la GCS pels aminociclitols C<sub>7</sub>N.

Compost	α-Glucosidasa (de llevat del pa)			α-Glucosidasa (d'arròs)			GCS
	% Inhibició (800 µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	$K_i$ (µM)	% Inhibició (800 µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	$K_i$ (µM)	% Inhibició (250 µM)
<b>24a</b>	80	2.6	2.1 <sup>[a]</sup>	0	ND		53
<b>24b</b>	92	7.0	1.9 <sup>[a]</sup>	20	ND		67
<b>24c</b>	86	26.9		7	ND		5
<b>24e</b>	37	ND		58	773		0
<b>25a</b>	51	962		0	ND		0
<b>25b</b>	68	383		19	ND		0
<b>25c</b>	44	ND <sup>[b]</sup>		12	ND		3
<b>25e</b>	2	ND		73	166		0
<b>26a</b>	17	ND		58	ND		0
<b>26b</b>	8	ND		61	ND		52
<b>26c</b>	0	ND		28	ND		2
<b>26e</b>	15	ND		96	21	25.6 <sup>[a]</sup>	0
<b>27a</b>	11	ND		8	ND		9
<b>27b</b>	24	ND		14	ND		1
<b>27c</b>	1	ND		5	ND		6
<b>27e</b>	12	ND		68	167		0

[a] Tipus d'inhibició: competitiu. [b] ND: no determinat.

Com es pot observar a la Taula 4.3, els compostos **24a-c** van presentar una inhibició destacable de l' $\alpha$ -glucosidasa de llevat del pa ( $IC_{50}$ =2.6-26.9  $\mu$ M) i els aminociclitols **25a** i **25b** van provocar una moderada inhibició del mateix enzim ( $IC_{50}$ =962  $\mu$ M i 383  $\mu$ M, respectivament). Es va determinar el tipus d'inhibició per als més actius i es van comportar com a inhibidors competitius. És interessant destacar que la validamina (Figura 4.1), un anàleg dels compostos **24a-c**, és un inhibidor de l' $\alpha$ -glucosidasa de llevat del pa ( $IC_{50}$ =580  $\mu$ M).<sup>182,203</sup>

Les amines lliures (**24e-27e**) van presentar una moderada inhibició de l' $\alpha$ -glucosidasa d'arròs ( $IC_{50}$ =21-773  $\mu$ M) i, per tant, la presència de cadenes lipòfiles en l'inhibidor no és favorable per a l'activitat inhibidora d'aquest enzim. En aquest cas, l'amina **26e** es comporta com a inhibidor competitiu de l' $\alpha$ -glucosidasa d'arròs amb una  $K_i$  de 25.6  $\mu$ M.

Per últim, cal mencionar que cap d'aquests aminociclitols van presentar una inhibició destacable de l' $\alpha$ -galactosidasa de gra de cafè verd ni de la GCS.



## *5. Amino- i diaminociclitols com a xaperones farmacològiques de la GCase*

---

5.1 Introducció i objectius

5.2 Síntesi dels amino- i 1,2-diaminociclitols

5.2.1 Síntesi dels aminociclitols **28-36**

5.2.2 Síntesi dels ciclitols **37-42**

5.3 Assaigs biològics dels compostos **28-42**

5.3.1 Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos **28-42**

5.3.2 Inhibició de la GCase pels compostos **28-40** i A-C9 en fibroblasts wt d'humans

5.3.3 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa en presència dels compostos **28-40**, A-C9 i NN-DNJ

5.3.4 Estudi de l'activitat xaperona dels ciclitols en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P



*Myo*-inosamine derivatives have been found to be potent inhibitors of glucocerebrosidase (GCCase), the  $\beta$ -glucosidase enzyme deficient in Gaucher disease. When tested using lymphoblasts derived from patients with Gaucher disease homozygous for N370S or L444P mutations, the compounds enhanced GCCase activity at very low concentrations. The most potent inhibitor, (1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-(nonylamino)-6-(nonyloxy)cyclohexane-1,2,3,4-tetraol had a  $K_i$  of 1 nM on recombinant enzyme and an  $IC_{50}$  of 4.3 nM when assayed in human fibroblast cell culture. This aminocyclitol

produced maximum increases of GCCase activities of 90% in N370S lymphoblasts at 1 nM and 40% in L444P at 0.01 nM following a 3-day incubation. In addition to inhibitory potency, this compound has the permeability, subcellular distribution, and cell metabolism characteristics that are important for use as a pharmacological chaperone. It is a remarkable finding that picomolar concentrations of aminocyclitols are sufficient to enhance activity in the L444P variant, which produces a severe neuronopathic form of Gaucher disease without clinical treatment.



## 5.1 Introducció i objectius

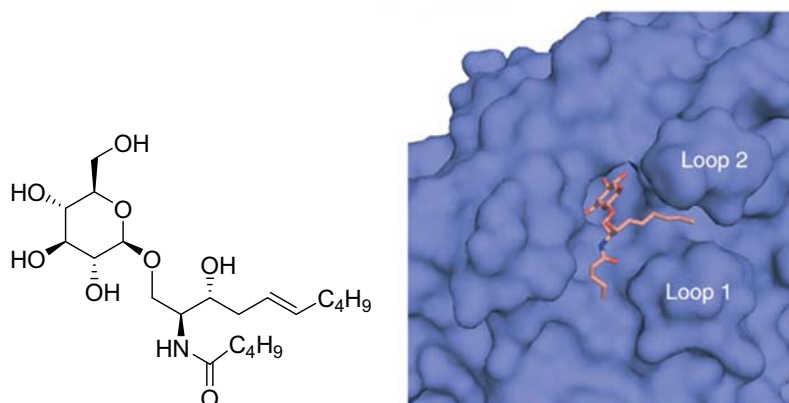
Com s'ha comentat en el capítol anterior, el nostre grup de recerca ha descrit una sèrie d'aminociclitols de tipus inosamina com a inhibidors selectius de la GCCase<sup>130-132</sup> i alguns d'ells amb potencial aplicabilitat com a xaperones farmacològiques.<sup>130,133</sup> En estudis anteriors es va trobar que dins de les dues sèries diastereomèriques (veure Figura 5.1), només els compostos de la sèrie C1 van presentar una significant inhibició de la imiglycerasa.

Sèrie C1		Sèrie C2	
R=H	5% <sup>[a]</sup>	R=H	10% <sup>[a]</sup>
R=C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	99.4	R=C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	9% <sup>[a]</sup>
R=C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Ph	76.8	R=C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Ph	33% <sup>[a]</sup>
R=C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	15.7	R=C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	503
R=C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> (A-C9)	3.9		
R=C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	1.8		
R=C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> Ph	27.6		

**Figura 5.1.** Inhibició (en cursiva, valors de IC<sub>50</sub>/μM) de la imiglycerasa per alguns aminociclitols de tipus inosamina descrits.<sup>130,131</sup> [a]: % Inhibició a 1 mM.

Dins de la sèrie C1, un dels millors inhibidors de la GCCase recombinant (imiglycerasa) i que presenta baixa citotoxicitat és l'*scyllo*-inosamina A-C9 (Figura 5.1). Aquest aminociclitol és un inhibidor de tipus competitiu ( $K_i=1.9 \mu\text{M}$ ) i té un efecte protector sobre la imiglycerasa en presència de condicions desnaturalitzants en el medi d'incubació.<sup>130</sup> Malauradament, aquest compost no va augmentar l'activitat de la GCCase en fibroblasts de malalts de Gaucher i tampoc en cultius de cèl·lules COS i, per tant, no actua com a xaperona farmacològica.<sup>133</sup> D'altra banda, l'estructura cristal·lina de la GCCase resolta per difracció de raigs X indica l'existència de dos butxaques hidrofòbiques<sup>39</sup> i, mitjançant estudis de *docking* d'un anàleg de la GlcCer, han observat que cadascuna de les dues cadenes d'aquest compost ocupen una butxaca hidrofòbica del centre actiu de l'enzim (Figura 5.2).<sup>123</sup>

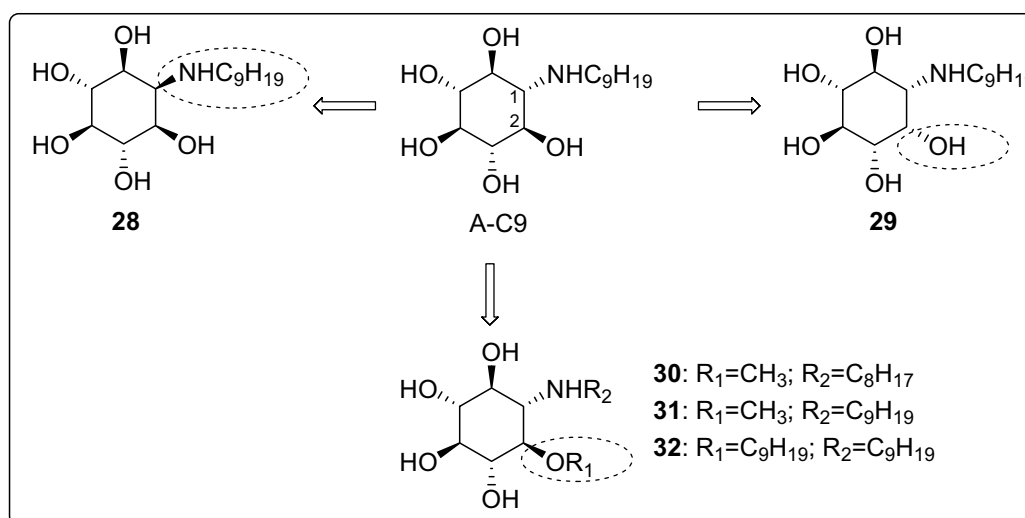




**Figura 5.2.** Cadascuna de les dues cadenes d'un anàleg de la GlcCer ocupen una butxaca hidrofòbica del centre actiu de la GCCase. Figura extreta d'un article de Lieberman i col·laboradors.<sup>123</sup>

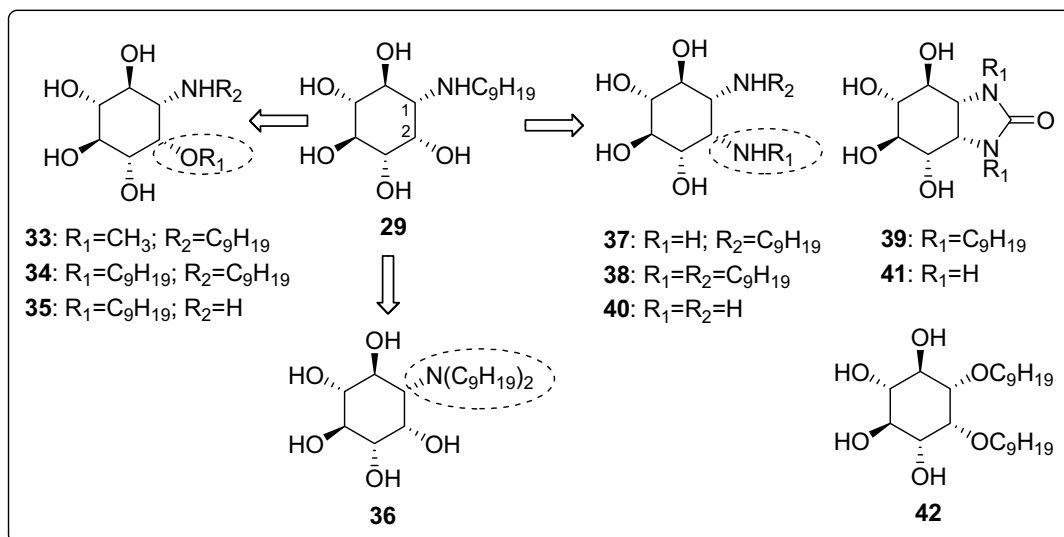
Tenint en compte aquests precedents, va semblar interessant sintetitzar una sèrie d'anàlegs de l'A-C9 (veure Figura 5.3) amb els següents objectius:

- Estudiar la importància que té la configuració dels centres C1 i C2 en la inhibició de la GCCase pels aminociclitols. Amb aquesta finalitat es van preparar els *N*-nonil aminociclitols **28** i **29**.
- Sintetitzar i estudiar l'activitat inhibidora d'una sèrie d'anàlegs amb dues cadenes alquílques en els grups amino i hidroxil de les posicions C1 i C2, respectivament, per tal de mimetitzar les dues cadenes presents en la GlcCer i ocupar les dues butxaques hidrofòbiques del centre actiu de la GCCase. D'acord amb això, es van sintetitzar els compostos **30-32**.



**Figura 5.3.** Estructura dels aminociclitols **28-32** i A-C9.

Un cop obtinguts aquests compostos, es van estudiar les seves activitats com a inhibidors de la imiglucerasa i, com es veurà al final d'aquest capítol, els aminociclitols **29** i **32** van resultar ser millors inhibidors d'aquest enzim que l'aminociclitol A-C9. D'acord amb aquests resultats, es van sintetitzar unes sèries d'aminociclitols (**33-36**) i 1,2-diaminociclitols (**37-38**), les quals mantenen la configuració dels centres C1 i C2 (configuració *myo*) que el compost **29** (veure Figura 5.4).

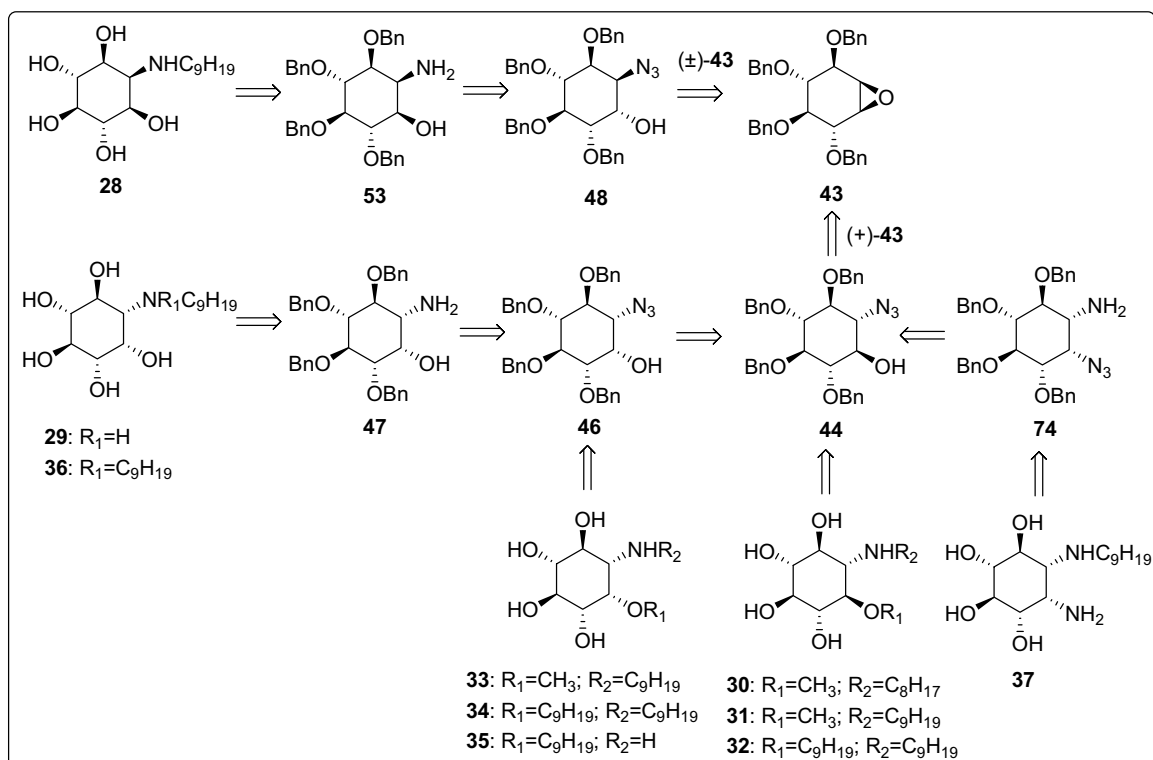


**Figura 5.4.** Estructura dels compostos **29**, **33-41** i **42**.

D'altra banda, un precursor de la imidazolidinona **39** es va obtenir com a subproducte en la síntesi del diaminociclitol **38** i, aprofitant alguns dels intermedis de la seva síntesi, es van preparar la diamina lliure **40**, la imidazolidinona **41** i el ciclitol **42** (veure Figura 5.4).

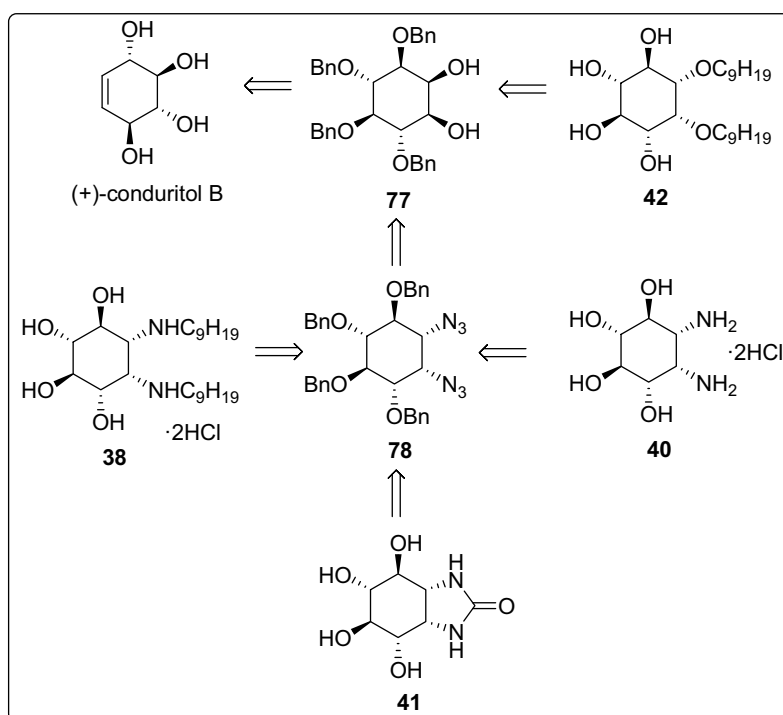
## 5.2 Síntesi dels amino- i 1,2-diaminociclitols

El nostre grup de recerca ha descrit una sèrie de metodologies per a la síntesi d'aminociclitols i 1,2-diaminociclitols,<sup>166,191,199</sup> basades en l'obertura regioselectiva de derivats de l'epòxid de conduritol B (tri- i tetra-*O*-benzilats). La preparació dels nous aminociclitols i l'1,2-diaminociclitol **37** es va plantejar a partir d'alguns productes prèviament descrits i que ja s'havien utilitzat com a intermedis sintètics en la preparació de les primeres generacions d'aminociclitols. La ruta sintètica proposada per a l'obtenció dels aminociclitols **28-36** i el diaminociclitol **37**, tal i com es representa a la Figura 5.5, parteix de l'epòxid de tetra-*O*-benzilconduritol B (**43**).



**Figura 5.5.** Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció dels compostos **28-37**.

D'altra banda, la ruta sintètica proposada per a la síntesi dels diaminociclitols **38** i **40**, la imidazolidinona **41** i el ciclitol **42**, tal i com es representa a la Figura 5.6, parteix del (+)-conduiritol B.

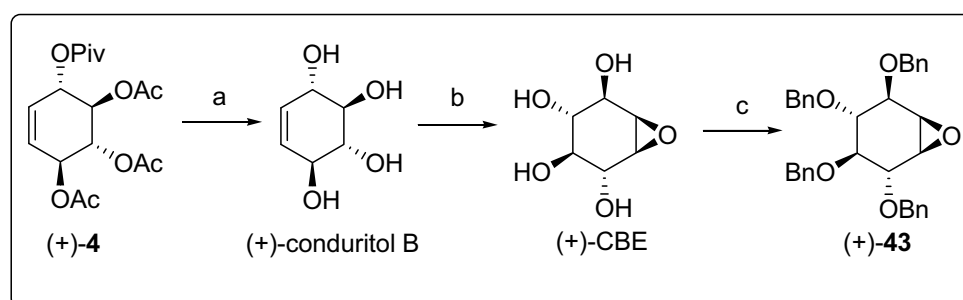


**Figura 5.6.** Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció dels compostos **38**, **40-41** i **42**.

### 5.2.1 Síntesi dels aminociclitols 28-36.

#### Síntesi de l'epòxid 43 a partir del pivalat (+)-4

Per a obtenir l'epòxid de tetra-*O*-benzilconduritol B (**43**) a partir del pivalat (+)-**4** van ser necessàries tres etapes, tal i com es representa a la Figura 5.7. Aquest és un procediment consolidat en el nostre grup de recerca i s'ha fet a gran escala.<sup>166</sup> La desprotecció de tots els grups èster del pivalat (+)-**4** i la posterior epoxidació amb MCPBA donà el CBE. En la darrera etapa es van protegir els grups hidroxil del CBE en forma d'èter benzílic i es va obtenir l'epòxid (+)-**43**.



a) NaOCH<sub>3</sub>, MeOH, t.a., 18 h, 99%; b) MCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 18 h, 84%; c) BnBr, NaH, DMF, 30 °C, 18 h, 72%.

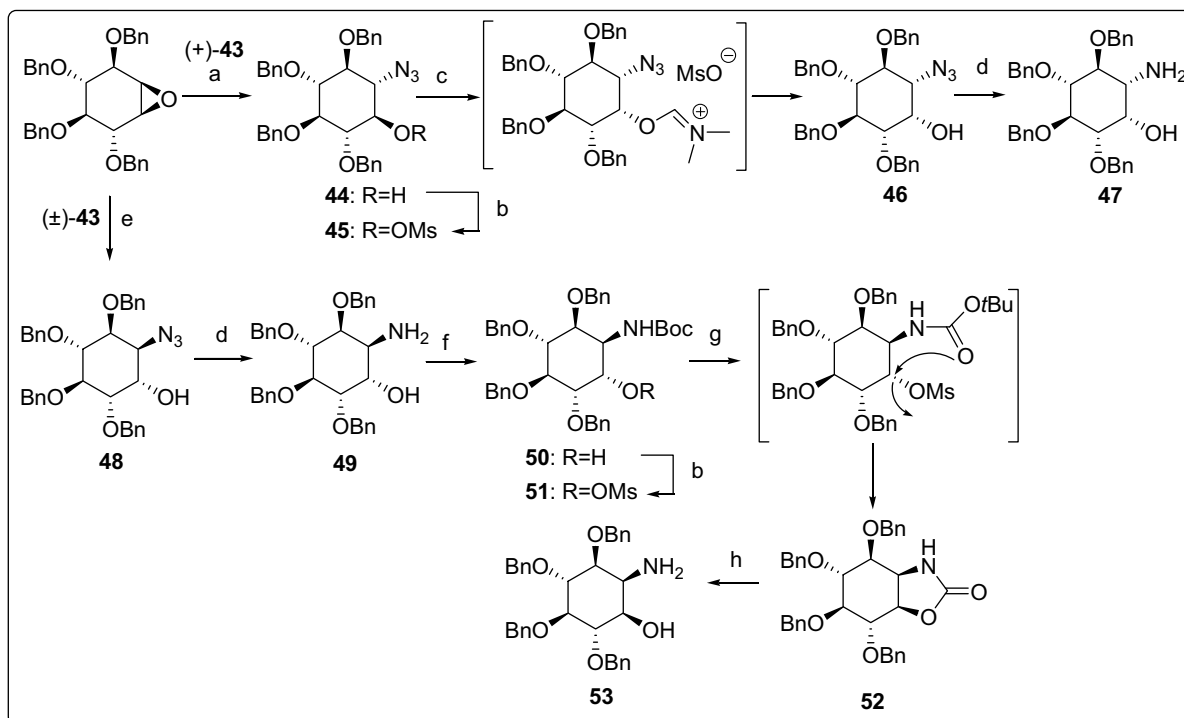
Figura 5.7. Síntesi de l'epòxid **43** a partir del pivalat (+)-**4**.<sup>166</sup>

#### Síntesi dels azidoalcohols **44**, **46**, **48** i els aminoalcohols **47**, **49**, **53** a partir de l'epòxid **43**

A partir de l'epòxid **43** es van sintetitzar els azidoalcohols **44**, **46**, **48** i els aminoalcohols **47**, **49** i **53**. A la Figura 5.8 es mostra un resum de les rutes sintètiques desenvolupades en el nostre grup de recerca i que s'han utilitzat per a la síntesi d'aquests intermedis.<sup>166,191,199</sup> Cal mencionar que l'aminociclitol aquiral **28** és l'únic compost que es va sintetitzar a partir de l'epòxid de conduiritol B en forma racèmica.

Per a la preparació de l'azidoalcohol **46** i l'aminoalcohol **47**, es va dur a terme l'obertura regio- i estereoselectiva de l'epòxid (+)-**43** amb azida sòdica i en condicions quelants, obtenint-se majoritàriament l'azidoalcohol **44**. Sorprenentment, tot i que aquesta reacció s'ha fet en múltiples ocasions durant aquesta tesi, en cap ocasió s'ha obtingut una total regioselectivitat en la reacció d'obertura amb NaN<sub>3</sub>, en desacord amb la descripció feta a la literatura pel mateix epòxid i, aparentment, idèntiques condicions de reacció.<sup>191</sup> Les raons

d'aquesta discrepància no s'han pogut determinar. Per tal d'invertir la configuració del carboni que suporta el grup hidroxil del compost **44**, es va dur a terme la protecció d'aquest grup amb clorur de mesil en presència de Et<sub>3</sub>N. A continuació, es va dissoldre el mesilat resultant en DMF i en presència d'un 2% d'aigua i es va escalfar en un tub tancat a 140 °C durant 4 dies i s'obtingué l'azidoalcohol **46**.<sup>166</sup> Per últim, la reducció de l'azida **46** amb LiAlH<sub>4</sub> va permetre obtenir l'aminoalcohol **47** (veure Figura 5.8).



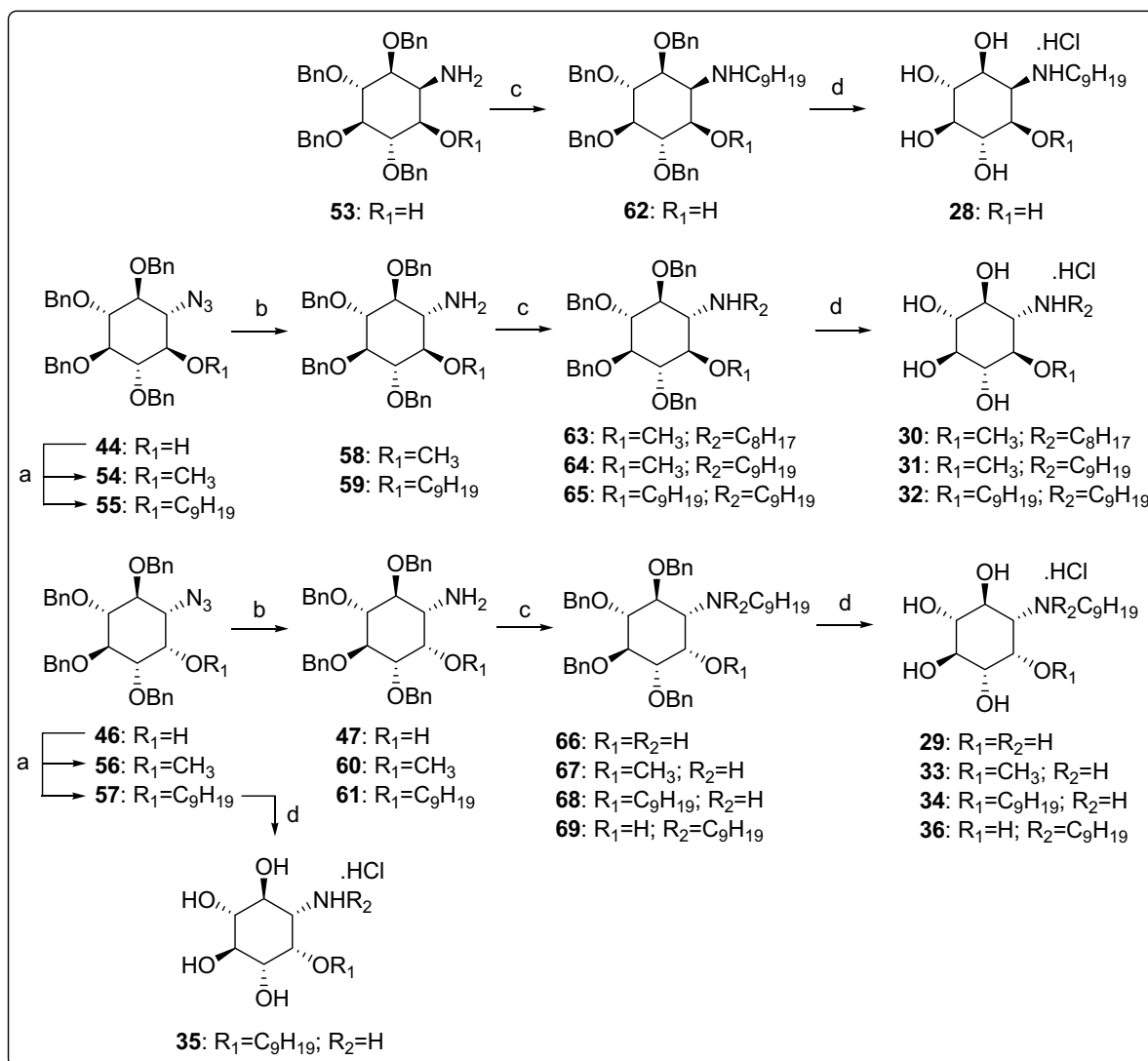
a) NaN<sub>3</sub>, LiClO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 80 °C, 18 h, 69%; b) MsCl, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 °C fins a t.a., 4 h (**51**) i 16 h (**45**), 88%; c) DMF (2% H<sub>2</sub>O), 140 °C, 100 h, 59%; d) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 0 °C fins a t.a., 2 h-3 h, 72-81%; e) NaN<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, MeOH:H<sub>2</sub>O (8:1), 100 °C, 48 h, 74%; f) Boc<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C fins a t.a., 18 h, 93%; g) DMF, 110 °C, 16 h, 63%; h) NaOH, EtOH, 80 °C, 16 h, 94%.

**Figura 5.8.** Síntesi dels azidoalcohols **44**, **46**, **48** i els aminoalcohols **47**, **49** i **53** a partir de l'epòxid **43**.

D'altra banda, la síntesi de l'aminoalcohol **53**, es va dur a terme per obertura regioselectiva de l'epòxid (±)-**43** amb azida sòdica i en condicions àcides, obtenint-se l'azidoalcohol **48** (obertura *trans*-diaxial de l'epòxid **43**). Un cop reduït el grup azido a amino, es van protegir els grups amino i hidroxil de l'aminoalcohol **49** i s'obtingué l'*N*-Boc mesilat **51** amb un bon rendiment. L'aminoalcohol **53** es va obtenir després del tractament en medi bàsic de l'oxazolidinona **52**, la qual s'obtingué per ciclació intramolecular de l'*N*-Boc mesilat **51** (Figura 5.8).

### Síntesi dels aminociclitols 28-36 a partir dels azidoalcohols 44 i 46 i els aminoalcohols 47 i 53.

Els aminociclitols **28**, **29** i **36** es van obtenir després d'una aminació reductora dels aminoalcohols **47** i **53** amb l'aldehid nonanal i la posterior desprotecció dels grups benzil per hidrogenòlisi (Figura 5.9). En l'aminació reductora per a la síntesi de l'*N,N*-dinonil aminociclitol **36**, es va utilitzar un excés de nonanal i de cianoborohidruir de sodi.



a) NaH, C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>I o CH<sub>3</sub>I, DMF, 0 °C, 45 min 71-93%; b) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 0 °C fins a t.a., 3 h, 72-95%; c) C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>CHO o C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>CHO (**63**), NaBH<sub>3</sub>CN, AcOH cat., MeOH, t.a., 4 h, 73-90%; d) Pd/C, THF, HCl, H<sub>2</sub> (2 atm), t.a., 24 h, 86-94%.

**Figura 5.9.** Síntesi dels aminociclitols **28-36**.

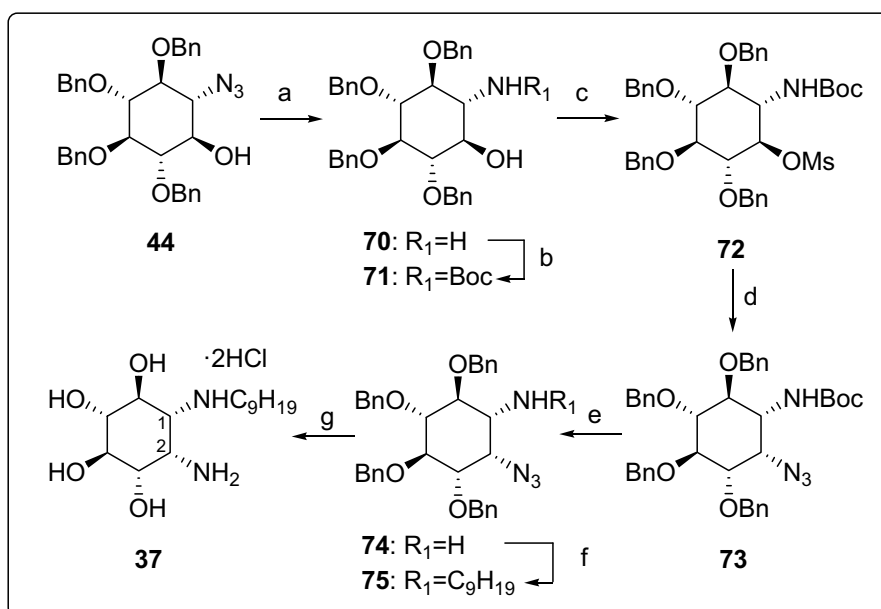
Els *O*-alquil aminociclitols **30-32** es van preparar a partir de l'azidoalcohol **44**. En primer lloc, la formació de l'alcòxid sòdic per reacció del grup hidroxil lliure amb NaH seguida de

l'alquilació amb iodur de metil o nonil donà les alcoziazides **54** i **55**, que es van reduir a les corresponents amines amb  $\text{LiAlH}_4$ . A continuació, l'aminació reductora de les amines primàries resultants amb l'aldehid corresponent i la posterior desprotecció dels grups *O*-benzil per hidrogenòlisi, va permetre obtenir els aminociclitols **30-32** amb bons rendiments (Figura 5.9). Els *O*-alquil aminociclitols **33** i **34** es van sintetitzar seguint la mateixa ruta sintètica a partir de l'azidoalcohol **46**.

D'altra banda, l'*O*-nonil aminociclitol **35** es va obtenir a partir de l'azida **57** després de reduir el grup azido a amino i la posterior desprotecció dels grups *O*-benzil per hidrogenòlisi (Figura 5.9).

### 5.2.2 Síntesi dels ciclitols 37-42

El diaminociclitol **37** amb l'amina en la posició C2 lliure i l'altra amina, en la posició C1, substituïda amb una cadena alquílica saturada de 9 àtoms de carboni, s'obtingué per hidrogenòlisi de l'azidoamina **75**, la qual es va sintetitzar en 6 etapes a partir de l'azidoalcohol **44**, seguint la mateixa ruta sintètica que la descrita prèviament pel nostre grup de recerca (veure Figura 5.10).<sup>199</sup>



a)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 0 °C fins a t.a., 2 h, 91%; b)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C fins a t.a., 18 h, 82%; c)  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 0 °C fins a t.a., 5 h, 63%; d)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 90°C, 18 h, 65%; e) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C fins a t.a., 4 h, 86%; f)  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CHO}$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , AcOH (cat.), MeOH, t.a., 1 h, 75%; g) Pd/C, MeOH, HCl,  $\text{H}_2$  (2 atm), t.a., 18 h, 77%.

**Figura 5.10.** Síntesi del diaminociclitol **37**.

Un cop reduïda l'azida **44** amb  $\text{LiAlH}_4$  a amina (**70**), la protecció del grup amino en forma de carbamat amb dicarbonat de di-*tert*-butil i la posterior mesilació de l'hidroxil lliure del compost **71** donà el mesilat **72**. A partir d'aquest intermedi, després de la reacció de substitució nucleòfila del grup mesil per azida i la posterior desprotecció del grup Boc amb TFA, es va obtenir l'azidoamina **74**.

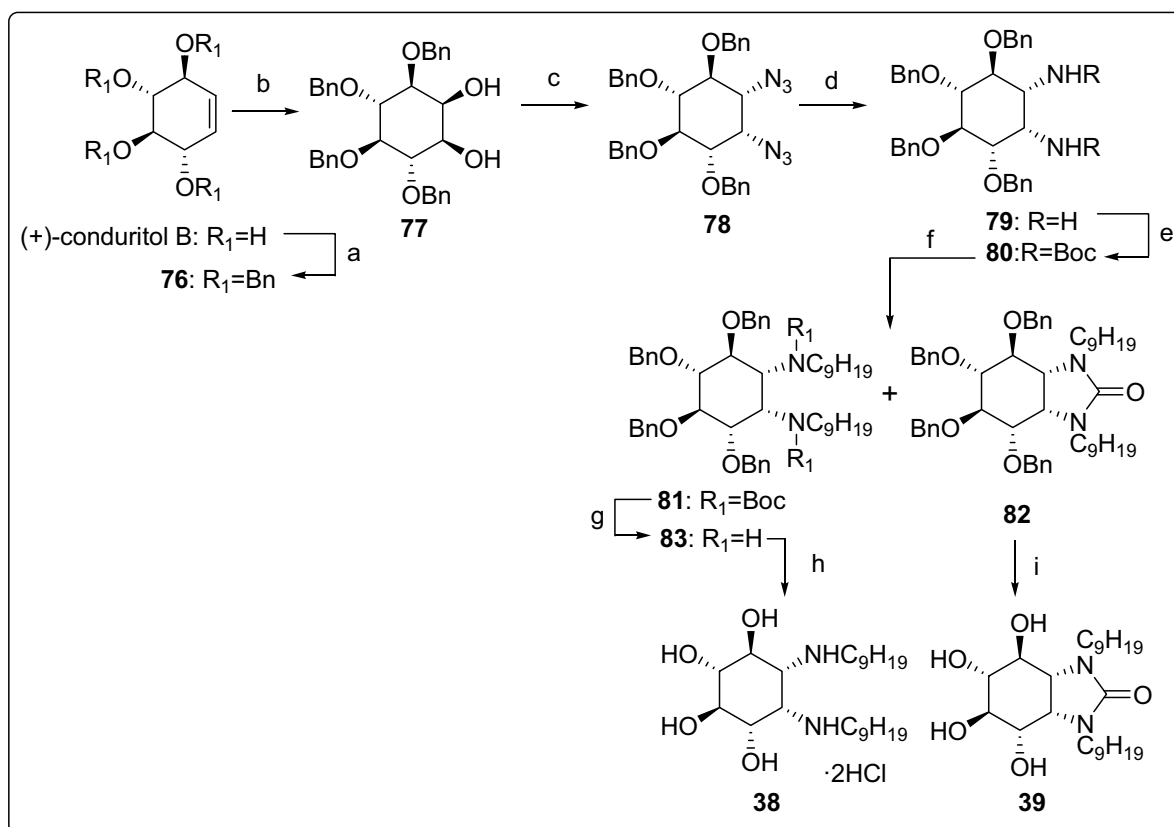
La diamina **37** es va preparar a partir de **74** en dues etapes: 1) aminació reductora de l'intermedi **74** amb nonanal i 2) desprotecció dels grups *O*-benzil i reducció del grup azido a amino per hidrogenació catalítica amb Pd/C (Figura 5.10).

D'altra banda, la síntesi de la diamina **38** amb les dues amines substituïdes amb una cadena alifàtica de 9 àtoms de carboni es va acomplir per alquilació del dicarbamat **80** amb iodur de nonil en presència d'hidrur de sodi. El dicarbamat **80** es va preparar a partir del (+)-conduiritol B, tal i com es representa a la Figura 5.11. La protecció dels grups hidroxil del conduiritol B en forma d'èter benzílic i la posterior *cis*-dihidroxiació del ciclohexè **76** amb quantitats catalítiques de  $\text{OsO}_4$  i amb *N*-òxid de 4-metilmorfolina (NMO) va conduir únicament a l'obtenció del diol **77**.<sup>204</sup> A partir d'aquest intermedi, segons la metodologia descrita a la bibliografia,<sup>205</sup> es va obtenir la diazida **78** després de la protecció dels grups hidroxil en forma de mesil i la substitució nucleòfila d'aquests grups per azides (veure Figura 5.11).

Es va intentar l'obtenció del dicarbamat **80** a partir de la diazida **78** segons descriu Azev i col·laboradors<sup>206</sup> per hidrogenació catalítica amb Pd/ $\text{CaCO}_3$  i en presència de dicarbonat de di-*tert*-butil, però es va obtenir una mescla complexa formada per intermedis de la reacció (azidoamina, *N*-Boc azida, *N*-Boc amina....), segurament degut a l'enverinament del catalitzador i, encara que es va renovar el catalitzador, no es va observar un avenç en la reacció. Afortunadament, la reducció de la diazida **78** amb  $\text{LiAlH}_4$  donà la diamina **79**, que va permetre preparar el dicarbamat **80** (Figura 5.11).

L'alquilació del dicarbamat **80** va resultar difícil, segurament degut al seu impediment estèric, i va ser necessari escalfar la reacció a 80 °C durant 4 dies per tal d'observar la desaparició de tot el material de partida. Però s'obtingueren dos productes, un 21% del producte esperat **81** juntament amb un 24% de la imidazolidinona **82**.





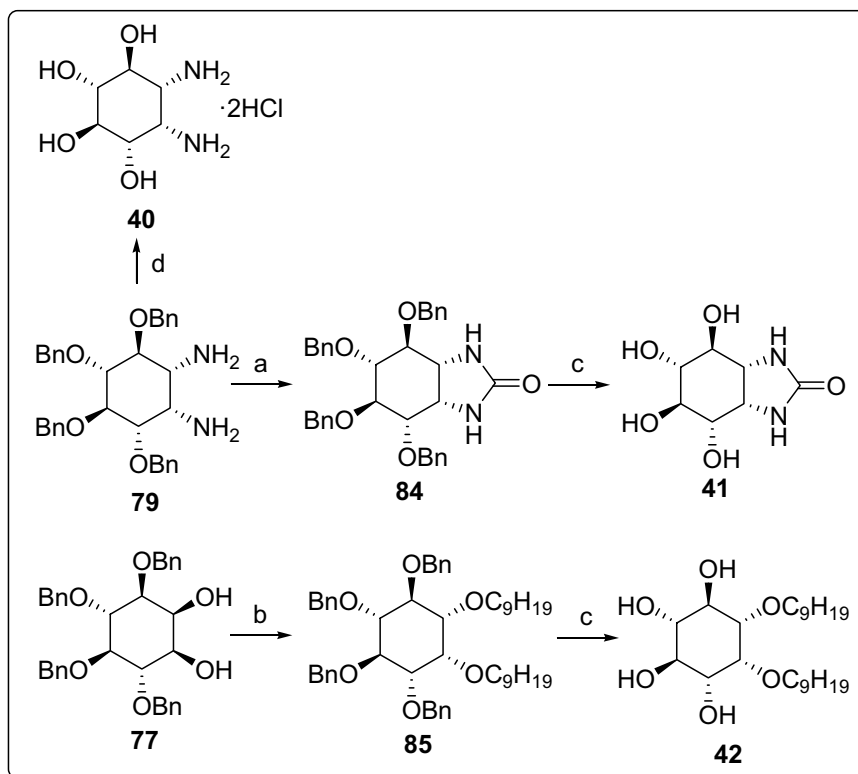
a) NaH, BnBr, DMF, 30 °C, 16 h, 75%; b) OsO<sub>4</sub>, acetona-H<sub>2</sub>O, NMO, t.a., 18 h, 83%; c) 1. MsCl, piridina, 0 °C fins a t.a., 16 h; 2. NaN<sub>3</sub>, DMF, 85 °C, 12 h, 77%; d) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 0 °C fins a t.a., 3 h, 93%; e) Boc<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C fins a t.a., 18 h, 53%; f) NaH, C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>I, DMF, 80 °C, 4 dies, 21% (**81**), 24% (**82**); g) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C fins a t.a., 4 h, 86%; h) Pd/C, MeOH, HCl, H<sub>2</sub> (2 atm), t.a., 18 h, 85%; i) Pd/C, MeOH, H<sub>2</sub> (2 atm), t.a., 18 h, 93%.

**Figura 5.11.** Síntesi del diaminociclitol **38** i la imidazolidinona **39** a partir del (+)-condurotol B.

El tractament de la imidazolidinona **82** amb condicions àcides i escalfant la reacció a altes temperatures durant algunes hores o potser dies ens hauria permès obtenir més quantitat de la diamina **83**. Però tenint en compte que només es van aïllar 50 mg de la imidazolidinona, es va decidir dur a terme la desprotecció dels grups *O*-benzil per hidrogenòlisi i estudiar l'activitat de la imidazolidinona resultant (**39**). Així mateix, un cop desprotegits els grups Boc de la diamina **81** amb TFA i els grups *O*-benzil per hidrogenòlisi es va obtenir el diaminociclitol **38** (Figura 5.11). Val a dir que la diamina **38** es podria haver obtingut a partir de l'intermedi **73** (veure Figura 5.10), però aquesta aproximació requeria un major esforç sintètic i es va desestimar.

A partir del diol **77** i la diamina **79** obtinguts en la ruta sintètica anterior, es van sintetitzar també els compostos **40-42** (Figura 5.12). Per una banda, el tractament de la diamina **79** amb BCl<sub>3</sub> va conduir a l'1,2-didesoxi-1,2-diamino-*myo*-inositol **40**. Per altra banda, la reacció de

la diamina **79** amb *N,N'*-carbonildiimidazole i la posterior desprotecció dels grups *O*-benzil per hidrogenació catalítica donà la imidazolidinona **41**. Finalment, el ciclitol **42** es va obtenir després de l'alquilació del diol **77** amb iodur de nonil seguida de la desprotecció dels grups *O*-benzil.



a) *N,N'*-carbonildiimidazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 2 h, 83%; b) NaH, C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>I, DMF, 0 °C, 3 h, 78%; c) Pd/C, MeOH, H<sub>2</sub> (2 atm), t.a., 18 h, 88-89%; d) BCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C fins a t.a., 18 h, 87%.

**Figura 5.12.** Síntesi dels compostos **40-42** a partir del diol **77** i la diamina **79**.

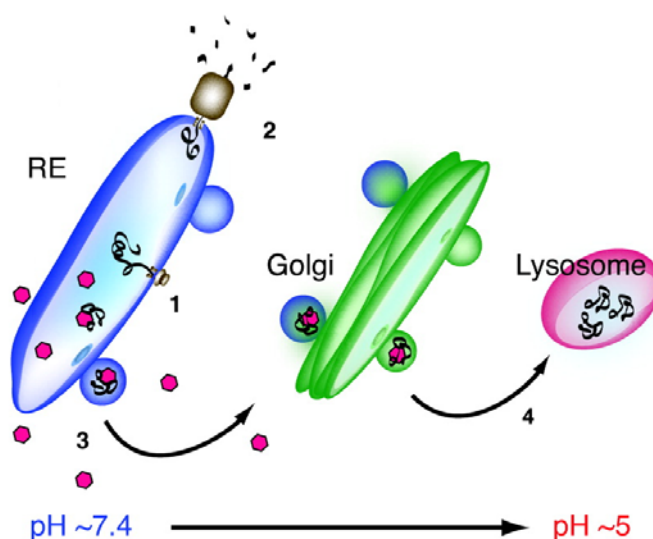
## 5.3 Assaigs biològics dels compostos 28-42

### 5.3.1 Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos 28-42

#### Inhibició de la GCCase recombinant (imiglucerasa)

Els compostos **28-42** van ser estudiats com a inhibidors de la GCCase recombinant (imiglucerasa, Cerezyme<sup>®</sup>). Per una banda, es van determinar a pH 5.2 la IC<sub>50</sub> de tots els compostos i la constant d'inhibició (*K<sub>i</sub>*), així com el tipus d'inhibició per als més actius.

D'altra banda, com s'ha comentat en la Introducció general d'aquesta memòria, un factor a tenir en compte per al disseny de xaperones farmacològiques és que l'inhibidor s'ha d'unir millor a l'enzim a pH neutre (condicions del reticle endoplasmàtic), que al pH àcid que hi ha en els lisosomes (veure Figura 5.13). D'aquesta forma, mesurant l'activitat a pH neutre podem veure si els inhibidors tenen una major afinitat per l'enzim en les condicions en les que s'uneixen a aquest en el reticle endoplasmàtic per tal de facilitar el seu correcte plegament, que al pH àcid del lisosoma on l'inhibidor, que es troba a concentracions subinhibitòries, es separa de l'enzim per l'efecte del substrat i, per tant, hauria de presentar una menor afinitat per l'enzim. Per aquest motiu, també es van determinar els valors de  $IC_{50}$  a pH 7.0 per a tots els compostos, excepte per a la imidazolidinona **41**, i es va incloure l'aminociclitol A-C9.



**Figura 5.13.** Mecanisme proposat per a una xaperona farmacològica. La presència de mutacions en el gen precursor de l'enzim provoca un plegament incorrecte de la proteïna (1). Les xaperones farmacològiques (hexàgons de color rosa) s'uneixen en el reticle endoplasmàtic (RE), on hi ha un pH neutre, a l'enzim mutant i eviten que sigui degradat pels proteasomes (2). Les xaperones farmacològiques formen un complex amb l'enzim mutant que l'estabilitza, facilita el seu correcte plegament (3) i posterior transport al lisosoma (4). La GCCase que no és estable en el pH neutre del reticle endoplasmàtic, és estable i actiu enzimàticament en el pH àcid que hi ha en els lisosomes. Figura extreta d'un article de Sawkar i col·laboradors.<sup>207</sup>

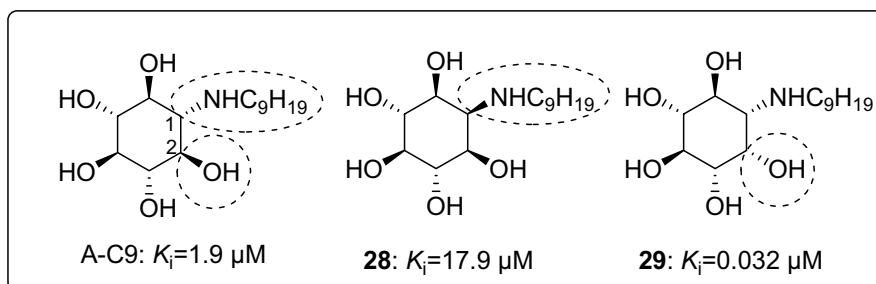
A la Taula 5.1 es recull un resum de les activitats obtingudes amb aquestes sèries de compostos.

**Taula 5.1.** Inhibició de la imiglycerasa pels compostos **28-42** i A-C9.

Compost	IC <sub>50</sub> (μM)		K <sub>i</sub> <sup>[a]</sup> (μM)
	pH 7.0	pH 5.2	
A-C9	0.78	3.9 <sup>[b]</sup>	1.9 <sup>[b]</sup>
<b>28</b>	24.9	52.6	17.9
<b>29</b>	0.025	0.08	0.032
<b>30</b>	1.39	9.7	3.46
<b>31</b>	0.67	4.4	1.58
<b>32</b>	0.17	0.67	0.28
<b>33</b>	0.019	0.13	0.053
<b>34</b>	0.005	0.004	0.001
<b>35</b>	0.12	0.45	0.13
<b>36</b>	0.53	1.72	0.82
<b>37</b>	0.081	0.64	0.17
<b>38</b>	0.056	0.09	0.026
<b>39</b>	1.21	1.61	0.70
<b>40</b>	44.4	53.4	ND <sup>[c]</sup>
<b>41</b>	ND	54% <sup>[d]</sup>	ND
<b>42</b>	49.3	144	ND

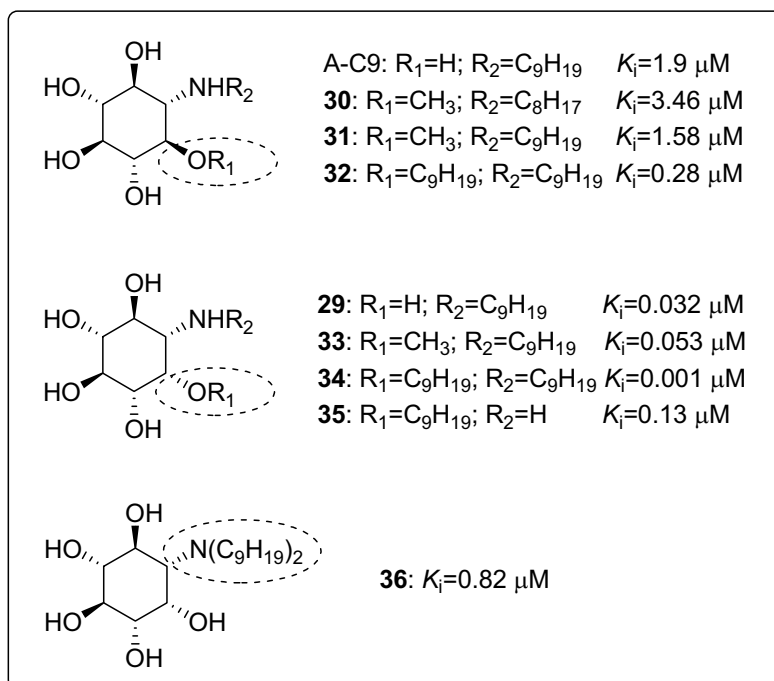
[a] Tipus d'inhibició: competitiva. [b] Ref.<sup>130</sup> [c] ND: no determinat. [d] % Inhibició a 1 mM.

Si comparem les activitats obtingudes pels *N*-nonil aminociclitols A-C9, **28** i **29**, es pot veure clarament la importància que té la configuració dels centres C1 i C2 en la inhibició de la GCase recombinant (veure Figura 5.14). Per als *N*-nonil aminociclitols A-C9 i **28** es van obtenir unes constants d'inhibició d'1.9 i 17.9 μM, respectivament. Sorprenentment, l'*N*-nonil aminociclitol **29** (configuració *myo*) va resultar ser 60 i 562 vegades més potent que els compostos A-C9 (configuració *scyllo*) i **28** (configuració *myo*), respectivament.



**Figura 5.14.** Estructures dels *N*-nonil aminociclitols A-C9, **28-29** i valors de la  $K_i$  (imiglycerasa) obtinguts.

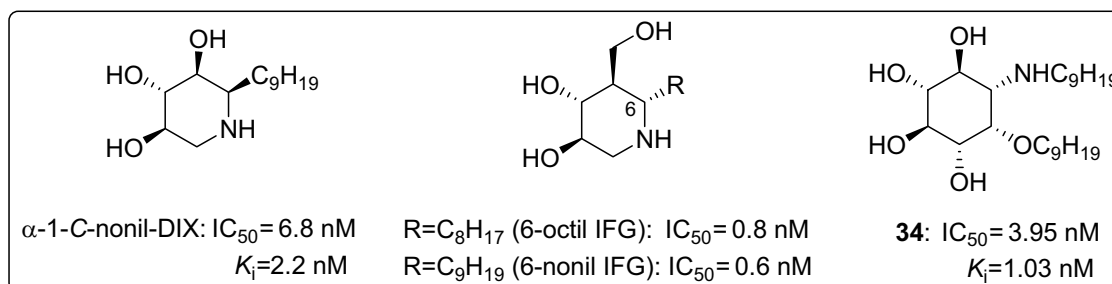
Així mateix, l'aminociclitol *N,N*-disubstituint **36** va ser menys actiu que l'*N*-nonil aminociclitol **29** (veure Figura 5.15). Cal esmentar que això ja s'havia observat prèviament en el nostre grup de recerca en una altra família d'aminociclitols.<sup>130</sup>



**Figura 5.15.** Estructures dels aminociclitols **29-36** i A-C9 i valors de la  $K_i$  (imiglucerasa) obtinguts.

Els valors de la  $K_i$  obtinguts per als *O*-metil aminociclitols **30**, **31** i **33** van ser del mateix ordre o fins i tot una mica més alts que els obtinguts per als corresponents aminociclitols amb tots els grups hidroxil lliures (A-C9 i **29**). En canvi, augmentant la llargària de la cadena *O*-alquíllica (*N,O*-dionil aminociclitols **32** i **34**) suposà un augment dràstic de la potència inhibidora de la imiglucerasa.

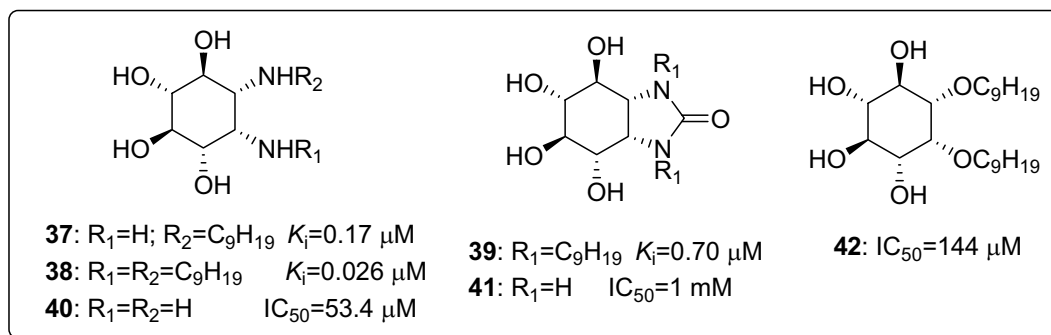
Cal mencionar que l'*N,O*-dionil aminociclitol **34**, amb una  $K_i$  d'1 nM, es troba entre els millors inhibidors de la GCCase descrits fins al moment (veure Figura 5.16).



**Figura 5.16.** Estructures i valors de la  $K_i$  o IC<sub>50</sub> (GCCase recombinant) per als millors inhibidors d'aquest enzim descrits fins al moment i l'*N,O*-dionil aminociclitol **34**.

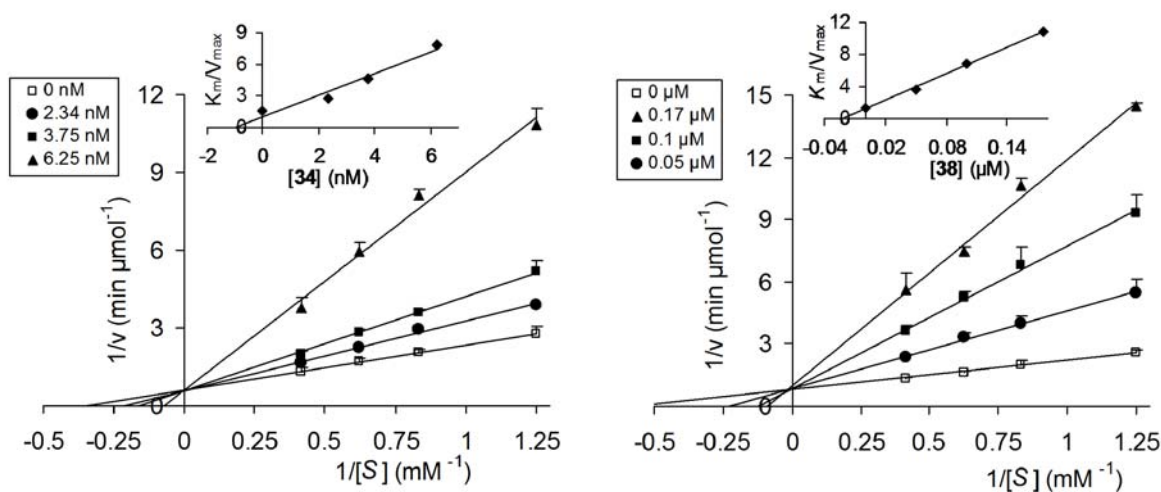
D'altra banda, l'*O*-nonil aminociclitol **35** amb l'amina lliure va ser menys actiu que l'*N,O*-dionil aminociclitol **34** i l'*N*-nonil aminociclitol **29**, per tant, la presència de la cadena *N*-alquíllica és favorable per a la inhibició de la imiglucerasa (veure Figura 5.15).

Per a l'1,2-didesoxi-1,2-diamino-*myo*-inositol **40**, es va obtenir una  $IC_{50}$  de 53.4  $\mu$ M a pH 5.2. Com era d'esperar, les *N*-alquil diamines **37** i **38** van ser més efectives com a inhibidors de la imiglucerasa. Per contra, la imidazolidinona **39** va ser menys activa que les anteriors *N*-alquil diamines, si bé es va determinar una  $K_i$  submicromolar en la inhibició de la imiglucerasa. Finalment, la imidazolidinona bicíclica **41** i l'1,2-di-*O*-nonil-*myo*-inositol **42** van presentar una potència molt inferior (veure Figura 5.17).



**Figura 5.17.** Estructures dels ciclitols **37-42** i valors de  $K_i$  o  $IC_{50}$  (imiglucerasa) obtinguts.

Els compostos **28-39** van presentar un tipus d'inhibició competitiu, tal i com es pot veure a la Figura 5.18 per a l'*N,O*-dionil aminociclitol **34** i el diaminociclitol **38**.



**Figura 5.18.** Inhibició de la imiglucerasa per l'*N,O*-dionil aminociclitol **34** i el diaminociclitol **38**. Representacions de Lineweaver-Burk i càlcul de la  $K_i$ .

Com es pot observar a la Taula 5.1, per a aquesta sèrie de compostos es van obtenir uns valors de IC<sub>50</sub> del mateix ordre o fins i tot inferior a pH 7.0 que a pH 5.2. Aquest fet, com s'ha comentat anteriorment, és un factor positiu a tenir en compte per a aquests compostos a l'hora de ser candidats a xaperones.

### Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos 28-42 sobre diverses glicosidases comercials i la GCS

Es va estudiar també la selectivitat que presentaven els compostos 28-42 i es van determinar les seves activitats sobre diverses glicosidases comercials i la glucosilceramida sintasa. Les activitats obtingudes amb aquests compostos sobre les  $\alpha$ -glucosidases d'arròs i de llevat del pa, la  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla, l' $\alpha$ -galactosidasa de gra de cafè verd, la  $\beta$ -galactosidasa de fetge de bou i la GCS s'indiquen a la Taula 5.2.

**Taula 5.2.** Inhibició de diverses glicosidases comercials i la GCS pels ciclitols 28-42.

Compost	$\alpha$ -Glucosidasa (de llevat del pa)	$\alpha$ -Glucosidasa (d'arròs)	$\beta$ -Glucosidasa (d'ametlla)	$\alpha$ -galactosidasa (de gra de cafè verd)	$\beta$ -galactosidasa (de fetge de bou)	GCS
	% Inhibició (100 $\mu$ M)	% Inhibició (100 $\mu$ M)	% Inhibició (100 $\mu$ M)	% Inhibició (100 $\mu$ M)	% Inhibició (100 $\mu$ M)	% Inhibició (250 $\mu$ M)
28	14	0	11	0	74	13
29	0	0	10	0	12	4
30	49 <sup>[a]</sup>	0 <sup>[a]</sup>	9 <sup>[a]</sup>	0 <sup>[b]</sup>	87	0
31	8 <sup>[a]</sup>	0 <sup>[a]</sup>	8 <sup>[a]</sup>	15 <sup>[b]</sup>	0	0
32	0	0	0	0	0	74
33	2	0	19	0	27	8
34	0	0	24	0	80	56 <sup>[c]</sup>
35	0	0	17	0	84	13
36	0	0	5	0	0	98 <sup>[c]</sup>
37	5	0	31	0	92	0
38	0	0	0	0	44	73 <sup>[c]</sup>
39	0	0	1	0	55	8
40	4	0	0	1	24	0
41	0	0	6	0	3	0
42	0	0	0	0	20	0

[a] % Inhibició a 800  $\mu$ M. [b] % Inhibició a 1.1 mM. [c] 0% d'inhibició a 50  $\mu$ M.

Com es pot comprovar a la Taula 5.2, tots els compostos van ser inactius a una concentració de 100  $\mu\text{M}$  sobre els enzims  $\alpha$ -glucosidases,  $\alpha$ -galactosidasa i  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla. Cal mencionar que els compostos **30**, **34**, **35** i **37** van presentar a una concentració de 100  $\mu\text{M}$  entre un 80 i un 92% d'inhibició de la  $\beta$ -galactosidasa de fetge de bou. Així mateix, l'aminociclitol **36** a una concentració de 250  $\mu\text{M}$  va presentar un 98% d'inhibició de la GCS en homogenats de cèl·lules A549 (cèl·lules epitelials de càncer de pulmó), però aquest compost va ser inactiu quan es va assajar a 50  $\mu\text{M}$ . Així doncs, es pot concloure que aquests amino- i diaminociclitols presenten una bona selectivitat per la GCCase recombinant.

### 5.3.2 Inhibició de la GCCase pels compostos 28-40 i A-C9 en fibroblasts wt d'humans

Un cop estudiada l'activitat inhibidora que presenten aquests ciclitols sobre la imiglucerasa, ens vàrem plantejar determinar la inhibició de la GCCase en fibroblasts d'humans (en cèl·lules intactes) pels compostos **28-40** i A-C9.

Per tal d'assegurar que una disminució de la fluorescència significava una disminució de l'activitat de la GCCase i no era el producte de la mort cel·lular provocada per una possible toxicitat dels compostos, es va estudiar la toxicitat dels compostos amb el mètode del MTT. El mètode MTT, descrit a l'any 1983 per Mosmann,<sup>208</sup> ha esdevingut un dels mètodes de mesura de proliferació cel·lular més utilitzats per veure l'efecte produït per l'addició de substàncies al medi de cultiu. Es tracta d'un mètode colorimètric que permet la utilització de plaques de cultiu de 96 pous. Consisteix en l'addició al medi de cultiu d'una solució de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli), el qual, després de ser reduït per l'activitat mitocondrial, forma uns cristalls de formazà de color violeta, que dissolts en DMSO donen coloració al medi. A més color observat, més activitat cel·lular per part dels mitocondris, que es correlaciona amb la quantitat de cèl·lules vives. A la Taula 5.3 es presenten els valors de  $CC_{50}$  (concentració citotòxica 50) per aquells compostos que van presentar citotoxicitat, mentre que la resta no van ser tòxics a concentracions inferiors a 300  $\mu\text{M}$ . Tal com es pot observar en aquesta Taula, es van obtenir uns valors de  $CC_{50}$  entre 12 i 24  $\mu\text{M}$  per als *N,O*-dinonil aminociclitols **32** i **34**, l'*N,N*-dinonil aminociclitol **36** i l'1,2-di-*N*-nonil diaminociclitol **38**. Així mateix, l'1,3-dinonil imidazolidinona **39** també va presentar certa citotoxicitat (amb un valor de  $CC_{50}$  de 60.7  $\mu\text{M}$ ).



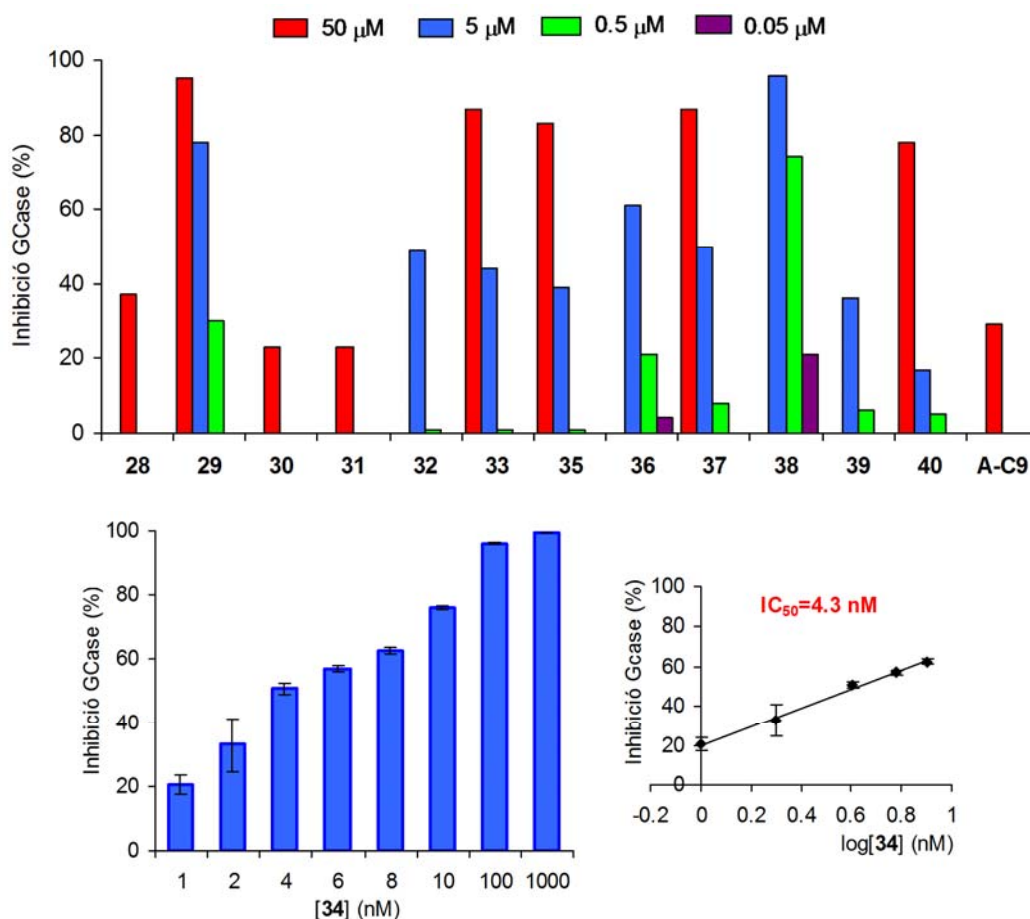
**Taula 5.3.** Citotoxicitat dels amino- i diaminociclitols en fibroblasts wt d'humans.

Compost	Citotoxicitat CC <sub>50</sub> (µM)
<b>32</b>	24.3
<b>34</b>	12.3
<b>36</b>	23.3
<b>38</b>	16.6
<b>39</b>	60.7

Un cop determinada la toxicitat, es va estudiar l'activitat inhibidora dels compostos no tòxics sobre la GCase en fibroblasts wt i després d'una incubació de 24 h a una concentració de 50 µM. Els amino- i diaminociclitols que van presentar citotoxicitat (veure Taula 5.3), es van assajar a una concentració de 5 µM.

Per tal de dur a terme els experiments en plaques de 24 pous i disposar d'una monocapa confluent de cèl·lules adherides al fons de cada pou, va ser necessari sembrar les cèl·lules el dia anterior a una concentració de  $2.5 \times 10^5$  cèl·lules per mil·lilitre ( $10^5$  cèl·lules per pou). Al cap de 24 h, un cop aspirat i renovat el medi, es van afegir cadascun dels compostos a una concentració determinada. Es van incubar les cèl·lules durant 24 h i després es va fer l'assaig d'activitat en cèl·lules intactes, segons el procediment descrit per Sawkar i col·laboradors<sup>115</sup> i utilitzant com a substrat el 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid (veure apartat 8.2.9 per un procediment més detallat de l'assaig).

A la Figura 5.19 s'indiquen els resultats obtinguts. Aquells compostos que van presentar un percentatge d'inhibició alt a 50 µM o 5 µM, també es van assajar a concentracions més baixes.



**Figura 5.19.** Inhibició de la GCCase pels compostos 28-40 en fibroblasts wt d'humans després d'una incubació de 24 h.

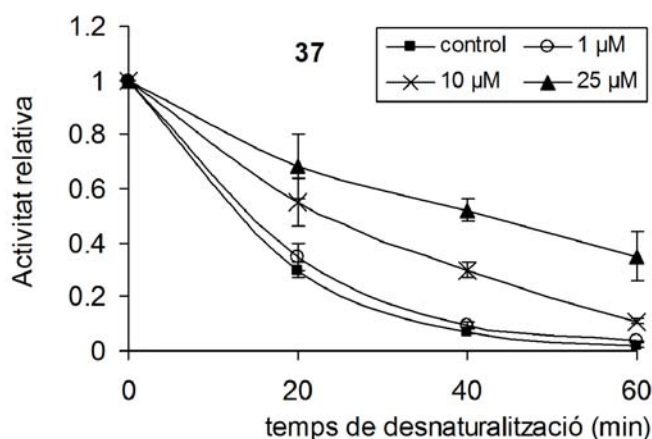
Com es pot veure a la Figura anterior, alguns dels compostos també van ser uns potents inhibidors de la GCCase en aquestes cèl·lules a una concentració de 5  $\mu\text{M}$  o fins i tot a 500 nM. A més, es va observar una bona correlació entre els valors de la  $K_i$  obtinguts per a la imiglucerasa i la inhibició de la GCCase en cèl·lules intactes, amb l'excepció de la diamina 40, la qual no havia presentat una potent activitat inhibidora de la imiglucerasa ( $\text{IC}_{50}$ =53  $\mu\text{M}$  a pH 5.2) i, malgrat això, aquest compost a 50  $\mu\text{M}$  produí un 78% d'inhibició de la GCCase en fibroblasts wt. Cal remarcar que s'ha treballat amb cèl·lules intactes que precisen d'una composició molt definida de les seves membranes per mantenir les seves propietats físico-químiques i les seves funcions cel·lulars. Novament, l'*N,O*-dinonil aminociclitol 34 va ser l'inhibidor més potent d'aquesta sèrie de compostos amb un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 4.3 nM. Aquests resultats són molt rellevants per a la finalitat terapèutica dels compostos, ja que indiquen una bona permeabilitat cel·lular i una correcta localització dels inhibidors que, a més, no perden potència respecte a la inhibició en enzima aïllat quan s'assagen en cèl·lules intactes.

### 5.3.3 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa en presència dels compostos 28-40, A-C9 i NN-DNJ

Per tal de determinar si aquesta sèrie de ciclitols tenen un efecte protector sobre la imiglucerasa en presència de condicions desnaturalitzants en el medi d'incubació, s'ha dut a terme una sèrie d'assaigs de desnaturalització tèrmica de l'enzim. Alguns dels compostos van ser assajats per Núria Guillem en els nostres laboratoris.

Aquest assaig consisteix en dur a terme una incubació de l'enzim a una temperatura alta (48 °C) durant diversos temps (20, 40 i 60 min) en presència i en absència de diferents concentracions de cadascun dels compostos. Un cop s'ha fet una dilució de la dissolució d'enzim-inhibidor i s'ha afegit el substrat, es mesura l'activitat de l'enzim mitjançant la quantificació de la 4-metilumbel·liferona que s'ha alliberat per la hidròlisi enzimàtica del substrat 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid. Cal dir que aquest assaig s'havia emprat en el nostre grup de recerca per a determinar l'activitat que presenten altres famílies d'aminociclitols i està descrit en la bibliografia per a altres compostos relacionats, com per exemple l'iminosure NN-DNJ.<sup>115,130,135</sup>

L'activitat enzimàtica relativa per a cada temps i concentració d'inhibidor s'ha determinat com el quocient entre l'activitat de l'enzim a un temps donat de desnaturalització i l'activitat de l'enzim sense desnaturalitzar. Si es representa l'activitat relativa enfront el temps de desnaturalització s'obté un perfil com el que s'indica a la Figura 5.20 per al diaminociclitol 37. Com es pot veure en aquesta Figura, l'activitat disminueix amb el temps de desnaturalització en el control (en absència d'inhibidor), en canvi amb la presència del compost a diferents concentracions (25, 10 i 1  $\mu$ M), la disminució de l'activitat és menor.



**Figura 5.20.** Efecte del diaminociclitol 37 sobre la pèrdua de l'activitat de la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica.

Aquest resultat està d'acord amb que el diaminociclitol **37** és capaç d'estabilitzar l'activitat de la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica.

A la Figura 5.21 s'indica les relacions d'estabilització obtingudes amb els ciclitols **28-40**, A-C9 i l'iminosucre NN-DNJ. Aquests valors s'han determinat com el quocient entre l'activitat relativa a una concentració i temps de desnaturalització determinats i l'activitat relativa del control al mateix temps de desnaturalització. Així mateix, a la Taula 5.4 s'indiquen els valors de les relacions d'estabilització després de 60 min d'incubació a una concentració determinada per a cadascun dels compostos.

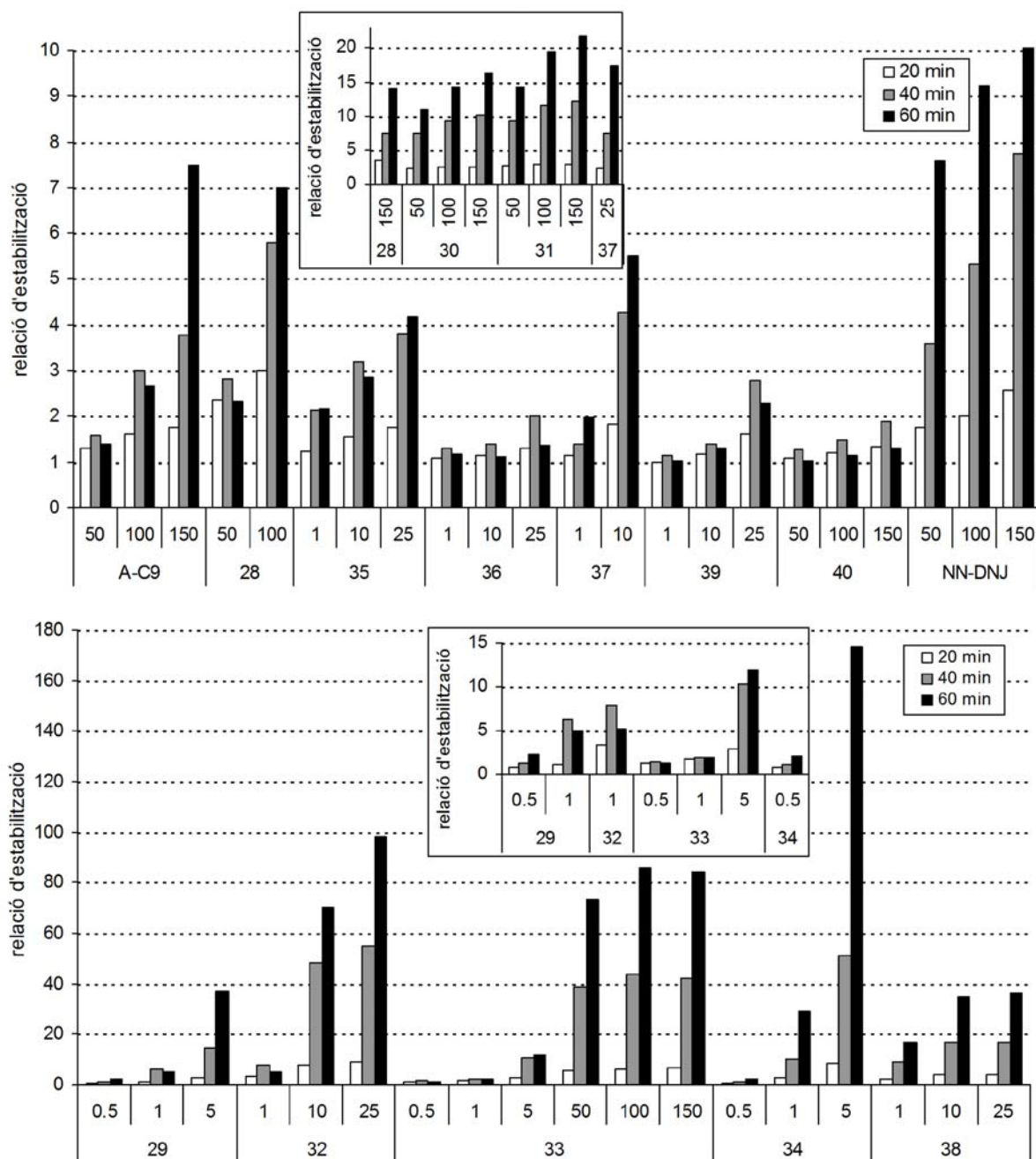
**Taula 5.4.** Relacions d'estabilització en condicions de desnaturalització tèrmica (a 48 °C durant 60 min) de la imiglucerasa per als compostos **28-40**, A-C9 i NN-DNJ a les concentracions indicades.

Compost	Relació d'estabilització	
A-C9	1.4 <sup>[a]</sup>	
<b>28</b>	2.3 <sup>[a]</sup>	
<b>29</b>	5.0 <sup>[c]</sup>	
<b>30</b>	11.0 <sup>[a]</sup>	
<b>31</b>	14.3 <sup>[a]</sup>	
<b>32</b>	5.2 <sup>[c]</sup>	
<b>33</b>	2.0 <sup>[c]</sup>	
<b>34</b>	29.0 <sup>[c]</sup>	
<b>35</b>	2.8 <sup>[b]</sup>	2.2 <sup>[c]</sup>
<b>36</b>	1.1 <sup>[b]</sup>	1.2 <sup>[c]</sup>
<b>37</b>	5.5 <sup>[b]</sup>	2.0 <sup>[c]</sup>
<b>38</b>	34.7 <sup>[b]</sup>	16.8 <sup>[c]</sup>
<b>39</b>	1.3 <sup>[b]</sup>	1.0 <sup>[c]</sup>
<b>40</b>	1.0 <sup>[a]</sup>	
NN-DNJ	7.6 <sup>[a]</sup>	

[a] Concentració de compost: 50 µM. [b] Concentració de compost: 10 µM.

[c] Concentració de compost: 1 µM.

Com es pot observar a la Taula 5.4 i a la Figura 5.21, per a tots els compostos, excepte per als ciclitols **36**, **39** i **40**, es van obtenir unes relacions d'estabilització superiors a 2 i en alguns casos a concentracions baixes. Finalment, cal destacar que es van obtenir uns valors de la relació d'estabilització entre 5 i 29 per als ciclitols **29**, **32**, **34** i **38** a una concentració de tan sols 1 µM i després de 60 min d'incubació a 48 °C, mentre que per a l'iminosucre NN-DNJ a una concentració de 50 µM es va obtenir una relació d'estabilització de 7.6 en les mateixes condicions.

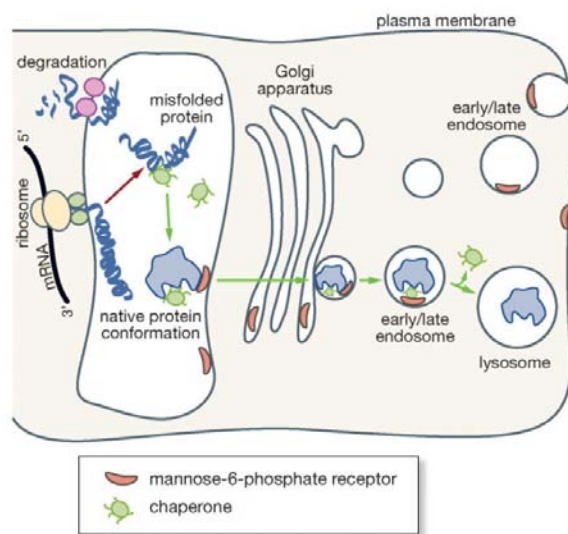


**Figura 5.21.** Relacions d'estabilització (relació entre l'activitat enzimàtica relativa obtinguda en presència de l'inhibidor respecte al control no tractat) dels compostos **28-40**, A-C9 i NN-DNJ en condicions de desnaturalització tèrmica (48 °C) durant 20, 40 i 60 min a les concentracions indicades (µM).

### 5.3.4 Estudi de l'activitat xaperona dels ciclitols en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P

Hi ha precedents bibliogràfics que demostren que els inhibidors competitiu d'un enzim, a concentracions subinhibitòries, poden actuar com a xaperones farmacològiques, ajudant al correcte plegament d'una proteïna i, per tant, afavorint el seu transport i la seva funció dins

l'òrganul cel·lular de destí (Figura 5.22) resultant en un augment net de l'activitat enzimàtica.<sup>76,79</sup>



**Figura 5.22.** Efecte de les xaperones farmacològiques sobre enzims amb defectes de plegament. Figura extreta d'un article de Parenti.<sup>80</sup>

Com s'ha comentat en la Introducció general d'aquesta memòria, l'ús de xaperones farmacològiques ha demostrat tenir interès terapèutic en malalties lisosomals com la de Gaucher, especialment en aquells casos on els malalts tenen afectació del sistema nerviós central i actualment no disposen de cap tractament adequat.<sup>77,79,80</sup> Com s'ha esmentat també anteriorment, en la gran majoria dels casos aquesta malaltia és deguda a mutacions en el gen GBA i les mutacions més freqüents trobades en els malalts de Gaucher són la N370S (malalts de tipus I, no neuronopàtic) i la L444P (normalment malalts de tipus II, neuronopàtic).

Un cop estudiada la inhibició de la GCase pels ciclitols **28-40** i tenint en compte els resultats obtinguts, en alguns casos sorprenents, tant de la inhibició com de l'estabilització de la imiglucerasa en condicions de desnaturalització, vàrem decidir determinar el potencial dels compostos **28-29**, **31-35**, **37-39** i A-C9 com a xaperones farmacològiques de la GCase en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P. A més, l'aminociclitol **36** i el diaminociclitol **40** es van estudiar com a possibles xaperones de la GCase amb la mutació N370S.

L'iminosucre NN-DNJ, que s'ha descrit com a xaperona farmacològica per a la mutació N370S, però no per a la L444P, es va incloure en tots els assaigs com a control.<sup>115</sup>

Una part dels estudis fets amb la mutació N370S es van realitzar durant una estada de tres mesos al Department of Biochemistry de la Universitat d'Òxford sota la supervisió del Dr. Terry D. Butters.

Els experiments de determinació de l'augment d'activitat enzimàtica induïda pels composts, rellevant per a determinar el possible efecte xaperona dels ciclitols sobre la GCCase amb les mutacions N370S o L444P, van consistir en incubar les cèl·lules a una densitat de  $2 \times 10^5$  cèl·lules per mil·lilitre en plaques de 12 pous durant tres dies en absència (control) o en presència dels compostos a assajar a diferents concentracions. Després d'aquesta incubació, es va determinar l'activitat enzimàtica (veure apartat 8.2.12 de la part experimental) utilitzant com a substrat el 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid.

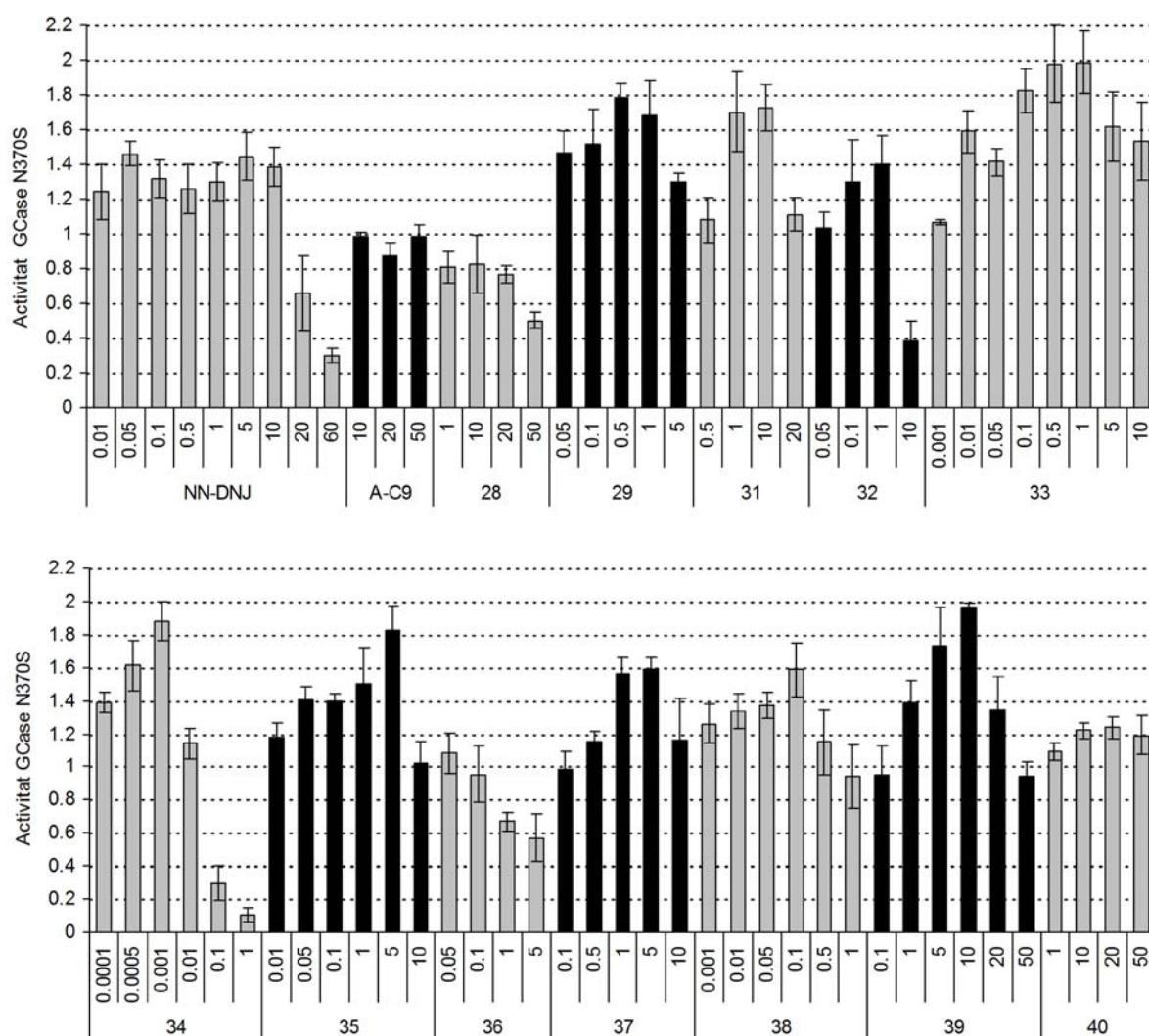
El resultat esperat pel cas d'un compost amb efecte xaperona és un increment de la fluorescència (major activitat enzimàtica) en les cèl·lules tractades respecte les cèl·lules control (en absència del compost). A les Figures 5.23 i 5.25 s'indiquen els resultats obtinguts per a les dues mutacions i a totes les concentracions a les que s'han assajat els compostos. El màxim increment de l'activitat enzimàtica i la concentració de cada compost on s'ha observat el màxim increment de l'activitat de la GCCase s'indiquen a la Taula 5.5.

**Taula 5.5.** Màxim increment de l'activitat de la GCCase observat per incubació de limfoblasts de malalts de Gaucher amb els compostos A-C9, **28-29**, **31-40** i NN-DNJ.

Compost	Màxim increment de l'activitat GCCase N370S <sup>[a]</sup>	Màxim Increment de l'activitat GCCase L444P <sup>[a]</sup>
A-C9	No incrementa	No incrementa
<b>28</b>	No incrementa	No incrementa
<b>29</b>	$1.8 \pm 0.1$ (0.5 $\mu$ M)	$1.2 \pm 0.1$ (0.1 $\mu$ M)
<b>31</b>	$1.7 \pm 0.1$ (10 $\mu$ M)	$1.5 \pm 0.2$ (1 $\mu$ M)
<b>32</b>	$1.4 \pm 0.1$ (1 $\mu$ M)	$1.2 \pm 0.1$ (5 nM)
<b>33</b>	$2.0 \pm 0.2$ (1 $\mu$ M)	$1.3 \pm 0.1$ (0.5 nM)
<b>34</b>	$1.9 \pm 0.1$ (1 nM)	$1.4 \pm 0.2$ (0.01 nM)
<b>35</b>	$1.8 \pm 0.1$ (5 $\mu$ M)	$1.3 \pm 0.1$ (0.1 $\mu$ M)
<b>36</b>	No incrementa	ND <sup>[b]</sup>
<b>37</b>	$1.6 \pm 0.1$ (1 $\mu$ M)	$1.3 \pm 0.2$ (1 $\mu$ M)
<b>38</b>	$1.6 \pm 0.2$ (0.1 $\mu$ M)	$1.3 \pm 0.1$ (1 nM)
<b>39</b>	$2.0 \pm 0.1$ (10 $\mu$ M)	No incrementa
<b>40</b>	$1.2 \pm 0.1$ (10 $\mu$ M)	ND <sup>[b]</sup>
NN-DNJ	$1.4 \pm 0.1$ (5 $\mu$ M)	No incrementa

[a] Els limfoblasts es van incubar amb els compostos durant 3 dies abans de mesurar l'activitat enzimàtica. Les dades entre parèntesi corresponen a la concentració a la que s'ha assajat el compost i s'ha obtingut el màxim increment de l'activitat de la GCCase. [b] ND: no determinat.

En els assaigs per a la mutació N370S, els aminociclitols A-C9, **28** i **36** no van provocar un augment de l'activitat de la GCase a cap de les concentracions a les que es van assajar i el diaminociclitol **40** va augmentar l'activitat enzimàtica un 20% com a màxim a una concentració de 10  $\mu\text{M}$ . Per altra banda, la resta de compostos van incrementar més d'un 40% l'activitat de la GCase a alguna de les concentracions assajats. El tractament amb els ciclitols **31** i **39** a una concentració de 10  $\mu\text{M}$  o amb **35** i l'imosure NN-DNJ a 5  $\mu\text{M}$  van produir un augment de l'activitat de la GCase entre 1.4 i 2 vegades. Així mateix, els compostos **32-33** i **37** a una concentració de 1  $\mu\text{M}$  van provocar el mateix augment de l'activitat.

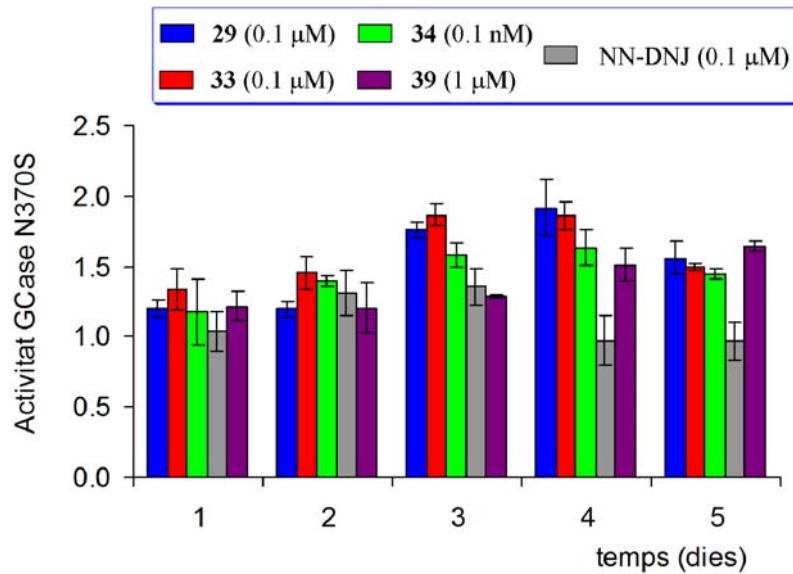


**Figura 5.23.** Efecte dels compostos **28-29**, **31-40**, NN-DNJ i A-C9 sobre l'activitat de la GCase en limfoblasts (GM10873) de malalts de Gaucher amb la mutació N370S. Es va fer una incubació de les cèl·lules durant 3 dies en absència i en presència de diferents concentracions ( $\mu\text{M}$ ) de cada compost abans de mesurar l'activitat de la GCase. Els experiments es van fer per triplicat i els resultats corresponen a la mitja  $\pm$  desviació estàndard. L'activitat enzimàtica s'ha normalitzat respecte a les cèl·lules no tractades, la qual s'ha assignat a una activitat relativa d'1.



D'altra banda, l'aminociclitol **29** a 500 nM i el diaminociclitol **38** a 100 nM van augmentar l'activitat enzimàtica de la GCCase amb la mutació N370S un 80% i un 60%, respectivament. El més sorprenent va ser l'efecte observat amb l'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** que va inhibir l'enzim a concentracions superiors a 100 nM, que està d'acord amb la inhibició de la GCCase que s'havia observat, tant amb la imiglucerasa com en els estudis fets amb fibroblasts. Però, el tractament dels limfoblasts amb l'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** a una concentració d'1 nM va produir el màxim augment de l'activitat enzimàtica (un 90%) i a concentracions més baixes l'activitat va disminuir de forma progressiva (veure Figura 5.23). Cal mencionar que aquest augment de l'activitat a concentracions tan baixes està en contraposició amb altres compostos descrits a la literatura que s'han estudiat com a xaperones farmacològiques. En la gran majoria dels casos s'han utilitzat concentracions de l'ordre micromolar i molt superiors als valors de les constants d'inhibició que s'havien determinat utilitzant la GCCase recombinant. La xaperona farmacològica de la GCCase més potent que hi havia descrita fins al moment a concentracions de l'ordre nanomolar era l' $\alpha$ -1-C-noniliminixilitol, que és capaç d'augmentar l'activitat de la GCCase fins a 1.8 vegades (a una concentració de 10 nM) en fibroblasts amb la mutació N370S després de 4 dies d'incubació.<sup>124</sup> La utilització de baixes concentracions de xaperones farmacològiques té molts punts a favor a l'hora de ser un possible tractament de la GD degut al increment de la selectivitat per la GCCase, i com a conseqüència, la disminució dels possibles efectes secundaris en el pacient.

Es va estudiar també l'activitat xaperona d'alguns dels amino- i diaminociclitols que havien donat millors resultats amb la mutació N370S durant 5 dies d'incubació. La finalitat d'aquest experiment era veure si augmentant el temps d'incubació també s'observava un major augment de l'activitat de la GCCase. Per fer aquest assaig es van incubar les cèl·lules en presència dels compostos **29**, **33** i NN-DNJ a 0.1  $\mu$ M, la imidazolidinona **39** a 1  $\mu$ M i l'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** a 0.1 nM i es va determinar l'activitat enzimàtica cada 24 h. Cal mencionar que es va estudiar prèviament la citotoxicitat d'aquests compostos en aquestes cèl·lules després de 5 dies d'incubació.



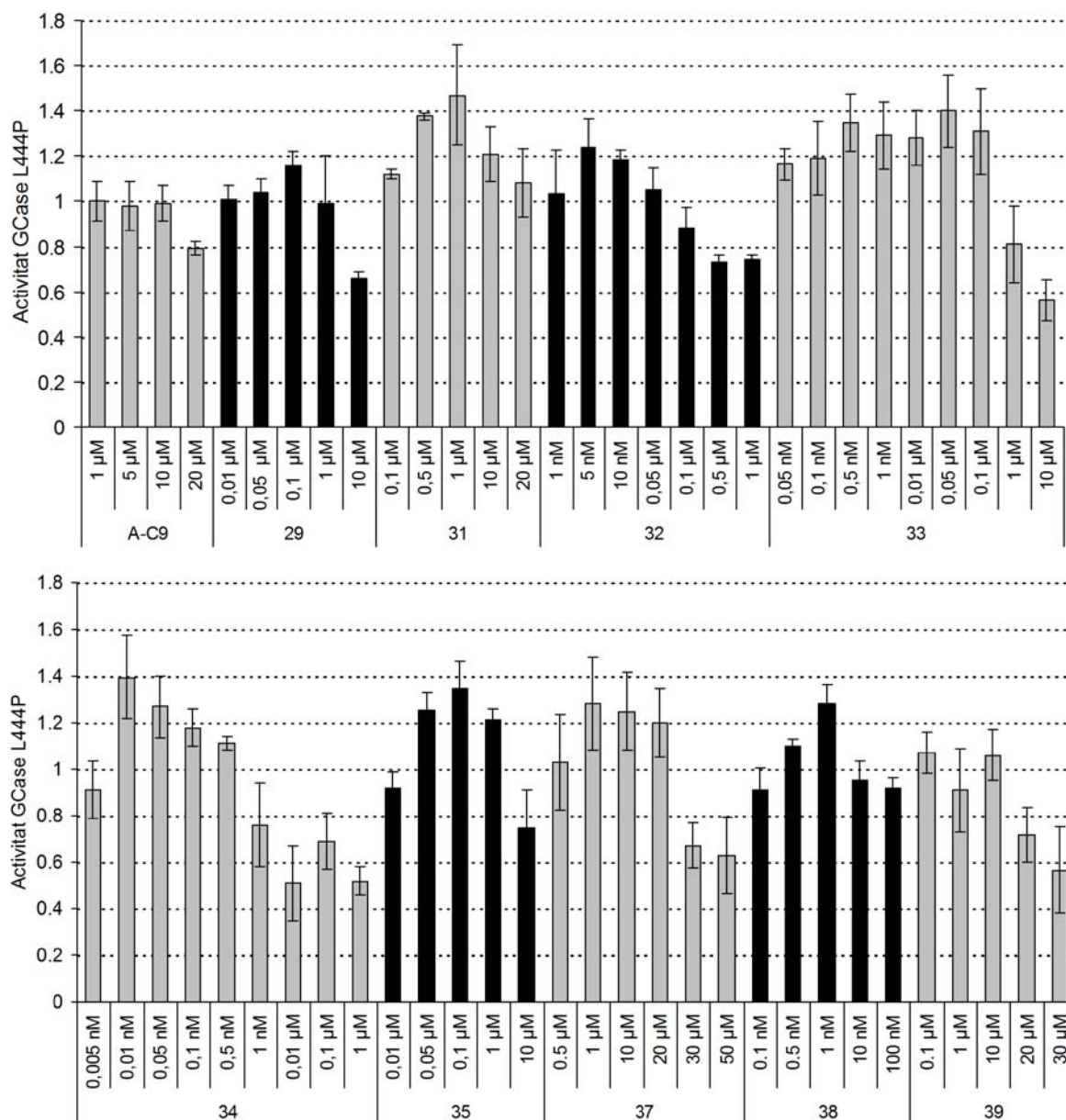
**Figura 5.24.** Efecte dels compostos **29**, **33-34**, **39** i NN-DNJ sobre l'activitat de la GCCase amb la mutació N370S després d'una incubació de 5 dies on es va determinar l'activitat enzimàtica cada 24 h. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  la desviació estàndard d'un experiment amb tres rèpliques. L'activitat enzimàtica s'ha normalitzat respecte a les cèl·lules no tractades, les quals s'han assignat a una activitat relativa d'1.

Com es pot observar a la Figura 5.24, l'activitat enzimàtica va anar augmentant amb els dies i es va arribar al màxim entre el tercer i el quart dia, llavors l'activitat va disminuir una mica. Una possible explicació per a aquesta disminució d'activitat en la última determinació podria ser degut a que les cèl·lules no estiguessin en bon estat ja que, al ser limfoblasts, estan en suspensió en el medi de cultiu i, per evitar la manipulació no es va dur a terme el canvi de medi habitual en aquests cultius i que es fa cada tres dies.

L'efecte dels compostos A-C9, **28-29**, **31-35**, **37-39** i NN-DNJ sobre l'activitat de la GCCase amb la mutació L444P, que com s'ha comentat en la introducció general d'aquesta memòria és un fenotip de la malaltia més sever que la mutació N370S, es va estudiar utilitzant cèl·lules d'un malalt de Gaucher de tipus II (GM 08752, Coriell Cell Repositories). Després de 3 dies d'incubació, els ciclitols A-C9, **28**, **39** i l'iminosucre NN-DNJ no van produir cap efecte sobre l'activitat de la GCCase o fins i tot van inhibir l'enzim a altes concentracions. D'altra banda, per als altres ciclitols es van observar moderats increments en l'activitat de la GCCase (20-50%) a baixes concentracions. Cal destacar que l'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** va produir un augment de l'activitat (un 40%) a una concentració de només 10 picomolar (veure Figura 5.25).

Cal afegir que en quasi tots els exemples descrits a la literatura (veure apartat 1.6 de la introducció general) de la utilització de xaperones farmacològiques per a diverses mutacions

de la GCCase, no es van obtenir bons resultats pel cas de la mutació L444P.<sup>114,115,122,128,188</sup> En molts dels casos això s'atribueix a que aquesta mutació es troba allunyada del centre actiu. Les úniques xaperones farmacològiques que s'han descrit fins al moment per a la GCCase amb la mutació L444P són la isofagomina,<sup>82</sup> l' $\alpha$ -1-C-octil-1-deoxinojirimicina<sup>113</sup> i l'ambroxol.<sup>136</sup>



**Figura 5.25.** Efecte dels compostos 29, 31-35, 37-39 i A-C9 sobre l'activitat de la GCCase en limfoblasts (GM08752) de malats de Gaucher amb la mutació L444P. Es va fer una incubació de les cèl·lules durant 3 dies en absència i en presència de diferents concentracions de cada compost abans de mesurar l'activitat de la GCCase. Els experiments es van fer per triplicat i els resultats corresponen a la mitja  $\pm$  desviació estàndard. L'activitat enzimàtica s'ha normalitzat respecte a les cèl·lules no tractades, la qual s'ha assignat a una activitat relativa d'1.

Així doncs es pot concloure que alguns dels amino- i diaminociclitols descrits en aquest capítol són uns inhibidors molt potents de la GCase tant d'aquest enzim en fibroblasts wt com de la GCase recombinant. A més, alguns d'ells, a concentracions de l'ordre nanomolar o fins i tot subnanomolar, augmenten l'activitat de la GCase en limfoblasts de malalts de Gaucher amb la mutació N370S, així com amb la mutació L444P, la qual s'ha associat amb un fenotip neuronopàtic i actualment no hi ha cap tractament efectiu.



## *6. Isoourees i guanidines bicíclicues com a xaperones farmacològiques de la GCase*

---

6.1 Introducció i objectius

6.2 Síntesi i assignació estructural de les isoourees i guanidines bicíclicues **86-90**

6.2.1 Síntesi de les isoourees i guanidines bicíclicues **86-90**

6.2.2 Assignació estructural per RMN de les isoourees i guanidines bicíclicues

6.3 Assaigs biològics dels compostos **86-90, 105 i 106**

6.3.1 Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos **86-90, 105 i 106**

6.3.2 Inhibició de la GCase pels compostos **86-90** en fibroblasts wt d'humans

6.3.3 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa en presència dels compostos **86c-90c, 86d, 89d, 90e** i l'iminosucre NN-DNJ

6.3.4 Estudi de l'activitat xaperona de les isoourees i guanidines bicíclicues en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P



Four diastereomeric series of *N*-alkylated [6+5] bicyclic isoureas having hydroxyl substituents mimicking glucose hydroxyl groups have been synthesized as potential  $\beta$ -glucocerebrosidase (GCCase) inhibitors with the aim of developing pharmacological chaperones for enzyme deficiency in Gaucher disease (GD). The bicyclic compounds differ either by the configuration of the ring fusion carbon atoms or by the nature of the *N*-alkyl substituents. When assayed for effects on GCCase activity, the isoureas displayed selective inhibition of GCCase with low micromolar to nanomolar  $IC_{50}$ 's in isolated enzyme experiments.

One of the series of isoureas, a family having a specific *cis* ring fusion, exhibited strong inhibition of recombinant GCCase activity with  $K_i$  values in the 2-42 nM range. In addition, the [6+5] bicyclic guanidine derivatives with a substitution pattern analogous to the most active isoureas were also found to be potent

inhibitors of GCCase with  $K_i$  values between 3 and 10 nM. Interestingly, the active bicyclic isoureas and guanidines also behaved as GCCase inhibitors in wild-type human fibroblasts at nanomolar concentrations.

The potential of these compounds as pharmaceutical chaperones was determined by analyzing their capacity for increasing GCCase activity in GD lymphoblasts derived from N370S and L444P variants, two of the most prevalent Gaucher mutations. Six compounds were selected from the different bicyclic isoureas and guanidines obtained that increased GCCase activity by 40-110% in N370S and 10-50% in L444P cells at low micromolar to nanomolar concentrations following a 3-day incubation. These results describe a promising series of potent GCCase ligands having the cellular properties required for pharmacological chaperones.

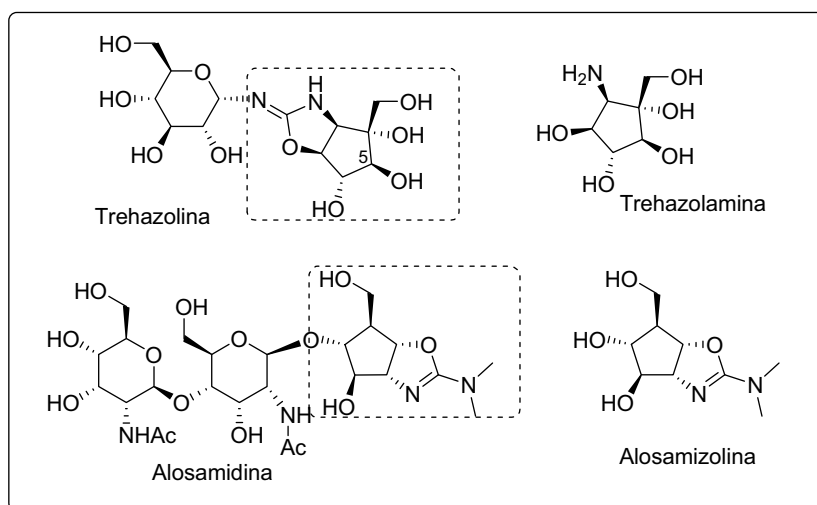




## 6.1 Introducció i objectius

La trehazolina i l'alosamidina són productes naturals amb interessants propietats biològiques associades als enzims que processen carbohidrats i que es caracteritzen per la presència en la seva estructura d'un aminociclitol de cinc baules (Figura 6.1).<sup>209</sup>

La trehazolina és un potent inhibidor de varies trehalases, els enzims específics que hidrolitzen l'enllaç glicosídic del disacàrid  $\alpha,\alpha'$ -trehalosa. Va ser aïllada en el 1991 per Ando i col·laboradors d'un cultiu del cep *Micromonospora* SANK 62390.<sup>210</sup> Pràcticament de forma simultània, Nakayama i col·laboradors<sup>211</sup> van descriure l'aïllament d'un inhibidor específic de la trehalasa d'un cultiu del cep *Amiclotopsis* SANK 60791 al que van anomenar trehalostatina. Aquests autors van proposar per a la trehalostatina l'epímer en C5 de la trehazolina. Però les propietats físiques dels dos compostos van ser idèntiques i, més tard, la síntesi total dels dos isòmers va demostrar que es tractava realment del mateix compost i l'estructura correcta d'aquest producte natural corresponia a la que s'havia assignat a la trehazolina.<sup>209,212</sup>



**Figura 6.1.** Estructures de la trehazolina, l'alosamidina, la trehazolina i l'alosamizolina.

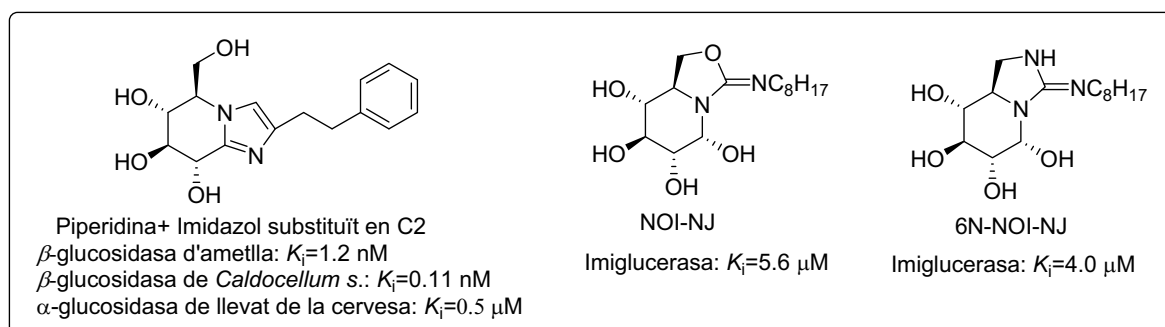
La trehazolina és un pseudo-disacàrid peculiar formada per una unitat  $\alpha$ -D-glucopiranosida unida a un aminociclitol de 5 baules (trehalamina, Figura 6.1) a través d'una isourea cíclica. La seva interessant estructura, així com la seva intensa activitat biològica han generat un gran interès per a la seva síntesi i la de compostos anàlegs. Des dels treballs de Shiozaki<sup>213</sup> i Ogawa,<sup>214</sup> que van confirmar l'estructura de la trehazolina, totes les aproximacions descrites per a la seva síntesi impliquen un esquema similar que suposa, en primer lloc, la síntesi de l'aminociclopentiol, seguida del seu acoblament amb un derivat de

glucopiranosil i, finalment, una reacció intramolecular per a formar la isourea. Degut a la seva major complexitat, els esforços sintètics s'han dirigit fonamentalment al desenvolupament de nous mètodes per a accedir al fragment aminociclitol, la trehazolamina.<sup>215,216</sup>

L'alosamidina és un potent inhibidor de la quitinasa i va ser aïllada en el 1986 per Sakuda i col·laboradors.<sup>217</sup> Aquest producte natural és un pseudo-trisacàrid format per un disacàrid unit a una isourea bicíclica (alosamizolina, Figura 6.1) formada per un aminociclitol i una isourea de cinc baules.

A part d'aquests dos productes naturals, s'han descrit una sèrie d'iminosucres amb una estructura bicíclica polihidroxilada com a inhibidors de glicosidases, com per exemple els productes naturals castanospermina,<sup>218</sup> swainsonina<sup>219</sup> o la calistegina.<sup>220</sup>

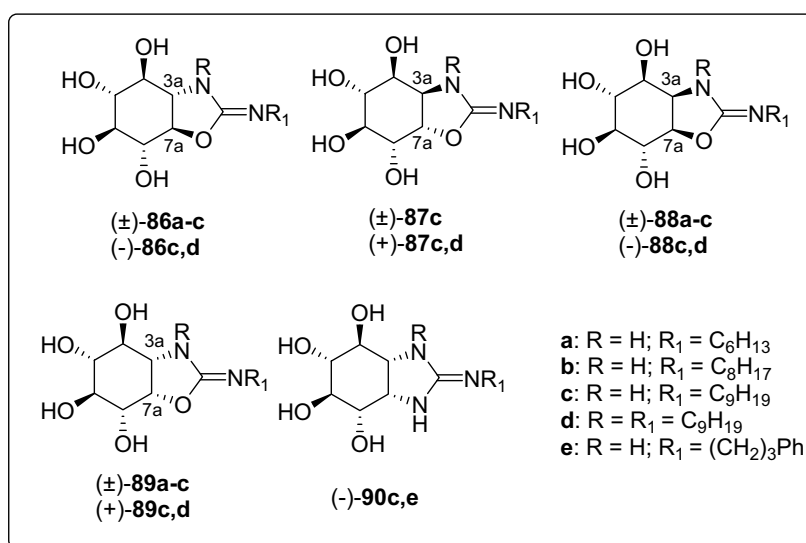
Així mateix, s'han sintetitzat diverses sèries de compostos amb estructura bicíclica formats per un iminosucre fusionat a una amidina cíclica<sup>221</sup> o a un anell heterocíclic,<sup>222</sup> com per exemple un imidazole, que van resultar ser inhibidors de  $\beta$ -glucosidases, amb valors de  $K_i$  de l'ordre nanomolar (Figura 6.2).<sup>223</sup>



**Figura 6.2.** Estructures d'iminosucres amb estructura bicíclica.

Un altre tipus de compostos amb estructura bicíclica, com s'ha comentat en la introducció general d'aquesta memòria, està formada per una família d'iminosucres relacionats estructuralment amb la nojirimicina (NJ) o la galactonojirimicina (GNJ) i han estat descrits recentment com a inhibidors de la GCCase (Figura 6.2).<sup>118</sup> En aquests compostos bicíclics, formats per un iminosucre de sis baules fusionat amb una isourea, guanidina o una isotiourea de cinc baules, l'àtom de nitrogen que ocupa la posició de cap de pont té un elevat caràcter  $sp^2$  i van presentar una bona selectivitat. A més s'ha descrit recentment que alguns d'ells presenten activitat xaperona i augmenten l'activitat de la GCCase en fibroblasts de malalts de Gaucher amb diverses mutacions.<sup>119</sup>

Tenint en compte aquests precedents, ens vàrem plantejar la síntesi d'una nova família de compostos amb estructura bicíclica formats per un anell de 6 baules polihidroxilat fusionat amb un anell de cinc baules on hi és present una isourea. D'altra banda, tenint en compte els resultats obtinguts amb les sèries d'amino- i diaminociclitols (capítol 5), vàrem pensar que seria de gran interès la síntesi de diverses sèries amb diferent configuració dels centres C3a i C7a (**86-89**, Figura 6.3) per tal d'estudiar la relació estructura-activitat dels mateixos com a inhibidors de glicosidases i en particular de la GCCase.



**Figura 6.3.** Estructures de les isourees i guanidines bicíclics [6+5] (**86-90**).

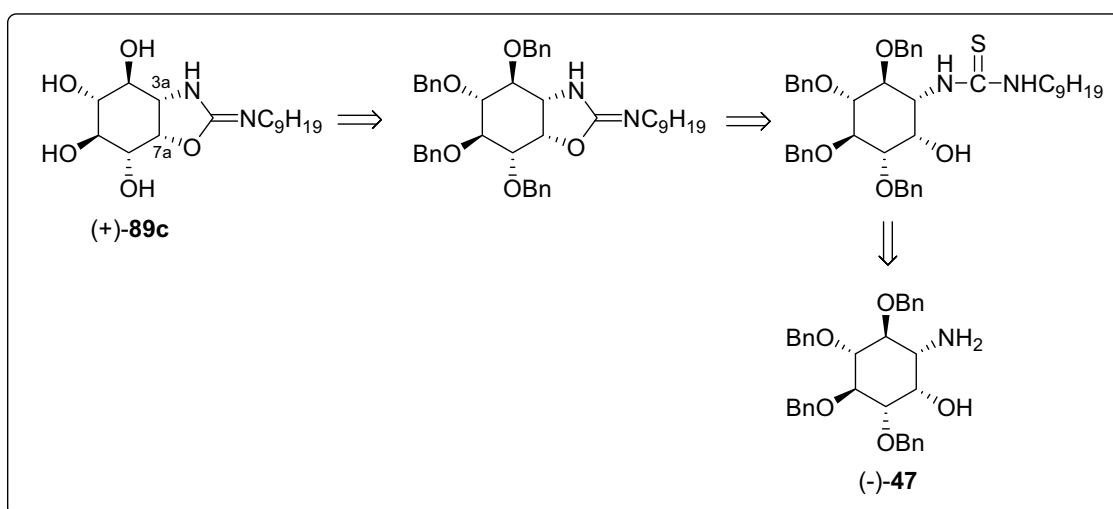
En aquests compostos podem trobar quatre sèries de isourees bicíclics, tant en forma racèmica com enantiomèricament pura, que es diferencien en la configuració dels centres C3a i C7a, però tots ells tenen el nitrogen exocíclic substituït amb una cadena alquílica de nou àtoms de carboni (**86c-89c**). Així com les isourees en forma enantiomèricament pura amb els dos àtoms de nitrogen substituïts amb una cadena alquílica de la mateixa longitud (**86d-89d**).

Dels compostos **86**, **88** i **89**, també es van sintetitzar les isourees bicíclics en forma racèmica amb el nitrogen exocíclic substituït amb una cadena alquílica de vuit o sis àtoms de carboni.

De les quatre sèries d'isourees, com després es comentarà en aquest capítol, la sèrie **89** va ésser la que va presentar una major inhibició de la GCCase i, d'acord amb això, es va decidir sintetitzar les guanidines **90c** i **90e**, les quals mantenen la configuració de tots els centres de l'anell de sis baules i que resulten del bescanvi formal de l'àtom d'oxigen de la isourea per un àtom de nitrogen (Figura 6.3).

Per a la síntesi de les isourees i guanidines bicíclics **86-90** es van utilitzar com a productes de partida alguns dels intermedis que s'havien sintetitzat prèviament per a la preparació dels amino- i diaminociclitols que s'han descrit anteriorment (veure capítol 5). D'aquesta manera, per a la síntesi de la isourea **89c** es va utilitzar l'aminoalcohol **47**, el qual presenta la mateixa configuració dels centres on es troben els grups amino i hidroxil lliures que els centres 3a i 7a, respectivament, en la isourea final.

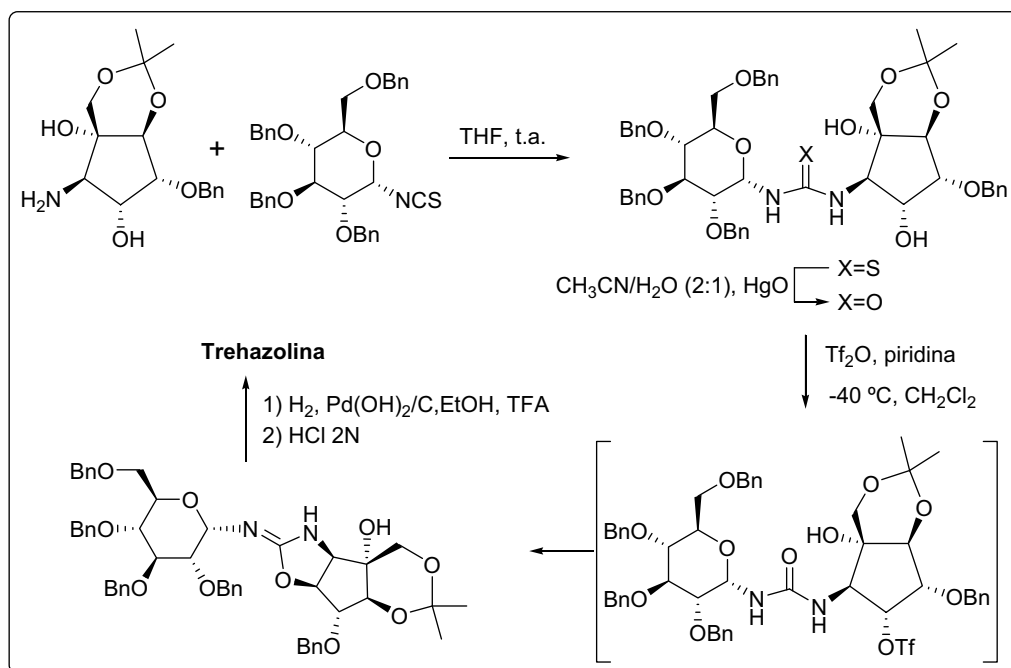
La isourea (+)-**89c** es podria obtenir després de la desprotecció de tots els grups benzil d'una isourea intermèdia, la qual es pot preparar per ciclació d'una tiourea o bé d'una urea. Per últim, la síntesi de la tiourea o la urea es podria fer fàcilment per reacció de l'aminoalcohol de partida amb isotiocianat de nonil o isocianat de nonil.



**Figura 6.4.** Retrosíntesi de la isourea (+)-**89c**.

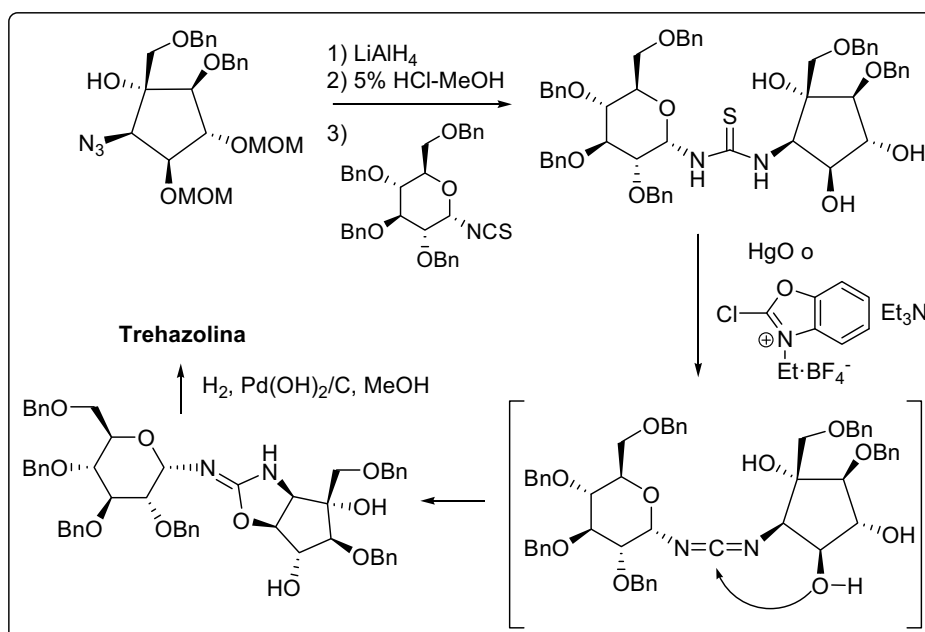
Per a la formació de la isourea a partir d'una tiourea o urea hi han diverses condicions descrites a la literatura per compostos amb una estructura similar als descrits en aquest capítol.

Storch de Gracia i col·laboradors<sup>224</sup> han descrit una síntesi de la trehazolina on el grup funcional isourea el van preparar a partir d'una urea amb un grup hidroxil adjacent. Segons Storch de Gracia i col·laboradors, la reacció de la  $\beta$ -hidroxiurea amb anhídrid triflic en presència de piridina evoluciona per un mecanisme clàssic de substitució nucleòfila tipus S<sub>N</sub>2 passant per un triflat intermedi (Figura 6.5). La formació de la isourea ve acompanyada en aquests cas amb una inversió de la configuració del centre on hi havia el grup hidroxil adjacent.



**Figura 6.5.** Síntesi de la trehazolina.<sup>224</sup>

Ogawa i col·laboradors<sup>214,216,225</sup> han descrit també una síntesi de la trehazolina i alguns anàlegs, on la isourea la van obtenir com el producte de la reacció d'una tiourea amb òxid de mercuri (II), passant per un intermedi de tipus carbodiimida. Alternativament, Kobayashi i col·laboradors<sup>212,213</sup> van proposar la utilització del reactiu tetrafluorborat de 2-cloro-3-etilbenzoxazolini (mètode de Mukaiyama). Els dos mètodes han estat utilitzats àmpliament en la síntesi d'anàlegs de la trehazolina (Figura 6.6).<sup>212</sup>

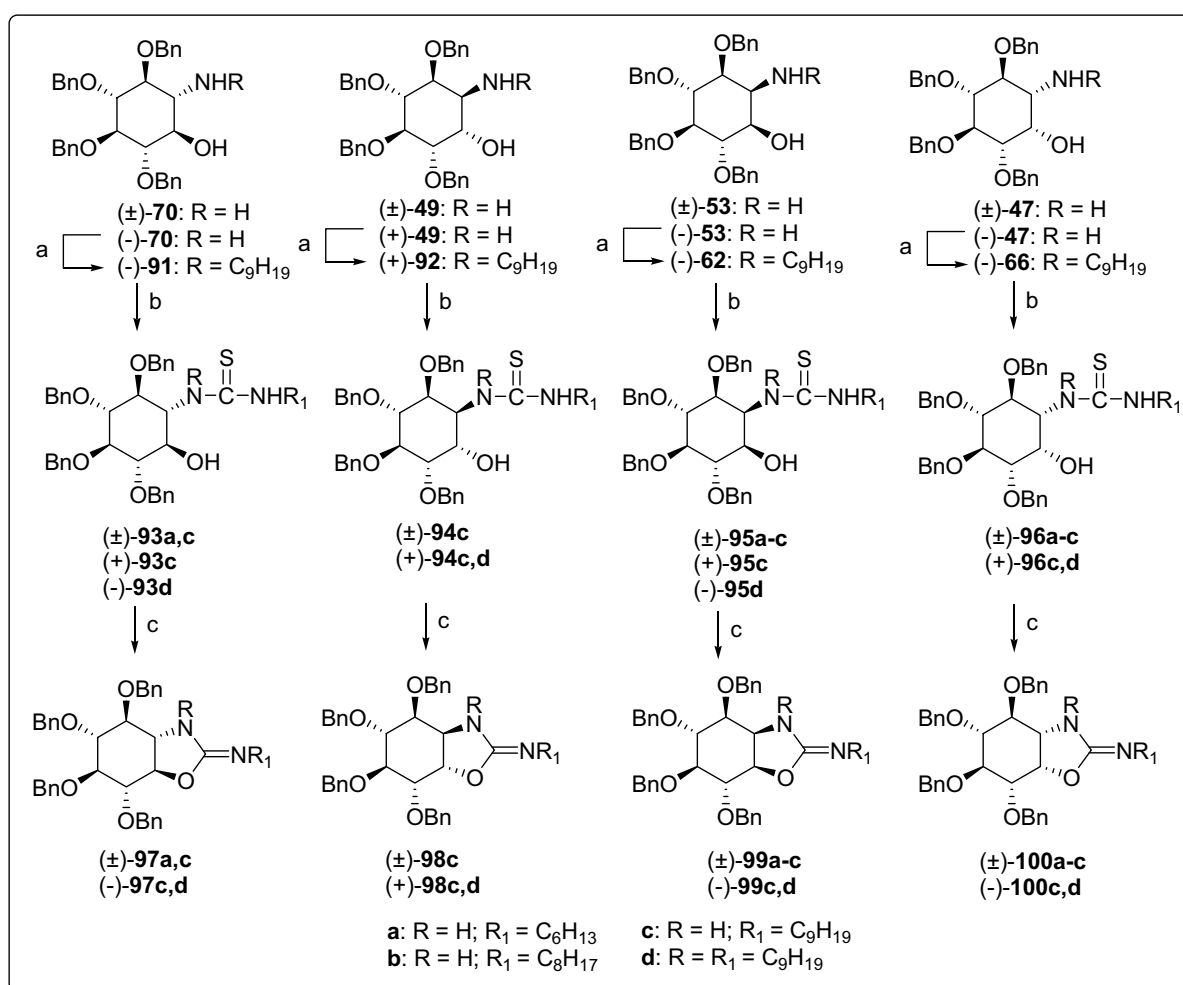


**Figura 6.6.** Síntesi de la trehazolina.<sup>212-214</sup>

## 6.2 Síntesi i assignació estructural de les isourees i guanidines bicíclics 86-90

### 6.2.1 Síntesi de les isourees i guanidines bicíclics 86-90

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, per a la síntesi de les isourees i guanidines bicíclics **86-90** es van utilitzar com a productes de partida alguns dels intermedis que s'havien sintetitzat prèviament per a la preparació dels amino- i diaminociclitols que s'han descrit en el capítol 5 d'aquesta memòria. D'aquesta manera, per a la síntesi de les isourees **86-89** es van utilitzar els aminoalcohols **47**, **49**, **53** i **70**, mentre que les guanidines **90c,e** es van preparar a partir de la diamina **79** (Figures 6.7 i 6.8).



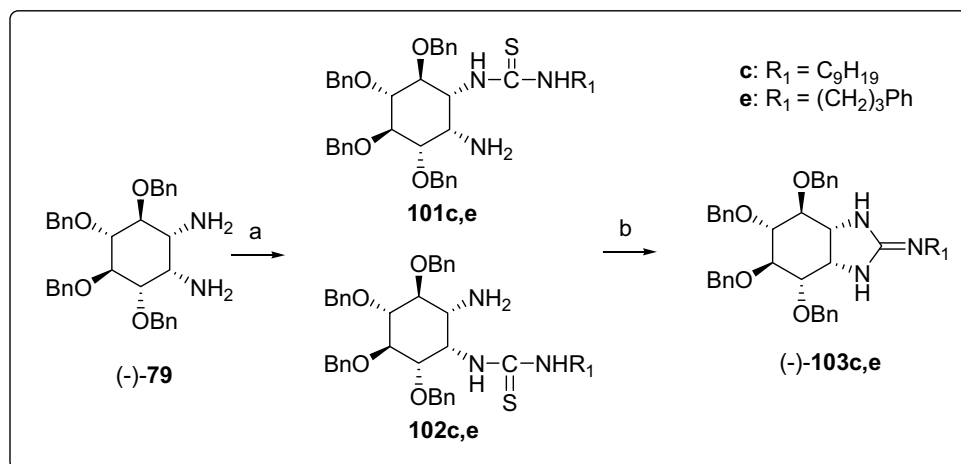
a) C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>CHO, NaBH<sub>3</sub>CN, MeOH, t.a., 4 h, 75-90%; b) R<sub>1</sub>NCS, THF, 45 °C, 18 h, 65-95%;  
c) HgO, toluè, 115 °C, 24-48 h, 67-95%.

**Figura 6.7.** Obtenció de les isourees bicíclics **97-100** a partir dels aminoalcohols **47**, **49**, **53** i **70**.

D'altra banda, per a la síntesi de les isourees **86d-89d** es van emprar els corresponents *N*-nonil aminociclitols derivats (**62**, **66**, **91**<sup>130</sup> i **92**). Aquests precursors es van preparar per aminació reductora dels aminoalcohols **47**,<sup>166</sup> **49**,<sup>226</sup> **53** i **70**<sup>130</sup> (en forma enantiomèricament pura) amb l'aldehid nonanal.

L'acoblament dels aminoalcohols de partida amb el corresponent *N*-alquil isotiocianat donà les tiourees **93-96** en una reacció que té lloc amb total quimioselectivitat en presència del grup hidroxil lliure. A continuació, el tractament de les tiourees resultants amb un excés (3 equivalents) d'òxid de mercuri (II) va conduir a les corresponents isourees bicíclics **97-100** (Figura 6.7). Val a dir que la formació de les isourees **97** i **98**, que tenen els dos anells fusionats en *trans*, va requerir més temps de reacció i es va utilitzar el doble d'equivalents d'òxid de mercuri (II).

En el cas de la síntesi de les guanidines **103**, la reacció de la diamina **79** amb 1 equivalent de l'isotiocianat corresponent donà una mescla de diastereoisòmers **101** i **102**, els quals es van fer reaccionar amb òxid de mercuri (II) i s'obtingueren únicament les guanidines desitjades **103c,e** (Figura 6.8).



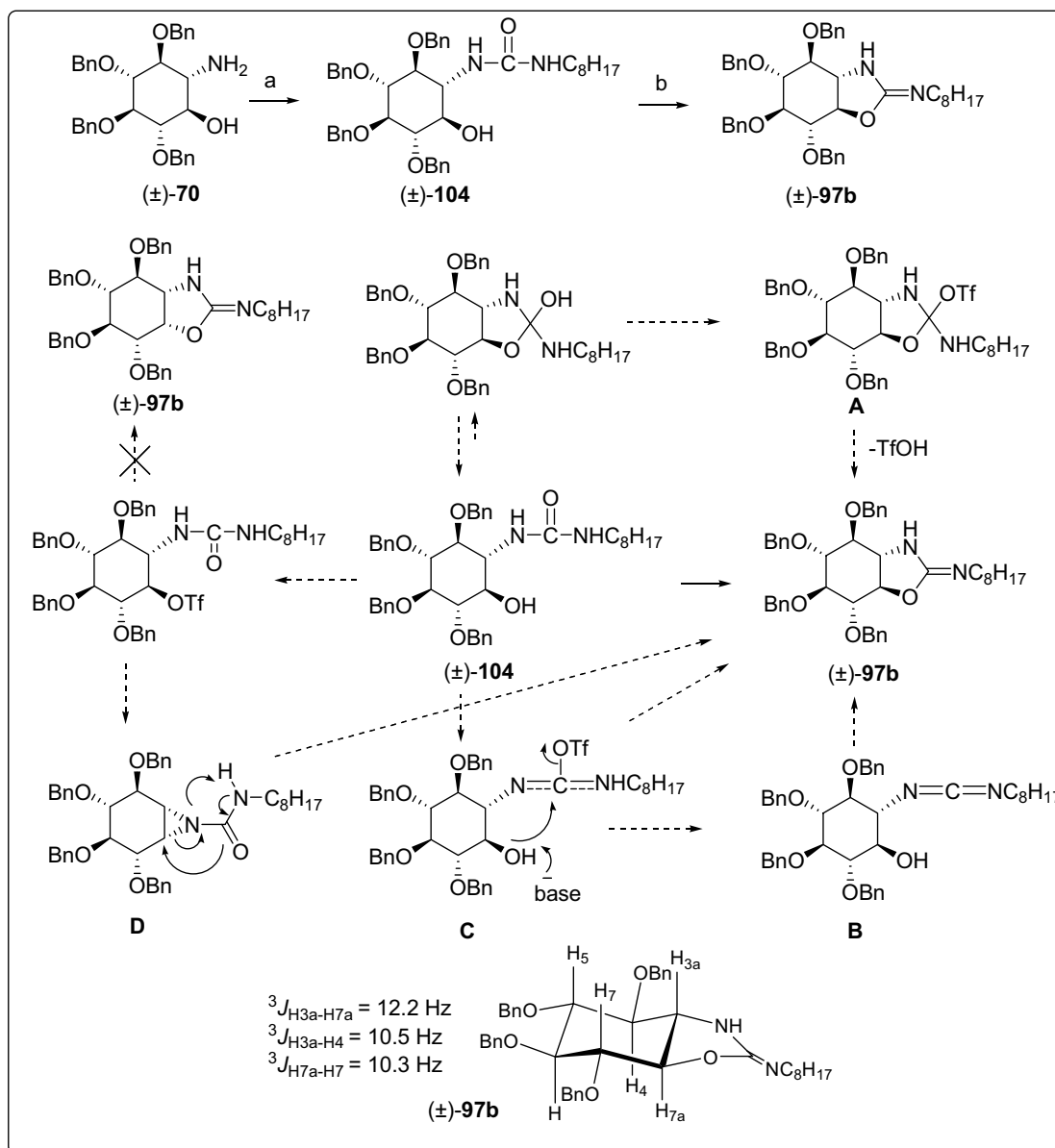
a)  $C_9H_{19}NCS$  o  $Ph(CH_2)_3NCS$ , THF, 45 °C, 18 h, 65-70%; b)  $HgO$ , toluè, 115 °C, 24 h, 70-79%.

**Figura 6.8.** Obtenció de les guanidines bicíclics **103c,e** a partir de la diamina **79**.

Cal mencionar que en un principi es va plantejar la síntesi de les isourees **100a-c** a partir de l'aminoalcohol **70**, que és sintèticament més assequible que l'aminoalcohol **47**, seguint el procediment que descriuen Storch de Gracia i col·laboradors.<sup>224</sup> Malauradament, el tractament de la urea **104** amb anhídrid trifílic en presència de piridina donà la isourea bicíclica **97b** amb retenció de la configuració del centre on es trobava l'alcohol secundari (Figura 6.9). Aquest fet està en desacord amb el transcurs estereoquímic de la reacció



descrita per Storch de Gracia i col·laboradors, en que s'observa la inversió de configuració en el carboni unit a l'èster trifílic. La retenció de configuració en **97b** està d'acord amb les constants d'acoblament (10.3-12.2 Hz) observades entre els protons H3a/H7a, H3a/H4 i H7a/H7 en el compost **97b**. A més, els espectres de RMN de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  dels compostos **97a-c** eren pràcticament iguals, excepte la part corresponent a la cadena *N*-alquílica.



a)  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NCO}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 6 h, 93%; b)  $\text{Tf}_2\text{O}$ , piridina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-40^\circ\text{C}$ , 1 h, 65%.

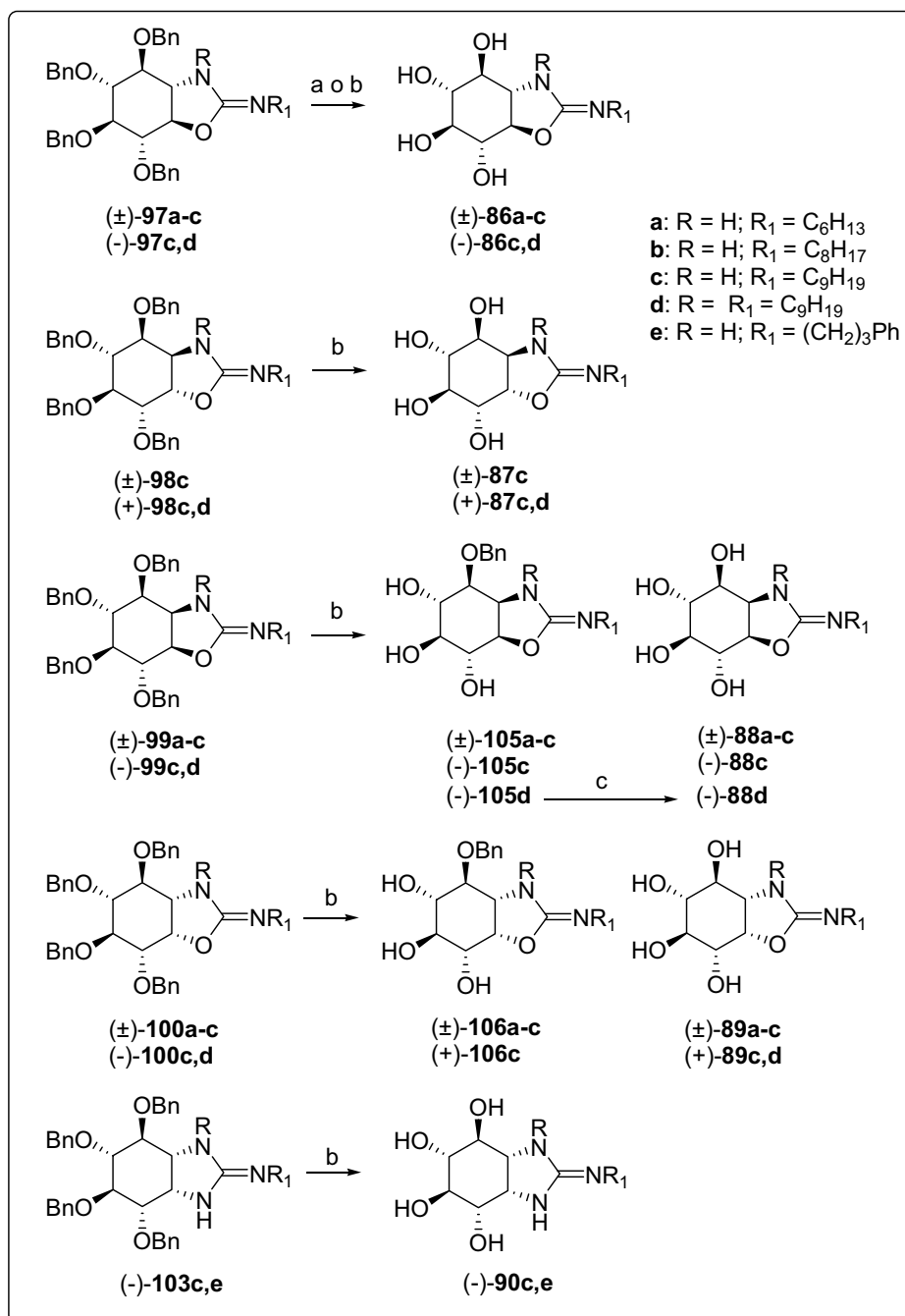
**Figura 6.9.** Obtenció de la isourea bicíclica **97b** a partir de l'aminoalcohol **70**.

Una possible explicació per a la retenció en la configuració obtinguda del centre on es trobava l'alcohol secundari podria ser que no s'hagués format l'intermedi amb el grup hidroxil protegit en forma de triflat degut a que no és cinèticament favorable enfront la

formació d'altres possibles intermedis. Cal mencionar que en sistemes semblants ja s'havien trobat problemes alhora de fer reaccions de substitució nucleòfila del grup hidroxil un cop transformat en *O*-mesil degut a l'impediment estèric originat pels grups *O*-benzil presents a la molècula.<sup>199</sup> Així doncs, l'anhídrid triflic podria reaccionar amb la urea<sup>227</sup> i formar un intermedi, que després d'una ciclació intramolecular del grup hidroxil lliure conduiria a l'obtenció de la isourea bicíclica. D'aquesta manera, es podria formar una ortourea i, després de la transformació del grup hidroxil a triflat s'acabaria obtenint l'intermedi **A**, que per pèrdua de TfOH donaria la isourea amb retenció. També es podria formar l'intermedi **C** i, en presència d'una base, podria donar-se una reacció intramolecular i formar-se la isourea **97b**. Així mateix, a partir de l'intermedi **C** es podria formar la carbodiimida **B** i s'acabaria obtenint amb tots els intermedis la isourea amb retenció de la configuració del centre on es trobava l'alcohol secundari.<sup>228</sup>

Una altra possible explicació per a la retenció de la configuració podria ser que hi hagués una doble inversió en el centre on es troba el grup hidroxil. Com per exemple, a partir de la urea amb el grup hidroxil adjacent transformat en triflat es podria formar una *N*-carbamoïlaziridina **D** i aquesta també podria conduir a l'obtenció de la isourea **97b** (Figura 6.9). En cap cas es van detectar els intermedis **A-D** en el transcurs de la reacció.

La desprotecció de tots els grups benzil de les isourees **97a-c** per hidrogenòlisi a 2 atm, utilitzant com a catalitzador Pd(OH)<sub>2</sub> i escalfant a 60 °C, tal i com es descriu a la literatura per a compostos similars,<sup>212,225,229</sup> donà les isourees bicíclics **86a-c** (Figura 6.10). D'altra banda, es va intentar l'obtenció de les isourees **88** i **89** de la mateixa forma i es van obtenir unes mesclades complexes en tots els casos. Com a alternativa, es va provar dur a terme les desproteccions dels grups benzil amb BCl<sub>3</sub> com ja s'havia fet amb alguns dels aminociclitols que s'han descrit anteriorment en aquesta memòria. Val a dir que en un principi, tenint en compte el medi àcid que s'hi genera amb aquest reactiu, ens va semblar que les isourees no serien estables en les condicions de la reacció. Per aquest motiu, les reaccions es van dur a terme a una temperatura més baixa (-78 °C durant 2 h i -40 °C durant 5 h) i es van obtenir uns bons resultats, fins i tot en alguns casos amb una simple precipitació amb AcOEt es va obtenir el producte desitjat i no va ser necessari purificar-lo per cromatografia en columna *flash* (Figura 6.10).



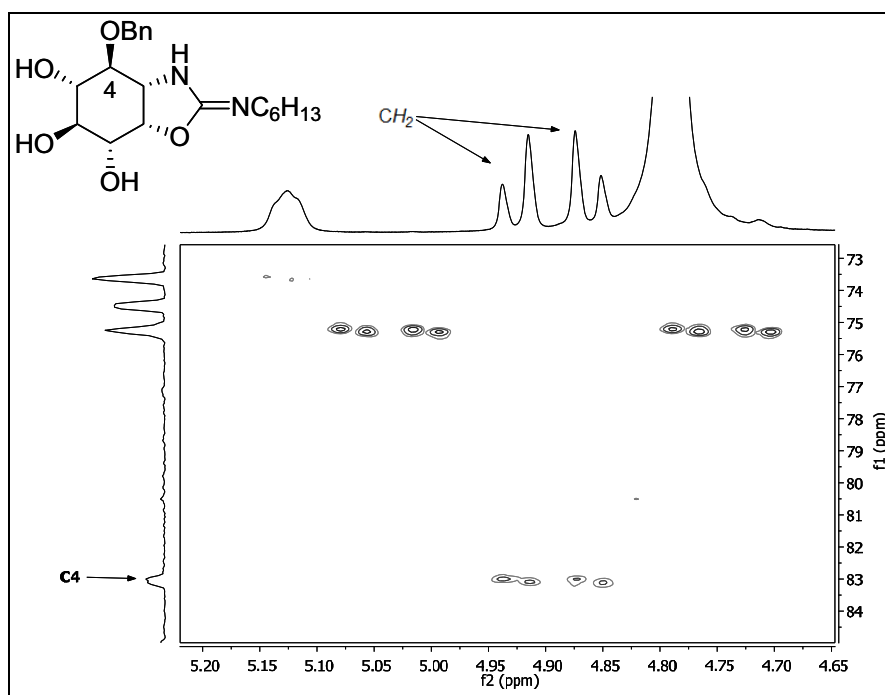
a) Pd(OH)<sub>2</sub>, EtOH, H<sub>2</sub> (2 atm), 60 °C, 18 h; b) BCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C (2 h), -40 °C (5 h); c) Pd/C, MeOH, H<sub>2</sub> (2 atm), t.a., 20 h.

**Figura 6.10.** Obtenció de les isourea i guanidines bicíclics 86-90.

En el cas de les desproteccions de les isoures **99** i **100**, es van obtenir com a subproductes les isoures **105** i **106**, respectivament, amb el grup hidroxil de la posició C4 protegit en forma d'èter benzílic. Així mateix, el tractament de la isourea **99d** amb BCl<sub>3</sub> donà únicament el compost **105d**. La desprotecció del grup benzil d'aquest compost es va dur a terme per hidrogenòlisi i es va aconseguir obtenir el producte final desitjat (**88d**), encara que es va

recuperar quasi un 50% del producte de partida. Els subproductes **105** i **106** es van separar de les isourees **88** i **89**, respectivament, per cromatografia en columna *flash* sobre gel de sílice.

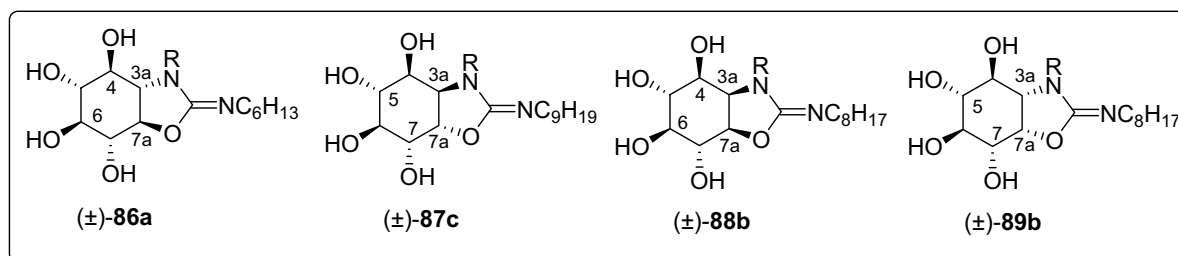
La posició del grup benzil en els subproductes **105** i **106** es va establir de manera inequívoca amb l'ajut dels experiments de correlació heteronuclear HMBC i HSQC de les isourees **105c** i **106a** (veure Figura 6.11 per al compost **106a**). Per una banda, en l'espectre HMBC del compost **105c**, els protons del metilè del grup benzil (4.57 i 4.82 ppm) correlacionen amb C4 (80.5 ppm). Per altra banda, en l'espectre HMBC del compost **106a** es pot observar una correlació entre els protons del metilè del grup benzil (4.86 i 4.93 ppm) amb C4 (82.7 ppm).



**Figura 6.11.** Espectre HMBC de la isourea **106a**.

### 6.2.2 Assignació estructural per RMN de les isourees i guanidines bicíclics

L'assignació estructural de tots els intermedis i productes finals s'ha realitzat amb un minuciós estudi per ressonància magnètica nuclear de protó i carboni-13 i s'han dut a terme experiments d'homo- i heterocorrelació per a la completa assignació dels senyals. A la Figura 6.12 es detalla l'assignació dels protons de les isourees **86a**, **87c**, **88b** i **89b**.



Compost (±)-86a			Compost (±)-87c		
protó	$\delta(^1\text{H})$ (m, J, Hz)	interaccions NOE	protó	$\delta(^1\text{H})$ (m, J, Hz)	interaccions NOE
H-7a	4.35 (t, 10.0)	H4/H6	H-7a	5.11 (d, 12.9)	H-7/H-5
H-7	4.00 (t, 7.0)	H3a	H-7	4.55-4.60 (m)	H-7a/H6
H-6	3.24-3.49 (m)	H-7a	H-6	4.12 (t, 3.5)	H-3a/H-5/H-7
H-5	3.24-3.49 (m)	H-3a	H-5	4.04 (t, 3.0)	H-4/H-6/H-7a
H-4	3.75 (t, 10.5)	H-7a	H-4	4.42-4.48 (m)	H-5
H-3a	3.79 (t, 10.5)	H-7/H-5	H-3a	4.52 (d, 14.2)	H-6

Compost (±)-88b			Compost (±)-89b		
protó	$\delta(^1\text{H})$ (m, J, Hz)	interaccions NOE	protó	$\delta(^1\text{H})$ (m, J, Hz)	interaccions NOE
H-7a	4.95-5.05 (m)	H-6	H-7a	5.18 (dd, 4.8, 6.7)	H-3a/H-7
H-7	3.86 (dd, 7.7, 10)	H-5	H-7	4.05 (dd, 4.3, 9.3)	H-5/H-7a
H-6	3.39-3.45 (m)	H-3a/H-4/H-7a	H-6	3.64 (t, 9.0)	H-4
H-5	3.65 (t, 8.3)	H-7	H-5	3.42 (t, 9.1)	H-3a/H-7
H-4	3.93 (dd, 4.6, 8.1)	H-3a/H-6	H-4	3.61 (dd, 8.0, 9.6)	H-6
H-3a	4.57 (dd, 4.9, 7.1)	H-4/H-6	H-3a	4.12 (t, 7.5)	H-5/H-7a

**Figura 6.12.** Assignació de l'espectre  $^1\text{H}$  RMN i interaccions NOEs observades en l'espectre ROESY de les isourees **86a**, **87c**, **88b** i **89b**.

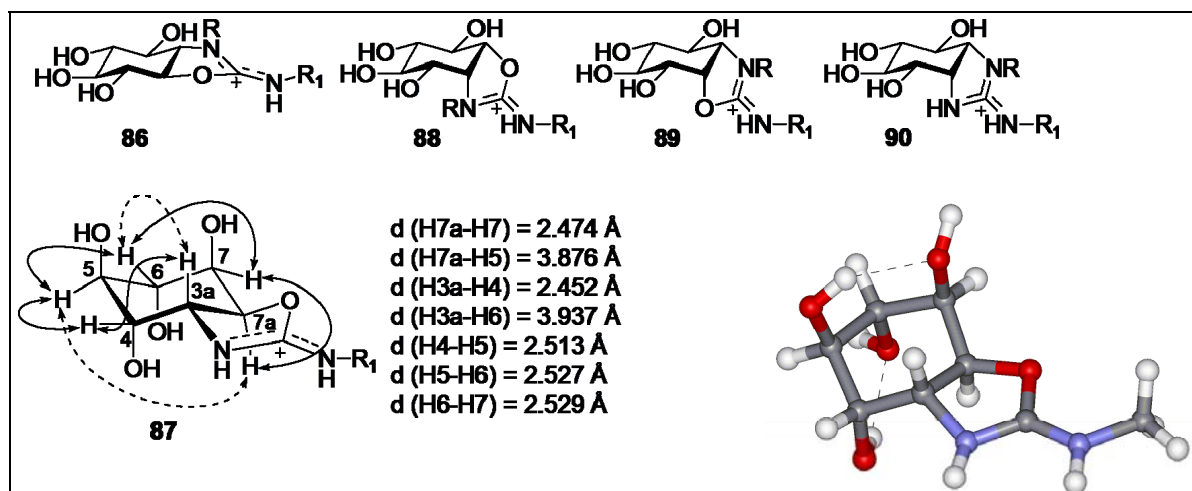
Un primer aspecte a comentar és la conformació que adopta el sistema bicíclic format per un anell de 6 baules fusionat amb un altre de 5 baules en cadascuna de les sèries. Amb aquest propòsit, un anàlisi de les constants d'acoblament entre els protons de l'anell de sis baules ens va ser molt útil.

D'acord amb les constants d'acoblament, l'anell de sis baules en les isourees **86**, **88** i **89** i les guanidines **90** adopta una conformació tipus cadira amb tots els grups hidroxil de les posicions 4-7 en disposició equatorial (Figura 6.13). Això està d'acord amb els valors grans de les constants d'acoblament observades entre els protons de les posicions 4-7 que confirma la disposició relativa *trans*-diaxial entre ells. D'aquesta manera, la isourea/guanidina fusionada adopta una disposició *trans*-diequatorial en la isourea **86** i una disposició *cis* en les isourees bicíclics **88-89** i en les guanidines **90c,e**.

En les isourees **87c** i **87d**, l'anell de sis baules adopta una conformació tipus cadira amb tots els grups hidroxil de les posicions 4-7 en disposició axial. Això està d'acord amb la

constant d'acoblament gran observada entre H3a i H7a ( ${}^3J_{\text{H3a-H7a}} = 12.9$  Hz), les constants d'acoblament petites trobades entre els altres protons de l'anell de sis baules ( ${}^3J_{\text{H-H}} = 3-4$  Hz) i els efectes NOE observats en l'espectre 2D ROESY (Figura 6.13).

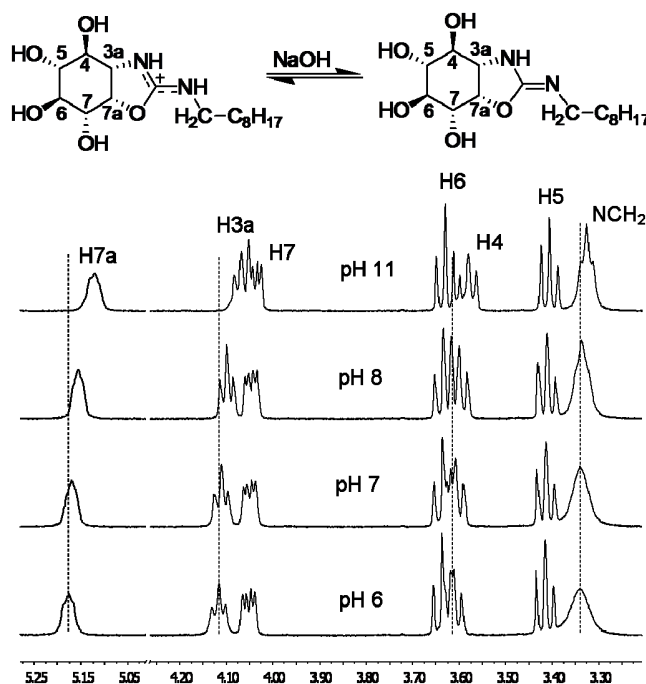
En una col·laboració amb el Dr. Ignacio Alfonso del departament de Química Biològica i modelització molecular (IQAC-CSIC), es va fer un càlcul teòric utilitzant B3LYP/6-31+G\* per a determinar la geometria optimitzada del compost **87c** simplificat (amb  $R_1 = \text{CH}_3$ ) i l'estructura optimitzada obtinguda es mostra a la Figura 6.13. Les distàncies trobades entre els protons de l'anell de sis baules estan d'acord amb els efectes NOE forts ( $\sim 2.5$  Å) i dèbils ( $\sim 3.9$  Å) que s'havien observat prèviament per RMN. A més, aquesta geometria podria estar estabilitzada per les interaccions per enllaç d'hidrogen entre els grups hidroxil en disposició axial (1-3 diaxial).



**Figura 6.13.** Conformacions tipus cadira observades (RMN) dels compostos **86-90**. Pel compost **87** es mostren els efectes NOE observats (forts: línia contínua, dèbils: línia discontinua) en l'espectre 2D ROESY (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K), la seva geometria optimitzada (de l'anàleg amb  $R_1 = \text{CH}_3$ , Spartan, B3LYP/6-31+G\*) i les distàncies entre els protons obtingudes.

Un altre aspecte que vàrem considerar interessant d'estudiar va ser l'estat de protonació dels productes finals en les condicions de pH utilitzades en els assaigs biològics. Tenint en compte el  $pK_a$  que solen tenir les guanidines, es pot assumir que aquesta sèrie està protonada a pH més baixos que 10. En el cas de les isoourees, encara que es podria esperar que es comportessin de la mateixa forma, vàrem decidir estudiar un dels compostos. Per fer-ho, es va enregistrar l'espectre RMN de protó en  $\text{D}_2\text{O}$  del compost **89c** a diferents valors de pH (entre pH 6 i 11). Si comparem l'espectre de RMN de protó enregistrarat a pH 11 amb els enregistrats entre pH 6 i pH 8 (Figura 6.14), s'observen diferències importants en els valors de desplaçament químic dels protons H3a, H4 i H7a. A més, en l'espectre RMN de protó

s'observa que el senyal corresponent als protons del metilè  $NCH_2$  a pH 6 és ample i, a mesura que el pH augmenta, aquest senyal va canviant de forma i a pH 11 s'observà un triplet a 3.33 ppm. Això estaria d'acord amb la desprotonació del nitrogen exocíclic i la formació de l'enllaç  $C=N$  exocíclic a pH 11. El conjunt d'aquests experiments i considerant el  $pK_a$  de la guanidina, podem concloure que tots els compostos (**86-90**) estan carregats positivament en les condicions de pH utilitzades en els assaigs biològics.



**Figura 6.14.** Espectres de RMN de protó de la isourea **89c** enregistrats entre pH 6 i pH 11.

Un últim aspecte a mencionar és que les isourees que tenen el protó N-H ( $R=H$ ), poden tenir dos possibles tautòmers amb l'enllaç  $C=N$  en la posició exocíclica o endocíclica. No es va observar cap correlació amb el protó N-H en l'espectre gDQCOSY de cap compost, degut a que el senyal apareixia solapat amb altres i/o s'intercanviava amb el dissolvent. En canvi, els desplaçaments químics dels protons i carbonis pròxims a la isourea van ser molt similars per a tots els compostos de la mateixa sèrie, incloent els que tenen l'àtom de nitrogen endocíclic substituït amb una alquilica de nou àtoms de carboni (família 'd') on només és possible l'enllaç  $C=N$  en la posició exocíclica. A més, en els espectres d'infraroig la banda corresponent a la tensió del grup  $C=N$  apareix a una freqüència al voltant de  $1700\text{ cm}^{-1}$  en tots els compostos (**97-100**). Aquestes observacions suggereixen la preferència del tautòmer amb l'enllaç  $C=N$  exocíclic.

## 6.3 Assaigs biològics dels compostos 86-90, 105 i 106.

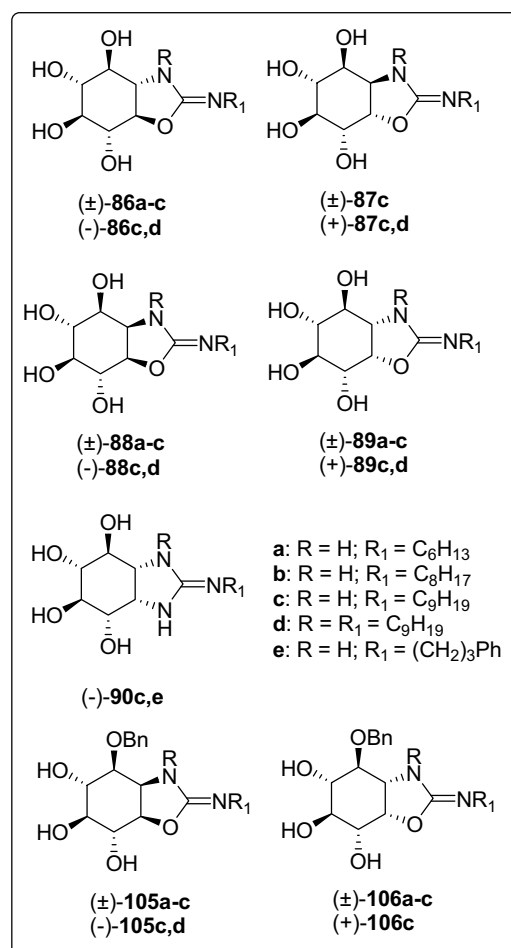
### 6.3.1 Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos 86-90, 105 i 106

#### Inhibició de la GCCase recombinant (imiglucerasa)

Un primer assaig que es va fer amb totes les isourees i guanidines bicíclics, incloent els subproductes **105** i **106**, va ser estudiar-les com a inhibidors de la GCCase recombinant (imiglucerasa, Cerezyme<sup>®</sup>) a pH 5.2.

**Taula 6.1.** Inhibició de la imiglucerasa per les isourees i guanidines bicíclics **86-90**, **105** i **106**.

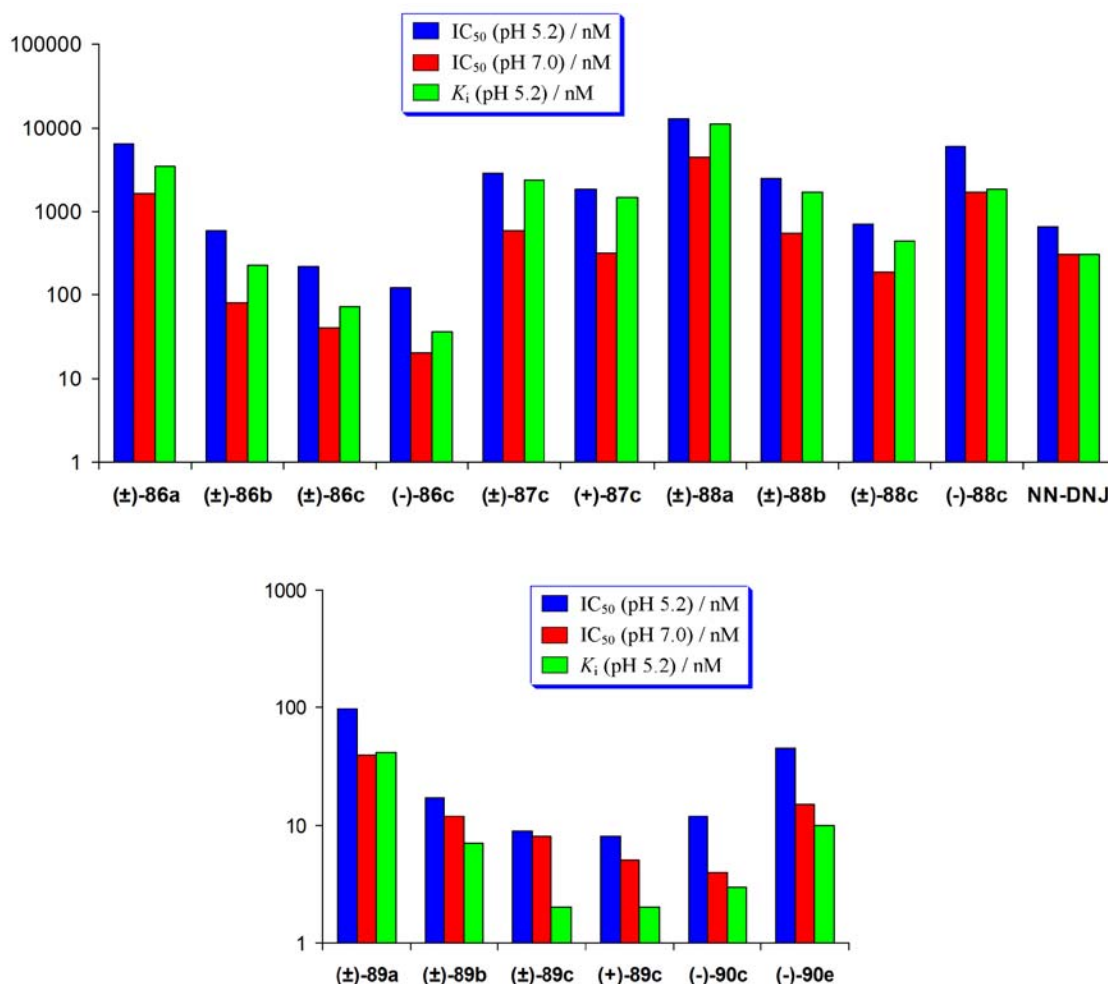
Compost	IC <sub>50</sub> (μM)		K <sub>i</sub> (μM) <sup>[a]</sup>
	pH 7.0	pH 5.2	
(±)- <b>86a</b>	1.63	6.44	3.39
(±)- <b>86b</b>	0.08	0.60	0.23
(±)- <b>86c</b>	0.04	0.22	0.074
(-)- <b>86c</b>	0.02	0.12	0.036
(-)- <b>86d</b>	5.57	11.1	12.5
(±)- <b>87c</b>	0.60	2.9	2.36
(+)- <b>87c</b>	0.32	1.86	1.50
(+)- <b>87d</b>	56.7	160	ND <sup>[b]</sup>
(±)- <b>88a</b>	4.38	12.9	11.1
(±)- <b>88b</b>	0.54	2.46	1.70
(±)- <b>88c</b>	0.19	0.71	0.44
(-)- <b>88c</b>	1.72	6.00	1.84
(-)- <b>88d</b>	1.23	10.4	4.79
(±)- <b>89a</b>	0.039	0.098	0.042
(±)- <b>89b</b>	0.012	0.017	0.007
(±)- <b>89c</b>	0.008	0.009	0.002
(+)- <b>89c</b>	0.005	0.008	0.002
(+)- <b>89d</b>	2.43	6.8	2.8
(-)- <b>90c</b>	0.004	0.012	0.003
(-)- <b>90e</b>	0.015	0.045	0.010
(±)- <b>105a</b>	ND <sup>[b]</sup>	64.4	25.9
(±)- <b>105b</b>	ND <sup>[b]</sup>	6.36	3.6
(±)- <b>105c</b>	ND <sup>[b]</sup>	1.34	0.53
(-)- <b>105c</b>	ND <sup>[b]</sup>	17.3	8.77
(-)- <b>105d</b>	ND <sup>[b]</sup>	157.4	ND <sup>[b]</sup>
(±)- <b>106a</b>	ND <sup>[b]</sup>	3.88	1.29
(±)- <b>106b</b>	ND <sup>[b]</sup>	0.74	0.13
(±)- <b>106c</b>	ND <sup>[b]</sup>	1.74	0.47
(+)- <b>106c</b>	ND <sup>[b]</sup>	0.35	0.18
NN-DNJ	0.30	0.66 <sup>[c]</sup>	0.30 <sup>[c]</sup>



[a] Tipus d'inhibició: competitiva.  
 [b] ND: no determinat. [c] Ref. <sup>124</sup>



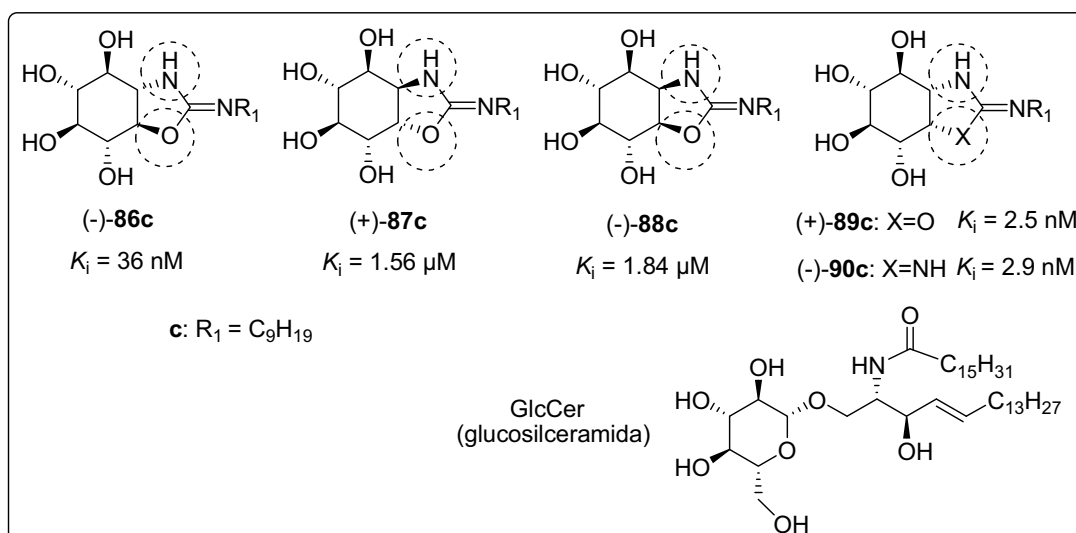
Com es pot observar a la Taula 6.1 i, com era d'esperar, la potencia inhibidora dels compostos amb un dels grups hidroxil protegit en forma d'èter benzílic (**105-106**) va ser inferior que les corresponents isourees bicíclics amb tots els grups hidroxil lliures, encara que per alguns d'ells es van obtenir uns valors de la  $K_i$  de l'ordre nanomolar. Així mateix, els *N*-nonil derivats (**86c**, **88c** i **89c**) van ser millors inhibidors de la imiglucerasa que els corresponents *N*-hexil i *N*-octil derivats de cadascuna de les sèries (veure Taula 6.1 i Figura 6.15). Amb la simple extensió de la cadena alquíllica d'octil o nonil, l'activitat inhibidora augmenta més de 3 vegades en les tres sèries. Això està d'acord amb la correlació entre la lipofília i l'activitat inhibidora que s'ha observat en altres famílies de compostos per aquest enzim, incloent-hi els aminociclitols  $C_7N$  descrits en aquesta memòria (veure apartat 4.3).<sup>33,121,124,126,131,202</sup>



**Figura 6.15.** Inhibició de la imiglucerasa per les isourees **86a-c**, **87c**, **88a-c**, **89a-c**, les guanidines **90c,e** i l'iminosucre NN-DNJ.

D'altra banda, la introducció d'una segona cadena alquíllica en el nitrogen endocíclic de les isourees **86c-89c** produeix una dràstica disminució de l'activitat inhibidora. Els valors de  $IC_{50}$  per als compostos **86d**, **88d** i **89d** són aproximadament de 10  $\mu\text{M}$  i en el cas de la isourea **87d** és de 160  $\mu\text{M}$ .

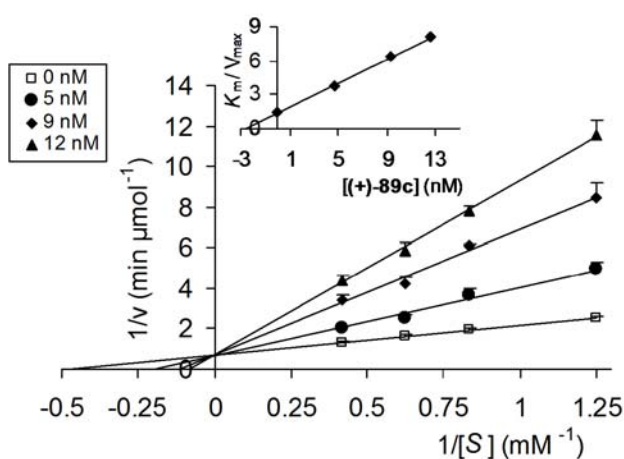
Encara que s'observi una bona correlació entre la lipofília i els valors de la  $K_i$ , la configuració dels centres on es troben els àtoms d'oxigen i de nitrogen de l'heterocicle fusionat són crucials per a la inhibició de la imiglucerasa (veure Figures 6.15 i 6.16). Per als compostos **87c** i **88a-c** s'han obtingut unes  $K_i$  entre 0.4 i 11  $\mu\text{M}$ , mentre que les isourees **86b-c**, **89a-c** i les guanidines **90c,e** són uns inhibidors més potents amb unes  $K_i$  de l'ordre nanomolar (2-230 nM). Val a dir que la importància en la configuració d'aquests centres per a la inhibició de la GCCase també s'havia trobat en la sèrie d'aminociclitols descrita en el capítol anterior (veure Figura 5.14 en el capítol 5). Un altre fet destacable en comparar les activitats de tots els compostos és que les sèries més actives (**86**, **89** i **90**) tenen l'àtom de nitrogen endocíclic en posició equatorial i mimetitzen millor a l'oxigen anomèric del  $\beta$ -glucòsid present en el substrat natural de la GCCase (GlcCer). Actualment s'està intentant cristal·litzar alguns d'aquests compostos amb l'enzim per tal de veure quines interaccions estableixen els inhibidors amb el centre actiu de la proteïna, tal i com està descrit amb la isofagomina.<sup>123</sup> D'aquesta manera, potser es podrà conèixer els motius de les diferències d'activitat observades en les isourees **89a-c**, que tenen l'àtom d'oxigen endocíclic en posició axial, i les isourees **86a-c** amb el mateix àtom en posició equatorial.



**Figura 6.16.** Estructures de les isourees **86c-89c** i la guanidina **90c** i inhibició de la imiglucerasa ( $K_i$ ).

Com es pot comprovar a la Figura 6.16, es van obtenir uns valors de  $K_i$  similars per a la isourea **89c** i la guanidina **90c**. Això suggereix que la substitució de l'oxigen de la isourea per un grup NH no afecta a la unió d'aquests compostos amb l'enzim. A més, la guanidina **90e**, amb un substituent *N*-3-fenilpropil, també és un potent inhibidor de la GCCase recombinant amb un valor de  $K_i$  de 10 nM. Aquest resultat podria indicar que altres substituents en el nitrogen exocíclic que no fossin cadenes alquíliques lineals també podrien ser uns bons inhibidors de la GCCase.

Els compostos **86-90**, **105** i **106** van presentar una inhibició de tipus competitiu, com es pot veure a la Figura 6.17 per a la isourea **89c**. Cal destacar que els valors de  $K_i$  determinats per a les isourees **89a-c** i les guanidines **90c,e** es troben entre 2 i 42 nM.

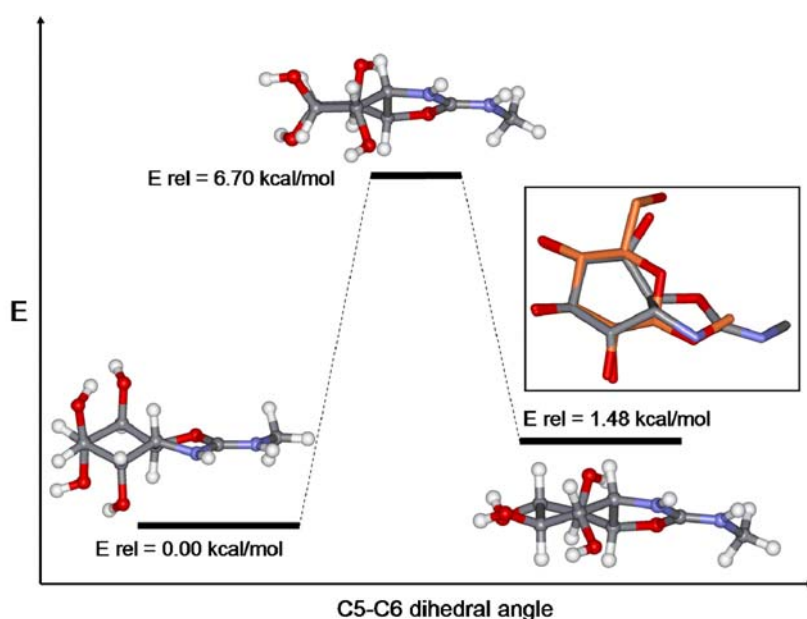


**Figura 6.17.** Inhibició de la imiglucerasa per la isourea **89c**. Representacions de Lineweaver-Burk i càlcul de la  $K_i$ .

Com ja s'ha comentat en més d'una ocasió en aquesta memòria, les xaperones farmacològiques s'uneixen a l'enzim mutant en el reticle endoplasmàtic (on hi ha un pH neutre), formen un complex estable i facilita el correcte plegament de la proteïna i el seu posterior transport al lisosoma. En aquest orgànul, la xaperona es separa de l'enzim pel baix pH i l'alta concentració de substrat i l'enzim realitza la seva funció. Així doncs, una xaperona farmacològica hauria de ser un inhibidor més efectiu al pH neutre, present en el reticle endoplasmàtic, que al pH àcid del lisosoma on s'ha de separar de l'enzim per poder hidrolitzar el substrat (GlcCer) i evitar la seva acumulació. Per tal de comparar les afinitats que tenen aquestes isourees i guanidines bicíclicues (**86-90**) per la imiglucerasa a pH àcid i a pH neutre, es van determinar també els valors de  $IC_{50}$  a pH 7.0 (veure Taula 6.1 i Figura 6.15). Com es pot observar, tots els compostos també van inhibir la imiglucerasa a pH neutre i, fins i tot, la potència inhibidora va augmentar fins a 8 vegades a aquest pH. Aquesta dependència de l'activitat inhibidora amb el pH s'ha descrit també en altres compostos com la isofagomina en fibroblasts wt i el fàrmac ambroxol, els quals s'han comportat com a

xaperones farmacològiques de la GCCase en fibroblasts de malalts de Gaucher amb diferents mutacions en l'enzim.<sup>82,85,135</sup>

Un últim aspecte a comentar és que les sèries **86** i **88-90** amb tots els grups hidroxil de les posicions 4-7 en disposició equatorial (veure Figures 6.13 i 6.16), es superposen bé amb l'anell de piranosa del substrat GlcCer. D'altra banda, en la sèrie **87**, com s'ha comentat en l'apartat anterior, l'anell de sis baules adopta una conformació tipus cadira amb tots els grups hidroxil de les posicions 4-7 en disposició axial i aquesta sèrie no es pot superposar tan bé amb l'anell de piranosa de la GlcCer. En canvi, s'han obtingut unes  $K_i$  per als compostos ( $\pm$ )-**87c** i (+)-**87c** de 2.36  $\mu\text{M}$  i 1.50  $\mu\text{M}$ , respectivament, i a més són inhibidors de tipus competitiu. Això feia pensar que la sèrie **87** podria adoptar una altra conformació diferent a la de tipus cadira a l'unir-se amb l'enzim, la qual es superposés millor amb la conformació del substrat natural i, així podria justificar l'activitat obtinguda en aquesta sèrie. Es va fer un càlcul amb el compost **87c** simplificat (amb el grup  $R_1=\text{CH}_3$ ) i es va trobar que la conformació tipus barca-torçada era només 1.48 kcal mol<sup>-1</sup> menys estable que la de tipus cadira (Figura 6.18). Per una banda, es va observar que aquesta conformació es superposava bé amb la de tipus cadira del substrat GlcCer (amb una estructura simplificada). Per altra banda, es va trobar que aquestes dues conformacions estan separades per una barrera energètica de només 6.7 kcal mol<sup>-1</sup>. Aquests fets podrien explicar el reconeixement de la isourea **87c** en el centre actiu de l'enzim, ja que hi ha conformacions accessibles energèticament i que tenen una disposició dels grups hidroxil semblant a la del substrat.



**Figura 6.18.** Estructures calculades (B3LYP/6-31+G\*) de les dues conformacions més estables (cadira i barca-torçada) i l'estat de transició que separa les dues conformacions per a la isourea **87c** amb una estructura simplificada ( $R_1=\text{CH}_3$ ) (C: gris; O: vermell; N: blau; H: blanc). També es representa la superposició de la conformació barca-torçada (àtoms de C: gris) i la conformació tipus cadira del  $\beta$ -OMe-glucòsid (àtom de C: taronja).

### Estudis d'inhibició enzimàtica dels compostos 86-90, 105 i 106 sobre diverses glicosidases comercials i la GCS

Es va estudiar també la selectivitat que presentaven les isourees **86-89**, les guanidines **90c,e** i els subproductes **105** i **106** per la imiglucerasa. Per fer-ho, es van determinar les seves activitats sobre diverses glicosidases comercials ( $\alpha$ -glucosidases d'arròs i de llevat del pa,  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla,  $\alpha$ -galactosidasa de gra de cafè verd i  $\beta$ -galactosidasa de fetge de bou) i la GCS. Les activitats obtingudes amb aquests compostos sobre diverses glicosidases comercials i la GCS s'indiquen a la Taula 6.2.

**Taula 6.2.** Inhibició de diverses glicosidases comercials<sup>[a]</sup> i la glucosilceramida sintasa (GCS) per les isourees i guanidines bicíclics.

Compost	$\alpha$ -Glucosidasa (de llevat del pa)	$\alpha$ -Glucosidasa (d'arròs)	$\beta$ -Glucosidasa (d'ametlla)	$\beta$ -galactosidasa (de fetge de bou)	GCS
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	% inhibició (250 $\mu$ M)
( $\pm$ )- <b>86a</b>	NI <sup>[b]</sup>	NI	NI	NI	NI
( $\pm$ )- <b>86b</b>	NI	NI	NI	85% <sup>[c]</sup>	NI
( $\pm$ )- <b>86c</b>	NI	NI	NI	NI	NI
(-)- <b>86c</b>	NI	NI	60% <sup>[c]</sup>	42% <sup>[c]</sup>	NI
(-)- <b>86d</b>	NI	NI	NI	NI	59%
( $\pm$ )- <b>87c</b>	NI	NI	NI	37% <sup>[c]</sup>	57%
(+)- <b>87c</b>	NI	NI	NI	NI	43%
(+)- <b>87d</b>	NI	NI	NI	35% <sup>[c]</sup>	90% <sup>[d]</sup>
( $\pm$ )- <b>88a</b>	0.9	33.9	NI	52% <sup>[c]</sup>	NI
( $\pm$ )- <b>88b</b>	0.8	22.9	NI	84% <sup>[c]</sup>	NI
( $\pm$ )- <b>88c</b>	0.8	12.9	NI	85% <sup>[c]</sup>	NI
(-)- <b>88c</b>	0.6	6.3	NI	47% <sup>[c]</sup>	35%
(-)- <b>88d</b>	NI	NI	NI	NI	35% <sup>[d]</sup>
( $\pm$ )- <b>89a</b>	NI	NI	15.7	0.14	44%
( $\pm$ )- <b>89b</b>	NI	NI	9.2	0.04	NI
( $\pm$ )- <b>89c</b>	NI	NI	9.8	0.02	NI
(+)- <b>89c</b>	NI	NI	6.9	0.01	NI
(+)- <b>89d</b>	NI	NI	NI	NI	59%
(-)- <b>90c</b>	48% <sup>[c]</sup>	NI	40% <sup>[c]</sup>	0.06	NI
(-)- <b>90e</b>	69% <sup>[c]</sup>	NI	5.2	0.18	NI
( $\pm$ )- <b>105a</b>	NI	NI	NI	NI	NI
( $\pm$ )- <b>105b</b>	59% <sup>[c]</sup>	NI	NI	NI	NI
( $\pm$ )- <b>105c</b>	1.9	36.2	NI	73% <sup>[c]</sup>	NI
(-)- <b>105c</b>	57	NI	NI	NI	67%
(-)- <b>105d</b>	NI	NI	NI	NI	64% <sup>[d]</sup>
( $\pm$ )- <b>106a</b>	54% <sup>[c]</sup>	NI	NI	49% <sup>[c]</sup>	NI
( $\pm$ )- <b>106b</b>	NI	NI	NI	81% <sup>[c]</sup>	NI
( $\pm$ )- <b>106c</b>	NI	NI	NI	74% <sup>[c]</sup>	NI
(+)- <b>106c</b>	NI	NI	NI	3.7	67%

[a] Cap compost a 100  $\mu$ M va inhibir l' $\alpha$ -Galactosidasa (de gra verd de cafè). [b] NI: No inhibeix a una concentració de 100  $\mu$ M ( $\alpha$ -Glucosidasa,  $\beta$ -Glucosidasa,  $\beta$ -Galactosidasa) i a 250  $\mu$ M (GCS). [c] % d'inhibició a 100  $\mu$ M. [d] No inhibeix a una concentració de 50  $\mu$ M.

Tots els compostos van ser inactius a una concentració de 100  $\mu\text{M}$  sobre l'enzim  $\alpha$ -galactosidasa, mentre que els compostos **88a-c**, els quals tenen l'àtom de nitrogen endocíclic en posició axial, van presentar activitat inhibidora de les  $\alpha$ -glucosidases de llevat del pa i d'arròs amb valors de  $\text{IC}_{50}$  de 0.6-0.9  $\mu\text{M}$  i 6-34  $\mu\text{M}$ , respectivament. Aquest resultat està d'acord amb que l'àtom de nitrogen endocíclic en posició axial mimetitza a l'oxigen anomèric de l' $\alpha$ -glucòsid present en el substrat natural de l' $\alpha$ -glucosidasa. També es van assajar aquests compostos com a inhibidors de l' $\alpha$ -glucosidasa lisosomal en fibroblasts wt (en cèl·lules intactes) després de 24 h d'incubació. A una concentració de 50  $\mu\text{M}$  es va observar menys del 7% d'inhibició (veure Taula 6.3).

D'altra banda, les isourees **89a-c** i les guanidines **90c,e** van presentar activitat inhibidora de la  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla i la  $\beta$ -galactosidasa de fetge de bou i es van obtenir uns valors de  $\text{IC}_{50}$  en el rang micromolar o fins i tot nanomolar en algun cas. Com es pot observar a la Taula 6.2, es va trobar una correlació entre la lipofília i la inhibició d'aquests enzims. Cal dir que es van assajar aquests compostos com a inhibidors de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal en fibroblasts wt (en cèl·lules intactes) després de 24 h d'incubació. A una concentració de 50  $\mu\text{M}$  es va observar menys del 2% d'inhibició (veure Taula 6.3).

**Taula 6.3.** Inhibició de l' $\alpha$ -glucosidasa i la  $\beta$ -galactosidasa lisosomals (% inhibició) en fibroblasts wt pels compostos bicíclics (50  $\mu\text{M}$ ) després de 24 h d'incubació.

Compost	$\alpha$ -Glucosidasa	$\beta$ -Galactosidasa
( $\pm$ )- <b>105c</b>	6	ND
( $\pm$ )- <b>88a</b>	0	ND
( $\pm$ )- <b>88b</b>	2	ND
( $\pm$ )- <b>88c</b>	4	0
(-)- <b>88c</b>	7	ND
( $\pm$ )- <b>89a</b>	ND	0
( $\pm$ )- <b>89b</b>	ND	2
( $\pm$ )- <b>89c</b>	ND	0
(+)- <b>89c</b>	17	1
(-)- <b>90c</b>	ND	0
(-)- <b>90e</b>	ND	2

Pel que fa a la inhibició de la GCS en homogenats de cèl·lules A549 (cèl·lules epitelials de càncer de pulmó), la isourea **87d** i els subproductes **105c,d** i **106c** a 250  $\mu\text{M}$  van presentar entre 64-90% d'inhibició i per a les isourees **86d**, **87c** i **89a,d** a una concentració de 250  $\mu\text{M}$

es van obtenir una inhibició al voltant del 50%. Aquest assaig va ser realitzat en els nostres laboratoris per la Dra. Meritxell Egidio-Gabás.

### 6.3.2 Inhibició de la GCCase pels compostos 86-90 en fibroblasts wt d'humans

Un cop estudiada l'activitat d'aquests compostos com a inhibidors de la imiglucerasa, es va determinar la inhibició de la GCCase en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) pels compostos **86-90**, tal i com es va fer amb els amino- i diaminociclitols (veure capítol 5, apartat 5.3.2). Per tal de fer aquest assaig es van incubar els fibroblasts wt d'humans amb cadascun dels compostos durant 24 h i després es va mesurar l'activitat enzimàtica (veure part experimental).

Per tal d'assegurar que una disminució de la fluorescència significava una disminució de l'activitat de la GCCase i no era el producte de la mort cel·lular provocada per una possible toxicitat dels compostos, es va estudiar la toxicitat dels compostos amb el mètode del MTT. A la Taula 6.4 es presenten els valors de  $CC_{50}$  (concentració citotòxica 50) per a les isourees que van presentar citotoxicitat després d'una incubació de 24 h, mentre que la resta de compostos no van ser tòxics a concentracions inferiors a 300  $\mu$ M. Com es pot observar en aquesta Taula, les isourees amb els àtoms de nitrogen endocíclic i exocíclic substituïts amb una cadena alquílica de nou àtoms de carboni (**86d-89d**) van presentar certa citotoxicitat amb valors de  $CC_{50}$  entre 13 i 15  $\mu$ M.

**Taula 6.4.** Citotoxicitat de les isourees bicíclics **86d-89d** en fibroblasts wt d'humans.

Compost	Citotoxicitat $CC_{50}$ ( $\mu$ M)
(-)- <b>86d</b>	15
(+)- <b>87d</b>	13
(-)- <b>88d</b>	13
(+)- <b>89d</b>	13

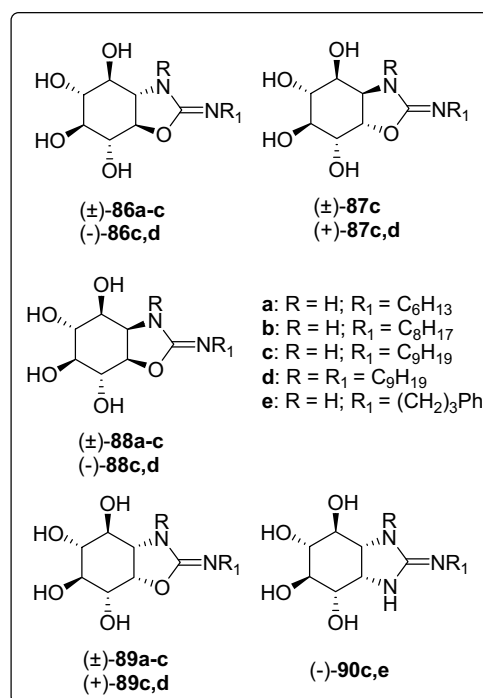
Un cop determinada la toxicitat, es va estudiar l'activitat inhibidora que presentaven els compostos no tòxics sobre la GCCase en fibroblasts wt a una concentració de 50  $\mu$ M i després d'una incubació de 24 h. Els productes que van presentar citotoxicitat (**86d-89d**) es van assajar a una concentració de 5  $\mu$ M.

Com es pot observar a la Taula 6.5, les isourees **88a-c** i **87c** van presentar una inhibició inferior al 53% a 50  $\mu$ M, mentre que per a les isourees **86b,c**, **89a-c** i les guanidines **90c,e** es

van observar inhibicions superiors al 67% a la mateixa concentració. Novament, els *N*-nonil derivats (**86c**, **88c** i **89c**) van ser millors inhibidors de la GCCase que els corresponents *N*-hexil i *N*-octil derivats de cadascuna de les sèries.

**Taula 6.5.** Inhibició de la GCCase en fibroblasts wt pels compostos **86-90** i l'iminosucre NN-DNJ.

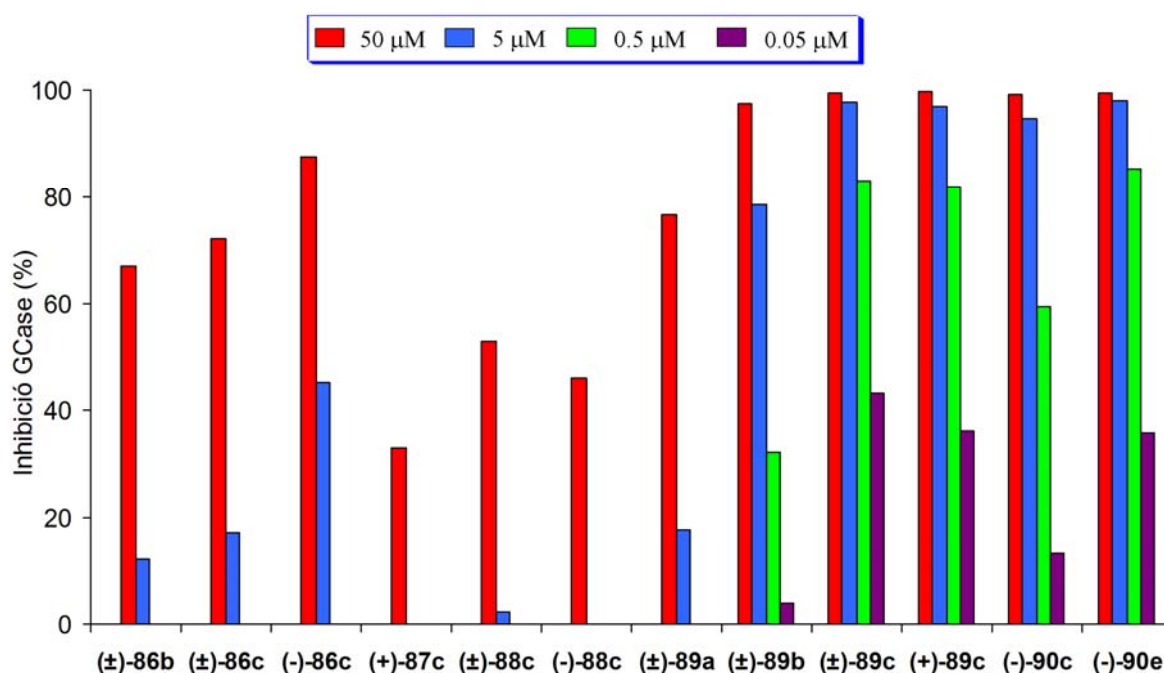
Compost	% Inhibició GCCase (en fibroblasts wt) <sup>[a]</sup>
(±)- <b>86a</b>	4
(±)- <b>86b</b>	67
(±)- <b>86c</b>	72
(-)- <b>86c</b>	87
(-)- <b>86d</b>	24 <sup>[b]</sup>
(±)- <b>87c</b>	34
(+)- <b>87c</b>	33
(+)- <b>87d</b>	40 <sup>[b]</sup>
(±)- <b>88a</b>	0
(±)- <b>88b</b>	2
(±)- <b>88c</b>	53
(-)- <b>88c</b>	46
(-)- <b>88d</b>	63 <sup>[b]</sup>
(±)- <b>89a</b>	77
(±)- <b>89b</b>	97
(±)- <b>89c</b>	99
(+)- <b>89c</b>	99
(+)- <b>89d</b>	17 <sup>[b]</sup>
(-)- <b>90c</b>	99
(-)- <b>90e</b>	100
NN-DNJ	56



[a] Incubació durant 24 h amb una concentració d'inhibidor de 50  $\mu$ M en fibroblasts wt. [b] Tòxic a 50  $\mu$ M. Incubació durant 24 h amb una concentració d'inhibidor de 5  $\mu$ M en fibroblasts wt.

Les isourees **86b-c**, **88c**, **89a-c** i les guanidines **90c,e**, les quals van presentar un elevat percentatge d'inhibició a 50  $\mu$ M, també es van assajar a concentracions més baixes. Com es pot observar a la Figura 6.19, les isourees **89b-c** i les guanidines **90c,e** també van ser uns bons inhibidors de la GCCase en cultius cel·lulars a una concentració de 500 nM o fins i tot 50 nM. Aquests resultats mostren que aquests compostos són uns potents inhibidors de la GCCase en cultius cel·lulars i presenten una bona permeabilitat i estabilitat cel·lular que permet una potent inhibició de l'enzim.





**Figura 6.19.** Inhibició de la GCCase per alguns dels compostos bicíclics en fibroblasts wt després d'una incubació de 24 h.

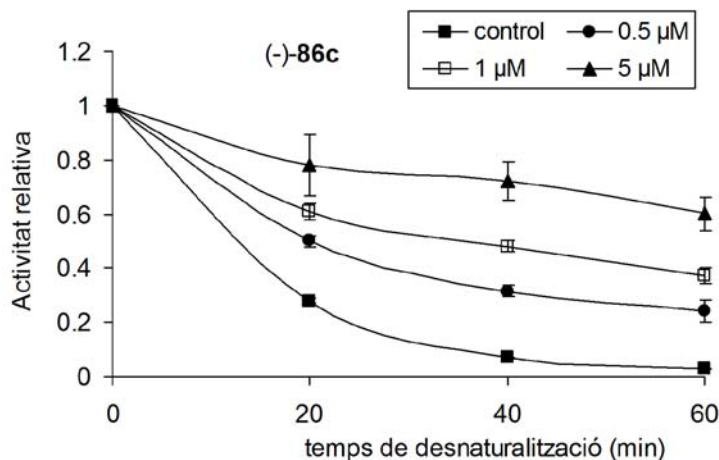
### 6.3.3 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa en presència dels compostos 86c-90c, 86d, 80d, 90e i l'imosucre NN-DNJ.

Com ja s'ha esmentat en la introducció general d'aquesta memòria, en les malalties lisosomals com la de Gaucher, la manca d'activitat enzimàtica és deguda, en la gran majoria de casos, a la presència de mutacions en el gen precursor de l'enzim que provoca un plegament incorrecte de la proteïna i aquesta és degradada en el mateix reticle endoplasmàtic o bé en l'aparell de Golgi pels proteasomes. Una de les teràpies que ha despertat un gran interès consisteix en el disseny de xaperones farmacològiques, les quals s'uneixen a l'enzim mutant en el reticle endoplasmàtic per a formar un complex que l'estabilitza, facilita el seu correcte plegament i el posterior transport al lisosoma, resultant en un augment net de l'activitat enzimàtica i una reducció en l'acumulació de substrat.

L'assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa en presència de candidats a xaperones farmacològiques s'utilitza per tal d'estudiar l'efecte protector del compost sobre l'enzim en presència de condicions desnaturalitzants.<sup>115,130,135</sup> En aquest assaig es mesura l'activitat de l'enzim sense desnaturalitzar en absència i en presència de diferents concentracions del candidat a xaperona farmacològica. A més, es determinen les activitats residuals de la GCCase recombinant un cop s'ha desnaturalitzat tèrmicament (a 48 °C) a diferents temps d'incubació, així com la seva recuperació en presència dels candidats a xaperones farmacològiques als mateixos temps d'incubació.

Així doncs, es va incubar la imiglucerasa a 48 °C durant 20, 40 i 60 min, en absència (control) i en presència de diferents concentracions dels compostos bicíclics **86c-90c**, **86d**, **89d** i **90e**. Un cop s'ha fet una dilució de la mescla enzim-inhibidor i s'ha afegit el substrat, es fa una altra incubació a 37 °C durant 10 min i es mesura l'activitat de l'enzim mitjançant la quantificació de la 4-metilumbel·liferona que s'ha alliberat per la hidròlisi enzimàtica del substrat (veure part experimental).

L'activitat enzimàtica relativa per a cada temps de desnaturalització i concentració d'inhibidor es determina com el quocient entre l'activitat residual de l'enzim a un temps donat de desnaturalització i l'activitat de l'enzim sense desnaturalitzar. Si es representa l'activitat relativa de la imiglucerasa enfront el temps de desnaturalització s'obté un perfil com el que es representa a la Figura 6.20 per a la isourea (-)-**86c**. Com es pot veure l'activitat disminueix amb el temps en el control (en absència de la isourea (-)-**86c**), en canvi amb la presència de la isourea bicíclica a concentracions de 0.5, 1 i 5 µM la disminució és menor. Aquest perfil obtingut és indicatiu que aquest compost és capaç d'estabilitzar l'activitat de la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica.

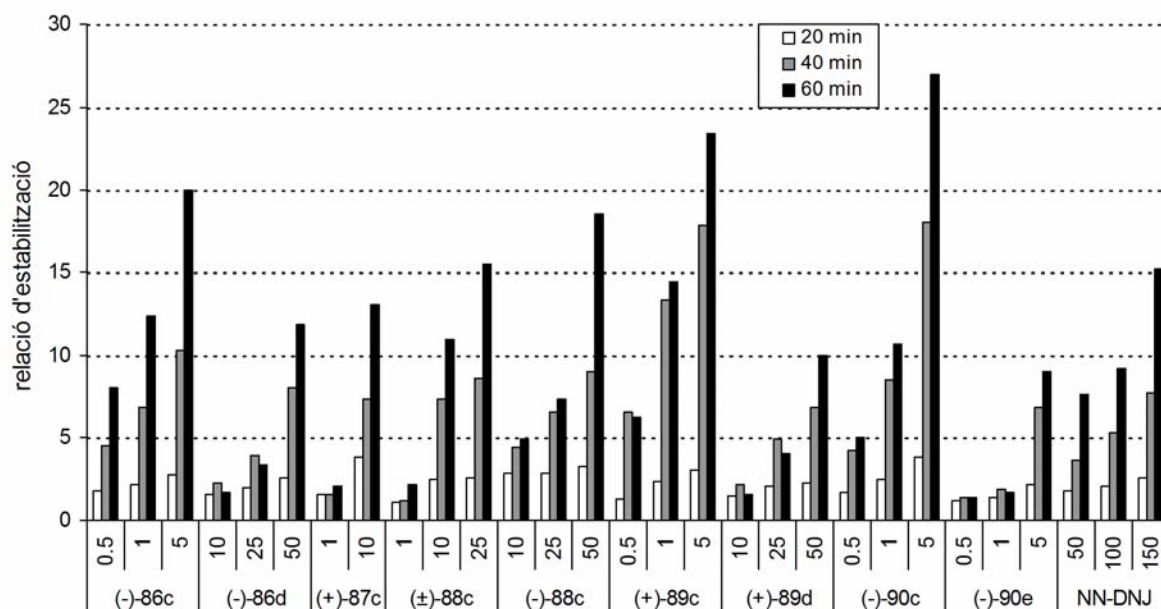


**Figura 6.20.** Efecte de la isourea (-)-**86c** sobre la pèrdua de l'activitat de la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica.

A la Figura 6.21 s'indiquen les relacions d'estabilització obtingudes amb els compostos bicíclics **86c-90c**, **86d**, **89d** i **90e** i l'iminosucre NN-DNJ que s'han determinat com el quocient entre l'activitat enzimàtica relativa a una concentració d'inhibidor i temps de desnaturalització determinats (20, 40 o 60 min) i l'activitat enzimàtica relativa del control (sense inhibidor) al mateix temps de desnaturalització.

Així mateix, a la Taula 6.6 s'indiquen els valors de les relacions d'estabilització després de 60 min d'incubació a una concentració de:

- 5  $\mu\text{M}$  per a les isourees **86c**, **89c** i les guanidines **90c,e**
- 10  $\mu\text{M}$  per a les isourees **86d**, **87c**, **88c** i **89d**
- 50  $\mu\text{M}$  per a la NN-DNJ



**Figura 6.21.** Relacions d'estabilització (relació entre l'activitat enzimàtica relativa obtinguda en presència de l'inhibidor respecte al control no tractat) dels compostos bicíclics **86c-90c**, **86d**, **89d**, **90e** i l'iminosucre NN-DNJ en condicions de desnaturalització tèrmica a 48 °C durant 20, 40 i 60 min a les concentracions indicades ( $\mu\text{M}$ ).

Com es pot observar a la Taula 6.6 i a la Figura 6.21, tots els compostos van estabilitzar a la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica. És interessant destacar que per als compostos **86c**, **89c**, **90c** i **90e**, els quals van presentar una elevada potència inhibidora de la GCase recombinant amb valors de la  $K_i$  de l'ordre nanomolar, es van obtenir unes relacions d'estabilització entre 9 i 27 a una concentració de 5  $\mu\text{M}$  i després de 60 min d'incubació a 48 °C. A més, aquests compostos es van assajar a concentracions més baixes (1  $\mu\text{M}$  i 0.5  $\mu\text{M}$ ) i es van obtenir unes relacions d'estabilització superiors a 5 després de 60 min d'incubació a 48 °C.

Així mateix, per als compostos **86d** i **89d**, els quals no van presentar una activitat inhibidora significativa sobre la imiglucerasa, es va observar que tenien un efecte protector sobre aquest enzim superior a la NN-DNJ a una concentració de 50  $\mu\text{M}$ . Per a aquestes isourees es van obtenir unes relacions d'estabilització al voltant de 10 a una concentració de 50  $\mu\text{M}$  i després de 60 min d'incubació.

**Taula 6.6.** Relacions d'estabilització en condicions de desnaturalització tèrmica (48 °C) durant 60 min de la imiglucerasa.

Compost	Relació d'estabilització <sup>[a]</sup>
(-)- <b>86c</b>	20 <sup>[b]</sup>
(-)- <b>86d</b>	1.7
(+)- <b>87c</b>	13
(±)- <b>88c</b>	11
(-)- <b>88c</b>	5
(+)- <b>89c</b>	23 <sup>[b]</sup>
(+)- <b>89d</b>	1.5
(-)- <b>90c</b>	27 <sup>[b]</sup>
(-)- <b>90e</b>	9 <sup>[b]</sup>
NN-DNJ	7.6 <sup>[c]</sup>

[a] Concentració de compost: 10 µM. [b] Concentració de compost: 5 µM.

[c] Concentració de compost: 50 µM.

#### 6.3.4 Estudi de l'activitat xaperona de les isourees i guanidines bicíclicues en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P

L'últim aspecte que es va estudiar amb algunes isourees bicíclicues de cadascuna de les sèries i les dues guanidines bicíclicues va ser el seu comportament com a xaperones farmacològiques en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les dues mutacions més freqüents en el gen precursor de la GCCase (N370S i L444P).

Es va decidir agafar de cada sèrie, els compostos amb una cadena alquílica de 9 àtoms de carboni en l'àtom de nitrogen exocíclic (**86c-90c**). Així mateix, un cop vist l'efecte de la guanidina **90e** sobre la GCCase en cultius cel·lulars i sobre la imiglucerasa, es va estudiar també com a xaperona farmacològica.

Una part dels estudis fets amb la mutació N370S es van fer durant una estada de tres mesos al Department of Biochemistry de la Universitat d'Òxford sota la supervisió del Dr. Terry D. Butters.

Per tal de determinar el potencial dels compostos com a xaperones farmacològiques, es van incubar els limfoblasts durant 3 dies en absència i en presència de cadascun dels compostos a diferents concentracions i es va determinar l'activitat de la GCCase, tal i com es van assajar els amino- i diaminociclitols (veure apartat 5.3.4). L'iminosucre NN-DNJ, que està descrit com a xaperona farmacològica per a la GCCase amb la mutació N370S però no per a la L444P, es va utilitzar com a control. El màxim increment de l'activitat de la GCCase

observat per a les dues mutacions, així com la concentració a la que s'han assajat cadascun dels compostos es detallen a la Taula 6.7. A més, en les Figures 6.22 i 6.24 s'indiquen els increments de l'activitat obtinguts a totes les concentracions a les que s'han assajat les isourees i les guanidines bicíclicues.

**Taula 6.7.** Màxim increment de l'activitat de la GCCase observat per incubació de limfoblasts de malalts de Gaucher amb les isourees **86c-89c**, les guanidines **90c,e** i l'iminosucre NN-DNJ.

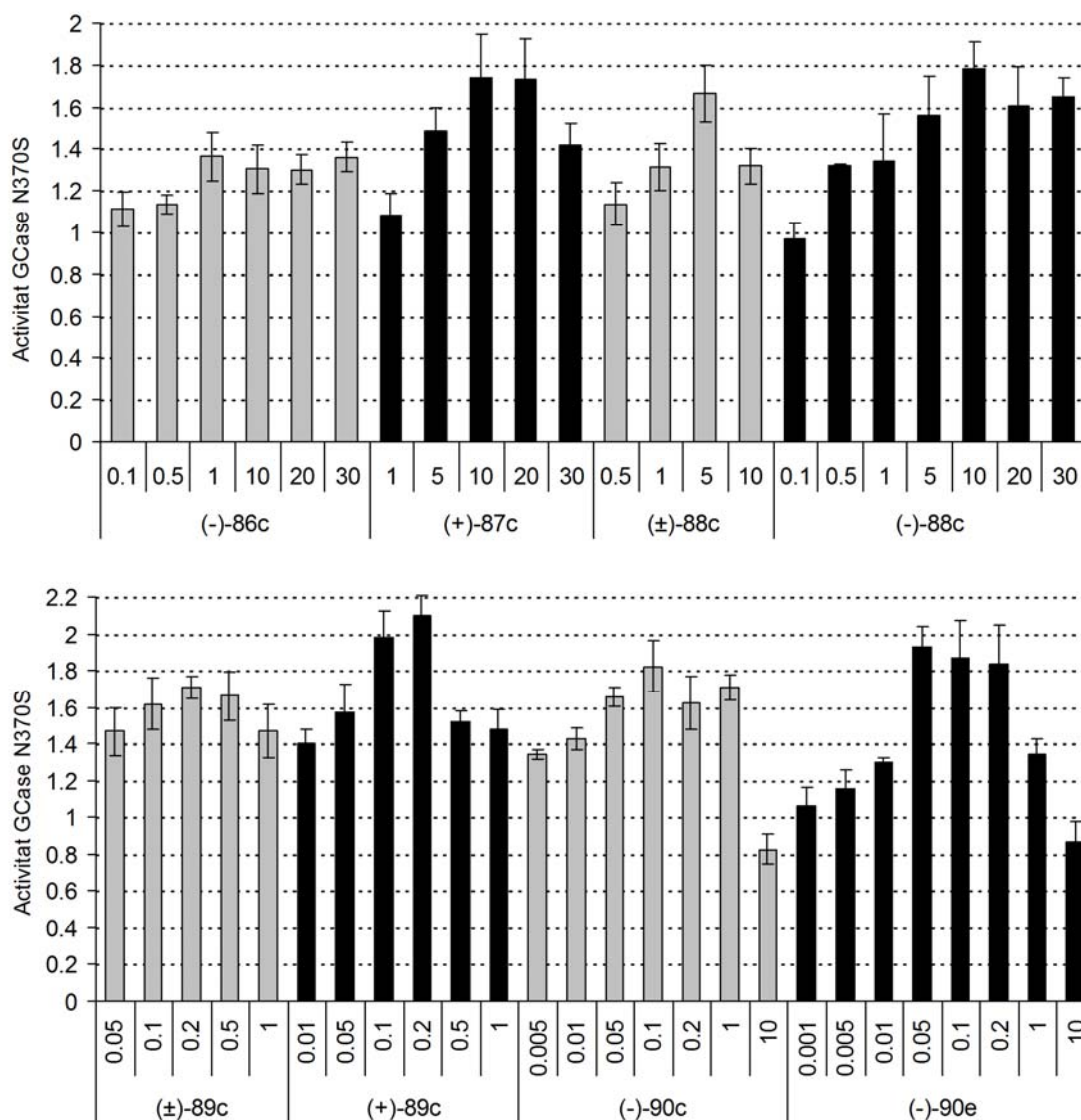
Compost	Màxim increment de l'activitat GCCase N370S <sup>[a]</sup>	Màxim Increment de l'activitat GCCase L444P <sup>[a]</sup>
(-)- <b>86c</b>	1.4 ± 0.1 (1 µM)	1.1 ± 0.1 (1 µM)
(+)- <b>87c</b>	1.7 ± 0.2 (10 µM)	1.3 ± 0.1 (1 µM)
(±)- <b>88c</b>	1.7 ± 0.1 (5 µM)	ND <sup>[b]</sup>
(-)- <b>88c</b>	1.8 ± 0.1 (10 µM)	1.4 ± 0.1 (0.1 µM)
(±)- <b>89c</b>	1.7 ± 0.1 (0.2 µM)	ND <sup>[b]</sup>
(+)- <b>89c</b>	2.1 ± 0.1 (0.2 µM)	1.5 ± 0.1 (0.01 µM)
(-)- <b>90c</b>	1.8 ± 0.1 (0.1 µM)	1.4 ± 0.1 (0.01 µM)
(-)- <b>90e</b>	1.9 ± 0.1 (0.05 µM)	1.4 ± 0.1 (0.01 µM)
NN-DNJ	1.4 ± 0.1 (5 µM)	No incrementa

[a] Els limfoblasts es van incubar amb els compostos durant 3 dies abans de mesurar l'activitat enzimàtica. Les dades entre parèntesi corresponen a la concentració a la que s'ha assajat el compost i s'ha obtingut el màxim increment de l'activitat de la GCCase. [b] ND: no determinat.

Com es pot observar, s'ha trobat una bona correlació entre la inhibició de la GCCase i la concentració a la que s'ha obtingut un màxim increment de l'activitat enzimàtica, a excepció de la isourea (-)-**86c**. Es va observar que aquesta isourea tenia una gran afinitat per la GCCase ( $K_i=36$  nM (imiglucerasa) i 87% d'inhibició a 50 µM (en fibroblasts wt)) i un efecte protector sobre la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica (a una concentració de 5 µM es va obtenir una relació d'estabilització de 20), però únicament es va obtenir un 40% d'increment de l'activitat de la GCCase amb la mutació N370S. Per contra, la resta d'isourees i guanidines bicíclicues van augmentar més d'1.7 i 1.3 vegades l'activitat enzimàtica de la GCCase amb les mutacions N370S i L444P, respectivament, a alguna de les concentracions en les que es van assajar els compostos.

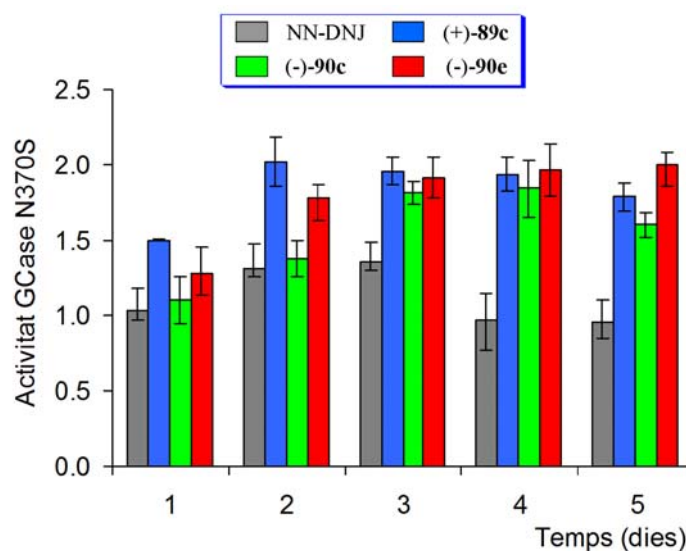
El tractament amb les isourees (+)-**87c** i (-)-**88c**, a una concentració de 10 µM, va produir un augment de l'activitat de la GCCase amb la mutació N370S d'1.7 i 1.8 vegades,

respectivament. D'altra banda, els compostos **89c**, **90c** i **90e** van arribar a augmentar l'activitat entre 1.7 i 2.1 vegades, a concentracions de l'ordre nanomolar (entre 50 nM i 200 nM). Utilitzant les mateixes condicions, la NN-DNJ a una concentració de 5  $\mu$ M va produir un augment del 40% en l'activitat enzimàtica. Cal mencionar que amb els compostos **89c**, **90c** i **90e** es va obtenir un augment aproximadament del 40% en l'activitat de la GCase amb la mutació N370S a una concentració de tan sols 10 nM (veure Figura 6.22).



**Figura 6.22.** Efecte dels compostos **86c-90c** i **90e** sobre l'activitat de la GCase en limfoblasts (GM10873) de malalts de Gaucher amb la mutació N370S. Es va fer una incubació de les cèl·lules durant 3 dies en absència i en presència de diferents concentracions ( $\mu$ M) de cada compost abans de mesurar l'activitat de la GCase. Els experiments es van fer per triplicat i els resultats corresponen a la mitja  $\pm$  desviació estàndard. L'activitat enzimàtica s'ha normalitzat respecte l'activitat de les cèl·lules no tractades, la qual s'ha assignat a una activitat relativa d'1.

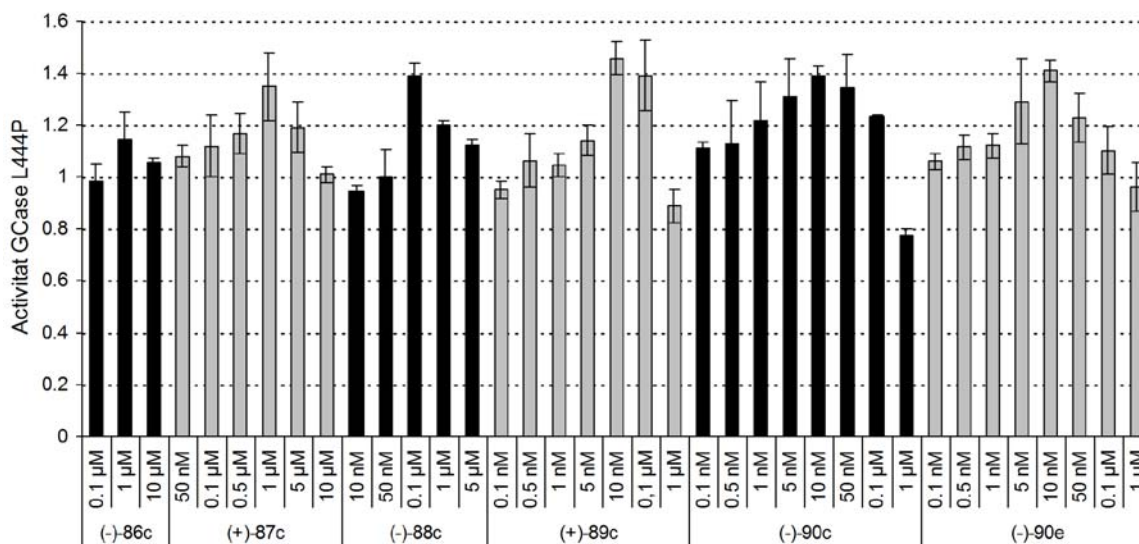
Finalment, tal i com es va fer amb els amino- i diaminociclitols, es va estudiar l'activitat xaperona de la isourea **89c** i les guanidines **90c** i **90e** durant 5 dies d'incubació amb limfoblasts de malalts de Gaucher amb la mutació N370S. La finalitat d'aquest experiment era veure si augmentant el temps d'incubació també s'observava un major augment de l'activitat de la GCCase. Per fer aquest assaig es van incubar les cèl·lules en presència dels compostos a una concentració de 100 nM i, cada 24 h, es va determinar l'activitat de la GCCase. Cal dir que es va determinar la citotoxicitat d'aquests compostos després de 5 dies d'incubació i cap d'ells va presentar senyals de toxicitat a concentracions inferiors a 300  $\mu$ M. Com es pot observar a la Figura 6.23, l'activitat enzimàtica va anar augmentant amb els dies i es va arribar al màxim entre el tercer i el quart dia. Un altre fet destacable és l'elevat increment en l'activitat de la GCCase observat en el segon dia, especialment en el cas de la isourea **89c** (un 100%) i la guanidina **90e** (un 80%).



**Figura 6.23.** Efecte dels compostos bicíclics **89c-90c**, **90e** i l'iminosucre NN-DNJ (a 100 nM) sobre l'activitat de la GCCase amb la mutació N370S després d'una incubació de 5 dies on es va determinar l'activitat enzimàtica cada 24 h. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  desviació estàndard d'un experiment amb tres rèpliques. L'activitat enzimàtica s'ha normalitzat respecte l'activitat de les cèl·lules no tractades, la qual s'ha assignat a una activitat relativa d'1.

L'efecte de les isourees **86c-89c** i les guanidines **90c,e** sobre l'activitat de la GCCase amb la mutació L444P (Figura 6.24), tal i com es va fer amb els amino- i diaminociclitols es va estudiar utilitzant cèl·lules d'un malalt de Gaucher de tipus II (GM 08752). Després de 3 dies d'incubació, la isourea **86c** i l'iminosucre NN-DNJ no van incrementar l'activitat de la GCCase a cap de les concentracions assajats. D'altra banda, els altres compostos bicíclics van produir moderats increments en l'activitat de la GCCase (30-50%) a baixes concentracions. El

tractament amb les isourees **87c** (a 1  $\mu\text{M}$ ) i **88c** (a 100 nM) va produir un augment de l'activitat de la GCCase amb la mutació L444P del 30 i 40%, respectivament. D'altra banda, els compostos **89c**, **90c** i **90e** a una concentració de 10 nM van incrementar l'activitat de la GCCase entre un 40 i un 50%.



**Figura 6.24.** Efecte dels compostos **86c-90c** i **90e** sobre l'activitat de la GCCase en limfoblasts (GM08752) de malalts de Gaucher amb la mutació L444P. Es va fer una incubació de les cèl·lules durant 3 dies en absència i en presència de diferents concentracions de cada compost abans de mesurar l'activitat de la GCCase. Els experiments es van fer per triplicat i els resultats corresponen a la mitja  $\pm$  desviació estàndard. L'activitat enzimàtica s'ha normalitzat respecte l'activitat de les cèl·lules no tractades, la qual s'ha assignat a una activitat relativa d'1.





## 7. Resum i Conclusions



- S'han sintetitzat dos inhibidors irreversibles de glicosidases, el ciclofelitol (**1**) i l'(*1R,6S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**), a partir d'un mateix intermedi, el (-)-1-*O*-Pivaloïl-conduritol B (**5**). L'estereoquímica de l'intermedi (+)-**10** s'ha confirmat amb la síntesi dels compostos **11-14**, els quals estan descrits a la bibliografia.
- S'ha determinat la inhibició de la imiglucerasa i la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces sp.* wt pels epòxids **1**, **2** i el CBE (epòxid de conduritol B). El ciclofelitol va ser el més efectiu amb uns valors del quocient  $k_i/K_i$  de 703 i 2.2 per a la imiglucerasa i la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces sp.* wt., respectivament. A més, s'ha estudiat la inhibició de glicosidases en cèl·lules intactes (fibroblasts) i en homogenats de lisats de cèl·lules pels epòxids **1** i **2**. El ciclofelitol va presentar una bona selectivitat per les  $\beta$ -glucosidases assajades, mentre que el seu diastereòmer produí inhibicions significatives tant en  $\beta$ - com  $\alpha$ -glucosidases.
- S'han sintetitzat unes sèries d'aminociclitols C<sub>7</sub>N (**24a-c,e** - **27a-c,e**) a partir de l'obertura regio- i estereoselectives dels epòxids **18** i **19**. En l'obertura de l'epòxid **18** amb diferents amines i en presència d'un agent quelant com el LiClO<sub>4</sub>, es va obtenir com a producte majoritari el d'obertura *trans*-diequatorial, mentre que amb l'epòxid **19**, utilitzant les mateixes condicions, es va obtenir el producte d'obertura *trans*-diequatorial amb total regioselectivitat. D'altra banda, l'obertura dels epòxids **18-19** en presència de LiClO<sub>4</sub> amb azida sòdica i l'obertura de l'epòxid **19** sota condicions àcides amb amines donà una baixa regioselectivitat.
- S'ha avaluat l'activitat inhibidora dels aminociclitols C<sub>7</sub>N (**24a-c,e** - **27a-c,e**) sobre la imiglucerasa i diverses glicosidases. Encara que aquests aminociclitols tenen una estructura més semblant a la GlcCer que les inosamines descrites anteriorment com a inhibidors de la imiglucerasa, van ser menys actius. Els compostos **26b** i **27b** van presentar una inhibició selectiva de la imiglucerasa amb valors de la  $K_i$  de 8.3 i 9.1  $\mu$ M, respectivament. D'altra banda, els aminociclitols **24a** i **24b**, els quals són anàlegs de la valienamina, van presentar una inhibició destacable de l' $\alpha$ -glucosidasa de llevat del pa ( $K_i$  pròxims a 2  $\mu$ M) i les amines lliures (**24e-27e**) van presentar una moderada inhibició de l' $\alpha$ -glucosidasa d'arròs (IC<sub>50</sub>=21-773  $\mu$ M).

- S'ha sintetitzat una sèrie d'anàlegs de l'aminociclitol A-C9 (configuració *scyllo*) per tal d'estudiar la importància que té la configuració dels centres C1 i C2 (aminociclitols **28** i **29**, configuració *myo*) en l'activitat inhibidora dels mateixos sobre la GCCase. També s'ha obtingut una sèrie d'anàlegs dels aminociclitols A-C9 i **29** amb dues cadenes alquíliques (*N,O*-alquil aminociclitols **30-34**) per tal de mimetitzar les dues cadenes presents en la GlcCer i ocupar les dues butxaques hidrofòbiques del centre actiu de la GCCase.
- S'ha preparat una sèrie d'amino- i diaminociclitols amb configuració *myo* (**35-38** i **40**), les imidazolidinones **39**, **41** i el *myo*-inositol **42**.
- S'ha verificat la importància que té la configuració dels centres C1 i C2 de l'aminociclitol A-C9 en l'activitat inhibidora de la GCCase. L'*N*-nonil aminociclitol **29** (configuració *myo*) va resultar ser 60 i 562 vegades més potent que els compostos A-C9 (configuració *scyllo*) i **28** (configuració *myo*), respectivament. A més, s'ha determinat que la substitució del grup hidroxil de la posició C2 per un grup *O*-alquil augmenta la potència inhibidora. Els aminociclitols **29**, **33-36** i els diaminociclitols **37** i **38** són inhibidors potents i selectius de la imiglucerasa amb valors de la  $K_i$  entre 1 i 820 nM. L'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** amb una constant d'inhibició d'1 nM, es troba entre els millors inhibidors de la GCCase descrits fins al moment.
- Els ciclitols **29**, **32-38** presenten una elevada potència inhibidora de la GCCase en cèl·lules (fibroblasts wt d'humans). L'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** és el millor inhibidor d'aquesta sèrie amb una  $IC_{50}$  de 4.3 nM.
- Tots els amino- i diaminociclitols sintetitzats, excepte els ciclitols **36**, **39** i **40-42**, són capaços d'estabilitzar l'activitat de la imiglucerasa en condicions de desnaturalització tèrmica. Els ciclitols **29**, **32**, **34** i **38**, a una concentració d'1  $\mu$ M i després de 60 min d'incubació a 48 °C, condueixen als millors resultats d'estabilització de l'enzim amb una relació d'estabilització entre 5 i 29.

- Entre tots els amino- i diaminociclitols estudiats com a xaperones farmacològiques en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P, destaquen per la seva eficàcia els aminociclitols **29**, **33-35** i els diaminociclitols **37-38** (tots amb configuració *myo*), els quals augmenten l'activitat de la GCCase entre un 60 i 100% amb la mutació N370S a concentracions de l'ordre micromolar o nanomolar després de 3 dies d'incubació. A més aquests compostos augmenten l'activitat de la GCCase amb la mutació L444P entre un 20 i 40% a concentracions de l'ordre nanomolar després de 3 dies d'incubació. L'*N,O*-dinonil aminociclitol **34** augmenta l'activitat de la GCCase un 90% amb la mutació N370S a una concentració d'1 nM i un 40% amb la mutació L444P a una concentració de 10 picomolar.
- S'han preparat quatre sèries diastereomèriques d'isourees amb estructura bicíclica [6+5] formades per un anell ciclohexànic polihidroxilat fusionat amb un anell de cinc baules on hi és present una isourea amb el nitrogen exocíclic substituït amb una cadena *N*-alquílica (**86a-c**, **87c**, **88a-c** i **89a-c**) o bé amb els dos àtoms de nitrogen substituïts amb una cadena alquílica de 9 àtoms de carboni (**86d-89d**). A més, s'han sintetitzat les guanidines bicícliques **90c,e**, les quals mantenen la configuració dels centres del cap de pont que la sèrie amb major activitat inhibidora sobre la GCCase (**89**).
- Les isourees i guanidines bicícliques, excepte els compostos **86d-89d**, són inhibidors potents de la imiglicerasa amb valors de la  $K_i$  entre 2 nM i 11  $\mu$ M. Dins d'aquest compostos, destaquen les isourees **89a-c** i les guanidines **90c,e** per les que s'han determinat valors de la  $K_i$  entre 2 i 42 nM. Aquests compostos presenten inhibició de la GCCase en fibroblasts wt d'humans a concentracions de l'ordre nanomolar.
- Les isourees **86c-89c** i les guanidines **90c,e** a una concentració de 10 o 5  $\mu$ M estableixen l'activitat de la imiglicerasa en condicions de desnaturalització a 48 °C. És interessant destacar que amb les isourees **86c** i **89c** i les guanidines **90c,e** a una concentració de 5  $\mu$ M es van obtenir unes relacions d'estabilització entre 9 i 27 i després d'incubar l'enzim durant 60 min a 48 °C.

- S'ha determinat el potencial de les isourees **86c-89c** i les guanidines **90c,e** com a xaperones farmacològiques en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les dues mutacions més freqüents en els malalts (N370S i L444P) després de 3 dies d'incubació. El tractament amb la isourea **89c** i les guanidines **90c,e** a concentracions de l'ordre nanomolar (entre 50 nM i 200 nM) produeix un augment entre 1.7 i 2.1 vegades de l'activitat de la GCCase amb la mutació N370S. Aquests compostos a una concentració de 10 nM van produir un augment de l'activitat de la GCCase amb la mutació L444P entre el 40 i 50%.
- Els resultats recollits en els capítols 5 i 6 indiquen que s'han trobat unes noves famílies de compostos que exhibeixen una elevada i selectiva potència inhibidora de la GCCase recombinant (imiglucerasa) i la GCCase en cultius cel·lulars (fibroblasts wt). Quan es tracten limfoblasts de malalts de Gaucher de les variants N370S o L444P amb els compostos esmentats a concentracions subinhibitòries, s'obtenen augments de l'activitat de la GCCase en les cèl·lules tractades respecte a les cèl·lules no tractades. Les concentracions efectives dels compostos en aquest augment són de l'ordre micromolar, nanomolar o fins i tot subnanomolar. Dels resultats obtinguts es pot deduir que, a més de l'alta afinitat per la GCCase, alguns compostos presenten la permeabilitat cel·lular, distribució subcel·lular i metabolisme cel·lular adequats per actuar com a xaperones farmacològiques a concentracions molt baixes, de l'ordre nanomolar o inferior.







# 8. Part Experimental

---

## 8.1 Síntesi i caracterització dels productes

- 8.1.1 Instrumentació i mètodes generals
- 8.1.2 Síntesi del ciclofelitol (**1**) i l'(1*R*, 6*S*)-*epi*-ciclofelitol (**2**)
- 8.1.3 Síntesi dels aminociclitols C<sub>7</sub>N
- 8.1.4 Síntesi dels amino- i diaminociclitols
- 8.1.5 Síntesi de les isourees i guanidines bicícliques

## 8.2 Estudis biològics

- 8.2.1 Materials i mètodes en cèl·lules
- 8.2.2 Estudis d'inactivació amb el CBE, el ciclofelitol i l'(1*R*,6*S*)-*epi*-ciclofelitol
- 8.2.3 Determinació de l'activitat GCase recombinant (Imiglucerasa)
- 8.2.4 Determinació de les activitats de diverses glicosidases comercials
- 8.2.5 Determinació de l'activitat glucosilceramida sintasa (GCS)
- 8.2.6 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglucerasa
- 8.2.7 Determinació de les activitats de diverses glicosidases en homogenats de cèl·lules (fibroblasts wt)
- 8.2.8 Estudis de citotoxicitat en fibroblasts wt d'humans
- 8.2.9 Determinació de l'activitat GCase en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) d'humans
- 8.2.10 Determinació de les activitats de diverses glicosidases en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) d'humans
- 8.2.11 Estudis de citotoxicitat en limfoblasts de malalts de Gaucher
- 8.2.12 Estudi de l'activitat xaperona en limfoblasts de malalts de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P



## 8.1 Síntesi i caracterització dels productes

### 8.1.1 Instrumentació i mètodes generals

Excepte en determinades ocasions, els reactius comercials no es van purificar.

La majoria de reaccions s'han dut a terme sota atmosfera d'argó i els dissolvents emprats han estat destil·lats per tal d'assecar-los de la següent forma: Et<sub>2</sub>O i THF per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre sodi i benzofenona en atmosfera de N<sub>2</sub>; MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN i Et<sub>3</sub>N per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre hidrur de calci en atmosfera de N<sub>2</sub>; DMF i piridina per destil·lació a pressió reduïda sobre hidrur de calci i es van guardar sobre tamisos moleculars de 4Å i en atmosfera d'argó.

Les reaccions es van seguir per cromatografia en capa fina (CCF) utilitzant plaques d'alumini amb SiO<sub>2</sub> ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> de 0.2 mm de gruix. La visualització dels productes s'ha realitzat mitjançant una làmpada d'ultraviolat ( $\lambda=254$  nm) i les següents dissolucions reveladores: ninhidrina (0.1% en EtOH), àcid fosfomolíbdic (5.7% en EtOH) i anisaldehyd.

La purificació dels productes s'ha dut a terme, sempre que no s'indiqui el contrari, per cromatografia en columna flash utilitzant com a fase estacionària gel de sílice de 60 Å (35-70  $\mu$ m Chromagel).

Els espectres d'infraroig s'han enregistrat emprant un espectrofotòmetre BOMEM MB-120 amb transformada de Fourier. Les mostres sòlides foren analitzades amb pastilla de KBr i les líquides s'han fet emprant un suport de NaCl. En la descripció només s'indiquen les absorcions (en cm<sup>-1</sup>) més significatives.

Els espectres de RMN es van registrar en dissolució de CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> o CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>. S'han utilitzat els desplaçaments químics de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C del dissolvent com a referència interna.

Els espectres s'han enregistrat en els següents aparells:

- Varian Unity-300 (<sup>1</sup>H-RMN a 300 MHz i <sup>13</sup>C-RMN a 75.4 MHz)
- Mercury-400 (<sup>1</sup>H-RMN a 400 MHz i <sup>13</sup>C-RMN a 100.6 MHz)
- Inova-500 (<sup>1</sup>H-RMN a 500 MHz i espectres bidimensionals)

Els desplaçaments químics s'expressen en parts per milió (ppm) i la multiplicitat del senyal s'expressa mitjançant la següent abreviació: s (singlet), br (singlet ample), d (doblet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) o combinacions d'aquestes abreviacions (per exemple dd seria un doblet de doblats). Els valors de les constants d'acoblament (*J*) s'expressen en Hertz (Hz).

Les mesures de poder rotatori ( $[\alpha]_D$  (c g/100 mL, dissolvent)) han estat determinades amb un polarímetre digital Perkin-Elmer 34 a 25 °C, utilitzant una cel·la d'1 dm de longitud i 1 mL de capacitat, emprant en totes les mesures una làmpada de sodi de 589 nm.

Els espectres de masses d'alta resolució es van fer analitzant les mostres per FIA utilitzant un aparell Waters Micromass LCT Premier, equipat amb una font iònica electrospray dual (ESI) LockSpray, i les dades van ser adquirides en ESI positiu.

Els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i  $^{13}\text{C}$ -RMN de tots els intermedis i productes sintetitzats, així com alguns dels experiments bidimensionals, s'adjunten com a material suplementari en el CD que acompanya aquesta memòria.

### 8.1.2 Síntesi del ciclofelitol (1) i l'(1R,6S)-epi-ciclofelitol (2)

Els següents compostos s'han preparat d'acord amb els procediments descrits a la literatura:

Tetraacetat de (1*RS*,2*SR*,3*SR*,4*RS*)-ciclohex-5-en-1,2,3,4-tetraol (3),<sup>163,167</sup>

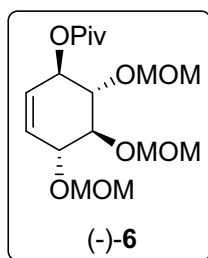
Triacetat de (1*S*,2*S*,3*R*,6*R*)-6-(pivaloïloxi)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (4),<sup>163,166</sup>

Pivalat de (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5,6-trihidroxiciclohex-2-enil (5).<sup>163</sup>

#### 8.1.2.1 Síntesi de l'(1R,2R,3S,6R)-6-(hidroximetil)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (10)

##### Pivalat d'(1R,4R,5S,6S)-4,5,6-tris(metoximetoxi)ciclohex-2-è (6)

En un matràs de dues boques equipat amb un refrigerant Dimroth, es va preparar una dissolució del triol (-)-**5**<sup>163,166,167</sup> (2.38 g, 10.3 mmol) en DMF anhidra (20 mL). A continuació es van addicionar, sota agitació magnètica i a 0 °C, 12 mL (68.9 mmol) d'*N,N*-diisopropiletamina i 6 mL de bromometil metil èter (73.5 mmol) i es va escalfar la mescla de reacció a 75 °C. Passades tres hores, quan ja no es va detectar la presència de producte de partida, la reacció es va refredar a 0 °C i es va afegir gel. La fase aquosa s'extragué amb Et<sub>2</sub>O (3 x 50 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques i es van rentar amb una solució de NaHCO<sub>3</sub> i amb una solució saturada de NaCl. La fase orgànica s'assecà sobre MgSO<sub>4</sub> i, després de filtrar, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1), donant lloc al pivalat **6** (2.76 g, 7.6 mmol, 73%) en forma d'oli groc.

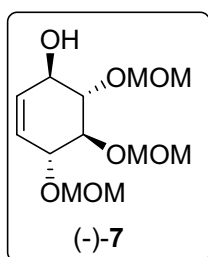


$[\alpha]_D^{25}$  -130.8 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$  = 2960, 2894, 2825, 1729, 1480, 1280, 1156, 1038, 921 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.21 (s, 9H), 3.38 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.74-3.83 (m, 2H), 4.21-4.23 (m, 1H), 4.74-4.89 (m, 6H), 5.40-5.44 (m, 1H), 5.48 (dt, 1H, *J* = 10.3, 2.3 Hz), 5.77 (dt, 1H, *J* = 10.3, 2.0 Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 27.2, 38.9, 55.8, 56.3, 56.4, 74.4, 78.2, 79.0, 79.3, 97.4, 98.0, 98.2, 125.9,

130.2, 178.0. HRMS calculat per C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>Na: 385.1838 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 385.1850.

### (1R,4R,5S,6S)-4,5,6-tris(metoximetoxi)ciclohex-2-enol (7)

Es va preparar una suspensió d'1.4 g (24.6 mmol) de NaOCH<sub>3</sub> en 50 mL de MeOH anhidre. Per altra banda, es va dissoldre el pivalat (-)-6 (5.68 g, 15.6 mmol) en 10 mL de MeOH anhidre i es va addicionar *via* cànula, sota atmosfera d'argó i a 0 °C, sobre la suspensió de NaOCH<sub>3</sub>. Després d'una nit de reacció a t.a., s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda i es va obtenir un oli que es va tornar a dissoldre en 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i es rentà amb una solució aquosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl i amb una solució aquosa saturada de NaCl. La fase orgànica s'assecà sobre MgSO<sub>4</sub> i, després de filtrar, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1), donant lloc a l'alcohol al·lílic (-)-7 (4.1 g, 14.6 mmol, 94%) en forma d'oli incolor.



$[\alpha]_D^{25}$  -108 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$  = 3442, 3039, 2894, 2825, 1470, 1384, 1125, 916, 774 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.41 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.73 (dd, 1H, *J* = 10.4, 7.7 Hz), 4.17 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 4.20-4.22 (m, 2H), 4.74-4.85 (m, 6H), 5.66-5.72 (m, 2H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 55.7, 56.08, 56.09, 56.1, 71.5, 78.5, 78.6, 87.3, 97.2, 98.0, 98.6, 127.8, 128.8. HRMS calculat per C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>Na:

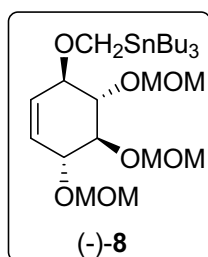
301.1263 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 301.1250.

### Tributil(((1R,4R,5S,6S)-4,5,6-tris(metoximetoxi)ciclohex-2-eniloxi)metil)estannà (8)

Es va preparar una suspensió de 760 mg (al 30%, 5.6 mmol) de KH en 10 mL de dimetoxietà (DME) anhidre. Per altra banda, es va dissoldre l'alcohol (-)-7 (810 mg, 2.9 mmol) en 10 mL de DME anhidre i es va addicionar *via* cànula, sota atmosfera d'argó i a 0 °C, a la suspensió de KH i es deixà la reacció en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es refredà la mescla de reacció a 0 °C i s'afegí, gota a gota, Bu<sub>3</sub>SnCH<sub>2</sub>I (1.9 g, 4.5 mmol) i es

deixà la mescla en agitació a t.a. durant 2 h més (control per CCF). Passat aquest temps, es va afegir una solució aquosa de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (30 mL), es van separar les fases i s'extragué la fase aquosa amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 50 mL). S'assecà el conjunt de fases orgàniques sobre  $\text{MgSO}_4$ , es filtrà i s'eliminaren els dissolvents a pressió reduïda. El cru així obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 6:1), donant lloc al compost **8** (1.3 g, 79%) en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_D^{25}$  -80 (*c* 2.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3039, 2925, 2851, 2822, 1465, 1388, 1153, 1034,$



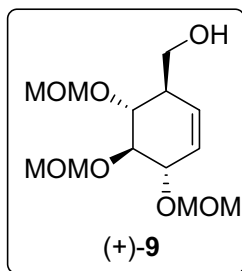
921, 774  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.87-0.9 (m, 15H), 1.27-1.31 (m, 6H), 1.45-1.52 (m, 6H), 3.41 (s, 3H), 3.44 (s, 6H), 3.59 (d, 1H,  $J = 9.8$  Hz), 3.65-3.72 (m, 2H), 3.83-3.88 (m, 2H), 4.17-4.19 (m, 1H), 4.74-4.91 (m, 6H), 5.70-5.75 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.0,

13.7, 13.9, 17.7, 27.0, 27.5, 28.0, 29.2, 55.7, 56.2, 56.2, 58.8, 78.1, 79.0, 79.4, 84.6, 97.4, 97.9, 98.2, 127.2, 128.7. HRMS calculat per  $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{NaSn}$ : 605.2476  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 605.2450.

#### ((1R,4S,5R,6R)-4,5,6-tris(metoximetoxi)ciclohex-2-enil)metanol (9)

En un matràs de dues boques, una proveïda de sèptum i l'altre amb un termòmetre, es va preparar una dissolució de 0.51 g (0.86 mmol) del compost (-)-**8** en 15 mL de THF anhidre sota atmosfera d'argó. La dissolució es va refredar en un bany d'acetona/neu carbònica (-78 °C) i, després de 30 min aproximadament, s'hi va afegir, gota a gota, 0.8 mL (1.29 mmol) d'*n*-BuLi (1.6 M en hexà). La mescla de reacció es va mantenir amb agitació a -78 °C durant 5 min i, després de comprovar per CCF la desaparició del producte de partida, s'afegiren 15 mL d'una solució aquosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Es van fer diverses extraccions amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 30 mL) i la fase orgànica es rentà amb una solució saturada de NaCl, s'assecà sobre  $\text{MgSO}_4$  i, després de filtrar, es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1 i 1:1), donant lloc a l'alcohol homoal·lílic **9** (216 mg, 0.74 mmol, 86%) en forma d'oli incolor.

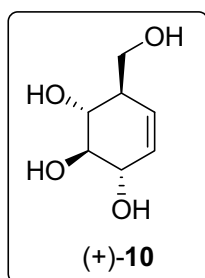
$[\alpha]_D^{25}$  +113 (*c* 1,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3454, 2892, 2826, 1651, 1469, 1444, 1392, 1151, 1105, 1025, 918, 771$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.42-2.46 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.66-3.70 (m, 2H), 3.79 (dd, 1H,  $J = 10.1, 7.7$  Hz), 3.88 (dd, 1H,  $J = 11.5, 3.8$  Hz), 4.18-4.21 (m, 1H), 4.71-4.94 (m, 6H), 5.59 (dt, 1H,  $J = 10.1, 2.0$  Hz), 5.73



(dt, 1H,  $J = 10.1, 2.6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 45.5, 55.7, 56.2, 56.3, 63.0, 77.8, 79.5, 81.6, 97.1, 98.0, 99.0, 129.0, 129.1; HRMS calculat per  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$ : 315.1420  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 315.1431.

### (*1R,2R,3S,6R*)-6-(hidroximetil)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (**10**)

A una dissolució de 0.6 mL (7.9 mmol) de clorur d'acetil en 20 mL de MeOH anhidre es va addicionar *via* cànula, sota atmosfera d'argó i a 0 °C, una dissolució de l'alcohol homoal·lílic (+)-**9** (0.38 g, 1.32 mmol) en 10 mL de MeOH anhidre. Es va escalfar la reacció a 40 °C durant 1 h i es va controlar per CCF. Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, es va aïllar el tetraol **10** (0.21 g, 1.31 mmol, 99%) en forma de sòlid blanc.



$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +120.9$  ( $c$  1.1, MeOH); lit<sup>162</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -13.4$  ( $c$  1.1, MeOH); IR (KBr):  $\nu = 3340, 1652, 1081, 723$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 2.21 - 2.30 (br s, 1H), 3.4-3.47 (m, 2H), 3.59 (dd, 1H,  $J = 10.6, 6.1$  Hz), 3.79 (dd, 1H,  $J = 10.6, 4.1$  Hz), 3.99-4.06 (m, 1H), 5.59-5.64 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 47.8, 63.5, 72.0, 73.7, 78.9, 128.6, 131.1; HRMS calculat per  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Na}$ : 183.0633  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 183.0629.

Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>162,172,173</sup>

#### 8.1.2.2 Síntesi dels compostos 11-14 a partir del tetraol **10**

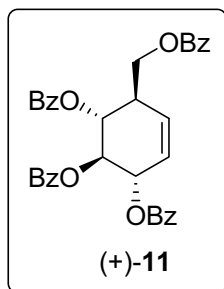
##### Tribenzoat d'(*1R,2R,3S,6R*)-6-(benzoïloximetil)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (**11**)

A una solució de 17 mg (0.1 mmol) de (+)-**10** en 1.5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre, es van addicionar 0.3 mL (3.7 mmol) de piridina anhidra, 7.2 mg (0.06 mmol) de DMAP i finalment 0.2 mL de clorur de benzoïl (1.7 mmol). La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant tota la nit. A l'endemà, la solució es va diluir amb 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i es va rentar amb aigua (10 mL). La fase orgànica s'assecà sobre  $\text{MgSO}_4$  i, després de filtrar, s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru resultant es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 5:1), donant lloc al compost **11** (39 mg, 0.07 mmol, 64%) en forma d'espuma blanca.



(+)-**11**: Excés enantiomèric >96% (determinat per HPLC [Chiralpak<sup>®</sup> IA 0.46 x 25 cm, fase mòbil hexà/iPrOH 90:10, 0.7 mL/min, 240 i 210 nm]. (-)-enantiòmer  $t_R$  25.69 min, (+)-enantiòmer  $t_R$  35.33 min.

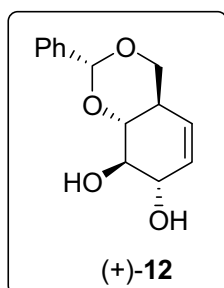
(+)-**11**:  $[\alpha]_D^{25} +159.7$  ( $c$  0.7, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR (film):  $\nu = 3063, 3034, 2955, 2928, 2854, 1736, 1601, 1451, 1315, 1275, 1178, 1113, 707$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.25-3.30 (m, 1H), 4.40 (dd, 1H,  $J = 11.3, 4.9$  Hz), 4.61 (dd, 1H,  $J = 11.3, 4.5$  Hz), 5.88-5.92 (m, 1H), 5.94-6.0 (m, 2H), 6.02-6.08 (m, 2H), 7.26-7.33 (m, 4H), 7.40-7.47 (m, 6H), 7.54-7.57 (m, 2H), 7.85-7.91 (m, 4H), 8.03 (d, 4H,  $J = 7.5$  Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 42.2, 64.0, 70.2, 73.0, 127.0-129.9, 133.2, 133.3, 133.32, 133.4, 166.0 (2), 166.1, 166.4; <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 43.3, 65.5, 71.9, 74.2, 74.7, 127.7-134.5, 167.3, 167.3, 167.4, 167.7; HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>Na: 599.1682 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 599.1674.



(-)-**11**: es va obtenir a partir del tetraol (-)-**10**, el qual es va preparar utilitzant com a producte de partida el triol (+)-**5**.  $[\alpha]_D^{25} -147.2$  ( $c$  0.7, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 86% *ee*); lit<sup>163</sup>  $[\alpha]_D^{25} -76.9$  ( $c$  1.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 88% *ee*);

### (*1R,3R,6R,9S,10S*)-9,10-dihidroxi-3-fenil-2,4-dioxabicyclo[4.4.0]dec-7-è (**12**)

A una solució de 25 mg (0.15 mmol) de (+)-**10** en 2 mL de DMF anhidra, s'addicionaren 30  $\mu$ L (0.2 mmol) de PhCH(OMe)<sub>2</sub> i 2 mg (0.01 mmol) d'àcid *p*-toluensulfònic. La mescla de reacció es va escalfar a 60 °C i a una pressió de 20 mm Hg, emprant l'evaporador rotatori, durant 5 h (control per CCF). A continuació, s'afegiren 10 mg de NaHCO<sub>3</sub> i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1), donant lloc al diol **12** (30 mg, 0.12 mmol, 78 %) en forma d'oli incolor.

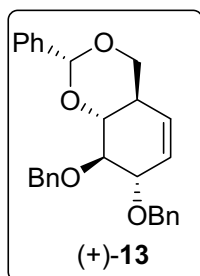


$[\alpha]_D^{25} +32$  ( $c$  1.8, EtOH); lit<sup>173</sup>  $[\alpha]_D^{25} +28$  ( $c$  2.5, EtOH); IR (film):  $\nu = 3333, 2957, 2922, 2851, 1462, 1453, 1369, 1360, 1261, 1165, 1095, 1025$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 2.55-2.60 (br s, 1H), 3.62 (t, 1H,  $J = 13$  Hz), 3.66 (t, 1H,  $J = 14$  Hz), 3.78 (dd, 1H,  $J = 13.0, 9.2$  Hz), 4.16-4.2 (m, 1H), 4.25 (dd, 1H,  $J = 10.7, 4.5$  Hz), 5.40 (dt, 1H,  $J =$

12.0, 2.0 Hz), 5.59-5.62 (m, 1H), 5.67 (dt, 1H,  $J = 12.5, 3.5$  Hz), 7.30-7.42 (m, 3H), 7.51 (t, 2H,  $J = 12.6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 40.2, 71.1, 75.2, 76.6, 82.3, 103.3, 125.1, 127.5, 129.0, 129.8, 132.3, 139.8; HRMS calculat per  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_4$ : 249.1127  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 249.1129. Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>173</sup>

### (*1R,3R,6R,9S,10S*)-9,10-dibenziloxi-3-fenil-2,4-dioxabicyclo[4.4.0]dec-7-è (**13**)

Una dissolució del diol (+)-**12** (30 mg, 0.12 mmol) en 2 mL de DMF es va addicionar *via* cànula sobre un suspensió de NaH (20 mg al 60%, 0.5 mmol) en 4 mL de DMF a 0 °C. Després de 30 min, es van addicionar 60  $\mu\text{L}$  de BnBr (0.06 mmol) i la reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant 1 h. A continuació, es refredà la reacció a 0 °C, s'addicionà aigua (1 mL) i es va diluir amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 mL). Es rentà amb aigua (20 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 20 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1) i es van obtenir 39.5 mg (0.09 mmol, 77%) del producte **13** en forma d'oli incolor.



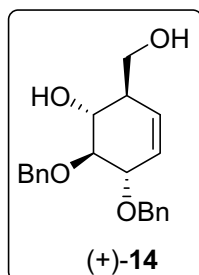
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +40.6$  ( $c$  1.85,  $\text{CHCl}_3$ ); lit<sup>173</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +34$  ( $c$  2.6,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3406, 2922, 2852, 1627, 1599, 1573, 1495, 1462, 1453, 1434, 1371, 1084, 1069, 1025$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.58-2.82 (m, 1H), 3.66 (t, 1H,  $J = 11.2$  Hz), 3.83 (t, 1H,  $J = 9.9$  Hz), 4.02 (ddd, 1H,  $J = 10.3, 7.0, 0.9$  Hz), 4.24-4.41 (m, 2H), 4.55-4.98 (m, 3H), 5.04 (d, 1H,  $J = 11.3$  Hz), 5.41 (dt, 1H,  $J = 9.9, 1.8$  Hz), 5.63-5.68 (m, 1H), 5.77 (dtd, 1H,  $J = 9.9, 3.0, 0.7$  Hz), 7.26-7.56 (m, 15H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 38.7, 70.1, 72.4, 74.8, 80.8, 82.0, 82.3, 101.6, 125.2, 126.1, 127.7-129.0, 138.3, 138.5, 138.8; HRMS calculat per  $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{O}_4$ : 429.2066  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 429.2062. HRMS calculat per  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Na}$ : 451.1885  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 451.1885. Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>173</sup>

### (*1R,2R,5S,6S*)-5,6-bis(benziloxi)-2-(hidroximetil)ciclohex-3-enol (**14**)

Es van dissoldre 32.2 mg (0.07 mmol) del compost (+)-**13** en 2 mL d'àcid acètic (al 80% en aigua) i es va escalfar la reacció a 40 °C durant 90 min. Després d'eliminar el dissolvent a

pressió reduïda, es va purificar el cru resultant per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1), donant lloc al diol **14** (19 mg, 0.05 mmol, 74%) en forma d'oli groc.

$[\alpha]_D^{25} +34$  (*c* 2.6, CHCl<sub>3</sub>);  $[\alpha]_D^{25} +158$  (*c* 1.1, acetona); lit<sup>173</sup>  $[\alpha]_D^{25} +147$  (*c* 1.1, acetona); lit<sup>162</sup>



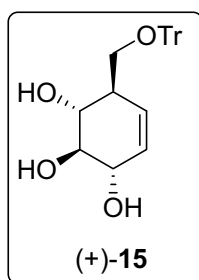
$[\alpha]_D^{25} +104.7$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3415, 3088, 3063, 3031, 1649, 1454, 1098, 1052 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.48-2.53 (m, 1H), 3.64-3.72 (m, 3H), 3.79 (dd, 1H, *J* = 10.7, 4.2 Hz), 4.20-4.24 (m, 1H), 4.64 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz), 4.72 (t, 2H, *J* = 11.5 Hz), 5.05 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz), 5.53 (dt, 1H, *J* = 10.2, 1.9 Hz), 5.80 (dt, 1H, *J* = 10.2, 2.5 Hz), 7.29-7.39 (m, 10H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 45.3, 65.5, 71.6, 72.8,

75.0, 80.3, 83.4, 127.5-128.7, 138.1, 138.5; HRMS calculat per C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>Na: 363.1572 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 363.1583. Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>162,173</sup>

### 8.1.2.3 Síntesi dels epòxids **1** i **2** a partir del tetraol **10**

#### (*1R,2R,3S,6R*)-6-(tritoloximetil)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (**15**)

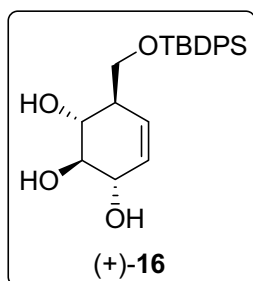
Es va dissoldre 0.36 g (2.25 mmol) del tetraol (+)-**10** en 15 mL d'una mescla CH<sub>3</sub>CN/DMF (20:1). Seguidament, es van addicionar 1.01 g (2.47 mmol) de tetrafluoroborat d'*N*-tritolpiridina. La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant 12 h (control CCF) i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. El cru resultant es va dissoldre en 20 mL d'AcOEt, es filtrà i el sòlid es va rentar amb AcOEt (3 x 5 mL). Es van ajuntar els filtrats i, després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, es va purificar el cru resultant per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1) i es va aïllar el triol **15** (702 mg, 1.74 mmol, 77 %).



$[\alpha]_D^{25} +85.6$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.58-2.59 (br s, 1H), 3.12-3.16 (m, 1H), 3.42-3.46 (m, 1H), 3.58-3.65 (m, 2H), 4.21-4.22 (m, 1H), 5.35-5.37 (m, 1H), 5.61-5.64 (m, 1H), 7.27-7.45 (m, 15H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 44.2, 66.5, 72.3, 73.6, 77.6, 87.6, 126.5, 127.4, 128.1, 128.7, 129.5, 143.6; HRMS calculat per C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>Na: 425.1729 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 425.1728.

**(1*R,2R,3S,6R*)-6-((*tert*-butildifenilsiloxi)metil)ciclohex-4-en-1,2,3-triol (**16**)**

A una solució de 163 mg (1.01 mmol) de (+)-**10** en 10 mL de DMF anhidra, es van addicionar a 0 °C, 148 mg (2.17 mmol) d'imidazole, 12 mg (0.1 mmol) de DMAP i 0.34 mL (1.3 mmol) de TBDPSCl. La mescla de reacció es va escalfar a 45 °C durant 2 h. Passat aquest temps, es deixà refredar a t.a. i s'afegiren 2 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es va purificar el cru resultant per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1) i es va aïllar el triol **16** (347 mg, 0.84 mmol, 83%) en forma de sòlid blanc.



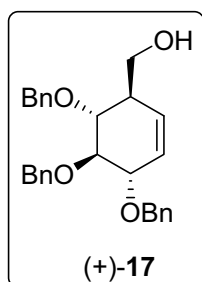
$[\alpha]_D^{25} +92.6$  (*c* 0.56, MeOH); IR (film):  $\nu = 3405, 2929, 2857, 1659, 1589, 1472, 1427, 1112, 823, 701 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.04 (s, 9H), 2.30-2.34 (br s, 1H), 3.41 (dd, 1H, *J* = 10.1, 8.0 Hz), 3.59 (t, 1H, *J* = 9.7), 3.79-3.89 (m, 2H), 4.03-4.06 (m, 1H), 5.58-5.66 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 6H), 7.66-7.68 (m, 4H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 20.2, 27.3, 48.0, 65.0, 71.5, 73.7, 79.0, 128.8, 129.3, 130.8, 130.9, 136.7, 136.7.

**(1*S,2R,3R,4R*)-4-hidroximetil-1,2,3-(tribenziloxi)ciclohex-5-è (**17**)**

a) Una dissolució del triol (+)-**15** (690 mg, 1.71 mmol) en 10 mL de DMF anhidra s'addicionà *via* cànula sobre un suspensió de NaH (304 mg al 60%, 7.6 mmol) i BnBr (0.9 mL, 7.6 mmol) en 5 mL de DMF a 0 °C. La solució resultant es mantingué amb agitació durant 30 min a 0 °C i a t.a. durant 2 h (control CCF). A continuació, es refredà la reacció a 0 °C, s'addicionà aigua (0.5 mL) i es va diluir amb Et<sub>2</sub>O (50 mL) i es rentà amb aigua (30 mL). Es van separar les fases i la fase aquosa es tornà a extreure amb Et<sub>2</sub>O (2 x 50 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El residu resultant es va dissoldre en 10 mL d'una mescla DCM/MeOH (1:4) i es van afegir 33 mg (0.17 mmol) d'àcid *p*-toluensulfònic. Després de 3 h, quan ja no es va detectar la presència de producte de partida, es van afegir 50  $\mu$ L de Et<sub>3</sub>N i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 5:1) i s'aïllà l'alcohol **17** (0.65 g, 1.50 mmol, 88 %).

b) Una dissolució del triol (+)-**16** (287 mg, 0.72 mmol) en 5 mL de DMF s'addicionà *via* cànula sobre un suspensió de NaH (144 mg al 60%, 3.6 mmol) i BnBr (0.5 mL, 4.2 mmol)

en 15 mL de DMF sota atmosfera d'argó i refredada a 0 °C. La solució resultant es mantingué amb agitació durant 2 h a 0 °C (control CCF). A continuació, es refredà la reacció a 0 °C, s'addicionà aigua (2 mL) i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. El residu obtingut es va dissoldre en 40 mL d'Et<sub>2</sub>O i es rentà amb aigua (30 mL). Es van separar les fases i la fase aquosa es tornà a extreure amb Et<sub>2</sub>O (2 x 30 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 40:1) i es va obtenir un oli incolor. Es va dissoldre l'oli resultant (376 mg, 0.56 mmol) en 15 mL de THF anhidre, es va refredar a 0°C i, s'hi van addicionar 1.2 mL (1.0 M en THF, 1.2 mmol) de TBAF. Després de 30 min a 0 °C, es va escalfar la reacció durant 2 h a 40 °C (control CCF). A continuació, es va tornar a refredar la reacció a 0 °C, es van addicionar 0.5 mL de MeOH i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:3-2:1) i s'aïllà l'alcohol **17** (217 mg, 0.5 mmol, 70 %).



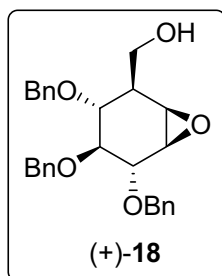
$[\alpha]_D^{25} +67.3$  (*c* 0.4, CHCl<sub>3</sub>); lit<sup>163</sup>  $[\alpha]_D^{25} +104.5$  (*c* 1.92, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3442, 3063, 3030, 2923, 2853, 2360, 2343, 1496, 1454, 1359$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.47-2.50 (br s, 1H), 3.64-3.71 (m, 3H), 3.85 (dd, 1H, *J* = 10.0, 7.8 Hz), 4.24-4.28 (m, 1H), 4.69 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.73 (s, 2H), 4.94-4.99 (m, 2H), 5.0 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.55 (dt, 1H, *J* = 10.0, 1.8 Hz), 5.76 (dt, 1H, *J* = 10.2, 2.1 Hz), 7.28-7.39 (m, 15H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 45.9, 63.4, 72.3, 75.2, 75.4, 78.7, 80.9, 85.3, 127.7-128.7, 138.4, 138.5, 138.9; HRMS calculat per C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na: 453.2042 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 453.2051. Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>156,157,163</sup>

**((1R,2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benziloxi)-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2-yl)metanol.**

**(+)-2,3,4-tri-*O*-benzilciclofelitol (18)**

Es van dissoldre 219 mg (0.5 mmol) de l'alcohol homoal·lilic (+)-**17** en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'hi van addicionar 370 mg (70%, 1.5 mmol) de MCPBA. La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant 18 h (control CCF). A continuació, la mescla resultant es va rentar amb una solució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) i la fase aquosa resultant s'extragué amb AcOEt (3 x 50 mL). Es van ajuntar les fases orgàniques, es van assecar sobre MgSO<sub>4</sub>

anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1 i 3:1) i es van obtenir 160 mg (0.36 mmol, 70%) de l'epòxid **18** en forma de sòlid blanc i 27 mg (0.06 mmol, 12%) de l'epòxid diastereomèric.

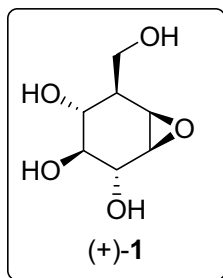


(+)-**18**:  $[\alpha]_D^{25} +65.8$  (*c* 0.9, CHCl<sub>3</sub>); lit<sup>163</sup>  $[\alpha]_D^{25} +71.0$  (*c* 0.9, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3356, 2957, 2924, 2854, 1463, 1454, 1070, 736, 694 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.18-2.22 (m, 1H), 3.19 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 3.36 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 3.49 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz), 3.59 (dd, 1H, *J* = 10.0, 8.0 Hz), 3.89 (dd, 2H, *J* = 11.8, 4.5 Hz), 3.98 (dd, 1H, *J* = 10.8, 4.5 Hz), 4.57 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz), 4.74-4.94 (m, 5H), 7.28-7.37 (m, 15H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 44.1, 53.1, 56.0, 63.0, 73.3, 75.5, 75.7, 75.7, 79.9, 85.1, 127.7-128.7, 137.7, 138.2, 138.7; HRMS calculat per C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na: 469.1991 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 469.1992. Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>157,161,163,168</sup>

### (*1S,2R,3S,4R,5R,6R*)-5-Hidroximetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol.

#### (+)-Ciclofelitol (**1**)

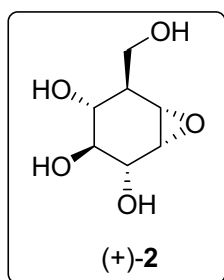
En un tub a pressió, es va dissoldre l'epòxid **18** (60 mg, 0.13 mmol) en 3 mL de THF i s'hi afegiren 50 mg de Pd/C (5-15%). El sistema es va purgar amb quatre cicles de buit i hidrogen, deixant finalment una pressió d'1 atm. Es deixà el sistema amb agitació vigorosa a t.a. durant 14 h. Passat aquest temps, es filtrà la mescla resultant sobre Celite<sup>®</sup> i es rentà amb 15 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es van aïllar 21.5 mg (0.12 mmol, 91%) de l'epòxid **1** en forma de sòlid blanc.



$[\alpha]_D^{25} +101$  (*c* 0.5, H<sub>2</sub>O); lit<sup>161</sup>  $[\alpha]_D^{25} +97$  (*c* 0.35, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.94-2.01 (m, 1H), 3.04-3.08 (m, 2H), 3.20 (dd, 1H, *J* = 9.9, 8.3 Hz), 3.40-3.42 (m, 1H), 3.64 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 3.68 (dd, 1H, *J* = 10.1, 9.3 Hz), 4.01 (dd, 1H, *J* = 10.5, 4.3 Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 45.9, 56.0, 57.4, 62.4, 68.8, 72.8, 78.5; HRMS calculat per C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na: 199.0582 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 199.0578. Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>161,163</sup>

**(1R,2R,3S,4R,5R,6S)-5-Hidroximetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol (2).****(+)-1R,6S-epi-ciclofelitol**

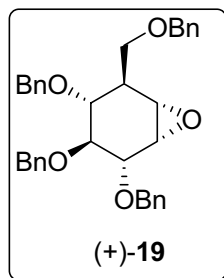
Es van dissoldre 0.30 g (1.87 mmol) del tetraol (+)-**10** en 15 mL d'àcid acètic i s'hi van addicionar 1.0 g (4.05 mmol) de MCPBA. La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant tota la nit (control CCF). Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, es va obtenir un sòlid de color groc, el qual es va rentar amb Et<sub>2</sub>O varies vegades. El sòlid blanc resultant s'assecà al buit i s'obtingueren 255 mg de l'epòxid **2** (1.45 mmol, 78%).



$[\alpha]_D^{25} +79$  (c 0.4, H<sub>2</sub>O); lit<sup>153</sup>  $[\alpha]_D^{25} +80$  (c 0.36, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.92-1.96 (m, 1H), 3.18 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 3.22 (t, 1H,  $J = 9.9$  Hz), 3.27 (dd, 1H,  $J = 3.7, 1.5$  Hz), 3.33-3.38 (m, 1H), 3.69-3.74 (m, 2H), 3.88 (dd, 1H,  $J = 10.8, 3.5$  Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 46.4, 55.3, 58.1, 62.1, 71.3, 73.3, 74.8; HRMS calculat per C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na: 199.0582 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 199.0575.

**8.1.3 Síntesi dels aminociclitols C<sub>7</sub>N****8.1.3.1 Síntesi de l'(1S,2R,3S,4R,5R,6S)-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptà (19)**

Una dissolució de l'epòxid **2** (200 mg, 1.13 mmol) en 5 mL de DMF anhidra es va addicionar *via* cànula sobre un suspensió de NaH (350 mg al 60%, 8.75 mmol) en 15 mL de DMF a 0 °C. Després de 10 min, s'addicionaren 0.9 mL de BnBr (7.6 mmol) i la reacció es mantingué amb agitació a t.a. sota atmosfera d'argó durant 6 h. Passat aquest temps, es refredà la reacció a 0 °C, s'addicionà aigua (1 mL) i es va diluir amb Et<sub>2</sub>O (40 mL). Es rentà amb aigua (30 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb Et<sub>2</sub>O (2 x 40mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1) i es van obtenir 315 mg (0.59 mmol, 52%) de l'epòxid **19** en forma de sòlid blanc.



$[\alpha]_D^{25} +53.5$  ( $c$  0.50,  $\text{CHCl}_3$ ); lit<sup>192</sup>  $[\alpha]_D +60$  ( $c$  0.50,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3062, 3029, 2923, 2852, 1737, 1496, 1454, 1363, 1158, 1072, 1027, 735, 697 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.22 (dt, 1H,  $J = 9.7, 3.2$  Hz, H-5), 3.17 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz, H-6), 3.34 (dd, 1H,  $J = 3.75, 1.4$  Hz, H-1), 3.48 (t, 1H,  $J = 9.7$  Hz, H-4), 3.56 (d, 2H,  $J = 3.5$  Hz, H-8, H-8'), 3.73 (t, 1H,  $J = 9.3$  Hz, H-3), 3.89 (dd, 1H,  $J = 8.5, 1.3$  Hz, H-2), 4.34-4.88 (m, 8H,  $4 \times \text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.16-7.42 (m, 20H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 43.0 (C5), 55.0 (C6), 55.2 (C1), 68.4 (C8), 73.0 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 73.3 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.4 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.9 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 77.7 (C4), 79.9 (C2), 82.4 (C3), 127.7-128.5 (CHar), 138.0 (Car), 138.5 (Car), 138.6 (Car), 138.8 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}$ : 559.2460  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 559.2479.

### 8.1.3.2 Reaccions d'obertura dels epòxids 18 i 19 amb nucleòfils en presència de $\text{LiClO}_4$

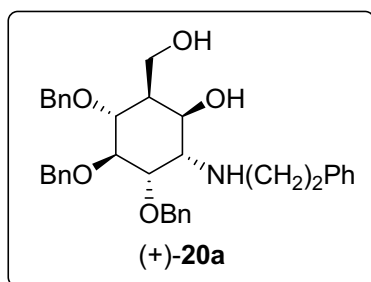
*Mètode general:* A una dissolució 2N de  $\text{LiClO}_4$  en 3 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidre, s'hi va addicionar l'epòxid 18 o 19 (0.3 mmol). A continuació, s'hi va addicionar  $\text{NaN}_3$  o la corresponent amina (3.0 mmol) i la reacció es va escalfar a 80 °C sota atmosfera d'argó durant 18 h. Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el residu es va dissoldre en 45 mL d'una mescla d'aigua/ $\text{Et}_2\text{O}$  (1:2) i es van separar les fases. La fase aquosa es tornà a extreure amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 30 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash*.

#### **(1R,2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(hidroximetil)-2-(fenetilamino)ciclohexanol (20a) i (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(hidroximetil)-6-(fenetilamino)ciclohexanol (21a)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid 18 (141 mg, 0.32 mmol) amb 2-feniletilamina (0.4 mL, 3.2 mmol) donà una mescla dels regioisòmers 21a i 20a (91:9), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/ $\text{AcOEt}$  1:2) i es van obtenir 14 mg (0.02 mmol, 8%) de 20a i 135 mg (0.24 mmol, 75%) de 21a.

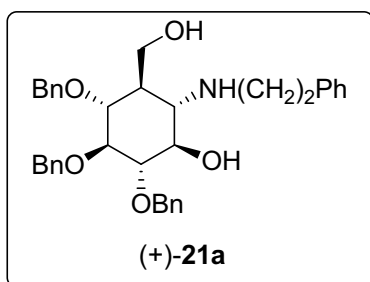


**20a:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +41.2$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3320, 3103, 3072, 2925, 2851, 1499, 1445, 1348, 1061, 693$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.12-2.20 (m, 1H, H-6), 2.73-



2.84 (m, 4H, PhCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 3.07 (t, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-2), 3.73 (dd, 1H, *J* = 11.0, 2.5 Hz, H-7), 3.87 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-5), 3.91 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-4), 3.98 (dd, 1H, *J* = 8.7, 4.2 Hz, H-3), 4.05 (dd, 1H, *J* = 11.0, 3.5 Hz, H-7'), 4.15-4.17 (m, 1H, H-1), 4.50-4.92 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.20-7.38 (m, 20 H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 36.6 (PhCH<sub>2</sub>),

41.5 (C<sub>6</sub>), 49.8 (NCH<sub>2</sub>), 60.0 (C<sub>2</sub>), 63.5 (C<sub>7</sub>), 72.3 (C<sub>1</sub>), 72.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.7 (C<sub>5</sub>), 79.9 (C<sub>3</sub>), 83.7 (C<sub>4</sub>), 126.3-128.7 (CHar), 138.6 (Car), 138.9 (Car), 139.1 (Car), 140.0 (Car); HRMS calculat per C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>5</sub>: 568.3063 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 568.3069.



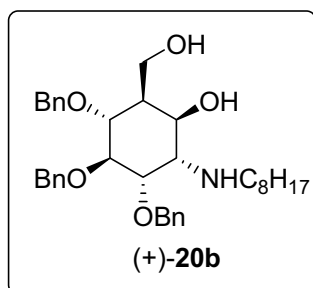
**21a:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +6.8$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3389, 3063, 3030, 2924, 2854, 1666, 1496, 1454, 1360, 1066, 1028, 750, 698$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.84-1.90 (m, 1H, H-5), 2.64 (t, 1H, *J* = 10.9 Hz, H-6), 2.72-2.89 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 2.95-3.08 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.24 (t, 1H, *J* = 9.9 Hz, H-4), 3.30 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-2), 3.54-3.62 (m,

2H, H-1, H-3), 3.66 (dd, 1H, *J* = 10.6, 7.8 Hz, H-7), 3.99 (dd, 1H, *J* = 10.6, 3.0 Hz, H-7'), 4.55-4.98 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.20-7.38 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 36.3 (PhCH<sub>2</sub>), 42.6 (C-5), 45.6 (NCH<sub>2</sub>), 60.5 (C<sub>6</sub>), 63.9 (C<sub>7</sub>), 72.4 (C<sub>1</sub>), 75.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 79.5 (C<sub>4</sub>), 83.8 (C<sub>2</sub>), 85.6 (C<sub>3</sub>), 126.6-128.8 (CHar), 138.0 (Car), 138.36 (Car), 138.42 (Car), 138.9 (Car); HRMS calculat per C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>5</sub>: 568.3063 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 568.3045.

**(1R,2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(hidroximetil)-2-(octilamino)ciclohexanol (20b) i (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(hidroximetil)-6-(octilamino)ciclohexanol (21b)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **18** (131 mg, 0.29 mmol) amb octilamina (0.48 mL, 2.9 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **21b** i **20b** (83:17), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:2) i es van obtenir 22 mg (0.04 mmol, 13%) de **20b** i 117 mg (0.20 mmol, 69%) de **21b**.

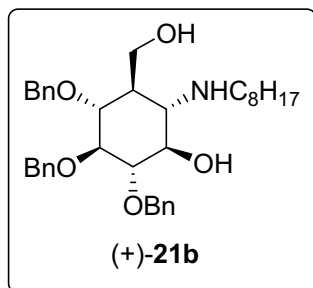
**20b**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +38.7$  (*c* 0.64, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3389, 3081, 3061, 3021, 2954, 2926, 2855, 1471, 1451, 1060, 1023, 661 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.18-1.42 (m, 12H, 6×CH<sub>2</sub>), 2.12-2.20 (m, 1H, H-6), 2.39-2.54 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.04 (t, 1H, *J* = 3.8 Hz, H-2), 3.75 (dd, 1H, *J* = 10.9, 2.1 Hz, H-7), 3.87 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-



5), 3.90 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-4), 3.98 (dd, 1H, *J* = 8.5, 4.1 Hz, H-3), 4.06 (dd, 1H, *J* = 10.9, 3.2 Hz, H-7'), 4.15-4.18 (m, 1H, H-1), 4.59-4.91 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.26-7.38 (m, 15H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 41.6 (C6), 48.7 (NCH<sub>2</sub>), 60.3 (C2), 63.5 (C7), 72.4 (C1), 72.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.7

(PhCH<sub>2</sub>O), 75.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.8 (C5), 80.3 (C3), 83.8 (C4), 127.7-128.7 (CHar), 138.6 (Car), 138.8 (Car), 139.1 (Car); HRMS calculat per C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>5</sub>: 576.3689 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 576.3693.

**21b**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +5.1$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3389, 3084, 3056, 3026, 2958, 2927, 2852, 1478, 1458, 1081, 1024, 893, 651 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.87 (t, 3H, *J*



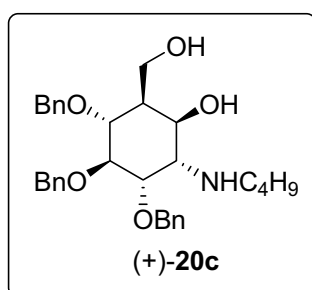
= 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.15-1.55 (m, 12H, 6×CH<sub>2</sub>), 1.95-2.01 (m, 1H, H-5), 2.74-2.88 (m, 3H, H-6, NCH<sub>2</sub>), 3.24 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-4), 3.33 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-2), 3.58 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-3), 3.65 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-1), 3.70 (dd, 1H, *J* = 10.7, 8.2 Hz, H-7), 4.07 (dd, 1H, *J* = 10.5, 2.7 Hz, H-7'), 4.54-4.97 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.26-7.36 (m, 15H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz,

CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 41.8 (C5), 45.0 (NCH<sub>2</sub>), 61.0 (C6), 63.7 (C7), 71.8 (C1), 75.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.70 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.73 (PhCH<sub>2</sub>O), 79.0 (C4), 83.4 (C2), 85.3 (C3), 127.9-128.8 (CHar), 137.8 (Car), 138.2 (Car), 138.3 (Car); HRMS calculat per C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>5</sub>: 576.3689 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 576.3702.

**(1R,2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloxi)-2-(butilamino)-6-(hidroximetil)ciclohexanol (20c) i (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-2,3,4-tris(benziloxi)-6-(butilamino)-5-(hidroximetil)ciclohexanol (21c)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **18** (141 mg, 0.32 mmol) amb butilamina (0.32 mL, 3.2 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **21c** i **20c** (87:13), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:2) i es van obtenir 19 mg (0.04 mmol, 11%) de **20c** i 121 mg (0.23 mmol, 74%) de **21c**.

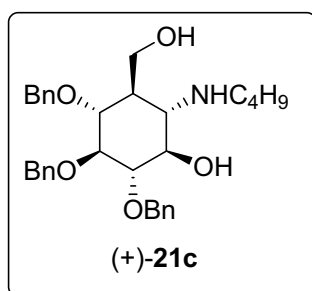
**20c**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +41.4$  (*c* 0.88, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3389, 3088, 3063, 3030, 2956, 2924, 2854, 1496, 1454, 1360, 1094, 1067, 1028, 733, 697, 665 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.54 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 2.14-2.19 (m, 1H, H-6),



2.44-2.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.07 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz, H-2), 3.77 (dd, 1H, *J* = 11.0, 2.5 Hz, H-7), 3.89 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-5), 3.92 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-4), 4.00 (dd, 1H, *J* = 8.6, 4.1 Hz, H-3), 4.07 (dd, 1H, *J* = 11.0, 4.1 Hz, H-7'), 4.17-4.21 (m, 1H, H-1), 4.62-4.93 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.28-7.38 (m, 15H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 41.6

(C<sub>6</sub>), 48.4 (NCH<sub>2</sub>), 60.3 (C<sub>2</sub>), 63.5 (C<sub>7</sub>), 72.3 (C<sub>1</sub>), 72.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.8 (C<sub>5</sub>), 79.8 (C<sub>3</sub>), 83.7 (C<sub>4</sub>), 127.6-128.7 (CHar), 138.6 (Car), 138.8 (Car), 139.1 (Car); HRMS calculat per C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>5</sub>: 520.3063 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 520.3061.

**21c**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +12.4$  (*c* 0.84, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3309, 3078, 3051, 3028, 2851, 1493,$



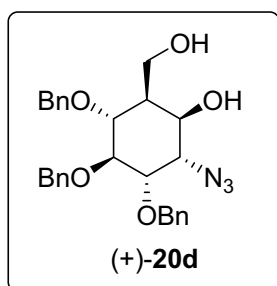
1458, 1090, 1065, 1025, 668 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.83-1.54 (m, 7H, CH<sub>3</sub>, 2×CH<sub>2</sub>), 2.12-2.18 (m, 1H, H-5), 2.95-3.15 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, H-6), 3.27 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-4), 3.39 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-2), 3.61 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-3), 3.74 (dd, 1H, *J* = 10.6, 8.9 Hz, H-7), 3.80 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-1), 4.16 (dd, 1H, *J* = 10.8, 2.9 Hz, H-7'), 4.53-4.96 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O),

7.26-7.40 (m, 15H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 13.6 (CH<sub>3</sub>), 19.7 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 40.7 (C<sub>5</sub>), 45.8 (NCH<sub>2</sub>), 61.8 (C<sub>6</sub>), 63.3 (C<sub>7</sub>), 71.3 (C<sub>1</sub>), 75.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 78.3 (C<sub>4</sub>), 82.7 (C<sub>2</sub>), 84.7 (C<sub>3</sub>), 127.8-128.8 (CHar), 137.6 (Car), 138.0 (Car), 138.1 (Car); HRMS calculat per C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>5</sub>: 520.3063 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 520.3080.

**(1R,2S,3S,4S,5R,6S)-2-azido-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(hidroximetil)ciclohexanol (20d) i (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-6-azido-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(hidroximetil)ciclohexanol (21d)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **18** (171 mg, 0.38 mmol) amb azida sòdica (0.25 g, 3.8 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **21d** i **20d** (75:25), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1) i es van obtenir 115 mg (0.23 mmol, 61%) de **21d** i 39 mg (0.08 mmol, 21%) de **20d**.

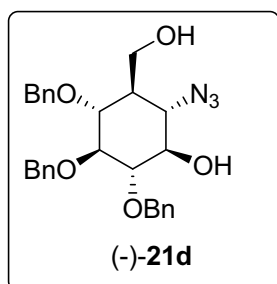
**20d**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +22$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3440, 3049, 3022, 2909, 2104, 1714, 1496,$



$1452 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.71-1.76 (m, 1H, H-6), 3.70-3.74 (m, 1H, H-7), 3.82-3.92 (m, 3H, H-2, H-4, H-5), 4.00 (dd, 1H, *J* = 10.9, 2.3 Hz, H-7'), 4.06-4.08 (m, 2H, H-1, H-3), 4.70-5.00 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.29-7.40 (m, 15H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 41.6 (C6), 62.8 (C2), 63.0 (C7), 73.1 (C1), 73.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.7 (C5), 75.0 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.0 (PhCH<sub>2</sub>O), 80.3 (C3),

84.3 (C4), 127.7-128.8 (CHar), 138.2 (Car), 138.6 (Car), 138.8 (Car); HRMS calculat per C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 512.2161 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 512.2159.

**21d**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} -8.8$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3439, 3054, 3026, 2903, 2106, 1953, 1721, 1493, 1455 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.41-1.47 (m, 1H, H-5), 2.57-2.75 (brs,



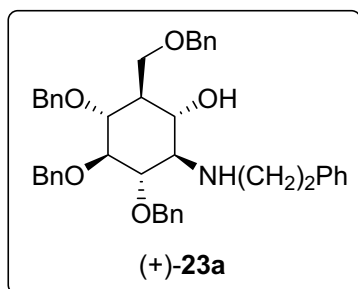
1H, OH), 3.38-3.45 (m, 2H, H-2, H-6), 3.56-3.62 (m, 3H, H-1, H-3, H-4), 3.79 (dd, 1H, *J* = 10.8, 2.4 Hz, H-7), 3.85 (dd, 1H, *J* = 10.8, 1.6 Hz, H-7'), 4.72-5.02 (m, 6H, 3×PhCH<sub>2</sub>O), 7.28-7.40 (m, 15H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 45.2 (C5), 58.3 (C7), 60.9 (C6), 75.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.9 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.3, 76.8, 83.2 (C2), 85.7 (C3), 127.9-128.8 (CHar), 138.1 (Car), 138.27 (Car),

138.35 (Car); HRMS calculat per C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 512.2161 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 512.2153.

**(1S,2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(benziloximetil)-2-(fenetilamino)ciclohexanol (23a)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (56 mg, 0.10 mmol) amb 2-feniletilamina (0.13 mL, 1.0 mmol) donà 51 mg (0.08 mmol, 74%) de l'amina **23a** després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:1) del cru.

**23a:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +11.6$  (*c* 0.43, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3331, 3062, 3028, 2923, 2853, 1658, 1495, 1453, 1069, 1028, 876, 750$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.68 (t, 1H, *J* =

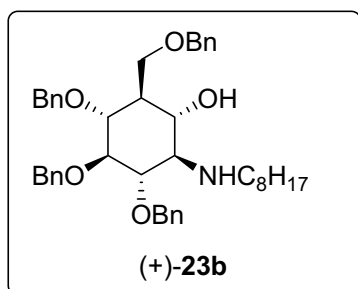


10.2 Hz, H-6), 2.49 (t, 1H, *J* = 10.2 Hz, H-2), 2.68-2.77 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 2.91 (dt, 1H, *J* = 11.2, 7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.13 (dt, 1H, *J* = 11.3, 7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.43 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-3), 3.49 (t, 1H, *J* = 10.3 Hz, H-1), 3.60-3.67 (m, 2H, H-4, H-5), 3.80 (dd, 1H, *J* = 8.9, 3.0 Hz, H-7), 3.88 (dd, 1H, *J* = 8.9, 1.9 Hz, H-7'), 4.54-4.99 (m, 8H, 4×PhCH<sub>2</sub>O), 7.14-7.34 (m, 25H,

Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 37.1 (PhCH<sub>2</sub>), 47.2 (C6), 47.9 (NCH<sub>2</sub>), 65.2 (C2), 65.9 (C7), 66.9 (C1), 73.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.60 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.62 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.9, 80.7 (C3), 88.0, 126.3-128.9 (CHar), 138.4 (Car), 138.51 (Car), 138.53 (Car), 138.7 (Car), 139.8 (Car); HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>5</sub>: 658.3532 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 658.3545.

**(1S,2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(benziloximetil)-2-(octilamino)ciclohexanol (23b)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (38 mg, 0.07 mmol) amb octilamina (0.12 mL, 0.7 mmol) donà 36 mg (0.05 mmol, 76%) de l'amina **23b** després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1) del cru.

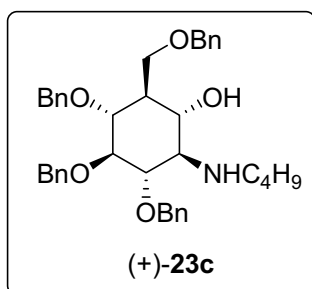


**23b:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +9.5$  (*c* 0.72, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3344, 3088, 3064, 3030, 2924, 2854, 1496, 1454, 1360, 1148, 1068, 1028, 734, 697, 666$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.17-1.38 (m, 12H, 6×CH<sub>2</sub>), 1.70 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz, H-6), 2.47 (t, 1H, *J* = 10.2 Hz, H-2), 2.57 (dt, 1H, *J* = 11.0, 7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 2.76 (dt, 1H, *J* = 11.0,

7.2 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.47 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-3), 3.50 (t, 1H, *J* = 10.2 Hz, H-1), 3.63-3.69 (m, 2H, H-4, H-5), 3.79 (dd, 1H, *J* = 8.9, 2.9 Hz, H-7), 3.90 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-7'), 4.48-5.03 (m, 8H, 4×PhCH<sub>2</sub>O), 7.21-7.37 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 46.6 (NCH<sub>2</sub>), 47.3 (C6), 65.1 (C2), 65.9 (C7), 66.8 (C1), 73.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (2×PhCH<sub>2</sub>O), 77.9, 80.5 (C3), 88.2, 127.7-128.7 (CHar), 138.50 (Car), 138.53 (Car), 138.55 (Car), 138.72 (Car); HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>NO<sub>5</sub>: 666.4158 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 666.4181

**(1S,2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(benziloximetil)-2-(butilamino)ciclohexanol (23c)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (39 mg, 0.07 mmol) amb butilamina (0.08 mL, 0.7 mmol) donà 32 mg (0.05 mmol, 72%) de l'amina **23c** després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1) del cru.

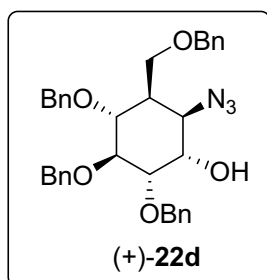


**23c**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +8.7$  (*c* 0.90, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3349, 3088, 3063, 3030, 2956, 2924, 2870, 1496, 1454, 1360, 1145, 1089, 1068, 1028, 734, 697, 666 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.40 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 1.69 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-6), 2.49 (t, 1H, *J* = 10.2 Hz, H-2), 2.60 (dt, 1H, *J* = 11.2, 7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 2.78 (dt, 1H, *J* = 11.0, 7.2 Hz,

NCH<sub>2</sub>), 3.47-3.55 (m, 2H, H-1, H-3), 3.62-3.67 (m, 2H, H-4, H-5), 3.79 (dd, 1H, *J* = 9.0, 3.2 Hz, H-7), 3.88 (dd, 1H, *J* = 9.0, 1.9 Hz, H-7'), 4.48-5.02 (m, 8H, 4×PhCH<sub>2</sub>O), 7.19-7.37 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 46.5 (NCH<sub>2</sub>), 47.3 (C6), 65.2 (C2), 66.0 (C7), 66.8 (C1), 73.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (2×PhCH<sub>2</sub>O), 77.9, 80.3 (C3), 88.1, 127.7-128.7 (CHar), 138.4 (Car), 138.47 (Car), 138.50 (Car), 138.7 (Car); HRMS calculat per C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>5</sub>: 610.3532 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 610.3553.

**(1S,2S,3S,4R,5R,6R)-6-azido-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)ciclohexanol (22d) i (1S,2R,3S,4S,5R,6S)-2-azido-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(benziloximetil)ciclohexanol (23d)**

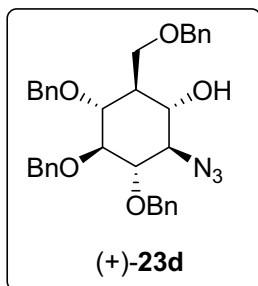
D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (161 mg, 0.30 mmol) amb azida sòdica (0.20 g, 3.0 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **22d** i **23d** (56:44), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 40:1) i es van obtenir 79 mg (0.14 mmol, 46%) de **22d** i 68 mg (0.12 mmol, 39%) de **23d**.



**22d**: Oli;  $[\alpha]_D^{25} +27.9$  (*c* 0.49, CHCl<sub>3</sub>); lit<sup>192</sup>  $[\alpha]_D^{25} +32$  (*c* 0.44, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3393, 3063, 3030, 2919, 2106, 1454, 1361, 1063, 1027, 735, 698 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.51-2.65 (m, 1H, H-5), 3.46-3.50 (m, 2H, H-4, H-7), 3.72 (dd, 1H, *J* = 9.4, 2.9 Hz, H-2), 3.80-3.84 (m, 2H, H-3, H-7'), 4.10 (t, 1H, *J* = 3.4 Hz, H-1), 4.20 (t, 1H, *J* = 3.4 Hz, H-6), 4.47-4.91 (m, 8H, 4×PhCH<sub>2</sub>O), 7.19-

7.37 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 40.4 (C5), 61.0 (C6), 67.8 (C7), 68.9

(C1), 73.27 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.30 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.9 (PhCH<sub>2</sub>O), 78.4 (C4), 80.3 (C2), 83.4 (C3), 127.7-128.7 (CHar), 137.9 (Car), 138.2 (Car), 138.3 (Car), 138.8 (Car); HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 602.2631 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 602.2655.



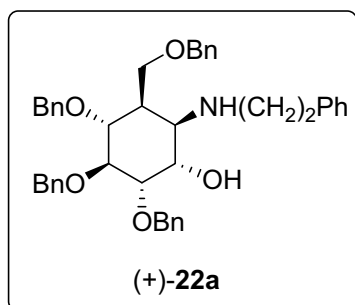
**23d:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +54.0$  (*c* 0.52, CHCl<sub>3</sub>); lit<sup>192</sup>  $[\alpha]_D^{25} +61$  (*c* 0.4, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3390, 3062, 3030, 2922, 2857, 2108, 1452, 1360, 1147, 1063, 1025, 992, 696 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.77-1.82 (m, 1H, H-6), 3.38 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-3), 3.41 (t, 1H, *J* = 9.9 Hz, H-2), 3.51 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-5), 3.56 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-1), 3.64 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-4), 3.68 (dd, 1H, *J* = 9.1, 4.6 Hz, H-7), 3.86 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.5 Hz, H-7'), 4.47-4.94 (m, 8H, 4×PhCH<sub>2</sub>O), 7.19-7.38 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 46.2 (C6), 66.8 (C7), 69.7 (C1), 70.0 (C2), 73.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.0 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.3 (C5), 81.3 (C3), 86.3 (C4), 127.7-128.6 (CHar), 137.8 (Car), 137.9 (Car), 138.2 (Car), 138.5 (Car); HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 602.2631 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 602.2617.

### 8.1.3.3 Reaccions d'obertura de l'epòxid **19** amb nucleòfils utilitzant condicions àcides

*Mètode general:* A una dissolució de l'epòxid **19** (100 mg, 0.18 mmol) en 4.5 mL d'una mescla MeOH:H<sub>2</sub>O (8:1) s'afegiren 59 mg (1.1 mmol) de NH<sub>4</sub>Cl i la corresponent amina (1.8 mmol). Es va escalfar la reacció a 100 °C durant 48-72 h sota atmosfera d'argó i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. El residu resultant es va dissoldre en 40 mL d'una mescla aigua/Et<sub>2</sub>O (1:1) i es van separar les fases. La fase aquosa es tornà a extreure amb Et<sub>2</sub>O (2 x 20 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtrà i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash*.

#### (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)-6-(fenetilamino)ciclohexanol (**22a**)

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (80 mg, 0.15 mmol) amb 2-feniletilamina (0.19 mL, 1.5 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **22a** i **23a** (59:41), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-1:2) i es van obtenir 49 mg (0.08 mmol, 50%) de **22a** i 32 mg (0.05 mmol, 32%) de **23a**.

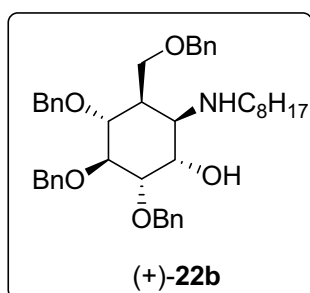


**22a:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +14.8$  ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3328, 3051, 3027, 2961, 2841, 2095, 1645, 1493, 1058, 1025, 743$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.31-2.33 (m, 1H, H-5), 2.62-2.79 (m, 4H,  $\text{PhCH}_2$ ,  $\text{NCH}_2$ ), 3.11-3.13 (m, 1H, H-6), 3.58 (d, 1H,  $J = 9.3$  Hz, H-7), 3.85 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-3), 3.91-4.0 (m, 4H, H-1, H-2, H-4, H-7'), 4.32-4.95 (m, 8H,  $4 \times \text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.18-7.37 (m, 25H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 36.7 ( $\text{PhCH}_2$ ), 39.9 (C5), 50.1 ( $\text{NCH}_2$ ), 61.1 (C6), 68.6, 70.0 (C7), 73.2 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 73.3 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.1 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.6 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 77.8, 80.9, 84.4 (C3), 126.1-128.8 (CHar), 138.2 (Car), 138.5 (Car), 139.1 (Car), 139.2 (Car), 140.3 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{NO}_5$ : 658.3532  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 658.3533.

**(1S,2S,3S,4R,5R,6R)-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)-6-(octilamino)ciclohexanol (22b)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (100 mg, 0.18 mmol) amb octilamina (0.3 mL, 1.8 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **22b** i **23b** (59:41), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-1:2) i es van obtenir 64 mg (0.09 mmol, 52%) de **22b** i 41 mg (0.06 mmol, 33%) de **23b**.

**22b:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +19.4$  ( $c$  0.72,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3341, 3098, 3061, 3025, 2951, 2862,$

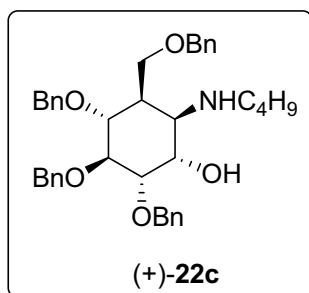


1483, 1446, 1357, 1134, 1052, 661  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.33 (m, 12H,  $6 \times \text{CH}_2$ ), 2.27-2.30 (m, 1H, H-5), 2.45 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 3.05 (t, 1H,  $J = 2.5$  Hz, H-6), 3.65 (dd, 1H,  $J = 9.1, 1.1$  Hz, H-7), 3.83 (t, 1H,  $J = 9.1$  Hz, H-3), 3.97-4.00 (m, 4H, H-1, H-2, H-4, H-7'), 4.46-4.91 (m, 8H,  $4 \times \text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.22-7.38 (m, 20H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3 ( $\text{CH}_3$ ), 22.8 ( $\text{CH}_2$ ), 27.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 30.6 ( $\text{CH}_2$ ), 32.1 ( $\text{CH}_2$ ), 40.0 (C5), 49.1 ( $\text{NCH}_2$ ), 61.7 (C6), 68.7, 70.4 (C7), 73.2 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 73.4 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.2 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.7 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 77.9, 81.0, 84.6 (C3), 127.5-129.2 (CHar), 138.2 (Car), 138.5 (Car), 139.2 (Car), 139.3 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{NO}_5$ : 666.4158  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 666.4164.



**(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)-6-(butilamino)ciclohexanol (22c)**

D'acord amb el mètode general, l'obertura de l'epòxid **19** (90 mg, 0.17 mmol) amb butilamina (0.17 mL, 1.7 mmol) donà una mescla dels regioisòmers **22c** i **23c** (55:45), els quals es van separar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-1:2) i es van obtenir 45 mg (0.07 mmol, 43%) de **22c** i 36 mg (0.06 mmol, 36%) de **23c**.



**22c:** Oli;  $[\alpha]_D^{25} +12.5$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3394, 3321, 3085, 3068, 3033, 2954, 2864, 1493, 1456, 1066, 1024, 663$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.87 (t, 3H, *J* = 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.22-1.34 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 2.31-2.34 (m, 1H, H-5), 2.47 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.07-3.09 (m, 1H, H-6), 3.66 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-7), 3.85 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-3), 4.00-4.05 (m, 4H, H-1, H-2,

H-4, H-7'), 4.46-4.95 (m, 8H, 4×PhCH<sub>2</sub>O), 7.26-7.39 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>2</sub>), 32.6 (CH<sub>2</sub>), 40.0 (C5), 48.6 (NCH<sub>2</sub>), 61.7 (C6), 68.7, 70.4 (C7), 73.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.9, 80.9, 84.5 (C3), 127.5-128.6 (CHar), 138.2 (Car), 138.5 (Car), 139.2 (Car), 139.3 (Car); HRMS calculat per C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>5</sub>: 610.3532 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 610.3550.

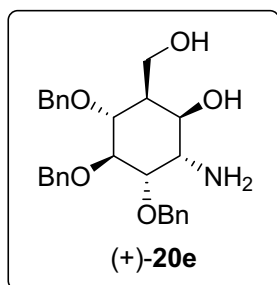
**8.1.3.4 Reducció de les azides 20d/21d i 22d/23d: síntesi de les amines 20e/21e i 22e/23e**

*Mètode general:* A una dissolució de l'azida (0.07 mmol) en 5 mL de THF, refredada a 0 °C, s'hi van addicionar 0.13 mmol de LiAlH<sub>4</sub> i es va deixar la reacció amb agitació a aquesta temperatura sota atmosfera d'argó durant 1 h. Passat aquest temps, la reacció es tornà a refredar a 0 °C i s'hi van addicionar unes gotes d'una solució saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Es van separar les sals per filtració a través de Celite<sup>®</sup> i es rentà amb 15-20 mL d'Et<sub>2</sub>O. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda es van aïllar les amines corresponents, les quals es van emprar en la següent reacció sense purificar.

**(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(hidroximetil)ciclohexanol (20e)**

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **20d** (36 mg, 0.07 mmol) donà 30 mg (0.06 mmol, 87%) de l'amina **20e**.

**20e:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +40.4$  (*c* 1.00,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3362, 2928, 2924, 2853, 1598, 1461, 1452, 1049, 1027, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.07-2.10 (m, 1H, H-6), 3.39-3.43 (m,

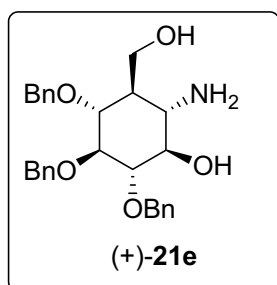


1H, H-2), 3.67-3.71 (brs, 3H,  $\text{NH}_2$ , OH), 3.77-3.81 (m, 1H, H-7), 3.85-3.93 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 4.04-4.09 (m, 2H, H-1, H-7'), 4.66-4.96 (m, 6H,  $3 \times \text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.28-7.36 (m, 15H, Ph);  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 41.6 (C6), 53.3 (C2), 63.1 (C7), 72.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.8 (C1), 74.9 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.1 (C5), 80.5 (C3), 83.6 (C4), 127.6-128.7 (CHar), 138.7 (Car), 138.8 (Car),

139.0 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_5$ : 464.2437  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 464.2438.

### (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-amino-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(hidroximetil)ciclohexanol (**21e**)

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **21d** (100 mg, 0.20 mmol) donà 84 mg (0.18 mmol, 89%) de l'amina **21e**.



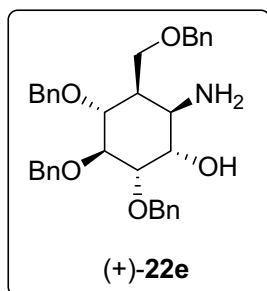
**21e:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +20.6$  (*c* 1.00,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3356, 3030, 2921, 1586, 1496, 1453, 1359, 1065, 1027, 734, 697, 665 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.50-1.61 (m, 1H, H-5), 2.58 (t, 1H,  $J = 10.3$  Hz, H-6), 2.70-3.00 (brs, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ), 3.20 (t, 1H,  $J = 9.3$  Hz, H-1), 3.31 (t, 1H,  $J = 9.3$  Hz, H-2), 3.35 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz, H-4), 3.63 (t, 1H,  $J = 9.3$  Hz, H-3), 3.76 (dd, 1H,  $J = 10.6, 6.3$  Hz, H-7), 4.01

(d, 1H,  $J = 10.5$  Hz, H-7'), 4.61-5.00 (m, 6H,  $3 \times \text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.28-7.40 (m, 15H, Ph);  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 46.4 (C5), 54.4 (C6), 62.5 (C7), 75.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.2 (C1), 79.2 (C4), 83.6 (C2), 85.9 (C3), 127.8-128.8 (CHar), 138.12 (Car), 138.14 (Car), 138.46 (Car), 138.51 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_5$ : 464.2437  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 464.2434

### (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-6-amino-2,3,4-tris(benziloxi)-5-(benziloximetil)ciclohexanol (**22e**)

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **22d** (70 mg, 0.12 mmol) donà 56 mg (0.10 mmol, 84%) de l'amina **22e**.

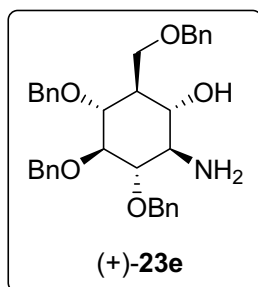
**22e:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +30.7$  (*c* 0.43,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3331, 3062, 3034, 2907, 2863, 1581, 1458, 1149, 683 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.30-2.33 (m, 1H, H-5), 3.52-3.54 (m, 1H, H-6), 3.69 (dd, 1H,  $J = 2.4, 9.4$  Hz, H-7), 3.83 (t, 1H,  $J = 9.0$  Hz, H-3), 3.88-3.91 (m, 2H,



H1, H-7'), 3.97 (t, 1H,  $J=10.0$  Hz, H-4), 4.00 (dd, 1H,  $J=3.0, 9.2$  Hz, H-2), 4.45-4.90 (m, 8H,  $4\times\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.21-7.34 (m, 20H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 40.3 (C5), 53.3 (C6), 69.7 (C7), 71.6 (C1), 73.0 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 73.4 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.2 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.6 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 77.5 (C4), 80.8 (C2), 84.3 (C3), 127.8-128.6 (CHar), 138.26 (Car), 138.32 (Car), 138.9 (Car), 139.2 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{NO}_5$ : 554.2906  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 554.2922.

### (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5-tris(benziloxi)-6-(benziloximetil)ciclohexanol (**23e**)

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **23d** (63 mg, 0.11 mmol) donà 47 mg (0.08 mmol, 78%) de l'amina **23e**.



**23e**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +9.4$  ( $c$  0.18,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3366, 3090, 3030, 2917, 2863, 1584, 1481, 1454, 1059, 693$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.77 (t, 1H,  $J=1.0, 0.7$  Hz, H-6), 2.20-2.60 (br s, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ), 2.67 (t, 1H,  $J=9.8$  Hz, H-2), 3.24 (t, 1H,  $J=9.5$  Hz, H-3), 3.46 (t, 1H,  $J=10.0$  Hz, H-1), 3.54 (t, 1H,  $J=10.1$  Hz, H-5), 3.62 (t, 1H,  $J=9.3$  Hz, H-4), 3.69 (dd, 1H,  $J=4.3, 8.8$  Hz, H-7), 3.86 (dd, 1H,  $J=1.3, 9.0$  Hz, H-7'), 4.45-4.99 (m, 8H,  $4\times\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.18-7.37 (m, 20H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 47.0 (C6), 59.2 (C2), 67.1 (C7), 70.5 (C1), 73.4 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.6 ( $2\times\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.7 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 78.0 (C5), 83.0 (C3), 87.1 (C4), 127.8-128.7 (CHar), 138.2 (Car), 138.42 (Car), 138.47 (Car), 138.6 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{NO}_5$ : 554.2906  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 554.2899.

#### 8.1.3.5 Reaccions d'O-desbenzilació amb $\text{BCl}_3$ : síntesi dels aminociclitols **24a-c,e** - **25a-c,e**, **26e** i **27a-c,e**

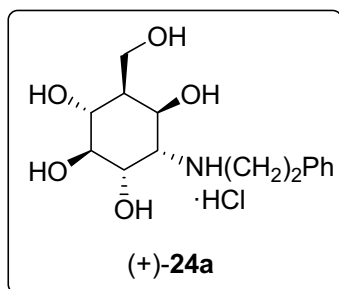
*Mètode general*: En una matrass de forma cònica, es van dissoldre els corresponent aminociclitols *O*-benzilats (0.21 mmol) en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidre sota atmosfera d'argó. Es va refredar el sistema a  $-78$  °C i es va addicionar, gota a gota, una dissolució de  $\text{BCl}_3$  1M en heptà (2.5 equivalents per cada grup benzil). Després de 2 h, es va deixar pujar la temperatura fins a t.a i es mantingué amb agitació durant 16 h. Passat aquest temps, es tornà a refredar el sistema a  $-78$  °C i es van afegir, gota a gota, 2 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, s'hi van addicionar uns 5 mL d'AcOEt de

qualitat HPLC sobre el cru i, després de deixar el matràs al ultrasons durant 2-3 min, es va observar la formació d'un precipitat blanc. Amb molta cura, es va treure el sobrenedant i, després de repetir el procés de rentat amb AcOEt dos cops més i assecar el sòlid al buit, es van obtenir els aminociclitols desitjats.

### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(hidroximetil)-4-(fenetilamino)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (24a)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 13 mg (0.02 mmol) de l'amina **20a** s'obtingueren 7 mg (0.02 mmol, 90%) de l'aminociclitol **24a**.

$[\alpha]_D^{25} +6.5$  (*c* 0.70, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.93-2.05 (m, 1H, H-6), 3.04-3.08 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 3.33-3.36 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.54 (t, 1H, *J* = 4.9 Hz, H-4), 3.61 (t, 1H, *J*

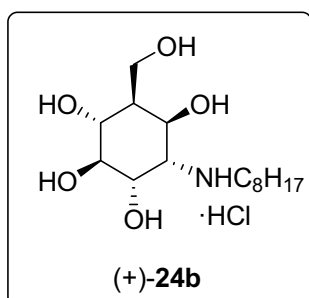


= 7.3 Hz, H-2), 3.72 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-1), 3.85 (dd, 1H, *J* = 10.6, 7.5 Hz, H-7), 3.96 (dd, 1H, *J* = 10.6, 4.8 Hz, H-7'), 4.07 (dd, 1H, *J* = 7.6, 4.5 Hz, H-3), 4.41 (dd, 1H, *J* = 4.7, 4.0 Hz, H-5), 7.26-7.36 (m, 5H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 32.9 (PhCH<sub>2</sub>), 46.7 (C6), 49.1 (NCH<sub>2</sub>), 60.6 (C7), 62.5 (C4), 65.4 (C5), 69.6 (C3), 71.6 (C1), 75.0 (C2), 128.3 (CHar), 129.7

(CHar), 130.0 (CHar), 137.8 (Car); HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>: 298.1654 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 298.1656.

### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(hidroximetil)-4-(octilamino)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (24b)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 20 mg (0.03 mmol) de l'amina **20b** s'obtingueren 11 mg (0.03 mmol, 91%) de l'aminociclitol **24b**.



$[\alpha]_D^{25} +5.4$  (*c* 1.00, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.91 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.23-1.76 (m, 12H, 6×CH<sub>2</sub>), 1.91-1.95 (m, 1H, H-6), 3.00-3.10 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.45 (t, 1H, *J* = 4.9 Hz, H-4), 3.58 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-2), 3.71 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-1), 3.85 (dd, 1H, *J* = 10.6, 7.4 Hz, H-7), 3.95 (dd, 1H, *J* = 10.6, 4.8 Hz; H-7'), 4.05 (dd, 1H, *J* = 7.9, 4.4 Hz, H-3), 4.33 (t, 1H, *J* = 4.2

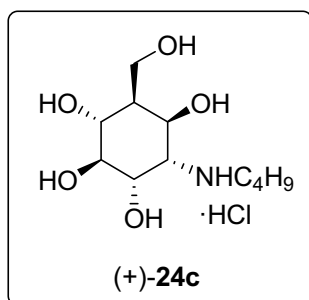
Hz, H-5); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>),

30.2 (CH<sub>2</sub>), 30.22 (CH<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 46.5 (C6), 48.1 (NCH<sub>2</sub>), 60.6 (C7), 62.2 (C4), 65.3 (C5), 69.6 (C3), 71.6 (C1), 75.0 (C2); HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>: 306.2280 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 306.2280.

### Hidroclorur de l'(**1R,2S,3S,4S,5R,6S**)-4-(butilamino)-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (**24c**)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 17 mg (0.03 mmol) de l'amina **20c** s'obtingueren 9 mg (0.03 mmol, 94%) de l'aminociclitol **24c**.

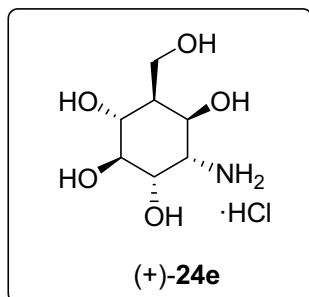
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +7.6 (*c* 0.90, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.00 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.39-1.75 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 1.92-1.99 (m, 1H, H-6), 3.11 (dd, 2H, *J* = 9.5, 6.9 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.46 (t, 1H, *J* = 5.0 Hz, H-4), 3.58 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-2), 3.71 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, H-1),



3.84 (dd, 1H, *J* = 10.6, 7.5 Hz, H-7), 3.95 (dd, 1H, *J* = 10.7, 4.8 Hz, H-7'), 4.05 (dd, 1H, *J* = 7.8, 4.5 Hz, H-3), 4.37 (dd, 1H, *J* = 5.2, 4.0 Hz, H-5); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.0 (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 46.5 (C6), 48.0 (NCH<sub>2</sub>), 60.7 (C7), 62.2 (C4), 65.4 (C5), 69.6 (C3), 71.6 (C1), 75.1 (C2); HRMS calculat per C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>: 250.1654 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 250.1647.

### Hidroclorur de l'(**1R,2S,3S,4S,5R,6S**)-4-amino-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (**24e**)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 25 mg (0.05 mmol) de l'amina **20e** s'obtingueren 11 mg (0.05 mmol, 87%) de l'aminociclitol **24e**.

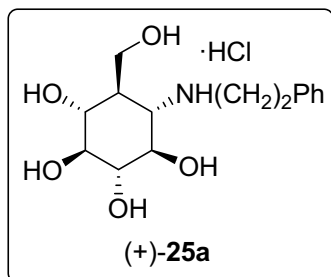


[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +11.1 (*c* 0.60, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.78-1.86 (m, 1H, H-6), 3.45-3.49 (m, 2H, H-2, H-4), 3.62 (t, 1H, *J* = 9.1 Hz, H-1), 3.83 (dd, 1H, *J* = 7.9, 10.5 Hz, H-7), 3.93-3.97 (m, 2H, H-3, H-7'), 4.24 (t, 1H, *J* = 3.5 Hz, H-5); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 45.4 (C6), 56.9 (C4), 60.8 (C7), 67.2 (C5), 69.5 (C3), 71.2 (C1), 75.6 (C2); HRMS calculat per C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>: 194.1028 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 194.1022.

### Hidroclorur de l'(*1R,2S,3S,4R,5S,6R*)-6-(hidroximetil)-5-(fenetilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (**25a**)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $\text{BCl}_3$ , a partir de 120 mg (0.21 mmol) de l'amina **21a** s'obtingueren 54 mg (0.18 mmol, 77%) de l'aminociclitol **25a**.

$[\alpha]_D^{25} +9.6$  (*c* 1.00,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.83-1.90 (m, 1H, H-6), 3.00

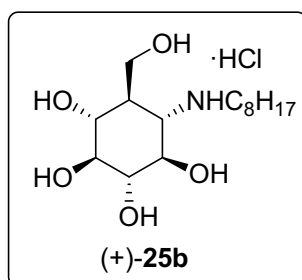


(t, 2H,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 3.14 (t, 1H,  $J = 9.4$  Hz, H-1), 3.16-3.23 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.33-3.40 (m, 1H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.54-3.60 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ , H-4), 3.70 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz, H-7), 4.13 (dd, 1H,  $J = 10.8, 3.3$  Hz, H-7'), 7.25-7.36 (m, 5H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 33.8 ( $\text{PhCH}_2$ ), 42.8 (C6), 48.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 63.3 (C5), 63.5 (C7), 71.7 (C1), 72.7 (C4), 76.0, 77.4,

128.4 (CHar), 129.9 (CHar), 130.0 (CHar), 137.6 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ : 298.1654  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 298.1646.

### Hidroclorur de l'(*1R,2S,3S,4R,5S,6R*)-6-(hidroximetil)-5-(octilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (**25b**)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $\text{BCl}_3$ , a partir de 100 mg (0.17 mmol) de l'amina **21b** s'obtingueren 55 mg (0.16 mmol, 92%) de l'aminociclitol **25b**.



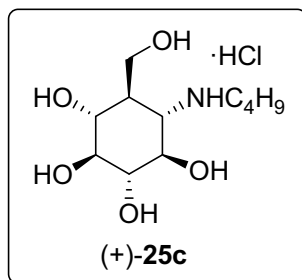
$[\alpha]_D^{25} +11.5$  (*c* 1.00,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.91 (t, 3H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.22-1.73 (m, 12H,  $6 \times \text{CH}_2$ ), 1.88-1.94 (m, 1H, H-6), 3.09-3.31 (m, 6H,  $\text{NCH}_2$ , H-1, H-2, H-3, H-5), 3.57 (dd, 1H,  $J = 10.2, 8.9$  Hz, H-4), 3.77 (dd, 1H,  $J = 10.4, 8.9$  Hz, H-7), 4.16 (dd, 1H,  $J = 10.8, 3.0$  Hz, H-7');  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.5 ( $\text{CH}_2$ ), 27.7 ( $\text{CH}_2$ ),

30.2 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $\text{CH}_2$ ), 32.9 ( $\text{CH}_2$ ), 42.8 (C6), 46.6 ( $\text{NCH}_2$ ), 63.0 (C5), 63.2 (C7), 71.6, 72.5 (C4), 76.0, 77.4; HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{NO}_5$ : 306.2280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 306.2268.

### Hidroclorur de l'(1R,2S,3S,4R,5S,6R)-5-(butilamino)-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (25c)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 115 mg (0.22 mmol) de l'amina **21c** s'obtingueren 56 mg (0.19 mmol, 88%) de l'aminociclitol **25c**.

$[\alpha]_D^{25} +13.9$  (*c* 0.48, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.99 (t, 3H, *J*=7.4 Hz, CH<sub>3</sub>),

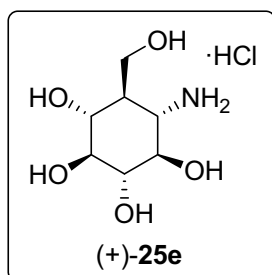


1.40-1.71 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 1.86-1.93 (m, 1H, H-6), 3.10-3.30 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>, H-1, H-2, H-3, H-5), 3.55 (dd, 1H, *J* = 10.4, 8.8 Hz, H-4), 3.77 (dd, 1H, *J* = 10.7, 8.7 Hz, H-7), 4.17 (dd, 1H, *J* = 10.8, 3.2 Hz, H-7'); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 13.9 (CH<sub>3</sub>), 20.7 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (C6), 46.3 (NCH<sub>2</sub>), 63.0 (C5), 63.3 (C7), 71.6, 72.5 (C4), 76.0, 77.5; HRMS calculat per C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>:

250.1654 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 250.1657.

### Hidroclorur de l'(1R,2S,3S,4R,5S,6R)-5-amino-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (25e)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 75 mg (0.16 mmol) de l'amina **21e** s'obtingueren 34 mg (0.15 mmol, 91%) de l'aminociclitol **25e**.

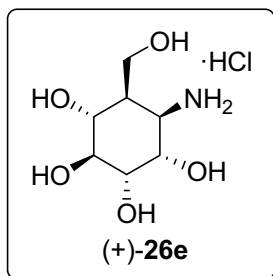


$[\alpha]_D^{25} +7.2$  (*c* 0.80, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.66-1.73 (m, 1H, H-6), 3.05 (t, 1H, *J* = 10.9 Hz, H-5), 3.16-3.23 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 3.37 (dd, 1H, *J* = 10.4, 9.3 Hz, H-4), 3.80 (dd, 1H, *J* = 6.9, 10.9 Hz, H-7), 4.03 (dd, 1H, *J* = 3.3, 10.9 Hz, H-7'); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 44.7 (C6), 56.1 (C5), 62.0 (C7), 71.5, 74.2 (C4), 76.0, 77.8; HRMS calculat per C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>: 194.1028 [M+H]<sup>+</sup>.

Trobat: 194.1021.

### Hidroclorur de l'(1R,2S,3S,4S,5R,6R)-5-amino-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (26e)

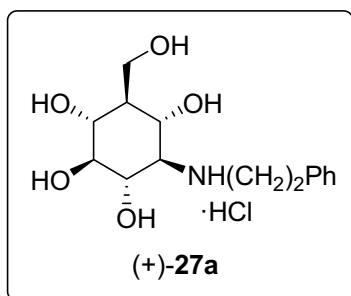
D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 50 mg (0.09 mmol) de l'amina **22e** s'obtingueren 18 mg (0.08 mmol, 85%) de l'aminociclitol **26e**.



$[\alpha]_D^{25} +7.8$  ( $c$  1.00,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 2.22-2.26 (m, 1H, H-6), 3.61-3.73 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-5), 3.82 (dd, 1H,  $J = 11.2, 3.2$  Hz, H-7), 4.01-4.04 (m, 2H, H-4, H-7');  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 42.8 (C6), 61.3 (2) (C5, C7), 67.7 (C4), 71.3, 73.6, 74.2 (C1, C2, C3); HRMS calculat per  $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{NO}_5$ : 194.1028  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 194.1023.

### Hidroclozur de l'(*1R,2S,3S,4R,5S,6S*)-6-(hidroximetil)-4-(fenetilamino)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (**27a**)

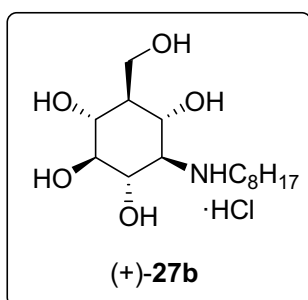
D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $\text{BCl}_3$ , a partir de 42 mg (0.06 mmol) de l'amina **23a** s'obtingueren 18 mg (0.05 mmol, 87%) de l'aminociclitol **27a**.



$[\alpha]_D^{25} +4.2$  ( $c$  1.00,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.50 (tt, 1H,  $J = 10.5, 3.2$  Hz, H-6), 3.04-3.10 (m, 3H,  $\text{PhCH}_2$ , H-4), 3.27-3.38 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 3.39-3.46 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.73 (t, 1H,  $J = 10.5$  Hz, H-5), 3.88-3.94 (m, 2H, H-7, H-7'), 7.27-7.36 (m, 5H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 33.4 ( $\text{PhCH}_2$ ), 47.4 ( $\text{NCH}_2$ ), 50.1 (C6), 58.4 (C7), 65.8 (C5), 66.2 (C4), 70.09 (C3), 70.11 (C1), 79.2 (C2), 128.3 ( $\text{CHar}$ ), 129.8 ( $\text{CHar}$ ), 130.0 ( $\text{CHar}$ ), 137.9 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ : 298.1654  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 298.1640.

### Hidroclozur de l'(*1R,2S,3S,4R,5S,6S*)-6-(hidroximetil)-4-(octilamino)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (**27b**)

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $\text{BCl}_3$ , a partir de 34 mg (0.05 mmol) de l'amina **23b** s'obtingueren 16 mg (0.05 mmol, 92%) de l'aminociclitol **27b**.



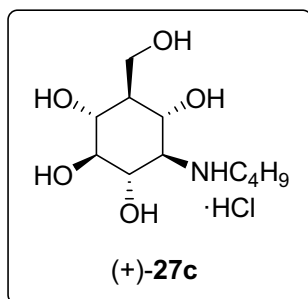
$[\alpha]_D^{25} +7.1$  ( $c$  1.00,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.91 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24-1.51 (m, 11H,  $5 \times \text{CH}_2$ , H-6), 1.71-1.79 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.97-3.02 (m, 1H, H-4), 3.12-3.20 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.27-3.46 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 3.71 (t, 1H,  $J = 10.5$  Hz, H-5), 3.89-3.95 (m, 2H, H-7, H-7');  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.3 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ),



30.2 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 46.2 (NCH<sub>2</sub>), 50.2 (C<sub>6</sub>), 58.4 (C<sub>7</sub>), 65.7 (C<sub>5</sub>), 66.1 (C<sub>4</sub>), 70.0 (C<sub>3</sub>), 70.1 (C<sub>1</sub>), 79.2 (C<sub>2</sub>); HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>: 306.2280 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 306.2268.

**Hidrocloreur de l'((1R,2S,3S,4R,5S,6S)-4-(butilamino)-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (27c)**

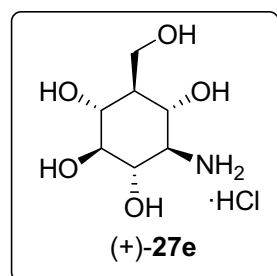
D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 25 mg (0.04 mmol) de l'amina **23c** s'obtingueren 11 mg (0.03 mmol, 86%) de l'aminociclitol **27c**.



[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +4.6 (*c* 0.72, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.00 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.39-1.75 (m, 5H, 2×CH<sub>2</sub>, H-6), 2.99 (t, 1H, *J* = 10.7 Hz, H-4), 3.13-3.20 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.25-3.44 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 3.71 (t, 1H, *J* = 10.5 Hz, H-5), 3.88-3.93 (m, 2H, H-7, H-7'); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 13.9 (CH<sub>3</sub>), 20.9 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 45.8 (NCH<sub>2</sub>), 50.2 (C<sub>6</sub>), 58.4 (C<sub>7</sub>), 65.7 (C<sub>5</sub>), 66.1 (C<sub>4</sub>), 69.9 (C<sub>3</sub>), 70.1 (C<sub>1</sub>), 79.2 (C<sub>2</sub>); HRMS calculat per C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>: 250.1654 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 250.1646.

**Hidrocloreur de l'((1R,2S,3S,4R,5S,6S)-4-amino-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,5-tetraol (27e)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 45 mg (0.08 mmol) de l'amina **23e** s'obtingueren 17 mg (0.07 mmol, 90%) de l'aminociclitol **27e**.



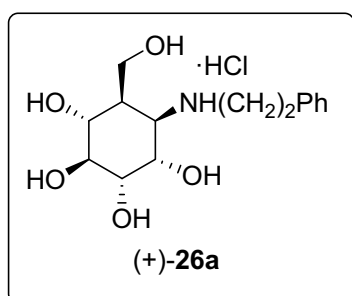
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +10.1 (*c* 0.54, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.46 (tt, 1H, *J* = 10.6, 2.8 Hz, H-6), 2.87 (t, 1H, *J* = 10.1 Hz, H-4), 3.24-3.27 (m, 2H, H-2, H-3), 3.34-3.39 (m, 1H, H-1), 3.55 (t, 1H, *J* = 10.2 Hz, H-5), 3.87-3.94 (m, 2H, H-7, H-7'); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 50.1 (C<sub>6</sub>), 58.3 (C<sub>7</sub>), 60.7 (C<sub>4</sub>), 67.3 (C<sub>5</sub>), 70.3 (C<sub>1</sub>), 71.6, 79.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>); HRMS calculat per C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>: 194.1028 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 194.1022.

### 8.1.3.6 Síntesi dels aminociclitols 26a-c per hidrogenòlisi utilitzant com a catalitzador Pd/C

*Mètode general:* En un tub a pressió, es va dissoldre l'aminociclitol *O*-benzilat (0.1 mmol) en 3 mL de THF i s'hi van addicionar 50 mg de Pd/C (5-15%) i 4 gotes de HCl concentrat. El sistema es va purgar amb quatre cicles de buit i hidrogen, deixant finalment una pressió de 2 atm d'H<sub>2</sub>. Es deixà el sistema amb agitació vigorosa a t.a. durant 14 h. Passat aquest temps, es filtrà la mescla resultant sobre Celite<sup>®</sup> per tal de separar el catalitzador i es rentà amb 15 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es van aïllar els aminociclitols corresponents en forma de sòlid blanc.

#### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(hidroximetil)-5-(fenetilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (26a)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 45 mg (0.07 mmol) de l'amina **22a** s'obtingueren 21 mg (0.06 mmol, 92%) de l'aminociclitol **26a**.

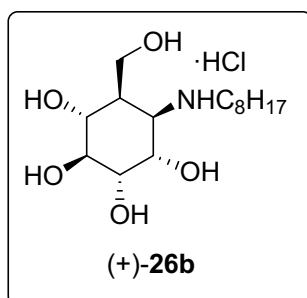


$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +7.2$  (*c* 0.90, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 2.38-2.41 (m, 1H, H-6), 2.97-3.12 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 3.37-3.48 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.67-3.72 (m, 1H, H-5), 3.73-3.87 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-7), 4.17 (dd, 1H, *J* = 11.1, 7.1 Hz, H-7'), 4.20-4.22 (m, 1H, H-4), 7.25-7.36 (m, 5H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 33.3 (PhCH<sub>2</sub>), 42.8 (C6), 50.1 (NCH<sub>2</sub>), 61.2 (2) (C5, C7), 67.6 (C4), 71.3, 73.6, 74.1 (C1, C2, C3), 128.3 (CHar), 129.8 (CHar), 130.0 (CHar), 137.7 (Car); HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>: 298.1654 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 250.1630.

#### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(hidroximetil)-5-(octilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (26b)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 55 mg (0.08 mmol) de l'amina **22b** s'obtingueren 26 mg (0.08 mmol, 93%) de l'aminociclitol **26b**.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +11.6$  (*c* 1.00, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.91 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.29-1.40 (m, 10H, 5×CH<sub>2</sub>), 1.70-1.76 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.41-2.42 (m, 1H, H-6), 3.11-

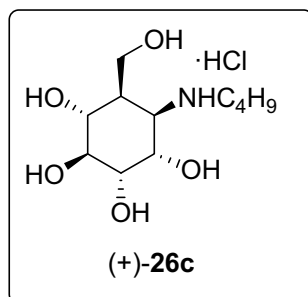


3.22 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.64 (dd, 1H, *J* = 9.1, 4.6 Hz, H-5), 3.74-3.81 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-7), 4.15-4.19 (m, 2H, H-4, H-7'); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 42.8 (C6), 49.0 (NCH<sub>2</sub>), 61.3 (2) (C5, C7), 67.6 (C4), 71.3, 73.7, 74.1 (C1, C2, C3); HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>: 306.2280 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 306.2276.

### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-(butilamino)-6-(hidroximetil)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (26c)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 40 mg (0.06 mmol) de l'amina **22c** s'obtingueren 17 mg (0.06 mmol, 92%) de l'aminociclitol **26c**.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +5.0 (*c* 1.00, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.99 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>),



1.40-1.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.67-1.73 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.39-2.41 (m, 1H, H-6), 3.16-3.18 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.61-3.65 (m, 1H, H-5), 3.75-3.82 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-7), 4.16-4.18 (m, 2H, H-4, H-7'); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 13.9 (CH<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (C6), 49.0 (NCH<sub>2</sub>), 61.3 (2) (C5, C7), 67.6 (C4), 71.2, 73.5, 74.2 (C1, C2, C3); HRMS calculat per C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>: 250.1654 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 250.1650.

#### 8.1.4 Síntesi dels amino- i diaminociclitols

Els següents compostos s'han preparat d'acord amb els procediments descrits a la literatura:

(1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptà (+)-**43**,<sup>166</sup>

(1*R**S*,2*R**S*,3*S**R*,4*S**R*,5*R**S*,6*S**R*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptà (±)-**43**,<sup>199</sup>

(1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (+)-**44**,<sup>166</sup>

(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-metanosulfonat de 2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexil (+)-**45**,<sup>166</sup>

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (+)-**46**,<sup>166</sup>

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (-)-**47**,<sup>166</sup>

(1*S**R*,2*S**R*,3*S**R*,4*R**S*,5*R**S*,6*S**R*)-2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (±)-**48**,<sup>199</sup>

(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol ( $\pm$ )-**53**,<sup>199</sup>  
 (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (-)-**70**,<sup>199</sup> (1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-5-ciclohexen-1,2,3,4-tetraol ((+)-conduiritol B).<sup>166</sup>

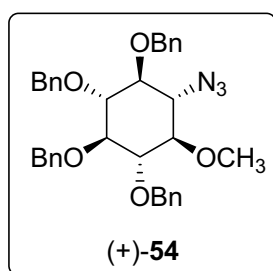
#### 8.1.4.1 Síntesi de les O-alkil azides **54-57** per alquilació dels azidoalcohols **44** i **46**

*Mètode general:* A una dissolució de l'azidoalcohol **44** o **46** (125 mg, 0.22 mmol) en 4 mL de DMF, es van afegir 15 mg (60%, 0.38 mmol) de NaH a 0 °C i es va mantenir amb agitació sota atmosfera inerta durant 15 min. A continuació, es va afegir iodur de metil o iodur de nonil (0.44 mmol), es deixà la mescla a 0 °C durant 30 min (control CCF) i, després s'afegí unes gotes d'aigua, es va diluir amb Et<sub>2</sub>O (40 mL). Es rentà amb aigua (40 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa s'extragué amb Et<sub>2</sub>O (2 x 40 mL). Es van ajuntar les fases orgàniques i es van assecat sobre Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Després de filtrar, s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda i el cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-6:1).

#### (1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-azido-1,2,3,4-tetrabenziloxi-6-(metoxi)ciclohexà (**54**)

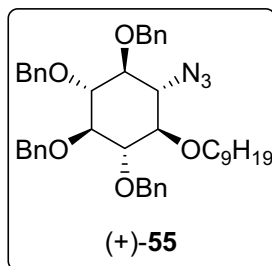
D'acord amb el mètode general, a partir de 762 mg (1.34 mmol) de l'azidoalcohol **44** s'obtingueren 722 mg (1.24 mmol, 93%) de l'azida **54**.

$[\alpha]_D^{25} +6.0$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3090, 3066, 3026, 2922, 2857, 2106, 1499, 1454, 1360, 1137, 1064, 1028, 735, 697$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.08 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz), 3.32 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz), 3.42 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz), 3.45-3.52 (m, 2H), 3.57 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz), 3.70 (s, 3H), 4.82-4.93 (m, 8H), 7.26-7.35 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 61.5, 66.7, 76.08, 76.10, 76.14, 81.0, 82.5, 83.3, 83.4 (2), 127.9-128.6, 137.9, 138.3, 138.4. HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 602.2631 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 602.2629.



#### (1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-azido-1,2,3,4-tetrabenziloxi-6-(noniloxi)ciclohexà (**55**)

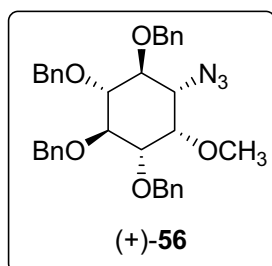
D'acord amb el mètode general, a partir de 125 (0.22 mmol) de l'azidoalcohol **44** s'obtingueren 145 mg (0.21 mmol, 93%) de l'azida **55**.



$[\alpha]_D^{25} +9.1$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3089, 3064, 3031, 2925, 2854, 2102, 1497, 1454, 1359, 1137, 1069, 1028, 733, 696$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H, *J*=6.9 Hz), 1.19-1.42 (m, 12H), 1.61-1.66 (m, 2H), 3.14 (t, 1H, *J*=9.4 Hz), 3.30 (t, 1H, *J*=9.7 Hz), 3.38-3.42 (m, 1H), 3.47-3.50 (m, 2H), 3.55 (t, 1H, *J*=9.2 Hz), 3.74-3.86 (m, 2H), 4.82-4.89 (m, 8H), 7.25-7.35 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 26.2, 29.4, 29.69, 29.71, 30.5, 32.0, 67.0, 74.4, 76.07, 76.09, 76.15, 81.1, 81.5, 82.6, 83.3, 83.4, 127.8-128.6, 137.9, 138.39, 138.40. HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 714.3883 [M+Na]. Trobat: 714.3901.

#### (1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-5-azido-1,2,3,4-tetrabenziloxi-6-(metoxi)ciclohexà (56)

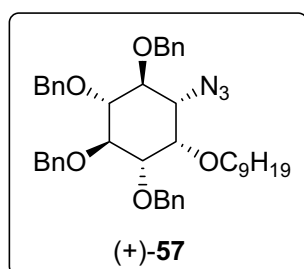
D'acord amb el mètode general, a partir de 115 mg (0.20 mmol) de l'azidoalcohol 46 s'obtingueren 82 mg (0.14 mmol, 71%) de l'azida 56.



$[\alpha]_D^{25} +5.2$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3090, 3031, 2925, 2854, 2102, 1497, 1453, 1361, 1069, 1028, 735, 696$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.23 (dd, 1H, *J*=10.4, 2.1 Hz), 3.44 (dd, 1H, *J*=9.8, 2.1 Hz), 3.49-3.55 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.98 (t, 1H, *J*=9.8 Hz), 4.01 (t, 1H, *J*=9.6 Hz), 4.70-4.93 (m, 8H), 7.30-7.35 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 61.6, 63.4, 73.3, 75.8, 75.9, 76.2, 78.8, 80.3, 81.4, 81.6, 84.4, 127.7-128.6, 138.03, 138.06, 138.61, 138.65. HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 602.2631 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 602.2625.

#### (1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-5-azido-1,2,3,4-tetrabenziloxi-6-(noniloxi)ciclohexà (57)

D'acord amb el mètode general, a partir de 163 mg (0.29 mmol) de l'azidoalcohol 46 s'obtingueren 180 mg (0.26 mmol, 90%) de l'azida 57.



$[\alpha]_D^{25} +7.6$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3089, 3064, 3031, 2925, 2855, 2106, 1497, 1454, 1360, 1137, 1065, 1028, 734, 697$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (t, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.08-1.44 (m, 12H), 1.46-1.70 (m, 2H), 3.17 (dd, 1H, *J*=10.3, 1.9 Hz), 3.41 (dd, 1H, *J*=9.8, 1.8 Hz), 3.53 (t, 1H, *J*=9.2 Hz), 3.67-3.71 (m, 1H), 3.88-3.92 (m, 2H), 3.99-4.04 (m, 2H), 4.73-4.97 (m, 8H),

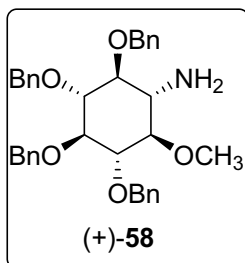
7.26-7.42 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3, 22.8, 26.2, 29.5, 29.6, 29.8, 30.4, 32.1, 63.4, 73.1, 73.9, 75.7, 76.1, 77.1, 80.2, 81.6, 81.7, 84.5, 127.7-128.6, 138.15, 138.22, 138.56, 138.71. HRMS calculat per  $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 714.3883  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 714.3898.

#### 8.1.4.2 Reducció de les azides 54-57: síntesi de les amines 58-61

*Mètode general:* Sobre una suspensió de 18 mg (0.42 mmol) de  $\text{LiAlH}_4$  en 4 mL de THF anhidre, refredada a 0 °C, s'addicionà *via* cànula una dissolució de l'azida (0.21 mmol) en 4 mL de THF i es va deixar la reacció amb agitació a t.a. sota atmosfera d'argó. Després de 3 h, la reacció es tornà a refredar a 0 °C i s'hi van addicionar unes gotes d'una solució saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Es van separar les sals per filtració a través de Celite<sup>®</sup> i es rentà amb 15-20 mL d'AcOEt. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda es van aïllar les amines corresponents, les quals es van emprar en la següent reacció sense purificar.

#### (1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(metoxi)ciclohexanamina (58)

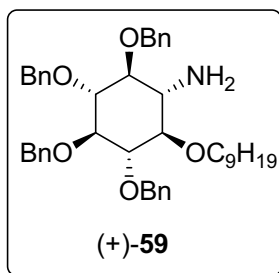
D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **54** (722 mg, 1.25 mmol) donà 655 mg (1.18 mmol, 95%) de l'amina **58**.



$[\alpha]_D^{25} +9.7$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3092, 3064, 3030, 2904, 2853, 1497, 1454, 1356, 1130, 1063, 1043, 1027, 734, 695 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.81 (br s, 2H), 2.88 (t, 1H,  $J=10.0$  Hz), 3.09 (t, 1H,  $J=9.5$  Hz), 3.36 (t, 1H,  $J=9.4$  Hz), 3.50-3.64 (m, 3H), 3.68 (s, 3H), 4.70-5.02 (m, 8H), 7.29-7.36 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 55.6, 61.6, 75.8, 75.9, 76.0, 76.1, 82.9, 83.5, 84.34, 84.35, 84.39, 127.8-128.7, 138.42, 138.45, 138.50, 138.55. HRMS calculat per  $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{NO}_5$ : 554.2906  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 554.2838.

#### (1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(noniloxi)ciclohexanamina (59)

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **55** (145 mg, 0.21 mmol) donà 100 mg (0.15 mmol, 72%) de l'amina **59**.

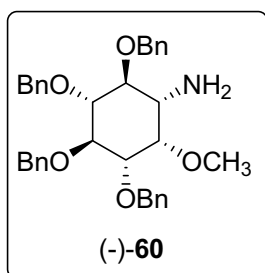


$[\alpha]_D^{25} +7.6$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3090, 3065, 3033, 2924, 2854, 1497, 1452, 1356, 1130, 1069, 1043, 1024, 732, 696$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (t, 3H, *J*=7.0 Hz), 1.19-1.40 (m, 12H), 1.54-1.67 (m, 2H), 1.90 (br s, 2H), 2.90 (t, 1H, *J*=10.0 Hz), 3.16 (t, 1H, *J*=9.4 Hz), 3.35 (t, 1H, *J*=9.4 Hz), 3.53-3.69 (m, 4H), 3.93-3.97 (m, 1H), 4.71-5.02 (m, 8H), 7.26-7.37 (m, 20H);

<sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 26.3, 29.4, 29.6, 29.7, 30.6, 32.0, 55.5, 74.1, 75.85, 75.89, 76.0, 76.1, 82.7, 83.1, 83.6, 84.4 (2), 127.8-128.7, 138.45, 138.47, 138.53. HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>NO<sub>5</sub>: 666.4158 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 666.4131.

### (1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(metoxi)ciclohexanamina (60)

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **56** (75 mg, 0.13 mmol) donà 65 mg (0.12 mmol, 85%) de l'amina **60**.

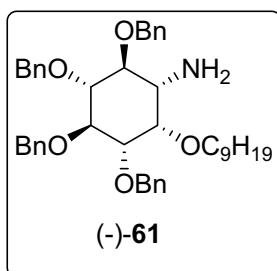


$[\alpha]_D^{25} -31.2$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3089, 3066, 3033, 2921, 2854, 1496, 1454, 1362, 1090, 1071, 1028, 735, 696$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.48 (d, 1H, *J*=9.4 Hz), 3.43-3.50 (m, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.71-3.75 (m, 1H), 3.96 (t, 1H, *J*=9.3 Hz), 4.61-4.93 (m, 8H), 7.24-7.35 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 54.3, 61.8, 73.1, 75.7, 75.9, 76.0, 79.9, 82.3, 82.9, 83.3, 85.0, 127.04-

128.65, 138.35, 138.67, 138.80, 138.86. HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>5</sub>: 554.2906 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 554.2927.

### (1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(noniloxi)ciclohexanamina (61)

D'acord amb el mètode general, la reducció de l'azida **57** (120 mg, 0.17 mmol) donà 90 mg (0.13 mmol, 80%) de l'amina **61**.



$[\alpha]_D^{25} -47.1$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3080, 3060, 3033, 2924, 2854, 1497, 1454, 1362, 1090, 1069, 1024, 732, 696$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.92 (t, 3H, *J*=6.7 Hz), 1.24-1.33 (m, 12H), 1.50-1.63 (m, 2H), 2.46 (d, 1H, *J*=9.5 Hz), 3.40-3.64 (m, 4H), 3.80-3.83 (m, 1H), 3.98-4.07 (m, 2H), 4.67-5.04 (m, 8H), 7.24-7.35 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 26.3, 29.5, 29.6,

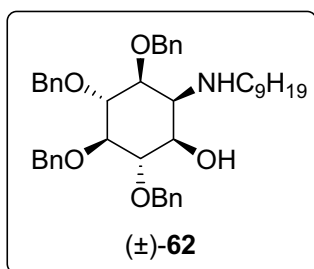
29.8, 30.6, 32.1, 54.3, 72.9, 73.6, 75.85, 75.86, 76.0, 78.1, 82.3, 83.0, 83.3, 85.1, 127.6-128.7, 138.4, 138.72, 138.73, 138.9. HRMS calculat per  $C_{43}H_{56}NO_5$ : 666.4158  $[M+H]^+$ . Trobat: 666.4156.

#### 8.1.4.3 Procediment general per a l'aminació reductora: síntesi de 62-69

A una dissolució de l'amina **47**, **53**, **58-60** o **61** (0.11 mmol) en MeOH (5 mL) es van addicionar, sota atmosfera d'argó, 0.23 mmol de cianoborohidrur de sodi ( $NaBH_3CN$ ), 8  $\mu$ L d'àcid acètic i l'aldehid (nonanal o octanal, 0.12 mmol). Després de deixar la mescla amb agitació durant 4 h (control CCF), s'addicionà 0.2 mL d'aigua i s'eliminaren els dissolvents a pressió reduïda. El residu resultant es va tornar a dissoldre en 20 mL d'èter dietílic, es rentà amb aigua (15 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb  $Et_2O$  (2 x 20 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre  $MgSO_4$  anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* utilitzant els eluents indicats en cada cas.

#### (1RS,2SR,3RS,4RS,5SR,6SR)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(nonilamino)ciclohexanol (**62**)

D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'aminoalcohol ( $\pm$ )-**53** (49 mg, 0.09 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-3:1) del cru, donà 49 mg (0.07 mmol, 82 %) de l'amina ( $\pm$ )-**62**.

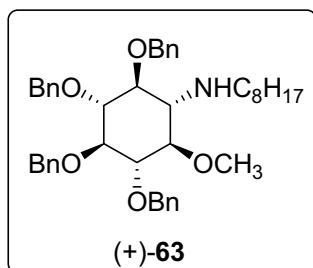


Oli incolor; IR (film):  $\nu = 3085, 3065, 3026, 2947, 2923, 2850, 1496, 1454, 1362, 1086, 1070, 1027\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $CDCl_3$ ): 0.92 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $CH_3$ ), 1.25-1.38 (m, 12H,  $6 \times CH_2$ ), 1.46-1.55 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2.76-2.88 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.33-3.37 (m, 1H, H-6), 3.51-3.55 (m, 2H, H-1, H-3), 3.59-3.61 (m, 1H, H-5), 3.90 (t, 1H,  $J=9.1$  Hz, H-2), 3.97 (t, 1H,  $J=9.0$  Hz, H-4), 4.65-4.97 (m, 8H,  $4 \times PhCH_2O$ ), 7.26-7.41 (m, 20H, Ph);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $CDCl_3$ ): 14.3 ( $CH_3$ ), 22.8 ( $CH_2$ ), 27.4 ( $CH_2$ ), 29.5 ( $CH_2$ ), 29.7 ( $CH_2$ ), 29.8 ( $CH_2$ ), 30.8 ( $CH_2$ ), 32.0 ( $CH_2$ ), 50.8 ( $NCH_2$ ), 57.7 (C6), 72.3 (C1), 72.6 ( $PhCH_2O$ ), 75.4 ( $PhCH_2O$ ), 75.6 ( $PhCH_2O$ ), 75.7 ( $PhCH_2O$ ), 81.0 (C2), 81.8 (C3 o C5), 81.9 (C3 o C5), 83.4 (C4), 127.7-128.7 ( $CHar$ ), 138.2 ( $Car$ ), 138.7 ( $Car$ ), 138.8 ( $Car$ ). HRMS calculat per  $C_{43}H_{56}NO_5$ : 666.4158  $[M+H]^+$ . Trobat: 666.4180.



**(1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-metoxi-N-octilciclohexanamina (63)**

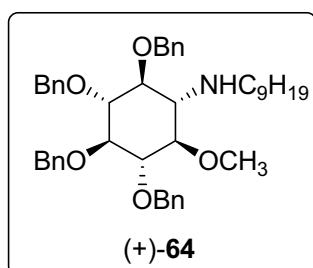
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'amina **58** (80 mg, 0.14 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1) del cru, donà 73 mg (0.11 mmol, 77 %) de l'amina **63**.



Oli;  $[\alpha]_D^{25} +7.5$  (*c* 0.2, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3089, 3064, 3031, 2925, 2854, 1497, 1454, 1359, 1134, 1064, 1028, 733, 697 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H, *J* =7.0 Hz), 1.25-1.50 (m, 12H), 2.57 (t, 1H, *J* =10.1 Hz), 2.73-2.81 (m, 2H), 3.16 (t, 1H, *J* =9.3 Hz), 3.41 (t, 1H, *J* =9.6 Hz), 3.50-3.65 (m, 3H), 3.67 (s, 3H), 4.73-5.01 (m, 8H), 7.24-7.43 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 27.4, 29.36, 29.39, 29.6, 30.7, 32.0, 49.9, 61.2, 62.1, 75.72, 75.90, 75.92, 76.0, 81.9, 83.2, 84.2, 84.4, 84.5, 127.8-128.6, 138.34, 138.47, 138.54. HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>NO<sub>5</sub>: 666.4158 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 666.4221.

**(1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-metoxi-N-nonilciclohexanamina (64)**

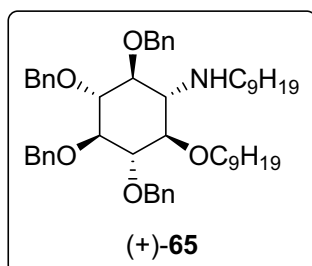
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'amina **58** (72 mg, 0.13 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1) del cru, donà 64 mg (0.09 mmol, 73%) de l'amina **64**.



Oli incolor;  $[\alpha]_D^{25} +13.0$  (*c* 0.3, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3089, 3065, 3033, 2924, 2854, 1497, 1454, 1359, 1136, 1064, 1028, 733, 697 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H, *J* =6.99 Hz), 1.22-1.44 (m, 14H), 2.55 (t, 1H, *J* =10.1 Hz), 2.73-2.81 (m, 2H), 3.16 (t, 1H, *J* =9.2 Hz), 3.41 (t, 1H, *J* =9.5 Hz), 3.49-3.61 (m, 3H), 3.65 (s, 3H), 4.73-5.00 (m, 8H), 7.28-7.35 (m, 20H); <sup>13</sup>C NMR ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 27.4, 29.4, 29.7, 30.7, 32.0, 49.9, 61.2, 62.1, 75.7, 75.91, 75.93, 76.1, 82.0, 83.2, 84.2, 84.44, 84.49, 127.8-128.7, 138.3, 138.47, 138.55. HRMS calculated for C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>NO<sub>5</sub>: 680.4315 [M+H]<sup>+</sup>. Found: 680.4221.

**(1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-N-nonil-6-(noniloxi)ciclohexanamina (65)**

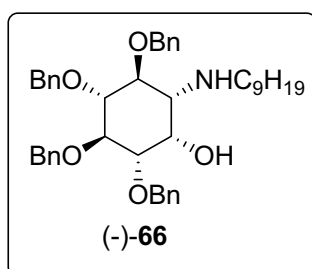
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'amina **59** (77 mg, 0.12 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-6:1) del cru, donà 74 mg (0.09 mmol, 81%) de l'amina **65**.



Oli incolor;  $[\alpha]_D^{25} +5.2$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3089, 3064, 3030, 2955, 2924, 2854, 1497, 1467, 1454, 1358, 1133, 1064, 1028, 735, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.90 (dt, 6H,  $J=6.9, 7.0$  Hz), 1.22-1.45 (m, 22H), 1.42-1.45 (m, 2H), 1.55-1.66 (m, 2H), 2.27-2.30 (m, 2H), 2.56 (t, 1H,  $J=10.0$  Hz), 2.76-2.85 (m, 2H), 3.20-3.23 (m, 1H), 3.37-3.44 (m, 1H), 3.51-3.68 (m, 4H), 3.91-3.95 (m, 1H), 4.74-4.98 (m, 8H), 7.27-7.35 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3, 22.8, 26.4, 27.4, 29.4, 29.5, 29.7, 30.7, 32.03, 32.05, 50.4, 62.2, 74.0, 75.7, 75.9, 76.0, 76.1, 82.2, 82.6, 83.3, 84.5 (2), 127.79-128.63, 138.4, 138.5, 138.56, 138.59. HRMS calculat per  $\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{NO}_5$ : 792.5567  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 792.5620.

**(1S,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(nonilamino)ciclohexanol (66)**

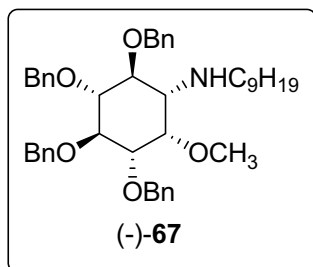
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'aminoalcohol **47** (66 mg, 0.12 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-3:1) del cru, donà 74 mg (0.11 mmol, 90%) de l'amina **66**.



Oli incolor;  $[\alpha]_D^{25} -20.2$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3087, 3058, 3028, 2947, 2924, 2853, 1496, 1454, 1362, 1086, 1070, 1028 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.93 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.28-1.44 (m, 14H,  $7 \times \text{CH}_2$ ), 2.41-2.45 (m, 1H, H-6), 2.47 (dd, 1H,  $J=2.4, 10.0$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 2.61-2.66 (m, 1H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.47 (dd, 1H,  $J=2.8, 9.6$  Hz, H-2), 3.59 (t, 1H,  $J=9.4$  Hz, H-4), 3.70 (t, 1H,  $J=9.7$  Hz, H-5), 4.08 (t, 1H,  $J=9.5$  Hz, H-3), 4.15 (t, 1H,  $J=2.5$  Hz, H-1), 4.61-5.05 (m, 8H,  $4 \times \text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7.30-7.46 (m, 20H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3 ( $\text{CH}_3$ ), 22.8 ( $\text{CH}_2$ ), 27.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 30.1 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ ), 47.3 ( $\text{NCH}_2$ ), 60.9 (C6), 65.4 (C1), 72.6 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 75.8 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 76.1 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 80.1 (C5), 81.2 (C2), 81.7 (C3), 85.0 (C4), 127.7-128.7 ( $\text{CHar}$ ), 138.4 (Car), 138.5 (Car), 138.7 (Car), 138.9 (Car); HRMS calculat per  $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{NO}_5$ : 666.4158  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 666.4175.

**(1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-metoxi-N-nonilciclohexanamina (67)**

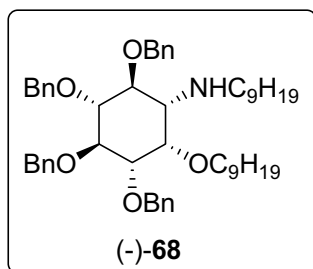
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'amina **60** (63 mg, 0.11 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-5:1) del cru, donà 62 mg (0.09 mmol, 80%) de l'amina **67**.



Oli incolor;  $[\alpha]_D^{25}$  -12.9 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$  = 3089, 3069, 3031, 2955, 2921, 2850, 1497, 1467, 1454, 1358, 1133, 1064, 1028, 735, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 0.88 (t, 3H, *J* = 5.9 Hz), 1.24-1.35 (m, 12H), 1.44-1.52 (m, 2H), 2.50-2.90 (m, 3H), 3.54 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 3.60-3.73 (m, 5H), 3.87 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.99-4.01 (m, 1H), 4.72-4.93 (m, 8H), 7.22-7.42 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 14.4, 23.3, 28.0, 29.9, 30.1, 30.3, 30.4, 32.6, 48.4, 61.6, 61.7, 73.1, 75.8, 75.9, 76.00, 82.6 (2), 83.2, 85.5, 128.0-129.1, 139.9, 140.2, 140.3 (2). HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>NO<sub>5</sub>: 680.4315 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 680.4346.

**(1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-N-nonil-6-(noniloxi)ciclohexanamina (68)**

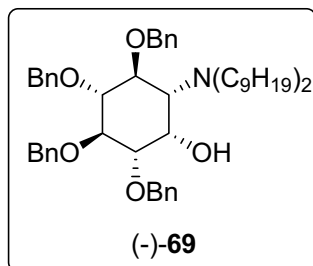
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'amina **61** (89 mg, 0.14 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-5:1) del cru, donà 85 mg (0.11 mmol, 75%) de l'amina **68**.



Oli incolor;  $[\alpha]_D^{25}$  -18.4 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$  = 3088, 3062, 3029, 2955, 2924, 2854, 1497, 1467, 1454, 1362, 1133, 1088, 1070, 732, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 0.85-0.90 (m, 6H), 1.20-1.39 (m, 24H), 1.39-1.51 (m, 2H), 1.57-1.63 (m, 2H), 2.50-2.70 (m, 2H), 2.75-2.90 (m, 1H), 3.48 (t, 1H, *J* = 9.1 Hz), 3.56 (dd, 1H, *J* = 9.8, 1.5 Hz), 3.64 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz), 3.71 (dt, 1H, *J* = 9.0, 6.4 Hz), 3.84-3.88 (m, 1H), 3.91 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.97 (dt, 1H, *J* = 8.9, 6.4 Hz), 4.14 (br s, 1H), 4.71-4.94 (m, 8H), 7.22-7.42 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>): 14.4, 23.34, 23.37, 27.0, 28.1, 29.2, 29.9, 30.1, 30.3, 30.4, 30.5, 31.2, 32.6, 32.7, 48.4, 62.0, 73.0, 73.8, 75.3, 75.9, 76.0, 82.7 (2), 83.4, 85.6, 128.0-129.0, 140.00, 140.30, 140.35, 140.45. HRMS calculat per C<sub>52</sub>H<sub>74</sub>NO<sub>5</sub>: 792.5567 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 792.5578.

**(1S,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(dionilamino)ciclohexanol (69)**

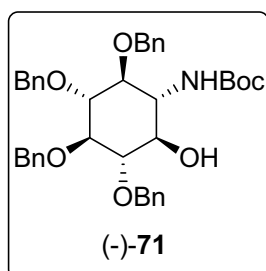
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'aminoalcohol **47** (50 mg, 0.09 mmol) amb 39  $\mu$ L (0.23 mmol) de nonanal i 29 mg (0.46 mmol) de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1) del cru, donà 60 mg (0.07 mmol, 81%) de l'amina **69**.



Oli incolor;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -28.5 (*c* 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu = 3085, 3065, 3026, 2958, 2938, 2855, 1496, 1454, 1394, 1086, 1070, 1059 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.90 (t, 6H,  $J=6.9$  Hz), 1.20-1.33 (m, 24H), 1.40-1.48 (m, 4H), 2.61 (dd, 1H,  $J=2.0, 10.7$  Hz), 2.77 (t, 4H,  $J=7.2$  Hz), 3.45 (dd, 1H,  $J=2.7, 9.1$  Hz), 3.56 (t, 1H,  $J=9.1$  Hz), 3.92 (t, 1H,  $J=9.2$  Hz), 4.11-4.18 (m, 2H), 4.72-4.93 (m, 8H), 7.27-7.38 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3, 22.8, 27.5, 29.5, 29.85, 29.87, 30.1, 32.1, 53.2, 62.2, 70.7, 72.6, 74.2, 75.8, 78.3, 81.8, 81.9, 86.1, 127.5-128.6, 138.1, 138.89, 138.94, 139.2. HRMS calculat per  $\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{NO}_5$ : 792.5567  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 792.5566.

**8.1.4.4 Síntesi de l'azidoamina **74** a partir de l'aminoalcohol **70******(1R,2S,3R,4R,5S,6R)-N-(2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)carbamat de *tert*-butil (**71**)**

Es van dissoldre 0.71 g (1.3 mmol) de l'aminoalcohol **70** en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i s'hi van addicionar 0.3 mL (1.7 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  i 0.40 g (1.8 mmol) de  $(\text{Boc})_2\text{O}$ . La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant 12 h (control CCF) i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 3:2) i es va aïllar el carbamat **71** (0.7 g, 1.10 mmol, 82 %).

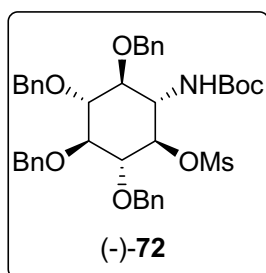


Oli incolor;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -21.4 (*c* 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.47 (s, 9H), 3.45-3.67 (m, 5H), 4.50 (d, 1H,  $J=6.5$  Hz), 4.70 (d, 1H,  $J=11.2$  Hz), 4.87-4.94 (m, 7H), 7.28-7.35 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 28.5, 56.5, 73.4, 75.3, 75.7, 75.9, 76.0, 79.2, 80.3, 82.6, 84.0, 84.2, 127.8-128.7, 138.1, 138.4, 138.6, 156.9; IR (film):  $\nu = 3342, 3063, 3030, 2976, 2901, 1687, 1534, 1497,$

1453, 1365  $\text{cm}^{-1}$ ; Les dades espectroscòpiques coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> HRMS calculat per  $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{NO}_7\text{Na}$ : 662.3094  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 662.3082.

**(1R,2R,3S,4R,5S,6S)-metanosulfonat de 2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(tert-butoxi-carbonilamino)ciclohexil (72)**

A una dissolució de 548 mg (1.0 mmol) del carbamat **71** en 6 mL de THF, s'hi van addicionar 400  $\mu\text{L}$  (2.9 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  i 100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol) de clorur de mesil. Es deixà la reacció amb agitació a t.a. durant 5 h (control CCF) i es va diluir la mescla amb 10 mL d' $\text{Et}_2\text{O}$ . Es van separar les sals per filtració a través de Celite<sup>®</sup> i es rentà varies vegades amb  $\text{Et}_2\text{O}$ . Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es va purificar el cru resultant per cromatografia en columna *flash* (hexà/ $\text{AcOEt}$  6:1) i es va aïllar el mesilat **72** (458 mg, 0.64 mmol, 63%).

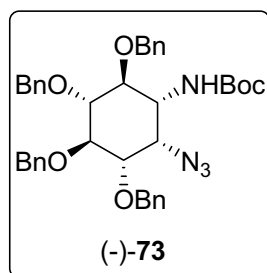


$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -25.6 ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.48 (s, 9H), 2.87 (s, 3H), 3.56-3.70 (m, 4H), 3.72-3.77 (m, 1H), 4.56-4.60 (m, 1H), 4.67-4.96 (m, 9H), 7.24-7.38 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 28.5, 39.0, 54.6, 75.6, 75.8, 76.0, 76.1, 79.1, 80.2, 80.8, 81.2, 82.5, 83.7, 127.8-128.6, 137.7, 137.9, 138.0, 138.2, 155.7; IR (film):  $\nu$  = 3068, 2974, 2862, 2105, 1698, 1463  $\text{cm}^{-1}$ ; Les

dades espectroscòpiques coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> HRMS calculat per  $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{NO}_9\text{NaS}$ : 740.2869  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 740.2853.

**(1R,2S,3S,4R,5R,6S)-N-(2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexil)carbamat de tert-butil (73)**

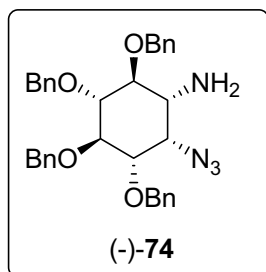
Sobre una dissolució del mesilat **72** (207 mg, 0.29 mmol) en 6 mL de DMF es van addicionar 56 mg (0.85 mmol) d'azida sòdica i la mescla resultant s'escalfà a 90  $^{\circ}\text{C}$  durant 18 h. Passat aquest temps, es va diluir la mescla amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 mL), es rentà amb aigua (20 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 20 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtrà i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/ $\text{AcOEt}$  3:1) i es van obtenir 125 mg (0.19 mmol, 65%) de l'azida **73** en forma d'oli incolor.



$[\alpha]_D^{25}$  -28.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.50 (s, 9H), 3.52-3.57 (m, 2H), 3.70-3.76 (m, 2H), 3.94 (t, 1H, *J*=8.6 Hz), 4.15-4.20 (m, 1H), 4.65-4.96 (m, 8H), 7.24-7.39 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 28.5, 51.5, 62.6, 73.3, 75.5, 76.0, 76.2, 79.1, 80.1, 81.0, 81.6, 84.2, 127.8-128.6, 137.6, 138.1, 138.5, 155.5; IR (film):  $\nu$  = 3340, 3031, 2912, 2101, 1684, 1526, 1357 cm<sup>-1</sup>; Les dades espectroscòpiques coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> HRMS calculat per C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na: 687.3159 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 687.3167.

#### (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanamina (74)

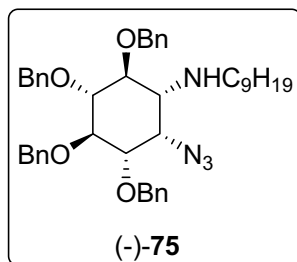
S'addicionà gota a gota TFA (0.8 mL) sobre una dissolució de l'azida **73** (120 mg, 0.18 mmol) en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Després de 4 h amb agitació a t.a., s'eliminaren els dissolvent a pressió reduïda. El residu obtingut es va dissoldre en 20 mL d'AcOEt i es rentà amb una solució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL). La fase orgànica s'assecà sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtrà i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1-1:3) i s'aïllà 87 mg (0.15 mmol, 86%) de l'aminoazida **74**.



$[\alpha]_D^{25}$  -14.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.50 (br s, 2H), 2.61 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 3.41 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz), 3.47 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz), 3.66 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.97 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz), 4.05-4.10 (m, 1H), 4.65-5.02 (m, 8H), 7.24-7.39 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 52.7, 63.7, 73.2, 75.8, 76.0, 76.2, 81.5, 82.2, 82.5, 84.6, 127.8-128.7, 137.7, 138.4, 138.5, 138.6; IR (film):  $\nu$  = 3377, 3063, 3030, 2914, 2101, 1697, 1585, 1496, 1454 cm<sup>-1</sup>; Les dades espectroscòpiques coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> HRMS calculat per C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 565.2815 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 565.2813.

#### 8.1.4.5 Síntesi de la (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-azido-3,4,5,6-tetrabenziloxi-*N*-nonilciclohexanamina (75)

D'acord amb el mètode general de l'aminació reductora (veure apartat 8.1.4.3), a partir de l'azidoamina **74** (69 mg, 0.12 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1) del cru de reacció, s'obtingueren 62 mg (0.09 mmol, 75%) de l'azidoamina **75**.

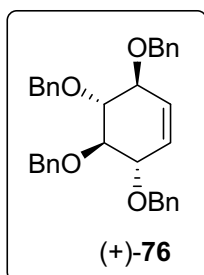


$[\alpha]_D^{25}$  -6.4 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.19-1.36 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.40-1.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.43 (td, 1H, *J* = 7.2, 10.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.53 (dd, 1H, *J* = 2.7, 10.1 Hz, H-1), 2.67 (ddd, 1H, *J* = 6.2, 7.8, 10.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.52 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-5), 3.57 (dd, 1H, *J* = 3.1, 9.6 Hz, H-3), 3.65 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-6), 3.96 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-4), 4.04 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz, H-2), 4.66-4.97 (m, 8H, 4xPhCH<sub>2</sub>O), 7.30-7.38 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 47.7 (CH<sub>2</sub>), 59.90 (C2), 59.92 (C1), 73.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.9 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 80.6 (C6), 81.2 (C3), 82.0 (C4), 84.9 (C5), 127.8-128.7 (CHar), 137.9 (Car), 138.3 (Car), 138.56 (Car), 138.58 (Car); IR (film):  $\nu$  = 3091, 3061, 3031, 2956, 2924, 2853, 2102, 1565, 1456, 1135, 1088, 1071, 668 cm<sup>-1</sup>; HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 691.4223 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4253.

#### 8.1.4.6 Síntesi de les diamines **79** i **80** a partir del condiritol **B**

##### (1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-1,2,3,4-tetrabenziloxi-ciclohex-5-è (**76**)

Una dissolució del (+)-conduritol B (1.5 g, 10 mmol) en 10 mL de DMF es va addicionar *via* cànula sobre un suspensió de NaH (2.4 g al 60%, 60 mmol) en 30 mL de DMF a 30 °C. Després de 30 min, es van addicionar 7.1 mL de BnBr (60 mmol) i la reacció es mantingué amb agitació a 30 °C durant 16 h. Passat aquest temps, es refredà la reacció a 0 °C, s'addicionaren 2 mL d'aigua i, després d'eliminar els dissolvents al buit, es va diluir la mescla amb Et<sub>2</sub>O (40 mL). Es rentà amb aigua (30 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb Et<sub>2</sub>O (2 x 40 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1) i es van obtenir 3.8 g (7.5 mmol, 75%) del producte **76** en forma de sòlid blanc.

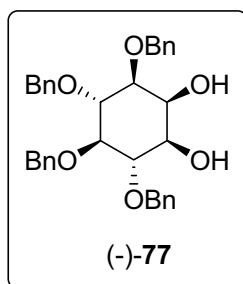


$[\alpha]_D^{25}$  +81.8 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.76 (dd, 2H, *J* = 2.3, 5.3 Hz), 4.24 (dd, 2H, *J* = 2.3, 5.2 Hz), 4.69-4.96 (m, 8H), 5.74 (s, 2H), 7.28-7.36 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 72.6, 75.7, 80.3, 83.8, 127.7-128.6, 138.4, 138.8; IR (film):  $\nu$  = 3087, 3062, 3029, 2901, 2861, 1497, 1454, 1085, 1071, 1032, 693 cm<sup>-1</sup>; Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H RMN) coincideixen amb les descrites a la

literatura.<sup>230</sup> HRMS calculat per C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>Na: 529.2355 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 529.2314.

### (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexan-1,2-diol (77)

Es va dissoldre l'alquè **76** (1.7 g, 3.3 mmol) en 40 mL d'una mescla d'acetona/aigua (9:1) i s'afegí *N*-òxid de 4-metilmorfolina (0.84 g, 7.2 mmol) i una solució 0.05 M de tetraòxid d'osmi en *tert*-butanol estabilitzada amb *tert*-butilhidroperòxid (4.2 mL, 0.32 mmol). Es deixà la mescla en agitació a t.a. durant una nit (control CCF). L'endemà, es va afegir sulfít de sodi (0.42 g, 3.3 mmol). Després d'1 h en agitació, es va diluir amb AcOEt (40 mL). Es rentà amb aigua (25 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb AcOEt (2 x 40 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1) i es van obtenir 1.47 g (2.71 mmol, 83%) del diol **77** en forma de sòlid blanc.



$[\alpha]_D^{25}$  -20.6 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) [lit<sup>231</sup>: $[\alpha]_D^{25}$  -24.3 (*c* 1.3, CHCl<sub>3</sub>)]; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.40-2.44 (br s, 1H), 2.47-2.52 (br s, 1H), 3.48-3.52 (m, 3H), 3.86 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.99 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 4.22-4.25 (m, 1H), 4.71-4.99 (m, 8H), 7.30-7.38 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 71.8, 72.9, 75.8, 75.9, 76.1, 80.1, 81.4, 81.8, 83.3, 127.8-128.7, 137.9, 138.6, 138.7; IR (film):  $\nu$  = 3420, 3085, 3064, 3029, 2901, 1070 cm<sup>-1</sup>; Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H RMN) coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>230</sup> HRMS calculat per C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>Na: 563.2410 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 563.2371.

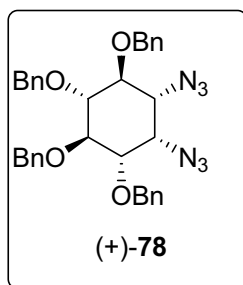
### (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-5,6-diazido-1,2,3,4-tetrabenziloxiciclohexà (78)

A una dissolució de 600 mg (1.1 mmol) del diol **77** en 6 mL de piridina, s'hi van afegir, a 0 °C, 300  $\mu$ L (3.1 mmol) de clorur de mesil. Es deixà la reacció amb agitació a t.a. durant 16 h (control CCF) i es va diluir la mescla amb 20 mL d'AcOEt. Es rentà amb aigua (2 x 20 mL) i amb una solució saturada de NaCl (25 mL). La fase orgànica s'assecà sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtrà i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. L'oli resultant es va dissoldre en 10 mL de DMF i s'hi van afegir 800 mg (12.2 mmol) d'azida sòdica. Es va escalfar la mescla a 85 °C durant 12 h (control CCF) i, després d'eliminar els dissolvents al buit, es va diluir la mescla amb Et<sub>2</sub>O (40 mL). Es rentà amb aigua (10 mL) i, després de separar les



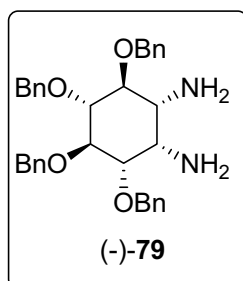
fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb Et<sub>2</sub>O (2 x 40 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 5:1) i es van obtenir 500 mg (0.85 mmol, 77%) de la diazida **78**.

$[\alpha]_D^{25} +18.1$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.38 (dd, 1H, *J*=10.2, 3.1 Hz), 3.48 (t, 1H, *J*=9.3 Hz), 3.57 (dd, 1H, *J*=9.6, 3.2 Hz), 3.82 (t, 1H, *J*=9.7 Hz), 3.91 (t, 1H, *J*=9.5 Hz), 3.98 (t, 1H, *J*=3.1 Hz), 4.72-4.93 (m, 8H), 7.25-7.40 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 61.9, 62.0, 73.5, 76.0, 76.3, 80.1, 80.3, 81.5, 84.0, 127.7-128.7, 137.5, 137.7, 138.3; IR (film): ν = 3083, 3063, 3031, 2923, 2872, 2101, 1091, 1065, 697 cm<sup>-1</sup>; Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H RMN i IR) coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>205</sup> HRMS calculat per C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Na: 613.2539 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 613.2554.



#### (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5,6-tetra(benziloxi)ciclohexan-1,2-diamina (**79**)

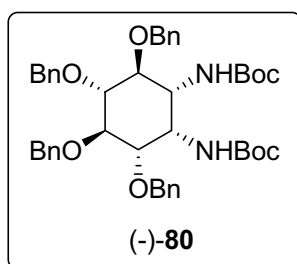
Sobre una suspensió de LiAlH<sub>4</sub> (0.11 g, 2.9 mmol) en 20 mL de THF, refredada a 0 °C, s'hi van afegir *via* cànula una dissolució de 580 mg (0.99 mmol) de la diazida **78** en 30 mL de THF. Després de 30 min, es va deixar la reacció amb agitació a t.a. sota atmosfera d'argó durant 3 h (control CCF). Tot seguit, la reacció es tornà a refredar a 0 °C, s'afegiren unes gotes d'una solució saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i es va diluir la mescla amb AcOEt. Es van separar les sals per filtració a través de Celite<sup>®</sup> i es rentà amb 15-20 mL d'AcOEt. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es van aïllar 500 mg (0.93 mmol, 93%) de la diamina **79** i es va emprar en la següent reacció sense purificar.



$[\alpha]_D^{25} -23.2$  (*c* 1.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.59 (br s, 4H), 2.69 (dd, 1H, *J*=10.0, 2.7 Hz), 3.46-3.57 (m, 3H), 3.79 (t, 1H, *J*=9.6 Hz), 4.07 (t, 1H, *J*=9.1 Hz), 4.64-5.02 (m, 8H), 7.29-7.36 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 51.7, 54.0, 72.4, 75.7, 75.8, 76.0, 81.82, 81.87, 81.99, 85.3, 127.6-128.7, 138.4, 138.7, 138.89, 138.91; IR (film): ν = 3084, 3060, 3029, 2923, 2855, 1496, 1453, 1088, 1070, 1027, 735, 697 cm<sup>-1</sup>; Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C RMN) coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>206</sup> HRMS calculat per C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 539.2910 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 539.2924.

**(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5,6-tetra(benziloxi)ciclohexan-1,2-diildicarbamat de di-*tert*-butil (80)**

Es van dissoldre 269 mg (0.5 mmol) de la diamina **79** en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'hi van addicionar a 0 °C, 0.21 mL (1.5 mmol) de Et<sub>3</sub>N i 0.33 g (1.5 mmol) de (Boc)<sub>2</sub>O. La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant tota la nit (control CCF) i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El cru resultant es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1-6:1) i es va aïllar el dicarbamat **80** (200 mg, 0.27 mmol, 53%).



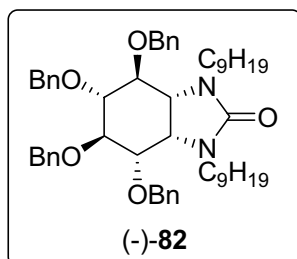
$[\alpha]_D^{25}$  -22.6 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>). HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na: 761.3778 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 761.3757; Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C RMN) coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>206</sup>

**8.1.4.7 Síntesi de la (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5,6-tetrabenziloxi-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>2</sup>-dionilciclohexan-1,2-diamina (83) i la (3*aS*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,7*aR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-1,3-dionil-hexahidro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ona (82)**

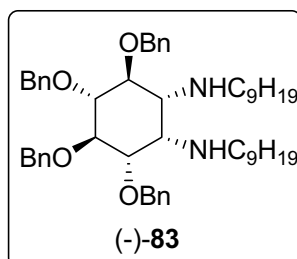
A una dissolució del dicarbamat **80** (187 mg, 0.25 mmol) en 5 mL de DMF, es van addicionar 25 mg (60%, 0.6 mmol) de NaH a 0 °C i es va mantenir amb agitació sota atmosfera inert durant 15 min. Seguidament s'addicionà iodur de nonil (200 µL, 1.0 mmol) i la mescla s'escalfà a 80 °C durant 24 h. Després de comprovar per CCF la presència de producte de partida, es van addicionar 100 µL (0.5 mmol) més d'iodur de nonil i es va tornar a escalfar a la mateixa temperatura durant 72 h. Passat aquest temps, s'addicionà unes gotes d'aigua, es va diluir la mescla amb Et<sub>2</sub>O (40 mL). Es rentà amb aigua (40 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa s'extragué amb Et<sub>2</sub>O (2 x 40 mL). Es van ajuntar les fases orgàniques i es van assecar sobre Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Després de filtrar, s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda i el cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1-5:1). Es van aïllar 52 mg (0.05 mmol, 21%) del dicarbamat **81** i 50 mg (0.06 mmol, 24%) de la imidazolidinona **82**.

El dicarbamat **81** (0.05 mmol) es va dissoldre en 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre i es van addicionar 0.6 mL de TFA i la reacció s'agità a t.a. durant 4 h. Després d'eliminar els dissolvent a pressió reduïda, el residu obtingut es va dissoldre en AcOEt i es rentà amb una solució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgànica s'assecà sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtrà i

s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 10:1-5:1) i s'aïllaren 34 mg (0.04 mmol, 86%) de la diamina **83**.



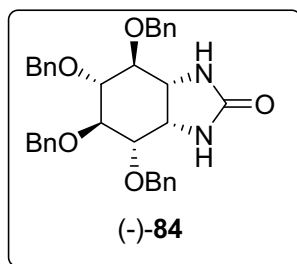
**82**:  $[\alpha]_D^{25} -13$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (dt, 6H, *J* =6.2, 6.9 Hz), 1.17-1.48 (m, 28H), 2.68-2.78 (m, 1H), 2.95-3.05 (m, 1H), 3.47-3.62 (m, 2H), 3.70 (dd, 1H, *J* =9.0, 5.6 Hz), 3.74-3.82 (m, 2H), 3.87 (dd, 1H, *J* =9.8, 2.9 Hz), 3.93 (dd, 1H, *J* =12.1, 6.8 Hz), 4.06 (dd, 1H, *J* =8.7, 7.1 Hz), 4.47-5.04 (m, 8H), 7.24-7.48 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 29.4, 29.5, 29.6, 29.71, 29.73, 32.0, 41.9, 42.7, 52.9, 56.4, 72.6, 73.1, 74.1, 75.3, 80.2, 81.0, 84.4, 127.6-128.7, 137.8, 138.0, 138.3, 138.4, 160.8; IR (film): ν = 3089, 3064, 3031, 2959, 2925, 2854, 1699, 1454, 1069, 1028, 734, 697 cm<sup>-1</sup>; HRMS calculat per C<sub>53</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na: 839.5339 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 839.5370.



**83**:  $[\alpha]_D^{25} -15$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.81-0.96 (m, 6H), 1.06-1.54 (m, 28H), 2.30-2.70 (m, 4H), 2.97-3.07 (m, 1H), 3.36-3.63 (m, 3H), 3.80 (t, 1H, *J* =9.4 Hz), 4.21 (t, 1H, *J* =9.0 Hz), 4.47-5.04 (m, 8H), 7.24-7.48 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 27.5, 29.50, 29.54, 29.73, 29.78, 29.8, 30.4, 30.8, 32.1, 47.3, 51.0, 54.5, 60.6, 72.7, 75.6, 75.7, 75.9, 81.2, 82.2, 84.3, 85.9, 127.6-128.7, 138.7, 138.9, 139.0; IR (film): ν = 3090, 3061, 3031, 2948, 2924, 2853, 1734, 1454, 1361, 1089, 1069, 1028, 732, 696 cm<sup>-1</sup>; HRMS calculat per C<sub>52</sub>H<sub>75</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 791.5727 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 791.5747.

#### 8.1.4.8 Síntesi de la (3a*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,7a*R*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ona (**84**)

Sobre una dissolució de 126 mg (0.23 mmol) de la diamina **79** en 7 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> es van addicionar 57 mg (0.35 mmol) de *N,N'*-carbonildiimidazole i s'escalfà a reflux durant 2 h. Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, es purificà el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:10) i es van obtenir 110 mg de la imidazolidinona **84** (0.19 mmol, 83%).

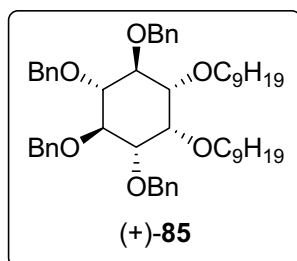


$[\alpha]_D^{25}$  -61.8 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.49-3.56 (m, 2H, H-3a, H-5), 3.66 (dd, 1H, *J* = 8.5, 4.6 Hz, H-7), 3.73 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-4), 3.89 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H-6), 4.03 (dd, 1H, *J* = 7.4, 4.7 Hz, H-7a), 4.52-4.96 (m, 8H, PhCH<sub>2</sub>O), 7.27-7.42 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 54.0 (C7a), 56.0 (C3a), 73.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.9 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.0 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.2 (PhCH<sub>2</sub>O),

78.1 (C7), 81.2 (C6), 82.3 (C4), 82.6 (C5), 127.83-128.83 (CHar), 138.0 (Car), 138.27 (Car), 138.34 (Car), 162.7 (Car); IR (film):  $\nu$  = 3220, 3090, 3063, 3029, 2922, 2853, 1702, 1453, 1359, 1086, 1070, 1028, 696 cm<sup>-1</sup>; HRMS calculat per C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 565.2702 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 565.2701.

#### 8.1.4.9 Síntesi de l'(**1S,2R,3R,4S,5S,6R**)-1,2,3,4-tetrabenziloxi-5,6-bis(noniloxi)ciclohexà (**85**)

A una dissolució del diol **77** (70 mg, 0.13 mmol) en 5 mL de DMF, es van addicionar 21 mg (60%, 0.52 mmol) de NaH a 0 °C i es va mantenir amb agitació sota atmosfera inert durant 15 min. Tot seguit, es va addicionar iodur de nonil (256 μL, 1.3 mmol) i es deixà la mescla a 0 °C durant 3 h (control CCF). Passat aquest temps, s'addicionaren unes gotes d'aigua i es va diluir la mescla amb Et<sub>2</sub>O (20 mL). Es rentà amb aigua (10 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa s'extragué amb Et<sub>2</sub>O (2 x 20 mL). Es van ajuntar les fases orgàniques, s'assecaren sobre Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, es filtraren i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El residu obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1) i es van obtenir 80 mg (0.10 mmol, 78%) del compost **85** en forma d'oli groc.



$[\alpha]_D^{25}$  +2.0 (*c* 0.7, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90-0.94 (m, 6H), 1.28-1.42 (m, 24H), 1.61-1.66 (m, 4H), 3.15-3.21 (m, 1H), 3.37-3.40 (m, 1H), 3.48 (td, 1H, *J* = 2.2, 9.2 Hz), 3.53-3.58 (m, 1H), 3.61-3.66 (m, 1H), 3.78 (td, 2H, *J* = 2.2, 6.5 Hz), 3.93 (d, 1H, *J* = 2.05 Hz), 3.97 (td, 1H, *J* = 2.3, 9.5 Hz), 4.05 (dt, 1H, *J* = 2.3, 9.5 Hz), 4.75-4.97 (m, 8H), 7.30-7.42 (m, 20H); <sup>13</sup>C

RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.83, 22.84, 26.3, 26.42, 26.47, 29.52, 29.66, 29.70, 29.74, 29.8, 30.4, 30.5, 32.0, 32.1, 70.9, 72.8, 73.5, 75.0, 75.9, 76.0, 76.1, 81.1, 81.6, 81.7, 81.8, 83.7, 127.6-128.5, 138.6, 138.97, 139.02, 139.2; IR (film):  $\nu$  = 3085, 3065, 3026, 2959,

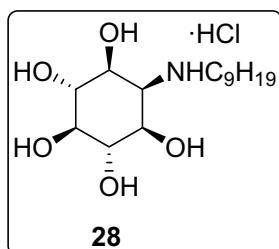
2924, 2854, 1734, 1718, 1267, 1095, 1071, 1028, 728, 668  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS calculat per  $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{Na}$ : 815.5227  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 815.5238.

#### 8.1.4.10 Síntesi dels compostos **28-39**, **41** i **42** per hidrogenòlisi utilitzant com a catalitzador Pd/C

*Mètode general:* En un tub a pressió, es va dissoldre l'amino- o azidociclitol *O*-benzilat (0.1 mmol) en 3 mL de THF i s'hi van addicionar 50 mg de Pd/C (5-15%) i 4 gotes de HCl concentrat (només per a la síntesi dels aminociclitols **28-36** i diaminociclitols **37-38**). El sistema es va purgar amb quatre cicles de buit i hidrogen, deixant finalment una pressió de 2 atm d' $\text{H}_2$ . Es deixà el sistema amb agitació vigorosa a t.a. durant 24 h. Passat aquest temps, es filtrà la mescla resultant sobre Celite<sup>®</sup> per tal de separar el catalitzador i es rentà amb 15 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es van aïllar els productes finals en forma de sòlid blanc.

##### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-6-(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4,5-pentaol (**28**)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 46 mg (0.07 mmol) de l'aminoalcohol **62** s'obtingueren 22 mg (0.06 mmol, 91%) de l'aminociclitol **28** en forma de sòlid blanc.



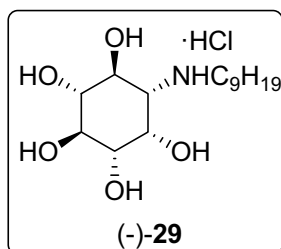
$^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24-1.45 (m, 12H,  $6\times\text{CH}_2$ ), 1.70-1.80 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.14-3.26 (m, 3H,  $\text{NCH}_2$ , H-1), 3.45-3.51 (m, 2H, H-2, H-4), 3.62-3.68 (m, 1H, H-6), 3.72-3.78 (m, 2H, H-3, H-5);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.6 ( $\text{CH}_2$ ), 26.4 ( $\text{CH}_2$ ), 27.5 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $\text{CH}_2$ ), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 32.9 ( $\text{CH}_2$ ), 52.2 ( $\text{NCH}_2$ ), 63.0 (C6), 69.8 (C3, C5), 73.9 (C2, C4), 74.9 (C1). HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{NO}_5$ : 306.2280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 306.2275.

##### Hidroclorur de l'(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4,5-pentaol (**29**)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 71 mg (0.11 mmol) de l'aminoalcohol **66** s'obtingueren 33 mg (0.10 mmol, 92%) de l'aminociclitol **29**.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -11.2 ( $c$  1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.7$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24-1.45 (m, 12H,  $6\times\text{CH}_2$ ), 1.64-1.83 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.04-3.18 (m, 3H,  $\text{NCH}_2$ , H-6), 3.18-

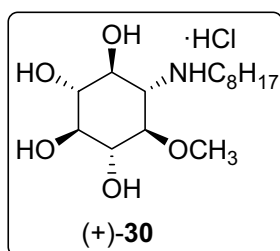
3.28 (m, 1H, H-4), 3.38-3.48 (m, 1H, H-2), 3.54-3.62 (m, 1H, H-3), 3.73-3.80 (m, 1H, H-5),



4.15-4.20 (m, 1H, H-1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.0 ( $\text{CH}_2$ ), 27.8 ( $\text{CH}_2$ ), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ ), 33.0 ( $\text{CH}_2$ ), 46.5 ( $\text{CH}_2$ ), 61.1 ( $\text{C}_6$ ), 68.0 ( $\text{C}_1$ ), 70.9 ( $\text{C}_5$ ), 73.5 ( $\text{C}_2$  o  $\text{C}_3$ ), 73.6 ( $\text{C}_2$  o  $\text{C}_3$ ), 76.8 ( $\text{C}_4$ ). HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{NO}_5$ : 306.2280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 306.2269.

### Hidrocloreur de l'(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-5-metoxi-6-(octilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (30)

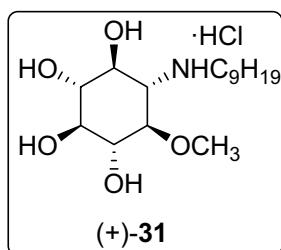
D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 62 mg (0.09 mmol) de l'amina **63** s'obtingueren 29 mg (0.09 mmol, 92%) de l'aminociclitol **30**.



$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +8.5$  (*c* 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz), 1.28-1.47 (m, 10H), 1.70-1.80 (m, 2H), 3.03 (t, 1H,  $J=10.8$  Hz), 3.08-3.14 (m, 2H), 3.17-3.26 (m, 2H), 3.33-3.37 (m, 1H), 3.44 (t, 1H,  $J=8.9$  Hz), 3.48-3.54 (m, 1H), 3.67 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4, 23.7, 27.3, 27.6, 30.2 (2), 32.9, 45.8, 60.9, 61.7, 69.7, 75.3, 76.3, 77.4, 79.0. HRMS calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{NO}_5$ : 306.2280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Found: 306.2276.

### Hidrocloreur de l'(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-5-metoxi-6-(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (31)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 51 mg (0.07 mmol) de l'amina **64** s'obtingueren 25 mg (0.07 mmol, 94%) de l'aminociclitol **31**.

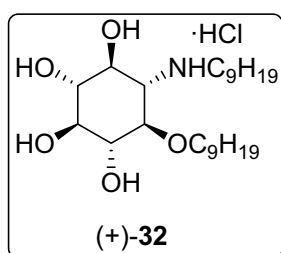


$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +10.3$  (*c* 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz), 1.31-1.43 (m, 12H), 1.70-1.75 (m, 2H), 3.03 (t, 1H,  $J=10.8$  Hz), 3.08-3.17 (m, 2H), 3.18-3.26 (m, 2H), 3.34-3.37 (m, 1H), 3.44 (t, 1H,  $J=8.9$  Hz), 3.49-3.54 (m, 1H), 3.66 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.5, 23.7, 27.3, 27.6, 30.2, 30.4,

30.5, 33.0, 46.0, 60.9, 61.7, 69.8, 75.3, 76.3, 77.4, 79.0. HRMS calculat per  $C_{16}H_{34}NO_5$ : 320.2437  $[M+H]^+$ . Trobat: 320.2433.

### Hidroclorur de l'(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-(nonilamino)-6-(noniloxi)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (32)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 62 mg (0.08 mmol) de l'amina **65** s'obtingueren 32 mg (0.07 mmol, 89%) de l'aminociclitol **32**.



$[\alpha]_D^{25} +9.3$  (*c* 0.9, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (dt, 6H, *J*=7.0, 6.9 Hz), 1.31-1.43 (m, 24H), 1.60-1.76 (m, 4H), 3.00-3.12 (m, 2H), 3.16-3.21 (m, 2H), 3.24 (t, 1H, *J*=9.1 Hz), 3.40-3.48 (m, 3H), 3.60-3.65 (m, 1H), 4.13-4.18 (m, 1H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.5, 23.8, 27.3, 27.4, 27.7, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 31.5, 33.06, 33.12, 46.8, 62.0, 70.0, 74.1, 75.4, 76.3,

77.6, 78.0. HRMS calculat per  $C_{24}H_{50}NO_5$ : 432.3689  $[M+H]^+$ . Trobat: 432.3675.

### Hidroclorur de l'(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-metoxi-6-(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (33)

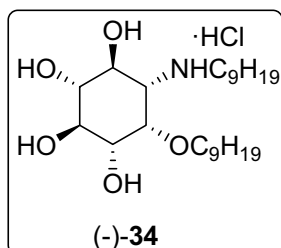
D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 55 mg (0.08 mmol) de l'amina **67** s'obtingueren 26 mg (0.08 mmol, 89%) de l'aminociclitol **33**.

$[\alpha]_D^{25} -15$  (*c* 0.9, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 3H, *J* =6.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.27-1.43 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.60-1.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.00-3.24 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, H-6, H-2), 3.50-3.60 (m, 2H, H-3, H-4), 3.65-3.72 (m, 4H, OCH<sub>3</sub>, H-1), 3.91-3.97 (m, 1H, H-5); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 47.0 (NCH<sub>2</sub>), 60.9 (C6), 62.0 (OCH<sub>3</sub>), 71.2 (C1), 73.6 (C3), 74.8 (C4), 77.0 (C2), 78.0 (C5).

HRMS calculat per  $C_{16}H_{34}NO_5$ : 320.2437  $[M+H]^+$ . Trobat: 320.2433.

### Hidroclorur de l'(**1R,2S,3R,4S,5S,6S**)-5-(nonilamino)-6-(noniloxi)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (**34**)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 80 mg (0.10 mmol) de l'amina **68** s'obtingueren 43 mg (0.09 mmol, 92%) de l'aminociclitol **34**.

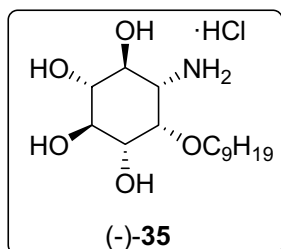


$[\alpha]_D^{25}$  -18 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.88-0.96 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 1.25-1.42 (m, 24H, 12xCH<sub>2</sub>), 1.60-1.80 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.04-3.09 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.13 (dd, 1H, *J*=10.7, 2.6 Hz, H-5), 3.19 (t, 1H, *J*=9.1 Hz, H-3), 3.50 (dd, 1H, *J*=9.9, 2.2 Hz, H-1), 3.54-3.64 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>, H-2), 3.72 (dd, 1H, *J*=10.5, 9.3 Hz, H-4), 3.98-4.05 (m, 1H, H-6), 4.16 (dt, 1H, *J*=9.1, 7.2 Hz, OCH<sub>2</sub>);

<sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.5 (2xCH<sub>3</sub>), 23.74 (CH<sub>2</sub>), 23.75 (CH<sub>2</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 30.51 (CH<sub>2</sub>), 30.53 (CH<sub>2</sub>), 30.76 (CH<sub>2</sub>), 30.80 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 46.9 (NCH<sub>2</sub>), 60.9 (C5), 71.3 (C4), 73.6 (C2), 74.8 (OCH<sub>2</sub>, C1), 76.6 (C6), 77.1 (C3). HRMS calculat per C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>5</sub>: 432.3689 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 432.3674.

### Hidroclorur de l'(**1R,2S,3R,4S,5S,6S**)-5-amino-6-(noniloxi)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (**35**)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 21 mg (0.03 mmol) de l'azida **57** s'obtingueren 10 mg (0.03 mmol, 90%) de l'aminociclitol **35**.



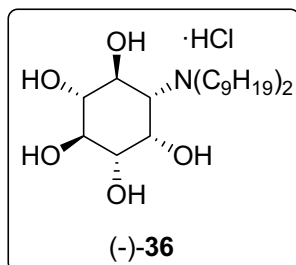
$[\alpha]_D^{25}$  -11.6 (*c* 0.5, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.25-1.40 (m, 12H), 1.55-1.70 (m, 2H), 3.10 (d, 1H, *J*=10.5 Hz), 3.19 (t, 1H, *J*=9.1 Hz), 3.45-3.53 (m, 1H), 3.54-3.70 (m, 3H), 3.80-3.87 (m, 1H), 3.98-4.05 (m, 1H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4, 23.7, 27.1, 30.5, 30.7, 30.8, 31.2, 33.1,

55.2, 71.5, 73.9, 74.6, 75.1, 77.0, 78.7. HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>: 306.2280 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 306.2265.



**Hidroclozur de l'(1S,2S,3S,4R,5S,6S)-6-(dinonilamino)ciclohexan-1,2,3,4,5-pentaol (36)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 40 mg (0.05 mmol) de l'amina **69** s'obtingueren 21 mg (0.04 mmol, 86%) de l'aminociclitol **36**.

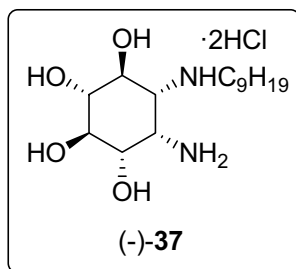


$[\alpha]_D^{25}$  -15 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.21-1.47 (m, 24H), 1.66-1.80 (m, 4H), 3.16-3.35 (m, 4H), 3.40-3.50 (m, 2H), 3.53-3.60 (m, 2H), 4.04 (dd, 1H, *J* = 8.9, 10.6 Hz), 4.24-4.28 (m, 1H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4, 23.7, 25.8, 26.7, 27.8, 27.9, 30.20, 30.23, 30.3, 30.5, 33.0, 54.0, 54.9, 64.5, 68.5, 69.2, 73.7, 73.8, 77.2. HRMS

calculat per C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>5</sub>: 432.3689 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 432.3686.

**(1S,2R,3R,4S,5S,6R)-5-amino-6-(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (37)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 51 mg (0.07 mmol) de l'azidoamina **75**, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 4:1-3:1 i 1% vol NH<sub>3</sub>) del cru de la reacció, s'obtingueren 17 mg (0.06 mmol, 77%) de la diamina **37**.

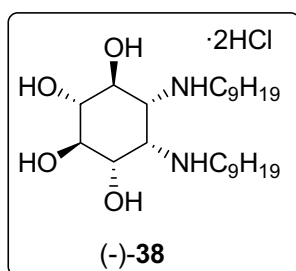


$[\alpha]_D^{25}$  -12.5 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.91 (t, 3H, *J* = 6.1 Hz), 1.22-1.45 (m, 12H), 1.50-1.61 (m, 2H), 2.47-2.56 (m, 2H), 2.70-2.74 (m, 1H), 3.17 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.40-3.46 (m, 2H), 3.51 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz), 3.63 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>): 13.7, 21.9, 26.7, 28.5, 28.79, 28.82,

29.6, 31.1, 46.7, 50.7, 60.9, 70.9, 72.4, 72.9, 76.4. HRMS calculat per C<sub>15</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 305.2440 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 305.2427.

**Dihidroclozur de l'(1S,2R,3R,4S,5R,6S)-5,6-bis(nonilamino)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (38)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 27 mg (0.03 mmol) de la diamina **83** s'obtingueren 15 mg (0.03 mmol, 85%) del diaminociclitol **38**.



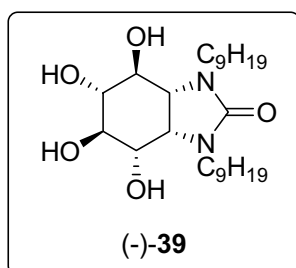
$[\alpha]_D^{25}$  -9.4 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.92 (t, 6H, *J* =6.7 Hz), 1.22-1.38 (m, 24H), 1.43-1.84 (m, 4H), 2.83-3.24 (m, 5H), 3.41-3.50 (m, 2H), 3.50-3.61 (m, 1H), 4.04-4.13 (m, 2H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.3, 23.5, 27.1, 27.3, 27.4, 27.6, 30.1, 30.14, 30.22, 30.24, 30.37, 30.39, 30.6, 30.9, 32.9, 45.6, 48.9, 59.5, 62.1, 68.2, 70.9, 73.9. HRMS calculat per:

C<sub>24</sub>H<sub>51</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 431.3849 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 431.3860.

**(3aR,4S,5R,6R,7S,7aS)-4,5,6,7-tetrahidroxi-1,3-dinonil-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (39)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 48 mg (0.06 mmol) de la imidazolidinona *O*-benzilada **82** s'obtingueren 25 mg (0.06 mmol, 93%) de la imidazolidinona **39**.

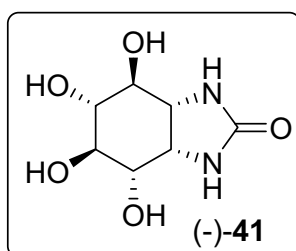
$[\alpha]_D^{25}$  -8.5 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 6H, *J* =6.8 Hz), 1.22-1.38 (m, 24H), 1.43-1.64 (m, 4H), 3.07-3.15 (m, 1H), 3.24 (dd, 1H, *J* =10.0, 7.0



Hz), 3.30-3.39 (m, 1H), 3.46 (td, 2H, *J* =13.6, 7.6 Hz), 3.55 (t, 1H, *J* =8.2 Hz), 3.62-3.65 (m, 1H), 3.75-3.82 (m, 2H), 3.84 (dd, 1H, *J* =8.8, 2.9 Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.5, 23.8, 27.8, 28.0, 30.4, 30.5, 30.8, 33.1, 43.3, 43.4, 56.2, 59.0, 71.9, 75.3, 76.1, 77.2, 163.5. HRMS calculat per C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 457.3641 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 457.3665.

**(3aR,4S,5R,6R,7S,7aS)-4,5,6,7-tetrahidroxi-hexahidro-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (41)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 50 mg (0.09 mmol) de la imidazolidinona *O*-benzilada **84** s'obtingueren 16 mg (0.08 mmol, 88%) de la imidazolidinona **41**.

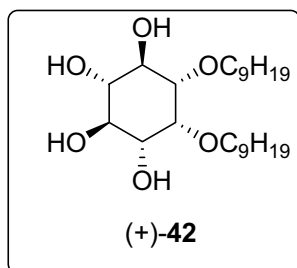


$[\alpha]_D^{25}$  -7.5 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.13 (t, 1H, *J* =9.4 Hz), 3.39 (dd, 1H, *J* =7.9, 6.8 Hz), 3.44 (dd, 1H, *J* =9.5, 8.1 Hz), 3.49 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz), 3.61 (dd, 1H, *J* =9.3, 4.8 Hz), 4.04 (dd, 1H, *J* =6.7, 4.8 Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz,

CD<sub>3</sub>OD): 58.3, 58.7, 72.5, 74.2, 74.8, 77.5, 166.3. HRMS calculat per C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na: 227.0644 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 227.0637.

#### (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-5,6-bis(noniloxi)ciclohexan-1,2,3,4-tetraol (**42**)

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups *O*-benzil, a partir de 70 mg (0.09 mmol) del ciclitol **85** s'obtingueren 34 mg (0.09 mmol, 89%) del ciclitol **42**.

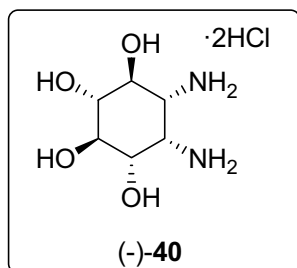


$[\alpha]_D^{25} +15.4$  (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 6H, *J* =6.9 Hz), 1.25-1.42 (m, 24H), 1.53-1.65 (m, 4H), 3.07 (dd, 1H, *J* =2.3, 9.9 Hz), 3.13 (t, 1H, *J* =9.2 Hz), 3.30-3.36 (m, 1H), 3.51-3.77 (m, 6H), 3.84 (t, 1H, *J* =2.4 Hz); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.5, 23.8, 27.3, 27.4, 30.49, 30.53, 30.7, 30.82, 30.84, 31.2, 31.4, 33.1, 71.7, 73.6, 73.9, 74.6, 76.8, 79.3, 82.4.

HRMS calculat per C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub>Na: 455.3349 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 455.3328.

#### 8.1.4.11 Síntesi del Dihidroclorur de l'((1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-diaminociclohexan-1,2,3,4-tetraol (**40**)

En una matrass de forma cònica, es van dissoldre 86 mg (0.16 mmol) de la diamina *O*-benzilada **79** en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre sota atmosfera d'argó. Tot seguit, es refredà el sistema a -78 °C i es va addicionar, gota a gota, una dissolució de BCl<sub>3</sub> 1M en heptà (2.0 equivalents per cada grup benzil). Després de 2 h, es va pujar la temperatura fins a t.a. i es mantingué amb agitació durant 5 h. Passat aquest temps, es tornà a refredar el sistema a -78 °C i es van afegir, gota a gota, 2 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, s'hi van addicionar uns 5 mL d'AcOEt de qualitat HPLC sobre el cru i, després de deixar al ultrasons el matrass durant 2-3 min, es va observar la formació d'un precipitat blanc. Amb molta cura, es va treure el sobrenedant i, després de repetir el procés de rentat amb AcOEt dos cops més i assecar el sòlid al buit, es van obtenir 35 mg (0.15 mmol, 87%) de la diamina **40** en forma de sòlid blanc.



$[\alpha]_D^{25} -6.4$  (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.43 (t, 1H, *J* =7.7 Hz), 3.56 (dd, 1H, *J* =9.8, 3.1 Hz), 3.63 (t, 1H, *J* =8.2 Hz), 3.82-3.90 (m, 2H), 3.91-3.97 (m, 1H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 52.5, 52.7, 69.6, 70.0, 73.4, 75.7. HRMS calculat per C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 179.1032 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 179.1025.

### 8.1.5 Síntesi de les isourees i guanidines bicíclicues

Els següents compostos s'han preparat d'acord amb els procediments descrits a la literatura:

(1*SR*,2*RS*,3*SR*,4*RS*,5*RS*,6*SR*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol ( $\pm$ )-**47**,<sup>199</sup>

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (-)-**47**,<sup>166</sup>

(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (+)-**49**,<sup>226</sup>

(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol ( $\pm$ )-**49**,<sup>199</sup>

(1*RS*,2*SR*,3*SR*,4*RS*,5*RS*,6*SR*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol ( $\pm$ )-**53**,<sup>199</sup>

(1*RS*,2*RS*,3*SR*,4*RS*,5*RS*,6*SR*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol ( $\pm$ )-**70**,<sup>199</sup>

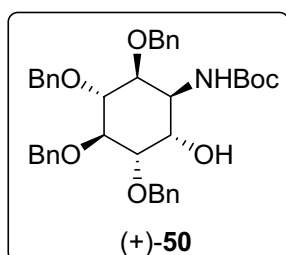
(1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxiciclohexanol (-)-**70**,<sup>199</sup>

(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-nonilaminociclohexanol (-)-**91**.<sup>130</sup>

#### 8.1.5.1 Síntesi de l'aminoalcohol (-)-**53** a partir de l'aminoalcohol (+)-**49**

##### (1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-*N*-(2,3,4,5-tetrabenzioxi-6-hidroxiciclohexil)carbamat de *tert*-butil (**50**)

Es van dissoldre 1.74 g (3.2 mmol) de l'aminoalcohol (+)-**49** en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'hi van addicionar a 0 °C, 0.6 mL (4.3 mmol) de Et<sub>3</sub>N i 0.96 g (4.4 mmol) de (Boc)<sub>2</sub>O. La reacció es mantingué amb agitació a t.a. durant tota la nit (control CCF). L'endemà, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1) i es va aïllar el carbamat (+)-**50** (1.92 g, 3.0 mmol, 93 %) en forma d'oli incolor.



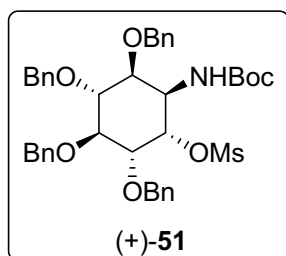
$[\alpha]_D^{25} +14.2$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3342, 3063, 3030, 2976, 2901, 1687, 1534, 1497, 1453, 1365$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.46 (s, 9H), 2.42-2.52 (m, 1H), 3.58 (t, 1H, *J*=9.1 Hz), 3.71 (dd, 1H, *J*=2.5, 9.1 Hz), 3.87 (t, 1H, *J*=8.9 Hz), 4.10 (dd, 1H, *J*=4.6, 9.3 Hz), 4.27-4.29 (m, 1H), 4.49 (br s, 1H), 4.51-4.91 (m, 8H), 7.29-7.38 (m, 20H); Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H RMN)

coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 28.4, 50.7, 68.0, 72.3, 72.9, 75.81, 75.83, 77.5, 79.5, 80.1, 80.8, 81.6, 127.7-128.6, 137.9, 138.0, 138.7, 138.8, 156.1. HRMS calculat per C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>Na: 662.3094 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 662.3078.

**(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-metanosulfonat de 2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(*tert*-butoxicarbonil-amino)ciclohexil (51)**

A una dissolució de 163 mg (0.25 mmol) del carbamat **50** en 2 mL de THF, s'hi van addicionar 140  $\mu$ L (1.0 mmol) de Et<sub>3</sub>N i 28  $\mu$ L (0.36 mmol) de clorur de mesil. Es deixà la reacció amb agitació a t.a. durant 5 h (control CCF) i es va diluir la mescla amb 10 mL d'Et<sub>2</sub>O. Es van separar les sals per filtració a través de Celite<sup>®</sup> i es rentà varies vegades amb Et<sub>2</sub>O. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, es va purificar el cru resultant per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 6:1) i es va aïllar el mesilat **51** (160 mg, 0.22 mmol, 88%).

$[\alpha]_D^{25} +19.9$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3068, 2982, 2932, 1809, 1757, 1477, 1458, 1395$

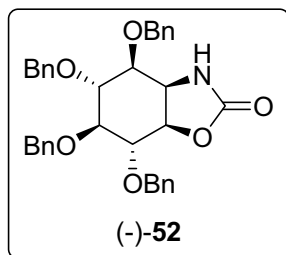


$\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.51 (s, 9H), 3.03 (s, 3H), 3.66 (t, 1H, *J*=8.1 Hz), 3.84 (t, 1H, *J*=9.0 Hz), 3.88 (t, 1H, *J*=9.6 Hz), 4.06 (dd, 1H, *J*=4.1, 8.5 Hz), 4.17-4.22 (m, 1H), 4.64-4.92 (m, 9H), 5.69 (br s, 1H), 7.24-7.38 (m, 20H); Les dades espectroscòpiques (<sup>1</sup>H RMN) coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 28.4, 38.7, 50.8, 72.7,

73.2, 75.9, 76.0, 76.7, 77.0, 80.4, 81.60, 127.8-128.7, 137.4, 138.4, 138.5, 155.7. HRMS calculat per C<sub>40</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>9</sub>NaS: 740.2869 [M+Na]<sup>+</sup>. Trobat: 740.2874.

**(3*aR*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7*aR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ona (52)**

Una dissolució d'1.2 g (1.67 mmol) del mesilat (+)-**51** en 10 mL de DMF s'escalfà a 110 °C durant 16 h. Passat aquest temps, es va eliminar el dissolvent al buit i el cru de reacció es va purificar per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 3:1-1:1) i es va aïllar l'oxazolidinona (-)-**52** (600 mg, 1.06 mmol, 63%).

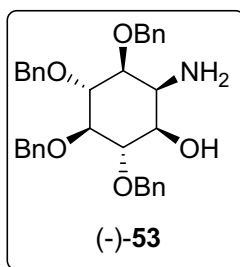


$[\alpha]_D^{25} -6.6$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu = 3273, 3092, 3068, 3059, 2974, 2866, 1757, 1454, 1070, 697$   $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.61 (dd, 1H, *J*=6.2, 8.7 Hz), 3.65 (dd, 1H, *J*=3.9, 6.1 Hz), 3.89 (t, 1H, *J*=6.2 Hz), 4.11 (dd, 1H, *J*=3.8, 8.4 Hz), 4.13 (dd, 1H, *J*=6.2, 8.7 Hz), 4.49-4.85 (m, 9H), 4.86 (br s, 1H), 7.28-

7.40 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 53.0, 73.1, 73.3, 73.9, 74.3, 76.1, 79.87, 79.92, 80.5, 81.2, 127.8-128.6, 137.5, 137.7, 138.1, 138.3, 159.8. HRMS calculat per  $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{NO}_6\text{Na}$ : 588.2362  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Trobat: 588.2374.

### (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-2-amino-3,4,5,6-(tetrabenziloxi)ciclohexanol (**53**)

Es va dissoldre l'oxazolidinona (-)-**52** (0.4 g, 0.71 mmol) en 12 mL d'una dissolució 1N de NaOH en EtOH i es va escalfar la mescla de reacció a 80 °C durant 16 h. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, el residu resultant es va dissoldre en 25 mL d'AcOEt i es rentà amb aigua (15 mL). Es van separar les fases i la fase aquosa s'extragué de nou amb AcOEt (2 x 15 mL). Es combinaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. D'aquesta manera, es van obtenir 0.37 g (0.68 mmol, 94%) de l'aminoalcohol (-)-**53**, el qual es va emprar en la següent reacció sense purificar.



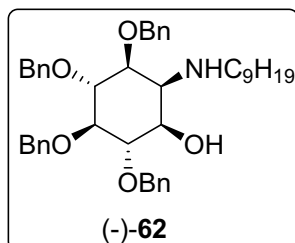
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -21.0 ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu$  = 3311, 3087, 3059, 3029, 2946, 1574, 1499, 1439  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.81 (br s, 3H), 3.48-3.54 (m, 3H), 3.67 (t, 1H,  $J$  = 3.3 Hz), 4.02 (t, 1H,  $J$  = 9.4 Hz), 4.15 (t, 1H,  $J$  = 9.5 Hz), 4.68-5.01 (m, 8H), 7.25-7.42 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 51.1, 71.8, 72.5, 75.57, 75.61, 76.0, 80.8, 81.2, 81.9, 83.9, 127.6-128.7, 138.3, 138.7, 138.80, 138.85. Les dades espectroscòpiques coincideixen amb les descrites a la literatura.<sup>199</sup> HRMS calculat per  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{NO}_5$ : 540.2750  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 540.2728.

#### 8.1.5.2 Procediment general per a l'aminació reductora: Síntesi de (-)-**62** i (+)-**92**

A una dissolució de l'aminoalcohol (0.14 mmol) en MeOH (5 mL) es van addicionar, sota atmosfera d'argó, 18 mg (0.29 mmol) de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , 10  $\mu\text{L}$  d'àcid acètic i l'aldehid nonanal (0.16 mmol). Després de deixar la mescla amb agitació durant 4 h (control CCF), s'addicionà 0.2 mL d'aigua i s'eliminaren els dissolvents a pressió reduïda. El residu resultant es va tornar a dissoldre en 20 mL d'èter dietílic, es rentà amb aigua (15 mL) i, després de separar les fases, la fase aquosa es tornà a extreure amb  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 20 mL). S'ajuntaren les fases orgàniques, s'assecaren sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidre i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* utilitzant els eluents indicats ens cada cas.

**(1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-nonilaminociclohexanol ((-)-62)**

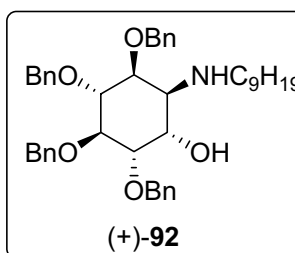
D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'aminoalcohol (-)-53 (99 mg, 0.18 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-3:1) del cru, donà 100 mg (0.15 mmol, 83 %) de l'amina (-)-62.



Oli;  $[\alpha]_D^{25}$  -14.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-62. HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>NO<sub>5</sub>: 666.4158 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 666.4180.

**(1S,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-(nonilamino)ciclohexanol ((+)-92)**

D'acord amb el mètode general, l'aminació reductora de l'aminoalcohol (+)-49 (160 mg, 0.30 mmol), després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1) del cru, donà 147 mg (0.23 mmol, 75%) de l'amina (+)-92.

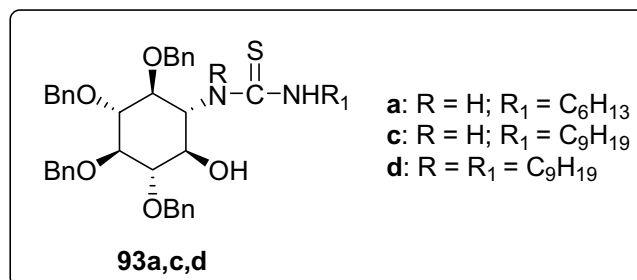


Oli;  $[\alpha]_D^{25}$  +28 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$ =3320, 3110, 3097, 2947, 2924, 2853, 1490, 1454, 1362, 1086, 1070, 1028 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.93 (t, 3H, *J*=6.9 Hz), 1.19-1.38 (m, 12H), 1.39-1.47 (m, 2H), 2.40-2.49 (m, 2H), 3.24 (t, 1H, *J*=3.9 Hz), 3.84 (t, 1H, *J*=9.0 Hz), 3.90 (t, 1H, *J*=9.1 Hz), 3.99-4.03 (m, 2H), 4.07 (t, 1H, *J*=3.3 Hz), 4.62-4.91 (m, 8H), 7.27-7.41 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 27.4, 29.5, 29.71, 29.75, 29.8, 32.0, 48.7, 58.3, 68.2, 72.7, 73.4, 75.7, 75.8, 79.6, 80.1, 81.7, 81.9, 127.6-128.6, 138.4, 138.6, 139.12, 139.13. HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>NO<sub>5</sub>: 666.4158 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 666.4175.

**8.1.5.3 Síntesi de les tiourees (±)-93a,c, (+)-93c, (-)-93d, (±)-94c, (+)-94c,d, (±)-95a-c, (+)-95c, (-)-95d, (±)-96a-c, (+)-96c,d, 101c,e i 102c,e**

*Mètode general:* A una dissolució de l'aminoalcohol corresponent (47, 49, 53, 62, 66, 70, 91-92) o la diamina 79 (0.22 mmol) en 6 mL de THF es va addicionar, sota atmosfera d'argó, el corresponent isotiocianat (0.44 mmol per als aminoalcohols i 0.22 mmol per a la diamina 79). La mescla s'escalfà a 45 °C durant 18 h (control CCF) i, després d'eliminar el

dissolvent a pressió reduïda, el cru es purificà per cromatografia en columna *flash* utilitzant els eluents indicats en cada cas.



### 1-hexil-3-((1*RS*,2*SR*,3*RS*,4*RS*,5*SR*,6*RS*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-**93a**)

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.18 mmol) de l'amina (±)-**70** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-3:1) del cru, 91 mg (0.13 mmol, 72%) de la tiourea (±)-**93a**.

Oli; IR (film):  $\nu=3333, 3030, 2922, 2854, 1558, 1362, 1044 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (t, 3H,  $J=7.2$  Hz), 1.10-1.31 (m, 8H), 3.01-3.15 (m, 1H), 3.37-3.53 (m, 3H), 3.56 (t, 1H,  $J=9.0$  Hz), 3.60-3.70 (m, 2H), 3.95-4.12 (m, 1H), 4.60-5.01 (m, 8H), 6.64-6.83 (br s, 1H), 6.87-7.04 (br s, 1H), 7.25-7.42 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.1, 22.6, 26.6, 28.7, 31.5, 45.9, 60.1, 72.6, 75.7, 75.8, 75.9, 82.0, 82.4, 83.2, 83.4, 127.8-128.7, 138.2, 138.3, 138.5, 183.7. HRMS calculat per C<sub>41</sub>H<sub>51</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 683.3519 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 683.3527.

### 1-nonil-3-((1*RS*,2*SR*,3*RS*,4*RS*,5*SR*,6*RS*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-**93c**)

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.18 mmol) de l'amina (±)-**70** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-3:1) del cru, 126 mg (0.17 mmol, 94%) de la tiourea (±)-**93c**.

Oli; IR (film):  $\nu=3313, 3092, 3031, 2924, 2854, 1559, 1454, 1360, 1064, 1027, 697 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz), 1.10-1.36 (m, 14H), 2.98-3.15 (m, 1H), 3.37-3.72 (m, 7H), 4.64-5.01 (m, 8H), 6.18-6.36 (br s, 1H), 6.82-7.02 (br s, 1H), 7.25-7.42 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 22.8, 27.0, 28.7, 29.4, 29.6, 32.0, 45.9,



60.0, 72.7, 75.7, 75.8, 75.9, 82.0, 82.4, 83.2, 83.4, 127.8-128.7, 138.1, 138.2, 138.3, 183.7. HRMS calculat per  $C_{44}H_{57}N_2O_5S$ : 725.3988  $[M+H]^+$ . Trobat: 725.4000.

**1-nonil-3-((1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea  
(+)-93c**

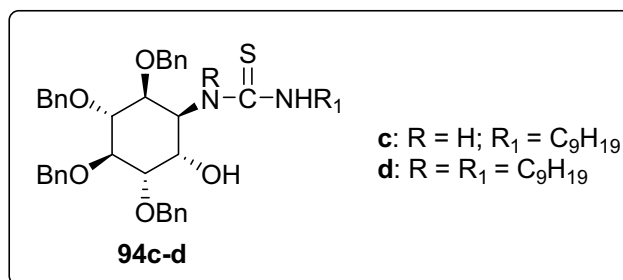
D'acord amb el mètode general, a partir de 120 mg (0.22 mmol) de l'amina (-)-70 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-3:1) del cru, 148 mg (0.20 mmol, 92%) de la tiourea (+)-93c.

Oli;  $[\alpha]_D^{25} +29$  (*c* 0.2,  $CHCl_3$ ); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic ( $\pm$ )-93c. HRMS calculat per  $C_{44}H_{57}N_2O_5S$ : 725.3988  $[M+H]^+$ . Trobat: 725.3993.

**1,3-dinonil-1-((1R,2S,3R,4R,5S,6R)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea  
(-)-93d**

D'acord amb el mètode general, a partir de 320 mg (0.48 mmol) de l'amina (-)-91<sup>130</sup> s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-10:1) del cru, 388 mg (0.46 mmol, 95%) de la tiourea (-)-93d.

Oli;  $[\alpha]_D^{25} -13.9$  (*c* 1.0,  $CHCl_3$ ); IR (film):  $\nu=3313, 3091, 3064, 3034, 2925, 2854, 1524, 1454, 1357, 1065, 1028, 697\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $CDCl_3$ ): 0.90 (t, 6H,  $J=6.7$  Hz), 1.17-1.85 (m, 28H), 2.35-2.57 (m, 2H), 2.96-3.10 (m, 1H), 3.15-3.29 (m, 1H), 3.45-3.81 (m, 6H), 4.53-5.19 (m, 8H), 5.73-5.94 (br s, 1H), 7.21-7.41 (m, 20H);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $CDCl_3$ ): 14.18, 14.20, 22.77, 22.79, 27.2, 27.5, 28.4, 29.2, 29.29, 29.33, 29.4, 29.5, 29.7, 31.96, 32.02, 45.2, 46.4, 53.5, 63.5, 71.8, 74.0, 75.9, 76.0, 78.4, 82.5, 84.0, 84.3, 127.8-128.6, 138.2, 138.4, 138.6, 186.1. HRMS calculat per  $C_{53}H_{75}N_2O_5S$ : 851.5397  $[M+H]^+$ . Trobat: 851.5375.



**1-nonil-3-((1*SR*,2*SR*,3*RS*,4*RS*,5*SR*,6*SR*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-**94c**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.18 mmol) de l'amina (±)-**49** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 6:1-4:1) del cru, 114 mg (0.16 mmol, 85%) de la tiourea (±)-**94c**.

Oli; IR (film):  $\nu=3285, 3091, 3063, 3031, 2925, 2854, 1549, 1455, 1071, 696 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.84-0.94 (m, 3H), 1.22-1.50 (m, 14H), 1.80-1.92 (m, 1H), 2.10-2.24 (m, 1H), 2.85-2.93 (m, 1H), 3.57-3.77 (m, 2H), 3.90 (t, 1H,  $J=7.9 \text{ Hz}$ ), 4.10-4.19 (m, 2H), 4.46-4.82 (m, 8H), 5.75-5.99 (br s, 1H), 6.41-6.73 (br s, 1H), 7.26-7.45 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 22.8, 27.0, 29.3, 29.4, 29.6, 32.0, 54.8, 60.6, 65.3, 68.3, 72.7, 73.0, 75.0, 75.4, 77.9, 79.5, 80.1, 80.5, 127.1-128.6, 137.6, 137.8, 138.39, 138.44, 183.4. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 725.3988 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 725.3990.

**1-nonil-3-((1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((+)-**94c**)**

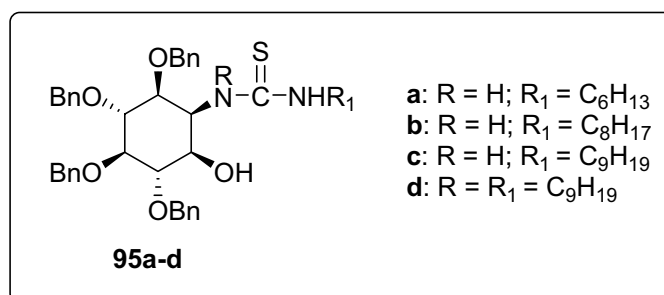
D'acord amb el mètode general, a partir de 146 mg (0.27 mmol) de l'amina (+)-**49** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 6:1-4:1) del cru, 147 mg (0.20 mmol, 75%) de la tiourea (+)-**94c**.

Oli;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +3.1$  ( $c$  1.0, CHCl<sub>3</sub>). Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-**94c**. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 725.3988 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 725.3991.

**1,3-dinonil-1-((1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((+)-**94d**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 120 mg (0.18mmol) de l'amina (+)-**92** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-8:1) del cru, 113 mg (0.13 mmol, 74%) de la tiourea (+)-**94d**.

Oli;  $[\alpha]_D^{25} +4.2$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (film):  $\nu=3288, 3090, 3064, 3034, 2925, 2854, 1525, 1454, 1065, 698 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.90 (t, 6H,  $J=7.0$  Hz), 1.04-2.01 (m, 28H), 3.34-3.47 (m, 1H), 3.49-3.63 (m, 2H), 3.65-3.77 (m, 1H), 3.84-3.91 (m, 3H), 4.02-4.08 (m, 2H), 4.30-4.72 (m, 9H), 7.21-7.41 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.20, 22.8, 27.26, 27.29, 28.1, 29.1, 29.4, 29.47, 29.51, 29.67, 29.73, 29.8, 32.0, 46.4, 60.5, 65.7, 72.31, 72.33, 73.0, 73.1, 75.8, 76.7, 78.9, 80.3, 127.9-128.6, 137.3, 138.06, 138.13, 138.2, 183.8. HRMS calculat per  $\text{C}_{53}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : 851.5397  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 851.5383.



**1-hexil-3-((1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-**95a**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 75 mg (0.14 mmol) de l'amina (±)-**53** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 85 mg (0.12 mmol, 90%) de la tiourea (±)-**95a**.

Oli; IR (film):  $\nu=3276, 3064, 3031, 2926, 2856, 1549, 1071, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz), 1.26-1.36 (m, 6H), 1.46-1.56 (m, 2H), 3.09-3.63 (m, 5H), 3.75 (t, 1H,  $J=8.9$  Hz), 3.83 (t, 1H,  $J=8.5$  Hz), 3.98-4.22 (m, 1H), 4.57-5.00 (m, 8H), 6.02-6.10 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.2, 22.7, 26.7, 28.8, 31.5, 46.1, 54.9, 71.5, 72.4, 75.4, 77.9, 80.0, 81.7, 82.6, 127.8-128.8, 137.1, 138.1,

138.19, 138.23, 185.4. HRMS calculat per  $C_{41}H_{51}N_2O_5S$ : 683.3519  $[M+H]^+$ . Trobat: 683.3525.

**1-octil-3-((1SR,2SR,3RS,4RS,5SR,6RS)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-95b)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 99 mg (0.18 mmol) de l'amina (±)-53 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 111 mg (0.16 mmol, 85%) de la tiourea (±)-95b.

Oli; IR (film):  $\nu=3270, 3064, 3031, 2925, 2855, 1549, 1071, 696\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz), 1.26-1.36 (m, 10H), 1.46-1.56 (m, 2H), 3.09-3.63 (m, 5H), 3.75 (t, 1H,  $J=8.9$  Hz), 3.83 (t, 1H,  $J=8.5$  Hz), 3.98-4.22 (m, 1H), 4.57-5.00 (m, 8H), 6.02-6.10 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.2, 22.8, 27.1, 28.9, 29.3, 29.4, 31.9, 46.1, 54.8, 71.5, 72.4, 75.4, 77.9, 80.0, 81.7, 82.6, 127.8-128.8, 137.1, 138.1, 138.19, 138.23, 185.4. HRMS calculat per  $C_{43}H_{55}N_2O_5S$ : 711.3832  $[M+H]^+$ . Trobat: 711.3773.

**1-nonil-3-((1SR,2SR,3RS,4RS,5SR,6RS)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-95c)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 101 mg (0.19 mmol) de l'amina (±)-53 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 103 mg (0.14 mmol, 76%) de la tiourea (±)-95c.

Oli; IR (film):  $\nu=3275, 3063, 3031, 2925, 2854, 1549, 1071, 696\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz), 1.26-1.36 (m, 12H), 1.46-1.56 (m, 2H), 3.20-3.68 (m, 5H), 3.75 (t, 1H,  $J=8.9$  Hz), 3.83 (t, 1H,  $J=8.5$  Hz), 3.98-4.22 (m, 1H), 4.57-5.00 (m, 8H), 6.02-6.10 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.2, 22.8, 27.0, 28.8, 29.4, 29.6, 32.0, 46.0, 55.0, 71.5, 72.4, 75.4, 77.9, 80.1, 81.7, 82.6, 127.8-128.8, 137.1, 138.1, 138.19, 138.23, 185.4. HRMS calculat per  $C_{44}H_{57}N_2O_5S$ : 725.3988  $[M+H]^+$ . Trobat: 725.3999.

**1-nonil-3-((1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea****(+)-95c**

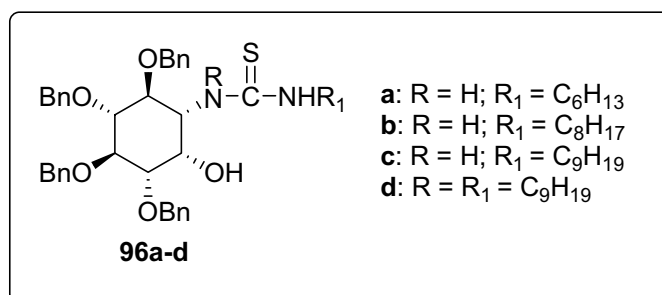
D'acord amb el mètode general, a partir de 120 mg (0.22 mmol) de l'amina (-)-53 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 152 mg (0.21 mmol, 94%) de la tiourea (+)-95c.

Oli;  $[\alpha]_D^{25} +25.1$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-95c. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 725.3988 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 725.4003.

**1,3-dinonil-1-((1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea****(-)-95d**

D'acord amb el mètode general, a partir de 92 mg (0.14 mmol) de l'amina (-)-62 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-10:1) del cru, 90 mg (0.11 mmol, 77%) de la tiourea (-)-95d.

Oli;  $[\alpha]_D^{25} -8.4$  (*c* 0.8 CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu=3300, 3090, 3062, 3030, 2925, 2854, 1539, 1072, 1068, 696$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (t, 6H, *J*=6.8 Hz), 1.26-1.36 (m, 24H), 1.46-1.56 (m, 4H), 1.72-1.88 (m, 1H), 3.40-3.68 (m, 4H), 3.81 (t, 1H, *J*=3.1 Hz), 3.97 (t, 1H, *J*=3.7 Hz), 4.03 (t, 1H, *J*=3.4Hz), 4.10-4.14 (m, 1H), 4.17-1.23 (m, 1H), 4.45- 4.73 (m, 9H), 6.02-6.10 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 22.8, 27.29, 27.34, 28.8, 29.2, 29.4, 29.5, 29.7, 29.8, 32.0, 46.9, 56.1, 72.6, 72.7, 72.8, 73.2, 73.3, 79.3, 80.8, 127.8-128.7, 137.5, 137.8, 138.2, 138.3, 182.8. HRMS calculat per C<sub>53</sub>H<sub>75</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 851.5397 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 851.5389.



**1-hexil-3-((1RS,2SR,3RS,4RS,5SR,6SR)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-96a)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 125 mg (0.23 mmol) de l'amina (±)-47 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1) del cru, 103 mg (0.15 mmol, 65%) de la tiourea (±)-96a.

Oli; IR (film):  $\nu=3318, 3091, 3063, 3031, 2926, 2857, 1550, 1070, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (t, 3H,  $J=7.2$  Hz), 1.10-1.35 (m, 8H), 2.86-3.18 (m, 2H), 3.30-3.45 (m, 1H), 3.47-3.55 (m, 1H), 3.58 (t, 1H,  $J=8.7$  Hz), 3.89 (t, 1H,  $J=9.8$  Hz), 3.94 (t, 1H,  $J=9.4$  Hz), 4.18-4.28 (m, 1H), 4.62-5.00 (m, 8H), 6.40-6.90 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.1, 22.6, 26.6, 28.7, 31.5, 45.6, 56.9, 68.9, 73.0, 75.9, 76.0, 80.4, 81.1, 83.7, 127.8-128.7, 137.5, 138.4, 138.6, 182.9. HRMS calculat per  $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : 683.3519  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 683.3516.

**1-octil-3-((1RS,2SR,3RS,4RS,5SR,6SR)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-96b)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 134 mg (0.20 mmol) de l'amina (±)-47 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1) del cru, 125 mg (0.18 mmol, 87%) de la tiourea (±)-96b.

Oli; IR (film):  $\nu=3316, 3088, 3063, 3031, 2925, 2855, 1550, 1086, 1069, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (t, 3H,  $J=7.2$  Hz), 1.10-1.35 (m, 12H), 2.86-3.18 (m, 2H), 3.30-3.45 (m, 1H), 3.47-3.55 (m, 1H), 3.58 (t, 1H,  $J=8.7$  Hz), 3.89 (t, 1H,  $J=9.8$  Hz), 3.94 (t, 1H,  $J=9.4$  Hz), 4.18-4.28 (m, 1H), 4.62-5.00 (m, 8H), 6.40-6.90 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.2, 22.8, 27.0, 28.7, 29.28, 29.31, 31.9, 45.2, 56.9, 68.8, 73.0, 75.9, 76.0, 80.4, 81.1, 83.7, 127.8-128.7, 137.6, 138.4, 138.6, 181.3. HRMS calculat per  $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : 711.3832  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 711.3861.

**1-nonil-3-((1RS,2SR,3RS,4RS,5SR,6SR)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea ((±)-96c)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 125 mg (0.23 mmol) de l'amina (±)-47 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1) del cru, 153 mg (0.21 mmol, 91%) de la tiourea (±)-96c.

Oli; IR (film):  $\nu=3305, 3088, 3063, 3030, 2926, 2854, 1549, 1097, 1070, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.88 (t, 3H,  $J=7.2 \text{ Hz}$ ), 1.10-1.35 (m, 14H), 2.86-3.18 (m, 2H), 3.30-3.45 (m, 1H), 3.47-3.55 (m, 1H), 3.58 (t, 1H,  $J=8.7 \text{ Hz}$ ), 3.89 (t, 1H,  $J=9.8 \text{ Hz}$ ), 3.94 (t, 1H,  $J=9.4 \text{ Hz}$ ), 4.18-4.28 (m, 1H), 4.62-5.00 (m, 8H), 6.40-6.90 (br s, 1H), 7.26-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.2, 22.8, 27.0, 28.7, 29.3, 29.5, 31.9, 45.6, 56.9, 68.7, 73.0, 75.9, 76.0, 80.4, 81.1, 83.7, 127.7-128.7, 137.6, 138.4, 138.6, 182.8. HRMS calculat per  $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : 725.3988  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 725.4016.

### **1-nonil-3-((1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea**

#### **(+)-96c**

D'acord amb el mètode general, a partir de 111 mg (0.20 mmol) de l'amina (-)-47 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1) del cru, 141 mg (0.19 mmol, 95%) de la tiourea (+)-96c.

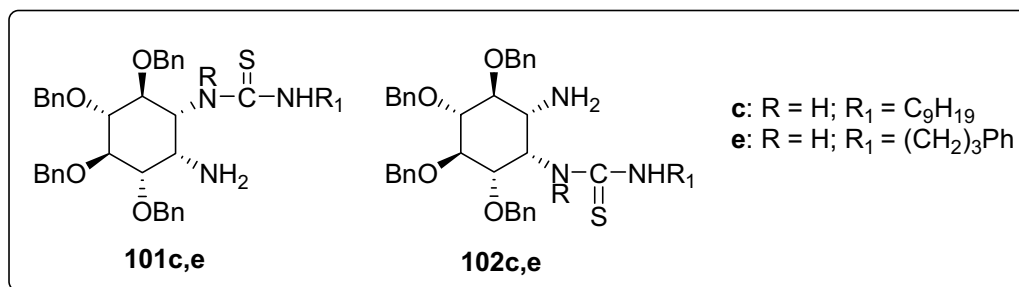
Oli;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +18.6$  ( $c$  0.6,  $\text{CHCl}_3$ ); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic ( $\pm$ )-96c. HRMS calculat per  $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : 725.3988  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 725.4008.

### **1,3-dinonil-1-((1R,2S,3R,4R,5S,6S)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)tiourea**

#### **(+)-96d**

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.15 mmol) de l'amina (-)-66 s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 20:1-10:1) del cru, 91 mg (0.11 mmol, 71%) de la tiourea (+)-96d.

Oli;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +7.7$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu=3308, 3090, 3064, 3032, 2925, 2854, 1534, 1098, 1068, 696 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.89 (t, 6H,  $J=6.7 \text{ Hz}$ ), 1.10-1.35 (m, 24H), 1.47-1.75 (m, 4H), 2.86-3.18 (m, 2H), 3.20-3.80 (m, 7H), 3.92 (t, 1H,  $J=9.3 \text{ Hz}$ ), 4.00-4.20 (m, 1H), 4.25-4.35 (m, 1H), 4.62-5.00 (m, 8H), 7.26-7.43 (m, 20H). HRMS calculat per  $\text{C}_{53}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : 851.5397  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 851.5397.



Una mescla d'1-((1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxi-ciclohexil)-3-noniltiurea (**101c**) i 1-((1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxi-ciclohexil)-3-noniltiurea (**102c**)

D'acord amb el mètode general, a partir de 150 mg (0.28 mmol) de la diamina (-)-**79** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:1) del cru, 130 mg (0.18 mmol, 65%) d'una mescla de les tioureas **101c** i **102c**.

Oli. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 724.4148 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 724.4127.

Una mescla d'1-((1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxi-ciclohexil)-3-(3-fenilpropil)tiurea (**101e**) i 1-((1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-amino-3,4,5,6-tetrabenziloxi-ciclohexil)-3-(3-fenilpropil)tiurea (**102e**)

D'acord amb el mètode general, a partir de 90 mg (0.17 mmol) de la diamina (-)-**79** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 1:1-1:2) del cru, 82 mg (0.11 mmol, 70%) d'una mescla de les tioureas **101e** i **102e**.

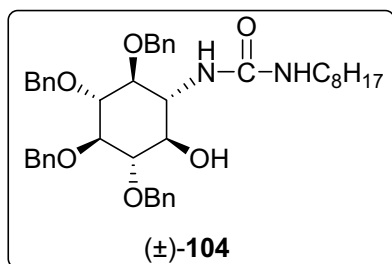
Oli. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 716.3522 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 716.3539.

#### 8.1.5.4 Síntesi de l'1-octil-3-((1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5-tetrabenziloxi-6-hidroxiciclohexil)urea ((±)-**104**)

A una dissolució de l'aminoalcohol (±)-**70** (115 mg, 0.21 mmol) en 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> es van afegir, sota atmosfera d'argó, 73 μL d'octil isocianat (0.41 mmol). Es deixà la mescla amb agitació a t.a. durant 6 h (control CCF) i, després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:1) i es van obtenir 133 mg (0.19 mmol, 93%) de la urea (±)-**104** en forma d'oli incolor.

IR (film): ν=3332, 3085, 3063, 3029, 2925, 2854, 1653, 1629, 1585, 1454, 1067, 1049, 695 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (t, 3H, J=7.0 Hz), 1.19-1.34 (m, 12H), 2.82-2.90 (m, 1H), 2.99-3.05 (m, 1H), 3.33-3.38 (m, 2H), 3.45-3.53 (m, 3H), 3.62 (t, 1H, J=8.6 Hz),

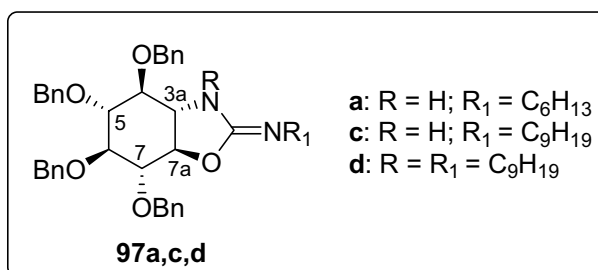




4.59-4.97 (m, 8H), 7.23-7.36 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3, 22.8, 27.0, 29.39, 29.44, 30.0, 32.0, 40.7, 57.1, 74.1, 75.2, 75.7, 75.9, 76.0, 80.9, 82.6, 83.7, 83.9, 127.8-128.8, 138.1, 138.4, 138.6, 138.8, 160.5. HRMS calculat per  $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_6$ : 695.4060  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 695.4044.

### 8.1.5.5 Síntesi de les isourees bicíclicues (±)-97a,c, (-)-97c,d, (±)-98c, (+)-98c,d, (±)-99a-c, (-)-99c,d, (±)-100a-c, (-)-100c,d i les guanidines bicíclicues (-)-103c,e

*Mètode general:* A una dissolució de la corresponent tiourea (0.11 mmol) en 15 mL de toluè, es van addicionar 72 mg (0.33 mmol, 3.0 equivalents) d'òxid de mercuri (II) i es va escalfar la suspensió, sota atmosfera d'argó, a 115 °C durant 24 h. Passat aquest temps, es va controlar la reacció per CCF i, si s'apreciava la presència de producte de partida, s'afegiren 3 equivalents més de HgO i s'escalfà la reacció durant 24 h més. Es deixà refredar la mescla, es filtrà sobre Celite<sup>®</sup> i es rentà amb 15 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda, el cru es purificà per cromatografia en columna *flash* utilitzant els eluents que s'indiquen en cada cas.



#### *N*-((3a*SR*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7a*RS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)hexan-1-amina ((±)-97a)

D'acord amb el mètode general, a partir de 88 mg (0.13 mmol) de la tiourea (±)-93a s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 3:1-1:1) del cru, 58 mg (0.09 mmol, 67%) de la isourea (±)-97a en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu=3305, 3090, 3061, 3032, 2925, 2855, 1717, 1654, 1455, 1362, 1274, 1097, 1067, 1027, 697 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.19-1.38 (m, 6H,  $3\times\text{CH}_2$ ), 1.55-1.63 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.21-3.30 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.51 (dd, 1H,

$J=10.5, 12.2$  Hz, H-3a), 3.63-3.74 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.84 (dd, 1H,  $J=12.2, 10.3$  Hz, H-7a), 3.91-3.96 (m, 1H, H-7), 4.70-4.95 (m, 7H, PhCH<sub>2</sub>O), 5.14 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 7.21-7.47 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>), 68.0 (C3a), 73.1 (2xPhCH<sub>2</sub>O), 76.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 80.6 (C7), 81.4 (C4), 83.5 (C7a), 84.9 (C6 or C5), 85.8 (C6 or C5), 127.5-128.5 (CHar), 138.3 (Car), 138.5 (Car), 138.6 (Car), 138.9 (Car), 163.0 (C2). HRMS calculat per C<sub>41</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 649.3641 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 649.3648.

***N*-((3a*SR*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7a*RS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((±)-97c)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 160 mg (0.22 mmol) de la tiourea (±)-93c s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 3:1-1:1) del cru, 126 mg (0.18 mmol, 82%) de la isourea (±)-97c en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu=3327, 3089, 3063, 3030, 2925, 2855, 1715, 1653, 1454, 1357, 1274, 1066, 1028, 697$  cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25-1.39 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.55-1.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23-3.32 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.51 (dd, 1H,  $J=10.5, 12.2$  Hz, H-3a), 3.63-3.74 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.84 (dd, 1H,  $J=12.2, 10.3$  Hz, H-7a), 3.91-3.96 (m, 1H, H-7), 4.72-4.96 (m, 7H, PhCH<sub>2</sub>O), 5.15 (d, 1H,  $J=11.8$  Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 7.21-7.47 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 26.9 (CH<sub>2</sub>), 29.40 (CH<sub>2</sub>), 29.43 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 43.2 (NCH<sub>2</sub>), 67.6 (C3a), 73.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.0 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 80.5 (C7), 81.3 (C4), 83.7 (C7a), 84.7 (C5 or C6), 85.6 (C5 or C6), 127.6-128.5 (CHar), 138.2 (Car), 138.4 (Car), 138.5 (Car), 138.8 (Car), 163.0 (C2). HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 691.4111 [M+ H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4122.

***N*-((3a*S*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7a*R*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-97c)**

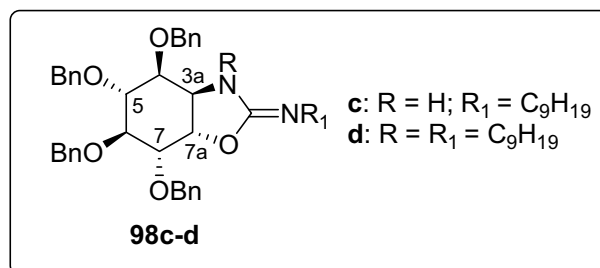
D'acord amb el mètode general, a partir de 125 mg (0.17 mmol) de la tiourea (+)-93c s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 3:1-1:1) del cru, 94 mg (0.14 mmol, 79%) de la isourea (-)-97c en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_D^{25}$  -4.6 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>). Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic ( $\pm$ )-**97c**. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 691.4111 [M+ H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4127.

***N*-((3*aS*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7*aR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-3-nonil-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-**97d**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 380 mg (0.45 mmol) de la tiourea (-)-**93d** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 6:1-1:1) del cru, 360 mg (0.42 mmol, 95%) de la isourea (-)-**97d** en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_D^{25}$  -19.6 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$ =3089, 3066, 3030, 2924, 2854, 1708, 1454, 1356, 1066, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (dt, 6H, *J*=6.7, 7.1 Hz), 1.25-1.39 (m, 24H), 1.42-1.67 (m, 4H), 3.05-3.15 (m, 1H), 3.17-3.30 (m, 3H), 3.31-3.46 (m, 1H), 3.64-3.80 (m, 3H), 3.82-3.93 (m, 2H), 4.61-5.00 (m, 8H), 7.21-7.46 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 22.82, 22.83, 25.9, 27.1, 27.7, 29.4, 29.5, 29.73, 29.75, 29.8, 29.9, 32.06, 32.1, 45.8, 46.7, 59.5, 73.4, 74.3, 75.59, 75.64, 78.7, 80.5, 82.2, 84.0, 85.6, 127.5-128.6, 138.0, 138.2 (2), 138.4, 154.5. HRMS calculat per C<sub>53</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 817.5519 [M+ H]<sup>+</sup>. Trobat: 817.5547.



***N*-((3*aRS*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7*aSR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina (( $\pm$ )-**98c**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 90 mg (0.12 mmol) de la tiourea ( $\pm$ )-**94c** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 67 mg (0.10 mmol, 79%) de la isourea ( $\pm$ )-**98c** en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu$ =3330, 3082, 3064, 3024, 2926, 2854, 1670, 1559, 1087, 1067, 1027, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (t, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.16-1.41 (m, 12H), 1.51-1.61 (m,

2H), 3.20-3.30 (m, 2H), 3.78-3.81 (m, 1H), 3.86-3.88 (m, 1H), 4.26-4.28 (m, 1H), 4.34-4.50 (m, 6H), 4.63 (d, 2H,  $J=12.2$  Hz), 4.72 (d, 1H,  $J=12.1$  Hz), 4.82 (d, 1H,  $J=13.2$  Hz), 4.90 (d, 1H,  $J=12.1$  Hz), 7.15-7.43 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3, 22.8, 26.9, 29.40, 29.45, 29.6, 29.9, 32.0, 43.0, 61.0, 72.2, 72.3, 72.4, 75.4, 77.0, 77.4, 78.2, 79.5, 127.4-128.5, 137.8, 138.0, 138.4, 138.9, 161.5. HRMS calculat per  $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_5$ : 691.4111  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 691.4136.

***N*-((3*aR*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7*aS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((+)-98c)**

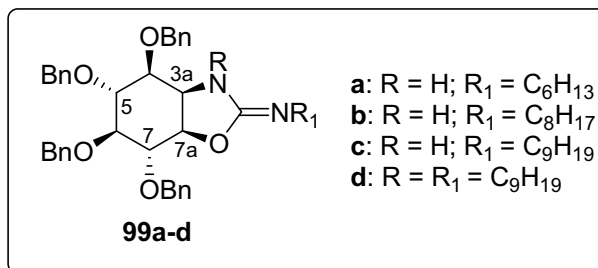
D'acord amb el mètode general, a partir de 132 mg (0.18 mmol) de la tiourea (+)-94c s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 87 mg (0.12 mmol, 68%) de la isourea (+)-98c en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +4.8$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic ( $\pm$ )-98c. HRMS calculat per  $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_5$ : 691.4111  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 691.4091.

***N*-((3*aR*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7*aS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-3-nonil-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((+)-98d)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 74 mg (0.09 mmol) de la tiourea (+)-94d s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-2:1) del cru, 52 mg (0.06 mmol, 73%) de la isourea (+)-98d en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +14.3$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film):  $\nu=3082, 3065, 3029, 2925, 2854, 1709, 1455, 1087, 1065, 1027, 696$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.81-0.95 (m, 6H), 1.16-1.39 (m, 24H), 1.45-1.61 (m, 4H), 2.96-3.07 (m, 1H), 3.13-3.33 (m, 3H), 3.80-3.87 (m, 2H), 3.92-3.98 (m, 1H), 3.99-4.08 (m, 1H), 4.19-4.24 (m, 1H), 4.31-4.82 (m, 9H), 7.15-7.39 (m, 20H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.2, 22.8, 26.7, 27.3, 27.7, 29.46, 29.51, 29.69, 29.72, 29.82, 29.84, 32.06, 32.09, 44.7, 46.6, 56.0, 72.0, 72.40, 72.43, 72.9, 74.5, 75.3, 75.5, 77.8, 127.7-128.6, 137.8, 138.0, 138.6, 161.5. HRMS calculat per  $\text{C}_{53}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_5$ : 817.5519  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 817.5546.



***N*-((3*aRS*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7*aRS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenczo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)hexan-1-amina ((±)-**99a**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 83 mg (0.12 mmol) de la tiourea (±)-**95a** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 62 mg (0.09 mmol, 80%) de la isourea (±)-**99a** en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu=3330, 3064, 3031, 2924, 2854, 1670, 1560, 1087, 1069, 1027, 696 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.21-1.38 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 1.46-1.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23 (t, 2H,  $J=7.1$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.57 (dd, 1H,  $J=4.5, 10.5$  Hz, H-4), 3.78-3.84 (m, 2H, H-5, H-6), 4.30 (dd, 1H,  $J=7.0, 10.4$  Hz, H-7), 4.32 (dd, 1H,  $J=2.9, 8.9$  Hz, H-3a), 4.40-4.50 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>O), 4.57 (dd, 1H,  $J=7.2, 9.0$  Hz, H-7a), 4.60-4.85 (m, 6H, 3xPhCH<sub>2</sub>O), 7.25-7.41 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>), 62.3 (C3a), 72.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.4 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 76.4 (C5 or C6), 79.9 (C7), 81.7 (C5 or C6), 82.3 (C4), 84.1 (C7a), 127.7-128.6 (CHar), 137.7 (Car), 138.3 (Car), 138.5 (Car), 138.6 (Car), 161.8 (C2). HRMS calculat per C<sub>41</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 649.3641 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 641.3640.

***N*-((3*aRS*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7*aRS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenczo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)octan-1-amina ((±)-**99b**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.14 mmol) de la tiourea (±)-**95b** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 78 mg (0.11 mmol, 79%) de la isourea (±)-**99b** en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu=3330, 3082, 3064, 3031, 2925, 2855, 1669, 1560, 1087, 1068, 1027, 696 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.21-1.39 (m, 10H, 5xCH<sub>2</sub>), 1.49-1.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23 (t, 2H,  $J=7.1$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.57 (dd, 1H,  $J=4.5, 10.5$  Hz, H-4), 3.76-3.84 (m, 2H, H-5, H-6), 4.30 (dd, 1H,  $J=7.1, 10.5$  Hz, H-7), 4.32 (dd, 1H,  $J=2.6, 9.1$

Hz, H-3a), 4.40-4.50 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>O), 4.58 (dd, 1H, *J*=7.6, 8.7 Hz, H-7a), 4.60-4.85 (m, 6H, 3xPhCH<sub>2</sub>O), 7.20-7.41 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.26 (CH<sub>2</sub>), 29.32 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>), 58.8 (C3a), 72.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.0 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (C5 or C6), 78.8 (C7), 80.6 (C5 or C6), 81.8 (C4), 85.4 (C7a), 127.9-128.7 (CHar), 137.3 (Car), 137.5 (Car), 138.1 (2xCar), 161.9 (C2). HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 677.3954 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 677.4011.

***N*-((3*aRS*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7*aRS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobencodioxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((±)-99c)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.14 mmol) de la tiourea (±)-95c s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 76 mg (0.11 mmol, 84%) de la isourea (±)-99c en forma d'oli incolor.

IR (film): ν=3330, 3082, 3064, 3024, 2924, 2854, 1670, 1560, 1087, 1068, 1027, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.19-1.39 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.48-1.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23 (t, 2H, *J*=7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.57 (dd, 1H, *J*=4.5, 10.5 Hz, H-4), 3.78-3.85 (m, 2H, H-5, H-6), 4.31 (dd, 1H, *J*=7.0, 10.4 Hz, H-7), 4.33 (dd, 1H, *J*=2.2, 8.4 Hz, H-3a), 4.40-4.51 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>O), 4.58 (dd, 1H, *J*=7.6, 8.7 Hz, H-7a), 4.60-4.84 (m, 6H, 3xPhCH<sub>2</sub>O), 7.21-7.43 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 43.3 (NCH<sub>2</sub>), 64.2 (C3a), 72.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.6 (PhCH<sub>2</sub>O), 74.1 (PhCH<sub>2</sub>O), 75.6 (C5 or C6) 80.4 (C7), 82.1 (C5 or C6), 82.5 (C4), 83.7 (C7a), 127.6-128.6 (CHar), 137.9 (Car), 138.68 (Car), 138.72 (Car), 138.9 (Car), 161.5 (C2). HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 691.4111 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4114.

***N*-((3*aR*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7*aR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobencodioxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-99c)**

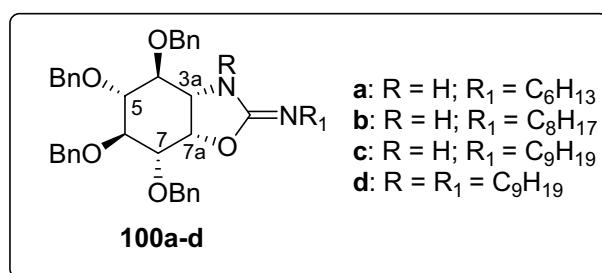
D'acord amb el mètode general, a partir de 148 mg (0.20 mmol) de la tiourea (+)-95c s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 108 mg (0.16 mmol, 77%) de la isourea (-)-99c en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_D^{25}$  -17.7 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>). Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-**99c**. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 691.4111 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4117.

***N*-((3*aR*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7*aR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-3-nonil-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-**99d**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 85 mg (0.10 mmol) de la tiourea (-)-**95d** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 4:1-1:1) del cru, 60 mg (0.07 mmol, 73%) de la isourea (-)-**99d** en forma d'oli incolor.

$[\alpha]_D^{25}$  -25.3 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film):  $\nu$ =3087, 3061, 3030, 2925, 2852, 1706, 1452, 1359, 1068, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.87-0.94 (m, 6H), 1.14-1.38 (m, 24H), 1.43-1.60 (m, 4H), 1.97-2.11 (m, 1H), 2.68-2.81 (m, 1H), 3.24 (t, 2H, *J*=7.2 Hz), 3.62 (dd, 1H, *J*=10.4, 4.9 Hz), 3.68 (t, 1H, *J*=2.9 Hz), 3.91 (dd, 1H, *J*=3.2, 4.5 Hz), 3.93-4.02 (m, 1H), 4.19-4.28 (m, 1H), 4.38-4.88 (m, 9H), 7.21-7.43 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 22.82, 27.5, 29.4, 29.4, 29.5, 29.7, 29.8, 29.8, 32.0, 32.1, 43.3, 46.0, 56.5, 72.5, 73.0, 74.0, 74.4, 77.3, 80.2, 82.0, 127.8-128.7, 137.8, 138.4, 153.2. HRMS calculat per C<sub>53</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 817.5519 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 817.5555.



***N*-((3*aSR*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7*aSR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)hexan-1-amina ((±)-**100a**)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 90 mg (0.14 mmol) de la tiourea (±)-**96a** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 72 mg (0.11 mmol, 85%) de la isourea (±)-**100a** en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu$ =3337, 3082, 3061, 3028, 2926, 2856, 1718, 1671, 1455, 1094, 1069, 1024, 697 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.86 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.34 (m, 6H,

3xCH<sub>2</sub>), 1.43-1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.14 (t, 2H, *J*=7.2 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.74 (t, 1H, *J*=5.2 Hz, H-5), 3.88 (t, 1H, *J*=5.0 Hz, H-4), 3.90 (dd, 1H, *J*=4.8, 8.2 Hz, H-6), 4.02 (dd, 1H, *J*=3.4, 8.1 Hz, H-7), 4.23 (dd, 1H, *J*=4.5, 8.7 Hz, H-3a), 4.53-4.82 (m, 9H, H-7a, 4xPhCH<sub>2</sub>O), 7.25-7.41 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>), 67.1 (C3a), 72.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 72.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.1 (C7), 78.8 (C7a), 79.6 (C4), 81.0 (C6), 82.5 (C5), 127.6-128.5 (CHar), 138.3 (2xCar), 138.6 (2xCar), 160.9 (C2). HRMS calculat per C<sub>41</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 649.3641 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 649.3670.

***N*-((3a*SR*,4*SR*,5*SRS*,6*SR*,7*SR*,7a*SR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobencodioxazol-2(3*H*)-iliden)octan-1-amina ((±)-100b)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 120 mg (0.17 mmol) de la tiourea (±)-**96b** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 96 mg (0.14 mmol, 84%) de la isourea (±)-**100b** en forma d'oli incolor.

IR (film): ν=3330, 3088, 3063, 3030, 2926, 2855, 1719, 1672, 1454, 1093, 1069, 1028, 697 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H, *J*=7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.19-1.35 (m, 10H, 5xCH<sub>2</sub>), 1.43-1.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.14 (t, 2H, *J*=7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.73 (t, 1H, *J*=5.2 Hz, H-5), 3.88 (t, 1H, *J*=5.0 Hz, H-4), 3.90 (dd, 1H, *J*=5.0, 8.3 Hz, H-6), 4.01 (dd, 1H, *J*=3.4, 8.2 Hz, H-7), 4.23 (dd, 1H, *J*=4.6, 8.7 Hz, H-3a), 4.53-4.83 (m, 9H, H-7a, 4xPhCH<sub>2</sub>O), 7.25-7.37 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 26.9 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (2xCH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>), 67.2 (C3a), 72.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 72.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.3 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.1 (C7), 78.7 (C7a), 79.7 (C4), 81.0 (C6), 82.5 (C5), 127.6-128.5 (CHar), 138.3 (Car), 138.58 (Car), 138.60 (Car), 160.9 (Car). HRMS calculat per C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 677.3954 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 677.3946.

***N*-((3a*SR*,4*SR*,5*SRS*,6*SR*,7*SR*,7a*SR*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobencodioxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((±)-100c)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 125 mg (0.17 mmol) de la tiourea (±)-**96c** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 112 mg (0.15 mmol, 90%) de la isourea (±)-**100c** en forma d'oli incolor.

IR (film): ν=3330, 3086, 3063, 3030, 2926, 2854, 1718, 1671, 1454, 1092, 1069, 1028, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H, *J*=7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.34 (m, 12H,



6xCH<sub>2</sub>), 1.41-1.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.14 (t, 2H, *J*=7.2 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.73 (t, 1H, *J*=5.2 Hz, H-5), 3.87 (t, 1H, *J*=5.0 Hz, H-4), 3.89 (dd, 1H, *J*=4.9, 8.2 Hz, H-6), 4.01 (dd, 1H, *J*=3.4, 8.2 Hz, H-7), 4.22 (dd, 1H, *J*=4.6, 8.7 Hz, H-3a), 4.52-4.82 (m, 9H, H-7a, 4xPhCH<sub>2</sub>O), 7.25-7.41 (m, 20H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 26.9 (CH<sub>2</sub>), 29.37 (CH<sub>2</sub>), 29.40 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>), 67.3 (C3a), 72.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 72.8 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.2 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.7 (PhCH<sub>2</sub>O), 77.1 (C7), 78.7 (C7a), 79.7 (C4), 81.0 (C6), 82.5 (C5), 127.6-128.5 (CHar), 138.3 (Car), 138.57 (Car), 138.59 (Car), 160.8 (C2). HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 691.4111 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4120.

***N*-((3a*S*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7a*S*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-100c)**

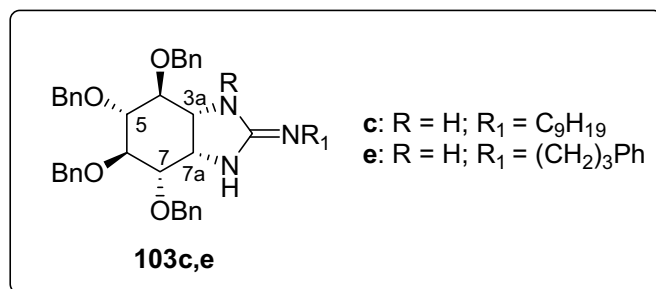
D'acord amb el mètode general, a partir de 130 mg (0.18 mmol) de la tiourea (+)-**96c** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 2:1-1:2) del cru, 112 mg (0.16 mmol, 89%) de la isourea (-)-**100c** en forma d'oli incolor.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -2.4 (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>). Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-**100c**. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 691.4111 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 691.4140.

***N*-((3a*S*,4*S*,5*R*,6*S*,7*S*,7a*S*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-3-nonil-hexahidrobenzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-100d)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 82 mg (0.10 mmol) de la tiourea (+)-**96d** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (hexà/AcOEt 6:1-2:1) del cru, 70 mg (0.09 mmol, 90%) de la isourea (-)-**100d** en forma d'oli incolor.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -10.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film): ν=3087, 3063, 3030, 2924, 2854, 1708, 1454, 1359, 1068, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.87-0.94 (m, 6H), 1.04-1.38 (m, 24H), 1.41-1.61 (m, 4H), 3.00-3.11 (m, 1H), 3.24-3.32 (m, 2H), 3.48-3.60 (m, 1H), 3.63 (dd, 1H, *J*=6.0, 7.6 Hz), 3.73-3.82 (m, 1H), 3.87 (t, 1H, *J*=5.8 Hz), 3.89-3.97 (m, 2H), 4.55-5.01 (m, 9H), 7.21-7.43 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 22.82, 22.84, 26.8, 27.0, 29.4, 29.5, 29.67, 29.74, 29.8, 29.9, 32.06, 32.1, 43.9, 46.7, 58.9, 73.1, 73.6, 74.0, 74.1, 77.4, 80.1, 81.0, 83.5, 127.7-128.6, 138.2, 138.3, 153.2. HRMS calculat per C<sub>53</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 817.5519 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 817.5549.



***N*-((3*aR*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,7*aS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-iliden)nonan-1-amina ((-)-103c)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 100 mg (0.13 mmol) d'una mescla de les tiourees **101c-102c** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1-8:1 i 3% NH<sub>3</sub>) del cru, 70 mg (0.10 mmol, 70%) de la guanidina (-)-**103c** en forma d'oli incolor.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -21.7 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film): ν=3330, 3082, 3064, 3030, 2925, 2855, 1682, 1454, 1088, 1068, 1028, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (t, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.17-1.36 (m, 12H), 1.41-1.52 (m, 2H), 3.01 (t, 2H, *J*=6.9 Hz), 3.56 (t, 1H, *J*=7.2 Hz), 3.75-3.86 (m, 4H), 4.11 (dd, 1H, *J*=3.8, 7.7 Hz), 4.62-4.83 (m, 8H), 7.18-7.39 (m, 20H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 27.8, 27.1, 29.4, 29.5, 29.7, 30.2, 32.0, 43.3, 59.9, 62.8, 73.3, 73.7, 73.9, 74.0, 77.4, 78.3, 81.7, 82.0, 83.6, 127.6-128.5, 138.66, 138.75, 138.8, 139.1, 160.7. HRMS calculat per C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 690.4271 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 690.4284.

**3-fenil-*N*-((3*aR*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,7*aS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-iliden)propan-1-amina ((-)-103e)**

D'acord amb el mètode general, a partir de 75 mg (0.10 mmol) d'una mescla de les tiourees **101e-102e** s'obtingueren, després d'una purificació per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1-15:1 i 1% NH<sub>3</sub>) del cru, 55 mg (0.08 mmol, 79%) de la guanidina (-)-**103e** en forma d'oli incolor.

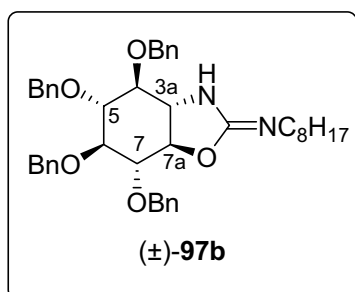
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -16.4 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR (film): ν=3330, 3082, 3069, 3030, 2924, 2853, 1682, 1454, 1088, 1069, 1027, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.83 (p, 2H, *J*=7.2 Hz), 2.64 (t, 2H, *J*=7.7 Hz), 2.94-3.10 (m, 2H), 3.59 (t, 1H, *J*=6.9 Hz), 3.74-3.91 (m, 4H), 4.13 (d, 1H, *J*=5.2 Hz), 4.62-4.83 (m, 8H), 7.13-7.41 (m, 25H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 31.5,

33.2, 42.7, 59.1, 62.0, 73.4, 73.8, 73.9, 77.4, 78.0, 81.4, 81.6, 83.4, 126.0, 127.6-128.5, 138.5, 138.6, 138.7, 139.0, 141.6, 160.2. HRMS calculat per  $C_{44}H_{48}N_3O_4$ : 682.3645  $[M+H]^+$ . Trobat: 682.3633.

#### 8.1.5.6 Síntesi de l'*N*-((3*aSR*,4*SR*,5*RS*,6*SR*,7*SR*,7*aRS*)-4,5,6,7-tetrabenziloxi-hexahidro-benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-iliden)octan-1-amina ((±)-**97b**)

Una dissolució de la urea (±)-**104** (130 mg, 0.19 mmol) en 3 mL de  $CH_2Cl_2$  es va refredar a  $-40\text{ }^\circ C$  i s'hi van afegir, sota atmosfera d'argó, 60  $\mu L$  de piridina (0.74 mmol) i 42  $\mu L$  (0.25 mmol) d'anhidrid triflic. Es deixà la mescla amb agitació a  $-40\text{ }^\circ C$  durant 1 h (control CCF). Tot seguit la solució es va diluir amb més  $CH_2Cl_2$  (15 mL) i es va fer un rentat amb una solució saturada de  $NaHCO_3$ . Després de separar les fases, la fase aquosa s'extragué amb  $CH_2Cl_2$  (3 x 15 mL), a continuació es van ajuntar les fases orgàniques i es van assecar sobre  $Na_2SO_4$ . Després de filtrar es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el cru es purificà per cromatografia en columna *flash* (hexà/ $AcOEt$  10:1-1:1) i es van obtenir 85 mg (0.12 mmol, 65%) de la isourea (±)-**97b** en forma d'oli incolor.

IR (film):  $\nu=3318, 3089, 3063, 3031, 2924, 2854, 1707, 1654, 1454, 1357, 1065, 1027, 696\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $CDCl_3$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $CH_3$ ), 1.17-1.42 (m, 10H,



5x $CH_2$ ), 1.51-1.63 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3.21-3.30 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.51 (dd, 1H,  $J=10.5, 12.2$  Hz, H-3a), 3.62-3.73 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.84 (dd, 1H,  $J=12.2, 10.3$  Hz, H-7a), 3.90-3.96 (m, 1H, H-7), 4.71-4.96 (m, 7H,  $PhCH_2O$ ), 5.15 (d, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $PhCH_2O$ ), 7.21-7.47 (m, 20H, Ph);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $CDCl_3$ ): 14.2 ( $CH_3$ ), 22.8 ( $CH_2$ ), 27.0 ( $CH_2$ ), 29.37

( $CH_2$ ), 29.43 ( $CH_2$ ), 30.2 ( $CH_2$ ), 32.0 ( $CH_2$ ), 43.3 ( $NCH_2$ ), 68.3 ( $C3a$ ), 73.09 ( $PhCH_2O$ ), 73.14 ( $PhCH_2O$ ), 75.9 ( $PhCH_2O$ ), 76.0 ( $PhCH_2O$ ), 80.9 ( $C7$ ), 81.7 ( $C4$ ), 83.7 ( $C7a$ ), 85.0 ( $C6$  or  $C5$ ), 85.9 ( $C6$  or  $C5$ ), 127.5-128.5 ( $CHar$ ), 138.5 ( $Car$ ), 138.8 ( $Car$ ), 138.9 ( $Car$ ), 139.2 ( $Car$ ), 162.9 ( $C2$ ). HRMS calculat per  $C_{43}H_{53}N_2O_5$ : 677.3954  $[M+H]^+$ . Trobat: 677.3924.

#### 8.1.5.7 Síntesi de les isourees bicíclicues (±)-**86a-c** per hidrogenòlisi utilitzant com a catalitzador $Pd(OH)_2$

*Mètode general:* En un tub a pressió, es va dissoldre la isourea bicíclica *O*-benzilada (0.12 mmol) en 3 mL d'etanol i s'hi van afegir 65 mg de  $Pd(OH)_2$  (20%, Degussa). El sistema



$^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24-1.41 (m, 10H,  $5\times\text{CH}_2$ ), 1.48-1.58 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.10-3.16 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.20-3.32 (m, 3H, H-3a, H-5, H-6), 3.42-3.46 (m, 1H, H-4), 3.62 (dd, 1H,  $J=10.3, 12.3$  Hz, H-2), 3.72-3.76 (m, 1H, H-7);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 28.0 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2$ ), 33.0 ( $\text{CH}_2$ ), 43.6 ( $\text{NCH}_2$ ), 68.5 (C3a), 73.8 (C7), 74.8 (C4), 79.0 (C5 or C6), 80.1 (C5 or C6), 84.7 (C7a), 165.4 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ : 317.2076  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 317.2057.

**(3aSR,4SR,5RS,6SR,7RS,7aRS)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-86c)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups benzil, a partir de 80 mg (0.11 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-97c s'obtingueren 32 mg (0.10 mmol, 85%) de la isourea bicíclica (±)-86c.

$^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.92 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24-1.41 (m, 12H,  $6\times\text{CH}_2$ ), 1.50-1.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.15-3.19 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.20-3.36 (m, 3H, H-3a, H-5, H-6), 3.44-3.52 (m, 1H, H-4), 3.70-3.80 (m, 2H, H-2, H-7);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.9 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ ), 30.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2$ ), 33.1 ( $\text{CH}_2$ ), 43.7 ( $\text{NCH}_2$ ), 68.1 (C3a), 73.7 (C7), 74.6 (C4), 79.0 (C5 or C6), 80.1 (C5 or C6), 84.8 (C7a), 165.5 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$ : 331.2233  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 331.2223.

**(3aS,4S,5R,6S,7R,7aR)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((-)-86c)**

D'acord amb el mètode general de la hidrogenòlisi per a la desprotecció dels grups benzil, a partir de 84 mg (0.12 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (-)-97c s'obtingueren 32 mg (0.10 mmol, 81%) de la isourea bicíclica (-)-86c.

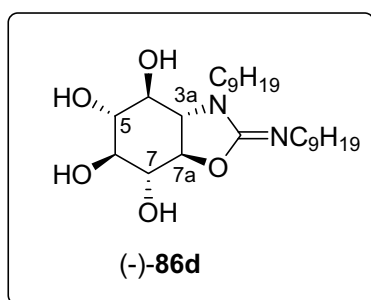
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -17 ( $c$  0.5, MeOH); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-86c. HRMS calculat per  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$ : 331.2233  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 331.2217.

### 8.1.5.8 Reaccions d'O-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>: síntesi de les isourees bicícliques (-)-**86d**, **87-89** i les guanidines bicícliques **90c,e**

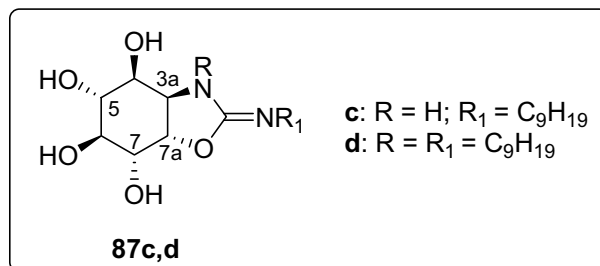
*Mètode general:* En una matràs de forma cònica, es van dissoldre les corresponents isourees o guanidines bicícliques *O*-benzilades (0.12 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre sota atmosfera d'argó. Tot seguit, es va refredar el sistema a -78 °C i es va addicionar, gota a gota, una dissolució de BCl<sub>3</sub> 1M en heptà (2.5 equivalents per cada grup benzil). Després de 2 h, es va pujar la temperatura fins a -40 °C i es mantingué amb agitació durant 5 h. Passat aquest temps, es tornà a refredar el sistema a -78 °C i es van afegir, gota a gota, 2 mL de MeOH. Després d'eliminar els dissolvents a pressió reduïda es va purificar el cru resultant com s'indica a continuació.

#### (3a*S*,4*S*,5*R*,6*S*,7*R*,7a*R*)-3-nonil-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[*d*]oxazol-4,5,6,7-tetraol (-)-**86d**

Es va seguir el procediment general per a l'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>. En aquest cas, es va partir de 100 mg (0.12 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-**97d** i un cop finalitzada la reacció, es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. Tot seguit, al residu resultant s'hi van addicionar uns 5 mL d'AcOEt de qualitat HPLC. Després de deixar el matràs al ultrasons durant 2-3 min, es va observar la formació d'un precipitat blanc. Amb molta cura, es va treure el sobrenedant i, després de repetir el procés de rentat amb AcOEt dos cops més i assecar el sòlid al buit, s'obtingueren 46 mg (0.10 mmol, 84%) de la isourea bicíclica (-)-**86d**.



(-)-**86d**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -12 (*c* 1.0, MeOH); <sup>1</sup>H RMN ( $\delta$ , 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 6H, *J*=6.5 Hz), 1.22-1.43 (m, 24H), 1.56-1.81 (m, 4H), 3.35 (t, 2H, *J*=6.0 Hz), 3.41 (t, 2H, *J*=7.1 Hz), 3.51-3.70 (m, 2H), 3.71-3.84 (m, 2H), 3.85-3.94 (m, 1H), 4.28 (t, 1H, *J*=10.5 Hz); <sup>13</sup>C RMN ( $\delta$ , 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4, 23.7, 27.6, 28.1, 30.3, 30.4, 30.57, 30.62, 33.0, 44.5, 45.7, 63.5, 72.3, 72.9, 78.2, 79.6, 85.5, 163.5. HRMS calculat per C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 457.3641 [M+ H]<sup>+</sup>. Trobat: 457.3643.



**(3aRS,4SR,5RS,6SR,7RS,7aSR)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-87c)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 57 mg (0.08 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-**98c**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1-8:1), s'obtingueren 14 mg (0.04 mmol, 50%) de la isourea bicíclica (±)-**87c**.

(±)-**87c**: Sòlid blanc; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 3H, *J*=6.9 Hz), 1.23-1.43 (m, 12H), 1.59-1.68 (m, 2H), 3.21-3.33 (m, 2H), 3.93-3.96 (m, 1H), 4.02-4.05 (m, 1H), 4.33-4.37 (m, 1H), 4.41-4.45 (m, 1H), 4.56 (d, 1H, *J*=12.8 Hz), 5.15 (d, 1H, *J*=12.0 Hz); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, D<sub>2</sub>O): 0.88 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.15-1.43 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.57-1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.27-3.47 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.04 (t, 1H, *J*=3.0 Hz, H-5), 4.12 (t, 1H, *J*=3.5 Hz, H-6), 4.42-4.48 (m, 1H, H-4), 4.52 (d, 1H, *J*=14.2 Hz, H-3a), 4.55-4.60 (m, 1H, H-7), 5.11 (d, 1H, *J*=12.9 Hz, H-7a); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (2xCH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 44.0 (NCH<sub>2</sub>), 56.7 (C3a), 71.1 (C7), 71.9 (C4), 75.3 (C5), 76.4 (C6), 84.5 (C7a), 164.4 (C2). HRMS calculat per C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 331.2233 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 331.2229.

**(3aR,4S,5R,6S,7R,7aS)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((+)-87c)**

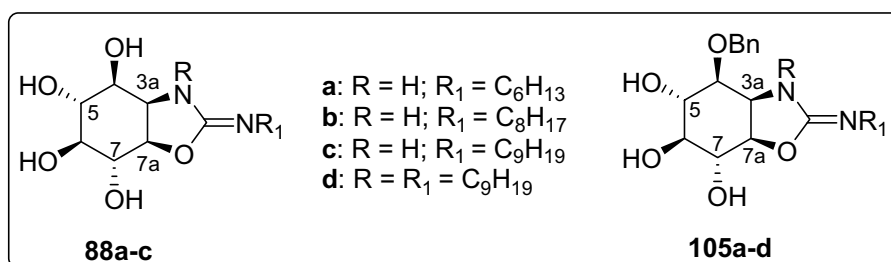
D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 70 mg (0.10 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (+)-**98c**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1-8:1), s'obtingueren 25 mg (0.08 mmol, 79%) de la isourea bicíclica (+)-**87c**.

(+)-**87c**: Sòlid blanc; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>+8.8 (*c* 1.0, MeOH); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-**87c**. HRMS calculat per C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 331.2233 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 331.2220.

**(3aR,4S,5R,6S,7R,7aS)-3-nonil-2-(nonilimino)-octahidrobencodioxazol-4,5,6,7-tetraol ((+)-87d)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 42 mg (0.05 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (+)-98d, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1-8:1), s'obtingueren 16 mg (0.03 mmol, 69%) de la isourea bicíclica (+)-87d.

(+)-87d: Sòlid blanc; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +12.5 (*c* 1.0, MeOH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.83-0.94 (m, 6H), 1.21-1.44 (m, 24H), 1.59-1.75 (m, 4H), 3.38-3.56 (m, 4H), 3.96-4.00 (m, 1H), 4.04-4.09 (m, 1H), 4.35-4.39 (m, 1H), 4.45-4.50 (m, 1H), 4.53 (dd, 1H, *J*=2.2, 13.3 Hz), 5.15 (dd, 1H, *J*=2.3, 13.2 Hz); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4, 23.7, 27.6, 27.8, 30.26, 30.32, 30.39, 30.44, 30.56, 30.58, 33.0, 44.1, 44.4, 59.0, 70.7, 71.1, 75.2, 76.5, 83.4, 162.6. HRMS calculat per C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 457.3641 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 457.3626.



**(3aRS,4SR,5SR,6SR,7RS,7aRS)-4-(benziloxi)-2-(hexilimino)-octahidrobencodioxazol-5,6,7-triol ((±)-105a) i (3aRS,4SR,5RS,6SR,7RS,7aRS)-2-(hexilimino)-octahidrobencodioxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-88a)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 58 mg (0.09 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-99a, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1-10:1), s'obtingueren 4 mg (0.01 mmol, 13%) de la isourea (±)-105a i 15 mg (0.05 mmol, 58%) de la isourea (±)-88a.

(±)-105a: Sòlid blanc; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.89 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.19-1.36 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 1.45-1.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.15-3.25 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.38 (dd, 1H, *J*=5.7, 10.6 Hz, H-6), 3.66 (t, 1H, *J*=3.3 Hz, H-4), 3.91 (dd, 1H, *J*=3.5, 5.5 Hz, H-5), 4.09 (dd, 1H, *J*=7.1, 10.6 Hz, H-7), 4.48 (dd, 1H, *J*=3.3, 8.5 Hz, H-3a), 4.56 (d, 1H, *J*=11.6 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.81 (d, 1H, *J*=11.5 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.85-4.90 (m, 1H, H-7a), 7.25-7.38 (m, 5H,



Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.3 ( $\text{CH}_3$ ), 23.6 ( $\text{CH}_2$ ), 27.3 ( $\text{CH}_2$ ), 32.5 ( $\text{CH}_2$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 57.7 (C3a), 72.4 (C7), 73.7 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 74.4 (C5), 75.9 (C6), 80.6 (C4), 87.9 (C7a), 128.6 (CHar), 128.9 (CHar), 129.5 (CHar), 139.2 (Car), 163.5 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$ : 379.2233  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 379.2240.

( $\pm$ )-**88a**: Sòlid blanc;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.92 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.25-1.44 (m, 6H,  $3\times\text{CH}_2$ ), 1.56-1.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26-3.34 (m, 3H,  $\text{NCH}_2$ , H-6), 3.66 (t, 1H,  $J=5.6$  Hz, H-5), 3.76-3.80 (m, 1H, H-7), 4.00-4.05 (m, 1H, H-4), 4.42-4.43 (m, 1H, H-3a), 4.87-4.95 (m, 1H, H-7a);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $\text{CH}_2$ ), 32.9 ( $\text{CH}_2$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 58.7 (C3a), 71.7 (C4), 72.9 (C6), 75.6 (C5), 76.5 (C7), 87.8 (C7a), 163.4 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ : 289.1763  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 289.1764.

**(3aRS,4SR,5SR,6SR,7RS,7aRS)-4-(benziloxi)-2-(octilimino)-octahidrobenczo[d]oxazol-5,6,7-triol (( $\pm$ )-105b) i (3aRS,4SR,5RS,6SR,7RS,7aRS)-2-(octilimino)-octahidrobenczo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol (( $\pm$ )-88b)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $\text{BCl}_3$ , a partir de 74 mg (0.11 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada ( $\pm$ )-**99b**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1-10:1), s'obtingueren 9 mg (0.02 mmol, 21%) de la isourea ( $\pm$ )-**105b** i 20 mg (0.06 mmol, 57%) de la isourea ( $\pm$ )-**88b**.

( $\pm$ )-**105b**: Sòlid blanc;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.36 (m, 10H,  $5\times\text{CH}_2$ ), 1.45-1.55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.15-3.25 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.38 (dd, 1H,  $J=5.6, 10.6$  Hz, H-6), 3.68 (t, 1H,  $J=2.9$  Hz, H-4), 3.91 (dd, 1H,  $J=3.4, 5.5$  Hz, H-5), 4.11 (dd, 1H,  $J=7.1, 10.5$  Hz, H-7), 4.50 (dd, 1H,  $J=2.4, 8.4$  Hz, H-3a), 4.56 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 4.82 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 4.85-4.90 (m, 1H, H-7a), 7.25-7.38 (m, 5H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $\text{CH}_2$ ), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ), 32.9 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 57.2 (C3a), 72.3 (C7), 73.7 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 74.3 (C5), 75.9 (C6), 80.5 (C4), 88.2 (C7a), 128.6 (CHar), 128.9 (CHar), 129.5 (CHar), 139.2 (Car), 163.5 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$ : 407.2546  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 407.2539

( $\pm$ )-**88b**: Sòlid blanc;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.23-1.44 (m, 10H,  $5\times\text{CH}_2$ ), 1.56-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26-3.34 (m, 3H,  $\text{NCH}_2$ , H-6), 3.67 (t, 1H,  $J=5.5$  Hz, H-5), 3.81 (t, 1H,  $J=4.2$  Hz, H-7), 4.04 (dd, 1H,  $J=7.2, 9.9$  Hz, H-4), 4.44 (d, 1H,

$J=5.7$  Hz, H-3a), 4.87-4.95 (m, 1H, H-7a);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 0.88 (t, 3H,  $J=6.7$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.19-1.41 (m, 10H,  $5\times\text{CH}_2$ ), 1.57-1.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.29-3.38 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.39-3.45 (m, 1H, H-6), 3.65 (t, 1H,  $J=8.3$  Hz, H-5), 3.86 (dd, 1H,  $J=7.7$ , 10.0 Hz, H-7), 3.93 (dd, 1H,  $J=4.6$ , 8.1 Hz, H-4), 4.57 (dd, 1H,  $J=4.9$ , 7.1 Hz, H-3a), 4.95-5.05 (m, 1H, H-7a);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ), 32.9 ( $\text{CH}_2$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 58.7 (C3a), 71.7 (C4), 72.9 (C6), 75.6 (C5), 76.5 (C7), 87.8 (C7a), 163.4 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ : 317.2076  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 317.2045.

**(3aRS,4SR,5SR,6SR,7RS,7aRS)-4-(benziloxi)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-5,6,7-triol ((±)-105c) i (3aRS,4SR,5RS,6SR,7RS,7aRS)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-88c)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $\text{BCl}_3$ , a partir de 68 mg (0.10 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-**99c**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1-10:1), s'obtingueren 7 mg (0.02 mmol, 18%) de la isourea (±)-**105c** i 17 mg (0.05 mmol, 53%) de la isourea (±)-**88c**.

(±)-**105c**: Sòlid blanc;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.17-1.41 (m, 12H,  $6\times\text{CH}_2$ ), 1.45-1.55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.15-3.26 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.40 (dd, 1H,  $J=5.6$ , 10.4 Hz, H-6), 3.66-3.73 (m, 1H, H-4), 3.88-3.94 (m, 1H, H-5), 4.11 (dd, 1H,  $J=7.1$ , 10.3 Hz, H-7), 4.50 (d, 1H,  $J=8.6$  Hz, H-3a), 4.57 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 4.82 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 4.91 (t, 1H,  $J=7.6$  Hz, H-7a), 7.25-7.42 (m, 5H, Ph);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ), 33.0 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 57.2 (C3a), 72.3 (C7), 73.7 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 74.3 (C5), 75.9 (C6), 80.5 (C4), 88.2 (C7a), 128.6 ( $\text{CHar}$ ), 128.9 ( $\text{CHar}$ ), 129.5 ( $\text{CHar}$ ), 139.2 ( $\text{Car}$ ), 163.5 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$ : 421.2702  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 421.2698.

(±)-**88c**: Sòlid blanc;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.22-1.44 (m, 12H,  $6\times\text{CH}_2$ ), 1.55-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26-3.34 (m, 3H,  $\text{NCH}_2$ , H-6), 3.68 (t, 1H,  $J=5.0$  Hz, H-5), 3.81 (t, 1H,  $J=4.2$  Hz, H-7), 4.05 (dd, 1H,  $J=7.6$ , 9.4 Hz, H-4), 4.44 (d, 1H,  $J=5.7$  Hz, H-3a), 4.87-4.95 (m, 1H, H-7a);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 30.6 ( $\text{CH}_2$ ), 33.0 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 58.7 (C3a), 71.7 (C4), 72.8 (C6), 75.6 (C5), 76.5 (C7), 87.8 (C7a), 163.4 (C2). HRMS calculat per  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$ : 331.2233  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 331.2214.

**(3aR,4S,5S,6S,7R,7aR)-4-(benziloxi)-2-(nonilimino)-octahidrobenczo[d]oxazol-5,6,7-triol ((-)-105c) i (3aR,4S,5R,6S,7R,7aR)-2-(nonilimino)-octahidrobenczo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((-)-88c)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 105 mg (0.15 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (-)-**99c**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1-10:1), s'obtingueren 10 mg (0.02 mmol, 15%) de la isourea (-)-**105c** i 33 mg (0.10 mmol, 66%) de la isourea (-)-**88c**.

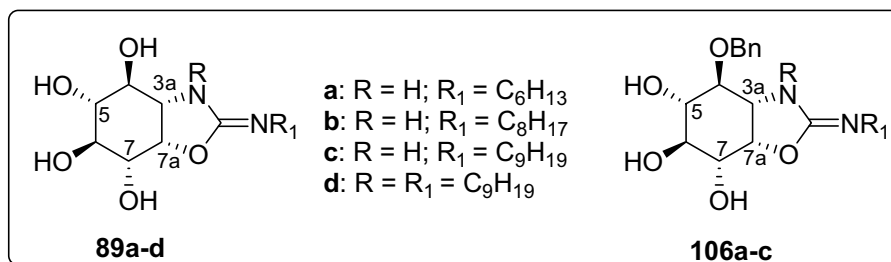
**(-)-105c**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -4.5 (*c* 1.0, MeOH); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-**105c**. HRMS calculat per C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 421.2702 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 421.2689.

**(-)-88c**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -29.6 (*c* 0.6, MeOH); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic (±)-**88c**. HRMS calculat per C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 331.2233 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 331.2235.

**(3aR,4S,5S,6S,7R,7aR)-4-(benziloxi)-3-nonil-2-(nonilimino)-octahidrobenczo[d]oxazol-5,6,7-triol ((-)-105d)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 50 mg (0.06 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (-)-**99d**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50:1-15:1), s'obtingueren 27 mg (0.05 mmol, 81%) de la isourea (-)-**105d**.

**(-)-105d**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -11.4 (*c* 1.0, MeOH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 6H, *J*=6.5 Hz), 1.21-1.37 (m, 24H), 1.47-1.63 (m, 4H), 2.86-2.94 (m, 1H), 3.26-3.36 (m, 3H), 3.42 (dd, 1H, *J*=5.1, 10.9 Hz), 3.78-3.81 (m, 1H), 4.02-4.07 (m, 1H), 4.20 (dd, 1H, *J*=7.1, 10.8 Hz), 4.44 (d, 1H, *J*=11.4 Hz), 4.48 (dd, 1H, *J*=2.8, 8.9 Hz), 4.81 (d, 1H, *J*=11.4 Hz), 4.90 (t, 1H, *J*=7.9 Hz), 7.27-7.42 (m, 5H); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4, 23.7, 27.5, 27.8, 30.24, 30.26, 30.30, 30.34, 30.48, 30.53, 30.56, 32.97, 32.99, 43.8, 44.3, 59.6, 71.8, 72.8, 73.8, 76.1, 77.7, 87.2, 129.32, 129.35 (2), 129.7 (2), 138.7, 161.5. HRMS calculat per C<sub>32</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 547.4111 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 547.4135.



**(3aSR,4SR,5SR,6SR,7RS,7aSR)-4-(benziloxi)-2-(hexilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-5,6,7-triol ((±)-106a) i (3aSR,4SR,5RS,6SR,7RS,7aSR)-2-(hexilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-89a)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 69 mg (0.11 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-**100a**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1-10:1), s'obtingueren 7 mg (0.02 mmol, 18%) de la isourea (±)-**106a** i 19 mg (0.07 mmol, 63%) de la isourea (±)-**89a**.

(±)-**106a**: Sòlid blanc; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.92 (t, 3H, *J*=6.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.29-1.39 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 1.55-1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.21 (dt, 2H, *J*=1.9, 6.8 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.61-3.67 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.97 (dd, 1H, *J*=3.6, 7.4 Hz, H-7), 4.14 (dd, *J*=5.8, 7.7 Hz, H-3a), 4.74 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.84 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.95-5.01 (m, 1H, H-7a), 7.26-7.43 (m, 5H, Ph); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, D<sub>2</sub>O): 0.93 (t, 3H, *J*=6.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.31-1.43 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 1.58-1.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.21-3.31 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.65 (t, 1H, *J*=7.9 Hz, H-4), 3.69 (t, 1H, *J*=8.4 Hz, H-5), 3.73 (t, 1H, *J*=8.3 Hz, H-6), 4.08 (dd, 1H, *J*=3.7, 9.1 Hz, H-7), 4.21 (t, 1H, *J*=6.6 Hz, H-3a), 4.86 (d, 1H, *J*=11.3 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.93 (d, 1H, *J*=11.3 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 5.10-5.16 (m, 1H, H-7a), 7.46-7.58 (m, 5H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 32.6 (CH<sub>2</sub>), 43.8 (NCH<sub>2</sub>), 62.5 (C3a), 71.1 (C7), 74.3 (C6), 75.3 (C5), 76.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 82.7 (C4), 84.2 (C7a), 128.7 (CHar), 129.1 (CHar), 129.3 (CHar), 139.7 (Car), 163.4 (C2). HRMS calculat per C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 379.2233 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 379.2214.

(±)-**89a**: Sòlid blanc; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.92 (t, 3H, *J*=6.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25-1.44 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 1.55-1.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23-3.33 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.34-3.38 (m, 1H, H-5), 3.66 (t, 1H, *J*=6.1 Hz, H-6), 3.81 (dd, 1H, *J*=7.5, 9.0 Hz, H-4), 3.95-4.05 (m, 1H, H-7), 4.09-4.12 (m, 1H, H-3a), 5.11-5.24 (m, 1H, H-7a); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.3 (CH<sub>3</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>), 27.3 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>), 44.0 (NCH<sub>2</sub>), 61.5 (C3a), 71.4 (C7), 74.5 (C6),

75.8 (C5), 76.6 (C4), 84.5 (C7a), 163.2 (C2). HRMS calculat per  $C_{13}H_{25}N_2O_5$ : 289.1763  $[M+H]^+$ . Trobat: 289.1739.

**(3aSR,4SR,5SR,6SR,7RS,7aSR)-4-(benziloxi)-2-(octilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-5,6,7-triol ((±)-106b) i (3aSR,4SR,5RS,6SR,7RS,7aSR)-2-(octilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-89b)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb  $BCl_3$ , a partir de 83 mg (0.12 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada ((±)-**100b**), després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* ( $CH_2Cl_2/MeOH$  20:1-10:1), s'obtingueren 7 mg (0.02 mmol, 15%) de la isourea ((±)-**106b**) i 26 mg (0.08 mmol, 67%) de la isourea ((±)-**89b**).

((±)-**106b**: Sòlid blanc;  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $CD_3OD$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=6.8$  Hz,  $CH_3$ ), 1.24-1.53 (m, 10H,  $5xCH_2$ ), 1.52-1.65 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3.24 (t, 2H,  $J=7.0$  Hz,  $NCH_2$ ), 3.64-3.71 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.98 (dd, 1H,  $J=3.6, 7.2$  Hz, H-7), 4.16-4.22 (m, 1H, H-3a), 4.75 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz,  $PhCH_2O$ ), 4.86 (d, 1H,  $J=11.4$  Hz,  $PhCH_2O$ ), 4.99-5.06 (m, 1H, H-7a), 7.26-7.43 (m, 5H, Ph);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $CD_3OD$ ): 14.4 ( $CH_3$ ), 23.7 ( $CH_2$ ), 27.7 ( $CH_2$ ), 30.1 ( $CH_2$ ), 30.33 ( $CH_2$ ), 30.35 ( $CH_2$ ), 33.0 ( $CH_2$ ), 43.8 ( $NCH_2$ ), 61.8 (C3a), 71.0 (C7), 74.3 (C6), 75.5 (C5), 76.5 ( $PhCH_2O$ ), 82.3 (C4), 84.4 (C7a), 128.7 ( $CHar$ ), 129.1 ( $CHar$ ), 129.3 ( $CHar$ ), 139.7 ( $Car$ ), 163.4 (C2). HRMS calculat per  $C_{22}H_{35}N_2O_5$ : 407.2546  $[M+H]^+$ . Trobat: 407.2544.

((±)-**89b**: Sòlid blanc;  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $CD_3OD$ ): 0.91 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz,  $CH_3$ ), 1.24-1.42 (m, 10H,  $5xCH_2$ ), 1.55-1.66 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3.19-3.30 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.35 (dd, 1H,  $J=6.0, 9.2$  Hz, H-5), 3.65 (t, 1H,  $J=6.1$  Hz, H-6), 3.80 (dd, 1H,  $J=7.5, 9.0$  Hz, H-4), 3.95-4.02 (m, 1H, H-7), 4.09 (t, 1H,  $J=7.7$  Hz, H-3a), 5.11-5.21 (m, 1H, H-7a);  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $D_2O$ ): 0.88 (t, 3H,  $J=6.9$  Hz,  $CH_3$ ), 1.24-1.40 (m, 10H,  $5xCH_2$ ), 1.58-1.68 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3.27-3.38 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.42 (t, 1H,  $J=9.0$  Hz, H-5), 3.61 (dd, 1H,  $J=8.0, 9.6$  Hz, H-4), 3.64 (t, 1H,  $J=9.0$  Hz, H-6), 4.05 (dd, 1H,  $J=4.3, 9.3$  Hz, H-7), 4.12 (t, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-3a), 5.18 (dd, 1H,  $J=4.8, 6.7$  Hz, H-7a);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $CD_3OD$ ): 14.5 ( $CH_3$ ), 23.7 ( $CH_2$ ), 27.6 ( $CH_2$ ), 30.3 ( $CH_2$ ), 30.4 ( $CH_2$ ), 33.0 ( $CH_2$ ), 44.0 ( $NCH_2$ ), 61.5 (C3a), 71.5 (C7), 74.5 (C6), 75.9 (C5), 76.6 (C4), 84.6 (C7a), 163.3 (C2). HRMS calculat per  $C_{15}H_{29}N_2O_5$ : 317.2076  $[M+H]^+$ . Trobat: 317.2046.

**(3aSR,4SR,5SR,6SR,7RS,7aSR)-4-(benziloxi)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-5,6,7-triol ((±)-106c) i (3aSR,4SR,5RS,6SR,7RS,7aSR)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((±)-89c)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 100 mg (0.14 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (±)-**100c**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1-10:1), s'obtingueren 7 mg (0.02 mmol, 12%) de la isourea (±)-**106c** i 33 mg (0.10 mmol, 69%) de la isourea (±)-**89c**.

(±)-**106c**: Sòlid blanc; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 3H, *J*=7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.39 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.54-1.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.22 (t, 2H, *J*=7.0 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.61-3.67 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.98 (dd, 1H, *J*=3.6, 7.1 Hz, H-7), 4.14-4.20 (m, 1H, H-3a), 4.74 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.85 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, PhCH<sub>2</sub>O), 4.95-5.05 (m, 1H, H-7a), 7.26-7.43 (m, 5H, Ph); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 30.39 (CH<sub>2</sub>), 30.42 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 43.8 (NCH<sub>2</sub>), 62.0 (C3a), 71.0 (C7), 74.3 (C6), 75.4 (C5), 76.5 (PhCH<sub>2</sub>O), 82.5 (C4), 84.3 (C7a), 128.7 (CHar), 129.1 (CHar), 129.3 (CHar), 139.7 (Car), 163.4 (C2). HRMS calculat per C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 421.2702 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 421.2682.

(±)-**89c**: Sòlid blanc; <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25-1.42 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.57-1.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.25-3.30 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.34-3.38 (m, 1H, H-5), 3.66 (t, 1H, *J*=6.0 Hz, H-6), 3.81 (t, 1H, *J*=8.3 Hz, H-4), 3.97-4.04 (m, 1H, H-7), 4.09-4.14 (m, 1H, H-3a), 5.13-5.24 (m, 1H, H-7a); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 44.0 (NCH<sub>2</sub>), 61.4 (C3a), 71.4 (C7), 74.5 (C6), 75.8 (C5), 76.5 (C4), 84.5 (C7a), 163.2 (C2). HRMS calculat per C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 331.2233 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 331.2223.

**(3aS,4S,5S,6S,7R,7aS)-4-(benziloxi)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-5,6,7-triol ((+)-106c) i (3aS,4S,5R,6S,7R,7aS)-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((+)-89c)**

D'acord amb el mètode general de la reacció d'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>, a partir de 112 mg (0.16 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (-)-**100c**, després de purificar el cru de reacció per cromatografia en columna *flash* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1-10:1), s'obtingueren 10 mg (0.02 mmol, 14%) de la isourea (+)-**106c** i 36 mg (0.11 mmol, 68%) de la isourea (+)-**89c**.

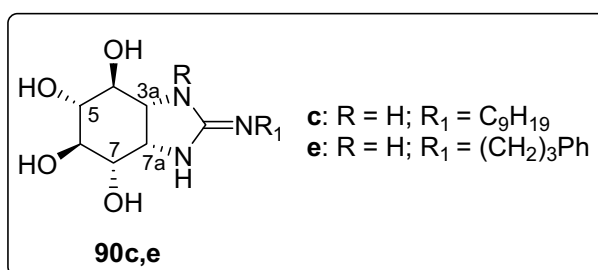
(+)-**106c**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25} +10.7$  (*c* 0.9, MeOH); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic ( $\pm$ )-**106c**. HRMS calculat per  $C_{23}H_{37}N_2O_5$ : 421.2702  $[M+H]^+$ . Trobat: 421.2704.

(+)-**89c**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25} +16.2$  (*c* 0.9, MeOH); Les dades espectroscòpiques obtingudes coincideixen amb les del producte racèmic ( $\pm$ )-**89c**. HRMS calculat per  $C_{16}H_{31}N_2O_5$ : 331.2233  $[M+H]^+$ . Trobat: 331.2235.

**(3a*S*,4*S*,5*R*,6*S*,7*R*,7a*S*)-3-nonil-2-(nonilimino)-octahidrobenczo[*d*]oxazol-4,5,6,7-tetraol**  
**(+)-89d**

Es va seguir el procediment general per a l'*O*-desbenzilació amb  $BCl_3$ . En aquest cas, es va partir de 57 mg (0.07 mmol) de la isourea bicíclica *O*-benzilada (-)-**100d** i un cop finalitzada la reacció, es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. Tot seguit, al residu resultant s'hi van afegir uns 5 mL d'AcOEt de qualitat HPLC. Després de deixar al ultrasons el matràs durant 2-3 min, es va observar la formació d'un precipitat blanc. Amb molta cura, es va treure el sobrenedant i, després de repetir el procés de rentat amb AcOEt dos cops més i assecat el sòlid al buit, s'obtingueren 29 mg (0.06 mmol, 90%) de la isourea bicíclica (+)-**89d**.

(+)-**89d**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25} +8.4$  (*c* 1.0, MeOH);  $^1H$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $CD_3OD$ ): 0.90 (t, 6H,  $J=6.8$  Hz), 1.23-1.42 (m, 24H), 1.57-1.83 (m, 4H), 3.31-3.34 (m, 1H), 3.36-3.44 (m, 2H), 3.53-3.62 (m, 2H), 3.64 (t, 1H,  $J=5.9$  Hz), 3.95 (dd, 1H,  $J=7.5, 9.6$  Hz), 3.98 (dd, 1H,  $J=3.8, 5.4$  Hz), 4.17 (t, 1H,  $J=7.9$  Hz), 5.16 (dd, 1H,  $J=3.4, 8.4$  Hz);  $^{13}C$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $CD_3OD$ ): 14.4, 23.7, 27.5, 27.6, 30.32, 30.34, 30.56, 30.58, 33.0, 44.3, 45.0, 64.0, 71.8, 73.1, 75.8, 76.6, 83.0, 161.1. HRMS calculat per  $C_{25}H_{49}N_2O_5$ : 457.3641  $[M+H]^+$ . Trobat: 457.3658.



**(3aR,4S,5R,6R,7S,7aS)-2-(nonilimino)-octahidro-1H-benzo[d]imidazol-4,5,6,7-tetraol ((-)-90c)**

Es va seguir el procediment general per a l'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>. En aquest cas, es va partir de 70 mg (0.10 mmol) de la guanidina bicíclica *O*-benzilada (-)-**103c** i un cop finalitzada la reacció, es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. Tot seguit, al residu resultant s'hi van afegir 5 mL d'AcOEt de qualitat HPLC. Després de deixar al ultrasons el matràs durant 2-3 min, es va observar la formació d'un precipitat blanc. Amb molta cura, es va treure el sobrenedant i, després de repetir el procés de rentat amb AcOEt dos cops més i assecat el sòlid al buit, s'obtingueren 28 mg (0.09 mmol, 85%) de la guanidina bicíclica (-)-**90c**.

(-)-**90c**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -14.5 (*c* 1.0, MeOH); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.90 (t, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.22-1.42 (m, 12H), 1.55-1.64 (m, 2H), 3.17-3.28 (m, 3H), 3.42-3.56 (m, 2H), 3.71-3.83 (m, 2H), 4.15-4.27 (m, 1H); <sup>1</sup>H RMN (δ, 500 MHz, D<sub>2</sub>O): 1.05 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.40-1.56 (m, 12H, 6xCH<sub>2</sub>), 1.73-1.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.44 (t, 2H, *J*=6.9 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.52 (t, 1H, *J*=9.6 Hz, H-5), 3.71 (dd, 1H, *J*=8.6, 9.5 Hz, H-4), 3.76 (t, 1H, *J*=9.3 Hz, H-6), 4.02 (t, 1H, *J*=7.3 Hz, H-3a), 4.07 (dd, 1H, *J*=4.9, 9.3 Hz, H-7), 4.47 (t, 1H, *J*=5.3 Hz, H-7a); <sup>13</sup>C RMN (δ, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14.4 (CH<sub>3</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (2xCH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 44.0 (NCH<sub>2</sub>), 60.0 (C3a), 60.9 (C7a), 71.6 (C7), 74.9 (C6), 75.2 (C5), 76.1 (C4), 160.9 (C2). HRMS calculat per C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 330.2393 [M+H]<sup>+</sup>. Trobat: 330.2386.

**(3aR,4S,5R,6R,7S,7aS)-2-(3-fenilpropilimino)-octahidro-1H-benzo[d]imidazol-4,5,6,7-tetraol ((-)-90e)**

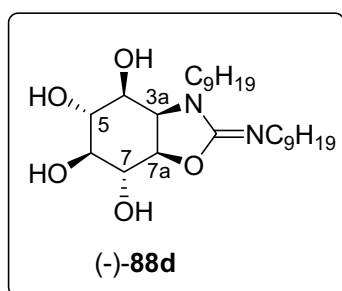
Es va seguir el procediment general per a l'*O*-desbenzilació amb BCl<sub>3</sub>. En aquest cas, es va partir de 50 mg (0.07 mmol) de la guanidina bicíclica *O*-benzilada (-)-**103e** i un cop finalitzada la reacció, es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. Tot seguit, al residu resultant s'hi van afegir 5 mL d'AcOEt de qualitat HPLC. Després de deixar al ultrasons el matràs durant 2-3 min, es va observar la formació d'un precipitat blanc. Amb molta cura, es va treure el sobrenedant i, després de repetir el procés de rentat amb AcOEt dos cops més i assecat el sòlid al buit, s'obtingueren 19 mg (0.06 mmol, 83%) de la guanidina bicíclica (-)-**90e**.



(-)-**90e**: Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -8.2 (*c* 1.0, MeOH);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.90-1.96 (m, 2H), 2.70 (t, 2H,  $J=7.7$  Hz), 3.18-3.30 (m, 3H), 3.47-3.59 (m, 2H), 3.73-3.83 (m, 2H), 4.17-4.26 (m, 1H), 7.14-7.34 (m, 5H);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 2.11-2.17 (m, 2H), 2.91 (t, 2H,  $J=7.3$  Hz), 3.45 (t, 2H,  $J=6.7$  Hz), 3.50 (t, 1H,  $J=9.7$  Hz), 3.66 (t, 1H,  $J=9.0$  Hz), 3.73 (t, 1H,  $J=9.0$  Hz), 3.98 (t, 1H,  $J=7.3$  Hz), 4.04 (dd, 1H,  $J=4.9, 8.8$  Hz), 4.38-4.48 (m, 1H), 7.42-7.63 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 31.8, 33.6, 43.4, 60.0, 60.9, 71.6, 75.0, 75.2, 76.1, 127.2, 129.39, 129.42, 129.6, 142.3, 160.9. HRMS calculat per  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$ : 322.1767  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 322.1771.

### 8.1.5.9 Síntesi del (3aR,4S,5R,6S,7R,7aR)-3-nonil-2-(nonilimino)-octahidrobenzo[d]oxazol-4,5,6,7-tetraol ((-)-**88d**)

En un tub a pressió, es va dissoldre la isourea bicíclica (-)-**105d** (25 mg, 0.04 mmol) en 3 mL de MeOH i s'hi van afegir 5 mg de Pd/C (5-15%) El sistema es va purgar amb quatre cicles de buit i hidrogen, deixant finalment una pressió de 2 atm d' $\text{H}_2$ . Es deixà el sistema amb agitació vigorosa a t.a. durant 20 h. Passat aquest temps, es filtrà la mescla resultant sobre Celite<sup>®</sup> per tal de separar el catalitzador, es rentà amb 15 mL de MeOH i s'eliminà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna *flash* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1-8:1). D'aquesta manera s'obtingueren 10 mg (0.02 mmol, 45%) de la isourea bicíclica (-)-**88d** i es recuperà part del producte de partida (-)-**105d**.



(-)-**88d**: (10 mg, 0.02 mmol, 45 %); Sòlid blanc;  $[\alpha]_D^{25}$  -15.2 (*c* 1.0, MeOH);  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0.90 (t, 6H,  $J=6.3$  Hz), 1.19-1.45 (m, 24H), 1.57-1.79 (m, 4H), 3.34-3.41 (m, 4H), 3.47-3.55 (m, 1H), 3.77-3.83 (m, 1H), 3.91-3.96 (m, 1H), 4.25 (dd, 1H,  $J=7.3, 10.6$  Hz), 4.41 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz), 4.89 (t, 1H,  $J=8.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta$ , 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 14.4, 23.7, 27.5, 27.7, 27.8, 30.27, 30.33, 30.5, 30.6, 33.0, 44.0, 44.3, 60.5, 70.2, 72.0, 76.3, 77.8, 87.1, 161.6. HRMS calculat per  $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_5$ : 457.3641  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Trobat: 457.3624.

## 8.2 Estudis biològics

### 8.2.1 Materials i mètodes en cèl·lules

Els enzims i substrats utilitzats en els assaigs d'inhibició van ser els següents:

- *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosid (Sigma)
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosid (Sigma)
- *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosid (Sigma)
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosid (Sigma)
- 4-metilumbel·liferil- $\alpha$ -D-galactopiranosid (Sigma)
- 4-metilumbel·liferil- $\beta$ -D-galactopiranosid (Sigma)
- 4-metilumbel·liferil- $\beta$ -D-glucopiranosid (Sigma)
- 4-metilumbel·liferil- $\alpha$ -D-glucopiranosid (Sigma)
- $\alpha$ -glucosidasa de llevat de pa (EC 3.2.1.20, Sigma)
- $\alpha$ -glucosidasa d'arròs (EC 3.2.1.20, Sigma)
- $\beta$ -glucosidasa d'ametlla (EC 3.2.1.21, Sigma)
- $\alpha$ -galactosidasa de gra verd de cafè (EC 3.2.1.22, Sigma)
- $\beta$ -galactosidasa de fetge de bou (EC 3.2.1.23, Sigma)
- Imiglucerasa (Cerezyme<sup>®</sup>, Genzyme)

La manipulació de cultius cel·lulars implica l'adopció de tota una sèrie de mesures per poder garantir al màxim les condicions d'esterilitat necessàries. Tant el material que entra en contacte amb les cèl·lules com la superfície de treball han de ser estèrils, per això és necessari treballar sota una campana de flux laminar prèviament esterilitzada amb radiacions ultraviolades i tots els medis de cultius, solucions i materials han de ser estèrils de tal manera que es pugui mantenir la viabilitat i esterilitat del cultiu.

El cultiu de totes les cèl·lules es va realitzar en un entorn estèril gràcies a l'ús de campanes de flux laminar vertical amb sistema de llum ultraviolada. Les cèl·lules es van cultivar en flascons de fons adherent i es va utilitzar un incubador a 37 °C amb una atmosfera amb un 5% de CO<sub>2</sub>.

Els fibroblasts wt d'humans (Eucellbank, Universitat de Barcelona) van ser cultivats en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) que contenia un 10% de FBS (Invitrogen) i un 1% d'antibiòtic (100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina). Quan s'observava que les cèl·lules eren confluents (cada 3-4 dies), es

procedia a la seva divisió. S'aspirava el medi i es rentaven les cèl·lules amb PBS. Després s'afegí Tripsina-EDTA 1x i es deixaven durant 2 minuts en contacte amb les cèl·lules a l'incubador. Passat aquest temps, es podia observar com les cèl·lules es despenien del fons del flascó. Tot seguit, s'afegia medi de cultiu en la quantitat necessària, es barrejava bé i es repartia en els diferents flascons. Les cèl·lules s'han utilitzat entre els 14 i 30 passatges.

Els limfoblasts de malats de Gaucher amb les mutacions N370S (GM10873, Coriell Cell Repositories) o L444P (GM08752, Coriell Cell Repositories) en el gen precursor de la GCCase es van créixer en suspensió i en medi de cultiu RPMI-1640 (Gibco) que es va suplementar amb un 20% de FBS (Invitrogen) i un 1% d'antibiòtic (100 U/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina). Per a la seva divisió, les cèl·lules es van treure del flascó i es disposaven en tubs Falcon. Els tubs es centrifugaven a 1300 rpm durant 3 min a 4 °C. Seguidament s'eliminà el sobrenedant i les cèl·lules de cada tub es van resuspendre amb 10 mL de medi nou. Tot seguit es contaven el nombre de cèl·lules utilitzant un hematòmetre Neubauer i la tinció amb Tripán blue. Les cèl·lules es tornaven a posar al flascó amb el medi necessari per tenir una densitat de  $3 \times 10^5$  cèl·lules/mL. Les cèl·lules s'han utilitzat entre els 5 i 16 passatges.

### 8.2.2 Estudis d'inactivació amb el CBE, el ciclofelitol i l'1R,6S-epi-ciclofelitol

Aquests estudis es van fer amb els inhibidors irreversibles sobre la imiglucerasa i la  $\beta$ -glucosidasa BgI<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp.

#### 8.2.2.1 Inactivació de la imiglucerasa pels epòxids

En el cas de la imiglucerasa, l'assaig es va fer en plaques de 96 pous. Es va fer una pre-incubació a 37 °C a diferents temps (0, 1, 2, 3, 4, 5 i 9 min), en absència (control) i en presència dels inhibidors a diferents concentracions amb 250 µL de l'enzim ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en un volum total de 270 µL de solució amortidora McIlvaine (100 mM d'àcid cítric i 200 mM de fosfat de sodi, pH 5.2) amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v). Després dels temps de pre-incubació, es va agafar una alíquota de 27 µL de les mescles enzim-inhibidor, enzim-sense inhibidor i del blanc i es van addicionar sobre una mescla de 13 µL d'una solució amortidora McIlvaine amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v) i 60 µL del substrat 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranòsid (4 mM en solució amortidora McIlvaine, pH 5.2) i la placa s'incubà durant 10 min a 37 °C. Passat aquest temps, la reacció es parà afegint a cada pou 150 µL d'una solució amortidora

Glicina/NaOH (100 mM, pH 10.6). Es barrejà bé el contingut dels pous i la placà es tapà de la llum. Per últim, es va determinar la 4-metilumbel·liferona formada en el fluorímetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i a una d'emissió de 460 nm.

Per a determinar l'activitat de la imiglucerasa després de la diàlisi en presència dels inhibidors irreversibles, es van incubar 75  $\mu\text{L}$  de l'enzim ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en absència (control) i en presència dels inhibidors en un volum total de 81  $\mu\text{L}$  de solució amortidora McIlvaine (pH 5.2) amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v) durant 20 min a 37 °C. Després de la incubació, es van agafar 54  $\mu\text{L}$  de la mescla i es va fer una diàlisi utilitzant filtres Centricon (Ultracel<sup>®</sup> YM-30). Es va rentar 3 vegades el filtre després de cada centrifugació (5 min) amb 50  $\mu\text{L}$  de la mateixa solució amortidora utilitzada en la incubació i es va mesurar l'activitat tant de les mostres no dialitzades (control) com de les dialitzades.

#### 8.2.2.2 Inactivació de la $\beta$ -glucosidasa Bgl<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp.

En el cas de la  $\beta$ -glucosidasa Bgl<sub>3</sub> d'*Streptomyces* sp., l'assaig es va fer en tubs eppendorf de 1.5 mL. Es va fer una pre-incubació a 35 °C a diferents temps, en absència (control) i en presència dels inhibidors a diferents concentracions amb l'enzim (10  $\mu\text{M}$ ) en un volum total de 300  $\mu\text{L}$  de solució amortidora de fosfats (50 mM, pH 7). Després dels temps de pre-incubació, es van agafar alíquotes de 20  $\mu\text{L}$  de les mescles enzim-inhibidor i les del control i es van diluir fins a un volum de 200  $\mu\text{L}$  amb la mateixa solució amortidora. D'aquesta solució, es van agafar 8  $\mu\text{L}$  i es van afegir sobre una mescla formada per 72  $\mu\text{L}$  d'aigua milliQ i 100  $\mu\text{L}$  de la solució amortidora de fosfats (50 mM, pH 7). Tot seguit es van afegir 20  $\mu\text{L}$  del substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranòsid (1 mM) sobre l'anterior mescla i la hidròlisi enzimàtica del substrat es va seguir en continu determinant l'absorbància a una longitud d'ona de 405 nm durant 5 min.

#### 8.2.3 Determinació de l'activitat GCCase recombinant (Imiglucerasa)

L'activitat de la imiglucerasa (Genzyme) es va determinar utilitzant el 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranòsid com a substrat i es va seguir el procediment descrit a la Tesi de Meritxell Egido-Gabás(2005)<sup>189</sup> i a la bibliografia.<sup>131</sup>

Aquest assaig es va fer en una placa de 96 pous i es van fer incubacions de 30 minuts (o incubacions de 5 min per a determinar la IC<sub>50</sub> dels epòxids, capítol 3) en absència (control) i en presència dels inhibidors a diferents concentracions amb 25  $\mu\text{L}$  de l'enzim ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ )

en un volum total de 40  $\mu\text{L}$  de solució amortidora McIlvaine (100 mM d'àcid cítric i 200 mM de fosfat de sodi, pH 5.2 o pH 7.0) amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v). Després dels 30 minuts d'incubació, es van afegir 60  $\mu\text{L}$  del substrat (4 mM en solució amortidora McIlvaine, pH 5.2) i es tornà a fer una incubació a 37 °C durant 10 min. Passat aquest temps, la reacció es parà afegint a cada pou 150  $\mu\text{L}$  d'una solució amortidora Glicina/NaOH (100 mM, pH 10.6). Es barrejà bé el contingut dels pous i la placà es tapà de la llum. Per últim, es va determinar la 4-metilumbel·liferona formada en el fluorímetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i a una d'emissió de 460 nm.

**Taula 8.1.** Relació de volums per als estudis d'activitat de la imiglucreasa.

	<b>Control</b>	<b>Inhibidor</b>	<b>Blanc</b>
Enzim	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	--
Inhibidor	--	variable	--
DMSO	2 $\mu\text{l}$	variable	--
Solució Amortidora	13 $\mu\text{l}$	13 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
Incubació 30 minuts			
Substrat	60 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$
Incubació 10 minuts			
Glicina/NaOH	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$

Els valors de  $\text{IC}_{50}$  (concentració d'inhibidor que produeix un 50% d'inhibició) es van determinar amb la representació del percentatge de fluorescència respecte al control enfront la concentració d'inhibidor. Per a determinar el valor de  $\text{IC}_{50}$  es van utilitzar com a mínim cinc concentracions diferents de l'inhibidor.

El tipus d'inhibició i els valors de  $K_i$  es van determinar amb la representació de Lineweaver-Burk (on es representa la inversa de la concentració de substrat i la inversa de la velocitat de reacció) dels assaigs fets amb diferents concentracions d'inhibidor i de substrat.

#### 8.2.4 Determinació de les activitats de diverses glicosidases comercials

Per a determinar l'activitat sobre diverses glicosidases es va seguir el procediment descrit a la Tesi de Meritxell Egido-Gabás (2005)<sup>189</sup> i a la bibliografia.<sup>131</sup>

Aquests assaigs es van fer en una placa de 96 pous i es van fer una pre-incubació a 37 °C durant 3 minuts en absència (control) i en presència dels inhibidors a diferents concentracions amb la solució amortidora al pH òptim per cada enzim. Després de la pre-incubació, es va afegir l'enzim corresponent dissolt prèviament en la mateixa solució

amortidora. Després de 5 minuts d'incubació a 37 °C, es va afegir el substrat corresponent i es tornà a fer una incubació a la mateixa temperatura durant 3 min (per a l' $\alpha$ -glucosidasa de llevat del pa i la  $\beta$ -glucosidasa d'ametlla), 5 min (per a la  $\beta$ -galactosidasa de fetge de bou), 10 min (per a l' $\alpha$ -glucosidasa d'arròs) o 13 min (per a l' $\alpha$ -galactosidasa de gra de cafè verd). Passat aquests temps, les reaccions es van parar afegint a cada pou 50  $\mu$ L d'una solució amortidora Tris HCl (50  $\mu$ L, 1 M) o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (180  $\mu$ L, 1 M, per a l' $\alpha$ -galactosidasa de gra de cafè verd). Per últim, es va determinar el *p*-nitrofenol format mesurant l'absorbància a una longitud d'onda de 405 nm amb l'espectrofotòmetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation).

**Taula 8.2.** Condicions utilitzades per a determinar l'activitat de diverses glicosidases comercials.

	$\alpha$ -Glucosidasa (de llevat del pa)	$\alpha$ -Glucosidasa (d'arròs)	$\beta$ -Glucosidasa (d'ametlla)	$\alpha$ -Galactosidasa (de gra verd de cafè)	$\beta$ -Galactosidasa (de fetge de bou)
<i>Solució amortidora</i>	Fosfat sòdic pH 7.2 (147.5 $\mu$ L, 100 mM)	Acetat sòdic pH 5.0 (147.5 $\mu$ L, 50 mM)	Acetat sòdic pH 5.0 (147.5 $\mu$ L, 100 mM)	Fosfat sòdic pH 6.8 (44.1 $\mu$ L, 100 mM)	Fosfat sòdic pH 7.2 (147.5 $\mu$ L 100 mM, 0.1 mM MgCl <sub>2</sub> )
<i><math>\mu</math>L inhibidor</i>	2.5 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L	0.9 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
<i>Temps incubació</i>	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min
<i><math>\mu</math>L enzim</i>	50 $\mu$ L (0.1 mg mL <sup>-1</sup> sol. amortidora)	50 $\mu$ L (30 $\mu$ L+1.8 mL sol. amortidora)	50 $\mu$ L (0.1 mg mL <sup>-1</sup> sol. amortidora)	20 $\mu$ L (7.4 $\mu$ L + 1.99 mL sol. amortidora)	50 $\mu$ L (0.5 mg mL <sup>-1</sup> sol. amortidora)
<i>Temps incubació</i>	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
<i>Substrat</i>	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosid (1 mM, 50 $\mu$ L)	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosid (1 mM, 50 $\mu$ L)	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosid (1 mM, 50 $\mu$ L)	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosid (1 mM, 25 $\mu$ L)	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosid (1 mM, 50 $\mu$ L)
<i>Temps incubació</i>	3 min	10 min	3 min	13 min	5 min
<i>Parada de la incubació</i>	Tris HCl (50 $\mu$ L, 1M)	Tris HCl (50 $\mu$ L, 1M)	Tris HCl (50 $\mu$ L, 1M)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (180 $\mu$ L, 1M)	Tris HCl (50 $\mu$ L, 1M)

### 8.2.5 Determinació de l'activitat glucosilceramida sintasa (GCS)

Per a mesurar l'activitat de la GCS es van fer servir cèl·lules A549 (cèl·lules epitelials de càncer de pulmó). Les cèl·lules van ser tripsinitzades i rentades amb PBS. Seguidament, es van resuspendre en una solució amortidora de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) i 10 mM MgCl<sub>2</sub>. A continuació, es van fer 3 cicles de sonicació (30 segons) i es deixaren en un bany de gel. En tubs eppendorf es van posar 100  $\mu$ L de l'homogenat i es van incubar en absència (control) i

en presència dels inhibidors (a una concentració de 250  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ) durant 10 min en un incubador a 37 °C. Passat aquest temps, es van afegir 25  $\mu\text{L}$  de NAD (16 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 i 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 25  $\mu\text{L}$  d'UDP-Glucosa (2 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 i 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) i 52  $\mu\text{L}$  de BSA/Ceramida C6 NBD (1:1, 20  $\mu\text{M}$ , Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 i 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Els tubs eppendorf es van tornar a posar a l'incubador durant 15 min a 37 °C i les reaccions es van parar amb l'addició de 800  $\mu\text{L}$  de MeOH. Es van centrifugar a 10000 rpm durant 3 min i el sobrenedant es va transferir a vials HPLC.

L'anàlisi de les mostres es va dur a terme en un equip HPLC (Alliance, Waters 2690 Separations Module, Waters) acoblat a un detector de fluorescència (Waters 2475 Multi $\lambda$  Fluorescent Detector, Waters) i es va utilitzar una columna C18 (Kromasil, 100 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 15x0.40, Teknokroma). Les condicions de l'anàlisi per HPLC van ser les següents:

- volum de mostra: 25 $\mu\text{L}$
- flux: 1 mL/min
- fase mòbil: acetonitril/aigua 85:15 amb 0.1% TFA
- $\lambda$  excitació: 465 nm
- $\lambda$  emissió: 530 nm

### 8.2.6 Assaig de desnaturalització tèrmica de la imiglycerasa

Aquest assaig es va fer amb el procediment descrit Sawkar i col·laboradors<sup>115</sup> amb algunes modificacions.

Es van incubar en tubs eppendorf 48  $\mu\text{L}$  de l'enzim (2 mg  $\text{mL}^{-1}$  aigua milliQ) en absència (control) i en presència de tres concentracions diferents de l'inhibidor en un volum total de 50  $\mu\text{L}$  a 48 °C (en un bany d'aigua termostatitzat) durant 0, 20, 40 i 60 minuts. Després d'aquest temps d'incubació, es van afegir 150  $\mu\text{L}$  d'una solució amortidora de fosfat-acetat (100 mM, pH 5.0) i 100  $\mu\text{L}$  del substrat 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid (4 mM en solució amortidora McIlvaine amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v), pH 5.2) i es va incubar durant 10 min a 37 °C en un bany d'aigua termostatitzat. Passat aquest temps d'incubació, la reacció es parà afegint a cada tub eppendorf 300  $\mu\text{L}$  d'una solució amortidora Glicina/NaOH (100 mM, pH 10.6). Es barrejà bé el contingut dels pous i la placà es tapà de la llum. Per últim, es va determinar la 4-metilumbel·liferona formada en el fluorímetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i a una d'emissió de 460 nm.

### 8.2.7 Determinació de les activitats de diverses glicosidases en homogenats de cèl·lules (fibroblasts wt d'humans)

Sobre un *pellet* de fibroblasts (aproximadament  $3 \times 10^6$  cèl·lules) s'hi va afegir 1 mL d'aigua milliQ i la barreja es va sonicar durant 10 segons (3 vegades) i es deixà en un bany de gel.

Aquest assaig es va fer en una placa de 96 pous i es van fer incubacions de 15 minuts en absència (control, 1  $\mu$ L DMSO) i en presència dels inhibidors a diferents concentracions amb 20  $\mu$ L de l'homogenat de cèl·lules en un volum total de 40  $\mu$ L de la solució amortidora corresponent (en funció de l'enzim). Després dels 15 minuts d'incubació a 37 °C, es van afegir 60  $\mu$ L del substrat corresponent i es tornà a fer una incubació a 37 °C durant 1 h. Passat aquest temps, la reacció es parà afegint a cada pou 150  $\mu$ L d'una solució amortidora Glicina/NaOH (100 mM, pH 10.6). Es barrejà bé el contingut dels pous i la placà es tapà de la llum. Per últim, es va determinar la 4-metilumbel·liferona formada en el fluorímetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i a una d'emissió de 460 nm.

A continuació s'indiquen les solucions amortidores i els substrats utilitzats per als diferents enzims:

Per a l' $\alpha$ -galactosidasa es va utilitzar una solució amortidora d'acetats (100 mM, pH 4.5) i una concentració inicial del substrat d'1 mM (4-metilumbel·liferil- $\alpha$ -D-galactopiranòsid, 1.16 mg en 3.43 mL de la mateixa solució amortidora). A més s'addicionà 1  $\mu$ L de la *N*-acetil-galactosamina (NAG, 100 mM) en solució amortidora d'acetats (100 mM, pH 4.5) i l'inhibidor de la *N*-acetil- $\alpha$ -galactosaminidasa ( $\alpha$ -NAGA) present en l'homogenat i que també utilitza el mateix substrat.

Per a la  $\beta$ -galactosidasa es va utilitzar una solució amortidora de citrats (100 mM, pH 4.4) i una concentració inicial del substrat d'1 mM (4-metilumbel·liferil- $\beta$ -D-galactopiranòsid, 1.0 mg en 3.12 mL de la mateixa solució amortidora).

Per a la  $\beta$ -glucosidasa es va utilitzar una solució amortidora McIlvaine amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v) i una concentració inicial del substrat de 4 mM (4-metilumbel·liferil- $\beta$ -D-glucopiranòsid, 3.75 mg en 2.77 mL de la mateixa solució amortidora).

Per a l' $\alpha$ -glucosidasa es va utilitzar una solució amortidora de citrats (50 mM, pH 4.0) i una concentració inicial del substrat de 4 mM (4-metilumbel·liferil- $\alpha$ -D-glucopiranòsid, 2.35 mg en 1.73 mL de la mateixa solució amortidora).



### 8.2.8 Estudis de citotoxicitat en fibroblasts wt d'humans

L'assaig del MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) és un mètode colorimètric de proliferació cel·lular que es basa en la capacitat de la deshidrogenasa mitocondrial present en les cèl·lules vives per reduir els anells de tetrazoli del MTT i formar uns cristalls de formazà de color violeta i insolubles en aigua. Però dissolts en DMSO donen coloració al medi. A més color observat, més activitat cel·lular per part dels mitocondris, que es correlaciona amb la quantitat de cèl·lules vives.

Es va estudiar la citotoxicitat dels inhibidors abans de determinar la seva inhibició sobre la GCCase i es van fer servir fibroblasts wt d'humans.

Una vegada tripsinitzades les cèl·lules, es preparà 10 mL d'una suspensió de cèl·lules a una concentració de 250000 cèl·lules/mL de medi. Seguidament, en una placa de cultiu de 96 pous estèril es van sembrar 100 µL d'aquesta suspensió per pou. Es deixà la placa a l'incubador a 37 °C durant 24 h. Passat aquest temps, s'eliminà el medi per aspiració i s'afegiren 100 µL de medi nou junt amb les diferents concentracions dels inhibidors i la placa es va deixar de nou a l'incubador durant 24 h. Passat aquest temps, s'eliminà el medi per aspiració i s'afegiren a cada pou 100 µL de medi fresc amb el reactiu MTT (1 mL de medi fresc i 200 µL del reactiu MTT a una concentració de 5 mg/mL en PBS).

Després de 3 h d'incubació a 37 °C, es retirà el medi i s'afegiren a cada pou 100 µL de DMSO. Es barrejà bé el contingut dels pous i la placa es tapà de la llum. Després de 3 h, es va mesurar l'absorbància en l'espectrofotòmetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona de 570 nm.

### 8.2.9 Determinació de l'activitat GCCase en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) d'humans

Per a determinar la inhibició que presenten alguns del compostos descrits en aquesta memòria sobre la GCCase, es van fer servir fibroblasts wt d'humans i es va fer l'assaig en cèl·lules intactes utilitzant el procediment que descriu Sawkar i col·laboradors.<sup>115</sup>

Una vegada tripsinitzades les cèl·lules, es preparà una suspensió de cèl·lules a una concentració de 250000 cèl·lules/mL de medi. En una placa de cultiu de 24 pous estèril, es van sembrar  $10^5$  cèl·lules per pou (400 µL de la solució 250000 cèl·lules/mL). Es deixà la placa a l'incubador a 37 °C durant 24 h. Passat aquest temps, s'eliminà el medi per aspiració i s'afegiren 400 µL de medi nou junt amb les diferents concentracions dels inhibidors i la placa es va deixar de nou a l'incubador a 37 °C durant 24 h. Passat aquest temps, s'eliminà el

medi per aspiració i es rentà les cèl·lules dues vegades amb 100  $\mu$ L de PBS. Tot seguit a cada pou es van afegir 80  $\mu$ L de PBS, 80  $\mu$ L de solució amortidora d'acetat (200 mM, pH 4.0) i 100  $\mu$ L del substrat 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid (5 mM en solució amortidora acetat 200 mM a pH 4.0) i es va posar la placa a l'incubador a 37 °C durant 2 h. Passat aquest temps, la reacció es va parar afegint a cada pou 1.8 mL d'una solució amortidora Glicina/NaOH (100 mM, pH 10.6). Es barrejà bé el contingut dels pous i la placa es tapà de la llum. Per últim, es va determinar la 4-metilumbel·liferona formada en el fluorímetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i a una d'emissió de 460 nm. Totes les determinacions es van fer per triplicat.

Per a estudiar la influència dels epòxids (capítol 3) sobre la glucosilceramida hidrolasa citosòlica es va fer el mateix experiment que el descrit en aquest apartat, però abans de treure el medi, les cèl·lules van ser tractades amb CBE (500  $\mu$ L) durant 2 h. Passat aquest temps, s'eliminà el medi per aspiració, es rentà les cèl·lules i es va determinar l'activitat.

### **8.2.10 Determinació de les activitats de diverses glicosidases en fibroblasts wt (cèl·lules intactes) d'humans**

Per a determinar les inhibicions dels enzims  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa i  $\alpha$ -galactosidasa en fibroblasts wt d'humans i fent l'assaig en cèl·lules intactes es va seguir el mateix procediment que el descrit per a determinar la inhibició de la GCase lisosòmica. Però es van utilitzar els següents substrats:

- $\alpha$ -glucosidasa: 4-metilumbel·liferil  $\alpha$ -D-glucopiranosid
- $\beta$ -galactosidasa: 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-galactopiranosid
- $\alpha$ -galactosidasa: 4-metilumbel·liferil  $\alpha$ -D-galactopiranosid

### **8.2.11 Estudis de citotoxicitat en limfoblasts de malats de Gaucher**

Es va estudiar la citotoxicitat dels inhibidors en limfoblasts de malats de Gaucher amb la mutació N370S abans d'estudiar si actuaven com a xaperones farmacològiques de la GCase.

En una placa de 96 pous estèril es van sembrar 10000 cèl·lules per pou i es van afegir les diferents concentracions dels inhibidors a provar (300  $\mu$ M-18  $\mu$ M). La placa es deixà a l'incubador a 37 °C durant 3 dies (o 5 dies). Passat aquest temps, es van afegir 10  $\mu$ L d'una solució del reactiu MTT (5 mg/mL en PBS) a cadascun dels pous. Es deixà incubant a 37 °C

durant 3 h i tot seguit s'afegiren 100  $\mu\text{L}$  d'una mescla DMSO:SDS (sulfat de dodecil de sodi al 20%) 1:1. Es deixà la placa durant 5 h com a mínim a t.a. i es llegí l'absorbància a 560 nm.

### 8.2.12 Estudi de l'activitat xaperona en limfoblasts de malats de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P

Per tal d'estudiar si alguns dels compostos que s'han descrit en aquesta memòria actuaven com a xaperones farmacològiques de la GCase es van utilitzar limfoblasts de malats de Gaucher amb les mutacions N370S o L444P i es va seguir el procediment descrit per Wang i col·laboradors amb algunes modificacions.<sup>117</sup>

En una placa de 12 pous estèrils es van sembrar  $2 \times 10^5$  cèl·lules per pou en 1 mL de medi de cultiu. Sobre aquestes es van afegir 10  $\mu\text{L}$  de DMSO (control) o les diferents concentracions dels inhibidors a provar per triplicat. Es deixà la placa durant 3 dies a l'incubador a 37 °C. Passat aquest temps, les cèl·lules es van transferir a tubs eppendorf d'1.5 mL i es van centrifugar a 10000 rpm durant 3 min. El sobrenedant es va retirar i es va rentar el pellet amb 100  $\mu\text{L}$  de PBS (refredat a 0 °C). Es va tornar a centrifugar amb les mateixes condicions, es tornà a retirar el sobrenedant i es repetí el rentat amb PBS. Els passos següents es van fer amb les mostres en gel en tot moment que no es manipulen i si no es podia fer l'assaig d'activitat el mateix dia es van deixar en el congelador.

A cada tub eppendorf es van afegir 35  $\mu\text{L}$  d'aigua milliQ i es van fer 3 cicles de sonicació (20 segons) i es deixaren en un bany de gel.

L'assaig d'activitat es van fer en plaques de 96 pous i per duplicat. S'hi van afegir 10  $\mu\text{L}$  de l'homogenat (el que queda del homogenat es va guardar per a la quantificació de la proteïna) i 50  $\mu\text{L}$  del substrat 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid (6 mM en solució amortidora McIlvaine amb 0.1% Triton X-100 (v/v) i 0.25% de taurocolat de sodi (p/v), pH 5.2). Es deixà la placa a l'incubador a 37 °C durant 2 h i es van afegir 150  $\mu\text{L}$  d'una solució amortidora Glicina/NaOH (200 mM, pH 10.6). Es barrejà bé el contingut dels pous i la placà es tapà de la llum. Per últim, es va determinar la 4-metilumbel·liferona formada en el fluorímetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i a una d'emissió de 460 nm.

D'altra banda, es va determinar l'activitat de la GCase no lisosòmica afegint el CBE (500  $\mu\text{M}$ ) al control. Després d'una incubació d'1h a 37 °C, es va afegir el substrat i es va fer

l'assaig d'activitat tal i com s'ha descrit en aquest apartat. Es va obtenir que era aproximadament del 2% per a les dues mutacions.

Es va quantificar la proteïna de cada mostra per duplicat fent servir el kit d'assaig de microproteïna BCA (àcid bicinconic, Pierce). En una placa de 96 pous, s'hi van afegir 17.5  $\mu\text{L}$  d'aigua milliQ, 2.5  $\mu\text{L}$  de l'homogenat i 100  $\mu\text{L}$  del reactiu Micro BCA i al mateix temps es va realitzar la recta patró amb diferents concentracions de BSA. Després d'incubar la placa a 37 °C durant 30 min, es va llegir l'absorbància a una longitud d'ona de 562 nm en l'espectrofotòmetre SpectraMax M5 (Molecular Devices Corporation) i es va determinar la concentració de proteïna de cada mostra a partir de la recta patró de BSA.



## *9. Bibliografia*

---



1. Hannun, Y. A.; Bell, R. M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* **1989**, *243*, 500-507.
2. a) Futerman, A. H.; Hannun, Y. A. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 777-782; b) Hoekstra, D.; Maier, O.; van der Wouden, J. M.; Slimane, T. A.; van, I. S. C. Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 869-877; c) Schmelz, E. M. Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 2632-2639.
3. Kolter, T.; Proia, R. L.; Sandhoff, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25859-25862.
4. Radin, N. S. Chemotherapy by slowing glucosphingolipid synthesis. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 589-595.
5. Jeckel, D.; Karrenbauer, A.; Burger, K. N.; van Meer, G.; Wieland, F. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 259-267.
6. Ichikawa, S.; Hirabayashi, Y. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 198-202.
7. Sawkar, A. R.; D'Haese, W.; Kelly, J. W. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders-a focus on Gaucher disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1179-1192.
8. de Duve, C.; Pressman, B. C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R.; Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **1955**, *60*, 604-617.
9. Vellodi, A. Lysosomal storage disorders. *Br. J. Haematol.* **2005**, *128*, 413-431.
10. Reczek, D.; Schwake, M.; Schroder, J.; Hughes, H.; Blanz, J.; Jin, X.; Brondyk, W.; Van Patten, S.; Edmunds, T.; Saftig, P. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Cell* **2007**, *131*, 770-783.
11. Griffiths, G. M. Gaucher disease: forging a new path to the lysosome. *Cell* **2007**, *131*, 647-649.
12. Sandhoff, K.; Kolter, T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2003**, *358*, 847-861.
13. Wilcox, W. R. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J. Pediatr.* **2004**, *144*, S3-14.
14. Futerman, A. H.; van Meer, G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 554-565.
15. Aerts, J. M.; Hollak, C.; Boot, R.; Groener, A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2003**, *358*, 905-914.



16. Brill, N. E.; Mandlebaum, F. S.; Libman, E. Primary Splenomegaly-Gaucher Type.: Report on One of Four Ases Occurring in A Single Generation of One Family. *Am. J. Med. Sci.* **1905**, *129*, 491-503.
17. a) Germain, D. P. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. *Clin. Genet.* **2004**, *65*, 77-86; Beutler, E.; b) Gelbart, T. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **1997**, *23*, 2-7; c) Chamoles, N. A.; Blanco, M.; Gaggioli, D.; Casentini, C. Gaucher and Niemann-Pick diseases-enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *317*, 191-197; d) Rite, S.; Baldellou, A.; Giraldo, P.; Labarta, J. I.; Giralt, M.; Rubio-Felix, D.; Guallar, A.; Perez-Calvo, J. I.; Mayayo, E.; Ferrandez, A.; Pocovi, M. Insulin-like growth factors in childhood-onset Gaucher disease. *Pediatr. Res.* **2002**, *52*, 109-112; e) Saito, M.; Rosenberg, A. The fate of glucosylceramide (glucocerebroside) in genetically impaired (lysosomal  $\beta$ -glucosidase deficient) Gaucher disease diploid human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2295-2300.
18. Zimmer, K. P.; le Coutre, P.; Aerts, H. M.; Harzer, K.; Fukuda, M.; O'Brien, J. S.; Naim, H. Y. Intracellular transport of acid  $\beta$ -glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *J. Pathol.* **1999**, *188*, 407-414.
19. Grabowski, G. A. Gaucher disease. Enzymology, genetics, and treatment. *Adv. Hum. Genet.* **1993**, *21*, 377-441.
20. Ida, H.; Rennert, O. M.; Kato, S.; Ueda, T.; Oishi, K.; Maekawa, K.; Eto, Y. Severe skeletal complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1999**, *22*, 63-73.
21. Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* **2008**, *372*, 1263-1271.
22. van Meer, G.; Wolthoorn, J.; Degroote, S. The fate and function of glycosphingolipid glucosylceramide. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2003**, *358*, 869-873.
23. Morton, D. L.; Ravindranath, M. H.; Irie, R. F. Tumor gangliosides as targets for active specific immunotherapy of melanoma in man. *Prog. Brain Res.* **1994**, *101*, 251-275.
24. Schwarz, A.; Rapaport, E.; Hirschberg, K.; Futerman, A. H. A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10990-10998.
25. Deguchi, H.; Fernandez, J. A.; Pabinger, I.; Heit, J. A.; Griffin, J. H. Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood* **2001**, *97*, 1907-1914.
26. a) Korkotian, E.; Schwarz, A.; Pelled, D.; Schwarzmann, G.; Segal, M.; Futerman, A. H. Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21673-21678; b) Lloyd-Evans, E.; Pelled, D.; Riebeling, C.; Bodennec, J.; de-Morgan, A.; Waller, H.; Schiffmann, R.; Futerman, A. H. Glucosylceramide and

- glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 23594-23599.
27. Bodennec, J.; Pelled, D.; Riebeling, C.; Trajkovic, S.; Futerman, A. H. Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by glucosylceramide. *FASEB J.* **2002**, 16, 1814-1816.
  28. Brady, R. O.; Kanfer, J. N.; Shapiro, D. Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, 18, 221-225.
  29. Vaccaro, A. M.; Tatti, M.; Ciaffoni, F.; Salvioli, R.; Barca, A.; Scerch, C. Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 16862-16867.
  30. Grabowski, G. A.; Gatt, S.; Horowitz, M. Acid  $\beta$ -glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, 25, 385-414.
  31. Boot, R. G.; Verhoek, M.; Donker-Koopman, W.; Strijland, A.; van Marle, J.; Overkleeft, H. S.; Wennekes, T.; Aerts, J. M. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as  $\beta$ -glucosidase 2. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 1305-1312.
  32. van Weely, S.; Brandsma, M.; Strijland, A.; Tager, J. M.; Aerts, J. M. Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1181, 55-62.
  33. Overkleeft, H. S.; Renkema, G. H.; Neele, J.; Vianello, P.; Hung, I. O.; Strijland, A.; van der Burg, A. M.; Koomen, G. J.; Pandit, U. K.; Aerts, J. M. Generation of specific deoxynojirimycin-type inhibitors of the non-lysosomal glucosylceramidase. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 26522-26527.
  34. Grabowski, G. A.; Osiecki-Newman, K.; Dinur, T.; Fabbro, D.; Legler, G.; Gatt, S.; Desnick, R. J. Human acid  $\beta$ -glucosidase. Use of conduritol B epoxide derivatives to investigate the catalytically active normal and Gaucher disease enzymes. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 8263-8269.
  35. a) Durand, P.; Lehn, P.; Callebaut, I.; Fabrega, S.; Henrissat, B.; Mornon, J. P. Active-site motifs of lysosomal acid hydrolases: invariant features of clan GH-A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis. *Glycobiology* **1997**, 7, 277-284; b) Mian, I. S. Sequence, structural, functional, and phylogenetic analyses of three glycosidase families. *Blood Cells Mol. Dis.* **1998**, 24, 83-100; c) Miao, S.; McCarter, J. D.; Grace, M. E.; Grabowski, G. A.; Aebersold, R.; Withers, S. G. Identification of Glu340 as the active-site nucleophile in human glucocerebrosidase by use of electrospray tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10975-10978; d) Liou, B.; Grabowski, G. A. Participation of asparagine 370 and glutamine 235 in the catalysis by acid  $\beta$ -glucosidase: the enzyme deficient in Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2009**, 97, 65-74.

36. Premkumar, L.; Sawkar, A. R.; Boldin-Adamsky, S.; Toker, L.; Silman, I.; Kelly, J. W.; Futerman, A. H.; Sussman, J. L. X-ray structure of human acid- $\beta$ -glucosidase covalently bound to conduritol-B-epoxide. Implications for Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23815-23819.
37. Sorge, J. A.; West, C.; Kuhl, W.; Treger, L.; Beutler, E. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am. J. Hum. Genet.* **1987**, *41*, 1016-1024.
38. Grace, M. E.; Grabowski, G. A. Human acid  $\beta$ -glucosidase: glycosylation is required for catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 771-777.
39. Dvir, H.; Harel, M.; McCarthy, A. A.; Toker, L.; Silman, I.; Futerman, A. H.; Sussman, J. L. X-ray structure of human acid- $\beta$ -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 704-709.
40. a) Beck, M. New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Hum. Genet.* **2007**, *121*, 1-22; b) Platt, F. M.; Lachmann, R. H. Treating lysosomal storage disorders: Current practice and future prospects. *BBA-Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 737-745; c) Goker-Alpan, O. Optimal therapy in Gaucher disease. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2010**, *6*, 315-323.
41. Beck, M. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 33-40.
42. Futerman, A. H.; Sussman, J. L.; Horowitz, M.; Silman, I.; Zimran, A. New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 147-151.
43. Freud, E.; Cohen, I. J.; Mor, C.; Golinsky, D.; Blumenfeld, A.; Zer, M. Splenic "regeneration" after partial splenectomy for Gaucher disease: histological features. *Blood Cells Mol. Dis.* **1998**, *24*, 309-316.
44. Goldblatt, J.; Sacks, S.; Dall, D.; Beighton, P. Total hip arthroplasty in Gaucher's disease. Long-term prognosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1988**, 94-98.
45. a) Ringden, O.; Groth, C. G.; Erikson, A.; Granqvist, S.; Mansson, J. E.; Sparrelid, E. Ten years' experience of bone marrow transplantation for Gaucher disease. *Transplantation* **1995**, *59*, 864-870; b) Rappeport, J. M.; Ginns, E. I. Bone-Marrow Transplantation in Severe Gaucher's Disease. *N. Engl. J. Med.* **1984**, *311*, 84-88.
46. Barranger, J. A.; Rice, E. O.; Dunigan, J.; Sansieri, C.; Takiyama, N.; Beeler, M.; Lancia, J.; Lucot, S.; Scheirer-Fochler, S.; Mohny, T.; Swaney, W.; Bahnson, A.; Ball, E. Gaucher's disease: studies of gene transfer to haematopoietic cells. *Baillieres Clin. Haematol.* **1997**, *10*, 765-778.
47. a) Nimgaonkar, M. T.; Bahnson, A. B.; Boggs, S. S.; Ball, E. D.; Barranger, J. A. Transduction of mobilized peripheral blood CD34+ cells with the glucocerebrosidase cDNA. *Gene Ther.* **1994**, *1*, 201-207; b) Dunbar, C.; Kohn, D. Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 231-253.

48. de Duve, C. From Cytases to Lysosomes. *Fed. Proc.* **1964**, *23*, 1045-1049.
49. Brady, R. O.; Pentchev, P. G.; Gal, A. E.; Hibbert, S. R.; Dekaban, A. S. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* **1974**, *291*, 989-993.
50. a) Sly, W. S.; Kaplan, A.; Achord, D. T.; Brot, F. E.; Bell, C. E. Receptor-mediated uptake of lysosomal enzymes. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1978**, *23*, 547-551; b) Stahl, P. D.; Rodman, J. S.; Miller, M. J.; Schlesinger, P. H. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1978**, *75*, 1399-1403.
51. Furbish, F. S.; Steer, C. J.; Krett, N. L.; Barranger, J. A. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *673*, 425-434.
52. Doebber, T. W.; Wu, M. S.; Bugianesi, R. L.; Ponpipom, M. M.; Furbish, F. S.; Barranger, J. A.; Brady, R. O.; Shen, T. Y. Enhanced macrophage uptake of synthetically glycosylated human placental  $\beta$ -glucocerebrosidase. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2193-2199.
53. Wiltink, E. H.; Hollak, C. E. Alglucerase (Ceredase). *Pharm. World Sci.* **1996**, *18*, 16-19.
54. Friedman, B.; Vaddi, K.; Preston, C.; Mahon, E.; Cataldo, J. R.; McPherson, J. M. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived  $\beta$ -glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood* **1999**, *93*, 2807-2816.
55. a) Zimran, A.; Altarescu, G.; Philips, M.; Attias, D.; Jmoudiak, M.; Deeb, M.; Wang, N.; Bhirangi, K.; Cohn, G. M.; Elstein, D. Phase 1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience. *Blood* **2010**, *115*, 4651-4656; b) Pastores, G. M. Velaglucerase alfa, a human recombinant glucocerebrosidase enzyme replacement therapy for type 1 Gaucher disease. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2010**, *11*, 472-478; c) Xu, Y.-H.; Sun, Y.; Barnes, S.; Grabowski, G. A. Comparative therapeutic effects of velaglucerase alfa and imiglucerase in a Gaucher disease mouse model. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10750.
56. a) Shaaltiel, Y.; Bartfeld, D.; Hashmueli, S.; Baum, G.; Brill-Almon, E.; Galili, G.; Dym, O.; Boldin-Adamsky, S. A.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Futerman, A. H.; Aviezer, D. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol. J.* **2007**, *5*, 579-590; b) Aviezer, D.; Brill-Almon, E.; Shaaltiel, Y.; Hashmueli, S.; Bartfeld, D.; Mizrachi, S.; Liberman, Y.; Freeman, A.; Zimran, A.; Galun, E. A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme-a preclinical and phase I investigation. *PLoS One* **2009**, *4*, e4792.
57. Weinreb, N. J.; Charrow, J.; Andersson, H. C.; Kaplan, P.; Kolodny, E. H.; Mistry, P.; Pastores, G.; Rosenbloom, B. E.; Scott, C. R.; Wappner, R. S.; Zimran, A. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher

- disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am. J. Med.* **2002**, *113*, 112-119.
58. a) Aoki, M.; Takahashi, Y.; Miwa, Y.; Iida, S.; Sukegawa, K.; Horai, T.; Orii, T.; Kondo, N. Improvement of neurological symptoms by enzyme replacement therapy for Gaucher disease type IIIb. *Eur. J. Pediatr.* **2001**, *160*, 63-64; b) Prows, C. A.; Sanchez, N.; Daugherty, C.; Grabowski, G. A. Gaucher disease: enzyme therapy in the acute neuronopathic variant. *Am. J. Med. Genet.* **1997**, *71*, 16-21.
59. Radin, N. S. Treatment of Gaucher disease with an enzyme inhibitor. *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 153-157.
60. a) Platt, F. M.; Jeyakumar, M.; Andersson, U.; Priestman, D. A.; Dwek, R. A.; Butters, T. D.; Cox, T. M.; Lachmann, R. H.; Hollak, C.; Aerts, J. M.; Van Weely, S.; Hrebicek, M.; Moyses, C.; Gow, I.; Elstein, D.; Zimran, A. Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2001**, *24*, 275-290; b) Zimran, A.; Elstein, D. Gaucher disease and the clinical experience with substrate reduction therapy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2003**, *358*, 961-966.
61. a) Abe, A.; Inokuchi, J.; Jimbo, M.; Shimeno, H.; Nagamatsu, A.; Shayman, J. A.; Shukla, G. S.; Radin, N. S. Improved inhibitors of glucosylceramide synthase. *J. Biochem.* **1992**, *111*, 191-196; b) Vunnam, R. R.; Radin, N. S. Analogs of ceramide that inhibit glucocerebrosidase in mouse brain. *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *26*, 265-278.
62. Lukina, E.; Watman, N.; Arreguin, E. A.; Banikazemi, M.; Dragosky, M.; Iastrebner, M.; Rosenbaum, H.; Phillips, M.; Pastores, G. M.; Rosenthal, D. I.; Kaper, M.; Singh, T.; Puga, A. C.; Bonate, P. L.; Peterschmitt, M. J. A Phase 2 study of eliglustat tartrate (Genz-112638), an oral substrate reduction therapy for Gaucher disease type 1. *Blood* **2010**, *116*, 893-899.
63. McEachern, K. A.; Fung, J.; Komarnitsky, S.; Siegel, C. S.; Chuang, W. L.; Hutto, E.; Shayman, J. A.; Grabowski, G. A.; Aerts, J. M.; Cheng, S. H.; Copeland, D. P.; Marshall, J. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2007**, *91*, 259-267.
64. Platt, F. M.; Neises, G. R.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *N*-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8362-8365.
65. Platt, F. M.; Butters, T. D. Substrate deprivation: a new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* **2000**, *2*, 1-17.
66. Platt, F. M.; Butters, T. D. New therapeutic prospects for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 421-430.
67. Platt, F. M.; Neises, G. R.; Reinkensmeier, G.; Townsend, M. J.; Perry, V. H.; Proia, R. L.; Winchester, B.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with *N*-butyldeoxynojirimycin. *Science* **1997**, *276*, 428-431.

- 
68. Jeyakumar, M.; Butters, T. D.; Cortina-Borja, M.; Hunnam, V.; Proia, R. L.; Perry, V. H.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with *N*-butyldeoxynojirimycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 6388-6393.
69. Heare, T.; Alp, N. J.; Priestman, D. A.; Kulkarni, A. B.; Qasba, P.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Clarke, K.; Channon, K. M.; Platt, F. M. Severe endothelial dysfunction in the aorta of a mouse model of Fabry disease; partial prevention by *N*-butyldeoxynojirimycin treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2007**, *30*, 79-87.
70. Elliot-Smith, E.; Speak, A. O.; Lloyd-Evans, E.; Smith, D. A.; van der Spoel, A. C.; Jeyakumar, M.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; d'Azzo, A.; Platt, F. M. Beneficial effects of substrate reduction therapy in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *Mol. Genet. Metab.* **2008**, *94*, 204-211.
71. Zervas, M.; Somers, K. L.; Thrall, M. A.; Walkley, S. U. Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1283-1287.
72. a) Elstein, D.; Hollak, C.; Aerts, J. M.; van Weely, S.; Maas, M.; Cox, T. M.; Lachmann, R. H.; Hrebicek, M.; Platt, F. M.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Zimran, A. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, *N*-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2004**, *27*, 757-766; b) Cox, T. M.; Aerts, J. M.; Andria, G.; Beck, M.; Belmatoug, N.; Bembi, B.; Chertkoff, R.; Vom Dahl, S.; Elstein, D.; Erikson, A.; Giralt, M.; Heitner, R.; Hollak, C.; Hrebicek, M.; Lewis, S.; Mehta, A.; Pastores, G. M.; Rolfs, A.; Miranda, M. C.; Zimran, A. The role of the iminosugar *N*-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher disease: a position statement. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2003**, *26*, 513-526.
73. Cox, T.; Lachmann, R.; Hollak, C.; Aerts, J.; van Weely, S.; Hrebicek, M.; Platt, F.; Butters, T.; Dwek, R.; Moyses, C.; Gow, I.; Elstein, D.; Zimran, A. Novel oral treatment of Gaucher's disease with *N*-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* **2000**, *355*, 1481-1485.
74. a) Lachmann, R. H.; te Vruchte, D.; Lloyd-Evans, E.; Reinkensmeier, G.; Sillence, D. J.; Fernandez-Guillen, L.; Dwek, R. A.; Butters, T. D.; Cox, T. M.; Platt, F. M. Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16*, 654-658; b) Patterson, M. C.; Vecchio, D.; Prady, H.; Abel, L.; Wraith, J. E. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol.* **2007**, *6*, 765-772.
75. a) Andersson, U.; Reinkensmeier, G.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. Inhibition of glycogen breakdown by imino sugars in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 697-705; b) Platt, F. M.; Neises, G. R.; Karlsson, G. B.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *N*-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect *N*-linked oligosaccharide processing. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27108-27114.
76. Morello, J.-P.; Salahpour, A.; Laperrière, A.; Bernier, V.; Arthus, M. F.; Lonergan, M.; Petäjä-Repo, U.; Angers, S.; Morin, D.; Bichet, D. G.; Bouvier, M.

- Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 887-895.
77. a) Fan, J.-Q. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355-360; b) Butters, T. D. Gaucher disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 412-418.
78. a) Ringe, D.; Petsko, G. A. What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J. Biol.* **2009**, *8*, 80; b) Yu, Z.; Sawkar, A. R.; Kelly, J. W. Pharmacologic chaperoning as a strategy to treat Gaucher disease. *Febs J.* **2007**, *274*, 4944-4950.
79. Suzuki, Y.; Ogawa, S.; Sakakibara, Y. Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect. Medicin. Chem.* **2009**, *3*, 7-19.
80. Parenti, G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 268-279.
81. a) Bernier, V.; Lagace, M.; Bichet, D. G.; Bouvier, M. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, *15*, 222-228; b) Kolter, T.; Wendeler, M. Chemical chaperones-a new concept in drug research. *Chembiochem* **2003**, *4*, 260-264.
82. Khanna, R.; Benjamin, E. R.; Pellegrino, L.; Schilling, A.; Rigat, B. A.; Soska, R.; Nafar, H.; Ranes, B. E.; Feng, J.; Lun, Y.; Powe, A. C.; Palling, D. J.; Wustman, B. A.; Schiffmann, R.; Mahuran, D. J.; Lockhart, D. J.; Valenzano, K. J. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of  $\beta$ -glucosidase. *FEBS J.* **2010**, *277*, 1618-1638.
83. a) Kornhaber, G. J.; Tropak, M. B.; Maegawa, G. H.; Tuske, S. J.; Coales, S. J.; Mahuran, D. J.; Hamuro, Y. Isofagomine induced stabilization of glucocerebrosidase. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2643-2649; b) Shen, J. S.; Edwards, N. J.; Hong, Y. B.; Murray, G. J. Isofagomine increases lysosomal delivery of exogenous glucocerebrosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 1071-1075.
84. Steet, R. A.; Chung, S.; Lee, W. S.; Pine, C. W.; Do, H.; Kornfeld, S. A. Selective action of the iminosugar isofagomine, a pharmacological chaperone for mutant forms of acid- $\beta$ -glucosidase. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1376-1383.
85. Steet, R. A.; Chung, S.; Wustman, B.; Powe, A.; Do, H.; Kornfeld, S. A. The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid  $\beta$ -glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13813-13818.
86. Grabowski, G. A.; Saal, H. M.; Wenstrup, R. J.; Barton, N. W. Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1996**, *23*, 25-55.
87. Germain, D. P.; Benistan, K. Prenatal diagnosis of Gaucher disease. *Rev. Med. Interne.* **2007**, *28 Suppl 2*, 193-197.

88. Ginns, E. I.; Choudary, P. V.; Tsuji, S.; Martin, B.; Stubblefield, B.; Sawyer, J.; Hozier, J.; Barranger, J. A. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1985**, *82*, 7101-7105.
89. Zimran, A.; Sorge, J.; Gross, E.; Kubitz, M.; West, C.; Beutler, E. A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 219-222.
90. a) Christomanou, H.; Aignesberger, A.; Linke, R. P. Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1986**, *367*, 879-890; b) Christomanou, H.; Chabás, A.; Pampols, T.; Guardiola, A. Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the newly identified lipid storage disorder. *Klin. Wochenschr.* **1989**, *67*, 999-1003; c) Schnabel, D.; Schroder, M.; Sandhoff, K. Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett.* **1991**, *284*, 57-59; d) Rafi, M. A.; de Gala, G.; Zhang, X. L.; Wenger, D. A. Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somat. Cell Mol. Genet.* **1993**, *19*, 1-7; e) Pampols, T.; Pineda, M.; Giros, M. L.; Ferrer, I.; Cusi, V.; Chabas, A.; Sanmarti, F. X.; Vanier, M. T.; Christomanou, H. Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathol.* **1999**, *97*, 91-97; f) Tylki-Szymanska, A.; Czartoryska, B.; Vanier, M. T.; Poorthuis, B. J.; Groener, J. A.; Lugowska, A.; Millat, G.; Vaccaro, A. M.; Jurkiewicz, E. Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Clin. Genet.* **2007**, *72*, 538-542; g) Amsallem, D.; Rodriguez, D.; Vanier, M. T.; Khayat, N.; Millat, G.; Campello, M.; Guillame, C.; Billette De Villemeur, T. Abstracts - SSIEM 42st Annual Symposium, Paris, France, 6-9 September, 2005. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2005**, *28*, 152.
91. Sun, Y.; Qi, X.; Grabowski, G. A. Saposin C is required for normal resistance of acid  $\beta$ -glucosidase to proteolytic degradation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31918-31923.
92. Inui, K.; Kao, F. T.; Fujibayashi, S.; Jones, C.; Morse, H. G.; Law, M. L.; Wenger, D. A. The gene coding for a sphingolipid activator protein, SAP-1, is on human chromosome 10. *Hum. Genet.* **1985**, *69*, 197-200.
93. Alattia, J. R.; Shaw, J. E.; Yip, C. M.; Prive, G. G. Molecular imaging of membrane interfaces reveals mode of  $\beta$ -glucosidase activation by saposin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 17394-17399.
94. Wilkening, G.; Linke, T.; Sandhoff, K. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 30271-30278.
95. Tsuji, S.; Choudary, P. V.; Martin, B. M.; Stubblefield, B. K.; Mayor, J. A.; Barranger, J. A.; Ginns, E. I. A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 570-575.



96. Hruska, K. S.; LaMarca, M. E.; Scott, C. R.; Sidransky, E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 567-583.
97. Beutler, E.; Nguyen, N. J.; Henneberger, M. W.; Smolec, J. M.; McPherson, R. A.; West, C.; Gelbart, T. Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am. J. Hum. Genet.* **1993**, *52*, 85-88.
98. Giraldo, P.; Pocovi, M.; Perez-Calvo, J.; Rubio-Felix, D.; Giralto, M. Report of the Spanish Gaucher's disease registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica* **2000**, *85*, 792-799.
99. Koprivica, V.; Stone, D. L.; Park, J. K.; Callahan, M.; Frisch, A.; Cohen, I. J.; Tayebi, N.; Sidransky, E. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 1777-1786.
100. Alfonso, P.; Aznarez, S.; Giralto, M.; Pocovi, M.; Giraldo, P. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J. Hum. Genet.* **2007**, *52*, 391-396.
101. Tsuji, S.; Martin, B. M.; Barranger, J. A.; Stubblefield, B. K.; LaMarca, M. E.; Ginns, E. I. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1988**, *85*, 2349-2352.
102. a) Tayebi, N.; Reissner, K. J.; Lau, E. K.; Stubblefield, B. K.; Klineburgess, A. C.; Martin, B. M.; Sidransky, E. Genotypic heterogeneity and phenotypic variation among patients with type 2 Gaucher's disease. *Pediatr. Res.* **1998**, *43*, 571-578; b) Stone, D. L.; Carey, W. F.; Christodoulou, J.; Sillence, D.; Nelson, P.; Callahan, M.; Tayebi, N.; Sidransky, E. Type 2 Gaucher disease: the collodion baby phenotype revisited. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2000**, *82*, F163-F166.
103. Laine, R. A. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.
104. Wolfenden, R.; Lu, X.; Young, G. Spontaneous Hydrolysis of Glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814-6815.
105. Wolfenden, R.; Snider, M. J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 938-945.
106. Koshland, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416-436.
107. Gloster, T. M.; Davies, G. J. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305-320.

108. Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. Recent Developments of Transition-State Analogue Glycosidase Inhibitors of Non-Natural Product Origin. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-554.
109. Legler, G. *Glycosidase Inhibition by Basic Sugar Analogs and the Transition State of Enzymatic Glycoside Hydrolysis, en Iminosugars as Glycosidase Inhibitors.* **1999**, Vol., Wiley-VCH:Weinheim, pp 31-67.
110. a) Sasak, V. W.; Ordovas, J. M.; Elbein, A. D.; Berninger, R. W. Castanospermine inhibits glucosidase I and glycoprotein secretion in human hepatoma cells. *Biochem. J.* **1985**, *232*, 759-766; b) Saul, R.; Chambers, J. P.; Molyneux, R. J.; Elbein, A. D. Castanospermine, a tetrahydroxylated alkaloid that inhibits  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *221*, 593-597.
111. a) Greenberg, P.; Merrill, A. H.; Liotta, D. C.; Grabowski, G. A. Human acid  $\beta$ -glucosidase: use of sphingosyl and *N*-alkyl-glucosylamine inhibitors to investigate the properties of the active site. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1039*, 12-20; b) Osiecki-Newman, K.; Fabbro, D.; Legler, G.; Desnick, R. J.; Grabowski, G. A. Human acid  $\beta$ -glucosidase: use of inhibitors, alternative substrates and amphiphiles to investigate the properties of the normal and Gaucher disease active sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *915*, 87-100; c) Osiecki-Newman, K.; Legler, G.; Grace, M.; Dinur, T.; Gatt, S.; Desnick, R. J.; Grabowski, G. A. Human acid  $\beta$ -glucosidase: inhibition studies using glucose analogues and pH variation to characterize the normal and Gaucher disease glycon binding sites. *Enzyme* **1988**, *40*, 173-188.
112. Dwek, R. A.; Butters, T. D.; Platt, F. M.; Zitzmann, N. Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 65-75.
113. Yu, L.; Ikeda, K.; Kato, A.; Adachi, I.; Godin, G.; Compain, P.; Martin, O.; Asano, N.  $\alpha$ -1-*C*-octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736-7744.
114. Alfonso, P.; Pampin, S.; Estrada, J.; Rodriguez-Rey, J. C.; Giraldo, P.; Sancho, J.; Pocovi, M. Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid  $\beta$ -glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells Mol. Dis.* **2005**, *35*, 268-276.
115. Sawkar, A. R.; Cheng, W. C.; Beutler, E.; Wong, C. H.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S  $\beta$ -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 15428-15433.
116. Sawkar, A. R.; Adamski-Werner, S. L.; Cheng, W. C.; Wong, C. H.; Beutler, E.; Zimmer, K. P.; Kelly, J. W. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1235-1244.
117. Wang, G. N.; Reinkensmeier, G.; Zhang, S. W.; Zhou, J.; Zhang, L. R.; Zhang, L. H.; Butters, T. D.; Ye, X. S. Rational design and synthesis of highly potent pharmacological chaperones for treatment of N370S mutant Gaucher disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3146-3149.

118. a) Aguilar-Moncayo, M.; Gloster, T. M.; Turkenburg, J. P.; Garcia-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Davies, G. J.; Garcia Fernandez, J. M. Glycosidase inhibition by ring-modified castanospermine analogues: tackling enzyme selectivity by inhibitor tailoring. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2738-2747; b) Brumshtein, B.; Aguilar-Moncayo, M.; Garcia-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M.; Silman, I.; Shaaltiel, Y.; Aviezer, D.; Sussman, J. L.; Futerman, A. H. 6-Amino-6-deoxy-5,6-di-*N*-(*N*-octyliminomethylidene)nojirimycin: synthesis, biological evaluation, and crystal structure in complex with acid  $\beta$ -glucosidase. *Chembiochem* **2009**, *10*, 1480-1485.
119. Luan, Z.; Higaki, K.; Aguilar-Moncayo, M.; Ninomiya, H.; Ohno, K.; Garcia-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M.; Suzuki, Y. Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with *N*-(*n*-nonyl)deoxynojirimycin. *Chembiochem* **2009**, *10*, 2780-2792.
120. Chang, H. H.; Asano, N.; Ishii, S.; Ichikawa, Y.; Fan, J. Q. Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *FEBS J.* **2006**, *273*, 4082-4092.
121. Zhu, X.; Sheth, K. A.; Li, S.; Chang, H. H.; Fan, J. Q. Rational design and synthesis of highly potent  $\beta$ -glucocerebrosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7450-7453.
122. Yu, Z.; Sawkar, A. R.; Whalen, L. J.; Wong, C. H.; Kelly, J. W. Isofagomine- and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 94-100.
123. Lieberman, R. L.; Wustman, B. A.; Huertas, P.; Powe, A. C.; Pine, C. W.; Khanna, R.; Schlossmacher, M. G.; Ringe, D.; Petsko, G. A. Structure of acid  $\beta$ -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 101-107.
124. Compain, P.; Martin, O. R.; Boucheron, C.; Godin, G.; Yu, L.; Ikeda, K.; Asano, N. Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *Chembiochem* **2006**, *7*, 1356-1359.
125. Tsunoda, H.; Inokuchi, J. I.; Yamagishi, K.; Ogawa, S. Pseudosugars, 35. Synthesis of glycosylceramide analogs composed of imino-linked unsaturated 5a-carbaglycosyl residues: Potent and specific gluco- and galactocerebrosidase inhibitors. *Liebigs Annalen* **1995**, *1995*, 279-284.
126. Ogawa, S.; Ashiura, M.; Uchida, C.; Watanabe, S.; Yamazaki, C.; Yamagishi, K.; Inokuchi, J.-i. Synthesis of potent  $\beta$ -D-glucocerebrosidase inhibitors: *N*-alkyl- $\beta$ -valienamines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 929-932.
127. Ogawa, S.; Kobayashi, Y.; Kabayama, K.; Jimbo, M.; Inokuchi, J. Chemical modification of  $\beta$ -glucocerebrosidase inhibitor *N*-octyl- $\beta$ -valienamine: synthesis and biological evaluation of *N*-alkanoyl and *N*-alkyl derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1955-1962.

128. a) Lei, K.; Ninomiya, H.; Suzuki, M.; Inoue, T.; Sawa, M.; Iida, M.; Ida, H.; Eto, Y.; Ogawa, S.; Ohno, K.; Suzuki, Y. Enzyme enhancement activity of *N*-octyl- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 587-596; b) Lin, H.; Sugimoto, Y.; Ohsaki, Y.; Ninomiya, H.; Oka, A.; Taniguchi, M.; Ida, H.; Eto, Y.; Ogawa, S.; Matsuzaki, Y.; Sawa, M.; Inoue, T.; Higaki, K.; Nanba, E.; Ohno, K.; Suzuki, Y. *N*-octyl- $\beta$ -valienamine up-regulates activity of F213I mutant  $\beta$ -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1689*, 219-228; c) Luan, Z.; Li, L.; Ninomiya, H.; Ohno, K.; Ogawa, S.; Kubo, T.; Iida, M.; Suzuki, Y. The pharmacological chaperone effect of *N*-octyl- $\beta$ -valienamine on human mutant acid  $\beta$ -glucosidases. *Blood Cells Mol. Dis.* **2010**, *44*, 48-54.
129. Ogawa, S.; Mito, T.; Taiji, E.; Jimbo, M.; Yamagishi, K.; Inokuchi, J.-i. Synthesis and biological evaluation of four stereoisomers of PDMP-analogue, *N*-(2-decylamino-3-hydroxy-3-phenylprop-1-yl)- $\beta$ -valienamine, and related compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1915-1920.
130. Egado-Gabás, M.; Canals, D.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A. Aminocyclitols as pharmacological chaperones for glucocerebrosidase, a defective enzyme in Gaucher disease. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 992-994.
131. Egado-Gabás, M.; Serrano, P.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A. New aminocyclitols as modulators of glucosylceramide metabolism. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1195-2201.
132. Serrano, P.; Casas, J.; Zucco, M.; Emeric, G.; Egado-Gabás, M.; Llebaria, A.; Delgado, A. Combinatorial approach to *N*-substituted aminocyclitol libraries by solution-phase parallel synthesis and preliminary evaluation as glucocerebrosidase inhibitors. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 43-52.
133. Sánchez-Ollé, G.; Duque, J.; Egado-Gabás, M.; Casas, J.; Lluch, M.; Chabás, A.; Grinberg, D.; Vilageliu, L. Promising results of the chaperone effect caused by imino sugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **2009**, *42*, 159-166.
134. Zheng, W.; Padia, J.; Urban, D. J.; Jadhav, A.; Goker-Alpan, O.; Simeonov, A.; Goldin, E.; Auld, D.; LaMarca, M. E.; Inglese, J.; Austin, C. P.; Sidransky, E. Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 13192-13197.
135. Maegawa, G. H.; Tropak, M. B.; Buttner, J. D.; Rigat, B. A.; Fuller, M.; Pandit, D.; Tang, L.; Kornhaber, G. J.; Hamuro, Y.; Clarke, J. T.; Mahuran, D. J. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23502-23516.
136. Bendikov-Bar, I.; Ron, I.; Filocamo, M.; Horowitz, M. Characterization of the ERAD process of the L444P mutant glucocerebrosidase variant. *Blood Cells Mol. Dis.* **2011**, *46*, 4-10.

137. Rempel, B. P.; Withers, S. G. Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology. *Glycobiology* **2008**, *18*, 570-586.
138. Atsumi, S.; Nosaka, C.; Iinuma, H.; Umezawa, K. Inhibition of glucocerebrosidase and induction of neural abnormality by cyclophellitol in mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297*, 362-367.
139. Xu, Y. H.; Quinn, B.; Witte, D.; Grabowski, G. A. Viable mouse models of acid  $\beta$ -glucosidase deficiency: the defect in Gaucher disease. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2093-2101.
140. Gloster, T. M.; Madsen, R.; Davies, G. J. Structural basis for cyclophellitol inhibition of a  $\beta$ -glucosidase. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 444-446.
141. Fan, J. Q.; Ishii, S.; Asano, N.; Suzuki, Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 112-115.
142. Schueler, U. H.; Kolter, T.; Kaneski, C. R.; Zirzow, G. C.; Sandhoff, K.; Brady, R. O. Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2004**, *27*, 649-658.
143. Suzuki, Y.; Ichinomiya, S.; Kurosawa, M.; Ohkubo, M.; Watanabe, H.; Iwasaki, H.; Matsuda, J.; Noguchi, Y.; Takimoto, K.; Itoh, M.; Tabe, M.; Iida, M.; Kubo, T.; Ogawa, S.; Nanba, E.; Higaki, K.; Ohno, K.; O. Brady, R. Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine GM1-Gangliosidosis. *Ann. Neurol.* **2007**, *62*, 671-675.
144. Germain, D. P.; Fan, J. Q. Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *47 Suppl 1*, S111-S117.
145. Xu, Y. H.; Ponce, E.; Sun, Y.; Leonova, T.; Bove, K.; Witte, D.; Grabowski, G. A. Turnover and distribution of intravenously administered mannose-terminated human acid  $\beta$ -glucosidase in murine and human tissues. *Pediatr. Res.* **1996**, *39*, 313-322.
146. Tropak, M. B.; Kornhaber, G. J.; Rigat, B. A.; Maegawa, G. H.; Buttner, J. D.; Blanchard, J. E.; Murphy, C.; Tuske, S. J.; Coales, S. J.; Hamuro, Y.; Brown, E. D.; Mahuran, D. J. Identification of pharmacological chaperones for Gaucher disease and characterization of their effects on  $\beta$ -glucocerebrosidase by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *ChemBiochem* **2008**, *9*, 2650-2662.
147. Marco-Contelles, J. Cyclohexane epoxides - Chemistry and biochemistry of (+)-cyclophellitol. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 1607-1618.
148. Atsumi, S.; Umezawa, K.; Iinuma, H.; Naganawa, H.; Nakamura, H.; Iitaka, Y.; Takeuchi, T. Production, isolation and structure determination of a novel  $\beta$ -glucosidase inhibitor, cyclophellitol, from *Phellinus* sp. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 49-53.
149. Withers, S. G.; Umezawa, K. Cyclophellitol: a naturally occurring mechanism-based inactivator of  $\beta$ -glucosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *177*, 532-537.

150. Atsumi, S.; Iinuma, H.; Nosaka, C.; Umezawa, K. Biological activities of cyclophellitol. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1579-1585.
151. Tai, V. W.; Fung, P. H.; Wong, Y. S.; Shing, T. K. Kinetic studies on cyclophellitol analogues--mechanism-based inactivators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *213*, 175-180.
152. Tai, V. W.; Fung, P. H.; Wong, Y. S.; Shing, T. K. M. Synthesis and glycosidase-inhibitory activity of cyclophellitol analogues. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1353-1362.
153. Tatsuta, K.; Niwata, Y.; Umezawa, K.; Toshima, K.; Nakata, M. Enantiospecific synthesis and biological evaluation of 1,6-*epi*-cyclophellitol. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 456-458.
154. Atsumi, S.; Nosaka, C.; Ochi, Y.; Iinuma, H.; Umezawa, K. Inhibition of experimental metastasis by an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, 1,6-*epi*-cyclophellitol. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4896-4899.
155. Legler, G. Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 319-384.
156. Kireev, A. S.; Breithaupt, A. T.; Collins, W.; Nadein, O. N.; Kornienko, A. Enantiodivergent formal synthesis of (+)- and (-)-cyclophellitol from D-xylose based on the latent symmetry concept. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 742-745.
157. Ishikawa, T.; Shimizu, Y.; Kudoh, T.; Saito, S. Conversion of D-glucose to cyclitol with hydroxymethyl substituent via intramolecular silyl nitronate cycloaddition reaction: application to total synthesis of (+)-cyclophellitol. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3879-3882.
158. a) Jung, M. E.; Choe, S. W. T. Total Synthesis of Cyclophellitol and (1*R*,2*S*)-Cyclophellitol from D-Mannose. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3280-3281; b) McDevitt, R. E.; Fraser-Reid, B. A Divergent Route for a Total Synthesis of Cyclophellitol and Epicyclophellitol from a [2.2.2]Oxabicyclic Glycoside Prepared from D-Glucal. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3250-3252; c) Shing, T. K. M.; Tai, V. W. F. (-)-Quinic acid in organic synthesis. part 4.1 syntheses of cyclophellitol and its (1*R*,6*S*)-, (2*S*)-, (1*R*,2*S*,6*S*)-diastereoisomers. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *14*, 2017-2025; d) Tatsuta, K.; Niwata, Y.; Umezawa, K.; Toshima, K.; Nakata, M. Total syntheses of glucosidase inhibitors, cyclophellitols. *Carbohydr. Res.* **1991**, *222*, 189-203.
159. a) Letellier, P.; Ralainairina, R.; Beaupere, D.; Uzan, R. Synthesis of New Cyclitol Derivatives. *Synthesis* **1997**, *8*, 925-930; b) Takahashi, H.; Iimori, T.; Ikegami, S. An efficient synthesis of cyclophellitol utilizing unusual regioselectivity of oxirane ring opening with Mes<sub>2</sub>BCH<sub>2</sub>Li. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6939-6942; c) Sato, K.; Bokura, M.; Moriyama, H.; Igarashi, T. Total Synthesis of a Novel  $\beta$ -Glucosidase Inhibitor, Cyclophellitol Starting from D-Glucose. *Chem. Lett.* **1994**, *23*, 37-40; d) Tatsuta, K.; Niwata, Y.; Umezawa, K.; Toshima, K.; Nakata, M. Enantiospecific Total Synthesis of a  $\beta$ -Glucosidase Inhibitor, Cyclophellitol. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1171-1172; e) Akiyama, T.; Ohnari, M.; Shima, H.; Ozaki, S. Total Synthesis of Cyclophellitol from L-Quebrachitol. *Synlett* **1991**, *11*, 831-832; f) Schlessinger, R. H.;

- Bergstrom, C. P. Enantioselective Synthesis of (+)-Cyclophellitol. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 16-17.
160. Ohba, K.; Suzuki, K.; Nakata, M. An improved practical synthesis of cyclophellitol and (1*R*,6*S*)-cyclophellitol from D-glucose by samarium diiodide promoted reductive coupling. *Carbohydr. Lett.* **1996**, *2*, 175-181.
161. Ziegler, F. E.; Wang, Y. A Synthesis of (+)-Cyclophellitol from D-Xylose. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 426-427.
162. Hansen, F. G.; Bundgaard, E.; Madsen, R. A Short Synthesis of (+)-Cyclophellitol. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10139-10142.
163. Trost, B. M.; Patterson, D. E.; Hembre, E. J. AAA in KAT/DYKAT processes: first- and second-generation asymmetric syntheses of (+)- and (-)-cyclophellitol. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3768-3775.
164. Nakata, M.; Chong, C.; Niwata, Y.; Toshima, K.; Tatsuta, K. A family of cyclophellitol analogs: synthesis and evaluation. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1919-1922.
165. Tatsuta, K. Total synthesis and chemical design of useful glycosidase inhibitors. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1341-1346.
166. González-Bulnes, P.; Casas, J.; Delgado, A.; Llebaria, A. Practical synthesis of (-)-1-amino-1-deoxy-*myo*-inositol from achiral precursors. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1947-1952.
167. Guo, Z.-X.; Haines, A. H.; Pyke, S. M.; Pyke, S. G.; Taylor, R. J. K. Improved preparation of (±)-(1,3/2,4)-5-cyclohexene-1,2,3,4-tetrol [(±)-condurotol-B] and its reaction with hydrobromic and hydrochloric acid; synthesis and characterisation of some (±)-1-deoxy-1-halo- and (±)-1,4-dideoxy-1,4-dihalocondurotols. *Carbohydr. Res.* **1994**, *264*, 147-153.
168. Trost, B. M.; Hembre, E. J. Pd Catalyzed kinetic resolution of condurotol B. Asymmetric synthesis of (+)-cyclophellitol. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 219-222.
169. Ogoshi, S.; Yoshida, W.; Ohe, K.; Murai, S. Reaction of palladium(II) complexes with allylsilanes: Convenient synthesis of [ $\eta^3$ -1-(silyl)allyl]palladium complexes. *Organometallics* **1993**, *12*, 578-579.
170. Nakai, T.; Mikami, K. [2,3]-Wittig sigmatropic rearrangements in organic synthesis. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 885-902.
171. Still, W. C.; Mitra, A. A highly stereoselective synthesis of Z-trisubstituted olefins via [2,3]-sigmatropic rearrangement. Preference for a pseudoaxially substituted transition state. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1927-1928.
172. Toyokuni, T.; Ogawa, S.; Suami, T. Synthetic studies on the validamycins. IV. Synthesis of DL- valienamine and related branched-chain unsaturated aminocyclitols. *Bull. Chem. Soc.* **1983**, *56*, 1161-1170.

- 
173. Ogawa, S.; Miyamoto, Y.; Nose, T. Synthetic studies on antibiotic validamycins. Part 12. Total synthesis of (+)-validamycin B and (+)-validoxylamine B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, *9*, 2675-2680.
174. Legler, G. Glucosidases. *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 368-381.
175. Pérez-Pons, J. A.; Cayetano, A.; Rebordosa, X.; Lloberas, J.; Guasch, A.; Querol, E. A  $\beta$ -glucosidase gene (bgl3) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and characterization of the encoded enzyme, a new member of family 1 glycosyl hydrolases. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 557-565.
176. Vallmitjana, M.; Ferrer-Navarro, M.; Planell, R.; Abel, M.; Ausin, C.; Querol, E.; Planas, A.; Perez-Pons, J. A. Mechanism of the family 1  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5975-5982.
177. a) Chapleur, Y. *Carbohydrate Mimics - Concepts and Methods.* **1998**, Chap.17, Wiley-VCH, Weinheim, 327-348; b) Ogawa, S. Design and Synthesis of Carba-Sugars of Biological Interest. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2004**, *16*, 33-53.
178. Ferrier, R. J.; Blattner, R.; Clinch, K.; Furneaux, R. H.; Gardiner, J. M.; Tyler, P. C.; Wightman, R. H.; Williams, N. R. *A Specialist Periodical Report, The Royal Society of Chemistry in Carbohydrate Chemistry.* **1996**, *28*, 251-262.
179. a) El Ashry, E. S. H.; Rashed, N.; Shobier, A. H. S. Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, part 1. *Pharmazie* **2000**, *55*, 251-262; b) El Ashry, E. S. H.; Rashed, N.; Shobier, A. H. S. Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, part 3. *Pharmazie* **2000**, *55*, 403-415; c) El Ashry, E. S. H.; Rashed, N.; Shobier, A. H. S. Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, part 2. *Pharmazie* **2000**, *55*, 331-348.
180. a) Delgado, A.; Casas, J.; Llebaria, A.; Abad, J. L.; Fabrias, G. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 1957-1977; b) Delgado, A.; Casas, J.; Llebaria, A.; Abad, J. L.; Fabrias, G. Chemical tools to investigate sphingolipid metabolism and functions. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 580-606.
181. Mahmud, T. The C<sub>7</sub>N aminocyclitol family of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 137-166.
182. Chen, X.; Fan, Y.; Zheng, Y.; Shen, Y. Properties and production of valienamine and its related analogues. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1955-1977.
183. a) Horii, S.; Fukase, H.; Matsuo, T.; Kameda, Y.; Asano, N.; Matsui, K. Synthesis and  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valioline derivatives as potential oral antidiabetic agents. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046; b) Horii, S.; Iwasa, T.; Kameda, Y. Studies on validamycins, new antibiotics. V. Degradation studies. *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 57-58.



184. a) Asano, N.; Kameda, Y.; Matsui, K. All eight possible mono- $\beta$ -D-glucosides of validoxylamine A. I. Preparation and structure determination. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1406-1416; b) Asano, N.; Tanaka, K.; Kameda, Y.; Matsui, K. All eight possible mono- $\beta$ -D-glucosides of validoxylamine A. II. Biological activities. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1417-1421; c) Lee, S.-B.; Park, K.-H.; Robyt, J. F. Inhibition of  $\beta$ -glycosidases by acarbose analogues containing cellobiose and lactose structures. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 13-18; d) McAuliffe, J. C.; Stick, R. V.; Stone, B. A. ' $\beta$ -Acarbose': A potential inhibitor of  $\beta$ -D-glucosidases and  $\beta$ -D-glucan hydrolases. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2479-2482.
185. a) Ogawa, S.; Ashiura, M.; Uchida, C. Synthesis of [ $\alpha$ ]-glucosidase inhibitors: kojibiose-type pseudodisaccharides and a related pseudotrisaccharide. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 83-95; b) Ogawa, S.; Maruyama, A.; Odagiri, T.; Yuasa, H.; Hashimoto, H. Synthesis and Biological Evaluation of  $\alpha$ -L-Fucosidase Inhibitors: 5a-Carba- $\alpha$ -L-fucopyranosylamine and Related Compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 967-974; c) Ogawa, S.; Orihara, M. Synthesis of the penta-*N,O*-acetyl derivatives of some pseudo-3-amino-3-deoxy-DL-hexopyranoses and -DL-hexopyranosylamine derivatives. *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 323-330.
186. Ogawa, S.; Nishi, K.; Shibata, Y. Synthesis of a carba-sugar analog of trehalosamine, [(1*S*)-(1,2,,5)-2-amino-3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-1-cyclohexyl]  $\alpha$ -D-glucopyranoside, and a revised synthesis of its  $\beta$  anomer. *Carbohydr. Res.* **1990**, *206*, 352-360.
187. a) Gravier-Pelletier, C.; Maton, W.; Dintinger, T.; Tellier, C.; Le Merrer, Y. Synthesis and glycosidase inhibitory activity of aminocyclitols with a C6- or a C7-ring. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8705-8720; b) Ogawa, S.; Fujieda, S.; Sakata, Y.; Ishizaki, M.; Hisamatsu, S.; Okazaki, K. Synthesis and glycosidase inhibitory activity of some *N*-substituted 6-deoxy-5a-carba- $\beta$ -DL- and L-galactopyranosylamines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3461-3463; c) Tanaka, K. S.; Winters, G. C.; Batchelor, R. J.; Einstein, F. W.; Bennet, A. J. A new structural motif for the design of potent glucosidase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 998-999.
188. Luan, Z.; Ninomiya, H.; Ohno, K.; Ogawa, S.; Kubo, T.; Iida, M.; Suzuki, Y. The effect of *N*-octyl- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev.* **2010**.
189. Egido-Gabás, M. Nuevos Aminociclitoles como moduladores del metabolismo de Glucosilceramida, Universitat de Barcelona. **2005**.
190. Serrano, P.; Llebaria, A.; Delgado, A. An Unexpected Chelation-Controlled Yb(OTf)<sub>3</sub>-Catalyzed Aminolysis and Azidolysis of Cyclitol Epoxides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7165-7167.
191. Serrano, P.; Llebaria, A.; Vazquez, J.; de Pablo, J.; Anglada, J. M.; Delgado, A. On the regio- and stereoselective synthesis of aminocyclitols from cyclitol epoxides: the effect of Li as a chelating agent. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4465-4472.
192. Tatsuta, K.; Niwata, Y.; Umezawa, K.; Toshima, K.; Nakata, M. Syntheses and enzyme inhibiting activities of cyclophellitol analogs. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 912-914.

193. a) Chini, M.; Crotti, P.; Flippin, L. A.; Macchia, F. Regiochemical control of the ring-opening of 1,2-epoxides by means of chelating processes. 3. Aminolysis and azidolysis of the *cis*- and *trans*-oxides derived from 4-(benzyloxy)cyclohexene. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7043-7048; b) Chini, M.; Crotti, P.; Favero, L.; Pineschi, M. Synthesis of  $\gamma$ -hydroxy ketones by LiClO<sub>4</sub>-catalyzed addition of lithium enolates to 1,2-Epoxides. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7583-7586.
194. a) Chini, M.; Crotti, P.; Favero, L.; Macchia, F.; Pineschi, M. Lanthanide(III) trifluoromethanesulfonates as extraordinarily effective new catalysts for the aminolysis of 1,2-epoxides. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 433-436; b) Chini, M.; Crotti, P.; Flippin, L. A.; Macchia, F. Alternating high regioselection in methyl group transfer to alicyclic oxiranes. Significance of the presence of a remote polar group. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6563-6566.
195. Fürst, A.; Plattner, P. A. Über Steroide und Sexualhormone. 160. Mitteilung. 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ - und 2 $\beta$ , 3 $\beta$ -Oxido-cholestane; Konfiguration der 2-Oxy-cholestane. *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 275-283.
196. Rickborn, B.; Murphy, D. K. Diequatorial opening of epoxides. 2,3-Dimethyl-2-octalin oxide. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3209-3209.
197. Ogawa, S.; Chida, N.; Suami, T. Synthetic studies on the validamycins. 5. Synthesis of DL-hydroxyvalidamine and DL-valienamine. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1203-1207.
198. McCarthy, J. R.; Wiedeman, P. E.; Schuster, A. J.; Whitten, J.; Barbuch, R. J.; Huffman, J. C. Stereospecific syntheses of the four diastereomeric 2-amino-5-phenoxy-cyclopentanol. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3095-3103.
199. Serrano, P.; Llebaria, A.; Delgado, A. Regio- and stereoselective synthesis of aminoinositols and 1,2-diaminoinositols from conduritol B epoxide. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7829-7840.
200. a) Cadenas, R. A.; Grass, M. Y.; Mosettig, J.; Gelpi, M. E. Nucleocyclitols. Coupling of heterocyclic bases to cyclitol oxiranes. *Nucleosides Nucleotides* **1990**, *9*, 21-34; b) Leicach, S. R.; Gelpi, M. E.; Cadenas, R. A. Nucleocyclitols. Synthesis of ethanolamino-purinyl inositol derivatives and their reaction with thionyl chloride. *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 2051-2058; c) Zhan, T.; Lou, H. Synthesis ofazole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 865-869.
201. Arcelli, A.; Cerè, V.; Peri, F.; Pollicino, S.; Ricci, A. Synthesis and glycosidase inhibition of new enantiopure 2,3-diamino conduritols. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3439-3444.
202. Godin, G.; Compain, P.; Martin, O. R.; Ikeda, K.; Yu, L.; Asano, N.  $\alpha$ -1-C-alkyl-1-deoxynojirimycin derivatives as potent and selective inhibitors of intestinal isomaltase: remarkable effect of the alkyl chain length on glycosidase inhibitory profile. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5991-5995.

203. Kameda, Y.; Asano, N.; Yoshikawa, M.; Takeuchi, M.; Yamaguchi, T.; Matsui, K.; Horii, S.; Fukase, H. Valiolamine, a new  $\alpha$ -glucosidase inhibiting aminocyclitol produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1301-1307.
204. Kornienko, A.; d'Alarcao, M. Synthesis of cyclitols via ring-closing metathesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 827-829.
205. Guedat, P.; Spiess, B.; Schlewer, G. Synthesis of ( $\pm$ )-1,2-dideoxy-1,2-diamino-*myo*-inositol. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7375-7378.
206. Azev, V. N.; D'Alarcao, M. Synthesis of 1,2-diamino-1,2-dideoxy-*myo*-inositol-derived ligands for the investigation of metal complex reactivity. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4839-4842.
207. Sawkar, A. R.; Schmitz, M.; Zimmer, K. P.; Reczek, D.; Edmunds, T.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. Chemical chaperones and permissive temperatures alter localization of Gaucher disease associated glucocerebrosidase variants. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 235-251.
208. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
209. Berecibar, A.; Grandjean, C.; Siriwardena, A. Synthesis and Biological Activity of Natural Aminocyclopentitol Glycosidase Inhibitors: Mannostatins, Trehazolin, Allosamidins, and Their Analogues. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 779-844.
210. Ando, O.; Satake, H.; Itoi, K.; Sato, A.; Nakajima, M.; Takahashi, S.; Haruyama, H.; Ohkuma, Y.; Kinoshita, T.; Enokita, R. Trehazolin, a new trehalase inhibitor. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1165-1168.
211. Nakayama, T.; Amachi, T.; Murao, S.; Sakai, T.; Shin, T.; Kenny, P. T. M.; Iwashita, T.; Zagorski, M.; Komura, H.; Nomoto, K. Structure of trehalostatin: a potent and specific inhibitor of trehalase. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 919-921.
212. Kobayashi, Y. Chemistry and biology of trehazolins. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 3-15.
213. a) Kobayashi, Y.; Miyazaki, H.; Shiozaki, M. Syntheses of Trehazolin, Trehalamine, and the Aminocyclitol Moiety of Trehazolin: Determination of Absolute Configuration of Trehazolin. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 813-822; b) Shiozaki, M.; Arai, M.; Kobayashi, Y.; Kasuya, A.; Miyamoto, S.; Furukawa, Y.; Takayama, T.; Haruyama, H. Stereocontrolled Syntheses of 6-*epi*-Trehazolin and 6-*epi*-Trehalamine from D-Ribonolactone. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4450-4460; c) Shiozaki, M.; Kobayashi, Y.; Arai, M.; Haruyama, H. Synthesis of 6-*epi*-trehazolin from D-ribonolactone: Evidence for the non-existence of a 5,6-ringfused structural isomer of 6-*epi*-trehazolin. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 887-890.
214. a) Ogawa, S.; Uchida, C. Total Synthesis of Trehalase Inhibitor, Trehazolin. *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 173-176; b) Uchida, C.; Yamagishi, T.; Ogawa, S. Total Synthesis and Trehalase-Inhibitory Activity of Trehalostatin and Its Diastereoisomer. *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 971-974.

215. a) Boiron, A.; Zillig, P.; Faber, D.; Giese, B. Synthesis of Trehazolin from D-Glucose. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5877-5882; b) Crimmins, M. T.; Tabet, E. A. Formal Total Synthesis of (+)-Trehazolin. Application of an Asymmetric Aldol-Olefin Metathesis Approach to the Synthesis of Functionalized Cyclopentenes. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4012-4018; c) Seepersaud, M.; Al-Abed, Y. An enantioselective approach to trehazolin: a concise and efficient synthesis of the aminocyclopentitol core. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1471-1473; d) Storch de Gracia, I.; Dietrich, H.; Bobo, S.; Chiara, J. L. A Highly Efficient Pinacol Coupling Approach to Trehazolamine Starting from D-Glucose. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5883-5889; e) Akiyama, M.; Awamura, T.; Kimura, K.; Hosomi, Y.; Kobayashi, A.; Tsuji, K.; Kuboki, A.; Ohira, S. Stereocontrolled synthesis of the aminocyclitol moiety of (+)-trehazolin via C-H insertion reaction of alkyldenecarbene. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7133-7136.
216. Uchida, C.; Yamagishi, T.; Kitahashi, H.; Iwaisaki, Y.; Ogawa, S. Further chemical modification of trehalase inhibitor trehazolin: structure and inhibitory-activity relationship of the inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1605-1624.
217. Sakuda, S.; Isogai, A.; Matsumoto, S.; Suzuki, A.; Koseki, K. The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* Sp. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2475-2478.
218. a) Hohenschutz, L. D.; Bell, E. A.; Jewess, P. J.; Leworthy, D. P.; Pryce, R. J.; Arnold, E.; Clardy, J. Castanospermine, A 1,6,7,8-tetrahydroxyoctahydroindolizine alkaloid, from seeds of *Castanospermum australe*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 811-814; b) Reymond, J. L.; Pinkerton, A. A.; Vogel, P. Total, asymmetric synthesis of (+)-castanospermine, (+)-6-deoxycastanospermine, and (+)-6-deoxy-6-fluorocastanospermine. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2128-2135.
219. a) Colegate, S. M.; Dorling, P. R.; Huxtable, C. R. A spectroscopic investigation of swainsonine: an  $\alpha$ -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257-2264; b) Fleet, G. W. J.; Gough, M. J.; Smith, P. W. Enantiospecific Synthesis of Swainsonine, (1*S*, 2*R*, 8*R*, 8*aR*)-1,2,8-trihydroxyoctahydroindolizine, from D-mannose. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1853-1856.
220. Dräger, B. Chemistry and biology of calystegines. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 211-223.
221. Heck, M.-P.; Vincent, S. P.; Murray, B. W.; Bellamy, F.; Wong, C.-H.; Mioskowski, C. Cyclic Amidine Sugars as Transition-State Analogue Inhibitors of Glycosidases: Potent Competitive Inhibitors of Mannosidases. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1971-1979.
222. a) Gloster, T. M.; Roberts, S.; Perugino, G.; Rossi, M.; Moracci, M.; Panday, N.; Terinek, M.; Vasella, A.; Davies, G. J. Structural, Kinetic, and Thermodynamic Analysis of Glucoimidazole-Derived Glycosidase Inhibitors. *Biochemistry* **2006**, *45*, 11879-11884; b) Granier, T.; Panday, N.; Vasella, A. Structure-Activity Relations for Imidazo-pyridine-Type Inhibitors of  $\beta$ -D-Glucosidases. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 979-987; c) Heightman, T. D.; Vasella, A. T. Recent Insights into Inhibition, Structure, and Mechanism of Configuration-Retaining Glycosidases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750-770.

223. Panday, N.; Canac, Y.; Vasella, A. Very Strong Inhibition of Glucosidases by C(2)-Substituted Tetrahydroimidazopyridines. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 58-79.
224. Storch de Gracia, I.; Bobo, S.; Martín-Ortega, M. D.; Chiara, J. L. A Concise and Highly Efficient Synthesis of Trehazolin and Trehalamine Starting from D-Mannose. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1705-1708.
225. Uchida, C.; Kimura, H.; Ogawa, S. Synthesis and biological evaluation of potent glycosidase inhibitors: *N*-phenyl cyclic isourea derivatives of 5-amino- and 5-amino-C-(hydroxymethyl)-1,2,3,4-cyclopentanetetraols. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 921-939.
226. Harrak, Y.; Barra, C. M.; Bedia, C.; Delgado, A.; Castano, A. R.; Llebaria, A. Aminocyclitol-substituted phytoceramides and their effects on iNKT cell stimulation. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1608-1613.
227. Stang, P. J.; Maas, G.; Smith, D. L.; McCloskey, J. A. Dication ether salts, R<sup>+</sup>-O-R<sup>+</sup>.2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, from the reaction of trifluoromethanesulfonic anhydride with activated ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4837-4845.
228. a) Charette, A.; Chua, P. A new method for the conversion of secondary and tertiary amides to bridged orthoesters. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8499-8502; b) Sforza, S.; Dossena, A.; Corradini, R.; Virgili, E.; Marchelli, R. Tf<sub>2</sub>O/Amide adducts: Versatile reagents for the synthesis of imidates and amidines. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 711-714.
229. Shiozaki, M.; Yoshiike, R.; Ando, O.; Ubukata, O.; Haruyama, H. Syntheses of 1-deoxynojirimycin-trehalamine-fused and -linked compounds and their biological activities. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15167-15182.
230. Yamauchi, N.; Kakinuma, K. Biochemical studies on 2-deoxy-*scyllo*-inosose, an early intermediate in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine. I. Chemical synthesis of 2-deoxy-*scyllo*-inosose and [2,2-2H<sub>2</sub>]-2-deoxy-*scyllo*-inosose. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1992**, *45*, 756-766.
231. Aneja, R.; Parra, A. Facile optical resolution of DL-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol: Key synthons for the phosphoinositides. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 525-526.



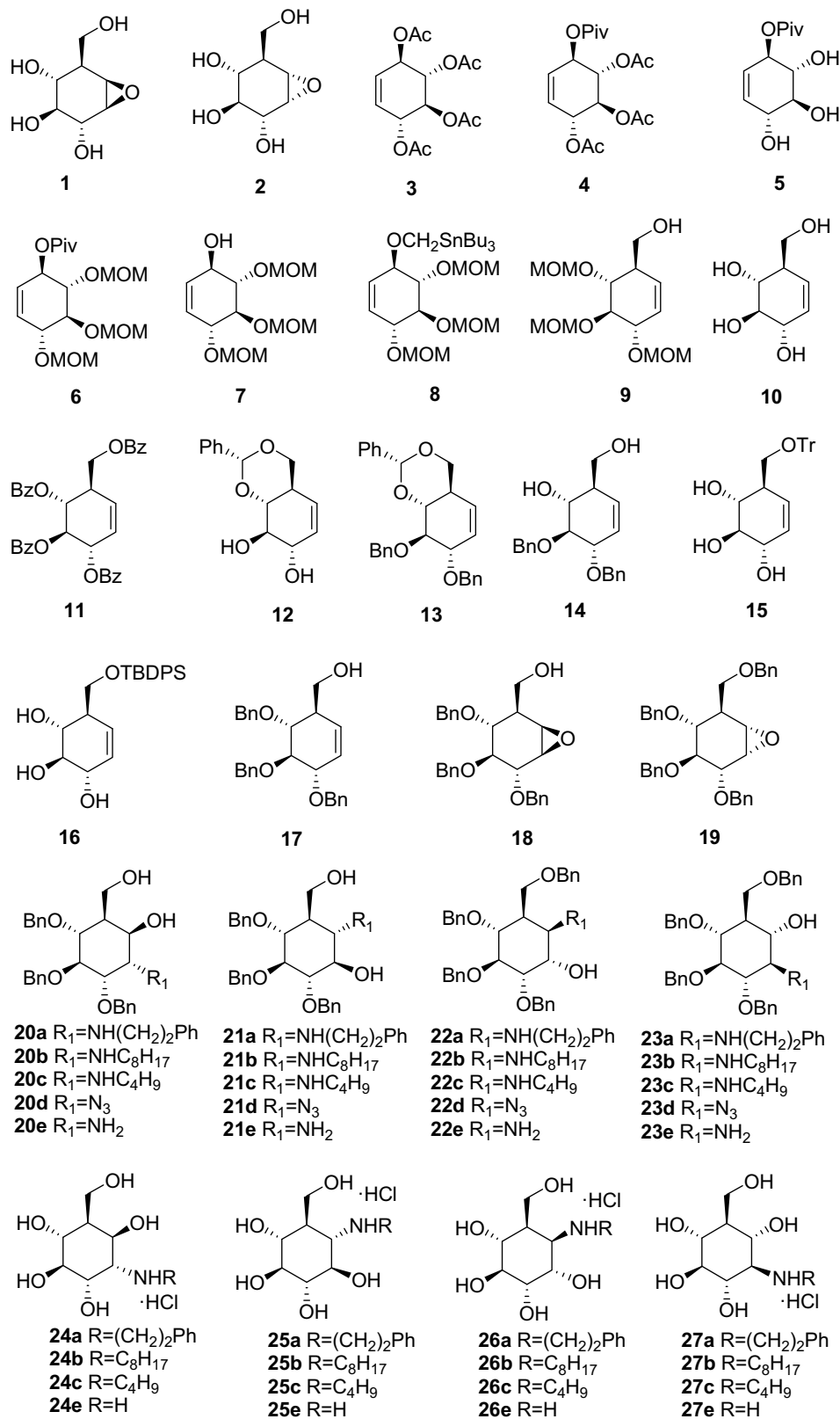


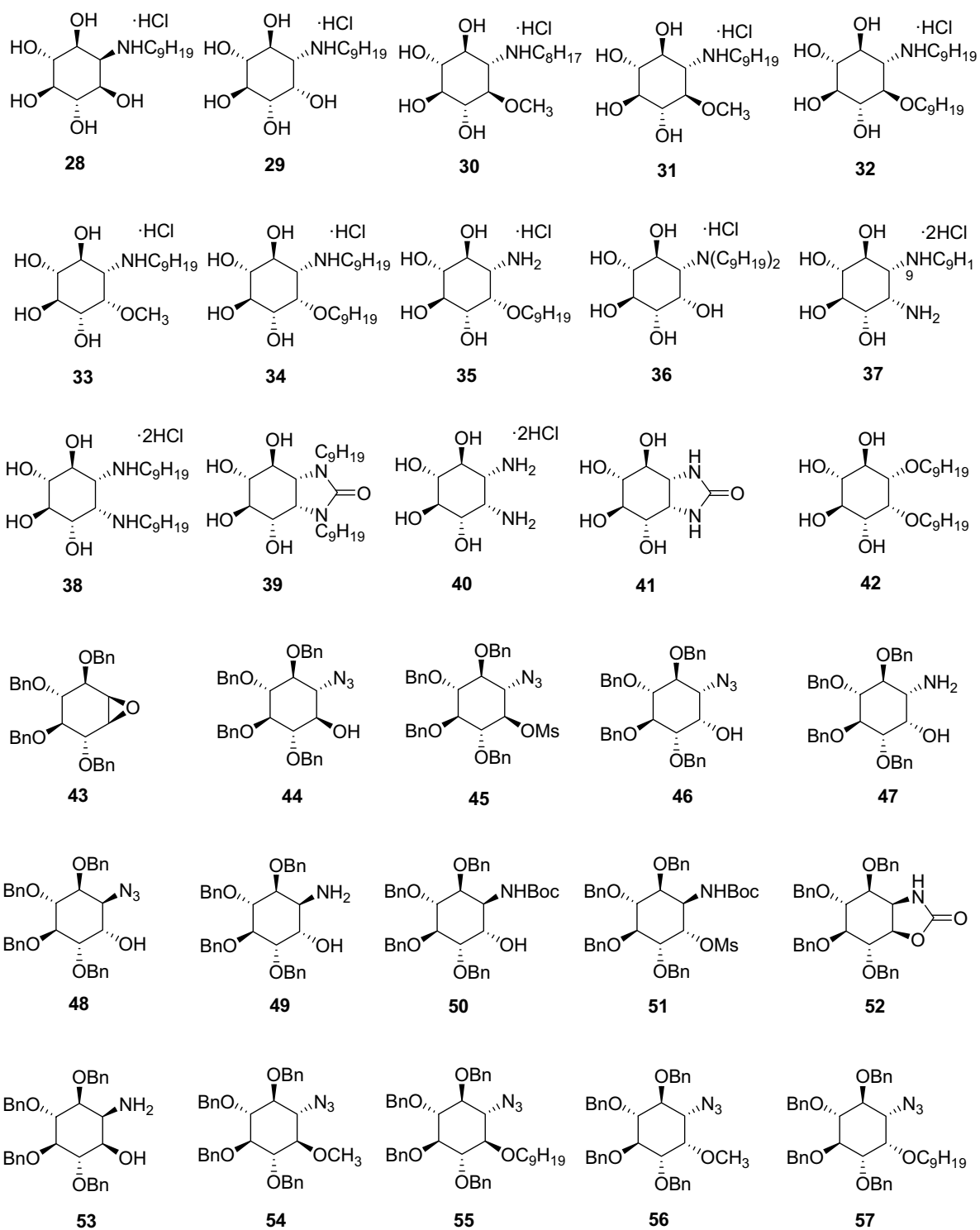
## *10.Índex de compostos*

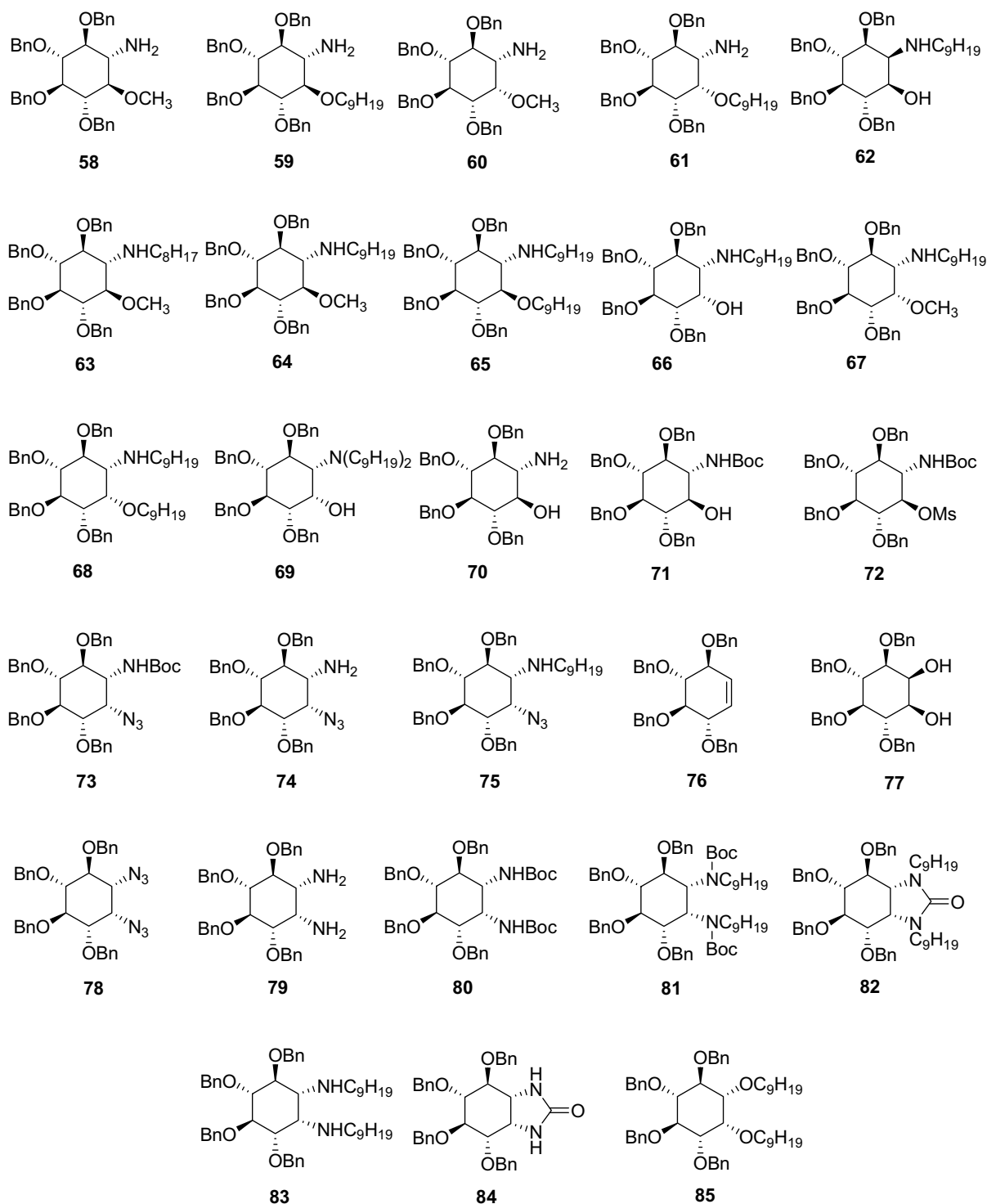
---

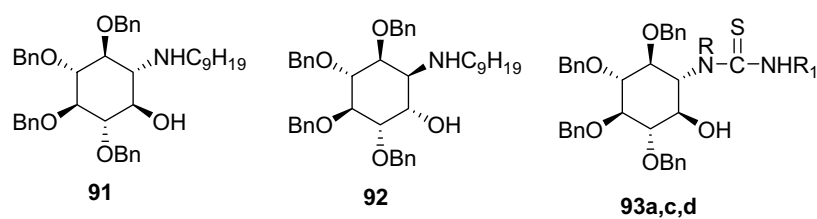
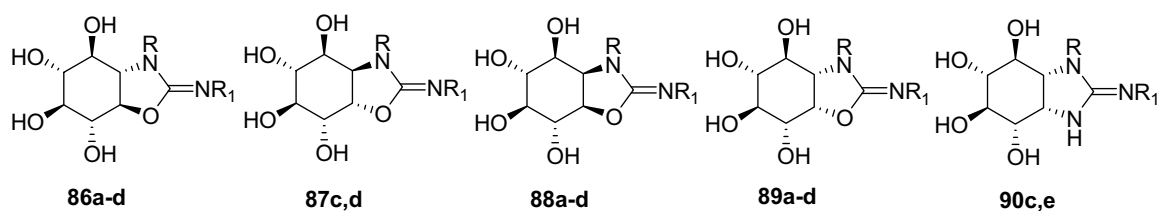












<b>a:</b> R = H; R <sub>1</sub> = C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>
<b>b:</b> R = H; R <sub>1</sub> = C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>
<b>c:</b> R = H; R <sub>1</sub> = C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>
<b>d:</b> R = R <sub>1</sub> = C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>
<b>e:</b> R = H; R <sub>1</sub> = (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Ph

