

## **TESIS DOCTORAL**

Título
Síntesis de α/β-péptidos híbridos tioglicosilados mediante apertura de sulfamidatos cíclicos
Autor/es
Iván García González
Director/es
Alberto Avenoza Aznar y Jesús Héctor Busto Sancirián
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico



#### Síntesis de α/β-péptidos híbridos tioglicosilados mediante apertura de sulfamidatos cíclicos, tesis doctoral

de Iván García González, dirigida por Alberto Avenoza Aznar y Jesús Héctor Busto Sancirián (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor

 © Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2016 publicaciones.unirioja.es
 E-mail: publicaciones@unirioja.es Facultad de Ciencia y Tecnología

Departamento de Química Área de Química Orgánica



**TESIS DOCTORAL** 

# SÍNTESIS DE $\alpha/\beta$ -PÉPTIDOS HÍBRIDOS TIOGLICOSILADOS MEDIANTE APERTURA DE SULFAMIDATOS CÍCLICOS

Memoria presentada en la Universidad de La Rioja para optar al grado de Doctor en Química por:

Iván García González

Junio 2016

**ALBERTO AVENOZA AZNAR**, Catedrático de Química Orgánica del Departamentode Química de la Universidad de La Rioja y

**JESÚS HÉCTOR BUSTO SANCIRIÁN**, Profesor Titular de Química Orgánica delDepartamento de Química de la Universidad de La Rioja

#### **CERTIFICAN:**

Que la memoria "Síntesis de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos tioglicosilados mediante apertura de sulfamidatos cíclicos" ha sido realizada por el Licenciado Iván García González en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja bajo su inmediata dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Logroño, Junio 2016

Fdo.: Alberto Avenoza Aznar

Fdo.: Jesús Héctor Busto Sancirián

### Abreviaciones, siglas, acrónimos y símbolos

Å	angstrom				
δ	desplazamiento químico				
[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub>	rotación específica				
φ	ángulo diedro ( <i>phi</i> )				
ψ	ángulo diedro ( <i>psi</i> )				
θ	ángulo diedro ( <i>theta</i> )				
μL	microlitro				
°C	grado Celsius				
<sup>1</sup> H RMN	resonancia magnética nuclear de protón				
<sup>13</sup> C RMN	resonancia magnética nuclear de carbono-13				
Аа	$\alpha$ -aminoácido				
Αβ	beta-amiloide				
Ac	acetilo				
ac.	acuoso				
ACC	ácido aminociclopropanocarboxílico				
AcCl	cloruro de acetilo				
ACBC	ácido aminociclobutanocarboxílico				
ACHC	ácido aminociclohexanocarboxílico				
AcO	acetato				
Ac <sub>2</sub> O	anhídrido acético				
AcOEt	acetato de etilo				
ACPC	ácido aminociclopentanocarboxílico				
ADN	ácido desoxirribonucleico				
Ala	alanina				
AICI <sub>3</sub>	tricloruro de aluminio				
AMBER	assisted model building with energy refinement				
anti	antiperiplanar				
APC	ácido aminopirrolidincarboxílico				
APP	precursor proteico amiloide				
arom	aromático				
BDPMI	(4S,5S)-4,5-bis(difenilfosfanilmetil)imidazolidin-2-ona				
BICP	bis-ciclopentildifenilfosfina				
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo				
Bn	bencilo				
BnBr	bromuro de bencilo				
Вос	<i>terc</i> -butoxicarbonilo				

ВОР	(benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato				
Boc <sub>2</sub> O	carbonato de di- <i>terc</i> -butilo				
br s	broad singlet				
BTA	benzotriazol				
Bu	butilo				
<sup>t</sup> Bu	<i>terc</i> -butilo				
<sup>t</sup> BuOH	terc-butanol				
Bz	benzoilo				
cat.	catalizador				
Ch.	chapter				
COSY	<sup>1</sup> H- <sup>i</sup> H correlated spectroscopy				
CN <sup>-</sup>	anión cianuro				
Cys	cisteína				
d	doblete, días				
DBU	1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno				
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida				
dd	doblete de dobletes				
DFT	teoría del funcional de densidad				
DHQ	dihidroquinina				
DHQD	dihidroquinidina				
DIEA	N,N-diisopropiletilamina				
DM	dinámica molecular				
DMAP	N,N-dimetilaminopiridina				
DMEA	dimetiletanolamina				
DMF	N,N-dimetilformamida				
DMF-d <sub>7</sub>	N,N-dimetilformamida deuterada				
DuPhos	1,2-bis[(2R,5R)-2,5-dimetilfosfolano]benceno				
E2	reacción de eliminación bimolecular				
eq	equivalente				
ESI	ionización por electrospray				
Et	etilo				
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo				
g	gramo				
Gal	galactosa				
GalNAc	N-acetil-galactosamina				
Glc	glucosa				
GlcNAc	N-acetil-glucosamina				
Gly	glicina				
GP	grupo protector				

h	horas					
HATU	hexafluorophosphate de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-					
	triazol [4,5]bipiridinio 3-óxido					
His	histidina					
НМВС	heteronuclear multiple bond correlation					
НМРА	hexametilfosforamida					
HOAt	7-aza-1-hidroxibenzotriazol					
HOBt	1-hidroxibenzotriazol					
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución					
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución					
HSQC	<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronuclear single quantum correlation					
Hz	hercio					
Im	imidazol					
IsoSer	isoserina					
J	constante de acoplamiento					
К	grado Kelvin					
L*	ligando quiral					
Leu	leucina					
m	multiplete					
Μ	molaridad					
mCPBA	ácido 3-cloroperbenzóico					
MD-tar	molecular dynamics with time-averaged restraints					
Ме	metilo					
MeOH	metanol					
MeOH-d <sub>4</sub>	metanol deuterado					
MeONa	metóxido de sodio					
mg	miligramo					
min	minutos					
mL	mililitro					
MM	mecánica molecular					
mmol	milimol					
m/z	realación masa/carga					
Ν	normalidad					
NMM	N-metil morfolina					
NOE/ NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy					
Nu	nucleófilo					
Pd/C	paladio soportado sobre carbono al 10% (en peso)					
Ph	fenilo					
Phe	fenilalanina					

Piv	pivaloilo				
PNB	<i>p</i> -nitrobenzoilo				
ppm	, partes por millón				
Pr	propilo				
<sup>i</sup> Pr	iso-propilo				
<sup>i</sup> PrOH	isopropanol				
Pro	prolina				
Ру	piridina				
РуВОР	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi) tripirrolidinofosfonio				
R	sustituyente				
RMN	resonancia magnética nuclear				
rto	rendimiento				
S	singlete				
Ser	serina				
S <sub>N</sub> 2	sustitución nucleófila bimolecular				
SPR	resonancia de plasmón de superficie				
STD	diferencia de transferencia de saturación				
Sul	sulfamidato				
т	temperatura				
t	triplete				
t.a.	temperatura ambiente				
TBAHS	hidrogenosulfato de tetrabutilamonio				
TEA	trietilamina				
TFA	ácido trifluoroacético				
TBTU	tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-				
	il)uronio				
TfOH	ácido trifluorometanosulfónico (ácido tríflico)				
TFPTTL	tetrakis[N-tetrafluoroftaloil-(S)-terc-leucinato				
THF	tetrahidrofurano				
Thr	treonina				
TLC	thin layer chromatography				
TMS	tetrametilsilano				
TMSCN	cianuro de trimetilsililo				
TMSI	yoduro de trimetilsililo				
t <sub>r</sub>	tiempo de retención				
Trt	trifenilmetilo (tritilo)				
Trp	triptófano				
Val	valina				
W	vatio				



## INTRODUCCIÓN

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes en los seres vivos, y sus propiedades físicas y químicas vienen determinadas por las subunidades de aminoácidos que las constituyen.<sup>1</sup>

La complejidad de estas estructuras varía desde el pequeño y simple péptido sin estructura tridimensional concreta, hasta complicados agrupamientos plegados y altamente organizados que pueden presentar las proteínas (Figura 1.1):

a) Estructura primaria, representa la forma de organización más básica de las proteínas. Este tipo de estructura de las proteínas está determinada por la secuencia de aminoácidos de la cadena proteica; es decir, por el número de aminoácidos presentes y por el orden en el que están enlazados por medio de enlaces peptídicos.

b) **Estructura secundaria**, corresponde a la disposición espacial de las moléculas de aminoácidos. Existen dos tipos principales de estructuras secundarias,  $\alpha$  hélice y lámina  $\beta$ .

c) Estructura terciaria, es la distribución tridimensional de todos los átomos que constituyen la proteína y está generalmente conformada por varios tramos con estructuras secundarias distintas.

d) **Estructura cuaternaria**, representa el nivel más complejo de organización de las proteínas y corresponde a la unión de dos o más cadenas polipeptídicas con estructura terciaria mediante uniones débiles como los enlaces de hidrógeno.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Andrew, B. H. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry Vols.* 1-5, **2011**, Wiley-VCH.



Figura 1.1 Niveles de complejidad estructural de las proteínas

Los responsables de esta increíble diversidad son 20 aminoácidos diferentes (22 incluyendo selenocisteína y pirrolisina),<sup>2</sup> conectados entre sí de forma repetitiva, mediante enlaces amida o enlaces peptídicos. La única diferencia que existe entre todos ellos es la estructura de la cadena lateral, ya que mantienen el mismo esqueleto aminoacídico (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Representación esquemática de un α-aminoácido y de su disposición espacial cuando se encuentran formando parte de péptidos

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Hao, B., Gong, W., Ferguson, T. K., James, C. M., Krzycki, J. A., Chan, M. K. *Science* **2002**, *296*, 1462-1466.

Cada aminoácido (excepto la glicina) puede tener dos formas isoméricas, por la posibilidad de existir como dos diferentes enantiómeros alrededor del átomo de carbono alfa. Estructuralmente, las dos posibles formas enantioméricas de cada aminoácido se denominan configuración D o L dependiendo de la orientación relativa en el espacio de los 4 grupos distintos unidos al carbono alfa.

Todos los aminoácidos proteicos son L-aminoácidos, pero ello no significa que sean levógiros. Se consideran L-aminoácidos los que estructuralmente derivan de L-gliceraldehído y D-aminoácidos los derivados del D-gliceraldehído (Figura 1.3).



Figura 1.3 Denominación D ó L de los aminoácidos atendiendo a su semejanza con el Lgliceraldehído

Los L-aminoácidos son los usados por los seres vivos para la síntesis de proteinas, mientras que sólo existen unos pocos ejemplos en los que los D-aminoácidos sean empleados; como ejemplo, podemos encontrarlos en las paredes celulares bacterianas pero no como constituyentes de proteínas.<sup>3</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Lam, H., Oh, D. C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., De Pedro, M. A., Waldor, M. K. *Science* **2009**, *325*, 1552-1555.

Los aminoácidos que constituyen las proteínas y están codificados en el genoma son  $\alpha$ -aminoácidos, esto significa que el grupo amino está unido al carbono adyacente al grupo carboxílico.

Con menor frecuencia, se observan formando parte de algunos péptidos,  $\beta$ aminoácidos en los que el grupo amino está ubicado en el carbono 3 de la cadena, y también  $\gamma$ -aminoácidos, en cuyo caso está ubicado en el carbono 4. Como ejemplo más significativo de ambos podemos encontrar de forma más abundante la  $\beta$ -alanina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Figura 1.4).



Figura 1.4 Estructuras de  $\alpha$ -aminoácidos,  $\beta$ -alanina y ácido Y-aminobutírico

Algunos  $\beta$ -aminoácidos muestran interesantes propiedades farmacológicas por si mismos, pero por lo general son intermedios sintéticos hacia productos más complejos con actividad biológica y farmacológica de mayor interés.

Podemos encontrar este tipo de aminoácidos en forma cíclica<sup>4</sup> o acíclica. Los  $\beta$ aminoácidos cíclicos de 3 y 4 miembros y sus derivados son relativamente raros en la naturaleza. En cambio, existen ejemplos cíclicos de 5 miembros con actividad

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> a) Kiss, L., Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1116-1169 b) Ramanathan, G., Duley, A., *Cyclic* β-amino acids as conformational constraints, in Biomolecular forms and functions: a celebration of 50 years of the Ramachandran map Bansal, M., Srinivasan, N. IISc Press-WSPC **2013**, 282-295.

antifúngica como la cispentacina<sup>5</sup> y el Bay-10-8888<sup>6</sup> y los de 6 miembros como la orizoximicina<sup>7</sup> que presenta actividad antibiótica frente a *Xanthomonas oryzae*, bacteria que ataca las hojas de las plantas arroceras (Figura 1.5).



Figura 1.5 β-aminoácidos cíclicos que presentan propiedades farmacológicas

Aparte de los anteriores, los  $\beta$ -aminoácidos acíclicos han sido descritos en la naturaleza, tanto en su forma libre, como formando parte de estructuras moléculares más complejas, siendo esta segunda situación la más frecuente.

Podemos encontrar al menos ocho de estos derivados análogos a los  $\alpha$ aminoácidos naturales entre los que se encuentran  $\beta$ -alanina,  $\beta$ -leucina,  $\beta$ -lisina,  $\beta$ -arginina, ácido  $\beta$ -glutámico,  $\beta$ -glutamina,  $\beta$ -fenilalanina y  $\beta$ -tirosina (Figura 1.6).

Formalmente el ácido aspártico puede ser considerado también como  $\beta$ aminoácido, pero es la funcionalidad como  $\alpha$ -aminoácido la que casi siempre se

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T., Kawaguchi, H. *J. Antibiot*. **1989**, *42*, 1749-1755.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Ziegelbauer, K., Babczinski, P., Schönfeld, W. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1998**, *42*, 2194-2205.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Hashimoto, T., Kondo, S., Takita, T., Hamada, M., Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 653-658.

observa en productos naturales. Sin embargo, algunas cianobacterias producen péptidos cíclicos que utilizan el ácido aspártico como  $\beta$ -aminoácido.<sup>8</sup>



Figura 1.6  $\beta$ -aminoácidos derivados de sus análogos proteinogénicos alfa

Entre esta diversidad tenemos que la  $\beta$ -alanina es el más común de los  $\beta$ aminoácidos y fue el primero en ser detectado en la naturaleza.

La  $\beta$ -alanina fue aislada por primera vez en 1909 mediante la hidrólisis de la carnosina,<sup>9</sup> dipéptido que se encuentra en altas concentraciones en tejidos musculares y cerebrales (Figura 1.7a).

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Namikoshi, M., Rinehart, K. L., Sakai, R., Sivonen, K., Carmichael, W. W. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6135-6139.

Además, la  $\beta$ -alanina forma parte de la estructura del ácido pantoténico (vitamina B5) necesario para formar la coenzima A, notable por su papel en la biosíntesis y la oxidación de ácidos grasos, así como en la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, paso previo al ciclo de Krebs (Figura 1.7b).



Figura 1.7 Estructura molecular de la carnosina y del ácido pantoténico. En rojo se resalta la subestructura de β-alanina

Los  $\beta$ -aminoácidos pueden tener sustituyentes en el carbono 2 (C<sub> $\alpha$ </sub>), en el carbono 3 (C<sub> $\beta$ </sub>) o en ambos, lo que da una mayor riqueza de derivados que los  $\alpha$ aminoácidos. En la Figura 1.8 se muestran los posibles patrones de sustitución<sup>10</sup> que se pueden dar en estos casos.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Baumann, L., Ingvaldsen, T. J. Biol. Chem. **1918**, 35, 263-276.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Seebach, D., Matthews, J. L. Chem. Commun. **1997**, 2015-2022.



Figura 1.8 Patrones de sustitución más comunes en los β-aminoácidos

Al igual que los  $\alpha$ -aminoácidos constituyen los  $\alpha$ -péptidos, los  $\beta$ -aminoácidos pueden generar estructuras complejas, dando lugar a los homo  $\beta$ -péptidos. La combinación de residuos de  $\alpha$ -aminoácidos naturales y residuos  $\beta$ -aminoácidos no naturales en una sola cadena conduce a oligómeros heterogéneos llamados  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos.<sup>11</sup>

La primera síntesis en la que se introdujeron  $\beta$ -aminoácidos en un  $\alpha$ -péptido fue llevada a cabo por el grupo del profesor Pavone<sup>12</sup> en 1990. Estos autores sintetizaron los péptidos cíclicos (L-Pro-L-Phe- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala) y (L-Pro-L-Pro-L-Phe- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala) que incorporaban en su estructura la  $\beta$ -alanina (Figura 1.9).

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Werner, H.M., Horne, W.S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *28*, 75-82.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> a) Pavone, V., Lombardi, A., Yang, X., Pedone, C., Di Blasio, B. *Biopolymers* **1990**, *30*, 189-196; b) Di Blasio, B., Lombardi, A., Yang, X., Pedone, C., Pavone, V. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1181-1188.



**Figura 1.9** Péptidos híbridos cíclicos (L-Pro-L-Phe-β-Ala-β-Ala) y (L-Pro-L-Pro-L-Phe-β-Alaβ-Ala)

El desarrollo de fármacos eficaces basados en  $\alpha$ -péptidos está a menudo limitado debido a la alta libertad conformacional de fragmentos cortos y a su baja estabilidad proteolítica *in vivo*.

La síntesis de péptidos bioactivos usando  $\beta$ -aminoácidos supone una estrategia muy prometedora a la hora de obtener análogos que exhiban interesantes aplicaciones<sup>13</sup> en química médica. Existen estudios en los que se ha observado que los  $\beta$ -péptidos o los  $\alpha/\beta$  péptidos híbridos ven modulada su conformación, dinámica y estabilidad proteolítica frente a los precursores  $\alpha$ -peptídicos, viéndose modificada de esta manera sus propiedades fisicoquímicas.<sup>14</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Cabrele, C., Martinek, T. A., Reiser, O., Berlicki, L. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9718-9739.

 <sup>&</sup>lt;sup>14</sup> a) Horne, W.S. *Expert Opin. Drug Discovery* 2011, *6*, 1247–1262; b) Koyack, M. J., Cheng,
 R. P. *Methods Mol. Biol.* 2006, *340*, 95–109.

A la hora de emplear estos  $\beta$ -aminoácidos como *building blocks* en la generación de nuevos péptidos tenemos la posibilidad de usar los  $\beta$ -aminoácidos acíclicos homólogos a sus derivados naturales (Figura 1.10a), o bien los monómeros cíclicos  $\beta$  que estructuralmente presentan un anillo de cicloalcano que hace que estén conformacionalmente más restringidos que los anteriores (Figura 1.10b).



Figura 1.10 Derivados acíclicos y cíclicos  $\beta$ -peptídicos

En los  $\alpha$ -péptidos, la estructura secundaria más común es la  $\alpha$ -hélice. Esta estructura fue postulada primero por Linus Pauling, Robert Corey y Herman Branson, en 1951, basándose en las estructuras cristalográficas entonces conocidas de aminoácidos y péptidos y en la predicción de Pauling de la forma planar de los enlaces peptídicos<sup>15</sup>.

 <sup>&</sup>lt;sup>15</sup> a) Pauling, L., Corey, R. B., Branson, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1951, *37*, 205-211; b)
 Eisenberg, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, *100*, 11207-11210.

El nombre hélice 3.6<sub>13</sub> se usa para determinar este tipo de estructuras ya que los aminoácidos presentes en una α-hélice están dispuestos en una estructura helicoidal con unos 3.6 aminoácidos por vuelta y 13 son los átomos involucrados en el enlace de hidrógeno existente entre el oxígeno del carbonilo que ocupa la posición (*i*) y el grupo N-H de la posición (*i*+4) (C=O<sub>i</sub>  $^{...}$  HN<sub>i+4</sub>) (Figura 1.11a). Por su parte, la denotada como hélice  $3_{10}$  se caracteriza por enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el carbonilo del aminoácido (i) y el grupo NH de la posición (*i*+3) (C=O<sub>i</sub> <sup>...</sup> HN<sub>i+3</sub>) (Figura 1.11b). Ambos tipos de hélices requieren una orientación en la misma dirección de las unidades que las constituyen, resultando el desarrollo de un momento dipolar macroscópico con el extremo positivo en la parte N terminal y el negativo en la C terminal.



Figura 1.11 Vistas lateral y cenital de las  $\alpha$ -hélices 3.6<sub>13</sub> y 3<sub>10</sub>

Los trabajos realizados en este campo han demostrado que los derivados peptídicos generados por los monómeros  $\beta$  pueden adoptar una amplia variedad

de estructuras secundarias debido a que la inserción de un carbono adicional amplía en gran medida el espacio conformacional de los mismos.

La estructura más común que adoptan estos derivados es en forma de hélice y, en general, el tipo de hélice que adopta depende en gran medida del patrón de sustitución de los monómeros que lo conforman. El número que define a la hélice indica, como en el caso anterior, los átomos involucrados entre enlaces de hidrógeno (Figura 1.12).



Figura 1.12 Ejemplos de hélices β-peptídicas basadas en patrones de enlace de hidrógeno

En el caso en el que tengamos homo- $\beta$ -péptidos se pueden dar varias situaciones. Por un lado, los  $\beta$ -péptidos constituidos por ciclopentil y ciclohexil  $\beta$ -aminoácidos más restringidos (ACPC y ACHC) tienden a plegarse en hélices-12 y hélices-14 respectivamente, mientras que los derivados de  $\beta^2$  y  $\beta^3$  aminoácidos acíclicos tienden a plegarse en forma de hélices-14 y hélices-10/12 en las que coexisten



enlaces de hidrogeno cada diez y doce átomos que condicionan el plegamiento peptídico (Figura 1.13).<sup>16</sup>

Figura 1.13 Diferentes posibles estructuras secundarias que presentan los  $\beta$ -péptidos

<sup>16</sup> a) Cheng, R. P., Gellman, S. H., DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232; b) Seebach, D., Beck, A. K., Bierbaum, D. J. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 1111-1239 c) Seebach, D., Gademann, K., Schreiber, J. V., Matthews, J. L., Hintermann, T., Jaun, N., Oberer, L., Hommel, U., Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033-2038; d) Seebach, D., Abele, S., Gademann, K., Guichard, G., Hintermann, T., Jaun, B., Matthews, J. L., Schreiber, J. V., Oberer, L., Hommel, U., Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *81*, 932-982; e) Guichard, G., Abele, S., Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 187-206; f) Martinek, T. A., Fülöp, F., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 687-702.

Por su parte, la aproximación heterogénea permite la síntesis de los que denominaremos péptidos híbridos que, circunscribiéndonos, al empleo en exclusiva de  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos pueden proporcionar diferentes combinaciones (por ejemplo,  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -, etc). Cada uno de estos esqueletos peptídicos heterogéneos ofrece una manera potencialmente diferente de disponer espacialmente sus cadenas laterales.<sup>17</sup>

En la figura 1.14 se recogen, a modo de ejemplo, los diferentes patrones de enlaces de hidrógeno intramolecular que definen las nuevas estructuras secundarias que forman los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos con alternancia  $\alpha:\beta$  1:1 en el esqueleto peptídico ( $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -...).



<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> a) Horne, W. S., Gellman, S., Acc. Chem. Res. 2008, 41, 1399-1408; b) Chatterjee, S., Roy,
R. S., Balaram, P. J. R. Soc. Interface 2007, 4, 587-606.



Figura 1.14 Patrones de enlaces de hidrógeno observados en diferentes hélices formadas por α/β-péptidos híbridos con alternancia 1:1. A) Hélice-13, B) Hélice-11, C) Hélices-14/15,
 D) Hélices-9/11. Los α- y β-aminoácidos aparecen remarcados en azul y verde, respectivamente

Los primeros estudios estructurales sistemáticos de oligómeros lineales con alternancia  $\alpha$ : $\beta$  1:1 fueron conducidos al mismo tiempo y de forma independiente por los grupos de Reiser y Gellman (Figura 1.15).<sup>18</sup>

 <sup>&</sup>lt;sup>18</sup>a) De Pol, S., Zorn, C., Klein, C. D., Zerbe, O., Reiser, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, *43*, 511-514; b) Hayen, A., Schmitt, M. A., Ngassa, F. N., Thomasson, K. A., Gellman, S. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, *43*, 505-510.



**Figura 1.15** Péptidos híbridos  $\alpha$ : $\beta$  (1:1) constituídos por  $\beta$ -aminoácidos cíclicos

El heptámero (I) representado en la parte superior, disuelto en metanol, adoptaba una hélice definida por enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos C=O<sup>...</sup>H–N de los aminoácidos i  $\rightarrow$  i–2 (Figura 1.14A).

Por su parte, mientras el octámero (II) exhibe una estructura secundaria helicoidal-11 pura en estado sólido, el nonámero (IV) presenta una estructura helicoidal basada en hélices 14/15 (Figura 1.14B-C), evidenciando una interconversión helicoidal (de hélice 11 a hélices 14/15) en función de la longitud del péptido. Este comportamiento observado en los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos es comparable al de los  $\alpha$ -péptidos, en los que tanto las conformaciones hélice 3<sub>10</sub> como la  $\alpha$ -hélice están representadas entre los oligómeros más cortos pero es la  $\alpha$ -hélice la favorecida cuando el esqueleto peptídico es elongado. El octámero (III), que difiere sutilmente del octámero (II), se presenta en estado sólido, fundamentalmente, como hélice-11, aunque el carbonilo del grupo Boc *N*-terminal está inmerso en un enlace de hidrógeno cíclico de 14 miembros (Figura 1.16).<sup>19</sup>



**Figura 1.16** Estructuras cristalinas de los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos (II)-(IV). Notar el cambio de comportamiento del grupo Boc (en gris) de un enlace de hidrógeno i  $\rightarrow$  i+3 en (II) a un enlace de hidrógeno i  $\rightarrow$  i+4 en (III)

 <sup>&</sup>lt;sup>19</sup> a) Choi, S. H., Guzei, I. A., Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 13780-13781; b)
 Schmitt, M. A., Choi, S. H., Guzei, I. A., Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 13130-13131.

Sharma, Kunwar y cols.<sup>20</sup> realizaron un estudio conformacional del  $\alpha/\beta$ -péptido (**V**) en disolución de cloroformo, identificando dos tipos de hélices, la hélice-9 y la hélice-11, que contienen dos tipos distintos de enlaces C=O<sup>...</sup>H–N con orientaciones opuestas en relación con la dirección del esqueleto peptídico (Figura 1.14 D) y (Figura 1.17).



Figura 1.17  $\alpha/\beta$ -pentapéptido constituído por  $\alpha$ -Phe y  $\beta$ -Leu

Este comportamiento estructural no está limitado a  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos con alternancia  $\alpha:\beta$  1:1 sino que es trasladable a otras distribuciones  $\alpha:\beta$  como 2:1 ó 1:2 (Figura 1.18).<sup>21</sup>

 <sup>&</sup>lt;sup>20</sup> a) Sharma, G. V. M., Nagendar, P., Jayaprakash, P., Krishna, P. R., Ramakrishna, K. V. S., Kunwar, A. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5878-5882; b) Srinivasulu, G., Kumar, S. K., Sharma, G. V. M., Kunwar, A. C. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8395-8400.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> a) Schmitt, M. A., Choi, S. H., Guzei, I. A., Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 4538-4539; b) Choi, S. H., Guzei, I. A., Spencer, L., Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 2917-2924.



Figura 1.18 Estructuras cristalinas de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos cortos con repeticiones  $\alpha\alpha\beta$  (A) y  $\alpha\beta\beta$  (B).

Un caso curioso de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos es el descrito por el grupo de investigación de Fülöp y Reiser<sup>22</sup> en 2012, que se centraban en el estudio conformacional de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos en el que observaron nuevas estructuras secundarias en forma de hélice diferentes de las descritas anteriormente (Figura 1.19).

Estos autores estudiaron estructuralmente dos péptidos distintos mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) en MeOH-d<sup>4</sup>. En uno de ellos se repetía una secuencia  $\alpha,\beta,\alpha,\beta...$ (VI) y en el otro  $\alpha,\alpha,\beta,\beta,\alpha,\alpha,\beta,\beta...$  (VII) En el primer caso, se observó una estructura en hélice 16/18, donde aparecen más átomos involucrados en el enlace de hidrógeno intramolecular que la define. En el

 <sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Berlicki, Ł., Pilsl, L., Wéber, E., Mándity, I. M., Cabrele, C., Martinek, T. A., Fülöp,
 F., Reiser, O. Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 2208-2212.



segundo caso, se observó una hélice constituída por un patrón de interacción 9/12/9/10 que, al igual que la anterior, no tenía precedente alguno (Figura 1.19).

Figura 1.19 Diferentes posibles estructuras secundarias que presentan los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos descritos por Fülöp y Reiser

Como ya se ha comentado con anterioridad, la estabilidad proteolítica de los  $\beta$ -péptidos y de los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos<sup>23</sup> es mayor que en el caso de los derivados naturales  $\alpha$ -peptídicos.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Mangelschots, J., Bibian, M., Gardiner, J., Waddington, L., Van Wanseele, Y., Van Eeckhaut, A., Acevedo, M. M. D., Van Mele, B., Madder, A., Hoogenboom, R., Ballet, S. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 437-445.

Por ejemplo, se ha observado esta estabilidad a la degradación en estudios desarrollados en 2005 en los cuales se incubaban tres péptidos distintos a 37 °C con una determinada peptidasa<sup>24</sup> (Tabla 1.1).

En este estudio, el péptido natural ( $\alpha$ -péptido) se dejaba reaccionando únicamente durante una hora con total degradación del péptido en la mayor parte de los casos, mientras que en los otros casos en los que se realizó el estudio con  $\beta$ péptidos o  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos, a pesar de que se mantenían reaccionando durante diez días en estas condiciones, permanecían inalterados (Figura 1.20).

	α-Péptido (1)	β-Péptido (2)	α/β-Péptido híbrido(3)
Quimiotripsina	+	-	-
Pepsina	+	-	-
Tripsina	-	-	-
Proteinasa K	+	-	-
Pronasa	+	-	-
(+): Degradación positiva		(-): Degradación negativa	

 Tabla 1.1 Degradación positiva o negativa de los péptidos dependiendo de la enzima

 empleada

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> a) Hook, D. F., Bindschädler, P., Mahajan, Y. R., Šebesta, R., Kast, P., Seebach, D. *Chem. Biodivers.* 2005, *2*, 591-632; b) Disney, M. D., Hook, D. F., Namoto, K., Seeberger, P. H., Seebach, D. *Chem. Biodivers.* 2005, *2*, 1624-1634.



Figura 1.20 Péptidos enfrentados a los ensayos de degradación proteolítica

Esta variación del esqueleto peptídico tiene como finalidad impedir la interacción adecuada con el bolsillo reactivo de la enzima, dando como resultado la dificultad en la degradación de estos péptidos.

Debido a esta estabilidad frente a la degradación, los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos han emergido en la actualidad como compuestos análogos a los polipéptidos naturales que pueden inhibir o aumentar las interacciones proteína-proteína. Estos reconocimientos proteína-proteína resultan de gran importancia en el campo de la medicina terapéutica,<sup>25</sup> ya que pueden estar implicados en innumerables funciones celulares, incluidas aquellas asociadas con muchas enfermedades.

Como ejemplo de aplicaciones terapéuticas tenemos el empleo de este tipo de péptidos híbridos para combatir enfermedades como el Alzheimer, causada por el acúmulo anómalo de la proteína beta-amiloide (también llamada amiloide A $\beta$ ) en los espacios interneuronales de los afectados. A $\beta$  se forma por la escisión secuencial del precursor proteico amiloide (APP), en cuyo proceso de producción es fundamental la participación de la enzima  $\gamma$ -secretasa (Figura 1.21).



Figura 1.21 Acumulación de A<sup>β</sup> oligómeros insolubles generando Alzheimer

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> a) Wells, J. A., McClendon, C. L. *Nature* 2007, *450*, 1001–1009; b) Checco, J. W., Lee, E.
F., Evangelista, M., Sleebs, N. J., Rogers, K., Pettikiriarachchi, A., Kershaw, N. J., Eddinger, G.
A., Belair, D. G., Wilson, J. L., Eller, C. H., Raines, R. T., Murphy, W. L., Smith, B. J., Gellman,
S. H., Fairlie, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, *137*, 11365-11375.

Cuando tiene lugar la agregación de estos  $\beta$ -amiloides solubles a A $\beta$  oligómeros insolubles, se produce la alteración de la membrana celular causando su apoptosis. Esta transformación de agregados solubles a insolubles transcurre a través de la generación de hojas  $\beta$  en su estructura que impiden que se solubilice.

Los péptidos híbridos, más estables a la degradación proteolítica, se presentan como firmes candidatos en este caso para impedir esta agregación mediante interacciones proteína-proteína que permitan revertir el proceso de generación de oligómeros insolubles más dañinos, hacia  $\beta$ -amiloides solubles y por consiguiente paliar los efectos de la enfermedad<sup>26</sup> (Figura 1.22).





agregación  $\beta$ -amiloide

Otra aplicación potencial de estos compuestos es su actividad como antimicrobianos<sup>27</sup>. La situación actual de resistencia de los microorganismos a los

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> a) Paul, A., Nadimpally, K. C., Mondal, T., Thalluri, K., Mandal, B. *Chem. Commun.* 2015, *51*, 2245-2248; b) Wojcik, P., Berlicky, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, *26*, 707-713.

 <sup>&</sup>lt;sup>27</sup> a) Raguse, T. L., Porter, E. A., Weisblum, B., Gellman, S. H. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 12774-12785; b) Schmitt, M. A., Weisblum, B., Gellman, S. H. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129,

antibióticos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas. Los péptidos antimicrobianos han suscitado un gran interés debido a que interaccionan con el patógeno a través de su membrana, o afectando dianas internas, como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas.

La mayoría de los péptidos antimicrobianos son catiónicos, lo que significa que tienen una carga positiva a un pH fisiológico. Varios estudios realizados por el grupo del profesor Gellman han mostrado resultados prometedores mediante el empleo de derivados  $\beta$ -peptídicos formados por subunidades hidrofóbicas ACPC y catiónicas APC (Figura 1.23a) y  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos formados por subunidades hidrofóbicas ACPC,  $\alpha$ -aminoácidos y catiónicas APC (Figura 1.23b) que tratan de imitar la acción antimicrobiana del péptido natural magainina (FIgura 1.23c).



417-428; c) Godballe, T., Nilsson, L. L., Petersen, P. D., Jenssen, H. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 77, 107-116.



**Figura 1.23** Empleo de  $\beta$ -péptidos y  $\alpha/\beta$ -péptidos catiónicos como antimicrobianos

Se encontró, no sólo, que la actividad del  $\beta$ -péptido era similar a la del natural sino que éste era efectivo contra cuatro especies bacterianas, incluidos dos patógenos que eran resistentes a los antibióticos comunes<sup>28</sup> (Figura 1.24).



Figura 1.24 Especies bacterianas frente a las que presentan actividad antibacteriana algunos de estos péptidos

Estas propiedades no sólo se restringen a los péptidos anteriormente mencionados, sino que cuando se presenta un  $\beta$ -aminoácido glicosilado incorporado en un polipéptido de mayor tamaño (ya sea homopéptido  $\beta$  o

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> a) Porter, E. A., Wang, X., Lee, H.-S., Weisblum, B., Gellman, S. H. *Nature* 2000, 404, 565;
b) Schmitt, M.A., Weisblum, B., Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 6848-6849.



heteropéptido híbrido), ese enlace glicosídico presenta, por ejemplo, mayor estabilidad frente a glicoamidasas<sup>29</sup> que sus homólogos naturales (Figura 1.25).

Figura 1.25 Resistencia del enlace glicosídico frente a glicoamidasas

También existen otros ejemplos de  $\beta$ -péptidos O-glicosilados que son capaces de plegarse en conformaciones helicoidales 3<sub>14</sub> en agua.<sup>30</sup> Este mismo glico- $\beta$ -péptido fue sometido a estudios de afinidad frente a lectinas como la *Vicia villosa* empleando técnicas como la resonancia de plasmón de superficie (SPR)<sup>31</sup> o técnicas de resonancia magnética nuclear como STD<sup>32</sup> (Figura 1.26).

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Disney, M. D., Hook, D. F., Namoto, K., Seeberger, P. H., Seebach, D. *Chem. Biodiv.* **2005**, *2*, 1624-1634.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> a) Norgren, A. S., Arvidsson, P. I. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5272-5278; b) Norgren, A. S., Norberg, T., Arvidsson, P. I. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 717-727.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Norgren, A. S., Geitmann, M., Danielson, U. H., Arvidsson, P. I. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 132-138.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Kaszowska, M., Norgren, A. S., Arvidsson, P. I., Sandström, C. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2577-2580.


Figura 1.26 Glico- $\beta$ -péptido sometido a estudios de afinidad frente a lectinas

Además de los ejemplos anteriores, existen otros estudios en la bibliografía de poliglico- $\beta$ -péptidos que se detallarán a continuación.

En 2006 Gallagher y colaboradores<sup>33</sup> sintetizaron un hexa- $\beta$ -péptido constituído por los aminoácidos  $\beta$ -ACPC y  $\beta$ -APC triglicosilado a través de un *linker* sulfonamida (Figura 1.27). El objetivo de este estudio era observar la disposición helicoidal de estos sustratos y, probar la exisencia de interacciones carbohidrato-carbohidrato.



Figura 1.27 Hexa β-péptido triglicosilado sintetizado por Gallagher

 <sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Simpson, G. L., Gordon, A. H., Lindsay, D. M., Promsawan, N., Crump, M. P., Mulholland,
 K., Hayter, B. R., Gallagher, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10638-10639.

En 2010 Taillefumier y colaboradores<sup>34</sup> describieron un método de síntesis de glicoclusters<sup>35</sup> constituídos por glico- $\beta$ -péptidos. Éstos empleaban la reacción click de cicloadición catalizada por Cu (I) entre azidas y alquinos para la obtención de poliglico- $\beta$ -péptidos de diversas longitudes (Figura 1.28).



Figura 1.28 Síntesis de poliglico-β-péptidos mediante la cicloadición entre azidas y alquinos

Teniendo en cuenta la gran importancia de los glicopéptidos en biología, se espera que estas moléculas puedan presentar una amplia utilidad en aplicaciones biomédicas futuras.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Barra, M., Roy, O., Traïkia, M., Taillefumier, C. Org. Biomol. Chem. **2010**, *8*, 2941-2955.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Stine, K. J. *Carbohydrate Nanotechnology, Glycoclusters and their Applications as Anti-Infective Agents, Vaccines, and Targeted Drug Delivery Systems Ch. VII* J. M. Casas, A. Vargas **2015**, Wiley-VCH.

De la misma manera, se puede encontrar en la bibliografía reciente algunos ejemplos de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos *C*-glicosilados<sup>36</sup> y O-glicosilados.<sup>37</sup>

En el primer caso se describe inicialmente la síntesis de los  $\beta$ -aminoácidos *C*glicosilados mediante la reacción S<sub>N</sub>2 de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -*D*bromoglucopiranosa con el carbanión del éster *terc*-butílico del ácido cianoacético que, tras una etapa de reducción, permite la obtencion del *building block* deseado (Figura 1.29a). Posteriormente, y tras el acoplamiento del  $\alpha$ -aminoácido, tanto enlazándolo al grupo ácido del glico- $\beta$ -aminoácido como al grupo amino, se obtuvieron los  $\alpha/\beta$ -dipéptidos híbridos *C*-glicosilados deseados (Figura 1.29b).



Figura 1.29 Esquema sintético para la obtención de los  $\alpha/\beta$ -dipéptidos híbridos

C-glicosilados

<sup>36</sup> Inaba, Y., Yano, S., Mikata, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 993-997.

<sup>37</sup> Karch, F., Hoffmann-Röder, A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, No. 47.

En el segundo caso, se describe la síntesis del análogo *beta* del antígeno  $T_N$ mediante la reacción de homologación de Arndt-Eistert. Esta reacción se lleva a cabo sobre un derivado protegido del antígeno  $T_N$  natural (Fmoc-Thr[OGalNac]-OH) obteniéndose el análogo  $\beta$ - $T_N$  que puede ser empleado en la síntesis peptídica de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos *O*-glicosilados<sup>37</sup> (Figura 1.30).



Figura 1.30 Esquema sintético para la obtención del antígeno  $\beta$ -T<sub>N</sub>

Teniendo en cuenta el escaso número de ejemplos existentes en la bibliografía donde se sintetizan  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos y que, los pocos estudios existentes, se han orientado preferentemente hacia la síntesis de *C*-glicopéptidos y *O*glicopéptidos, uno de los principales objetivos de la presente tesis doctoral será la obtención de  $\beta$ -aminoácidos *S*-glicosilados y de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos *S*glicosilados de manera enantioméricamente pura.



# **OBJETIVOS Y ANTECEDENTES**

- 2.1 Objetivos
- 2.2 Síntesis de  $\beta$ -aminoácidos
- 2.3 Sulfamidatos cíclicos
- 2.4 Síntesis de sulfamidatos 1,2-cíclicos
- 2.5 Reactividad de los sulfamidatos cíclicos frente a nucleófilos
- 2.6 Sulfamidatos cíclicos precursores de aminoácidos

Como ha quedado evidenciado en el capítulo anterior, la síntesis y el estudio estructural de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos glicosilados y los conocimientos que de ello se deriven pueden ser relevantes a la hora de ser incorporados en cadenas peptídicas, con un mayor número de residuos.

Para llevar a cabo este propósito, nuestro grupo de investigación dispone de una dilatada experiencia en la síntesis de sulfamidatos cíclicos derivados de  $\alpha$ -metilisoserina y en su reactividad frente a nucleófilos azufrados, nitrogenados y oxigenados, para la obtención de diferentes compuestos de interés, siendo los  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos cuaternarios enantioméricamente puros los derivados más representativos de esta metodología sintética.

# 2.1- Objetivos

i) El principal objetivo de la presente tesis doctoral es modificar estructuralmente los sulfamidatos derivados de la  $\alpha$ -metilisoserina, modificando la estructura original al añadir tanto a la parte C-terminal como a la parte sulfonamida (Nterminal) diferentes  $\alpha$ -aminoácidos naturales.



ii) En una segunda etapa, se realizarán las aperturas nucleofílicas de dichos compuestos mediante nucleófilos azufrados como son los tiocarbohidratos, para la obtención de diversos  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos *S*-glicosilados.



iii) Otro objetivo importante de este trabajo, incluirá la realización de un pormenorizado estudio conformacional de algunos de estos  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos *S*-glicosilados, con el propósito de analizar si existen cambios conformacionales sustanciales respecto a estudios conformacionales previos realizados sobre otros  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos.



iv) Por último, se iniciará una nueva línea de investigación orientada a la síntesis y estudio de los sulfamidatos derivados de la (*S*)-isoserina, que se trata del  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminoácido más simple, a partir del cual se puede sintetizar sulfamidatos. Curiosamente, ni la síntesis de sus diversos sulfamidatos, ni su explotación como electrófilos en la reacción de apertura con diferentes nucleófilos, habían sido previamente descritos por ningún grupo de investigación.



A continuación, se procederá a realizar una breve revisión de los procedimientos más generales de síntesis de  $\beta$ -aminoácidos, enfocando nuestra atención en la síntesis por apertura nucleófila de sulfamidatos cíclicos de cinco miembros.

# 2.2- Síntesis de β-aminoácidos

Existen varias metodologías a la hora de sintetizar  $\beta$ -aminoácidos. A modo de ejemplo, comentaremos algunas de las más tradicionales<sup>1</sup>, para finalizar con las más novedosas que emplean la síntesis catalítica asimétrica.

#### 2.2.1-Preparación de $\beta$ -aminoácidos a partir de $\alpha$ -aminoácidos.

Es una de las metodologías más empleadas durante años debido a la accesibilidad de los  $\alpha$ -aminoácidos precursores.

La homologación Arndt-Eistert<sup>2</sup> está basada en el empleo de diazometano sobre un cloruro de ácido para dar una  $\alpha$ -diazocetona. La etapa clave en esta síntesis es el transposición de Wolff<sup>3</sup> promovida por Ag(I) y en presencia de un nucleófilo que capture la cetena intermedia, dando como resultado el  $\beta$ -aminoácido (Figura 2.1).

<sup>a) Juaristi, E., Soloshonok, V.</sup> *Enantioselective Synthesis of β-Amino Acids*, 2ª edición,
2005, Wiley-VCH; b) Matthews, J. L. *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. Houben-Weyl, Editores: Félix, A., Morodor, L., Toniolo, C., George Thieme Verlag. Sttutgart. 2003,
Vol. E22c, p. 552; c) Kiss, L., Cherepanova, M., Fülöp, F. *Tetrahedron* 2015, *71*, 2049-2069;
d) Liljeblad, A., Kanerva, L. T. *Tetrahedron* 2006, *62*, 5831-5834; e) Liu, M., Sibi, M. P. *Tetrahedron* 2002, *58*, 7991-8035.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Müller, A., Vogt, C., Sewald, N. *Synthesis* **1998**, 837-841.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Meier, H., Zeller, K. P. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **1975**, 14, 32-43.



Figura 2.1 Homologación Arndt-Eistert de  $\alpha$ -aminoácidos a  $\beta$ -aminoácidos

Esta metodología permite la obtención de forma sencilla y enantiopura de  $\beta^3$ -aminoácidos.

Otra metodología empleada ha sido la derivatización de ácido aspártico<sup>4</sup> o de la asparagina.<sup>5</sup> En el primer caso, la síntesis de la  $\gamma$ -butirolactona o de una oxazolidinona intermedia dan lugar a la obtención de  $\beta^{2,3}$ -aminoácidos (Figuras 2.2a y 2.2b). Asimismo, en el caso de la asparagina se sintetiza un derivado de perhidropirimidina que tras varias etapas de reacción permite la obtención de  $\beta$ -aminoácidos (Figura 2.2c).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> a) Jefford, C. W., McNulty, J., Lu, Z.-H., Wang, J. B. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1203-1216;
b) Seki, M., Matsumoto, K. *Biosci. Biotech. Bioch.* **1996**, *60*, 916-917; c) Seki, M., Shimizu, T., Matsumoto, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1298-1304.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Lakner, F. J., Chu, K. S., Negrete, G. R., Konopelski, J. P. *Org. Synth.* **1996**, *73*, 201-214.





Figura 2.2 Síntesis de β-aminoácidos a partir de ácido aspártico y asparagina

## 2.2.2 Transposición de Curtius de derivados de succinatos funcionalizados.

Los succinatos funcionalizados son precursores ideales para la síntesis asimétrica de  $\beta$ -aminoácidos siempre y cuando se pueda transformar selectivamente uno de los grupos carboxilo en un grupo amino por medio de una transposición de Curtius. Esta transposición se da al pasar de una acil-azida a un isocianato más reactivo que, con adición por ejemplo, de *terc*-butanol genera el grupo amino protegido como Boc. El protocolo de Curtius descrito anteriormente proporcionó una ruta práctica para la obtención de una gran variedad de  $\beta^2$  y  $\beta^3$ -aminoácidos<sup>6</sup> mediante alquilaciones selectivas previas (Figura 2.3).

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> a) Sibi, M.P., Deshpande, P.K. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 2000, 1461-1466; b) Lebel,
H., Leogane, O. Org. Lett. 2005, 7, 4104-4110.



Figura 2.3 Transposición de Curtius de derivados de succinatos funcionalizados

## 2.2.3 Reacciones de hidrogenación catalítica asimétrica.

La hidrogenación catalítica asimétrica ha sido extensamente empleada a la hora de hidrogenar  $\beta$ -aminoacrilatos  $\beta$ -sustituidos para obtener los correspondientes  $\beta$ aminoácidos. Los isómeros (*Z*) o (*E*) presentan amplias diferencias en cuanto a reactividad.<sup>7</sup> Los isómeros (*E*) generalmente proporcionan enantioselectividades mayores con una amplia variedad de complejos de rodio y rutenio con ligandos quirales como BINAP, DuPhos, BICP, mientras que los isómeros (*Z*), que

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>a) Tang, W., Zhang, X. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3029-3069; b) Qiu, M., Hu, X.-P., Huang, J.-D., Wang, D.-J., Deng, J., Yu, S.-B., Duan, Z.-C., Zheng, Z. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2683-2689.

frecuentemente reaccionan más rápido, dan más problemas en estos términos, obteniéndose altos excesos enantioméricos sólo si se emplean determinados ligandos quirales como BDPMI o TangPhos (Figura 2.4).



Figura 2.4 Hidrogenación catalítica asimétrica de  $\beta$ -aminoacrilatos  $\beta$ -sustituidos

#### 2.2.4 Reacciones de adición de Michael con nucleófilos C y N.

La adición conjugada catalítica asimétrica de nucleófilos carbonados<sup>8</sup> sobre sistemas  $\alpha$ , $\beta$ -insaturados es muy efectiva a la hora de obtener  $\beta$ -aminoácidos con altos excesos enantioméricos. De este modo, la adición de nucleófilos sobre sistemas  $\beta$ -nitroacrilatos o  $\beta$ -nitroolefinas que actúan como aceptores de Michael supone una importante estrategia para la formación de nuevos enlaces C-C generando los consiguientes  $\beta$ -aminoácidos (Figura 2.5).

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup>a) Eilitz, U., Leßmann, F., Seidelmann, O., Wendisch, V. *Tetrahedron Asymmetry* 2003, *14*, 189-191; b) Trost, B.M., Hisaindee, S. *Org. Lett.* 2006, *8*, 6003-6005; c) Sammis, G.M., Jacobsen, E.N. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 4442-4443; d) Weng, J-Q., Deng, Q-M., Wu, L., Xu, K., Wu, H., Liu, R-R. Gao, J-R., Jia, Y-X *Org. Lett.* 2014, 16, 776-779.



**Figura 2.5** Adición conjugada de nucleófilos carbonados sobre sistemas  $\alpha$ , $\beta$ -insaturados

La adición conjugada catalítica asimétrica de nucleófilos nitrogenados<sup>9</sup> sobre aceptores de Michael es otra metodología con la que se puede abordar la síntesis de  $\beta$ -aminoácidos. Ésta, se ha llevado a cabo empleando una amplia variedad de nucleófilos como aminas aromáticas, hidroxilaminas o carbamatos entre otros, observándose elevados excesos enantioméricos (Figura 2.6).

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>a) Li, K., Cheng, X., Hii, K.K. *Eur. J. Org. Chem.* 2004, *5*, 959-964; b) Palomo, C., Oiarbide,
M., Halder, R., Kelso, R., Gómez-Bengoa, E., García, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, *126*, 9188-9189.



Figura 2.6 Adición conjugada catalítica asimétrica de nucleófilos nitrogenados sobre sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados

#### 2.2.5 Reacciones de Mannich.

La reacción de Mannich<sup>10</sup> es también muy importante a la hora de obtener nuevos enlaces C-C. Ésta consiste en la alquilación en posición  $\alpha$  de una cetona o aldehído utilizando iones imonio como electrófilo. En las condiciones clásicas, el ión imonio se genera *in situ* a partir de un aldehído y una amina (normalmente secundaria). El producto es un compuesto  $\beta$ -aminocarbonílico que se puede transformar en el  $\beta$ aminoácido deseado (Figura 2.7).

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Verkade, J. M. M., Hemert, L. J. C. V., Quaedflieg, P. J. L. M., Rutjes, F. P. J. T. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 29-41.



Figura 2.7 Síntesis de  $\beta$ -aminoácidos mediante la reacción de Mannich

La versión asimétrica<sup>11</sup> de esta reacción emplea o complejos organometálicos con ligandos quirales (Figura 2.8a-b) o catalizadores orgánicos quirales libres de metal (Figura 2.8c).

En los primeros existe una amplia variedad de complejos metálicos quirales<sup>12</sup> que se pueden emplear, siendo éstos los que determinan la configuración de los derivados  $\beta$ -aminoácidos obtenidos.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Weiner, B., Szymański, W., Janssen, D.B., Minnaard, A.J., Feringa, B.L. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1656-1691.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> a) Morimoto, H., Lu, G., Aoyama, N., Matsunaga, S., Shibasaki, M. J. Am. Chem. Soc. **2007**, *129*, 9588-9589; b) Chen, S., Hou, Z., Zhu, Y., Wang, J., Lin, L., Liu, X., Feng, X. Chem.– Eur. J. **2009**, *15*, 5884-5887.



Figura 2.8 Síntesis de β-aminoácidos mediante la reacción asimétrica de Mannich

En la organocatálisis<sup>13</sup>, los derivados orgánicos empleados forman una enamina con el aldehído; así, las reacciones asimétricas de Mannich llevadas a cabo con (*S*)-prolina, forman mayoritariamente el estereoisómero (*S*,*S*)-*syn*, con un e.e. > 99%. Recientemente, se ha llevado a cabo la misma reacción con una pirrolidina quiral,

 <sup>&</sup>lt;sup>13</sup>a) Notz, W., Tanaka, F., Watanabe, S.-I., Chowdari, N.S., Turner, J.M., Thayumanavan,
 R., Barbas III, C.F. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9624-9634; b) Mitsumori, S., Zhang, H., Cheong,
 P.H.-Y., Houk, K.N., Tanaka, F., Barbas, C.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1040-1041; c)
 Meyer, D., Marti, R., Seebach, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 4883-4891.

obteniéndose de forma mayoritaria el estereoisómero (*R*,S)-*anti,* con un e.e. > 97%.

# 2.2.6 Síntesis de $\beta$ -aminoácidos mediante reacciones de apertura nucleófila de epóxidos y aziridinas.

En los últimos años, debido a la facilidad para la obtención tanto de epóxidos como de aziridinas, de forma enantioméricamente pura, estos compuestos han sido muy empleados para la preparación de una amplia variedad de  $\beta$ -aminoácidos.

En el caso en el que empleamos epóxidos, existen dos principales rutas de síntesis, la epoxidación de Sharpless<sup>14</sup> de alcoholes alílicos o la epoxidación de Jacobsen<sup>15</sup> de ésteres  $\alpha$ , $\beta$ -insaturados. Ambas, permiten la obtención de epóxidos con elevados excesos enantioméricos.

A partir de epóxidos enantioméricamente puros, la metodología más empleada para la síntesis de  $\beta$ -aminoácidos es su apertura nucleófila mediante el empleo de azida como nucleófilo y posterior reducción a grupo amino.<sup>16</sup> (Figura 2.9).



Figura 2.9 Síntesis de  $\beta$ -aminoácidos mediante apertura nucleófila de epóxidos

<sup>14</sup> Katsuki, T., Sharpless, K.B. J. Am. Chem. Soc. **1980**, 102, 5974-5976.

<sup>15</sup> Deng, L., Jacobsen, E.N. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4320-4323.

<sup>16</sup> Fringuelli, F., Pizzo, F., Rucci, M., Vaccaro, L. J. Org. Chem. **2003**, 68, 7041-7045.

Los métodos sintéticos para la obtención de aziridinas son limitados en comparación con los disponibles para la obtención de epóxidos, pero cabe destacar la ciclación de haloaminas o de aminoalcoholes y su síntesis a partir de epóxidos. Esta última es la que más se emplea a la hora de obtener aziridinas complejas enantioméricamente puras, pero en la actualidad están surgiendo otras alternativas para su obtención.<sup>17</sup>

Un ejemplo para la obtención de  $\beta$ -aminoácidos a partir de aziridinas se basa en la apertura reductora de 2-alcoxicarbonil aziridinas N-activadas mediante el empleo de SmI<sub>2</sub> y DMEA<sup>18</sup> (Figura 2.10).



Figura 2.10 Síntesis de  $\beta$ -aminoácidos mediante la apertura nucleófila de aziridinas

El SmI<sub>2</sub> actúa como agente reductor capaz de reducir un amplio rango de grupos funcionales con un alto grado de selectividad, en la mayoría de los casos, hacia la generación del derivado  $\beta$ -aminoácido frente al aducto N,N-disustituído no deseado.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Liu, Y. Curr. Org. Chem. **2016**, 20, 19-28.

 <sup>&</sup>lt;sup>18</sup> a) Zhao, W., Lu, Z., Wulff, W. D. *J. Org. Chem.* 2014, *79*, 10068-10080; b) Molander, G.
 A., Stengel, P. J. *Tetrahedron* 1997, *53*, 8887-8912.

La regioselectividad condicionada por el medio de reacción en el caso de la apertura de epóxidos y aziridinas depende de unas condiciones de reacción muy concretas (medio ácido: ataque al carbono más sustituido o medio básico: ataque al carbono menos sustituido), que imposibilitan la obtención de los sustratos deseados en muchos de los casos.

# 2.3- Sulfamidatos cíclicos

McCombie y Parkes descubrieron en 1912 y de forma accidental los sulfamiditos cíclicos<sup>19</sup>. Sin embargo, estos compuestos permanecieron con un uso limitado hasta 1969 cuando Deyrup y Moyer's intentaron preparar, sin éxito, aziridinas a partir de 1,3-aminoalcoholes, obteniendo en su lugar los susodichos sulfamiditos cíclicos.<sup>20</sup> Como veremos con posterioridad, estos sulfamiditos cíclicos aparecen como intermedios clave en alguno de los procedimientos de síntesis de sulfamidatos cíclicos.

Los sulfamidatos cíclicos son una clase de electrófilos heterocíclicos que han sido muy empleados en síntesis orgánica como *building blocks* quirales versátiles en la preparación de aminoácidos modificados y otros compuestos de alto valor añadido<sup>21</sup>. El auge en el empleo de estos derivados se debe fundamentalmente a

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> McCombie, H., Parkes, J. W. J. Chem. Soc. **1912**, 101, 1991-1998.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Deyrup, J. A., Moyer, C. L. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 175-179.

 <sup>&</sup>lt;sup>21</sup>a) Meléndez, R. E., Lubell, W. D. *Tetrahedron* 2003, *59*, 2581-2616; b) Jamieson,
 A.G., Boutard, N., Beauregard, K., Bodas, M. S., Ong, H., Quiniou C., Chemtob, S., Lubell,
 W.D. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 7917-7927; c) Saeidian, H., Abdoli, M., Mirjafary, Z.

la gran versatilidad que presentan y a la posibilidad de obtenerlos enantioméricamente puros de forma sencilla. Como se observa a continuación (Figura 2.11), existe una amplia variedad de estos compuestos en cuanto al tamaño de ciclo que los conforman, siendo los de cinco miembros, también denominados 1,2-cíclicos, donde nos centraremos a partir de ahora.



Figura 2.11 Representación de sulfamidatos cíclicos y de la 1,2,3-oxatiazolidina

La reactividad que caracteriza a estos sulfamidatos es la apertura nucleofílica<sup>22</sup>. El ataque nucleofílico se produce muy preferentemente sobre el carbono unido al oxígeno de forma regioselectiva (Figura 2.12).

*Synthesis* **2015**, *47*, 1057-1075; d) Baig, R. B. N., Nadagouda, M. N., Varma, R. S. *Aldrichimica Acta* **2015**, *48*, 71-80.

<sup>22</sup> Spillane, W., Malaubier, J.-B. *Chem. Rev.* 2014, 114, 2507-2586.



Figura 2.12 Representación del ataque nucleofílico a sulfamidatos 1,2-cíclicos

Los sulfamidatos 1,2-cíclicos compiten con epóxidos y aziridinas en términos de reactividad y selectividad<sup>23</sup>. La regioselectividad no condicionada por el medio de reacción, en el caso de los sulfamidatos, es la principal ventaja sobre las reacciones de apertura de epóxidos y aziridinas.

La reacción de apertura nucleofílica tiene lugar mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N 2$ ), generando un intermedio *N*-sulfonato que posteriormente se hidroliza mediante el empleo de condiciones ácidas suaves, para dar como resultado la correspondiente amina sustituida<sup>24</sup> (Figura 2.13).

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> a) Sienel, G., Rieth, R., Rowbottom, K. T. *Epoxides* in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2005**, Wiley-VCH; b) Andrei, K. Y. *Aziridines and Epoxides in Organic Synthesis* **2006**, Wiley-VCH.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Bower, J. F., Rujirawanicha, J., Gallagher, T. Org. Biomol. Chem. **2010**, *8*, 1505-1519.



Figura 2.13 Reacción  $S_N 2$  con inversión total de configuración

Además de la sustitución nucleófila, estos compuestos también pueden dar lugar a reacciones de eliminación; es más, en algunos casos, ambas reactividades ( $S_N 2 y$  E2) compiten y se pueden modular cambiando el sustituyente unido al carbono reactivo, o bien el nucleófilo empleado<sup>25</sup> (Figura 2.14 y Tabla 2.1).



Figura 2.14 Competición  $S_N 2$  vs E2 observada en la reactividad de los sulfamidatos

	Nu	S <sub>N</sub> 2	E2	E2′
1	KSAc	82 %	-	-
2	ONa	-	23 %	28 %
3	NaOAc	47 %	-	28 %

Tabla 2.1 Resultados de competición S<sub>N</sub>2, E2 y E2' observados

<sup>25</sup> Aguilera, B., Fernández-Mayoralas, A., Jaramillo, C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5863-5876.

# 2.4- Síntesis de sulfamidatos 1,2-cíclicos

En esta tesis doctoral nos centraremos en el estudio de la síntesis y la reactividad de los sulfamidatos 1,2-cíclicos que pueden sintetizarse de forma directa mediante varias metodologías diferentes, que serán brevemente descritas a continuación.

#### 2.4.1-Síntesis mediante el empleo de dioles y epóxidos.

Uno de los reactivos más empleados para la síntesis de sulfamidatos a partir de dioles y epóxidos es el reactivo de Burgess, el cual se desarrolló en 1968 como agente deshidratante<sup>26</sup> (Figura 2.15).



Figura 2.15 Reactivo de Burgess empleado para convertir alcoholes secundarios y terciarios en alquenos

Nicolaou y colaboradores demostraron que cuando se trataban 1,2-dioles con exceso del reactivo de Burgess se producía la doble sulfonilación del diol. Este procedimiento de doble activación del alcohol desencadenaba la reacción de

 <sup>&</sup>lt;sup>26</sup> a) Atkins, G. M., Burgess, E. M. J. Am. Chem. Soc. **1968**, 90, 4744-4745; b) Burgess, E.
 M., Penton Jr., H. R., Taylor, E. A., J. Org. Chem. **1973**, 38, 26-31.

ciclación intramolecular posterior a través de un mecanismo  $S_N 2$  dando lugar a la generación del sulfamidato<sup>27</sup> (Figura 2.16).



Figura 2.16 Mecanismo de reacción entre 1,2-dioles y el reactivo de Burgess para generar sulfamidatos

La limitación de este método es la regioselectividad del proceso que viene determinada por una combinación de factores estéricos y electrónicos aunque, en

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> Nicolaou, K. C., Huang, X. H., Snyder, S. A., Rao, P. B., Bella, M., Reddy, M. V. Angew. *Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 834-836.

bastantes casos, se han logrado alcanzar excelentes rendimientos y regioselectividades.<sup>28</sup>

En el caso del empleo de epóxidos como material de partida tenemos dos posibilidades, una es la desarrollada por Hudlicky y colaboradores, que podían transformar directamente epóxidos en los correspondientes sulfamidatos cíclicos de cinco miembros con rendimientos moderados<sup>29</sup> (Figura 2.17a). La otra, desarrollada por NIcolaou, consiste en el empleo de epoxialcoholes<sup>27</sup> cuyo tratamiento directo con el reactivo de Burgess conduce a la generación de los sulfamidatos cíclicos (Figura 2.17b).



Figura 2.17 Preparación de sulfamidatos a partir de epóxidos y epoxialcoholes

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Nicolaou, K. C., Snyder, S. A., Longbottom, D. A., Nalbandian, A. Z., Huang, X. H. *Chem.-Eur. J.* **2004**, *10*, 5581-5606.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Rinner, U., Adams, D. R., Dos Santos, M. L., Abboud, K. A., Hudlicky, T. *Synlett*, **2003**, 1247-1252.

#### 2.4.2-Síntesis mediante el empleo de aminoalcoholes.

Uno de los métodos más empleados para la síntesis de sulfamidatos cíclicos de cinco miembros se basa en el uso de  $\beta$ -aminoalcoholes<sup>30</sup> como precursores. Éstos son fáciles de obtener de forma enantioméricamente pura, con lo que constituyen una herramienta fundamental en la síntesis de este tipo de electrófilos.

En la bibliografía se recogen dos metodologías diferenciadas, una en la que se emplea SOCl<sub>2</sub> como agente sulfonilante (Figura 2.18) obteniéndose como intermedio el denominado sulfamidito que, tras una etapa de oxidación, nos da como resultado el sulfamidato deseado.<sup>31</sup>



Figura 2.18 Preparación de sulfamidatos a partir de aminoalcoholes empleando SOCl<sub>2</sub>

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> Juszczyk, P., Kasprzykowska, R., Kołodziejczyk, A. S. Lett. Pept. Sci. **2003**, *10*, 79-82.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Tiede, S., Berger, A., Schlesiger, D., Rost, D., Lühl, A., Blechert, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, *49*, 3972-3975.

En la segunda se emplea  $SO_2Cl_2 o SO_2Im_2^{22}$  sin necesidad de una etapa intermedia de oxidación<sup>32</sup> (Figura 2.19). Esta metodología debería ser la preferida debido a su mayor sencillez; sin embargo, sólo se da de manera satisfactoria cuando se emplean 1,2-aminoalcoholes conformacionalmente rígidos, mientras que los 1,2-aminoalcoholes más flexibles tienden a reaccionar formando aziridinas y no los sulfamidatos deseados.<sup>33</sup>



Figura 2.19 Preparación directa de sulfamidatos a partir de aminoalcoholes mediante el empleo de  $SO_2Cl_2 y SO_2Im_2$ 

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Tabassum, S., Gilani, M. A., Wilhelm, R. *Tetrahedron-Asymmetry* **2011**, *22*, 1632-1639.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Kuyl-Yeheskiely, E., Lodder, M., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3013-3016.

# 2.4.3-Síntesis mediante aminación intramolecular de sulfamatos.

La aminación de enlaces  $C_{sp3}$ -H catalizada por complejos metálicos está adquiriendo cada vez más relevancia como metodología para la formación estereoselectiva de enlaces C-N. En estos casos es muy común el empleo de complejos quirales metálicos de rodio e incluso complejos metálicos de hierro y manganeso para la obtención de sulfamidatos<sup>34</sup> (Figura 2.20).



<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> a) Collet, F., Lescot, C., Dauban, P. *Chem. Soc. Rev.* 2011, *40*, 1926-1936; b) Yamawaki,
M., Kitagaki, S., Anada, M., Hashimoto, S. *Heterocycles* 2006, *69*, 527-537; *c*) Zhang, J.L., Huang, J.-S., Che, C.-M. *Chem-Eur. J.* 2006, *12*, 3020-3031; d) Liu, Y., Guan, X., Wong, E.
L.-M., Huang, J.-S., Che, C.-M. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, *135*, 7194-7204; e) Paradine, S.
M., Griffin, J. R., Zhao, J., Petronico, A. L., Miller, S. M., White, M. C. *Nat. Chem.* 2015, *7*, 987-994.



Figura 2.20 Aminación intramolecular de sulfamatos catalizada por complejos quirales metálicos

# 2.4.4-Síntesis mediante la reducción de iminas sulfamato cíclicas.

Mediante el empleo de derivados tanto de alquil como de aril  $\alpha$ -hidroxicetonas como precursores se pueden obtener rendimientos moderados de los derivados de iminas cíclicas correspondientes al hacerlas reaccionar con el cloruro de sulfamoílo. Estas iminas precursoras de sulfamidatos se someten a una

hidrogenación asimétrica llevada a cabo empleando catalizadores quirales de paladio o de rodio<sup>35</sup>, obteniendo así excelentes excesos enantioméricos. (Figura 2.21).



Figura 2.21 Generación de sulfamidatos cíclicos a partir de iminas sulfamato cíclicas

Estas iminas cíclicas también permiten la obtención de sulfamidatos cuaternarios mediante la adición de reactivos de Grignard, aunque hasta ahora solo se han publicado ejemplos de forma racémica<sup>36</sup> (Figura 2.22a). Sin embargo, el empleo de alquil o aril boranos y catalizadores quirales de rodio ha dado lugar a la obtención de altos excesos enantioméricos de los sulfamidatos cuaternarios<sup>37</sup> (Figura 2.22b), mejorando de forma considerable el empleo de reactivos de Grignard.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup>a) Wang, Y.-Q., Yu, C.-B., Wang, D.-W., Wang, X.-B., Zhou, Y.-G. Org. Lett. 2008, 10, 2071-2074; b) Kang, S., Han, J., Lee, E. S., Choi, E. B., Lee, H.-K. Org. Lett. 2010, 12, 4184-4187; c) Lee, S. A., Kwak, S. H., Lee, K.-I. Chem. Commun. 2011, 47, 2372-2374.

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup>Chang, S., Lee, E. E. Synthesis **2010**, 2361-2366.

 <sup>&</sup>lt;sup>37</sup>a) Luo, Y., Hepburn, H. B., Chotsaeng, N., Lam, H. W. Angew. Chem. Int. Ed. **2012**, *51*, 8309-8313; b) Chen, Y.-J., Chen, Y.-H., Feng, C.-G., Lin, G.-Q. Org. Lett. **2014**, *16*, 3400-3403.





# 2.5- Reactividad de los sulfamidatos cíclicos frente a nucleófilos

#### 2.5.1-Reactividad frente a nucleófilos carbonados.

Desde hace varios años se viene intentando perfeccionar este tipo de reactividad, ya que la generación de enlaces C-C es algo muy perseguido en síntesis orgánica. En este apartado distinguiremos entre nucleófilos carbonados duros y blandos, ya que se han observado diferencias de reactividad sustanciales entre unos y otros.

Existen varios ejemplos en la bibliografía<sup>38</sup> en los que se ha logrado realizar la apertura de sulfamidatos cíclicos mediante el empleo de nucleófilos duros

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> a) Eskici, M., Karanfil, A., Özer, M. S., Sarikürkcü, C. *Tetrahedron Lett.* 2011, *52*, 6336-6341; b) Pound, M. K., Davies, D. L., Pilkington, M., De Pina Vaz Sousa, M. M., Wallis, J. D. *Tetrahedron Lett.* 2002, *43*, 1915-1918; c) Hebeisen, P., Weiss, U., Alker, A., Staempfli, A. *Tetrahedron Lett.* 2011, *52*, 5229-5233.

(litiados, organocuprados y magnesianos) dando lugar a la generación de nuevos enlaces C-C de alto valor sintético (Figura 2.23).



Figura 2.23 Aperturas nucleofílicas mediante nucleófilos duros

Además del empleo de nucleófilos organometalados, previamente se utilizaron nucleófilos carbonados estabilizados<sup>39</sup>, como el malonato de dietilo y otros nucleófilos carbonados como el anión cianuro (Figura 2.24). Estos derivados blandos presentan una mayor selectividad que los anteriores debido a factores de conjugación o estabilización que los hacen menos reactivos que los duros.

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> a) Baldwin, J. E., Spivey, A. C., Schofield, C. J. *Tetrahedron Asymmetry* **1990**, *12*, 881-884;
b) Bower, J. F., Švenda, J., Williams, A. J., Charmant, J. P. H., Lawrence, R. M., Szeto, P., Gallagher, T. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4727-4730; c) White, G. J., Garst, M. E. *J. Org. Chem.* **1990**, *56*, 3177-3178.



Figura 2.24 Aperturas nucleofílicas con malonato de etilo y cianuro de sodio

## 2.5.2-Reactividad frente a nucleófilos oxigenados.

Este tipo de compuestos también son susceptibles de reaccionar con diferentes nucleófilos oxigenados. La apertura nucleófila de sulfamidatos no ha tenido éxito con la mayoría de los nucleófilos oxigenados básicos. Por ejemplo, cuando se emplean alcóxidos las reacciones de apertura nucleófila no tienen éxito debido a que, por su alta basicidad, se ve favorecida la eliminación bimolecular<sup>40</sup> E2 frente a la sustitución nucleófila S<sub>N</sub>2 (Figura 2.25).



Figura 2.25 Reactividad de sulfamidatos frente a alcóxidos básicos

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Jiménez-Osés, G., Peregrina, J. M. *Chem. Commun.* **2004**, 10, 980-981.

En cambio, se tienen resultados satisfactorios con nucleófilos oxigenados débilmente básicos como son los alcoholes<sup>41</sup> primarios y secundarios, e incluso iones fenóxido estabilizados<sup>42</sup> (Figura 2.26).



Figura 2.26 Aperturas nucleófilas con alcoholes primarios, secundarios y fenóxidos estabilizados

# 2.5.3-Reactividad frente a nucleófilos nitrogenados.

Debido a la abundancia del grupo amino en compuestos naturales como péptidos, alcaloides, nucleósidos, etc. y su importancia en las propiedades y funciones

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> a) Alker, D., Doyle, K.J., Harwood, L.M., McGregor, A. *Tetrahedron Asymmetry* **1990**, *12*, 877-880; b) Jiménez-Osés, G., Avenoza, A., Busto, J. H., Rodríguez, F., Peregrina, J. M. *Chem-Eur. J.* **2009**, *15*, 9810-9823.

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> Okuda, M., Tomioka, K. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4585-4586.
biológicas de estas moléculas, se han desarrollado un gran número de metodologías sintéticas que permiten formar el enlace C-N.<sup>43</sup> Además, las aminas están presentes en un gran número de medicamentos con una amplia diversidad de funciones, siendo en muchas ocasiones necesarias sus versiones quirales<sup>44</sup> para que presenten la actividad biológica adecuada. Entre las aminas capaces de actuar como nucleófilos en la apertura de sulfamidatos cíclicos tenemos tanto las alquilaminas como las arilaminas<sup>45</sup> (Figura 2.27).



Figura 2.27 Aperturas con alquil y arilaminas

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Ricci, A., Amino Group Chemistry **2008**, Wiley-VCH.

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> a) Nugent, T. C., El-Shazly, M. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 753-819; b) North, M. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 **1998**, 2959-2972.

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> a) Posakony, J. J., Tewson, T. J. *Synthesis* **2002**, 859-864; b) Mata, L., Avenoza, A., Busto,

J. H., Peregrina, J. M. Chem-Eur. J. 2013, 19, 6831-6839.

Asimismo, existen en la bibliografía precedentes de apertura con heterocíclos nitrogenados como piridinas<sup>46</sup> e imidazoles<sup>47</sup> (Figura 2.28).



Figura 2.28 Aperturas con heterociclos nitrogenados

#### 2.5.4-Reactividad frente a nucleófilos halogenados.

En la bibliografía se pueden encontrar varios ejemplos de apertura de sulfamidatos mediante el empleo de halógenos. Es muy común la apertura mediante el uso de iones fluoruro<sup>48</sup> para la obtención de una amplia variedad de  $\beta$ -aminofluoruros. En concreto se ha empleado esta metodología para la síntesis de compuestos con <sup>18</sup>F para promover el desarrollo de radiotrazadores para el diagnóstico de tumores por

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> Mata, L., Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Peregrina, J. M. *Chem-Eur. J.* **2012**, *19*, 15822-15830.

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Zhang, L., Luo, S., Mi, X., Liu, S., Quiao, Y., Xu, H., Cheng, J.-P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 567-576.

 <sup>&</sup>lt;sup>48</sup> a) Van Dort, M. E., Jung, Y.-W., Sherman, P. S., Kilbourn, M. R., Wieland, D. M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 810-815; b) Posakony, J. J., Tewson, T. J. *Synthesis* **2002**, *6*, 766-770.

imagen (Figura 2.29a). Otro nucleófilo halogenado con el que se ha observado una reactividad  $S_N 2$  con este tipo de compuestos es el anión bromuro<sup>40</sup> (Figura 2.29b).



Figura 2.29 Aperturas con fluoruros y bromuros

#### 2.5.5-Reactividad frente a nucleófilos azufrados.

Los grupos tiol de los compuestos azufrados son bastante más ácidos que sus homólogos oxigenados, de modo que no es necesario emplear bases muy fuertes para preparar sus aniones, que son las especies nucleófilas que producen la apertura del sulfamidato. Esta razón, unida a la gran nucleofilia que presentan estos reactivos a causa de su elevada polarizabilidad, evitan la reacción de eliminación (E2) anteriormente descrita, permitiendo altos rendimientos de los productos de apertura ( $S_N 2$ ). En este caso se han observado reacciones de apertura nucleófila mediante el empleo de cisteínas, alquil y ariltioderivados y tiocarbohidratos con buenos rendimientos<sup>49</sup> (Figura 2.30).



Figura 2.30 Aperturas nucleofílicas mediante nucleófilos azufrados

### 2.6- Sulfamidatos cíclicos precursores de aminoácidos

Es bastante habitual observar en la bibliografía casos en los que los sulfamidatos son precursores tanto de  $\alpha$ -aminoácidos como de  $\beta$ -aminoácidos. Éstos dan acceso de forma sencilla a aminoácidos con diferentes patrones de sustitución como se observa a continuación (Figura 2.31).

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> a) Cohen, S. B., Halcomb, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124*, 2534-2543; b) Cohen, S. B.;
Halcomb, R. L. *Org. Lett.* 2001, *3*, 405-407 c) Avenoza, A., Busto, J. H., Jiménez-Osés,
G., Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.*, 2006, *71*, 1692-1695.



**Figura 2.31** Obtención de  $\alpha$  y  $\beta$  aminoácidos sustituidos a partir de sulfamidatos

Sobre estos sulfamidatos se han realizado diversas reacciones de apertura de anillo para la obtención de varios productos de interés. Así, se ha llevado a cabo la síntesis estereoselectiva de bis-aminoácidos, ortogonalmente protegidos como derivados de lantionina<sup>50</sup> y de histidinoalanina<sup>51</sup> (Figura 2.32).

 <sup>&</sup>lt;sup>50</sup> a) Denoël, T., Zervosen, A., Gerards, T., Lemaire, C., Joris, B., Blanot, D., Luxen, A. *Bioorgan. Med. Chem.* 2014, *22*, 4621-4628; b) Avenoza, A., Busto, J. H., Jiménez-Osés, G., Peregrina, J. M. *Org. Lett.* 2006, *8*, 2855-2858.

 <sup>&</sup>lt;sup>51</sup> a) Taylor, C. M., De Silva, S. T. *J. Org. Chem.* 2011, *76*, 5703-5708; b) Mata, L., Jiménez-Osés, G., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* 2011, *76*, 4034-4042.



Figura 2.32 Obtención de  $\alpha$  y  $\beta$  aminoácidos sustituidos a partir de sulfamidatos

Además, se ha promovido la síntesis de fluoroalanina empleando <sup>18</sup>F para el desarrollo de radiotrazadores en el diagnóstico de tumores por imagen<sup>52</sup> (Figura 2.33)



Figura 2.33 Síntesis de fluoroalanina marcada con <sup>18</sup>F

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> Yu, W., McConathy, J., Williams, L., Camp, V. M., Malveaux, E. J., Zhang, Z., Olson, J. J., Goodman, M. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 876-886.



# Sulfamidatosprecursores de( $\alpha,\beta$ )-( $\beta,\alpha$ )- y( $\beta,\alpha,\alpha$ )péptidos híbridos

- 3.1 Introducción
- 3.2 Síntesis de los sulfamidatos precursores de dipéptidos híbridos
- 3.3 Parte Experimental

#### 3.1 - Introducción

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la síntesis de  $\beta$ -péptidos es un campo emergente con aplicaciones interesantes y diversas, que van desde el desarrollo de nuevos materiales funcionales al descubrimiento de nuevos fármacos<sup>1</sup> que mejoren los ya existentes. Las propiedades especiales de estos péptidos se derivan de la estabilización de estructuras secundarias inusuales que proporcionan un alto grado de resistencia frente a la hidrólisis ácida y a la degradación enzimática.

Más recientemente, la síntesis de péptidos  $\alpha/\beta$  híbridos mediante la combinación de residuos  $\alpha$ -aminoácidos proteinogénicos y  $\beta$ -aminoácidos sintéticos ha contribuido a ampliar el espacio químico de las estructuras disponibles con potenciales aplicaciones. Debido a esto, varios  $\beta$ -aminoácidos con diferentes patrones de sustitución ( $\beta^2$ ,  $\beta^3$ ,  $\beta^{2,3}$  y  $\beta^{3,3}$ ) se han incorporado a  $\alpha$ -péptidos con la intención de obtener nuevos compuestos de alto valor añadido.

Sin embargo, como ya se ha comentado en capítulos anteriores, la dificultad sintética que presentan los  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos hace que haya solo unos pocos casos en los que estos derivados se hayan incorporado a  $\alpha$ -péptidos.

En este sentido, trataremos de desarrollar en este capítulo la síntesis de precursores de péptidos  $\alpha/\beta$  híbridos que incorporen  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos no proteinogénicos y que puedan presentar propiedades interesantes.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Johnson, L. M., Gellman, S. H. *Methods Enzymol.* **2013**, *523*, 407-429.

La estrategia que vamos a emplear en esta tesis es la que involucra a los sulfamidatos cíclicos precursores de  $\beta$ -aminoácidos y que han sido ampliamente estudiados en nuestro grupo de investigación<sup>2</sup> para la obtención de una amplia variedad de  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos al hacerlos reaccionar con diversos nucleófilos.

La intención es incorporar  $\alpha$ -aminoácidos tanto a la parte C-terminal como a la Nterminal de estos sulfamidatos para la posterior realización de su apertura nucleofílica y obtener así distintos derivados  $\alpha/\beta$ -peptídicos híbridos que incorporen a su estructura  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos enantioméricamente puros (Figura 3.1).



Figura 3.1 Síntesis de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos a partir de sulfamidatos

En la síntesis del sulfamidato derivado de la  $\alpha$ -metilisoserina<sup>3</sup>, llevada a cabo con anterioridad en nuestro grupo de investigación, la etapa clave para la introducción

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> a) Mata, L., Jiménez-Osés, G., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4034-4042; b) Mata, L., Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Peregrina, J. M. *Chem.-Eur. J.* **2012**, *18*, 15822-1583; c) Mata, L., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M. *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19*, 6831-6839.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Jiménez-Osés, G., Peregrina, J. M. *Chem. Comm.* **2004**, *10*, 980-981.

de la quiralidad es la dihidroxilación asimétrica de Sharpless,<sup>4</sup> sobre un derivado del ácido metacrílico (olefina **B**) (Figura 3.2).

La olefina **B**, que presenta en su estructura la denominada amida de Weinreb,<sup>5</sup> se sintetiza a partir del cloruro del ácido metacrílico comercial **A** por tratamiento con metoximetilamina y trietilamina en diclorometano, y es el derivado que mejor exceso enantiomérico proporciona en la reacción de dihidroxilación asimétrica.



Figura 3.2 Ruta sintética para la obtención del sulfamidato derivado de la  $\alpha$ -metilisoserina

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> a) Zaitsev, A. B., Adolfsson, H. Synthesis **2006**, 1725-1756; b) Bennani, Y. L., Sharpless, K.

B. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2079-2082; c) Kolb, H. C., Van Nieuwenhze, M. S., Sharpless,

K. B. Chem. Rev. 1994, 94, 2483-2547.

 <sup>&</sup>lt;sup>5</sup> a) Nahm, S., Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818. b) Balasubramaniam,
 S., Aidhen, I. S. *Synthesis* **2008**, 3707-3738.

Esta reacción permite la doble funcionalización de la olefina a la vez que se genera un centro cuaternario quiral. En la dihidroxilación asimétrica de Sharpless, el catalizador empleado es un complejo de Os (VIII) con ligandos quirales naturales de tipo alcaloide, derivados de la quinina [(DHQ)<sub>2</sub>PHAL y (DHQD)<sub>2</sub>PHAL]. Este complejo se comercializa con el nombre de AD-mix  $\alpha$  o AD-mix  $\beta$ , y es una mezcla de reactivos (OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y ligando).

Este procedimiento permite obtener cualquiera de los dos enantiómeros del diol **C**, según se emplee la mezcla comercial AD-mix  $\alpha$  o AD-mix  $\beta$ , con un 93% de exceso enantiomérico.

Estos dioles son transformados en los correspondientes sulfamidatos quirales por reacción con el reactivo de Burgess. Se obtiene de forma exclusiva y con excelente rendimiento el regioisómero **D**.<sup>6</sup>

El último paso es la transformación de la amida de Weinreb a éster metílico, mediante el empleo de ácido tríflico en metanol para obtener el compuesto **E** con excelentes rendimientos (Figura 3.2).

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> a) Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Nalbandian, A. Z.; Longbottom, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6234-6235. b) Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Longbottom, D. A.; Nalbandian, A. Z.; Huang, X. H. *Chem.-Eur. J.* **2004**, *10*, 5581-5606.

# **3.2** Síntesis de los sulfamidatos precursores de dipéptidos híbridos

## <u>3.2.1 - Síntesis de los sulfamidatos precursores de dipéptidos híbridos por</u> acoplamiento de $\alpha$ -aminoácidos sobre el grupo sulfonamida.

La conversión directa del sulfamidato **E** al sulfamidato metilamida con el NH sulfámico libre **F** se consigue a escala multigramo siguiendo las condiciones descritas recientemente en nuestro grupo de investigación<sup>2b</sup>.

Esta transformación consiste en la *N*-desprotección del carbamato éster metílico y conversión del éster metílico en metilamida con el simple tratamiento del sulfamidato **E** con metilamina 2M en THF. De esta forma, y partiendo del sulfamidato **E** se consiguió obtener un muy buen rendimiento del 94% del compuesto **F** (Figura 3.3).



Figura 3.3 Conversión del sulfamidato E al F mediante el empleo de metilamina

Asimismo, se realizó el mismo proceso que en el caso anterior, pero con el sulfamidato funcionalizado con la amida de Weinreb. De este modo se acorta una etapa de reacción, obteniendo el compuesto deseado por la desprotección del

carbamato y transformación en el mismo paso de la amida de Weinreb en metilamida con buenos rendimientos en 3 días de reacción (Figura 3.4).



Figura 3.4 Conversión del sulfamidato D al F mediante el empleo de metilamina

Una vez obtenido el compuesto **F**, se funcionalizó el nitrógeno sulfámico como *N*acetilsulfonamida, para de esta forma obtener el precursor más sencillo que simule un enlace peptídico en el nitrógeno de la sulfonamida.

Para ello abordamos esta síntesis tratando el sulfamidato **F** en las condiciones estándar de acetilación con anhídrido acético y piridina en acetonitrilo (Figura 3.5a). En este caso se obtuvo el compuesto deseado **G** pero con un rendimiento moderado del 44%.

Debido al bajo rendimiento obtenido, se decidió ensayar otras condiciones de acetilación, empleando DIEA y AcCl en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En este caso y tras purificación, se logró obtener el sulfamidato deseado con un 96% de rendimiento (Figura 3.5b).



Figura 3.5 Acetilación del compuesto F para la obtención del compuesto G

Este sulfamidato **G** se puede considerar como un precursor de  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos, en el que tanto el grupo amino como el ácido carboxílico están funcionalizados como amidas y la posición cuaternaria está preactivada para su posterior funcionalización.

A continuación se abordó la preparación de los sulfamidatos precursores de  $\alpha/\beta$ dipéptidos híbridos mediante el acoplamiento de un  $\alpha$ -aminoácido sobre el NHsulfámico del compuesto **F**.

Inicialmente se trató de incorporar un residuo de alanina sobre el extremo Nterminal del sulfamidato **F** empleando metodologías estándar de acoplamientos peptídicos. Como primera estrategia para el acoplamiento de *N*-Boc-L-Ala-OH sobre el sulfamidato **F** se decidió emplear DCC y DMAP en acetonitrilo en condiciones de acoplamiento estándar. Sin embargo, al emplear esta metodología, sólo se observó producto de partida **F** y productos de descomposición cuya estructura no se logró dilucidar.

En segundo lugar, se ensayó el acoplamiento mediante el empleo de TBTU como agente de acoplamiento y DIEA como base. La reacción se llevó a cabo en acetonitrilo a temperatura ambiente, y tras 24 h condujo a la generación del compuesto **1**, no deseado, con un 70% de rendimiento y trazas del compuesto N-Boc-Ala-Sul-CONHMe **2** (Figura 3.6).



Figura 3.6 Obtención del  $\alpha/\beta$  dipéptido híbrido 1 mediante la apertura nucleofílica con HOBt

Este resultado indicó que el compuesto de acoplamiento que se perseguía se estaba generando pero, en estas condiciones, reaccionaba con el 1hidroxibenzotriazol (HOBt) generado como subproducto del TBTU que actuaría como nucleófilo abriendo el sulfamidato y dando **1** como compuesto mayoritario (Figura 3.7).



Figura 3.7 Mecanismo de la reactividad no deseada en la que el HOBt actúa como nucleófilo sobre el sulfamidato generado

Para evitar esta reactividad secundaria no deseada, se decidió disminuir el tiempo de reacción, así como la temperatura (30 minutos a -20° C) y realizar un cuidadoso tratamiento posterior de la reacción. Al emplear estos ajustes, se observó la generación del compuesto **2** con un rendimiento del 82% (Figura 3.8).



Figura 3.8 Obtención de *N*-Boc-Ala-Sul-CONHMe mediante el empleo de TBTU y DIEA en condiciones controladas

La estructura del compuesto **2** pudo ser confirmada de forma inequívoca por medio de estudios de difracción de rayos X, ya que fuimos capaces de obtener monocristales aptos para su estudio (Figura 3.9).



Figura 3.9 Diagrama ORTEP correspondiente al compuesto 2

Una vez se demostró que la incorporación de  $\alpha$ -aminoácidos sobre el NH sulfonamida del sulfamidato era viable, se trató de llevar a cabo la reacción de acoplamiento con el compuesto *N*-Ac-L-Ala-OH adecuadamente funcionalizado. De esta forma, se podrían obtener los péptidos híbridos finales con los extremos N- y C-terminales funcionalizados como amidas sin necesidad de transformaciones posteriores.

Al tener ambos extremos en forma de amida, se simulan dos enlaces peptídicos adicionales que permitirán obtener más información acerca de la disposición espacial del esqueleto peptídico.

Con este fin y bajo las condiciones óptimas descritas anteriormente, se observó la desaparición del material de partida y el compuesto deseado **3** se obtuvo con un bajo rendimiento del 25% (Figura 3.10).



**Figura 3.10** Obtención del *N*-Ac-L-Ala-Sul-CONHMe mediante el empleo de TBTU y DIEA en condiciones controladas

A la vista de estos resultados se decidió obtener el compuesto **3** a partir del recientemente sintetizado compuesto **2**. Para ello se realizó la desprotección del grupo Boc con TFA, seguido de la acetilación de la amina en presencia de anhídrido acético y piridina.

En estas condiciones no se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que en la etapa de acetilación se observaba un crudo de reacción complejo, que no permitió su posterior purificación (Figura 3. 11).



Figura 3.11 Secuencia infructuosa de desprotección/acetilación de la amina en el compuesto 2

Sin embargo, el uso de cloruro de acetilo en presencia de DIEA proporcionó el sulfamidato deseado *N*-Ac-L-Ala-Sul-CONHMe **3** con un rendimiento del 85% a partir de **2** (Figura 3.12).



**Figura 3.12** Obtención del *N*-Ac-L-Ala-Sul-CONHMe **3** a partir del *N*-Boc-Ala-L-Sul-CONHMe **2** 

Con el objetivo de estudiar la versatilidad del procedimiento sintético establecido, y de obtener una mayor diversidad estructural de precursores de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos, se planeó la incorporación de aminoácidos aromáticos en la estructura del sulfamidato.

Además del papel ampliamente reconocido y bien estudiado que juegan los enlaces de hidrógeno en las conformaciones que adquieren los péptidos, las interacciones CH- $\pi$  también han atraído considerable interés en los últimos años<sup>7</sup>.

Estas fuerzas atractivas de van der Waals son consideradas hoy en día como importantes fuerzas moduladoras entre otras cosas del empaquetamiento cristalino de las estructuras de ciertas moléculas biológicas y aparecen implicadas en los procesos de reconocimiento molecular<sup>8</sup>.

Por lo tanto, se decidió introducir residuos de fenilalanina y triptófano mediante la estrategia sintética para el acoplamiento de aminoácidos sobre sulfamidatos descrita con anterioridad.

Inicialmente, empleando el *N*-Boc-L-Phe-OH se ensayaron las primeras condiciones anteriores con TBTU como agente de acoplamiento y DIEA como base a temperatura ambiente, con lo que también se observó la generación del aducto **4** procedente del ataque del benzotriazol (Figura 3.13a).

Empleando las nuevas condiciones optimizadas, se logró obtener el *N*-Boc-L-Phe-Sul-CONHMe **5** con un buen rendimiento del 79% tras purificación por columna cromatográfica (Figura 3.13b).

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> a) Tsuzuki, S. Annu. Rep. Prog. Chem. C 2012, 108, 69-95; b) Hudson, K.L., Bartlett, G. J., Diehl, R. C., Agirre, J., Gallagher, T., Kiessling, L. L., Woolfson, D. N. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 15152-15160.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Nishio, M. Phys. Chem. Chem. Phys. C **2011**, *13*, 13873-13900.



Figura 3.13 Síntesis del N-Boc-L-Phe-Sul-CONHMe 5 a partir de F

Usando la misma estrategia y mediante el empleo de *N*-Boc-L-Trp-OH, se obtuvo también el derivado *N*-Boc-L-Trp-Sul-CONHMe **6** con un rendimiento del 80% (Flgura 3. 14).



Figura 3.14 Síntesis del N-Boc-L-Trp-Sul-CONHMe 6 a partir del compuesto F

Además de poder acoplar mediante esta metodología derivados  $\alpha$ -aminoacídicos protegidos como Boc carbamato, se trató de realizar el acoplamiento de  $\alpha$ -aminoácidos protegidos como Fmoc.

Aunque el Fmoc es sensible a medios básicos, era de esperar que las condiciones de reacción permitieran obtener los productos en condiciones similares. De esta forma se abre la puerta a la síntesis de  $\alpha/\beta$ -péptidos convenientemente protegidos para ampliar su posterior funcionalización.

En este sentido, se ensayó el acoplamiento de *N*-Fmoc-L-Phe-OH y *N*-Fmoc-L-Cys(STr)-OH en las mismas condiciones en las que se había obtenido con éxito los derivados Boc protegidos, observando la formación de ambos compuestos con elevados rendimientos del 73% y 90% respectivamente (Figura 3.15).



**Figura 3.15** Síntesis de los derivados con *N*- Fmoc-L-Phe-Sul-CONHMe y *N*-Fmoc-L-Cys(STrt)-Sul-CONHMe a partir de **F** 

Como se observa, esta metodología de síntesis de sulfamidatos precursores de péptidos híbridos es válida tanto para obtener derivados Fmoc como Boc protegidos.

# <u>3.2.2 - Síntesis de los sulfamidatos precursores de dipéptidos híbridos por</u> <u>acoplamiento de α-aminoácidos sobre el grupo carboxilo.</u>

La anterior metodología nos ha permitido la obtención de una amplia variedad de sulfamidatos elongados por la parte amida de la sulfonamida (N-terminal) con un  $\alpha$ -aminoácido (Flgura 3.16a).

En esta segunda parte se decidió abordar la síntesis de nuevos sulfamidatos precursores de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos mediante la elongación del sulfamidato por acoplamiento de un  $\alpha$ -aminoácido por el grupo carboxilo (C-terminal) (Figura 3.16b).



**Figura 3.16** Sulfamidatos derivados de la α-metilisoserina elongados por la sulfonamida (a) y por el grupo carboxilo (b)

Partiendo del sulfamidato **D**, se llevó a cabo la desprotección de la amida para la obtención del ácido carboxílico en su forma libre según la metodología previa desarrollada por nuestro grupo de investigación<sup>9</sup>. Esta desprotección selectiva de la amida se realiza mediante una hidrólisis controlada, empleando  $H_2SO_4$  6M a temperatura ambiente (Figura 3.17).



Figura 3.17 Síntesis del sulfamidato H con el ácido libre a partir del compuesto D

Posteriormente, se realizó el acoplamiento del clorhidrato del éster bencílico de la L-fenilalanina sobre este compuesto **H**, empleando en primera instancia TBTU y DIEA como en los casos anteriores (Figura 3.18).



Figura 3.18 Intento de acoplamiento de un  $\alpha$ -aminoácido sobre el grupo carboxilo del

sulfamidato **H** 

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>Jiménez-Osés, G., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 443-449.

En este caso no se logró obtener el aducto de acoplamiento deseado, ya que se generó un crudo de reacción demasiado complejo para poder determinar la estructura de sus distintos componentes.

Con el afán de conseguir que este tipo de reactividad fuese factible, se empleó además de TBTU, HATU como agente de acoplamiento y DIEA como base en una amplia variedad de condiciones de reacción que incluyeron distintos disolventes y temperaturas (Tabla 3.1).

	Reactivos empleados	Disolvente	Temperatura (° C)
1	TBTU, DIEA	$CH_2CI_2$	- 20
2	TBTU, DIEA	$CH_2CI_2$	0
3	TBTU, DIEA	CH₃CN	- 20
4	TBTU, DIEA	DMF	22
5	HATU, DIEA	$CH_2CI_2$	0
6	HATU, DIEA	CH₃CN	- 20
7	HATU, DIEA	DMF	22

**Tabla 3.1** Distintas condiciones de temperatura, disolvente y agentes de acoplamientoempleadas para la obtención de los sulfamidatos objetivo

En ningún caso se observó la generación del sulfamidato precursor de  $\alpha/\beta$ péptidos híbridos deseado. Con el propósito de superar esta dificultad, se realizó el acoplamiento sobre el sulfamidato de la  $\alpha$ -metilisoserina completamente desprotegido, que también había sido sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación<sup>10</sup> (Figura 3.19).



Figura 3.19 Síntesis del compuesto I por desprotección del sulfamidato D empleando condiciones básicas

Empleando los agentes de acoplamiento utilizados anteriormente, no se obtuvo el compuesto deseado; así que, se decidió emplear otro tipo de agentes de acoplamiento más eficientes.

Así pues, se probaron los acoplamientos empleando PyBOP<sup>10</sup>, que se trata de una sal de fosfonio que se utiliza como un sustituto del reactivo BOP<sup>11</sup>, evitando así la formación de HMPA, producto secundario carcinogénico (Figura 3.20).



<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Coste, J., Le-Nguyen, D., Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G., Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222.



Figura 3.20 Diferencias estructurales entre PyBOP y BOP y mecanismo de acoplamiento

En este sentido, tratamos de realizar el acoplamiento del clorhidrato del éster bencílico de la L-fenilalanina sobre este compuesto I empleando PyBOP, DIEA y HOAT como aditivo con el fin de mejorar la reactividad. Inicialmente se disuelve el aminoácido en DMF y se enfría a 0° C; posteriormente, se mezcla con el PyBOP, DIEA y HOAT, y finalmente se adiciona lentamente el sulfamidato I. Tras la adición se deja a temperatura ambiente y se mantiene reaccionando 17 h (Figura 3.21).



Figura 3.21 Síntesis del NH-Sul-L-Phe-OBn 9 a partir del sulfamidato I

97

Mediante esta metodología<sup>12</sup> se obtuvo sin problemas el compuesto deseado **9**, con un rendimiento alto del 87% tras purificación mediante columna cromatográfica.

Además de este compuesto NH-Sul-L-Phe-OBn, se realizó este mismo acoplamiento empleando los clorhidratos de los ésteres metílicos de L-alanina y Ltriptófano, obteniendo así los sulfamidatos precursores de péptidos híbridos NH-Sul-L-Ala-OMe **10** y NH-Sul-L-Trp-OMe **11** con buenos rendimientos (Figura 3.22).



Figura 3.22 Síntesis del NH-Sul-L-Ala-OMe 10 y NH-Sul-L-Trp-OMe 11 a partir del sulfamidato I

 <sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Kuranaga, T., Sesoko, Y., Sakata, K., Maeda, N., Hayata, A., Inoue, M. J. Am. Chem. Soc.
 **2013**, 135, 5467-5474.

Cabe destacar, que se consiguieron realizar los acoplamientos en el extremo Cterminal del sulfamidato I manteniendo el grupo NH desprotegido, mientras que no se pudo decir lo mismo cuando el sulfamidato presentaba ese grupo NH protegido como carbamato (Figura 3.18). Este hecho parece confirmar algo que ya había sido observado con anterioridad en nuestro grupo de investigación y es que la sustitución o no del NH del grupo sulfonamida puede modular la reactividad del sulfamidato, especialmente la del carbono de la posición  $\alpha$ , observándose en este último caso una mayor reactividad frente al ataque nucleófilo.

Con esta idea en mente y una vez sintetizados los compuestos **9**, **10** y **11**, se buscó la protección del grupo sulfonamida en forma de acetamido para favorecer la reactividad  $S_N 2$  sobre el sulfamidato, la cual se estudiará en capítulos posteriores. Para ello, se llevó a cabo la reacción de acetilación empleando anhídrido acético y piridina en condiciones estándar, logrando obtener los compuestos **12**, **13** y **14** con moderados a buenos rendimientos (Figura 3.23).



Figura 3.23 Acetilación de la sulfonamida de los compuestos 9, 10 y 11 usando Ac<sub>2</sub>O/Py

# <u>3.2.3 - Síntesis de los sulfamidatos precursores de tripéptidos híbridos por</u> <u>acoplamiento de $\alpha$ -aminoácidos sobre sulfamidatos.</u>

El primer método que se estudió fue la elongación a través de la parte *C*-terminal de los  $\alpha$ -aminoácidos de los sulfamidatos precursores de  $\alpha/\beta$ -dipéptidos híbridos que ya habían sido sintetizados previamente (Figura 3.24a). La otra opción pasa por elongar la estructura añadiendo un nuevo  $\alpha$ -aminoácido por el extremo *N*-terminal sulfonamida (Figura 3.24b). De esta forma, se pueden obtener dos amplias familias de compuestos precursores de  $\alpha/\beta$ -tripéptidos híbridos que se caracterizarían o bien por tener el grupo sulfonamida en el extremo *N*-terminal o bien en una posición central, lo que permitiría disponer posteriormente de derivados de  $\beta, \alpha, \alpha$ - ó  $\alpha, \beta, \alpha$ -tripéptidos híbridos.



Figura 3.24 Obtención de sulfamidatos precursores de  $\alpha/\beta$ -tripéptidos híbridos

Con este planteamiento, se obtuvo el precursor tripeptídico acetilado **16** *N*-Ac-Sul-L-Ala-L-Trp-OMe a partir del compuesto **13** NH-Sul-L-Ala-OMe, siguiendo la siguiente metodología (Figura 3.25).

En primer lugar, se realizó la desprotección del éster metílico empleando medio básico y, posteriormente, se realizó el acoplamiento del clorhidrato NH<sub>2</sub>-L-Trp-

OMe empleando las mismas condiciones con PyBOP, DIEA y HOAT, descritas con anterioridad.

De este modo, se logró sintetizar el compuesto **15** NH-Sul-L-Ala-L-Trp-OMe, que tras su acetilación permitió la obtención del compuesto **16** con un rendimiento global del 47% (Figura 3.25).



Figura 3.25 Síntesis de NH-Sul-L-Ala-L-Trp-OMe 15 y N-Ac-Sul-L-Ala-L-Trp-OMe 16

Para el segundo caso de formación de tripéptidos que incorporan el sulfamidato (Figura 3.24b), se decidió acoplar un  $\alpha$ -aminoácido sobre el NH de la sulfonamida del compuesto **9** NH-Sul-L-Phe-OBn, previamente sintetizado. De esta forma, el sulfamidato queda en medio de los dos  $\alpha$ -aminoácidos (Figura 3.26).



Figura 3.26 Obtención de sulfamidatos precursores de  $\alpha/\beta$ -tripéptidos híbridos en los

que el sulfamidato está en posición central

Para ello, se siguió la metodología de acoplamiento sobre la sulfonamida con TBTU y DIEA que ya había funcionado previamente y se consiguió obtener los compuestos **17** *N*-Boc-L-Phe-Sul-L-Phe-OBn y **18** *N*-Boc-L-Trp-Sul-L-Phe-OBn con buenos rendimientos (Figura 3.27).



Figura 3.27 Síntesis de N-Boc-L-Phe-Sul-L-Phe-OBn 17 y N-Boc-L-Trp-Sul-L-Phe-OBn 18

#### 3.3 - Parte experimental

La instrumentación utilizada en la caracterización de los compuestos de todas las partes experimentales de esta tesis doctoral se detalla a continuación:

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se realizaron en espectrómetros Bruker ARX-300 y Bruker Avance-400. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm en la escala  $\delta$  y las constantes de acoplamiento en Hz. Se utilizaron como disolventes deuterados cloroformo, con TMS como referencia interna y agua deuterada, con el propio disolvente como referencia interna. La temperatura de adquisición fue de 298 K.

Los análisis de espectrometría de masas (ESI-MS) se realizaron en un equipo microTOF-Q-BRUKER con fuente MultiMode, ionización ESI y se registraron en modo de ión positivo e ión negativo.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi 350 y no están corregidos.

Los ángulos de rotación óptica se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 341, utilizando celdas de 1.0 y 0.5 dm de longitud y de 0.35 y 1.0 mL de capacidad, respectivamente.

La cromatografía de capa fina se llevó a cabo en placas de silicagel (Alugram<sup>®</sup> SILG/UV254) sobre soporte de aluminio y para su visualización se utilizó luz ultravioleta, revelador de ácido fosfomolíbdico en etanol y revelador de ácido sulfúrico en etanol.La cromatografía de columna se realizó utilizando silicagel de 0.04-0.06 mm (230-240 mesh).

# (*R*)-3-Acetyl-*N*,5-dimethyl-2,2-dioxo-2λ<sup>6</sup>-[1,2,3]oxathiazolidine-5carboxamide



Acetyl chloride (0.14 mL, 2.02 mmol) and DIEA (0.35 mL, 2.02 mmol) were added to a solution of sulfamidate **F** (157 mg, 0.81 mmol) in  $CH_2CI_2$  (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 5 h. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 3:7) to give sulfamidate **G** (183 mg, 96%) as a white solid.

M.p.: 102-104° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.13, CHCl<sub>3</sub>): -37.4

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	259.0368
	calculated: $C_7H_{12}N_2O_5SNa^+$	259.0365

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.91 (d, 3H, *J* = 4.9 Hz, NHCH<sub>3</sub>), 4.00 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.52 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, CH<sub>2</sub>N), 6.62 (br s, 1H, NHCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 22.3 (CH<sub>3</sub>CO), 24.0 (CH<sub>3</sub>C), 26.8 (NHCH<sub>3</sub>), 52.9 (CH<sub>2</sub>N), 80.7 (CCH<sub>3</sub>), 166.3 (CH<sub>3</sub>CO), 168.7 (CONH).
# *tert*-Butyl (*S*)-1-[(*S*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yloxy)-2-methyl-3-(methylamino)-3-oxopropylamino]-1-oxopropan-2-ylcarbamate



DIEA (0.71 mL, 4.08 mmol) and TBTU (328 mg, 1.02 mmol) were added to a solution of protected amino acid *N*-Boc-L-Ala-OH (193 mg, 1.02 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and was cooled at -20° C. Sulfamidate **F** (198 mg, 1.02 mmol) was added to the mixture, which

was stirred at -20° C for 24 h. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 2:8) to give **1** (300 mg, 70%) as a white solid.

M.p.: 113-115° C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -12.8

HRMS (ESI+):	found: $[M+H]^+$	421.2194
	calculated: $C_{19}H_{29}N_6O_5^+$	421.2199

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.37-1.44 (m, 15H, *CH*<sub>3</sub>CH, *CH*<sub>3</sub>C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.90 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz, NHC*H*<sub>3</sub>), 3.68 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, *CH*<sub>2</sub>NH), 4.08 (dd, *J* = 14.5, 7.1 Hz, 1H, *CH*<sub>2</sub>NH), 4.21 (m, 1H, *CHC*H<sub>3</sub>), 5.41 (br s, 1H, *NH*Boc), 7.36-7.46 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>, arom), 7.51 (br s, 1H, *NH*CH<sub>3</sub>), 7.62-8.06 (3H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 18.4 (CH<sub>3</sub>CH), 19.1 (CH<sub>3</sub>C), 26.7 (NHCH<sub>3</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.6 (CH<sub>2</sub>NH), 50.5 (CHCH<sub>3</sub>), 80.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 93.1 (CCH<sub>3</sub>), 109.5, 120.4, 125.2, 129.1, 129.6, 143.1 (arom), 155.6, 170.1, 173.4 (CO).

# *tert*-Butyl (*S*)-1-[(*R*)-5-methyl-5-(methylcarbamoyl)-2,2-dioxo- $2\lambda^{6}$ -[1,2,3] oxathiazolidin -3-yl]-1-oxopropan-2-ylcarbamate



DIEA (0.35 mL, 2.00 mmol) and TBTU (159 mg, 0.50 mmol) were added to a solution of protected amino acid *N*-Boc-L-Ala-OH (94 mg, 0.50 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then cooled at -20° C. Sulfamidate **F** (96 mg, 0.50 mmol) was

added to the mixture, which was stirred at -20° C for 30 min. The solution was warmed to room temperature and extracted with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined, washed with 0.1M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 2:8) to give sulfamidate **2** (150 mg, 82%) as a white solid.

M.p.: 64-66° C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 0.96, CHCl<sub>3</sub>): -37.0

HRMS (ESI+): found:  $[M+H]^+$  366.1329 calculated:  $C_{13}H_{24}N_3O_7S^+$  366.1335

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.40-1.46 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CH, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.91 (d, 3H, J = 4.9 Hz, NHCH<sub>3</sub>), 4.06 (d, 1H, J = 11.4 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.59 (d,

3H, J = 11.3 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.75 (br s, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 5.06 (br s, 1H, NHBoc), 6.48 (br s, 1H, NHCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 18.5 (CH<sub>3</sub>CH), 24.0 (CH<sub>3</sub>C), 26.8 (NHCH<sub>3</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 49.5 (CHCH<sub>3</sub>), 52.9 (CH<sub>2</sub>N), 77.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 86.9 (CCH<sub>3</sub>), 168.7, 168.9, 170.6 (CO).

# (*R*)-3-[(*S*)-2-Acetamidopropanoyl]-*N*,5-dimethyl-2,2-dioxo- $2\lambda^6$ -[1,2,3]oxathiazolidine -5-carboxamide



Method A: DIEA (0.30 mL, 1.68 mmol) and TBTU (160 mg, 0.50 mmol) were added to a solution of protected amino acid *N*-Ac-L-Ala-OH (65 mg, 0.50 mmol) in  $CH_2CI_2$  (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then cooled at -20° C. Sulfamidate **F** (96 mg, 0.50 mmol)

was added to the mixture, which was stirred at -20° C for 30 min. The solution was warmed to room temperature and extracted with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2CI_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined, washed with 0.1M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 2:8) to give sulfamidate **3** (38 mg, 25%) as a colorless oil.

Method B: TFA (0.5 mL, 2.95 mmol) was added dropwise to a solution of sulfamidate **2** (124 mg, 0.34 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL). The reaction mixture was

then stirred at room temperature for 4h. When the reaction was completed, the excess of TFA and the solvent were removed under vacuum conditions using Et<sub>2</sub>O to favor TFA evaporation. The resulting oil was dissolved in THF (10 mL), and acetyl chloride (36  $\mu$ L, 0.51 mmol) and DIEA (0.15 mL, 0.85 mmol) were added to the reaction mixture, which was stirred at room temperature for 12h. After this time, the mixture was concentrated under vacuum, dissolved in 10 ml of CHCl<sub>3</sub>/<sup>i</sup>PrOH (3:1) and H<sub>2</sub>O (10 mL) was added. The aquous layer was washed twice with CHCl<sub>3</sub>/<sup>i</sup>PrOH ( 10 mL, 3:1). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (MeOH/EtOAc, 2:98) to give compound **3** (88 mg, 85%) as a colorless oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -37.2

HRMS (ESI+):	found: $[M+H]^+$	308.0903
	calculated: C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> SH <sup>+</sup>	308.0916

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCI_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 1.45 (d, 3H, J = 7.0 Hz,  $CH_3CH$ ), 1.83 (s, 3H,  $CH_3C$ ), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.91 (d, 3H, J = 4.8 Hz, NH $CH_3$ ), 4.06 (d, 1H, J = 11.2 Hz,  $CH_2N$ ), 4.62 (d, 1H, J = 11.2 Hz,  $CH_2N$ ), 5.05-4.82 (m, 1H, COCH), 6.17 (d, 1H, J = 5.4 Hz, NHAc), 6.56 (br s, 1H, NHMe).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 18.2 (CH<sub>3</sub>CH), 23.0 (COCH<sub>3</sub>), 23.9 (CH<sub>3</sub>C), 26.8 (NHCH<sub>3</sub>), 48.4 (COCH), 52.8 (CH<sub>2</sub>N), 86.9 (CH<sub>3</sub>C), 168.6, 169.9, 170.2 (CO).

*tert*-Butyl (*S*)-1-[(*S*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yloxy)-2-methyl-3-(methylamino)-3-oxopropylamino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate



DIEA (0.70 mL, 4.00 mmol) and TBTU (321 mg, 1.00 mmol) were added to a solution of protected amino acid *N*-Boc-L-Phe-OH (266 mg, 1.00 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then cooled at -20° C. Sulfamidate **F** (194 mg, 1.00 mmol) was added to the reaction

mixture, which was stirred at -20° C for 24 h. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 2:8) to give compound **4** (372 mg, 75%) as a white solid.

M.p.: 110-112° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.01, CHCl<sub>3</sub>): -17.9

HRMS (ESI+): found:  $[M+Na]^+$  519.2320 calculated:  $C_{23}H_{32}N_6O_5Na^+$  519.2332

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.90 (d, 3H, J = 4.8 Hz, NHCH<sub>3</sub>), 3.02–3.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.17 (dd, 1H, J = 13.7, 6.8 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.65-3.79 (m, 1H, J = 13.6, 4.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.97 (dd, 1H, J = 14.4, 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 4.28-4.40 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 5.33 (d, 1H, J = 7.4 Hz, NHBoc), 7.10-7.21 (m, 5H, arom<sub>Phe</sub>), 7.34-7.42 (m, 2H, NHMe, arom<sub>BTA</sub>), 7.57 ("t", 1H, J = 7.6 Hz, arom<sub>BTA</sub>), 7.72 (d, 1H, J = 8.3 Hz, arom<sub>BTA</sub>), 8.02 (d, 1H, J = 8.4 Hz, arom<sub>BTA</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 18.9 (CH<sub>3</sub>C), 26.7 (NHCH<sub>3</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub>β), 44.8 (CH<sub>2</sub>NH), 56.5 (CHα), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 92.9 (CCH<sub>3</sub>), 109.5, 120.4, 125.2, 129.4 (arom<sub>BTA</sub>), 127.0, 128.6, 129.1, 129.6, 136.9 (arom<sub>Phe</sub>), 143.1 (arom<sub>BTA</sub>), 155.5, 170.0, 171.9 (CO).

# *tert*-Butyl (*S*)-1-[(*R*)-5-methyl-5-(methylcarbamoyl)-2,2-dioxo-2λ<sup>6</sup>-[1,2,3] oxathiazolidin-3-yl]-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate



DIEA (0.35 mL, 2.00 mmol) and TBTU (159 mg, 0.50 mmol) were added to a solution of protected amino acid *N*-Boc-L-Phe-OH (134 mg, 0.50 mmol) in  $CH_2CI_2$  (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then cooled at -20° C. Sulfamidate **F** (96 mg, 0.50 mmol) was

added to the mixture, which was stirred at -20° C for 30 min. When the reaction was completed, the resulting mixture was warmed to room temperature and extracted with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2CI_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined, washed with 0.1M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 2:8) to give sulfamidate **5** (172 mg, 79%) as a white solid.

M.p.: 80-83° C

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -32.3

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	464.1473
	calculated: $C_{19}H_{27}N_3O_7SNa^+$	464.1467

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.85-3.03 (m, 4H, NHCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.18 (dd, 1H, J = 13.6, 6.1 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.67 (br s, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.53 (d, 1H, J = 10.7 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.80 (br s, 1H, CH $\alpha$ ), 5.10 (br s, 1H, NHBoc), 6.52 (br s, 1H, NHCH<sub>3</sub>), 7.17-7.37 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 23.8 (CH<sub>3</sub>C), 26.7 (NHCH<sub>3</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>β), 52.8 (CH<sub>2</sub>N), 54.9 (CHα), 80.6 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 86.2 (*C*CH<sub>3</sub>), 127.5, 129.0, 129.6, 135.3 (arom), 154.8, 168.6, 169.6 (CO).

# *tert*-Butyl [(*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-((*R*)-5-methyl-5-(methylcarbamoyl)-2,2dioxido-1,2,3-oxathiazolidin-3-yl]-1-oxopropan-2-yl)carbamate



DIEA (0.23 mL, 1.24 mmol) and TBTU (99 mg, 0.31 mmol) were added to a solution of protected amino acid *N*-Boc-L-Trp-OH (76 mg, 0.31 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then cooled at -20° C. Sulfamidate **F** (60 mg, 0.31 mmol) was added to the

mixture, which was stirred at -20° C for 30 min. When the reaction was completed, the resulting mixture was warmed to room temperature and extracted with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined, washed with 0.1M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue

was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 2:8) to give sulfamidate **6** (119 mg, 80%) as a white solid.

M.p.: 84-86° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +10.7

HRMS (ESI+): found:  $[M+Na]^{+}$  503.1570 calculated:  $C_{21}H_{28}N_4O_7SNa^{+}$  503.1571

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.38-1.48 (m, 12H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>C), 2.87 (s, 3H, CONHCH<sub>3</sub>), 3.27-3.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.59 (br s, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.43 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.88 (s, 1H, CH $\alpha$ ), 5.16 (br s, 1H, NHCH $\alpha$ ), 6.44 (br s, 1H, CONHCH<sub>3</sub>), 7.07 (s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>), 7.12-7.64 (m, 4H, arom.), 8.21 (s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 23.4 (*C*H<sub>3</sub>C), 26.7 (CONH*C*H<sub>3</sub>), 28.4 (C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>β), 53.0 (NCH<sub>2</sub>), 54.1 (CHα), 80.6 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 85.9 (CCH<sub>3</sub>), 109.1, 123.7, 115.5, 118.6, 120.3, 122.7 127.4, 136.3 (arom), 155.1, 168.6, 170.3 (*C*O).

# (*R*)-3-[(*R*)-*N*-Fmoc-phenylalaninyl]-*N*-methyl-5-methyl-2,2-dioxo- $2\lambda^6$ -[1,2,3]oxathiazolidine-5-carboxamide



To a solution of protected amino acid *N*-Fmoc-L-Phe-OH (387 mg, 1.00 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL), DIEA (0.72 mL, 4.00 mmol) and TBTU (322 mg, 1.00 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min. Then, the mixture was cooled at -20° C and sulfamidate

**F** (194 mg, 1.00 mmol) was added and stirred at -20° C. After stirring for 30 min, the resulting mixture was warmed at room temperature and extracted with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined and washed with 0.1 M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) aqueous solutions and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 3:7) to give sulfamidate **7** (565 mg, 73%) as a colourless oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 0.96, CHCl<sub>3</sub>): +11.2

HRMS (ESI+):
 found: 
$$[M+Na]^+$$
 586.1748

 calculated:  $C_{29}H_{29}N_3O_7SNa^+$ 
 586.1624

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.78 (d, 3H, J = 4.8 Hz, CONHCH<sub>3</sub>), 2.92 (dd, 1H, J = 13.6 Hz, J = 7.6 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.13 (dd, 1H, J = 13.4 Hz, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.60 (br s, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.09 (t, 1H, J = 6.9 Hz, CH<sub>Fmoc</sub>), 4.19-4.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sub>Fmoc</sub>), 4.46 (d, 1H, J = 10.8 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.82 (br s, 1H, CH $\alpha$ ), 5.41 (d, J = 7.1, NHCH $\alpha$ ), 6.43 (d, 1H, J = 4.6 Hz, NHCH<sub>3</sub>), 7.12 (d, 2H, J = 6.9 Hz, arom<sub>Fmoc</sub>), 7.16-

7.27 (m, 5H, arom<sub>Ph</sub>), 7.31 (t, 2H, J = 7.5 Hz, arom<sub>Fmoc</sub>), 7.44 (t, 2H, J = 7.3 Hz, arom<sub>Fmoc</sub>), 7.67 (d, 2H, J = 7.5 Hz, arom<sub>Fmoc</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 23.8 (CH<sub>3</sub>C), 26.7 (NHCH<sub>3</sub>), 33.6 (C<sub>β</sub>), 47.1 (CH<sub>Fmoc</sub>), 52.8 (CH<sub>2</sub>N), 55.3 (C<sub>α</sub>), 67.4 (CH<sub>2Fmoc</sub>), 86.4 (CCH<sub>3</sub>), 120.1, 125.2, 127.2, 127.6, 127.8, 129.0, 129.6, 135.0, 141.4, 143.8 (arom) 155.6, 168.5, 169.3 (CO).

# (*R*)-3-[(*R*)-*N*-Fmoc-(S-trityl)cysteinyl]-*N*-methyl-5-methyl-2,2-dioxo- $2\lambda^6$ -[1,2,3]oxathiazolidine-5-carboxamide



To a solution of protected amino acid *N*-Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (422 mg, 0.72 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL), DIEA (0.52 mL, 2.88 mmol) and TBTU (232 mg, 0.72 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min. Then, the mixture was cooled at -20° C and

sulfamidate **F** (140 mg, 0.72 mmol) was added and stirred at -20° C. After stirring for 30 min, the resulting mixture was warmed at room temperature and extracted with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined and washed with 0.1 M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) aqueous solutions and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 3:7) to give sulfamidate **8** (502 mg, 90%) as a yellow oil.

M.p.: 84-86° C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 0.96, CHCl<sub>3</sub>): -22.0

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	784.2364
	calculated: $C_{42}H_{39}N_{43}O_7S_2Na^+$	784.2127

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.61 (dd, 1H, J = 12.7 Hz, J = 8.0 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 2.74-2.85 (m, 4H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , CH<sub>3</sub>NH), 3.82 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.18 (t, 1H, J = 7.0 Hz, CH<sub>Fmoc</sub>), 4.28-4.41 (m, 3H, CH $\alpha$ , CH<sub>2Fmoc</sub>), 4.48 (d, 1H, J = 11.1 Hz, CH<sub>2</sub>N), 5.27 (d, 1H, J = 6.8 Hz, N*H*Fmoc), 6.49 (d, 1H, J = 4.7 Hz, N*H*CH<sub>3</sub>), 7.16-7.30 (m, 11H, arom), 7.32-7.43 (m, 8H, arom), 7.56 (dd, 2H, J = 7.2 Hz, J = 3.6 Hz, arom<sub>Fmoc</sub>), 7.73 (d, 2H, J = 7.4 Hz, J = 7.2 Hz, J = 3.6 Hz, arom<sub>Fmoc</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 23.7 (CH<sub>3</sub>C), 26.6 (NHCH<sub>3</sub>), 33.1 (C<sub>β</sub>), 47.1 (CH<sub>Fmoc</sub>), 52.7 (CH<sub>2</sub>N), 53.0 (C<sub>α</sub>), 67.5 (CH<sub>2Fmoc</sub>), 86.5 (CCH<sub>3</sub>), 120.0-144.2 (arom) 155.4, 167.7, 168.4 (CO).

# Benzyl [(*R*)-5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5-carbonyl]-Lphenylalaninate



In a schlenk, under an argon atmosphere, to a solution of L-Phe-(OBn) hydrochloride (974 mg, 3.59 mmol) in DMF (4.0 mL) were added sulfamidate I (650 mg, 3.59 mmol), DIEA (1.22 mL, 7.01 mmol), PyBOP (1.89 g, 3.59 mmol) and a 0.6 M solution of HOAt (6.0 mL, 3.60 mmol) in DMF at 0° C. The reaction mixture was allowed to warm to

room temperature, and stirred for 17 h. The reaction mixture was then cooled to 0° C, and quenched with saturated aqueous  $NaHCO_3$ , extracted with  $CH_2CI_2$ , washed with brine, and dried over  $Na_2SO_4$ . The solution was concentrated and the

residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexane 6.5:3.5) to give sulfamidate **9** (1.31 g, 87%) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -27.6

 HRMS (ESI+):
 found:  $[M+H]^+$  419.1307

 calculated:  $C_{20}H_{22}N_2O_6SH^+$  419.1277

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.00 (dd, 1H, J = 14.1 Hz, J = 7.9 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.16 (dd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 5.3 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.29 (dd, 1H, J = 21.0 Hz, J = 9.3 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.78 (dd, 1H, J = 12.8 Hz, J = 2.4 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 4.73 (dd, 1H, J = 13.3 Hz, J = 7.8 Hz, CH $\alpha$ ), 5.00-5.19 (m, 3H, NHCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 6.86 (d, 1H, J = 7.5 Hz, NHCH $\alpha$ ), 7.01 (d, 2H, J= 7.4 Hz, arom), 7.16-7.34 (m, 8H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 22.1 (CH<sub>3</sub>C), 37.0 (CH<sub>2</sub>β), 53.3 (CH<sub>2</sub>NH), 54.0 (CHα), 68.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 90.9 (CCH<sub>3</sub>), 127.6, 128.7, 128.8, 128.9, 129.0, 129.1, 129.1, 129.7, 134.8, 135.1 (arom), 170.7, 171.3 (CO).

# Methyl [(R)-5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5-carbonyl]-Lalaninate



In a schlenk, under an argon atmosphere, to a solution of L-Ala-(OMe) hydrochloride (104 mg, 0.75 mmol) in DMF (1.2 mL) were added sulfamidate I (135 mg, 0.75 mmol), DIEA (270  $\mu$ L, 1.55 mmol), PyBOP (388 mg, 0.75 mmol) and a 0.6 M solution of HOAt (1.3 mL, 0.78 mmol) in DMF at

0° C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature, and stirred for 17 h. The reaction mixture was then cooled to 0° C, and quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, extracted with  $CH_2CI_2$ , washed with brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexane 1:1) to give sulfamidate **10** (141 mg, 71%) as a colorless oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -19.7

HRMS (ESI+):	found: [M+H] <sup>+</sup>	267.1121
	calculated: $C_8H_{14}N_2O_6SH^+$	267.0651

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.49 (d, 3H, *J* = 7.4 Hz, *CH*<sub>3</sub>CH $\alpha$ ), 1.73 (s, 3H, *CH*<sub>3</sub>C), 3.50 (dd, 1H, *J* = 12.9 Hz, *J* = 11.1 Hz, *CH*<sub>2</sub>NH), 3.77 (s, 3H, CO<sub>2</sub>*CH*<sub>3</sub>), 3.99 (dd, 1H, *J* = 12.9 Hz, *J* = 6.9 Hz, *CH*<sub>2</sub>NH), 4.45 - 4.63 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 5.71 (dd, 1H, *J* = 10.8 Hz, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 6.98 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, NHCH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 17.1 (CH<sub>3</sub>CH), 22.0 (CH<sub>3</sub>C), 49.0 (CHCH<sub>3</sub>), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.5 (CH<sub>2</sub>NH), 91.2 (CCH<sub>3</sub>), 170.9, 173.4 (CO).

#### Methyl [(*R*)-5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5-carbony]-Ltryptophanate



In a schlenk, under an argon atmosphere, to a solution of L-Trp-(OMe) hydrochloride (95 mg, 0.37 mmol) in DMF (1.2 mL) were added sulfamidate I (67 mg, 0.37 mmol), DIEA (129  $\mu$ L, 0.74 mmol), PyBOP (193 mg, 0.39 mmol) and a 0.6 M solution of HOAt (0.65 mL, 0.39 mmol) in DMF at 0° C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature, and stirred for 17 h. The reaction mixture was then cooled to 0° C, and quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with brine, and dried

over  $Na_2SO_4$ . The solution was concentrated and the residue was purified by column chromatography (EtOAc/hexane 7:3) to give sulfamidate **11** (106 mg, 75%) as a yellow oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -17.8

HRMS (ESI+):	found: [M+H] <sup>+</sup>	382.1101
	calculated: $C_{16}H_{19}N_3O_6SH^+$	382.1073

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.35 (m, 3H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , CH<sub>2</sub>NH), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.86 (dd, 1H, J = 12.9 Hz, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 4.79 (m, 1H,CH $\alpha$ ), 5.56 (dd, 1H, J = 10.4 Hz, J = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 7.03 (d, 1H, J = 1.7 Hz, NHCH<sub>indol</sub>), 7.05-7.23 (m, 2H, NHCH $\alpha$ , arom), 7.19 (t, 1H, J = 7.5 Hz, CH<sub>arom</sub>), 7.34 (d, 1H, J = 8.1 Hz, arom), 7.53 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom), 8.35 (br s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 21.9 (CH<sub>3</sub>C), 26.8 (CH<sub>2</sub>β), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.2 (CH<sub>2</sub>NH), 53.5 (CHα), 91.0 (CCH<sub>3</sub>), 109.1, 111.6, 118.3, 119.9, 122.6, 123.1, 127.2, 136.4 (arom) 170.8, 172.4 (CO).

Benzyl [(*R*)-3-acetyl-5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5carbonyl]-L-phenylalaninate



Compound **9** (67 mg, 0.16 mmol) was added into a round bottom flask and dissolved in pyridine (2.8 mL). Then, acetic anhydride (1.4 mL) was added and allowed to react for 1.5 h at room temperature. After concentration and purification by column chromatography on silica gel (EtOAc /hexane 4:6), acetylated compound **12** 

(68 mg, 92%) was obtained as a viscous colourless oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -33.8

HRMS (ESI+): found:  $[M+Na]^+$  483.1198 calculated:  $C_{22}H_{24}N_2O_7SNa^+$  483.1196

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.39 (s, 3H, Ac), 3.09 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 8.0 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.27 (dd, 1H, J = 16.0 Hz, J = 8.0 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.92 (d, 1H, J= 11.3 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.45 (d, 1H, J= 11.3 Hz, CH<sub>2</sub>N), 4.83-4.90 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 5.13-5.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.90 (d, 1H, J = 7.8 Hz, NHCH $\alpha$ ), 6.95-7.45 (m, 10H, arom of Ph and Bn).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 22.1 (CH<sub>3</sub>CO), 23.6 (CH<sub>3</sub>C), 37.5 (CH<sub>2</sub>β), 52.4 (NCH<sub>2</sub>), 53.5 (CHα), 67.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 86.0 (CCH<sub>3</sub>), 127.4, 128.7, 129.2, 134.9, 135.1 (arom), 166.1, 167.7, 170.1 (CO).

### Methyl [(*R*))-3-acetyl -5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5carbonyl]-L-alaninate



Compound **10** (30 mg, 0.11 mmol) was added into a round bottom flask and dissolved in pyridine (2.0 mL). Then, acetic anhydride (1.0 mL) was added and allowed to react for 1.5 h at room temperature. After concentration and purification by column chromatography on silica

gel (EtOAc/hexane 4:6), acetylated compound **13** (20 mg, 59%) was obtained as a viscous yellow oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -35.5

HRMS (ESI+):	found: [M+H] <sup>+</sup>	309.0748
	calculated: $C_{10}H_{16}N_2O_7SH^+$	309.0751

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.47 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz, *CH*<sub>3</sub>CH), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.44 (s, 3H, Ac), 3.77 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.99 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.52 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.54-4.58 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 6.98-7.09 (m, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 17.9 (CH<sub>3</sub>CH), 22.2 (CH<sub>3</sub>CO), 23.6 (CH<sub>3</sub>C), 48.6 (CHα), 52.6 (NCH<sub>2</sub>), 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 86.1 (CCH<sub>3</sub>), 166.1, 167.8, 172.1 (CO).

### Methyl [(*R*))-3-acetyl -5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5carbony]-L-tryptophanate



Compound **11** (34 mg, 0.08 mmol) was added into a round bottom flask and dissolved in pyridine (1.6 mL). Then, acetic anhydride (0.8 mL) was added and allowed to react for 1.5 h at room temperature. After concentration and purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexane 7:3), acetylated compound **14** (30 mg, 81%) was obtained as a viscous yellow oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -18.1

HRMS (ESI+):	found: $[M+H]^+$	424.1185
	calculated: $C_{18}H_{21}N_3O_7SH^+$	424.1173

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.39 (s, 3H, Ac), 3.30-3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.74 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.92 (d, 1H, J= 11.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.47 (d, 1H, J= 11.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.84-4.90 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 6.98 (d, 1H, J= 7.6 Hz, NHCH $\alpha$ ), 7.00-7.56 (m, 5H, arom), 8.21 (s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 22.2 (CH<sub>3</sub>CO), 23.4 (CH<sub>3</sub>C), 27.4 (CH<sub>2</sub>β), 52.7 (NCH<sub>2</sub>), 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.5 (CHα), 86.2 (CCH<sub>3</sub>), 109.6, 111.5, 118.5, 119.9, 122.6, 122.9, 127.5, 136.3 (arom), 166.2, 167.9, 171.2 (CO).

### Methyl [(*R*)-5-methyl-2,2-dioxo- $2\lambda_6$ -[1,2,3]-oxathiazolidine-5-carbonyl]-Ltryptophanate



Sulfamidate **10** (44 mg, 0.165 mmol) and LiOH·H<sub>2</sub>O (70 mg, 1.66 mmol) were suspended in a mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2, 15 mL) and stirred at room temperature for 24 h. After that, the generated suspension were concentrated, and after evaporation of methanol, acidified with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%. The extraction of the aqueous layer firstly with

 $CH_2Cl_2$ , and then with  $CHCl_3/^{I}PrOH$  (3:1) gave, after drying over  $Na_2SO_4$  and concentrating under vacuum, a white solid which was used without further purification.

In a schlenk, under an argon atmosphere, to a solution of L-Trp-(OMe) hydrochloride (42 mg, 0.16 mmol) in DMF (1.2 mL) were added to sulfamidate **10** (42 mg, 0.16 mmol), DIEA (60  $\mu$ L, 3.44 mmol), PyBOP (87 mg, 0.16 mmol) and a 0.6 M solution of HOAt (0.31 ml, 0.18 mmol) in DMF at 0° C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature, and stirred for 17 h. The reaction mixture was then cooled to 0° C, and quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was concentrated and the residue was purified by column chromatography (EtOAc/hexane 9:1) to give sulfamidate **15** (31 mg, 59%) as a yellow oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -4.8

HRMS (ESI+):	found: [M+H]⁺	453.1438
	calculated: $C_{19}H_{24}N_4O_6SH^+$	453.1444

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.20 (d, 3H, J = 7.3 Hz,  $CH_3CH$ ), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 3.21 (dd, 1H, J = 14.8 Hz, J = 7.3 Hz,  $CH_2\beta$ ), 3.32 (dd, 1H, J = 14.9 Hz, J= 5.1 Hz,  $CH_2\beta$ ), 3.42 (dd, 1H, J = 12.5 Hz, J= 10.4 Hz,  $CH_2NH$ ), 3.72 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 4.08 (dd, 1H, J = 12.7 Hz, J = 6.3 Hz,  $CH_2NH$ ), 4.31 (t, 1H, J = 7.3 Hz,  $CH\alpha_{Ala}$ ), 4.95-5.02 (m, 1H,  $CH\alpha_{Trp}$ ), 6.61-6.71 (m, 2H,  $CH_2NH$ ,  $NH_{Trp}$ ), 6.78 (d, 1H, J = 7.1 Hz, ,  $NH_{Ala}$ ), 7.06 (d, 1H, J = 2.0 Hz,  $NHCH_{indol}$ ), 7.13 (t, 2H, J = 7.2 Hz, arom), 7.18 (t, 1H, J = 7.1 Hz, arom), 7.35 (d, 1H, J = 8.0 Hz, arom), 7.56 (d, 1H, J = 7.8 Hz, arom), 8.18 (br s, 1H,  $NHCH_{indol}$ ).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 17.4 (CH<sub>3</sub>CH), 22.0 (CH<sub>3</sub>C), 27.9 (CH<sub>2</sub>β), 50.7 (CHα<sub>Ala</sub>), 52.7 (CHα<sub>Trp</sub>), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.5 (CH<sub>2</sub>NH), 91.8 (CCH<sub>3</sub>), 110.0, 111.4, 118.6, 119.8, 122.4, 123.1, 127.8, 136.2 (arom) 170.5, 171.6, 173.7 (CO).

### Methyl [(*R*)-3-acetyl-5-methyl-2,2-dioxo-2 $\lambda_6$ -[1,2,3]-oxathiazolidine-5carbonyl]-L-tryptophanate



Compound **15** (55 mg, 0.12 mmol) was added into a round bottom flask and dissolved in pyridine (2.0 mL). Then, acetic anhydride (1.0 mL) was added and allowed to react for 1.5 h at room temperature. After concentration and purification by column chromatography on silica gel (EtAcO/hexane 9:1), acetylated compound **16** (47 mg, 80%) was obtained as a viscous yellow oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -4.1

 HRMS (ESI+):
 found:  $[M+H]^+$  495.1549

 calculated:  $C_{21}H_{26}N_4O_8SH^+$  495.1544

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.27 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, *CH*<sub>3</sub>CH), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.19 (s, 3H, Ac), 3.15-3.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ <sub>Trp</sub>), 3.61 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.79 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.23 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.42 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH $\alpha$ <sub>Ala</sub>), 4.87 (dd, 1H, *J* = 9.5 Hz, J= 4.1 Hz, CH $\alpha$ <sub>Trp</sub>), 6.64 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NHCH $\alpha$ <sub>Trp</sub>), 6.87 (m, 2H, NHCH $\alpha$ <sub>Ala</sub>, CHNH<sub>indol</sub>), 6.95-7.03 (m, 1H, arom), 7.05-7.10 (m, 1H, arom), 7.25-7.31 (m, 1H, arom), 7.39-7.43 (m, 1H, arom), 8.31(s, 1H, CHNH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 18.2 (CH<sub>3</sub>CH), 22.2 (CH<sub>3</sub>CO), 23.7 (CH<sub>3</sub>C), 27.5 (CH<sub>2</sub>β<sub>Trp</sub>), 49.6 (CHα<sub>Ala</sub>), 52.6 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 52.7 (NCH<sub>2</sub>), 53.0 (CHα<sub>Trp</sub>), 85.9 (CCH<sub>3</sub>), 109.8, 111.6, 118.4, 119.7, 122.3, 123.1, 127.7, 136.2 (arom), 166.4, 167.9, 170.8, 172.0 (CO).



To a solution of *N*-Boc-L-Phe-OH (134 mg, 0.50 mmol) in  $CH_2CI_2$  (10 mL), DIEA (0.35 mL, 2.00 mmol) and TBTU (159 mg, 0.50 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min. The mixture was then cooled at -20° C and sulfamidate **9** (209 mg, 0.50 mmol) was added and stirred at -20° C. After stirring

for 30 min, the resulting mixture was warmed to room temperature and extracted with brine (15 mL). Then, the aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 10 mL). The organic phases were combined and washed with 0.1 M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) aqueous solutions and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by a silica gel column chromatography (hexane/EtOAc, 4:6) to give compound **17** (290 mg, 87%) as a colorless oil.

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -20.3

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.30 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.83 (dd, 1H, *J* = 12.4 Hz, *J* = 7.6 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 2.99 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.03-3.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.63 (br s, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.43 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz , CH<sub>2</sub>N), 4.65-

4.83 (m, 2H, CHα, CHα), 4.95 (d, 1H, J = 5.6 Hz, NHBoc), 5.07 (dd, 2H, J = 32.5, J = 12.1 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 6.83 (d, 1H, J = 7.6, NHCHα), 6.92 (br s, 2H, arom), 7.07-7.32 (m, 13H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 23.5 (CH<sub>3</sub>C), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.6 (Cβ), 37.9 (Cβ), 52.5 (CH<sub>2</sub>N), 53.5 (Cα), 54.9 (Cα), 67.8 (CH<sub>2</sub>Ph), 80.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 86.0 (CCH<sub>3</sub>), 127.4, 127.5, 128.8, 128.9, 129.0, 129.3, 129.5, 129.6, 134.3, 135.1, 135.6 (arom), 154.8, 167.9, 169.3, 170.2 (CO).

# Benzyl [(*R*)-3-((tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl)-5-methyl-2,2-dioxido-1,2,3-oxathiazolidine-5-carbonyl]-L-phenylalaninate



To a solution of *N*-Boc-L-Trp-OH (76 mg, 0.31 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL), DIEA (0.23 mL, 1.24 mmol) and TBTU (99 mg, 0.31 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min. The mixture was then cooled at -20° C and sulfamidate **9** (130 mg, 0.31 mmol) was added and stirred at -20° C. After stirring

for 30 min, the resulting mixture was warmed to room temperature and extracted with brine (15 mL). Then, the aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 10 mL). The organic phases are combined and washed with 0.1 M HCl (15 mL) and 5% NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) aqueous solutions and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent, the residue was purified by a silica gel column chromatography (hexane/EtOAc, 6:4) to give compound **18** (177 mg, 81%) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -10.3

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	727.2189
	calculated: C <sub>36</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> SNa <sup>+</sup>	727.2414

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 1.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.04 (dd, 1H, J = 13.8 Hz, J = 6.9 Hz,  $CH_2\beta_{Trp}$ ), 3.16-3.39 (m, 3H,  $CH_2\beta_{Trp}$ ,  $CH_2\beta_{Phe}$ ), 3.59 (br s, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.39 (d, 1H, J = 9.3 Hz ,  $CH_2$ N), 4.75-4.93 (m, 2H, CH $\alpha_{Trp}$ , CH $\alpha_{Phe}$ ), 5.04-5.19 (m, 3H,  $CH_2$ Ph, NHBoc), 6.88 (d, 1H, J = 5.6, NHCH $\alpha_{Phe}$ ), 6.94-7.03 (m, 3H, NHC $H_{indol}$ , arom), 7.09-7.39 (m, 11H, arom), 7.60 (d, 1H, J = 7.4, arom), 8.23 (s, 1H, , NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 23.3 (*C*H<sub>3</sub>C), 28.4 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.4 (CH<sub>2</sub> $\beta_{Phe}$ ), 37.6 (CH<sub>2</sub> $\beta_{Trp}$ ), 52.5 (CH<sub>2</sub>N), 53.6 (CHα), 54.1 (CHα), 67.8 (*C*H<sub>2</sub>Ph), 80.5 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 85.6 (*C*CH<sub>3</sub>), 109.2, 111.4, 118.7, 120.1, 122.5, 123.8, 127.5, 127.6, 128.8, 128.9, 129.0, 129.1, 129.3, 134.9, 135.2, 136.3 (arom), 155.0, 167.9, 169.9, 170.2 (CO).



# Reactividad frente a *S*-Carbohidratos

- 4.1 Introducción
- 4.2 Estudio de la reactividad
- 4.3 Parte Experimental

#### 4.1 - Introducción

Es bastante común encontrar en la bibliografía  $\beta$ -péptidos constituidos por  $\beta$ aminoácidos con diferentes patrones de sustitución<sup>1</sup> ( $\beta^2$ ,  $\beta^3$ ,  $\beta^{2,3}$ ), pero en cambio hay muy pocos ejemplos en los que se incorporan  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos<sup>2</sup> y, en la mayoría de los casos, los sustituyentes que poseen son idénticos debido a la complejidad sintética de este tipo de  $\beta$ -aminoácidos<sup>3</sup> (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Representación esquemática de tres homo- $\beta$ -péptidos constituidos por - $\beta^{2,2}$ aminoácidos

En el caso de los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos, ocurre lo mismo, encontrándose únicamente como ejemplos bibliográficos estudios recientes realizados por el

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Peter G. N. *Pseudo-peptides in Drug Discovery* **2004**, Wiley-VCH, 33-120.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> a) Seebach, D., Abele, S., Sifferlen, T., Hänggi, M., Gruner, S., Seiler, P. *Helv. Chim. Acta* 1998, *81*, 2218-2243; b) Abele, S., Seiler, P., Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* 1999, *82*, 1559-1571.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Romanens, A., Bélanger, G. Org. Lett. **2015**, 17, 322-325.

grupo del profesor Morten B. Strøm<sup>4</sup>. Estos estudios se centran en la síntesis de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos lineales (Figura 4.2a) o cíclicos (Figura 4.2b), constituidos por un  $\beta^{2,2}$ -aminoácido con residuos lipofílicos sobre el cual estudian su posible actividad anticancerosa contra las células del linfoma de Burkitt humano (Figura 4.2).



Figura 4.2 Representación esquemática de varios  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos

Además de la escasez de los ejemplos en los que se incorporan  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos, es todavía más raro encontrar en la bibliografía estudios de  $\beta$ -péptidos<sup>5</sup> y de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos<sup>6</sup> en los que se incorporan  $\beta$ -aminoácidos glicosilados.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> a) Tørfoss, V., Ausbacher, D., Cavalcanti-Jacobsen, C. D. A., Hansen, T., Brandsdal, B.-O., Havelkova, M., Strøm, M.B. *J. Pept. Sci.* 2012, *18*, 170-176; b) Tørfoss, V., Isaksson, J., Ausbacher, D., Brandsdal, B.-O., Flaten, G. E., Anderssen, T., Cavalcanti-Jacobsen, C. D. A., Havelkova, M., Nguyen, N. T.,, Strøm, M.B. *J. Pept. Sci.* 2012, *18*, 609-619; c) Sivertsen, A., Tørfoss, V., Isaksson, J., Ausbacher, D., Anderssen, T., Brandsdal, B.-O., Havelkova, M., Skjørholm, A.E., Strøm, M.B. *J. Pept. Sci.* 2014, *20*, 279-291.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> a) Norgren, A. S., Arvidsson, P. I. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1359-1361; b) Norgren, A.S., Norberg, T., Arvidsson, P.I. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 717-727.

En este segundo caso se presenta como ejemplo la síntesis de la  $\beta^3$ -homotreonina glicosilada (análogo del antígeno T<sub>N</sub>) y su posterior incorporación sobre un fragmento peptídico constituido por 20 aminoácidos que corresponden a un fragmento de la mucina humana MUC1. Los glicopéptidos de la familia de las mucinas decorados con antígenos asociados a tumores han demostrado ser importantes estructuras diana para el desarrollo de vacunas contra el cáncer; de ahí, el interés por el estudio de los  $\alpha/\beta$ -péptidos glicosilados (Figura 4.3).



Figura 4.3 Secuencia peptídica análoga a MUC1 que incorpora la  $\beta^3$ -homotreonina glicosilada ( $\beta$ -T<sub>N</sub>)

<sup>6</sup> Karch, F., Hoffmann-Röder, A. Beilstein J. Org. Chem. **2010**, 6, No. 47.

En nuestro grupo de investigación venimos centrando nuestra atención en la síntesis y estudio estructural de este tipo de  $\beta$ -aminoácidos mediante la apertura, con una amplia variedad de nucleófilos, de sulfamidatos cíclicos derivados de la  $\alpha$ -metilisoserina<sup>7</sup> (Figura 4.4).



Figura 4.4 Diferentes  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos obtenidos en nuestro grupo de investigación

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> a) Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Jiménez-Osés, G., Peregrina, J. M. *Chem. Comm.* **2004**, *10*, 980-981; b) Mata, L., Jiménez-Osés, G., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4034-4042; c) Mata, L., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M. *Chem-Eur. J.* **2013**, *19*, 6831-6839.

Todo esto sumado a la estabilidad proteolítica que presentan los  $\beta$ -péptidos glicosilados frente a glicosidasas y a la importancia creciente que están adquiriendo los *S*-glicopéptidos<sup>8</sup> frente a sus homólogos *O*-glicosilados naturales, centró nuestra atención en la síntesis de  $\alpha$ , $\beta^{2,2}$ -péptidos híbridos *S*-glicosilados.

Para abordar su preparación, se emplearon los péptidos híbridos que incorporan los sulfamidatos cíclicos quirales, sintetizados en el capítulo anterior, como electrófilos en el proceso de apertura nucleófila empleando tiocarbohidratos como nucleófilos (Figura 4.5).



Figura 4.5 Esquema general de la metodología sintética a emplear

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Tan, F.Y.Y., Tang, C.M., Exley, R.M. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 342-350.

#### 4.2 -Estudio de la reactividad

Antes de iniciar el estudio de la reactividad general, que implica el uso de  $\alpha/\beta$ péptidos híbridos que incorporan sulfamidatos como electrófilos en las reacciones de apertura nucleófila, se consideró oportuno realizar un estudio previo de esta reacción empleando el sulfamidato **G** como electrófilo y derivados de la  $\beta$ tioglucopiranosa como nucleófilos. Inicialmente, se establecieron las condiciones de reacción más adecuadas para aplicar esta metodología a sulfamidatos más complejos y, posteriormente, se sintetizó el  $\beta$ -tioglico- $\beta^{2,2}$ -péptido modelo enantioméricamente puro más simple, cuyo análisis conformacional podría revelar importantes datos acerca de la disposición espacial de este tipo de sustratos (Figura 4.6).



Figura 4.6 Esquema general de apertura del sulfamidato G con tiocarbohidratos para la obtención de  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos diamida tioglicosilados

Este sulfamidato **G** es por sí mismo un  $\beta^{2,2}$ -aminoácido enmascarado, en el que tanto el grupo amino como el ácido carboxílico están funcionalizados como amidas y la posición cuaternaria está preactivada para su posterior funcionalización.

Comenzamos el estudio de reactividad del sulfamidato **G** enfrentándolo al 2,3,4,6tetra-*O*-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa como nucleófilo.

Esta reacción de apertura se realizó inicialmente siguiendo el protocolo ya establecido en nuestro grupo de investigación<sup>9</sup>, el cual implica el uso del 1,8diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) como base encargada de la desprotonación previa del grupo SH del carbohidrato en THF como disolvente y a 0° C. Desafortunadamente, en estas condiciones, lo único que se observaba era la desprotección no deseada del grupo NH de la sulfonamida, dando lugar a la obtención del compuesto **F** con un 93% de rendimiento (Figura 4.7).



Figura 4.7 Intento de apertura del sulfamidato G con la  $\beta$ -tioglucopiranosa tetraacetilada

El uso de acetonitrilo en lugar de THF dio como resultado el mismo compuesto de desprotección con rendimientos similares. Para solventar este problema y tomando como punto de partida el trabajo publicado en 2002 por Cohen y Halcomb<sup>10</sup> donde se realizaba la reacción de apertura nucleofílica en medio

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Avenoza, A., Busto, J. H., Jiménez-Osés, G., Peregrina, J. M. Synthesis **2006**, 641-644.

 <sup>&</sup>lt;sup>10</sup> a) Cohen, S.B., Halcomb, R.L. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124*, 2534-2543; b) Cohen,
 S.B., Halcomb, R.L. *Org. Lett.* 2001, *3*, 405-407.

acuoso empleando la sal sódica del tiocarbohidrato desprotegido sobre el sulfamidato cíclico procedente de la L-serina, se decidió trasladar estas mismas condiciones de reacción a nuestro estudio.

Así, se pudo ensayar estas mismas condiciones ya que el sulfamidato diamida **G** era completamente soluble en agua y la sal sódica de la 1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa, soluble en agua también, se pudo preparar fácilmente a partir de la tio- $\beta$ -D-glucopiranosa tetraacetilada mediante la desprotección de sus acetatos con metóxido de sodio en metanol (Figura 4.8).



**Figura 4.8** Preparación de la sal sódica de la 1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa

Siguiendo el procedimiento descrito por Cohen y Halcomb, la sal sódica del tio- $\beta$ carbohidrato fue añadida a una disolución del sulfamidato **G** y NaHCO<sub>3</sub> en agua; posteriormente, esta mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 4 horas (Figura 4.9).



Figura 4.9 Apertura de G con la sal sódica de la 1-tio-β-D-glucopiranosa en medio acuoso

Bajo estas condiciones, se logró obtener el *S*-glicoaminoácido, de configuración (*S*), **19** con un rendimiento del 11 % ya que, como se observa en la figura 4.7, el proceso transcurre con inversión total de la configuración ( $S_N 2$ ). Este compuesto **19** puede considerarse como el *S*-glico- $\beta$ -péptido híbrido modelo más simple derivado de la  $\alpha$ -metilisoserina.

Sin embargo, el compuesto mayoritario que se sigue observando en la reacción anterior es el producto de desprotección **F** con un 52% de rendimiento. Para tratar de mejorar el rendimiento del compuesto de apertura frente al de desprotección, se intentó realizar el control del pH de la disolución. De este modo, se llevó a cabo la reacción en un buffer fosfato a pH 7, dando como resultado sólo trazas del derivado de apertura nucleófila.

Por último, se abordó esta reacción de apertura nucleófila empleando la síntesis asistida por microondas<sup>11</sup>. En este caso, la reacción se llevó a cabo a 140° C ( 80 W de potencia) durante 4 minutos, observándose la aparición del compuesto deseado **19** con un 40 % de rendimiento, además de un 30 % de sulfamidato **F** (Figura 4.10). A modo de resumen se presenta la Tabla 4.1 donde se detalla la reactividad observada en las aperturas del sulfamidato **G**.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> De la Hoz, A., Loupy, A. *Microwaves in Organic Synthesis 3<sup>rd</sup> Ed.* **2012**, Wiley-VCH.



Figura 4.10 Reacción de apertura nucleofílica del sulfamidato G con derivados de 1-tio- $\beta$ -

D-glucopiranosa

	a, b	Condiciones	F %	(19) %
1	R= Ac, R'= H (a)	DBU, THF/ CH₃CN, 2 h	93	-
2	R= H, R'= Na (b)	NaHCO <sub>3</sub> . H <sub>2</sub> O, 4 h	52	trazas
3	R= H, R'= Na (b)	buffer pH 7, H₂O, 5 h	68	trazas
4	R= H, R'= Na (b)	microondas, H <sub>2</sub> O, 4 min	30	40

**Tabla 4.1** Resumen de reactividad del compuesto G frente a derivados de 1-tio- $\beta$ -D-<br/>glucopiranosa

Como conclusión a este estudio, se puede decir, que ninguna de las condiciones probadas han resultado eficaces a la hora de obtener el compuesto de apertura deseado, obteniéndose de forma preponderante el producto de desacetilación **F**. Tan solo el empleo de microondas en medio acuoso ha mostrado ser parcialmente válido a la hora de obtener un rendimiento moderado del compuesto de apertura nucleófila perseguido.

En la segunda parte de este estudio se abordó la apertura nucleofílica de la biblioteca de sulfamidatos precursores de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos, sintetizados en el

capítulo anterior, empleando *S*-carbohidratos como nucleófilos, obteniendo de esta forma péptidos híbridos tioglicosilados que incorporan en su estructura  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos enantioméricamente puros.

Inicialmente, se emplearon los sulfamidatos **2**, **5** y **6** que incorporan L-alanina, Lfenilalanina y L-triptófano, protegidos con Boc en el extremo N-terminal, respectivamente, para efectuar las reacciones de apertura con la 2,3,4,6-tetra-*O*acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa como nucleófilo (Figura 4.11).



Figura 4.11 Esquema general de apertura de *N*-Boc-Xxx-Sul-CONHMe empleando  $\beta$ -tioglucopiranosa tetraacetilada como nucleófilo

Debido a la escasa o nula solubilidad de estos sulfamidatos en agua, se descartó emplear las condiciones anteriormente descritas con la sal sódica de la tioglucosa en medio acuoso (Entrada 4, Tabla 4.1).

Así pues, se inició el estudio de reactividad con el sulfamidato 2 que incorpora alanina en acetonitrilo con DBU como base. La reacción se mantuvo durante 30

minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la etapa de hidrólisis del resto sulfámico empleando  $H_2SO_4$  (20%).

En estas condiciones únicamente se observó aproximadamente el 15% de conversión del compuesto de apertura **20**, que no pudo ser aislado por cromatografía de columna. Asimismo, se detectó la presencia del sulfamidato **F**, logrando aislar el tioéster **21** con un rendimiento del 39 % (Figura 4.12).



Figura 4.12 Apertura del sulfamidato 2 con  $\beta$ -tioglucopiranosa tetraacetilada

La generación del sustrato **21** se corresponde con el ataque del tiocarbohidrato sobre el carbonilo perteneciente al  $\alpha$ -aminoácido al actuar el sulfamidato **F** de grupo saliente<sup>12</sup>.

Con el afán de aumentar el rendimiento del compuesto deseado **20**, se llevó a cabo la reacción en DMF seca a 50° C y empleando la sal de amidinio de la 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa, preparada in situ por adición de DBU sobre una disolución del tiocarbohidrato en DMF seca.

Una vez finalizada la etapa de apertura nucleófila y realizada la hidrólisis ácida empleando una disolución de  $H_2SO_4$  (20%) en diclorometano para eliminar el resto

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Manabe, S., Sugioka, T., Ito, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 849-853.
sulfámico, se pudo detectar, por <sup>1</sup>H RMN y ESI-MS, la presencia del compuesto de apertura **20**, el cual no pudo ser aislado mediante cromatografía de columna en las diversas condiciones empleadas. Esta circunstancia, obligó a trabajar con el crudo de reacción sin purificar en las siguientes etapas de reacción.

De este modo, se decidió avanzar en la síntesis del péptido híbrido final funcionalizado como diamidas terminales sin aislar los correspondientes intermedios de reacción. Para ello, inicialmente, se llevó a cabo la desprotección del grupo Boc empleando TFA en diclorometano a temperatura ambiente en una relación (1:2), seguido de la acetilación del grupo amino con anhídrido acético en piridina como base en una relación (1:2). Finalmente, la desprotección de los grupos hidroxilo del tiocarbohidrato se realizó disolviendo el crudo de reacción en MeOH, añadiendo la misma cantidad de una disolución saturada de metóxido de sodio en metanol, dejando la mezcla reaccionar durante 1 hora. Estas secuencias de reacción dieron lugar al compuesto **22** con un rendimiento global del 37% a partir de sulfamidato **2** tras su purificación mediante cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa que se detallará en la sección experimental (Figura 4.13).



Figura 4.13 Apertura de 2 con  $\beta$ -tioglucopiranosa y posteriores etapas de transformación para sintetizar 22

Con el objetivo de ampliar la aplicabilidad sintética del protocolo establecido y de obtener una mayor diversidad estructural de  $\alpha/\beta$ -glicopéptidos híbridos, se planteó la apertura de los sulfamidatos **5** y **6** que incorporan  $\alpha$ -aminoácidos aromáticos en la sulfonamida.

La apertura nucleofílica con la sal de amidinio de la 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente, para obtener los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos **23** y **24** en cinco etapas de reacción y con unos rendimientos globales del 34 y 30% respectivamente (Figura 4.14).



Figura 4.14 Apertura de 5 y 6 con  $\beta$ -tioglucopiranosa y posteriores etapas de

transformación para sintetizar 23 y 24

Teniendo en cuenta el relativo éxito obtenido en la apertura con  $\beta$ tioglucopiranosa de los dipéptidos que incorporan un sulfamidato, se decidió ampliar la reactividad a otros derivados carbohidrato azufrados diferentes de la  $\beta$ tioglucopiranosa. Así, se abordará la apertura nucleófila de los sulfamidatos con  $\alpha$ -*S*-GalNAc y el  $\alpha$ -*S*-GlcNAc, convenientemente protegidos como tri-O-acetilderivados (Figura 4.15).



**Figura 4.15** Estructuras del  $\beta$ -S-Glc,  $\alpha$ -S-GalNAc y  $\alpha$ -S-GlcNAc acetilados

El primero de los tres tiocarbohidratos es comercial, pero tanto el  $\alpha$ -S-GlcNAc como el  $\alpha$ -S-GalNAc tuvieron que ser sintetizados mediante un procedimiento descrito en la bibliografía,<sup>13</sup> y que consistió en el empleo del denominado reactivo de Lawesson (Figura 4.16).

 <sup>&</sup>lt;sup>13</sup> a) Jesberger, M., Davis, T. P., Barner, L., *Synthesis* 2003, *13*, 1929-1958; b) Ozturk,
T., Ertas, E., Mert, O. *Chem. Rev.* 2007, *107*, 5210-5278.



Figura 4.16 Estructura del reactivo de Lawesson y mecanismo de tionación

Para ello partimos de los productos comerciales 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2acetamido- $\beta$ -D-glucopiranosa y 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-acetamido- $\beta$ -Dglucopiranosa siguiendo las condiciones descritas por Knapp y Myers<sup>14</sup> con unas leves modificaciones experimentales. Éstas consistieron en la mejora de la solubilización de los reactivos, al adicionar al tolueno pequeñas proporciones de 1,2-dicloroetano, miscible con el disolvente anterior, mejorando de esta manera la reactividad al mejorar la solubilidad.

La transformación del grupo acetamido (MeCONH) de la glucosamina peracetilada en el correspondiente grupo tioacetamido (MeCSNH) por acción del reactivo de Lawesson da lugar a la generación de la tiazolina intermedia que tras una etapa de hidrólisis con TFA nos permitió la obtención de 3,4,6-tri-*O*-acetil-1-tio-2acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosa y 3,4,6-tri-O-acetil-1-tio-2-acetamido-2desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosa

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Knapp, S., Myers, D. S. J. Org. Chem. **2002**, 67, 2995-2999.

Al llevar a cabo la síntesis de estos tiocarbohidratos se obtuvieron como únicos compuestos los anómeros  $\alpha$  gracias a la asistencia anquimerica del grupo tioacetamido y la subsiguiente formación de la tiazolina intermedia que, tras su hidrólisis, permite obtener los  $\alpha$ -tiocarbohidratos a escala multigramo (Figura 4.17).



Figura 4.17 Síntesis del  $\alpha$ -S-GalNAc y del  $\alpha$ -S-GlcNAc acetilados

Una vez sintetizados los tiocarbohidratos, la siguiente etapa se derivó hacia las aperturas nucleófilas de los precursores tripeptídicos **17** y **18** para obtener  $\alpha/\beta$ -tripéptidos tioglicosilados (Figura 4.18).



Figura 4.18 Sulfamidatos 17 y 18 precursores tripeptídicos híbridos

Se inició el estudio de reactividad con el sulfamidato **18**, empleando inicialmente  $\beta$ -tioglucopiranosa como nucleófilo en las condiciones optimizadas de apertura que obtuvimos anteriormente; DMF a 50° C y con DBU como base (Figura 4.19).



Figura 4.19 Reactividad del sustrato 18 frente al ataque nucleofílico de la  $\beta$ -tioglucopiranosa

Sin embargo, no se logró aislar el compuesto de apertura deseado, sino que éste únicamente pudo ser observado en pequeñas trazas en la espectrometría de masas del crudo de reacción. El producto mayoritario de la reacción se producía por el ataque sobre el carbonilo del triptófano, con generación del tioéster y salida del sulfamidato **9** como grupo saliente (Figura 4.20).



Figura 4.20 Productos obtenidos en el estudio de la reactividad del compuesto 18 frente a

 $\beta$ -tioglucopiranosa

Se realizaron diversas variaciones de las condiciones de reacción (disolvente, temperatura...), observándose en todas ellas la generación del tioéster como producto mayoritario y, en algunos casos, la formación del compuesto de ataque  $S_N 2$  en un pequeño porcentaje, detectado por ESI-MS, y que no pudo ser aislado (Tabla 4.2).

	Disolvente	Temperatura (° C)	Compuesto 25 (%)
1	DMF	20	40
2	DMF	50	45
3	DMF	-20	25
4	DMF (tamiz 4 Å)	20	40
5	CH₃CN	50	35
6	CH₃CN	-20	28

Tabla 4.2 Resumen de reactividad del compuesto 18 frente a  $\beta$ -tioglucopiranosa

Los resultados obtenidos cuando se amplió este tipo de reactividad a los tiocarbohidratos  $\alpha$ -S-GlcNAc y  $\alpha$ -S-GalNAc fueron bastante similares, observando únicamente la generación de los tioésteres **26** y **27** respectivamente y, a pesar de que como en el caso anterior, se ensayaron varias condiciones de reacción (Figura 4.21)



Figura 4.21 Tioésteres obtenidos al emplear el sulfamidato 18 como electrófilo con  $\beta$ -S-

Glc,  $\alpha$ -S-GlcNAc y  $\alpha$ -S-GalNAc

Debido a la importancia biológica que se asocia a glicopéptidos y glicoproteínas que presentan aminoácidos glicosilados con  $\alpha$ -GalNAc,<sup>15</sup> y para constatar que los resultados anteriores no dependían del sulfamidato elegido, se ensayó la apertura del compuesto **17**, empleando la amplia variedad de condiciones descritas con anterioridad (Tabla 4.3). De este modo, y como en el caso anterior, lo único que se observó de nuevo fue el ataque al carbonilo con generación del tioéster **28** (Figura 4.22).



Figura 4.22 Productos obtenidos en la reactividad del compuesto 17 frente a  $\alpha$ -S-GalNAc

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> a) Desai, P. R. *Tranfus. Med. Rev.* **2000**, *14*, 312-325; b) Lo-Man, R., Vichier-Guerre, S., Perraut, R., Dériaud, E., Huteau, V., BenMohamed, L., Diop, O. M., Livingston, P. O., Bay, S. Leclerc, C. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4987-4994; c) Slovin, S., Ragupathi, G., Fernandez, C., Diani, M., Jefferson, M., Wilton, A., Kelly, W. K., Morris, M., Solit, D., Clausen, H., Livingston, P., Scher, H. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1921-1930.

	Disolvente	Temperatura (° C)	Compuesto 28 (%)
1	DMF	20	25
2	DMF	50	35
3	DMF	-20	20
4	DMF (tamiz 4 Å)	20	45
5	CH₃CN	50	22
6	CH₃CN	-20	26

**Tabla 4.3** Resumen de reactividad del compuesto **17** frente a  $\alpha$ -S-GalNAc

Manteniendo como objetivo principal la obtención de los compuestos procedentes del ataque S<sub>N</sub>2 sobre sulfamidatos se decidió ensayar otras condiciones, tomando como referente una metodología descrita en la bibliografía.<sup>16</sup> En ella se describe el ataque S<sub>N</sub>2 de  $\alpha$ -S-GalNAc y  $\alpha$ -S-GlcNAc sobre varios bromoderivados, como bromoalaninas incorporadas en péptidos, por lo que se decidió trasladar estas condiciones a nuestro caso particular.

De esta manera, la reacción se llevó a cabo en un sistema bifásico AcOEt/H<sub>2</sub>O con TBAHS a un pH controlado de 8.5. Inicialmente se probaron estas condiciones sobre ambos sulfamidatos **17** y **18** con  $\alpha$ -S-GalNAc y, de la misma manera que en el caso anterior, se observó la formación de los tioésteres **27** y **28** como productos mayoritarios, con rendimientos que oscilaban entre 62-71 % (Figura 4.23).

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Zhu, X., Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6063-6067.



Figura 4.23 Productos obtenidos en la reactividad de los compuestos 17 y 18 frente a  $\alpha$ -S-GalNAc en condiciones de transferencia de fase

En vista de que estos sulfamidatos precursores de tripéptidos  $\alpha,\beta,\alpha$  **17** y **18** daban problemas de reactividad, se optó por ensayar la reactividad de apertura nucleófila frente a los compuestos **9**, **10**, **11** y **15** que presentan el NH del sulfamidato libre. Puesto que en este caso no existe la posibilidad de formación del tioéster es probable que en caso de reaccionar lo realice a través del carbono cuaternario activado (Figura 4.24).



Figura 4.24 Esquema general de apertura de sulfamidatos precursores de tripéptidos

híbridos empleando diferentes tiocarbohidratos

En todos estos casos, y bajo las condiciones ensayadas previamente, no se observó reactividad alguna con ninguno de los tiocarbohidratos, recuperándose el sulfamidato de partida inalterado.

Este hecho parece indicar que la sustitución en el NH sulfámico es relevante de cara a la reactividad de estos sustratos. De este modo, se propuso realizar las aperturas de los derivados acetilados **12**, **13**, **14** y **16** sintetizados en el capítulo anterior (Figura 4.25).



Figura 4.25 Sulfamidatos *N*-acetilados sobre los que se ensayó la apertura nucleófila con tiocarbohidratos

Se inició el estudio de reactividad de estos compuestos mediante el empleo de la 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa como nucleófilo, en DMF y empleando DBU como base. En todos los casos se realizó la reacción a temperatura ambiente, observándose por <sup>1</sup>H RMN la presencia mayoritaria de los compuestos derivados de un  $\alpha/\beta$ -péptido híbrido tioglicosilado. De esta manera, tras la correspondiente etapa de hidrólisis del sulfamato con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% se logró

aislar los compuestos **29** y **30** con rendimientos del 65% y 74% respectivamente (Figura 4.26a,b)

Sin embargo, en los casos en los que se empleaban los sulfamidatos **14** y **16**, no fue posible aislar el compuesto de apertura  $S_N 2$  mediante columna cromatográfica.

Debido a esto, y para estos dos últimos ejemplos, se decidió realizar la derivatización de los mismos desprotegiendo los grupos hidroxilo del tiocarbohidrato para poder realizar su posterior purificación por HPLC (Figura 4.26).





Figura 4.26 Aperturas de los sulfamidatos acetilados 12, 13, 14 y 16 realizadas con β-S-Glc

Con estas mismas condiciones se llevaron a cabo las reacciones con  $\alpha$ -S-GalNAc y el  $\alpha$ -S-GlcNAc tri-O-acetilados como nucleófilos, observándose que en los casos en los que se usaba  $\alpha$ -S-GalNAc, la reacción no transcurría de la manera prevista. En estos casos, lo que parece suceder, principalmente, es un proceso de oxidación, donde se debe generar el dímero del carbohidrato<sup>17</sup> y una mezcla compleja de productos de transformación del sulfamidato que no pudieron ser aislados (Figura 4.27).

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> a) Knapp, S., Myers, D. S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2995-2999; b) Knapp, S., Darout, E., Amorelli, B. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1380-1389



Figura 4.27 Dimerización oxidante del  $\alpha$ -S-GalNAc tetracetato

Por el contrario, cuando se emplea  $\alpha$ -S-GlcNAc la reacción sí que transcurre adecuadamente con la formación de los aductos de apertura nucleófila (S<sub>N</sub>2) en todos los casos con la excepción del derivado **12** de fenilalanina (Figura 4.28a).

Además en el caso del compuesto **16** precursor de tripéptido híbrido, fue necesaria su derivatización hacia el carbohidrato libre, como en los casos anteriores, debido a la dificultad que observamos para la purificación del intermedio acetilado puro (Figura 4.28d).



Figura 4.28 Aperturas de los sulfamidatos acetilados 12, 13, 14 y 16 realizadas con  $\alpha$ -S-

GlcNAc

#### 4.3 - Parte experimental

#### (S)-3-Acetamido-N,2-dimethyl-2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)thio)propanamide



Method A: The sodium salt of 1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (56 mg, 0.26 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O (2 mL). In a second flask, NaHCO<sub>3</sub> (54.2 mg, 0.64 mmol) was added to sulfamidate **G** (61 mg, 0.26 mmol). The reaction was initiated by addition of the sodium thiolate solution to the flask containing sulfamidate **G**. The reaction was

stirred at room temperature for 4 h and evaporated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h and evaporated under reduced pressure. The obtained product was dissolved in  $H_2O$  (3 mL), and the solution was adjusted to pH 7 by the addition of NaHCO<sub>3</sub> (58 mg). The mixture was washed with CHCl<sub>3</sub>/iPrOH (3:1), the aqueous phase was evaporated, and the residue was dissolved in  $H_2O$  (2 mL) and eluted through a reverse-phase Sep-pak C18 cartridge to obtain, after evaporation, the corresponding compound **19** (10 mg, 11%) as a colorless oil.

Method B: In a microwave vial with a capacity of 10 mL, the sodium salt of 1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (84 mg, 0.39 mmol) and sulfamidate **G** (61 mg, 0.26 mmol) were added. The vial was purged with argon to remove oxygen, and H<sub>2</sub>O (2 mL)

was added to the reaction mixture. The sealed reaction vial was placed in the microwave reactor at 140 °C with stirring for 4 min. The solution was cooled to room temperature, washed with ethyl acetate, and evaporated under reduced pressure. The reaction mixture was purified using a reverse-phase Sep-pak C18 cartridge to obtain, after evaporation, the corresponding compound **19** (33 mg, 40%) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.13, H<sub>2</sub>O): -10.3

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	375.1198
	calculated: C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> SNa <sup>+</sup>	375.1202

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.78 (s, 3H, NH*CH*<sub>3</sub>), 3.33 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, H<sub>2s</sub>), 3.46 (m, 2H, H<sub>4s</sub>, H<sub>5s</sub>), 3.52 (m, 1H, H<sub>3s</sub>), 3.65 (s, 2H, *CH*<sub>2</sub>NH), 3.73 (dd, *J* = 12.5, 3.4 Hz, 1H, H<sub>6s</sub>), 3.88 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H<sub>6's</sub>), 4.62 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H<sub>1s</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  (ppm) = 21.9 (CH<sub>3</sub>C), 21.9 (CH<sub>3</sub>CO), 26.4 (NHCH<sub>3</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>NH), 54.1 (CCH<sub>3</sub>), 60.7 (C<sub>6s</sub>), 69.2 (C<sub>4s</sub>), 72.2 (C<sub>2s</sub>), 77.1 (C<sub>3s</sub>), 79.7 (C<sub>5s</sub>), 83.4 (C<sub>1s</sub>), 174.4, 174.8 (CO).

# (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((4*S*,8*S*)-4,8,12,12-tetramethyl-3,7,10-trioxo-11-oxa-2,6,9-triazatridecan-4-yl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



DBU (61  $\mu$ L, 0.41 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (155 mg, 0.43 mmol) in dry CH<sub>3</sub>CN (4 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was added by cannula to a solution of sulfamidate **2** 

(141 mg, 0.39 mmol) in dry CH<sub>3</sub>CN (4 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature, after that, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with CHCl<sub>3</sub>/iPrOH (3:1) or CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated. Under these conditions only about 15% conversion of the compound of ring opening **20** was observed by <sup>1</sup>H NMR, but it could not be isolated by column chromatography.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((*tert*-butoxycarbonyl)-Lalanyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



Compound **21** was obtained as a non desired compound in the ring openning reaction described above. It was isolated after column chromatography (EtOAc/Hex, 8:2) with a 39 % of yield.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -22.2. HRMS (ESI+):

found: [M+Na]<sup>+</sup> 558.1701 calculated: C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>12</sub>SNa<sup>+</sup> 558.1621

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.44 (d, 3H, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 9H NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 3.82-3.93 (m, 1H, H<sub>5s</sub>), 4.08-4.17 (m, 2H, H<sub>6s</sub>), 4.47-4.62 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 5.06-5.20 (m, 2H, H<sub>2s</sub>, H<sub>4s</sub>), 5.32-5.49 (m, 2H, H<sub>1s</sub>, H<sub>3s</sub>), 5.31 (br s, 1H, NHBoc).

#### (2S)-3-(2-Acetamidopropanamido)-N,2-dimethyl-2-{[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]thio}propanamide



DBU (61  $\mu$ L, 0.41 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (155 mg, 0.43 mmol) in dry DMF (4 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was added by cannula to a solution of sulfamidate **2** (141 mg,

0.39 mmol) in dry DMF (4 mL). The reaction mixture was heated to 50° C and stirred for 30 min. The mixture reaction was cooled, the solvent removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with CHCl<sub>3</sub>/iPrOH (3:1) or CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated. The crude product was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) and TFA (4 mL), and the resulting mixture was stirred for 15 min at room temperature. The excess of TFA and the solvent were removed and concentrated under vacuum. The resulting oil was dissolved in pyridine (8 mL) and Ac<sub>2</sub>O (4 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum. A solution of the obtained colorless oil in MeOH (4 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was removed by filtration and the aqueous solution washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 3 mL).

evaporated to give a colorless oil, which was purified by semipreparative HPLC to give compound **22** (61 mg, 37% overall yield) as a colorless oil.

Semi-preparative HPLC gradient (t<sub>R</sub>= 22.37)

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (%)	Acetonitrile (%)
0	10	97	3
20	10	95	5
22	10	87	13
25	10	70	30
30	10	97	3

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, H<sub>2</sub>O): -16.2

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	446.1598
	calculated: C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> SNa⁺	446.1568

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 1.38 (d, 3H, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>CH), 1.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 2.05 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.77 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 3.33 ('t', 1H, J = 9.3 Hz, H<sub>2s</sub>), 3.42-3.46 (m, 2H, H<sub>4s</sub>, H<sub>5s</sub>), 3.49-3.53 (m, 1H, H<sub>3s</sub>), 3.61 (d, 1H, J = 14.2 Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.70-3.78 (m, 2H, H<sub>6s</sub>, CH<sub>2</sub>N), 3.87 (d, 1H, J = 12.4 Hz, H<sub>6's</sub>), 4.26 (q, 1H, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>CH), 4.60 (d, 1H, J = 9.9 Hz H<sub>1s</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O) amide region  $\delta$  7.96-8.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH, NHME), 8.27 (d, 1H, J = 5.8 Hz NH<sub>Ala</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 16.6 (CH<sub>3</sub>CH), 21.7 (NHCOCH<sub>3</sub>), 22.0 (CH<sub>3</sub>C), 26.5 (NHCH<sub>3</sub>), 45.4 (CH<sub>2</sub>N), 50.1 (CH<sub>3</sub>CH), 54.2 (*CCH<sub>3</sub>*), 60.8 (C<sub>6s</sub>), 69.3 (C<sub>4s</sub>), 72.3 (C<sub>2s</sub>) 77.3 (C<sub>3s</sub>), 79.8 (C<sub>5s</sub>), 83.4 (C<sub>1s</sub>), 174.1, 174.8, 175.6 (CO).

#### (2S)-3-(2-Acetamido-3-phenylpropanamido)-N,2-dimethyl-2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2Hpyran-2-yl)thio)propanamide



DBU (61  $\mu$ L, 0.41 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (102 mg, 0.28 mmol) in dry DMF (2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was added by cannula to a solution of sulfamidate **5** (98 mg, 0.22 mmol) in dry DMF (2 mL). The reaction

mixture was heated to 50° C and stirred for 30 min. The mixture reaction was cooled, the solvent removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with CHCl<sub>3</sub>/iPrOH (3:1) or CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated. The crude product was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) and TFA (4 mL), and the resulting mixture was stirred for 15 min at room temperature. The excess of TFA and the solvent were removed and concentrated under vacuum. The resulting oil was dissolved in pyridine (8 mL) and Ac<sub>2</sub>O (4 mL), and the mixture was stirred for 1 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum. A solution of the obtained colorless oil in MeOH (4 mL) was treated with a saturated solution of sodium methoxide in MeOH (4 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was removed by filtration and the aqueous solution washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 3 mL). The aqueous

phase was evaporated to give a colorless oil, which was purified by semipreparative HPLC to give compound **23** (37 mg, 34 % overall yield) as a colorless oil.

Semi-preparative HPLC gradient (t<sub>R</sub>= 25.64)

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (%)	Acetonitrile (%)
0	10	87	13
16	10	82	18
22	10	70	30
27	10	87	13

 $\left[\alpha\right]^{^{20}}{}_{^{D}}$  (c 1.00, H\_2O): -7.3

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	522.1902
	calculated: C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> SNa <sup>+</sup>	522.1886

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.94 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.71 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 2.97 (dd, 1H, *J* = 13.9, 8.4 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 3.07 (dd, 1H, *J* = 13.8, 8.4 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 3.22-3.32 (m, 1H, H<sub>2s</sub>), 3.36-3.40 (m, 2H, H<sub>4s</sub>, H<sub>5s</sub>), 3.44-48 (m, 1H, H<sub>3s</sub>), 3.49-3.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.64-3.71 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 3.81 (d, 1H, *J* = 11.8 H<sub>6s</sub>'), 4.52 (t, 1H, *J* = 3.7 Hz, COCH), 4.54 (s, 1H, H<sub>1s</sub>), 7.48-7.39 (m, 5H, arom). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O) amide region  $\delta$  7.92 ('t', 1H, *J* = 6.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 7.93-7.98 (m, 1H, NHCH<sub>3</sub>), 8.26 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz NH<sub>Phe</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 21.5 (CH<sub>3</sub>C), 21.8 (NHCOCH<sub>3</sub>), 26.4 (NHCH<sub>3</sub>), 36.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 45.4 (CH<sub>2</sub>N), 53.7 (CCH<sub>3</sub>), 55.4 (COCH), 60.6 (C<sub>6s</sub>), 69.1 (C<sub>4s</sub>), 72.2 (C<sub>2s</sub>) 77.1 C<sub>3s</sub>), 79.7 (C<sub>5s</sub>), 83.3 (C<sub>1s</sub>), 127.2, 128.8, 129.1, 136.4 (arom), 173.6, 174.0, 174.6 (CO).



DBU (46  $\mu$ L, 0.44 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (167 mg, 0.46 mmol) in dry DMF (4 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was added by cannula to a solution of sulfamidate **6** (200 mg, 0.42 mmol) in dry DMF (4 mL). The reaction mixture was heated to 50° C and stirred for 30 min. The mixture reaction was cooled, the

solvent removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with CHCl<sub>3</sub>/iPrOH (3:1) or CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated. The crude product was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) and TFA (4 mL), and the resulting mixture was stirred for 15 min at room temperature. The excess of TFA and the solvent were removed and concentrated under vacuum. The resulting oil was dissolved in pyridine (8 mL) and Ac<sub>2</sub>O (4 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum. A solution of the obtained colorless oil in MeOH (4 mL) was treated with a saturated solution of sodium methoxide in MeOH (4 mL). The resultion mixture was stirred for 1 h and neutralized with Dowex 50W-X8. The resin was removed by filtration

and the aqueous solution washed with  $CH_2Cl_2$  (2 x 3 mL). The aqueous phase was evaporated to give a colorless oil, which was purified by semipreparative HPLC to give compound **24** (67 mg, 30 % overall yield) as a colorless oil.

Semi-preparative HPLC gradient (t<sub>R</sub>= 46.88)

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (%)	Acetonitrile (%)
0	10	97	3
20	10	97	3
22	10	95	5
32	10	70	30
42	10	97	3
52	10	97	3

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, H<sub>2</sub>O): -+26.0

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	561.1990
	calculated: $C_{24}H_{34}N_4O_8SNa^+$	561.1995

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.99 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.70 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 3.17-3.29 (m, 3H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , H<sub>2s</sub>), 3.30-3.48 (m, 4H, H<sub>4s</sub>, H<sub>5s</sub>, H<sub>3s</sub>, CH<sub>2</sub>N), 3.54 (d, 1H, J= 14.2 Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.67 (dd, 1H, J= 12.4, 4.8 Hz, H<sub>6s</sub>), 3.80 (dd, 1H, J= 12.5, 1.9 Hz, H<sub>6</sub>'s), 4.44 (d, 1H, J= 9.9 Hz, H<sub>1s</sub>), 4.61 (t, 1H, J= 7.4 Hz, CH $\alpha$ ), 7.19 (t, 1H, J= 7.4 Hz, arom), 7.23-7.29 (m, 2H, NHCH<sub>indol</sub>, arom), 7.52 (d, 1H, J= 8.1, arom), 7.67 (d, 1H, J= 7.8, arom). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O) amide region  $\delta$  7.69 ('t', 1H, J = 6.1 Hz, NHCH $\alpha$ ), 7.84-7.90 (m, 1H, NHCH<sub>3</sub>), 8.18 (d, 1H, J = 6.8 Hz NHCH<sub>indol</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 21.6 (CH<sub>3</sub>C), 21.8 (NHCOCH<sub>3</sub>), 26.4 (NHCH<sub>3</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 45.2 (CH<sub>2</sub>N), 53.6 (CCH<sub>3</sub>), 55.0 (CH $\alpha$ ), 60.6 (C<sub>6s</sub>), 69.1 (C<sub>4s</sub>), 72.2 (C<sub>2s</sub>)

77.1 (C<sub>3s</sub>), 79.7 (C<sub>5s</sub>), 83.2 (C<sub>1s</sub>), 108.9, 111.9, 118.4, 119.3, 122.0, 124.4, 126.8, 136.2 (arom), 173.9, 174.0, 174.6 (CO).

#### General procedure for the synthesis of thioesters 25, 26 and 27

DBU (15  $\mu$ L, 0.10 mmol) was added to a solution of the corresponding thioglucopyranose (0.11 mmol) in dry DMF (1 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was added by cannula to a solution of sulfamidate **18** (69 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was heated to 50° C and stirred for 30 min. The mixture reaction was cooled, the solvent removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with CHCl<sub>3</sub>/iPrOH (3:1) or CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 5 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated. There were isolated after column chromatography (EtOAc/Hex, 8:2) with a 71 (**25**), 62 (**26**) and 67 (**27**) % of yield respectively. (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((*tert*-butoxycarbonyl)-Ltryptophyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



$$\label{eq:alpha} \begin{split} & \left[\alpha\right]^{20}{}_{\text{D}} \text{ (c 1.00, CHCl}_3\text{): } +1.3 \\ & \text{HRMS (ESI+):} \\ & \text{found: } [\text{M+Na}]^+ & \text{673.2160} \\ & \text{calculated: } \text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{SNa}^+ \text{673.2043} \end{split}$$

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) =

1.41 (s, 9H C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.89 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 3.16-3.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.84 (t, 1H, *J* = 10.3 Hz, H<sub>5s</sub>), 4.18-4.27 (m, 2H, H<sub>6s</sub>), 4.69-4.76 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 4.96 (d, 1H, *J* = 9.5, NHBoc), 5.09-5.17 (m, 2H, H<sub>2s</sub>, H<sub>4s</sub>), 5.20-5.29 (m, 2H, H<sub>1s</sub>, H<sub>3s</sub>), 7.03 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, NHCH<sub>indol</sub>), 7.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, arom), 7.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, arom), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, arom), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, arom), 8.24 (br s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 28.3 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 61.5 (CH $\alpha$ ), 61.7 (C<sub>6s</sub>), 68.3 (C<sub>4s</sub>), 69.2 (C<sub>2s</sub>), 74.2 (C<sub>3s</sub>), 76.5 (C<sub>5s</sub>), 80.3 (C<sub>1s</sub>), 80.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 109.3, 111.4, 118.8, 120.0, 122.5, 123.5, 127.7, 136.2 (arom), 155.2, 169.5, 169.8, 170.3, 170.8, 171.3 (CO). (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*tert*-butoxycarbonyl)-L-tryptophyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



 $\label{eq:alpha} \begin{bmatrix} \alpha \end{bmatrix}^{20}{}_{\rm D} \mbox{ (c 1.00, CHCl}_3\mbox{): } +5.5 \\ \mbox{HRMS (ESI+):} \\ \mbox{found: } [M+Na]^+ \mbox{ } 672.2278 \\ \mbox{calculated: } C_{30}H_{39}N_3O_{11}SNa^+ \mbox{ } 672.2203 \\ \mbox{} \end{array}$ 

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.10 (s, 3H, Ac), 3.30 (d, 2H, J = 5.9 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.70 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H<sub>5s</sub>), 3.99-4.06 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.21 (dd, 1H, J = 12.4, 3.8 Hz, H<sub>6s</sub>), 4.19 (d, 1H, J = 3.8 Hz, H<sub>5s</sub>), 4.44-4.53 (m, 1H, H<sub>2s</sub>), 4.64 (dt, 1H, J = 17.6, 8.9 Hz, CH $\alpha$ ), 5.04 (d, 1H, J = 6.2, NHBoc), 5.11-5.19 (m, 2H, H<sub>3s</sub>, H<sub>4s</sub>), 5.78 ( dd, 1H, J = 7.0. 5.4 Hz, NHAc), 6.08 (d, 1H, J = 4.9, H<sub>1s</sub>), 7.06 (d, 1H, J = 2.2 Hz, NHCH<sub>indol</sub>), 7.17 (t, J =7.1 Hz, 1H, arom), 7.23 (t, J =7.2 Hz, 1H, arom), 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 1H, arom), 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 1H, arom), 8.29 (br s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 20.8 (*C*H<sub>3</sub>CO), 22.8 (NHCO*C*H<sub>3</sub>), 28.2 (*C*H<sub>2</sub> $\beta$ ), 28.3 (*C*(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.7 (*C*<sub>2s</sub>), 61.5 (*C*<sub>6s</sub>), 61.9 (*C*H $\alpha$ ), 66.9 (*C*<sub>4s</sub>), 69.4 (*C*<sub>3s</sub>), 72.2 (*C*<sub>5s</sub>), 81.3 (*C*(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.1 (*C*<sub>1s</sub>), 108.8, 111.5, 118.6, 120.0, 122.5, 123.5, 127.5, 136.3 (arom), 155.6, 170.5, 170.9, 171.2, 170.7, 171.9 (CO).

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*tert*-butoxycarbonyl)-L-tryptophyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



$$\label{eq:alpha} \begin{split} & \left[\alpha\right]^{20}{}_{\text{D}} \text{ (c 1.00, CHCl}_3\text{): } +12.3 \\ & \text{HRMS (ESI+):} \\ & \text{found: } [\text{M+H}]^+ & \text{650.2285} \\ & \text{calculated: } \text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{SH}^+ \text{ 650.2384} \end{split}$$

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.42

(s, 9H C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.88 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.18 (s, 3H, Ac), 3.30 (d, 2H, J = 5.7 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.95 (t, 1H, J = 6.4 Hz, H<sub>5s</sub>), 3.99-4.07 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.14-4.20 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.61 (dt, 1H, J = 18.6, 9.3 Hz, CH $\alpha$ ), 4.85 (dd, 1H, J = 11.6, 3.0 Hz, H<sub>3s</sub>), 4.91-5.02 (m, 1H, H<sub>2s</sub>), 5.05 (d, 1H, J = 6.2, NHBoc), 5.35 (d, 1H, J = 2.6 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.60 (d, 1H, J = 9.2 Hz, NHAc), 6.13 (d, 1H, J = 4.7, arom), 7.05 (s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>), 7.17 (t, J = 7.5 Hz, 1H, arom), 7.24 (t, J = 7.7 Hz, 1H, arom), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H, arom), 7.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H, arom), 8.48 (br s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 20.8 (CH<sub>3</sub>CO, NHCOCH<sub>3</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.7 (C<sub>2s</sub>), 61.3 (C<sub>6s</sub>), 61.6 (CH $\alpha$ ), 66.8 (C<sub>4s</sub>), 69.4 (C<sub>3s</sub>), 71.4 (C<sub>5s</sub>), 81.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.0 (C<sub>1s</sub>), 108.9, 111.6, 118.6, 120.2, 122.7, 123.5, 127.6, 136.4 (arom), 155.8, 170.8, 170.9, 171.3, 170.9, 171.9 (CO).

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((*tert*butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



M.p.: 79-82° C  $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +107.6. HRMS (ESI+): found:  $[M+H]^+$  611.2312 calculated: C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>SH<sup>+</sup> 611.2275

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (s, 9H C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.93 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.17 (s, 3H, Ac), 2.98 (dd, 1H, *J* = 14.2, 8.6 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.17 (dd, 1H, *J* = 14.2, 4.9 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.97-4.18 (m, 3H, H<sub>5s</sub>, H<sub>6s</sub>, H<sub>6s</sub>'), 4.40-4.63 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 4.81-5.05 (m, 3H, H<sub>3s</sub>, H<sub>2s</sub>, NHBoc), 5.38 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.64 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NHAc), 6.14 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz, H<sub>1s</sub>), 7.19 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom), 7.28-7.38 (m, 3H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.8 (CH<sub>3</sub>CO), 23.1 (NHCOCH<sub>3</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 47.7 (C<sub>2s</sub>), 61.6 (C<sub>6s</sub>), 62.2 (C $\alpha$ ), 66.9 (C<sub>4s</sub>), 69.3 (C<sub>3s</sub>), 72.0 (C<sub>5s</sub>), 81.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.2 (C<sub>1s</sub>), 127.7, 129.1, 129.3, 135.1 (arom), 155.7, 170.4, 170.5, 170.7, 170.8, 197.7 (CO).

(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(((*S*)-3-Acetamido-1-(((*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3phenylpropan-2-yl)amino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)thio)-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



Under a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques, to a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-gluco-pyranose (24 mg, 0.06 mmol) in dry DMF (2 mL), DBU (12  $\mu$ L, 0.06 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 5 min. This mixture was

added via cannula to a solution of sulfamidate **12** (3 mg, 0.06 mmol) in dry DMF (2 mL) and the mixture was stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of aqueous 20%  $H_2SO_4/CH_2CI_2$  (1:1), which was stirred for 15 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with  $CH_2CI_2$  (2 x 20 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and purified by column chromatography (EtOAc/Hex, 95:5) to give the compound **29** (33 mg, 65 %) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +60.5



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.95 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 3.07 (dd, 1H, *J*= 13.8 Hz, *J* = 7.5 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.17 (dd, 1H, *J* = 13.8 Hz, *J* = 5.4 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.40 (dd, 1H, *J* = 13.7 Hz, *J*= 3.8 Hz, CH<sub>2</sub>NHAc), 3.48 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.3 Hz, H<sub>5s</sub>), 3.87 (dd, 1H, *J* = 13.8 Hz, *J* = 8.4 Hz, CH<sub>2</sub>NHAc), 3.93-4.06 (m, 2H, H<sub>6s</sub>, H<sub>6s</sub>'), 4.62 (dd, 1H, *J* = 12.9 Hz, *J*= 6.9 Hz, CHCH<sub>2</sub>), 4.74 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz, H<sub>1s</sub>), 4.83-4.96 (m, 2H, H<sub>2s</sub>, H<sub>4s</sub>), 5.07-5.25 (m, 3H, H<sub>3s</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 6.27 (d, 1H, *J* = 3.9, NHAc), 6.99 (d, 1H, *J* = 6.9, NHCH $\alpha$ ), 7.14 (d, 2H, *J* = 6.8, arom), 7.28.7.41 (m, 8H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.7, 20.7, 20.8, 20.8 (4 x OAc), 23.1 (*C*H<sub>3</sub>C), 23.4 (NH*Ac*), 37.2(CH<sub>2</sub>β), 45.9 (*C*H<sub>2</sub>NHAc), 52.8 (*C*CH<sub>3</sub>), 54.1 (CHα), 62.0 (C<sub>6s</sub>), 67.5 (*C*H<sub>2Bn</sub>), 68.1 (C<sub>4s</sub>), 70.4 (C<sub>2s</sub>), 73.8 (C<sub>3s</sub>), 76.0 (C<sub>5s</sub>), 80.7 (C1s), 127.7, 128.8, 128.8, 129.1, 129.5, 135.3, 135.9 (arom) 169.5, 169.5, 170.2, 170.6, 170.7, 171.0, 173.3 (CO).

# (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(((*S*)-3-Acetamido-1-(((*S*)-1-methoxy-1-oxopropan-2yl)amino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)thio)-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



Under a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques, to a solution 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyr-anose (28 mg, 0.08 mmol) in dry DMF (4 mL), DBU (13  $\mu$ L, 0.08 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 5 min. This mixture was

added via cannula to a solution of sulfamidate **13** (25 mg, 0.08 mmol) in dry DMF (4 mL) and the mixture was stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of aqueous 20%  $H_2SO_4/CH_2CI_2$  (1:1), which was stirred for 15 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with  $CH_2CI_2$  (2 x 20 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and purified by column chromatography (EtOAc/Hex, 7:3) to give the compound **30** (35 mg, 74 %) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +6.9

HRMS (ESI+): found: [M+H] <sup>+</sup>		593.1955
	calculated: $C_{24}H_{36}N_2O_{13}SH^+$	593.2016

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz, *CH*<sub>3</sub>CH $\alpha$ ), 1.52 (s, 3H, *CH*<sub>3</sub>C), 2.00, 2.01, 2.02, 2.08, 2.09 (s, 15H, OAc, NHA*c*), 3.45 (dd, 1H, *J* = 13.8 Hz, *J* = 4.1 Hz, *CH*<sub>2</sub>NHAc), 3.67 (ddd, 1H, *J* = 10.1 Hz, *J* = 5.0 Hz, *J* = 2.1 Hz, H<sub>5s</sub>), 3.76 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.93 (dd, 1H, *J* = 13.8 Hz, *J* = 8.5 Hz, *CH*<sub>2</sub>NHAc), 4.08 (dd, 1H, *J* = 12.4 Hz, *J* = 2.1 Hz, H<sub>6s</sub>), 4.18 (dd, 1H, *J* = 12.5 Hz, *J* = 5.1 Hz, H<sub>6s'</sub>), 4.38-4.50 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 4.86 (d, 1H, *J* = 10.2 Hz, H<sub>1s</sub>), 4.97 (t, 1H, *J* = 6.9, H<sub>2s</sub>), 5.05 (t, 1H, *J* = 9.8, H<sub>4s</sub>), 5.21 (t, 1H, *J* = 9.3, H<sub>3s</sub>), 6.34 (dd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 3.6 Hz, NHAc), 6.99 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, NHCH $\alpha$ ).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 17.7 (*C*H<sub>3</sub>CH), 20.7, 20.7, 20.8, 20.9 (4 x OAc), 23.3 (*C*H<sub>3</sub>C), 23.5 (NH*Ac*), 46.0 (*C*H<sub>2</sub>NHAc), 48.8 (CH $\alpha$ ), 52.7 (CO<sub>2</sub>*C*H<sub>3</sub>), 62.0 (*C*H<sub>2</sub>OAc), 68.1 (C<sub>4s</sub>), 70.3 (C<sub>2s</sub>), 73.9 (C<sub>3s</sub>), 76.2 (*C*CH<sub>3</sub>), 81.2 (C<sub>1s</sub>), 169.5, 169.5, 170.2, 170.6, 170.7, 172.9, 173.0 (CO).

# Methyl ((S)-3-acetamido-2-methyl-2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)thio)propanoyl)-Ltryptophanate



In a schlenk and under argon atmosphere, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1thio- $\beta$ -D-glucopyranose (27 mg, 0.07 mmol) was dissolved in DMF (2 mL). After solution, DBU (11  $\mu$ L, 0.07 mmol) and compound **14** (30 mg, 0.07 mmol) were added and allowed to

react for 30 min at room temperature. After concentration, the resulting crude was dissolved in a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous solution (1:1) and stirred for 30 min at room temperature. After extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and concentration of the organic phase, the crude was dissolved in methanol (2 mL) and a 0.5 M solution of sodium methoxide in methanol (1 mL) was added. After stirring for 1 h at room temperature, the sulfonic acid Dowex<sup>®</sup> resin is added. The liquid phase is filtered with methanol and concentrated. Purification by semipreparative HPLC in reversed phase afforded compound **31** (27 mg, 66%) as a viscous yellow oil.

Semi-preparative HPLC gradient (t<sub>R</sub>= 18.20)

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (%)	Acetonitrile (%)
0	10	100	0
10	10	70	30
20	10	50	50
25	10	50	50
30	10	100	0

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 1.00, H<sub>2</sub>O): -17.2

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	562.1827
	calculated: $C_{24}H_{33}N_3O_9SNa^+$	562.1830

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 1.40 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3H, Ac), 2.86-292 (m, 1H, H<sub>4s</sub>), 2.96-3.06 (m, 3H. H<sub>2s</sub>, H<sub>5s</sub>, H<sub>6s</sub>), 3.17-3.25 (m, 2H, H<sub>3s</sub>, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.34-3.50 (m, 4H, H<sub>6s</sub>, NHC*H*<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.35 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H<sub>1s</sub>), 4.49-4.57 (m, 1H, CH $\alpha$ ), 7.08-7.71 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  (ppm) = 21.7 (Ac ), 22.4 (CCH<sub>3</sub>), 25.8 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 44.6 (NCH<sub>2</sub>), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.8 (CCH<sub>3</sub>), 54.4 (CH $\alpha$ ), 61.0 (C<sub>6s</sub>), 69.3 (C<sub>4s</sub>), 72.4 (C<sub>2s</sub>), 77.0 (C<sub>3s</sub>), 79.6 (C<sub>5s</sub>), 82.3 (C<sub>1s</sub>), 109.0, 112.1, 114.7, 117.6, 118.3, 119.5, 122.1, 124.5, 126.7, 136.2 (arom), 173.9, 174.3, 175.9 (CO).

# Methyl ((S)-3-acetamido-2-methyl-2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)thio)propanoyl)-L-alanyl-Ltryptophanate



In a schlenk and under argon atmosphere, 2,3,4,6-tetra-Oacetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (27 mg, 0.07 mmol) was dissolved in DMF (2 mL). After solution, DBU (11  $\mu$ L, 0.07 mmol) and compound **16** (31 mg, 0.07 mmol) were added and

allowed to react for 30 min at room temperature. After concentration, the resulting crude was dissolved in a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous solution (1:1) and stirred for 30 min at room temperature. After extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and concentration of the organic phase, the crude was dissolved in methanol (2 mL) and a 0.5 M solution of sodium methoxide in methanol (1 mL) was added. After stirring for 1 h at room temperature, the sulfonic acid Dowex<sup>®</sup> resin is added. The liquid phase is filtered with methanol and concentrated. Purification by semipreparative HPLC in reversed phase affords compound **32** (28 mg, 66%) as a viscous yellow oil.
Semi-preparative HPLC gradient ( <b>t<sub>R</sub>= 18.22</b> )	

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (%)	Acetonitrile (%)
0	10	100	0
10	10	70	30
20	10	50	50
25	10	50	50
30	10	100	0

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 1.00, H<sub>2</sub>O): +9.4

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	633.2214
	calculated: $C_{27}H_{38}N_4O_{10}SNa^+$	633.2201

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 1.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 1.31 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.90 (s, 3H, Ac), 3.19-3.27 (m, 2H, H<sub>2s</sub>, H<sub>4s</sub>), 3.28-3.37 (m, 4H, H<sub>3s</sub>, H<sub>5s</sub>, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.47-3.52 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.61-3.67 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 3.69 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.73-3.80 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.11-4.20 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CH), 3.42 (d, 1H, J = 9.9 Hz, H<sub>1s</sub>), 4.74 (t, 1H, J = 6.6 Hz, CH $\alpha$ ), 7.06-7.66 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 16.3 (CH<sub>3</sub>CH), 21.6 (CCH<sub>3</sub>), 21.8 (Ac), 26.5 (CH<sub>2</sub>β), 45.6 (NCH<sub>2</sub>), 50.7 (CHCH<sub>3</sub>), 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.4 (CHα), 53.6 (CCH<sub>3</sub>), 60.7 (C<sub>6s</sub>), 69.1 (C<sub>5s</sub>), 72.3 (C<sub>2s</sub>), 77.2 (C<sub>3s</sub>), 79.6 (C<sub>4s</sub>), 83.3 (C<sub>1s</sub>), 108.8, 111.9, 118.3, 119.5, 122.0, 124.6, 126.9, 136.2 (arom), 173.7, 174.4, 174.9 (CO).

## (2R,3S,4R,5R,6R)-5-Acetamido-6-(((S)-3-acetamido-1-(((S)-1-methoxy-1oxopropan-2-yl)amino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)thio)-2-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



Under a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques, to a solution of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio-2-acetamido-2deoxy-α-D-glucopyranose (28 mg, 0.08 mmol) in dry DMF (4 mL), DBU (13 µL, 0.08 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 5 min. This mixture was added via cannula to a solution of sulfamidate **13** (25 mg, 0.08 mmol) in dry

DMF (4 mL) and the mixture was stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of aqueous 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), which was stirred for 15 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and purified by column chromatography (EtOAc/MeOH, 92:8) to give compound **33** (32 mg, 68 %) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +98.7

HRMS (ESI+):	found: [M+H] <sup>+</sup>	593.1955
	calculated: $C_{24}H_{36}N_2O_{13}SH^+$	593.2016

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.42 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz, *CH*<sub>3</sub>CH), 1.53 (s, 3H, *CH*<sub>3</sub>C), 1.96 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 3.38 (dd, 1H, *J* = 14.7 Hz, *J* = 3.5 Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.11-4.17 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.20-4.30 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N, H<sub>6s</sub>·), 4.33-4.44 (m, 2H, *CHC*H<sub>3</sub>, H<sub>5s</sub>), 4.52 (ddd, 1H, *J* = 11.1 Hz, *J* = 8.9 Hz, *J* = 5.3 Hz, H<sub>2s</sub>), 4.97 (t, 1H, *J* = 6.9, H<sub>3s</sub>), 5.06 (t, 1H, *J* = 9.7, H<sub>4s</sub>), 5.46 (d, 1H, *J* = 5.3, H<sub>1s</sub>), 6.03 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, NHAc), 6.89 (d, 1H, *J* = 6.4 Hz, NHACCH<sub>2</sub>), 7.64 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, NHCH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 17.3 (*C*H<sub>3</sub>CH), 20.7, 20.8, 20.8 (3 x OAc), 23.1, 23.2 (NH*Ac*), 24.0 (*C*H<sub>3</sub>C), 47.3 (*C*H<sub>2</sub>NHAc), 49.3 (*C*HCH<sub>3</sub>), 52.0 (C<sub>2s</sub>), 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.7 (*C*CH<sub>3</sub>), 62.6 (*C*H<sub>2</sub>OAc), 68.5 (C<sub>4s</sub>), 70.6 (C<sub>5s</sub>), 71.5 (C<sub>3s</sub>), 83.7 (C<sub>1s</sub>), 169.5, 170.6, 171.3, 171.8, 172.0, 173.5 (CO).

(2R,3S,4R,5R,6R)-6-(((S)-1-(((S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-3-acetamido-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)thio)-5-acetamido-2-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



Under a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques to a solution of 3,4,6-tri-*O*-acetyl-1-thio-2acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose (28 mg, 0.08 mmol) in dry DMF (4 mL), DBU (13  $\mu$ L, 0.08 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 5 min. This mixture was added via cannula to a solution of sulfamidate **14** (34 mg, 0.08 mmol) in dry DMF (4 mL) and the mixture was stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of aqueous 20%  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 15 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The desired product was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 20 mL), dried over  $Na_2SO_4$ and purified by column chromatography (EtOAc/MeOH = 95:5) to give compound **34** (34 mg, 61 %) as a colorless oil.

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -7.8

HRMS (ESI+):	found: $[M+H]^+$	707.2412
	calculated: $C_{32}H_{42}N_4O_{12}SH^+$	707.2598

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C), 1.93 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.94 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 3.24 (dd, 1H, *J* = 14.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.32-3.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , CH<sub>2</sub>NH), 3.74 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.94 (dd, 1H, *J* = 14.3 Hz, *J* = 8.5 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 4.03-4.18 (m, 2H, H<sub>6s</sub>, H<sub>6s</sub>'), 4.21-4.33 (m, 1H, H<sub>5s</sub>), 4.38-4.55 (m, 1H, H<sub>2s</sub>), 4.69 (dd, 1H, *J* = 12.6 Hz, *J* = 7.3 Hz, CH $\alpha$ ), 4.93 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz, H<sub>3s</sub>), 5.01 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.26 (d, 1H, *J* = 5.1, H<sub>1s</sub>), 5.91 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 6.66 (m, 1H, NHCOCH<sub>3</sub>), 7.10 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, NHCH<sub>indol</sub>), 7.14 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, arom), 7.20 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, arom), 7.33-7.41 (m, 2H, NHCH, arom), 7.61 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, arom), 8.36 (br s, 1H, NHCH<sub>indol</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.8, 20.8, 20.8 (3 x OAc), 23.1, 23.3 (2 x NHAc), 23.7 (*C*H<sub>3</sub>C), 27.1 (*C*H<sub>2</sub>β), 46.8 (*C*H<sub>2</sub>NH), 51.8 (*C*<sub>2s</sub>), 52.8 (*C*O<sub>2</sub>*C*H<sub>3</sub>), 54.2 (*C*H $\alpha$ ), 56.6 (*C*CH<sub>3</sub>), 62.4 (*C*H<sub>2</sub>OAc), 68.6 (*C*<sub>4s</sub>), 70.2 (*C*<sub>5s</sub>), 71.6 (*C*<sub>3s</sub>), 83.0 (*C*<sub>1s</sub>), 110.4, 111.6, 118.7, 119.9, 122.6, 123.1, 127.4, 136.5 (arom) 169.4, 170.7, 170.7, 171.4, 172.0, 172.6 (CO).

# Methyl ((2S)-3-acetamido-2-(((2R,3R,4R,6R)-3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)thio)-2-methylpropanoyl)-Lalanyl-L-tryptophanate



In a schlenk, under argon atmosphere, 3,4,6tri-*O*-acetyl-1-thio-2-acetamido-2-deoxy-α-D-glucopyranose (27 mg, 0.07 mmol) was dissolved in DMF (2 mL). DBU (11 μL, 0.07 mmol) and compound **16** (30 mg, 0.07 mmol) were added and allowed to react for 30 min at room temperature. After concentration, the resulting crude is redissolved in a 1:1 mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% and stirred for 30 min at room temperature. After extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

and concentration of the organic phase, the crude is redissolved in methanol (2 mL) and a 0.5 M solution of sodium methoxide in methanol (1 mL). The mixture was allowed to react 1 hour at room temperature and the resin of acid sulfonic Dowex <sup>®</sup> was added. The liquid phase was filtered with methanol and

concentrated. Purification by semipreparative HPLC in reversed-phase afforded compound **35** (29 mg, 67%) as a viscous yellow oil.

Semi-preparative HPLC gradient (t<sub>R</sub>= 18.27)

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA (%)	Acetonitrile (%)
0	10	100	0
10	10	70	30
20	10	50	50
25	10	50	50
30	10	100	0

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, H<sub>2</sub>O): +39.8

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	674.2466
	calculated: $C_{29}H_{41}N_5O_{10}SNa^+$	674.2466

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 1.25-1.33 (m, 6H, CH<sub>3</sub>CH, CCH<sub>3</sub>), 1.88 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 3.27-3.38 (m, 3H, H<sub>4s</sub>, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.39-3.53 (m, 2H, H<sub>3s</sub>, NHCH<sub>2</sub>), 3.58 (d, 1H, J = 14.1 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.62-3.71 (m, 4H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H<sub>6s</sub>), 3.74 (d, 1H, J = 12.2 Hz, H<sub>6s</sub>'), 3.87-3.95 (m, 1H, H<sub>5s</sub>), 3.98-4.05 (m, 1H, H<sub>2s</sub>), 4.18 (dd, 1H, J = 14.0, 6.8 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 4.73 (t, 1H, J = 6.5 Hz, CH $\alpha$ ), 5.26 (d, 1H, J = 5.5 Hz, H<sub>1s</sub>), 7.07-7.65 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) = 16.4 (CH<sub>3</sub>CH), 21.1 (CH<sub>3</sub>C),21.8 (Ac), 21.9 (Ac), 26.5 (CH<sub>2</sub>β), 45.9 (NCH<sub>2</sub>), 50.5 (CHCH<sub>3</sub>), 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.4 (CHα), 53.5 (NCH<sub>2</sub>), 53.8 (*C*<sub>2s</sub>), 60.4 (*C*<sub>6s</sub>), 70.1 (*C*<sub>4s</sub>), 71.0 (*C*<sub>3s</sub>), 73.7 (*C*<sub>5s</sub>), 82.6 (*C*<sub>1s</sub>), 108.8, 112.0, 114.8, 117.7, 118.3, 119.4, 122.0, 124.4, 126.9, 136.2 (arom), 173.6, 173.7, 174.1, 174.4, 174.6 (CO).



Análisis conformacional de los  $\alpha/\beta$ -dipéptidos híbridos que incorporan *S*-glicosil- $\beta^{2.2}$ -aminoácidos

- 5.1 Introducción
- 5.2 Estudios conformacionales

### 5.1 - Introducción

En disolución la mayoría de los péptidos adoptan múltiples conformaciones con alto grado de flexibilidad. La determinación de los confórmeros y evaluación de sus poblaciones dominantes es el objetivo de los estudios conformacionales de péptidos y glicopéptidos, en los que los métodos teóricos y experimentales juegan papeles complementarios.

Un protocolo actual en el análisis conformacional de glicopéptidos en disolución acuosa combina experimentos de espectroscopia de RMN y simulaciones de dinámica molecular (MD) en agua explícita (Anexo I).

Para obtener una distribución de confórmeros capaz de reproducir cuantitativamente los datos espectroscópicos de RMN se emplearon las distancias protón-protón obtenidas de experimentos NOESY 2D promediadas en el tiempo como restricciones en simulaciones de dinámica molecular (MD-tar) (Figura 5.1).



Figura 5.1 Pasos a seguir para el estudio conformacional de compuestos

Los estudios conformacionales en glicopéptidos están dirigidos a analizar y estudiar la disposición espacial de las cadenas de polipéptidos y determinar los factores que rigen el proceso de plegamiento que estabilizan la estructura nativa de una glicoproteína.

Además, este tipo de estudio está orientado a la determinación de la relación existente entre conformación y actividad de péptidos biológicamente importantes.

Los β-aminoácidos geminalmente disustituidos fueron introducidos por vez primera en péptidos sintéticos por el grupo de Seebach,<sup>1</sup> demostrando que, en contraste con los  $\alpha$ -análogos, los  $\beta$ -aminoácidos 2,2-disustituidos podían acoplarse para dar los correspondientes β-hexa-, β-nona- y β-dodecapéptidos con altos rendimientos por procedimientos estándar de acoplamiento tanto en disolución como en fase sólida. Las estructuras cristalinas del derivado del ácido 1-(aminometil)ciclohexanocarboxílico (Boc- $\beta^{2,2}$ Ac6c-OH) y del  $\beta^{2,2}$ -tripéptido,  $Boc-\beta^{2,2}Ac6c-\beta^{2,2}Ac6c-\beta^{2,2}Ac6c-OMe$ protegido, ponen de completamente manifiesto la tendencia a cristalizar de estos derivados. El  $\beta^{2,2}$ -tripéptido adopta un inusual giro constituido por 10-átomos (C10), a través de un enlace de hidrógeno intramolecular, con polaridad invertida del tipo  $N-H_i^{--}O=C_{i+1}$  (1 $\rightarrow$ 2) y de direccionalidad opuesta a la normalmente observada en  $\alpha$ -péptidos, comparable

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> a) Seebach, D., Abele, S., Sifferlen, T., Hänggi, M., Gruner, S., Seiler, P. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2218-2243; b) Abele, S., Seiler, P., Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 1559-1571.





**Figura 5.2** Estructura de Rayos X del tripéptido Boc- $\beta^{2,2}$ Ac6c- $\beta^{2,2}$ Ac6c- $\beta^{2,2}$ Ac6c-OMe. a) Estructura de la unidad de repetición; b) Giro central descrito en la hélice 12/10/12 de un  $\beta^2/\beta^3$ -hexapéptido; c) Empaquetamiento de la estructura cristalina del  $\beta^{2,2}$ -tripéptido, mostrando los enlaces de hidrógeno intramoleculares (2,1 Å) e intermoleculares (2,0 Å)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Seebach, D., Abele, S., Gademann, K., Guichard, G., Hintermann, T., Jaun, B., Matthews, J.

L., Schreiber, J. V., Oberer, L., Hommel, U., Widmer, H. Helv. Chim. Acta 1998, 81, 932-982.

Mientras los derivados de ciclohexano presentan esta disposición C<sub>10</sub>, la disposición estructural secundaria característica hallada en los derivados de ciclopropano (Boc- $\beta^{2,2}$ Ac3c- $\beta^{2,2}$ Ac3c- $\Omega^{2,2}$ Ac3c- $\beta^{2,2}$ Ac3



**Figura 5.3** Estructura secundaria C<sub>8</sub> "ribbon-type" observada en la estructura cristalina del tripéptido Boc- $\beta^{2,2}$ Ac3c- $\beta^{2,2}$ Ac3c- $\beta^{2,2}$ Ac3c-OH

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Appella, D. H., Christianson, L. A., Klein, D. A., Powell, D. R., Huang, S., Barchi Jr., J. J., Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381-384.

El grupo de P. Balaram describió en 2012<sup>4</sup> los primeros estudios conformacionales de  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos modelo donde el  $\beta$ -péptido era el residuo  $\beta^{2,2}$ Ac6c-NHMe. Así, llevó a cabo la síntesis de los dipéptidos híbridos Boc-Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c-NHMe y Boc-Phe- $\beta^{2,2}$ Ac6c-NHMe, obteniendo estructura cristalina sólo para el primero de ellos. La figura 5.4 muestra una vista, con la misma orientación, de las conformaciones observadas en las dos moléculas independientes que fueron halladas en la unidad cristalográfica. En ambos casos, un enlace de hidrógeno intramolecular que involucra a 11 átomos (C<sub>11</sub>) es el rasgo conformacional más destacado.



**Figura 5.4** Vista de dos moléculas independientes (A) y (B) halladas en la unidad cristalográfica del péptido Boc-Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c-NHMe y detalle del enlace de hidrógeno intramolecular C<sub>11</sub> entre Boc-C=O<sup>...</sup>HNMe (en color azul). Ángulos de torsión del esqueleto peptídico  $\phi$ ,  $\theta$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  (en color marrón)

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Basuroy, K., Rajagopal, A., Raghothama, S., Shamala, N., Balaram P. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1671-1678.

De los datos extraídos de la figura 5.4 (estructuras en color azul) se deduce que el  $\alpha$ -aminoácido Leu adopta valores de  $\phi \ y \ \psi$  propios de la región helicoidal del espacio conformacional mientras que el residuo  $\beta^{2,2}$ Ac6c adopta conformaciones *gauche* sobre el enlace C $\alpha$ -C $\beta$  ( $\theta \approx 60^{\circ}$ ). Los valores de los ángulos de torsión se corresponden estrechamente con los previamente caracterizados para giros helicoidales C<sub>11</sub> en secuencias  $\alpha/\beta$  híbridas.<sup>5</sup> Los estudios conformacionales realizados en disolución en CDCl<sub>3</sub> vienen a ratificar lo observado en el estado sólido, sugiriendo que el residuo  $\beta^{2,2}$ Ac6c pueda ser válido para el diseño de plegamientos helicoidales que incorporen residuos  $\beta$  sustituidos.

La figura 5.5 muestra las estructuras de Ac- $\beta^{2,2}$ Ac6c-NHMe (I) y otros cuatro  $\alpha/\beta$ péptidos híbridos constituidos por  $\beta^{2,2}$ Ac6c y Aib como residuos  $\beta$ - y  $\alpha$ aminoácidos, respectivamente.



**Figura 5.5** Estructuras de  $\alpha$ , $\beta$ -péptidos híbridos constituidos por  $\beta^{2,2}$ Ac6c y Aib

<sup>5</sup> Valores de ángulos de torsion sugeridos para una hélice  $\alpha,\beta$  C<sub>11</sub> ideal  $\alpha$  ( $\phi = -62^{\circ}, \psi = -44^{\circ}$ ),  $\beta$  ( $\phi = -105^{\circ}, \theta = 80^{\circ}, \psi = -73^{\circ}$ ). Vasudev, P. G., Chatterjee, S., Shamala, N., Balaram, P. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657–687.

El estudio por difracción de Rayos X del tripéptido Boc-Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c-Aib-OMe (**II**) reveló la aparición de un nuevo plegamiento estabilizado por dos enlaces de hidrógeno intramoleculares, C<sub>11</sub> y C<sub>9</sub>, de direccionalidad opuesta [un enlace de hidrógeno intramolecular que involucra a 11 átomos entre el C=O del  $\beta$ -residuo i y el H-N de un  $\alpha$ -residuo (i+3) y un enlace de hidrógeno intramolecular de 9 átomos entre el C=O del  $\alpha$ -residuo i y el H-N del  $\beta$ -residuo (i+1)]. Una importante característica estructural hallada en este péptido afecta a ambos residuos Aib, al adoptar conformaciones de poliprolina (PII) ( $\phi \approx -60^\circ$ ,  $\psi \approx 120^\circ$ ) extremadamente raras en oligopéptidos plegados donde las conformaciones helicoidales ( $\alpha$ L/ $\alpha$ R) ( $\phi \approx \pm 60^\circ$ ,  $\psi \approx \pm 30^\circ$ ) son invariablemente observadas. Por su parte, el tetrapéptido Boc-[Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-OMe (**III**), y el pentapéptido Boc-[Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-Aib-OMe (**IV**) formaron segmentos cortos de una hélice  $\alpha/\beta$ -híbrida C<sub>11</sub> estabilizada por dos y tres enlaces de hidrógeno intramoleculares, respectivamente (Figura 5.6). Finalmente, la estructura del dipéptido Boc-Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c-OMe (**V**) no presentó ningún enlace de hidrógeno intramolecular.<sup>6</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Basuroya, K., Karuppiah, V., Shamala, N., Balaram, P. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 2589-2603.



**Figura 5.6** Conformaciones moleculares en cristales: a) Boc-Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c-Aib-OMe (II), b) Boc-[Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-OMe (III), c) Boc-[Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-Aib-OMe (IV) cristalizada con una molécula de cloroformo

Posteriormente, cuatro nuevos  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos fueron añadidos a la lista de la caracterización cristalográfica de esta familia.<sup>7</sup> Los tripéptidos Boc-Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c-Aib-OMe (VI) y Boc-Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c-Leu-OMe (VII) presentaron conformaciones mezcla de C<sub>11</sub> y C<sub>9</sub>. La extensión de la cadena al tetrapéptido Boc-[Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-OMe (VIII) reveló la persistencia de la misma disposición espacial (C<sub>11</sub> y C<sub>9</sub>) (Figura 5.7). Esta última circunstancia refleja un marcado contraste con el tetrapéptido Boc-[Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-OMe (III), en el que las Leu 1 y Leu 3 son reemplazadas por residuos de Aib y donde sólo se observaron dos enlaces de hidrógeno consecutivos (C<sub>11</sub>) (Figuras 5.7 y 5.6b).

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Basuroy, K., Karuppiah, V., Balaram, P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4614–4617.



**Figura 5.7** Conformaciones moleculares en la estructura cristalina de los péptidos (a) Boc-Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c-Aib-OMe (**VI**), (b) Boc-Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c-Leu-OMe (**VII**), (c) Boc-[Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-OMe (**VIII**)

La difracción de rayos X del hexapéptido Boc-[Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>3</sub>-OMe (**IX**) demostró la existencia de dos moléculas en la unidad cristalográfica conjuntamente con una molécula de agua. Ambas moléculas mostraron plegamientos de hélices dextrógiras mezcla de (C<sub>11</sub>y C<sub>9</sub>), conteniendo cuatro enlaces de hidrógeno intramoleculares, C<sub>11</sub>/ C<sub>9</sub> / C<sub>11</sub>/ C<sub>9</sub>. Los ángulos de torsión revelaron que las seis Leu de las dos moléculas independientes adoptan conformaciones semiextendidas tipo poliprolina, recordando la estructura de este hexapéptido a la obtenida para el pentapéptido Boc-[Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>2</sub>-Aib-OMe (**IV**) que formaba una estructura helicoidal basada en tres sucesivos enlaces de hidrógeno C<sub>11</sub> (Figuras 5.8 y 5.6c).



**Figura 5.8** Conformación molecular de Boc-[Leu- $\beta^{2,2}$ Ac6c]<sub>3</sub>-OMe (**IX**) y vista de las conformaciones del esqueleto de las dos moléculas de simetría independientes halladas en la unidad cristalográfica de dicho hexapéptido.

Algunas características generales de importancia en el diseño específico de tipos de hélices en  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos emergen de estos resultados estructurales. En secuencias aquirales  $(\alpha\beta)_n$ , como por ejemplo los péptidos (Aib- $\beta^{2,2}$ Ac6c)<sub>n</sub>, ambas estructuras, la hélice continua C<sub>11</sub> y la mezcla C<sub>11</sub>/C<sub>9</sub> son estereoquímicamente factibles. El intercambio observado entre ambas estructuras helicoidales al pasar de los tripéptidos a los tetrapéptidos debe atribuirse a la penalización de energía que necesita pagarse por el hecho de que los residuos Aib adopten la conformación poliprolina (PII), que es un requerimiento de la formación de la hélice C<sub>11</sub>/C<sub>9</sub>. Las secuencias híbridas ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub> que contienen  $\alpha$ -residuos quirales y  $\beta$ -residuos aquirales pueden proporcionar sistemas modelo atractivos para estudiar

transiciones en hélices de péptidos entre estructuras con enlaces de hidrógeno unidireccionales y hélices mezcladas.

Estos no son los únicos estudios estructurales que confirman la preponderancia de conformaciones mezcla de C<sub>11</sub> y C<sub>9</sub> ya que, recientemente, el grupo de Choi<sup>8</sup> ha sintetizado diferentes  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos basados en el empleo del ácido *cis*-2-aminociclohexanocarboxílico (*cis*-ACHC) como  $\beta$ -aminoácido.

El mismo grupo de investigación<sup>9</sup> ha desarrollado un nuevo análogo del *cis*-ACHC que incrementa dicha preponderancia,  $C_{11}/C_9$ , en  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos en disolución. Una forma ópticamente activa de *cis,cis*-mACHC, donde el metilo tiene como misión rigidificar el ciclohexano, evitando conformaciones locales no deseadas, fue eficientemente sintetizada a partir de material racémico (Figura 5.9).

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup>Lee, M., Shim, J., Kang, P., Guzei, I. A., Choi, S. H. Angew. Chem. Int. Ed.**2013**, 52, 12564-12567.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>Lee, M., Shim, J., Kang, P., Choi, M.-G., Choi, S. H. *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 5950-5952.



**Figura 5.9** a) Diseño de un nuevo análogo de cis-ACHC con un grupo metilo en posición 4 (*cis,cis*-mACHC), b) Estructura cristalina del  $\alpha/\beta$ -péptido híbrido Boc-Ala-cis-ACHC-Ala-cis,cis-mACHC-Ala-OMe

Como se puede desprender de lo descrito hasta el momento, la mayor parte de los homo- $\beta$ -péptidos y  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos fueron sintetizados empleando  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos aquirales lo que, obviamente, limita el control del espacio conformacional de los péptidos resultantes. Es paradójico que, a pesar del creciente interés que despiertan estos estudios conformacionales, uno tan sólo de estos estudios se base en la síntesis de  $\beta$ -péptidos derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos quirales y acíclicos. Así, el grupo de Abell<sup>10</sup> sintetizó una serie de  $\beta$ -dipéptidos

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Peddie, V., Butcher, R. J., Robinson, W. T., Wilce, , Traore, D. A. K., Abell, A. D. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 6655-6662.

fluorados formados a partir de unidades de  $\alpha$ -fluoro- $\beta^2$ -homofenilananina y observaron, en el estado sólido, que la incorporación del flúor en la posición alfa de un  $\beta$ -aminoácido puede controlar la conformación del enlace peptídico con la posibilidad de gobernar las estructuras secundarias de  $\beta$ -péptidos.

M. Orena y colaboradores<sup>11</sup> han investigado el uso de centros cuaternarios como clave para modular la conformación en  $\beta$ -péptidos al introducir un grupo metilo adicional en la estructura del ácido (3*R*,4*S*,1'*S*)-4-amino-1-(1'-(4-metoxifenil)etil)-5-oxopirrolidina-3-carboxílico y realizar el análisis conformacional de un hexámero del homo- $\beta$ -péptido (Figura 5.10a).



Figura 5.10 a) β-hexapéptido derivado del ácido (3*R*,4*S*,1'*S*)-4-amino-1-(1'-(4metoxifenil)etil)-3-metil-5-oxopirrolidina-3-carboxílico y estructura de mínima energía, b) β-hexapéptido derivado de residuos del ácido (2*R*,3*S*)-3-alquil-3-amino-2hidroxicarboxílico y su estructura secundaria derivada de datos de RMN

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Galeazzi, R., Martelli, G., Mazzanti, A., Orena, M., Rinaldi, S. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12564-12568.

El uso de  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos acíclicos con dos sustituyentes en C $\alpha$ , siendo uno de ellos un heteroátomo, parece ser una herramienta válida para el diseño de nuevos  $\beta$ -péptidos con conformaciones plegadas definidas. Sin embargo, hasta el momento, el efecto que el grupo polar en posición C $\alpha$  pueda derivar sobre la estabilidad de estructuras secundarias de  $\beta$ -péptidos ha sido escasamente investigado (Figura 5.10b).<sup>12</sup> Curiosamente en ambos casos se observa una estructura secundaria fundamentada en la presencia de giros C<sub>8</sub> basados en enlaces de hidrógeno intramolecular similares a los observados para los  $\beta$ péptidos derivados de  $\beta^{2,2}$ Ac3c (Figuras 5.10 y 5.3).

Más en concreto, sólo existen dos ejemplos previos en los que el  $\beta^{2,2}$ -aminoácido  $\alpha$ -metilisoserina es incluido en forma quiral en la síntesis de péptidos,<sup>13</sup> pero en ninguno de los casos se realiza el estudio conformacional ni en estado sólido ni en disolución (Figura 5.11).

 <sup>&</sup>lt;sup>12</sup> a) Gessier, F., Noti, C., Rueping, M., Seebach, D. *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 1862; b)
 Gademann, K., Häne, A., Rueping, M., Jaun, B., Seebach, D. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1534-1537.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup>a) Pires, R., Burger, K. Synthesis 1996, 1277–1279; b) Oaksmith, J. M., Peters, U., Ganem,
B. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 13606–13607.



**Figura 5.11** Péptidos con α-metilisoserina: a) Fmoc-L-Phe-(S)-α-MeIsoSer-L-Ala-Ot-Bu, b)  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos derivados de α-metilisoserina

En este contexto, nuestro grupo de investigación es el único que ha sintetizado y realizado el estudio conformacional de homo- $\beta$ -péptidos derivados de  $\alpha$ metilisoserina demostrando la presencia de conformaciones plegadas en disolución acuosa.<sup>14</sup> En la figura 5.12a se representa las conformaciones mayoritarias obtenidas a partir de estudios de simulación de dinámica molecular en DMSO (48%) y agua (36%) del homo- $\beta$ -dipéptido modelo Ac- $\alpha$ -Melsoser- $\alpha$ Melsoser-NHMe. Ambos confórmeros presentan sendos giros C<sub>10</sub> estabilizados por un enlace de hidrógeno intramolecular entre el C=O del  $\beta$ -residuo (i+2) y el H-N del  $\beta$ -residuo (i+1), similares al formado por el tripéptido Boc- $\beta^{2,2}$ Ac<sub>6</sub>c- $\beta^{2,2}$ Ac<sub>6</sub>c- $\beta^{2,2}$ Ac<sub>6</sub>c-OMe (Figura 5.2a). Esta conformación observada en ambos disolventes recuerda la estructura típica helicoidal de un  $\alpha$ -péptido y puede definirse como un

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Rodríguez, F. Corzana, F., Busto, Avenoza, A., Peregrina, J. M., Zurbano, M. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 1225-1234.

mimético del giro tipo beta l'.<sup>15</sup> Para ilustrar esta cuestión, un giro beta l' ideal ha sido superpuesto a las conformaciones mayoritarias en DMSO y agua de este  $\beta$ -péptido (Figura 5.12b). Sin embargo, es importante señalar que estos giros, aunque han sido observados anteriormente, sólo han demostrado su existencia en disoluciones orgánicas o en el estado sólido. Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que dichos giros han sido detectados en disolución acuosa.



**Figura 5.12** a) Conformaciones mayoritarias para el homo- $\beta$ -dipéptido modelo de la  $\alpha$ metilisoserina en DMSO y agua. Ángulos de torsión ( $\phi$ ,  $\theta$  y  $\psi$ ) en grados, b) Superposición de un giro beta l' ideal con las conformaciones mayoritarias del  $\beta$ -dipéptido en DMSO y agua

Demostrada la interesante y variada disposición conformacional que pueden presentar los diferentes  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos referidos anteriormente y los efectos que sobre su actividad biológica dichas estructuras tridimensionales les

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> a) Seebach, D., Beck, A. K., Capone, S., Deniau, G., Grošelj, U., Zass, E. *Synthesis* 2009, 1-32; b) Tyndall, J. D., Pfeiffer, B., Abbenante, G., Fairlie, D. P. *Chem. Rev.*, 2005, 105, 793-826.

pueda ocasionar; en este capítulo, se pretende realizar un pormenorizado estudio conformacional, en medio acuoso, de algunos de los *S*-glico- $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos sintetizados en esta tesis doctoral.

## 5.2 - Estudios conformacionales

En este sentido, se eligieron los derivados **19**, **22**, **23** y **24** sintetizados a partir de la apertura nucleófila con tioglucopiranosa de los sulfamidatos elongados por la sulfonamida (Figura 5.13).



Figura 5.13 Derivados péptidicos sobre los que se realizaron estudios conformacionales

El estudio que se realizó sobre estos sustratos se dividió en varios subapartados dependiendo de la parte de la molécula estudiada. De este modo, se diferenció entre: a) el grupo hidroximetilo, b) el enlace tioglicosídico y c) el esqueleto peptídico.

#### 5.2.1 - Estudio conformacional del grupo hidroximetilo

El análisis conformacional del grupo hidroximetilo en el resto  $\beta$ -D-glucopiranosa de todos los tioglicopéptidos estudiados se describe como un equilibrio entre tres rotámeros, siendo posibles ángulos de torsión  $\omega$  (O5-C5-C6-O6) cercanos a +60° (*gauche-trans, gt*), 180° (*trans-gauche, tg*) y -60° (*gauche-gauche, gg*). En los cuatro casos estudiados, las conformaciones mayoritarias observadas en los carbohidratos tras las simulaciones de dinámica molecular son la *gt* y la *gg* como ocurre habitualmente en otros glicoconjugados, <sup>16</sup> ya que la *tg* se da con menos frecuencia (Figura 5.14).



Figura 5.14 Conformaciones observadas para los grupos hidroximetilo del carbohidrato en los compuestos 19, 22, 23 y 24

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Kirschner, K. N., Woods, R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 10541-10545.

Estas dos conformaciones mayoritarias para el grupo hidroximetilo de la  $\beta$ -Dtioglucopiranosa evitan que se den interacciones entre el átomo de oxigeno seis y los sustituyentes presentes en el carbono cuatro al estar más alejados espacialmente.

#### 5.2.2 - Estudio conformacional del enlace tioglicosídico

Este apartado se iniciará con el estudio conformacional del enlace tioglicosídico del sustrato **19**, el estructuralmente más sencillo. En la figura 5.15 se representa el diagrama de Ramachandran correspondiente a los ángulos torsionales  $\phi$  (O5-C1-S-C $\alpha$ ) y  $\psi$  (C1-S-C $\alpha$ -C $\beta$ ) del enlace tioglicosídico. La figura muestra una agrupación homogénea de valores en torno a -120° para el ángulo torsional  $\phi$  y cercano a -60° para el ángulo torsional  $\psi$ , lo que determina que el carbohidrato se encuentre bastante rígido (Figura 5.15).



Figura 5.15 Ángulos  $\phi$  y  $\psi$  que presenta el enlace tioglicosídico del sustrato 19

Una vez realizado el estudio de  $\beta$ -tioglicopéptido **19** más sencillo, se prosiguió con el estudio conformacional de los tioglico- $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos **22, 23** y **24**.

Los enlaces tioglicosídicos de **22** y **23** (que contienen alanina y fenilalanina como  $\alpha$ -aminoácidos respectivamente) presentan de forma mayoritaria una conformación con un ángulo torsional  $\phi$  (O5-C1-S-C $\alpha$ ) alrededor de -60° y un ángulo torsional  $\psi$  (C1-S-C $\alpha$ -C $\beta$ ) cercano a -60°.

Esta geometría es bastante similar a la que se puede encontrar en anteriores estudios de  $\beta$ -S-glicosil derivados, llevados a cabo en nuestro grupo de investigación<sup>17</sup>. Curiosamente, el compuesto **24** (que contiene triptófano como  $\alpha$ -aminoácido) presenta una mayor flexibilidad, observándose dos conformaciones mayoritarias:  $\phi/\psi$  (-60°, -30°) y (-90°, 180°) con unas poblaciones relativas del 61% y del 39% respectivamente (Figura 5.16).

 <sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Aydillo, C., Compañón, I., Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Peregrina, J. M., Zurbano,
 M. M. *J. Am.Chem. Soc.* **2014**, *136*, 789-800.



Figura 5.16 Ángulos  $\phi$  y  $\psi$  que presenta el enlace tioglicosídico de los sustratos 22, 23 y 24

### 5.2.3 - Estudio conformacional del esqueleto peptídico

En trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación se observó que los  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos que incorporan heterociclos nitrogenados aromáticos <sup>18</sup> muestran una disposición antiperiplanar ( $\theta$  = 180°) del ángulo diedro N-C<sub> $\beta$ </sub>-C<sub> $\alpha$ </sub>-CO (Figura 5.17).

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Mata, L., Avenoza, A., Busto, J. H., Corzana, F., Peregrina, J. M. *Chem-Eur. J.* **2012**, *18*, 15822-15830.



Figura 5.17 Características estructurales del  $\beta^{2,2}$ -aminoácido estudiado previamente en nuestro grupo de investigación

Similar disposición espacial ha podido deducirse del estudio conformacional efectuado sobre el tioglicopéptido **19**. Esta disposición antiperiplanar del ángulo  $\theta$  (N-C $\beta$ -C $\alpha$ -CO) podría ser la responsable de la rigidez conformacional del esqueleto peptídico que se ve reflejada en los ángulos torsionales  $\phi$  y  $\psi$  de alrededor de 180° y 120° respectivamente (Figura 5.18).



Figura 5.18 Angulos  $\phi$ ,  $\theta$  y  $\psi$  que presenta el esqueleto peptídico del sustrato 19

Como conclusión al estudio del compuesto **19** quisiera hacer notar que tanto la conformación del grupo hidroximetilo, como la del enlace tioglicosídico y la de los ángulos torsionales  $\phi$ ,  $\theta$  y  $\psi$  del enlace peptídico vienen a definir una molécula que, a pesar de los múltiples grados de libertad que presenta, parece bastante rígida.

En el caso de los sustratos **22**, **23** y **24**, inicialmente, se llevó a cabo el estudio conformacional del fragmento  $\beta$ -aminoácido y, al igual que lo observado en el compuesto **19**, los datos extraídos de los ángulos torsionales indican una más que notable rigidez, mostrando una conformación muy mayoritaria en disolución. Cabe destacar que la conformación que adquieren es distinta en cada uno de los  $\alpha/\beta$ -tioglicopéptidos estudiados, observándose una distribución de valores de  $\phi$ ,  $\theta$  y  $\psi$  dispar en cada caso (Figura 5.19).



Figura 5.19 Ángulos φ, θ y ψ que presenta el esqueleto peptídico de los sustratos 22, 23 y 24 en la zona β-aminoacídica

Para el compuesto **22**, los valores de  $\phi$ ,  $\theta$ , y  $\psi$  correspondientes al  $\beta$ -aminoácido rondan todos ellos 180°. Este valor en el caso de  $\theta$  favorece la conformación *gauche* entre el átomo de azufre del carbohidrato y el grupo NH del  $\beta$ -aminoácido, mostrando una disposición espacial similar a la del compuesto **19** (Figura 5.20).



Figura 5.20 Conformación *gauche* entre la parte S-glicosil y el grupo NHCOR del enlace  $\theta$  observada en los compuestos 19 y 22

Con respecto a la conformación que presenta el esqueleto peptídico en el fragmento  $\alpha$ -aminoácido, los compuestos **22** y **24** presenta un cierto grado de flexibilidad, con dos o tres confórmeros significativamente poblados. Sin embargo el *S*-tioglicopéptido **23**, presenta una única y rígida conformación extendida con valores de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de -150° y 150° respectivamente (Figura 5.21).



**Figura 5.21** Ángulos  $\phi$  y  $\psi$  que presenta el esqueleto peptídico de los sustratos **22**, **23** y **24** en la zona  $\alpha$ -aminoacídica

Con los datos observados de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  en el  $\alpha$ -aminoácido alanina del compuesto **22**, se pudo determinar que ese residuo exhibía mayoritariamente una conformación tipo  $\gamma$ -turn, con un bajo porcentaje de disposición extendida del esqueleto peptídico.

También se pudo saber con los estudios de dinámica molecular que existía una interacción de hidrógeno estabilizante entre el carbohidrato y la cadena peptídica,



que tenía lugar durante un 40 % del tiempo calculado e implica al grupo hidroximetilo del carbohidrato y al carbonilo del  $\beta$ -aminoácido (Figura 5.22).

Figura 5.22 Enlace de hidrógeno estabilizante entre el carbohidrato y la cadena peptídica observada en el compuesto 22

Curiosamente, y en contraste con los compuestos **19** y **22** ( $\theta$  cerca de 180°), la presencia de  $\alpha$ -aminoácidos aromáticos obliga al resto  $\beta$ -aminoacídico a adquirir una conformación plegada en los derivados **23** y **24**, con valores de  $\theta$  cercanos a 60° (Figura 5.19).

En el caso del compuesto **23**, esta geometría se encuentra estabilizada por la existencia de interacciones  $CH-\pi$  que se dan entre el anillo aromático de la

fenilalanina<sup>19</sup>, el grupo metilo del centro cuaternario ( $\alpha$ -Me) y el metilo del NHMe correspondiente a la metilamida. Por esta razón, la fenilalanina adquiere una conformación extendida que realza esta interacción hidrofóbica (Figura 5.23a).

En el caso del compuesto **24**, el esqueleto peptídico se adapta para maximizar esta interacción CH- $\pi$  entre el grupo metilo del centro cuaternario ( $\alpha$ -Me) y el anillo indólico.

Como consecuencia de esta adaptación estructural, el residuo de triptófano está forzado a adquirir una configuración más plegada (Figura 5.23b).



<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Wagner, J. P., Schreiner, P. R. Angew. Chem. Int. Edit. **2015**, 54, 12274-12296.




La viabilidad y la base teórica de estas interacciones CH- $\pi$  fueron confirmadas por medio de cálculos DFT (Figura 5.24) y soportadas experimentalmente por <sup>1</sup>H RMN, ya que se mostraba una migración hacia campos más altos de los desplazamientos químicos de los grupos metilo correspondientes al centro cuaternario en **23** y **24**, debido al desapantallamiento provocado por los anillos aromáticos (Figura 5.25).



**Figura 5.24** Estructuras de los intermedios de reacción de los sustratos **23** y **24** determinadas mediante cálculos DFT. Las energías de interacción (E<sub>int</sub>) estan dadas en kcal.mol<sup>-1</sup> y las distancias en Å

Las señales de este metilo aparecían a  $\delta$ = 1.59 y  $\delta$ = 1.56 ppm en los compuestos **19** y **22** respectivamente, mientras que en los compuestos **23** y **24** aparecían a  $\delta$ = 1.36 y  $\delta$ = 1.24 ppm, respectivamente (Figura 5.25a).

Además, la presencia de picos de cruce NOE entre el grupo metilo cuaternario y el anillo aromático indólico en el compuesto **24** apoyó más si cabe la existencia de estas interacciones CH- $\pi$  en disolución (Figura 5.25b).



Figura 5.25 Desplazamientos químicos observados en el  $\alpha$ -Me de los compuestos estudiados, así como el 2D NOESY del compuesto 24

Por lo tanto, se puede decir que se ha comprobado mediante estudios conformacionales que la presencia o ausencia de un residuo aromático, en el

esqueleto peptídico de este tipo de derivados, controla la disposición espacial de dicho esqueleto, observándose una disposición *gauche* entre el tiocarbohidrato y el  $\alpha$ -aminoácido en los derivados **19** y **22**, y una disposición *antiperiplanar* en los derivados **23** y **24** que presentan  $\alpha$ -aminoácidos con residuos aromáticos (Figura 5.26).



Figura 5.26 Disposición gauche o antiperiplanar modulada por la presencia de residuos

aromáticos en estos derivados



### 6.1 Introducción

- 6.2 Síntesis de sulfamidatos cíclicos derivados de la (S)-isoserina
- 6.3 Reacción de apertura nucleófila con el anión azida sobre los sulfamidatos derivados de isoserina y  $\alpha$ -metilisoserina
- 6.4 Estudio de la reacción de apertura nucleófila sobre los sulfamidatos derivados de (S)-isoserina
- 6. Parte experimental

#### 6.1 - Introducción

Teniendo en cuenta el efecto fundamental que el grupo metilo ejerce sobre la modulación de las conformaciones del esqueleto peptídico, como acabamos de demostrar en el capítulo anterior; en este capítulo, abordaremos la síntesis de sulfamidatos cíclicos derivados de isoserina. De esta forma, se podrá acceder a electrófilos cuya apertura nucleófila con carbohidratos deberá permitir la síntesis de  $\alpha/\beta^2$ -péptidos híbridos glicosilados.

Los productos naturales aislados de microorganismos, plantas o animales, son compuestos muy atractivos desde hace unos años debido a la susceptibilidad de los mismos para ser empleados como sustrato de partida a la hora de sintetizar interesantes compuestos a nivel biomédico. Un ejemplo representativo de esto lo constituyen los  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminoácidos, que son sustratos muy interesantes para la síntesis de una amplia variedad de peptidomiméticos y también pueden presentarse como componentes de varios productos naturales que exhiban actividad biológica.<sup>1</sup>

La *(S)*-isoserina representa el ejemplo más simple y al mismo tiempo más frecuente de este tipo de  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminoácidos y debido a la presencia del grupo hidroxi en su estructura, permitirá el diseño de nuevos péptidos híbridos glicosilados. La *(S)*-isoserina fue sintetizada por primera vez por el grupo del

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> a) Ziora, Z., Skwarczynski, M., Kiso, Y. *Medicinal Chemistry of α-Hydroxy-β-Amino Acids in Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry Vol. 4, Ch. VI* Hughes, A. B. **2011** Wiley-VCH; b) Lambertus, T. *Chemistry of functionalized small-ring heterocycles Ch.* IV **2007**, Radboud Univ. Nijmegen.

profesor Miyazawa<sup>2</sup> en 1976. Para ello los autores partieron de la L-asparagina natural, obteniendo como intermedio por nitrosación el ácido (*S*)- $\beta$ -malamídico que, tras una reacción de transposición de Hofmann, daba lugar a la (*S*)-isoserina (Figura 6.1).



Figura 6.1 Primera síntesis de (S)-Isoserina

Curiosamente, tras una pormenorizada búsqueda bibliográfica, y a pesar de la sencillez estructural de la isoserina y del buen número de sulfamidatos cíclicos que aparecen descritos en la bibliografía, el correspondiente sulfamidato cíclico de la (*S*)-isoserina aparece descrito tan solo en una referencia bibliográfica y de forma marginal.<sup>3</sup>

Por tanto, en este capítulo, se abordará la síntesis de diferentes sulfamidatos derivados de isoserina así como sus aperturas con diversos nucleófilos, incluyendo

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Miyazawa, T., Akita, E., Ito, T. Agr. Biol. Chem. **1976**, 40, 1651-1652.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> James, T., Maclellan, P., Burslem, G. M., Simpson, I., Grant, J. A., Warriner, S., Sridharan, V., Nelson, A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2584-2591.

*O*- y *S*- carbohidratos. Para ello, partiremos de la *(S)*-isoserina comercial debido a que es más accesible que su enantiómero *(R)* (Figura 6.2).



Figura 6.2 Sulfamidatos derivados de (S)-isoserina y su apertura nucleófila

## 6.2 - Síntesis de sulfamidatos cíclicos derivados de la (S)isoserina

Inicialmente se procedió a la protección de la *(S)*-isoserina comercial tanto en el grupo amino como en el grupo carboxilo, para impedir de este modo las posibles reacciones colaterales en las siguientes etapas de síntesis.

En primer lugar, se llevó a cabo la protección del grupo amino como carbamato Boc que es resistente a las condiciones de reacción de las siguientes etapas sintéticas planteadas para la obtención del sulfamidato y es el más empleado cuando se parte de hidroxi-aminoácidos.

Para ello, se utilizó  $Boc_2O$  en una mezcla dioxano/NaOH en una relación (1:1) y la reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se realizó una extracción con éter para eliminar el anhídrido de Boc sobrante y, posteriormente, se acidificó la fase acuosa

y se extrajo con diclorometano obteniéndose el compuesto **36** como sólido blanco con excelente rendimiento 91% (Figura 6.3).



Figura 6.3 Síntesis del sustrato 36 a partir de (S)-isoserina

A continuación, se llevó a cabo la protección del grupo carboxilo del  $\beta$ -aminoácido en forma de diferentes ésteres. Inicialmente, se trató de proteger en forma de éster metílico, haciendo reaccionar el carboxilato de la isoserina con ioduro de metilo en DMF, obteniendo el aminoácido protegido **37** con un bajo rendimiento del 30 % (Figura 6.4).



Figura 6.4 Síntesis del sustrato 37 a partir de 36

El rendimiento obtenido en este caso provocó un cambio de planteamiento de la estrategia sintética a seguir, cambiando el orden de las reacciones anteriores. Se decidió iniciar la síntesis con la generación del éster metílico de la (*S*)-isoserina y

posterior protección con el grupo Boc, esperando un rendimiento global de las dos etapas superior a la metodología anterior. Así, la síntesis de **38** se efectuó mediante el empleo de AcCl en MeOH (Figura 6.5).



Figura 6.5 Síntesis del sustrato 38 a partir de la (S)-isoserina

A continuación, se protegió el grupo amino en forma de carbamato. Para ello, se añade en primer lugar trietilamina sobre una disolución de **38** en THF y se enfría en baño de hielo. A dicha mezcla se le añade, gota a gota, Boc<sub>2</sub>O disuelto en THF y se deja 14 horas en agitación a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo se aumenta la temperatura a 50° C y se deja durante 3 h para completar la reacción, obteniéndose el compuesto **37** con un rendimiento del 82 % (Figura 6.6).



Figura 6.6 Síntesis del sustrato 37 a partir de 38

En este caso se obtiene un rendimiento global (80 %) mucho mejor que en el caso anterior (27 %), por lo que se prefirió esta metodología frente a la anterior a la hora de sintetizar el  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminoácido **37** que no había sido descrito previamente en la bibliografía.

Además del *N*-Boc-IsoSer-OMe (**37**), se llevó a cabo la síntesis de los ésteres bencílico *N*-Boc-IsoSer-OBn (**39**) y *tert*-butílico *N*-Boc-IsoSer-O<sup>t</sup>Bu (**40**), en la búsqueda del más adecuado para la obtención del sulfamidato de (*S*)-isoserina.

En primer lugar, se llevó a cabo la proteccción en forma de éster bencílico. Para ello, se hizo reaccionar el compuesto *N*-Boc-IsoSer-OH (**36**) con Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y se añadió gota a gota bromuro de bencilo disuelto en DMF. Esta reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, obteniéndose el compuesto **39** con un rendimiento aceptable del 45 % teniendo en cuenta la presencia de un grupo hidroxi libre (Figura 6.7).



Figura 6.7 Síntesis de N-Boc-IsoSer-OBn (39) a partir de 36

Como ya se ha comentado, también se llevó a cabo la protección del ácido en forma de éster *tert*-butílico partiendo del compuesto **36**. Para ello, inicialmente se mantiene una premezcla de DCC y CuCl (catalítico) en <sup>t</sup>BuOH durante 3 días. Transcurrido ese tiempo se adicionó el compuesto Boc-IsoSer-OH (**36**) en una sola

fracción y se mantuvo la agitación durante 3 horas, obteniendo el compuesto **40** con bueno rendimiento (Figura 6.8).



Figura 6.8 Síntesis del sustrato N-Boc-IsoSer-O<sup>t</sup>Bu (40) a partir de 36

Con estos derivados de (*S*)-isoserina anteriormente sintetizados, *N*-Boc-IsoSer-OMe (**37**), *N*-Boc-IsoSer-OBn (**39**) y *N*-Boc-IsoSer-O<sup>t</sup>Bu (**40**), se procederá a continuación a describir la síntesis de los correspondientes sulfamidatos derivados de los mismos (Figura 6.9).



Figura 6.9 Diferentes sulfamidatos derivados de la isoserina objetivo

Estos tres compuestos se obtuvieron siguiendo la misma ruta sintética, consistente en el ataque nucleófilo del aminoalcohol sobre  $SOCl_2$  y la posterior oxidación del sulfamidito cíclico a sulfamidato. A pesar de realizarse en dos pasos, esta metodología tiene mejores rendimientos y sencillez de purificación que la que da acceso directo al sulfamidato por reacción con  $SO_2Cl_2$ .

Para ello, se realizó en primer lugar una premezcla de cloruro de tionilo e imidazol y se enfrió a 0° C. Posteriormente, se le añadieron los diferentes aminoalcoholes y las mezclas de reacción se mantuvieron agitando durante 2 h, obteniéndose así los sulfamiditos intermedios de reacción.

Dichos intermedios no fueron aislados, sino que, disueltos en  $CH_2CI_2$ , se oxidaron directamente con tetróxido de rutenio "RuO<sub>4</sub>" generado *in situ*, a partir de RuCI<sub>3</sub>  $H_2O$  y una disolución acuosa de NaIO<sub>4</sub>. Todo esto se lleva a cabo en un sistema bifásico ( $H_2O:CH_2CI_2$ ) con agitación vigorosa. Este procedimiento permite obtener los correspondientes sulfamidatos **41**, **42** y **43** con buenos rendimientos (Figura 6.10).



**Figura 6.10** Síntesis de los sulfamidatos derivados de (S)-isoserina empleando SOCl<sub>2</sub> y posterior oxidación

Posteriormente, se procedió a la síntesis de alguno de los derivados de sulfamidato monoprotegidos, ya sea con el grupo carboxilo libre o con la sulfonamida, con la finalidad de poder introducir otros grupos protectores, otros grupos funcionales u otros aminoácidos como en los capítulos anteriores.

Para ello, inicialmente se trató de desproteger el grupo éster eligiendo en este caso el sulfamidato protegido como éster metílico **41** y bencílico **42** debido a la ortogonalidad que ambos grupos presentan con el grupo Boc.

En el caso del sulfamidato **41**, se buscaron unas condiciones suaves para la desprotección del éster metílico. En este sentido, se encontró una metodología

que describe el empleo del hidróxido de trimetilestaño como base para la desprotección del éster.

Esta metodología fue descrita inicialmente por Mascaretti y colaboradores<sup>4</sup>, y posteriormente fue empleada por Nicolaou y colaboradores<sup>5</sup> para la desprotección selectiva de esteres metílicos en condiciones suaves. La metodología consiste en disolver el sulfamidato **41** en 1,2-dicloroetano y posteriormente adicionar el hidróxido de trimetilestaño manteniendo la mezcla a temperatura ambiente 4 h. Estas condiciones permitieron obtener el sustrato **44** con rendimiento moderados del 67 % (Figura 6.11a).

En el caso del sulfamidato con el éster bencílico **42**, se llevó a cabo una hidrogenólisis en condiciones estándar empleando Pd/C como catalizador para la obtención del mismo sustrato **44**, pero en este caso se trató de una reacción más limpia, presentando un rendimiento del 90 % (Figura 6.11b).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Furlán, R. L. E., Mata, E. G., Mascaretti, O. A., Peña, C., Coba, M. P. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13023-13034.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Nicolaou, K. C., Estrada, A. A., Zak, M., Lee, S. H., Safina, B. S. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, *44*, 1378-1382.



Figura 6.11 Síntesis del sulfamidato 44 por las reacciones de desprotección en 41 y 42

Además del derivado monoprotegido **44**, se logró obtener cada uno de los derivados monoprotegidos con el grupo sulfonamida libre de los sustratos **41**, **42** y **43**.

Inicialmente, se empleó TFA en exceso en una relación (1:2) con el disolvente para la desprotección de los sustratos **41** y **42**, ya que los ésteres presentes en los mismos no son sensibles a estas condiciones de reacción. De este modo se obtuvieron con buenos rendimientos los derivados *N*-desprotegidos **45** y **46** tras mantenerlos reaccionando a temperatura ambiente durante 4 h (Figura 6.12).



Figura 6.12 Síntesis de los sulfamidatos 45 y 46 por desprotección del grupo Boc en los sustratos 41 y 42

Por otro lado, partiendo del sulfamidato **43**, disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL), se llevó a cabo la desprotección del grupo Boc mediante la adición de cantidades crecientes de TFA, observándose la completa desaparición del sustrato de partida con la adición de 13 equivalentes de TFA.

A pesar de este tratamiento, no se logró desproteger de manera selectiva el grupo Boc sino que se obtuvo mezclas de ambos compuestos **47** y **48** en una relación (1:1) entre ambos. El compuesto **47** pudo ser identificado y aislado mediante esta metodología con un rendimiento del 48 % (Figura 6.13).



Figura 6.13 Síntesis de los sulfamidatos 47 y 48 por desprotección parcial y total del compuesto 43

Sobre este mismo sustrato **43** disuelto en  $CH_2Cl_2$ , y con tan solo aumentar la cantidad de TFA empleada (en una relación 1:2 con el disolvente), se obtuvó el aducto completamente desprotegido **48** (Figura 6.14).



Figura 6.14 Síntesis del sulfamidato 48 por total desprotección del sulfamidato 43 con TFA

# 6.3 - Reacción de apertura nucleófila con el anión azida sobre los sulfamidatos derivados de isoserina y $\alpha$ -metilisoserina

Antes de abordar el estudio de las aperturas nucleófilas sobre los sulfamidatos cíclicos de cinco miembros, derivados de isoserina y  $\alpha$ -metilisoserina, con diversos *S*- y *O*-carbohidratos como nucleófilos, se decidió realizar un estudio previo de esta reacción empleando azida de sodio como nucleófilo, con la finalidad de corroborar que el mecanismo de reactividad que seguían estos derivados de isoserina era un sustitución nucleófila bimolecular (S<sub>N</sub>2), que transcurre con total inversión de configuración, al igual que nuestro grupo de investigación demostró para los derivados de  $\alpha$ -metilisoserina.<sup>6</sup>

Así, nuestro estudio se basará en la apertura nucleófila del sulfamidato **41** con azida de sodio, con el objetivo de sintetizar el hidrocloruro del ácido 2,3diaminopropiónico para la posterior comparación de su rotación específica con la del mismo compuesto que aparece previamente descrito en la bibliografía.

Para ello, se disolvieron en DMF el sulfamidato **41** y la azida de sodio y se mantuvo agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, hasta total desaparición del sulfamidato de partida. Posteriormente, se realizó la hidrólisis del resto sulfámico empleando  $H_2SO_4$  (20 %) en las condiciones descritas en capítulos anteriores obteniendo el compuesto de apertura **49** con buenos rendimientos (Figura 6.15).

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Jiménez-Osés, G., Avenoza, A., Busto, J. H., Rodríguez, F., Peregrina, J. M. *Chem-Eur. J.* **2009**, *15*, 9810-9823.

Una vez concluida esta etapa se procedió a la hidrogenación de la azida en condiciones estándar con Pd/C durante 16 h y seguidamente, sin aislar el intermedio generado, se procedió a la hidrolisis del resto de grupos protectores empleando HCl 6N a 60° C para obtener el sustrato deseado **50** con un rendimiento global del 60 % (Figura 6.15).





Posteriormente, se procedió a la medición de la rotación específica  $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 0.50 , HCl 1N), teniendo como resultado -24.2 que, al compararlo con la bibliografía,<sup>7</sup> coincidía con el enantiómero (*R*) corroborando así que la reacción transcurrió con total inversión de configuración.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Morán-Ramallal, R., Liz, R., Gotor, V. Org. Lett. **2007**, *9*, 521-524.

Una vez se determinó que la reactividad de estos sustratos tiene lugar del mismo modo que en los sulfamidatos derivados de  $\alpha$ -metilisoserina previamente estudiados por nuestro grupo de investigación, se decidió realizar un ensayo de competición para comprobar si, como es lógico presuponer, el derivado de isoserina es más reactivo que su homólogo  $\alpha$ -metilado.

Para ello seleccionamos el sulfamidato **E**, lo que nos llevó a plantear la síntesis del derivado análogo de la (*S*)-isoserina, como éster metílico y carbamato de metilo, para que la única diferencia entre ambas estructuras fuera la presencia del metilo en la posición alfa, con generación de un carbono cuaternario (Figura 6.16).



Figura 6.16 Sulfamidatos seleccionados para el estudio de reactividad comparada

La síntesis del sulfamidato objetivo se llevó a cabo empleando la metodología anteriormente descrita de generación del sulfamidito y posterior oxidación del mismo.

Partimos del derivado aminoácido **38** para su posterior protección en forma de carbamato de metilo, empleando cloroformiato de metilo en agua y en presencia

de NaHCO<sub>3</sub>,<sup>8</sup> obteniéndose de esta manera el  $\beta$ -aminoácido diprotegido **51** en tan solo 10 minutos de reacción y con un 92 % de rendimiento (Figura 6.17).



Figura 6.17 Síntesis del compuesto 51 a partir del derivado de isoserina 38

La siguiente etapa para la síntesis del sulfamidato pasa por la formación del sulfamidito cíclico, empleando  $SOCl_2$  e imidazol y su posterior oxidación con "RuO<sub>4</sub>" generado *in situ* a partir de NalO<sub>4</sub> y RuCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (Figura 6.18).



Figura 6.18 Síntesis en dos etapas del sulfamidato 52 a partir del derivado de isoserina 51

A partir del sulfamidato **52** y siguiendo condiciones de reacción similares a las descritas en la figura 6.15 para el sulfamidato **41** se efectuó la reacción de apertura con azida de sodio para dar lugar al compuesto **53** (Figura 6.19).

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Itaya, T., Mizutani, A., Iida, T. Chem. Pharm. Bull. **1991**, 39, 1407-1414.



Figura 6.19 Reacción de apertura del sulfamidato 52 con NaN<sub>3</sub>

Una vez descrita la apertura nucleófila del sulfamidato **52** se optó por desarrollar un experimento de competición de reactividad entre dicho sulfamidato y su homólogo cuaternario **E**, empleando azida de sodio como nucleófilo. El experimento se realizó directamente en el tubo de RMN, con DMF deuterada como disolvente, empleando 0.1 mmoles de cada sustrato.

Inicialmente, se adicionó la azida de sodio en el tubo de RMN y se disolvió en DMFd<sub>7</sub> (200  $\mu$ L) y, más tarde, se añadieron de forma simultánea los derivados **52** y **E** disueltos en DMF-d<sub>7</sub> (600  $\mu$ L) (Figura 6.20).



Figura 6.20 Secuencia de RMN's obtenidos a medida que avanzaba el tiempo de reacción

Los resultados obtenidos indicaban que el sulfamidato **52** derivado de la isoserina era más reactivo que el análogo **E** de la  $\alpha$ -metilisoserina, el cual se mantenía

prácticamente inalterado a lo largo del experimento (óvalo azul  $H_{\beta}$  E). En cambio, se observa la desaparición del sulfamidato 52 (óvalo rojo  $H_{\beta}$  52) y la aparición del producto de ataque nucleófilo de la azida 53 sobre el mismo (círculo naranja  $H_{\beta}$  53).

De este modo se pudo observar la desaparición del sulfamidato **52**, la aparición del sustrato de ataque **53** y el mantenimiento casi inalterado del sulfamidato **E**.

## 6.4 - Estudio de la reacción de apertura nucleófila sobre los sulfamidatos derivados de (*S*)-isoserina

En este apartado se centrará la atención sobre la apertura nucleófila de los sulfamidatos derivados de (*S*)-isoserina. Inicialmente, se hicieron reaccionar los sulfamidatos (**41**, **42** y **43**) con ácido para-nitrobenzóico (PNB-OH) empleando CsF como base. Se realizó una premezcla de PNB-OH y CsF en DMF a temperatura ambiente para lograr la desprotonación del nucleófilo. Posteriormente, se calentó a 50° C y se añadieron cada uno de los sulfamidatos, manteniendo la agitación durante 12 horas. Tras la etapa de hidrólisis pertinente con  $H_2SO_4$  (20 %) se obtuvieron con buenos rendimientos los correspondientes compuestos de apertura nucleófila **54**, **55** y **56** (Figura 6.21).



Figura 6.21 Apertura nucleófila de los sulfamidatos 41, 42 y 43 con PNB-OH

A partir de los productos de apertura **54**, **55** y **56** y, teniendo en cuenta la no disponibilidad comercial, a un precio razonable, del enantiómero (R) de la isoserina, se decidió realizar la hidrólisis del grupo p-nitrobenzoato con el fin de obtener los derivados protegidos de (R)-isoserina, enantiómeros a los previamente descritos para la serie (S) (**37**, **39** y **40**).

En primer lugar, sobre los tres sustratos se realizó la hidrólisis del *p*-nitrobenzoato empleando HCl 6N a reflujo durante 12 horas (Figura 6.22).

BocHN (R)	HCI 6N, 100º C, 12 h	R <sup>1</sup> HN (R)
OPNB	────►	OH
R= Me (54) Bn (55) <sup>7</sup> Bu (56)		R= Me, Bn, <sup>t</sup> Bu R <sup>1</sup> = H, Boc

Figura 6.22 Hidrólisis no selectiva de los derivados 54-56

Estas condiciones resultaron ser demasiado fuertes para la desprotección selectiva del p-nitrobenzoato, obteniéndose mezclas de productos de desprotección y lográndose aislar únicamente el éster metílico de la (*R*)-isoserina (**57**), con un 20 % de rendimiento, cuando se empleó el compuesto **54** como producto de partida.

Para solventar este problema, se procedió a la desprotección selectiva del *p*nitrobenzoato en condiciones más suaves, descritas en la bibliografía.<sup>9</sup> Esta metodología, consistente en el empleo de azida de sodio en metanol a 40° C, es lo suficientemente selectiva como para ser empleada sobre compuestos con grupos funcionales sensibles tanto a medios ácidos como básicos (Figura 6.23).

BocHN (R) OPNB	NaN <sub>3,</sub> MeOH, 40° C	BocHN (R) CO <sub>2</sub> R
		Rdto.
R= Me (54)		R= Me (58) 65 %
Bn (55)		<sup>t</sup> Bu (59) 71 %
'Bu (56)		Bn (60) 75 %

Figura 6.23 Hidrólisis selectiva de los derivados 54-56

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Gómez-Vidal, J. A., Forrester, M. T., Silverman, R. B. Org. Lett. **2001**, *3*, 2477-2479.

Midiendo la rotación específica de estos compuestos y comparándola con los (S)aminoácidos protegidos (**37**, **39** y **40**), se logró demostrar sin ninguna duda, que la reacción tenía lugar mediante  $S_N 2$  con total inversión de configuración, ya que los  $[\alpha]_{D}^{20}$  medidos eran los correspondientes a compuestos enantiómeros entre sí. Además se ha conseguido desarrollar un método óptimo para la síntesis de derivados protegidos del isómero (*R*) de la isoserina, mucho más sencillo que los descritos con anterioridad.<sup>1b,10</sup>

En una segunda parte de nuestro estudio de reactividad, se decidió ensayar la apertura nucleófila de sulfamidatos de la (*S*)-isoserina mediante el empleo de distintos S- y O-carbohidratos. Se inició el estudio de reactividad empleando 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosa como nucleófilo y DBU como base.

Siguiendo las condiciones descritas en el capítulo 4, se llevó a cabo una premezcla del tiocarbohidrato y la DBU en DMF. Tras agitar esta mezcla durante unos 5 minutos, se adicionó el sulfamidato pertinente y se mantuvo la agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la hidrólisis del resto sulfámico, se obtuvieron los compuestos de apertura **61**, **62** y **63** con buenos rendimientos (Figura 6.24).

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Kim, Y., Ha, H.-J., Yun, H., Lee, B. K., Lee, W. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8844-8849.



Figura 6.24 Apertura de los sulfamidatos 41, 42 y 43 con  $\beta$ -tioglucopiranosa

Una vez realizadas las aperturas con la  $\beta$ -*S*-tioglucopiranosa, se procedió a realizar las aperturas de los sulfamidatos anteriores empleando también  $\alpha$ -*S*-GalNAc y  $\alpha$ -*S*-GlcNAc protegidos como tri-*O*-acetil derivados para la obtención de los correspondientes productos glicosilados de la (*R*)-isocisteína (Figura 6.25 y Tabla 6.1).



Figura 6.25 Apertura de los sulfamidatos 41, 42 y 43 con los derivados tri-O-acetilados de  $\alpha$ -S-GalNAc y  $\alpha$ -S-GlcNAc

	R	$R_1/R_2$	Nu	Rendimiento
1	Me ( <b>41</b> )	OAc/H	lpha-S-GalNAc	-
2	<sup>t</sup> Bu ( <b>42</b> )	OAc/H	lpha-S-GalNAc	-
3	Bn ( <b>43</b> )	OAc/H	lpha-S-GalNAc	-
4	<sup>t</sup> Bu ( <b>42</b> )	H/OAc	lpha-S-GlcNAc	68 % ( <b>64</b> )
5	Bn ( <b>43</b> )	H/OAc	$\alpha$ -S-GlcNAc	75 % ( <b>65</b> )

**Tabla 6.1** Resultados obtenids al emplear  $\alpha$ -S-GalNAc y  $\alpha$ -S-GalNAc

Cuando se empleó el derivado de  $\alpha$ -S-GalNAc, en ningún caso, se logró la obtención de los derivados de apertura deseados, quizás debido a la formación del compuesto dimerizado<sup>11</sup> por un proceso de oxidación como producto mayoritario.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> a) Knapp, S., Myers, D. S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2995-2999; b) Knapp, S., Darout,

E., Amorelli, B. J. Org. Chem. 2006, 71, 1380-1389

En cambio, cuando se empleó el derivado de  $\alpha$ -S-GlcNAc se lograron obtener con buenos rendimientos los derivados S-glicosilados de apertura deseados, **64** y **65**.

Una vez estudiada la reactividad frente a *S*-carbohidratos, el estudio se llevó un paso más allá, ensayando la reactividad que presentan estos sulfamidatos frente a los *O*-carbohidratos, de mayor relevancia biológica.

Este tipo de reactividad no dio sus frutos cuando se emplearon los sulfamidatos derivados de  $\alpha$ -metilisoserina, pero la mayor reactividad que presentan los derivados de isoserina permite ser optimistas a la hora de abordar este tipo de reactividad.

Para ello, tomando como referencia las condiciones descritas por el profesor David Gin<sup>12</sup> que consistían en el empleo hidruro de sodio como base para la desprotonación de *O*-carbohidratos en su posición anomérica para su posterior empleo como nucleófilos en las aperturas de aziridinas (Figura 6.26), se decidió trasladar dichas condiciones a nuestro caso particular de apertura de sulfamidatos.



Figura 6.26 Condiciones descritas por David Gin para la apertura de aziridinas con Ocarbohidratos

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Ryan, D. A., Gin, D. Y. J. Am. Chem. Soc. **2008**, 130, 15228-15229.

La síntesis de los *O*-carbohidratos acetilados con el grupo hidroxilo anomérico libre se llevó a cabo partiendo de los correspondientes carbohidratos peracetilados y realizando la desprotección selectiva de sus posiciones anoméricas mediante metodologías previamente descritas en la bibliografía,<sup>13</sup> en las cuales se obtenían como compuestos mayoritarios los anómeros  $\alpha$ .

De este modo, se llevó a cabo la reacción empleando el sulfamidato **42** con 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glucopiranosa que se obtuvo a partir de la glucosa peracetilada en las condiciones descritas por Q. Wang<sup>13a</sup> y colaboradores. Estas condiciones consisten en el empleo de 2 eq de acetato de amonio que se adicionan sobre la  $\alpha$ -glucosa peracetilada disuelta en DMF. Tras 12 h de reacción a temperatura ambiente se evaporó el disolvente y se purificó el crudo de reacción obteniendo la 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glucopiranosa en una relación  $\alpha/\beta$  (9:1) (Figura 6.27).



Figura 6.27 Obtención de la 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-D-glucopiranosa a partir de la  $\alpha$ glucosa peracetilada

 <sup>&</sup>lt;sup>13</sup> a) Chittaboina, S., Hodges, B., Wang, Q. *Lett. Org. Chem.* 2006, *3*, 35-38; b) Avalos,
M., Babiano, R., Cintas, P., Jiménez, J. L., Palacios, J. C., Valencia, C. *Tetrahedron Lett.* 1993,
*34*, 1359-1362.

Una vez obtenida la 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-D-glucopiranosa, se disolvió en DMF bajo atmósfera de nitrógeno y, tras su completa disolución, se adicionó el NaH al 60 % en aceite mineral y se mantuvo la agitación unos minutos. Una vez realizada esta operación, se adicionó el sulfamidato **42** manteniendo la agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la pertinente etapa de hidrólisis del resto sulfámico se obtuvo el compuesto **66** con un rendimiento del 71 % (Figura 6.28).



Figura 6.28 Apertura del sulfamidato 42 con 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-D-glucopiranosa



Figura 6.29 <sup>1</sup>H RMN del compuesto 66 en el que podemos determinar la disposición a del carbohidrato

En este caso, se observó la presencia de un único anómero mayoritario, cuya configuración pudo determinarse mediante estudios de <sup>1</sup>H RMN, resultando ser el anómero  $\alpha$ .

Posteriormente, se trató de sintetizar un derivado del antígeno Tn en el que se sustituye el aminoácido serina por isoserina. El antígeno Tn es una molécula sencilla, formada por una *N*-acetil-galactosamina unida a un aminoácido (serina o treonina), a través de un enlace  $\alpha$ -*O*-glicosídico (Figura 6.30).<sup>14</sup>



Figura 6.30 Antígeno Tn natural y el análogo de isoserina

El antígeno Tn no aparece en abundancia en las células y tejidos sanos, sin embargo, aparecen en concentraciones elevadas en las células cancerosas, por lo que puede utilizarse como marcador tumoral para detectar la existencia de un

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Dahr, W., Uhlenbruck, G., Gunson, H. H., Van Der Hart, M. Vox Sang. **1975**, 29, 36-50.

tumor maligno y, de hecho, existe una relación directa entre la agresividad de un tumor y la concentración de dicho antígeno.<sup>15</sup>

Para ello empleamos tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-GalNAc como precursor del tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-GalNAc, que se obtuvo en las condiciones descritas previamente por J. C. Palacios y colaboradores.<sup>12b</sup> Esta desprotección selectiva del grupo acetato anomérico se llevó a cabo en MeOH y en presencia de silicagel (1 g/mmol). La reccción que tiene lugar es una transesterificación en la superficie de la silica (SiO<sub>2</sub>), obteniéndose únicamente el anómero  $\alpha$  ya que se ve favorecido por el efecto anomérico<sup>16</sup> (Figura 6.31).



**Figura 6.31** Obtención del tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-GalNAc a partir del tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-GalNAc

Con este planteamiento, se hizo reaccionar en las condiciones descritas anteriormente, el sulfamidato **43** con el derivado tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-GalNAc obteniendo de esta forma el análogo glicosilado **67** con buenos rendimientos (Figura 6.32).

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Ju, T., Otto, V. I., Cummings, R. D. Angew. Chem. Int. Ed. **2011**, 50, 1770-1791.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Tvaroska, I., Bleha, T. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **1989**, 47, 45-123.



Figura 6.32 Apertura del sulfamidato 43 con el derivado de  $\alpha$ -D-GalNAc



Figura 6.33 <sup>1</sup>H RMN del compuesto 67 en el que podemos determinar la disposición a del

carbohidrato
Al igual que en el caso anterior, se obtuvo el anómero  $\alpha$  como compuesto mayoritario, cuya configuración pudo determinarse mediante estudios de <sup>1</sup>H RMN.

Como conclusión a este capítulo podemos decir que:

a) Se ha abordado la síntesis de nuevos sulfamidatos derivados de (S)-isoserina.

 b) Se ha realizado la apertura de los mismos con nucleófilos oxigenados, azufrados y nitrogenados.

c) Por último y más importante, se ha llevado a cabo por primera vez el ataque de un *O*-carbohidrato sobre un sulfamidato para la obtención de un análogo del antígeno  $T_N$ .

#### 6.5 - Parte experimental

#### (S)-3-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxypropanoic acid



(S)-Isoserine (1.04 g, 9.8 mmol) was dissolved in 1 N aqueous NaOH (20 mL) and dioxane (10 mL) at 0° C and treated with di-*tert*-butyl dicarbonate (2.57 g, 11.8 mmol) and the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 24 h. The dioxane

was then evaporated and the aqueous layer was washed with  $Et_2O$  (30 mL) to remove di-*tert*-butyl dicarbonate. Ethyl acetate (50 mL) was then added to the aqueous layer and the mixture was stirred while a 20 % aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution was added to give pH 2-3. The organic layer was extracted, the aqueous layer was then saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (4 x 50 mL). The combined organic layers were dried and filtered and the solvent was removed to give compound **36** (1.83 g, 91 %), as a white solid.

M.p.: 85-88° C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, MeOH): +6.7

HRMS (ESI+): found:  $[M+H]^+$  206.1028 calculated:  $C_8H_{15}NO_5H^+$  206.1016

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.24 (dd, 1H, *J* = 13.9, 6.6 Hz,CH<sub>2</sub>β), 3.39 (dd, 1H, *J* = 13.8, 4 Hz, CH<sub>2</sub>β), 4.07-4.18 (m, 1H, CHα).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.7 (C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 45.1 (CH<sub>2</sub>β), 71.2 (CHα), 80.3(*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 158.5, 175.9 (CO).

#### Methyl (S)-3-amino-2-hydroxypropanoate hydrochloride



Acetyl chloride (2 mL) was added dropwise at 0 °C in about 20 min to absolute methanol (12 mL) through a dropping funnel. After complete addition, the ice bath was removed and (*S*)-Isoserine (1.0 g, 9.52mmol) was added in one portion and the

solution was heated to reflux for 2 h. After reflux, the reaction mixture was allowed to cool to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure to give **38** (1.11 g, 98%) of the methyl ester hydrochloride as a white solid, which was used without further purification in the next step.

The spectroscopic data are consistent with those described in the literature.<sup>17</sup>

#### Methyl -(S)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxypropanoate



Compound **38** (1.11 g, 9.32mmol) was suspended in THF (24 mL) and triethylamine (2.84 mL, 20.5 mmol) was added and the mixture cooled down to 0° C. Ditert-butyl dicarbonate (2.06 g, 9.44 mmol), dissolved in THF (8 mL) was added slowly under nitrogen

atmosphere within 1 h using a dropping funnel. The resulting mixture was left stirring for 14 h at room temperature and afterward was stirred at 50° C for additional 3 h. The solvent was then removed and the crude residue was partitioned between  $Et_2O$  (400 mL) and saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (20mL). The

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Lowpetch, K., Young, D. W. *Org. Biomol.Chem.* **2005**, *3*, 3348-3356.

aqueous phase was extracted with  $Et_2O$  three times. The combined organic layers were dried over NaSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo to give **37** (1.705 g, 82%) as a colorless oil, which was used as such for the next step.

The spectroscopic data are consistent with those described in the literature<sup>18</sup>.





To a stirring solution of N-Boc-(*S*)-Isoserine (**36**) (517 mg, 2.52 mmol) in DMF (100 mL) was added  $Cs_2CO_3$  (822 mg, 2.52 mmol) and the stirring was continued 30 min. Benzyl bromide (300  $\mu$ l, 2.52 mmol) was then added and the resulting solution was stirred 18

h. The reaction mixture was then diluted with EtOAc (25 mL), washed with lithium bromide (3 x 15 mL), NaHCO<sub>3</sub>(2 x 15 mL), and brine (2 x 15 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate. The solvent was then removed under reduced pressure and the resulting tan oil was purified by flash chromatography, using 7:3 hexane/EtOAc, to afford the product **39** (45 %) as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): -3.7

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	318.1327
	calculated: C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub> Na <sup>+</sup>	318.1317

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (s, 9H, C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.34-3,56 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.30 (dd, 1H, *J* = 9.3, 4.9 Hz, CH $\alpha$ ), 4.93 (s, 1H, N*H*Boc), 5.15-5.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.29-7.42 (m, 5H, arom).

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Garcia, J. M., Curzon, S. S., Watts, K. R., Konopelski, J. P. Org. Lett. **2012**, *14*, 2054-2057.

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.0 (CH<sub>2</sub>β), 67.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.4 (CHα), 79.9(*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.5, 128.6, 128.7, 135.0 (arom), 156.2, 173.0 (CO).

#### tert-Butyl (S)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxypropanoate



*Tert*-Butanol (1.60 g, 21.6 mmol), DCC (3.50 g, 10.5 mmol) and CuCl (38 mg, 0.38 mmol) were stirred under exclusion of light for 3 days. The mixture was diluted with dry dichloromethane (10 mL) and a solution of the compound **36** (1.07 g, 5.2 mmol) in

dry dichloromethane (15 mL) was added at room temperature. After 3 h, N,N'dicyclohexylurea was filtered off and, then, the solvent removed in vacuo. The remaining powder was subjected to flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to give protected amino acid **40** (1.11 g, 4.26 mmol, 82%) as a white solid. M.p.: 83-86° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +11.8

HRMS (ESI+):	found: $[M+H]^+$	262.1642
	calculated: $C_{12}H_{23}NO_{5}H^{+}$	262.1654

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.37 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.42 (d, 2H, *J* = 4.5 Hz, CH<sub>2</sub>β), 4.09 (t, 1H, *J* = 4.3 Hz, CHα).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.3, 28.7 (C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.1 (CH<sub>2</sub>β), 70.7 (CHα), 79,8, 83.4 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.3, 172.7 (CO).

#### (S)-3-tert-Butyl-5-methyl 1,2,3-oxathiazolidine-3,5-dicarboxylate 2,2-dioxide



To a solution of imidazole (3.20 g, 47 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added at 0-5° C to a solution of thionyl chloride (1 mL, 14 mmol) in dichloromethane (10 mL) for 15 min. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 h and then cooled to  $-10^{\circ}$ C. To the resulting suspension

was added *N*-Boc-(*S*)-isoserine methyl ester (**37**) (1.705 g, 7.8 mmol) in dichloromethane (16 mL) during 30 min at  $-10^{\circ}$ C and the mixture was then stirred at room temperature for 2 h. To the resulting suspension water (60 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. The organic phase was washed with 10% aqueous citric acid (40 mL) and brine (40 mL) and dried over sodium sulphate. The solids were removed by filtration and washed with dichloromethane. The combined filtrates were mixed with a 10% aqueous sodium periodate solution (40 mL) and cooled to 0° C. To the well stirred mixture, ruthenium (III) chloride hydrate (18 mg, 0.78 mmol) was added and vigorously stirred at 0° C for 2 h and additional 2 h at room temperature. The organic phase was washed with 10% aqueous sodium ascorbate solution (10 mL) and filtered over silica gel. The product was eluted with hexane:EtAcO (2:1), obtaining compound **41** as a white solid (1.80 g, 82 %).

M.p.: 75-77° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +0.9

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	304.0481
	calculated: C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>7</sub> SNa <sup>+</sup>	304.0467

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.55 (s, 9H, C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, CO<sub>2</sub>*CH*<sub>3</sub>), 4.17 (dd, 1H, *J* = 10.1, 7.4 Hz CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.26 (dd, 1H, *J* = 10.1, 7.4 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 5.17 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH $\alpha$ ).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.1 (CH<sub>2</sub>β), 53.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 72.5 (CHα), 86.3(*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 148.3, 165.6 (CO).

#### (S)-5-benzyl-3-tert-Butyl 1,2,3-oxathiazolidine-3,5-dicarboxylate 2,2-dioxide



To a solution of imidazole (1.06 g, 15.7 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added at 0-5° C to a solution of thionyl chloride (333  $\mu$ L, 4.67 mmol) in dichloromethane (3 mL) for 15 min. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 h and then cooled to -10° C. To the resulting suspension

was added *N*-Boc-(*S*)-isoserine benzyl ester (**39**) (767 mg, 2.6 mmol) in dichloromethane (6 mL) during 30 min at  $-10^{\circ}$  C and the mixture was then stirred at room temperature for 2 h. To the resulting suspension was added water (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. The organic phase was washed with 10% aqueous citric acid (12 mL) and brine (12 mL) and dried over sodium sulphate. The solids were removed by filtration and washed with dichloromethane. The combined filtrates were mixed with a 10% aqueous sodium periodate solution (12 mL) and cooled to 0° C. To the well stirred mixture ruthenium (III) chloride hydrate (6 mg, 0.26 mmol) was added and vigorously stirred at 0° C for 2 h and additional 2 h at room temperature. The organic phase

was washed with 10% aqueous sodium ascorbate solution (10 mL) and filtered over silica gel. The product was eluted with hexane:ethyl acetate (1:1). obtaining compound **42** as a white solid (650 mg, 70 %).

M.p.: 65-67° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +3.1

HRMS (ESI+):

found:  $[M+Na]^+$  380.0801 calculated:  $C_{15}H_{19}NO_7SNa^+$  380.0780

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.54 (s, 9H, C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.14 (dd, 1H, *J* = 10.2, 7.4 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.24 (dd, 1H, *J* = 10.2, 7.3 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 5.16 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH $\alpha$ ), 5.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.38 (s, 5H, arom).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.0 (C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.1 (CH<sub>2</sub>β), 68.9 (*C*H<sub>2</sub>Ph), 72.5 (CHα), 86.3 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.8, 129.0, 129.2, 134.1 (arom), 148.3, 164.9 (CO).

#### (S)-di-tert-Butyl 1,2,3-oxathiazolidine-3,5-dicarboxylate 2,2-dioxide



To a solution of imidazole (1.06 g, 15.7 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added at 0-5° C to a solution of thionyl chloride (333  $\mu$ L, 4.67 mmol) in dichloromethane (3 mL) for 15 min. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 h and then cooled to -10° C. To the resulting suspension

was added N-Boc-(S)-isoserine tert-butyl ester (40) (679 mg, 2.6 mmol) in

dichloromethane (6 mL) during 30 min at  $-10^{\circ}$  C and the mixture was then stirred at room temperature for 2 h. To the resulting suspension was added water (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. The organic phase was washed with 10% aqueous citric acid (12 mL) and brine (12 mL) and dried over sodium sulphate. The solids were removed by filtration and washed with dichloromethane. The combined filtrates were mixed with a 10% aqueous sodium periodate solution (12 mL) and cooled to 0° C. To the well stirred mixture ruthenium (III) chloride hydrate (6 mg, 0.26 mmol) was added and vigorously stirred at 0° C for 2 h and additional 2 h at room temperature. The organic phase was washed with 10% aqueous sodium ascorbate solution (10mL) and filtered over silica gel. The product was eluted with hexane:EtAcO (8:2). obtaining compound **43** as a white solid (647 mg, 77 %).

M.p.: 93-95° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +2.1

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	346.0899
	calculated: $C_{12}H_{21}NO_7SNa^+$	346.0936

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.53 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.55 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.10 (dd, 1H, *J* = 10.2, 7.6 Hz CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.21 (dd, 1H, *J* = 10.2, 7.2 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 5.04 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, CH $\alpha$ ).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.4 (CH<sub>2</sub>β), 72.9 (CHα), 85.4, 86.0 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 148.4, 163.8 (CO).

#### (S)-3-(tert-Butoxycarbonyl)-1,2,3-oxathiazolidine-5-carboxylic acid 2,2-dioxide



Sulfamidate **41** (281 mg, 1.00 mmol) was dissolved in 1,2-dichloroethane (5 mL) and after addition of trimethyltin hydroxide (542 mg, 3.00 mmol), the mixture was stirred at room temperature until TLC analysis indicated a complete reaction (3 h). Afterward, the mixture was concentrated in vacuo, and the residue was

taken up in EtAcO (10 mL). The organic layer was washed with aqueous HCl 0.5 N (5 mL). The organic layer was then washed with brine (10 mL) and dried over sodium sulfate. Removal of the solvent in vacuo afforded the carboxylic acid **44** as a colourless oil in a moderate yield of 67 %.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +5.1

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	290.0267
	calculated: $C_8H_{13}NO_7SNa^+$	290.0310

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.55 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.14 (dd, 1H, *J* = 10.2, 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>β), 4.28 (dd, 1H, *J* = 10.1, 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>β), 5.19 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, CHα), 8.27 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.3 (CH<sub>2</sub>β), 72.7 (CHα), 86.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 148.4, 168.1 (CO).

#### Methyl (S)-1,2,3-oxathiazolidine-5-carboxylate 2,2-dioxide



Sulfamidate **41** (281 mg, 1.00 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) and TFA (2 mL) was added and the solution was allowed stirring at room temperature until starting material was consumed by TLC monitoring (4 h). Then, the solution was concentrated in vacuo and the residue was purified by column chromatography on silica gel

(hexane/EtAcO, 8:2) to give sulfamidate 45 (172 mg, 95%) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +3.2

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	203.9951
	calculated: C₄H <sub>7</sub> NO₅SNa <sup>+</sup>	203.9943

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.87 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.95-4.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 4.15-4.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 4.72 (br s, 1H, NH), 5.12 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, CHα).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 46.2 (CH<sub>2</sub>β), 54.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 73.0 (CHα), 165.6 (CO).

#### Benzyl (S)-1,2,3-oxathiazolidine-5-carboxylate 2,2-dioxide



Sulfamidate **42** (357 mg, 1.00 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) and TFA (2 mL) was added and the solution was allowed stirring at room temperature until starting material was consumed by TLC monitoring (4 h). Then, the solution was concentrated in vacuo and the residue was purified by column chromatography on silica gel

(hexane/EtAcO, 8:2) to give sulfamidate 46 (244 mg, 95%) as a white solid.

M.p.: 86-89° C

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 0.50, MeOH): +1.8

HRMS (ESI+):
 found: 
$$[M+Na]^+$$
 280.0251

 calculated:  $C_{10}H_{11}NO_5SNa^+$ 
 280.0256

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.70-3.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 3.85-4.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 4.83 (br s, 1H, NH), 5.11 (dd, 1H, *J* = 7.4, 4.3 Hz, CHα), 5.27 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.38 (s, 5H, arom).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 46.1 (CH<sub>2</sub>β), 68.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 77.6 (CHα), 128.7, 129.0, 129.1, 134.6 (arom), 167.1 (CO).

#### tert-Butyl (S)-1,2,3-oxathiazolidine-5-carboxylate 2,2-dioxide



Sulfamidate **43** (323 mg, 1.00 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) and TFA (995  $\mu$ l, 13.0 mmol) was added and the solution was allowed stirring at room temperature until starting material was consumed by TLC monitoring (14 h). The solution was concentrated in vacuo and the residue was purified by column

chromatography on silica gel (hexane/EtAcO, 8:2) to give sulfamidate **47** (106 mg, 48%) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +2.8.

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	246.0438
	calculated: C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO₅SNa <sup>+</sup>	246.0412

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.52 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.75 (ddd, 1H, *J* = 12.6, 8.0, 4.2 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.91 (ddd, 1H, *J* = 10.1, 7.4, 3.8 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.77 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH), 4.97 (dd, 1H, *J* = 7.2, 4.2 Hz, CH $\alpha$ ).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.3 (CH<sub>2</sub>β), 78.2 (CHα), 85.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 166.3 (CO).

#### (S)-1,2,3-oxathiazolidine-5-carboxylic acid 2,2-dioxide



Sulfamidate **43** (323 mg, 1.00 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) and TFA (2 mL) was added and the solution was allowed stirring at room temperature until starting material was consumed by TLC monitoring (4 h). The solution was concentrated in vacuo and sulfamidate **48** (162 mg, 95%) was obtained as a white solid without

further purification.

M.p.: 143-146° C

[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> (c 1.00, MeOH): +1.0

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	189.9819
	calculated: C₃H₅NO₅SNa <sup>+</sup>	189.9786

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, MeOD): δ (ppm) = 3.69 (dd, 1H, *J* = 12.5, 5.3 Hz NC*H*<sub>2</sub>), 3.88 (dd, 1H, *J* = 12.4, 7.6 Hz, NC*H*<sub>2</sub>), 5.06-5.24 (m, 1H, C*H*CO<sub>2</sub>H).



#### Methyl (R)-2-azido-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate

To a well stirred solution of sulfamidate **41** (33 mg, 0.12 mmol) in DMF (1 mL), at room temperature, sodium azide (31 mg, 0.47 mmol) was added in one portion. The reaction was stirred 30 min and the remaining DMF was evaporated under vacuum conditions. The crude was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (5 mL)

and 20%  $H_2SO_4$  (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and the solvent mixture was extracted with  $CH_2CI_2$ . The combined organic phase was dried with  $Na_2SO_4$ , concentred under vacuum and purified by column chromatography using hexane: EtAcO(6.5:3.5) as an eluent to give the desire product **49** (25 mg, 85%) as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.01, CHCl<sub>3</sub>): +100.5

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	267.1097
	calculated: $C_9H_{16}N_4O_4Na^+$	267.1069

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.48-3.35(m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.67-3.51 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.82 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.15 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, CH $\alpha$ ), 4.92 (br s , 1H, N*H*Boc).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.4 (C(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.8 (CH<sub>2</sub>β), 53.0 (CO<sub>2</sub>C*H*<sub>3</sub>), 61.7 (CHα), 80.2 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.7, 169.4 (CO).

#### 2,3-Diaminopropanoic acid hydrochloride



The catalyst (Pd/C, 2.5 mg, 10% mass) was suspended in methanol (3 mL) into schlenk reactor and prehydrogenated for 10 min. Then, we added, in one portion, compound **49** (25 mg, 0.1 mmol) dissolved in methanol (3 mL) and the reaction mixture was vigorously

stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through diatomaceous earth and concentrated in vacuo. Subsequently, the residue was dissolved in HCl 6N (6 mL) and kept stirring at 60° C for 12 h. The aqueous phase was evaporated, and the residue dissolved in  $H_2O$  (2 mL) and eluted through a reverse-phase Sep-pak C18 cartridge to obtain, after evaporation, the corresponding compound **50** (9 mg, 60 %) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{^{20}}_{^{D}}$  (c 0.50 , 1 N HCl): -24.2

HRMS (ESI+):	found: [M+H] <sup>+</sup>	105.0672
	calculated: $C_3H_8N_2O_2H^+$	105.0664

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 3.03-3.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, CHα).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ (ppm) = 40.8 (CH<sub>2</sub>β), 52.5 (CHα), 174.5 (CO).

#### (S)-Methyl 2-hydroxy-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate



Methyl chloroformate (93 µl, 1.2 mmol) was added to a pre-cooled (10° C) solution of hydrochloride 38 (155 mg, 1.0 mmol) in water (3 mL) in the presence of NaHCO<sub>3</sub> (250 mg) over a period of 5 min with vigorous stirring on a magnetic stirrer. The mixture was stirred at room temperature for a

further 5 min and brought to pH 6 with HCl (0.5 N). The resulting solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) and the combined organic layers were dried over NaSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give compound 51 (159 mg, 92 %) as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +24.1

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	200.0499
	calculated: $C_6H_{11}NO_5Na^+$	200.0535

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.38-3.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.62 (s, 3H, NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 3.75 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.99 (br s, 1H, OH), 4.28 (t, 1H, J = 4.5 Hz, CH $\alpha$ ), 5.57 (br s , 1H, NH).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 44.2 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 52.3 (NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 52.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 70.1 (CHα), 157.5, 173.5 (CO).

#### Dimethyl (S)-1,2,3-oxathiazolidine-3,5-dicarboxylate 2,2-dioxide



To a solution of imidazole (553 mg, 7.85 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added at 0-5° C to a solution of thionyl chloride (167  $\mu$ L, 2.33 mmol) in dichloromethane (2 mL) for 15 min. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 h and then cooled to -10° C. To the resulting

suspension was added a solution of **51** (230 mg, 1.3 mmol) in dichloromethane (3 mL) during 30 min at  $-10^{\circ}$  C and the mixture was then stirred at room temperature for 2 h. Then water (10 mL) was added to this suspension and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. The organic phase was washed with 10% aqueous citric acid (7 mL) and brine (7 mL) and dried over sodium sulphate. The solids were removed by filtration and washed with dichloromethane. The combined filtrates were mixed with a 10% aqueous sodium periodate solution (7 mL) and cooled to 0° C. To the well stirred mixture ruthenium (III) chloride hydrate (4 mg, 0.13 mmol) was added and the mixture was stirred at 0° C for 2 h and additional 2 h at room temperature. The organic phase was washed with 10% aqueous sodium ascorbate solution (2 mL) and filtered over silica gel. The product was eluted with hexane:EtAcO(7:3). obtaining compound **52** as a colourless oil (249 mg, 80 %).

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +5.0

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	262.0005
	calculated: C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>7</sub> SNa <sup>+</sup>	261.9997

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.91 (s, 3H, NHCO<sub>2</sub>Me) 3.94 (s, 3H, CO<sub>2</sub>Me), 4.22-4.30 (m, 2H, CHβ), 5.22 (t, *J* = 7.1 Hz, CHα).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 47.4 (*C*H<sub>2</sub>β), 54.0 (NHCO<sub>2</sub>*Me*), 55.1 (CO<sub>2</sub>*CH*<sub>3</sub>), 72.9 (*C*Hα), 150.1, 165.3 (CO).

#### Methyl (R)-2-azido-3-((methoxycarbonyl)amino)propanoate



Sulfamidate **52** (120 mg, 0.50 mmol) was dissolved in DMF (4 mLl) at room temperature. Then, sodium azide (98 mg, 1.50 mmol) was added and kept stirring during 40 min till starting material had disappeared. After evaporation of DMF, the crude was purified by column chromatography on silica

gel (hexane/EtAcO, 7:3) to give compound 53 (81 mg, 80%) as a colorless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +93.2

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	225.0608
	calculated: $C_6H_{10}N_4O_4Na^+$	225.0600

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMF-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 3.41-3.52(m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 3.57-3.67 (m, 4H, CH<sub>2</sub>β, NHCO<sub>2</sub>Me), 3.78 (s, 3H, CO<sub>2</sub>Me), 4.32 (dd, J = 7.0, 4.7 Hz, 1H, CHα), 7.41 (br s , 1H, NHCO<sub>2</sub>Me).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMF-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 42.4 (*C*H<sub>2</sub>β), 51.4 (NHCO<sub>2</sub>*Me*), 52.4 (CO<sub>2</sub>*CH*<sub>3</sub>), 61.4 (*C*Hα), 155.3, 169.5 (CO).

# (*R*)-3-((t*ert*-Butoxycarbonyl)amino)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl 4nitrobenzoate



Sulfamidate **41** (225 mg, 0.80 mmol), CsF (134 mg, 0.88 mmol), and *p*-nitrobenzoic acid (147 mg, 0.88 mmol) were dissolved in DMF (5 mL) and the mixture was heated at 50° C for 12 h, until the total disappearance of starting material monitored by TLC. After the solvent was evaporated, the residue was dissolved in a

mixture of aqueous 20%  $H_2SO_4/CH_2CI_2$  (1:1, 10 mL) and it was stirred at room temperature for 30 min. The aqueous phase was extracted with  $CH_2CI_2$  (3 x 15 mL), the combined organic phases were dried ( $Na_2SO_4$ ) and evaporated to give a residue, which was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtAcO, 6.5:3.5). In this way, compound **54** (212 mg, 72%) was isolated as a white solid.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>): +0.8

 HRMS (ESI+):
 found:  $[M+Na]^+$  391.1249

 calculated:  $C_{16}H_{20}N_2O_8Na^+$  391.1117

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.75-3.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.81 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.86 (br s, 1H, NH), 5.38 (t, 1H, J = 4.6 Hz, CH $\alpha$ ), 8.20-8.34 (m, 4H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.4 (CH<sub>2</sub>β), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 73.0 (CHα), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 123.8, 131.3, 134.7, 151.0 (arom), 155.8, 164.1, 168.4 (CO<sub>2</sub>).

## (*R*)-1-(Benzyloxy)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl 4nitrobenzoate



Sulfamidate **42** (386 mg, 0.80 mmol), CsF (134 mg, 0.88 mmol), and *p*-nitrobenzoic acid (147 mg, 0.88 mmol) were dissolved in DMF (5 mL) and the mixture was heated at 50° C for 12 h, until the total disappearance of starting material was observed by TLC. After the solvent was evaporated, the residue was dissolved in a

mixture of aqueous 20%  $H_2SO_4/CH_2CI_2$  (1:1, 10 mL) and it was stirred at room temperature for 30 min. The aqueous phase was extracted with  $CH_2CI_2$  (3 x 15 mL), the combined organic phases were dried ( $Na_2SO_4$ ) and evaporated to give a residue, which was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc, 6.5:3.5). In this way, compound **55** (263 mg, 74%) was isolated as a white solid.

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>): +2.2

HRMS (ESI+):	found: [M+H] <sup>+</sup>	445.1623
	calculated: $C_{22}H_{24}N_2O_8H^+$	445.1611

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.72-3.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.79 (br s, 1H, N*H*), 5.23 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.42 (t, 1H, *J* = 4.6 Hz, CH $\alpha$ ), 7.27-7.41 (s, 5H, arom), 8.20-8.34 (m, 4H, arom PNB).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.4 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 67.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 71.0 (CH $\alpha$ ), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 123.8, 128.4, 128.6, 128.8, 131.3, 134.7, 135.0 151.0 (arom), 155.8, 164.1, 168.4 (CO<sub>2</sub>).

### (*R*)-1-(*tert*-Butoxy)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl 4nitrobenzoate



Sulfamidate **43** (259 mg, 0.80 mmol), CsF (134 mg, 0.88 mmol), and *p*-nitrobenzoic acid (147 mg, 0.88 mmol) were dissolved in DMF (5 mL) and the mixture was heated at 50° C for 12 h, until the total disappearance of starting material was observed by TLC. After the solvent was evaporated, the residue was dissolved in a

mixture of aqueous 20%  $H_2SO_4/CH_2CI_2$  (1:1, 10 mL) and it was stirred at room temperature for 30 min. The aqueous phase was extracted with  $CH_2CI_2$  (3 x 15 mL), the combined organic phases were dried ( $Na_2SO_4$ ) and evaporated to give a residue, which was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc, 6.5:3.5). In this way, compound **56** (249 mg, 76%) was isolated as a white solid.

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>): +1.7

HRMS (ESI+):	found: $[M+Na]^+$	433.1592
	calculated: $C_{19}H_{26}N_2O_8Na^+$	433.1587

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.72-3.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.83 (br s, 1H, N*H*), 5.26 (t, 1H, *J* = 4.9 Hz, CH $\alpha$ ), 8.28 (d, 4H, *J* = 7.9 Hz, arom PNB).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 27.9, 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.1 (NCH<sub>2</sub>), 73.5 (CHCO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 123.6, 130.5, 134.7, 151.2 (arom), 155.8, 165.3, 169.4.

# General procedure for the azide mediated cleavage of the *p*-nitrobenzoates to obtain compounds 58, 59 and 60

A solution of *p*-nitrobenzoate protected compound (**54**, **55** and **56**) (0.41 mmol) and sodium azide (1.22 mmol) in dry MeOH (10 mL) was warmed at 40 °C for 14 h under nitrogen. The solvent was removed on a rotary evaporator, and the hidroxide free compound was purified by column chromatography to give **58**, **59** and **60** with good yields.

# (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((*R*)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1methoxy-1-oxopropan-2-yl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



DBU (19  $\mu$ L, 0.13 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyran-ose (44 mg, 0.12 mmol) in dry DMF (1 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room

temperature for 5 min and was then added by cannula to a solution of sulfamidate **41** (34 mg, 0.12 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtAcO, 6.5:3.5), and compound **61** (49 mg, 72%) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +196.3

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	588.1707
	calculated: C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>13</sub> SNa <sup>+</sup>	588.1727

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 3.30-3.45 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.58-3.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.71-3.80 (m, 5H, CH $\alpha$ , H<sub>5s</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ), 4.11-4.22 (m, 2H, H<sub>6s</sub>), 4.82 (d, 1H, *J* = 10.2, H<sub>1s</sub>), 4.97 (t, 1H, *J* = 9.7, H<sub>2s</sub>), 5.04 (t, 1H, *J* = 9.7, H<sub>4s</sub>), 5.14 (t, *J* = 5.6 Hz, NHBoc), 5.23 (t, 1H, *J* = 9.3, H<sub>3s</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 45.8 (CH $\alpha$ ), 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.3 (C<sub>6s</sub>), 68.4 (C<sub>4s</sub>), 69.9 (C<sub>2s</sub>), 73.8 (C<sub>3s</sub>), 76.0 (C<sub>5s</sub>), 80.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 82.2 (C<sub>1s</sub>), 155,9, 169.4, 169.6, 170.2, 170.7, 171.2 (CO).

# (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((*R*)-1-(benzyloxy)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



DBU (28  $\mu$ L, 0.19 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyran-ose (66 mg, 0.18 mmol) in dry DMF (2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room

temperature for 5 min and was then added by cannula to a solution of sulfamidate **42** (64 mg, 0.18 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5

mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtAcO, 6:4), and compound **62** (89 mg, 77%) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +8.3

 HRMS (ESI+):
 found:  $[M+Na]^+$  664.2151

 calculated:  $C_{29}H_{39}NO_{13}SNa^+$  664.2040

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 3.39 (ddd, 1H, *J* = 13.9, 7.6, 5.9 Hz, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.58-3.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , H<sub>5s</sub>), 3.77 (t, 1H, *J* = 7.2, CH $\alpha$ ), 4.06-4.21 (m, 2H, H<sub>6s</sub>), 4.74 (d, 1H, *J* = 10.3, H<sub>1s</sub>), 4.88-5.06 (m, 2H, H<sub>2s</sub>, H<sub>4s</sub>), 5.07-5.26 (m, 4H, N*H*Boc, H<sub>3s</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 7.33-7.41 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.8 (CH<sub>2</sub>β), 45.9 (CHα), 62.3 (C<sub>6s</sub>), 67.5 (CH<sub>2</sub>Ph) 68.4 (C<sub>4s</sub>), 69.8 (C<sub>2s</sub>), 73.8 (C<sub>3s</sub>), 75.9 (C<sub>5s</sub>), 80.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 82.2 (C<sub>1s</sub>), 128.4, 128.8, 128.9, 135.4 (arom), 155,9, 169.4, 169.5, 170.2, 170.4, 170.7 (CO).

# (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((*R*)-1-(*tert*-butoxy)-3-((*tert*butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



DBU (15  $\mu$ L, 0.10 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (36 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room

temperature for 5 min and was then added by cannula to a solution of sulfamidate **43** (32 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc, 6:4), and compound **63** (49 mg, 81%) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +30.7

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	630.2203
	calculated: C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>13</sub> SNa <sup>+</sup>	630.2196

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 9H, NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 3.13-3.39 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.56 (t, 1H, *J* = 11.2, CH $\alpha$ ), 3.63-3.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , H<sub>5s</sub>), 4.07-4.23 (m, 2H, H<sub>6s</sub>), 4.86-5.10 (m, 3H, H<sub>1s</sub>, H<sub>2s</sub>, H<sub>4s</sub>), 5.13-5.28 (m, 2H, NHBoc, H<sub>3s</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.5 (NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 46.7 (CH $\alpha$ ), 62.4 (C<sub>6s</sub>), 68.5 (C<sub>4s</sub>), 69.7 (C<sub>2s</sub>), 73.9 (C<sub>3s</sub>), 75.8 (C<sub>5s</sub>), 79.8 (NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.8 (C<sub>1s</sub>), 82.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155,9, 169.6, 169.7, 170.2, 170.2, 170.7 (CO).

# (2R,3S,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((R)-1-(*tert*-butoxy)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



DBU (15  $\mu$ L, 0.10 mmol) was added to a solution of 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-1thio- $\alpha$ -D-glucopyranose (36 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then added by cannula to a solution of sulfamidate **43** (32 mg,

0.10 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5

mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtAcO, 1:1), and compound **64** (42 mg, 68 %) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>): +29.3

 HRMS (ESI+):
 found:  $[M+Na]^+$  629.2303

 calculated:  $C_{26}H_{42}N_2O_{12}SNa^+$  629.2356

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 9H NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.11 (s, 3H, Ac), 3.42-3.58 (m, 3H, CH<sub>2</sub> $\beta$ , CH $\alpha$ ), 4.04-4.17 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.26-4.42 (m, 2H, H<sub>6s</sub>, H<sub>5s</sub>), 4.52 (ddd, 1H, *J* = 11.0, 8.4, 5.4 Hz, H<sub>2s</sub>), 4.99-5.10 (m, 2H, NHBoc, H<sub>3s</sub>), 5.16 (t, 1H, *J* = 12.6 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.70-5.82 (m, 2H, H<sub>1s</sub>, NHAc).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.8 (CH<sub>3</sub>CO), 23.3 (NHCOCH<sub>3</sub>), 28.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.5 (NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 45.9 (CH $\alpha$ ), 52.7 (C<sub>2s</sub>), 62.0 (C<sub>6s</sub>), 68.0 (C<sub>4s</sub>), 69.1 (C<sub>5s</sub>), 71.2 (C<sub>3s</sub>), 82.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 84.1 (C<sub>1s</sub>), 155,8, 169.4, 170.0, 170.5, 170.9, 171.9 (CO).

## butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)thio)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



DBU (15  $\mu$ L, 0.10 mmol) was added to a solution of 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-1thio- $\alpha$ -D-glucopyranose (36 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then added by

cannula to a solution of sulfamidate **42** (32 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtAcO, 1:1), and compound **65** (48 mg, 75 %) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>): +42.8

 HRMS (ESI+):
 found:  $[M+Na]^+$  663.2194

 calculated:  $C_{29}H_{40}N_2O_{12}SNa^+$  663.2200

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.90 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 3.43-3.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 3.72 (t, 1H, J = 8.4 Hz, CH $\alpha$ ), 4.03-4.12 (m, 1H, H<sub>6s</sub>), 4.24-4.37 (m, 2H, H<sub>6s</sub>, H<sub>5s</sub>), 4.51 (ddd, 1H, J = 11.0, 8.5, 5.4 Hz, H<sub>2s</sub>), 4.94-5.08 (m, 2H, NHBoc, H<sub>3s</sub>), 5.12 (d, 1H, J = 9.6 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.16-5.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.66-5.75 (m, 2H, H<sub>1s</sub>, NHAc), 7.28-7.44 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.8 (CH<sub>3</sub>CO), 23.3 (NHCOCH<sub>3</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.9 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 45.4 (CH $\alpha$ ), 52.5 (C<sub>2s</sub>), 62.0 (C<sub>6s</sub>), 67.8 (CH<sub>2</sub>Ph), 68.0 (C<sub>4s</sub>), 69.2 (C<sub>5s</sub>), 71.3 (C<sub>3s</sub>), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.9 (C<sub>1s</sub>), 128.4, 128.7, 128.9, 135.2 (arom), 155,7, 169.4, 170.3, 170.9, 171.0, 171.8 (CO).

# (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(((*R*)-1-(benzyloxy)-3-((*tert*butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate



Sodium hydride 60 % dispersion in mineral oil (8 mg, 0.20 mmol) was added to a solution of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (70 mg, 0.20 mmol) in dry DMF (2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then added by cannula to a solution of sulfamidate

**42** (72 mg, 0.20 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and

the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtAcO, 5.5:4.5), and compound **66** (89 mg, 71 %) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]_{D}^{20}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +54.3

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	648.2271
	calculated: $C_{29}H_{39}NO_{14}Na^+$	648.2268

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.00-2.06 (m, 9H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 3.54-3.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.03-4.15 (m, 2H, H<sub>6s</sub>, H<sub>5s</sub>), 4.27 (dd, 1H, J = 12.3, 4.0 Hz, H<sub>6s</sub>), 4.38 (t, 1H, J = 5.0 Hz, CH $\alpha$ ), 4.87 (dd, 1H, J = 12.4, 4.3 Hz, H<sub>3s</sub>), 4.91-4.99 (m, 1H, NHBoc), 5.06 (t, 1H, J = 9.9 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.12-5.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.25 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H<sub>1s</sub>), 5.51 (t, 1H, J = 9.8 Hz, H<sub>3s</sub>), 7.29-7.41 (m, 5H, arom).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.8 (CH<sub>3</sub>CO), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 61.9 (C<sub>6s</sub>), 67.5 (CH<sub>2</sub>Ph), 68.2 (C<sub>5s</sub>), 68.7 (C<sub>4s</sub>), 70.0 (C<sub>3s</sub>), 70.5 (C<sub>2s</sub>), 74.2 (CH $\alpha$ ), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 95.0 (C<sub>1s</sub>), 128.2, 128.8, 128.9, 135.3 (arom), 155.4, 169.3, 169.7, 170.6, 170.9, 171.1, 171.6 (CO). (2R,3S,4R,5R,6R)-5-Acetamido-2-(acetoxymethyl)-6-(((R)-1-(*tert*-butoxy)-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diyl diacetate



Sodium hydride 60 % dispersion in mineral oil
(10 mg, 0.25 mmol) was added to a solution of 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-glucopyranose (70 mg, 0.20 mmol) in dry DMF
(2 mL) in a nitrogen atmosphere and using standard schlenk techniques. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 min and was then added by cannula to a

solution of sulfamidate **43** (70 mg, 0.20 mmol) in dry DMF (1 mL). The reaction mixture was kept at room temperature and stirred for 30 min. After that time, the solvent was removed, and the residue dissolved in a mixture of 20% aqueous  $H_2SO_4/CH_2Cl_2$  (1:1), which was stirred for 30 min at room temperature to hydrolyze the sulfamic acid intermediate. The reaction crude was isolated after extraction with  $CH_2Cl_2$  (2 x 5 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated. That crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc, 3:7--> 2:8), and compound **67** (87 mg, 74 %) was isolated as a colourless oil.

 $[\alpha]^{20}_{D}$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>): +41.5

HRMS (ESI+):	found: [M+Na] <sup>+</sup>	613.2717
	calculated: $C_{26}H_{42}N_2O_{13}Na^+$	613.2585

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.41-150 (m, 18H NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.01-2.05 (m, 6H, 2 x Ac), 2.10 (s, 3H, Ac), 3.54 (t, 2H, J = 4.8, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 4.03-4.16 (m, 2H, H<sub>5s</sub>, H<sub>6s</sub>), 4.21-4.28 (m, 2H, CH $\alpha$ , H<sub>6s</sub>), 4.37 (ddd, 1H, J = 11.0, 8.4, 5.4 Hz, H<sub>2s</sub>), 4.82 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H<sub>1s</sub>), 4.91 (br s, 1H, NHBoc), 5.15 (t, 1H, J = 9.8 Hz, H<sub>4s</sub>), 5.26 (dd, 1H, J = 20.1, 10.4, H<sub>3s</sub>) 6.60 (d, 1H, J = 8.9 Hz, NHAc).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 20.7, 20.8, 20.9 (CH<sub>3</sub>CO), 23.3 (NHCOCH<sub>3</sub>), 28.1 (NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 51.6 (C<sub>2s</sub>), 62.0 (C<sub>6s</sub>), 68.3 (C<sub>4s</sub>), 68.8 (C<sub>5s</sub>), 71.5 (C<sub>3s</sub>), 76.4 (CH $\alpha$ ), 80.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.5 (CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 98.5 (C<sub>1s</sub>), 155.7, 169.4, 170.8, 171.2 (CO).



# CONCLUSIONES

Las conclusiones que derivan del trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en:

- Se ha logrado elongar los sulfamidatos derivados de la  $\alpha$ -metilisoserina mediante la adición de  $\alpha$ -aminoácidos tanto sobre el grupo sulfonamida como sobre el grupo carboxilo o sobre ambos simultáneamente.



-Se ha llevado a cabo el estudio del ataque nucleófilo de distintos S-carbohidratos sobre los derivados anteriormente sintetizados, observándose resultados positivos para la obtención de los correspondientes  $\alpha/\beta$ -glicopéptidos híbridos.



- Se ha llevado a cabo el estudio conformacional de los  $\alpha/\beta$ -péptidos híbridos tioglicosilados con  $\beta$ -1-tio-D-glucopiranosa **19**, **22**, **23** y **24** observándose una disposición *gauche* entre el tiocaarbohidrato y el  $\alpha$ -aminoácido en los derivados **19** y **22** y una disposición antiperiplanar en los derivados **23** y **24** debido a la existencia de una interacción CH- $\pi$  entre el grupo CH<sub>3</sub> y la densidad electrónica  $\pi$  del anillo aromático presente en estos dos últimos derivados.



- Se ha desarrollado un método de síntesis satisfactorio para la obtención de varios sulfamidatos derivados de la *(S)*-isoserina consistente en la síntesis en dos etapas del sulfamidito correspondiente y su posterior oxidación para la obtención del sulfamidato deseado.



- Se ha determinado la mayor reactividad de los derivados de isoserina frente a los de  $\alpha$ -metilisoserina mediante un estudio competitivo de reactividad, empleando NaN<sub>3</sub> como nucleófilo.

-Se ha determinado que la reactividad de los derivados de isoserina transcurre mediante un mecanismo  $S_N 2$  mediante la síntesis del hidrocloruro del ácido 2,3diaminopropiónico **50** y la posterior comprobación de su rotación específica con la descrita en la bibliografía.
Se ha descrito una metodología sencilla para la obtención del enantiómero (R)
 del aminoácido isoserina, de difícil disponibilidad comercial. Esta metodología pasa
 por la hidrólisis selectiva del grupo *p*-nitrobenzoato de los sustratos 54, 55 y 56.

-Se ha llevado a cabo el estudio del ataque nucleófilo de distintos *S*-carbohidratos sobre los sulfamidatos de la isoserina observándose resultados positivos para laobtención de los correspondientes productos glicosilados de la (*R*)-isocisteína.



-Por último, cabe destacar la síntesis del derivado **67** que puede considerarse como un análogo del antígeno  $T_N$ , dónde el  $\alpha$ -aminoácido serina ha sido sustituido por el  $\beta$ -aminoácido isoserina.





## ANEXO I: CÁLCULOS DE DINÁMICA MOLECULAR

#### Anexo I. Dinámica molecular (DM)

La DM es una herramienta para el estudio teórico de propiedades dinámicas de las moléculas que ha tenido un gran desarrollo en el ámbito de las biomoléculas durante la década de los 80. Al igual que en mecánica molecular (MM), los átomos se consideran esferas rígidas con una carga puntual centrada y los enlaces como muelles. De esta forma, el orden de enlace está relacionado con una constante elástica (Figura 1).<sup>1</sup>



Figura 1. En MM y DM los átomos son considerados como esferas y los enlaces como muelles

El aspecto más importante de la DM es el campo de fuerzas. Éste está formado por las ecuaciones matemáticas que describen la energía del sistema en función de las coordenadas atómicas y por un conjunto de parámetros necesarios para describir

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> a) Machida, K. "*Principles of Molecular Mechanics*", Kodansha/John Wiley & Sons, Tokyo/New York, **1999**; b) Haile, J. M. "*Molecular Dynamics Simulation*", John Wiley and Sons, New York, **1992**; c) Alexander, D.; Mackerell, J. R. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1584-1604.

de forma correcta dicha energía (Figura 2). Los parámetros se obtienen de datos experimentales (rayos X, IR...) o bien de cálculos *ab initio*.



Figura 2. Ecuación general de un campo de fuerzas (izda) y representación de algunas de las energías del campo de fuerzas (dcha)

La misión del campo de fuerzas es deducir la estructura de un amplio conjunto de moléculas a partir de los datos empíricos de que dispone (parámetros). Es, por tanto, muy importante que el campo de fuerzas elegido disponga de parámetros adecuados para la molécula en cuestión. En nuestro caso, se usará el campo de fuerzas AMBER, <sup>2</sup> ya que posee los parámetros adecuados para simular correctamente el comportamiento conformacional de péptidos y proteínas.

 <sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Cornell, W. D., Cieplack, P. C., Bayly, I., Gould, I. R., Merz, K., Ferguson, D. M., Spellmeyer,
 D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *17*, 5179-5197.

Además, para modelar la parte carbohidrato de los glicopéptidos, el campo de fuerzas AMBER se complementa con el GLYCAM-06.<sup>3</sup>

El método de DM consiste en resolver la ecuación de movimiento de Newton para un sistema de partículas. En este caso, la fuerza viene dada por el gradiente de la energía potencial del sistema con respecto a las coordenadas atómicas ( $Fi=\delta E/\delta xi$ ). Los cálculos de DM suelen hacerse a temperatura constante y presión constante. En cuanto al tratamiento del disolvente, en los métodos de DM existen diversas aproximaciones. Éstas van desde considerarlo simplemente como una constante dieléctrica, usar un modelo de disolvente continuo<sup>4</sup> o incluir explícitamente las moléculas de disolvente.<sup>5</sup>

Cabe destacar que los cálculos de DM identifican bastante bien las conformaciones de baja energía para una molécula dada, pero éstos generalmente fallan a la hora de predecir sus poblaciones relativas, en especial cuando se emplea el campo de fuerzas AMBER, que tiende a sobreestimar la estructura  $\alpha$ -hélice para péptidos pequeños.<sup>6</sup>

Para mejorar los resultados obtenidos con este método es conveniente introducir los datos experimentales de los que disponemos como restricciones promediadas

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Woods, R. J., Dwek, R. A., Edge, C. J., Fraser-Reid, B. *J. Phys. Chem. B* **1995**, *99*, 3832-3846.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Onufriev, A., Bashford D., Case, D. A. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3712-3720.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J., Impey, R. W., Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.

 <sup>&</sup>lt;sup>6</sup> a) Gnanakaran, S., García, A. E. *J. Phys. Chem. B* 2003, *107*, 12555-12557; b) Best, R. B.,
 Buchete, N. V., Hummer, G. *Biophys. J. Biophys. Lett.* 2008, *95*, L07-L09.

en el tiempo (MD-tar, del Inglés *molecular dynamics simulations with time-averaged restraints*),<sup>7</sup> con el objetivo de obtener una distribución de confórmeros de baja energía capaces de reproducir de forma cuantitativa los datos de RMN. Así, este procedimiento elimina las limitaciones inherentes a ambas técnicas y proporciona un camino para estudiar la flexibilidad de pequeñas moléculas mediante la interpretación de los datos de RMN.

Las restricciones estructurales (generalmente distancias H-H y constantes de acoplamiento 3*J*) se introducen en la ecuación del campo de fuerzas utilizado en DM para forzar al sistema a ajustarse a estas propiedades, a saltar barreras de potencial y a explorar más eficientemente el espacio conformacional. Así, la nueva función de potencial consta de dos partes (ecuación 1).

$$E_{Total} = V_{teorico} + V_{experimental}$$
(ecuación 1

La primera parte,  $V_{teórico}$ , es el potencial habitual del campo de fuerzas, mientras que  $V_{experimental}$  es un potencial que representa la información experimental que se pretende ajustar y que contiene las distintas restricciones. Este potencial es del tipo:

$$V_{rest} = K_{rest} \cdot (R_{ij} - R_{experimental})^2$$
 (ecuación 2)

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> a) Pearlman, D. A. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 1-16; b) Nanzer, A. P., van Gunsteren, W. E, Torda, A. E. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 313-320.

cuya función es obligar a la estructura a satisfacer una distancia determinada  $(R_{deseado})$ , mediante una penalización energética. Si queremos que las restricciones sean satisfechas no por una única estructura, sino por todas las integrantes de una trayectoria dinámica en *promedio*, bastaría por sustituir la ecuación 2 por:

$$V_{rest} = K_{rest} \cdot \left( \left\langle R_{ij} \right\rangle - R_{experimental} \right)^2 \qquad (\text{ecuación 3})$$

Dado que los NOEs dependen no de  $\langle R \rangle$  sino de  $\langle R^{-6} \rangle$ , la expresión correcta para una distancia *promediada* en el tiempo sería:

$$E_{rest} = K_{rest} \cdot \left( \left\langle R_{ij}^{-6} \right\rangle^{-1/6} - R_{\text{experimental}} \right)^2 \qquad (\text{ecuación 4})$$

En esta expresión:

$$\left\langle R_{ij}^{-6} \right\rangle^{-1/6} = \frac{\left(\sum_{0}^{t} R(t)^{-6}\right)^{-1/6}}{N} \qquad (\text{ecuación 5})$$

donde N es el número total de "frames" en la trayectoria. Un "frame" en DM es la congelación de una conformación particular, a un tiempo dado, del conjunto de conformaciones que componen la dinámica completa.

Experimentalmente se ha visto que la expresión de la ecuación 5, aunque fundamentalmente correcta, tiene la desventaja de requerir tiempos de simulación excesivamente largos para garantizar que nuestras restricciones se

satisfacen en *promedio* por todo el conjunto de estructuras representativo de la trayectoria. Con objeto de reducir los tiempos de simulación, la expresión utilizada para el *promedio* de distancias es en realidad:



En esta última expresión, la constante  $\tau$  que aparece en la función exponencial es un parámetro ajustable empíricamente, con objeto de garantizar una rápida convergencia de las distancias promedio a los valores experimentales.

Ecuaciones similares pueden deducirse para las restricciones de constantes de acoplamiento  ${}^{3}J_{H,H}$  promediadas en el tiempo (aunque, como es lógico, en este caso el promediado es lineal).

Por tanto, la introducción de restricciones promediadas en el tiempo tiene en cuenta el hecho de que las restricciones de RMN representan un *promedio* entre distintas conformaciones. De esta manera, el sistema no tiene que satisfacer todas las restricciones simultáneamente en cada instante de la trayectoria, sino que es el conjunto de estructuras el que lo hace.



# ANEXO II: Espectros de RMN

En este anexo se presentan algunos de los espectros de <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN más relevantes de la presente memoria. Todos estos experimentos se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance-400. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm en la escala  $\delta$  y las constantes de acoplamiento en Hz. Se utilizaron como disolventes deuterados cloroformo, con TMS como referencia interna, metanol- $d_4$ , agua deuterada y acetonitrilo- $d_3$ , con referencia interna del propio disolvente. La temperatura de adquisición fue de 298 K.









170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 f1 (ppm)



## 8 7



170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 f1 (ppm)

## 4









































### 77 58 69<







100 90 f1 (ppm) ![](_page_323_Figure_1.jpeg)
























