



HAL
open science

Conception et synthèse de nouvelles classes d'iminosucres d'intérêt thérapeutique : chimie click, multivalence et maladies génétiques rares

Camille Decroocq

► **To cite this version:**

Camille Decroocq. Conception et synthèse de nouvelles classes d'iminosucres d'intérêt thérapeutique : chimie click, multivalence et maladies génétiques rares. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAF043 . tel-01124060

HAL Id: tel-01124060

<https://theses.hal.science/tel-01124060v1>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR7509

THÈSE

présentée par

Camille DECROOCQ

soutenue le : **31 octobre 2012**

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Chimie

**Conception et Synthèse
de Nouvelles Classes d'Iminosucres d'Intérêt
Thérapeutique :
Chimie Click, Multivalence et Maladies Génétiques Rares**

THÈSE dirigée par :

M. COMPAIN Philippe

Professeur, ECPM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BEAU Jean-Marie

Professeur, Université Paris-Sud 11

M. SOLLOGOUB Matthieu

Professeur, Université Pierre et Marie Curie

MEMBRES DU JURY :

M. BEAU Jean-Marie

Professeur, Université Paris-Sud 11

M. SOLLOGOUB Matthieu

Professeur, Université Pierre et Marie Curie

M. BAATI Rachid

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

M. COMPAIN Philippe

Professeur, ECPM, Université de Strasbourg

A mon Papi,

*Chaque jour j'apprenais quelque chose sur la planète, sur le départ, sur le voyage.
Ça venait tout doucement, au hasard des réflexions.*

Antoine de Saint Exupéry
- Le Petit Prince

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Pr. Philippe Compain, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce beau projet de multivalence d'iminosucres et pour avoir encadré mon travail pendant ces trois années. Son enthousiasme, sa passion pour la chimie sont de précieux atouts de motivation, et son sens de l'humour est toujours au rendez-vous...

Je remercie les membres du jury de cette thèse, le Pr. Jean-Marie Beau et le Pr. Matthieu Sollogoub, rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que le Dr. Rachid Baati.

Je voudrais exprimer ma gratitude à tous les laboratoires avec lesquels nous avons collaboré pour ces projets. Ces collaborations sont toujours des expériences très enrichissantes. En particulier merci au Dr. Jean-François Nierengarten, au Pr. Carmen Ortiz Mellet, au Dr. Caroline Norez, au Pr. Frédéric Becq, au Pr. Naoki Asano, au Pr. Antonio Delgado, au Dr. Terry Butters.

Je voudrais remercier Damien, que j'ai connu post-doc, aujourd'hui maître de conférences, qui est toujours disponible pour des conseils éclairés. Je le remercie également d'avoir relu ce manuscrit avec son œil aiguisé et averti.

Je remercie Anne, dernière « permanente » arrivée, d'avoir amené une douceur féminine au laboratoire. Sa bonne humeur et son aide sont précieuses, je lui souhaite plein de bonheur.

Je voudrais remercier aussi mes compatriotes du laboratoire, les doctorants : Pierre-Antoine, cœur de rocheur, qui s'occupe si bien du laboratoire et qui, j'en suis sûre, aura un avenir plein de réussites, Mathieu pour sa bonne humeur et ses chansons entraînantes et entêtantes. Merci aux post-docs du laboratoire : Daví, dans le top 5 des porteras qui m'a bien aidée quand je suis arrivée, Antoine, le papy belge du labo qui prend la suite de ce beau projet. Bon courage à Johanna, pour ses enseignements et son projet.

Je remercie également tous les masters qui sont passés par là et ont mis l'ambiance au laboratoire, Laura, Antoine, Guillaume, Nadia, Fabien et plus particulièrement ceux que j'ai pu encadrer, Virginie, Raphaël et Julien. Julien ça a été un réel plaisir de travailler avec toi, enthousiasme et courage dans toutes les épreuves synthétiques, et biensûr un grand merci pour tout le travail bio que tu as fait à Oxford...Merci aussi au « petit chef » technicien, Emile, le BG du labo, sans qui je n'aurais jamais fini toutes ces synthèses...

Merci également à tous les services d'analyse de l'université et en particulier au Dr. Michel Schmitt pour toute son aide en RMN qui m'a permis de caractériser mes molécules complexes et au Dr. Jean-Marc Strub pour les expériences Maldi-TOF.

Bien sûr je n'oublie pas les collègues de l'UMR. Le R2, où j'ai squatté tous les midis pour le déjeuner. Merci à Flo qui s'gave, Marie, Nico, Thomas et tous les autres. Merci aussi à Thibault R4 délocalisé R5, confident de tous les instants de ce doctorat, à Luis, Meera et David mes collègues de l'étage.

Merci à mes amis, et particulièrement ceux « de Strasbourg » pour avoir partagé avec moi plein de super moments et quelques peines. Marine, Lisa, et Mélanie particulièrement plein de mercis. Pierre, sans toi je n'aurais jamais voyagé ;-)...

Enfin, je voudrais remercier toute ma famille pour son appui indéfectible : mes parents, grand soutien devant l'éternel qui ont toujours respecté mon indépendance et mes choix, mes grands-parents aimants, ma Mamie confidente, mes deux sœurs : ma jumelle Juju si proche à 500km et ma soeurette Marion, mon asticoteuse préférée à l'avenir brillant.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
0.1. Historique	1
0.2. Les iminosucres, des inhibiteurs de glycosidases.....	3
0.2.1. Les glycosidases	3
0.2.2. Mécanismes d'action des glycosidases.....	3
0.2.3. Les iminosucres comme inhibiteurs de glycosidases : des agents thérapeutiques prometteurs	5
0.3. Propriété chaperon des iminosucres	7
0.4. Plan du travail de thèse	8

Chapitre 1

Synthèse de nouveaux chaperons pharmacologiques « monovalents »..... 11

1.1. Utilisation d'une méthodologie de diamination pallado-catalysée : vers la synthèse de nouveaux iminosucres pour le traitement de la mucoviscidose.	13
1.1.1. La mucoviscidose	13
1.1.2. Un inhibiteur d' α -glucosidase pour sauvegarder la protéine delF508-CFTR	16
i) Biosynthèse des protéines <i>N</i> -glycanes et contrôle-qualité dans le RE.....	16
ii) Stratégies pour sauver la delF508-CFTR, hypothèse de l'équipe du Pr. Becq.....	17
1.1.3. Design de nouveaux chaperons pharmacologiques pour la mucoviscidose	19
i) Propriétés de la série DNJ.....	19
ii) Etudes sur la partie aglycone	21
iii) Conception d'inhibiteurs potentiels de glucosidase I et II du RE.....	22
1.1.4. Rétrosynthèse envisagée des composés.....	22
1.1.5. Diamination pallado-catalysées	23
i) Palladium	24
ii) Nickel.....	28
iii) Cuivre II.....	29
iv) Or	30
v) Sans métal, halogènes	32
1.1.6. Stratégie adoptée.....	35

1.1.7.	Synthèse du substrat test pour la réaction de diamination	35
i)	Synthèse du 2,3,4-tri- <i>O</i> -benzyl-D-xylopyranose 30	35
ii)	Accès au substrat de diamination.....	36
1.1.8.	Premiers essais de diamination	37
1.2.	Synthèse d'une librairie de chaperons pour la maladie de Gaucher par chimie click en série imino-xylytol.	42
1.2.1.	La maladie de Gaucher	42
i)	Définition et manifestation de la maladie de Gaucher	42
ii)	Traitements de la maladie	44
iii)	La thérapie chaperon.....	47
1.2.2.	Stratégie adoptée.....	54
1.2.3.	Synthèse du précurseur 66	57
i)	Synthèse du composé 67	58
ii)	Obtention de l'iminosucre 1-propargylé déprotégé 66	61
1.2.4.	Synthèse des composés les plus prometteurs par chimie click.....	64

Chapitre 2

Synthèse de nouveaux chaperons pharmacologiques multivalents 67

2.1.	Introduction	69
2.2.	La multivalence, un phénomène biologique dans les interactions sucre-lectine, premières applications.....	69
2.2.1.	La multivalence dans la nature	69
2.2.2.	Les modes de liaison et mécanismes de la multivalence	70
i)	L'effet chélate	71
ii)	L'effet d'agrégation des récepteurs, effet cluster	71
iii)	La liaison à un site secondaire	71
iv)	Les effets de concentration, phénomène de glissements.....	72
2.2.3.	Conception et structures des systèmes multivalents pour les interactions sucre-lectine.....	73
i)	Inhibition de l'hémagglutination du virus <i>influenza</i>	73
ii)	Inhibition de toxines bactériennes	74
2.2.4.	Structures multivalentes glycosylées, le cas des cyclodextrines	76
i)	Cyclodextrines monofonctionnalisées.	77

ii) Cyclodextrines polyfonctionnalisées sur une face	81
iii) Cyclodextrines polyfonctionnalisées sur les deux faces	85
2.2.5. Structures multivalentes glycosylées, les fullerènes C ₆₀	88
i) Synthèse de glycofullerènes monovalents	89
ii) Synthèse de glycofullerènes multivalents.....	93
2.3. Multivalence et inhibition de glycosidases.....	101
2.3.1. Les travaux du groupe de Johnson.....	101
2.3.2. Les travaux du groupe de Bols	103
2.3.3. Les travaux du groupe de Le Merrer	104
2.3.4. Les travaux des groupes d'Aerts et d'Overkleeft	105
2.3.5. Travaux du groupe de Gouin et Kovensky	106
2.3.6. Travaux récents de synthèse d'iminosucres multivalents.....	107
2.4. Conception des inhibiteurs multivalents pour l'inhibition des glycosidases.....	109
2.4.1. Introduction.....	109
2.4.2. Les différents paramètres.....	109
2.5. Synthèse des systèmes multivalents	111
2.5.1. Synthèse des charpentes	111
i) Fullerène	111
ii) Cyclodextrines	112
2.5.2. Synthèse des systèmes multivalents	118
i) Série DNJ.....	119
ii) Série modèle	129
iii) Série iminoxylitol	129
iv) Série DMJ	136

Chapitre 3

Évaluations biologiques des chaperons pharmacologiques mono- et multivalents

3.1. L'inhibition enzymatique	141
3.2. La multivalence pour l'inhibition de glycosidases	145
3.3. Maladie de Gaucher.....	154
3.3.1. Chaperons monovalents.....	154
3.3.2. Chaperons multivalents	159

i) Série DNJ	159
ii) Série Iminoxyitol	160
3.4. Mucoviscidose	161
Conclusion générale	163
Partie Expérimentale	167
GENERAL METHODS	169
SYNTHESIS AND ANALYTICAL DATA	170
Publications	225
Glossaire des composés synthétisés	

Abréviations et acronymes :

Ac	acétyl
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
ACN	acétonitrile
AgOTf	triflate d'argent
Asc.	ascorbate
Bn	benzyl
BnBr	bromure de benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Bu	butyl
CuAAC	copper catalyzed azoture alkyne cycloaddition
DCM	dichlorométhane
DIAD	diisopropylazodicarboxylate
DMAP	diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
DMJ	désoxymannojirimicine
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNJ	désoxynojirimicine
Et ₃ N	triéthylamine
éq.	équivalent
ERT	enzyme replacement therapy
GCase	β-glucocérébrosidase
GCS	glucosylcéramide synthase
GP	groupement protecteur
IPy ₂ BF ₄	tétrafluoroborate de bis(pyridine)iodonium
IC ₅₀	concentration pour diminuer la vitesse de la réaction de 50%
ITC	isothermal titration calorimetry
K _i	constante de dissociation du complexe enzyme/inhibiteur
mM	millimolaire
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight
Me	méthyl
MeOH	méthanol
MsCl	chlorure de mésyle
Nap	naphtylméthyl
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
nM	nanomolaire
Pd/C	palladium sur charbon
pM	picomolaire
Py	pyridine

RE	réticulum endoplasmique
RMN	résonance magnétique nucléaire
SRT	substrate reduction therapy
t.a.	température ambiante
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
TBAF	fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBAH	hydroxyde de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
Tos ou Ts	toluènesulfonyl
TsCl	chlorure de <i>p</i> -toluènesulfonyl
Troc	trichloroacétyl
TroCl	chlorure de trichloroacétyl
μM	micromolaire

Introduction générale

0.1. Historique

Les glucides ont une importance majeure dans une grande diversité de processus biologiques. Au cours de ces dernières années, les chercheurs se sont employés à comprendre ces nombreux processus dans lesquels les sucres sont engagés afin de répondre à différentes problématiques dans plusieurs domaines thérapeutiques. Ces processus incluent notamment des phénomènes de communication cellulaire ou de maturation de glycoprotéines. Pour ce faire, une partie des travaux a été consacrée à la synthèse de glycomimétiques, c'est-à-dire de mimes de sucres. Les modifications structurales apportées aux sucres ont pour objectif d'augmenter leur stabilité, leur biodisponibilité et leurs affinités vis-à-vis de cibles biologiques ce qui en fait des candidats attractifs pour le développement de sondes mécanistiques ou de médicaments. Parmi ces glycomimétiques, on peut citer différentes classes. Les carbasucres, dans lesquels l'oxygène endocyclique est remplacé par un méthylène ; les thiosucres dans lesquels il est remplacé par un atome de soufre ; les iminosucres dans lesquels il est remplacé par un atome d'azote ; les C-glycosides dans lesquels l'oxygène anomérique est remplacé par un carbone, etc.

Nous nous intéresserons dans ce travail à une classe bien spécifique : les iminoalditols plus couramment appelés **les iminosucres**.¹ Ils se définissent comme une classe de glycomimétiques dans lesquels l'atome d'oxygène endocyclique du sucre est remplacé par un atome d'azote. On peut les regrouper communément en 5 classes (Figure 1) qui se différencient par leur squelette (monocyclique ou bicyclique) et par la taille des cycles (5 ou 6 membres). Ces cycles peuvent être substitués par une grande diversité de groupements fonctionnels, majoritairement des fonctions hydroxyles mais également des acides carboxyliques, des amides...

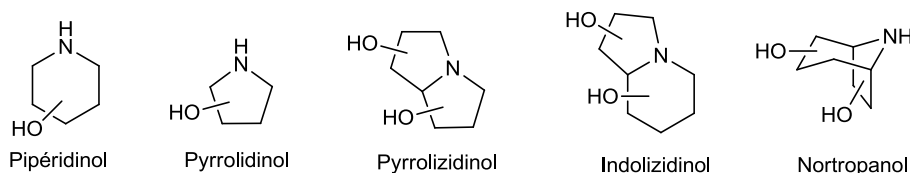


Figure 1. Les cinq grandes classes d'iminosucres

Les iminosucres sont connus par les chimistes depuis les années 60. Les premiers travaux dans le domaine étaient des purs exercices académiques qui consistaient à voir l'influence du remplacement de l'oxygène endocyclique des sucres par d'autres hétéroatomes, comme le soufre ou l'azote. Parmi les chimistes qui ont contribué à ces premiers efforts synthétiques on note Hanessian² et Paulsen³. La découverte des propriétés biologiques des iminosucres remonte à l'isolement du 5-amino-5-désoxy-D-glucose (nojirimycin **1**) de plusieurs sources de *Streptomyces*⁴, notamment *Str. roseochromogenes* R-468, *Str. lavendulae* SF-425 et *Str.*

¹P. Compain et O. R. Martin, (Eds.), *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, Wiley, Chichester, **2007**.

² S. Hanessian, T. H. Haskell, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2604-2610.

³ H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1*, 454.

⁴ T. Nishikawa, N. Ishida, *J. Antibiot. A*, **1965**, *18*, 132-133.

nojiriensis n. sp. SF-426 qui lui a donné son nom. Sa caractérisation a été faite en 1966 par S. Inouye⁵ qui a aussi découvert ses propriétés antibiotiques. De nombreux autres iminosucres ont pu être isolés de plantes tels que la fagomine **3**.⁶ La moranoline⁷ a été isolée à partir du mûrier et a pu être identifiée comme étant la 1-désoxynojirimicine (DNJ) **2** déjà synthétisée chimiquement par Paulsen⁸ à partir du L-sorbofuranose. Parallèlement un autre composé appartenant à la classe des pyrrolidines le 2,5-didésoxy-2,5-imino-D-mannitol (DMDP) **4** a été isolé à partir d'une plante légumineuse tropicale, *Derris elliptica*.⁹

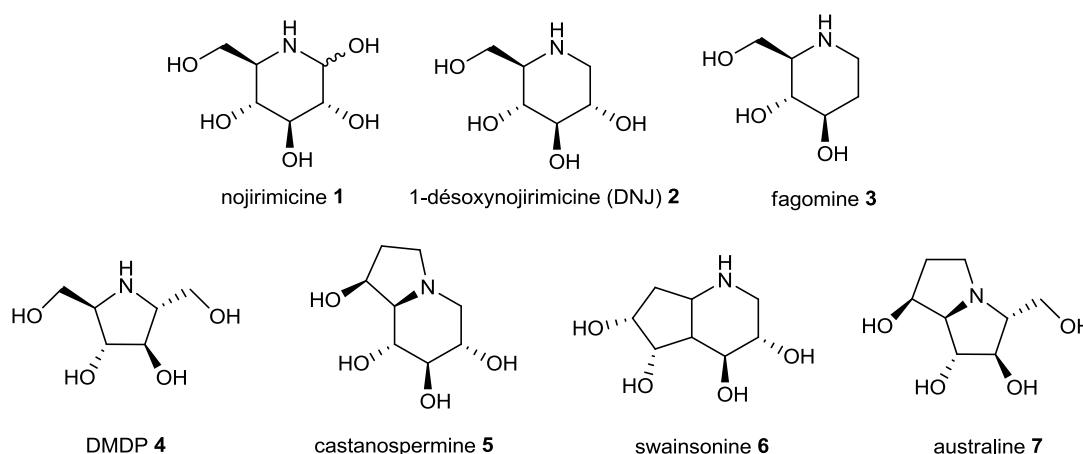


Figure 2. Exemples d'iminosucres naturels.

Peu de temps après, les composés bicycliques ont fait leur apparition avec l'isolement de la swainsonine¹⁰ **6** et de la castanospermine¹¹ **5** dans la classe des indolizidines suivi plus tard par les pyrrolizidines comme par exemple l'australine¹² **7** isolée à partir des fruits toxiques du *Castanospermum australe*, un châtaigner d'Australie. Plus d'une centaine de composés de type iminosucre ont pu être isolés à ce jour à partir de plantes, de bactéries et de champignons.¹³

Des évaluations biologiques ont été menées sur cette nouvelle classe de molécules dans différents domaines dans les années 1980 par l'industrie pharmaceutique par exemple comme agents anti-cancéreux ou anti-HIV. Mais ce sont leurs propriétés comme inhibiteurs de glycosidases découvertes par la société Bayer en 1976 qui ont aboutit à la première application

⁵ a) S. Inouye, T. Tsuruka, T. Niida, *J. Antibiot. A*, **1966**, *19*, 288-292, b) S. Inouye, T. Tsuruka, T. Ito, T. Niida, *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 2125-2144.

⁶ M. Koyama, S. Sakamura, *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1111-1112.

⁷ M. Yagi, T. Kouno, Y. Aoyagi, H. Murai, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **1976**, *50*, 571-572.

⁸ H. Paulsen, I. Sangster, K. Heyns, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 802-8015.

⁹ A. Welter, J. Jadot, G. Dardenne, M. Marlier, J. Casimir, *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 747-749.

¹⁰ S. M. Colegate, P. R. Dorling, C. R. Huxtable, *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257-2264.

¹¹ L. D. Hohenschutz, E. A. Bell, P. J. Jewess, D. P. Leworthy, R. J. Pryce, E. Arnold, J. Clardy, *Phytochemistry*, **1981**, *20*, 811-814.

¹² R. J. Molyneux, M. Benson, R. Y. Wong, J. E. Tropea, A. D. Elbein, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1198-1206.

¹³ Pour des revues sur les iminosucres naturels voir: a) N. Asano, R. J. Nash, R. J. Molyneux, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 1645-1680 ; b) A. A. Watson, G. W. J. Fleet, N. Asano, R. J. Molyneux, R. J. Nash, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265-295.

thérapeutique des iminosucres avec le Glyset™ (diabète de type 2).¹⁴ En fait, ces propriétés étaient déjà connues depuis bien longtemps. En effet, les propriétés des feuilles de mûriers qui contiennent comme principe actifs différents iminosucres étaient déjà exploitées dans la médecine traditionnelle chinoise pour soigner le « Xiao-ke », c'est-à-dire le diabète. Les glucosidases intestinales réalisent l'hydrolyse de polysaccharides en libérant du glucose qui est absorbé par les parois intestinales. Les iminosucres contenus dans les décoctions des feuilles de mûrier régulaient le taux de glucose dans le sang en inhibant ces hydrolyses.

0.2. Les iminosucres, des inhibiteurs de glycosidases

Depuis les années 60, les chercheurs du domaine ont développé de nombreuses voies synthétiques¹⁵ pour pouvoir accéder facilement à une diversité de composés comme agents thérapeutiques contre les multiples maladies dans lesquelles des glycosidases sont impliquées.^{1,14} Les iminosucres ont également montré une activité inhibitrice d'autres enzymes, dont notamment les glycosyltransférases.¹⁶ Cependant, dans cette thèse nous nous intéresserons à leur activité principale comme inhibiteurs de glycosidases.

0.2.1. Les glycosidases

Les glycosidases sont une famille d'enzymes présentes chez presque tous les êtres vivants et qui ont un rôle capital dans de nombreux processus biologiques. On en connaît aujourd'hui environ 86000.¹⁷ Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. La classification CAZy (carbohydrate-active enzyme) les regroupe en 123 familles en fonction de leur domaine catalytique qui comprend 120 acides aminés. Ces familles sont elles-mêmes regroupées en 14 clans qui rassemblent des caractéristiques communes comme le mécanisme d'action ou la configuration du carbone anomérique du substrat.

0.2.2. Mécanismes d'action des glycosidases

La liaison glycosidique est la liaison covalente des polymères biologiques la plus stable. Le temps de demi-vie pour l'hydrolyse spontanée de la liaison glycosidique dans la cellulose, est en effet estimé à 4,7 millions d'années !¹⁸ Les glycosidases catalysent cette réaction d'hydrolyse avec des constantes de vitesse jusqu'à 1000 s⁻¹ ce qui en fait des catalyseurs impressionnants d'efficacité. Depuis le milieu des années 50, les chercheurs se sont intéressés à la compréhension des mécanismes d'action de ces enzymes. Aujourd'hui les glycosidases peuvent être sommairement séparées en deux grandes classes en fonction de leur mécanisme. On distingue en effet des glycosidases avec rétention de configuration ou inversion de configuration au niveau du

¹⁴ a) A. E. Stütz, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley, Weinheim, **1999**; b) V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

¹⁵ B. La Ferla, L. Cipolla, F. Nicotra dans P. Compain et O. R. Martin, (Eds.), *Iminosugars : From Synthesis to Therapeutic Applications*, Wiley, Chichester, **2007**, pp. 25-61.

¹⁶ P. Compain, O. R. Martin, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 541-560.

¹⁷ D. G. Naumoff, *Biochemistry (Moscow)*, **2011**, *76*, 622-635.

¹⁸ R. Wolfenden, X. Lu, G. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814-6815.

centre anomérique. Koshland¹⁹ a été le premier à postuler deux mécanismes avec dans le cas du mécanisme avec rétention de configuration, deux substitutions successives et intermédiairement la formation d'une liaison enzyme-substrat et dans le cas du mécanisme avec inversion de configuration une seule substitution. Vernon²⁰ a, lui, proposé le passage par un intermédiaire réactionnel oxocarbénium.

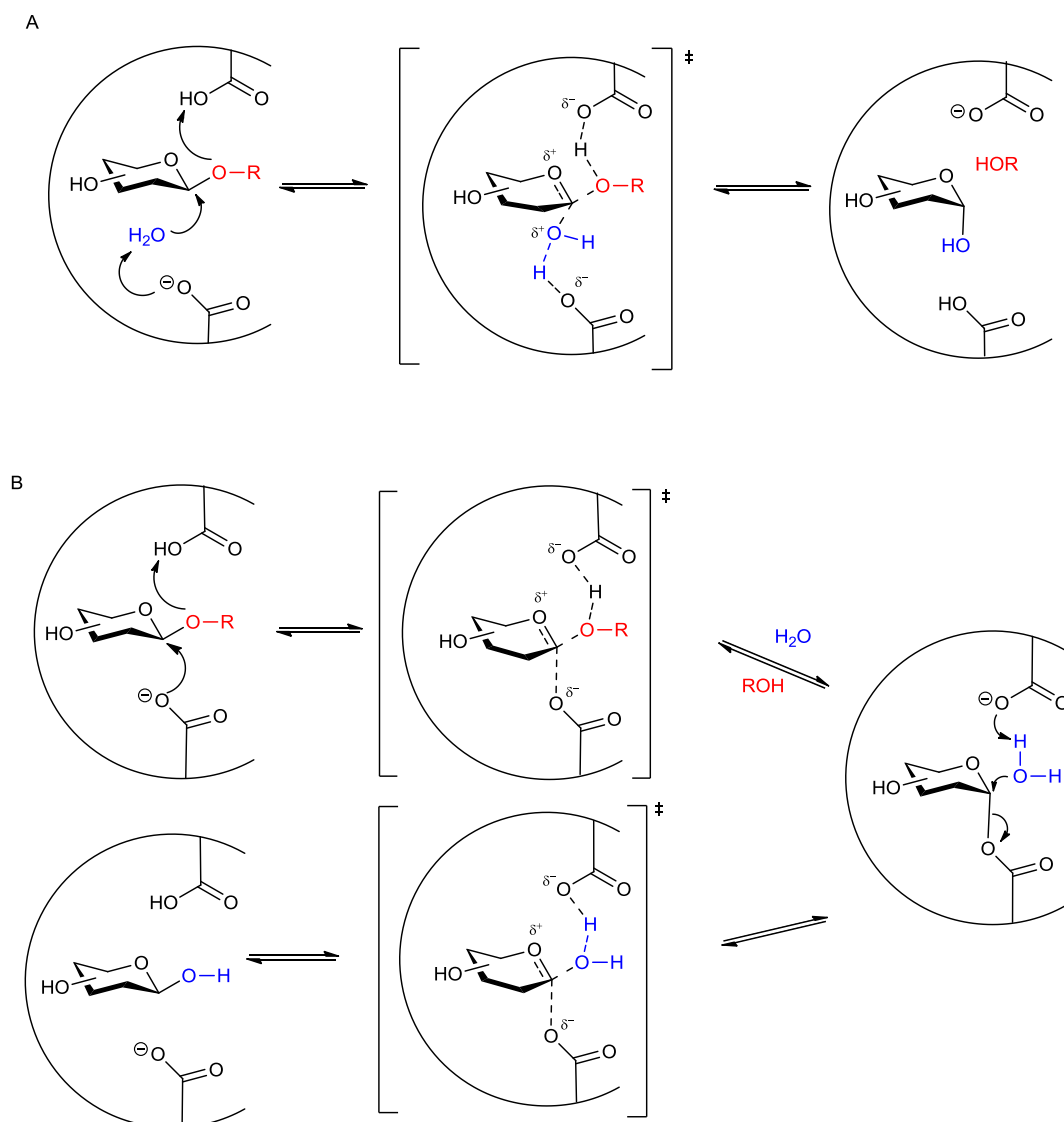


Schéma 1. Mécanismes généraux des glycosidases avec inversion (A) et rétention (B) de configuration.

Ces mécanismes postulés sont aujourd'hui bien établis²¹ et font intervenir deux fonctions carboxyliques situées à l'opposé l'une de l'autre dans le site actif de la glycosidase. Dans le cas de l'hydrolyse avec inversion de configuration (Schéma 1 A), les résidus carboxyliques sont situés à une distance d'environ 10,5 Å. L'un des deux acides carboxyliques joue le rôle de catalyseur acide pour activer la liaison glycosidique. Le deuxième, sous sa forme carboxylate permet la

¹⁹ D. E. Koshland, *Biol. Rev.* **1953**, 28, 416-436.

²⁰ C. A. Vernon, B. Banks, *Biochem. J.* **1963**, 86, Proc. Biochem. Soc. 7P.

²¹ D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 11-18.

déprotonation de la molécule d'eau qui peut s'insérer dans le site actif de l'enzyme grâce à la distance suffisamment importante entre les dérivés carboxyliques. L'hydrolyse se fait alors avec un seul état de transition de type oxocarbenium. Dans le cas de l'hydrolyse avec rétention de configuration (Schéma 1 B), la distance séparant les deux acides carboxyliques est plus petite de l'ordre de 5,5 Å. Un acide carboxylique joue de nouveau le rôle de catalyseur acide pour activer la liaison glycosidique mais cette fois-ci, le site actif est trop exigu pour que la molécule d'eau s'incère et c'est le carboxylate qui va être le nucléophile et permettre le départ du résidu alcool. Une liaison covalente se forme alors entre le carbone anomérique et l'oxygène du carboxylate. Dans un deuxième temps, la molécule d'eau peut alors rentrer, être déprotonée par l'autre carboxylate qui joue maintenant le rôle de base et attaquer la position anomérique pour donner le résidu sucre avec une configuration inversée au niveau du carbone anomérique. Ce deuxième mécanisme passe par deux états de transition de type oxocarbenium.

Ces deux mécanismes permettent une première approche pour comprendre les propriétés inhibitrices de glycosidases observées pour des iminosucres. En effet, ceux-ci miment le substrat des glycosidases avec leur structure polyol et l'atome d'azote leur confère une grande affinité avec le site actif. Celui-ci peut se protoner à pH physiologique et générer alors de fortes interactions électrostatiques avec les carboxylates du site actif des glycosidases (Figure 3). Cela fait des iminosucres des inhibiteurs compétitifs réversibles des glycosidases¹⁴ avec des inhibitions qui peuvent être très importantes (K_i pouvant atteindre le pM²²).

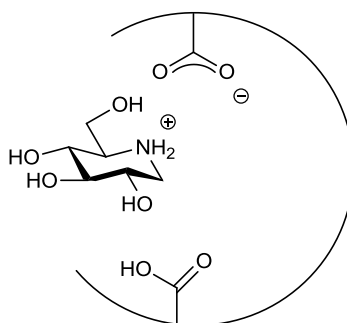


Figure 3. Interactions d'un iminosucre avec le site actif des glycosidases

0.2.3. Les iminosucres comme inhibiteurs de glycosidases : des agents thérapeutiques prometteurs

Au niveau des cellules, les glycosidases sont impliquées dans les processus de biosynthèse et de maturation des glycoprotéines, mais également dans le catabolisme des glycolipides et la dégradation des glucides complexes en sucres simples comme le glucose.

Les applications thérapeutiques des inhibiteurs de glycosidases vont donc se situer dans des domaines variés se traduisant par une grande diversité de maladies visées comme : le diabète,

²² C.-F. Chang, C.-W. Ho, C.-Y. Wu, T.-A. Chao, C.-H. Wong, C.-H. Lin, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1301-1306.

le cancer, les infections virales, les maladies génétiques rares dont les maladies lysosomales et la mucoviscidose.²³ Quelques exemples seront détaillés ici.

L'inhibition des glucosidases intestinales représente une stratégie importante dans la régulation du taux de sucre dans le sang pour traiter les complications associées au diabète de type 2. L'acarbose, un tétrasaccharide possédant une unité carbasucre, inhibiteur puissant de la sucrase intestinale, a été mis sur le marché en 1990 à cet effet sous le nom de Glucobay[®]. En 1996, le miglitol, commercialisé sous le nom de Glyset[®] a été mis sur le marché pour le traitement des complications associées au diabète de type 2.²⁴ C'est le premier médicament basé sur une structure de type iminosucre à avoir été commercialisé.

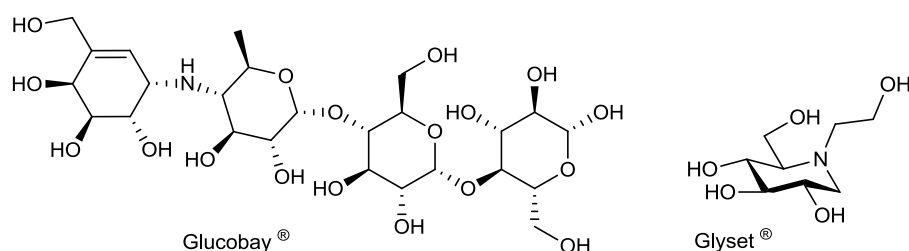


Figure 4. Antidiabétiques

Les iminosucres ont également des activités antivirales. Le Celgosivir[®] un dérivé de la castanospermine **5** est à un stade d'essais cliniques avancé comme agent antiviral contre le virus de l'hépatite C.²⁵ Cet iminosucre bicyclique inhiberait différentes glycosidases et altérerait la maturation de glycoprotéines virales. Ceci causerait le mauvais repliement de certaines protéines d'enveloppe du virus et réduirait sa production.

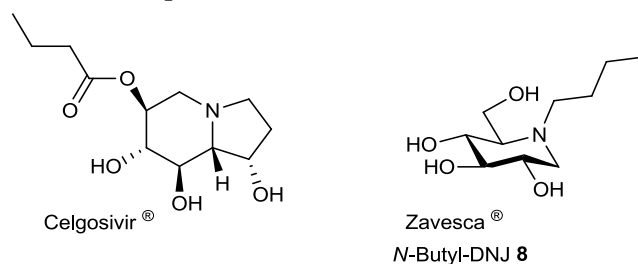


Figure 5.

Les applications comprennent aussi des maladies génétiques rares. Notamment elles incluent des maladies lysosomales dans lesquelles des glycosphingolipides (GSL) s'accumulent dans les lysosomes, des organites cellulaires, et ce, en raison de la déficience de certaines glycosidases. Le Zavesca[®] (miglustat, *N*-butyl DNJ **8**) est sur le marché depuis 2006 pour le traitement de la maladie de Gaucher de type I (déficience de la β -glucocérébrosidase, GCCase). Cet iminosucre agit comme inhibiteur de la glucosylcéramide synthase (GCS). Cette glycosyltransférase est en effet impliquée dans la biosynthèse du glycosphingolipide qui s'accumule de part la déficience de la GCCase.²⁶

²³Pour une revue récente sur les perspectives thérapeutiques des iminosucres, voir: G. Horne, F. X. Wilson, *Prog. Med. Chem.* **2011**, *50*, 135-176.

²⁴A. Mitrakou, N. Tountas, A. E. Raptis, R. J. Bauer, H. Schulz, S. A. Raptis, *Diabet. Med.* **1998**, *15*, 657-660.

²⁵L. A. Sorbera, J. Castaner, L. Garcia-Capdevilla, *Drugs Future* **2005**, *30*, 545-552.

²⁶L. A. Sorbera, J. Castaner, M. Bayes, *Drugs Future* **2003**, *28*, 229-236.

0.3. Propriété chaperon des iminosucres

Aujourd'hui un autre concept a émergé pour le traitement des maladies génétiques rares dans lesquelles sont impliquées des glycosidases déficientes mal repliées : la notion de chaperon pharmacologique.²⁷ Cette notion est apparue récemment comme une piste très prometteuse. Il a en effet été montré que des molécules de faibles poids moléculaires, inhibiteurs réversibles des glycosidases mal repliées impliquées dans ces maladies, avaient la capacité de stabiliser la structure tridimensionnelle de ces protéines et d'éviter la destruction de celles-ci par les mécanismes de contrôle-qualité du réticulum endoplasmique (RE). Ainsi, ces chaperons permettent de récupérer une partie de l'activité enzymatique de ces protéines mal repliées mais encore catalytiquement actives. Le premier exemple a été démontré par Fan et Asano en 1999²⁸ avec la 1-désoxygalactonojirimycine, inhibiteur et chaperon pharmacologique d'une galactosidase impliquée dans la maladie de Fabry, une maladie lysosomale.

Dans ce travail la notion de chaperon pharmacologique sera étendue à toute molécule permettant d'éviter à des protéines mal repliées d'être détruites par le système contrôle-qualité du RE. On inclut ainsi dans le terme de chaperon pharmacologique les molécules qui agissent directement sur les glycosidases mal repliées (maladies lysosomales), mais également les inhibiteurs des glycosidases impliquées dans les mécanismes de contrôle-qualité du RE, notamment les α -glucosidases I et II du RE qui entraînent la destruction des protéines mal repliées, comme dans le cas de la mucoviscidose.

²⁷ T. Kolter, M. Wendeler, *ChemBioChem* **2003**, 4, 260-264.

²⁸ J.-Q. Fan, S. Ishii, N. Asano, Y. Suzuki, *Nat. Med.* **1999**, 5, 112-115.

0.4. Plan du travail de thèse

L'objectif général de ce travail de thèse est la mise en évidence de chaperons pharmacologiques originaux pour le traitement de deux maladies génétiques rares : la maladie de Gaucher et la mucoviscidose.

Dans **un premier chapitre**, nous présenterons deux stratégies innovantes d'accès à des chaperons pharmacologiques « **monovalents** ». La première stratégie consiste en l'utilisation d'une méthodologie récente de diamination d'alcènes pallado-catalysée pour la synthèse rapide de produits en série imino-*C*-glycosides possédant un groupement de type *N*-acétamido en position aglycone. Le but est d'identifier de nouveaux inhibiteurs efficaces et sélectifs des glucosidases cellulaires ce qui constituerait une piste vers la découverte d'un traitement pour la mucoviscidose.

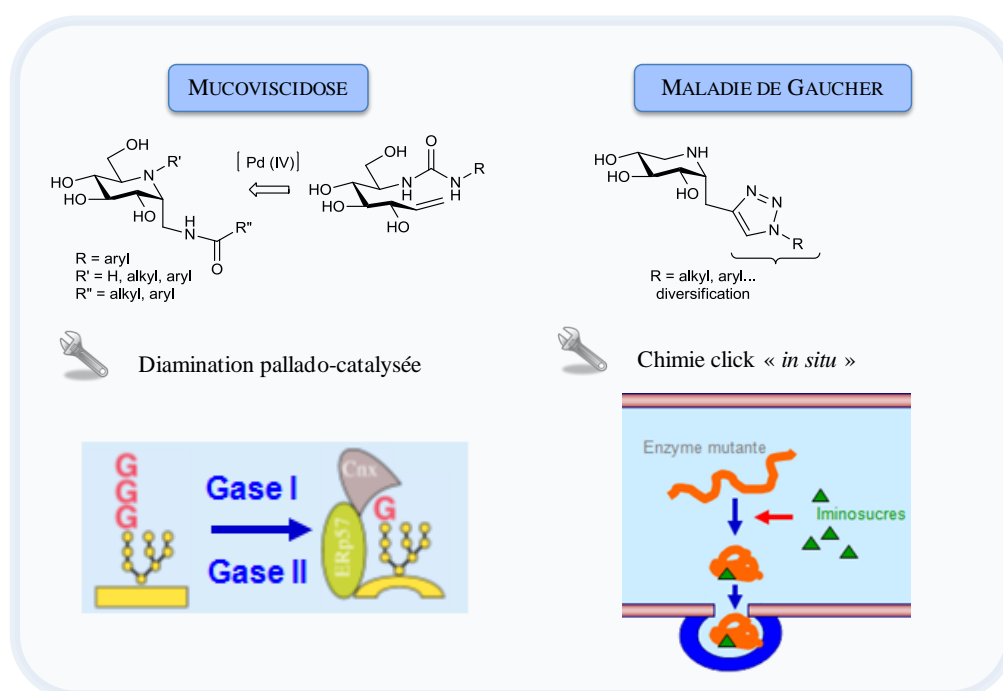


Figure 6. Chapitre 1, les chaperons pharmacologiques monovalents

La seconde stratégie consiste en l'identification de chaperons puissants de la β -glucocérébrosidase (GCCase) à partir d'une tête de série développée au laboratoire. Cette stratégie repose sur l'accès rapide, par réaction de cycloaddition azotures-alcynes « *in situ* », à une bibliothèque de produits avec une grande diversité dans la partie aglycone.

Dans **un deuxième chapitre**, nous nous intéresserons à la synthèse d'minosucre **multivalents**. En effet, si l'impact de la multivalence a été très étudié dans le cadre des interactions de type lectine-sucre avec des gains spectaculaires d'activité,²⁹ très peu d'études se sont intéressées à l'effet de la multivalence sur l'inhibition des glycosidases.

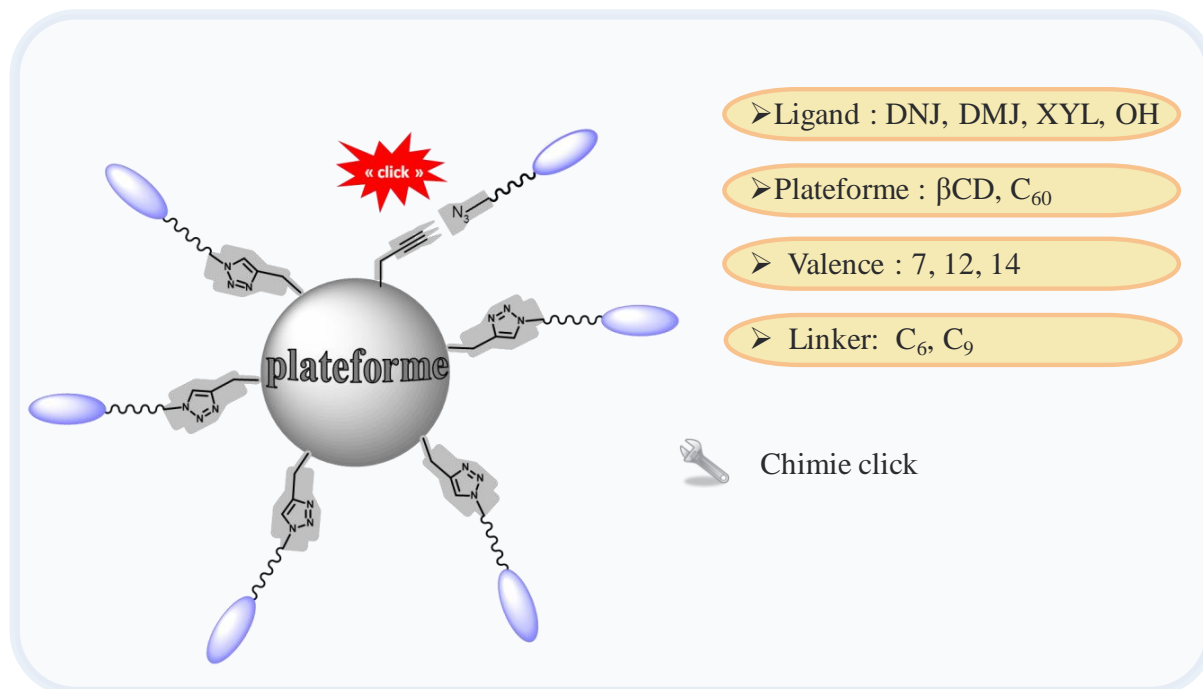


Figure 7. Chapitre 2, les chaperons pharmacologiques multivalents.

Plusieurs produits multivalents ont été ainsi synthétisés en faisant varier divers paramètres comme la structure de la plateforme, le « linker » et la valence. Le choix du ligand a été adapté aux cibles biologiques visées. La chimie click a été utilisée comme étape clé lors de nos synthèses et a permis d'accéder de façon efficace à des structures multivalentes complexes.

²⁹ S.-K. Choi, *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications*, Wiley, Hoboken, **2004**.

INTRODUCTION

Les évaluations biologiques de nos composés mono- et multivalents seront présentées dans **un troisième chapitre**. Dans un premier temps, les iminosucres multivalents ont été évalués sur un panel de glycosidases commerciales afin de mettre en évidence un effet multivalent sur l'inhibition de cette classe d'enzymes. Puis, les iminosucres mono- et multivalents ont été évalués comme chaperons pour le traitement de la maladie de Gaucher (cible : β -glucocérébrosidase, GCase) et la mucoviscidose (cibles : α -glucosidases I et II du réticulum endoplasmique, RE). Ces premières applications de l'effet multivalent à des glycosidases d'intérêt thérapeutique ont donné des résultats préliminaires encourageants.

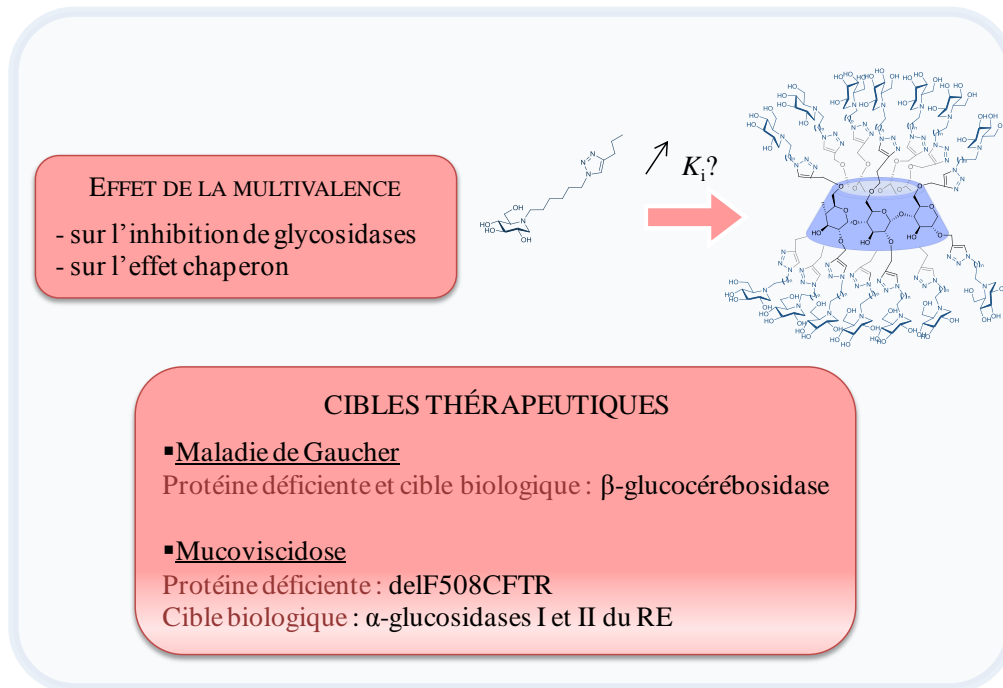
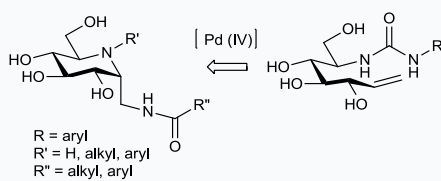


Figure 8. Chapitre 3, Evaluations biologiques des iminosucres synthétisés

Chapitre 1

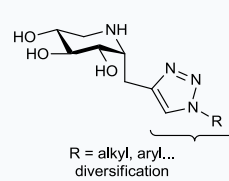
Synthèse de nouveaux chaperons pharmacologiques « monovalents »

MUCOVISCIDOSE

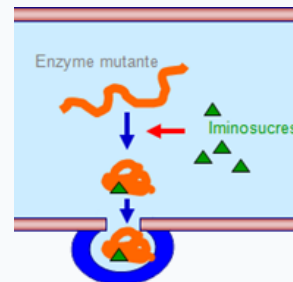


Diamination pallado-catalysée

MALADIE DE GAUCHER



Chimie click « *in situ* »



1.1. Utilisation d'une méthodologie de diamination pallado-catalysée : vers la synthèse de nouveaux iminosucres pour le traitement de la mucoviscidose.

1.1.1. La mucoviscidose

La mucoviscidose ou fibrose kystique est une maladie génétique héréditaire à transmission autosomique. C'est la maladie rare héréditaire la plus répandue dans la population caucasienne. En 2010, on compte en France 5792 patients.³⁰ L'âge moyen de décès des patients est seulement de 29 ans. L'incidence de cette maladie sur la population en France est de 1 sur 2500 naissances environ. Cette maladie est connue depuis le Moyen Age mais n'a été décrite pour la première fois par le pédiatre Fanconi qu'en 1936.³¹

C'est une maladie qui touche tous les tissus épithéliaux et affecte donc de nombreux organes. Cette pathologie entraîne chez les malades des anomalies respiratoires sévères d'obstruction des bronches (mucus visqueux qui a donné son nom à la maladie) et de non-évacuation des bactéries. Ces anomalies engendrent la plupart des décès. D'autres manifestations graves sont associées à cette maladie notamment des anomalies digestives. Il n'existe malheureusement aucun traitement curatif à ce jour pour cette maladie, les traitements actuels étant surtout symptomatiques. Il s'agit essentiellement de kinésithérapie respiratoire, de fluidification du mucus et de traitement anti-inflammatoires et antibiotiques pour les manifestations pulmonaires.

La maladie est due à différentes mutations sur le chromosome 7 du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) codant pour la protéine CFTR qui est une protéine de transport de type canal chlorure au sein des cellules épithéliales.

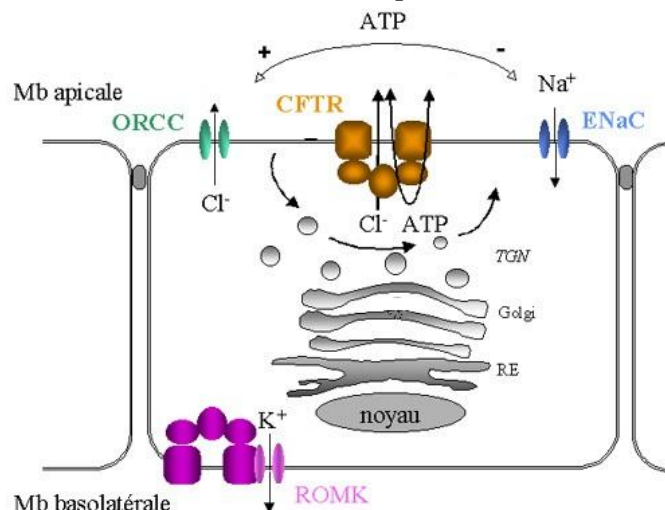


Figure 9. Protéines de transport dans les cellules épithéliales, d'après Schwiebert.³²

³⁰ *Registre Français de la Mucoviscidose (RFM) : Bilan des données 2010 de l'Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM)*, Paris, Vaincre la Mucoviscidose et Institut National d'Études Démographiques (INED), **2012**.

³¹ G. Fanconi, E. Uehlinger, C. Knauer, *Wien Med. Wschr.* **1936**, 86, 753-756.

³² E. M. Schwiebert, D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, W. B. Guggino, *Physiol. Rev.* **1999**, 79, S145-S166.

Les protéines de transport en général sont responsables des flux d'ions, d'acides aminés, de sucres et de molécules d'eau (Figure 9).

En plus de son rôle de transporteur d'ions chlorure, il a été montré entre autres, que la protéine CFTR avait un rôle dans la régulation du canal sodique ENaC (épithélial Na⁺ channel) situé également dans la membrane apicale des cellules épithéliales.³³ La déficience de la protéine CFTR entraîne donc au niveau des poumons, le défaut de transport des ions chlorures ainsi qu'une hyperabsorption des ions sodium ce qui participe à la déshydratation du mucus respiratoire³⁴ et entraîne les affections pulmonaires observées.

La protéine CFTR est constituée de deux fois six segments transmembranaires (TMD), deux domaines de liaisons aux nucléotides NBD (Nucleotide Binding Domain) et un domaine régulateur (domaine R) (Figure 10).³⁵ Sa biosynthèse³⁶ commence par la formation de sa chaîne protéique par traduction de l'ARNm au sein du ribosome. La protéine CFTR est alors transformée dans le Reticulum Endoplasmique (RE).

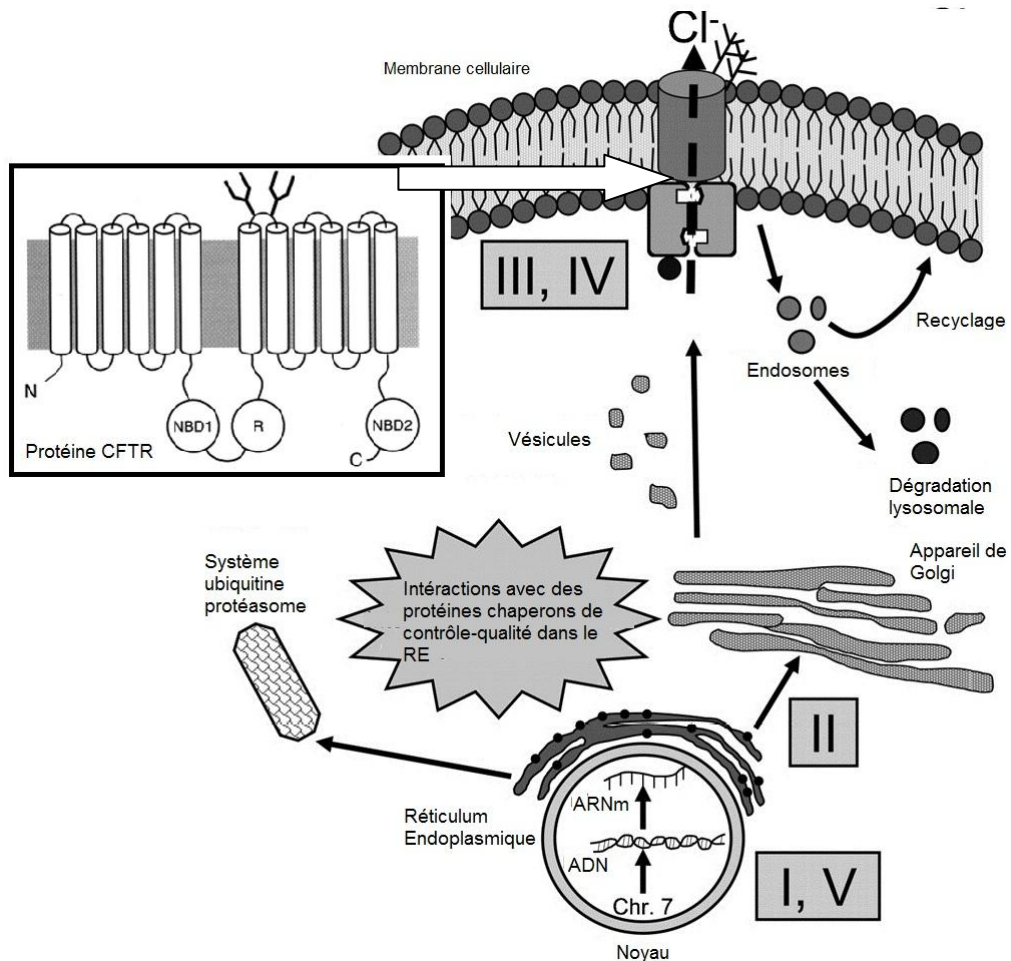


Figure 10. Structure de la protéine CFTR schéma de sa biosynthèse, classes des mutations.³⁷

³³ M. Mall, M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber, K. Kunzelmann, *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 15-21.

³⁴ M. R. Knowles, M. J. Stutts, A. Spock, N. Fisher, J. T. Gatzky, R. C. Boucher, *Science* **1983**, *221*, 1067-1070.

³⁵ D. N. Sheppard, M. J. Welsh *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S23-S45.

³⁶ R. R. Kopito, *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S167-S173.

³⁷ a) T.F. Scanlin, M. C. Glick, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 241-253. b) M. P. Rogan, D. A. Stoltz, D. B. Hornick, *Chest* **2011**, *6*, 1480-1490.

Pendant cette maturation, des protéines chaperons lui sont associées pour prévenir des erreurs de repliements et éviter les phénomènes d'agrégation, elle acquiert alors sa conformation de protéine canal avec l'assemblage correct de ses sous-unités. La protéine CFTR arrive ensuite au niveau de l'appareil de Golgi où les transformations finales sont réalisées. Elle est ensuite dirigée par un système de vésicules vers la membrane plasmique.

Depuis la découverte du gène codant pour la protéine CFTR³⁸ en 1985 et son isolement en 1989, plus de 1700 mutations de ce gène ont été recensées. Ces mutations sont regroupées en différentes classes en fonction de l'endroit où elles interviennent dans la synthèse et du dysfonctionnement de la protéine CFTR qu'elles entraînent (Figure 10) :

classe I : défaut de synthèse ; classe II : défaut de maturation ; classe III : défaut de régulation ; classe IV : défaut de conduction ; classe V : défaut de stabilité de l'ARNm

La mutation la plus répandue dans les populations caucasiennes est une mutation de classe II, qui concerne 70% des patients: la mutation delF508-CFTR. Il s'agit de la délétion d'une phénylalanine en position 508 du domaine NBD1 du CFTR. Cette mutation perturbe le processus de maturation de la protéine au niveau du RE et donc son repliement en particulier au niveau du domaine NBD1. Ceci provoque sa dégradation par, entre autres, le protéasome. Toutefois, si la protéine est surexprimée, il a été constaté qu'elle fonctionnait encore comme canal chlorure. Son fonctionnement est malgré tout amoindri.³⁹ Ce résultat suggère cependant que si on parvient à réadresser la protéine mal repliée à la membrane apicale par le biais d'agents pharmacologiques on peut récupérer une partie de son activité de transport.

C'est pourquoi les traitements pharmacologiques aujourd'hui envisagés sont de deux types :

- des correcteurs de CFTR capables de sauver les protéines delF508-CFTR des processus de dégradation et d'augmenter leur quantité au niveau des membranes des cellules épithéliales
- des potentiateurs de CFTR afin d'augmenter l'activité des protéines défectueuses delF508-CFTR

Depuis 1994 un grand nombre d'activateurs et de potentiateurs de CFTR ont été décrits.⁴⁰ Comme les raisons du dysfonctionnement ainsi que de la dégradation de la protéine delF508-CFTR sont encore très mal connues, ces activateurs et potentiateurs ont souvent été mis en évidence par criblages de banques de molécules et les biologistes tentent aujourd'hui de comprendre leurs différents modes d'action.

³⁸ L. C. Tsui, M. Buchwald, D. Barker, J. C. Braman, R. Knowlton, J. W. Schumm, H. Eiberg, J. Mohr, D. Kennedy, N. Plavsic *et al.* *Science* **1985**, 230, 1054-1057.

³⁹ W. Dalemans, P. Barbry, G. Champigny, S. Jallat, K. Dott, D. Dreyer, R. G. Crystal, A. Pavirani, J.-P. Lecocq, M. Lazdunski, *Nature* **1991**, 354, 526-528.

⁴⁰ Revue sur les correcteurs et potentiateurs: F. Becq, M. A. Mall, D. N. Sheppard, M. Conese, O. Zegarra-Moran, *J. Cyst. Fibros.* **2011**, 10, S129-S145.

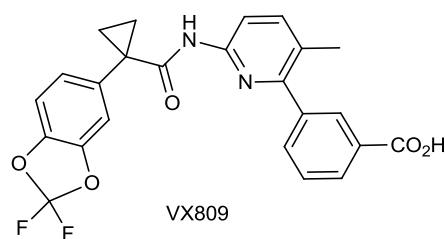


Figure 11 Composé VX809 en phase d'essai clinique II.

Aujourd'hui plusieurs activateurs sont en phase d'essais cliniques dont par exemple le « VX 809 » (Figure 11) en phase II⁴¹ c'est-à-dire des essais cliniques sur 100 à 300 patients.

1.1.2. Un inhibiteur d' α -glucosidase pour sauvegarder la protéine delF508-CFTR

Récemment, il a été montré par l'équipe du Pr. Becq que le miglustat, la *N*-butyl-DNJ **8** (commercialisé sous le nom de Zavesca[®] pour la maladie de Gaucher) (Figure 13), était un correcteur de delF508-CFTR.⁴² Ce composé permettrait en effet, de sauvegarder la protéine mutante delF508-CFTR des mécanismes de dégradation dans la cellule. Pour expliquer quels mécanismes pourraient être à l'origine de son défaut d'adressage, il est nécessaire de bien comprendre les étapes de biosynthèse des protéines *N*-glycanes (dont fait partie la protéine CFTR) expliquées dans le paragraphe suivant.

i) Biosynthèse des protéines *N*-glycanes et contrôle-qualité dans le RE.

Au sein du réticulum endoplasmique, les mécanismes de contrôle qualité assurent l'assemblage et le repliement des protéines.⁴³ Les chaînes protéiques sont transférées *via* un translocon au sein du lumen du RE après leur formation dans le ribosome. Simultanément, une oligosaccharyltransférase glycosyle le résidu asparagine d'une chaîne d'acides aminés Asn-X-Ser/Thr (X= acide aminé sauf la proline) de la protéine et forme ainsi la protéine *N*-glycane. La partie glycane (Glc₃Man₉GlcNAc₂) permet alors le repliement correct du polypeptide⁴⁴ en le stabilisant et en servant de « marqueur » pour permettre l'interaction avec différentes glycosidases, glycosyltransférases et lectines essentielles à son développement correct et à son transport vers l'appareil de Golgi. La protéine *N*-glycane formée rentre donc dans le cycle de contrôle qualité du RE (Figure 12). Deux unités glucoses sont retirées successivement de la partie glycane par les α -glucosidases I et II du RE. Les protéines chaperones calnexine et calréticulum se fixent alors sur la protéine (interactions calcium-dépendantes) et permettent alors son repliement

⁴¹ Voir le site internet du groupe Vertex : www.vrtx.com

⁴² C. Norez, S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, F. Becq, *FEBS Lett.* **2006**, 580, 2081-2086.

⁴³ L. Ellgaard, A. Helenius, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**, 4, 181-191.

⁴⁴ A. Helenius, M. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 1019-1049.

correct grâce, entre autres, à la formation d'une liaison bisulfite avec l'aide de la thiol-disulphide oxidoreductase ERp57.

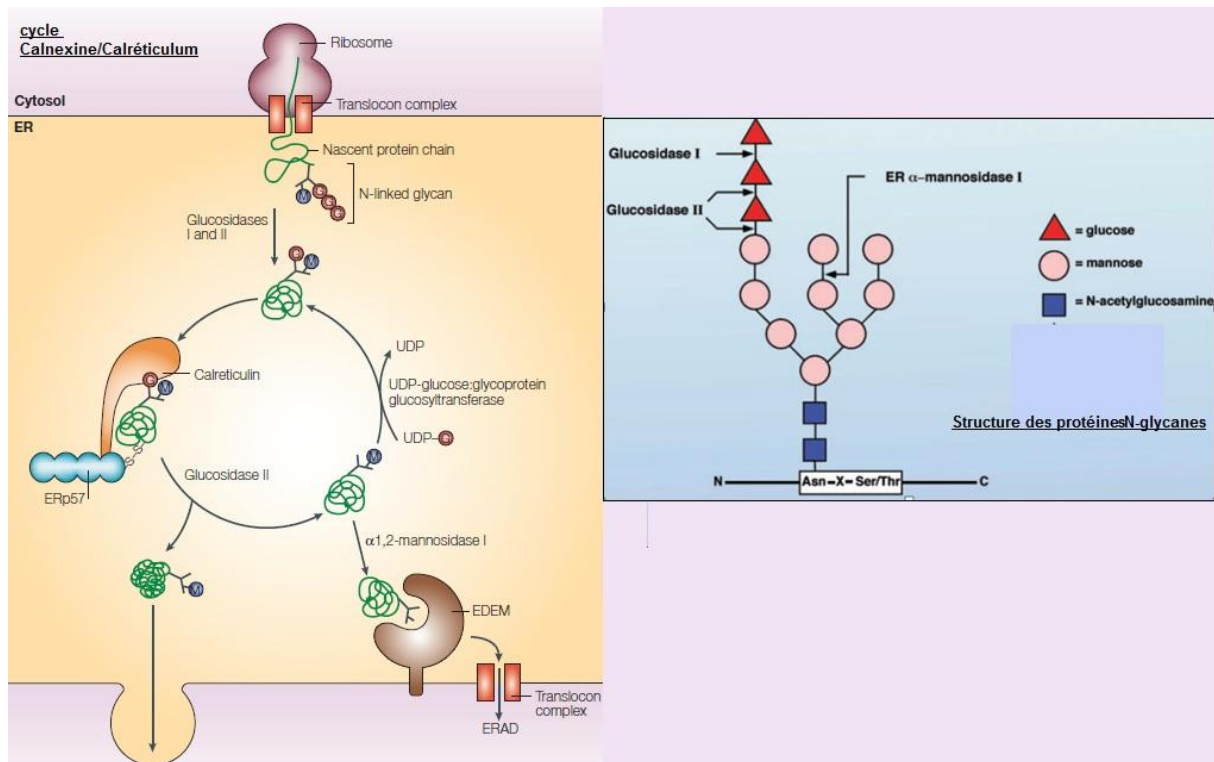


Figure 12. Le cycle calnexine.⁴³

L' α -glucosidase II du RE coupe ensuite le dernier résidu glucose et met fin aux interactions avec la calnexine et le calréticulum ce qui permet l'extraction de la protéine vers l'appareil de Golgi. Si celle-ci n'est pas correctement repliée, un nouveau résidu glucose lui est transféré et celle-ci rentre à nouveau en interaction avec la calnexine. Au terme de cette interaction, si la protéine est encore mal repliée, le résidu mannose est coupé par une α -1,2-mannosidase du RE et la protéine est alors reconnue par une protéine de dégradation EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein) et rentre dans les mécanismes de dégradation du réticulum endoplasmique (ERAD ER-associated degradation).

ii) Stratégies pour sauver la delF508-CFTR, hypothèse de l'équipe du Pr. Becq

Il a été montré que l'association de la calnexine avec la protéine delF508-CFTR était plus longue qu'avec la protéine non mutée et que donc, la calnexine participerait à retenir des formes non matures de delF508-CFTR dans le système de contrôle qualité du réticulum endoplasmique.⁴⁵ De ce fait, plusieurs stratégies ont été mises au point pour essayer de réduire ces interactions avec la calnexine. L'administration de curcumin, un inhibiteur non toxique de pompe à calcium du réticulum endoplasmique a permis de récupérer une partie du transport de la protéine mutante chez des souris.^{46a} La régulation du taux de calcium en général peut permettre de restaurer une

⁴⁵ S. Pind, J. R. Riordan, D. B. Williams, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12784-12788.

⁴⁶ a) M. E. Egan, M. Pearson, S. A. Weiner, V. Rajendran, D. Rubin, J. Glöckner-Pagel, S. Canny, K. Du, G. L. Lukacs, M. J. Caplan, *Science* **2004**, 304, 600-602; b) C. Norez, F. Antigny, F. Becq, C. Vandebrouck, *Traffic*, **2006**, 7, 562-573.

partie de l'activité canal ionique de la CFTR mutante.^{46b} Cependant, certains résultats sont controversés⁴⁷ et les relations entre la protéine CFTR et le taux de Ca^{2+} doivent être mieux comprises.⁴⁸ D'autres travaux⁴⁹ ont montré qu'une forme mutée de la calnexine pouvait aider à replier correctement la delF508-CFTR.

L'hypothèse de l'équipe de F. Becq repose sur le fait que l'inhibition des glucosidases I et II du RE pourrait empêcher les déglucosylations de la delF508-CFTR et éviter son interaction avec la calnexine et donc enrayer son processus de dégradation. Or, la DNJ et ses dérivés *N*-alkylés sont connus pour être inhibiteurs de ces glucosidases.⁵⁰ Les résultats de cette équipe ont montré que la *N*-Butyl-DNJ (le miglustat) **8** permettait de sauver partiellement la protéine mutante delF508-CFTR dans des cellules épithéliales humaines des voies respiratoires (Figure 13), de glandes trachéales, de cellules du conduit pancréatique et de cellules intestinales ainsi que dans des cellules intestinales de souris présentant la même mutation.⁴²

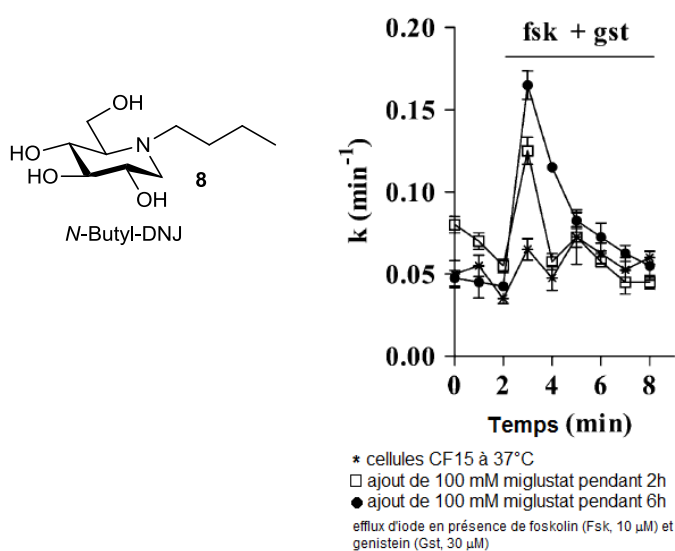


Figure 13. Récupération du fonctionnement de la delF508-CFTR en présence de miglustat (*N*-Butyl-DNJ).

Ces résultats ont montré également que le miglustat empêchait en grande partie les interactions entre la protéine défectueuse et la calnexine, prouvant la pertinence du raisonnement scientifique.⁴² Il a aussi été mis en évidence que le miglustat inhibe l'hyperabsorption de sodium⁵¹ du canal ENaC et régule l'homéostasie calcique,⁵² ce qui démontre l'efficacité de ce composé sur différentes manifestations de la maladie. Un traitement journalier des cellules malades nasales humaines à une concentration de 3 μM de miglustat pendant deux mois permet en outre une correction stable et réversible du transport cellulaire de delF508-CFTR.⁵³ Parallèlement il a été

⁴⁷ A. Dragomir, J. Björstad, L. Hjelte, G. M. Roomans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 322, 447-451; b) B. R. Grubb, S. E. Gabriel, A. Mengos, M. Gentsch *et al. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2006**, 34, 355-363.

⁴⁸ F. Antigny, C. Norez, F. Becq, C. Vandebrouck, *Front. Pharmacol.* **2011**, 2, 67.

⁴⁹ T. Okiyonedo, I. Wada, H. Jono, T. Shuto, K. Yoshitake, N. Nakano, S. Nagayama, K. Harada, Y. Isohama, T. Miyata, H. Kai, *FEBS Lett.* **2002**, 526, 87-92.

⁵⁰ DNJ inhibitrice des α -glucosidases du RE: B. Saunier, R. D. Kilker, J. S. Tkacz, A. Quaroni, A. Herscovics, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 14155-14161.

⁵¹ S. Noel, M. Wilke, A. G. Bot, H. R. De Jonge, F. Becq, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 325, 1016-1023.

⁵² F. Antigny, C. Norez, F. Becq, C. Vandebrouck, *Cell. Calcium* **2008**, 43, 175-183.

⁵³ C. Norez, F. Antigny, S. Noel, C. Vandebrouck, F. Becq *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2009**, 41, 217-225.

montré que le miglustat avait un effet anti-inflammatoire dans les cellules épithéliales bronchiques de mucoviscidose et de cellules épithéliales bronchiques normales.⁵⁴

1.1.3. Design de nouveaux chaperons pharmacologiques pour la mucoviscidose

Ces résultats très prometteurs permettent aujourd'hui d'envisager un traitement par voie orale de la mucoviscidose. Le miglustat est actuellement en phase d'essais cliniques IIa sur des patients homozygotes pour delF508-CFTR. Ces essais sont menés par l'entreprise pharmaceutique Actelion.⁵⁵

L'objectif de notre projet est l'identification de nouveaux inhibiteurs plus efficaces et plus sélectifs des glucosidases cellulaires que la *N*-Butyl-DNJ. Les α -glucosidases du réticulum endoplasmique impliquées dans la maturation des protéines *N*-glycanes sont des exoglycosidases qui hydrolysent des liens α -D-glucopyranosiques. Elles sont nommées :

- α -glucosidase I ou Mannosyl-oligosaccharide glucosidase (enzyme de type EC 3.2.1.106 famille GH 63 dans la classification CAZy)
- et α -glucosidase II ou Glucan 1,3- α -glucosidase (enzyme de type EC 3.2.1.84 famille GH31 dans la classification CAZy)

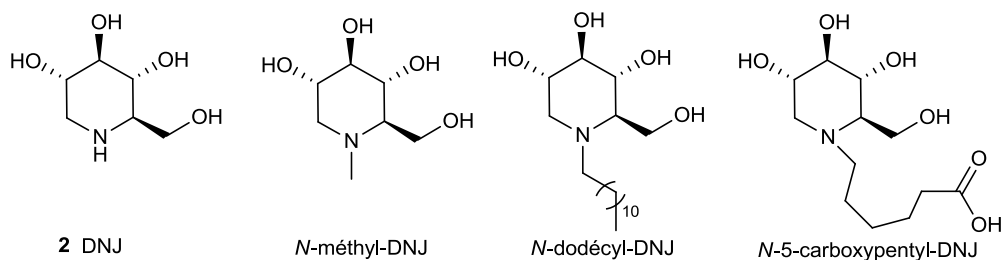
i) Propriétés de la série DNJ.

Compte tenu de l'importance des applications thérapeutiques, plusieurs études se sont attelées à trouver des inhibiteurs de ces glucosidases I et II du RE et ont montré l'activité inhibitrice de différents dérivés de la DNJ. Dès 1984, une étude⁵⁶ a été réalisée sur plusieurs composés *N*-alkylés de la DNJ (Tableau 1). On peut remarquer que l'ajout d'un méthylène sur l'atome d'azote permet de gagner en inhibition pour l' α -glucosidase I, en revanche l'inhibition diminue pour l' α -glucosidase II. L'augmentation de la longueur de chaîne et l'ajout d'un groupement acide carboxylique n'a pas beaucoup d'influence sur l'inhibition de l' α -glucosidase I (facteur 2,5) mais diminue de beaucoup celle de l' α -glucosidase II.

⁵⁴ M. C. Dehecchi, E. Nicolis, C. Norez, V. Bezzeri, M. Borgatti, I. Mancini, P. Rizzotti, C. M. P. Ribeiro, R. Gambari, F. Becq, G. Cabrini, *J. Cyst. Fibros.* **2008**, *7*, 555-565.

⁵⁵ www.actelion.com étude n° AC-056A203

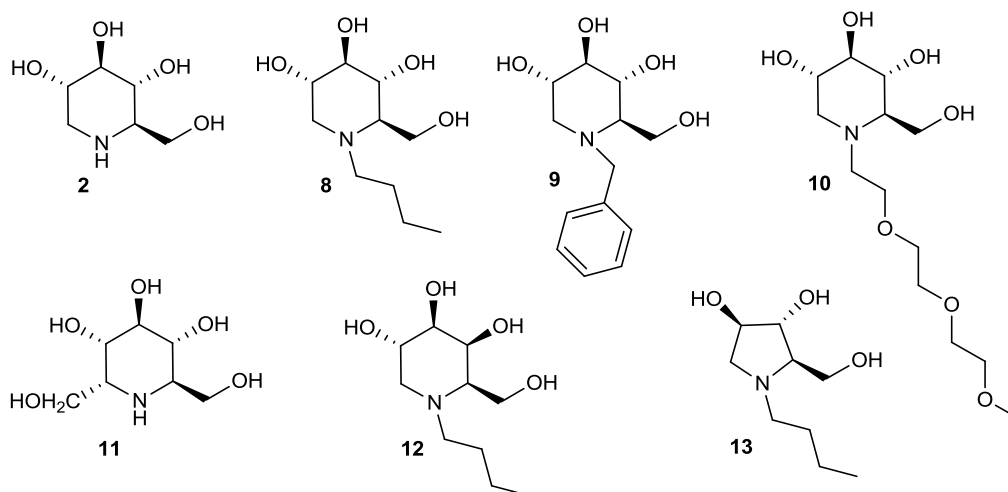
⁵⁶ H. Hettcamp, G. Legler, E. Bause, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 85-90.



Inhibiteur	IC ₅₀ (μM) α-glucosidase I	IC ₅₀ (μM) α-glucosidase II
1-DNJ (2)	3	20
N-méthyl-DNJ	0,3	130
N-dodécyl-DNJ	8	>500
N-5-carboxypentyl-DNJ	8	>500

Tableau 1. Inhibition des α-glucosidases du RE de microsomes de foie de veau⁵⁶

Le groupe de Butters^{57,58} a, par la suite, réalisé une étude de type relation structure-activité plus systématique (Tableau 2) pour l'inhibition de l'α-glucosidase I.



Composé	2	8	9	10	11	12	13
IC ₅₀ (μM) α-glucosidase I	1,5	0,6	0,2	21	5,0	2130	319

Tableau 2. Sélection d'iminosucres choisis par Butters et leur IC₅₀ sur l'α-glucosidase I de foie de porc⁵⁸

⁵⁷ L. A. G. M. Van Den Broek, M. W. P. Kat-Van Den Nieuwenhof, T. D. Butters, C. A. A. Van Boeckel, *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 172-178.

⁵⁸ T. D. Butters, L. A. G. M. Van Den Broek, G. W. J. Fleet, T. M. Krulle, M. R. Wormald, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2000**, *11*, 113-124.

Il a ainsi été montré que l'ajout d'une chaîne alkyle courte sur l'atome d'azote permettait de gagner en inhibition. La lipophilie amenée par le groupement phényle de **9** permet également de gagner en inhibition. L'ajout d'atomes d'oxygènes sur la chaîne en diminuant la lipophilie ne permet pas de gagner en inhibition. La fonctionnalisation en position 1 par un groupement hydroxyméthyle (composé **11**) a un effet peu significatif sur l'inhibition. Le changement de configuration de *gluco* à *galacto* (composé **12**) ou la réduction de la taille du cycle (composé **13**) diminuent drastiquement l'inhibition observée.

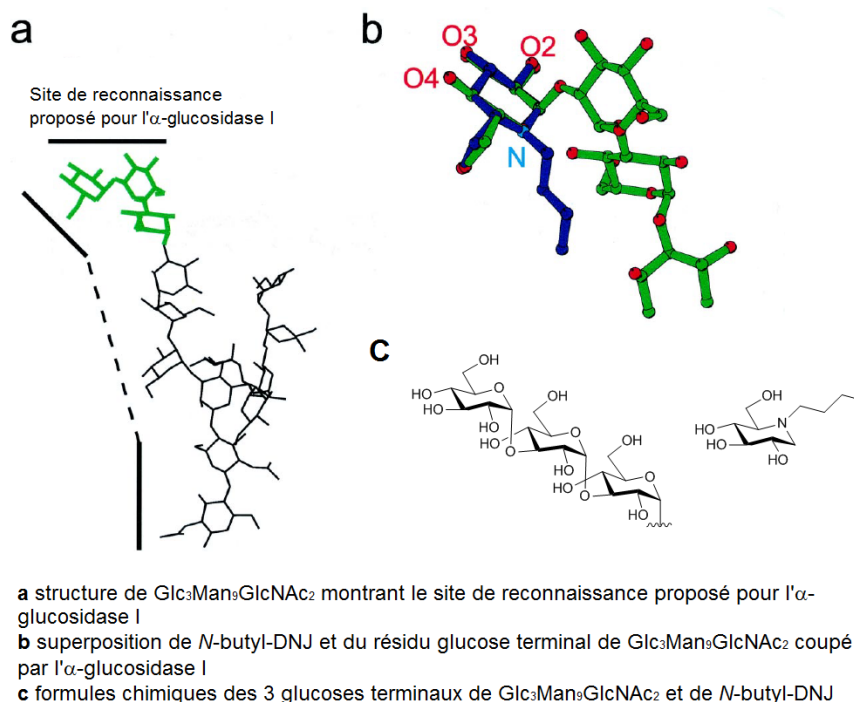


Figure 14. Modèle de reconnaissance de l'inhibiteur *N*-Butyl-DNJ de l'enzyme.

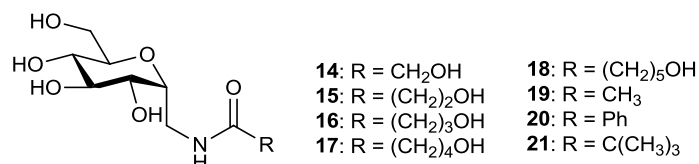
Pour expliquer ces résultats, les auteurs proposent un modèle (Figure 14) qui superpose la *N*-butyl-DNJ avec le substrat de l'enzyme et montre l'importance probable des hydroxyles en C-2, C-3 et C-4 pour la reconnaissance dans le site actif de l'enzyme. Bien que plusieurs structures tridimensionnelles aient été trouvées pour d'autres glucosidases, aucune n'a été reportée à ce jour pour les α -glucosidases du RE, ce qui limite la rationalisation des résultats obtenus et la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs.

ii) Etudes sur la partie aglycone

Par ailleurs, l'équipe du Pr. Hakamata a cherché à identifier une structure optimale permettant d'inhiber les glucosidase I et II du RE en se concentrant sur la partie aglycone. Les auteurs ont ainsi utilisé un *C*-glycoside en série *D*-*gluco* peu inhibiteur de ces enzymes.^{59,60}

⁵⁹ W. Hakamata, M. Muroi, T. Nishio, T. Oku, A. Takatsuki, *J. Carbohydr. Chem.* **2004**, 23, 27-39.

⁶⁰ W. Hakamata, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio, T. Oku, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, 9, 3-12.



Inhibition (%)	14	15	16	17	18	19	20	21
α -glucosidase I	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	18,2	< 1
α -glucosidase II	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	5,9	< 1

Tableau 3. Inhibition des α -glucosidases I et II du RE.

Le composé **20** avec un groupement phényl amide en position aglycone s'est révélé le meilleur inhibiteur avec une inhibition de 18 % de l' α -glucosidase I du RE et de 6% de l' α -glucosidase II à 2 mM. Ce qui est un résultat intéressant pour la conception de nouveaux inhibiteurs.

iii) Conception d'inhibiteurs potentiels de glucosidase I et II du RE

Aux vues de ces premières pistes prometteuses nous avons souhaité synthétiser de nouveaux inhibiteurs plus puissants des glucosidases I et II du RE afin de découvrir de nouveaux chaperons pharmacologiques comme premier traitement de la mucoviscidose. Logiquement, nous avons combiné l'utilisation d'iminosucres, bons inhibiteurs de glycosidases, avec une partie aglycone efficace sur la base des travaux de Hakamata.

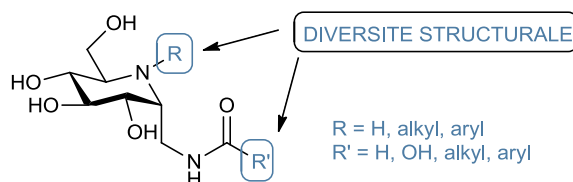


Figure 15. Conception des nouveaux composés.

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse d'imino-C-glycosides possédant un groupement de type *N*-acétamido en partie aglycone. Nous pourrions de ce fait introduire une diversité au niveau de la fonctionnalisation de l'azote du cycle ainsi qu'au niveau de la fonction amide.

1.1.4. Rétrosynthèse envisagée des composés

Pour synthétiser nos composés cibles, nous avons envisagé l'utilisation d'une méthodologie récente de diamination d'alcènes pallado-catalysée⁶¹ qui nous donnerait accès rapidement à ces nouveaux composés. L'objectif est ainsi de créer simultanément en une seule étape les deux liaisons C-N ce qui permettrait de former le cycle pipéridine et la liaison C-glycosidique de notre cible. La rétrosynthèse suivante a été envisagée (Schéma 2).

⁶¹ J. Streuff, C. H. Hövelmann, M. Nieger, K. Muñiz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14586-14587.

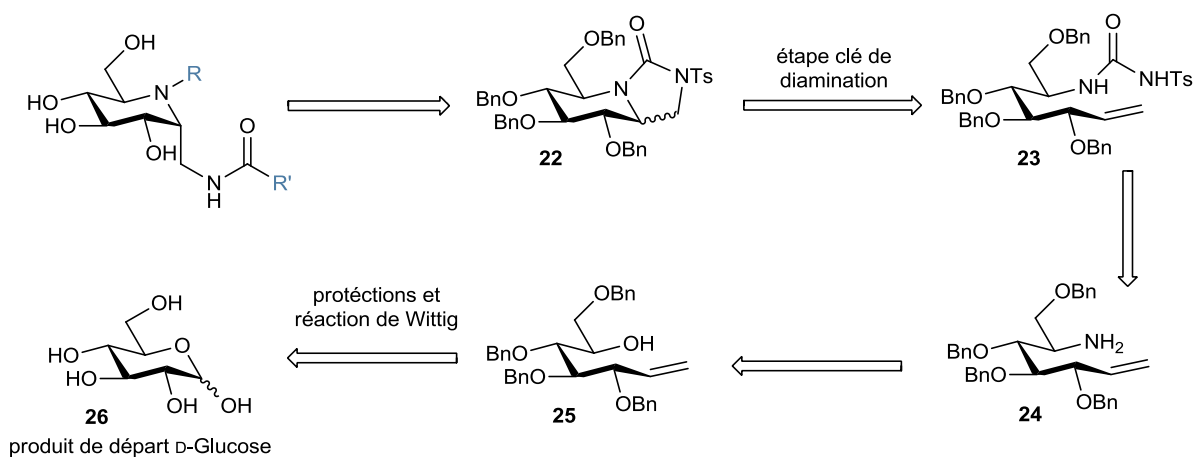


Schéma 2. Rétrosynthèse des composés cibles.

Les produits finaux seraient obtenus après diverses déprotections et fonctionnalisations du composé bicyclique **22**. L'étape clé de cette synthèse est la réaction de diamination pallado-catalysée sur la δ -alcényl urée polysubstituée **23** correspondante. Celle-ci serait obtenue par réaction du *p*-toluènesulfonylisocyanate sur l'amine **24**. Cette amine pourrait être synthétisée par deux réactions de Mitsunobu successives réalisées sur le δ -alcényl alcool **25** correspondant. L'alcène serait obtenu à partir du D-glucose (**26**) par une réaction de Wittig.

1.1.5. Diamination pallado-catalysées

Le développement de synthèses de 1,2-diamines est d'une grande importance considérant le nombre de produits naturels possédant ce motif. Cependant, la voie d'introduction directe de deux atomes d'azotes sur des alcènes a été pendant longtemps très peu étudiée. Les premières stratégies remontent aux années 70, où plusieurs groupes ont rapporté des diaminations utilisant des métaux en quantités stœchiométriques pour la formation des liaisons C-N sur des alcènes. Le développement de méthodes catalytiques a été probablement freiné par le fait que les amines sont de très bons chélatants des métaux de transition ce qui a pour conséquence un empoisonnement du catalyseur. Les premiers exemples de diaminations métallocatalysées remontent aux années 2000. Dès lors, de nombreuses méthodes ont été publiées comme l'atteste le nombre relativement important de revues parues en quelques années sur le sujet.⁶²

Dans les paragraphes suivants, nous décrivons essentiellement les méthodes de diamination qui pourraient être utiles à notre projet. Le but principal étant l'accès rapide à une diversité de composés en série imino-*C*-glycosides, les méthodes recensées sont essentiellement celles de diaminations intramoléculaires. Ces méthodologies seront répertoriées en fonction du catalyseur utilisé.

⁶² a) K. Muñiz, A. Iesato, M. Nieger, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5581-5596; b) K. Muñiz, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 166-174; c) F. Cardona, A. Goti, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 269-275; d) R. M. de Figueiredo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1190-1193; e) S. R. Chemler, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3009-3019; f) K. C. Majumdar, B. Roy, P. Debnath, A. Taher, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 846-887; g) S. R. Chemler, *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 150-158; h) S. de Jong, D. G. Nosal, D. J. Wardrop, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4067-4105.

i) Palladium

Dès 1978, Bäckwall⁶³ a décrit la première réaction de diamination assistée au palladium en stoechiométrique sur des alcènes mono- ou 1,2 di-substitués. La réaction se fait en présence de palladium II et d'oxydants variés (*m*-CPBA, Br₂, NBS, Pb(OAc)₂), elle est stéréospécifique.

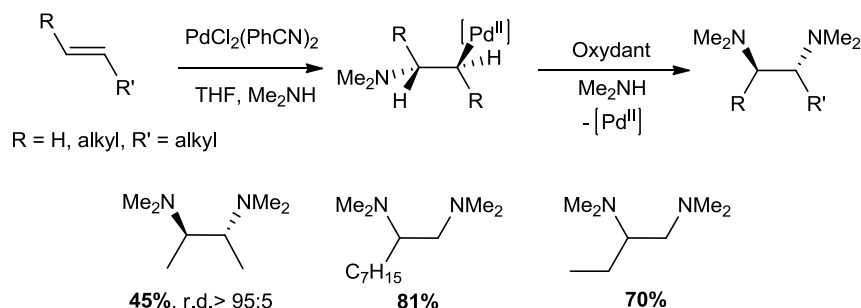


Figure 16. 1,2-diamination d'alcènes assistée par le palladium II de Bäckwall.⁶³

La réaction procéderait par une *trans* aminopalladation suivie d'une oxydation du palladium II en palladium IV et du déplacement du palladium par l'amine avec inversion de configuration.

En 2005, les groupes de Booker-Milburn⁶⁴ et de Muñiz⁶¹ ont rapporté indépendamment les premières diaminations catalysées au palladium en utilisant une même source pour l'introduction des deux amines.

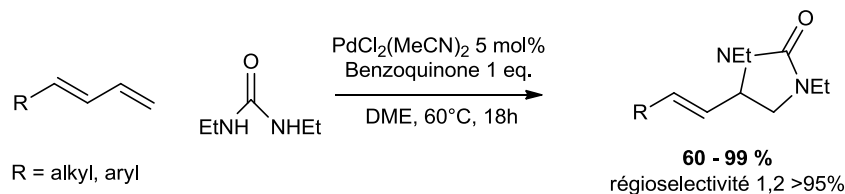


Schéma 3 1,2-diamination d'1,3-diènes catalysée au palladium de Booker-Milburn.⁶⁴

Booker-Milburn a décrit la formation d'urées vinyliques cycliques à partir d'1,3-diènes et de *N,N'*-diéthylurées en présence d'une quantité catalytique de dichlorure de bis(acétonitrile)palladium (Schéma 3). Concernant le mécanisme, le cycle catalytique serait un cycle de type Pd(II)/Pd(0). La réaction avec un diène cyclique a montré que l'étape initiale est une *anti*-aminopalladation qui générerait un intermédiaire η^3 -allylique qui subirait une substitution intramoléculaire réductrice du palladium pour redonner le Pd(0) et le produit.

La réaction palladocatalysée en intramoléculaire a été réalisée par l'équipe de Muñiz^{61,65} avec des ω -alcényl-urées substituées (Figure 17). Les urées cycliques avec des cycles accolés de 5 à 7 membres sont formées par réaction des alcènes correspondants en présence de quantité catalytique d'acétate de palladium, d'un oxydant en quantité stœchiométrique, l'iodosobenzène

⁶³ J.-E. Bäckwall, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 163-166.

⁶⁴ G. L. J. Bar, G. C. Lloyd-Jones, K. I. Booker-Milburn, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7308-7309.

⁶⁵ K. Muñiz, C. H. Hövelmann, J. Streuff, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 763-773.

diacétate, et d'une base à température ambiante dans le dichlorométhane. Ces réactions peuvent être réalisées en présence d'O₂.

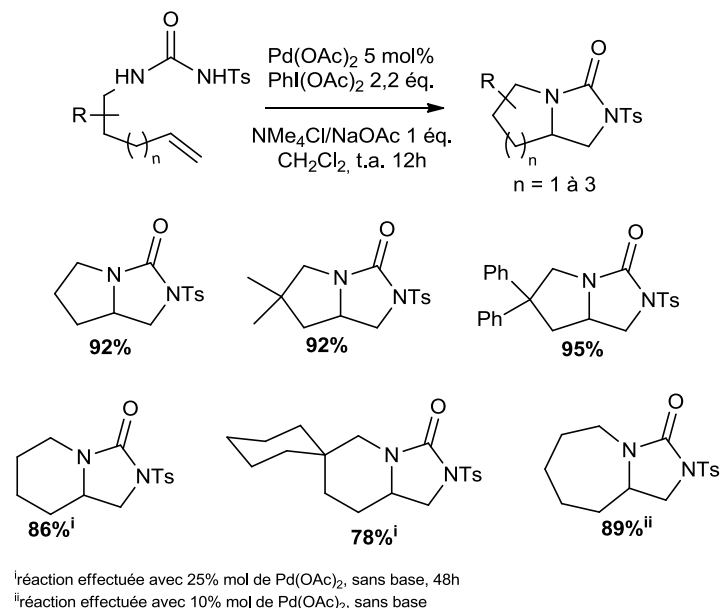


Figure 17. Diaminations intramoléculaires d'alcènes terminaux développées par le groupe de K. Muñiz.⁶¹

Des études de cinétique par titrations RMN, ainsi que des expériences avec des substrats deutérés ont permis à ce groupe de rationaliser le mécanisme réactionnel (Schéma 4). Il s'agirait d'un cycle catalytique Pd(II)/Pd(IV).⁶⁵ Après déprotonation du proton du groupement tosylamide par la base, la première étape serait une étape de *syn*-aminopalladation. L'alcène rentre alors dans la sphère de coordination du palladium et la première liaison C-N est formée. Le produit d'aminopalladation serait alors un complexe carré plan alkyl-palladium (II). La seconde liaison Csp₃-N se formerait, grâce à l'implication d'un complexe de Pd(IV) formé par oxydation du Pd(II) par l'iodosobenzène diacétate.

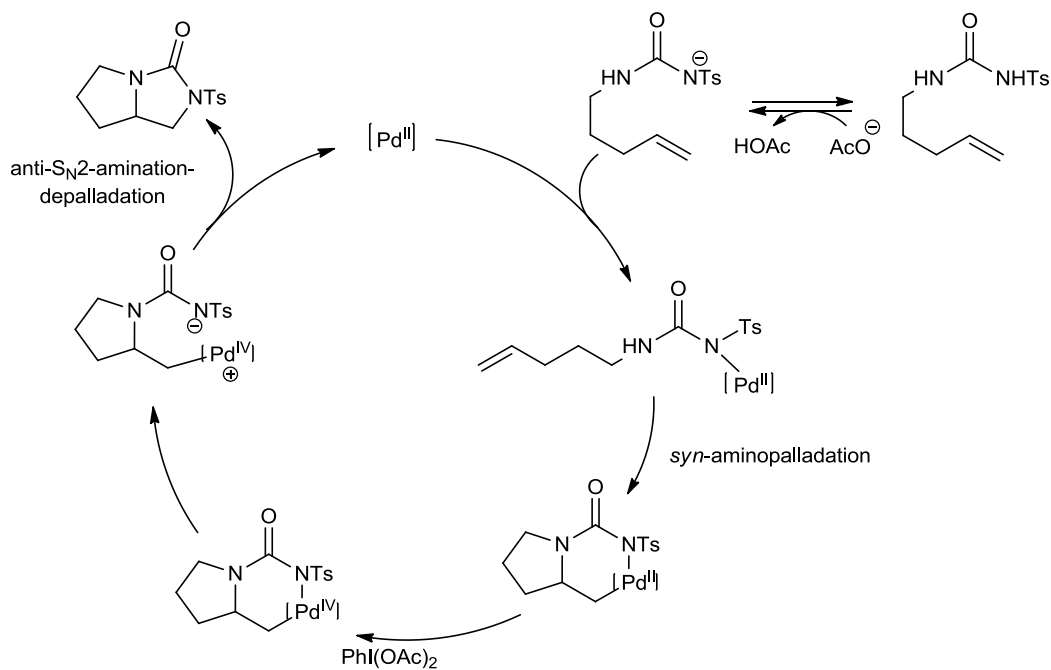


Schéma 4. Cycle catalytique décrivant la réaction de diamination.

La stéréochimie observée pour la réaction par des analyses sur des composés deutérés (alcène *E* donne produit *syn*, alcène *Z* donne produit *anti*) indique que la dernière étape est une S_N2 avec inversion de configuration. Ceci nécessite donc une décooordination du tosylamide et l'obtention d'un intermédiaire octaédrique cationique palladium (IV). Cet intermédiaire favoriserait l'électrophilicité du méthylène palladié et donc la substitution menant à la formation de la liaison C-N après rotation de la liaison Pd-C.

Dans un article ultérieur⁶⁶, Muñiz et Barluenga ont montré que le changement de l'oxydant $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ par du cuivre (II) (CuBr_2), permettait la diamination d'alcène non terminaux (Schéma 5). Cependant, la stéréochimie de la réaction est différente et les études réalisées montrent que les alcènes *E* donnent des produits *anti* tandis que les alcènes *Z* donnent des produits *syn*.

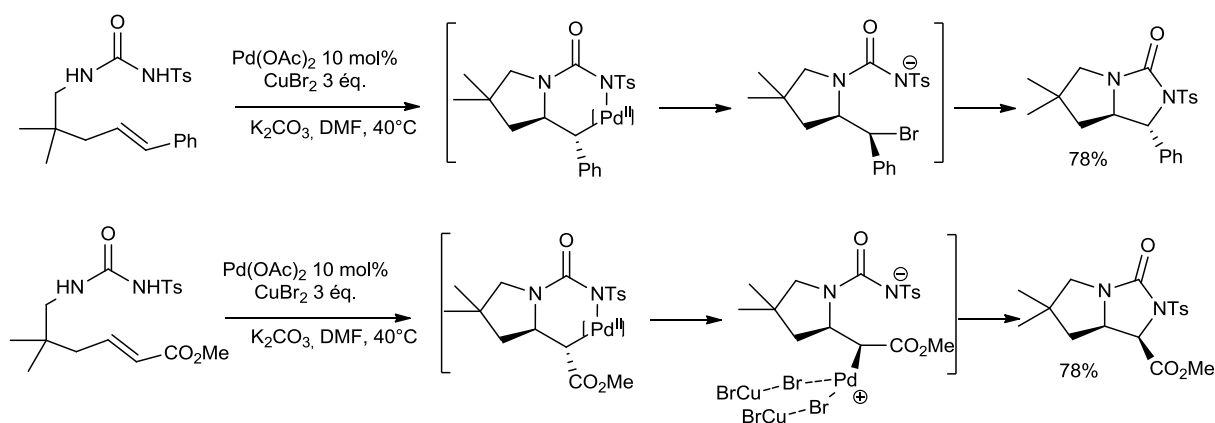


Schéma 5. Diaminations intramoléculaires palladocatalysées d'alcène non terminaux.

Ceci serait dû à la formation intermédiaire d'un produit halogéné par réaction d'*anti*-bromation/palladation avant la formation *anti* de la liaison C-N. En revanche, des essais sur des esters acryliques⁶⁷ ont montré une issue stéréochimique différente avec l'obtention de produits *syn* à partir d'alcènes *E*. Les auteurs postulent cette fois-ci la dissociation de la liaison N-Pd, la rotation de la liaison C-C et la S_N2 induite par l'oxydation transitoire du Pd par les sels de cuivre. Des résultats récents ont montré l'obtention de produits avec une stéréochimie globale *anti* à partir d'esters acryliques avec des sulfamides comme source d'azote et du carbonate de césium comme base.⁶⁸ Le mécanisme impliquerait cette fois-ci l'intermédiaire bromé.

Les exemples de diamination d'alcènes non terminaux ne nous intéressent pas directement pour notre synthèse mais sont importants d'un point de vue mécanistique ; de plus il est à noter l'obtention intéressante de pipéridines avec ces conditions d'oxydation du palladium par des dérivés du Cu(II) (Schéma 6).

⁶⁶ K. Muñiz, C. H. Hövelmann, E. Campos-Gómez, J. Barluenga, J. M. González, J. Streuff, M. Nieger, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 776-788.

⁶⁷ K. Muñiz, J. Streuff, P. Chávez, C. H. Hövelmann, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1248-1255.

⁶⁸ P. Chávez, J. Kirsch, J. Streuff, K. Muñiz, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1922-1930.

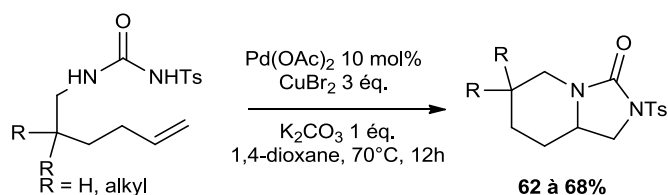


Schéma 6. Obtention de pipéridines par diamination pallado-catalysée en présence de CuBr_2 .

Le groupe de Muñiz a pu également obtenir des diaminations d'alcènes terminaux avec comme source d'amine des guanidines (Schéma 7).⁶⁹

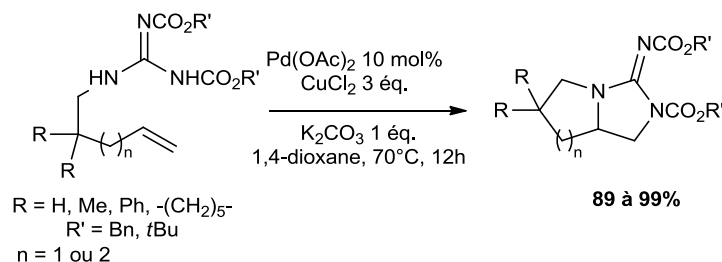


Schéma 7. Diaminations d'*N*- ω -alcényl-guanidines palladocatalysées

Différents produits sont obtenus avec des structures bicycliques 5-5 et 6-5 et des groupements protecteurs Boc et Cbz sur les azotes des guanidines. L'utilisation du sel chlorure de cuivre à la place du bromure de cuivre permet d'éviter la dégradation du produit en urée. La stéréochimie indique l'obtention de produits *syn* à partir d'alcènes *E*.

Le groupe de Michael a développé également des réactions de diaminations d'alcènes terminaux pallado-catalysées mais avec deux différentes sources d'azote, une intra- et l'autre intermoléculaire (Schéma 8).⁷⁰ Les auteurs ont obtenu en effet « par hasard » des produits de diamination alors qu'ils attendaient une fluoro-amination en traitant des *N*- ω -alcényl-amides, -carbamates et -urées par du *N*-fluorobenzènesulfonimide (NFBS) en présence d'une quantité catalytique de triflate de palladium. Le TEMPO et le benzène-sulfonimide de triéthylammonium ont été ajoutés aux conditions réactionnelles afin d'éviter la formation de produits secondaires.

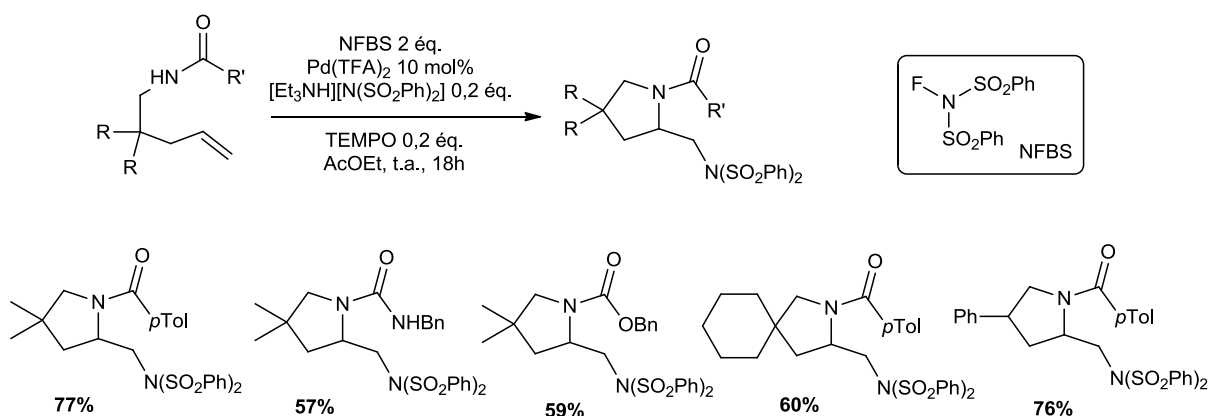


Schéma 8. Diaminations pallado-catalysées avec un amide et une *N*-fluorobenzène-sulfonimide comme source d'azote.

⁶⁹ C. H. Hövelmann, J. Streuff, L. Brelot, K. Muñiz, *Chem. Commun.*, **2008**, 2334-2336.

⁷⁰ P. A. Sibbald, F. E. Michael, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1147-1149

Plusieurs études RMN ont montré que la stéréochimie du procédé était *syn* et que ce mécanisme passait par une *anti* aminopalladation de l'alcène pour former le complexe alkyl-Pd, suivi d'une addition oxydante du NFBS pour générer le complexe de palladium (IV).⁷¹

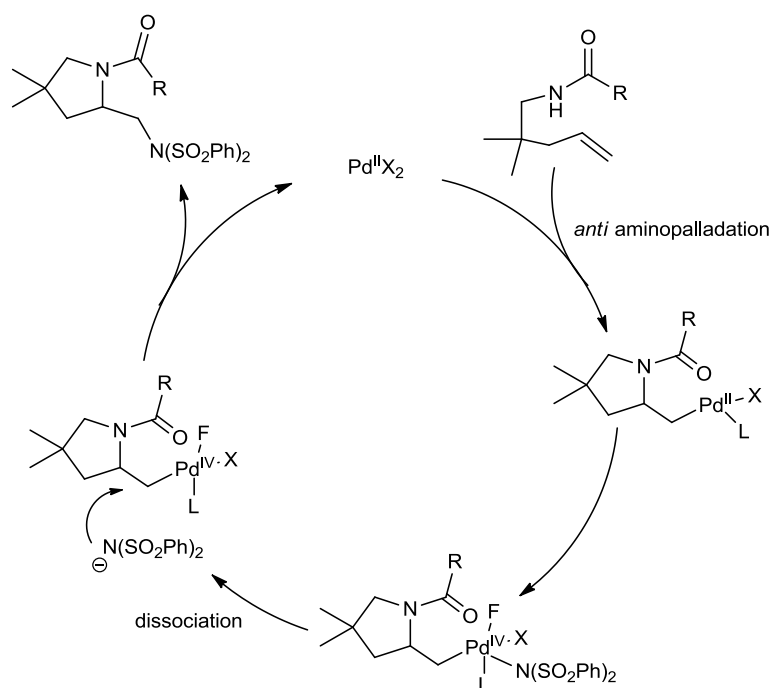


Schéma 9. Cycle catalytique proposé pour la diamination intra/inter moléculaire d'alcènes terminaux.

Dans une troisième étape il se produit une dissociation du benzène-sulfonimide qui substituerait alors le complexe de palladium par un mécanisme S_N2 et formerait ainsi la liaison C-N et régénérerait le Pd (II). Pour cette réaction, uniquement des pyrrolidines ont été décrites ce qui représente un intérêt plus limité pour notre synthèse car nous ne savons pas si cette méthodologie fonctionne pour la formation de pipéridines.

ii) Nickel

Le groupe de Muñiz a également développé par la suite des diaminations intramoléculaires d'alcènes terminaux avec comme source d'azote des sulfamides grâce à l'utilisation du nickel comme catalyseur.⁷² Des expériences précédentes avec le palladium n'avaient pas permis d'obtenir des produits de diamination avec cette source d'azote mais à la place des pyrrolidines fonctionnalisées (Schéma 10).⁶⁵

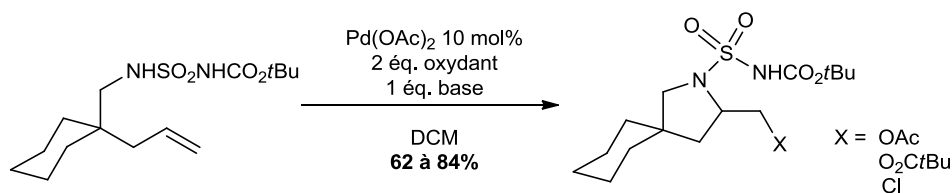


Schéma 10. Obtention des pyrrolidines fonctionnalisées

⁷¹ P. A. Sibbald, C. F. Rosewall, R. D. Swartz, F. E. Michael, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15945-15951.

⁷² K. Muñiz, J. Streuff, C. H. Hövelmann, A. Nuñez, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7125-7127.

Le Nickel se montre un bon catalyseur pour la transformation des *N*- δ -alcénylsulfamides (Schéma 11). Cependant, ici encore, aucune pipéridine n'est décrite, seulement des pyrrolidines. Un résultat toutefois intéressant est la réaction réalisée sur un produit énantiopur et l'obtention du produit cyclisé correspondant avec une très bonne diastéréosélectivité. Les auteurs décrivent également la déprotection totale et sélective de l'azote des carbamates en présence de LAH par rapport au groupement sulfamide.

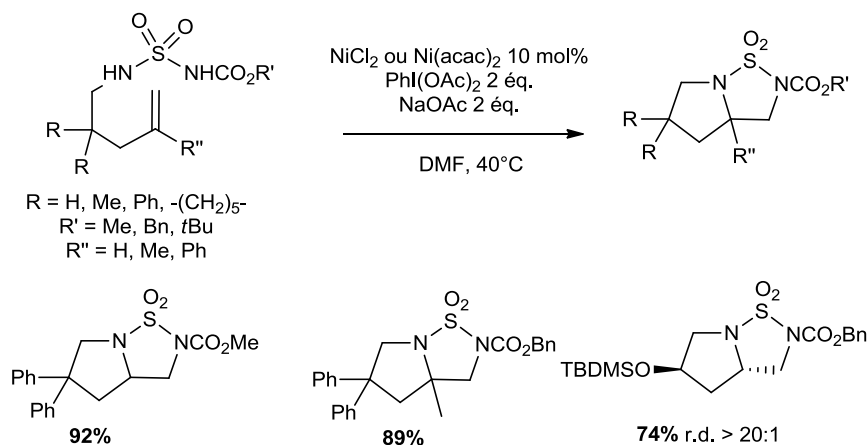


Schéma 11. Réactions de diaminations d'alcènes terminaux à partir d'alcényl-sulfamides catalysées au nickel.

iii) Cuivre II

Les travaux de diaminations d'alcènes grâce au cuivre ont été majoritairement réalisés par l'équipe de Chemler en stoechiométrique. Les premiers travaux⁷³ décrivent la synthèse de produits majoritairement tricycliques avec un cycle benzénique accolé à l'hétérocycle azoté. Cette réaction se fait en présence de cuivre II ($Cu(OAc)_2$) et de K_2CO_3 . Il est à noter que les auteurs parviennent également à synthétiser plusieurs cycles à 6 membres. Cependant les conditions réactionnelles sont assez drastiques avec des températures élevées comprises entre 90° à 120°C et des temps de réaction relativement longs.

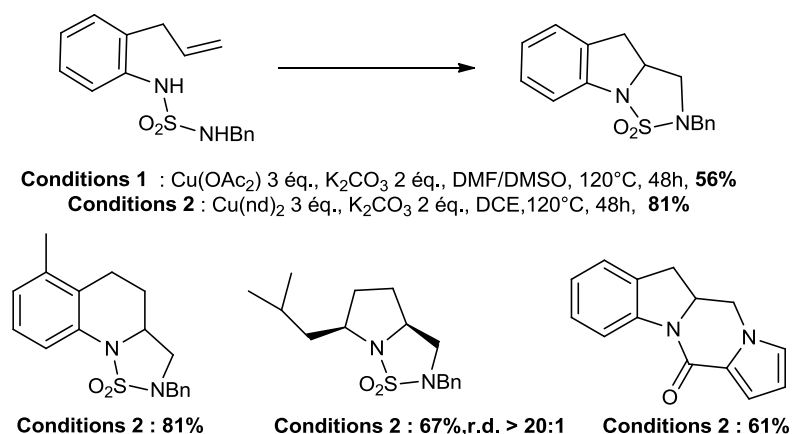


Schéma 12. Diaminations d'alcènes terminaux avec des sulfamides comme source d'azote catalysées au cuivre II.

⁷³ T. P. Zabawa, D. Kasi, S. R. Chemler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11250-11251.

L'optimisation des conditions réactionnelles⁷⁴ avec l'utilisation du cuivre(II) néodécanoate $[\text{Cu}(\text{nd})_2]$ en quantité stoechiométrique, un sel de cuivre soluble dans les solvants organiques, permet de réaliser les manipulations avec un solvant moins polaire (DCE) pendant 24 à 48h à 90°C dans un tube scellé. Chemler *et al.* ont toutefois pu élargir le champ d'applications de leur réaction à une bonne diversité de substrats.

Concernant le mécanisme de la réaction, les auteurs proposent tout d'abord la coordination du cuivre sur l'azote, par échange de ligand avec assistance basique du carbonate de potassium.^{73,74}

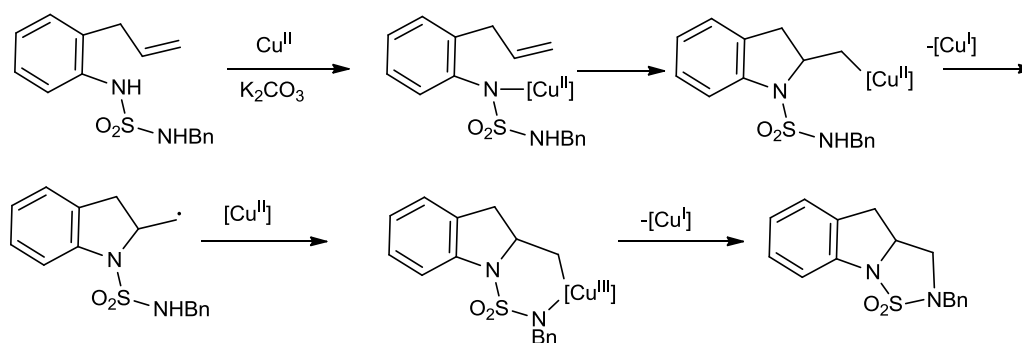


Schéma 13. Mécanisme proposé par Chemler *et al.*⁷⁴

Cette étape est suivie d'une *syn* aminocupration. Le complexe d'alkyl cuivre serait alors instable et mènerait à la rupture homolytique de la liaison Cu-C pour former un radical. L'interaction de ce radical avec un complexe de Cu(II) conduirait alors à la formation d'un complexe d'alkylcuivre (III) qui subirait alors l'élimination réductrice pour former la deuxième liaison C-N.

Le groupe de Shi a également beaucoup travaillé sur les réactions de diamination intermoléculaires. Nous n'avons pas décrit ici les différentes méthodes pallado-catalysées utilisant des diaziridinones comme donneurs d'azote car celles-ci réalisent les diaminations en position allylique ce qui serait peu adapté à nos substrats. Cependant il est utile de mentionner que l'équipe de Shi a parallèlement développé une méthode catalysée au cuivre (I) permettant la diamination intermoléculaire d'alcènes terminaux avec des dioxydes de thydiaziridines et des diaziridinimines comme donneurs d'azote.⁷⁵ Ces méthodes restent cependant peu adaptées pour nos futurs substrats car il s'agit d'alcènes terminaux activés (de type α -aryl ou diène) et, de plus, nous privilégions dans un premier temps les réactions intramoléculaires.

iv) Or

La catalyse à l'or dont on découvre ces dernières années le grand potentiel, a été également appliquée à ces réactions de diamination d'alcènes par l'équipe de Muñiz.⁷⁶ En 2009, cette équipe a rapporté une réaction de diamination de *N*- δ -alcényl urées en présence d'un complexe acétate d'or (I), de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ et d'acétate de sodium (Schéma 14). La méthodologie s'applique sur des alcènes terminaux et procède selon une sélectivité globale *syn*.

⁷⁴ T. P. Zabawa, S. R. Chemler, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2035-2038.

⁷⁵ a) B. Zhao, W. Yuan, H. Du, Y. Shi, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4943-4945 ; b) B. Zaho, H. Du, Y. Shi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1087-1090.

⁷⁶ A. Iglesias, K. Muñiz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10563-10565.

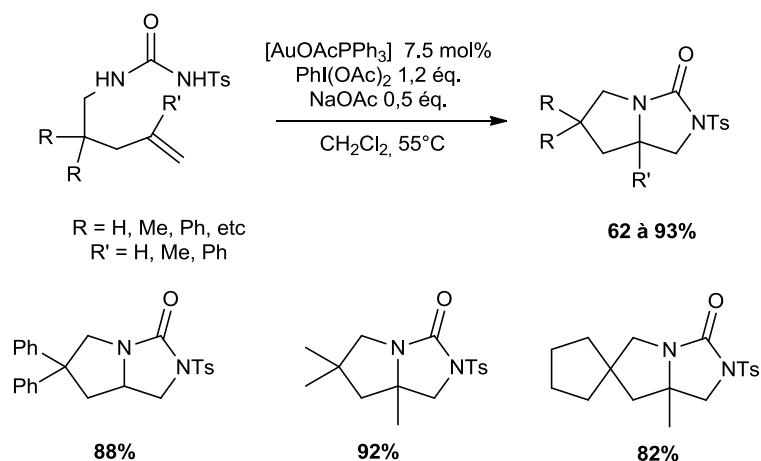


Schéma 14. Diaminations catalysées à l'or d'alcènes terminaux avec des urées comme donneurs d'azote.

Sur la base d'études RMN sur des produits deutérés, Muñiz *et al.* ont proposé le cycle catalytique présenté Schéma 15. Il y aurait tout d'abord la formation d'un complexe d'alkyl-or (I) par un mécanisme d'*anti* aminoauration. Ce complexe serait alors oxydé irréversiblement par le $\text{PhI}(\text{OAc})_2$.⁷⁶

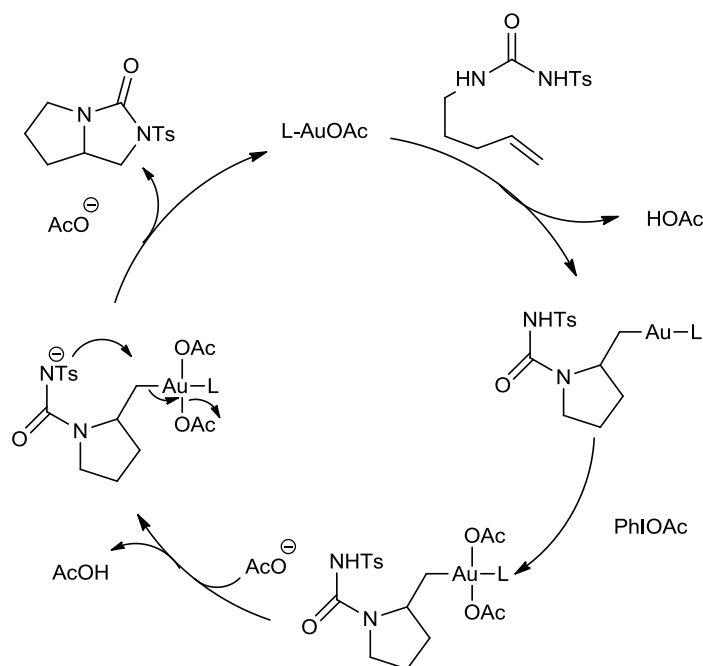


Schéma 15. Cycle catalytique proposé pour la diamination catalysée à l'or.

Le complexe d'or (III) ainsi formé subirait alors une substitution avec inversion de configuration au niveau du carbone portant le métal ce qui donnerait le produit et régénérerait le complexe d'or (I). Ce procédé est donc complémentaire concernant la diastéréosélectivité avec le procédé catalysé par le palladium, cependant le prix élevé du catalyseur d'or I reste assez dissuasif pour réaliser cette réaction. De plus aucune formation de bicyclic 6-5 n'est décrite à ce jour par cette méthode.

v) Sans métal, halogènes

Plusieurs réactions de diamination ne faisant pas intervenir de métaux ont été décrites sur des substrats qui pourraient nous intéresser dans le cadre de notre étude. Les premières diaminations d'alcènes grâce à des halogènes ont été rapportées par l'équipe d'Al-Mourabit⁷⁷ et concernaient des cycloguanidinations d'hydropyridines *N*-acétylées en présence de dibrome ou de NBS. Cependant cette réaction n'est décrite que sur des hétéroaromatiques polyinsaturés et ne pourrait pas s'appliquer à nos substrats. Depuis, d'autres groupes se sont intéressés à ces réactions avec des halogènes. Muñiz et Barluenga⁶⁶ ont utilisé le tétrafluoroborate de bis(pyridine)iodonium (IPy₂BF₄) comme source d'iodonium pour faire des diaminations intramoléculaires de *N*- δ -alcényl-*N'*-sulfonyl urées. La réaction est décrite à des températures élevées (120°C) dans le toluène et conduit aux produits avec de très bons rendements.

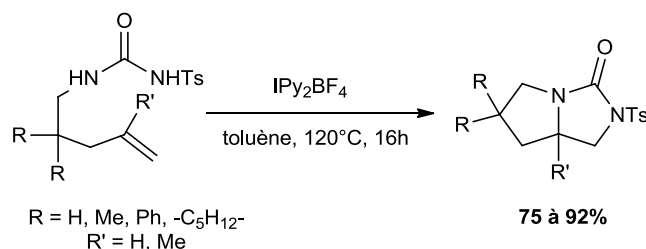


Schéma 16. Réaction de diamination intramoléculaire avec un dérivé d'iode.

Les études réalisées sur des produits deutérés ont montré la diastéréosélectivité de la réaction (Schéma 17), l'alcène *E* donnant le produit *anti* correspondant et l'alcène *Z* le produit *syn* (Schéma 17).

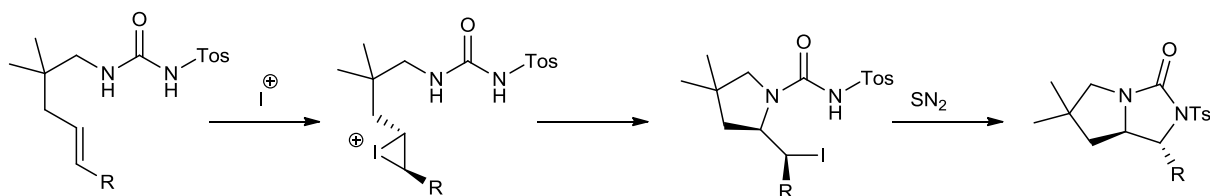


Schéma 17. Mécanisme de diamination avec IPy₂BF₄ conduisant à la stéréochimie observée.

Plusieurs alcènes 1,2 di-substitués ont aussi été testés et des produits secondaires ont été formés notamment une iso-urée et un produit d'alcoxy-iodination. Cependant, aucune formation de cycle pipéridine n'a été rapportée avec ce réactif à ce jour.

Widenhofer a, lui, décrit des diaminations et des alcoxy-aminations d'alcènes portant des motifs sulfonylurées avec du *N*-iodosuccinimide.⁷⁸ La formation des imidazolidinones se fait facilement en présence de NIS et de 1 équivalent de NaHCO₃ à 25°C dans le toluène (Schéma 18). Les auteurs ont également montré qu'en ajoutant du triflate d'argent et pas de base le produit iso-urée se formait.

⁷⁷ R. Abou-Jneid, S. Ghouami, M.-T. Martin, E. T. Huu Dau, N. Travert, A. Al-Mourabit, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3933-3936.

⁷⁸ H. Li, R. A. Widenhofer, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4827-4831.

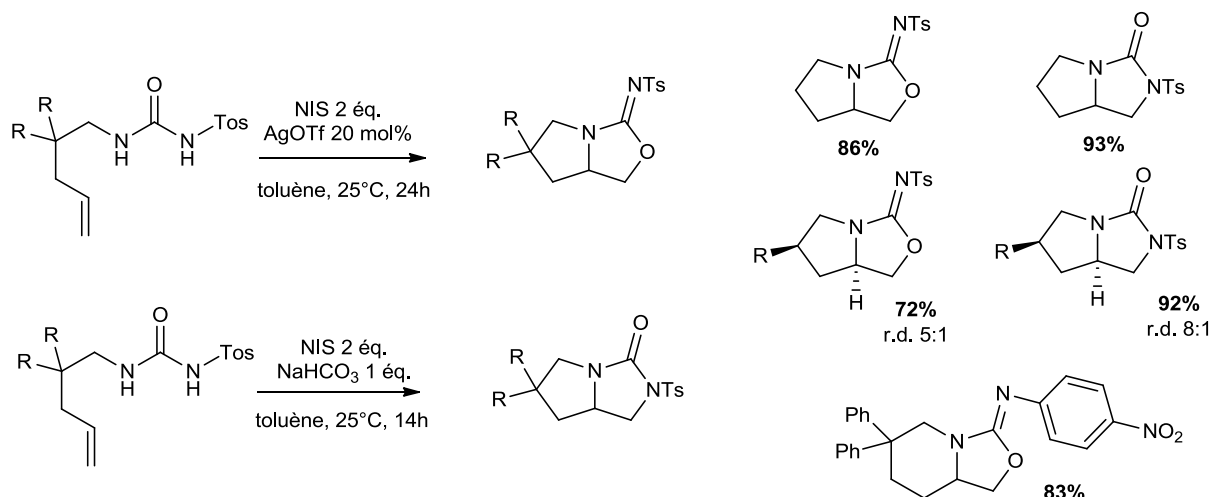


Schéma 18. Diamination et alcoxyamination intramoléculaire d' ω -alcényl urées à l'aide d'*N*-iodosuccinimide.

Widenhoefer et Li supposent que l'argent active le NIS car le temps de réaction est réduit de moitié. Ils font aussi l'hypothèse que ce sel facilite la formation de la liaison C-O en augmentant l'électrophilicité du dérivé alkyl iodé formé intermédiairement, ce qui mènerait à l'attaque préférentielle du nucléophile le plus dur, l'atome d'oxygène de l'urée. De nombreux produits ont été testés et donnent de bonnes stéréosélectivités. Widenhoefer et Li parviennent également à réaliser l'alcoxy-amination en formant un cycle azoté à 6 membres mais ne parviennent pas à obtenir le produit de diamination correspondant (Schéma 18).

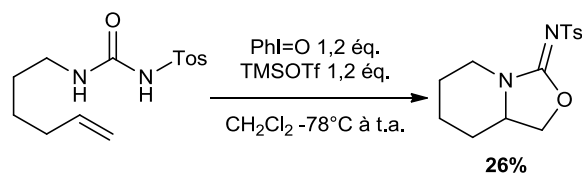


Schéma 19. Alcoxy-amination en présence d'iodosylbenzène et de TMSOTf avec obtention d'un cycle à 6 carbones.

L'équipe de Michael a également réalisé des alcoxyaminations de ces mêmes types de composés au moyen d'iodosylbenzène et de différents acides (Schéma 19).⁷⁹ Dans les conditions décrites, aucun produit de diamination n'a été observé. Il est à noter l'obtention d'un produit d'alcoxyamination avec un cycle à 6 membres, cependant le rendement est faible.

Très récemment, le groupe de Muñiz a réalisé des diaminations intramoléculaires d'alcènes terminaux par catalyse avec un bromonium.⁸⁰ Un simple sel de brome (KBr) est utilisé en quantité catalytique en présence de divers oxydants.

⁷⁹ B. M. Cochran, F. E. Michael, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5039-5042.

⁸⁰ P. Chávez, J. Kirsch, C. H. Hövelmann, J. Streuff, M. Martínez-Belmonte, E. C. Escudero-Adán, E. Martín, K. Muñiz, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2375-2382.

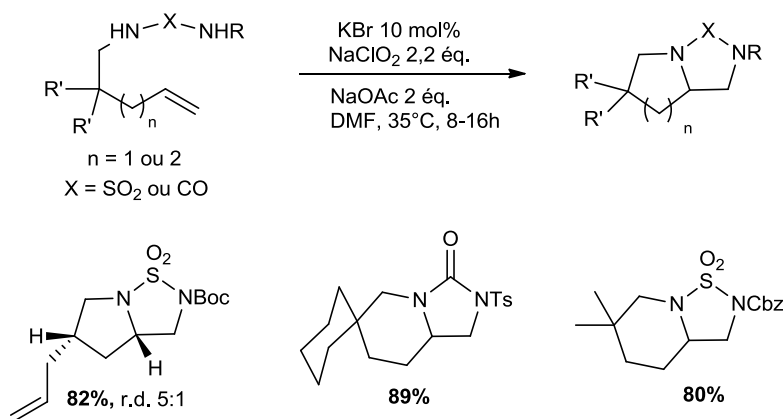


Schéma 20. Diamination catalysée au brome.

Les substrats sur lesquels Muñiz *et al.* réalisent leurs diaminations intramoléculaires sont variés, avec des sulfamides ou des urées comme groupe donneurs d'azote, des alcènes terminaux ou non, substitués ou non, ou des acrylates (Schéma 20). Les produits sont obtenus avec de très bons rendements et de bonnes diastéréosélectivités. Plusieurs exemples de formation de cycles à 6 membres avec des sulfamides et des urées sont également décrits avec de très bons rendements. Concernant le mécanisme de cette réaction, l'équipe de Muñiz propose le cycle catalytique présenté sur le Schéma 21. L'oxydation de l'ion bromure en ion hypobromite par le chlorite de sodium mènerait en présence de base à l'espèce Br^+ . Ce Br^+ réagirait alors avec l'azote extérieur du sulfamide ce qui pourrait être favorisé par le solvant (DMF).

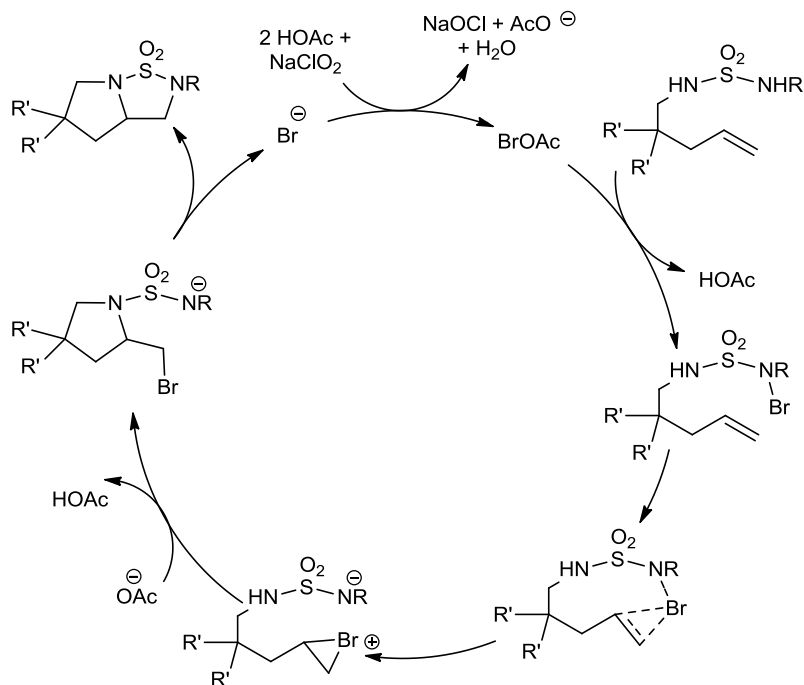


Schéma 21. Cycle catalytique proposé pour la diamination catalysée au bromure.

Le groupement *N*-Br oxyde alors la double liaison. Le pont bromonium ainsi formé serait ouvert par l'azote du sulfamide pour former le premier cycle. Il s'en suivrait alors une $\text{S}_{\text{N}}2$ qui formerait le second cycle. Le brome serait alors substitué et régénéré sous forme d'ion bromure pour

continuer le cycle catalytique. Cette méthodologie semble prometteuse car elle est valable pour un grand nombre de substrats et les conditions réactionnelles sont particulièrement faciles à mettre en œuvre.

1.1.6. Stratégie adoptée

Sur la base des méthodologies de diaminations connues au tout début de l'année 2010, nous avons décidé de privilégier le procédé de Muñiz utilisant une catalyse au palladium sur des ω -alcényl urées. En effet, cette méthodologie semblait robuste et conduisait aux produits diaminés avec de bons rendements et de bonnes diastéréosélectivités. Les conditions réactionnelles sont faciles à mettre en œuvre et selon les auteurs la réaction peut même se faire sous air ambiant sans précautions drastiques pour éviter la présence d'O₂ ou d'eau. Des exemples de synthèse de pipéridines avec de bons rendements, nous ont encouragés vers cette voie. L'utilisation de cette méthodologie nous permettait d'envisager la formation rapide de nos composés avec la création simultanée du cycle pipéridine et de la liaison C-glycosidique (rétrosynthèse au § 1.1.4).

Pour pouvoir tester l'étape clé, nous avons commencé notre étude en série D-xylose ce qui nous permettait d'accéder plus rapidement au substrat test de la réaction en évitant une double inversion de Mitsunobu, obligatoire pour conserver la configuration absolue en C-5 en série D-glucose.

1.1.7. Synthèse du substrat test pour la réaction de diamination

i) Synthèse du 2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose **30**

Le 2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose **30** est synthétisé en 3 étapes à l'échelle de plusieurs grammes grâce à une méthode⁸¹ décrite par Nadein et Kornienko légèrement modifiée au laboratoire (Schéma 22). La première étape consiste en la protection de la position anomérique sous forme d'un groupement méthoxy par catalyse acide dans le méthanol. Les trois alcools secondaires sont alors protégés par des groupements benzyles par réaction de Williamson en présence d'hydruure de sodium et de bromure de benzyle.

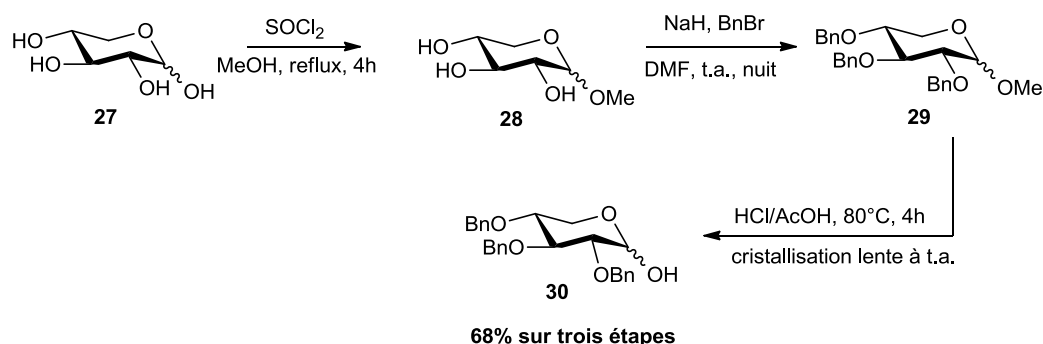


Schéma 22. Synthèse du tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose

⁸¹ N. O. Nadein, A. Kornienko, *Org. Lett.* **2004**, 6, 831-834.

La position anomérique est ensuite déprotégée en conditions acides. Le produit **30** cristallise lentement au refroidissement du milieu réactionnel et est assez pur pour être utilisé sans recristallisation pour les étapes suivantes. La synthèse rapide et robuste de ce composé **30** en fait un synthon de départ important dans les synthèses d'iminosucres d'intérêt thérapeutique au laboratoire (voir §1.2.3).

ii) Accès au substrat de diamination

L'introduction de la fonction alcène essentielle pour la réaction de diamination se fait par réaction de Wittig. Toutefois, les conditions décrites dans l'article de Kornienko⁸¹ ne nous ont pas permis d'obtenir le produit souhaité (Schéma 23). En effet, nous avons observé la formation d'un diène **31** correspondant à l'élimination du groupement OBn en position 3. Cette élimination avait été décrite en série glucose par Sinaÿ en présence de NaH dans le DMSO.⁸² Les auteurs recommandent dans une publication ultérieure⁸³ la transformation préalable du sucre protégé en son sel de lithium par ajout de *n*BuLi dans le THF. Ce sel est alors additionné sur le phosphorane formé par réaction du sel de méthyltriphénylphosphine avec le *n*BuLi. En suivant ce protocole, nous avons pu obtenir le produit désiré **32** avec un rendement de 62%.

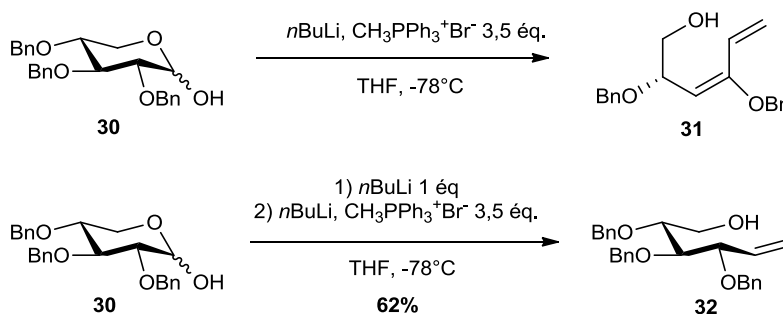


Schéma 23. Conditions réactionnelles pour obtenir l'alcène **32**.

Une réaction de Mitsunobu avec un phtalimide comme nucléophile permet l'introduction de la fonction amine (Schéma 24) dans des conditions décrites en série 2-désoxy-glucose.⁸⁴

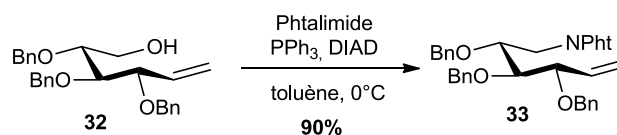


Schéma 24. Réaction de Mitsunobu pour l'introduction de l'amine.

⁸² J.-R. Pougny, M. A. M. Nassr, P. Sinaÿ, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 375-376

⁸³ J.-M. Lancelin, J.-R. Pougny, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1985**, 136, 369-374.

⁸⁴ J.-Y. Goujon, D. Gueyrard, P. Compain, O. R. Martin, K. Ikeda, A. Kato, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2313-2324.

La déprotection du groupement phtalimide se fait très facilement avec l'éthylène diamine dans l'EtOH à 80°C et le produit **34** peut être directement utilisé dans l'étape suivante de formation de l'urée (Schéma 25).

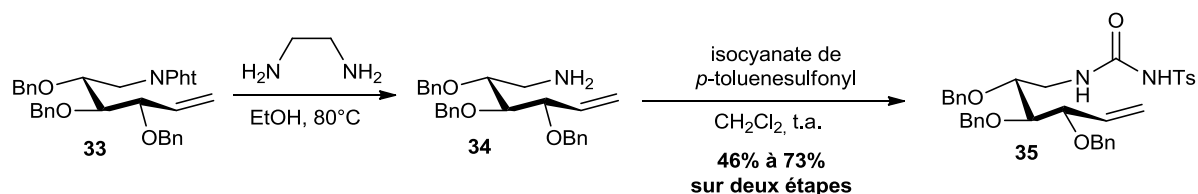


Schéma 25. Introduction du groupement urée.

L'introduction du groupement urée se fait par réaction de l'amine **34** avec l'isocyanate de *p*-toluènesulfonyl dans le dichlorométhane à température ambiante. Les rendements sur ces deux étapes sont variables et dépendent de la purification de l'urée **35** qui se révèle délicate car souvent mélangée à des résidus de tosylamine difficiles à séparer par colonne de chromatographie sur gel de silice.

1.1.8. Premiers essais de diamination

Le premier essai de diamination a été réalisé directement sur notre substrat **35** dans les conditions décrites pour l'obtention des bicycles 6-5,⁶¹ à savoir 0,25 éq. de palladium acétate, 2,2 équivalents d'oxydant (PhI(OAc)₂) dans le dichlorométhane à température ambiante.

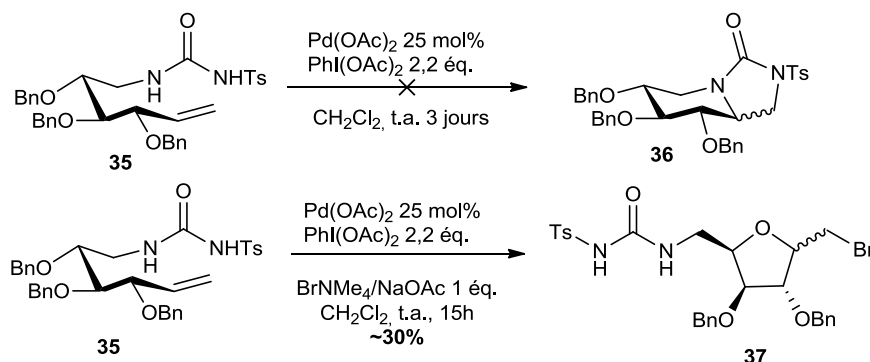


Schéma 26. Essais diaminations sur notre substrat.

Malheureusement, dans les conditions décrites, au bout de 48 heures, aucun avancement sur CCM n'est observé. Au bout de 72h le milieu brunit pour devenir noir-verdâtre. La chromatographie du résidu ne permet pas d'isoler de produit identifiable ; avec le temps, le substrat de départ semble s'être dégradé (Schéma 26).

Les conditions expérimentales décrites pour l'obtention des cycles pipéridines ne comprennent pas l'utilisation de base contrairement aux cycles pyrrolidines. Cette différence de mode opératoire n'est pas justifiée par les auteurs et nous avons décidé dans un second temps de rajouter un équivalent de base. Au bout d'une nuit, le produit de départ est consommé entièrement. La chromatographie sur colonne de silice nous permet de récupérer le produit **37** dont nous n'avons pu identifier la structure que lors d'essais ultérieurs de diamination (Schéma 29).

Devant ces premiers résultats décevants, nous avons décidé de reproduire la diamination sur un substrat modèle décrit par Muñiz *et al.* pour voir si, dans nos mains, la réaction de diamination fonctionnait. Cela nous a permis en outre de tester différentes conditions sur un composé plus accessible que notre substrat test **35** synthétisé en 7 étapes.

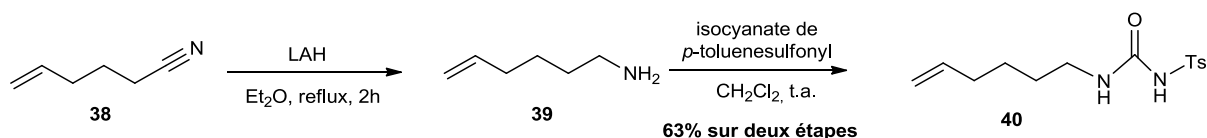


Schéma 27. Synthèse du substrat « modèle ».

La synthèse de l'urée modèle peut se faire rapidement en deux étapes à partir du hex-5-ène-nitrile commercial **38**.⁸⁵ Il s'agit d'abord d'une réduction de la fonction nitrile suivie d'une addition nucléophile de l'amine sur l'isocyanate de *p*-toluènesulfonyl avec un bon rendement global de 63 % sur deux étapes.

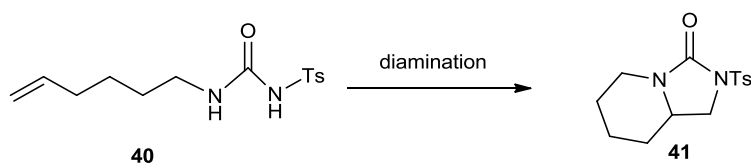


Schéma 28. Réaction de diamination sur le substrat « modèle ».

Le premier essai de diamination se fait dans les conditions décrites, à l'air avec une garde avec un desséchant à base de gel de silice (Tableau 4 entrée 1). Au bout de 3 jours d'agitation à température ambiante, la conversion semble complète, cependant après colonne de chromatographie sur gel de silice, seulement 14% du composé espéré **41** est obtenu contre 83% dans la publication initiale.⁶¹ Différents essais d'optimisation ont alors été réalisés en changeant les conditions pour essayer d'augmenter le rendement de cette réaction (Tableau 4). L'ajout d'une base (entrée 2) a accéléré grandement la réaction mais seulement 20% du produit a pu être isolé. Muñiz *et al.* ont également décrit plus tard des conditions oxydantes avec un sel de cuivre⁶⁶ et nous avons réalisé plusieurs essais avec du CuBr₂ comme oxydant (entrée 3 à 7). En augmentant la charge de catalyseur, nous sommes parvenus à augmenter le rendement jusqu'à 47% (entrée 4) mais en restant toujours assez loin de celui de référence de 83% !⁶¹

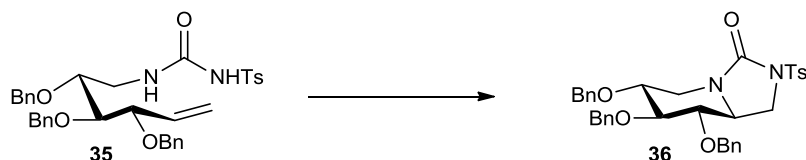
⁸⁵ Y. Tamaru, M. Hojo, H. Higashimura, Z. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3994-4002.

N°	Catalyseur	(%mol)	Oxydant	(éq.)	Solvant	Base (éq.)	Temp.	Durée	Rdt
1	Pd(OAc) ₂	25	PhI(OAc) ₂	2,3	CH ₂ Cl ₂	-	t.a.	3 j.	14%
2	Pd(OAc) ₂	25	PhI(OAc) ₂	2,3	CH ₂ Cl ₂	NMe ₄ Br/NaOAc (1 éq.)	t.a.	15h	20%
3	Pd(OAc) ₂	10	CuBr ₂	3	1,4- dioxane	K ₂ CO ₃ (2 éq.)	70°C	20h	35%
4	Pd(OAc) ₂	20	CuBr ₂	3	1,4- dioxane	K ₂ CO ₃ (2 éq.)	70°C	25h	47%
5	Pd(OAc) ₂	20	CuBr ₂	3	THF	K ₂ CO ₃ (2 éq.)	t.a.+ 80°C	20h	45%
6	Pd(OAc) ₂	20	CuBr ₂	3	DMF	K ₂ CO ₃ (2 éq.)	t.a.	20h	13%
7	PdCl ₂ (PhCN) ₂	20	CuBr ₂	3	THF	K ₂ CO ₃ (2 éq.)	70°C	20h	34%
8	PdCl ₂ (PhCN) ₂	25	PhI(OPiv) ₂	2,3	CH ₂ Cl ₂	NMe ₄ Br/NaOAc (1 éq.)	t.a.	6h	21%

Tableau 4. Essais pour la réaction de diamination sur le substrat « modèle ».

Le changement du 1,4 dioxane par le THF n'apporte pas d'amélioration significative (entrée 5). Dans le DMF, solvant décrit pour la réaction avec un substrat analogue, le rendement chute drastiquement à 13% (entrée 6). Nous avons également essayé de changer la source de palladium (II) et l'iode hypervalent utilisés sans augmentation significative du rendement (entrée 7 et 8).

A la suite de ces essais, nous avons appliqué les meilleures conditions obtenues (Tableau 4 entrées 4 et 5) à notre substrat **35** afin de voir si nous pouvions former le produit de diamination attendu (Tableau 5 entrée 3). Malheureusement, nous n'avons pu récupérer après chromatographie sur colonne que des traces de produit (masse ESI correcte) et de faibles quantités de produit de départ (entrée 3). Enfin, d'autres essais ont été réalisés. Les conditions initiales de la publication sans catalyseur de palladium n'ont pas entraîné de conversion du produit de départ (entrée 4). Suite à la publication de Widenhoefer,⁷⁸ nous avons voulu également tester les conditions de cyclisation sans catalyseur métallique en présence de *N*-iodosuccinimide. Widenhoefer n'obtenait pas de produit de diamination mais un produit d'aminoalcoxylation. Cependant, les conditions étaient applicables directement à notre substrat et nous pouvions imaginer d'autres transformations ultérieures pour parvenir à nos cibles si nous obtenions le produit d'aminoalcoxylation. Les deux types de conditions (entrées 5 et 6) appliqués à notre substrat mènent à l'obtention d'un même produit **42** (Schéma 29).



N°	Catalyseur (éq.)	Oxydant (éq.)	Base (éq.)	Solvant	Temp	Durée	Produit
1	Pd(OAc) ₂ (0,25 éq.)	PhI(OAc) ₂ (2,2 éq.)	-	CH ₂ Cl ₂	t.a. + 30°C	3 j	-
2	Pd(OAc) ₂ (0,25 éq.)	PhI(OAc) ₂ (2,2 éq.)	Me ₄ NBr/NaOAc (1 éq.)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	15h	37 (30%)
3	Pd(OAc) ₂ (0,25 éq.)	CuBr ₂ (3 éq.)	K ₂ CO ₃ (2éq.)	THF	t.a. + 70°C	22h	36 traces
4			Me ₄ NBr/NaOAc (1éq.)	CH ₂ Cl ₂	t.a.	3 j	-
5		NIS (2 éq.)	NaHCO ₃ (1éq.)	toluène	t.a.	24h	42 (≈25%)
6	AgOTf (0,5 éq.)	NIS (2 éq.)	-	toluène	t.a.	24h	42 (≈25%)

Tableau 5. Conditions pour les essais de diamination

A ce stade, nous avons pu identifier les produits **37** et **42**. Dans les deux cas nous avons formé des produits tétrahydrofuraniques polysubstitués portant un groupe iodo- ou bromométhyle sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères. Ces produits proviendraient de cyclisations électrophiles *via* des ponts halogéniums, le groupement OBn en position 2 jouant le rôle de nucléophile. Ce type de réaction menant à la formation de tétrahydrofuranes substitués sont déjà bien connues. Les premières iodocyclisations d'éthers γ,δ -insaturés ont été décrites par Barlett en 1981 avec comme conditions réactionnelles I₂ dans l'acétonitrile.⁸⁶ Pour la formation de C-glycosides, c'est Pougny *et al.* qui ont rapporté⁸² l'activation des doubles liaisons par des électrophiles. Plusieurs groupes ont alors décrit dans les années 1980, différentes méthodes avec plusieurs électrophiles et substrats pour engendrer une bonne diastéréosélectivité.

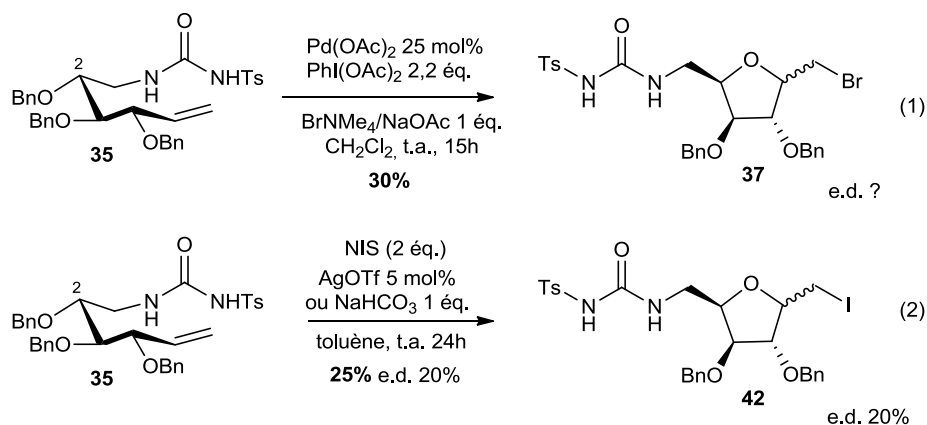


Schéma 29. Formation des cycles tétrahydrofuraniques substitués.

⁸⁶ S. D. Rychnovsky, P. A. Barlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3963-3964

Dans le cas de notre réaction (Schéma 29), il est toutefois surprenant d'observer la formation du tétrahydrofurane **37** car nous n'avions pas mis de source de brome électrophile dans les conditions réactionnelles. Cependant, on peut penser que dans les conditions oxydantes en présence d'iodosobenzène diacétate, l'ion bromure serait oxydé en hypobromite qui donnerait la forme Br^+ en présence de la base AcO^- . Ce résultat est supporté par le fait que sans la présence d'iodosobenzène diacétate, aucun produit ne se forme. Le palladium n'entrerait finalement pas en compte dans le mécanisme de formation du produit. Dans le cas de la réaction (2), c'est le *N*-iodosuccinimide qui joue le rôle d'électrophile. Pour ces deux réactions, l'azote de l'urée n'est visiblement pas assez nucléophile pour attaquer le pont halogénium formé, et l'éther benzylique joue alors le rôle de nucléophile pour former le cycle tétrahydrofuranique très stable.

Devant ces résultats plutôt décevants, et aux vues des très bons résultats obtenus avec le projet mené en parallèle concernant les iminosucres multivalents (voir Chapitre 2), nous avons décidé de mettre cette étude de côté. En effet, les résultats expérimentaux nous prouvent que l'obtention des cycles à 6 membres, qui est largement moins décrite que celles des cycles à 5 membres, est difficile et moins favorisée. La formation de **37** et **42** montre que l'urée n'est pas assez nucléophile pour attaquer le pont halogénium. De plus, dans nos mains nous n'avons pas pu reproduire la méthodologie de K. Muñiz sur un substrat test, même après optimisation.

1.2. Synthèse d'une librairie de chaperons pour la maladie de Gaucher par chimie click en série imino-xylitol.

1.2.1. La maladie de Gaucher

i) Définition et manifestation de la maladie de Gaucher

La maladie de Gaucher est une maladie génétique autosomique récessive rare. Elle a été décrite par le Pr. Gaucher en 1882. C'est une maladie lysosomale c'est-à-dire une maladie due à l'accumulation de glycolipides dans le lysosome, un organite cellulaire chargé de la dégradation cellulaire. La maladie de Gaucher est la maladie lysosomale la plus répandue, son incidence non connue exactement est d'environ 1/60000 naissances dans la population mondiale mais elle est beaucoup plus importante dans la population juive ashkénase (1/800 à 1/1000 naissances).⁸⁷ En France en 2006, 450 patients ont été recensés.⁸⁸ Cette maladie est due à la déficience d'une enzyme du lysosome, la β -glucocérébrosidase (GCase, classification EC : 3.2.1.45).⁸⁹ Le gène muté codant pour la protéine est appelé GBA et est situé sur le chromosome 1. Cette déficience induit une accumulation du substrat de cette enzyme, le glucosylcéramide (GlcCer) dans les macrophages mais aussi dans différents organes comme le foie, la rate ou encore dans la moelle osseuse ce qui entraîne les symptômes observés.

Les symptômes les plus courants associés à cette maladie sont une hépatosplénomégalie, des atteintes osseuses et dans certaines formes plus rares, une atteinte neurologique. On distingue couramment trois phénotypes:⁹⁰

- Le type I, sans atteinte neurologique, concerne 95% des patients. Les symptômes sont le plus souvent, l'hépatosplénomégalie et les atteintes osseuses, les atteintes des autres organes étant plus rares. Certaines formes de la maladie sont asymptomatiques. Ce type I est diagnostiqué chez des patients enfants ou adultes.
- Le type II représente moins d'1% et se caractérise par une atteinte neurologique précoce et une hépatosplénomégalie. L'âge médian du décès des patients est de 9 mois et est principalement dû à l'évolution rapide des manifestations neurologiques du système nerveux central.
- Le type III (5%) se caractérise par une atteinte neurologique plus tardive. Le décès survient généralement au bout de quelques années seulement. Les manifestations sont très hétérogènes.

Plus de 200 mutations sont recensées pour le gène GBA (Figure 18).⁹¹ Les plus courantes sont les allèles N370S et L444P.

⁸⁷ G. A. Grabowski, *Lancet* **2008**, 372, 1263-1271.

⁸⁸ J. Stirnemann, T. Bilette de Villemeur, N. Belmatoug, *Rev. Med. Interne* **2007**, 28, S198-S201.

⁸⁹ R. O. Brady, J. N. Kanfer, D. Shapiro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, 18, 221-225.

⁹⁰ J. Stirnemann, *Rev. Med. Interne* **2008**, 29, 176-178 ;

⁹¹ H. Dvir, M. Harel, A. A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, A. H. Futerman, J. L. Sussman, *EMBO Rep.* **2003**, 4, 704-709.

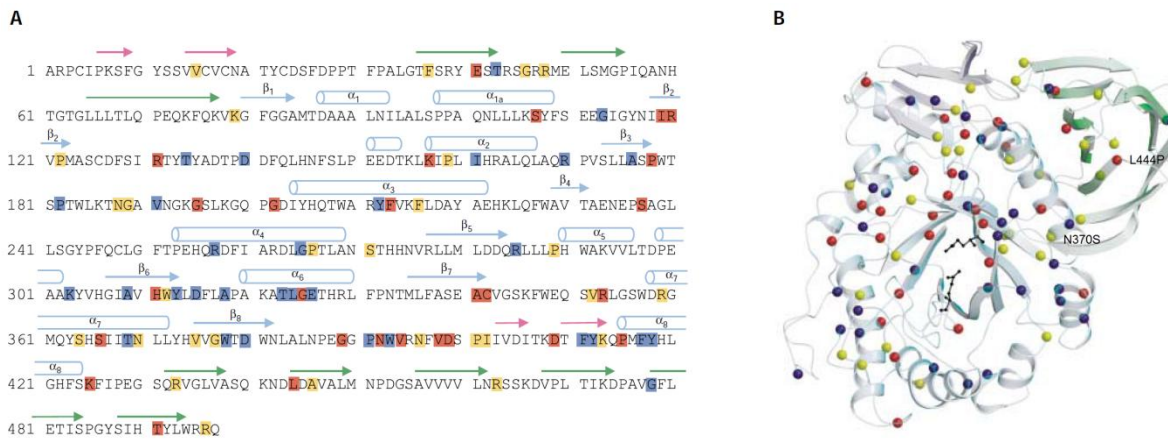


Figure 18. Mutations connues sur la GCCase.⁹¹ A) Séquence des 497 acides aminés de la GCCase, les mutations sont reportées en rouge (manifestations sévères), jaune (manifestations moins sévères) et bleu (pas d'information sur la gravité). B) Structure tridimensionnelle avec les différentes mutations reportées.

On peut citer également entre autres les allèles G202R, R463C, 84GG, recNciI et recTL, leurs prévalences ainsi que les corrélations entre le génotype et le phénotype sont étudiées parmi différentes populations.⁹² Ces corrélations ne sont pas exactement homogènes dans les populations mais on peut quand même déduire certains points communs essentiels pour le diagnostic de cette maladie.

Mutation	% d'individus affectés
N370S/N370S	29%
N370S/ ?	20%
N370S/L444P	16%
N370S/84GG	12%
L444P/L444P	6%
L444P/ ?	3%

Tableau 6 Mutations les plus courantes et fréquences observées dans un échantillon de 1067 individus.⁹³

L'allèle N370S (remplacement d'une asparagine par une sérine en position 370 de la chaîne protéique) est le plus répandu. La présence de cet allèle, même en association avec un allèle portant une autre mutation implique un phénotype de type I. Il a été également montré que les allèles portant la substitution L444P (remplacement d'une leucine par une proline en position 444 de la chaîne protéique) sont le plus souvent associés à un phénotype avec atteinte neurologique de type II ou III. Enfin, des patients ayant le même génotype ne présentent pas forcément le même phénotype ce qui implique de possibles autres facteurs génétiques ou non-génétiques.⁹²

⁹² C. Drugan, L. Procopciuc, G. Jebeleanu, P. Grigorescu-Sido, J. Dussau, L. Poenaru, C. Caillaud, *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**, *10*, 511-515.

⁹³ Chiffres de l'année 1999 basé sur 1067 individus du programme ICGG (International Cooperative Gaucher Group): G. M. Pastores, D. A. Hughes, *Gaucher Disease*. **2000** dans R. A. Pagon, T.D. Bird, C. R. Dolan, *et al.* (Eds). *GeneReviews*TM, Seattle, consultable sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/>

Des chercheurs tentent également d'établir des relations entre les positions des différentes mutations sur la GCase et la gravité des symptômes associés à ces mutations.⁹¹ Ces relations sont établies aussi pour la GCase en association avec une protéine activatrice avec laquelle elle interagit, la saposine C (SAP-C).⁹⁴

Le glucosylcéramide qui s'accumule dans les cellules est un glycosphingolipide (GSL). Les GSLs sont des composés minoritaires de la membrane plasmique des cellules eucaryotes, ils ont un rôle privilégié dans la communication intercellulaire et les mécanismes d'adhésion cellulaire.⁹⁵ Le céramide est synthétisé par l'action de quatre enzymes dans la membrane du réticulum endoplasmique, celui-ci est alors transporté grâce à une vésicule vers l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi, la glucosylcéramide synthase catalyse la glycosylation de l'alcool primaire du céramide en utilisant l'UDP-glucose comme donneur de glucose.

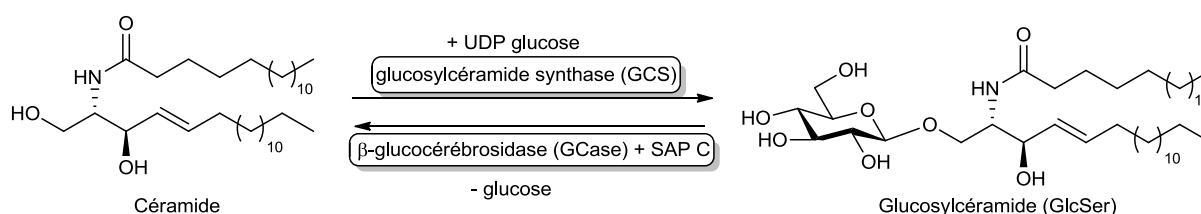


Schéma 30. Synthèse et dégradation du glucosylcéramide.

La dégradation de ces glycosphingolipides commence par une endocytose des régions de la membrane plasmique contenant ces glycosphingolipides. Les endosomes sont alors transportés vers l'appareil de Golgi ou les lysosomes pour la dégradation des sphingolipides et des GSLs. Pour les glycosphingolipides avec moins de quatre unités glycosidiques, cette dégradation se fait avec l'aide de protéines activatrices de sphingolipides (SAP sphingolipid activator protein). Le glucosylcéramide est hydrolysé grâce à la β-glucocérébrosidase et à l'activateur SAP-C.

ii) Traitements de la maladie

Depuis une vingtaine d'années, de gros progrès ont été faits pour le traitement des maladies lysosomales. Il existe aujourd'hui deux types de traitement⁹⁶ : une thérapie par voie orale qui agit en inhibant la glucosylcéramide synthase (SRT, substrate reduction therapy) et l'enzymothérapie substitutive⁹⁷ (ERT, enzyme replacement therapy).

⁹⁴ S. Atrian, E. López-Viñas, P. Gómez-Puertas, A. Chabás, L. Vilageliu, D. Grinberg, *Proteins* **2008**, *70*, 882-891.

⁹⁵ T. Kolter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta Biomenbr.* **2006**, *1758*, 2057-2079.

⁹⁶ M. Beck, *Hum. Genet.* **2007**, *121*, 1-22.

⁹⁷ R. J. Desnick, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2004**, *27*, 385-410.

a) L'enzymothérapie substitutive ERT

Cette thérapie est utilisée depuis 1992⁹⁸ et se révèle efficace. Elle consiste à injecter une enzyme de substitution aux patients pour remplacer la GCCase défectueuse et récupérer la fonction d'hydrolyse du glucosylcéramide (GlcCer) et ainsi éviter son accumulation dans les lysosomes des macrophages. L'enzyme recombinée prescrite est l'imiglucérase (Cérézyme®) et est obtenue par culture de cellules de mammifères (Chinese Hamster Ovary cells CHO). En France elle est administrée en deux prises mensuelle et est prescrite pour les formes sévères des maladies de Gaucher de type I (elle est inefficace pour les maladies de Gaucher de type II et de type III).⁹⁹ Les premières améliorations cliniques apparaissent au bout de 3 à 6 mois avec des diminutions des volumes de la rate et du foie. On observe également des améliorations au niveau osseux qui sont plus lentes à apparaître (au bout d'un an et demi de traitement) mais permettent une nette amélioration de la qualité de vie.¹⁰⁰ Malheureusement, la perméabilité des barrières hémato-encéphaliques ne permet pas de pouvoir traiter les manifestations neurologiques de la maladie avec ce type de traitement. Plus récemment deux autres enzymes ont reçu une autorisation de mise sur le marché, la vélaglucérase- α (VPRIVTM) en 2010 et la taliglucérase- α (ElelysoTM) en mai 2012. Il est à noter que le coût de cette thérapie est extrêmement élevé¹⁰¹ (de 100 000 à plus de 200 000 US\$ par patient et par an) et lourd pour les patients avec deux perfusions mensuelles.

b) Traitement par réduction du substrat SRT

Le deuxième traitement existant aujourd'hui repose sur la stratégie de réduction du substrat. Le principe est en fait d'agir en amont en inhibant la glucosylcéramide synthase (GCS) qui intervient dans la synthèse du GlcSer (Schéma 30). Ce concept a été introduit par Vunnam en 1980 avec la synthèse d'analogues de céramide dans le but d'inhiber la GCS.¹⁰² En 1994, Platt et Butters ont montré sur un modèle de cellules *in vitro* que la *N*-Butyl-DNJ **8** permettait d'éviter l'accumulation de GlcCer dans les cellules.¹⁰³ Ils ont, par la suite, montré les relations structurelles entre l'iminosucre et le substrat de l'enzyme permettant d'expliquer en partie l'affinité et donc l'activité inhibitrice observée pour la GCS (Figure 19).¹⁰⁴

⁹⁸ N. W. Barton, R. O. Brady, J. M. Dambrosia *et al.* *N. Eng. J. Med.* **1991**, 324, 1464-1470.

⁹⁹ PNDs Protocole National de Diagnostic et de Soins Maladie de Gaucher disponible sur le site de HAS Haute Autorité de Santé: www.has-sante.fr

¹⁰⁰ N. Weinreb, J. Barranger, S. Packman, A. Prakash-Cheng, B. Rosenbloom, K. Sims *et al.* *Clin. Genet.* **2007**, 71, 576-588.

¹⁰¹ E. Beutler, *Mol. Genet. Metab.* **2006**, 88, 208-215.

¹⁰² R. R. Vunnam, N. S. Radin, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, 26, 265-278.

¹⁰³ F. M. Platt, G. R. Neises, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8362-8365.

¹⁰⁴ T. D. Butters, H. R. Mellor, K. Narita, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2003**, 358, 927-945.

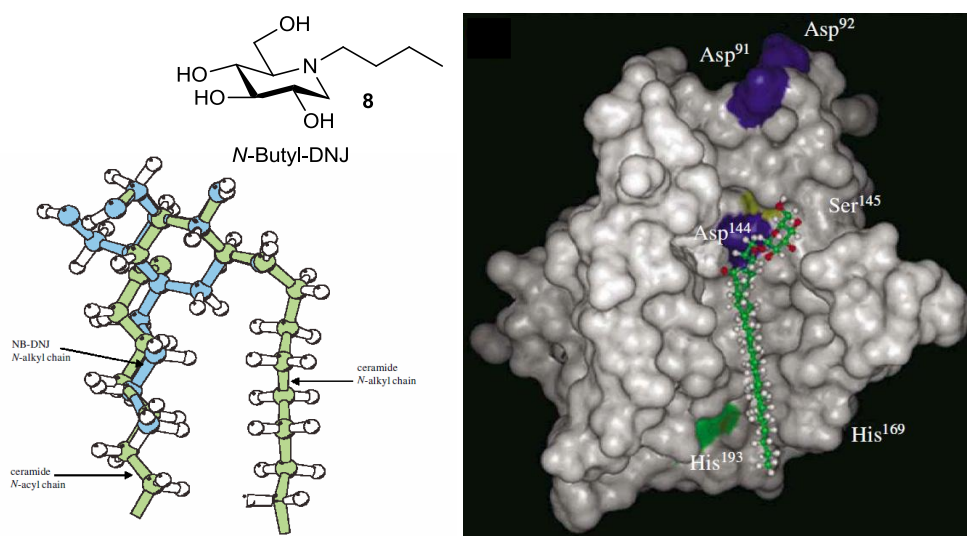


Figure 19 Comparaison de la structure de la *N*-butyl-DNJ et du GlcCer et modèle du GlcCer dans le site actif de la GCS.¹⁰⁴

Ces résultats ont conduit, après les différentes phases d'essais cliniques, à la mise sur le marché par Actelion du Zavesca[®] ou miglustat (*N*-Butyl-DNJ **8**) pour le traitement de la maladie de Gaucher de type I en 2002. Moins efficace que le traitement ERT, il est prescrit aux patients ne pouvant bénéficier pour diverses raisons du traitement ERT. Sa posologie est de 3 x 100 mg par jour. Le Zavesca entraîne des effets secondaires relativement lourds, notamment des diarrhées chroniques qui peuvent néanmoins être évitées par d'autres traitements médicamenteux secondaires. Ces effets sont dus principalement au manque de sélectivité de la *N*-butyl-DNJ qui est un inhibiteur connu de nombreuses glycosidases notamment les glucosidases intestinales. Ce traitement SRT présente certains avantages par rapport au traitement ERT. On peut citer notamment l'administration par voie orale qui est beaucoup moins lourde pour les patients et une pénétration possible de la barrière hémato-encéphalique ce qui ferait du Zavesca un candidat possible pour le traitement des phénotypes avec atteinte neurologique. Mais le coût de ce traitement reste très élevé étant donné les doses journalières administrées (environ 90 000 US\$ par patient et par an).¹⁰⁵

Ces deux traitements, ERT et SRT, sont aujourd'hui les seuls disponibles pour la maladie de Gaucher. Les enjeux actuels, sont dans le cas de la SRT, le développement de nouveaux inhibiteurs plus actifs et plus sélectifs de la GCS. Actuellement Genz-1128638 (Eliglustat tartrate) (Figure 20), un composé développé par Genzyme est en phase d'essai clinique II comme traitement SRT et a montré de bons résultats préliminaires.¹⁰⁶

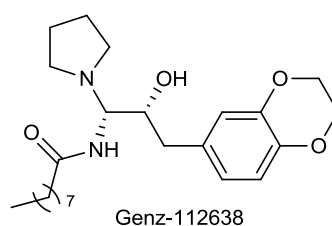


Figure 20.

¹⁰⁵ Source genzyme

¹⁰⁶ a) E. Lukina, N. Watman, E. A. Arrequin, M. Banikazemi, M. Dragoski *et al. Blood* **2010**, *116*, 893-899; b) <http://clinicaltrials.gov> pour consulter les derniers résultats, numéro de l'étude : NCT00358150

Mais les coûts très élevés de ces deux types de traitement, ainsi que leurs désavantages respectifs (lourdeur du traitement, effets secondaires importants) encouragent les chercheurs à développer de nouvelles voies thérapeutiques. Une approche alternative qui a été développée récemment est le sauvetage *in situ* de l'enzyme mutante afin de récupérer son activité enzymatique, c'est l'approche thérapeutique « chaperon » (PCT pharmacological chaperone therapy).

iii) La thérapie chaperon

a) Concept

Chez des patients atteints de maladies lysosomales, des enzymes déficientes entraînent l'accumulation d'un substrat dans le lysosome. Ces enzymes mutantes sont la plupart du temps encore catalytiquement actives mais sont mal repliées et retenues dans le RE pour être finalement détruites par des mécanismes de contrôle-qualité.

N. Asano et J.-Q. Fan ont montré en 1999 que la *N*-butyl-désoxygalactojirimicine (*N*-butyl-DGJ), un puissant inhibiteur de l'enzyme défectueuse impliquée dans la maladie de Fabry, était capable d'augmenter l'activité de l'enzyme mutante d'environ un facteur 8 à une concentration de 20 μM pour une mutation.²⁸ Ce phénomène a été nommé « effet chaperon » par analogie avec les chaperons moléculaires qui sont des protéines facilitant le repliement au cours de la maturation des protéines.^{107,27} Un composé « chaperon pharmacologique » est défini comme une petite molécule présentant une grande affinité avec l'enzyme défectueuse et capable d'augmenter son activité.

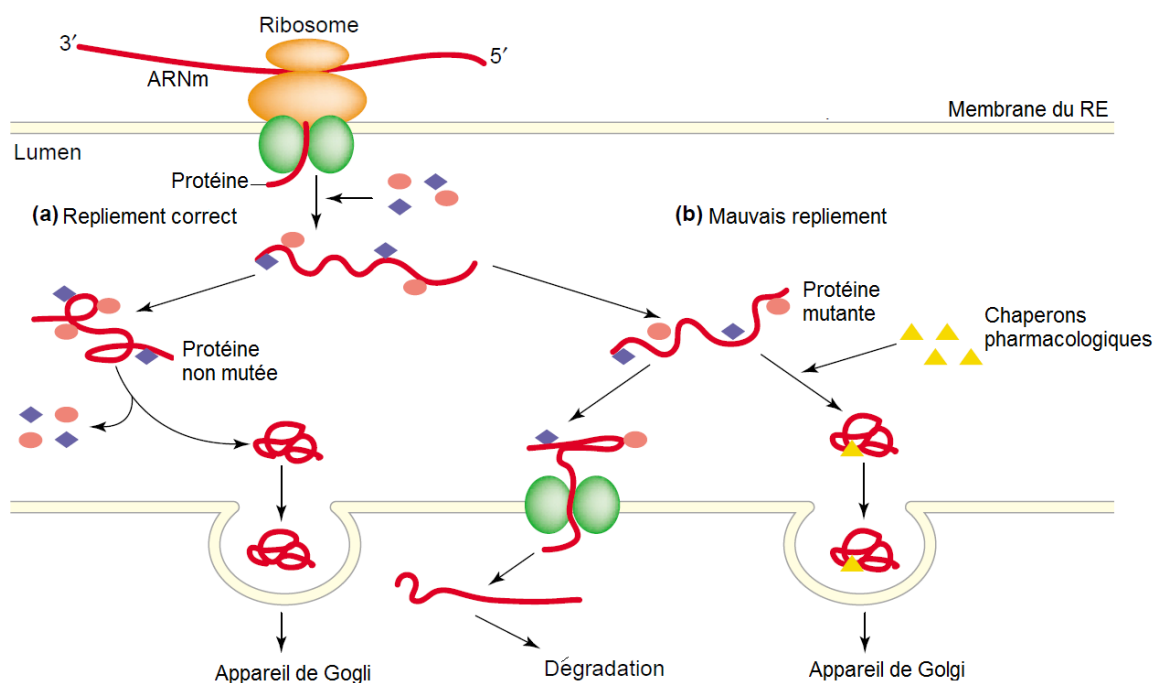


Figure 21. Principe de l'effet chaperon¹⁰⁸

¹⁰⁷ D. Ringe, G. A. Petsko, *J. Biol.* **2009**, 8, 80-84

¹⁰⁸ J.-Q. Fan, *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, 24, 355-360.

Les inhibiteurs compétitifs réversibles de ces enzymes constituent une piste importante dans la découverte de nouveaux chaperons pharmacologiques. En effet, grâce à leur grande affinité avec le site actif de ces enzymes, et à des concentrations sub-inhibitrices, nombre d'entre eux ont montré des activités chaperons.^{108,109} Ces chaperons agiraient directement sur l'enzyme mal repliée au niveau de son site actif et stabiliseraient sa conformation tridimensionnelle. Ainsi l'enzyme réussirait à passer le système de contrôle-qualité du RE et à être transportée vers le lysosome (Figure 21). Dans le lysosome la molécule chaperon serait remplacée dans le site actif de l'enzyme par le substrat accumulé, en très large excès chez les patients atteints de la maladie.

Cette approche thérapeutique émergente repose sur l'effet de seuil : l'enzyme mutante possède une activité résiduelle et augmenter son activité même d'un facteur 1,5 ou 2 peut avoir une grande influence sur les symptômes cliniques des patients.¹¹⁰ Par exemple, il a été montré chez des patients atteints de la maladie de Sandhoff que des malades possédant les symptômes classiques avaient une activité résiduelle de l'enzyme déficiente de 3 à 6% tandis que des malades asymptomatiques avaient une activité résiduelle de l'enzyme de seulement 9 à 10%.¹¹¹

b) Chaperons de la β -glucocérébrosidase

Depuis ce premier résultat obtenu pour la maladie de Fabry, de nombreux groupes ont décrit des chaperons de la β -glucocérébrosidase, l'enzyme déficiente impliquée dans la maladie de Gaucher.¹¹² Pour trouver des chaperons de la GCCase, la première approche des chimistes a été de chercher de bons inhibiteurs compétitifs de l'enzyme qui présentent donc une grande affinité pour son site actif.¹⁰⁸ Du fait de leur activité bien connue comme inhibiteur de glycosidases, les iminosucres représentent une classe de choix pour la découverte de chaperon efficaces de la GCCase.

Mutation N370S:

Le groupe de Kelly a présenté le premier résultat en 2002 en montrant que la *N*-nonyl-DNJ **43**, un bon inhibiteur de la GCCase (IC₅₀ de 1 μ M) permettait d'augmenter l'activité résiduelle de l'enzyme mutée N370S dans des fibroblastes (cellules du tissu conjonctif) de patients de la maladie Gaucher de 65% à une concentration sub-inhibitrice de 5 μ M (Figure 22).¹¹³ Ce résultat a été suivi en 2005 par une étude sur quelques composés alkylés en série DNJ.¹¹⁴

¹⁰⁹ J.-Q. Fan, *Biol. Chem.* **2007**, 389, 1-11.

¹¹⁰ E. Conzelmann, K. Sandhoff, *Dev. Neurosci.* **1984**, 6, 58-71.

¹¹¹ B. Dlott, A. d'Azzo, D. V. Quon, E. F. Neufeld, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 17921-17927.

¹¹² Revue sur la thérapie chaperon pour la maladie de Gaucher : J. M. Benito, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, *Expert Opin. Ther. Patents*, **2011**, 21, 885-903.

¹¹³ A. R. Sawkar, W.-C. Cheng, E. Beutler, C.-H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 15428-15433.

¹¹⁴ A. R. Sawkar, S. L. Adamski-Werner, W.-C. Cheng, C.-H. Wong, E. Beutler, K.-P. Zimmer, J. W. Kelly, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 1235-1244.

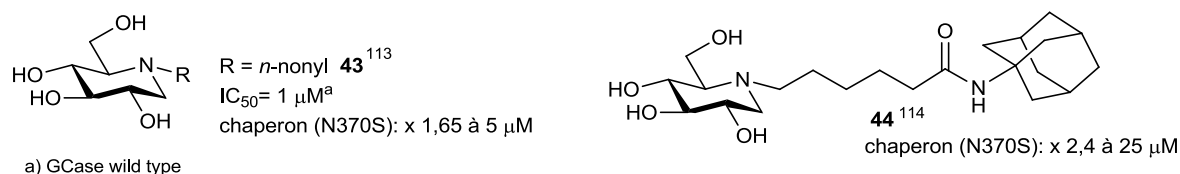


Figure 22.

Leur meilleur composé **44** est un composé alkylé substitué par un groupement adamantyl amide hydrophobe. Ce composé se comporte comme un chaperon de l'enzyme mutée N370S pour une grande fenêtre de concentration de 1 à 100 μ M avec un maximum d'augmentation d'un facteur 2,4 à 25 μ M (Figure 22).

Ces premiers résultats ont été suivis par deux études réalisées par O. R. Martin et P. Compain en 2006. La première étude porte sur deux séries de composés dérivés de la DNJ.¹¹⁵ Les tests d'inhibitions sur la série *N*-alkyl-DNJ, et la série α -1-*C*-alkyl-DNJ montrent que l'allongement de la longueur de la chaîne alkyl augmente l'inhibition des composés pour la GCCase. Ainsi, les IC_{50} varient pour les dérivés *N*-butyl à *N*-nonyl de 270 μ M à 0,66 μ M et pour les dérivés α -1-*C*-butyl à α -1-*C*-nonyl de 100 μ M à 0,27 μ M. Les meilleurs composés : l' α -1-*C*-octyl-DNJ **45** et l' α -1-*C*-nonyl-DNJ **46**, ont été testés comme chaperons de la GCCase et ont montré des augmentations d'activité de facteurs 1,7 à 20 μ M et 1,7 à 2,5 μ M respectivement (Figure 23).

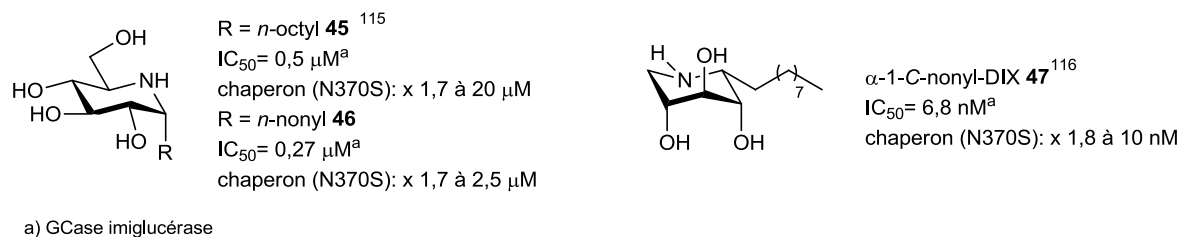


Figure 23.

Un excellent inhibiteur de la GCCase, l' α -1-*C*-nonyl-imino-D-xylitol **47** (IC_{50} de 6,8 nM) a été mis en évidence dans une seconde étude de type relation structure-activité.¹¹⁶ Ce composé s'est révélé également très sélectif de cette enzyme en inhibant pas les diverses α -glucosidases testées. L' α -1-*C*-nonyl-imino-D-xylitol montre une activité chaperon avec un gain d'un facteur 1,8 à une très faible concentration cellulaire de 10 nM.

Parallèlement, Fan *et al.* ont mis en évidence le potentiel chaperon de l'isofagomine **48**.¹¹⁷ Ce très bon inhibiteur de la GCCase (IC_{50} de 40 nM) a permis une augmentation d'un facteur 1,9 de l'activité résiduelle de l'enzyme mutée N370S à 50 μ M (Figure 24). Des tests d'immunocytochimie ont montré que l'isofagomine avait bien pour effet d'augmenter le transport de la N370S GCCase du RE vers le lysosome.¹¹⁷ L'ajout de l'isofagomine modifierait le repliement

¹¹⁵ L. Yu, K. Ikeda, A. Kato, I. Adachi, G. Godin, P. Compain, O. R. Martin, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736-7744.

¹¹⁶ P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1356-1359.

¹¹⁷ a) X. Zhu, K. A. Sheth, S. Li, H.-H. Chang, J.-Q. Fan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7450-7453. b) H.-H. Chang, N. Asano, S. Ishii, Y. Ichikawa, J.-Q. Fan, *FEBS J.* **2006**, *273*, 4082-4092.

et la maturation de la GCCase mutée et ainsi augmenterait son activité au pH acide du lysosome (pH = 5,2).¹¹⁸ Ces études très prometteuses ont conduit aux premiers essais cliniques de l'isofagomine (sous le nom de PliceraTM) sur des patients atteints de la maladie de Gaucher de type I. Cependant, les résultats de la phase clinique II avec l'isofagomine sont contrastés.¹¹⁹ Bien que ces essais aient montré une augmentation de la quantité de GCCase dans les globules blancs des patients traités, des améliorations cliniques n'ont été observées que chez un patient sur dix-huit. La firme Amicus Therapeutics prévoit d'examiner en profondeur les résultats mais n'envisagerait pas de poursuivre en phase III pour le moment.

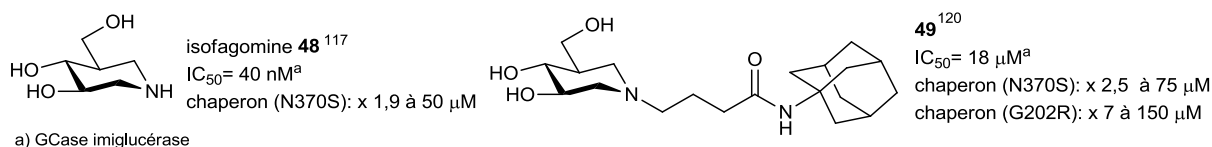


Figure 24.

L'équipe de Kelly a ensuite greffé le groupement alkyl terminé par la fonction adamantyl amide qui avait montré de bons résultats en série DNJ sur l'azote de l'isofagomine. Le composé formé **49** s'est révélé être un moins bon inhibiteur de la GCCase (18 μM) mais a montré une augmentation d'un facteur 2,5 de l'activité de l'enzyme mutée N370S à 75 μM (Figure 24).¹²⁰

Suite à ces premiers résultats de nombreuses structures ont été synthétisées dans le but d'augmenter encore l'affinité avec l'enzyme et l'effet chaperon. Dans les paragraphes suivants seront rapportés plusieurs exemples de nouveaux composés intéressants.

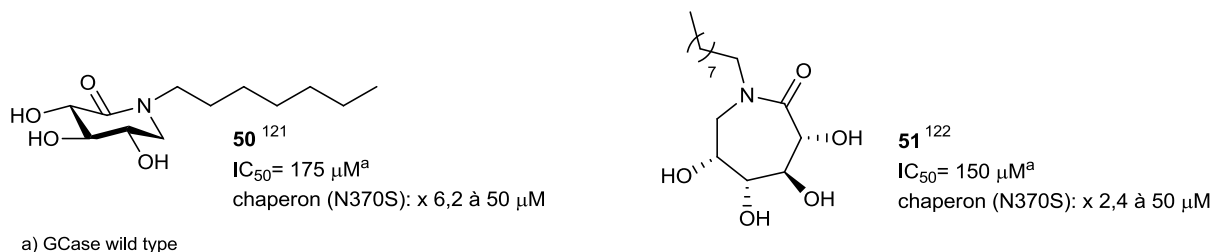


Figure 25.

Ye et Butters ont décrit la synthèse d'une série de composé avec des structures proches de la DNJ mais possédant une fonction carbonyle sur le carbone 5 (Figure 25).¹²¹ Ces iminosucres, particuliers car possédant un azote désactivé qui ne se protone pas à pH physiologique, présentent des inhibitions faibles mais une activité chaperon intéressante sur l'enzyme mutée N370S. Ainsi, de façon surprenante, le composé **50**, faible inhibiteur de la GCCase (IC_{50} de 175 μM) a permis une augmentation de l'activité résiduelle de l'enzyme d'un facteur 6,2 à 50 μM . Cette augmentation est l'une des plus grande obtenue pour cette mutation. Néanmoins, cette forte augmentation ne se

¹¹⁸ R. A. Steet, S. Chung, B. Wustman, A. Powe, H. Do, S. A. Kornfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13813-13818.

¹¹⁹ Pour le communiqué de presse sur les essais cliniques : www.amicustherapeutics.fr

¹²⁰ Z. Q. Yu, A. R. Sawkar, L. J. Whalen, C. H. Wong, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 94-100.

¹²¹ G.-N. Wang, G. Reinkensmeier, S.-W. Zhang, J. Zhou, L.-R. Zhang, L.-H. Zhang, T. D. Butters, X.-S. Ye, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3146-3149.

retrouvant pas pour des analogues avec des longueurs de chaîne très proches, ce résultat demande sans doute confirmation. Similairement les auteurs ont très récemment décrit une série de ϵ -hexonolactames *N*-alkylés (par exemple le composé **51** Figure 25).¹²²

D'autres exemples de composés ayant un azote désactivé ont été décrits par les groupes de Ortiz Mellet, de Fernández et de Suzuki avec la synthèse de structures bicycliques.¹²³ Ces composés « à caractère sp^2 » de l'azote présentent des inhibitions moyennes pour l'enzyme mutante N370S comme le composé **52**. Ces composés se sont révélés sélectifs de cette enzyme et n'inhibent pas les autres glycosidases lysosomales. L'activité chaperon de **52** est cependant assez faible avec une augmentation d'un facteur environ 1,3 à 3 μ M.

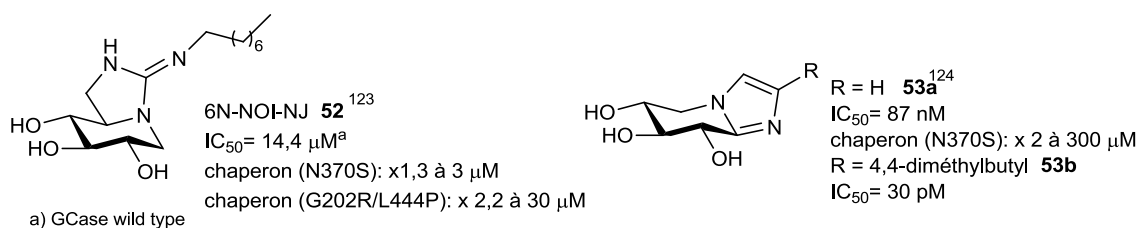


Figure 26.

L'équipe de Fan a également synthétisé d'excellents inhibiteurs de la GCCase avec une structure gluco-imidazole. Les IC_{50} des composés **53a** et **53b** sont de 87 nM et 30 pM ! Cependant, le composé **53a**, présente une activité chaperon décevante par rapport à cette inhibition avec une augmentation d'un facteur 2 de l'activité de la N370S GCCase à 300 μ M (Figure 26).¹²⁴ Les auteurs ne fournissent pas d'explication quant à ce résultat assez inattendu.

En dehors des iminosucres à cycle pipéridine, les carbasucres représentent également une classe d'inhibiteur de GCCase bien étudiée. L'équipe de Delgado a développé des synthèses originales pour identifier de bons inhibiteurs de GCCase en série aminocyclitol. L'activité chaperon de dérivés *N*-alkylés a été mesurée par dénaturation thermique de la GCCase (imiglucérase) et non par des tests cellulaires classiques.¹²⁵ La dénaturation thermique induit le dépliement partiel de l'enzyme et donc diminue voire inhibe son activité enzymatique. Les tests de dénaturation visent donc à montrer la capacité ou non des molécules testées à interagir avec l'enzyme pour sauvegarder son activité catalytique. Ces activités chaperons (jusqu'à une augmentation d'un facteur 2,5 à 100 μ M pour **54**) prouvent l'intérêt de ces composés comme chaperon potentiels de la GCCase mutée (Figure 27). Toutefois, il a été montré que ces composés n'avaient que peu d'activité chaperon sur des GCCase mutées de maladie de Gaucher avec un gain modeste sur des mutations mixtes.¹²⁶

¹²² G.-N. Wang, G. Twigg, T. D. Butters, S. Zhang, L. Zhang, L.-H. Zhang, X.-S. Ye, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2923-2927.

¹²³ Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, H. Ninomiya, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz-Mellet, J. M. García-Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2780-2792.

¹²⁴ J.-Q. Fan, X. Zhu, K. Sheth, **2005**, US20050137223.

¹²⁵ M. Egido-Gabas, D. Canals, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *ChemMedChem*, **2007**, *2*, 992-994.

¹²⁶ G. Sánchez-Ollé, J. Duque, M. Egido-Gabás, J. Casas, M. Lluch, A. Chabás, D. Grinberg, L. Vilageliu, *Blood Cell. Mol. Dis.* **2009**, *42*, 159-166.

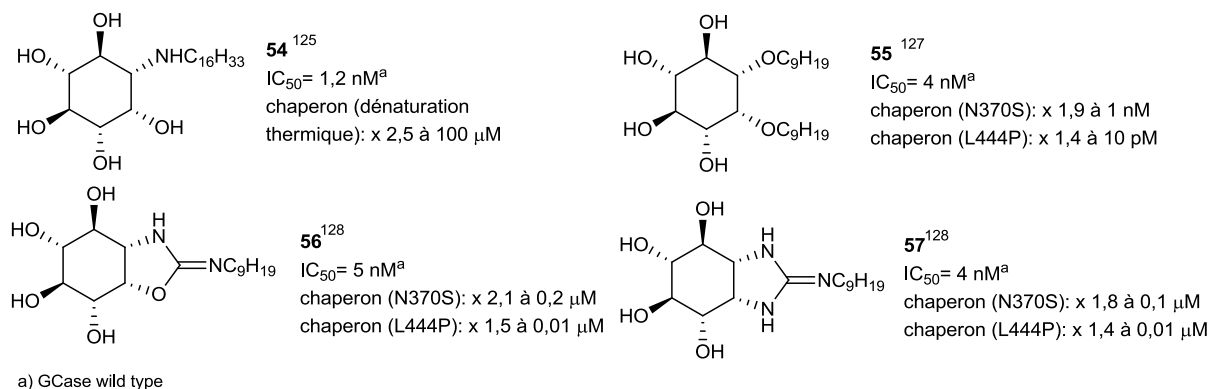


Figure 27.

Très récemment, il a été rapporté de très bons résultats biologiques avec des carbasucres di-alkylés dérivés du *myo*-inositol.¹²⁷ En effet, le composé **55** s'est révélé être un bon chaperon de l'enzyme N370S à de très faibles concentrations! Ainsi il permet d'obtenir un gain d'un facteur 1,9 à 1 nM sur l'activité de l'enzyme mutée N370S (Figure 27). Ces composés se révèlent être également très sélectifs de la GCCase par rapport aux autres glycosidases lysosomales (α -glucosidase, α -galactosidase et β -galactosidase). Ces résultats font suite à d'autres bons résultats obtenus avec des thiourées ou guanidines polyhydroxylées. Les composés **56** et **57** sont en effet de très bons inhibiteurs de la GCCase avec des IC_{50} de 5 et 4 nM respectivement et présentent lors de tests cellulaires des augmentations d'activité de l'enzyme N370S de facteurs 2,1 à 0,2 μM et 1,8 à 0,1 μM respectivement.¹²⁸ Les résultats d'activité chaperon de ces composés sont très bons pour l'enzyme mutée L444P et seront commentés dans un paragraphe ultérieur.

Etant donné que pour le moment il n'est pas possible d'établir des critères pour la conception de chaperons, des études sont réalisées par criblage de banques de composés chimiques. A partir de ces études, des dérivés non osidiques ont été identifiés comme chaperons de la GCCase. Certaines bibliothèques sont constituées de médicaments dont les propriétés pharmacocinétiques et cytotoxiques ont déjà été étudiées. Ainsi par ces méthodes, les composés identifiés peuvent atteindre plus rapidement des phases d'essais cliniques avancées.

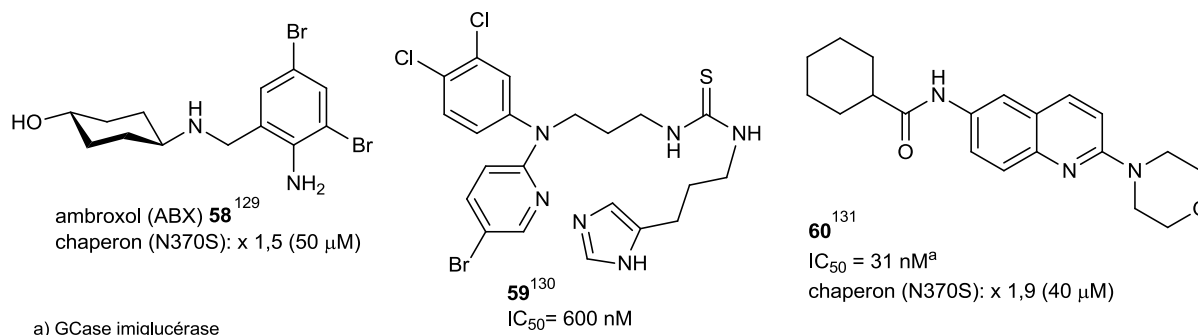


Figure 28.

L'ambroxol (ABX **58**) a été ainsi identifié comme chaperon de la GCCase avec une augmentation d'un facteur de 1,5 à 50 μM de la N370S GCCase à partir d'une bibliothèque de 1040 médicaments

¹²⁷ A. Trapero, P. Gonzáles-Bulnes, T. D. Butters, A. Llebaria, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4479-4488.

¹²⁸ A. Trapero, I. Alfonso, T. D. Butters, A. Llebaria, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5474-5484.

approuvés par la FDA (Food Drug Administration).¹²⁹ A l'origine, l'ambroxol est prescrit pour ses propriétés expectorantes et mucolytiques dans le traitement de certaines bronchites, toux et sinusite. D'autres composés ont été découverts par screening notamment la thio-urée **59** qui présente un IC₅₀ de 600 nM et qui, après avoir montré une activité chaperon *in vitro*, a été administrée à des souris.¹³⁰ Des études pharmacocinétiques ont montré que ce composé était capable d'atteindre le cerveau des souris. Un groupe de recherche américain a également mis en évidence, à partir d'une librairie de 59815 composés, trois groupes de molécules inhibitrices de la GCCase avec des activités chaperon sur la mutation N370S, des sulfonamides, des triazines et des aminoquinolines comme par exemple le produit **60** (Figure 28).¹³¹

Autres mutations, mutation L444P :

La mutation N370S est la plus courante et représente jusqu'à 90% du génotype dans la population juive ashkénase des patients atteints de la maladie de Gaucher. Cependant d'autres mutations sont aussi observées chez un certain nombre de patients. De nombreux tests d'activité chaperons sur différentes mutations ont été également conduits. Parmi les activités remarquables on peut noter par exemple l'augmentation jusqu'à un facteur 7 de l'activité de l'enzyme mutée G202R par **49** à 150 μM (Figure 24). L'équipe d'Ohno a supposé que la *N*-octyl-β-valienamine **61**, bon inhibiteur de la β-glucosidase de foie de souris, pouvait être inhibiteur de la GCCase et présenter une activité chaperon. Ce composé s'est révélé spécifique de la mutation F213I avec des augmentations d'activité d'un facteur 6 à 30 μM pour l'enzyme mutée F213I.¹³²

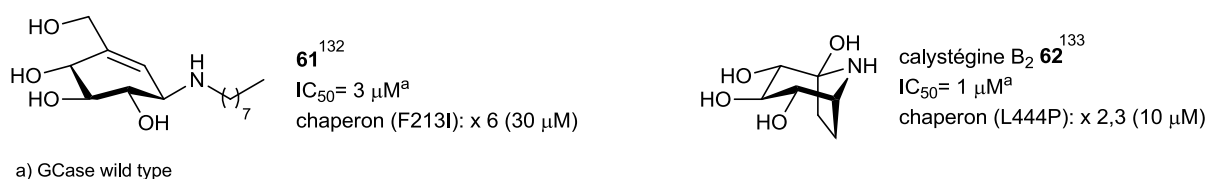


Figure 29.

Malheureusement, très peu de composés présentent des activités chaperon significatives pour la mutation L444P qui conduit aux phénotypes les plus graves avec des troubles neurologiques. Ceci pourrait en partie s'expliquer par le fait que cette mutation est située plus loin du domaine catalytique de l'enzyme que la mutation N370S. La meilleure activité chaperon pour cette enzyme a été rapportée pour la calystégine B₂ **62** et ses analogues avec une augmentation d'activité pour la calystégine B₂ d'un facteur 2,3 à 10 μM (Figure 29).¹³³ L'isofagomine a montré aussi un effet sur la L444P et son administration orale à des souris portant cette mutation donne des résultats encourageants.¹³⁴ Des résultats intéressants ont été obtenus très récemment sur des dérivés carbasucres. Les composés **56** et **57** ont montré des activités chaperons sur cette mutation :

¹²⁹ G.H. B. Maegawa, M. B. Tropak, J. D. Buttner, B. A. Rigat *et al.* *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23502-23516.

¹³⁰ J. J. Marugan, W. Huang, O. Motabar, W. Zheng, J. Xiao *et al.* *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 56-60.

¹³¹ W. Zheng, J. Padia, D. J. Urban, A. Jadhav, O. Goker-Alpan, A. Simeonov, E. Goldin, D. Auld *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 13192-13197.

¹³² H. Lin, Y. Sugimoto, Y. Ohsaki, H. Ninomiya, A. Oka, M. Tanigushi, H. Ida, Y. Eto, S. Ogawa *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1689*, 219-228.

¹³³ J.-Q. Fan, S. Ishii, N. Asano, **2005**, US20070021381.

¹³⁴ R. Khanna, E. R. Benjamin, L. Pellegrino, A. Schilling, B. A. Rigat *et al.* *FEBS J.* **2010**, *277*, 1618-1638.

x1,5 et 1,4 à une concentration très faible de 10 nM (Figure 27). Le résultat le plus remarquable est pour le produit **55** qui permet d'obtenir un gain d'activité d'un facteur 1,4 de l'enzyme mutée L444P à une concentration de seulement 10 pM !

Perspectives

Les mécanismes à la base de l'effet chaperon restent aujourd'hui controversés et complexes à rationaliser.¹³⁵ D'autres paramètres que la simple activité inhibitrice des composés pourraient rentrer en compte telles que la perméabilité membranaire, les différences d'inhibition à pH neutre (RE) et légèrement acide (lysosome) etc. Dans une étude très récente sur les structures cristallines de l'enzyme N370S GCCase et de l'enzyme recombinée, le groupe de Wei a montré qu'il n'existerait quasiment pas de différences structurales entre ces deux enzymes.¹³⁶ La mutation N370S induirait seulement une rigidité supplémentaire au niveau de la région de la boucle 1 de la protéine mutante. Ceci aurait pour effet de réduire l'activité catalytique de l'enzyme. Selon eux, le mécanisme d'action de ces inhibiteurs chaperons ne résulterait donc pas de l'aide au repliement et de l'adressage correct mais d'une diminution de la sensibilité de ces protéines à la dégradation dans le lysosome, leur durée de vie étant ainsi prolongée. Ce nouvel éclairage, bien qu'intéressant, va à l'opposé de l'explication « classique » de l'effet chaperon communément admis (Figure 20) et vient d'être très récemment remis en cause par le groupe de Tropack.¹³⁵

Si les mécanismes d'action de ces chaperons pharmacologiques restent incertains pour le moment, le champ d'application et l'espoir suscité par cette nouvelle voie thérapeutique sont très importants. De nombreuses stratégies sont envisagées pour atteindre les objectifs des différents enjeux de cette thérapie. En effet, il faut pouvoir trouver des critères pour la conception de nouveaux chaperons. Ces nouveaux chaperons devront être plus puissants, c'est-à-dire engendrer des augmentations d'activité plus importantes des GCases mutées à des concentrations plus faibles et, être plus sélectifs pour ne pas générer d'effets indésirables. C'est dans ce cadre que nous avons imaginé une stratégie pour l'élaboration d'une bibliothèque de nouveaux chaperons.

1.2.2. Stratégie adoptée

La stratégie envisagée repose sur une collaboration avec l'équipe du Pr. A. Delgado de l'université de Barcelone. En effet, cette équipe a développé une méthode de screening *in situ* d'aminocyclitols en utilisant le concept de chimie click.¹³⁷ Cette étude a été conduite dans le but de déterminer rapidement une structure optimale pour la partie pseudo-aglycone des composés. Cette famille de composés possède des activités inhibitrices de la GCCase,¹³⁸ mais ne présente pas d'activité chaperon significative pour un nombre conséquent de mutations.¹²⁶ L'étude réalisée par ce groupe, leur a permis tout de même de mettre en évidence plusieurs composés intéressants avec des IC₅₀ sur la GCCase de l'ordre de la centaine de nM (composés **63**, **64**, **65**) (Figure 30). Certains

¹³⁵ G. Babajani, M. B. Tropack, D. J. Mahuran, A. R. Kermode, *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *106*, 323-329.

¹³⁶ R. R. Wei, H. Hughes, S. Boucher, J. J. Bird, N. Guziewicz, S. M. V. Patten, H. Qiu, C. Qun Pan, T. Edmunds, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 299-308.

¹³⁷ L. Díaz, J. Casas, J. Bujons, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2069-2079.

¹³⁸ M. Edigo-Gabas, P. Serrano, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1195-1201.

de ces composés se révèlent être de bons chaperons de la GCCase ayant subi une dénaturation thermique avec des augmentations significatives de l'activité de cette enzyme. Par exemples, les aminocyclitols **63** et **65** permettent de récupérer plus de 90% de l'activité enzymatique après 60 minutes de dénaturation à une concentration de 100 μM .

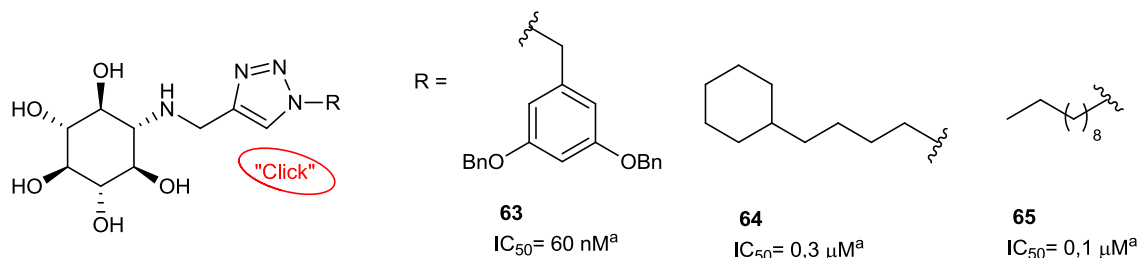


Figure 30. Exemple de composés mis en évidence par la stratégie du groupe du Pr. Delgado.¹³⁷

La puissance de cette méthodologie réside surtout dans l'identification rapide de « hits » par évaluation biologique *in situ* des composés synthétisés en parallèle par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC pour « Copper Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition »). Cette réaction, décrite par Huisgen,¹³⁹ puis dans sa version régiosélective catalytique au cuivre I, indépendamment par Meldal et Sharpless,¹⁴⁰ permet un accès extrêmement rapide à une diversité de produits. Comme cette réaction est réalisée dans l'eau, le screening des propriétés biologiques peut se faire directement sur le milieu réactionnel après vérification par HPLC de la formation des produits et de la consommation complète des réactifs. Ceci permet une identification très rapide des premiers « hits » qui peuvent, par la suite, être testés après avoir été obtenus purs pour confirmation des premiers tests biologiques. Delgado *et al.* ont par ailleurs, vérifié sur les produits alkylés correspondants que le cycle triazole présent sur la chaîne n'avait pas d'influence notable sur l'activité des produits.¹⁴¹

Adaptée à la série phare de notre laboratoire, les dérivés α -1-C-substitués-imino-D-xylitol, cette méthodologie nous permettrait d'accéder de façon très rapide à de nouveaux chaperons de la GCCase (Figure 31). Ainsi nous serions en mesure de combiner la méthodologie développée par le Pr. A. Delgado avec les propriétés du motif α -1-C-alkyl-iminoxylitol, bien meilleur inhibiteur de la GCCase que la série N-substitué-aminocyclitol et chaperon avéré de la GCCase mutée N370S.¹¹⁶

¹³⁹ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.

¹⁴⁰ a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599; c) concept de «click chemistry» H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

¹⁴¹ L. Diaz, J. Bujons, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5248-5255.

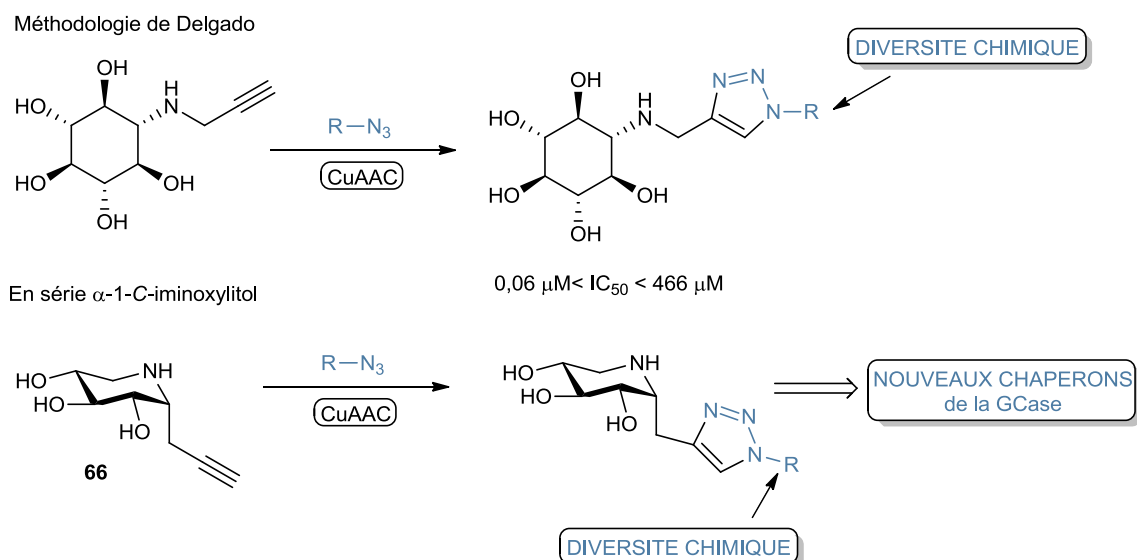


Figure 31. Stratégie de diversification de la partie aglycone

La partie aglycone joue un rôle important dans l'inhibition. Quelques observations on déjà pu être faites à ce sujet. On remarque généralement que les composés possédant de longues chaînes grasses ont de bonnes activités inhibitrices et chaperon de la GCCase.^{115,116} Il semble toutefois y avoir un certain plafonnement à partir d'une longueur de chaîne pour l'inhibition. Une étude de 2011 en série *N*-alkyl-DNJ avec un adamantane terminal semble confirmer ce genre d'effet.¹⁴² Le produit **B**₄ est un meilleur inhibiteur que ses analogues possédant les chaînes plus courtes et on observe une baisse de l'inhibition pour les produits possédant les chaînes plus longues (Tableau 7).

composé	n	IC ₅₀ / μ M GCCase ¹⁴²
A ₁	1	2,11
A ₂	2	1,12
A ₄	4	0,6
B ₄	4	0,3
B ₆	6	0,46
B ₈	8	0,47
B ₁₀	10	0,81

composé	IC ₅₀ / nM GCCase ^{116,143}
α -1-C-hexyl-iminoxylylitol	19
α -1-C-nonyl-iminoxylylitol	6,8
α -1-C-dodécyl-iminoxylylitol	14

n = 4, 7 et 10

Tableau 7. Influence de la longueur de la chaîne de la partie aglycone.^{142,116,143}

¹⁴² N. Ardes-Guisot, D. S. Alonzi, G. Reinkensmeier, T. D. Butters, C. Norez, F. Becq, Y. Shimada, S. Nakagawa, A. Kato, Y. Blériot, M. Sollogoub, B. Vauzeilles, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5373-5388.

Cet effet était également marqué sur la série α -1-C-iminoxylitol avec de simples chaînes alkyles. Le composé possédant une chaîne nonyl présentait un IC₅₀ de 6,8 nM tandis que les composés avec une chaîne hexyl et dodécyl présentaient des IC₅₀ de 19 et 14 nM respectivement (Tableau 7).^{143,116}

La présence de longues chaînes peut toutefois poser des problèmes de cytotoxicité.¹⁴⁴ Il semble donc intéressant de tester d'autres groupements hydrophobes pour essayer d'obtenir de bonnes inhibitions sans problèmes de cytotoxicité. Une étude récente en série DNJ fait part de l'effet de divers groupements hydrophobes, en particulier des aromatiques fonctionnalisés.¹⁴⁵

L'ajout de différents substituants sur notre structure xylitol **66** pourrait également permettre en plus d'augmenter l'affinité pour l'enzyme, d'apporter d'autres propriétés aux composés leur permettant par exemple de passer plus facilement les barrières biologiques. Il est à noter que pendant la phase de tests biologiques de nos composés, un projet similaire a été publié dans la littérature par le groupe de Withers, utilisant notre substrat en série α -1-C-iminoxylitol.¹⁴⁶ Les auteurs ont introduit aussi une diversité structurale dans la partie aglycone par chimie click mais en utilisant une réaction de type thiol-ène. Leurs résultats seront expliqués plus loin dans la partie résultats biologiques en comparaison avec nos résultats (Chapitre 3).

1.2.3. Synthèse du précurseur **66**

La synthèse de nos différents produits repose sur l'obtention de l'intermédiaire **66** possédant une liaison alcyne terminale nécessaire aux réactions de chimie click. La contrainte majeure de ce projet est la quantité relativement importante de produit qu'il faut synthétiser (environ 200 mg). De ce fait, la synthèse s'est basée sur des étapes robustes avec le passage par l'intermédiaire clé allylé **67** qui est utilisé dans d'autres synthèses (voir Chapitre 2).¹⁴⁷ On garantissait ainsi un accès rapide au produit afin d'initier rapidement le projet en collaboration avec le Pr. Delgado. Cette synthèse est conçue avec deux étapes clés. La première est l'obtention de **66** par réaction de coupure oxydante suivie d'une homologation de Bestmann-Ohira à partir du composé **67**. La deuxième étape clé réside dans la formation de la liaison C-C par réaction de **69** avec l'allyl-Grignard.

¹⁴³ F. Oulaïdi, S. Front-Deschamps, E. Gallienne, E. Lesellier, K. Ikeda, N. Asano, P. Compain, O. R. Martin, *ChemMedChem*, **2011**, *6*, 353-361.

¹⁴⁴ H. R. Mellor, F. M. Platt, R. A. Dwek, T. D. Butters, *Biochem. J.* **2003**, *374*, 307-314.

¹⁴⁵ J. Diot, I. Garcia Moreno, G. Twigg, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, T. D. Butters, J. Kovensky, S. G. Gouin, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7757-7768.

¹⁴⁶ E. D. Goddard-Borger, M. B. Tropak, S. Yonekawa, C. Tysoe, D. J. Mahuran, S. G. Withers, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2737-2745.

¹⁴⁷ C. Decroocq, L. Mamani Laparra, D. Rodríguez-Lucena, P. Compain, *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, *30*, 559-574.

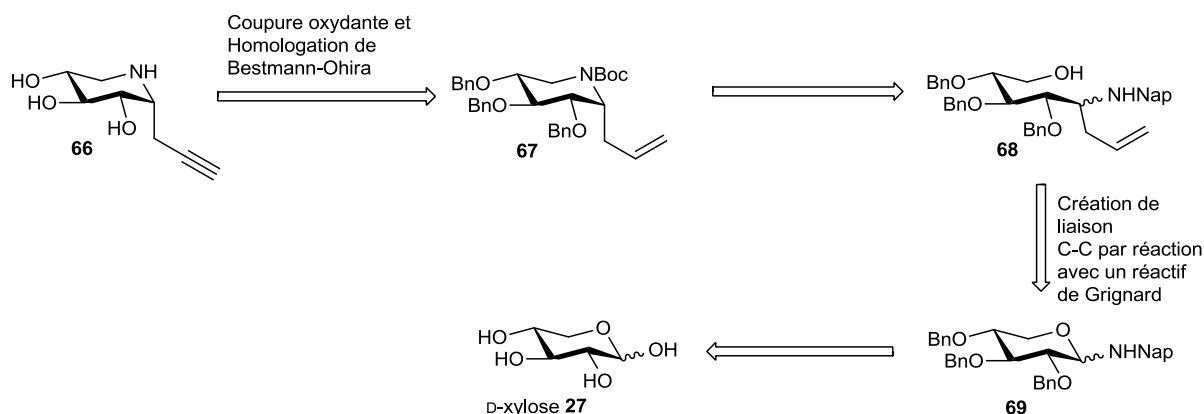


Schéma 31. Schéma rétrosynthétique de l'obtention du composé 66.

i) Synthèse du composé 67.

La synthèse du composé 67 repose donc sur l'addition diastéréosélective de bromure d'allylmagnésium sur l'amine glycosylée 69. Cette méthodologie développée par Nicotra¹⁴⁸ pour la synthèse d'imino-*C*-glycosides, a été adaptée avec l'utilisation du groupement protecteur de l'amine, le 2-naphtylméthyl (Nap) à la place du groupement benzyle. En effet, le groupement *N*-Nap peut être déprotégé sélectivement par rapport aux groupements benzyles dans des conditions douces en présence de 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ).¹⁴⁹ Ceci nous permettra de protéger l'atome d'azote par un groupement Boc pour l'étape de coupure oxydante. Le 2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose 30 est obtenu comme décrit précédemment au paragraphe 1.1.7 en trois étapes à partir du D-xylose 27 commercial avec un rendement de 68% sur les 3 étapes. Parallèlement la 2-naphtylméthylamine hydrochlorée 71 est synthétisée par réaction d'hydrogénation catalytique du 2-naphtalène-carbonitrile 70 de façon quantitative.¹⁵⁰ Le produit 71 est utilisé sans purification supplémentaire dans l'étape d'amination.

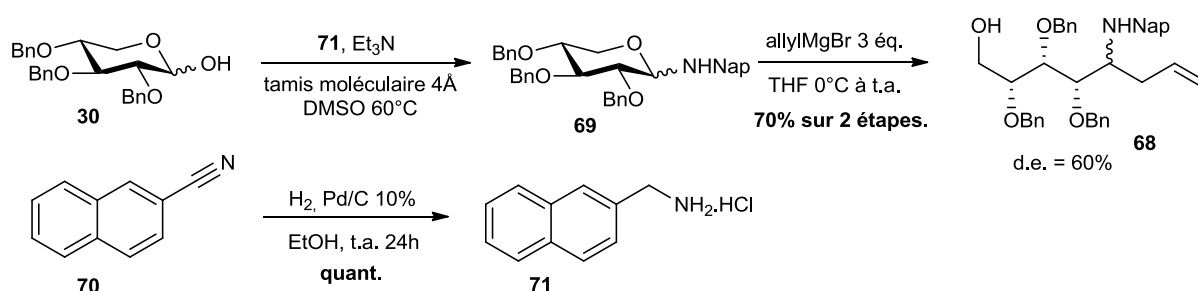


Schéma 32. Obtention du δ-aminoalcool 68.

Cette étape se fait par réaction du tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose 30 avec le sel d'ammonium 71 dans le DMSO en présence de Et₃N à 60°C. Le composé *N*-Nap-glycosylamine obtenu, assez instable, est utilisé immédiatement dans l'étape suivante sans purification. Le δ-aminoalcool 68 est obtenu par addition de 3 équivalents de bromure d'allylmagnésium sur le composé 69 dans le

¹⁴⁸ L. Cipolla, L. Lay, F. Nicotra, C. Pangrazio, L. Panza, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 4679-4690.¹⁴⁹ G. Godin, P. Compain, O. R. Martin, *Synlett* **2003**, 2065-2067.¹⁵⁰ W. H. Hartung *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, 50, 3370-3374.

THF avec un bon rendement sur deux étapes de 70% et une bonne diastéréosélectivité (e.d. = 60%). Le diastéréosélectivité observée peut s'expliquer grâce au modèle de Felkin-Anh (Figure 32). A ce stade, les deux diastéréoisomères ne sont pas séparés.

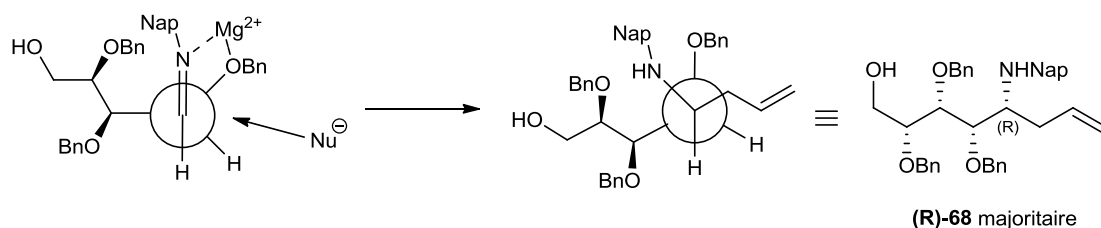


Figure 32. Modèle de Felkin Anh pour expliquer la diastéréosélectivité observée.

Le composé **68** est cyclisé par une réaction de S_N2 intramoléculaire grâce à l'utilisation de chlorure de mésyle^{151a} en présence de tamis moléculaire dans la pyridine à 100°C (Schéma 33). Les α - et β -imino-*C*-glycosides **72** sont alors séparés facilement par chromatographie sur gel de silice. Le diastéréoisomère **72 α** est obtenu avec un rendement isolé de 76% contre 13% pour son épimère **72 β** . La configuration 1,2 cis de ce produit est confirmée par RMN du 1H avec une constante de couplage $H_{1,2}$ axiale-équatoriale de 5,6 Hz.^{151b}

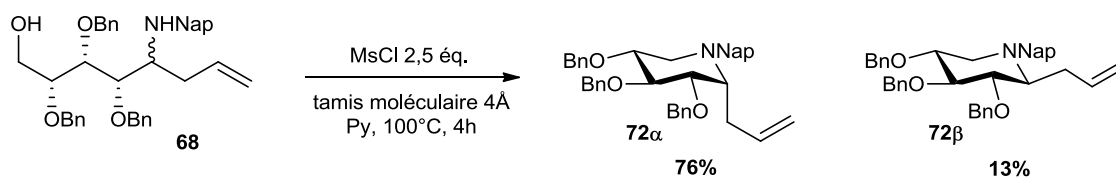


Schéma 33 Cyclisation du mélange de diastéréoisomères **72**.

Dans les conditions classiques de déprotection du groupement Nap¹⁴⁹ le produit **73** n'a été obtenu qu'avec 28% de rendement (Schéma 34).

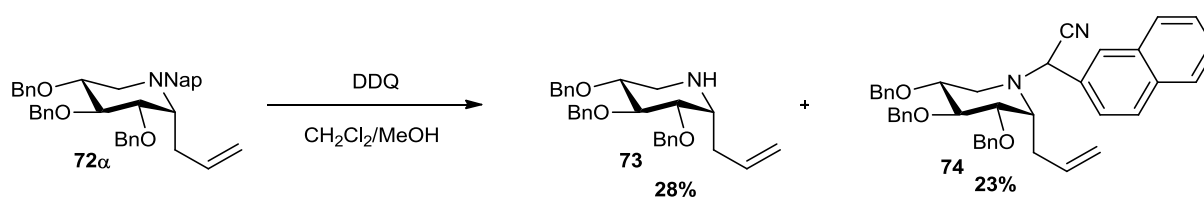


Schéma 34. Essai de déprotection de l'amine

Dans un premier temps nous avons pensé à une sensibilité des groupements benzyles qui sont normalement inertes à ces conditions douces au DDQ. Cependant, l'identification du produit secondaire **74**, qui a été obtenu avec un rendement de 23%, a prouvé que ce n'était pas le cas (Schéma 35). Un tel produit secondaire n'avait encore jamais été observé jusqu'à présent dans ces conditions de déprotection. Au cours de la déprotection, le DDQ oxyde le méthylène en position

¹⁵¹ a) A. Dondoni, D. Perrone, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4261-4273; b) Nota Bene: Bien que la conformation de la chaise n'ait pas été déterminée pour tous les substrats, les composés protégés et déprotégés seront représentés dans ce manuscrit en conformation 4C_1 . (on observe que la conformation est souvent 1C_4 pour les produits en série xylitol déprotégés)

benzylique du groupement Nap pour former le carbocation correspondant. A ce stade, le MeOH joue le rôle de nucléophile et attaque le carbocation pour donner après déprotonation un intermédiaire hémiaminal instable qui conduit à l'amine libre correspondante.

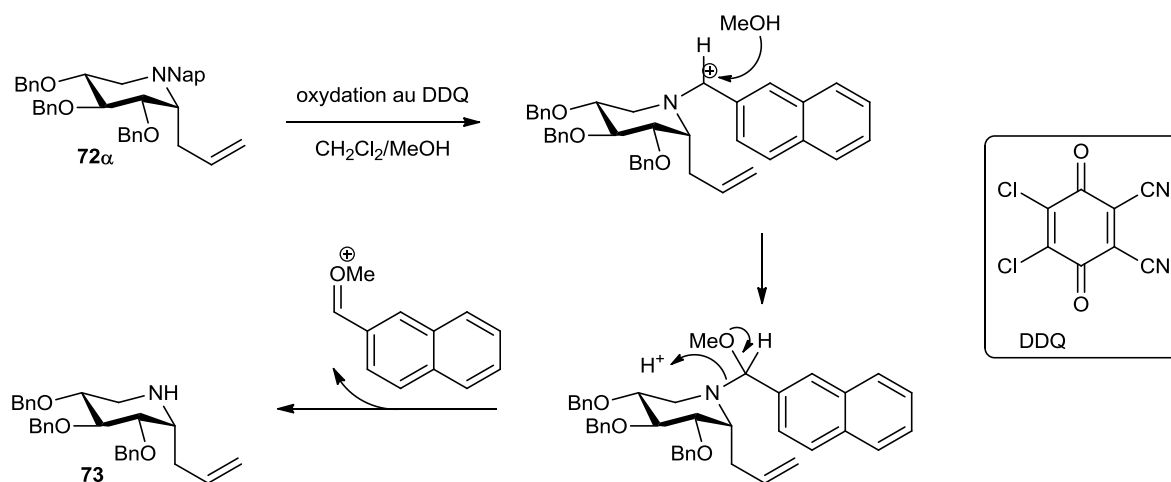


Schéma 35. Mécanisme de la déprotection en présence de DDQ.

Dans notre cas, un ion cyanure provenant du DDQ semble entrer en compétition avec le méthanol pour former l'espèce **74**, stable. Un simple changement du co-solvant nucléophile, le méthanol, par de l'eau a permis d'obtenir le produit souhaité avec un très bon rendement de 86% (Schéma 36). Ce changement avait été rapporté pour accélérer la réaction de déprotection de groupements *O*-methoxybenzyl.¹⁵²

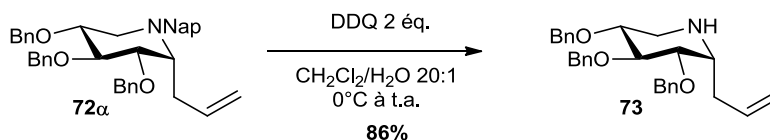


Schéma 36. Déprotection du groupement Nap en présence d'eau.

L'amine **73** peut alors facilement être protégée sous forme de carbamate dans des conditions classiques à l'aide de dicarbonate de di-*tert*-butyl en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane (Schéma 37). Le produit **67** est alors obtenu avec un rendement de 97%.

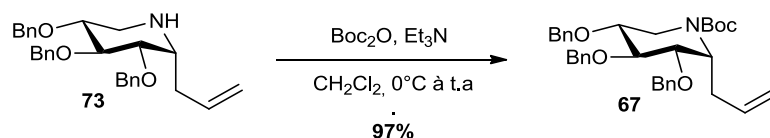


Schéma 37. Protection de l'amine **73** sous forme de carbamate.

¹⁵² Y. Oikawa, T. Yoshioka, O. Yonemitsu, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 885-888.

ii) Obtention de l'iminosucre 1-propargylé déprotégé **66**

L'obtention de l'alcyne se fait par la réaction clé d'homologation de Bestmann-Ohira. Cette réaction, initialement décrite par Seiferth et Gilbert permet l'accès à des alcynes à partir d'aldéhydes ou de cétone au moyen du diméthyl(diazométhyl)diphosphonate assisté par une base telle que *t*BuOK.¹⁵³ Ohira puis Bestmann ont modifié ces conditions pour élargir le champ d'application aux aldéhydes sensibles aux bases fortes avec un réactif modifié le diméthyl-1-diazo-2-oxopropylidiphosphonate (connu sous le nom de réactif de Bestmann-Ohira) qui permet l'utilisation de K₂CO₃ comme base.¹⁵⁴ Cette réaction semble se faire sans problème en présence d'une amine protégée par un groupement Boc.¹⁵⁵

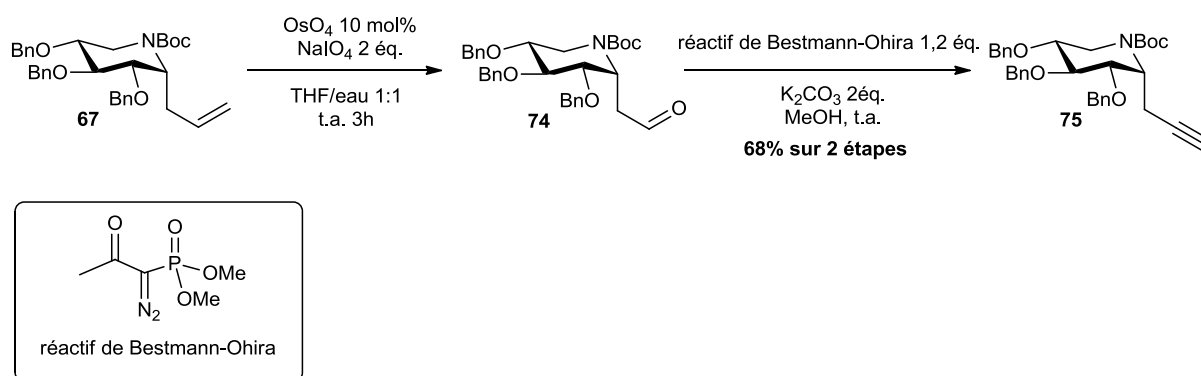


Schéma 38. Transformation de l'alcène **67** en alcyne **75**.

L'alcène **67** est d'abord transformé en aldéhyde **74** par une réaction classique¹⁵⁶ de coupure oxydante en présence de tétraoxyde d'osmium en quantité catalytique et de periodate de sodium. L'aldéhyde est utilisé sans purification et engagé directement dans la réaction de Bestmann-Ohira. L'alcyne est isolé avec un bon rendement de 68% sur deux étapes. Le produit **75** doit ensuite être complètement déprotégé.

Dans un premier temps nous avons choisi de déprotéger d'abord l'atome d'azote. La déprotection du groupement Boc se fait très facilement en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane (Schéma 39). Après un lavage basique, l'amine libre **76** est obtenue pur avec un rendement brut de 93%.

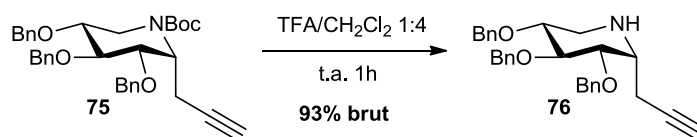


Schéma 39. Déprotection de la fonction carbamate.

¹⁵³ a) D. Seyferth, R. S. Marmor, P. Hilbert *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1379-1386; b) E. W. Colvin, B. J. Hamill, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 869-874. c) J. C. Gilbert, U. Weerasooriya, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4997-4998.

¹⁵⁴ a) S. Ohira, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 561-564; b) S. Müller, B. Liepold, G. J. Roth, H. J. Bestmann, *Synlett* **1996**, 521-522.

¹⁵⁵ A. Fürstner, J. W. J. Kennedy, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7398-7410.

¹⁵⁶ R. Pappo, D. S. Allen, R. U. Lemieux, W. S. Johnson, *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 478-479.

L'utilisation de BCl_3 nous permettait ensuite, en théorie, de déprotéger chimiosélectivement les groupements *O*-benzyles en présence de l'alcyne terminal.¹⁵⁷ Cette procédure dans des conditions douces a été rapportée également sur des iminosucres,¹⁵⁸ et les conditions expérimentales classiques sont l'utilisation de BCl_3 dans le dichlorométhane à basse température entre -60°C et 0°C . D'après le peu d'exemples de déprotection en présence d'une fonction alcyne vrai décrits dans la littérature, il semble que cette fonction ne soit pas sensible aux conditions avec BCl_3 . Ainsi, Delgado *et al.* ont réalisé la déprotection de fonctions *O*-benzyl en présence d'un *N*-propargyl avec de très bons rendements.¹³⁷ Les auteurs préconisent néanmoins de réaliser cette déprotection à -78°C et d'arrêter la réaction également à cette température. L'équipe d'Adamo rapporte aussi la déprotection de 1-alcynyl-riboses avec le BCl_3 sans que la fonction alcyne ne pose de problèmes.¹⁵⁹ Le premier essai sur notre substrat s'est montré pourtant très décevant. En effet, après purification sur résine acide, nous n'avons pas isolé l'alcyne attendu mais un mélange de produits où il semble rester des groupes benzyloxy.

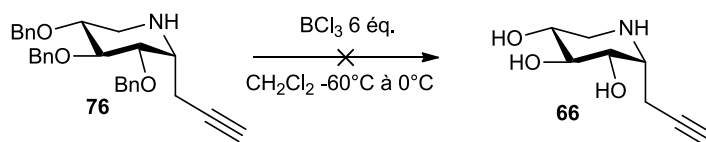


Schéma 40. Premier essai de déprotection sans succès.

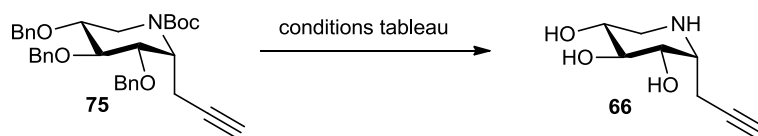
La réaction est ensuite réalisée à partir de **75**, l'analogue *N*-Boc du composé **76**, afin d'évaluer si l'échec de notre première tentative n'est pas dû à la présence d'une amine libre sur le substrat. Dans ces conditions au BCl_3 , nous observons par RMN la déprotection du carbamate. Ce type de réaction a déjà été décrit dans plusieurs publications.¹⁶⁰ Malheureusement, la formation du produit **66** semble très minoritaire en RMN et nous ne parvenons pas à isoler le produit pur après purification par chromatographie sur gel de silice (Tableau 8 entrée 1).

¹⁵⁷ M. S. Congreve, E. C. Davison, M. A. M. Fuhry, A. B. Holmes, A. N. Payne, R. A. Robinson, S. E. Ward, *Synlett* **1993**, 663-664.

¹⁵⁸ Par exemple : a) M. Bosco, P. Bissere, C. Bouix-Peter, J. Eustache, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7949-7952 ; b) S. Devergnès, Y. Vallée, S. Py, *Org. Lett.* **2008**, 10, 2967-2970.

¹⁵⁹ M. F. A. Adamo, R. Pergoli, *Org. Lett.* **2007**, 9, 4443-4446.

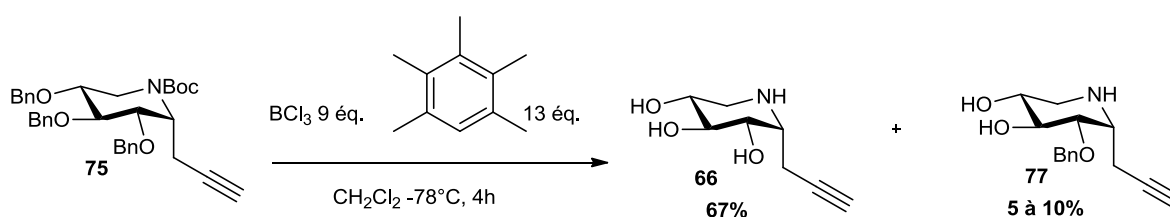
¹⁶⁰ a) R. Baggio, D. Elbaum, Z. F. Kanyo, P. J. Carroll, R. C. Cavalli, D. E. Ash, D. W. Christianson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8107-8108; b) T. Wakimoto, K. Miyata, H. Ohuchi, T. Asakawa, H. Nukaya, Y. Suwa, T. Kan, *Org. Lett.* **2011**, 13, 2789-2791.



Entrée	Réactif	Additif	Temp.	Durée	Solvant	Produit
1	BCl ₃ 9 éq.	-	-60°C à -20°C	4h	CH ₂ Cl ₂	-
2	BCl ₃ 9 éq.	Na ₂ CO ₃ 1 éq.	-78°C	4h30	CH ₂ Cl ₂	-
3	TMSI 8 éq.	-	0°C à t.a.	15h	CH ₂ Cl ₂	-
4	BCl ₃ 9 éq.	C ₆ HMe ₅ 20 éq.	-78°C	1/2h	CH ₂ Cl ₂	23% + monobenzylé
5	BCl ₃ 9 éq.	C ₆ HMe ₅ 13 éq.	-78°C	4h	CH ₂ Cl ₂	67%+ monobenzylé

Tableau 8. Essais de débenzylation

Nous avons alors décidé, dans un premier temps, d'ajouter une base faible Na₂CO₃ (1 éq.) au cas où l'acidité potentielle du BCl₃ serait en cause, mais nous n'obtenons pas de meilleur résultat (entrée 2). La tentative suivante a été l'utilisation de TMSI pour débenzyler. Cette procédure est décrite pour déprotéger des substrats osidiques¹⁶¹ et une publication¹⁶² montre que les groupements propargyles résistent à ces conditions. Toutefois, il n'a pas été possible d'isoler le produit **66** attendu qui est en mélange avec un autre produit inconnu.

Schéma 41. Conditions optimisée pour la déprotection de l'iminosucre **75**.

La solution a été trouvée avec l'ajout de pentaméthylbenzène au milieu réactionnel dans les conditions classiques de déprotection au BCl₃. Cet ajout a été rapporté par l'équipe de Tokuyama qui décrit le pentaméthylbenzène comme un piège à cations.¹⁶³ Le pentaméthylbenzène ne masque pas l'acidité de Lewis du BCl₃ et permet d'éviter des réactions secondaires parasites de dégradation.¹⁶³ Le produit est obtenu de façon reproductible avec un rendement de 67% en 4 heures à -78°C. Des conditions d'éluions très polaires ont été mises au point (éluant ACN/eau/NH₄OH 10:0,5:0,5) pour purifier le produit par chromatographie sur gel de silice. Le pentaméthylbenzène est enlevé facilement lors de cette purification et 5 à 10% de produit monobenzylé **77** sont récupérés. Des expériences RMN 2D et longue distance nous ont permis de déduire la place du groupement benzyle restant sur le produit monobenzylé. Des débenzylation partielles de glycosides perbenzylés ont déjà été décrites en utilisant le BCl₃. Les auteurs

¹⁶¹ Par exemples: a) O. R. Martin, O. M. Saavedra, F. Xie, L. Liu, S. Picasso, P. Vogel, H. Kizu, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 1269-1278; b) O. Gaurat, J. Xie, J.-M. Valéry, *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, 22, 645-656.

¹⁶² P. Meffre, S. Hermann, P. Durand, G. Reginato, A. Riu, *Tetrahedron* **2002**, 58, 5159-5162.

¹⁶³ K. Okano, K.-I. Okuyama, T. Fukuyama, H. Tokuyama, *Synlett* **2008**, 1977-1980.

rapportent cependant des débenzylations complètement sélectives avec l'obtention d'un produit unique avec un très bon rendement.¹⁶⁴

En conclusion, malgré quelques difficultés inattendues, notre stratégie de synthèse s'est révélée satisfaisante et nous a permis de préparer plus de 190 mg du composé **66** en 11 étapes et avec un rendement global de 14 % à partir du D-xylose.

1.2.4. Synthèse des composés les plus prometteurs par chimie click

L'évaluation biologique « *in situ* » d'une librairie de composés dérivés de **66**, obtenus par chimie click a permis de mettre en évidence 5 composés prometteurs (voir Chapitre 3, § 3.3.1). Nous avons synthétisé les cinq imino-*C*-glycosides **82**, **84**, **86**, **88** et **90** afin de réaliser une étude biologique plus poussée à partir de produits purs. Dans un premier temps nous avons réalisé la réaction de cycloaddition alcyne-azoture CuAAC sur le produit protégé **76** pour faciliter la purification. La réaction se fait très facilement et les produits **79** et **81** sont isolés avec des rendements de 86% et 79% respectivement.

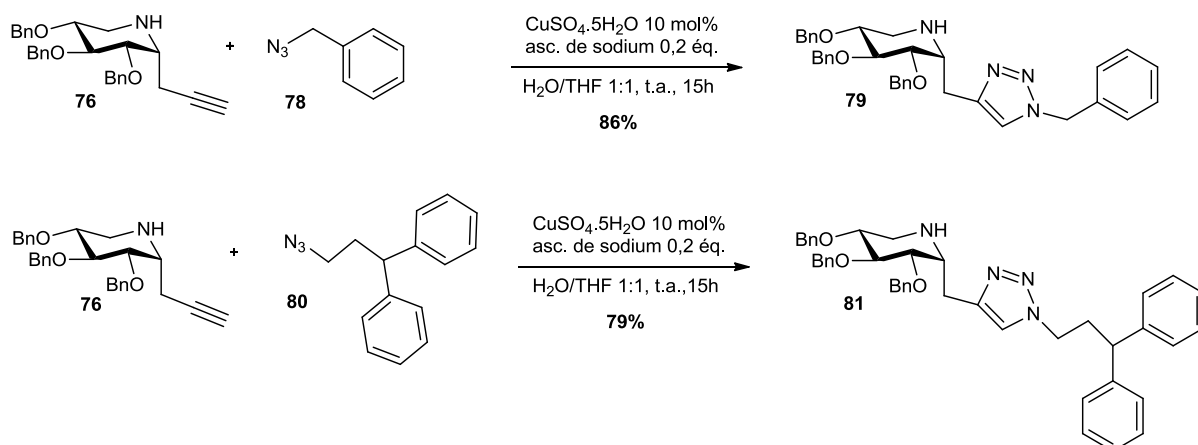
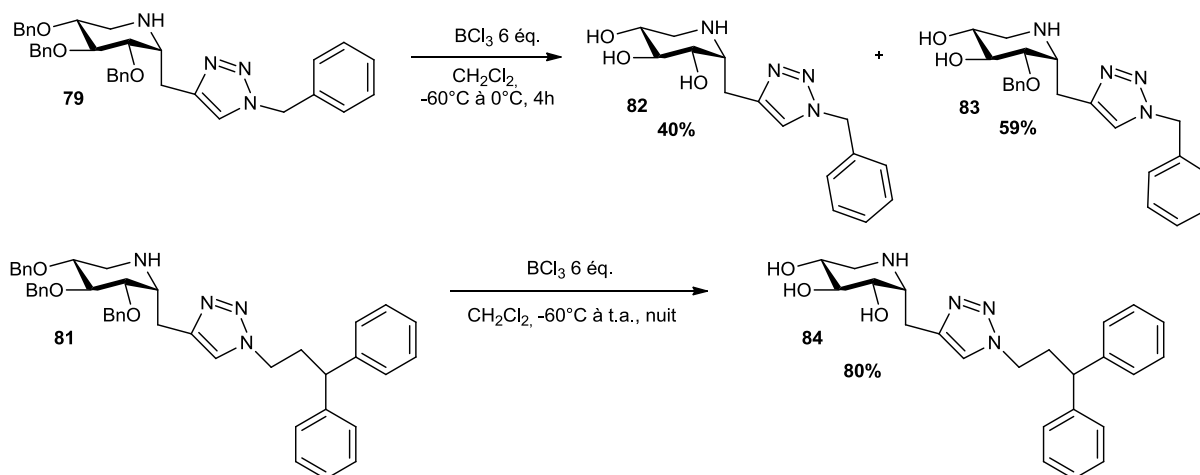


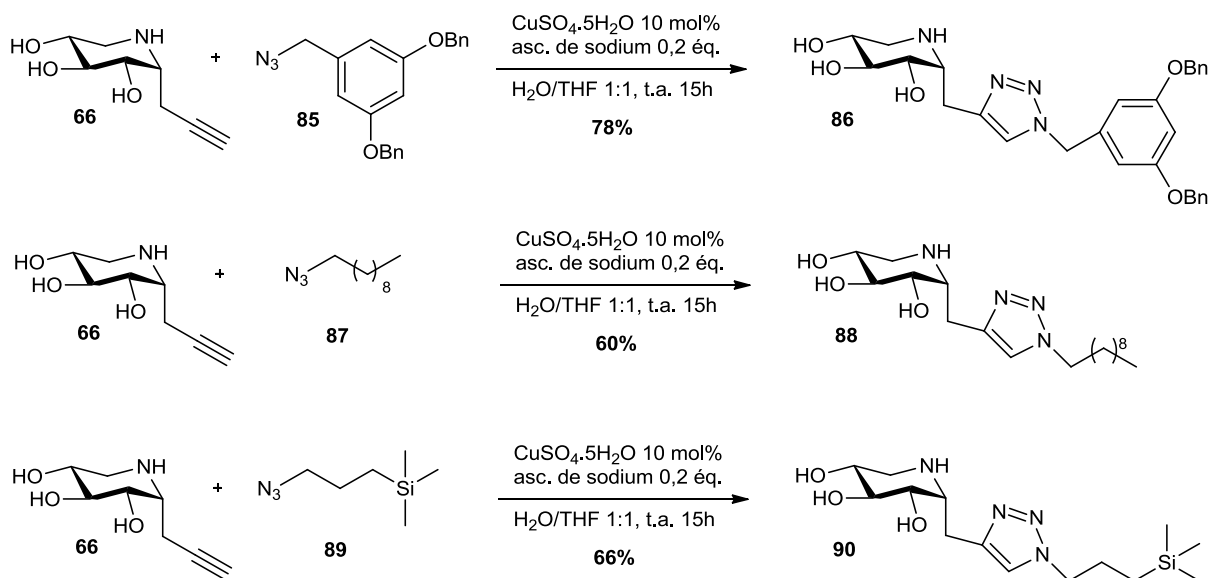
Schéma 42. Réactions de chimie click catalysées au cuivre.

Les produits **79** et **81** sont alors déprotégés dans les conditions classiques au BCl_3 , c'est-à-dire sans utilisation du paraméthylbenzène, prouvant ainsi que c'est très probablement le propargyle qui posait problème pour la déprotection de **75**. La déprotection du produit **79** s'est révélée plus difficile et c'est le produit monobenzylé **83** qui a été récupéré majoritairement. Pour pallier à ce problème, la réaction de déprotection de **81** a été remontée à une température supérieure aux conditions habituelle (t.a.) pendant la nuit. Le produit complètement déprotégé a été obtenu seul avec un rendement de 80%.

¹⁶⁴ J. Xie, M. Ménand, J.-M. Valéry, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 481-487.

Schéma 43. Déprotections au BCl_3 des produits **79** et **81**.

La synthèse de **86** a été faite directement à partir du produit déprotégé **66** à cause des fonctions benzyloxy de l'azoture **85** (Schéma 44). Au vu de la facilité d'obtention du produit **86**, les deux derniers produits **88** et **90** ont été synthétisés de la même façon par réaction de CuAAC directement sur le produit **66** et sont obtenus avec des rendements de 60 et 66% respectivement. Les azotures **80**, **85** et **87** nécessaires à nos synthèses nous ont été fournis par le groupe du Pr. Delgado, qui les a préparés à partir des alcools ou des bromures commerciaux correspondants.¹³⁷ L'azoture de benzyle **78** est lui, commercial. L'azoture **89** a été synthétisée en une étape à partir du chlorure commercial correspondant avec un rendement de 49%.¹⁶⁵

Schéma 44. Réactions de cycloadditions 1,3-dipolaires à partir de **66**.

Les tests biologiques plus poussés réalisés à partir de ces cinq « hits » seront décrits plus amplement dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

¹⁶⁵ A. Amore, R. van Heerbeek, N. Zeep, J. van Esch, J. N. H. Reek, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1851-1860.

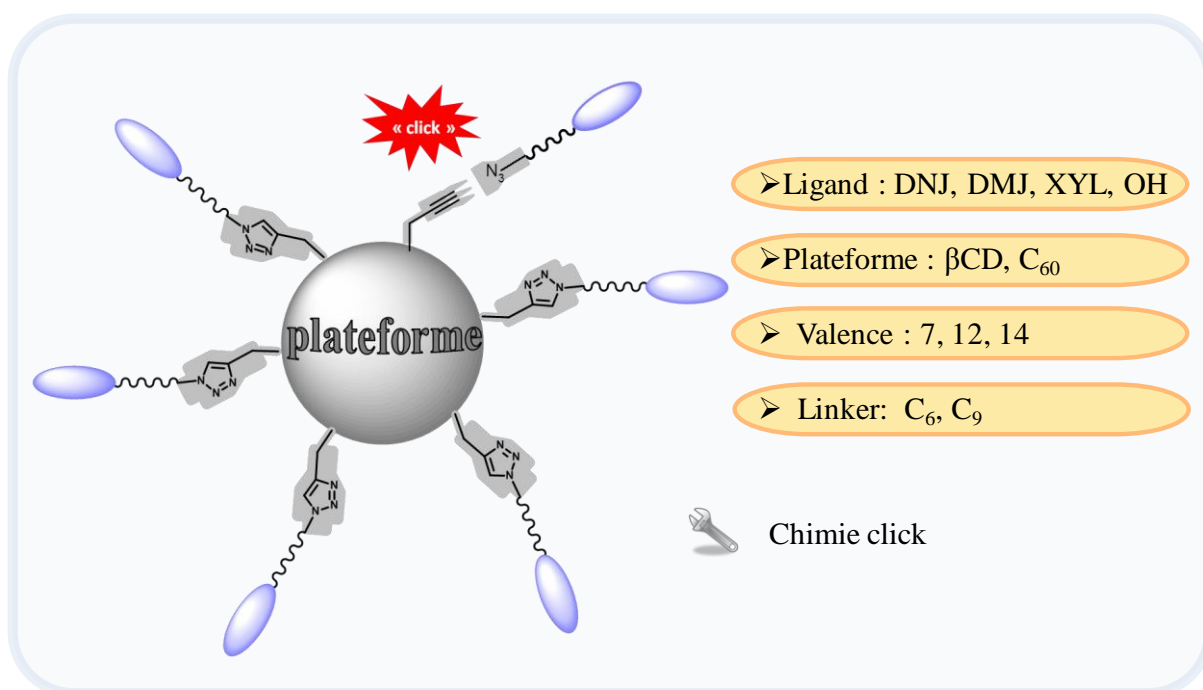
Conclusion du chapitre 1.

La première stratégie de synthèse de chaperons pour le traitement de la mucoviscidose reposait sur une étape synthétique cruciale pour l'obtention de nos composés cibles. Cette étape de diamination intramoléculaire d'alcène avec une urée comme source d'azote avait été choisie parce qu'elle semblait présenter les meilleures chances de succès sur la base des résultats de la littérature. Cependant, malgré nos efforts, cette méthodologie n'a pas pu être appliquée à notre substrat polyfonctionnalisé. Il s'avère également que l'obtention des pipéridines par ces réactions de diaminations intramoléculaires est vraisemblablement bien plus difficile que celle des pyrrolidines.

La deuxième stratégie concernant la préparation de chaperons pharmacologiques permettant de restaurer une partie de l'activité de la β -glucocérébrosidase déficiente dans la maladie de Gaucher a été conduite en collaboration avec l'équipe du Pr. Delgado. Afin de pouvoir réaliser un screening de la partie aglycone, nous avons réalisé avec succès la synthèse de l'intermédiaire clé propargylé **66**. Les premiers résultats nous ont conduits à synthétiser cinq iminosucres, correspondant aux meilleurs composés évalués, par réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre.

Chapitre 2

Synthèse de nouveaux chaperons pharmacologiques multivalents



2.1. Introduction

Le deuxième axe de cette thèse concerne la synthèse de chaperons pharmacologiques multivalents pour la maladie de Gaucher et la mucoviscidose.

La multivalence est un phénomène observé en biologie dans de nombreux domaines dont celui des interactions sucre-lectine. Ce concept n'a été exploité par les chimistes pour la conception de nouveaux agents pharmaceutiques que depuis une vingtaine d'années.²⁹ Cependant, très peu de travaux ont porté sur l'inhibition de glycosidases malgré l'intérêt thérapeutique de cette famille d'enzymes.

Nous verrons donc dans ce chapitre après une introduction sur la multivalence dans le cadre des interactions sucre-lectine, la conception et la synthèse de systèmes multivalents à base d'iminosucres réalisées sur des charpentes de type fullerène et cyclodextrine.

2.2. La multivalence, un phénomène biologique dans les interactions sucre-lectine, premières applications

2.2.1. La multivalence dans la nature

Un grand nombre de processus biologiques cellulaires sont gouvernés par des interactions de type sucre-lectine¹⁶⁶ qui ont lieu à la surface des cellules. Pour faciliter ces interactions qui sont généralement faibles ($> \mu\text{M}$), la Nature utilise la multivalence afin de gagner en affinité mais aussi en sélectivité. En effet, les interactions multivalentes permettent une réponse biologique finement ajustée, « un spectre » de réponses, plutôt qu'une réponse binaire de type « on » ou « off » ainsi qu'un gain d'affinité. Lee a introduit le concept « d'effet glycocluster » pour décrire le phénomène d'augmentation d'affinité entre des ligands osidiques et des récepteurs multivalents.¹⁶⁷

Pour illustrer l'importance de la notion de multivalence en biologie, on peut citer en exemple d'interactions polyvalentes, les interactions entre les anticorps et les antigènes. Ces interactions ont un rôle majeur dans les réponses immunitaires et permettent à la fois d'éviter l'infection par des cellules étrangères et de promouvoir le nettoyage de ces corps étrangers par d'autres mécanismes biologiques. On peut également citer les infections virales ou bactériennes qui se font grâce aux phénomènes d'adhésion des virus ou bactéries aux cellules par des interactions multiples. Par exemple, la bactérie *Escherichia Coli* très courante dans les infections urinaires, possède à sa surface des structures en forme de fins cheveux appelés *pili* et *fimbriae* qui reconnaissent spécifiquement des sucres à la surface des cellules épithéliales de l'urètre et de la vessie (Figure 33).

¹⁶⁶ M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.

¹⁶⁷ a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; b) R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 543-551; c) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.

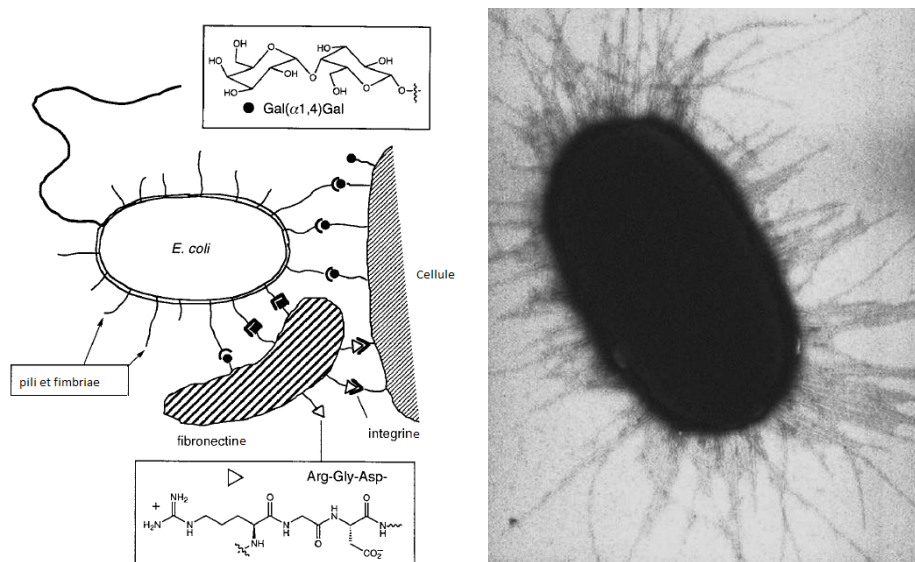


Figure 33. Reconnaissance cellulaire de la bactérie *Escherichia coli*.¹⁶⁸

Les avantages de ces interactions multiples par rapport à plusieurs interactions monovalentes ou encore une seule interaction monovalente plus forte sont diverses. Notamment, ces interactions multiples peuvent créer des contacts entre de larges surfaces biologiques, engendrer des signaux biologiques en induisant des formes géométriques et des distributions moléculaires particulières, prévenir des interactions indésirées etc.¹⁶⁶

Au vu du nombre de processus dans lesquels sont impliquées ces interactions multivalentes, le potentiel pour développer de nouveaux agents thérapeutiques est important. Aussi, de nombreux ligands multivalents synthétiques ont été conçus soit pour inhiber des interactions ligand/récepteurs soit pour activer des processus de transduction de signaux. Les ligands ainsi synthétisés sont selon les cas des inhibiteurs ou des effecteurs.

2.2.2. Les modes de liaison et mécanismes de la multivalence

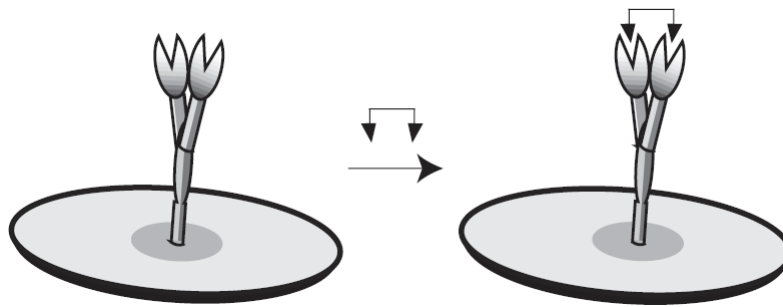
Les interactions entre récepteurs et ligands multivalents résultent en une augmentation d'affinité. Cette augmentation d'affinité constitue un « effet multivalent » si l'affinité du ligand multivalent comprenant x entités est au moins x fois supérieure à celle du ligand monovalent. Si l'affinité est juste égale à x fois celle du ligand multivalent, l'effet observé est alors considéré comme purement statistique.¹⁶⁹ Les paramètres qui jouent sur cette augmentation d'affinité sont multiples chacun entraînant une contribution énergétique. De façon intuitive on peut penser que l'augmentation de l'affinité va dépendre de la somme des contributions individuelles de chaque interaction, de l'orientation et des distances entre les différents éléments mais également du « scaffold », c'est-à-dire du type de la charpente de la structure multivalente. Différents types de mécanismes ont été envisagés pour expliquer l'effet multivalent.¹⁷⁰ Toutefois, ces mécanismes n'interviennent pas tous simultanément selon, par exemple, que le récepteur présente un ou plusieurs sites de reconnaissance.

¹⁶⁸ L. Gross, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e314.1474-1475.

¹⁶⁹ D. Deniaud, K. Julienne, S. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966-979

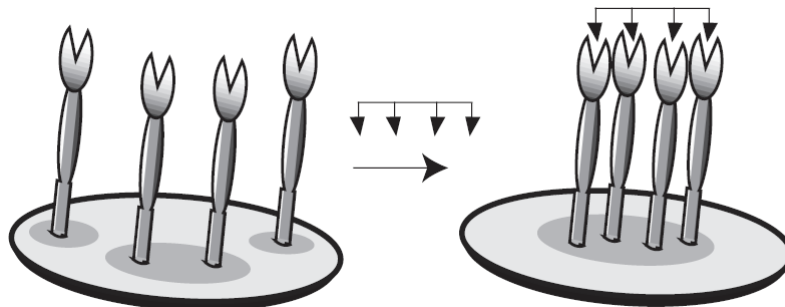
¹⁷⁰ L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703; b) C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science*, **2001**, *291*, 2357-2364.

i) L'effet chélate



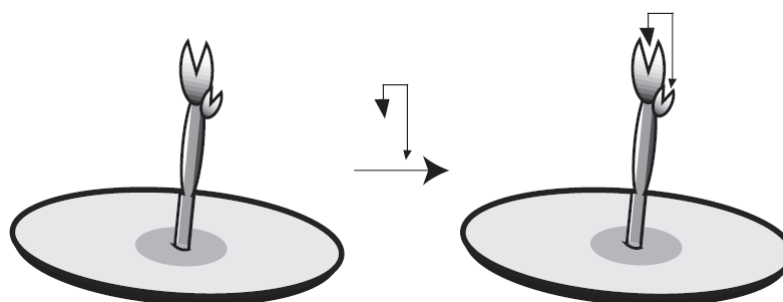
Le ligand multivalent peut se fixer à un récepteur oligomérique par plusieurs sites de liaison. Dans ce cas, le coût entropique de l'interaction multivalente n'a lieu que lors de la première fixation, la deuxième fixation se faisant sans coût additionnel, en intramoléculaire.

ii) L'effet d'agrégation des récepteurs, effet cluster



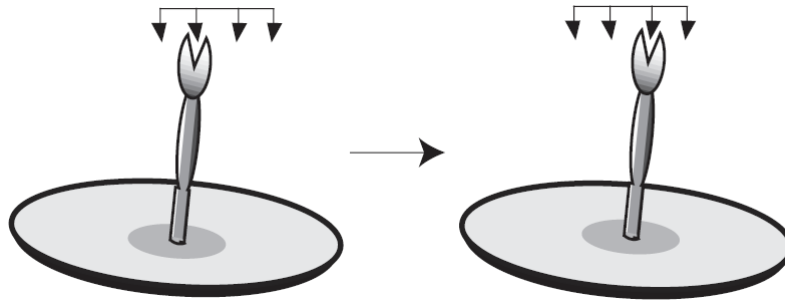
Un ligand multivalent peut se lier avec plusieurs récepteurs, en favorisant une agrégation des récepteurs à la surface des cellules. Ceci est rendu possible par la fluidité des membranes cellulaires dans lesquelles les récepteurs peuvent diffuser dans deux dimensions.

iii) La liaison à un site secondaire



Un ligand multivalent peut également se lier à un récepteur monomérique par son site principal et simultanément par un site secondaire présent sur ce récepteur et ainsi augmenter son affinité avec le récepteur. Ce second site peut être complètement indépendant du premier ou une extension de celui-ci.

iv) Les effets de concentration, phénomène de glissements



Dû principalement à la forte concentration locale en ligand, on peut également observer une augmentation d'affinité avec un récepteur monomérique. Le récepteur se lie de façon non covalente à une entité du ligand multivalent et peut glisser et « recapturer » une seconde entité du ligand en augmentant ainsi le temps d'interaction et la force de l'affinité. La proximité des multiples entités du ligand multivalent promeut ce mécanisme de recapture.

On peut aussi envisager un effet de stabilisation stérique dû à l'encombrement du ligand multivalent qui empêcherait l'interaction avec un autre ligand monomérique. Des phénomènes d'agrégation et de précipitation sont également possibles si des ligands multivalents lient des récepteurs en intermoléculaire.

Pour étudier plus précisément l'effet multivalent, il est nécessaire d'étudier les paramètres thermodynamiques mis en jeu lors d'une interaction multivalente. Pour ce faire, différentes méthodes biophysiques sont utilisées selon les cibles biologiques visées. On peut citer parmi les méthodes les plus utilisées pour mesurer ces affinités, les tests de calorimétrie par titrations isothermes (ITC isothermal titration calorimetry) ainsi que les méthodes de résonance des plasmons des surfaces (SPR surface plasmon resonance).¹⁷¹

¹⁷¹ Pour une description des tests voir la référence 167c

2.2.3. Conception et structures des systèmes multivalents pour les interactions sucre-lectine

De très nombreux ligands multivalents à base de sucres ont été décrits jusqu'à présent et beaucoup de structures ont été imaginées.¹⁷² Parmi ces structures, on trouve plusieurs familles : les glyoclusters (regroupe les ligands multivalents ne portant que peu d'unités sucres), les dendrimères,¹⁷³ les lysosomes, les polymères linéaires ou sphériques. Dans ce paragraphe, nous citerons deux exemples emblématiques de la conception de systèmes multivalents glycosylés.

i) Inhibition de l'hémagglutination du virus *influenza*

Un des premiers exemples d'application de la multivalence impliquant des polymères inhibiteurs synthétiques a été dans le cadre de la prévention de l'hémagglutination du virus influenza (virus de la grippe). L'hémagglutination est le phénomène d'adhésion du virus à ces cellules hôtes (Figure 35), le virus envahit les cellules à l'aide d'interactions multivalentes entre l'hémagglutinine trimérique du virus (protéine à sa surface) et des groupements acide *N*-actétylneuraminique (NeuAc ou acide sialique) présents à la surface des cellules.¹⁷⁴

Plusieurs ligands multivalents à base de polymères acrylamides (pAA) substitués par des groupements NeuAc ont été synthétisés par le groupe de Whitesides (Figure 34) dans le but d'inhiber l'hémagglutination.¹⁷⁵ Les auteurs ont également introduit sur la chaîne polymérique d'autres substituants pouvant faire des liaisons secondaires avec le virus.

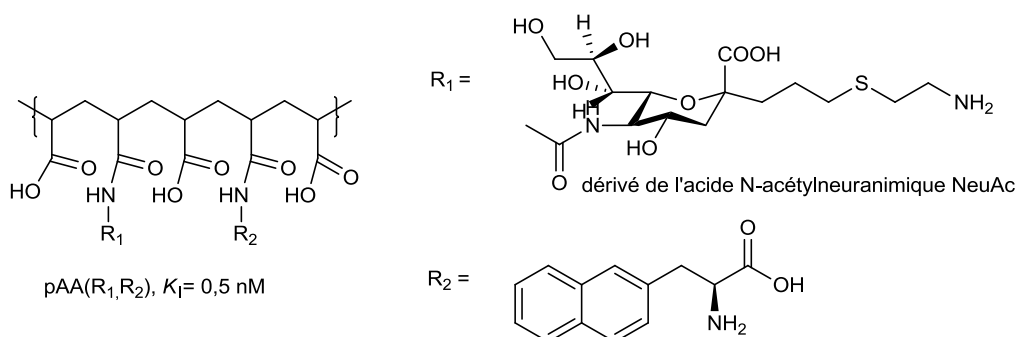


Figure 34. Système multivalent basé sur un polymère acrylamide.¹⁷⁵

Le groupe de Whitesides a ainsi obtenu de très bons résultats d'inhibition avec, pour le meilleur composé (Figure 34) une inhibition de l'hémagglutinine avec un K_i de 0,5 nM soit un gain d'un facteur 10^6 par rapport aux K_i de l'ordre du μM des dérivés monovalents NeuAc.

¹⁷² Pour des revues sur le sujet : a) M. Lahmann, *Top. Curr. Chem.* **2009**, 288, 17-65, b) L. L. Kiessling, T. Young, T. D. Gruber, K. H. Mortell, Multivalency in Protein-Carbohydrate Recognition in *Glycoscience*, B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem (Eds) **2008**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2483-2523.

¹⁷³ Pour des revues sur les glycodendrimères : a) R. Roy *Trends Glycosci. Glyc.* **2003**, 15, 291-310; b) Y. M. Chabre, R. Roy, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8, 1237-1285.

¹⁷⁴ W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1988**, 333, 426-431.

¹⁷⁵ a) S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4103-4111; b) G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3789-3800.

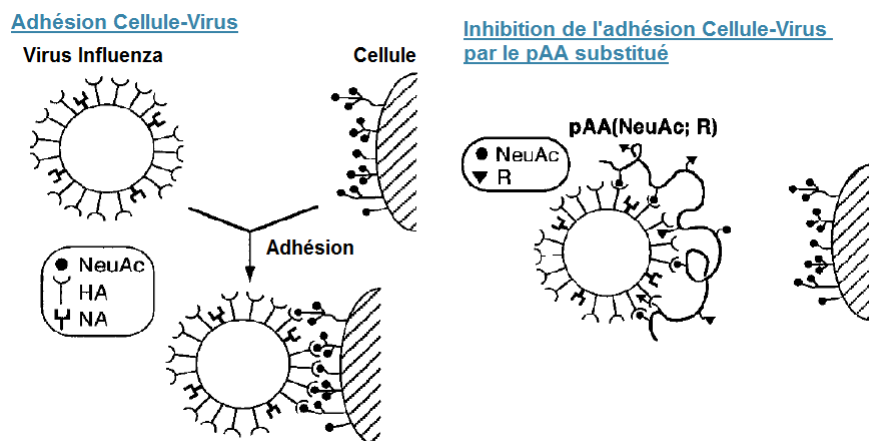


Figure 35. Inhibition de l'adhésion cellule-virus influenza par un pAA substitué par des dérivés NeuAc. HA = hémagglutinine, NA = neuranimidase.

Les auteurs postulent que l'effet de multivalence pourrait être accru du fait de liaisons avec des sites secondaires grâce à la présence d'autres fonctionnalisations sur le polymère (groupement R sur Figure 35) mais également par des phénomènes d'encombrement stérique de la surface du virus par la présence du polymère. Toutefois, en raison de la toxicité des polymères acrylamides ces molécules ne peuvent pas présenter aujourd'hui d'applications thérapeutiques.

ii) Inhibition de toxines bactériennes

Les exemples les plus impressionnants de glycoclusters multivalents ont été rapportés pour l'inhibition de deux toxines bactériennes, la toxine LT-1 thermolabile provenant d'*Escherichia coli* et la toxine SLT-1 (Shiga-like toxin 1) provenant de *Shigella dysenteriae* toutes deux faisant partie de la classe AB₅ des toxines. Dans cette classe, les toxines possèdent un arrangement pentagonal de cinq sous-unités B et d'une sous-unité A. Ces toxines ont pu être cristallisées en présence de sucres monovalents et les informations structurales ont permis la conception de plusieurs inhibiteurs multivalents.

L'équipe de Fan a décrit la synthèse et l'activité de ligands pentavalents sur une structure aza-macrocyclique pour l'inhibition de la toxine LT-1 (Figure 36 A).¹⁷⁶ Les auteurs ont fait varier la longueur du linker et ont montré une augmentation d'affinité jusqu'à 10⁴ par rapport à l'analogue monovalent (soit un facteur 2000 par unité sucre) pour le substrat avec la plus grande longueur du linker (n = 4). Cette longueur est la longueur qui correspond le mieux à la distance entre deux unités B de la toxine (45Å). La démarche de ce groupe montre ainsi l'importance de connaître la structure du récepteur pour la conception du ligand. L'IC₅₀ de cet inhibiteur se rapproche de celui du ligand naturel de la toxine.

¹⁷⁶ E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hole, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.

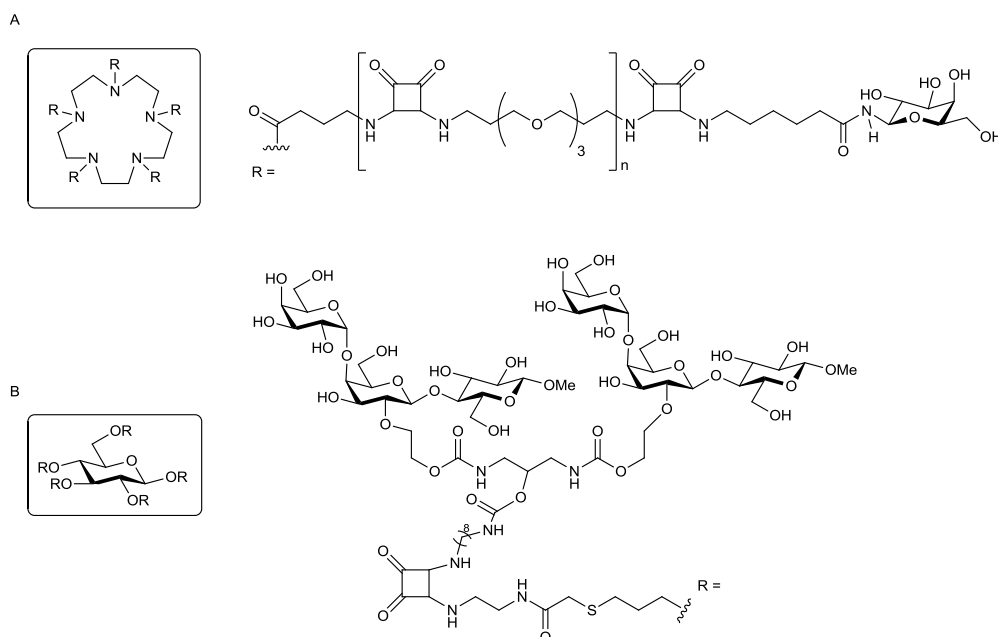


Figure 36. Deux ligands multivalents inhibiteurs de la toxine de type AB₅.

Le résultat le plus impressionnant a été obtenu par l'équipe de Bundle qui a conçu un ligand décavalent (Figure 36 B) nommé STARFISH inhibant la toxine SLT-1. Ils observent une augmentation d'affinité de 10^6 par rapport au ligand monovalent.¹⁷⁷ Leur ligand présente deux unités oligosaccharidiques au bout de chacun des cinq bras construits sur une structure glucose. Les cinq sous-unités B possèdent chacune trois sites de liaison classés en sites 1, 2 et 3. Le ligand était conçu initialement pour interagir avec les sites 1 et 2 d'une même sous-unité B, mais les études cristallographiques ont montré que le ligand se liait en fait par les cinq sites 2 de deux sous-unités B (Figure 37). Ces interactions multivalentes impliquent donc des mécanismes par effet chélate mais aussi par agrégation des récepteurs !

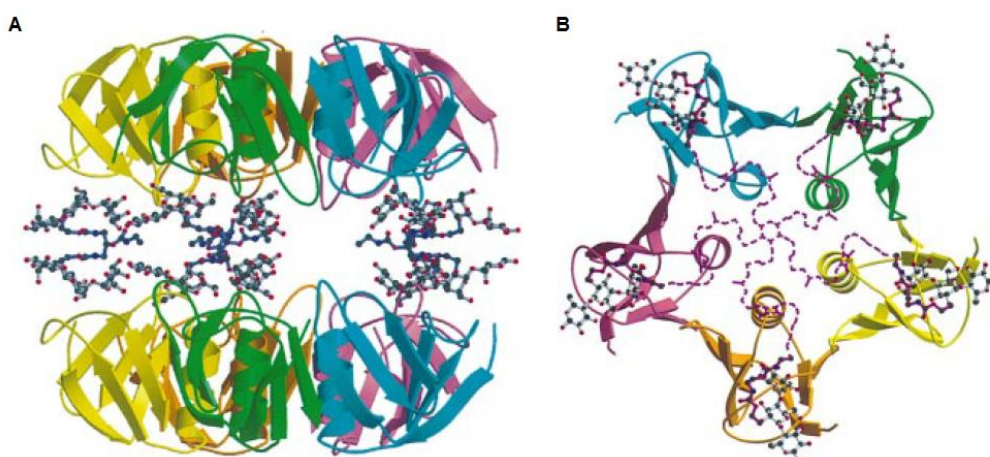


Figure 37.

Légende : **A)** Vue du ligand lié à deux sous unités B de la toxine (le sucre central et les linkers ne sont pas représentés). **B)** Vue de coupe horizontale montrant l'interaction des différentes unités glycosidiques du ligand avec les 5 parties d'une sous-unité B (le sucre central du ligand ainsi que les linkers sont représentés en pointillés).

¹⁷⁷ P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, 403, 669-672.

Ces deux augmentations spectaculaires d'affinité sont sans doute favorisées par le fait que contrairement à de nombreuses lectines, ces toxines bactériennes possèdent leurs cinq sites de liaison dans le même plan. Néanmoins, ces exemples soulignent encore l'importance de l'adéquation entre le ligand multivalent synthétique et le récepteur visé.

Pour la conception de nos systèmes multivalents à base d'iminosucres, nous nous sommes tournés vers deux charpentes différentes, les fullerènes et les cyclodextrines. Dans le paragraphe suivant, nous verrons donc plus en détails ce qui a été réalisé concernant la multivalence de systèmes glycosylés sur ces deux types de structures et plus particulièrement concernant les aspects synthétiques.

2.2.4. Structures multivalentes glycosylées, le cas des cyclodextrines

Les cyclodextrines¹⁷⁸ sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités D-glucose liées entre elles par des liens α -(1,4). Elles proviennent de la dégradation de l'amidon par des enzymes, ce processus naturel est réalisé par plusieurs microorganismes.¹⁷⁹ Les cyclodextrines les plus connues et utilisées sont au nombre de trois : l' α -cyclodextrine (α -CD), la β -cyclodextrine (β -CD) et la γ -cyclodextrine (γ -CD) composées respectivement de six, sept et huit unités glucose. Les trois sont produites industriellement à la tonne mais la β -CD est la moins chère et la plus utilisée. Ces macromolécules sont symétriques et forment des cônes tronqués. Les hydroxyles primaires des unités glucoses sont situées sur la face « supérieure » la plus étroite dite primaire tandis que les hydroxyles secondaires sont situés sur la face « inférieure » dite secondaire c'est-à-dire la face la plus large. La cavité que forment ces molécules de glucose est hydrophobe et permet l'incorporation de petites molécules hydrophobes selon la taille de la cavité. Les cyclodextrines représentent une structure de choix pour la synthèse de molécules d'intérêt thérapeutique car elles sont biocompatibles et non immunogéniques.¹⁸⁰

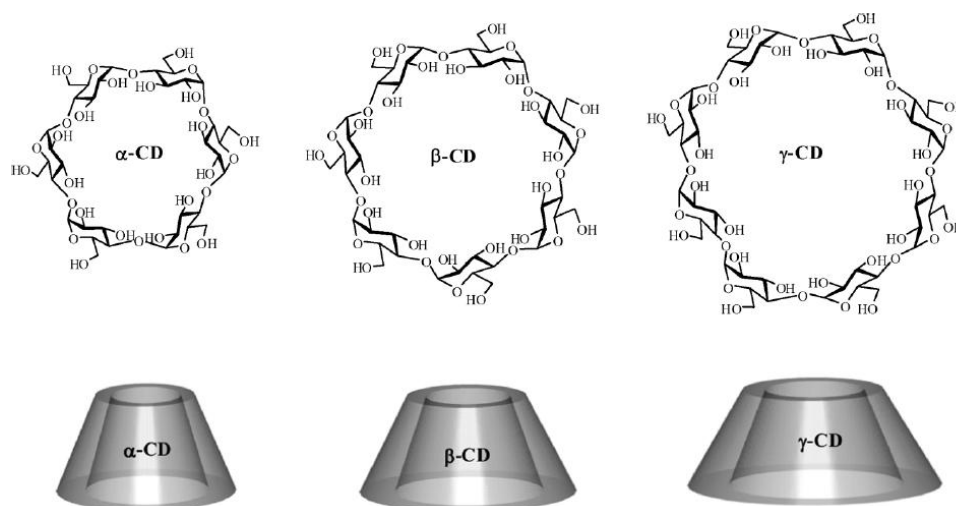


Figure 38. Les trois types de cyclodextrines et leurs représentations coniques schématiques.

¹⁷⁸ J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1753.

¹⁷⁹ A. Biwer, G. Antranikian, E. Heinzle, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 609-617.

¹⁸⁰ R. Arun, K. C. K. Ashok, V. V. N. S. S. Sravanthi, *Sci. Pharm.* **2008**, 76, 567-598.

Du fait de ces propriétés et de leur disponibilité, les cyclodextrines sont utilisées dans de nombreux domaines d'application tels que l'industrie alimentaire, les cosmétiques, les fibres textiles et l'industrie pharmaceutique.^{181,179}

La greffe d'unités sucres sur les cyclodextrines, alliée à leurs propriétés naturelles d'inclusion font de ces molécules d'excellentes candidates pour la recherche dans le domaine de « targeted drug delivery », c'est-à-dire le développement de systèmes d'encapsulation pour la libération de substances pharmacologiques à des endroits précis du corps humains.¹⁸² Un tel système serait conçu pour que les parties glycosylées greffées sur la cyclodextrine reconnaissent spécifiquement des cellules. Ainsi, le système pourrait libérer à un endroit précis du corps le médicament encapsulé par la cavité de la cyclodextrine. Par exemple, le groupe de Stoddart a synthétisé des cyclodextrines portant plusieurs lactoses qui sont reconnus par des lectines à la surface des cellules hépatiques. Dans le cas de maladies telles que la cirrhose, ces systèmes basés sur des cyclodextrines qui peuvent inclure une molécule de naproxen, un anti-inflammatoire, pourraient le libérer spécifiquement aux hépatocytes.¹⁸³ Les cyclodextrines ont de ce fait, au cours des dernières années, fait l'objet de nombreuses études pour le développement de méthodologies pour greffer des unités glycosylées sur leur structure.¹⁸⁴ Nous tenterons dans ce paragraphe de classer les différentes méthodes synthétiques utilisées pour la fonctionnalisation de ces cyclodextrines par des sucres, sans pour autant être exhaustifs compte tenu du nombre important de dérivés synthétisés à ce jour.

i) Cyclodextrines monofonctionnalisées.

Les premières synthèses de cyclodextrines glycosylées ont été décrites à la fin des années 1980. Dans un premier temps un unique résidu glucose a été greffé par un lien $\alpha(1,6)$ sur une position 6 de la cyclodextrine donnant les composés **91**¹⁸⁵ et **92**.¹⁸⁶ Ces premières cyclodextrines glycosylées ont été synthétisées par simples **substitutions nucléophiles**. Mais ces systèmes, se sont révélés peu adaptés à des applications dans les interactions sucre-lectine d'une part à cause de leur faible valence mais également à cause de leur manque de flexibilité.

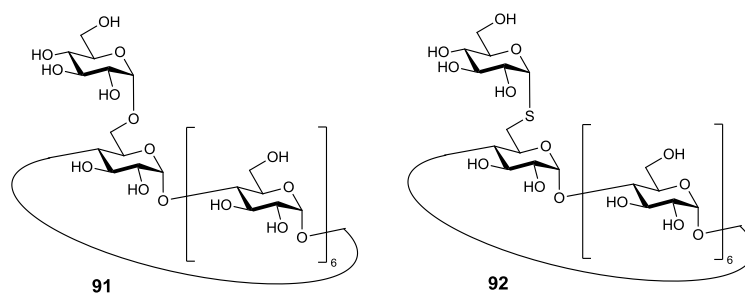


Figure 39. Premiers exemples de cyclodextrines glycosylées.

¹⁸¹ M. Singh, R. Sharma, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341-359.

¹⁸² A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, J. M. Casas-Solvas, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2007**, *4*, 1-14.

¹⁸³ D. A. Fulton, A. R. Pease, J. F. Stoddart, *Isr. J. Chem.* **2000**, *40*, 325-333.

¹⁸⁴ Pour des revues sur le sujet : a) N. Smiljanic, D. Yockot, V. Cendret, M. Francois-Heude, V. Moreau, F. Djedaini-Pilard, *Carbohydr. Chem.* **2012**, *37*, 374-397; b) D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 655-667; c) C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1982-1990.

¹⁸⁵ P. Fugedi, P. Nanasi, J. Szejtli, *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 173-181.

¹⁸⁶ J. Defaye, A. Gabelle, A. Guiller, R. Darcy, T. O'Sullivan, *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, 251-258.

Plusieurs groupes ont alors commencé à développer de nouvelles structures dans lesquelles le sucre était relié au moyen d'un bras espaceur (« linker ») permettant une plus grande flexibilité. Les premiers dérivés ont été synthétisés par formation de **liaison amide** *via* un couplage peptidique comme par exemple **93** (Schéma 45).¹⁸⁷

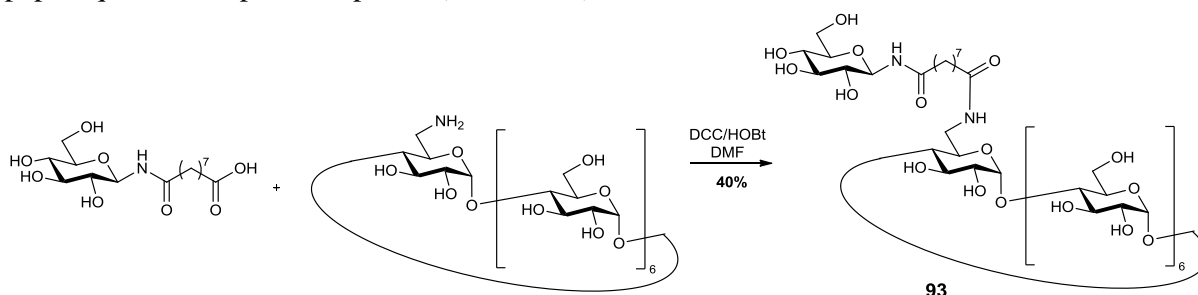


Schéma 45. Glycosylation d'une cyclodextrine avec un linker par formation de liaison amide.¹⁸⁷

Le groupe de Parot Lopez a synthétisé des analogues de **93** en série galactose¹⁸⁸ en faisant varier la longueur du linker de 1 à 7 carbones et a montré que celle-ci avait une influence sur l'affinité avec « KbcWL », une lectine spécifique au galactose. Ce sont ainsi les produits avec la plus grande longueur qui ont une meilleure affinité avec la lectine.

Le même groupe a réalisé également pour la première fois une étape de **synthèse enzymatique** pour transformer un composé cyclodextrine glycosylé sur une position 6 en son analogue disaccharide **94** (Schéma 46).¹⁸⁹

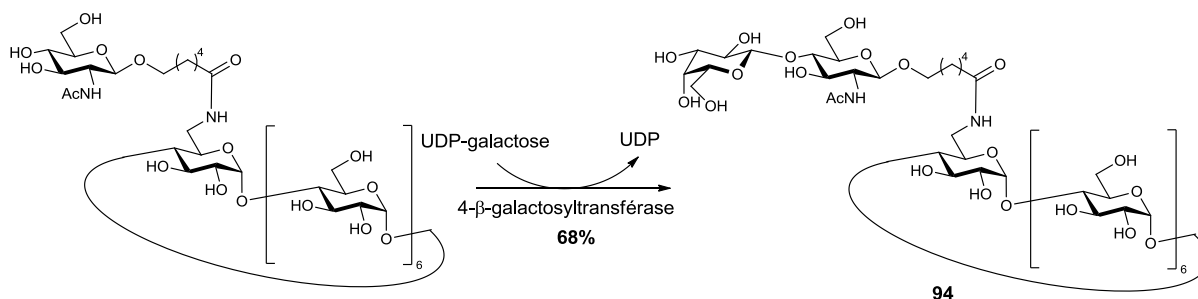


Schéma 46. Couplage enzymatique sur une cyclodextrine monoglycosylée.

Plusieurs groupes ont utilisé des réactions enzymatiques pour greffer directement un ou plusieurs sucres sur les positions 6 de la cyclodextrine pour améliorer la solubilité dans l'eau des cyclodextrines naturelles.¹⁹⁰ Cette méthode enzymatique n'est cependant pas idéale pour une glycosylation directe car dans la plupart des cas, plusieurs produits sont formés avec des rendements faibles et ceux-ci doivent être séparés par HPLC.

¹⁸⁷ H. Parrot-Lopez, H. Galons, A. W. Coleman, J. Mahuteau, M. Miocque, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 209-212.

¹⁸⁸ R. Kassab, C. Félix, H. Parrot-Lopez, R. Bonaly, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7555-7558.

¹⁸⁹ E. Leray, H. Parrot-Lopez, C. Augé, A. W. Coleman, C. Finance, R. Bonaly, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1019-1020.

¹⁹⁰ a) Y. Okada, M. Semma, A. Ichikawa, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1315-1322; b) V. Bonnet, C. Boyer, V. Langlois, R. Duval, C. Rabiller, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8987-8989; c) K. Koizumi, T. Tamimoto, Y. Kutoba, S. Kitahata, *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 393-400.

Les groupes de Fernández et Defaye ont développé la synthèse de cyclodextrine mono-fonctionnalisées par **formation d'une thio-urée** comme par exemple le dérivé **95**.¹⁹¹

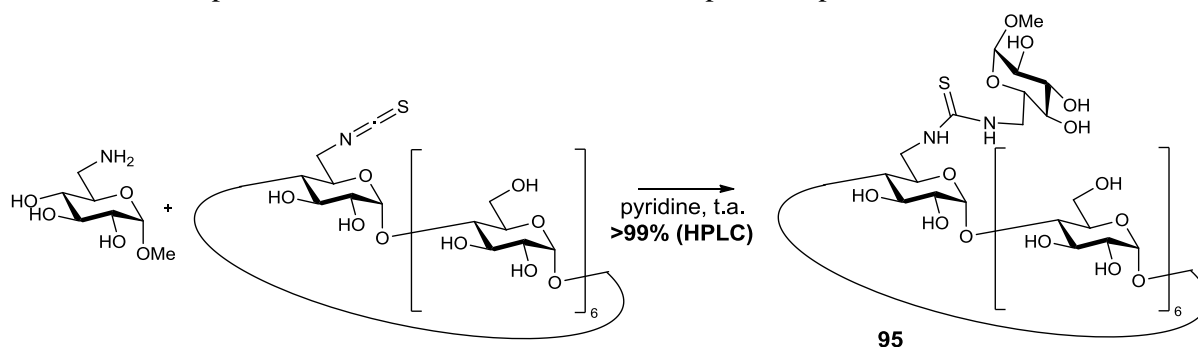


Schéma 47. Cyclodextrine monosubstituée par formation d'une thio-urée.

La réaction se fait entre une cyclodextrine monosubstituée par un isothiocyanate en position 6 et un dérivé *N*-glycosylé et peut également se faire de la manière inverse avec une cyclodextrine mono-substituée par une amine en position 6 et un sucre substitué par un groupement isothiocyanate.

L'équipe de Rabiller a également réalisé la synthèse de cyclodextrines monofonctionnalisées par réaction **d'amination réductrice**.¹⁹² Les auteurs ont réalisé la synthèse de plusieurs dérivés dont **96** (Schéma 48) qui est obtenu avec 45% de rendement.

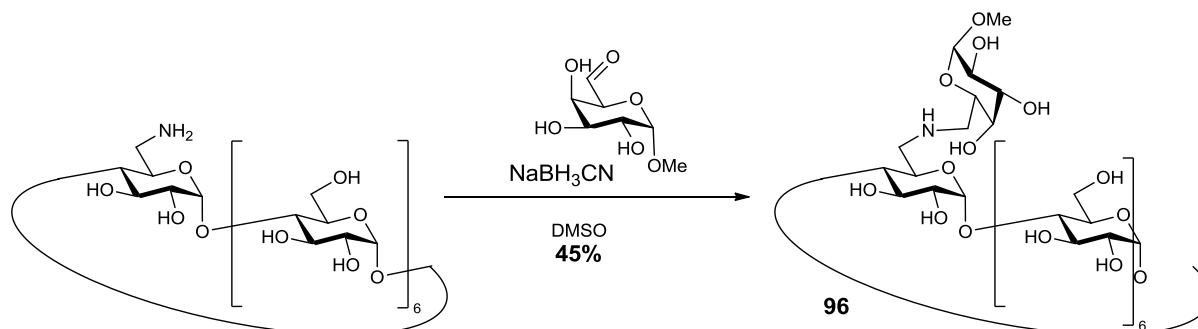


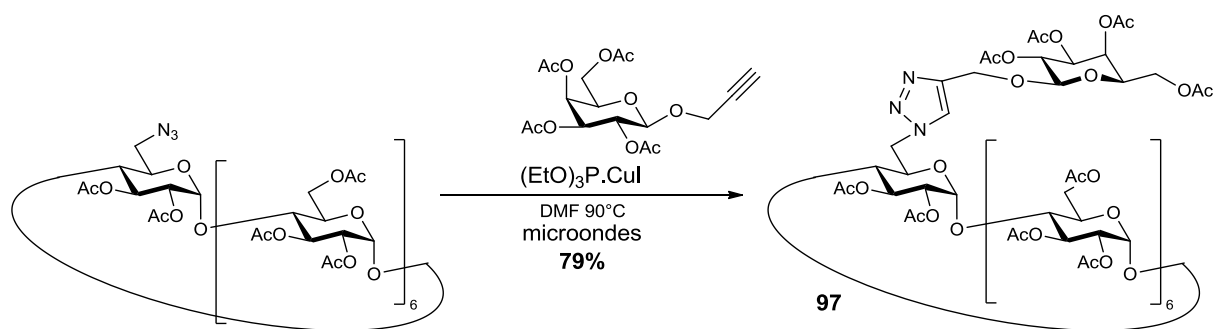
Schéma 48. Glycosylation par amination réductrice.

La fonctionnalisation des cyclodextrines avec des sucres a également été réalisée par **cycloaddition 1,3 dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC)**. Ainsi, une monofonctionnalisation a été réalisée sur une structure cyclodextrine comportant une fonction azoture sur une position 6 par le groupe de Santoyo-Gonzales pour donner le composé **97** avec un très bon rendement de 79% (Schéma 49).¹⁹³

¹⁹¹ J. M. García-Fernández, C. Ortiz Mellet, S. Maciejewski, J. Defaye, *Chem. Commun.* **1996**, 2741-2742.

¹⁹² V. Bonnet, R. Duval, V. Tran, C. Rabiller, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4810-4818.

¹⁹³ M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo, M. D. Giron-Gonzales, N. Sevillano-Tripero, R. Salto-Gonzalez, F. Santoyo-Gonzales, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2291-2301.



Plusieurs groupes se sont intéressés au développement des premières cyclodextrines multivalentes par mono-fonctionnalisation de la cyclodextrine, la multivalence étant apportée par le **dendron**. Les différents groupes ont utilisé les réactions préalablement mises au point de formation d'amide¹⁹⁴, de couplage peptidique ou de formation de thio-urée¹⁹⁵ avec des synthèses plus axées sur la formation des dendrons. Récemment Seeberger *et al.* ont utilisé la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire alcyne-azoture pour introduire un dendron nonavalent sur une cyclodextrine monosubstituée en C-6 dans le but de réaliser un système de délivrance thérapeutique spécifique pour des cellules hépatiques.¹⁹⁶ Le produit **98** a été obtenu avec un excellent rendement de 82% (Figure 40).

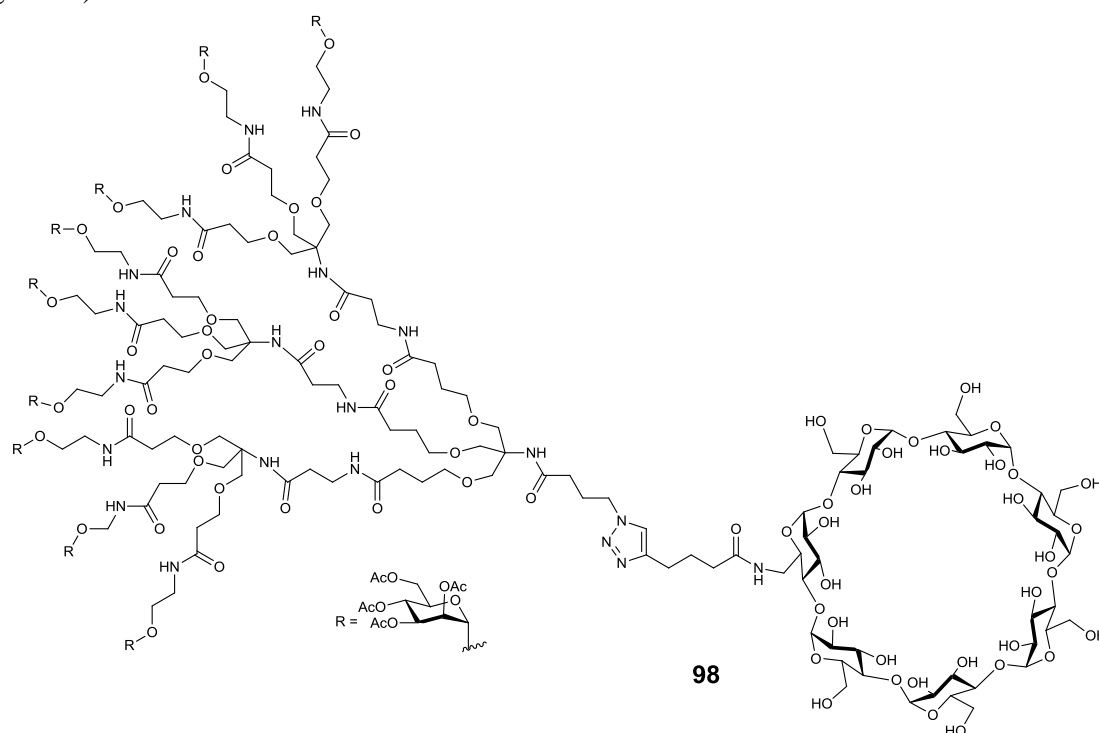


Figure 40. Multivalence introduite par un dendron sur une cyclodextrine monofonctionnée.¹⁹⁶

¹⁹⁴ a) C. Lancelon-Pin, H. Driguez, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3125-3128 ; b) N. Smiljanic, V. Moreau, D. Yockot, J. M. García Fernández, F. Djedaïni-Pilard, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57, 9-14.

¹⁹⁵ I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García-Fernández, H. Law, J. Defaye, *Chem. Commun.* **2000**, 1489-1490.

¹⁹⁶ G. J. L. Bernardes, R. Kikkeri, M. Magliano, P. Laurino, M. Collot, S. Y. Hong, B. Lepenies, P. H. Seeberger, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4987-4996.

ii) Cyclodextrines polyfonctionnalisées sur une face

Pour des raisons pratiques, les premiers travaux sur les cyclodextrines polyfonctionnalisées se sont concentrés sur la perfonctionnalisation de la position 6 qui est la plus facile à réaliser. Les réactions de couplage doivent être hautement efficaces, la purification de produits partiellement fonctionnalisés se révélant particulièrement difficile. Les premiers exemples de cyclodextrines polyglycosylées (par exemple **99** Schéma 50) ont été synthétisés par l'équipe de Driguez en 1994 par réaction de substitution nucléophile sur des cyclodextrines dont l'hydroxyle en positions 6 a été préalablement substitué par un brome.¹⁹⁷ Les réactions de couplage peptidique ont été également étendues par plusieurs groupes aux cyclodextrines polyglycosylées.¹⁸⁸

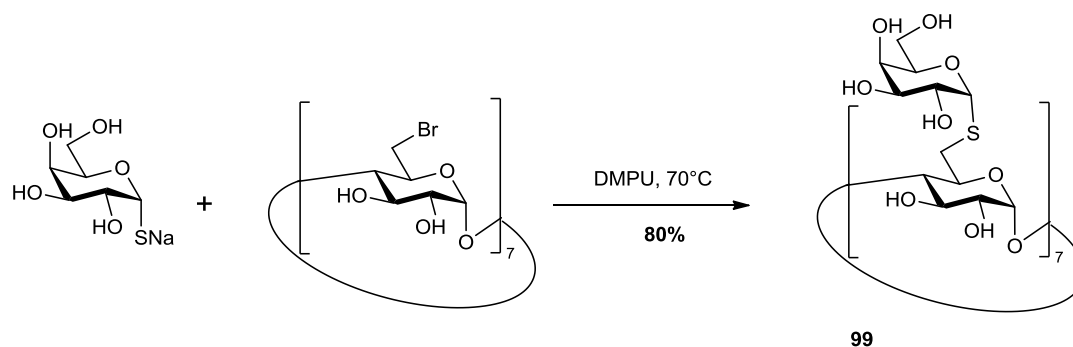


Schéma 50. Cyclodextrine polyglycosylée par substitution nucléophile.¹⁹⁷

La fonctionnalisation par formation de liens thio-urées a également été étendue à la formation des cyclodextrines perfonctionnalisées en position 6 par les équipes de Fernández et Defaye.¹⁹⁸

Les groupes de Roy et Santoyo-González ont mené une étude¹⁹⁹ poussée pour mesurer l'influence de plusieurs paramètres tels que la nature du « linker » ou de l'unité glycosidique sur les interactions de ces composés avec des lectines. Pour la synthèse de **100**, **101**, **102** et **103** (Figure 41), les auteurs ont développé une réaction de substitution nucléophile d'halogènes par des thiolates masqués sous forme d'isothiuronium.

¹⁹⁷ L. de Robertis, C. Lancelon-Pin, H. Driguez, F. Attioui, R. Bonaly, A. Marsura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1127-1130.

¹⁹⁸ C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, H. Law, K. Chmurski, J. Defaye, M. L. O'Sullivan, H. N. Caro, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2523-2531.

¹⁹⁹ J. J. García-López, F. Hernández-Mateo, J. Isac-García, J. M. Kim, R. Roy, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 522-531.

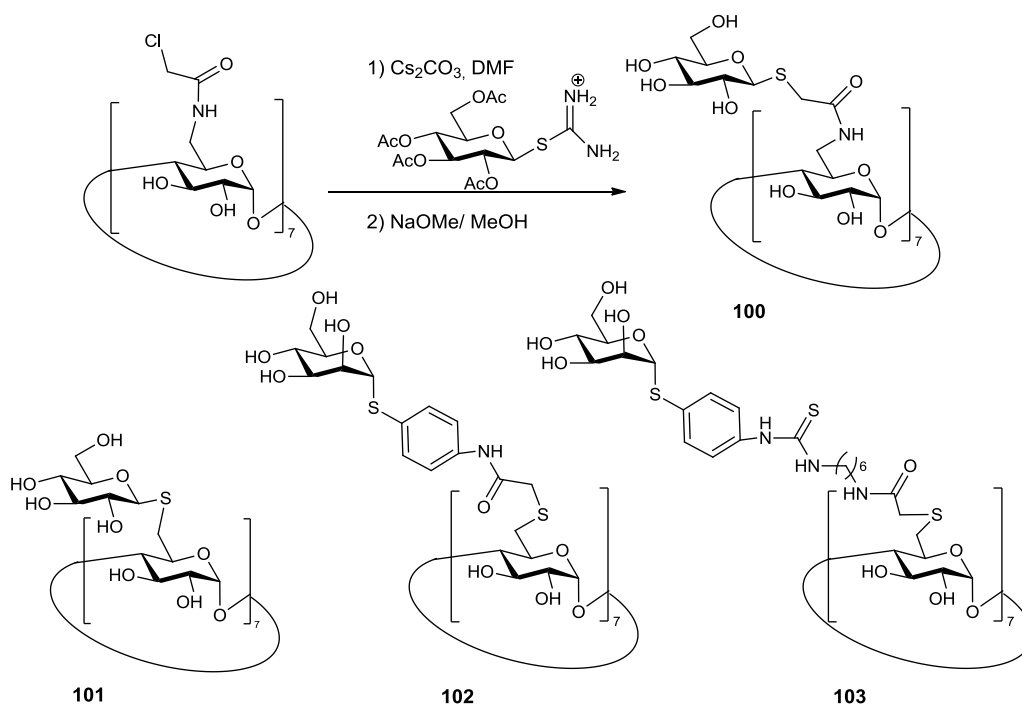


Figure 41. Perglycosylation en position 6 de cyclodextrines avec différents « linkers »

Les résultats biologiques sont intéressants avec, par exemple un gain d'inhibition d'un facteur 10 pour **101** et de 100 pour **100** par rapport au β -D-glucose montrant encore une fois l'importance du linker.

L'équipe de Santoyo-González a été la première à introduire la réaction de **cycloadditions 1,3 dipolaires alcynes-oxyde de nitrile** pour la glycosylation de cyclodextrines avec la formation d'isoxazoles.²⁰⁰

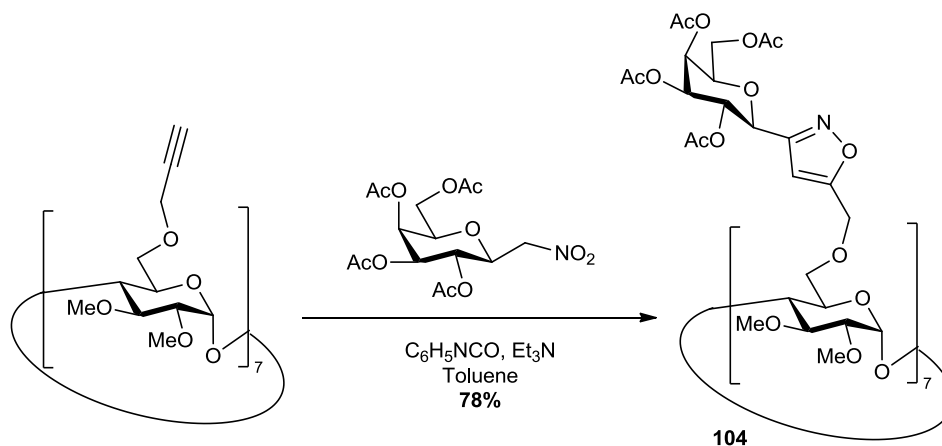


Schéma 51. Première fonctionalisation de cyclodextrines par cycloaddition 1,3-dipolaire alcynes-oxyde de nitrile.²⁰⁰

Ce groupe a par exemple rapporté la synthèse de **104** par réaction entre un galactose substitué en position 1 par un oxyde de nitrile et la cyclodextrine perpropargylée en position 6 (Schéma 51) avec un très bon rendement de 78%.

²⁰⁰ F. G. Calvo-Flores, J. Isac-García, F. Hernández-Mateo, F. Pérez-Balderas, J. A. Calvo-Asín, E. Sánchez-Vaquero, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2499-2502.

La réaction de CuAAC a également été utilisée par plusieurs groupes pour des polyfonctionnalisations avec l'utilisation de dérivés de cyclodextrines possédant soit des fonctions azotures soit des fonctions alcynes.^{201,193,200}

Par exemple Santoyo-González *et al.* ont synthétisé plusieurs systèmes heptaglycosylés comme **105** à partir de cyclodextrines heptapropargylées (Schéma 52).¹⁹³

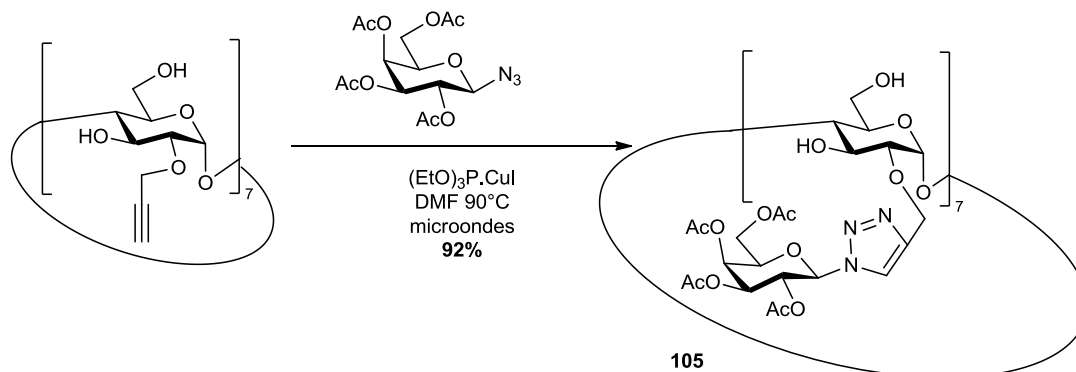


Schéma 52. 2-pergalactosylation par CuAAC.

L'utilisation de **dendrons polyglycosylés** consiste également un moyen d'augmenter la valence de cyclodextrines perfonctionnalisées en position 6. Le composé **106** a par exemple été synthétisé à partir de la cyclodextrine substituée par un iode en position 6 par substitution nucléophile par le dendron thiol portant deux unités mannosides (Figure 42).²⁰²

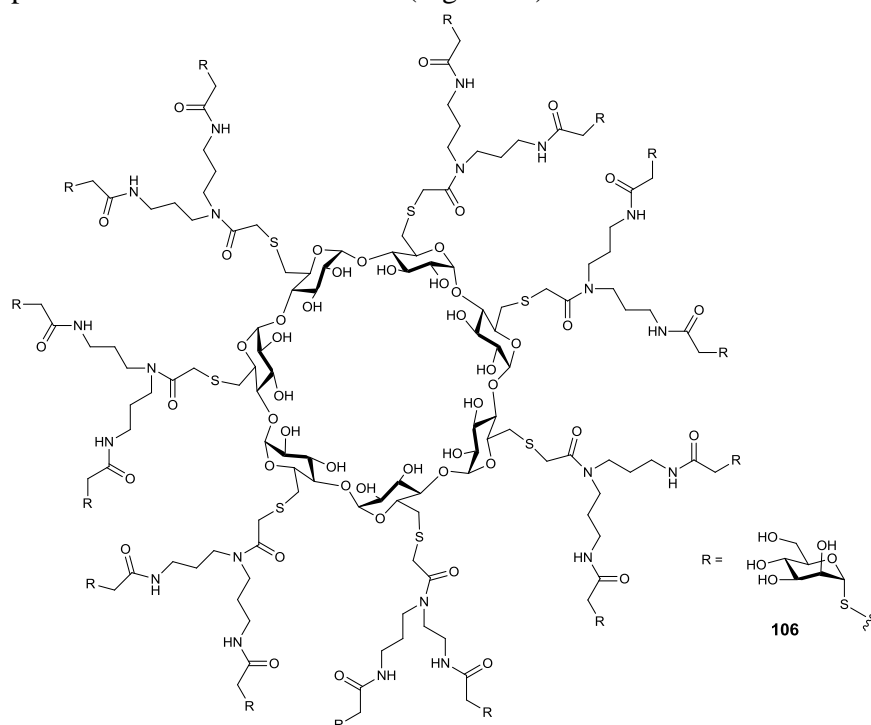


Figure 42. Doublement de la valence par l'utilisation d'un système dendritique²⁰²

²⁰¹ a) Cyclodextrines bi-fonctionnalisées: H. Staunstrup Christensen, B. W. Sigurskjod, T. Gylling Frihed, L. G. Marinescu, C. M. Pedersen, M. Bols, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5279-5290; b) Utilisation de la CuAAC pour synthétiser un glycoconjugué multivalent : C. Papin, G. Doisneau, J.-M. Beau *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 53-57.

²⁰² a) A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, F. Santoyo-González, J. J. Garcí-López, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, E. Ortiz-Salmerón, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 812-827; b) F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez, L. García-Fuentes, E. Ortiz-Salmerón, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7786-7795.

L'évaluation de la capacité d'inclusion de ces systèmes a fait l'objet d'une étude mais contrairement à leurs analogues 7-valents non dendritiques, ils n'ont pas montré de liaisons avec les deux molécules d'inclusion testées (le 8-anilino-1-naphthalènesulfonate de sodium et le 2-naphthalènesulfonate de sodium). Ceci pourrait être dû à un encombrement stérique trop important. En revanche **106** a montré un gain d'affinité d'un facteur 3 par rapport au méthyl- α -D-mannose pour une lectine spécifique aux mannoses, la concanavalin A (ConA).

Très récemment, une équipe espagnole a rapporté la synthèse de cyclodextrines perfonctionnalisées en position 6 avec l'utilisation de dendrons possédant plusieurs unités glycosydes différentes (Figure 43).^{203,204} Les dendrons sont introduits sur la cyclodextrine par des réactions menant à la formation de thiourées.

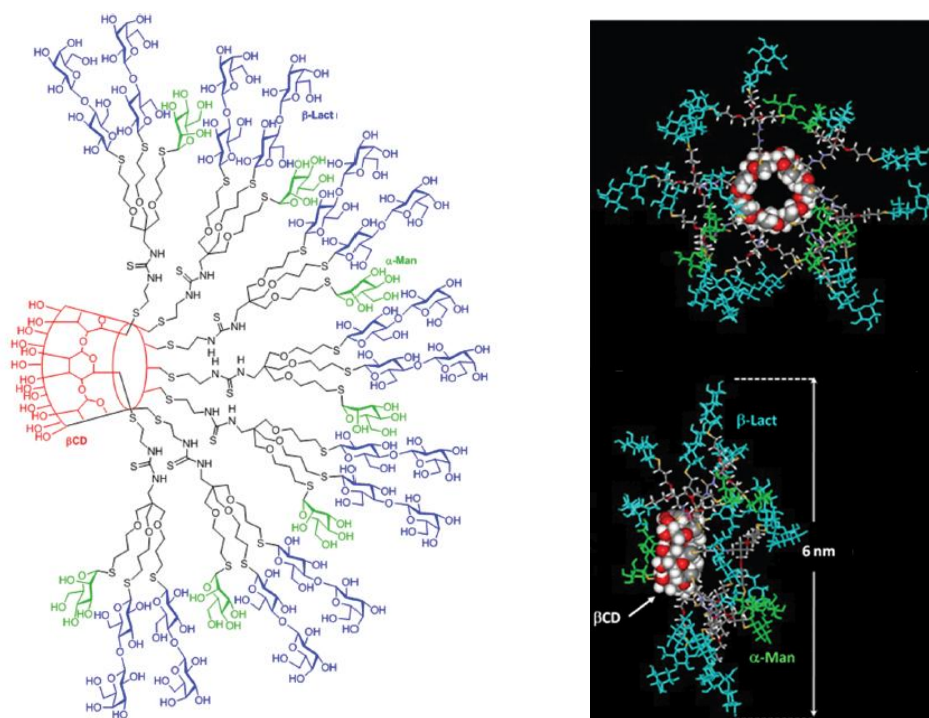


Figure 43. Cyclodextrine polyglycosylée avec des mannoses et des lactoses.

La présence de résidus β -lactose a contribué à augmenter l'affinité du complexe avec la lectine ConA spécifique aux mannoses, les auteurs définissent cet effet comme un effet hétérocluster.²⁰⁵ Inversement, les mannoses contribuent aussi à l'affinité du composé avec une lectine spécifique aux lactoses.

²⁰³ M. Gómez-García, J. M. Benito, A. P. Butera, C. Ortiz Mellet, J. M. García-Fernández, J. L. Jiménez-Blanco, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1273-1288.

²⁰⁴ M. Gómez-García, J. M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz-Mellet, R. Gutierrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García-Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.

²⁰⁵ Pour une revue récente sur les hétéroglycoclusters : J. L. Giménez Blanco, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Soc. Rev.* **2013** DOI : 10.1039/C2CS35219B

iii) Cyclodextrines polyfonctionnalisées sur les deux faces

C'est l'équipe de Stoddart qui a décrit en premier des réactions de fonctionnalisations sur la face primaire et/ou la face secondaire en utilisant les réactions de **photo-addition thiol-ène**.²⁰⁶

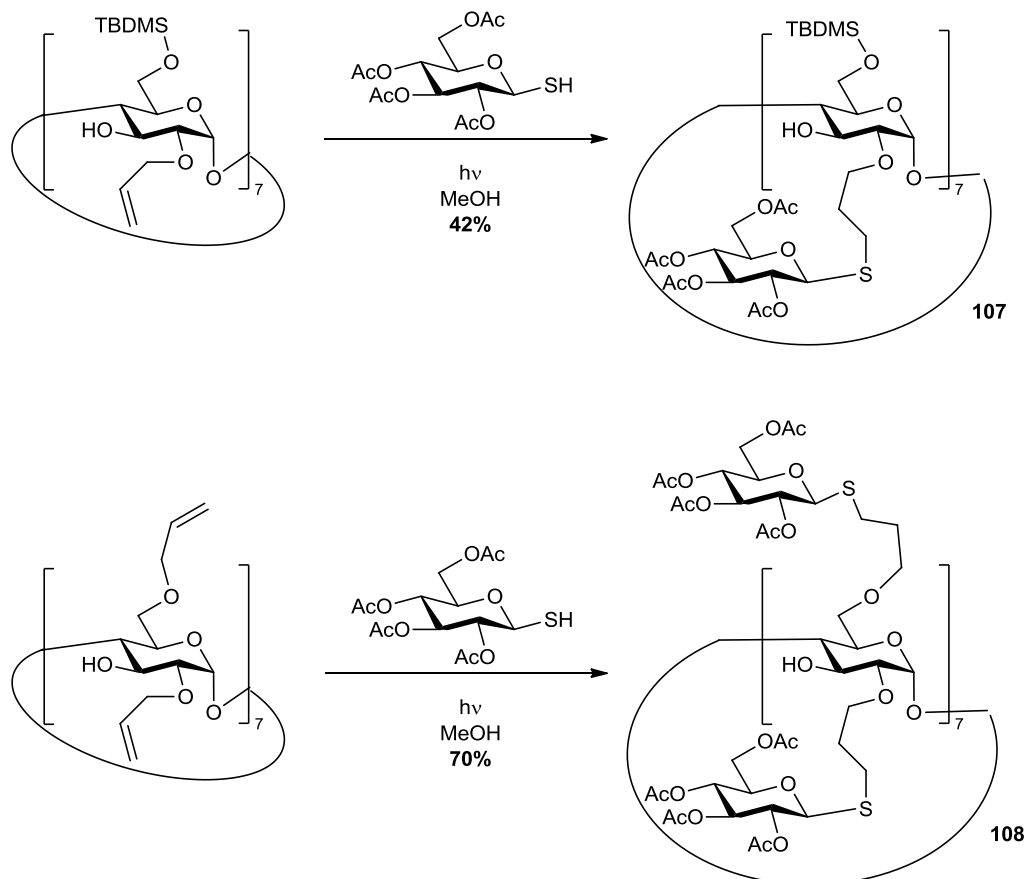


Schéma 53. Glycosylation de la face inférieure et des deux faces de β -cyclodextrines²⁰⁶

Ils ont ainsi pu synthétiser les produits fonctionnalisés sur la face primaire ou sur la face secondaire (**107**) et le produit tétradécavalant **108** fonctionnalisé sur les deux faces de la cyclodextrine (Schéma 53).

Le groupe de Vargas-Berenguel a également synthétisé des cyclodextrines polypropargylées pour former des glycoclusters par **couplage de Sonogashira**.²⁰⁷ Les cyclodextrines perpropargylées en position 6, en position 3 (Schéma 54 produit **109**), en positions 2 et 6 et également en positions 2, 3 et 6 (Schéma 54 produit **110**) sont ainsi obtenues et permettent l'accès à quatre systèmes multivalents avec des valences variables de 7 à 21. Les étapes de couplages sont ici très efficaces avec des rendements compris entre 60 et 75%.

²⁰⁶ D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1113-1116; b) D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8309-8319.

²⁰⁷ F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez-Martinez, A. Vargas-Berenguel, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2389-2392.

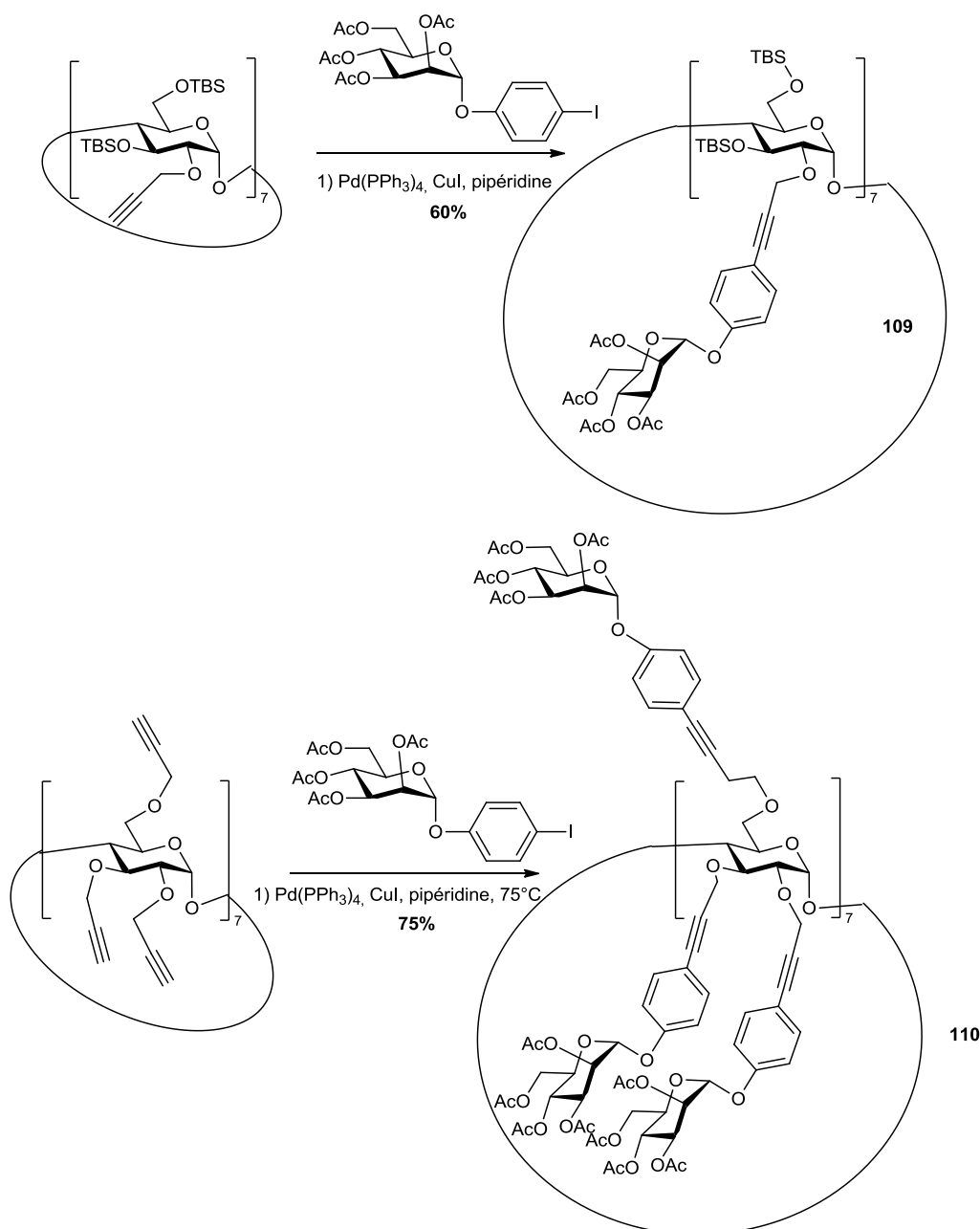


Schéma 54 Introduction des unités osidiques par couplage de Sonogashira.

Ces produits n'ont toutefois pas encore fait l'objet d'études d'affinité pour des lectines.

La plupart des cyclodextrines glycosylées décrites ci-dessus, ont fait l'objet de tests, pour évaluer leurs propriétés de solubilité, d'affinité pour différentes lectines, ou leur capacité d'inclusion d'entités chimiques. Les résultats encourageants, montrent, entre autres, des augmentations d'affinité vis-à-vis de lectines.^{184a} La cyclodextrine elle-même pourrait jouer un rôle dans les augmentations d'affinité. En effet, il a été montré sur des dérivés monoglycosylés que la β -CD pouvait stabiliser le complexe avec la lectine ConA de près de $-0,35 \text{ kCal.mol}^{-1}$.²⁰⁸ Comme nous avons pu le voir les synthèses ont beaucoup évolué et permettent aujourd'hui d'accéder à des dérivés de valences très importantes.

²⁰⁸ I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. Defaye, *ChemBioChem* **2001**, 2, 777-783.

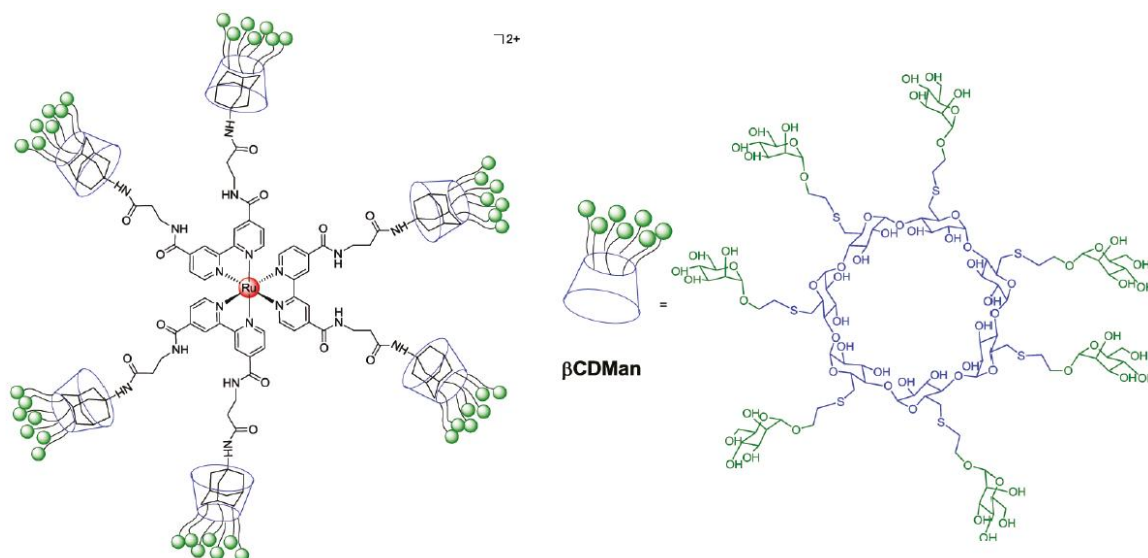


Figure 44. Complexe de ruténium portant six cyclodextrines heptavalentes.²⁰⁹

Ainsi, l'équipe de Seeberger a réalisé très récemment la synthèse d'un système supramoléculaire comprenant six cyclodextrines heptavalentes pour tester son affinité pour une lectine.²⁰⁹ Le composé (Figure 44) portait 42 résidus mannoses !

L'ensemble des résultats du domaine fait de la cyclodextrine une excellente charpente pour la conception de systèmes multivalents glycosylés. En effet, les nombreux sites de fonctionnalisation permettent d'accéder à des produits variés dans la valence mais aussi dans la disposition des ligands glycosides. Deux points apparaissent également importants pour la conception des systèmes multivalents : le choix et la longueur du « linker » qui amène une flexibilité et peut avoir une influence sur les résultats biologiques ainsi que les méthodes de synthèse choisies qui doivent être d'une grande efficacité. Parmi les réactions décrites on peut remarquer que les réactions de chimie click (thiol-ène, alcyne-oxyde de nitrile ou encore alcyne-azoture) permettent d'accéder aux produits avec des rendements particulièrement bons. Cependant encore très peu d'exemples de synthèses de produits perglycosylés par réaction de CuAAC ont été décrits malgré l'intérêt et l'efficacité de ce type de réaction.

²⁰⁹ D. Grünstein, M. Magliano, R. Kikkeri, M. Collot, K. Barylyuk, B. Lepenies, F. Kamena, R. Zenobi, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13957-13966.

2.2.5. Structures multivalentes glycosylées, les fullerènes C₆₀.

Les fullerènes²¹⁰ ont été découverts en vaporisant du carbone graphite par des irradiations au laser en 1985.²¹¹ Ils constituent la troisième forme de carbone avec le graphite et le diamant. Depuis leur découverte, ils ont déjà fait l'objet d'intenses études. Le C₆₀ est le fullerène le plus communément utilisé. Cette molécule très stable est composée de soixante atomes de carbones formant par des liaisons covalentes vingt hexagones et douze pentagones, chaque pentagone étant entouré de cinq hexagones. Le fullerène C₆₀ est également appelé Buckminster fullerène en raison de sa structure qui ressemble aux constructions géodésiques de l'architecte Buckminster Fuller. Cette structure fait également penser à un objet très commun, le ballon de football. Les soixante atomes de carbones de sa structure hautement symétrique (symétrie I_h isocahédrique) sont tous équivalents.



Figure 45. Représentation chimique du fullerène C₆₀, ballon de football et biosphère de Montréal par R. Buckminster Fuller

Il existe deux types de liaison sur le fullerène, les liaisons de type double entre deux hexagones (nommées [6,6]) et les liaisons de type simple entre un pentagone et un hexagone (nommées [5,6]). Le fullerène C₆₀ présente un caractère aromatique ambigu, sa structure sphérique fait que les carbones sp₂ ne sont pas plans mais pyramidaux. Ce caractère aromatique lui confère également des propriétés électroniques. Le C₆₀ peut en effet accepter jusqu'à 6 électrons par 6 réductions successives.²¹² Ceci fait de lui un composé plutôt électrophile. Cette réactivité fait que le C₆₀ fera le plus souvent l'objet d'additions nucléophiles. Le fullerène C₆₀, très hydrophobe, est insoluble dans les solvants polaires. Ce composé est peu soluble dans les hydrocarbures et le dichlorométhane mais se solubilise plus facilement dans les solvants tels que le toluène (2,8 mg.mL⁻¹) ou le benzène.

Les propriétés intrinsèques du fullerène C₆₀ font de lui un objet d'études particulièrement intéressant dans plusieurs domaines telles que les nanotechnologies, le photovoltaïque, mais aussi la biologie²¹³ et la chimie médicinale. Les fonctionnalisations et modifications chimiques changent les propriétés du fullerène C₆₀. Naturellement, sa structure s'est révélée intéressante pour

²¹⁰ F. Langa, J.-F. Nierengarten (Eds) *Fullerenes: Principles and Applications*, RCS Nanoscience and Nanotechnology Series, Royal Chemical Society, London, **2007**.

²¹¹ H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* **1985**, 318, 162-163.

²¹² Q. Xie, E. Perez-Cordero, L. Echegoyen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3978-3980.

²¹³ a) A. W. Jensen, S. R. Wilson, D. I. Schuster, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 767-779; b) S. Bosi, T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 913-923.

la synthèse de glycoconjugués nommés glycofullerènes.²¹⁴ Dans les paragraphes suivants, de manière similaire à ce qui a été fait pour le scaffold cyclodextrine, nous décrivons les différentes méthodes utilisées pour la glycosylation des fullerènes C₆₀. Cette description sera non exhaustive mais tentera de couvrir les principales avancées du domaine.

i) Synthèse de glycofullerènes monovalents

Par cycloadditions directes des glycosides.

Comme dans le cas des cyclodextrines, les premiers glycofullerènes synthétisés sont des fullerènes monoglycosylés. Le premier dérivé a été rapporté par les équipes de Vasella et Diederich²¹⁵ en 1992 et provient de la réaction directe d'un C-glycoside diazirine avec le C₆₀ pour former un spiro C-glycoside de C₆₀ **111** (Schéma 55).

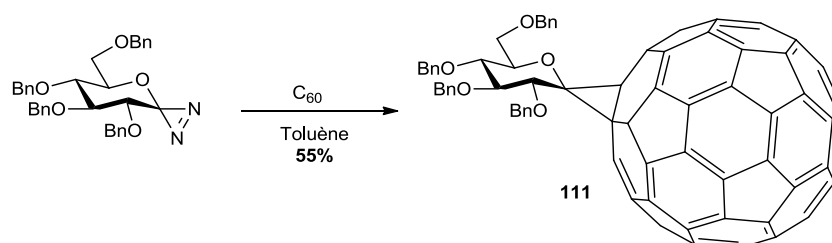


Schéma 55. Première synthèse d'un glycofullerène.

Une méthode similaire a été développée par l'équipe de Kobayashi avec la réaction de cycloaddition [3+2] de différents glycosyles azotures sur les liaisons doubles [5,6] du C₆₀ pour former différents glycoconjugués comme par exemple le composé **112** en série maltose.²¹⁶

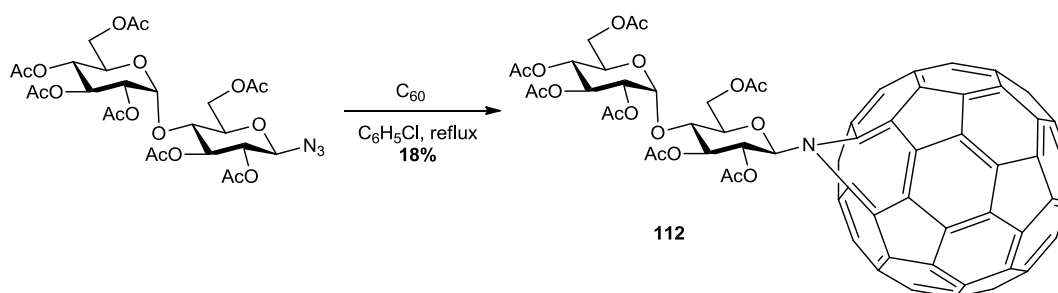


Schéma 56. Glycosylation par cycloaddition de glycosides azotures

Cependant, si la méthode est généralisable, les rendements restent modestes (entre 13 et 28%).

²¹⁴ Pour une revue sur le sujet : Y. M. Chabre, R. Roy, ch. 4, pp 64-77 in *Synthesis and biological Applications of Glycoconjugates* O. Renaudet, N. Spinelli (Eds), **2011**.

²¹⁵ A. Vasella, P. Uhlmann, C. A. A. Waldraff, F. Diederich, C. Thilgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1388-1390.

²¹⁶ A. Yashiro, Y. Nishida, M. Ohno, S. Egushi, K. Kobayashi, *Tetrahedron. Lett.* **1998**, *39*, 9031-9034.

La réaction de Prato de fonctionnalisation de fullerène par formation de pyrrolidine a été aussi adaptée à la glycosylation directe du fullerène C_{60} (Schéma 57).²¹⁷ Cette réaction est une réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire d'ylure d'azométhyne sur le C_{60} .

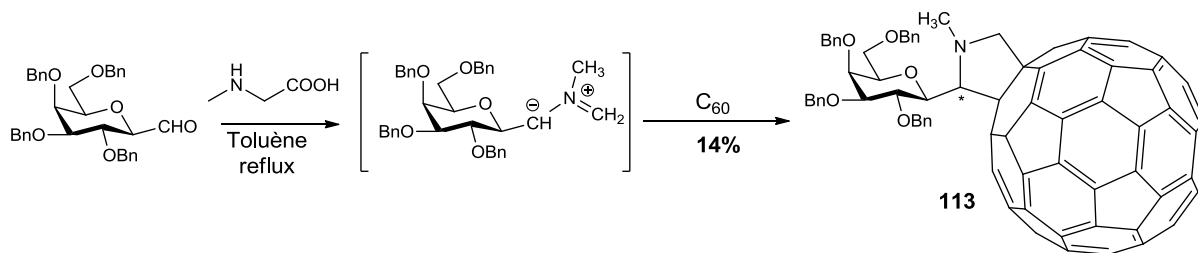


Schéma 57. Glycosylation par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylure d'azométhyne.

L'ylure d'azométhyne est formé par réaction du formyl-C-glycoside avec la *N*-méthylglycine (sarcosine). Le glycofullerène **113** a ainsi été isolé sous forme d'un mélange de diastéréoisomères avec un rendement de 10%. Cette stratégie a été, par la suite, adaptée à la synthèse de dérivés fullerènes C_{60} comportant une unité 6-(β -D-glycopyranosylamino)pyrimidin-4-one comme **114** (Figure 46).²¹⁸

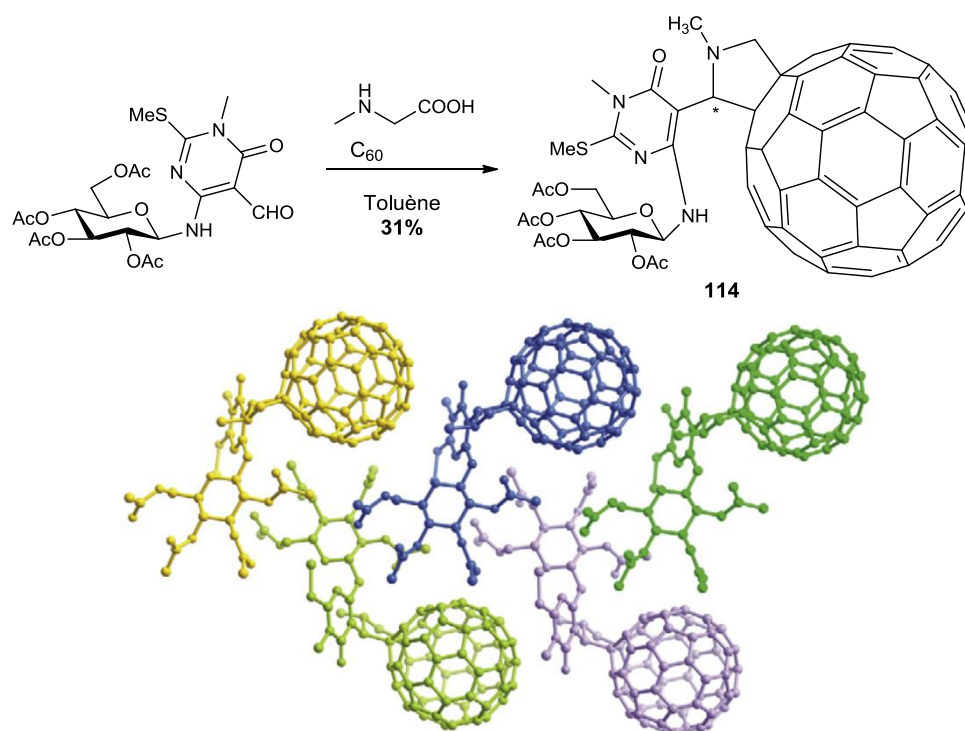


Figure 46. Glycosylation et arrangement spatial des molécules déterminé par rayons X.

Un des deux diastéréoisomères de **114** a pu être cristallisé et les auteurs ont alors montré que les glycofullerènes s'arrangeaient pour former un ruban avec les unités sucres à l'intérieur et les fullerènes à l'extérieur de l'arrangement.

²¹⁷ A. Dondoni, A. Marra, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1649-1652.

²¹⁸ C. I. C. Jordão, A. S. F. Farinha, R. F. Enes, A. C. Tomé, A. M. S. Silva *et al.* *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4427-4437.

Les rendements de ces réactions de « glycosylation directe » du fullerène C₆₀ restent très modestes.

Par des réactions sur des fullerènes déjà fonctionnalisés

Une autre stratégie de synthèse consiste à passer par des intermédiaires fullerènes fonctionnalisés. Ceci permet l'obtention de fullerènes monoglycosylés avec de meilleurs rendements.

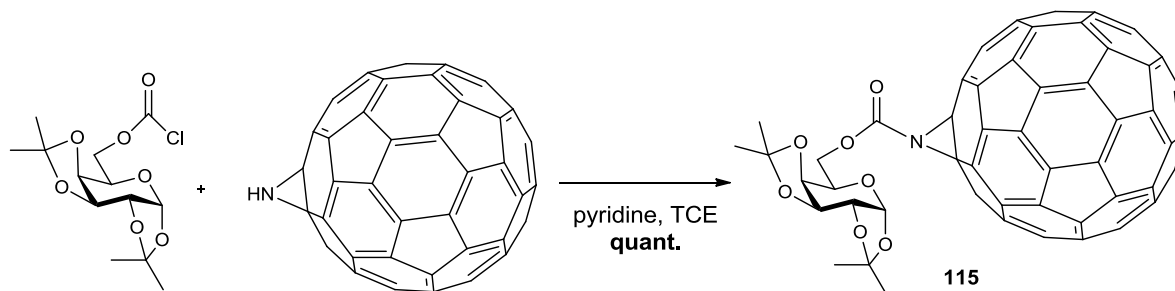


Schéma 58. Glycosylation par réaction avec l'aziridinofullerène.²¹⁹

Banks *et al* ont ainsi réalisé la synthèse de glycofullerènes à partir d'un aziridino-fullerène par réaction entre l'aziridine et un dérivé de sucre substitué par un chloroformate pour former le carbamate correspondant **115** (Schéma 59).²¹⁹

Le groupe de Saigo a décrit la synthèse d'un glycofullerène **116** par une réaction d'estérification entre l'alcool en position 6 d'un dérivé du glucose et un fullerène fonctionnalisé par un chlorure d'acide (Schéma 59).²²⁰

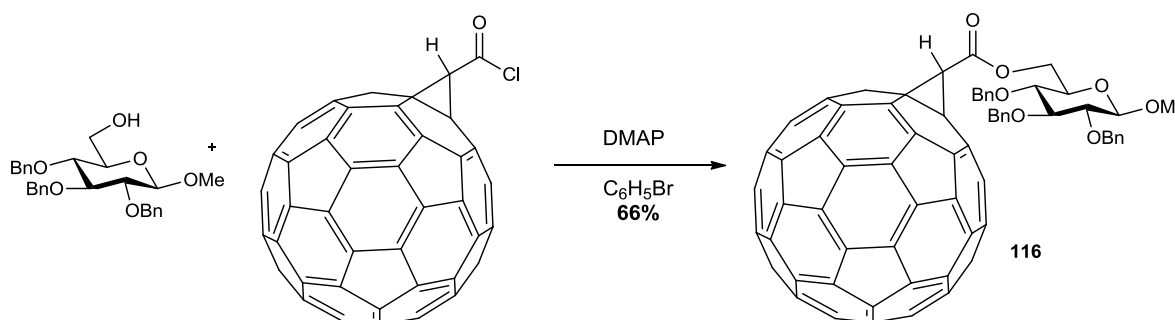


Schéma 59. Glycosylation par réaction avec un chlorure de fullerénoacétyle.

Le groupe de Toshima a rapporté également la synthèse d'un glycofullerène **117** à partir d'un dérivé fullerène cyclohexanol obtenu par réaction de Diels Alder pour des applications dans la photodégradation d'une protéase du HIV.²²¹

²¹⁹ M. R. Banks, J. I. G. Cadogan, I. Gosney, P. K. G. Hodgson, P. R. R. Langridge-Smith, J. R. A. Millar, A. T. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 885-886.

²²⁰ H. Ito, T. Tada, M. Sudo, Y. Ishida, T. Hino, K. Saigo, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2643-2645.

²²¹ S. Tanimoto, S. Sakai, S. Matsumura, D. Takahashi, K. Toshima, *Chem. Commun.* **2008**, 5767-5769.

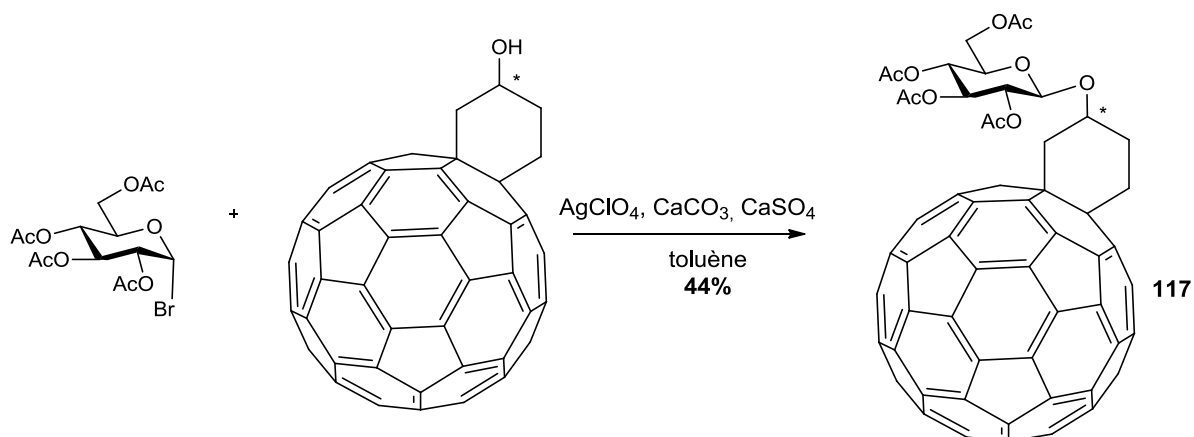


Schéma 60. Glycosylation par substitution nucléophile avec un dérivé fullerène cyclohexanol.²²¹

Le glycofullerène **117** est obtenu par réaction de glycosylation du fullerène cyclohexanol avec le dérivé glycoside bromé (Schéma 60).

L'équipe de Toshima a utilisé également un couplage péptidique avec un fullerène pyrrolidine pour synthétiser le glycofullerène **118** (Schéma 61).²²² Le but était de concevoir des agents thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer qui agiraient par photo-dégradation d'amyloïdes β , des peptides qui forment des agrégats et s'accumulent dans le cerveau des malades.

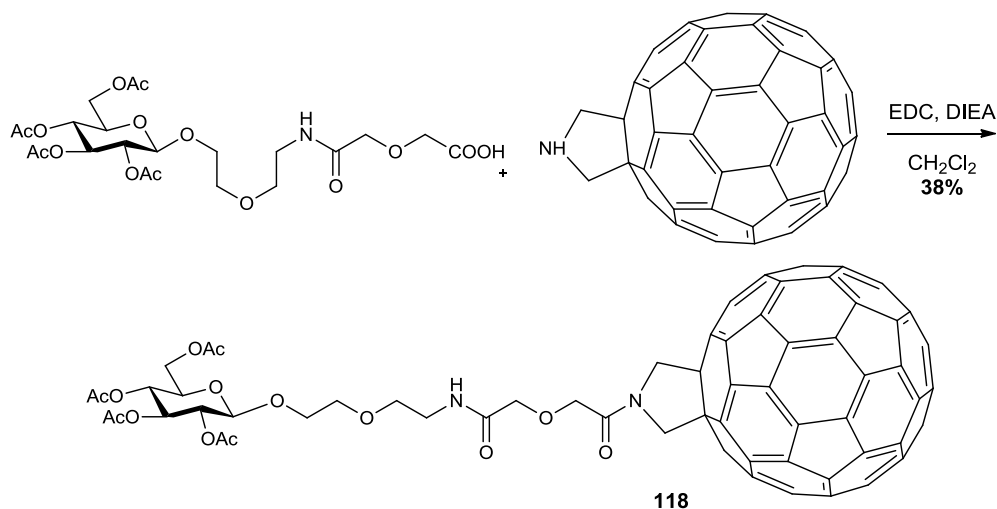


Schéma 61. Synthèse d'un glycofullerène par couplage péptidique²²²

Bien que le mécanisme ne soit pas encore clair, le composé **118** s'est révélé inhibiteur du processus d'agrégation d'amyloïdes β après irradiation UV et constitue une réelle piste pour le développement d'agents photo-dégradants de ces peptides.

²²² Y. Ishida, S. Tanimoto, D. Takahashi, K. Toshima, *Med. Chem. Commun.* **2010**, *1*, 212-215.

ii) Synthèse de glycofullerènes multivalents

Par cycloaddition directe sur le fullerène C₆₀.

La synthèse du premier glycofullerène divalent a été réalisée par cycloaddition [3+2] thermique d'un mannoside portant une fonction azoture sur le fullerène C₆₀.²²³ Le produit **119** a été isolé pur avec 10% de rendement d'un mélange comprenant également deux isomères monovalents **120** et **121** (19% de rendement). Ces deux isomères monovalents sont issus de l'addition sur une liaison [6,5] et [6,6] du fullerène respectivement (Schéma 62).

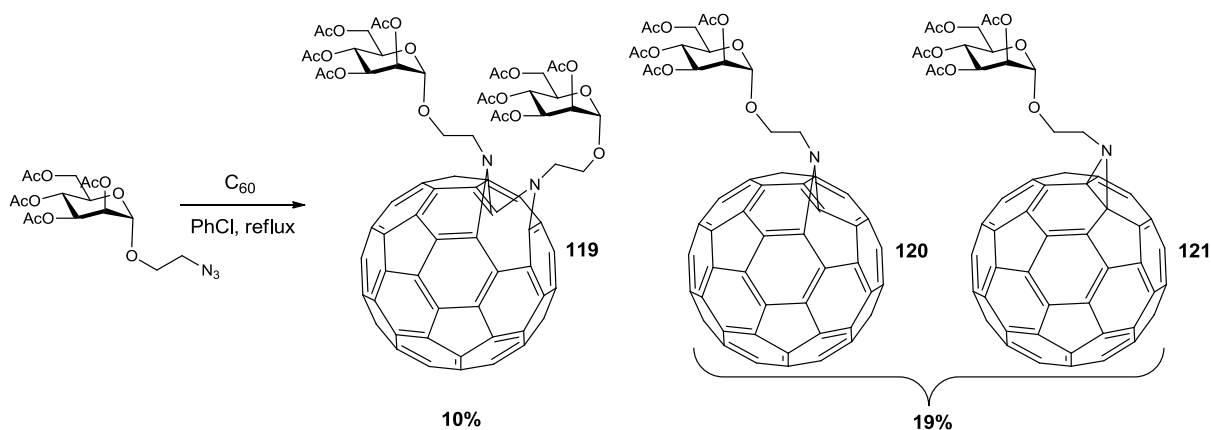


Schéma 62. Diglycosylation par réaction de cycloaddition thermique.

Les produits ont ensuite été polyhydroxylés au niveau du fullerène en présence de TBAH et de soude donnant accès à des produits avec en moyenne 29 hydroxyles par fullerène. L'affinité des différents produits polyhydroxylés avec une lectine spécifique aux mannosides, la concanavalin A (ConA) a alors été testée mais ne donne pas de résultat d'effet cluster pour le dérivé divalent par rapport aux fullerènes monovalents.

Cependant, une autre étude²²⁴ montre que les dérivés monovalents **120** et **121** non hydroxylés, après déprotection, présentent une activité accrue d'inhibition de la ConA par rapport à un mannoside classique. Ceci pourrait être dû, selon les auteurs, à un effet de multivalence provenant de la propension de ces dérivés à s'auto-assembler. Les auteurs ont montré également par la suite que le produit divalent déprotégé avait également une capacité à s'auto-assembler pour former des lysosomes et des vésicules bicouches.²²⁵ Le même type de synthèse a été aussi décrit avec différents glycosides, les glycofullerènes correspondant présentent des activités photocytotoxiques pour des cellules cancéreuses (par exemple en série galactose **122** Figure 47).²²⁶

²²³ H. Kato, A. Yashiro, A. Mizuno, Y. Nishida, K. Kobayashi, H. Shinohara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 2935-2939.

²²⁴ Y. Nishida, A. Mizuno, H. Kato, A. Yashiro, T. Ohtake, K. Kobayashi, *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 1452-1464.

²²⁵ H. Kato, N. Kaneta, S. Nii, K. Kobayashi, N. Fukui, H. Shinohara, Y. Nishida, *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, 1232-1241.

²²⁶ Y. Mikata, S. Takagi, M. Tanahashi, S. Ishii, M. Obata, Y. Miyamoto, K. Wakita *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3289-3292.

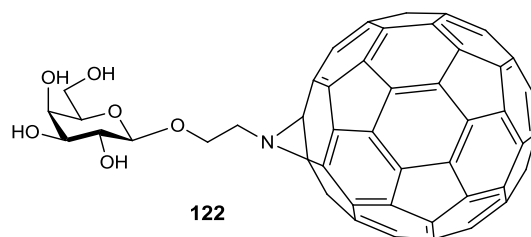


Figure 47. Exemple de glycofullerène présentant une activité cytotoxique pour des cellules cancéreuses.

En 2007, Hirsch et collaborateurs augmentent la valence de ces produits en introduisant des dendrons glycosylés.²²⁷ Ils obtiennent ainsi un dérivé hexavalent **123** après séparation du monoadduit (Schéma 63). Ce produit présente une bonne solubilité dans l'eau une fois déprotégé supérieure à 40 mg par millilitre ce qui constituait un record alors pour un dérivé fullerène.

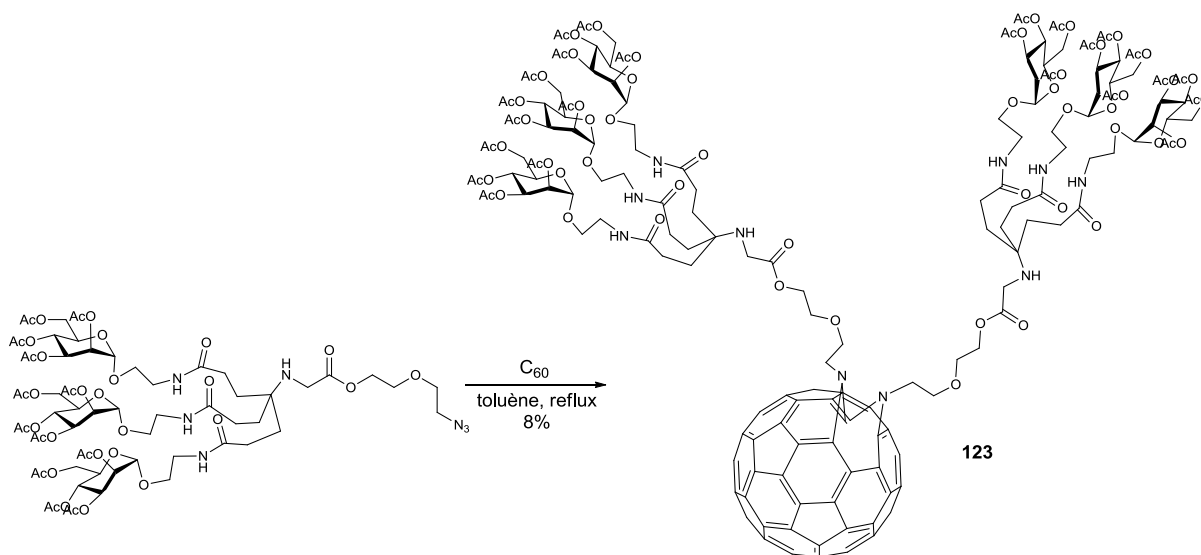


Schéma 63. Glycosylation par cycloaddition de dendrons glycosylés.

L'utilisation des méthodes de fonctionnalisation des fullerènes C_{60} développées par Bingel²²⁸ puis Hirsch²²⁹ a permis l'obtention de fullerènes substitués par cycloadditions de malonates. Cette voie de synthèse a été utilisée avec des malonates substitués par deux unités glycosidiques.²³⁰ Les auteurs synthétisent ainsi un galactofullerène divalent **124** et également un glucofullerène **125** avec des rendements de 37 et 18% respectivement (Schéma 64).

²²⁷ H. Kato, C. Böttcher, A. Hirsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2659-2666.

²²⁸ C. Bingel, *Chem. Ber.* **1993**, 126, 1957-1959.

²²⁹ X. Camps, A. Hirsch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 11, 1595-1596.

²³⁰ R. F. Enes, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. El-Agamey, D. J. McGarvey, *Tetrahedron* **2005**, 61, 11873-11881.

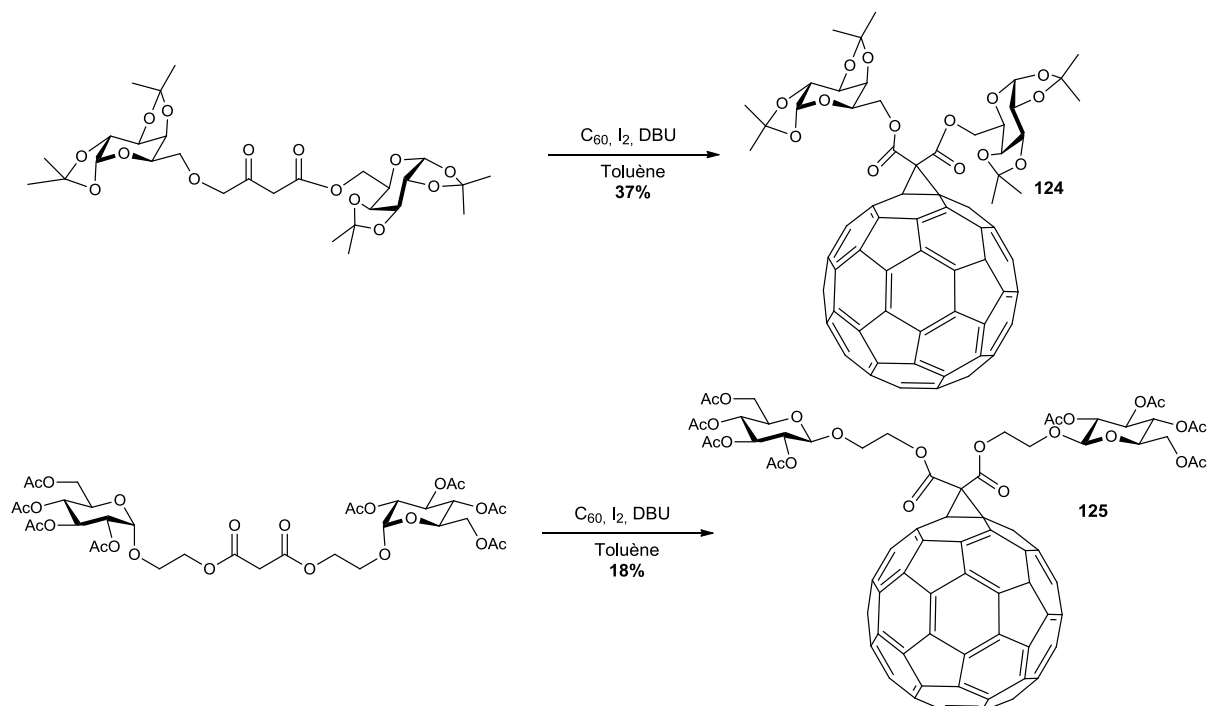


Schéma 64. Glycosylation de fullerènes C₆₀ par cyclopropanation de malonates glycosylés.²³⁰

Il est à noter que la très mauvaise solubilité du galactofullerène déprotégé n'a pas permis de le caractériser et les auteurs ne semblent pas avoir tenté la déprotection de **125**. Par ailleurs, les fonctions esters sont souvent sensibles aux conditions basiques utilisées pour la déprotection des groupements acétates.

C'est pourquoi l'équipe de Hirsch a utilisé un malonamide substitué par deux unités glycosides pour la réaction de cyclopropanation du fullerène.²²⁷ Les fonctions amides sont plus stables que les fonctions esters provenant de l'addition classique de malonates.

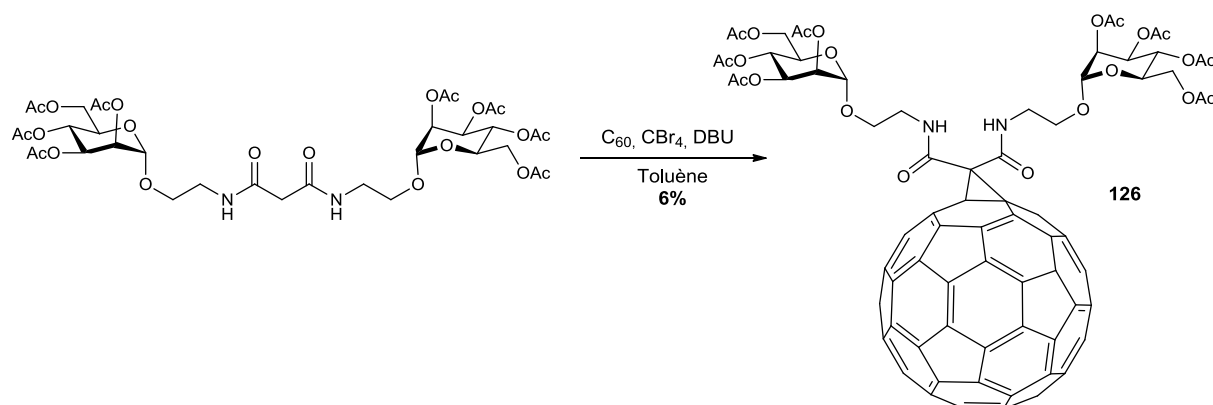


Schéma 65. Introduction de 2 unités mannoses par cyclopropanation de fullerène avec des malonamides glycosylés.

Cependant l'obtention de **126** (Schéma 65) se révèle quand même difficile avec un rendement de 6% seulement après purification d'un mélange de polyadduits.

Par réactions sur des fullerènes déjà fonctionnalisés

Cardullo *et al.* ont synthétisé plusieurs glycofullerènes pour la formation de films de Langmuir.²³¹ Les auteurs ont choisi de travailler sur des fullerènes déjà fonctionnalisés par des réactions de cyclopropanation. L'utilisation de glycodendrons leur a permis, en outre, d'augmenter la valence et d'accéder à des dérivés tri- et hexavalents. Les glycofullerènes **128** et **129** ont été obtenus par couplages peptidiques entre les fonctions acides du fullerène et les amines des dendrons avec des rendements compris entre 32 et 57% (Schéma 66).

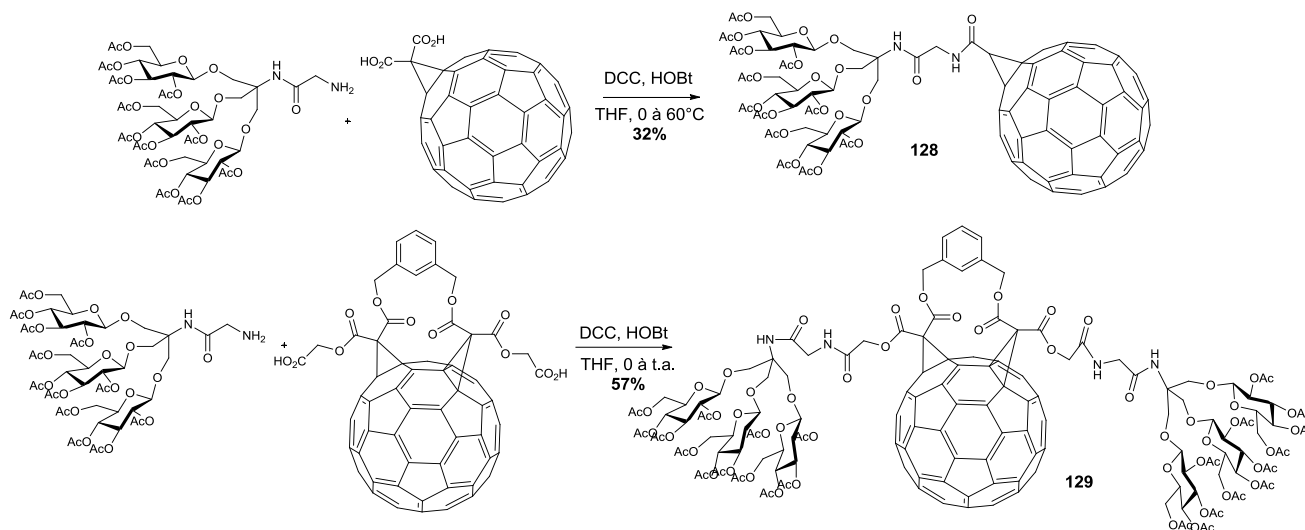


Schéma 66. Synthèse de glycofullerènes à partir de malonates de fullerènes et de glycodendrons.

L'équipe de Pereira de Freitas a récemment introduit la « chimie click » associée à l'utilisation des malonates pour la synthèse de plusieurs glycofullerènes.²³² Cette approche leur a permis de synthétiser 6 glycofullerènes différents (dont **130**) comportant divers glycosides.

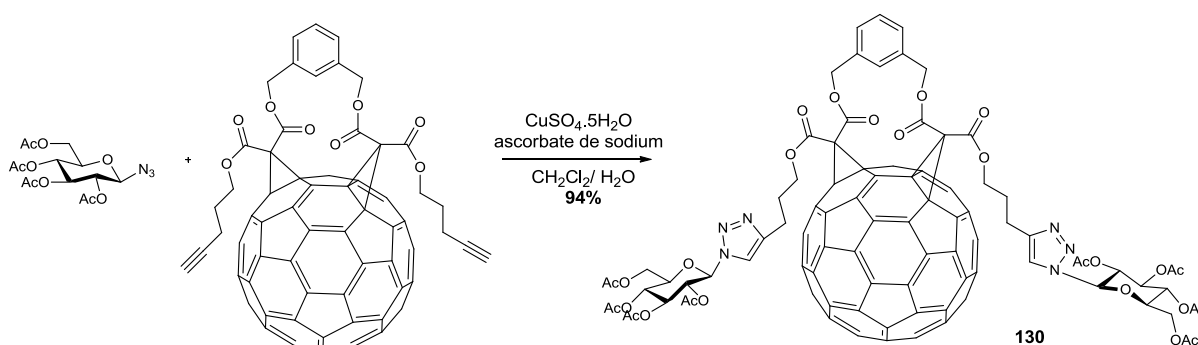


Schéma 67. Glycosylation d'un bisadduit portant deux fonctions alcynes par chimie click.

La stratégie de synthèse par CuAAC permet, en plus de la facilité de mise en œuvre de la réaction d'obtenir les produits désirés avec de très bons rendements compris entre 80 et 98%. Ceci constitue un avantage considérable en comparaison des méthodes utilisées précédemment.

²³¹ F. Cardullo, F. Diederich, L. Echegoyen, T. Habisher, N. Jayaraman, R. M. Leblanc, J. F. Stoddart, S. Wang, *Langmuir* **1998**, *14*, 1955-1959.

²³² G. Rocha Pereira, L. José Santos, I. Luduvico, R. Brondi Alves, R. Pereira de Freitas, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1022-1025.

Nierengarten *et al.* ont parallèlement synthétisé des glycofullerènes dodécavalents en utilisant également la réaction de CuAAC.²³³ Le groupe de Nierengarten a développé en 2008 et 2009 deux hexa-adduits du C₆₀ portant 12 fonctions alcynes ou azotures par cyclopropanation de malonates, permettant l'accès rapide à des dérivés multivalents basés sur une structure fullerène C₆₀.²³⁴

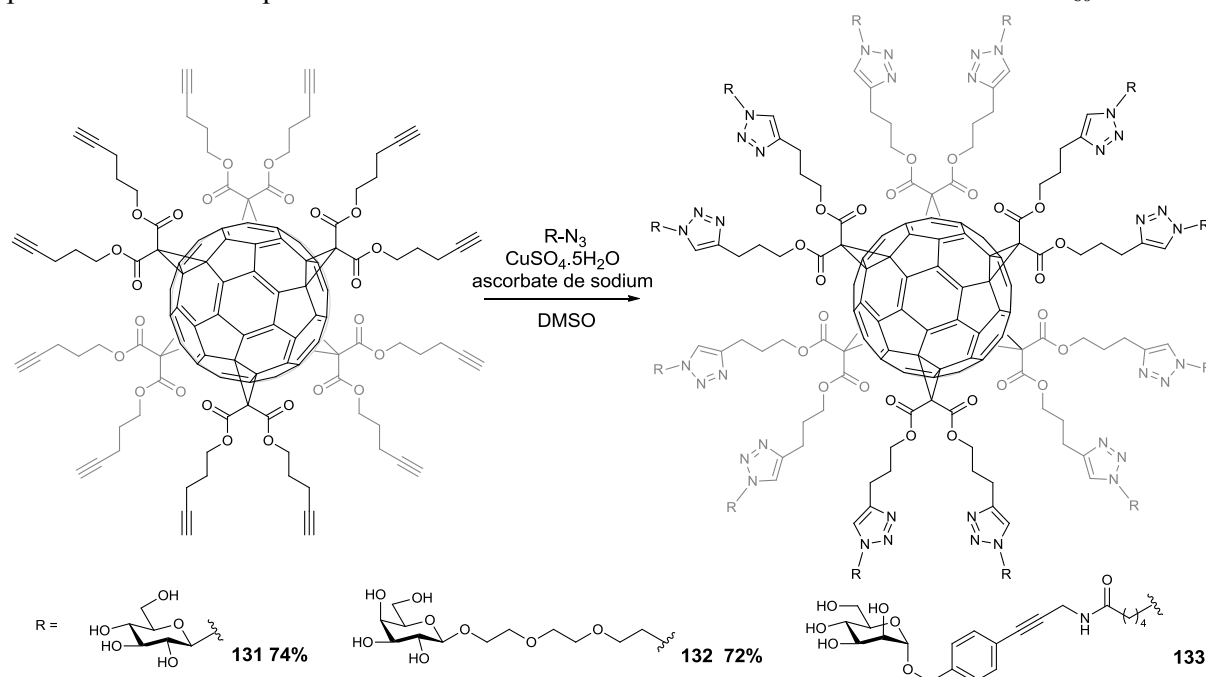


Schéma 68. Multi-glycosylation d'un hexa-adduit de fullerène par chimie click.

Les glycofullerènes **131**, **132** et **133** sont synthétisés par réaction avec les dérivés azotés de glycosides déjà déprotégés ce qui permet de s'affranchir de l'étape de déprotection qui est souvent délicate en raison de la présence des groupements esters. Les auteurs ont également montré que les fonctions alcynes initialement protégées peuvent être déprotégées en présence de TBAF *in situ* pendant l'étape de cycloaddition. Des réactions « inverses » sont également décrites en partant de l'hexa-adduit portant douze fonctions azotures et de glycosides portant des fonctions alcynes vrais.²³⁴ Le dérivé fullerène portant les fonctions alcynes protégées a cependant l'avantage d'être bien plus stable que son analogue azoture. Après cycloadditions, les unités sucres sont distribuées tout autour du fullerène, faisant de ces composés hautement symétriques les premiers glycofullerènes globulaires.

Plusieurs applications biologiques de ces composés ont été décrites par les groupes de Nierengarten et Vincent. Il a été ainsi montré que des fullerènes substitués par 12 mannoses avaient des affinités de l'ordre du nanomolaire avec la FimH (par exemple **133**).²³⁵ La FimH est une protéine de type adhésine, monovalente, présente sur les pilis de la bactérie *E. Coli* et responsable de l'adhésion de la bactérie aux cellules. Des expériences ITC et SPR ont par ailleurs montré un effet de multivalence par rapport au méthyl- α -D-mannose dépendant de la longueur et de la nature du « linker » utilisé. Ils ont également montré un effet d'agrégation induit par les

²³³ J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, *et al.* *Chem. Commun.* **2010**, 46, 3860-3862.

²³⁴ a) J. Iehl, R. Pereira de Freitas, B. Delavaux-Nicot, J.-F. Nierengarten, *Chem. Commun.* **2008**, 2450-2452; b) J. Iehl, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7306-7309.

²³⁵ M. Durka, K. Buffet, J. Iehl, M. Holler, J.-F. Nierengarten, J. Taganna, J. Bouckaert, S. P. Vincent, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1321-1323.

glycofullerènes. Les composés multivalents synthétisés peuvent en effet se lier à 7 protéines FimH simultanément, ce qui pourrait conduire aux premières applications des glycofullerènes en tant qu'antiadhésifs bactériens. Ces deux groupes ont aussi montré le premier effet de multivalence sur une glycosyltransférase, l'heptosyltransférase WaaC.²³⁶

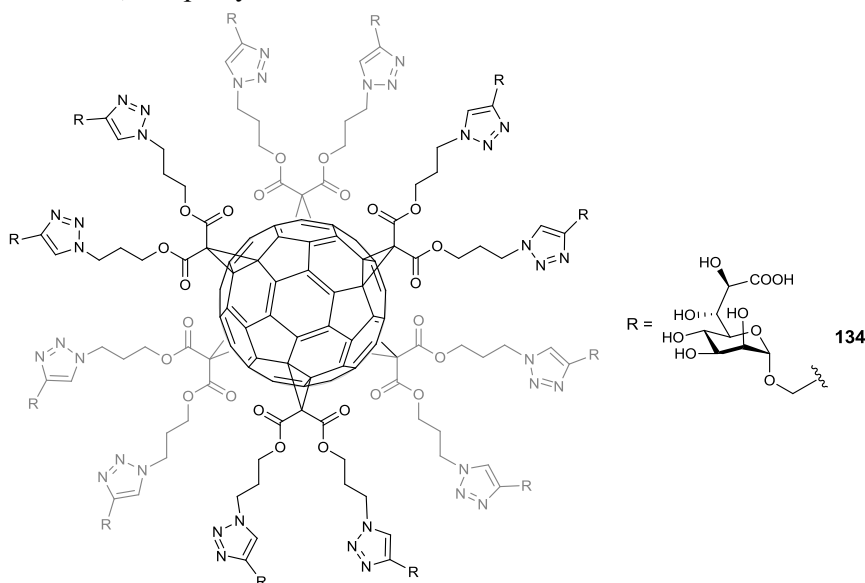


Figure 48. Glycofullerène multivalent inhibiteur d'une glycosyltransférase

Le composé **134** (Figure 48), synthétisé par réaction de CuAAC entre le fullerène portant les douze azotures terminaux et le dérivé de mannose portant une fonction alcyne, a en effet montré une inhibition de 6,7 μM , comparable aux meilleurs inhibiteurs de cette glycosyltransférase et 61 fois plus importante que son analogue monovalent.

Récemment les groupes de Rojo et Martín ont synthétisé par la même stratégie de CuAAC et à partir de la structure hexa-adduit portant douze alcynes terminaux un composé 24-valent **135** grâce à l'utilisation d'un dimère de mannose portant une fonction azoture terminale.²³⁷

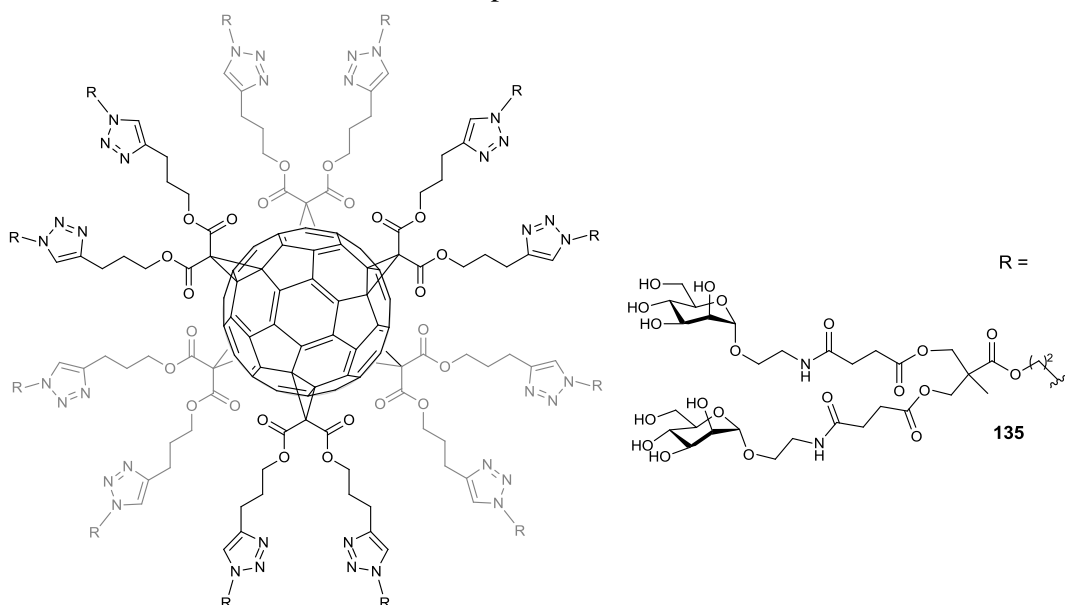


Figure 49. Glycofullerène 24-valent.²³⁷

²³⁶ M. Durka, K. Buffet, J. Iehl, M. Holler, J.-F. Nierengarten, S. P. Vincent, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 641-651.

²³⁷ M. Sánchez-Navarro, A. Muñoz, B. M. Illescas, J. Rojo, N. Martín, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 766-769.

Ce composé glycosylé présente la plus grande valence rapporté à ce jour pour un fullerène glycoconjugué. Toutefois, il a montré une moins bonne affinité que son analogue 12-valent pour une lectine spécifique aux mannoses, la ConA. Ceci serait dû à un processus de liaison moins favorable entropiquement, probablement en raison du nombre important de lectines ConA (quinze) qui peuvent interagir avec le système.

Enfin, le groupe de Nakamura a décrit la synthèse de glycofullerènes pentavalents par réactions d'alkylation d'un composé fullerène pentathiophénol avec divers dérivés de sucres.²³⁸

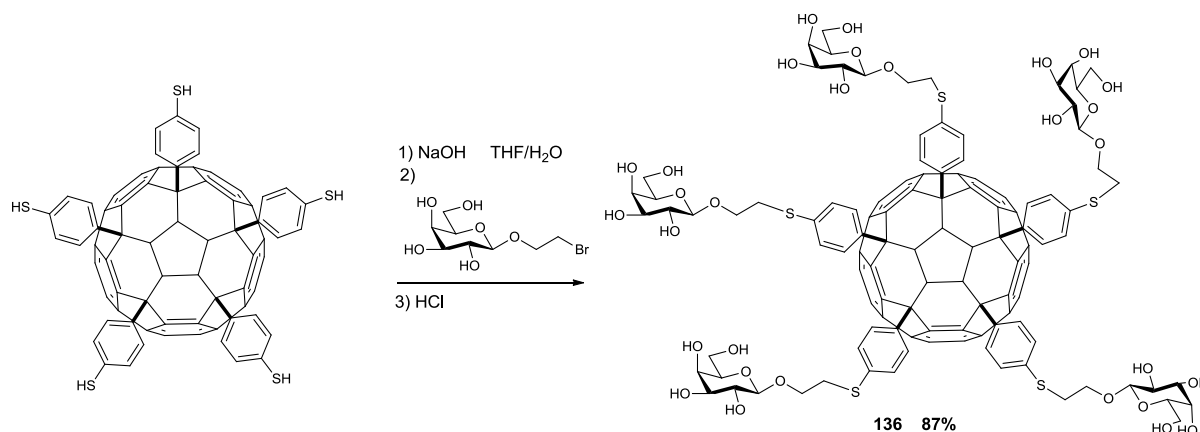


Schéma 69. Multi-glycosylation d'un système pentathiol fullerène par substitutions nucléophiles.

Le dérivé pentathiol est obtenu par réaction du fullerène C_{60} avec un organocuprate²³⁹ et donne accès à cette structure pentavalente facilement glycosylable avec des glycosides halogénés. Les produits qui présentent une faible solubilité dans l'eau sont obtenus avec de très bons rendements entre 73 et 87% pour **136** (Schéma 69). Aux vues des très bons résultats d'affinité obtenus pour le ligand STARFISH avec la toxine SLT-1 obtenus par l'équipe de Bundle (Figure 36 et 37),¹⁷⁷ Nakamura et collaborateurs se sont intéressés à la synthèse d'un système pentavalent basé sur leur dérivé fullerène en combinaison avec les unités trisaccharidiques reconnues par la toxine.²⁴⁰ Les auteurs ont voulu s'affranchir de quelques réactions parasites obtenues lors des substitutions par les thiolates et ont modifié leur structure en fonctionnalisant avec des alcynes pour pouvoir utiliser la réaction de CuAAC. Cela leur a permis également d'augmenter la distance avec les unités sucres et ainsi de s'adapter mieux aux dimensions de la toxine. L'unité trisaccharidique est alors greffée par cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée au cuivre avec un très bon rendement de 86% pour le composé **137** (Schéma 70).

Les résultats d'affinité avec la toxine ne sont pas encore publiés à ce jour.

²³⁸ H. Isobe, H. Mashima, H. Yorimitsu, E. Nakamura, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4461-4463.

²³⁹ M. Sawamura, H. Iikura, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12850-12851.

²⁴⁰ H. Isobe, K. Cho, N. Solin, D. B. Werz, P. H. Seeberger, E. Nakamura, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4611-4614.

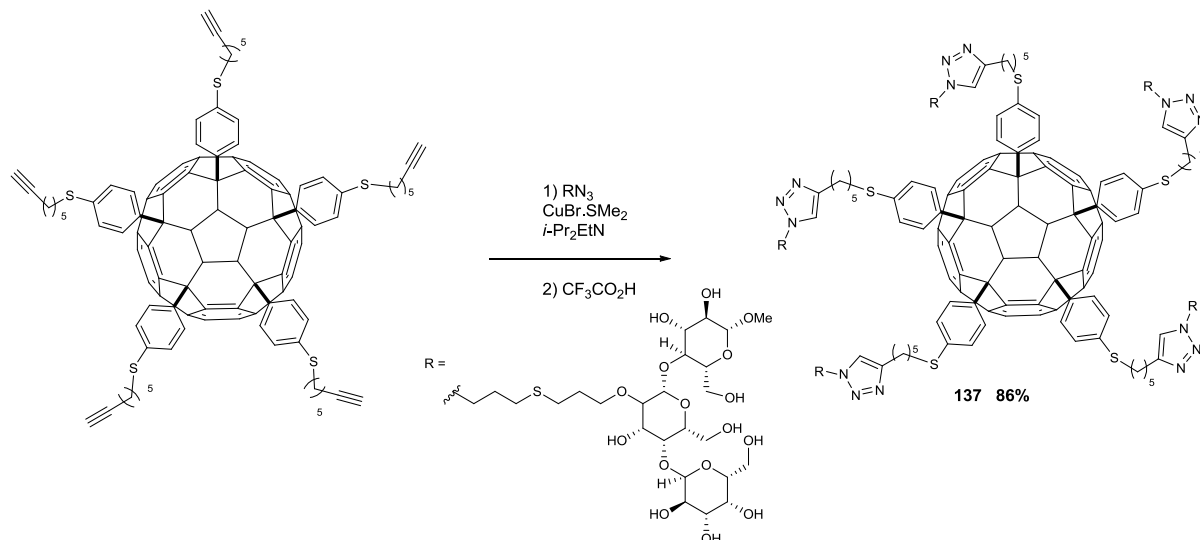


Schéma 70. Multi-glycosylation d'un système pentaivalent de fullerène C_{60} par chimie click.

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les systèmes glycoconjugués sur des structures fullerènes ont fait l'objet d'un développement important en moins de 20 ans. Un grand nombre de méthodologies a été imaginé pour la glycosylation du fullerène C_{60} . Cependant les rendements sont souvent faibles souvent à cause de conversions incomplètes ou de purifications difficiles notamment pour les glycosylations directes du fullerène. Les stratégies basées sur la post-glycosylation de systèmes multivalents et, en particulier, celles qui font intervenir la réaction de CuAAC, se révèlent particulièrement efficaces et augmentent ces rendements de façon importante.

2.3. Multivalence et inhibition de glycosidases

La multivalence a fait l'objet de beaucoup d'études dans le cadre des interactions sucre-lectine avec des gains d'affinité pouvant être spectaculaires. Cependant très peu d'études se sont intéressées à la multivalence dans le cadre de l'inhibition de glycosidases. Contrairement à la plupart des lectines, les glycosidases possèdent un seul site de reconnaissance, le site actif, qui est souvent difficile d'accès. En théorie le phénomène de multivalence serait donc beaucoup moins favorisé pour l'inhibition des glycosidases. En effet, les mécanismes tels que l'effet cluster ou l'effet d'agrégations des récepteurs ne peuvent pas s'appliquer à l'inhibition d'un récepteur monovalent tel qu'une glycosidase (voir § 2.2.2). Ces considérations ont pu constituer un frein aux développements de systèmes multivalents basés sur des iminosucres pour l'inhibition de glycosidases.

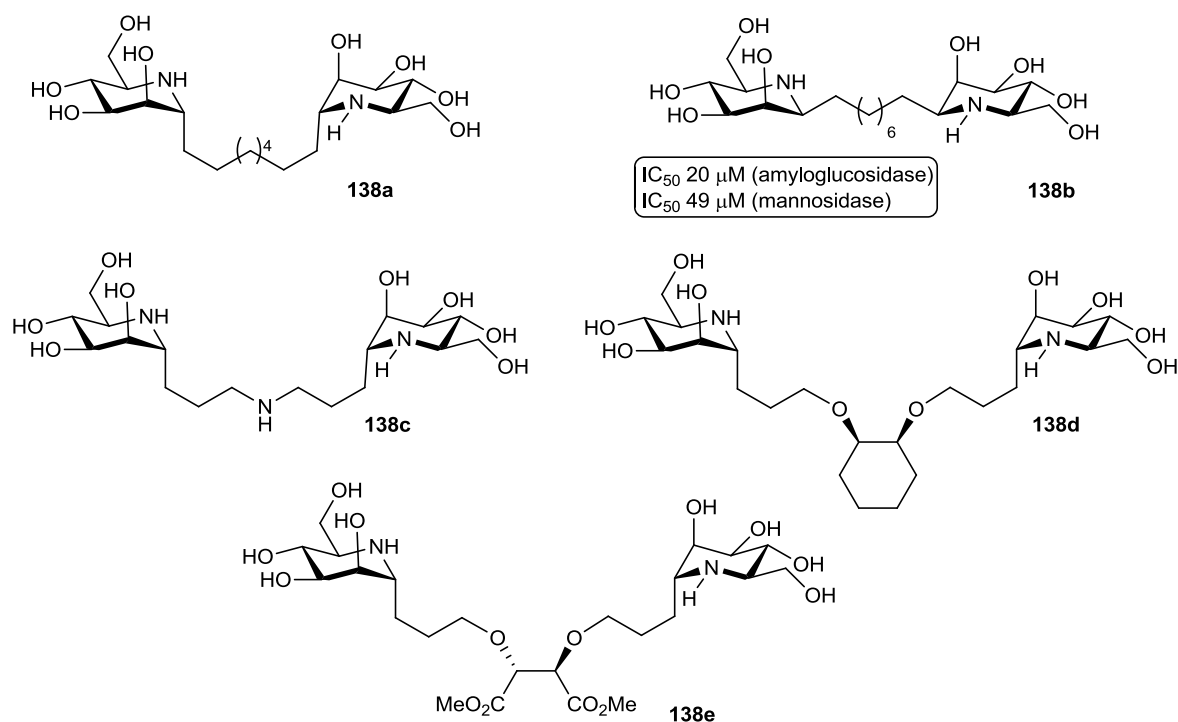
Ainsi, au début du projet de cette thèse seulement cinq publications décrivaient la synthèse d'iminosucres di- à tétravalent et une seule étude systématique avait été conduite pour la recherche de gains d'inhibition de glycosidases. Dans les paragraphes suivants nous décrirons les iminosucres multivalents qui ont été synthétisés à ce jour ainsi que les résultats obtenus pour l'inhibition de glycosidases.

Par souci de clarté, le composé se rapprochant le plus de la référence monovalente correspondante sera appelé « mono », même si dans certains cas, sa structure n'est pas forcément la plus pertinente. En effet, dans la plupart des études citées, les auteurs ne cherchaient pas à mettre en évidence un effet multivalent.

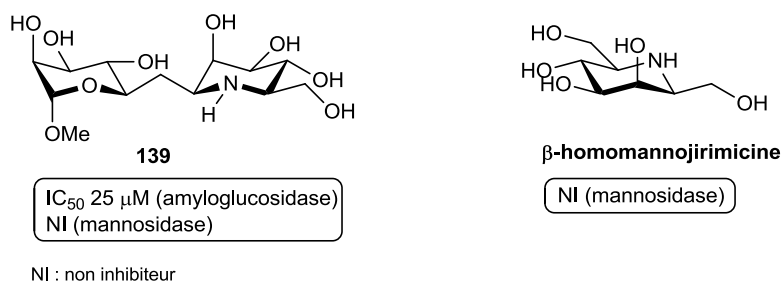
2.3.1. Les travaux du groupe de Johnson

Le premier groupe à avoir décrit des iminosucres divalents est le groupe de Johnson en 1998.²⁴¹ Cinq iminosucres divalents en série désoxymannojirimicine (DMJ) liés en position 1 (Figure 50) ont ainsi été synthétisés. La diversité entre les produits provient d'une modulation des chaînes liant les deux unités DMJ. Les auteurs ont changé la stéréochimie en C-1 (**138a** et **138b**), introduit des hétéroatomes (**138c**, **138d** et **138e**) et introduit une certaine rigidité dans la chaîne (**138d**).

²⁴¹ B. A. Johns, C. R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 749-752.



Malheureusement, seul le composé **138b** a été testé biologiquement vis-à-vis de 7 glycosidases. Ce composé **138b** a présenté une activité inhibitrice pour deux glycosidases avec des IC_{50} de 20 μM pour l'amyloglycosidase et de 49 μM pour l' α -mannosidase. Aucun analogue monovalent n'est décrit dans la publication. A titre comparatif, les auteurs prennent en exemple des iminosucres en série DMJ substitués en C-1 par différents groupements sucres.²⁴² Le composé qui se rapproche le plus de **138b**, est substitué par un mannose et présente un lien β -(1,6) **139**. Ce composé possède un IC_{50} de 25 μM pour l'amyloglycosidase et ne présente pas d'activité vis-à-vis de l' α -mannosidase.



On n'observe donc pas d'effet de multivalence pour l'amyloglycosidase. Cependant on observe un effet non quantifiable de multivalence pour l' α -mannosidase. En effet **138b** est inhibiteur de cette glycosidase alors que **139** ne l'est pas. Ce résultat est conforté par le fait que la β -homomannojirimicine qui pourrait également être prise comme référence monovalente n'est pas non plus inhibitrice de plusieurs α -mannosidases (Jack bean, RE de foie de rat, lysosome de foie

²⁴² B. A. Johns, Y. T. Pan, A. D. Elbein, C. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4856-4865.

de rat).²⁴³ Cependant ces comparaisons sont à prendre avec beaucoup de précautions car on ne connaît pas l'influence de la chaîne alkyle du composé divalent **138b**. De plus, il aurait été intéressant de pouvoir comparer les inhibitions de **138b** avec une référence plus adéquate possédant une chaîne alkyle et non hydroxyméthyle beaucoup plus polaire.

2.3.2. Les travaux du groupe de Bols

Dans une étude sur l'inhibition de glycosidases et d'une phosphorylase par une librairie de 125 composés possédants une structure 1-azafagomine substituée par différents peptides, Bols décrit également la synthèse d'un tétra-iminosucre.²⁴⁴ Ce composé **139** est construit sur une structure tétra-amine synthétisée à partir d'un diamino-acide : l'ornithine. Une quadruple réaction de substitution nucléophile sur le dérivé de la structure tétra-amine par la 1-azafagomine leur permet d'obtenir le composé **139**.

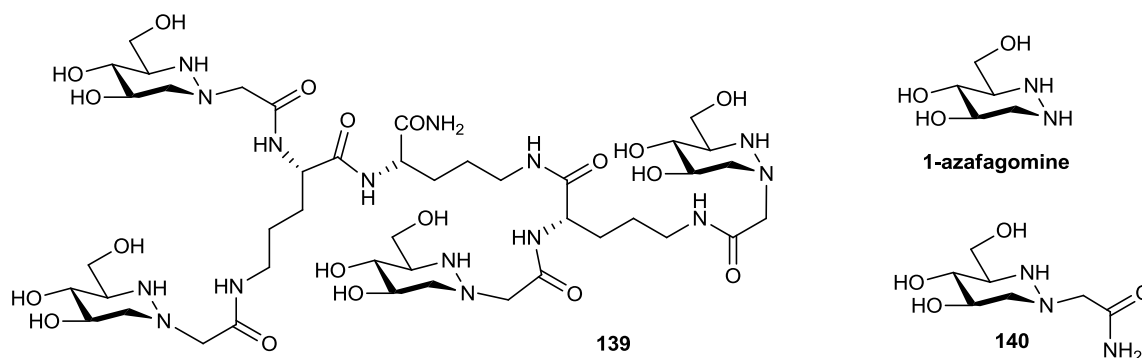


Figure 52. Système tétravalent en série 1-azafagomine ainsi que deux références monovalentes.

Le composé **139** a été testé vis à vis de la β -glucosidase (amande) et possède un K_i de 70 μM . Ceci en fait un moins bon inhibiteur que l'azafagomine qui possède un K_i de 0,65 μM .²⁴⁵

K_i (μM)	139 ²⁴⁴	1-azafagomine ²⁴⁵	140 ²⁴⁴
β -glucosidase (amande)	70	0,65	>1000

Tableau 9. Inhibition de la β -glucosidase

Toutefois, si on le compare à **140** qui a une structure plus proche du composé tétravalent, on observe un effet de multivalence non relevé par les auteurs, car **140** possède un $K_i > 1000 \mu\text{M}$ pour la β -glucosidase (Tableau 9). Cet effet n'est donc non quantifiable mais il est d'au moins un facteur 14. Les auteurs n'ont, par ailleurs, pas directement testé l'influence de la structure peptidique.

²⁴³ N. Asano, M. Nishida, A. Kato, H. Kizu, K. Matsui, Y. Shimada *et al.* *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2565-2571.

²⁴⁴ A. Lohse, K. B. Jensen, K. Lundgren, M. Bols, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965-1971.

²⁴⁵ M. Bols, R. G. Hazell, I. B. Thomsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 940-947.

2.3.3. Les travaux du groupe de Le Merrer

Le groupe de Le Merrer a décrit la synthèse de deux iminosucres divalents *N*-liés entre eux par un linker polyhydroxylé dérivé du D-mannitol, **141** et **142a** (Figure 53).²⁴⁶

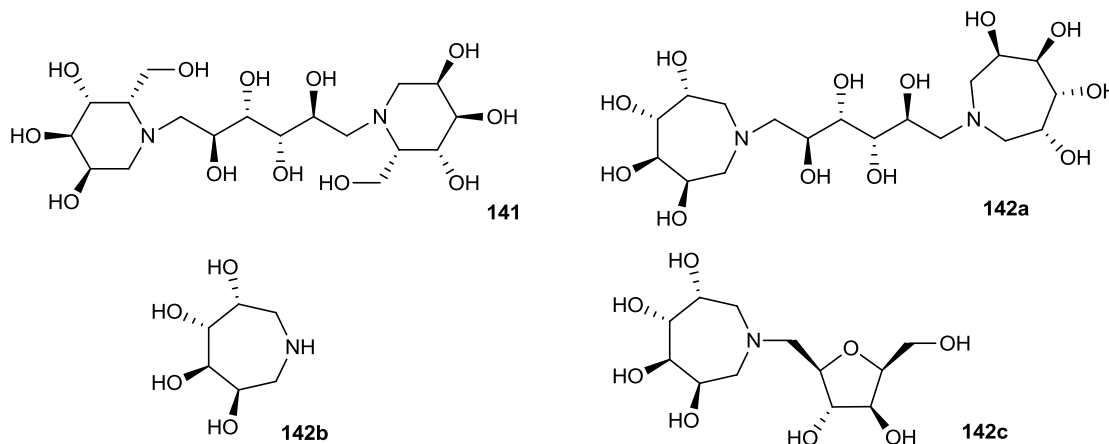


Figure 53. Iminosucres divalents et monovalent.²⁴⁶

L'inhibition de quatre glycosidases (α -D-glucosidase, β -D-glucosidase, α -D-mannosidase et α -L-fucosidase) par ces deux composés a été mesurée. Le composé **141** ne s'est révélé inhibiteur d'aucune de ces glycosidases tandis que le composé **142a** a montré un K_i de 15 μ M pour l' α -L-fucosidase, ce qui représente un petit gain d'inhibition par rapport à l'azépane monovalent non substitué sur l'azote **142b** dont le K_i était de 28 μ M.²⁴⁷

K_i (μ M)	141 ²⁴⁶	142a ²⁴⁶	142b ²⁴⁷	142c ²⁴⁶
α -D-glucosidase	n.i.	n.i.	70	n.i.
β -D-glucosidase	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -D-mannosidase	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α -L-fucosidase	n.i.	15	28	n.i.

Tableau 10. Constantes d'inhibition des composés

Au-delà de ce modeste gain, les auteurs soulignent le gain en sélectivité car ce composé divalent **142a** n'inhibe pas l' α -glucosidase contrairement à son analogue monovalent **142b** ($K_i = 70 \mu$ M). Le composé **142c** pourrait être également pris comme référence monovalente, le furanose serait alors l'analogue du linker. Dans ce cas on observerait un gain d'inhibition plus important car **142c** n'est pas inhibiteur des glycosidases testées ($K_i > \text{mM}$). Ce gain n'est pas quantifiable mais correspondrait à une augmentation d'au moins un facteur 66. Il est toutefois difficile de faire des comparaisons pertinentes et quantitatives du fait de la forte polyfonctionnalisation du linker qui peut être aussi un élément de reconnaissance et agir sur l'affinité avec les glycosidases testées.

²⁴⁶ I. McCort, M. Sanière, Y. Le Merrer, *Tetrahedron* **2003**, 59, 2693-2700.

²⁴⁷ Y. Le Merrer, L. Poitout, J.-C. Depezay, I. Dosbaa, S. Geoffroy, M.-J. Foglietti, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 519-533.

2.3.4. Les travaux des groupes d'Aerts et d'Overkleeft

En 2009, les groupes de Aerts et Overkleeft ont décrit la synthèse de quatre iminosucres divalents basés sur des charpentes de type adamantane en série *D-gluco*- et *L-ido*-DNJ.²⁴⁸ Ces synthèses ont été effectuées dans le but d'obtenir de meilleurs inhibiteurs que les analogues monovalents de plusieurs glycosidases et d'une glycosyltransférase, la glucosylcéramide synthase (GCS). Les auteurs se sont basés sur des résultats de leur laboratoire²⁴⁹ permettant d'attester l'importance de la structure adamantanyle qui pourrait permettre, par des interactions hydrophobes, de rapprocher les iminosucres des membranes cellulaires auxquelles sont attachées ces deux enzymes. La longueur optimale du linker a aussi été déterminée pour concevoir ces iminosucres divalents.²⁴⁹ Deux charpentes différentes ont été conçues avec une modulation au niveau de l'orientation des deux résidus iminosucres. L'adamantane joue, en plus de son rôle dans des interactions hydrophobes potentielles avec la membrane, le rôle de charpente rigide du système multivalent.

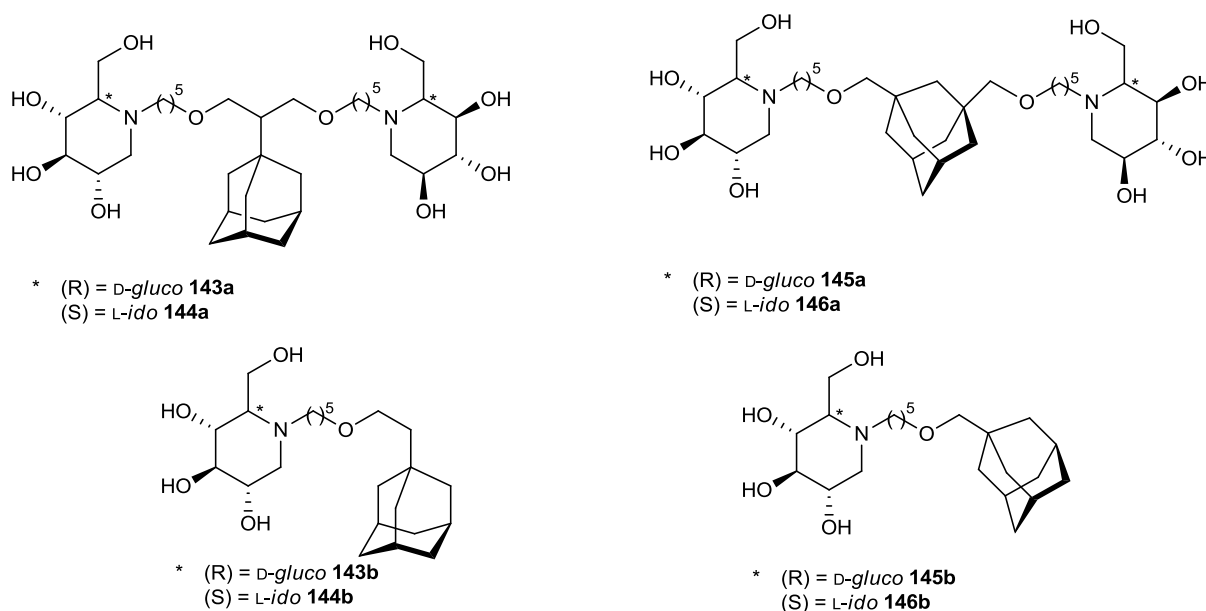


Figure 54. Composés divalents et leurs analogues monovalents.

Cependant les résultats de l'évaluation biologique de ces composés se sont avérés très décevants (Tableau 11). Les iminosucres divalents sont presque tous de moins bons inhibiteurs que leurs analogues monovalents vis-à-vis de la GCse et de la β -glucosidase 2 avec des diminutions dans les IC₅₀ de facteurs allant de 1,6 à 25. Seul le composé **146a** possède une inhibition deux fois inférieure à celle de **146b**. Les tests sur deux autres glycosidases non liées à une membrane (l' α -glucosidase lysosomale et la sucrase) montrent des inhibitions presque égales entre les dérivés divalents et monovalents. Un seul résultat d'augmentation d'affinité a été observé pour le composé en série *D-gluco* **143a** avec un gain d'un facteur 2 par rapport au dérivé monovalent **143b** sur l'inhibition de l' α -glucosidase lysosomale.

²⁴⁸ T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, K. M. Bongers, W. E. Donker-Koopman, A. Ghisaidoobe, G. A. van der Marel, A. Strijland, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 836-846.

²⁴⁹ T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, T. J. Boltje, W. E. Donker-Koopman, B. Kuijper, G. A. van der Marel, A. Strijland, C. P. Verhagen, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1258-1283.

IC ₅₀ (μM)	di	mono	di	mono	di	mono	di	mono
	143a	143b	144a	144b	145a	145b	146a	146b
GCase	0,38	0,19	5	2	2	0,2	6	0,34
β-glucosidase 2	0,008	0,005	0,150	0,006	0,01	0,001	0,013	0,03
α-glucosidase lisosomale	0,35	0,8	700	>100	0,5	0,4	>100	>100
sucrase	0,4	0,35	200	200	>100	0,5	>100	0,5

Tableau 11. IC₅₀ des dérivés mono et divalents.

Toutefois il est important de noter que les iminosucre divalents ont tous présenté une inhibition vis-à-vis des différentes enzymes et également lors de tests *in vivo* sur la GCS avec des inhibitions du même ordre de grandeur que *in vitro*. Ceci prouve ainsi que les membranes cellulaires sont perméables à ces composés qui sont plus polaires et plus encombrants que leurs analogues monovalents.

2.3.5. Travaux du groupe de Gouin et Kovensky

La première étude systématique de l'influence de la multivalence sur l'inhibition de glycosidases a été réalisée par le groupe de Gouin et Kovensky en 2009²⁵⁰ sur un panel neuf glycosidases commerciales. Les iminosucre bi et trivalents ont été construits sur des charpentes de type oligoéthylène glycol avec des longueurs de chaînes variées (Figure 55).

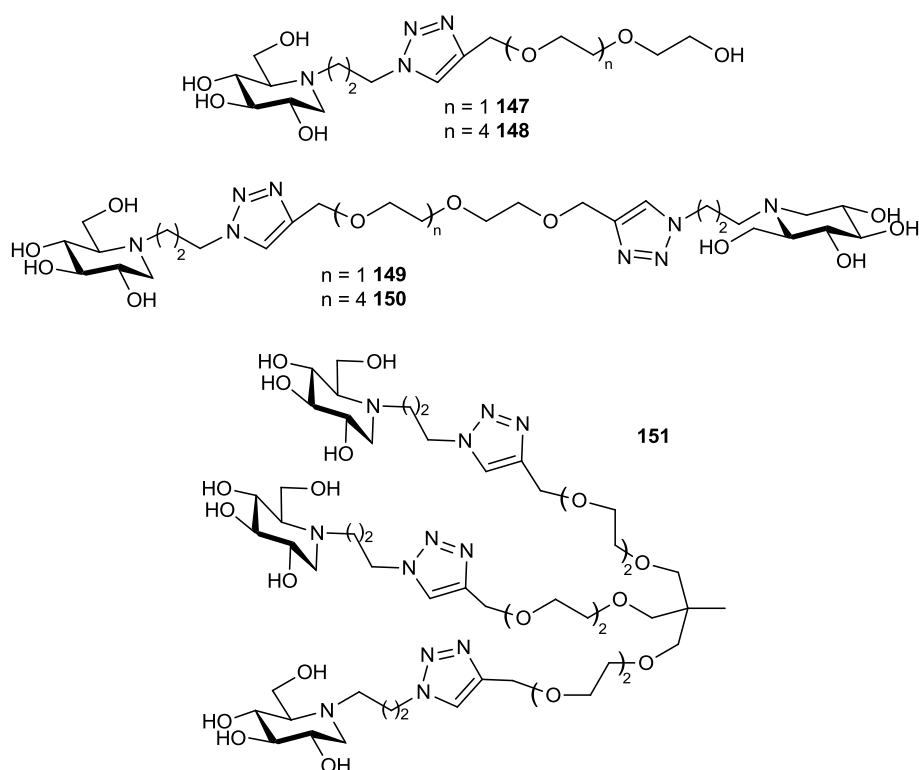


Figure 55. Iminosucre di- et trivalents basés sur des charpentes polyéthylène glycol et leurs analogues monovalents.

²⁵⁰ J. Diot, M. I. García-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 357-363.

Les ligands choisis ont été des dérivés *N*-alkylés de la 1-DNJ. Le groupe a synthétisé deux iminosucre divalents et un iminosucre trivalent

De manière générale, l'augmentation de la longueur du linker par l'ajout d'unités éthylène glycol (**147** et **148** ainsi que **149** et **150**) n'a pas d'effet significatif sur l'inhibition excepté pour une enzyme, l'isomaltase, où l'augmentation de la longueur de la chaîne permet d'augmenter l'inhibition d'un facteur 2. Le tableau suivant présente les valeurs des K_i pour les composés **147**, **149** et **151** vis-à-vis de sept glycosidases (Tableau 12).

Enzyme	147 mono	149 di	inhibition relative divalent ^a	151 tri	inhibition relative trivalent ^a
β -galactosidase (foie de bovin)	950	NI ^b	> 2,1	790	1,2
β -glucosidase (amande douce)	47	70	1,5	400	8,5
α -galactosidase (café vert)	120	215	1,8	225	1,9
Isomaltase	1050	NI ^b	>1,9	1440	1,3
α -mannosidase (Jack bean)	230	120	1,9	35	6,6
Amyloglucosidase (<i>aspergillus niger</i>)	28	17	1,6	11	2,5
Naringinase (<i>Penicillium Decumbes</i>)	80	60	1,3	75	1,1

^a inhibition relative par rapport au modèle monovalent **147**, gain et perte d'inhibition, ^b NI non inhibiteur à 2 mM.

Tableau 12. K_i (μ M) des composés mono-, di- et trivalents vis-à-vis de glycosidases commerciales.

Pour la β -glucosidase, l' α -galactosidase et l'isomaltase, la multivalence semble avoir un effet négatif sur l'inhibition. On observe des diminutions jusqu'à un facteur 8,5 pour le dérivé trivalent par rapport au monovalent pour l'inhibition de la β -glucosidase. Pour la β -galactosidase et la naringinase, les constantes d'inhibitions sont à peu près du même ordre de grandeur pour les trois produits. Pour l'amyloglucosidase on observe une augmentation d'un facteur 2,5 de l'inhibition pour le composé trivalent par rapport au monovalent. Le résultat le plus important est un gain d'inhibition pour l' α -mannosidase de Jack bean d'un facteur 2 pour le dérivé divalent **149** et 6,6 pour le dérivé trivalent **151** par rapport au monovalent **147**. C'est-à-dire que le gain d'inhibition est de 2 par unité DNJ pour le dérivé trivalent.

Ce résultat constitue le **premier exemple d'un effet multivalent quantifiable sur l'inhibition de glycosidases** qui, bien que modéré, est significatif. En effet pour un dérivé de valence 3 on observe un gain d'inhibition supérieur à un facteur 3 par rapport à l'analogue monovalent.¹⁶⁹

2.3.6. Travaux récents de synthèse d'iminosucre multivalents.

Très récemment et après la publication de nos travaux de synthèse d'iminosucre multivalents sur des charpentes élaborées de type fullerène et β -cyclodextrine,^{267,268} les premiers clusters d'iminosucre basés sur des charpentes de type calix[4]arène ont été décrits.^{251,252}

Marradi *et al.* ont en effet rapporté la synthèse de calix[4]arènes portant plusieurs unités dihydroxypyrrolidine liées par des liens amides.²⁵¹ La dihydroxypyrrolidine leur sert à la fois d'unité élémentaire iminosucre et d'élément constitutif du dendron. Ceci a permis aux auteurs de synthétiser un calixarène tétravalent ainsi qu'un calixarène octavalent. Des études intéressantes d'inclusion d'ions métalliques alcalins dans la cavité polaire du calixarène tétravalent ont montré que leur introduction permettait de rigidifier la structure globale et d'organiser les iminosucres.

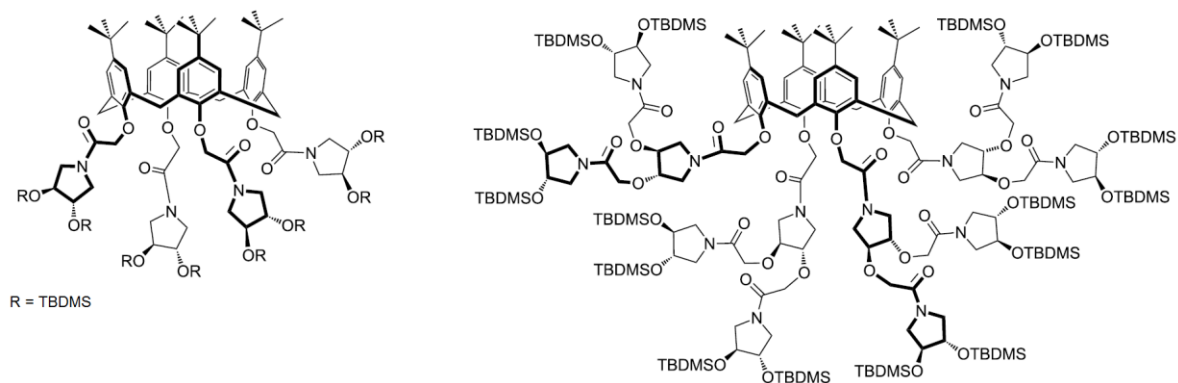


Figure 56. Calixarène tétra- et octavalents portant des motifs dihydroxypyrrolidines.

Cardona *et al.* ont également développé une méthodologie pour la synthèse d'iminosucres multivalents sur des charpentes calix[4]arène.²⁵² Les produits ont été obtenus par réaction de cycloaddition 1,3 dipolaires de nitrones cycliques énantiopures sur diverses fonctions allyles de calix[4]arènes polyfonctionnalisés.

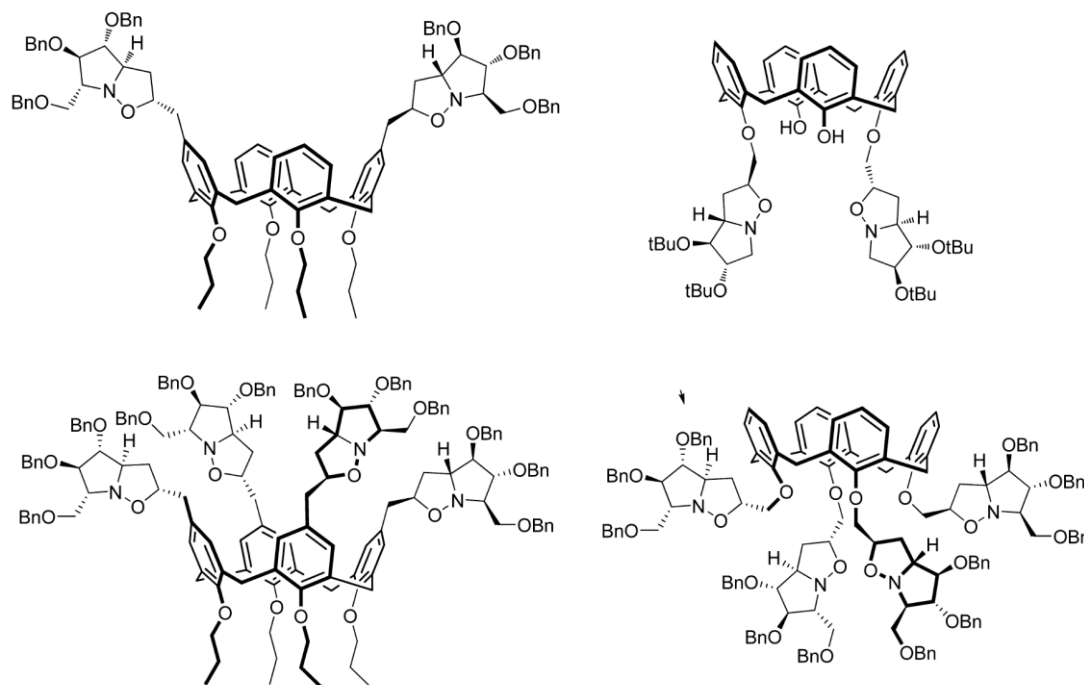


Figure 57. Calixarène di- et tétravalents formés par réactions de cycloadditions 1,3 dipolaires de nitrones énantiopures sur des charpentes calixarènes fonctionnalisées.

²⁵¹ M. Marradi, S. Cicchi, F. Sansone, A. Casnati, A. Goti, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 951-957.

²⁵² F. Cardona, G. Isoldi, F. Sansone, A. Casnati, A. Goti, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 6980-6988.

La réaction de cycloaddition est hautement régio- et stéréosélective et permet d'obtenir 4 produits multivalents (di- à tétravalents) avec des motifs isoxazolidines polyhydroxylées. Par traitement avec du zinc dans un mélange acide acétique/eau, les auteurs sont parvenus à obtenir les amino-alcools divalents correspondants. Cependant, aucune étude biologique ou physicochimique n'a encore été publiée sur ces produits.

2.4. Conception des inhibiteurs multivalents pour l'inhibition des glycosidases

2.4.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les iminosucres multivalents sont peu nombreux mais les premiers résultats obtenus par Gouin et Kovensky montrent qu'un effet multivalent est possible sur l'inhibition de glycosidases et que l'utilisation d'inhibiteurs multivalents peut permettre de gagner en sélectivité.

Au début de ce travail, aucun ligand multivalent à base d'iminosucre avec une valence supérieure à 4 n'avait été décrit. Notre projet a donc été de voir dans un premier temps, si, en augmentant grandement la valence, nous pouvions obtenir des résultats plus significatifs pour l'inhibition de glycosidases. Dans un second temps, et après les premiers résultats biologiques encourageants, nous avons diversifié nos structures afin d'optimiser et de comprendre l'effet multivalent observé par une étude de type relation structure-activité.

2.4.2. Les différents paramètres

Pour la conception de nos systèmes multivalents, plusieurs paramètres cruciaux sont à prendre en compte. Il s'agit de la **charpente** ou **plateforme** permettant de construire le système multivalent, de la **valence** du système, du **ligand**, du « **linker** » permettant d'espacer le ligand de la charpente (ou plateforme) mais également des **réactions chimiques** utilisées qui doivent être hautement efficace.

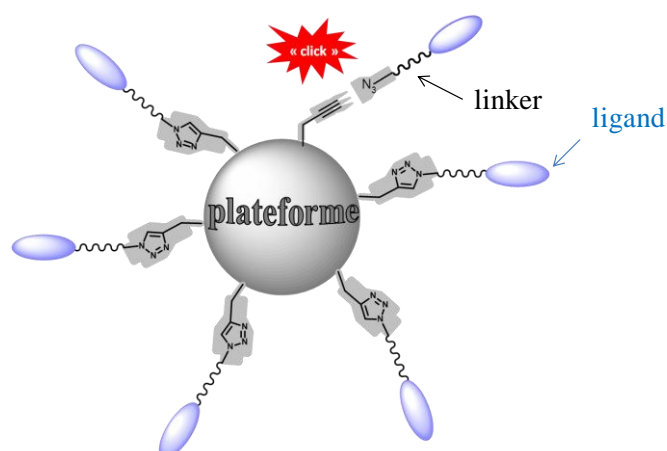


Figure 58. Représentation schématique du système multivalent.

Basés sur les exemples de glycoconjugués de la littérature, nous nous sommes intéressés à deux charpentes différentes nous permettant d'accéder à plusieurs produits de valence et de géométrie différentes : le fullerène C_{60} et la β -cyclodextrine. Ces deux charpentes permettent d'atteindre une valence de 12 pour les dérivés hexaadduits du C_{60} (Schéma 68) et pouvant aller jusqu'à 21 pour la β -cyclodextrine. Ces valences peuvent être encore démultipliées par l'utilisation de dendrons. Comme nous l'avons vu précédemment, la β -cyclodextrine représente une charpente de choix pour la synthèse de glycoconjugués, notamment en raison de sa biocompatibilité (§ 2.2.4). Plusieurs systèmes ont été décrits pour la multifonctionnalisation de la cyclodextrine, en particulier des systèmes perpropargylés qui permettent d'accéder à des produits multivalents présentant des topologies diverses (iminosucres sur la face supérieure, inférieure ou sur les deux faces). Concernant le fullerène C_{60} , de nombreuses avancées ont été faites pour sa multifonctionnalisation (§ 2.2.5). Les systèmes hexa-adduits nous ont parus très intéressants en raison de leur géométrie mais également de leur valence. Les réactions de chimie click de type CuAAC de par leur efficacité semblaient prometteuses pour la formation de nos systèmes à base d'iminosucres.

C'est donc la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen azoture-alcyne¹³⁹ que nous avons choisie pour la formation de nos systèmes multivalents. Cette réaction, dont la version catalysée au cuivre I (CuAAC) développée par Sharpless et Meldal permet d'obtenir une totale régiosélectivité, fait partie des réactions dites de « chimie click ». Ce concept,^{140c} introduit par Sharpless en 2001 définit des réactions d'une grande efficacité qui répondent à un certain nombre de critères, dont, entre autres, de hauts rendements, une totale stéréospécificité, un grand champ d'application et une facilité de mise en œuvre dans la disponibilité des réactifs et la purification des produits.

La réaction de CuAAC nous est donc apparue comme la plus adaptée pour la synthèse de nos produits multivalents vue la relative complexité de nos systèmes et le nombre de réactions mises en jeu simultanément. Son efficacité semble parfaitement adaptée aux systèmes multivalents au vu des résultats de la littérature dans le domaine des glycofullerènes²¹⁴ et glycocyclodextrines.²⁵³ Ceci impliquerait, pratiquement, d'introduire des fonctions azotures et alcynes sur nos différents substrats. Nous avons choisi de travailler avec les charpentes possédant les fonctions alcynes déjà décrites dans la littérature et les ligands possédant les fonctions azotures.

Concernant le choix des ligands, nous avons tout d'abord opté pour des iminosucres classiques, dérivés de la 1-DNJ. En effet, les analogues *N*-alkylés de la DNJ sont connus pour être peu sélectifs et inhibent de nombreuses glycosidases. Ces composés seraient donc des modèles de choix pour étudier l'influence de la multivalence non seulement sur le pouvoir inhibiteur, mais aussi sur la sélectivité d'inhibition vis-à-vis des glycosidases. En outre, différentes longueurs de la chaîne *N*-alkyl nous permettraient de moduler le « linker » et donc l'espacement avec la charpente. Comme nous l'avons vu pour les glycocyclodextrines et les glycofullerènes, ce paramètre est crucial pour la flexibilité et la solubilité des produits et peut avoir une influence sur les résultats biologiques.

²⁵³ Pour une revue récente sur les cyclodextrines et la CuAAC : P.-A. Faugeras, B. Boëns, P.-H. Elchinger, F. Brouillette, D. Montplaisir, R. Zerrouki, R. Lucas, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4087-4105.

Par la suite, comme nous le verrons, nous nous sommes également intéressés à d'autres ligands plus spécifiques de certaines glycosidases d'intérêt thérapeutique : un ligand en série désoxymannojirimicine (DMJ, cible : mucoviscidose) ainsi qu'un ligand en série α -1-C-alkyl-iminoxylitol (cible : maladie de Gaucher).

2.5. Synthèse des systèmes multivalents

2.5.1. Synthèse des charpentes

i) Fullerène

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. Nierengarten à Strasbourg, nous avons pu greffer nos iminosucres sur des charpentes fullerènes multivalentes. Cette équipe a en effet développé une méthode d'obtention d'un fullerène hexa-adduit C_{60} portant douze fonctions alcynes terminales (Schéma 72).²³⁴

Cette méthode repose sur la réaction de fonctionnalisation du fullerène développée par Bingel²²⁸ par addition d'un halomalonate sur les liaisons [6,6] du C_{60} . Cette réaction a été améliorée par Hirsch²²⁹ et Diederich²⁵⁴ avec la formation *in situ* de l'halomalonate par réaction du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) avec un malonate et du CBr_4 . Les conditions mises au point permettent notamment d'accéder à un produit hexa-adduit du C_{60} de symétrie octaédrique²⁵⁵ qui est le produit thermodynamique de la réaction (Figure 59).

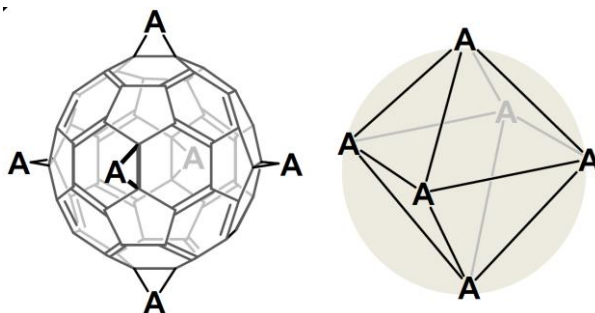


Figure 59. Modèle de l'hexa-adduit de C_{60} .

L'équipe de Sun a montré par la suite qu'utiliser un large excès de CBr_4 (100 éq.), de DBU (20 éq.) ainsi que de malonate (10 éq.) permettait d'obtenir l'hexa-adduit avec de bons rendements et une excellente régiosélectivité qui n'est pas observée en conditions stœchiométriques.²⁵⁶ Le produit hexa-adduit se formerait grâce à un « effet template » dû aux multiples additions de l'anion CBr_3^- sur les liaisons [6,6] du fullerène (Schéma 71).²⁵⁷ Toutefois les rendements de ces réactions de formation des hexa-adduits dépendent de la complexité des malonates utilisés.

²⁵⁴ J.-F. Nierengarten, V. Gramlich, F. Cardullo, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2101-2103.

²⁵⁵ a) A. Hirsch, I. Lamparth, T. Grösser, H. R. Karfunkel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9385-9386; b) A. Hirsch, O. Vostrowsky, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 829-848.

²⁵⁶ H. Li, A. Kitaygorodskiy, R. A. Carino, Y.-P. Sun, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 859-861.

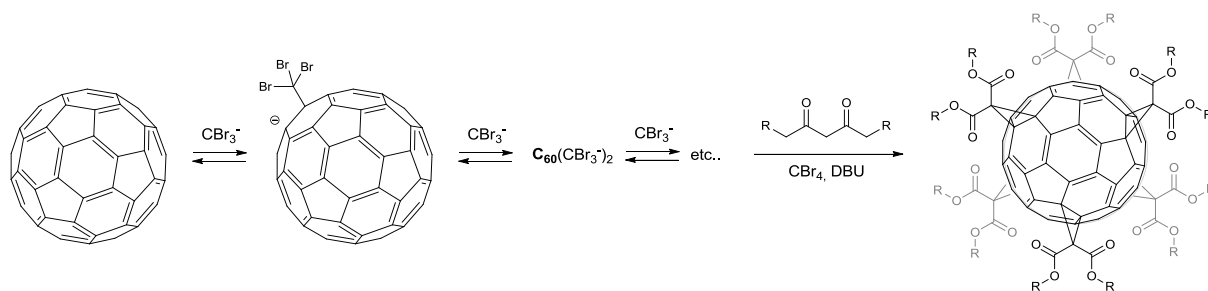


Schéma 71. Mécanisme proposé par J.-F. Nierengarten *et al.* pour la formation de l'hexa-adduit.²⁵⁷

C'est pourquoi l'équipe de Nierengarten a développé la synthèse d'un hexa-adduit portant 12 fonctions alcynes avec de bons rendements permettant ainsi une post-fonctionnalisation du produit très facile par réaction de chimie click azoture-alcyne avec déprotection *in situ* des fonctions alcynes silylées en présence de TBAF.²³⁴

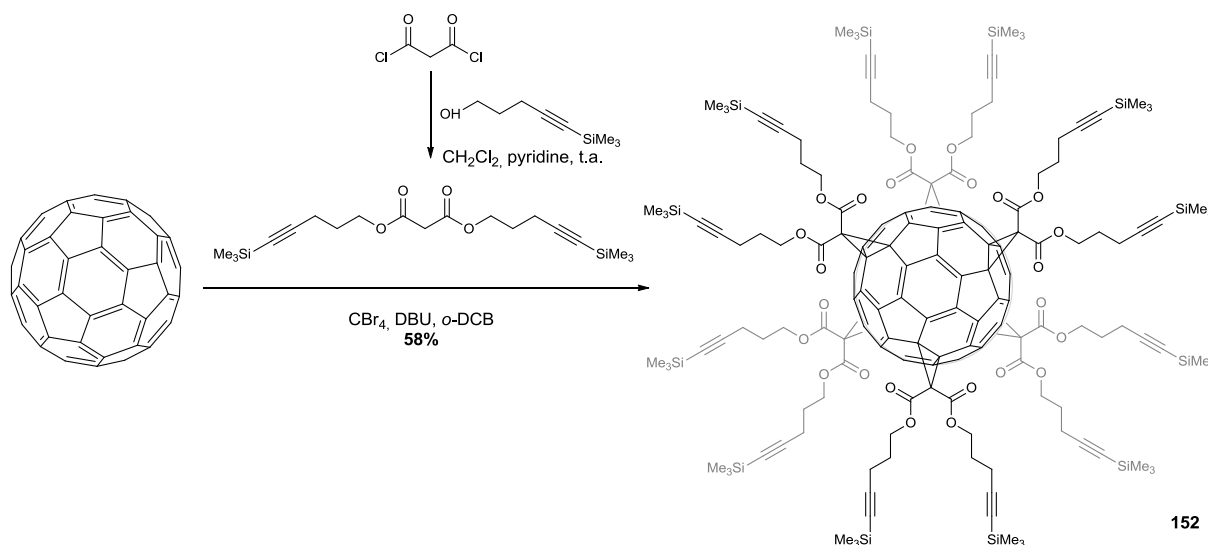


Schéma 72. Formation de l'hexa-adduit du C₆₀ portant douze fonctions alcynes silylées.

Le produit **152** est donc la charpente permettant la formation d'iminosucres dodécavalents possédant une structure tridimensionnelle sphérique.

ii) Cyclodextrines

La β -cyclodextrine nous est également apparue comme une charpente très intéressante. En effet, la diversité des fonctionnalisations possibles²⁵⁸ mais également ses propriétés non immunogéniques en font une charpente idéale pour la formation de composés d'intérêts thérapeutiques.

²⁵⁷ J. Iehl Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, **2010**.

²⁵⁸ a) A. R. Kahn, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977-1996; b) O. Bistri, P. Sinaÿ, J. Jiménez Barbero, M. Sollogoub, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9757-9774.

Nous nous sommes donc proposé de synthétiser 4 cyclodextrines différentes (Figure 60) portant des fonctions alcynes terminales en vue d'une post-fonctionnalisation avec nos ligands iminosucres : une première charpente heptavalente **153** fonctionnalisée en positions 6 de la β -cyclodextrine par des propargyles, deux charpentes tétradécavalentes **154** et **155**, fonctionnalisées sur les positions 2 et 6 ou 2 et 3 respectivement ainsi qu'une charpente 21-valente perfonctionnalisée sur les positions 2, 3 et 6, **156**.

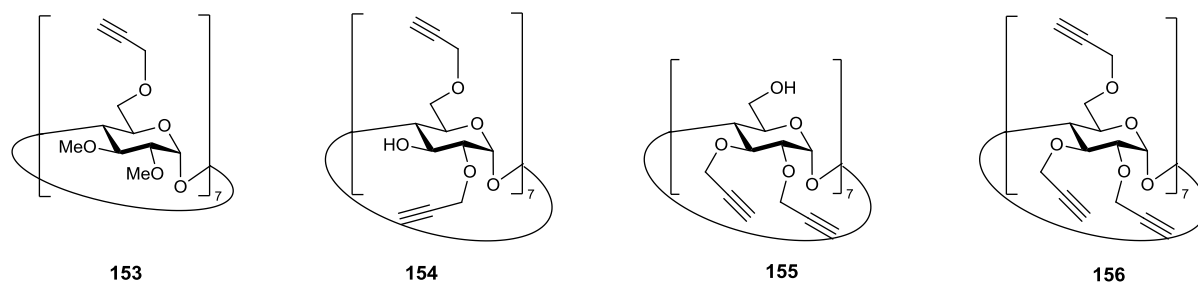


Figure 60. Les différentes structures β -cyclodextrines envisagées pour la construction des systèmes multivalents.

Ces diverses charpentes nous permettront d'étudier plus particulièrement l'influence de la valence ainsi que l'impact de la présentation et de la densité des ligands iminosucres sur l'inhibition.

La synthèse de la **cyclodextrine heptavalente** se fait en quatre étapes à partir de la β CD commerciale selon des procédures décrites.^{200,259} La stratégie consiste à isoler les alcools en positions 6 par des protections et déprotections successives. La première étape est la protection des sept alcools primaires en positions 6 sous forme d'éthers silylés. Le produit **157** est obtenu en mélange avec un produit octasilylé qui peut être séparé par chromatographie sur gel de silice. Les hydroxyles secondaires sont ensuite alkylés en présence d'hydruide de sodium et d'iodure de méthyle dans le THF. **158** est ainsi synthétisé avec un bon rendement isolé de 73%. Les alcools primaires silylés sont ensuite déprotégés en présence de fluorure de tétrabutylammonium pour donner **159** (Schéma 73). Pour installer les sept propargyles, Calvo-Flores *et al.* proposent comme conditions basiques d'utiliser une solution à 50 % de soude et du $n\text{Bu}_4\text{NBr}$.²⁰⁰

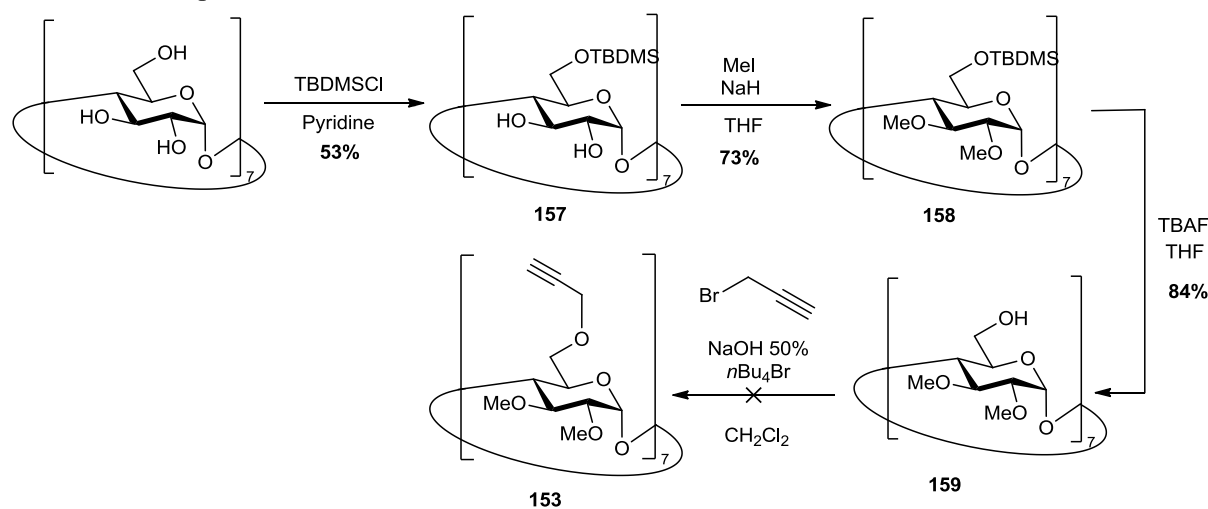


Schéma 73 Isolement et tentative de propargylation des positions 6 de la cyclodextrine.

²⁵⁹ K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 203-221.

Cependant dans ces conditions, la réaction n'est pas complète et un mélange de produits pas complètement propargylés est obtenu. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé des conditions décrites pour la synthèse de la cyclodextrine **154** par l'équipe de Vargas-Barenguel (Schéma 74).²⁰⁷ En présence des oxydes et hydroxydes de baryum et d'un gros excès de bromure de propargyle (58 éq.) dans un mélange DMF/DMSO nous avons pu obtenir le produit désiré **153** avec un très bon rendement de 90%.

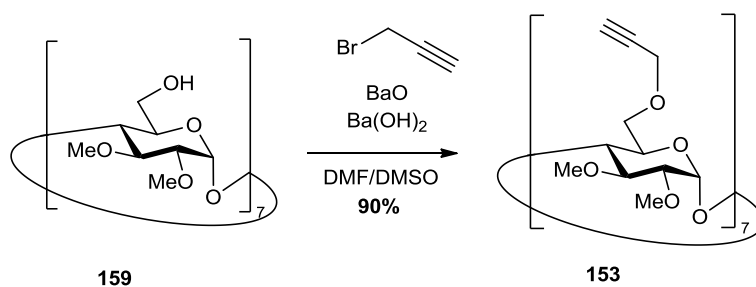


Schéma 74. Installation du propargyle sur l'alcool primaire de la β CD.

En ce qui concerne les **cyclodextrines tétradécavalentes** nous avons dans un premier temps synthétisé la β CD propargylée sur les positions 2 et 6, accessible en une étape à partir de la β CD selon le protocole décrit par l'équipe de Vargas-Berenguel.²⁰⁷

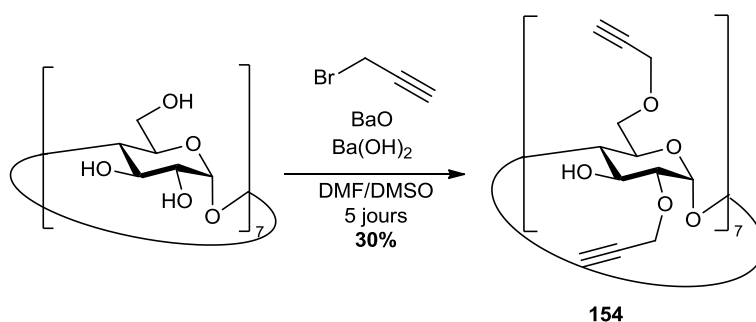


Schéma 75. Formation de la charpente tétradécavalente position 2 et 6 de la β CD.

Dans cette publication, les auteurs obtiennent le produit **154** avec 37% de rendement sans donner d'explication concernant la régiosélectivité de la réaction. Nous avons en fait obtenu le produit attendu en mélange avec les produits portant 15, 16, 17, 18, 19, 20 et 21 propargyles. Plusieurs purifications très délicates permettent finalement d'isoler le produit portant les 14 propargyles **154** avec un rendement de 30%.

La synthèse de la deuxième cyclodextrine tétradécavalente propargylée sur la face secondaire de la β CD a été décrite en 2011 par l'équipe de Ling.²⁶⁰ Les auteurs préconisent l'utilisation d'hydruure de sodium sur le produit **157** pour la déprotonation des hydroxyles secondaires puis l'ajout du bromure de propargyle. Toutefois, dans les conditions décrites nous avons observé la formation d'un mélange presque solide, noir et aucun produit propargylé n'a pu être isolé. Nous avons postulé la formation de produits secondaires de dégradation ainsi qu'éventuellement des polymérisations dues au bromure de propargyle.

²⁶⁰ S. Ward, C.-C. Ling, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4853-4861.

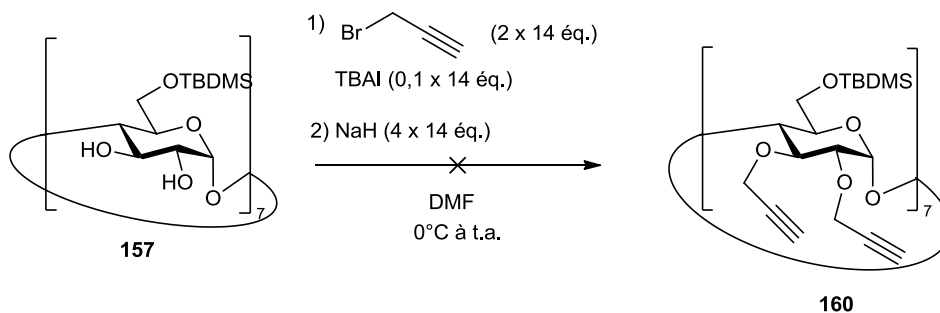
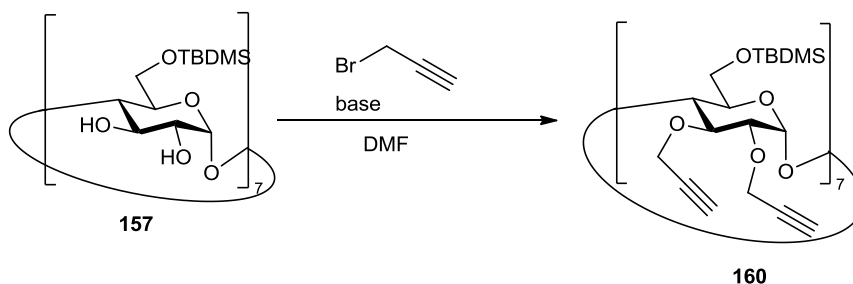


Schéma 76. Tentative de propargylation des positions 2 et 3.

Nous avons donc, par la suite, effectué différents essais (Tableau 13) en changeant les conditions réactionnelles. Dans tous les cas nous avons obtenu un milieu réactionnel noirâtre très difficile à extraire. Les analyses par chromatographie sur couche mince nous ont montré la formation de plusieurs produits. Les hydroxyles en position 3 semblent en effet difficilement accessibles et on observe dans certains cas la formation de mélanges de produits portant de 7 à 14 propargyles que nous n'avons pu à ce jour séparer.



Entrée	Réactifs (éq.) Ordre d'addition ^a	Dilution (mmol/mL)	Echelle	Rdt 160
1	1) Bromure de propargyle (2 x 14) TBAI 0,1 x 14) 2) NaH (4 x 14)	0,1	790 mg	-
2 ^{b,c}	1) NaH (3 x 14) 2) Bromure de propargyle (3 x 14)	5.10 ⁻³	160 mg	4%
3 ^{b,c}	1) NaH (3 x 14) 2) Bromure de propargyle (3 x 14)	5.10 ⁻³	200mg	-
4 ^{b,c,d}	1) NaH (1,2 x 14 + 2 x 14) 2) Bromure de propargyle (1 x 14 + 2 x 14) TBAI 0,1 x 14)	5.10 ⁻³	194mg	-
5 ^b	1) Bromure de propargyle (2 x 14) TBAI 0,1 x 14) 2) NaH (4 x 14)	5.10 ⁻³	146 mg	-
6 ^b	1) Bromure de propargyle (2,5 x 14) TBAI (0,1 x 14) 2) NaH (4 x 14)	3.10 ⁻²	212mg	18%
7 ^b	Idem 6	3.10 ⁻²	400mg	14%
8 ^b	Idem 6	3.10 ⁻²	1g	3%
9 ^b	Idem 6	3.10 ⁻²	359 mg	21%

^a l'addition du NaH se fait à 0°C, agitation pendant 24h à t.a.; ^b la réaction est effectuée en absence de lumière; ^c l'ordre d'addition est inversé; ^dLe produit de départ est canulé sur le NaH préalablement lavé à l'hexane.

Tableau 13. Conditions de perpropargylation de la βCD en positions 2 et 3.

Pour éviter les réactions parasites dues au bromure de propargyle nous avons pris la précaution d'effectuer la réaction en absence de lumière.

L'inversion de l'ordre d'addition des réactifs (entrées 2, 3 et 4 : addition préalable de l'hydrure de sodium à 0°C puis ajout du bromure de propargyle) n'a pas permis d'obtenir de bons résultats. En effet, le produit attendu **160** a été obtenu seulement à 4 % de rendement (entrée 2) mais cette réaction n'a pas pu être reproduite. L'augmentation de la dilution (entrée 5), indispensable pour pouvoir traiter la réaction n'aide pas non plus à la formation du produit. Enfin, l'échelle sur laquelle est effectuée la réaction semble aussi jouer un rôle (entrées 7, 8 et 9) et le rendement le meilleur est obtenu pour 350 mg de produit de départ.

Un essai avec les oxydes de baryum a été effectué. Après 3 jours de réaction le produit propargylé en position 2, **161**,²⁶¹ est récupéré majoritairement avec un rendement de 84% (Schéma 77).

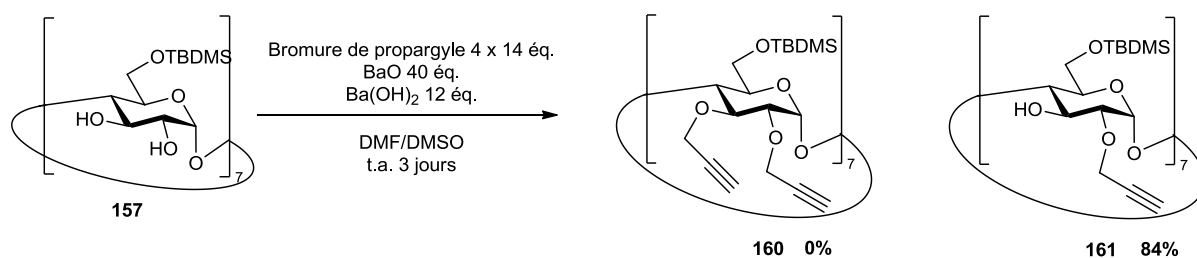


Schéma 77. Essai de propargylation en présence d'oxydes de baryum

Nous avons réalisé aussi un essai en présence de soude mais aucune réaction ne se produit et on récupère le produit de départ intégralement.

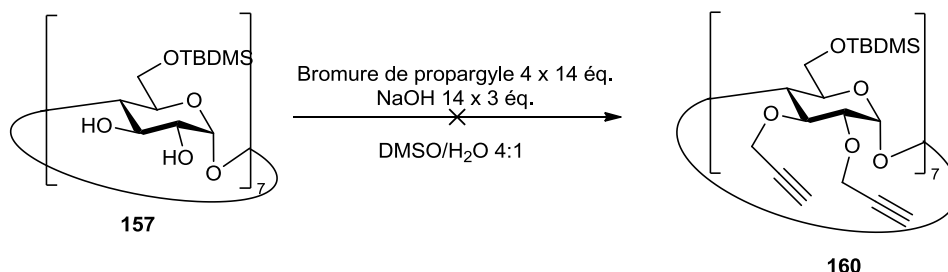


Schéma 78. Essai de propargylation avec de la soude comme base.

Nous avons également essayé de recommencer la réaction sur le produit heptapropargylé **161** isolé et pur en présence d'oxydes de baryum et de bromure de propargyle mais aucune conversion n'est observée. Un essai similaire sur un mélange de produits propargylés entre 7 et 14 fois avec de l'hydrure de sodium et du bromure de propargyle a été réalisé mais là aussi sans succès.

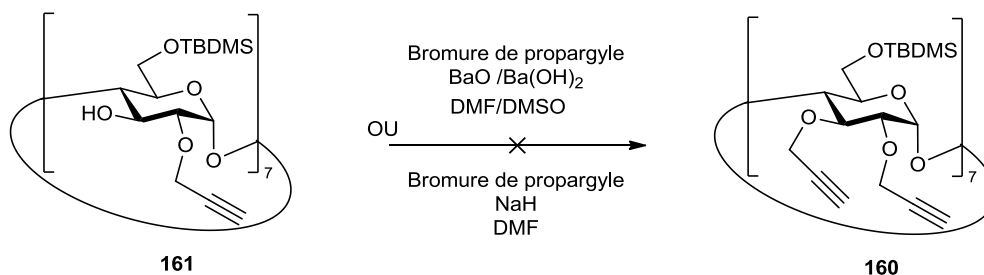


Schéma 79. Essais de propargylation des alcools en C-3.

²⁶¹ A. M. O'Mahony, J. Ogier, S. Desgranges, J. F. Cryan, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4954-4960.

Finalement les différents essais n'ont pas permis d'obtenir un rendement équivalent à celui obtenu dans la littérature (60%). Les conditions aux entrées 7 et 9 du tableau nous permettent quand même d'obtenir, après un traitement laborieux et une purification par chromatographie sur gel de silice, le produit attendu avec un rendement compris entre 14 et 21 % suffisant pour pouvoir poursuivre les synthèses.

Les déprotections des alcools en positions 6 se font très facilement en présence de fluorure de tétrabutylammonium et on obtient la charpente désirée tetradécavalente **155** avec un rendement de 93% pour cette étape de déprotection (Schéma 80).

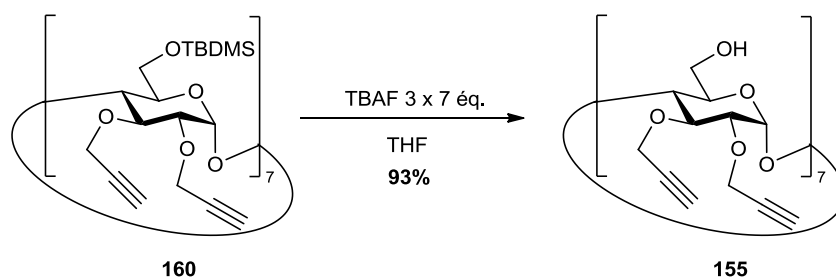


Schéma 80. Déprotection des alcools en positions 6.

En ce qui concerne **le produit perpropargylé**, l'équipe de Vargas-Berenguel décrit sa synthèse en une étape à partir de la β CD en présence d'hydrure de sodium et de bromure de propargyle dans le DMF (Schéma 76).²⁰⁷ Cependant, en reproduisant les conditions décrites nous n'avons pu isoler aucun produit propargylé. Nous avons également réalisé un essai sur le composé **154** en présence de NaH, de bromure de propargyle et d'iodure de tétrabutylammonium. Le produit de départ est cannulé à 0°C sur une solution de NaH lavé préalablement à l'hexane puis le TBAI et le bromure de propargyle sont ajoutés. Mais l'avancement de la réaction n'est pas complet après 48h d'agitation et on obtient seulement un mélange de produits.

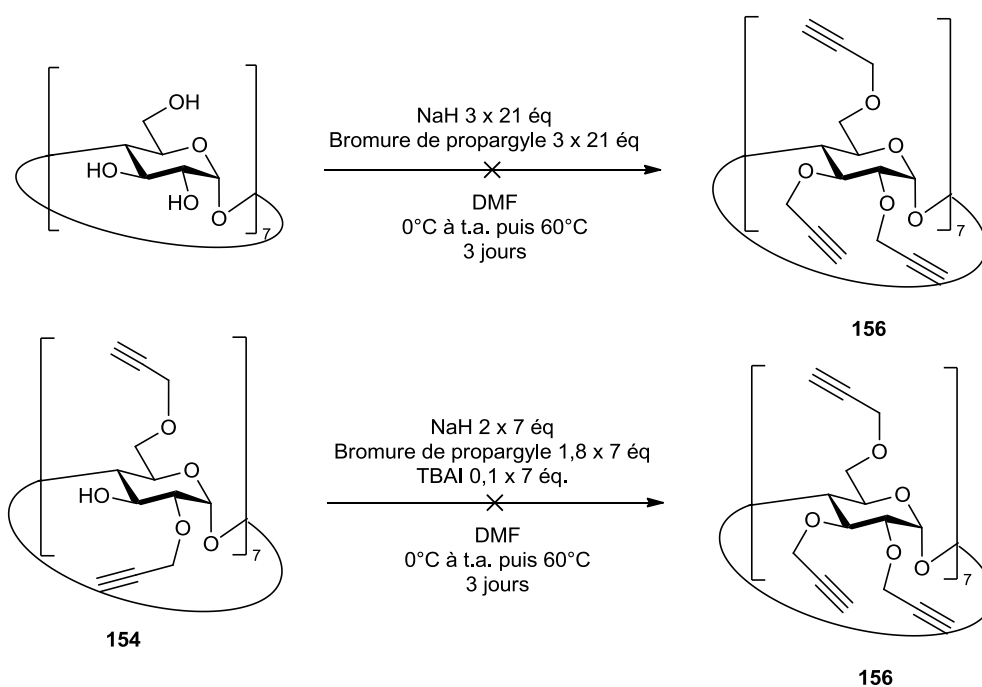


Schéma 81. Essais de perpropargylation de la β CD sur les positions 2, 3 et 6.

Au final, malgré les difficultés inhérentes à la synthèse de cyclodextrines polyfonctionnalisées, nous avons pu synthétiser trois charpentes permettant d'explorer à la fois l'influence de la valence (7 ou 14) et de la position des iminosucres sur l'inhibition (7 en haut, 7 en haut et 7 en bas, 14 en bas).

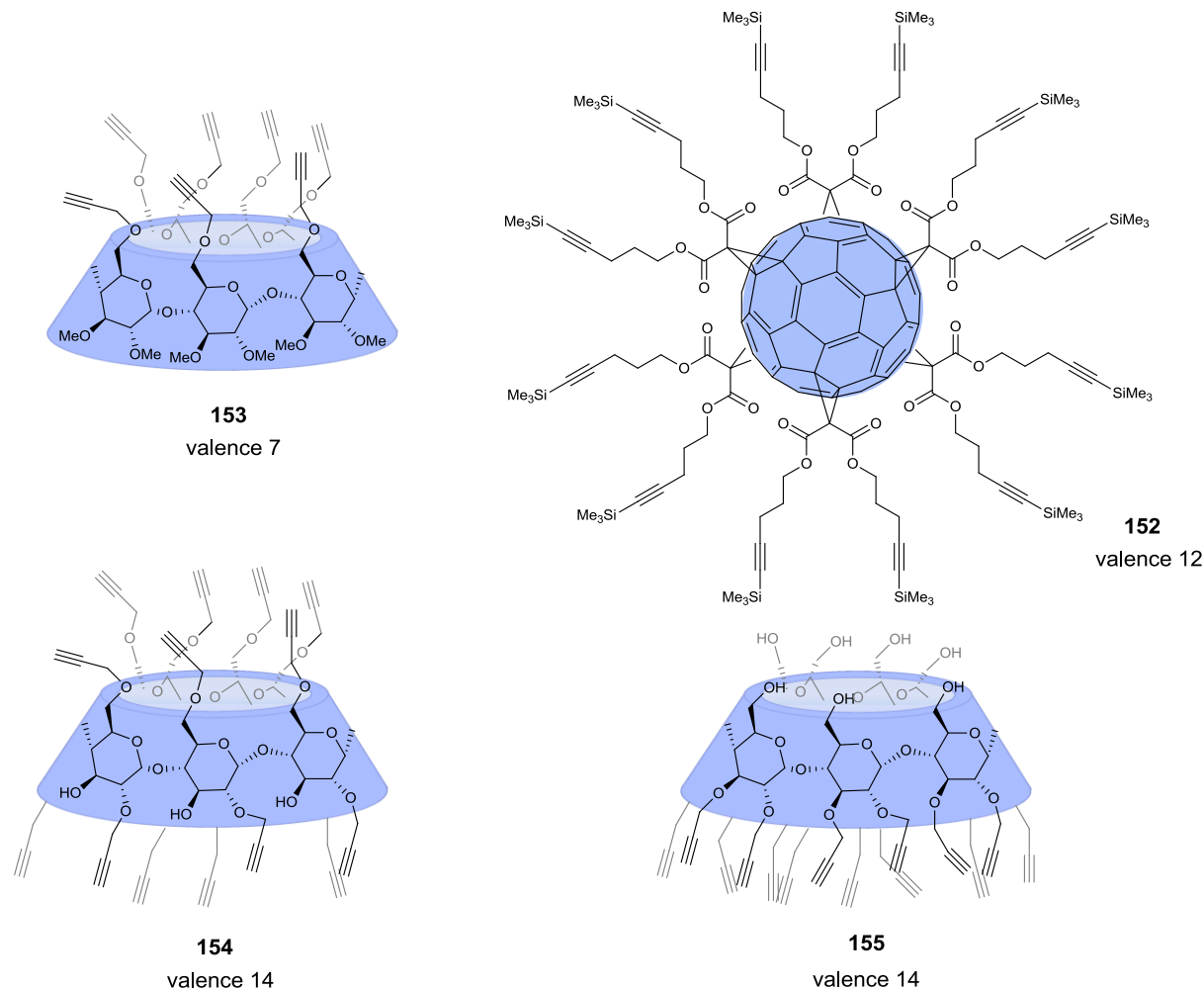


Figure 61. Charpentes polypropargylées pour la formation des systèmes multivalents.

En plus des 3 systèmes basés sur un cœur cyclodextrine, l'influence de la nature de la charpente sera étudiée par comparaison avec des iminosucres dodécavalents basés sur un noyau fullerène.

2.5.2. Synthèse des systèmes multivalents

Dans ce paragraphe, nous décrivons la synthèse des systèmes multivalents en les classant en fonction du ligand. Dans chaque partie on montrera d'abord la synthèse du ligand portant la fonction azoture ainsi que la synthèse de la référence monovalente puis la synthèse des systèmes multivalents.

i) Série DNJ

Synthèse des ligands

Les premiers ligands que nous avons sélectionnés sont des dérivés *N*-alkylés de la 1-DNJ. Cette famille d'iminosucres qui a fait l'objet de nombreuses études biologiques,^{1,14} constitue un excellent ligand modèle pour notre étude de la multivalence sur l'inhibition de glycosidase. En effet, ces dérivés sont peu sélectifs et inhibent avec des constantes d'inhibitions moyennes à bonnes un grand nombre de glycosidases. Les résultats que nous attendrons sont à deux niveaux, des gains d'affinité et donc d'inhibition, mais également des gains en sélectivité par des modulations d'inhibition en fonction des glycosidases.

Nous nous sommes basés sur deux longueurs de chaîne alkyle pour la synthèse de nos ligands. Cette chaîne représentera l'espaceur, le « linker » entre la charpente et le ligand, permettant une modulation dans la flexibilité du système. Nous avons choisi une chaîne à 6 carbones ainsi qu'une chaîne à 9 carbones. Il est à noter que dans notre cas une partie du linker peut être reconnue par le site actif de glycosidases comme par exemple, celles qui possèdent une poche hydrophobe. A l'extrémité de la chaîne alkyle, une fonction azoture est indispensable pour la formation de nos systèmes multivalents par CuAAC.

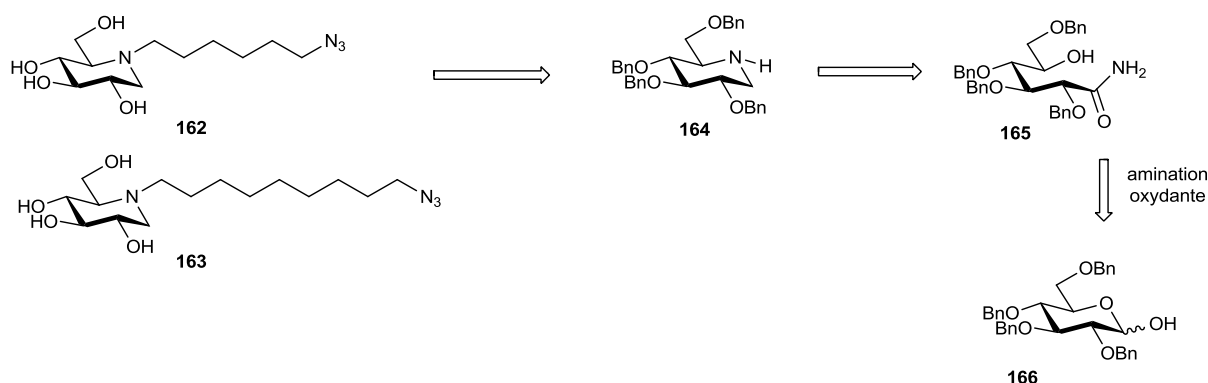


Schéma 82. Rétrosynthèse des ligands en série *N*-alkyl-DNJ.

La synthèse (Schéma 82) des ligands repose sur une optimisation d'une stratégie développée indépendamment par Overkleeft²⁶² et Vasella.²⁶³ Cette optimisation réside en une étape d'amination oxydante du tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose **166** permettant l'introduction de la fonction amine et l'oxydation de la position 1 en une étape. Le composé **165** subirait ensuite plusieurs transformations avant d'être alkylé pour donner les deux composés voulus **162** et **163**.

La synthèse des ligands se fait à partir du 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose **166** commercial. Ce produit est cependant onéreux (5 g/133 € chez Alfa-Aesar). Il peut être préparé en 3 étapes (Schéma 83) à partir du glucose sur des échelles de plusieurs grammes par une synthèse similaire à celle employée pour le 2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose (§1.1.7.). Le produit est obtenu avec un rendement sur les 3 étapes de 42%.

²⁶² H. S. Overkleeft, J. van Wiltenburg, U. K. Pandit, *Tetrahedron* **1994**, 50, 4215-4224.

²⁶³ R. Hoos, A. B. Naughton, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1802-1807.

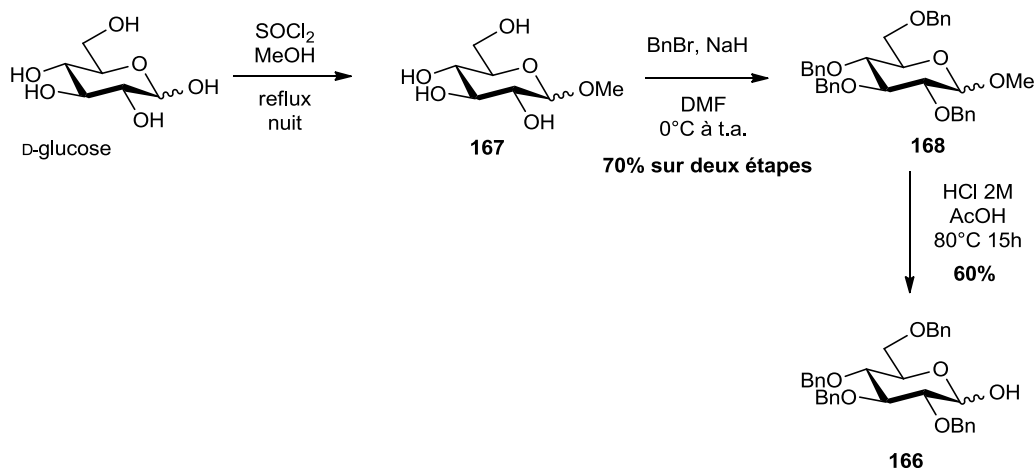


Schéma 83. Synthèse du 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose

La synthèse se poursuit avec l'étape clé d'amination oxydante en présence d'iode et d'ammoniaque aqueux.²⁶⁴ La δ -hydroxyamide **165** est obtenue avec un rendement de 78% (Schéma 84).

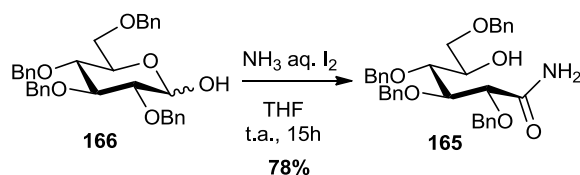


Schéma 84. Réaction d'amination oxydante.

Une oxydation d'Albright Goldman permet alors d'oxyder l'hydroxyle en C-5. A ce stade le produit n'est pas purifié mais utilisé directement dans la réaction suivante d'amination réductrice pour donner le lactame correspondant **169** (Schéma 85).

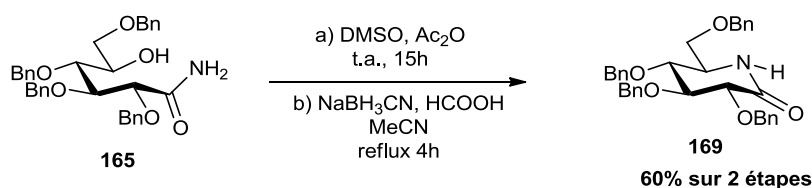


Schéma 85. Obtention du lactame **169** par amination réductrice.

Le mécanisme de cette réaction (Schéma 86) passe par un iminium formé après déshydratation du produit d'addition de l'amide sur la cétone. La stéréosélectivité de la réaction peut être expliquée par l'attaque axiale de l'hydrure sur la conformation demi-chaîse du *N*-acyliminium la plus favorisée, c'est-à-dire celle avec tous les substituants en position pseudo-équatoriales. L'attaque équatoriale conduirait à un intermédiaire possédant une conformation de type bateau-croisé très défavorisée.²⁶²

²⁶⁴ a) L. Colombeau, T. Traore, P. Compain, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8647-8650 ; b) M.-Y. Chen, J.-L. Hsu, J.-J. Shie, J.-M. Fang, *J. Chin. Chem. Soc.* **2003**, *50*, 129-133.

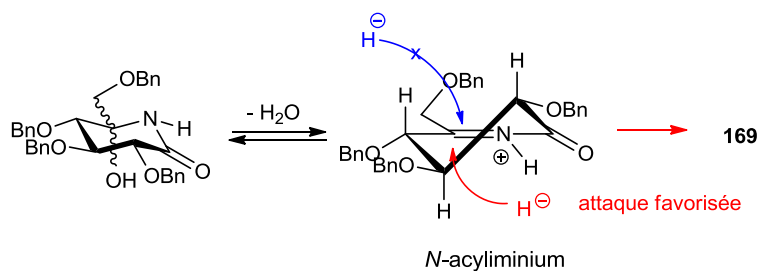


Schéma 86. Mécanisme de l'amination réductrice pour la formation de **169**.

Le lactame **169** est alors réduit en amine en présence de LAH pour former l'amine correspondante **164** avec un très bon rendement de 90% (Schéma 87).

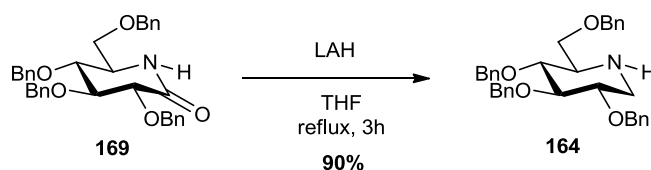


Schéma 87. Réduction du lactame **169** en amine **164**.

L'alkylation du produit se fait ensuite avec une chaîne bromoazoture par substitution nucléophile. Les deux azotures **170** et **171** sont formés par réaction des chaînes dibromées commerciales correspondantes avec de l'azoture de sodium en quantité sub-stoechiométrique dans le DMSO.²⁶⁵

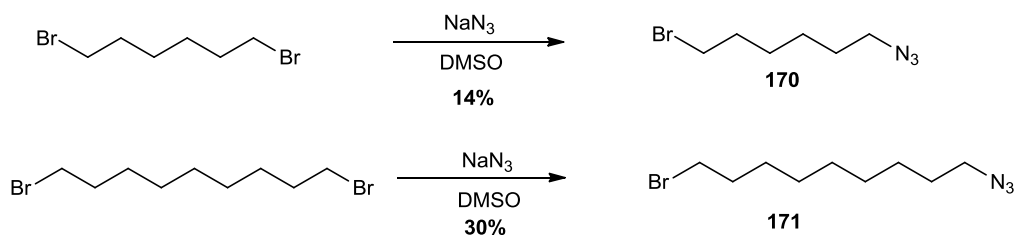
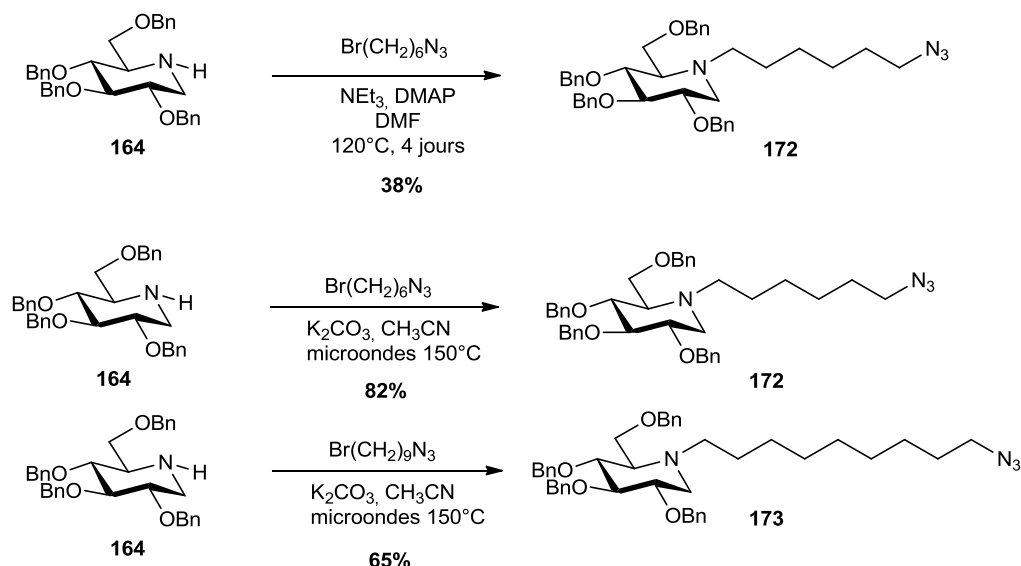


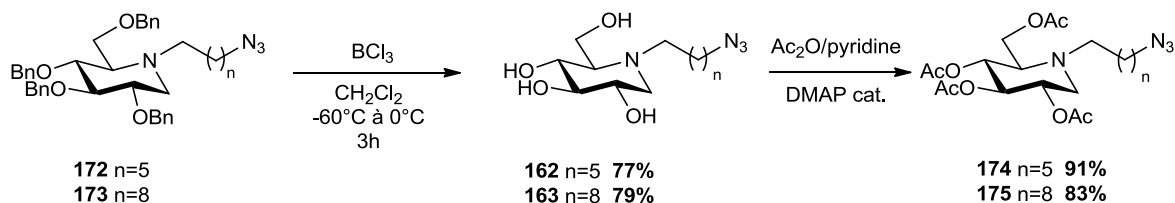
Schéma 88. Synthèse des chaînes bromoazoture à 6 et 9 carbones.

Les premiers essais d'alkylation se sont révélés difficiles et le produit alkylé avec la chaîne à 6 carbones **172** a été obtenu avec seulement 38% de rendement après 4 jours en présence de Et_3N , de DMAP dans le DMF à 120°C (Schéma 89). Après différents essais d'optimisation, l'utilisation d'une activation micro-ondes couplée à l'emploi de K_2CO_3 dans l'acétonitrile a donné de très bons résultats.

²⁶⁵ B. Jagadish, R. Sankaranarayanan, L. Xu, R. Richards, J. Vagner, V. J. Hrubby, R. J. Gillies, E. A. Mash, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3310-3313.

Schéma 89. Alkylation de l'amine **164**.

Le rendement de la réaction a ainsi été plus que doublé (82%) et la durée de réaction a été réduite à quelques heures. Le produit **173** a été obtenu de la même manière avec un rendement de 65%. La déprotection des benzyles se fait ensuite sélectivement en présence de BCl_3 à basses températures sans toucher aux fonctions azotures avec de bons rendements de 77 et 79% pour les iminosucres avec une chaîne alkyl de 6 carbones et de 9 carbones respectivement.

Schéma 90. Obtention des ligands azotures **174** et **175**.

Les alcools peuvent être ensuite facilement reprotégés sous forme d'acétates pour des raisons pratiques liées à la purification des systèmes multivalents basés sur des charpentes β -cyclodextrines.

Synthèse des références monovalentes

Avec les produits **162** et **163** déprotégés en main, nous pouvons synthétiser nos modèles monovalents. Afin d'être le plus proche possible de nos structures multivalentes nous avons synthétisé deux analogues pour chaque longueur de chaîne. Ces analogues posséderont la longueur totale de chaîne du linker mais aussi la fonction triazole obtenue lors des réactions de chimie click azoture-alcyne. Le triazole sera introduit par réaction avec le 1-pentyne ou l'acétate de 4-pentynyl. Ce dernier mimerait les fonctions esters des malonates présents sur la structure fullerène.

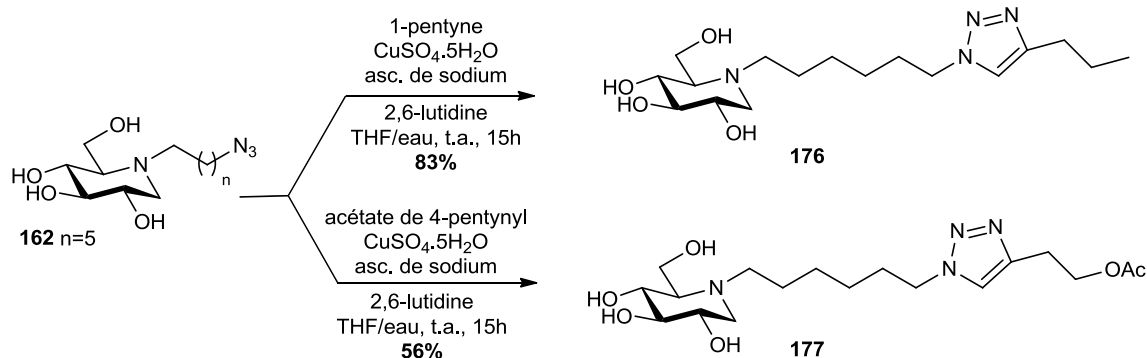


Schéma 91. Synthèse des ligands monovalents avec la chaîne à 6 carbones.

Les quatre produits sont obtenus par réactions de chimie click azoture-alcyne avec soit le 1-pentyne soit le 4-pentynyl acétate en présence d'une quantité catalytique de CuSO₄·5H₂O et d'ascorbate de sodium. Nous avons rajouté une base la 2,6-lutidine afin d'améliorer les rendements des réactions.²⁶⁶

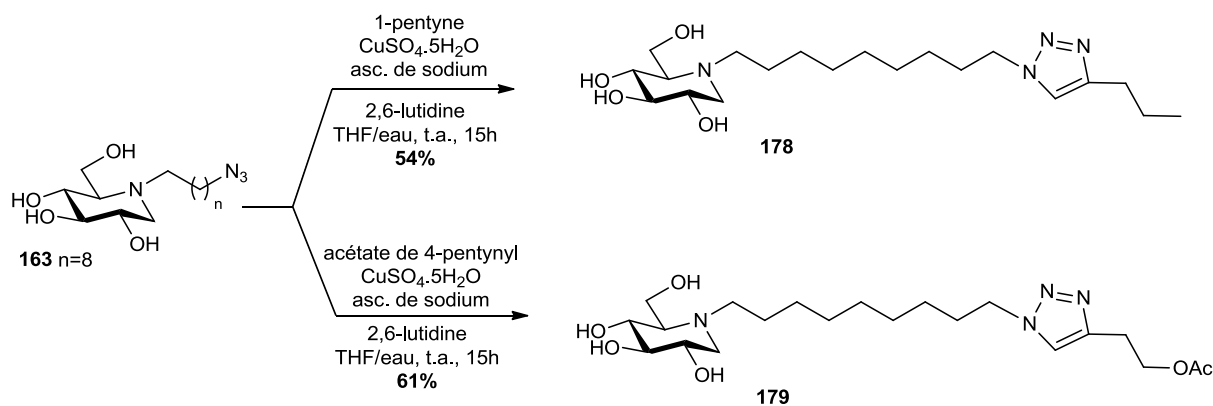


Schéma 92. Synthèse des ligands monovalents avec la chaîne à 9 carbones.

Ces rendements moyens non optimisés sont en partie dus aux faibles quantités sur lesquelles sont effectuées ces réactions et à la difficulté de travailler avec des composés partiellement solubles dans l'eau.

Synthèse du système multivalent fullerène

Nous avons ensuite pu nous consacrer à la synthèse des systèmes multivalents. Cette synthèse se fait par réaction de CuAAC. Dans un premier temps, le laboratoire du Dr. Nierengarten a réalisé la synthèse du produit fullerène portant comme ligand, le dérivé avec le linker à 6 carbones **162**.²⁶⁷ Cette réaction (Schéma 93) a été effectuée dans un mélange CH₂Cl₂/eau pour solubiliser les deux réactifs, à température ambiante pendant 24h. Le produit **180** a ensuite été purifié par précipitations successives dans le méthanol permettant ainsi d'enlever l'excès de l'iminosucre-azoture (1,1 x 12 éq dans la réaction). Le cuivre et les sels sont retirés par filtrations sur gel d'exclusion stérique.

²⁶⁶ D. D. Díaz, K. Rajagopal, E. Strable, J. Schneider, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6056-6057.

²⁶⁷ P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazeldard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.

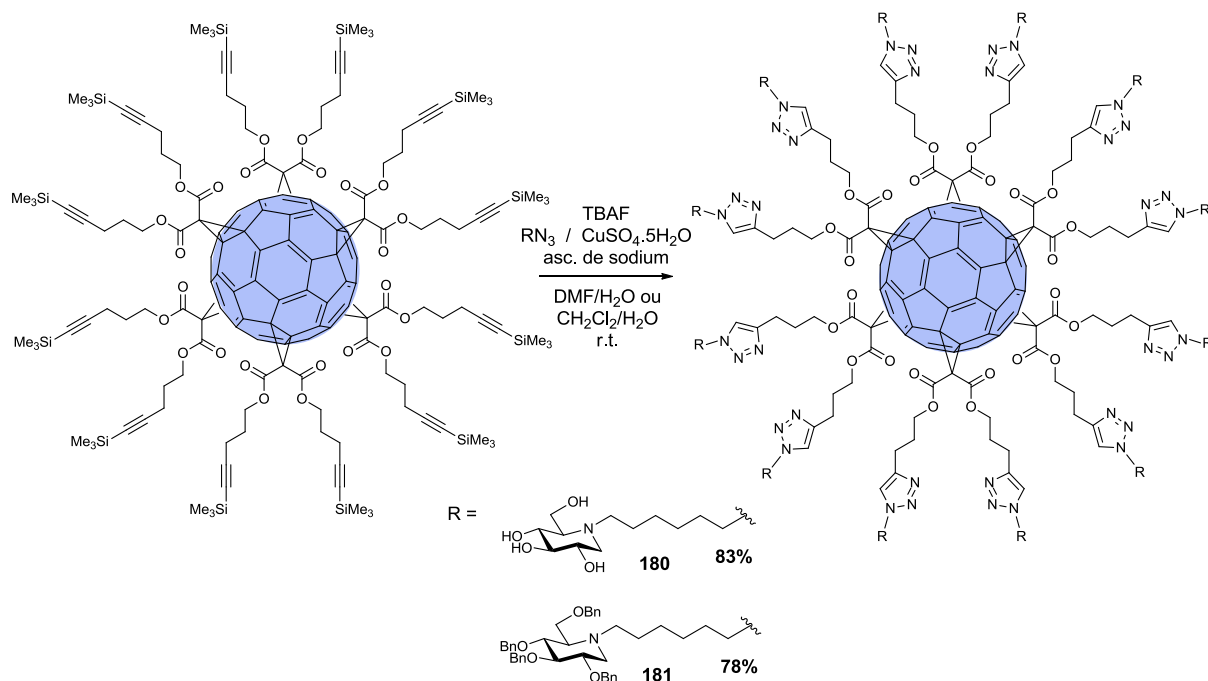


Schéma 93. Réaction de chimie click pour la formation du système multivalent

Le produit **180** est obtenu avec un excellent rendement de 83% compte tenu du fait que 12 réactions sont en jeu et que l'excès d'iminosucre n'est que de 1,2 équivalent par unité alcyne. Le produit a été entièrement caractérisé par RMN. On a pu reconnaître notamment les pics des carbones du fullerène caractéristiques de la symétrie de l'hexa-adduit ainsi que les carbones de l'iminosucre.

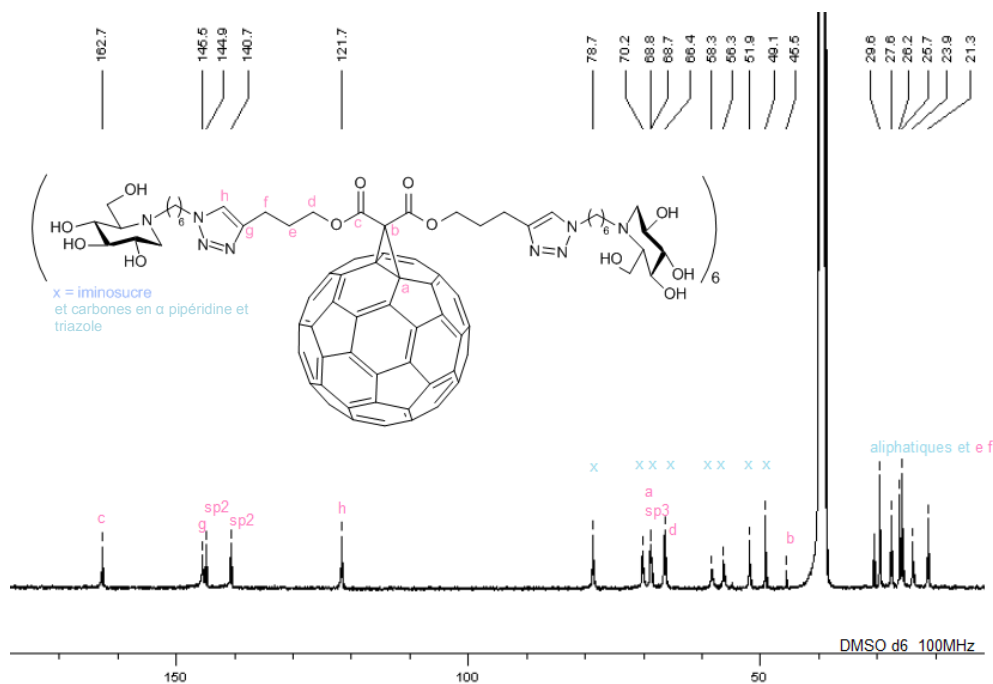


Figure 62. Spectre RMN ^{13}C 100MHz de **180**.

On remarque ainsi les 3 carbones non équivalents du fullerène, les 2 carbones sp_2 ($\delta = 140,7$ et $144,9$ ppm) et le carbone sp_3 ($\delta = 68,8$ ppm) caractéristiques de la symétrie T_h ainsi que les carbones équivalents des 6 malonates et les carbones également équivalents des iminosucres (Figure 62).

Toutefois, il a été impossible d'obtenir le pic moléculaire de ce composé lors d'analyses MALDI-TOF. Seules de multiples fragmentations ont pu être observées. Ce phénomène avait déjà été observé par l'équipe de Nierengarten lors de la greffe de dérivés sucres sur l'hexa-adduit²³³ et également par d'autres équipes. Pour donner une preuve supplémentaire de la formation de notre produit, la réaction de CuAAC a été réalisée sur le produit protégé par des benzyles **173** pour obtenir l'hexa-adduit **181**. Cette fois, moins de fragmentations ont été observées et le pic moléculaire est obtenu permettant ainsi une caractérisation complète.

Synthèse des systèmes multivalents cyclodextrines

Nous avons ensuite greffé les ligands sur les cyclodextrines.²⁶⁸ Suite à des difficultés survenues au laboratoire dans la purification des produits obtenus directement par cycloaddition des ligands déprotégés (**162** et **163**) et afin de pouvoir effectuer un suivi plus facile des réactions, nous avons réalisé l'étape de cycloaddition à partir des ligands protégés par des acétates **174** et **175** (Schéma 94,95 et 96).

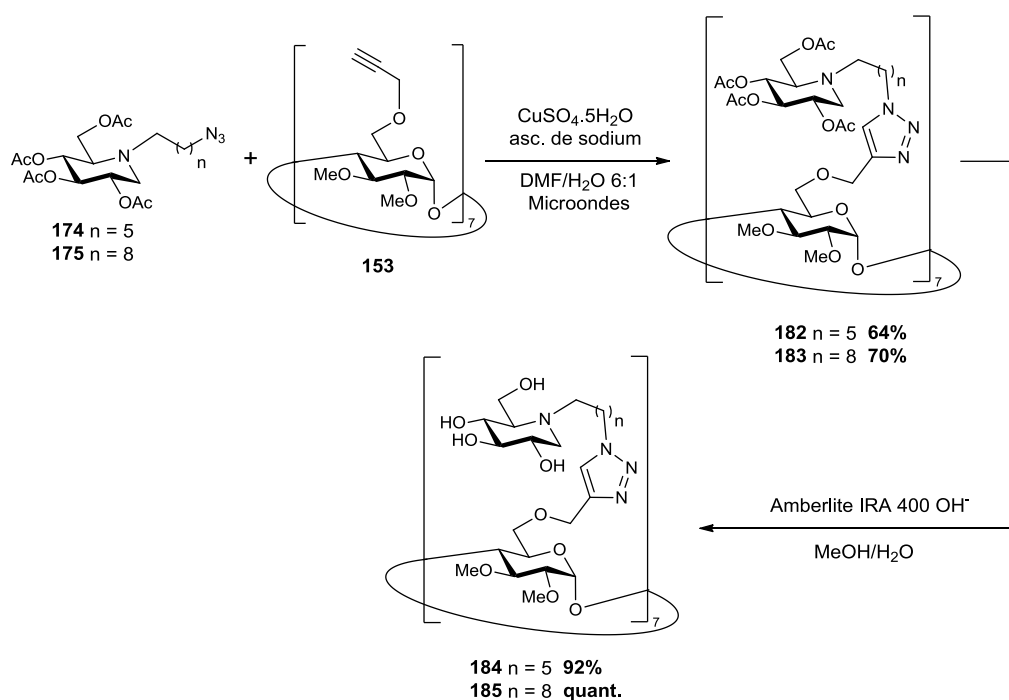


Schéma 94. Synthèse des cyclodextrines heptavalentes.

Les réactions de chimie click ont été faites par activation micro-ondes en 25 minutes. Grâce aux protections sur les alcools, les cyclodextrines acétylées sont facilement purifiées par chromatographie sur gel de silice.

²⁶⁸C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragan, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.

En ce qui concerne la présence de traces de cuivre, nous avons tout de suite remarqué qu'un simple traitement aqueux ne parvenait pas à l'éliminer. En effet les analyses MALDI-TOF nous montraient le pic $[M+Cu]^+$ largement majoritaire sans traitement spécifique. Nous avons donc réalisé un lavage du produit avec une solution d'ammoniaque aqueux à 10%.²⁶⁹ Ce traitement permet d'éliminer rapidement le cuivre qui reste dans la phase aqueuse bleutée. Au besoin cette opération peut être répétée jusqu'à la disparition du pic en analyse MALDI-TOF. Les rendements de ces réactions entre 54 et 70% sont très bons compte tenu du nombre de réactions mises en jeu lors d'une même expérience. 54% de rendement pour 14 réactions simultanées représentent en effet un rendement moyen de 96% par réaction de cycloaddition.

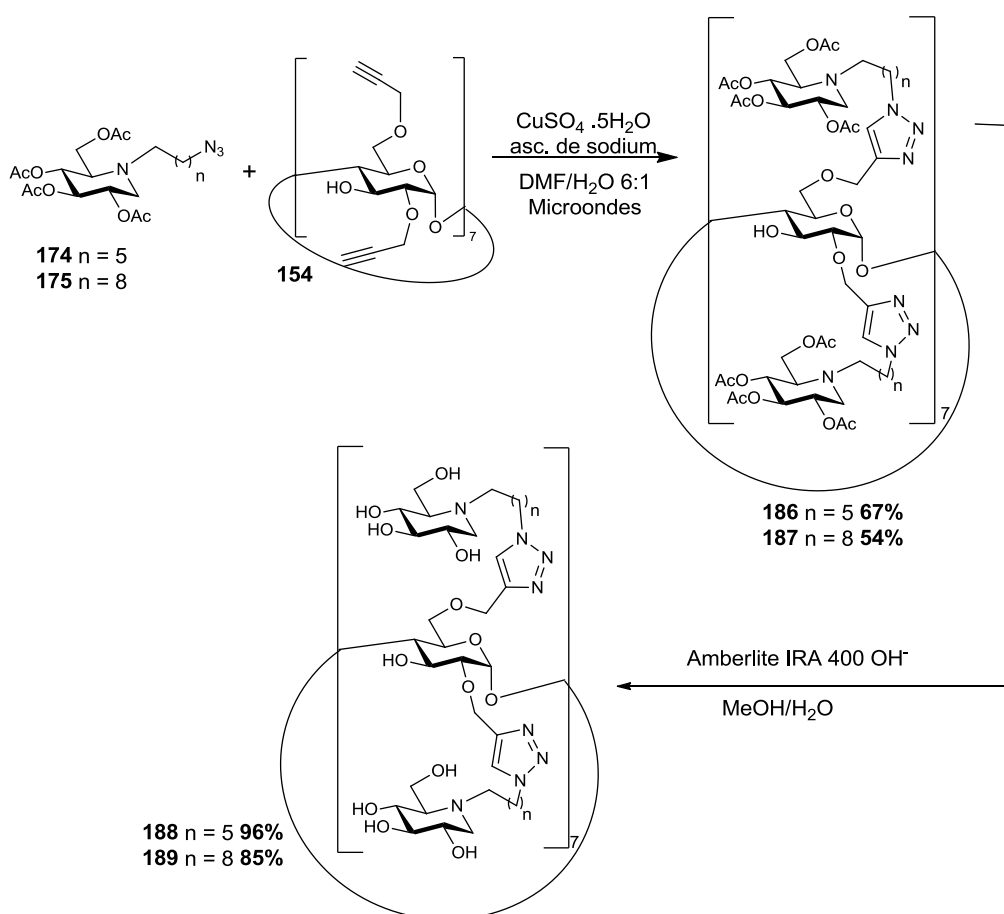


Schéma 95. Synthèse des cyclodextrines tétradécavalentes substituées sur les deux faces.

Le produit **190** (Schéma 96) n'est obtenu qu'avec un rendement de 36%. Ceci s'explique en partie par les pertes dues aux lavages successifs pour retirer le cuivre et non par un manque de réactivité car les réactions sont toujours totales.

²⁶⁹ S. Srinivasachari, K. M. Fichter, T. M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4618-4627.

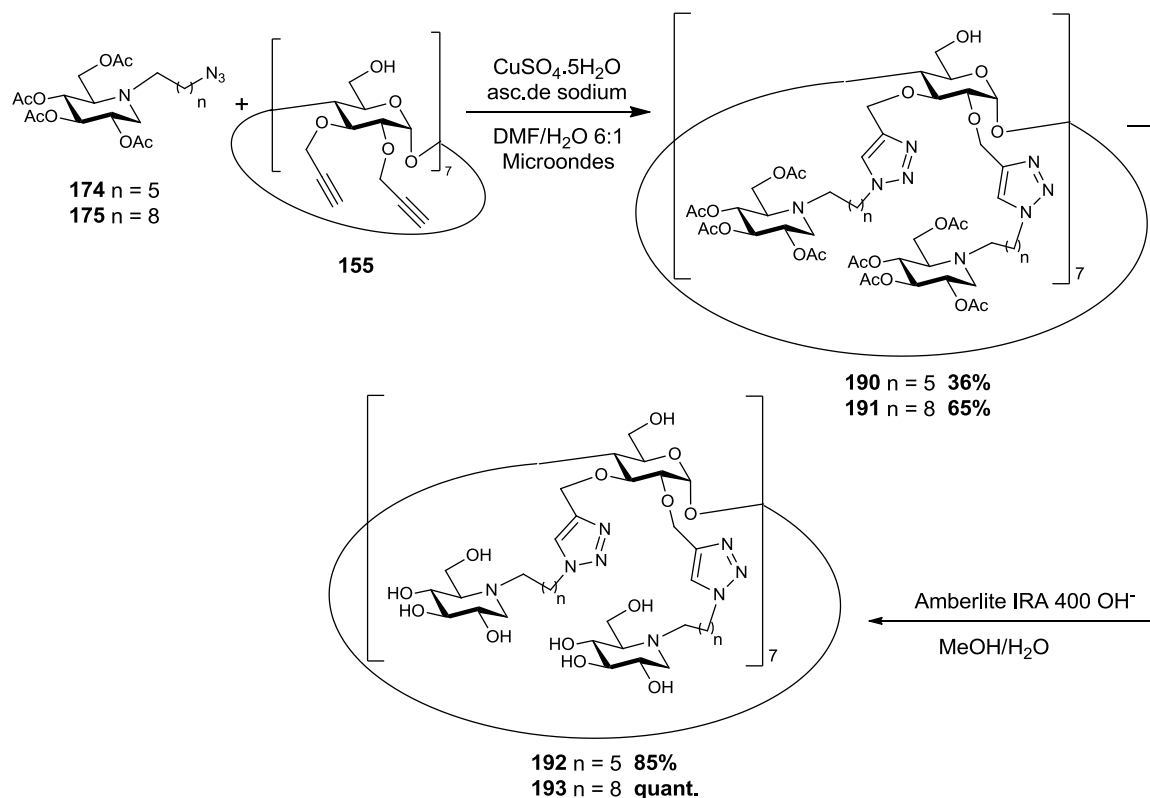


Schéma 96. Synthèse des cyclodextrines tétradécavalentes substituées sur la face secondaire.

Les déprotections se font facilement au moyen d'une résine basique Amberlite IRA 400 OH^- . Cette méthode²⁷⁰ décrite sur des molécules simples s'est avérée très pratique et adaptable à des structures relativement complexes comme les cyclodextrines polyfonctionnalisées. Elle présente le grand avantage de ne produire aucun sous-produit non volatil contrairement à d'autres méthodes classiques de déprotection de fonctions acétates (par exemple l'utilisation de NaOMe/MeOH). En quelques heures, la réaction est terminée et les produits sont obtenus par simple filtration de la résine suivie de l'évaporation du méthanol et de l'eau avec d'excellents rendements.

Au final, les 6 produits obtenus sous forme de solides blancs ont pu être caractérisés entièrement par RMN. Par exemple, pour le composé tétradécavalent **192**, on reconnaît sur le spectre proton (Figure 63) les signaux caractéristiques des deux triazoles à 7,78 et 7,86 ppm ainsi que les signaux des iminosucres presque équivalents et ceux de la cyclodextrine avec les bonnes intégrations relatives. En ^{13}C (Figure 64), on remarque que les signaux de la cyclodextrine sont beaucoup plus petits que ceux de l'iminosucre ce qui est cohérent avec la stœchiométrie et le fait que les iminosucres apparaissent équivalents. Les produits sont également caractérisés par analyse MALDI-TOF où on observe cette fois-ci, dans le cas des cyclodextrines, parfaitement le pic moléculaire.

²⁷⁰ V. P. Pathak, *Synth. Commun.* **1993**, 23, 83-85.

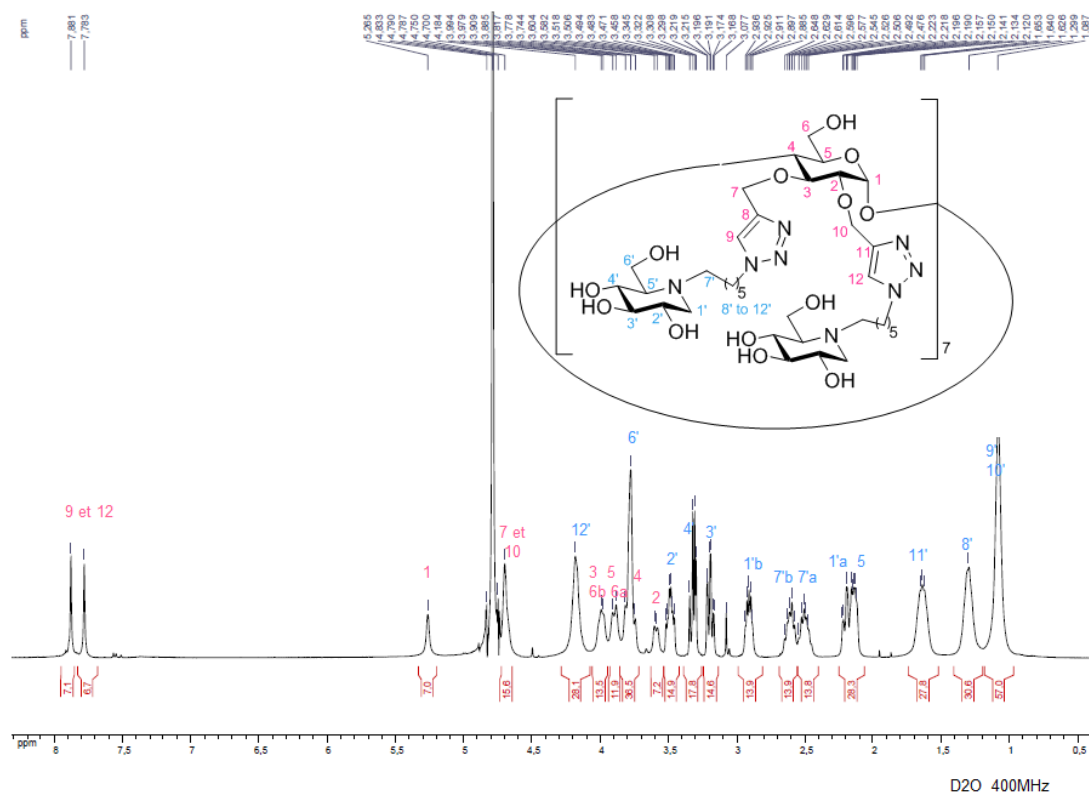


Figure 63. RMN ^1H de **192** dans le D_2O à 400 MHz.

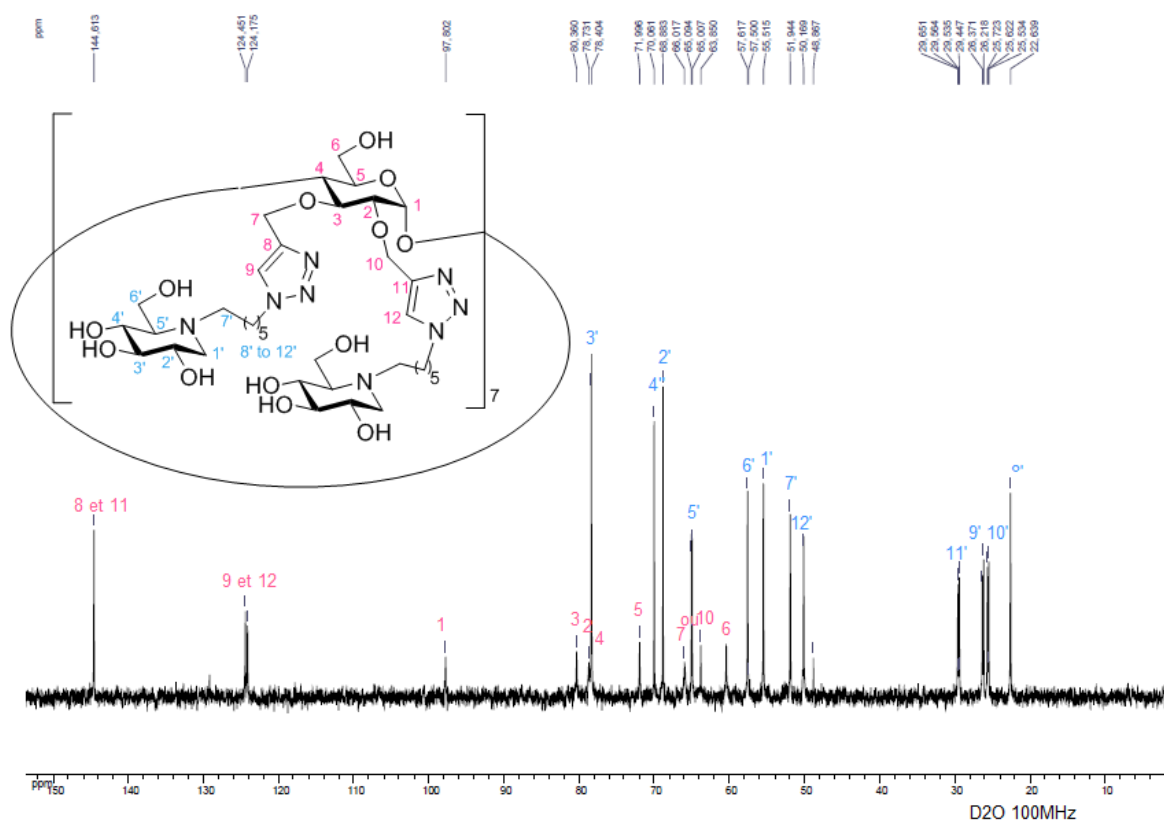


Figure 64. RMN ^{13}C de **192** dans le D_2O à 100 MHz

Pour les produits tétradécavalents, on observe quelques problèmes de solubilisation et plus particulièrement pour les produits possédant le linker à 9 carbones. Des dilutions plus importantes ou l'ajout d'un cosolvant tel que le MeOH permettent cependant toujours de solubiliser complètement les composés. Toutefois, il semble difficile d'allonger encore la longueur du linker sans prendre d'autres précautions telles que l'introduction d'hétéroatomes (oxygène) dans les chaînes pour aider à la solubilisation.

ii) Série modèle

Dans le but de valider nos résultats biologiques avec nos ligands iminosucres multivalents, nous avons voulu synthétiser une charpente modèle dans laquelle le ligand est substitué par un hydroxyle. Ce composé permettra de s'assurer que l'activité biologique de nos composés n'est pas due en partie à la charpente et/ou au linker. Pour ce faire nous avons donc synthétisé le modèle heptavalent **196** ainsi que son analogue monovalent **195**.

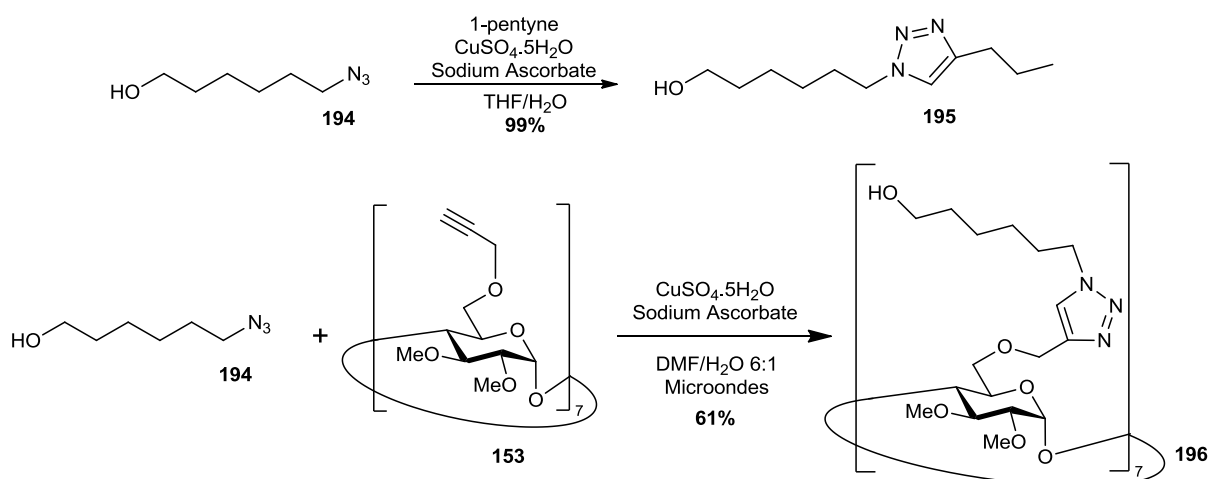


Schéma 97. Synthèse des composés modèles monovalent et heptavalent.

La molécule de base est donc une chaîne azido-hexanol **194** qui est mise en réaction avec le pentyne d'une part et la charpente heptavalente portant les fonctions alcynes d'autre part pour donner le composé modèle heptavalent et son analogue monovalent (Schéma 97).

iii) Série iminoxylitol

Nous nous sommes également intéressés à la synthèse de ligands spécifiques à certaines glycosidases d'intérêt thérapeutique. Notamment, suite aux bons résultats obtenus au laboratoire avec l'iminosucre α -1-C-nonyl-imino-D-xylitol (l' α -1-C-nonyl-DIX),¹¹⁶ nous avons envisagé de greffer ce substrat sur nos structures multivalentes. En effet l' α -1-C-nonyl-DIX avait montré un K_i de 2,2 nM pour l'inhibition de la β -glucocérébrosidase (GCCase) impliquée dans la maladie de Gaucher.¹¹⁶ Il avait également montré une activité chaperon lors de tests cellulaires sur des fibroblastes de Gaucher avec la mutation N370S d'un facteur 1,8 à 10 nM. Nous étions donc très curieux de savoir ce que la multivalence pouvait apporter à ces résultats.

Synthèse du ligand

Pour des raisons de solubilité, nous avons opté dans un premier temps pour une chaîne à 6 carbones. Pour synthétiser le ligand choisi **197** portant l'azoture nécessaire aux réactions de chimie click, nous avons imaginé une stratégie de synthèse flexible¹⁴⁷ via une réaction clé de métathèse croisée permettant d'introduire à partir d'un intermédiaire de synthèse avancé **198**, des chaînes de différentes longueurs portant la fonction azoture (Schéma 98). Cette réaction pourrait se faire entre le produit allylé **198** et l'alcène **199**. L'atome d'azote du composé **73** serait désactivé sous forme d'un carbamate afin de ne pas empoisonner le catalyseur de métathèse. En effet, les catalyseurs de métathèse sont connus pour leur sensibilité vis-à-vis des amines.^{271,272} La protection de **73** pourrait être réalisée à l'aide de chloroformate de trichloroéthyle. La synthèse de l'amine **73** à partir du D-xylose a été décrite dans les paragraphes §1.1.7 et §1.2.3. L'alcène **199** proviendrait du pentèn-1-ol **200** commercial.

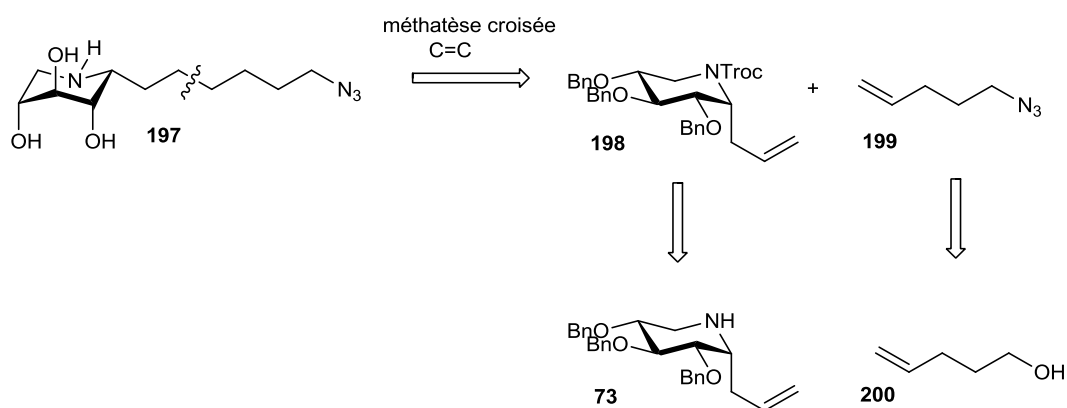


Schéma 98. Schéma rétrosynthétique du ligand en série iminoxylitol.

Le composé **73** est obtenu en 7 étapes à partir du D-xylose (**27**) avec un rendement global de 31%.

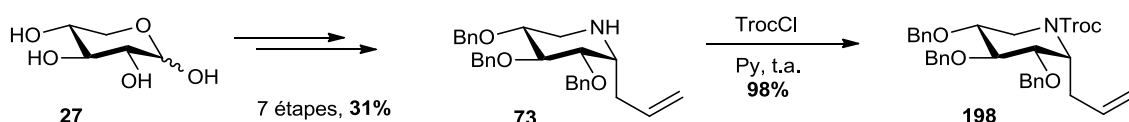


Schéma 99. Protection de l'amine avec un groupement Troc.

Le groupement Troc est greffé dans des conditions classiques avec un rendement de 98%. Le composé **198** est obtenu sous la forme d'un mélange de rotamères ce qui dédouble certains signaux RMN. Une RMN à haute température 110°C dans le DMSO-d₆ permet d'obtenir un

²⁷¹ Pour une revue sur les métathèses d'oléfines contenant des amines : P. Compain, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1829-1846.

²⁷² Pour les premiers exemples de réaction de métathèse croisée avec un iminosucre voir : G. Godin, P. Compain, O. R. Martin, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3269-3272.

spectre bien résolu. L'alcène nécessaire à la réaction de métathèse croisée, le 5-azidopentène **199** est obtenu en deux étapes à partir du pent-4-èn-1-ol commercial.²⁷³

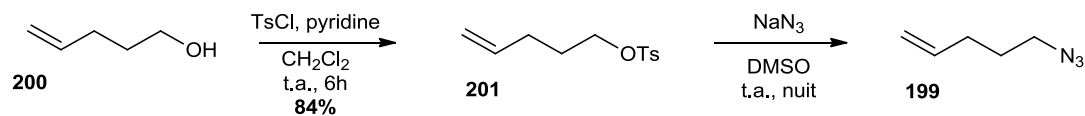


Schéma 100. Synthèse du 5-azidopent-1-ène.

Plusieurs essais de métathèse croisée (Schéma 101) ont ensuite été réalisés entre le produit **198** et l'azidopentène **199** en présence de catalyseur de Grubbs II. Bien que plusieurs exemples de métathèse croisée en présence d'azotures aient été décrits dans la littérature,²⁷⁴ dans notre cas, aucune réaction n'est observée et on obtient uniquement le produit de départ. Devant ces échecs, nous avons décidé de réaliser la métathèse croisée avec l'alcène portant le groupement tosyloxy que nous pourrions déplacer ultérieurement en présence d'azoture de sodium.

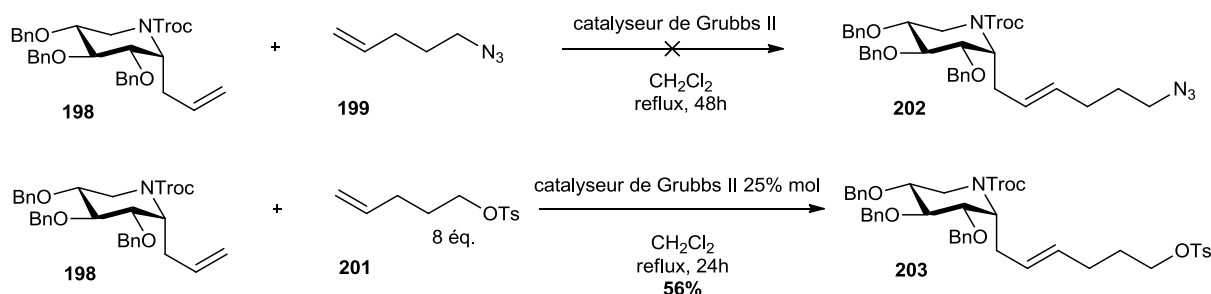


Schéma 101. Réactions de métathèse croisée.

La réaction a fonctionné et on obtient le produit **203** avec un rendement de 56%. Les 8 équivalents d'alcène **201** sont ajoutés en deux fois pour essayer de favoriser l'obtention du produit **203** par rapport à la réaction d'homodimérisation du partenaire de métathèse tosylé **201**. La réaction est également tentée à partir de l'intermédiaire **72** dont l'atome d'azote n'est pas désactivé, mais de façon non surprenante, la réaction ne fonctionne pas (Schéma 102).²⁷⁰

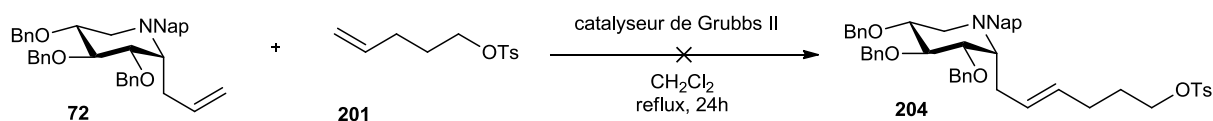


Schéma 102. Réaction de métathèse croisée sans « désactivation » de l'atome d'azote.

Le produit **203** est ensuite hydrogéné (Schéma 103) de façon à déprotéger les groupements benzyles et à réduire la double liaison. Le produit **205** est obtenu avec un rendement moyen de 46%. On isole également un produit dont la masse correspond à celle d'un produit monobenzylé avec un rendement de 9% et un produit déchloré au niveau du groupement troc avec un rendement de 8%.

²⁷³ T. Smejkal, B. Breit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 311-315 ; b) P. C. Montecvecchi, M. L. Navacchia, P. Spagnolo, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1219-1226.

²⁷⁴ a) V. D. Chaudhari, K. S. A. Kumar, D. D. Dhavale, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5805-5807; b) A. N. Rai, A. Basu, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2861-2863.

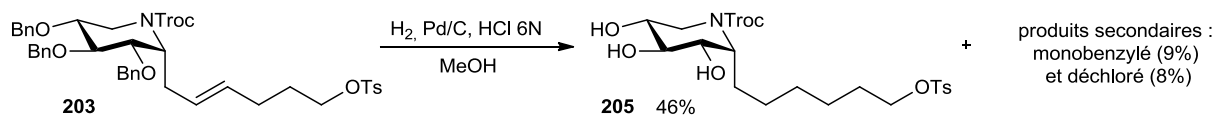


Schéma 103. Hydrogénation de 203

Le déplacement du tosylate par l'azoture se fait avec un très bon rendement de 86% (Schéma 104).

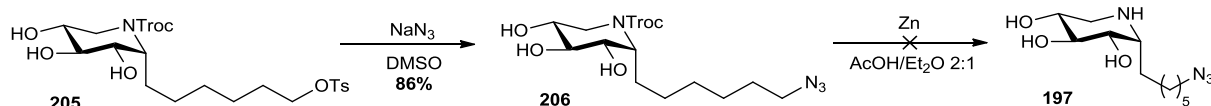


Schéma 104. Mise en place de l'azoture et déprotection du groupement Troc.

Aucun produit ne peut être isolé lors de la déprotection du groupement Troc réalisée sur une petite quantité de produit en présence de Zn et d'un mélange acide acétique diéthyl éther.²⁷² Nous décidons donc de changer le groupement Troc qui semble problématique pour plusieurs étapes par un groupement *tert*-butoxycarbonyl Boc.

La mise en place du groupement Boc se fait sans difficultés à l'aide d'anhydride de Boc et de Et₃N dans le CH₂Cl₂. Plusieurs catalyseurs (Figure 65) ont été utilisés afin d'optimiser l'étape de métathèse croisée.

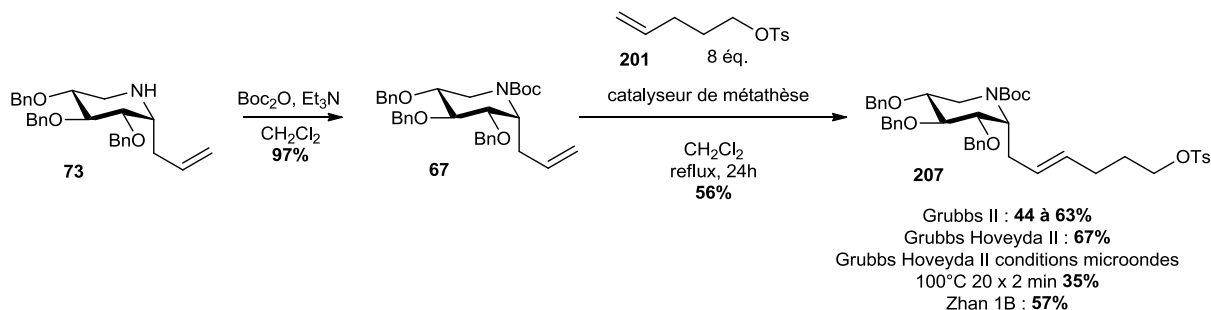


Schéma 105. Essais métathèse produit Boc.

Finalement ce sont les conditions classiques de chauffage thermique à reflux avec le catalyseur de Grubbs Hoveyda II qui ont donné le meilleur rendement pour l'étape de métathèse croisée réalisée avec un rendement de 67% (Schéma 105).

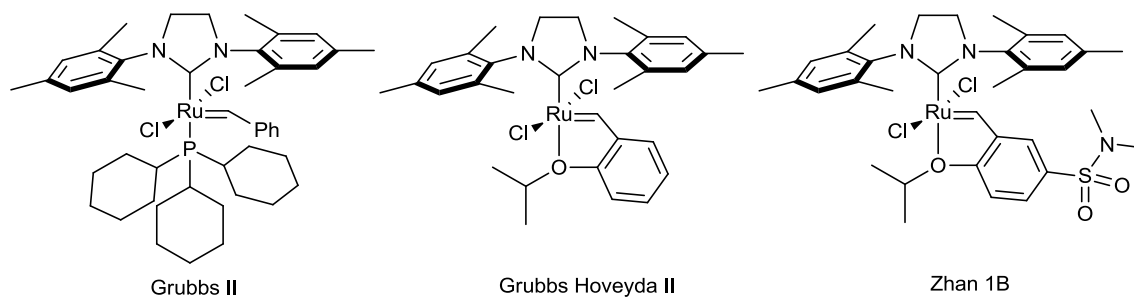


Figure 65. Catalyseurs de métathèse utilisés.

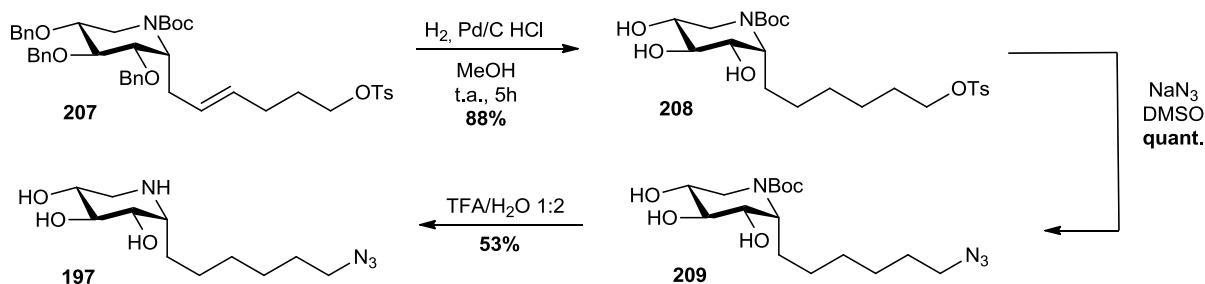


Schéma 106. Déprotections et introduction de l'azoture.

La déprotection des groupements benzyles ainsi que la réduction de la double liaison se font sous atmosphère d'hydrogène et à l'aide de 10% de palladium sur charbon et permettent d'obtenir le produit **208** avec un très bon rendement de 88%. La substitution nucléophile S_N2 du groupement tosyloxy par l'azoture se fait de manière quantitative et un premier essai de déprotection du groupement Boc en présence d'acide trifluoroacétique se révèle positif et permet d'obtenir l'iminosucre **197** après purification sur résine H^+ (Schéma 106).

Comme dans le cas de la série DNJ, nous avons également protégé les alcools sous forme d'acétate dans l'objectif de manipuler et purifier plus facilement les cyclodextrines multivalentes cibles.

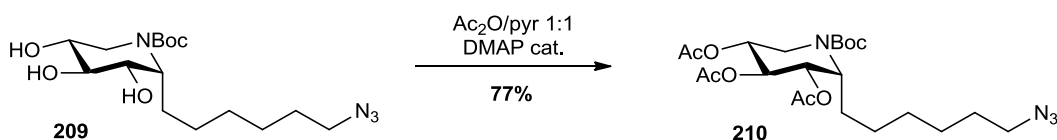
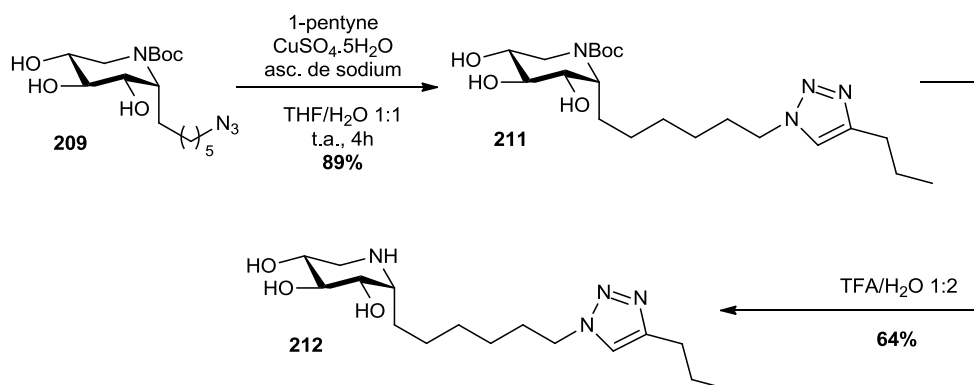


Schéma 107. Protection des hydroxyles sous forme d'acétates.

La protection se fait en présence d'anhydride acétique, de pyridine et d'une quantité catalytique de DMAP et le produit protégé **210** est obtenu avec un rendement de 77%.

Synthèse du modèle monovalent

Ayant validé toutes les étapes synthétiques y compris celles de déprotections, nous avons pu synthétiser le modèle monovalent par réaction de chimie click catalysée au cuivre en présence du 1-pentyne sur le produit **209** protégé par le Boc, plus facile à manipuler que son analogue **197** qui est très polaire. La réaction s'effectue avec un très bon rendement de 89%.

Schéma 108. Synthèse de la référence monovalente **212**.

Le produit **211** est ensuite déprotégé en présence de TFA et le ligand monovalent **212** est obtenu après purification sur résine H⁺.

Synthèse des systèmes multivalents sur les charpentes cyclodextrines

La synthèse du système tétradécavalent se fait donc à partir de l'iminosucre protégé **210** par réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre. Le produit **213** est obtenu avec 44% de rendement après avoir subi le traitement à l'ammoniaque aqueux pour enlever le cuivre ainsi qu'une purification par chromatographie sur gel de silice.

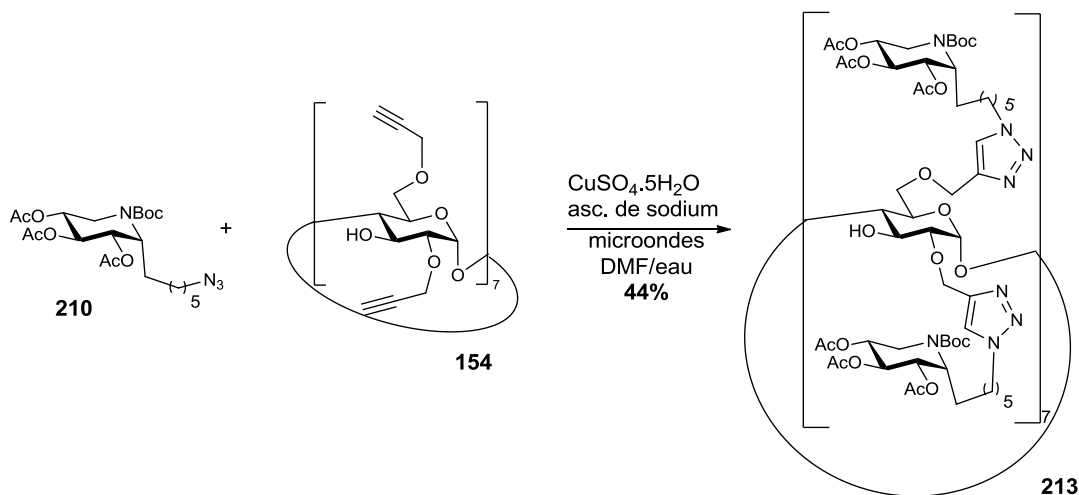


Schéma 109. Réaction de chimie click pour la formation du ligand tétradécavalent.

Pour la déprotection (Schéma 110) nous avons choisi d'enlever d'abord le groupement Boc pour purifier le produit à ce stade. Dans un second temps les acétates sont déprotégés avec la résine basique Amberlite IRA 400 OH⁻ et le ligand tétradécavalent est obtenu avec un rendement de 60% sur les deux étapes de déprotections.

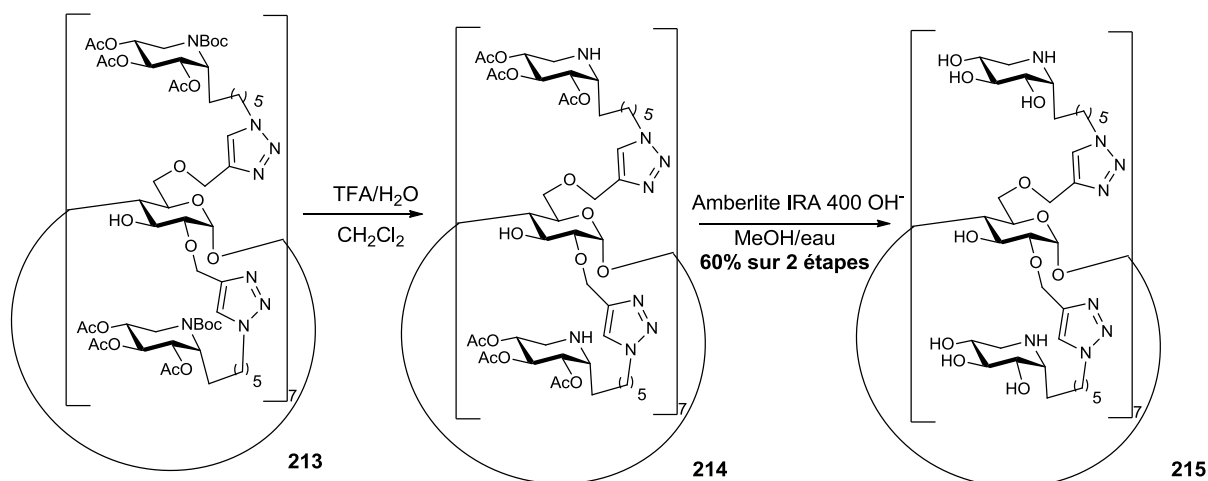


Schéma 110. Réactions de déprotections.

Dans un second temps, nous avons décidé pour simplifier la procédure expérimentale d'utiliser pour la formation du système heptavalent le dérivé iminoxylitol protégé avec les acétates sans protection de l'atome d'azote endocyclique.

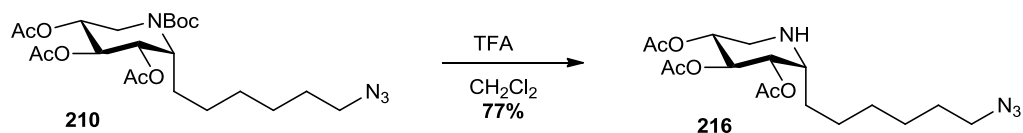


Schéma 111. Déprotection de la fonction Boc.

Le ligand azoture **216** est obtenu facilement avec 77% de rendement et peut être utilisé dans la réaction de cycloaddition (Schéma 111). La réaction de chimie click azoture-alcyne se fait dans nos conditions classiques par activation micro-ondes (Schéma 112).

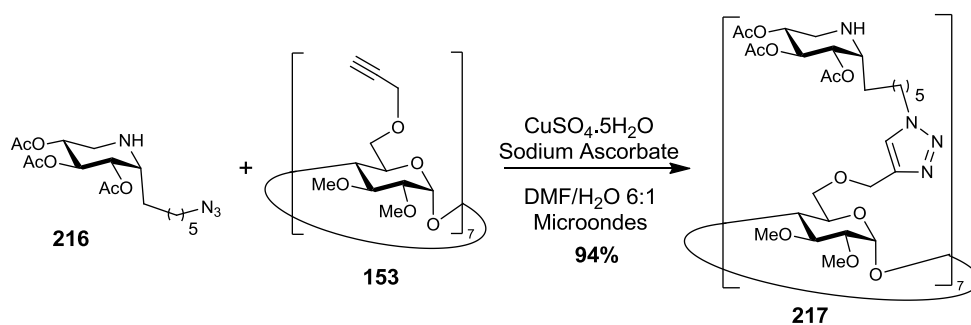


Schéma 112. Cycloaddition pour l'obtention du produit heptavalent.

Pour ce produit, une technique très efficace de purification a été mise au point. L'iminosucre heptavalent est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant très polaire ACN/NH₄OH/eau (15:1:1). L'utilisation de l'ammoniaque dans l'éluant permet ainsi d'enlever les résidus de cuivre et dispense des lavages préalables avec la solution d'ammoniaque. On accède ainsi au produit **217** avec un excellent rendement de 94% sans perte de produit.

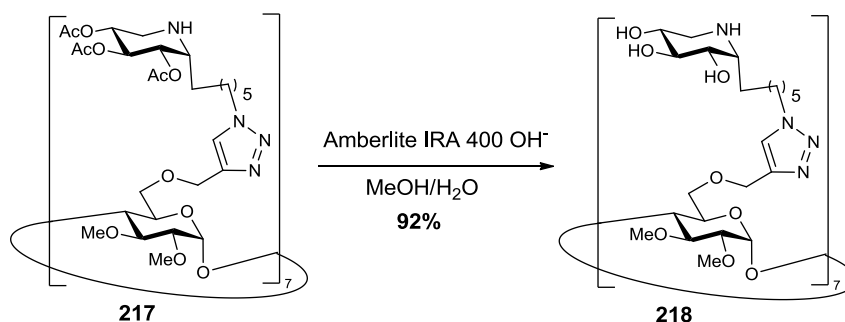


Schéma 113. Déprotection des acétates en présence de résine basique.

La déprotection s'effectue dans nos conditions classiques en présence de résine basique et le produit heptavalent en série α -1-C-imino-D-xylitol **218** est obtenu avec un très bon rendement de 92%.

Nous avons donc synthétisé deux produits multivalents en série α -1-C-hexyl-imino-D-xylitol de valence 14 et 7. Les rendements globaux sont de 3,6% sur 15 étapes à partir du D-xylose pour le produit tétradécavalent **215** et de 9% sur 15 étapes pour le produit heptavalent **218**. Le produit monovalent **212** a lui été obtenu en 13 étapes avec un rendement global de 10%.

iv) Série DMJ

Des résultats non publiés du groupe de F. Becq ont montré que des inhibiteurs des α -mannosidases du RE pouvaient entraîner une sauvegarde partielle de la protéine CFTR des mécanismes de contrôle qualité du RE. Dans le but d'appuyer ces résultats préliminaires, nous avons voulu synthétiser un inhibiteur multivalent de ces glycosidases basé sur un ligand *N*-alkyl-déoxymannojirimicine (*N*-alkyl-DMJ).

Pour tester rapidement l'effet de la multivalence sur la sauvegarde de la protéine CFTR, nous avons effectué la synthèse du ligand directement à partir de la DMJ.HCl commerciale. En deux étapes nous avons pu synthétiser le ligand **220** possédant la fonction azoture avec une chaîne alkyl de 6 carbones. Cette synthèse s'effectue par réaction de substitution nucléophile sur la chaîne azido-bromée en présence d'une base inorganique, le K_2CO_3 . Le produit obtenu **219** est directement acétylé dans les conditions classiques Ac_2O /pyridine et DMAP en quantité catalytique (Schéma 114).

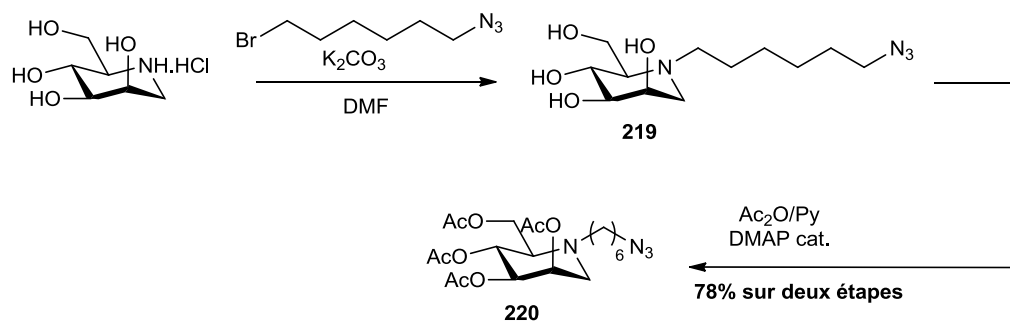


Schéma 114. Synthèse du ligand en série DMJ.

Le produit protégé et alkylé est obtenu avec un très bon rendement sur deux étapes de 78%. Le modèle monovalent **222** est synthétisé par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire suivie d'une déprotection des acétates en présence de résine basique avec de bons rendements.

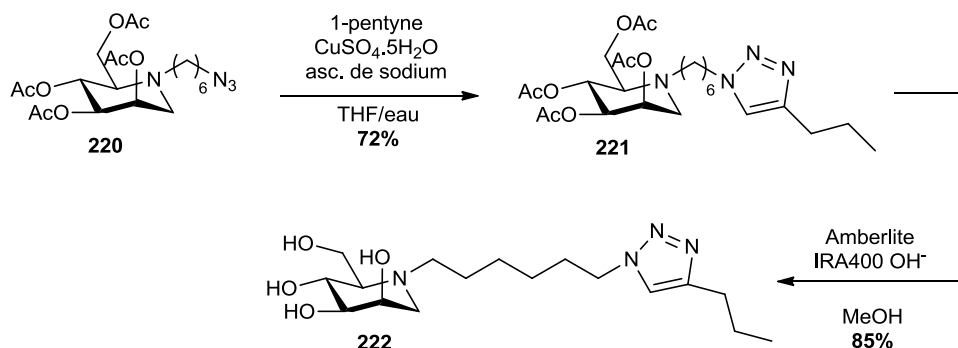


Schéma 115. Synthèse de la référence monovalente en série DMJ.

Compte tenu de la quantité de produit dont nous disposons, l'iminosucre en série DMJ n'a été greffé que sur une seule cyclodextrine. Nous avons choisi dans un premier temps la cyclodextrine

heptavalente que nous pensons plus à même de passer les barrières cellulaires que son analogue tétradécavalente qui est de taille beaucoup plus importante (Schéma 116).

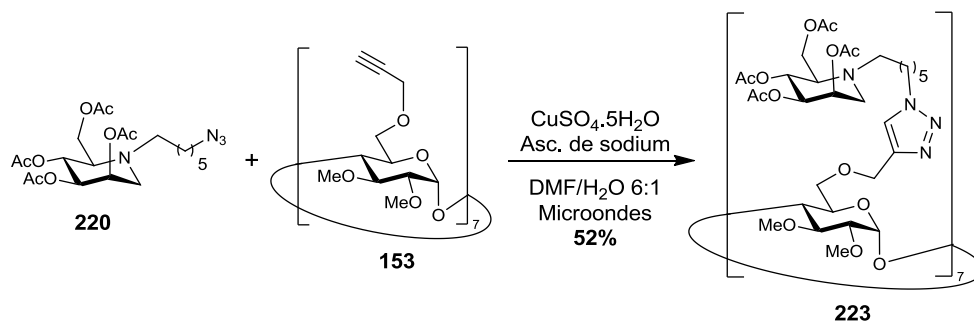


Schéma 116. Formation du composé heptavalent **223** en série DMJ.

Le produit est purifié dans nos conditions classiques. Les sels de cuivre sont éliminés par lavage avec une solution d'ammoniaque à 10% suivi d'une chromatographie sur colonne.

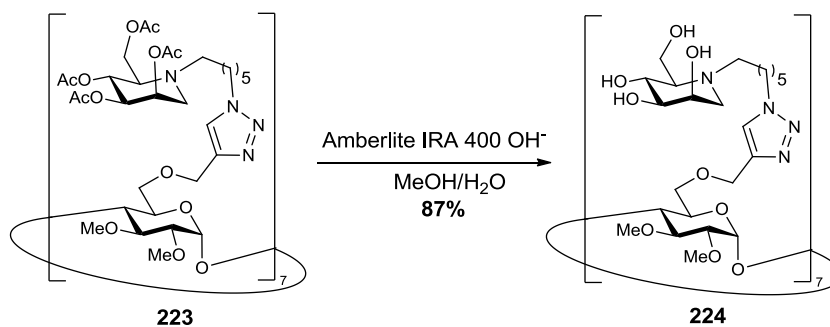


Schéma 117. Obtention du système heptavalent cible en série DMJ.

La déprotection des acétates en présence de résine basique se fait avec un très bon rendement de 87% et nous permet d'accéder au produit final heptavalent **224** en série DMJ (Schéma 117).

Conclusion du chapitre 2.

Les chimistes se sont intéressés à la synthèse de systèmes multivalents principalement dans le cadre des interactions sucre-lectine. De nombreuses méthodes de synthèses ont été développées notamment dans le domaine des cyclodextrines et des fullerènes comme nous avons pu le voir. Les résultats impressionnants de gains d'affinité pour des lectines et toxines obtenus avec des ligands multivalents nous ont amenés à nous intéresser à la multivalence dans le domaine de l'inhibition de glycosidases, domaine très peu exploré jusqu'à présent. Nous avons pu synthétiser 10 systèmes multivalents iminosucres basés sur les charpentes fullerène et cyclodextrine que nous avons retenues. Après l'obtention des charpentes polypropargylées et des ligands azotures, les couplages entre les charpentes et les ligands ont été réalisés par réaction de CuAAC, qui, très efficace, nous a permis d'obtenir tous les produits désirés avec de bons rendements (Figure 66). L'évaluation biologique de ces systèmes multivalents en tant qu'inhibiteurs de glycosidases et chaperons pharmacologiques sera détaillée dans le chapitre 3.

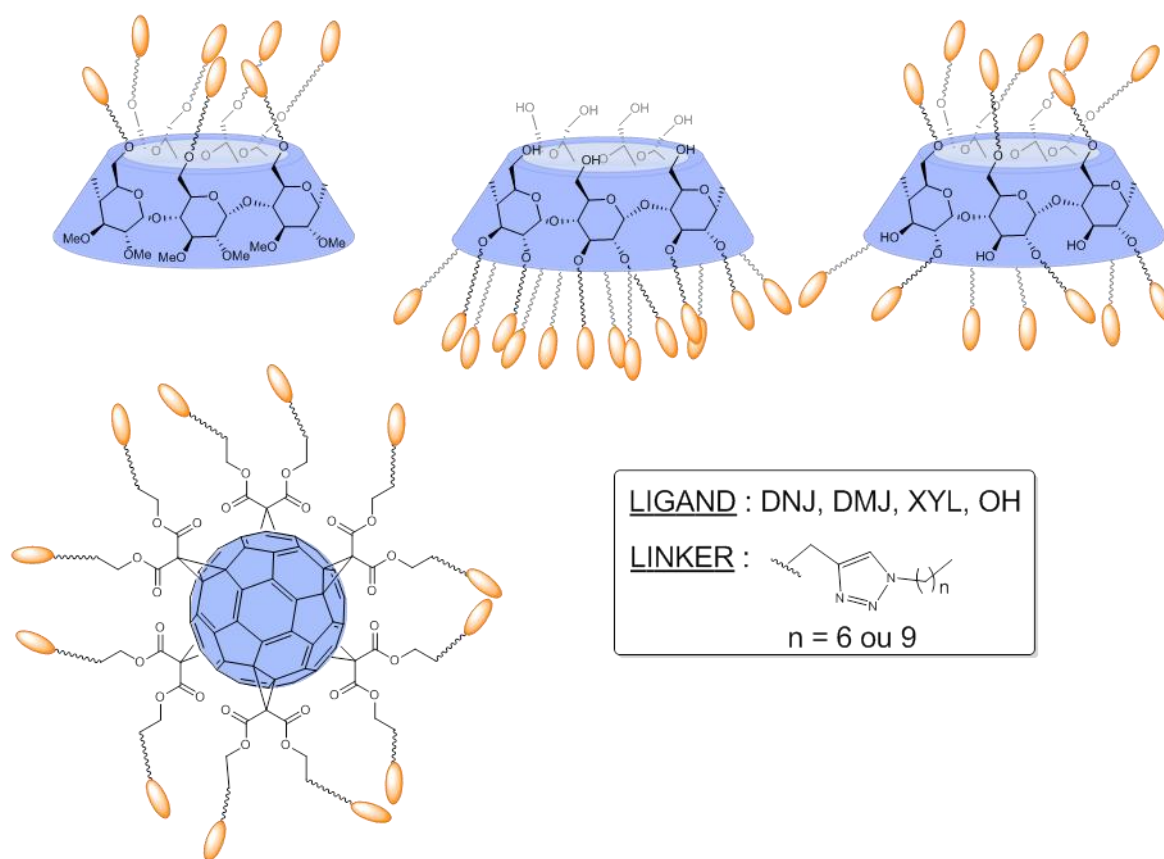
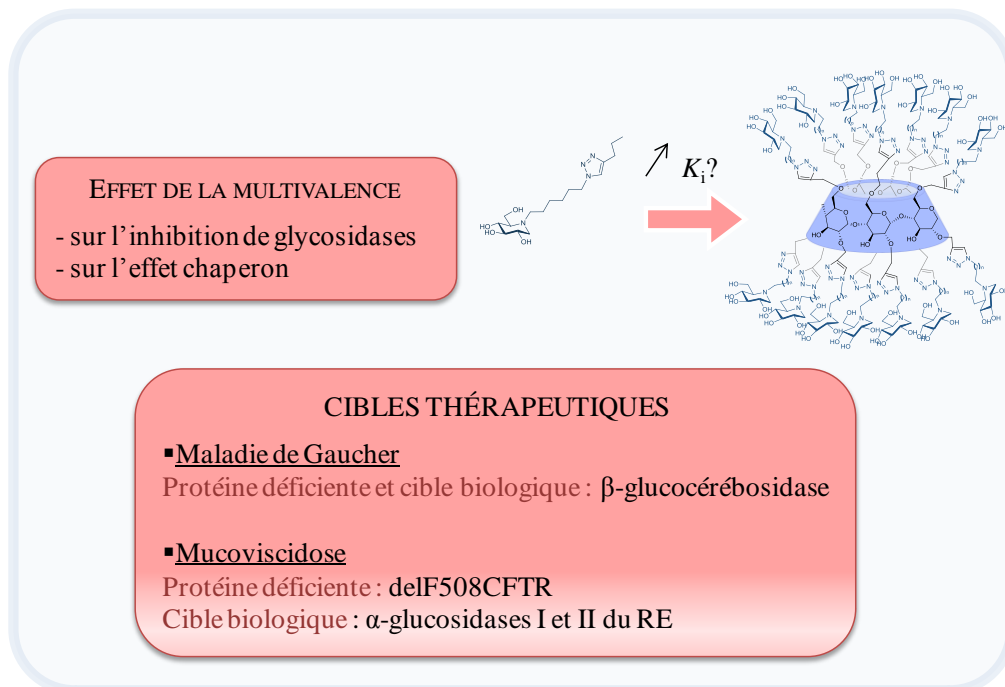


Figure 66. Représentation schématique des systèmes multivalents synthétisés.

Chapitre 3

Évaluations biologiques des chaperons pharmacologiques mono- et multivalents



Les produits synthétisés ont été testés biologiquement sur différentes cibles grâce à cinq collaborations scientifiques avec les équipes ci-dessous:

- Le laboratoire du Pr. Ortiz Mellet à Séville (Espagne)
- Le laboratoire du Pr. Delgado à Barcelone (Espagne)
- Le laboratoire du Pr. Asano à Kanazawa (Japon)
- Le laboratoire du Dr. Butters à Oxford (Royaume Uni)
- Le laboratoire du Pr. Becq à Poitiers (France)

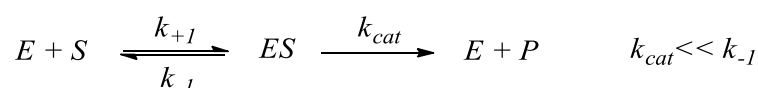
Pour des raisons pratiques nous nommerons les produits multivalents par un code permettant de relier la molécule rapidement aux différents paramètres que sont la charpente, le linker, le ligand et la valence. Ainsi, par exemple, CD7DNJC9 désignera le produit **185**, correspondant à la cyclodextrine heptavalente portant le ligand DNJ avec un linker de 9 carbones. CD14downDNJC6 désignera le produit **192**, correspondant à la cyclodextrine tétradécavalente portant les ligands sur la face secondaire en série DNJ avec le linker à 6 carbones...

Après une introduction sur l'inhibition enzymatique, nous décrirons dans ce chapitre les résultats obtenus pour l'inhibition de glycosidases en général, puis, plus spécifiquement, les résultats biologiques obtenus pour les chaperons pharmacologiques potentiels mono- et multivalents pour la maladie de Gaucher et la mucoviscidose.

3.1. L'inhibition enzymatique

Dans ce paragraphe nous rappellerons quelques définitions liées à l'inhibition enzymatique. C'est sur ces notions que reposent une partie des tests biologiques réalisés sur nos composés.

Michaelis et Menten ont défini des équations permettant de décrire les réactions enzymatiques avec les différents paramètres : E représente l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme substrat et P le produit.



$$v = k_{cat} \times [ES] = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

avec $K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}}$ où K_m est appelée constante de Michaelis

Équation 1. Equation décrivant la cinétique d'une réaction enzymatique.

De façon générale, les inhibiteurs d'enzymes ralentissent les réactions enzymatiques.²⁷⁵

Ils modifient la cinétique de ces réactions de différentes manières et dans chaque cas on peut écrire une nouvelle équation de la vitesse de la réaction.²⁷⁶ Couramment, on utilise deux paramètres pour décrire l'inhibition d'une enzyme par un inhibiteur : l'IC₅₀ et le K_i.²⁷⁷

²⁷⁵ C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Volume 12, Oxford, Elsevier Science Ltd., **1994**.

Le K_i est la constante de dissociation du complexe enzyme/inhibiteur. Elle correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour occuper 50% des sites de l'enzyme à l'équilibre. Cette constante est déterminée en faisant varier indépendamment la concentration en substrat et la concentration en inhibiteur. L' IC_{50} est la concentration en inhibiteur nécessaire pour diviser l'activité ou la vitesse de la réaction par 2. L' IC_{50} est donné dans des conditions spécifiques et pour une concentration en substrat donnée.

L' IC_{50} et le K_i ne sont pas donc pas liés par une simple relation linéaire mais évoluent de façon similaire. Leur relation dépend du mode d'inhibition.

On distingue couramment trois types d'inhibiteurs réversibles, les inhibiteurs compétitifs, les inhibiteurs non compétitifs et les inhibiteurs incompétitifs. Ils existent également des modes d'inhibition mixtes.

Pour connaître le type d'inhibition mis en jeu, on peut tracer un graphique avec les courbes de Lineweaver-Burk qui sont caractéristiques de l'inhibition. Il s'agit de tracer $1/v$ en fonction de $1/[S]$ pour différentes concentrations en inhibiteur $[I]$, où v est la vitesse de la réaction et $[S]$ la concentration en substrat. C'est par cette méthode que l'on peut également déterminer le K_i .

- L'inhibition compétitive

L'inhibition est compétitive si l'inhibiteur se lie réversiblement à l'enzyme et empêche le substrat d'accéder au site actif. Les équilibres en jeu sont les suivants :

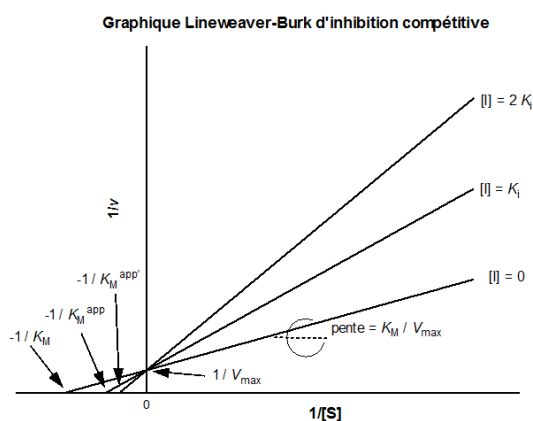
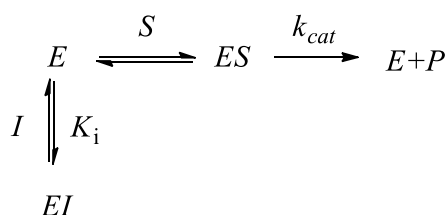


Figure 67. Graphique de Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive.

²⁷⁶ a) A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, London, Protland Press Ltd. **2004**. b) I. H. Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, New York, Wiley, **1975**.

²⁷⁷ B. T. Burlingham, T. S. Widlanski, *J. Chem. Ed.* **2003**, *80*, 214-218.

Dans le cas de l'inhibition compétitive les courbes de Lineweaver Burk se coupent sur l'axe des ordonnées en $1/v_{max}$. La v_{max} ne varie pas en fonction de la concentration en inhibiteur.

- L'inhibition incompétitive

Ce mode d'inhibition décrit un inhibiteur qui se lie réversiblement uniquement au complexe enzyme substrat et non à l'enzyme seule.

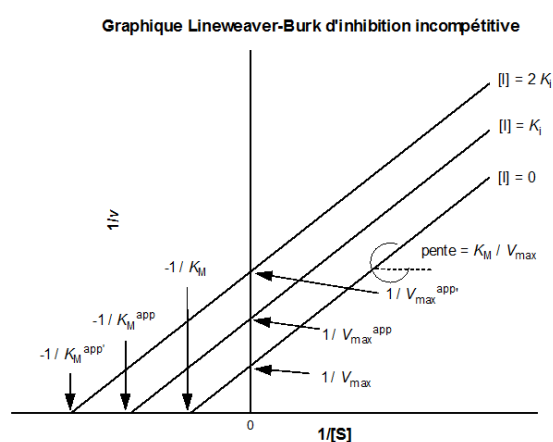
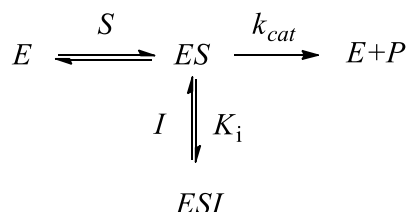
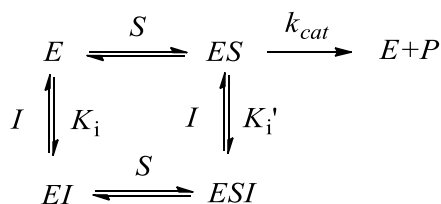


Figure 68. Graphique de Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive.

Cette fois-ci le K_m et la v_{max} varient en fonction de la concentration en inhibiteur (Figure 68) et les droites du graphique de Lineweaver Burk sont parallèles.

- L'inhibition non compétitive ou inhibition mixte

Lors d'une inhibition non compétitive, l'inhibiteur peut se lier à l'enzyme et au complexe enzyme/substrat. L'inhibiteur non compétitif n'a pas d'effet sur la formation du complexe enzyme/substrat. Son principal effet est de réduire la v_{max} . Ce mode d'inhibition est en quelque sorte une combinaison des deux inhibitions précédentes et on a deux types de graphiques de Lineweaver Burk en fonction de la « force » relative de ces deux inhibitions.



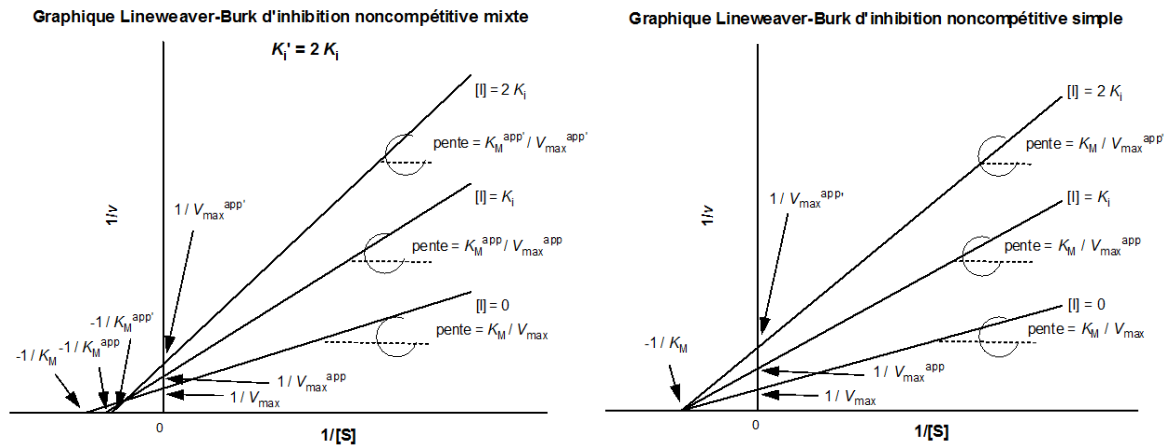


Figure 69. Schéma et graphiques de Lineweaver-Burk pour une inhibition non compétitive.

Les courbes se coupent soit sur l'axe des abscisses soit légèrement en décalé, on dit que l'inhibition est non compétitive mixte et non compétitive simple respectivement. Dans le cas de l'inhibition non compétitive simple, $K_i = K_i'$, l'inhibiteur a autant d'affinité pour le complexe enzyme substrat que pour l'enzyme seule.

3.2. La multivalence pour l'inhibition de glycosidases

Les composés en série DNJ mono- et multivalents ont été testés au laboratoire du Pr. Ortiz Mellet à Séville sur un panel de 11 glycosidases commerciales. Dans un premier temps, ces tests, sur des glycosidases qui n'ont pas d'intérêt thérapeutique, nous ont permis de montrer les premiers effets de la multivalence sur l'inhibition de glycosidases.

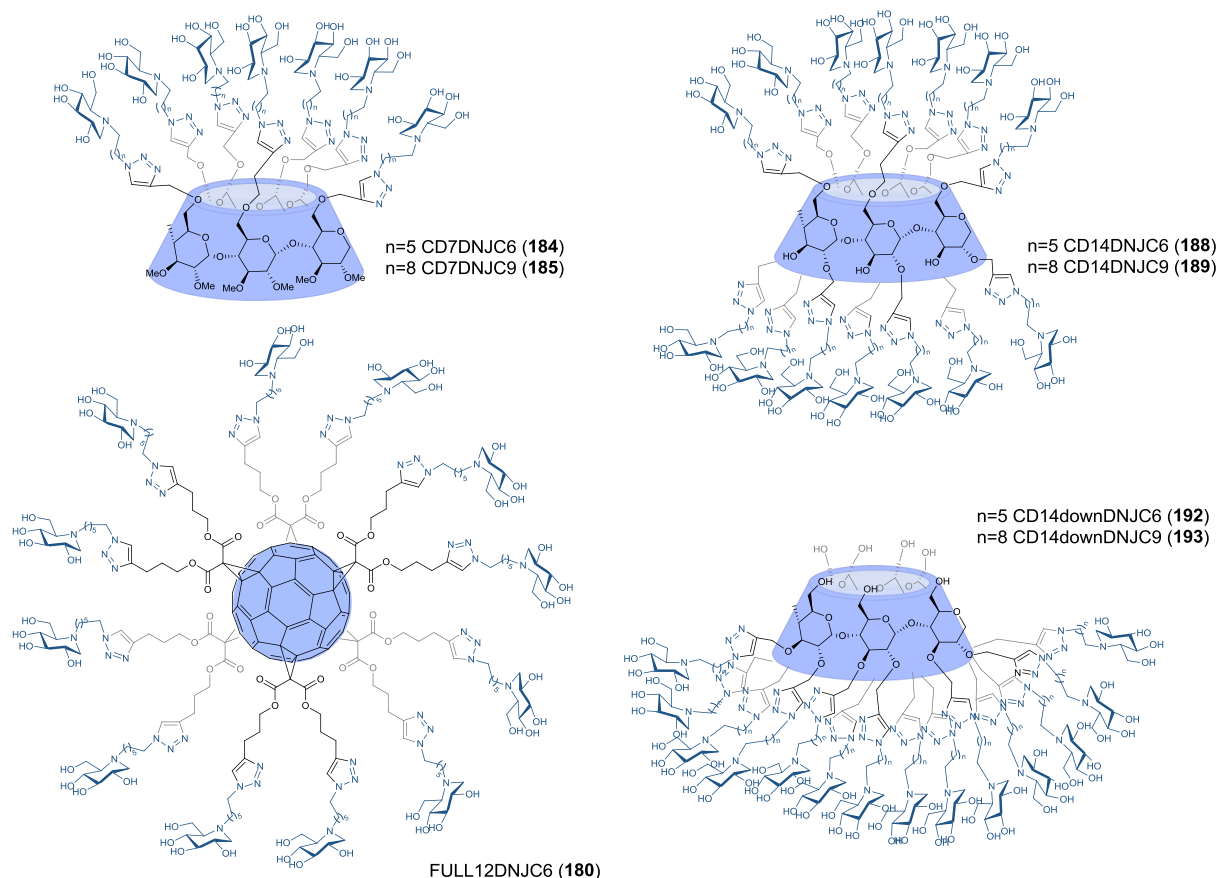


Figure 70. Les 7 produits multivalents en série *N*-alkyl-DNJ.

Les 7 composés testés sont ceux en série *N*-akyl-DNJ, un inhibiteur peu sélectif des glycosidases. Les références monovalentes ont également été testées ainsi que les deux « modèle hexanol » monovalent et heptavalent basé sur une charpente cyclodextrine.

- Références monovalentes et modèles

Dans un premier temps, nous avons pu comparer entre elles les références monovalentes (Figure 71). Nous voulions voir notamment l'influence de la partie la plus éloignée de l'iminosucre comprenant le groupement triazole et la petite chaîne propyle ou acétoxypropyle sur l'inhibition.

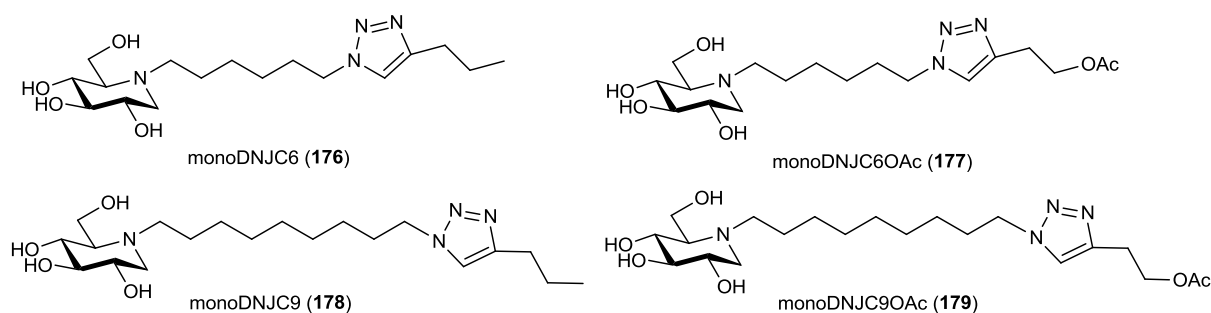


Figure 71. Références monovalentes en série DNJ

La fonction acétoxy a été ajoutée sur les deux références monovalente pour mimer les fonctions esters de l'hexa-adduit C₆₀, qui, bien que relativement éloignées des iminosucres pouvaient avoir une influence sur l'inhibition.

On remarque dans le Tableau 14 que les différences entre les références monovalentes possédant la même longueur de chaîne alkyle mais un groupement terminal différent ne sont pas significatives et ceci de façon encore plus marquée pour le plus long linker (9 carbones).

Enzyme	monoDNJC6	monoDNJC6OAc	monoDNJC9	monoDNJC9OAc	monohexanol	CD7hexanol
β-galactosidase						
foie de bovin	262	138	23	36	NI ^b	60
α-galactosidase						
café vert	NI ^b	207	544	351	NI ^b	NI ^b
β-glucosidase						
amandes pH = 7,3	11	15	11	15	NI ^b	NI ^b
amandes pH = 5,5	-- ^a	38	36	45	NI ^b	NI ^b
α-glucosidase						
amyloglucosidase						
(<i>Asp. Niger</i>)	0,71	2,8	1,7	1,7	NI ^b	NI ^b
levure de boulangier	152	395	116	192	NI ^b	NI ^b
isomaltase (levure de boulangier)	943	NI	154	370	NI ^b	NI ^b
Trehalase						
rein de porc	-- ^a	1,9	0,4	0,4	NI ^b	NI ^b
Naringinase						
<i>Penicillium decumbens</i>	9,1	13,8	2,3	1,3	NI ^b	NI ^b
β-mannosidase						
<i>Helix pomatia</i>	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b
α-mannosidase						
Jack bean	322	533	188	204	NI ^b	NI ^b

^a-- : non testé, ^bNI : non inhibiteur à 2 mM

Tableau 14. Tableau d'inhibition des références monovalentes ainsi que du modèle CD7hexanol.

Les différences d'inhibition entre monoDNJC6 et monoDNJC6OAc n'excèdent par un facteur 2,6 pour toutes les glycosidases sauf deux, l'α-galactosidase de café vert et l'amyloglucosidase. Pour

l' α -galactosidase de café vert, le dérivé monoDNJC6 n'est pas inhibiteur à une concentration inférieure de 2 mM tandis que son analogue acétoxy montre un K_i de 207 μ M. Pour l' α -glucosidase amyloglucosidase on remarque également une différence d'un facteur 3,8 entre les deux composés le monoDNJC6 étant le meilleur inhibiteur. Pour les dérivés monoDNJC9 et monoDNJC9OAc les différences d'inhibition sont au plus d'un facteur 1,3.

On peut déduire de ces résultats que le groupement terminal acétoxy n'a quasiment pas d'influence sur l'inhibition.

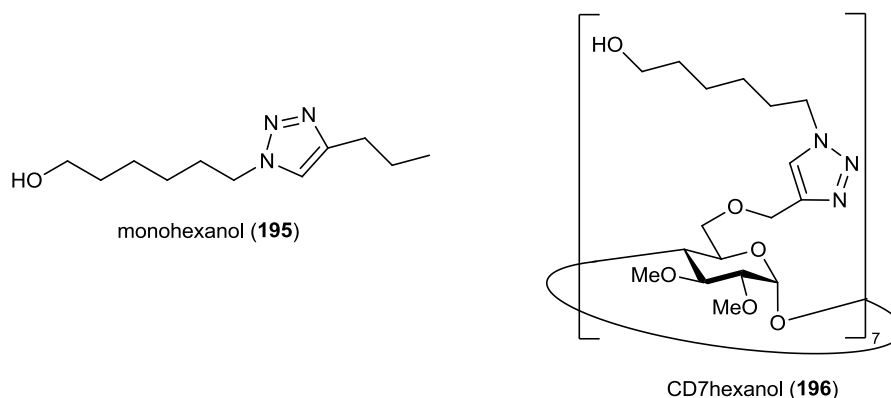


Figure 72. Composés modèles en série hexanol.

En ce qui concerne les composés modèles (Figure 72), on observe dans l'ensemble qu'ils ne sont pas inhibiteurs des glycosidases testées. De façon surprenante, le composé CD7heptanol s'est révélé toutefois inhibiteur de la β -galactosidase de foie de bovin. Ce résultat isolé pourrait être dû à une affinité particulière de ce composé avec un site secondaire de cette glycosidase mais, n'ayant pas d'autres données, il n'est pas possible de conclure pour le moment. Nous verrons par la suite qu'aucun des systèmes multivalents testés en série DNJ n'a une inhibition inférieure au μ M pour cette β -galactosidase pour laquelle on attend une plus grande affinité pour des ligands en série *D-galacto* (Tableaux 15 et 17).

Les résultats globaux montrent néanmoins que la fonction triazole et la charpente cyclodextrine ne sont pas responsables de l'inhibition observée pour nos composés iminosucres mono- et multivalents.

- Composés multivalents

Linker à 6 carbones

L'ensemble des valeurs de K_i de tous les composés avec le linker à 6 carbones en série *N*-alkyl-DNJ est présenté dans le Tableau 15. Les inhibitions vont de la centaine de nM à la centaine de μ M.

Enzyme	monoDNJC6	FULL12DNJC6	CD7DNJC6	CD14DNJC6	CD14downDNJC6
β-galactosidase					
foie de bovin	262	34	139	25	23
α-galactosidase					
café vert	NI ^b	207	33	28	26
β-glucosidase					
amandes pH = 7,3	11	95	162	111	113
amandes pH = 5,5	-- ^a	-- ^a	305	80	NI ^b
α-glucosidase					
amyloglucosidase (<i>Asp. Niger</i>)	0,71	0,69	0,52	0,2	0,26
levure de boulanger isomaltase	152	18	760	270	NI ^b
(levure de boulanger)	943	10,5	256	63	NI ^b
Trehalase					
rein de porc	-- ^a	-- ^a	14	20	-- ^a
Naringinase					
<i>Penicillium decumbens</i>	9,1	0,41	8,7	5,2	14
β-mannosidase					
<i>Helix pomatia</i>	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b
α-mannosidase					
Jack bean	322	0,15	7,7	0,5	0,67

^a -- non testé, ^b NI : non inhibiteur à 2 mM

Tableau 15. Valeurs des K_i des composés possédant le linker à 6 carbones (μ M)

Les composés ont tous montré des inhibitions compétitives sauf le produit heptavalent qui a montré une inhibition non compétitive mixte. Ceci nous conduit à penser que les inhibitions de ces produits multivalents sont dues à des mécanismes plus complexes que de simples interactions avec le site actif de l'enzyme. La face secondaire de la cyclodextrine heptavalente étant dégagée, il est possible que des résidus d'acides aminés hydrophobes de l'enzyme rentrent dans la cavité de la cyclodextrine en créant des interactions additionnelles non spécifiques. Ce type d'inhibition a également été observé pour le composé heptavalent portant le linker à 9 carbones donc le K_i est présenté tableau 16.

L'influence de la multivalence sur l'inhibition est plus facilement mise en évidence dans le tableau 16 qui regroupe les inhibitions relatives des composés par rapport à la référence monovalente monoDNJC6. Ceci permet de visualiser directement l'impact de la multivalence sur l'inhibition.

Inhibition relative ^a	FULL12DNJC6	CD7DNJC6	CD14DNJC6	CD14downDNJC6
β-galactosidase				
foie de bovin	7,7	1,9	10,5	11,4
α-galactosidase				
café vert	>9,7	>60,6	>71,4	>76,9
β-glucosidase				
amandes pH = 7,3	< ^b	< ^b	< ^b	< ^b
α-glucosidase				
amyloglucosidase (<i>Asp. Niger</i>)	= ^c	1,4	3,6	2,7
levure de boulanger isomaltase (levure de boulanger)	8,4	< ^b	< ^b	< ^b
89,8	3,7	15	< ^b	
Naringinase				
<i>Penicillium decumbens</i>	22,2	= ^c	1,8	< ^b
α-mannosidase				
Jack bean	2146,7	41,8	644	480

^a inhibition relative des dérivés multivalents indiqués par rapport au modèle monovalent monoDNJC6, ^b < : perte dans l'inhibition, ^c = inhibition similaire

Tableau 16. Comparaison des inhibitions multivalents/monovalentes

Plusieurs tendances se dégagent du tableau 16. Nous pouvons constater que pour la β -glucosidase d'amandes et pour l' α -glucosidase de levure de boulanger nous avons une perte d'inhibition des composés multivalents par rapport au dérivé monovalent. Dans ces deux cas, la multivalence a un effet défavorable sur l'inhibition avec une perte d'inhibition pouvant aller jusqu'à un facteur 14 pour le dérivé heptavalent par rapport à l'analogue monovalent. Pour l'amyloglucosidase et pour la naringinase les résultats sont contrastés et on observe soit de faibles gains d'inhibition soit des inhibitions comparables soit de faibles pertes d'inhibition. On peut dire que pour ces deux glycosidases l'effet de la multivalence est presque nul. Pour les autres glycosidases, on constate des gains dans l'inhibition pour presque tous les composés multivalents. L'effet est particulièrement marqué pour deux glycosidases, l' α -galactosidase de café vert et l' α -mannosidase de Jack bean. Dans ces deux cas, la multivalence a eu pour effet de transformer de faibles inhibiteurs en série D-*gluco* d'une galactosidase et d'une mannosidase en d'excellents inhibiteurs de ces enzymes. Ceci est particulièrement marqué pour le fullerène dodécavalent avec un gain d'inhibition de l' α -mannosidase d'un facteur 2147. Les effets sur l'inhibition de cette enzyme en particulier sont détaillés Tableau 19.

La cyclodextrine tétradécavalente fonctionnalisée sur la face secondaire semble plus sélective que son analogue fonctionnalisée sur la face primaire et secondaire avec une perte de l'inhibition pour l'isomaltase et la naringinase.

Linker à 9 carbones

Les mêmes tests ont été effectués avec les produits multivalents en série DNJ avec le linker à 9 carbones. La référence monovalente est le dérivé monoDNJC9. Les K_i sont globalement du même ordre de grandeur que dans le cas du linker à 6 carbones avec en général un gain du pouvoir inhibiteur pouvant aller jusqu'à un facteur 37 (Naringinase, CD7DNJC9 et CD14DNJC9) (Tableau 17).

Enzyme	monoDNJC9	CD7DNJC9	CD14DNJC9	CD14downDNJC9
β-galactosidase				
foie de bovin	23	35	4	27
α-galactosidase				
café vert	150	6,1	9	16
β-glucosidase				
amandes pH = 7,3	11	108	10	57
amandes pH = 5,5	36	133	12	NI ^b
α-glucosidase				
amyloglucosidase (<i>Asp. Niger</i>)	1,7	1,2	0,1	0,2
levure de boulanger isomaltase	116	234	62	NI ^b
(levure de boulanger)	154	74	18	NI ^b
Trehalase				
rein de porc	0,4	6,5	6,9	-- ^a
Naringinase				
<i>Penicillium decumbens</i>	2,3	0,23	0,14	0,56
β-mannosidase				
<i>Helix pomatia</i>	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b
α-mannosidase				
Jack bean	188	0,36	0,022	0,068

^a -- : non testé, ^b NI : non inhibiteur à 2 mM

Tableau 17. Valeurs des K_i des composés possédant le linker à 9 carbones (μ M)

De façon similaire, nous avons calculé les inhibitions relatives de ces composés par rapport à la référence monovalente (Tableau 18).

Les chiffres montrent les mêmes tendances générales pour les différentes glycosidases testées : une diminution de l'inhibition des composés multivalents par rapport à la référence monovalente pour les β -glucosidases, l' α -glucosidase de levure de boulanger et la trehalase et des augmentations significatives pour l' α -galactosidase de café vert et l' α -mannosidase de Jack Bean. Toutefois, le composé tétradécavalent substitué sur la face secondaire de la cyclodextrine, se démarque des autres composés multivalents comme pour la série avec le linker à 6 carbones avec des pertes d'inhibition importantes par rapport au dérivé monovalent pour la β -glucosidase d'amandes (pH = 5,5), et pour les deux α -glucosidases de levure de boulanger.

Inhibition relative	CD7DNJC9	CD14DNJC9	CD14downDNJC9
β-galactosidase			
foie de bovin	< ^b	5,8	= ^c
α-galactosidase			
café vert	24,6	16,7	9,4
β-glucosidase			
amandes pH = 7,3	< ^b	= ^c	< ^b
amandes pH = 5,5	< ^b	3	< ^b
α-glucosidase			
amyloglucosidase (<i>Asp. Niger</i>)	1,4	17	8,5
levure de boulanger isomaltase (levure de boulanger)	< ^b	1,8	< ^a
	2,1	8,6	< ^a
Trehalase			
rein de porc	< ^b	< ^b	-- ^d
Naringinase			
<i>Penicillium decumbens</i>	10	16,4	4,1
α-mannosidase			
Jack bean	522,2	8545,5	2764,7

^a inhibition relative des composés multivalents indiqués par rapport au modèle monovalent monoDNJC9, ^b < : perte dans l'inhibition, ^c = : inhibition similaire, ^d -- : non testé

Tableau 18. Comparaison des inhibitions multivalents/monovalentes

A partir des résultats obtenus en série DNJ, nous pouvons déjà tirer une conclusion générale : la multivalence permet de gagner en **sélectivité**. Comme nous l'avons vu, l'activité inhibitrice est modulée selon les enzymes avec des gains ou des pertes d'inhibition. Les tendances sont à peu près les mêmes indépendamment de la charpente, de la longueur du linker et de la valence. Le gain en sélectivité est cependant accentué pour la cyclodextrine tétradécavalente substituée sur la face secondaire.

Le cas de l' α -mannosidase de Jack Bean

L'effet multivalent le plus spectaculaire a été obtenu pour une α -mannosidase, l' α -mannosidase de Jack Bean. Le Tableau 19 permet de mettre en évidence les différents paramètres structuraux clés impliqués dans cet effet multivalent.

- On remarque qu'en moyenne, augmenter la longueur du linker de 3 carbones sur une même charpente permet d'augmenter l'inhibition relative d'un facteur 10.
- L'orientation et la densité des ligands semblent avoir également un rôle dans l'inhibition car la cyclodextrine tétradécavalente fonctionnalisée sur la face secondaire montre des gains d'inhibitions moins bons que son analogue fonctionnalisée sur les deux faces de la cyclodextrine.

- On observe également que, globalement, passer de la charpente heptavalente à la charpente tétradécavalente fonctionnalisée sur les deux faces, c'est-à-dire doubler la valence, permet d'augmenter en moyenne l'inhibition relative d'un facteur 10.
- La charpente fullerène permet d'obtenir un fort gain d'inhibition de trois ordres de grandeur pour le composé avec le linker à 6 carbones par rapport à son analogue monovalent. On s'attend donc peut être à des résultats encore meilleur en augmentant la longueur du linker de ce composé si la tendance est la même que pour la cyclodextrine. (travaux en cours).

L'augmentation de l'affinité va jusqu'à un facteur d'environ 9000 pour le dérivé tétradécavalent de la cyclodextrine fonctionnalisée sur les deux faces avec le linker à 9 carbones. On peut donc gagner jusqu'à près de 4 ordres de grandeur dans l'inhibition soit un facteur de plus de 600 par unité DNJ !

Composé	K_i (μM) α -mannosidase	Inhibition relative	Inhibition relative/unitéDNJ
monoDNJC6	322	-	-
monoDNJC9	188	-	-
CD7DNJC6	7,7	42	6
CD7DNJC9	0,36	522	75
FULL12DNJC6	0,15	2147	179
CD14DNJC6	0,5	644	46
CD14DNJC9	0,022	8546	610
CD14downDNJC6	0,67	480	34
CD14downDNJC9	0,068	2765	198

Tableau 19. Effet multivalent sur l' α -mannosidase de Jack bean.

Comme nous pouvons donc le voir avec l'exemple de cette glycosidase, **la longueur du linker, la valence, la présentation des ligands et la charpente** sont quatre paramètres fondamentaux pour la conception des systèmes multivalents.

Ligand en série DMJ

Au vu des résultats obtenus pour l'inhibition de l' α -mannosidase de Jack bean, nous avons souhaité tester un inhibiteur plus spécifique de cette enzyme en série *D-manno*, un dérivé *N*-alkylé de la DMJ. Dans un premier temps, nous avons testé le composé **224**, CD7DMJC6 ainsi que son analogue monovalent **222** (Tableau 20).

Comme nous nous y attendions, le changement du ligand par un ligand plus spécifique, un dérivé en série DMJ, a conduit à des meilleurs inhibiteurs mais a aussi pour effet d'augmenter sensiblement l'effet multivalent d'un facteur 6 si on considère les valeurs d'inhibition relatives.

Composé	K_i (μM) α -mannosidase	Inhibition relative	Inhibition relative/iminosucre
monoDNJC6	322	-	-
CD7DNJC6	7,7	42	6
monoDMJC6	118	-	-
CD7DMJC6	0,49	241	34

Tableau 20. Résultats de la série DMJ sur l'inhibition de l' α -mannosidase de Jack bean

Ceci augure d'excellent résultats pour les produits en série DMJ en cours de synthèse, dans lesquels la valence et la longueur du linker sont augmentées (CD7DMJC9 et CD14DMJC9).

En conclusion, notre étude a mis en évidence les premiers exemples d'un effet multivalent puissant sur l'inhibition de glycosidases. Nous avons pu voir que la multivalence permet de gagner en affinité mais également en sélectivité. Le changement de paramètres clés comme la valence, le linker, la charpente et la présentation des ligands nous ont permis d'obtenir des gains d'inhibitions jusqu'à près de quatre ordres de grandeurs pour une glycosidase : l' α -mannosidase de Jack bean.

Ces résultats doivent encore être rationalisés et des expériences d'ITC²⁷⁸ (Isothermal Titration Calorimetry) sont actuellement en cours. Les résultats préliminaires obtenus par l'équipe d'Ortiz Mellet sur le dérivé CD7DNJC9 ont montré une constante de dissociation similaire au K_i obtenu par les courbes de Lineweaver Burk ($K_D = 0,33 \mu\text{M}$ et $K_i = 0,36 \mu\text{M}$). Par ailleurs, le rapport stœchiométrique entre l' α -mannosidase et le ligand multivalent est de un, ce qui implique qu'une seule protéine se lie au ligand. Les paramètres thermodynamiques indiquent que le processus de fixation est majoritairement gouverné par un gain enthalpique ($\Delta H = -41,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $-T\Delta S = 4,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

²⁷⁸ Pour une revue sur les mesures ITC dans les interactions sucre-lectine, voir : T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-430.

3.3. Maladie de Gaucher

3.3.1. Chaperons monovalents

L'équipe du Pr. Delgado a réalisé une étude de « screening *in situ* de la partie aglycone » sur notre motif iminoxylitol **66** par la même méthode que celle utilisée précédemment sur son motif aminocyclitol (Figure 73).¹³⁷ Les tests biologiques sont encore en cours et nous décrivons dans ce paragraphe les résultats préliminaires obtenus.

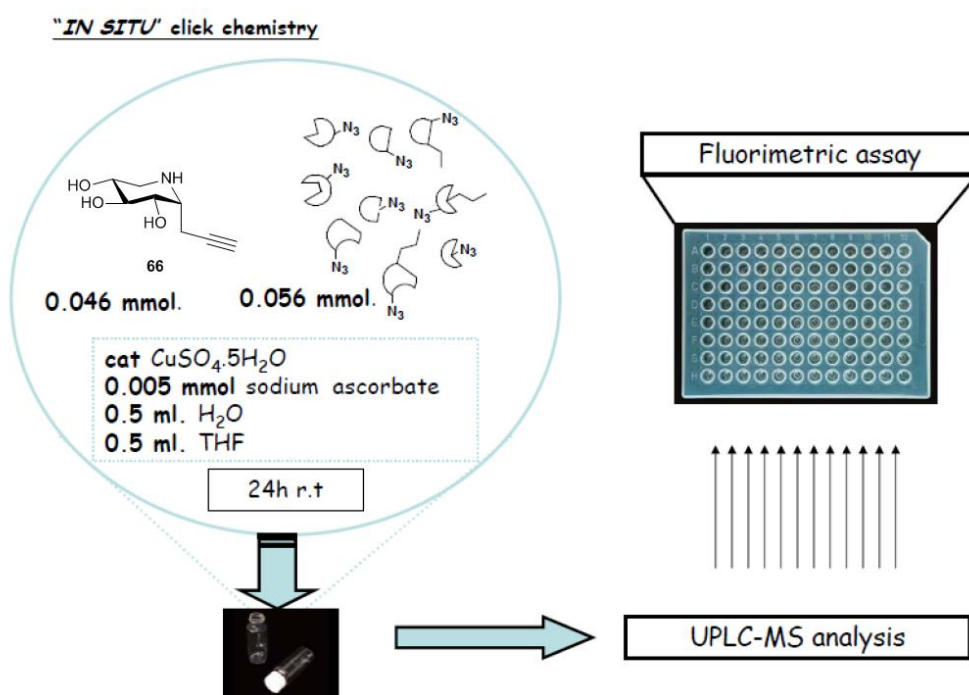


Figure 73. Représentation schématique de la méthode de screening *in situ*

L'équipe du Pr. Delgado a pu synthétiser en parallèle 19 composés par CuAAC. Les réactions étant réalisées dans l'eau, les mesures des IC₅₀ peuvent se faire directement sur le milieu réactionnel après caractérisation des produits par UPLC-MS. Delgado *et al.* ont vérifié préalablement que les réactifs de la réaction de CuAAC n'avaient pas d'influence notable sur les valeurs des IC₅₀.¹³⁷

Les IC_{50} de ces composés « bruts » ont été mesurés pour l'imiglucérase, analogue recombiné de la β -glucosérosidase humaine. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 21.

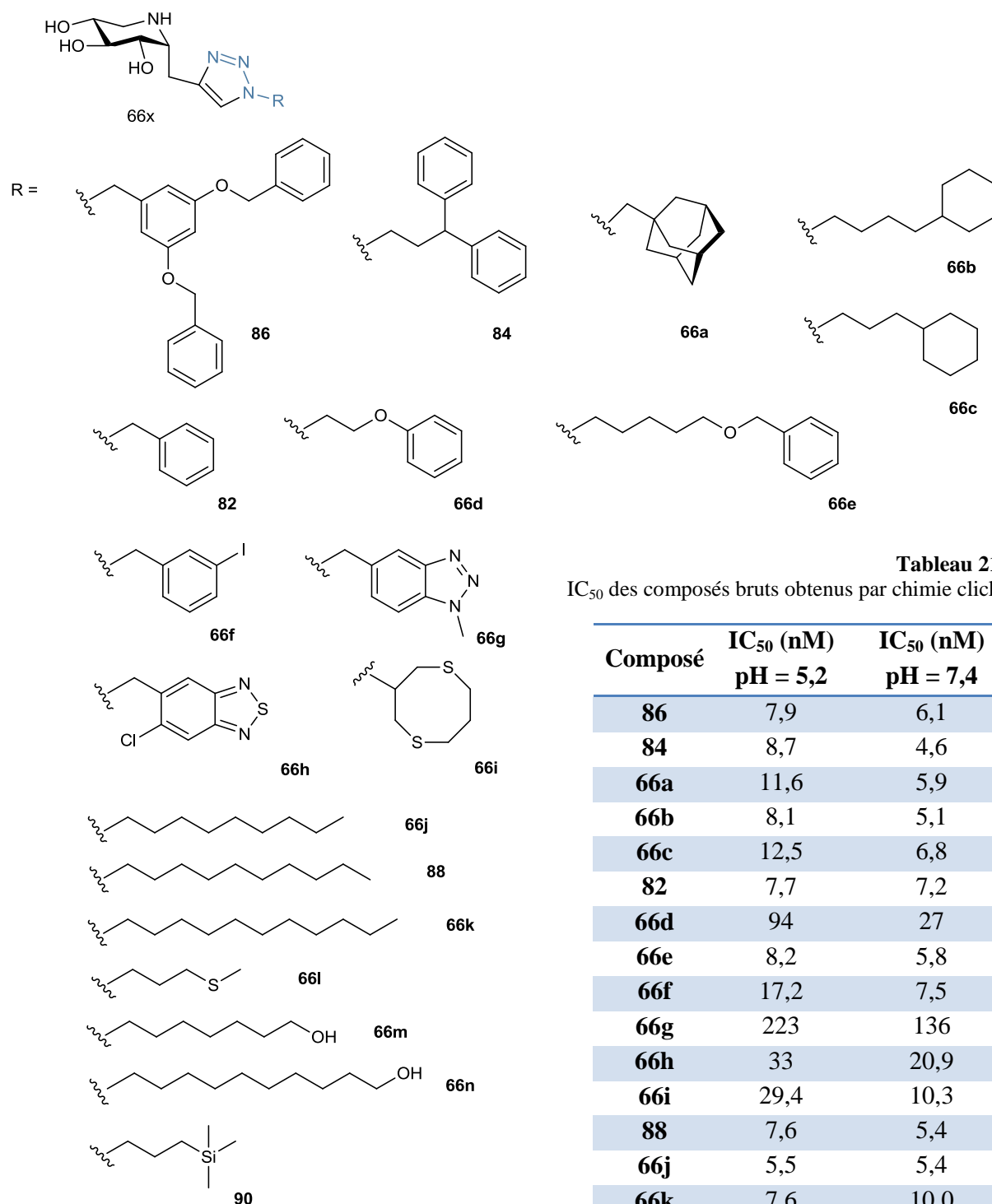


Tableau 21.
 IC_{50} des composés bruts obtenus par chimie click.

Composé	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
	pH = 5,2	pH = 7,4
86	7,9	6,1
84	8,7	4,6
66a	11,6	5,9
66b	8,1	5,1
66c	12,5	6,8
82	7,7	7,2
66d	94	27
66e	8,2	5,8
66f	17,2	7,5
66g	223	136
66h	33	20,9
66i	29,4	10,3
88	7,6	5,4
66j	5,5	5,4
66k	7,6	10,0
66l	112	50,5
66m	83	44,5
66n	18,9	12,1
90	7,8	6,4

Figure 74. Composés synthétisés et caractérisés par UPLC-MS.

Comme nous le constatons, les inhibitions pour la série iminoxylitol vont de 5,5 à 223 nM tandis que celle en série aminocyclitol allaient de 60 nM à 130 μ M.

En général, nous remarquons que l'IC₅₀ au pH de 7,4 est inférieur à celui au pH de 5,2. Ceci est positif car un bon chaperon doit avoir une plus grande affinité avec l'enzyme dans le RE où le pH est neutre. Dans le lysosome, où le pH est plus acide (~5-6),²⁷⁹ le chaperon doit être moins affiné pour l'enzyme pour que le substrat, en excès, puisse plus facilement le remplacer dans le site actif.

Les tendances générales observées sur l'inhibition sont les suivantes :

Les meilleurs composés sont ceux possédant en partie aglycone lipophile :

- des groupements phényles (excepté **66d**)
- de longues chaînes grasses
- le groupement silylé (**90**)
- le groupement adamantyle

De la même façon, les paramètres qui semblent baisser le pouvoir inhibiteur sont :

- la présence d'hétéroatomes (S,O)
- la fonction hydroxyle terminale des chaînes
- les hétéroaromatiques

Nous voyons donc clairement que la lipophilie de la partie aglycone est un paramètre important pour l'inhibition. Au vu de ces premiers résultats « bruts », nous avons pu sélectionner 5 composés (**82**, **86**, **84**, **88**, **90**) que nous avons synthétisés et purifiés de manière classique (§1.2.4) pour pouvoir réaliser des tests biologiques plus poussés. La sélection s'est faite sur la base du pouvoir inhibiteur, mais aussi sur la capacité des analogues correspondants en série aminocyclitol à être de bons chaperons.¹³⁷

Les IC₅₀ de ces cinq composés « purs » ont été mesurés afin de valider la méthode de screening *in situ*. En dehors du composé **82** où on observe un petit écart, les IC₅₀ des composés purs ont des valeurs très proches des IC₅₀ des composés bruts.

Composé	86	84	88	82	90
IC ₅₀ pH = 5,2 pur	4,7	10,1	5,1	25,7	6,4
IC ₅₀ pH = 5,2 brut	7,9	8,7	7,6	7,7	7,8

Tableau 22. IC₅₀ des composés sélectionnés purs.

L'équipe de Withers a publié un article au cours de notre projet avec une étude similaire réalisée sur le même motif en série α -1-C-imino-D-xylitol en utilisant la réaction de chimie click thiol-ène.¹⁴⁶ Les mêmes tendances générales sont observées sur leur série de composés. Les auteurs remarquent que les produits les plus lipophiles ont les valeurs de constantes d'inhibition les plus basses (jusqu'à un K_i de 0,4 nM pour l'enzyme mutée N370S pour un composé possédant une

²⁷⁹ a) C. Butor, G. Griffiths, N. N. Aronson, A. Varki, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2213-2219; b) D.-J. Reijngoud, J. M. Tager *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *472*, 419-449.

chaîne de 8 carbones). Leurs composés les moins lipophiles (présence de groupement amide ou urées ou petites chaînes alkyles) possèdent des constantes d'inhibition supérieures de l'ordre de la centaine de nM.

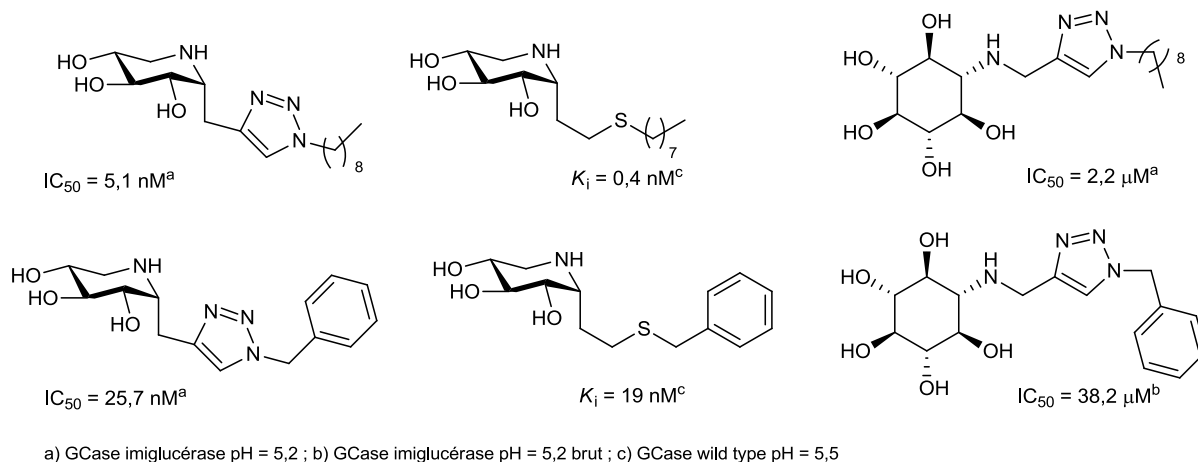


Figure 75. Comparaison de composés dans les trois séries, iminoxylitol par réaction CuAAC, iminoxylitol par réaction thiol-ène, aminocyclitol.

Sur la Figure 75 sont présentés deux composés similaires dans les 3 séries. Les inhibitions pour les deux séries iminoxylitols sont équivalentes tandis que pour la série aminocyclitol, elles sont de l'ordre du μM .

Les premières études chaperons ont pu être menées avec nos meilleurs inhibiteurs (composés **82**, **86**, **84**, **88**, **90** ainsi que **83**) sur des fibroblastes de patients portant différentes mutations. Nous présentons ici deux des mutations testées, la mutation la plus fréquente N370S/N370S ainsi que la mutation G202R/L444P. D'autres analyses sur d'autres mutations sont encore en cours.

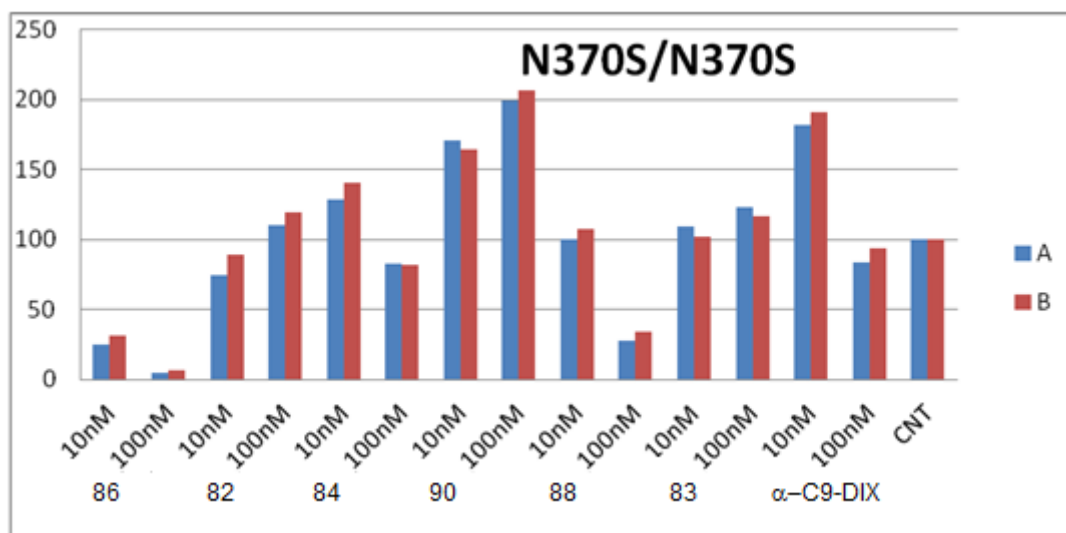


Figure 76. Activité normalisée de la GCCase mutée N370S/N370S après un traitement de 6 jours avec les différents composés à 10 et 100 nM. Les deux couleurs désignent deux lignes cellulaires. CNT= cellules non traitées.

Le graphique pour la mutation N370S nous montre l'activité normalisée de la GCCase après traitement pendant 6 jours avec les différents composés. Le composé **86** est inhibiteur aux deux concentrations testées. Le composé le plus intéressant semble être le composé **90** qui se révèle

chaperon de la GCase N370S en augmentant l'activité de l'enzyme de facteurs 1,6 et 2 aux concentrations respectives de 10 et 100 nM. La référence α -1-C-nonyl-imino-D-xylitol (α -C9-DIX) reste donc meilleure à la concentration de 10 nM mais le composé **90** est meilleur chaperon à 100 nM. Il serait toutefois intéressant de tester le composé **86** à des concentrations inférieures (de 0,1 à 1 nM). En effet, en général, un chaperon est chaperon pour une petite gamme de concentration avant d'être inhibiteur à plus haute concentration (Figure 76).

L'équipe de Withers a testé l'ensemble de ses composés sur des fibroblastes portant la mutation N370S et deux tendances se dégagent de leur étude.¹⁴⁶ Les composés les plus lipophiles, très bons inhibiteurs de la GCase se révèlent être de bons chaperons à de basses concentrations (augmentation d'un facteur environ 2 au nM) tandis que les composés les moins lipophiles, moins bons inhibiteurs de la GCase se révèlent être de meilleurs chaperons mais à des concentrations beaucoup plus élevées (augmentation d'un facteur 2,5 à 3,2 pour des concentrations du μ M à la centaine de μ M).

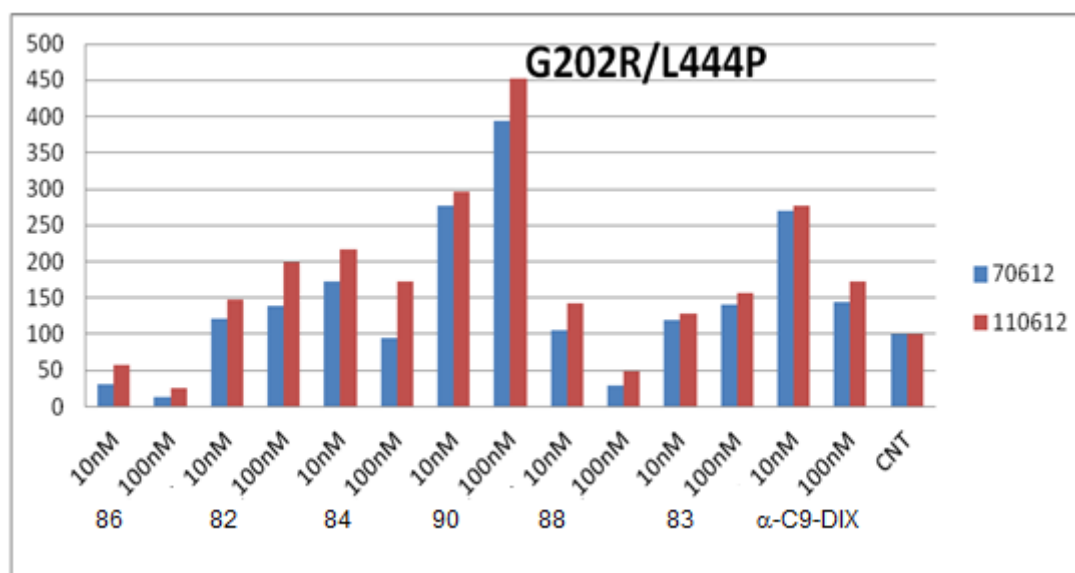


Figure 77. Activité normalisée de la GCase mutée G202R/L444P après un traitement de 6 jours avec les différents composés à 10 et 100 nM. Les deux couleurs désignent deux lignes cellulaires. CNT= cellules non traitées.

Pour la mutation G202R/L444P, les composés **82**, **84** et **83** montrent des activités chaperons moyennes avec des gains de facteur 1,2 à 2 pour les concentrations testées (10 et 100 nM). C'est encore le composé **90** qui se révèle être le meilleur chaperon avec un triplement de l'activité de l'enzyme mutée G202R/L444P à 10 nM et un quadruplement à 100 nM.

En conclusion, les premiers résultats de cette étude nous ont permis de confirmer l'importance d'une partie aglycone lipophile pour obtenir de bons inhibiteurs de la GCase. Cependant les composés portant les chaînes alkyles sont souvent cytotoxiques. Il est donc intéressant de chercher d'autres groupements pouvant apporter de la lipophilie sans être cytotoxiques. Nous avons ici montré que la lipophilie pouvait être amenée par exemple par des groupements phényles qui nous permettaient de conserver une bonne inhibition. Un composé portant une chaîne courte et un groupement triméthylsilyle s'est révélé particulièrement prometteur sur des tests cellulaires sur

des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher portant différentes mutations. Cette méthode d'évaluation *in situ* de composés permet en outre la mise en évidence très rapide des composés les plus prometteurs.

3.3.2. Chaperons multivalents

i) Série DNJ

Les premiers tests de multivalence pour la maladie de Gaucher ont été effectués par l'équipe du Pr. Asano au Japon.²⁸⁰ Nous avons tout d'abord testé quelques-uns des premiers produits synthétisés en série *N*-alkyl-DNJ. Les tests d'inhibition ont été réalisés sur l'enzyme GCase recombinée imiglucérase (Tableau 23).

Composé	IC ₅₀ GCase (imiglucérase) (nM)	IC ₅₀ α -glucosidase lysosomale (myozyme) (nM)
monoDNJC6	5900	300
monoDNJC9	1600	120
CD7DNJC6	120	110
CD7DNJC9	8	10
CD14DNJC6	13400	260
CD14DNJC9	96	13

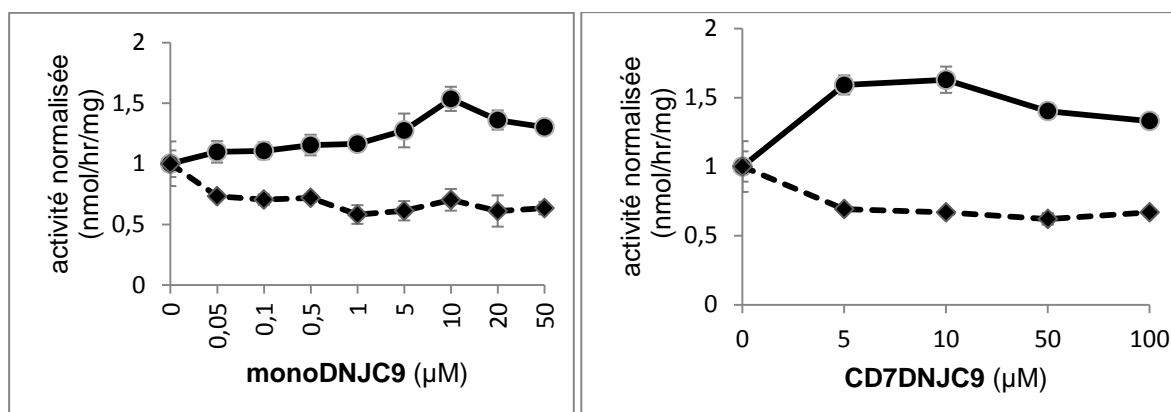
Tableau 23. Inhibition de la GCase et de l' α -glucosidase lysosomale par les composés mono- et multivalents en série DNJ.

Pour cette enzyme le composé heptavalent s'est révélé meilleur inhibiteur que le composé tétradécavalent. Le composé CD7DNJC9 a montré un résultat intéressant pour la multivalence avec la GCase avec un gain d'inhibition d'un facteur 200 par rapport à son analogue monovalent. Néanmoins, ce résultat très prometteur n'a pas été confirmé par des études actuellement réalisées sur nos composés dans le laboratoire de Dr. T. D. Butters, l'effet multivalent observé étant plutôt d'un facteur 10. Pour le composé CD14DNJC9 le gain d'inhibition par rapport à son analogue monovalent est d'un facteur 17. Le composé CD14DNJC6 s'est révélé moins bon inhibiteur que son analogue monovalent. Les composés ont aussi été testés vis-à-vis de l' α -glucosidase lysosomale. Ces systèmes mono- et multivalents basés sur un ligand DNJ étant généralement peu sélectifs, on a observé de façon non surprenante également une bonne inhibition de cette enzyme par tous les composés testés.

Pour les tests cellulaires, nous avons sélectionné le meilleur inhibiteur, CD7DNJC9 ainsi que son analogue monovalent, le monoDNJC9. Ces composés ont tous les deux montré des activités chaperons pour l'enzyme mutée N370S (Figure 78). Le composé monovalent a montré une augmentation de l'activité d'un facteur 1,6 à 10 μ M. L'iminosucre heptavalent augmente également l'activité de la GCase N370S d'un facteur 1,5 à 5 μ M et 10 μ M. En revanche, aucune

²⁸⁰ C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, K. Ikeda, N. Asano, P. Compain, *ChemBioChem*. **2012**, *13*, 661-664.

augmentation significative de l'activité de l'enzyme mutée L444P n'a été observée pour les deux composés.



Les fibroblastes ont été incubés 4 jours avec les produits aux différentes concentrations.

Figure 78. Activités normalisées de la GCCase mutée N370S -●- et de l'α-glucosidase lysosomale --◆-- en présence des composés monoDNJC9 et CD7DNJC9 à différentes concentrations

Même si la multivalence ne semble pas avoir d'influence significative sur l'effet chaperon observé, ces premiers résultats permettent d'attester que le composé heptavalent est capable d'accéder au RE et/ou au lysosome des fibroblastes. Ceci constitue également le premier exemple d'un chaperon multivalent.

ii) Série Iminoxylytol

A la suite de ces premiers résultats, nous avons voulu tester nos produits en série α-1-C-iminoxylytol conçus spécialement pour viser la GCCase. En effet, ce ligand est un bien meilleur inhibiteur de la GCCase (de l'ordre du nM) que la série DNJ. De plus, le dérivé α-1-C-nonyl-DIX a montré une bonne activité chaperon à une très basse concentration de 10 nM.¹¹⁶

J. de Sousa (étudiant master II du laboratoire) a réalisé avec l'équipe du Dr. Butters à Oxford des tests d'inhibition sur nos composés en série iminoxylytol. Le composé α-1-C-nonyl-DIX a été pris en référence et permet de valider ces premiers résultats biologiques.

Composé	α-1-C-nonyl-DIX	monoXYLC6	CD7XYLC6	CD14XYLC6
IC₅₀ (nM)				
GCCase wild type	2,2	107	ND	46

Tableau 24. IC₅₀ des composés en série iminoxylytol sur la GCCase wild type (ND : non déterminé).

Les résultats obtenus ne montrent pas d'effet réel de la multivalence sur l'inhibition de la GCCase pour nos composés multivalents avec ce ligand. On observe en effet un gain d'un facteur 2,3 pour le composé tétradécavalent ce qui n'est pas significatif (Tableau 24).

Les résultats préliminaires des tests cellulaires sont exposés Figure 79.

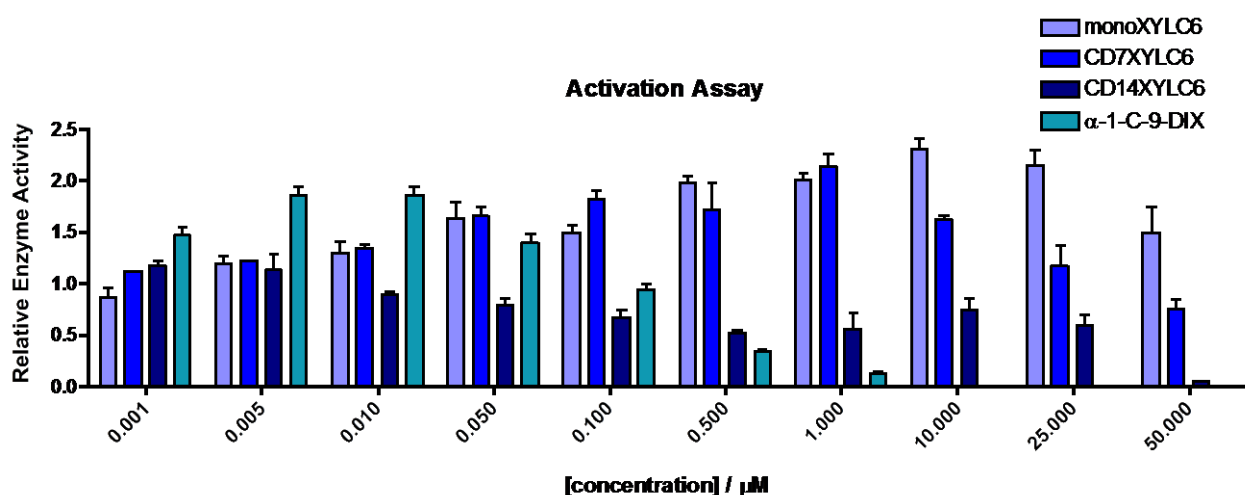


Figure 79. Activité enzymatique normalisée de la GCCase mutée N370S en présence de différentes concentrations des produits mono- et multivalents en série iminoxylitol.

Ce graphique présente les activités normalisées de la GCCase mutée N370S en présence des différents produits à plusieurs concentrations. On remarque qu'aux faibles concentrations la référence α -1-C-nonyl-imino-D-xylitol est meilleure que nos composés mono- et multivalents avec des augmentations d'un facteur 1,8 à 5 nM et 10 nM. A des concentrations plus élevées de l'ordre du μ M, le dérivé monovalent ainsi que le produit heptavalent permettent encore d'augmenter l'activité résiduelle de l'enzyme de près d'un facteur 2. En revanche le composé tétradécavalent est inhibiteur à partir de 10 nM.

Ces premiers résultats confirment la capacité de ces composés multivalents à passer, au moins en partie, les barrières cellulaires. Des tests sur des composés avec des valences inférieures et un linker plus long (en cours de synthèse au laboratoire) devraient nous permettre des conclusions plus affinées sur l'impact de la multivalence sur l'effet chaperon.

3.4. Mucoviscidose

En ce qui concerne l'étude biologique de nos composés pour un traitement possible de la mucoviscidose, les résultats des tests effectués au laboratoire du Pr. Becq à Poitiers sont encore en cours. Nous pouvons présenter ici les tous premiers résultats obtenus pour 3 systèmes multivalents en série DNJ.

Cette étude repose sur un résultat encourageant du laboratoire du Pr. Becq. Cette équipe a montré que le miglustat (*N*-Butyl-DNJ), un bon inhibiteur des glucosidases cellulaires, permettait de récupérer l'activité de la protéine mutante del508CFTR impliquée dans la maladie. Ce composé agirait en inhibant les glucosidases du RE ce qui aurait pour effet d'empêcher la protéine mutante d'être détruite par les mécanismes de contrôle qualité du RE. Avec nos composés multivalents présentant de multiples inhibiteurs de type *N*-alkyl-DNJ, nous espérons augmenter cet effet.

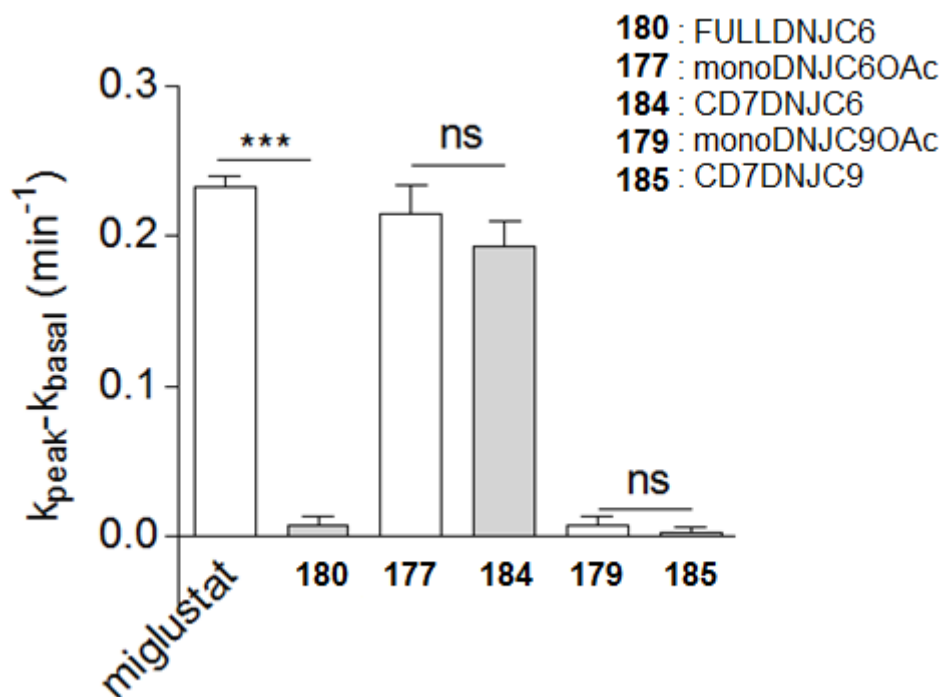


Figure 80. Influence des différents composés sur l'activité de la protéine mutante delF508CFTR.

Les premiers résultats (Figure 80) montrent que le fullerène, le dérivé CD7DNJC9 et son analogue monovalent n'ont pas d'effet sur l'activité de la delF508CFTR. Cependant, le dérivé CD7DNJC6 et son analogue monovalent permettent tous les deux d'augmenter l'activité résiduelle de la protéine mutante de façon similaire au miglustat. La multivalence ne semble cependant pas démultiplier l'effet. Ces résultats sont néanmoins intéressants en prouvant qu'un composé multivalent peut permettre de récupérer une partie de l'activité de la protéine delF508CFTR. On observe également une grande sensibilité des systèmes biologiques mis en jeu car l'augmentation de la longueur du linker de 3 carbones seulement, ou le passage à une plateforme fullerène annule l'effet observé sur l'activité. Des résultats à venir devraient nous permettre de conclure plus précisément sur l'effet observé.

Conclusion générale

Nous avons donc pu réaliser au cours de ce travail de thèse la synthèse de nouvelles classes d'iminosucres multivalents ainsi qu'une librairie de composés en série iminoxylitol.

Dans un premier temps, la synthèse des produits monovalents a été réalisée selon deux stratégies. La première consistait en l'utilisation d'une méthodologie de diamination d'alcènes pallado-catalysée pour accéder rapidement à des produits en série α -1-C-DNJ avec un groupement *N*-acétamido en partie aglycone. Cette stratégie n'a malheureusement pas abouti. Ceci est principalement dû à un manque de réactivité de nos substrats.

La deuxième approche reposait sur une stratégie de chimie click « *in situ* » permettant la synthèse et l'évaluation rapide d'une bibliothèque de composés en série α -1-C-iminoxylitol. Cette approche permet notamment de tester un grand nombre de parties aglycones présentant des structures originales. Sur la base des premiers résultats biologiques, nous avons pu sélectionner cinq produits que nous avons synthétisés de manière classique. Les résultats biologiques toujours en cours actuellement nous ont déjà permis de conclure sur quelques paramètres essentiels. La lipophilie de la partie aglycone apparaît comme un élément très important dans la conception d'inhibiteurs puissants de la GCase. Cette lipophilie peut être amenée par d'autres éléments que de longues chaînes alkyles qui donnent souvent lieu à des activités cytotoxiques. Notamment, plusieurs de nos composés possédant des groupements aromatiques ont donné de bons résultats d'inhibition. Un composé original possédant une courte chaîne alkyle et un groupement triméthylsilyle s'est révélé particulièrement intéressant lors des premiers tests cellulaires avec une augmentation d'un facteur 2 à 100 nM de l'activité de la GCase mutée N370S par exemple.

Dans un second temps nous avons réalisé la synthèse d'une petite bibliothèque de produits multivalents. Les premiers composés synthétisés ont permis de réaliser une étude systématique sur la multivalence et l'inhibition de glycosidases, domaine qui avait été jusqu'à présent peu étudié. Le premier exemple d'un effet multivalent puissant sur l'inhibition des glycosidases a ainsi pu être observé avec un gain d'inhibition pouvant aller jusqu'à 4 ordres de grandeur pour l' α -mannosidase de Jack bean. En faisant varier divers paramètres comme la charpente (fullerène ou cyclodextrine), la valence des systèmes, le linker ainsi que la disposition des ligands en série *N*-alkyl-DNJ, nous sommes parvenus à donner un premier aperçu des éléments clés contrôlant cette augmentation d'activité. Des tests cellulaires sur des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher nous ont également permis de mettre en évidence le premier chaperon multivalent. L'effet observé sur un composé heptavalent, bien que modéré, prouve que ces composés multivalents peuvent passer les barrières cellulaires et ouvre la voie à une nouvelle classe de chaperons pharmacologiques multivalents.

A la suite de cette première étude, nous avons également fait varier le ligand. Nous avons synthétisé un ligand en série α -1-C-hexyl-iminoxylitol qui est un très bon inhibiteur et un bon chaperon de la GCase impliquée dans la maladie de Gaucher. Ce ligand nous a permis d'accéder aux produits mono- et multivalents correspondants. Les effets de la multivalence sur l'inhibition de la GCase pour ces composés restent pour l'instant modérés. Les premiers tests cellulaires ont cependant montré de bonnes activités chaperons de l'enzyme mutée N370S notamment pour le

composé heptavalent. Sur la base de nos travaux, de meilleurs résultats sont attendus avec les composés correspondants possédant un linker en C9 (dont la synthèse est en cours).

Des résultats préliminaires sur la mucoviscidose n'ont pas mis en évidence d'effet multivalent sur l'augmentation de l'activité de la protéine déficiente delF508CFTR mais ont tout de même montré qu'un composé heptavalent pouvait augmenter l'activité de la protéine de façon presque comparable au composé de référence, *N*-butyl-DNJ. De plus, ce système biologique semble très sensible à des changements structuraux liés à la multivalence (longueur du linker, plateforme C₆₀ ou β -cyclodextrine). Là encore, c'est un tout nouveau domaine à explorer et d'autres essais sont en cours avec des systèmes multivalents possédant un ligand DMJ ou une valence plus faible.

Les effets multivalents puissants observés pour la première fois sur l'inhibition des glycosidases ouvrent de nombreuses pistes de recherche de part l'importance biologique de cette classe d'enzyme et le potentiel des glycomimétiques multivalents. La suite logique de ce travail de thèse sera donc de continuer à chercher à comprendre et à optimiser cet effet multivalent et à l'appliquer à des glycosidases d'intérêt thérapeutique.

Partie Expérimentale

GENERAL METHODS

Solvents:

Dichloromethane (CH₂Cl₂) was distilled over CaH₂ under argon. Dimethylsulfoxide (DMSO) was distilled over CaH₂ under reduced pressure. Methanol was distilled over Mg/I₂ under argon. Tetrahydrofuran (THF) was distilled over sodium/benzophenone under argon or dried by passage through an activated alumina column under argon. Dimethylformamide (DMF) was distilled over MgSO₄ under reduced pressure or purchased anhydrous over molecular sieve from Aldrich. Triethylamine (Et₃N) was distilled over KOH under argon and stored over KOH. Pyridine was distilled over KOH under reduced pressure and stored over KOH.

All reactions were performed in standard glassware or microwave reactor vials purchased from Biotage. Microwave reactions were carried out in on a Biotage Initiator™ microwave synthesizer.

Purification

Flash column chromatographies were carried out with silica gel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) purchased from E. Merck. Automatic flash chromatographies were carried out in a Grace Reveleris® flash system equipped with UV/Vis and ELSD detectors.

Characterisation:

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on aluminum sheets coated with silica gel 60 F₂₅₄ purchased from E. Merck.

IR spectra (cm⁻¹) were recorded on a Perkin– Elmer Spectrum One Spectrophotometer.

NMR (nuclear magnetic resonance) spectra were recorded on a Bruker AC 300, Bruker 1C 400 or Avance DRX500 with solvent peaks as reference.²⁸¹ Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. The ¹H and ¹³C signals were assigned by COSY (correlation spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum correlation spectroscopy), HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy) and 1D TOCSY (total correlation spectroscopy) experiments. Couplage constants (*J*) are in Hertz (Hz) and multiplicity was described with (s) as singulet, (d) as doublet, (t) as triplet and (q) as quadruplet, (br) stands for broad.

MALDI-TOF-mass spectra were carried out on a Bruker BIFLEX™ matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometer (matrix = dithranol).

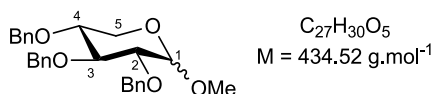
ESI-HRMS mass spectra were carried out on a Bruker MicroTOF spectrometer.

Specific rotations were determined at room temperature (20°C) in a Perkin–Elmer 241 polarimeter for sodium (λ= 589 nm).

²⁸¹ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

SYNTHESIS AND ANALYTICAL DATA

α - and β -methyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranosides (**29**)⁸¹



Under anhydrous conditions, thionyl chloride (2 mL, 27.6 mmol) was added dropwise to methanol (100 mL) in order to get a 1% solution of HCl. D-xylose **27** (10.0 g, 66.6 mmol, 1.0 eq) was then added and the reaction mixture was stirred under reflux for 4 hours. After cooling down to 0°C, sodium bicarbonate (7 g) was added slowly and the mixture filtered off. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was taken in ethanol (80 mL) and the solution was concentrated to a half of the original volume. Toluene was then added and the mixture was concentrated under reduced pressure and dried under vacuum to afford yellow foam **28**, which was not further purified before utilization in the next step.

The crude mixture was partially dissolved in anhydrous DMF (340 mL) dried over MgSO₄. At 0°C, benzyl bromide (47.5 mL, 399.6 mmol, 6.0 eq) was added in one portion, sodium hydride suspension in oil 60% (7.9 g, 333 mmol, 5.0 eq) was slowly added in small portions. The mixture was first stirred at 0°C for 1 hour and then at rt for 19 hours. 10 mL of a saturated solution of ammonium chloride were added in order to quench residual sodium hydride, followed by water (200 mL). This mixture was extracted using diethyl ether (3 x 250 mL); the organic phase was then washed with water (2 x 80 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/petroleum ether 0:1 to 6:4). Compound **29** was obtained as white crystals (24.7 g, 85%).

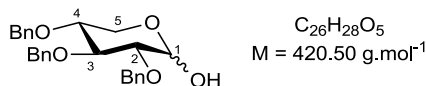
Anomer β R_f 0.58 (AcOEt/Petroleum Ether 1:3).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.25 (dd, J = 11.5 and 9.5 Hz, 1H, H-5a), 3.39 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-2), 3.56 (s, 3H, OMe), 3.59-3.70 (m, 2H, H-3 and H-4), 3.97 (dd, J = 11.5 and 4.7 Hz, 1H, H-5b), 4.29 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-1), 4.65 (d, J = 11.6 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.74 (d, J = 11.1 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.76 (d, J = 11.7 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.89 (s, 2H, CH₂Ph), 4.92 (d, J = 11.2 Hz, 1H, CH₂Ph), 7.27-7.47 (m, 15H, H_{Ar}).

Anomer α R_f 0.48 (AcOEt/Petroleum Ether 1:3).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.41 (s, 3H, OMe), 3.49 (dd, J = 9.6 and 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.53-3.68 (m, 3H, H-4 and H-5), 3.90-4.00 (m, 1H, H-3), 4.57 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.66 (d, J = 11.7 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.70 (d, J = 12.1 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.78 (d, J = 11.6 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.84 (d, J = 12.2 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.91 (d, J = 10.9 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.98 (d, J = 10.9 Hz, 1H, CH₂Ph), 7.28-7.46 (m, 15H, H_{Ar}).

2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose (**30**)⁸¹



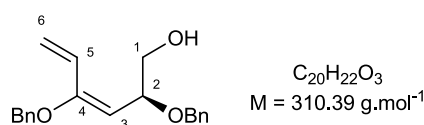
Compound **2** (10 g, 23 mmol, 1.0 eq) was dissolved in glacial acetic acid (200 mL). A 2 M solution of hydrochloric acid (80 mL) was added and the colorless solution was then stirred at 80°C for 15 hours. The mixture was allowed to cool down to 0°C and crystallization was observed. The mixture was filtered, the white crystals washed with water and dried under vacuum. Compound **30** was obtained as white needles (6.6 g, 68%).

$R_f = 0.16$ (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) Mixture of diastereomers (α/β 1:0.2) δ 2.88 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, OH α), 3.00-3.07 (m, 0.2 H), 3.23-3.38 (m, 0.4 H), 3.49 (dd, $J = 8.9$ and 3.5 Hz, 1H, H-2 α), 3.51-3.72 (m, 2.3 H), 3.74-3.92 (m, 1.8 H), 3.95 (dd, $J = 11.5$ and 4.5 Hz, H-5b β), 4.56-4.94 (m, 6.8 H, CH_2Ph and H-1 β), 5.12 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-1 α), 7.26-7.39 (m, 17.8 H, H_{Ar}).

HRMS (ESI): m/z 443.183 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NaO}_5$: 443.183).

(*S,E*)-2,4-bis(benzyloxy)hexa-3,5-dien-1-ol (**31**)



To a stirred suspension of methyltriphenylphosphonium bromide (631 mg, 1.5 mmol, 2.1 eq.) in THF (2 mL) was added *n*BuLi (1.15 mL of 1.3 M solution in hexanes, 1.5 mmol, 2.1 eq.) dropwise at 0 °C. The mixture was stirred for 2 h at rt. To the above red solution was added a solution of 2,3,4,tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose **30** (300 mg, 0.71 mmol) in THF (2.5 mL). The reaction mixture was stirred overnight and then refluxed 20h. NH_4Cl saturated solution (1 mL) was added and the THF was evaporated. The latter was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The organic extracts were combined, washed with brine and dried over MgSO_4 . The residue was purified by column chromatography (AcOEt/ Petroleum Ether 1:9 to 1:4) to afford **31** as a colorless oil mixed with benzylic alcohol (around 60%).

R_f 0.40 (AcOEt/Petroleum ether, 3:7).

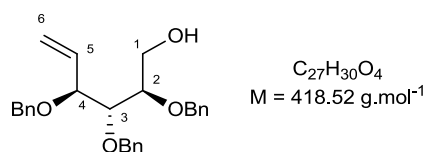
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.37-3.50 (m, 2H, H-1), 4.29 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.36-4.40 (m, 1H, H-2), 4.53 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.76 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.83 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.03 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 5.29 (dd, $J = 11.1$ and 0.6 Hz, 1H, H-6a), 5.58 (dd, $J = 17.4$ and 0.6 Hz, 1H, H-6b), 6.22 (dd, $J = 17.1$ and 10.8 Hz, 1H, H-5), 7.27-7.42 (m, 10H, H_{Ar})

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 65.2 (CH_2Ph), 70.5 (CH_2Ph), 73.6 (C-1), 74.5 (C-2), 115.5 (C-3), 116.5 (C-6), 127.7, 127.8, 128.0, 128.3, 128.5, 128.6 (10 CH_{Ar}), 131.9 (C-5), 137.1 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}).

IR (neat) : 3345 (O-H) cm^{-1} ;

MS (ESI): m/z 333.129 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NaO}_3$: 333.146).

(2*R*,3*R*,4*S*)-2,3,4-Tri(benzyloxy)-hex-5-ene-1-ol (**32**)⁸¹



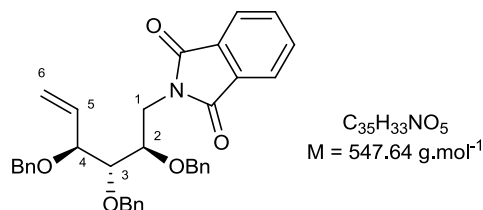
To a stirred suspension of methyltriphenylphosphonium bromide (892 mg, 2.5 mmol, 3.5 eq.) in THF (6 mL) was added *n*BuLi (1.82 mL of 1.37 M solution in hexanes, 2.5 mmol, 3.5 eq.) dropwise at 0 °C. The mixture was stirred for 2 h at rt. To another solution of 2,3,4,tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose **30** (300 mg, 0.71 mmol) in THF (1 mL) was added *n*BuLi (0.52 mL of 1.37 M solution in hexanes, 0.71 mmol, 1 eq.) . After 10 minutes stirring this second reaction was cannulated into the first red solution of methylphosphonium ylide dropwise at 0 °C. The reaction mixture was allowed to reach rt and stirred for 4 h. NH_4Cl saturated solution (1 mL) was added and solvents were evaporated. The latter was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The organic extracts were combined, washed with brine and dried over MgSO_4 . The residue was purified by column chromatography

(AcOEt/ Petroleum Ether 1:9 to 1:5) to afford **32** as a colorless oil (140 mg, 47%). Analytical data were consistent with the literature:^{81,282}

R_f 0.43 (AcOEt/Petroleum ether, 3:7).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.41 (s, 1H, OH), 3.58-3.68 (m, 1H), 3.58-3.88 (m, 3H), 4.18 (dd, $J = 7.3$ and 4.6 Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 11.8$, 1H, CH_2Ph), 4.61-4.74 (m, 3H, CH_2Ph), 4.74-4.87 (m, 2H, CH_2Ph), 5.37 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-6a), 5.38 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H, H-6b), 5.96 (ddd, $J = 17.2$, 10.6 and 7.2 Hz, 1H, H-5), 7.28-7.46 (m, 15H, H_{Ar}).

(2R,3R,4S)-2,3,4-Tri(benzyloxy)-5-hexene-1-phthalimidamine (33)



To a solution of the alcohol **32** (120 mg, 0.287 mmol) in toluene (6 mL) were added triphenylphosphine (226 mg, 0.860 mmol, 3 eq.) and phthalimide (127 mg, 0.860 mmol, 3 eq.). At 0°C was added DIAD (173 mg, 0.860 mmol, 170 μL , 3 eq.). The reaction was then stirred 3.5 hours at rt. The solvent were evaporated and the residue was purified by column chromatography (AcOEt/ Petroleum Ether 1:9 to 1:3) to afford **33** (140 mg, 89%) as a yellow oil.

R_f 0.52 (AcOEt/Petroleum ether, 1:3);

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.5$ (c 1, CHCl_3).

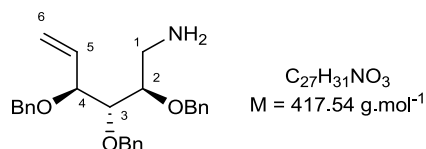
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 3.62 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-3), 3.92 (br d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-1), 4.08 (q, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-2), 4.24 (dd, $J = 7.4$ and 5.0 Hz, 1H, H-4), 4.46 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.51 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H CH_2Ph), 4.64 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.67 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.84 (s, 2H, CH_2Ph), 5.34 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H, H-6a), 5.35 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H-6b), 5.97 (ddd, $J = 16.8$, 11.2 and 7.6 Hz, 1H, H-5), 6.98-7.21 (m, 5H, H_{Ar}), 7.26-7.50 (m, 10H H_{Ar}), 7.62-7.71 (m, 2H, H_{Ar}), 7.74-7.81 (m, 2H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 38.8 (C-1), 70.8 (CH_2Ph), 73.1 (CH_2Ph), 74.7 (CH_2Ph), 76.4, 80.5 and 81.9 (C-2, C-3 and C-4), 119.0 (C-6), 123.1 (CH_{Ar}), 127.4, 127.58, 127.62, 128.1, 128.3 and 128.4 (CH_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 133.7 (CH_{Ar}), 135.2 (C-5), 138.2, 138.2 and 138.5 (C_{Ph}), 168.3 (C=O).

IR (neat) : 1713 (C=O) cm^{-1} ;

HRMS (ESI): m/z 570.229 ($[\text{M}+\text{Na}^+]$, calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{NNaO}_5$: 570.225).

(2R,3R,4S)-2,3,4-Tri(benzyloxy)-5-hexene-1-amine (34)



To a solution of **33** (254 mg, 0.465 mmol) in EtOH was added distilled ethylenediamine and the mixture was stirred at 80°C overnight. The mixture was evaporated to dryness. The residue obtained was purified by column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 9:1 + 1% NH_4OH) to afford **34** (146 mg, 75%) as a colourless oil.

²⁸² F. E. Ziegler, Y. Wang, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7920-7930.

R_f 0.56 (AcOEt/Petroleum Ether 9:1 + 1% NH_4OH).

$[\alpha]_D^{20} = +8.5$ (c 1, CHCl_3).

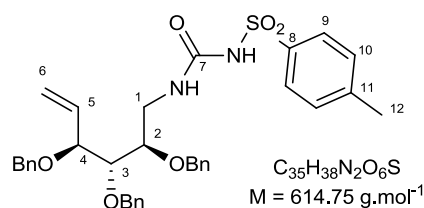
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.24 (s, 2H, NH_2), 2.76 (dd, $J = 13.4$ and 5.5 Hz, 1H, H-1a), 2.86 (dd, $J = 13.4$ and 4.6 Hz, 1H, H-1b), 3.56-3.71 (m, 2H, H-3 and H-2), 4.12 (dd, $J = 7.2$ and 4.8 Hz, 1H, H-4), 4.42 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.62 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.69 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.70 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.81 (s, 2H, CH_2Ph), 5.34 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-6a), 5.36 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H, H-6b), 5.95 (ddd, $J = 17.1$, 10.1 and 7.2 Hz, 1H, H-5), 7.27-7.47 (m, 15H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 41.9 (C-1), 70.6 (CH_2Ph), 72.9 (CH_2Ph), 74.7 (CH_2Ph), 80.6, 81.3 and 81.5 (C-2, C-3 and C-4), 118.5 (C-6), 127.5, 127.6, 127.8, 127.9, 128.3 (CH_{Ar}), 135.3 (C-5), 138.2, 138.5 and 138.7 (C_{Ar}).

IR (neat): 3379 (NH_2) cm^{-1} .

MS (ESI): m/z 418.41 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{NO}_3$; 418.24).

4-Methyl-*N*-(((2*R*,3*R*,4*S*)-2,3,4-tris(benzyloxy)hex-5-en-1-yl)carbamoyl)benzenesulfonamide (**35**)



To a solution of the amine **34** (107 mg, 0.256 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was added *p*-toluenesulfonylisocyanate (47 μL , 0.307 mmol, 1.2 eq.) dropwise at 0°C . The mixture was allowed to reach rt within 1 hour and it was stirred 2 hours more at rt. The mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 1:2 to 1:1) to afford **35** (115 mg, 73%) as a colorless oil.

R_f 0.28 (AcOEt/Petroleum Ether 4:6).

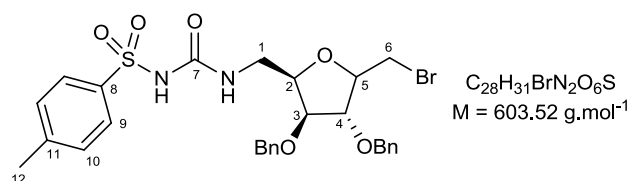
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.29 (s, 3H, H-12), 3.13 (dt, $J = 13.9$ and 4.2 Hz, 1H, H-1a), 3.47 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-3), 3.52-3.73 (m, 2H, H-2 and H-1b), 4.14 (dd, $J = 7.1$ and 5.8 Hz, 1H, H-4), 4.39 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.43 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.52 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.61 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.69 (s, 2H, CH_2Ph), 5.25 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, H-6a), 5.26 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H-6b), 5.71-5.89 (m, 1H, H-5), 6.94 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, N-H), 7.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-9), 7.17-7.38 (m, 15H, H_{Ar}), 7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-10), 9.01 (br s, 1H, N-H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 21.6 (C-12), 40.2 (C-1), 70.8 (CH_2Ph), 72.4 (CH_2Ph), 74.6 (CH_2Ph), 77.1, 80.9 and 81.8 (C-2, C-3 and C-4), 119.1 (C-6), 127.1, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 128.7 and 129.8 (CH_{Ar}), 135.0 (C-5), 137.1 (C-11), 138.1, 138.2 and 138.3 (C_{Ar}), 144.3 (C-8), 152.3 (C-7).

IR (neat): 3363 (NH), 1676 (C=O), 1344 and 1160 (SO_2) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 637.237 ($[\text{M}+\text{Na}^+]$, calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}$; 637.234).

N-(((2*R*,3*R*,4*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(bromomethyl)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)carbamoyl)-4-toluenesulfonamide (**37**)



This product was obtained during a diamination trial:

To a solution of iodosobenzene diacetate (110 mg, 0.340 mmol, 2,3 eq.) and palladium acetate (8 mg, 0.04 mmol, 25 mol%) in CH_2Cl_2 (2 mL) was added **34** (91 mg, 0.148 mmol). NMe_4Br (23 mg, 0.148 mmol, 1 eq.)

and NaOAc (12 mg, 0.148 mmol) were added and the mixture was stirred 15 h. A saturated solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 mL) was added. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), then dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated. The residue was purified by column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 1:4 to 1:1) and **37** was obtained as a colorless oil.

R_f 0.42 (AcOEt/Petroleum Ether 1:2).

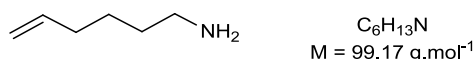
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.29 (s, 3H, H-12), 3.16-3.30 (m, 1H, H-1a), 3.31-3.40 (m, 1H, H-6a), 3.48 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-6b), 3.52-3.63 (m, 1H, H-1b), 3.87 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-2, H-3, H-4 or H-5), 4.00 (d, $J = 3.5$ Hz, H-2, H-3, H-4 or H-5), 4.06-4.19 (m, 1H, H-2, H-3, H-4 or H-5), 4.26-4.34 (m, 1H, H-2, H-3, H-4 or H-5), 4.33 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.42-4.53 (m, 3H, CH_2Ph), 6.88 (br s, 1H, N-H), 7.13-7.38 (m, 13H, H_{Ar} and N-H), 7.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-10).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 21.7 (C-12), 28.4 (C-1), 40.1 (C-6), 72.4 (CH_2Ph), 73.1 (CH_2Ph), 79.2, 80.7, 80.8 and 81.8 (C-2, C-3 C-4 and C-5), 127.2, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.9, 129.4 and 130.0 (CH_{Ar}), 136.8, 137.3 and 137.4 (C_{Ar}), 144.8 (C-8), 151.9 (C-7).

IR (neat): 3377 (NH), 1682 (C=O), 1346 and 1160 (SO_2) cm^{-1} .

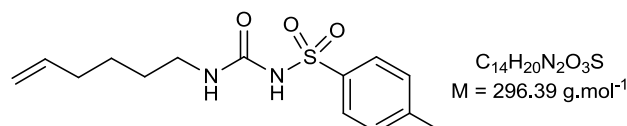
MS (ESI): m/z 627.080 ($[\text{M}+\text{Na}^+]$, calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{BrNaN}_2\text{O}_6\text{S}$: 627.234).

Hex-5-ene-1-amine (**39**)⁸⁵



To a suspension of LAH (199 mg, 5.26 mmol, 2 eq.) in Et_2O (10 mL) was added hex-5-enenitrile **38** (0.300 mL, 2.63 mmol). The mixture was refluxed for 2 hours. The reaction was then cooled at 0°C and successively were added water (0.2 mL), NaOH 15% solution (0.2 mL) and water again (0.6 mL). The mixture was then filtered with Et_2O over a short pad of celite to remove the alumina residue. The solvent was then removed and the product obtained was used in the next step without further purification.

N-(hex-5-enylcarbamoyl)-toluenesulfonamide (**40**)^{85,65}

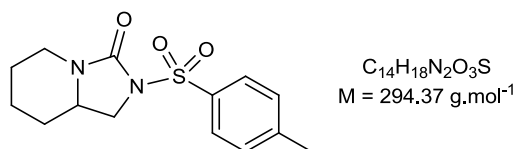


To a solution of hex-5-ene-1-amine **39** (261 mg, 2.63 mmol) in CH_2Cl_2 (7.5 mL) was added *p*-toluenesulfonylisocyanate (0.482 mmol, 1.2 eq.) in CH_2Cl_2 (7.5 mL) at 0°C . The mixture was allowed to reach rt in one hour and stirred two more hours. The solvent was then evaporated to dryness and the residue was purified by column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether, 1:4 to 1:2) to afford **40** as a colourless oil (491 mg, 63% over 2 steps). The analytical data were consistent with literature.⁶⁵

R_f 0.42 (AcOEt/Petroleum Ether 1:1).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.20-1.38 (m, 2H), 1.38-1.55 (m, 2H), 2.00 (br quintuplet, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 3.19 (br q, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.89-5.04 (m, 2H), 5.63-5.82 (m, 1H), 6.52 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, N-H), 7.28 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 9.15 (br s, 1H, N-H).

Hexahydro-2-(*p*-tolylsulfonyl)imidazo[1,5-*a*]pyridine-3(*5H*)-one (**41**)⁶¹

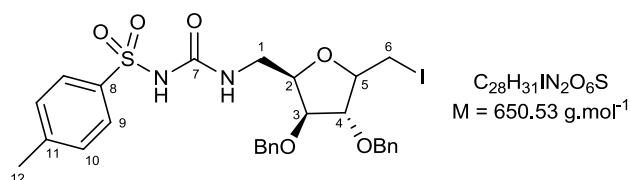


To a solution of **40** (111 mg, 0.37 mmol) in dioxane (3.8 mL) was added Pd(OAc)₂ (16.8 mg, 0.074 mmol, 20 mol %), CuBr₂ (251 mg, 1.124 mmol, 3 eq.), K₂CO₃ (102 mg, 0.74 mmol, 2 eq.) under argon. The mixture was heated at 70°C 24h. The reaction was stopped by addition of Na₂S₂O₃ saturated solution (3 mL). The mixture was then extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The organic phase was washed with brine, dried over Na₂SO₄ filtered and evaporated. The residue was then purified by flash chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 1:3 to 1:1) to afford **41** (51.6 mg, 47%). The analytical data were consistent with literature.⁶¹

R_f 0.37 (AcOEt/Petroleum Ether 1:1).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.12-1.43 (m, 3H), 1.52-1.67 (m, 1H), 1.68-1.96 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.65 (td, *J* = 13.0 and 3.5 Hz, 1H), 3.34-3.52 (m, 2H), 3.81 (dd, *J* = 13.4 and 4.3 Hz, 1H), 3.96 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}).

***N*-(((2*R*,3*R*,4*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(iodomethyl)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)carbamoyl)-4-toluenesulfonamide (**42**)**



This product was obtained during a diamination trial (see p40):

To a solution of **35** (91mg, 0.148 mmol) in toluene (1.5 mL) were added NIS (66.6 mg, 0.296 mmol, 2 eq.) and NaHCO₃ (12.4 mg, 0.148 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred 24 h then evaporated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether, 1:4 to 1:1) and **42** was obtained as a colorless oil.

R_f 0.39 (AcOEt/Petroleum Ether 4:6).

d.e. = 20%

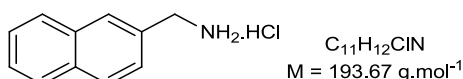
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.31-2.47 (m, 3H, H-12), 3.16-3.46 (m, 3H, H-6, H-1a), 3.56-3.79 (m, 1H, H-1b), 3.93-4.01 (m, 1H), 4.05-4.09 (m, 0.6H, 1 H-dia min), 4.10-4.14 (m, 0.4H, 1 H-dia maj), 4.14-4.20 (m, 0.6H, 1 H-dia maj), 4.20-4.29 (m, 0.8H, 2 H-dia min), 4.39-4.49 (m, 1.6H, 1 CH₂Ph and 1 H-dia maj), 4.52-4.67 (m, 3H, CH₂Ph), 6.90-7.01 (m, 1H, N-H), 7.16-7.48 (m, 13H, N-H and H_{Ar}), 7.77 (br d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-10).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 1.1 (C-6 dia maj), 6.6 (C-6 dia min), 21.7 (C-12), 40.3 (C-1), 71.7 (CH₂Ph dia min), 72.3 (CH₂Ph dia min), 72.4 (CH₂Ph dia maj), 73.3 (CH₂Ph dia maj), 79.5 (C-dia maj), 80.3 (C-dia min), 81.2 (C-dia maj), 81.4 (C-dia maj), 81.8 (C-dia maj), 82.9 (C-dia min), 84.1 (C-dia min), 84.6 (C-dia min), 127.2, 127.97, 128.03, 128.1, 128.17, 128.21, 128.3, 128.7, 128.8, 130.0 (CH_{Ar}), 136.8 (C-11), 137.2 (C_{Ar}-dia min), 137.3 (C_{Ar}-dia maj), 137.4 (C_{Ar}-dia maj) and 137.5 (C_{Ar}-dia min), 144.8 (C-8), 151.2 (C-7).

IR (neat): 3361 (NH), 1671 (C=O), 1345 and 1161 (SO₂) cm⁻¹.

MS (ESI): *m/z* 673.088 ([M+Na⁺], calcd for C₂₈H₃₁NaN₂IO₆S: 673.084).

2-naphtylmethylamine hydrochloride (71**)¹⁵⁰**



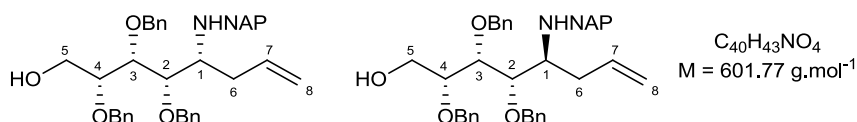
Naphtalene-2-carbonitrile (3.0 g, 19.58 mmol) was dissolved in absolute ethanol (112 mL). 10% wt. palladium supported on carbon (1.041 g, 0.979 mmol, 0.05 eq. Pd) was added followed by concentrated hydrochloric acid (1.98 mL, 19.58 mmol, 1.0 eq.). Argon was bubbled into the solution followed by hydrogen gas. The mixture was stirred at rt, under H_2 atmosphere, for 20 h. It was then filtered through a pad of celite and washed thoroughly with ethanol, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and finally dried under vacuum. The desired product **71** was obtained as white powder (3.670 g, **97%** yield). Analytical data were consistent with the literature:^{150,283}

R_f 0.46 ($CH_3CN/H_2O/NH_4OH$ 10:1:1).

1H NMR (MeOD, 300 MHz): δ 4.32 (s, 2H, CH_2N), 7.53-7.62 (m, 3H, H_{Ar}), 7.88-8.03 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR (MeOD, 75.5 MHz): 45.4 (CH_2N), 127.8, 128.7, 128.8, 129.7, 129.9, 130.3, 131.0 (CH_{Ar}), 132.6, 135.6, 135.7 (C_{Ar}).

MS (ESI): m/z 158.1 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{11}H_{12}N$ 158.1).

(2R,3R,4S,5R)-2,3,4-tris(benzyloxy)-5-((naphthalen-2-ylmethyl)amino)oct-7-en-1-ol and (2R,3R,4S,5S)-2,3,4-tris(benzyloxy)-5-((naphthalen-2-ylmethyl)amino)oct-7-en-1-ol (68)



Under anhydrous conditions, compound **30** (1.95 g, 4.64 mmol) was dissolved in DMSO (12 mL). Naphtalene-2-yl-methyl-amine hydrochloride **71** (1.35 g, 6.96 mmol, 1.5 eq.), triethylamine (0.97 mL, 6.96 mmol, 1.5 eq.) and molecular sieves 4 Å (0.4 g) were added to the mixture, which was stirred at 60° C for 22 h. The latter was filtered through celite and washed thoroughly with diethyl ether. Water (100 mL) was added to the filtrate and phases were separated. The aqueous layer was extracted using diethyl ether (3 x 120 mL). The combined extracts were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to provide impure *N*-methylnaphtyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranosylamine **69** as an orange solid. R_f 0.45 (AcOEt/petroleum ether 1:3 + 1% Et_3N).

Under anhydrous conditions, the crude compounds **69** were dissolved in THF. At 0°C, allylmagnesium bromide (13.9 mL of 1.0 M solution in Et_2O , 13.9 mmol, 3 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt for 15 hours. After cooling down to 0°C, the mixture was hydrolyzed using a few mL of water. The mixture was concentrated under reduced pressure, the residue dissolved in diethyl ether (250 mL) and water was added. The organic layer was washed with water (3 x 150 mL), brine (100 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and finally concentrated under reduced pressure. The yellow solid residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/petroleum ether +0.5% Et_3N 1:5 to 1:3). The diastereoisomers **68** were obtained as colorless oil (1.95 g, 70% over 2 steps).

R_f (AcOEt/petroleum ether 1:3 + 1% Et_3N).

d.e. = 60% in favor of **68R**, derived using 1H NMR on the crude mixture.

IR: ν_{max} (neat) 3461 (OH, NH) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 602.326 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{40}H_{44}NO_4$: 602.326).

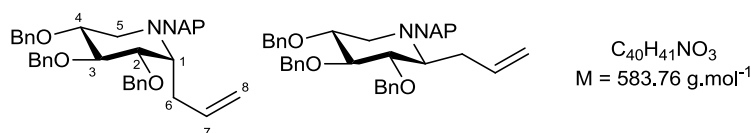
²⁸³ F. Lehmann, M. Scobie, *Synthesis*, 2008, **11**, 1679-1682.

A pure analytical sample of major, (1*R*)-1-*C*-allyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-methylnaphtylamino-1-deoxy-*D*-xylitol, has been characterized by NMR ¹H and ¹³C:

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.23-2.38 (m, 1H, H-6a), 2.41-2.54 (m, 1H, H-6b), 2.61-2.71 (m, 1H, H-1), 3.35 (q, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-4), 3.61 (dd, *J* = 11.7 and 4.2 Hz, 1H, H-5a), 3.70 (dd, *J* = 11.7 and 5.2 Hz, 1H, H-5b), 3.77 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, CH₂Ar), 3.81 (dd, *J* = 7.2 and 2.4 Hz, 1H, H-2), 4.07 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, CH₂Ar), 4.10-4.17 (m, 1H, H-3), 4.30 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.48 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.59 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.72 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.81 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.87 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.97-5.07 (m, 2H, H-8), 5.56-5.75 (m, 1H, H-7), 7.14-7.21 (m, 2H, H_{Ar}), 7.22-7.37 (m, 13H, H_{Ar}), 7.41-7.51 (m, 3H, H_{Ar}), 7.62-7.87 (m, 4H, H_{Ar}).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 35.4 (C-6), 51.2 (CH₂Ar), 56.4 (C-1), 61.8 (C-5), 72.0, 74.4, 74.7 (3CH₂Ph), 78.3 (C-4), 80.08 (C-3), 80.14 (C-2), 117.2 (C-8), 125.7, 126.1, 126.8, 127.2, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.3, 128.38, 128.44, 128.6 (22CH_{Ar}), 132.7, 133.4 (2C_{Ar}), 136.1 (C-7), 138.19, 138.24, 138.4, 138.9 (4C_{Ar}).

α-1-*C*-allyl-*N*-methylnaphtyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-xylitol (72α) and β-1-*C*-allyl-*N*-methylnaphtyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-xylitol (72β)



Under anhydrous conditions, compound **68** (1.804 g, 3.00 mmol) was dissolved in pyridine (45 mL). Methanesulfonyl chloride (0.58 mL, 7.49 mmol, 2.5 eq.) was then added followed by molecular sieves 4 Å (1.9 g). The reaction mixture was stirred at 100°C for 4 hours. It was then filtered on celite and washed thoroughly with ethyl acetate (200 mL). The organic layer was then washed with water (4 x 150 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Toluene was added and the mixture was concentrated; this operation was repeated three times to remove residual pyridine. The resulting brown oil was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/petroleum ether: 1:5 to 1:3) to afford the two separated diastereomers: 1.325 g of anomer **72α** (76% yield) and 0.220 g of anomer **72β** (13% yield).

Major diastereomer 72α

R_f 0.48 (AcOEt/petroleum ether 1:4).

[α]_D²⁰ = +21.0 (*c* 1, CHCl₃).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.34-2.50 (m, 2H, H-6), 2.52-2.67 (m, 1H, H-5a), 2.78 (dd, *J* = 12.4 and 4.5 Hz, 1H, H-5b), 3.18 (q, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-1), 3.53-3.67 (m, 2H, H-3 and H-4), 3.74 (dd, *J* = 9.6 and 5.3 Hz, 1H, H-2), 3.79 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, CH₂Ar(Nap)), 3.94 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, CH₂Ar(Nap)), 4.50 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.56 (s, 2H, CH₂Ph), 4.61 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.82 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.87 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.98 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H-8a), 5.06 (d, *J* = 17.2 and 1.7 Hz, 1H, H-8b), 5.75-5.95 (m, 1H, H-7), 7.11-7.47 (m, 18H, H_{Ar}), 7.59 (s, 1H, H_{Ar}), 7.69-7.83 (m, 3H, H_{Ar}).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 28.8 (C-6), 48.2 (CH₂(Nap) or C-5), 59.2 (CH₂(Nap) or C-5), 60.2 (C-1), 72.7, 73.1, 75.7 (3 CH₂Ph), 78.7, 80.8, 82.9 (C-2, C-3 and C-4), 115.8 (C-8), 125.7, 126.1, 126.7, 126.8, 127.56, 127.63, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.42, 128.43 (22 CH_{Ar}), 133.0, 133.5, 137.1 (3 C_{Ar}), 138.5 (C-7), 138.6, 138.7, 139.3 (3 C_{Ar}).

HRMS (ESI): *m/z* 584.312 ([M+H]⁺, calcd. for C₄₀H₄₂NO₃: 584.316).

Minor diastereomer 72β

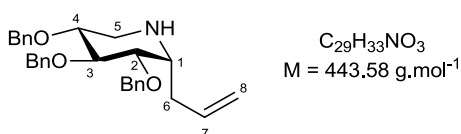
R_f 0.37 (AcOEt/petroleum ether 1:4).

$[\alpha]_D^{20} = -2.0$ (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.87-2.01 (m, 1H, H-5a), 2.43-2.59 (m, 1H, H-1), 2.65-2.81 (m, 2H, H-6), 2.97 (dd, $J = 11.5$ and 3.2 Hz, 1H, H-5b), 3.28 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, CH_2Ar), 3.47-3.62 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.28 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, CH_2Ar), 4.43 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.52 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.69 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.82 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.99 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.02 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.17 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H, H-8b), 5.96-6.15 (m, 1H, H-7), 7.05-7.18 (m, 4H, H_{Ar}), 7.20-7.39 (m, 11H, H_{Ar}), 7.40-7.57 (m, 3H, H_{Ar}), 7.67 (s, 1H, H_{Ar}), 7.74-7.91 (m, 3H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 32.2 (C-6), 54.0 (CH_2Ar or C-5), 59.2 (CH_2Ar or C-5), 64.6 (C-1), 72.7, 75.3, 75.5 (3 CH_2Ph), 78.4, 80.2, 87.6 (C-2, C-3 and C-4), 117.7 (C-8), 125.7, 126.1, 127.0, 127.3, 127.6, 127.77, 127.80, 127.86, 127.89, 127.94, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6 (22 CH_{Ar}), 133.0, 133.5 (2 C_{Ar}), 134.4 (C-7), 136.5, 138.4, 138.8, 139.0 (4 C_{Ar}).

α -1-C-allyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (**73**)



Compound **72a** (308 mg, 0.53 mmol) was dissolved in a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ mixture 18:1 (12 mL) and placed at 0°C . DDQ (180 mg, 0.79 mmol, 1.5 eq.) was added and the mixture was stirred at rt for 1.5 h. 0.5 eq. of DDQ was added to complete the reaction and the mixture was stirred at rt for another 15 min. The mixture was concentrated to dryness and the residue was taken up in DCM. This organic phase was washed five times with a saturated solution of sodium bicarbonate, dried over Na_2SO_4 and filtered. Solvent was evaporated off and the residual brown liquid was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether +1% Et_3N 1:9 to 1:1) to afford **73** as a brown viscous oil (202 mg, 86% yield).

R_f 0.28 (AcOEt/petroleum ether 1:1 + 1% Et_3N).

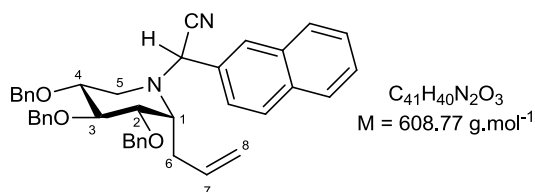
$[\alpha]_D^{20} = -5.0$ (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.91 (br s, 1H, NH), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-6), 2.89 (dd, $J = 13.2$ and 6.1 Hz, 1H, H-5a), 3.00 (dd, $J = 13.3$ and 4.0 Hz, 1H, H-5b), 3.07 (td, $J = 7.3$ and 3.8 Hz, 1H, H-1), 3.43 (q, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-4), 3.49 (dd, $J = 6.1$ and 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.73 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-3), 4.52 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.59 (s, 2H, CH_2Ph), 4.65 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.67 (s, 2H, CH_2Ph), 5.02-5.13 (m, 2H, H-8), 5.67-5.83 (m, 1H, H-7), 7.19-7.42 (m, 15H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 33.0 (C-6), 44.4 (C-5), 54.8 (C-1), 72.2, 72.5, 74.1 (CH_2Ph), 76.7 (C-4), 77.3 (C-3), 78.1 (C-2), 117.2 (C-8), 127.70, 127.73, 127.8, 127.96, 128.00, 128.44, 128.50, 128.51 (15 CH_{Ar}), 136.1 (C-7), 138.68, 138.70, 138.71 (C_{Ar}).

HRMS (ESI): m/z 444.253 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_1\text{O}_3$: 444.253).

α -1-C-allyl-N-(cyano-naphtalen-2-yl-methyl)-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (74)



Compound **74** was obtained as a by-product in the reaction of deprotection of the 2-naphtalenmethyl group using DDQ in $CH_2Cl_2/MeOH$.

R_f 0.75 (AcOEt/Petroleum Ether + 1% Et_3N 1:1).

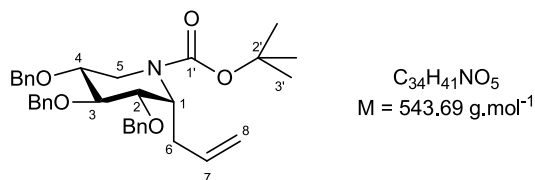
$[\alpha]_D^{20} = +20.5$ (c 1, $CHCl_3$).

1H NMR (400 MHz, $CHCl_3$): δ 2.52-2.62 (m, 2H, H-6), 2.69-2.84 (m, 2H, H-5), 3.31 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, H-1), 3.68-3.79 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.47-4.68 (m, 4H, CH_2Ph), 4.82 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.87 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.05 (s, 1H, $-CHCN$), 5.11 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-8a), 5.17 (dd, $J = 17.0$ and 1.7 Hz, 1H, H-8b), 5.84-5.98 (m, 1H, H-7), 7.15-7.25 (m, 5H, H_{Ar}), 7.25-7.40 (m, 10H, H_{Ar}), 7.51 (dd, $J = 8.4$ and 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.54-7.61 (m, 2H, H_{Ar}), 7.81-7.94 (m, 4H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 29.5 (C-6), 46.2 (C-5), 58.8 (C-1 or N-CHCCN), 59.2 (C-1 or N-CHCCN), 72.88, 72.93, 75.1 (CH_2Ph), 77.4 (C-2, C-3 or C-4), 79.7 (C-2, C-3 or C-4), 81.3 (C-2, C-3 or C-4), 117.0 (C-8), 118.3 ($C\equiv N$), 125.0, 126.8, 127.0, 127.5, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 127.99, 128.00, 128.36, 128.42, 129.2 (22 CH_{Ar}), 131.4, 133.1, 133.7 (3 C_{Ar}), 136.9 (C-7), 138.36, 138.42, 139.0 (3 C_{Ar}).

HRMS (ESI): m/z 631.291 ($[M+Na]^+$, calcd. for $C_{41}H_{40}N_2NaO_3$: 631.293).

α -1-C-allyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylitol (67)



Compound **73** (202 mg, 0.46 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3.5 mL). Et_3N (70 μL , 0.50 mmol, 1.1 eq.) and Boc_2O (109 mg, 0.50 mmol, 1.1 eq.) were added at $0^\circ C$. The reaction mixture was allowed to rise rt and stirred for 3.5 h until the starting material was completely consumed. Solvent was evaporated off. The residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:20 to 1:8) to afford a colorless oil **67** as a mixture of rotamers, according to NMR data (240 mg, 97% yield).

R_f 0.63 (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$[\alpha]_D^{20} = -15.0$ (c 1, $CHCl_3$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) (mixture of rotamers): δ 1.48 (s, 9H, H-3'), 2.23-2.45 (m, 1H, H-6a), 2.53-2.68 (m, 1H, H-6b), 2.76 (q, $J = 11.6$ Hz, 1H, H-5a), 3.39-3.67 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.75 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 4.12 (dd, $J = 13.5$ and 5.6 Hz, 0.5H, H-5b), 4.34-4.45 (m, 0.5H, H-1), 4.49 (dd, $J = 13.5$ and 5.7 Hz, 0.5H, H-5b), 4.63-4.86 (m, 4.5H, H-1 and CH_2Ph), 4.86-5.02 (m, 2H, CH_2Ph), 5.03-5.19 (m, 2H, H-8), 5.62-5.90 (m, 1H, H-7), 7.27-7.48 (m, 15H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 28.3 (C-3'), 29.7 (C-6), 39.9 and 41.3 (C-5), 51.2 and 53.1 (C-1), 72.6, 73.0, 73.1, 73.2, 75.7, 75.8 (3 CH_2Ph), 78.3 and 78.5 (C-2, C-3 or C-4), 79.7 and 79.9 (C-2, C-3 or C-4), 80.1 and 80.3 (C-2'), 82.1 and 82.3 (C-2, C-3 or C-4), 116.9 and 117.3 (C-8), 127.6, 127.7, 127.8, 127.89, 127.92, 128.0, 128.3, 128.4, 128.45, 128.48 (15 CH_{Ar}), 134.7 and 134.8 (C-7), 138.2, 138.26, 138.28, 138.32, 138.9 (3 C_{Ar}), 154.9 (C-1').

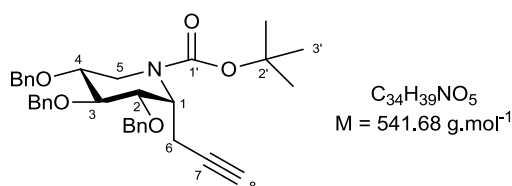
^1H NMR (400 MHz, 70°C , DMSO- D_6): δ 1.38 (s, 9H, H-3'), 2.26-2.40 (m, 1H, H-6a), 2.41-2.48 (m, 1H, H-6b), 2.67 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-5a), 3.31-3.41 (m, 1H, H-4), 3.45 (dd, $J = 9.1$ and 6 Hz, 1H, H-2), 3.66 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-3), 4.03-4.21 (m, 1H, H-1), 4.37-4.54 (m, 1H, H-5), 4.66 (br s, 4H, CH_2Ph), 4.80 (br s, 2H, CH_2Ph), 4.98 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-8a), 5.09 (d, $J = 17$ Hz, 1H, H-8b), 5.62-5.78 (m, 1H, H-7), 7.19-7.43 (m, 15H, CH_{Ar}).

^{13}C NMR (100 MHz, 70°C , DMSO- D_6): δ 27.5 (C-3'), 28.8 (C-6), 40.7 (C-5), 51.7 (C-1), 71.4, 71.6, 73.9 (3 CH_2Ar), 77.5, 78.8, 78.9 (C-2, C-3, C-4), 81.0 (C-2'), 116.1 (C-8), 126.7, 126.9, 127.0, 127.08, 127.13, 127.5, 127.66, 127.68 (15 CH_{Ar}), 134.7 (C-7), 137.9, 138.1, 138.6 (3 C_{Ar}), 153.6 (C-1').

IR (neat): 1693 (C-1') cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 566.285 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_1\text{Na}_1\text{O}_5$: 566.288).

α -1-C-propargyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylytol (75)



To a solution of **67** (313 mg, 0.576 mmol) in THF : water (1:1, 7.4 mL) was added osmium tetroxide (2.5% wt solution in *t*BuOH, 0.058 mmol, 590 μL , 10% mol) then sodium periodate (246 mg, 1.151 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred for 3 hours. Then, water (3 mL) was added to the reaction. The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 . The extracts were combined and dried over Na_2SO_4 . The solution was filtered and the solvent was removed. The crude product **74** (320 mg) was used in the next step without purification. This residue was dissolved in MeOH (9 mL) and K_2CO_3 (159 mg, 1.152 mmol, 2 eq.) was added. Then the Bestmann-Ohira reagent¹⁵⁴ (104 μL , 0.691 mmol, 1.2 eq.) was added and the solution was stirred for 5 hours. The reaction is then complete. Diethyl ether (20 mL) and a solution of NaHCO_3 (5%, 15 mL) were added. The aqueous phase was extracted with Et_2O (3 x 15 mL) and the extracts were combined and dried over Na_2SO_4 . The solution was filtered and evaporated. The residue was purified by automatic flash column chromatography (AcOEt/petroleum ether 0:1 to 1:4) to afford a colourless oil **75** (212 mg, 68 % over two steps) as a mixture of rotamers according to NMR data.

R_f 0.52 (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.0$ (c 1, CHCl_3).

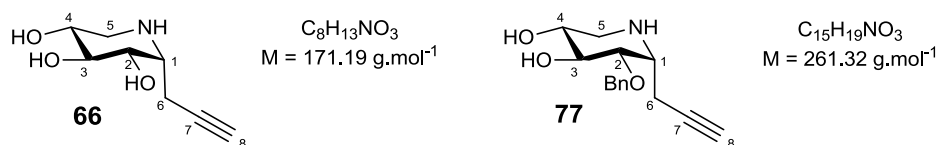
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H, H-3'), 1.94 (br s, 1H, H-8), 2.50 (ddd, $J = 17.5$, 11.0 and 2.4 Hz, 1H, H-6a), 2.61-2.85 (m, 2H, H-6b and H-5a), 3.34-3.70 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.13 (br dd, $J = 13.5$ and 5.3 Hz, 0.5H, H-5b), 4.42-4.58 (m, 1H, H-5b and H-1), 4.60-4.78 (m, 4H, CH_2Ph), 4.78-4.98 (m, 2.5H, CH_2Ph and H-1), 7.27-7.40 (m, 15H, CH_{Ar}).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 16.1 (C-6), 28.4 (C-3'), 40.0 and 41.5 (C-5), 50.8 and 52.4 (C-1), 70.3 (C-8), 72.9, 73.2 and 73.3, 75.7 and 75.8 (3 CH_2Ph), 77.4 (C-7), 78.3 and 78.4 (C-4), 79.0 and 79.4 (C-3), 80.5 and 80.7 (C-2'), 81.9 and 82.0 (C-2), 127.7, 127.88, 128.97, 128.02, 128.4, 128.6 (15 CH_{Ar}), 138.1, 138.3, 138.9 (3 C_{Ar}), 154.8 (C-2').

IR (neat): 1694 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 564.271 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{NNaO}_5$: 564.272).

α -1-C-propargyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (66) and α -1-C-propargyl-2-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (77)



To a solution of **75** (436 mg, 0.805 mmol) in CH_2Cl_2 (16 mL) was added pentamethylbenzene (1.790 g, 12.07 mmol, 15 eq.). Then boron trichloride (7.24 mL, 7.24 mmol, 9 eq.) is added dropwise at -78°C and the mixture was stirred four hours. 2 mL of MeOH/ H_2O (1:20) was added at -78°C and the mixture was evaporated to dryness. This step was repeated twice. The residue was purified by column chromatography (ACN/ H_2O / NH_4OH 15:0.5:0.5 to 10:0.5:0.5) to afford **66** as a white solid (92.5 mg, 67 %):

R_f 0.29 (ACN/ H_2O / NH_4OH 10:0.5:0.5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9.0$ (c 1, MeOH).

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 2.31 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-8), 2.36 (ddd, $J = 16.6$ Hz, 7.4 and 2.5 Hz, 1H, H-6a), 2.46 (ddd, $J = 16.6$ Hz, 7.8 and 2.5 Hz, 1H, H-6b), 2.80 (dd, $J = 13.3$ and 4.1 Hz, 1H, H-5a), 3.05 (dd, $J = 13.3$ and 2.7 Hz, 1H, H-5b), 3.09 (td, $J = 7.5$ and 2.6 Hz, 1H, H-1), 3.55 (br qd, $J = 4.1$ and 1.0 Hz, 1H, H-4), 3.69-3.73 (m, 1H, H-2), 3.76 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): δ 20.5 (C-6), 47.5 (C-5), 55.4 (C-1), 70.4, 71.2, 71.3 and 71.3 (C-2, C-3, C-4 and C-8), 82.0 (C-7).

IR (neat): 3282 (O-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 172.096 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_3$: 172.097).

Compound **77** was obtained as a by-product of the reaction (5 to 10%):

$R_f = 0.45$ (ACN/ H_2O / NH_4OH 10:0.5:0.5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22.0$ (c 0.33, MeOH).

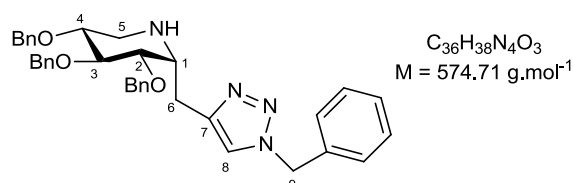
^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 2.36 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-8), 2.42 (ddd, $J = 16.8$ Hz, 7.8 and 2.6 Hz, 1H, H-6a), 2.48 (ddd, $J = 16.8$ Hz, 7.4 and 2.5 Hz, 1H, H-6b), 2.78 (dd, $J = 13.2$ and 5.1 Hz, 1H, H-5a), 3.03 (dd, $J = 13.1$ and 3.3 Hz, 1H, H-5b), 3.22 (td, $J = 7.6$ and 3.3 Hz, 1H, H-1), 3.52 (br q, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-4), 3.63 (dd, $J = 5.0$ and 3.4 Hz, 1H, H-2), 3.85 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-3), 4.62 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.74 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 7.25-7.38 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.38-7.45 (m, 2H, CH_{Ar}).

^{13}C (100 MHz, MeOD): δ 19.8 (C-6), 47.1 (C-5), 54.8 (C-1), 69.8 (C-3), 70.7 (C-4), 71.8 (C-8), 74.1 (CH_2Ph), 78.8 (C-2), 81.7 (C-7), 128.9, 129.39 and 129.44 (5 CH_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}).

IR (neat) : 3291 (O-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 262.145 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_3$: 262.144).

α -1-C-(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (79)



To a solution of **76** (42 mg, 0.095 mmol) and benzylazide **78** (16.5 mg, 0.124 mmol, 1.3 eq.) in THF (1 mL) were added $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.3 mg, 0.010 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (3.7 mg, 0.020 mmol, 0.2 eq.) dissolved in water (1 mL). The mixture was stirred overnight at rt. The mixture was diluted with AcOEt and the

phases were separated. The organic phase was washed with 10% solution of NH_4OH and then dried over Na_2SO_4 and evaporated. The residue was purified by column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:0 to 95:5) to afford **79** as a pale yellow oil (47 mg, 86%).

R_f 0.39 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{20} = -3.0$ (c 1, CHCl_3).

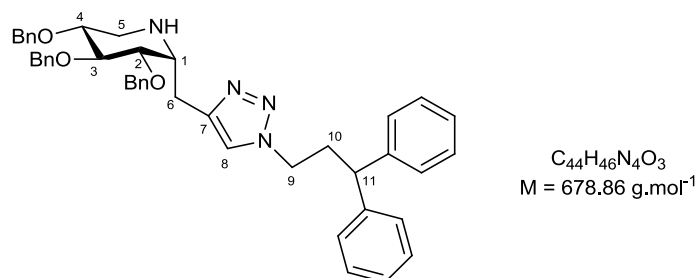
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.07 (br s, 1H, N-H), 2.96-3.15 (m, 4H, H-6 and H-5), 3.43-3.59 (m, 2H, H-1 and H-4), 3.62 (dd, $J = 6.3$ and 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.83 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3), 4.60 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.69 (s, 2H, CH_2Ph), 4.71-4.79 (m, 3H, CH_2Ph), 5.52 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, N- CH_2Ph), 5.58 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, N- CH_2Ph), 7.28-7.54 (m, 21H, H_{Ar} and H-8).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 24.7 (C-6), 44.4 (C-9 or C-5), 54.1 (C-9 or C-5), 55.2 (C-1), 72.1, 72.4 and 74.0 (3 CH_2Ph), 76.8 (C-2, C-3 or C-4), 77.4 (C-2, C-3 or C-4), 78.1 (C-2, C-3 or C-4), 121.7 (C-8), 127.6, 127.70, 127.73, 127.86, 127.92, 128.0, 128.10, 128.15, 128.39, 128.44, 128.7, 129.1, (20 CH_{Ar}), 135.0, 138.6, 138.7 (4 C_{Ar}), 146.4 (C-7).

IR (neat): 3295 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 575.301 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_3$: 575.302).

α -1-C-((1-(3,3-diphenylpropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (81**)**



To a solution of **76** (35.5 mg, 0.080 mmol) and 1,1-diphenyl-3-azidopropane **80** (26.7 mg, 0.113 mmol, 1.4 eq.) in THF (1 mL) were added $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.0 mg, 0.008 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (3.2 mg, 0.016 mmol, 0.2 eq.) dissolved in water (1 mL). The mixture was stirred overnight at rt. The mixture was diluted with AcOEt and the phases were separated. The organic phase was washed with 10% solution of NH_4OH and then dried over Na_2SO_4 and evaporated. The residue was purified by column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:0 to 95:5) to afford **81** as a pale yellow oil (43 mg, 79%).

R_f 0.44 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{20} = -5.0$ (c 1, CHCl_3).

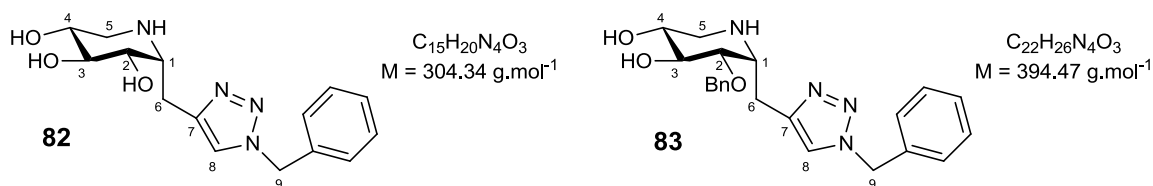
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.12 (br s, 1H, N-H), 2.78 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-10), 2.98-3.20 (m, 4H, H-5 and H-6), 3.48-3.55 (m, 1H, H-1), 3.55-3.64 (m, 1H, H-4), 3.68 (dd, $J = 6.3$ and 3.8 Hz, 1H, H-2), 3.89 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-3), 4.02 (t, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H-11), 4.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-9), 4.68 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.74 (s, 2H, CH_2Ph), 4.77-4.87 (m, 3H, CH_2Ph), 7.28-7.57 (m, 26H, H_{Ar} , and H-8).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 24.7 (C-6), 36.0 (C-10), 44.5 (C-5), 48.3 (C-1 or C-11), 48.7 (C-9), 55.2 (C-1 or C-11), 72.1, 72.5 and 74 (3 CH_2Ph), 72.1 (C-2, C-3 or C-4), 72.5 (C-2, C-3 or C-4), 74.1 (C-2, C-3 or C-4), 122.0 (C-8), 126.8, 127.68, 127.70, 127.73, 127.8, 127.86, 127.87, 127.93, 128.1, 128.4, 128.5, 128.9 (25 CH_{Ar}), 138.6, 138.7 and 143.3 (5 C_{Ar}), 145.8 (C-7).

IR (neat): 3260 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 679.365 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_3$: 679.364).

α -1-C-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (82**) and α -1-C-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-2-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (**83**)**



To a solution of **79** (47 mg, 0.082 mmol) in CH_2Cl_2 at -60°C was added dropwise BCl_3 1M solution in CH_2Cl_2 (0.5 mL, 0.50 mmol, 6 eq.). The mixture was allowed to raise 0°C in 3 hours. Then, a 20:1 mixture of $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3 mL) was added and after 10 minutes stirring, the solvent was evaporated. This step was repeated once again. The residue was purified by column chromatography ($\text{ACN}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 15:0.5:0.5 to 10:0.5:0.5) to afford **82** as a pale yellow oil (10 mg, 40%):

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.0$ (c 0.55, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 3.11 (dd, $J = 15.1$ and 6.9 Hz, 1H, H-6a), 3.17-3.28 (m, 2H, H-6b and H-5a), 3.43 (dd, $J = 13.1$ and 1.8 Hz, 1H, H-5b), 3.70-3.74 (m, 1H, H-2), 3.78 (br td, $J = 8.4$ and 1.8 Hz, 1H, H-1), 3.90-3.99 (m, 2H, H-3 and H-4), 5.59 (s, 2H, H-9), 7.28-7.43 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.92 (s, 1H, H-8).

^{13}C (75 MHz, MeOD): δ 25.9 (C-6), 47.5 (C-5), 55.0 (C-9), 56.3 (C-1), 67.8 (C-2, C-3 or C-4), 68.0 (C-2, C-3 or C-4), 69.6 (C-2, C-3 or C-4), 124.9 (C-8), 129.3, 129.6 and 130.0 (5 CH_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 143.3 (C-7); IR (neat) : 3240, 3124, 3001 (O-H, N-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 305.160 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$: 305.161).

83 (19 mg, 59%) was obtained as a by-product in the above reaction as no complete reaction could be obtained.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.0$ (c 1, MeOH).

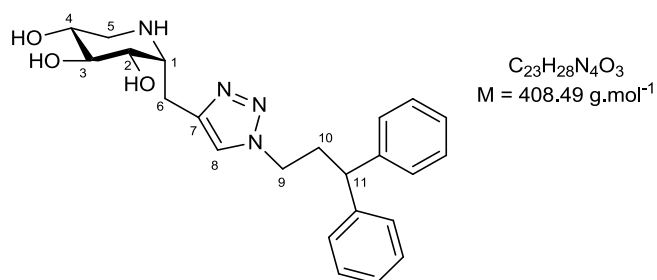
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 2.80-3.03 (m, 3H, H-6 and H-5a), 3.10 (dd, $J = 13.6$ and 2.2 Hz, 1H, H-5b), 3.26-3.37 (m, 1H, H-1), 3.55-3.60 (m, 1H, H-3), 3.64 (br t, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-2), 3.74-3.79 (m, 1H, H-4), 4.52 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.57 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.56 (s, 2H, H-9), 7.18-7.41 (m, 10H, H_{Ar}), 7.76 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ 27.6 (C-6), 48.3 (C-5), 54.9 (C-9), 56.2 (C-4), 67.7 (C-1), 68.6 (C-3), 73.3 (CH_2Ph), 77.2 (C-2), 124.4 (C-8), 128.8, 128.9, 129.1, 129.4, 129.5, 130.0 (10 CH_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 145.8 (C-7).

IR (neat): 3276, 3032, 2918 (O-H, N-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 395.207 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$: 395.208).

α -1-C-((1-(3,3-diphenylpropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (84**)**



To a solution of **81** (44 mg, 0.065 mmol) in CH_2Cl_2 (2.5 mL) at -60°C was added dropwise BCl_3 1M solution in CH_2Cl_2 (0.4 mL, 0.4 mmol, 6 eq.). The solution was allowed to raise room temperature and stirred overnight.

Then a MeOH/H₂O (20:1 solution, 3 mL) was added and it was evaporated to dryness. This step was repeated once again. The residue was purified by column chromatography (ACN/NH₄OH/H₂O 15:0.5:0.5) to afford **84** as a white solid (21 mg, 80%).

R_f 0.29 (ACN/NH₄OH/H₂O 10:1:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.5$ (*c* 1, MeOH).

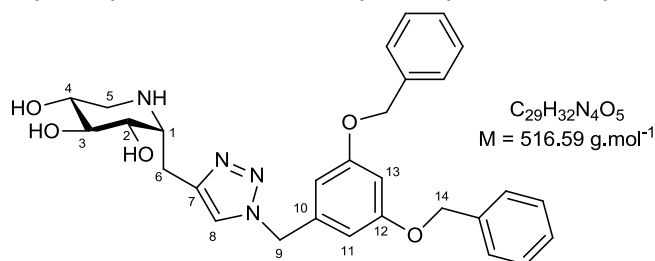
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 2.69 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-10), 3.11 (dd, *J* = 14.8 and 7 Hz, 1H, H-6a), 3.16-3.30 (m, 2H, H-6b and H-5a), 3.44 (dd, *J* = 13.2 and 2.0 Hz, 1H, H-5b), 3.70-3.82 (m, 2H, H-2 and H-1), 3.88-4.01 (m, 3H, H-11, H-3 and H-4), 4.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-9), 7.09-7.23 (m, 3H, H_{Ar}), 7.23-7.37 (m, 7H, H_{Ar}), 7.82 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD): δ 25.9 (C-6), 36.8 (C-10), 47.5 (C-5), 49.6 (C-11), 50.1 (C-9), 56.3 (C-1), 67.8 (C-3 or C-4), 68.0 (C-3 or C-4), 69.6 (C-2), 125.0 (C-8), 127.6, 128.8 and 129.7 (10 CH_{Ar}), 142.9, 145.0 (2 C_{Ar} and C-7).

IR (neat): 3330, 3025 (O-H and N-H) cm⁻¹.

HRMS (ESI): *m/z* 409.223 ([M+H⁺], calcd. for C₂₃H₂₉N₄O₃: 409.225).

α -1-C-((1-(3,5-bis(benzyloxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (86)



66 (17 mg, 0.099 mmol) and **85** (42 mg, 0.122 mmol, 1.3 eq.) were solubilized in THF (1 mL) and CuSO₄·5H₂O (2.3 mg, 0.009 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (3.7 mg, 0.019 mmol, 0.2 eq.), dissolved in water (1 mL), were added. The mixture was stirred overnight and then the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (ACN/NH₄OH/H₂O 15:0.5:0.5) to afford **86** as a white solid (37.5 mg, 78%).

R_f 0.12 (ACN/NH₄OH/H₂O 10:0.5:0.5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.0$ (*c* 0.17, MeOH).

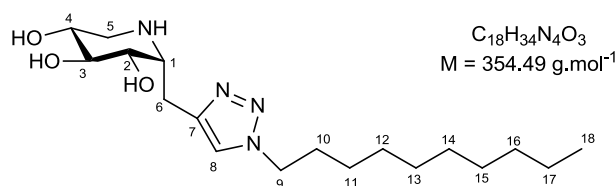
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 2.99 (dd, *J* = 14.7 and 7.2 Hz, 1H, H-6a), 3.03-3.15 (m, 2H, H-6b and H-5a), 3.22-3.30 (m, 1H, H-5b), 3.57 (td, *J* = 7.4 and 2.2 Hz, 1H, H-1), 3.61-3.65 (m, 1H, H-2), 3.73-4.81 (m, 1H, H-4), 3.87 (t, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-3), 5.03 (s, 4H, H-14), 5.47 (s, 2H, H-9), 6.53-6.58 (m, 2H, H-11), 6.59-6.62 (m, 1H, H-13), 7.23-7.44 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.78 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD): δ 26.4 (C-6), 47.5 (C-5), 54.9 (C-9), 56.2 (C-1), 69.0 (C-2), 69.3 (C-3), 70.4 (C-4), 71.2 (C-14), 103.1 (C-13), 108.4 (C-11), 124.7 (C-8), 128.6, 128.9, 129.5 (13 CH_{Ar}), 138.4, 138.8 (3 C_{Ar}), 144.6 (C-7), 161.8 (C-12).

IR (neat): 3253 (O-H and N-H) cm⁻¹.

HRMS (ESI): *m/z* 517.244 ([M+H⁺], calcd. for C₂₉H₃₃N₄O₃: 517.245).

α -1-C-((1-decyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (88**)**



Compound **66** (17 mg, 0.099 mmol) and 1-azidodecane **88** (25 mg, 0.137 mmol, 1.3 eq.) were solubilized in THF (1 mL). $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.6 mg, 0.011 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (4.2 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq.), dissolved in water (1 mL) were added. The mixture was stirred overnight and then the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography (ACN/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 15:0.5:0.5) to afford **88** as a white solid (22.2 mg, 60%).

R_f 0.22 (ACN/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 10:1:1).

$[\alpha]_D^{20} = -8.0$ (c 1, MeOH).

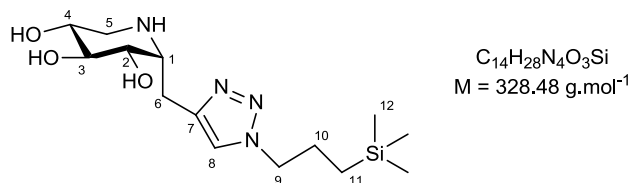
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-18), 1.17-1.46 (m, 14H, H-11 to H-17), 1.80-1.97 (m, 2H, H-10), 3.12 (dd, $J = 14.8$ and 6.6 Hz, 1H, H-6a), 3.17-3.29 (m, 2H, H-6b and H-5a), 3.44 (dd, $J = 13.1$ and 2.0 Hz, 1H, H-5b), 3.71-3.74 (m, 1H, H-2), 3.78 (td, $J = 7.3$ and 1.7 Hz, 1H, H-1), 3.90-4.01 (m, 2H, H-3 and H-4), 4.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-9), 7.91 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ 14.4 (C-18), 23.7, 25.9 (C-6), 27.5, 30.1, 30.4, 30.5, 30.6, 31.3 (C-10), 33.0, 47.5 (C-5), 51.4 (C-9), 56.3 (C-1), 67.9 (C-3 or C-4), 68.0 (C-3 or C-4), 69.6 (C-2), 124.8 (C-8), 142.9 (C-7).

IR (neat): 3348 (O-H and N-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 355.270 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3$: 355.271).

α -1-C-((1-(3-(trimethylsilyl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (90**)**



Compound **66** (17 mg, 0.099 mmol) and (3-azidopropyl)trimethylsilane **89** (20.3 mg, 0.129 mmol) were solubilized in THF (1 mL). $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg, 0.010 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (3.9 mg, 0.020 mmol, 0.2 eq.), dissolved in water (1 mL), were added. The mixture was stirred overnight, and then the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography (ACN/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 15:0.5:0.5) to afford **90** as a white solid (21.6 mg, 66%).

R_f 0.43 (ACN/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 10:1:1).

$[\alpha]_D^{20} = -7.5$ (c 1, MeOH).

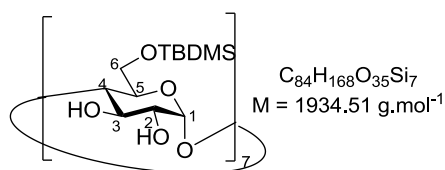
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 0.0 (s, 9H, H-12), 0.44-0.56 (m, 2H, H-11), 1.83-1.98 (m, 2H, H-10), 3.12 (dd, $J = 14.9$ and 6.7 Hz, 1H, H-6a), 3.18-3.39 (m, 2H, H-6b and H-5a), 3.45 (dd, $J = 13.1$ and 1.9 Hz, 1H, H-5b), 3.71-3.76 (m, 1H, H-2), 3.79 (td, $J = 7.5$ and 1.5 Hz, 1H, H-1), 3.90-4.01 (m, 2H, H-3 and H-4), 4.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-9), 7.92 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ -1.9 (C-12), 14.3 (C-11), 25.9 (C-6), 26.3 (C-10), 47.5 (C-5), 54.4 (C-9), 56.4 (C-1), 67.8 (C-3 or C-4), 68.0 (C-3 or C-4), 69.6 (C-2), 124.9 (C-8), 142.8 (C-7).

IR (neat): 3336, 3022 (O-H and N-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 329.200 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3\text{Si}$: 329.201).

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**157**)²⁵⁹



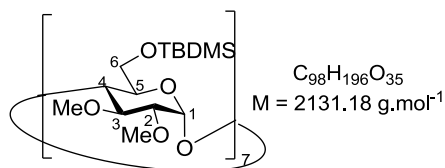
To a stirred suspension of β -cyclodextrin (2g, 1.76 mmol) in pyridine (29 mL) was added *tert*-butyldimethylsilylchloride. The mixture was stirred 24 hours, then 1.5 eq of *tert*-butyldimethylsilylchloride was added again and the suspension was stirred another 24 hours. The mixture was poured into ice water (320 mL). The white solid was then filtrated and dried under vacuum. The white powder was then purified by flash column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 1:0 to 8:2) to afford **157** as a white powder (1.82 g, 53%). Analytical data were consistent with the literature:²⁵⁹

R_f 0.25 (AcOEt/EP 1:7).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.03 (s, 21H, $Si^iBu(CH_3)_2$), 0.04 (s, 21H, $Si^iBu(CH_3)_2$), 0.86 (s, 63H, $Si^iBu(CH_3)_2$), 3.42-3.80 (m, 28H), 3.90 (dd, $J = 10.7$ and 1.8 Hz, 7H), 4.04 (t, $J = 9.0$ Hz, 7H), 4.89 (d, $J = 3.3$ Hz, 7H, H-1), 5.27 (br s, 7H, OH), 6.73 (br s, 7H, OH).

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ -5.0, -4.9 ($Si^iBu(CH_3)_2$), 18.4 ($SiC(CH_3)_3(CH_3)_2$), 26.1 ($SiC(CH_3)_3(CH_3)_2$), 61.8 (C-6), 72.7, 73.6 and 73.8 (C-2, C-3 and C-5), 81.9 (C-4), 102.2 (C-1).

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (**158**)²⁵⁹

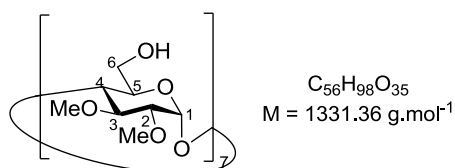


Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose **157** (1g, 0.517 mmol) was dissolved in THF (25 mL), NaH (60% in oil, 870 mg, 21.7 mmol, 3 x 14 eq.) was added by portion at 0°C. The mixture was stirred 30 min at rt and MeI (5.14 g, 36.2 mmol, 2.25 mL, 5 x 14 eq.) was added. The solution was stirred overnight then MeOH was added to quench the reaction. The mixture was extracted with AcOEt (2 x 50 mL) and the organic phase was washed with brine dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The residue was then purified by flash column chromatography (AcOEt: Petroleum ether 1:5 to 1:1) to afford **158** as a white powder (805 mg, 73%). Analytical data were consistent with the literature:²⁵⁹

R_f 0.42 (AcOEt/EP 3:7).

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 0.01 (s, 21H, $Si^iBu(CH_3)_2$), 0.02 (s, 21H, $Si^iBu(CH_3)_2$), 0.87 (s, 63H, $Si^iBu(CH_3)_2$), 3.05 (dd, $J = 9.7$ and 3.1 Hz, 7H), 3.51 (s, 21H, OMe), 3.66 (s, 21H, OMe), 3.52-3.79 (m, 28H), 4.12 (d, $J = 9.9$ Hz, 7H), 5.19 (d, $J = 3.3$ Hz, 7H, H-1).

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**159**)²⁵⁹

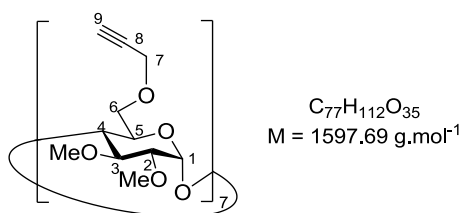


To a solution of Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose **158** (1.7 g, 0.81 mmol) in THF (23 mL) was added TBAF (1M solution in THF, 7.9 mL, 1.4 x 7 eq.). The mixture was refluxed 4 hours. Solvents were evaporated and the residue was taken in DCM (50 mL) and the organic phase was washed twice with brine (2 x 30 mL). The residue was then purified by flash column chromatography (AcOEt: Petroleum ether 1:5 to 1:1) to afford **159** as a yellowish solid (910 mg, 84%). Analytical data were consistent with the literature:²⁵⁹

R_f 0.42 (AcOEt/EP 3:7).

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, MeOD): δ 2.81 (dd, $J = 9.4$ and 3.5 Hz, 7H), 3.17 (s, 21H, OMe), 3.29 (s, 21H, OMe), 3.16-3.32 (m, 14H), 3.32-3.43 (m, 7H), 3.43-3.51 (m, 7H), 3.58 (dd, $J = 12.2$ and 3.5 Hz, 7H), 4.84 (d, $J = 3.4$ Hz, 7H, H-1).

Heptakis(2,3-dimethyl-6-propargyl)cyclomaltoheptaose (**153**)²⁰⁰



To a solution of Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose **158** in DMF/DMSO (1:1, 12 mL) were added BaO and Ba(OH)₂ (1.04 g of each) and propargyl bromide (80% solution in toluene, 2.35 mL, 7 x 8.3 eq) and the mixture was stirred 4 days. At the end of the reaction AcOEt was added and several washings with brine were made. The organic layer was then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The product was purified by flash column chromatography to afford **153** as a yellow solid (540 mg, 90%).

$[\alpha]_D^{20} = +126.5$ (c 1, CHCl₃).

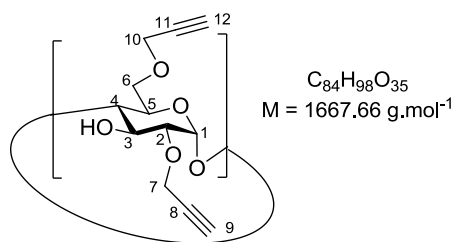
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃): δ 2.48 (t, $J = 2.3$ Hz, 7H, H-9), 3,17 (dd, $J = 9.4$ and 3.5 Hz, 7H, H-2), 3.44-3.52 (m, 7H, H-3), 3.48 (s, 21H, OMe), 3.56 (t, $J = 8,8$ Hz, 7H, H-4), 3.62 (s, 21H, OMe), 3.80-3.85 (m, 7H, H-5), 3.86 (m, 14H, H-6), 4.27 (dd, $J = 15,8$ and $2,5$ Hz, 14H, H-7), 5,10 (d, $J = 3,7$ Hz, 7H, H-1).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl₃): δ 58.6, 58.6, 61.6, 69.0, 70.9, 75.0, 79.9, 80.8, 81.9, 82.2, 99.2.

IR (neat): 3256 ($\equiv\text{C-H}$), 2114 ($\text{C}\equiv\text{C}$) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 1619.67 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. for $C_{77}H_{112}O_{35}\text{Na}$: 1619.69).

Heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose (**154**)²⁰⁷



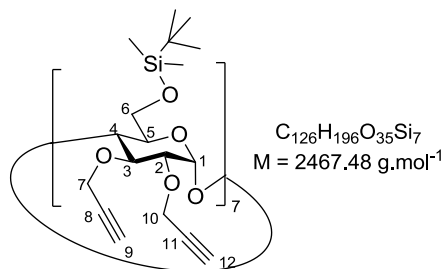
To a suspension of β CD (1 g, 0.88 mmol) in DMF/DMSO 1:1 (50 mL) was added propargylbromide (80% solution in toluene, 9.04 mL, 6.8 x 14 eq.) and BaO (5 g) and Ba(OH)₂ (5 g). The reaction was stirred at rt for 72 hours. Then MeOH (10 mL) was added. The mixture was extracted with difficulties with AcOEt. The organic phase was washed with water then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. Several column chromatographies were needed to separate the product from the more substituted by-products (CH₂Cl₂/MeOH 99:1 to 95:5). The product **154** could be obtained as a yellow solid (439 mg, 30%).

Analytical data were consistent with the literature:²⁰⁷

R_f 0.10 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.46 (t, $J = 2.3$ Hz, 7H, H-9 or H-12), 2.50 (t, $J = 2.3$ Hz, 7H, H-9 or H-12), 3.49 (t, $J = 9.3$, 7H, H-4), 3.66-3.75 (m, 14H, H-5 and H-2), 3.79 (dd, $J = 10.1$ and 4.1 Hz, 7H, H-6a), 3.89-4.02 (m, 14H, H-6b and H-3), 4.20 (dd, $J = 15.8$ and 2.5 Hz, 7H, H-10a), 4.31 (dd, $J = 15.8$ and 2.3 Hz, 7H, H-10b), 4.51 (dd, $J = 15.9$ and 2.3 Hz, 7H, H-7a), 4.57 (dd, $J = 15.9$ and 2.3 Hz, 7H, H-7b), 4.75 (s, 7H, OH), 4.99 (d, $J = 3.8$ Hz, 7H, H-1).

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-2,3-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose (**160**)²⁶⁰

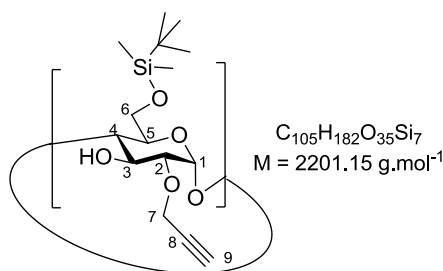


To a solution of heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose **157** (359 mg, 0.186 mmol) in DMF (5.5 mL) were added propargylbromide (80% solution in toluene, 0.7 mL, 6.493 mmol, 2.5 x 14 eq.) and tetra-*n*-butylammonium iodide (96 mg, 0.260 mmol, 0.1 x 7 eq.). The mixture was placed in the dark and NaH was added portionwise. The mixture was stirred at rt overnight. MeOH and then water were added to quench the reaction. The mixture was then extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the organic phase was washed with brine (2 x 20 mL). The residue was then purified by column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether, 1:9 to 1:5) to give **160** as a white solid (101 mg, 22 %). Analytical data were consistent with the literature:²⁶⁰

R_f 0.25 (AcOEt/EP 1:7).

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 0.01 (s, 42H, Si^tBu(CH₃)₂), 0.87 (s, 63H, Si^tBu(CH₃)₂), 2.39 (t, $J = 2.0$ Hz, 7H, H-9 or H-12), 2.51 (t, $J = 2.0$ Hz, 7H, H-9 or H-12), 3.48 (dd, $J = 9.1$ and 3.3 Hz, 7H, H-2), 3.52-3.68 (m, 14H, H-5 and H-6a), 3.80 (t, $J = 9.0$ Hz, 7H, H-4), 3.87 (t, $J = 8.9$ Hz, 7H, H-3), 4.11 (d, $J = 9.9$ Hz, 7H, H-6b), 4.40 (dd, $J = 16.0$ and 2.2 Hz, 7H, H-7 or H-10), 4.43 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.66 (dd, $J = 15.2$ and 2.1 Hz, 7H, H-7 or H-10), 5.20 (d, $J = 3.3$ Hz, 7H, H-1).

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose (**161**)²⁶¹



This compound **161** was obtained as a non-desirated compound in many of the dipropagation-trials to get **160**.

R_f 0.46 (AcOEt/EP 1:4).

$[\alpha]_D^{20} = +45.2$ (c 1.2, $CHCl_3$).

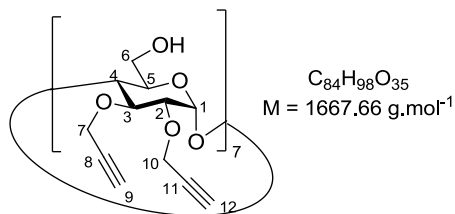
1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 0.04 (s, 42H, $Si^tBu(CH_3)_2$), 0.87 (s, 63H, $Si^tBu(CH_3)_2$), 2.45 (t, $J = 2.3$ Hz, 7H, H-9), 3.50-3.61 (m, 21H, H-2, H-4 and H-5), 3.66 (d, $J = 11.1$ Hz, 7H, H-6a), 3.93 (d, $J = 11.8$, 7H, H-6b), 3.95-4.01 (m, 7H, H-3), 4.51 (dd, $J = 15.9$ and 2.1 Hz, 7H, H-7a), 4.56 (dd, $J = 15.9$ and 2.4 Hz, 7H, H-7b), 4.71 (s, 7H, O-H), 4.96 (d, $J = 3.6$ Hz, 7H, H-1).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -5.1 and -4.9 ($Si^tBu(CH_3)_2$), 18.4 ($SiC(CH_3)_3(CH_3)_2$), 26.1 ($SiC(CH_3)_3(CH_3)_2$), 59.5 (C-7), 61.9 (C-6), 71.8 (C-5), 73.6 (C-3), 75.2 (C-9), 79.0 (C-2 or C-4), 79.6 (C-8), 82.1 (C-2 or C-4), 101.3 (C-1).

IR (neat): 3450 (OH), 3312 ($\equiv C-H$), 2120 ($C\equiv C$) cm^{-1}

MALDI-TOF-MS: average m/z 2222.22 (calcd. for $C_{105}H_{182}O_{35}NaSi_7$: 2222.07).

Heptakis(2,3-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose (**155**)²⁶⁰

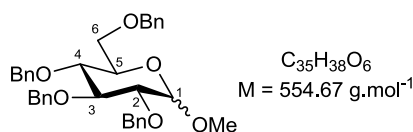


To a solution of heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **160** (81 mg, 0.033 mmol) in THF (1.3 mL) was added TBAF (1M in THF solution, 0.7 mL, 0.689 mmol, 3 x 7 eq.). The mixture was stirred overnight at rt, then it was evaporated. AcOEt (20 mL) was added and the organic phase was washed with brine (2 x 10 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The residue was then purified by column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5 to 8:2) to give **155** as a white solid (50.8 mg, 93 %). Analytical data were consistent with the literature.²⁶⁰

R_f 0.48 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 85:15).

1H NMR (300MHz, MeOD) δ 2.82 (t, $J = 2.3$ Hz, 7H, H-9 or H-12), 2.88 (t, $J = 2.3$ Hz, 7H, H-9 or H-12), 3.56 (dd, $J = 9.3$ and 3.4 Hz, 7H, H-2), 3.67-4.02 (m, 42H, H-3, H-4, H-5 and H-6), 4.41-4.48 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.51 (dd, $J = 15.2$ and 2.3 Hz, 7H, H-7 or H-10), 4.65 (dd, $J = 15.3$ and 2.4 Hz, 7H, H-7 or H-10), 5.26 (d, $J = 3.5$ Hz, 7H, H-1).

α - and β -methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranosides (**168**)



Under anhydrous conditions, thionyl chloride (2 mL, 27.6 mmol) was added dropwise to methanol (100 mL) in order to get a 1% solution of HCl. D-glucose (10.0 g, 55.5 mmol, 1.0 eq) was then added and the reaction mixture was stirred under reflux for 4 hours. After cooling down to 0°C, sodium bicarbonate (7 g) was added slowly and the mixture filtered off. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was taken in ethanol (80 mL) and the solution was concentrated to a half of the original volume. Toluene was then added and the mixture was concentrated under reduced pressure and dried under vacuum to afford yellow foam **167**, which was not further purified before utilization in the next step.

The crude mixture was partially dissolved in anhydrous DMF (340 mL). At 0°C benzyl bromide (47.5 mL, 399.6 mmol, 6.0 eq) was added in one portion, a sodium hydride (suspension in oil 60%, 7.9 g, 333 mmol, 5.0 eq) was slowly added in small portions. The mixture was first stirred at 0°C for 1 hour and then at rt for 19 hours. 10 mL of a saturated solution of ammonium chloride were added in order to quench residual sodium hydride, followed by water (200 mL). This mixture was extracted using diethyl ether (3 x 250 mL); the organic phase was then washed with water (2 x 80 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (ethyl acetate/petroleum ether 0:1 to 6:4). Compound **168** was obtained as white crystals (21.7 g, 70%).

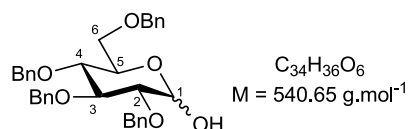
Anomer β R_f 0.58 (AcOEt/Petroleum Ether 1:3).

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 3.40-3.51 (m, 2H, H-2 and H-5), 3.54-3.65 (m, 5H, H-3, H-4 and OMe), 3.69 (dd, $J = 10.8$ and 4.8 Hz, 1H, H-6a), 3.76 (dd, $J = 10.6$ and 2.3 Hz, 1H, H-6b), 4.31 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-1), 4.53 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.55 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.62 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.70 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.78 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.82 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.55 (d, $J = 10.9$ Hz, 2H, CH_2Ph), 7.12-7.19 (m, 2H, H_{Ar}), 7.21-7.41 (m, 18H, H_{Ar}).

Anomer α R_f 0.48 (AcOEt/Petroleum Ether 1:3).

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 3.40 (s, 3H, OMe), 3.58 (dd, $J = 9.8$ and 3.6 Hz, 1H, H-2), 3.60-3.70 (m, 2H, H-4 and H-6a), 3.70-3.82 (m, 2H, H-5 and H-6b), 4.01 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 4.50 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H, CH_2Ph), 4.59-4.73 (m, 3H, CH_2Ph and H-1), 4.82 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.84 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.86 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.00 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 7.12-7.19 (m, 2H, H_{Ar}), 7.24-7.42 (m, 18H, H_{Ar}).

2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose (**166**)

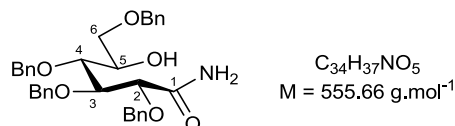


Compound **168** (10 g, 23 mmol, 1.0 eq) was dissolved in glacial acetic acid (200 mL). A 2 M solution of hydrochloric acid (80 mL) was added and the colorless solution was then stirred at 80°C for 15 hours. The mixture was allowed to cool down slowly to r.t. then 0°C and crystallization was observed. The mixture was filtered, the white crystals washed with water and dried under vacuum. Compound **166** was obtained as white needles (6 g, 60%).

R_f 0.60 (ethyl acetate/petroleum ether 1:2).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) Mixture of diastereomers (α/β 1:0.1): δ 2.87 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{OH}\alpha$), 3.13 (d, $J = 5.6$ Hz, 0.1H), 3.35-3.40 (m, 0.3 H), 3.48-3.68 (m, 5.1 H), 3.89-4.10 (m, 2.1 H), 4.39-4.89 (m, 8.6 H), 4.90-5.02 (m, 1.2H), 5.23 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, $\text{H-1}\alpha$), 7.07-7.19 (m, 2.4 H), 7.20-7.45 (m, 22.1 H).

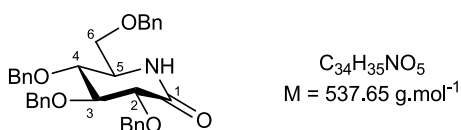
2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-gluconamide (**165**)²⁶⁴



A 30% aqueous NH_3 solution (21 mL) and iodine (650 mg, 2.57 mmol) were added to a solution of **166** (1.07 g, 1.98 mmol) in THF (4.5 mL). After 16 h, a 5% aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution (3 mL) was added. The resulting mixture was extracted with Et_2O (3 x 25 mL). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (AcOEt/petroleum ether 2:) to afford **165** (854 mg, 78%) as an amorphous white solid. The analytical data of **165** were in complete agreement with those reported in the literature:²⁶⁴

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.81 (br d, $J = 3.6$ Hz, 1H, O-H), 3.58 (dd, $J = 9.6$ and 5.3 Hz, 1H, H-6a), 3.65 (dd, $J = 9.8$ and 2.9 Hz, 1H, H-6b), 3.83-3.94 (m, 2H, H-4, H-5), 4.07 (dd, $J = 5.2$ and 3.3 Hz, 1H, H-3), 4.25 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-2), 4.46-4.76 (m, 8H, CH_2Ph), 5.43 (s, 1H, NH), 6.60 (s, 1H, NH), 7.19-7.40 (m, 20H, H_{Ar}).

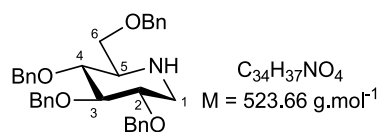
2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-glucono- δ -lactam (**169**)²⁶²



A solution of **165** (911 mg, 1.64 mmol) and acetic anhydride (3.5 mL) in DMSO (6 mL) was stirred at room temperature for 17 h. The mixture was then cooled at 0°C and H_2O (22 mL) was added. The mixture was stirred for another 15 min., then extracted with Et_2O (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The product was used for the next step without further purification. The resulting liquid was dissolved in CH_3CN (35 mL) and formic acid (6.2 mL) was added. NaCNBH_3 (330 mg, 5.25 mmol) was then added and the mixture heated under reflux for 3 h. The mixture was then cooled at 0°C and a 0.1 M aqueous HCl solution (50 mL) was added. The resulting mixture was poured into a 1:1 mixture of ethyl acetate/saturated aqueous NaHCO_3 (100 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:1) to afford **169** (532 mg, 60 % over the two steps) as a white solid. The analytical data of **3** were in complete agreement with those reported in the literature:²⁶²

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.25 (td, $J = 8.4$ and 1.5 Hz, 1H, H-4), 3.44-3.63 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-3), 4.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-2), 4.47 (m, 3H, CH_2Ph), 4.72 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.77 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.84 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.85 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.17 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.88 (s, 1H, NH), 7.13-7.46 (m, 20H, H_{Ar}).

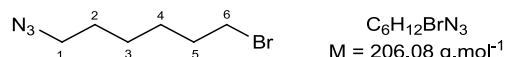
2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**164**)²⁶²



A solution of **169** (532 mg, 0.99 mmol) in dry THF (8 mL) was added dropwise to a suspension of LAH (113 mg, 2.97 mmol) in dry THF (6 mL) at 0°C. The reaction mixture was heated under reflux for 2 h, then cooled at 0°C. H₂O (0.12 mL) and a 15% aqueous NaOH solution (0.12 mL) were successively added to the mixture. After 15 min., an additional portion of H₂O (0.8 mL) was added. The resulting mixture was filtered through a pad of celite with Et₂O and concentrated. The residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:1) to afford **164** (465 mg, 90%) as a colorless syrup. The analytical data of **164** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁶²

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.51 (dd, $J = 12.3$ and 10.4 Hz, 1 H, H-1a), 2.73 (ddd, $J = 9.9$, 5.8 and 2.8 Hz, 1H, H-5), 3.25 (dd, $J = 12.3$ and 4.5 Hz, 1H, H-1b), 3.36 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 3.46-3.60 (m, 3H, H-2, H-3, H-6a), 3.68 (dd, $J = 9.0$ and $.7$ Hz, 1H, H-6b), 4.39-4.53 (m, 3H, CH₂Ph), 4.65 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.71 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.98 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, CH₂Ph), 7.17-7.23 (m, 2H, H_{Ar}), 7.23-7.38 (m, 18H, H_{Ar}).

1-Azido-6-bromohexane (**170**)²⁶⁵

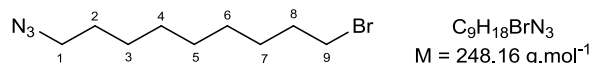


To a solution of 1,6-dibromohexane (9.4 g, 38.5 mmol) in DMSO (20 mL) was added NaN₃ (1 g, 15.4 mmol, 0.4 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 19 h. Then water was added (100 mL) and extracted with Et₂O (3 x 60 mL). Organic layers were washed with brine (20 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. Resulting residue was purified by column chromatography (petroleum ether to Et₂O/petroleum ether 1:9) to afford **170** as a colorless liquid oil (1.1 g, 14%). Analytical data were consistent with the literature.²⁶⁵

R_f 0.31 (petroleum ether).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.34-1.51 (m, 4H, H-3 and H-4), 1.61 (quintuplet, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-2), 1.86 (quintuplet, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-5), 3.26 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-1), 3.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-6).

1-Azido-9-bromononane (**171**)



To a solution of 1,9-dibromononane (2.0 g, 6.99 mmol) in DMSO (4 mL) was added NaN₃ (0.19 g, 2.77 mmol) and the solution was stirred at room temperature for 4 h. Then water was added (25 mL) and the reaction mixture was extracted with Et₂O (3 x 15 mL). Organic layers were washed with brine (20 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to dryness. Resulting residue was purified by flash column chromatography (petroleum ether to Et₂O/petroleum ether 1:9) to afford **171** as a colorless liquid oil (520 mg, 30%).

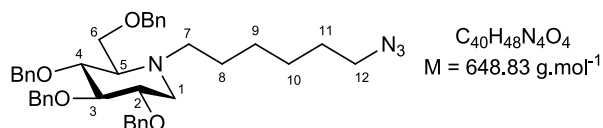
R_f 0.36 (petroleum ether).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.23-1.45 (m, 10H, H-3 to H-7), 1.53-1.62 (m, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-2), 1.78-1.88 (m, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-8), 3.23 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-1), 3.38 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-9).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 26.9, 28.3, 28.8, 29.0, 29.2, 29.5, 33.0, 34.1, 51.7.

IR (neat): 2091 (N_3) cm^{-1} .

N-(6-Azidohexyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**172**)



A suspension of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol **164** (748 mg, 1.43 mmol), 1-azido-6-bromohexane **170** (383 mg, 1.86 mmol) and K_2CO_3 (247 mg, 1.86 mmol) in CH_3CN (10 mL) was heated under microwave irradiation at 150 °C for 2 h. Then an additional portion of 1-azido-6-bromohexane (147 mg, 0.72 mmol) was added and the suspension was heated under microwave irradiation at 150 °C for 2 h more. The resulting suspension was filtered, solid was washed with CH_2Cl_2 (2 x 20 mL) and the filtrate was concentrated to dryness. The residue obtained was purified by flash chromatography (petroleum ether to AcOEt/petroleum ether 1:8) giving **172** (748 mg, 81%) as a colorless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.0$ (c 1, CHCl_3).

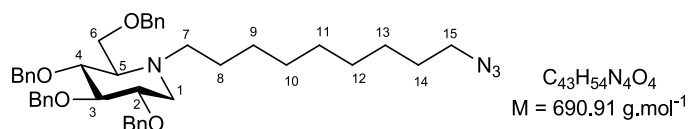
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.08-1.28 (m, 2H), 1.28-1.51 (m, 4H), 1.58 (quintuplet, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-11), 2.24 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-1a), 2.34 (br d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-5), 2.51-2.64 (m, 1H, H-7a), 2.64-2.80 (m, 1H, H-7b), 3.11 (dd, $J = 11.1$ and 4.8 Hz, 1H, H-1b), 3.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-12), 3.49 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.54-3.64 (m, 2H), 3.64-3.76 (m, 2H), 4.47 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H, CH_2Ph), 4.53 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.67 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.73 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.84 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.91 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.99 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 7.13-7.22 (m, 2H, H_{Ar}), 7.24-7.43 (m, 18H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 23.8, 26.7, 27.1, 28.9 (C-8, C-9, C-10 and C-11), 51.4 (C-12), 52.3 (C-7), 54.6 (C-1), 64.0 (C-5), 65.7 (C-6), 72.8, 73.5, 75.3, 75.4 (4 CH_2Ph), 78.65 (C-2 or C-4), 78.7 (C-2 or C-4), 87.4 (C-3), 127.5, 127.6, 127.7, 127.9, 128.4, 128.4, 128.5 (20 CH_{Ar}), 137.9, 138.7, 139.1 (4 C_{Ar}).

IR (neat): 2093 (N_3) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 649.378 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. For $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_4$: 649.375).

N-(9-Azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**173**)



A suspension of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol **164** (500 mg, 0.95 mmol), **171** (308 mg, 1.24 mmol) and K_2CO_3 (172 mg, 1.24 mmol) in CH_3CN (10 mL) was heated under microwave irradiation at 150 °C for 2 h. Then an additional portion of **171** (118 mg, 0.48 mmol) was added and suspension was heated under microwave irradiation at 150 °C for 1 h more. The resulting suspension was filtered, the solid was washed with CH_2Cl_2 (2 x 15 mL) and the resulting filtrate was concentrated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:9 to 1:8) to give **173** (462 mg, 65%) as a colorless oil.

R_f 0.74 (AcOEt/petroleum ether 1:2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.0$ (c 1.0, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.15-1.44 (m, 12H, H-8 to H-13), 1.63 (m, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-14), 2.26 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-1b), 2.33 (br d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-5), 2.55-2.76 (m, 2H, H-7), 3.12 (dd, $J = 11.1$ and 4.8 Hz, 1H,

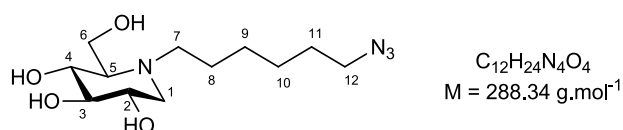
H-1a), 3.29 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-15), 3.49 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.57 (dd, $J = 11.5$ and 2.1 Hz, 1H, H-6b), 3.59-3.66 (m, 1H, H-4), 3.60-3.70 (m, 1H, H-6a), 3.68-3.75 (m, 1H, H-2), 4.45 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.47-4.55 (m, 2H, CH₂Ph), 4.68 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.73 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.85 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.91 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.99 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH₂Ph), 7.15-7.18 (m, 2H, H_{Ar}), 7.26-7.39 (m, 18H, H_{Ar}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 23.6, 26.7, 27.5, 28.9, 29.1, 29.4, 29.5 (C-8 to C-14), 51.5 (C-15), 52.4 (C-7), 54.5 (C-1), 63.7 (C-5), 65.4 (C-6), 72.8, 73.5, 75.2, 75.3 (4 CH₂Ph), 78.6, 78.7 (C-4 and C-2), 87.4 (C-3), 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 127.9, 128.3, 128.4, 128.5 (CH_{Ar}), 137.9, 138.6, 139.1 (C_{Ar}).

IR (neat): 2093 (N₃) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 691.419 ([M+H]⁺, calcd. for C₄₃H₅₅N₄O₄: 691.422).

N-(6-Azidohexyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**162**)



A 1 M BCl₃ solution in CH₂Cl₂ (0.62 mL, 0.62 mmol) was added to a solution of **172** (154 mg, 0.24 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) at -60°C. The resulting mixture was allowed to warm to 0°C over 3 h. A 20:1 MeOH/H₂O mixture (3 mL) was added and the resulting mixture concentrated under vacuum, those steps were repeated twice. MeOH was added and the mixture filtered through an anionic resin (Amberlite IRA-440C). The filtrate was concentrated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) gave **162** (53 mg, 77%) as a colorless oil. The analytical data of **162** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁸⁴

$[\alpha]_D^{20} = -13.0$ (c 1, MeOH).

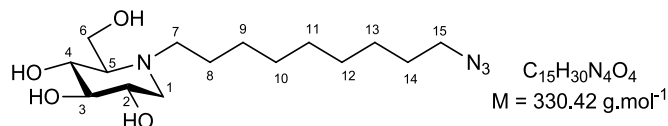
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.29-1.52 (m, 4H, C-9 and C-10), 1.52-1.69 (m, 4H, C-8 and C-11), 2.30-2.45 (m, 2H, H-1a, H-5), 2.66-2.81 (m, 1H, H-7a), 2.87-3.03 (m, 1H, H-7b), 3.12 (dd, $J = 11.3$ and 4.9 Hz, 1H, H-1b), 3.20 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-3), 3.28-3.35 (m, 2H, H-12), 3.42 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-4), 3.54 (td, $J = 9.9$ and 4.8 Hz, 1H, H-2), 3.83-3.98 (m, 2H, H-6);.

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 25.0, 27.6, 27.9, 29.8 (C-8, C-9, C-10, C-11), 52.4, 53.7, 57.1, 58.6 (C-1, C-6, C-7, C-12), 67.4, 70.2, 71.4, 80.1 (C-2, C-3, C-4, C-5).

IR (neat): 3356 (O-H), 2095 (N₃) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 289.184 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₂H₂₅N₄O₄: 289.187).

N-(9-Azidononyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**163**)



A fresh 1 M BCl₃ solution in CH₂Cl₂ (5.0 mL, 5.0 mmol) was added to a solution of **173** (426 mg, 0.62 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) at -60°C under Ar. The resulting mixture was allowed to warm to 0°C over 3 h. A 20:1 MeOH/H₂O mixture (21 mL) was added and the resulting mixture concentrated under vacuum, those steps were repeated twice. MeOH (20 mL) was added and the mixture neutralized with anionic resin (Amberlite IRA-440C). The filtrate was concentrated and resulting residue purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 to 8:2) to give **163** (161 mg, 79%) as a colorless oil.

²⁸⁴ J. Rawlings, H. Lomas, A. W. Pilling, J.-R. L. Lee, D. S. Alonzi, J. S. S. Rountree, S. F. Fenkinson, G. W. J. Fleet, R. A. Dwek, J. H. Jones, T. D. Butters, *Chem. Bio. Chem.* **2009**, *10*, 1101-1105.

R_f 0.54 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2).

$[\alpha]_D^{20} = -13.5$ (c 1.0, MeOH).

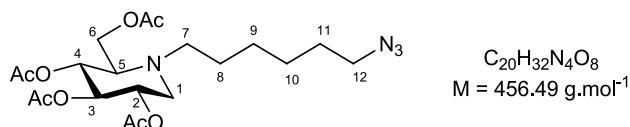
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.22-1.45 (m, 10H, H-9 to H-13), 1.45-1.63 (m, 4H, H-8 and H-14), 2.22 (br d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5), 2.27 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-1a), 2.60-2.70 (m, 1H, H-7a), 2.81-2.91 (m, 1H, H-7b), 3.04 (dd, $J = 11.1$ and 4.8 Hz, 1H, H-1b), 3.16 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.28 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-15), 3.38 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-4), 3.50 (td, $J = 9.3$ and 4.8 Hz, 1H, H-2), 3.87 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-6).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 25.2, 27.9, 28.6, 30.0, 30.3, 30.6, 30.7 (C-8 to C-14), 52.6, 53.9, 57.4, 59.0 (C-1, C-6, C-7 and C-15), 67.5, 70.5, 71.7, 80.4 (C-2, C-3, C-4 and C-5).

IR (neat): 3338 (OH), 2094 (N₃) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 331.234 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₅H₃₁N₄O₄: 331.234).

N-(6-Azidohexyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**174**)



To a solution of **172** (200 mg, 0,694 mmol) in Py/Ac₂O (1:1, 18 mL) was added DMAP (13 mg, 0,104 mmol). The solution was stirred for 24 hours. Water (9 mL) was added slowly at 0°C. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 15 mL). The combined organic layers were then washed with an aqueous solution of HCl (2M, 2 x 10 mL) and a saturated aqueous NaHCO₃ solution (1 x 15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:20 to 1:2) to give **174** as a colorless oil (289 mg, 91%).

R_f 0.3 (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$[\alpha]_D^{20} = +9.0$ (c 1, CHCl₃).

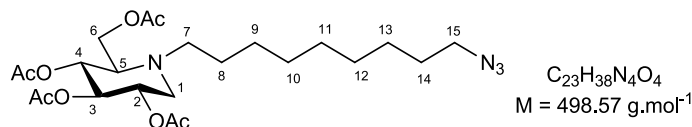
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.13-1.49 (m, 6H, H-8, H-9 and H-10), 1.49-1.63 (m, 2H, H-11), 1.98 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.99 (s, 6H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.28 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-1b), 2.45-2.57 (m, 1H, H-7b), 2.60 (dt, $J = 8.9$ and 2.5 Hz, 1H, H-5), 2.65-2.78 (m, 1H, H-7a), 3.23 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-12), 4.05-4.20 (m, 2H, H-6), 4.27 (dd, $J = 11.4$ and 5.0 Hz, 1H, H-1a), 4.88-4.97 (m, 1H, H-2), 4.97-5.09 (m, 2H, H-3 and H-4).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20.77, 20.83, 20.9, 21.0 (C(O)CH₃), 24.9 (C-8), 26.7, 26.8 (C-9 and C-10), 28.9 (C-11), 51.4 (C-12), 51.7 (C-7), 53.0 (C-1), 59.6 (C-6), 61.7 (C-5), 69.5 (C-2), 69.6 (C-3 or C-4), 74.8 (C-3 or C-4), 169.8, 170.1, 170.4, 171.0 (C(O)CH₃).

IR (neat): 2095 (N₃), 1740 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 457.228 ([M+H]⁺, calcd. for C₂₀H₃₃N₄O₈: 457.229).

N-(9-Azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-actetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**175**)



To a solution of **173** (183 mg, 0,553 mmol) in Py/Ac₂O (1:1, 14 mL) was added DMAP (10 mg, 0,082 mmol). The solution was stirred for 24 hours. Water (9 mL) was added slowly at 0°C. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 15 mL). The combined organic layers were then washed with an aqueous solution of HCl (2M, 2 x 10 mL) and a saturated aqueous NaHCO₃ solution (1 x 15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:9 to 1:4) to give **175** as a colorless oil (229 mg, 83%).

R_f 0.3 (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$[\alpha]_D^{20} = +8.0$ (c 1, CHCl_3).

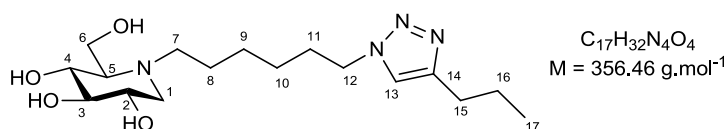
^1HMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.09-1.45 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12 and H-13), 1.57 (quintuplet, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-14), 1.99 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.00 (s, 6H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.05 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.31 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-1a), 2.47-2.79 (m, 3H, H-7, H-5), 3.17 (dd, $J = 11.2$ and 4.8 Hz, 1H, H-1b), 3.24 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-12), 4.06-4.22 (m, 2H, H-6), 4.89-4.98 (m, 1H, H-2), 4.98-5.11 (m, 2H, H-3 and H-4).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 20.78, 20.84, 20.9, 21.0 (4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.7, 24.9, 26.8, 27.2, 28.9, 29.1, 29.4, 29.5 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13 and C-14), 51.5, 51.9, 53.0 (C-1, C-7 and C-15), 59.6 (C-6), 61.5 (C-5), 69.5, 69.6 (C-2 and C-3 or C-4), 74.8 (C-3 or C-4), 169.8, 170.1, 170.5, 171.0 (4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat): 2096 (N_3), 1744 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 499.273 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_8$: 499.276).

N-(6-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**176**)



A mixture of **162** (49 mg, 0.17 mmol), 1-pentyne (58mg, 0.85 mmol, 5 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.017 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (10 mg, 0.51 mmol, 0.3 eq.) in THF/ H_2O (1:1, 4 mL) was stirred at room temperature. After 24 h, the mixture was then filtered through a pad of celite and concentrated. Column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) gave **176** (50 mg, 83%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20} = -10.0$ (c 0.82, MeOH).

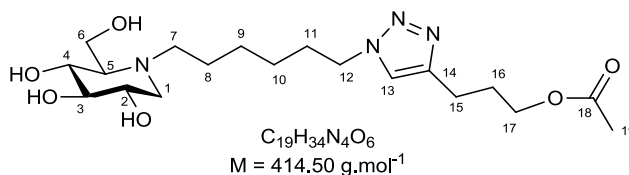
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-17), 1.24-1.42 (m, 4 H, H-9, H-10), 1.45-1.59 (m, 2H, H-8), 1.69 (sextuplet, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-16), 1.91 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-11), 2.25-2.37 (m, 2H, H-1a, H-5), 2.59-2.75 (m, 3H, H-7a, H-15), 2.82-2.97 (m, 1H, H-7b), 3.07 (dd, $J = 11.2$ and 4.7 Hz, 1H, H-1b), 3.17 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 3.39 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-4), 3.50 (td, $J = 10.0$ and 4.9 Hz, 1H, H-2), 3.87 (br d, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-6), 4.37 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-12), 7.73 (s, 1H, H-13).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 14.0 (C-17), 23.8, 25.0, 27.3, 27.7, 28.3, 31.2, 51.1, 53.7, 57.2, 58.8, 67.5, 70.2, 71.5, 80.2, 123.1 (C-13), 149.1 (C-14).

IR (neat): 3317 cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 357.250 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$: 357.246).

N-(6-(4-(3-acetoxypropyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-hexyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**177**)



To a solution of amine **162** (50 mg, 0.17 mmol) and 4-pentynyl acetate (44 mg, 0.35 mmol, 2 eq.) in THF (2 mL), were added a solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4.3 mg, 0.017 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (6.8 mg, 0.034 mmol, 0.2 eq.) in H_2O (2 mL), and then, 2,6-lutidine (6.0 μL , 0.052 mmol, 0.3 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was then filtered through a pad of celite, concentrated and the residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 to 8:2) giving **9c** (40 mg, 56%) as a colorless oil.

R_f 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2).

$[\alpha]_D^{20} = -10.0$ (c 1.0, MeOH).

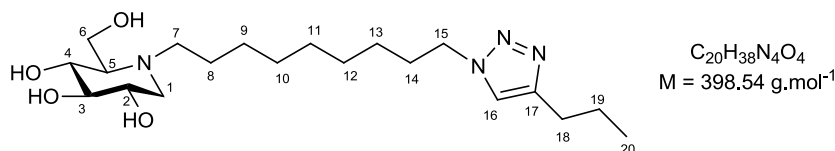
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.25-1.41 (m, 4H, H-9 and H-10), 1.41-1.59 (m, 2H, H-8), 1.83-1.95 (m, 2H, H-11), 1.97-2.02 (m, 2H, H-16), 2.03 (s, 3H, H-19), 2.13-2.29 (m, 2H, H-1a and H-5), 2.51-2.69 (m, 1H, H-7a), 2.78 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-15), 2.75-2.90 (m, 1H, H-7b), 3.02 (dd, $J = 10.9$ and 4.6 Hz, 1H, H-1b), 3.14 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-3), 3.36 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 3.48 (td, $J = 9.9$ and 4.6 Hz, 1H, H-2), 3.80-3.91 (m, 2H, H-6), 4.09 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-17), 4.37 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-12), 7.78 (s, 1H, H-13).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 20.9, 22.9, 25.2, 27.5, 28.0, 29.6, 31.3, 51.3, 53.8, 57.6, 59.3, (64.8, 67.1, 70.2, 71.5 and 80.0 C-2, C-3, C-4, C-5), 123.2 (C-13), 147.8 (C-14), 172.6 (C-18).

IR (neat): 3340 (OH) 1734 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 415.261 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₉H₃₅N₄O₆: 415.255).

N-(9-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**178**)



To a solution of **163** (50 mg, 0.15 mmol) and 1-pentyne (52 mg, 0.76 mmol) in THF (2 mL), was added a solution of CuSO₄·5H₂O (3.8 mg, 0.015 mmol) and sodium ascorbate (6.0 mg, 0.030 mmol) in H₂O (2 mL), and then, 2,6-lutidine (5.3 μ L, 0.045 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 17 h. The mixture was then filtered through a pad of celite, concentrated and the residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 to 8:2) giving **178** (32 mg, 54%) as a colorless oil.

R_f 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2).

$[\alpha]_D^{20} = -13.0$ (c 1.0, MeOH).

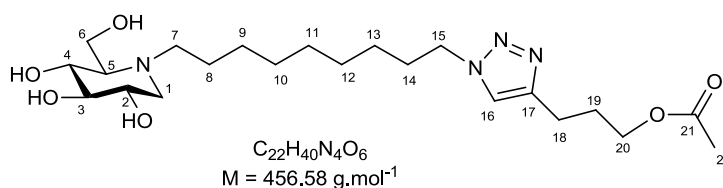
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 0.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H-20), 1.21-1.40 (m, 10H, H-9 to H-13), 1.41-1.56 (m, 2H, H-8), 1.69 (sextuplet, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-19), 1.88 (quintuplet, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-14), 2.15-2.35 (m, 2H, H-1a and H-5), 2.57-2.66 (m, 1H, H-7a), 2.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-18), 2.75-2.90 (m, 1H, H-7a), 3.03 (dd, $J = 10.0$ and 3.0 Hz, 1H, H-1a), 3.15 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.37 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 3.49 (td, $J = 9.0$ and 3.0 Hz, 1H, H-2), 3.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-6), 4.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-15), 7.73 (s, 1H, H-16).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 14.1 (C-20), 24.0, 25.3, 27.6, 28.4, 28.6, 30.1, 30.61, 30.64, 31.4 (C8 to C-14, C-18 and C-19), 51.3, 53.9, 57.6, 59.2 (C-1, C-6, C-7 and C-15), 67.5, 70.6, 71.9, 80.5 (C-2, C-3, C-4 and C-5), 123.3 (C-16), 149.2 (C-17).

IR (neat): 3331 (OH) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 399.298 ([M+H]⁺, calcd. for C₂₀H₃₉N₄O₄: 399.297).

N-(9-(4-(3-acetoxypropyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**179**)



To a solution of **163** (27 mg, 0.083 mmol) and 4-pentynyl acetate (21 mg, 0.17 mmol) in THF (1 mL), was added a solution of CuSO₄·5H₂O (2.1 mg, 0.008 mmol) and sodium ascorbate (3.3 mg, 0.017 mmol) in H₂O (1

mL), and then, 2,6-lutidine (2.9 μL , 0.025 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was then filtered through a pad of celite, concentrated and the residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 to 8:2) giving **179** (23 mg, 61%) as a colorless oil.

R_f 0.44 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2).

$[\alpha]_D^{20} = -10.0$ (c 1.0, MeOH).

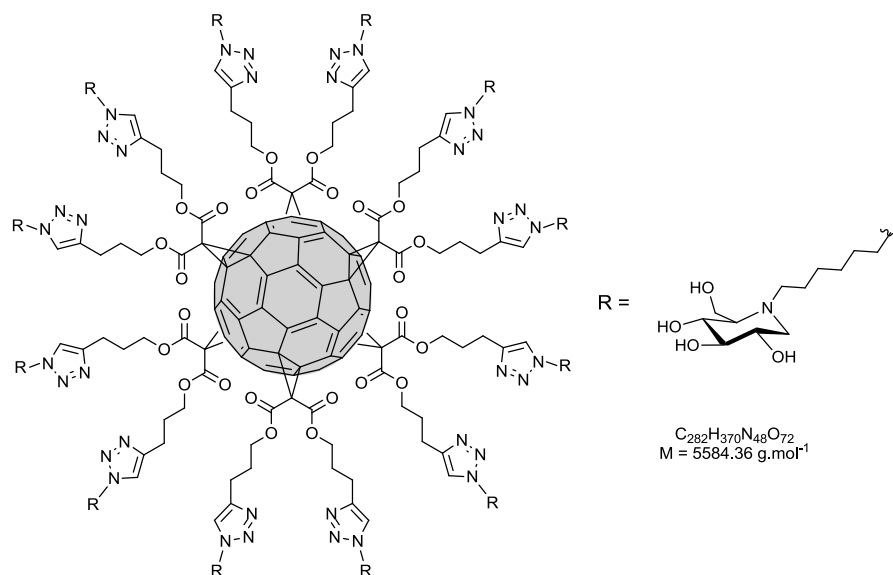
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.21-1.41 (m, 10H, H-9 to H-13), 1.43-1.55 (m, 2H, H-8), 1.82-1.95 (m, 2H, H-14), 1.95-2.03 (m, 2H, H-19), 2.03 (s, 3H, H-22), 2.15-2.25 (m, 2H, H-1a and H-5), 2.55-2.65 (m, 1H, H-7a), 2.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-18), 2.75-2.90 (m, 1H, H-7b), 3.01 (dd, $J = 10.5$ and 3.0 Hz, 1H, H-1a), 3.14 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.36 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 3.48 (td, $J = 9.0$ and 3.0 Hz, 1H, H-2), 3.86 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-6), 4.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-20), 4.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-15), 7.77 (s, 1H, H-16).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 20.9 (C-22), 22.9, 25.3, 27.6, 28.6, 29.6, 30.1, 30.6 (2 CH_2), 31.4, 51.4, 53.9, 57.7, 59.3, 64.8, 67.5, 70.7, 72.0, 80.6, 123.5 (C-16), 148.2 (C-17), 173.0 (C-21).

IR (neat): 3353 (OH) 1738 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 457.306 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_6$: 457.302).

Compound 180 (reaction performed by Dr. J. Iehl)²⁵⁷



A 1 M solution of TBAF in THF (0.19 mL, 0.19 mmol) was added to a mixture of **152** (40 mg, 0.013 mmol), **162** (52 mg, 0.17 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mg, 0.001 mmol) and sodium ascorbate (0.8 mg, 0.004 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1:1, 1.5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred at room temperature. After 24 h, methanol (10 mL) was added to the mixture and the resulting orange precipitate filtered, extensively washed with methanol then CH_2Cl_2 and dried under high vacuum to give **180** (62 mg, 83%) as a red-orange powder.

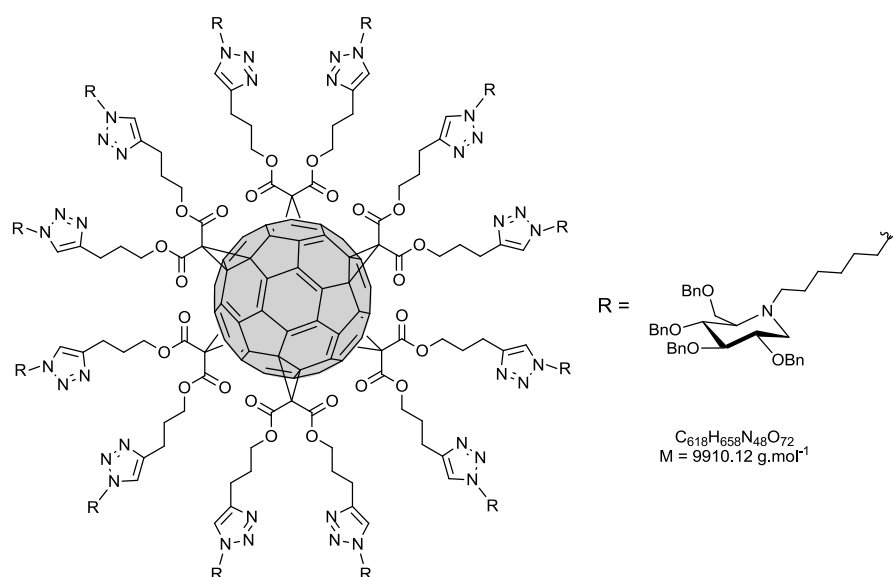
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 1.23 (m, 48H), 1.39 (m, 24H), 1.77 (m, 24H), 2.15 (m, 24H), 2.63 (m, 24H), 2.85 (m, 12H), 2.96 (m, 12H), 3.10 (m, 12H), 3.28 (m, 12H), 3.46 (m, 12H), 3.61 (m, 12H), 3.68 (m, 24H), 4.27 (m, 48H), 7.81 (s, 12H).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): δ 21.3, 23.9, 25.7, 26.2, 27.6, 29.6, 45.5, 49.1, 51.9, 56.3, 58.3, 66.4, 66.5, 68.8, 70.2, 78.2, 121.7, 140.7, 144.9, 145.5, 162.7.

IR (neat): 3310 (O-H), 1740 (C=O).

UV/Vis (H_2O): 246 (sh, 93800), 270 (79900), 285 (73700), 320 (sh, 45700), 337 (sh, 36700);

Compound 181 (reaction performed by Dr. J. Iehl)²⁵⁷



A 1 M solution of TBAF in THF (0.1 mL, 0.1 mmol) was added to a mixture of **152** (20 mg, 0.0066 mmol), **172** (56 mg, 0.086 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg, 0.0006 mmol) and sodium ascorbate (0.4 mg, 0.002 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 0.5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred at room temperature. After 24 h, the organic layer was diluted with CH_2Cl_2 , washed with water, dried (MgSO_4) and concentrated. Column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH_2Cl_2) gave **181** (52 mg, 78%) as an orange glassy product.

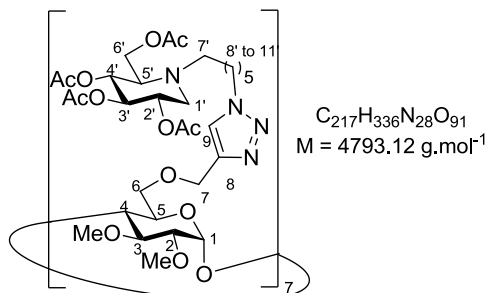
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.10-1.40 (m, 72H), 1.82 (m, 24H), 2.09 (m, 24H), 2.18 (t, $J = 10$ Hz, 12H), 2.27 (br d, $J = 9$ Hz, 12H), 2.52 (m, 12H), 2.64 (m, 12H), 2.76 (m, 24H), 3.06 (dd, $J = 11$ and 5 Hz, 12H), 3.44 (t, $J = 9$ Hz, 12H), 3.53 (m, 24H), 3.62 (m, 24H), 4.23 (m, 24H), 4.34 (m, 24H), 4.44 (m, 36H), 4.63 (d, $J = 11$ Hz, 12H), 4.67 (d, $J = 11$ Hz, 12H), 4.79 (d, $J = 11$ Hz, 12H), 4.86 (d, $J = 11$ Hz, 12H), 4.94 (d, $J = 11$ Hz, 12H), 7.03-7.12 (m, 24H), 7.12-7.37 (m, 206H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 22.1, 23.6, 26.4, 26.9, 28.1, 29.6, 30.3, 45.4, 50.0, 52.2, 54.4, 63.8, 65.5, 66.3, 69.1, 72.7, 73.3, 75.1, 75.2, 78.4, 78.5, 87.3, 121.0, 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 137.8, 138.5, 138.9, 141.1, 145.8, 146.3, 163.7.

IR (neat): 1742 (C=O); UV/Vis (CH_2Cl_2): 247 (sh, 110400), 258 (86100), 265 (82000), 269 (80700), 283 (72300), 320 (sh, 39400), 339 (sh, 27900).

MALDI-TOF-MS: 9911.02 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. For $\text{C}_{618}\text{H}_{659}\text{N}_{48}\text{O}_{72}$: 9911.12).

Compound 182



To a solution of Heptakis(2,3-dimethyl-6-propargyl)cyclomaltoheptaose **153** (35 mg, 0.022 mmol) and the iminosugar **174** (77 mg, 0.168 mmol, 1.1 x 7 eq.), in DMF (3.8 mL) were added copper sulfate pentahydrate (3.8 mg, 0.015 mmol, 0.1 x 7 eq.) and sodium ascorbate (6.1 mg, 0.031 mmol, 0.2 x 7 eq.) dissolved in water (1 mL). The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (12 mL), then dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by flash chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 100:0 to 90:10). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL). NH_4OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 to 90:10) giving **182** (67.5 mg, 64%) as a yellowish solid.

R_f 0.36 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5).

$[\alpha]_D^{20} = +48.0$ (c 1.0, $CHCl_3$).

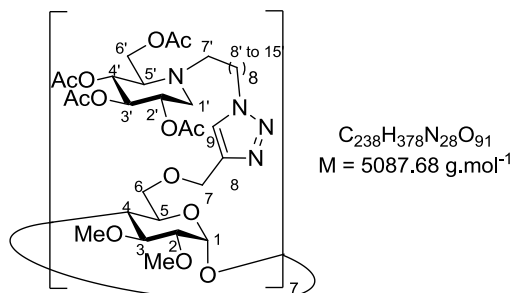
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.15-1.34 (m, 28H, H-9' and H-10'), 1.34-1.50 (m, 14H, H-8'), 1.76-1.89 (m, 14H, H-11'), 1.96 (s, 21H, C=OCH₃), 1.97 (s, 42H, C=OCH₃), 2.02 (s, 21H, C=OCH₃), 2.26 (t, $J = 10.8$ Hz, 7H, H-1'a), 2.45-2.55 (m, 7H, H-7'a), 2.55-2.61 (m, 7H, H-5'), 2.63-2.73 (m, 7H, H-7'b), 3.05-3.18 (m, 14H, H-1'b and H-2), 3.39-3.50 (m, 28H, H-3 and OMe), 3.54-3.69 (m, 35H, H-6a, H-4 and OMe), 3.77 (br d, $J = 9.2$ Hz, 7H, H-5), 3.91 (br d, $J = 8.5$ Hz, 7H, H-6b), 4.05-4.15 (m, 14H, H-6'), 4.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 14H, H-12'), 4.51 (d, $J = 12.2$ Hz, 7H, H-7a), 4.60 (d, $J = 12.2$ Hz, 7H, H-7b), 4.84-4.94 (m, 7H, H-2'), 4.95-5.09 (m, 21H, H-1, H-3', H-4'), 7.61 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 20.7, 20.8, 20.9 (C=OCH₃), 24.8 (C-8'), 26.5, 26.7 (C-9' and C-10'), 30.4 (C-11'), 50.2 (C-12'), 51.7 (C-7'), 52.9 (C-1'), 58.7 (OMe), 59.5 (C-6'), 61.5 (OMe), 61.6 (C-5'), 65.0 (C-7), 69.2 (C-6), 69.4 (C-2'), 69.5 (C-3' or C-4'), 71.1 (C-5), 74.7 (C-3' or C-4'), 80.2 (C-4), 81.9 (C-3), 82.2 (C-2), 99.1 (C-1), 122.7 (C-9), 145.0 (C-8), 169.7, 170.0, 170.3, 170.8 (C=O).

IR (neat): 1743 (C=O) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 4791.310 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{217}H_{337}N_{28}O_{91}$: 4791.26).

Compound 183



To a solution of Heptakis(2,3-dimethyl-6-propargyl)cyclomaltoheptaose **153** (51 mg, 0.032 mmol) and the iminosugar **175** (123 mg, 0.246 mmol, 1.1 x 7 eq.) in DMF (4 mL) were added copper sulfate pentahydrate (5.6

mg, 0.022 mmol, 0.1 x 7 eq.) and sodium ascorbate (8.9 mg, 0.045 mmol, 0.2 x 7 eq.) dissolved in water (1 mL). The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with water (12 mL), then dried over Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/ MeOH 100:0 to 90:10). The product was then filtrated over a small column of silica with ACN/H₂O/NH₄OH 15:0.5:0.5 to remove the traces of copper. **183** (113 mg, 70%) was obtained as a pale yellow solid.

R_f 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).

[α]_D²⁰ = +42.5 (*c* 1.0, CHCl₃).

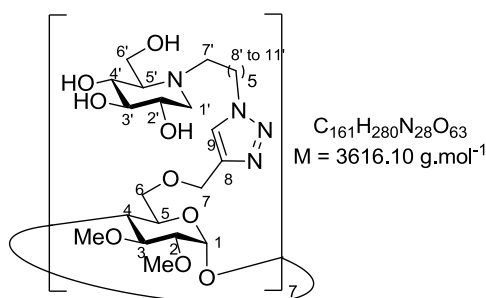
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.06-1.28 (m, 70H, H-9' to H-13'), 1.29-1.50 (m, 14H, H-8'), 1.69-1.87 (m, 14H, H-14'), 1.95 (s, 21H, C(O)CH₃), 1.96 (s, 21H, C(O)CH₃), 2.01 (s, 42H, C(O)CH₃), 2.28 (t, *J* = 10.6 Hz, 7H, H-1'a), 2.42-2.75 (m, 21H, H-7' and H-5'), 3.01-3.10 (m, 7H, H-2), 3.13 (dd, *J* = 11.5 and 4.9 Hz, 7H, H-1'b), 3.27-3.50 (m, 28H, OMe and H-3), 3.50-3.70 (m, 35H, OMe, H-6a and H-4), 3.75 (br d, *J* = 9.4 Hz, 7H, H-5), 3.90 (br d, *J* = 8.6 Hz, 7H, H-6a), 4.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 14H, H-6'), 4.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 14H, H-15'), 4.50 (d, *J* = 12.2 Hz, 7H, H-7a), 4.60 (d, *J* = 12.3 Hz, 7H, H-7b), 4.84-4.95 (m, 7H, H-2'), 4.95-5.11 (m, 21H, H-1, H-3', H-4'), 7.60 (s, 7H, H-9).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 20.68, 20.74, 20.8, 20.9 (C=OCH₃), 24.7 (C-8'), 26.6, 27.2, 29.0, 29.5 (2 CH₂) (C-9' to C-13'), 30.4 (C-14'), 50.3 (C-15'), 51.8 (C-7'), 53.0 (C-1'), 58.6 (OMe), 59.5 (C-6'), 61.4 (C-5' and OMe), 64.9 (C-7), 69.2 (C-6), 69.4, 69.5 (C-2' and C-3' or C-4'), 71.1 (C-5), 74.7 (C-3' or C-4'), 80.2 (C-4), 81.8 (C-3), 82.1 (C-2), 99.0 (C-1), 122.7 (C-9), 144.9 (C-8), 169.7, 170.0, 170.3, 170.9 (C=O).

IR (neat) : 1745 (C=O) cm⁻¹.

MALDI-TOF-MS: *m/z* 5085.29 ([M+H]⁺, calcd. for C₂₃₈H₃₇₉N₂₈O₉₁: 5085.59).

CD7DNJC6 (**184**)



Compound **182** (67.5 mg, 0.014 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 8.4 mL). Amberlite resin IRA 400 OH 1.4 meq/mL (2.18 g) was added, and the mixture was stirred for 4 hours at 27 °C using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **184** (47 mg, 92%) as pale white solid.

R_f 0.16 (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:3:4).

[α]_D²⁰ = +53.5 (*c* 1.0, H₂O).

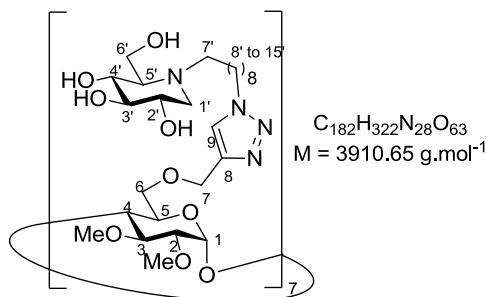
¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 1.28-1.42 (m, 28H, H-9' and H-10'), 1.44-1.54 (m, 14H, H-8'), 1.86-1.97 (m, 14H, H-11'), 2.09-2.14 (m, 7H, H-5'), 2.13 (t, *J* = 10.7, 7H, H-1'b), 2.49 (dt, *J* = 13.8 and 7.5 Hz, 7H, H-7'a), 2.79 (dt, *J* = 13.8 and 8.3 Hz, 7H, H-7'b), 2.99 (dd, *J* = 11.3 and 4.9 Hz, 7H, H-1'a), 3.08-3.13 (m, 7H, H-2), 3.14 (t, *J* = 9.1 Hz, 7H, H-3'), 3.35 (t, *J* = 9.1 Hz, 7H, H-4'), 3.43-3.48 (m, 7H, H-2'), 3.49 (s, 21H, OMe), 3.62 (s, 21H, OMe), 3.81 (dd, *J* = 11.8 and 3.0 Hz, 7H, H-6'b), 3.86 (dd, *J* = 11.8 and 2.6 Hz, 7H, H-6'a), 3.43-4.08 (m, 35H, H-3, H-4, H-5 and H-6), 4.32-4.41 (m, 14H, H-12'), 4.52-4.69 (m, 14H, H-7), 5.03-5.12 (m, 7H, H-1), 7.93 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): δ 25.5 (C-8'), 27.5, 28.1 (C-9' and C-10'), 31.4 (C-11'), 51.3 (C-12'), 53.7 (C-7'), 57.8 (C-1'), 59.1 (OMe), 60.0 (C-6'), 61.8 (OMe), 65.4 (C-7), 67.6 (C-5'), 70.8 (C-6), 70.9 (C-2'), 72.3 (C-4'), 72.4 (C-5'), 80.5 (C-4), 80.7 (C-3'), 83.5 (C-3 and C-2), 99.6 (C-1), 125.2 (C-8), 146.0 (C-9).

IR (neat): 3352 (OH) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 3617.54 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{161}\text{H}_{281}\text{N}_{28}\text{O}_{63}$: 3617.10).

CD7DNJC9 (185)



Compound **183** (96 mg, 0.019 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 9 mL). Amberlite resin IRA 400 OH⁻ 1.4 meq/mL (2.9 g) was added, and the mixture was stirred for 4 hours at 27 °C using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **185** (73 mg, quant.) as white solid.

R_f 0.28 (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:3:4).

$[\alpha]_D^{20} = +50.0$ (c 1.0, H₂O).

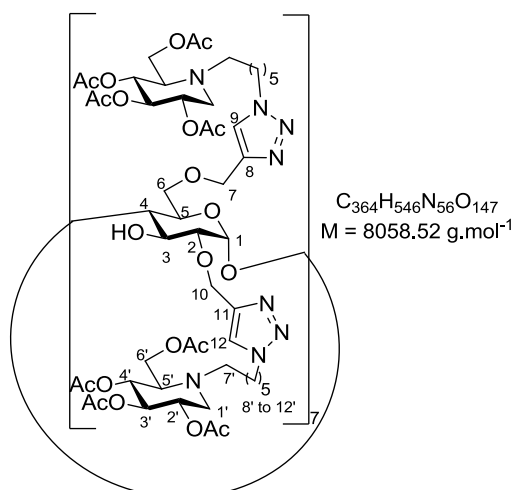
^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 1.23-1.40 (m, 70H, H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'), 1.44-1.52 (m, 14H, H-8'), 1.85-1.96 (m, 14H, H-14'), 2.10-2.15 (m, 7H, H-5'), 2.15 (t, $J = 11.1$, 7H, H-1'a), 2.50 (dt, $J = 13.4$ and 9.0 Hz, 7H, H-7'a), 2.79 (dt, $J = 13.4$ and 8.0 Hz, 7H, H-7'b), 3.00 (dd, $J = 11.1$ and 4.8 Hz, 7H, H-1'b), 3.08-3.13 (m, 7H, H-2), 3.14 (t, $J = 9.1$ Hz, 7H, H-3'), 3.36 (t, $J = 9.1$ Hz, 7H, H-4'), 3.44-3.48 (m, 7H, H-2'), 3.49 (s, 21H, OMe), 3.62 (s, 21H, OMe), 3.83 (dd, $J = 12.0$ and 2.7 Hz, 7H, H-6'a), 3.86 (dd, $J = 12.0$ and 2.9 Hz, 7H, H-6'b), 3.42-4.08 (m, 35H, H-3, H-4, H-5 and H-6), 4.31-4.40 (m, 14H, H-15'), 4.50-4.71 (m, 14H, H-7), 5.00-5.13 (m, 7H, H-1), 7.92 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (125.7 MHz, MeOD): δ 25.6 (C-8'), 27.6, 28.6, 30.1, 30.6, 31.4 (C-9' to C-14'), 51.4 (C-15'), 53.8 (C-7'), 57.8 (C-1'), 58.6 (OMe), 59.9 (C-6'), 61.8 (OMe), 65.3 (C-7), 67.5 (C-5'), 70.8 (C-2' and C-6), 72.2 (C-5), 72.3 (C-4'), 80.6 (C-3'), 80.7 (C-4), 83.5 (C-3 and C-2), 99.8 (C-1), 125.2 (C-9), 146.0 (C-8).

IR (neat): 3340 (OH) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 3911.31 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{182}\text{H}_{323}\text{N}_{28}\text{O}_{63}$: 3911.66).

Compound 186



In a 2-mL microwave reactor vial, iminosugar **174** (75 mg, 0.164 mmol, 1.1 x 7 eq.), heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **154** (17.8 mg, 0.011 mmol), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (3.7 mg, 0.015 mmol, 0.1 x 7 eq.), sodium ascorbate (5.9 mg, 0.030 mmol, 0.2 x 7 eq.) in DMF/ H_2O 6:1 (1.4 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 to 90:10). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL). NH_4OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 to 90:10) giving **186** (53 mg, 62%) as a white solid.

R_f 0.26 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5).

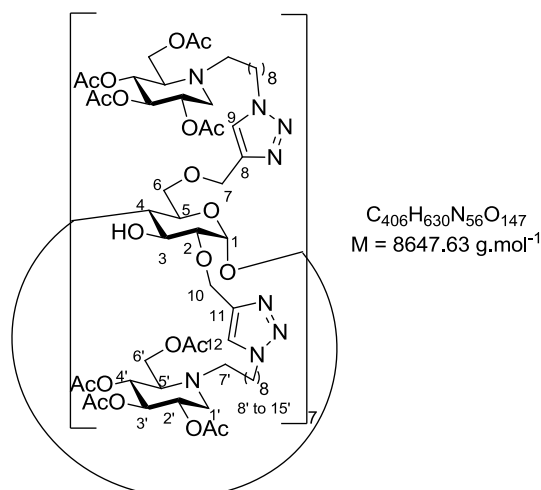
$[\alpha]_D^{20} = +12.0$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.12-1.55 (m, 84H, H-8', H-9' and H-10'), 1.79-1.94 (m, 28H, H-11'), 1.99 (s, 47H, C(O)CH₃), 2.00 (s, 79H, C(O)CH₃), 2.05 (s, 42H, C(O)CH₃), 2.28 (t, $J = 10.5$, 14H, H-1'a), 2.45-2.58 (m, 14H, H-7'a), 2.61 (dd, $J = 6.1$ and 2.3 Hz, 14H, H-5'), 2.80-2.65 (m, 14H, H-7'b), 3.16 (dd, $J = 11.2$ and 4.6 Hz, 14H, H-1'b), 3.38 (t, $J = 9.2$ Hz, 7H, H-4), 3.46 (dd, $J = 8.9$ and 2.5 Hz, 7H, H-2), 3.57-3.76 (m, 21H, H-6, H-5), 3.91 (t, $J = 8.8$ Hz, 7H, H-3), 4.13 (m, 28H, H-6'), 4.22-4.41 (m, 28H, H-12'), 4.50 (d, $J = 12.0$ Hz, 7H, H-7a or H-10a), 4.56 (d, $J = 12.6$ Hz, 7H, H-7b or H-10b), 4.69-4.81 (m, 7H, H-1), 4.83-5.12 (m, 56H, H-3', H-4', H-2' and H-7 or H-10), 7.50-7.85 (m, 14H, H-9 and H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 20.68, 20.73, 20.9 (C(O)CH₃), 24.9, 26.5, 26.7 (C-8', C-9' and C-10'), 30.4 (C-11'), 50.2, 50.3 (C-12'), 51.7 (C-7'), 52.9 (C-1'), 59.6 (C-6'), 61.6 (C-5'), 64.8, 65.2 (C-7 and C-10), 68.7 (C-6), 69.4 (C-2', C-3' or C-4'), 69.6 (C-2', C-3' or C-4'), 70.3 (C-5), 73.3 (C-3), 74.7 (C-2', C-3' or C-4'), 79.1 (C-2), 82.9 (C-4), 101.6 (C-1), 122.9, 123.6 (C-9 and C-12), 144.1, 144.7 (C8 and C-11), 169.7, 170.0, 170.3, 170.7 (C=O); IR (neat) : 3432 (OH), 1742 (CO) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: average m/z 8058.39, calcd. for $C_{364}H_{546}N_{56}O_{147}$: 8058.52).

Compound 187



In a 5-mL microwave reactor vial, iminosugar **175** (110 mg, 0.221 mmol, 1.1 x 7 eq.), heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **154** (24.5 mg, 0.015 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5.1 mg, 0.021 mmol, 0.1 x 7 eq.), sodium ascorbate (8.1 mg, 0.041 mmol, 0.2 x 7 eq.) in DMF/ H_2O 6:1 (3.5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 12 mL). The combined organic layers were washed with water (12 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL). NH_4OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10) giving **187** (69 mg, 54%) as a pale yellow solid.

R_f 0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

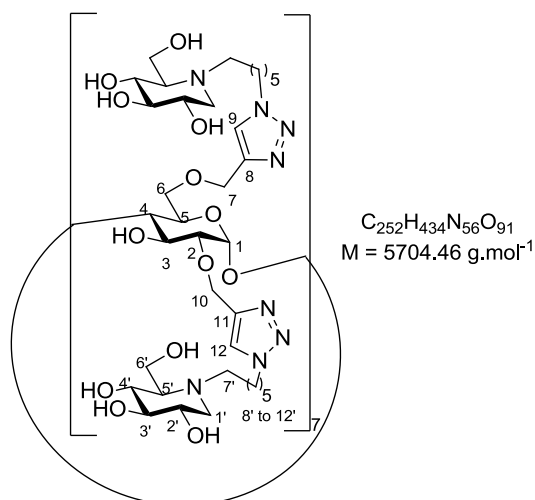
$[\alpha]_D^{20} = +16.5$ (c 0.5, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.12-1.34 (m, 140H, H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'), 1.34-1.46 (m, 28H, H-8'), 1.77-1.93 (m, 28H, H-14'), 1.98 (s, 49H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.99 (s, 76H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 43H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.29 (t, $J = 10.8$ Hz, 14H, H-1a'), 2.47-2.57 (m, 14H, H-7a'), 2.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 14H, H-5'), 2.44- 2.77 (m, 14H, H-7b'), 3.16 (dd, $J = 4.7$ and 11.3 Hz, 14H, H-1a'), 3.27-3.52 (m, 14H, H-2 and H-4), 3.52-3.80 (m, 21H, H-6 and H-5), 3.90 (t, $J = 8.2$ Hz, 7H, H-3), 4.12 (br s, 28H, H-6'), 4.18-4.39 (m, 28H, H-15'), 4.41-4.60 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.81-4.66 (m, 7H, H-1), 5.24-4.81 (m, 56H, H-3', H-4', H-2' and H-7 or H-10), 7.83-7.50 (m, 14H, H-9 and H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.75, 20.8, 20.92, 20.95 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.8 (C-8'), 26.7, 27.3, 29.1, 29.6 (C-9' to C-13'), 30.5 (C-14'), 50.3, 50.4 (C-15'), 51.9 (C-7'), 53.0 (C-1'), 59.6 (C-6'), 61.5 (C-5'), 64.9, 65.2 (C-7 and C-10), 68.7 (C-6), 69.5, 69.6 (C-2' and C-4'), 70.3 (C-5), 73.4 (C-3), 74.8 (C-3'), 79.1 (C-2), 83.0 (C-4), 101.7 (C-1), 122.9, 123.6 (C-9 and C-12), 144.1, 144.7 (C-8 and C-11), 169.8, 170.0, 170.4, 170.9 ($\text{C}=\text{OCH}_3$).

IR (neat): 3427 (OH), 1745 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: average m/z 8646.31 (calcd. for $\text{C}_{406}\text{H}_{630}\text{N}_{56}\text{O}_{147}$: 8647.63).

CD14DNJC6 (188)

Compound **186** (86 mg, 0.0107 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 1.8 mL). Amberlite resin IRA 400 OH 1.4 meq/mL (3.31 g) was added, and the mixture was stirred for 4 hours at 27 °C without using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **188** (58.5 mg, 96%) as pale yellow solid.

$[\alpha]_D^{20} = +26.5$ (*c* 0.14, H₂O).

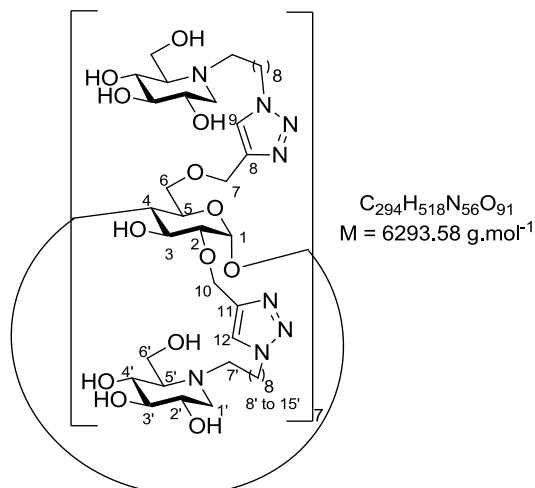
¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 1.07-1.28 (m, 56H, H-9', H-10'), 1.30-1.47 (m, 28H, H-8'), 1.65-1.91 (m, 28H, H-11'), 2.12-2.32 (m, 28H, H-1a' and H-5'), 2.40-2.77 (m, 28H, H-7'), 2.97 (dd, *J* = 10.8 and 4.2 Hz, 14H, H-1b'), 3.23 (t, *J* = 9.3 Hz, 14H, H-3'), 3.37 (t, *J* = 9.1 Hz, 14H, H-4'), 3.48-3.58 (m, 14H, H-2'), 3.80 (m, 28H, H-6'), 3.42-4.03 (m, 42H, H-2, H-3, H-4, H-5 and H-6), 4.11-4.56 (m, 42H, H-12' and H-7 or H-10), 4.74-4.86 (m, 14H, H-1 and H-7 or H-10), 4.89-5.02 (m, 7H, H-7 or H-10), 7.82-8.03 (bs, 7H, H-9 or H-12), 8.08 (s, 7H, H-9 or H-12).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 22.5 (C-8'), 22.6, 25.4, 25.6, 26.2, 26.3 (C9' and C-10'), 29.6 (C-11'), 50.2, 50.4 (C-12'), 51.9 (C-7'), 55.5 (C-1'), 57.6 (C-6'), 63.4, 64.5 (C-7 and C-10), 65.1 (C-5'), 68.6 (C-6), 68.9 (C-2'), 70.1 (C-4'), 70.5 (C-5), 72.7 (C-3), 78.4 (C-3'), 79.4 (C-2), 81.8 (C-4), 100.4 (C-1), 124.7, 125.3 (C-8 and C-11), 143.4, 143.8 (C-9 and C-12).

IR (neat): 3327 (OH) cm⁻¹.

MALDI-TOF-MS: average *m/z* 5703.53 (calcd. for C₂₅₂H₄₃₄N₅₆O₉₁: 5704.46).

CD14DNJC9 (189)



Compound **187** (69 mg, 0.0080 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 4.8 mL). Amberlite resin IRA 400 OH 1.4 meq/mL (2.47 g) was added, and the mixture was stirred for 5.5 hours at 27 °C without using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **189** (42.5 mg, 85%) as pale yellow solid.

$[\alpha]_D^{20} = +12.0$ (*c* 0.54, MeOH and 3 drops of D₂O).

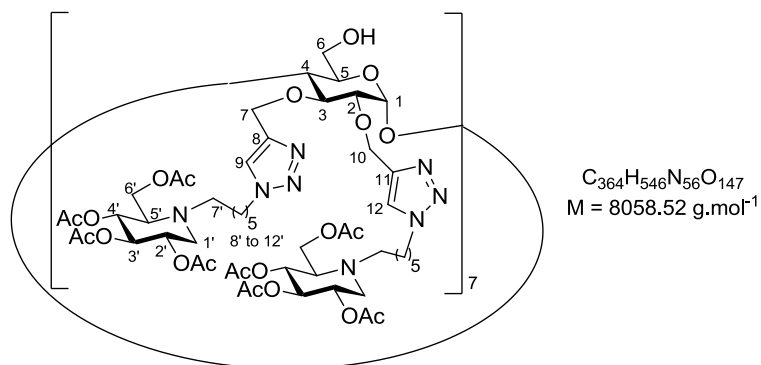
¹H NMR (400 MHz, MeOD+D₂O 9:1): δ 1.18-1.35 (m, 140H, H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'), 1.46 (t, *J* = 6.0 Hz, 28H, H-8'), 1.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 14H, H-14'), 1.89 (t, *J* = 6.0 Hz, 14H, H-14'), 2.14 (d, *J* = 9.4 Hz, 14H, H-5'), 2.20 (t, *J* = 10.8 Hz, 14H, H-1'a), 2.51-2.66 (m, 14H, H-7'a), 2.68-2.81 (m, 14H, H-7'b), 2.98 (dd, *J* = 11.1 and 4.7 Hz, 14H, H-1b'), 3.18 (t, *J* = 9.1 Hz, 14H, H-3'), 3.37 (t, *J* = 9.1 Hz, 14H, H-4'), 3.56-3.47 (m, 21H, H-2 and H-2'), 3.60-3.79 (m, 14H, H-4 and H-5), 3.79-3.97 (m, 49H, H-6', H-6 and H-3), 4.31 (br s, 14H, H-15'), 4.42 (t, *J* = 6.5 Hz, 14H, H-15'), 4.48-4.65 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.73-4.91 (m, 14H, H-1, H-7a and H-10a), 4.99 (d, *J* = 13.1 Hz, 7H, H-7b and H-10b), 8.09 (s, 7H, H-9 or H-12), 8.09 (s, 7H, H-9 or H-12).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD+D₂O): δ 24.8 (C-8'), 27.4, 28.50, 28.54, 29.89, 29.95, 30.4, 30.5 (C-9' to C-13'), 31.2, 31.3 (C-14'), 51.3, 51.4 (C-15'), 53.7 (C-7'), 57.4 (C-1'), 59.4 (C-6'), 65.0, 65.9 (C-7 and C-10), 67.0 (C-5'), 70.2 (C-6), 70.5 (C-2'), 71.7 (C-5), 71.8 (C-4'), 74.4 (C-3), 80.3 (C-3'), 80.9 (C-2), 83.9 (C-4), 102.2 (C-1), 125.3, 125.9 (C-9 and C-12), 145.0, 145.6 (C-8 and C-11).

IR (neat) : 3352 (OH) cm⁻¹.

MALDI-TOF-MS: average *m/z* 6294.95 (calcd. for C₂₉₄H₅₁₈N₅₆O₉₁: 6293.58).

Compound 190



In a 5-mL microwave reactor vial, heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **155** (22.5 mg, 0.014mmol), **174** (94.8 mg, 0.208 mmol, 1.1 x 14 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4.7 mg, 0.019 mmol, 0.1 x 14 eq.), sodium ascorbate (7.5 mg, 0.038 mmol, 0.2 x 14 eq.) in $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ 6:1 (3 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL). NH_4OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10) giving **190** (39 mg, 36%) as a white solid.

R_f 0.48 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_D^{20} = +24.5$ (c 1.0, CHCl_3).

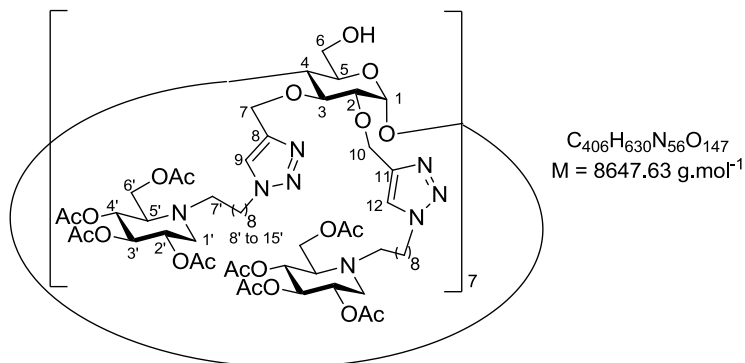
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.12-1.68 (m, 84H, H-8', H-9' and H-10'), 1.75-1.92 (m, 28H, H-11'), 1.97-2.02 (m, 126 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 42H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.29 (td, $J = 10.7$ and 2.3 Hz, 14H, H-1'a), 2.45-2.58 (m, 14H, H-7'a), 2.58-2.65 (m, 14H, H-5'), 2.65-2.76 (m, 14H, H-7'b), 3.16 (br dt, $J = 10.3$ and 3.9 Hz, 14H, H-1'b), 3.21-3.42 (br s, 7H, OH), 3.47 (br d, $J = 9.7$ Hz, 7H, H-2), 3.63 (t, $J = 8.3$ Hz, 7H, H-4), 3.72-3.82 (m, 7H, H-6a), 3.82-3.89 (m, 7H, H-5), 3.95 (t, $J = 8.5$ Hz, 14H, H-3 and H-6b), 4.13 (br s, 28H, H-6'), 4.19-4.34 (m, 28H, H-12'), 4.76 (d, $J = 12.8$ Hz, 7H, H-7a or H-10a), 4.80-4.97 (m, 28H, H-2', 14H H-7 or H-10), 4.97-5.06 (m, 28H, H-3' and H-4'), 5.12 (br s, 7H, H-1), 5.20 (br d, $J = 10.6$ Hz, 7H, H-7b or H-10b), 7.96 (s, 14H, H-9 and H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.79, 20.84, 20.97, 20.98 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.8 and 24.9 (C-8'), 26.5, 26.7, 26.81 and 26.84 (C-9' and C-10'), 30.3 and 30.5 (C-11'), 50.2 (C-12'), 51.8 (C-7'), 53.0 (C-1'), 59.6 (C-6'), 61.6 (C-5'), 62.1 (C-6), 64.4 and 67.3 (C-7 and C-10), 69.5 (C-2'), 69.6 (C-3' or C-4'), 72.8 (C-5), 74.8 (C-3' or C-4'), 78.5 (C-2), 78.9 (C-4), 81.4 (C-3), 98.0 (C-1), 123.8 and 124.2 (C-9 and C-12), 144.7 and 145.3 (C-8 and C-11), 169.82, 169.84, 170.1, 170.2, 170.4, 170.87, 170.92 ($\text{C}=\text{OCH}_3$).

IR (neat): 3460 (OH), 1741 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 8054.93 (calcd. for $\text{C}_{364}\text{H}_{546}\text{N}_{56}\text{O}_{147}$: 8054.70).

Compound 191



In a 5-mL microwave reactor vial, heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **155** (48 mg, 0.029mmol), iminosugar **175** (221 mg, 0.443 mmol, 1.1 x 14 eq.), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (10.1 mg, 0.040 mmol, 0.1 x 14 eq.), sodium ascorbate (16 mg, 0.081 mmol, 0.2 x 14 eq.) in DMF/ H_2O 5:1 (5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then were dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by flash chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 to 90:10). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL). NH_4OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 to 90:10) giving **191** (161 mg, 65%) as a white solid.

R_f 0.25 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5).

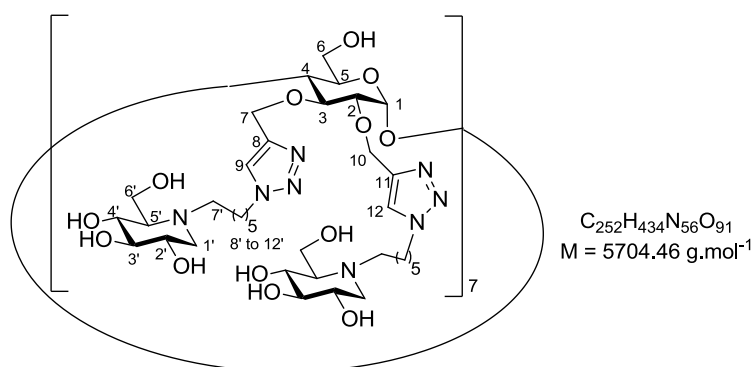
$[\alpha]_D^{20} = +23.0$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.11-1.28 (m, 140H, H-9' to H-13'), 1.26-1.43 (m, 28H, H-8'), 1.68-1.86 (m, 28H, H-14'), 1.95 (s, 42H, $C(O)CH_3$), 1.96 (s, 84H, $C(O)CH_3$), 2.01 (s, 42H, $C=OCH_3$), 2.27 (t, $J = 10.5$ Hz, 14H, H-1'a), 2.43-2.54 (m, 14H, H-7'a), 2.58 (br d, $J = 8.9$ Hz, 14H, H-5'), 2.61-2.71 (m, 14H, H-7'b), 3.13 (dd, $J = 11.4$ and 5.0 Hz, 14H, H-1'b), 3.43 (br d, $J = 8.0$ Hz, 7H, H-2), 3.57 (t, $J = 6.6$ Hz, 7H, H-4), 3.68-3.85 (m, 14H, H-5 and H-6a), 3.85-4.03 (m, 14H, H-3 and H-6b), 4.09 (s, 28H, H-6'), 4.14-4.34 (m, 28H, H-15'), 4.71 (br d, $J = 12.3$ Hz, 7H, H-7a or H-10a), 4.74-4.85 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.85-4.94 (m, 14H, H-2'), 4.94-5.06 (m, H-3' and H-4', 28H), 5.14 (br s, 14H, H-1 and H-7b or H-10b), 7.90 (s, 7H, H-9 or H-12), 7.95 (s, 7H, H-9 or H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 20.68, 20.73, 20.8, 20.9, ($C(O)CH_3$), 24.8 (C-8'), 26.6, 26.7, 27.26, 27.28, 29.05, 29.07, 29.5, 29.6 (C-9' to C-13'), 30.3 and 30.4 (C-14'), 50.2 (C-15'), 51.8 (C-7'), 53.0 (C-1'), 59.6 (C-6'), 61.5 (C-5'), 61.9 (C-6), 64.2 and 67.2 (C-7 and C-10), 69.4, 69.5 (C-2' and C-3' or C-4'), 72.8 (C-5), 74.7 (C-3' or C-4'), 78.4 (C-2), 79.0 (C-4), 81.1 (C-3), 97.8 (C-1), 123.8 and 124.1 (C-9 and C-12), 144.7 and 145.1 (C-8 and C-11), 169.70, 169.96, 169.99, 170.3, 170.80, 170.84 (C=O).

IR (neat): 3475 (OH), 1743 (C=O) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: average m/z 8649.07 ($[M+H]^+$ calcd. for $C_{406}H_{631}N_{56}O_{147}$: 8648.64).

CD14downDNJC6 (192)

Compound **190** (33 mg, 4.09 μmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 3 mL). Amberlite resin IRA 400 OH⁻ 1.4 meq/mL (1.3 g) was added, and the mixture was stirred for 4.5 hours at 27 °C using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **192** (20 mg, 85%) as a white solid.

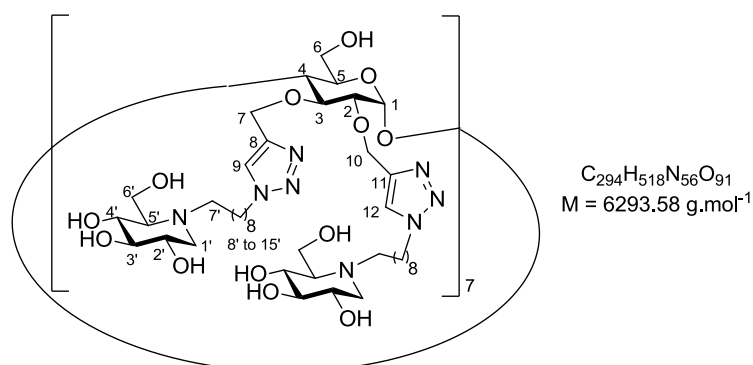
$[\alpha]_D^{20} = +34.0$ (c 0.33, H₂O).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 0.98-1.15 (m, 56H, H-9', H-10'), 1.19-1.42 (m, 28H, H-8'), 1.56-1.77 (m, 28H, H-11'), 2.08-2.24 (m, 28H, H-1a' and H-5'), 2.42-2.55 (m, 14H, H-7'a), 2.55-2.65 (m, 14H, H-7'b), 2.84-2.96 (m, 14H, H-1b'), 3.19 (td, $J = 9.5$ and 2.3 Hz, 14H, H-3'), 3.32 (t, $J = 9.4$ Hz, 14H, H-4'), 3.49 (td, $J = 9.5$ and 5.0 Hz, 14H, H-2'), 3.59 (br d, $J = 9.1$ Hz, 7H, H-2), 3.72-3.85 (m, 35H, H-6' and H-4), 3.85-3.95 (m, 14H, H-5 and H-6a), 3.94-4.06 (m, 14H, H-3 and H-6b), 4.07-4.28 (m, 28H, H-12'), 4.63-4.73 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.73-4.86 (m, 14H, H-7 or H-10), 5.26 (br s, 7H, H-1), 7.78 (s, 7H, H-9 or H-12), 7.88 (s, 7H, H-9 or H-12).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 22.6 (C-8'), 25.5, 25.6, 26.2, 26.4 (C9' and C-10'), 29.4, 29.6 (C-11'), 50.2 (C-12'), 51.9 (C-7'), 55.5 (C-1'), 57.6 (C-6'), 60.5 (C-6), 63.8 (C-7 or C-10), 65.1 (C-5'), 66.0 (C-7 or C-10), 68.9 (C-2'), 70.1 (C-4'), 72.0 (C-5), 78.4 (C-4 and C-3'), 78.7 (C-2), 80.4 (C-3), 97.8 (C-1), 124.2, 124.5 (C-9 and C-12), 144.6 (C-8 and C-11).

IR (neat): 3323 (OH) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: average m/z 5705.5 ($[M+H]^+$, calcd. for C₂₅₂H₄₃₅N₅₆O₉₁: 5705.47).

CD14downDNJC6 (193)

Compound **191** (138 mg, 16 μmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 12 mL). Amberlite resin IRA 400 OH⁻ 1.4 meq/mL (5 g) was added, and the mixture was stirred for 4 hours at 27 °C using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **193** (100.2 mg, quant.) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = +30.5$ (c 0.58, MeOH/H₂O 1:1).

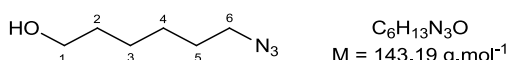
¹H NMR (400 MHz, D₂O, 55°C): δ 1.12-1.36, (m, 140H, H-9' to H-13'), 1.40-1.55 (m, 28H, H-8'), 1.66-1.87 (m, 28H, H-14'), 2.18-2.34 (m, 28H, H-1a' and H-5'), 2.51-2.68 (m, 14H, H-7'a), 2.68-2.85 (m, 14H, H-7'b), 3.03 (br dd, $J = 11.3$ and 4.1 Hz, 14H, H-1b'), 3.27 (t, $J = 8.8$ Hz, 14H, H-3'), 3.43 (t, $J = 8.6$ Hz, 14H, H-4'), 3.52-3.66 (m, 21H, H-2' and H-2), 3.83-3.91 (m, 28H, H-6'), 3.91-4.09 (m, 35H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 4.15 (br t, $J = 7.1$ Hz, 14H, H-15), 4.23 (br t, $J = 7.0$ Hz, 14H, H-15), 4.63-4.88 (m, 28H, H-7 and H-10), 5.34 (br s, 7H, H-1), 7.81 (s, 7H, H-9 or H-12), 7.98 (s, 7H, H-9 or H-12).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 50°C): δ 24.4, 24.5 (C-8'), 26.9, 27.1, 28.1, 28.2, 29.4, 29.6, 29.9, 30.1, 30.5, 30.7 (C-9' and C-14'), 50.8, 50.9 (C-15'), 53.2 (C-7'), 56.8 (C-1'), 59.0 (C-6'), 61.6 (C-6), 64.8 (C-7 or C-10), 66.3 (C-5'), 66.8 (C-7 or C-10), 69.9 (C-2'), 71.2 (C-4'), 73.2 (C-5), 79.5 (C-3'), 79.6 (C-4), 81.1 (C-2), 83.7 (C-3), 124.8, 125.1 (C-9 and C-12), 144.6 (C-8 and C-11).

IR (neat) : 3323 (OH) cm⁻¹.

MALDI-TOF-MS: average m/z 6294.59 ($[M+H]^+$ calcd. for C₂₉₄H₅₁₉N₅₆O₉₁: 6296.87).

6-Azido-hexan-1-ol (**194**)²⁸⁵

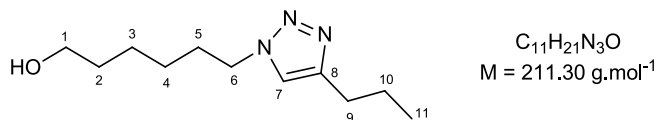


Commercially available 6-chlorohexan-1-ol (218 mg, 1.596 mmol) was dissolved in DMF. Sodium azide (156 mg, 2.39 mmol) was added and the suspension was heated at 50°C for 5 hours. The mixture was then cooled to rt and extracted with Et₂O (3 x 10 mL). The organic phase was washed with water and brine then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The product **194** was obtained as a colourless liquid (210 mg, 92%) and used without further purification. Analytical data were consistent with the literature:²⁸⁵

R_f 0.23 (AcOEt/Petroleum ether 1:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.31-1.49 (m, 4H), 1.51-1.69 (m, 4H), 3.27 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H).

6-(4-Propyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexan-1-ol (**195**)



To a solution of 1-azidohexanol **194** (54 mg, 0.377 mmol) and 1-pentyne (206 mg, 3.017 mmol, 8 eq.) in THF (4 mL) was added a solution of CuSO₄·5H₂O (9.4 mg, 0.038 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (15 mg, 0.075 mg) in water (4 mL). The mixture was stirred at rt overnight. Solvents were then evaporated and the residue was taken in AcOEt. The solution was washed with a 10% solution of NH₄OH to remove copper. The organic layer was then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The resulting residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:9 to 1:0) to give **195** as a white solid (79 mg, 99%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-11), 1.20-1.43 (m, 4H, H-3 and H-4), 1.43-1.55 (m, 2H, H-2), 1.62 (sextuplet, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-10), 1.82 (quintuplet, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-5), 2.61 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-9), 2.81 (s, 1H, O-H), 3.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-1), 4.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-6), 7.23 (s, 1H, H-7).

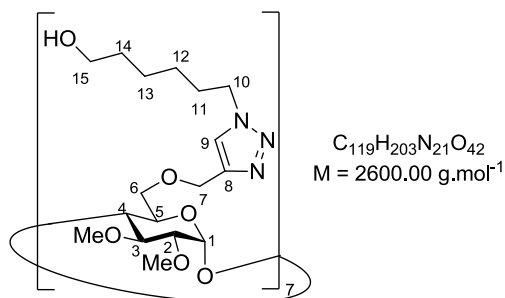
¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 13.7, 22.7, 25.2, 26.2, 27.6, 30.3, 32.4, 50.0, 62.2, 120.6 (C-7), 148.1 (C-8).

IR (neat): 3367 (OH) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 234.158 ($[M+Na]^+$, calcd. for C₁₁H₂₁N₃NaO: 234.158).

²⁸⁵ G. Mantovani, V. Ladmiral, L. Tao, D. M. Haddleton *Chem. Commun.* **2005**, 2089-2091.

Compound 196



To a solution of Heptakis(2,3-dimethyl-6-propargyl)cyclomaltoheptaose **153** (35 mg, 0.022 mmol) and the 6-azidoheptanol **194** (28.5 mg, 0.199 mmol, 1.3 x 7 eq.), in DMF (4 mL) were added copper sulfate pentahydrate (3.8 mg, 0.015 mmol, 0.1 x 7 eq.) and sodium ascorbate (4.3 mg, 0.022 mmol, 0.2 x 7 eq.) dissolved in water (1 mL). The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 10 min. The mixture was evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ACN/H₂O/NH₄OH 15:0.5:0.5 to 10:1:1). **196** (36 mg, 63%) was obtained as a pale yellow solid.

R_f 0.38 (ACN/H₂O/NH₄OH 15:0.5:0.5).

$[\alpha]_D^{20} = +84.5$ (c 1.0, MeOD).

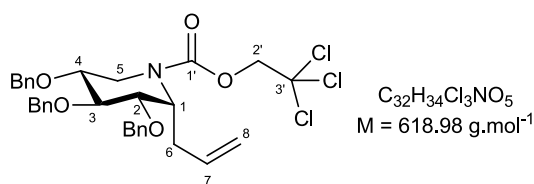
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.24-1.45 (m, 28H, H-12 and H-13), 1.47-1.58 (m, 14H, H-14), 1.90 (quintuplet, 14H, H-11), 3.10 (dd, $J = 9.5$ and 3.6 Hz, 7H, H-2), 3.41-3.56 (m, 49H, H-3, H-4, H-15 and OMe), 3.57-3.71 (m, 28H, H-6a and OMe), 3.78 (br d, $J = 9.6$ Hz, 7H, H-5), 3.93 (br dd, $J = 11.0$ and 3.4 Hz, H-6b), 4.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 14H, H-10), 4.54 (d, $J = 12.4$ Hz, 7H, H-7a), 4.60 (d, $J = 12.4$ Hz, 7H, H-7b), 5.05 (d, $J = 3.5$ Hz, 7H, H-1), 7.99 (s, 7H, H-9).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 26.4 (C-13 or C-12), 27.4 (C-12 or C-13), 31.5 (C-11), 33.4 (C-14), 51.3 (C-10), 59.0 (OMe), 61.9 (OMe), 62.7 (C-15), 65.2 (C-7), 70.6 (C-6), 72.3 (C-5), 80.9 (C-4), 83.1 (C-2), 83.5 (C-3), 99.7 (C-1), 125.2 (C-9), 145.9 (C-8).

IR (neat) : 3422 (O-H) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 2621.356 ($[M+Na]^+$, calcd. for $C_{119}H_{203}N_{21}NaO_{42}$: 2621.43).

1-C-Allyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-2',2'-trichloroethylcarboxylimino-D-xylitol (**198**)



Under anhydrous conditions, compound **73** (101 mg, 0.228 mmol) was dissolved in pyridine (3 mL). 2,2,2-trichloroethyl chloroformate (0.047 mL, 0.342 mmol, 1.5 eq.) was added and the mixture was stirred at rt for 4 hours. TrocCl was added twice (1.5 eq. + 1.0 eq. after ½ h) and the mixture was stirred at rt for 3 hours. Solvent was evaporated under reduced pressure. Few mL of toluene were added and evaporated off to help removal of pyridine. This operation was repeated three times. Residual viscous solid was taken up in CH₂Cl₂ (10 mL). This organic solution was washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, dried over MgSO₄ and filtered. Solvent was evaporated off yielding orange solid, which was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether +1% Et₃N 1:9 to 1:8) to afford a white viscous solid **198** as a mixture of rotamers, according to NMR data (0.138 g, 98% yield).

R_f 0.64 (AcOEt/petroleum ether 1:4 + 1% Et₃N).

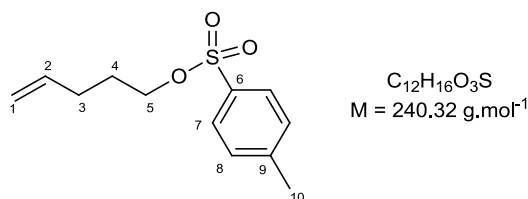
$[\alpha]_D^{20} = -11.0$ (c 1, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.25-2.43 (m, 1H, H-6a), 2.56-2.72 (m, 1H, H-6b), 2.83 (q, 1H, $J = 11.7$ Hz, H-5a), 3.43-3.64 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.72 (td, $J = 9.1$ and 2.7 Hz, 1H, H-3), 4.34 (td, $J = 13.8$ and 5.7 Hz, 1H, H-5b), 4.52-4.78 (m, 6.5H, CH_2Ph , H-1 and H-2'), 4.79-4.90 (m, 2.5H, CH_2Ph and H-2'), 5.04 (br d, $J = 11.7$ Hz, 1H, H-8a), 5.10 (br d, $J = 18.3$ Hz, 1H, H-8b), 5.62-5.81 (m, 1H, H-7), 7.27-7.40 (m, 15H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 29.7 and 29.8 (C-6), 41.1 (C-5), 52.8 and 53.3 (C-1), 73.06, 73.15, 73.36, 73.39, 75.2, 75.3, 75.9, 76.0 (CH_2Ph and C-3'), 78.1, 78.3, 79.6, 79.7, 81.9, 82.0 (C-2, C-3 and C-4), 95.6 and 95.8 (C-2'), 117.8 and 118.0 (C-8), 127.9, 128.06, 128.12, 128.2, 128.28, 128.31, 128.7, 128.8, 128.9 (15 CH_{Ar}), 134.10 and 134.14 (C-7), 138.07, 138.11, 138.81, 138.83 (C_{Ar}), 153.8 and 153.9 (C-1').

HRMS (ESI): m/z 640.138 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{Cl}_3\text{N}_1\text{NaO}_5$: 640.139).

1-(4-Methylbenzenesulfonate)pent-4-ene (**201**)^{273a}

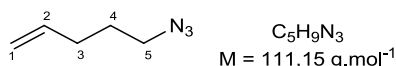


To a solution of 4-penten-1-ol (1g, 0.012 mmol) in CH_2Cl_2 (12 mL) was added pyridine (1.87 mL, 0.023 mmol, 2 eq.) and tosylchloride (3.32 g, 0.017 mmol, 1.5 eq). After 6 hours of stirring, the reaction was completed, water (20 mL) and Et_2O (30 mL) were added. The phases were separated and the organic phase was washed with HCl (2N solution, 15 mL) then NaHCO_3 saturated solution (15 mL). This operation was repeated once again. The organic phase was then dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 0:1 to 1:9) to afford **201** (2.34 g, 84 %) as a colourless oil. Analytical data were consistent with the literature:^{273a}

R_f 0.31 (petroleum ether).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.74 (quintuplet, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-4), 2.08 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-3), 2.45 (s, 3H, H-10), 4.04 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-5), 4.89-5.01 (m, 2H, H-1), 5.59-5.80 (m, 1H, H-2), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-7), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-8).

5-Azido-pent-1-ene (**199**)²⁸⁶

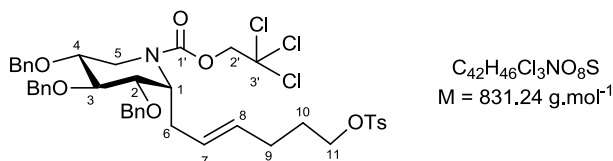


To a solution of **201** (697 mg, 2.90 mmol) in DMSO (15 mL) was added sodium azide (207 mg, 3.19 mmol, 1.1 éq) at 0°C. The mixture was stirred at r.t. for two days. The mixture was then extracted with n-pentane (4 x 20 mL). The pentane phase was washed with brine (15 mL) and dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to afford crude **199** as a yellowish oil (154 mg, 48%). Analytical data were consistent with the literature:²⁸⁶

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.70 (quintuplet, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-4), 2.08 (br q, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-3), 3.29 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-5), 4.95-5.10 (m, 2H, H-1), 5.71-5.88 (m, 1H, H-2).

²⁸⁶ P. C. Montecchi, M. L. Navacchia, P. Spagnolo, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1219-1226.

α -1-C-(6-Tosyloxy-hexen-2-yl)-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-2',2',2'-trichloroethylcarboxylimino-D-xylitol (203)



Under anhydrous conditions, compound **198** (80 mg, 0.129 mmol) was dissolved in distilled and degassed CH_2Cl_2 (8 mL). 1-Tosyloxy-4-pentene **201** (186 mg, 0.775 mmol, 6 eq.) was added and then the Grubbs Hoveyda II catalyst (16 mg, 0.019 mmol, 15 mol%) was added rapidly. The mixture was refluxed for 5 hours and another 0.10 eq of catalyst and 2 eq. of tosylated compound were added. The mixture was refluxed again for 18 hours. The reaction was then filtrated on silica gel and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:20 to 1:3) to afford a colorless oil **203** as a mixture of rotamers according to NMR data (60 mg, 56% yield).

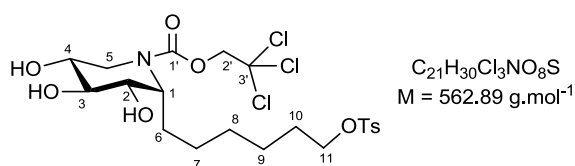
R_f 0.12 (AcOEt/petroleum ether 1.5:8.5).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) (mixture of rotamers): δ 1.60-1.70 (quintplet, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-10), 1.90-2.05 (m, 2H, H-9), 2.17-2.29 (m, 1H, H-6a) 2.42 (s, 3H, $PhCH_3$), 2.45-2.55 (m, 1H, H-6b), 2.76 (q, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-5a), 3.42-3.58 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.68 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3), 3.99 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-11), 4.30 (td, $J = 12.9$ and 5.4 Hz, 1H, H-5b), 4.46-4.50 (m, 0.5H, H-1), 4.55-5.66 (m, 6.5 H, CH_2Ph and H-1), 4.80-4.90 (m, 2H, H-2'), 5.18-5.45 (m, 2H, H-7 and H-8), 7.27-7.42 (m, 17H, H_{Ar}), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (75,5 MHz, $CDCl_3$): δ 21.7 ($PhCH_3$), 23.51 (C-10), 28.5 and 28.7 (C-6), 29.8 (C-9), 41.1 (C-5), 53.0 and 53.5 (C-1), 69.9 (C-11), 73.1, 73.4, 75.2, 75.9 (3 CH_2Ph and C-2'), 78.1 and 78.3 (C-4), 79.6 and 79.7 (C-2), 81.9 and 82.0 (C-3), 95.6 and 95.8 (C-3'), 126.9, 127.0, 127.4, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.5, 128.6, 130.0, 131.4 and 131.6 (19 CH_{Ar} , C-7 and C-8), 133.31, 133.34, 138.0, 138.1, 138.8, 144.8 (5 C_{Ar}), 153.8 (C-1').
IR (neat) : 1716 (C=O), 1362 (SO_2), 1176 (SO_2) cm^{-1} .

MS (ESI): m/z 830.90 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{42}H_{47}Cl_3N_1O_8S_1$: 830.21).

α -1-C-(6-tosyloxy-hexen-2-yl)-1,5-dideoxy-1,5-2',2',2'-trichloroethylcarboxylimino-D-xylitol (205)



Compound **203** (94 mg, 0.113 mmol) was dissolved in THF/MeOH (4:1, 5 mL), 4 drops of HCl 6M and Pd/C (12 mg of 10% Pd, 0.1 eq.) were added. Three cycles of vacuum/Argon were made in the flask followed by two cycles vacuum/ H_2 . The reaction mixture was stirred under H_2 atmosphere for 48 hours. The reaction was then filtered through a pad of celite and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (MeOH/ CH_2Cl_2 1:99 to 5:95) to afford a colorless oil **205** as a mixture of rotamers according to NMR data (29 mg, 46% yield).

R_f 0.28 (MeOH/ CH_2Cl_2 5:95).

$[\alpha]_D^{20} = -1.0$ (c 1, $CHCl_3$).

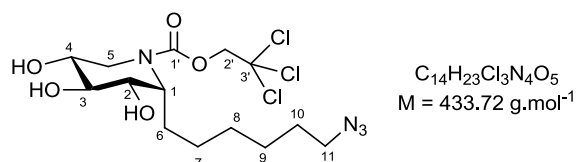
1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.12-1.39 (m, 6H, H-7, H-8 and H-9), 1.43-1.65 (m, 3H, H-10 and H-6a), 1.67-1.82 (m, 1H, H-6b), 2.46 (s, 3H, $PhCH_3$), 2.66-2.83 (m, 1H, H-5a), 3.33-3.49 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.01 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-11), 4.15 (dd, $J = 13.2$ and 5.1 Hz, 1H, H-5b), 4.26-4.42 (m, 1H, H-1), 7.76 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-2'a), 4.88 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-2'), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{Ar}) 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 21.6 (PhCH₃), 24.6 and 24.8 (C-6), 26.4 and 26.5 (C-7, C-8, or C-9), 27.0, (C-7, C-8, or C-9), 29.4 and 29.7 (C-7, C-8, or C-9), 29.8 (C-10), 44.1 (C-5), 57.2 and 57.6 (C-1), 71.3 and 71.7 (C-4), 71.9 (C-11), 72.5 and 72.9 (C-2), 75.8 (C-3), 76.2 (C-2'), 97.0 and 97.1 (C-3'), 128.9 (CH_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 134.5 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 155.4 and 155.5 (C-1').

IR (neat) : 3409 (O-H), 1715 (C=O), 1356 (SO₂), 1176 (SO₂) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 584.064 ([M+Na]⁺, calcd. for C₂₁H₃₀Cl₃N₁Na₁O₈S₁: 584.065).

α -1-C-(6-azido-hexyl)-1,5-dideoxy-1,5-2',2',2'-trichloroethylcarboxylimino-D-xylitol (206)



Compound **205** (39 mg, 0.069 mmol) was dissolved in DMSO (1 mL), sodium azide (5.6 mg, 0.09 mmol, 1.25 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 24h. Water was added slowly. The aqueous phase was extracted with Et₂O (3 x 7 mL). The organic phases were washed with water (5 mL) and dried over Na₂SO₄. The residue was purified by flash chromatography (MeOH/CH₂Cl₂ 1:20 to 1:9) to afford a colorless oil **206** as a mixture of rotamers according to NMR data (25.7 mg, 86%).

R_f 0.4 (MeOH/CH₂Cl₂ 1:9).

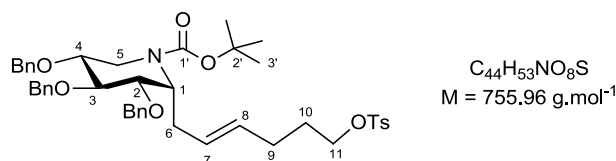
$\alpha_D^{20} = +1.0$ (c 1, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, MeOD): (mixture of rotamers) δ 1.22-1.48 (m, 6H, H-7, H-8 and H-9), 1.50-1.65 (m, 3H, H-10 and H-6a), 1.73-1.91 (m, 1H, H-6b), 2.69-2.89 (m, 1H, H-5a), 3.25-3.30 (m, 2H, H-11), 3.35-3.52 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.16 (dd, $J = 13.2$ and 5.1 Hz, 1H, H-5b), 4.31-4.49 (m, 1H, H-1).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 24.6, 24.9, 26.6, 27.1, 27.7, 27.8 (C-6, C-7, C-8 and C-9), 29.8 (C-10), 44.1 (C-5), 52.4 (C-11), 57.3 and 57.7 (C-1), 71.3 and 71.7 (C-2, C-3 or C-4), 72.5 and 73.0 (C-2, C-3 or C-4), 75.8 and 75.9 (C-2, C-3 or C-4), 76.1 and 76.2 (C-2'), 97.0 and 97.2 (C-3'), 155.5 (C-1').

IR (neat): 3384 (O-H), 2097 (N₃) 1713 (C=O) cm⁻¹.

α -1-C-(6-tosyloxy-hexen-2-yl)-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylitol (207)



Under anhydrous conditions, compound **67** (244 mg, 0.449 mmol) was dissolved in distilled and degassed CH₂Cl₂ (8 mL). 1-Tosyloxy-4-pentene compound **201** (431mg, 1.80 mmol, 4 eq.) was added and then the Grubbs Hoveyda II catalyst (42 mg, 0.07 mmol, 15 mol%) was added rapidly. The mixture was refluxed for 5 hours and another 0.05 eq of catalyst and 2 eq. of tosylated compound were added. The mixture was refluxed again for 18 hours. The reaction was then filtrated on silica gel and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:20 to 1:3) to afford a colorless oil **207** as a mixture of rotamers according to NMR data (228 mg, **67%** yield).

R_f 0.63 (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$[\alpha]_D^{20} = -4.0$ (c 1, CHCl₃).

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) (mixture of rotamers): δ 1.39 (s, 9H, H-3'), 1.62-1.75 (m, 2H, H-10), 1.94-2.05 (m, 2H, H-9), 2.12-2.32 (m, 1H, H-6a), 2.38-2.50 (m, 1H, H-6b), 2.43 (s, 3H, PhCH₃), 2.62 (q, $J = 13.5$ Hz, 1H, H-

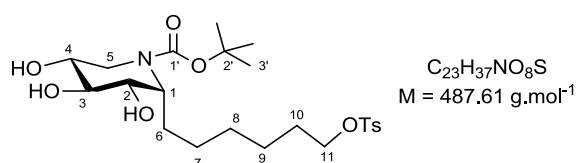
5a), 3.32-3.59 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.65 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.93-4.09 (m, 2.5H, H-11 and H-5b), 4.21-4.31 (m, 0.5H, H-1), 4.38 (dd, $J = 13.3$ and 5.9 Hz, 0.5H, H-5b), 4.58-4.78 (m, 4.5H, CH₂Ph and H-1), 4.80-4.93 (m, 2H, CH₂Ph), 5.18-5.41 (m, 2H, H-7 and H-8), 7.27-7.42 (m, 17H, H_{Ar}), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{Ar}).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.7 (PhCH₃), 28.39, 28.41 and 28.45 (3 C-3'), 28.75 and 28.81 (C-6), 40.0 and 41.4 (C-5), 51.4 and 53.3 (C-1), 69.96 and 70.04 (C-11), 72.6, 73.1, 73.2, 73.3, 75.77, 75.83 (3 CH₂Ph), 78.4 and 78.6 (C-4), 79.8 and 80.0 (C-2), 80.2 (C-2'), 82.2 and 82.3 (C-3), 127.56, 127.64, 127.71, 127.75, 127.8, 127.9, 127.99, 128.00, 128.04, 128.4, 128.50, 128.53, 128.6, 129.3, 129.8, 129.9, 130.0, 130.7, 130.9, (19 CH_{Ar}), 133.30, 133.34, 138.27, 138.30, 138.4, 139.0, 144.8, 144.9 (5 C_{Ar}), 154.86 and 154.90 (C-1').

IR (neat) : 1690 (C=O), 1363 (SO₂), 1176 (SO₂) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 756.356 ([M+H]⁺, calcd. for C₄₄H₅₄N₁O₈S₁: 756.356).

α -1-C-(6-tosyloxy-hexen-2-yl)-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylitol (**208**)



Compound **207** (228 mg, 0.30 mmol) was dissolved in THF/MeOH (3:1, 12 mL) and 4 drops of HCl 2M and Pd/C (32 mg of 10% Pd, 0.1 eq.) were added. Three cycles of vacuum/Argon were made in the flask followed by two cycles vacuum/H₂. The reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 5.5 hours. The reaction was then filtered through a pad of celite and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (MeOH/CH₂Cl₂ 1:99 to 5:95) to afford a colorless oil **208** as a mixture of rotamers according to NMR data (129 mg, 88% yield).

R_f 0.29 (MeOH/CH₂Cl₂ 5:95).

$[\alpha]_D^{20} = +3.0$ (c 1, CHCl₃).

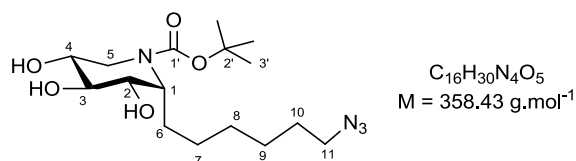
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.14-1.35 (m, 6H, H-7, H-8 and H-9), 1.45 (br s, 10H, H-3' and H-6a), 1.55-1.66 (m, 2H, H-10), 1.66-1.82 (m, 1H, H-6b), 2.46 (s, 3H, PhCH₃), 2.50-2.72 (m, 1H, H-5a), 3.23-3.34 (m, 1H, H-4), 3.35-3.46 (m, 2H, H-2 and H-3), 4.02 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-11), 4.05-4.17 (m, 1H, H-5b), 4.18-4.35 (m, 1H, H-1), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{Ar}) 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{Ar}).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 21.6 (PhCH₃), 24.7 and 24.8 (C-6), 26.4 and 26.6 (C-7, C-8, or C-9), 26.8 (C-7, C-8, or C-9), 28.6 (C-3'), 29.6 (C-7, C-8 or C-9), 29.8 (C-10), 43.0 and 44.2 (C-5), 55.8 and 57.1 (C-1), 71.6 (C-4), 71.9 (C-11), 72.7 and 73.0 (C-2 or C-3), 75.91 and 76.92 (C-2 or C-3), 81.5 (C-2'), 128.9 (CH_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 156.7 and 156.8 (C-1').

IR (neat) : 3382 (O-H), 1692, 1664 (C=O), 1365 (SO₂), 1176 (SO₂) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 510.215 ([M+Na]⁺, calcd. for C₂₃H₃₇N₁Na₁O₈S₁: 510.213).

α -1-C-(6-azido-hexyl)-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylitol (**209**)



Compound **208** (129 mg, 0.26 mmol) was dissolved in DMSO (1.8 mL), sodium azide (22 mg, 0.33 mmol, 1.25 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 24h. Water was added slowly. The aqueous phase was extracted with Et₂O (3 x 7 mL). The organic phases were washed with water (5 mL) and dried over Na₂SO₄. The

residue was purified by flash chromatography (MeOH/CH₂Cl₂ 1:20 to 1:9) to afford a colorless oil **209** as a mixture of rotamers according to NMR data (94.5 mg, quant.).

R_f 0.5 (MeOH/CH₂Cl₂ 1:9).

$\alpha_D^{20} = +2.5$ (*c* 1, MeOD).

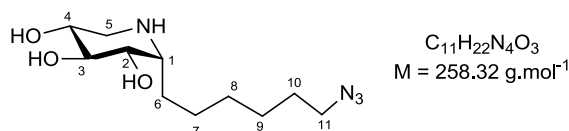
¹H NMR (300 MHz, MeOD): (mixture of rotamers) δ 1.18-1.45 (m, 6H, H-7, H-8 and H-9), 1.44-1.49 (m, 9H, H-3'), 1.50-1.67 (m, 3H, H-10 and H-6a), 1.68-1.86 (m, 1H, H-6b), 2.52-2.74 (m, 1H, H-5a), 3.22-3.36 (m, 3H, H-4 and H-11), 3.35-3.47 (m, 2H, H-2 and H-3), 4.06 (br t, *J* = 4 Hz, 1H, H-5b), 4.21-4.37 (m, 1H, H-1).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 24.7, 24.8, 26.7, 27.0, 27.78, 27.82 (C-6, C-7, C-8 and C-9), 28.6 (C-3'), 29.9 (C-10), 43.1 and 44.3 (C-5), 52.4 (C-11), 55.9 and 57.1 (C-1), 71.6 and 71.9 (C-2, C-3 or C-4), 72.8 and 73.0 (C-2, C-3 or C-4), 75.9 (C-2, C-3 or C-4), 81.4 (C-2'), 156.7 (C-1').

IR (neat): 3376 (O-H), 2095 (N₃) 1683 (C=O) cm⁻¹.

MS (ESI): *m/z* 381.216 ([M+Na]⁺, calcd. for C₁₆H₃₀N₄NaO₅: 381.211).

***α*-1-C-(6-azido-hexyl)-1,5-dideoxy-1,5-amino-D-xylitol (197)**



Compound **209** (18 mg, 0.05 mmol) was dissolved in H₂O (0.6 mL). TFA (0.3 mL) was added dropwise at 0°C; the reaction mixture was allowed to raise rt and was stirred for 4 h. The solvent was evaporated. The product was taken up in water and DOWEX 50 x 8 (H⁺) ion-exchange resin was added. The resin was washed with MeOH and H₂O. The product was eluted with aqueous ammonia (7% NH₄OH) and the eluted fractions were concentrated under vacuum. The product was then dissolved in water again and Ambersep 800 (OH⁻) ion exchange resin was added. The resin was filtered off and the solvent was removed to afford **197** as a white solid (10 mg, 53%).

R_f 0.48 (MeOH/CH₂Cl₂ 2:8).

$[\alpha]_D^{20} = +8.0$ (*c* 1, H₂O).

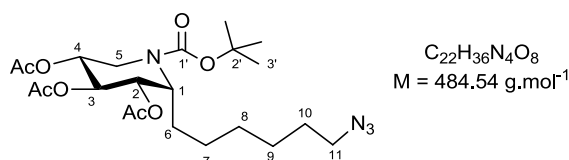
¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 1.20-1.55 (m, 8H), 1.56-1.67 (m, 2H), 2.64 (dd, *J* = 13.0 and 8.1 Hz, 1H, H-5a), 2.88 (dd, *J* = 13.0 and 4.4 Hz, 1H, H-5b), 2.92-3.00 (m, 1H, H-1), 3.33 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-11), 3.46-3.55 (m, 1H, H-3), 3.55-3.64 (m, 2H, H-2 and H-4).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 25.2, 25.4, 25.8, 27.9, 28.1 (C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), 43.8 (C-5), 51.2 (C-11), 54.8 (C-1), 70.6 (C-3), 72.1 (C-4), 72.6 (C-2).

IR (neat): 3319 (O-H, N-H), 2094 (N₃) cm⁻¹.

HRMS (ESI): *m/z* 259.177 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₁H₂₃N₄O₃: 259.176).

***α*-1-C-(6-azido-hexyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylitol (210)**



To a solution of **209** (64 mg, 0.178 mmol) in pyridine (1.7 mL) was added acetic anhydride (1.7 mL) and dimethylaminopyridine (3.3 mg, 0.027 mmol, 0.15 eq.). The solution was stirred overnight. Water (2 mL) was added at 0°C. Few mL of a saturated NaHCO₃ solution were added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted with AcOEt. The combined organic layers were washed with saturated solution of NaHCO₃

and dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The residue was purified by automatic flash column chromatography (AcOEt/petroleum ether 1:5 to 1:3) to afford a pale yellow oil **210** (67 mg, 77%) as a mixture of rotamers according to NMR data.

R_f 0.3 (AcOEt/petroleum ether 1:3).

$[\alpha]_D^{20} = +10.5$ (c 1, CHCl_3).

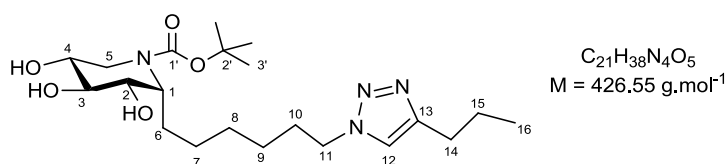
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.11-1.39 (m, 6H, H-7, H-8 and H-9), 1.39-1.48 (m, 9H, H-3'), 1.48-1.66 (m, 4H, H-6 and H-10), 1.94-2.06 (m, 9H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.69 (br q, $J = 11.3$ Hz, 1H, H-5b), 3.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-11), 4.09-4.65 (m, 2H, H-5a and H-1), 4.68-5.01 (m, 2H, H-4 and H-2), 5.25 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 20.8, 20.9 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.7, 25.2, 25.4, 26.5, 26.7, 28.3 (C-3'), 28.9, 39.0 and 40.1 (C-5), 51.4 (C-11), 52.5 and 53.5 (C-1), 69.3, 69.8, 70.4, 71.0, 71.06 (C-2, C-3 and C-4), 81.1 (C-2'), 153.3 and 153.4 (C-1'), 169.4, 169.6, 169.76, 169.83, 169.9, 170.4 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat): 2098 (N_3), 1753, 1699 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 507.239 ($[\text{M}+\text{Na}^+]$, calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{NaO}_8$: 507.243).

α -1-C-(6-(4-Propyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-1,5-dideoxy-1,5-*t*-butoxycarboxylimino-D-xylitol (**211**)



To a solution of **209** (35 mg, 0.098 mmol) in THF (1 mL), was added pent-1-yne (48 μL , 0.488 mmol, 5 eq.) and then copper sulfate pentahydrate (3.3 mg, 0.010 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (5.8 mg, 0.03 mmol, 0.2 eq.) dissolved in water (1 mL). 4 hours later, the reaction mixture was filtered over celite and the solvents were evaporated. The residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10 and 1% NH_4OH) to afford a pale yellow oil **211** (37 mg, 89%) as a mixture of rotamers according to NMR data.

R_f 0.2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10 and 3 drops of NH_4OH).

$[\alpha]_D^{20} = +2.5$ (c 1, MeOH).

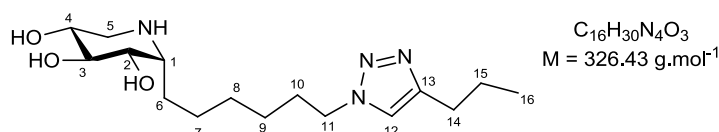
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-16), 1.17-1.39 (m, 6H, H-7, H-8 and H-9), 1.38-1.50 (m, 10H, H-6a and H-3'), 1.61-1.81 (m, 3H, H-15 and H-6b), 1.88 (br quintuplet, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-10), 2.49-2.70 (m, 1H, H-5a), 2.66 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-14), 3.22-3.32 (m, 1H, H-4), 3.35-3.44 (m, 2H, H-3 and H-2), 3.91-4.15 (m, 1H, H-5b), 4.17-4.30 (m, 1H, H-1), 4.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-11), 7.72 (s, 1H, H-12).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ 14.0 (C-16), 23.8 (C-15), 24.7 and 24.8, 26.6 and 26.9, 27.5, 28.3 (C-14), 28.6 (C-3'), 29.6 and 29.7, 31.3 (C-6), 43.0 and 44.2 (C-5), 51.2 (C-11), 55.8 and 57.1 (C-1), 71.6 and 71.9, 72.8 and 73.0, 75.9 (C-2, C-3 and C-4), 81.5 (C-2'), 123.1 (C-12), 149.0 (C-13), 156.7 (C-1').

IR (neat): 3380 (O-H), 1686 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 449.274 ($[\text{M}+\text{Na}^+]$, calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{NaO}_5$: 449.273).

α -1-C-(6-(4-Propyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-1,5-dideoxy-imino-D-xylitol (**212**)



To a suspension of **211** (37 mg, 0.087 mmol) in water (0.6 mL) was added trifluoroacetic acid (0.3 mL) dropwise at 0°C . The mixture was stirred 5 hours at rt and then evaporated to dryness. The product was dissolved in water and H^+ resin IR 120 was added. After 15 minutes of stirring without mechanical agitation the

resin was filtered with water and methanol. The resin was then eluted with NH_4OH solution (6%). It was then evaporated and **212** was obtained as a white solid (18 mg, 64%).

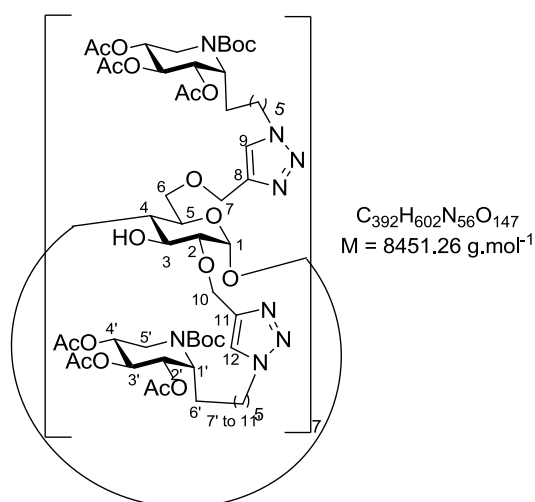
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.8$ (c 1, MeOH).

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H-16), 1.27-1.52 (m, 7H, H-7, H-8, H-9 and H-6a), 1.52-1.62 (m, 1H, H-6b), 1.68 (sextuplet, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-15), 1.90 (br quintuplet, $J = 7$ Hz, 2H, H-10), 2.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-14), 2.76-2.87 (m, 1H, H-5a), 2.92 (br t, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-1), 2.99-3.12 (m, 1H, H-5b), 3.52-3.61 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.74-3.82 (m, 1H, H-3), 4.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-11), 7.72 (s, 1H, H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): δ 14.0 (C-16), 23.8 (C-14), 26.7, 27.3, 28.3 (C-15), 30.1, 31.2, 47.5 (C-5), 51.2 (C-11), 55.6 (C-1), 70.3, 70.9 and 71.5 (C-2, C-3 and C-4), 123.1 (C-12), 149.0 (C-13); IR (neat) : 3321 (O-H) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 327.238 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_3$: 327.240).

Compound 213



In a 5-mL microwave reactor vial, heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **154** (19.9 mg, 0.012 mmol), **210** (89 mg, 0.184 mmol, 1.1 x 14 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4.2 mg, 0.017 mmol, 0.1 x 14 eq.), sodium ascorbate (6.6 mg, 0.033 mmol, 0.2 x 14 eq.) in DMF/ H_2O (2.2/0.5 mL) were added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated.

As the crude mixture showed a mixture of partially clicked product, another 2 eq. of iminosugars were added in presence of copper sulfate and sodium ascorbate as described above. The mixture was heated again under microwave irradiation at 70°C for 20 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL). NH_4OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10) giving a yellow solid **213** (44.2 mg, 44%) as a mixture of rotamers according to the NMR data.

R_f 0.43 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20.0$ (c 1.0, CHCl_3).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.11-1.38 (m, 84H, H-7', H-8' and H-9'), 1.44 (s, 126H, C-(CH_3)₃), 1.50-1.71 (m, 28H, H-6'), 1.77-1.94 (m, 28H, H-10'), 1.99 (s, 42H, C(O) CH_3), 2.01 (s, 42H, C(O) CH_3), 2.03 (s, 42H, C(O) CH_3), 2.70 (br q, $J = 12.0$ Hz, 14H, H-5'a), 3.40 (t, $J = 8.6$ Hz, 7H, H-4), 3.46 (br d, $J = 9.6$ Hz, 7H, H-2), 3.54-3.84 (m, 21H, H-5 and H-6), 3.91 (t, $J = 8.9$ Hz, H-3), 4.10-4.35 (m, 42H, H-5'b, H-11'), 4.40-4.66 (m,

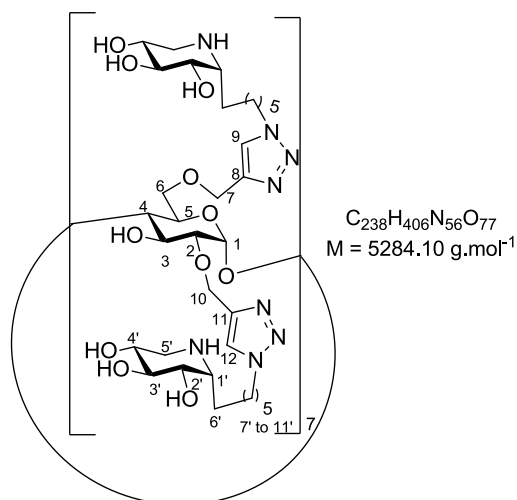
28H, H-1' and H-7 or H-10), 4.69-5.07 (m, 49H, H-1, H-2', H-4' and H-7 or H-10), 5.25 (t, $J = 9.8$ Hz, 14H, H-3'), 7.48-7.87 (m, 14H, H-9 and H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 20.87, 20.94 (C(O)CH_3), 24.7 (C-6'), 25.4 and 26.7 (C-7' and C-8'), 26.7 (C-(CH_3)₃), 28.9 (C-9'), 30.5 (C-10'), 39.0 and 40.2 (C-5), 50.4 (C-11), 51.4 and 52.6 (C-1), 64.9 and 65.0, (C-7 and C-10), 65.1 (C-6), 69.4 (C-2' or C-4'), 69.8 (C-5), 70.4 (C-2' or C-4'), 71.0 (C-3'), 73.4 (C-3), 79.0 (C-2), 81.1 (C-(CH_3)₃), 83.0 (C-4), 101.7 (C-1), 122.9 and 123.7 (C-9 and C-12), 144.0 and 144.7 (C-8 and C-11), 154.3 and 154.5 (N-C=O), 169.5, 169.6, 169.8 and 169.9 (C(O)CH_3).

IR (neat): 3431 (OH), 1750 and 1696 (C=O) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z [$\text{M}+\text{H}^+$] 8447.6, calcd. for $\text{C}_{392}\text{H}_{603}\text{N}_{56}\text{O}_{147}$: 8447.15).

CD14XYLC6 (215)



Compound **213** (44.2 mg, 5.23 μmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.3 mL) and TFA (0.3 mL) was added. The solution was stirred 5 hours and evaporated to dryness. The residue was filtered through a short silica column with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 + 1% Et_3N , and the solvent was evaporated. This residue was then dissolved in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 3mL) and Amberlite resin IRA 400 OH^- 1.4 meq/mL (0.81 g) was added. The mixture was stirred for 4.5 hours at 27 $^\circ\text{C}$ using a rotary evaporator at atmospheric pressure. After evaporation, the product was dissolved again in water and washed with ether to remove small impurities. The phases were separated and the solvent was evaporated giving **215** (18 mg, 66% over two steps) as a white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16.5$ (c 1, MeOH)

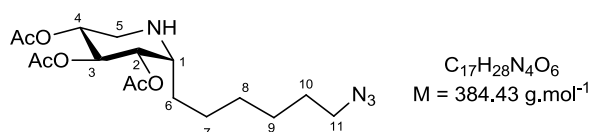
^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 1.30-1.48 (m, 98H, H-7' to H-9' and H-6'a), 1.48-1.64 (m, 14H, H-6'b), 1.81-1.99 (m, 28H, H-10'), 2.76 (br d, $J = 13.0$ Hz, 14H, H-5'a), 2.81-2.90 (m, 14H, H-1'), 3.01 (d, $J = 13.4$ Hz, 14H, H-5'b), 3.40 (t, $J = 8.9$ Hz, 7H, H-4), 3.47-3.56 (m, 35H, H-2', H-4' and H-2), 3.69-3.98 (m, 42H, H-6, H-5, H-3' and H-3), 4.33 (t, $J = 6.2$ Hz, 14H, H-11'), 4.42 (t, $J = 6.9$ Hz, 14H, H-11'), 4.48-4.64 (m, 14H, H-7 or H-10), 4.80-4.91 (m, 14H, H-7a or H-10a and H-1), 5.00 (d, $J = 12.3$ Hz, 7H, H-7b or H-10b), 7.91 (s, 7H, H-9 or H-12), 8.07 (s, 7H, H-9 or H-12)

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): δ 26.9, 27.4, 30.2, 30.7 (C-6' to C-9'), 31.3 (C-10'), 47.5 (C-5'), 51.3 (C-11'), 55.6 (C-1'), 65.2 and 66.1 (C-7 and C-10), 70.5 (C-6), 70.7 (C-2' or C-4'), 71.4 (C-5), 71.9 (C-2' or C-4'), 73.9 (C-3'), 74.6 (C-3), 81.2 (C-2), 84.2 (C-4), 102.5 (C-1), 125.1 and 125.7 (C-9 and C-12), 145.3 and 145.9 (C-8 and C-11).

IR (neat): 3352 (OH) cm^{-1}

MALDI-TOF-MS: average m/z 5286.20 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{238}\text{H}_{407}\text{N}_{56}\text{O}_{77}$: 5285.11).

α -1-C-(6-azido-hexyl)-2,3,4-tri-O-acetyl-1,5-imino-D-xylitol (**216**)



To a solution of **210** (136 mg, 0.280 mmol) in CH_2Cl_2 (4.5 mL) was added trifluoroacetic acid (1.2 mL) and the mixture was stirred for 2 hours at r.t. The mixture was then evaporated to dryness and the residue was taken in CH_2Cl_2 (10 mL), the organic phase was washed with saturated $NaHCO_3$ solution (2 x 10mL) and then dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH$ 1:0 to 95:5) to afford **216** (83 mg, 77%) as a pale yellow oil.

R_f 0.6 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1).

$[\alpha]_D^{20} = -3.0$ (c 1, $CHCl_3$).

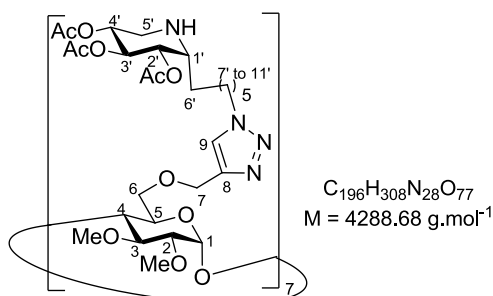
1H NMR (300 MHz, $CHCl_3$): δ 1.17-1.47 (m, 8H, H-6, H-7, H-8 and H-9), 1.47-1.58 (m, 2H, H-10), 1.58-1.68 (m, 1H, N-H), 1.94-2.08 (m, 9H, $C(O)CH_3$), 2.88 (dd, $J = 14.3$ and 5.1 Hz, 1H, H-5a), 2.93-2.98 (m, 1H, H-1), 3.03 (dd, $J = 14.3$ and 3.7 Hz, 1H, H-5b), 3.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-11), 4.64 (br q, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-4), 4.72 (dd, $J = 5.6$ and 3.5 Hz, 1H, H-2), 5.05 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CHCl_3$): δ 20.8, 21.0 (3 $C(O)CH_3$), 25.9, 26.6, 28.8 (2 C), 29.1 (C-6, C-7, C-8, C-9 and C-10), 44.1 (C-5), 51.4 (C-11), 53.7 (C-1), 68.3 (C-3), 68.7 (C-4), 70.2 (C-2), 169.3, 169.8, 169.9 ($C=OCH_3$).

IR (neat): 3342 (N-H), 2096 (N_3), 1744 ($C=O$) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z 385.209 ($[M+H]^+$), calcd for $C_{17}H_{29}N_4O_6$: 385.208).

Compound **217**



To a solution of Heptakis(2,3-dimethyl-6-propargyl)cyclomaltoheptaose **153** (43 mg, 0.027 mmol) and the iminosugar **216** (80 mg, 0.208 mmol, 1.1 x 7 eq.), in DMF (5 mL) were added copper sulfate pentahydrate (4.7 mg, 0.019 mmol, 0.1 x 7 eq.) and sodium ascorbate (7.5 mg, 0.038 mmol, 0.2 x 7 eq.) dissolved in water (1 mL). The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with water (12 mL), then dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (ACN/ H_2O/NH_4OH) 15:0.5:0.5) giving **217** (108.5 mg, 94%) as a pale yellow solid.

R_f 0.25 (ACN/ H_2O/NH_4OH 10:0.5:0.5).

$[\alpha]_D^{20} = +42.0$ (c 1.0, $CHCl_3$).

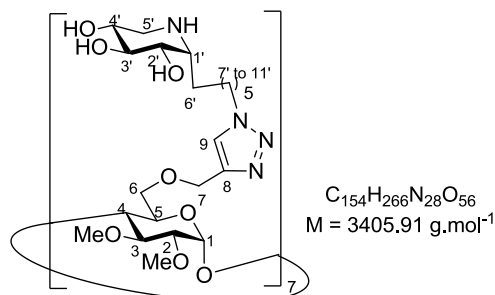
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.12-1.52 (m, 56H, H-6', H-7', H-8' and H-9'), 1.72-1.89 (m, 14H, H-10'), 2.03 (s, 21H, $C(O)CH_3$), 2.05 (s, 42H, $C(O)CH_3$), 2.82-2.99 (m, 14H, H-5'a, H-1), 3.04 (dd, $J = 14.2$ and 3.7 Hz, 7H, H-5'b), 3.11 (dd, $J = 9.8$ and 3.2 Hz, 7H, H-2'), 3.35-3.42 (m, 28H, H-3 and OMe), 3.52-3.72 (m, 35H, H-4, H-6a, OMe), 3.78 (d, $J = 8.3$ Hz, 7H, H-5), 3.92 (d, $J = 7.6$ Hz, 7H, H-6b), 4.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 14H, H-11'), 4.52 (d, $J = 12.2$ Hz, 7H, H-7a), 4.57-4.70 (m, 14H, H-4' and H-7b), 4.73 (dd, $J = 5.6$ and 3.5 Hz, 7H, H-2'), 4.97-5.11 (m, 14H, H-3' and H-1), 7.62 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 20.9, 21.0 (C(O)CH₃), 25.9, 26.5, 28.7, 29.0 (C-6' to C-9'), 30.3 (C-10'), 44.0 (C-5'), 50.2 (C-11'), 53.6 (C-1'), 58.6 (OMe), 61.5 (OMe), 64.9 (C-7), 68.2 (C-3'), 68.7 (C-4'), 69.2 (C-6), 70.2 (C-2'), 71.1 (C-5), 80.2 (C-4), 81.8 (C-3), 82.1 (C-2), 99.0 (C-1), 122.7 (C-9), 144.9 (C-8), 169.2, 169.8 and 169.9 (C=O).

IR (neat): 3336 (NH) 1746 (C=O) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 4287.50 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{196}\text{H}_{309}\text{N}_{28}\text{O}_{77}$: 4287.11).

CD7XYLC6 (218)



Compound **217** (102.5 mg, 0.024 mmol) was dissolved in MeOH/ H_2O (1:1, 12 mL). Amberlite resin IRA 400 OH⁻ 1.4 meq/mL (2.8 g) was added, and the mixture was stirred for 5.5 hours at 27 °C using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated giving **218** (75 mg, 92%) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +54.0$ (c 1, MeOH).

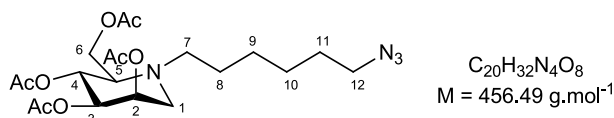
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.07-1.68 (m, 56H, H-6' to H-9'), 1.77-2.02 (m, 14H, H-10'), 2.75 (dd, $J = 13.4$ and 3.5 Hz, 7H, H-5'a), 2.81-2.90 (m, 7H, H-1'), 3.01 (d, $J = 12.6$ Hz, 7H, H-5'b), 3.11 (br, dd, $J = 9.0$ and 2.8 Hz, 7H, H-2), 3.42-3.56 (m, 42H, OMe, H-2', H-4' and H-3), 3.57-3.70 (m, 35H, OMe, H-6a and H-4), 3.71-3.86 (m, 14H, H-3' and H-5), 3.86-4.04 (m, 7H, H-6b), 4.37 (t, $J = 6.9$ Hz, 14H, H-11'), 4.54 (d, $J = 11.6$ Hz, 7H, H-7a), 4.61 (d, $J = 12.2$ Hz, 7H, H-7b), 5.05 (br s, 7H, H-1), 8.01 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 27.0, 27.6, 30.3, 30.7, 31.4 (C-6' to C-10'), 47.5 (C-5'), 51.4 (C-11'), 55.5 (C-1'), 59.0 (OMe), 59.0 (OMe), 65.2 (C-7), 70.5 (C-6), 70.7 (C-2' or C-4'), 71.5 (C-3' or C-5), 71.8 (C-2' or C-4'), 72.3 (C-3' or C-5), 80.8 (C-4), 83.0 (C-2), 83.4 (C-3), 99.6 (C-1), 125.2 (C-9), 145.8 (C-8).

IR (neat): 3378 (OH and NH) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: average m/z 3426.51 (calcd. for $\text{C}_{154}\text{H}_{266}\text{N}_{28}\text{NaO}_{56}$: 3426.87).

N-(6-Azidohexyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannocitol (220)



To a solution of 1-deoxymanojirimicin (21.8 mg, 0.109 mmol) in DMF (0.8 mL) was added potassium carbonate (55 mg, 0.401 mmol, 4 eq.) and 1-azido-6-bromohexane **170** (49 mg, 0.200 mmol, 2 eq., purity 84%wt). The mixture was heated at 90°C for 4 hours. The solvent was then removed by evaporation and the crude mixture was directly used in the next step without purification. This crude product **219** was dissolved in pyridine (1.3 mL) and dimethylaminopyridine (2.4 mg, 20 μmol , 0.2 eq.) and acetic anhydride (1.3 mL) were added. The mixture was stirred 3 hours at rt. The solvent was then removed by evaporation and the residue was purified by column chromatography (AcOEt/ Petroleum Ether 1:1) to afford **220** as a pale yellow oil (38.9 mg, 78% over two steps).

R_f 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH 1:9).

$[\alpha]_D^{20} = -34.0$ (c 1, CHCl₃).

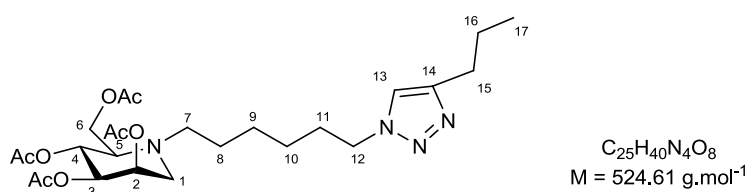
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.23-1.46 (m, 6H, H-8, H-9, H-10), 1.57 (quintuplet, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-11), 1.99 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.03 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.06 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.09 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.53-2.66 (m, 2H, H-1a and H-7a), 2.66-2.78 (m, 2H, H-5 and H-7b), 3.03 (dd, $J = 13.1$ and 4.9 Hz, 1H, H-1b), 3.23 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-12), 4.14-4.28 (m, 2H, H-6), 4.29 (dd, $J = 8.5$ and 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.16-5.30 (m, 2H, H-4 and H-2).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 20.9, 21.0, 21.2 (4 C(O)CH₃), 25.2, 26.7, 26.8 (C-8, C-9 and C-10), 28.9 (C-11), 50.8 (C-1), 51.4 (C-12), 52.7 (C-7), 60.1 (C-6), 61.3 (C-5), 67.2 (C-2), 68.1 (C-4), 71.6 (C-3), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 (4 C(O)CH₃).

IR (neat): 2095 (N₃), 1737 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 457.230 ([M+H⁺], calcd. for C₂₀H₃₃N₄O₈: 457.229).

N-(6-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-mannocitol (**221**)



Compound **220** (25.3 mg, 0.055 mmol) and 1-pentyne (18.8 mg, 0.277 mmol, 5 eq.) were solubilized in THF (2 mL) and CuSO₄·5H₂O (1.4 mg, 0.006 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (3.3 mg, 0.017 mmol, 0.3 eq) dissolved in water (2 mL) were added. The mixture was stirred overnight and then the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 1:1 + 1% NH₄OH to AcOEt/Petroleum Ether 1:1 + 1% NH₄OH) to afford **221** as a white solid (20.8 mg, 72%).

R_f 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH 1:9).

$[\alpha]_D^{20} = -37.5$ (c 1, CHCl₃).

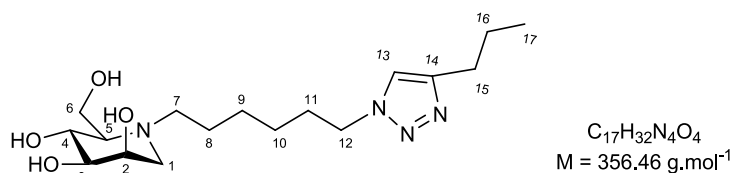
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-17), 1.24-1.48 (m, 6H, H-8, H-9 and H-10), 1.68 (sextuplet, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-16), 1.80-1.95 (m, 2H, H-11), 2.01 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.07 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.09 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.51-2.80 (m, 6H, H-5, H-7, H-1a and H-15), 3.03 (dd, $J = 13.2$ and 5.3 Hz, 1H, H-1b), 4.16-4.25 (m, 2H, H-6), 4.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-12), 4.96 (dd, $J = 8.5$ and 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.16-5.30 (m, 2H, H-4 and H-2), 7.24 (s, 1H, H-14).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 13.9 (C-17), 20.8, 20.95, 21.03, 21.2 (4 C=OCH₃), 22.8 (C-16), 25.2, 26.5, 26.7 (C-8, C-9 and C-10), 27.8 (C-15), 30.5 (C-11), 50.1 (C-12), 50.8 (C-1), 52.8 (C-7), 60.1 (C-6), 61.3 (C-5), 67.2 (C-2), 68.1 (C-4), 71.6 (C-3), 120.5 (C-14), 148.4 (C-13), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 (4 C=OCH₃).

IR (neat): 1737 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z 525.291 ([M+H⁺], calcd. for C₂₅H₄₁N₄O₈: 525.292).

N-(6-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-mannocitol (**222**)



To a solution of **221** (20.8 mg, 0.040 mmol) in MeOH (2 mL) was added IRA 400 OH⁻ resin (400 mg) and the solution was stirred using a rotary evaporator at atmospheric pressure for 3 hours. The resin was then filtered off and the solvent was evaporated to give **222** (12 mg, 85%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = -39.5$ (*c* 0.6, MeOH).

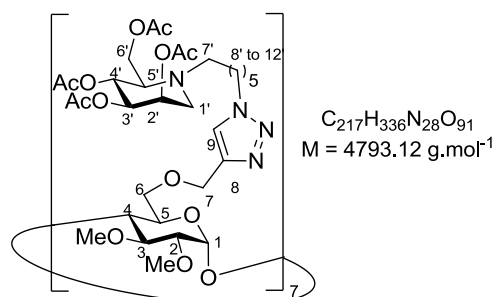
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-17), 1.25-1.37 (m, 4H, H-9 and H-10), 1.40-1.54 (m, 2H, H-8), 1.68 (sextuplet, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-16), 1.82-1.96 (m, 2H, H-11), 2.10 (dt, *J* = 9.0 and 2.5 Hz, 1H, H-5), 2.45 (dd, *J* = 12.4 and 1.6 Hz, 1H, H-1), 2.48-2.61 (m, 1H, H-7a), 2.66 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-15), 2.69-2.81 (m, 1H, H-7b), 2.97 (dd, *J* = 12.2 and 3.8 Hz, 1H, H-1b), 3.26-3.31 (m, 1H, H-3), 3.65 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-4), 3.78-3.83 (m, 1H, H-2), 3.83-3.90 (m, 2H, H-6), 4.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-12), 7.72 (s, 1H, H-13).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD): δ 14.0 (C-17), 23.8 (C-16), 25.3 (C-8), 27.4 and 27.9 (C-9 and C-10), 28.3 (C-15), 31.2 (C-11), 51.1 (C-12), 53.7 (C-7), 56.4 (C-1), 59.3 (C-6), 67.1 (C-5), 69.6 (C-2), 69.7 (C-4), 76.6 (C-3), 123.1 (C-13), 149.0 (C-14).

IR (neat): 3367 (O-H) cm⁻¹.

HRMS (ESI): *m/z* 379.231 ([M+Na⁺], calcd for C₁₇H₃₂N₄NaO₄: 379.232).

Compound **223**



To a solution of Heptakis(2,3-dimethyl-6-propargyl)cyclomaltoheptaose **153** (17.7 mg, 0.011 mmol) and the iminosugar **220** (38.9 mg, 0.085 mmol, 1.1 x 7 eq.), in DMF (1.2 mL) were added copper sulfate pentahydrate (1.9 mg, 0.008 mmol, 0.1 x 7 eq.) and sodium ascorbate (3.1 mg, 0.016 mmol, 0.2 x 7 eq.) dissolved in water (0.2 mL). The resulting suspension was stirred at rt for 16 hours. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). In order to remove copper from the product, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL). NH₄OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified again by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98:2 to 95:5) giving **223** (27.8 mg, 52%) as a pale yellow solid.

*R*_f 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

$[\alpha]_D^{20} = +12.5$ (*c* 0.6, CHCl₃).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.27-1.37 (m, 28H, H-9' and H-10'), 1.36-1.48 (m, 14H, H-8'), 1.86 (br t, *J* = 6.7 Hz, 14H, H-11'), 2.01 (s, 21H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 21H, C(O)CH₃), 2.07 (s, 21H, C(O)CH₃), 2.10 (s, 21H, C(O)CH₃), 2.56-2.80 (m, 28H, H-7', H-5' and H-1'a), 3.04 (dd, *J* = 13.3 and 4.6 Hz, 7H, H-1'b), 3.14 (dd, *J* =

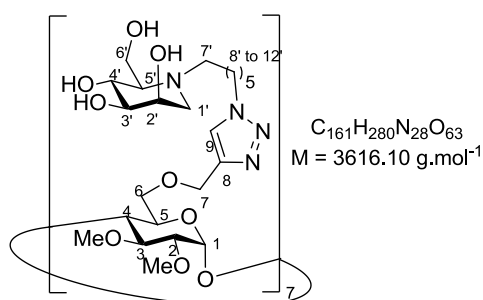
9.8 and 3.1 Hz, 7H, H-2), 3.41-3.55 (m, 28H, OMe and H-3), 3.57-3.75 (m, 35H, OMe, H-4 and H-6a), 3.81 (br d, $J = 9.7$ Hz, 7H, H-5), 3.90-4.01 (m, 7H, H-6a), 4.16-4.26 (m, 14H, H-6'), 4.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 14H, H-12'), 4.55 (d, $J = 12.3$ Hz, 7H, H-7a), 4.64 (d, $J = 12.1$ Hz, 7H, H-7b), 4.96 (dd, $J = 8.6$ and 3.7 Hz, 7H, H-3'), 5.09 (br d, $J = 3.3$ Hz, 7H, H-1), 5.20-5.28 (m, 14H, H-4' and H-2'), 7.63 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.9, 21.0, 21.1 and 21.3 (C(O)CH₃), 25.0 (C-8'), 26.6, 26.8 (C-9' and C-10'), 30.5 (C-11'), 50.3 (C-12'), 51.0 (C-1'), 52.8 (C-7'), 58.8 (OMe), 60.0 (C-6'), 61.3 (C-5'), 61.6 (OMe), 65.1 (C-7), 67.3 (C-2'), 68.0 (C-4'), 71.2 (C-5), 71.8 (C-3'), 80.3 (C-4), 82.0 (C-3), 82.3 (C-2), 99.2 (C-1), 122.8 (C-9), 145.1 (C-8), 169.8, 170.1, 170.7 and 171.0 (C=O).

IR (neat): 1746 (C=O) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: m/z 4792.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{217}\text{H}_{337}\text{N}_{28}\text{O}_{91}$: 4291.26).

CD7DMJC6 (224)



Compound **223** (20 mg, 0.004 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 3 mL). Amberlite resin IRA 400 OH⁻ 1.4 meq/mL (0.65 g) was added, and the mixture was stirred for 4 hours at 27 °C using a rotary evaporator at atmospheric pressure. The resin was then filtered and washed with methanol and water. After evaporation, the product was dissolved again in water and washed with ether to remove small impurities visible by ^1H NMR. The phases were separated and the solvent was evaporated giving **224** (13 mg, 87%) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30.5$ (c 1, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, MeOD, 50°C): δ 1.31-1.42 (m, 28H, H-9' and H-10'), 1.47 (quintuplet, $J = 7.0$ Hz, 14H, H-8'), 1.82-1.99 (m, 14H, H-11'), 2.12 (dt, $J = 8.8$ and 2.8 Hz, 7H, H-5), 2.43 (dd, $J = 12.3$ and 1.6 Hz, 7H, H-1'a), 2.47-2.58 (m, 7H, H-7'a), 2.71-2.81 (m, 7H, H-7'b), 2.97 (dd, $J = 12.3$ and 3.9 Hz, 7H, H-1'b), 3.10 (dd, $J = 9.2$ and 3.5 Hz, 7H, H-2), 3.32-3.35 (m, 7H, H-3'), 3.43-3.57 (m, 35H, OMe, H-3, and H-4), 3.57-3.72 (m, 49H, H-4', H-5, H-6 and OMe), 3.75-3.92 (m, 21H, H-2' and H-6'), 4.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 14H, H-12'), 4.50-4.68 (m, 14H, H-7), 5.07 (s, 7H, H-1), 7.93 (s, 7H, H-9).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ 25.4 (C-8'), 27.5, 28.0 (C-9' and C-10'), 31.4 (C-11'), 51.3 (C-12'), 53.7 (C-7'), 56.5 (C-1'), 59.2 (OMe), 59.3 (C-6), 61.9 (OMe), 65.3 (C-7), 67.1 (C-5'), 69.6 (C-2'), 69.7 (C-4'), 70.5 (C-6), 72.4 (C-5), 76.6 (C-3'), 80.6 (C-4), 83.3 (C-2), 83.5 (C-3), 99.5 (C-1), 125.3 (C-9), 145.9 (C-8).

IR (neat): 3375 (OH) cm^{-1} .

MALDI-TOF-MS: average m/z 3615.08 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{161}\text{H}_{281}\text{N}_{28}\text{O}_{63}$: 3614.97).

Publications

Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls: A Dramatic Multivalent Effect**

Philippe Compain,* Camille Decroocq, Julien Iehl, Michel Holler, Damien Hazelard, Teresa Mena Barragán, Carmen Ortiz Mellet,* and Jean-François Nierengarten*

The electronic and structural properties of fullerene derivatives make them very attractive candidates for the construction of nanostructures that are potentially useful for applications in materials science and biological chemistry.^[1] In particular, the C₆₀ hexakis adducts with a T_h-symmetrical octahedral addition pattern initially developed by Hirsch and co-workers^[2] are unique organic molecules with an appealing compact spherical scaffold for the construction of multifunctional nanomaterials.^[3] However, the synthesis of functionalized fullerene hexakis adducts from malonates and C₆₀ is difficult.^[3,4] This major problem limits the applications of such systems and has been recently solved by the development of synthetic methodologies based on the postfunctionalization of easily accessible building blocks of fullerene hexakis adducts.^[5,6] It has been shown that fullerene hexakis adducts that bear 12 peripheral carbohydrate moieties can be prepared in excellent yields by grafting unprotected sugar derivatives onto the fullerene core.^[7] Although these fullerene sugar balls are obviously perfectly suited for applica-

tions in the field of carbohydrate–lectin interactions,^[8] the evaluation of carbohydrate-processing enzyme inhibition with such multivalent derivatives is less obvious. Indeed, among the possible strategies to attain specific potent glycosidase inhibition, the concept of multivalent design has been clearly overlooked.^[9] Most enzymes actually have a single, deep active site that is usually less accessible than the shallow binding pockets or grooves on the lectin surfaces.^[10] Consequently, a limited number of binding mechanisms, including statistical rebinding, are possible, whereas multivalent ligands may interact with multiple receptors by additional mechanistic options (e.g., the chelate effect, receptor clustering).^[9,11] It is likely that these factors may have hampered interest in projects directed towards the design of multivalent glycosidase inhibitors. In addition, the experimental results obtained to date were not particularly encouraging.^[12] Di- to tetravalent analogues of 1-deoxynojirimycin, which is a well-known glycosidase inhibitor,^[13] generally displayed comparable if not decreased inhibition compared with their monomeric counterparts. The best result reported to date was found for a trivalent iminosugar that showed a sixfold affinity enhancement towards Jack bean α -mannosidase.^[14] Herein we report the synthesis of a fullerene hexakis adduct decorated with 12 iminosugar residues. The inhibition profile of this fullerene iminosugar ball has been systematically evaluated against various glycosidases,^[15] and dramatic multivalent effects have been observed for the first time.

In order to explore the potential of multivalency on glycosidase inhibition with a globular polytopic ligand constructed around the fullerene scaffold, an N-alkyl analogue of 1-deoxynojirimycin was selected as the peripheral ligand. This class of compounds is indeed poorly selective and displays modest to good glycosidase inhibition.^[13] It was thus anticipated that these compounds could be excellent models for the examination of the influence of multivalency on inhibition selectivity over a large range of glycosidases. In addition, the alkyl chain on the endocyclic nitrogen atom of the iminosugar is an ideal spacer that may allow for easy grafting onto the central C₆₀ core by means of a cycloaddition reaction.^[16] The synthesis of the azide building block is based on the optimization of a strategy reported independently by Overkleeft et al.^[17] and Vasella and co-workers.^[18] As shown in Scheme 1, the δ -hydroxy amide **2** was obtained directly from commercially available tetra-*O*-benzyl D-glucopyranose (**1**) in 78% yield by oxidative amidation with iodine in 30% aqueous ammonia (30%).^[19] The main advantage of this one-pot process is that aldehyde oxidation and C–N bond formation are performed in a single synthetic step. Oxidation of the hydroxy group at C5 followed by intramolecular

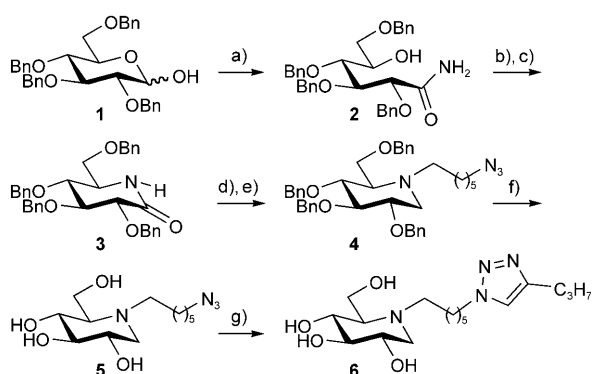
[*] Prof. P. Compain, C. Decroocq, Dr. D. Hazelard
Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives
Université de Strasbourg et CNRS (UMR 7509)
Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux
25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg (France)
Fax: (+33) 3-6885-2754
E-mail: philippe.compain@unistra.fr

J. Iehl, Dr. M. Holler, Prof. J.-F. Nierengarten
Laboratoire de Chimie des Matériaux Moléculaires
Université de Strasbourg et CNRS (UMR 7509)
Ecole Européenne de Chimie
Polymères et Matériaux
25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg (France)
Fax: (+33) 3-6885-2774
E-mail: nierengarten@chimie.u-strasbg.fr

T. Mena Barragán, Prof. C. Ortiz Mellet
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química
Universidad de Sevilla
Profesor García González 1, 41012 Sevilla (Spain)
E-mail: mellet@us.es

[**] This work was supported by the CNRS (UMR 7509), the Centre International de Recherche aux Frontières de la Chimie (FRC), the Agence National de la Recherche (ANR, grant number 08JC-0094-01), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (contract numbers CTQ2007-61180/PPQ), the Fundación Ramón Areces and the Junta de Andalucía, and doctoral fellowships from the French Department of Research to C.D. and J.I. We further thank A. Schiffrin and I. Pfeifer for assistance with synthetic work, Dr. D. Rodríguez-Lucena for helpful comments, and M. Schmitt for NMR measurements.

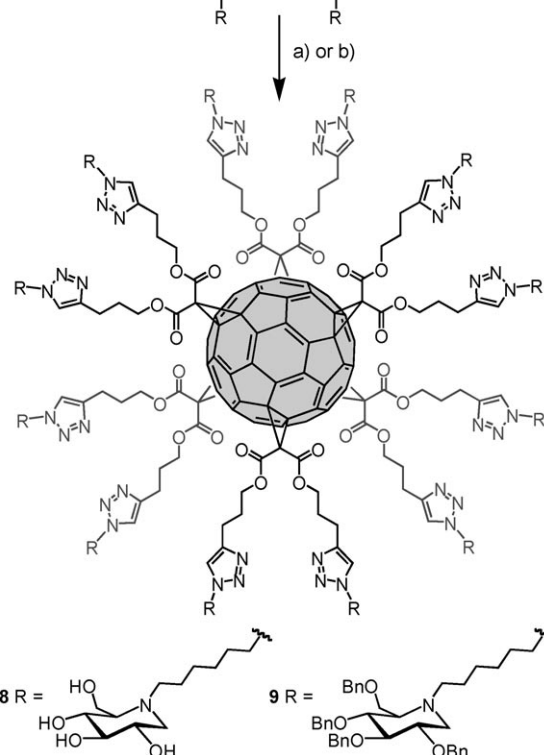
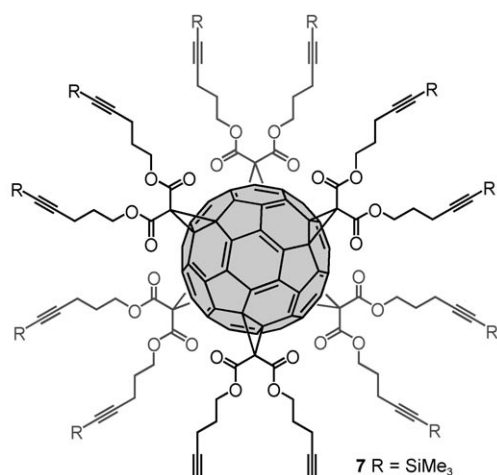
Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201002802>.



Scheme 1. a) aq NH₃ (30%), I₂, THF, 16 h, 78%; b) DMSO, Ac₂O; c) NaBH₃CN, HCOOH, MeCN, 80°C, 60% over two steps; d) LAH, THF, reflux, 90%; e) Br(CH₂)₆N₃, Et₃N, 4-dimethylaminopyridine (DMAP), DMF, 120°C, 38% (51% based on recovered starting material); f) BCl₃, CH₂Cl₂, -60°C→0°C, 77%. g) Pent-1-yne, sodium ascorbate, CuSO₄·5H₂O, DMF/H₂O (1:1), 61%.

reductive amination afforded the expected lactam **3**. Reduction with lithium aluminium hydride (LAH) and subsequent alkylation of the corresponding amine by using 1-azido-6-bromo-hexane afforded the O-benzylated iminosugar **4**. Selective cleavage of the benzyl protecting groups of **4** without interfering with the azide moiety was performed successfully by treatment with an excess of BCl₃ in CH₂Cl₂ at low temperatures (-60–0°C).^[20] Reaction of the resulting compound **5**^[21] with 1-pentyne in the presence of CuSO₄·5H₂O and sodium ascorbate gave the derivative **6**, which was used as the monovalent model compound in the inhibition assay.

The synthesis of fullerene iminosugar ball **8** is shown in Scheme 2. Compound **7**^[6] was desilylated in situ with tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) to form the corresponding hexaadduct bearing 12 terminal alkyne units, with which the azide precursor **5** was subsequently reacted. The functionalized fullerene **8** was thus obtained in 83% yield. The chemical structure of compound **8** was confirmed by its ¹H and ¹³C NMR spectra, which show the expected signals for the 12 equivalent peripheral iminosugar residues as well as the characteristic features of the fullerene hexakis-adduct core (see the Supporting Information). To further confirm the structure of compound **8**, mass spectra (MALDI-TOF and ESI-MS) were recorded under different conditions. However, as already observed in the case of related fullerene sugar balls,^[7] a high level of fragmentation prevented the observation of the expected molecular ion peak. This difficulty prompted us to prepare compound **9** by reaction of the fullerene derivative **7** with the benzylated iminosugar **4** (Scheme 2). The ¹H and ¹³C NMR spectra of compound **9** show the same characteristic features that were observed for unprotected compound **8** (see the Supporting Information). MALDI-TOF mass spectrometry also confirmed the structure of fullerene derivative **9**. The level of fragmentation was less dramatic in this case and the molecular ion peak could be clearly observed at *m/z* 9911.02 ([*M* + H]⁺, calculated for C₆₁₈H₆₅₉N₄₈O₇₂: 9911.12). Finally, the UV/Vis spectra of



Scheme 2. a) **5**, TBAF, sodium ascorbate, CuSO₄·5H₂O, DMF/H₂O (1:1), 83%; b) **4**, TBAF, sodium ascorbate, CuSO₄·5H₂O, CH₂Cl₂/H₂O (1:1), 78%.

compounds **8** and **9** show the characteristic features of fullerene hexaadducts.^[5]

Fullerene iminosugar **8** and its monovalent analogue **6** were tested against a range of commercially available glycosidases and their inhibition constants (*K_i*) were evaluated (Table 1). The biological results may be divided unevenly into three categories with regard to inhibition: decreased, unaffected, and increased by multivalency. Only one example of a significant affinity decrease (ninefold) compared to the monovalent iminosugar was observed for sweet almond β-glucosidase. For two other glycosidases (amyloglucosidase and bovine liver β-glucosidase), the multivalent and monovalent iminosugars showed similar *K_i* values.

Table 1: Glycosidase inhibitory activities K_i .^[a]

Enzyme	Monovalent iminosugar 6	Multivalent iminosugar 8	Relative inhibition potency of 8 over 6 ^[b]
β -galactosidase Bovine liver	262	34	7.7 (0.64)
α -galactosidase <i>Aspergillus niger</i> Green coffee	NI ^[c] NI ^[c]	NI ^[c] 84	– > 23 (> 1.9)
β -glucosidase Almonds (pH 7.3) Bovine liver	11 482	95 247	0.1 (0.01) 1.9 (0.16)
α -glucosidase Amyloglucosidase (<i>Asp. Niger</i>) Baker's yeast Isomaltase (Baker's yeast)	0.71 152 943	0.69 18 10.5	1.0 (0.08) 8.7 (0.72) 89.8 (7.48)
Naringinase <i>Penicillium decumbens</i>	9.1	0.41	22.2 (1.84)
β -mannosidase <i>Helix pomatia</i>	NI ^[c]	NI ^[c]	–
α -mannosidase Jack Bean	322	0.15	2147 (179)

[a] Values reported in μM . [b] The value indicated in brackets corresponds to the relative inhibition potency per nojirimycin residue. [c] NI: no inhibition detected at 2 mM.

For most of the glycosidases tested, a significant binding enhancement (up to 2150-fold) was observed relative to the corresponding monomer. The most impressive results were obtained for three α -glycosidases. Remarkably, multivalent iminosugar **8** was found to be a good inhibitor of green coffee α -galactosidase, whereas its monomeric analogue **6** in the D-gluco series was completely inactive. The stronger measurable multivalent effects were obtained with baker's yeast isomaltase and Jack bean α -mannosidase, which had K_i values that were two and three orders of magnitude higher, respectively, than monomeric iminosugar **6**.

Comparison of the inhibition profile of the dodecavalent system **8** and a previously described trivalent iminosugar^[14] provides interesting insights. For both compounds, the best multivalent effect was obtained with Jack bean α -mannosidase (sixfold enhancement for trivalent and approximately 2150-fold for dodecavalent as compared to monovalent iminosugars). However, contrary to compound **8**, the trivalent iminosugar was a weaker inhibitor of baker's yeast isomaltase than its monomeric analogue. The analysis of the valency-corrected potency of the two multivalent systems toward Jack bean α -mannosidase (twofold and approximately 180-fold for the trivalent and dodecavalent systems respectively) is more interesting. These results highlight the impact of the central scaffold on the inhibition activity of the multivalent architecture. It is noteworthy that, in general, N-alkylated analogues

of mannojirimycin show little if any inhibition of mannosidases.^[13]

Further research will certainly be needed for the rationalization of the significant binding enhancements observed for glycosidase inhibition with multivalent inhibitors. When considered on an inhibitor residue basis, our results unequivocally evidence the existence of a multivalent effect beyond the expected statistical rebinding and local concentration effect. A sliding mechanism of the iminosugars in the enzyme active site or an additional binding at a close allosteric site may account for the distinct specificity enhancement observed.^[9,11,22] Beyond its fundamental interest, our work shows that, in addition to the modulation of selectivity, multivalency is a promising tool for the design of potent glycosidase inhibitors.

Received: May 8, 2010

Published online: July 7, 2010

Keywords: enzymes · fullerenes · iminosugars · inhibitors · multivalency

- [1] *Fullerenes: Principles and Applications*, RSC Nanoscience and Nanotechnology Series (Eds.: F. Langa, J.-F. Nierengarten), Royal Society of Chemistry, London, **2007**.
- [2] A. Hirsch, I. Lamparth, T. Grösser, H. R. Karfunkel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9385–9386.
- [3] For a review on fullerene hexakis adducts, see: A. Hirsch, O. Vostrowsky, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 829–848.
- [4] X. Camps, A. Hirsch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 1595–1596; H. Li, A. Kitaygorodskiy, R. A. Carino, Y.-P. Sun, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 859–862.
- [5] a) J. Iehl, R. Pereira de Freitas, B. Delavaux-Nicot, J.-F. Nierengarten, *Chem. Commun.* **2008**, 2450–2452; b) P. Pierrat, S. Vanderheiden, T. Muller, S. Bräse, *Chem. Commun.* **2009**, 1748–1750; c) P. Pierrat, C. Réthoré, T. Muller, S. Bräse, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11458–11460; d) J. Iehl, J.-F. Nierengarten, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4160–4162.
- [6] J. Iehl, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7306–7309.
- [7] J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Muñoz, N. Martín, J. Rojo, M. Sánchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka, S. P. Vincent, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3860–3862.
- [8] Y. M. Chabre, R. Roy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 165–393, and references cited herein.
- [9] a) S.-K. Choi, *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications*, Wiley, New York, **2004**; b) S. Cecioni, O.-A. Argintaru, T. Dosca, P. Gergely, J.-P. Praly, S. Vidal, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 148–156, and references cited therein.
- [10] J. M. Rini, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 551–577.
- [11] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [12] a) T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, K. M. Bongers, W. E. Donker-Koopman, A. Ghisaidoobe, G. A. Van der Marel, A. Strijland, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 836–846; b) A. Lohse, K. B. Jensen, K. Lundgren, M. Bols, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965–1971; c) B. A. Johns, C. R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749–752.
- [13] *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley, New York, **2007**; *Iminosugars*

- as *Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond* (Ed.: A. E. Stütz), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [14] J. Diot, M. I. Garcia-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363.
- [15] Glycosidase inhibitors are useful probes to elucidate fundamental biological pathways and attractive leads for drug discovery, see for example: a) V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515–553; b) N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R–104R; c) T. M. Gloster, G. J. Davies, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305–320; d) T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 794–815; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750–770; e) B. P. Rempel, S. G. Withers, *Glycobiology* **2008**, *18*, 570–586.
- [16] a) R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613–628; b) R. Huisgen, W. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494–2507; c) C. W. Tornøe, M. Meldal, Proceedings of the 2nd International and 17th American Peptide Symposium, Peptides: The Waves of the Future (Eds.: M. Lebl, R. A. Houghten), San Diego, **2001**, 263–264; d) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [17] H. S. Overkleeft, J. van Wiltenburg, U. K. Pandit, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4215–4224.
- [18] V. Hoos, A. B. Naughton, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1802–1807.
- [19] a) L. Colombeau, T. Tenin, P. Compain, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8647–8650; b) M.-Y. Chen, J.-L. Hsu, J.-J. Shie, J.-M. Fang, *J. Chin. Chem. Soc.* **2003**, *50*, 129–133.
- [20] a) V. Liautard, A. E. Christina, V. Desvergnès, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7337–7345; b) S. Desvergnès, Y. Vallée, S. Py, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2967–2970.
- [21] A. J. Rawlings, H. Lomas, A. W. Pilling, M. J.-R. Lee, D. S. Alonzi, J. S. S. Rountree, S. F. Jenkinson, G. W. J. Fleet, R. A. Dwek, J. H. Jones, T. D. Butters, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1101–1105.
- [22] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933.

Synthesis of Azide-armed α -1-C-Alkyl-imino-D-xylitol Derivatives as Key Building Blocks for the Preparation of Iminosugar Click Conjugates

Camille Decroocq, Laura Mamani Laparra,
David Rodríguez-Lucena, and Philippe Compain

Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives, Université de Strasbourg et CNRS (UMR 7509), Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

Azide-armed α -1-C-alkyl-imino-D-xylitol derivatives have been efficiently prepared by way of olefin cross-metathesis in eight to nine steps and in an overall yield of 19% to 26% from 2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranose. Optimization of cleavage conditions of *N*-NAP-protected tertiary amines using DDQ in CH₂Cl₂-H₂O (18:1) is also reported. The iminosugars synthesized will be used as key building blocks in the synthesis of multivalent iminosugars of biological interest by way of Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction.

Keywords Iminosugars; Olefin cross-metathesis; Pharmacological chaperones; Gaucher disease; C-glycosides

INTRODUCTION

Thousands of iminosugars have been synthesized or isolated since the discovery of this famous class of glycosidase inhibitors in the 1960s.^[1,2] Quite surprisingly, there are still very few examples of multivalent iminosugars^[3,4] in the literature, whereas numerous analogs of multimeric carbohydrates have been reported to date.^[5,6] In addition, prior glycosidase inhibition studies performed

Received June 6, 2011; accepted July 31, 2011.

Address correspondence to Philippe Compain, Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives, Université de Strasbourg et CNRS (UMR 7509), Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France. E-mail: philippe.compain@unistra.fr

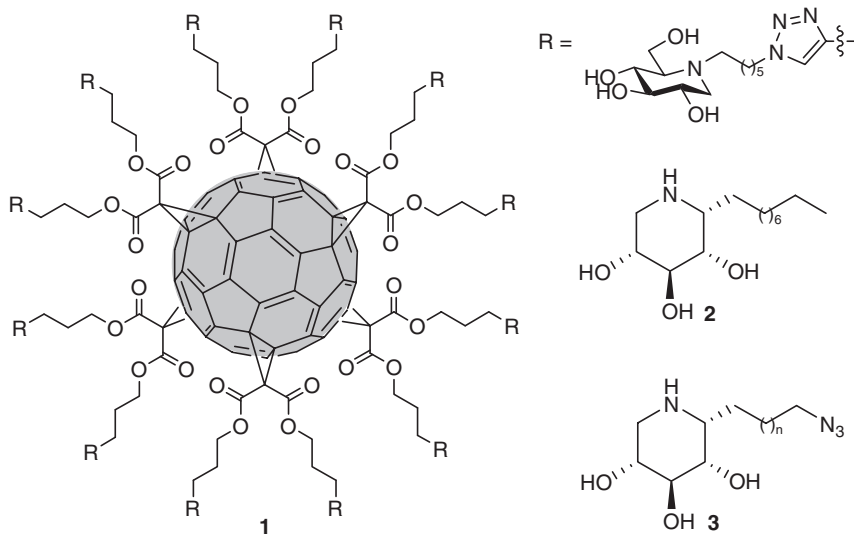
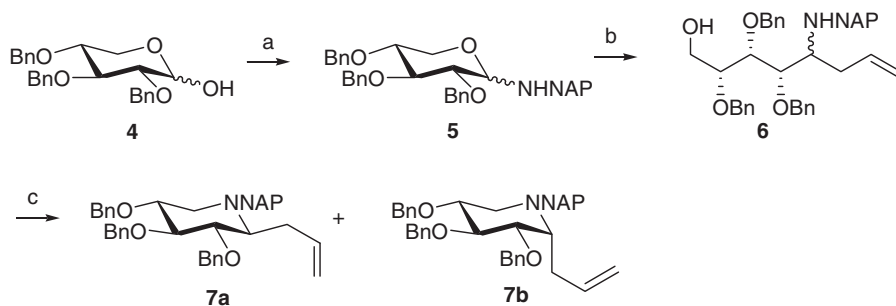


Figure 1: Iminosugar click cluster **1** and iminoxylitol derivatives **2** and **3**.

with di- to tetravalent analogs of 1-deoxynojirimycin (DNJ), a famous glycosidase inhibitor, generally displayed comparable if not decreased inhibition over their monomeric counterparts.^[3] Very recently, we reported the synthesis of dodecavalent iminosugar **1** by way of Cu(I)-catalyzed 1,3-cycloaddition of organic azides with terminal alkynes, a so-called “click” reaction (Fig. 1).^[4] Evaluation toward a panel of glycosidases led to the first evidence of a significant multivalent effect in glycosidase inhibition with binding enhancement of up to three orders of magnitude over the corresponding monovalent ligand for Jack bean α -mannosidase. These results have been further confirmed with multivalent iminosugars based on a β -cyclodextrin core.^[7]

In our first exploration study,^[4] *N*-alkyl analogs of DNJ were selected as the peripheral ligands. This class of compounds is known to consist of poorly selective glycosidase inhibitors and therefore was used as a model for examining the influence of multivalency on inhibition selectivity. In a second step, our aim was to prepare multivalent systems based on potent and specific inhibitors of glycosidases of therapeutic interest. In connection with our studies on pharmacological therapy for lysosomal diseases,^[8,9] we have recently disclosed that α -1-*C*-alkyl-imino-D-xylitol derivatives (α -1-*C*-alkyl-DIX) were highly potent inhibitors of human β -glucocerebrosidase (GCase) with K_i values in the nM range.^[8c,9] GCase is the enzyme involved in Gaucher disease, which is one of the most prevalent lysosomal storage disorders.^[10] The lead compound of the DIX family, α -1-*C*-nonyl-imino-D-xylitol (**2**), acts as a pharmacological chaperone^[10b] and is able to partially restore the residual cellular activity of GCase in N370S fibroblasts from Gaucher patients at nanomolar subinhibitory concentration.^[9] The preparation of multivalent systems presenting potent GCase

inhibitors in multiple copies by way of azide-alkyne cycloaddition reaction requires an efficient access to azide-armed α -1-*C*-alkyl-iminoxylytol derivatives such as **3**. This is quite a challenging task; in our initial strategy, α -1-*C*-alkyl-imino-D-xylitol derivatives were obtained in 10 steps from L-xylose in low overall yields, the two key steps of the process (imine-chain extension and one-pot acetal deprotection/intramolecular reductive amination) proceeding in low and unreliable yields (ca. 5% to 35%).^[9] Our synthetic strategy hinges on two key steps: the stereoselective addition of allyl Grignard reagents to xylopyranosylamine **5** and the olefin cross-metathesis reaction of α -1-*C*-allyl-imino-D-xylitol derivatives **11** (Sch. 1 and 2). Structural diversity may then be easily introduced by means of the second key step to access α -1-*C*-substituted iminoxylytol derivatives containing linkers of different lengths and structures.

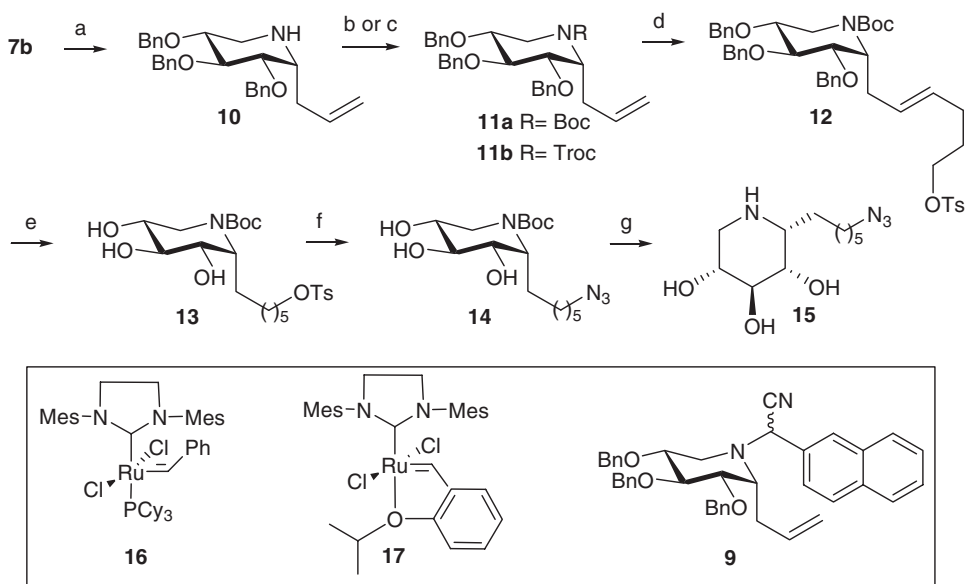


Scheme 1: Reagent: (a) **8**, Et₃N, molecular sieves 4Å, DMSO, 60°C; (b) allylMgBr, THF, 0°C to rt, 70% over two steps (c) MsCl, molecular sieves 4Å, Py, 100°C, 4 h, 76%.

RESULTS AND DISCUSSION

α -1-*C*-Allyl-imino-D-xylitol derivatives **14** and **15** were prepared by modification of the chain extension methodology using glycosylamine substrates reported by the groups of Nicotra^[11] and Martin^[8c,12,13] for the synthesis of imino-*C*-glycosides (Sch. 1). The synthetic strategy was applied to 2-naphthalenemethyl (NAP)-protected xylopyranosylamine **5** instead of the corresponding *N*-benzyl derivative. The *N*-NAP group can be cleaved very selectively under mild conditions using DDQ in the presence of benzyloxy groups.^[14]

Our synthetic strategy based on a cross-metathesis reaction indeed requires replacement of the endocyclic amine with a less coordinating group to avoid chelation with the catalyst metal center and thus the formation of unproductive complexes.^[15] The readily available tri-*O*-benzyl-D-xylitol **4**^[16] was dissolved in DMSO and reacted with 2-naphthylmethylamine hydrochloride (**8**)^[17] in the presence of TEA at 60°C. The corresponding *N*-NAP glycosylamine **5** obtained was submitted to the next step without purification. Addition of three equivalents of allylmagnesium bromide to **5** in THF



Scheme 2: Reagent: (a) DDQ, CH₂Cl₂/H₂O, 0°C to rt, 86%; (b) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C to rt, 97% (**11a**); (c) TrocCl, Py, rt, 98% (**11b**); (d) 1-tosyloxy-4-pentene, **17** cat., CH₂Cl₂, 40°C, 67%; (e) H₂, Pd/C, HCl 2M, THF/MeOH, rt, 88%; (f) NaN₃, DMSO, rt, quant.; (g) TFA/H₂O, rt, 53%.

afforded the expected δ -amino alcohols **6** as a mixture of diastereoisomers (de 60%) and in a good yield (70% from **4**). Diastereoisomers **6** were efficiently cyclized using mesyl chloride in pyridine at 100°C via an intramolecular S_N2 mechanism.^[8c,18] This efficient process afforded α -1-*C*-allyl-iminopyranoside **7b** in 76% yield after purification on silica gel, the minor β -epimer **7a** being obtained in 13% yield. The 1,2-*cis* configuration of the major epimer **7b**, which adopted predominantly the ⁴C₁ conformation ($J_{2,3} = 8.9$ Hz, axial-axial coupling constant), was established unambiguously by $J_{H,H}$ coupling constants ($J_{1,2} = 5.6$ Hz, axial-equatorial coupling constant). Quite unexpectedly, the removal of the *N*-naphthalenemethyl protective group proved difficult. Under typical deprotection conditions (1.5 equiv. of DDQ in CH₂Cl₂-MeOH),^[14] the expected amine **10** was obtained along with compound **9** in 28% and 23% yield, respectively (Sch. 2). This side reaction was never observed in our previous investigations of the scope of the oxidative cleavage of the *N*-NAP-protecting group.^[14] After various attempts, the best results were obtained using a smaller quantity of DDQ (2 equiv.) in the presence of water instead of MeOH as the nucleophilic co-solvent. Under these conditions, the secondary amine **10** was obtained in 86% yield and protected with a Boc group or a Troc group to provide α -1-*C*-allyl-iminopyranoside derivatives **11** (Sch. 2). The direct introduction of the azide function by reacting 5-azido pentene^[19] and α -1-*C*-allyl-iminopyranoside **11b** in the presence of 5 to 10 mol% of Grubbs catalyst (**16**) was found to be unsuccessful under various experimental conditions.^[20,21] The reaction was then performed

with 1-tosyloxy-4-pentene to obtain a versatile intermediate allowing the direct introduction of an azide function or more elaborated moieties by S_N2 -type reactions. A solution of α -1-*C*-allyl-iminoxylitol derivative **11a** was refluxed in the presence of 6 equiv. of 1-tosyloxy-4-pentene^[19a] and 20 mol% of Grubbs catalyst (**16**) or Grubbs-Hoveyda catalyst (**17**). The best results were obtained for this latter catalyst and the desired cross-metathesis product **12** was isolated in 67% yield. Not surprisingly, attempts to perform the same reaction using **7b** failed under various experimental conditions. The selective one-step removal of the benzyl-protecting groups and reduction of the double bond in **12** was conducted with 10% palladium on carbon to provide the piperidinol **13** in 88% yield. The displacement of the tosylate group with sodium azide was achieved in quantitative yield in DMSO to afford the desired *N*-Boc-protected substrate **14** for azide-alkyne cycloaddition reaction. The fully deprotected azide-armed α -1-*C*-alkyl-iminoxylitol derivative **15** was obtained by treatment of **14** with TFA. The same synthetic sequence applied to **11b**, the *N*-Troc analog of **11a**, was found to be much less efficient as lower yields were obtained for every synthetic step. In addition, the final removal of the *N*-Troc-protecting group using Zn in AcOH/ether^[21] led to degradation products.

CONCLUSION

In conclusion, we have developed a practical and efficient access to azide-armed α -1-*C*-alkyl-imino-D-xylitol derivatives by way of olefin cross-metathesis in eight to nine steps and in an overall yield of 19% to 26% from xylopyranose **4**.^[16] The synthetic versatility of key advanced intermediates such as **11** or **12** may be further exploited to access α -1-*C*-substituted iminoxylitol derivatives containing linkers of different lengths and structures. Optimization of cleavage conditions of *N*-NAP-protected tertiary amines using DDQ in CH_2Cl_2 - H_2O (18:1) has also been achieved. Azide-armed α -1-*C*-alkyl-imino-D-xylitol derivatives synthesized will be used as key building blocks in the synthesis of original multivalent iminosugars by way of Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. It is noteworthy that despite the tremendous surge of interest in so-called “click” methodologies for functional molecule synthesis,^[22] this concept has been poorly exploited in the field of iminosugars to date.^[3a,4,23] The synthesis and biological evaluation of the iminosugar click clusters designed as human β -glucocerebrosidase inhibitors will be reported in due course. Azide-armed iminosugars prepared in this study may also find application in the preparation of other relevant iminosugar conjugates or in the design of libraries of biologically active compounds.

General Methods

Dichloromethane (CH_2Cl_2) was distilled over CaH_2 under Ar; dimethylsulfoxide (DMSO) was distilled over CaH_2 under reduced pressure. Tetrahydrofuran (THF) was dried by passage through an activated alumina column under

Ar. Pyridine was distilled over KOH under reduced pressure and stored over KOH. All reactions were performed in standard glassware. Column chromatography: silica gel 60 (230–400 mesh, 0.040–0.063 mm) was purchased from E. Merck. Flash chromatography was carried out in a Grace Reveleris flash system equipped with UV/Vis and ELSD detectors. Thin layer chromatography (TLC) was performed on aluminum sheets coated with silica gel 60 F₂₅₄ purchased from E. Merck. IR spectra (cm⁻¹) were recorded on a Perkin–Elmer Spectrum One Spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 or AC 400 with solvent peaks as reference. Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. The ¹H signals were assigned by COSY, HSQC. ESI-HRMS mass spectra were carried out on a Bruker MicroTOF spectrometer. Specific rotations were determined at rt (20°C) in a Perkin–Elmer 241 polarimeter for sodium ($\lambda = 589$ nm).

2-Naphthylmethylamine Hydrochloride (**8**)^[17]

Naphthalene-2-carbonitrile (3.0 g, 19.58 mmol) was dissolved in absolute ethanol (112 mL); 10% wt. palladium supported on carbon (1.041 g, 0.979 mmol, 0.05 eq. Pd) was added followed by concentrated hydrochloric acid (1.98 mL, 19.58 mmol, 1.0 eq.). Argon was bubbled into the solution followed by hydrogen gas. The mixture was stirred at rt, under H₂ atmosphere, for 20 h. It was then filtered through a pad of celite and washed thoroughly with ethanol, and the filtrate concentrated under reduced pressure and finally dried under vacuum. The desired product **8** was obtained as white powder (3.670 g, 97% yield). Analytical data were consistent with the literature:^[17b] *R_f* 0.46 (CH₃CN/H₂O/NH₄OH 10:1:1); ¹H NMR (MeOD, 300 MHz): δ 4.32 (s, 2H, CH₂N), 7.53–7.62 (m, 3H), 7.88–8.03 (m, 4H); ¹³C NMR (MeOD, 75.5 MHz): δ 45.4 (CH₂N), 127.8, 128.7, 128.8, 129.7, 129.9, 130.3, 131.0 (CH_{Ar}), 132.6, 135.6, 135.7 (C_{Ar}); MS (ESI): *m/z* 158.1 (calcd. for [C₁₁H₁₂N]⁺ 158.1).

1-C-Allyl-2,3,4-tri-O-Benzyl-1-Methylnaphthylamino-1-Deoxy-D-Xylitol (**6**)

Under anhydrous conditions, compound **4** (1.95 g, 4.64 mmol) was dissolved in DMSO (12 mL). 2-Naphthylmethylamine hydrochloride (**8**) (1.35 g, 6.96 mmol, 1.5 eq.), triethylamine (0.97 mL, 6.96 mmol, 1.5 eq.), and molecular sieves 4 Å (0.4 g) were added to the mixture, which was stirred at 60°C for 22 h. The latter was filtered through celite and washed thoroughly with diethyl ether. Water (100 mL) was added to the filtrate and phases were separated. The aqueous layer was extracted using diethyl ether (3 × 120 mL). The combined extracts were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated

under reduced pressure to provide *N*-methylnaphthyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-D-xylopyranosylamines (**5**) as an orange solid. R_f 0.45 (AcOEt/petroleum ether 1:3 + 1% Et₃N).

Under anhydrous conditions, the crude compounds **5** were dissolved in THF. At 0°C, allylmagnesium bromide (13.9 mL of 1.0 M solution in Et₂O, 13.9 mmol, 3 eq.) was added dropwise. After 15 hours, 2 more equivalents of allylmagnesium bromide were added at 0°C and the reaction was stirred at rt for another 15 hours. After cooling down to 0°C, the mixture was hydrolyzed using a few milliliters of water. The mixture was concentrated under reduced pressure, the residue dissolved in diethyl ether (250 mL), and water was added to allow the phases to separate. The organic layer was washed with water (3 × 150 mL) and brine (100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and finally concentrated under reduced pressure. The yellow solid residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/petroleum ether + 0.5% Et₃N 1:5 to 1:3). The diastereoisomers **6** were obtained as colorless oil (1.95 g, 70% yield over two steps). R_f 0.27 (AcOEt/petroleum ether 1:3 + 1% Et₃N). IR: ν_{\max} (neat) 3461 (OH, NH) cm⁻¹; HRMS (ESI): m/z 602.326 ([M+H]⁺, calcd. for C₄₀H₄₄NO₄: 602.326).

A pure analytical sample of the major diastereoisomer, (1*R*)-1-*C*-allyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-methylnaphthylamino-1-deoxy-D-xylitol, has been isolated and characterized by NMR ¹H and ¹³C: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.23–2.38 (m, 1H, -CH_{2a}-CH=), 2.41–2.54 (m, 1H, -CH_{2b}-CH=), 2.61–2.71 (m, 1H, H-1), 3.35 (q, J = 4.4 Hz, 1H, H-4), 3.61 (dd, J = 11.7 and 4.2 Hz, 1H, H-5a), 3.70 (dd, J = 11.7 and 5.2 Hz, 1H, H-5b), 3.77 (d, J = 13.2 Hz, 1H, CH₂Ar), 3.81 (dd, J = 7.2 and 2.4 Hz, 1H, H-2), 4.07 (d, J = 13.0 Hz, 1H, CH₂Ar), 4.10–4.17 (m, 1H, H-3), 4.30 (d, J = 11.7 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.48 (d, J = 11.8 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.59 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.72 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.81 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.87 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.97–5.07 (m, 2H, -CH=CH₂), 5.56–5.75 (m, 1H, -CH=CH₂), 7.14–7.21 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.22–7.37 (m, 13H, CH_{Ar}), 7.41–7.51 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.62–7.87 (m, 4H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 35.4 (-CH₂-CH=), 51.2 (CH₂Ar), 56.4 (C-1), 61.8 (C-5), 72.0, 74.4, 74.7 (3 CH₂Ph), 78.3 (C-4), 80.08 (C-3), 80.14 (C-2), 117.2 (-CH=CH₂), 125.7, 126.1, 126.8, 127.2, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.3, 128.38, 128.44, 128.6 (22 CH_{Ar}), 132.7, 133.4 (2 C_{Ar}), 136.1 (-CH=CH₂), 138.19, 138.24, 138.4, 138.9 (4 C_{Ar}).

1-*C*-Allyl-*N*-Methylnaphthyl-2,3,4-Tri-*O*-Benzyl-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (**7a** and **7b**)

Under anhydrous conditions, compound **6** (1.804 g, 3.00 mmol) was dissolved in pyridine (45 mL). Methanesulfonyl chloride (0.58 mL, 7.49 mmol, 2.5 eq.) was then added followed by molecular sieves 4 Å (1.9 g). The reaction mixture was stirred at 100°C for 4 h. It was then filtered through

celite and washed thoroughly with AcOEt (200 mL). The organic layer was then washed with water (4×150 mL), dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. Toluene was added and the mixture was concentrated; this operation was repeated three times to remove residual pyridine. The resulting brown oil was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/petroleum ether: 1:5 to 1:3) to afford 1.325 g of diastereoisomer **7b** (76% yield) and 0.220 g of diastereoisomer **7a** (13% yield).

Major diastereomer **7b**

$R_f = 0.48$ (AcOEt/petroleum ether 1:4); $[\alpha]_D^{20} +21.1$ (c 1, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6): δ 2.46 (bt, $J = 7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 2.53–2.66 (m, 1H, H-5a), 2.87 (dd, $J = 12.4$ and 4.5 Hz, 1H, H-5b), 3.33 (q, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-1), 3.59–3.70 (m, 2H, H-3 and H-4), 3.79 (dd, $J = 8.9$ and 5.6 Hz, 1H, H-2), 3.92 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, CH_2Ar), 4.06 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, CH_2Ar), 4.55–4.69 (m, 4H, CH_2Ph), 4.87 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.92 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.99 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_{2a}$), 5.13 (d, $J = 17.3$ and 1.7 Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_{2b}$), 5.90–6.03 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.13–7.36 (m, 13H, CH_{Ar}), 7.37–7.43 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.45–7.53 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.76 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.81–7.92 (m, 3H, CH_{Ar}). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 28.8 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 48.2 (CH_2Ar or C-5), 59.2 (CH_2Ar or C-5), 60.2 (C-1), 72.7, 73.1, 75.7 (3 CH_2Ph), 78.7, 80.8, 82.9 (C-2, C-3 and C-4), 115.8 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 125.7, 126.1, 126.7, 126.8, 127.56, 127.63, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.42, 128.43 (22 CH_{Ar}), 133.0, 133.5, 137.1 (3 C_{Ar}), 138.5 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 138.6, 138.7, 139.3 (3 C_{Ar}). HRMS (ESI): m/z 584.312 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{NO}_3$: 584.316).

Minor diastereomer **7a**

$R_f = 0.37$ (AcOEt/petroleum ether 1:4); $[\alpha]_D^{20} -1.8$ (c 1, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.87–2.01 (m, 1H, H-5a), 2.43–2.59 (m, 1H, H-1), 2.65–2.81 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 2.97 (dd, $J = 11.5$ and 3.2 Hz, 1H, H-5b), 3.28 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, CH_2Ar), 3.47–3.62 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.28 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, CH_2Ar), 4.43 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.52 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.69 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.82 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.99 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.02 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.17 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.96–6.15 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.05–7.18 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.20–7.39 (m, 11H, CH_{Ar}), 7.40–7.57 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.67 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.74–7.91 (m, 3H, CH_{Ar}). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 32.2 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 54.0 (CH_2Ar or C-5), 59.2 (CH_2Ar or C-5), 64.6 (C-1), 72.7, 75.3, 75.5 (3 CH_2Ph), 78.4, 80.2, 87.6 (C-2, C-3 and C-4), 117.7 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 125.7, 126.1, 127.0, 127.3, 127.6, 127.77, 127.80, 127.86, 127.89, 127.94, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6 (22 CH_{Ar}), 133.0, 133.5 (2 C_{Ar}), 134.4 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 136.5, 138.4, 138.8, 139.0 (4 C_{Ar}).

α -1-C-Allyl-*N*-(Cyano-Naphthalen-2-yl-Methyl)-2,3,4-Tri-O-Benzyl-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (9)

Compound **9** was obtained as a by-product in the reaction of deprotection of the 2-naphthalenemethyl group using DDQ in CH₂Cl₂/MeOH. $R_f = 0,75$ (AcOEt/petroleum ether + 1% Et₃N 1:1); $[\alpha]_D^{20} +20.4$ (*c* 1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CHCl₃) δ 2.52–2.62 (m, 2H, –CH₂–CH=), 2.69–2.84 (m, 2H, H-5), 3.31 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, H-1), 3.68–3.79 (m, 3H, H-2, H-3 and H-4), 4.47–4.68 (m, 4H, CH₂Ph), 4.82 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.87 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH₂Ph), 5.05 (s, 1H, –CHCN), 5.11 (d, $J = 10$ Hz, 1H, –CH=CH_{2a}), 5.17 (dd, $J = 17.0$ and 1.7 Hz, 1H, –CH=CH_{2b}), 5.84–5.98 (m, 1H, –CH=CH₂), 7.15–7.25 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.25–7.40 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.51 (dd, $J = 8.4$ and 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54–7.61 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.81–7.94 (m, 4H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD) δ 29.5 (–CH₂–CH=), 46.2 (C-5), 58.8 (C-1 or CH–C≡N), 59.2 (C-1 or CH–C≡N), 72.88, 72.93, 75.1 (CH₂Ph), 77.4, 79.7, 81.3, 117.0 (–CH=CH₂), 118.3 (C≡N), 125.0, 126.8, 127.0, 127.5, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 127.99, 128.00, 128.36, 128.42, 129.2 (22 CH_{Ar}), 131.4, 133.1, 133.7 (3 C_{Ar}), 136.9 (–CH=CH₂), 138.36, 138.42, 139.0 (3 C_{Ar}); HRMS (ESI): m/z 631.291 ([M+Na]⁺, calcd. for C₄₁H₄₀N₂Na₁O₃: 631.293).

α -1-C-Allyl-2,3,4-Tri-O-Benzyl-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (10)

Compound **7b** (308 mg, 0.53 mmol) was dissolved in a CH₂Cl₂/H₂O mixture 18:1 (12 mL) and stirred at 0°C. DDQ (180 mg, 0.79 mmol, 1.5 eq.) was added and the mixture was stirred at rt for 1.5 h; 0.5 eq. of DDQ was added to complete the reaction and the mixture was stirred at rt for another 15 min. The mixture was concentrated to dryness and the residues were taken up in DCM. This organic phase was washed five times with a saturated solution of sodium bicarbonate, dried over Na₂SO₄, and filtered. Solvent was evaporated off and the residual brown liquid was purified by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/petroleum ether + 1% Et₃N 1:9 to 1:1) to afford **10** as a brown viscous oil (202 mg, 86% yield).

R_f 0.28 (AcOEt/petroleum ether 1:1 + 1% Et₃N); $[\alpha]_D^{20} -5.0$ (*c* 1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.91 (bs, 1H, NH), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, –CH₂–CH=), 2.89 (dd, $J = 13.2$ and 6.1 Hz, 1H, H-5a), 3.00 (dd, $J = 13.3$ and 4.0 Hz, 1H, H-5b), 3.07 (td, $J = 7.3$ and 3.8 Hz, 1H, H-1), 3.43 (q, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-4), 3.49 (dd, $J = 6.1$ and 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.73 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-3), 4.52 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.59 (s, 2H, CH₂Ph), 4.65 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.67 (s, 2H, CH₂Ph), 5.02–5.13 (m, 2H, –CH=CH₂), 5.67–5.83 (m, 1H, –CH=CH₂), 7.19–7.42 (m, 15H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 33.0 (–CH₂–CH=), 44.4 (C-5), 54.8 (C-1), 72.2, 72.5, 74.1 (3 CH₂Ph), 76.7 (C-4), 77.3 (C-3), 78.1 (C-2), 117.2 (–CH=CH₂), 127.70, 127.73, 127.8, 127.96, 128.00, 128.44, 128.50, 128.51 (15 CH_{Ar}), 136.1 (–CH=CH₂), 138.68, 138.70, 138.71 (3 C_{Ar}). HRMS (ESI): m/z 444.253 ([M+H]⁺, calcd. for C₂₉H₃₄N₁O₃: 444.253).

α -1-C-Allyl-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2,3,4-Tri-O-Benzyl-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (11a)

Compound **10** (202 mg, 0.46 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (3.5 mL). Et₃N (70 μ L, 0.50 mmol, 1.1 eq.) and Boc₂O (109 mg, 0.50 mmol, 1.1 eq.) were added at 0°C. The reaction mixture was allowed to raise rt and stirred for 3 h 30 min until the starting material was completely consumed. Solvent was evaporated off. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/petroleum ether 1:20 to 1:8) to afford a colorless oil **11a** as a mixture of rotamers, according to NMR data (240 mg, 97% yield).

R_f = 0.63 (AcOEt/petroleum ether 1:3); $[\alpha]_D^{20}$ -15.0 (*c* 1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.23–2.45 (m, 1H, -CH_{2a}-CH=), 2.53–2.68 (m, 1H, -CH_{2b}-CH=), 2.76 (q, J = 11.6 Hz, 1H, H-5a), 3.39–3.67 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.75 (t, J = 9.2 Hz, 1H, H-3), 4.12 (dd, J = 13.5 and 5.6 Hz, 0.5H, H-5b), 4.34–4.45 (m, 0.5H, H-1), 4.49 (dd, J = 13.5 and 5.7 Hz, 0.5H, H-5b), 4.63–4.86 (m, 4.5H, H-1 and CH₂Ph), 4.86–5.02 (m, 2H, CH₂Ph), 5.03–5.19 (m, 2H, -CH=CH₂), 5.62–5.90 (m, 1H, -CH=CH₂), 7.27–7.48 (m, 15H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 28.3 (CH₃), 29.7 (-CH₂-CH=), 39.9 and 41.3 (C-5), 51.2 and 53.1 (C-1), 72.6, 73.0, 73.1, 73.2, 75.7, 75.8 (3 CH₂Ph), 78.3 and 78.5 (C-2, C-3 or C-4), 79.7 and 79.9 (C-2, C-3 or C-4), 80.1 and 80.3 (-C(CH₃)₃), 82.1 and 82.3 (C-2, C-3 or C-4), 116.9 and 117.3 (-CH=CH₂), 127.6, 127.7, 127.8, 127.89, 127.92, 128.0, 128.3, 128.4, 128.45, 128.48 (15 CH_{Ar}), 134.7 and 134.8 (-CH=CH₂), 138.2, 138.26, 138.28, 138.32, 138.9 (3 C_{Ar}), 154.9 (C = O). ¹H NMR (400 MHz, 70°C, DMSO-D₆) δ 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.26–2.40 (m, 1H, -CH_{2a}-CH=), 2.41–2.48 (m, 1H, -CH_{2b}-CH=), 2.67 (t, J = 12.2 Hz, 1H, H-5a), 3.31–3.41 (m, 1H, H-4), 3.45 (dd, J = 9.1 and 6 Hz, 1H, H-2), 3.66 (t, J = 9.1 Hz, 1H, H-3), 4.03–4.21 (m, 1H, H-1), 4.37–4.54 (m, 1H, H-5), 4.66 (bs, 4H, CH₂Ph), 4.80 (bs, 2H, CH₂Ph), 4.98 (d, J = 10 Hz, 1H, -CH=CH_{2a}), 5.09 (d, J = 17 Hz, 1H, -CH=CH_{2b}), 5.62–5.78 (m, 1H, -CH=CH₂), 7.19–7.43 (m, 15H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (100 MHz, 70°C, DMSO-D₆) δ 27.5 (CH₃), 28.8 (-CH₂-CH=), 40.7 (C-5), 51.7 (C-1), 71.4, 71.6, 73.9 (3 CH₂Ph), 77.5, 78.8, 78.9 (C-2, C-3, C-4), 81.0 (-C(CH₃)₃), 116.1 (-CH=CH₂), 126.7, 126.9, 127.0, 127.08, 127.13, 127.5, 127.66, 127.68 (15 CH_{Ar}), 134.7 (-CH=CH₂), 137.9, 138.1, 138.6 (3 C_{Ar}), 153.6 (C=O); IR (neat): 1693 (C=O) cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z 566.285 ([M+Na]⁺, calcd. for C₃₄H₄₁N₁Na₁O₅: 566.288).

α -1-C-Allyl-*N*-(2,2,2-Trichloro-Ethoxycarbonyl)-2,3,4-Tri-O-Benzyl-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (11b)

Under anhydrous conditions, compound **11b** (101 mg, 0.228 mmol) was dissolved in pyridine (3 mL). 2,2,2-Trichloroethyl chloroformate (0.047 mL, 0.342 mmol, 1.5 eq.) was added and the mixture was stirred at rt for 4 h. TrocCl was added again (1.0 eq.) and the mixture was stirred at rt for another 3 h. Solvent

was evaporated under reduced pressure. A few milliliters of toluene was added and evaporated off to help removal of pyridine. This operation was repeated three times. Residual viscous solid was taken up in CH_2Cl_2 (10 mL). This organic solution was washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, dried over MgSO_4 , and filtered. Solvent was evaporated off and the crude product was purified by chromatography (SiO_2 , AcOEt/petroleum ether + 1% Et_3N 1:9 to 1:8) to afford a white viscous solid **11b** as a mixture of rotamers, according to NMR data (0.138 g, 98% yield).

R_f 0.64 (AcOEt/petroleum ether 1:4 + 1% Et_3N); $[\alpha]_D^{20} -11.0$ (c 1, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.25–2.43 (m, 1H, $-\text{CH}_{2a}-\text{CH}=\text{}$), 2.56–2.72 (m, 1H, $-\text{CH}_{2b}-\text{CH}=\text{}$), 2.83 (q, 1H, $J = 11.7$ Hz, H-5a), 3.43–3.64 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.72 (td, $J = 9.1$ and 2.7 Hz, 1H, H-3), 4.34 (td, $J = 13.8$ and 5.7 Hz, 1H, H-5b), 4.52–4.78 (m, 6.5H, CH_2Ph , H-1 and CH_2CCl_3), 4.79–4.90 (m, 2.5H, CH_2Ph and CH_2CCl_3) 5.04 (bd, $J = 11.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_{2a}$), 5.10 (bd, $J = 18.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_{2b}$), 5.62–5.81 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.27–7.40 (m, 15H, CH_{Ar}). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 29.7 and 29.8 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 41.1 (C-5), 52.8 and 53.3 (C-1), 73.06, 73.15, 73.36, 73.39, 75.2, 75.3, 75.9, 76.0 (CH_2Ph and CH_2CCl_3), 78.1, 78.3, 79.6, 79.7, 81.9, 82.0 (C-2, C-3 and C-4), 95.6 and 95.8 ($-\text{CCl}_3$), 117.8 and 118.0 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 127.7, 127.86, 127.93, 128.0, 128.08, 128.11, 128.5, 128.58, 128.61, 128.64 (15 CH_{Ar}), 134.10 and 134.14 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 138.07, 138.11, 138.81, 138.83 (3 C_{Ar}), 153.8 and 153.9 (C=O). IR (neat) : 1673, 1717 (C=O) cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z 640.138 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{Cl}_3\text{N}_1\text{NaO}_5$: 640.139).

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)- α -1-C-[6-(Toluene-4-Sulfonyloxy)-Hex-2-Enyl]-2,3,4-Tri-O-Benzyl-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (**12**)**

Under anhydrous conditions, compound **11a** (244 mg, 0.449 mmol) was dissolved in distilled and degassed CH_2Cl_2 (8 mL). 1-Tosyloxy-4-pentene^[19] (431 mg, 1.80 mmol, 4 eq.) was added to the reaction mixture and then the catalyst **17** (42 mg, 0.07 mmol, 15 mol%). The mixture was refluxed for 5 h and another 0.05 eq. of catalyst and 2 eq. of tosylated compound were added. The mixture was refluxed again for 18 h. The reaction was then filtered through silica gel and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (SiO_2 , AcOEt/petroleum ether 1:20 to 1:3) to afford a colorless oil **12** as a mixture of rotamers, according to NMR data (228 mg, 67% yield). $R_f = 0.63$ (AcOEt/petroleum ether 1:3); $[\alpha]_D^{20} -4.2$ (c 1, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.62–1.75 (m, 2H), 1.94–2.05 (m, 2H), 2.12–2.32 (m, 1H, $\text{C}1-\text{CH}_{2a}-\text{CH}=\text{}$), 2.38–2.50 (m, 1H, $\text{C}1-\text{CH}_{2b}-\text{CH}=\text{}$), 2.43 (s, 3H, PhCH_3), 2.62 (q, $J = 13.5$ Hz, 1H, H-5a), 3.32–3.59 (m, 2H, H-2 and H-4), 3.65 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.93–4.09 (m, 2.5H, CH_2OTs and H-5b), 4.21–4.31 (m, 0.5H, H-1), 4.38 (dd, $J = 13.3$ and 5.9 Hz, 0.5H, H-5b),

4.58–4.78 (m, 4.5H, CH₂Ph and H-1), 4.80–4.93 (m, 2H, CH₂Ph), 5.18–5.41 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.27–7.42 (m, 17H, CH_{Ar}), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 21.7 (PhCH₃), 23.0, 23.1, 28.39, 28.41 and 28.45 (C(CH₃)₃), 28.75 and 28.81 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 40.0 and 41.4 (C-5), 51.4 and 53.3 (C-1), 69.96 and 70.04 (CH₂OTs), 72.6, 73.1, 73.2, 73.3, 75.77, 75.83 (3 CH₂Ph), 78.4 and 78.6 (C-4), 79.8 and 80.0 (C-2), 80.2 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82.2 and 82.3 (C-3), 127.56, 127.64, 127.71, 127.75, 127.8, 127.9, 127.99, 128.00, 128.04, 128.4, 128.50, 128.53, 128.6, 129.3, 129.8, 129.9, 130.0, 130.7, 130.9, (19 CH_{Ar} and $-\text{CH}=\text{CH}-$), 133.30, 133.34, 138.27, 138.30, 138.4, 139.0, 144.8, 144.9 (5 C_{Ar}), 154.86 and 154.90 (C=O); IR (neat) : 1690 (C=O), 1363 (SO₂), 1176 (SO₂) cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z 756.356 ([M+H]⁺, calcd. for C₄₄H₅₄N₁O₈S₁: 756.356).

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)- α -1-C-[6-(Toluene-4-Sulfonyloxy)-Hexyl]-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (13)**

Compound **12** (228 mg, 0.30 mmol) was dissolved in THF/MeOH (3:1, 12 mL); 4 drops of HCl 2M were added as well as Pd/C (32 mg of 10% Pd, 0.1 eq.). Three cycles of vacuum/argon were made in the flask followed by two cycles vacuum/H₂. The reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 5.5 h. The reaction was then filtered through a pad of celite and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ 1:99 \rightarrow 5:95) to afford a colorless oil **13** as a mixture of rotamers, according to NMR data (129 mg, 88% yield). $R_f = 0.29$ (MeOH/CH₂Cl₂ 5:95); $[\alpha]_D^{20} +2.9$ (c 1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.14–1.35 (m, 6H), 1.45 (bs, 10H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ and C1-CH_{2a}), 1.55–1.66 (m, 2H, H-10), 1.66–1.82 (m, 1H, C1-CH_{2b}), 2.46 (s, 3H, PhCH₃), 2.50–2.72 (m, 1H, H-5a), 3.23–3.34 (m, 1H, H-4), 3.35–3.46 (m, 2H, H-2 and H-3), 4.02 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OTs}$), 4.05–4.17 (m, 1H, H-5b), 4.18–4.35 (m, 1H, H-1), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, CH_{Ar}) 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD) δ 21.6 (PhCH₃), 24.7 and 24.8 (C1-CH₂), 26.4 and 26.6, 26.8, 28.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.6, 29.8, 43.0 and 44.2 (C-5), 55.8 and 57.1 (C-1), 71.6 (C-4), 71.9 ($-\text{CH}_2\text{OTs}$), 72.7 and 73.0 (C-2 or C-3), 75.91 and 76.92 (C-2 or C-3), 81.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.9 (CH_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 156.7 and 156.8 (C=O); IR (neat): 3382 (O-H), 1692, 1664 (C=O), 1365 (SO₂), 1176 (SO₂) cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z 510.215 ([M+Na]⁺, calcd. for C₂₃H₃₇N₁Na₁O₈S₁: 510.213).

α -1-C-(6-Azido-Hexyl)-*N*-(*Tert*-Butoxycarbonyl)-1,5-Dideoxy-1,5-Imino-D-Xylitol (14)

Compound **13** (129 mg, 0.26 mmol) was dissolved in DMSO (1.8 mL), sodium azide (22 mg, 0.33 mmol, 1.25 eq.) was added, and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 24 h. Water was added slowly to

quench the reaction. The aqueous phase was extracted with Et₂O (3 × 7 mL). The organic phases were washed with water (5 mL) and dried over Na₂SO₄. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ 1:20 to 1:9) to afford a colorless oil **14** as a mixture of rotamers, according to NMR data (94.5 mg, quant.). *R_f* = 0,5 (MeOH/CH₂Cl₂ 1:9); [α]_D²⁰ +2.4 (c 1, MeOD). ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.18–1.45 (m, 6H), 1.44–1.49 (m, 9H, –C(CH₃)₃), 1.50–1.67 (m, 3H, H_{alkyl} and C1–CH_{2a}), 1.68–1.86 (m, 1H, C–1–CH_{2b}), 2.52–2.74 (m, 1H, H-5a), 3.22–3.36 (m, 3H, H-4 and –CH₂OTs), 3.35–3.47 (m, 2H, H-2 and H-3), 4.06 (bt, *J* = 4 Hz, 1H, H-5b), 4.21–4.37 (m, 1H, H-1). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD) δ 24.7, 24.8, 26.7, 27.0, 27.78, 27.82, 28.6 (–C(CH₃)₃), 29.9, 43.1 and 44.3 (C-5), 52.4 (–CH₂OTs), 55.9 and 57.1 (C-1), 71.6 and 71.9 (C-2, C-3 or C-4), 72.8 and 73.0 (C-2, C-3 or C-4), 75.9 (C-2, C-3 or C-4), 81.4 (–C(CH₃)₃), 156.7 (C=O); IR (neat): 3376 (O–H), 2095 (N₃) 1683 (C=O) cm^{–1}. HRMS (ESI): *m/z* 381.216 ([M+Na]⁺, calcd. for C₁₆H₃₀N₄Na₁O₅: 381.211).

α-1-C-(6-Azido-Hexyl)-1,5-Dideoxy-1,5-Amino-D-Xylitol (**15**)

Compound **14** (26 mg, 0.07 mmol) was dissolved in H₂O (0.6 mL). TFA (0.3 mL) was added dropwise at 0°C; the reaction mixture was allowed to raise to rt and was stirred under Ar atmosphere for 4 h. The solvent was evaporated. The product was taken up in water and Dowex 50 × 8 (H⁺) ion-exchange resin was added. The resin was washed with MeOH and H₂O. The product was eluted with aqueous ammonia (7% NH₄OH) and the eluted fractions were concentrated under vacuum. The product was then dissolved in water again and Ambersep 800 (OH[–]) ion-exchange resin was added. The resin was filtered off and the filtrate solvent was removed to afford **15** as a white solid (10 mg, 53%). *R_f* = 0.48 (MeOH/CH₂Cl₂ 2:8); [α]_D²⁰ +8.2 (c 0.5, H₂O). ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 1.20–1.55 (m, 8H), 1.56–1.67 (m, 2H), 2.64 (dd, *J* = 13.0 and 8.1 Hz, 1H, H-5a), 2.88 (dd, *J* = 13.0 and 4.4 Hz, 1H, H-5b), 2.92–3.00 (m, 1H, H-1), 3.33 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, –CH₂OTs), 3.46–3.55 (m, 1H, H-3), 3.55–3.64 (m, 2H, H-2 and H-4). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD) δ 25.2, 25.4, 25.8, 27.9, 28.1, 43.8 (C-5), 51.2 (C-11), 54.8 (C-1), 70.6 (C-3), 72.1 (C-4), 72.6 (C-2); IR (neat) : 3319 (O–H, N–H), 2094 (N₃) cm^{–1}. HRMS (ESI): *m/z* 259,177 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₁H₂₃N₄O₃: 259,176).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CNRS, the University of Strasbourg, the Agence National de la Recherche (ANR, grant number 08JC-0094-01), and a doctoral fellowship from the French Department of Research to C.D. We further thank M. Schmitt for NMR measurements.

REFERENCES

1. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*; Compain, P., Martin, O.R., Eds.; Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
2. *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*; Stütz, A.E., Ed., Wiley-VCH, New York, **1999**.
3. (a) For the first systematic biological evaluation of multivalent iminosugars as glycosidase inhibitors see: Diot, J.; Garcia-Moreno, M.I.; Gouin, S.G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363; (b) Wennekes, T.; van der Berg, R.J.B.H.N.; Bongers, K.M.; Donker-Koopman, W.E.; Ghisaidoobe, A.; van der Marel, G.A.; Srijland, A.; Aerts, J.M.F.G.; Overkleef, H.S. Synthesis and evaluation of dimeric lipophilic iminosugars as inhibitors of glucosylceramide metabolism. *Tetrahedron Asymm.* **2009**, *20*, 836–846; (c) Johns, B.A.; Johnson, C.R. Scaffolded bis-azasugars: a dual warhead approach to glycosidase inhibition. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749–752; (d) Lohse, A.; Jensen, K.B.; Lundgren, K.; Bols, M. Synthesis and deconvolution of the first combinatorial library of glycosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965–1971.
4. Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. Glycosidase inhibition with fullerene iminosugar balls: a dramatic multivalent effect. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753–5756.
5. See for example: (a) Lahman, M. Architectures of multivalent glycomimetics for probing carbohydrate–lectin interactions. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *288*, 17–65; (b) Dam, T.K.; Brewer, C.F. Multivalent lectin-carbohydrate interactions: energetics and mechanisms of binding. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 139–164; (c) Imberty, A.; Chabre, Y.; Roy, R. Glycomimetics and glycodendrimers as high affinity microbial anti-adhesins. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7490–7499.
6. Choi, S.-K. *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications*, Wiley & Sons, New Jersey, **2004**.
7. Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. The multivalent effect in glycosidase inhibition: Probing the influence of architectural parameters with cyclodextrin-based iminosugar click clusters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *in press* (DOI 10.1002/chem.201102266).
8. See for example: (a) Yu, L.; Ikeda, K.; Kato, A.; Adachi, I.; Godin, G.; Compain, P.; Martin, O.R.; Asano, N. α -1-C-Octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736–7744; (b) Boucheron, C.; Toumieux, S.; Compain, P.; Martin, O.R.; Ikeda, K.; Asano, N. Synthesis of 4-O-glycosylated 1-deoxynojirimycin derivatives as disaccharide mimic-based inhibitors of human β -glucocerebrosidase. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1960–1965; (c) Schönemann, W.; Gallienne, E.; Compain, P.; Ikeda, K.; Asano, N.; Martin, O.R. Synthesis of new β -1-C-alkylated imino-L-itolols: a comparative study of their activity as β -glucocerebrosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2645–2650; (d) Oulaidi, F.; Front-Deschamps, S.; Gallienne, E.; Lesellier, E.; Ikeda, K.; Asano, N.; Compain, P.; Martin, O.R. Second-generation iminoxylitol-based pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 353–361.
9. Compain, P.; Martin, O.R.; Boucheron, C.; Godin, G.; Yu, L.; Ikeda, K.; Asano, N. Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1356–1359.
10. (a) Zimran, A. *Gaucher's Disease*. Balliere Tindall, **1997**; (b) Fan, J.-Q. Iminosugars as active-site-specific chaperones for the treatment of lysosomal storage disorders. In

Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications; Compain, P.; Martin, O.R., Eds. Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. 225–247.

11. (a) Cipolla, L.; Lay, L.; Nicotra, F.; Pangrazio, C.; Panza, L. Synthesis of azasugars by Grignard reaction on glycosylamines. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 4679–4690; (b) Cipolla, L.; Palma, A.; La Ferla, B.; Nicotra, F. Synthesis of nojirimycin C-glycosides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* **2002**, 2161–2165.

12. For a review on imino-C-glycoside synthesis see: Compain, P.; Chagnault, V.; Martin, O.R. Tactics and strategies for the synthesis of iminosugar-C-glycosides: a review. *Tetrahedron: Asymm.* **2009**, *20*, 672–711.

13. Liautard, V.; Desvergnès, V.; Itoh, K.; Liu, H.-W.; Martin, O.R. Convergent and stereoselective synthesis of iminosugar-containing GalF and UDP-GalF mimics: evaluation as inhibitors of UDP-Gal Mutase. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3103–3115.

14. Godin, G.; Compain, P.; Martin, P. 2-Naphtylmethyl (NAP) as a versatile amino protecting group, chemoselective removal under mild conditions. *Synlett.* **2003**, 2065–2067.

15. For a review on olefin metathesis of amine-containing systems see: Compain, P. Olefin metathesis of amine-containing systems: beyond the current consensus. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1829–1846.

16. Nadein, O.N.; Kornienko, A. An approach to pancratistatins via ring-closing metathesis: efficient synthesis of novel 1-Aryl-1-deoxyconduritol F. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 831–834.

17. (a) Hartung, W.H. Catalytic reduction of nitriles and oximes. *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, *50*, 3370–3374; (b) Lehmann, F.; Scobie, M. Rapid and convenient microwave-assisted synthesis of primary amines via reductive N-alkylation of methyl carbamate with aldehydes. *Synthesis* **2008**, *11*, 1679–1682.

18. Dondoni, A.; Perrone, D. A convenient synthesis of iminosugar-C-glycosides via organometallic addition to N-benzyl-N-glycosylhydroxylamines. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4261–4273.

19. For the synthesis of 5-azido pentene and 1-tosyloxy-4-pentene see: (a) Smejkal, T.; Breit, B. A supramolecular catalyst for regioselective hydroformylation of unsaturated carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 311–315; (b) Montecchi, P.C.; Navacchia, M.L.; Spagnolo, P. A study of vinyl radical cyclization onto the azido group by addition of sulfanyl, stannyl, and silyl radicals to alkynyl azides. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1219–1226.

20. For examples of olefin cross-metathesis performed with azide-containing substrates see: (a) Chaudhari, V.D.; Ajish Kumar, K.S.; Dhavale, D.D. An efficient synthesis of D-erythro- and D-threo-sphingosine from D-glucose: olefin cross-metathesis approach. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5805–5807; (b) Rai, A.N.; Basu, A. Sphingolipid synthesis via olefin cross metathesis: preparation of a differentially protected building block and application to the synthesis of D-erythro-ceramide. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2861–2863.

21. For the first examples of olefin cross-metathesis reaction performed with iminosugar substrates see: Godin, G.; Compain, P.; Martin, O.R. General access to iminosugar C-Glycoside building blocks by means of cross-metathesis: a gateway to glycoconjugate mimetics. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3269–3272.

22. See for example: (a) Moses, J.E.; Moorhouse, A.D. The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262; (b) Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137; (c) Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.

23. (a) Diaz, L.; Bujons, J.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A.J. Click chemistry approach to new *N*-substituted aminocyclitols as potential pharmacological chaperones for Gaucher disease. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5248–5255; (b) Ardes-Guisot, N.; Alonzi, D.S.; Reinkensmeier, G.; Butters, T.D.; Norez, C.; Becq, F.; Shimada, Y.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Blériot, Y.; Sollogoub, M.; Vauzeilles, B. Selection of the biological activity of DNJ neoglycoconjugates through click length variation of the side chain. *Org. Bio. Chem.* **2011**, *9*, 5373–5388; (c) Diot J.D.; Garcia Moreno, I.; Twigg G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt K.; Butters, T.D.; Kovensky, J.; Gouin, S.G., Amphiphilic 1-deoxynojirimycin derivatives through click strategies for chemical chaperoning in N370S Gaucher cells. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7757–7768.

The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters

Camille Decroocq,^[a] David Rodríguez-Lucena,^[a] Virginie Russo,^[a]
Teresa Mena Barragán,^[b] Carmen Ortiz Mellet,^{*,[b]} and Philippe Compain^{*,[a]}

Abstract: In contrast to most lectins, glycosidases may appear to be unpromising targets for multivalent binding because they display only a single active site. To explore the potential of multivalency on glycosidase inhibition, unprecedented cyclodextrin-based iminosugar conjugates have been designed and prepared. The synthesis was performed by way of Cu^I-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction under

microwave activation between propargylated multivalent β -cyclodextrins and an azide-armed *N*-alkyl 1-deoxynojirimycin derivative. Evaluation with a panel of glycosidases of this new class of glycomimetic clusters revealed the

Keywords: click chemistry • cyclodextrins • glycosidases • iminosugars • inhibitors

strongest affinity enhancement observed to date for a multivalent glycosidase inhibitor, with binding enhancement up to four orders of magnitude over the corresponding monovalent ligand for α -mannosidase. These results demonstrate that the multivalency concept extends beyond carbohydrate-lectin recognition processes to glycomimetic-enzyme inhibition.

Introduction

Selective hydrolysis of glycosidic bonds in carbohydrates is of utmost importance for a wide range of biological processes. Examples include energy uptake, post-translational modification of glycoproteins and catabolism of glycoconjugates. Glycosidase inhibitors are, therefore, not only useful probes to elucidate fundamental biological pathways, but also attractive leads for drug discovery for a wide range of diseases.^[1] A number of medicines on the market such as Acarbose (type II diabetes) or Tamiflu (influenza virus) have recently demonstrated the clinical relevance of glycosidase inhibitors. Despite these successes, the design of highly potent and selective glycosidase inhibitors remains a major challenge.^[2]

Presentation of a ligand in multiple copies is very often found in nature as a way to increase affinity and modulate selectivity towards a given receptor, and is a concept profusely exploited by chemists in the field of glycobiology to

generate useful glycoligands for therapeutically relevant lectins.^[3,4] In stark contrast, the possibility of implementing the multivalency concept to control the interaction between glycosyl hydrolases and complementary glycomimetics has been almost unexplored.^[5] Thus, there are only a few examples of multivalent iminosugars in the literature,^[6,7] although they constitute a major class of glycosidase inhibitors.^[8]

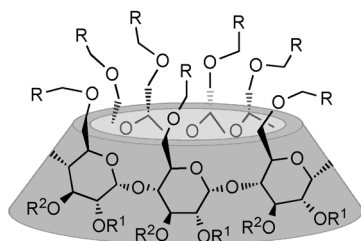
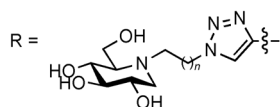
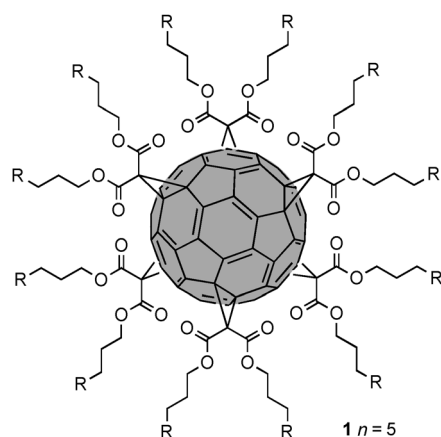
From a theoretical point of view, the multivalent approach might appear to be better suited to lectins than to enzymes. First, lectins are usually multimeric and display shallow binding pockets or grooves on their surface,^[9] whereas most enzymes display a single, less accessible active site. As a consequence, some of the mechanisms responsible for the affinity increase associated with multivalent effects, such as the chelate effect or receptor clustering, become inoperative.^[5,10,11] Nevertheless, provided that the kinetics of the inhibitor-enzyme association and dissociation processes are fast enough, the scenario should not be very different from that encountered for monovalent lectins interacting with multivalent ligands. The “intrinsic” multivalent effect^[3c,12] associated with local concentration (rebinding) and sliding processes might theoretically lead to affinity enhancements going up to three to four orders of magnitude.

Previous glycosidase inhibition studies performed with ditetrahedral analogues of 1-deoxynojirimycin (DNJ) showed very little to no multivalent effect,^[6,7] which probably discouraged further research in this direction. Very recently, we reported the first evidence of a significant multivalent effect in glycosidase inhibition; dodecavalent iminosugar derivative **1**, with a fullerene hexakis-adduct core, was found to display a strong binding enhancement to α -mannosidase (up to 2150-fold) relative to the corresponding monomer.^[13]

[a] C. Decroocq, Dr. D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, Prof. P. Compain
Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives
Université de Strasbourg, et CNRS (UMR 7509)
Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux
25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg (France)
Fax: (+33)3-6885-2754
E-mail: philippe.compain@unistra.fr

[b] T. Mena Barragán, Prof. C. Ortiz Mellet
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química
Universidad de Sevilla, Profesor García González 1
41012, Sevilla (Spain)
E-mail: mellet@us.es

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201102266>.



- 2a** $R^1 = R^2 = \text{Me}$, $n=5$
2b $R^1 = R^2 = \text{Me}$, $n=8$
3a $R^1 = \text{CH}_2\text{R}$, $R^2 = \text{H}$, $n=5$
3b $R^1 = \text{CH}_2\text{R}$, $R^2 = \text{H}$, $n=8$

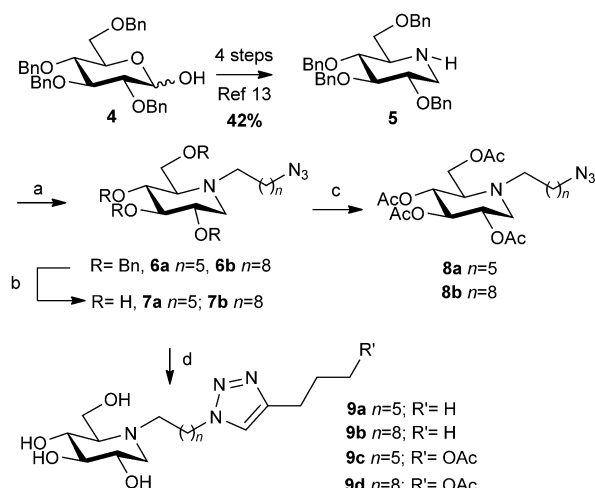
These combined results strongly suggest that the valency and relative disposition of the inhibitor moieties are critical parameters that govern the multivalent effect towards a given glycosidase. Elucidating how structural aspects affect glycosidase inhibition by multivalent systems thus becomes a fundamental goal in view of further applications. Herein, we report the design and synthesis of multifunctionalized iminosugar–cyclodextrin conjugates (ICDCs; **2** and **3**) as a new class of glycomimetic clusters, and describe their evaluation as glycosidase inhibitors. By using these systems, the strongest affinity enhancement observed to date for a multivalent glycosidase inhibitor (up to four orders of magnitude) was observed.^[7,13] In addition, cyclodextrin-based iminosugar clusters were found to be useful tools that highlight the effect of molecular topology on the multivalent effect.

Results and Discussion

Cyclodextrins (CDs) hold many advantages as cores to build well-defined multivalent constructs that are differentiated by the number of ligands and their spatial orientation. Grafting of the iminosugar moieties onto the primary and/or secondary face may be performed by selective functionalization methodologies.^[14] In addition, cyclodextrins are essen-

tially nonimmunogenic carbohydrates with inherently low pharmacological activity. The most interesting CD representative from the industrial point of view, namely cyclomaltoheptaose (β CD), was chosen as a scaffold in the present case. Its biocompatible cup-shaped structure can form inclusion complexes with specific guests such as adamantane-based molecules,^[15] which offers many additional possibilities for the design of supramolecular multivalent systems. For comparison purposes with the multivalent system of reference **1**, *N*-alkyl analogues of DNJ were selected as the peripheral ligand. The Cu^{I} -catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction^[16] allows very efficient grafting of the iminosugar moieties onto the central β CD core, resulting in full homogeneity of the multiconjugates in a C_7 symmetric arrangement.^[17]

For the synthesis of the azide-armed *N*-hexyl and *N*-nonyl DNJ derivatives **7** and **8** from **4**, an improvement on the previously reported method^[13] has been developed (Scheme 1). Alkylation of the rather unreactive endocyclic

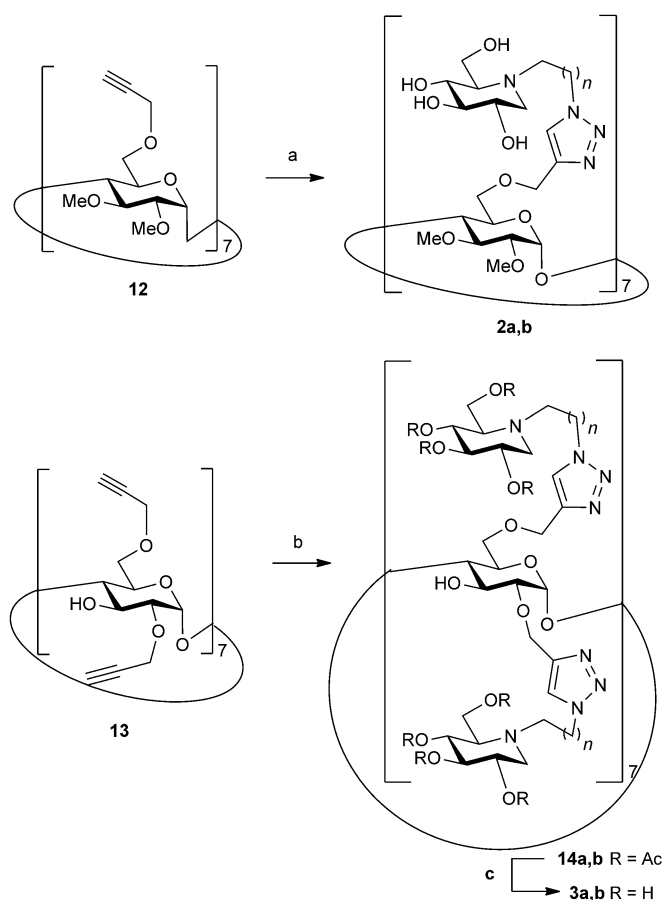


Scheme 1. Reagents and conditions: a) $\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{N}_3$ (**10**), K_2CO_3 , CH_3CN , MW, 150°C , 81% (**6a**), 65% (**6b**); b) BCl_3 , CH_2Cl_2 , -60°C to 0°C , 77% (**7a**),^[13] 79% (**7b**); c) Ac_2O , pyridine, DMAP cat., 91% (**8a**), 83% (**8b**); d) 1-pentyne (**11a**) or 4-pentynyl acetate (**11b**), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ cat., sodium ascorbate, 2,6-lutidine, $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 61% (**9a**),^[13] 54% (**9b**), 67% (**9c**), 61% (**9d**).

amine **5** proceeded in less than 40% yield after four days at 120°C in *N,N*-dimethylformamide (DMF). A dramatic improvement in this key alkylation step was realized by using microwave irradiation. Thus, heating a solution of iminosugar **5** and the azidobromoalkanes **10** in acetonitrile in a microwave reactor at 150°C for 4 h produced the expected products **6** in yields up to 81%. Selective cleavage of the benzyl protecting group afforded the azidopiperidinols **7**, which were readily peracetylated to provide compounds **8**. Iminosugars **7** were first reacted with pentyne derivatives **11a** or **11b** in the presence of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium as-

corbate to yield the corresponding adducts **9**, which were used as monovalent controls to assess the multivalent effect.

Two different prototypes of β CD-centered multivalent displays were considered, that is, heptavalent compounds having the inhibitory moieties located at the primary O-6 positions (**2**) and tetradecavalent derivatives bearing DNJ motifs simultaneously at both the O-6 and O-2 positions (**3**). Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose (**12**), the cyclooligosaccharide precursor for the synthesis of heptavalent ICDCs **2**, was prepared in four steps from commercial β CD according to a combination of previously reported procedures (Scheme 2).^[18] The analogous scaffold to access the 14-valent derivatives, per(2,6-di-*O*-propargyl) β CD (**13**), was obtained in only one step from β CD.^[19]



Scheme 2. Reagents and conditions: a) **7a** or **7b**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ cat., sodium ascorbate, 2,6-lutidine, THF/ H_2O (1:1), MW, 120 °C, 48% (**2a**), 42% (**2b**); b) **8a** or **8b**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ cat., sodium ascorbate, DMF/ H_2O (6:1), MW, 80 °C, 62% (**14a**), 54% (**14b**); c) Amberlite IRA 400 (OH^-), $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 96% (**3a**), 85% (**3b**).

The heptavalent systems **2** were synthesized by direct microwave-assisted 1,3-dipolar cycloaddition of alkyne **12** and the corresponding unprotected azides **7** using $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /sodium ascorbate in tetrahydrofuran (THF)/water (1:1) in the presence of 2,6-lutidine^[20] (Scheme 2). Purification of

the fully unprotected cycloadducts proved to be difficult, and compounds **2** were finally obtained in 42–48% yield after a peracetylation/deacetylation sequence. To facilitate monitoring of the multiconjugation reaction, the protected DNJ derivatives **8** were used in the synthesis of 14-valent ICDCs from **13**. 1,3-Dipolar cycloaddition then provided the functionalized cyclodextrins **14**, which could be conveniently purified by flash chromatography on silica gel. *O*-Deacetylation of **14** was subsequently conducted by optimization of a simple, mild, and convenient method using anion exchange Amberlite IRA-400 (OH^-) resin.^[21] The ICDCs **2** and **3**, were characterized by standard spectroscopic and analytical techniques. In particular, the ^1H and ^{13}C NMR spectra were consistent with the expected symmetrical arrangement, and the MALDI-TOF mass spectra showed peaks corresponding only to the fully substituted material.

The inhibitory properties of compounds **2** and **3** were assayed against a panel of commercial glycosidases covering α - and β -glucosidase, α - and β -galactosidase, and α - and β -mannosidase activities. Compounds **9** were included in the study as structurally related monovalent controls. The corresponding inhibition constants (K_i) are collected in Table 1. For comparison purposes, K_i values for the 12-valent fullerene-DNJ conjugate **1** have also been included. The presence of the *N*-alkyltriazolyl substituent in compounds **9** did not have a large impact on the affinity or selectivity towards glycosidases as compared to DNJ, independent of the presence or not of an additional oxygen functionality (**9c** and **9d**).

Compounds **9** behaved as strong competitive inhibitors of several α - and β -glucosidases but displayed a high configurational selectivity; no inhibition was observed for β -galactosidase or β -mannosidase and only weak inhibition of α -galactosidase and α -mannosidase was detected. Heptavalent presentation of the DNJ motif in ICDCs **2** was, in general, either detrimental or irrelevant, regarding inhibition of glycosidases. In sharp contrast, the inhibitory potency towards α -mannosidase was found to increase by 2–3 orders of magnitude, which is indicative of a strong multivalent effect. The effect was more pronounced in the case of the conjugate with the longest spacer **2b**, for which the relative inhibition potency per DNJ motif (75–81 fold) approached that of the dodecavalent fullerene derivative **1** (179; Table 2).

Both heptavalent ICDCs **2a** and **2b** behaved as reversible mixed (competitive/non-competitive) inhibitors of Jack bean α -mannosidase. The presence of the open secondary rim of β CD may facilitate inclusion of hydrophobic amino acid residues in the vicinity of the active site in the CD cavity, accounting for the non-competitive contribution to enzyme inhibition. Although we have exclusively considered the K_i value arising from competitive inhibition for evaluation of the multivalent effect, the possible existence of cooperative interactions involving the β CD scaffold, which would result in overestimation, cannot be discarded. Inclusion phenomena should be prevented in the case of the 14-valent conjugates **3**, which bear bulky *O*-triazolylmethyl substituents at both the primary and secondary faces. Most revealing, the inhibition potency towards α -mannosidase dramatically in-

Table 1. Glycosidase inhibitory activities (K_i , μM) for monovalent DNJ derivatives (**9**) as well as multivalent DNJ–fullerene (**1**) and DNJ– βCD conjugates (ICDCs **2** and **3**).

Enzyme	Monovalent controls				12-valent reference 1	7-valent ICDCs		14-valent ICDCs	
	9a	9b	9c	9d		2a	2b	3a	3b
α-glucosidase									
baker's yeast	152	116	395	192	18	760	234	270	62
amylglucosidase (<i>Asp. Niger</i>)	0.71	1.7	2.8	1.7	0.69	0.52	1.2	0.2	0.1
isomaltase (baker's yeast)	943	154	NI ^[a]	370	10.5	256	74	63	18
β-glucosidase									
almonds	11	11	15	15	95	162	108	111	10
bovine liver ^[b]	482	23	138	36	247	139	35	25	4
naringinase (<i>P. decumbens</i>) ^[c]	9.1	2.3	13.8	1.3	0.41	8.7	0.23	5.2	0.14
α-galactosidase									
<i>Aspergillus niger</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
green coffee	NI	544	207	351	84	33	6.1	28	9
β-galactosidase									
<i>E. coli</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
α-mannosidase									
Jack bean	322	188	533	204	0.15	7.7 ^[d]	0.36 ^[e]	0.5	0.022
β-mannosidase									
<i>Helix pomatia</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

[a] NI: no inhibition detected at 2 mM. [b] This enzyme hydrolyzes β -glucopyranosides and β -galactopyranosides with approximately the same efficiency. [c] Naringinase also exhibits α -L-rhamnosidase activity. [d] Mixed inhibition mode; a $K'_i=26.9 \mu\text{M}$ was determined for the non-competitive term. [e] Mixed inhibition mode; a $K'_i=1.2 \mu\text{M}$ was determined for the non-competitive term.

Table 2. Relative inhibition potencies against Jack bean α -mannosidase of multivalent DNJ conjugates **1–3**.

Compounds	DNJ units	Relative potency ^[a]	Relative potency [M] ^[b]
1	12	2147	179
2a	7	42–69	6–10
2b	7	522–567	75–81
3a	14	644–1066	46–76
3b	14	8546–9273	610–662

[a] Values represent relative inhibition potencies of the multivalent conjugate over the corresponding monovalent analogues with identical spacer arm. For ICDCs **2** and **3**, a range is indicated considering either **9a–d** as the monovalent controls. [b] Valence-corrected values per DNJ unit.

creased on going from compounds **2** to **3**, reaching a relative potency close to 10^4 (over 600 in a molar basis) for compound **3b** compared to the monovalent counterparts **9b** and **9d** (Tables 1 and 2).

These results constitute the highest multivalent effect ever reported in the context of glycosidase inhibition, rivaling those of carbohydrate–lectin interactions. Considering the large molecular size of this enzyme (190 kDa as determined by gel filtration), it is very unlikely that simultaneous interaction between the ICDCs with more than one protein molecule occurs. Actually, no aggregation phenomena were observed during the enzyme inhibition experiments, unequivocally proving that the observed affinity enhancements arise from intrinsic multivalent mechanisms.^[3c] The ensemble of data for compounds **1–3** provide evidence that the multivalent effect for a given inhibitor motif (DNJ)–enzyme (α -mannosidase) pair is strongly dependent on topological features including: 1) the nature of the scaffold, which defines

to a great extent the relative orientation of the active moieties; 2) the valency; and 3) the accessibility of the ligands and their separation, which is controlled by the spacer length. Thus, increasing the valency from 7 to 14 led to more than a 15-fold increase in inhibitory potency (7- to 10-fold in a molar basis). A further 20-fold affinity enhancement was observed when the spacer length was increased, that is, on going from compounds **2a** and **3a** to **2b** and **3b**, respectively. When considering **3b** and the panel of enzymes evaluated, the consequences are rather impressive: by virtue of multivalency, a μM inhibitor of α - and β -glucosidases (DNJ) has been transformed into a low nM inhibitor of α -mannosidase.

Conclusion

The efficient synthesis of the first examples of multivalent cyclodextrin-based iminosugar clusters was achieved through Cu^I-catalyzed azide–alkyne cycloaddition reaction. Evaluation against a panel of glycosidases led to the identification of the strongest affinity enhancement observed to date for a multivalent glycosidase inhibitor, with binding enhancement up to four orders of magnitude over the corresponding monovalent ligand for Jack bean α -mannosidase. We believe that the relevance of this work in the field of glycobiology is threefold. First, the current results demonstrate that the multivalency concept extends beyond carbohydrate–lectin recognition processes to glycomimetic–enzyme inhibition and illustrates how it can be exploited to

modulate inhibitory potency and selectivity by varying structural parameters. Second, the results suggest that high-throughput methods for the evaluation of glycosidase inhibitors based on microarray technologies, implying multivalent presentation on a surface,^[22] may give rise to false positives and should be interpreted with care. Third, the results suggests that Nature could make use of multivalent mechanisms, involving multiple copies of weak monovalent inhibitors, to regulate glycosidase functioning. Future research will be conducted to fully ascertain the scope and implications of multivalent enzyme inhibition in these venues.

Experimental Section

General methods: see the Supporting Information.

Preparation of *N*-(9-azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-glucitol (6b**):** A suspension of **5**^[13,23] (500 mg, 0.95 mmol), **10b** (308 mg, 1.24 mmol), and K₂CO₃ (172 mg, 1.24 mmol) in CH₃CN (10 mL) was heated under microwave irradiation at 150 °C for 2 h. An additional portion of **10b** (118 mg, 0.48 mmol) was added and the suspension was heated under microwave irradiation at 150 °C for a further 1 h. The resulting suspension was filtered, the solid was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 15 mL), and the resulting filtrate was concentrated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography (SiO₂, petroleum ether → AcOEt/petroleum ether 1:9 → 1:8) to give **6b** (462 mg, 65%) as a colorless oil. *R*_f = 0.74 (AcOEt/petroleum ether 1:2); [α]_D²⁰ = -3.8 (*c* = 1.0 in CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.39–7.26 (m, 18H; ArH), 7.18–7.15 (m, 2H; ArH), 4.99 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.91 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.85 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.73 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; CH₂Ph), 4.55–4.47 (m, 2H; CH₂Ph), 4.45 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H; CH₂Ph), 3.75–3.68 (m, 1H; H-2), 3.70–3.60 (m, 1H; H-6a), 3.66–3.59 (m, 1H; H-4), 3.57 (dd, *J* = 11.5, 2.1 Hz, 1H; H-6b), 3.49 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H; H-3), 3.29 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H; H-15), 3.12 (dd, *J* = 11.1, 4.8 Hz, 1H; H-1a), 2.76–2.55 (m, 2H; H-7), 2.33 (br d, *J* = 9.6 Hz, 1H; H-5), 2.26 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H; H-1b), 1.63 (m, *J* = 6.9 Hz, 2H; H-14), 1.44–1.15 ppm (m, 12H; H-8 to H-13); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 139.1, 138.6, 137.9, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 87.4, 78.7, 78.6, 75.3, 75.2, 73.5, 72.8, 65.4, 63.7, 54.5, 52.4, 51.5, 29.5, 29.4, 29.1, 28.9, 27.5, 26.7, 23.6 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 2093 cm⁻¹ (N₃); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₄₃H₅₅N₄O₄: 691.422 [*M*+H]⁺; found: 691.419.

Preparation of *N*-(9-azidononyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-glucitol (7b**):** A freshly prepared solution of BCl₃ (1 M in CH₂Cl₂, 5.0 mL, 5.0 mmol) was added to a solution of **6b** (426 mg, 0.62 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) at -60 °C under Ar. The resulting mixture was allowed to warm to 0 °C over 3 h. A 20:1 MeOH/H₂O mixture (21 mL) was added and the resulting mixture was concentrated under vacuum, these steps were repeated twice. MeOH (20 mL) was added and the mixture was neutralized with anionic resin (Amberlite IRA-440C). The filtrate was concentrated and resulting residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1 → 8:2) to give **7b** (161 mg, 79%) as a colorless oil. *R*_f = 0.54 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2); [α]_D²⁰ = -13.4 (*c* = 1.0 in MeOH); ¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 3.87 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H; H-6), 3.50 (td, *J* = 9.3, 4.8 Hz, 1H; H-2), 3.38 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H; H-4), 3.28 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H; H-15), 3.16 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H; H-3), 3.04 (dd, *J* = 11.1, 4.8 Hz, 1H; H-1a), 2.91–2.81 (m, 1H; H-7a), 2.70–2.60 (m, 1H; H-7b), 2.27 (t, *J* = 11.1 Hz, 1H; H-1b), 2.22 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H; H-5), 1.63–1.45 (m, 4H; H-8 and H-14), 1.45–1.22 ppm (m, 10H; H-9 to H-13); ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ = 80.4, 71.7, 70.5, 67.5, 59.0, 57.4, 53.9, 52.6, 30.7, 30.6, 30.3, 30.0, 28.6, 27.9, 25.2 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3338 (OH), 2094 cm⁻¹ (N₃); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₃H₃₁N₄O₄: 331.234 [*M*+H]⁺; found: 331.234.

Preparation of *N*-(9-azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-glucitol (8b**):** DMAP (10 mg, 0.082 mmol) was added to a solu-

tion of **7b** (183 mg, 0.553 mmol) in Py/Ac₂O (1:1, 14 mL). The solution was stirred for 24 h, then water (9 mL) was added slowly at 0 °C to quench the reaction. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 15 mL) and the combined organic layers were washed with aqueous HCl (2 M, 2 × 10 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (15 mL), dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (SiO₂, petroleum ether → AcOEt/petroleum ether 1:9 → 1:4) to give **8b** as a colorless oil (229 mg, 83%). *R*_f = 0.3 (AcOEt/petroleum ether 1:3); [α]_D²⁰ = +8.0 (*c* = 1 in CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 5.11–4.98 (m, 2H; H-3 and H-4), 4.98–4.89 (m, 1H; H-2), 4.22–4.06 (m, 2H; H-6), 3.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H; H-12), 3.17 (dd, *J* = 11.2, 4.8 Hz, 1H; H-1a), 2.79–2.47 (m, 3H; H-7, H-5), 2.31 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H; H-1b), 2.05 (s, 3H; C=OCH₃), 2.00 (s, 6H; C=OCH₃), 1.99 (s, 3H; C=OCH₃), 1.64–1.45 (m, 2H; H-14) 1.45–1.09 ppm (m, 12H; H-8, H-9, H-10, H-11, H-12 and H-13); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 171.0, 170.5, 170.1, 169.8, 74.8, 69.6, 69.5, 61.5, 59.6, 53.0, 51.9, 29.5, 29.4, 29.1, 28.9, 27.2, 26.8, 24.7, 24.9, 21.0, 20.9, 20.84, 20.78 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 2096 (N₃), 1744 cm⁻¹ (C=O); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₃H₃₉N₄O₈: 499.276 [*M*+H]⁺; found: 499.273.

Preparation of *N*-(9-(4-propyl-1*H*,1,2,3-triazol-1-yl)nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-glucitol (9b**):** A solution of CuSO₄·5H₂O (3.8 mg, 0.015 mmol) and sodium ascorbate (6.0 mg, 0.030 mmol) in H₂O (2 mL), followed by 2,6-lutidine (5.3 μL, 0.045 mmol), were added to a solution of **7b** (50 mg, 0.15 mmol) and 1-pentene (52 mg, 0.76 mmol) in THF (2 mL). The resulting solution was stirred at RT for 17 h, then the mixture was then filtered through a pad of Celite, concentrated, and the residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1 → 8:2) to give **9b** (32 mg, 54%) as a colorless oil. *R*_f = 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2); [α]_D²⁰ = -12.8 (*c* = 1.0 in MeOH); ¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 7.73 (s, 1H; H-16), 4.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H; H-15), 3.86 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H; H-6), 3.49 (td, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H; H-2), 3.37 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H; H-4), 3.15 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H; H-3), 3.03 (dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, 1H; H-1a), 2.90–2.75 (m, 1H; H-7a), 2.66 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H; H-18), 2.66–2.57 (m, 1H; H-7b), 2.35–2.15 (m, 2H; H-1b and H-5), 1.88 (m, *J* = 7.2 Hz, 2H; H-14), 1.69 (m, *J* = 7.5 Hz, 2H; H-19), 1.56–1.41 (m, 2H; H-8), 1.40–1.21 (m, 10H; H-9 to H-13), 0.96 ppm (t, *J* = 7.5 Hz, 3H; H-20); ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ = 149.2, 123.3, 80.5, 71.9, 70.6, 67.5, 59.2, 57.6, 53.9, 51.3, 31.4, 30.6, 30.1, 28.6, 28.4, 27.6, 25.3, 24.0, 14.1 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3331 (OH) cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₀H₃₉N₄O₄: 399.297 [*M*+H]⁺; found: 399.298.

Preparation of **2a:** In a 10 mL microwave reactor vial, debenzylated **7a**^[13] (103 mg, 0.35 mmol), **12**^[18] (72 mg, 0.045 mmol), CuSO₄·5H₂O (7.8 mg, 0.031 mmol), sodium ascorbate (12.4 mg, 0.063 mmol), and 2,6-lutidine (11 μL, 0.095 mmol) in THF/H₂O 1:1 (5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 120 °C for 1 h. Solvents were evaporated and, to facilitate purification, the resulting residue was directly acetylated by adding Ac₂O/Py 1:1 (10 mL) at 0 °C and stirred at RT overnight. The reaction was quenched by the addition of water (10 mL) at 0 °C, and then extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous HCl (2 M, 2 × 10 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 97:3 → 90:10). The acetylated compound was directly dissolved in MeOH (5 mL) and deacetylated under Zemplén conditions by adding methanolic NaOMe solution (1 M, 0.13 mL). The reaction was stirred at RT for 3 h, then solid CO₂ was added portionwise until pH 7, and the mixture was concentrated. Purification by gel permeation chromatography (Sephadex G-25, MeOH/water 1:1) gave **2a** (77 mg, 48%) as a yellowish glassy solid. *R*_f = 0.16 (MeCN/H₂O/NH₄OH, 6:3:4); [α]_D²⁰ = +53.5 (*c* = 1.0 in H₂O); ¹H NMR (500 MHz, MeOD, 333 K): δ = 7.93 (s, 7H; H-9), 5.12–5.03 (m, 7H; H-1), 4.69–4.52 (m, 14H; H-7), 4.41–4.32 (m, 14H; H-12'), 4.08–3.43 (m, 35H; H-3, H-4, H-5 and H-6), 3.86 (dd, *J* = 11.8, 2.6 Hz, 7H; H-6'a), 3.81 (dd, *J* = 11.8, 3.0 Hz, 7H; H-6'b), 3.62 (s, 21H; OMe), 3.49 (s, 21H; OMe), 3.48–3.43 (m, 7H; H-2'), 3.35 (t, *J* = 9.1 Hz, 7H; H-4'), 3.14 (t, *J* = 9.1 Hz, 7H; H-3'), 3.13–3.08 (m, 7H; H-2), 2.99 (dd, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 7H; H-1'a), 2.79 (dt, *J* = 13.8, 8.3 Hz, 7H; H-7'a), 2.49 (dt, *J* = 13.8, 7.5 Hz, 7H; H-7'b), 2.14–2.09 (m, 7H; H-5'), 2.13 (t, *J* = 10.7, 7H; H-1'b), 1.97–1.86 (m, 14H; H-11'), 1.54–1.44 (m, 14H; H-8'), 1.42–1.28 ppm (m, 28H; H-9' and H-

10'); ¹³C NMR (125.7 MHz, MeOD, 313 K): δ = 146.0, 125.2, 99.6, 83.5, 80.7, 72.3, 70.9, 67.6, 65.4, 61.8, 60.0, 59.1, 57.8, 53.7, 51.3, 31.4, 28.1, 27.5, 25.5 ppm; IR (neat): ν̄ = 3352 cm⁻¹ (OH); MALDI-TOF-MS: *m/z* calcd for C₁₆₁H₂₈₁N₂₈O₆₃: 3617.10 [M+H]⁺; found: 3617.54.

Preparation of 2b: In a 10 mL microwave reactor vial, **7b** (110 mg, 0.33 mmol), **12**^[18] (69 mg, 0.043 mmol), CuSO₄·5H₂O (7.5 mg, 0.030 mmol), sodium ascorbate (11.9 mg, 0.060 mmol), and 2,6-lutidine (11 μL, 0.091 mmol) in THF/H₂O (1:1, 5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 120 °C for 1 h. Solvents were evaporated and, to facilitate purification, the resulting residue was directly acetylated by adding Ac₂O/Py (1:1, 10 mL) at 0 °C and stirring at RT overnight. The reaction was quenched by addition of water (10 mL) at 0 °C, and then extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous HCl (2 M, 2 × 10 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 97:3–90:10). The acetylated compound was directly dissolved in MeOH (5 mL) and deacetylated under Zemplén conditions by adding methanolic NaOMe (1 M, 0.12 mL). The reaction was stirred at RT for 3 h, then solid CO₂ was added portionwise to pH 7 and the mixture was concentrated. Purification by gel permeation chromatography (Sephadex G-25, MeOH/H₂O, 1:1) gave **2b** (71 mg, 42%) as a yellowish glassy solid. *R*_f = 0.28 (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:3:4); [α]_D²⁰ = +49.7 (*c* = 1.0 in H₂O); ¹H NMR (500 MHz, MeOD, 333 K): δ = 7.92 (s, 7H; H-9), 5.13–5.00 (m, 7H; H-1), 4.71–4.50 (m, 14H; H-7), 4.40–4.31 (m, 14H; H-15'), 4.08–3.42 (m, 35H; H-3, H-4, H-5 and H-6), 3.86 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 7H; H-6'a), 3.83 (dd, *J* = 12.0, 2.7 Hz, 7H; H-6'b), 3.62 (s, 21H; OMe), 3.49 (s, 21H; OMe), 3.48–3.44 (m, 7H; H-2'), 3.36 (t, *J* = 9.1 Hz, 7H; H-4'), 3.14 (t, *J* = 9.1 Hz, 7H; H-3'), 3.13–3.08 (m, 7H; H-2), 3.00 (dd, *J* = 11.1, 4.8 Hz, 7H; H-1'a), 2.79 (dt, *J* = 13.4, 8.0 Hz, 7H; H-7'a), 2.50 (dt, *J* = 13.4, 9.0 Hz, 7H; H-7'b), 2.15 (t, *J* = 11.1, 7H; H-1'b), 2.15–2.10 (m, 7H; H-5'), 1.96–1.85 (m, 14H; H-14'), 1.52–1.44 (m, 14H; H-8'), 1.40–1.23 ppm (m, 70H; H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'); ¹³C NMR (125.7 MHz, MeOD, 313 K): δ = 146.0, 125.2, 99.8, 83.5, 80.7, 72.3, 70.8, 67.5, 65.3, 61.8, 59.9, 58.6, 57.8, 53.8, 51.4, 31.4, 30.6, 30.1, 28.6, 27.6, 25.6 ppm; IR (neat): ν̄ = 3340 cm⁻¹ (OH); MALDI-TOF-MS: *m/z* calcd for C₁₈₂H₃₂₃N₂₈O₆₃: 3911.66 [M+H]⁺; found: 3911.31.

Preparation of 14a: In a 2 mL microwave reactor vial, **8a** (75 mg, 0.164 mmol), heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose^[19] (**13**, 17.8 mg, 0.011 mmol), CuSO₄·5H₂O (3.7 mg, 0.015 mmol), and sodium ascorbate (5.9 mg, 0.030 mmol) in DMF/H₂O (6:1, 1.4 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2–90:10). To remove copper from the product, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL), NH₄OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 1 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2–90:10) to give **14a** (53 mg, 62%) as a white solid. *R*_f = 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); [α]_D²⁰ = +11.9 (*c* = 1.0 in CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 7.85–7.50 (m, 14H; H-9 and H-12), 5.12–4.83 (m, 56H; H-3', H-4', H-2' and H-7 or H-10), 4.81–4.69 (m, 7H; H-1), 4.56 (d, *J* = 12.6 Hz, 7H; H-7a or H-10a), 4.50 (d, *J* = 12 Hz, 7H; H-7b or H-10b), 4.41–4.22 (m, 28H; H-12'), 4.13 (m, 28H; H-6'), 3.91 (t, *J* = 8.8 Hz, 7H; H-3), 3.76–3.57 (m, 21H; H-6, H-5), 3.46 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 7H; H-2), 3.38 (t, *J* = 9.2 Hz, 7H; H-4), 3.16 (dd, *J* = 11.2, 4.6 Hz, 14H; H-1a'), 2.80–2.65 (m, 14H; H-7a'), 2.61 (dd, *J* = 6.1, 2.3 Hz, 14H; H-5'), 2.58–2.45 (m, 14H; H-7b'), 2.28 (t, *J* = 10.5, 14H; H-1b'), 2.05 (s, 42H; C=OCH₃), 2.00 (s, 79H; C=OCH₃), 1.99 (s, 47H; C=OCH₃), 1.94–1.79 (m, 28H; H-11'), 1.55–1.12 ppm (m, 84H; H-8', H-9' and H-10'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 301 K): δ = 170.7, 170.3, 170.0, 169.7, 144.7, 144.1, 123.6, 122.9, 101.6, 82.9, 79.1, 74.7, 73.3, 70.3, 69.6, 69.4, 68.7, 65.2, 64.8, 61.6, 59.6, 52.9, 51.7, 50.3, 50.2, 30.4, 26.7, 26.5, 24.9, 20.9, 20.68, 20.73 ppm; IR

(neat): ν̄ = 3432 (OH), 1742 cm⁻¹ (CO); MALDI-TOF-MS: average *m/z* calcd for C₃₆₄H₅₄₆N₅₆O₁₄₇: 8058.52; found: 8058.39.

Preparation of 3a: Compound **14a** (86 mg, 0.0107 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 1.8 mL), Amberlite resin IRA 400 OH⁻ (1.4 meq/mL, 3.31 g) was added, and the mixture was stirred for 4 h at 27 °C without mechanical stirring. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated to give **3a** (58.5 mg, 96%) as a pale-yellow solid. [α]_D²⁰ = +26.6 (*c* = 0.14, H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O, 300 K): δ = 8.08 (s, 7H; H-9 or H-12), 8.03–7.82 (br s, 7H; H-9 or H-12), 5.02–4.89 (m, 14H; H-7 or H-10), 4.86–4.74 (m, 21H; H-1 and H-7 or H-10), 4.56–4.11 (m, 42H; H-12' and H-6 or H-5 and H-4), 4.03–3.42 (m, 28H; H-2, H-3 and H-5, H-4 or H-6), 3.80 (m, 28H; H-6'), 3.58–3.48 (m, 14H; H-2'), 3.37 (t, *J* = 9.1 Hz, 14H; H-4'), 3.23 (t, *J* = 9.3 Hz, 14H; H-3'), 2.97 (dd, *J* = 10.8, 4.2 Hz, 14H; H-1a'), 2.77–2.40 (m, 28H; H-7'), 2.32–2.12 (m, 28H; H-1b' and H-5'), 1.91–1.65 (m, 28H; H-11'), 1.47–1.30 (m, 28H; H-8'), 1.28–1.07 ppm (m, 56H; H-10', H-11'); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 300 K): δ = 143.8, 143.4, 125.3, 124.7, 100.4, 81.8, 79.4, 78.4, 72.7, 70.5, 70.1, 68.9, 68.6, 65.1, 64.5, 57.6, 55.5, 51.9, 50.4, 50.2, 29.6, 26.3, 26.2, 25.6, 25.4, 22.6, 22.5 ppm; IR (neat): ν̄ = 3327 cm⁻¹ (OH); MALDI-TOF-MS: average *m/z* calcd for C₂₅₂H₄₃₄N₅₆O₉₁: 5704.46; found: 5703.53.

Preparation of 14b: In a 5 mL microwave reactor vial, **8b** (110 mg, 0.221 mmol), heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose^[19] (**13**, 24.5 mg, 0.015 mmol), CuSO₄·5H₂O (5.1 mg, 0.021 mmol), and sodium ascorbate (8.1 mg, 0.041 mmol) in DMF/H₂O (6:1, 3.5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (3 × 12 mL). The combined organic layers were washed with water (12 mL), then dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2–90:10). To remove copper from the product, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL), NH₄OH (10% solution, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 1 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2–90:10) to give **14b** (69 mg, 54%) as a pale-yellow solid. *R*_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); [α]_D²⁰ = +16.6 (*c* = 0.5 in CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 7.83–7.50 (m, 14H; H-9 and H-12), 5.24–4.81 (m, 56H; H-3', H-4', H-2' and H-7 or H-10), 4.81–4.66 (m, 7H; H-1), 4.60–4.41 (m, 14H; H-7 or H-10), 4.39–4.18 (m, 28H; H-15'), 4.12 (m, 28H; H-6'), 3.90 (t, *J* = 8.2 Hz, 7H; H-3), 3.80–3.52 (m, 21H; H-6 and H-5), 3.52–3.27 (m, 14H; H-2 and H-4), 3.16 (dd, *J* = 4.7, 11.3 Hz, 14H; H-1a'), 2.77–2.44 (m, 14H; H-7a'), 2.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 14H; H-5'), 2.57–2.47 (m, 14H; H-7b'), 2.29 (t, *J* = 10.8 Hz, 14H; H-1b'), 2.04 (s, 43H; C=OCH₃), 1.99 (s, 76H; C=OCH₃), 1.98 (s, 49H; C=OCH₃), 1.93–1.77 (m, 28H; H-14'), 1.46–1.34 (m, 28H; H-8'), 1.34–1.12 ppm (m, 140H; H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 301 K): δ = 170.9, 170.4, 170.0, 169.8, 144.7, 144.1, 123.6, 122.9, 101.7, 83.0, 79.1, 74.8, 73.4, 70.3, 69.6, 69.5, 68.7, 65.2, 64.9, 61.5, 59.6, 53.0, 51.9, 50.4, 50.3, 30.5, 29.6, 29.1, 27.3, 26.7, 24.8, 20.95, 20.92, 20.8, 20.75 ppm; IR (neat): 3427 (OH), 1745 cm⁻¹ (C=O); MALDI-TOF-MS: average *m/z* calcd for C₄₀₆H₆₃₀N₅₆O₁₄₇: 8647.63; found: 8646.31.

Preparation of 3b: Compound **14b** (69 mg, 0.0080 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 4.8 mL), Amberlite resin IRA 400 OH⁻ (1.4 meq/mL, 2.47 g) was added, and the mixture was stirred for 5.5 h at 27 °C without mechanical stirring. The resin was then filtered and washed with methanol and water. The solvent was evaporated to give **3b** (42.5 mg, 85%) as pale-yellow solid. [α]_D²⁰ = +11.7 (*c* = 0.54 in MeOH and 3 drops of D₂O); ¹H NMR (400 MHz, MeOD+D₂O 9:1, 300 K): δ = 8.09 (s, 7H; H-9 or H-12), 8.09 (s, 7H; H-9 or H-12), 4.99 (d, *J* = 13.1 Hz, 14H; H-7a and H-10a), 4.91–4.73 (m, 21H; H-1, H-7b and H-10b), 4.65–4.48 (m, 14H; H-6 or H-5 and H-4), 4.42 (t, *J* = 6.5 Hz, 14H; H-15'), 4.31 (s, 14H; H-15'), 3.97–3.79 (m, 35H; H-6' and H-3), 3.79–3.60 (m, 14H; H-6 or H-4 and H-5), 3.56–3.47 (m, 21H; H-2 and H-2'), 3.37 (t, *J* = 9.1 Hz, 14H; H-4'), 3.18 (t, *J* = 9.1 Hz, 14H; H-3'), 2.98 (dd, *J* = 11.1, 4.7 Hz, 14H; H-1a'), 2.81–2.68 (m, 14H; H-7a'), 2.66–2.51 (m, 14H; H-7b'), 2.20 (t, *J* = 10.8 Hz, 14H; H-1b'), 2.14 (d, *J* = 9.4 Hz, 14H; H-5'), 1.89 (t, *J* = 6.0 Hz,

14H; H-14'), 1.83 (t, $J=6.0$ Hz, 14H; H-14'), 1.46 (t, $J=6.0$ Hz, 28H; H-8'), 1.35–1.18 ppm (m, 140H; H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD + D₂O, 301 K): $\delta=145.6, 145.0, 125.9, 125.3, 102.2, 83.9, 80.9, 80.3, 74.4, 71.8, 70.5, 70.2, 67.0, 65.9, 65.0, 59.4, 57.4, 53.7, 51.4, 51.3, 31.3, 31.2, 30.5, 30.4, 29.95, 29.89, 28.54, 28.50, 27.4, 24.8$ ppm; IR (neat): $\bar{\nu}=3352$ cm⁻¹ (OH); MALDI-TOF-MS: average m/z calcd for C₂₉₄H₅₁₈N₅₆O₉₁: 6293.58; found: 6294.95.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS (UMR 7509), the Centre International de Recherche aux Frontières de la Chimie (FRC), the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant number 08 JC-0094-01), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (contract numbers SAF2010-15670), the Fundación Ramón Areces and the Junta de Andalucía (P08-FQM-03711), and doctoral fellowships from the French Department of Research to C.D. We further thank M. Schmitt for NMR measurements, J.-M. Strub for MALDI-TOF experiments and the CITIUS (University of Sevilla) and IIQ (CSIC) for technical support.

- [1] See for example: a) V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515–553; b) N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R-104R; c) T. M. Gloster, G. J. Davies, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305–320; d) T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 794–815; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750–770; e) B. P. Rempel, S. G. Withers, *Glycobiology* **2008**, *18*, 570–586; f) T. Kajimoto, M. Node, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 13–33.
- [2] G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 107–118.
- [3] For reviews, see: a) R. T. Lee, Y. Ichikawa, T. Kawasaki, K. Drickamer, Y. C. Lee, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *299*, 129–136; b) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327; c) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578; d) A. Imberly, Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7490–7499; e) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291–310; f) R. Roy, M.-G. Baek, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 291–309; g) M. Lahmann, *Top. Curr. Chem.* **2009**, *288*, 17–65; h) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 139–164; i) D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966–979; j) R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013–2025; k) V. Roldós, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 990–1005.
- [4] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669–672.
- [5] S.-K. Choi, *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2004**.
- [6] a) T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, K. M. Bongers, W. E. Donker-Koopman, A. Ghisaidoobe, G. A. van der Marel, A. Strijland, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 836–846; b) A. Lohse, K. B. Jensen, K. Lundgren, M. Bols, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965–1971; c) B. A. Johns, C. R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749–752.
- [7] For the first systematic biological evaluation of multivalent iminosugars as glycosidase inhibitors, see: J. Diot, M. I. García-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363.
- [8] *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), John Wiley & Sons, Chichester, **2007**; *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond* (Ed.: A. E. Stütz), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [9] J. M. Rini, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 551–577.
- [10] a) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Withersides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794; b) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933.
- [11] S. Cecioni, O.-A. Argintaru, T. Docsa, P. Gergely, J.-P. Praly, S. Vidal, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 148–156 and references cited therein.
- [12] a) M. Gómez-García, J. M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez-Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970–7971; b) M. Gómez-García, J. M. Benito, R. Gutiérrez-Gallego, A. Maestre, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. L. Jiménez Blanco, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1849–1860.
- [13] P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazeldar, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5889–5892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753–5756.
- [14] A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, and V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996.
- [15] For selected examples, see: a) S. J. Hwang, N. C. Bellocq, M. E. Davis, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 280–290; b) N. C. Bellocq, S. H. Pun, G. S. Jensen, M. E. Davis, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1122–1132; c) N. Smiljanic, V. Moreau, D. Yockot, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Djedaiini-Pilard, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5591–5594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5465–5468.
- [16] a) R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613–628; b) R. Huisgen, W. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494–2507; c) C. W. Tornøe, M. Meldal, *Proceedings of the 2nd International and 17th American Peptide Symposium*, San Diego, **2001**, 263–264; d) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [17] For selected examples of the CuAAC reaction in the cyclodextrin field, see: a) J. Deng, N. Li, K. Mai, C. Yang, L. Yan, L.-M. Zhang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 5273–5281; b) A. Megia-Fernandez, M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 3306–3320; c) S. Srinivasachari, T. M. Reineke, *Biomaterials* **2009**, *30*, 928–938; d) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681–2684; e) J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1505–1509; f) M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo, M. D. Giron-Gonzalez, N. Sevillano-Tripero, R. Salto-Gonzalez, F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2291–2301; g) R. J. Pieters, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1181–1190.
- [18] a) F. G. Calvo-Flores, J. Isac-García, F. Hernandez-Mateo, F. Pérez-Balderas, J. A. Calvo-Asín, E. Sánchez-Vaquero, F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2499–2502; b) K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 203–221.
- [19] F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez-Martínez, A. Vargas-Berenguel, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2389–2392.
- [20] D. D. Díaz, K. Rajagopal, E. Strable, J. Schneider, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6056–6057.
- [21] V. P. Pathak, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 83–85.
- [22] A. J. Steiner, A. E. Stütz, T. M. Wrodnigg, C. A. Tarling, S. G. Withers, A. Hermetter, H. Schmidinger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1922–1925.
- [23] H. S. Overkleeft, J. van Wiltenburg, U. K. Pandit, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4215–4224.

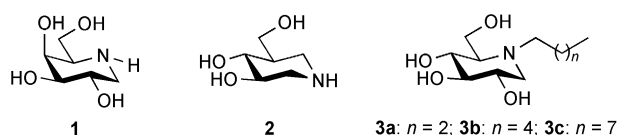
Received: August 23, 2011
Published online: November 3, 2011

DOI: 10.1002/cbic.201200005

Cyclodextrin-Based Iminosugar Click Clusters: The First Examples of Multivalent Pharmacological Chaperones for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders

Camille Decroocq,^[a] David Rodríguez-Lucena,^[a] Kyoko Ikeda,^[c] Naoki Asano,^[d] and Philippe Compain^{*,[a, b]}

The pharmacological chaperone concept has recently raised many hopes for the treatment of inherited diseases that are caused by improperly folded proteins.^[1] The most relevant successes have undoubtedly been obtained in the field of glycosphingolipid lysosomal storage disorders (GLSDs),^[2] a small group of diseases characterized by a deficiency of the glycosidases involved in the catabolism of glycosphingolipids in the lysosome.^[3] Pharmacological chaperone therapy is based on the ability of reversible inhibitors of the deficient enzymes to enhance their residual hydrolytic activity at sub-inhibitory concentrations. The proof-of-concept of this approach was demonstrated in 1999 with 1-deoxygalactonojirimycin (**1**, Amigal), a potent inhibitor of the galactosidase involved in Fabry disease (Scheme 1).^[4] The counterintuitive basis of the pharmacological



Scheme 1. Selected examples of pharmacological chaperones for Gaucher's disease.

chaperone therapy has triggered many studies into the possible mechanisms involved; however, without reaching a consensus. So far, the most accepted theory to account for the chaperone effect is based on the observation that the binding of inhibitors can stabilize the mutant glycosidase against thermal denaturation and lead to an increase in lysosomal levels of the enzyme.^[5] It has been thus proposed that, by inducing or stabilizing the proper conformation of the defective enzyme,

reversible inhibitors prevent its degradation by a "quality-control" mechanism,^[2] termed endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD).^[6] Normal trafficking of the mutant enzyme to lysosomes is restored, and the residual enzyme activity is consequently enhanced in these organelles. Very recently, Wei et al. proposed a completely different view of the chaperone effect based on the X-ray structure and biochemical properties of N370S β -glucocerebrosidase,^[7] the mutant enzyme involved in type I Gaucher's disease.^[8] Comparative studies between N370S and wild-type β -glucocerebrosidase appear to indicate that the N370S mutation results in a correctly folded but catalytically deficient enzyme that is processed normally.^[7] Supported by literature precedents,^[9] these findings suggest that the main effect of pharmacological chaperones is to increase the resistance of the mutant enzyme to lysosomal proteases by rigidifying its structure rather than to prevent protein degradation in the endoplasmic reticulum. In this context, as suggested by Llebaria et al.,^[10] the term "enzyme enhancer" would be probably more accurate, as, rigorously, a pharmacological chaperone is supposed to act by assisting the folding process of the mutant enzyme.

The majority of the pharmacological chaperones identified for the treatment of Gaucher's disease, the most prevalent GLSDs, are iminosugars.^[2] Isofagomine (**2**, Plicera) has recently shown promising results in clinical trials (Scheme 1).^[11] All the patients who were enrolled showed increased enzymatic activity without serious side effects. However, Plicera might not move forward to phase III development, as significant clinical improvements were observed for only one patient out of 18.^[11a] This result could indicate that the doubling of the residual GCase activity reported for Plicera is not sufficient for a therapeutic application.^[12] This is a crucial issue for the field, given that almost all reported chaperones for type I Gaucher's disease more or less double the residual cellular activity whatever their affinity for human GCase.^[2] This challenge is even more pressing for infantile acute neuropathic (type II) Gaucher's disease, as the pharmacological chaperone activity observed on L444P GCase is usually much lower. Access to a second generation of chaperones with improved enhancing activities is indeed a tough challenge, as no rational criteria for the design of such compounds are known. In addition, the basis of the complex mechanisms underlying the chaperone effect is still under debate.

As part of a program to generate novel classes of glycomimetics of biological interest,^[13] we recently reported the synthesis of multivalent iminosugars based on a fullerene (C₆₀)^[14] or a β -cyclodextrin core (Scheme 2).^[15] The biological evaluation of these compounds as inhibitors of a panel of commer-

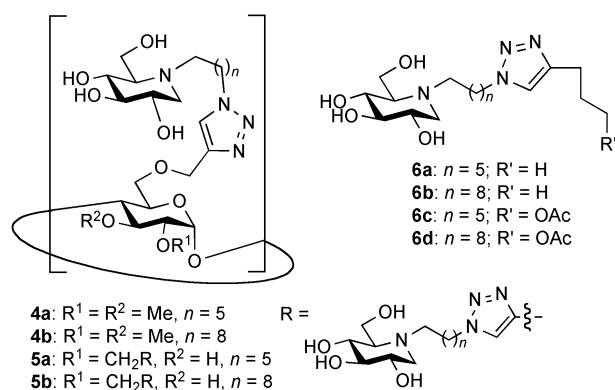
[a] C. Decroocq, Dr. D. Rodríguez-Lucena, Prof. P. Compain
Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives (SYBIO)
Université de Strasbourg/CNRS (UMR 7509)
Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux
25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg (France)
E-mail: philippe.compain@unistra.fr

[b] Prof. P. Compain
Institut Universitaire de France
103 bd. Saint-Michel, 75005 Paris (France)

[c] Dr. K. Ikeda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University
Kanazawa 920-1181 (Japan)

[d] Prof. N. Asano
BioApply Co., Ltd.
Kanazawa 920-0955 (Japan)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200005>.



Scheme 2. Iminosugar–cyclodextrin conjugates (ICDCs) and their corresponding monovalent controls.

cial glycosidases led to the first evidence of a strong multivalent effect in glycosidase inhibition, rivaling those encountered for carbohydrate–lectin interactions. Indeed, binding enhancement of up to four orders of magnitude over the corresponding monovalent ligand was observed with Jack bean α -mannosidase. Herein, we report the first application of the concept of multivalency to a glycosidase of therapeutic interest.

Our first objective was to disclose a novel class of pharmacological chaperones for the treatment of a GLSD, namely Gaucher's disease. We therefore targeted N370S and L444P GCases, the two most common mutations to cause this lysosomal disorder. The multivalent architecture was designed with the double goal of developing high-affinity chaperones for GCCase, while exploring the influence of multivalency on inhibition potency and selectivity. We therefore chose to use N-alkyl analogues of 1-deoxynojirimycin (DNJ) as the peripheral ligands. Because these compounds display relatively low affinity for GCCase, with inhibition in the μM range,^[2j,16] the multivalent binding effect might be more significant. In addition, N-alkyl analogues of DNJ are poorly selective and display modest to good glycosidase inhibition.^[17] It was anticipated that they could therefore be an excellent model for probing the influence of multivalency on inhibition selectivity. It is noteworthy that N-nonyl DNJ (**3c**) was the first pharmacological chaperone reported for the treatment of Gaucher's disease.^[16] This compound is able to double the residual activity of GCCase in N370S fibroblasts from Gaucher patients at a concentration of 10 μM . β -Cyclodextrin (β -CD) was selected as the core to build well-defined multivalent constructs differentiated by the number of ligands and their spatial orientation (Scheme 2). In addition, the strongest multivalent effect in glycosidase inhibition has been observed for the 14-valent cyclodextrin-based iminosugar cluster **5b** with Jack bean α -mannosidase.^[15]

A range of iminosugar–cyclodextrin conjugates (ICDCs) were synthesized^[15] by Cu^I-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC)^[18] so as to evaluate the influence on binding affinity of key structural parameters such as valency, ligand topology, and alkyl spacer length (C₆ or C₉). Two different prototypes of β CD-centered multivalent displays were thus considered: heptavalent compounds that have their inhibitory moieties located at the primary O-6 positions (**4**) and tetradevalent derivatives

that have DNJ motifs simultaneously at the O-6 and O-2 positions (**5**). We first evaluated the inhibitory activities of ICDCs **4** and **5** toward recombinant GCCase (ceredase), because the first step toward a potent pharmacological chaperone is to identify a ligand displaying high affinity for the protein (Table 1).

Inhibitors	IC ₅₀ [nM]	
	GCCase	α -Glucosidase
N-butyl DNJ (3a)	270 000 ^[13b]	5000 ^[13b]
N-hexyl DNJ (3b)	13 000 ^[13b]	4000 ^[13b]
N-nonyl DNJ (3c)	660 ^[13b]	1500 ^[13b]
Monovalent models		
6a	5900	300
6b	1600	120
6c	21 000	270
6d	1200	120
7-valent ICDCs		
4a	120	110
4b	8	10
14-valent ICDCs		
5a	13 400	260
5b	96	13

[a] Ceredase. [b] Myozyme.

Iminosugars **6**^[14,15] were also evaluated as monovalent controls so as to assess any possible multivalent effect in GCCase inhibition. The presence of the N-alkyltriazolyl substituent in compounds **6** did not have a strong impact on the affinity for GCCase as compared to N-nonyl or N-hexyl DNJ,^[13a,b,16] independent of the presence or not of an additional oxygen functionality (Table 1). We were pleased to observe a significant multivalent effect with the heptavalent derivatives **4**. The effect is most pronounced in the case of the iminosugar cluster with the longest spacer, **4b**, which is 200 times more potent than the corresponding monomer **6b**. To date, this is the strongest multivalent effect observed for a β -glucosidase.^[14,15] Increasing the valency from 7 to 14 was found to reduce (**5b**) or almost abolish (**5a**) the multivalent effect. As shown in a previous study with green coffee bean α -galactosidase,^[15] increasing cluster valency does not necessarily lead to better inhibitors.

Remarkably, multivalency was also found to be a promising tool for controlling inhibitor selectivity. This point is particularly relevant given the potential detrimental side effects caused by nonselective iminosugar-based therapeutic agents. For example, N-nonyl-DNJ (**3c**) has been reported to be an effective pharmacological chaperone that increases the activity of mutant GCCase in Gaucher cells,^[16] although it is also known that this compound is a potent inhibitor of α -glucosidase processing in the endoplasmic reticulum (ER).^[19] Inhibitors that target a host function such as ER processing α -glucosidases must be carefully considered in terms of side effects because they can inhibit the folding, secretion, and trafficking of other glycoproteins in patient's cells or might directly inhibit lysosomal α -glucosidase after being taken up into cells. ICDCs **4a** and **5a**, with the shorter spacer (C₆) displayed inhibition

toward human lysosomal α -glucosidase (α -GLCase, Myozyme) in the same range as the corresponding monomers **6a** and **6c**, and only modest multivalent effects (up to 12-fold) were observed with the multivalent iminosugars **4b** and **5b** bearing the longer spacer (C_9). Consequently, although the monovalent models **6** were found to be 13 to 80 times less potent as inhibitors of GCCase than as inhibitors of α -GLCase, their corresponding 7-valent analogues displayed comparable inhibition against the two glycosidases. The pharmacological chaperone activity was evaluated with **4b**, the ICDC showing the most potent in vitro inhibitory activity, and with the corresponding monovalent analogue **6d** for comparison purposes. The influence of **4b** and **6d** on human GCCase activity was investigated in N370S fibroblasts cultured for three days.

Compound **4b** increased GCCase activity in a dose-dependent manner up to a concentration of 10 μM ; its chaperoning activity then decreased at higher concentrations. The maximum increase in activity in N370S Gaucher fibroblasts for **4b** was 1.5 times that of untreated cells (Figure 1A). Iminosugar **6d**, the

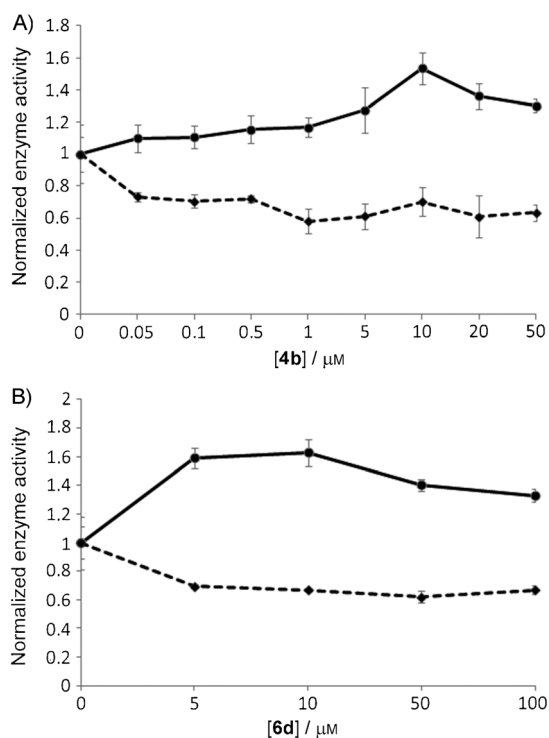


Figure 1. The influence of A) ICDC **4b** and B) **6d** on GCCase (—●—) and α -GLCase (---◆---) activities in N370S Gaucher fibroblasts (GM00372). The fibroblasts were incubated in the presence of **4b** (0–50 μM) or of **6d** (0–100 μM) for three days. Mean values \pm SD are shown for triplicate experiments.

monovalent analogue of **4b**, displayed a similar profile and maximally increased GCCase activity by 1.6-fold at 10 μM (Figure 1B).^[20] The influence of **4b** and **6d** on lysosomal α -glucosidase (α -GLCase) activities was also investigated in N370S fibroblasts cultured for three days (Figure 1). Again, **4b** and **6d** displayed similar activities and decreased the activity between 30 and 39% at micromolar concentrations (between 5 and 100 μM). In comparison, *N*-nonyl DNJ (**3c**) decreased cellular GLCase activity by 50% at 10 μM and by 70% at 50 μM .^[13b]

The GCCase and α -GLCase activities of an L444P variant were then measured by using a cell line (GM00877) derived from type II Gaucher's disease patients after incubation with 7-valent iminosugar **4b** or the monovalent analogue **6d** for three days (Figure 2). None of the two DNJ derivatives showed

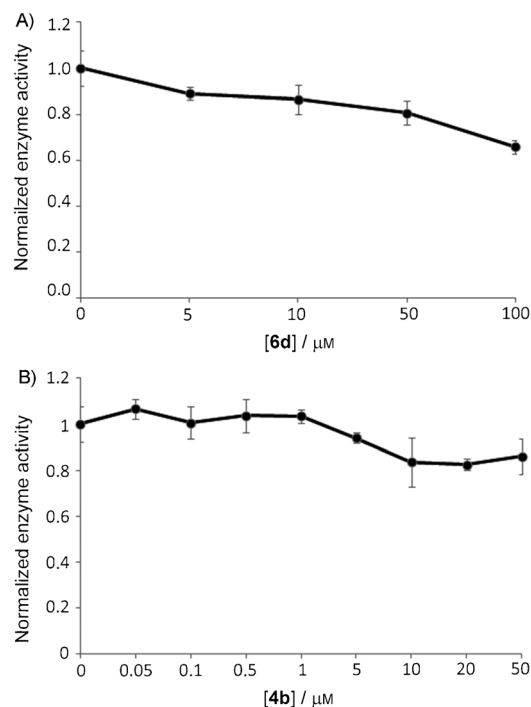


Figure 2. The influence of A) **6d** and B) **4b** on GCCase activity in L444P Gaucher fibroblasts (GM00877). The fibroblasts were incubated in the presence of **4b** (0–50 μM) or **6d** (0–100 μM) for three days. Mean values \pm SD are shown for triplicate experiments.

distinct chaperoning activity in this cell line. L444P mutation is indeed known to be highly resistant to chaperone enhancement.^[10] In addition, the two compounds weakly inhibited cellular GCCase activity at concentrations higher than 1 μM . Compounds **4b** and **6d** were also both found to be weak inhibitors of α -GLCase, reducing its activity by 20–30% at 50 μM (see the Supporting Information).

In conclusion, we have reported the first multivalent effect observed for a glycosidase of therapeutic interest. By virtue of multivalency, a modest μM inhibitor of GCCase has been transformed into a potent low-nM inhibitor. To achieve such progress, it usually takes an extensive structure–activity relationship study, as illustrated by our recent identification of potent iminoxylitol-based GCCase inhibitors from taking *N*-alkyl DNJ derivatives as a starting point.^[13a–c] In addition, this study demonstrates that multivalency could also be a useful way to increase inhibitor selectivity. Although the chaperoning activity of the corresponding monovalent ligand, **6d**, is slightly higher, the ability of ICDC **4b** to access the ER and/or the lysosomes is unambiguously shown by the significant enhancement of GCCase activity in Gaucher fibroblasts. Altogether, these results augur well for a new class of pharmacological chaperones based on multivalent architectures for the treatment of lysosomal diseases.

es. A systematic study on the influence of key structural parameters such as valency, ligand topology, and scaffold structure on GCase binding affinity and chaperoning activity is currently underway in our laboratory.

Experimental Section

The enhancement of intracellular GCase activity in treated patient fibroblasts caused by using the iminosugars **4b** and **6d** was evaluated as described previously.^[13a,b] Additional details concerning the influence of **4b** and of **6d** on α -GLCase activity in L444P Gaucher fibroblasts are provided in the Supporting Information.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut Universitaire de France (IUF), the CNRS (UMR 7509), the University of Strasbourg, the Agence National de la Recherche (ANR, grant number 08JC-0094-01), and a doctoral fellowship from the French Department of Research to C.D.

Keywords: chaperones · cyclodextrins · Gaucher's disease · iminosugars · multivalency

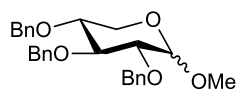
- [1] a) T. Kolter, M. Wendeler, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 260–264; b) A. Ulloa-Aguirre, J. A. Janovick, S. P. Brothers, P. M. Conn, *Traffic* **2004**, *5*, 821–837; c) D. Ringe, G. A. Petsko, *J. Biol.* **2009**, *8*, 80–84.
- [2] a) J.-Q. Fan in *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. 225–247; b) J.-Q. Fan, *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355–360; c) J.-Q. Fan, *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 1–11; d) Z. Yu, A. R. Sawkar, J. W. Kelly, *FEBS J.* **2007**, *274*, 4944–4950; e) Y. Suzuki, S. Ogawa, Y. Sakakibara, *Perspect. Med. Chem.* **2009**, *3*, 7–19; f) G. Parenti, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 268–279; g) R. J. Desnick, *J. Inherited Metab. Dis.* **2004**, *27*, 385–410; h) M. Beck, *Expert Opin. Emerging Drugs* **2010**, *15*, 495–507; i) A. R. Sawkar, W. D'haeze, J. W. Kelly, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1179–1192; j) P. Compain, V. Desvergnès, V. Liautard, C. Pillard, S. Toumieux in *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. 327–455.
- [3] a) B. Winchester, A. Vellodi, E. Young, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 150–154; b) N. Gregersen, *J. Inherited Metab. Dis.* **2006**, *29*, 456–470; c) T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568; d) E. F. Neufeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 257–280; e) T. Kolter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 2057–2079; f) A. Raas-Rothschild, I. Pankova-Kholmyansky, Y. Kacher, A. H. Futerman, *Glycoconjugate J.* **2004**, *21*, 295–304; g) T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, R. G. Boot, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. M. F. G. Aerts, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9006–9028; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8848–8869.
- [4] a) J.-Q. Fan, S. Ishii, N. Asano, Y. Suzuki, *Nat. Med.* **1999**, *5*, 112–115; b) J.-Q. Fan, S. Ishii, *FEBS J.* **2007**, *274*, 4962–4971.
- [5] a) G. H.-F. Yam, C. Zuber, J. Roth, *FASEB J.* **2005**, *19*, 12–18; b) G. J. Kornhaber, M. B. Tropak, G. H. Maegawa, S. J. Tuske, S. J. Coales, D. J. Mahuran, Y. Hamuro, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2643–2649; c) R. L. Lieberman, B. A. Wustman, P. Huertas, A. C. Powe, C. W. Pine, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 101–107; d) R. A. Steet, S. Chung, B. Wustman, A. Powe, H. Do, S. A. Kornfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13813–13818; e) M. Schmitz, M. Alfalah, J. M. F. G. Aerts, H. Y. Naim, K.-P. Zimmer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 2310–2320; f) A. R. Sawkar, M. Schmitz, K.-P. Zimmer, D. Reczek, T. Edmunds, W. E. Balch, J. W. Kelly, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 235–251.
- [6] For a review of the ERAD pathway see: S. S. Vembar, J. L. Brodsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 944–957.
- [7] R. R. Wei, H. Hughes, S. Boucher, J. J. Bird, N. Guziewicz, S. M. Van Paten, H. Qiu, C. Qun Pan, T. Edmunds, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 299–308.
- [8] a) A. Zimran, *Gaucher's Disease*; Balliere Tindall, London, **1997**; b) E. Beutler, G. Grabowski in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Eds.: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Vogelstein, B. Childs, K. W. Kinzler), McGraw-Hill, New York, **2001**, pp. 3635–3668; c) T. D. Butters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 412–418; d) G. A. Grabowski, *Lancet* **2008**, *372*, 1263–1271.
- [9] See for example: a) T. Ohashi, C. M. Hong, S. Weiler, J. M. Tomich, J. M. F. G. Aerts, J. M. Tager, J. A. Barranger, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3661–3667; b) M. E. Grace, P. N. Graves, F. I. Smith, G. A. Grabowski, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6827–6835; c) M. E. Grace, K. M. Newman, V. Scheinker, A. Berg-Fussman, G. A. Grabowski, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2283–2291.
- [10] A. Trapero, I. Alfonso, T. D. Butters, A. Llebaria, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5474–5484 and references therein.
- [11] a) G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 107–118; b) D. P. Germain, J.-Q. Fan, *Int. J. Clin. Pharm. Ther.* **2009**, *47*, S111–S117.
- [12] For an interesting study on the correlation between GCase activity and substrate storage in a cell-culture model system for Gaucher's disease see: U. H. Schueler, T. Kolter, C. R. Kaneski, G. C. Zirzow, K. Sandhoff, R. O. Brady, *J. Inherited Metab. Dis.* **2004**, *27*, 649–658.
- [13] For examples of iminosugar-based pharmacological chaperones developed in our groups see: a) P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1356–1359; b) L. Yu, K. Ikeda, A. Kato, I. Adachi, G. Godin, P. Compain, O. R. Martin, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736–7744; c) F. Oulaïdi, S. Front-Deschamps, E. Gallienne, E. Lesellier, K. Ikeda, N. Asano, P. Compain, O. R. Martin, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 353–361; d) W. Schönemann, E. Gallienne, P. Compain, K. Ikeda, N. Asano, O. R. Martin, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2645–2650.
- [14] P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5889–5892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753–5756.
- [15] C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825–13831.
- [16] A. R. Sawkar, W.-C. Cheng, E. Beutler, C.-H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15428–15433.
- [17] a) *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond* (Ed.: A. E. Stütz), Wiley-VCH, New York, **1999**; b) *Iminosugars, From Synthesis to Therapeutic Applications* (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2007**.
- [18] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; b) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015; c) Residual copper-based impurities were efficiently removed by using gel permeation chromatography (Sephadex G-25) or by washing the products with ammonium hydroxide as described in ref. [15]. If needed, this operation was repeated until no more copper-based impurities were detected by MALDI-TOF mass spectrometry.
- [19] N. Zitzmann, A. S. Mehta, S. Carrouée, T. D. Butters, F. M. Platt, J. McCauley, B. S. Blumberg, R. A. Dwek, T. M. Block, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11878–11882.
- [20] As suggested by one referee, the lower chaperoning effect observed for multivalent iminosugar **4b**, considering the high value of inhibition in vitro, might be due to lower cellular permeability with respect to the monovalent analogue **6d**.

Received: January 4, 2012

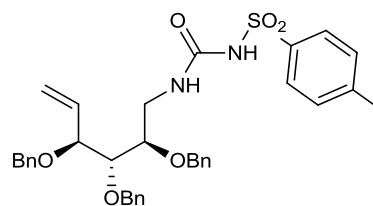
Published online on February 16, 2012

Index des composés synthétisés

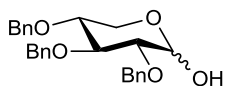
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



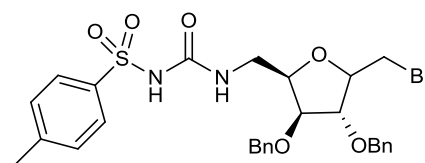
29 (36, 170)



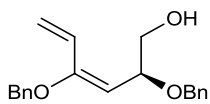
35 (37, 173)



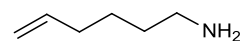
30 (36, 170)



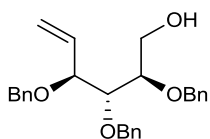
37 (37, 173)



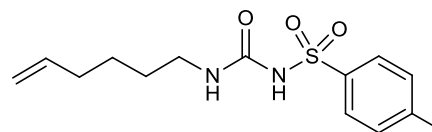
31 (36, 171)



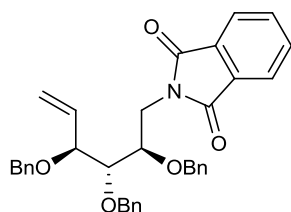
39 (38, 174)



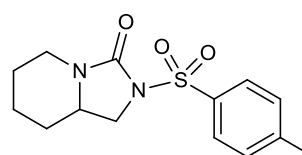
32 (36, 171)



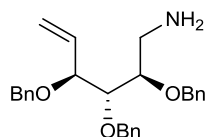
40 (38, 174)



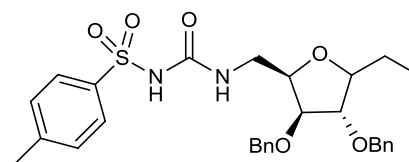
33 (36, 172)



41 (38, 175)

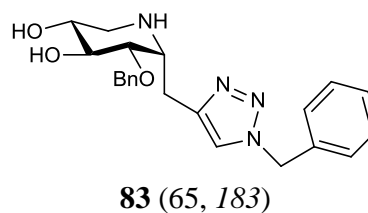
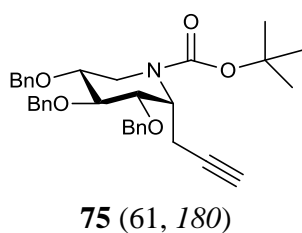
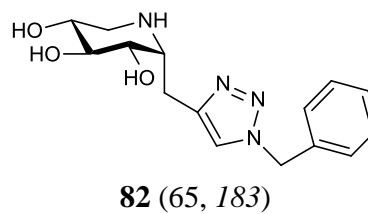
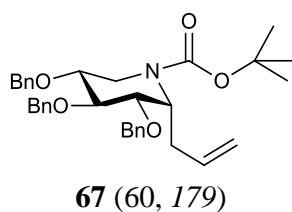
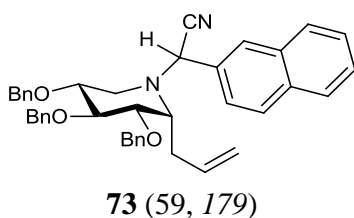
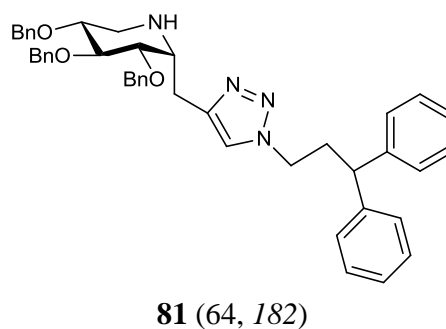
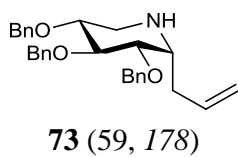
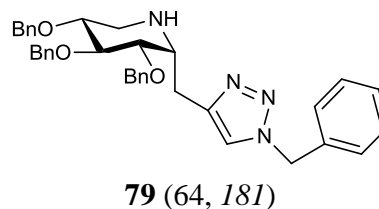
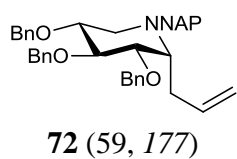
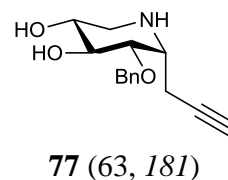
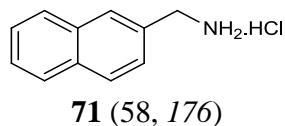
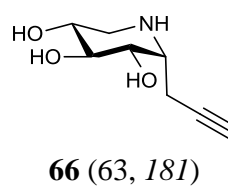
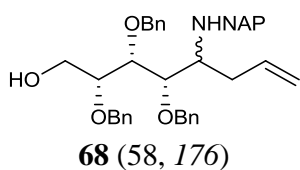


34 (37, 172)

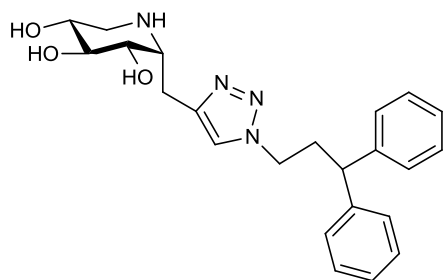


42 (40, 175)

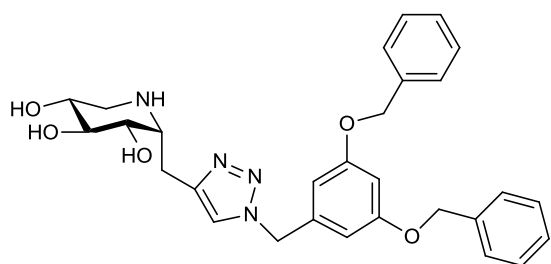
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



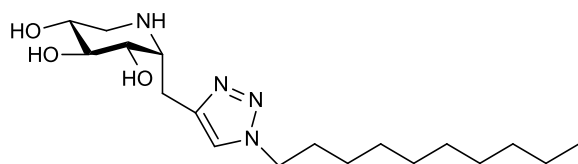
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



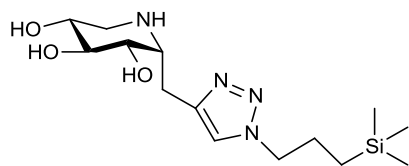
84 (65, 183)



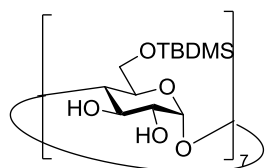
86 (65, 184)



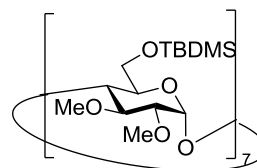
88 (65, 185)



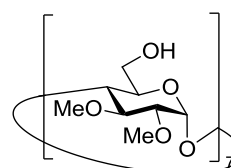
90 (65, 185)



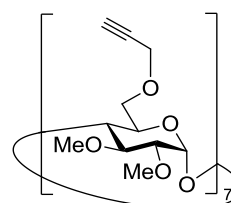
157 (113, 186)



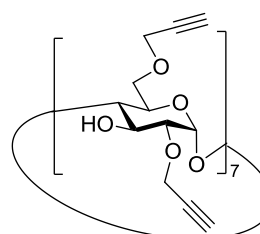
158 (113, 186)



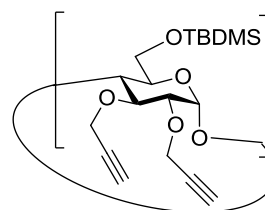
159 (113, 187)



153 (114, 187)

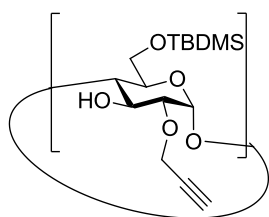


154 (114, 188)

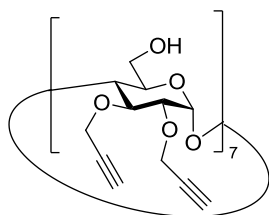


160 (115, 189)

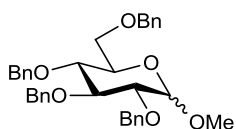
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



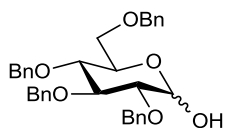
161 (116, 189)



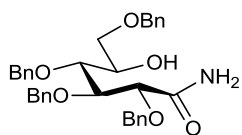
155 (117, 189)



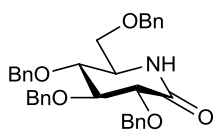
168 (120, 190)



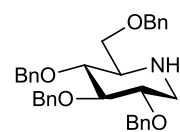
166 (120, 190)



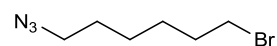
165 (120, 191)



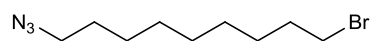
169 (120, 191)



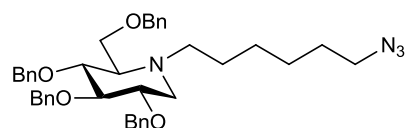
164 (121, 192)



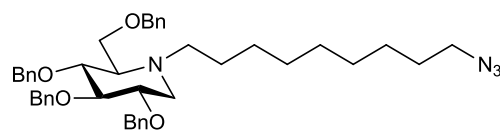
170 (121, 192)



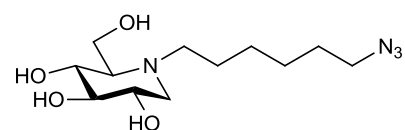
171 (121, 192)



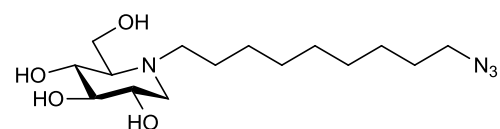
172 (122, 193)



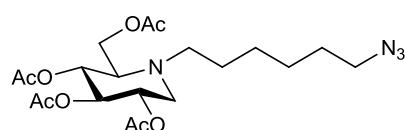
173 (122, 193)



162 (122, 194)

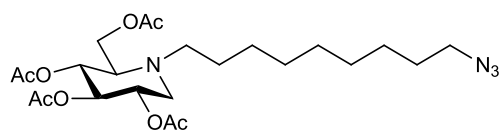


163 (122, 194)

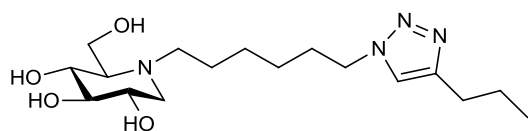


174 (122, 195)

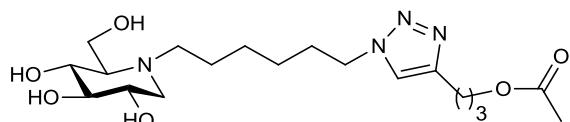
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



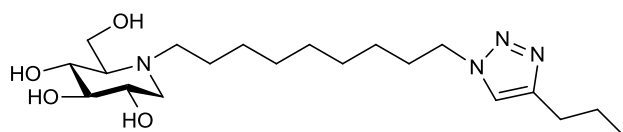
175 (122, 195)



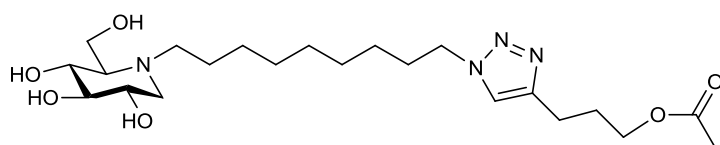
176 (123, 196)



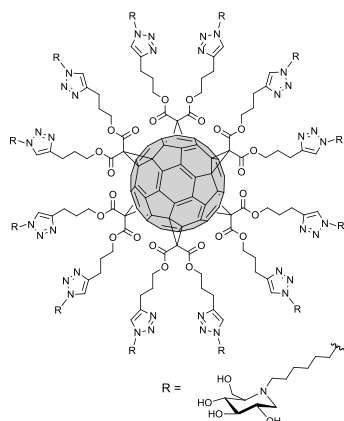
177 (123, 196)



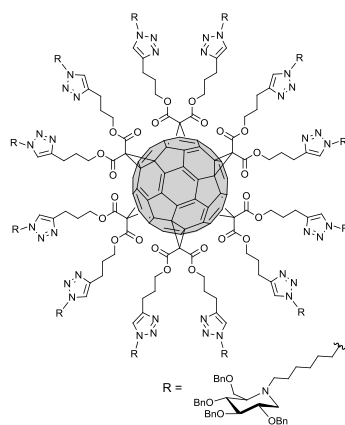
178 (123, 197)



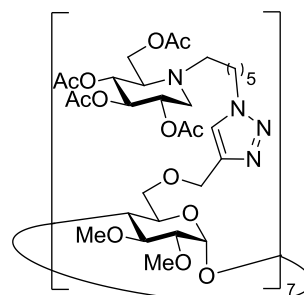
179 (123, 197)



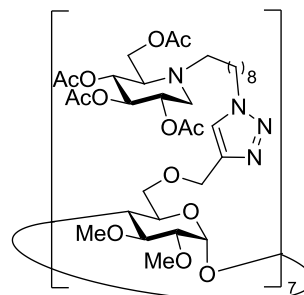
FULLDNJC6 (180) (124, 198)



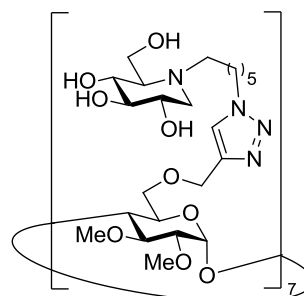
181 (124, 199)



182 (125, 200)

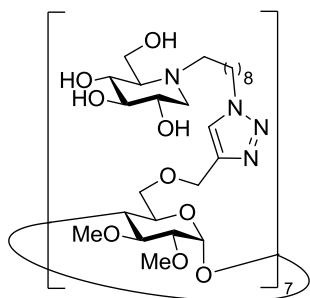


183 (125, 200)

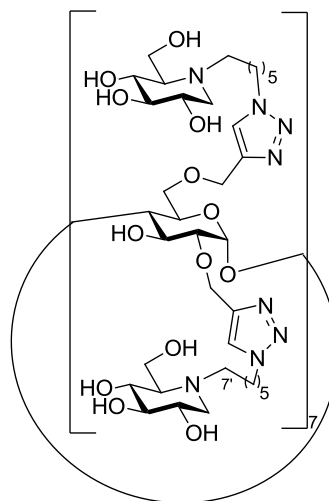


CD7DNJC6 (184) (125, 201)

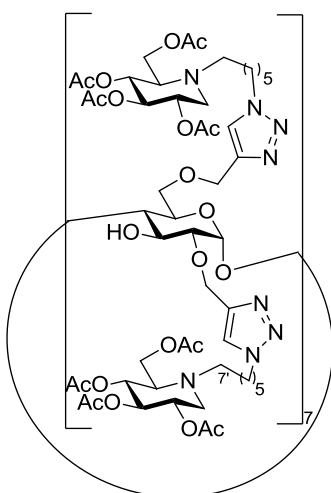
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



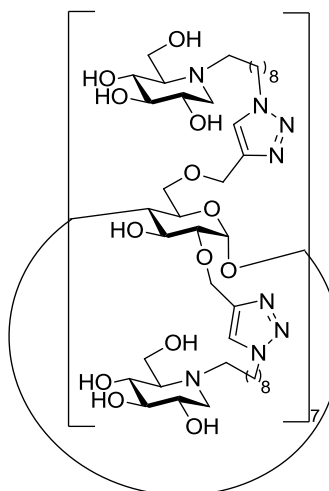
CD7DNJC9 (185) (125, 202)



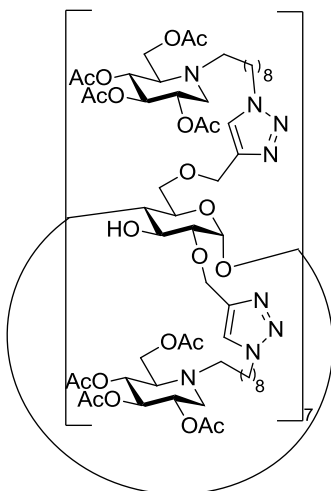
CD14DNJC6 (188) (126, 205)



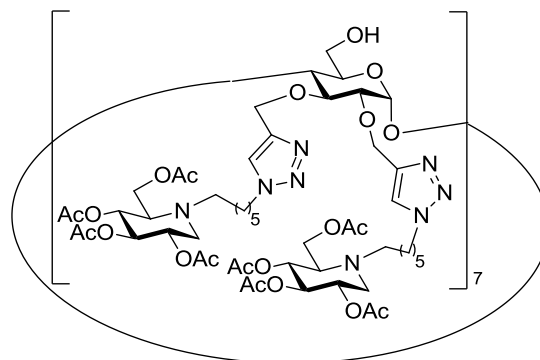
186 (126, 203)



CD14DNJC9 (189) (126, 206)

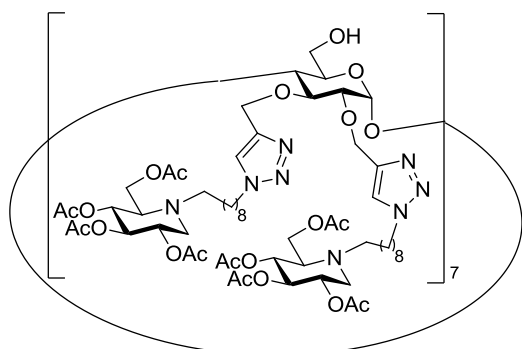


187 (126, 204)

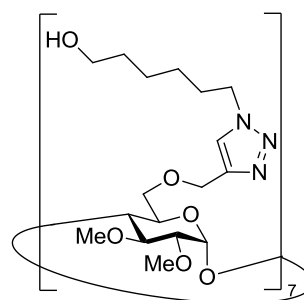


190 (127, 207)

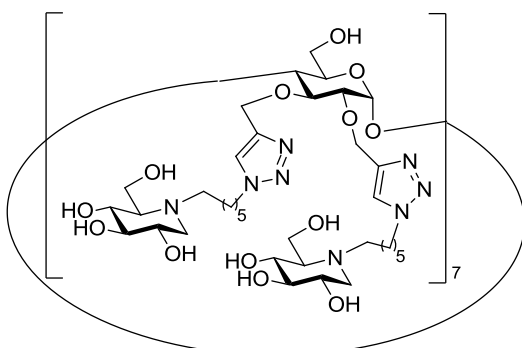
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



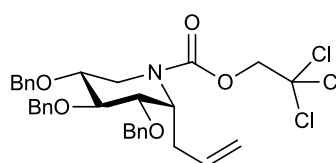
191 (127, 208)



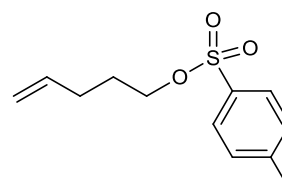
196 (129, 211)



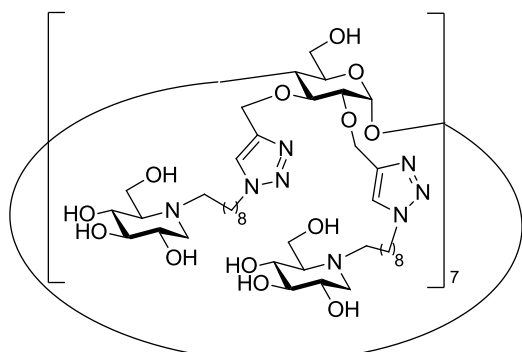
CD14downDNJC6 (192) (127, 209)



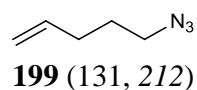
198 (130, 211)



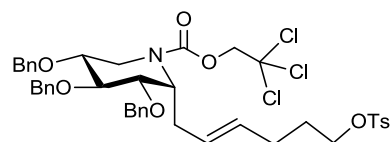
201 (131, 212)



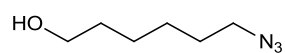
CD14downDNJC9 (193) (127, 209)



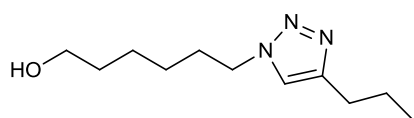
199 (131, 212)



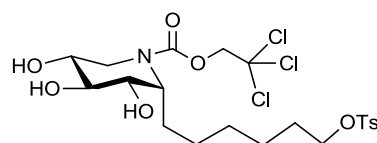
203 (131, 213)



194 (129, 210)

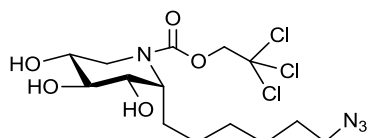


195 (129, 210)

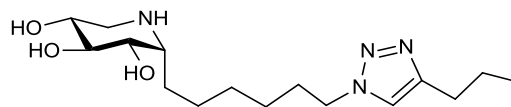


205 (132, 213)

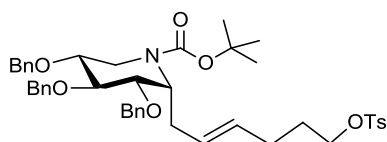
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



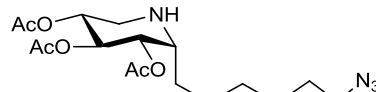
206 (132, 214)



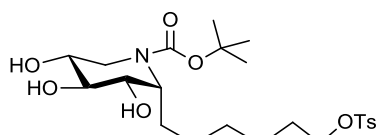
212 (133, 217)



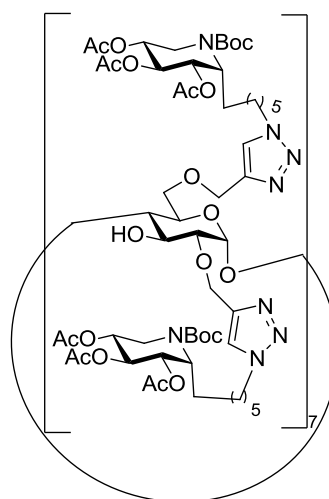
207 (132, 214)



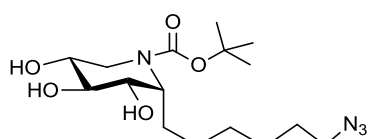
216 (135, 220)



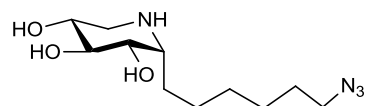
208 (133, 215)



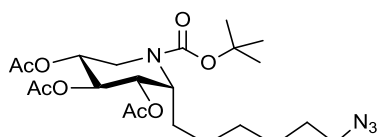
213 (134, 218)



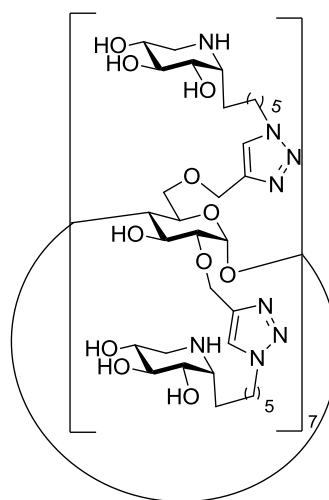
209 (133, 215)



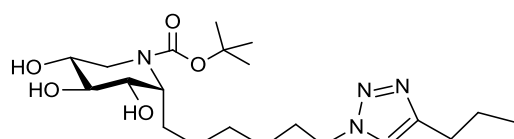
197 (133, 216)



210 (133, 216)

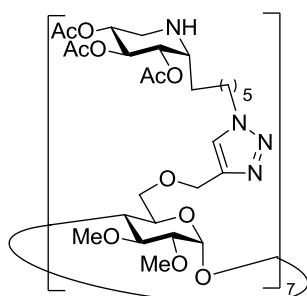


CD14XYLC6 (215) (134, 219)

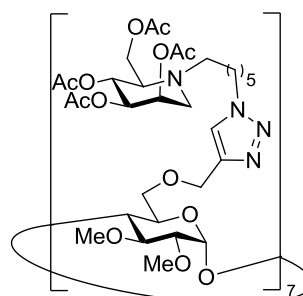


211 (133, 217)

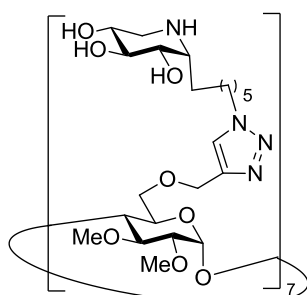
N° du composé (N° de la page théorique, N° de la page expérimentale)



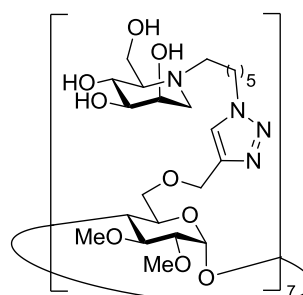
217 (135, 220)



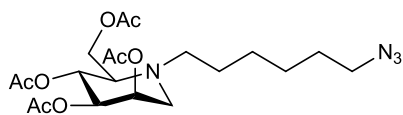
223 (137, 223)



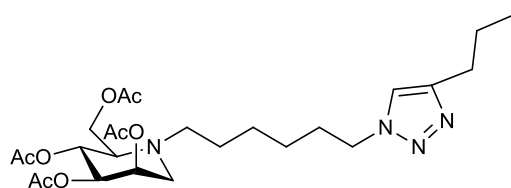
CD7XYLC6 (218) (135, 221)



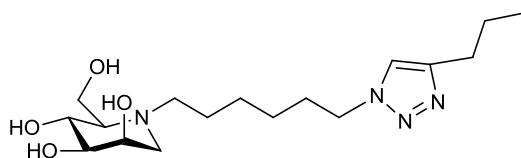
CD7DMJC6 (224) (137, 224)



220 (136, 221)



221 (136, 222)



222 (136, 223)

Conception et Synthèse de Nouvelles Classes d'Iminosucres d'Intérêt Thérapeutique : Chimie Click, Multivalence et Maladies Génétiques Rares

Résumé

Récemment, le concept de chaperon pharmacologique a émergé pour le traitement des maladies lysosomales. Comme inhibiteurs réversibles de glycosidases mutantes impliquées dans ces maladies, les chaperons pharmacologiques sont capables, à des concentrations sub-inhibitrices, de stabiliser ces enzymes et de les sauver des mécanismes de destruction du réticulum endoplasmique. Ainsi, une partie de l'activité enzymatique est restaurée. Les iminosucres sont connus pour être une classe importante de chaperons pharmacologiques.

Au cours de ce travail de thèse, de nouvelles classes d'iminosucres mono- et multivalents ont été conçues et synthétisées. Nos objectifs étaient de mettre en évidence de nouveaux chaperons pour la β -glucocérébrosidase, enzyme impliquée dans la maladie de Gaucher, mais également d'identifier de nouveaux inhibiteurs des α -glucosidases du réticulum endoplasmique impliquées dans la destruction de la protéine delF508CFTR déficiente chez les malades atteints de la mucoviscidose. Dans ce cadre, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre, notamment, l'utilisation d'une méthodologie de diamination d'alcènes pallado-catalysée, l'utilisation d'une méthodologie permettant la synthèse rapide d'une bibliothèque de composés iminosucres par chimie click ou encore l'utilisation de la multivalence. Une étude poussée sur la multivalence et l'inhibition de glycosidases a également été réalisée en faisant varier des paramètres clés de la multivalence tels que la valence, la charpente, le linker, ou encore la nature des ligands iminosucres. Le premier exemple d'un effet multivalent puissant jusqu'à quatre ordre de grandeur sur l'inhibition de glycosidases a ainsi pu être mis en évidence avec des systèmes iminosucres multivalents basés sur des charpentes de type β -cyclodextrine et fullerène C_{60} .

Mots clés : Iminosucres, Chaperons pharmacologiques, Inhibiteurs de glycosidase, Multivalence, Maladies lysosomales, Maladie de Gaucher, Mucoviscidose, Chimie click, Fullerène C_{60} , β -cyclodextrine.

Abstract

Recently an innovative concept for the treatment of lysosomal diseases as emerged called pharmacological chaperone. Pharmacological chaperones are reversible inhibitors of the deficient glycosidases involved in these diseases. These molecules are able, at sub-inhibitory concentrations, to stabilize the enzymes and rescue them from the destruction by the quality control system of the endoplasmic reticulum. A part of the catalytic activity of the enzyme could be restored. Iminosugars are known to be an important class of pharmaceutical chaperones.

During this PhD work, novel classes of mono- and multivalent iminosugars were designed and synthesized in order to identify novel pharmacological chaperones for the glycosidase: β -glucocerebrosidase involved in Gaucher's disease and novel inhibitors of the α -glucosidases involved in the destruction of the defective protein delF508CFTR in cystic fibrosis. Several strategies were applied to achieve this aim. These strategies consist in the use of a synthetic methodology of palladium catalyzed alkenes diamination, the use of an efficient methodology to synthesize a library of novel iminosugars by click chemistry and the use of multivalency. A full study on the impact of multivalency on glycosidases inhibition was also completed by changing crucial structural parameters including valency, scaffold, linker and ligand. The first strong multivalent effect on glycosidases inhibition up to four orders of magnitude was reported with multivalent iminosugars based on β -cyclodextrin or C_{60} fullerene cores.

Key words: Iminosugars, Pharmacological chaperones, Glycosidase inhibitors, Multivalency, Lysosomal diseases, Gaucher's disease, Cystic fibrosis, Click chemistry, Fullerene C_{60} , β -Cyclodextrin.