

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**Interacción aminoglicósido-ARN: bases moleculares y diseño de
nuevos ligandos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ester Jiménez Moreno

Directores
Juan Luis Asensio Álvarez

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica I



**INTERACCIÓN AMINOGLICÓSIDO-ARN:
BASES MOLECULARES Y DISEÑO DE NUEVOS LIGANDOS**

TESIS DOCTORAL

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Ester Jiménez Moreno

Director

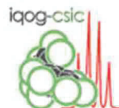
Dr. Juan Luis Asensio Álvarez

Instituto de Química Orgánica General (CSIC)



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



MADRID, 2015

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Bioorgánica (QOB) del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. Juan Luis Asensio Álvarez

El trabajo ha estado financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, dentro del proyecto “Estudios sobre reconocimiento molecular de aminoglicósidos por ARN ribosómico y enzimas de resistencia: aproximaciones al diseño de nuevos agentes antimicrobianos” (CTQ2010-19073), y por el Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del proyecto “Aproximaciones al diseño de nuevos ligandos de ARN basados carbohidratos: de la química combinatoria al diseño racional” (CTQ2013-45538-P)

Dña. Ester Jiménez Moreno ha sido financiada por una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (convocatoria 2011). Referencia: BES-2011-044466.

Relación de abreviaturas	i
Resumen	iii
Summary	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aminoglicósidos: aspectos generales	3
1.1.1 Perspectiva histórica	3
1.1.2 Estructura y clasificación	4
1.1.3 Modo de acción	6
1.1.3.1 Bases moleculares de la actividad antibiótica	6
1.1.3.2 Aplicaciones de los aminoglicósidos en el tratamiento de enfermedades genéticas: “miscoding” y supresión de PTCs.....	9
1.2 Interacción ARN-aminoglicósido	12
1.2.1 Aspectos generales de la interacción: propiedades conformacionales del ligando y receptor	12
1.2.2 Aspectos generales de la interacción: fuerzas directoras y termodinámica de la asociación	17
1.2.3 Interacciones CH/ π como elemento clave en el reconocimiento molecular de aminoglicósidos	19
1.2.4 Características estructurales de los complejos aminoglicósido/ARN	24
1.2.4.1 Sitio A	24
1.2.4.2 Dianas presentes en el VIH.....	28
1.2.4.3 Ribozimas.....	33
1.3 Problemas asociados a los aminoglicósidos	36
1.3.1 Aparición de fenómenos de resistencia bacteriana.....	36
1.3.2 Toxicidad	37
1.4 Modificaciones sintéticas en aminoglicósidos	37
1.4.1 Modificaciones orientadas a vencer la resistencia bacteriana	37
1.4.2 Modificaciones orientadas a aumentar la afinidad o selectividad: híbridos, dímeros y conjugados.....	41

1.5 Química combinatoria dinámica	44
1.5.1 DCC para la obtención de ligandos de ácidos nucleicos	46
2. OBJETIVOS	49
3. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES CH/$\pi$$\pi$ COMO ELEMENTO CLAVE EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE AMINOGLICÓSIDOS	55
3.1 Introducción	57
3.2 Objetivos específicos	58
3.3 Discusión de resultados	62
3.3.1 Síntesis de las librerías	62
3.3.2 Análisis de las interacciones CH/ π	63
Anexo 1	69
Anexo 2	101
Anexo 3	141
4. DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA EL DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LIGANDOS POLI-AMINADOS DE ARN	197
4.1 Introducción	199
4.1.1 Desarrollo de nuevos aminoglicósidos: interés y actualidad.....	199
4.1.2 Desarrollo de nuevos aminoglicósidos: aspectos metodológicos ...	200
4.2 Objetivos específicos	202
4.3 Discusión de resultados	206
Anexo 4	209
5. CONCLUSIONES	225
5.1 Análisis de las interacciones CH/π como elemento clave en el reconocimiento molecular de aminoglicósidos	227
5.2 Desarrollo de nuevas metodologías para el diseño y optimización de ligandos poli-aminados de ARN	227
6. BIBLIOGRAFÍA	229

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

2-DOS	2-deoxiestreptamina
AAC	N-acetiltransferasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANT	O-adeniltransferasa
APH	O-fosfotransferasa
ARN o RNA	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CTFR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
DCC	<i>Dynamic combinatorial chemistry</i>
DIBAL	<i>Diisobutylaluminium hydride</i>
DIS	<i>Dimerization initiation site</i>
NIS	<i>N-iodosuccinimide</i>
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i>
PTC	<i>Premature termination codon</i>
Rib	Ribosa
RMN o NMR	Resonancia magnética nuclear
RNAsa	Ribonucleasa
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RRF	<i>Ribosome recycling factor</i>
Strp	Estreptamina
TAR	<i>Trans activation responsive element</i>
TMSOTf	<i>Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Los aminoglicósidos son una familia de antibióticos de naturaleza oligosacáridica ampliamente utilizados en clínica. Constituyen, a su vez, una de las familias más importantes de ligandos de ARN, siendo capaces de reconocer de forma específica una gran variedad de dianas de origen viral o bacteriano de relevancia biológica. Por lo tanto, desde una perspectiva química-biológica, estos compuestos pueden considerarse armazones privilegiados para el desarrollo de ligandos poli-aminados de ARN de alta afinidad. Por lo que respecta a su actividad antibiótica, la emergencia y diseminación de fenómenos de resistencia bacteriana ha conferido a la búsqueda de nuevos compuestos activos un carácter de urgencia en años recientes.

Desafortunadamente, a pesar de los esfuerzos realizados en este campo durante los últimos 20 años, los avances obtenidos hasta la fecha pueden calificarse de discretos. En nuestra opinión, dos son las razones que han obstaculizado en mayor medida el desarrollo de nuevos compuestos dotados de novedosas actividades. Por un lado, desde una perspectiva fundamental, nuestra comprensión de las fuerzas intermoleculares que determinan la afinidad y selectividad de la interacción ARN/ligando es todavía limitada. En segundo lugar, la dificultad inherente a la preparación de estos compuestos ha supuesto un freno significativo a la química-biológica de los aminoglicósidos. Efectivamente, la elevada polaridad de estas moléculas, la presencia de un buen número de posiciones químicamente equivalentes así como su complejidad estructural confieren a la obtención de nuevos derivados el carácter de reto sintético.

En la presente tesis pretendemos contribuir a la superación de ambas limitaciones empleando para ello aproximaciones basadas en química combinatoria dinámica y RMN.

Así, en la primera parte se aborda un estudio experimental de interacciones CH/ π en agua. Cabe destacar que, a pesar de su discreta contribución a la energía libre de asociación, estos contactos son ubicuos en complejos aminoglicósido/ARN y resultan determinantes para la especificidad del proceso de reconocimiento. Con objeto de analizar de forma cuantitativa sus propiedades se han diseñado y sintetizado diversas librerías que incorporan una gran variedad de donadores y aceptores CH/ π estructuralmente diversos. Empleando una aproximación combinatoria dinámica, dichas librerías han permitido

Resumen

cuantificar con precisión la estabilidad de más de un centenar de complejos, evidenciando diferencias entre ellos inferiores a la décima de kcal/mol. A partir de los valores de energía libre obtenidos se han derivado las principales relaciones estructura/estabilidad que gobiernan la formación de los complejos CH/ π en medios fisiológicos. Adicionalmente, nuestro análisis ha demostrado el papel protagonista que las interacciones electrostáticas y las fuerzas solvofóbicas desempeñan en la estabilización de los mismos.

La segunda parte de esta memoria se ha centrado en el desarrollo de una nueva metodología para el diseño y optimización de ligandos poli-aminados de ARN basados en aminoglicósidos. Más concretamente, hemos explorado la reactividad de los complejos aminoglicósido/ARN en reacciones de aminación reductora como fuente de información de relevancia químico-médica. Nuestros esfuerzos se han centrado inicialmente en una modificación química sencilla pero de gran potencial en química biológica, como es la N-metilación con formaldehído. Dada la gran complejidad de las mezclas de reacción resultantes, ha sido precisa la puesta a punto de un novedoso protocolo de deconvolución basado en la implementación de esquemas sencillos de marcaje y dilución isotópica y experimentos de RMN. Los resultados obtenidos demuestran que la reactividad del ligando en su estado asociado a ARN puede proporcionar información valiosa de carácter cinético, termodinámico o dinámico.

SUMMARY

Aminoglycosides are antibiotics of oligosaccharidic nature widely employed in clinics. They constitute, in turn, one of most important families of RNA ligands, being able to recognize specifically a great variety of viral or bacterial targets of biological relevance. Indeed, from a chemical-biology perspective, these compounds can be considered privileged architectures for the development of high affinity polyamine RNA ligands. Regarding their antibiotic activity, the emergence and dissemination of bacteria resistance phenomena has conferred to the search of new active compounds a character of urgency in the recent years.

Unfortunately, despite the efforts made within this field during the last 20 years, the progress obtained to date can be described as modest. In our opinion, there are two main reasons that have obstructed the development of new compounds with novel activities. On the one hand, from a fundamental perspective, our comprehension of the intermolecular forces that determine the affinity and selectivity of the RNA/ligand interaction is still limited. On the other hand, aminoglycoside synthesis is inherently difficult, which has supposed a considerable obstacle to chemical-biology efforts. In particular, the high polarity and structural complexity of these compounds, together with the presence of a large number of chemically equivalent positions, make the preparation of new derivatives a considerable synthetic challenge.

The present thesis is intended to contribute to overcome both limitations by employing new approaches based on dynamic combinatorial chemistry and NMR.

Thus, in the first part, we perform an experimental study of CH/ π interactions in water. It should be noted that, in spite of their modest contribution to the association free energy, these contacts are ubiquitous in aminoglycoside/RNA complexes and determine, to a significant extent, the specificity of the recognition process. In order to quantitatively analyse their properties we have designed and synthesized several compound libraries that include a great variety of CH/ π donor and acceptor fragments. By employing a dynamic combinatorial approach, such libraries have allowed us to precisely quantify the stability of more than one hundred complexes, revealing differences between them inferior to 0.1 kcal/mol. From the free energy values obtained, the

Summary

main structure/stability relationships that govern the formation of CH/ π complexes under physiological environments have been deduced. Additionally, our analysis has demonstrated the key role played by electrostatic and solvophobic contributions on the stabilization of these weak interaction modes.

The second part of this memory deals with the development of a novel methodology for the design and optimization of polyamine RNA ligands based on aminoglycosides. Specifically, we have explored the chemical reactivity of aminoglycosides/RNA complexes in reductive amination reactions as source of useful information for drug design. Our efforts have firstly been focused on a simple chemical modification with great potential in biological chemistry as the N-methylation of aminoglycosides with formaldehyde. Due to the high complexity of the resulting reaction mixtures, it has been necessary the development of a novel deconvolution protocol based on simple isotopic labelling and dilution experiments and NMR. The obtained results demonstrate that the ligand reactivity in the bound state can provide valuable information of kinetic, thermodynamic or dynamic character.

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 AMINOGLICÓSIDOS: ASPECTOS GENERALES

1.1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

Los aminoglicósidos son una familia de antibióticos de amplio espectro usados para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas aerobias y, en menor medida, por bacterias Gram positivas.

El primer compuesto de esta familia descrito, la estreptomina, fue descubierto por Waksman y su equipo en 1944 al buscar agentes activos frente a bacterias Gram negativas en medios de cultivo de diferentes microorganismos.¹ Producido por *Streptomyces griseus*, fue además el primer antibiótico con actividad antituberculosa conocido.² Desafortunadamente, su aplicación terapéutica se vio limitada en poco tiempo por la temprana aparición de cepas resistentes así como por efectos adversos tales como su nefro y ototoxicidad. Dichos problemas condujeron a la búsqueda de nuevos compuestos dotados de actividad similar.

La neomicina B, producida por *Streptomyces fradiae*, fue el segundo antibiótico de esta familia en ser descubierto (en el año 1949).³ Sin embargo, su aplicación se ha visto fundamentalmente limitada al uso tópico debido a su elevada toxicidad y su pobre biodisponibilidad oral.

La siguiente aportación de relevancia a este campo de investigación se produjo en 1957, año en el cual Umezawa aisló la kanamicina a partir de cultivos de *Streptomyces kanamyceticus*.⁴ Si bien inicialmente se pensaba que la producción de aminoglicósidos se restringía a las especies del género *Streptomyces*, dicha idea fue definitivamente desterrada en el año 1963 con el descubrimiento de la gentamicina en el medio de fermentación de *Micromonospora purpurea*.⁵

Más adelante, en 1967, la familia se expandió nuevamente con la incorporación de la tobramicina producida por *Streptomyces tenbrarius*.⁶ Por último, ya en la década de los 70, diversas modificaciones químicas de la kanamicina permitieron el acceso a derivados semisintéticos como la amikacina⁷ y la dibekacina,⁸ dotados de una mayor actividad en cepas resistentes a los compuestos naturales.

Como punto final, cabe mencionar que la publicación, en el año 96, de la estructura en disolución correspondiente al complejo entre el sitio A del ARN 16S

y paromomicina⁹ (un antibiótico perteneciente al grupo de la neomicina), así como la posterior determinación, en 1998, de la estructura del complejo entre la misma diana de ARN y gentamicina¹⁰ (perteneciente a la familia de la kanamicina), proporcionaron por primera vez comprensión, a nivel estructural, de cómo ejercen su acción ambas familias de antibióticos (ver sección 1.2.4.1). La información obtenida fue confirmada más recientemente por la determinación, usando difracción de rayos X,¹¹ de la estructura tridimensional completa de la subunidad menor del ribosoma asociada a diversos aminoglicósidos, así como por diversos estudios posteriores (ver sección 1.1.3.1). Estos trabajos han reactivado enormemente la investigación en aminoglicósidos, abriendo la puerta, por primera vez, al diseño racional de fármacos más potentes.

En la actualidad, los aminoglicósidos constituyen un ejemplo paradigmático de ligandos de ARN de alta afinidad y su capacidad para interactuar con un buen número de dianas, no solo bacterianas, sino también virales o eucariotas, es bien conocida. De hecho, el desarrollo de nuevos compuestos basados en aminoglicósidos, más activos y selectivos, ha constituido un activo campo de investigación en química biológica durante los últimos 10 años.

1.1.2 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Desde un punto de vista químico, los aminoglicósidos son compuestos oligosacáridicos formados por aminoazúcares unidos a un anillo de aminociclitol. En función del aminociclitol que contenga la estructura pueden dividirse en dos clases:

- **Derivados de estreptidina:** estreptomomicina y espectinomomicina
- **Derivados de 2-deoxiestreptamina (2-DOS):** Esta familia, a su vez, incluye dos subgrupos en función del patrón de sustitución del anillo de aminociclitol: los *4,5-disustituidos* (como la neomicina, la paromomicina o la ribostamicina) y los *4,6-disustituidos* (entre los que se encuentran la kanamicina, la tobramicina y la gentamicina).

La unidad de neamina, formada por la unión de 2,6-dideoxi-2,6-diamino- α -glucosa a la posición 4 de la 2-DOS, constituye la unidad básica de este grupo de aminoglicósidos. De hecho este fragmento, como tal o con diversas modificaciones, se encuentra presente en todos ellos.

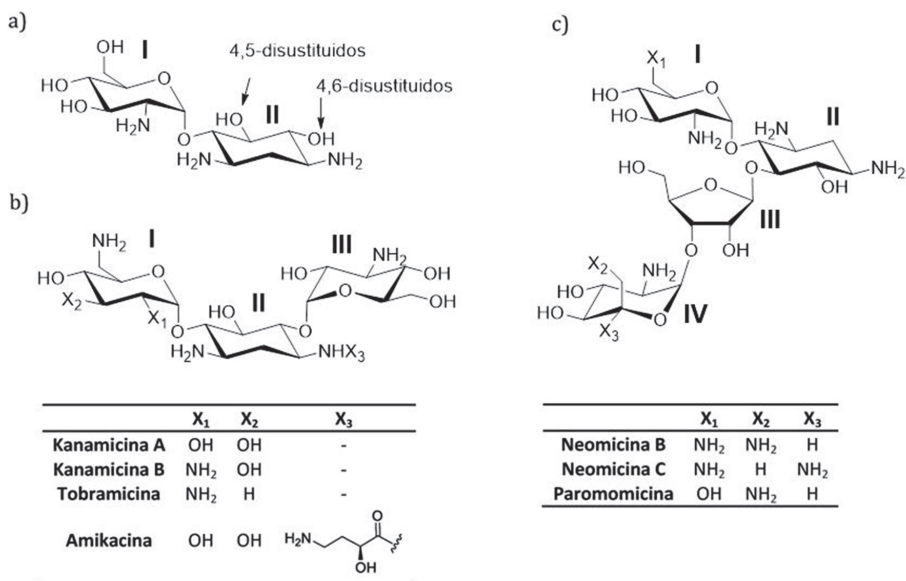


Figura 1.1. Estructura química de los aminoglicósidos. a) Unidad de neamina. b) Sub-familia de aminoglicósidos 4,6-disustituidos. c) Sub-familia de aminoglicósidos 4,5-disustituidos.

La nomenclatura que se va a usar a lo largo de la presente tesis doctoral en relación con los anillos de los diferentes aminoglicósidos se representa de modo esquemático en la figura 1.1. De acuerdo con ésta, el anillo de 2-deoxiestreptamina será el anillo II, el anillo unido a la posición 4 será el anillo I y los anillos unidos en las posiciones 5 o 6 (dependiendo del subgrupo) serán nombrados como unidades III, IV... en orden creciente según se alejen del anillo de 2-DOS.

Como es lógico, la estructura química de los aminoglicósidos determina sus propiedades como ligandos. Así, el elevado número de grupos amino e hidroxilo presente confiere a estas moléculas un marcado carácter básico y polar, dotándolas de una elevada solubilidad en medios acuosos. De acuerdo con diversos estudios, el pKa de las funciones amino oscila entre 6 y 9.5 dependiendo de su posición y las condiciones del medio.¹² Como consecuencia, a pH fisiológico los aminoglicósidos son policationes, lo que los permite establecer interacciones electrostáticas con sus dianas. Además, la gran cantidad de grupos hidroxilo que contienen hace posible el establecimiento de uniones adicionales por puentes de hidrógeno y contactos de van der Waals.¹³ Finalmente, las funciones CH

polarizadas presentes tanto en las piranosas como en el anillo de aminociclitol participan frecuentemente en interacciones CH/ π .¹⁴ El estudio de dichos contactos constituye uno de los objetivos de la presente tesis (los rasgos generales de la interacción aminoglicósido ARN se describen en los apartados 1.2.1, 1.2.2 y 1.2.3).

1.1.3 MODO DE ACCIÓN

1.1.3.1 Bases moleculares de la actividad antibiótica

Los aminoglicósidos ejercen su actividad antibiótica a nivel del ribosoma bacteriano, bien reduciendo la fidelidad de la traducción,¹⁵ (lo que produce una acumulación de proteínas truncadas o no funcionales), bien inhibiendo la translocación del ribosoma¹⁶ o bien inhibiendo el reciclado ribosomal.¹⁷ En todos los casos su acción conduce a la muerte bacteriana. Su diana biológica concreta es el sitio A del ARN 16S situado en la subunidad 30S.¹⁸ Se trata de una región activamente implicada en el mecanismo de verificación de errores y su función es garantizar que el emparejamiento codón-anticodón es correcto. Así, mediante un complejo mecanismo que involucra diversas regiones del ribosoma, el sitio A contribuye a diferenciar los ARNt correctos de los que no lo son, asegurando una correcta traducción del ARNm. Dentro de la estructura general del ribosoma, la ubicación del sitio A se localiza en la hélice 44 de la subunidad 30S, concretamente, en el extremo que contacta con la subunidad 50S (figura 1.2a).

La estructura secundaria del sitio A consta de dos hélices tipo A que encierran un bucle interno formado por tres adeninas A1408, A1492 y A1493 (figura 1.2b). Se trata de una región inherentemente dinámica del ARN, capaz de adoptar diversos estados conformacionales de relevancia funcional. Así, en ausencia de unión a un aminoacil-ARNt, las adeninas A1492 y A1493 del bucle interno están plegadas hacia el interior de la hélice y A1493 forma un enlace de hidrógeno con A1498 (figura 1.3a).^{9, 19} En estas circunstancias los contactos entre el sitio A y el fragmento de ARNm unido al ribosoma son mínimos.

Sin embargo, dicha estructura se ve significativamente alterada como consecuencia de la asociación de un aminoacil-ARNt correcto. Así, la complementariedad entre codón y anticodón genera una mini hélice constituida por tres pares de bases y estabilizada por emparejamientos de tipo Watson-Crick. Su proximidad induce un cambio conformacional en el sitio A, de forma que los residuos A1492 y A1493 del bucle interno son desplazados hacia el surco menor

quedando expuestos en el exterior de la hélice.^{9, 19} Este cambio conformacional permite a ambas adeninas contactar con el surco menor de la hélice formada por los dos primeros pares de bases del par codón-anticodón. Más concretamente, estudios de difracción de Rayos X^{11, 20} revelan el establecimiento de un patrón específico de enlaces de hidrógeno que involucra los residuos A1492/A1493 y los hidroxilos 2'OH de ribosa situados a ambos lados de la hélice codón-anticodón. Dicho patrón de interacciones es muy sensible a las distorsiones de surco causadas por un apareamiento de bases incorrecto y permite la discriminación de los aminoacil-ARNt unidos. De acuerdo con esto, la energía requerida para promover el cambio conformacional en el sitio A se ve compensada por los contactos establecidos con el par codón-anticodón solamente si éste muestra un apareamiento correcto. Curiosamente, la geometría de la tercera posición del par codón-anticodón no es supervisada por el sitio A de un modo tan exhaustivo, lo cual resulta consistente con la degeneración del código genético (figura 1.3c).^{11, 20-21}

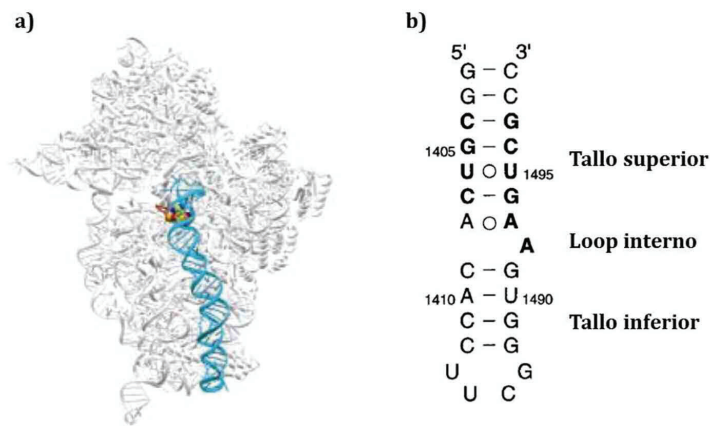


Figura 1.2. Representación del sitio de unión de los aminoglicósidos en el ribosoma bacteriano a) Subunidad 30S del ribosoma bacteriano. En azul se ha resaltado la hélice 44 con un aminoglicósido unido en la parte superior.¹¹ b) Estructura secundaria del sitio A.

En este contexto, el mecanismo de acción de los aminoglicósidos resulta sencillo de explicar. Diversos estudios estructurales han puesto de manifiesto que la asociación de un aminoglicósido al sitio A induce en éste un cambio conformacional similar al producido en presencia de un par codón-anticodón correcto (figura 1.3b), desplazando las adeninas A1492 y A1493 fuera de la hélice hacia el surco menor. Como es lógico, la estabilización de dicha conformación

afecta la monitorización de la geometría de la hélice codón-anticodón que se vuelve menos estricta. De este modo se reduce la fidelidad de la traducción, facilitándose la incorporación de aminoácidos incorrectos a la cadena polipeptídica creciente (figura 1.3d).^{11, 20, 22}

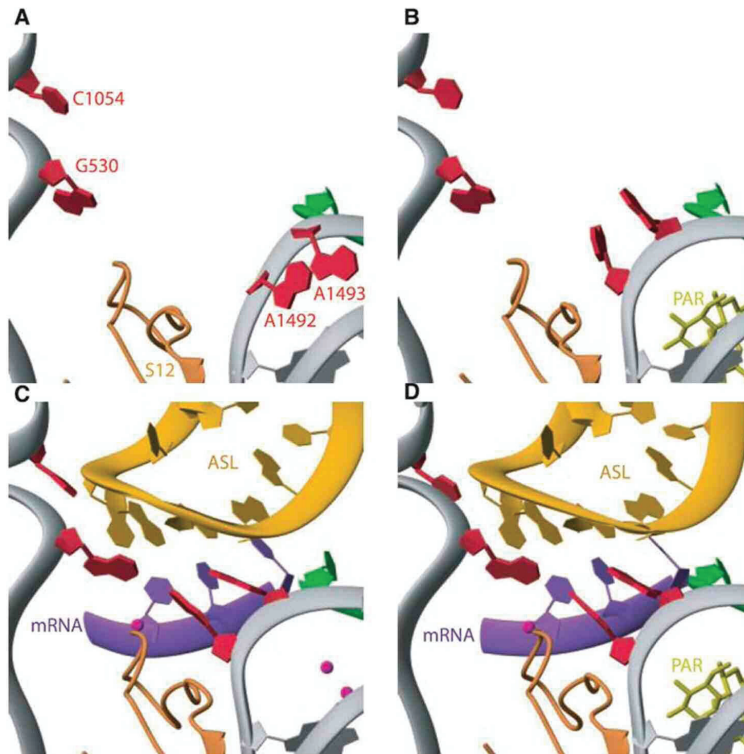


Figura 1.3. Diferentes estados conformacionales del sitio A.²⁰ ARNt (amarillo), codón del ARNm (morado), adeninas A1492 y A1493 (rosa). a) En ausencia de ARNm las adeninas A1492 y A1493 se encuentran hacia el interior de la hélice del sitio A. b) En presencia de paromomicina las adeninas A1492 y A1493 salen hacia fuera de la hélice. c) Cuando se une un aminoacil-ARNt cuyo anticodón es complementario al codón del mRNA las adeninas A1492 y A1493 salen hacia fuera de la hélice del sitio A para monitorizar la interacción. d) En presencia de paromomicina la estructura es similar a c).

Si bien la mayoría de los aminoglicósidos actúan reduciendo la fidelidad del proceso de traducción, este modo de acción no es, en ningún caso, el único, existiendo mecanismos de acción alternativos o simultáneos. Así, algunos aminoglicósidos como la apramicina son capaces de inhibir adicionalmente la translocación del ribosoma. En este caso la asociación, además de provocar el

cambio conformacional habitual en el sitio A, permite la interacción directa entre el antibiótico y la proteína S12 (figura 1.4). Dicha proteína está involucrada en el movimiento del ribosoma a lo largo del cadena de ARNm y sus contactos con el aminoglicósido interfieren en este proceso.²³

Finalmente, los aminoglicósidos también son capaces de impedir el reciclado ribosomal, es decir, la separación de sus dos subunidades para un nuevo ciclo de traducción. En condiciones normales el proceso es asistido por la proteína RRF (“ribosome recycling factor”) que se une al ribosoma y ayuda a separar ambas subunidades.^{21b} Sin embargo, para ello se requiere un cambio conformacional significativo en la hélice 69 de la subunidad 50S del ribosoma. La asociación de los aminoglicósidos al extremo 3’ de dicha hélice impiden que se produzca este cambio conformacional, bloqueando así el proceso.¹⁷

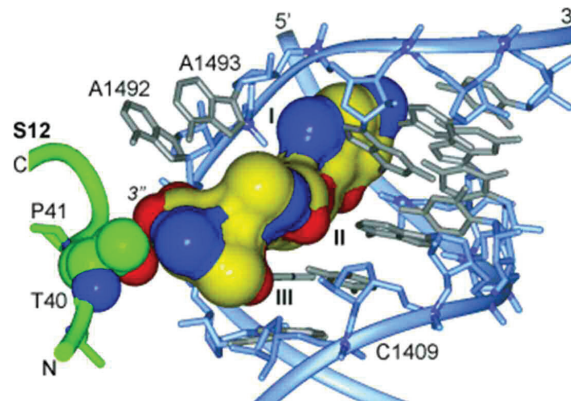


Figura 1.4. Estructura de la apramicina unida al sitio A.²³ Se puede observar la interacción con la proteína S12 y el desplazamiento de las adeninas A1492 y A1493 hacia fuera de la hélice.

1.1.3.2 Aplicaciones de los aminoglicósidos en el tratamiento de enfermedades genéticas: “miscoding” y supresión de PTCs

De acuerdo con estudios recientes, la capacidad de los aminoglicósidos de inducir errores en el proceso de traducción les confiere una actividad prometedora frente a determinadas enfermedades genéticas causadas por codones de terminación prematuros (PTC, “premature stop codon”). Dichos codones (UAA, UAG o UGA) son introducidos por las denominadas mutaciones sin sentido y provocan la conclusión prematura de la traducción, promoviendo, por

tanto, la producción de proteínas truncadas, no funcionales. Entre las enfermedades causadas por mutaciones sin sentido se encuentran la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne, la hemofilia A y B o el síndrome de Tay-Sachs.²⁴

Una de las primeras enfermedades estudiadas en este contexto fue la fibrosis quística, patología asociada a la producción defectuosa de la proteína CTFR. Diversos estudios *in vitro* demostraron que los aminoglicósidos eran capaces de restituir parcialmente la expresión de dicha proteína en forma funcional.²⁵ De un modo similar se han estudiado otras enfermedades tanto *in vitro* como *in vivo* y se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos que han mostrado una parcial restauración en la producción de proteínas implicadas en el origen de la patología.²⁶

Curiosamente, la eficacia de los aminoglicósidos en este proceso parece depender de la mutación concreta causante de la enfermedad. Ello es debido a que la eficiencia del proceso de terminación es dependiente del codón concreto que lo codifica, siendo UAA el codón más eficiente seguido de UAG y UGA. Adicionalmente, el nucleótido siguiente al codón de terminación (posición +4) también determina, en buena medida, el proceso. Como es lógico, la capacidad de los aminoglicósidos de suprimir la terminación en estos codones es inversamente proporcional a la eficacia de la terminación en su ausencia.²⁷

Es importante subrayar que, en este caso concreto, el origen de la acción terapéutica de los aminoglicósidos está en su interacción con el sitio A eucariota (en contraposición con la actividad antibiótica, que depende de la interacción del fármaco con el ribosoma bacteriano). Desafortunadamente, hasta la fecha no existen estudios estructurales de la interacción entre aquellos aminoglicósidos que inducen este proceso y el sitio A eucariota humano. Sin embargo, a partir del estudio del proceso de terminación y el conocimiento existente del mecanismo de acción de los aminoglicósidos en el ribosoma bacteriano se ha propuesto un posible mecanismo de acción. De acuerdo con él, estos ligandos se asociarían al ribosoma eucariota de un modo similar al previamente descrito para el ribosoma bacteriano, produciendo la incorporación de un aminoácido mediante un proceso de "miscoding".^{26b} Esta hipótesis es avalada por el hecho de que la unión de los aminoglicósidos al sitio A de *Leishmania* y al procariota son enteramente análogas²⁸ y provocan, en ambos casos, un desplazamiento similar de los residuos A1492 y A1493.

Por otra parte, es preciso mencionar que al unirse un ARNt portador de un codón de terminación al ribosoma el cambio conformacional que se produce es diferente al observado en los demás casos; solo la adenina A1492 sale hacia el exterior de la hélice mientras que la A1493 permanece en el interior.²⁹ De acuerdo con la hipótesis mecanística sugerida, el cambio conformacional promovido por los aminoglicósidos inhibiría la unión de los factores de terminación mediante impedimentos estéricos, ya que la salida de la adenina A1493 hacia fuera de la hélice produciría una colisión con el factor de terminación (figura 1.5b).^{26b}

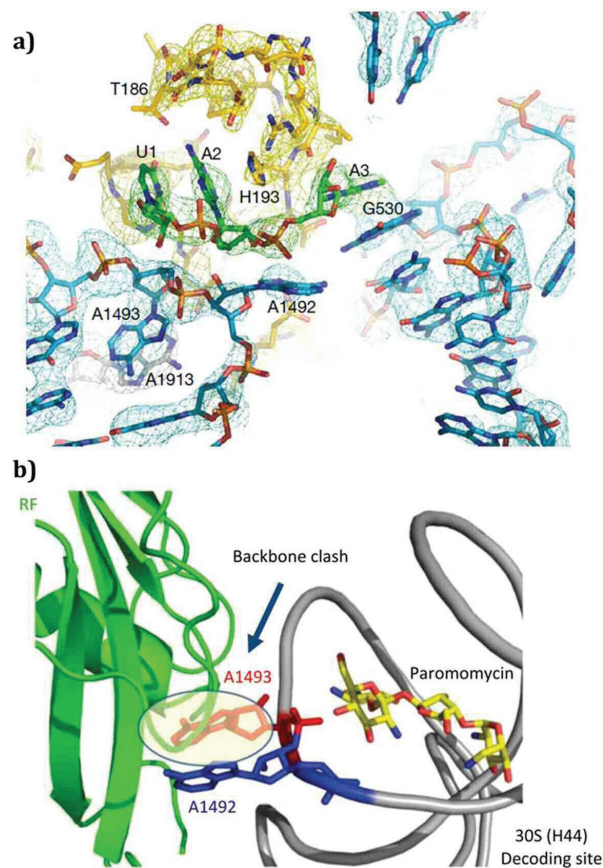


Figura 1.5. Estructura del ribosoma con un factor de terminación unido. a) Cambio conformacional producido en el sitio A al unirse un factor de terminación.²⁹ Se puede observar que solo la adenina A1492 sale hacia fuera de la hélice. b) Superposición del sitio A bacteriano con paromomicina y un factor de terminación unidos.^{26b} Puede apreciarse la colisión entre la adenina A1493 y el factor de terminación.

Curiosamente, a pesar de que los aminoglicósidos son capaces de suprimir las señales de terminación de los PTC, la terminación de la transcripción en los codones de terminación normales parece que no se ve afectada a las mismas dosis.³⁰ Esto podría deberse a que ambos tipos de codones operan a través de mecanismos diferentes. En eucariotas, el factor de terminación eRF3 interacciona con la proteína de unión a la cola poli-A (PABP) presente en el extremo 3' de los ARNm aumentando la eficiencia de la terminación de la traducción. Al parecer, este contacto es posible en un codón de terminación normal pero no en un PTC debido a su mayor distancia con respecto al fragmento terminal de poli-A.^{26a, 31}

Un factor importante a considerar en la aplicación clínica de estas moléculas como supresores de PTC es la posibilidad de que su administración incrementa la tasa de errores en la traducción, potenciando la introducción de aminoácidos aleatorios en las proteínas. Sin embargo, estudios en células eucariotas parecen indicar que a las concentraciones empleadas los aminoglicósidos inducen la incorporación de aminoácidos en codones PTC sin producir un efecto similar significativo en otros codones.³² En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que el beneficio causado por una restauración parcial de la expresión de la proteína cuyo defecto provoca la enfermedad podría compensar una reducción global en la fidelidad de la traducción.

1.2 INTERACCIÓN ARN-AMINOGLICÓSIDO

1.2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN: PROPIEDADES CONFORMACIONALES DEL LIGANDO Y RECEPTOR

Como es lógico, la estructura tridimensional de los aminoglicósidos resulta un factor determinante para su unión a ARN. En principio, se trata de estructuras oligosacáridicas y, por tanto, sus propiedades estructurales están en buena medida condicionadas por efectos estereoelectrónicos, polares y estéricos análogos a los descritos para otros glicósidos. Sin embargo, es preciso considerar que, adicionalmente, se trata de moléculas altamente cargadas a pH fisiológico, hecho que afecta en buena medida a su comportamiento en disolución. De hecho, estudios recientes realizados por nuestro grupo han demostrado que su carácter policatiónico les confiere propiedades relativamente inusuales. De acuerdo con ellos, el mayor potencial donador de enlaces de hidrógeno que caracteriza a las funciones NH_3^+ unido a la repulsión electrostática existente entre las mismas determina, en buena medida, la estructura tridimensional de estas moléculas,

permitiendo el acceso a regiones del espacio conformacional tradicionalmente consideradas como “de alta energía”. Entre ellas, llegan a incluirse orientaciones de los enlaces glicosídicos no compatibles con la operatividad del efecto exoanomérico. A modo de ejemplo, un estudio de la neomicina en disolución demuestra que se trata de un antibiótico altamente flexible, pudiendo observarse conformeros no-exo-anoméricos para la unión Rib- β (1-6)-2-deoxy-Strp. Curiosamente, en este caso concreto las transiciones conformacionales en torno al enlace glicosídico están fuertemente correlacionadas con la observadas en el anillo de ribosa (otra fuente tradicional de movilidad interna en aminoglicósidos, figura 1.6). Adicionalmente, los datos de RMN revelan una inusual movilidad en torno al enlace ψ para todas las uniones glicosídicas.³³

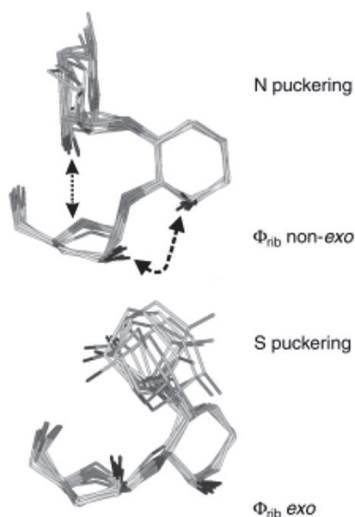


Figura 1.6. Imagen de dinámica molecular representando los movimientos de los anillos I, II y III de la neomicina.³³ Se puede observar que en función de la conformación del anillo de ribosa, el ángulo ϕ del enlace Rib- β (1-6)-2-deoxy-Strp adopta valores no-exo-anoméricos.

Otro rasgo diferencial de los aminoglicósidos es la mayor relevancia de las interacciones polares entre las diversas unidades. A modo de ejemplo, nuestro grupo ha estudiado recientemente las propiedades conformacionales de los antibióticos pertenecientes a la familia de la kanamicina. Los resultados obtenidos indican que el patrón de sustitución $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+/\text{OH}$ presente alrededor de los enlaces glicosídicos determina, en gran medida, la flexibilidad y conformación de estas moléculas. Curiosamente, se ha observado que ciertos sustituyentes aumentan considerablemente la proporción de geometrías anti- ψ ($\psi=180^\circ$), usualmente muy minoritarias en glicósidos neutros. Tal es el caso de la kanamicina A y la amikacina cuyo patrón de sustitución alrededor del enlace

entre las unidades I y II (ver notación en figura 1.7) es A) NH_3^+ , B) OH, C) OH y D) NH_3^+ .

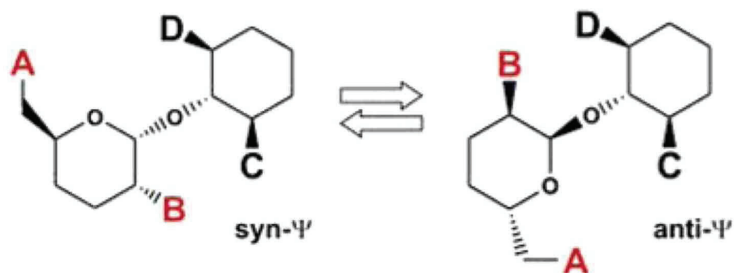


Figura 1.7. Representación esquemática de los anillos I y II en aminoglicósidos pertenecientes a la familia de la kanamicina.³⁴ A, B, C y D representan grupos $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+/\text{OH}$. Se puede observar la disposición relativa de dichos grupos en los conformeros *syn-ψ*/*anti-ψ*.

Para ambos antibióticos los datos de RMN son consistentes con hasta un 50% de conformaciones *anti-ψ* en medio ácido, fracción que disminuye de forma gradual al aumentar el pH. Este peculiar comportamiento conformacional tiene su origen en interacciones concretas entre unidades vecinas (I y II. Ver figura 1.1). Así, puede observarse como a pH ácido la conformación *syn-ψ* está desestabilizada por la repulsión electrostática existente entre los grupos amino 6-I y 3-II (ver notación en figura 1.1) mientras que la *anti-ψ* se ve fuertemente estabilizada por un puente de hidrógeno que involucra el hidroxilo en posición 2 la glucosa (2-I) y la función amonio situada en posición 3 del anillo de 2-deoxiestreptamina (3-II), como puede observarse en la figura 1.8. Como es lógico, la sustitución de dicha función hidroxilo (figura 1.8) por NH_3^+ (tobramicina vs kanamicina) se traduce en una drástica disminución de la proporción de *anti-ψ* (<10%), restituyéndose el comportamiento conformacional usual en glicósidos.³⁴

En definitiva, los estudios realizados hasta la fecha indican que los aminoglicósidos presentan estructuras altamente dinámicas, así como fuertemente condicionadas por interacciones de tipo polar y electrostático. Ambas características pueden, en principio, afectar de manera significativa a sus propiedades como ligando. En primer lugar, su elevada movilidad interna confiere a estas moléculas una extraordinaria capacidad de adaptar su forma a centros de reconocimiento de topologías diversas. Sin embargo, como aspecto negativo debe considerarse que, la asociación al ARN diana implica, en la mayoría

de los casos, una severa restricción de movilidad. A modo de ejemplo la figura 1.9 muestra la distribución conformacional existente para la neomicina B en el estado libre (deducida partir de datos de RMN) junto con la presente en el estado asociado al sitio A (deducida a partir de cálculos de dinámica molecular). Es de esperar que dicha pérdida de grados de libertad afecte al balance energético del proceso incrementando su coste entrópico.³³

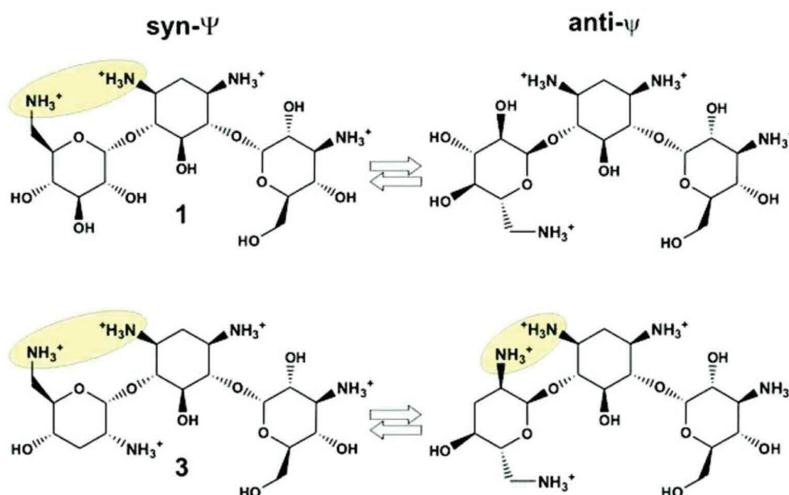


Figura 1.8. Principales repulsiones electrostáticas entre grupos de las unidades I y II presentes en la kanamicina A (parte superior) y la tobramicina (parte inferior) para los conformeros *syn-ψ* y *anti-ψ*.³⁴

Partiendo de esta idea, diversos grupos han intentado, en años recientes, incrementar la afinidad de los aminoglicósidos por sus dianas mediante la introducción de restricciones conformacionales concretas en su estructura.³⁵ Lamentablemente, todas las aproximaciones en este sentido han resultado, hasta la fecha, infructuosas. Ello es debido a diversos factores. Por un lado, la restricción conformacional se consigue mediante la unión covalente de funciones implicadas en la asociación al sitio A, lo cual debe implicar una penalización entálpica en el balance energético del proceso. Por otro lado, a partir de la información estructural disponible cabe suponer que un cierto grado de flexibilidad es, de hecho, esencial para la asociación.

Finalmente, otro rasgo distintivo de la unión de los aminoglicósidos a ARN es que, en buena parte de los casos, se trata de un proceso de ajuste inducido; es decir, el ligando y/o el receptor de ARN sufren cambios conformacionales

sustanciales como resultado de la asociación. Dicha propiedad supone una diferencia significativa con respecto al comportamiento habitualmente observado en glicósidos neutros (donde el modelo de “llave y cerradura” es habitual).

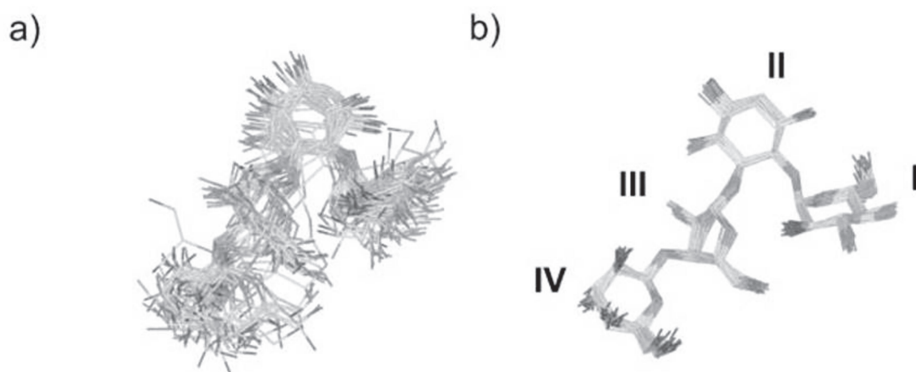


Figura 1.9. Representación de la neomicina B en estado libre (a) y unida al sitio A (b). Los cálculos predicen una rigidificación significativa del ligando como consecuencia de la unión a ARN que debe contribuir a la barrera entrópica del proceso.³³

En este contexto, es preciso considerar que, al igual que los aminoglicósidos, el propio receptor de ARN es, en la mayoría de los casos, una molécula altamente flexible y, por tanto, adaptable. Un ejemplo de esta adaptabilidad se recoge en un trabajo recientemente descrito por Blount et.al.^{35c} En él se demuestra que tanto la neomicina como un análogo conformacionalmente restringido de ésta se unen al mismo sitio de la secuencia TAR del VIH con afinidad similar. Dicho resultado resulta sorprendente dado que, teniendo en cuenta la estructura del receptor, la unión de la forma restringida del antibiótico no debería ser factible (ver figura 1.10). En conclusión, el ARN debe experimentar un ajuste conformacional significativo con un mínimo coste energético, lo cual demuestra su gran plasticidad. Además del ajuste inducido, algunos autores han sugerido que la selección conformacional por parte del ARN también juega un papel importante en el proceso de asociación ARN/aminoglicósido.³⁶ En contraposición con el ajuste inducido, este modelo implica la selección, por parte del receptor, de aquella conformación del ligando que presente las características geométricas adecuadas para la unión, de entre las diversas opciones presentes en disolución, y viceversa.

Finalmente, mecanismos de unión combinados de selección conformacional y ajuste inducido también han sido propuestos recientemente para la unión entre ARN y proteínas. De acuerdo con esta propuesta, en primer lugar se produciría una selección conformacional de ligando y en segundo lugar un ajuste inducido entre éste y el receptor.³⁷

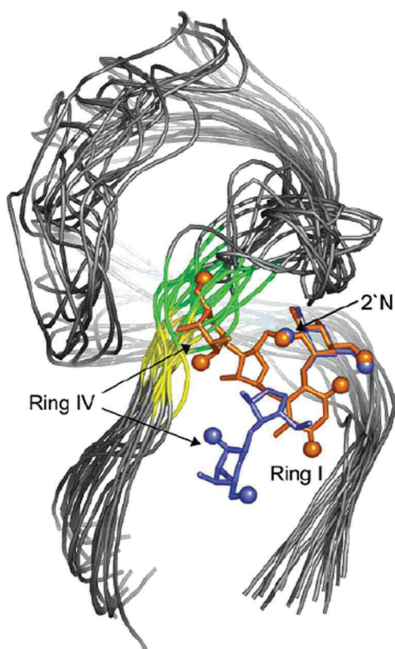


Figura 1.10. Representación de la neomicina (azul) en complejo con la secuencia TAR.^{35c} Puede deducirse que la asociación del análogo conformacionalmente restringido (representado en naranja) debe conllevar un ajuste conformacional del ARN significativo que evite el conflicto estérico resaltado en la figura.

1.2.2 ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN: FUERZAS DIRECTORAS Y TERMODINÁMICA DE LA ASOCIACIÓN

Como es lógico, la interacción dominante entre los aminoglicósidos y el ARN es de tipo electrostático e involucra los grupos amino de los aminoglicósidos (cargados positivamente a pH fisiológico) y los grupos fosfato del esqueleto del ARN.³⁸ Esta preponderancia de las interacciones electrostáticas confiere al proceso de asociación una marcada sensibilidad a factores tales como el pH del medio, la fuerza iónica o la concentración de iones Mg^{2+} . Además, determina una termodinámica de asociación compleja, modulada en buena medida por procesos de protonación/desprotonación acoplados.

Como se ha comentado previamente (ver sección 1.1.2), los valores de pKa de las funciones NH_2/NH_3^+ presentes en los aminoglicósidos varían entre 6.5 y 9.

Capítulo 1

Por lo tanto, diversas posiciones del ligando presentan un estado de protonación parcial en condiciones de pH fisiológico. Estudios de microcalorimetría llevados a cabo con diferentes secuencias de ARN demuestran que en entornos neutros y básicos la formación del complejo está acoplada a la protonación de varias funciones amino del ligando. Como es lógico, este proceso deja su impronta en los parámetros termodinámicos de asociación. Así, la protonación de un grupo amino es un proceso altamente exotérmico y en consecuencia la unión aminoglicósido/ARN presenta valores de entalpía negativos a pHs básicos parcialmente compensados por balances entrópicos desfavorables. A medida que se reduce el pH del medio se aprecia una disminución en el carácter exotérmico de la unión, hasta llegar a $\text{pH} < 5.5$. En estas condiciones, la formación del complejo no produce un cambio neto en el estado de protonación del ligando y el proceso pasa a estar dirigido por el término entrópico. Dicho balance entrópico favorable se ha atribuido comúnmente a la liberación de iones de Na^+ y moléculas de agua previamente unidas al ARN. Como es lógico, la disminución en el pH del medio se traduce igualmente en una reducción sustancial en la energía libre de asociación, que se vuelve así más favorable.^{12, 39} Todas estas observaciones subrayan la relevancia de las interacciones electrostáticas como fuerza directora de la asociación. De hecho, estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo (empleando una novedosa aproximación de RMN) han demostrado que incluso a valores de $\text{pH} > 9$ la unión de neomicina B a un aptámero de ARN implica una protonación total del antibiótico (es decir la transferencia de casi 6 protones del buffer al ligando).⁴⁰

Como es lógico, la afinidad también es dependiente de la fuerza iónica de la solución y muy especialmente de la presencia de iones magnesio. La primera de ambas propiedades puede atribuirse simplemente a la atenuación de interacciones coulombicas promovida por las sales.³⁹ Con respecto al magnesio, se ha demostrado que dicho ion presenta en algunos receptores de ARN sitios preferentes de interacción de los cuales serían desplazados por el ligando.⁴¹ Dicha competencia justificaría en el efecto diferencial del Mg^{2+} sobre la asociación.

A pesar de su enorme influencia sobre a la energía libre de asociación, las interacciones electrostáticas contribuyen, en general, poco a la especificidad del proceso. De hecho, uno de los problemas fundamentales de la asociación aminoglicósido/ARN es la limitada capacidad que estos ligandos tienen de discriminar entre secuencias o receptores alternativos. En general, dicha

capacidad recae casi en exclusiva sobre las interacciones de enlace de hidrógeno y los contactos CH/ π . Por lo que respecta a las primeras, estos ligandos son capaces de establecer un buen número de puentes de hidrógeno, tanto directos como mediados por moléculas de agua con sus dianas.^{14, 42} Adicionalmente, el apilamiento (“stacking”) de las bases nitrogenadas contra las caras de las unidades de piranosa o aminocitol constituye un motivo de reconocimiento relativamente común en complejos aminoglicósido/ARN. Dichas disposiciones están estabilizadas por un número variable de contactos CH/ π , y aunque resultan análogas a las ya descritas desde hace años en receptores proteicos de carbohidratos (lectinas, anticuerpos etc...), presentan, a su vez, diversas peculiaridades (ver sección 1.2.3).⁴³ Un buen ejemplo de estos contactos es proporcionado por los diversos complejos aminoglicósido/sitio A descritos hasta la fecha (ver sección 1.2.4.1).^{14, 42}

Dada la relevancia que los contactos CH/ π tienen en el reconocimiento molecular de aminoglicósidos y, teniendo en cuenta su papel protagonista en esta tesis doctoral, sus principales características se describen un poco más en detalle en el siguiente apartado.

1.2.3 INTERACCIONES CH/ π COMO ELEMENTO CLAVE EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE AMINOGLICÓSIDOS

Si bien los procesos de asociación de aminoglicósidos podrían legítimamente considerarse un ámbito idóneo para el estudio de interacciones electrostáticas, no debe minimizarse el papel desempeñado por otros contactos más débiles pero igualmente claves: los enlaces CH/ π . De un modo general, se denomina enlace CH/ π a la fuerza atractiva que surge entre una función CH polarizada y la nube π de un sistema aromático. Estos contactos juegan un papel fundamental en la asociación de glicósidos neutros a receptores proteicos, razón por la cual han sido objeto de extensos estudios durante los últimos 20 años.⁴⁴ Adicionalmente, es preciso mencionar que las interacciones CH/ π están presentes en un buen número de complejos de diversa naturaleza y, por lo tanto, tienen una relevancia general en campos diversos como la química biológica, la química médica o el desarrollo de nuevos materiales.

Desde una perspectiva fundamental, las interacciones CH/ π presentan un carácter dual, ya que en su establecimiento intervienen tanto fuerzas de carácter dispersivo como electrostático.^{44b, c} Los estudios teóricos realizados hasta la fecha

establecen que, en fase gaseosa, las fuerzas dispersivas son las principales responsables de la estabilización de estos complejos. Sin embargo, aunque su contribución es menor, las fuerzas electrostáticas también son importantes ya que proporcionan una cierta direccionalidad a la interacción.^{44b, d} Esta contribución podría, en principio, incrementarse mediante la incorporación de grupos electroattractores (como los halógenos) a las funciones CH que aumenten la polarización de las mismas. De hecho, cálculos “ab initio” en fase gaseosa han mostrado que enlaces CH polarizados por átomos de halógeno establecen interacciones más fuertes. Curiosamente, este efecto se ha atribuido a un incremento de las fuerzas dispersivas, dada la gran polarizabilidad de los átomos de halógeno, y no a un aumento de la contribución electrostática.^{44e}

En contraposición con esta evidencia teórica, la contribución de las fuerzas dispersivas y electrostáticas a las interacciones CH/ π en agua es difícil de predecir y, hasta la fecha, no hay estudios inequívocos que cuantifiquen su aportación relativa. Es preciso considerar, que en principio, ambas componentes pueden verse, en cierta medida, disminuidas por interacciones competitivas con el disolvente. A modo de ejemplo, un estudio reciente ha demostrado que las fuerzas dispersivas presentes entre cadenas alquílicas en disolución tienen un efecto mínimo sobre su asociación debido a la competencia del disolvente.⁴⁵ Sin embargo, es preciso mencionar que los resultados de este trabajo no son extrapolables a las interacciones CH/ π dada la diferente forma y polarizabilidad de las especies implicadas.

Por lo que respecta a las interacciones electrostáticas, sería, en principio, esperable una reducción significativa de las mismas en medios altamente polares, como el agua. Sin embargo, no hay hasta la fecha ningún estudio que demuestre su relevancia y permita cuantificar su aportación a la asociación.

Finalmente, cabe mencionar que diversos autores han planteado la existencia de una contribución solvofóbica significativa a la asociación CH/ π en medios fisiológicos.^{44b, c, f, 46} Dicha propuesta se apoya fundamentalmente en estudios experimentales que demuestran el efecto desestabilizador que los co-disolventes orgánicos tienen sobre la interacción. Sin embargo, interpretaciones alternativas atribuyen este fenómeno a interacciones CH/ π competitivas establecidas con el disolvente.^{44b, c}

En el ámbito concreto de los carbohidratos es preciso considerar que las

diversas unidades de piranosa pueden, dependiendo de su estereoquímica, exponer varios grupos CH en la misma cara del anillo. Estos forman así una superficie apolar capaz de interactuar con anillos aromáticos. De un modo general, este tipo de interacciones se conoce con el nombre de apilamiento (“stacking”) carbohidrato/aromático e involucra la formación simultánea de diversos enlaces CH/ π entre ambas entidades.

Desde un punto de vista estructural los complejos carbohidrato/aromático pueden presentar diversas geometrías. Así, las piranosas (o furanosas en menor medida) son capaces de interactuar tanto a través de su cara α como de su cara β , siendo el primer modo de interacción relativamente más frecuente. Una explicación sencilla a este comportamiento es que los complejos mediados por la cara β implican el establecimiento de un contacto n/ π entre el oxígeno endocíclico y el sistema aromático, cuyo efecto estabilizante pudiera ser inferior al de los enlaces CH/ π .^{44c} A pesar de todo, es preciso destacar que no hay hasta la fecha ningún estudio experimental que aborde los factores que determinan la selectividad facial en estos complejos (este aspecto concreto de la interacción será objeto de estudio en el capítulo 3). Se ha demostrado igualmente que funciones OH axiales expuestas en la cara de interacción son altamente desestabilizantes.^{44h, 47}

Adicionalmente, los contactos entre la unidad de piranosa y el sistema aromático pueden involucrar tres funciones CH axiales, o dos funciones axiales y una ecuatorial (situación típicamente observada en anillos de galactosa o manosa). Ambos modos de interacción implican disposiciones paralelas y no paralelas, respectivamente, entre las dos entidades. Si bien estas representan las geometrías más comúnmente observadas en complejos naturales, es preciso destacar que no constituyen los únicos modos posibles de interacción. De hecho, existen estudios donde se observa que el anillo de piranosa se desliza sobre el residuo aromático dando lugar a una gran variedad de orientaciones espaciales, lo que demuestra la gran versatilidad y el carácter dinámico de estas interacciones. Desde la perspectiva del reconocimiento molecular esta característica es clave. Es preciso considerar que la asociación de carbohidratos a receptores naturales (sean proteínas o ácidos nucleicos) está mediada por un buen número de interacciones polares. La tremenda plasticidad del apilamiento carbohidrato/aromático permite ajustar finamente la geometría del complejo con el objetivo de optimizar las diversas interacciones de enlace de hidrógeno.⁴⁸

Por lo que respecta al papel de los anillos aromáticos se ha observado que el tamaño es un factor importante, favoreciéndose la interacción al aumentar éste.^{44i, 49} Otro factor de importancia a considerar es su carácter rico o pobre en electrones. Así, se ha demostrado que un aumento de la densidad electrónica de la nube π de estos residuos incrementa la fuerza de la interacción. Por el contrario, la presencia de grupos electroattractores (que disminuyan su densidad electrónica) es desfavorable.⁴⁹⁻⁵⁰ Sin embargo, es preciso considerar que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se restringen a un número reducido de sistemas aromáticos, con especial énfasis en aquellos más comunes en receptores naturales. No existen, por lo tanto, estudios experimentales cuantitativos que consideren un conjunto suficientemente amplio y diversos de unidades aromáticas en el contexto de la interacción de apilamiento (este será, de hecho, uno de nuestros objetivos en el capítulo 3).

En el ámbito de los aminoglicósidos, las interacciones de apilamiento presentan tres rasgos diferenciadores con respecto a las observadas en otros ligandos. En primer lugar, involucran armazones altamente cargados. Curiosamente, estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que la presencia de grupos NH_3^+ tiene un efecto desfavorable para el establecimiento de interacciones CH/π (a pesar de su mayor efecto polarizador con respecto a los NH_2). Ello es debido a que la formación de los complejos de apilamiento implica una desolvatación parcial de los grupos cargados, lo cual tiene un coste energético significativo. Dependiendo de la topología del complejo, este coste puede atenuarse mediante interacciones de carácter polar de las funciones amonio con grupos del receptor. En cualquier caso, la participación de residuos aromáticos en el reconocimiento de ligandos altamente cargados como los aminoglicósidos impone requerimientos estrictos respecto a la geometría final del complejo. Por lo tanto, con independencia de su contribución final a la energía libre de asociación, los residuos aromáticos contribuyen a la especificidad del proceso.^{44g}

En principio, sería posible disminuir el coste asociado a la desolvatación de los grupos NH_3^+ , a la vez que se mantienen el efecto sobre las interacciones electrostáticas, mediante la N-metilación de los grupos amino.⁵¹ De hecho, esta constituye una posible estrategia en la estabilización de complejos aminoglicósido/ARN cuyo potencial y limitaciones aún no se ha explorado. No resulta sorprendente, por tanto, comprobar que las funciones N-alquilo son

relativamente frecuentes en aminoglicósidos naturales como la gentamicina. El efecto de la N-metilación sobre la asociación aminoglicósido/ARN será objeto de estudio en el capítulo 4.

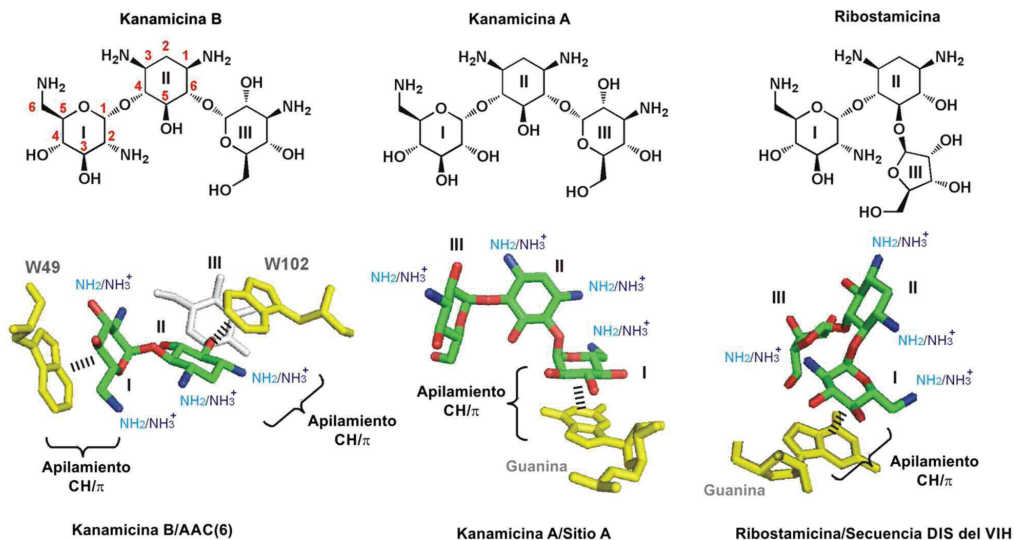


Figura 1.11. En la parte superior se muestra una representación esquemática de las estructuras de la kanamicina B, kanamicina A y ribostamicina. En la parte inferior se pueden observar los complejos CH/ π que respectivamente establecen con la enzima AAC(6'), el sitio A ribosomal y la secuencia viral DIS del VIH.^{44b} Se puede observar que los tres complejos involucran la cara β de los anillos de piranosa y en los complejos formados con secuencias de ARN (sitio A y secuencia DIS) participan anillos de guanina.

La segunda peculiaridad de las interacciones aminoglicósido/aromático es que, en la mayoría de los ejemplos descritos en la literatura, involucran la cara β de la piranosa (en contraposición a lo comúnmente observado en glicósidos neutros. Ver figura 1.11).^{14, 42, 52}

Finalmente, el apilamiento en ácidos nucleicos implica necesariamente la participación de sistemas heterocíclicos complejos (normalmente adenina o guanina. Ver figura 1.11) cuyo potencial como aceptores de enlaces CH/ π no ha sido estudiado hasta la fecha.

El esclarecimiento de varias de estas cuestiones constituye uno de los objetivos de la presente tesis doctoral y, por lo tanto, los enlaces CH/ π serán objeto de un estudio experimental detallado en el capítulo 3.

1.2.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS COMPLEJOS AMINOGLICÓSIDO/ARN

Los diversos estudios descritos hasta la fecha permiten sugerir la existencia de dos tipos generales de sitios de unión de aminoglicósidos en receptores de ARN:⁵³

- **Tipo I:** bucles internos (“internal loops”) como los presentes en el sitio A, el elemento RRE, la secuencia TAR o el dímero de la secuencia DIS (ver más abajo). En la mayoría de estos casos los aminoglicósidos ejercerían su actividad mediante la distorsión de la estructura tridimensional del ARN.
- **Tipo II:** sitios de unión de metales divalentes tales como los presentes en ribozimas. En este caso la asociación se produciría por el desplazamiento de cationes esenciales de la estructura de ARN.

A continuación se detallan algunos de los rasgos estructurales más significativos de los principales complejos aminoglicósido/ARN descritos hasta la fecha en la literatura.

1.2.4.1 Sitio A

A pesar de las diferencias estructurales de las distintas familias de aminoglicósidos, todos ellos interaccionan de forma similar con el sitio A.

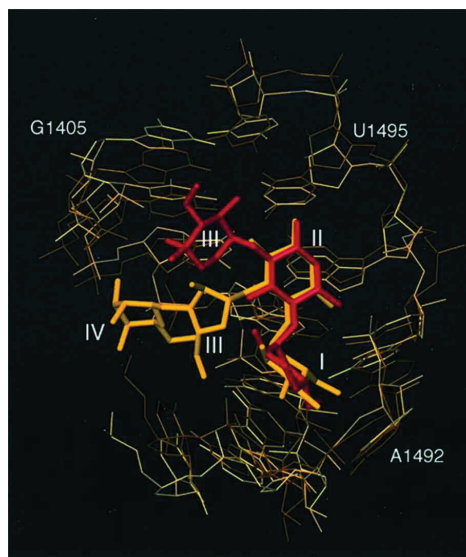


Figura 1.12. Comparación de los modos de unión al sitio A correspondientes a la paromomicina (4,5-disustituido) y la gentamicina (4,6-disustituido).¹⁰ Se puede observar cómo, en ambos casos, los anillos I y II adoptan una disposición idéntica en el complejo.

De un modo general, estos ligandos se unen al surco mayor del sitio A y los anillos I y II (ver numeración en figura 1.1) se insertan en su bucle interno. Los antibióticos pertenecientes a la familia de la 4,5-DOS, como la paromomicina, adoptan una disposición en forma de L en la que los anillos II, III y IV están en línea formando un ángulo aproximado de 90° con el anillo I. La geometría resultante permite a los anillos III y IV establecer contactos con el tallo inferior del sitio A.⁹ Por el contrario, los ligandos pertenecientes a la familia de la 4,6-DOS, como la kanamicina, presentan una disposición en línea de los anillos I, II y III de forma que el anillo III interacciona con el tallo superior del sitio A^{10, 54} (figura 1.12).

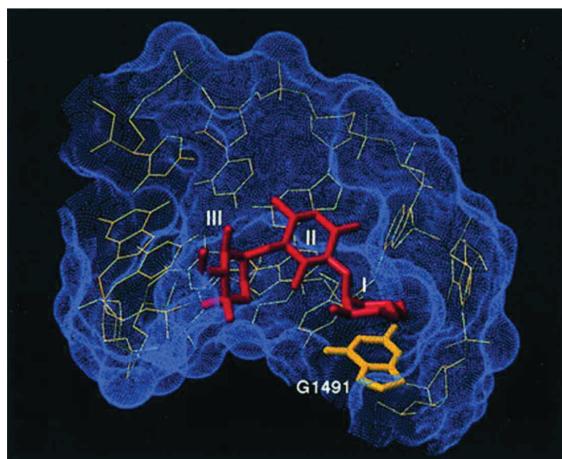


Figura 1.13. Representación del complejo gentamicina/sitio A.¹⁰ Se destaca la interacción de apilamiento entre el anillo I del antibiótico y el residuo G1491.

Se ha demostrado que los anillos I y II (fragmento común a las subfamilias 4,5-DOS y 4,6-DOS) establecen el grueso de las interacciones específicas de secuencia con el ARN y constituyen, por lo tanto, el motivo mínimo de unión al sitio A. Más concretamente, el anillo I se inserta en el bucle interno de la hélice, estableciendo una interacción de apilamiento CH/ π con la guanina G1491 (figura 1.13) y formando dos enlaces de hidrógeno con la adenina A1408. Resulta curioso comprobar como dicha disposición de la unidad de glucosamina (I) mimetiza perfectamente el papel normalmente desempeñado por una base nitrogenada convencional, tanto en lo referente al apilamiento como a su apareamiento con la unidad de A1408. La inserción del anillo I en el bucle interno provoca que los residuos A1492 y A1493 sean desplazados hacia el surco menor quedando expuestos fuera de la hélice. En estas circunstancias, el anillo I queda rodeado por los grupos fosfato de dichos residuos. La inevitable desolvatación parcial de ambos fosfatos es compensada mediante diversos puentes de

hidrógeno con el ligando, bien directos, bien mediados por moléculas de agua, dependiendo del antibiótico concreto. Por su parte, el anillo II interacciona con los pares U1406-U1495 y C1407-G1494 estableciendo, igualmente, puentes de hidrógeno tanto con átomos de las bases nitrogenadas como con los grupos fosfato del ARN. Este peculiar patrón de interacciones que abarca los residuos I y II del ligando es, tal y como se ha comentado con anterioridad, el principal determinante de la especificidad de unión.^{9-10, 14, 42, 54-55}

Por lo que respecta a los anillos III y IV de los antibióticos 4,5-disustituidos, éstos se extienden a lo largo del surco mayor de la doble hélice de ARN y establecen interacciones electrostáticas con los grupos fosfato del esqueleto, dirigiendo y ayudando a la correcta disposición de los anillos I y II. Si bien dichos contactos son importantes a la hora de potenciar afinidad de la unión, su contribución es relativamente independiente de la secuencia de bases siempre y cuando la estructura general del receptor en esta zona sea de doble hélice.^{9, 55} Estudios termodinámicos han demostrado que la unidad IV potencia la estabilidad del complejo entre 470 y 1500 veces, en función del pH (tal y como lo reflejan las afinidades relativas de la neomicina y la ribostamicina).^{39b}

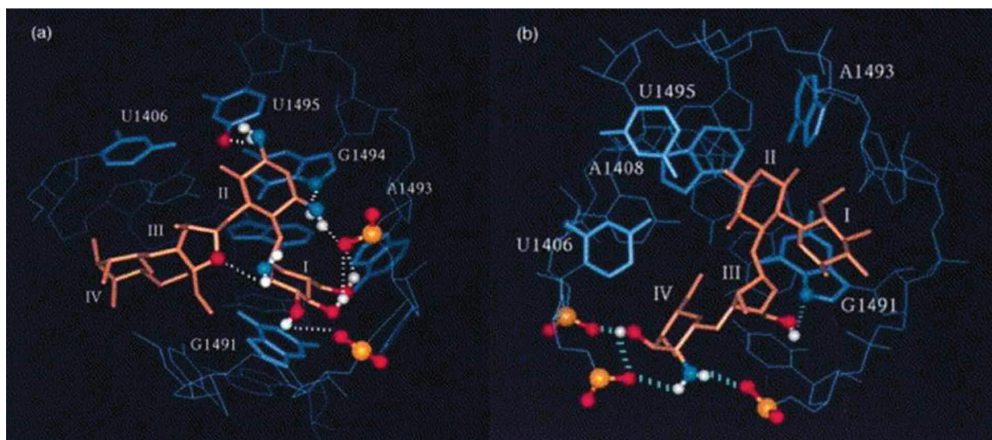


Figura 1.14. Representación del modo de unión de paromomicina al sitio A.⁵⁵ a) Interacciones de los anillos I y II con el receptor de ARN. Se observa la interacción de apilamiento del anillo I con la guanina G1491 así como las interacciones con los grupos fosfato de las adeninas A1492 y A1493. También se observan puentes de hidrógeno entre los grupos amino del anillo II y las bases nitrogenadas de los residuos U1495 y G1494. b) Interacciones de los anillos III y IV con el receptor de ARN. Se aprecian diversas interacciones de carácter electrostático con los grupos fosfato del esqueleto de la doble hélice.

En los antibióticos 4,6-disustituidos el anillo III interacciona con el tallo superior del sitio A estableciendo interacciones con los residuos G1405 y U1404 mediante puentes de hidrógeno. Estos contactos son específicos de secuencia, de forma que mutaciones en el residuo de G1405 o U1404 provocan una pérdida de afinidad por el antibiótico, dando origen a fenómenos de resistencia.^{10, 54}

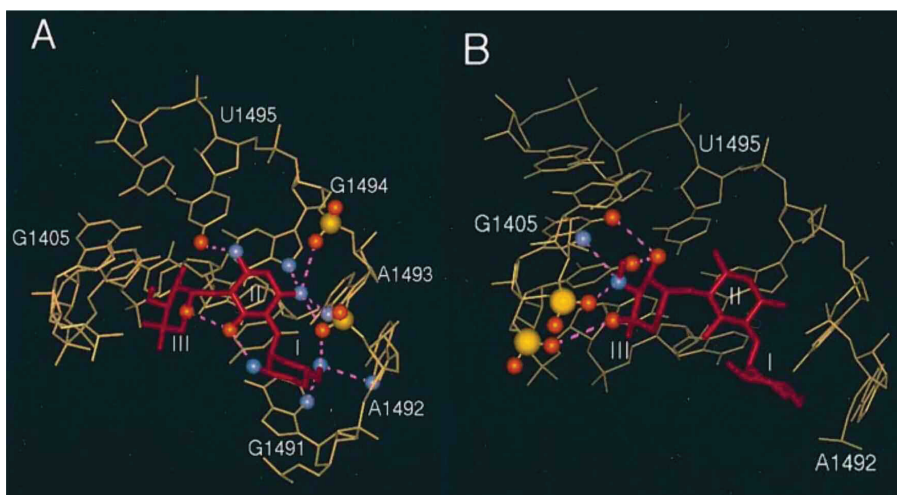


Figura 1.15. Representación del modo de unión de gentamicina al sitio A.¹⁰ a) Interacciones de los anillos I y II con el receptor de ARN. Se observa una interacción de apilamiento entre el anillo I del ligando y la guanina G1491 así como interacciones con los grupos fosfato de las adeninas A1492 y A1493. También se aprecian puentes de hidrógeno entre los grupos amino del anillo II y las bases nitrogenadas de los residuos U1495 y G1494. b) Interacciones del anillo III con el receptor de ARN. Se destacan los contactos con los residuos G1405 y U1404.

Finalmente, la existencia de un buen número de complejos cristalizados con buena resolución ha puesto de manifiesto el interesante papel que las moléculas de agua juegan en el proceso de asociación.^{14, 42} Así, se ha comprobado que todos los ligandos estudiados establecen un número de contactos similar con el ARN independientemente del número de anillos que posean. Ello es, en parte, debido a que las moléculas de agua rellenan los huecos existentes entre receptor y ligando, permitiendo interacciones indirectas entre ambos. A modo de ejemplo, la paromomicina establece un puente de hidrógeno directo con G1491 mientras que en la tobramicina un contacto equivalente es mediado por una molécula de agua asociada al núcleo de neamina.^{54, 56}

1.2.4.2 Dianas presentes en el VIH

Ciertos aminoglicósidos son capaces de unirse con alta afinidad a secuencias de ARN del genoma del virus VIH, tales como el elemento TAR (“trans-activation responsive element”),⁵⁷ la secuencia RRE (“Rev responsive element”)⁵⁸ o la secuencia DIS (“dimerization initiation site”).⁵⁹ Estas dianas juegan un papel clave en el ciclo replicativo del virus.

Así, tras la entrada en la célula y la posterior integración en su genoma, el provirus VIH actúa como un molde transcripcional y está regulado tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional por las proteínas Tat y Rev. Dichas proteínas establecen interacciones específicas de secuencia con distintos fragmentos del ARN viral. Más concretamente, la proteína Tat es un activador transcripcional que interacciona con la secuencia TAR localizada en el extremo 5' de los ARNm virales. Por su parte, la proteína Rev interviene en el procesado post-transcripcional al unirse a la secuencia RRE de los ARNm en el núcleo celular, permitiendo su exportación al citoplasma donde tiene lugar la traducción.⁶⁰ Finalmente, el VIH encapsula dos copias de su ARN genómico unidas por su extremo 5'. Ambas copias interaccionan mutuamente mediante la secuencia SL1 o DIS que contiene 6 nucleótidos autocomplementarios formando un dímero intermolecular (“kissing loop complex”) que más tarde generará un dúplex al interaccionar con proteínas de la nucleocápside.⁶¹

Interacción de aminoglicósidos con la secuencia TAR

El elemento TAR es una secuencia presente en el extremo 5' de los ARNm del VIH. Su estructura de tipo horquilla incluye un bucle interno formado por los nucleótidos UCU o UUU situado 4 pares de bases por debajo del bucle terminal. La proteína Tat se une al bucle interno a través de su surco mayor e interacciona con el tallo superior. Al unirse estimula la transcripción del genoma completo del virus mediante la prevención del desacoplamiento del complejo de transcripción del ADN viral.⁶²

La neomicina actúa como inhibidor no competitivo y es capaz de unirse al complejo Tat-TAR incrementando la tasa de disociación del mismo. Así, se ha demostrado que la interacción del aminoglicósido con el tallo menor del receptor promueve un cambio conformacional en el ARN que resulta incompatible con la unión del activador transcripcional.⁶³

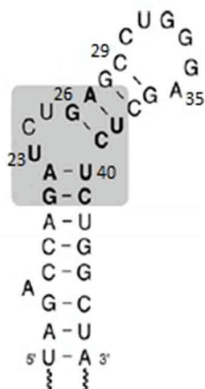


Figura 1.16. Representación de la secuencia TAR. Se destaca el sitio de unión de Tat en gris.⁶²

Más concretamente, la neomicina se inserta en el surco menor de TAR con los anillos I y II debajo del bucle interno. El anillo III, por su parte, se posiciona en el surco menor cerca de la guanina G21, mientras que el anillo IV contacta con los residuos A20 y G43. Como consecuencia, el surco menor se ensancha, con la consiguiente reducción del tamaño del surco mayor, donde se une la proteína Tat (figura 1.18). Las reducidas dimensiones del surco mayor, especialmente en el tallo inferior de la secuencia, provocan que el uracilo U23 y la guanina G26 tengan una orientación relativa a Tat diferente, por lo que el complejo se vuelve inestable y Tat se disocia del ARN.⁶⁴

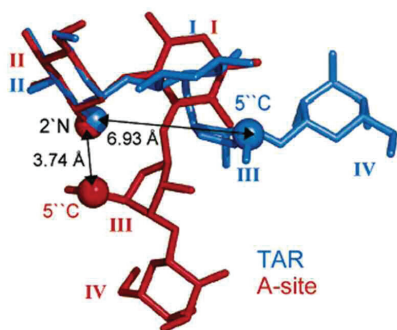


Figura 1.17. Superposición de la estructura de la neomicina unida a la secuencia TAR (azul) y al sitio A. (rojo).^{35c}

En contraste con el complejo neomicina/sitio A anteriormente descrito, en este caso el aminoglicósido adopta una conformación más extendida en el estado asociado, tal y como puede verse en la figura 1.17. Además, la secuencia TAR es más adaptable y, por tanto, menos selectiva. Dicha propiedad la capacita para interactuar con ligandos muy diversos con afinidades comparables, como demuestran diversos estudios recientes.^{35c, 65}

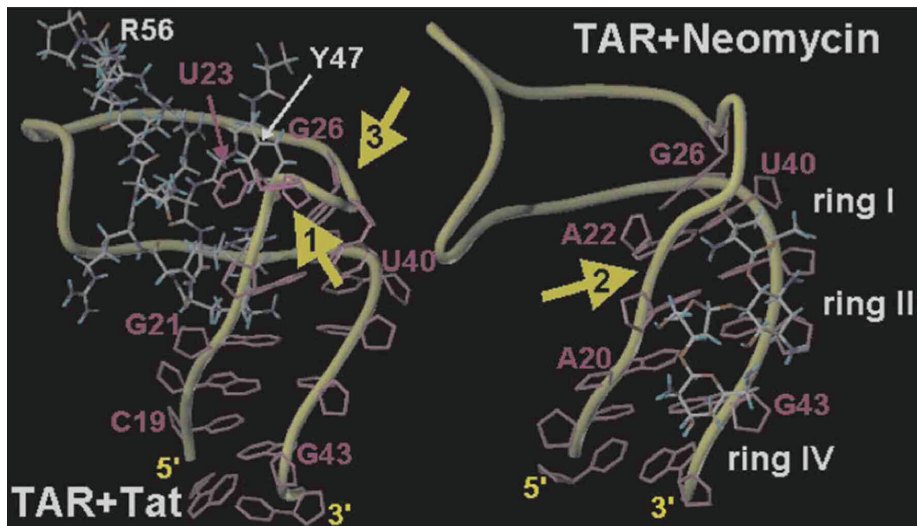


Figura 1.18. Comparación de los complejos Tat-TAR (izquierda) y neomicina-TAR (derecha).⁶⁴ Las flechas indican las diferencias estructurales entre los dos complejos. 1) En presencia de Tat el residuo de uridina U23 se introduce en el surco mayor mientras que en presencia de neomicina el esqueleto fosfatado de esta región se dobla hacia el surco menor formando el sitio de unión del antibiótico. 2) En presencia de neomicina el esqueleto de los residuos del bucle interno se dobla hacia el surco mayor provocando una reducción del tamaño de éste. 3) En presencia de Tat la parte superior del bucle interno (uridina U25) se dobla hacia el surco menor y la tirosina Y47 se introduce en la cavidad resultante. Por el contrario, en presencia de neomicina esta parte del bucle interno es desplazada hacia el surco mayor ocupando el sitio de unión de la tirosina Y47.

Interacción de aminoglicósidos con el elemento RRE

La secuencia RRE forma parte de todos los ARNm virales y adopta una estructura en horquilla que incluye un bucle interno formado por dos pares purina-purina (GG y GA) y una uridina (figura 1.19a). El modo de asociación de los aminoglicósidos a esta diana es, hoy por hoy, objeto de controversia. Así, diversos estudios parecen indicar que estos ligandos compiten con la proteína Rev por el bucle interno.^{58, 66}

Sin embargo, otros estudios realizados con modelos simplificados de la diana natural (figura 1.19b) muestran que la neomicina tiene varios sitios de unión en este elemento y que no todos estos procesos de asociación conducen a una inhibición en la unión de Rev. Más concretamente, los autores identifican un

modo de unión de la neomicina al tallo inferior del ARN caracterizado por una elevada afinidad. Si bien los detalles estructurales de la misma se desconocen, ésta implica posiblemente la inserción del ligando en el surco menor del ARN. Curiosamente, dicho complejo no interfiere con de la asociación de la proteína Rev. Adicionalmente, la neomicina parece ser capaz de unirse al lugar de interacción de Rev, el bucle interno, con menor afinidad, produciendo un efecto inhibitorio.⁶⁷ Lamentablemente, estos resultados pueden ser cuestionados ya que el truncado de la secuencia de ARN natural en una región tan próxima al sitio de asociación de la neomicina podría alterar dicha unión y afectar al mecanismo por el que la neomicina compite con la proteína Rev por RRE.⁶²

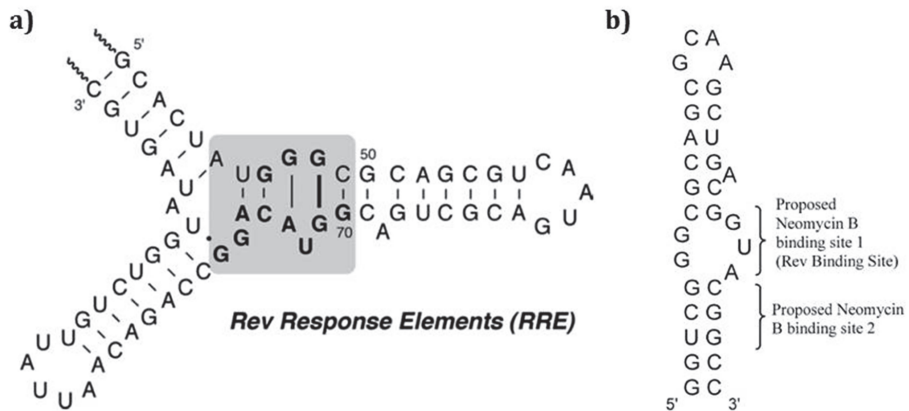


Figura 1.19. Representación de la secuencia RRE a) Secuencia RRE viral con el sitio de unión de la proteína Rev sombreado.⁶² b) Secuencia RRE simplificada, empleada en diversos estudios de unión a aminoglicósidos.^{68a}

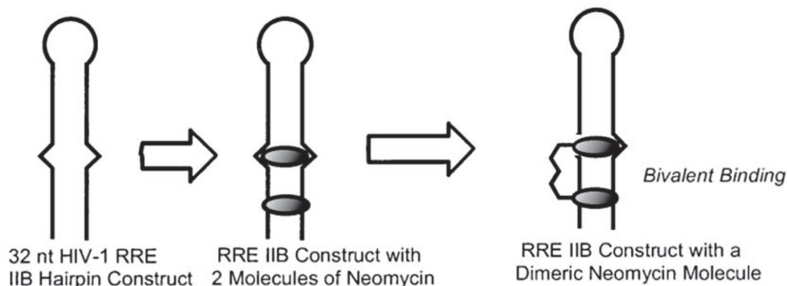


Figura 1.20. Modo de unión a la secuencia RRE propuesto para ligandos de neomicina diméricos.^{68a}

A pesar de ello, la posible existencia de diversos sitios de reconocimiento ha inspirado estrategias químico-médicas basadas en la síntesis de aminoglicósidos diméricos. Más concretamente, se han descrito ligandos diméricos de neomicina como potenciales fármacos antivirales (figura 1.20).⁶⁸ Adicionalmente, han sido estudiados dímeros de aminoglicósidos y agentes intercalantes^{68b} y aminoglicósidos modificados con grupos guanidinio.⁶⁹

Interacción de aminoglicósidos con la secuencia DIS

La secuencia DIS se localiza en el extremo 5' del ARN genómico del virus. Este fragmento de ARN forma una horquilla con un bucle interno y es altamente parecido al sitio A bacteriano tanto a nivel de secuencia (figura 1.21) como a nivel estructural (figura 1.22).⁵⁹

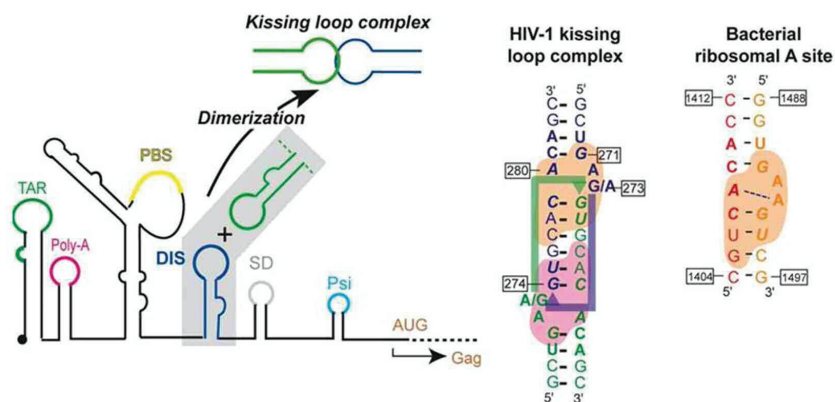


Figura 1.21. A la izquierda se muestra la localización de la secuencia DIS en el extremo 5' del ARN genómico viral. A la derecha se muestran las secuencias del complejo "kissing loop" y del sitio A bacteriano, entre las que existe una gran similitud.^{70a}

El VIH empaqueta en su partícula viral dos copias de su genoma que forman un dímero cuyo punto de unión coincide con la secuencia DIS. Estudios de interacción entre este complejo y aminoglicósidos de la familia de la neomicina han demostrado que cada dímero une dos moléculas de antibiótico, con modos de unión casi idénticos a los observados en el sitio A (figura 1.23). Así, cada ligando se sitúa en la interfaz entre las dos hebras de ARN interaccionando con el bucle interno y el surco mayor de la hélice. Los anillos I, II y el III están implicados en el reconocimiento específico de la secuencia mediante contactos directos o mediados por moléculas de agua. Asimismo, puede observarse una interacción de

apilamiento entre el anillo I y el residuo G271. Adicionalmente, la unión del anillo II provoca el desplazamiento de un átomo de Mg^{2+} que, en ausencia del aminoglicósido, se sitúa en el centro de la secuencia DIS.⁷⁰ Diversos estudios han demostrado el papel fundamental de este átomo de magnesio para que se produzca una dimerización eficiente.^{61b, 71} Por su parte, los anillos I, III y IV interactúan principalmente con la misma hebra de ARN mientras que la unidad II lo hace con la opuesta (figura 1.23).⁷⁰

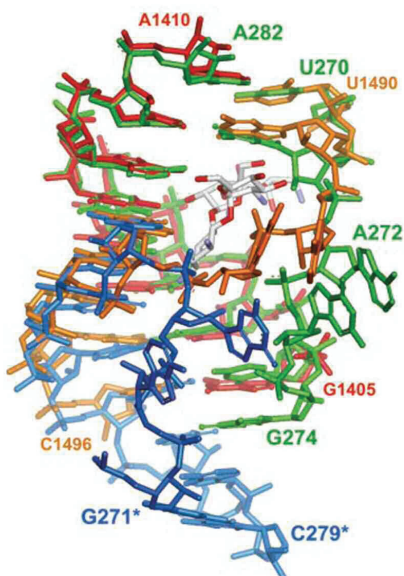


Figura 1.22. Superposición de las estructuras del sitio A con paromomicina unida (rojo y naranja) y el complejo “kissing loop” (azul y verde).⁵⁹ Se puede apreciar una gran similitud estructural.

El dímero, una vez formado, interactúa con proteínas constituyentes de la nucleocápside del virus para su empaquetamiento, evolucionando posteriormente hacia una estructura en forma de dúplex.^{61b, 72} Curiosamente, los aminoglicósidos son capaces de unirse a este dúplex de forma similar, con los anillos I, II y III involucrados en interacciones específicas de secuencia. Sin embargo, en este caso el número total de contactos ligando/receptor establecidos es menor que las observadas en el dímero.^{52a}

1.2.4.3 Ribozimas

Los aminoglicósidos también son capaces de unirse a ribozimas e inhibir su actividad. Entre los ejemplos descritos se incluyen la ribozima hammerhead, la RNAsa P, los intrones del grupo I, la ribozima hairpin y las ribozimas del virus

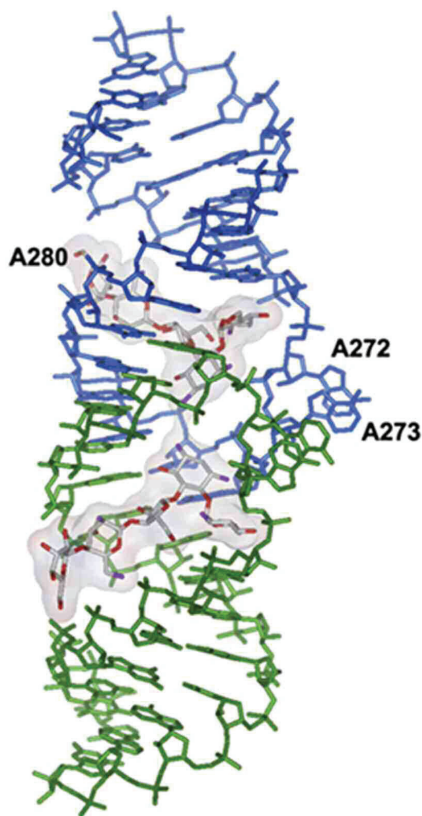


Figura 1.23. Estructura del dímero de fragmentos DIS con dos moléculas de lividomicina unidas.^{70b}

causante de la hepatitis D. En todos los casos las interacciones electrostáticas constituyen la principal fuerza conductora de la unión.

Ribozima Hammerhead

La ribozima hammerhead es una pequeña molécula de ARN que se encuentra en diversos viroides y ARNs satélite de virus vegetales y cataliza reacciones de auto-escisión.⁷³ Se ha demostrado que varios aminoglicósidos de la familia de la neomicina, como la neomicina B y la paromomicina, son capaces de unirse a esta ribozima e inhibir su actividad catalítica.⁷⁴ La unión tiene un marcado carácter electrostático y la molécula de antibiótico parece competir con cationes Mg^{2+} esenciales para la catálisis. De acuerdo con esto, un aumento en la concentración de Mg^{2+} produce una disminución de las propiedades inhibitorias de los aminoglicósidos. De un modo similar, la actividad inhibitoria del ligando se reduce al aumentar el pH. Finalmente, se ha observado que aquellos ligandos con un mayor número de grupos amino son mejores inhibidores.⁷⁵ Todos estos

resultados parecen subrayar que la carga de estas moléculas constituye un elemento esencial para su actividad.

Estudios estructurales han demostrado, sin embargo, que tan importante como el número de cargas positivas es su disposición tridimensional; ésta debe ser similar a la de los cationes Mg^{2+} presentes la estructura de la ribozima y que son desplazados como consecuencia del proceso de asociación. (Figura 1.24).^{41, 76}

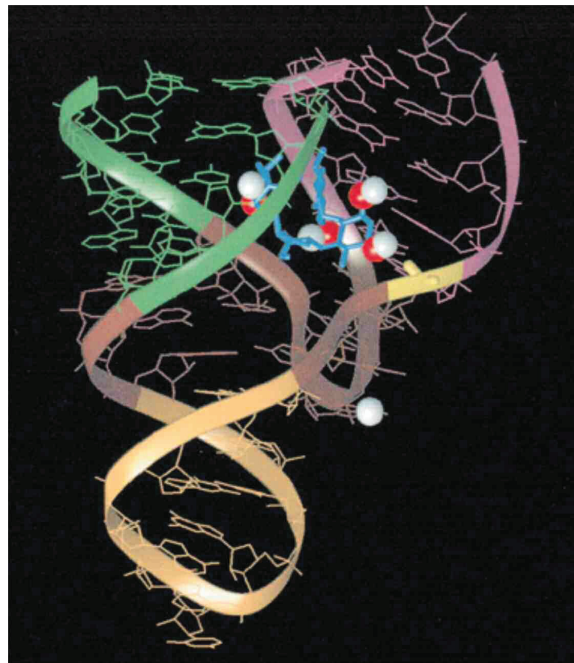


Figura 1.24. Estructura de la ribozima hammerhead con neomicina unida.⁴¹ Las esferas blancas representan los átomos de Mg^{2+} y las rojas los grupos amino de la neomicina coincidentes con átomos de Mg^{2+} . Se puede observar que cuatro de los cinco grupos amino de la neomicina están situados en lugares de unión de Mg^{2+} .

RNasa P

La ribonucleasa P es una endo-ribonucleasa implicada en la maduración del extremo 5' de los ARNt y para su actividad es necesaria la presencia de iones Mg^{2+} .⁷⁷ La unión de aminoglicósidos interfiere con su función y (al igual que en el caso de la unión a la ribozima hammerhead) la inhibición se produce por un

desplazamiento de átomos de Mg^{2+} esenciales. Nuevamente, las cargas positivas presentes en la molécula de antibiótico constituyen un elemento clave para la actividad inhibitoria como lo demuestra la disminución del efecto inhibitorio al aumentar la concentración de Mg^{2+} en el buffer de reacción o el pH.⁷⁸

Otras ribozimas

Los aminoglicósidos también son capaces de unirse a intrones del grupo I (inhibiendo su capacidad de auto-escisión),⁷⁹ a la ribozima del virus de la hepatitis D (implicada en el procesamiento del genoma del virus durante su replicación)⁸⁰ y a la ribozima hairpin presente en viroides y ARNs satélites del virus vegetales.⁸¹

Al igual que en los casos anteriores, la actividad inhibitoria de los aminoglicósidos tiene su origen en el desplazamiento de cationes Mg^{2+} esenciales para las ribozimas y el efecto es dependiente del pH.⁸⁰⁻⁸²

1.3 PROBLEMAS ASOCIADOS A LOS AMINOGLICÓSIDOS

1.3.1 APARICIÓN DE FENÓMENOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

Un problema de especial importancia en la aplicación clínica de esta familia de antibióticos es la aparición de fenómenos de resistencia bacteriana. Esta puede tener su origen en tres mecanismos diferentes:

- **Disminución de la concentración intracelular del antibiótico:** esta puede deberse a una menor eficacia en la entrada del antibiótico a la célula.⁸³ Alternativamente, algunos microorganismos resistentes sobreexpresan bombas capaces de expulsar activamente al aminoglicósido.⁸⁴
- **Modificación del sitio A bacteriano:** mediante metilación de bases implicadas en la unión⁸⁵ o bien mediante mutaciones que disminuyen la afinidad de los aminoglicósidos.⁸⁶
- **Modificación enzimática de los aminoglicósidos:** esta es la estrategia de defensa bacteriana más comúnmente observada. Existen tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglicósidos: nucleotidil transferasas, fosfotransferasas o acetiltransferasas.⁸⁷ Todas ellas modifican posiciones del antibiótico clave para la actividad biológica, reduciendo así su toxicidad para la bacteria.

1.3.2 TOXICIDAD

Otro de los problemas que ha limitado tradicionalmente la aplicación terapéutica de los aminoglicósidos es la elevada toxicidad de los mismos. Los principales efectos secundarios asociados al uso de aminoglicósidos son su nefrotoxicidad y su ototoxicidad.

- **Nefrotoxicidad:** se ha observado una acumulación de los aminoglicósidos en los riñones donde pueden ser endocitados por células renales. Dentro de las células se unen a las membranas lipídicas debido a su carácter policationico e inhiben la actividad fosfolipasa lisosomal. También pueden actuar sobre el ribosoma mitocondrial induciendo apoptosis.⁸⁸
- **Ototoxicidad:** la ototoxicidad de los aminoglicósidos se debe principalmente a la destrucción de células sensoriales del oído interno de forma dosis-dependiente tanto en la población general como en personas con susceptibilidad genética. Estudios recientes parecen indicar que este efecto adverso tiene su origen en la acción de los aminoglicósidos sobre el proceso de traducción mitocondrial.⁸⁹

1.4 MODIFICACIONES SINTÉTICAS EN AMINOGLICÓSIDOS

Desafortunadamente, la aparición de resistencias bacterianas así como la inherente toxicidad de estas moléculas ha limitado seriamente su aplicación clínica. Como consecuencia, el desarrollo de nuevos derivados de aminoglicósidos que posean una menor toxicidad así como una mayor actividad en cepas resistentes constituye un campo de estudio de gran interés.

1.4.1 MODIFICACIONES ORIENTADAS A VENCER LA RESISTENCIA BACTERIANA

El avance en el conocimiento de las estructuras de los aminoglicósidos unidos a diversas dianas de ARN así como a enzimas de resistencia ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas para evitar la inactivación enzimática. Un claro ejemplo es el desarrollo de análogos conformacionalmente restringidos de neomicina llevado a cabo por nuestro grupo de investigación. Este trabajo tiene como punto de partida una sencilla observación experimental: la estructura de la kanamicina A en complejo con la proteína ANT(4') (de acuerdo con datos cristalográficos)⁹⁰ es marcadamente diferente a la observada en el

complejo cristalográfico con el sitio A. Dicha evidencia experimental condujo al desarrollo de derivados de neomicina B conformacionalmente restringidos, capaces de mantener su unión al sitio A. Ensayos de inactivación demostraron que estos compuestos eran peores sustratos del enzima mostrando en casos extremos una total insensibilidad a la misma.^{35b, d}

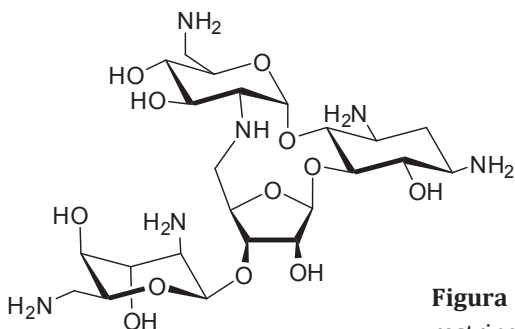


Figura 1.25. Análogo conformacionalmente restringido de neomicina B.^{35b, d}

Otra aproximación sencilla se basa en la eliminación de aquellos grupos que son modificados por las enzimas, lo cual es posible siempre y cuando estos no sean esenciales para su interacción con el ARN ribosomal. Un ejemplo de esta estrategia se encuentra en el desarrollo de derivados dideoxigenados en las posiciones 3 y 4 del anillo I con el objetivo de evitar la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la posición 3' por la enzima APH(3'). Esta estrategia ha dado lugar a antibióticos como la dibekacina.⁹¹

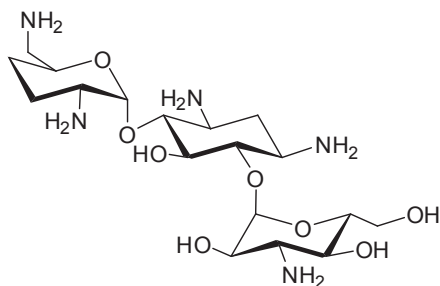


Figura 1.26. 3',4'-dideoxikanamicina B (dibekacina)

De un modo similar, la incorporación de diferentes sustituyenes a la posición N1 del anillo II es una de las modificaciones más empleadas. Ejemplos de este tipo de aproximación se pueden encontrar tanto en derivados de kanamicina⁹² (tales como la amikacina) como de neomicina.⁹³

Una estrategia novedosa para prevenir la inactivación enzimática ha sido descrita por Mobashery y col. En concreto, los autores de este trabajo sintetizaron un derivado de kanamina A en el cual el hidroxilo 3-I fue sustituido por un grupo carbonilo. Como se puede observar en la figura 1.27, en disolución la cetona está en equilibrio con su variante hidratada de forma que puede ser modificada por la enzima APH(3') mediante la fosforilación del hidroxilo ecuatorial. Sin embargo, esta especie es inestable y sufre la eliminación espontánea del grupo fosfato para regenerar el compuesto de partida.⁹⁴ Otra aproximación desarrollada por este grupo de investigación para prevenir la inactivación del antibiótico por la misma enzima consiste en la disminución de la nucleofilia del hidroxilo 3-I. Así, se ha observado que derivados que contienen átomos de fluor en la posición 4-I son peores sustratos de la enzima APH(3').⁹⁵

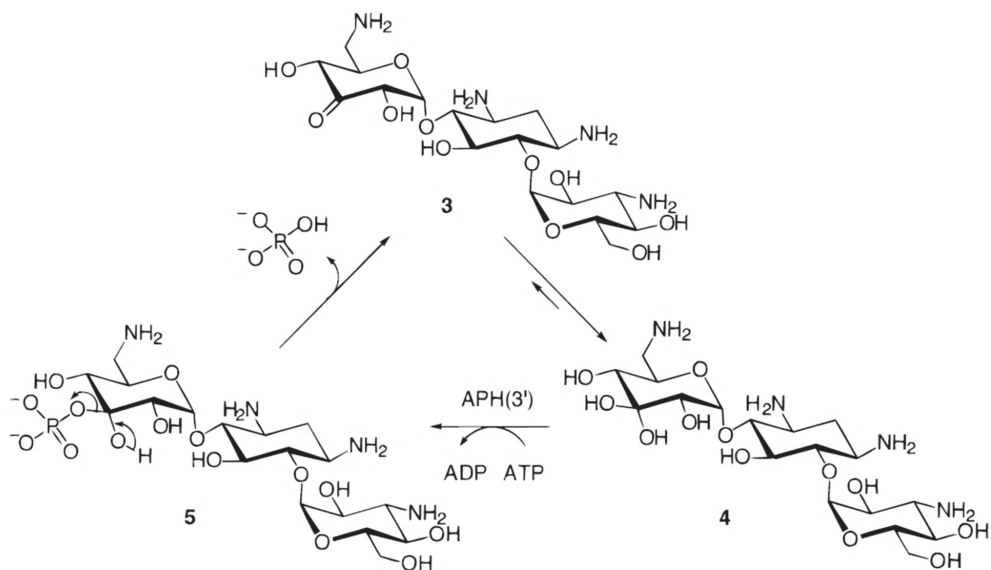


Figura 1.27. Representación esquemática del proceso de auto-regeneración de la cetona-kanamicina A (descrita por Mobashery y col.) tras su modificación por la enzima APH(3').⁹⁴

Un tercer estudio descrito por el grupo de investigación de Mobashery ha demostrado la importancia que las interacciones electrostáticas tienen en la unión de los aminoglicósidos a las enzimas de resistencia.⁹⁶ Más concretamente, mediante estudios de reactividad los autores ponen de manifiesto que derivados de neamina y kanamicina A a los que se les ha eliminado algún grupo amino son peores sustratos de la enzima APH(3').

En un trabajo reciente, nuestro grupo de investigación también ha evaluado la importancia de las interacciones electrostáticas en la unión de aminoglicósidos a la enzima ANT(4'). Más concretamente, se ha demostrado que la distribución espacial de cargas alrededor de los anillos I y II (ver figura 1.1) determina el modo de unión de estas moléculas al centro catalítico de la enzima y, con ello, la regioselectividad de la reacción de adenilación. Así, la presencia de grupos amino en las posiciones 2 y 6 del anillo I promueven la modificación del OH en posición 4 por la enzima, lo que conlleva a la inactivación del antibiótico. Sin embargo, dichos grupos amino no parecen ser esenciales para la unión con el sitio A. De hecho, existen aminoglicósidos naturales, como la paromomicina o la kanamicina A, que no contienen grupos amino en la posición 6 o en la 2 del anillo I, respectivamente. Considerando esto, derivados con patrones de aminación modificados podrían presentar una menor susceptibilidad a la inactivación enzimática por ANT(4').⁹⁷

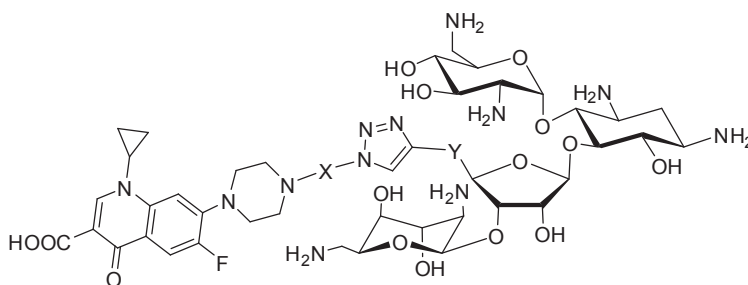


Figura 1.28 .Híbridos ciprofloxacina-neomicina B.

Finalmente, diversos autores han explorado la forma de superar los procesos de resistencia bacteriana mediante la síntesis de estructuras que integren dos principios activos dotados de mecanismos de acción diferentes. A modo de ejemplo, en el campo de los aminoglicósidos se han sintetizado conjugados con fluoroquinolonas. Así, la unión de ciprofloxacina a neomicina B mediante una unidad de 1,2,3-triazol ha permitido obtener compuestos efectivos frente a bacterias tanto gram positivas como negativas. Estudios de actividad indican que estos derivados poseen un modo de acción dual, siendo capaces de inhibir tanto la traducción bacteriana como la acción de las ADN girasas y la topoisomerasa IV. Además, se ha observado que la aparición de resistencias bacterianas se produce más tarde en comparación de los compuestos de partida por separado o en mezclas de ambos 1:1.⁹⁸

1.4.2 MODIFICACIONES ORIENTADAS A AUMENTAR LA AFINIDAD O SELECTIVIDAD: HÍBRIDOS, DÍMEROS Y CONJUGADOS

De un modo general, la estrategia más sencilla para aumentar la afinidad del ligando por sus dianas de ARN consiste en maximizar el número de posibles contactos entre ambos. Con este objetivo se han propuesto en años recientes diversas modificaciones sintéticas.

Un ejemplo de esta aproximación ha sido descrito por Hanessian y col.⁹⁹ Más concretamente, los autores sintetizaron diversos análogos de tobramicina mediante la introducción de sustituyentes cargados en la posición 5 del anillo II. La elección de este hidroxilo como punto de anclaje tiene como objetivo que el sustituyente introducido mimetice los anillos III y IV presentes en la neomicina, dando lugar a moléculas híbridas de las dos grandes familias de aminoglicósidos (4,5-DOS y 4,6-DOS. Ver apartado 1.1.2).

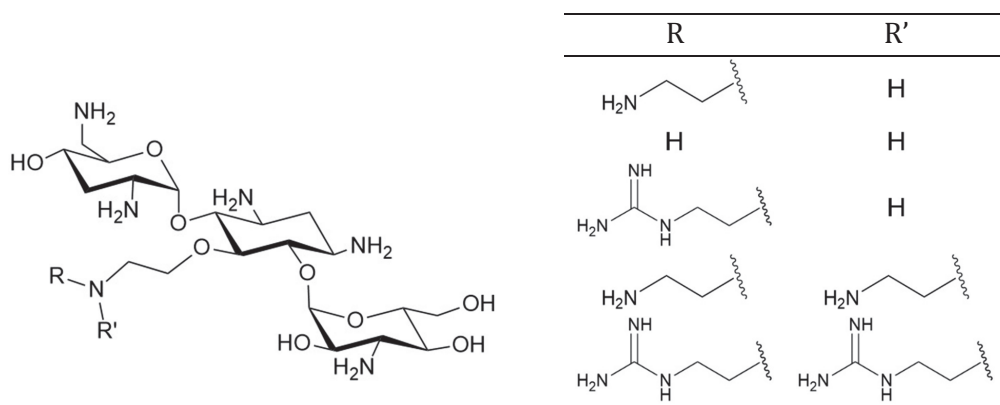


Figura 1.29. Análogos de tobramicina sintetizados por Hanessian y col.⁹⁹

Una estrategia similar ha sido utilizada por nuestro grupo de investigación para obtener híbridos kanamicina/neomicina, con el objetivo de mejorar la afinidad y especificidad por el receptor bacteriano.¹⁰⁰ Estos ligandos combinan en una única estructura los anillos III presentes en ribostamicina y kanamicina, permitiendo, de este modo, el establecimiento de contactos simultáneos con el tallo superior e inferior del sitio A

De un modo similar, la introducción de anillos adicionales también ha llevado a la preparación de nuevos derivados de neomicina B.¹⁰¹ Así, el grupo del

profesor Baasov sintetizó pentasacáridos mediante la introducción de un monosacárido adicional en la posición 5 del anillo III de la neomicina B.

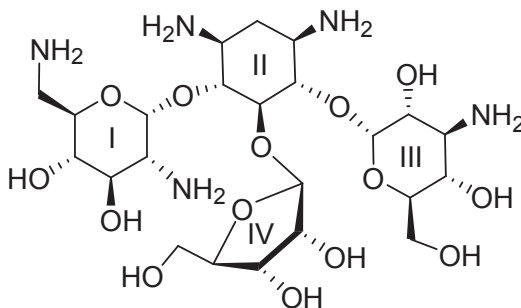


Figura 1.30. Híbrido kanamicina/neomicina sintetizado por nuestro grupo de investigación.¹⁰⁰

La creación de estructuras dimericas formadas por aminoglicósidos es otra de las estrategias exploradas por diversos autores para aumentar la afinidad de estos ligandos por sus dianas de ARN. Así, para su creación se han usado espaciadores de diferentes dimensiones y naturaleza.

Un ejemplo de esta aproximación ha sido proporcionado por Wong y colaboradores. Más concretamente, los investigadores sintetizaron diversos dímeros de neamina, empleando para su unión cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud. Los resultados obtenidos indican que aquellos dímeros que poseen una mayor flexibilidad tienen mejor actividad antibiótica, además de ser resistentes a la modificación por las enzimas AAC(6') y APH(3'). Otro resultado interesante de este estudio es que algunos de estos ligandos son capaces de inhibir la actividad de la enzima APH(2'') del dímero AAC(6')-APH(2'').¹⁰²

Adicionalmente, se han descrito heterodímeros formados por unidades de neomicina B y tobramicina unidos mediante cadenas que contienen un anillo de naftalendiimida.¹⁰³

Finalmente, esta táctica ha llevado al diseño de ligandos de diversas dianas presentes en el genoma del VIH. Así, se han sintetizado dímeros de neamina que se unen a la secuencia DIS¹⁰⁴ y a la secuencia TAR inhibiendo la unión TAR-Tat en concentraciones submicromolares.¹⁰⁵ De un modo similar, se han descrito dímeros neomicina-neomicina, tobramicina-tobramicina y neomicina-

tobramicina capaces de reconocer la secuencia RRE con una afinidad mayor que la del aminoglicósido natural.^{68a}

La conjugación de aminoglicósidos con moléculas de diferente naturaleza es otra estrategia común en el desarrollo de nuevos derivados.

Un ejemplo de dicha aproximación ha sido proporcionado por Blount et al. en un trabajo reciente. En él, los investigadores sintetizaron diversos conjugados nucleobase/aminoglicósido, empleando tanto paromomicina como neomicina, con el objetivo de incrementar la afinidad y selectividad de los ligandos por el sitio A. La evaluación de las propiedades de asociación de los nuevos derivados al sitio A y la secuencia TAR mostró que estos conjugados eran, en contra de lo previsto y de forma general, más selectivos por la secuencia TAR.¹⁰⁶

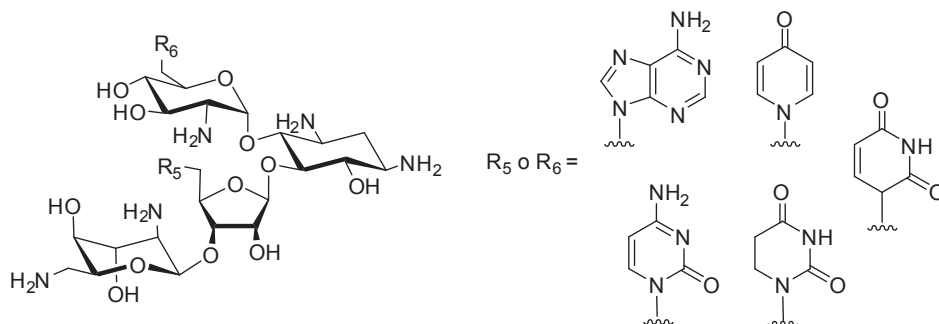


Figura 1.31. Conjugados aminoglicósido-nucleobase sintetizados por Blount y col.¹⁰⁶

La incorporación de residuos de arginina en las estructuras de los aminoglicósidos es otro de los ejemplos englobados en esta estrategia. La elección de esta molécula se fundamenta en la observación experimental de que péptidos que interaccionan con ARN, como Rev y Tat son, en general, ricos en arginina. Desde una perspectiva química, y a diferencia de las funciones amino, los grupos guanidinio presentes en este aminoácido son capaces de formar enlaces bidentados con los fosfatos del esqueleto de ARN, constituyendo, por lo tanto, armazones idóneos para el reconocimiento de ácidos nucleicos. En consecuencia, resulta razonable suponer que la conjugación de arginina con aminoglicósidos puede mejorar su afinidad por las secuencias virales RRE y TAR. De hecho, se ha demostrado que la unión de una molécula de arginina a la neamina aumenta su afinidad por dichos fragmentos de ARN aproximadamente 50 veces.¹⁰⁷ También se ha observado que conjugados de neomicina B,

paramomicina y neamina con múltiples moléculas de arginina muestran una mayor afinidad por la secuencia TAR que por RRE, por lo que esta podría ser también una estrategia válida para mejorar la selectividad de los aminoglicósidos.¹⁰⁸

Finalmente, partiendo de la misma idea se han sintetizado y evaluado derivados de aminoglicósidos en los que las funciones amino han sido, total o parcialmente, reemplazadas por grupos guanidinio. Así, estos compuestos han mostrado mejores afinidades y selectividades por la secuencia viral RRE que los compuestos de partida.^{69, 109}

1.5 QUÍMICA COMBINATORIA DINÁMICA

Una aproximación relativamente reciente al desarrollo de ligandos de potencial aplicación biomédica es la química combinatoria dinámica. De un modo general, se entiende por química combinatoria dinámica la generación de mezclas en equilibrio cuyos componentes se combinan e intercambian mediante una reacción química reversible hasta alcanzar el equilibrio termodinámico. En ese momento la composición de la librería queda determinada por la estabilidad relativa de los diferentes miembros.¹¹⁰ El hecho de que las librerías se generen bajo control termodinámico implica, a su vez, que la composición final va a estar influenciada por las condiciones de reacción. Así, cualquier modificación en las condiciones experimentales provoca una adaptación de la librería que responde re-equilibrándose. Dicha propiedad resulta de utilidad en química biológica y, muy especialmente, en el desarrollo de nuevos ligandos de potencial interés químico-médico. La idea central de esta estrategia es emplear la propia diana farmacológica como elemento perturbador del equilibrio. Para ello se lleva a cabo la equilibración de la librería en presencia de una diana farmacológica determinada (proteína o ácido nucleico). Si un miembro específico de la librería se une a la biomolécula, se estabilizará y el equilibrio se desplazará hacia su formación, aumentando así su concentración final en la mezcla a expensas de otros derivados con menor afinidad por la diana. En otras palabras, en presencia del receptor, y en casos favorables, la composición de la mezcla puede alterarse en beneficio de aquellos ligandos que presentan mejores propiedades de unión. Estos son identificados en una etapa subsiguiente mediante la comparación de las mezclas obtenidas en presencia y ausencia de la macromolécula, empleando idénticas condiciones experimentales.

Tal y como se ha comentado previamente, un punto central en química combinatoria dinámica es la utilización de reacciones químicas reversibles. Sin embargo, es preciso mencionar que este no es el único requisito que deben satisfacer los procesos químicos empleados. Adicionalmente, deben cumplir una serie de requerimientos, algunos de los cuales se resumen a continuación:

- En primer lugar, los equilibrios de reacción debe ser rápidos de forma que las librerías puedan adaptarse de forma eficiente a los cambios en el entorno.
- Las condiciones de reacción (disolvente, temperatura, pH...) deben ser compatibles con la presencia del receptor biológico (sea proteína o ácido nucleico). Ello implica necesariamente que la reacción debe poderse llevar a cabo en condiciones cercanas a las fisiológicas (uso de agua como disolvente, pH neutro y temperatura moderada), con objeto de preservar la integridad estructural de la biomolécula.
- Todos los miembros de la librería deben ser solubles en las condiciones del experimento.
- La reactividad de todos los productos de partida debe ser similar con objeto de que todos los posibles miembros de la librería se formen con una probabilidad comparable.
- La reacción debe ser quimioselectiva. Así se evita la competencia de reacciones paralelas con otros grupos funcionales presentes en los productos de partida. A su vez, debe cumplir criterios de bio-ortogonalidad, evitando alterar la estructura química de la diana farmacológica presente en el medio.
- Finalmente, con objeto de hacer posible el análisis de los resultados, una vez alcanzado el equilibrio, este debe poder ser congelado sin que esto afecte a la composición de la mezcla. Algunos métodos para detener la interconversión de sus componentes son la introducción de una segunda reacción irreversible o una alteración en el pH.

Entre las reacciones usadas hasta la fecha para la generación de librerías dinámicas se encuentran la formación de acetales, de cianohidrinas, de ésteres, de puentes disulfuro o de iminas.¹¹⁰

Finalmente, cabe mencionar que, además de su tremendo potencial en el desarrollo de ligandos, la química combinatoria dinámica puede utilizarse como herramienta en química del reconocimiento molecular básica, permitiendo evaluar la fortaleza relativa de un número determinado de interacciones débiles. A modo de ejemplo esta estrategia se ha empleado para evaluar la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el plegamiento de estructuras helicoidales formadas por tres α -hélices peptídicas¹¹¹ así como en estudios relativos a la formación de cuadruplexes de PNA.¹¹² En ambos contextos se produce la formación preferente de aquellas estructuras que establecen las interacciones moleculares más estables. Los trabajos desarrollados en la presente tesis y recogidos en los capítulos 3 y 4 constituyen ejemplos claros de esta doble vertiente aplicada.

1.5.1 DCC PARA LA OBTENCIÓN DE LIGANDOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La capacidad de sintetizar una librería de compuestos relacionados y, simultáneamente, discriminar aquel con mayor afinidad por una diana biológica hace de la química combinatoria dinámica una técnica de gran potencial para el desarrollo de nuevos ligandos. A pesar de ello, su utilización en reconocimiento molecular de ácidos nucleicos ha sido relativamente limitada hasta la fecha.

Las reacciones más empleadas en este campo son la formación de puentes disulfuro y de iminas. Ambas se pueden realizar en medio acuoso a valores de pH fisiológico, resultando sencillo congelar el equilibrio sin afectar a la distribución de especies presentes en la mezcla. En el caso de los puentes disulfuro y las iminas, esta última etapa se lleva a cabo mediante una bajada de pH o un paso de reducción irreversible a aminas, respectivamente.^{110a}

Uno de los primeros ejemplos en los que se ilustra la utilidad de esta metodología en el desarrollo de ligandos de ácidos nucleicos fue descrito por el grupo del profesor Miller. Más concretamente, dicho grupo ideó una librería dinámica basada en la complejación de Cu^{2+} con diversas salicilamidas para formar varios ligandos bi o tridentados. Esta librería se enfrentó a una secuencia de ADN determinada y su homóloga de ARN. Sorprendentemente, los resultados de esta investigación permitieron la identificación de un componente de la mezcla cuya afinidad por ARN era 300 veces superior a la que presentaba por el receptor de ADN.¹¹³

Si bien, en principio, las librerías diseñadas pueden tener cualquier tamaño, en la práctica sus dimensiones se ven limitadas por la necesidad de analizar y cuantificar sus diferentes componentes (en presencia y ausencia del receptor). De hecho, cabe mencionar que la deconvolución de las mezclas resultantes está lejos, en la mayoría de los casos, de ser trivial y constituye uno de los obstáculos tradicionales en este tipo de aproximaciones experimentales. Con el objetivo de eludir este problema, Miller y colaboradores desarrollaron un método basado en la localización espacial de los componentes de la librería. De modo general, el método desarrollado se basó en la inmovilización de los compuestos de partida sobre resinas. Tras este paso, se añadieron las mismas moléculas en solución, generándose una librería sobre la que se adicionó la diana biológica marcada fluorescentemente. Como es lógico, la biomolécula se une en mayor medida a aquellos miembros por los que posee una afinidad más elevada, los cuales pudieron ser identificados de un modo sencillo mediante un análisis de microscopía de fluorescencia.¹¹⁴ Empleando este procedimiento el grupo del profesor Miller ha analizado librerías de hasta 11325 miembros frente a diferentes secuencias de ARN.¹¹⁵

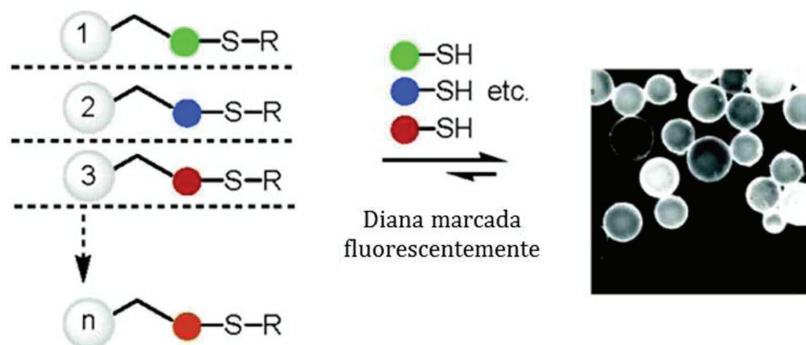


Figura 1.32. Esquema de la estrategia usada por Miller y col. para la localización espacial de los miembros de su librería.¹¹⁴

Por su parte, el grupo del profesor Balasubramanian ha empleado la química combinatoria dinámica como método para el desarrollo de ligandos de cuadruplexes. Así, en una primera aproximación generaron una librería formada por poliamidas que contenían de una a tres unidades de pirrol. Dicha librería fue enfrentada a dúplexes y cuadruplexes de ADN y, aunque en ambos casos se

observaba una amplificación de los derivados con mayor número de pirroles, esta era mucho mayor en el caso de la unión al dúplex de ADN.¹¹⁶ En una aproximación más reciente, el grupo del profesor Balasubramanian sintetizó una librería basada en la unión de carbohidratos a macrociclos, siendo este uno de los pocos ejemplos descritos en la literatura en los que se emplean carbohidratos para el desarrollo de este tipo de ligandos. El análisis de la unión de la librería con cuadruplexes demostró que pequeños cambios en la geometría de los carbohidratos implicaba importantes alteraciones en los perfiles de amplificación observados, indicando que este parámetro condiciona significativamente la afinidad de los diversos ligandos por la diana.¹¹⁷

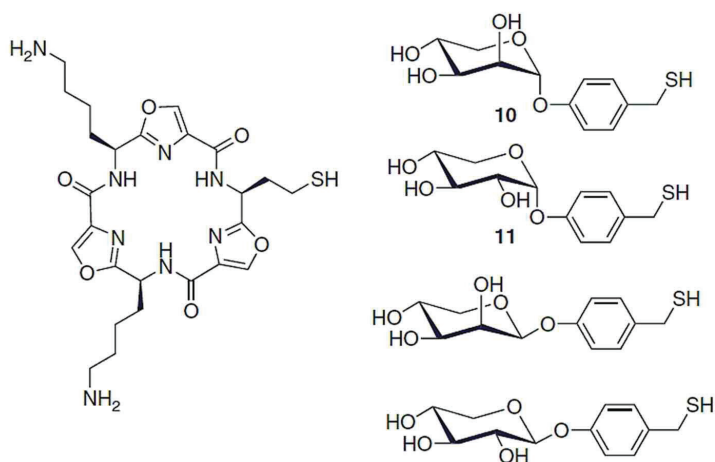


Figura 1.33. Productos de partida empleados por el profesor Balasubramanian para la generación de sus librerías.¹¹⁷

CAPÍTULO 2

Objetivos

El presente proyecto de tesis se enmarca en el campo de la química del reconocimiento molecular y pretende hacer aportaciones tanto de carácter fundamental como aplicado al estudio de los aminoglicósidos y sus interacciones con dianas de relevancia biológica. Desde una perspectiva fundamental nuestro objetivo es arrojar luz sobre interacciones intermoleculares que juegan un papel clave en la asociación de estas moléculas a ARN y proteínas, como son las interacciones CH/ π . Desde una perspectiva aplicada nuestra intención es desarrollar metodologías que faciliten el diseño y desarrollo de nuevos ligandos de ARN dotados de mayor afinidad y/o especificidad por sus dianas. Cada una de estas líneas generales se engloba en uno de los dos apartados que a continuación se describen:

• ***Análisis de las interacciones CH/ π como elemento clave en el reconocimiento molecular de aminoglicósidos***

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, a pesar de su carácter débil, los contactos CH/ π juegan un papel fundamental en el reconocimiento molecular de estos ligandos poliaminados. De hecho, constituyen, junto con los enlaces de hidrógeno, uno de los principales factores determinantes de la especificidad de la asociación. Curiosamente, tras más de 20 años de investigación en el campo diversos aspectos de los enlaces CH/ π son todavía pobremente comprendidos y merecen, por tanto, una investigación detallada (ver sección 1.2.3). Ello es debido, en parte, a la dificultad que entraña el estudio experimental de los enlaces débiles en disolución. De hecho, hoy en día una parte significativa de nuestra comprensión de los complejos CH/ π se apoya en cálculos teóricos realizados sobre modelos simplificados y en fase gaseosa. En nuestra opinión, es preciso el desarrollo de metodologías experimentales novedosas que permitan soslayar buena parte de los problemas inherentes al estudio de estos contactos. Por lo tanto y como primer objetivo dentro de este apartado, nos proponemos el desarrollo y puesta a punto de una nueva estrategia suficientemente sensible y versátil que permita una cuantificación precisa de los enlaces CH/ π en agua. Seguidamente, haremos un uso extensivo de dicha metodología con objeto de responder aspectos clave de los mismos. Más concretamente, nos proponemos arrojar luz sobre las siguientes cuestiones:

a) ¿Cuáles son las principales contribuciones energéticas que promueven la formación de los contactos CH/ π en medios fisiológicos?

b) ¿Cuáles son las principales relaciones estructura/estabilidad que modulan su comportamiento?

c) ¿En qué medida la polarización de las funciones CH contribuye a la estabilidad de los complejos en agua?

d) ¿Cuál es la estabilidad relativa de los complejos mediados por la cara α y β de la piranosa y qué factores lo condicionan?

e) ¿En qué medida las propiedades del sistema aromático condicionan la interacción?

Es preciso mencionar que, por su relevancia, algunas de estas cuestiones trascienden el ámbito de los aminoglicósidos y podrían, por tanto, considerarse de importancia general en el campo del reconocimiento molecular. Los planteamientos concretos y resultados obtenidos en este estudio son objeto de descripción detallada en el capítulo 3.

• *Desarrollo de nuevas metodologías para el diseño y optimización de ligandos poli-aminados de ARN*

Tal y como se ha explicado con anterioridad, los aminoglicósidos presentan la capacidad de asociarse a un buen número de secuencias de ARN de distinto origen (entre las que se incluyen diversas dianas virales y bacterianas de relevancia biomédica. Ver sección 1.2.4). Desde una perspectiva química-biológica constituyen, por tanto, armazones privilegiados para el desarrollo de ligandos poli-aminados de ARN de alta afinidad. Por lo que respecta a la actividad antibiótica de estos compuestos, la emergencia y diseminación de fenómenos de resistencia bacteriana ha conferido a la búsqueda de nuevos compuestos activos un carácter de urgencia en años recientes. En resumen, el desarrollo de nuevos ligandos de ARN basados en aminoglicósidos y dotados de interesantes actividades biológicas constituye un campo de investigación de gran interés y actualidad.

Lamentablemente, los esfuerzos investigadores en este sentido se han visto irremisiblemente lastrados por la dificultad inherente a la preparación y/o modificación de estas complejas estructuras oligosacáridicas. Efectivamente, su elevada polaridad, su carácter policationico o el elevado número de grupos OH o NH₂ químicamente equivalentes presentes en sus estructuras tiene como consecuencia que el desarrollo de nuevos derivados suponga un reto sintético

importante y derive en rutas largas, caras y con bajos rendimientos globales. En nuestra opinión, sería altamente deseable la puesta a punto de metodologías que faciliten el desarrollo de nuevos ligandos poli-aminados de ARN. En particular, el desarrollo de estrategias que permitan inferir de un modo sencillo el efecto que una modificación determinada tiene sobre la asociación permitiría focalizar los esfuerzos sintéticos y, por tanto, supondría un ahorro de tiempo y dinero significativo.

En este contexto cabe mencionar que, desde un punto de vista metodológico, los aminoglicósidos constituyen, a primera vista, un campo adecuado para la implementación de métodos basados en química combinatoria dinámica. Así, sus armazones poli-aminados incluyen un buen número de centros reactivos (entre 4 y 6 funciones amino) susceptibles de ser modificados mediante reacciones de aminación reductora, generando, potencialmente, una gran diversidad estructural. De hecho, cabe señalar que la incorporación de sustituyentes en las funciones amino constituye una fuente de diversidad común en estos compuestos, dando origen a diversos aminoglicósidos de interés tanto naturales como semi-sintéticos (por ejemplo, la amikacina o la gentamicina).

Sin embargo, y a pesar de su indudable potencial, es preciso considerar la dificultad que entraña la implementación de protocolos de química combinatoria dinámica basados en aminación reductora en el campo de los aminoglicósidos. Así, estos compuestos incluyen un número variable de funciones $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ que normalmente se sitúa en el rango 4-6. Para un aminoglicósido como la kanamicina B (con cinco funciones $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$), una reacción de aminación reductora con un aldehído sencillo es capaz de generar un número máximo de $3^5=243$ derivados. Por otro lado, todos ellos poseen un armazón común y, por lo tanto, propiedades químico-físicas similares, lo cual confiere al análisis y separación de las mezclas resultantes una tremenda dificultad. De acuerdo con esto, los esfuerzos orientados a la implementación de métodos de química combinatoria dinámica en el campo de los aminoglicósidos deben ir de la mano de desarrollos metodológicos que permitan la deconvolución de las librerías resultantes. El presente apartado de la tesis tiene, por lo tanto, un doble objetivo.

Por un lado, nos planteamos explorar la reactividad de los complejos aminoglicósido/ARN en reacciones de aminación reductora como fuente de información de relevancia químico-médica. Estos esfuerzos estarán centrados inicialmente en una modificación química sencilla pero de gran potencial en

Capítulo 2

química biológica como es la N-metilación con formaldehído (ver capítulo 4 para una explicación más detallada).

Como segundo objetivo general nos planteamos el desarrollo de nuevas estrategias de deconvolución basadas en la implementación de esquemas sencillos de marcaje isotópico y detección mediante RMN.

Los objetivos planteados se resumen, por tanto, en los siguientes epígrafes:

a) Desarrollo de protocolos experimentales que permitan “interrogar” los complejos aminoglicósido/ARN con aldehídos sencillos en reacciones de aminación reductora. Este apartado estará en primera instancia restringido a la utilización de formaldehído como agente para la N-metilación del ligando.

b) Desarrollo de nuevos métodos de deconvolución de las mezclas resultantes basados en la utilización de marcaje isotópico y RMN.

c) Verificación del potencial y limitaciones de la aproximación desarrollada mediante la aplicación del esquema experimental puesto a punto a diversos complejos aminoglicósido/ARN.

d) Racionalización de los resultados obtenidos mediante la utilización de cálculos de dinámica molecular y experimentos sencillos de valoración.

CAPÍTULO 3

Análisis de las interacciones CH/ π como
elemento clave en el reconocimiento
molecular de aminoglicósidos

3.1 INTRODUCCIÓN

Tal y como se ha comentado en el capítulo 1, las interacciones CH/π juegan un papel fundamental en el reconocimiento molecular de los aminoglicósidos por ARN. Esto es así porque, si bien, en términos relativos su contribución a la energía libre de asociación (ΔG) es limitada, estos contactos determinan en buena medida la selectividad del proceso ($\Delta\Delta G$), permitiendo discriminar entre dianas alternativas.

Evidentemente, la relevancia de los enlaces CH/π no se restringe al ámbito de los aminoglicósidos. Por el contrario, estas interacciones forman parte del repertorio de enlaces débiles habitualmente empleado por las proteínas para el reconocimiento molecular de glicósidos neutros (enzimas,^{43a, 118} lectinas,^{43b, 119} anticuerpos,^{43c, 120} toxinas^{43d, 121} o proteínas amiloidogénicas^{43e, 122}) así como de ligandos de todo tipo.

Siendo así, no resulta sorprendente comprobar que los contactos CH/π han sido objeto de múltiples estudios, tanto teóricos como experimentales, durante los últimos 20 años. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados en dicho ámbito de estudio, diversos aspectos de estas interacciones no se comprenden todavía en su totalidad. En particular, no existe hasta la fecha un estudio detallado y cuantitativo que relacione la energía de la interacción con las características estructurales tanto de los donadores CH/π como de los anillos aromáticos implicados (relación estructura/estabilidad). En nuestra opinión, una aportación de esta índole podría tener un impacto significativo en campos diversos relacionados con el reconocimiento molecular o la química médica. Por otro lado, y desde una perspectiva fundamental, la aportación relativa de las diferentes contribuciones (dispersivas, electrostáticas y solvofóbicas) a la energía libre de interacción en medios fisiológicos es, a día de hoy, poco clara.

Ambas carencias tienen su origen en la dificultad que entraña el estudio experimental de interacciones débiles en disolución. Así, idealmente, un estudio orientado a la determinación de relaciones estructura/estabilidad debería ser capaz de permitir la cuantificación de contactos CH/π aislados (es decir, en ausencia de otras interacciones adicionales), así como de determinar con precisión pequeñas diferencias de estabilidad entre complejos. En este contexto, es preciso mencionar que diversos estudios han cifrado la energía de interacción entre una piranosa y un anillo aromático en 1-2 kcal/mol.^{44b, f, i, 123} Esto implica

que las diferencias de estabilidad entre complejos es, en la mayoría de los casos, de unas pocas décimas de kcal/mol. En estas circunstancias parece claro que la sensibilidad constituye un requerimiento clave de cualquier aproximación experimental al problema. En nuestra opinión, la química combinatoria dinámica, por sus características específicas, constituye una herramienta de tremendo interés en el estudio de interacciones débiles, cuyo potencial hasta la fecha ha sido pobremente explorado.

En el presente capítulo nos planteamos como objetivo general el desarrollo de una estrategia basada en química combinatoria dinámica, suficientemente sensible y versátil, para el estudio de los enlaces CH/ π en agua. Dicha metodología se aplicará, en un segundo paso, al establecimiento de relaciones estructura/estabilidad cuantitativas. Finalmente, a partir de éstas se intentará dilucidar el papel de las diferentes contribuciones energéticas a la estabilidad de los complejos en medios fisiológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La estrategia desarrollada se representa de modo esquemático en la figura 3.1. En primer lugar, se diseñaron y sintetizaron diversos sistemas modelo. Como puede observarse, todos ellos incluyen una unidad monosacárida común (a la que nos referiremos en adelante como unidad reactiva) caracterizada por la presencia de un grupo amino axial en posición 3, así como diversas unidades CH/ π -donadoras (representadas por elipses coloreadas en la figura 3.1). Estas se unen a la posición anomérica de la unidad reactiva mediante enlaces glicosídicos con estereoquímica α . Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la reacción de dichas especies con arilacetaldehídos genera mezclas de iminas/enaminas en las cuales el sistema aromático está óptimamente posicionado para el establecimiento de interacciones de apilamiento con una cara concreta de la unidad CH/ π -donadora (determinada por el punto de anclaje de la unidad donadora a la unidad reactiva). La estabilidad relativa de los diversos complejos puede cuantificarse con precisión empleando una aproximación combinatoria dinámica sencilla. Para ello, mezclas equimoleculares de los sistemas modelo en disolución acuosa (fosfato 10 mM, pH 6.2) son tratadas con una cantidad sub-estequiométrica de un arilacetaldehído concreto para dar lugar a una mezcla de iminas/enaminas intermedias estabilizadas por contactos CH/ π intramoleculares.

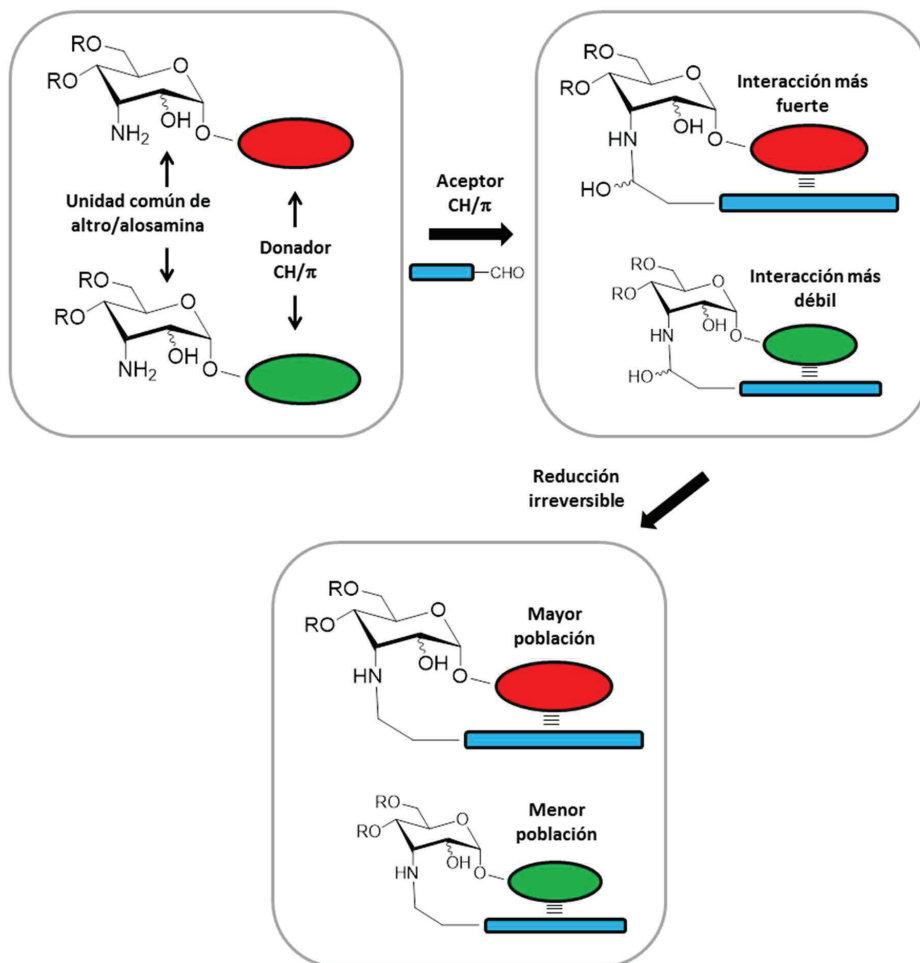


Figura 3.1. Representación esquemática de la aproximación de química combinatoria dinámica empleada para el análisis de las interacciones carbohidrato/aromático

La idea central de nuestra aproximación es que, debido a que todos los sistemas comparten el mismo punto de anclaje para el arilacetaldeído, la estabilidad de las correspondientes iminas/enaminas formadas y, por lo tanto, sus poblaciones relativas, está determinada exclusivamente por la fortaleza de los contactos CH/ π establecidos entre los sistemas donadores (elipses coloreadas) y los anillos aromáticos. La congelación de este equilibrio mediante la adición de hidruro proporciona una mezcla de aminas secundarias cuyas proporciones relativas reflejan las diferencias de energía entre los diferentes

complejos de apilamiento formados ($\Delta\Delta G$). Finalmente, el análisis y cuantificación de las mezclas generadas por RMN permite el cálculo de las energías de interacción relativas de cada complejo.

Para el desarrollo de este trabajo se han diseñado y sintetizado dos librerías de donadores CH/ π (denominadas librerías I y II y orientadas a responder preguntas concretas relativas a estas interacciones) y una librería de arilacetaldéhdos (denominada librería III).

La primera de ellas (librería I, figura 3.2) está formada por 9 disacáridos diferentes y fue diseñada con el objetivo de elucidar las principales relaciones estructura/estabilidad que modulan las interacciones CH/ π . Todos los disacáridos que la componen incorporan como unidad reactiva un residuo común de 3-amino-3-deoxy- α -altropiranososa cuya silla está bloqueada en una conformación 4C_1 mediante un grupo benciliden entre las posiciones 4 y 6. Por su parte, como unidades donadoras de enlaces CH/ π se contemplan unidades de piranososa con diferentes configuraciones en posiciones clave, así como sustituciones OH/F puntuales. Adicionalmente, la librería va a permitir el análisis de los factores que condicionan la selectividad facial en complejos de apilamiento. Así, los complejos formados por los compuestos A-E (con enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-2)$) involucran la cara α de la piranososa mientras que aquellos establecidos por los derivados F-I (con enlaces $\alpha(1-3)$) interaccionan por la cara β . Como punto final, entre los derivados sintetizados se incluye un compuesto de referencia (denominado Ref en la Figura 3.2) sin unidad CH/ π -donadora, cuyo propósito es permitir la medida de energías netas de interacción (ΔG).

La segunda librería (librería II, figura 3.2) está formada por 3 pseudodisacáridos diferentes y fue diseñada con el objetivo específico de analizar el efecto que tiene la polarización de los enlaces CH sobre la estabilidad de los complejos CH/ π en medios fisiológicos. Estos pseudodisacáridos incorporan una unidad común de 3-amino-3-deoxi- α -alopiranososa y diferentes unidades CH/ π -donadoras unidas a su posición anomérica, equipadas con cero, uno o tres grupos CH polarizados en la cara de interacción con el anillo aromático. Es preciso mencionar que, en contraposición con las unidades CH/ π -donadoras presentes en la librería I, las de la librería II poseen una solubilidad limitada en medios acuosos. Con objeto de incrementar la solubilidad de nuestros derivados nos vimos obligados a rediseñar la unidad reactiva de amino-azúcar. Así, en primer

lugar se eliminó el grupo benciliden presente entre las posiciones 4 y 6 de la piranosa. Adicionalmente, con el objetivo de mantener la conformación 4C_1 requerida para nuestros propósitos, se invirtió la configuración de la posición 2, dando lugar a una unidad de 3-amino-3-deoxi- α -alopiranososa. Al igual que en el caso anterior, la librería II incluye un compuesto de referencia desprovisto de unidad CH/ π -donadora.

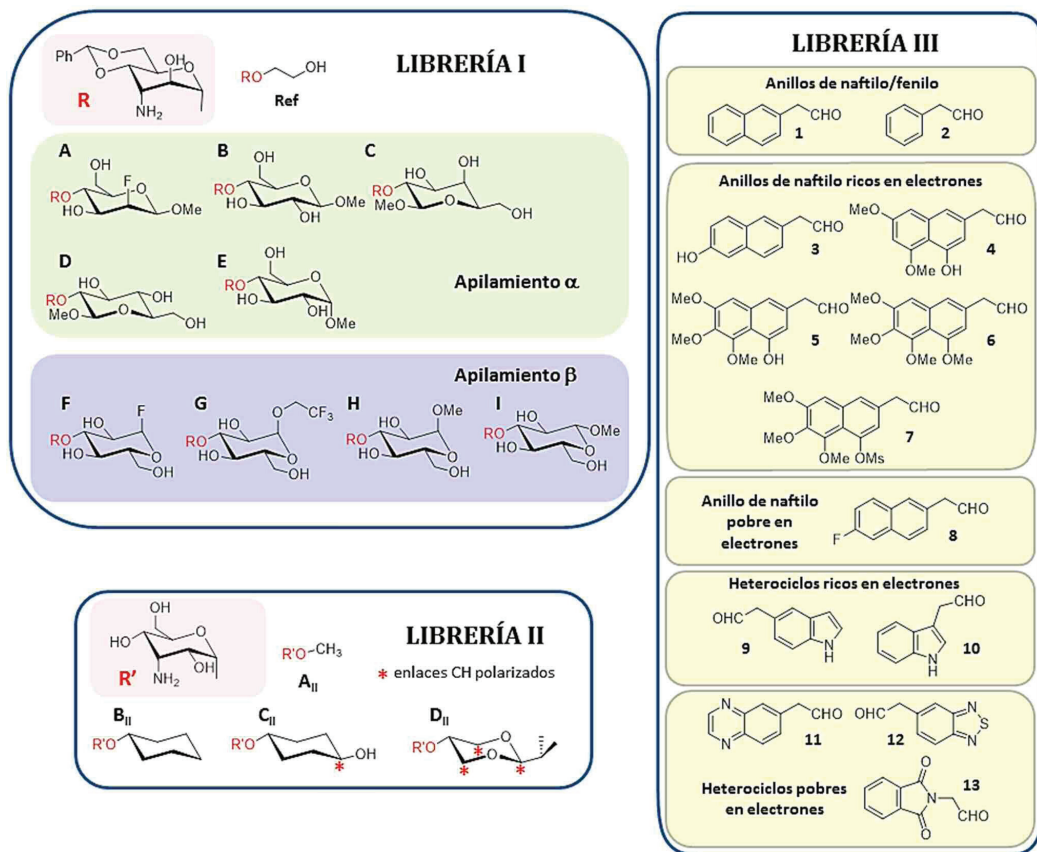


Figura 3.2. Librerías de los disacáridos (librería I), pseudodisacáridos (librería II) y arilacetaldehídos (librería III) sintetizados

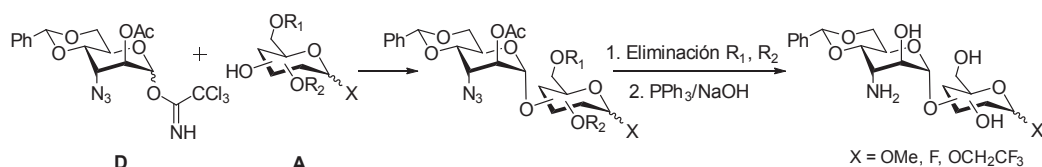
Por lo que respecta a la última librería empleada (librería III, figura 3.2), esta se compone de 13 arilacetaldehídos. Esta librería fue diseñada con el objetivo de evaluar en qué medida las propiedades del anillo aromático influyen en las interacciones CH/ π . Entre ellos se incluyen anillos aromáticos con

diferente tamaño, distribuciones electrónicas y solubilidades.

Finalmente, cabe mencionar que los estudios experimentales descritos en esta sección se complementaron con cálculos mecánico-cuánticos que permitieron racionalizar las tendencias observadas.

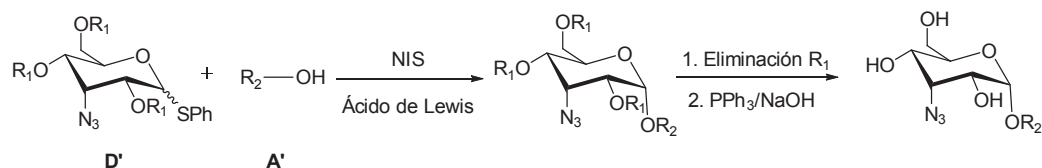
3.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3.1 SÍNTESIS DE LAS LIBRERÍAS



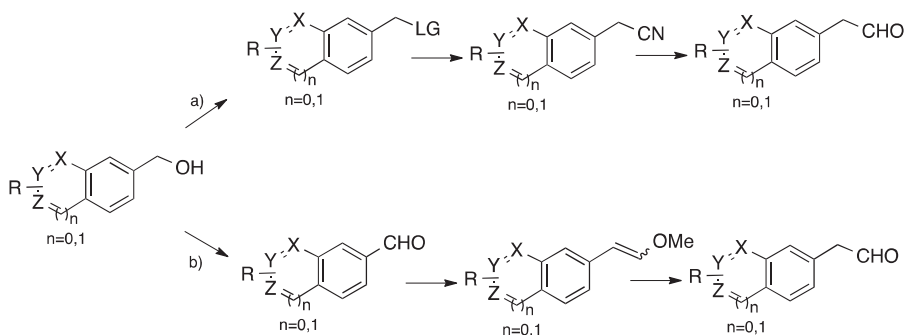
Esquema 3.1. Ruta sintética empleada para la obtención de los disacáridos de la librería I

La ruta sintética empleada para la preparación de los disacáridos de la librería I se muestra en el esquema 3.1. El donador de glicosilo (D) empleado fue preparado a partir del compuesto alil 3-azido-3-deoxi-4,6-benziliden- α -D-altropiranos¹²⁴ mediante un proceso de acetilación, eliminación del grupo alilo y formación del tricloroacetimidato, mientras que los diferentes aceptores de glicosilo (A) fueron preparados mediante procedimientos previamente descritos en la literatura.¹²⁵ Como se puede observar, todos los derivados de esta librería se obtuvieron mediante una reacción de glicosilación llevada a cabo en CH₂Cl₂ anhidro a -65°C bajo atmósfera de argón en presencia de TMSOTf. En último lugar, los productos finales se obtuvieron mediante la desprotección de los grupos hidroxilos y la liberación de la amina en la posición 3 mediante una reducción de Staudinger.



Esquema 3.2. Ruta sintética empleada para la obtención de los pseudodisacáridos de la librería II

De forma análoga, la ruta sintética empleada para la obtención de los pseudisacáridos de la librería II se muestra en el esquema 3.2. El donador de glicosilo (D') se preparó a partir del compuesto 1,2,4,6-tetra-O-acetil-3-azido-3-deoxi- β -D-alopiranos¹²⁶ mediante un proceso de tioglicosilación, desacetilación y protección de los grupos hidroxilo con diferentes grupos protectores (bencilo, p-metoxibencilo o triisopropilsililo). Tras esto, se llevó a cabo la reacción de glicosilación con los alcoholes correspondientes (A') en presencia de NIS y TMSOTf o $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en una mezcla $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 3:1 con objeto de favorecer la formación del anómero α . Tras la reacción de glicosilación se procedió a la desprotección de los grupos hidroxilos y la reducción de la azida presente en la unidad reactiva mediante la reacción de Staudinger.



Esquema 3.3. Rutas sintéticas empleadas para la obtención de los arilacetaldéhdos de la librería III

Los arilacetaldéhdos que componen la librería III se sintetizaron mediante las rutas sintéticas que se muestran en el esquema 3.3 a partir de los correspondientes alcoholes bencílicos. En la ruta a, la elongación se logró mediante el desplazamiento del correspondiente grupo saliente (mesilato, bromuro o benzoato) con un grupo ciano y la subsecuente reducción con DIBAL. De forma alternativa, en la ruta b, la elongación se logró mediante una oxidación Dess-Martin del alcohol bencílico, la posterior homologación mediante una reacción tipo Wittig y la hidrólisis del vinil éter correspondiente.

3.3.2 ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES CH/ π

Empleando la estrategia combinatoria descrita en el apartado anterior (figura 3.1) se llevaron a cabo competiciones entre los distintos miembros de las librerías.

Más concretamente, por lo que respecta a la librería I se realizaron experimentos involucrando todas las combinaciones posibles Ref/disacárido/aldehído para obtener las energías netas de interacción (ΔG) y D/disacárido/aldehído para determinar las estabilidades relativas de los complejos ($\Delta\Delta G$) con respecto a los formados por el compuesto D. Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos empleando mezclas más complejas que involucran 5-8 disacáridos y un aldehído simultáneamente.

Por lo que respecta a la librería II se llevaron a cabo experimentos análogos con mezclas Ref/C_{II} y los arilacetaldéhdos 2, 3, 8, 10 y 12. Además, se realizaron competiciones con dichos sistemas aromáticos y los pseudodisacáridos B_{II}/C_{II} y D_{II}/C_{II}.

Los resultados obtenidos mediante dichos experimentos se detallan en los siguientes epígrafes.

Relaciones estructura/estabilidad

Nuestros experimentos muestran que tanto las unidades de piranosa como los anillos aromáticos tienen una influencia significativa en la estabilidad de los compuestos formados. Así, pueden apreciarse las siguientes tendencias:

- La estabilidad de los complejos es dependiente de la extensión de los sistemas aromáticos. En otras palabras, cuanto mayor sea el número de contactos CH/ π establecidos mayor es la energía libre de interacción. Esto explica por qué el anillo 2 establece interacciones considerablemente más débiles que el anillo 1 (Figura 3 del anexo 3).
- Grupos polares axiales en la cara de la piranosa involucrada en la formación del complejo son altamente desestabilizantes como se puede deducir de la competición entre los disacáridos B y E con el anillo aromático 3 (Figura 4a del anexo 3).
- Grupos polares axiales en la cara de la piranosa no involucrada en el apilamiento proporcionan una mayor estabilidad que los ecuatoriales (tal y como puede deducirse de la comparación entre los complejos formados por los compuestos C y D. Figura 4b del Anexo 3). Este resultado puede tener su origen en interacciones repulsivas entre los grupos polares ecuatoriales y el anillo aromático. Además, ha de tenerse en cuenta que el coste de desolvatación dichos grupos polares ecuatoriales es presumiblemente mayor.

- Para piranosas con todos sus sustituyentes en disposición ecuatorial, el complejo formado con la cara α es, de forma general, más estable que el formado con la β . De este resultado podemos deducir que los enlaces n/ π establecidos entre el oxígeno endocíclico de la piranosa son menos estables que los análogos CH/ π .
- Las interacciones mediadas por la cara β de los carbohidratos son sensibles a la densidad electrónica del oxígeno endocíclico. Esta carga puede ser modulada mediante la unión de sustituyentes electronegativos al carbono anomérico (como puede deducirse de las estabilidades relativas de los complejos formados por los disacáridos F y G respecto a H. Figura 4b del Anexo 3).
- Los anillos aromáticos con mayor densidad electrónica establecen, de forma general, interacciones más fuertes. De hecho, dado un anillo concreto se puede aumentar la fuerza de las interacciones CH/ π mediante la incorporación de sustituyentes con átomos de oxígeno como puede deducirse comparando los complejos que establecen los anillos 1 y 4 (figura 3 del anexo 3). Sin embargo, esta estrategia tiene limitaciones. Por encima de un determinado número de sustituyentes la congestión estérica fuerza los grupos OMe fuera del plano, lo cual tiene un efecto perjudicial sobre la interacción (tal es el caso de los sistemas 5-7).
- La estabilidad de los complejos de apilamiento correlaciona linealmente con el valor del potencial electrostático 2 Å por encima de los centroides de los sistemas aromáticos (figura 5b del anexo 3). Curiosamente, dicha correlación presenta pendientes diferentes para las interacciones mediadas por la cara α y β de la piranosa. Una consecuencia interesante de este comportamiento es que mientras que los sistemas ricos en electrones prefieren interactuar por la cara α , aquellos pobres en electrones lo hacen preferentemente por la cara β . Este cambio en la selectividad facial refleja la mayor estabilidad de los contactos n/ π establecidos por el oxígeno endocíclico con sistemas pobres en electrones.

Efecto de la polarización de los enlaces CH

El análisis comparativo de los complejos formados por los diversos componentes de la librería II demuestra que la polarización de los enlaces CH

contribuye en gran medida a estabilizar los contactos CH/ π en agua. Más concretamente, en complejos formados por anillos ricos en electrones cada CH polarizado incrementa, en promedio, 0.3 kcal/mol la energía de la interacción. En consonancia con los resultados comentados en el epígrafe anterior se observó, adicionalmente, que los complejos formados con anillos pobres en electrones eran menos estables. Sin embargo, aun en estos casos la polarización de los enlaces CH involucrados es claramente estabilizante.

Contribuciones energéticas en agua

Con el objetivo de racionalizar los resultados experimentales se llevó a cabo un estudio teórico basado en cálculos mecánico-cuánticos en sistemas modelo. Así, se calcularon las energías de interacción de los complejos formados por los diversos sistemas aromáticos considerados en nuestro estudio (con excepción de las unidades densamente oxigenadas 5-7) y un anillo de tetrahidropirano (como versión simplificada de una piranosa). Como segundo paso se separaron las energías de interacción calculadas en sus diferentes contribuciones (electrostáticas, de polarización y dispersivas) empleando la metodología LMO-EDA ("Localized Molecular Orbital Energy Decomposition Analysis") a un nivel SCS-MP2¹⁶/6-311G(2d,p). Finalmente, se compararon los valores experimentales deducidos para sistemas seleccionados (como C o D) con las energías teóricas de interacción, así como con las diferentes contribuciones individuales.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de una buena correlación entre las estabilidades teóricas y experimentales (figura 6 del anexo 3). Curiosamente, las variaciones de energía libre observadas parecen depender de modo exclusivo de la componente electrostática de la interacción que, de hecho, presenta una excelente correlación con los valores de ΔG experimentales. Por el contrario, la componente dispersiva presenta una pobre correlación con los datos experimentales, exhibiendo, además, menores diferencias entre complejos del mismo tamaño.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que, incluso en disolventes altamente polares como el agua, las interacciones coulómbicas son el principal factor modulador de la estabilidad de los complejos CH/ π . Este papel clave se manifiesta en la elevada influencia que aspectos estructurales como la

polarización CH o la densidad electrónica de los sistemas aromáticos tiene sobre fortaleza de estas interacciones.

Finalmente, evaluamos el papel de las fuerzas solvofóbicas en la formación los enlaces CH/ π en agua. Para ello se midió la estabilidad de complejos seleccionados en presencia de diferentes fracciones de co-disolventes orgánicos. Los resultados obtenidos indican que la presencia de los mismos es, en todos los casos, desestabilizante. Curiosamente, los valores de ΔG experimentales correlacionan linealmente con la cohesividad del medio, con excelentes coeficientes de correlación (figura 7 del anexo 3). De este resultado puede deducirse que la estabilidad de los complejos CH/ π en agua no depende exclusivamente de los contactos donador/aceptor. Adicionalmente, las interacciones entre ambos y el disolvente y, muy especialmente, las interacciones disolvente/disolvente juegan un papel clave. En definitiva, nuestro análisis avala la existencia de una componente solvofóbica significativa cuyo papel modulador de los contactos CH/ π es determinante.

En resumen, hemos desarrollado un método versátil y sencillo para el análisis de las interacciones CH/ π en medios fisiológicos. Este método ha permitido la determinación de las energías de interacción de más de 100 complejos carbohidrato/aromático, así como el establecimiento de relevantes relaciones estructura/estabilidad. Además, desde un punto de vista fundamental, los resultados obtenidos han contribuido a clarificar las principales contribuciones energéticas que promueven la formación de este tipo de contactos en medios acuosos.

ANEXO 1

A Dynamic Combinatorial Approach for the Analysis of Weak Carbohydrate/Aromatic Complexes: Dissecting Facial Selectivity in CH/ π Stacking Interactions

Andrés G. Santana,^{†,‡} Ester Jiménez-Moreno,^{†,‡} Ana M. Gómez,[†] Francisco Corzana,[‡] Carlos González,[§] Gonzalo Jiménez-Oses,^{||} Jesús Jiménez-Barbero,[⊥] and Juan Luis Asensio^{*,†}

[†]Instituto de Química Orgánica (IQOG-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

[‡]Departamento de Química, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, La Rioja, Spain

[§]Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC), E-28006 Madrid, Spain

^{||}Department of Chemistry & Biochemistry, University of California, Los Angeles, California 90095, United States

[⊥]Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), 28040 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: A dynamical combinatorial approach for the study of weak carbohydrate/aromatic interactions is presented. This methodology has been employed to dissect the subtle structure–stability relationships that govern facial selectivity in these supramolecular complexes.

Understanding how proteins and nucleic acid receptors recognize oligosaccharides represents a fundamental issue in chemical biology with far-reaching implications in fundamental biology, biotechnology, and drug design.¹ After two decades of studies, it is now widely accepted that stacking interactions involving pyranose rings and aromatic systems are pivotal to these processes.² While the free energy of these contacts is dominated by the dispersive component, electrostatic and solvent-dependent effects also must be considered. Despite extensive efforts in this area, a detailed comprehension of the existing relationship between these contributions and the chemical nature of the pyranose and aromatic rings is still missing. This absence can at least partially be attributed to the lack of a simple system for the study of stacking complexes that displays enough sensitivity to reveal minor stability differences. Employing concepts from dynamic combinatorial chemistry,³ we have developed a simple and versatile model for the analysis of weak carbohydrate/aromatic complexes.

Our general strategy is outlined in Figure 1a. First, several disaccharide model systems were designed and synthesized. All of them included a common aminoaltriose ring locked in a ⁴C₁ conformation by a benzylidene group and linked to an equatorial position of a variety of potential “CH/ π donor” sugar units (represented as colored ellipses). Next, equimolar amounts of the different models were dissolved in 10 mM phosphate solution [see the experimental section in the Supporting Information (SI)] and treated with 2-naphthylacetaldehyde to form a dynamic mixture of hemiaminals/imines (undetectable under the employed experimental conditions).

Previous studies have shown that these species adopt a hairpinlike major conformation stabilized by intramolecular stacking between the aromatic system and the sugar CH/ π

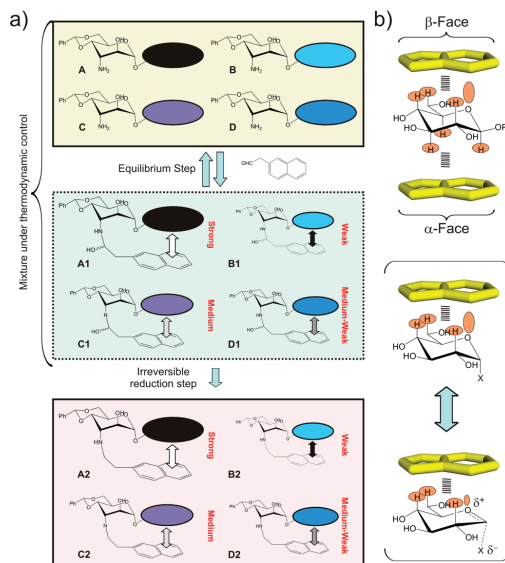


Figure 1. (a) Schematic representation of the dynamic combinatorial approach employed for the analysis of carbohydrate/aromatic interactions. (b) (top) Complexes involving the D-pyranose β/α faces for both anomers are shown (up and down). Interacting regions of the D-pyranose are highlighted. (bottom) The charge density at the ring oxygen is modulated by hyperconjugative delocalization of its lone pair (a common explanation for the anomeric effect).

donor.⁴ Since the resulting mixture is formed under thermodynamic control, the observed composition directly depends on the energy contribution of the different carbohydrate/aromatic contacts (the only distinct factor among the species). Subsequent chemical reduction of the

Received: December 10, 2012

Published: February 18, 2013

Supporting Information

for

**A dynamic combinatorial approach for the analysis of weak
carbohydrate/aromatic complexes: dissecting facial selectivity in
CH/ π stacking interactions**

Submitted to the *Journal of the American Chemical Society* by:

Andrés G. Santana, Ester Jiménez-Moreno, Ana M. Gómez, Francisco Corzana, Carlos
González, Gonzalo Jiménez-Oses, Jesus Jiménez-Barbero, Juan Luis Asensio*

CONTENTS:

Experimental Section

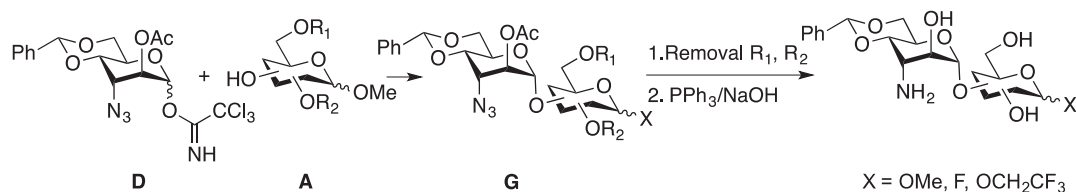
Figures S1 to S11

Experimental part

Preliminary considerations

In order to dissect the subtle factors that govern facial selectivity in weak carbohydrate/aromatic complexes, several disaccharide model systems were designed and synthesized. All of them include a common 3-amino-3-deoxy α -altrose moiety linked to an equatorial position of a variety of potential “CH/ π donor” sugar units (represented as coloured ellipses in Figure 1). Previous studies on related compounds¹ indicate that after reductive amination of the disaccharides with 2-naphthyl acetaldehyde, the aromatic system becomes optimally positioned to stabilize hairpin-like structures by means of a stacking interaction with the CH/ π donor unit. A benzylidene moiety between positions 4 and 6 of the inherently flexible altrose ring was incorporated in order to prevent its inversion. Indeed, preliminary experiments have shown that this function is essential for an adequate positioning of the amino group with respect to the CH/ π donor unit.

Synthesis of the disaccharide library



Scheme 1

The synthetic route followed for the preparation of the disaccharide library is represented in Scheme 1. It includes the glycosylation reaction between the common glycosyl donor **D** and ethylene glycol **A1** or the substituted alkyl D-pyranosides **A2-A8** to give glycosides **G** (**G1-G8**). Subsequent steps related to the cleavage of protecting groups and Staudinger reduction, granted access to the reference compound **1** and disaccharides **2-8**, respectively.

General Information

Chemicals were purchased and used without further purification. All solvents were purified by distillation over drying agents or by elution through a PURE SOLV purification system. Unless stated otherwise, reactions were carried out under a dry argon atmosphere in vacuum-flame dried glassware. Residual water was removed from starting compounds by repeated coevaporation with toluene. Detection was by examination under UV light (254 nm) and by charring with 10% sulfuric acid in

¹ T. Vacas, F. Corzana, G. Jiménez-Oses, C. González, A. M. Gómez, A. Bastida, J. Revuelta, J. L. Asensio, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12074-12090.

ethanol. Flash column chromatography was performed using silica gel [Merck, 230–400 mesh (40–63 μm)]. Extracts were concentrated *in vacuo* using both a Büchi rotary evaporator (bath temperatures up to 40 °C) at a pressure of either 15 mmHg (diaphragm pump) or 0.1 mmHg (oil pump), as appropriate, and a high vacuum line at room temperature. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were measured in the solvent stated at 500, 400 or 300 and 126, 101 or 75 MHz, respectively. Chemical shifts are quoted in parts per million from residual solvent peak and coupling constants (J) given in Hertz. Multiplicities are abbreviated as: b (broad), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet) or combinations thereof. An Agilent 6520 accurate-mass quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass analyzer was used for the HR-MS. Glycosyl donor **D** was prepared from allyl 3-azido-3-deoxy-4,6-*O*-benzylidene α -D-atropyranose² by acetylation, allyl cleavage at the anomeric position, and trichloroacetimidate formation according to standard procedures. Starting glycosyl acceptors **A2–A8** were prepared following well-established procedures, and cleavage of protecting hydroxyl groups was carried out following standard procedures.³

General experimental procedure for glycosidation: A stirred solution of the glycosyl donor **D** (3.0 mmol) and the appropriate glycosyl acceptor **A** (1.0 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL) under argon at -65°C (unless otherwise noted), was treated with TMSOTf (0.2 mmol) and allowed to stir at this temperature until no glycosyl acceptor was left (monitored by TLC). Et_3N was then added and the resulting mixture was vigorously stirred for 10 min. The reaction mixture was then concentrated, without heating, and the crude product was purified by flash chromatography.

General experimental procedure for oxidative cleavage of the *p*-methoxybenzyl groups: 1. *Method A.* To a solution of the *p*-methoxybenzyl ether (1.0 mmol) in a 8:1:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ mixture (50 mL) was added DDQ (2.0 mmol/*p*-methoxybenzyl group) and then stirred at rt. for 3–6 h. The crude was chromatographed using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 0→10%. 2. *Method B*⁴. To a solution of the corresponding *p*-methoxybenzyl ether (1.0 mmol) and di-*tert*-butyl pyridine (3.0 mmol/*p*-methoxybenzyl group) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (18:1, 55 mL) was added DDQ (1.5 mmol/*p*-methoxybenzyl group). The reaction mixture was vigorously stirred overnight and concentrated *in vacuo*. The residue was then purified by column chromatography.

² R. H. Plet, A. K. Sandhu, M. Sehailia, M. J. Porter *Synlett* **2009**, 3258–3262.

³ P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3rd Edn., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

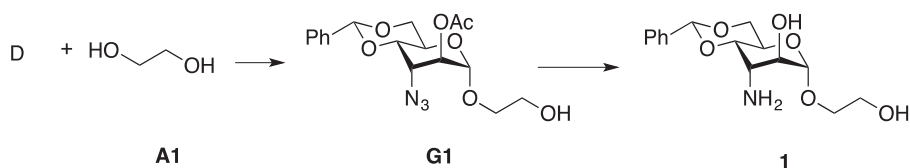
⁴ H. M. Kim, I J. Kim, S. J. Danishefsky *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 35–48.

General experimental procedure for cleavage of the *p*-methoxybenzylidene group⁵: To a solution of the corresponding *p*-methoxybenzylidene containing compound (1 mmol) in CH₃CN containing 10% water (30 mL) was added Selectfluor (2.4 mmol) at rt.. The reaction mixture was allowed to react at appropriate temperature. Finally, the solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography.

General experimental procedure for selective opening of the *p*-methoxybenzylidene group⁶: A solution of trifluoroacetic acid (15 mmol) in DMF (4 mL) cooled to 0°C was added dropwise to a stirred mixture of the corresponding *p*-methoxybenzylidene containing compound (1 mmol), sodium cyanoborohydride (10 mmol) and 3Å molecular sieves (2 g) in DMF (10 mL). The reaction was stirred overnight at rt. and then filtered through Celite. The filtrate was poured into ice-cold saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution. The aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography.

General experimental procedure for reduction of azide group through a Staudinger reaction with concomitant acetate hydrolysis: A solution of the corresponding azide (1 mmol) in THF (32 mL) was treated with aqueous 0.1 M NaOH (2 mL) and PMe₃ (1.5 mmol, 1 M solution in THF). The mixture was then stirred at rt. until TLC showed no starting azide was left. The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography.

Characterization of the disaccharides.



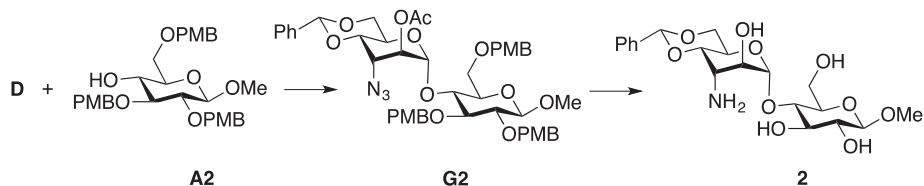
(2-Hydroxyethyl) 3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy α -D-altropyranoside (1**):** The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **D** (0.266 mmol, 127mg) and ethylene glycol **A1** (0.30 mL, 5.3 mmol) but at -20°C for 1.5 h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (6:4) to give glycosylated compound **G1** (13 mg, 13%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.52 – 7.46 (m, 2H, Ph), 7.41 – 7.34 (m, 3H,

⁵ J. Liu and C.-H. Wong *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4037–4039.

⁶ C. Grandjean, G. Lukacs *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, 15, 831-855.

Ph), 5.62 (s, 1H, H7), 5.02 (dd, $J = 2.5, 1.0$ Hz, 1H, H2), 4.75 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H1), 4.37 – 4.29 (m, 2H), 4.11 – 4.04 (m, 2H), 3.86 – 3.74 (m, 4H), 3.61 (m, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 169.61 (CO), 137.18 (C_{hipso}), 129.65 ($\text{C}_{\text{para Ph}}$), 128.73 (2xCH, Ph), 126.48 (2xCH, Ph), 102.66 (C7), 98.03 (C1), 76.16, 70.62 (C2), 70.00 (CH_2), 69.27 (C6), 62.04 (CH_2), 59.31, 58.03, 21.26 (CH_3); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_7$ [$\text{M}+\text{NH}_4^+$]: 397.1718, found: 397.1722.

Compound **G1** (13 mg, 0.035 mmol) was subjected to the general procedure for reduction of the azide moiety by treatment with PMe_3 (53 μL , 0.053 mmol) and 0.1 M NaOH (71 μL) at rt for 6h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) to give the desired product **1** (9 mg, 90%): ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.57 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.50 – 7.43 (m, 3H, Ph), 5.84 (s, 1H, H7'), 4.87 (s, 1H, H1), 4.33 (dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz, 1H, H6a), 4.22 (dd, $J = 9.9, 4.9$ Hz, 1H, H5), 4.18 (dd, $J = 10.1, 4.0$ Hz, 1H, H4), 4.04 (dd, $J = 2.8, 1.2$ Hz, 1H, H2), 3.93 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H6b), 3.88 (ddd, $J = 11.0, 4.9, 4.0$ Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.81–3.76 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.63–3.57 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.43 – 3.39 (m, 1H, H3); ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 131.24 (CH, Ph), 129.99 (CH, Ph), 127.56 (CH, Ph), 103.46 (C7), 101.55 (C1), 76.19 (C4), 70.59 (C2), 70.50 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 69.62 (C6), 61.66 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 59.45 (C5), 51.97 (C3); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_6$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 312.1442, found: 312.1444.



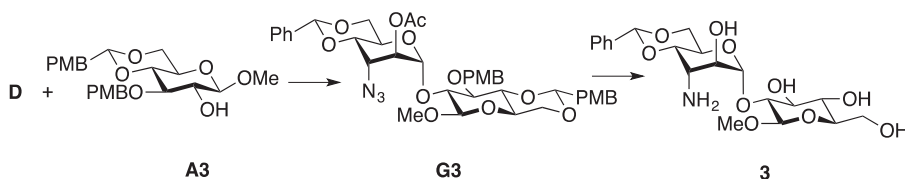
Methyl 4-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- β -D-glucopyranoside (2).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **D** (164 mg, 0.34 mmol) and acceptor **A2**⁷ (63 mg, 0.11 mmol) at -65°C for 25 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 then 6:4) to give glycosylated compound **G2** (24 mg, 25%): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7.36-7.52 (m, 5H, Ph), 7.11-7.33 (m, 6H, PMB), 6.80-6.88 (m, 6H, PMB), 5.58 (s, 1H, H7'), 5.26 (s, 1H, H1'), 4.94 (d, $J=10.9$ Hz, 1H, PMB), 4.93 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H2'), 4.85 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.64 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, PMB), 4.61 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.56 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, PMB), 4.55 (d, $J=10.9$ Hz, 1H, PMB), 4.32 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H1), 4.22-4.27 (m, 1H, H5'), 4.17 (dd, $J=10.3, 5.5$ Hz, 1H, H6a'), 4.03 (dd, $J=3.5, 2.9$ Hz, 1H, H3'), 3.95 (dd, $J=9.4, 3.5$ Hz, 1H, H4'), 3.86 (dd, $J=9.8, 9.0$ Hz, 1H, H4), 3.80 (s, 3H, PMB), 3.82-3.79 (m, 2H, H6a, H6b), 3.79 (s, 3H, PMB), 3.74 (s, 3H, PMB), 3.69 (dd, $J=10.3, 3.1$

⁷ Prepared from methyl β -D-glucopyranoside as described for methyl α -D-glucopyranoside in C. Grandjean, G. Lukacs *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 831-855.

Hz, 1H, H6b'), 3.65 (dd, $J=9.0, 7.4$ Hz, 1H, H3), 3.60 (s, 3H, -OCH₃), 3.51(ddd, $J=9.8, 3.3, 3.3$ Hz, 1H, H5), 3.43 (dd, $J=9.0, 7.8$ Hz, 1H, H2), 1.94 (s, 3H, AcO); ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃); 168.9 (C, CO-AcO), 159.2 (C, PMB), 159.0 (C, PMB), 158.8 (C, PMB), 137.0 (C_{hipso}, Ph), 130.5 (C, PMB), 130.4 (C, PMB), 130.3 (C, PMB), 129.8 (2x CH, Ph), 129.5 (CH, Ph), 129.2 (2x CH, PMB), 128.7 (2x CH, PMB), 128.3 (2x CH, PMB), 126.1 (2x CH, Ph), 113.75 (2x CH, PMB), 113.66 (2x CH, PMB), 113.6 (2x CH, PMB), 104.6 (CH, C1), 102.0 (C7'), 97.7 (CH, C1'), 84.4 (CH, C3), 82.1 (CH, C2), 75.7 (CH, C4'), 74.4 (CH₂, PMB), 74.14 (CH₂, PMB), 74.12 (CH, C5), 73.3 (CH₂, PMB), 73.0 (CH, C4), 70.3 (CH, C2'), 68.8 (CH₂, C6'), 68.5 (CH₂, C6), 59.3 (CH, C5'), 57.3 (CH₃, MeO), 57.0 (CH, C3'), 55.22 (2x CH₃, PMB), 55.15 (CH₃, PMB), 20.7 (CH₃, AcO); MS (API-ES positive mode): 889 (M+NH₄)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₆H₅₇N₄O₁₄ [M+NH₄]⁺: 889.3866, found: 889.3892.

Compound **G2** (24 mg, 0.03 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 6 h. The crude material was purified by column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (95:5) and the resulting residue (12 mg, 0.027 mmol) was treated with PMe₃ (40 μL, 0.04 mmol) and 0.1 M NaOH (60 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/Dioxane/NH₄OH mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **2** (7 mg, 52% overall yield): ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.59 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.52 – 7.44 (m, 3H, Ph), 5.86 (s, 1H, H-7'), 5.17 (s, 1H, H1'), 4.38 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H1), 4.33 (dd, $J=10.4, 4.9$ Hz, 1H, H6a'), 4.25 (td, $J=10.0, 4.9$ Hz, 1H, H5'), 4.16 (dd, $J=10.0, 3.9$ Hz, 1H, H4'), 4.12 (dd, $J=3.0, 1.4$ Hz, 1H, H2'), 3.99 – 3.90 (m, 2H, H6b', H6a), 3.81 (dd, $J=12.1, 4.6$ Hz, 1H, H6b), 3.68 (t, $J=8.8$ Hz, 1H, H3), 3.65 – 3.54 (m, 5H, H4, H5, -OCH₃), 3.35 (m, 1H, H3'), 3.28 (dd, $J=9.5, 7.9$ Hz, 1H, H2); ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) δ 137.51 (C_{hipso}, Ph), 130.61 (Ph), 129.35 (Ph), 103.68 (C1), 102.85 (C1'), 102.79 (C7), 78.68 (C4), 77.30 (C3), 76.09 (C4'), 74.95 (C5), 73.75 (C2), 70.67 (C2'), 68.88 (C6'), 61.45 (C6), 59.44 (C5'), 57.76 (-OCH₃), 51.27 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₀H₂₉NO₁₀ [M+H]⁺: 444.1864, found: 444.1865.



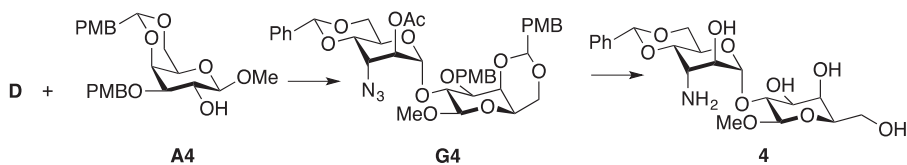
Methyl 2-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- β -D-glucopyranoside (3).

This compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **D** (305

mg, 0.64 mmol) and acceptor **A3**⁸ (100 mg, 0.23 mmol) at -65°C for 1.5 h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (7:3) to give glycosylated compound **G3** (173 mg, quantitative): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.55 – 7.34 (m, 9H, Ar), 6.94 – 6.89 (m, 2H, Ar), 6.71–6.66 (m, 2H, Ar), 5.61 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.15 (s, 1H, H1'), 5.04 (dd, *J* = 2.7, 0.8 Hz, 1H, H2'), 4.88 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, CH₂PMB), 4.82 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, CH₂PMB), 4.65 (td, *J* = 10.1, 5.3 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H1), 4.35 (dd, *J* = 10.5, 5.0 Hz, 1H), 4.13 – 4.03 (m, 3H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.81 – 3.65 (m, 5H), 3.59 (s, 3H, OCH₃), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.44 (td, *J* = 9.9, 5.0 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H, OAc); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 169.36, 160.25, 159.46, 137.52, 130.88, 129.94, 129.31, 128.50, 127.51, 126.43, 114.04, 113.84, 105.40 (C1), 102.25 (C7'), 101.48 (PMPCH), 96.95 (C1'), 82.31, 78.56, 77.05, 76.18, 75.25, 70.44 (C2'), 69.00, 68.91, 66.27, 58.84, 58.04, 57.85, 55.51, 55.25, 21.18 (AcO); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₃₈H₄₄N₃O₁₃ [M+H⁺]: 750.2869, found: 750.2851 [M+H]⁺.

Compound **G3** (160 mg, 0.21 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups by treatment with di-*tert*-butyl pyridine (0.14 mL, 0.642 mmol) and DDQ (73 mg, 0.321 mmol) overnight (method B). The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (7:3). The resulting residue (95.6 mg, 0.15 mmol) was reacted with Selectfluor (80 mg) at rt. according to the general procedure for the cleavage of *p*-methoxybenzylidene groups and then purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient 98:2 to 96:4). This material (56.3 mg, 0.110 mmol) was finally treated with PMe₃ (165 μL, 0.165 mmol) and 0.1 M NaOH (220 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (gradient 95:5 to 90:10) to give the desired product **3** (25 mg, 27%, overall yield): ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 7.55 (m, 2H, Ph), 7.50–7.44 (m, 3H, Ph), 5.84 (s, 1H, H7'), 5.16 (s, 1H, H1'), 4.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 4.46 (td, *J* = 10.2, 5.0 Hz, 1H, H5'), 4.32 (dd, *J* = 10.4, 5.1 Hz, 1H, H6a'), 4.20 (dd, *J* = 10.3, 4.0 Hz, 1H, H4'), 4.09 – 4.04 (m, 1H, H2'), 3.97–3.88 (m, 2H, H6b', H6), 3.72 (dd, *J* = 12.3, 5.7 Hz, 1H, H6), 3.66 – 3.59 (m, 1H, H3), 3.58 (s, 3H, -OCH₃), 3.49–3.35 (m, 4H, H2, H4, H5, H3'); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 137.5 (C_{hipso}, Ph), 129.64 (Ph), 126.92 (Ph), 126.83 (Ph), 104.27 (C1), 102.77 (C7'), 100.41 (C1'), 78.46 (C2), 76.31, 75.38 (C4'), 74.82 (C3), 70.46, 69.90 (C2'), 68.98 (C6a'), 61.30 (C6), 59.03 (C5'), 57.93 (-OCH₃), 51.24 (C3'); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₂₉NO₁₀ [M+H⁺]: 444.1864, found: 444.1860.

⁸ J. Chen, L. Feng, and G. D. Prestwich; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6511-6522.



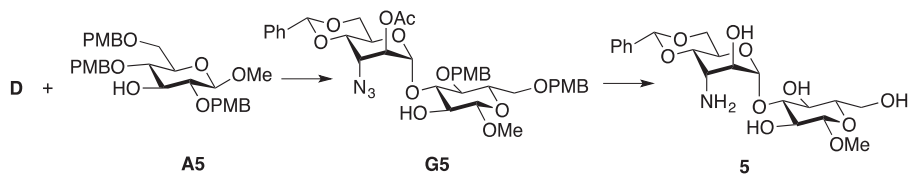
Methyl 2-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy-α-D-altropyranosyl)- β-D-galactopyranoside (4).

This compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **D** (173 mg, 0.362 mmol) and acceptor **A4**⁹ (100 mg, 0.231 mmol) at -65°C for 1 h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (6:4) to give glycosylated compound **G4** (166 mg, 96 %): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.51 – 7.43 (m, 4H, Ar), 7.41 – 7.33 (m, 5H, Ar), 6.92 – 6.79 (m, 4H, Ar), 5.57 (s, 1H, H7'), 5.43 (s, 1H, PMBCH), 5.09 (s, 1H, H1a), 5.03 (d, J=2.6 Hz, 1H, H2'), 4.69 (s, 2H, PMBCH₂), 4.64 (td, J = 10.0, 5.2 Hz, 1H, H5'), 4.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H1), 4.29 (m, 1H, H6), 4.17 (dd, J = 10.2, 5.3 Hz, 1H, H6'), 4.14 – 3.97 (m, 4H), 3.92 (dd, J = 9.7, 7.9 Hz, 1H, H2), 3.81 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.64 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H6'), 3.56 (m, 1H, H3) 3.53 (s, 3H), 3.31 (s, 1H, H5), 2.15 (s, 3H, OAc); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.50, 160.36, 159.58, 137.67, 130.79, 130.24, 130.10, 129.41, 128.61, 128.12, 126.56, 114.16, 113.78, 105.05 (C1), 102.42 (C7'), 101.55 (PMPCH), 97.75 (C1'), 77.27 (C3), 76.34 (C4'), 75.06 (C2), 73.45 (C5), 71.34 (PMBCH₂), 70.60 (C2'), 69.45 (C6), 69.30 (C6'), 66.78 (C5), 59.06 (C5'), 58.04 (C3'), 57.72, 55.64, 55.47, 21.33 (Me); HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₈H₄₇N₄O₁₃ [M+ NH₄⁺]: 767.3134, found: 767.3165.

Compound **G4** (150 mg, 0.200 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups by treatment with di-*tert*-butyl pyridine (0.134 mL, 0.6 mmol) and DDQ (68 mg, 0.3 mmol) over a course of 1.5 h (method B). The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4). The resulting residue (108 mg, 0.17 mmol) was reacted with Selectfluor (91 mg) at rt. according to the general procedure for the cleavage of *p*-methoxybenzylidene groups and then purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient 98:2, 96:4 then 94:6). This material (42.7 mg, 0.084 mmol) was finally treated with PMe₃ (125 μL, 0.125 mmol) and 0.1 M NaOH (168 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (90:10) to give the desired product **4** (30 mg, 34% overall yield): ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 7.56–7.51 (m, 2H, Ph), 7.49–7.41 (m, 3H, Ph), 5.81 (s, 1H, H7'), 5.13 (s, 1H, H1'), 4.43 (m, 2H, H1, H5'), 4.33 (dd, J = 10.2, 5.1 Hz, 1H, H6a'), 4.13 (dd, J = 10.3, 4.0 Hz, 1H, H4'), 4.01 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H2'),

⁹ Prepared from methyl β-D-galactopyranoside following the same procedure described for **A3**. See J. Chen, L. Feng, and G. D. Prestwich; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6511-6522.

3.92 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H4), 3.89 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H, H6b'), 3.82 – 3.70 (m, 3H, H6a, H6b, H3), 3.69 – 3.64 (m, 1H, H5), 3.58 (m, 4H, -OCH₃, H2), 3.32 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H3'); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 137.51 (C_{hipso}, Ph), 129.41 (Ph), 126.90 (Ph), 104.74 (C1g), 102.81 (C7'), 100.80 (C1'), 76.83 (C2), 76.16 (C4'), 75.63 (C5), 71.93 (C3), 70.57 (C2'), 69.62 (C4), 69.07 (C6'), 61.56 (C6), 58.93 (C5'), 57.90 (-OCH₃), 51.45 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₀H₂₉NO₁₀ [M+H⁺]: 444.1864, found: 444.1880.



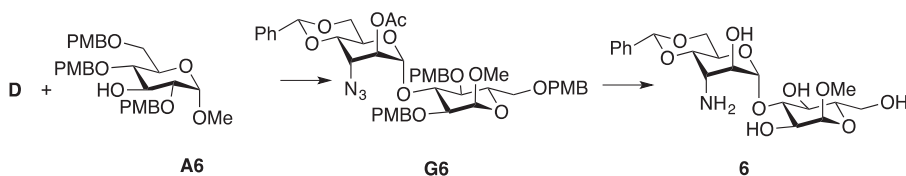
Methyl 3-*O*-(3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- β -D-glucopyranoside (5).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **D** (188 mg, 0.39 mmol) and acceptor **A5**¹⁰ (71 mg, 0.13 mmol) at -65 °C for 30 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 to 6:4) to give a compound which was identified as partially deprotected **G5** (33 mg, 38%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.54-7.36 (m, 5H, Ph), 7.30-7.07 (m, 4H, PMB), 6.88-6.80 (m, 4H, PMB), 5.61 (s, 1H, H7'), 5.07 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, H2'), 4.98 (s, 1H, H1'), 4.69 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.66 (ddd, $J=10.5, 9.1, 5.3$ Hz, 1H, H5'), 4.59 (d, $J=12.1$ Hz, 1H, PMB), 4.49 (d, $J=12.1$ Hz, 1H, PMB), 4.48 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.35 (dd, $J=10.3, 5.3$ Hz, 1H, H6b'), 4.20 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, H1), 4.08 (dd, $J=6.6, 3.5$ Hz, 1H, H3'), 4.06 (dd, $J=9.1, 3.5$ Hz, 1H, H4'), 3.803 (s, 3H, PMB), 3.796 (s, 3H, PMB), 3.78-3.75 (m, 1H, H6a'), 3.71-3.62 (m, 4H, H3, H4, H6a, H6b), 3.58 (s, 3H, -OCH₃), 3.54 (dd, $J=7.8, 7.4$ Hz, 1H, H2), 3.42 (ddd, $J=9.0, 3.9, 2.3$ Hz, 1H, H5), 3.09 (bd, $J=3.5$ Hz, 1H, H-OH), 2.10 (s, 3H, AcO); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃): 169.0 (C, CO-AcO), 159.23 (C, PMB), 159.21 (C, PMB), 136.9 (C_{hipso}, Ph), 130.4 (C, PMB), 130.0 (C, PMB), 129.6 (2x CH, PMB), 129.4 (2x CH, PMB), 129.2 (C, PMB), 128.3 (2x CH, PMB), 126.1 (2x CH, Ph), 113.8 (2x CH, PMB), 113.7 (2x CH, PMB), 103.7 (CH, C1), 102.3 (C7'), 98.8 (CH, C1'), 84.0 (CH, C4), 77.4 (CH, C3), 75.7 (CH, C4'), 75.0 (CH, C5), 74.5 (CH₂, PMB), 73.2 (CH₂, PMB), 72.7 (CH, C2), 70.5 (CH, C2'), 68.8 (CH₂, C6'), 68.1 (CH₂, C6), 59.2 (CH, C5'), 57.5 (CH, C3'), 57.2 (CH₃, OCH₃), 55.2 (2x CH₃, PMB), 20.8 (CH₃, AcO). MS (API-ES positive

¹⁰ This compound was prepared from 3-*O*-allyl-1,2:4,6-bis-*O*-isopropylidene- α -D-glucopyranose by methanolysis, as described in Y. Yoshimoto, Y. Tsuda *Chem PharmBull* **1983**, *31*, 4335-4340 followed by per *p*-methoxybenzylation and allyl-cleavage. Separation of the anomers **A5** and **A6** was carried out in the final step.

mode): 769 ($M+NH_4^+$); HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{38}H_{49}N_4O_{13}$: $[M+NH_4]^+$: 769.3291, found: 769.3321.

Compound **G5** (30 mg, 0.04 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 3 h. The crude material was purified by column chromatography using $CH_2Cl_2/MeOH$ (95:5) and the resulting residue (18 mg, 0.036 mmol) was treated with PMe_3 (50 μL , 0.05 mmol) and 0.1 M NaOH (80 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using $CH_2Cl_2/MeOH/Dioxane/NH_4OH$ mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **5** (15 mg, 85% overall yield): 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.58 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.48 (m, 3H, Ph), 5.87 (s, 1H, H7'), 5.26 (s, 1H, H1'), 4.49 (td, $J = 10.1, 4.9$ Hz, 1H, H5'), 4.44 – 4.38 (m, 2H, H1g, H4'), 4.33 (dd, $J = 10.4, 4.9$ Hz, 1H, H6a'), 4.29 (dd, $J = 2.8, 1.5$ Hz, 1H, H2'), 3.98 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, H6b'), 3.92 (dd, $J = 12.4, 2.3$ Hz, 1H, H6a), 3.84 (t, $J = 3.5$ Hz, 1H, H3'), 3.73 (dd, $J = 12.4, 5.7$ Hz, 1H, H6b), 3.68 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H3), 3.61 (m, 4H, H4g, $-OCH_3$), 3.48 (ddd, $J = 10.0, 5.7, 2.3$ Hz, 1H, H5), 3.46 – 3.41 (m, 1H, H2); ^{13}C RMN (126 MHz, D_2O) δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 126.96 (Ph), 129.49 (Ph), 102.93 (C7'), 100.82 (C1'), 59.38 (C5'), 103.86 (C1), 72.74 (C4'), 68.90 (C6'), 67.65 (C2'), 61.01 (C6), 50.61 (C3'), 83.22 (C3), 70.58 (C4), 58.02 ($-OCH_3$), 76.20 (C5), 72.28 (C2); HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{20}H_{29}NO_{10}$ [$M+H^+$]: 444.1864, found: 444.1876.

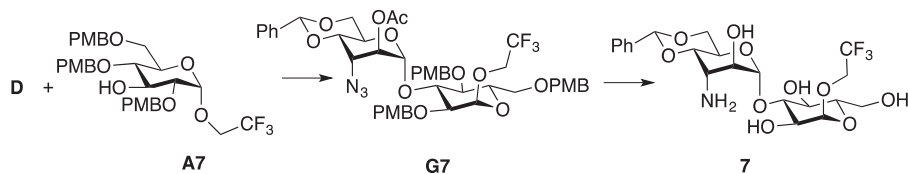


Methyl 3-*O*-(3-amino-3-deoxy-4,6-*O*-benzylidene α -D-altropyranosyl)- α -D-glucopyranose (**6**).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **D** (194 mg, 0.40 mmol) and acceptor **A6**¹⁰ (75 mg, 0.13 mmol) at -65 °C for 20 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 to 7:3) to give compound **G6** (73 mg, 72%): 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 7.52-7.33 (m, 5H, Ph), 7.28-6.95 (m, 6H, PMB), 6.88-6.75 (m, 6H, PMB), 5.57 (s, 1H, H7'), 5.11 (s, 1H, H1'), 5.05 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, H2'), 4.80 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, PMB), 4.67 (td, $J=9.8, 5.2$ Hz, 1H, H5'), 4.60 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, PMB), 4.58 (d, $J=11.5$ Hz, 1H, PMB), 4.55 (d, $J=10.0$ Hz, 1H, PMB), 4.53 (s, 1H, H1), 4.40 (d, $J=11.5$ Hz, 1H, PMB), 4.37 (d, $J=10.0$ Hz, 1H, PMB), 4.30 (dd, $J=10.1, 5.2$ Hz, 1H, H6a'), 4.06 (dd, $J=3.5, 2.7$ Hz, 1H, H3'), 4.10-4.03 (m, 1H, H6b'), 3.99 (dd, $J=9.4, 3.5$ Hz, 1H, H4'), 3.78 (s, 3H, PMB), 3.77 (s, 3H, PMB), 3.71 (s, 3H, PMB), 3.70-3.62 (m, 4H, H3, H4, H5, H6a), 3.58 (d, $J=9.8$ Hz, 1H, H2), 3.49 (dd, $J=9.8, 3.7$ Hz, 1H, H6b), 3.32 (s, 3H, $-OCH_3$), 1.99 (s, 3H, AcO); ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 168.9 (C, CO-AcO),

159.6 (C, PMB), 159.5 (C, PMB), 159.2 (C, PMB), 137.5 (C_{hipso} , Ph), 130.5 (C, PMB), 130.2 (C, PMB), 130.1 (C, PMB), 130.08 (2x CH, Ph), 129.6 (2x CH, PMB), 129.0 (CH, Ph), 128.6 (2x CH, PMB), 128.2 (2x CH, PMB), 126.3 (2x CH, Ph), 114.1 (2x CH, PMB), 113.9 (2x CH, PMB), 113.8 (2x CH, PMB), 102.2 (C7'), 98.3 (CH, C1), 98.1 (CH, C1'), 79.2 (CH, C4), 77.5 (CH, C3), 76.4 (CH, C4'), 73.9 (CH₂, PMB), 73.3 (CH₂, PMB), 72.89 (CH₂, PMB), 72.85 (CH, C5), 70.8 (CH, C2), 70.0 (CH, C2'), 69.1 (CH₂, C6'), 68.3 (CH₂, C6), 58.8 (CH, C5'), 57.8 (CH, C3'), 55.3 (CH₃, MeO), 55.23 (CH₃, PMB), 55.17 (CH₃, PMB), 55.1 (CH₃, PMB), 20.6 (CH₃, AcO). MS (API-ES positive mode): 889 ($M+\text{NH}_4$)⁺; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₄₆H₅₇N₄O₁₄: [$M+\text{NH}_4$]⁺: 889.3866, found: 889.3861.

Compound **G6** (60 mg, 0.07 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 3 h. The crude material was purified by column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (95:5) and the resulting residue (16.5 mg, 0.032 mmol) was treated with PMe₃ (50 μL, 0.05 mmol) and 0.1 M NaOH (80 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/Dioxane/NH₄OH mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **6** (14 mg, 46% overall yield): ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.54 (m, 2H, Ph), 7.46 (m, 3H, Ph), 5.82 (s, 1H, H7'), 5.17 (s, 1H, H1'), 4.81 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H1), 4.47 (dt, *J* = 10.2, 5.0 Hz, 1H, H5'), 4.30 (dd, *J* = 10.4, 5.1 Hz, 1H, H6a'), 4.13 (dd, *J* = 10.2, 3.9 Hz, 1H, H4'), 4.08 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H2'), 3.94 – 3.81 (m, 2H, H6b', H6a), 3.81 – 3.71 (m, 2H, H3, H6b), 3.69 – 3.62 (m, 2H, H2, H5), 3.57 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H4), 3.42 (s, 3H, -OCH₃), 3.32 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, H3'); ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 130.06 (2x Ph), 127.55 (2xPh), 103.17 (C7'), 102.30 (C1'), 100.36 (C1), 80.53 (C3), 76.49 (C4'), 71.44 (C2 and C5), 71.35 (C4), 70.87 (C2'), 69.22 (C6'), 61.14 (C6), 58.97 (C5'), 55.74 (-OCH₃), 52.39 (C3'). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₂₉NO₁₀ [$M+\text{H}^+$]: 444.1864, found: 444.1867.



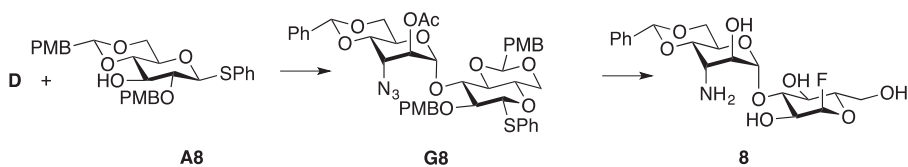
Trifluoroethyl 3-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy α-D-altropyranosyl)-α-D-glucopyranoside (7).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **D** (159 mg, 0.33 mmol) and acceptor **A7**¹¹ (68 mg, 0.11 mmol) at -65 °C for 20 min. The crude material was

¹¹ This compound was prepared in a similar manner than compound **A6** but using trifluoroethanol instead of methanol and concentrated sulphuric acid as catalyst in the opening of 3-O-allyl-1,2:4,6-bis-O-isopropylidene-α-D-glucopyranoside. See: Y. Yoshimoto, Y. Tsuda *Chem PharmBull* **1983**, *31*, 4335-4340.

purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 to 7:3) to give compound **G7** (60 mg, 56%): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.54-7.34 (m, 5H, Ph), 7.28-7.17 (m, 4H, PMB), 7.05-6.70 (m, 8H, PMB), 5.55 (s, 1H, H7'), 5.12 (s, 1H, H1'), 5.05 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H2'), 4.87 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.78 (d, $J=3.7$ Hz, 1H, H1), 4.68 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, PMB), 4.67 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.63 (ddd, $J=9.6, 9.2, 6.2$ Hz, 1H, H5'), 4.59 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.52 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, PMB), 4.44 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.24-4.13 (m, 2H, H5, H6a'), 4.10 (dd, $J=6.2, 3.1$ Hz, 1H, H6b'), 4.05 (dd, $J=4.8, 2.9$ Hz, 1H, H3'), 3.99 (dd, $J=9.6, 3.8$ Hz, 1H, H4'), 3.86 (dd, $J=7.8$ Hz; $^3J_{\text{H-F}}=17.3$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$), 3.79 (s, 3H, PMB), 3.77 (s, 3H, PMB), 3.74 (s, 3H, PMB), 3.80-3.67 (m, 3H, H3, H4, H6a), 3.61 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H2), 3.56 (dd, $J=10.0, 3.7$ Hz, 1H, H6b), 1.97 (s, 3H, AcO); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): 168.9 (C, CO-AcO), 159.6 (2x C, PMB), 159.2 (C, PMB), 137.5 (C_{hipso} , Ph), 130.3 (C, PMB), 130.0 (CH, Ph), 129.9 (2x CH, Ph), 129.6 (2x CH, PMB), 129.0 (C, PMB), 128.8 (2x CH, PMB), 128.2 (2x CH, PMB), 128.1 (C, PMB), 126.3 (2x CH, Ph), 114.1 (2x CH, PMB), 114.0 (2x CH, PMB), 113.8 (2x CH, PMB), 102.2 (C7'), 98.2 (CH, C1), 97.7 (CH, C1'), 78.7 (CH, C4), 77.3 (CH, C3), 76.1 (CH, C4'), 74.1 (CH₂, PMB), 73.3 (CH, C5; CH₂, PMB), 72.8 (CH₂, PMB), 71.0 (CH, C2), 70.7 (CH, C2'), 69.0 (CH₂, C6'), 67.9 (CH₂, C6), 58.7 (CH, C5'), 57.8 (CH, C3'), 55.2 (2x CH₃, PMB), 55.0 (CH₃, PMB), 20.6 (AcO). MS (API-ES positive mode): 957 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_{14}$: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 957.3740, found: 957.3777.

Compound **G6** (50 mg, 0.05 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 5 h. The crude material was purified by column chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) and the resulting residue (11.5 mg, 0.016 mmol) was treated with PMe_3 (30 μL , 0.03 mmol) and 0.1 M NaOH (40 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Dioxane}/\text{NH}_4\text{OH}$ mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **7** (8 mg, 31% overall yield): ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 7.57 (m, 2H, Ph), 7.49 (m, 3H, Ph), 5.87 (s, 1H, H7'), 5.73 (dd, $J=53.0, 2.9$ Hz, 1H, H1), 5.20 (s, 1H, H1'), 4.51 (td, $J=10.3, 5.1$ Hz, 1H, H5'), 4.33 (dd, $J=10.3, 5.2$ Hz, 1H, H6a'), 4.17 (dd, $J=10.1, 4.0$ Hz, 1H, H4'), 4.15 – 4.11 (m, 1H, H2'), 3.94 (t, $J=10.3$ Hz, 1H, H6b'), 3.91 – 3.75 (m, 5H, H6, H4, H2, H3), 3.75 – 3.69 (m, 1H, H5), 3.36 (m, 1H, H3'); ^{13}C RMN (126 MHz, D_2O) δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 129.57 (Ph), 126.99 (Ph), 109.22 (C1), 107.41 (C1), 102.79 (C7'), 102.17 (C1'), 79.91 (C3), 76.32 (C4'), 74.53 (C4 or C5), 70.68 (C2'), 70.46 (C2), 69.67 (C5 or C4), 60.53 (C6), 58.88 (C5'), 51.56 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$: 512.1738, found: 512.1723.



3-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- α -D-glucopyranosyl fluoride (8).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **D** (313 mg, 0.65 mmol) and acceptor **A8**¹² (100 mg, 0.196 mmol) at -65°C for 20 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (8:2 then 7:3) to give compound **G8** (124.4 mg, 77 %): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.60–7.46 (m, 4H, Ph), 7.45–7.28 (m, 10H, Ph), 6.86–6.79 (m, 2H, Ph), 6.68–6.61 (m, 2H, Ph), 5.60 (s, 1H, H7'), 5.52 (s, 1H, PMPCH), 5.28 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H1'), 5.14 (dd, $J = 2.7, 0.9$ Hz, 1H, H2'), 5.04 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, PMBCH₂), 4.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, PMBCH₂), 4.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H1), 4.54 (td, $J = 10.0, 5.2$ Hz, 1H, H5'), 4.35 (dd, $J = 10.6, 4.9$ Hz, 1H, H6a), 4.16 – 3.98 (m, 4H, H3', H4', H6a', H3), 3.82 – 3.74 (m, 5H, -OCH₃, H4, H6b), 3.65 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H6b'), 3.60 (s, 3H, -OCH₃), 3.56 – 3.49 (m, 1H, H2), 3.47 – 3.39 (m, 1H, H5), 2.04 (s, 3H, -OAc), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.28, 160.26, 159.62, 137.58 (C_{hipso}, Ph), 133.61, 132.38, 130.76, 129.41, 128.60, 127.70, 126.52, 114.22, 113.68, 102.23 (C7'), 101.29 (PMBCH), 97.69 (C1'), 89.04 (C1), 82.14 (C4), 79.10 (C2), 76.21 (C4'), 75.99 (PMBCH₂), 70.39 (C2'), 70.08 (C5), 69.07 (C6'), 68.89 (C6), 59.05 (C5'), 58.16 (C3'), 55.62 (-OCH₃), 55.42 (-OCH₃), 21.41 (-OAc). HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₃H₄₆N₃O₁₂S [M+H]⁺: 828.2797, found: 828.2795.

A solution of NIS (40.6 mg, 0.181 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3 mL) was cooled to -40°C . HF-pyridine complex (54.5 μL , 3 mmol) was then added and the solution was stirred for 5 min.¹³ A solution of **G8** (124.4 mg, 0.150 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2 mL) was then added dropwise. After 1.5 h, the reaction mixture was quenched with pyridine and washed with 10% aqueous sodium thiosulfate containing NaHCO₃, and then water. The organic layer was dried, concentrated, and the residue purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 7:3) to afford an anomeric mixture of highly unstable glycosyl fluorides (63 mg, 57%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): Selected peaks δ : 5.42 (dd, $J = 52.2, 2.9$ Hz, 1H, H1 α -anomer); 5.31 (dd, $J = 52.5, 6.7$ Hz, 1H, H1 β -anomer); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): Selected peaks δ : 105.81 (d, $J = 230.6$ Hz, C1 α -anomer); 109.72 (d, $J = 216.7$ Hz, C1 β -anomer). This material (53.5 mg, 0.073 mmol) was immediately subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method B) over a course of 5 h. The crude material was purified by column

¹² K. Suzuki, I. Ohtsuka, T. Kanemitsu, T. Aiko, O. Kanie *J. Carbohyd. Chem.* **2005**, *24*, 219-236.

¹³ J. C. López, P. Bernal-Albert, C. Uriel, A. M. Gómez *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5037–5041.

chromatography using hexane/EtOAc (8:2) and the resulting residue (32 mg, 0.052 mmol) was reacted with Selectfluor (28 mg) at 50 °C according to the general procedure for the cleavage of *p*-methoxybenzylidene groups and then purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient 98:2 to 96:4). The residue (12.8 mg, 0.026 mmol) was treated with PMe₃ (40 μL, 0.04 mmol) and 0.1 M NaOH (30 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (90:10) to give the desired product **8** as pure α -anomer (13 mg, 20 % overall yield) ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 7.57 (m, 2H, Ph), 7.49 (m, 3H, Ph), 5.87 (s, 1H, H7'), 5.73 (dd, *J* = 53.0, 2.9 Hz, 1H, H1), 5.20 (s, 1H, H1'), 4.51 (td, *J* = 10.3, 5.1 Hz, 1H, H5'), 4.33 (dd, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 1H, H6'), 4.17 (dd, *J* = 10.1, 4.0 Hz, 1H, H4'), 4.15 – 4.11 (m, 1H, H2'), 3.94 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H, H6a'), 3.91 – 3.75 (m, 5H, H6, H4, H2, H3), 3.75 – 3.69 (m, 1H, H5), 3.36 (m, 1H, H3'); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ 137.51 (C_{hipso}, Ph), 129.63 (Ph), 127.01 (Ph), 108.37 (d, *J* = 225 Hz, C1), 102.81 (C7'), 102.18 (C1'), 79.93 (C3), 76.34 (C4'), 74.55 (C4), 70.69 (C2'), 70.47 (C2), 69.78 (C5), 69.11 (C6'), 60.55 (C6), 58.89 (C5'), 51.55 (C3'); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₉H₂₇FNO₉ [M+H⁺]: 432.1664, found: 432.1670.

Reductive amination reactions with the individual disaccharide derivatives 1-8

As a first step, we performed reductive amination reactions with all the individual disaccharide models (see Figures 2 and 3) of our library and 2-naphthyl acetaldehyde (see Figures 2 and 3), and characterized the reaction products by NMR. To a 1 mM solution of a single disaccharide in D₂O (10 mM phosphate) was added 5 equivalents of 2-naphthyl acetaldehyde and 10 equivalents of sodium cyanoborohydride. Reduction of the imine/enamine derivatives usually proceeds faster under slightly acidic conditions. For this reason a pH of 6.2 was selected for the final set of assays. Formation of the secondary amine products was followed by NMR (Figure 3) and confirmed by mass spectrometry. These compounds were fully characterized by NMR without purification. The NMR data confirmed that all of them exhibited a dominant hairpin-like conformation stabilized by CH/ π interactions between the naphthyl ring and the CH/ π donor D-pyranose unit. These contacts were clearly reflected in the chemical shifts of the interacting CH/groups, significantly up-field shifted (up to -2.12 ppm). The chemical shift perturbations promoted by the naphthyl system at the CH/ π donor pyranose (extracted by comparing the disaccharide chemical shifts before and after the reaction) were taken as an indication of the existing geometrical differences among carbohydrate/aromatic complexes.

Competition Experiments

Secondly, we performed control pairwise competition experiments with the reference monosaccharide **1** and the different disaccharide models (**2-8**. See Figure 2). Equimolecular solutions of both the monosaccharide **1** and the corresponding disaccharide (300 μM each) were mixed with benzaldehyde or 2-naphthyl acetaldehyde in D_2O (10 mM phosphate at pH 6.2). After a short equilibration period, sodium cyanoborohydride (5 mM) was added. The evolution of the reaction mixture at 25 $^\circ\text{C}$ was followed by 1D-NMR experiments. These assays confirmed that 2-naphthyl acetaldehyde exhibits a strong preference for disaccharides **2-8** with respect to the reference compound **1** (3-10 fold increased reactivity). Moreover, the observed reactivities were in agreement with the relative stabilities expected for the alternative stacking modes. In contrast, smaller aldehydes, as benzaldehyde, were much less selective, which is in agreement with their limited ability to contact the CH/π donor unit in the disaccharide products.

Thirdly, we performed pairwise competition experiments with all the disaccharide pairs within our library. Equimolecular mixtures of two disaccharides (300 μM each) in D_2O (10 mM phosphate, pH 6.2) were treated with 2-naphthyl acetaldehyde (250 μM). After a short equilibration period, we added sodium cyanoborohydride (5 mM). Formation of the reaction products was followed by 1D-NMR. We derived the ratio between the alternative hairpin products by integrating several NMR signals at different reaction times, for disaccharide conversions inferior to 30 %. These values were assumed to reflect differences in the population of the corresponding imine/enamine intermediates (see Figure 1) and therefore, taken as an indication of the relative stability of the alternative stacking modes. Alternative competition experiments were performed with selected pairs of disaccharides under neutral pH conditions with identical results (Figure S11).

Finally, we also carried out competition experiments employing mixtures of 3-5 disaccharide models and following a protocol identical to that described above.

The employed concept could be easily extended to more complex mixtures by simply incorporating ^{13}C -isotopically enriched (or labelled) CH/π -donor pyranose units. This strategy would be favoured by the significant signal dispersion exhibited by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ signals in the secondary amine products (as a consequence of the carbohydrate aromatic stacking).

Figure S1.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **2** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

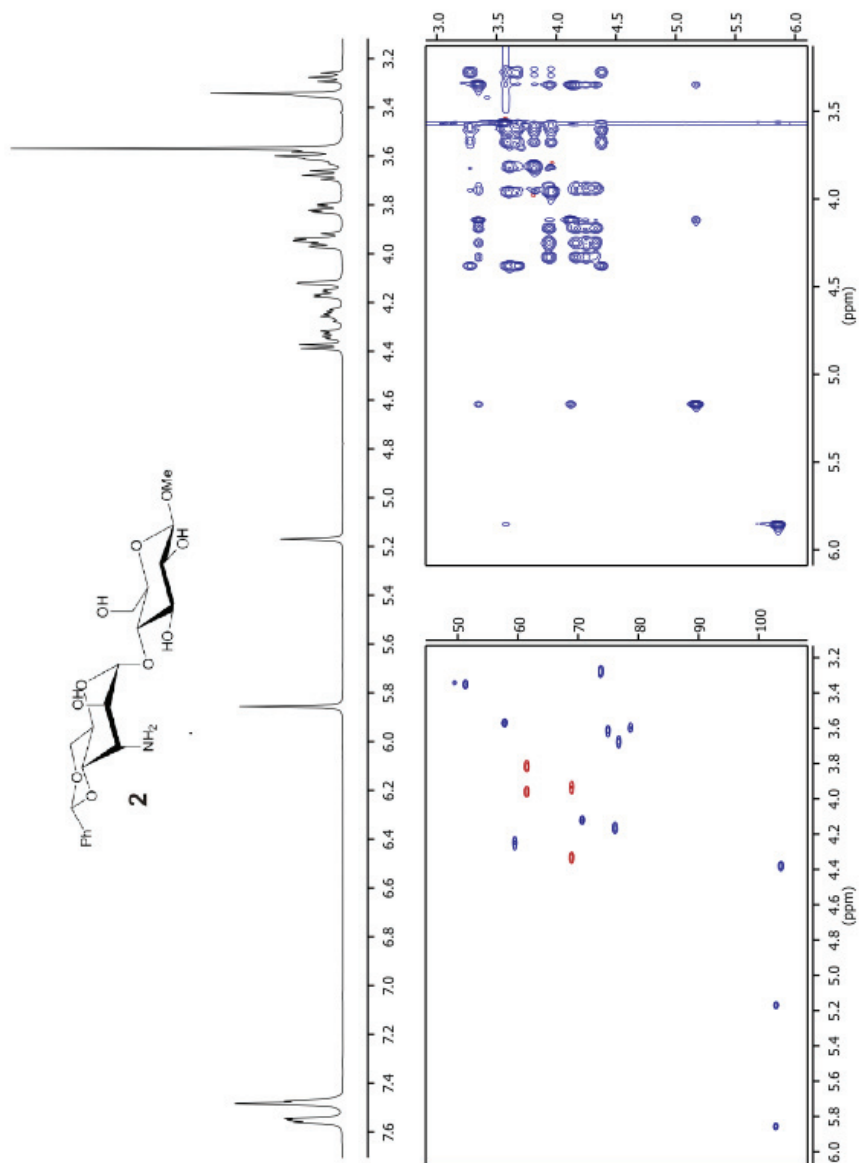


Figure S2.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **3** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

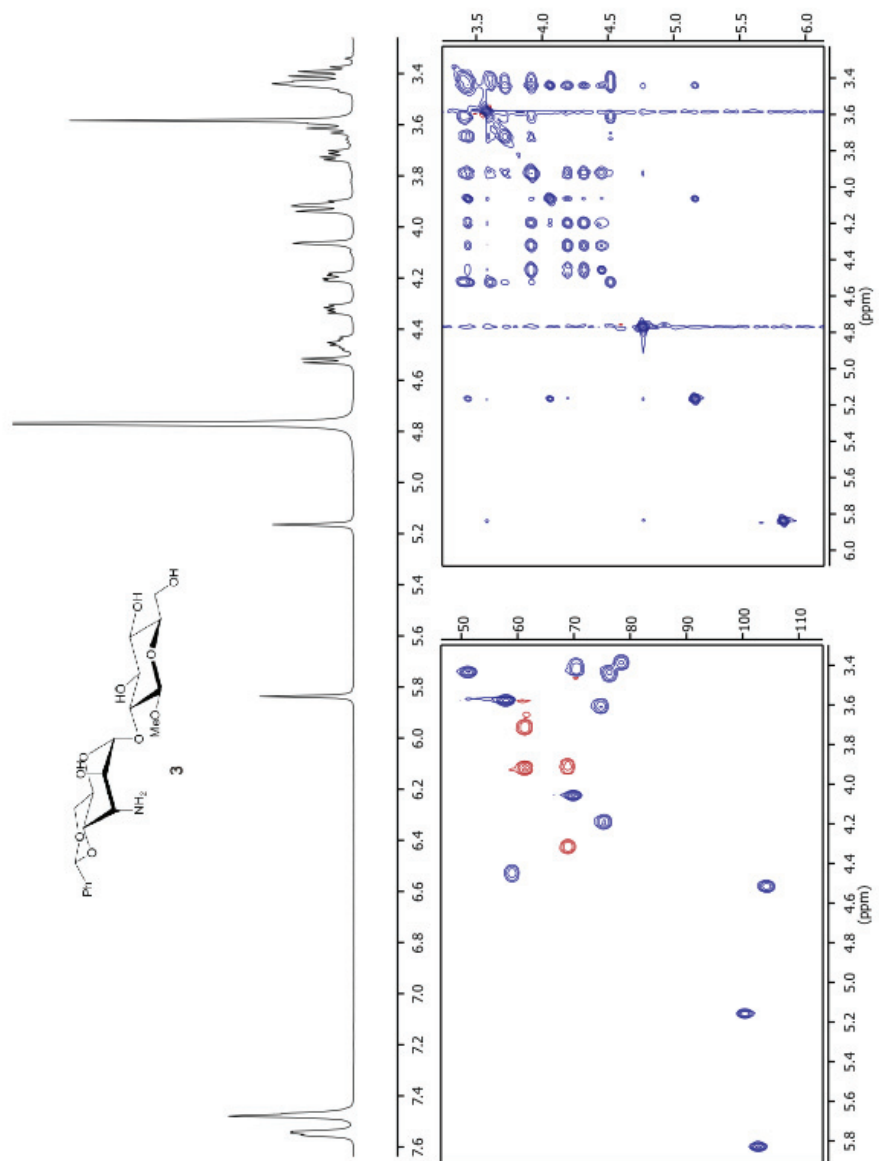


Figure S3.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **4** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

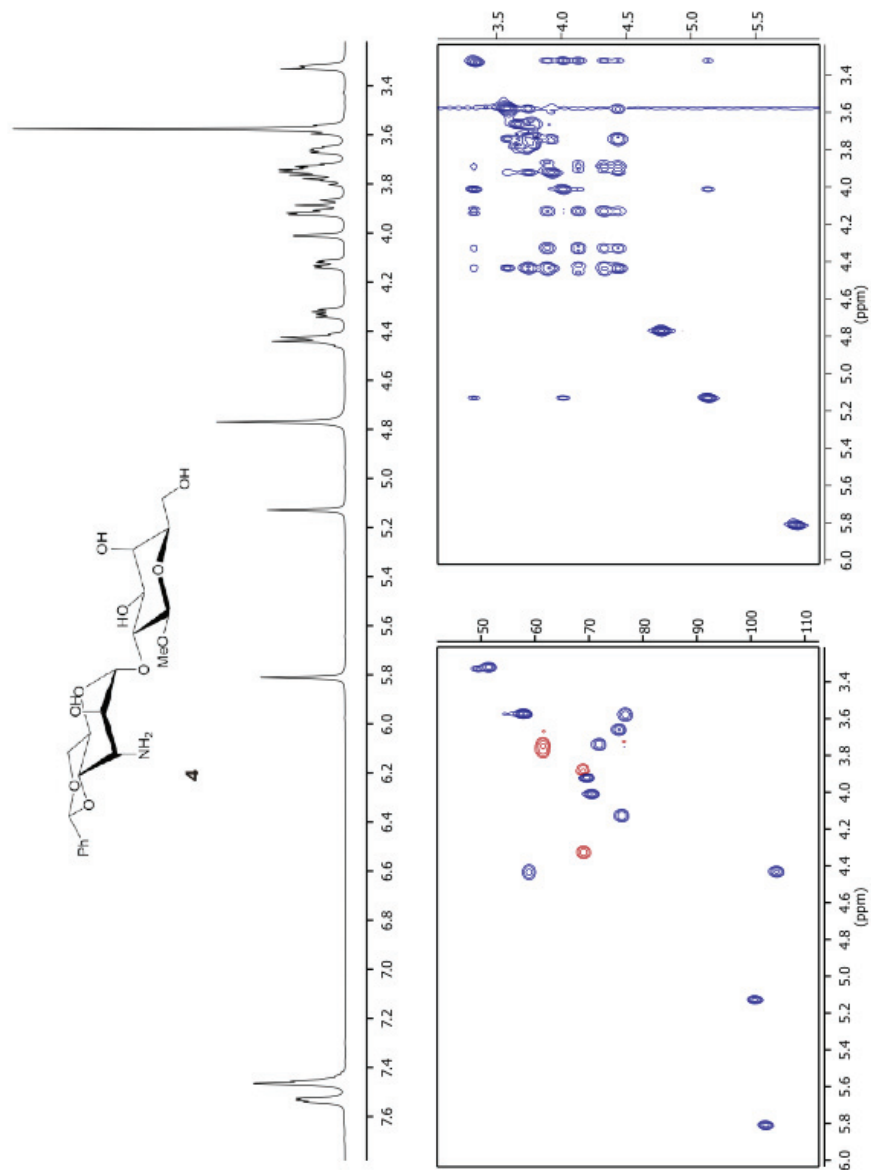


Figure S4.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **5** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

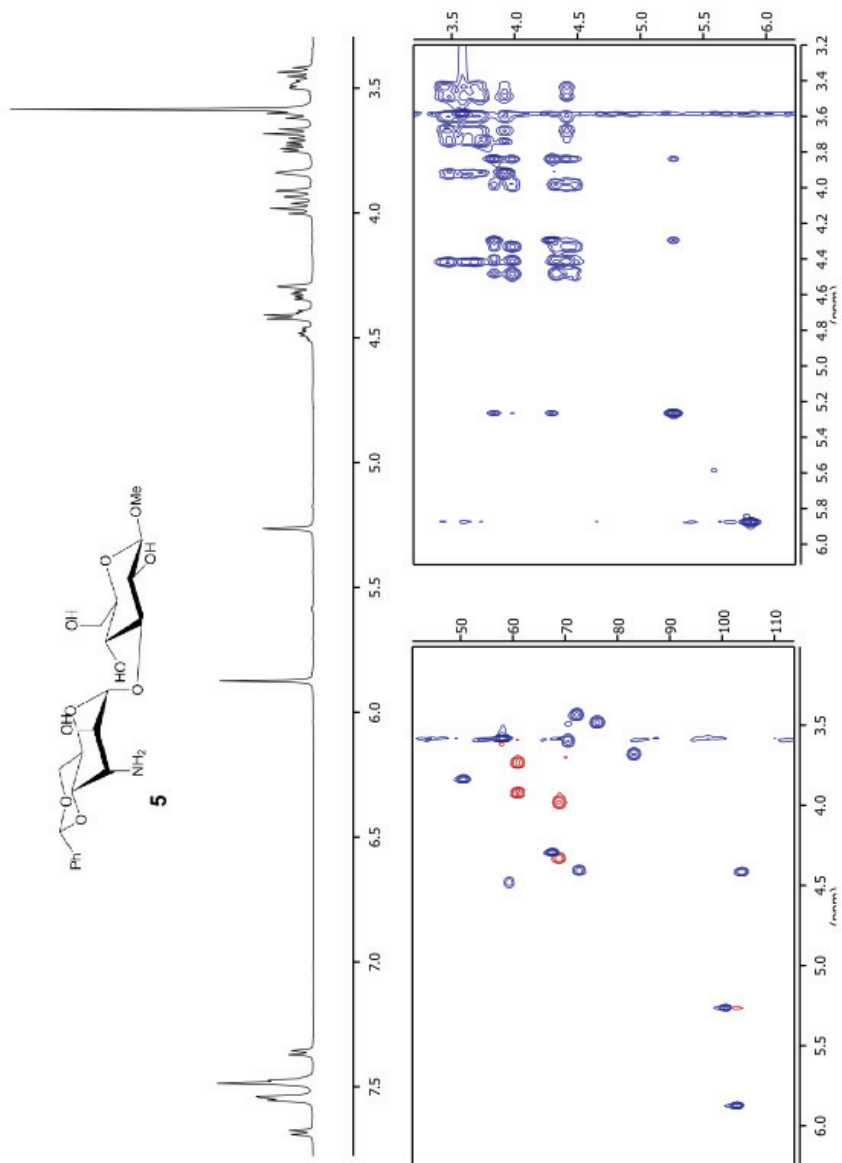


Figure S5.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **6** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

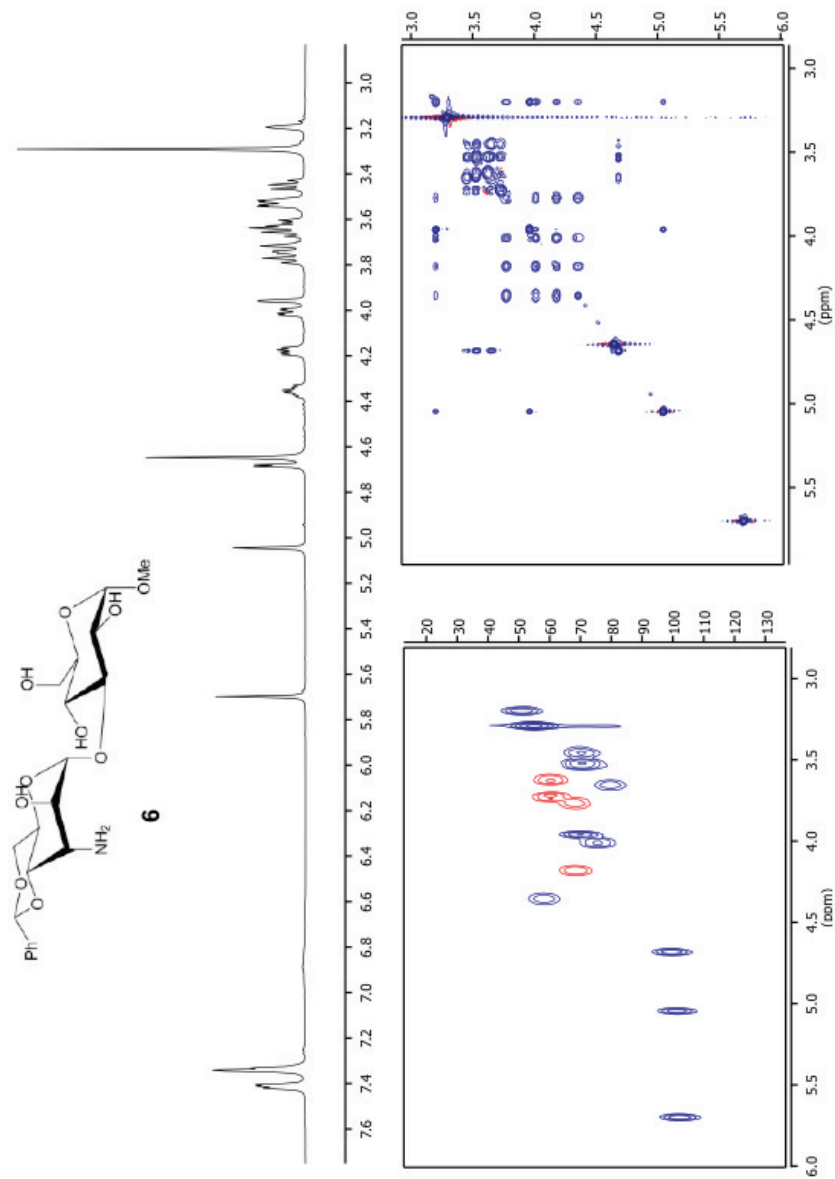


Figure S6.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **7** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

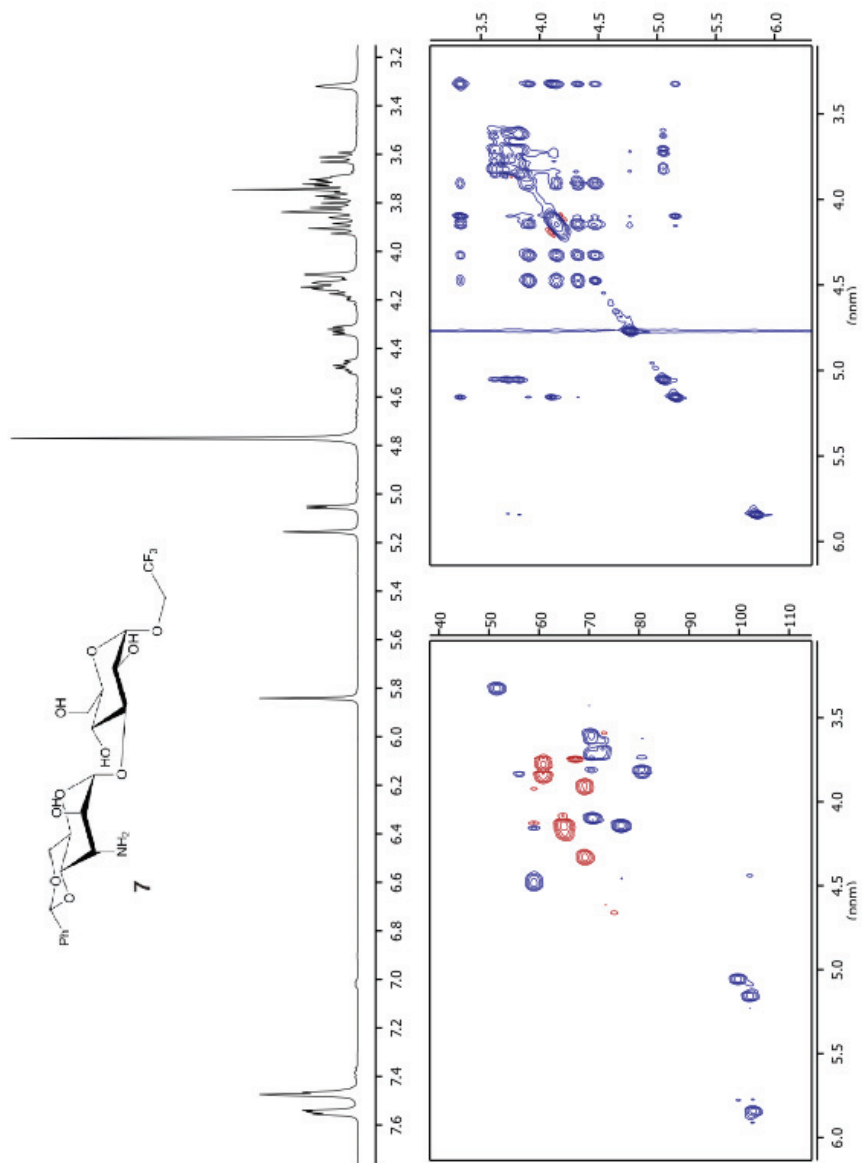


Figure S7.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **8** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

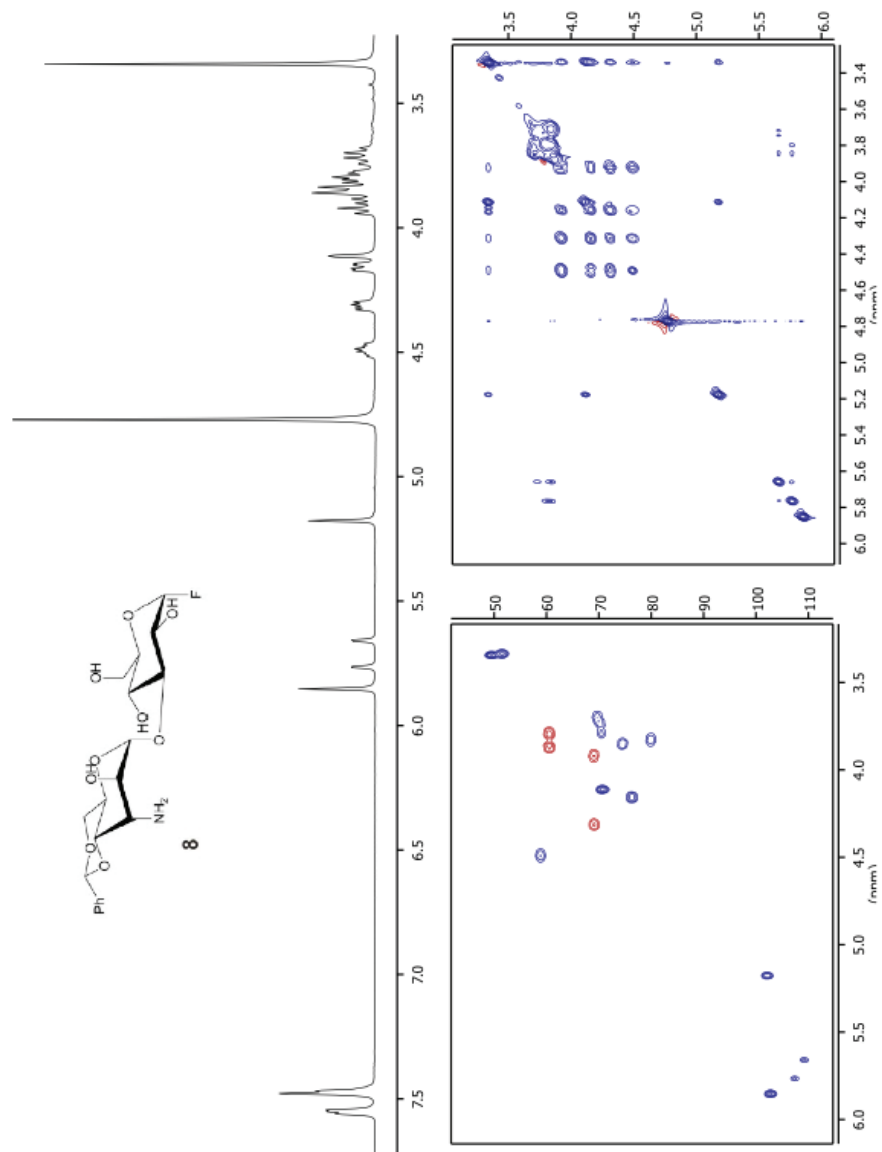


Figure S8.- Each library member was designed to allow a unique carbohydrate/aromatic interaction mode upon reaction with 2-naphthyl acetaldehyde. In particular, the stacking could be mediated by either the α or β face of the CH/ π -donor pyranose, but not by both of them. This specificity is, to a large extent, determined by the strong conformational preferences of the existing glycosidic linkages (either $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ or $\alpha(1-4)$). As an example, for derivative **3** a global (Left) and a high-energy (Right) minimum can be identified. Indeed, both conformations would lead to rather different carbohydrate/aromatic complexes (involving the α or β face of the pyranose). However, according to Molecular Mechanics calculations, the stability difference between them before the reductive amination is proximate to 2 kcal/mol. Moreover, this difference further increases in the reaction product (to almost 5 kcal/mol), reflecting the distorted geometry of the stacking mediated by the pyranose β -face in the high-energy conformation (Right). Consequently, the equilibrium population of this later specie, together with its contribution to the competition experiments described in the manuscript, can be considered negligible. In summary, the selected disaccharide scaffolds are essentially mono-conformational and promote a unique and well-defined interaction between the aromatic ring and the CH- π donor carbohydrate (involving either the α or β face of the CH/ π -donor sugar).

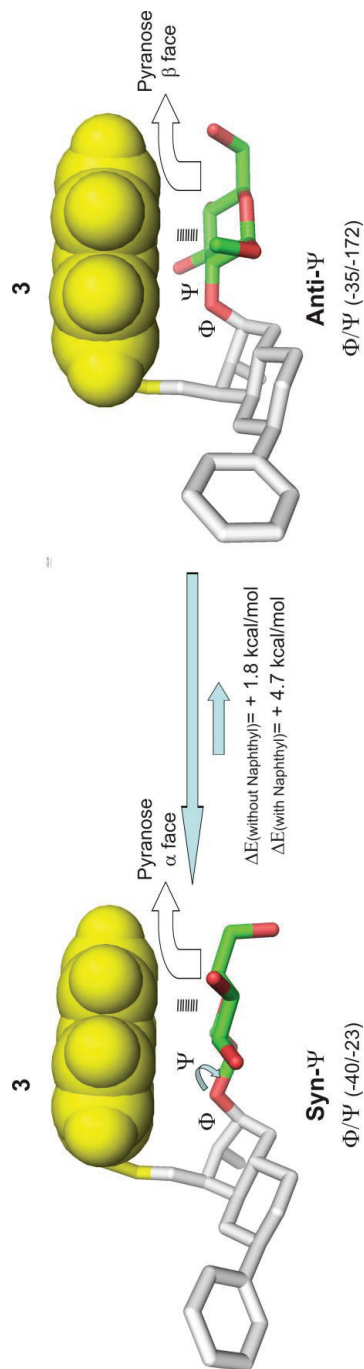


Figure S9.– Pairwise competition experiments monitored by NMR. Time evolution of a 1:1 mixture of pairs **2/5**, **5/6**, **6/7**, and **7/2** (from left to right) upon addition of 2-naphthyl acetaldehyde and sodium cyanoborohydride (see the experimental section). NMR signals from their respective secondary amine products (shown at the top) are indicated by colored circles/squares.

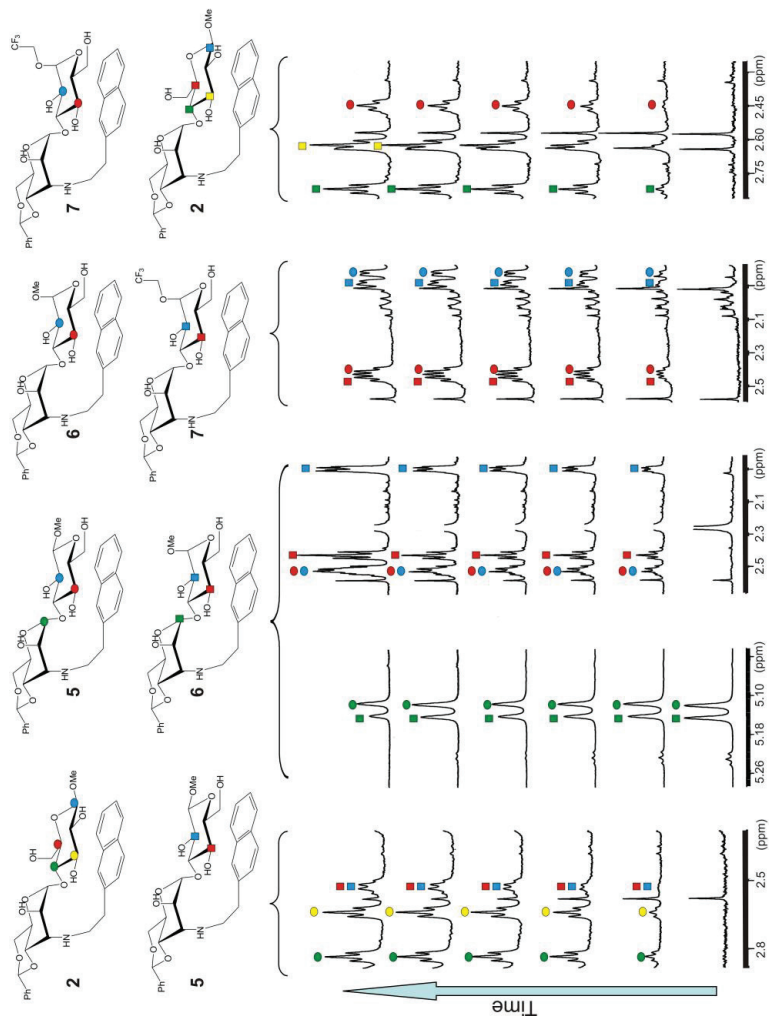


Figure S10.- Pairwise competition experiments monitored by NMR. Time evolution of a 1:1 mixture of disaccharides **6** and **8** upon addition of 2-naphthyl acetaldehyde and sodium cyanoborohydride. The marginal stabilization of the carbohydrate/aromatic stacking by the anomeric fluorine atom leads to a tiny (but detectable) 5-10% excess of the corresponding secondary amine product. This experiment illustrates the remarkable sensitivity of the employed methodology. The minor stabilization of the carbohydrate/aromatic complex formed by the fluorinated derivative is in agreement with the result quantum mechanics calculations performed in our group (data not shown).

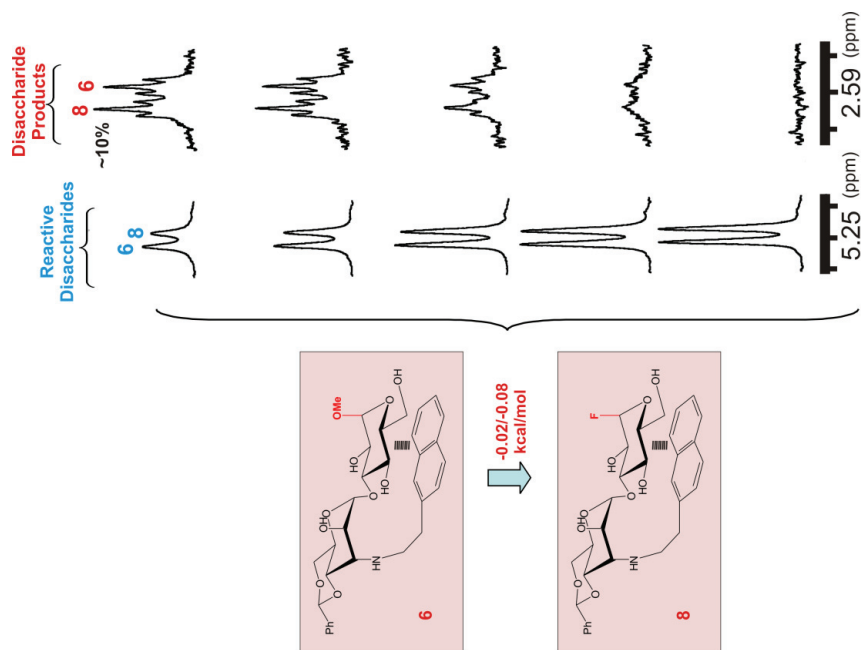
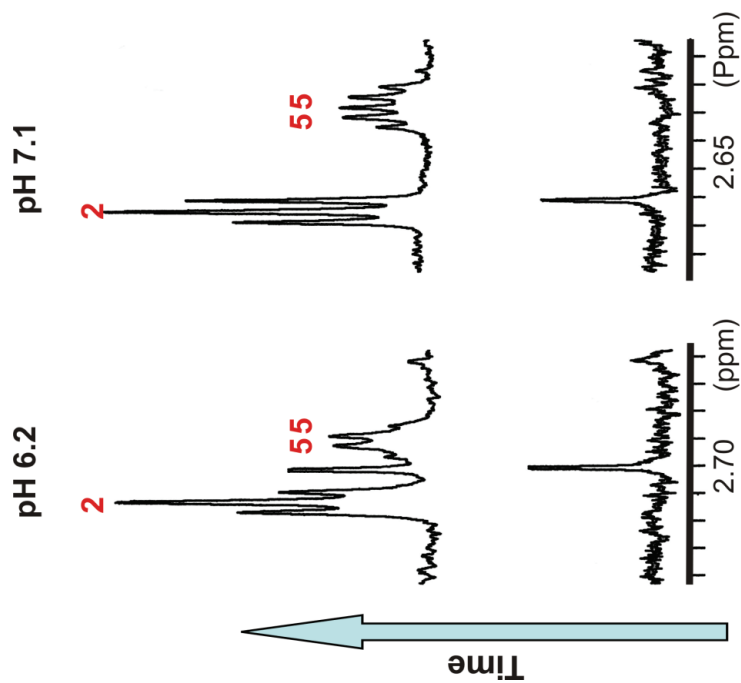


Figure S11.- Pairwise competition experiments monitored by NMR under neutral (Right. 10 mM phosphate, pH 7.1) and slightly acidic (Left. 10 mM phosphate, pH 6.2) conditions. Time evolution of a 1:1 mixture of disaccharides **2** and **5** upon addition of 2-naphthyl acetaldehyde and sodium cyanoborohydride.



ANEXO 2

Modulating Weak Interactions for Molecular Recognition: A Dynamic Combinatorial Analysis for Assessing the Contribution of Electrostatics to the Stability of CH- π Bonds in Water**

Ester Jiménez-Moreno, Ana M. Gómez, Agatha Bastida, Francisco Corzana, Gonzalo Jiménez-Oses, Jesús Jiménez-Barbero, and Juan Luis Asensio*

Abstract: Electrostatic and charge-transfer contributions to CH- π complexes can be modulated by attaching electron-withdrawing substituents to the carbon atom. While clearly stabilizing in the gas phase, the outcome of this chemical modification in water is more difficult to predict. Herein we provide a definitive and quantitative answer to this question employing a simple strategy based on dynamic combinatorial chemistry.

Nowadays it has become clear that CH- π interactions^[1–3] play a key role in a variety of molecular recognition processes^[4,5] including conformation stabilization,^[6] crystal packing,^[7] formation of gas-phase clusters,^[8] or chiral discrimination.^[9] Nevertheless, there are still aspects of these interactions that remain poorly understood.

Most theoretical analyses have revealed that, in the gas phase, the stability of CH- π complexes largely arises from dispersion forces.^[2,3] However, although relatively small, electrostatic interactions cannot be neglected, because they contribute to both the strength and the directionality of the contact. Actually, this dual dispersive/electrostatic nature represents an essential feature of CH- π bonds and explains their ubiquitous presence under different environments.^[2] It is important to note that electrostatic forces can be enhanced by the presence of electron-withdrawing substituents attached to the interacting carbon atom (Figure S1). Indeed, in the gas

phase, polarized CH moieties form tighter complexes with aromatic systems than nonpolarized ones.^[3] Similarly, replacement of the CH group by an OH function (which, from an electrostatic perspective, might resemble an extremely polarized CH) leads to a larger enhancement in stability.^[3] Hence, CH polarization represents a simple chemical strategy for the stabilization of CH- π complexes in the absence of solvent.

The outcome of this simple chemical modification in water is, however, more difficult to predict. In fact, exposed ROH- π contacts^[10] are usually highly destabilized in water due to the competence provided by the stronger and ubiquitous ROH \cdots H₂O hydrogen bonds. Analogously, the polarization of a particular CH bond could also enhance its own polar interactions with the solvent, thus leading to a minor stabilization, a null effect, or even a significant destabilization of the CH- π contact (Figure S1). However, to the best of our knowledge, no unambiguous experimental evidences have been presented so far to support or disprove the stabilizing role of CH polarization in water. Moreover, the corresponding effect, if any, has never been quantified.

These questions have profound implications for the molecular recognition and drug design fields, and providing the right answers will contribute to the longstanding challenge of unravelling the complicated influence of water on molecular association.^[11]

To this aim, we have employed a modified version of the simple strategy recently developed by us,^[12] based on the principles of dynamic combinatorial chemistry.^[13] This methodology is schematically represented in Figure 1 (see also Figures S2–S10). First, several model systems, including a reactive 3-amino- α -D-allopyranose scaffold (unit I in Figure 1) and alternative CH- π donor units (dubbed II and IIa in Figure 1) were designed and synthesized. As a next step, buffered water solutions containing equimolecular amounts of two or more specific model compounds were treated with an arylacetaldehyde to form a dynamic mixture of hemiaminals/imines in exchange. It should be noted that, in these transient species, the aromatic system is optimally positioned to establish intramolecular interactions with a single face of the alternative CH- π donor units (a conclusion based on our previous experience with related altrose disaccharides and also supported by molecular dynamics calculations). The resulting energy contributions depend on the chemical nature of the CH- π donor and acceptor units, and render the hemiaminal/imine species nonequivalent in terms of stability. Consequently, they exhibit a distinct equilibrium population. Subsequent chemical reduction of the transient species with

[*] E. Jiménez-Moreno, Dr. A. M. Gómez, Dr. A. Bastida, Dr. J. L. Asensio
Departamento de Química Bio-orgánica
Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC)
Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid (Spain)
E-mail: juanluis.asensio@csic.es

Dr. F. Corzana
Departamento de Química
Universidad de la Rioja (Spain)

Dr. G. Jiménez-Oses
Department of Chemistry and Biochemistry
University of California
Los Angeles (USA)

Dr. J. Jiménez-Barbero
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid (Spain), CIC-bioGUNE, Derio-Bizkaia (Spain), and Ikerbasque, Bilbao (Spain)

[**] This investigation was supported by research grants of the Spanish “Plan Nacional” (MINECO) CTQ2010-19073, CTQ2013-45538-P, CTQ2012-32025, and CTQ2012-32114.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201411733>.

Supporting Information

Modulating Weak Interactions for Molecular Recognition: A Dynamic Combinatorial Analysis for Assessing the Contribution of Electrostatics to the Stability of CH- π Bonds in Water**

*Ester Jiménez-Moreno, Ana M. Gómez, Agatha Bastida, Francisco Corzana, Gonzalo Jiménez-Oses, Jesús Jiménez-Barbero, and Juan Luis Asensio**

anie_201411733_sm_miscellaneous_information.pdf

Supporting Information

CONTENTS:

Experimental Section	2-20
General information	
Preparation, spectroscopic and analytical data of 2-arylacetaldehydes 1-4 .	
Preparation, spectroscopic and analytical data of of alkyl 3-amino- α -D-allosamine pyranosides A-D .	
Figures S1 to S11	21-31

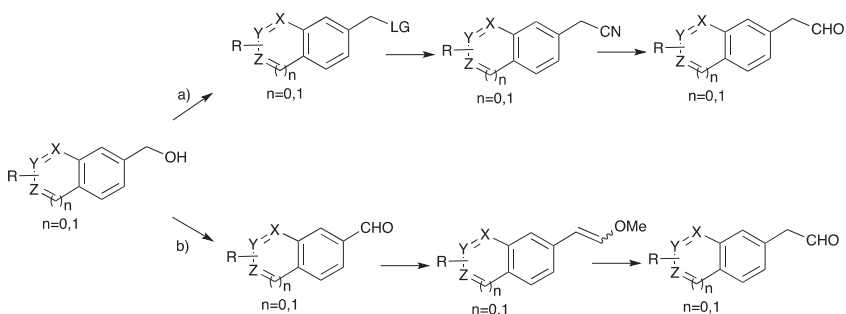
Experimental section

General Information

Chemicals were purchased from commercial sources and were used without further purification. All solvents were purified by distillation over drying agents or by elution through a PURE SOLV purification system. Unless stated otherwise, reactions were carried out under a dry argon atmosphere in vacuum-flame dried glassware. Residual water was removed from starting compounds by repeated coevaporation with toluene. Analytical thin layer chromatography was carried out using pre-coated, aluminium backed plates (Merck Kieselgel 60 F254). Detection was by examination under UV light (254 nm) and then by charring with 10% sulfuric acid in ethanol or cerium-ammonium-molybdate. Flash column chromatography was performed using silica gel [Merck, 230–400 mesh (4–63 μm)]. Extracts were concentrated in *vacuo* using both a Buchi rotary evaporator (bath temperatures up to 40 °C) at a pressure of 15 mmHg (diaphragm pump) and a high vacuum line at room temperature. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were measured in the solvent stated at 500, 400 or 300 and 126, 101 or 75 MHz, respectively. Chemical shifts are quoted in parts per million from residual solvent peak and coupling constants (J) given in Hertz. Multiplicities are abbreviated as: b (broad), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet) or combinations thereof. An Agilent 6520 accurate-mass quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass analyzer was used for the HR-MS.

Synthesis of the 2-arylacetaldehydes library (1-4)

The required 2-arylacetaldehydes were prepared using the appropriate benzyl-type alcohols as starting materials and following either of the routes shown in the scheme below (Scheme 1). In route *a*, elongation was carried out by displacement at the benzylic position of an appropriate leaving group (mesylate, bromide or benzoate) with cyanide anion and subsequent DIBAL-H reduction. Alternatively, in route *b*, elongation was achieved using a sequence of reactions including successive Dess-Martin oxidation, a Wittig-type homologation and vinyl ether hydrolysis.



Scheme 1. Alternative routes for the preparation of the 2- aryl-acetaldehydes library

General experimental procedure for mesylation: A solution of the corresponding alcohol (1 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) cooled to 0 °C and under inert atmosphere was treated with triethylamine (3 mmol) and mesyl chloride (1.2 mmol). The mixture was stirred until TLC showed no starting alcohol was left and was then poured onto a saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The organic phase was separated and the aqueous layer was extracted twice with CH_2Cl_2 . The combined organics layers were washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. Crude mesylates were used in the following step without further purification.

General experimental procedure for displacement with cyanide: A solution of the compound with the appropriate leaving group (1 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) was treated with KCN (4 mmol) under inert atmosphere. The reaction mixture was allowed to react at the corresponding temperature (rt to 90°C) until TLC showed completion of the reaction. The mixture was then poured onto a saturated solution of NH_4Cl and extracted twice with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to afford a residue which was purified by flash chromatography.

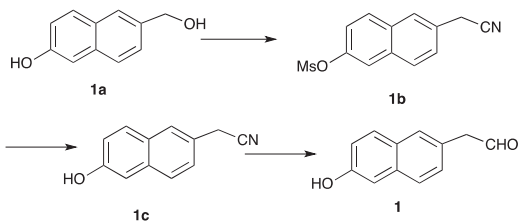
General experimental procedure for nitrile reduction with DIBAL-H: To a solution of the corresponding nitrile (1 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) at -78 °C under Ar was added dropwise a solution of DIBAL-H 1M in toluene (2-4 mmol). The reaction was stirred allowing the temperature to raise until -50 °C and after 2-3 hours (unless

stated otherwise) EtOAc was added to destroy the excess of the reducing reagent. When the reaction has reached room temperature, a 1:1 mixture of acetic acid and water was added and it was stirred for additional 5 minutes. The mixture was then neutralized with a saturated solution of sodium bicarbonate and extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was washed again with a saturated solution of sodium bicarbonate and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Finally, the residue was purified by flash chromatography

General experimental procedure for Dess-Martin oxidation. To a solution of the alcohol (1 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) or CH₂Cl₂/THF (1:1, 6 mL) under argon atmosphere, Dess Martin Periodinane (1.1 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. until TLC showed no starting alcohol was left. Then, it was poured onto a saturated solution of sodium bicarbonate and extracted twice with CH₂Cl₂. The organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography.

General experimental procedure for the Wittig reaction. To a suspension of (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride (4 mmol) in anhydrous THF (6.6 mL) under argon atmosphere and cooled to 0°C, BuLi (1.6 M in hexane, 3.96 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 30 minutes. A solution of the corresponding aldehyde (1 mmol) in anhydrous THF (2.2 mL) was then added at 0 °C and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred until no starting aldehyde was left (monitored by TLC). Acetone was added to quench the excess of reagent and stirred for 5 min. Addition of Et₂O produced a solid precipitate which was filtered off. The filtrate was subsequently washed with a saturated solution of sodium bicarbonate and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography.

General experimental procedure for the hydrolysis of vinyl ethers. A solution of the corresponding methyl vinyl ether (1 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) containing 10 % TFA was stirred at room temperature until no starting material was left. The solvent was removed at reduced pressure and the residue purified by flash chromatography.



Scheme 2. Synthetic route for the preparation of 2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde **1**.

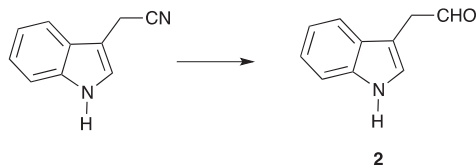
6-(cyanomethyl)naphthalen-2-yl methanesulfonate 1b. This compound was prepared following the general procedure for mesylation from 6-hydroxymethyl-2-naphthol **1a**¹ (530 mg, 3.05 mmol) by treatment with mesyl chloride (0.56 mL, 7.31 mmol) and triethylamine (2.53 mL, 18.28 mmol). The resulting material was subjected to the general procedure for the formation of nitriles. The reaction was stirred for 5 hours at 60 °C and after the aqueous work up, the residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 6:4) to afford compound **1b** (430 mg, 1.65mmol, 54% two steps). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.91 – 7.84 (m, 3H), 7.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.44 (dt, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.21 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 147.5, 133.2, 132.2, 130.4, 129.3, 128.5, 127.1, 127.1, 122.1, 119.7, 117.9, 37.9, 24.1. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₃H₁₁NO₃S+H⁺]: [M+H⁺] 262.0532, found: 262.0521.

2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetonitrile 1c. To a solution of compound **1b** (410 mg, 1.57 mmol) in THF/MeOH/H₂O 1:1:1 (7.8 mL) a 4 M NaOH solution (3.9 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature for 20 hours. 2% aq HCl was then added (30 mL) and the product was extracted twice with CH₂Cl₂. The organic layers were dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to afford compound **1c** (122 mg, 0.67mmol, 43%). ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.69 (ddd, *J* = 6.1, 3.0, 1.1 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ

¹ A. Samat, V. Lokshin, K. Chamontin, D. Levi, G. Pepe, R. Guglielmetti *Tetrahedron* 2001, 57, 7349-7359

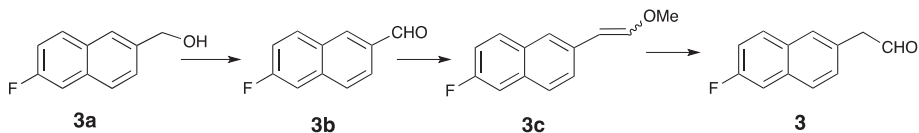
156.9, 135.7, 130.3, 129.7, 128.2, 127.7, 127.0, 126.4, 120.0, 119.8, 109.8, 23.5. HRMS (ESI+): calculated for $[C_{12}H_9NO+H^+]$: $[M+H^+]$ 184.0757, found: 184.0748.

2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde 1. This compound was prepared following the general procedure from compound **1c** (50 mg, 0.27 mmol) in CH_2Cl_2 (2.73 mL) and DIBAL-H (1.08 mL, 1M in toluene) according to the general procedure for reduction of nitriles. Compound **1** (16 mg, 0.09 mmol, 33%) was obtained after purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3). 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.81 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 – 7.60 (m, 1H), 7.31 – 7.23 (m, 1H), 7.15 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 200.0., 154.0, 134.1, 129.8, 129.4, 128.8, 128.4, 127.5, 127.1, 118.7, 109.7, 50.9. HRMS (ESI+): calculated for $[C_{12}H_{10}O_2+H^+]$: $[M+H^+]$ 187.0754, found: 187.0752.



Scheme 3. Synthetic route for the preparation of 2-(1H-indol-3-yl)acetaldehyde **2**.

2-(1H-indol-3-yl)acetaldehyde 2. This compound was prepared according to the general procedure for reduction of nitriles from 3-indoleacetonitrile (150 mg, 0.96 mmol) in CH_2Cl_2 (9.6 mL) using DIBAL-H (2.4 mL, 1M in toluene) followed by flash chromatography purification (hexane/ethyl acetate 8:2) (50 mg, 0.31 mmol, 33% yield). 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.77 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.56 (dt, $J = 7.9, 1.0$ Hz, 1H), 7.40 (dt, $J = 8.2, 0.9$ Hz, 1H), 7.24 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.19 – 7.14 (m, 2H), 3.82 (dd, $J = 2.5, 0.9$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 199.8, 123.5, 123.4, 122.7, 120.1, 120.1, 118.6, 111.5, 111.4, 40.5. HRMS (ESI+): calculated for $[C_{10}H_9NO+H^+]$: $[M+H^+]$ 160.0757, found: 160.0760.



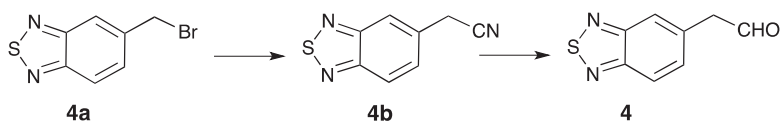
Scheme 4. Synthetic route for the preparation of 2-(6-fluoronaphthalen-2-yl)acetaldehyde **3**.

6-fluoro-2-naphthaldehyde 3b. This compound was prepared following the general experimental procedure for Dess-Martin oxidation from (6-fluoronaphthalen-2-yl)methanol² (400 mg, 2.27 mmol) in CH₂Cl₂/THF 1:1 (13.6 mL). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) afforded compound **3b** (360mg, 2.07 mmol, 765). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.14 (s, 1H), 8.33 (dd, *J* = 1.5, 0.8 Hz, 1H, H1), 8.04 – 7.95 (m, 2H, H3, H8), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H4), 7.52 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H, H5), 7.37 (ddd, *J* = 9.0, 8.3, 2.6 Hz, 1H, H7). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 192.2, 162.8 (d, *J* = 251.4 Hz), 137.9 (d, *J* = 9.8 Hz), 134.6, 133.9 (d, *J* = 2.6 Hz), 132.5 (d, *J* = 9.5 Hz), 129.9, 128.8 (d, *J* = 5.4 Hz), 124.3, 117.9 (d, *J* = 25.4 Hz), 111.9 (d, *J* = 20.8 Hz). HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₁H₇FO+H⁺]: [M+H⁺] 175.0554, found: 175.0559

2-fluoro-6-(2-methoxyvinyl)naphthalene 3c. This compound was prepared following the general procedure for the Wittig reaction from compound **3b** (360 mg, 2.07 mmol), (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride (2837 mg, 8.28 mmol) and BuLi (1.6 M in hexane, 5.1 mL, 8.19 mmol). The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) to afford compound **3c** (372 mg, 1.84 mmol, 89%) as a 1:1 mixture of Z/E isomers ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.93 (s, 1H), 7.73 – 7.55 (m, 5H), 7.49 (s, 1H), 7.39 – 7.35 (m, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 2H, H5 Z and E), 7.18 – 7.07 (m, 2H, H7 both isomers), 7.09 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, E), 6.14 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, Z), 5.88 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, E), 5.28 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, Z), 3.75 (s, 3H), 3.65 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, selected peaks) δ 160.4 (d, *J* = 244.9 Hz), 160.2 (d, *J* = 244.6 Hz), 149.4, 148.5, 116.5 (d, *J* = 25.2 Hz), 116.2 (d, *J* = 25.4 Hz), 110.9 (d, *J* = 18.7 Hz), 110.7 (d, *J* = 18.8 Hz), 105.5, 105.1, 60.9, 56.7. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₃H₁₁FO+H⁺]: [M+H⁺] 203.0867, found: 203.0868.

² J.-H. Chun, V. W. Pikea *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6300-6306.

2-(6-fluoronaphthalen-2-yl)acetaldehyde 3. Compound **3c** (100 mg, 0.50 mmol) was subjected to the general procedure for the hydrolysis of the vinyl ethers by treatment with TFA (0.2 mL) in CH₂Cl₂ (5 mL) at rt for 20 minutes. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5) to give compound **3** (30 mg, 0.16 mmol, 32%) ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.83 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.80 (m, 2H, H4 y H8), 7.71 – 7.66 (m, 1H, H1), 7.45 (dd, *J* = 9.7, 2.3 Hz, 1H, H5), 7.35 (dd, *J* = 8.9, 1.5 Hz, 1H, H4), 7.31 – 7.25 (m, 1H, H7), 3.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 199.3 (CHO), 160.8 (d, *J* = 246.2 Hz, C6), 133.4 (d, *J* = 9.3 Hz), 130.7, 130.1 (d, *J* = 9.2 Hz), 128.7 (d, *J* = 2.8 Hz), 128.6, 128.2 (d, *J* = 5.7 Hz), 117.0 (d, *J* = 25.2 Hz), 111.0 (d, *J* = 20.5 Hz), 50.7.



Scheme 5. Synthetic route for the preparation of 2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-yl)acetaldehyde **4**.

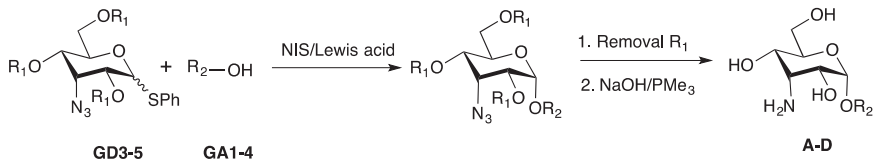
2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-yl)acetonitrile 4b. To a solution of 5-bromomethylbenzo[1,2,5]thiadiazole **4a** (250 mg, 1.09 mmol) in EtOH/H₂O 2:1 (3 mL) was added KCN (85 mg, 1.35 mmol). The reaction was stirred at 50 °C for 3 hours and then cooled to room temperature. The mixture was extracted twice with EtOAc and the organic phases were washed with brine, dried with anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 85:15) to afford **4b**³ (110mg, 0.63 mmol, 58%)

2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-yl)acetaldehyde 4. Compound **4b** (50 mg, 0.29 mmol) was subjected to the general procedure for the reduction of nitriles. Purification of the residue by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) afforded pure compound **4** (14 mg, 0.08 mmol, 26%). ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.88 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 9.0, 0.8 Hz, 1H), 7.88 (dq, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 9.0, 1.7 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 198.1, 155.1, 154.2, 134.0, 131.6, 122.0, 122.0, 50.6. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₈H₆N₂OS+H⁺]: [M+H⁺] 179.0274, found: 179.0266.

³ V. G. Pesin et al., *J. Gen. Chem. USSR* (Engl. Transl.), **1964**, *34*, 1272 – 1276.

Synthesis of the library of alkyl α -D-allosamine pyranosides (A-D)

The required alkyl α -D-allosamine pyranosides derivatives were prepared according to the general scheme outlined below (Scheme 6). It includes the glycosylation reaction between a thioglycosyl donor (**GD3-5**) and the appropriate acceptor (**GA1-4**) to give the corresponding glycoside. Subsequent steps related to the cleavage of protecting groups and Staudinger reduction, granted access to the desired compounds (**A-D**).



Scheme 6. Synthetic route for the preparation of alkyl 3-amine- α -D-allosamine pyranosides **A-D**.

General experimental procedure for glycosidation: *Method A:* A stirred solution of the glycosyl donor (1 mmol) and the appropriate alcohol (0.6-10 mmol) in anhydrous Et₂O/CH₂Cl₂ 3:1 (10 mL) under argon and in the presence of 4Å molecular sieves was cooled at -40°C, and then treated with NIS (1.2 mmol) and TMSOTf (0.5 mmol). The reaction mixture was at this temperature until no glycosyl acceptor was left (monitored by TLC). Et₃N was then added and the resulting solution was vigorously stirred for 10 min. The reaction mixture was then concentrated, without heating, and the crude product was purified by flash chromatography.

Method B: A stirred solution of the glycosyl donor (1 mmol) and the appropriate alcohol (0.6-10 mmol) in anhydrous Et₂O/CH₂Cl₂ 3:1 (10 mL) under argon at 0 °C with 4A molecular sieves, was treated with NIS (1.2mmol) and BF₃·OEt₂ (1.2 mmol) at this temperature for 1 hour. Then, the temperature was allowed to rise to room temperature and the reaction was stirred until no starting material was left (monitored by TLC). Et₃N

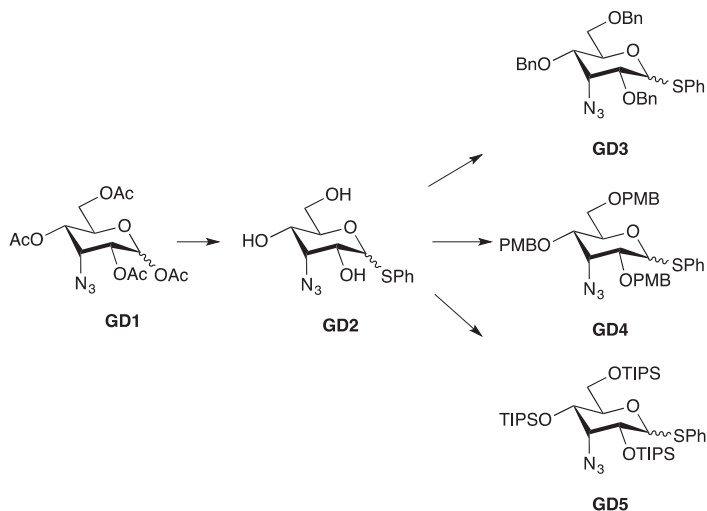
was then added and the resulting mixture was filtered through a celite and washed with aq Na₂S₂O₃. The aqueous phase was re-extracted with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography.

General experimental procedure for reduction of azide group through a Staudinger reaction: A solution of the corresponding azide (1 mmol) in THF (32 mL) was treated with aqueous 0.1 M NaOH (2 mL) and PMe₃ (1.5 mmol, 1 M solution in THF). The mixture was then stirred at room temperature until TLC showed no starting material was left. The solvent was then removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography.

General Procedure for hydrogenolysis of benzyl groups. To a solution of the corresponding benzylated compound in MeOH (5 mL) was added a catalytic amount to Pd/C and was stirred under a hydrogen atmosphere at room temperature until no starting product was left (TLC). The mixture was filtered through celite and concentrated at reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography

Synthesis of glycosyl donors (GD1-5). The requisite thioglycosyl derivatives (**GD3-5**) were prepared according to the scheme shown below from 1,2,4,6-Tetra-*O*-acetyl-3-azido-3-deoxy-β-D-allopyranose (**GD1**)⁴ by thioglycosylation, deacetylation and appropriate protection of the hydroxyl groups (benzyl, *p*-methoxybenzyl or triisopropylsilyl).

⁴ M. Worch, V. Wittmann, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*,2118–2129



Scheme 7. Preparation of glycosyl donors **GD3-5**.

Thiophenyl 3-azido-3-deoxy-D-allopyranoside GD2. To a cooled solution (0 °C) of 1,2,4,6-tetra-*O*-acetyl-3-azido-3-deoxy- β -D-allopyranose **GD1**⁴ (2.22 g, 5.95 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10.7 mL) under argon, thiophenol (1.82 mL, 17.85 mmol) and BF₃·OEt₂ (1.13 mL, 8.93 mmol) were sequentially added. The reaction was allowed to warm at room temperature and after 14 h, the reaction mixture was poured onto a saturated aqueous NaHCO₃ solution. The aqueous layer was then extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL) and the combined extracts were washed with 2M aq NaOH, brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was directly dissolved in methanol (30 mL) and a catalytic amount of freshly prepared NaOMe was added. After stirring for 3 hours at room temperature the mixture was neutralize with ion exchange resin amberlite IR-120, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 4%) to afford compound **GD2** as an inseparable 1:1 mixture of α/β anomers (1.25g, 4.21 mmol, 71%). ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.57 – 7.53 (m, 4H), 7.33 – 7.20 (m, 6H), 5.39 (d, *J* = 5.8Hz, 1H, H1 α), 4.81 (d, *J* = 9.8Hz, 1H, H1 β), 4.14 – 4.05 (m, 4H), 3.84 – 3.80 (m, 2H), 3.80 – 3.72 (m, 2H), 3.69 – 3.60 (m, 2H), 3.59 – 3.53 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 139.1, 135.0, 132.8, 132.5, 129.9, 129.8, 128.4, 128.0, 91.0 (C1 α anomer), 86.5 (C1 beta anomer), 78.5, 70.5, 70.4, 70.1, 69.6, 68.0, 67.4, 67.3, 62.7, 62.2; HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₂H₁₅N₃O₄S+NH₄⁺]: [M+NH₄⁺] 315.1122, found 315.1114.

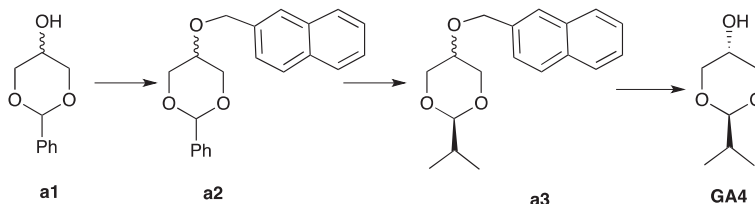
Thiophenyl 2,4,6-tri-*O*-benzyl-3-azido-3-deoxy- α/β -D-allopyranoside GD3. A solution of compound **GD2** (1.25 g, 4.21 mmol) in anhydrous DMF (21 mL) under argon and at 0 °C was treated with sodium hydride (673 mg, 16.83 mmol) and benzyl bromide (2 mL, 16.83 mmol). The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. Then, it was diluted with ethyl acetate and washed with a saturated solution of NaHCO₃, brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) to afford compound **GD3** as a 1:1.2 inseparable mixture of anomers (1.5 g, 2.64 mmol, 63%). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.58 – 7.49 (m, 4H), 7.38 – 7.21 (m, 35H), 5.50 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H1 α), 4.97 (d, *J* = 9.6 Hz, 1.2H, H1 β), 4.75 – 4.49 (m, 13H), 4.42 (ddd, *J* = 9.8, 3.2, 1.9 Hz, 1 H, H5 α), 4.16 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, H3 α), 4.01 (t, *J* = 3.2 Hz, 1.2H, H3 β), 3.86 – 3.79 (m, 3.2H, H6 α , H2 α , H5 β), 3.77 – 3.66 (m, 4.4H, H4 α , H6 β , H6 α'), 3.58 (dd, *J* = 9.6, 3.1 Hz, 1.2H, H4 β), 3.35 (dd, *J* = 9.6, 3.2 Hz, 1.2H, H2 β); ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.6, 138.2, 137.7, 137.6, 137.5, 137.3, 133.6, 132.6, 131.3, 129.2, 129.1, 128.9, 128.9, 128.9, 128.7, 128.7, 128.5, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.2, 87.2 (C1 α), 84.3 (C1 β), 76.2 (C2 β), 75.5 (C5 β), 74.7 (C2 α), 73.9 (C4 β), 73.8, 73.7, 73.4 (C4 α), 73.0, 72.3, 72.2, 71.5, 69.1 (C6 β), 68.7 (C6 α), 67.6 (C5 α), 62.0 (C3 β), 60.8 (C3 α). HRMS (ESI+): calculated for [C₃₃H₃₃N₃O₄S+NH₄⁺]: [M+NH₄⁺] 585.2536, found 585.2529.

Thiophenyl 2,4,6-tri-*O*-*p*-methoxybenzyl-3-azido-3-deoxy- α/β -D-allopyranoside GD4. To a cooled solution of compound **GD2** (700 mg, 2.36 mmol) in anhydrous DMF (23 mL) under argon at 0°C was added sodium hydride (567 mg, 14.18 mmol). After being stirred for 10 minutes, TBAI (174 mg, 0.47 mmol) and *p*-methoxybenzyl chloride (1.3 mL, 9.45 mmol) were added. The reaction was stirred overnight at room temperature. Then, it was quenched with methanol and the solvent was removed at reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate and washed with water. The aqueous layer was re-extracted with ethyl acetate and the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Hexane/ethyl acetate 8:2) to afford **GD4** as a 1:1 mixture of inseparable anomers (1.140 g, 1.74 mmol, 74%). ¹H

NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.58 – 7.48 (m, 4H), 7.32 – 7.22 (m, 14H), 7.20 – 7.13 (m, 4H), 6.93 – 6.81 (m, 12H), 5.43 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.67 – 4.35 (m, 13H, Hben, H5 α), 4.10 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H, H3 α), 3.97 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H, H3 β), 3.83 (s, 3H), 3.82 – 3.78 (m, 17H, OMe H5 β , H6), 3.78 – 3.75 (m, 1H, H2 α), 3.72 – 3.60 (m, 4H, H6, H4 α), 3.53 (dd, $J = 9.7, 3.2$ Hz, 1H, H4 β), 3.33 (dd, $J = 9.6, 3.3$ Hz, 1H, H2 β). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.7, 159.6, 159.6, 159.4, 159.3, 159.2, 137.6, 133.6, 132.2, 130.9, 130.5, 130.0, 130.0, 129.8, 129.7, 129.7, 129.6, 129.6, 129.5, 129.3, 129.1, 128.9, 128.8, 127.5, 126.9, 114.0, 114.0, 113.9, 113.8, 113.8, 87.1 (C1 α), 84.2 (C1 β), 75.5, 75.3, 74.0, 73.3, 73.2, 73.1, 72.9, 72.3, 71.7, 71.6, 71.0, 68.5, 68.1, 67.3 (C5 α), 61.8 (C3 β), 60.7 (C3 α), 55.4, 55.4, 55.3. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}+\text{NH}_4^+]$: $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ 675.2847, found 675.2866.

Thiophenyl 2,4,6-tri-*O*-triisopropylsilyl-3-azido-3-deoxy- α/β -D-allopyranoside GD5. To a cooled (0 °C) solution of compound **GD2** (820 mg, 2.76 mmol) in anhydrous DMF (14 mL) and under argon, imidazole (1128 mg, 16.87 mmol) and triisopropylsilyl triflate (2.6 mL, 9.67 mmol) were added. The reaction was stirred for 72 hours at room temperature. The mixture was then diluted with ethyl acetate and washed with a saturated solution of NaHCO_3 , brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, gradient 0 to 10%) afforded protected compound **GD5** as an inseparable mixture 1:2 of α/β anomers (1.320 g 1.64 mmol, 59%). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.59 – 7.50 (m, 6H), 7.29 – 7.19 (m, 9H), 5.35 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H1 α), 5.03 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, H1 β), 4.26 – 4.22 (m, 1H), 4.21 (t, $J = 3.0$ Hz, 2H), 4.11 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.05 (ddd, $J = 10.6, 5.3, 1.9$ Hz, 3H), 3.94 – 3.84 (m, 7H), 3.80 (dd, $J = 10.6, 6.5$ Hz, 2H), 3.74 (ddd, $J = 8.5, 6.6, 1.6$ Hz, 2H), 1.19 – 1.01 (m, 189H) ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.2, 135.9, 133.3, 132.7, 131.5, 130.5, 128.8, 128.7, 126.8, 126.7, 89.2, 86.8, 78.1, 71.7, 71.2, 69.9, 68.8, 68.6, 67.5, 66.9, 63.6, 63.0, 18.4, 18.4, 18.2, 18.1, 18.1, 18.1, 18.1, 18.0, 13.0, 12.9, 12.9, 12.3, 12.2, 12.1. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{36}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_4\text{SSi}+\text{NH}_4^+]$: $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ 783.5124, found 783.5131.

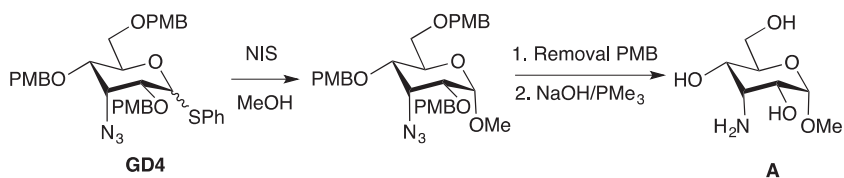
Synthesis of glycosyl acceptor GA4.



Scheme 8. Synthetic route for the preparation of acceptor **GA4**

5-(2-naphthylmethoxy)-2-phenyl-1,3-dioxane a2. Sodium hydride (444 mg 60% in mineral oil, 11.09 mmol) was suspended in anhydrous DMF (27 mL), and the mixture was cooled in an ice/H₂O bath. 5-Hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxane **a1** (1 g, 5.55 mmol,) was added in portions, and the mixture was stirred for 15 min. 2-Naphtyl bromide (1.84 g, 8.32 mmol) and TBAI (60 mg, 0.16 mmol) were added. The reaction was stirred at 0 °C to room temperature for three hours and then it was quenched by the addition of a saturated solution of NaHCO₃. The solution was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) afforded compound **a2** as a separable mixture of *cis*- (560 mg, 1.75 mmol, 31%) and *trans*-isomers (750 mg, 2.34 mmol, 42%). For *trans* isomer: ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.89 – 7.83 (m, 3H), 7.79 (dt, *J* = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 7.55 – 7.43 (m, 5H), 7.40 – 7.32 (m, 3H), 5.42 (s, 1H, H5), 4.77 (s, 2H), 4.42 – 4.37 (m, 2H, H4, H6eq), 3.91 – 3.82 (m, 1H, H5), 3.74 – 3.66 (m, 2H, H4, H6ax); ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 137.7, 135.4, 133.3, 133.2, 129.1, 128.6, 128.4, 128.0, 127.9, 126.8, 126.4, 126.2, 126.2, 125.7, 101.4, 72.1, 70.3, 68.1. HRMS (ESI+): calculated for [C₂₁H₂₀O₃+H⁺]: [M+H⁺] 321.1485, found 321.1499. For *cis* isomer (two conformers are detected): ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.88 – 7.80 (m, 4H), 7.60 – 7.53 (m, 3H), 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.43 – 7.32 (m, 3H), 5.58 (s, 1H, H2), 5.57 (s, 0.15H, H2), 4.88 (s, 2H), 4.72 (p, *J* = 1.7 Hz, 0.15H, H5), 4.41 (dq, *J* = 12.8, 1.6 Hz, 2H, H4, H6), 4.31 (dq, *J* = 13.2, 1.5 Hz, 0.30H, H4, H6), 4.20 – 4.15 (m, 0.30H, H4, H6), 4.05 (dq, *J* = 12.7, 1.7 Hz, 2H, H4, H6), 3.39 (p, *J* = 1.7 Hz, 1H, H5); ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.2, 135.7, 133.3, 133.1, 129.0, 128.4, 128.3, 127.8, 127.8, 126.7, 126.3, 126.2, 126.1, 125.9, 101.5, 101.3, 70.6, 69.3, 69.2, 69.2, 66.1. HRMS (ESI+): calculated for [C₂₁H₂₀O₃+H⁺]: [M+H⁺] 321.1485, found 321.1478.

5-hidroxy-2-isopropyl-1,3-dioxane GA4. To a solution of 5-(2-naphthylmethoxy)-2-phenyl-1,3-dioxane **a2** (both *cis* and *trans* isomers, 1.31 g, 4.09 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL), trifluoroacetic acid (1 mL) was added. The solution was stirred at room temperature for 3 days and then concentrated *in vacuo* to afford a residue (590 mg, 2.54 mmol) that was used in the next reaction without further purification. The above material was dissolved in anhydrous toluene (25 mL) and treated with *p*-toluenesulfonic acid (96 mg, 0.5 mmol) and isobutyraldehyde (4.7 mL, 50.86 mmol) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 12 h, quenched with triethylamine and then concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 1 to 5%) to afford a major fraction of *trans* isomer of **a3** along with other subproducts (640 mg) and a minor fraction containing the *cis* isomer and byproducts (270 mg). The major fraction was dissolved in ethyl acetate (15 mL), treated with a catalytic amount of Pd/C (64 mg 10% w/w) and stirred at room temperature under a hydrogen atmosphere for 24 hours. The mixture was filtered through celite and concentrated. The residue was purified by flash chromatography to afford compound **GA4** (70 mg, 0.48 mmol, 12% overall). ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.22 – 4.14 (m, 2H, H4, H6 eq), 4.12 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H2), 3.85 (tq, *J* = 10.2, 5.0 Hz, 1H, H5), 3.39 – 3.29 (m, 2H, H4, H6 ax), 1.85 – 1.70 (m, 2H), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 105.7 (C2), 71.7 (C4, C6), 61.6 (C5), 32.4, 17.3. HRMS (ESI-): calculated for [C₇H₁₂O₃]: [M-H⁺] 145.087, found 145.0869

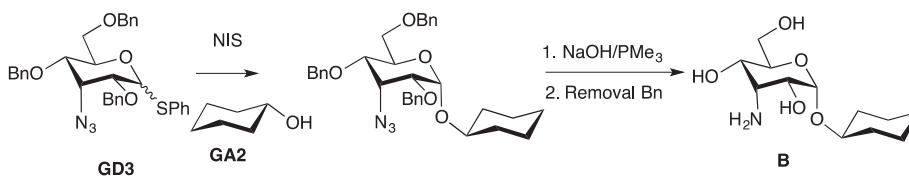


Scheme 9. Synthetic route for the preparation of methyl 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside **A**.

Methyl 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside A. Glycosyl donor **GD4** (300 mg, 0.53 mmol) and methanol (169mg, 5.29 mmol) were coupled according to the general procedure for glycosylation (method B). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) afford the α anomer (101 mg, 0.174 mmol, 34%) along with

the corresponding β isomer (144 mg, 0.248 mmol, 47%). For α anomer: ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.26 – 7.20 (m, 4H), 7.17 – 7.09 (m, 2H), 6.91 – 6.79 (m, 6H), 4.61 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H1), 4.58 – 4.50 (m, 3H), 4.45 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, Hben), 4.38 (m, 2H), 4.00 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H, H3), 3.93 (dt, $J = 9.8, 2.6$ Hz, 1H, H5), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.70 (dd, $J = 10.6, 3.1$ Hz, 1H, H6a), 3.62 – 3.56 (m, 2H, H6b, H4), 3.41 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H, H2), 3.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.8, 159.6, 159.5, 130.1, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 114.2, 114.04, 113.9, 98.0 (C1), 73.5, 73.5 (C2), 73.1 (C4), 71.5, 71.2, 68.1 (C6), 66.0 (C5), 59.6 (C3), 56.1, 55.5, 55.5, 55.4. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_3+\text{NH}_4^+]$: $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ 597.2919, found 597.2923.

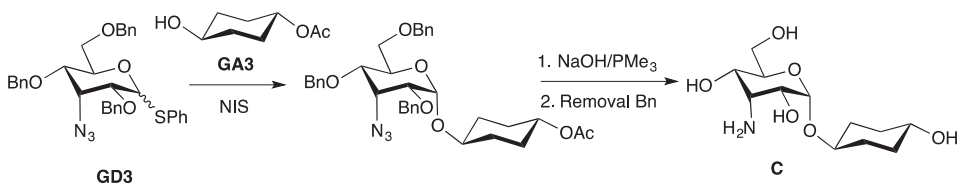
This material (100 mg, 0.17 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) containing 10 % TFA and it was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed at reduced pressure and the residue purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). This material was treated with with PMe_3 (0.14 mL, 0.14 mmol) and 0.1 M NaOH (0.18 mL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM/MeOH/Dioxane/ NH_4OH mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **A** (10 mg, 0.052 mmol, 31%): ^1H NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ 4.85 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H1), 4.00 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H, H2), 3.97 (dd, $J = 10.4, 4.6$ Hz, 1H, H4), 3.89 (dd, $J = 12.3, 2.3$ Hz, 1H, H6), 3.80 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H3), 3.77 (dd, $J = 12.3, 5.1$ Hz, 1H, H6), 3.70 (ddd, $J = 10.5, 5.2, 2.3$ Hz, 1H, H5), 3.42 (s, 3H, OMe). ^{13}C NMR (126 MHz, Deuterium Oxide) δ 98.7 (C1), 67.0 (C5), 64.3 (C2), 62.6 (C4), 60.5 (C6), 55.5 (OMe) 54.9 (C3). HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}+\text{NH}_4^+]$: $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ 194.1023, found 194.1022.



Scheme 10. Synthetic route for the preparation of cyclohexyl 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside **B**.

Cyclohexyl 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside A. Glycosyl donor **GD3** (300 mg, 0.53 mmol) and cyclohexanol (132 mg, 1.32 mmol) were coupled according to the general procedure for glycosylation (method B). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5) afforded α -glycoside (60 mg, 0.108 mmol, 24%) along with the corresponding β isomer (113mg, 0.203 mmol, 46%). For α -anomer: ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.38 – 7.23 (m, 15H), 5.03 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H1), 4.65 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.63 – 4.56 (m, 3H), 4.52 – 4.39 (m, 2H), 4.23 (t, J = 3.6 Hz, 1H, H3), 4.17 – 4.12 (m, 1H, H5), 3.78 (dd, J = 10.5, 3.3 Hz, 1H, H6a), 3.65 (dd, J = 10.6, 2.1 Hz, 1H, H6b), 3.61 (dd, J = 9.9, 3.5 Hz, 1H, H4), 3.62 – 3.51 (m, 1H, H_{cyclohexyl}), 3.52 (t, J = 3.8 Hz, 1H, H2), 1.89 – 1.71 (m, 5H), 1.55 – 1.40 (m, 3H), 1.26 (dq, J = 8.0, 4.1, 3.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.3, 137.9, 137.7, 128.8, 128.8, 128.7, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 128.0, 94.9 (C1), 76.4 (C), 75.0 (C2), 73.9, 73.5 (C4), 71.7, 71.3, 68.8 (C6), 66.4 (C5), 58.8 (C3), 33.7, 31.8, 26.0, 24.4, 24.1. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}_3+\text{NH}_4^+]$: $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ 575.3228, found 575.3216.

The α -anomer (50 mg, 0.09 mmol) was treated with PMe_3 (0.14 mL, 0.14 mmol) and 0.1 M NaOH (0.18 mL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%). The residue was subjected to the general procedure for hydrogenation by treatment with Pd/C in MeOH (5 mL) for 5 days. Purification by flash chromatography using DCM/MeOH/Dioxane/ NH_4OH mixture (7:2:1.5:1) gave the desired product **B** (21 mg, 0.08 mmol, 89%). ^1H NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ 5.14 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1), 4.02 – 3.95 (m, 2H, H2 and H4), 3.87 (dd, J = 11.7, 1.9 Hz, 1H, H6a), 3.85 – 3.75 (m, 3H, H3, H5, H6b), 3.68 (m, 1H, H_{cyclohexanol}), 1.98 – 1.90 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.52 (m, 1H), 1.47 – 1.38 (m, 1H), 1.35 – 1.23 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, Deuterium Oxide) δ 95.7 (C1), 77.7, 66.8 (C5), 64.1 (C2), 62.2 (C4), 60.2 (C6), 54.6 (C3), 32.7, 30.7, 24.9, 23.7, 23.5.

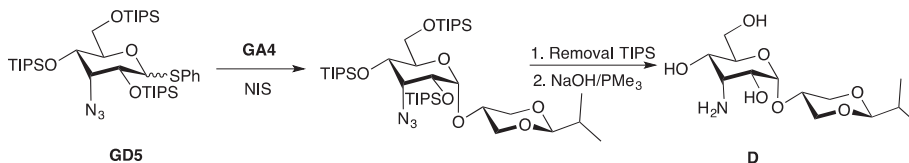


Scheme 11. Synthetic route for the preparation of *trans*-4-hydroxy-cyclohexyl 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside **C**.

trans-4-hydroxy-cyclohexyl 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside C. Glycosyl donor **GD3** (250 mg, 0.44 mmol) and trans-4-acetoxy-1-cyclohexanol⁵ (46 mg, 0.29 mmol) were coupled at -40 °C according to the general procedure for glycosylation (method A). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 85:15) afforded α -glycoside (60 mg, 0.098 mmol, 22%) along with the corresponding β isomer (50 mg, 0.081 mmol, 18%). For α -anomer: ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.33 – 7.18 (m, 15H), 4.94 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H1), 4.75 (tt, *J* = 8.2, 3.7 Hz, 1H, HOAc), 4.58 – 4.52 (m, 4H), 4.44 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, Hben), 4.40 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, Hben), 4.20 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H3), 4.09 – 4.04 (m, 1H, H5), 3.72 (dd, *J* = 10.6, 3.3 Hz, 1H, H6), 3.65 – 3.58 (m, 2H), 3.56 (dd, *J* = 9.8, 3.5 Hz, 1H, H4), 3.49 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, H2), 1.98 (s, 3H, OAc), 2.02 – 1.82 (m, 4H), 1.64 – 1.33 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.9 (CO), 138.2, 137.7, 137.7, 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 128.0, 95.3 (C1), 75.2, 74.8 (C2), 73.9, 73.3 (C4), 71.7, 71.7, 71.5, 68.7 (C6), 66.5 (C5), 58.5 (C3), 29.7, 28.3, 28.0, 27.9, 21.7 (OAc). HRMS (ESI+): calculated for [C₃₅H₄₁O₇N₃+NH₄⁺]: [M+NH₄⁺] 633.3283, found 633.3291.

The α -anomer (60 mg, 0.098 mmol) was treated with PMe₃ (0.15 mL, 0.15 mmol) and 0.1 M NaOH (0.2 mL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 2%). The residue was treated with a catalytic amount of NaOMe in MeOH (2 mL) for 2 hours at room temperature and purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). This material was finally subjected to the general procedure for hydrogenation by treatment with Pd/C in MeOH (5 mL) for 36 hours. Purification by flash chromatography using DCM/MeOH/Dioxane/NH₄OH mixture (7:2:1.5:1) gave the desired product C (10 mg, 0.036 mmol, 37%). ¹H NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ 5.11 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H1), 4.01 – 3.96 (m, 2H, H2 and H4), 3.89 – 3.75 (m, 4H, H3, H5 and H6), 3.73 – 3.63 (m, 2H, H), 2.04 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.50 (tdd, *J* = 13.0, 10.4, 3.5 Hz, 1H), 1.34 (m, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, Deuterium Oxide) δ 96.1 (C1), 76.9, 69.0, 66.8 (C5), 64.0 (C2), 62.1 (C4), 60.1 (C6), 54.6 (C3), 31.5, 31.3, 30.1, 28.2. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₂H₂₃O₆N+H⁺]: [M+H⁺] 278.15981, found 278.16002.

⁵ H. Ogawa, M. Amanoa and T. Chihara *Chem Commun.* **1998**, 495-496.



Scheme 12. Synthetic route for the preparation of (2R, 5R)-5-(2-isopropyl-1,3-dioxanyl)-3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside **D**.

(2R, 5R)-5-(2-isopropyl-1,3-dioxanyl)- 3-amino-3-deoxy- α -D-allopyranoside **D.**

Glycosyl donor **GD5** (403 mg, 0.53 mmol) and 5-hydroxy-2-isopropyl-1,3-dioxane (70 mg, 0.48 mmol) were coupled at 0 °C according to the general procedure for glycosylation (method B). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 98:2) afforded corresponding glycoside (282 mg, 0.352 mmol, 66%) as a 1:1 mixture of α and β isomers. ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.84 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H1 α), 4.64 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H1 β), 4.44 (ddd, $J = 10.8, 5.0, 2.1$ Hz, 1H), 4.31 (ddd, $J = 10.8, 5.2, 2.2$ Hz, 1H), 4.22 (dtd, $J = 11.0, 5.4, 2.3$ Hz, 2H), 4.15 – 4.08 (m, 3H), 4.04 (t, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J = 10.7, 1.8$ Hz, 2H), 3.97 – 3.59 (m, 10H), 3.52 (t, $J = 10.5$ Hz, 2H), 3.45 – 3.31 (m, 2H), 1.77 (pd, $J = 6.9, 4.9$ Hz, 2H), 1.17 – 0.97 (m, 126H), 0.92 (d, $J = 2.8$ Hz, 6H), 0.90 (d, $J = 2.7$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 105.9 (C2 diox), 105.8 (C2diox), 100.2 (C1 β), 99.1 (C1 α), 76.0, 72.6, 71.3, 71.3, 71.2, 69.9, 69.8, 69.6, 69.5, 69.0, 68.7, 68.5, 68.2, 64.4, 63.7, 63.5, 32.7, 32.6, 18.4, 18.4, 18.4, 18.3, 18.3, 18.2, 17.6, 17.5, 17.4, 17.4, 13.0, 12.8, 12.5, 12.4, 12.3. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{40}\text{H}_{83}\text{O}_7\text{N}_3\text{Si}_3+\text{Na}^+]$: $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 824.5431, found 824.5428.

To a solution of this material (270 mg, 0.34 mmol) in THF (6.7 mL) was added TBAF (478 mg, 1.52 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 4 hours and the solvent was removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3%) and this material was treated with PMe_3 (0.41 mL, 0.41 mmol) and 0.1 M NaOH (0.55 mL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The residue was purified by preparative TLC using DCM/MeOH/Dioxane/ NH_4OH mixture (6:2:1.5:1) to give the desired product **D** (10 mg, 0.032 mmol, 10%). ^1H NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ 5.10 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H1), 4.37 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, CH diox), 4.36 – 4.32 (m, 1H, CH eq), 4.28 (ddd, $J = 11.0, 5.3, 2.1$ Hz, 1H, CH eq), 4.01 – 3.95 (m, 2H, H2 y H4), 3.92 – 3.85 (m, 2H, H6,

Hdiox glicos), 3.82 – 3.73 (m, 3H, H6, H3 y H5), 3.69 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, Hax), 3.62 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, Hax), 1.79 (dq, $J = 13.5, 6.4$ Hz, 1H, Hisop), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, Me isopr). ^{13}C NMR (126 MHz, Deuterium Oxide) δ 105.9 (Cdioxan), 97.9 (C1), 69.2 (CH₂), 69.1, 68.1 (CH₂), 67.2 (C5), 63.8 (C2), 62.0 (C4), 60.1 (C6), 54.1 (C3), 31.4 (CH isop), 16.2 (Me isop). HRMS (ESI+): calculated for [C₁₃H₂₆O₇N+H⁺]: [M+H⁺] 308.17038, found 308.17084.

Figure S1.– Effect of CH polarization (A and B) on the stability of CH/ π complexes in gas phase (red line), together with those expected in water (cyan lines). The influence of water solvation on the stability of OH/ π complexes (C) is also represented for comparison. See the main text.

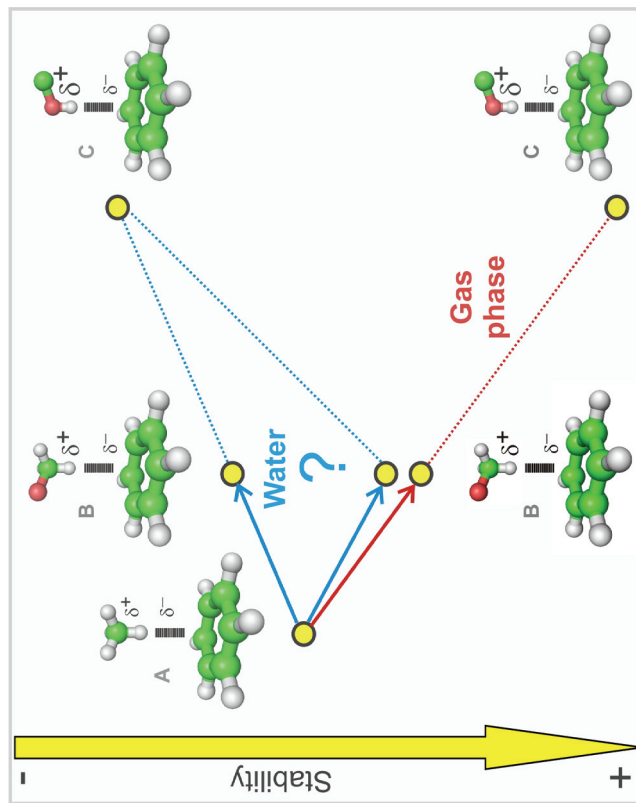


Figure S2.- 1D- (Top-Left) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra together with a key region of a 2D-TOCSY (Bottom-Right) experiment acquired for compound **A** at 500 MHz, pH 6.2 and 318K.

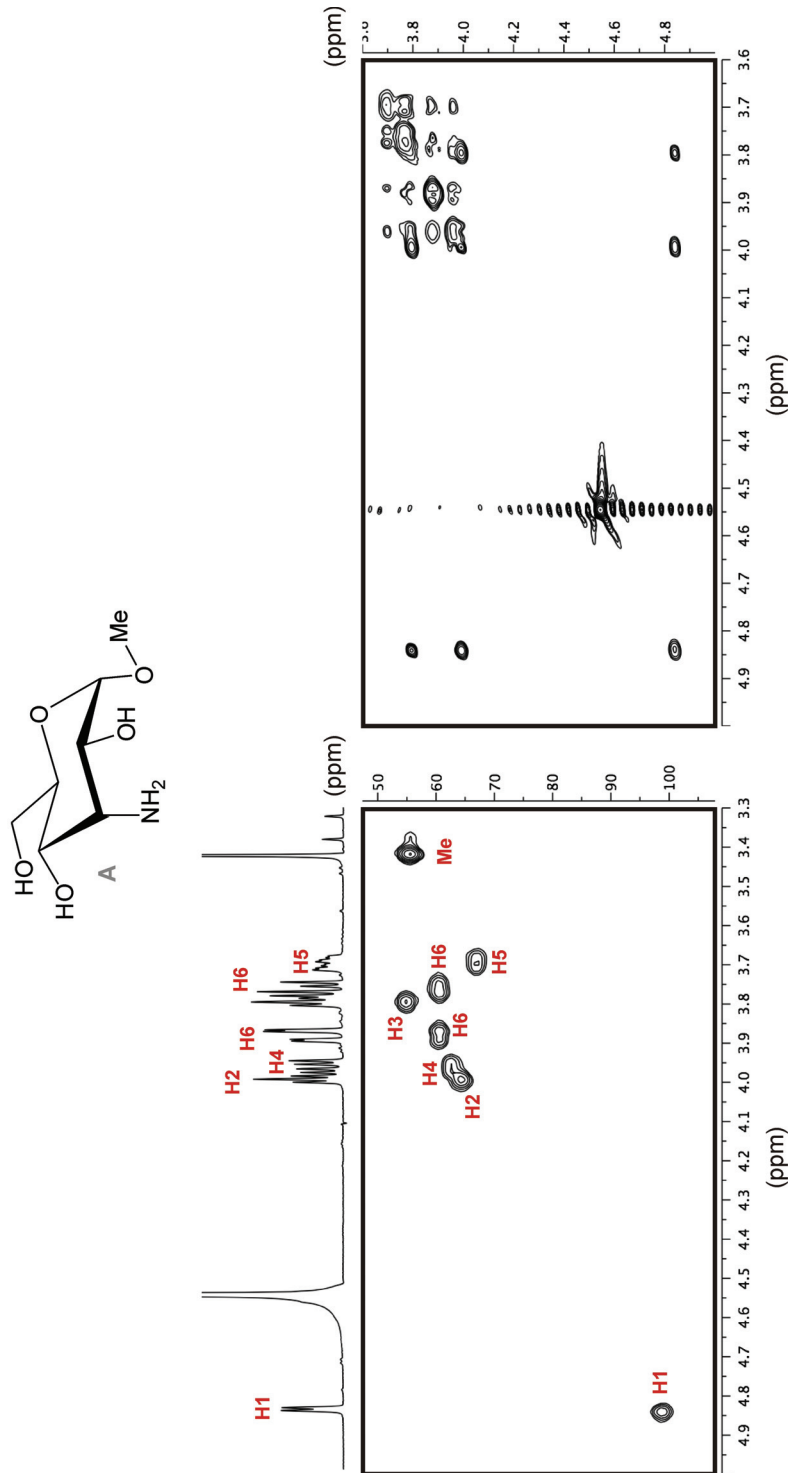


Figure S3. 1D- (Top-Left) and 2D-TOCSY (Bottom-Left) spectra acquired for compound **B** at 500 MHz, pH 6.2 and 298K. A key region of a 2D-HSQC experiment acquired under identical experimental conditions is represented on the right-hand side. Some relevant assignments for the allose (red) and cyclohexane (cyan) fragments are indicated.

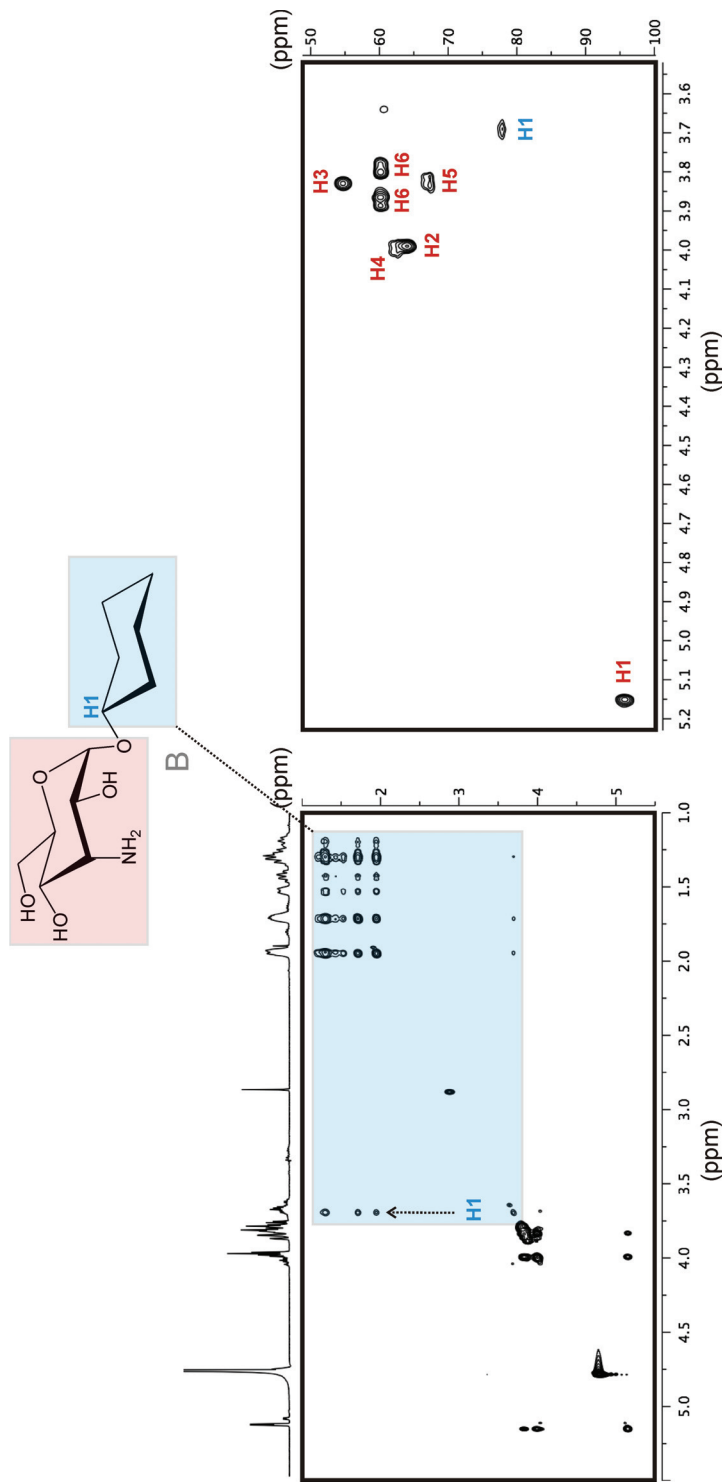


Figure S4.- 1D- (Top-Left) and 2D-TOCSY (Bottom-Left) spectra acquired for compound **C** at 500 MHz, pH 6.2 and 298K. A 2D-HSQC experiment acquired under identical experimental conditions is represented on the right-hand side. Some allose and cyclohexanol assignments are labelled in the TOCSY expansion represented above.

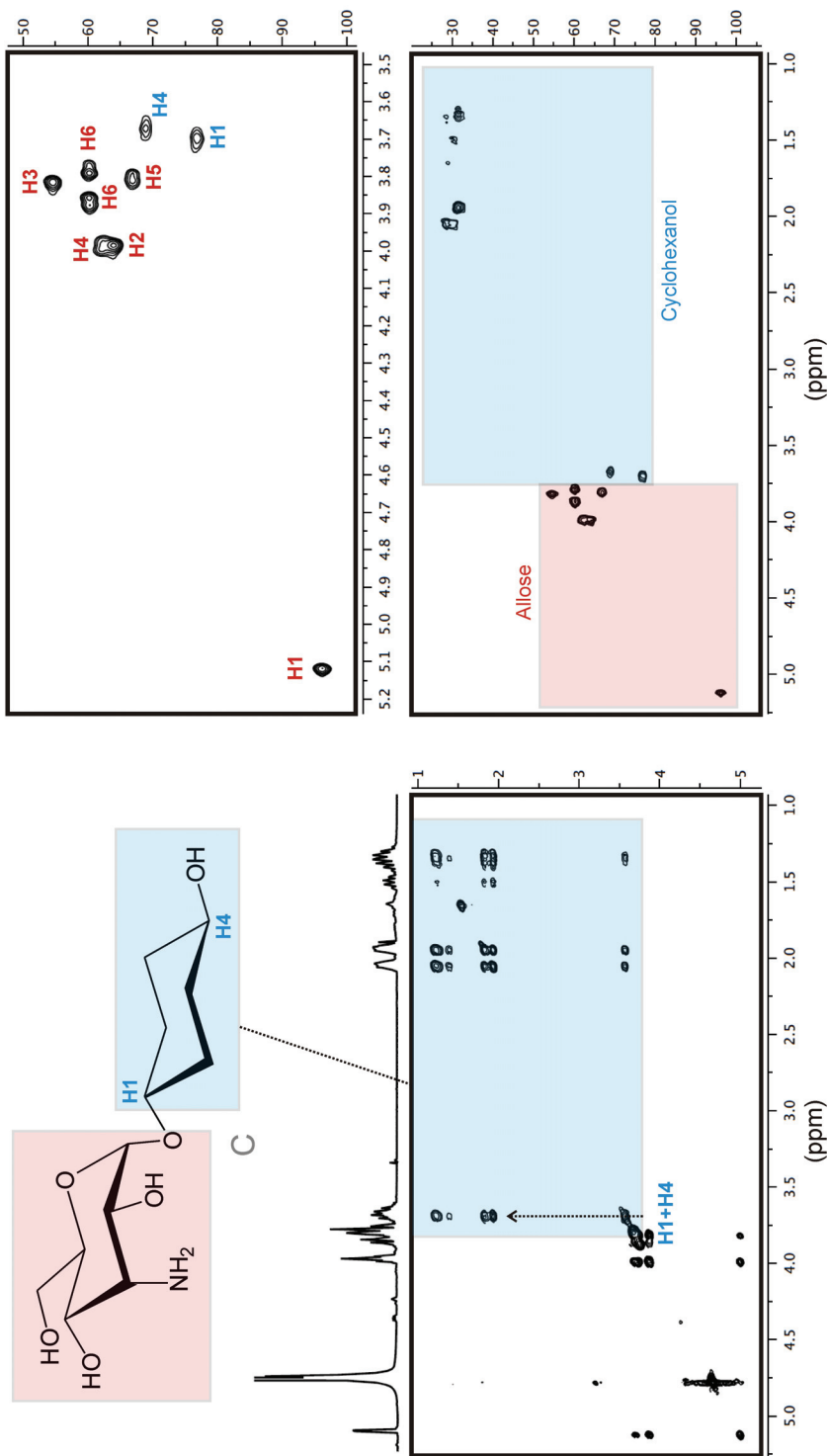


Figure S5.-A full 2D-TOCSY spectrum acquired for derivative **C** at 500 MHz, 298 K and pH 6.2 is shown on the Top-Right side of the Figure. Key regions of 1D, 2D-HSQC (Bottom-Left) and TOCSY (Bottom-Right) experiments are represented below. Some assignments for the allose (red) and dioxane (cyan) fragments are indicated.

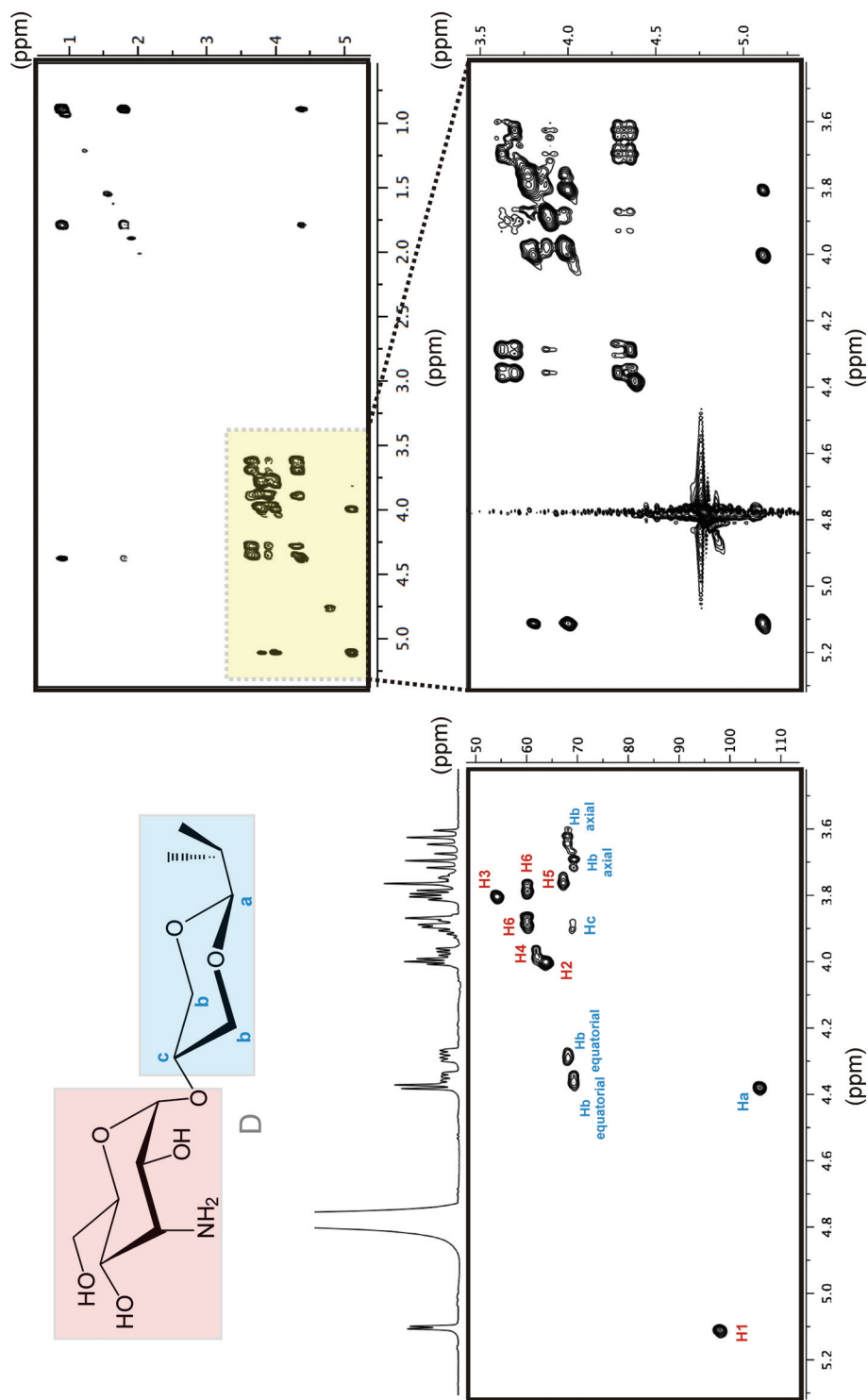


Figure S6.— 2D-TOCSY experiments acquired for compound **D** before (Left) and after (Right) the reductive imination reaction with aldehyde **1**. Axial protons of the dioxane (b_{axial}) fragment appear strongly up-field shifted in the final product (**D-1**) as a result of the dioxane/aromatic stacking. Chemical shift perturbations measured for the corresponding signals are indicated. Unambiguous stereospecific assignment for protons b_{axial} (red) and $b_{equatorial}$ (cyan) were not feasible. In these cases maximum $\Delta\delta$ (ppm) values were derived considering the two possible assignments (separated by /).

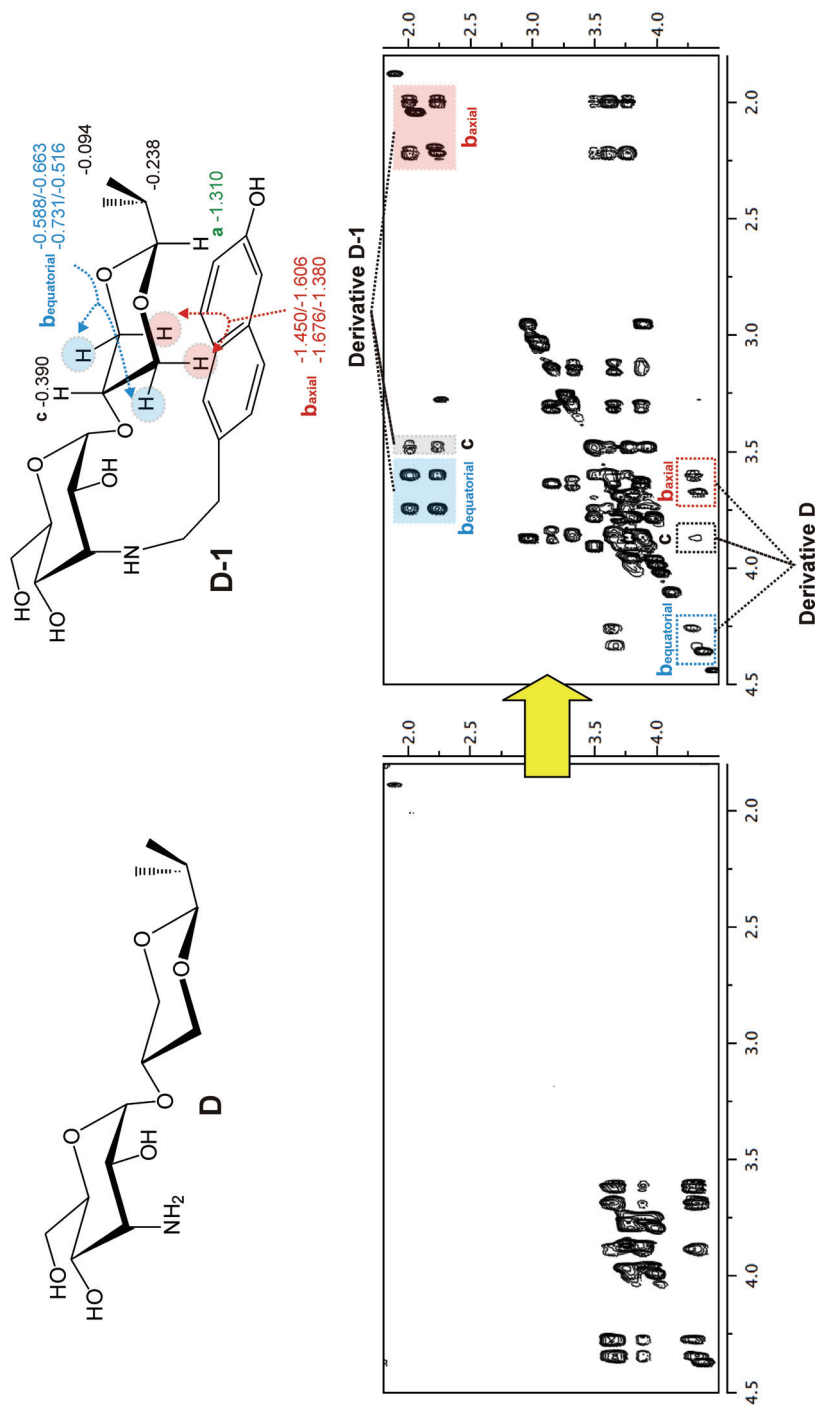


Figure S7.- 2D-TOCSY experiments acquired for compounds **B** (left) and **C** (Right) after addition of 0.5 equivalents of aldehyde **1** and sodium cyanoborohydride. In both cases, a mixture of the initial allose derivatives (**B** or **C**) with the corresponding reaction products (**B-1** or **C-1**) are detected. TOCSY connections from protons **H1** (Left) and **H1/H4** (Right) in both, reactives and products, are highlighted. The strong up-field shifting of the cyclohexane (Left) and cyclohexanol (Right) fragments that result from the CH/ π contacts present in the final products (**B-1** and **C-1**, respectively) is apparent.

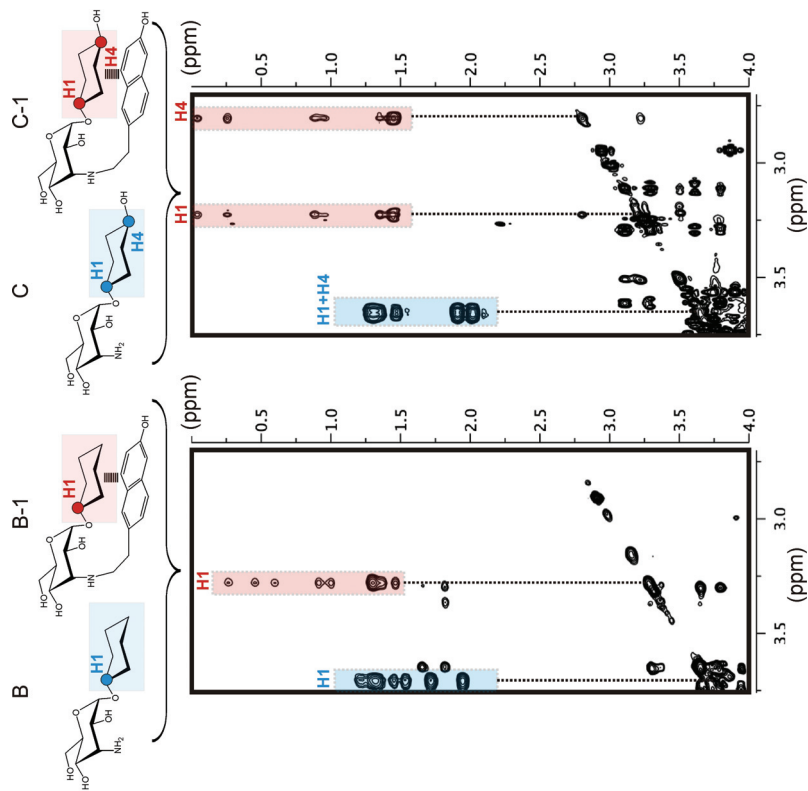


Figure S8.- In particular cases, ΔG values were also estimated from the relative populations of the intermediate imines/enamines (before the reduction step). Despite their intrinsic low stability in water, these species could be detected employing concentrated mixtures of the model compounds (**A-D**) and aldehydes. As an example, two regions of a 1D NMR spectra acquired for **B** (10 mM) in the absence (down) and presence (up) of aldehyde **1** (10 mM) are shown at the bottom of the figure. Strongly up-field shifted NMR signals, corresponding to imines/enamines are highlighted with a cyan circle. Imines/enamines were also detected from concentrated **C:1** and **D:1** mixtures (green and red circles, respectively). A competition experiment performed with a concentrate **A:B:C** (1:1:1) solution upon addition of aldehyde **1** is represented in the upper part of the figure. Relative populations of the intermediate species (represented in the yellow square) were estimated from the corresponding NMR signals (highlighted with cyan, green and red circles). The obtained values were in agreement with those measured from the respective secondary amines after the reduction step (see Figure 4), providing a strong validation of our strategy (which, overall, represents a much simpler and convenient way to derive stability differences).

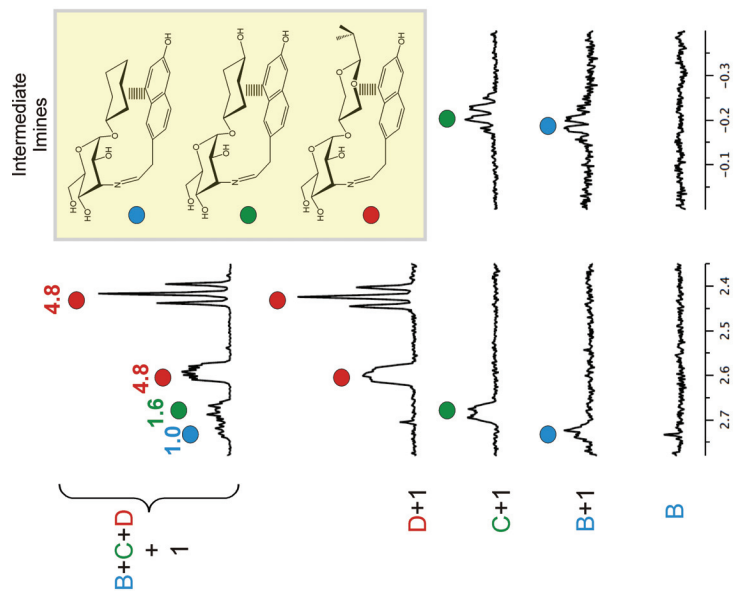


Figure S9.– Dynamic combinatorial experiments performed for triad **B/C/D** employing aldehyde **5**. This small aromatic aldehyde is just able to establish non-optimal contacts with the CH groups that flank the glycosidic linkage upon reductive imination. Nevertheless, these interactions suffice to reveal a clear preference of the aromatic system for the 1,3-dioxane fragment as CH- π donor unit.

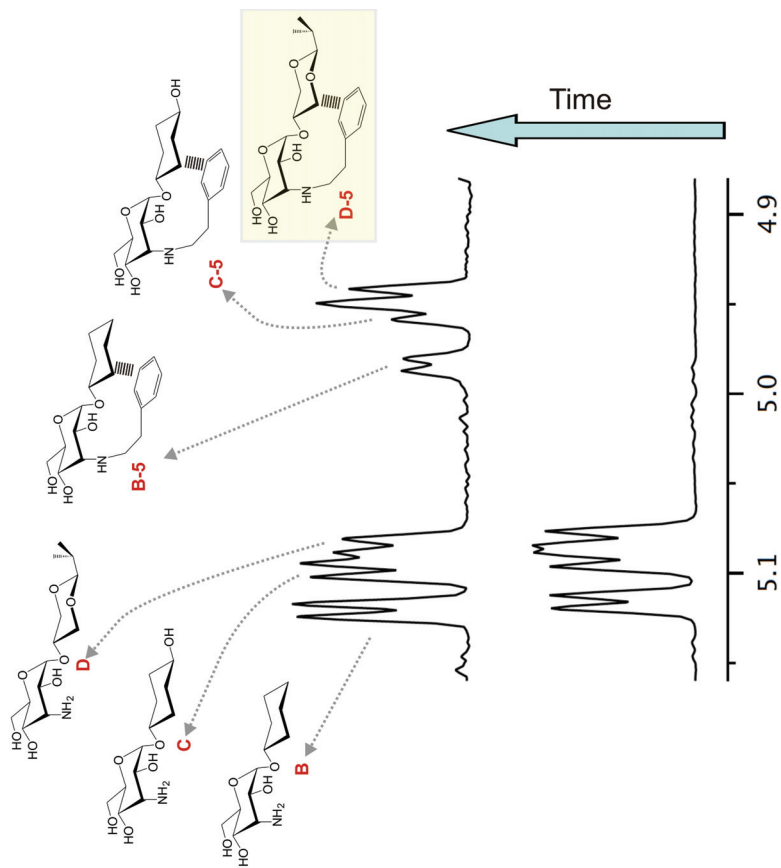


Figure S10.- Dynamic combinatorial experiments were performed for triad B/C/D and pairs C/D, B/D, B/C, employing different aldehydes (see Figure 5). In some cases, in order to measured product ratios a deconvolution of the overlapping NMR signals was required. This was carried out employing the line-fitting module implemented in the program MestreNova. The output of the fitting protocol for well-resolved (Left) and overlapping (Right) NMR signals is shown. The areas of the fitted peaks together with their assignments are shown in red. The product ratios derived from this data are shown in black (bottom).

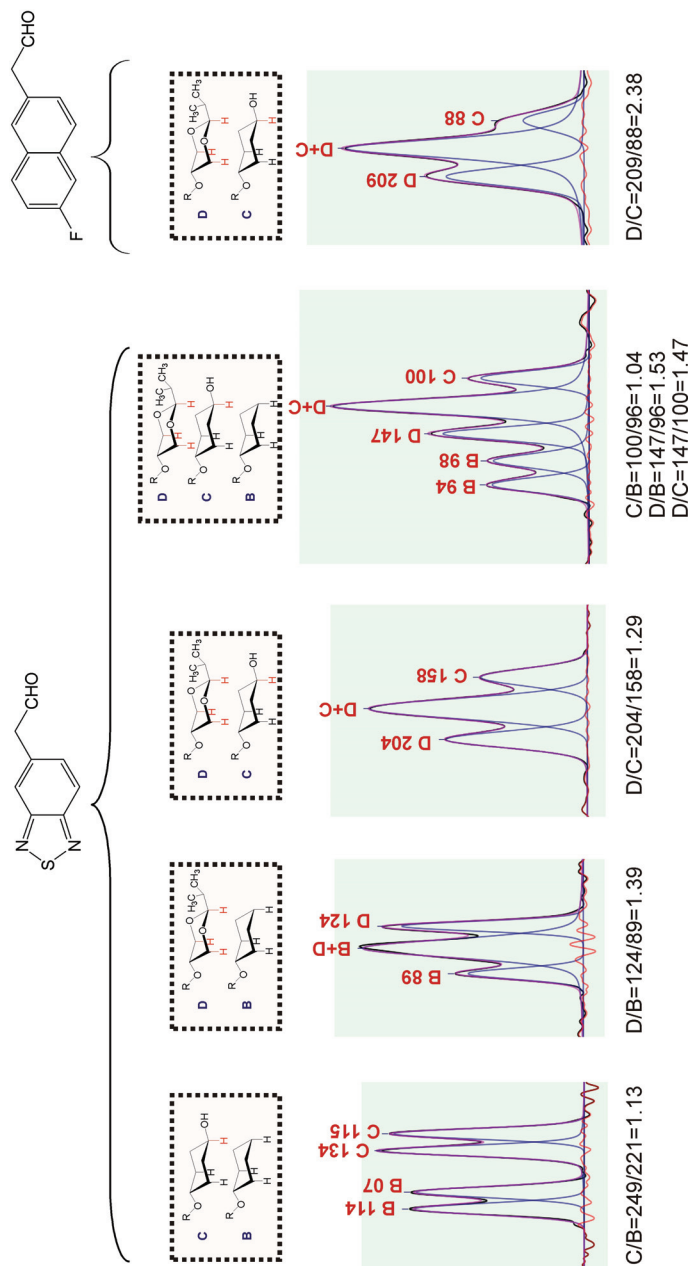
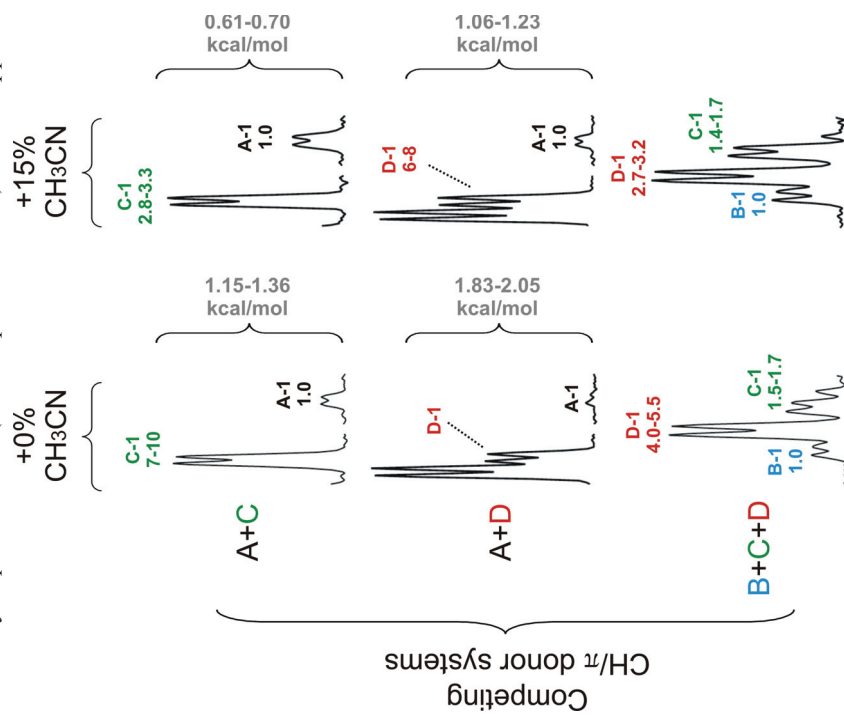


Figure S11.—Additional competition experiments were performed in the presence of organic co-solvents. 1D-NMR data and population ratios measured from stoichiometric **A:C** (upper panel), **A:D** (middle panel) and **B:C:D** (lower panel) mixtures upon reductive imination with **1**, in the absence (left) and presence (right) of acetonitrile are represented. The ΔG values derived from these data are shown in grey. The **A:D** ratio in the absence organic co-solvent was too large for an accurate determination and the corresponding ΔG value has been taken from table 1 (see the main text). As expected, according to these experiments the addition acetonitrile (10–20%) leads to a progressive destabilization of all the CH/π complexes, reflecting the attenuation of the hydrophobic effect (i.e. less polar medium) and the appearance of competitive interactions with the alkyl groups of the co-solvent.



ANEXO 3

The key role of coulombic forces for stabilizing CH/ π complexes in water solution

Ester Jiménez-Moreno,^{‡a} Gonzalo Jiménez-Oses,^{‡b,c,d} Ana M. Gómez,^a Andrés G. Santana,^a Francisco Corzana,^c Agatha Bastida,^a Jesus Jiménez-Barbero,^{e,f,g} Juan Luis Asensio^{a*}.

^aInstituto de Química Orgánica (IQOG-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. Fax: +34-91-5644853; Tel: +34-91-5622900. ^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles. ^cDept. Química and Centro de Investigación en Síntesis Química, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain. ^dInstitute of Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI) University of Zaragoza, BIFI-IQFR (CSIC), Zaragoza, Spain. ^eCentro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain. ^fCenter for Cooperative Research in Biosciences (CIC-bioGUNE), Derio-Bizkaia, Spain. ^gBasque Foundation for Science, Ikerbasque, Bilbao, Spain.

KEYWORDS: CH/ π interactions, Carbohydrate/Aromatic stacking, Structure-stability relationships, Electrostatic Forces, Solvophobic interactions, Dispersion Forces, Dynamic Combinatorial Chemistry, Quantum Mechanics Calculations.

ABSTRACT: CH/ π interactions play a key role in a large variety of molecular recognition processes of biological relevance. However, the origin and structural determinants of these interaction modes in water remain poorly understood. In order to improve our comprehension of CH/ π bonds, we have performed a quantitative analysis of a large data set comprising 117 chemically diverse carbohydrate/aromatic stacking complexes, prepared through a dynamic combinatorial approach recently developed by our group. The obtained free energies provide a detailed picture of the structure/stability relationships that govern CH/ π complexes. Moreover, this experimental data set, in combination with quantum mechanical calculations have contributed to dissect the main driving forces that promote the association process. The obtained data conclusively show that coulombic contributions represent a reliable predictor for relative binding strengths.

Biomolecular recognition processes are mediated by a wide range of weak intermolecular forces, which cooperatively act to provide binding affinity and specificity. Among them, CH/ π bonds have attracted a considerable attention in recent years due to their importance and widespread occurrence.¹⁻¹² These interactions can be generally described as the attractive molecular force occurring between polarized CH fragments and aromatic rings. According to theoretical studies, *in the gas phase*, a major dispersive component, together with a smaller, but still significant, electrostatic contribution (which increases with the polarization of the involved CH groups) determine the stability of the resulting complexes.^{2,3} However, the structural determinants and driving forces behind CH/ π bonds *in water* have proved more difficult to dissect and remain poorly understood.

High-dielectric solvents are expected to attenuate coulombic interactions between the CH moieties and the aromatic systems. Intriguingly, we have shown in a recent study that, even in water, CH/ π contacts are strongly stabilized by CH polarization, suggesting that electrostatic forces remain remarkably relevant.⁵ Since this contribution increases in low dielectric environments, CH/ π complexes might be expected to be stronger in organic solvents. However, it is well established that the addition of organic co-solvents usually has a strongly unfavorable influence on the interaction.^{2,4d,6a,7a} This phenomenon has traditionally

been considered an evidence for the relevance of the hydrophobic effect in the stabilization of the complex. However, it might also be explained by competitive CH/ π contacts between the substrates and co-solvent molecules, as pointed out by Nishio and co-workers.²

Regarding the van der Waals contribution, while certainly dominant in the gas phase, its significance and relative weight in solution remains unclear. Indeed, recent experimental measurements of alkyl-alkyl interactions in solution seem to be consistent with a large cancellation of dispersion forces, due to competitive interactions with the solvent.¹³ This attenuation is expected to be highly dependent on the molecular properties of the involved species and its magnitude for CH/ π bonds is presently unknown.

Finally, from a design perspective, a quantitative description of the most relevant features of these complexes and their influence on the binding free energies would be greatly acknowledged. Such an analysis should explicitly consider a wide range of variations in both the CH/ π donor and acceptor molecules (see below).

In summary, after more than twenty years of scientific research on this topic, a detailed and quantitative picture of the origin and structure/stability relationships that govern these important interaction modes in water is still missing.

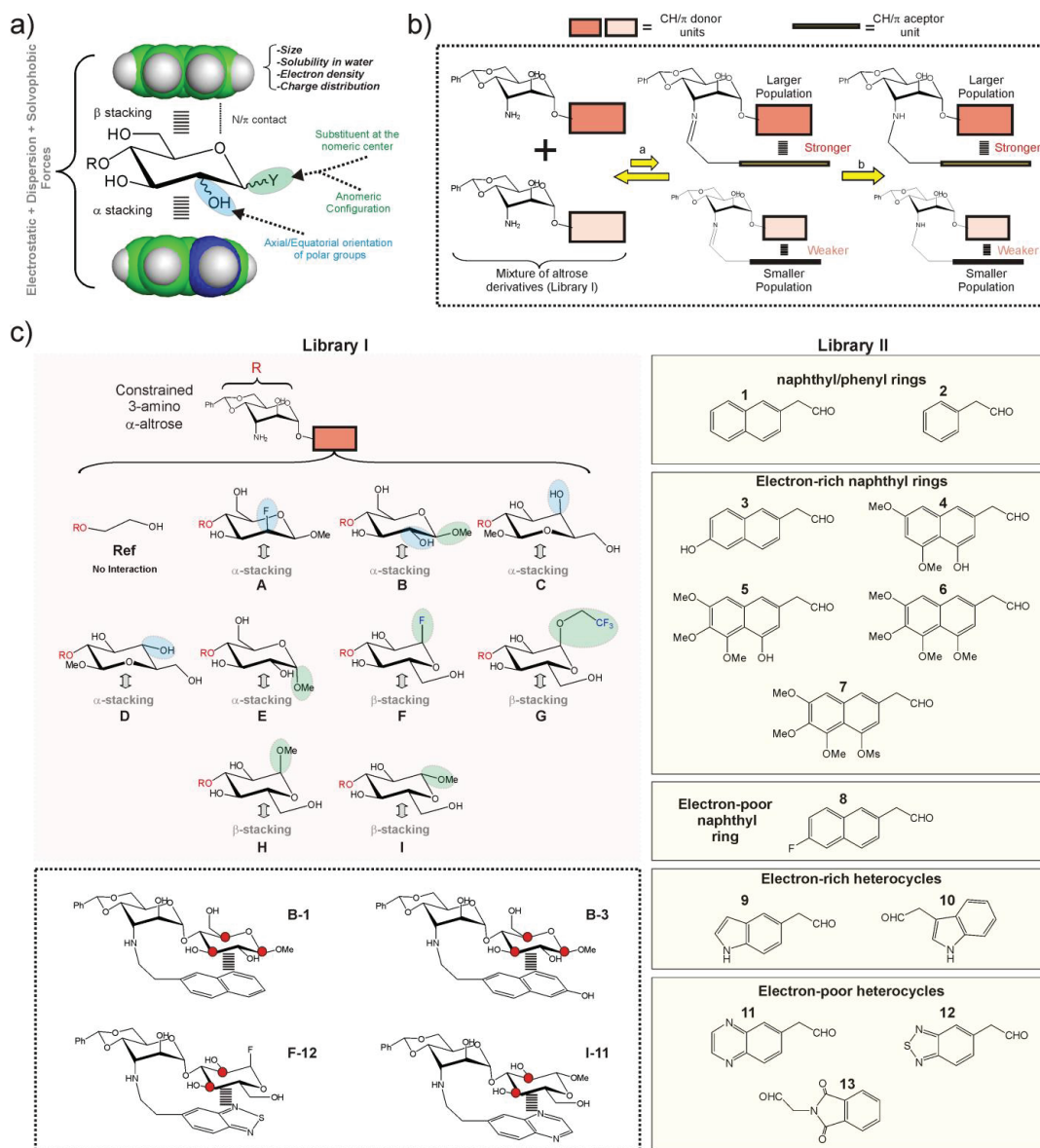


FIGURE 1.-a) The main structural features that determine the stacking free energy are indicated. b) Schematic representation of the employed dynamic combinatorial strategy (see the main text). c) Library of disaccharide derivatives (Library I, compounds A-I) and aldehyde (Library II, compounds 1-13) derivatives synthesized for our analyses. For Library I diverse functions and/or stereochemistries were considered for both anomeric and non-anomeric positions. Most relevant variations at these key sites are highlighted with green and cyan ellipses, respectively (see the main text). The interacting face (α or β) of the different CH/ π donor units is indicated with an arrow. Some examples of the products obtained upon reductive imination of disaccharides A-I with aldehydes 1-13 are shown at the bottom-left corner.

Such description might have a significant impact in different fields, such as chemical biology, supramolecular chemistry, and medicinal chemistry, facilitating the design of improved ligands, receptors, foldamers, or new materials.

In order to improve our understanding of CH/ π complexes in water, we have carefully studied a paradigmatic example of biological relevance: carbohydrate/aromatic stacking (Figure 1a).⁶⁻¹² This particular interaction mode plays a

key role in the molecular recognition of glycans by antibodies, enzymes, lectins, and nucleic acids and typically involves the simultaneous formation of 2-3 intermolecular bonds between pyranose CH groups and receptor aromatic units. It should be noted that carbohydrate/aromatic contacts can involve the α and/or β faces of the pyranose ring (herein referred as α - and β -type complexes, respectively) and that different axial/equatorial orientations are also feasible for the polar OH moieties. Moreover, the aromatic systems can also exhibit a wide range of chemical properties (electron density, charge distribution, solubility), conferring a significant structural diversity to the stacking complexes (Figure 1a).

We have employed a dynamic combinatorial protocol recently developed by our group to analyze a large data set of 117 chemically diverse carbohydrate/aromatic complexes. This represents the most quantitative and extensive experimental study reported so far for CH/ π complexes in water. The obtained experimental data, in combination with quantum mechanics calculations, provide a detailed picture of the structure/stability relationships that govern these complexes, and contribute to clarify their origin in physiological environments.

RESULTS AND DISCUSSION

A.- Brief description of the dynamic combinatorial approach and designed libraries. The employed methodology has been previously described and is briefly outlined in Figure 1b.^{8a} First, libraries **I** and **II** were designed and synthesized (Figure 1c and S1-S2). Library **I** included nine disaccharide derivatives (**A-I**) formed by a common 3-deoxy-3-amino α -altrose scaffold linked to alternative CH/ π donor units. Similarly, library **II** included thirteen acetaldehyde derivatives (**1-13**) equipped with different CH/ π acceptor aromatic systems. It should be noted that for any given disaccharide/aldehyde pair, one particular imine/enamine adduct could be formed. Interestingly, according to previous studies, these species are stabilized by well-defined intra-molecular CH/ π contacts, involving the aromatic system and only one (α or β) face of the donor fragment (Figure 1b, 1c and S3). Thus, disaccharides with $\alpha(1-2)$ (**C, D**) or $\alpha(1-4)$ (**A, B** and **E**) bonds form α -type complexes upon reaction with the aromatic aldehyde, while those with $\alpha(1-3)$ linkages (**F, G, H** and **I**) establish β -type complexes. Our library also included CH/ π donor units with different axial/equatorial orientations for the key OH/F positions (Figure 1c). All these modifications were selected to evaluate specific structural features of the interaction modes and their influence on stability. These include:

- The relative orientation of the pyranose and aromatic units (compound **B** vs **D**).
- The equatorial or axial orientation of those polar groups located on non-interacting CH positions (compounds **A** vs **B** and **C** vs **D**).
- The presence of axial polar groups on the interacting pyranose face (compounds **B** vs **E**).

d) The participation of the α or β pyranose face in the stacking interaction (**C** vs **H** and **D** vs **I**).

e) The configuration of the anomeric center in β -type complexes (**H** vs **I**).

f) The presence of electron-withdrawing substituents at the anomeric center in β -type complexes (**H** vs **F** or **G**).

Finally, a reference compound (**Ref**) that lacks a CH/ π donor pyranoside was also prepared.

Regarding library **II**, aromatic systems with different sizes, orientations, electronic properties and water solubility were explicitly considered (Figure 1c).

Equimolecular mixtures of two or more model disaccharides in buffered water solutions were treated with substoichiometric amounts of a given aldehyde to produce a dynamic mixture of the intermediate imines/enamines (step **a** in Figure 1b). After equilibration, chemical reduction of the transient species with an externally added reagent (step **b**) yields a non-equimolecular mixture of secondary amines whose relative populations were evaluated by either 2D or 1D NMR spectroscopy. These populations have been shown to reflect that of the intermediate species⁵ and, therefore, were employed to determine the stability differences ($\Delta\Delta G$) among alternative stacking modes. Moreover, by including the reference altrose derivative **Ref** (for which no stacking is feasible) in the initial mixture, we could also determine net interaction energies for the different complexes (ΔG).

This experimental approach outperforms more conventional methodologies, commonly based on binding studies with synthetic receptors^{4a,6} or wild-type/mutated proteins.^{7a,6,10} First, it allows the analysis and quantification of CH/ π bonds in the absence of additional interfering interactions (such as hydrogen bonds, van der Waals contacts, etc). Second, it displays an unprecedented sensitivity. Our experience showed that down to 10% population differences among final products can be safely detected by NMR.^{8a} At 277 K (the temperature selected for our experiments), this permits the quantification of $\Delta\Delta G$ values as small as 0.05 kcal/mol. This point is of capital importance when dealing with very weak forces, such as CH/ π interactions. Finally, most experimental analysis of carbohydrate/aromatic complexes reported so far has been restricted to a few simple carbohydrate/aromatic pairs, with special attention to those systems commonly found in Nature. In contrast, our method is highly versatile and allows incorporating a large variety of CH/ π donor and acceptor fragments.

B.- Experimental evaluation of stacking free energies. In order to estimate the CH/ π donor properties of the different pyranose units, we first carried out combinatorial experiments with relatively complex mixtures, formed by up to 5-8 selected disaccharides and one single aldehyde. Relative populations of the final products were determined by integrating key representative signals in 2D-HSQC experiments.

One example is represented in Figure 2. In this particular case, an equimolecular mixture of disaccharides **B, C, D, E, H** and **I**, together with the reference compound (**Ref**) were treated with aldehyde **9** (see the experimental section). In

the presence of an excess of aldehyde, the reductive amination reaction yields an equimolar mixture of the final disaccharide products that can be easily identified by 2D-HSQC experiments (Figure 2 upper panel: the alucose anomeric region). On the contrary, using a sub-stoichiometric amount of aldehyde **9**, the effective competition among the alternative CH/ π donor units is established. Under these circumstances (middle and lower panel), the experiment yields unequal populations of the different disaccharide products, thus providing a qualitative indication of the stability differences among the carbohydrate/aromatic complexes. Thus, the data showed that glucose unit **B** forms the most stable complex with the indole ring (complex **B-9**), while the weakest interaction corresponds to **I**. As expected, the reaction product for the reference compound (**Ref-9**), with no carbohydrate/aromatic stacking, is barely detectable in solution.

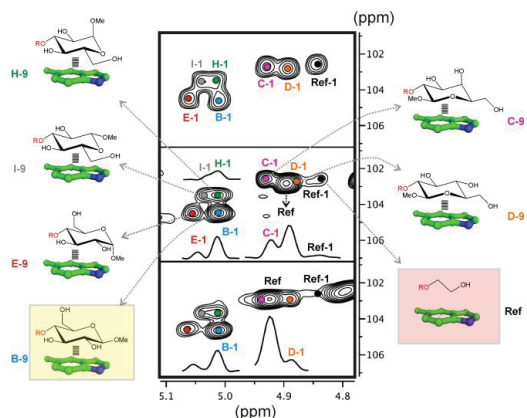


FIGURE 2.- Dynamic combinatorial experiments followed by 2D-HSQC NMR (see the main text). Middle and lower panel show NMR data acquired at slightly different pH values to relieve the signal overlapping.

Although the HSQC data provided valuable qualitative information, a more precise integration of the NMR signals required 1D ^1H -NMR data collected with long acquisition delays. Therefore, simpler experiments, involving a single pair of alucose derivatives and one aldehyde at a time were performed. Specifically, we carried out competitions with in all possible **Ref**/disaccharide pairs and the different aldehydes to obtain net interaction free energies (ΔG) for the alternative stacking modes. Moreover, we also determined the relative stabilities of all the complexes with respect to those formed by **D** ($\Delta\Delta G$), performing reactions with all possible **D**/disaccharide/aldehyde combinations. Finally, many other crosschecks were carried out with selected aldehydes and disaccharide pairs (Figure S4).

The preferred geometry of the CH/ π complexes was deduced from the pattern of chemical shift perturbations, promoted at the interacting pyranoses (Figures S3 and S5-S7). The interaction geometries were also estimated by molecular dynamic simulations in explicit solvent (MD, Figure S8).

The obtained results, expressed as net stacking energies (ΔG_{exp} (kcal/mol)), are schematically represented in Figure 3 and collected in Table S1. According to these data, the stability of carbohydrate/aromatic complexes in water is in the 0-1.5 kcal/mol range. These values are in close agreement with those reported in the literature for natural systems,^{7a} and imply that every single CH/bond contributes by up to 0.5-0.7 kcal/mol to the interaction free energy.

C.- Structure/stability relationships: Influence of the pyranose and aromatic chemical nature.- The results indicate that both, the pyranose and the aromatic unit, have a significant influence on the stability of the stacking complexes. Several trends are apparent (see Figures 3-5):

a) *The larger the number of CH/ π contacts, the stronger the complex.* This simple rule explains why the aromatic system **2** establishes weaker interactions than the more extended naphthyl unit present in **1**. It also explains why derivative **B** forms more stable complexes than **C** or **D** (in the former case, the glucose hydroxymethyl group also contacts the aromatic ring. See Figure S6).

b) *An axial-oriented OMe group on the interacting face of the pyranose can be highly disruptive for complex formation.* This effect is exemplified by the different stability exhibited by complexes **B-3** and **E-3** (0.64 kcal/mol larger for the former. See Table S1 and Figure 4a). The energy penalty detected in **E-3** results from the steric conflict between the axial polar group and the aromatic system and, consequently, depends on the size and orientation of this ring. In agreement with this view, for a differently oriented indole ring, the complex destabilization decreases down to 0.38 kcal/mol (**B-10** vs **E-10**. Figure 4a) while the smaller phenyl ring becomes virtually insensitive to the pyranose configuration (**B-2** vs **E-2**).

c) *For non-interacting pyranose CH groups, axial polar substituents are generally preferred over equatorial ones.* Complexes formed by pairs **C/D**, **A/B** or **H/I** provide an example of this rule. A simple explanation for this behavior is that equatorial polar moieties might be involved in repulsive interactions with the aromatic unit, being their solvation negatively affected. As expected, the magnitude of the energy penalty associated to the axial/equatorial inversion depends on the precise geometrical features of the complex, varying from 0.3 kcal/mol, (see **C-3** vs **D-3** in Figure 4b) to <0.1 kcal/mol (see **A-4** vs **B-4** in Figure 4b). The structural differences among these complexes, inferred from $\Delta\delta$ values, are outlined in Figure S7).

d) *For glycosides with all-equatorial substituents, the α -face is, in most cases, preferred for interaction over the β -face.* This selectivity is, exemplified by the extra stability displayed by **C** or **D** complexes with respect to those formed by **I** (Figure 3 and Table S1). It should be noted that, in the former case, complex formation is only mediated by CH/ π bonds. In contrast, for β -type interactions, the endocyclic oxygen becomes also involved in a n/π bond with the aromatic unit. According to our data, this later contact provides little contribution to the binding strength, being somewhat repulsive for electron-rich aromatic systems.

e) *Interactions mediated by the pyranose β face are sensitive to the electron density at the endocyclic oxygen, which,*

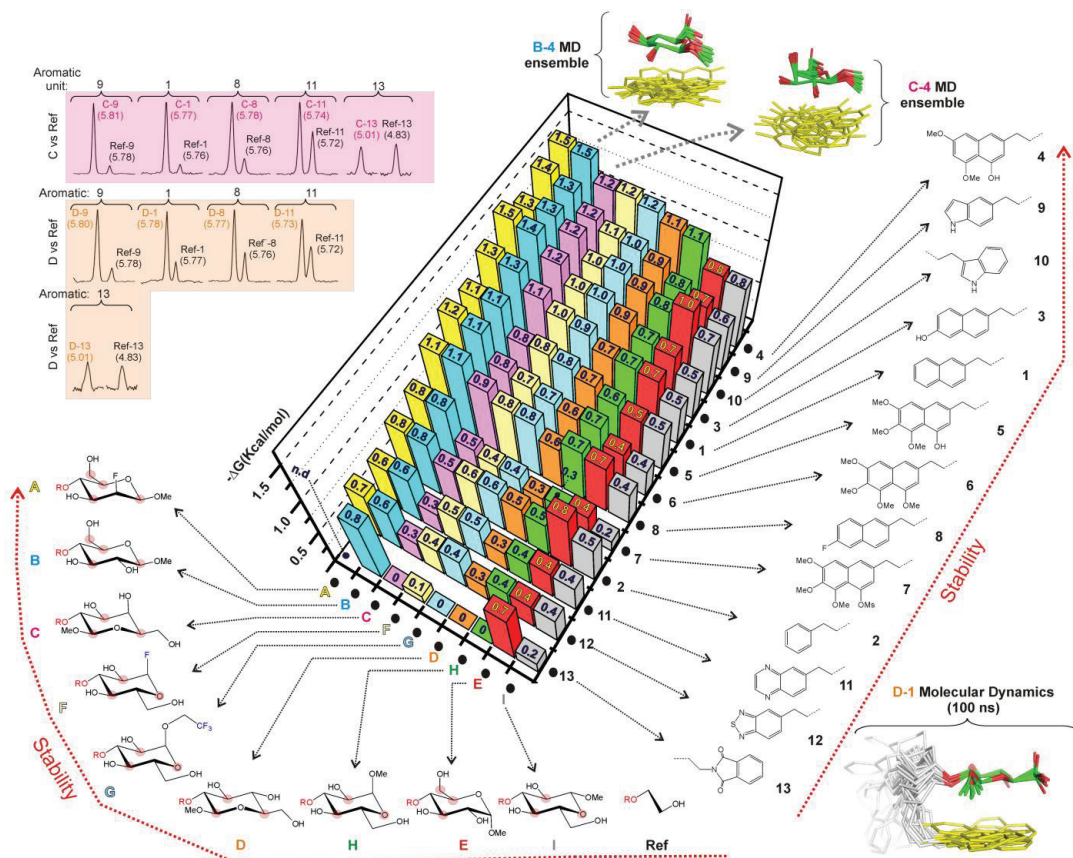


FIGURE 3.- Net stabilities (ΔG , kcal/mol) for the CH/ π complexes established between donors A-I and the aromatic rings present in 1-13 measured from NMR pairwise competition experiments. Examples of experimental data sets are shown in the upper-right corner. The structural features of the different complexes were estimated from 100 ns MD simulations. Conformational ensembles obtained for products B-4, C-4 and D-1 through the MD simulations are also represented.

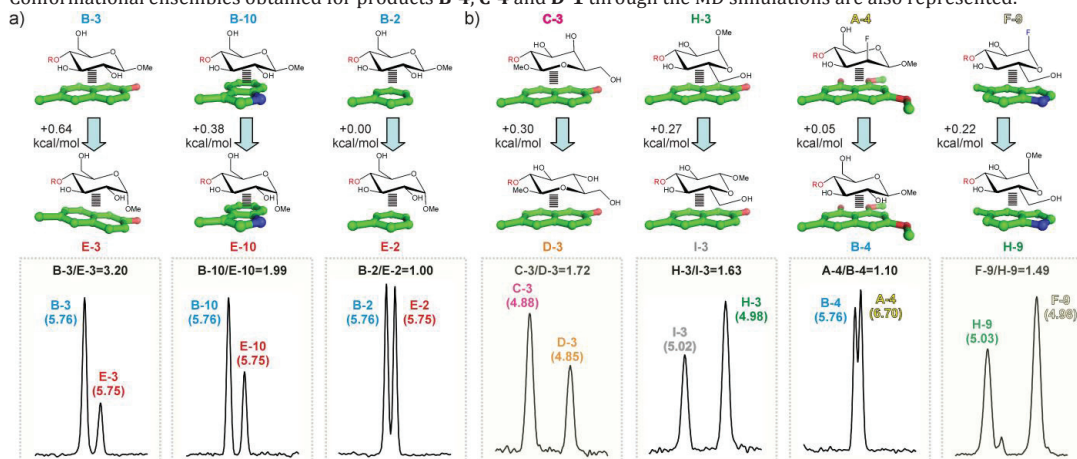


FIGURE 4.- Pairwise competition experiments between selected disaccharide pairs and aldehydes. NMR signals for the al-trose anomeric proton in the final products are shown in the bottom panel. Chemical shifts (ppm) are indicated above the signals together with the measured product ratios (black). The estimated free energy differences between the alternative CH/ π complexes are represented in the upper panel.

in turn can be modulated by attaching electron-withdrawing substituents to the anomeric center. This effect is clearly illustrated by the larger stability displayed by **F** or **G** complexes with respect to those formed by **H** (See for example **F-9** vs **H-9** in Figure 4b).

f) *The stability of the CH/ π bonds established by a simple aromatic ring (for example the naphthyl unit present in **1**) can be enhanced by the incorporation of oxygen substituents (Table S1, Figures 3 and S9). In agreement with this view, aromatic binding strengths follow the order **4**>**3**>**1**, as expected for increasing electron-rich substrates. However, this simple strategy presents limitations. It can be observed that those complexes formed by densely oxygenated aromatic systems as **5-7** display reduced ΔG_{exp} values. Interestingly, quantum mechanical calculations (Figure S9) show that, in contrast to **4**, the OR groups present in **5-7** are not co-planar with the naphthyl unit, being feasible multiple conformations. Although merely speculative, this peculiarity might oppose binding by, imposing a significant conformational entropic penalty on the recognition process (this hypothesis is supported by the theoretical evaluation of binding enthalpies for the different aromatic units. See below).*

g) *The obtained data strongly suggest that electrostatics have a large influence on the aromatic binding ability. To illustrate this point we calculated the electrostatic potential surfaces of different aromatic systems (densely oxygenated and conformationally flexible systems **5-7** were not included in this analysis). Selected surfaces are represented in Figure 5a, together with the electric potential values at 2 Å above the center of the rings (denoted as V_1 and V_2), which is approximately the equilibrium distance at which the CH interacts with the aromatic ring in the complexes (see quantum mechanical geometries below). It can be observed that, for any given disaccharide (as **D** and **I**. See the Figure 5b), ΔG_{exp} values correlate linearly with the sum of the aromatic electric potentials V_1+V_2 . Indeed, according to these data, this simple parameter represents a reliable predictor of the ability of the aromatic unit to participate in CH/ π interactions. Interestingly, the observed linear correlations exhibit distinct slopes for β -type and α -type complexes, implying that electron-rich aromatic aldehydes (as **9** or **4**) exhibit some selectivity for the α face of the pyranose unit, while electron-poor units (as **12** or **13**) are slightly β -selective (Figure 5b). This result was further corroborated by pairwise competition experiments using a selected disaccharide pair (**D** and **I**. See Figure 5c) and both, electron-rich and -poor, aldehydes (**9** and **12**). A simple explanation for this behavior is that, for β -type complexes, electron-poor aromatic rings promote more stabilizing donor-acceptor n/π bonds with the pyranose endocyclic oxygen. Alternatively, for α -complexes, acceptor-donor CH/ π bonds are dominant.*

D.- Dissecting the driving forces for the formation of CH/ π complexes in water: Electrostatic vs dispersion components.-According to current knowledge, CH/ π interactions in the gas phase are dominated by dispersive forces. Intriguingly, we have shown that, in water, the aromatic binding strengths are strongly correlated with the electrostatic potentials (Figure 5a,b). To get insights

into the different contributions that stabilize CH/ π complexes in physiological environments, a theoretical analysis was performed.

Quantum mechanical methods allowed us to assess the magnitude of the CH/ π contacts established by the evaluated aromatic systems. Interaction enthalpies (ΔH_{QM}) were calculated at the M06-2X/TZVP level¹⁴ in water (IEF-PCM method¹⁵) for simplified inter-molecular complexes formed by tetrahydropyran (THP, as a pyranose model) and the aromatic units present in **1-13** (Figure 6a, Table S2, see experimental section for details). For each interacting pair, two orientations of the THP unit were considered (herein referred as **a** and **b**) to simulate the alternative geometries of the CH/ π contacts established by derivatives **C/D** and **A/B/E**, respectively, upon reductive amination with the aldehydes. A representation of the calculated ΔH_{QM} values versus the free energies (ΔG_{exp}) measured for **C** and **D** (geometry **a**. Upper panel) and **A** and **B** (geometry **b**. Lower panel), together with the optimized geometries obtained for some of the complexes is shown in Figure 6a. It can be observed that the most significant deviations between both data sets correspond to the densely oxygenated aromatic systems **5-7**. As previously mentioned, complex formation by these units could display a larger entropic cost, which explains the lack of correspondence between ΔG_{exp} and ΔH_{QM} values. For the rest of the aromatic systems, ΔG_{exp} correlates linearly with ΔH_{QM} with good correlation coefficients (see Figure 6a).

The optimized geometries for the THP/aromatic complexes were employed to dissect the different contributions to the stability (Figure 6b and Table S2). To this aim, single-point interaction energies calculated at the SCS-MP2¹⁶/6-311G(2d,p) level in the gas phase were partitioned into electrostatic, polarization, exchange, repulsion and dispersion contributions, through a Localized Molecular Orbital Energy Decomposition Analysis (LMO-EDA).¹⁷ In addition, the penalties associated to the THP and aromatic desolvation were evaluated at the same theory level (it should be noted that these theoretical values do not account for solvophobic contributions. See the experimental section for details).

These various contributions were represented versus the experimental ΔG_{exp} values measured in solution. The purpose of this comparison was to identify the main components of the interaction energies responsible for the experimentally observed trends. As an example, a representation of the experimental ΔG_{exp} values measured for **C** and **D** versus the interaction energies (both the total values and their contributions) calculated with SCS-MP2/6-311G(2d,p) level are shown in Figure 6b. Linear fits and correlation coefficients are also represented in all cases (see also Figure S10). As observed from these plots, the predicted interaction energies show a good correspondence with the experimental ΔG_{exp} values. Regarding the energy contributions, different trends are apparent:

a) First, a weak and negative correlation is deduced for the energy penalty associated to the desolvation processes that accompany binding. This observation can be rationalized by considering that the stronger complexes usually involve more polar aromatic units, which in turn are more strongly solvated by water.

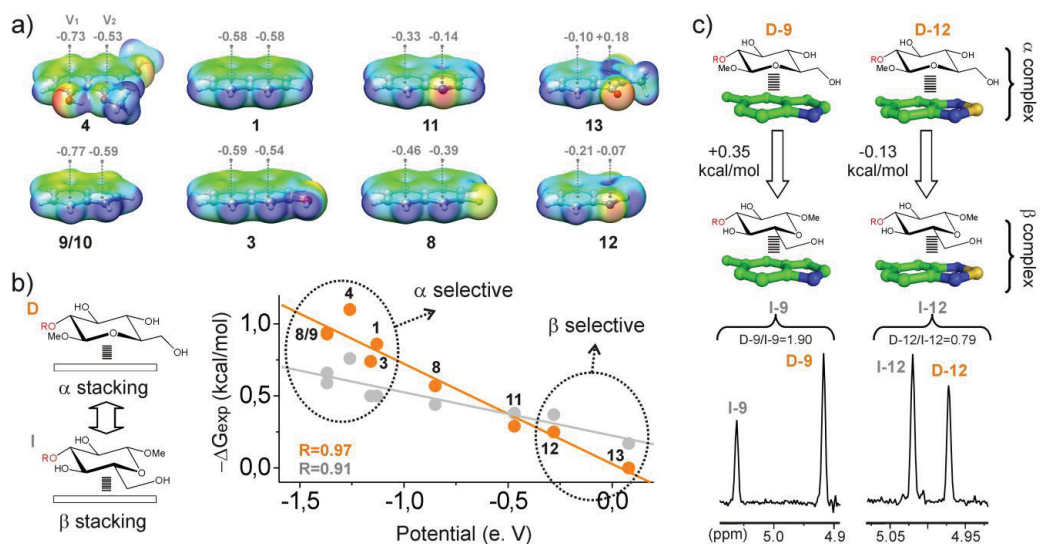


FIGURE 5.- a) Electrostatic potential surfaces calculated with M06-2X/TXVP level for selected aromatic systems, together with the electronic potential values at 2 Å above the centre of the rings (V_1 and V_2). b) Representation of ΔG_{exp} versus the aromatic potentials (V_1+V_2) for alditose derivatives **D** and **I**. Linear fits and correlation coefficients, (R) are shown. c) Pair-wise competition experiments performed with disaccharide pair **D/I** and both, electron rich and poor aldehydes (**9** and **12**). NMR signals for the alditose anomeric proton in the final products are shown in the bottom panel, together with the measured product ratios (black). Free energy differences between the alternative CH/ π complexes are represented in the upper panel.

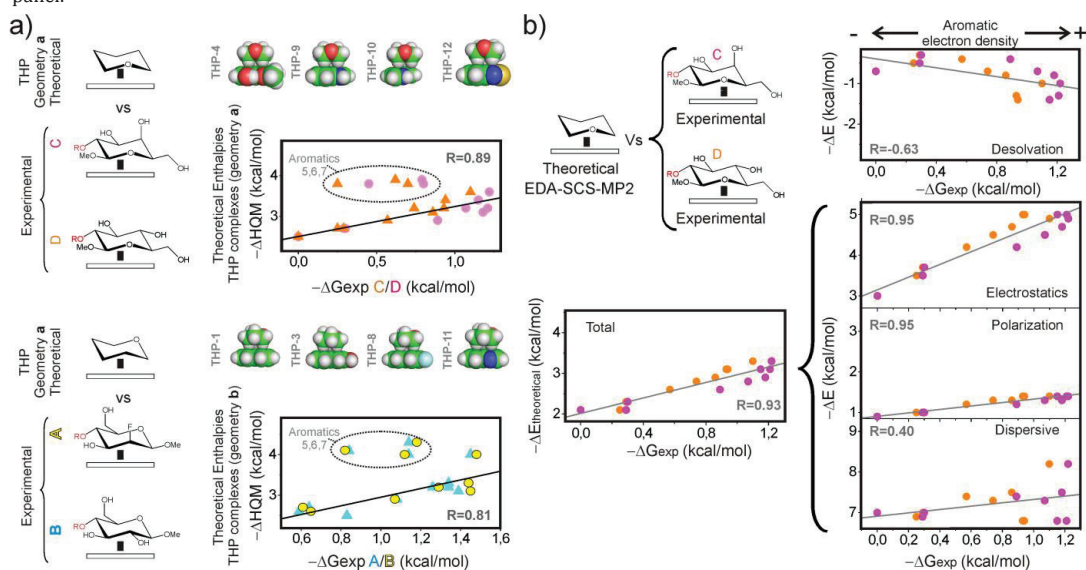


FIGURE 6.- a) Interaction enthalpies in water were calculated by quantum mechanics (M06-2X/TXVP level) for simplified inter-molecular complexes formed by tetrahydropyrane and the aromatic units present in **1-13** assuming two alternative geometries (herein referred as **a** and **b**. See the main text). These data are represented against the experimental free energy values (ΔG_{exp}) measured for derivatives **C** and **D** (geometry **a**. Up) and **A** and **B** (geometry **b**. Down). Linear fits and correlation coefficients (R) are indicated. b) Experimental ΔG_{exp} values measured for derivatives **C** (orange) and **D** (magenta) are represented against the gas phase interaction energies and the different contributions calculated with SCS-MP2/6-311G(2d,p) level for the THP/aromatic complexes (see the main text). Linear fits and correlation coefficients are shown in all cases.

b) Second, dispersion forces prevail among favorable contributions in the gas phase. However, this term shows a poorer correlation with the solution experimental free energies (ΔG_{exp}) than the electrostatic and polarization terms. Of note, some of the most stable complexes (as **9** and **10**, involving an indole unit) display weaker dispersive forces. In addition, this contribution exhibits little variations for most of the complexes.

c) Finally, electrostatic and polarization contributions display a fairly good positive correlation with the experimental stabilities, and show larger variations between strong and weak complexes.

In summary, although dominant in the gas phase, dispersion forces do not account for the observed ΔG_{exp} variations in solution. On the contrary, these can be adequately justified in terms of electrostatic and polar interactions. All these observations strongly suggest that *the experimental trends are dictated by electrostatics. Therefore, this term should be considered as a key determinant for the formation of CH/ π bonds in water.* Moreover, our results indicate that *coulombic forces represent the most decisive modulating influence for these complexes and, consequently, can be employed to accurately predict and fine-tune the relative binding strengths.*

E.- Dissecting the driving forces for the formation of CH/ π complexes in water: Evidences for the relevance of solvophobic contributions.

The role of solvophobic forces on the stabilization of CH/ π bonds in water was also evaluated. To this aim, we measured the effect of adding organic co-solvents on the strength of a selected complex (**C-3**). Figure 7a shows some of the pairwise competition experiments carried out with pair **C/Ref** and aldehyde **3** in the presence of increasing fractions (in the 0-30% range) of various organic co-solvents (indicated in black).

The data show that the addition of organic co-solvents is, in all cases, highly disruptive for the formation of the CH/ π complex, with notable differences in the magnitude of the destabilization. Thus, 30% methanol decreases the free energy of association (ΔG_{exp}) from 1.18 down to 0.75 kcal/mol. In contrast, identical fraction of THF renders the interaction almost undetectable ($\Delta G_{\text{exp}} < 0.1$ kcal/mol). Overall, the disruptive power of the solvents follows the order $\text{MeOH} < \text{EtOH} < \text{DMSO} < \text{acetonitrile} < \text{THF}$.

It should be noted that this experimental trend does not correlate with the dipolar moment ($\mu_{\text{DMSO}}=3.96 > \mu_{\text{acetonitrile}}=3.92 > \mu_{\text{H}_2\text{O}}=1.85 > \mu_{\text{THF}}=1.75 > \mu_{\text{MeOH}}=1.70 > \mu_{\text{EtOH}}=1.69$) or dielectric constant ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}=80.0 > \epsilon_{\text{DMSO}}=46.7 > \epsilon_{\text{acetonitrile}}=37.5 > \epsilon_{\text{MeOH}}=33.0 > \epsilon_{\text{EtOH}}=24.5 > \epsilon_{\text{THF}}=7.5$) of the different solvent molecules. Moreover, it can not be easily rationalized only by invoking competitive solute/solvent interactions (in fact, the relative stabilities of the alternative solvent/naphthalene complexes, estimated through quantum mechanics, does not provide support for this hypothesis. See Figure S11).

In order to demonstrate the relevance of the hydrophobic effect as a driving force for complex formation, the relationship between the carbohydrate/aromatic interaction energies (ΔG_{exp}) and the cohesive energy densities of the solvent media was evaluated (Figure 7).¹³ It can be observed that the stronger interactions correspond to

higher cohesive energy densities, while a decrease in this parameter usually implies a destabilization of the complex. In fact, both ΔG_{exp} values and cohesive energy densities exhibit an excellent linear correlation (correlation coefficient $R=0.93$).

In summary, according to these data, the destabilizing influences of the organic co-solvents cannot be explained just in terms of solute/solvent competitive contacts. On the contrary, it seems to rely on a delicate balance between solute/solvent and solvent/solvent interactions.

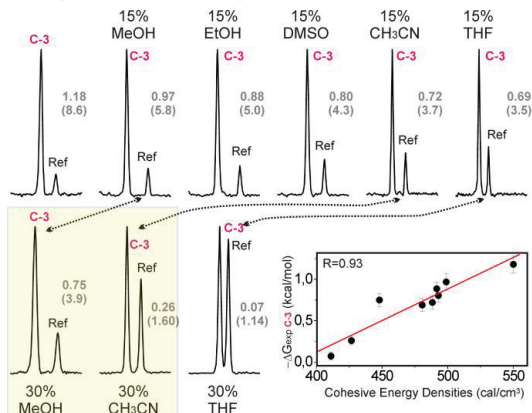


FIGURE 7.- Pairwise competition experiments performed with pair **C/Ref** and aldehyde **3** in the presence of organic co-solvents (indicated in black). NMR signals for the alditose anomeric proton in the final products are shown. Product ratios (in brackets) together with the **C-3** complex stabilities under the different solvent conditions are indicated in grey. Differences in the destabilization induced by methanol and acetonitrile are highlighted with a yellow square. A representation of the measured stabilities versus the cohesive energy densities of the different mixtures is shown in the bottom-right corner. Linear fit and correlation coefficient (R) are shown.

Indeed, the co-solvent ability to reduce the cohesive energy density of the mixture is a key feature to this process. These results demonstrate that solvophobic forces play an important role in the stabilization of CH/ π bonds in water.

CONCLUSIONS

An extensive analysis of CH/ π interactions in water has been performed. The employed dynamic combinatorial methodology has allowed the accurate determination of the binding free energies for 117 isolated carbohydrate/aromatic complexes, presenting a large diversity of chemical features at both the CH/ π donor and acceptor units. These data have revealed the most relevant structure-stability relationships that govern complex formation.

Most importantly, from a more fundamental perspective, our analysis has contributed to clarify the origin of these contacts. In particular, our results highlight the key role of electrostatics on the stabilization of CH/ π complexes under physiological conditions. Indeed, most of the free energy

variations herein described can be rationalized in terms of simple coulombic interactions between the pyranose and the aromatic units. Thus, in most cases, attractive or repulsive polar interactions can be invoked to explain how the stability of the complexes is modulated by the orientation of the pyranose electron-withdrawing substituents. In addition, it also clarifies the observed facial selectivity and how this parameter is affected by the electron-rich or poor character of the aromatic unit. Finally, the relative binding strengths of the different aromatic systems can be anticipated from their electronic properties.

In a previous study, we have demonstrated that the polarization of the interacting CH groups by electron-withdrawing substituents makes a significant contribution to the stability of CH bonds, indicating that even in a high dielectric media, electrostatic interactions are relevant.⁵ Herein, we show that coulombic forces determine the relative stability of these contacts in water. In fact, according to our data *this contribution, alone, constitutes a reliable predictor for the relative binding strength* (in the 0-1.5 kcal/mol range) of a diverse set of complexes.

Regarding dispersion forces, although they have been traditionally considered to be dominant in the gas phase, this consideration might not hold for a physiological environment.¹³ While their relative weight in solution cannot be inferred from this work, our results suggest that *this term exhibits smaller variations for systems of similar sizes and, therefore can not be employed to tune the binding free energies.*

Finally, we have demonstrated that the strength of the CH/ π bonds not depends only on the donor/acceptor contacts. Indeed, solute/solvent and, most importantly, solvent-solvent interactions have to be taken into account. Our results indicate that solvophobic interactions provide a significant contribution to the complex stability.

Our interpretation of these results is that in highly cohesive media, such as water, solvent molecules form a 'cage' in which the polar interactions between the carbohydrate and the aromatic are not disrupted by the dielectric character of the environment. On the other hand, less cohesive media form less structured cages and tend to establish more interactions with the solute molecules, decreasing the complexation energies.

Overall, the data presented herein provide key clues, at the general and specific levels, to understand and modulate biomolecular interaction processes in which aromatics are involved, with particular interest for the molecular recognition of glycans.

EXPERIMENTAL SECTION

Experimental procedures for the synthesis of our libraries are described in the Supplementary Material.

Dynamic combinatorial experiments.- As a first step, reductive imination reactions were performed in NMR tubes with single altrosamine derivatives. Thus, a mixture of the saccharide (~1 mM) and aldehyde (~2 mM) were dissolved in D₂O (10 mM phosphate, pH 6.2) and treated with sodium cyanoborohydride at room temperature. After reaction completion, final products were assigned employing a combination of 2D-COSY, TOCSY and HSQC experi-

ments. From these data, we determined the chemical shift perturbations promoted by the aromatic units on the CH/ π donor pyranoses. The obtained $\Delta\delta$ (ppm) values were taken as an indicative of the geometry of the different stacking complexes (Figures S3 and S5-S7).

Next, equimolecular mixtures of 6-8 altrosamine derivatives (~1 mM each) in D₂O (10 mM phosphate, pH 6.2) were treated with a sub-stoichiometric amount of a given arylacetaldehyde (compounds 1-13 in Figure 1). The aldehyde concentration was carefully adjusted to achieve maximum conversions of the altrosamine derivatives not superior to 40% (usually in the 400-800 μ M range depending on the number of components present in the mixture). Mixtures were left to equilibrate for 2 hours at 277 K, and then we added sodium cyanoborohydride (5 mM). Reactions were kept overnight at 277 K. After reaction completion, we performed a qualitative quantification of the reaction products by focusing our attention on the altrosamine anomeric signals in 2D-HSQC experiments acquired at 318 K.

In order to evaluate more precisely the stability of the different CH/ π complexes considered in our study, we performed pairwise competition experiments following the same protocol. The quantification of the relative populations of the final products was accomplished by integrating key NMR signals in 1D experiments acquired at 318 K with long relaxation delays ($d_1 > 5$). Overlapping signals were deconvoluted before integration employing the line-fitting module implemented in MestreNova software. The obtained values reflect the population of the corresponding imine/enamine intermediates and therefore, were employed to derive the relative stability ($\Delta\Delta G$) of the alternative stacking modes according to $\Delta\Delta G = R \cdot 278 \cdot \ln(P_1/P_2)$ (where P_1/P_2 represents the population ratio and 278 is the reaction and equilibration temperatures in K). This protocol has been recently validated by our group employing structurally related allosamine disaccharides (for which imine/enamine intermediates could be detected and their populations measured).⁵

We performed pairwise competitions with all possible **Ref**/disaccharide pairs so that the net free energy (ΔG) of the stacking complexes could be determined. Selected data points were derived from at least two independent reactions in order to estimate errors. In these cases, product populations were also measured from NMR spectra acquired with distinct relaxation delays. Experimental errors were found to be dependent on the population ratios (P_1/P_2). Errors upper bounds were estimated as $\pm 10\%$ for $1 < P_1/P_2 < 3$, $\pm 15\%$ for $3 < P_1/P_2 < 6$ and $\pm 20\%$ for $6 < P_1/P_2$. At 277 K these values translate into energy ranges of ± 0.05 , ± 0.08 , ± 0.11 kcal/mol, respectively (Table S1).

In addition to the net interaction energies (ΔG), we also determined free energy differences ($\Delta\Delta G$) of all the complexes with respect to those formed by **D**, by performing the corresponding pairwise competitions. Finally, many other crosschecks were carried out with selected aldehydes and disaccharide pairs (Figure S4). The obtained $\Delta\Delta G$ values were found to be fully consistent with the net interaction energies (ΔG) and errors represented in Table S1.

Quantum Mechanical Calculations.- Full geometry optimizations for the different THF/aromatic complexes were carried out with Gaussian 09¹⁸ using the M06-2X functional¹⁴ with an ultrafine integration grid and the triple-zeta TZVP basis set.¹⁹ Two interaction modes, named as **a** and **b**, were assumed in each case to simulate the alternative geometries of complexes formed by derivatives **C/D** and **A/B/E**, respectively, upon the reductive amination reaction. Solvent effects were included in the optimization through the integral equation formalism variant of the polarizable continuum model (IEF-PCM),¹⁵ using UFF radii and parameters for water, as implemented in Gaussian 09. Frequency analyses were carried out at the same level used in the geometry optimizations to evaluate the zero-point vibrational energy and thermal corrections at 298 K necessary to derive enthalpies and free energies. The nature of the stationary points was determined according to the appropriate number of negative eigenvalues of the Hessian matrix.

Houk and Wheeler unambiguously determined the local character of π/π interactions, that is, that the through-space attraction between the polar groups present on the aromatics, and not between the perturbed aromatic electron densities, is the true driving force for such type of complexation.²⁰ This model has been recently supported by Sherrill,²¹ and it has been suggested to operate also in certain CH/*N*-heteroarene complexes.²² However, in our systems, a Houk-Wheeler analysis of the computed interaction energies suppressing the aromatic moieties and considering only their polar groups, showed a different behavior (Figure S12). While the same local effect is surely at the origin of the computed electrostatic properties for the different aromatics, the through-space interaction between the carbohydrate and the aromatic polar groups is much less evident. This is also reflected by the fact that the interaction enthalpies (ΔH_{QM} , see below) calculated for complexes of the same donor/acceptor but in different orientations and thus with different dipole moments (models for **B** and **D**), are essentially the same (see table S2). The reason for this different behavior might be the particular geometry of the CH/ π bond, which is much more localized towards the centroid of the aromatic rings, thus making the changes in the aromatic density more relevant than in the more extended π/π contacts.

Gas-phase single-point energies at the spin-component scaled MP2 (SCS-MP2) level¹⁶ with the triple-zeta 6-311G(2d,p) basis set, and also at the M06-2X/TZVP level (see Figure S10), were calculated on the optimized geometries using Gamess (v.2014).²³ Basis set superposition errors (BSSE) were corrected by the Boys-Bernardi counterpoise method.²⁴ Solvation free energies (ΔG_{solv}) were calculated at the ab initio level using the IEF-PCM method using the parameters for water as implemented in Gamess. Various contributions to the interaction energies (electrostatic, exchange, repulsion, polarization and dispersion) were estimated through the Localized Molecular Orbital Energy Decomposition Analysis (LMO-EDA) method¹⁶ as implemented in Gamess.

It should be borne in mind, though, that such an energy partitioning is always arbitrary and unphysical, and that only the total interaction energy in solution is a physical

observable. Our goal was, thus, not to overestimate the numbers derived from the energy decomposition analysis, but to detect the origin of the measured complexation trends in a more understandable way.

Molecular dynamics calculations.-The conformational and dynamical properties of selected complexes (Figure S8) were estimated through Molecular Dynamics (MD) simulations performed with the AMBER 12 package.²⁵ 100 ns trajectories were collected in the presence of explicit TIP3P water,²⁶ periodic boundary conditions and Ewald sums for the treatment of long-range electrostatic interactions,²⁷ following a protocol identical to that previously described.²⁸ In all cases, RESP atomic charges were derived by applying the RESP module of AMBER to the HF/6-31G(d) ESP charges calculated with Gaussian 09. The ffSB14 force field²⁹ was implemented with GLYCAM06³⁰ and GAFF³¹ parameters to accurately simulate the conformational behavior of these molecules. The timestep was 1 fs in all the simulations.

ASSOCIATED CONTENT

Synthesis of disaccharides and aldehydes, NMR competition experiments and theoretical calculations. Figures S1-S12. Tables S1-S2.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

juanluis.asensio@csic.es

Author Contributions

‡Ester Jiménez-Moreno and Gonzalo Jiménez-Osés are both first authors

Funding Sources

This investigation was supported by research grants of the Spanish "Plan Nacional" (MINECO) CTQ2013-45538-P, CTQ2012-32025, and CTQ2012-32114. BiFi is gratefully acknowledged for supercomputer support (Memento cluster).

REFERENCES

- (1) Meyer, E.A.; Castellano, R.K.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1244–1287.
- (2) (a) Nishio, M. Hirota, M. Umezawa, M. The CH/ π interaction. Evidence, Nature, and Consequences, Wiley-VCH, New York, **1998**. (b) Nishio, M. *Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13873–13900. (c) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Fantini, J.; Weiss, M.S.; Chakrabarti, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 12648–12683.
- (3) (a) Tsuzuki, S.; Fujii, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 2584–2594. (b) Fujii, A.; Shibasaki, K.; Kazam, T.; Itaya, R.; Mikami, N.; Tsuzuki, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 2836–2843.
- (4) (a) Carrillo, R.; López-Rodríguez, M.; Martín, V.S.; Martín, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7803–7808. (b) Aliev, A. E.; Arendorf, J. R. T.; Pavlakos, I.; Moreno, R. B.; Porter, M. J.; Rzepa, H. S.; Motherwell, W. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 551–555. (c) Scarso, A.; Trembleau, L.; Rebeck, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13512–13518. (d) Bhayana, B.; Wilcox, C.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6833–6836. (e) Plevin, M. J.; Bryce, D. L.; Boisbouvier, J. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 466–471. (f) Harigai, M.; Kataoka, M.; Imamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10646–110647.

- (5) Jimenez-Moreno, E.; Gomez, A.M.; Bastida, A.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J.L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4344–4348.
- (6) (a) Klein, E.; Ferrand, Y.; Barwell, N. P.; Davis, A. P. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2008**, *47*, 2693–2696. (b) Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P. *Science*. **2007**, *318*, 619–622. (c) Ke, C.; Destecroix, H.; Crump, M.P.; Davis, A.P. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 718–723. (d) Ferrand, Y.; Klein, E.; Barwell, N. P.; Crump, M. P.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C.; Boons, G.-J.; Ingale, S.; Davis, A. P. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2009**, *48*, 1775–1779. (e) Barwell, N. P.; Davis, A. P. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6548–6557.
- (7) (a) Asensio, J.L.; Ardá, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 946–954 (b) Terraneo, G.; Potenza, D.; Canales, A.; Jiménez-Barbero, J.; Baldrige, K. K.; Bernardi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2890–2900. (c) Fernández-Alonso, M. C.; Cañada, F. J.; Jimenez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7379–7386. (d) Ramírez-Gualito, K.; Alonso-Rios, R.; Quiroz-García, B.; Rojas-Aguilar, A.; Díaz, D.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18129–18138. (e) Chavez, M.; Andreu, C.; Vidal, P.; Aboitiz, N.; Freire, F.; Groves, P.; Asensio, J. L.; Asensio, G.; Muraki, M.; Cañada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *Chem.-Eur. J.* **2005**, *11*, 7060–7074.
- (8) (a) Santana, A.G.; Jiménez-Moreno, E.; Gómez, A.M.; Corzana, F.; González, C.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3347–3350; (b) Vacas, T.; Corzana, F.; Jiménez-Oses, G.; González, C.; Gómez, A.M.; Bastida, A.; Revuelta, J.; Asensio, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12074–12090.
- (9) (a) Screen, J.; Stanca-Kaposta, E. C.; Gamblin, D. P.; Liu, B.; Macleod, N. A.; Snoek, L. C.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2007**, *46*, 3644–3648. (b) Cocinero, E. J.; Carbabal, P.; Vaden, T. D.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4548–4557. (c) Su, Z.; Cocinero, E. J.; Stanca-Kaposta, E. C.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *471*, 17–21.
- (10) Chen, W.; Enck, S.; Price, J.L.; Powers, D. L.; Powers, E. T.; Wong, C. H.; Dyson, H. J.; Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9877–9884.
- (11) (a) Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14625–14633. (b) Kiehna, S. E.; Laughrey, Z. R.; Waters, M. L. *Chem. Commun.* **2007**, *39*, 4026–4028.
- (12) Lucas, R.; Gomez-Pinto, I.; Aviño, A.; Reina, J.J.; Eritja, R.; González, C.; Morales, J.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1909–1916.
- (13) (a) Yang, L.; Adam, C.; Nichol, G. S.; Cockroft, S. L. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 1006–1010. (b) Adam, C.; Yang, L.; Cockroft, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1164–1167.
- (14) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- (15) Scalmani, G.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*.
- (16) Grimme, S. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 9095–9102.
- (17) Su, P.; Li, H. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 1–15.
- (18) Pople, J. A. et al. GAUSSIAN 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- (19) a) Schaefer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571–2577. b) Schaefer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829–5835.
- (20) a) Wheeler, S.E.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10854–10855. b) Wheeler, S.E.; Houk, K. N. *J. Chem. Theory. Comput.* **2009**, *5*, 2301–2312. c) Wheeler, S.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10262–10274. d) Wheeler, S.E. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1029–1038.
- (21) Parrish, R.M.; Sherrill, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17386–17389.
- (22) Li, P.; Parker, T.M.; Hwang, J.; Deng, F.; Smith, M. D.; Pellechia, P.J.; Sherrill, C.D.; Shimizu, K.D. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5064–5067.
- (23) a) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363. b) Gordon, M. S.; Schmidt, M. W. Chapter 41, pp 1167–1189, in *Theory and Applications of Computational Chemistry, the first forty years*. Dykstra, C. E.; Frenking, G.; Kim, K. S.; Scuseria, G. E. editors. Elsevier, Amsterdam, **2005**.
- (24) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553–566.
- (25) D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman (2012), AMBER 12, University of California, San Francisco.
- (26) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- (27) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- (28) Madariaga, D.; Martínez-Sáez, N.; Somovilla, V.J.; García-García, L.; Berbis, M. A.; Valero-González, J.; Martín-Santamaría, S.; Hurtado-Guerrero, R.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12616–12627.
- (29) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2006**, *65*, 712–725.
- (30) Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 622–655.
- (31) Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P.A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–74

Supporting Information

For

The key role of coulombic forces for stabilizing CH/ π complexes in water solution

Ester Jiménez-Moreno, Gonzalo Jiménez-Oses, Ana M. Gómez, Andrés G. Santana,
Francisco Corzana Agatha Bastida, Jesus Jiménez-Barbero, Juan Luis Asensio*.

CONTENTS:

Experimental Section

Tables S1 and S2

Figures S1 to S12

1. General Information

Chemicals were purchased from commercial sources and were used without further purification. All solvents were purified by distillation over drying agents or by elution through a PURE SOLV purification system. Unless stated otherwise, reactions were carried out under a dry argon atmosphere in vacuum-flame dried glassware. Residual water was removed from starting compounds by repeated coevaporation with toluene. Analytical thin layer chromatography was carried out using pre-coated, aluminium backed plates (Merck Kieselgel 60 F254). Detection was by examination under UV light (254 nm) and then by charring with 10% sulfuric acid in ethanol or cerium-ammonium-molybdate. Flash column chromatography was performed using silica gel [Merck, 230–400 mesh (4–63 μm)]. Extracts were concentrated *in vacuo* using both a Buchi rotary evaporator (bath temperatures up to 40 $^{\circ}\text{C}$) at a pressure of 15 mmHg (diaphragm pump) and a high vacuum line at room temperature. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were measured in the solvent stated at 500, 400 or 300 and 126, 101 or 75 MHz, respectively. Chemical shifts are quoted in parts per million from residual solvent peak and coupling constants (J) given in Hertz. Multiplicities are abbreviated as: b (broad), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet) or combinations thereof. An Agilent 6520 accurate-mass quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass analyzer was used for the HR-MS. Glycosyl donor was prepared from allyl 3-azido-3-deoxy-4,6-*O*-benzylidene α -D-altropyranose¹ by acetylation, allyl cleavage at the anomeric position, and trichloroacetimidate formation according to standard procedures. Starting glycosyl acceptors **A1-I1** were prepared following well-established procedures, and cleavage of protecting hydroxyl groups was carried out according standard procedures.²

2. General Procedures

2.1 General experimental procedure for mesylation: A solution of the corresponding alcohol (1 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) cooled to 0 $^{\circ}\text{C}$ and under inert atmosphere was treated with triethylamine (3 mmol) and mesyl chloride (1.2 mmol). The mixture was stirred until TLC showed no starting alcohol was left and was then poured onto a saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The organic phase was separated and the aqueous layer was extracted twice with CH_2Cl_2 . The combined organics layers

¹ R. H. Plet, A. K. Sandhu, M. Sehalia, M. J. Porter *Synlett* **2009**, 3258-3262.

² P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3rd Edn., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

were washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. Crude mesylates were used in the following step without further purification.

2.2 General experimental procedure for displacement with cyanide: A solution of the compound with the appropriate leaving group (1 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) was treated with KCN (4 mmol) under inert atmosphere. The reaction mixture was allowed to react at the corresponding temperature (rt to 90°C) until TLC showed completion of the reaction. The mixture was then poured onto a saturated solution of NH_4Cl and extracted twice with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to afford a residue which was purified by flash chromatography.

2.3 General experimental procedure for nitrile reduction with DIBAL-H: To a solution of the corresponding nitrile (1 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) at -78°C under Ar was added dropwise a solution of DIBAL-H 1M in toluene (2-4 mmol). The reaction was stirred allowing the temperature to raise until -50°C and after 2-3 hours (unless stated otherwise) EtOAc was added to destroy the excess of the reducing reagent. When the reaction has reached room temperature, a 1:1 mixture of acetic acid and water was added and it was stirred for additional 5 minutes. The mixture was then neutralized with a saturated solution of sodium bicarbonate and extracted with CH_2Cl_2 . The organic phase was washed again with a saturated solution of sodium bicarbonate and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. Finally, the residue was purified by flash chromatography

2.4 General experimental procedure for Dess-Martin oxidation. To a solution of the alcohol (1 mmol) in CH_2Cl_2 (6 mL) or $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (1:1, 6 mL) under argon atmosphere, Dess Martin Periodinane (1.1 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. until TLC showed no starting alcohol was left. Then, it was poured onto a saturated solution of sodium bicarbonate and extracted twice with CH_2Cl_2 . The organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography.

2.5 General experimental procedure for the Wittig reaction. To a suspension of (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride (4 mmol) in anhydrous THF (6.6 mL) under argon atmosphere and cooled to 0°C , BuLi (1.6 M in hexane, 3.96 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 30 minutes. A solution of the corresponding aldehyde (1 mmol) in anhydrous

THF (2.2 mL) was then added at 0 °C and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred until no starting aldehyde was left (monitorized by TLC). Acetone was added to quench the excess of reagent and stirred for 5 min. Addition of Et₂O produced a solid precipitate which was filtered off. The filtrate was subsequently washed with a saturated solution of sodium bicarbonate and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography.

2.6 General experimental procedure for the hydrolysis of vinyl ethers. A solution of the corresponding methyl vinyl ether (1 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) containing 10 % TFA was stirred at room temperature until no starting material was left. The solvent was removed at reduced pressure and the residue purified by flash chromatography.

2.7 General experimental procedure for glycosidation: A stirred solution of the glycosyl donor **D** (3.0 mmol) and the appropriate glycosyl acceptor **A** (1.0 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (50 mL) under argon at -65°C (unless otherwise noted), was treated with TMSOTf (0.2 mmol) and allowed to stir at this temperature until no glycosyl acceptor was left (monitored by TLC). Et₃N was then added and the resulting mixture was vigorously stirred for 10 min. The reaction mixture was then concentrated, without heating, and the crude product was purified by flash chromatography.

2.8 General experimental procedure for oxidative cleavage of the *p*-methoxybenzyl groups: 1. *Method A.* To a solution of the *p*-methoxybenzyl ether (1.0 mmol) in a 8:1:1 CH₂Cl₂/MeOH/H₂O mixture (50 mL) was added DDQ (2.0 mmol/*p*-methoxybenzyl group) and then stirred at rt. for 3-6 h. The crude was chromatographed using CH₂Cl₂/MeOH 0→10%. 2. *Method B*³. To a solution of the corresponding *p*-methoxybenzyl ether (1.0 mmol) and di-*tert*-butyl pyridine (3.0 mmol/*p*-methoxybenzyl group) in CH₂Cl₂/H₂O (18:1, 55 mL) was added DDQ (1.5 mmol/*p*-methoxybenzyl group). The reaction mixture was vigorously stirred overnight and concentrated *in vacuo*. The residue was then purified by column chromatography.

³ H. M. Kim, I J. Kim, S. J. Danishefsky *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 35-48.

2.9 General experimental procedure for cleavage of the *p*-methoxybenzylidene group⁴: To a solution of the corresponding *p*-methoxybenzylidene containing compound (1 mmol) in CH₃CN containing 10% water (30 mL) was added Selectfluor (2.4 mmol) at rt. The reaction mixture was allowed to react at appropriate temperature. Finally, the solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography.

2.10 General experimental procedure for selective opening of the *p*-methoxybenzylidene group⁵: A solution of trifluoroacetic acid (15 mmol) in DMF (4 mL) cooled to 0°C was added dropwise to a stirred mixture of the corresponding *p*-methoxybenzylidene containing compound (1 mmol), sodium cyanoborohydride (10 mmol) and 3Å molecular sieves (2 g) in DMF (10 mL). The reaction was stirred overnight at rt. and then filtered through Celite. The filtrate was poured into ice-cold saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution. The aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography.

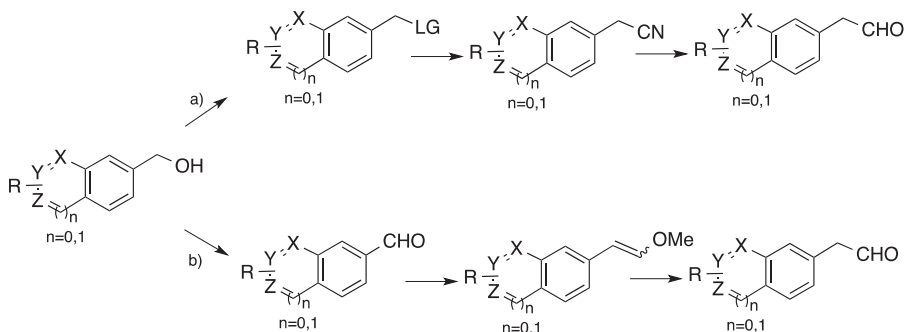
2.11 General experimental procedure for reduction of azide group through a Staudinger reaction with concomitant acetate hydrolysis: A solution of the corresponding azide (1 mmol) in THF (32 mL) was treated with aqueous 0.1 M NaOH (2 mL) and PMe₃ (1.5 mmol, 1 M solution in THF). The mixture was then stirred at rt. until TLC showed no starting azide was left. The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography.

3. Synthetic approach to the 2-aryl-/hetaryl-acetaldehyde library (3-12)

The required 2-aryl/hetarylacetaldehydes were prepared using the appropriate benzyl-type alcohols as starting materials and following either of the routes shown in the scheme below (Scheme 1). In route *a*, elongation was carried out by displacement at the benzylic position of an appropriate leaving group (mesylate, bromide or benzoate) with cyanide anion and subsequent DIBAL-H reduction. Alternatively, in route *b*, elongation was achieved using a sequence of reactions including successive Dess-Martin oxidation, a Wittig-type homologation and vinyl ether hydrolysis.

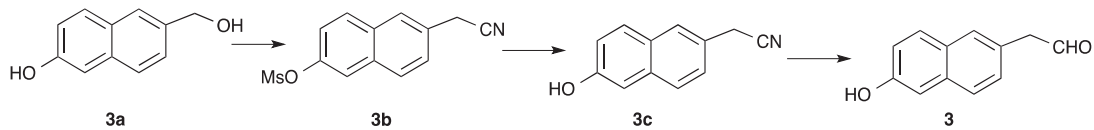
⁴ J. Liu and C.-H. Wong *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4037–4039.

⁵ C. Grandjean, G. Lukacs *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 831-855.



Scheme 1. Alternative routes for the preparation of the 2- aryl-acetaldehydes library

4. Preparation and Characterization of 2- aryl-acetaldehydes



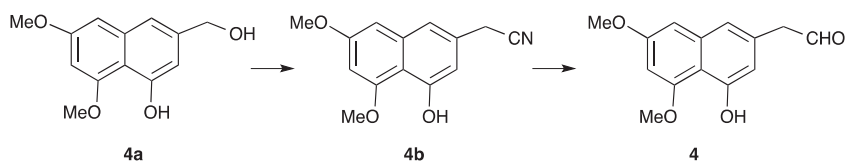
Scheme 2. Synthetic route for the preparation of 2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde **3**.

6-(cyanomethyl)naphthalen-2-yl methanesulfonate 3b. This compound was prepared following the general procedure for mesylation from 6-hydroxymethyl-2-naphthol **3a**⁶ (530 mg, 3.05 mmol) by treatment with mesyl chloride (0.56 mL, 7.31 mmol) and triethylamine (2.53 mL, 18.28 mmol). The resulting material was subjected to the general procedure for the formation of nitriles. The reaction was stirred for 5 hours at 60 °C and after the aqueous work up, the residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 6:4) to afford compound **3b** (430 mg, 1.65mmol, 54% two steps). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.91 – 7.84 (m, 3H), 7.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.44 (dt, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.21 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 147.5, 133.2, 132.2, 130.4, 129.3, 128.5, 127.1, 127.1, 122.1, 119.7, 117.9, 37.9, 24.1. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₃H₁₁NO₃S+H⁺]: [M+H⁺] 262.0532, found: 262.0521.

⁶ A. Samat, V. Lokshin, K. Chamontin, D. Levi, G. Pepe, R. Guglielmetti *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7349-7359

2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetonitrile 3c. To a solution of compound **3b** (410 mg, 1.57 mmol) in THF/MeOH/H₂O 1:1:1 (7.8 mL) a 4 M NaOH solution (3.9 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature for 20 h. HCl was then added (2% aq, 30 mL) and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). The combined organic layer were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to afford compound **3c** (122 mg, 0.67 mmol, 43%). ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.69 (ddd, *J* = 6.1, 3.0, 1.1 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 156.9, 135.7, 130.3, 129.7, 128.2, 127.7, 127.0, 126.4, 120.0, 119.8, 109.8, 23.5. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₂H₉NO+H⁺]: [M+H⁺] 184.0757, found: 184.0748.

2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde 3. This compound was prepared from compound **3c** (50 mg, 0.27 mmol) in CH₂Cl₂ (2.73 mL) and DIBAL-H (1.08 mL, 1M in toluene) according to the general procedure for reduction of nitriles. Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) afforded **3** (16 mg, 0.09 mmol, 33%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.81 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 – 7.60 (m, 1H), 7.31 – 7.23 (m, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 200.0., 154.0, 134.1, 129.8, 129.4, 128.8, 128.4, 127.5, 127.1, 118.7, 109.7, 50.9. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₂H₁₀O₂+H⁺]: [M+H⁺] 187.0754, found: 187.0752.



Scheme 3. Synthetic route for the preparation of 2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde **4**.

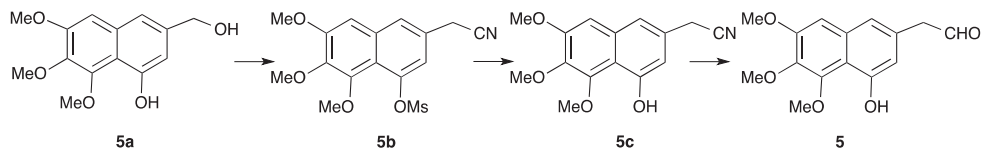
2-(4-hydroxy-5,7-dimethoxynaphthalen-2-yl)acetonitrile 4b.

A solution of the readily available naphthoate **4a**⁷ (400 mg, 1.71 mmol) in anhydrous THF (17 mL), cooled to 0 °C and under inert atmosphere was treated with triethylamine (0.35 mL, 2.56 mmol) and triisopropylbenzenesulfonyl chloride (621 mg, 2.05 mmol). The mixture was stirred for 16 hours at

⁷ a) Hauser, F. M., Sengupta, and S. A. Corlett *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1967; b) Cameron, D. W.; Feutrill, G. I.; Pannan, L. *J. H. Aut. J. Chem.* **1980**, 33, 2531

room temperature and then 24 hours at 50 °C. Next, it was poured onto water and extracted twice with EtOAc (2 x 30 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) to afford a material containing an inseparable mixture of the expected triisopropylbenzenesulfonate derivative along with the corresponding chloride substitution product. The mixture was subjected to the general procedure for the formation of nitriles. The reaction was stirred for 24 hours at 50 °C and after the aqueous work up, the residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to afford compound **4b** (36 mg, 0.15 mmol, 9% two steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.78 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 158.6, 157.3, 155.5, 137.7, 130.1, 117.9, 116.9, 110.3, 108.2, 99.5, 98.3, 56.4, 55.6, 23.8. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₄H₁₄NO₃+H⁺]: [M+H⁺] 244.09682, found: 244.09717.

2-(4-hydroxy-5,7-dimethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde 4. Compound **4b** (30 mg, 0.12 mmol) was treated with DIBAL-H (0.62 mL, 1M in toluene) in CH₂Cl₂ (1.23 mL) according to the general procedure for reduction of nitriles. Compound **4** (11 mg, 0.04 mmol, 37%) was obtained after purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.05 (s, 1H), 6.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.91 (dd, *J* = 13.7, 5.4 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J* = 13.7, 5.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 159.4, 158.6, 155.4, 139.0, 138.8, 119.6, 111.1, 110.6, 100.3, 100.2, 98.1, 56.7, 55.7, 44.6. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₄H₁₅O₄+H⁺]: [M+H⁺] 247.09649, found 247.09655



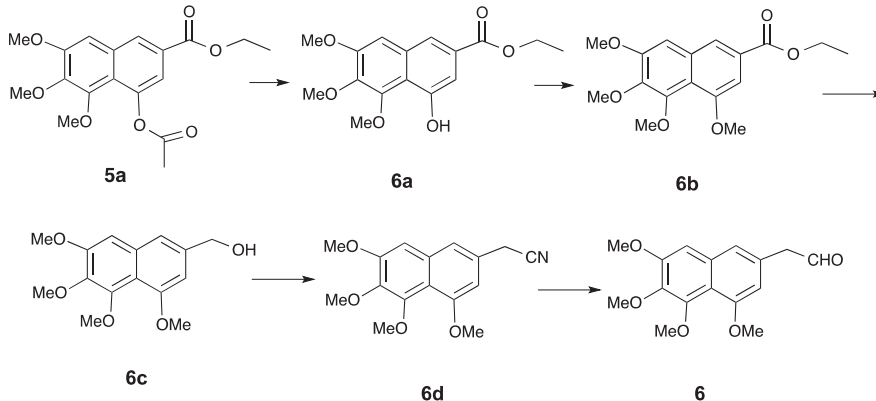
Scheme 4. Synthetic route for the preparation of 2-(4-hydroxy-5,6,7-trimethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde **5**.

2-(4-methanosulphonyloxy-5,6,7-trimethoxynaphthalen-2-yl)acetonitrile 5b. 3-(Hydroxymethyl)-6,7,8-trimethoxynaphthalen-1-ol **5a**⁸ (237 mg, 0.84 mmol) was treated with mesyl chloride (143 μ L, 1.84 mmol) and triethylamine (412 μ L, 2.94 mmol) according to the general procedure of mesylation. After usual work-up, the residue containing unpurified dimesylate was dissolved in dry DMF (5 mL) and subjected to the general procedure for the formation of nitriles by treatment with KCN (330 mg, 5.04 mmol). The reaction was stirred overnight at room temperature and after aqueous work up, and purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) afforded compound **5b** (180 mg, 61% two steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.72 – 7.69 (m, 1H), 7.24 (d, J = 1.7, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.89 (s, 2H), 3.17 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 154.3, 147.5, 144.4, 144.2, 133.3, 127.0, 125.3, 118.7, 117.3, 117.0, 103.6, 62.3, 61.6, 56.1, 37.4, 23.5. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₆H₁₈NO₆S+H⁺]: [M+H⁺] 352.08493, found: 352.08381.

2-(4-hydroxy-5,6,7-trimethoxynaphthalen-2-yl)acetonitrile 5c. A solution of the mesylate **5b** (120 mg, 0.34 mmol) in THF/MeOH/H₂O (1:1:1) (5 mL) was treated with aqueous NaOH (0.85 mL, 4M). The reaction was stirred at r.t. overnight. Then, it was neutralized with HCl (1M) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to afford nitrile **5c** (37 mg, 40%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.53 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.62 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 4.14 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.78 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.6, 153.5, 148.3, 140.0, 132.6, 128.7, 117.9, 116.6, 112.2, 108.2, 103.4, 62.5, 61.3, 56.0, 23.8. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₅H₁₆NO₄+H⁺]: [M+H⁺] 274.10738, found: 274.10774.

2-(4-hydroxy-5,6,7-trimethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde 5. This compound was prepared from nitrile **5c** (23 mg, 0.08 mmol) following the general procedure for nitrile reduction with DIBAL-H (0.4 mL, 1M in toluene). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) afforded **5** (9 mg, 45%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.80 – 9.74 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 9.49 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.15 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.70 (d, J = 2.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 199.7, 154.7, 153.6, 148.6, 140.1, 133.1, 131.1, 118.7, 112.3, 110.3, 103.5, 62.7, 61.6, 56.2, 50.9. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₅H₁₇O₅+H⁺]: [M+H⁺] 277.10705, found: 277.10720.

⁸ A. Samat, V. Lokshin, K. Chamontin, D. Levi, G. Pepe, R. Guglielmetti *Tetrahedron* 2001, 57, 7349-7359



Scheme 5. Synthetic route for the preparation of 2-(4,5,6,7-tetramethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde **6**.

Ethyl 4-hydroxy-5,6,7-trimethoxy-2-naphthoate 6a. Ethyl 4-acetoxy-5,6,7-trimethoxy-2-naphthoate⁹ **5a** (1.5 g, 4.3 mmol) was dissolved in a mixture of EtOH/Et₃N (4:1, 10 mL) and heated at 80°C for 10 h. After concentration, the residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) to yield compound **6a** (1.06 gr, 80%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.47 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 4.40 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.15 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 166.6, 153.8, 153.2, 148.0, 141.4, 131.6, 128.8, 120.5, 115.1, 107.9, 104.7, 62.4, 61.2, 61.0, 55.9, 14.3. HRMS (ESI+): calculated for [C₁₆H₁₉O₆+H]⁺: [M+H⁺] 307.11761; found: 307.11609.

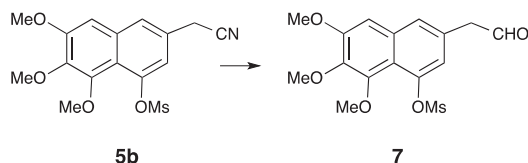
Ethyl 4,5,6,7-tetramethoxy-2-naphthoate 6b. A solution of **6a** (977 mg, 3.5 mmol) in dry DMF (10 mL) was cooled to 0 °C and treated under argon atmosphere with NaH (60% dispersion in mineral oil, 431 mg, 10.5 mmol). After stirring at 0 °C for 30 min, methyl iodide (2.2 mL, 35 mmol) was added. The reaction mixture was then allowed to reach room temperature and stirred overnight. The reaction was diluted with water (10 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 25 mL). The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated *in vacuo*, and then purified by flash column chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) to yield compound **6b** (870 mg, 78%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (dd, *J* = 1.5, 0.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H),

⁹ H. Pati, R. LeBlanc, M. Lee, *Heterocyclic Communications*. **2003**, *9*, 587–592.

3.99 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 1.44 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 166.9, 156.2, 153.4, 149.6, 144.5, 132.3, 127.6, 122.83, 118.6, 104.8, 103.1, 77.4, 62.3, 61.5, 61.2, 56.3, 56.0, 14.6. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_6+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 321.13326; found: 321.13335.

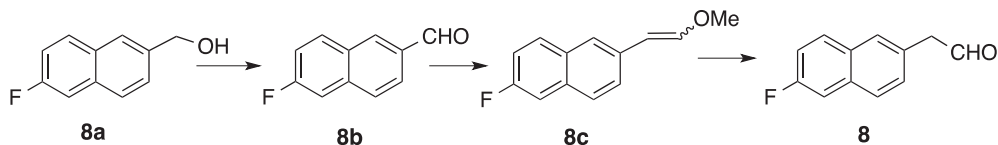
(4,5,6,7-tetramethoxynaphthalen-2-yl)metanol 6c. Lithium aluminium hydride (106 mg, 2.8 mmol) was added in one portion to a stirred solution of naphthoate **6b** (260 mg, 0.93 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C under argon. The resulting suspension was stirred for 1 h. After cooling to 0 °C, Et_2O was added followed by the carefully portionwise addition of solid hydrated sodium sulfate until effervescence ceased. The solids were removed by filtration through Celite and the filter cake was washed with 9:1 CH_2Cl_2 -MeOH (150 mL). The filtrate was dried (Na_2SO_4) and then purified by flash column chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to yield derivative **6c** (212 mg, 82%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.22 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.91 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.6, 153.3, 149.7, 142.6, 138.6, 133.3, 117.5, 115.7, 103.5, 103.1, 65.8, 62.3, 61.6, 56.2, 56.0. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_5+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 279.1227; found: 279.1223.

2-(4,5,6,7-tetramethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde 6. This compound was prepared following the general procedure for mesylation from compound **6c** (170 mg, 0.60 mmol) by treatment with mesyl chloride (70 μL , 0.9 mmol) and triethylamine (252 μL , 1.8 mmol). After usual work-up, the crude residue was dissolved in dry DMF (5 mL) and subjected to the general procedure for the formation of nitriles by treatment with KCN (117 mg, 1.8 mmol). The reaction was stirred overnight at room temperature and after aqueous work up, and purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) afforded compound **6d** which was treated with DIBAL-H (0.12 mL, 1M in toluene) according to the general procedure for reduction of nitriles. Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) afforded **6** (35 mg, 20%). ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.18 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.76 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.97 (dd, $J = 13.8, 5.3$ Hz, 1H), 2.89 (dd, $J = 13.8, 5.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 156.9, 154.1, 150.2, 143.0, 136.4, 134.8, 121.3, 115.7, 107.7, 104.6, 100.4, 62.6, 61.7, 56.4, 56.2, 44.7. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_5+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 291.1227; found: 291.12304.



Scheme 6. Synthetic route for the preparation of 2-(4,5,6,7-tetramethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde **7**.

2-(4,5,6,7-tetramethoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde 7. This compound was prepared from compound **5b** (22 mg, 0.06 mmol) in CH_2Cl_2 (1.2 mL) and DIBAL-H (0.12 mL, 1M in toluene) according to the general procedure for reduction of nitriles. Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 6:4) afforded **7** (4 mg, 15%). ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.61 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 4.75 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.01 (dd, $J = 13.9, 5.4$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 13.9, 5.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 154.9, 148.5, 144.9, 144.4, 136.1, 134.7, 128.1, 121.8, 117.4, 104.6, 99.9, 62.5, 61.7, 56.4, 44.0, 37.4. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{S}+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 355.0846, found: 355.08465.



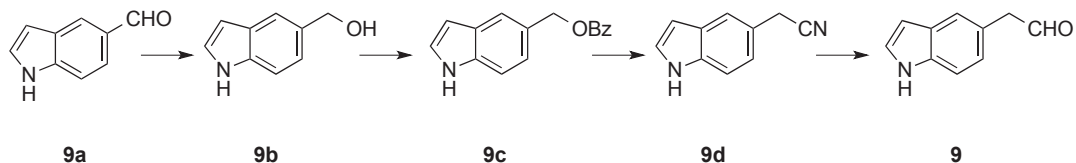
Scheme 7. Synthetic route for the preparation of 2-(6-fluoronaphthalen-2-yl)acetaldehyde **8**.

6-fluoro-2-naphthaldehyde 8b. This compound was prepared following the general experimental procedure for Dess-Martin oxidation from (6-fluoronaphthalen-2-yl)methanol¹⁰ (400 mg, 2.27 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ 1:1 (13.6 mL). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) afforded compound **8b** (360 mg, 76%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.14 (s, 1H), 8.33 (dd, $J = 1.5, 0.8$ Hz, 1H, H1), 8.04 – 7.95 (m, 2H, H3, H8), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H4), 7.52 (dd, $J = 9.4, 2.7$ Hz, 1H, H5), 7.37 (ddd, $J = 9.0, 8.3, 2.6$ Hz, 1H, H7). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 192.2, 162.8 (d, $J = 251.4$ Hz), 137.9 (d, $J = 9.8$ Hz), 134.6, 133.9 (d, $J = 2.6$ Hz), 132.5 (d, $J = 9.5$ Hz), 129.9, 128.8 (d, $J = 5.4$ Hz), 124.3, 117.9 (d, $J = 25.4$ Hz), 111.9 (d, $J = 20.8$ Hz). HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{11}\text{H}_7\text{FO}+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 175.0554, found: 175.0559

¹⁰ J.-H. Chun, V. W. Pikea *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6300-6306.

2-fluoro-6-(2-methoxyvinyl)naphthalene 8c. Compound **8b** (360 mg, 2.07 mmol), was treated with (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride (2837 mg, 8.28 mmol) and BuLi (1.6 M in hexane, 5.1 mL, 8.19 mmol) according to the general procedure. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 9:1) to afford compound **8c** (372 mg, 1.84 mmol, 89%) as a 1:1 mixture of Z/E isomers ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (s, 1H), 7.73 – 7.55 (m, 5H), 7.49 (s, 1H), 7.39 – 7.35 (m, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 2H, H5 de Z y E), 7.18 – 7.07 (m, 2H, H7 both isomers), 7.09 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, E), 6.14 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, Z), 5.88 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, E), 5.28 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, Z), 3.75 (s, 3H), 3.65 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, selected peaks) δ 160.4 (d, *J* = 244.9 Hz), 160.2 (d, *J* = 244.6 Hz), 149.4, 148.5, 116.5 (d, *J* = 25.2 Hz), 116.2 (d, *J* = 25.4 Hz), 110.9 (d, *J* = 18.7 Hz), 110.7 (d, *J* = 18.8 Hz), 105.5, 105.1, 60.9, 56.7. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₃H₁₁FO+H⁺]: [M+H⁺] 203.0867, found: 203.0868.

2-(6-fluoronaphthalen-2-yl)acetaldehyde 8. Compound **8c** (100 mg, 0.50 mmol) was subjected to the general procedure for the hydrolysis of the vinyl ethers by treatment with TFA (0.2 mL) in CH₂Cl₂ (5 mL) at rt for 20 minutes. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5) to give compound **3** (30 mg, 0.16 mmol, 32%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.83 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.80 (m, 2H, H4 y H8), 7.71 – 7.66 (m, 1H, H1), 7.45 (dd, *J* = 9.7, 2.3 Hz, 1H, H5), 7.35 (dd, *J* = 8.9, 1.5 Hz, 1H, H4), 7.31 – 7.25 (m, 1H, H7), 3.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 199.3 (CHO), 160.8 (d, *J* = 246.2 Hz, C6), 133.4 (d, *J* = 9.3 Hz), 130.7, 130.1 (d, *J* = 9.2 Hz), 128.7 (d, *J* = 2.8 Hz), 128.6, 128.2 (d, *J* = 5.7 Hz), 117.0 (d, *J* = 25.2 Hz), 111.0 (d, *J* = 20.5 Hz), 50.7.



Scheme 8. Synthetic route for the preparation of 2-(1*H*-indol-5-yl)acetaldehyde **9**.

(1*H*-indol-5-yl)methanol 9b. Lithium aluminium hydride (1.04 g, 27.6 mmol) was added in one portion to a stirred solution of indole-5-carboxaldehyde **9a** (1.0 g, 6.90 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C under argon. The resulting suspension was stirred for 1 h. After cooling to 0 °C, Et₂O was added followed by the carefully portionwise addition of solid hydrated sodium sulfate until effervescence ceased. The solids were removed by filtration through Celite and the filter cake was washed with 9:1 CH₂Cl₂-MeOH

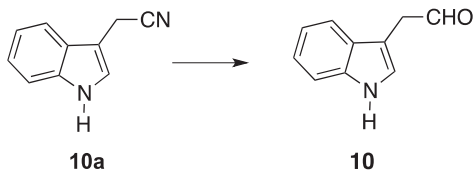
(150 mL). The filtrate was dried (Na_2SO_4) and then purified by flash column chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to yield derivative **9b** (1.0 g, 6.90 mmol, quantitative). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (s, 1H, NH), 7.63 (dt, $J = 1.6, 0.8$ Hz, 1H), 7.36 (dt, $J = 8.3, 0.8$ Hz, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 2H), 6.55 (ddd, $J = 3.1, 2.0, 0.9$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 135.7, 132.6, 128.1, 125.1, 122.2, 119.9, 111.5, 102.8, 66.5. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 148.0757, found: 148.0755.

(1H-indol-5-yl)methyl benzoate 9c. Benzoyl chloride (0.48mL, 4.14mmol) was added under inert atmosphere and at 0 °C to a solution of **9b** (500 mg, 3.45 mmol) in anhydrous THF (34 mL) containing triethylamine (1.43 mL, 10.34 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight and then it was poured onto a saturated NaHCO_3 solution. The product was extracted twice with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated to yield compound **9c** (845 mg, quantitative). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (s, 1H), 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.76 (dt, $J = 1.5, 0.8$ Hz, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 3H), 7.31 (dd, $J = 8.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 3.2, 2.4$ Hz, 1H), 6.58 (ddd, $J = 3.1, 2.0, 0.9$ Hz, 1H), 5.48 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.9, 135.9, 133.1, 130.7, 129.9, 128.9, 128.5, 127.6, 125.1, 123.2, 121.6, 111.4, 103.0, 68.1. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_2+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 252.1019, found: 252.1009.

2-(1H-indol-5-yl)acetonitrile 9d. Compound **9c** (845mg, 3.45 mmol) was dissolved in dry DMF (5 mL) and subjected to the general procedure for the formation of nitriles by treatment with KCN (1.19 g mg, 17.2 mmol). The reaction was heated at 105 °C for 5 h. Aqueous work up and purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) afforded compound **9d** (430 mg, 80%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (s, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.38 (dt, $J = 8.4, 0.9$ Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 3.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 8.4, 1.9$, 1H), 6.53 (ddd, $J = 3.1, 2.0, 0.9$ Hz, 1H), 3.83 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 135.4, 128.4, 125.5, 121.8, 121.1, 120.2, 119.0, 111.8, 102.5, 23.8. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_2+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 157.0687, found: 157.0754.

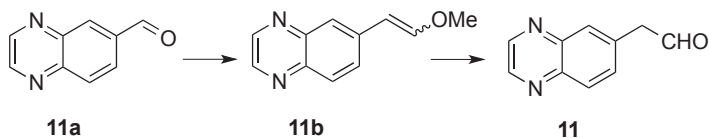
2-(1H-indol-5-yl)acetaldehyde 9. Compound **9d** (150 mg, 0.96 mmol) was treated with DIBAL-H (1.92 mL, 1M in toluene) according to the general procedure for reduction of nitriles. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) to give compound **9** (77 mg, 50%) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.78 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.50 (dt, $J = 1.7, 0.8$ Hz, 1H), 7.39 (dt, $J = 8.3, 0.8$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 3.3, 2.3$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H), 6.54 (ddd, J

= 3.1, 2.0, 0.9 Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 200.6, 135.2, 128.6, 125.1, 123.7, 123.0, 121.8, 111.7, 102.6, 50.9. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 160.0757, found: 160.0759.



Scheme 9. Synthetic route for the preparation of 2-(1H-indol-3-yl)acetaldehyde **10**.

2-(1H-indol-3-yl)acetaldehyde 10. This compound was prepared according to the general procedure for reduction of nitriles from 3-indoleacetonitrile **10a** (150 mg, 0.96 mmol) in CH_2Cl_2 (9.6 mL) using DIBAL-H (2.4 mL, 1M in toluene). Purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) afforded **10** (50 mg, 0.31 mmol, 33% yield). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.77 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.20 (s, 1H) 7.56 (dt, $J = 7.9, 1.0$ Hz, 1H), 7.40 (dt, $J = 8.2, 0.9$ Hz, 1H), 7.24 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.19 – 7.14 (m, 2H), 3.82 (dd, $J = 2.5, 0.9$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 199.8, 123.5, 123.4, 122.7, 120.1, 120.1, 118.6, 111.5, 111.4, 40.5. HRMS (ESI+): calculated for $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}+\text{H}^+]$: $[\text{M}+\text{H}^+]$ 160.0757, found: 160.0760.

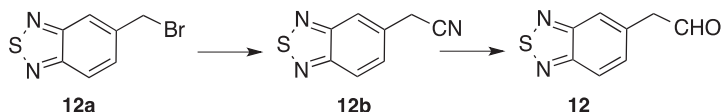


Scheme 10. Synthetic route for the preparation of 2-(Quinoxalin-6-yl)acetaldehyde **11**.

6-(2-Methoxyvinyl)quinoxaline 11b. This compound was prepared following the general procedure for the Wittig reaction from compound **11a** (50 mg, 0.32 mmol), (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride (434 mg, 1.26 mmol) and BuLi (1.6 M in hexane, 2.1 mL, 1.25 mmol). The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to afford compound **11b** (35 mg, 59%) as a 1:1 mixture of *Z/E* isomers ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.76 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.73 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 3H), 7.82 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, E), 6.35 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, Z), 6.00 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, E), 5.43 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, Z), 3.88 (s, 3H), 3.77 (s, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz,

CDCl₃) δ 151.6 (E), 150.9 (Z), 145.5, 145.3, 144.2, 144.0, 143.9, 143.7, 142.2, 141.9, 139.1, 138.4, 131.8, 129.8, 129.1, 128.0, 127.5, 124.3, 104.9 (Z), 104.6 (E), 61.5, 57.2. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₁H₁₁N₂O+H⁺]: [M+H⁺] 187.0866, found: 187.0872.

2-(Quinoxalin-6-yl)acetaldehyde 11. Compound **11b** (26 mg, 0.14 mmol) was subjected to the general procedure for the hydrolysis of the vinyl ethers by treatment with TFA (0.2 mL) in CH₂Cl₂ (2 mL) at rt for 4 h. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) to give compound **11** (15 mg, 64%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.88 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.87 – 8.82 (m, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 3.98 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 198.4, 145.6, 145.3, 143.2, 142.4, 134.6, 132.0, 130.3, 130.2, 50.6. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₁₀H₉N₂O+H⁺]: [M+H⁺] 173.0709, found: 173.0712.



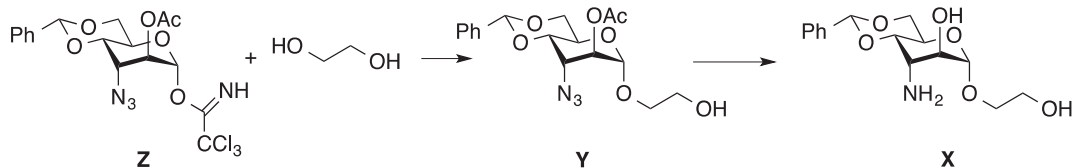
Scheme 11. Synthetic route for the preparation of 2-(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)acetaldehyde **12**.

2-(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)acetonitrile 12b. To a solution of 5-bromomethylbenzo[1,2,5]thiadiazole **12a** (250 mg, 1.09 mmol) in EtOH/H₂O 2:1 (3 mL) was added KCN (85 mg, 1.35 mmol). The reaction was stirred at 50 °C for 3 hours and then cooled to room temperature. The mixture was extracted twice with EtOAc and the organic phases were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 85:15) to afford **12b**¹¹ (110 mg, 58%).

2-(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)acetaldehyde 12. Compound **12b** (50 mg, 0.29 mmol) was subjected to the general procedure for the reduction of nitriles. Purification of the residue by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 8:2) afforded pure compound **12** (14 mg, 26%). ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.88 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 9.0, 0.8 Hz, 1H), 7.88 (dq, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 9.0, 1.7 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 198.1, 155.1, 154.2, 134.0, 131.6, 122.0, 122.0, 50.6. HRMS (ESI⁺): calculated for [C₈H₆N₂OS+H⁺]: [M+H⁺] 179.0274, found: 179.0266.

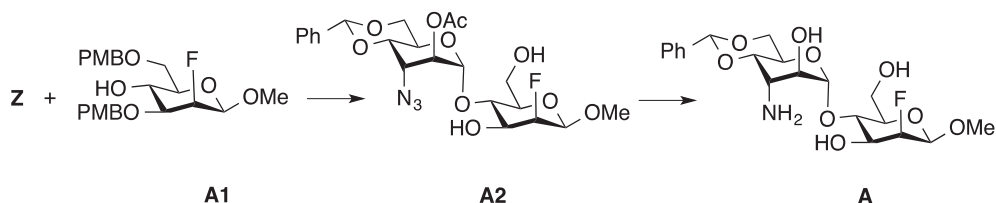
¹¹ V. G. Pesin et al., *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)*, **1964**, 34, 1272 – 1276.

6. Preparation and Characterization of disaccharides



(2-Hydroxyethyl) 3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy α -D-altropyranoside (X, Ref): The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **Z** (0.266 mmol, 127 mg) and ethylene glycol (0.30 mL, 5.3 mmol) but at -20°C for 1.5 h. The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4) to give glycosylated compound **Y** (13 mg, 13%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.52 – 7.46 (m, 2H, Ph), 7.41 – 7.34 (m, 3H, Ph), 5.62 (s, 1H, H7), 5.02 (dd, $J = 2.5, 1.0$ Hz, 1H, H2), 4.75 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H1), 4.37 – 4.29 (m, 2H), 4.11 – 4.04 (m, 2H), 3.86 – 3.74 (m, 4H), 3.61 (m, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 169.6 (CO), 137.2, 129.6, 128.7, 126.5, 102.7 (C7), 98.0 (C1), 76.2, 70.6 (C2), 70.0 (CH_2), 69.3 (C6), 62.0 (CH_2), 59.3, 58.0, 21.3 (CH_3); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_7$ [$\text{M}+\text{NH}_4^+$]: 397.1718, found: 397.1722.

Compound **Y** (13 mg, 0.035 mmol) was subjected to the general procedure for reduction of the azide moiety by treatment with PMe_3 (53 μL , 0.053 mmol) and 0.1 M NaOH (71 μL) at rt for 6h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) to give the desired product **X** (9 mg, 90%): ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.57 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.50 – 7.43 (m, 3H, Ph), 5.84 (s, 1H, H7'), 4.87 (s, 1H, H1), 4.33 (dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz, 1H, H6a), 4.22 (dd, $J = 9.9, 4.9$ Hz, 1H, H5), 4.18 (dd, $J = 10.1, 4.0$ Hz, 1H, H4), 4.04 (dd, $J = 2.8, 1.2$ Hz, 1H, H2), 3.93 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H6b), 3.88 (ddd, $J = 11.0, 4.9, 4.0$ Hz, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.81–3.76 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.63–3.57 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.43 – 3.39 (m, 1H, H3); ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 137.5, 131.2, 130.0, 127.6, 103.5 (C7), 101.5 (C1), 76.2 (C4), 70.6 (C2), 70.5 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 69.6 (C6), 61.7 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 59.4 (C5), 52.0 (C3); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_6$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 312.1442, found: 312.1444.

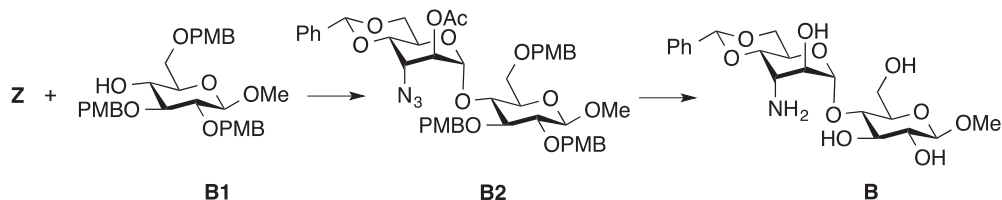


Methyl 4-*O*-(3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)-2-deoxy-2-fluoro- β -D-mannopyranoside (A). The compound was prepared from donor **Z** (0.266 mmol, 262 mg) and methyl 2-deoxy-2-fluoro-3,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl- β -D-mannopyranoside **A1**¹² (0.30 mL, 5.3 mmol) following the general procedure of glycosylation but in the presence of 0.7 equiv. of TMSOTf and at 50°C for 1.5 h. The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4) to give glycosylated compound **A2** in which cleavage of the PMB-ethers was also observed (18 mg, 34%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.53 – 7.35 (m, 5H, Ph), 5.62 (s, 1H, H-7'), 5.26 (s, 1H, H1'), 5.04 (dd, J = 2.7, 0.8 Hz, 1H, H2'), 4.73 (dd, J = 51.1, 2.6 Hz, 1H, H2), 4.47 (d, J = 19.0 Hz, 1H, H1), 4.40 – 4.27 (m, 2H), 4.15 – 4.09 (m, 2H), 4.06 (dd, J = 9.4, 3.6 Hz, 1H), 4.02 – 3.95 (m, 2H), 3.90 (dd, J = 12.1, 4.1 Hz, 2H), 3.86 – 3.80 (m, 1H), 3.78 (t, J = 10.1 Hz, 1H, H4), 3.59 (s, 3H, -OCH₃), 3.41 (dt, J = 9.5, 3.4 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H, -OAc); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 137.5, 129.7, 127.0, 103.2 (C-1'), 102.9, 99.9 (C-1), 91.5 (d, J = 186.0, C-2), 76.4 (C-4'), 76.3 (C-4), 75.2 (C-5), 72.6 (C-3), 71.0 (C-2'), 69.0 (C-6'), 61.5 (C-6), 59.5 (C-5'), 57.9 (-OCH₃), 51.4 (C-3')

Compound **A2** (11 mg, 0.023 mmol) was treated with PMe₃ (40 μ L, 0.04 mmol) and 0.1 M NaOH (60 μ L) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (93:7) to give the desired product **A** (7 mg, 52% overall yield): ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.57 (dd, J = 6.8, 2.9 Hz, 2H, Ph), 7.49 (dd, J = 5.2, 1.8 Hz, 3H, Ph), 5.86 (s, 1H, H-7'), 5.14 (s, 1H, H1'), 4.83 (dd, J = 50, 2.5 Hz, 1H, 2H), 4.73 (d, J = 19.5 Hz, 1H, H1), 4.35 (dd, J = 10.3, 5.0 Hz, 1H, H6'), 4.30 – 4.22 (m, 1H, H5'), 4.19 – 4.13 (m, 1H, H4'), 4.12 – 4.09 (m, 1H, H3'), 4.02 – 3.92 (m, 3H, H6, H6', H3), 3.85 (dd, J = 12.1, 5.4 Hz, 1H, H6), 3.79 (t, J = 9.6 Hz, 1H, H4), 3.60 (s, 4H, -OCH₃, H5), 3.36 – 3.29 (m, 1H, H2); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 137.5, 129.0, 126.3, 102.3, 101.8 (C-1'), 99.2 (C-1), 78.9 (C-4), 73.3 (C-4'), 73.2 (C-3), 71.1 (C-2), 69.9 (C-5), 68.2 (C-6'), 68.1 (C-2'), 60.8 (C-6), 59.2 (C-5'), 55.1 (-OCH₃), 50.2 (C-3')

¹² Prepared from methyl 3-*O*-*p*-methoxybenzyl-4,6-*p*-methoxybenzylidene β -D-glucopyranoside as described for the benzyl analogue in T. Haradahira, M. Maeda, H. Omae, Y. Yano, M. Kojima *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 4758-4766.

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{20}H_{29}FNO_9$ $[M+H]^+$: 446.1821, found: 446.1826.



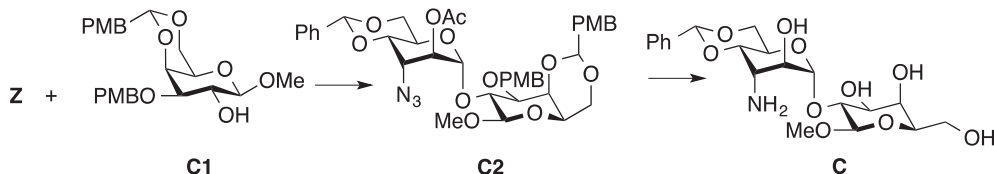
Methyl 4-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- β -D-glucopyranoside (B).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **Z** (164 mg, 0.34 mmol) and acceptor **B1**¹³ (63 mg, 0.11 mmol) at -65°C for 25 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 then 6:4) to give glycosylated compound **B2** (24 mg, 25%): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7.36-7.52 (m, 5H, Ph), 7.11-7.33 (m, 6H, PMB), 6.80-6.88 (m, 6H, PMB), 5.58 (s, 1H, H7'), 5.26 (s, 1H, H1'), 4.94 (d, $J=10.9$ Hz, 1H, PMB), 4.93 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H2'), 4.85 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.64 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, PMB), 4.61 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.56 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, PMB), 4.55 (d, $J=10.9$ Hz, 1H, PMB), 4.32 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H1), 4.22-4.27 (m, 1H, H5'), 4.17 (dd, $J=10.3, 5.5$ Hz, 1H, H6a'), 4.03 (dd, $J=3.5, 2.9$ Hz, 1H, H3'), 3.95 (dd, $J=9.4, 3.5$ Hz, 1H, H4'), 3.86 (dd, $J=9.8, 9.0$ Hz, 1H, H4), 3.80 (s, 3H, PMB), 3.82-3.79 (m, 2H, H6a, H6b), 3.79 (s, 3H, PMB), 3.74 (s, 3H, PMB), 3.69 (dd, $J=10.3, 3.1$ Hz, 1H, H6b'), 3.65 (dd, $J=9.0, 7.4$ Hz, 1H, H3), 3.60 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.51 (ddd, $J=9.8, 3.3, 3.3$ Hz, 1H, H5), 3.43 (dd, $J=9.0, 7.8$ Hz, 1H, H2), 1.94 (s, 3H, AcO); ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): 168.9 (CO), 159.2, 159.0, 158.8, 137.0, 130.5, 130.4, 130.3, 129.8, 129.5, 129.2, 128.7, 128.3, 126.1, 113.7, 113.7, 113.6, 104.6 (C1), 102.0 (C7'), 97.7 (C1'), 84.4 (C3), 82.1 (C2), 75.7 (C4'), 74.4 (PMB), 74.1 (PMB), 74.1 (C5), 73.3, 73.0 (C4), 70.3 (C2'), 68.8 (C6'), 68.5 (C6), 59.3 (C5'), 57.3 (CH₃), 57.0 (C3'), 55.2 (CH₃), 55.1 (CH₃), 20.7 (CH₃); MS (API-ES positive mode): 889 ($M+\text{NH}_4$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{46}H_{57}N_4O_{14}$ $[M+\text{NH}_4]^+$: 889.3866, found: 889.3892.

Compound **B2** (24 mg, 0.03 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 6 h. The crude material was purified by column chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) and the resulting residue (12 mg, 0.027 mmol) was treated with PMe_3 (40 μL , 0.04 mmol) and 0.1 M NaOH (60 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using

¹³ Prepared from methyl β -D-glucopyranoside as described for methyl α -D-glucopyranoside in C. Grandjean, G. Lukacs *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 831-855.

CH₂Cl₂/MeOH/Dioxane/NH₄OH mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **B** (7 mg, 52% overall yield): ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.59 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.52 – 7.44 (m, 3H, Ph), 5.86 (s, 1H, H-7'), 5.17 (s, 1H, H1'), 4.38 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 4.33 (dd, *J* = 10.4, 4.9 Hz, 1H, H6a'), 4.25 (td, *J* = 10.0, 4.9 Hz, 1H, H5'), 4.16 (dd, *J* = 10.0, 3.9 Hz, 1H, H4'), 4.12 (dd, *J* = 3.0, 1.4 Hz, 1H, H2'), 3.99 – 3.90 (m, 2H, H6b', H6a), 3.81 (dd, *J* = 12.1, 4.6 Hz, 1H, H6b), 3.68 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H, H3), 3.65 – 3.54 (m, 5H, H4, H5, -OCH₃), 3.35 (m, 1H, H3'), 3.28 (dd, *J* = 9.5, 7.9 Hz, 1H, H2); ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) δ 137.5 (C_{hipso}, Ph), 130.6 (Ph), 129.3 (Ph), 103.7 (C1), 102.8 (C1'), 102.8 (C7), 78.7 (C4), 77.3 (C3), 76.1 (C4'), 75.0 (C5), 73.7 (C2), 70.7 (C2'), 68.9 (C6'), 61.4 (C6), 59.4 (C5'), 57.8 (-OCH₃), 51.3 (C3'); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₂₉NO₁₀ [M+H⁺]: 444.1864, found: 444.1865.



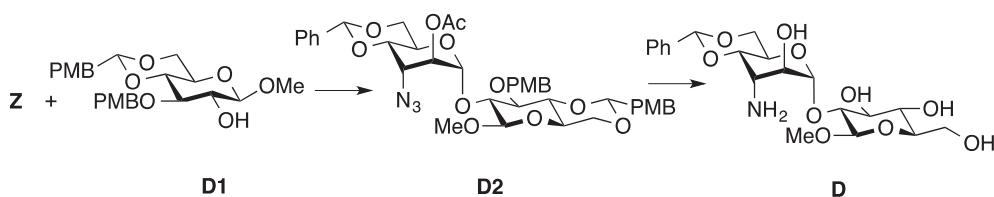
Methyl 2-*O*-(3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy-α-D-altropyranosyl)- β-D-galactopyranoside (**C**).

This compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **Z** (173 mg, 0.362 mmol) and acceptor **C1**¹⁴ (100 mg, 0.231 mmol) at -65°C for 1 h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (6:4) to give glycosylated compound **C2** (166 mg, 96 %): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.51 – 7.43 (m, 4H, Ar), 7.41 – 7.33 (m, 5H, Ar), 6.92 – 6.79 (m, 4H, Ar), 5.57 (s, 1H, H7'), 5.43 (s, 1H, PMBCH), 5.09 (s, 1H, H1a), 5.03 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H2'), 4.69 (s, 2H, PMBCH₂), 4.64 (td, *J* = 10.0, 5.2 Hz, 1H, H5'), 4.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 4.29 (m, 1H, H6), 4.17 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 1H, H6'), 4.14 – 3.97 (m, 4H), 3.92 (dd, *J* = 9.7, 7.9 Hz, 1H, H2), 3.81 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.64 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H6'), 3.56 (m, 1H, H3) 3.53 (s, 3H), 3.31 (s, 1H, H5), 2.15 (s, 3H, OAc); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 160.4, 159.6, 137.7, 130.8, 130.2, 130.1, 129.4, 128.6, 128.1, 126.6, 114.1, 113.8, 105.0 (C1), 102.4 (C7'), 101.5, 97.7 (C1'), 77.3 (C3), 76.3 (C4'), 75.1 (C2), 73.4 (C5), 71.3, 70.6 (C2'), 69.4 (C6),

¹⁴ Prepared from methyl β-D-galactopyranoside: See J. Chen, L. Feng, and G. D. Prestwich; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6511-6522.

69.3 (C6'), 66.8 (C5), 59.1 (C5'), 58.0 (C3'), 57.7, 55.6, 55.5, 21.3 (Me); HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{38}H_{47}N_4O_{13}$ $[M+NH_4^+]$: 767.3134, found: 767.3165.

Compound **C2** (150 mg, 0.200 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups by treatment with di-*tert*-butyl pyridine (0.134 mL, 0.6 mmol) and DDQ (68 mg, 0.3 mmol) over a course of 1.5 h (method B). The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (6:4). The resulting residue (108 mg, 0.17 mmol) was reacted with Selectfluor (91 mg) at rt. according to the general procedure for the cleavage of *p*-methoxybenzylidene groups and then purified by flash chromatography using CH_2Cl_2 /MeOH (gradient 98:2, 96:4 then 94:6). This material (42.7 mg, 0.084 mmol) was finally treated with PMe_3 (125 μ L, 0.125 mmol) and 0.1 M NaOH (168 μ L) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 /MeOH (90:10) to give the desired product **C** (30 mg, 34% overall yield): 1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 7.56–7.51 (m, 2H, Ph), 7.49–7.41 (m, 3H, Ph), 5.81 (s, 1H, H7'), 5.13 (s, 1H, H1'), 4.43 (m, 2H, H1, H5'), 4.33 (dd, $J = 10.2, 5.1$ Hz, 1H, H6a'), 4.13 (dd, $J = 10.3, 4.0$ Hz, 1H, H4'), 4.01 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H2'), 3.92 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H4), 3.89 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H, H6b'), 3.82 – 3.70 (m, 3H, H6a, H6b, H3), 3.69 – 3.64 (m, 1H, H5), 3.58 (m, 4H, -OCH₃, H2), 3.32 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H3'); ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 129.41 (Ph), 126.90 (Ph), 104.74 (C1g), 102.81 (C7'), 100.80 (C1'), 76.83 (C2), 76.16 (C4'), 75.63 (C5), 71.93 (C3), 70.57 (C2'), 69.62 (C4), 69.07 (C6'), 61.56 (C6), 58.93 (C5'), 57.90 (-OCH₃), 51.45 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{20}H_{29}NO_{10}$ $[M+H^+]$: 444.1864, found: 444.1880.



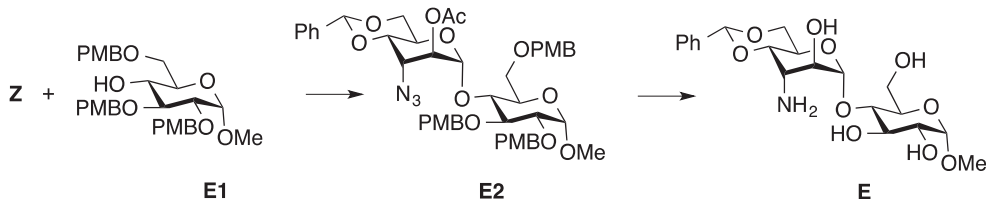
Methyl 2-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- β -D-glucopyranoside (D).

This compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **Z** (305 mg, 0.64 mmol) and acceptor **D1**¹⁵ (100 mg, 0.23 mmol) at -65°C for 1.5 h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (7:3) to give glycosylated

¹⁵ J. Chen, L. Feng, and G. D. Prestwich; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6511-6522.

compound **D2** (173 mg, quantitative): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.55 – 7.34 (m, 9H, Ar), 6.94 – 6.89 (m, 2H, Ar), 6.71–6.66 (m, 2H, Ar), 5.61 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.15 (s, 1H, H1'), 5.04 (dd, $J = 2.7$, 0.8 Hz, 1H, H2'), 4.88 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, CH_2PMB), 4.82 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, CH_2PMB), 4.65 (td, $J = 10.1$, 5.3 Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H1), 4.35 (dd, $J = 10.5$, 5.0 Hz, 1H), 4.13 – 4.03 (m, 3H), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.81 – 3.65 (m, 5H), 3.59 (s, 3H, OCH_3), 3.54 (s, 3H, OCH_3), 3.44 (td, $J = 9.9$, 5.0 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H, OAc); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 169.3, 160.2, 159.4, 137.5, 130.9, 129.9, 129.3, 128.5, 127.5, 126.4, 114.0, 113.8, 105.4 (C1), 102.2 (C7'), 101.5, 96.9 (C1'), 82.3, 78.6, 77.0, 76.2, 75.2, 70.4 (C2'), 69.0, 68.9, 66.3, 58.8, 58.0, 57.8, 55.5, 55.2, 21.2 (AcO); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_{13}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 750.2869, found: 750.2851 [$\text{M}+\text{H}^+$].

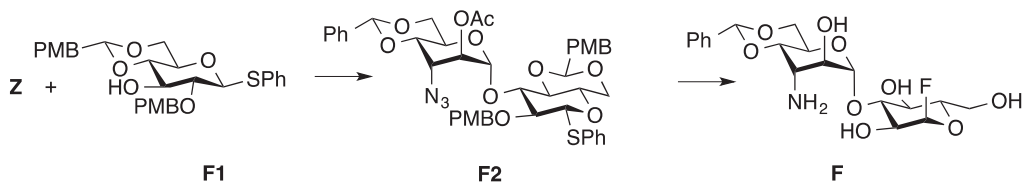
Compound **D2** (160 mg, 0.21 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups by treatment with di-*tert*-butyl pyridine (0.14 mL, 0.642 mmol) and DDQ (73 mg, 0.321 mmol) overnight (method B). The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (7:3). The resulting residue (95.6 mg, 0.15 mmol) was reacted with Selectfluor (80 mg) at rt. according to the general procedure for the cleavage of *p*-methoxybenzylidene groups and then purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient 98:2 to 96:4). This material (56.3 mg, 0.110 mmol) was finally treated with PMe_3 (165 μL , 0.165 mmol) and 0.1 M NaOH (220 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient 95:5 to 90:10) to give the desired product **D** (25 mg, 27%, overall yield): ^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 7.55 (m, 2H, Ph), 7.50–7.44 (m, 3H, Ph), 5.84 (s, 1H, H7'), 5.16 (s, 1H, H1'), 4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H1), 4.46 (td, $J = 10.2$, 5.0 Hz, 1H, H5'), 4.32 (dd, $J = 10.4$, 5.1 Hz, 1H, H6a'), 4.20 (dd, $J = 10.3$, 4.0 Hz, 1H, H4'), 4.09 – 4.04 (m, 1H, H2'), 3.97–3.88 (m, 2H, H6b', H6), 3.72 (dd, $J = 12.3$, 5.7 Hz, 1H, H6), 3.66 – 3.59 (m, 1H, H3), 3.58 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.49–3.35 (m, 4H, H2, H4, H5, H3'); ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 137.5, 129.6, 126.9, 126.8, 104.3 (C1), 102.8 (C7'), 100.4 (C1'), 78.5 (C2), 76.3, 75.4 (C4'), 74.8 (C3), 70.5, 69.9 (C2'), 69.0 (C6a'), 61.3 (C6), 59.0 (C5'), 57.9 ($-\text{OCH}_3$), 51.2 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 444.1864, found: 444.1860.



Methyl 2-*O*-(3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- α -D-glucopyranoside (E).

This compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **Z** (203 mg, 0.42 mmol) and acceptor **E1**¹³ (120 mg, 0.21 mmol) at -65°C for 1 h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel CH₂Cl₂/MeOH (98:2) to give glycosylated compound **E2** (11 mg, 10%) in which cleavage of the PMB-ethers was observed: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (qd, *J* = 5.0, 4.2, 2.0 Hz, 3H), 7.44 – 7.34 (m, 2H), 5.63 (s, 1H), 5.30 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H1'), 5.06 (dd, *J* = 2.6, 0.8 Hz, 1H, H2'), 4.78 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H1), 4.41 – 4.27 (m, 2H), 4.13 – 4.03 (m, 2H), 3.93 (dt, *J* = 14.4, 4.6 Hz, 3H), 3.85 – 3.59 (m, 4H), 3.50 (td, *J* = 12.0, 10.7, 5.2 Hz, 1H), 3.43 (s, 3H, -OCH₃), 3.16 (qd, *J* = 7.5, 4.9 Hz, 1H), 3.02 (s, 1H), 2.15 (s, 3H, OAc).

Compound **E2** (10 mg, 0.021 mmol) was treated with PMe₃ (40 μ L, 0.04 mmol) and 0.1 M NaOH (60 μ L) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/Dioxane/NH₃ (7:2:1.5:0.5) to give the desired product **E** (3 mg, 33%): ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.61 – 7.54 (m, 2H), 7.50 (m, 3H), 5.89 (s, 1H), 5.22 (s, 1H, H-1'), 4.84 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.38 (dd, *J* = 10.3, 4.7 Hz, 1H, H-6'), 4.36 – 4.29 (m, 2H, H-4', H-5'), 4.27 (s, 1H, H-2'), 4.00 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-6'), 3.92 (dd, *J* = 12.0, 2.4 Hz, 1H, H-6), 3.90 – 3.80 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 3.70 – 3.64 (m, 2H, H-3', H-4), 3.61 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2), 3.45 (s, 3H, -OCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 137.5, 129.0, 126.3, 102.3, 101.8 (C-1'), 99.2 (C-1), 78.9 (C-4), 73.3 (C-4'), 73.2 (C-3), 71.1 (C-2), 69.9 (C-5), 68.2 (C-6'), 68.1 (C-2'), 60.8 (C-6), 59.2 (C-5'), 55.1 (-OCH₃), 50.2 (C-3'). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₃₀NO₁₀ [M+H⁺]: 444.1864, found: 444.1851.



3-*O*-(3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- α -D-glucopyranosyl fluoride (F).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donador **Z** (313 mg, 0.65 mmol) and acceptor **F1**¹⁶ (100 mg, 0.196 mmol) at -65°C for 20 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (8:2 then 7:3) to give compound

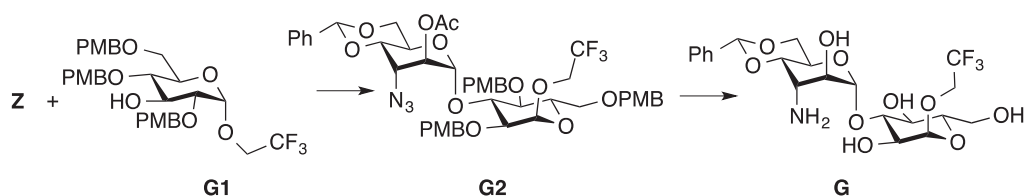
¹⁶ K. Suzuki, I. Ohtsuka, T. Kanemitsu, T. Aiko, O. Kanie *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 219-236.

F2 (124.4 mg, 77 %): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.60–7.46 (m, 4H, Ph), 7.45–7.28 (m, 10H, Ph), 6.86–6.79 (m, 2H, Ph), 6.68–6.61 (m, 2H, Ph), 5.60 (s, 1H, H7'), 5.52 (s, 1H, PMPCH), 5.28 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H1'), 5.14 (dd, $J = 2.7, 0.9$ Hz, 1H, H2'), 5.04 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, PMBCH₂), 4.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, PMBCH₂), 4.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H1), 4.54 (td, $J = 10.0, 5.2$ Hz, 1H, H5'), 4.35 (dd, $J = 10.6, 4.9$ Hz, 1H, H6a), 4.16 – 3.98 (m, 4H, H3', H4', H6a', H3), 3.82 – 3.74 (m, 5H, -OCH₃, H4, H6b), 3.65 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, H6b'), 3.60 (s, 3H, -OCH₃), 3.56 – 3.49 (m, 1H, H2), 3.47 – 3.39 (m, 1H, H5), 2.04 (s, 3H, -OAc), ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.28, 160.26, 159.62, 137.58, 133.61, 132.38, 130.76, 129.41, 128.60, 127.70, 126.52, 114.22, 113.68, 102.23 (C7'), 101.29 (PMBCH), 97.69 (C1'), 89.04 (C1), 82.14 (C4), 79.10 (C2), 76.21 (C4'), 75.99, 70.39 (C2'), 70.08 (C5), 69.07 (C6'), 68.89 (C6), 59.05 (C5'), 58.16 (C3'), 55.62 (-OCH₃), 55.42 (-OCH₃), 21.41 (-OAc). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 828.2797, found: 828.2795.

A solution of NIS (40.6 mg, 0.181 mmol) in dry CH_2Cl_2 (3 mL) was cooled to -40°C . HF-pyridine complex (54.5 μL , 3 mmol) was then added and the solution was stirred for 5 min.¹⁷ A solution of **F2** (124.4 mg, 0.150 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was then added dropwise. After 1.5 h, the reaction mixture was quenched with pyridine and washed with 10% aqueous sodium thiosulfate containing NaHCO_3 , and then water. The organic layer was dried, concentrated, and the residue purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 7:3) to afford an anomeric mixture of highly unstable glycosyl fluorides (63 mg, 57%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): Selected peaks δ : 5.42 (dd, $J = 52.2, 2.9$ Hz, 1H, H1 α -anomer); 5.31 (dd, $J = 52.5, 6.7$ Hz, 1H, H1 β -anomer); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): Selected peaks δ : 105.81 (d, $J = 230.6$ Hz, C1 α -anomer); 109.72 (d, $J = 216.7$ Hz, C1 β -anomer). This material (53.5 mg, 0.073 mmol) was immediately subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method B) over a course of 5 h. The crude material was purified by column chromatography using hexane/EtOAc (8:2) and the resulting residue (32 mg, 0.052 mmol) was reacted with Selectfluor (28 mg) at 50°C according to the general procedure for the cleavage of *p*-methoxybenzylidene groups and then purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient 98:2 to 96:4). The residue (12.8 mg, 0.026 mmol) was treated with PMe_3 (40 μL , 0.04 mmol) and 0.1 M NaOH (30 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10) to give the desired product **F** as pure α -anomer (13 mg, 20 % overall yield) ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 7.57 (m, 2H, Ph),

¹⁷ J. C. López, P. Bernal-Albert, C. Uriel, A. M. Gómez *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5037–5041.

7.49 (m, 3H, Ph), 5.87 (s, 1H, H7'), 5.73 (dd, $J = 53.0, 2.9$ Hz, 1H, H1), 5.20 (s, 1H, H1'), 4.51 (td, $J = 10.3, 5.1$ Hz, 1H, H5'), 4.33 (dd, $J = 10.3, 5.2$ Hz, 1H, H6'), 4.17 (dd, $J = 10.1, 4.0$ Hz, 1H, H4'), 4.15 – 4.11 (m, 1H, H2'), 3.94 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H, H6a'), 3.91 – 3.75 (m, 5H, H6, H4, H2, H3), 3.75 – 3.69 (m, 1H, H5), 3.36 (m, 1H, H3'); ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 129.63 (Ph), 127.01 (Ph), 108.37 (d, $J = 225$ Hz, C1), 102.81 (C7'), 102.18 (C1'), 79.93 (C3), 76.34 (C4'), 74.55 (C4), 70.69 (C2'), 70.47 (C2), 69.78 (C5), 69.11 (C6'), 60.55 (C6), 58.89 (C5'), 51.55 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{FNO}_9$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 432.1664, found: 432.1670.

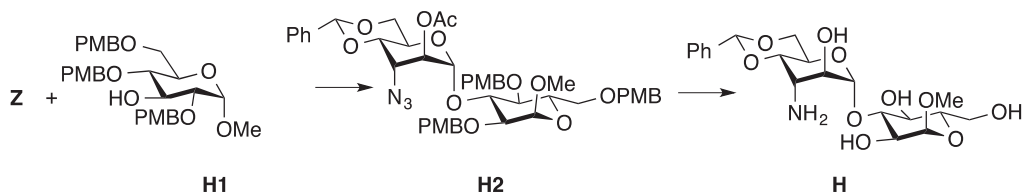


Trifluoroethyl 3-O-(3-amino-4,6-O-benzylidene-3-deoxy α -D-altropyranosyl)- α -D-glucopyranoside (G). The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **Z** (159 mg, 0.33 mmol) and acceptor **G1**¹⁸ (68 mg, 0.11 mmol) at -65 °C for 20 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 to 7:3) to give compound **G2** (60 mg, 56%): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.54-7.34 (m, 5H, Ph), 7.28-7.17 (m, 4H, PMB), 7.05-6.70 (m, 8H, PMB), 5.55 (s, 1H, H7'), 5.12 (s, 1H, H1'), 5.05 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H2'), 4.87 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.78 (d, $J=3.7$ Hz, 1H, H1), 4.68 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, PMB), 4.67 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.63 (ddd, $J=9.6, 9.2, 6.2$ Hz, 1H, H5'), 4.59 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.52 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, PMB), 4.44 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, PMB), 4.24-4.13 (m, 2H, H5, H6a'), 4.10 (dd, $J=6.2, 3.1$ Hz, 1H, H6b'), 4.05 (dd, $J=4.8, 2.9$ Hz, 1H, H3'), 3.99 (dd, $J=9.6, 3.8$ Hz, 1H, H4'), 3.86 (dd, $J=7.8$ Hz; $^3J_{\text{H-F}}=17.3$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$), 3.79 (s, 3H, PMB), 3.77 (s, 3H, PMB), 3.74 (s, 3H, PMB), 3.80-3.67 (m, 3H, H3, H4, H6a), 3.61 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H2), 3.56 (dd, $J=10.0, 3.7$ Hz, 1H, H6b), 1.97 (s, 3H, AcO); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): 168.9 (CO), 159.6, 159.2, 137.5, 130.3, 130.0 (CH, Ph), 129.9, 129.6, 129.0, 128.8, 128.2, 128.1, 126.3, 114.1, 114.0, 113.8, 102.2 (C7'), 98.2 (CH, C1), 97.7 (CH, C1'), 78.7 (CH, C4), 77.3 (CH, C3), 76.1 (CH, C4'), 74.1 (CH_2 , PMB), 73.3 (CH, C5; CH_2 , PMB), 72.8 (CH_2 , PMB), 71.0 (CH, C2), 70.7 (CH, C2'), 69.0 (CH_2 , C6'), 67.9 (CH_2 , C6), 58.7 (CH,

¹⁸ This compound was prepared in a similar manner than compound **A6** but using trifluoroethanol instead of methanol and concentrated sulphuric acid as catalyst in the opening of 3-*O*-allyl-1,2:4,6-bis-*O*-isopropylidene- α -D-glucopyranose. See: Y. Yoshimoto, Y. Tsuda *Chem Pharm Bull* **1983**, *31*, 4335-4340.

C5'), 57.8 (CH, C3'), 55.2, 55.0, 20.6 (AcO). MS (API-ES positive mode): 957 (M+NH₄)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₇H₅₆F₃N₄O₁₄: [M+NH₄]⁺: 957.3740, found: 957.3777.

Compound **G2** (50 mg, 0.05 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 5 h. The crude material was purified by column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (95:5) and the resulting residue (11.5 mg, 0.016 mmol) was treated with PMe₃ (30 μL, 0.03 mmol) and 0.1 M NaOH (40 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/Dioxane/NH₄OH mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **7** (8 mg, 31% overall yield): ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 7.57 (m, 2H, Ph), 7.49 (m, 3H, Ph), 5.87 (s, 1H, H7'), 5.73 (dd, *J* = 53.0, 2.9 Hz, 1H, H1), 5.20 (s, 1H, H1'), 4.51 (td, *J* = 10.3, 5.1 Hz, 1H, H5'), 4.33 (dd, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 1H, H6a'), 4.17 (dd, *J* = 10.1, 4.0 Hz, 1H, H4'), 4.15 – 4.11 (m, 1H, H2'), 3.94 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H, H6b'), 3.91 – 3.75 (m, 5H, H6, H4, H2, H3), 3.75 – 3.69 (m, 1H, H5), 3.36 (m, 1H, H3'); ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) δ 137.5, 129.6, 127.0, 109.2 (C1), 107.4 (C1), 102.8 (C7'), 102.2 (C1'), 79.9 (C3), 76.3 (C4'), 74.5 (C4 or C5), 70.7 (C2'), 70.5 (C2), 69.7 (C5 or C4), 60.5 (C6), 58.9 (C5'), 51.6 (C3'); HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₁H₂₉F₃NO₁₀ [M+H]⁺: 512.1738, found: 512.1723.

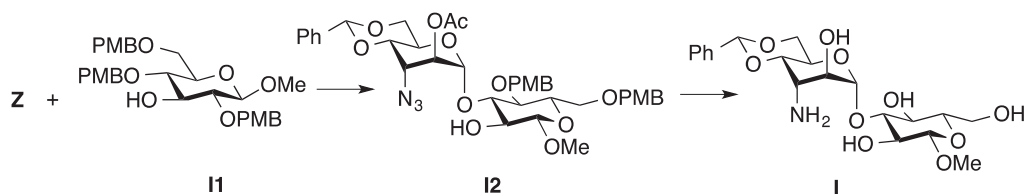


Methyl 3-*O*-(3-amino-3-deoxy-4,6-*O*-benzylidene α-*D*-altropyranosyl)- α-*D*-glucopyranose (**H**).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **Z** (194 mg, 0.40 mmol) and acceptor **A6**¹⁰ (75 mg, 0.13 mmol) at -65 °C for 20 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 to 7:3) to give compound **H2** (73 mg, 72%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.52-7.33 (m, 5H, Ph), 7.28-6.95 (m, 6H, PMB), 6.88-6.75 (m, 6H, PMB), 5.57 (s, 1H, H7'), 5.11 (s, 1H, H1'), 5.05 (d, *J*=2.7 Hz, 1H, H2'), 4.80 (d, *J*=11.7 Hz, 1H, PMB), 4.67 (td, *J*=9.8, 5.2 Hz, 1H, H5'), 4.60 (d, *J*=11.7 Hz, 1H, PMB), 4.58 (d, *J*=11.5 Hz, 1H, PMB), 4.55 (d, *J*=10.0 Hz, 1H, PMB), 4.53 (s, 1H, H1), 4.40 (d, *J*=11.5 Hz, 1H, PMB), 4.37 (d, *J*=10.0 Hz, 1H, PMB), 4.30 (dd, *J*=10.1, 5.2 Hz, 1H, H6a'), 4.06 (dd, *J*=3.5, 2.7 Hz, 1H, H3'), 4.10-4.03 (m, 1H, H6b'), 3.99 (dd, *J*=9.4, 3.5 Hz, 1H, H4'), 3.78 (s, 3H, PMB), 3.77 (s, 3H, PMB), 3.71 (s, 3H, PMB), 3.70-3.62 (m, 4H, H3, H4, H5, H6a), 3.58 (d, *J*=9.8 Hz, 1H, H2), 3.49 (dd, *J*=9.8, 3.7 Hz, 1H, H6b), 3.32 (s, 3H, -OCH₃), 1.99 (s, 3H, AcO); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃); 168.9 (CO), 159.6,

159.5, 159.2, 137.5, 130.5, 130.2, 130.1, 130.08, 129.6, 129.0, 128.6, 128.2, 126.3, 114.1, 113.9, 113.8, 102.2 (C7'), 98.3 (CH, C1), 98.1 (CH, C1'), 79.2 (CH, C4), 77.5 (CH, C3), 76.4 (CH, C4'), 73.9, 73.3, 72.89 (CH₂, PMB), 72.85 (C5), 70.8 (C2), 70.0 (C2'), 69.1 (C6'), 68.3 (C6), 58.8 (C5'), 57.8 (C3'), 55.3 (MeO), 55.23 (CH₃), 55.17 (CH₃), 55.1 (CH₃), 20.6 (CH₃). MS (API-ES positive mode): 889 (M+NH₄)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₆H₅₇N₄O₁₄: [M+NH₄]⁺: 889.3866, found: 889.3861.

Compound **H2** (60 mg, 0.07 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 3 h. The crude material was purified by column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (95:5) and the resulting residue (16.5 mg, 0.032 mmol) was treated with PMe₃ (50 μL, 0.05 mmol) and 0.1 M NaOH (80 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/Dioxane/NH₄OH mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **H** (14 mg, 46% overall yield): ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.54 (m, 2H, Ph), 7.46 (m, 3H, Ph), 5.82 (s, 1H, H7'), 5.17 (s, 1H, H1'), 4.81 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H1), 4.47 (dt, *J* = 10.2, 5.0 Hz, 1H, H5'), 4.30 (dd, *J* = 10.4, 5.1 Hz, 1H, H6a'), 4.13 (dd, *J* = 10.2, 3.9 Hz, 1H, H4'), 4.08 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H2'), 3.94 – 3.81 (m, 2H, H6b', H6a), 3.81 – 3.71 (m, 2H, H3, H6b), 3.69 – 3.62 (m, 2H, H2, H5), 3.57 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H4), 3.42 (s, 3H, -OCH₃), 3.32 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, H3'); ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) δ 137.51 (C_{hipso}, Ph), 130.06 (2x Ph), 127.55 (2xPh), 103.17 (C7'), 102.30 (C1'), 100.36 (C1), 80.53 (C3), 76.49 (C4'), 71.44 (C2 and C5), 71.35 (C4), 70.87 (C2'), 69.22 (C6'), 61.14 (C6), 58.97 (C5'), 55.74 (-OCH₃), 52.39 (C3'). HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₀H₂₉NO₁₀ [M+H]⁺: 444.1864, found: 444.1867.



Methyl 3-*O*-(3-amino-4,6-*O*-benzylidene-3-deoxy- α -D-altropyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**I**).

The compound was prepared following the general procedure of glycosylation from donor **Z** (188 mg, 0.39 mmol) and acceptor **II**¹⁹ (71 mg, 0.13 mmol) at -65 °C for 30 min. The crude material was purified by column chromatography on silica gel using hexane/EtOAc (gradient 8:2 to 6:4) to give a compound

¹⁹ This compound was prepared from 3-*O*-allyl-1,2:4,6-bis-*O*-isopropylidene- α -D-glucopyranose by methanolysis, as described in Y. Yoshimoto, Y. Tsuda *Chem PharmBull* **1983**, *31*, 4335-4340 followed by *p*-methoxybenzylolation and allyl-cleavage. Separation of the anomers was carried out in the final step.

which was identified as partially deprotected **12** (33 mg, 38%): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.54-7.36 (m, 5H, Ph), 7.30-7.07 (m, 4H, PMB), 6.88-6.80 (m, 4H, PMB), 5.61 (s, 1H, H7'), 5.07 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, H2'), 4.98 (s, 1H, H1'), 4.69 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.66 (ddd, $J=10.5, 9.1, 5.3$ Hz, 1H, H5'), 4.59 (d, $J=12.1$ Hz, 1H, PMB), 4.49 (d, $J=12.1$ Hz, 1H, PMB), 4.48 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, PMB), 4.35 (dd, $J=10.3, 5.3$ Hz, 1H, H6b'), 4.20 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, H1), 4.08 (dd, $J=6.6, 3.5$ Hz, 1H, H3'), 4.06 (dd, $J=9.1, 3.5$ Hz, 1H, H4'), 3.803 (s, 3H, PMB), 3.796 (s, 3H, PMB), 3.78-3.75 (m, 1H, H6a'), 3.71-3.62 (m, 4H, H3, H4, H6a, H6b), 3.58 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.54 (dd, $J=7.8, 7.4$ Hz, 1H, H2), 3.42 (ddd, $J=9.0, 3.9, 2.3$ Hz, 1H, H5), 3.09 (bd, $J=3.5$ Hz, 1H, H-OH), 2.10 (s, 3H, AcO); $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): 169.0 (CO), 159.2, 159.2, 136.9, 130.4, 130.0, 129.6, 129.4, 129.2, 128.3, 126.1, 113.8, 113.7, 103.7 (C1), 102.3 (C7'), 98.8 (C1'), 84.0 (C4), 77.4 (C3), 75.7 (C4'), 75.0 (C5), 74.5, 73.2, 72.7 (CH, C2), 70.5 (C2'), 68.8 (C6'), 68.1 (C6), 59.2 (C5'), 57.5 (C3'), 57.2 (CH_3), 55.2, 20.8 (AcO). MS (API-ES positive mode): 769 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_{13}$: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 769.3291, found: 769.3321.

Compound **12** (30 mg, 0.04 mmol) was subjected to the general procedure for deprotection of the PMB protecting groups (method A) over a course of 3 h. The crude material was purified by column chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) and the resulting residue (18 mg, 0.036 mmol) was treated with PMe_3 (50 μL , 0.05 mmol) and 0.1 M NaOH (80 μL) according to the general procedure of reduction of the azido moiety. The material was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Dioxane}/\text{NH}_4\text{OH}$ mixture (7:2:1.5:1) to give the desired product **1** (15 mg, 85% overall yield): $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 7.58 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.48 (m, 3H, Ph), 5.87 (s, 1H, H7'), 5.26 (s, 1H, H1'), 4.49 (td, $J = 10.1, 4.9$ Hz, 1H, H5'), 4.44 – 4.38 (m, 2H, H1g, H4'), 4.33 (dd, $J = 10.4, 4.9$ Hz, 1H, H6a'), 4.29 (dd, $J = 2.8, 1.5$ Hz, 1H, H2'), 3.98 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, H6b'), 3.92 (dd, $J = 12.4, 2.3$ Hz, 1H, H6a), 3.84 (t, $J = 3.5$ Hz, 1H, H3'), 3.73 (dd, $J = 12.4, 5.7$ Hz, 1H, H6b), 3.68 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H3), 3.61 (m, 4H, H4g, $-\text{OCH}_3$), 3.48 (ddd, $J = 10.0, 5.7, 2.3$ Hz, 1H, H5), 3.46 – 3.41 (m, 1H, H2); $^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, D_2O) δ 137.51 (C_{hipso} , Ph), 127.0, 129.5 (Ph), 102.9 (C7'), 100.8 (C1'), 59.4 (C5'), 103.9 (C1), 72.7 (C4'), 68.9 (C6'), 67.6 (C2'), 61.0 (C6), 50.6 (C3'), 83.2 (C3), 70.6 (C4), 58.0 ($-\text{OCH}_3$), 76.2 (C5), 72.3 (C2); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 444.1864, found: 444.1876.

Table S1.- Net interaction free energies (at 4 °C, kcal/mol) measured for the CH/ π complexes established between donors **A-I** and the aromatic rings present in **1-13**. These values were derived from pair-wise competition experiments in which each disaccharide was confronted with the reference compound (**Ref**). The ratio between the respective final products (measured by NMR) is indicated in brackets.

Model Disaccharides (A-I)									
α -face stacking					β -face stacking				
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
4	-1.48±0.11 (14.76)	-1.45±0.11 (14.05)	-1.22±0.11 (9.25)	-1.10±0.11 (7.40)	-0.79±0.08 (4.23)	-1.24±0.11 (9.50)	-1.19±0.11 (8.75)	-1.06±0.11 (6.95)	-0.76±0.08 (3.98)
9	-1.44±0.11 (13.64)	-1.34±0.11 (11.47)	-1.15±0.11 (8.05)	-0.94±0.08 (5.50)	-0.70±0.08 (3.60)	-1.05±0.11 (6.75)	-1.03±0.11 (6.45)	-0.79±0.08 (4.18)	-0.59±0.05 (2.90)
10	-1.29±0.11 (10.54)	-1.34±0.11 (11.50)	-1.21±0.11 (9.07)	-0.93±0.08 (5.41)	-0.96±0.08 (5.68)	-0.98±0.08 (5.92)	-1.03±0.11 (6.50)	-0.82±0.08 (4.46)	-0.66±0.08 (3.33)
3	-1.45±0.11 (14.00)	-1.39±0.11 (12.66)	-1.18±0.11 (8.60)	-0.86±0.08 (4.80)	-0.70±0.08 (3.60)	-0.97±0.08 (5.82)	-0.98±0.08 (5.90)	-0.73±0.08 (3.75)	-0.50±0.05 (2.50)
1	-1.29±0.11 (10.48)	-1.26±0.11 (9.86)	-1.07±0.11 (7.00)	-0.74±0.08 (3.84)	-0.72±0.08 (3.70)	-0.95±0.08 (5.57)	-0.89±0.08 (5.04)	-0.74±0.08 (3.85)	-0.50±0.05 (2.50)
5	-1.12±0.11 (7.70)	-1.14±0.11 (8.00)	-0.80±0.08 (4.30)	-0.70±0.08 (3.58)	-0.53±0.05 (2.63)	-0.83±0.08 (4.52)	-0.78±0.08 (4.16)	-0.60±0.05 (2.98)	-0.52±0.05 (2.58)
6	-1.18±0.11 (8.65)	-1.14±0.11 (7.92)	-0.79±0.08 (4.25)	-0.62±0.08 (3.06)	-0.44±0.05 (2.23)	-0.73±0.08 (3.80)	-0.67±0.08 (3.38)	-0.66±0.08 (3.30)	-0.36±0.05 (1.93)
8	-1.07±0.11 (7.05)	-1.08±0.11 (7.13)	-0.89±0.08 (5.00)	-0.57±0.05 (2.81)	-0.65±0.08 (3.25)	-0.77±0.08 (4.08)	-0.76±0.08 (3.98)	-0.71±0.08 (3.60)	-0.44±0.05 (2.23)
7	-0.82±0.08 (4.47)	-0.84±0.08 (4.60)	-0.45±0.05 (2.26)	-0.25±0.05 (1.57)	-0.35±0.05 (1.88)	-0.38±0.05 (2.00)	-0.38±0.05 (1.98)	-0.28±0.05 (1.67)	-0.15±0.05 (1.32)
2	-0.76±0.08 (4.00)	-0.75±0.08 (3.90)	-0.54±0.05 (2.67)	-0.53±0.05 (2.61)	-0.76±0.08 (4.00)	-0.56±0.05 (2.76)	-0.58±0.05 (2.86)	-0.48±0.05 (2.39)	-0.50±0.05 (2.48)
11	-0.61±0.08 (3.03)	-0.64±0.08 (3.24)	-0.30±0.05 (1.73)	-0.29±0.05 (1.72)	-0.39±0.05 (2.06)	-0.45±0.05 (2.27)	-0.46±0.05 (2.30)	-0.35±0.05 (1.89)	-0.38±0.05 (1.98)
12	-0.65±0.08 (3.26)	-0.59±0.05 (2.92)	-0.29±0.05 (1.70)	-0.25±0.05 (1.58)	-0.37±0.05 (1.97)	-0.40±0.05 (2.08)	-0.43±0.05 (2.20)	-0.37±0.05 (1.96)	-0.37±0.05 (1.96)
13	- (-)	-0.83±0.08 (4.56)	0.00±0.05 (1.00)	0.00±0.05 (1.00)	-0.71±0.08 (3.65)	-0.12±0.05 (1.25)	0.00±0.05 (1.00)	0.00±0.05 (1.00)	-0.17±0.05 (1.35)

Table S2.- Interaction enthalpies (ΔH , kcal/mol) were calculated at the M06-2X/TZVP level in water (IEF-PCM method) for simplified intermolecular complexes formed by tetrahydropyran (THP, as a pyranose model) and the aromatic units present in **1-13** (Figure 6a, see experimental section for details), considering two orientations of the THP unit (referred as geometry **a** and **b**). From these geometries, single-point interaction energies (ΔE_{Total} , kcal/mol) were calculated at the SCS-MP216/6-311G(2d,p) level in the gas phase. In addition, we derived the electrostatic (ΔE_{Elect} , kcal/mol), polarization (ΔE_{Pol} , kcal/mol), exchange+repulsion ($\Delta E_{\text{Ex-Rp}}$, kcal/mol) and dispersion (ΔE_{Disp} , kcal/mol) contributions, through a Localized Molecular Orbital Energy Decomposition Analysis (LMO-EDA). Finally, the penalties associated to THP and aromatic desolvation upon formation of the complexes (ΔE_{Solv} , kcal/mol) were evaluated at the same theory level. The corresponding values obtained for the different complexes are represented below.

	Geometry a						Geometry b							
	M06-2X/TZVP			SCS-MP216/6-311G(2d,p)			M06-2X/TZVP			SCS-MP216/6-311G(2d,p)				
	ΔH	ΔE_{Total}	ΔE_{Elect}	$\Delta E_{\text{Ex-Rp}}$	ΔE_{Pol}	ΔE_{Disp}	ΔE_{Solv}	ΔH	ΔE_{Total}	ΔE_{Elect}	$\Delta E_{\text{Ex-Rp}}$	ΔE_{Pol}	ΔE_{Disp}	ΔE_{Solv}
THP-1	-3.2	-2.8	-4.5	+10.2	-1.3	-7.3	+0.7	-3.2	-2.9	-4.4	+10.1	-1.2	-7.4	+0.9
THP-3	-3.1	-2.9	-4.7	+10.5	-1.3	-7.5	+0.8	-3.1	-2.9	-4.4	+10.4	-1.3	-7.6	+0.6
THP-4	-3.6	-3.3	-4.9	+11.3	-1.4	-8.2	+1.0	-4.0	-3.5	-5.0	+11.5	-1.3	-8.7	+1.4
THP-5	-3.8	-	-	-	-	-	-	-4.0	-	-	-	-	-	-
THP-6	-3.9	-	-	-	-	-	-	-4.3	-	-	-	-	-	-
THP-7	-3.8	-	-	-	-	-	-	-4.1	-	-	-	-	-	-
THP-8	-2.9	-2.6	-4.2	+10.2	-1.2	-7.4	+0.4	-2.9	-2.7	-4.2	+10.1	-1.2	-7.5	+0.5
THP-9	-3.4	-3.1	-5.0	+10.0	-1.4	-6.8	+1.4	-3.3	-3.0	-4.6	+9.7	-1.3	-6.7	+1.2
THP-10	-3.4	-3.1	-5.0	+10.1	-1.4	-6.8	+1.3	-3.2	-2.9	-4.5	+9.6	-1.3	-6.7	+0.9
THP-11	-2.7	-2.3	-3.7	+9.5	-1.0	-7.0	+0.3	-2.7	-2.5	-3.8	+9.3	-1.0	-7.0	+0.8
THP-12	-2.7	-2.1	-3.5	+9.2	-1.0	-6.9	+0.5	-2.6	-2.2	-3.3	+9.0	-1.0	-6.9	+0.3
THP-13	-2.5	-2.1	-3.0	+8.8	-0.9	-7.0	+0.7	-2.5	-2.5	-3.3	+8.7	-0.9	-6.9	+1.2

Figure S1.- 1D- (up), 2D-TOCSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **A** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

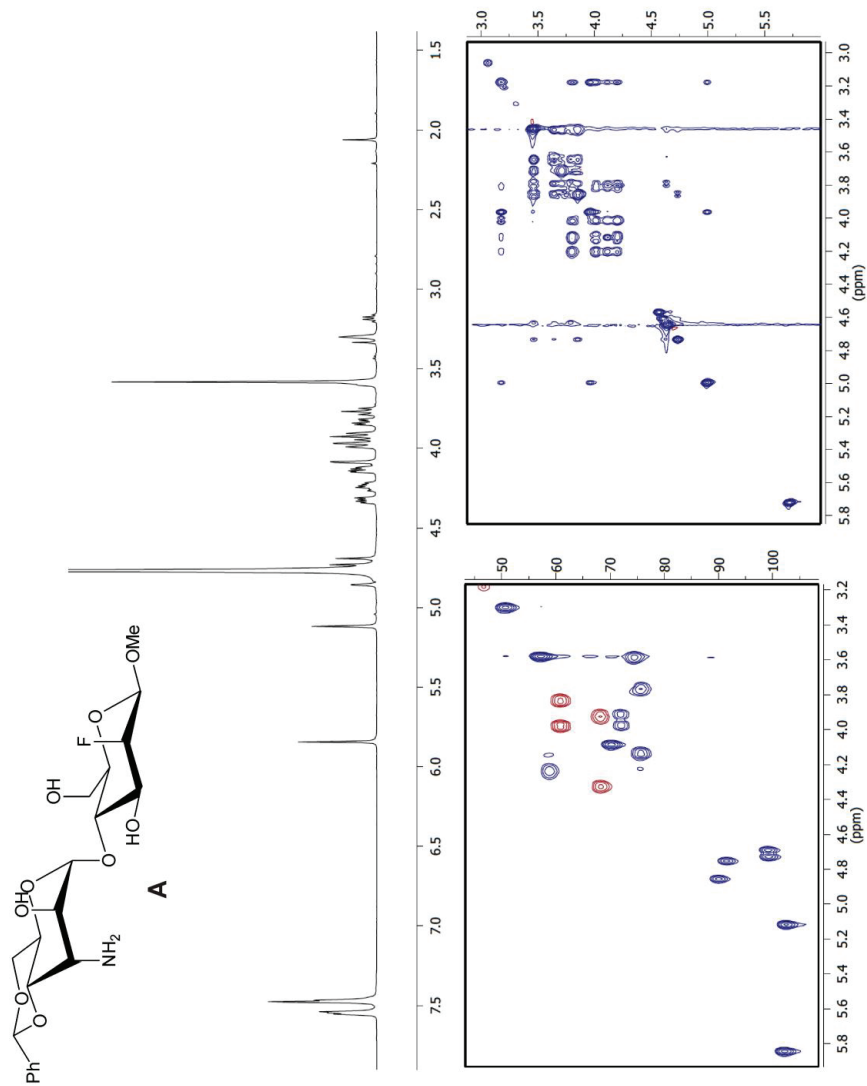


Figure S1.- 1D- (up), 2D-COSY (Bottom-Right) and 2D-HSQC (Bottom-Left) spectra acquired for compound **E** at 500 MHz, pH 7.5 and 298K.

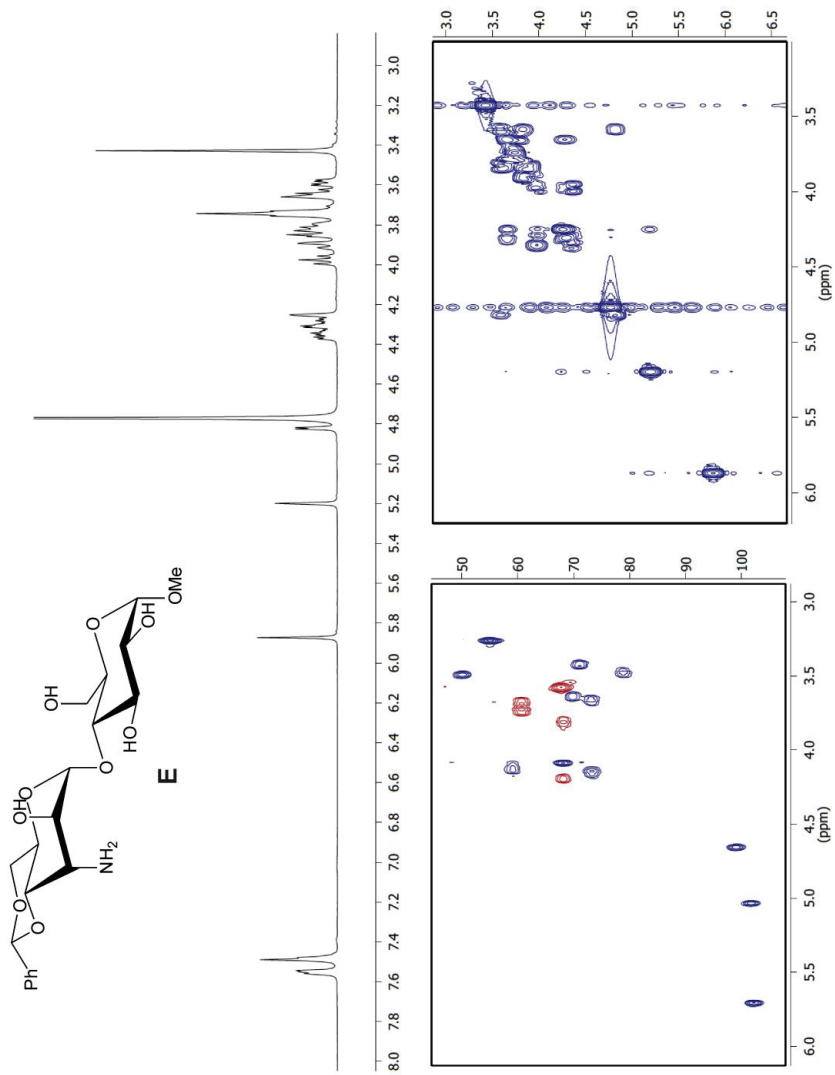


Figure S3.- Key region of 1D-NMR Spectra acquired for compounds **B-1**(Left) and **H-1** (Right). NMR signals for protons involved in CH/ π interactions with the aromatic ring are highlighted with coloured circles. Chemical shift perturbations promoted by the aromatic ring at the interacting D-pyranose units are shown above. These data indicate that complexation is mediated by the pyranose α -face in **B-1** and by the β -face in **H-1**.

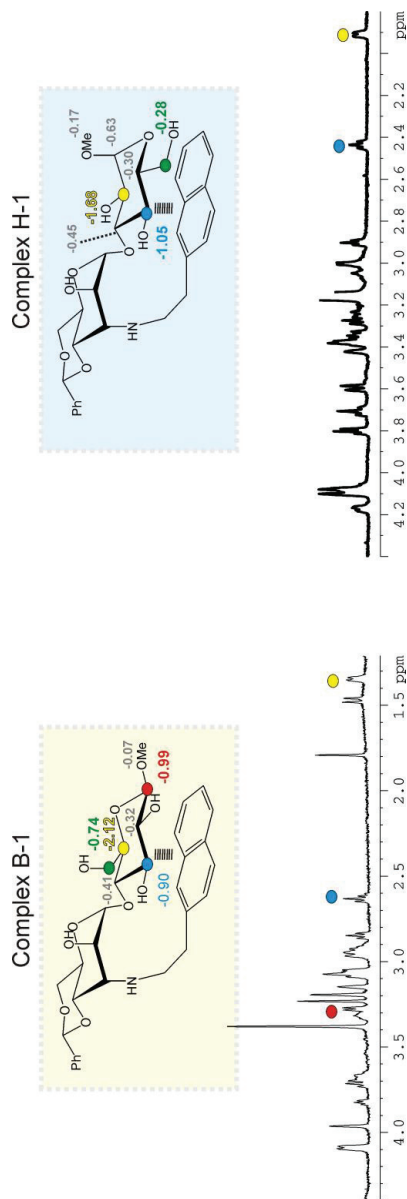


Figure S4.- We performed pairwise competitions with all possible **Ref/disaccharide** pairs so that the net free energy (ΔG) of the stacking complexes could be determined (upper panel). In addition, crosschecks were carried out with selected aldehydes and disaccharide pairs (lower panel). The obtained $\Delta\Delta G$ values were found to be fully consistent with the net interaction energies (ΔG) and errors represented in Table S1. NMR signals for the altriose anomeric proton in the final products, together with the product ratios (grey), are shown in Table S1. Energy differences between alternative interaction modes (in black) are shown.

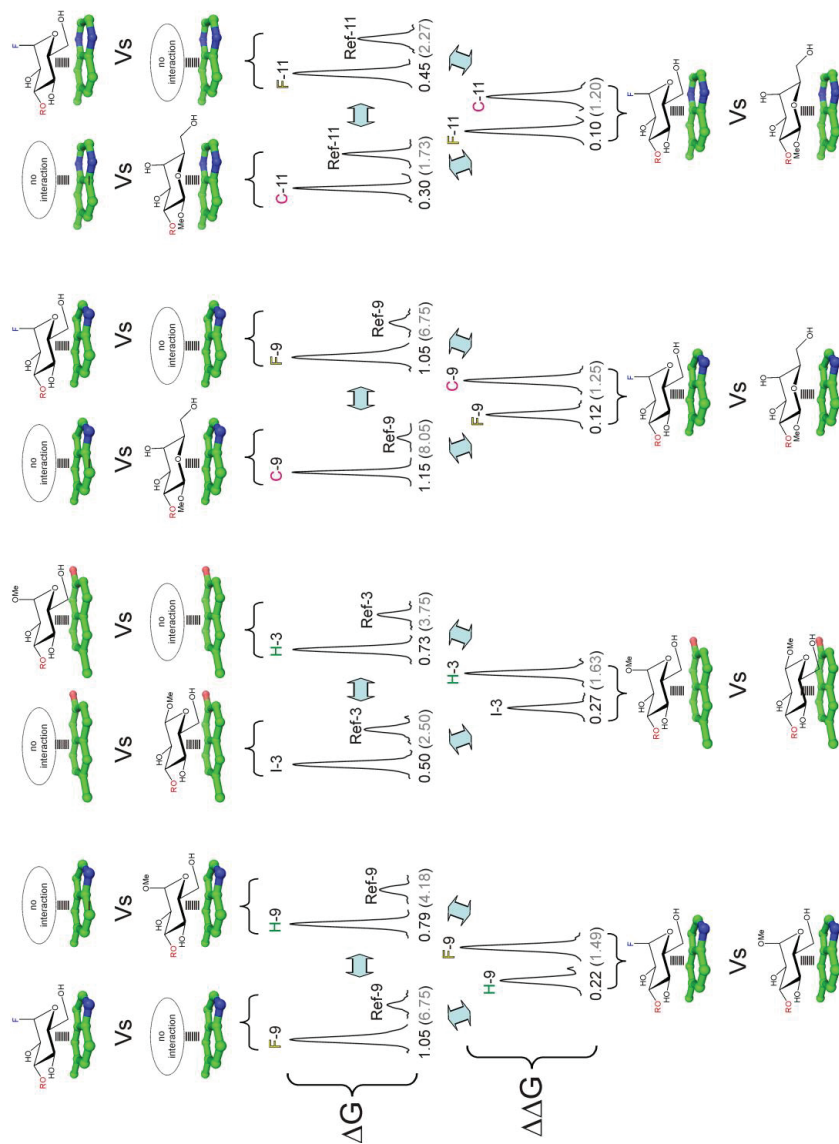


Figure S5.- Chemical shift perturbations promoted by the aromatic ring at the interacting D-pyranose unit in selected complexes. These values were taken as indicative of the interaction geometry.

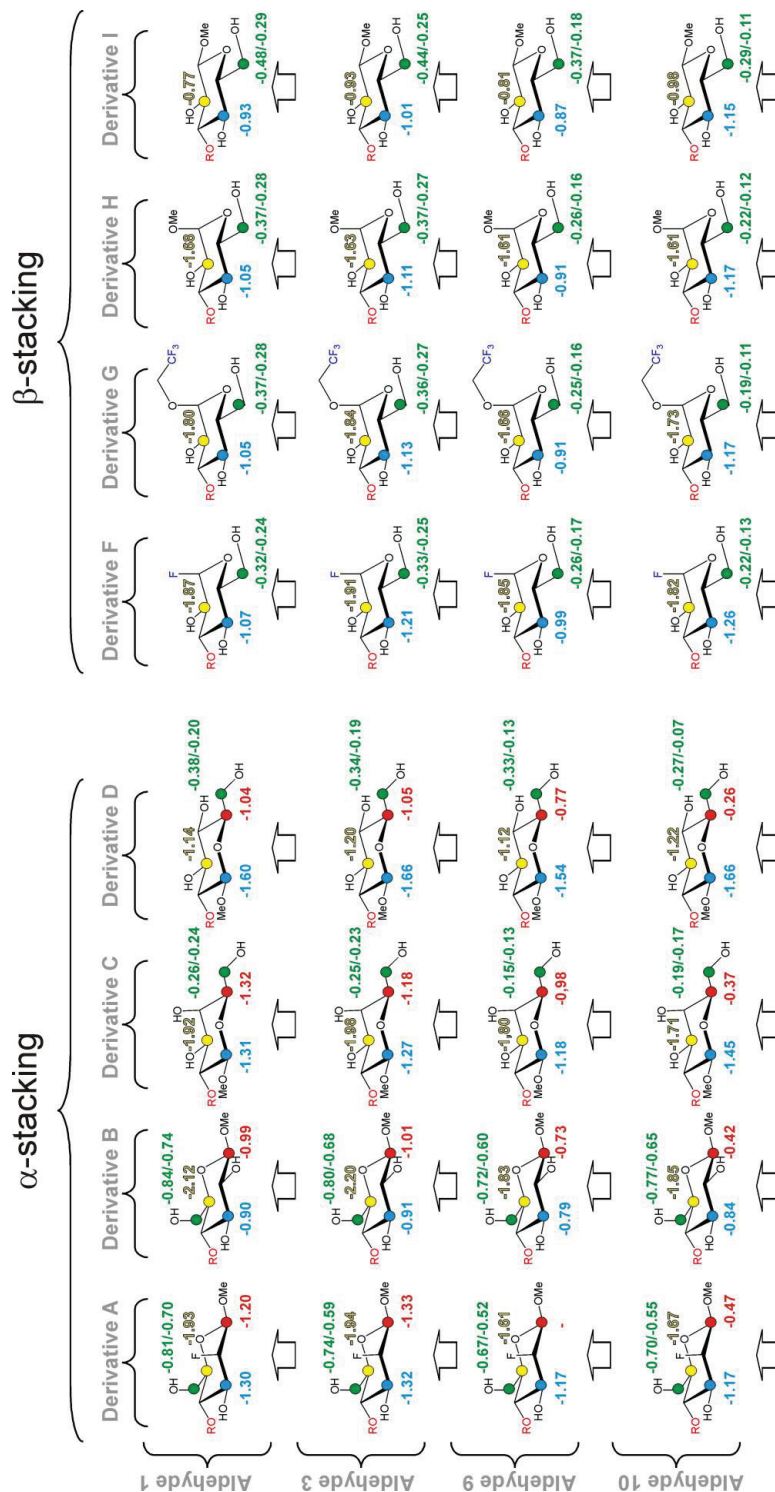


Figure S6. Chemical shift perturbations promoted by the aromatic ring at the interacting D-pyranose unit in complexes **B-1/B-3** (left) and **C-1/C-3** (right). According to these data the hydroxymethyl group (highlighted with a red ellipse) participates in contacts with the aromatic unit only for **B** complexes.

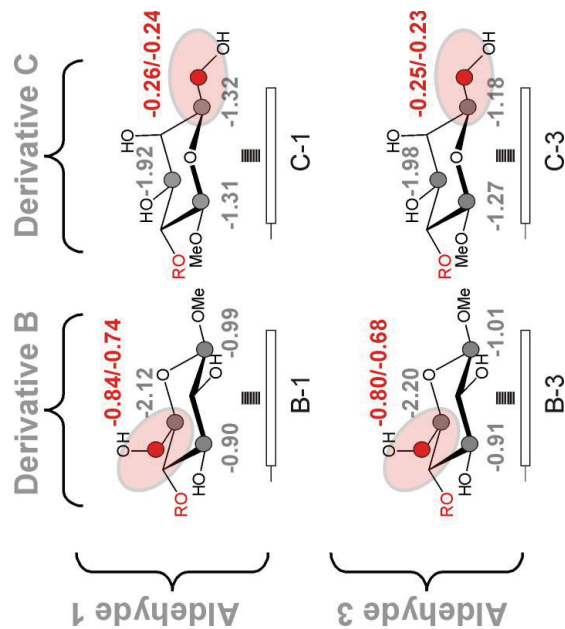


Figure S7.- The magnitude of the energy penalty associated to the axial/equatorial inversion of a pyranose polar group (highlighted with a green ellipse) depends on the precise geometrical features of the complex, varying from 0.3 kcal/mol, (**C-1** vs **D-1** or **C-3** vs **D-3**) to <0.1 kcal/mol (**A-1** vs **B-1** or **A-3** vs **B-3**). Measured $\Delta\delta$ values indicate that for **C** and **D** complexes the aromatic ring is closer to the inverted position.

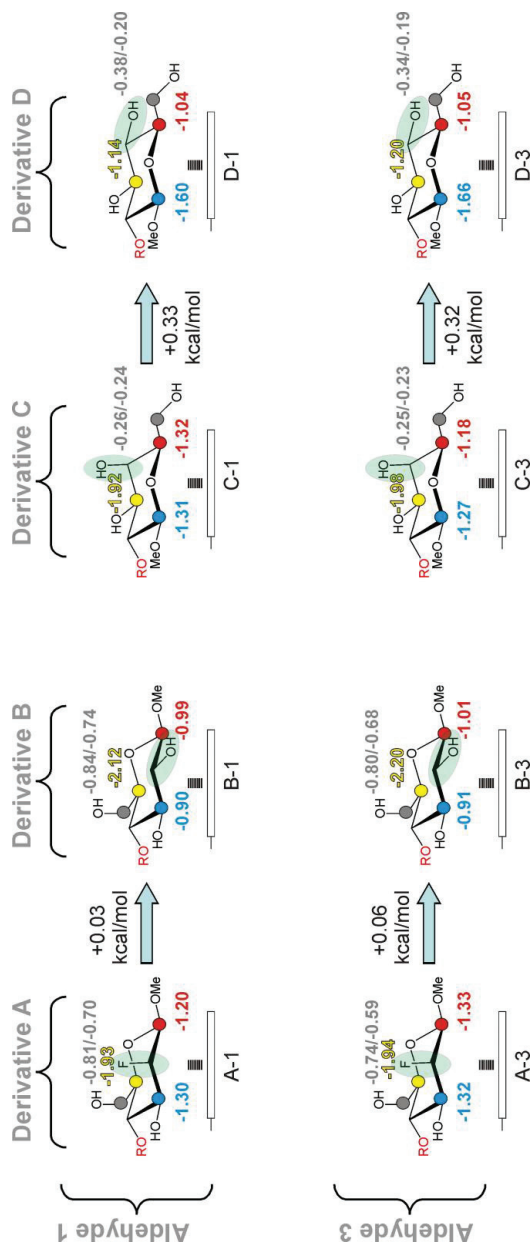


Figure S8.- To estimate the geometrical features of the different pyranose/aromatic complexes we performed 100 ns Molecular Dynamics (MD) simulations in the present of explicit solvent (see the Experimental Section). Selected ensembles are shown below.

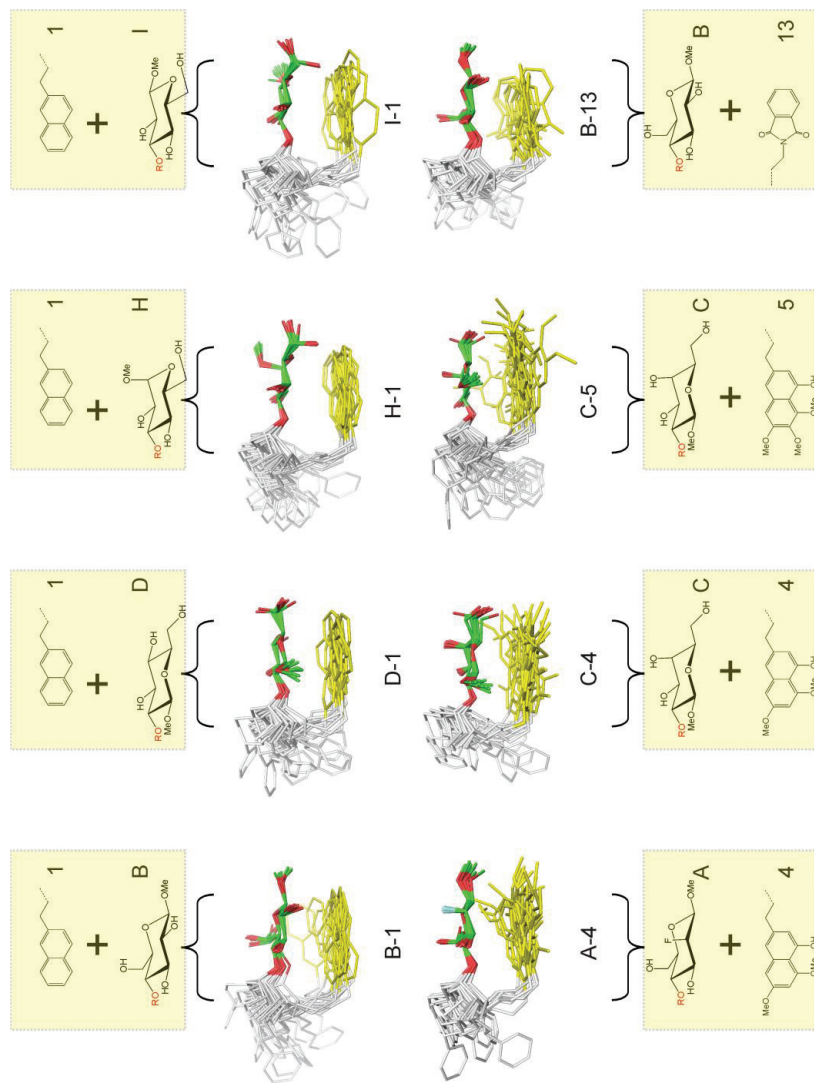


Figure S9.- Experimental free energies (ΔG_{exp}) measured for complexes formed by derivatives **C**, **D** or **F** with substituted naphthyl or phenyl rings (Right). Overall, the stability of the CH/ π bonds increases with the electron-rich character of the aromatic unit. However, it can be observed that those complexes formed by densely oxygenated aromatic systems as **5-7** display reduced ΔG_{exp} values. Interestingly, quantum mechanics calculations show that the OR groups present in **5-7** are not co-planar with the naphthyl unit (so that multiple conformations are feasible). Although merely speculative, this peculiarity might oppose binding by, imposing a significant entropic penalty on the recognition process (Left).

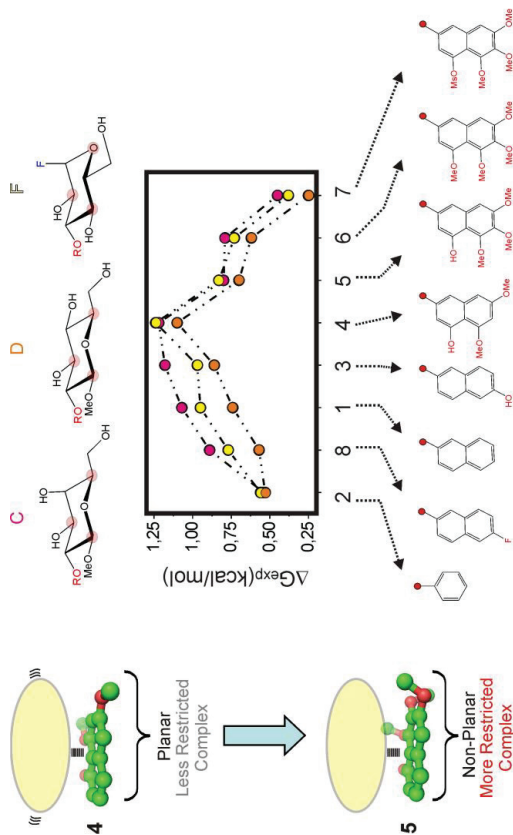


Figure S10. Experimental ΔG_{exp} values measured for derivatives **C** (orange) and **D** (magenta) are represented against the gas phase interaction energies and the different contributions calculated with SCS-MP2/6-311G(2d,p) (Left) and M06-2X/TXVP (Right) levels for the THP/aromatic complexes (see the main text). Linear fits (red lines) and correlation coefficients (R, in grey) are shown in all cases.

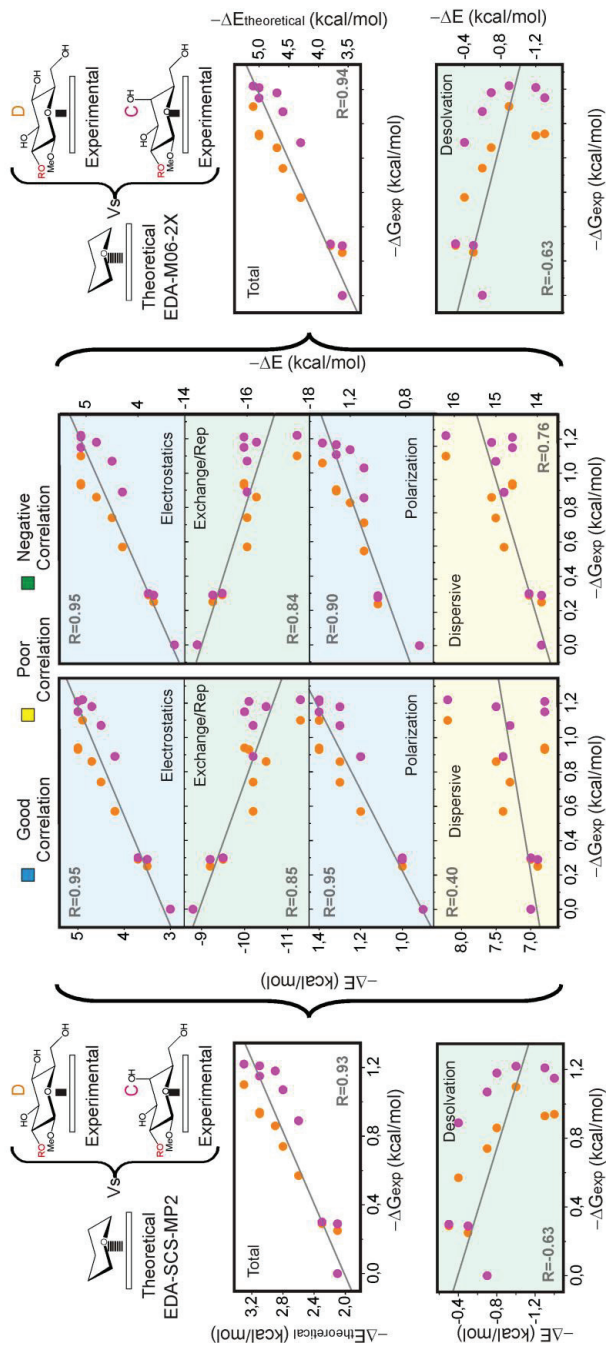


Figure S11.- a) Pairwise competition experiments performed with pair **C/Ref** and aldehyde **3** in the presence of organic co-solvents (indicated in black). NMR signals for the altriose anomeric proton in the final products are shown. Product ratios (in brackets) together with the **C-3** complex stabilities under the different solvent conditions are indicated in grey. A representation of the measured stabilities versus the cohesive energy densities of the different mixtures is shown in the bottom-right corner. Linear fit and correlation coefficient (R) are shown. b) Interaction energies for different solvent/naphthalene complexes in the gas phase, estimated at the M06-2X and SCS-MP2 levels.

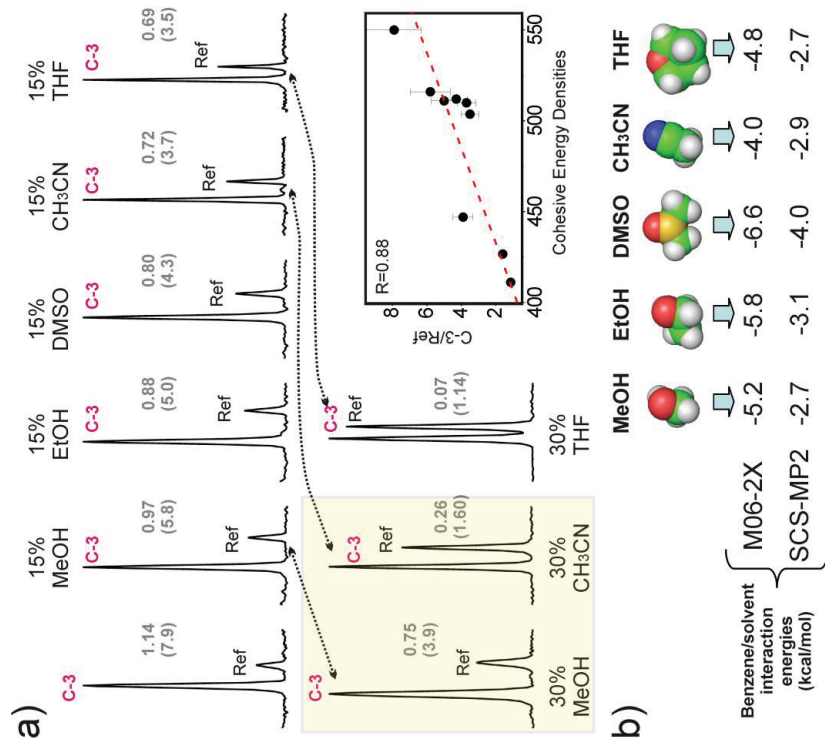
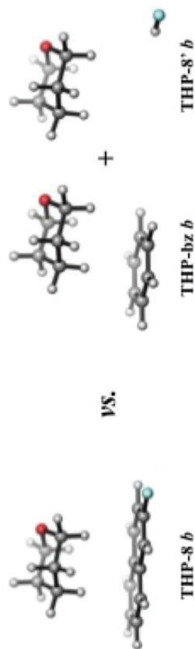


Figure S12.-Interaction energies (ΔE_{int} , kcal/mol) calculated with M06-2X/7XVP in water (IEF-PCM) for the full pyranose-aromatic complexes in different orientations (**THP-X a/b**, see manuscript) and the unoptimized partial complexes between the model pyranose ring and: 1) the benzene ring present in all complexes (**THP-bz a/b**), and 2) the H-capped polar substituent characteristic of each aromatic (**THP-X' a/b**). In all cases the calculated ΔE_{int} is compared to the sum of the ΔE_{int} of the separated fragments, showing little or no correspondence, and revealing the poor trough-space, local character of the CH/ π interactions.



X (aromatic)	Geometry <i>a</i>			Geometry <i>b</i>		
	full complex	fragmented complex		full complex	fragmented complex	
	THP-X	THP-bz	THP-X' + THP-bz + THP-X'	THP-X	THP-bz	THP-X' + THP-bz + THP-X'
1	-4.7	-0.9	-0.1	-4.7	-1.1	-0.1
3	-4.9	-0.9	-0.3	-4.8	-1.1	-0.3
8	-4.7	-0.9	-0.3	-4.7	-1.1	-0.3
9	-4.7	+5.3 _a	-0.3	-4.6	+5.3 _a	-0.4
10	-4.6	+5.3 _a	-0.3	-4.6	+5.2 _a	-0.2
11	-4.2	-1.1	-1.5	-4.2	-1.2	-1.4
12	-4.0	+3.3 _a	-1.7	-3.9	+3.2 _a	-1.6
13	-3.8	+3.6 _a	-1.2	-3.8	+3.6 _a	-1.3

^aThe very positive (unfavorable) interaction energies in these cases are due to the highly distorted geometry of the benzene rings fused to five membered rings (pyrrole in **11**, thiadiazole in **12** and maleimide in **13**).

CAPÍTULO 4

Desarrollo de nuevas metodologías
para el diseño y optimización de
ligandos poli-aminados de ARN

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 DESARROLLO DE NUEVOS AMINOGLICÓSIDOS: INTERÉS Y ACTUALIDAD

Desde su descubrimiento en la década de 1940 los aminoglicósidos han sido compuestos ampliamente utilizados en clínica por sus propiedades anti-bacterianas. Sin embargo, su aplicación terapéutica se ha visto tradicionalmente limitada por dos factores adversos. En primer lugar, en la mayoría de los casos su uso provoca efectos secundarios (fundamentalmente ototoxicidad y nefrotoxicidad) cuyas bases moleculares han sido objeto de investigación por parte de la comunidad científica y empiezan a ser comprendidas en la actualidad. En segundo lugar, la eficacia de estos compuestos se ha visto disminuida por la aparición y diseminación de cepas bacterianas resistentes. Este fenómeno no es exclusivo de los aminoglicósidos sino común a todos los agentes antimicrobianos disponibles en la actualidad. De hecho, cada vez son más las cepas descritas con resistencia simultánea a varias (MDR, “multidrug resistance bacteria”) o, en casos extremos, a todas (XDR, “extreme drug-resistant”) las clases de antibióticos disponibles actualmente en nuestro arsenal terapéutico. Ambas limitaciones han impulsado enormemente la investigación orientada al desarrollo de nuevos compuestos dotados de mayor actividad en cepas resistentes y una menor toxicidad.

Por otro lado, cabe mencionar que, desde una perspectiva químico-médica, el interés de los aminoglicósidos trasciende sus propiedades anti-bacterianas. Tal y como se ha comentado en el capítulo 1, estos compuestos son capaces de formar complejos específicos con un buen número de dianas del VIH y constituyen, por tanto, un punto de partida interesante para el diseño de nuevos compuestos anti-virales.

Finalmente, progresos realizados en biología molecular durante los últimos 20 años han puesto de manifiesto la gran diversidad de funciones que el ARN desempeña en los seres vivos. Hoy en día es ampliamente reconocido que juega papeles esenciales en procesos clave como la regulación de la transcripción o la traducción y que constituye un actor fundamental en la progresión de infecciones víricas y bacterianas.¹²⁷ Dicha diversidad funcional ha contribuido a afianzar la percepción del mismo como una diana prometedora en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.¹²⁸ Desafortunadamente, a pesar de los indudables

progresos realizados, nuestra capacidad para diseñar moléculas capaces de reconocer con alta afinidad secuencias o motivos estructurales de ARN concretos es todavía limitada. Los aminoglicósidos son ligandos de ARN de alta afinidad y, por lo tanto, han constituido una herramienta químico-biológica privilegiada para el estudio del proceso de reconocimiento de ARN desde una perspectiva fundamental.

En definitiva, la síntesis y evaluación un nuevos armazones poliaminados basados en aminoglicósidos y dotados de potencial actividad biológica reviste un indudable interés y ha constituido un campo de investigación activo durante los últimos 20 años.

4.1.2 DESARROLLO DE NUEVOS AMINOGLICÓSIDOS: ASPECTOS METODOLÓGICOS

Tradicionalmente, el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos se ha basado en la síntesis de una gran cantidad de derivados estructuralmente relacionados y su posterior evaluación. En este contexto, cabe mencionar que uno de los obstáculos que ha lastrado tradicionalmente el desarrollo de nuevos aminoglicósidos, más potentes, selectivos y menos tóxicos, es la dificultad inherente a la preparación de estas estructuras oligosacáridicas. En primer lugar, sus armazones incorporan un buen número de posiciones químicamente equivalentes, como son los diversos grupos hidroxilo o amino. Por esta razón, la introducción de modificaciones regioselectivas es complicada (especialmente en las funciones amino debido a su mayor reactividad) y requiere de rutas sintéticas largas que incluyen múltiples etapas de protección y desprotección. Además, los aminoglicósidos son altamente polares y, por tanto, insolubles en medios orgánicos, lo cual supone una dificultad adicional especialmente por lo que respecta a las etapas de purificación. Estos factores determinan rutas sintéticas largas, caras, y con bajos rendimientos globales.¹²⁹ En definitiva, la presencia de un buen número de funciones polares altamente reactivas, su carácter marcadamente polar, así como su complejidad estructural suponen un reto sintético considerable.

En un intento de minimizar estas desventajas se han desarrollado diversos estudios basados en química combinatoria. Desde su formulación a principios de los 80 la química combinatoria ha madurado hasta convertirse en una herramienta clave en Química Biológica.¹³⁰ Bajo dicha denominación se agrupan

un conjunto diverso y relativamente heterogéneo de técnicas orientadas tanto a la síntesis en paralelo de compuestos orgánicos individuales como a la preparación, manejo y evaluación de librerías más o menos complejas. En todos los casos se pretende evitar procedimientos sintéticos laboriosos así como pasos difíciles de purificación. En definitiva, el objetivo último es la generación rápida de mezclas estructuralmente diversas cuyas propiedades pueden ser evaluadas de un modo sencillo. En el contexto de los aminoglicósidos se pueden encontrar algunos ejemplos en la literatura, si bien no son muy abundantes. Tal es el caso de una síntesis paralela descrita de múltiples derivados mediante la reacción multicomponente de Ugi¹³¹ o la síntesis de derivados peptídicos unidos a neomicina, si bien en este caso la química combinatoria se aplica a la parte peptídica.¹³²

La química combinatoria dinámica constituye, por su parte, un nuevo paradigma en la búsqueda de compuestos bio-activos.¹¹⁰ Su objetivo es la generación de mezclas en equilibrio, cuya composición es modificada por el propio receptor, en beneficio de los mejores ligandos. Dicha metodología se apoya, por tanto, en reacciones reversibles que, a su vez, deben cumplir criterios de bio-ortogonalidad.

Es preciso mencionar que, desde un punto de vista metodológico, los aminoglicósidos constituyen, a primera vista, un campo óptimo para la aplicación de métodos de química combinatoria. Dicha elección estaría, en primer lugar, plenamente justificada, dada la dificultad inherente a la preparación y purificación de aminoglicósidos modificados por síntesis química. Por otro lado, sus armazones poli-aminados incluyen un buen número de centros reactivos (entre 4 y 6 funciones amino) susceptibles de ser modificados mediante reacciones de aminación reductora, generando potencialmente una gran diversidad estructural. Así, no resulta sorprendente comprobar la existencia de diversos derivados naturales o semi-sintéticos provistos de interesantes actividades biológicas que incluyen modificaciones en dichas posiciones.^{13, 128b} Curiosamente, los ejemplos descritos en la literatura de este tipo de aproximaciones en el campo de los aminoglicósidos son relativamente escasos y, en general, tienden a explotar de modo preferente la reactividad de los OH (previa protección de los -NH₂) en la generación de las librerías.^{131a, 132-133}

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En la presente tesis doctoral nos proponemos, en primer lugar, el desarrollo y puesta a punto de metodologías de química combinatoria dinámica orientadas a la optimización de glicósidos poli-aminados como ligandos de ARN. Con este objetivo, nos hemos centrado en una modificación sencilla que, a pesar de ello, tiene una clara relevancia químico-médica: la N-metilación de aminoglicósidos. En principio, la introducción de funciones N-metilo en estos ligandos tiene hasta tres efectos potenciales beneficiosos sobre su actividad:

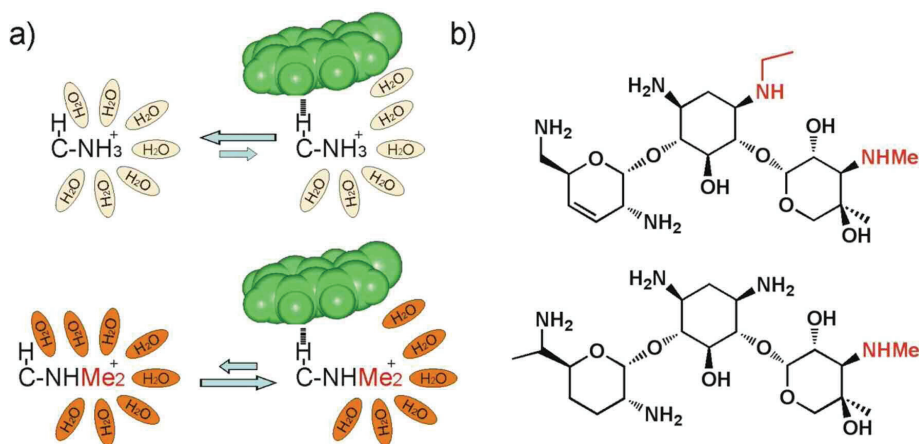


Figura 4.1. a) Representación esquemática del efecto ejercido por la N-metilación sobre las interacciones CH/ π . b) Ejemplos de aminoglicósidos naturales que incorporan fragmentos de N-alquilo: netilmicina (arriba) y gentamicina (abajo)

- En primer lugar, los grupos NMe pueden participar en contactos de van der Waals o CH/ π adicionales con el receptor, contribuyendo a incrementar la afinidad de la asociación.
- En segundo lugar, es preciso considerar que las funciones NMe están, en general, más pobremente solvatadas en agua que las $-NH_2$. Por lo tanto, la N-metilación tiende a reducir el coste energético asociado a la desolvatación parcial de las funciones amino que acompaña la asociación. Esta consideración es especialmente relevante en aquellos casos en que el proceso de reconocimiento involucra interacciones de apilamiento con anillos aromáticos (Figura 4.1a).

- Finalmente, esta simple modificación puede proporcionar una protección eficiente frente a la inactivación de los aminoglicósidos por enzimas N-acil-transferasas.

No resulta, por tanto, sorprendente comprobar como las funciones N-alquilo son relativamente frecuentes en antibióticos naturales (Figura 4.1b).

Desafortunadamente, como ya se ha comentado con anterioridad, desde una perspectiva sintética, la preparación de aminoglicósidos modificados puntualmente con funciones N-metilo o N-alquilo está lejos de ser trivial. Por otro lado, el número de grupos amino presentes en estos ligandos es elevado (entre 4 y 6), de modo que, en ausencia de información adicional (de tipo estructural o de otra índole) una optimización basada en esta modificación, normalmente implicará la preparación de un buen número de derivados.

En la presente tesis *nos proponemos explotar la reactividad del complejo aminoglicósido/ARN como fuente de información para el diseño de ligandos optimizados*. Con este objetivo, planteamos un protocolo experimental sencillo (representado de modo esquemático en la figura 4.2). De acuerdo con él, se realizan reacciones de aminación reductora, tanto sobre el complejo aminoglicósido/ARN como sobre el ligado libre, en idénticas condiciones experimentales. Una vez digerido el receptor de ARN con ribonucleasa, se comparan los patrones de N-metilación presentes en las mezclas resultantes. Las diferencias observadas pueden, en principio, estar determinadas por factores tanto de tipo cinético como termodinámico. Así, en primer lugar, podrían proporcionar información relativa a la accesibilidad de las diferentes posiciones reactivas dentro del complejo (información estructural de baja resolución pero de un indudable valor químico-médico). En segundo lugar, es preciso considerar que la reacción de aminación reductora incluye un paso de equilibrio (de amina a imina/enamina) y, por tanto, en casos favorables el enriquecimiento de la mezcla en un componente podría reflejar el efecto beneficioso de la modificación sobre la estabilidad del complejo.

Es preciso destacar que la reacción de aminación reductora con formaldehído es susceptible de generar mezclas de una gran complejidad. Por ejemplo, en el caso concreto de la kanamicina B (con 5 funciones amino), esta estaría integrada por un número máximo de $3^5 = 243$ derivados. Desafortunadamente, todos ellos presentan propiedades químico-físicas

similares lo cual, unido a la ausencia de cromóforos en su estructura, dificulta enormemente su separación o análisis. Con objeto de superar dicha dificultad hemos desarrollado en la presente tesis un sencillo protocolo de deconvolución basado en la utilización de RMN y etiquetado en ^{13}C (Figura 4.3).

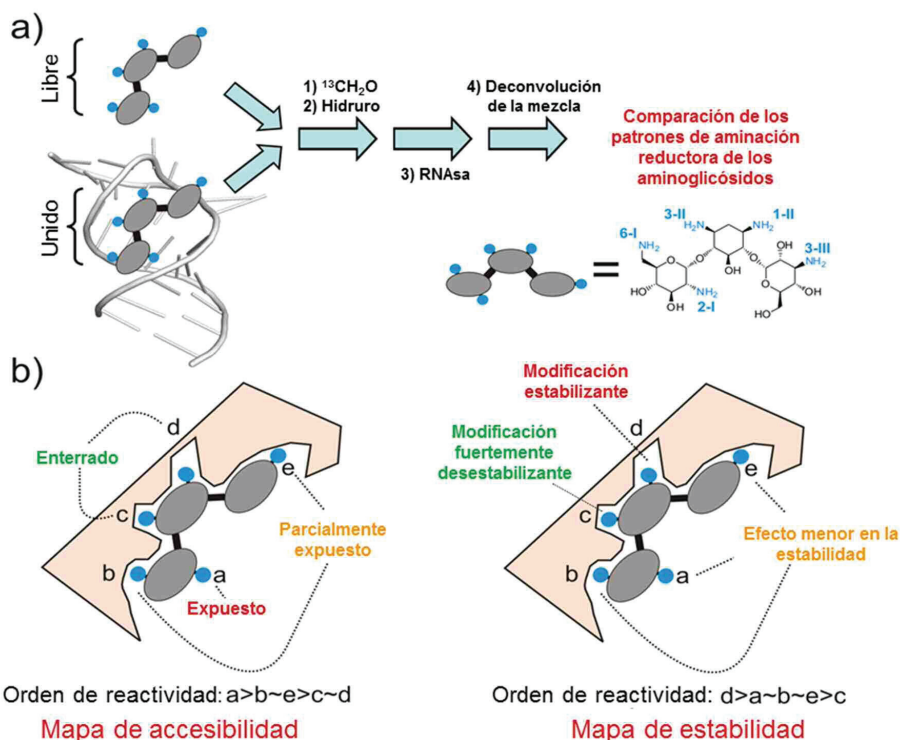


Figura 4.2. a) Representación esquemática de la estrategia combinatoria puesta a punto para estudiar el efecto de la N-metilación de antibióticos aminoglicósidos sobre su interacción con receptores de ARN. Se llevan a cabo reacciones de N-metilación en presencia y ausencia de ARN empleando formaldehído etiquetado en ^{13}C y se comparan los patrones de N-metilación resultantes. b) La modificación preferente de determinadas posiciones del ligando en el contexto del receptor podría reflejar tanto su mayor exposición al disolvente (izquierda) como el efecto estabilizante de la misma sobre el complejo (derecha).

De acuerdo con él, la reacción de aminación reductora llevada a cabo sobre la forma libre y complejada del aminoglicósido hace uso de formaldehído marcado en ^{13}C . En segundo lugar, una vez digerido el ARN, llevamos a cabo, en ambos casos, una segunda reacción de aminación reductora con formaldehído sin

etiquetar. Este experimento de dilución isotópica reduce la complejidad de la librería a un único compuesto permetilado que incorpora en las distintas posiciones diferentes fracciones de ^{13}C , fácilmente cuantificables mediante experimentos HSQC.

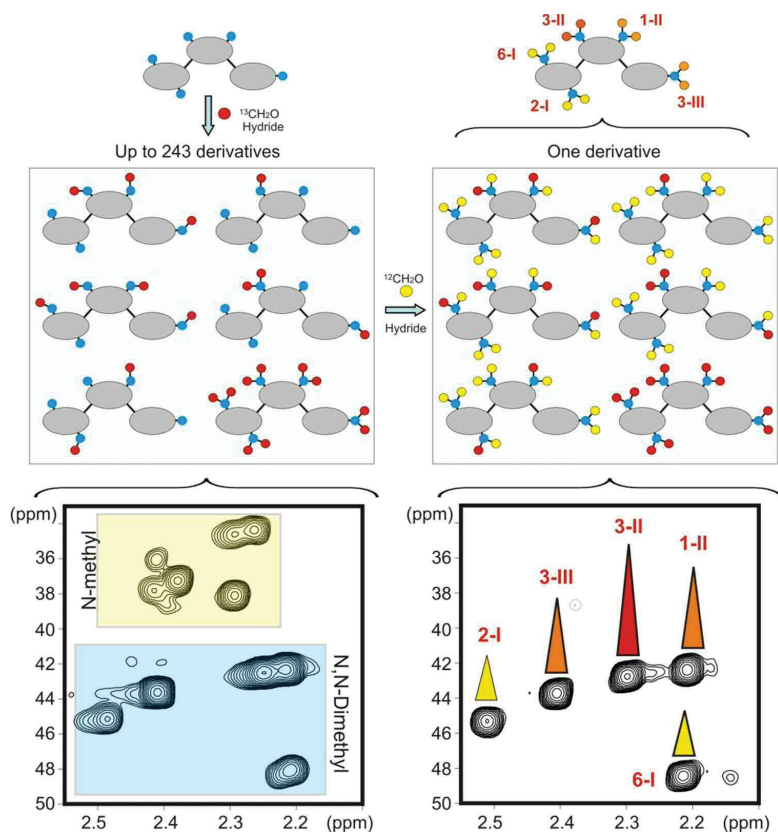


Figura 4.3. Método de deconvolución desarrollado para el análisis de las librerías de aminoglicósidos N-metilados.

Debe observarse que en el caso de la kanamicina B, las muestras obtenidas en este punto proporcionan un espectro sencillo, caracterizado por la presencia de solo 5 picos (uno para cada función $-\text{NMe}_2$), cuya intensidad contiene información relativa a la reactividad de cada función amino en la primera reacción de aminación reductora. La substracción de los espectros obtenidos a partir del complejo ligando/ARN y del aminoglicósido libre proporciona una manera sencilla de visualizar los cambios de intensidad para las diferentes señales.

En el presente capítulo de la tesis hemos trabajado en el desarrollo de esta idea. Adicionalmente, hemos analizado su potencial y limitaciones en el contexto de tres procesos de reconocimiento de relevancia biológica.

4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Empleando la estrategia combinatoria anteriormente descrita hemos analizado la reactividad de la kanamicina B complejada a tres receptores de ARN para los cuales existe información estructural de alta resolución: el sitio-A procariota,^{10, 14} la hélice 69^{17, 134} (fragmento localizado en la subunidad menor del ribosoma) y un aptámero de tobramicina.¹³⁵

Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes epígrafes:

- Nuestro protocolo experimental permite, de un modo sencillo, determinar la reactividad relativa de cada una de las posiciones $-NH_2$ del ligando en el estado asociado a los diferentes receptores (figura 3 del anexo 4).
- Los fragmentos de ARN alteran la reactividad del antibiótico de una forma distintiva que refleja las topologías de los diferentes centros de reconocimiento. Más concretamente, la kanamicina B complejada con el aptámero de tobramicina se modifica de forma preferente en posición 6-I. Por el contrario, para el complejo kanamicina B/hélice 69 la posición más reactiva es 2-I. Finalmente, el antibiótico asociado al sitio-A experimenta una modificación preferente en posiciones 6-I y 3-III (figura 3 del anexo 4).
- Con objeto de racionalizar estos resultados se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de los diferentes complejos y se calcularon las accesibilidades promedio de cada una de las posiciones del antibiótico a lo largo de la trayectoria. Las reactividades relativas derivadas para el complejo kanamicina B/aptámero mostraron una excelente correlación con las accesibilidades teóricas y, por lo tanto, parecen reflejar el grado de exposición de cada grupo $-NH_2$ en el estado asociado. Por el contrario, en los demás complejos, reactividades y accesibilidades mostraron una pobre correlación, indicando la existencia de condicionantes adicionales (figura 4 del anexo 4).
- Como siguiente paso, se evaluó el efecto que la mono-N-metilación de kanamicina B en sus distintas posiciones tiene sobre la asociación a los diferentes receptores. Así, hemos demostrado que, bajo las condiciones

experimentales adecuadas (pH 7.7, relación aminoglicósido/aldehído 10:1), la kanamicina B reacciona con cantidades sub-estequiométricas de formaldehído marcado en ^{13}C para dar cinco derivados mono-N-metilados en proporciones similares. Estos pueden ser separados como mezcla, generando una pequeña librería. La afinidad relativa de sus componentes por los diferentes receptores de ARN se evaluó mediante valoraciones monitorizadas por RMN. Los resultados obtenidos demuestran que la *N-metilación de la posición 3-III del antibiótico incrementa la afinidad del ligando por el sitio-A*. Este resultado explica la modificación preferente de dicha posición en el contexto del complejo. Por el contrario, la modificación de la posición 6-I no parece tener un efecto beneficioso sobre la asociación. De un modo similar, la N-metilación en posición 2-I no incrementa la afinidad del ligando por la hélice 69 (figura 5 del anexo 4). Curiosamente, en ambos casos la modificación se sitúa en un entorno altamente dinámico de los complejos. Así, la posición 6-I del ligando está en contacto con los residuos A1492/A1493 del sitio A, en cuyo equilibrio dentro/fuera de la hélice está en el origen de la actividad antibiótica. Dicho desplazamiento puede, dependiendo de su extensión, incrementar la exposición del amino 6-I, explicando su elevada reactividad. Igualmente, la posición 2-I de kanamicina se sitúa en las proximidades del par de bases terminal de la hélice 69, una región altamente dinámica y posiblemente afectada por un cierto deshilachamiento (“frying ends”).

En resumen, los resultados obtenidos indican que las reactividades exhibidas por las diferentes posiciones del antibiótico en complejo con ARN pueden proporcionar información de diversos tipos. En casos favorables (posición 3-III de kanamicina B en complejo con el sitio A) son indicativas del efecto estabilizante que la modificación tiene sobre el complejo. Adicionalmente, pueden reflejar la accesibilidad de cada posición reactiva en el estado asociado (tal es el caso del complejo kanamicina B/aptámero aquí estudiado). Finalmente, pueden, en ocasiones, poner de manifiesto sutiles procesos dinámicos.

ANEXO 4

Chemical Interrogation of Drug/RNA Complexes: From Chemical Reactivity to Drug Design**

Ester Jiménez-Moreno, Irene Gómez-Pinto, Francisco Corzana, Andrés G. Santana, Julia Revuelta, Agatha Bastida, Jesus Jiménez-Barbero, Carlos González, and Juan Luis Asensio*

Medicinal chemistry efforts oriented to the optimization of bioactive compounds have traditionally relied on the synthesis and evaluation of a large number of structurally related chemical derivatives. This procedure, which is in most cases expensive and time consuming, represents a major challenge for complex molecules containing numerous equivalent reactive positions. Unfortunately, such equivalent positions are not unusual among natural ligands, such as carbohydrates or polyamine RNA binders. Indeed, aminoglycosides (a family of antibiotic RNA-binding oligosaccharides) represent a typical example of this situation.

In a recent contribution, Herrmann and co-workers have proposed the use of RNA aptamers as protecting groups for the selective modification of these complex chemical structures.^[1] Inspired by the principles of dynamic combinatorial chemistry,^[2] and employing a fundamentally different approach, we hypothesized that the chemical reactivity of the aminoglycosides complexed with their target RNAs could provide valuable guidelines for the design of a reduced number of binders. Thus, the synthesis and evaluation process of the potential drug derivatives would be highly facilitated. To explore the scope and limitations of this concept, we have focused on a fairly simple chemical modification; the *N*-methylation of kanamycin B by reductive amination with formaldehyde (Figure 1 a). This choice is fully justified by the current knowledge of RNA ligands.^[3] In fact, these molecules frequently include several ammonium groups, that, in many occasions, are mono- or dialkylated, typically with methyl

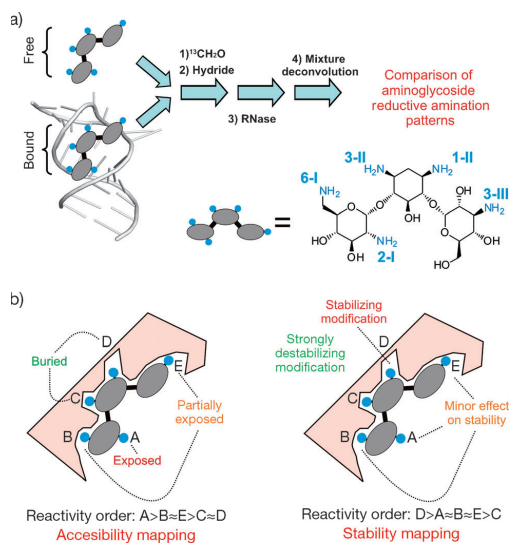


Figure 1. a) Schematic representation of the proposed method. The numbering of the different kanamycin B ammonium groups is shown. b) Information that can potentially be discovered by these experiments. More complex situations are also conceivable (see the main text).

groups, as observed in aminoglycoside antibiotics and other recently described RNA binders. According to recent studies, this structural feature might be of general importance for the molecular recognition of nucleic acids (Supporting Information, Figure S1).^[4,5]

In particular, the proposed method was based on a detailed comparison of the drug *N*-methylation patterns obtained from reductive amination reactions performed with both the free and RNA-bound drug (Figure 1 a). We hypothesized that, in the most simple case, the observed changes could be kinetically dictated by the relative accessibility of the reactive amino groups within the complex, thus providing a simple way to chemically map the exposed or buried location of these key functions (left panel in Figure 1 b). Alternatively, RNA might also alter the equilibrium populations of the different imine/enamine species leading to the enrichment of the most stable complexes (right panel in Figure 1 b). Obviously, more complex situations could be conceived in which the reaction mixture would obey both, kinetic and thermodynamic constraints.

[*] E. Jiménez-Moreno, Dr. A. G. Santana, Dr. J. Revuelta, Dr. A. Bastida, Dr. J. L. Asensio
Departamento de Química Bio-orgánica,
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid (Spain)
E-mail: juanluis.asensio@csic.es

I. Gómez-Pinto, Dr. C. González
Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC), Madrid (Spain)

Dr. F. Corzana
Departamento de Química, Universidad de la Rioja (Spain)

Dr. J. Jiménez-Barbero
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid (Spain)

[**] This investigation was supported by research grants from the Spanish "Plan Nacional" (MCYT) CTQ2010-19073, CTQ2009-08536, and CTQ2010-21567-C02-02 and the Comunidad de Madrid (Grant S2009/PPQ-1752).

Supporting information for this article (experimental details) is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201209434>.

Supporting Information

© Wiley-VCH 2013

69451 Weinheim, Germany

Chemical Interrogation of Drug/RNA Complexes: From Chemical Reactivity to Drug Design**

*Ester Jiménez-Moreno, Irene Gómez-Pinto, Francisco Corzana, Andrés G. Santana, Julia Revuelta, Agatha Bastida, Jesus Jiménez-Barbero, Carlos González, and Juan Luis Asensio**

anie_201209434_sm_miscellaneous_information.pdf

CONTENTS:

Experimental Section

Supplementary References

Figures S1 to S6

Experimental Section

The 19-mer Helix-69 model was obtained in its polyacrylamide gel electrophoresis- (PAGE-) purified sodium salt form from Dharmacon Research, Inc (Lafayette, CO). The 27-mer A-site model and the tobramycin aptamer were prepared by in vitro transcription. Finally, ^{13}C -labelled formaldehyde was purchased from Sigma-Aldrich.

Reductive amination reactions on the free and complexed kanamycin-B were performed in D_2O (10 mM phosphate, 100 mM NaCl, 30 μM ^{13}C -AcONa, 1 mM ^{12}C -AcOH and pH 5.0). For the complexed state, lyophilized RNA samples were dissolved in 500 μl buffer (pH 6.0) to a final concentration of 300-350 μM and renatured (by heating to 85° C for 1 min and then slowly cooling back to 20° C over a 2 h period). Then, kanamycin-B was added from stock solutions to a final concentration of 200 μM . According to the literature, binding affinities of the drug for the three receptors is in the 10^6 - 10^8 M^{-1} range.^[6,8,S1] Therefore, under the employed experimental conditions, the fraction of kanamycin-B bound to RNA was, in all cases, larger than 95%. After a 5

minutes equilibration period, the buffer pH was adjusted to 5.0 and ^{13}C -labelled formaldehyde was added from stock solutions to a final concentration of 150-200 μM . Samples were left to equilibrate for 1 h and we added then 4 mM sodium cyanoborohydride. Final reaction volumes were 550 μL . The aminoglycoside reductive amination was allowed to proceed for 6 days. After this period, the sample pH was adjusted to 6 and the RNA was digested with RNase-B (1 μM). The reductive amination reaction was then completed to produce a single per-methylated kanamycin-B derivative, by adding 20 mM ^{12}C -formaldehyde/25 mM sodium cyanoborohydride. Simultaneous experiments were performed in the absence of RNA for the reference samples, following an identical protocol. The fraction of ^{13}C - incorporated at each – NMe_2 position of the resulting permethyl kanamycin-B samples was evaluated by means of NMR HSQC experiments acquired at pH 10.0.

Experimental structures of the Aptamer/tobramycin (pdb code: 2QBC), Helix-69/gentamycin (pdb code: 1TOB) and A-site/gentamycin (pdb code: 2ET3) complexes were employed as starting coordinates for molecular dynamic (MD) simulations. After replacing these ligands with the closely related kanamycin-B, 5 ns MD trajectories were collected following a protocol identical to that previously described.^[S2] Solvent accessible surfaces for the reactive $-\text{NH}_3^+$ groups were obtained from representative ensembles employing the program ASA.^[S3]

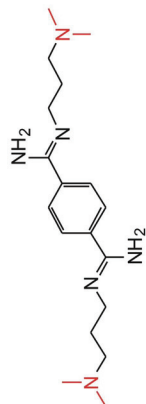
Tailored kanamycin-B mixtures were prepared by performing reductive amination reactions with 100 mM kanamycin-B, 5 mM ^{13}C -labelled formaldehyde, and 20 mM sodium cyanoborohydride at pH 7.8. Extensive fractionation of the reaction crude by flash chromatography on silica-gel rendered a mixture of the five mono- N -methyl compounds in similar proportion, as judged by mass spectrometry and NMR, respectively (Figure S5).

Supplementary References

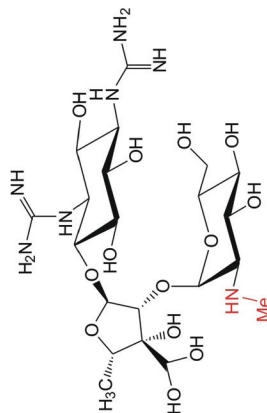
- [S1] J. Revuelta, T. Vacas, F. Corzana, C. Gonzalez, A. Bastida, J. L. Asensio, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2986-2991.
- [S2] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864–7871.
- [S3] A. Shrake, J. A. Rupley. *J. Mol. Biol.* **1973**, *79*, 351- 371.

Figure S1.- Schematic representation of some of the potential benefits promoted by *N*-methylation in RNA-binding polycationic molecules. Some examples of RNA binders that incorporate these functions together with their RNA targets are shown.

HIV-1 Frameshift RNA



16S rRNA



HCV IRES RNA

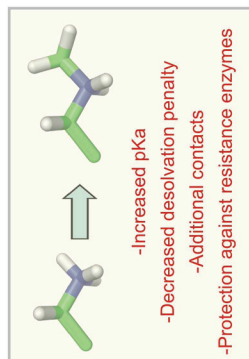
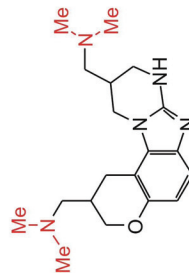


Figure S2.- Relative reactivity of the different aminoglycoside NH₂ groups as a function of pH. Kanamycin-B (1 mM) was mixed with 1 equivalent of ¹³C-labelled formaldehyde in phosphate buffer at pH values 5, 6, 7, 8 and 9. The resulting solutions were left to equilibrate for 1 hour and then 10 equivalents of sodium cyanoborohydride were added. After 12 hours, the reaction was completed by adding 20 equivalents of ¹²C-formaldehyde and 20 equivalents of hydride. The ¹³C fraction incorporated by each ligand position was evaluated by HSQC experiments employing ¹³C-Sodium acetate (in grey) as internal reference for the integrals. pKa values or the different drug amino groups are shown above.

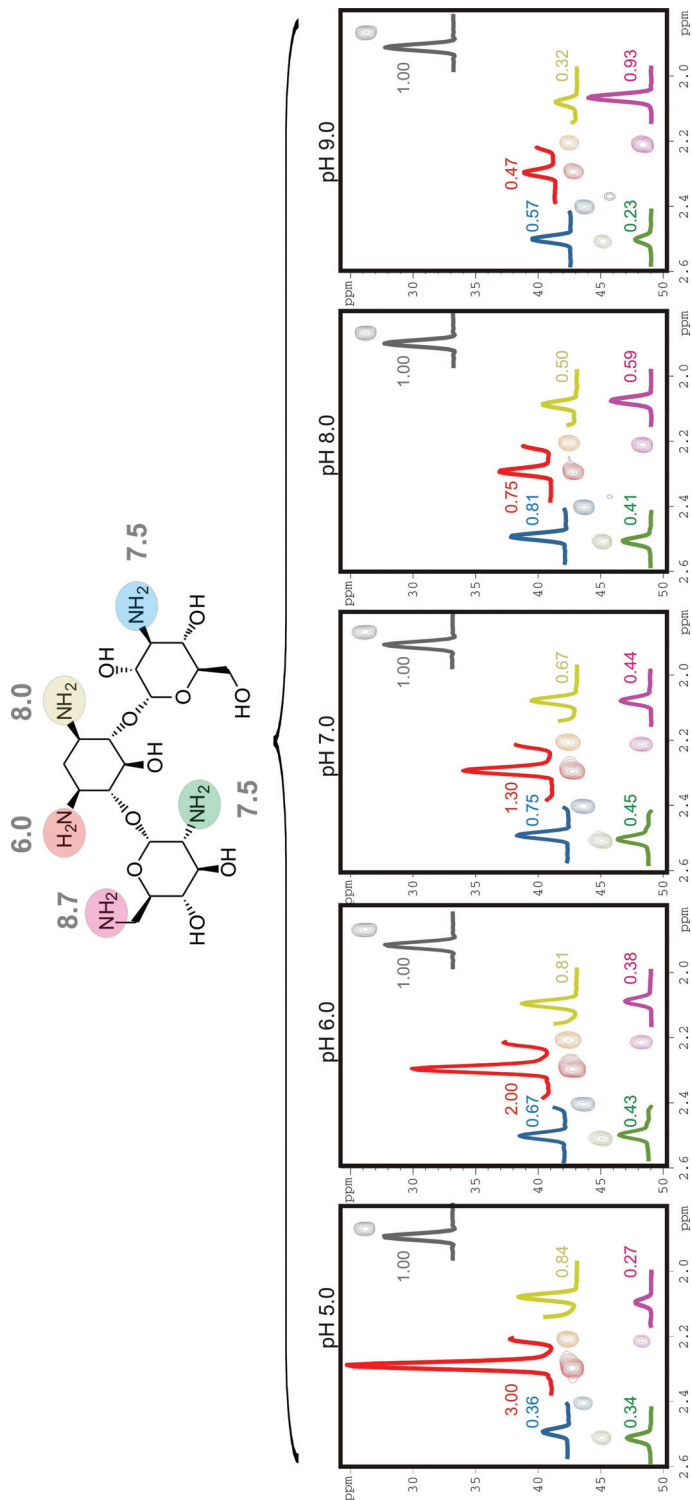


Figure S3.- The data shown in Figure S2 indicates that the reactivity of the different amino groups is strongly dependent on its degree of protonation (that is on its pKa and the buffer pH conditions). Previous studies have shown that aminoglycoside binding to RNA, at neutral and basic pH values, is coupled to the protonation of the amino groups. In order to reduce this potentially interfering effect, reductive amination reactions with the different complexes were performed at pH 5.0. Thus, the protonation state of the drug in the free and receptor-bound state could be assumed to be roughly constant.

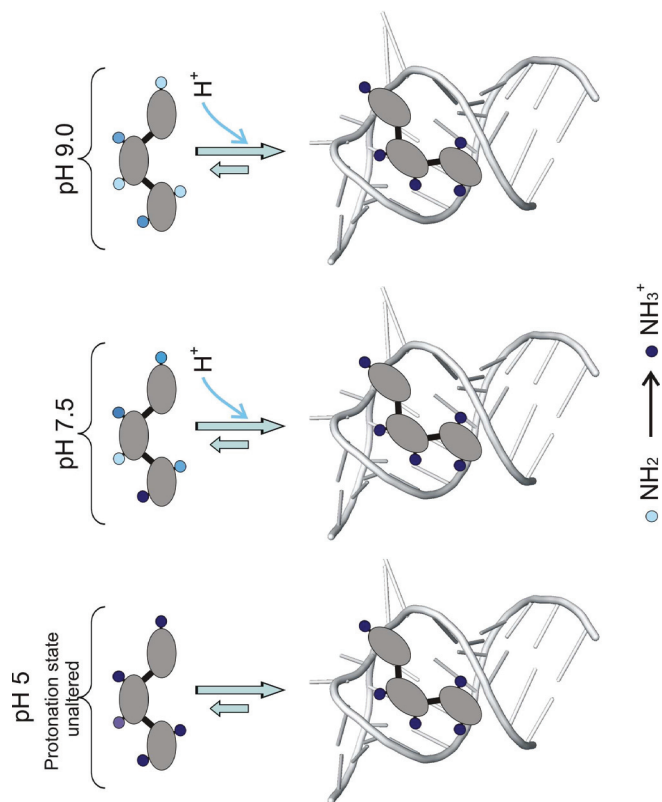


Figure S4.- a) Reductive amination reactions performed with ^{13}C -formaldehyde (200 μM), kanamycin-B (200 μM) and Helix 69 (300 μM) under three different experimental conditions. The resulting mixtures were analyzed employing the proposed NMR-based protocol. Upper panels show HSQC data obtained from the complexes, after enzymatic digestion of the RNA and isotopic dilution with ^{12}C -formaldehyde/cyanoborohydride. Middle panels represent the reference experiments obtained in the absence of RNA under identical experimental conditions. In order to highlight changes in intensity, we have included cross sections of the different peaks. These are coloured according to the code shown on the left. Lower panels represent difference HSQC data obtained by subtracting the previous two experiments. Amplification/reduction factors for each signal are indicated by *. This signal must be cancelled out in the difference HSQC data shown at the bottom. b) Identical experiments were conducted with a mutated version of Helix-69. In this particular case, preferred *N*-methylation at position 2-I (represented in green) was not observed.

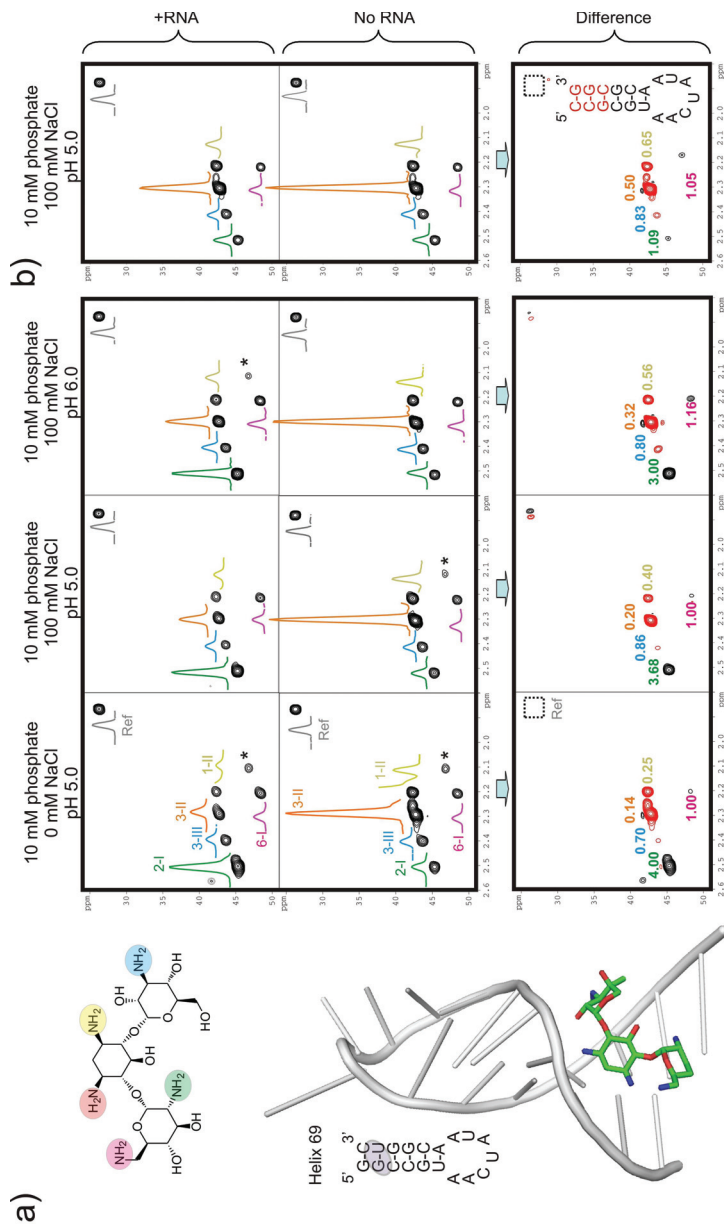


Figure S5.- In order to get a tailored mixture of mono- *N*-methyl kanamycin-B derivatives, we performed the reductive amination reactions with ^{13}C -labelled formaldehyde, employing 20-fold excess of the aminoglycoside (5 mM, formaldehyde/100 mM kanamycin-B, pH 7.8). Under these experimental conditions, the incorporation of two or more methyl groups to the aminoglycoside is seriously limited. Extensive fractionation of the reaction crude by flash chromatography on silica-gel rendered a mixture of the five mono- *N*-methyl compounds in similar proportion, as judged by mass spectrometry and NMR, respectively, together with a minor proportion of the unmodified drug. HSQC experiments acquired with three different fractions of the chromatography are shown.

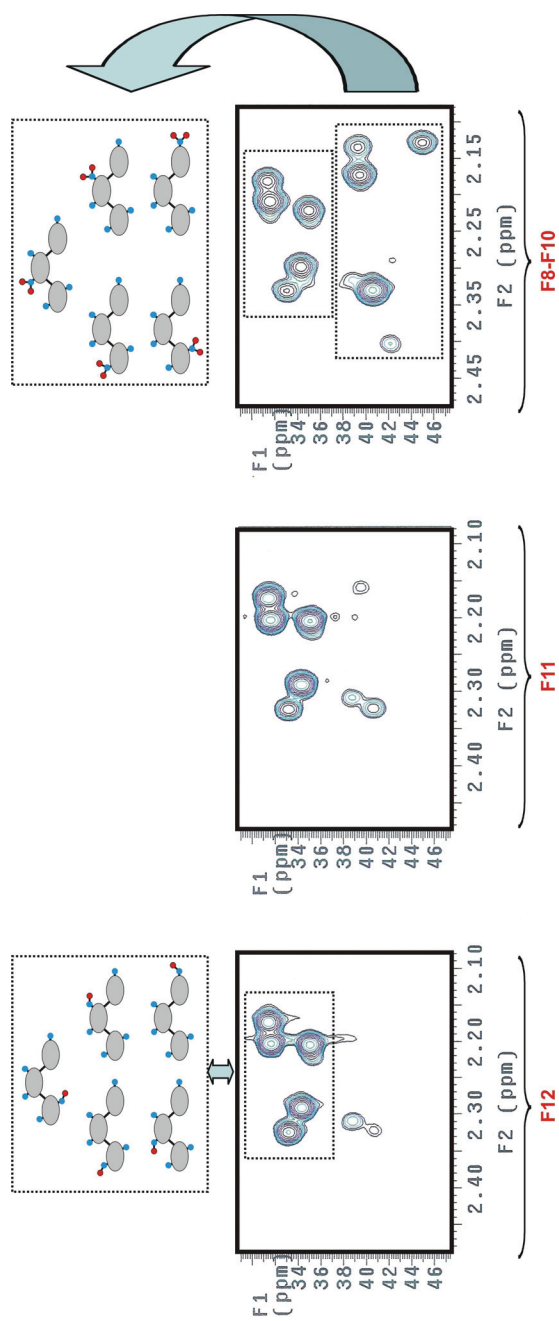
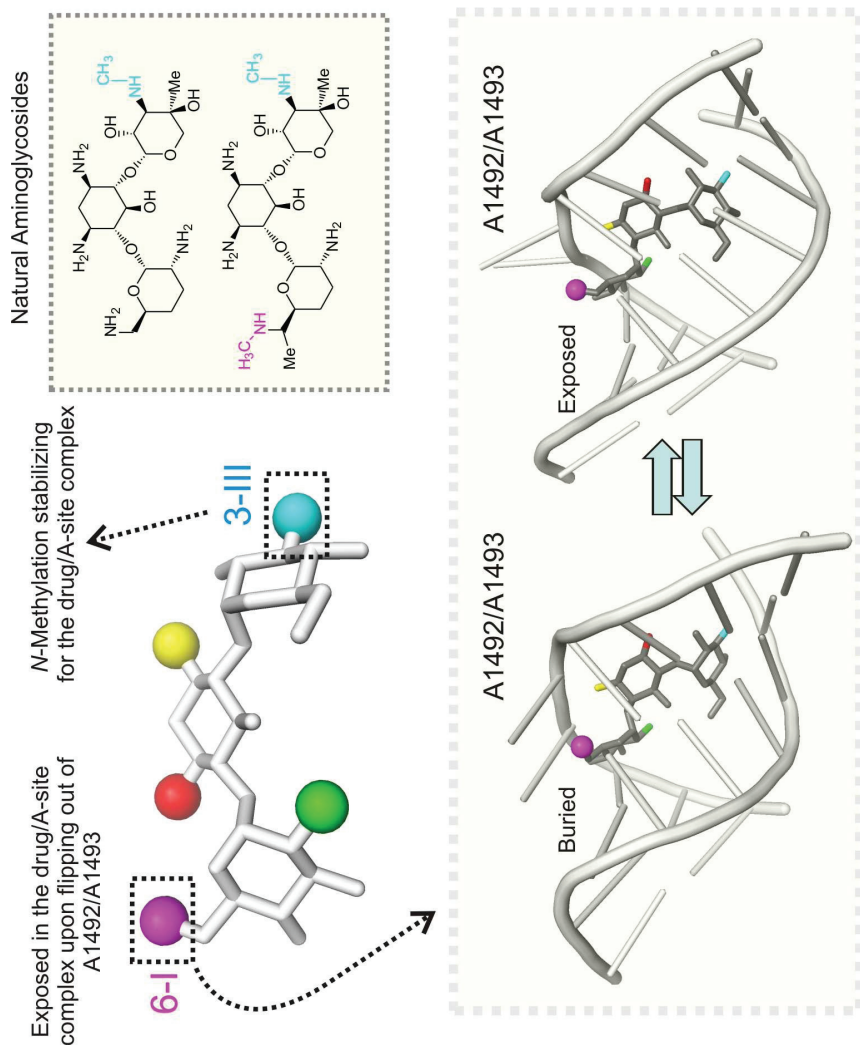


Figure S6.- Most reactive $-\text{NH}_3^+$ groups of kanamycin-B when bound to the A-site are highlighted with a dotted box on the top-left panel. Interestingly, both kanamycin-B sites constitute the most common *N*-methylation positions found in natural aminoglycosides (Top-Right panel). The reasons behind this peculiar behaviour are outlined (see the main text).



CAPÍTULO 5

Conclusiones

5.1 ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES CH/ π COMO ELEMENTO CLAVE EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE AMINOGLICÓSIDOS

a) Hemos diseñado y optimizado una estrategia versátil y sencilla que permite el análisis de interacciones CH/ π en medios acuosos empleando conceptos de química combinatoria dinámica. Esta novedosa aproximación es extremadamente sensible permitiéndonos detectar diferencias de estabilidad entre complejos inferiores a 0.1 kcal/mol.

b) Se ha realizado un análisis exhaustivo de las interacciones CH/ π en agua que comprende medidas precisas de estabilidad para más de un centenar complejos estructuralmente diversos.

c) Las energías de interacción determinadas han permitido establecer las principales relaciones estructura/estabilidad que modulan la formación de estos complejos en agua.

d) Hemos demostrado de forma concluyente y cuantificado con precisión el efecto estabilizante derivado de la polarización de los enlaces CH sobre los complejos CH/ π en agua.

e) Se ha diseccionado la influencia relativa que las diferentes contribuciones tienen en la formación de estos contactos. Nuestros resultados indican que la contribución electrostática es la principal encargada de modular la estabilidad de los complejos CH/ π en medios fisiológicos y, por sí misma, permite inferir la fortaleza relativa los mismos. Adicionalmente, nuestros resultados permiten concluir que las contribuciones solvofóbicas contribuyen notablemente a la estabilidad de los enlaces CH/ π .

5.2 DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA EL DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LIGANDOS POLI-AMINADOS DE ARN

a) Se ha puesto a punto una aproximación de química combinatoria dinámica para el diseño de ligandos de ARN optimizados basada en “interrogar” los complejos aminoglicósido/ARN con formaldehído en reacciones de aminación reductora.

b) Se ha desarrollado un método de deconvolución de las mezclas generadas basada en marcaje isotópico y RMN.

c) Dicha aproximación se ha aplicado con éxito al estudio del reconocimiento molecular de kanamicina B y sus derivados N-metilados por tres receptores de ARN diferentes.

d) Se ha demostrado que la reactividad del ligando en su estado asociado a ARN puede proporcionar información valiosa de carácter cinético, termodinámico o dinámico. Así, en los casos más sencillos, la reactividad de las diferentes posiciones del aminoglicósido puede reflejar su accesibilidad en el complejo. Por otra parte, puede poner de manifiesto la existencia de fluctuaciones dinámicas concretas en el entorno del centro de reconocimiento. Finalmente, en los casos más favorables, la modificación preferente de alguna posición en la forma complejada puede ser indicativa del efecto estabilizante de dicha modificación sobre el complejo.

CAPÍTULO 6

Bibliografía

1. Schatz, A.; Bugle, E.; Waksman, S. A., *Exp. Biol. Med.* **1944**, *55* (1), 66-69.
2. Schatz, A.; Waksman, S. A., *Exp. Biol. Med.* **1944**, *57* (2), 244-248.
3. Waksman, S. A.; Lechevalier, H. A., *Science* **1949**, *109* (2830), 305-307.
4. Umezawa, H.; Ueda, M.; Maeda, K.; Yagishita, K.; Kondo, S.; Okami, Y.; Utahara, R.; Osato, Y.; Nitta, K.; Takeuchi, T., *J. Antibiot. (Tokyo)* **1957**, *10* (5), 181-8.
5. Weinstein, M. J.; Luedemann, G. M.; Oden, E. M.; Wagman, G. H.; Rosselet, J. P.; Marquez, J. A.; Coniglio, C. T.; Charney, W.; Herzog, H. L.; Black, J., *J. Med. Chem.* **1963**, *6* (4), 463-464.
6. Higgins, C. E.; Kastner, R. E., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**, *7*, 324-31.
7. Kawaguchi, H.; Naito, T.; Nakagawa, S.; Fujisawa, K. I., *The Journal of Antibiotics* **1972**, *25* (12), 695-708.
8. Umezawa, S.; Umezawa, H.; Okazaki, Y.; Tsughiya, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1972**, *45* (12), 3624-3628.
9. Fourmy, D.; Recht, M. I.; Blanchard, S. C.; Puglisi, J. D., *Science* **1996**, *274* (5291), 1367-1371.
10. Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Puglisi, J. D., *The EMBO Journal* **1998**, *17* (22), 6437-6448.
11. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V., *Nature* **2000**, *407* (6802), 340-348.
12. Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Kerrigan, J. E.; Pilch, D. S., *J. Mol. Biol.* **2003**, *326* (5), 1373-1387.
13. Walter, F.; Vicens, Q.; Westhof, E., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3* (6), 694-704.
14. François, B.; Russell, R. J. M.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E., *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (17), 5677-5690.
15. Davies, J.; Gilbert, W.; Gorini, L., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1964**, *51* (5), 883-890.

Capítulo 6

16. (a) Jesús Cabañas, M.; Vázquez, D.; Modolell, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *83* (3), 991-997; (b) Perzynski, S.; Cannon, M.; Cundliffe, E.; Chahwala, S. B.; Davies, J., *Eur. J. Biochem.* **1979**, *99* (3), 623-628.
17. Borovinskaya, M. A.; Pai, R. D.; Zhang, W.; Schuwirth, B. S.; Holton, J. M.; Hirokawa, G.; Kaji, H.; Kaji, A.; Cate, J. H. D., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14* (8), 727-732.
18. Moazed, D.; Noller, H. F., *Nature* **1987**, *327* (6121), 389-394.
19. Fourmy, D.; Yoshizawa, S.; Puglisi, J. D., *J. Mol. Biol.* **1998**, *277* (2), 333-345.
20. Ogle, J. M.; Brodersen, D. E.; Clemons, W. M.; Tarry, M. J.; Carter, A. P.; Ramakrishnan, V., *Science* **2001**, *292* (5518), 897-902.
21. (a) Ogle, J. M.; Murphy Iv, F. V.; Tarry, M. J.; Ramakrishnan, V., *Cell* **2002**, *111* (5), 721-732; (b) Schmeing, T. M.; Ramakrishnan, V., *Nature* **2009**, *461* (7268), 1234-1242.
22. Pape, T.; Wintermeyer, W.; Rodnina, M. V., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2000**, *7* (2), 104-107.
23. Han, Q.; Zhao, Q.; Fish, S.; Simonsen, K. B.; Vourloumis, D.; Froelich, J. M.; Wall, D.; Hermann, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (18), 2694-2700.
24. Atkinson, J.; Martin, R., *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (8), 1327-1334.
25. (a) Howard, M.; Frizzell, R. A.; Bedwell, D. M., *Nat. Med.* **1996**, *2* (4), 467-469; (b) Bedwell, D. M.; Kaenjak, A.; Benos, D. J.; Bebok, Z.; Bubien, J. K.; Hong, J.; Tousson, A.; Clancy, J. P.; Sorscher, E. J., *Nat. Med.* **1997**, *3* (11), 1280-1284.
26. (a) Keeling, K. M.; Bedwell, D. M., *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2011**, *2* (6), 837-852; (b) Shalev, M.; Baasov, T., *MedChemComm* **2014**, *5* (8), 1092-1105; (c) Zingman, L. V.; Park, S.; Olson, T. M.; Alekseev, A. E.; Terzic, A., *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *81* (1), 99-103.
27. (a) Manuvakhova, M.; Keeling, K.; Bedwell, D. M., *RNA* **2000**, *6* (7), 1044-1055; (b) Howard, M. T.; Shirts, B. H.; Petros, L. M.; Flanigan, K. M.; Gesteland, R. F.; Atkins, J. F., *Ann. Neurol.* **2000**, *48* (2), 164-169; (c) Floquet, C.; Hatin, I.; Rousset, J.-P.; Bidou, L., *PLoS Genet.* **2012**, *8* (3), e1002608.

28. Shalev, M.; Kondo, J.; Kopelyanskiy, D.; Jaffe, C. L.; Adir, N.; Baasov, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (33), 13333-13338.
29. Laurberg, M.; Asahara, H.; Korostelev, A.; Zhu, J.; Trakhanov, S.; Noller, H. F., *Nature* **2008**, *454* (7206), 852-857.
30. Keeling, K. M.; Brooks, D. A.; Hopwood, J. J.; Li, P.; Thompson, J. N.; Bedwell, D. M., *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10* (3), 291-299.
31. Singh, G.; Rebbapragada, I.; Lykke-Andersen, J., *PLoS Biol.* **2008**, *6* (4), e111.
32. Salas-Marco, J.; Bedwell, D. M., *J. Mol. Biol.* **2005**, *348* (4), 801-815.
33. Asensio, J. L.; Hidalgo, A.; Cuesta, I.; González, C.; Cañada, J.; Vicent, C.; Chiara, J. L.; Cuevas, G.; Jiménez-Barbero, J., *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8* (22), 5228-5240.
34. Corzana, F.; Cuesta, I.; Freire, F.; Revuelta, J.; Torrado, M.; Bastida, A.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (10), 2849-2865.
35. (a) Navarre, N.; Amiot, N.; van Oijem, A.; Imberty, A.; Poveda, A.; Jiménez-Barbero, J.; Cooper, A.; Nutley, M. A.; Boons, G.-J., *Chemistry – A European Journal* **1999**, *5* (8), 2281-2294; (b) Bastida, A.; Hidalgo, A.; Chiara, J. L.; Torrado, M.; Corzana, F.; Pérez-Cañadillas, J. M.; Groves, P.; Garcia-Junceda, E.; Gonzalez, C.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (1), 100-116; (c) Blount, K. F.; Zhao, F.; Hermann, T.; Tor, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (27), 9818-9829; (d) Asensio, J. L.; Hidalgo, A.; Bastida, A.; Torrado, M.; Corzana, F.; Chiara, J. L.; García-Junceda, E.; Cañada, J.; Jiménez-Barbero, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (23), 8278-8279.
36. (a) Asensio, J.; Bastida, A.; Jiménez-Barbero, J., Studies on the Conformational Features of Neomycin-B and its Molecular Recognition by RNA and Bacterial Defense Proteins. In *Bioactive Conformation II*, Peters, T., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2008; Vol. 273, pp 117-138; (b) Vaiana, A. C.; Sanbonmatsu, K. Y., *J. Mol. Biol.* **2009**, *386* (3), 648-661.
37. Kurisaki, I.; Takayanagi, M.; Nagaoka, M., *Biochemistry* **2014**, *53* (22), 3646-3657.
38. (a) Wang, H.; Tor, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (37), 8734-8735; (b) Hermann, T.; Westhof, E., *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (7), 1250-1261.

39. (a) Jin, E.; Katritch, V.; Olson, W. K.; Kharatisvili, M.; Abagyan, R.; Pilch, D. S., *J. Mol. Biol.* **2000**, *298* (1), 95-110; (b) Kaul, M.; Pilch, D. S., *Biochemistry* **2002**, *41* (24), 7695-7706.
40. Freire, F.; Cuesta, I.; Corzana, F.; Revuelta, J.; Gonzalez, C.; Hricovini, M.; Bastida, A.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L., *Chem. Commun.* **2007**, (2), 174-176.
41. Hermann, T.; Westhof, E., *J. Mol. Biol.* **1998**, *276* (5), 903-912.
42. Vicens, Q.; Westhof, E., *Structure* **2001**, *9* (8), 647-658.
43. (a) Wildberger, P.; Luley-Goedl, C.; Nidetzky, B., *FEBS Lett.* **2011**, *585* (3), 499-504; (b) Martin-Santamaria, S.; Andre, S.; Buzamet, E.; Caraballo, R.; Fernandez-Cureses, G.; Morando, M.; Ribeiro, J. P.; Ramirez-Gualito, K.; de Pascual-Teresa, B.; Canada, F. J.; Menendez, M.; Ramstrom, O.; Jimenez-Barbero, J.; Solis, D.; Gabius, H.-J., *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (15), 5445-5455; (c) Lak, P.; Makeneni, S.; Woods, R. J.; Lowary, T. L., *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21* (3), 1138-1148; (d) Bernardi, A.; Arosio, D.; Potenza, D.; Sánchez-Medina, I.; Mari, S.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J., *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (18), 4395-4406; (e) Fantini, J.; Yahi, N., *J. Mol. Biol.* **2011**, *408* (4), 654-669.
44. (a) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (11), 1210-1250; (b) Nishio, M., *PCCP* **2011**, *13* (31), 13873-13900; (c) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Fantini, J.; Weiss, M. S.; Chakrabarti, P., *PCCP* **2014**, *16* (25), 12648-12683; (d) Tsuzuki, S.; Fujii, A., *PCCP* **2008**, *10* (19), 2584-2594; (e) Fujii, A.; Shibasaki, K.; Kazama, T.; Itaya, R.; Mikami, N.; Tsuzuki, S., *PCCP* **2008**, *10* (19), 2836-2843; (f) Asensio, J. L.; Ardá, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J., *Acc. Chem. Res.* **2012**, *46* (4), 946-954; (g) Vacas, T.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; González, C.; Gómez, A. M.; Bastida, A.; Revuelta, J.; Asensio, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (34), 12074-12090; (h) Fernández-Alonso, M. d. C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7379-7386; (i) Laughrey, Z. R.; Kiehna, S. E.; Riemen, A. J.; Waters, M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14625-14633.
45. Yang, L.; Adam, C.; Nichol, G. S.; Cockroft, S. L., *Nat. Chem.* **2013**, *5* (12), 1006-1010.
46. (a) Bhayana, B.; Wilcox, C. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (36), 6833-6836; (b) Klein, E.; Ferrand, Y.; Barwell, N. P.; Davis, A. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (14), 2693-2696.

47. Ke, C.; Destecroix, H.; Crump, M. P.; Davis, A. P., *Nat. Chem.* **2012**, *4* (9), 718-723.
48. (a) Sujatha, M. S.; Sasidhar, Y. U.; Balaji, P. V., *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **2004**, *13* (9), 2502-2514; (b) Vandenbussche, S.; Díaz, D.; Fernández-Alonso, M. C.; Pan, W.; Vincent, S. P.; Cuevas, G.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bartik, K., *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14* (25), 7570-7578.
49. Chávez, M. I.; Andreu, C.; Vidal, P.; Aboitiz, N.; Freire, F.; Groves, P.; Asensio, J. L.; Asensio, G.; Muraki, M.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J., *Chemistry – A European Journal* **2005**, *11* (23), 7060-7074.
50. Barwell, N. P.; Davis, A. P., *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (16), 6548-6557.
51. (a) Salonen, L. M.; Bucher, C.; Banner, D. W.; Haap, W.; Mary, J.-L.; Benz, J.; Kuster, O.; Seiler, P.; Schweizer, W. B.; Diederich, F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (4), 811-814; (b) Hughes, R. M.; Benshoff, M. L.; Waters, M. L., *Chemistry – A European Journal* **2007**, *13* (20), 5753-5764.
52. (a) Freisz, S.; Lang, K.; Micura, R.; Dumas, P.; Ennifar, E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (22), 4110-4113; (b) Maurice, F.; Broutin, I.; Podglajen, I.; Benas, P.; Collatz, E.; Dardel, F., *EMBO Reports* **2008**, *9* (4), 344-349.
53. Schroeder, R.; Waldsich, C.; Wank, H., *The EMBO Journal* **2000**, *19* (1), 1-9.
54. Vicens, Q.; Westhof, E., *Chem. Biol.* **2002**, *9* (6), 747-755.
55. Fourmy, D.; Recht, M. I.; Puglisi, J. D., *J. Mol. Biol.* **1998**, *277* (2), 347-362.
56. Vicens, Q.; Westhof, E., *Biopolymers* **2003**, *70* (1), 42-57.
57. Mei, H.-Y.; Galan, A. A.; Halim, N. S.; Mack, D. P.; Moreland, D. W.; Sanders, K. B.; Hoa, N. T.; Czarnik, A. W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (22), 2755-2760.
58. Zapp, M. L.; Stern, S.; Green, M. R., *Cell* **1993**, *74* (6), 969-978.
59. Ennifar, E.; Paillart, J.-C.; Marquet, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Dumas, P.; Walter, P., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (4), 2723-2730.
60. Nekhai, S.; Jeang, K.-T., *Future Microbiol.* **2006**, *1* (4), 417-426.

Capítulo 6

61. (a) Skripkin, E.; Paillart, J. C.; Marquet, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (11), 4945-4949; (b) Ennifar, E.; Walter, P.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Dumas, P., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2001**, *8* (12), 1064-1068.
62. Elson-Schwab, L.; Tor, Y., Targeting HIV-1 RNA with Aminoglycoside Antibiotics and Their Derivatives. In *Aminoglycoside Antibiotics*, John Wiley & Sons, Inc.: 2007; pp 267-287.
63. Wang, S.; Huber, P. W.; Cui, M.; Czarnik, A. W.; Mei, H.-Y., *Biochemistry* **1998**, *37* (16), 5549-5557.
64. Faber, C.; Sticht, H.; Schweimer, K.; Rösch, P., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (27), 20660-20666.
65. Edwards, T. E.; Sigurdsson, S. T., *Biochemistry* **2002**, *41* (50), 14843-14847.
66. Cho, J.; Rando, R. R., *Biochemistry* **1999**, *38* (26), 8548-8554.
67. Lacourciere, K. A.; Stivers, J. T.; Marino, J. P., *Biochemistry* **2000**, *39* (19), 5630-5641.
68. (a) Tok, J. B. H.; Dunn, L. J.; Des Jean, R. C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (9), 1127-1131; (b) Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y., *Biochemistry* **2003**, *42* (39), 11391-11403.
69. Luedtke, N. W.; Baker, T. J.; Goodman, M.; Tor, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (48), 12035-12036.
70. (a) Ennifar, E.; Paillart, J.-C.; Bodlenner, A.; Walter, P.; Weibel, J.-M.; Aubertin, A.-M.; Pale, P.; Dumas, P.; Marquet, R., *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (8), 2328-2339; (b) Ennifar, E.; Paillart, J.-C.; Bernacchi, S.; Walter, P.; Pale, P.; Decout, J.-L.; Marquet, R.; Dumas, P., *Biochimie* **2007**, *89* (10), 1195-1203.
71. Jossinet, F.; Paillart, J. C.; Westhof, E.; Hermann, T.; Skripkin, E.; Lodmell, J. S.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B.; Marquet, R., *RNA* **1999**, *5* (9), 1222-1234.
72. Huthoff, H.; Berkhout, B., *Biochemistry* **2002**, *41* (33), 10439-10445.
73. Forster, A. C.; Symons, R. H., *Cell* **1987**, *50* (1), 9-16.
74. Stage, T. K.; Hertel, K. J.; Uhlenbeck, O. C., *RNA* **1995**, *1* (1), 95-101.

75. (a) Clouet-d'Orval, B.; Stage, T. K.; Uhlenbeck, O. C., *Biochemistry* **1995**, *34* (35), 11186-11190; (b) Wang, H.; Tor, Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (1-2), 109-111.
76. Schiemann, O.; Fritscher, J.; Kisseleva, N.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F., *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 1057-1065.
77. Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S., *Cell* **1983**, *35* (3, Part 2), 849-857.
78. (a) Mikkelsen, N. E.; Brännvall, M.; Virtanen, A.; Kirsebom, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (11), 6155-6160; (b) Tekos, A.; Tsagla, A.; Stathopoulos, C.; Drainas, D., *FEBS Lett.* **2000**, *485* (1), 71-75; (c) Kawamoto, S. A.; Sudhakar, C. G.; Hatfield, C. L.; Sun, J.; Behrman, E. J.; Gopalan, V., *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (2), 697-704.
79. von Ahsen, U.; Davies, J.; Schroeder, R., *Nature* **1991**, *353* (6342), 368-370.
80. Rogers, J.; Chang, A. H.; von Ahsen, U.; Schroeder, R.; Davies, J., *J. Mol. Biol.* **1996**, *259* (5), 916-925.
81. Earnshaw, D. J.; Gait, M. J., *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (24), 5551-5561.
82. Hoch, I.; Berens, C.; Westhof, E.; Schroeder, R., *J. Mol. Biol.* **1998**, *282* (3), 557-569.
83. Taber, H. W.; Mueller, J. P.; Miller, P. F.; Arrow, A. S., *Microbiol. Rev.* **1987**, *51* (4), 439-457.
84. Putman, M.; van Veen, H. W.; Konings, W. N., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64* (4), 672-693.
85. Yan, J.-J.; Wu, J.-J.; Ko, W.-C.; Tsai, S.-H.; Chuang, C.-L.; Wu, H.-M.; Lu, Y.-J.; Li, J.-D., *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54* (6), 1007-1012.
86. (a) Suzuki, Y.; Katsukawa, C.; Tamaru, A.; Abe, C.; Makino, M.; Mizuguchi, Y.; Taniguchi, H., *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36* (5), 1220-1225; (b) Powers, T.; Noller, H. F., *The EMBO Journal* **1991**, *10* (8), 2203-2214.
87. (a) Magnet, S.; Blanchard, J. S., *Chem. Rev.* **2004**, *105* (2), 477-498; (b) Houghton, J. L.; Green, K. D.; Chen, W.; Garneau-Tsodikova, S., *ChemBioChem* **2010**, *11* (7), 880-902.

Capítulo 6

88. Destache, C. J., *J. Pharm. Pract.* **2014**, 27 (6), 562-566.
89. Matt, T.; Ng, C. L.; Lang, K.; Sha, S.-H.; Akbergenov, R.; Shcherbakov, D.; Meyer, M.; Duscha, S.; Xie, J.; Dubbaka, S. R.; Perez-Fernandez, D.; Vasella, A.; Ramakrishnan, V.; Schacht, J.; Böttger, E. C., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, 109 (27), 10984-10989.
90. Pedersen, L. C.; Benning, M. M.; Holden, H. M., *Biochemistry* **1995**, 34 (41), 13305-13311.
91. Matsuno, T.; Yoneta, T.; Fukatsu, S.; Umemura, E., *Carbohydr. Res.* **1982**, 109 (0), 271-275.
92. Hanessian, S.; Kornienko, A.; Swayze, E. E., *Tetrahedron* **2003**, 59 (7), 995-1007.
93. Li, J.; Chen, H.-N.; Chang, H.; Wang, J.; Chang, C.-W. T., *Org. Lett.* **2005**, 7 (14), 3061-3064.
94. Haddad, J.; Vakulenko, S.; Mobashery, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (50), 11922-11923.
95. Kim, C.; Haddad, J.; Vakulenko, S. B.; Meroueh, S. O.; Wu, Y.; Yan, H.; Mobashery, S., *Biochemistry* **2004**, 43 (9), 2373-2383.
96. Roestamadji, J.; Grapsas, I.; Mobashery, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (45), 11060-11069.
97. Revuelta, J.; Vacas, T.; Torrado, M.; Corzana, F.; Gonzalez, C.; Jiménez-Barbero, J.; Menendez, M.; Bastida, A.; Asensio, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (15), 5086-5103.
98. Pokrovskaya, V.; Belakhov, V.; Hainrichson, M.; Yaron, S.; Baasov, T., *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (8), 2243-2254.
99. Hanessian, S.; Tremblay, M.; Swayze, E. E., *Tetrahedron* **2003**, 59 (7), 983-993.
100. Revuelta, J.; Vacas, T.; Corzana, F.; Gonzalez, C.; Bastida, A.; Asensio, J. L., *Chemistry – A European Journal* **2010**, 16 (10), 2986-2991.
101. Fridman, M.; Belakhov, V.; Yaron, S.; Baasov, T., *Org. Lett.* **2003**, 5 (20), 3575-3578.

102. Sucheck, S. J.; Wong, A. L.; Koeller, K. M.; Boehr, D. D.; Draker, K.-a.; Sears, P.; Wright, G. D.; Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (21), 5230-5231.
103. Tok, J. B. H.; Fenker, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (22), 2987-2991.
104. Bodlenner, A.; Alix, A.; Weibel, J.-M.; Pale, P.; Ennifar, E.; Paillart, J.-C.; Walter, P.; Marquet, R.; Dumas, P., *Org. Lett.* **2007**, *9* (22), 4415-4418.
105. Riguet, E.; Désiré, J.; Boden, O.; Ludwig, V.; Göbel, M.; Bailly, C.; Décout, J.-L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (21), 4651-4655.
106. Blount, K. F.; Tor, Y., *ChemBioChem* **2006**, *7* (10), 1612-1621.
107. Hamasaki, K.; Ueno, A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (4), 591-594.
108. Lapidot, A.; Vijayabaskar, V.; Litovchick, A.; Yu, J.; James, T. L., *FEBS Lett.* **2004**, *577* (3), 415-421.
109. Baker, T. J.; Luedtke, N. W.; Tor, Y.; Goodman, M., *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (26), 9054-9058.
110. (a) Herrmann, A., *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1899-1933; (b) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S., *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 3652-3711.
111. (a) Case, M. A.; McLendon, G. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (33), 8089-8090; (b) Cooper, H. J.; Case, M. A.; McLendon, G. L.; Marshall, A. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (18), 5331-5339.
112. Krishnan-Ghosh, Y.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S., *Chem. Commun.* **2005**, (24), 3068-3070.
113. Karan, C.; Miller, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (30), 7455-7456.
114. McNaughton, B. R.; Miller, B. L., *Org. Lett.* **2006**, *8* (9), 1803-1806.
115. (a) McNaughton, B. R.; Gareiss, P. C.; Miller, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (37), 11306-11307; (b) Gareiss, P. C.; Sobczak, K.; McNaughton, B. R.; Palde, P. B.; Thornton, C. A.; Miller, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (48), 16254-16261.
116. Ladame, S.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (35), 5736-5739.

117. Bugaut, A.; Jantos, K.; Wietor, J.-L.; Rodriguez, R.; Sanders, J. K. M.; Balasubramanian, S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (14), 2677-2680.
118. Zhang, Y.; Deshpande, A.; Xie, Z.; Natesh, R.; Acharya, K. R.; Brew, K., *Glycobiology* **2004**, *14* (12), 1295-1302.
119. Harata, K.; Muraki, M., *J. Mol. Biol.* **2000**, *297* (3), 673-681.
120. Murase, T.; Zheng, R. B.; Joe, M.; Bai, Y.; Marcus, S. L.; Lowary, T. L.; Ng, K. K. S., *J. Mol. Biol.* **2009**, *392* (2), 381-392.
121. Ling, H.; Boodhoo, A.; Hazes, B.; Cummings, M. D.; Armstrong, G. D.; Brunton, J. L.; Read, R. J., *Biochemistry* **1998**, *37* (7), 1777-1788.
122. Fantini, J.; Yahi, N., *Expert Rev. Mol. Med.* **2010**, *12*, null-null.
123. (a) Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P., *Science* **2007**, *318* (5850), 619-622; (b) Jiménez-Barbero, J.; Javier Cañada, F.; Asensio, J. L.; Aboitiz, N.; Vidal, P.; Canales, A.; Groves, P.; Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C., Hevein Domains: An Attractive Model to Study Carbohydrate-Protein Interactions at Atomic Resolution. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Derek, H., Ed. Academic Press: 2006; Vol. Volume 60, pp 303-354.
124. Plet, J.; Sandhu, A.; Sehailia, M.; Porter, M., *Synlett* **2009**, *2009* (20), 3258-3262.
125. Kocienski, P. J., *Protecting groups*. 3rd ed.. ed.; Georg thieme verlag: Stuttgart, 2005.
126. Worch, M.; Wittmann, V., *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (12), 2118-2129.
127. (a) Fedor, M. J.; Williamson, J. R., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (5), 399-412; (b) Bayne, E. H.; Allshire, R. C., *Trends Genet.* **2005**, *21* (7), 370-373.
128. (a) Thomas, J. R.; Hergenrother, P. J., *Chem. Rev.* **2008**, *108* (4), 1171-1224; (b) Hermann, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (11), 1890-1904.
129. Wang, J.; Chang, C.-W. T., Design, Chemical Synthesis, and Antibacterial Activity of Kanamycin and Neomycin Class Aminoglycoside Antibiotics. In *Aminoglycoside Antibiotics*, John Wiley & Sons, Inc.: 2007; pp 141-180.
130. Fenniri, H., *Combinatorial Chemistry: A Practical Approach*. Oxford University Press: 2000.

131. (a) Park, W. K. C.; Auer, M.; Jaksche, H.; Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (42), 10150-10155; (b) Westermann, B.; Dorner, S., *Chem. Commun.* **2005**, (16), 2116-2118.
132. Dae-Ro Ahna, J. Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *13* (4), 1177-1183.
133. (a) Disney, M. D.; Magnet, S.; Blanchard, J. S.; Seeberger, P. H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (12), 1591-1594; (b) Disney, M. D.; Seeberger, P. H., *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (13), 3308-3314; (c) Artigas, G.; Lopez-Senin, P.; Gonzalez, C.; Escaja, N.; Marchan, V., *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (2), 452-464; (d) Lopez-Senin, P.; Artigas, G.; Marchan, V., *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (46), 9243-9254; (e) López-Senín, P.; Gómez-Pinto, I.; Grandas, A.; Marchán, V., *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17* (6), 1946-1953.
134. Scheunemann, A. E.; Graham, W. D.; Vendeix, F. A. P.; Agris, P. F., *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (9), 3094-3105.
135. Jiang, L.; Suri, A. K.; Fiala, R.; Patel, D. J., *Chem. Biol.* **1997**, *4* (1), 35-50.