



**SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DE ÁCIDO
HIALURÓNICO Y SULFATO DE
CONDROITINA Y EVALUACIÓN DE SUS
INTERACCIONES CON PROTEÍNAS POR
POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA.**

Giuseppe Macchione

Sevilla, 2014



Instituto de Investigaciones
Químicas



Departamento de Química
Orgánica



cicCartuja centro de
investigaciones científicas
isla de la cartuja

Centro de Investigaciones Científicas
Isla de la Cartuja

**SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DE ÁCIDO
HIALURÓNICO Y SULFATO DE
CONDROITINA Y EVALUACIÓN DE SUS
INTERACCIONES CON PROTEÍNAS POR
POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA.**

Memoria presentada por el Licenciado Giuseppe Macchione

Para optar al grado de Doctor en Química

Sevilla, 2014

El Dr. José Luis de Paz Carrera, Científico Titular, y el Dr. Pedro Manuel Nieto Mesa, Investigador Científico del C.S.I.C.

CERTIFICAN que el presente trabajo titulado “SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO Y SULFATO DE CONDROITINA Y EVALUACIÓN DE SUS INTERACCIONES CON PROTEÍNAS POR POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA.” ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla) constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. Giuseppe Macchione para aspirar al grado de Doctor en Química.

Sevilla, Mayo 2014

Fdo.: José Luis de Paz Carrera

Fdo.: Pedro Manuel Nieto Mesa

El presente trabajo ha sido realizado por el licenciado Giuseppe Macchione con una beca FPI asociada al proyecto CTQ2009-07168 del MICINN, en el Laboratorio de Glicosistemas del Instituto de Investigaciones Químicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC - Universidad de Sevilla) bajo la dirección del Dr. José Luis de Paz Carrera y del Dr. Pedro Manuel Nieto Mesa. El trabajo ha sido tutelado por el Profesor José María Fernández-Bolaños Guzmán en el marco del Programa de Doctorado en Química.

Sevilla, Mayo 2014

Giuseppe Macchione

Dr. José Luis de PAZ CARRERA

Dr. José María FERNANDEZ-
BOLAÑOS GUZMAN

Tutor de la Tesis Doctoral

Dr. Pedro Manuel NIETO MESA

Directores de la Tesis Doctoral

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. José Luis de Paz y al Dr. Pedro Nieto, directores de esta Tesis Doctoral, por haberme dado esta valiosa oportunidad.

También me gustaría agradecer al Profesor José María Fernandez-Bolaños Guzman por haber aceptado ser Tutor de la presente Tesis Doctoral.

Gracias José Luis por haberme ayudado y guiado en un camino tan difícil. A parte de ser un óptimo director, has sido un buen compañero de trabajo y un amigo siempre disponible.

Sólo quien ha estado encerrado aquí dentro puede entender el verdadero significado de estas 300 páginas. Por esto esta Tesis la dedico a vosotrxs.

A los compañeros y las compañeras de laboratorio, de pasillo, de despacho y de mesa. Con algunas más, con otros menos, hemos compartido reacciones perfectas, columnas jodidas, miradas cómplices y a veces algunas cervezas de más. Brasil, Calabria, Madrid, Málaga, Granada, Valencia, Valladolid, El Coronil, Huelva, Canarias, Algeciras, Colombia, Francia y por supuesto Sevilla, una mezcla de culturas que ha sido explosiva. Puedo decir que he aprendido mucho de cada una!

Hay gente muy especial en esta vida, y por lo tanto en estos kilométricos pasillos.

La doctorada más competente que he conocido en mi vida, he aprendido mucho contigo! Ha conseguido casi que me gustase la química orgánica.

El Alcalde de Oviedo. En el fondo eres un romántico, solo que te cuesta... un buen compañero de cerveza!

La Calabresa medio Sevillana que me trataba como si fuese su marido!
Todavía escucho ruidos raros cuando tomo café! Ti voglio bene e mi manchi!

El brasileño que de brasileño no tiene nada, o poco, pero menos que yo...seguro! Eres un personaje como hay poco en este mundo. Un día tocaré a tu timbre *meu irmao!*

MI HERMANA, la gitana madrileña con más arte de toa la feria de Sevilla, que me ha adoptado desde el primer día que nos conocimos. Si nos hemos aguantado todos estos años entonces es amor verdadero. Gracias por todo lo que has hecho por mí: cafés con charlas, recogerme en urgencia, cocinarme, escucharme, reñirme, animarme, hacerme reir y llorar... Pero lo más grande que has hecho ha sido creer en mí! A veces te odio, la mayoría de las veces te quiero y te admiro!

Hay lugares mágicos en este mundo, y no hace falta cruzar océanos y escalar montañas para encontrarlos. Por esto...

Grazie a *Bergamo*, per avermi cresciuto.

Gracias a *Granada*, por haberme enamorado.

Gracias a *Sevilla*, por haberme adoptado.

Pero los lugares no son nada sin las personas que los viven y los rellenan!

Ai fratelli e le sorelle bergamasche, compagni e compagne di mille avventure, feste, occupazioni, manifestazioni. KSL, Onzio Lima, Eta Beta, Paci Paciana, Spartaco, Piovo Pietre e Torneo del Bae! Una serie di esperienze indimenticabili che mi hanno fatto crescere, gioire e soffrire, ma soprattutto credere e lottare per i nostri ideali!

A la Capoeira y al señor Wallas!

A lxs bergabascxs de Gasteiz, *ESKERRIK ASKO*. La fuerza y la constancia que tenéis son algo tan potente que atrae, como un enorme imán. En todos estos años con vostrxs he conseguido entender que nada y nadie puede detener un sueño: *AURRERA!* Nos vemos en el camino de la Libertad!

A lxs Mamones! No hacen falta muchas palabras para poder explicar que han sido estos diez años con todos y todas vosotras! Me habéis enamorado y me seguís enamorando todos los días! No podrán los miles de kilómetros que se han puesto entre nosotrxs romper esta unión tan fuerte. Lo estamos demostrando cada vez que nos reunimos, que sea una boda, un cumpleaños, un festival o un simple fin de semana. Gracias por haberme acompañado hasta aquí! Gracias por acompañarme hasta allí! Diez años y pico, y que este pico sea algo infinito!

A Sambiosis! A vosotrxs os debo un *OBRIGADO* con mucho ritmo. Todavía recuerdo la primera vez que os vi. Esto sí que fue un flechazo! Me acompañáis en cada ensayo y en cada bolo. *AXÉ!*

Ha sido duro pero al final me has adoptado, Sevilla! A RuaRuido y todxs lxs que han pasado por ensayos, talleres y bolos! Gracias por haber confiado en mí, gracias por haberme aguantado y gracias por todas las emociones que hemos compartido!

Al Comando Pumarejo y la Sambera, a la Gitana Madrileña, al Vecino Cabrón, al Punki de San Lucar, al del Ritmo Tropical, a la Modelo más bonita del mundo, a la Murciana JapoBrasileña, a la Avecilla, a mi Enano, a mi Surdista Favorita, a la Buha, al niño más bonito del mundo que te como la oreja, al Conguero Mayor, al Rasta, a la Kurka, a la mujer de Chocolate, al Londines, a la Argentina, a la cordobesa más salá de toa Andalucía!

A la Reyna de Grazalema! Una mezcla explosiva entre Toscana y Cádiz! No puedo...tendría que escribir otras 300 páginas! Sabemos tu y yo...

A mi madre y a mi padre, por haberme empujado a seguir mi camino año tras año y por haber confiado en mí en cada momento. Por haberme dado esta oportunidad. Por haber aceptado esta lejanía.

Che te devo di

(anónimo)

ABREVIATURAS

AIBN: Azoisobutironitrilo

AT-III: Antitrombina III

BSA: Albúmina de suero bovino

Bu₃SnH: Hidruro de tributil estaño

CD44: Cluster de diferenciación 44

CS: Sulfato de condroitina

CSA: ácido camforsulfónico

DBU: 1,8-diazabicycloundeceno

DS: Sulfato de dermatano

DTBS: di-*tert*-butilsililideno

FGF: Factor de crecimiento para fibroblastos

FGF-2: Factor de crecimiento para fibroblastos 2 (humano)

FGFR: Receptor para FGF

FP: Polarización de fluorescencia (del inglés *Fluorescence Polarization*)

F-SPE: Extracción en fase sólida fluorada (del inglés *fluorous solid-phase extraction*)

GAG: Glicosaminoglicano

GalN: Galactosamina

GalNAc: *N*-acetil-D-galactosamina

GlcA: Ácido glucurónico

GlcN: Glucosamina

GP: Glicoproteína

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HA: Ácido hialurónico

HIT: trombocitopenia inducida por heparina

HS: Sulfato de heparano

I-(CH₂)₃-C₈F₁₇: yoduro de heptadecafluoroundecilo

IdoA: Ácido idurónico

K_{D, surf}: Constante de disociación superficial

KS: Sulfato de queratano

MEC: Matriz extracelular

MP o *p*MP: *p*-metoxifenilo

NAP: 2-naftilmetilo

N-Phth: Ftalimido

N-TCP: tetracloroftalimido

PBS: buffer salino fosfato

PF4: Factor plaquetario 4

PG: Proteoglicano

Ph₂SO: Difenil sulfóxido

PLC: Cromatografía en capa preparativa (del inglés *preparative layer chromatography*)

PMB: *p*-metoxibencilo

SPR: Resonancia de plasmón de superficie (del inglés *surface plasmon resonance*)

STD: Diferencia de transferencia fase (del inglés *saturation transference difference*)

STol: Tiotolilo

TBS: *tert*-butildimetilsililo

TEMPO: 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil

Tf₂O: Anhídrido triflico

TfOH: Ácido triflico

TMSOTf: Triflato de trimetilsililo

TTBP: tri-*tert*-butilpirimidina

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1. La Matriz Extracelular (MEC).....	3
1.2. Los Proteoglicanos (PGs).....	6
1.3. Los Glicosaminoglicanos.....	10
1.3.1. SULFATO DE HEPARANO (HS) y HEPARINA (Figura 4). 11	
1.3.2. SULFATO DE CONDROITINA y SULFATO DE DERMATANO (CS y DS) (Figura 4).....	13
1.3.3. SULFATO DE QUERATANO (KS) (Figura 4).....	14
1.3.4. ÁCIDO HIALURÓNICO (HA) (Figura 4).....	15
1.4. Glicosaminoglicanos: biosíntesis y funciones biológicas.....	15
1.5. Actividades biológicas mediadas por secuencias específicas de los GAGs: papel de la síntesis química.....	18
1.5.1. Heparina.....	19
1.5.2. Sulfato de condroitina y estimulación neuronal.....	25
1.5.3. Ácido hialurónico y CD44.....	28
2. Objetivos.....	33
3. Síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.....	39
3.1. Antecedentes.....	39
3.2. Resultados y discusión.....	57
3.2.1. Primera aproximación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.....	59
3.2.1.1. Preparación del tricloroacetimidato 48 , donador de glucosamina.....	62

3.2.1.2.	Preparación del tricloroacetimidato 46 , donador de ácido glucurónico.....	64
3.2.1.3.	Síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico utilizando la primera aproximación sintética.	65
3.2.2.	Segunda aproximación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.....	75
3.2.2.1.	Preparación del aceptor 80 y del donador 78 de ácido glucurónico.....	77
3.2.2.2.	Preparación del donador de glucosamina (79).	79
3.2.2.3.	Preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico utilizando la segunda aproximación sintética.....	80
3.2.3.	Síntesis de oligosacáridos de HA asistida por un espaciador perfluorado.	86
3.2.4.	Estudio de la interacción HA-proteína a través de experimentos STD de RMN.	95
4.	Síntesis de oligosacáridos de sulfato de condroitina.	105
4.1.	Antecedentes.	105
4.2.	Resultados y discusión.	114
4.2.1.	Síntesis de oligosacáridos de CS, utilizando bloques de GalNHTFA.....	116
5.	Estudios de las interacciones GAG-proteína.....	129
5.1.	Métodos para la evaluación de las interacciones carbohidrato-proteína.....	129
5.2.	Resultados y discusión.	134
5.2.1.	Estudios de interacción glicosaminoglicano-proteína mediante inmovilización de oligosacáridos a microplacas funcionalizadas.	135

5.2.2. Estudios de interacción carbohidrato-proteína por polarización de fluorescencia.....	143
6. Conclusiones	155
7. Parte experimental.....	161
7.1. Disolventes y reactivos.....	161
7.2. Técnicas y aparatos	162
7.3. Procedimientos sintéticos y caracterización estructural de los compuestos preparados.	163
8. Bibliografía	221

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN.

1. Introducción.

1.1. La Matriz Extracelular (MEC).

Los tejidos animales no están constituidos exclusivamente por células, sino que una gran parte de su volumen está ocupado por la matriz extracelular (MEC) que supondría el espacio existente entre las diferentes células. En el caso de los tejidos conjuntivos, la matriz está compuesta por moléculas muy diversas, secretadas y ensambladas localmente, formando una compleja red que se encuentra en íntima asociación con la superficie de la célula que la produce.

La matriz extracelular ha sido considerada durante mucho tiempo un material inerte que hidratava y que tenía como función principal la de servir de plataforma estabilizante de la estructura tisular. Sin embargo, estudios recientes, apoyados en sofisticadas técnicas analíticas, han demostrado que la MEC desempeña un papel muy activo y complejo en la regulación del

comportamiento de las células en contacto con ésta y que los polisacáridos que la componen juegan una importante labor en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos, como por ejemplo, en el crecimiento y desarrollo celular, la angiogénesis, el cáncer y la patogénesis microbial, entre otros.¹

La MEC está compuesta principalmente por tres tipos de macromoléculas: *proteínas estructurales*, *glicoproteínas (GPs) adhesivas* y *proteoglicanos (PGs)*. Todas ellas se hallan en un medio acuoso junto con otras moléculas de menor tamaño e iones. La cantidad, la proporción y el tipo de cada una de estas macromoléculas es lo que distingue a unas matrices extracelulares de otras.

Las *proteínas estructurales* más abundantes son el colágeno y la elastina. El principal papel del colágeno es formar un armazón que sostiene los tejidos y que resiste las fuerzas de tensión mecánica. Por otro lado, la elastina confiere elasticidad a los tejidos ya que, en contraposición a las fibras de colágenos, tiene la capacidad de estirarse y contraerse en respuesta a dichas tensiones, recuperando así su longitud inicial.

Las distintas moléculas que forman la matriz extracelular están unidas entre sí para formar un entramado altamente cohesionado. La mayoría de estas conexiones se dan entre distintas proteínas o entre proteínas y azúcares y están mediadas principalmente por *glicoproteínas (GPs) adhesivas*. Existen tres tipos de uniones que dan consistencia a los tejidos, cada una de las cuales está mediada por GPs adhesivas diferentes entre las que encontramos *las fibronectinas*, que intervienen en la cohesión de las distintas moléculas de la MEC; *las integrinas*, que ensamblan las células y la matriz extracelular, y las *cadherinas*, *inmunoglobulinas*, *selectinas* y algunos tipos de *integrinas*, que dan lugar a uniones entre células contiguas.

Las proteínas de colágeno, las fibras elásticas y otras moléculas presentes en la matriz extracelular se encuentran embebidas en un medio compuesto fundamentalmente por agua y polímeros no ramificados de azúcares de tipo *glicosaminoglicano (GAG)* o *mucopolisacáridos*. Estas macromoléculas se unen a proteínas para formar estructuras complejas conocidas como *proteoglicanos (PGs)* (Figura 1).

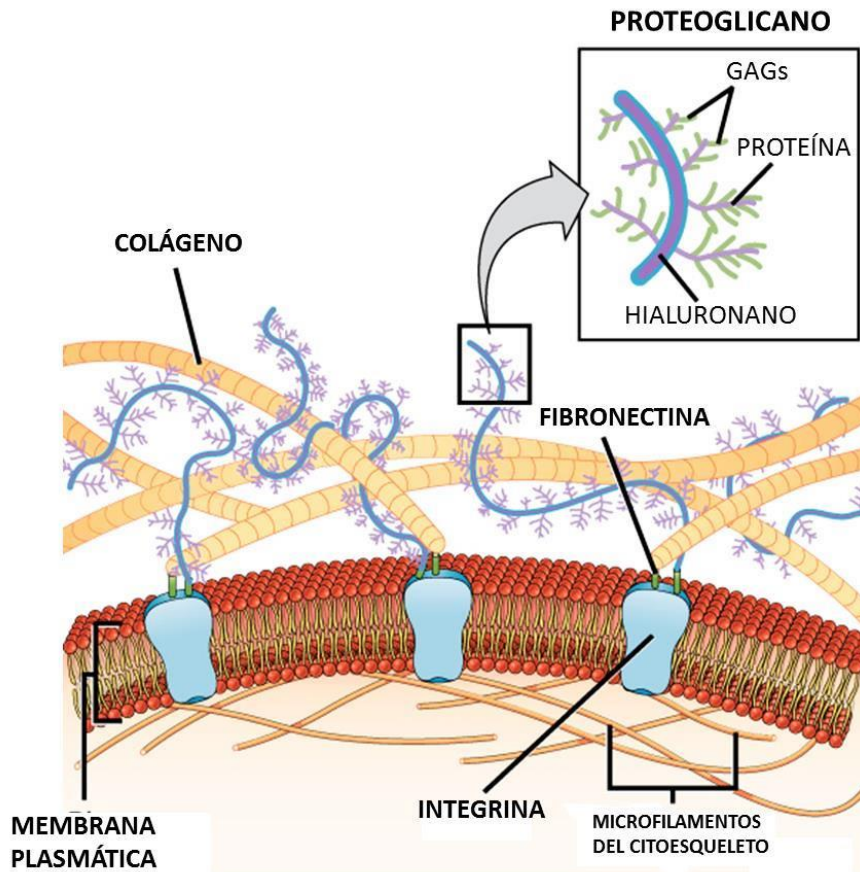


Figura 1. Representación esquemática de la matriz extracelular y sus principales componentes.

Aunque el entendimiento acerca de la estructura, la organización y la función de este tipo de macromoléculas es todavía limitado, se están llevando a cabo rápidos avances en estos campos del conocimiento.

1.2. Los Proteoglicanos (PGs).

Los proteoglicanos están constituidos por una proteína núcleo (core) y varias cadenas laterales de polisacáridos (glicosaminoglicanos). Aunque existan algunos tipos intracelulares, la mayoría de los PGs se encuentran en la superficie extracelular de las membranas o en el espacio extracelular (MEC), dependiendo de la localización de la proteína misma. En los vertebrados podemos encontrar varias combinaciones de proteínas (de la matriz, transmembrana o unidas covalentemente a glicosilfosfatidilinosoles (GPI) de la membrana) y de cadenas de GAGs (Figura 2).² La diversidad estructural de los proteoglicanos es la base de sus diferentes funciones biológicas.

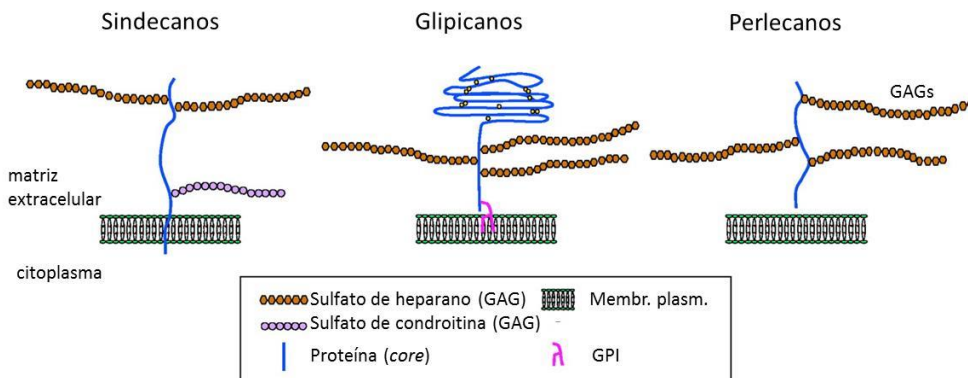


Figura 2. Diferentes tipos de proteoglicanos extracelulares y transmembrana. Cada proteoglicano se compone de una proteína núcleo (core) y de varias cadenas laterales de glicosaminoglicanos (sulfato de heparano y sulfato de condroitina, por ejemplo).

Los polisacáridos que los componen (GAGs) poseen habitualmente una carga neta negativa (debida a la presencia de grupos sulfato y carboxilato), están altamente hidratados y ocupan una parte importante del espacio extracelular,

lo cual es adecuado para cumplir con su función de lubricantes y filtros moleculares.

La función más evidente de los PGs es la de proporcionar soporte mecánico, aunque ofrecen también una gran superficie de contacto a la cual se pueden fijar otros componentes de la matriz tales como moléculas con función reguladora. Mediante su unión a biomoléculas, como ciertos factores de crecimiento, los PGs han demostrado tener papeles cruciales de regulación tanto en procesos fisiológicos normales, como por ejemplo en la embriogénesis, como en condiciones patofisiológicas, incluyendo los procesos de aparición de tumores y progresión de los mismos.

Las tres principales familias de proteoglicanos son (Figura 2):³

- *Proteoglicanos de la superficie celular* (sindecanos, glipicanos, CD44 y betaglicanos, entre otros)
- *Proteoglicanos extracelulares* (de la membrana basal y grandes y pequeños PGs intersticiales, p. ej. perlecanos)
- *Proteoglicanos intracelulares* (en gránulos secretores)

Dos ejemplos de PGs de la superficie celular son los *sindecanos* y los *glipicanos*. Éstos se unen a una multitud de factores de crecimiento y de moléculas de la matriz extracelular, y están implicados en varias vías de señalización que regulan la proliferación y diferenciación celular. Mientras los sindecanos son proteínas transmembrana con un dominio citoplasmático intracelular, los glipicanos están unidos a regiones de la membrana celular por un anclaje con GPI.⁴

Los *perlecanos* son un ejemplo de proteoglicanos extracelulares. Una vez secretados en la matriz extracelular contribuyen a la organización y estructuración de la misma, participando también en procesos fisiológicos

como la regulación de factores de crecimiento y la creación de gradientes de morfógenos.

Los PGs poseen numerosas funciones (Figura 3):⁵

- Actúan como co-factores de la unión entre factores de crecimiento y sus receptores tirosina kinasa, presentes en la misma célula (a) o en una adyacente (b).
- Transportan quimiocinas a través de las células (c) para presentarlas en la superficie celular a sus receptores específicos (d).
- Liberan ligandos tales como factores de crecimiento por acción secuencial de una degradación proteolítica (e) y de una enzima específica (f).
- Se internalizan de forma activa por endocitosis (g). Una vez en el interior de la célula pueden ser reciclados de nuevo a la superficie o degradarse en los lisosomas (h).
- Facilitan la adhesión celular (i) y forman puentes con el citoesqueleto (j).
- Están involucrados en la formación de matrices extracelulares organizadas que forman barreras fisiológicas (k) y secuestran factores de crecimiento y morfógenos para su posterior liberación (l).
- Se empaquetan en gránulos secretores de las células (m) y en el núcleo (n), aunque su función en éste es todavía desconocida.

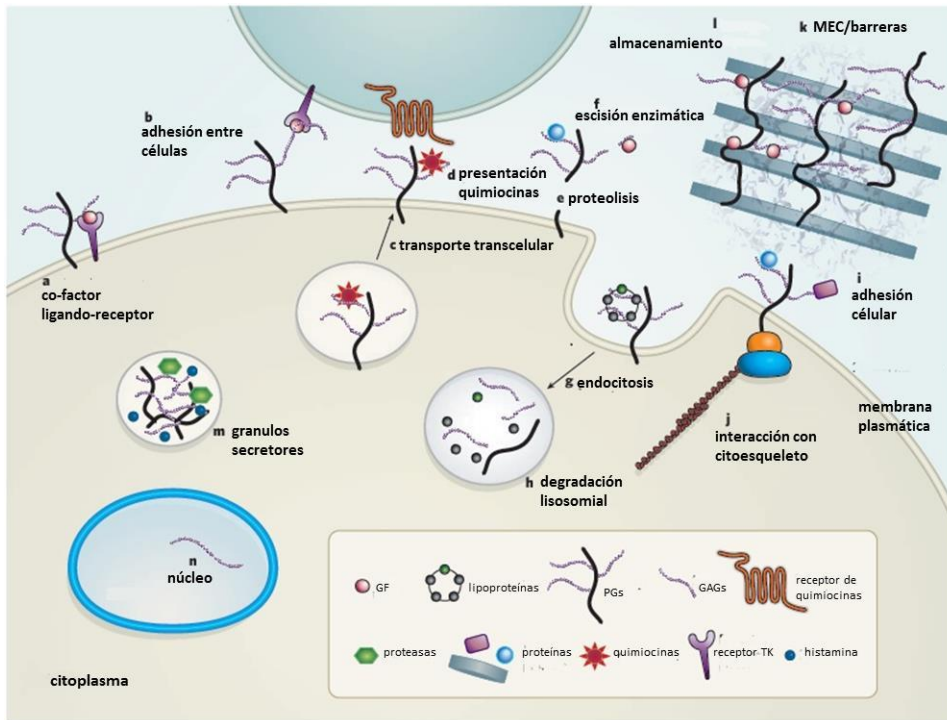


Figura 3. Diferentes procesos en los que están involucrados los proteoglicanos.

En general, se acepta que los GAGs (el componente polisacárido de los PGs) son los principales responsables de todas estas funciones biológicas, de ahí la importancia de su estudio. Es en esta familia de polisacáridos donde se centra la presente Tesis Doctoral.

1.3. Los Glicosaminoglicanos.

Los *Glicosaminoglicanos* o *GAGs*, una de las clases más importantes de moléculas extracelulares, son cadenas polisacáridicas lineales. A excepción del ácido hialurónico, los GAGs se unen frecuentemente de forma covalente a un núcleo de proteína (*core*) de la superficie celular o de la matriz extracelular, formando los *proteoglicanos* (PGs) (Figuras 1 y 2) tal y como hemos señalado anteriormente. Los GAGs actúan como moduladores de señales en procesos de comunicación entre la célula y su entorno.⁶

Están formados por unidades disacáridicas repetitivas que consisten, en líneas generales, en un ácido urónico (ácido α -L-idurónico o ácido β -D-glucurónico) unido a través de un enlace (1 \rightarrow 3) ó (1 \rightarrow 4) a un amino azúcar (*N*-acetil glucosamina o *N*-acetil galactosamina). La presencia de grupos sulfato y de grupos carboxilato a lo largo de la cadena confiere a estas macromoléculas una elevada carga negativa.

Dependiendo de los monosacáridos que constituyan la unidad disacáridica, del tipo de enlace entre ellos y del número y la localización de los grupos sulfato, podemos catalogar los GAGs en cuatro grandes familias: la primera constituida por el sulfato de heparano (HS) y la heparina; una segunda, a la que pertenecen el sulfato de condroitina (CS) y el sulfato de dermatano (DS); el sulfato de queratano (KS) y, finalmente, el ácido hialurónico (HA) (Figura 4).⁷

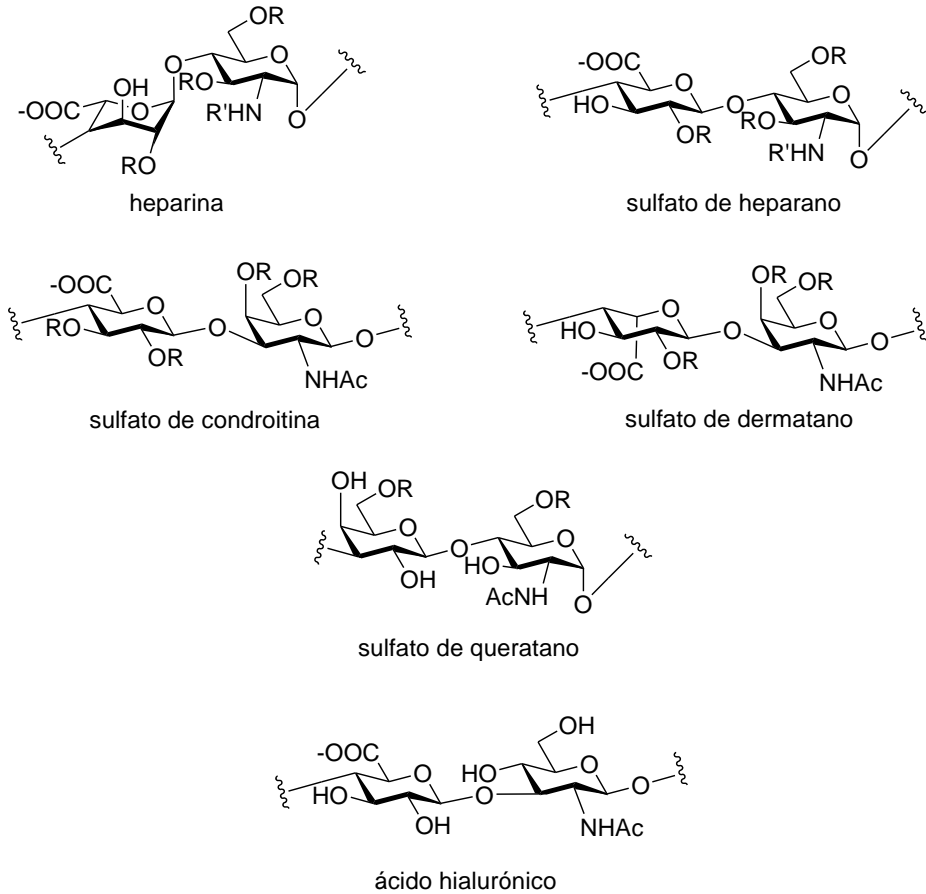


Figura 4. Diferentes clases de glicosaminoglicanos y sus unidades disacáridicas de repetición. R=SO₃⁻, H; R'=SO₃⁻, COCH₃ ó H.

A continuación, describiremos en detalle la estructura de los distintos GAGs.

1.3.1. SULFATO DE HEPARANO (HS) y HEPARINA (Figura 4).

La *heparina*, empleada como anticoagulante durante los últimos 60 años, se encuentra exclusivamente en los mastocitos y se caracteriza por tener un peso molecular que varía entre 5 y 40 kDa, con un valor medio de alrededor de 15 kDa. Este polisacárido lineal no ramificado, altamente sulfatado, se compone de unidades disacáridicas que consisten en un residuo de ácido urónico unido

a una D-glucosamina a través de un enlace (1,4). Los residuos de ácido urónico más frecuentes son de ácido L-idurónico (90%) mientras que su epímero C5 (ácido D-glucurónico) sólo está presente en un 10%.⁸

En general, para todos los GAGs, se generan *in vivo* diferentes patrones de sulfatación a partir de diversas modificaciones en la cadena principal. Por ejemplo, la sulfatación de la unidad disacáridica repetitiva de la heparina se puede dar en la posición 2 de los ácidos urónicos y en la 3 y/o 6 de la unidad de glucosamina. Además, el grupo amino de la posición 2 de la glucosamina puede estar sulfatado, acetilado o incluso no estar modificado, lo cual se da con menor frecuencia.⁸ La estructura más común en la heparina es el disacárido trisulfatado que se denomina *región regular* (Figura 5). Sin embargo, pueden existir variaciones estructurales (*región variable*) de este disacárido, que conducen a la alta heterogeneidad de dicho glicosaminoglicano.⁹

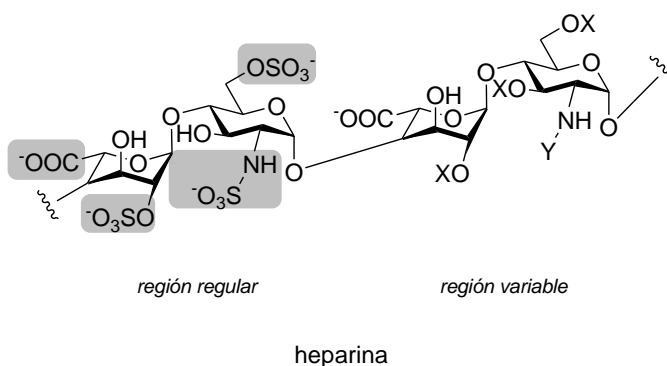


Figura 5. Región regular y variable de la heparina. X=H o SO₃⁻; Y=Ac, SO₃⁻ o H.

Todas estas variaciones dan lugar a 48 posibles disacáridos diferentes en la estructura de la heparina. Los grupos sulfato presentes a lo largo de la cadena, junto con los grupos carboxilato, hacen de la heparina una de las macromoléculas más ácidas de la naturaleza.

El *sulfato de heparano* (HS) está relacionado estructuralmente con la heparina, pero, a diferencia de ésta, se distribuye ampliamente en los diferentes tipos de células y tejidos y tiene un mayor número de funciones fisiológicas. Con un intervalo de peso molecular de 5 a 50 kDa y un peso molecular medio de 30 kDa, las cadenas de este GAG son generalmente más largas que las de la heparina. Al igual que la heparina, el HS es un copolímero lineal formado por la repetición de la unidad disacáridica compuesta por un ácido urónico (principalmente ácido glucurónico, GlcA y, en menor cantidad ácido idurónico, IdoA) y una N-acetil glucosamina.⁹ En el HS también existe una región regular, mucho menos frecuente que la región variable, lo cual da una estructura mucho más compleja aunque mucho menos sulfatada.

1.3.2. SULFATO DE CONDROITINA y SULFATO DE DERMATANO (CS y DS) (Figura 4).

El *sulfato de condroitina* (CS) y el *sulfato de dermatano* (DS) son polisacáridos lineales altamente heterogéneos y sulfatados.^{10,11} El CS está formado por la repetición de unidades del disacárido de ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), siguiendo la secuencia GlcA- β (1 \rightarrow 3)-GalNAc- β (1 \rightarrow 4) (Figura 6). El disacárido de repetición del DS contiene principalmente ácido L-idurónico (IdoA) en lugar de GlcA. Ambos polisacáridos pueden contener grupos sulfato en diferentes posiciones de la cadena.

Según el patrón de sulfatación, podemos distinguir diferentes tipos de cadenas de CS y DS (Figura 6).¹¹

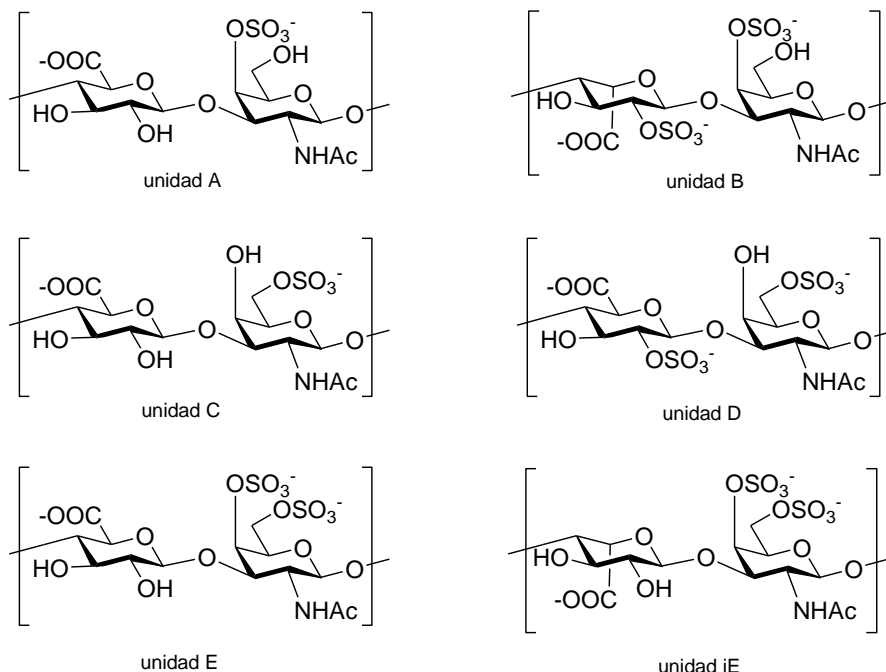


Figura 6. Unidades disacáridicas típicas que se encuentran en las cadenas de CS y DS. Las diferentes unidades A, B, C, D, E e iE son características de CS-A, DS-B, CS-C, CS-D, CS-E y DS-E, respectivamente. La abreviatura 'i' en 'iE' significa IdoA.

Por ejemplo, el disacárido E [GlcA β 1-3GalNAc(4S,6S)] es característico del sulfato de condroitina tipo E (CS-E), en el cual están sulfatadas las posiciones 4 y 6 de la *N*-acetil galactosamina. Si la única posición sulfatada es la 4, la unidad disacáridica [GlcA β 1-3GalNAc(4S)] y el correspondiente sulfato de condroitina se llamarán de tipo A (CS-A).

1.3.3. SULFATO DE QUERATANO (KS) (Figura 4).

El sulfato de queratano es el glicosaminoglicano más peculiar, ya que contiene monosacáridos que no se encuentran en otras categorías de GAGs, carece de ácido urónico y posee regiones ramificadas. A diferencia de otros

GAGs, para el sulfato de queratano no se ha encontrado unión específica a ninguna proteína funcional.

1.3.4. ÁCIDO HIALURÓNICO (HA) (Figura 4).

El ácido hialurónico (HA), aislado por primera vez en 1934 por Mayer y Palmer del humor vítreo bovino,¹² es un polímero de alto peso molecular de la matriz extracelular de más de 2×10^4 kDa. En claro contraste con los demás glicosaminoglicanos, el HA no se sintetiza en el aparato de Golgi sino en la superficie citoplasmática de la membrana celular. El HA es el único glicosaminoglicano no sulfatado y la unidad repetitiva está compuesta por un ácido glucurónico unido a una *N*-acetil glucosamina a través de un enlace $\beta(1-3)$.

1.4. Glicosaminoglicanos: biosíntesis y funciones biológicas.

La gran complejidad estructural de los GAGs y, en consecuencia, la elevada densidad de información que éstos contienen, deriva de su biosíntesis, un complejo proceso donde están involucradas varias enzimas con isoformas distintas en función del tejido en el que se encuentren.

La biosíntesis (Figura 7) comienza con la unión de un espaciador tetrasacarídico ($\text{GlcA}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Xyl}\beta 1-O$) al oxígeno de un residuo de serina de la proteína del núcleo, la cual se lleva a cabo por cuatro enzimas diferentes (Xyl-T, GalT-I, GalT-II y GlcAT-I). Posteriormente, tiene lugar un paso de elongación de la cadena, mediante la transferencia de *N*-acetil glucosamina o de *N*-acetil galactosamina, que define el tipo específico de GAG que se obtendrá a continuación. La construcción real de la cadena comienza en el siguiente paso, en donde una glicosiltransferasa multidominio transfiere sucesivamente unidades de ácido β -D-glucurónico, *N*-acetil

glucosamina o - galactosamina. Una vez que la cadena polisacáridica esté madura, actuarán sobre ella una nueva serie de enzimas. La acción de estas enzimas biosintéticas da lugar a la epimerización de algunos ácidos D-glucurónicos a ácido L-idurónico, y también a la *O*-sulfatación, *N*-sulfatación y *N*-deacetilación. El resultado final será la síntesis de cadenas de glicosaminoglicanos con patrones de sulfatación diversos.¹³

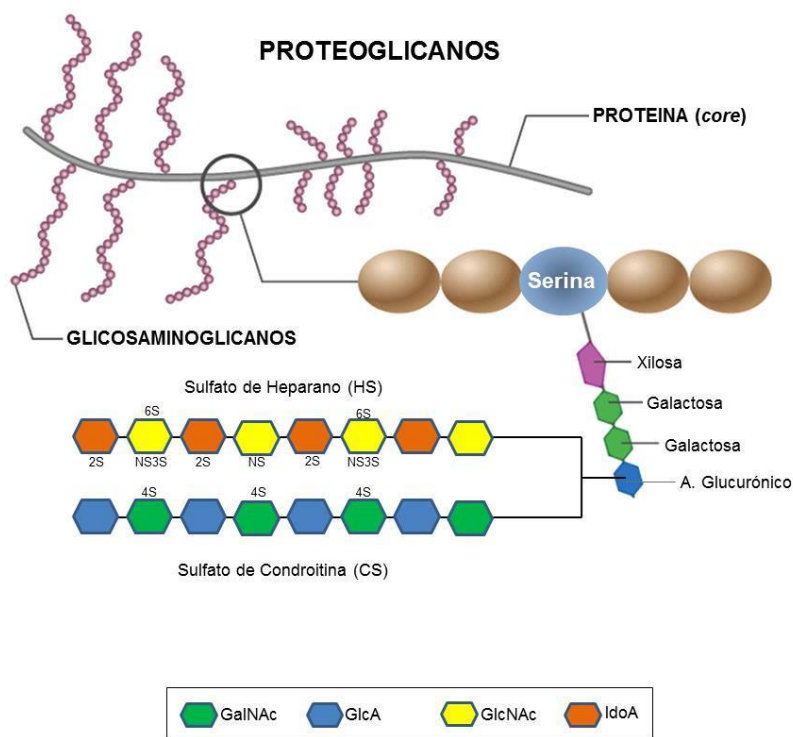


Figura 7. Biosíntesis de glicosaminoglicanos. Como se describe en el texto, los GAGs se sintetizan a partir de un tetrasacárido común, unido a la proteína *core* a través de un residuo de serina. La cadena se elonga por acción de glicosiltransferasas específicas alternando la introducción de una hexosamina y de un GlcA. Por último, enzimas específicas se ocuparán de las modificaciones postsintéticas (por ejemplo, epimerización y sulfatación).

Resulta, por tanto, evidente que la diversidad de secuencias de una cadena de GAG se rige por la expresión de estas enzimas (y sus isoformas específicas de tejido) y sus distintas especificidades de sustrato.

Una de las consecuencias de la inmensa diversidad estructural de los GAGs es que estas moléculas son capaces de unirse e interactuar con una amplia variedad de proteínas, tales como factores de crecimiento, quimiocinas, morfógenos y enzimas.^{7,8,14,15}

Como se puede ver en la Tabla 1, la unión de los GAGs a las proteínas es mediada por secuencias específicas donde el tamaño de la cadena y el patrón de sulfatación de la misma juegan un papel muy importante.¹⁴

GAG-proteína	Funciones biológicas	Secuencia específica
Heparina-FGF1	Oligomerización de FGFs, unión FGF-FGFR con oligomerización y señalización celular. Crecimiento celular y desarrollo, angiogénesis.	-[IdoA _{2S} -GlcN _{NS,6S}] _n - n>2 interacción n>5 señalización mediada por FGF
Heparina-FGF2		-[IdoA _{2S} -GlcN _{NS,6X}] _n - n>2 interacción n>5 señalización mediada por FGF
CS-Midkina/ pleiotrofina	Adhesión, migración y crecimiento neuronal	-[GlcA-GalN _{NAc,4S,6S}] _n - ó -[GlcA _{2S} -GalN _{NAc,6S}] _n -
Heparina-AT-III	Anticoagulación y antitrombosis	-[GlcN _{NAc,6S} -GlcA-GlcN _{NS,3S,6S} -IdoA _{2S} -GlcN _{NS,6S}] _n -
Heparina-Annexina V	Antitrombosis	-[IdoA _{2S} -GlcN _{NS,6S}] _n -
HA-CD44	Migración celular	octasacárido

Tabla 1. Interacciones GAG-proteína y función biológica específica. Cada interacción está mediada por una secuencia bien definida de glicosaminoglicanos, donde el tamaño y el patrón de sulfatación juegan un papel muy importante. (IdoA= ácido idurónico, GlcN=glucosamina, GlcA=ácido glucurónico, GalN=galactosamina, FGFs=factores de crecimiento de fibroblastos, AT-III=antitrombina III, CD44=cluster de diferenciación 44).

1.5. Actividades biológicas mediadas por secuencias específicas de los GAGs: papel de la síntesis química.

Los mecanismos moleculares por los que los glicosaminoglicanos contribuyen a estos eventos biológicos están empezando a ser entendidos. Muchos estudios sugieren que tanto el peso molecular como el patrón de sulfatación específico son cruciales para la unión y el ensamblaje del complejo GAG-proteína, responsable de dichas funciones biológicas.

En la actualidad, no existe ningún método para una rápida identificación de los motivos de sulfatación biológicamente activos y de la secuencia verdaderamente implicada en el proceso. Esta identificación requiere el desarrollo de nuevas estrategias para el análisis y la evaluación de las estructuras específicas de glicosaminoglicanos.

Dada la complejidad estructural y la heterogeneidad de los glicosaminoglicanos, su aislamiento a partir de fuentes naturales posee notables limitaciones. Los preparados obtenidos a través de estas técnicas son sistemas polidispersos, caracterizados por múltiples y distintos motivos de sulfatación, lo cual hace difícil la atribución de una función biológica específica a un patrón de sulfatación concreto.

En este contexto, la síntesis orgánica se presenta como una alternativa muy interesante para la preparación de oligosacáridos estructuralmente bien definidos. Mediante la química sintética se puede preparar prácticamente cualquier glicosaminoglicano con un elevado control en la estereoquímica, el tamaño y el patrón de sulfatación. La obtención de estructuras bien definidas facilita la identificación de secuencias biológicamente activas y la obtención de relaciones estructura-actividad, lo cual permite analizar el potencial terapéutico de los glicosaminoglicanos, en áreas como la biología del cáncer, la neurobiología y la virología.

A continuación, veremos algunos ejemplos de interacción GAG-proteína en los que se han usado oligosacáridos sintéticos para obtener información de estos procesos de reconocimiento molecular e incluso para interferir en las funciones biológicas de los polisacáridos naturales.

1.5.1. Heparina.

1.5.1.1. Heparina y factores de crecimiento para fibroblastos (FGFs).

Muchos factores de crecimiento, incluyendo los FGFs (factores de crecimiento para fibroblastos), necesitan, para la unión a su diana biológica, la interacción, probablemente previa, con GAGs tales como la heparina y el sulfato de heparano.

Los factores de crecimiento para fibroblastos de mamíferos pertenecen a una familia de más de veinte polipéptidos diferentes que están involucrados en una elevada variedad de procesos biológicos incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la angiogénesis.

FGF-1 y FGF-2 son los factores de crecimiento arquetípicos de esta familia de proteínas. Las funciones biológicas de los FGFs se activan por la unión de éstos a los receptores quinasa transmembrana específicos de tirosina (FGFR) presentes en la superficie celular.¹⁶ La unión entre FGF y su receptor específico (FGFR) está mediada principalmente por la heparina,⁸ la cual actúa como regulador de dicha interacción.

Estos procesos de reconocimiento molecular son altamente complejos. Por ejemplo, para el caso de FGF-1 y FGF-2 se conoce que tanto el grado de sulfatación de la heparina como su tamaño son cruciales para la interacción y por tanto para la función biológica, hasta el punto de dar lugar a procesos opuestos dependiendo del tipo de heparina que medie la interacción.

Las secuencias mínimas requeridas para promover la unión entre heparina y FGF-2, consisten en oligómeros cortos tales como tri- y pentasacáridos de la región regular, los cuales son capaces de interactuar con FGF-2 pero no dan lugar a la activación del proceso. Sin embargo, oligómeros más largos sí conducen a la dimerización de FGFRs, activando la cascada de señalización mediada por factores de crecimiento.¹⁷

La región de unión a FGF-2 ha sido identificada como una secuencia pentasacáridica que contiene un único grupo O-sulfato, esencial, en el C2 del ácido idurónico y una D-glucosamina N-sulfatada. Para una unión eficiente a FGF-2, todas las unidades de ácido urónico deben estar presentes como ácido L-idurónico. La sulfatación en la posición 6 de la GlcNAc no es necesaria para la unión a FGF-2,¹⁸ pero se cree que es esencial para la actividad mitogénica de FGF-1 (Figura 8).¹⁹

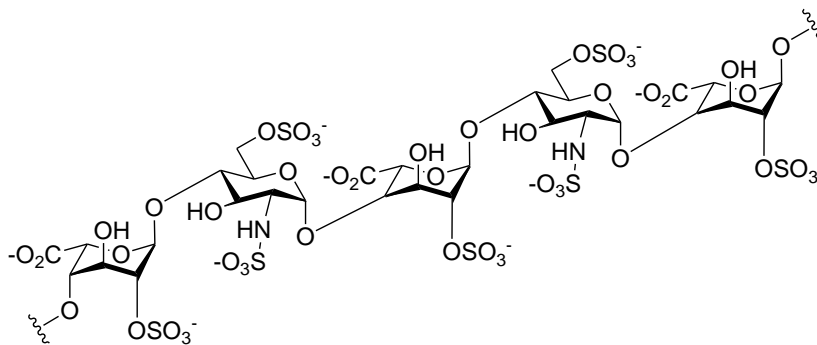


Figura 8. Dominio pentasacáridico de la heparina necesario para su unión a FGF-1.

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado rutas sintéticas para la preparación de oligosacáridos de heparina de diferente tamaño y patrón de sulfatación,^{20,21,22} tanto de la región regular como de la región variable (Figura 9).

Esta librería de compuestos ha contribuido a la elucidación de las bases moleculares del proceso de activación de FGF y la influencia del patrón de sulfatación en la actividad biológica de FGF-1.²³

Así, el hexasacárido sintético B (Figura 9), donde todos los grupos sulfato se orientan hacia uno de los dos lados de la estructura tridimensional de la molécula, fue capaz de activar la mitogénesis mediada por FGF-1. Esta actividad fue similar a la mostrada por la heparina natural y muy superior a la obtenida con el hexasacárido sintético de la región regular A (Figura 9). Se demostró, por primera vez, con estos compuestos sintéticos, que la dimerización del FGF-1 no es un requisito indispensable para su actividad biológica. Además, se obtuvieron las estructuras tridimensionales de los complejos de estos oligosacáridos sintéticos con FGF-1 y su correspondiente receptor FGFR, aportando datos de estas interacciones a nivel molecular.

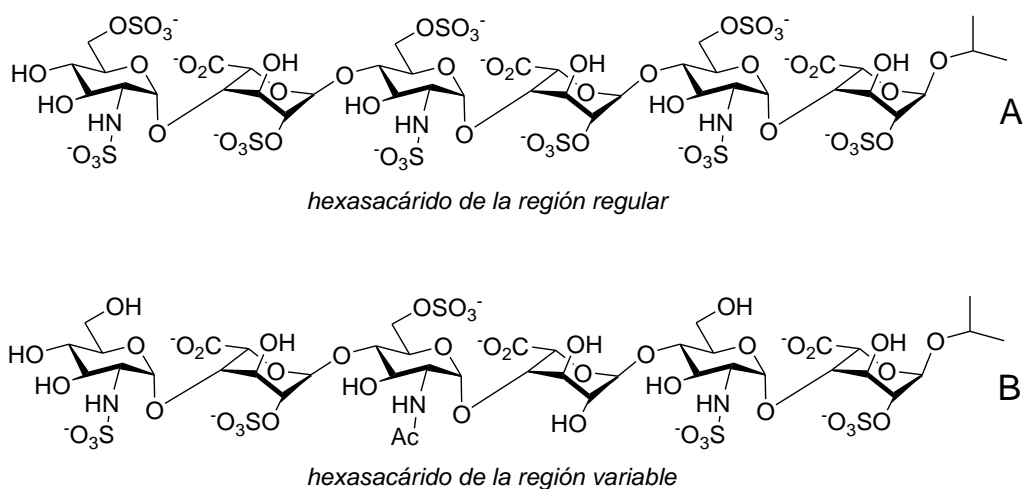


Figura 9. Dos hexasacáridos, uno de la región regular y otro de la región variable, sintetizados en nuestro grupo de investigación.

1.5.1.2. Heparina y antitrombina III (AT-III). La cascada de la coagulación.

Una de las principales razones por las que la heparina y el sulfato de heparano son los GAGs más estudiados es su participación en procesos de anticoagulación y en el trastorno tromboembólico.

La hemostasia o hemostasis es el conjunto de mecanismos que permite la formación de coágulos para detener una hemorragia, posteriormente reparar el daño y finalmente reabsorber el coágulo. Este proceso está controlado por un complejo sistema del que forman parte, entre otros, los factores de coagulación y las plaquetas. La estimulación de este sistema promueve la activación secuencial de una cascada de zimógenos, que, en última instancia, conduce a la formación de un coágulo de fibrina (Figura 10). Una vez iniciada, dicha cascada de coagulación se puede ver alterada en diferentes puntos, debido a la acción de ciertos compuestos, como es el caso de la antitrombina III (AT-III). El efecto de la antitrombina sobre las cascadas de reacciones anteriormente descritas impediría la coagulación en el sitio de la lesión local, previniendo efectos potencialmente letales, como por ejemplo, la coagulación intravascular.

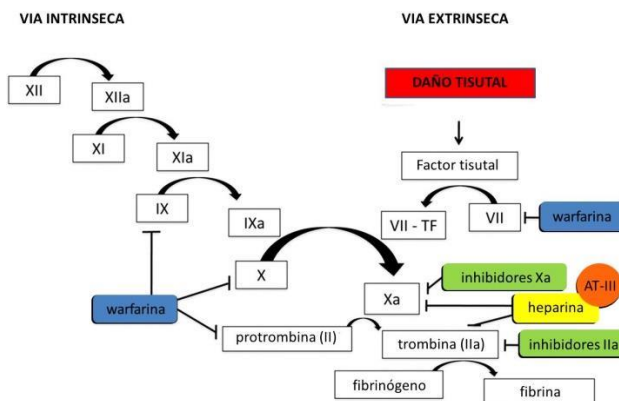


Figura 10. La cascada de la coagulación, una secuencia compleja de reacciones proteolíticas, está formada por dos vías, extrínseca e intrínseca, que, al unirse, forman la vía común, que termina con la formación del coágulo de fibrina. Este proceso está finamente regulado en diferentes puntos.

En este sentido, la interacción con heparina conduce a la formación de un complejo ternario junto con la trombina y la AT-III (Figura 10), aumentando así la capacidad inhibitoria de la AT-III sobre la trombina en más de 2000 veces, impidiendo de este modo la progresión de la cascada.²⁴ La capacidad de la heparina para inhibir la coagulación a través de su unión a AT-III es esencial para su uso terapéutico.

La heparina que se usa como fármaco anticoagulante se aísla principalmente de intestinos porcinos o bovinos. Los criterios de seguridad de la heparina así obtenida pueden verse comprometidos debido a la contaminación por otros derivados. En 2007, lotes de este glicosaminoglicano, contaminados por sulfato de condroitina sobre-sulfatado, condujeron a más de 80 muertos y cerca de 1.000 casos de reacciones alérgicas en los EE.UU. y Alemania.^{25,26}

Aproximadamente el 3% de los pacientes desarrolla trombocitopenia inducida por heparina (HIT),²⁷ una respuesta autoinmune severa provocada por la formación de un complejo entre la heparina y el factor plaquetario 4 (PF4). En conjunto, estos hechos ponen en relieve la necesidad de desarrollar alternativas más seguras a la utilización de heparina de origen animal. En líneas generales, para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades tromboembólicas, los fragmentos cortos de heparina obtenidos por síntesis química se prefieren a la heparina no fraccionada debido a su farmacocinética más predecible, vidas medias más prolongadas y un menor riesgo de efectos secundarios.

AT-III reconoce selectivamente la secuencia pentasacarídica [GlcN_{NAc,6S}-GlcA-GlcN_{NS,3S,6S}-IdoA_{2S}-GlcN_{NS,6S}] (Figura 11); es decir, dentro de la compleja estructura de la heparina, AT-III sólo interacciona con una porción pentasacarídica que es la responsable de la actividad anticoagulante.

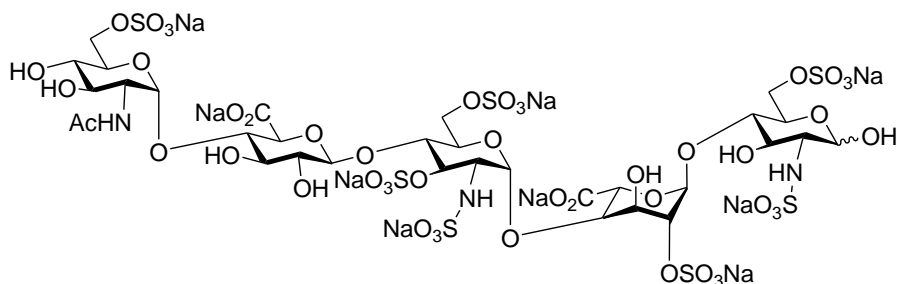


Figura 11. Secuencia pentasacáridica, dentro de la estructura de la heparina, reconocida por AT-III, responsable de la actividad anticoagulante.

En preparados comerciales, este motivo pentasacáridico se encuentra tan sólo en una proporción del 3%,²⁴ lo cual hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos para la obtención de dicho epítipo. En este sentido, se ha demostrado el gran potencial de la síntesis química para la preparación de glicosaminoglicanos con interesantes aplicaciones biológicas.

Choay y colaboradores²⁸ sintetizaron en 1983 el pentasacárido sulfatado clave que interactuaba con la antitrombina III (AT-III), inhibiendo la coagulación de la sangre. La síntesis de este compuesto ayudó a dilucidar el mecanismo de la actividad anticoagulante de la heparina y condujo a la producción y comercialización del fármaco ArixtraTM (Figura 12), una alternativa eficaz de bajo peso molecular a la heparina para el tratamiento de la trombosis venosa profunda.

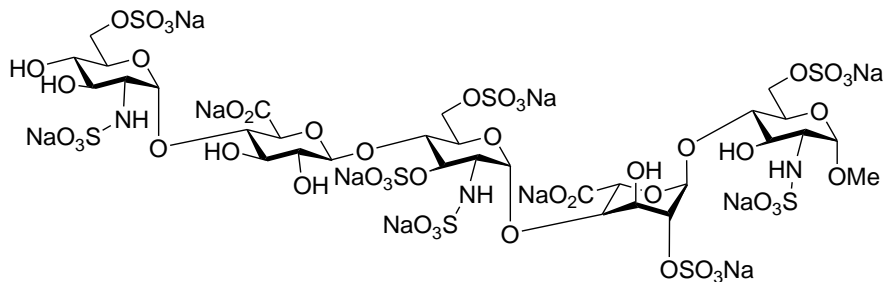


Figura 12. Arixtra™, el α -O-metil glicósido análogo del pentasacárido reconocido por AT-III.

La preparación de oligosacáridos sintéticos ha permitido elucidar los grupos funcionales claves para la actividad anticoagulante, abriendo la puerta a la obtención de análogos simplificados que compartan las características fundamentales de los glicosaminoglicanos y su capacidad para modular las proteínas.

1.5.2. Sulfato de condroitina y estimulación neuronal.

Históricamente, los estudios de los glicosaminoglicanos se han centrado en el sulfato de heparano y en la heparina. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que los glicosaminoglicanos de la clase CS también juegan un papel esencial en procesos biológicos tales como el crecimiento y la regeneración neuronal.

Así, el sulfato de condroitina está implicado en la división celular, el desarrollo neuronal y en las lesiones de la médula espinal.^{11, 29,30} Estudios preliminares demostraron que dicho polisacárido era activo tanto para estimular como para inhibir el crecimiento de las neuronas en cultivos biológicos. En estos primeros trabajos, se emplearon muestras con 200 tipos de sacáridos de longitud diferente y heterogéneamente sulfatados, hecho que podría explicar estos resultados contradictorios (estimulación e inhibición).

Hsieh-Wilson y colaboradores³⁰ publicaron en 2004 los primeros estudios biológicos en los que se empleaban moléculas de CS sintéticas de tamaño bien definido, partiendo de la hipótesis de que, entre los patrones de sulfatación implicados en la modulación del crecimiento celular, el motivo CS-E era probablemente uno de los más importantes. Se sintetizaron dos tetrasacáridos (uno de secuencia tipo CS-E, Figura 13, y otro no sulfatado) y un disacárido CS-E y se probaron en la estimulación del crecimiento de neuronas del hipocampo embrionario.

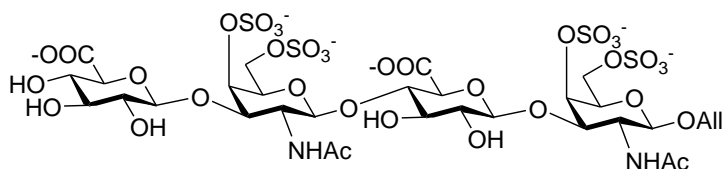


Figura 13. Tetrasacárido de sulfato de condroitina tipo E.

Como se puede apreciar en la Figura 14, el tetrasacárido CS-E promueve el crecimiento de neuritas en un 40%, mientras que el disacárido y el tetrasacárido no sulfatado no poseen actividad estimulante.

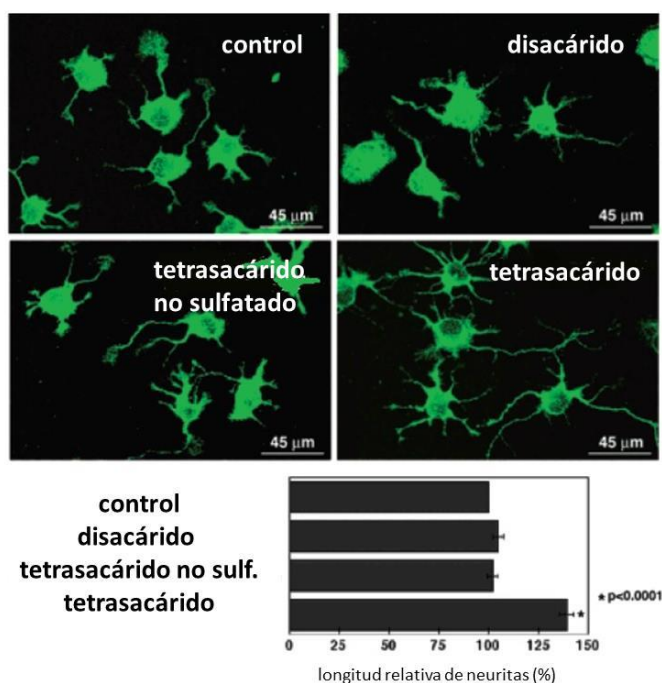


Figura 14. El tetrasacárido sulfatado estimula el crecimiento neuronal en el hipocampo, mientras que el control, el disacárido y el tetrasacárido no sulfatado no tienen esta capacidad. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de neuronas 48 h después del tratamiento con el compuesto indicado. (B) Análisis estadístico de la longitud de las neuronas.

Estos resultados demuestran que es necesaria la sulfatación de CS para promover el crecimiento neuronal y define un tetrasacárido como el motivo funcional mínimo.

Para poder demostrar que es necesario un patrón de sulfatación específico para esta actividad, Hsieh-Wilson y colaboradores³¹ prepararon cuatro tetrasacáridos de CS sulfatados en diferentes posiciones (Figura 15).

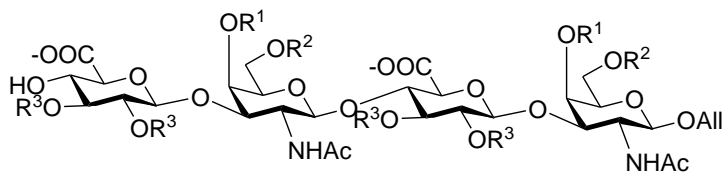


Figura 15. Patrones de sulfatación de los 4 tetrasacáridos preparados. **CS-E**, $R^1=R^2=SO_3^-$, $R^3=H$; **CS-C**, $R^2=SO_3^-$, $R^1=R^3=H$; **CS-A**, $R^1=SO_3^-$, $R^2=R^3=H$; **CS-R**, $R^3=SO_3^-$, $R^1=R^2=H$.

Se utilizaron estas estructuras bien definidas para la construcción de microarrays de carbohidratos, explorando las consecuencias de la sulfatación en la unión con el factor de crecimiento neuronal midkina. Observaron así que el tetrasacárido CS-E se une selectivamente a la proteína en una concentración dentro del rango fisiológico, y que la interacción de la midkina con CS-A, CS-C y CS-R, los motivos de sulfatación más abundantes en el cerebro de mamífero, es significativamente más débil que con CS-E, lo que indica que la asociación proteína-CS requiere una disposición específica de grupos sulfato y no se rige por interacciones electrostáticas no específicas.

Estos estudios proporcionan la primera demostración directa de que la actividad de CS puede ser controlada a nivel molecular a través de sus patrones de sulfatación. Oligosacáridos sintéticos están siendo empleados en la actualidad para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la actividad del CS-E.

1.5.3. Ácido hialurónico y CD44.

Al contrario que el resto de los GAGs, el ácido hialurónico no presenta sulfatación ni epimerización a lo largo de la cadena, modificaciones postsintéticas sobre las que se basa la gran variedad estructural y funcional de este tipo de moléculas. No obstante, a pesar de su sencillez estructural, el HA participa también en un elevado número de actividades biológicas. En este

sentido, las variables que determinan qué tipo de función fisiológica tendrá el HA en cuestión serán la ubicación de la proteína con la que éste interacciona, la concentración de polímero y el tamaño de la cadena polisacáridica, siendo esta última la más importante.

El ácido hialurónico se degrada mediante tres vías diferentes, aunque las enzimas de la familia de las hialuronidasas (Hyal) parecen tener un papel predominante en el catabolismo de HA. Es probable que tanto las enzimas de la síntesis como las implicadas en la degradación estén involucradas en la generación de oligosacáridos de tamaño definido de HA. Polímeros de HA de diferentes tamaños tienen funciones biológicas que pueden ser contradictorias.

En líneas generales, se puede decir que cadenas de HA de alto peso molecular ($2 \cdot 10^3 - 10^5$ monómeros) son inmunosupresivas y anti-angiogénicas mientras que oligosacáridos más pequeños ($4 - 10^3$ monómeros) son inmunoestimulantes y angiogénicos (Tabla 2).³²

Tamaño (nº monosacáridos)	Función
HA de gran peso molecular HA > 1000-5000	Inmunosupresión Anti-angiogénicos Inhibición de fagocitosis Supresión de síntesis de HA
Fragmentos de HA ~1000	Inducción de citoquinas inflamatorias
10-40	Promoción de la migración de células tumorales
8-32	Estimulación de angiogénesis
4	Supresión de apoptosis

Tabla 2. Funciones biológicas de fragmentos de HA en función de su tamaño.

Otro ejemplo donde puede verse la importancia del tamaño del HA es en la interacción con la CD44 (cluster de diferenciación 44), una glicoproteína

transmembrana de la superficie celular que se expresa en un gran número de tipos de células de mamíferos y está sobreexpresada en muchos tipos de tumores,³³ participando en las interacciones célula-célula y en la adhesión y migración celular.³⁴

Así, el HA de bajo peso molecular induce la escisión proteolítica de CD44 en la superficie de las células cancerosas, promoviendo así la migración de células tumorales de una manera dependiente de CD44,³⁵ lo cual afianza la hipótesis de que los fragmentos de HA facilitan la progresión del cáncer. Cadenas de alto peso molecular, son incapaces de activar la CD44 y, por tanto, no inducen migración celular.

Por otro lado, se ha demostrado que se requiere un octámero de hialuronano para la unión de alta afinidad con CD44.³⁶

Los fragmentos de hialuronano se están utilizando cada vez más para estudiar las diferentes actividades biológicas del producto natural. Por tanto, la síntesis química de oligosacáridos de HA de longitud y peso molecular bien definidos resulta, en este sentido, de gran interés. A través de fragmentos sintéticos de pequeño tamaño (tetra – octasacárido) se puede estudiar, a nivel molecular, la interacción con CD44, entendiendo más en detalle este proceso y abriendo el camino al diseño de potenciales inhibidores de la interacción HA-CD44. Además, la preparación de estructuras multivalentes con oligosacáridos de HA presenta mucho interés en el transporte selectivo de fármacos a células tumorales que sobre expresan CD44.

CAPÍTULO 2.

OBJETIVOS.

2. Objetivos

Como hemos dicho anteriormente, la acción secuencial de un conjunto de enzimas, presentes en el aparato de Golgi de las células eucarióticas, es la base de la biosíntesis de los glicosaminoglicanos. Hemos visto en detalle que esta biosíntesis genera estructuras muy complejas y heterogéneas capaces de unirse a diferentes proteínas e influir así en numerosos procesos biológicos. La estructura específica requerida para el enlace y, en consecuencia, la modulación de la función de las proteínas, ha sido establecida sólo en algunos casos: la interacción de la heparina con la antitrombina es el ejemplo más estudiado, como se ha visto anteriormente. En nuestro grupo de investigación existe una amplia experiencia en la síntesis de derivados de heparina, como también hemos indicado.

En esta memoria centraremos nuestra atención en GAGs menos estudiados, tales como el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina, que, como hemos dicho, también participan en numerosos procesos biológicos.

Debido a la diversidad estructural de estas biomoléculas, el aislamiento de ácido hialurónico y de sulfato de condroitina desde fuentes naturales es un

procedimiento complejo que, en líneas generales, genera sistemas polidispersos, con una pureza limitada.

En este contexto, la síntesis química resulta ser una buena alternativa y una herramienta eficaz para acceder a oligosacáridos bien definidos,^{9,37} tanto de HA como de CS. Éstos pueden ser utilizados para la determinación de relaciones estructura-actividad y el estudio de las secuencias específicas y de los patrones de sulfatación implicados en el enlace con proteínas y, por tanto, en la actividad biológica.^{23,31} Además, la síntesis química puede proporcionar secuencias no naturales y análogos, como potenciales herramientas para modular las interacciones proteína-GAG.

Así, en la presente Tesis Doctoral se aborda la preparación de oligosacáridos de HA y CS para el estudio de sus interacciones con diversas proteínas, mediante, por ejemplo, técnicas de RMN y polarización de fluorescencia.

La síntesis de oligosacáridos no es trivial. Las numerosas purificaciones cromatográficas de los intermedios complican y alargan la preparación de estas moléculas, obteniendo muchas veces rendimientos globales muy bajos. Un ejemplo representativo en este sentido es la síntesis de Arixtra, para la cual se requieren alrededor de 50 pasos de reacción con un rendimiento global de tan sólo el 0.1%.³⁸

Además, en el caso específico de la síntesis de glicosaminoglicanos, la utilización de bloques pocos reactivos (como es el caso de los ácidos urónicos), la formación de intermedios de reacción no deseados en las glicosidaciones (como las oxazolinas) y las dificultades asociadas a las reacciones de desprotección y sulfatación finales, complican y dificultan la preparación de estas moléculas.

En la presente Tesis Doctoral se desarrollan estrategias sintéticas que tratan de solventar algunos de estos problemas.

En concreto los objetivos de esta Memoria son los siguientes:

- Preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico para el estudio, a nivel molecular, de sus interacciones con proteínas, como langerina y CD44, mediante experimentos de RMN. Dado que uno de los más importantes problemas en la síntesis de oligosacáridos es el gran número de purificaciones cromatográficas requeridas, se evaluará el uso de etiquetas perfluoradas para facilitar las purificaciones de los intermedios de reacción.
- Desarrollo de una nueva ruta sintética para la obtención de oligosacáridos de sulfato de condroitina, con el objetivo de solucionar algunos de los problemas más comunes asociados con la preparación de estos compuestos (bajos rendimientos en las reacciones de glicosidación y dificultades en las reacciones de desprotección-sulfatación). Para ello se usarán nuevos bloques monosacáridicos de *N*-acetil galactosamina, protegidos con un grupo *N*-trifluoroacetilo. Se empleará radiación microondas para facilitar la introducción de los grupos sulfato en las posiciones deseadas, uno de los puntos críticos de la síntesis paso a paso. El esquema sintético deberá permitir acceder a oligosacáridos con distintos patrones de sulfatación.
- Puesta a punto de experimentos basados en medidas de fluorescencia para evaluar la interacción de los oligosacáridos GAG sintetizados con determinadas proteínas. Los estudios se llevarán a cabo en microplacas estándar, con un lector de fluorescencia convencional, usando FGF-2 como proteína modelo.

CAPÍTULO 3.

**SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS
DE ÁCIDO HIALURÓNICO.**

3. Síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.

3.1. Antecedentes.

En los últimos años el interés hacia el ácido hialurónico ha crecido enormemente, no sólo por su utilización en cosmética y en la industria médico-farmacéutica, sino también por su participación en otros procesos biológicos como el crecimiento tumoral. Desde su descubrimiento se han hecho muchos avances hacia un conocimiento completo de la estructura y de la función biológica de este polisacárido.

En 1934, Karl Meyer y su colaborador, John Palmer, describieron un procedimiento para aislar un novedoso glicosaminoglicano del cuerpo vítreo de ojos bovinos.¹² Ellos demostraron que esta sustancia contenía un ácido urónico y un aminoazúcar, pero carecía de grupos sulfato. Con el nombre de

ácido hialurónico (de la fusión de *hyaloid*, vítreo, y ácido urónico) marcaron, así, el anuncio del descubrimiento de una nueva macromolécula, subrayando su característica de existir *in vivo* como molécula polianiónica y no en la forma de ácido protonado.

Se necesitarían otros 20 años para que el laboratorio de Meyer completara finalmente el estudio que determinó la estructura química precisa del motivo disacárido básico que forma el ácido hialurónico.³⁹ Durante estos años se demostró que el ácido urónico y el aminoazúcar en la unidad repetitiva son, respectivamente, el ácido D-glucurónico (GlcA) y la N-acetil glucosamina (GlcNAc), y que están unidos entre sí a través de la alternancia de enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 16).

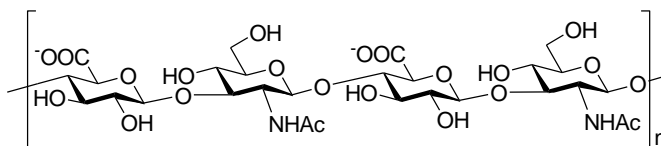


Figura 16. Fragmento de ácido hialurónico de tamaño tetrasacárido y de secuencia $[\text{GlcA}\beta(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcA}\beta(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}]_n$

Desde la primera síntesis de un disacárido de HA publicada por Jeanloz en 1964,⁴⁰ se han descrito varias rutas sintéticas para la construcción de oligómeros que pueden tener indistintamente un bloque de GlcA o uno de GlcNAc en el extremo reductor.⁴¹

En los trabajos publicados durante estos años, se han utilizado, en líneas generales, dos métodos para la obtención de oligosacáridos de ácido hialurónico. Por un lado, una síntesis clásica, definida como “paso a paso” (del inglés *stepwise*), que requiere la purificación de los productos intermedios después de cada una de las etapas que componen la ruta sintética general. Por otro lado, un método más novedoso, definido con el término

inglés *one-pot*, “en un solo recipiente”, donde múltiples glicosidaciones secuenciales pueden llevarse a cabo en el mismo matraz de reacción, sin purificación intermedia, lo que permite la construcción de oligosacáridos de ácido hialurónico en unas pocas horas. Además, la naturaleza repetitiva del polímero de HA y los recientes avances en la química sintética han estimulado, en los últimos años, el desarrollo de aproximaciones sintéticas en fase sólida para la preparación de este glicosaminoglicano.

A continuación, veremos en detalle algunas de las estrategias que se han usado para la síntesis de estas moléculas.

Jacquinet y colaboradores ⁴² describieron la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico utilizando un método clásico en solución. Los bloques de glucosamina empleados contenían un grupo tricloroacetilo (TCA) para bloquear la posición amino: es éste el caso del monosacárido **1** (Figura 17). En todas las síntesis precedentes, el residuo de ácido D-glucurónico se obtenía, después de la construcción del oligosacárido, por oxidación selectiva en C-6 de un residuo de la D-glucosa correspondiente. Sin embargo, en el diseño sintético de Jacquinet, para las reacciones de glicosidación, se utilizó directamente un bloque de ácido D-glucurónico (monosacárido **2**, Figura 17).

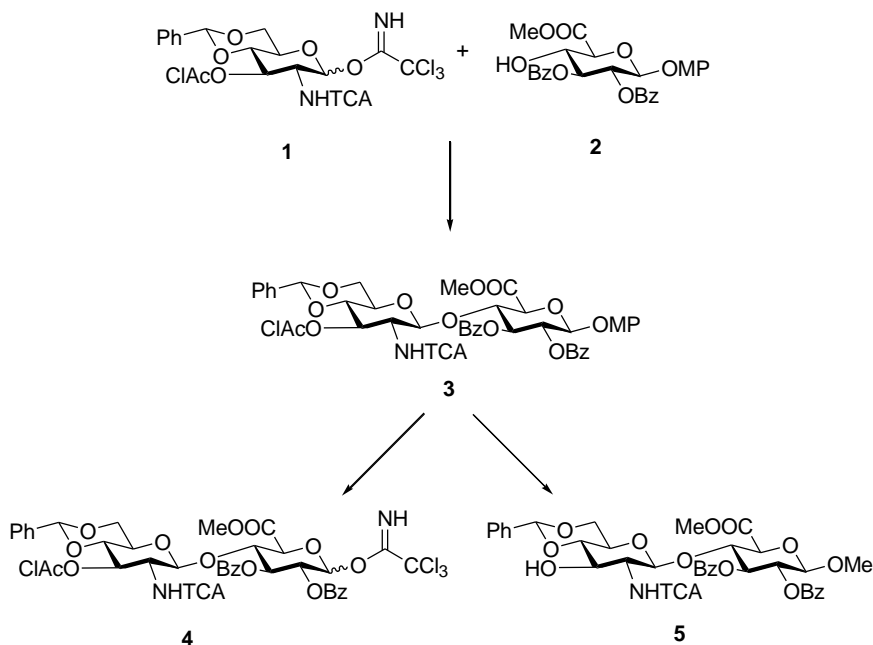


Figura 17. La glicosidación entre el donador de glucosamina **1** y el aceptor de ácido glucurónico **2** proporcionó el disacárido **3**, producto de partida para obtener el donador y el aceptor disacárido **4** y **5**.

Así, con estos dos bloques monosacáridicos (**1** y **2**) y empleando el método del tricloroacetimidato para la formación del enlace glicosídico, se preparó el bloque disacárido **3**, que fue fácilmente transformado en el correspondiente donador **4** y aceptor **5** (Figura 17).

Con estos disacáridos (**4** y **5**), y utilizando una *estrategia modular* “2+2”, se sintetizaron un tetrasacárido, un hexasacárido y un octasacárido completamente protegidos (**6-8**, Figura 18).

Los grupos participantes 2-OBz y 2-NHTCA permitieron la obtención de los 1,2-*trans*-glicósidos deseados. La completa desprotección de estos derivados, para la preparación de los oligosacáridos **9-11** (Figura 18), se llevó a cabo por tratamiento con Bu_3SnH (hidruro de tributil estaño) y AIBN

(azoisobutironitrilo), obteniendo así los acetamidos correspondientes, seguido de hidrólisis ácida de los bencilidén acetales y saponificación.

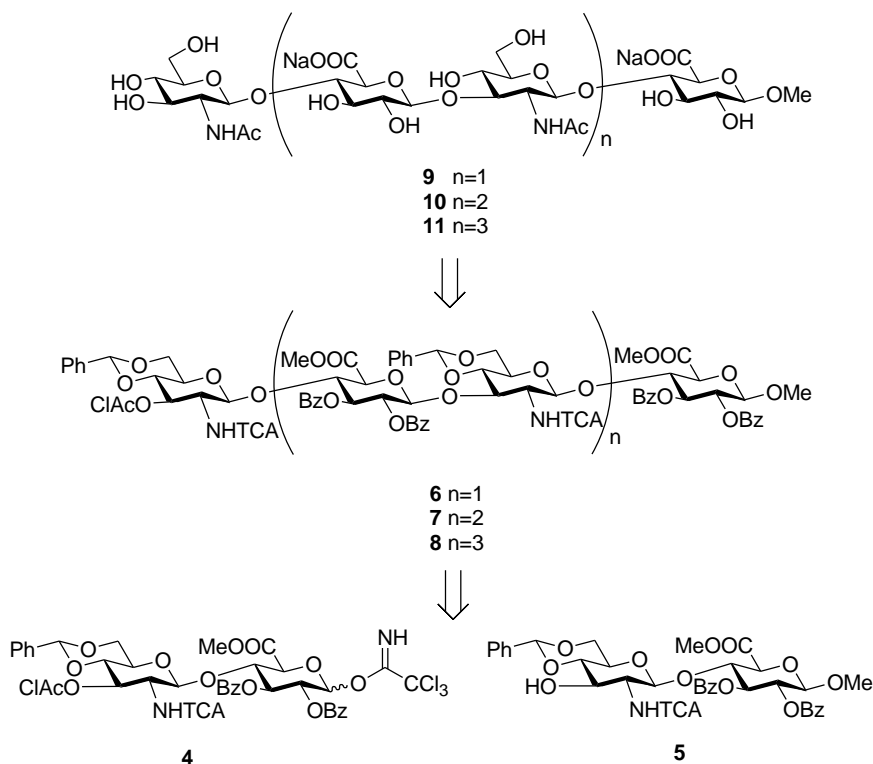


Figura 18. Esquema retrosintético para la preparación de los oligosacáridos finales **9-11**, utilizando los bloques disacáridicos **4** y **5**.

Estas estrategias sintéticas clásicas, paso a paso, aunque proporcionan de forma eficiente oligosacáridos de ácido hialurónico, requieren un gran número de purificaciones por columna cromatográfica, hecho que complica y alarga los tiempos de preparación de estos compuestos.

A lo largo de esta Tesis han ido apareciendo varios trabajos relacionados con la síntesis de ácido hialurónico, hecho que indica la importancia creciente de estas biomoléculas en los últimos años. En ellos se subraya la necesidad de

desarrollar nuevos métodos que tienen como objetivo facilitar la purificación de los intermedios de reacción, disminuyendo el tiempo necesario para la preparación de estas biomoléculas (métodos *one-pot* y síntesis en fase sólida).

Veremos, en primer lugar, el trabajo desarrollado en los últimos años por el grupo de investigación de Huang y colaboradores⁴³ de la Universidad de Michigan (EEUU). En estos trabajos, debido a la baja reactividad de los ácidos glucurónicos, se empleó un bloque de glucosa en su lugar (monosacárido **12**, Figura 19). En esta estrategia, un grupo protector ortogonal, el *p*-metoxibencilo (PMB), se introdujo en la posición 6 de la unidad de glucosa. La desprotección selectiva y posterior oxidación de la posición 6 de todas las glucosas presentes en la cadena se llevó a cabo tras las glicosidaciones y dio lugar a los productos finales de HA con los correspondientes carboxilatos.

Como método de glicosidación se eligió, como alternativa a los tricloroacetimidatos, los tioglicósidos (**12** y **13**, Figura 19). El grupo tiotolilo (STol) tiene la ventaja de ser estable a muchas de las condiciones utilizadas en la síntesis de GAGs y de ser fácilmente activado por una gran variedad de promotores. Además, estos donadores pueden ser almacenados en nevera durante meses sin descomposición.

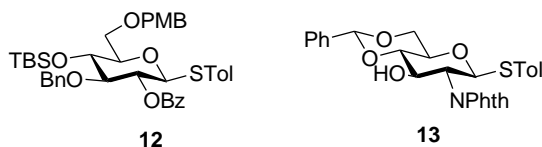


Figura 19. Tioglicósido de glucosa **12**, utilizado como donador. Tioglicósido de glucosamina **13**, utilizado como aceptor.

Siguiendo el esquema de pre-activación del donador **12** representado en la Figura 20a, se sintetizó el bloque disacárido **14**, utilizado como donador en las siguientes reacciones de glicosidación, y como producto de partida para la preparación de los disacáridos aceptores **15** y **16** (Figura 20b).

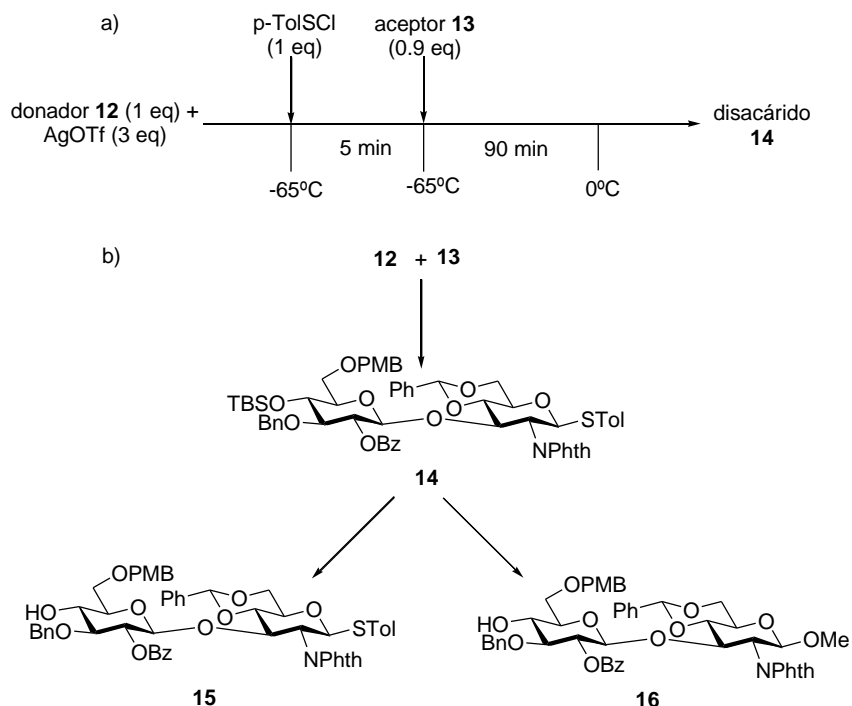


Figura 20. a) El tioglicósido **12** se activa en ausencia del aceptor con *p*-TolSOTf, generado *in situ* haciendo reaccionar *p*-TolSOTf con AgOTf a -65°C. En este punto se añade el aceptor **13** que reacciona para dar el disacárido correspondiente **14**. b) El disacárido **14** se utilizó para preparar los dos aceptores **15** y **16**.

Con estos bloques disacáridos (**14-16**), Huang y colaboradores desarrollaron una síntesis one-pot de un hexasacárido de ácido hialurónico (Figura 21). En esta estrategia, basada en la pre-activación del donador **14** y sucesiva adición de los aceptores **15** y **16** (Figura 21), pueden llevarse a cabo múltiples glicosidaciones secuenciales en el mismo recipiente de reacción sin

purificación intermedia, permitiendo así la construcción de oligosacáridos de HA en pocas horas, como por ejemplo el hexasacárido **17**.⁴³

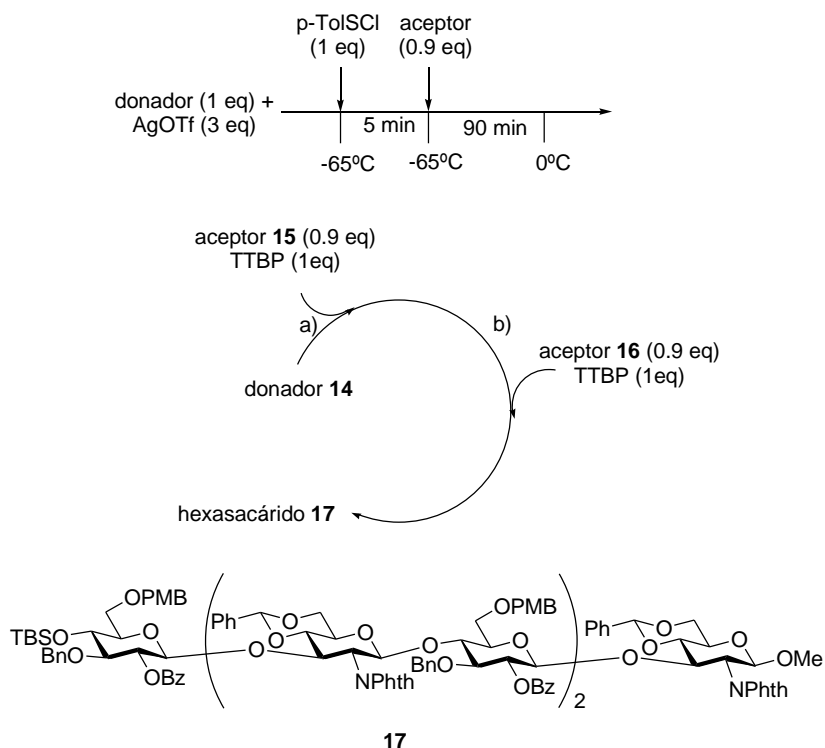


Figura 21. Esquema de la síntesis one-pot del hexasacárido de HA **17**, utilizando los bloques disacarídicos **14**, **15** y **16** previamente preparados. Reactivos y condiciones: a) AgOTf, *p*-TolSCl, -65°C, 10 minutos; acepto **15**, TTBP, 90 minutos a 0°C; b) acepto **16**, TTBP, AgOTf, *p*-TolSCl, -65°C→0°C en 90 minutos. TTBP (tri-*tert*-butilpirimidina)

Sin embargo, a pesar de la eficiencia de esta estrategia *one-pot*, Huang y colaboradores encontraron muchas dificultades a la hora de desproteger el oligosacárido sintetizado, concretamente en la hidrólisis del PMB y en la posterior oxidación de las posiciones 6 de las glucosas.⁴⁴ Además, las condiciones drásticas requeridas para la desprotección de los grupos ftalimido (*N*-Phth) resultaron ser incompatibles con los ésteres carboxílicos presentes en la cadena.

Debido a las dificultades encontradas en las reacciones de desprotección, Huang y colaboradores decidieron abandonar el grupo Phth y considerar el uso del tricloroacetilo (TCA) como grupo protector alternativo para el nitrógeno en la posición 2 de la glucosamina. Además, decidieron oxidar la posición 6 de las glucosas a nivel disacárido.

Sobre la base de estas consideraciones, se diseñó una nueva ruta retrosintética para la preparación del decaacárido **24** (Figura 22). El compuesto totalmente protegido **23** se sintetizó a partir de los disacáridos **20**, **21** y **22** (que ya contienen ácido glucurónico), que a su vez derivan de los bloques monosacáridicos **12**, **18** y **19**.

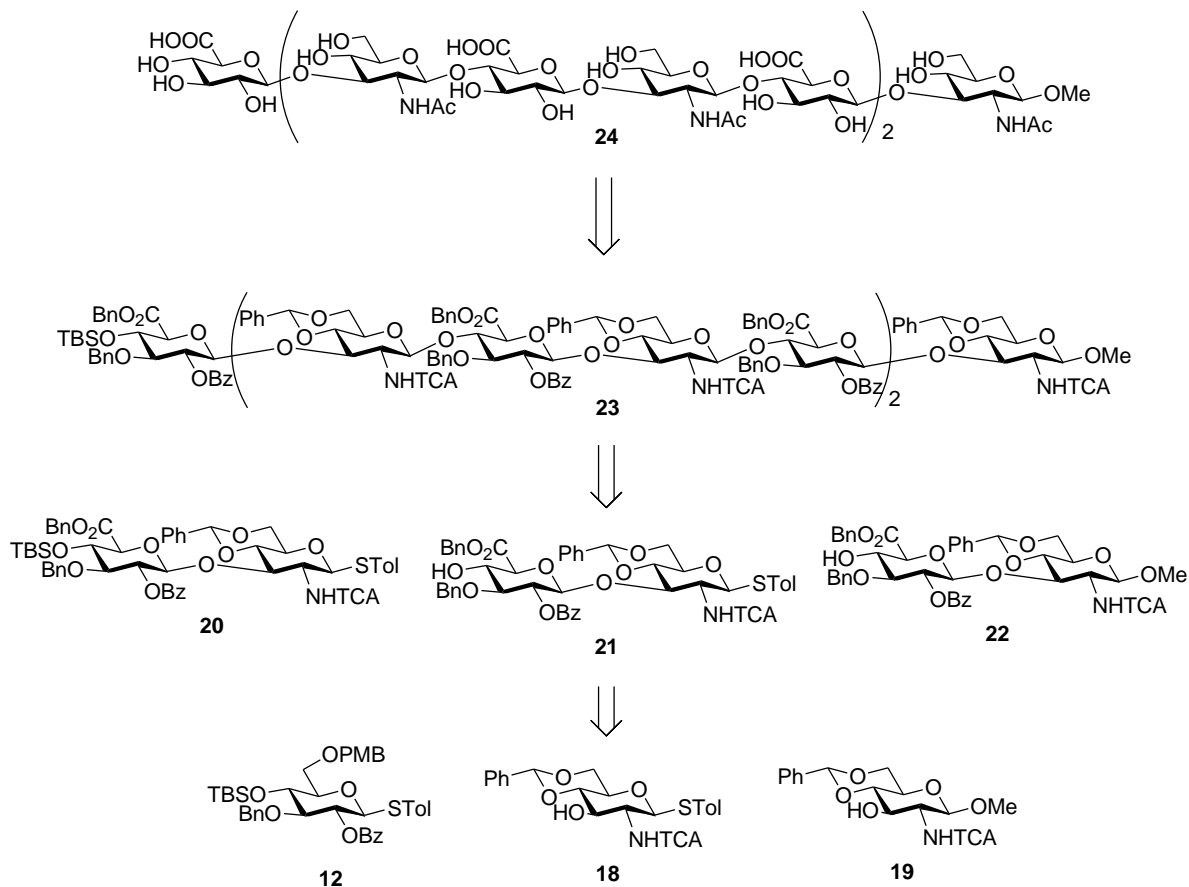


Figura 22. Los bloques monosacáridicos **12**, **18** y **19** se utilizaron para preparar los disacáridos **20**, **21** y **22**, que contienen los ésteres benzílicos de los bloques de ácido glucurónico. El decasacárido **23** se desprotegió para dar el producto final **24**.

Hay que resaltar que Huang y colaboradores se encontraron nuevamente con varios problemas en la síntesis del decasacárido **24**. Por ejemplo, los primeros ensayos de la reacción de glicosidación entre el donador **20** y el aceptor **21** dieron cuantitativamente la correspondiente oxazolina **25** (Figura 23a) y no el tetrasacárido deseado. El mecanismo que explica la formación de este producto secundario se muestra en el esquema de la Figura 23b.

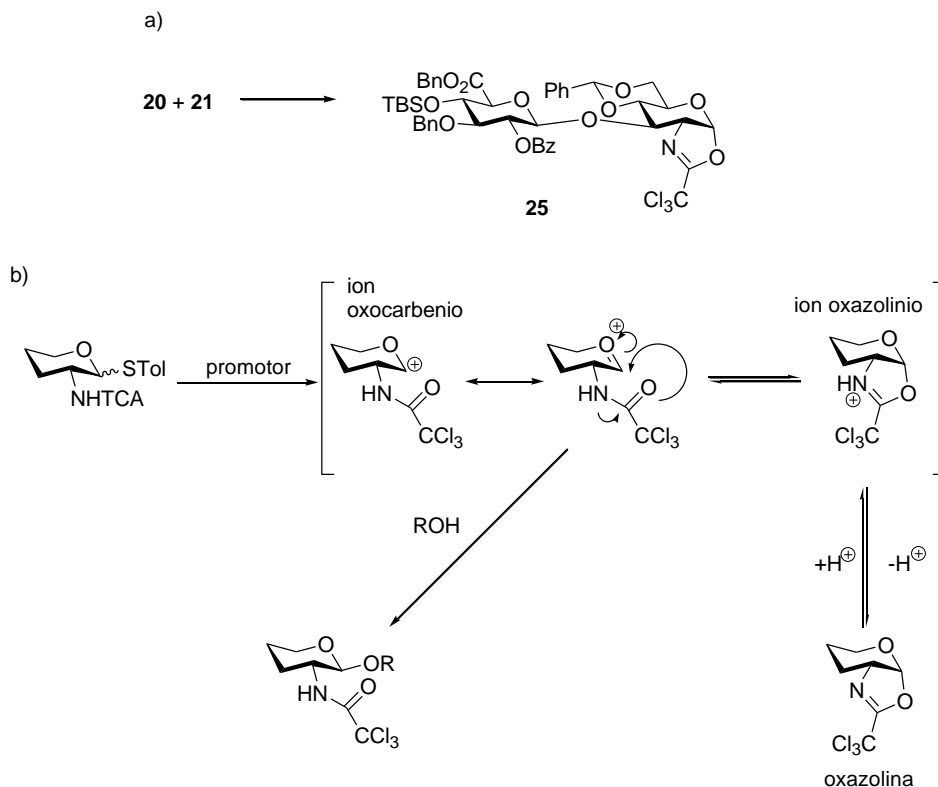


Figura 23. a) Los primeros ensayos de glicosidación entre el donador **20** y el aceptor **21** dieron cuantitativamente la oxazolina **25**. b) Esquema que explica la formación de la oxazolina y del glicósido deseado.

Según este esquema, el promotor, en este caso el *p*-TolSOTf generado *in situ*, activa el donador, generando el correspondiente catión oxocarbenio que está en equilibrio con el catión oxazolinico. Éstas son las especies que reaccionan con el nucleófilo aceptor (ROH) para dar el glicósido deseado. La desprotonación del ion oxazolinio, promovida por la presencia de una base, la TTBP (tri-*tert*-butilpirimidina), conduce a la formación de la triclorooxazolina correspondiente, estable y menos reactiva como donador de glicosilo. Así se podría explicar la formación cuantitativa del intermedio **25** en la glicosidación de la Figura 23a.

Sólo cuando estos investigadores estadounidenses eliminaron el uso de la base y usaron una cantidad adicional de triflato de trimetilsililo (TMSOTf), consiguieron preparar, con buenos rendimientos, el tetrasacárido. Según el esquema de la Figura 23b, de esta manera se impide la desprotonación del ion oxazolinio y, en consecuencia, la formación de la oxazolina, lo que se traduce en el avance de la reacción con formación del glicósido deseado.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, y prácticamente en paralelo a la publicación de Huang y colaboradores, nos hemos encontrado el mismo problema en la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico, como se verá más en detalle en este capítulo (Apartado 3.2.1.3.).

Pasamos ahora a describir el trabajo de Van der Marel y colaboradores, de la Universidad de Leiden (Holanda), que han optimizado, en los últimos años, una ruta sintética en solución para la preparación de oligómeros de HA. Los resultados obtenidos han permitido el desarrollo de la primera síntesis en fase sólida de este tipo de biomoléculas.

La primera estrategia descrita por este grupo holandés⁴⁵ se basó en el uso de los bloques monosacáridicos **26** y **27** (Figura 24). El bloque de ácido glucurónico **26**, un 1-hidroxiázúcar, se condensó con un aceptor 1-tiofenilo, la glucosamina **27**, protegida en la posición amino con un tricloroacetilo. Utilizando el complejo de activación Ph₂SO/Tf₂O, se obtuvo el disacárido **28**. Con el objetivo de neutralizar el TfOH generado *in situ* y evitar así la hidrólisis ácida del benciliden acetal se usó una base, la TTBP. El tio-disacárido **28** se utilizó como núcleo de elongación de la cadena, tanto en el extremo reductor (donador) como en el extremo no reductor (aceptor).

Así, la glicosidación entre este disacárido donador y el aceptor **29** dio el trisacárido **30**, adecuadamente protegido en su posición anomérica con un espaciador 3-azidopropanol.

El aceptor correspondiente, el trisacárido **31**, se glicosidó con el donador **28** para dar el pentasacárido **32**. Finalmente, la hidrólisis ácida del bencilidén acetal seguida por la saponificación y la *N*-acetilación selectiva dio el compuesto final desprotegido **33** (Figura 24).

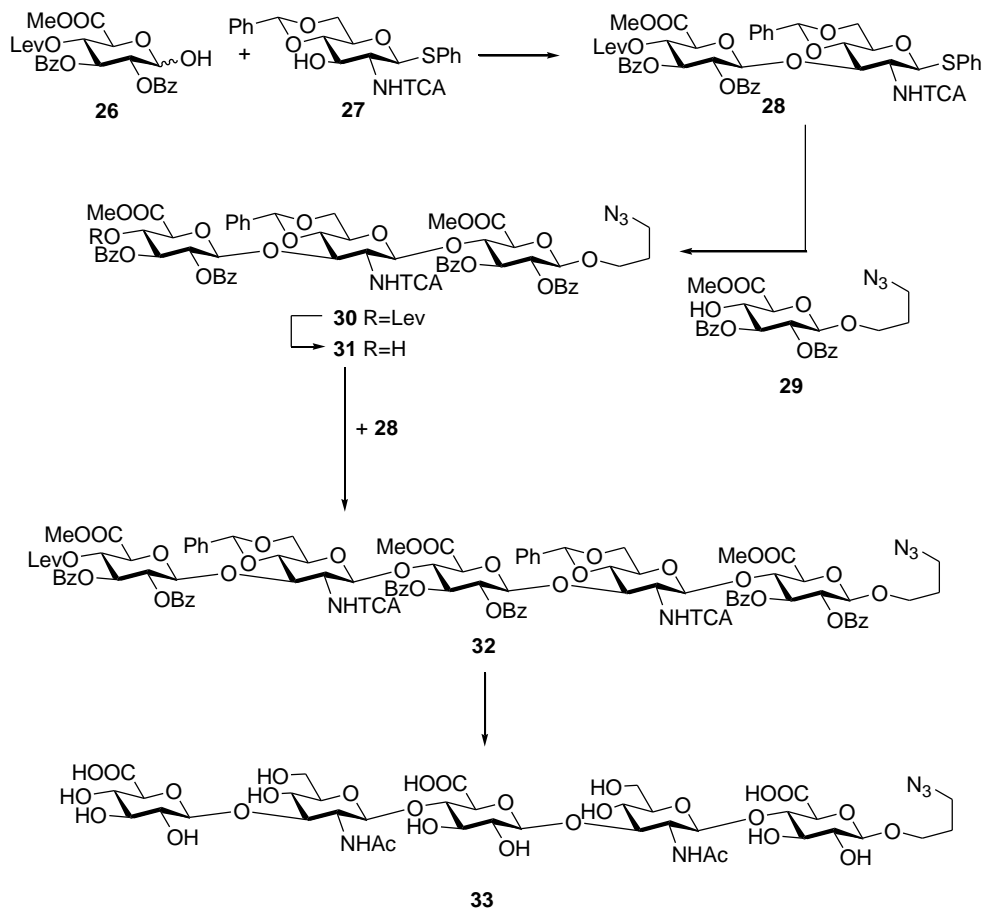


Figura 24. Esquema sintético para la obtención del pentasacárido de HA **33**, protegido en su posición anomérica por un 3-azido propanol.

En este trabajo de van der Marel hay que subrayar que el uso de una estrategia one-pot para la síntesis del trisacárido **30** no dio buenos rendimientos,

preferiéndose, así, la síntesis clásica paso a paso. En cualquier caso, los rendimientos de las glicosidaciones fueron moderados.

Un inconveniente de este primer diseño sintético fue la dificultad que encontraron en la optimización de las cantidades de base necesarias. El uso de una pequeña cantidad de base (TTBP) dio lugar a la hidrólisis del grupo bencilideno (debida a la incompleta neutralización del TfOH), mientras que utilizando un exceso de TTBP se observó la formación de ortoésteres y oxazolininas (véase también la Figura 23b).

Con el fin de evitar estos problemas, van der Marel y colaboradores publicaron una segunda ruta sintética donde decidieron utilizar el grupo protector di-*tert*-butilsililideno (DTBS) para bloquear los hidroxilos C4 y C6 del residuo de glucosamina. Este nuevo grupo tiene la ventaja de ser mucho más estable en medio ácido y permitió, de esta manera, evitar el uso de una base para neutralizar la acidez del medio de reacción.

Este nuevo esquema sintético llevó a la preparación del heptasacárido **38** (Figura 25).⁴⁶ Como se puede ver en la Figura 25, el *N*-feniltrifluoroacetimidato de glucosamina **34** se glicosidó con el aceptor feniltioglicósido **35**, obteniendo así el correspondiente disacárido **36**, que se utilizó en la siguiente glicosidación con el aceptor **37**. Tras deslevulinación y glicosidación del oligosacárido correspondiente, obtuvieron el compuesto final **38**, con rendimientos muchos mejores que los de la primera aproximación.

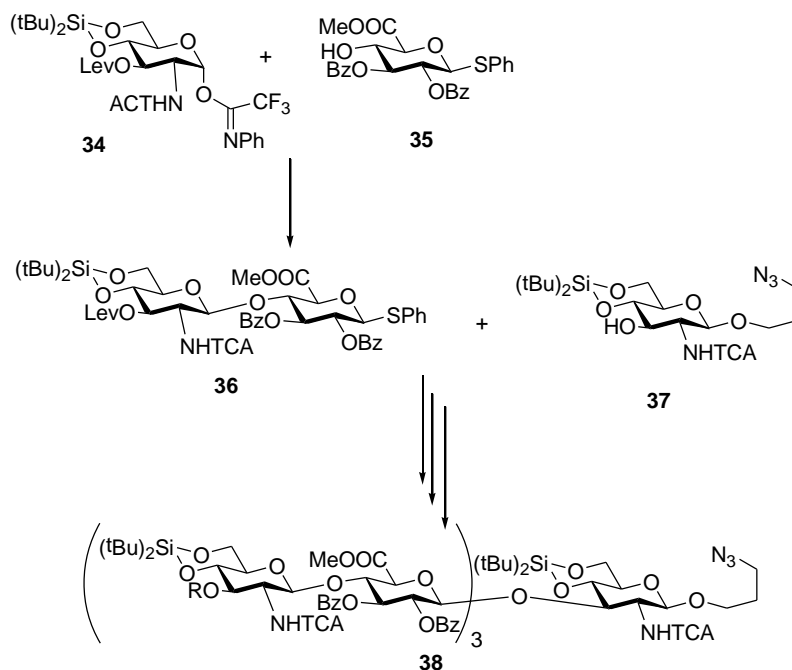


Figura 25. Esquema sintético para la preparación del heptasacárido **38**. Un di-*tert*-butilsililideno protege las posiciones 4 y 6 de los residuos de glucosamina.

La optimización de esta ruta sintética en solución, abrió el camino al desarrollo de la primera síntesis en fase sólida de oligosacáridos de ácido hialurónico ⁴⁷ (Figura 26).

A diferencia de la síntesis automatizada de oligopéptidos y oligonucleótidos, la síntesis en fase sólida automatizada de carbohidratos no es todavía una operación de rutina y se ve obstaculizada por la falta de un conjunto estándar de bloques monosacáridicos y disacáridicos de partida y por las dificultades inherentes a la química de los carbohidratos (por ejemplo, adecuada regio y estereoselectividad del enlace glicosídico, condiciones anhidras, temperatura de trabajo). Un reto importante en el caso del HA (y de los GAGs en general) es la baja reactividad de los bloques de ácido glucurónico. Este hecho obliga, la mayoría de las veces, a utilizar un exceso de bloques de partida y muchos

ciclos repetitivos de reacción, lo que implica el uso de grandes cantidades de sustancias de partida y de promotor en las glicosidaciones.

El esquema sintético de la Figura 26 resume la estrategia puesta a punto por el grupo de investigación de van der Marel.⁴⁷ En primer lugar, el sintón de glucosamina **34** se condensó con una resina Merrifield funcionalizada con un espaciador butendiol, generando el bloque de partida para poder elongar la cadena oligosacáridica. El uso repetitivo del disacárido **39**, de secuencia GlcN-GlcA, protegido ortogonalmente con un grupo levulino en la posición 3, permitió la preparación, después de 7 ciclos, del pentadecámero **40** (Figura 26).

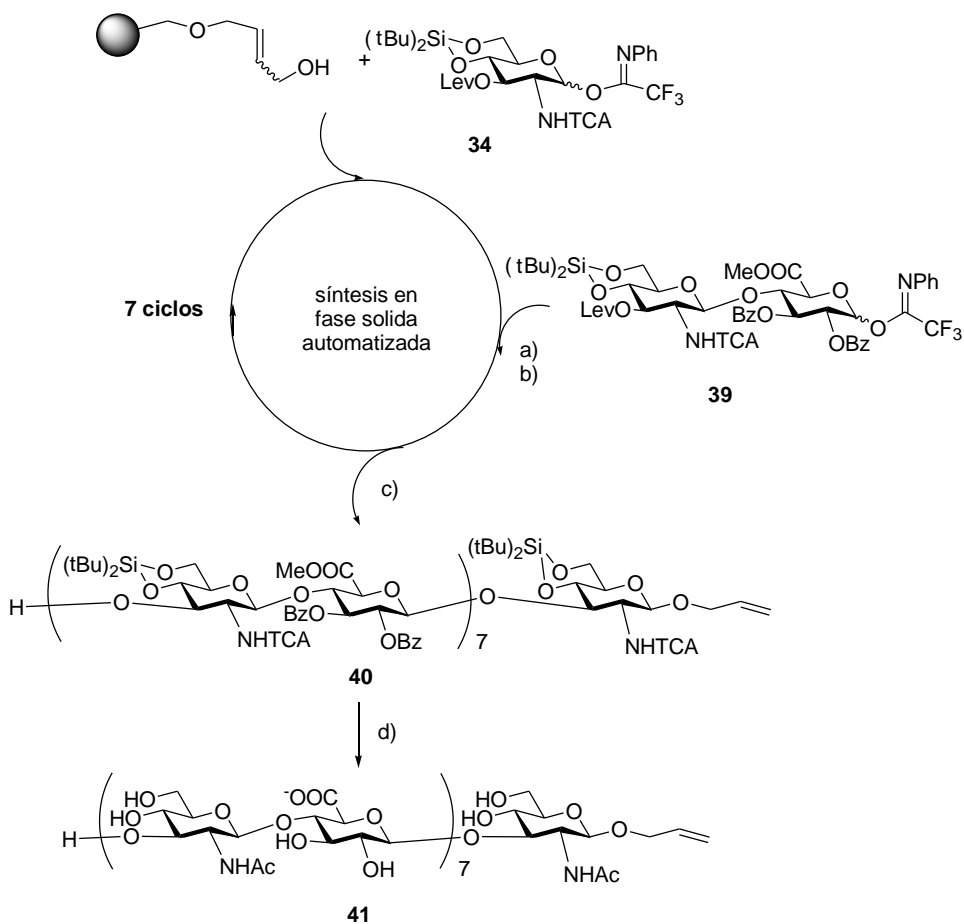


Figura 26. Síntesis en fase sólida automatizada del pentadecámero **41**. Reactivos y condiciones a) TfOH (cat.), CH₂Cl₂ (3 x 30 min), 2.7 eq. de donador; b) NH₂NH₂, Py/AcOH (2x10 min); c) catalizador de Grubbs, Cl₃CC(=O)NH₂, CH₂=CH₂, CH₂Cl₂; d) Et₃N/HF, THF; KOH, H₂O, THF; Ac₂O, NaHCO₃, H₂O.

Como ya hemos dicho anteriormente, esta estrategia sintética presenta un punto débil. En cada ciclo de glicosidación se utilizan hasta 3 equivalentes de donador, lo que implica un enorme gasto de productos de partida muy valiosos. Además, las grandes cantidades de promotor necesarias para activar los donadores, limitan la elección de grupos protectores estables en estas condiciones.

El espaciador butendiol fue compatible con todas las condiciones de reacción utilizadas. Los oligosacáridos se desanclaron finalmente por metátesis de

olefinas, utilizando el catalizador de Grubbs, dejando, así, la posición anomérica protegida por un grupo alilo. Después de hidrólisis del sililidén acetal, saponificación y *N*-acetilación se obtuvo el pentadecámero deseado **41**.

Describiremos, a continuación, los resultados obtenidos durante esta Tesis, en relación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.

3.2. Resultados y discusión.

En el marco de un proyecto más amplio enfocado al desarrollo de novedosas rutas sintéticas de glicosaminoglicanos y con el objetivo de evaluar interacciones carbohidrato-proteína mediante experimentos de RMN como el STD (del inglés *saturation transference difference*), se presenta a continuación la preparación de dos disacáridos de ácido hialurónico, **42** y **43**, y de un trisacárido y un tetrasacárido, **44** y **45** (Figura 27), protegidos en el extremo reductor por un espaciador 3-azidopropanol o por un grupo 4-metoxifenilo.

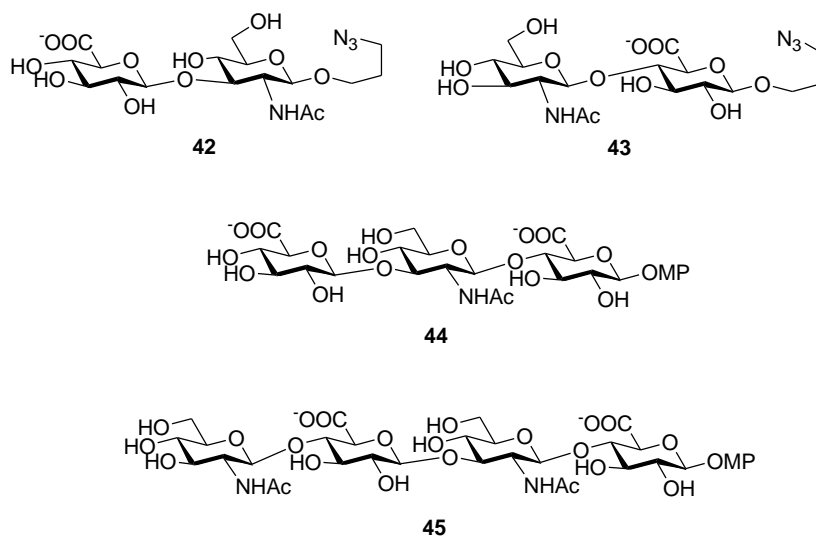


Figura 27. Oligosacáridos de ácido hialurónico sintetizados a lo largo de esta Tesis Doctoral. Los disacáridos están funcionalizados en su posición anomérica por un 3-azido propanol. El trisacárido y el tetrasacárido están protegidos con un grupo 4-metoxifenilo.

En líneas generales, la síntesis de oligosacáridos de HA requiere la preparación previa de bloques de glucosamina y de ácido glucurónico adecuadamente protegidos, para poderlos ensamblar, formando las cadenas oligosacarídicas.

En principio, decidimos utilizar bloques peracilados con el fin de facilitar la generación de las estructuras totalmente desprotegidas. Con este primer patrón de grupos protectores, los productos finales se pueden obtener a partir de los precursores protegidos en sólo dos etapas, hidrólisis alcalina y *N*-acetilación (apartado 3.2.1).

Con el objetivo de mejorar los rendimientos de las glicosidaciones y evitar algunos problemas encontrados en la primera aproximación sintética, se diseñó un nuevo esquema retrosintético donde los bloques monosacáridos peracilados y desactivados son sustituidos por azúcares más reactivos debido a la presencia de grupos protectores donadores de electrones como los bencilos (apartado 3.2.2).

Una vez puesto a punto un patrón de grupos protectores adecuado para la construcción de oligosacáridos en solución, éste se aplicó a la síntesis de fragmentos de ácido hialurónico asistida por un espaciador perfluorado. Aunque todavía quedan algunos problemas por resolver, hemos conseguido sintetizar un trisacárido, simplificando de esta manera la purificación de los intermedios de reacción (apartado 3.2.3).

Finalmente, los dos disacáridos sintetizados han sido utilizados para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína mediante experimentos STD de RMN, utilizando como proteína modelo la langerina (apartado 3.2.4).

3.2.1. Primera aproximación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.

En principio, se diseñó un esquema retrosintético enfocado a la preparación de oligosacáridos de HA tanto de secuencia GlcA-GlcN, como de secuencia opuesta GlcN-GlcA, protegidos por un espaciador 3-azidopropanol en la posición anomérica del terminal reductor (Figura 28). Esta estrategia puede ser empleada para la síntesis de oligosacáridos de diferente tamaño.

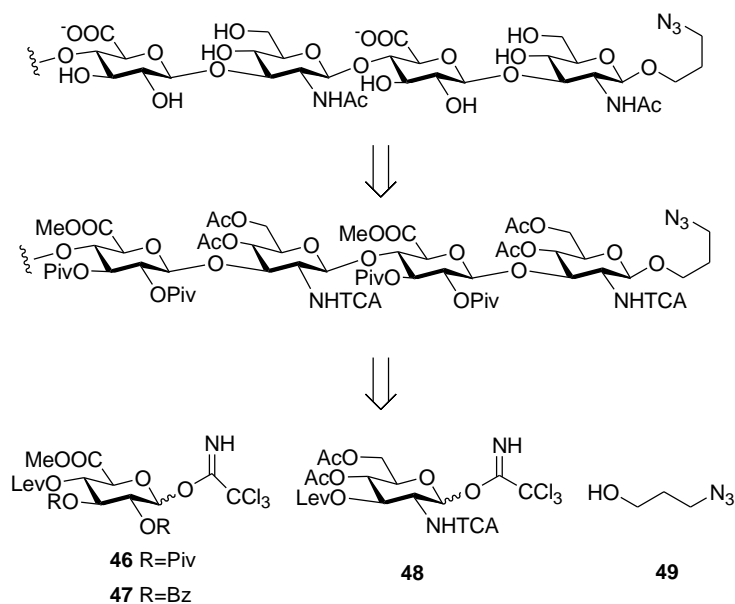


Figura 28. Análisis retrosintético de la primera aproximación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.

Para la obtención de los oligosacáridos es necesaria la preparación previa, y a escala multigramo, de los bloques monosacáridicos de ácido glucurónico **46** y **47** y de glucosamina **48**, que tienen un adecuado patrón de grupos protectores. También se preparó el espaciador 3-azidopropanol **49**.

Como grupo protector ortogonal se utilizó el levulino (Lev) que nos permitió proteger temporalmente los aceptores de glicosilo. Este grupo pudo desprotegerse fácil y selectivamente a través de un tratamiento con acetato de hidracina para dar el correspondiente aceptor, permitiendo así la elongación de la cadena oligosacáridica, tras reacción con el correspondiente donador.

Para proteger la posición 2 de la unidad de glucosamina hemos utilizado el grupo tricloroacetilo (TCA). Con este grupo protector podemos controlar la estereoselectividad del enlace glicosídico obteniendo así los 1,2-*trans* glicósidos correspondientes. Al mismo tiempo, su desprotección puede llevarse a cabo al final de la síntesis para obtener las moléculas objetivo, acetiladas en la posición amino. Por otro lado, para proteger la posición 2 de las unidades de GlcA se eligieron grupos acilo participantes, concretamente pivaloato y benzoato, que permiten dirigir la estereoselectividad del enlace glicosídico hacia el 1,2-*trans* glicósido deseado. Como puede verse en la Figura 28 se han empleado directamente unidades de ácido glucurónico en las glicosidaciones y no derivados de glucosa. A pesar de la baja reactividad de los bloques de glucurónico, se evitan, con esta estrategia, las dificultades relacionadas con una oxidación posterior a la glicosidación (ver antecedentes, apartado 3.1).

Como grupo saliente de los donadores, tanto de glucurónico como de glucosamina, se han empleado tricloroacetimidatos de glicosilo, uno de los métodos de glicosidación más ampliamente usados en la química de carbohidratos.⁴⁸

La posición anomérica del terminal reductor se protegió previa y ortogonalmente con el espaciador 3-azidopropanol **49**.⁴⁹ Este espaciador nos permitió, al mismo tiempo, bloquear la posición anomérica del oligosacárido y permitir su posterior bio-conjugación con otras macromoléculas o superficies.

Finalmente, utilizando estos bloques monosacáridicos se diseñó una *estrategia modular "1+1"*, en la que las unidades se añaden una a una a la cadena creciente. La elongación del oligosacárido ocurre a través de la liberación del aceptor (por deslevulinación) y consiguiente glicosidación con el correspondiente donador.

En los siguientes apartados (3.2.1.1 y 3.2.1.2) describiremos la síntesis detallada de las unidades de GlcA y GlcN empleadas en esta primera aproximación.

3.2.1.1. Preparación del tricloroacetimidato **48**, donador de glucosamina.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis del bloque monosacárido de glucosamina **48**, adecuadamente protegido, para poderlo utilizar como donador en las sucesivas glicosidaciones (Figura 29).

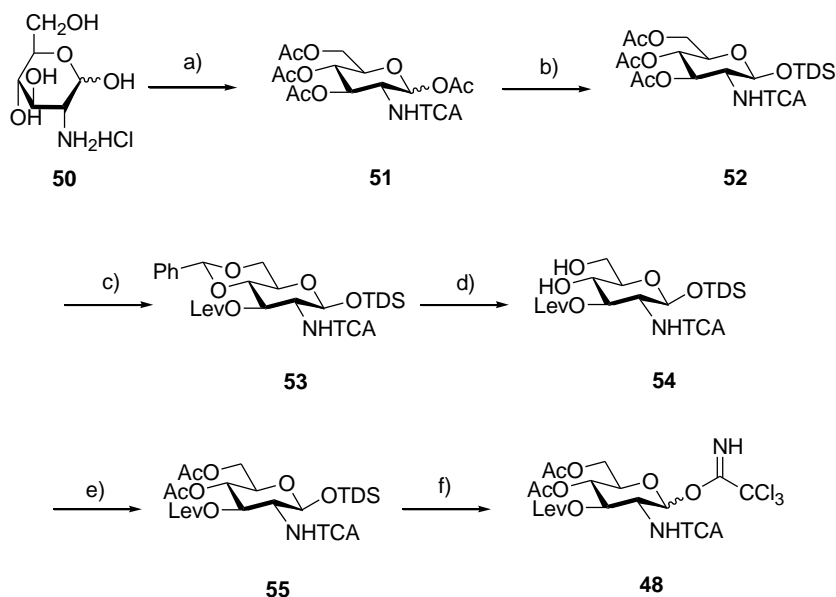


Figura 29. Síntesis del donador de glucosamina **48**. Reactivos y condiciones: a) $\text{Cl}_3\text{CC}(=\text{O})\text{Cl}$, MeOH, Et_3N ; Ac_2O , Py; b) BnNH_2 , THF; TDSCl, imidazol, CH_2Cl_2 , 80%; c) MeO^-Na^+ , MeOH; $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$, *p*-TsOH, CH_3CN ; LevOH, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , 76%; d) TFA, CH_2Cl_2 , 90%; e) Ac_2O , Py, 99%; f) $(\text{HF})_n$, Py, THF; Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , 75%.

La preparación a escala multigramo del bloque de glucosamina **48** se llevó a cabo empleando como material de partida el hidrocloreto de D-glucosamina **50**. Esta síntesis empezó con la introducción del grupo participante tricloroacetilo en la función amino libre del anillo (usando cloruro de tricloroacetilo y trietilamina en metanol) y posterior peracetilación de las restantes posiciones para dar el derivado **51**.^{46, 50} La posición anomérica se

desprotegió selectivamente con BnNH_2 en THF y se introdujo un grupo texildimetilsililo (TDS) para protegerla ortogonalmente (**52**, 80%). La desacetilación de las restantes posiciones, la protección selectiva con un 4,6-bencilidén acetal y, finalmente, la introducción del grupo temporal levulino (Lev) en 3 dio como producto el derivado **53** con un rendimiento final del 76%. Dada la inestabilidad del bencilidén acetal en presencia de ácidos de Lewis fuertes como el TMSOTf, que observamos en experimentos preliminares y que está descrita también en la bibliografía,⁴⁵ se decidió hidrolizar este grupo protector (**54**, 90%) y diacetilar para obtener el compuesto **55** (99%). Finalmente, la desprotección del silil éter de la posición anomérica y la posterior activación como tricloroacetimidato proporcionaron el compuesto deseado **48** con un rendimiento del 75%. Este compuesto, obtenido en seis pasos de reacción, actuará como donador de glicosilo de GlcN en nuestro esquema sintético.

3.2.1.2. Preparación del tricloroacetimidato **46**, donador de ácido glucurónico.

Paralelamente a la síntesis del imidato de glucosamina, se preparó, siguiendo el esquema de la Figura 30, el bloque de ácido glucurónico **46** que posee un adecuado patrón de grupos protectores.

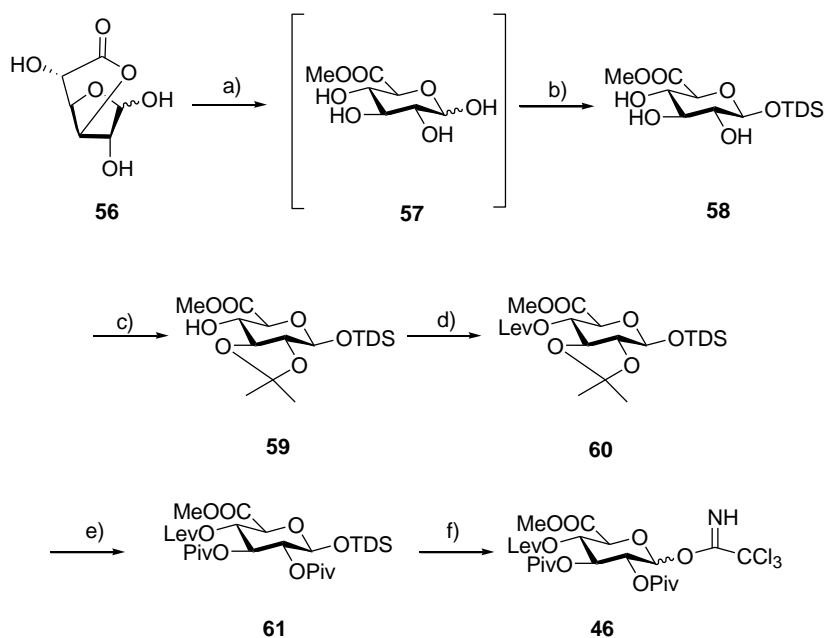


Figura 30. Síntesis del donador de ácido glucurónico **46**. Reactivos y condiciones: a) NaOH, MeOH; b) TDSCl, imidazol, CH₂Cl₂; 30% desde **56**, 2 pasos, no optimizado; c) 2-metoxipropeno, CSA, DMF, 0°C; MeOH, 0°C; 50%; d) LevOH, DCC, DMAP, CH₂Cl₂; 88% e) resina ácida DOWEX, MeOH; PivCl, Py; 78% f) (HF)_nPy, THF; Cl₃CCN, K₂CO₃, CH₂Cl₂; 72%.

Por tratamiento con NaOH en MeOH de la 6,3-D-glucuronolactona **56**, que permitió la apertura de la lactona y la formación del metiléster **57**, y posterior sililación selectiva de la posición anomérica, se obtuvo el derivado **58** con un rendimiento final para las dos etapas del 30% (rendimiento no optimizado). Para diferenciar los grupos OH del triol, se protegieron selectivamente las

posiciones 2 y 3 con un isopropilidén acetal (compuesto **59**, 50%). Junto a este producto, se obtuvo el isómero 3,4-isopropilidén acetal (36%), el cual puede ser fácilmente recuperado por hidrólisis ácida, obteniendo así nuevamente el triol de partida. El compuesto **59** se transformó en **61** a través de levulinación de la posición 4 (compuesto **60**, 88%), hidrólisis del 2,3-isopropilidén acetal y pivaloilación de las posiciones 2 y 3 (**61**, 78%). El compuesto **61** se desililó y se activó como tricloroacetimidato para dar el donador de glucurónico **46**,⁵¹ con un rendimiento del 72%.

3.2.1.3. Síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico utilizando la primera aproximación sintética.

Una vez sintetizados los dos bloques monosacáridicos a escala multigramo y el 3-azidopropanol **49**,⁴⁹ centramos nuestra atención en la glicosidación entre el tricloroacetimidato de glucosamina **48** y el espaciador **49**, para bloquear adecuadamente la posición anomérica del oligosacárido.

Para llevar a cabo con éxito esta glicosidación se usó la información obtenida en ensayos preliminares que se habían realizado con un tricloroacetimidato análogo al comienzo de esta Tesis Doctoral (Figura 31).

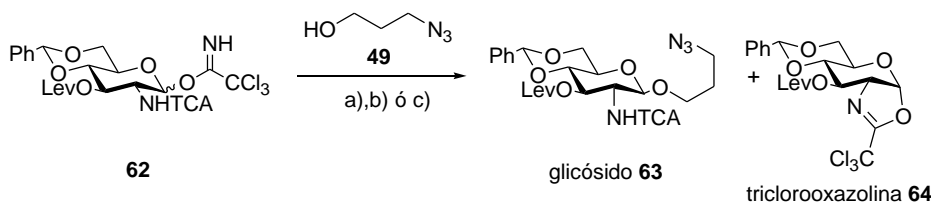


Figura 31. Protección de la posición anomérica con el espaciador 3-azido propanol. Reactivos y condiciones: a) TMSOTf 5%, CH₂Cl₂, 0°C: triclorooxazolina **64**; b) TMSOTf 5 + 5%, CH₂Cl₂, 0°C: 44% glicósido **63** y detección de triclorooxazolina **64**; c) TMSOTf 10%, CH₂Cl₂, 0°C: 58% glicósido **63** sin detección de triclorooxazolina **64**.

En general, para activar un tricloroacetimidato es suficiente con la adición de una pequeña cantidad catalítica (5%) de TMSOTf, el ácido de Lewis elegido como promotor de la glicosidación. (El porcentaje de TMSOTf se calcula con respecto al número de milimoles de donador). Sin embargo, cuando se usaron estas condiciones en la glicosidación de **62** con el espaciador **49**, se obtuvo cuantitativamente la triclorooxazolina **64** sin detectar la formación del glicósido **63** deseado. Esta oxazolina **64** resultó ser, por tanto, mucho más estable de lo esperado, según la bibliografía. Fue necesaria la adición de una mayor cantidad de TMSOTf (10%) para detectar la formación de **63** (Figura 31, condiciones b y c). Curiosamente, el mejor rendimiento se obtuvo tras la adición directa de un 10% de TMSOTf (58%, condición c), experimento en el que no se detectó formación de la oxazolina **64**. A pesar de optimizar las condiciones de reacción y obtener un rendimiento aceptable del glicósido **63**, hay que resaltar que detectamos también productos derivados de la hidrólisis del bencilidén acetal, hecho que nos obligó a descartar este grupo protector tal y como hemos indicado anteriormente.

Estos resultados parecen indicar que la glicosidación transcurre con mejor rendimiento cuando el medio es lo suficientemente ácido como para evitar la formación de la oxazolina intermedia (10% de promotor, condición c) y que, una vez formado este compuesto secundario, usando sólo un 5% de promotor, la reacción de glicosidación no procede con la misma eficiencia aunque añadamos un 5% adicional de TMSOTf (condición b, véase también la Figura 23). Es decir, aunque las triclorooxazolininas pueden actuar como donadores de glicosilo en reacciones de glicosidación,⁵² en nuestro caso la formación de estos intermedios hace que el acoplamiento transcurra con un menor rendimiento.

Con estos conocimientos previos, se llevó a cabo la glicosidación entre el bloque de glucosamina **48** y el 3-azidopropanol **49** (Figura 32). Cuando se usó un 15% de TMSOTf a una temperatura de 0°C, sólo se obtuvo un 30% de

glicósido **65**, detectando por masas y por RMN la triclorooxazolina **66**. Cuando, finalmente, utilizamos un 25% de promotor a temperatura ambiente el rendimiento fue mucho mayor (**65**, 86%) y no se detectó oxazolina.

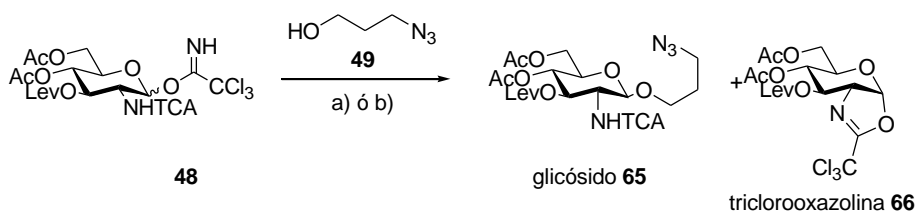


Figura 32. Protección de la posición anomérica con el espaciador 3-azido propanol. Reactivos y condiciones: a) TMSOTf 15%, CH₂Cl₂, 0°C, 30% **65** + detección de **66**. b) TMSOTf 25%, CH₂Cl₂, t.a., 86% **65**.

Como hemos visto anteriormente en la Figura 23b, para evitar que se forme la oxazolina intermedia y mejorar de esta manera el rendimiento de la glicosidación, hace falta una mayor cantidad de promotor. De esta forma, siguiendo el esquema de la figura, evitamos la desprotonación del ion oxazolinio, forzando la reacción hacia la formación del enlace glicosídico.

Una vez protegida la posición anomérica del bloque de glucosamina, pasamos a la desprotección selectiva del grupo levulínico de la posición 3 del glicósido recién sintetizado. Por tratamiento con acetato de hidracina en CH₂Cl₂ obtuvimos, fácilmente y con un buen rendimiento, el aceptor correspondiente con el hidroxilo de la posición 3 libre (compuesto **67**, Figura 33), que utilizamos posteriormente en la glicosidación con el donador de ácido glucurónico **46** (Figura 34).

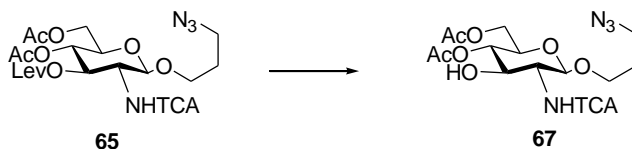


Figura 33. Deslevulinación y preparación del aceptor **67**. Reactivos y condiciones: $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, piridina-AcOH, CH_2Cl_2 ; 78%.

Se realizaron varios ensayos de glicosidación para optimizar el rendimiento de esta reacción, que llegó a ser del 55% (compuesto **68**, Figura 34) utilizando un 25% de promotor a temperatura ambiente. Este rendimiento, sin ser óptimo, es aceptable teniendo en cuenta la baja reactividad de los bloques monosacáridos utilizados.

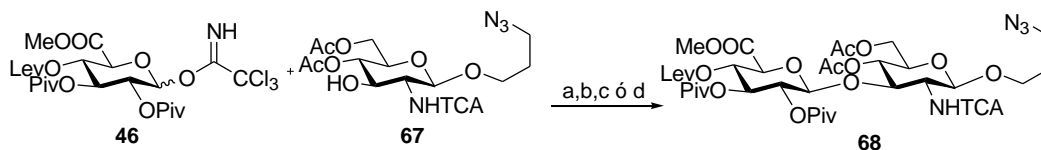


Figura 34. a) TMSOTf 5%, CH_2Cl_2 , 0°C , 40% b) TMSOTf 10%, CH_2Cl_2 , t.a, 49%. c) TMSOTf 15%, CH_2Cl_2 , t.a, 48%. d) TMSOTf 25%, CH_2Cl_2 , t.a, 55%.

Con el objetivo de elongar la cadena y sintetizar, según una *estrategia modular "1+1"*, un trisacárido de ácido hialurónico, se desprotegió el grupo ortogonal levulino de la posición 4 del terminal no reductor del disacárido **68** (Figura 35).

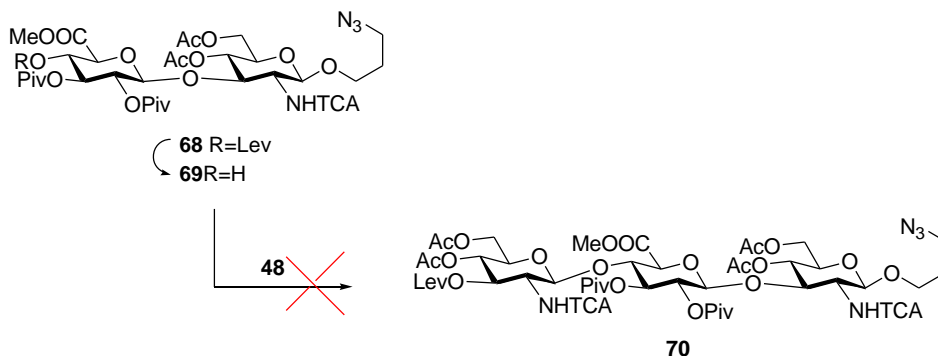


Figura 35. Deslevulinación del disacárido **68** para dar el aceptor correspondiente **69**. La glicosidación con el donador **48** no proporcionó el trisacárido deseado **70**.

La reacción, llevada a cabo en CH_2Cl_2 y utilizando acetato de hidracina, transcurrió con un buen rendimiento. Se obtuvo de esta manera el correspondiente aceptor disacárido **69** que puede teóricamente ser glicosidado con el donador de glucosamina **48** (Figura 35).

A pesar de utilizar las condiciones de reacción optimizadas en ensayos precedentes, la glicosidación entre el nuevo aceptor **69** y el donador de glucosamina **48** no proporcionó el trisacárido deseado. Por espectrometría de masas sólo se detectaron el aceptor, el derivado hidrolizado del donador y trazas del trisacárido **70**.

Resultó por tanto evidente que la formación del enlace glicosídico entre la glucosamina **48** y el ácido glucurónico del terminal no reductor del disacárido **69**, inesperadamente, no era trivial.

Para intentar solucionar este problema, se decidió ensayar a nivel monosacárido la formación del enlace GlcNAc-GlcA con un nuevo bloque aceptor.

Se pensó que el impedimento estérico del grupo pivaloato de la posición 3 del terminal no reductor del disacárido **69**, podía dificultar esta glicosidación por

lo que se decidió cambiarlo por un grupo menos voluminoso como el benzoato (OBz).

Utilizando como producto de partida el intermedio **60**, se sintetizó, en escala multigramo y con buenos rendimientos, el nuevo donador de ácido glucurónico **47** (Figura 36).

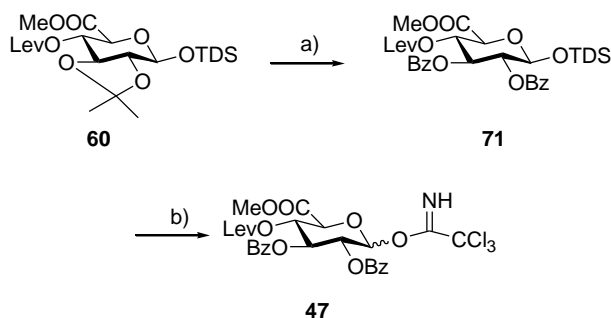


Figura 36. Síntesis del nuevo donador de glucurónico **47**. Reactivos y condiciones: a) resina ácida DOWEX, MeOH; BzCl, Py; 74% b) (HF)_nPy, THF; Cl₃CCN, K₂CO₃, CH₂Cl₂; 72%.

El compuesto **71** se obtuvo por hidrólisis del 2,3-isopropilidén acetal (resina ácida DOWEX en MeOH) y benzoilación de las posiciones 2 y 3, con un rendimiento del 74%. Finalmente, el intermedio **71** se desililó liberando la posición anomérica que se activó como tricloroacetimidato para dar el donador de glucurónico **47** (72%).

Una vez preparado el bloque monosacárido **47** a escala multigramo y utilizando tanto el donador de glucosamina **48** como el espaciador 3-azidopropanol **49** preparados anteriormente, pasamos a la síntesis del disacárido de HA **74**, de secuencia GlcN-GlcA (Figura 37).

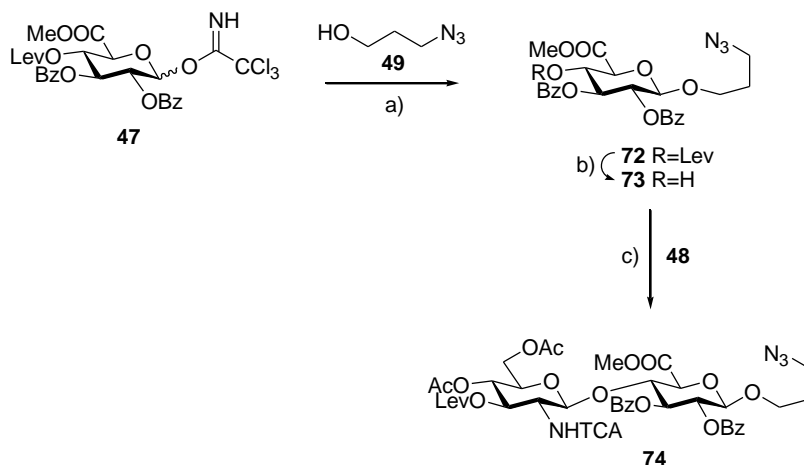


Figura 37. Síntesis del disacárido **74**. Reactivos y condiciones: a) TMSOTf 10%, CH₂Cl₂, t.a.; 64%. b) NH₂NH₂·H₂O, piridina-AcOH, CH₂Cl₂; 89%. c) TMSOTf 15%, CH₂Cl₂, t.a.; 30%.

Así, se llevó a cabo la glicosidación entre el donador **47** y el espaciador 3-azidopropanol **49**, que transcurrió con un rendimiento del 64% (compuesto **72**).

Una vez protegida la posición anomérica del bloque de glucurónico, se preparó el correspondiente aceptor **73**,⁴⁵ por tratamiento con acetato de hidracina en CH₂Cl₂ con un buen rendimiento.

Se llevaron a cabo varios ensayos, con diferentes cantidades de TMSOTf, para optimizar la glicosidación entre el donador de glucosamina **48** y el aceptor de ácido glucurónico **73**. El mejor rendimiento, aunque bajo, se obtuvo a temperatura ambiente utilizando un 15% de TMSOTf (compuesto **74**, 30%).

El empleo de cantidades más bajas de promotor no condujo a rendimientos más altos, dado el problema de formación de oxazolinas intermedias que hemos visto anteriormente. Cuando se usaron cantidades mayores de TMSOTf, tampoco se mejoró el rendimiento de la glicosidación ya que se detectaron por masas varios productos secundarios, tanto a nivel

monosacárido (por ejemplo el glicial derivado del donador) como a nivel disacárido.

En concreto, por espectrometría de masas y RMN se detectó, como producto secundario principal, un compuesto disacárido que había perdido el grupo levulino y que no poseía el grupo azida del espaciador. Además se vio que el compuesto había perdido el protón anomérico de la unidad de glucosamina y el de la posición 2, y que el OH del aceptor no había reaccionado. Con estos datos, propusimos para este producto secundario la estructura que aparece en la Figura 38. Este compuesto puede formarse, a partir del glicial derivado del donador, por transposición de Ferrier.

La transposición de Ferrier es una reacción orgánica que implica una sustitución nucleófila combinada con un desplazamiento alílico en un glicial (un glucósido 1,2-insaturado). Según esta reacción química el glicial derivado de la unidad de glucosamina podría reaccionar con la azida, que actuaría como nucleófilo, con el consiguiente desplazamiento del doble enlace del glicial a la posición 2,3, dando como resultado el compuesto de la Figura 38.

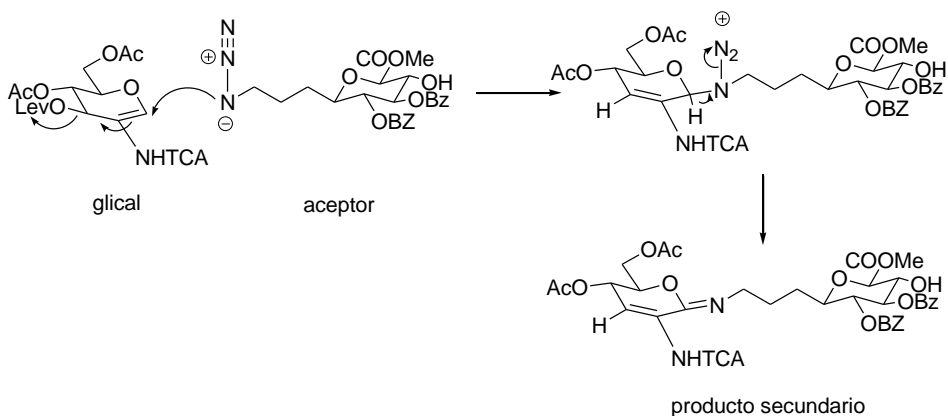


Figura 38. Esquema de la transposición de Ferrier entre el glicial de la unidad de glucosamina y el grupo azida del aceptor de glucurónico.

En resumen, el bajo rendimiento obtenido en la formación del enlace glicosídico GlcNAc-GlcA con esta primera serie de monosacáridos desaconsejaba la utilización de esta primera aproximación sintética para preparar oligómeros más largos. En cualquier caso, decidimos estudiar las reacciones de desprotección de los dos disacáridos sintetizados (**74** y **68**).

La desprotección del disacárido **68** (Figura 39) se llevó a cabo por tratamiento básico con KOH (10 eq.) en THF/H₂O 1:1, como se describe en la bibliografía.^{44,45,46} Utilizando estas condiciones, tras varios días de reacción, se detectó la formación del intermedio **75**. El grupo tricloroacetilo resistió, por tanto, a este tratamiento y sólo utilizando 80 equivalentes de KOH adicionales conseguimos desproteger completamente el disacárido (compuesto **76**). Las dificultades encontradas en esta desprotección se pueden relacionar con la posición del TCA en el disacárido. La hidrólisis alcalina del grupo *N*-tricloroacetilo en compuestos en los que la posición vecinal está glicosidada (disacárido **68**), procede mucho más lentamente y requiere, a veces, calentamiento, en comparación con los derivados 3-*O*-acilados (véase más adelante, disacárido **74**).⁵³ El paso siguiente fue la *N*-acetilación de la posición 2 de la glucosamina, por tratamiento con Ac₂O/TEA en MeOH, obteniéndose así el producto final (compuesto **42**), que está convenientemente funcionalizado en su posición anomérica con un espaciador 3-azidopropanol (Figura 39).

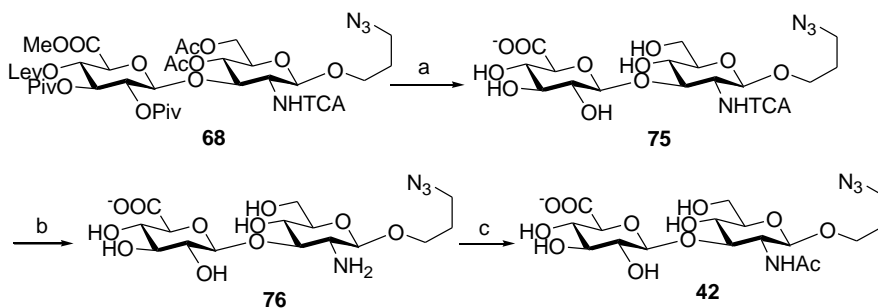


Figura 39. Desprotección del disacárido **68**. Condiciones y reactivos: a) KOH 10 eq., THF/H₂O 1:1, 48h; b) KOH 80 eq., THF/H₂O, 4 días; c) Ac₂O/TEA, MeOH, 90% desde **68**.

La desprotección del disacárido totalmente protegido **74** (Figura 40) se llevó a cabo por tratamiento básico con 10 eq. de KOH en THF/H₂O 1:1. En este caso, el grupo TCA se encuentra en el terminal no reductor y la posición 3 de la glucosamina no está glicosidada, hecho que facilita su desprotección. Después de 3 días, se purificó, por cromatografía en gel de sílice, el intermedio **77** con el amino libre, con un rendimiento del 96%.

La *N*-acetilación de la posición 2 de la glucosamina, por tratamiento con Ac₂O/TEA en MeOH, proporcionó el producto final, el compuesto **43**, debidamente bloqueado en su posición anomérica con un espaciador 3-azidopropanol, con un rendimiento cuantitativo.

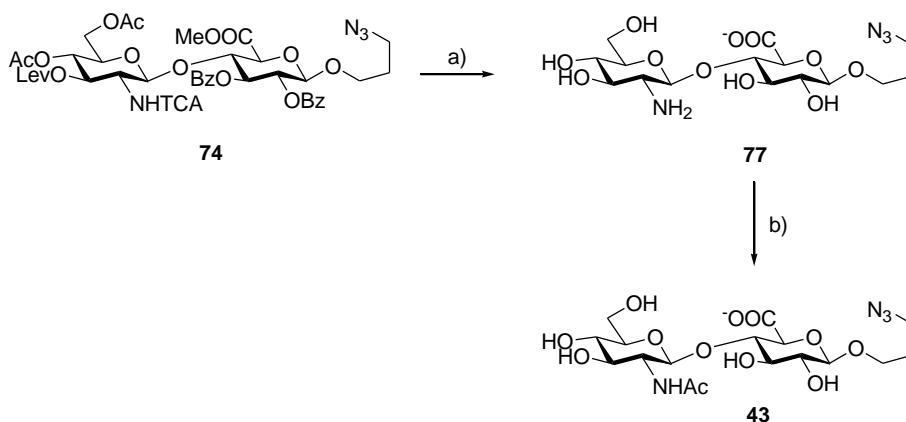


Figura 40. Desprotección del disacárido **74**. Reactivos y condiciones: a) KOH 10 eq., THF/H₂O 1:1, 96%; b) TEA 1 eq, Ac₂O 25 eq, MeOH, cuantitativo.

3.2.2. Segunda aproximación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico.

Con el objetivo de resolver los problemas encontrados en la síntesis descrita en el apartado 3.2.1., se diseñó un nuevo esquema retrosintético utilizando bloques más activados, los monosacáridos **78**, **79** y **80** (Figura 41).

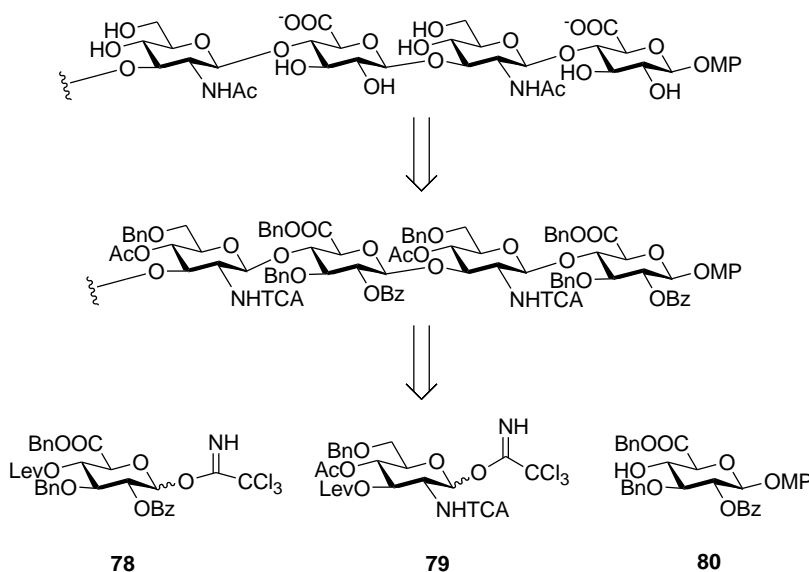


Figura 41. Análisis retrosintético de la segunda aproximación a la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico, utilizando los bloques monosacáridicos más reactivos **78**, **79** y **80**.

La introducción de grupos bencilo en diferentes posiciones, tanto en el bloque de glucosamina como en el de ácido glucurónico, nos obliga a añadir una reacción de desprotección a la ruta sintética (la hidrogenación), pero proporciona monosacáridos mucho más reactivos.

Así, utilizando bloques monosacáridicos como éstos, esperábamos evitar o, al menos disminuir, la formación de oxazolininas intermedias que nos obligaban a

añadir grandes cantidades de promotor, evitando de esta manera reacciones secundarias de descomposición.

La detección de productos secundarios, donde posiblemente estaba implicada de alguna manera la azida terminal, nos llevó a cambiar el grupo utilizado para proteger la posición anomérica del terminal reductor. Se eligió, finalmente, el 4-metoxifenilo, ampliamente utilizado en la bibliografía.⁴²

Como grupo protector ortogonal y grupos participantes en la posición 2 se mantuvieron, respectivamente, el grupo levulino y los grupos tricloroacetilo y benzoato.

Con estos bloques monosacáridicos se abordó una nueva *estrategia modular* “1+1” para la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico de diferente tamaño (Figura 41).

3.2.2.1. Preparación del aceptor **80** y del donador **78** de ácido glucurónico.

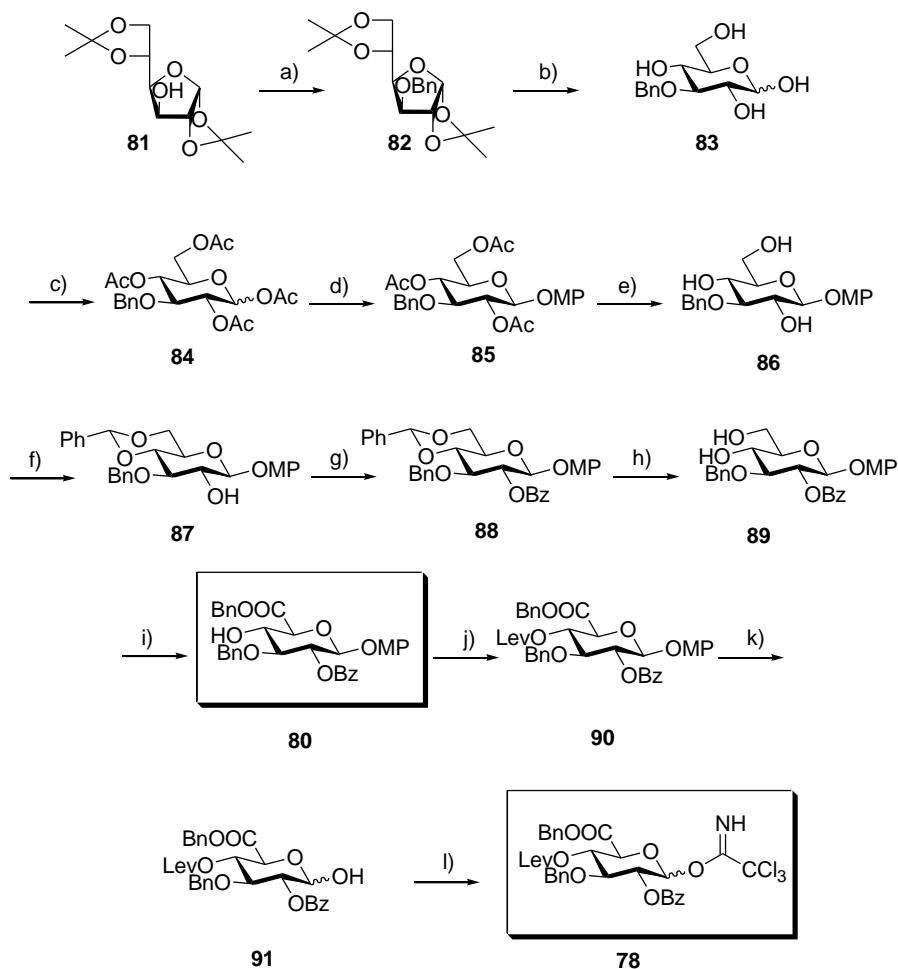


Figura 42. Síntesis de los bloques monosacáridos **80** y **78**. Condiciones y reactivos: a) NaH, NBu₄I, BnBr; b) H₂SO₄ 0.1M; c) Ac₂O, Piridina; 85%, 3 etapas; d) 4-metoxifenol, TMSOTf 15%, CH₂Cl₂, t.a.; 55%; e) MeO⁻Na⁺, MeOH; f) PhCH(OMe)₂, *p*-TsOH, CH₃CN; g) BzCl, piridina; h) CSA, MeOH/CH₂Cl₂ 3:1; 85%, 4 etapas; i) TEMPO, Bu₄NBr, KBr, CaCl₂O₂, NaHCO₃, CH₂Cl₂/H₂O; Bu₄NI, BnBr, DMF, 60°C; 50%; j) LevOH, DCC, DMAP, CH₂Cl₂; 78%; k) CAN, Tol/MeCN/H₂O 1:6:1; 91%; l) K₂CO₃, Cl₃CCN, CH₂Cl₂; 92%.

En primer lugar, siguiendo el esquema de la Figura 42, se prepararon a escala multigramo el aceptor y el donador de ácido glucurónico **80** y **78**. Una

ventaja de este diseño es que en la misma ruta sintética se pueden obtener los dos bloques, dado que el aceptor es un intermedio de la síntesis del donador.

La primera reacción fue la bencilación con bromuro de bencilo de la 1,2,5,6-diisopropilidén-D-glucofuranosa (diacetón-D-glucosa **81**) en DMF, protegiendo de esta manera la posición 3 (compuesto **82**). La hidrólisis de los dos acetales en medio ácido (H_2SO_4 0.1M aq., compuesto **83**) y la peracetilación de los cuatro hidroxilos libres proporcionaron el compuesto **84**,⁵⁴ como mezcla de los dos anómeros α/β , con un rendimiento total en las tres etapas del 85%.

La posición anomérica se glicosidó con 4-metoxifenol y, después de cristalización, se obtuvo el compuesto **85** con un moderado rendimiento. El triol correspondiente **86** se preparó a partir del compuesto triacetilado por tratamiento con metóxido sódico. La protección selectiva con un 4,6-bencilidén acetal (compuesto **87**) y la introducción del grupo participante benzoato (Bz) en la posición 2 dio como producto el derivado **88**.

Una vez protegida la posición 2, se llevó a cabo la hidrólisis del bencilidén acetal con CSA en MeOH:DCM 3:1, obteniendo el compuesto cristalino **89** con un rendimiento global excelente.⁵⁵ El tratamiento del diol **89** con TEMPO en presencia de hipoclorito de calcio como co-oxidante, en condiciones básicas de transferencia de fase,⁵⁶ dio el correspondiente ácido carboxílico, que se esterificó directamente por tratamiento con bromuro de bencilo en DMF para dar el bencil glucuronato **80**, con un rendimiento global del 50%.

De esta manera, obtuvimos, a escala multigramo, el aceptor de ácido glucurónico, que utilizamos en la construcción de las cadenas de oligosacáridos de ácido hialurónico.

La introducción del grupo temporal levulino (Lev) en la posición 4 dio como producto el compuesto **90** con un rendimiento del 78%.

La desprotección selectiva de la posición anomérica (compuesto **91**) y la activación a imidato del correspondiente 1-hidroxiázúcar generaron el tricloroacetimidato **78**, que utilizaremos como donador de glucurónico en la preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico.

3.2.2.2. Preparación del donador de glucosamina (79).

Paralelamente a la síntesis del aceptor y donador de ácido glucurónico, se preparó el tricloroacetimidato de glucosamina **79**, adecuadamente protegido, según el esquema de la Figura 43.

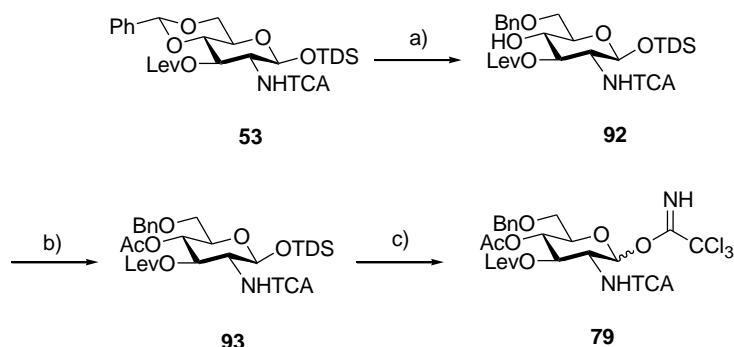


Figura 43. Síntesis del tricloroacetimidato **79**. Condiciones y reactivos: a) TES/TFA, CH₂Cl₂; 85%; b) Ac₂O, piridina; c) (HF)_nPy, THF; Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂; 70%.

El producto **53**, intermedio de la síntesis de la glucosamina desactivada (Figura 29), se utilizó como producto de partida para la preparación de este nuevo monosacárido más reactivo. La apertura selectiva del 4,6-bencilidén acetal en condiciones reductoras (TFA/TES)^{41e.57} proporcionó el correspondiente producto bencilado en la posición 6, con un hidroxilo libre en la posición 4 (compuesto **92**). La acetilación del grupo hidroxilo produjo el compuesto **93** totalmente protegido. La conversión de **93** a tricloroacetimidato

de glicosilo (compuesto **79**, 70%) se logró por desprotección del sililo anomérico utilizando un exceso del complejo $(HF)_n \cdot Py$ y posterior tratamiento del lactol con tricloroacetonitrilo (Cl_3CCN) y cantidades catalíticas de DBU en CH_2Cl_2 .

El compuesto **79** se sintetizó en tan sólo 3 pasos, a partir de un intermedio ya preparado anteriormente, obteniéndose así un donador de glucosamina más activado que estaba listo para ser usado en las glicosidaciones correspondientes.

3.2.2.3. Preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico utilizando la segunda aproximación sintética.

Una vez preparados los 3 bloques monosacáridicos **78**, **79** y **80**, se sintetizó, en primer lugar, siguiendo una *estrategia modular "1+1"*, el trisacárido **96** (Figura 44).

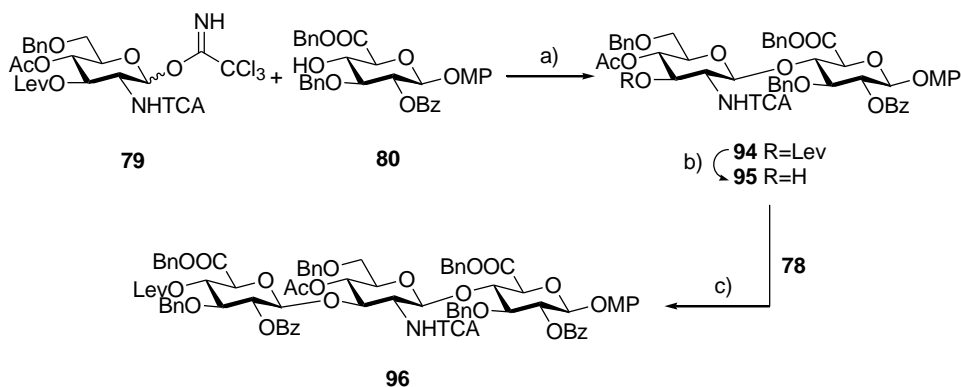


Figura 44. Síntesis del trisacárido **96**. Condiciones y reactivos: a) TMSOTf 20%, CH_2Cl_2 , $0^\circ C$.; 72%; b) $NH_2NH_2 \cdot H_2O$, piridina-AcOH, CH_2Cl_2 ; 93%; c) TMSOTf 20%, CH_2Cl_2 , t.a.; 41%.

La glicosidación entre el donador de glucosamina **79** y el aceptor **80** se llevó a cabo a 0°C y con un 20% de promotor (TMSOTf). El disacárido **94** se obtuvo, tras purificación por columna cromatográfica, con un rendimiento muy bueno, en comparación a la glicosidación con bloques menos reactivos (Figura 37). Estos hechos confirman que el uso de bloques monosacáridicos más activados nos permite evitar los problemas encontrados anteriormente, pasando de un rendimiento del 30% a un 72% en la formación del enlace GlcN-GlcA.

Con el objetivo de elongar la cadena, el disacárido **94** se convirtió en el aceptor correspondiente por tratamiento con acetato de hidracina en diclorometano (compuesto **95**, 93%).

El aceptor recién formado se glicosidó con el donador de ácido glucurónico **78**. En la glicosidación, llevada a cabo a temperatura ambiente, se obtuvo el trisacárido **96**, con un rendimiento del 41%.

Se decidió preparar también el tetrasacárido de ácido hialurónico **98** (Figura 45). Así, el correspondiente aceptor trisacárido **97**, preparado fácilmente con un rendimiento del 71%, se glicosidó con el donador de glucosamina **79** previamente preparado. La reacción proporcionó, con un rendimiento del 64%, el tetrasacárido **98**.

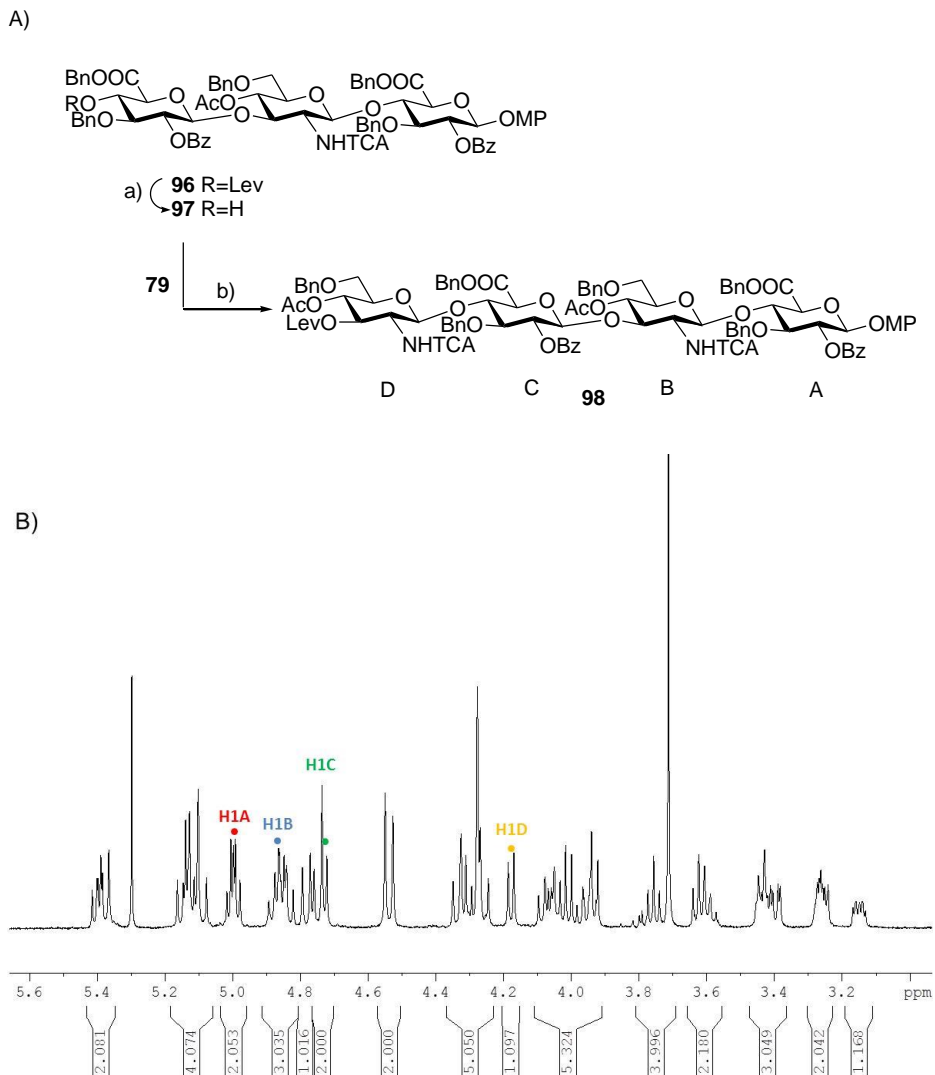


Figura 45. A) Síntesis del tetrasacárido **98**. Reactivos y condiciones: a) $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, piridina-AcOH, CH_2Cl_2 ; 71%; b) TMSOTf 20%, CH_2Cl_2 , 0°C ; 64%. B) Espectro de ^1H -RMN del tetrasacárido final protegido indicando el desplazamiento químico de los 4 protones anoméricos.

Una vez obtenidos, con buenos rendimientos, un trisacárido y un tetrasacárido de ácido hialurónico, estudiamos las reacciones de desprotección que conducen a los productos finales desprotegidos (Figuras 46 y 47).

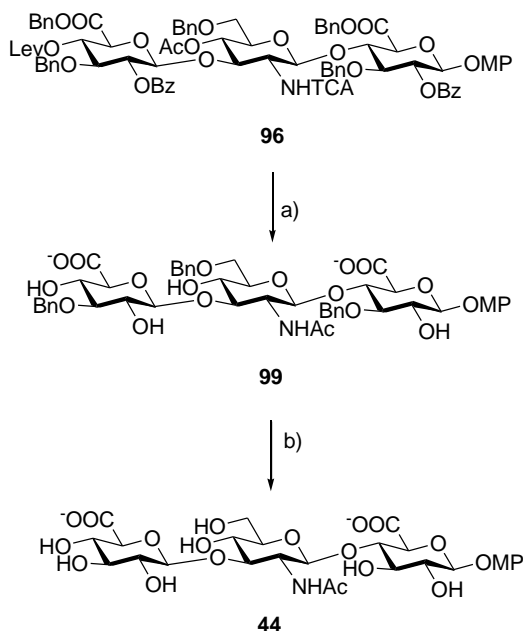


Figura 46. Desprotección del trisacárido **96**. Condiciones y reactivos: a) LiOH/H₂O₂, THF; NaOH, MeOH; TEA, Ac₂O, MeOH; 87%; b) H₂, Pd(OH)₂, MeOH/H₂O; cuantitativo.

Para evitar la eliminación en medio básico del protón 5 de las unidades de GlcA, con la consiguiente formación de un doble enlace en la posición 4,5 y ruptura del enlace glicosídico, se procedió al tratamiento con LiOH/H₂O₂ en THF, durante 24 horas, transformando así los grupos R-COOBn en los correspondientes carboxilatos. A continuación, se añadió NaOH 4M y MeOH para desproteger el resto de grupos acilos, obteniéndose así el compuesto intermedio con el amino libre. La *N*-acetilación (Ac₂O/TEA en MeOH) de la posición 2 de la glucosamina dio rápidamente el compuesto **99** con un rendimiento del 87%. Para poder caracterizar más fácilmente el compuesto *N*-acetilado se formó la sal sódica correspondiente, por elución a través de una columna de DOWEX Na⁺.

La última reacción de desprotección (hidrogenación) no es trivial, dada la inestabilidad del grupo 4-metoxifenilo en presencia de grandes excesos de $\text{Pd}(\text{OH})_2$. Por lo tanto, la cantidad de catalizador utilizada en esta reacción es un aspecto muy importante de la misma. Usando una cantidad de $\text{Pd}(\text{OH})_2$ similar al número de miligramos de producto de partida, en una mezcla H_2O - MeOH 9:1, se obtuvo cuantitativamente el producto final, el trisacárido desprotegido **44**, con un excelente rendimiento.

La desprotección del tetrasacárido **98** (Figura 47) se llevó a cabo en las mismas condiciones puestas a punto para el trisacárido **96**.

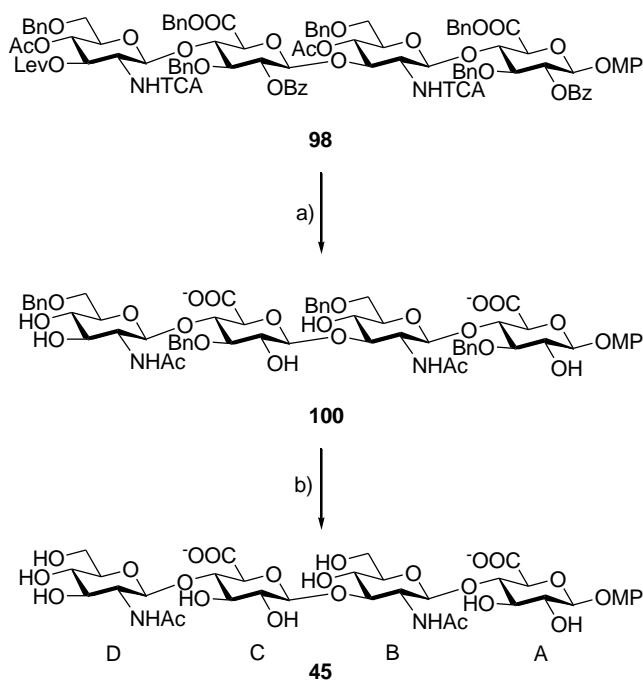


Figura 47. Desprotección del tetrasacárido **98**. Condiciones y reactivos: a) $\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}_2$, THF; NaOH , MeOH ; TEA, Ac_2O , MeOH ; 64%; b) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; cuantitativo.

Después del tratamiento con $\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}_2$ en THF (24 horas), la saponificación de los grupos acilos se obtuvo añadiendo MeOH y una solución acuosa de

NaOH 4M. Al cabo de 5 días de reacción, se *N*-acetiló por tratamiento con Ac₂O y TEA (compuesto **100**, 64%).

Finalmente, la hidrogenación de los 4 grupos bencilo produjo con un rendimiento cuantitativo el tetrasacárido **45** (Figura 48).

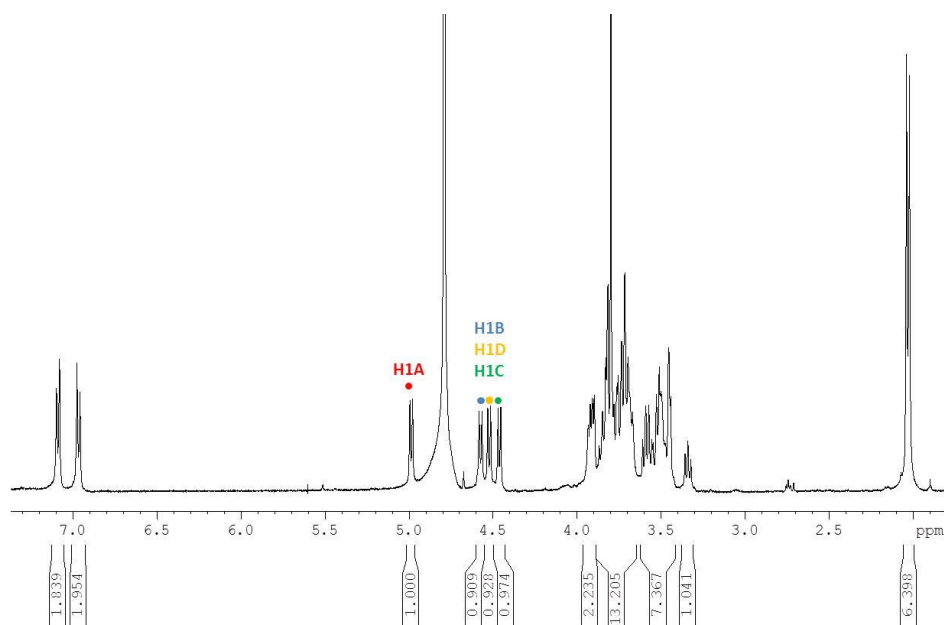


Figura 48. Espectro de ¹H-RMN del tetrasacárido final desprotegido **45** indicando el desplazamiento químico de los 4 protones anoméricos.

3.2.3. Síntesis de oligosacáridos de HA asistida por un espaciador perfluorado.

Utilizando estos nuevos bloques monosacáridicos más activados conseguimos resolver algunos de los problemas que habíamos encontrado en la síntesis de oligosacáridos de HA, como por ejemplo los bajos rendimientos de las glicosidaciones, la formación de productos intermedios (triclorooxazolina) y las reacciones secundarias de descomposición.

Con el objetivo de dar un paso más, simplificando y reduciendo el número de purificaciones necesarias, decidimos explorar una nueva estrategia, para la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico. Esta metodología, que se basa en la purificación por extracción a través de una fase sólida fluorada (F-SPE del inglés *fluorous solid-phase extraction*), nos permitió un rápido y sencillo aislamiento de los productos deseados, una vez que están funcionalizados con una etiqueta perfluorada.

De hecho, el gran número de purificaciones por columna cromatográfica convencional necesarias en la síntesis de oligosacáridos, la mayoría de las veces complicadas y algunas veces poco productivas, es uno de los puntos débiles de la síntesis de carbohidratos en fase líquida.

La F-SPE se introdujo en 1997⁵⁸ y se caracteriza por el uso de una fase sólida fluorada, como se ilustra en la Figura 49,⁵⁹ que es típicamente una gel de sílice perfluorada comercialmente disponible bajo el nombre de FluoroFlash®.

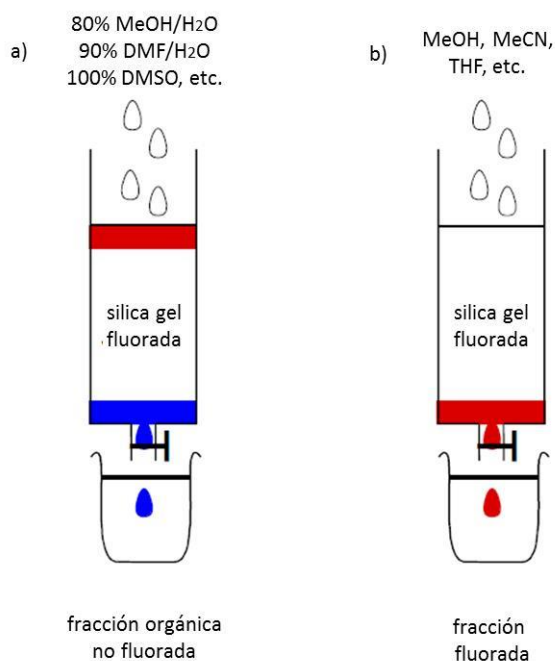


Figura 49. Esquema de la F-SPE. Después de haber cargado el crudo de reacción en el cartucho que contiene la sílica perfluorada, extraemos primero la fracción no fluorada (a) y a continuación (b) la fracción con todas las especies fluoradas.

En esta técnica, el crudo de reacción, que contiene compuestos tanto fluorados como no fluorados, se carga sobre un cartucho de gel de sílica fluorada y se lava con un disolvente (o mezcla de disolventes) fluorofóbico, como por ejemplo MeOH-H₂O 4:1 (Figura 49a). En esta primera elución, los compuestos no fluorados se mueven con el frente del disolvente y se eluyen inmediatamente, mientras que los compuestos marcados con una etiqueta fluorada son retenidos en la gel de sílice. La elución con un disolvente orgánico anhidro (MeOH seco, CH₃CN, THF, entre otros) proporciona la fracción fluorada que contiene el compuesto o los compuestos deseados (Figura 49b). De esta manera, se evita la colección de un amplio número de fracciones (tubos) y su posterior análisis, característico de la elución de una cromatografía en columna convencional, minimizando el volumen de disolvente requerido y el tiempo empleado para la purificación.

Este método, aplicado a la síntesis de carbohidratos, permite la repetición de varios ciclos de glicosidación con la finalidad, en teoría, de consumir completamente el aceptor utilizado. Así, el aceptor sin reaccionar, oportunamente funcionalizado con un espaciador fluorado, se puede fácilmente recuperar en la fracción eluida con MeOH 100%, junto con el glicósido obtenido, y volver a usarlo en un segundo ciclo de glicosidación para consumirlo y mejorar, de esta manera, el rendimiento global de la reacción. En claro contraste con la síntesis en fase sólida, la síntesis asistida por etiquetas perfluoradas no requiere el empleo de grandes excesos de bloques de partida. Como veremos a continuación, los equivalentes totales necesarios son razonablemente bajos, similares a los usados en la química convencional en solución.

Desde que Curran ⁶⁰ y colaboradores publicaron la síntesis de un disacárido utilizando una etiqueta fluorada, se han publicado varias rutas para la obtención de oligosacáridos que recurren a esta metodología.⁶¹ La mayoría de estos estudios se centraron en etiquetas introducidas en la posición anomérica de los oligosacáridos.

En nuestro caso, decidimos introducir el marcador perfluorado en las unidades de GlcA durante la reacción de esterificación necesaria para la formación de dichas unidades. De esta forma, al unir la etiqueta perfluorada a través del grupo carboxilato de los GlcA, nos podemos beneficiar de las ventajas de la F-SPE sin necesidad de incluir etapas adicionales en nuestra ruta sintética.

Siguiendo el esquema de la Figura 50 se preparó un trisacárido de HA marcado con una etiqueta perfluorada (compuesto **104**). Como espaciador elegimos el yoduro de heptadecafluoroundecilo ($I-(CH_2)_3-C_8F_{17}$), disponible comercialmente, que tiene un número de átomos de flúor adecuado para poder diferenciar compuestos fluorados de los no fluorados y, a la vez, mantener la solubilidad en disolventes orgánicos.

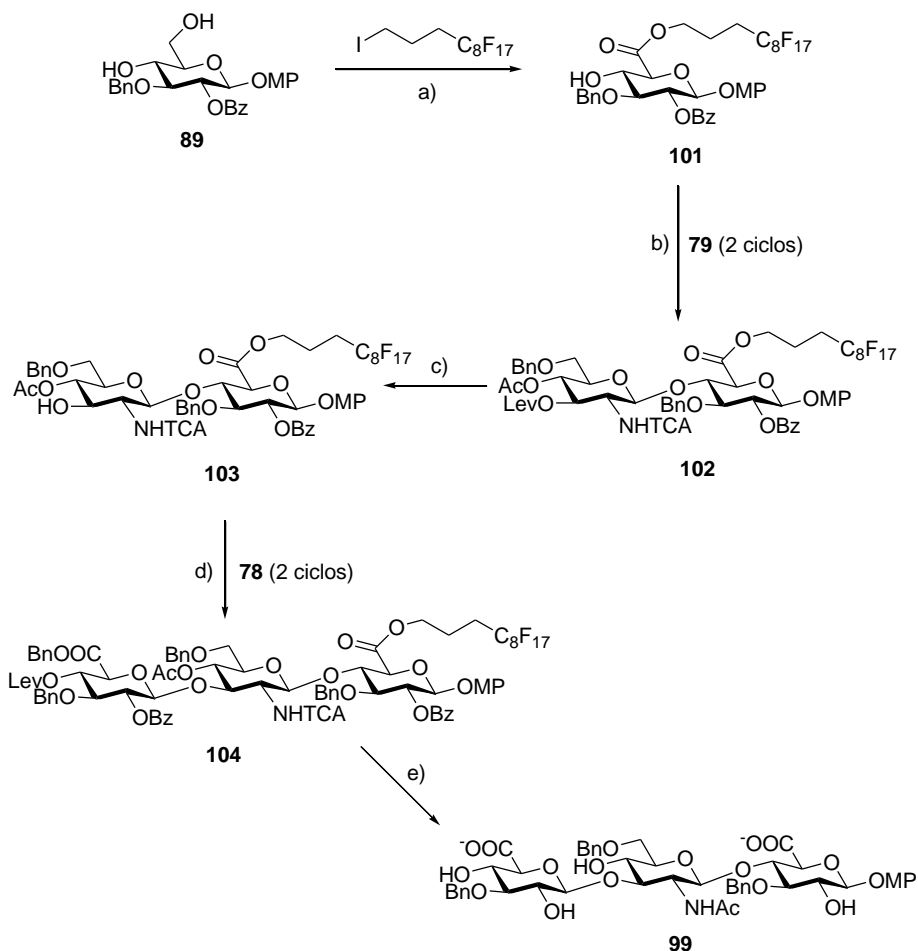


Figura 50. Síntesis del trisacárido **104** asistida por un espaciador perfluorado. Condiciones y reactivos: a) TEMPO, Bu₄NBr, KBr, CaCl₂O₂, NaHCO₃, CH₂Cl₂/H₂O; C₈F₁₇(CH₂)₃I, DMF, 60°C; 55%; b) TMSOTf 20%, CH₂Cl₂, 0°C; 2 ciclos; c) NH₂NH₂·H₂O, piridina-AcOH, CH₂Cl₂; d) TMSOTf 20%, CH₂Cl₂, t.a.; 2 ciclos; 12%, 3 etapas desde **101**; e) LiOH/H₂O₂, THF; NaOH, MeOH; TEA, Ac₂O; 90%

Como hemos dicho anteriormente, el aceptor **101** se preparó a partir del diol **89**, intermedio de la ruta sintética de las unidades de GlcA (Figura 42) mediante la misma secuencia de 2 reacciones. La oxidación del hidroxilo primario se llevó a cabo en las mismas condiciones vistas anteriormente (Figura 50). El crudo de reacción se disolvió directamente en DMF y se trató

con el agente alquilante (I-(CH₂)₃-C₈F₁₇), introduciendo de esta manera el espaciador perfluorado en el bloque de glucurónico (compuesto **101**, 55%).

El aceptor recién formado se glicosidó con el donador de glucosamina **79** en las condiciones puestas a punto anteriormente. El crudo de reacción se purificó rápidamente utilizando una columna de sílica perfluorada (F-SPE). Aprovechando la presencia del espaciador, se eluyeron, en MeOH:H₂O 4:1, primero todos los compuestos no fluorados (en este caso los derivados del donador y residuos del promotor). Sólo cuando se utilizó MeOH 100% pudimos eluir el disacárido **102** y el aceptor **101** que no había reaccionado, las únicas dos especies que contienen la etiqueta.

La fracción eluida con metanol se analizó por espectrometría de masas (Figura 51), donde se pudieron apreciar solamente los picos de los dos compuestos **101** y **102**, comprobando así la utilidad de la etiqueta y la sencillez del método de purificación.

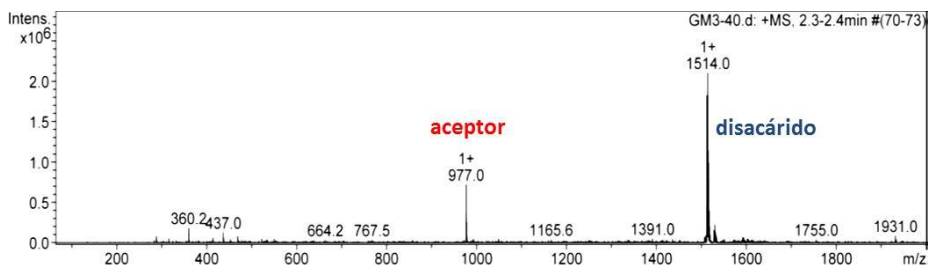


Figura 51. Espectrometría de masas de la fracción eluida con MeOH 100%, donde se pueden apreciar los picos del aceptor **101** [M+Na]⁺ y del disacárido **102** [M+Na]⁺.

En el espectro de protón de la misma fracción se ven claramente las señales del disacárido **102** y del aceptor **101**. Según las integrales, los dos compuestos están en una relación estequiométrica 2:1 (Figura 52).

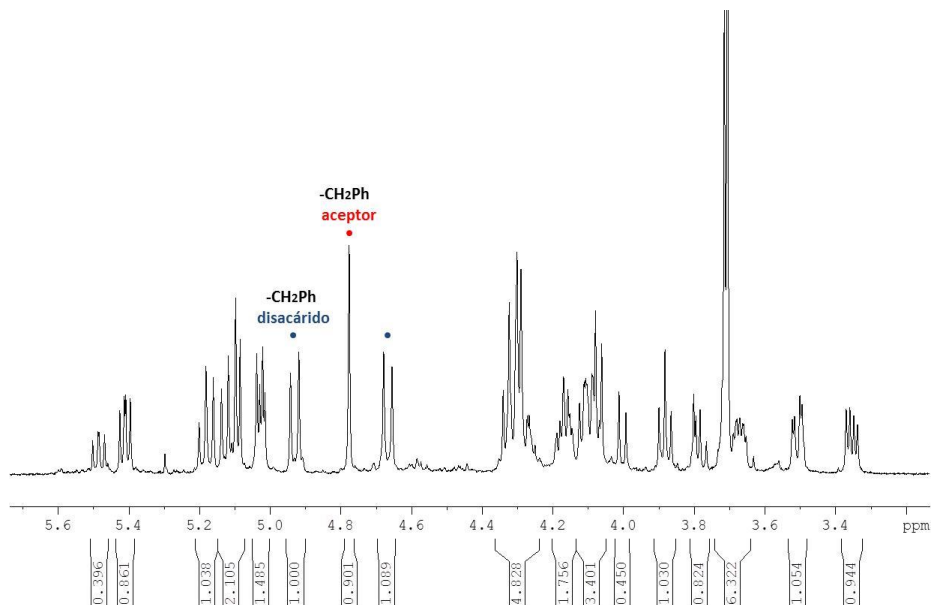


Figura 52. Espectro de ^1H -RMN de la fracción eluida con MeOH 100%. La relación estequiométrica entre aceptor y disacárido se calculó basándose en señales aisladas de los dos compuestos. Los protones del grupo bencilo nos permitieron deducir una ratio 2:1 disacárido/aceptor.

Con el objetivo de consumir el aceptor que no había reaccionado, se llevó a cabo un segundo ciclo de glicosidación, en las mismas condiciones, calculando los equivalentes de donador necesarios para completar la reacción. Como hemos dicho anteriormente, hay que remarcar que esta técnica permite realizar varios ciclos de reacción, sin que esto suponga un elevado gasto de donador. En nuestro caso, en los dos ciclos utilizamos sólo 1.65 equivalentes en total. Después del segundo ciclo de glicosidación se obtuvo una mezcla disacárido/aceptor en una proporción 6:1 (Figura 53), confirmando la utilidad de este segundo ciclo para consumir el aceptor **101** prácticamente en su totalidad. Desafortunadamente, también observamos una significativa pérdida de material fluorado (aproximadamente un 10%) después de cada extracción F-SPE. Esta importante limitación desaconsejaba la realización de más ciclos para terminar de consumir el aceptor **101**.

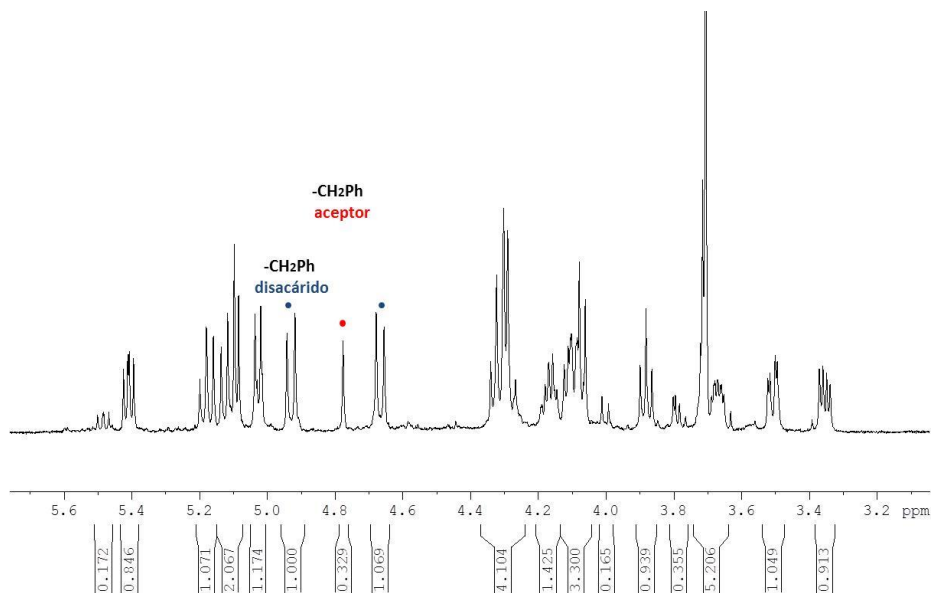


Figura 53. Espectro de ^1H -RMN de la fracción eluida con MeOH 100% después del segundo ciclo de glicosidación. Basándose en las señales de los protones del grupo bencilo, calculamos una nueva ratio disacárido/aceptor, que resultó ser 6:1.

Por esta razón, el aceptor disacárido **103** (Figura 53) se preparó directamente a partir del compuesto **102** por tratamiento con acetato de hidracina en diclorometano. El crudo de reacción se purificó por gel de sílica perfluorada, obteniéndose el aceptor correspondiente. Por espectrometría de masas (Figura 54) se pudo confirmar el resultado de la reacción.

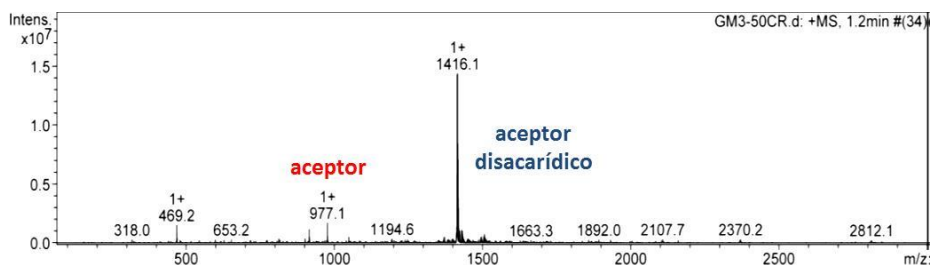


Figura 54. Espectrometría de masas de la fracción eluida con MeOH 100% después de deslevulinación. Se pueden apreciar los picos del aceptor monosacárido **101** $[M+\text{Na}]^+$ y del aceptor disacárido **103** $[M+\text{Na}]^+$.

Finalmente, el trisacárido **104** se obtuvo a través de dos ciclos de glicosidación con el donador de GlcA **78**, utilizando las mismas condiciones vistas anteriormente. La purificación por F-SPE dio una fracción eluida en MeOH en la que podía verse el pico correspondiente al trisacárido deseado por espectrometría de masas (Figura 55).

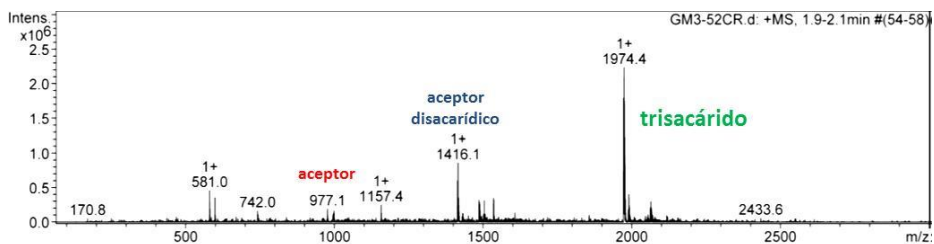


Figura 55. Espectrometría de masas de la fracción eluida con MeOH 100% después de dos ciclos de glicosidación. Entre otros, se pueden apreciar los picos del aceptor monosacárido **101** $[M+Na]^+$, del aceptor disacarídico **103** $[M+Na]^+$ y del trisacárido final **104** $[M+Na]^+$.

Para aislar el compuesto final **104** resultó necesaria una purificación por TLC preparativa. Finalmente, se obtuvieron 16 mg de trisacárido que corresponden a un 12% de rendimiento global. Este bajo rendimiento puede explicarse por varios motivos.

Observamos que los ciclos de glicosidación estaban funcionando, dado que por RMN se veía perfectamente que la ratio disacárido/aceptor iba aumentando (Figuras 52 y 53). Teóricamente, se podrían utilizar más ciclos hasta consumir totalmente el aceptor. Sin embargo, en cada purificación por F-SPE, hemos notado una pérdida de masa, alrededor de un 10% en peso, lo que nos impidió realizar más ciclos de reacción para aumentar el rendimiento global.

También hay que tener en cuenta los rendimientos moderados de las glicosidaciones puestas a punto en la ruta sintética en solución, en particular del acoplamiento con el donador **78**.

A pesar de estos problemas se ha sintetizado, utilizando pocos equivalentes de donador, un trisacárido de HA, simplificando de forma significativa las purificaciones de los intermedios. Utilizando esta estrategia, evitamos purificaciones por cromatografía en sílica flash que se caracterizan por ser muy caras y muy lentas. La sílica perfluorada, por contra, se puede lavar y volver a utilizar para la siguiente purificación.

Finalmente, para comprobar la utilidad del método, tuvimos que verificar que la desprotección del espaciador perfluorado no diese problemas y que pudiéramos fácilmente obtener el intermedio **99** (Figura 50), el mismo que se preparó anteriormente en solución para dar el trisacárido final (Figura 46).

Así, la desprotección del trisacárido marcado se llevó a cabo por tratamiento con LiOH/H₂O₂ en THF, durante 24 horas y con NaOH 4M en MeOH durante los siguientes 4 días, desprotegiendo de esta manera todos los grupos acilos y obteniendo el compuesto intermedio con el amino libre. La *N*-acetilación (Ac₂O/TEA en MeOH) de la posición 2 de la glucosamina dio rápidamente el compuesto **99**, con un rendimiento final para las dos etapas de un 90%. A través de un análisis por RMN y por espectrometría de masas, se confirmó la estructura de **99**.

En resumen, a pesar del bajo rendimiento obtenido en la preparación del trisacárido **104**, consideramos que la ruta sintética asistida por etiquetas perfluoradas que se ha desarrollado puede ser útil para facilitar la síntesis de oligosacáridos de la familia de los glicosaminoglicanos. La estrategia empleada permite disfrutar de las ventajas de las purificaciones por F-SPE sin tener que añadir etapas de reacción adicionales para introducir y eliminar la etiqueta.

3.2.4. Estudio de la interacción HA-proteína a través de experimentos STD de RMN.

A continuación, se describen los estudios de interacción HA-proteína que se han llevado a cabo con algunos de los productos sintetizados y que forman parte de la Tesis Doctoral del Dr. Juan Carlos Muñoz-García,⁶² realizada en nuestro grupo de investigación bajo la supervisión de los Dres. Jesús Angulo y Pedro M. Nieto.

Los disacáridos **42** y **43** (Figura 56) se han utilizado para estudiar las características estructurales de las interacciones de una proteína modelo, la langerina, con derivados de ácido hialurónico. La interacción de estos dos compuestos con langerina se evaluó mediante una combinación de experimentos STD (del inglés *saturation transference difference*) de RMN y técnicas de modelización molecular (*docking*).

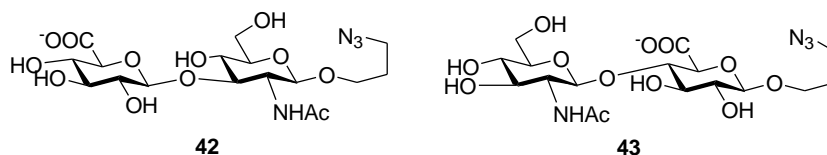


Figura 56. Disacáridos **42** y **43**, de secuencia GlcA-GlcN y GlcN-GlcA respectivamente, utilizados para el estudio de su interacción con la langerina por STD-RMN y docking.

La langerina es una lectina tipo C, es decir, una proteína que reconoce e interacciona con carbohidratos de una manera dependiente de iones calcio.⁶³ Las lectinas, en general, reconocen carbohidratos neutros por interacción con dos grupos OH contiguos ecuatoriales (p. ej. manosa, glucosa y GlcNAc poseen dos OH ecuatoriales en las posiciones 3 y 4)

Lo que distingue y, por lo tanto, hace interesante y diferente a la langerina frente a otras lectinas es que además ésta interacciona con azúcares cargados, como los GAGs. Todavía se desconocen las implicaciones biológicas de esta interacción, aunque todo apunta a que esta propiedad de la langerina esté relacionada con su participación en la formación de unos orgánulos intracelulares que engloban y destruyen virus y patógenos (los gránulos de Birbeck). En este contexto resulta interesante estudiar la interacción de la langerina con el ácido hialurónico.

El STD ^{64,65,66} es una técnica de RMN de observación del ligando utilizada para evaluar la interacción, y los sitios involucrados en ella, entre una molécula de bajo peso molecular, el ligando (carbohidrato en este caso), y una proteína de alto peso molecular. Trabajando con un exceso de ligando no se ven las señales de la proteína, sino que sólo se detectan las del ligando.

En un experimento de STD (Figura 57), se irradia en una zona del espectro donde no hay señales del ligando pero sí de la proteína, que es saturada. Cuando se forma el complejo proteína-ligando, la irradiación se trasfiere por NOE intramolecular de la proteína al ligando. Al disociarse, el ligando lo hace con la magnetización adquirida en el estado enlazado. De esta manera, la magnetización de cada protón del ligando cambia, de acuerdo con la geometría del estado enlazado.

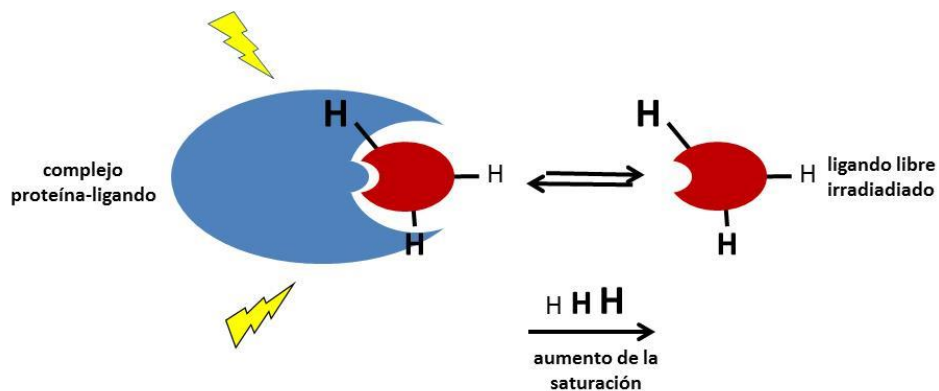


Figura 57. Representación esquemática de un experimento de STD. La irradiación en una zona concreta del espectro se transfiere al ligando por NOE intramolecular. Los protones se verán más o menos afectados, dependiendo del grado de implicación en la interacción proteína-ligando.

Los protones que se ven más afectados por esta transferencia de magnetización tendrán una intensidad menor en el espectro (ON resonance). La diferencia entre el espectro ON resonance y el espectro de referencia del ligando (OFF resonance) se define como espectro de STD (Figura 58). Los valores de intensidad reflejan la proximidad de los contactos del ligando con la proteína. De esta manera podemos estimar los protones más involucrados en la interacción ligando-proteína.

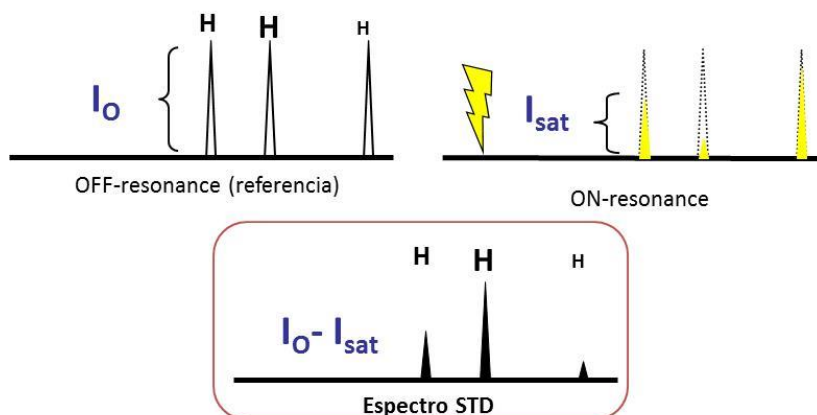


Figura 58. La diferencia entre el espectro OFF-resonance y el espectro ON-resonance da como resultado un espectro de STD. Las intensidades de las señales en el espectro de STD son proporcionales a la implicación del mismo protón en la interacción con la proteína.

A priori, sólo teniendo en cuenta la estructura de los dos disacáridos **42** y **43**, podríamos esperar que ambos interactuaran con la langerina, ya que contienen los dos átomos de oxígeno ecuatoriales en el terminal no reductor necesarios para quelar el ion calcio y para enlazar la proteína.

Sin embargo, la ausencia de señales de ligando en el experimento de STD RMN con el disacárido **42** de secuencia GlcA-GlcN (Figura 59) indicó claramente la ausencia de interacción ligando-proteína en este caso.

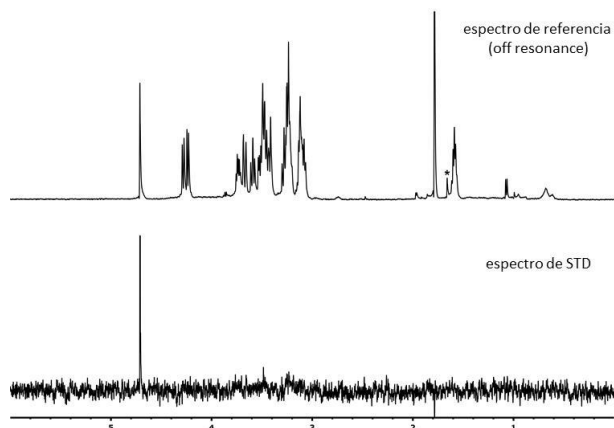


Figura 59. Espectro de referencia y de STD del disacárido **42** en presencia de langerina (en una relación proteína:ligando 1:60) a 10°C, 6 segundos de tiempo de saturación y a 500 MHz. *Señal del buffer.

Por otro lado, se observó unión del disacárido **43**, de secuencia GlcN-GlcA, a la proteína (Figura 60b). Para confirmar la importancia del calcio en esta interacción se añadió un exceso de EDTA-d₁₂, un quelante del ion calcio (Figura 60c).

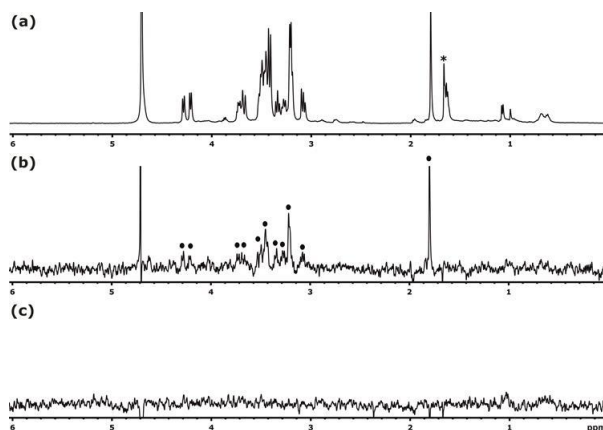


Figura 60. La interacción del disacárido **43** con langerina es calcio dependiente. a) espectro de referencia. *Señal del buffer. b) Espectro de STD para el disacárido **43**. Los puntos indican las señales STD del ligando. c) Espectro de STD para el disacárido **43** en presencia de langerina en un buffer 10 mM EDTA. (relación proteína:ligando 1:27, 10°C, 4 segundos de tiempo de saturación).

A través de las curvas de acumulación de STD para el disacárido **43**, podemos evaluar los protones del ligando más involucrados en la interacción con langerina, definiendo de esta manera un epítipo de unión. Asignando arbitrariamente un valor de 100% al protón que recibe la saturación más rápidamente (H3 de GlcN) se puede calcular el valor relativo para los demás protones (Figura 61).

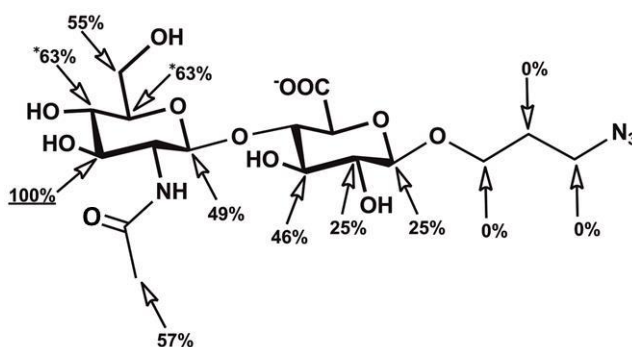


Figura 61. Epítipo de unión del disacárido **43** en su interacción con langerina. Los valores relativos se calculan tomando como referencia (100%) el H3 de la glucosamina, que es el protón que recibe más saturación. Algunos protones no se pudieron cuantificar debido a solapamiento de las señales. *Los valores de STD de los protones H4 y H5 de la unidad de glucosamina se han considerado equivalentes debido a solapamiento.

Analizando el epítipo de unión para el disacárido **43** (Figura 61), se deduce que los protones que establecen los contactos más cercanos con la superficie de la proteína son H3, H4, H5, H6 y los protones CH₃ de la acetamida del anillo de GlcNAc del terminal no reductor, hecho que pone de relieve la importancia de este residuo de la molécula en la unión con la langerina.

Este resultado, junto con la observación de la eliminación de la unión a la proteína después de la retirada del catión divalente, apoya firmemente que el disacárido **43** se une a langerina en el sitio de unión dependiente de Ca²⁺, por

una coordinación clásica del ion de calcio a través de los oxígenos ecuatoriales del anillo del terminal no reductor.

El residuo de ácido glucurónico participa en un menor grado en la unión; los protones H4 y H5 de este anillo también dieron lugar a STD, pero su cuantificación no fue posible debido al solapamiento de las señales. Con respecto a los protones del espaciador 3-azido propanol, éstos no participan en la unión (ausencia de señales de STD), por lo que es lógico imaginar que el espaciador permanece expuesto al disolvente cuando se forma el complejo proteína-ligando.

Paralelamente a los experimentos de STD, se utilizó la técnica computacional de docking para estudiar y explicar, por un lado, el epítipo del disacárido **43** y, por otro lado, las razones por las cuales el disacárido **42** no se une a la proteína.

Los resultados de estos estudios ponen de relieve que existen interacciones repulsivas entre el carboxilato del ácido glucurónico del terminal no reductor del disacárido **42** y una cadena lateral de un residuo de glutamato de la langerina, que destabilizan la unión disacárido-langerina (Figura 62).

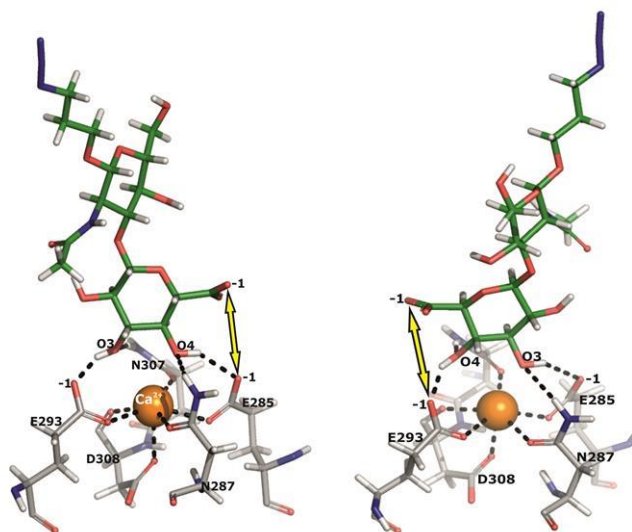


Figura 62. Representación de las interacciones repulsivas y destabilizantes del disacárido **42** (en la orientación O_3-O_4 y O_4-O_3) con los residuos de glutamato E285 y E293.

Como se puede apreciar en la Figura 62, el disacárido **42** puede entrar en el sitio de unión de dos maneras: de forma similar a la laminatriosa, la orientación O_3-O_4 (a la izquierda), o en la orientación O_4-O_3 , imagen especular de la primera, (a la derecha). En ambas, la disposición paralela de los grupos carboxilato con respecto al GLU285 o al GLU293 puede explicar la ausencia de interacción entre este disacárido y la langerina.

Los oligosacáridos sintetizados en este capítulo se están usando además para el estudio de la interacción HA-CD44, a través de una colaboración con el Dr. Jesús Angulo (Universidad de East Anglia, Norwich). Como se indicó en el capítulo 1, CD44 es un receptor natural de HA implicado en la migración de la células tumorales, por lo que se espera que estos estudios aporten datos interesantes, a nivel molecular, sobre la implicación del HA en este proceso.

CAPÍTULO 4.

**SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS
DE SULFATO DE
CONDROITINA.**

4. Síntesis de oligosacáridos de sulfato de condroitina.

4.1. Antecedentes.

Según la Organización Mundial de la Salud, que desarrolla un sistema de clasificación internacional de todos los fármacos basado en sus propiedades químicas, farmacológicas y terapéuticas, el sulfato de condroitina pertenece a la categoría de fármacos antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroideos. Además, el CS se utiliza también en medicina veterinaria y como suplemento nutricional.

Las funciones biológicas específicas de este glicosaminoglicano son, en la actualidad, todavía un tema de intensa investigación.

Como ya se ha dicho anteriormente, refiriéndonos a los GAGs en general, las numerosas actividades que desempeña el sulfato de condroitina, como el

desarrollo y la regeneración cerebral,⁶⁷ la unión a selectinas⁶⁸ y su participación en la infección de la malaria,⁶⁹ están íntimamente relacionadas con su estructura, estando esta última altamente regulada *in vivo*.

El sulfato de condroitina se extrae principalmente de cartílago bovino, porcino o de cartílago de origen marino. El método de extracción incluye un tratamiento proteolítico seguido de una separación específica y una purificación por tamaño y número de cargas. Dependiendo de la especie animal de la que se extrae y del método utilizado, el preparado puede estar caracterizado por diferentes proporciones de grupos sulfatos, así como por diferentes pesos moleculares.

Con el fin de estudiar mejor la estructura y, en consecuencia, la actividad biológica de estos compuestos, se requieren fragmentos puros, de longitud y patrón de sulfatación definidos, que difícilmente pueden ser obtenidos por extracción de fuentes naturales. Por lo tanto, el progreso en este campo deberá basarse en la síntesis química de oligosacáridos.

Desafortunadamente, los oligosacáridos de CS no se preparan con facilidad, a pesar de que tengan una gran demanda.

Desde los primeros estudios realizados por Levene⁷⁰ y Davidson,⁷¹ el interés acerca de los oligosacáridos de sulfato de condroitina ha crecido enormemente. Sobre todo en los últimos años, muchos investigadores han centrado su interés en la obtención de este glicosaminoglicano.^{72,73}

Veremos, a continuación, algunas de las contribuciones más importantes en este campo, focalizando nuestra atención en los trabajos de L. Hsieh-Wilson y en los de J.-C. Jacquinet.

Hsieh-Wilson y colaboradores,^{30,31} del California Institute of Technology de Pasadena, desarrollaron un esquema sintético para la preparación de oligosacáridos de sulfato de condroitina, en el que la introducción de los grupos sulfato en posiciones precisas de la cadena permitió la síntesis de estructuras definidas, tales como tetrasacáridos tipo CS-E, CS-C, CS-A y CS-R (ver más adelante, Figura 65).

Como hemos visto anteriormente en el Apartado 1.5.2, este estudio demostró qué motivos de sulfatación actúan como elementos de reconocimiento molecular de factores de crecimiento y modulan, así, el desarrollo neuronal (Figuras 14 y 15).

En este esquema sintético, el grupo de Hsieh-Wilson preparó el bloque disacáridico **106** (Figura 63) a partir del donador de ácido glucurónico **105a** y el aceptor de galactosamina **105b**. El diseño de grupos protectores empleado permitió la obtención de diferentes patrones de sulfatación.

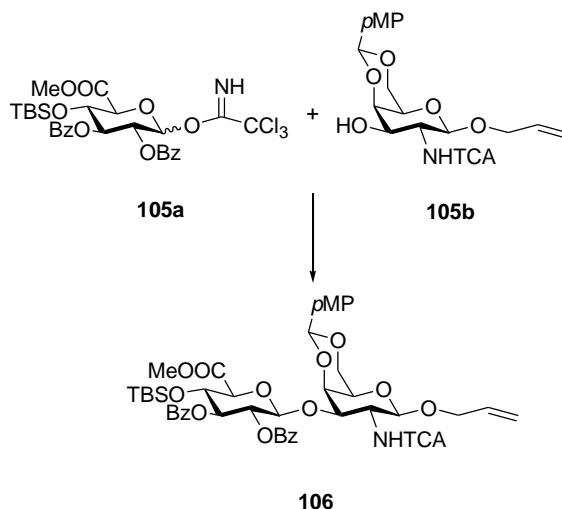


Figura 63. La glicosidación entre el donador **105a** y el aceptor **105b** dio el disacárido base **106**, adecuadamente protegido, que será utilizado para la síntesis del tetrasacárido correspondiente, utilizando una estrategia 2+2. (*pMP* = *p*-metoxifenilo).

Como donadores, eligieron los tricloroacetimidatos y utilizaron directamente unidades de ácido glucurónico, en vez de glucosa para las glicosidaciones. La protección de las posiciones 4 y 6 de los bloques de galactosamina con un *p*-metoxibencilidén acetal, permitió, después de su desprotección, la introducción de grupos sulfato en ambos o en uno solo de los hidroxilos. Como grupo ortogonal en la posición 4 del terminal no reductor, utilizaron el *tert*-butildimetilsililo (TBS), que puede ser desprotegido selectivamente para permitir la elongación de la cadena oligosacáridica. Para garantizar la estereoselectividad del enlace glicosídico, las posiciones 2 de los monómeros **105a** y **105b**, se protegieron con los grupos participantes –OBz y –NHTCA. Finalmente, el hidroxilo anomérico de **105b** se bloqueó con un grupo alilo, que permite la funcionalización de las moléculas finales y su unión, por ejemplo, a superficies de vidrio para crear los correspondientes microarrays.

Hsieh-Wilson y colaboradores utilizaron el disacárido **106** como producto de partida para la preparación del donador **107** y del aceptor **108** (Figura 64). Siguiendo una estrategia 2+2, obtuvieron, con un rendimiento moderado, el tetrasacárido **109**.

La reducción radicalaria del *N*-TCA para dar el *N*-acetil derivado, y la hidrólisis del *p*-metoxibencilidén acetal proporcionaron el tetraol intermedio **110**, compuesto clave para la obtención de los diferentes patrones de sulfatación.

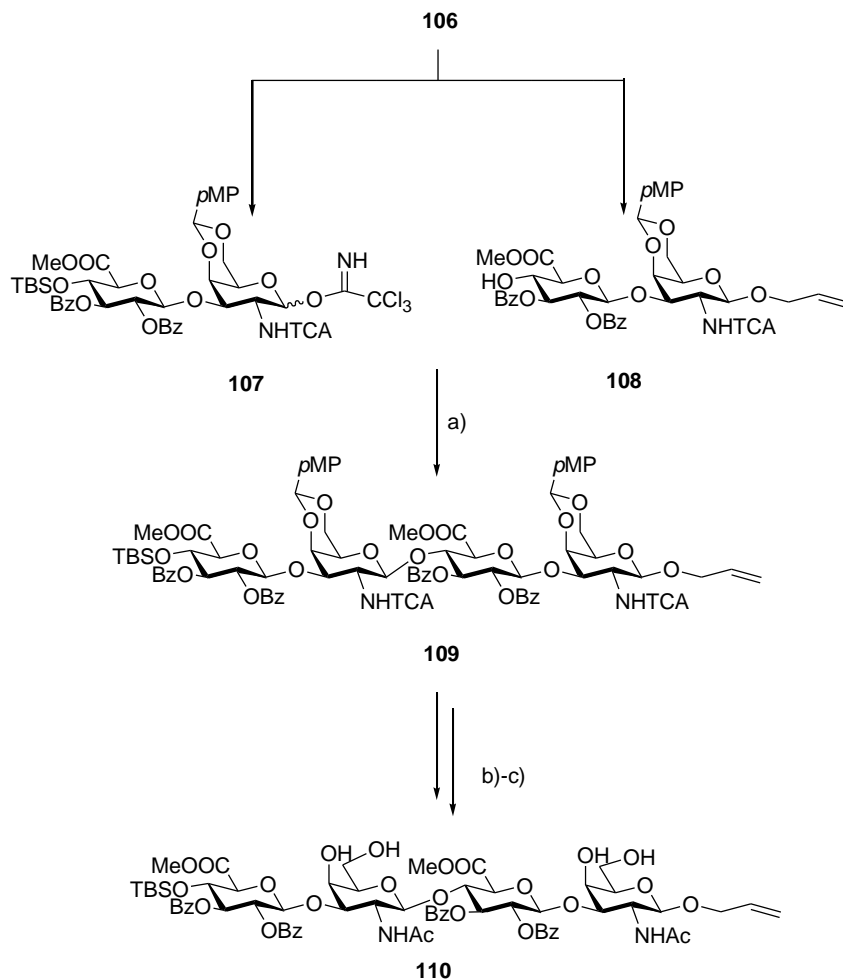


Figura 64. Síntesis del tetraol de CS **110**. El disacárido base **106** se utilizó para preparar el correspondiente tricloroacetimidato **107** y el aceptor disacárido **108**. (a) La glicosidación entre estos dos disacáridos proporcionó, con un rendimiento moderado del 44%, el tetrasacárido **109**. (b) La conversión radicalaria del NHTCA a NHAc y (c) la desprotección de las posiciones 4 y 6 de la unidad de galactosamina proporcionaron el tetraol intermedio **110**, con un patrón de grupo protectores apropiado para las siguientes reacciones de sulfatación/desprotección.

Con el tetrasacárido **110** adecuadamente funcionalizado, estos investigadores californianos pudieron sintetizar diferentes estructuras de CS con motivos específicos de sulfatación (ver detalles, Figura 65). Establecieron, de esta manera, que la asociación de la midkina (un factor de crecimiento neuronal) a fragmentos de CS requiere, primero, una secuencia mínima tetrasacáridica y,

segundo, una disposición específica de los grupos sulfato, la que está presente en el oligosacárido tipo E (compuesto **111**, Figura 65).

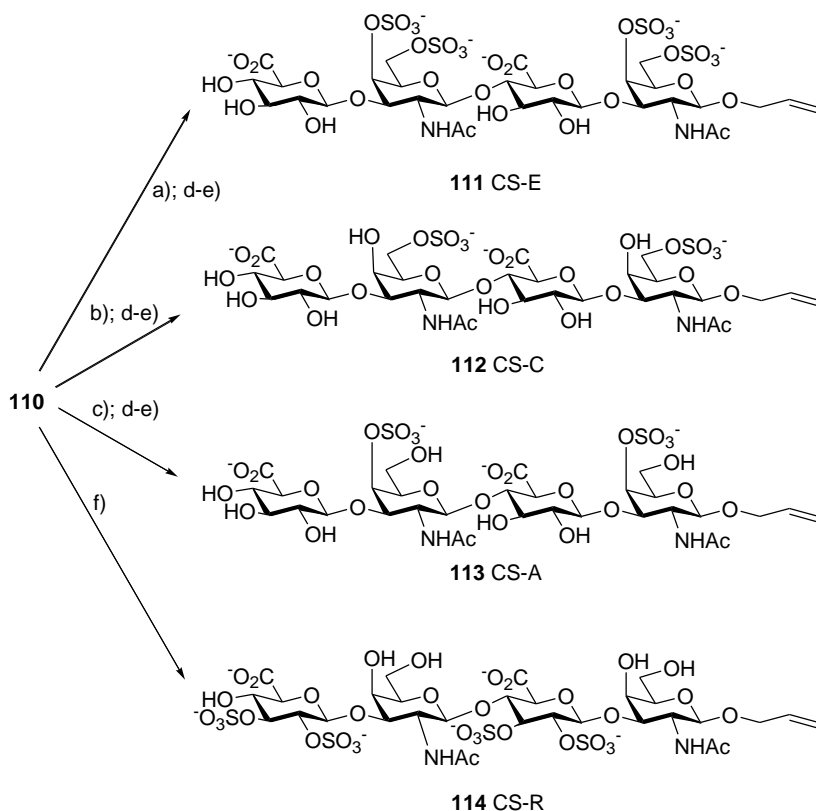


Figura 65. Esquema sintético para la preparación de los 4 tetrasacáridos con diferentes patrones de sulfatación: a) CS-E: sulfatación de las posiciones 4 y 6 del tetraol utilizando 50 eq. del reactivo de sulfatación; b) CS-C: sulfatación selectiva de la posición 6 (5 eq. de $\text{SO}_3\text{Me}_3\text{N}$); c) CS-A: benzoilación de la posición 6 y sulfatación de la posición 4 (20 eq. de $\text{SO}_3\text{Me}_3\text{N}$); d) desililación; e) saponificación; f) CS-R: bencilidénación, saponificación, sulfatación de las posiciones 2 y 3 de GlcA e hidrólisis del bencilidén acetal y del silil éter.

Este resultado subraya la necesidad de sintetizar oligosacáridos de CS de tamaño y patrón de sulfatación bien definidos para el estudio de las relaciones estructura-actividad de estos compuestos.

Otro grupo que ha centrado su atención en el estudio de este GAG, es el de Jacquinet, de la Universidad de Orleans en Francia. Estos investigadores franceses han publicado varios trabajos relacionados con la síntesis de sulfato de condroitina.^{55,56} En sus primeros trabajos utilizaban, como material de partida, bloques monosacáridos sintéticos preparados en laboratorio.

En 2006,⁷⁴ este grupo de investigación desarrolló una semisíntesis que aprovechaba fuentes naturales, fácilmente disponibles, como producto de partida. Así, la condrosina, la unidad disacáridica GlcA-GalN de repetición básica del sulfato de condroitina (desulfatada y *N*-deacetilada), pudo obtenerse por hidrólisis ácida a partir del polímero natural. La sucesiva formación del metiléster (disacárido **115**) y la *N*-tricloroacetilación de la posición 2 de la galactosamina proporcionaron el disacárido desprotegido **116**. A partir del bloque disacáridico **116**, en 10 etapas, Jacquinet y colaboradores obtuvieron el compuesto **117** adecuadamente funcionalizado (Figura 66).

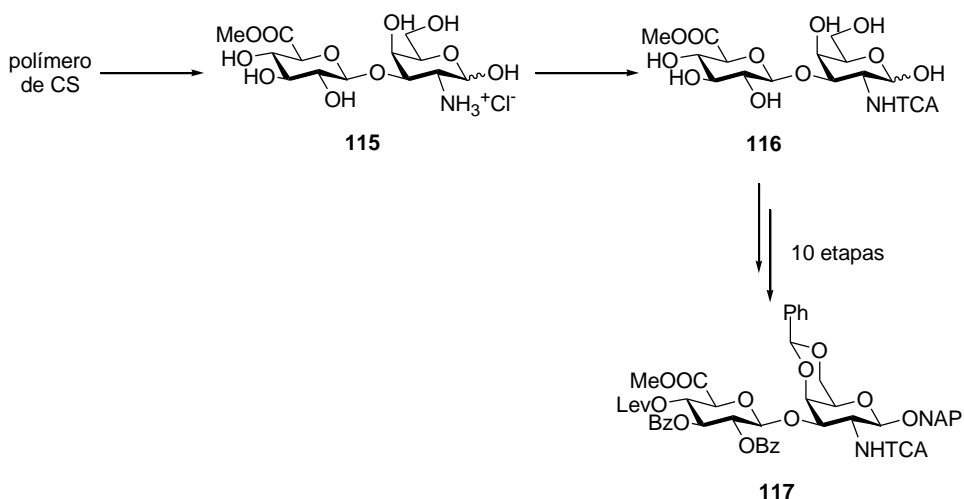


Figura 66. La hidrólisis ácida del polímero natural de CS (resina ácida IR-120, H₂O; H₂SO₄ 0.5M, 100°C), la esterificación (AcCl, MeOH) y *N*-tricloroacetilación (Cl₃CCOCl, piridina) proporcionaron el disacárido **116**, que en 10 etapas se transformó en el derivado completamente protegido **117**. (NAP = 2-naftilmetilo)

Usando este disacárido, el compuesto **117**, diseñaron una ruta sintética, basada en una estrategia 2+2 y enfocada a la preparación de oligosacáridos de CS diferentemente sulfatados.^{75,76} El patrón de grupos protectores permitió la elongación de la cadena. La hidrólisis y activación a imidato de la posición anomérica, por un lado, y la deslevulinación, por otro, dieron acceso a los correspondientes donadores y aceptores (compuestos **118** y **119**, Figura 67). De esta manera, Jacquinet y colaboradores sintetizaron fragmentos tetra- y hexasacarídicos de CS con diferentes motivos de sulfatación, entre ellos los de tipo CS-A, CS-C y CS-E (Figura 67).

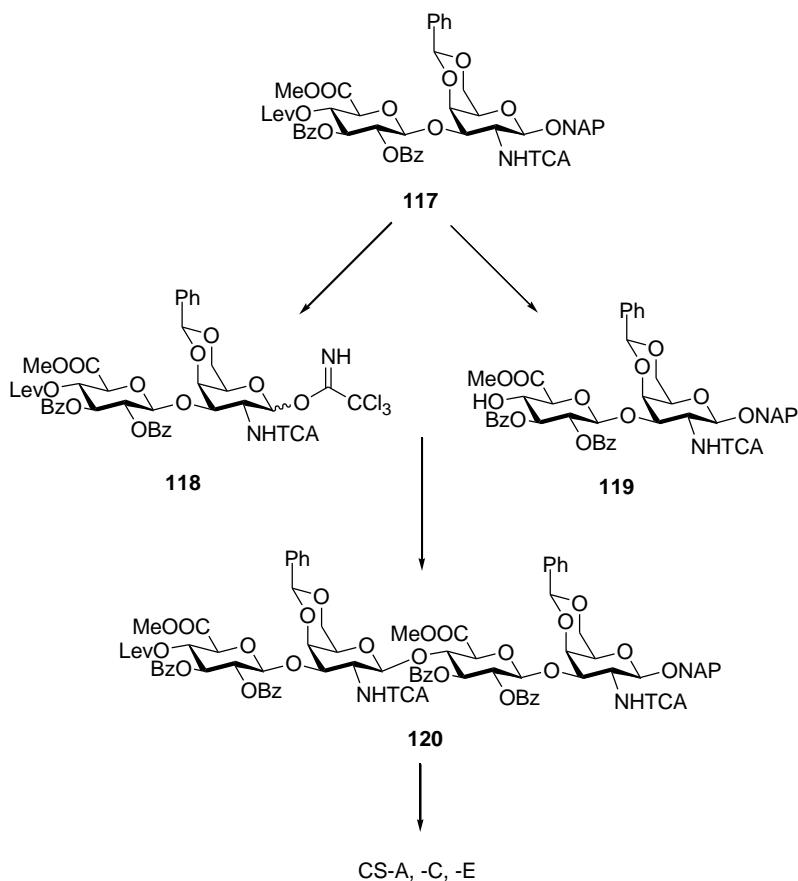


Figura 67. El disacárido base **117** se transformó en los correspondientes donador y aceptor **118** y **119**. La glicosidación entre **118** y **119** proporcionó el tetrasacárido **120**, que se utilizó para la preparación de los derivados con patrón de sulfatación tipo CS-A, -C y -E.

Paralelamente a los trabajos de Hsieh-Wilson y Jacquinet en los que se usa el TCA como grupo participante en 2, el equipo de investigación japonés de Tamura⁷⁷ desarrolló un esquema sintético diferente.

En este diseño, hay que resaltar que el disacárido modelo, utilizado para preparar oligosacáridos de CS de tamaño diferente (compuesto **121**), se caracteriza por su secuencia inversa GalN-GlcA (Figura 68). En contraposición a los esquemas vistos anteriormente, Tamura y colaboradores protegieron la posición 2 de la galactosamina con un grupo azida.

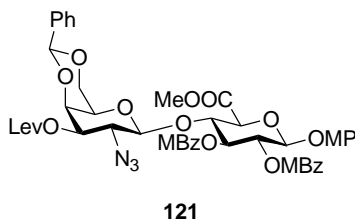


Figura 68. Disacárido modelo utilizado por Tamura y colaboradores. La posición 2 del bloque de galactosamina está protegida por un grupo azida.

En el apartado siguiente describiremos nuestra aportación a la preparación de oligosacáridos de CS.

4.2. Resultados y discusión.

Como hemos dicho anteriormente, en el diseño de una síntesis enfocada a la preparación de oligosacáridos de CS, el patrón de grupos protectores posee una gran importancia. Éste, por un lado, tiene que asegurar unos buenos rendimientos en las glicosidaciones y la adecuada estereoselectividad del enlace glicosídico. Por otro lado, tiene que facilitar las reacciones de desprotección y permitir, de esta manera, la obtención de los motivos de sulfatación deseados.

Un punto muy importante en este diseño es el grupo protector elegido para la posición 2 de la unidad de galactosamina. Como hemos visto en los antecedentes de este capítulo, en general se han usado dos grupos protectores diferentes: el grupo azida (N_3) y el grupo tricloroacetamido (NHTCA).⁷⁸

Los 2-azido derivados presentan algunas limitaciones dado que el grupo N_3 no es un grupo participante. Esto puede generar una mezcla de α/β -glicósidos y obliga muchas veces a un ajuste meticuloso de las condiciones de reacción para poder obtener exclusivamente el enlace glicosídico 1,2-*trans*. Por otro lado, la desprotección de este grupo no es trivial, y los problemas aumentan cuando la cadena oligosacáridica contiene muchos grupos N_3 .^{77b}

El grupo TCA,^{30,31,75-76, 79} aunque es el más usado en la síntesis de oligómeros de CS para proteger la posición 2 de la hexosamina, también presenta algunos inconvenientes. Como ya se ha dicho en el capítulo anterior, las oxazolinas que se pueden formar explican en ocasiones los bajos rendimientos de las glicosidaciones y obligan, la mayoría de las veces, a forzar las condiciones de reacción para evitar su formación, lo cual puede conducir a productos de descomposición. Además, la hidrólisis básica de grupos NHTCA necesita largos tiempos de reacción.⁴⁴ La reducción alternativa del NHTCA a grupo acetamido, con $Bu_3SnH/AIBN$ o $Zn/AcOH$, puede dar, en algunos casos, intermedios mono- o dicloroacetamido.

Por estas razones, y con la experiencia previa en la síntesis de oligosacáridos de ácido hialurónico, en nuestro grupo de investigación se han explorado nuevos grupos protectores de la posición amino para la síntesis de oligosacáridos de CS, intentando resolver algunos de los problemas experimentales que presenta actualmente la preparación de estas moléculas.

En principio, consideramos que el grupo tetracloroftalimido (*N*-TCP) podría ser, por las ventajas que lo caracterizan, una buena alternativa. Este grupo protector no puede generar oxazolininas intermedias y favorece la formación del enlace glicosídico 1,2-*trans*. Además, la hidrólisis del *N*-TCP no requiere condiciones tan drásticas como su análogo, el grupo ftalimido (*N*-Phth).

Así, en nuestro grupo de investigación se sintetizó un disacárido de CS con buen rendimiento usando bloques *N*-TCP. Pero, cuando se intentó elongar la cadena, los intentos de glicosidaciones, utilizando una estrategia 2+2, no proporcionaron en ningún caso el tetrasacárido deseado.⁸⁰ Es importante recordar que el tamaño tetrasacarídico muestra ya actividad biológica y unión a determinadas proteínas, por lo que consideramos a los tetrámeros de CS como nuestro primer objetivo sintético relevante.

Decidimos, así, abandonar el uso de este grupo, para explorar las glicosidaciones con un nuevo bloque de galactosamina, la GalNHTFA **122**, protegida en su función amino con un grupo trifluoroacetilo (TFA) (figura 69).

El grupo *N*-TFA^{81,82,83} se puede desproteger en condiciones básicas más fácilmente que el TCA y, al mismo tiempo, siendo un grupo participante, asegura la estereoselectividad β del enlace glicosídico.^{84,85} En la Tesis Doctoral de María del Mar Kayser, desarrollada en nuestro grupo de investigación, se sintetizó el disacárido **123**,⁸⁶ por glicosidación de **78** y **122**, con un rendimiento muy alto, alrededor del 95%. El grupo silileno cíclico en las posiciones 4 y 6 resultó crucial para el alto rendimiento de la

glicosidación, dado que con otros grupos protectores no se obtuvieron resultados aceptables. Además este grupo puede permitir la fácil manipulación de estas posiciones, con el objetivo final de introducir grupos sulfato en posiciones precisas de la molécula.

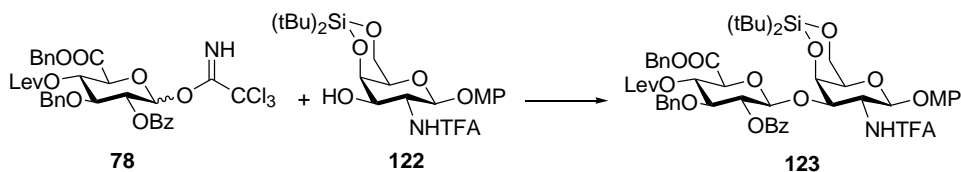


Figura 69. Síntesis del disacárido de sulfato de condrotina **123**. Condiciones y reactivos: TMSOTf 10%, CH₂Cl₂, 0°C.; 95%

En este capítulo se describe la síntesis de un tetrasacárido de CS usando como disacárido clave el compuesto **123**, empleando para ello el acoplamiento 2+2 de bloques disacarídicos adecuadamente sustituidos.

4.2.1. Síntesis de oligosacáridos de CS, utilizando bloques de GalNHTFA.

Para la preparación de oligosacáridos de sulfato de condroitina utilizamos el bloque de ácido glucurónico **78**, ya descrito en el Apartado 3.2.2.1.

A continuación, describiremos la síntesis de la unidad de GalNHTFA **122**, utilizada como aceptor en la obtención del disacárido **123** (Figura 69).

4.2.1.1. Preparación del aceptor de galactosamina 122, NHTFA derivado.

Seguindo el esquema de la Figura 70, sintetizamos el bloque de galactosamina **122** desde el hidrocloreto de galactosamina comercial **124**.

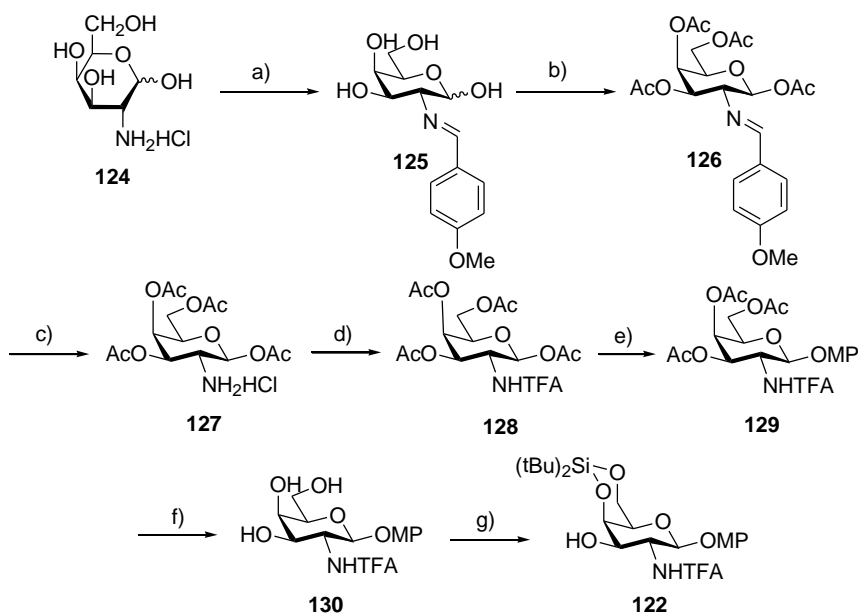


Figura 70. Síntesis del bloque de GalNHTFA **122**. Condiciones y reactivos: a) NaOH 1M, $p\text{-OMeC}_6\text{H}_4\text{CHO}$; 60%; b) Ac_2O , Piridina; 70%; c) acetona, HCl 5M; 80%; d) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, Piridina, CH_2Cl_2 ; 80%; e) 4-metoxifenol, TMSOTf 15%, CH_2Cl_2 , 0°C .; 97%; f) MeO^-Na^+ , MeOH ; 97%; g) $(\text{tBu})_2\text{Si}(\text{OTf})_2$, Piridina; 88%.

En la presente Tesis Doctoral se optimizó la preparación del derivado **129**, mejorando la ruta sintética descrita anteriormente por nuestro grupo de investigación.⁸⁶

En ensayos anteriores, en los que se utilizó una mezcla de α/β acetatos para la preparación del derivado **129**, el rendimiento fue moderado (40%),

recuperándose el anómero α cuantitativamente. Este hecho indicaba que en la reacción de glicosidación reaccionaba solo el anómero β , lo que puede explicar el bajo rendimiento obtenido.

Decidimos, entonces, preparar la correspondiente β -GalNHTFA **128**, para mejorar el rendimiento de la reacción de glicosidación con el 4-metoxifenol.

La preparación del β -acetato **128**⁸⁷ se llevó a cabo empleando como material de partida el hidrocloreuro de D-galactosamina **124** de la siguiente manera. En primer lugar, se protegió el grupo amino con un grupo *p*-metoxibencilideno (compuesto **125**, 60%) que permitió la preparación del β -peracetilado **126**, utilizando anhídrido acético y piridina, con un rendimiento del 70%. La desprotección de la función amino (compuesto **127**, 80%) y posterior introducción del trifluoroacetilo (TFA) proporcionaron la β -GalNHTFA deseada **128** con un buen rendimiento. Finalmente el β -acetato **128** se glicosidó con el 4-metoxifenol para dar el glicósido **129** con un rendimiento excelente (97%). Como hemos dicho anteriormente, utilizando la mezcla α/β -acetato solo se obtuvo un 40% de rendimiento.

El triol **130** se preparó a partir del compuesto triacetilado por tratamiento con metóxido sódico (97%). La protección selectiva con un 4,6-*O*-di-*tert*-butilsililidén acetal, usando bistriflato de di-*tert*-butilsililo [tBu₂Si(OTf)₂] en piridina, proporcionó el bloque GalNHTFA **122** (88%) adecuadamente protegido para ser utilizado como aceptor en la siguiente glicosidación.

4.2.1.2. Síntesis de una secuencia tetrasacarídica de sulfato de condroitina.

Como hemos visto anteriormente en la Figura 69, el monosacárido **122** demostró ser un excelente aceptor en la glicosidación con el tricloroacetimidato de glucurónico **78**, generando de esta manera el disacárido

correspondiente **123** con un rendimiento del 95%. El grupo benzoato de la posición 2 del GlcA permitió la obtención selectiva del 1,2-*trans* glicósido.

El bloque disacárido **123** se usó para la preparación de una secuencia tetrasacárida de CS (compuesto **135**), por acoplamiento 2+2 de dos derivados disacáridicos, los compuestos **133** y **134** (Figura 71).

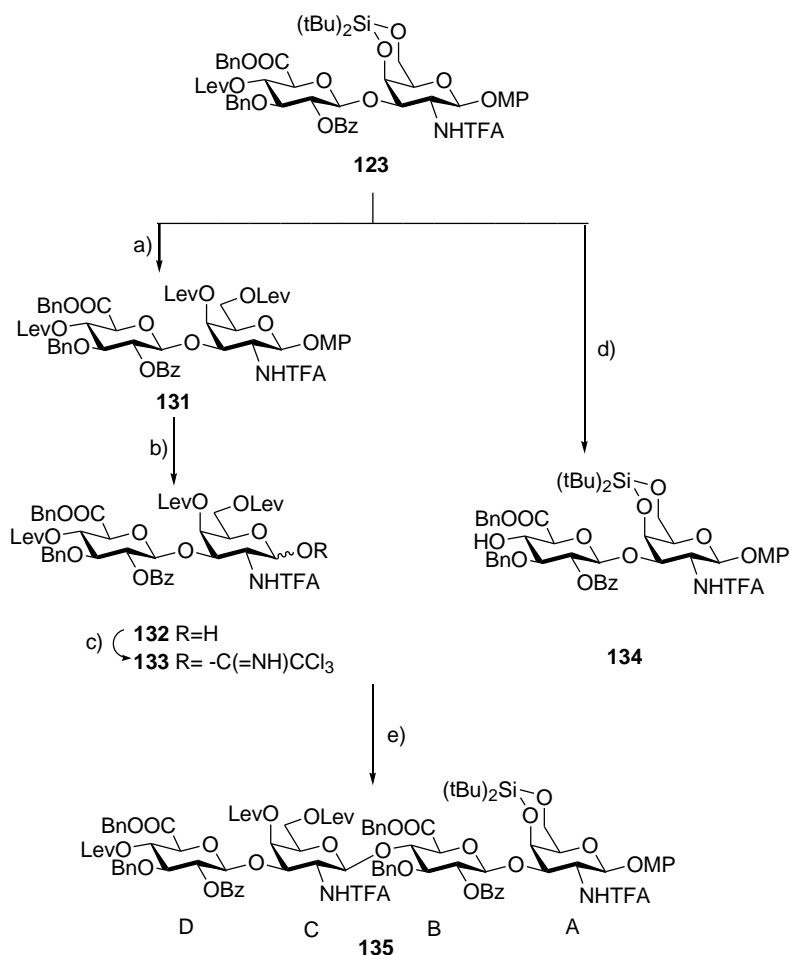


Figura 71. Síntesis del tetrasacárido **135**. Condiciones y reactivos: a) (HF)_nPy, THF, 0°C; Lev₂O, Py, DMAP; 83%; b) CAN, CH₂Cl₂/CH₃CN/H₂O; 81%; c) Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂; 70%; d) NH₂NH₂·H₂O, piridina-AcOH, CH₂Cl₂; 95%; e) TMSOTf, CH₂Cl₂, 0°C; 71%.

Para poder llevar a cabo con éxito la glicosidación 2+2 y con el objetivo de garantizar la formación del enlace 1,2-*trans*, tuvimos que cambiar el 4,6-*O*-*tert*-butilsililideno de la unidad de galactosamina. Este grupo protector, de hecho, conduce a la formación selectiva de enlaces 1,2-*cis* (o α -glicósidos), a pesar de la presencia de grupos participantes en la posición 2.⁸⁸ En algunos casos, también se ha descrito la pérdida de estereoselectividad β con 4,6-*O*-bencilidén derivados de galactosamina que poseen un grupo participante en 2.⁸⁹

Por estas razones, decidimos introducir, en una primera aproximación, grupos levulino en 4 y 6 de galactosamina. Éstos, a pesar de no ser ortogonales, dada la presencia de otro levulino en la secuencia disacarídica, son los que menos problemas han generado a la hora de su introducción. En este punto es importante resaltar que la manipulación de los grupos protectores en estos derivados de GalNHTFA no es trivial ya que estos compuestos suelen formar geles o ser insolubles en un gran número de disolventes orgánicos.

Así, el disacárido **123** se transformó en el compuesto **131** por desililación de las posiciones 4 y 6 y posterior tratamiento del diol correspondiente con anhídrido levulínico y DMAP. El tricloroacetimidato **133** se obtuvo, con buenos rendimientos, por hidrólisis del grupo 4-metoxifenilo de la posición anomérica (compuesto **132**) y posterior tratamiento con tricloroacetnitrilo y DBU en CH₂Cl₂.

Por otro lado, el aceptor disacarídico (compuesto **134**) se obtuvo fácilmente y con buen rendimiento por deslevulinación de la posición 4 del terminal no reductor con hidracina monohidrato en una solución Py/AcOH.

La glicosidación entre el donador **133** y el aceptor **134**, llevada a cabo en diclorometano a 0°C y utilizando un 10% de promotor, proporcionó con un rendimiento del 71% el β -tetrasacárido **135**.

El compuesto tetrasacárido **135** se caracterizó por RMN (Figura 72) y espectrometría de masas, comprobándose la utilidad de esta ruta sintética para preparar tetrámeros de CS.

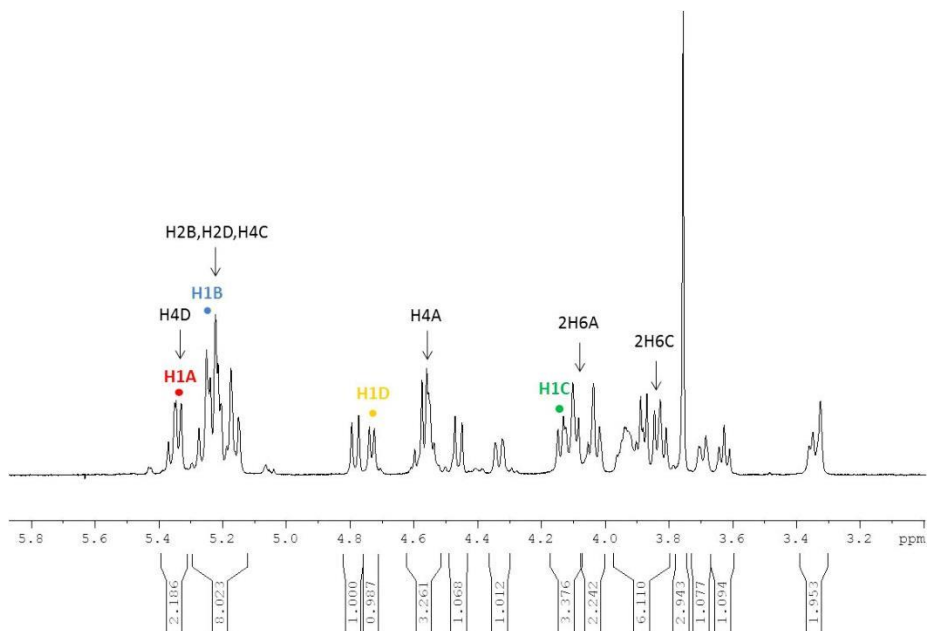


Figura 72. Espectro de ^1H -RMN del tetrasacárido protegido **135**. En diferentes colores están indicadas las señales de los protones anoméricos. Las flechas indican las posiciones que se sulfatarán posteriormente.

La distribución de grupos protectores diseñada para el tetrasacárido **135** puede permitir la preparación de secuencias de CS con diferentes motivos de sulfatación e incluso la elongación de la cadena oligosacárida.

En una primera aproximación, y para demostrar que nuestro diseño de grupos protectores es compatible con la secuencia de reacciones de desprotección y de sulfatación necesarias para la obtención de las moléculas finales, decidimos sintetizar el compuesto persulfatado **140** (Figura 73). Este derivado contiene siete grupos sulfatos, en las posiciones 4 y 6 de las galactosaminas y 2 y 4 de las unidades de glucurónico. Este patrón de sulfatación no es natural, pero resultó interesante su preparación, para poder comparar su actividad

biológica con derivados sintetizados anteriormente en nuestro grupo de investigación.

En concreto, esta elección se basó en el hecho de que un análogo de **140**, que contiene un ácido idurónico en el terminal no reductor,⁸⁶ era capaz de unirse a FGF-2. Todo esto se verá más detalladamente en el siguiente capítulo de esta Tesis.

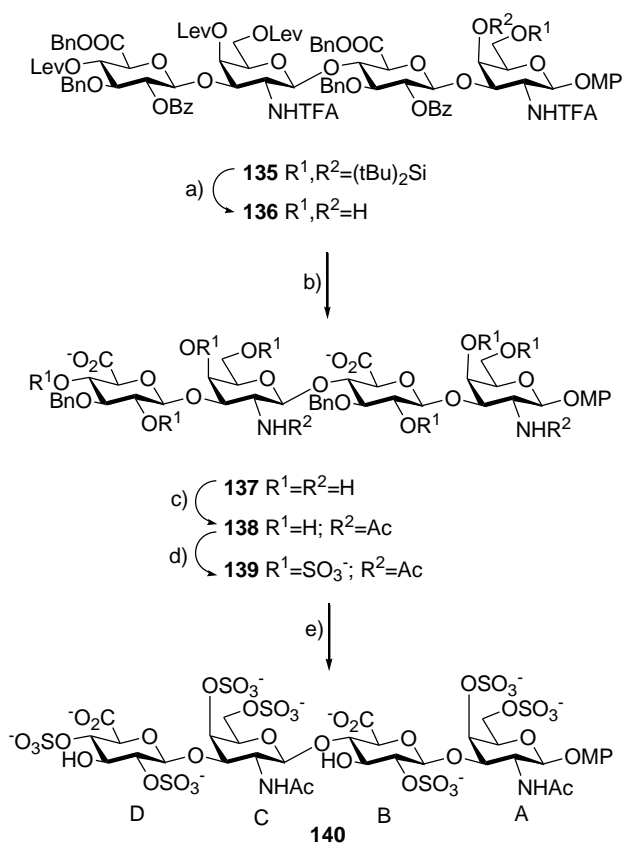


Figura 73. Reacciones de desprotección y sulfatación para la preparación del tetrasacárido persulfatado **140**. Condiciones y reactivos: a) $(\text{HF})_n$, Py, THF, 0°C ; 75%; b) LiOH, H_2O_2 , THF; NaOH, MeOH; c) Ac_2O , MeOH, Et_3N ; 90% (2 etapas, desde **136**); d) $\text{SO}_3 \cdot \text{Me}_3\text{N}$, DMF, 100°C , MW, 2h; 56%; e) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 97%.

Así, la hidrólisis del grupo silileno, utilizando $(\text{HF})_n\text{Py}$ en THF, proporcionó el diol correspondiente **136**, que se sometió a saponificación (**137**) y *N*-acetilación selectiva, para dar el compuesto **138**, con un rendimiento del 90% en las dos etapas.

La introducción de siete grupos sulfatos en el compuesto **138** no es trivial. Los problemas experimentales asociados a esta reacción química, tales como los bajos rendimientos de los productos aislados y los tiempos de reacción, la mayoría de las veces muy largos, llegando a ser incluso de varios días, están ampliamente descritos en la literatura.²²

En nuestro grupo de investigación, se estudió el uso de microondas para llevar a cabo la *O*-sulfatación en derivados de heparina.⁹⁰ Se demostró que la aplicación de radiación microondas reduce drásticamente los tiempos de reacción, lo que permitió una sulfatación rápida y de alto rendimiento de derivados di-, tetra- y hexasacarídicos.

Aquí, se aplicaron estas condiciones optimizadas para la persulfatación del derivado **138**. Así, el tratamiento del intermedio **138** con el complejo de sulfatación (SO_3NMe_3) a 100°C, usando microondas, dio el tetrasacárido hepta-*O*-sulfatado **139** con un rendimiento del 56%, en tan sólo 2 horas.

La introducción de los grupos sulfato en las posiciones deseadas se confirmó por RMN de ^1H y de ^{13}C . Como se puede apreciar en la Tabla 3, las señales de ^1H de las posiciones sulfatadas del intermedio **139** y del producto final **140** aparecen a campo más bajo en comparación al producto no sulfatado. Los datos resumidos en la Tabla 3 confirmaron la completa sulfatación del compuesto tetrasacárido.

Compuesto	H-4A	H-6A	H-2B	H-4C	H-6C	H-2D	H-4D
138^a	4.19-4.12	3.86-3.56	3.46	4.19-4.12	3.86-3.56	3.41	3.72-3.56
139^b	4.96	4.36-4.10	4.41	4.96	4.36-4.10	4.41	4.93-4.85
140^b	4.95	4.36-4.21	4.28-4.21	4.93	4.36-4.21	4.28-4.21	4.51

Tabla 3. Desplazamientos químicos (¹H-RMN) de las posiciones sulfatadas de los compuestos **139** y **140** y de las correspondientes posiciones no sulfatadas de **138**. ^asal sódica, en MeOD; ^bsal sódica, en D₂O.

Así, por ejemplo, los protones de las posiciones 4 de las galactosaminas (unidades A y C) se desplazan de 4.19-4.12 ppm, cuando no están sulfatados, a 4.96 ppm después de sulfatación. Este hecho puede apreciarse también en los espectros de RMN de ¹³C (Tabla 4).

Compuesto	C-4A	C-6A	C-2B	C-4C	C-6C	C-2D	C-4D
138^a	67.6	61.1	72.7	67.6	61.1	73.0	- ^c
139^b	76.9	69.3-68.6	80.0	76.9	69.3-68.6	80.0	77.2
140^b	77.0	69.0-68.7	80.7	77.0	69.0-68.7	80.7	79.0

Tabla 4. Desplazamientos químicos (¹³C-RMN) de las posiciones sulfatadas de los compuestos **139** y **140** y de las correspondientes posiciones no sulfatadas de **138**. ^asal sódica, en MeOD; ^bsal sódica, en D₂O; ^cno determinado.

Finalmente, la hidrogenación de los grupos bencilo de **139** proporcionó el tetrámero de CS totalmente desprotegido **140**.

Los espectros de masas (Figura 74) y de RMN de ¹H (Figura 75) y de ¹³C confirmaron la estructura de **140**. Los datos de RMN de ¹H y de ¹³C de las posiciones sulfatadas (Tablas 3 y 4) están de acuerdo con los aportados en la bibliografía para derivados de sulfato de condroitina similares.

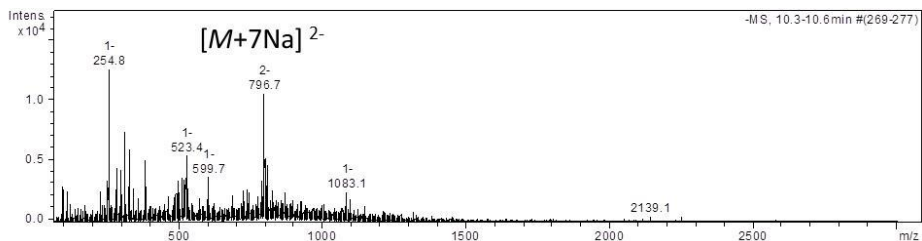


Figura 74. Espectrometría de masas del compuesto final tetrasacárido **140**, donde se puede apreciar el pico $[M+7Na]^{2-}$

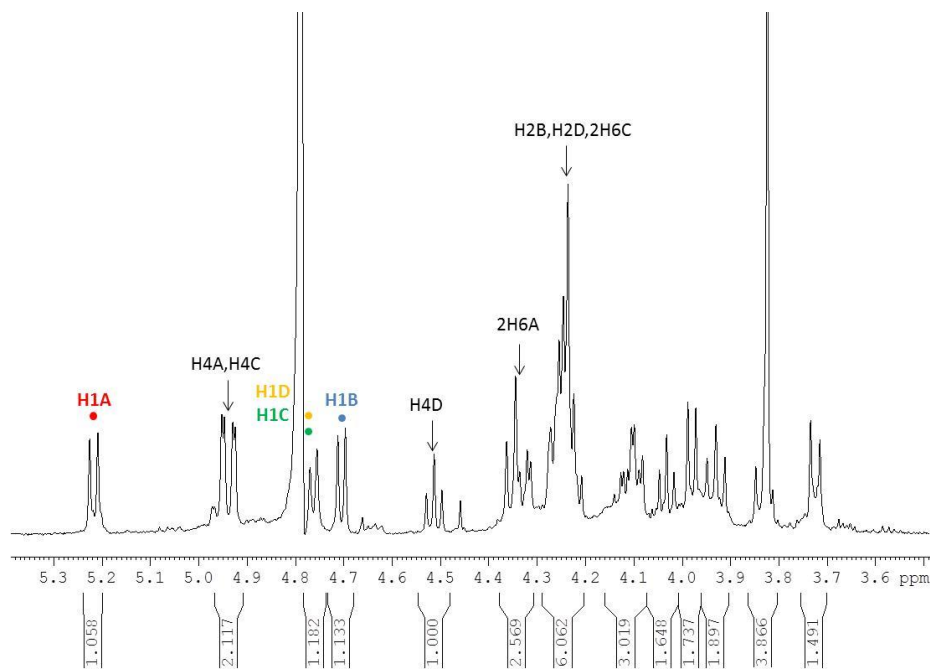


Figura 75. Espectro de ^1H -RMN del tetrasacárido final **140**. En diferentes colores están indicadas las señales de los protones anoméricos. Las flechas indican las posiciones sulfatadas.

En este capítulo, hemos presentado la síntesis total de un tetrasacárido de CS, usando una nueva ruta sintética basada en el empleo de unidades de galactosamina con un grupo *N*-trifluoroacetilo.

Tanto el intermedio dibencilado sintetizado (compuesto **139**) como el tetrasacárido final **140**, ambos solubles en agua, se utilizaron, juntos con otros

oligosacáridos preparados en nuestro grupo de investigación, en estudios de interacción con la proteína modelo FGF-2, como veremos en detalle en el Capítulo 5.

CAPÍTULO 5.

**ESTUDIOS DE INTERACCIÓN
GLICOSAMINOGLICANO-
PROTEÍNA.**

5. Estudios de las interacciones GAG-proteína

5.1. Métodos para la evaluación de las interacciones carbohidrato-proteína.

Como ya hemos dicho anteriormente, los glicosaminoglicanos se caracterizan por una estructura muy compleja que explica las numerosas funciones biológicas en las que estas biomoléculas están implicadas. Estas actividades biológicas están mediadas por interacciones específicas entre determinadas secuencias y ciertas proteínas. Resulta, por tanto, evidente la importancia que tiene el estudio de estas interacciones GAG-proteína.

En este capítulo de la presente Tesis Doctoral, hemos centrado nuestra atención en la evaluación de la afinidad de algunos compuestos sintéticos,

preparados en nuestro laboratorio, por una proteína modelo, el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGF-2). Para poder estudiar la afinidad de los GAGs sintéticos por FGF-2, se han desarrollado dos métodos experimentales basados en medidas de fluorescencia. Los resultados de estos experimentos pueden complementar los obtenidos a través de otras técnicas como la RMN, la microcalorimetría o la cristalografía de rayos X. El conjunto de los resultados provenientes de diferentes métodos proporciona una información completa, útil para poder conocer profundamente las bases de estos procesos biológicos de reconocimiento molecular.

A continuación, veremos un resumen de los métodos más utilizados en los estudios de las interacciones GAG-proteína.⁸ En el apartado 5.2 presentaremos los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, analizando los protocolos optimizados para los estudios de las moléculas sintetizadas en su interacción con la proteína modelo FGF-2.

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar las interacciones GAG-proteína es la *cromatografía de afinidad*. En este método, el glicosaminoglicano o la proteína se inmovilizan en una matriz sólida dentro de una columna y su pareja de unión se deja fluir a lo largo de la columna, permitiendo así el enlace entre las dos biomoléculas. Dado que las interacciones entre las proteínas y los GAGs tienen una gran componente electrostática, la cantidad de sal necesaria para eluir el ligando unido a lo largo de la columna, es una medida cuantitativa de la afinidad de unión. La limitación de este tipo de ensayos es que sólo se revela la componente electrostática y no se tienen en cuenta otros tipos de unión, tales como los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, también importantes.

No obstante, la cromatografía de afinidad es una herramienta útil para estudiar las interacciones GAG-proteína.

Otras dos técnicas que necesitan la inmovilización previa de una de las moléculas de interés sobre una superficie son la *resonancia de plasmón superficial* o SPR (del inglés *surface plasmon resonance*) y los *microarrays de carbohidratos*. A diferencia de la cromatografía de afinidad, estos experimentos tienen la ventaja de no necesitar mucha cantidad de muestra para el análisis.

La *resonancia de plasmón superficial* es una valiosa herramienta analítica que permite monitorizar, con gran sensibilidad y en tiempo real, interacciones moleculares superficiales. En este método, una de las especies que interactúan se inmoviliza sobre la superficie de una lámina de oro y la pareja de unión se hace fluir a través de este chip. El cambio del índice de refracción que resulta de la interacción entre las dos biomoléculas se mide como una variación en la intensidad y en el ángulo de la luz reflejada desde la superficie de oro. La magnitud de este cambio es directamente proporcional a la masa del complejo y proporciona una valoración en tiempo real de las velocidades de asociación y disociación a partir de las cuales se pueden calcular las correspondientes constantes de disociación. La ventaja más importante de este método es que las señales se obtienen utilizando cantidades mínimas de material, del orden de microgramos. Si bien esta técnica puede proporcionar informaciones importantes sobre la cinética de unión, tiene la desventaja de requerir la inmovilización del ligando al soporte sólido.

Los *microarrays*⁹¹ se han convertido en una herramienta estándar para el estudio de las interacciones de biomoléculas (proteínas, anticuerpos, células y virus) con carbohidratos (*glicoarrays* o *microarrays de carbohidratos*). Esta técnica utiliza un portaobjetos de vidrio de tamaño estándar donde se inmovilizan, de manera covalente o no covalente, los carbohidratos, sintetizados químicamente o aislados de fuentes naturales. Esta

inmovilización se lleva a cabo por medio de robots de impresión. Una vez inmovilizados los compuestos que se quieren examinar, se incuban las proteínas sobre los microarrays, permitiendo la unión a los carbohidratos expuestos en los soportes. Las proteínas que no se han unido se lavan, eliminándolas de la superficie. En el siguiente paso, se detectan las interacciones ligando-proteína. Los métodos de detección basados en fluorescencia son los más ampliamente utilizados debido a la alta sensibilidad y a la disponibilidad de lectores de fluorescencia de alta resolución. El procedimiento estándar implica el uso de dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, éste último marcado fluorescentemente, lo que permite la detección de la señal de fluorescencia del complejo formado. La ventaja más importante de la tecnología de los glycorrays, en comparación con los enfoques más convencionales que se utilizan en la SPR y en la microcalorimetría, es la capacidad de detectar varios miles de eventos de unión en una sola placa, utilizando cantidades mínimas tanto de ligando como de proteína.

A través de técnicas como la *espectroscopía de RMN* y la *crystalografía de rayos X* se pueden obtener informaciones estructurales extremadamente precisas acerca de las interacciones carbohidrato-proteína. El análisis de RMN proporciona datos estructurales y conformacionales que son útiles en la identificación de los puntos de contacto entre las moléculas que interactúan. Aunque los experimentos de RMN dan una imagen detallada de la interacción entre los GAGs y la proteína (como se ha visto en el apartado 3.2.4 de la presente Tesis Doctoral), la falta de sensibilidad de este método obliga a utilizar cantidades en el orden de poco miligramos, aumentando los problemas de solubilidad.

Otra técnica usada para el estudio de las interacciones GAG-proteína es la *microcalorimetría*. Este método proporciona información sobre la termodinámica de las interacciones ligando-proteína. Una de las dos especies que se quiere estudiar se introduce, en solución, en una célula termostatzada. A continuación, la otra especie se inyecta poco a poco en dicha célula. El calor liberado durante la formación del complejo ligando-proteína se mide después de cada inyección, ofreciendo una curva de titulación sigmoideal. Mediante el ajuste de esta curva, se pueden obtener los valores de entalpía, la constante de asociación y la estequiometría de unión. Aunque muy útil, la microcalorimetría tiene la gran desventaja de necesitar cantidades del orden de miligramos por cada especie en examen, lo que implica concentraciones relativamente altas de analitos que pueden conducir a precipitación.

La *espectroscopía de fluorescencia* es un método muy sensible que también puede proporcionar información acerca de las interacciones GAG-proteína. De hecho, en esta Tesis se han usado medidas de fluorescencia para estudiar dichas interacciones, tal y como se describe a continuación.

5.2. Resultados y discusión.

En este apartado describiremos los estudios de interacción glicosaminoglicano-proteína que se han realizado en esta Tesis Doctoral utilizando los oligosacáridos preparados en nuestro laboratorio. Para ello, se han puesto a punto experimentos basados en medidas de fluorescencia, llevados a cabo en microplacas estándar con un lector de fluorescencia convencional. Para la optimización de estos protocolos, hemos elegido el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGF-2) como proteína modelo. FGF-2 es una proteína implicada en la angiogénesis y en la proliferación y diferenciación celular, que reconoce tanto heparina como sulfato de condroitina. Los métodos desarrollados para estudiar este tipo de unión pueden aplicarse, en principio, a otros receptores proteicos menos estudiados. Se han diseñado dos aproximaciones diferentes, como veremos a continuación.

En un primer experimento (Apartado 5.2.1), los oligosacáridos sintéticos se inmovilizaron covalentemente en los pocillos de las microplacas y, a continuación, se incubaron con la proteína. La detección de la proteína enlazada se llevó a cabo a través de la unión a un anticuerpo primario y uno secundario (este último marcado fluorescentemente). A través de este método, pudimos analizar cualitativa y cuantitativamente la interacción entre derivados sintéticos de heparina y la proteína FGF-2.⁹²

En segundo lugar (Apartado 5.2.2), hemos optimizado un experimento basado en medidas de polarización de fluorescencia. En este caso, las interacciones se han estudiado en solución, evitando así los artefactos y los lavados asociados a experimentos donde el ligando tiene que ser inmovilizado a una superficie sólida. A través de estos estudios, hemos evaluado las afinidades relativas de una serie de compuestos frente a la proteína modelo, incluyendo, entre ellos, los derivados tetrasacáridicos de sulfato de condroitina **139** y **140** (Figura 73), sintetizados en esta Tesis Doctoral.^{80,86}

Los resultados obtenidos muestran que los dos métodos son eficaces y permiten el estudio de las interacciones carbohidrato-proteína utilizando solo una pequeña cantidad de muestra (en el orden de nmol/pmol).

5.2.1. Estudios de interacción glicosaminoglicano-proteína mediante inmovilización de oligosacáridos a microplacas funcionalizadas.

Esta primera aproximación para evaluar las interacciones carbohidrato-proteína es muy similar a la de los microarrays de carbohidratos descritos en el apartado anterior. En este protocolo, los oligosacáridos se inmovilizaron en microplacas, y, a continuación, se añadieron la proteína y dos anticuerpos, uno de ellos marcado fluorescentemente, con el objetivo de detectar la proteína enlazada con el carbohidrato. Esta técnica se basa, por lo tanto, en el análisis de las intensidades de fluorescencia asociadas al complejo que se forma entre la proteína y el compuesto a examen.

En este estudio se utilizaron los derivados de heparina **141-144**, preparados en nuestro grupo de investigación por la Doctora Susana Maza Pérez (Figura 76).^{92,20,90}

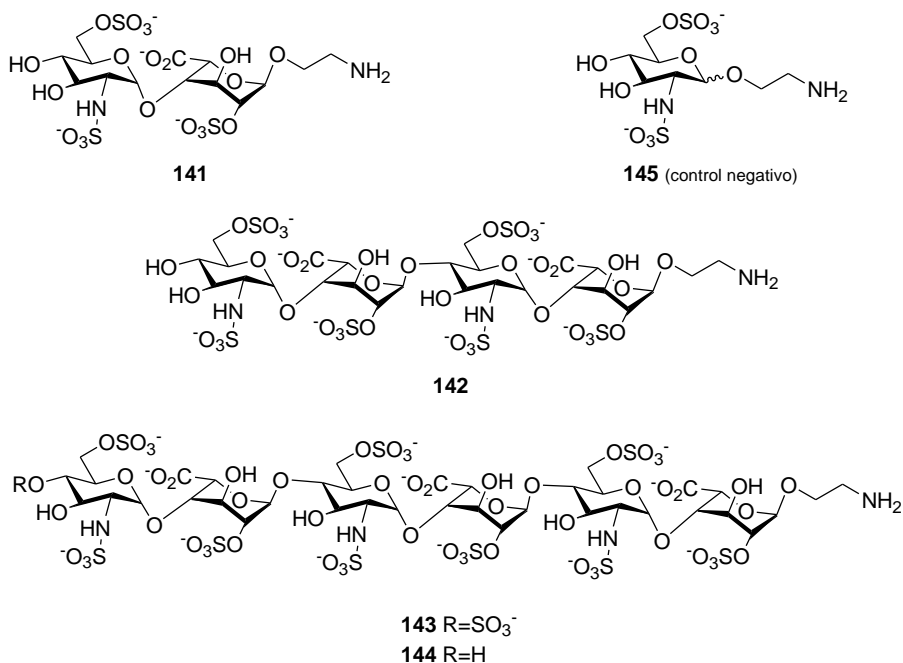


Figura 76. Derivados de heparina **141-144** sintetizados en nuestro grupo de investigación y utilizados para estudiar su interacción con FGF-2. Los compuestos están funcionalizados en su posición anomérica con un grupo amino para poder ser inmovilizados en las microplacas. El monosacárido **145** se empleó como control negativo.

El disacárido **141**, el tetrasacárido **142** y el hexasacárido **144** son derivados de heparina que contienen el patrón de sulfatación de la región regular de este glicosaminoglicano. Además, se sintetizó el producto no natural hexasacárido que contiene un grupo sulfato adicional en la posición 4 de la glucosamina del terminal no reductor (compuesto **143**). El monosacárido disulfatado de glucosamina **145** (Figura 76) se utilizó como control negativo. Todos estos compuestos están adecuadamente funcionalizados en su posición anomérica con un espaciador amino, que permitió su inmovilización en las microplacas (Figura 77).

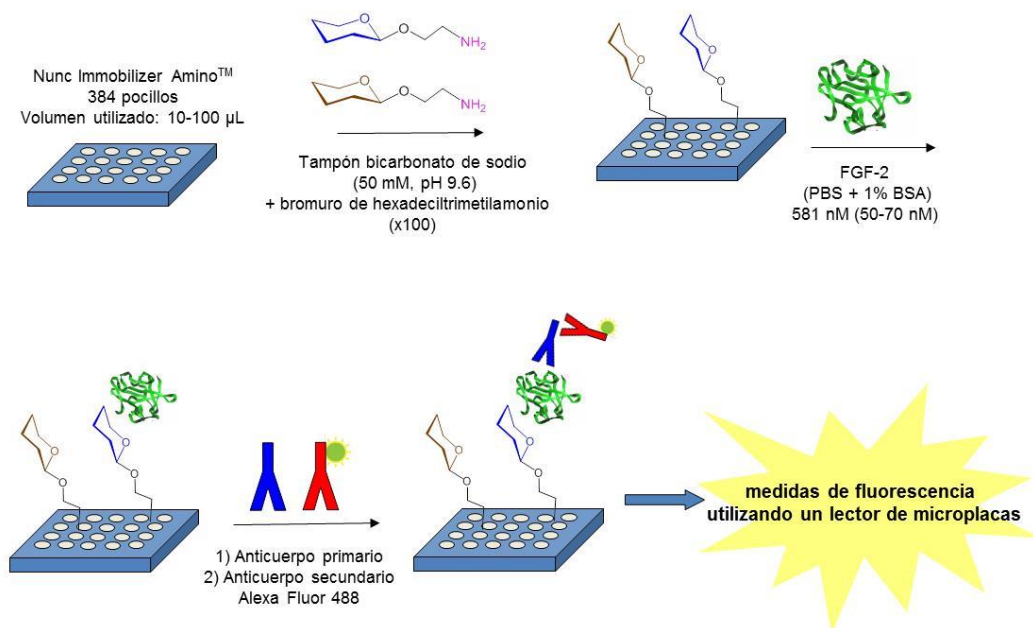


Figura 77. Los derivados de heparina **141-144** y el monosacárido **145** se inmovilizaron en microplacas tipo Nunc Immobilizer Amino™ y se incubaron con el factor de crecimiento FGF-2. A continuación, se añadieron los dos anticuerpos, uno de ellos marcado fluorescentemente. La fluorescencia se midió utilizando un lector de fluorescencia convencional.

Así, como se ilustra en la Figura 77, los derivados de heparina **141-144** y el monosacárido **145**, se inmovilizaron en microplacas de tipo Nunc Immobilizer Amino™. Estos soportes están adecuadamente funcionalizados para que compuestos que contengan un grupo amino libre, tales como los oligosacáridos sintetizados, puedan unirse a los pocillos de las microplacas. Con el objetivo de reducir el volumen de solución requerida para la inmovilización utilizamos placas de 384 pocillos.

Para su inmovilización, los derivados de heparina **141-144** y el monosacárido **145** (Figura 76) se disolvieron en un tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 9.6) y se incubaron en los pocillos durante una noche a temperatura ambiente. Durante la optimización de este protocolo se comprobó que la adición, en el tampón de inmovilización, de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, a una concentración 100 veces más alta que la de los

oligosacáridos de heparina, reducía enormemente la concentración de azúcar requerida para una eficiente fijación a las placas. Anteriormente, se había descrito el uso de esta sal de amonio para mejorar la eficiencia de la unión de oligosacáridos de heparina a las láminas de oro que se utilizan en la SPR.⁹³ La repulsión electrostática entre oligosacáridos altamente sulfatados dificulta su acoplamiento a un soporte sólido. Esta repulsión se puede reducir en presencia de micelas cargadas positivamente, facilitando, de esta manera, la inmovilización de estos compuestos en los pocillos. En nuestro caso, utilizando una concentración 10 μM de los oligosacáridos en un tampón que contiene bromuro de hexadeciltrimetilamonio 1 mM, se consiguió una inmovilización adecuada para estudiar las interacciones carbohidrato-proteína.

Después de inmovilizar los oligosacáridos, las microplacas se vaciaron y se lavaron con agua miliQ. El tratamiento con etanolamina (100 mM en tampón bicarbonato sódico) permitió bloquear los sitios de enlace que pudieran quedar activos.

A continuación se añadió en cada pocillo la proteína recombinante humana FGF-2, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó para eliminar la proteína que no interaccionó con los compuestos inmovilizados. La proteína enlazada se detectó por incubación con un anticuerpo recombinante anti-FGF-2, que reconoce selectivamente el factor de crecimiento para fibroblastos, y, a continuación, con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente con Alexa Fluor 488, que reconoce el anticuerpo primario (Figura 77).

Cada incubación con los anticuerpos se llevó a cabo por agitación de la placa a temperatura ambiente durante 1 hora (la última, con el anticuerpo marcado fluorescentemente, en ausencia de luz) seguida por un lavado para eliminar todo el anticuerpo que no se unió.

La fluorescencia generada por la unión de la proteína a los oligosacáridos, detectada por la presencia de los dos anticuerpos, se midió a 535 nm mediante el uso de un lector estándar de fluorescencia. En este experimento se incluyeron, como blanco, pocillos en los que no se inmovilizó ningún carbohidrato. Los valores de fluorescencia de estos blancos se restaron de todas las demás medidas. Como se puede apreciar en la Figura 78, a una concentración de FGF-2 de 291 nM, para el tetrasacárido **142** y para los dos hexasacáridos **143** y **144**, se observaron valores elevados de fluorescencia que indican una interacción fuerte carbohidrato-proteína (Figura 78). También se observó que el disacárido **141** interacciona con menos afinidad a esta concentración de factor de crecimiento FGF-2. El monosacárido **145**, utilizado como control negativo, no dio prácticamente señal de fluorescencia (Figura 78).

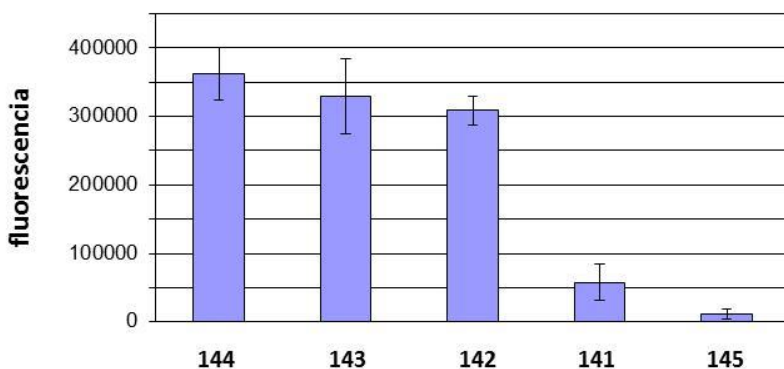


Figura 78. Gráfica de la interacción de los oligosacáridos sintéticos de heparina con el factor de crecimiento FGF-2. Los pocillos recubiertos con los azúcares (a una concentración 10 μ M) fueron incubados con una determinada concentración de la proteína (291 nM). Para cada oligosacárido, las señales de fluorescencia son el promedio de cinco pocillos replicados y las barras de error muestran las desviaciones estándar para estas medidas.

Estos resultados están de acuerdo con los requisitos estructurales mínimos necesarios para que derivados de heparina se puedan unir a FGF-2 (véase también Apartado 1.5.1.1).^{94,17,95,96} Además, se confirmó que la longitud corta

del espaciador amino (2 átomos de carbono) no influyó negativamente en el experimento.

El ensayo de la Figura 78, en el que se utilizó una concentración fija de proteína (291 nM), proporcionó una información cualitativa para poder diferenciar los compuestos que interactuaron con FGF-2 fuertemente (el tetrasacárido **142** y los hexasacáridos **143** y **144**), débilmente (el disacárido **141**) o que no mostraron señales de interacción (el monosacárido **145**). Sin embargo, este experimento, en el que se utiliza una única concentración de FGF-2, no es capaz de discernir entre la afinidad de los hexasacáridos **143** y **144** y el tetrasacárido **142**. Para poder establecer cuál de estos oligosacáridos presenta una mayor afinidad por FGF-2, se requiere una cuantificación más exacta de las interacciones utilizando diferentes concentraciones de proteína.^{97,98}

Así, el tetrasacárido **142** y los hexasacáridos **143** y **144** se inmovilizaron en las microplacas, utilizando el mismo protocolo puesto a punto anteriormente, y se incubaron con 9 concentraciones crecientes de FGF-2, desde 3 hasta 581 nM. Para cada azúcar, la intensidad de fluorescencia se representó frente a las diferentes concentraciones de proteína. De esta manera, pudimos determinar las constantes de disociación superficial ($K_{D, surf}$) de los oligosacáridos **142**, **143** y **144**. Las curvas de las Figuras 79, 80 y 81 se analizaron como isotermas de Langmuir, asumiendo un modelo de un sitio de interacción y suponiendo que el sistema alcanzó el equilibrio durante la incubación.⁹⁷ Los valores de las tres $K_{D, surf}$ indicaron que la unión de estos oligosacáridos a FGF-2 está dentro del rango nanomolar.

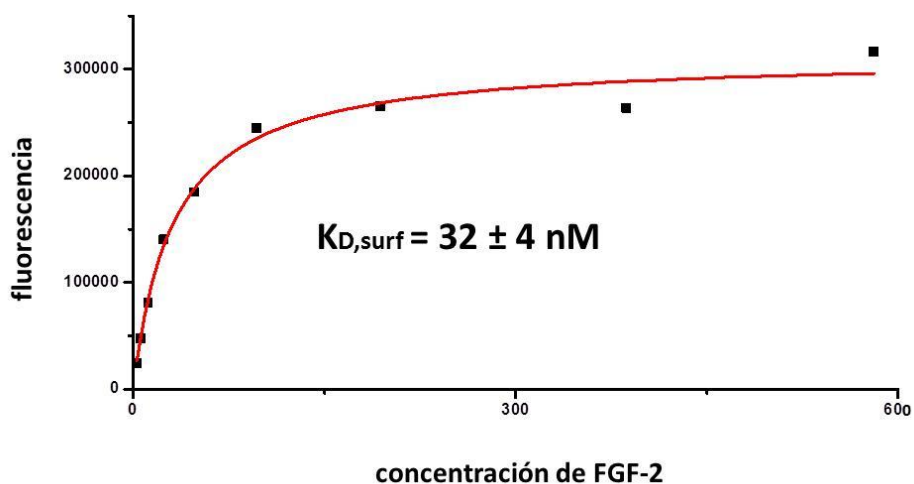


Figura 79. Curva de interacción del hexasacárido 144. Las intensidades de fluorescencia se representan frente a la concentración de proteína. El valor de $K_{D,surf}$ se obtuvo mediante el ajuste de la curva a una isoterma de Langmuir suponiendo un modelo de un sitio de interacción.

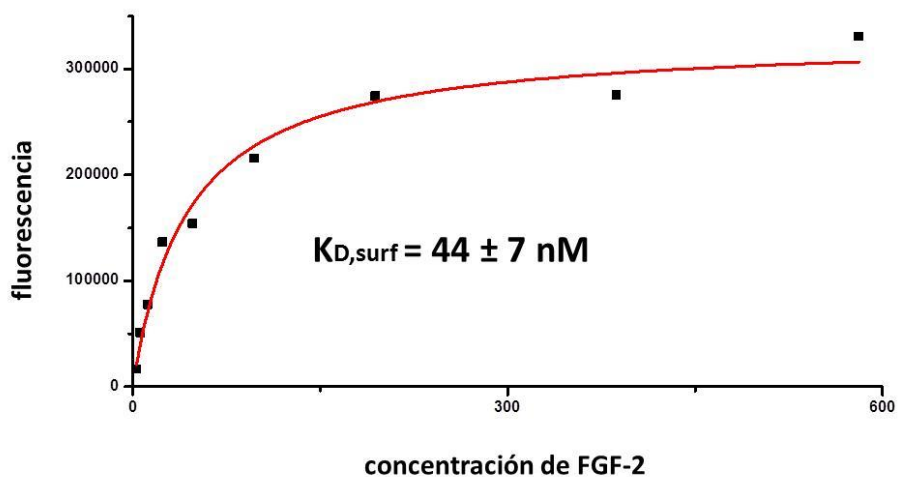


Figura 80. Curva de interacción del hexasacárido 143. Las intensidades de fluorescencia se representan frente a la concentración de proteína. El valor de $K_{D,surf}$ se obtuvo mediante el ajuste de la curva a una isoterma de Langmuir suponiendo un modelo de un sitio de interacción.

Las constantes de disociación superficial ($K_{D,surf}$) de los dos hexasacáridos 144 y 143 resultaron ser muy parecidas, con unos valores de 32 ± 4 y 44 ± 7

nM, respectivamente. Estos valores sugirieron que la presencia de un grupo sulfato en la posición 4 del extremo no reductor del oligosacárido no natural **143** no afecta significativamente la unión a FGF-2.

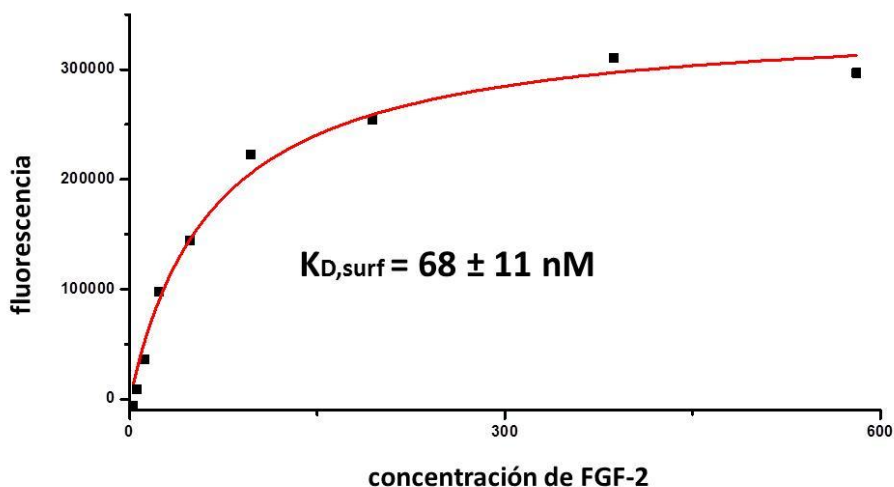


Figura 81. Curva de interacción del tetrasacárido **142**. Las intensidades de fluorescencia se representan frente a la concentración de proteína. El valor de $K_{D,surf}$ se obtuvo mediante el ajuste de la curva a una isoterma de Langmuir suponiendo un modelo de un sitio de interacción.

El valor de $K_{D,surf}$ que se determinó para el tetrasacárido **142** ($68 \pm 11 \text{ nM}$) indica una ligera reducción en la afinidad, en comparación con los dos hexasacáridos. Estos resultados están de acuerdo con los datos recogidos en la bibliografía.^{94,95,99}

En resumen, este primer protocolo experimental puesto a punto permite evaluar las interacciones entre oligosacáridos de tipo GAG y una proteína tanto cualitativa- como cuantitativamente, calculando las correspondientes constantes de disociación. Los oligosacáridos sintéticos deben poseer un grupo amino en su estructura, que permita su inmovilización sobre microplacas convenientemente funcionalizadas. En estos ensayos se emplea

un lector convencional de fluorescencia y cantidades mínimas tanto de oligosacárido (0.2 nmol/pocillo) como de proteína (pmol/pocillo).

5.2.2. Estudios de interacción carbohidrato-proteína por polarización de fluorescencia.

La polarización de fluorescencia (FP, del inglés *Fluorescence Polarization*) es una valiosa herramienta que se utiliza para el estudio de interacciones entre biomoléculas en solución.¹⁰⁰ La ventaja más importante de esta técnica es que no es necesaria la inmovilización de los compuestos, a diferencia del método descrito en el apartado anterior.

En primer lugar, vamos a explicar las bases de la polarización de fluorescencia. Cuando una molécula fluorescente es excitada por luz polarizada en un plano, la polarización remanente de la luz emitida depende de la velocidad de rotación de la molécula fluorescente en solución. Esta velocidad de rotación es inversamente proporcional a su volumen y, por consiguiente, a peso molecular (Figura 82).

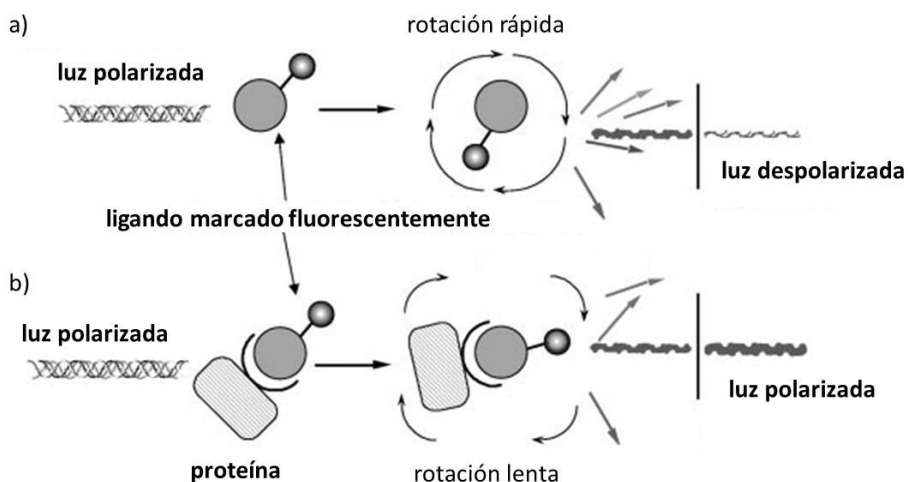


Figura 82. Esquema de un experimento basado en la polarización de fluorescencia. a) Cuando moléculas pequeñas, caracterizadas por un movimiento rotatorio rápido, son excitadas por luz polarizada en un plano, la luz emitida estará altamente despolarizada. b) Por el contrario, moléculas grandes, o complejos ligando-proteína, que rotan mucho más lentamente, emitirán una luz polarizada.

La figura 82 explica cómo se puede aplicar la polarización de fluorescencia a la evaluación de las interacciones carbohidrato-proteína. En general, las moléculas en solución se caracterizan por un movimiento rotatorio. En el caso de moléculas pequeñas, este movimiento es muy rápido. El movimiento se vuelve cada vez más lento cuanto más grandes sean las moléculas. Por lo tanto, la luz emitida por un pequeño compuesto, como por ejemplo un carbohidrato marcado fluorescentemente, que gira rápidamente en solución, será altamente despolarizada (Figura 82a, el valor de polarización será bajo). Si el mismo compuesto interactúa con una proteína de alto peso molecular, el complejo girará más lentamente y la luz emitida será polarizada (Figura 82b, valor de polarización más alto).

Es importante destacar, como ya hemos dicho anteriormente, que los estudios basados en medidas de polarización de fluorescencia no necesitan la inmovilización de la proteína o del ligando a una superficie para poder

detectar la interacción. Ésta puede ser fácilmente medida en solución, evitando los posibles artefactos e inconvenientes derivados de la unión de las biomoléculas a los soportes sólidos. Por otra parte, esta técnica es ideal para el análisis de la unión de pequeños ligandos, tales como los oligosacáridos, a una proteína. Además, requiere muy poca cantidad de muestra.^{101,102}

Utilizando esta técnica, hemos diseñado un experimento de competición para estudiar la afinidad de oligosacáridos sintéticos (no fluorescentes) por una proteína modelo, nuevamente el factor de crecimiento para fibroblastos FGF-2.^{80,86}

Para llevar a cabo estos experimentos, lo primero que se debe preparar es una sonda fluorescente adecuada. En nuestro grupo de investigación se prepararon cinco oligosacáridos diferentes conjugados con fluoresceína: los derivados de heparina **146-148** y de ácido hialurónico **149-150** (Figura 83). Entre estos compuestos se eligió el ligando más adecuado, para usarlo como sonda en los estudios posteriores de competición.

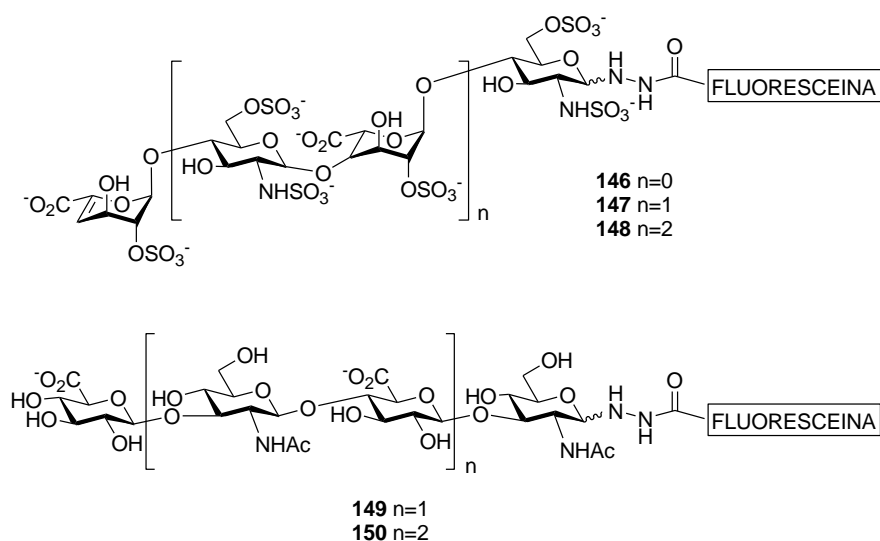


Figura 83. Los derivados de heparina **146-148** y los de ácido hialurónico **149-150** se prepararon en nuestro laboratorio y se ensayaron frente a una concentración constante de FGF-2. Entre ellos se eligió la sonda más adecuada para los posteriores experimentos de competición.

La polarización de fluorescencia de muestras que contenían los oligosacáridos **146-150** marcados fluorescentemente y una concentración constante de FGF-2 se midió en microplacas de 384 pocillos usando un lector estándar de fluorescencia (Figura 84). Los pocillos que contenían sólo la sonda fluorescente, sin proteína, se utilizaron como control (en azul).

Es importante destacar que el uso de placas de 384 pocillos permitió la minimización de las cantidades de muestra requeridas para estos experimentos. El ensayo estándar se realizó con una concentración 10 nM de los ligandos fluorescentes y aproximadamente 100 nM de la proteína, con un volumen final de 40 μ L por pocillo.

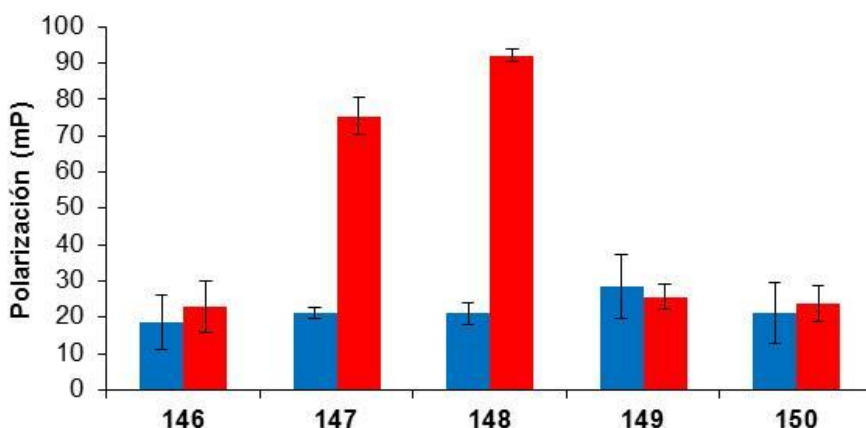


Figura 84. Los valores de polarización de fluorescencia (derecha, en color rojo) de los pocillos que contienen los oligosacáridos fluorescentes **146-150** (10 nM) y FGF-2 (97 nM) se compararon con los valores obtenidos en ausencia de proteína (izquierda, en color azul). Para cada oligosacárido, los valores de polarización son la media de tres pocillos replicados y las barras de error muestran las desviaciones estándar para estas medidas.

El experimento dio resultados que están de acuerdo con los datos recogidos en la bibliografía para las interacciones GAG-FGF-2^{95,14} (Figura 84). No se detectó interacción con el disacárido de heparina **146** ni con los oligosacáridos de ácido hialurónico **149** y **150**, descartando, así, cualquier tipo de unión de

FGF-2 a estos compuestos debido a la presencia de la fluoresceína. Para el hexasacárido **148** y el tetrasacárido **147** se observó un aumento significativo del valor de polarización, hecho que indica interacción carbohidrato-proteína. El mayor incremento de polarización de fluorescencia se observó con el compuesto **148**, que fue elegido como sonda fluorescente para los experimentos de inhibición.

La unión del hexasacárido **148** a FGF-2 se midió a concentraciones crecientes de proteína, obteniendo la curva correspondiente polarización/concentración que se analizó como isoterma de Langmuir para determinar la constante de disociación (K_D). El valor obtenido ($K_D = 117 \pm 10$ nM) resultó ser similar a una medida anterior, realizada en solución, de la afinidad de interacción entre un hexasacárido de heparina y FGF-2.⁹⁵

Una vez elegido el compuesto **148** como sonda fluorescente, se puso a punto el experimento de competición que permitió evaluar las afinidades relativas de una serie de oligosacáridos sintéticos, no fluorescentes, preparados en nuestro laboratorio. Esta serie de productos incluye (Figura 85): dos disacáridos de sulfato de condroitina C y E (**151** y **152**), cuatro tetrasacáridos mixtos sulfato de condroitina/sulfato de dermatano (**153-156**) y los dos tetrasacáridos persulfatados de sulfato de condroitina **139** y **140** que se han sintetizado en la presente Tesis Doctoral, además de los derivados de heparina **141-144**, descritos anteriormente en la Figura 76. En estos experimentos se midió la capacidad relativa de estos oligómeros sintéticos para inhibir la interacción entre FGF-2 y una sonda de heparina marcada fluorescentemente, el hexasacárido **148**.

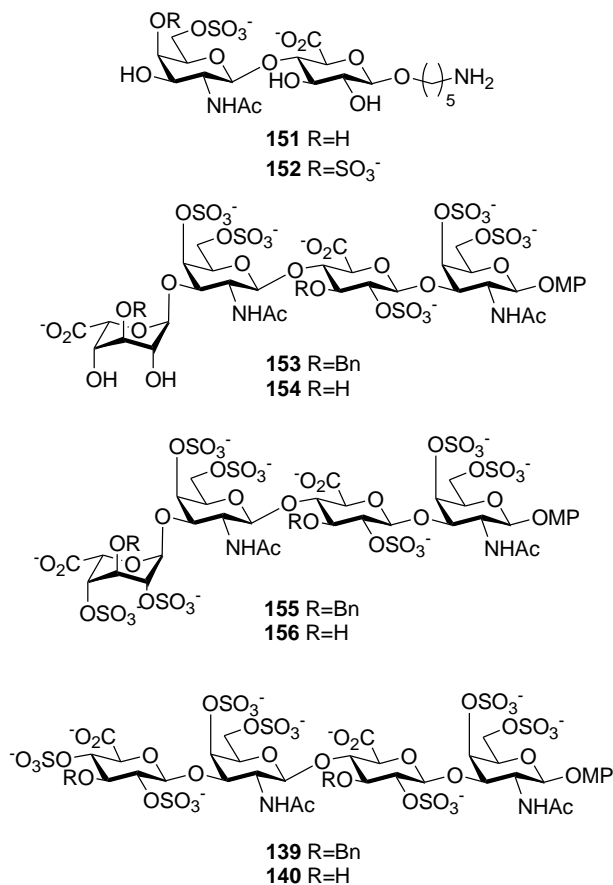


Figura 85. Derivados sintéticos de sulfato de condroitina (**151**, **152**, **139**, **140**) y mixtos sulfato de condroitina/sulfato de dermatano (**153-156**) utilizados en el experimento de inhibición de la interacción entre la sonda fluorescente **148** y el factor de crecimiento FGF-2. Los tetrasacáridos mixtos poseen una unidad de ácido L-idurónico y otra de ácido D-glucurónico, característicos del sulfato de dermatano y del sulfato de condroitina, respectivamente. Secuencia mixtas de estos dos GAGs aparecen de forma abundante en el sistema nervioso central.

El desplazamiento del ligando fluorescente **148** por parte de uno de los competidores activos resultó en una disminución del valor de polarización (Figura 86). De esta manera, la capacidad inhibitoria de los compuestos no marcados pudo ser fácil y rápidamente evaluada.

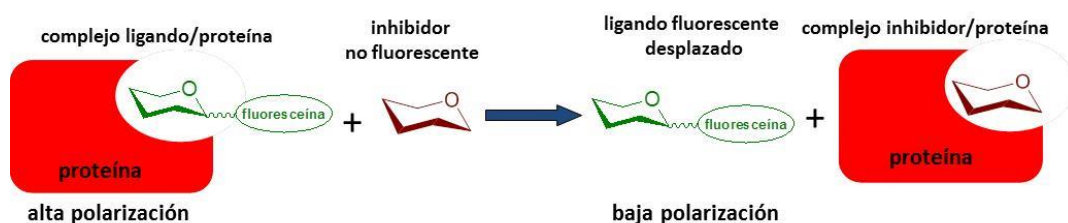


Figura 86. Representación esquemática del experimento de competición. El desplazamiento del ligando fluorescente del sitio de enlace de una proteína por parte de un inhibidor activo resulta en una disminución del valor de polarización. Esto permite evaluar fácil y rápidamente la capacidad inhibidora de una serie de compuestos.

En la Figura 87 se representan los valores de polarización (en azul) obtenidos en pocillos que contienen el inhibidor (25 μM), FGF-2 (73 nM) y la sonda fluorescente **148** (10 nM). Los pocillos control (en rojo) corresponden a muestras que contienen solamente la sonda **148** (izquierda) y FGF-2 más sonda fluorescente, sin inhibidor (derecha), e indican los valores esperados para un 100% y un 0% de inhibición, respectivamente.

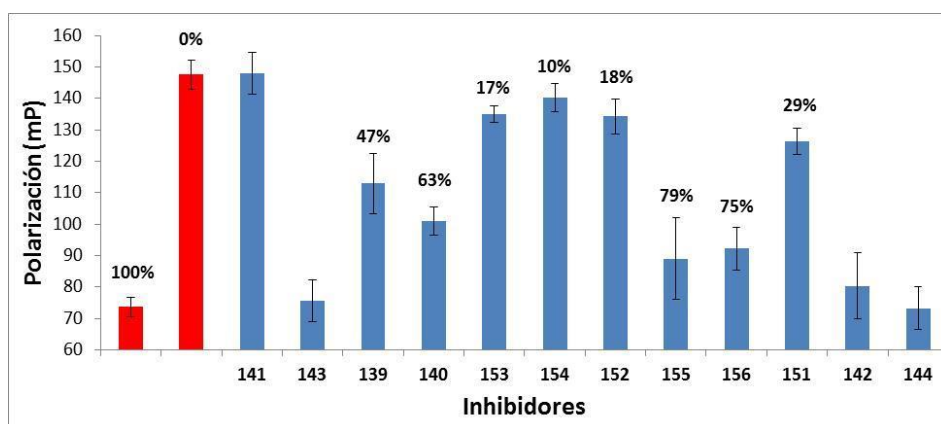


Figura 87. Gráfica del ensayo de competición para la evaluación del poder inhibitorio de una serie de compuestos sintéticos (**139**, **140**, **141-144** y **151-156**). Se indican los porcentajes de inhibición obtenidos para los tetrasacáridos de tipo sulfato de condroitina y los correspondientes a los pocillos control (en rojo). Todas las medidas son los promedios de tres pocillos replicados y las barras de error muestran las desviaciones estándar para estas medidas.

Con el fin de obtener un valor de polarización suficientemente alto y al mismo tiempo utilizar una cantidad mínima de inhibidores, se eligió, en estos experimentos, una concentración de FGF-2 próxima a la K_D de la interacción de FGF-2 con la sonda fluorescente **148**, concretamente 73 nM.

Como se puede apreciar en la Figura 87, a una concentración de inhibidor de 25 μ M, los disacáridos de sulfato de condroitina **151** y **152** y los tetrasacáridos mixtos sulfato de condroitina/sulfato de dermatano **153** y **154** mostraron baja actividad inhibidora. De igual forma, el disacárido de heparina **141** no mostró capacidad de inhibición. Por contra, los tetrasacáridos persulfatados de sulfato de condroitina **139** y **140**, sintetizados en esta Tesis, fueron capaces de inhibir hasta un 47 y un 63 %, respectivamente, la interacción entre FGF-2 y la sonda **148**. Las actividades inhibidoras de estos compuestos fueron, no obstante, inferiores a las obtenidas con los tetrasacáridos que contienen ácido idurónico (IdoA) **155** y **156** (Figura 85). Finalmente, los valores de inhibición que más se aproximaron al 100% fueron los que correspondían a los oligómeros de heparina **142-144**.

Estos datos indican que, entre los derivados de tipo sulfato de condroitina, las estructuras persulfatadas no naturales (**139-140**, **155-156**) son las que muestran capacidad inhibidora más alta. Estos resultados también sugieren que la presencia de una unidad de ácido idurónico, en lugar de un ácido glucurónico, en el extremo no reductor, como ocurre en los compuestos **155** y **156**, puede aumentar las afinidades relativas de los oligosacáridos sintéticos por el factor de crecimiento FGF-2.

Después de demostrar que este ensayo de polarización de fluorescencia se puede utilizar para la evaluación rápida de una biblioteca de compuestos, se eligió el tetrasacárido persulfatado **156** para evaluar su potencia inhibidora más en detalle. Así, se midió la polarización de muestras que contenían la proteína FGF-2, la sonda fluorescente **148** y concentraciones crecientes de

tetrasacárido **156** para obtener un valor de IC_{50} para este compuesto (Figura 88). El análisis de la curva obtenida dio un valor de IC_{50} de $15 \mu M$.

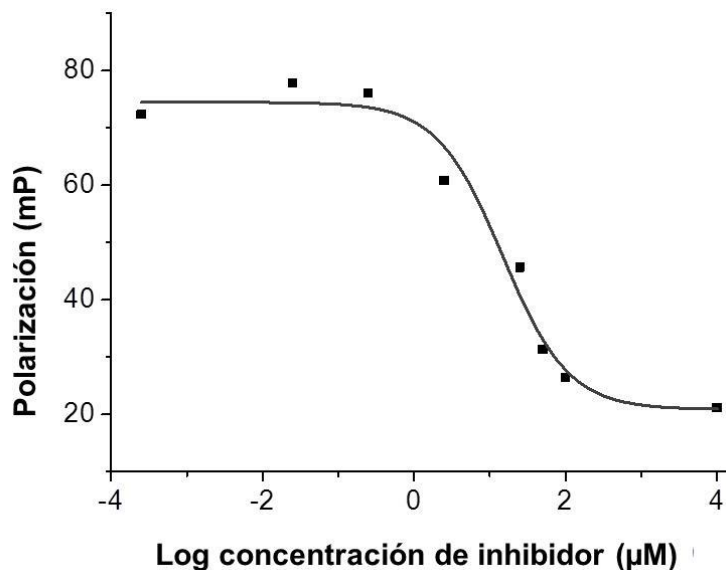


Figura 88. Curva de inhibición del tetrasacárido **156** donde se muestra la capacidad de este compuesto, a diferentes concentraciones (desde $0.025 \mu M$ hasta $100 \mu M$), para inhibir la interacción entre FGF-2 (103 nM) y el hexasacárido fluorescente **148** (10 nM). La concentración necesaria para inhibir la interacción un 50%, el valor de IC_{50} , resultó ser $15 \mu M$. Todos los valores de polarización son la media de seis pocillos replicados.

La interacción entre FGF-2 y heparina es crucial para el avance del crecimiento tumoral y la angiogénesis. Por lo tanto, el descubrimiento de compuestos que inhiben la interacción FGF-2/heparina resulta de gran interés.^{99,103}

Aunque los compuestos ensayados muestran actividades modestas, este experimento proporciona algunos datos interesantes sobre las características estructurales que deben poseer derivados sintéticos para inhibir la unión FGF-

2/heparina. Por otra parte, estos ensayos ilustran claramente el potencial de este método para la rápida comparación de las actividades inhibitoras relativas de una serie de compuestos sintéticos.

En conclusión, hemos desarrollado un método rápido y eficaz para el cribado de una serie de compuestos sintéticos mediante medidas de polarización de fluorescencia. Esta técnica tiene la ventaja de no requerir inmovilización previa del ligando, por lo que no se necesita introducir un grupo ortogonal en la molécula sintética para tal fin. Además, para estas medidas se necesita una cantidad mínima de muestra.

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES.

6. Conclusiones

1. El desarrollo de una estrategia sintética en la que se usan directamente bloques de ácido glucurónico en las reacciones de glicosidación ha permitido la preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico. El diseño de grupos protectores empleado ha permitido controlar la regio- y estereoquímica de los enlaces glicosídicos. El uso de unidades monosacáridicas parcialmente benciladas, más reactivas, incrementó los rendimientos de las glicosidaciones, minimizando la formación de productos secundarios como las triclороoxazolinás. La eficiencia de esta ruta se ha demostrado con la síntesis total de fragmentos de ácido hialurónico de tamaño di-, tri- y tetrasacárido.

Estos productos finales han resultado ser unos ligandos excelentes para estudiar, a nivel molecular, las interacciones entre el ácido hialurónico y determinados receptores proteicos, como la langerina, mediante técnicas de RMN y modelización molecular.

2. En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la utilidad de una ruta asistida por etiquetas perfluoradas para la síntesis de oligómeros de ácido hialurónico. Los intermedios de reacción pudieron ser fácilmente purificados mediante extracción sólida a través de una sílica gel perfluorada, evitando así las dificultades inherentes a la realización de múltiples purificaciones cromatográficas características de la síntesis de oligosacáridos clásica. La unión del espaciador perfluorado a través del grupo carboxilato de la unidad de glucurónico del terminal reductor nos ha permitido disfrutar de las ventajas de esta técnica sin necesidad de añadir etapas adicionales en la ruta sintética para la introducción y la eliminación de la etiqueta. A pesar del bajo rendimiento obtenido en la preparación de un trisacárido de ácido hialurónico, consideramos que esta estrategia puede ser útil para la síntesis de oligosacáridos de la familia de los glicosaminoglicanos.
3. El empleo de una aproximación sintética basada en el uso de unidades de galactosamina en las que la función amino se ha protegido temporalmente con un grupo trifluoroacetilo ha resultado ser eficaz para la preparación de oligosacáridos que responden a la estructura del sulfato de condroitina. El acoplamiento de derivados disacarídicos ácido glucurónico-galactosamina, convenientemente protegidos, permitió la obtención de los correspondientes fragmentos tetrasacarídicos con buen rendimiento. El grupo trifluoroacetilo condujo a la formación selectiva de los 1,2-*trans* glicósidos deseados y, al mismo tiempo, pudo ser fácilmente desprotegido al final de la secuencia

sintética para generar los productos finales *N*-acetilados. La compatibilidad del diseño sintético desarrollado con las etapas finales de desprotección/sulfatación se demostró con la preparación de un tetrasacárido heptasulfatado.

4. Se ha demostrado la utilidad de experimentos basados en medidas de fluorescencia para la evaluación de las interacciones entre oligómeros sintéticos de tipo glicosaminoglicano y las correspondientes proteínas. En una primera aproximación, oligosacáridos sintéticos de heparina se inmovilizaron de forma covalente a los pocillos de una microplaca convenientemente funcionalizada. Para la detección de la proteína enlazada se emplearon los correspondientes anticuerpos. De esta manera, se pudieron determinar las constantes de disociación relativas para la interacción carbohidrato-proteína. Por otro lado, se ha desarrollado también un experimento de polarización de fluorescencia que permitió estimar las afinidades relativas de los oligosacáridos sintéticos en solución, sin necesidad de funcionalizarlos para tal fin, ni unirlos a una superficie sólida, lo que supone una gran ventaja. A través de este ensayo de competición se pudieron analizar y comparar, rápidamente, las actividades de un gran número de compuestos, con un consumo mínimo de muestra.

CAPÍTULO 7.

PARTE EXPERIMENTAL.

7. Parte experimental

7.1. Disolventes y reactivos.

Los reactivos y productos de partida se obtuvieron de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Fluka y Carbosynth, y fueron utilizados directamente sin purificación previa.

Los disolventes utilizados se obtuvieron de la casa comercial Scharlau. El agua empleada como disolvente presenta una pureza miliQ (18.3 Ω). Los disolventes anhidros se han obtenido por tratamiento con tamiz molecular de 4Å. El diclorometano anhidro fue secado con un dispositivo de columna de alúmina PURESOLV (Scharlab). Como atmósfera inerte, en las reacciones que la han precisado, se ha utilizado argón.

7.2. Técnicas y aparatos

Para el seguimiento rutinario de las reacciones se utilizó cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 600 F₂₅₄ (Merck). Para la detección de los productos se utilizó luz UV ($\lambda = 254$ nm), y/o los siguientes reveladores: anisaldehído (450 mL etanol, 25 mL anisaldehído, 25 mL H₂SO₄ y 1 mL AcOH) y/o mostain (21 g Mo₇O₂₄(NH₄)₆, 1 g CeSO₄, 30 mL H₂SO₄ conc., 450 mL H₂O), según las características de cada compuesto. La cromatografía en columna se ha realizado con gel de sílice tipo 60 (Merck) como adsorbente. La cromatografía de permeación sobre gel se llevó a cabo utilizando gel Sephadex G-10 y LH-20 (Pharmacia, Suecia). Para la cromatografía de intercambio iónico se empleó resina DOWEX 50WX4 Na⁺ (Fluka). Para la F-SPE se utilizó gel de sílice FluoroFlash.

Los valores de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 341. En cada caso se indica el disolvente y la concentración de la muestra sobre la que se llevó a cabo la medida.

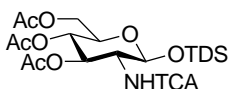
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se registraron en espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DPX-300. Los espectros se realizaron empleando como disolvente deuterado el que se indica en cada caso; los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, usando como referencia interna el desplazamiento de la señal del disolvente en el espectro de deuterio, y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. En los casos en los que no se especifica la temperatura los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente. La multiplicidad de las señales se indica mediante las abreviaturas s (singlete), bs (del inglés *broad singlet*, singlete ancho), d (doblete), dd (doble doblete), ddd (doble doble de doblete), t (triplete), pt (pseudotriplete) y m (multiplete). A partir de las estructuras trisacáridicas las unidades monosacáridicas se nombraron con las letras A, B, C (y D para tetrasacáridos), siendo A la unidad del terminal reductor. A nivel disacárido

los protones se nombraron como H (terminal reductor) y H' (terminal no reductor). Para la asignación de las estructuras más complejas se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY y TOCSY) y protón-carbono (HMQC y HSQC) usando la secuencia de pulsos estándar.

Los espectros de masas se han llevado a cabo en un espectrómetro Esquire 6000 ESI-MS Bruker Daltonics. Los espectro de masas de alta resolución se han llevado a cabo por el CITIUS (Universidad de Sevilla) y por el SIDI (Universidad Autónoma de Madrid). Las reacciones de sulfatación en microondas se llevaron a cabo en un equipo Biotage Initiator Eight.

7.3. Procedimientos sintéticos y caracterización estructural de los compuestos preparados.

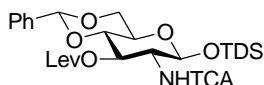
3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo (52)



A una solución de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- α,β -D-glucopiranososa (**51**)^{46,50} (1.00 g, 2.03 mmol) en THF anhidro (10 mL) se añadió bencilamina (0.267 mL, 2.44 mmol). Después de 3 horas, se añadió una cantidad adicional de bencilamina (0.267 mL, 2.44 mmol). Después de 3 horas, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con HCl 1N. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo [CCF (3:2 Hex/AcOEt) R_f 0.34] se disolvió en CH₂Cl₂ (5 mL) y se añadieron imidazol (379 mg, 5.57 mmol) y cloruro de texildimetilsililo (0.481 mL, 2.45

mmol). Después de 24 horas, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 3:1) obteniendo **52** (964 mg, 80%). CCF (Hex/AcOEt 3:2) R_f 0.66; $[\alpha]_D^{20}$ -6.8° (c 1.17, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (d, $J_{2,\text{NH}} = 9.0$ Hz, 1H, NH), 5.34 (dd, 1H, H-3), 5.10 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, 1H, H-4), 4.90 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1H, H-1), 4.25-4.13 (m, 2H, H-6), 4.00 (ddd, 1H, H-2), 3.76 (ddd, 1H, H-5), 2.10-2.04 (3s, 9H, COCH_3), 1.62 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.93-0.84 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.18-0.15 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 171.1, 170.6, 169.3, 161.8, 95.7, 92.4, 72.0, 71.8, 68.9, 62.5, 57.9, 33.9, 24.8, 20.7, 20.63, 20.60, 20.0, 19.9, 18.53, 18.49, -1.9, -3.4. HRMS: m/z : calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_9\text{NCl}_3\text{SiNa}$: 616.1279; encontrado: 616.1302 $[M+\text{Na}]^+$.

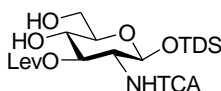
4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo (**53**)



A una solución del compuesto **52** (11.5 g, 19.4 mmol) en metanol (160 mL) se añadió NaOMe (1.5 mL de una solución 2.17 M en MeOH). Después de 12 horas, se añadió resina ácida AMBERLITE hasta alcanzar un $\text{pH}=7$. La resina AMBERLITE se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se coevaporó con CH_2Cl_2 y tolueno, se disolvió en acetonitrilo y se añadieron benzaldehído dimetilacetal (3.5 mL, 23.2 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (367 mg, 1.9 mmol). Después de 3 horas agitando a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó en AcOEt y se lavó con NaHCO_3 aq. sat. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo [CCF (Hex/AcOEt 3:2) R_f 0.73] se disolvió en CH_2Cl_2 (113 mL) y, a continuación, se añadieron ácido levulínico (9.9 mL, 97 mmol), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (6.0 g, 29 mmol) y DMAP (500 mg). Después de 3

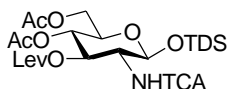
horas, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con NaHCO_3 aq. sat. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 3:1) obteniendo **53** (9.7 g, 76%). CCF (Hex/AcOEt 3:1) R_f 0.5; $[\alpha]_D^{20}$ -47.2° (c 3.17, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.43-7.26 (m, 6H, Ar, NH), 5.40 (m, 2H, H-3, PhCHO), 4.70 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1H, H-1), 3.94 (ddd, 1H, H-2), 3.86 (dd, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, 1H, H-6a), 3.61 (m, 2H, H-4, H-6b), 3.30 (ddd, 1H, H-5), 2.68-2.48 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 1.51 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.80-0.73 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.00 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 205.8, 173.3, 162.2, 137.2-126.1 (Ar), 101.1, 96.2, 92.7, 79.0, 71.9, 68.5, 66.2, 58.4, 38.1, 34.0, 29.9, 28.4, 24.8, 20.2, 20.0, 18.7, 18.6, -1.7, -3.2. HRMS: m/z : calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{NCl}_3\text{SiNa}$: 674.1486; encontrado: 674.1448 $[M+\text{Na}]^+$.

2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo (**54**)



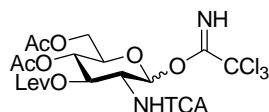
A una solución de **53** (2.0 g, 3.0 mmol) en CH_2Cl_2 (150 mL) se añadió TFA (7.5mL) a una temperatura de 0°C . Después de 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con NaHCO_3 aq. sat. y brine. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 1:1) obteniendo **54** (1.51 g, 90%). CCF (Hex/AcOEt 1:1) R_f 0.21; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.98 (br d, $J_{2,NH} = 8.9$ Hz, 1H, NH), 5.21 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$ Hz, 1H, H-3), 4.89 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1), 3.96-3.73 (m, 4H, H-2, H-4, 2H-6), 3.57-3.48 (m, 1H, H-5), 2.89-2.40 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.18 (s, 3H, COCH_3), 1.67-1.52 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.87-0.79 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.18-0.10 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo (55)



A una disolución de **54** (1.51 g, 2.66 mmol) en piridina (16 mL) se añadieron 8 mL de Ac₂O a una temperatura de 0°C. Después de 10 minutos se subió la temperatura a t.a. y se dejó agitando 1 hora. Se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl 1N, NaHCO₃ aq. sat. y H₂O. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío, obteniendo **55** (1.7 g, 99%). CCF (Hex:AcOEt 1:1) R_f 0.2; [α]_D²⁰ -17.0° (*c* 1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (br d, *J*_{2,NH} = 8.9 Hz, 1H, NH), 5.33 (dd, *J*_{2,3} = 10.7 Hz, *J*_{3,4} = 9.4 Hz, 1H, H-3), 5.07 (dd, *J*_{4,5} = 9.6 Hz 1H, H-4), 4.90 (d, *J*_{1,2} = 7.9 Hz, 1H, H-1), 4.24-4.12 (m, 2H, H-6), 3.97-3.85 (m, 1H, H-2), 3.77-3.67 (m, 1H, H-5), 2.75-2.41 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.13 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (2s, 6H, OCOCH₃), 1.65-1.52 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.87-0.78 (m, 12H, C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), 0.18-0.10 (2s, 6H, Si(CH₃)₂); ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 206.1, 172.4, 170.5, 169.7, 161.7, 95.5, 92.3, 71.9, 71.7, 68.4, 62.4, 58.1, 37.6, 33.8, 29.5, 28.0, 24.7, 20.7, 20.6, 19.9, 19.8, 19.5, 18.5, 18.4, -2.0, -3.4. HRMS: *m/z*: calculado para C₂₅H₄₀Cl₃NO₁₀NaSi: 670.1385; encontrado: 670.1345 [*M*+Na]⁺.

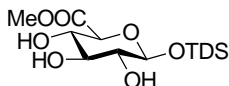
Tricloroacetimidato de 4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- α,β -D-glucopiranosilo (48)



El complejo (HF)_nPy (9 mL) se añadió a una solución del compuesto **55** (2.0 g, 3.2 mmol) en THF seco (30 mL) a 0°C. Después de 3 días en agitación a 0°C, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se extrajo con H₂O y NaHCO₃ aq. sat. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró.

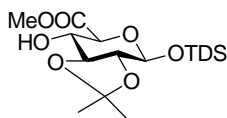
El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro y se añadió Cl_3CCN (3.4 mL, 34 mmol) y DBU (5.1 μl , 34 μmol). Después de 4 horas agitando a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1 + 1% Et_3N) obteniendo **48** (1.51 g, 75%) como una mezcla de anómeros α/β . CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.28. Datos para el anómero α : $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.82 (s, 1H, NH), 7.03 (br d, $J_{2,\text{NH}} = 8.4$ Hz, 1H, NH), 6.50 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 5.47 (dd, $J_{2,3} = 10.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, 1H, H-3), 5.31 (dd, $J_{4,5} = 10.0$ Hz 1H, H-4), 4.47-4.37 (m, 1H, H-2), 4.34-4.25 (m, 1H, H-6), 4.20-4.07 (m, 2H, H-5, H-6), 2.85-2.37 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.15 (2s, 6H, OCOCH_3), 2.09 (s, 3H, COCH_3). ES-MS: m/z : calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{NaO}_{10}$: 672.9; encontrado: 672.7 [$M+\text{Na}$] $^+$.

(β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo) uronato de metilo (**58**)



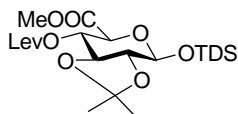
Se disolvió hidróxido de sodio (138 mg) en 375 mL de metanol y, a continuación, se añadieron, poco a poco, 50 g (284 mmol) de **56** a esta mezcla. (NOTA: La lactona debería disolverse casi inmediatamente. Se podría añadir más base si el pH cae por debajo de 8.0). La mezcla se agitó 1 hora a temperatura ambiente y la reacción se neutralizó con resina AMBERLITE IR-120, se filtró, y el disolvente se concentró a vacío, coevaporando, finalmente, con CH_2Cl_2 . El residuo **57** (60 g 0.29 moles) e imidazol (49.0 g, 0.72 moles) se disolvieron en DMF seca. La disolución se enfrió a 0°C . TDSCI (85 mL, 0.43 moles) se añadió, gota a gota, bajo agitación. Después de agitar durante 24 horas a 0°C , la mezcla se diluyó con AcOEt y se lavó con H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 24:1) obteniendo **58** (31 g, 30%). CCF ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1) R_f 0.14.

(2,3-*O*-isopropilidén-β-D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo) uronato de metilo (59)



159 mL de 2-metoxipropeno (1.65 moles) se añadieron a una disolución del compuesto **58** (29 g, 0.082 moles) en DMF seca (160 mL). La reacción se enfrió a 0°C y se añadió, gota a gota y bajo agitación, una solución de ácido (1S)-(+)-camforsulfónico (1.92 g, 0.008 moles) en DMF (30 mL). Después de 2 horas a 0°C, 30 mL de metanol se añadieron a la reacción, que se dejó agitando 30 min a 0°C. Se añadió trietilamina (7 mL) y la mezcla de reacción se diluyó en AcOEt y se lavó con H₂O. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH 29:1 → 20:1) obteniendo **59** (16.1 g, 50%). $[\alpha]_D^{20}$ - 20.4° (*c* 0.75, CHCl₃); CCF (Hex/AcOEt 4:1) R_f 0.37; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 4.91 (d, *J*_{1,2}=7.5 Hz, 1H, H-1), 4.10 (dd, *J*_{3,4}=*J*_{4,5}=9.2 Hz, 1H, H-4), 3.84-3.81 (m, 4H, H-5, COOCH₃), 3.55 (dd, 1H, H-3), 3.33 (dd, *J*_{2,3}=9.3 Hz, 1H, H-2), 1.66 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.46-1.45 (2s, 6H, C(CH₃)₂ isopropilidén acetal), 0.90-0.88 (m, 12H, C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), 0.20 (s, 6H, Si(CH₃)₂); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 113.8, 99.3, 81.5, 80.3, 77.9, 73.2, 55.0, 36.1, 28.8, 27.2, 22.3, 22.1, 20.7, 20.6, 0.0, -0.8. HRMS: *m/z* calculado para C₁₈H₃₄O₇SiNa: 413.1972; encontrado: 413.1965 [*M*+Na]⁺.

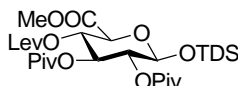
(2,3-*O*-isopropilidén-4-*O*-levulinoil-β-D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo) uronato de metilo (60)



El compuesto **59** (1.87 g, 4.78 mmol), ácido levulínico (2.78 g, 23.9 mmol), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (1.48 g, 7.17 mmol) y DMAP (80 mg) se

disolvieron en CH_2Cl_2 (20 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 4:1) obteniendo **60** (2.04 g, 88%). $[\alpha]_D^{20}$ -29.0° (*c* 0.42, CHCl_3); CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.29; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 5.30 (dd, $J_{3,4}=9.9$ Hz, $J_{4,5}=8.4$ Hz, 1H, H-4), 4.94 (d, $J_{1,2}=7.5$ Hz, 1H, H-1), 3.93 (d, 1H, H-5), 3.75 (s, 3H, COOCH_3), 3.65 (dd, 1H, H-3), 3.47 (dd, $J_{2,3}=9.6$ Hz, 1H, H-2), 2.77-2.61 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.19 (s, 3H, COCH_3) 1.65 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.45-1.44 (2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropilidén acetal), 0.90-0.83 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.20 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 206.1, 171.6, 167.9, 111.7, 96.9, 78.1, 77.2, 74.6, 71.4, 52.7, 37.7, 33.9, 29.9, 27.7, 26.6, 26.5, 24.9, 20.1, 19.9, 18.5, 18.4, -2.2, -3.0. HRMS: *m/z* calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{SiNa}$: 511.2339; encontrado: 511.2341 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

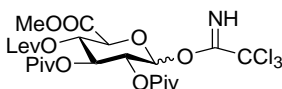
(4-*O*-levulinoil-2,3-di-*O*-pivaloil- β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo) uronato de metilo (61**)**



El compuesto **60** (7.14 g, 14.6 mmol) se disolvió en MeOH (110 mL) y, a continuación, se añadió resina ácida DOWEX 50WX2 (9 g). Después de 3 horas de reacción, la resina DOWEX se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se disolvió en piridina (75 mL) y se añadió cloruro de pivaloilo (11.3 mL, 91.8 mmol) y DMAP (1.0 g, 8.19 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, se añadió una cantidad adicional de DMAP (1.0 g, 8.19 mmol). Después de dos días más agitando, se diluyó el crudo con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 1N, NaHCO_3 aq. sat. y H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 4:1)

obteniendo **61** (7.04 g, 78%). $[\alpha]_D^{20} - 7.8^\circ$ (*c* 0.67, CHCl₃); CCF (Hex/AcOEt 2:1) *R_f* 0.55; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.29 (m, 2H, H-3, H-4), 5.03 (dd, 1H, H-2), 4.84 (d, *J*_{1,2}=7.5 Hz, 1H, H-1), 4.05 (d, *J*_{4,5}=9.9 Hz 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, COOCH₃), 2.72-2.49 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.18 (s, 3H, COCH₃) 1.61 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.17-1.13 (2s, 18H, OCOC(CH₃)₃), 0.88-0.83 (m, 12H, C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), 0.20-0.13 (2s, 6H, Si(CH₃)₂); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 205.7, 177.3, 176.3, 171.1, 167.2, 95.9, 72.7, 72.3, 71.8, 69.8, 52.7, 38.7, 37.5, 33.7, 29.8, 27.6, 27.2, 27.0, 24.7, 20.0, 19.8, 18.5, 18.4, -2.0, -3.2. HRMS: *m/z* calculado para C₃₀H₅₂O₁₁SiNa: 639.3177; encontrado: 639.3191 [M+Na]⁺.

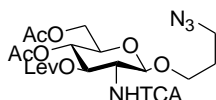
Tricloroacetimidato de 4-*O*-levulinoil-2,3-di-*O*-pivaloil- α,β -D-glucopiranosiluronato de metilo (**46**)



A una solución de **61** (2.05 g, 3.12 mmol) en THF seco (33 mL) se añadió un exceso del complejo (HF)_nPy (8.7 mL) a 0°C. Después de 24 horas agitando a 0°C y 10 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con H₂O y NaHCO₃ aq. sat. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío para dar el compuesto 4-*O*-levulinoil-2,3-di-*O*-pivaloil- α,β -D-glucopiranosuronato de metilo. El residuo (1.58 g, 3.1 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco y se añadió tricloroacetnitrilo (3.1 mL, 31 mmol) y K₂CO₃ (470 mg, 3.41 mmol). Después de 3 horas agitando a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) para dar **46** (1.44 g, 72%) como una mezcla de anómeros α/β . Datos para el anómero α : CCF (Hex/AcOEt 2:1) *R_f* 0.45; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H, NH), 6.67 (d, *J*_{1,2}=3.3 Hz, 1H, H-1), 5.71 (dd, *J*_{2,3}=*J*_{3,4}=9.9 Hz, 1H, H-3), 5.33 (dd, 1H, H-4), 5.20 (dd, 1H, H-2), 4.53 (d, *J*_{4,5}=10.2 Hz 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, COOCH₃), 2.74-2.50 (m, 4H,

OCO(CH₂)₂), 2.19 (s, 3H, COCH₃), 1.17-1.14 (2s, 18H, OCOC(CH₃)₃); datos para el anómero β: CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.26; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.77 (s, 1H, NH), 6.04 (d, J_{1,2}=7.2 Hz, 1H, H-1), 5.40-5.37 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.26 (d, J_{4,5}=9.0 Hz 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, COOCH₃), 2.72-2.52 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.19 (s, 3H, COCH₃), 1.16-1.15 (2s, 18H, OCOC(CH₃)₃). ES-MS: m/z: calculado para C₂₄H₃₄O₁₁NCl₃Na: 640.1; encontrado: 640.1 [M+Na]⁺.

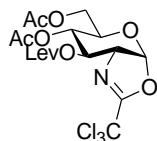
4,6-di-O-acetil-2-desoxi-3-O-levulinoil-2-tricloroacetamido-β-D-glucopiranosido de 3-azidopropilo (65)



El espaciador 3-azidopropanol **49** (75 mg, 0.75 mmol) y el tricloroacetimidato **48** (193 mg, 300 μmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío y se disolvieron en CH₂Cl₂ anhidro (1 mL). A continuación, se añadió TMSOTf (300 μL de una disolución 0.25 M en CH₂Cl₂) a temperatura ambiente. Después de agitar a t.a. durante 10 min, la reacción se paró con trietilamina (0.2 mL) y el disolvente se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 5:1) para dar **65** (150 mg, 86%). CCF (Tolueno:Acetona 3:1) R_f 0.28; [α]_D²⁰ +9.0° (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6.82 (br d, J_{2,NH} = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.33 (dd, J_{2,3} = 10.6 Hz, J_{3,4} = 9.4 Hz, 1H, H-3), 5.13 (dd, J_{4,5} = 9.7 Hz 1H, H-4), 4.69 (d, J_{1,2} = 8.3 Hz, 1H, H-1), 4.29 (dd, J_{5,6a} = 4.7 Hz, J_{6a,6b} = 12.3 Hz, 1H, H-6a), 4.15 (dd, J_{5,6b} = 2.3 Hz, J_{6a,6b} = 12.3 Hz, 1H, H-6b) 4.03-3.84 (m, 2H, H-2 y OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.76-3.68 (m, 1H, H-5), 3.63-3.53 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.41-3.33 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 2.76-2.42 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.15 (s, 3H, COOCH₃), 2.09 (2s, 6H, OCOCH₃), 1.94-1.76 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 206.2, 172.6, 170.6, 169.6, 162.1, 100.6, 92.2, 72.0, 71.8, 67.9, 66.5, 62.0, 56.0 47.9, 37.6, 29.5,

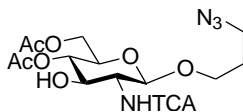
28.9, 28.0, 20.7. HRMS: m/z : calculado para $C_{20}H_{27}Cl_3N_4O_{10}Na$: 611.0690; encontrado: 611.0705 $[M+Na]^+$.

Oxazolina (66)



CCF (Tolueno/Acetona 3:1) R_f 0.26; 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.36 (d, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, 1H, H-1), 5.39 (dd, 1H, H-3), 4.93 (m, 1H, H-4), 4.51 (m, 1H, H-2), 4.32-4.15 (m, 2H, 2H-6), 3.78 (m, 1H, H-5), 2.89-2.45 (m, 4H, $OCO(CH_2)_2$), 2.18 (s, 3H, $COCH_3$), 2.09 (2s, 6H, $OCOCH_3$). ES-MS: m/z : calculado para $C_{17}H_{20}Cl_3NNaO_9$: 510.0; encontrado: 509.7 $[M+Na]^+$.

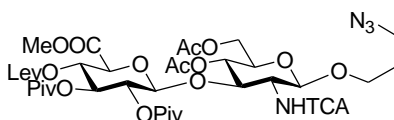
4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosido de 3-azidopropilo (67)



El compuesto **65** (461 mg, 0.78 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (6 mL) y se añadieron 3.1 mL de una solución 0.5 M de hidrazina monohidratada en Py/AcOH 1.2:0.8. La mezcla se agitó durante 2 horas y la reacción se paró con acetona (0.2 mL). A continuación, se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl 1M (aq.), $NaHCO_3$ aq. sat. y H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 1:1) obteniendo **67** (300 mg, 78%). CCF (Hex/AcOEt 1:1) R_f 0.33; $[\alpha]_D^{20} +36.0^\circ$ (c 1, $CHCl_3$); 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.06 (br d, $J_{2,NH} = 7.0$ Hz, 1H, NH), 4.92-4.83 (m, 2H, H-4 y H-1), 4.29 (dd, $J_{5,6a} = 4.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, 1H, H-6a), 4.15 (m, 2H, H-6b y H-3), 3.96 (m, 1H, $OCH_2CH_2CH_2N_3$), 3.69 (M, 1H, H-5), 3.61 (m, 1H, $OCH_2CH_2CH_2N_3$), 3.51 (m, 1H, H-2), 3.44-3.33 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2N_3$),

2.12-2.09 (2s, 6H, COCH₃), 1.90-1.80 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 171.0, 170.9, 162.6, 99.5, 92.3, 71.9, 71.6, 71.2, 66.6, 62.3, 59.2, 48.0, 29.0, 20.9, 20.8. HRMS: *m/z*: calculado para C₁₅H₂₁Cl₃N₄O₈Na: 513.0323; encontrado: 513.0309 [M+Na]⁺.

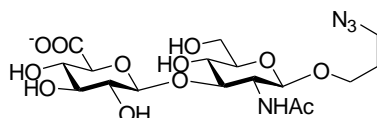
***O*-(4-*O*-levulinoil-2,3-di-*O*-pivaloil-β-D-glucopiranosiluronato de metilo)-(1→3)-4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-2-tricloroacetamido-β-D-glucopiranosido de 3-azidopropilo (68).**



El donador **46** (103 mg, 0.22 mmol) y el aceptor **67** (82 mg, 0.17 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío y se disolvieron en CH₂Cl₂ anhidro (1.5 mL). A continuación, se añadió TMSOTf (300 μL de una disolución 0.18 M en CH₂Cl₂) a temperatura ambiente. Después de agitar a t.a. durante 1 hora, la reacción se paró con trietilamina (0.2 mL) y el disolvente se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 1:1) para dar **68** (90 mg, 55%). CCF (Hex:AcOEt 1:1) R_f 0.16; [α]²⁰_D +24.8° (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.00 (br d, J_{NH,2} = 7.1 Hz, 1H, NH), 5.17-5.12 (m, 2H, H-3' y H-4'), 5.01-4.94 (m, 3H, H-2', H-1 y H-4), 4.68 (d, J_{1,2} = 7.9 Hz 1H, H-1'), 4.61 (dd, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2 Hz, 1H, H-3), 4.23 (dd, J_{5,6a} = 5.2 Hz, J_{6a,6b} = 12.2 Hz, 1H, H-6a), 4.14 (m, 1H, H-6b), 3.97-3.92 (m, 2H, H-5' y OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.76-3.70 (m, 4H, COOCH₃ y H-5), 3.60 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.40-3.34 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.31 (m, 1H, H-2), 2.73-2.42 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.16-2.14 (2s, 6H, COCH₃), 2.09 (s, 3H, COCH₃), 1.88-1.81 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 1.16-1.10 (2s, 18H, OCOC(CH₃)₃); ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 205.6, 177.1, 175.8, 171.1, 170.7, 169.6, 166.9, 162.0 (8 x CO), 99.5 (C-1'), 98.5 (C-1), 92.1 (CCl₃), 74.4 (C-3), 72.4, 72.0 (C-5, C-5'), 71.5, 70.6, 69.7 (C-2', C-3', C-4'), 68.1 (C-4), 66.9 (OCH₂), 62.3 (C-6), 59.2

(C-2), 52.8 (COOCH₃), 48.0 (CH₂N₃), 38.7, 38.6, 37.3, 29.7, 29.6, 28.9, 27.4, 27.1, 26.9, 20.7, 20.6. HRMS: *m/z*: calculado para C₃₇H₅₃Cl₃N₄O₁₈Na: 969.2318; encontrado: 969.2313 [*M*+Na]⁺.

***O*-(ácido-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido de 3-azidopropilo (42).**

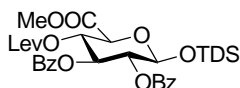


El disacárido **68** (20 mg, 23 μmol) se disolvió en una mezcla THF/H₂O (3mL, 1/1 v/v) y una solución 0.5 M de KOH en H₂O (0.46 mL, 0.23 mmol) se añadió, poco a poco, en alícuotas de 1 eq., a lo largo de 48 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con resina Amberlite H⁺, se filtró y se concentró a vacío y se purificó a través de Sephadex LH-20 obteniendo el compuesto **75**. CCF (AcOEt/Py/H₂O/AcOH 10:5:3:1) R_f 0.40.

El intermedio **75** se disolvió en una mezcla THF/H₂O (3mL, 1/1 v/v) y se añadió solución 0.5M de KOH adicional a lo largo de 4 días (20 eq./día: 80 eq. totales). La mezcla de reacción se neutralizó con Amberlite H⁺, se filtró y se concentró a vacío y se purificó a través de Sephadex G-10 obteniendo el compuesto **76**. CCF (AcOEt/Py/H₂O/AcOH 8:5:3:1) R_f 0.18; ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 4.63 (d, *J*_{1',2'} = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.48 (d, *J*_{1,2} = 8.3 Hz, 1H, H-1), 4.06-4.00 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.94 (dd, *J*_{5,6a} = 2.0 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.3 Hz, 1H, H-6a), 3.81-3.74 (m, 3H, H-5', H-6b y OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.66-3.60 (dd, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.1 Hz, 1H, H-3), 3.59-3.53 (m, 3H, H-3', H-4' y H-4), 3.53-3.46 (m, 3H, H-5 y OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.43 (dd, 1H, H-2'), 2.88 (dd, 1H, H-2), 1.97-1.90 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HMQC, 125 MHz, D₂O) δ 103.1, 101.8, 86.1, 75.7, 75.6, 75.4, 73.2, 71.3, 68.3, 67.8, 67.4, 60.6, 55.7, 28.6. ES-MS: *m/z*: calculado para C₁₅H₂₆N₄O₁₁: 436.2; encontrado: 436.7 [*M*-1H]⁻.

El disacárido **76** se disolvió en 3 mL de MeOH anhidro y la reacción se enfrió a 0°C. Entonces se añadieron TEA (2 µL, 11.4 µmol) y Ac₂O (27 µL, 0.285 mmol). Después de 15 min agitando se subió la temperatura a t.a. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se coevaporó 3 veces con tolueno y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en 3 mL de H₂O y se añadieron 0.1 mL de una solución 0.5M de LiOH en H₂O. Después de 2 horas, la reacción se neutralizó con AcOH y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó por Sephadex G-10 y se liofilizó 3 veces obteniendo el sólido blanco **42** (10 mg, 90%). CCF (AcOEt/Py/H₂O/AcOH 8:5:3:1) R_f 0.15; ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 4.55 (d, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, 1H, H-1), 4.49 (d, *J*_{1,2'} = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.01-3.96 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.94 (dd, *J*_{5,6a} = 2.1 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, 1H, H-6a), 3.87-3.82 (dd, 1H, H-2), 3.80-3.73 (m, 3H, H-5', H-3 y H-6b), 3.73-3.66 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.57-3.46 (m, 4H, H-3', H-4', H-4 y H-5), 3.42-3.33 (m, 3H, H-2' y OCH₂CH₂CH₂N₃), 2.05 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.89-1.83 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HMQC, 125 MHz, D₂O) δ 102.7 (C-1'), 100.8 (C-1), 82.7 (C-3 o C-5'), 75.5 (C-3 o C-5'), 75.4 (C-3' o C-4' o C-4 o C-5), 75.2 (C-3' o C-4' o C-4 o C-5), 72.8 (C-2'), 66.9 (OCH₂CH₂CH₂N₃), 71.7 ((C-3' o C-4' o C-4 o C-5), 68.7 (C-3' o C-4' o C-4 o C-5), 60.7 (C-6), 54.6 (C-2), 47.8 (OCH₂CH₂CH₂N₃), 28.0 (OCH₂CH₂CH₂N₃), 22.8 (CH₃CONH). HR MS: *m/z*: calculado para C₁₇H₂₈N₄O₁₂Na: 503.1601; encontrado: 503.1616 [M+Na]⁺.

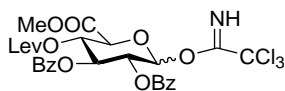
(2,3-di-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil-β-D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo) uronato de metilo (71**)**



El compuesto **60** (7.14 g, 14.6 mmol) se disolvió en metanol (110 mL) y, a continuación, se añadió resina ácida DOWEX 50WX2 (9 g). Después de 3 horas de reacción, la resina DOWEX se filtró y el disolvente se eliminó a

vacio. El residuo (1.96 g) se disolvió en piridina (15 mL) y se añadió cloruro de benzoilo (5 mL, 43.6 mmol). Después de 18 horas agitando a temperatura ambiente, el crudo de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con 1N HCl, NaHCO_3 aq. sat. y H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) obteniendo **71** (2.05g, 74%). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 40.7^\circ$ (*c* 1, CHCl_3); CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.44; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.93-7.89 (m, 4H, Ar), 7.53-7.47 (m, 2H, Ar), 7.39-7.34 (m, 4H, Ar), 5.67 (dd, $J_{2,3}=J_{3,4}=9.6$ Hz, 1H, H-3), 5.48 (dd, $J_{3,4}=9.6$ Hz, 1H, H-4), 5.42 (dd, $J_{1,2}=7.4$ Hz, $J_{2,3}=9.6$ Hz, 1H, H-2), 5.01 (d, $J_{1,2}=7.4$ Hz, 1H, H-1), 4.20 (d, $J_{4,5}=9.8$ Hz, 1H, H-5), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 2.68-2.35 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.04 (s, 3H, COCH_3) 1.50 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.74-0.70 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.18-0.08 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 205.7, 171.2, 167.2, 165.7, 164.9, 133.6, 133.3, 133.1, 130.1, 129.9, 129.7, 129.4, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3, 96.1, 73.2, 72.7, 72.5, 69.9, 52.9, 37.7, 33.8, 29.6, 27.7, 24.7, 19.8, 19.7, 18.4, 18.3, -2.0, -3.5. HRMS: m/z calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{11}\text{SiNa}$: 679.2551; encontrado: 679.2531 $[M+\text{Na}]^+$.

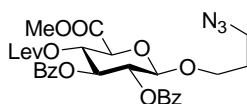
Tricloroacetimidato de 2,3-di-O-benzoil-4-O-levulinoil- α,β -D-glucopiranosiluronato de metilo (47)



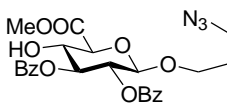
A una solución de **71** (2.05 g, 3.12 mmol) en THF seco (33 mL) se añadió un exceso del complejo $(\text{HF})_n\text{Py}$ (8.7 mL) a 0°C . Después de 24 horas agitando a 0°C y 10 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O y NaHCO_3 aq. sat. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío para dar el compuesto 4-O-levulinoil-2,3-di-O-benzoil- α,β -D-glucopiranosuronato de metilo. El residuo (1.58 g, 3.1 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (20mL) y se añadió tricloroacetnitrilo (3.1 mL, 31 mmol) y K_2CO_3 (470 mg, 3.41 mmol). Después de 3 horas agitando a

temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) para dar **47** (1.44 g, 72%) como una mezcla de anómeros α/β . CCF (Hex:AcOEt 1:1) R_f 0.49. Datos para el anómero α : $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (s, 1H, NH), 7.96-7.91 (m, 4H, Ar), 7.55-7.47 (m, 2H, Ar), 7.41-7.33 (m, 4H, Ar), 6.84 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 6.10 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3), 5.58-5.50 (m, 2H, H-2, H-4), 4.65 (d, 1H, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, H-5), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 2.70-2.37 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.04 (s, 3H, COCH_3). ES-MS: m/z : calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{NaO}_{10}$: 680.0; encontrado: 679.7 $[M+\text{Na}]^+$.

(2,3-di-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil- β -D-glucopiranosido de 3-azidopropilo) uronato de metilo (72)

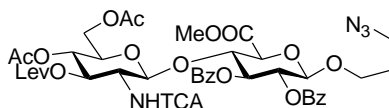


El espaciador 3-azidopropanol **49** (460 mg, 4.6 mmol) y el tricloroacetimidato **47** (1.2 g, 1.8 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío y se disolvieron en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL). A continuación, se añadió TMSOTf (33 μL , 0.18 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a t.a. durante 10 min, la reacción se paró con trietilamina y el disolvente se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) para dar **72** (700 mg, 64%). CCF (Hex:AcOEt 1:1) R_f 0.59. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.96-7.89 (m, 4H, Ar), 7.55-7.48 (m, 2H, Ar), 7.41-7.34 (m, 4H, Ar), 5.70 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, H-3), 5.50-5.41 (m, 2H, H-2 y H-4), 4.77 (d, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, 1H, H-1), 4.22 (d, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-5), 4.24 (m, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 3.61 (m, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.32-3.18 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 2.69-2.35 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 1.89-1.70 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$). ES-MS: m/z : calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{NaO}_{11}$: 620.2; encontrado: 619.9 $[M+\text{Na}]^+$.

(2,3-di-*O*-benzoil-β-D-glucopiranosido de 3-azidopropilo) uronato de metilo (73)

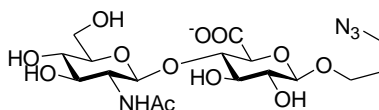
El compuesto **72** (790 mg, 1.32 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (15 mL) y se añadieron 5.1 mL de una solución 0.5 M de hidrazina monohidratada en Py/AcOH 1.2:0.8. La mezcla se agitó durante 2 horas y la reacción se paró con acetona (0.4 mL). Se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl 1M (aq.), NaHCO₃ aq. sat. y H₂O. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 8:1) obteniendo **73** (590 mg, 89%). CCF (Hex:AcOEt 3:2) R_f 0.62; [α]²⁰_D +37.2° (*c* 1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.98-7.94 (m, 4H, Ar), 7.54-7.48 (m, 2H, Ar), 7.40-7.34 (m, 4H, Ar), 5.55 (dd, 1H, H-3), 5.42 (dd, *J*_{1,2} = 7.7 Hz, *J*_{2,3} = 9.8 Hz, 1H, H-2), 4.75 (d, *J*_{1,2} = 7.7 Hz, 1H, H-1), 4.20 (dd, 1H, H-4), 4.10 (d, *J*_{4,5} = 9.7 Hz, 1H, H-5), 4.01 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.86 (s, 3H, COOCH₃), 3.63 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.32-3.17 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 1.89-1.70 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 169.1, 166.5, 165.2, 133.4, 133.3, 129.9, 129.7, 129.1, 129.0, 128.7, 128.5, 128.4, 101.4, 74.9, 74.8, 71.4, 70.5, 66.9, 52.9, 47.8, 28.9. HRMS: *m/z*: calculado para C₂₄H₂₅N₃O₉Na: 522.1488; encontrado: 522.1483 [*M*+Na]⁺.

***O*-(4,6-di-*O*-acetil-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(2,3-di-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido de 3-azidopropilo) uronato de metilo (**74**)**



El donador **48** (68 mg, 0.14 mmol) y el aceptor **73** (118 mg, 0.18 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío y se disolvieron en CH₂Cl₂ anhidro (1.5 mL). A continuación, se añadió TMSOTf (150 μ L de una disolución 0.01 M en CH₂Cl₂) a temperatura ambiente. Después de agitar a t.a. durante 30 minutos, la reacción se paró con trietilamina (0.2 mL) y el disolvente se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 7:1) para dar **74** (40 mg, 30%). CCF (Tolueno:Acetona 6:1) R_f 0.66; $[\alpha]_D^{20}$ -8.4° (*c* 1, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.97-7.89 (m, 4H, Ar), 7.53-7.45 (m, 2H Ar), 7.39-7.30 (m, 4H, Ar), 6.86 (br d, *J*_{NH,2} = 8.8 Hz, 1H, NH), 5.67 (dd, 1H, H-3'), 5.34 (dd, 1H, H-2'), 5.16 (dd, 1H, H-3), 4.96 (d, 1H, H-1), 4.87 (dd, 1H, H-4), 4.74 (d, 1H, H-1'), 4.30 (dd, 1H, H-4'), 4.13 (d, 1H, H-5'), 4.00-3.90 (m, 2H, H-2, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.86 (s, 1H, COOCH₃), 3.66-3.59 (m, 2H, H-6, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.57-3.51 (m, 1H, H-5), 3.46-3.42 (m, 1H, H-6), 3.33-3.18 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 2.75-2.39 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.35 (s, 3H, COCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 1.99 (s, 3H, COCH₃), 1.87 (s, 3H, COCH₃), 1.83-1.73 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 206.1, 172.1, 170.3, 169.5, 169.3, 165.2, 165.1, 161.6, 133.4, 133.2, 129.7, 129.6, 129.5, 129.0, 128.4, 128.2, 101.3, 100.3, 92.4, 73.85, 72.3, 72.2, 67.6, 66.0, 61.5, 55.8, 53.2, 47.8, 37.7, 29.7, 29.5, 28.9, 27.9, 20.7, 20.5. HRMS: *m/z*: calculado para C₄₁H₄₅Cl₃N₄O₁₈Na: 1009.1692; encontrado: 1009.1717 [M+Na]⁺.

***O*-(2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4) ácido β -D-glucopiranosidurónico de 3-azidopropilo (**43**)**

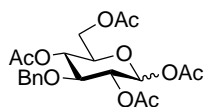


A una solución de **74** (13mg, 0.013 mmol) en THF/H₂O (1.5mL, 1:1) se añadieron 60 μ L de KOH 0.5M aq. A continuación se añadieron 4 alícuotas adicionales de la solución acuosa 0.5M de KOH (50 μ L x 4) después de 6, 22, 25 y 28 horas. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 3 días. A continuación, el crudo de reacción se neutralizó con la resina ácida Amberlite IR-120, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt/Py/H₂O/AcOH 10:5:3:1) obteniendo el intermedio deseado con el grupo amino libre **77** (5.5 mg, 96%). CCF (AcOEt/Py/H₂O/AcOH 8:5:3:1), R_f 0.26.

A una solución del intermedio **77** (5.5 mg, 0.012 mmol) y Et₃N (2 μ L, 0.014 mmol) en MeOH (1mL), a 0°C y bajo atmosfera inerte de argón, se añadió Ac₂O (28 μ L, 0.30 mmol) y la solución se dejó agitando a temperatura ambiente durante 2.5 horas. El disolvente se evaporó y el crudo se secó a vacío durante 12 horas. El residuo se disolvió en H₂O (1 mL), y se añadieron 100 μ L de una solución 0.66 M de NaOH. La solución se dejó bajo agitación durante 1.5 horas, se neutralizó con resina ácida Amberlite IR-120, y se purificó por Sephadex G-10 (H₂O/MeOH 9:1) obteniendo el compuesto **43** con un rendimiento cuantitativo (6 mg). CCF (AcOEt/MeOH/H₂O 15:5:3) R_f 0.35; ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 4.48 (d, $J_{1,2}$ = 8.5 Hz, 1H, H-1'), 4.39 (d, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, 1H, H-1), 3.90 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.86 (bd, 1H, $J_{6a,6b}$ = 13.0 Hz, H-6'a), 3.72-3.61 (m, 5H, H-6'b, OCH₂CH₂CH₂N₃, H-2', H-4, H-5), 3.52 (t, 1H, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.1 Hz, H-3), 3.46 (bt, 1H, H-3'), 3.40 (m, 2H, H-4', H-5'), 3.38 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃), 3.27 (dd, 1H, H-2), 1.98 (s, 3H, COCH₃), 1.83 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂N₃); datos seleccionados del espectro de

RMN de ^{13}C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, D_2O) δ 102.3 (C-1), 100.6 (C-1'), 79.9 (C-4), 76.4 (C-5), 75.5 (C-4' o C-5'), 73.8 (C-3, C-3'), 72.6 (C-2), 69.4 (C-4' o C-5'), 67.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 60.4 (C-6'), 55.2 (C-2'), 47.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 28.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 22.3 (CH_3CONH). HR MS: m/z : calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{12}$: 479.1630; encontrado: 479.1681 [M].

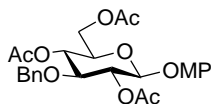
1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3-*O*-bencil- α,β -D-glucopiranososa (**84**)⁵⁴



A una disolución de 40 g (0.15 mol) de 1,2,5,6-di-*O*-isopropilidén- α -D-glucofuranosa (**81**) en 250 mL de DMF, se añadió lentamente, bajo agitación y enfriando en un baño de hielo, 7.7 gramos (0.19 mol) de NaH al 60% en aceite mineral. Después de 30 minutos agitando a 0°C, se subió la temperatura a t.a. y se añadieron 1.7 g (4.6 mmol) de NBu_4I y 19.2 mL (0.162 mol) de BnBr . La mezcla de reacción se dejó agitando bajo atmósfera inerte de argón durante 4 horas. A continuación, se añadieron 10 mL de MeOH y se dejó agitando 20 minutos. El crudo de reacción se diluyó con AcOEt y se lavó con H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío para dar el compuesto **82**. [CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.43]. El residuo **82** se trató con H_2SO_4 0.1M (530 mL). La temperatura se subió poco a poco hasta 90°C y se dejó toda la noche bajo agitación. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH 0.1M. El crudo de reacción se coevaporó con una mezcla MeOH/Tolueno y se secó a vacío para dar el compuesto **83**. [CCF ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:1) R_f 0.48]. **83** se disolvió en piridina (340 mL) y a la disolución se añadieron 183 mL de Ac_2O a 0°C. Después de 1 hora se subió la temperatura a t.a. y se dejó agitando 18 horas. Se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl 1N, NaHCO_3 aq. sat. y H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) obteniendo **84** (57

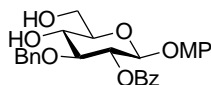
g, 85%). CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.33; Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

2,4,6-tri-*O*-acetil-3-*O*-bencil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo (**85**)⁵⁵



Una mezcla de **84** (57 g, 0.13 mol), 4-metoxifenol (40 g, 0.32 mol) y tamiz molecular de 4Å (35 g) en 440 mL de CH_2Cl_2 se agitó durante 30 minutos a 0°C y bajo atmósfera inerte de argón. A continuación, se añadió TMSOTf (3.5 mL, 0.02 mol). Después de agitar a 0°C durante 3 horas, la reacción se neutralizó con trietilamina y el disolvente se concentró a vacío. El residuo se cristalizó desde acetato de etilo para dar **85** (34.5 g, 55%). CCF (Hex/AcOEt 1:1) R_f 0.31; Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

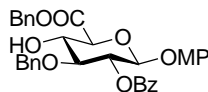
3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo (**89**)⁵⁵



A una solución de **85** (13.6 g, 27 mmol) en MeOH (136 mL) se añadieron 1.95 mL de una solución 1M de metóxido sódico en MeOH y se dejó agitando a t.a. bajo argón 18 horas. La reacción se diluyó con MeOH, se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120 (H^+), se filtró y se concentró a vacío para dar el crudo **86**. El residuo **86** (27 mmol) se disolvió en MeCN (200 mL) y se añadieron bajo argón 6.3 mL (41 mmol) de benzaldehído dimetil acetal y ácido p-toluensulfónico (5.8 mL de una solución 0.48M en MeCN seco). Se dejó agitando algunos minutos, se neutralizó con trietilamina (400 μL) y se evaporó a vacío. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío para dar el crudo **87**. Este residuo (27 mmol) se disolvió en piridina (225 mL) y a esta

disolución se añadió cloruro de benzoilo (25 mL, 216 mmol). Después de agitar durante 18 horas a t.a. bajo atmosfera de argón, se diluyó el crudo con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 2N, NaHCO_3 aq. sat. y H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío para dar el crudo **88**. Este residuo (27 mmol) y CSA (3.13 g, 13.5 mmol) se disolvieron en $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (250 mL 3:1). Después de 20 horas agitando a t.a. y bajo atmosfera de argón, la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con NaHCO_3 aq. sat. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. El crudo se cristalizó usando de Hex/AcOEt para dar **89** como solido blanco (11.6 g, 85%). CCF (Tolueno/AcOEt 1:3) R_f 0.42; Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

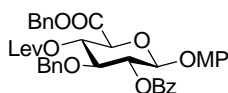
[3-O-bencil-2-O-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo] uronato de bencilo (80**)⁸⁶**



A una solución del diol **89** (1 g, 2.1 mmol) en CH_2Cl_2 , bajo una intensa agitación y a 0°C , se añadieron gota a gota TEMPO (1.3 mL de una solución 0.016M en CH_2Cl_2), Bu_4NBr (1.3 mL de una solución 0.016 M en CH_2Cl_2), KBr (0.42 mL de una solución 0.5M en H_2O) y una solución de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (743 mg, 5.2 mmol) y NaHCO_3 (751 mg, 8.9 mmol) en H_2O (20.2 mL). Después de 1 hora a 0°C , la reacción se neutralizó añadiendo Na_2SO_3 (13 mL de una solución 0.8M en H_2O). Después de 15 minutos a 0°C , el crudo se diluyó con CH_2Cl_2 y H_2O , y la fase orgánica se lavó con Na_2SO_3 (0.8 M) y brine, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en DMF (3 mL) y se añadieron bromuro de bencilo (0.5 mL, 4.2 mmol) y Bu_4NI (390 mg, 1.1 mmol). La reacción se agitó a 60°C durante 4 horas, se diluyó con AcOEt, se lavó con H_2O , se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 12:1) obteniendo **80** (600 mg, 50%). CCF (Tolueno/AcOEt 1:3)

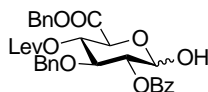
R_f 0.47; Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

[3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil-β-D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo] uronato de bencilo (90**)⁸⁶**



El compuesto **80** (2.4 g, 4.1 mmol), ácido levulínico (2.39 g, 20.5 mmol), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (1.27 g, 6.17 mmol) y DMAP (50 mg) se disolvieron en CH₂Cl₂ (30 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 20:1) obteniendo el compuesto **90** (2.55 g, 78%). CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.29; Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

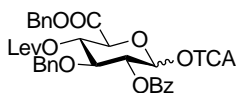
3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil-α,β-D-glucopiranosiluronato de bencilo (91**)⁸⁶**



A una solución de **90** (2.55 g, 3.73 mmol) en tolueno/MeCN/H₂O (200 mL, 1:6:1) se añadió CAN (8.7 g, 14.9 mmol) y la reacción se agitó durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La reacción se vertió sobre H₂O fría y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ aq. sat. y H₂O, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 12:1) obteniendo el compuesto **91** como una mezcla de anómeros α/β (2.0 g, 91%). CCF

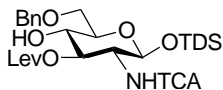
(Tolueno/AcOEt 2:1) R_f 0.46. Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

Tricloroacetimidato de 3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil- α,β -D-glucopiranosiluronato de bencilo (78)⁸⁶



El compuesto **91** (2 g, 3.47 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (25 mL) y se añadió tricloroacetnitrilo (3.5 mL, 34.7 mmol) y K_2CO_3 (527 mg, 3.82 mmol). Después de 2 horas agitando a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) para dar **78** (2.3 g, 92%) como una mezcla de anómeros α/β . CCF (Hex/AcOEt 1:1) R_f 0.49. Los datos de RMN se corresponden con los que se encuentran en la bibliografía.

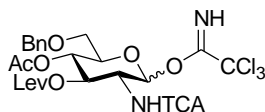
6-*O*-bencil-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosido de dimetiltexilsililo (92)



El compuesto **53** (3 g, 4.6 mmol) se coevaporó con tolueno y se disolvió en CH_2Cl_2 seco (30 mL). A continuación se dejó agitando 30 minutos sobre tamiz molecular activado (3g). A continuación, se añadió trietilsilano (8.8 mL, 55.2 mmol) y se dejó agitando a temperatura ambiente. A los 15 minutos se añadió gota a gota TFA (4.5 mL, 60.72 mmol). Después de 10 minutos el crudo de reacción se filtró y se diluyó con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 ac. sat. y con H_2O , se secó sobre MgSO_4 , y se concentró. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1 \rightarrow 1:1) obteniendo **92** (2.55 g, 85%). CCF (Hex/AcOEt 2:1)

R_f 0.24; $[\alpha]_D^{20}$ -22.9° (c 1, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.39-7.27 (m, 5H, Ar), 6.78 (br d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9.3$ Hz, NH), 5.13 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.6$ Hz, H-3), 4.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1), 4.60 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 3.92 (m, 1H, H-2), 3.81-3.75 (m, 3H, H-4, H-6a y H-6b), 3.58 (m, 1H, H-5), 2.81-2.44 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.17 (s, 3H, COCH_3), 1.60 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.86-0.82 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.18-0.13 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75MHz, CDCl_3): δ 207.8, 173.4, 162.0 (C=O), 138.1-127.7 (Ar-CH y Ar-C), 95.8 (C-1), 92.7 (CCl_3), 75.7, 74.5 (C-3 y C-5), 73.7 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 70.2, 69.9 (C-4 y C-6), 57.6 (C-2), 38.4 ($\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 34.0 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 29.9 (COCH_3), 28.4 ($\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 24.8, 20.1, 20.0, 18.7, 18.6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), -1.7, -3.2 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). HRMS: m/z : calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{Cl}_3\text{NO}_8\text{SiNa}$: 676.1643; encontrado: 676.1675 [$M+\text{Na}$] $^+$.

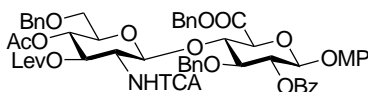
Tricloroacetimidato de 4-O-acetil-6-O-bencil-2-desoxi-3-O-levulinoil-2-tricloroacetamido- α,β -D-glucopiranosilo (79)



El compuesto **92** (1.2g, 1.83 mmol) se disolvió en Py (10mL/g) y a continuación se añadió anhídrido acético (5mL/g) a 0°C. Después de 10 minutos se subió la temperatura a t.a. Una vez terminada la reacción, se diluyó el crudo con AcOEt, se lavó con HCl 1N, NaHCO_3 ac. sat. y finalmente con H_2O destilada. La fase orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró, obteniendo con un rendimiento cuantitativo el intermedio **93**. A continuación, el residuo **93** (1.83 mmol) se disolvió en THF seco (25 mL) y se añadió un exceso de complejo $(\text{HF})_n\text{Py}$ (5.2 mL) a 0°C. Después de 5 días agitando a 0°C, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O y NaHCO_3 aq. sat. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío para dar el 1-hidroxiázúcar correspondiente (rendimiento cuantitativo). Una parte del residuo (527 mg, 0.95 mmol) se disolvió en

CH₂Cl₂ seco (10mL) y se añadió tricloroacetnitrilo (0.95 mL, 9.5 mmol) y DBU (1%). Después de 1 hora agitando a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 3:1 + 1% TEA) para dar **79** (463 mg, 70%) como una mezcla de anómeros α/β . CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.45; datos para el anómero α : ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.74 (s, 1H, NH), 7.26 (m, 5H, Ar), 6.97 (br d, 1H, $J_{NH,2}$ = 8.2 Hz, NH), 6.46 (d 1H, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, H-1), 5.44-5.32 (m, 2H, H-3 y H-4), 4.48 (2d, 2H, CH₂(Bn)), 4.36 (m, 1H, H-2), 4.07 (m, 1H, H-5), 3.53 (m, 2H, H-6a y H-6b), 2.78-2.36 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 1.98 (s, 3H, COCH₃). HRMS: m/z : calculado para C₂₄H₂₆Cl₆N₂NaO₉: 718,9667; encontrado: 718,9669 [M+Na]⁺.

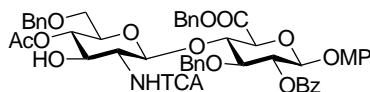
***O*-(4-*O*-acetil-6-*O*-bencil-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo) uronato de bencilo (**94**)**



El donador **79** (3.73 g, 5.34 mmol) y el aceptor **80** (2.4 g, 4.1 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío, y se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (90 mL) en presencia de tamiz molecular 4Å activado. Después de 10 minutos agitando a 0°C y bajo atmosfera de argón, se añadió TMSOTf (199 μ L, 1.1 mmol). Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se neutralizó con trietilamina y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tol/Acetona 14:1) para dar **94** (3.31 g, 72%). CCF (Hex/AcOEt 3:2) R_f 0.38; [α]_D²⁰ +14.1° (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (m, 2H, Ar), 7.56 (m, 1H, Ar), 7.45-7.37 (m, 6H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.26 (m, 4H, Ar), 7.16 (m, 2H, Ar), 7.05 (m, 3H, Ar), 6.87 (m, 3H, NH y Ar), 6.69 (m, 2H, Ar), 5.44 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 7.1 Hz, $J_{2,3}$ = 9.0 Hz, H-2), 5.27, 5.10 (2d, 2H, J_{gem} = 12.0 Hz, CH₂(Bn)), 5.06 (t, 1H, $J_{3,4}$ = $J_{4',5'}$ =

9.5 Hz, H-4'), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.1$ Hz, H-1), 4.93 (t, 1H, H-3'), 4.90, 4.63 (2d, 2H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH₂(Bn)), 4.41 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.4$ Hz, H-1'), 4.32 (2d, 2H, CH₂(Bn)), 4.21 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.1$ Hz, H-4), 4.06-4.00 (m, 2H, H-5 y H-2'), 3.82 (pt, 1H, H-3), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.47 (m, 1H, H-6'a), 3.33-3.26 (m, 2H, H-5' y H-6'b), 2.71-2.42 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 1.97 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 206.1 (CO(Lev)), 172.3, 169.8, 168.9, 165.1, 162.1 (CO), 155.8, 151.0 (Ar-C), 138.1-114.5 (Ar-C, Ar-CH), 101.0 (C-1), 100.1 (C-1'), 92.5 (CCl₃), 79.6 (C-3), 78.1 (C-4), 75.3 (CH₂(Bn)), 74.5 (C-5), 73.7 (C-5'), 73.6 (CH₂(Bn)), 73.0 (C-2), 72.8 (C-3'), 69.1 (C-6'), 68.8 (C-4'), 68.0 (CH₂(Bn)), 56.0 (C-2'), 55.7 (OCH₃), 37.8 (OCO(CH₂)₂), 29.7 (COCH₃), 28.1 (OCO(CH₂)₂), 20.8 (COCH₃). HRMS: *m/z*: calculado para C₅₆H₅₆NO₁₇NaCl₃: 1142.2512; encontrado: 1142.2543 [M+Na]⁺.

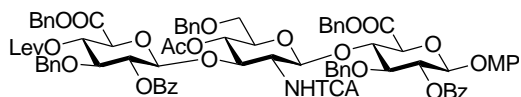
***O*-(4-*O*-acetil-6-*O*-bencil-2-deoxi-2-tricloroacetamido-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil-β-D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo)uronato de bencilo (**95**)**



El compuesto **94** (200 mg, 0.18 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (2.5 mL) y, a continuación, se añadió hidrazina monohidrato (340 μL de una solución 1 M en Py/AcOH 3:2). Después de 2 horas agitando a temperatura ambiente, la reacción se neutralizó con acetona (0.1 mL), se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl 1N, NaHCO₃ aq. sat., y H₂O. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 7:1) obteniendo el compuesto **95** (170 mg, 93%). CCF (Hex/AcOEt 3:2) R_f 0.30; $[\alpha]_D^{20} +16.6^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (m, 2H, Ar), 7.57 (m, 1H, Ar), 7.43-7.37 (m, 7H, Ar y NH), 7.33 (m, 2H, Ar), 7.26 (m, 4H, Ar), 7.15 (m, 2H, Ar), 7.05

(m, 3H, Ar), 6.88 (m, 2H, Ar), 6.70 (m, 2H, Ar), 5.45 (dd, 1H, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 9.1$ Hz, H-2), 5.28, 5.15 (2d, 2H, $J_{gem} = 12.2$ Hz, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 5.01 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, H-1), 4.93-4.89 (m, 2H, H-4' y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.62 (d, 1H, $J_{gem} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.38 (d, 1H, $J_{1,2'} = 8.3$ Hz, H-1'), 4.31 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.17 (pt, 1H, H-4), 4.08 (d, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, 1H, H-5), 3.85-3.80 (m, 2H, H-3 y H-2'), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.50-3.46 (m, 2H, H-3' y H-6'a), 3.33 (m, 1H, H-6'b), 3.30 (m, 1H, H-5'), 2.00 (s, 3H, COCH_3); ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 170.7, 169.3, 165.1, 163.6 (CO), 155.8, 151.0 (Ar-C), 138.0-114.5 (Ar-C, Ar-CH), 100.9 (C-1), 99.7 (C-1'), 92.6 (CCl_3), 79.7 (C-3), 78.1 (C-4), 75.2 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 74.4 (C-5), 74.3 (C-3'), 73.7 (C-5'), 73.6 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 72.9 (C-2), 72.2 (C-4'), 69.1 (C-6'), 68.0 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 58.7 (C-2'), 55.6 (OCH_3), 20.9 (COCH_3). HRMS: m/z : calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{NO}_{15}\text{NaCl}_3$: 1044.2144; encontrado: 1044.2161 $[M+\text{Na}]^+$.

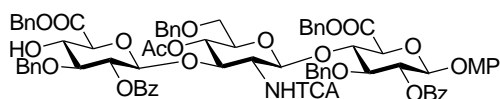
O-(3-O-bencil-2-O-benzoil-4-O-levulinoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-O-(4-O-acetil-6-O-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-O-bencil-2-O-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo) uronato de bencilo (96)



El donador **78** (275 mg, 0.38 mmol) y el aceptor **95** (300 mg, 0.29 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío, y se disolvieron en CH_2Cl_2 seco (4 mL) en presencia de tamiz molecular 4Å activado. La reacción se agitó durante 10 minutos a t.a. y bajo atmosfera de argón, y, a continuación, se añadió TMSOTf (14 μL , 76 μmol). Después de 15 minutos, la mezcla de reacción se neutralizó con trietilamina y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 10:1) para dar **96** (192 mg, 41%) y aceptor **95** (56 mg, 18%). CCF (Tolueno/Acetone 7:1) R_f 0.28; $[\alpha]_D^{20} +15.6^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H -RMN (500

MHz, CDCl₃) δ 8.04 (m, 2H, Ar), 7.93 (m, 2H, Ar), 7.54 (m, 2H, Ar), 7.44-7.24 (m, 17H, Ar), 7.14-7.02 (m, 12H, Ar), 6.90 (br d, 1H, $J_{2,NH} = 7.8$ Hz, NH), 6.86 (m, 2H, Ar), 6.68 (m, 2H, Ar), 5.41 (dd, 1H, $J_{1,2} = 6.9$ Hz, $J_{2,3} = 8.4$ Hz, H-2A), 5.28-5.22 (m, 2H, H-2C y H-4C), 5.20-5.08 (m, 4H, 2CH₂(Bn)), 5.00 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, H-1A), 4.90 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4B), 4.84-4.80 (m, 2H, H-1B y H-1C), 4.75 (d, 1H, $J_{gem} = 11.6$ Hz, CH₂(Bn)), 4.59-4.53 (m, 3H, CH₂(Bn)), 4.36-4.26 (m, 3H, H-4A y CH₂(Bn)), 4.18 (pt, 1H, H-3B), 4.02 (d, 1H, $J_{4,5} = 8.8$ Hz, H-5A), 4.00 (d, 1H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-5C), 3.80-3.73 (m, 2H, H-3A y H-3C), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (m, 1H, H-2B), 3.44 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 3.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.7$ Hz, H-6bB), 3.37 (m, 1H, H-5B), 3.26 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.4$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.7$ Hz, H-6aB), 2.55-2.19 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 1.78 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 206.0(CO(Lev)), 171.4 (CO(Lev)), 169.9, 168.5, 167.1, 165.2, 164.8, 161.5 (CO), 155.7, 151.1 (Ar-C), 138.1-114.5 (Ar-C, Ar-CH), 100.9 (C-1A), 99.1 (C-1C), 98.6 (C-1B), 92.8 (CCl₃), 79.4 (C-3A), 79.1 (C-3C), 76.6 (C-4A), 75.9 (C-3B), 74.8, 74.6 (CH₂(Bn) y C-5A), 74.1, 73.9, 73.6 (2CH₂(Bn) y C-5B), 73.1 (C-2A), 72.8, 72.7 (C-2C y C-5C), 71.3 (C-4C), 69.3 (C-6B), 68.7 ((C-4B), 68.1 (CH₂(Bn)), 67.8 (CH₂(Bn)), 58.5 (C-2B), 55.7 (OCH₃), 37.7 (OCO(CH₂)₂), 29.9 (COCH₃), 27.8 (OCO(CH₂)₂), 20.6 (COCH₃). HRMS: m/z : calculado para C₈₃H₈₀NO₂₄NaCl₃: 1602.4034; encontrado: 1602.4025 [M+Na]⁺.

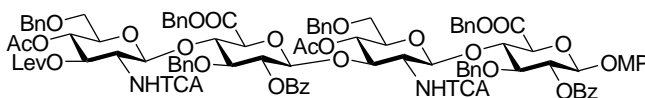
***O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*O*-(4-*O*-acetil-6-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo) uronato de bencilo (97)**



El compuesto **96** (124 mg, 0.08 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (2 mL) y, a continuación, se añadió hidrazina monohidrato (152 μ L de una solución 1 M

en Py/AcOH 3:2). Después de 2 horas agitando a temperatura ambiente, la reacción se paró con acetona (0.1 mL), se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl 1N, NaHCO₃ aq. sat., y H₂O. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 7:1) obteniendo el compuesto **97** (82 mg, 71%). CCF (Tolueno/Acetona 6:1) R_f 0.28; $[\alpha]_D^{20} +6.9^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (m, 2H, Ar), 7.94 (m, 2H, Ar), 7.56 (m, 2H, Ar), 7.44-7.24 (m, 17H, Ar), 7.19-7.01 (m, 12H, Ar), 6.86 (m, 2H, Ar), 6.81 (d, 1H, $J_{2,NH} = 8.0$ Hz, NH), 6.68 (m, 2H, Ar), 5.41 (dd, 1H, $J_{1,2} = 7.0$ Hz, $J_{2,3} = 8.4$ Hz, H-2A), 5.27 (2d, 2H, CH₂(Bn)), 5.17 (m, 2H, H-2C y CH₂(Bn)), 5.10 (d, 1H, $J_{gem} = 12.1$ Hz, CH₂(Bn)), 5.00 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.9$ Hz, H-1A), 4.88 (pt, 1H, H-4B), 4.81 (d, 1H, H-1B), 4.77-4.74 (m, 2H, H-1C y CH₂(Bn)), 4.68 (s, 2H, CH₂(Bn)), 4.53 (d, 1H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH₂(Bn)), 4.36-4.26 (m, 3H, H-4A y CH₂(Bn)), 4.13 (pt, 1H, H-3B), 4.03-4.00 (m, 2H, H-5A y H-4C), 3.92 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-5C), 3.76 (pt, 1H, H-3A), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.64-3.55 (m, 2H, H-2B y H-3C), 3.45 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 3.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.6$ Hz, H-6bB), 3.40 (m, 1H, H-5B), 3.27 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.6$ Hz, H-6aB), 1.75 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 169.7, 168.6, 168.4, 165.2, 165.1, 161.4 (CO), 155.7, 151.0 (Ar-C), 138.1-114.5 (Ar-C, Ar-CH), 100.9 (C-1A), 99.8 (C-1C), 98.7 (C-1B), 92.8 (CCl₃), 80.9 (C-3C), 79.4 (C-3A), 76.7 (C-4A), 76.2 (C-3B), 74.8, 74.7, 74.7, 74.6 (2CH₂(Bn), C-5C, C-5A), 73.9 (C-5B), 73.6 (CH₂(Bn)), 73.1 (C-2A), 72.9 (C-2C), 72.1 (C-4C), 69.4 (C-6B), 69.0 (C-4B), 67.8 (2 CH₂(Bn)), 58.3 (C-2B), 55.7 (OCH₃), 20.6 (COCH₃). HRMS: m/z: calculado para C₇₈H₇₄NO₂₂NaCl₃: 1504.3666; encontrado: 1504.3644 [M+Na]⁺.

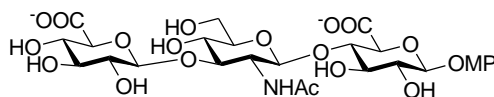
***O*-(4-*O*-acetil-6-*O*-bencil-2-desoxi-3-*O*-levulinoil-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*O*-(4-*O*-acetil-6-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo) uronato de bencilo (**98**)**



El donador **79** (56 mg, 0.08 mmol) y el aceptor **97** (80 mg, 0.05 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío, y se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (2 mL) en presencia de tamiz molecular 4Å activado. La reacción se agitó durante 10 minutos a 0°C y bajo atmosfera de argón, y, a continuación, se añadió TMSOTf (100 μ L de una solución 0.16 M en CH₂Cl₂ seco). Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se neutralizó con trietilamina y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 4:1) para dar **98** (69 mg, 64%). CCF (Tolueno/AcOEt 4:1) R_f 0.30; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +6.5^{\circ}$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (m, 4H, Ar), 7.54 (m, 2H, Ar), 7.48-7.22 (m, 25H, Ar), 7.12 (m, 2H, Ar), 7.08-7.02 (m, 7H, Ar), 6.85 (m, 2H, Ar), 6.83 (br d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9.2$ Hz, NHD), 6.74 (br d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 8.1$ Hz, NHB), 6.67 (m, 2H, Ar), 5.42-5.37 (m, 2H, H-2A y CH₂(Bn)), 5.16-5.08 (m, 4H, H-2C y CH₂(Bn)), 5.02-4.98 (m, 2H, H-1A y H-4D), 4.89-4.82 (m, 3H, H-1B, H-4B y H-3D), 4.79-4.72 (m, 3H, H-1C y CH₂(Bn)), 4.54 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, CH₂(Bn)), 4.35-4.25 (m, 5H, H-4A y 2CH₂(Bn)), 4.18 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1D), 4.10-4.03 (m, 2H, H-3B y H-4C), 4.01 (d, 1H, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, H-5A), 3.98-3.92 (m, 2H, H-2D y H-5C), 3.76 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.5$ Hz, H-3A), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.64-3.57 (m, 2H, H-3C y H-2B), 3.46-3.38 (m, H-5B y 2H₆), 3.26 (m, 2H, 2H₆), 3.15 (m, 1H, H-5D), 2.76-2.42 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 1.98 (s, 3H, COCH₃), 1.78 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 206.2 (CO(Lev)), 172.3 (CO(Lev)), 169.8, 169.5, 168.7,

168.5, 165.2, 165.1, 162.3, 161.6 (CO), 155.7, 151.0 (Ar-C), 138.1-114.5 (Ar-C y Ar-CH), 100.9 (C-1A), 99.9, 99.8 (C1-C y C-1D), 99.0 (C-1B), 92.7, 92.5 (2CCl₃), 79.5 (C-3A), 79.4 (C-3C), 77.8 (C-4C), 77.4, 76.4 (C-3B y C-4A), 75.0, 74.7(X3) (2CH₂(Bn), C-5A y C-5C), 73.9, 73.7, 73.6(X2) (C-5D, C-5B y 2 CH₂(Bn)), 73.1 (C-2A), 72.8 (C-2), 72.6 (C-3D), 69.6, 69.4, 69.0, 68.8 (C-6B, C-6D, C-4B y C4D), 68.0 (CH₂(Bn)), 67.8 (CH₂(Bn)), 58.1 (C-2B), 56.0 (C-2D), 55.7 (OCH₃), 37.8 (OCO(CH₂)₂), 29.8 (COCH₃), 28.1 (OCO(CH₂)₂), 20.8, 20.6 (COCH₃). HRMS: m/z: calculado para C₁₀₀H₁₀₆N₄O₃₀NaCl₆: 1028.2501; encontrado: 1028.2558 [M+2NH₄]²⁺.

***O*-(ácido β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil)-(1→4) ácido β-D-glucopiranosidurónico de 4-metoxifenilo (44)**



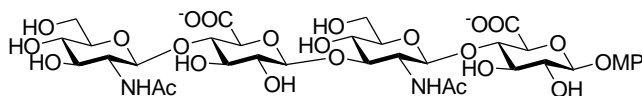
A una disolución del trisacárido **96** (11.6 mg, 7.3 μmol) en THF (0.83 mL) se añadieron, a una temperatura de -5°C, H₂O₂ (30%, 0.31 mL) y LiOH (0.19 mL de una solución 0.7M). Después de 24 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadieron MeOH (0.83 mL) y una solución de NaOH (0.18 mL, 4M). Después de 72 horas a temperatura ambiente, la reacción se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120 (H⁺), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en MeOH (1 mL) y se añadieron trietilamina (4 μL) y Ac₂O (5 μL) a 0°C. Después de 1 hora agitando a t.a., la reacción se coevaporó con tolueno y metanol. El residuo se volvió a disolver en MeOH (1 mL) y se añadió NaOH (0.25M, 0.2 mL). Después de 12 h la reacción se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120 (H⁺), se filtró y se concentró a vacío. Se añadió trietilamina (0.3 mL) y el crudo se purificó por Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1:1). El residuo se convirtió en sal sódica por elución en Dowex 50WX4-Na⁺ con MeOH/H₂O 9:1 para dar **99** (6.5 mg, 87%). CCF (AcOEt/MeOH/H₂O 20:5:3) R_f 0.35; ¹H-RMN (500 MHz, MeOD) δ 7.44 (m,

4H, Ar), 7.32-7.17 (m, 11H, Ar), 7.03 (m, 2H, Ar), 6.81 (m, 2H, Ar), 5.07 (d, $J_{gem} = 11.2$ Hz, 1H, CH₂(Bn)), 4.89 (m, 2H, CH₂(Bn)), 4.81 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1H, H-1A), 4.76 (d, $J_{gem} = 11.2$ Hz, 1H, CH₂(Bn)), 4.69 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1B), 4.52 (d, $J_{gem} = 11.9$ Hz, 1H, CH₂(Bn)), 4.43 (d, $J_{1,2} = 7.4$ Hz, 1H, H-1C), 4.36 (d, $J_{gem} = 11.9$ Hz, 1H, CH₂(Bn)), 4.05 (pt, 1H, H-4A), 3.89 (pt, 1H, H-2B), 3.85 (m, 1H, H-6B), 3.80 (d, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-5A), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.69-3.52 (m, 6H, H-2A, H-3B, H-6B, H-5C, H-4C y H-3A), 3.48 (m, 2H, H-5B y H-4B), 3.44-3.38 (m, 2H, H-2C y H-3C), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃); datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, MeOD) δ 151.5-115.0 (Ar), 104.6 (C-1C), 102.9 (C-1A), 100.8 (C-1B), 85.1 (C-2C o C-3C), 84.8 (C-3B o C-5C), 83.7 (C-3A), 79.7 (C-4A), 78.0 (C-5A), 77.0 (C-4B o C-5B), 75.1 (CH₂(Bn)), 75.0 (CH₂(Bn)), 74.9 (C-3B o C-5C), 74.2 (CH₂(Bn)), 74.2 (C-2C o C-3C), 73.6 (C-2A), 73.0 (C-4C), 70.7 (C-4B o C-5B), 70.5 (C-6B), 56.2 (C-2B), 55.7 (OCH₃), 23.7 (NHCOCH₃). HRMS: m/z: calculado para [C₄₈H₅₃NO₁₉]²⁺: 473.6611; encontrado: 473.6622 [M]²⁺.

Una solución de **99** (6.5 mg, 6.8 μ mol, sal sódica) en 4.5 mL de H₂O/MeOH (8:1) se hidrogenó en presencia de Pd(OH)₂ (5 mg) a una presión de 1 bar. Después de 24 horas, la suspensión se filtró sobre Celita y se concentró a vacío. El residuo se purificó por Sephadex G-10 (H₂O/MeOH 9:1) para dar el compuesto **44** después de liofilización (4.6 mg, cuantitativo). ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 7.10 (m, 2H, Ar), 6.98 (m, 2H, Ar), 5.00 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1A), 4.60 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1B), 4.47 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1C), 3.94 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.7$ Hz, H-6B), 3.89-3.78 (m, 7H, H-2B, H-4A, H-5A, OCH₃ y H-6B), 3.75-3.68 (m, 3H, H-3B, H-5C y H-3A), 3.61 (dd, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, 1H, H-2A), 3.56 (pt, 1H, H-4B), 3.50 (m, 3H, H-3C, H-4C y H-5B), 3.33 (m, 1H, H-2C), 2.04 (s, 3H, NHCOCH₃); datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, D₂O) δ 118.1, 115.0 (Ar), 102.9 (C-1C), 101.3 (C-1A), 100.5 (C-1B), 82.9 (C-3B o C-5C), 79.8 (C-4A o C-5A), 76.6 (C-4A o C-5A),

75.6 (C-3B o C5C), 75.3 (C-5B o C-3C o C-4C), 73.6 (C-3A), 72.7 (C-2C), 72.5 (C-2A), 71.6 (C-5B o C-3C o C-4C), 68.5 (C-4B), 60.5 (C-6B), 55.7 (OCH₃), 54.2 (C-2B), 22.4 (NHCOCH₃). HRMS: m/z: calculado para [C₂₇H₃₅NO₁₉]²⁻: 338.5907; encontrado: 338.5904 [M]²⁻.

O-(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(ácido β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-O-(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil)-(1→4) ácido β-D-glucopiranosidurónico de 4-metoxifenilo (45)



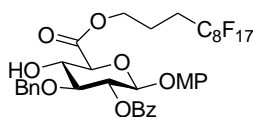
A una disolución del tetrasacárido **98** (20 mg, 10 μmol) en THF (1 mL) se añadieron, a una temperatura de -5°C, H₂O₂ (30%, 0.42 mL) y LiOH (0.25 mL de una solución 0.7M). Después de 24 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadieron MeOH (1 mL) y una solución de NaOH (0.25 mL, 4M). Después de 5 días a temperatura ambiente, la reacción se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120 (H⁺), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en MeOH (1 mL) y se añadieron trietilamina (5 μL) y Ac₂O (6 μL) a 0°C. Después de 2 horas agitando a t.a., la reacción se coevaporó con tolueno y metanol. El residuo se volvió a disolver en MeOH (1 mL) y se añadió NaOH (0.3M, 0.2 mL). Después de 12 h la reacción se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120 (H⁺), se filtró y se concentró a vacío. Se añadió trietilamina (0.3 mL) y el crudo se purificó por Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1:1). El residuo se convirtió en sal sódica por elución en Dowex 50WX4-Na⁺ con MeOH/H₂O 9:1 para dar **100** (8 mg, 64%). CCF (AcOEt/MeOH/H₂O 20:5:3) R_f 0.25; ¹H-RMN (500 MHz, MeOD) δ 7.45 (m, 4H, Ar), 7.27-7.17 (m, 16H, Ar), 7.03 (m, 2H, Ar), 6.81 (m, 2H, Ar), 5.04 (m, 2H, CH₂(Bn)), 4.80 (d, J_{1,2} = 7.9 Hz, 1H, H-1A), 4.74 (2d, J_{gem} = 10.6 Hz, 2H, CH₂(Bn)), 4.68 (d, J_{1,2} = 8.6 Hz, 1H, H-1B), 4.62 (d, J_{1,2} = 8.6 Hz, 1H, H-1D), 4.50 (2d, J_{gem} = 10.6 Hz, 2H, CH₂(Bn)), 4.43 (d, J_{1,2} = 7.2 Hz, 1H, H-1C),

4.34 (2d, $J_{gem} = 12.0$ Hz, 2H, CH₂(Bn)), 4.05 (pt, 1H, H-4A), 3.93 (pt, 1H, H-4C), 3.87 (dd, $J_{2,3} = 10.1$ Hz, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, 1H, H-2B), 3.84-3.72 (m, 7H, H-6B, H-6D, H-5A, H-5C y OCH₃), 3.67-3.51 (m, 6H, H-6B, H-6D, H-2A, H-2D, H-3B y H-3A), 3.49-3.43 (m, 4H, H-4B, H-5B, H-2C y H-3C), 3.39-3.36 (m, 3H, H-3D, H-4D y H-5D), 2.06 (2s, 6H, NHCOCH₃); datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, MeOD) δ 152.8-115.1 (Ar), 104.3 (C-1C), 103.1 (C-1A), 100.8 (C-1B y C-1D), 85.2 (C-3B), 83.7 (C-3A), 83.3 (C-4B o C-5B o C-2C o C-3C), 79.7 (C-4A), 79.4 (C-4C), 78.2 (C-5A o C-5C), 78.0 (C-3D o C-4D o C-5D), 77.5 (C-3D o C-4D o C-5D), 76.9 (C-4B o C-5B o C-2C o C-3C), 76.9 (C-5A o C-5C), 75.2 (2xCH₂(Bn)), 74.5 (CH₂(Bn)), 74.3 (CH₂(Bn)), 73.9 (C-2A), 73.8 (C-4B o C-5B o C-2C o C-3C), 72.1 (C-3D o C-4D o C-5D), 70.6 (C-6B y C-6D), 70.5 (C-4B o C-5B o C-2C o C-3C), 57.8 (C-2D), 56.2 (C-2B), 55.8 (OCH₃), 23.1 (2xNHCOCH₃). HRMS: m/z: calculado para [C₆₃H₇₂N₂O₂₄]²⁻: 620.2243; encontrado: 620.2280 [M]²⁻.

Una solución de **100** (8.0 mg, 6.2 μ mol, sal sódica) en H₂O/MeOH (4.5 mL/0.5 mL) se hidrogenó a una presión de 2 bar en presencia de Pd(OH)₂ (17 mg). Después de 48 horas, la suspensión se filtró sobre celita y se concentró a vacío. El residuo se purificó por Sephadex G-10 (H₂O/MeOH 9:1) para dar **45** después de liofilización (5.6 mg, cuantitativo). ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 7.09 (m, 2H, Ar), 6.97 (m, 2H, Ar), 4.99 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1A), 4.57 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1H, H-1B), 4.52 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1D), 4.46 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1C), 3.92 (m, 2H, H-6B y H-6D), 3.87-3.65 (m, 13H, H-2B, H-4A, H-5A, H-6B, H-6D, OCH₃, H-4C, H-5C, H-3B, H-2D y H-3A), 3.61-3.56 (m, 2H, H-2A y H-3C), 3.55-3.44 (m, 5H, H-4B, H-3D, H-4D, H-5D y H-5B), 3.34 (pt, 1H, H-2C), 2.04 (s, 3H, NHCOCH₃), 2.02 (s, 3H, NHCOCH₃); datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, D₂O) δ 118.0, 114.9 (Ar), 103.0 (C-1C), 101.2 (C-1A), 100.6 (C-1D), 100.4 (C-1B), 82.4 (C-3B o C-4C o C-5C), 79.8 (C-4A o C-5A), 79.6 (C-3B o C-4C o C-5C), 76.5 (C-4A o C-5A), 76.1 (C-3B o C-4C o

C-5C), 75.4 (C-4B o C-5B o C-3D o C-4D o C-5D), 75.2 (C-4B o C-5B o C-3D o C-4D o C-5D), 73.8 (C-4B o C-5B o C-3D o C-4D o C-5D), 73.5 (C-3C), 73.6 (C-3A), 72.5 (C-2A), 72.4 (C-2C), 69.4 (C-4B o C-5B o C-3D o C-4D o C-5D), 68.4 (C-4B o C-5B o C-3D o C-4D o C-5D), 60.4 (C-6B y C-6D), 55.6 (OCH₃), 55.2 (C-2D), 54.2 (C-2B), 22.5 (2xNHCOCH₃). HRMS: m/z: calculado para [C₃₅H₄₈N₂O₂₄]²⁻: 440.1304; encontrado: 440.1323 [M]²⁻.

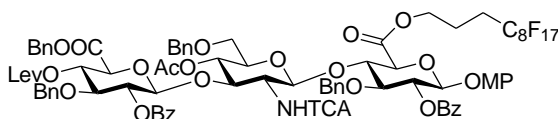
(3-O-bencil-2-O-benzoil-β-D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo) uronato de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecilo (101):



A una solución del diol **89** (100 mg, 0.21 mmol) en CH₂Cl₂ (2.1 mL) a 0°C se añadieron, gota a gota, TEMPO (0.39 mL de una solución 0.016 M en CH₂Cl₂), Bu₄NBr (0.13 mL de una solución 0.08 M en CH₂Cl₂) y KBr (40 μL de una solución 0.5 M en H₂O). A continuación, una solución de Ca(ClO)₂ (74 mg, 0.52 mmol) y NaHCO₃ (75 mg, 0.9 mmol) en H₂O (2.0 mL) se añadió gota a gota y a 0°C. Después de agitar durante 45 minutos a 0°C, la reacción se neutralizó con Na₂SO₃ (1.3 mL de una solución 0.8 M en H₂O). Después de 15 minutos agitando a 0°C, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y H₂O y la fase orgánica se separó, se lavó con una solución de Na₂SO₃ (0.8 M) y brine, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en DMF (3 mL) y se añadió yoduro de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecilo (245 mg, 0.42 mmol). La reacción se agitó durante 3 h a 60 °C, se diluyó con AcOEt, se lavó con H₂O, se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (tolueno/AcOEt 12:1) para dar **101** (110 mg, 55%). CCF (tolueno/AcOEt 6:1) R_f 0.39; [α]_D²⁰ -1.7° (c 1.0, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (m, 2H, Ar), 7.60 (m, 1H, Ar), 7.46 (m, 2H, Ar), 7.19 (m, 5H, Ar), 6.89 (m, 2H, Ar), 6.73 (m, 2H, Ar), 5.49 (dd, J_{1,2} = 7.6 Hz, J_{2,3} =

9.2 Hz, 1H, H-2), 5.02 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.6$ Hz, H-1), 4.78 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.30 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_8\text{F}_{17}$), 4.17 (pt, 1H, H-4), 4.00 (d, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-5), 3.79 (pt, 1H, H-3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 2.29-1.97 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_8\text{F}_{17}$); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 169.0, 165.3 (CO), 156.0-114.5 (Ar), 101.5 (C-1), 80.8 (C-3), 74.7 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 74.4 (C-5), 73.1 (C-2), 71.8 (C-4), 64.4 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_8\text{F}_{17}$), 55.5 (OCH_3), 28.1-20.0 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}_8\text{F}_{17}$); HR MS: m/z : calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{31}\text{F}_{17}\text{NaO}_9$: 977.1594; encontrado: 977.1627 [$M+\text{Na}$] $^+$.

***O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*O*-(4-*O*-acetil-6-*O*-bencil-2-desoxi-2-tricloroacetamido- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosido de 4-metoxifenilo) uronato de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecilo (104)**



El donador **79** (62 mg, 0.09 mmol) y el aceptor **101** (65 mg, 0.07 mmol) se coevaporaron con tolueno y se disolvieron en CH_2Cl_2 seco (1 mL) en presencia de tamiz molecular 4Å activado. La reacción se agitó, bajo atmósfera de argón, durante 10 minutos a 0°C y, a continuación, se añadió TMSOTf (140 μL de una solución 0.25 M en CH_2Cl_2). Después de 15 minutos agitando a 0°C , la mezcla de reacción se neutralizó con trietilamina y se concentró a vacío. El residuo se purificó usando una columna FSPE. Los compuestos no fluorados se eluyeron con $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20 y el producto fluorado se eluyó con 100% MeOH . La fracción fluorada se concentró y se utilizó en un segundo ciclo de glicosidación con el donador **79** (16 mg, 0.022 mmol). La mezcla de reacción se disolvió en CH_2Cl_2 seco (1 mL) en presencia de tamiz molecular 4Å activado y se dejó bajo agitación a 0°C durante 10 minutos. A continuación, se añadió TMSOTf (25 μL de una solución 0.18 M en CH_2Cl_2). Después de 15 minutos agitando a 0°C , la mezcla de reacción se

neutralizó con Et_3N y se concentró a vacío. El residuo se purificó utilizando una columna FSPE como hemos descrito anteriormente. La fracción eluida en metanol se concentró para dar el disacárido **102** junto con una pequeña cantidad de aceptor **101** sin reaccionar. Datos para el disacárido **102**: CCF (tolueno/ AcOEt 6:1) R_f 0.29; Datos seleccionados del espectro de $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.41 (dd, 1H, H-2A), 5.18 (pt, 1H, H-3B), 5.12 (pt, 1H, H-4B), 5.09 (d, 1H, H-1A), 5.03 (d, 1H, H-1B), 4.93, 4.67 (2d, 2H, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.34-4.27 (m, 3H, H-4A y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.18-4.07 (m, 4H, H-2B, H-5A y COOCH_2), 3.88 (pt, 1H, H-3A), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.67 (m, 1H, H-5B), 3.51 (dd, 1H, H-6B), 3.35 (dd, 1H, H-6B), 2.76-2.43 (m, 4H, $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$). ESI MS: m/z : calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{55}\text{Cl}_3\text{F}_{17}\text{NNaO}_{17}$: 1514.1; encontrado: 1514.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

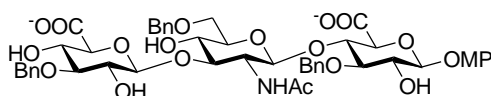
El residuo que contenía el disacárido **102** (75 mg) se disolvió en CH_2Cl_2 (1.5 mL) y, a continuación, se añadió hidracina monohidrato (67 μL de una solución 1 M en Py/AcOH 3:2). Después de 2 horas agitando a temperatura ambiente, la reacción se paró con acetona. La mezcla de reacción se concentró a vacío, se coevaporó con tolueno y se purificó por columna FSPE. La fracción eluida con metanol contenía el aceptor **103**: datos seleccionados del espectro de $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.43 (dd, 1H, H-2A), 5.09 (d, 1H, H-1A), 4.95 (m, 3H, H-1B, H-4B y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.66 (d, 1H, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.30-4.11 (m, 6H, H-4A, H-5A y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 3.87 (m, 2H, H-3A y H-2B), 3.79 (m, 1H, H-3B), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.61 (m, 1H, H-5B), 3.53 (dd, 1H, H-6B), 3.37 (dd, 1H, H-6B). ESI MS: m/z : calculado para $\text{C}_{55}\text{H}_{49}\text{Cl}_3\text{F}_{17}\text{NO}_{15}$: 1416.2; encontrado: 1416.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

El residuo que contenía el aceptor **103** (70 mg) y el donador **78** (45 mg, 0.062 mmol) se coevaporaron con tolueno y se disolvieron en CH_2Cl_2 seco (1 mL) en presencia de tamiz molecular 4\AA activado. La mezcla de reacción se agitó, bajo atmósfera de argón, durante 10 minutos a 0°C y, a continuación, se añadió TMSOTf (28 μL de una solución 0.22 M en CH_2Cl_2). Después de 15

minutos, la reacción se neutralizó con Et₃N y se concentró a vacío. El residuo se purificó por columna FSPE. Los compuestos no fluorados se eluyeron con MeOH/H₂O 80% y el compuesto deseado con MeOH 100%. Esta última fracción se concentró y se sometió a un segundo ciclo de glicosidación. El residuo fluorado y donador **78** (45 mg, 0.062 mmol) adicional se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (1 mL) en presencia de tamiz molecular 4Å activado. La mezcla de reacción se agitó, bajo atmósfera de argón, durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió TMSOTf (1.1 µL, 6.2 µmol). Después de 15 minutos, la reacción se neutralizó con Et₃N y se concentró a vacío. El residuo se purificó por columna FSPE. La fracción eluida con metanol se volvió a purificar por PLC (cromatografía en capa preparativa) (tolueno/AcOEt 6:1) para dar el trisacárido **104** (16 mg, 12% desde **101**). CCF (tolueno/AcOEt 4:1) R_f 0.32; [α]_D²⁰ +6.8° (c 1.0, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (m, 2H, Ar), 7.94 (m, 2H, Ar), 7.56 (m, 2H, Ar), 7.46-7.06 (m, 25H, Ar y NH), 6.86 (m, 2H, Ar), 6.72 (m, 2H, Ar), 5.40 (dd, 1H, J_{1,2} = 6.5 Hz, J_{2,3} = 8.1 Hz, H-2A), 5.27-5.22 (m, 2H, H-2C y H-4C), 5.16-5.13 (m, 2H, H-1B y CH₂(Bn)), 5.10-5.06 (m, 2H, H-1A y CH₂(Bn)), 4.97 (pt, 1H, H-4B), 4.85 (d, 1H, J_{1,2} = 7.5 Hz, H-1C), 4.76 (d, 1H, J_{gem} = 11.8 Hz, CH₂(Bn)), 4.60-4.52 (m, 3H, CH₂(Bn)), 4.44-4.29 (m, 4H, H-4A, H-3B y CH₂(Bn)), 4.16 (m, 1H, CH₂(CH₂)₂C₈F₁₇), 4.09 (m, 1H, CH₂(CH₂)₂C₈F₁₇), 4.05 (d, 1H, J_{4,5} = 8.1 Hz, H-5A), 3.99 (d, 1H, J_{4,5} = 10.0 Hz, H-5C), 3.83 (pt, 1H, H-3A), 3.76 (pt, 1H, H-3C), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.62 (m, 1H, H-5B), 3.49 (m, 2H, H-2B y H-6aB), 3.31 (dd, 1H, J_{5,6b} = 5.4 Hz, J_{6a,6b} = 10.7 Hz, H-6bB), 2.54-2.28 (m, 4H, OCO(CH₂)₂), 2.21-2.02 (m, 7H, CH₂(CH₂)₂C₈F₁₇ y COCH₃), 1.71 (COCH₃); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 205.9, 171.3, 169.8, 168.6, 167.1, 165.1, 164.6, 161.5 (CO), 155.6-114.4 (Ar), 100.5 (C-1A), 98.6 (C-1C), 98.4 (C-1B), 92.6 (CCl₃), 79.1 (C-3A o C-3C), 78.9 (C-3A o C-3C), 76.3 (C-4A o C-3B), 75.7 (C-4A o C-3B), 74.6, 74.3, 74.0, 73.8, 73.6, 73.1, 72.6, 72.5, 71.1 (3CH₂(Bn), C-5A, C-5B, C-2A, C-4C, C-5C y C-2C), 69.2 (C-6B), 68.2 (C-4B), 68.0 (CH₂(Bn)), 64.5

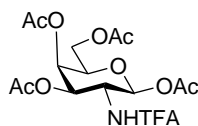
(CH₂(CH₂)₂C₈F₁₇), 58.8 (C-2B), 55.4 (OCH₃), 37.5 (OCO(CH₂)₂), 29.7 (COCH₃), 27.6 (OCO(CH₂)₂), 28.0-27.2 (CH₂(CH₂)₂C₈F₁₇), 20.4 (COCH₃). HR MS: *m/z*: calculado para C₈₇H₇₉Cl₃F₁₇NNaO₂₄: 1972.3684; encontrado: 1972.3987 [M+Na]⁺.

***O*-(ácido 3-*O*-bencil-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-*O*-(2-acetamido-6-*O*-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosil)-(1→4)- ácido 3-*O*-bencil-β-D-glucopiranosidurónico de 4-metoxifenilo (99)**



A una disolución del trisacárido **104** (15 mg, 7.7 μmol) en THF (1.2 mL) se añadieron, a una temperatura de -5°C, H₂O₂ (30%, 0.3 mL) y LiOH (0.19 mL de una solución 0.7M). Después de 24 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadieron MeOH (1 mL) y una solución de NaOH (385 μL, 4M). Después de 4 días agitando a temperatura ambiente, la reacción se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120 (H⁺), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en MeOH (2.1 mL) y se añadieron trietilamina (14 μL) y Ac₂O (14 μL) a 0°C. Después de 1 hora agitando a t.a., la reacción se coevaporó con tolueno y metanol. Se añadió trietilamina (0.3 mL) y el crudo se purificó por Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1:1). El residuo se convirtió en sal sódica por elución en Dowex 50WX4-Na⁺ con MeOH/H₂O 4:1 para dar **99** (6.9 mg, 90%).

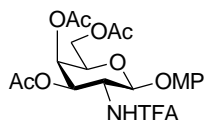
1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopiranososa (128)



A una solución de hidrocloreuro de D-galactosamina **124** (15 g, 0.07 mol) en NaOH 1 M (72 mL) se añadió, bajo intensa agitación, p-anisaldehído (10.5

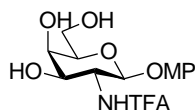
mL, 0.08 mol). Después de pocos minutos, el crudo de reacción empezó a cristalizar. La reacción se enfrió durante 2 horas y el precipitado se filtró y se lavó con H₂O fría y una mezcla MeOH/EtOH 1:1, obteniendo la 2-desoxi-2-[*p*-metoxibenciliden(amino)]-D-galactopiranososa **125** (12.3 g, 60%). El compuesto **125** se disolvió en una mezcla piridina (64 mL)/AcOH (54 mL) y se agitó durante 1 hora en un baño de hielo, y durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución amarilla se vertió sobre 300 mL de agua/hielo y el precipitado blanco se filtró, se lavó con H₂O fría y se secó. Se obtuvo así la 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-[*p*-metoxibenciliden(amino)]-β-D-galactopiranososa **126** (13.4 g, 70%). El compuesto obtenido se disolvió en acetona caliente (134 mL), y se añadió HCl (5 M, 5.2 mL) con inmediata formación de un precipitado. El precipitado se filtró, se lavó con Et₂O y se secó (MgSO₄) para dar **127** (8.9 g, 80%). A una suspensión de **127** (2.36 g, 6.14 mmol) en CH₂Cl₂ (46 mL) y piridina (2.4 mL), mantenida en frío por un baño de agua y hielo, se añadió anhídrido trifluoroacético (2.4 mL). Después de 30 minutos agitando la solución se lavó con H₂O, se secó y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 2:1) obteniendo **128** (2.17 g, 80%). CCF (Hex/AcOEt 2:1) R_f 0.27; [α]_D²⁰ +5.6° (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.02 (bs, 1H, NH), 5.77 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.7 Hz, H-1), 5.40 (dd, 1H, H-4), 5.18 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 11.3 Hz, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, H-3), 4.49 (m, 1H, H-2), 4.28–4.03 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.18–2.00 (m, 12H, CH₃); ESI MS: m/z: calculado para C₁₆H₂₀F₃NO₁₀Na: 466.1; encontrado: 466.1 [M + Na]⁺.

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-2-trifluoroacetamido- β -D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (**129**)



A una solución de **128** (7 g, 15.8 mmol) y 4-metoxifenol (4.9 g, 39.5 mmol) en CH_2Cl_2 seco (70 mL) a 0°C se añadió TMSOTf (430 μL , 2.37 mmol). Después de agitar 45 minutos a 0°C , la mezcla de reacción se neutralizó con Et_3N y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/ AcOEt 3:1) para dar **129** (7.8 mg, 97%). CCF (Tolueno/ AcOEt 4:1); R_f 0.17; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -3.5^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.98 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}} = 9.1$ Hz, NH), 6.92 (m, 2H, Ar), 6.78 (m, 2H, Ar), 5.41 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, H-4), 5.31 (dd, 1H, $J_{2,3} = 11.3$ Hz, H-3), 5.04 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 4.26–4.12 (2dd, 2H, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz, H-6a, H-6b), 4.03 (br dd, 1H, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.5$ Hz, H-5), 3.76 (s, 3H, Me(OMP)), 2.18–2.00 (3s, 9H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 170.7, 170.6, 170.3 (COCH_3), 158.0 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 34.1$ Hz, COCF_3), 155.9, 151.0 (Ar-C), 118.8, 114.7 (Ar-CH), 115.6 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 287.0$ Hz, COCF_3), 100.4 (C-1), 71.1 (C-5), 69.5 (C-3), 66.4 (C-4), 61.6 (C-6), 55.7 (Me(OMP)), 51.8 (C-2), 20.5 ($\text{CH}_3(\text{Ac})$); HR MS: m/z: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_{10}\text{F}_3\text{Na}$: 530.1250; encontrado: 530.1268 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

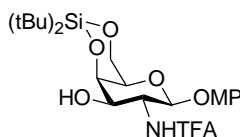
2-desoxi-2-trifluoroacetamido- β -D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (**130**)



A una solución de **129** (7.8 g, 15.4 mmol) en MeOH (110 mL) se añadió metóxido sódico (1.08 mL de una solución 2.17 M en MeOH). Después de 1 hora y media agitando, se neutralizó con resina ácida AMBERLITE IR-120

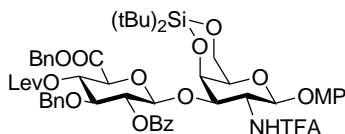
(H⁺), se filtró y se secó a vacío obteniendo **130** (5.7 g, 97%). CCF (CH₂Cl₂/MeOH 16:1) Rf 0.21; ¹H-RMN (300 MHz, MeOD): δ 6.97 (m, 2H, Ar), 6.82 (m, 2H, Ar), 4.91 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, H-1), 4.25 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 10.7 Hz, H-2), 3.91 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3.1 Hz, H-4), 3.87-3.71 (m, 6H, H-6a, H-6b, H-3, CH₃(OMP)), 3.64 (dd, 1H, H-5); HR MS: m/z: calculado para C₁₅H₁₈NO₇F₃Na: 404.0933; encontrado: 404.0923 [M + Na]⁺.

4,6-*O*-di-*tert*-butilsililén-2-desoxi-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (**122**)



A una solución de **130** (3.37 g, 8.85 mmol) en piridina seca (150 mL) a 0 °C se añadió tBu₂Si(OTf)₂ (3.03 mL, 9.3 mmol) y la reacción se agitó durante 12 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió MeOH (18 mL), se diluyó con AcOEt, y se lavó con HCl 1 M, NaHCO₃ ac. sat. y H₂O. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (tolueno/AcOEt 5:1) para dar **122** (4.1 g, 88%). CCF (Tolueno/AcOEt 3:1) Rf 0.30; [α]_D²⁰ -17° (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.92 (m, 2H, Ar), 6.87 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 9.1 Hz, NH), 6.78 (m, 2H, Ar), 4.97 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.4 Hz, H-1), 4.39 (d, 1H, *J*_{3,4} = 2.7 Hz, H-4), 4.24 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.09 (bq, 1H, H-2), 3.89 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 10.5 Hz, H-3), 3.75 (s, 3H, Me(OMP)), 3.46 (bs, 1H, H-5), 2.68 (bs, 1H, OH), 1.09, 1.06 (2s, 18H, C(CH₃)₃); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 158.2 (q, *2J*_{C,F} = 37.2 Hz, COCF₃), 155.9, 151.2 (Ar-C), 119.7 (Ar-CH), 115.9 (q, *1J*_{C,F} = 288.0 Hz, COCF₃), 114.6 (Ar-CH), 100.2 (C-1), 72.0 (C-4), 71.5 (C-5), 70.7 (C-3), 66.9 (C-6), 55.7 (Me(OMP)), 55.1 (C-2), 27.5 (C(CH₃)₃), 23.4, 20.9 (C(CH₃)₃); HR MS: m/z: calculado para C₂₃H₃₄F₃NO₇SiNa: 544.1954; encontrado: 544.1968 [M + Na]⁺.

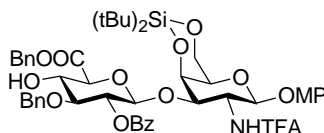
3-O-(3-O-bencil-2-O-benzoil-4-O-levulinoil-β-D-glucopiranosiluronato de bencilo)-4,6-O-di-*tert*-butilsililén-2-desoxi-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (123).



El donador **78** (2 g, 2.83 mmol) y el aceptor **122** (983 mg, 1.88 mmol) se coevaporaron con tolueno, se secaron a vacío, y se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (25 mL) en presencia de tamiz molecular activado 4Å. Después de 15 minutos agitando a 0°C y bajo atmosfera de argón, se añadió TMSOTf (51 μL, 0.28 mmol). Después de 20 minutos a 0°C, la mezcla de reacción se neutralizó con trietilamina y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 8:1) para dar **123** (1.93 g, 95%). CCF (Tolueno/AcOEt 5:1) R_f 0.57; [α]_D²⁰ +16.5° (c 1.0, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (m, 2H, Ar), 7.62 (m, 1H, Ar), 7.47 (m, 2H, Ar), 7.42-7.31 (m, 5H, Ar), 7.18-7.07 (m, 5H, Ar), 6.94 (m, 2H, Ar), 6.81 (m, 2H, Ar), 5.41-5.30 (m, 4H, H-2B, H-1B, H-4B, H-1A), 5.18 (2d, 2H, CH₂(Bn)), 4.68-4.53 (m, 3H, H-4A, CH₂(Bn)), 4.43 (dd, 1H, J_{2,3} = 11.3 Hz, J_{3,4} = 2.4 Hz, H-3A), 4.21-4.03 (m, 4H, H-6aA, H-6bA, H-5B, H-2A), 3.86 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 8.7 Hz, H-3B), 3.78 (s, 3H, Me(OMP)), 3.42 (s, 1H, H-5A), 2.62–2.22 (m, 4H, CH₂(Lev)), 2.13 (s, 3H, CH₃(Lev)), 1.09, 0.98 (2s, 18H, C(CH₃)₃); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 206.0 (CO(Lev)), 171.3, 167.0, 164.9 (CO(COObn, Bz, Lev)), 157.6 (q, ²J_{C,F} = 38.6 Hz, COCF₃), 155.8, 151.1, 137.2, 134.6 (Ar-C), 133.5 (Ar-CH), 129.8–127.8 (Ar), 120.0 (Ar-CH), 115.5 (q, ¹J_{C,F} = 288.5 Hz, COCF₃), 114.5 (Ar-CH), 99.5, 99.4 (C-1B, C-1A), 79.6 (C-3B), 74.5 (C-3A), 74.2 (CH₂(Bn)), 73.2 (C-4A), 72.5 (C-4B or C-2B), 72.2 (C-5B), 71.3 (C-5A), 70.7 (C-2B or C-4B), 68.1 (CH₂(Bn)), 67.0 (C-6A), 55.6 (Me(OMP)), 53.7 (C-2A), 37.6 (CH₂(Lev)), 29.8 (CH₃(Lev)), 27.7, 27.6, 27.4 (CH₂(Lev), C(CH₃)₃), 23.2, 20.8 (C(CH₃)₃);

HR MS: m/z: calculado para $C_{55}H_{64}NO_{16}F_3NaSi$: 1102.3844; encontrado: 1102.3820 $[M + Na]^+$.

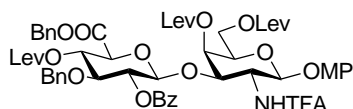
3-O-(3-O-bencil-2-O-benzoil-β-D-glucopiranosiluronato de bencilo)-4,6-O-di-tert-butilsililén-2-desoxi-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (134)



El compuesto **123** (300 mg, 0.28 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (4 mL) y, a continuación, se añadió hidrazina monohidrato (1.08 mL de una solución 0.5 M en Py/AcOH, 3:2). Después de 2 horas agitando a temperatura ambiente, la reacción se paró con acetona (1 mL), se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 1 M, $NaHCO_3$ aq. sat., y H_2O . La fase orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 8:1) obteniendo el compuesto **134** (260 mg, 95%). CCF (Tolueno/AcOEt 5:1) R_f 0.43; $[\alpha]_D^{20} +6.1^\circ$ (c 1.0, CH_2Cl_2); 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.00 (m, 2H, Ar), 7.61 (m, 1H, Ar), 7.46 (m, 2H, Ar), 7.43-7.31 (m, 5H, Ar), 7.23-7.12 (m, 5H, Ar), 6.98 (d, 1H, $J_{2,NH} = 6.5$ Hz, NH), 6.92 (m, 2H, Ar), 6.81 (m, 2H, Ar), 5.44 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1A), 5.39 (d, 1H, $CH_2(Bn)$), 5.34 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1B), 5.29 (dd, 1H, H-2B), 5.20 (d, 1H, $CH_2(Bn)$), 4.77 (2d, 2H, $CH_2(Bn)$), 4.62 (d, 1H, H-4A), 4.44 (dd, 1H, $J_{2,3} = 11.3$ Hz, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-3A), 4.19-4.05 (m, 2H, H-6aA, H-4B), 4.03-4.91 (m, 3H, H-6bA, H-5B, H-2A), 3.78 (s, 3H, Me(OMP)), 3.69 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3B), 3.35 (s, 1H, H-5A), 1.08, 1.00 (2s, 18H, $C(CH_3)_3$); ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ 169.0, 165.0 (CO(COOBn, Bz)), 157.7 (q, $^2J_{C,F} = 37.1$ Hz, COCF₃), 155.9, 151.1, 137.6, 134.4 (Ar-C), 133.5 (Ar-CH), 129.9-127.8 (Ar), 120.2 (Ar-CH), 115.4 (q, $^1J_{C,F} = 286.4$ Hz, COCF₃), 114.5 (Ar-CH), 100.3 (C-1B), 99.0 (C-1A), 81.0 (C-3B), 74.9 (C-3A), 74.7 ($CH_2(Bn)$), 73.8 (C-5B), 73.4 (C-4A), 72.5 (C-2B), 72.2 (C-4B),

71.3 (C-5A), 68.0 (CH₂(Bn)), 66.9 (C-6A), 55.6 (Me(OMP)), 54.2 (C-2A), 27.6, 27.4 (C(CH₃)₃), 23.2, 20.8 (C(CH₃)₃); HR MS: m/z: calculado para C₅₀H₅₈NO₁₄F₃NaSi: 1004.3476; encontrado: 1004.3511 [M + Na]⁺.

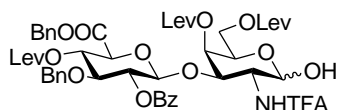
3-O-(3-O-bencil-2-O-benzoil-4-O-levulinoil-β-D-glucopiranosiluronato de bencilo)-2-desoxi-4,6-di-O-levulinoil-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (131)



A una solución de **123** (1.23 g, 1.14 mmol) en THF seco (25 mL) a 0°C se añadió el complejo (HF)_nPy (5.5 mL) bajo atmósfera de argón. Después de 2 horas agitando a 0°C, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con H₂O y NaHCO₃ aq. sat. hasta pH neutro. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para dar el correspondiente diol [CCF (Tolueno/AcOEt 1:4) R_f 0.46]. A una solución de dicitclohexilcarbodiimida (2.35 g, 11.4 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) a 0°C se añadió LevOH (2.32 mL, 22.8 mmol). Después de agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió, se filtró y se concentró para dar cuantitativamente anhídrido levulínico (Lev₂O, 11.4 mmol). Una solución del diol (1.14 mmol) en piridina seca (30 mL) se añadió, bajo atmósfera inerte de argón, a un matraz con Lev₂O (11.4 mmol) y DMAP (140 mg, 1.14 mmol). Después de agitar durante 5 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con HCl 1M, NaHCO₃ aq. sat. y H₂O. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 2:1) obteniendo el compuesto **131** (950 mg, 83%). CCF (Tolueno/AcOEt 2:1) R_f 0.37; [α]_D²⁰ +20° (c 1.0, CHCl₃); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.94 (m, 2H, Ar), 7.59 (m, 1H, Ar), 7.44 (m, 2H, Ar), 7.39-7.30 (m, 5H, Ar), 7.13-7.07 (m, 5H, Ar), 6.89 (m, 2H, Ar), 6.77 (m, 2H, Ar), 6.69 (bs, 1H, NH), 5.47 (d,

1H, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-4A), 5.32 (pt, 1H, H-4B), 5.28 (pt, 1H, H-2B), 5.19-5.11 (m, 3H, H-1A y CH₂(Bn)), 4.79 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-1B), 4.61-4.52 (m, 3H, H-3A y CH₂(Bn)), 4.15-4.09 (m, 2H, 2 x H-6A), 4.07 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-5B), 3.89-3.80 (m, 3H, H-5A, H-3B y H-2A), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.80-2.20 (m, 12H, 3 x OCO(CH₂)₂), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.14 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-RMNR (125 MHz, CDCl₃): δ 206.84 (CO(Lev)), 206.81 (CO(Lev)), 206.1 (CO(Lev)), 172.3 (CO), 171.5 (CO), 171.2 (CO), 166.9 (CO), 165.0 (CO), 157.6 (q, $J_{C,F} = 38.7$ Hz, COCF₃), 155.9 (Ar), 151.0 (Ar), 137.4 – 114.3 (Ar-C y Ar-CH), 115.5 (q, $J_{C,F} = 289.0$ Hz, COCF₃), 100.1 (C-1B), 98.9 (C-1A), 79.2 (C-3B), 74.2 (CH₂(Bn)), 73.2 (C-3A), 72.8 (C-5B), 72.6 (C-2B), 71.6 (C-5A), 70.8 (C-4B), 68.7 (C-4A), 67.9 (CH₂(Bn)), 62.3 (C-6A), 55.7 (OCH₃), 54.6 (C-2A), 38.2 (OCO(CH₂)₂), 38.0 (OCO(CH₂)₂), 37.7 (OCO(CH₂)₂), 29.9 (COCH₃), 29.8 (2 x COCH₃), 28.0 (OCO(CH₂)₂), 27.9 (OCO(CH₂)₂), 27.8 (OCO(CH₂)₂); HR MS: m/z : calculado para C₅₇H₆₀F₃NNaO₂₀: 1158.3558; encontrado: 1158.3596 [$M+Na$]⁺.

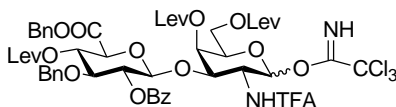
3-O-(3-O-bencil-2-O-benzoil-4-O-levulinoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-2-desoxi-4,6-di-O-levulinoil-2-trifluoroacetamido- α,β -D-galactopiranososa (132)



A una solución de **131** (950 mg, 0.84 mmol) en CH₂Cl₂/MeCN (1:2; 22.8 mL), se añadió CAN (7.6 mL de una solución 0.44 M en H₂O). La reacción se agitó vigorosamente durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con AcOEt. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ aq. sat. y H₂O, se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 3:1) obteniendo el compuesto **132** como una mezcla de anómeros α/β (695 mg, 81%). CCF (Tolueno/AcOEt 3:2) R_f 0.44 y 0.31; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) (datos para

el anómero α): δ 7.94 (m, 2H, Ar), 7.57 (m, 1H, Ar), 7.44-7.32 (m, 7H, Ar), 7.15-7.05 (m, 5H, Ar), 6.69 (d, 1H, $J_{2,NH} = 8.7$ Hz, NH), 5.39 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.3$ Hz, H-4A), 5.31-5.25 (m, 3H, H-1A, H-2B y H-4B), 5.19-5.11 (2d, 2H, $J_{gem} = 11.9$ Hz, CH₂(Bn)), 4.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, H-1B), 4.55 (2d, 2H, $J_{gem} = 11.6$ Hz, CH₂(Bn)), 4.40-4.32 (m, 2H, H-2A y H-5A), 4.27-4.20 (m, 2H, H-6aA y H-3A), 4.05 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, H-5B), 3.94 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 8.8$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, H-6bA), 3.82 (pt, 1H, H-3B), 2.84-2.21 (m, 12H, 3 x OCO(CH₂)₂), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 2.09 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) (datos para el anómero α): δ 208.8 (CO(Lev)), 206.9 (CO(Lev)), 206.0 (CO(Lev)), 172.2 (CO), 171.8 (CO), 171.2 (CO), 166.8 (CO), 165.0 (CO), 157.1 (q, COCF₃), 137.3-127.8 (Ar-C y Ar-CH), 115.7 (q, COCF₃), 99.6 (C-1B), 91.4 (C-1A), 79.3 (C-3B), 74.2 (CH₂(Bn)), 73.0 (C-5B), 72.2 (C-2B), 72.0 (C-3A), 71.0 (C-4B), 68.9 (C-4A), 68.0 (CH₂(Bn)), 67.0 (C-5A), 63.0 (C-6A), 50.1 (C-2A), 38.5 (OCO(CH₂)₂), 38.1 (OCO(CH₂)₂), 37.7 (OCO(CH₂)₂), 30.0 (COCH₃), 29.9 (COCH₃), 29.8 (COCH₃), 28.3 (OCO(CH₂)₂), 28.0 (OCO(CH₂)₂), 27.7 (OCO(CH₂)₂); HR MS: m/z : calculado para C₅₀H₅₄NO₁₉NaF₃: 1052.3140; encontrado: 1052.3175 [M+Na]⁺.

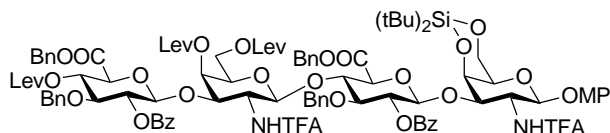
Tricloroacetimidato de 3-O-(3-O-bencil-2-O-benzoil-4-O-levulinoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-2-desoxi-4,6-di-O-levulinoil-2-trifluoroacetamido- α,β -D-galactopiranosilo (133)



El disacárido **132** (120 mg, 0.11 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (3 mL) y, a continuación, se añadieron Cl₃CCN (234 μ L, 2.3 mmol) y DBU (261 μ L de una solución 0.066 M en CH₂Cl₂). Después de agitar durante 5 horas a temperatura ambiente, la reacción se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 5:1 + 1% Et₃N) obteniendo **133** (95 mg, 70%) como mezcla de anómeros α/β (2.17 g,

80%). CCF (Tolueno/Acetona 3:2) Rf 0.65 y 0.48; $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) (datos para el anómero α): δ 8.71 (s, 1H, NH(TCA)), 7.96 (m, 2H, Ar), 7.59 (m, 1H, Ar), 7.44 (m, 2H, Ar), 7.37 (m, 5H, Ar), 7.13-7.05 (m, 5H, Ar), 7.00 (br d, $J_{\text{NH},2} = 7.3$ Hz, 1H, NH(TFA)), 6.54 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, 1H, H-1A), 5.55 (br d, 1H, H-4A), 5.35 (pt, 1H, H-2B), 5.23 (pt, 1H, H-4B), 5.18-5.06 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1B), 4.62-4.51 (m, 3H, H-2A y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.35 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-3A), 4.28 (m, 1H, H-5A), 4.12-4.04 (m, 3H, H-5B y 2 x H-6A), 3.85 (pt, 1H, H-3B), 2.74-2.16 (m, 12H, $3\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.14 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.03 (s, 3H, COCH_3).

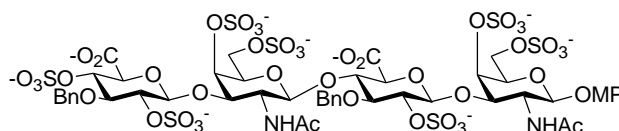
***O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil-4-*O*-levulinoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-*O*-(2-desoxi-4,6-di-*O*-levulinoil-2-trifluoroacetamido- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -D-glucopiranosiluronato de bencilo)-(1 \rightarrow 3)-2-desoxi-4,6-*O*-di-*tert*-butilisilén-2-trifluoroacetamido- β -D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (135)**



El donador **133** (143 mg, 0.12 mmol) y el aceptor **134** (67 mg, 0.07 mmol) se coevaporaron con tolueno, se concentraron a vacío y se disolvieron en CH_2Cl_2 seco (3 mL) en presencia de tamiz molecular activado 4Å. Después de agitar durante 10 minutos a 0 °C, se añadió TMSOTf (264 μL de una solución 0.09 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón. Después de agitar durante 30 minutos a 0°C, la reacción se neutralizó con Et_3N , se filtró, y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/Acetona 5:1) obteniendo el tetrasacárido **135** (97 mg, 71%). CCF (Tolueno/AcOEt 2:1) Rf 0.34; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +11^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.96 (m, 2H, Ar), 7.91 (m, 2H, Ar), 7.57 (m, 2H, Ar), 7.46-

7.29 (m, 14H, Ar), 7.15-7.08 (m, 10H, Ar), 6.90 (m, 2H, Ar), 6.84 (d, 1H, $J_{2,NH} = 6.9$ Hz, NH), 6.78 (m, 2H, Ar), 6.52 (d, 1H, $J_{2,NH} = 8.7$ Hz, NH), 5.37-5.33 (m, 2H, H-1A y H-4D), 5.27-5.15 (m, 8H, H-1B, H-2B, H-4C, H-2D y 2 x CH₂(Bn)), 4.78 (d, 1H, $J_{gem} = 11.1$ Hz, CH₂(Bn)), 4.73 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.4$ Hz, H-1D), 4.61-4.52 (m, 3H, H-4A y CH₂(Bn)), 4.46 (d, 1H, $J_{gem} = 11.1$ Hz, CH₂(Bn)), 4.33 (dd, 1H, $J_{2,3} = 11.1$ Hz, $J_{3,4} = 1.9$ Hz, H-3A), 4.15-4.08 (m, 3H, H-1C, H-5D y H-6A), 4.05-4.02 (m, 2H, H-4B y H-6A), 3.96-3.81 (m, 6H, H-2A, H-2C, 2 x H-6C H-5B y H-3D), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (m, 1H, H-3C), 3.63 (m, 1H, H-3B), 3.34 (m, 2H, H-5A y H-5C), 2.75-2.21 (m, 12H, 3 x OCO(CH₂)₂), 2.18 (s, 3H, COCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 1.04 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.99 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 207.1 (CO(Lev)), 206.6 (CO(Lev)), 206.0 (CO(Lev)), 172.2 (CO), 171.4 (CO), 171.2 (CO), 168.6-164.9 (4 x CO), 157.6 (2q, 2 x COCF₃), 156.0-114.5 (Ar-C y Ar-CH), 117.9 (2q, 2 x COCF₃), 100.2 (C-1B), 99.8, 99.7 (C-1C y C-1D), 99.3 (C-1A), 80.1 (C-3B), 79.2 (C-3D), 77.8 (C-4B), 75.4 (C-3A), 75.1 (CH₂(Bn)), 74.3, 74.2, 74.1, 73.2, 73.0 (C-3C, C-5B, CH₂(Bn), C-4A, C-5D), 72.5, 72.4 (2C: C-2B o C-4C o C-2D o CH₂(Bn)), 71.4, 71.1 (C-5A y C-5C), 70.9 (C-4D), 68.2, 68.1, 67.9 (3C: CH₂(Bn) o C-2B o C-4C o C-2D), 67.0 (C-6A), 61.5 (C-6C), 55.7 (OCH₃), 54.0, 53.0 (C-2A y C-2C), 38.1 (OCO(CH₂)₂), 38.0 (OCO(CH₂)₂), 37.7 (OCO(CH₂)₂), 29.9 (COCH₃), 29.8 (COCH₃), 29.7 (COCH₃), 28.1 (OCO(CH₂)₂), 27.9 (OCO(CH₂)₂), 27.7 (OCO(CH₂)₂), 27.6, 27.5, 27.5 (C(CH₃)₃), 23.3, 20.8 (C(CH₃)₃); HR MS: m/z : calculado para C₁₀₀H₁₁₀N₂O₃₂F₆NaSi: 2015.6607; encontrado: 2015.6607 [M+Na]⁺.

O-(ácido 3-*O*-bencil-2,4-di-*O*-sulfo-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-4,6-di-*O*-sulfo-β-D-galactopiranosil)-(1→4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-4,6-di-*O*-sulfo-β-D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (**139**)



Un exceso de $(\text{HF})_n \cdot \text{Py}$ (102 μL , 3.8 mmol) se añadió a una solución de **135** (39 mg, 0.02 mmol) en THF seco (1.0 mL) a 0°C. Después de 24 horas agitando a 0°C, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O y NaHCO_3 aq. sat. hasta pH neutro. La fase orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Tolueno/ AcOEt 2:3) para dar **136** (27 mg, 75%). CCF (Tolueno/ AcOEt 1:2) R_f 0.36; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.96 (m, 2H, Ar), 7.86 (m, 2H, Ar), 7.56 (m, 2H, Ar), 7.46-7.33 (m, 14H, Ar), 7.13-7.06 (m, 10H, Ar), 6.86 (m, 2H, Ar), 6.74 (m, 2H, Ar), 5.34-5.11 (m, 9H, H-4D, H-2D, H-1A, H2B, H-4C y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.75 (m, 3H, H-1B, H-1D y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.60-4.49 (m, 4H, H-1C y $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 4.38 (bs, 1H, H-3A), 4.15 (bs, 1H, H-4B), 4.08-3.97 (m, 4H, H-4A, H-5D, H-5B y H-3C), 3.90 (m, 3H, H-2C y 2 x H-6A o C), 3.82 (m, 3H, H-2A, H-3D y H-6A o C), 3.72 (m, 4H, H-3B y OCH_3), 3.56 (m, 3H, H-5A, H-5C y H6A o C), 2.74-2.17 (m, 12H, 3x $\text{OCO}(\text{CH}_2)_2$), 2.12 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3); Datos seleccionados del espectro de RMN de ^{13}C (obtenido de un experimento HSQC, 100 MHz, CDCl_3) δ 100.1 (C-1B), 99.7 (C-1D), 99.6 (C-1C), 98.7 (C-1A), 79.3 (C-3B), 79.1 (C-3D), 77.5 (C-3A), 77.3 (C-4B), 74.5 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 74.1 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 74.1 (C-5B o 5D), 74.0 (C-5A o 5C), 73.9 (C-3C), 72.7 (C-5B o 5D), 72.4 (C-2B, C4C), 71.0 (C-5A o 5C), 70.7 (C-4D), 68.3 (C-4A), 68.0 (C-2D, 2 x $\text{CH}_2(\text{Bn})$), 62.6 (C-6A o C), 61.7 (C-6A o C),

55.7 (COCH₃), 54.1 (C-2A), 53.2 (C-2C); HR MS: *m/z*: calculado para C₉₂H₉₄F₆N₂Na₂O₃₂: 949.2739; encontrado: 949.2735 [*M*+2Na]²⁺.

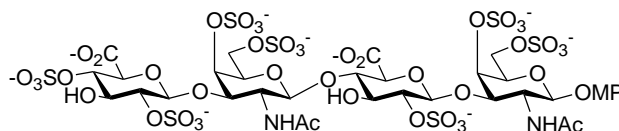
H₂O₂ (30%, 0.26 mL) y 0.16 mL de una solución 0.7 M de LiOH se añadieron, a -5°C, a una solución de **136** (12 mg, 6.5 μmol) en THF (1.0 mL). Después de 24 horas agitando a temperatura ambiente, se añadieron 1 mL de MeOH y una solución de NaOH (4 M, 0.33 mL). Después de 3 días agitando a temperatura ambiente, la reacción se neutralizó con resina ácida Amberlite IR-120 (H⁺), se filtró y se concentró para dar **137**. ESI MS: *m/z*: calculado para C₄₅H₅₆N₂NaO₂₂: 999.3; encontrado: 999.4 [*M*+Na]⁻.

A una solución de **137** (6.5 μmol) en MeOH seco a 0°C se añadieron Et₃N (12 μL, 85 μmol) y Ac₂O (12 μL, 129 μmol). Después de agitar durante 3 horas a temperatura ambiente, se añadieron 0.3 mL de trietilamina y la reacción se coevaporó con tolueno y metanol. El residuo se purificó por Sephadex LH-20 (MeOH/CH₂Cl₂ 1:1) obteniendo el compuesto **138** como sal de trietilamonio. La sal sódica de **138** (6.2 mg, 90%) se obtuvo por tratamiento con resina Amberlite IR-120 (H⁺) en MeOH (pH ~ 3), filtración, tratamiento con NaOH 0.04 M (pH ~ 7) y evaporación. ¹H-RMN (500 MHz, MeOD, datos para la sal sódica): δ 7.58 (m, 2H, Ar), 7.44 (m, 2H, Ar), 7.34-7.20 (m, 6H, Ar), 6.98 (m, 2H, Ar), 6.82 (m, 2H, Ar), 5.05 (d, 1H, *J*_{gem} = 10.3 Hz, CH₂(Bn)), 4.93 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, H-1A), 4.88 (m, 2H, CH₂(Bn)), 4.72 (d, 1H, *J*_{gem} = 10.3 Hz, CH₂(Bn)), 4.62 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, H-1C), 4.43 (m, 2H, H-1B y H-1D), 4.27 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, *J*_{2,3} = 10.7 Hz, H-2A), 4.19-4.12 (m, 3H, H-2C, H-4C y H-4A), 3.96 (m, 1H, H-4B), 3.86-3.76 (m, 4H, H-3A y 3 x H-6A o C), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.72-3.56 (m, 6H, H-5B, H-6A o C, H-3C, H-5A o C, H-4D y H-5D), 3.51 (m, 1H, H-5A o C), 3.46 (m, 2H, H-2B y H-3B), 3.41 (m, 2H, H-2D y H-3D), 2.05 (s, 3H, NHCOCH₃), 2.05 (s, 3H, NHCOCH₃); Datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HSQC, 100 MHz, MeOD) δ 128.5-113.7 (Ar), 104.2 (C-1B y C-1D), 100.6 (C-1A), 100.0 (C-1C), 84.1 (C-3D), 82.6 (C-3C), 82.5 (C-3B), 80.6 (C-3A),

77.6 (C-4B), 76.4 (C-5B), 75.8 (C-5A o C), 75.2 (2C: C-4D o C-5D o C-5A o C), 75.0 (CH₂(Bn)), 74.0 (CH₂(Bn)), 73.0 (C-2D), 72.7 (C-2B), 72.0 (C-4D o C-5D o C-5A o C), 67.6 (C-4A y C-4C), 61.1 (C-6A y C-6C), 54.4 (COCH₃), 51.5 (C-2C), 51.2 (C-2A), 22.1 (NHCOCH₃), 21.6 (NHCOCH₃); HR MS: *m/z*: calculado para C₄₉H₆₀N₂O₂₄: 530.1773; encontrado: 530.1775 [*M*]²⁻.

El compuesto **138** (6 mg, 5.4 μmol) y el complejo SO₃: Me₃N (26 mg, 0.19 mmol) se disolvieron en DMF seca (1.5 mL) y se agitaron durante 2 horas a 100°C usando radiación de microondas (potencia 20 W). El vial de reacción se dejó enfriar y, a continuación, se añadieron Et₃N (150 μL) y MeOH (1 mL). El residuo se purificó por Sephadex LH-20 (MeOH 100%) obteniendo **139** como sal de trietilamonio. El residuo se convirtió en la correspondiente sal sódica por elución por columna Dowex 50WX4-Na⁺ con MeOH/H₂O 9:1 (5 mg, 56%). ¹H-RMN (500 MHz, D₂O, 40 °C, datos para la sal sódica): δ 7.62 (m, 2H, Ar), 7.50-7.36 (m, 8H, Ar), 7.12 (m, 2H, Ar), 7.00 (m, 2H, Ar), 5.31 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, H-1A), 4.96 (m, 2H, H-4A y H-4C), 4.93-4.85 (m, 4H, H-1B o D, H-4D y CH₂(Bn)), 4.80-4.71 (m, 4H, H-1C, H-1D o B, y CH₂(Bn)), 4.41 (m, 2H, H-2B y H-2D), 4.36-4.23 (m, 5H, H-3D o H-5D, H-3A y 3 x H-6A o C), 4.20 (m, 2H, H-3D o H-5D, y H-5A o C), 4.15 (m, 2H, H-4B y H-3C), 4.10 (m, 1H, H-6A o C), 3.99 (m, 2H, H-2C y H-2A), 3.93 (m, 1H, H-5A o C), 3.88 (pt, 1H, H-3B), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (m, 1H, H-5B), 2.09 (NHCOCH₃), 2.08 (NHCOCH₃); Datos seleccionados del espectro de RMN de ¹³C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, D₂O, 40°C) δ 130.6-116.4 (Ar), 103.8 (C-1D o B), 102.4 (C-1B o D), 101.6 (C-1A), 101.4 (C-1C), 81.6 (C-3B), 80.0 (C-2B y 2D), 80.0 (C-5A/C o C-3D o C-5D) 79.5 (C-3D o 5D), 78.7 (C-5B), 78.6 (C-3C y C-4B), 77.9 (C-3A), 77.2 (C-4D), 76.9 (C-4A y C-4C), 75.1 (CH₂(Bn)), 74.2 (CH₂(Bn)), 74.1 (C-5A/C o C-3D o C-5D), 73.4 (C-5A o 5C), 69.3 (C-6A o 6C), 68.6 (C-6A o 6C), 57.2 (OCH₃), 53.9 (C-2A y C-2C), 23.9 (2x NHCOCH₃).

O-(ácido 2,4-di-O-sulfo-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-O-(2-acetamido-2-desoxi-4,6-di-O-sulfo-β-D-galactopiranosil)-(1→4)-O-(ácido 2-O-sulfo-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-4,6-di-O-sulfo-β-D-galactopiranosido de 4-metoxifenilo (140)



Una solución de **139** (4.0 mg, 2.5 μmol , sal sódica) en $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (3.6 mL/0.4 mL) se hidrogenó a una presión de 1.5 bar en presencia de $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (12 mg). Después de 24 horas, la suspensión se filtró sobre celita y se concentró para dar **140** después de liofilización (3.4 mg, 97 %). ^1H -RMN (500 MHz, D_2O , datos para la sal sódica): δ 7.10 (m, 2H, Ar), 6.99 (m, 2H, Ar), 5.22 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1A), 4.95 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-4A), 4.93 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4C), 4.77 (m, 2H, H-1C y H-1D), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1B), 4.51 (pt, 1H, H-4D), 4.36-4.31 (m, 2H, 2 x H-6A o C), 4.28-4.21 (m, 6H, 2 x H-6A o C, H-5A o C, H-2D, H-3A y H-2B), 4.16-4.08 (m, 4H, H-3C, H-5A o C, H-2C y H-2A), 4.03 (pt, 1H, H-3D), 3.98 (d, 1H, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-5D), 3.93 (pt, 1H, H-4B), 3.85-3.81 (m, 4H, H-3B y OCH_3), 3.72 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-5B), 2.07 (NHCOCH_3), 2.06 (NHCOCH_3); Datos seleccionados del espectro de RMN de ^{13}C (obtenido de un experimento HSQC, 125 MHz, D_2O) δ 119.6 (Ar), 116.2 (Ar), 103.8 (C-1B), 102.9 (C-1D), 102.6 (C-1C), 101.7 (C-1A), 81.5 (C-4B), 80.7 (C-2B y C-2D), 79.0 (C-4D), 77.9 (C-3A), 77.8 (C-5B), 77.5 (C-3C y C-5D), 77.0 (C-4A y C-4C), 74.4 (C-3B), 74.2 (C-3D), 73.9 (C-5A o C), 73.5 (C-5A o C), 69.0 (C-6A o C), 68.7 (C-6A o C), 56.8 (OCH_3), 53.3 (C-2A y C-2C), 23.7 (2x NHCOCH_3). ES-MS: m/z : calculado para $[\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{Na}_7\text{O}_{45}\text{S}_7]^{2-}$: 796.9; encontrado: 796.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Procedimiento general para la F-SPE.

En un tubo de plástico de 10 ml se añadió gel de sílice FluoroFlash (3 g.). La columna F-SPE se lavó con DMF (1 mL) y luego se preconditionó con MeOH/H₂O 80:20 (10 mL). A continuación, el crudo de reacción (100 mg) se disolvió en DMF (0.8 mL) y se cargó en la columna. La elución de la fracción fluorofóbica se llevó a cabo con 10 mL de MeOH/H₂O 80:20. Los compuestos fluorados se eluyeron usando MeOH 100% (16 mL). Para regenerar la columna F-SPE se lavó con acetona (10 mL).

Estudios de interacción glicosaminoglicano-proteína mediante inmovilización de oligosacáridos a microplacas funcionalizadas.

Los oligosacáridos **141-144** y el monosacárido **145** se disolvieron en un tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 9.6) que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1 mM), obteniendo soluciones 10 μ M de los diferentes azúcares. Estas soluciones (20 μ L por pocillo) se incubaron en los pocillos de microplacas de tipo Nunc Inmovilizador Amino™ 384 (Thermo Scientific). Los pocillos considerados como blanco se incubaron con 100 mM de etanolamina en un tampón de bicarbonato de sodio (50 mM, pH 9.6) que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1 mM) (80 μ L por pocillo). Para cada oligosacárido se llevaron a cabo cinco pocillos replicados. La placa se agitó durante la noche a temperatura ambiente y, a continuación, los pocillos se vaciaron y se lavaron con agua. Todos los pocillos se bloquearon por incubación durante 1 h con etanolamina 100 mM en un tampón de bicarbonato de sodio y, finalmente, se lavó con agua. A continuación, 20 μ L de una solución de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (FGF-2, Peprotech, 5 mg mL⁻¹ en PBS + 1 % de BSA) se añadieron a cada pocillo. La microplaca se incubó bajo agitación suave y a temperatura ambiente durante 1 h y, después, se lavó con PBS + 1 % de

Tween 20 y 0,1 % de BSA, y agua. Después, el anticuerpo de conejo anti-FGF-2 humano (Peprotech, 5 mg mL⁻¹ en PBS + 1 % de BSA, 20 µL por pocillo) se añadió en los pocillos. La placa se agitó durante 1 h y se lavó con PBS + 1 % de Tween 20 + 0.1 % de BSA, y agua. A continuación, el anticuerpo primario anti-FGF-2 se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 20 mg mL⁻¹ en PBS + 1 % de BSA, 20 µL por pocillo). La placa se incubó bajo agitación en ausencia de luz durante 1 h y, después, se lavó con PBS + 1 % de Tween 20 y 0.1 % de BSA, y agua. La fluorescencia generada por la unión de la proteína a los oligosacáridos, se midió a 535 nm mediante el uso de un lector estándar de fluorescencia TRIAD (Dynex). Los valores de fluorescencia de los blancos se restaron de todas las demás medidas.

Determinación de las constantes de disociación de superficie ($K_{D,surf}$)

Los oligosacáridos **142-144** se inmovilizaron en las microplacas tipo Nunc Immobilizer Amino™ de 384 pocillos como hemos descrito anteriormente. Los oligosacáridos se incubaron con 9 concentraciones diferentes de FGF-2, desde 3 hasta 581 nM. Todas las concentraciones y muestras fueron realizadas en cinco replicados. La proteína enlazada se detectó usando los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, como hemos visto anteriormente. Los datos se analizaron como isotermas de Langmuir, asumiendo un modelo de un sitio de interacción.

Estudios de interacción carbohidrato-proteína por polarización de fluorescencia

Las medidas de polarización de fluorescencia se realizaron en microplacas de 384 pocillos (poliestireno negro, no tratado, Corning) utilizando un lector

multimodo TRIAD (Dyner). La sonda fluorescente **148** (hexasacárido fluorescente derivado de la heparina) y los inhibidores **139-140**, **141-144** y **151-156** se disolvieron en un tampón de PBS (10 mM, pH 7.4). El factor de crecimiento humano recombinante FGF-2 (PeproTech) se disolvió en un tampón de PBS (10 mM, pH 7.4) + 1 % de BSA. Para el ensayo de inhibición, 10 μ L de solución de la sonda y 20 μ L de proteína a una concentración fija (40 nM y 145 nM, respectivamente) se incubaron junto con 10 μ L de solución de inhibidor (100 μ M). El volumen total de la muestra en cada pocillo fue de 40 μ L. Por lo tanto, todas las medidas se realizaron en PBS + 0.5 % de BSA, y las concentraciones finales de inhibidor, de la sonda fluorescente y de FGF-2 en cada pocillo fueron 25 μ M, 10 nM y 73 nM, respectivamente. Después de agitar durante 5 minutos en ausencia de luz, se midió la polarización de fluorescencia. En el estudio se incluyeron dos pocillos control. El primero sólo contenía la sonda fluorescente; el segundo contenía la sonda fluorescente y FGF-2, sin inhibidor. Los pocillos utilizados como blanco contenían 20 μ L de solución de FGF-2 y 20 μ L de tampón PBS y sus medidas se restaron de todos los demás valores. Todas las muestras se llevaron a cabo en tres réplicas. Para la determinación del valor de IC_{50} , los pocillos que contenían la sonda y FGF-2 a una concentración fija, como se describió anteriormente, se incubaron con 6 concentraciones diferentes de inhibidor, desde 0.025 μ M hasta 100 μ M. Los valores medios de polarización de los seis pocillos replicados se representaron gráficamente frente al logaritmo de la concentración de inhibidor, y la curva se ajustó a la fórmula correspondiente a una interacción competitiva de un solo sitio. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces.

CAPÍTULO 8.

BIBLIOGRAFÍA.

8. Bibliografía

1. Davies, J. A., Extracellular Matrix. In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
2. Iozzo, R. V.; Murdoch, A. D., Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *The FASEB Journal* **1996**, *10* (5), 598-614.
3. Bertolami, C. N.; Messadi, D. V., The Role of Proteoglycans in Hard and Soft Tissue Repair. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **1994**, *5* (3), 311-337.
4. Sasisekharan, R.; Shriver, Z.; Venkataraman, G.; Narayanasami, U., Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (7), 521-528.
5. Bishop, J. R.; Schuksz, M.; Esko, J. D., Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **2007**, *446* (7139), 1030-1037.
6. Handel, T. M.; Johnson, Z.; Crown, S. E.; Lau, E. K.; Sweeney, M.; Proudfoot, A. E., REGULATION OF PROTEIN FUNCTION BY GLYCOSAMINOGLYCANS—AS EXEMPLIFIED BY CHEMOKINES. *Annual Review of Biochemistry* **2005**, *74* (1), 385-410.
7. Gama, C. I.; Hsieh-Wilson, L. C., Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (6), 609-619.
8. Capila, I.; Linhardt, R. J., Heparin-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (3), 390-412.
9. Noti, C.; Seeberger, P. H., Chemical Approaches to Define the Structure-Activity Relationship of Heparin-like Glycosaminoglycans. *Chemistry & Biology* **2005**, *12* (7), 731-756.
10. Trowbridge, J. M.; Gallo, R. L., Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* **2002**, *12* (9), 117R-125R.
11. Sugahara, K.; Mikami, T.; Uyama, T.; Mizuguchi, S.; Nomura, K.; Kitagawa, H., Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13* (5), 612-620.
12. Meyer, K.; Palmer, J. W., THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. *Journal of Biological Chemistry* **1934**, *107* (3), 629-634.
13. Uyama, T.; Kitagawa, H.; Sugahara, K. N., Biosynthesis of Glycosaminoglycans and Proteoglycans. 2007; Vol. 3, pp 79-104.
14. Raman, R.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R., Structural Insights into Biological Roles of Protein-Glycosaminoglycan Interactions. *Chemistry & Biology* **2005**, *12* (3), 267-277.

15. Kreuger, J.; Spillmann, D.; Li, J.-p.; Lindahl, U., Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *The Journal of Cell Biology* **2006**, *174* (3), 323-327.
16. Faham, S.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C., Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **1998**, *8* (5), 578-586.
17. Maccarana, M.; Casu, B.; Lindahl, U., Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (32), 23898-23905.
18. Rusnati, M.; Coltrini, D.; Caccia, P.; Dellera, P.; Zoppetti, G.; Oreste, P.; Valsasina, B.; Presta, M., Distinct Role of 2-O-, N-, and 6-O-Sulfate Groups of Heparin in the Formation of the Ternary Complex with Basic Fibroblast Growth Factor and Soluble FGF Receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, *203* (1), 450-458.
19. Wang, H.; Toida, T.; Kim, Y. S.; Capila, I.; Hileman, R. E.; Bernfield, M.; Linhardt, R. J., Glycosaminoglycans Can Influence Fibroblast Growth Factor-2 Mitogenicity without Significant Growth Factor Binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *235* (2), 369-373.
20. de Paz, J.-L.; Angulo, J.; Lassaletta, J.-M.; Nieto, P. M.; Redondo-Horcajo, M.; Lozano, R. M.; Giménez-Gallego, G.; Martín-Lomas, M., The Activation of Fibroblast Growth Factors by Heparin: Synthesis, Structure, and Biological Activity of Heparin-Like Oligosaccharides. *ChemBioChem* **2001**, *2* (9), 673-685.
21. Lucas, R.; Angulo, J.; Nieto, P. M.; Martín-Lomas, M., Synthesis and structural study of two new heparin-like hexasaccharides. *Org Biomol Chem* **2003**, *1* (13), 2253-2266.
22. de Paz, J. L.; Martín-Lomas, M., Synthesis and Biological Evaluation of a Heparin-Like Hexasaccharide with the Structural Motifs for Binding to FGF and FGFR. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, *2005* (9), 1849-1858.
23. Angulo, J.; Ojeda, R.; de Paz, J.-L.; Lucas, R.; Nieto, P. M.; Lozano, R. M.; Redondo-Horcajo, M.; Giménez-Gallego, G.; Martín-Lomas, M., The Activation of Fibroblast Growth Factors (FGFs) by Glycosaminoglycans: Influence of the Sulfation Pattern on the Biological Activity of FGF-1. *ChemBioChem* **2004**, *5* (1), 55-61.
24. Desai, U. R.; Petitou, M.; Björk, I.; Olson, S. T., Mechanism of Heparin Activation of Antithrombin: ROLE OF INDIVIDUAL RESIDUES OF THE PENTASACCHARIDE ACTIVATING SEQUENCE IN THE RECOGNITION OF NATIVE AND ACTIVATED STATES OF ANTITHROMBIN. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (13), 7478-7487.
25. Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.; Viswanathan, K.; Bisio, A.; Capila, I.; Lansing, J. C.; Guglieri, S.; Fraser, B.; Al-Hakim, A.; Gunay, N. S.; Zhang, Z.; Robinson, L.; Buhse, L.; Nasr, M.; Woodcock, J.;

- Langer, R.; Venkataraman, G.; Linhardt, R. J.; Casu, B.; Torri, G.; Sasisekharan, R., Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotech* **2008**, *26* (6), 669-675.
26. Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R. J., Lessons learned from the contamination of heparin. *Natural Product Reports* **2009**, *26* (3), 313-321.
27. Warkentin, T. E.; Levine, M. N.; Hirsh, J.; Horsewood, P.; Roberts, R. S.; Gent, M.; Kelton, J. G., Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Treated with Low-Molecular-Weight Heparin or Unfractionated Heparin. *New England Journal of Medicine* **1995**, *332* (20), 1330-1336.
28. Choay, J.; Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Sinay, P.; Casu, B.; Gatti, G., Structure-activity relationship in heparin: A synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *116* (2), 492-499.
29. Mizuguchi, S.; Uyama, T.; Kitagawa, H.; Nomura, K. H.; Dejima, K.; Gengyo-Ando, K.; Mitani, S.; Sugahara, K.; Nomura, K., Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2003**, *423* (6938), 443-448.
30. Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C., A Chondroitin Sulfate Small Molecule that Stimulates Neuronal Growth. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (25), 7736-7737.
31. Gama, C. I.; Tully, S. E.; Sotogaku, N.; Clark, P. M.; Rawat, M.; Vaidehi, N.; Goddard, W. A.; Nishi, A.; Hsieh-Wilson, L. C., Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nat Chem Biol* **2006**, *2* (9), 467-473.
32. Stern, R.; Asari, A. A.; Sugahara, K. N., Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* **2006**, *85* (8), 699-715.
33. Toole, B. P., Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (7), 528-539.
34. Banerji, S.; Wright, A. J.; Noble, M.; Mahoney, D. J.; Campbell, I. D.; Day, A. J.; Jackson, D. G., Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14* (3), 234-239.
35. Sugahara, K. N.; Murai, T.; Nishinakamura, H.; Kawashima, H.; Saya, H.; Miyasaka, M., Hyaluronan Oligosaccharides Induce CD44 Cleavage and Promote Cell Migration in CD44-expressing Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (34), 32259-32265.
36. Teriete, P.; Banerji, S.; Noble, M.; Blundell, C. D.; Wright, A. J.; Pickford, A. R.; Lowe, E.; Mahoney, D. J.; Tammi, M. I.; Kahmann, J. D.; Campbell, I. D.; Day, A. J.; Jackson, D. G., Structure of the Regulatory Hyaluronan Binding Domain in the Inflammatory Leukocyte Homing Receptor CD44. *Molecular Cell* **2004**, *13* (4), 483-496.

37. Poletti, L.; Lay, L., Chemical Contributions to Understanding Heparin Activity: Synthesis of Related Sulfated Oligosaccharides. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 2003 (16), 2999-3024.
38. Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A., A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next? *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (24), 3118-3133.
39. Weissmann, B.; Meyer, K., The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord1,2. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, 76 (7), 1753-1757.
40. Jeanloz, R. W.; Jeanloz, D. A., The Degradation of Hyaluronic Acid by Methanolysis*. *Biochemistry* **1964**, 3 (1), 121-123.
41. (a) Ferrer Lopez, A.; Jacquinet, J.-C.; Lopin-Bon, C., From Chondroitin Polymer to Size-Defined Hyaluronan Oligosaccharides. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, 2013 (30), 6934-6947; (b) Gu, G.; Adabala, P. J. P.; Szczepina, M. G.; Borrelli, S.; Pinto, B. M., Synthesis and Immunological Characterization of Modified Hyaluronic Acid Hexasaccharide Conjugates. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78 (16), 8004-8019; (c) Virlouvet, M.; Gartner, M.; Koroniak, K.; Sleeman, J. P.; Bräse, S., Multi-Gram Synthesis of a Hyaluronic Acid Subunit and Synthesis of Fully Protected Oligomers. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, 352 (14-15), 2657-2662; (d) Rele, S. M.; Iyer, S. S.; Chaikof, E. L., Hyaluronan-based glycoclusters as probes for chemical glycobiology. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48 (29), 5055-5060; (e) Palmacci, E. R.; Seeberger, P. H., Toward the modular synthesis of glycosaminoglycans: synthesis of hyaluronic acid disaccharide building blocks using a periodic acid oxidation. *Tetrahedron* **2004**, 60 (35), 7755-7766; (f) Yeung, B. K. S.; Hill, D. C.; Janicka, M.; Petillo, P. A., Synthesis of Two Hyaluronan Trisaccharides. *Organic Letters* **2000**, 2 (9), 1279-1282; (g) Slaghek, T. M.; Nakahara, Y.; Ogawa, T.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G., Synthesis of hyaluronic acid-related di-, tri-, and tetra-saccharides having an N-acetylglucosamine residue at the reducing end. *Carbohydrate Research* **1994**, 255 (0), 61-85.
42. Blatter, G.; Jacquinet, J.-C., The use of 2-deoxy-2-trichloroacetamido-d-glucopyranose derivatives in syntheses of hyaluronic acid-related tetra-, hexa-, and octa-saccharides having a methyl β -d-glucopyranosiduronic acid at the reducing end. *Carbohydrate Research* **1996**, 288 (0), 109-125.
43. Huang, L.; Huang, X., Highly Efficient Syntheses of Hyaluronic Acid Oligosaccharides. *Chemistry – A European Journal* **2007**, 13 (2), 529-540.
44. Lu, X.; Kamat, M. N.; Huang, L.; Huang, X., Chemical Synthesis of a Hyaluronic Acid Decasaccharide. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74 (20), 7608-7617.
45. Dinkelaar, J.; Codée, J. D. C.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A., Synthesis of Hyaluronic Acid Oligomers Using Ph₂SO/Tf₂O-Mediated Glycosylations. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72 (15), 5737-5742.

46. Dinkelaar, J.; Gold, H.; Overkleeft, H. S.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A., Synthesis of Hyaluronic Acid Oligomers using Chemoselective and One-Pot Strategies. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74* (11), 4208-4216.
47. Walvoort, M. T. C.; Volbeda, A. G.; Reintjens, N. R. M.; van den Elst, H.; Plante, O. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C., Automated Solid-Phase Synthesis of Hyaluronan Oligosaccharides. *Organic Letters* **2012**, *14* (14), 3776-3779.
48. Schmidt, R. R.; Kinzy, W., Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis: The Trichloroacetimidate Method. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Derek, H., Ed. Academic Press: 1994; Vol. Volume 50, pp 21-123.
49. Aucagne, V.; Hänni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Walker, D. B., Catalytic "Click" Rotaxanes: A Substoichiometric Metal-Template Pathway to Mechanically Interlocked Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (7), 2186-2187.
50. Blatter, G.; Beau, J.-M.; Jacquinet, J.-C., The use of 2-deoxy-2-trichloroacetamido-d-glucopyranose derivatives in syntheses of oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **1994**, *260* (2), 189-202.
51. Mar Kayser, M.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M., Polymer-Supported Synthesis of Oligosaccharides Using a Diisopropylsiloxane Linker and Trichloroacetimidate Donors. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010* (11), 2138-2147.
52. Donohoe, T. J.; Logan, J. G.; Laffan, D. D. P., Trichloro-oxazolines as Activated Donors for Aminosugar Coupling. *Organic Letters* **2003**, *5* (26), 4995-4998.
53. Sherman, A. A.; Yudina, O. N.; Mironov, Y. V.; Sukhova, E. V.; Shashkov, A. S.; Menshov, V. M.; Nifantiev, N. E., Study of glycosylation with N-trichloroacetyl-d-glucosamine derivatives in the syntheses of the spacer-armed pentasaccharides sialyl lacto-N-neotetraose and sialyl lacto-N-tetraose, their fragments, and analogues. *Carbohydrate Research* **2001**, *336* (1), 13-46.
54. David, S.; Malleron, A.; Dini, C., Preparation of oligosaccharides with β -d-mannopyranosyl and 2-azido-2-deoxy- β -d-mannopyranosyl residues by inversion at C-2 after coupling. *Carbohydrate Research* **1989**, *188* (0), 193-200.
55. Karst, N.; Jacquinet, J.-C., Chemical synthesis of [small beta]-D-GlcpA(2SO₄)-(1 \rightarrow 3)-D-GalpNAc(6SO₄), the disaccharide repeating unit of shark cartilage chondroitin sulfate D, and of its methyl [small beta]-D-glycoside derivative. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, (16), 2709-2717.
56. Karst, N.; Jacquinet, J.-C., Stereocontrolled Total Syntheses of Shark Cartilage Chondroitin Sulfate D-Related Tetra- and Hexasaccharide Methyl Glycosides. *European Journal of Organic Chemistry* **2002**, *2002* (5), 815-825.

57. DeNinno, M. P.; Etienne, J. B.; Duplantier, K. C., A method for the selective reduction of carbohydrate 4,6-O-benzylidene acetals. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36* (5), 669-672.
58. Curran, D. P.; Hadida, S.; He, M., Thermal Allylations of Aldehydes with a Fluorous Allylstannane. Separation of Organic and Fluorous Products by Solid Phase Extraction with Fluorous Reverse Phase Silica Gel†. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (20), 6714-6715.
59. Zhang, W.; Curran, D. P., Synthetic applications of fluorous solid-phase extraction (F-SPE). *Tetrahedron* **2006**, *62* (51), 11837-11865.
60. Curran, D. P.; Ferritto, R.; Hua, Y., Preparation of a fluorous benzyl protecting group and its use in fluorous synthesis approach to a disaccharide. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (28), 4937-4940.
61. (a) Zhang, F.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Curran, D. P.; Liu, G., Synthesis and Applications of a Light-Fluorous Glycosyl Donor. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74* (6), 2594-2597; (b) Manzoni, L., Rapid synthesis of oligosaccharides using an anomeric fluorous silyl protecting group. *Chemical Communications* **2003**, (23), 2930-2931; (c) Manzoni, L.; Castelli, R., Synthesis of the Lewis a Trisaccharide Based on an Anomeric Silyl Fluorous Tag. *Organic Letters* **2004**, *6* (23), 4195-4198; (d) Yang, B.; Jing, Y.; Huang, X., Fluorous-Assisted One-Pot Oligosaccharide Synthesis. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010* (7), 1290-1298; (e) Zong, C.; Venot, A.; Dhamale, O.; Boons, G.-J., Fluorous Supported Modular Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides. *Organic Letters* **2013**, *15* (2), 342-345.
62. Muñoz-García, J. C. Insights on the structure and dynamics of glycosaminoglycans and their interactions with langerin: NMR and computational studies. 2013.
63. (a) Feinberg, H.; Powlesland, A. S.; Taylor, M. E.; Weis, W. I., Trimeric Structure of Langerin. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (17), 13285-13293; (b) Stambach, N. S.; Taylor, M. E., Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* **2003**, *13* (5), 401-410.
64. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
65. Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (8), 864-890.
66. Angulo, J.; Enríquez-Navas, P. M.; Nieto, P. M., Ligand-Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16* (26), 7803-7812.
67. Schwartz, N.; Domowicz, M., Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J* **2004**, *21* (6), 329-341.

68. Kawashima, H.; Atarashi, K.; Hirose, M.; Hirose, J.; Yamada, S.; Sugahara, K.; Miyasaka, M., Oversulfated Chondroitin/Dermatan Sulfates Containing GlcA β 1/IdoA α 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) Interact with L- and P-selectin and Chemokines. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (15), 12921-12930.
69. Beeson, J. G.; Andrews, K. T.; Boyle, M.; Duffy, M. F.; Choong, E. K.; Byrne, T. J.; Chesson, J. M.; Lawson, A. M.; Chai, W., Structural Basis for Binding of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 to Chondroitin Sulfate and Placental Tissue and the Influence of Protein Polymorphisms on Binding Specificity. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (31), 22426-22436.
70. Levene, P. A., ON CHONDROSIN. *Journal of Biological Chemistry* **1941**, *140* (1), 267-277.
71. Davidson, E. A.; Meyer, K., Structural Studies on Chondroitin Sulfuric Acid.1,2 I. The Nature of Chondrosine. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76* (22), 5686-5689.
72. Despras, G.; Bernard, C.; Perrot, A.; Cattiaux, L.; Prochiantz, A.; Lortat-Jacob, H.; Mallet, J.-M., Toward Libraries of Biotinylated Chondroitin Sulfate Analogues: From Synthesis to In Vivo Studies. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (2), 531-540.
73. Eller, S.; Collot, M.; Yin, J.; Hahm, H. S.; Seeberger, P. H., Automated Solid-Phase Synthesis of Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (22), 5858-5861.
74. Lopin, C.; Jacquinet, J.-C., From Polymer to Size-Defined Oligomers: An Expeditious Route for the Preparation of Chondroitin Oligosaccharides. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (16), 2574-2578.
75. Vibert, A.; Lopin-Bon, C.; Jacquinet, J.-C., From Polymer to Size-Defined Oligomers: A Step Economy Process for the Efficient and Stereocontrolled Construction of Chondroitin Oligosaccharides and Biotinylated Conjugates Thereof: Part 1. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (37), 9561-9578.
76. Jacquinet, J.-C.; Lopin-Bon, C.; Vibert, A., From Polymer to Size-Defined Oligomers: A Highly Divergent and Stereocontrolled Construction of Chondroitin Sulfate A, C, D, E, K, L, and M Oligomers from a Single Precursor: Part 2. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (37), 9579-9595.
77. (a) Tamura, J.-I.; Neumann, K. W.; Ogawa, T., Synthetic Studies of Glycosyl Serines in the Carbohydrate-Protein Region of Protoglycans. *Liebigs Annalen* **1996**, *1996* (8), 1239-1257; (b) Tamura, J.-i.; Tokuyoshi, M., Synthesis of Chondroitin Sulfate E Hexasaccharide in the Repeating Region by an Effective Elongation Strategy toward Longer Chondroitin Oligosaccharide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2004**, *68* (12), 2436-2443; (c) Tamura, J.-i.; Nakada, Y.; Taniguchi, K.; Yamane, M., Synthesis of chondroitin sulfate E octasaccharide in a repeating region involving an acetamide auxiliary. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (1), 39-

- 47; (d) Tamura, J.-i.; Tsutsumishita-Nakai, N.; Nakao, Y.; Kawano, M.; Kato, S.; Takeda, N.; Nadanaka, S.; Kitagawa, H., Synthesis and interaction with midkine of biotinylated chondroitin sulfate tetrasaccharides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (3), 1371-1374; (e) Tamura, J.-i.; Tanaka, H.; Nakamura, A.; Takeda, N., Synthesis of β -d-GalNAc(4,6-diS)(1-4)[α -l-Fuc(2,4-diS)(1-3)]- β -d-GlcA, a novel trisaccharide unit of chondroitin sulfate with a fucose branch. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (30), 3940-3943.
78. Bedini, E.; Parrilli, M., Synthetic and semi-synthetic chondroitin sulfate oligosaccharides, polysaccharides, and glycomimetics. *Carbohydrate Research* **2012**, *356* (0), 75-85.
79. Vibert, A.; Lopin-Bon, C.; Jacquinet, J.-C., Efficient and Stereocontrolled Construction of Homo- and Heterogeneously 4- and 6-Sulfated Biotinylated Chondroitin Oligomers. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *2011* (22), 4183-4204.
80. Macchione, G. M., S.; Kayser, M. Mar; de Paz, J. L. ; Nieto, P. M., Synthesis of chondroitin sulfate oligosaccharides using N-tetrachlorophthaloyl and N-trifluoroacetyl galactosamine building blocks. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, *in press*.
81. Wolfrom, M. L.; Conigliaro, P. J., Trifluoroacetyl as an N-protective group in the synthesis of purine nucleosides of 2-amino-2-deoxy saccharides. *Carbohydrate Research* **1969**, *11* (1), 63-76.
82. Wolfrom, M. L.; Bhat, H. B., Trichloroacetyl and trifluoroacetyl as N-blocking groups in nucleoside synthesis with 2-amino sugars. *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32* (6), 1821-1823.
83. Silva, D. J.; Wang, H.; Allanson, N. M.; Jain, R. K.; Sofia, M. J., Stereospecific Solution- and Solid-Phase Glycosylations. Synthesis of β -Linked Saccharides and Construction of Disaccharide Libraries Using Phenylsulfenyl 2-Deoxy-2-Trifluoroacetamido Glycopyranosides as Glycosyl Donors. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (16), 5926-5929.
84. Bongat, A. F. G.; Kamat, M. N.; Demchenko, A. V., Chemoselective Synthesis of Oligosaccharides of 2-Deoxy-2-aminosugars. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72* (4), 1480-1483.
85. Weiss, H.; Unverzagt, C., Highly Branched Oligosaccharides: A General Strategy for the Synthesis of Multiantennary N-Glycans with a Bisected Motif. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (35), 4261-4263.
86. Maza, S.; Mar Kayser, M.; Macchione, G.; Lopez-Prados, J.; Angulo, J.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M., Synthesis of chondroitin/dermatan sulfate-like oligosaccharides and evaluation of their protein affinity by fluorescence polarization. *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (21), 3510-3525.
87. Wolfrom, M. L.; Bhat, H. B.; Conigliaro, P. J., Pyrimidine nucleosides of 2-amino-2-deoxy-D-galactose. *Carbohydrate Research* **1971**, *20* (2), 375-381.
88. Imamura, A.; Kimura, A.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M., Extended Applications of Di-tert-butylsilylene-Directed α -Predominant Galactosylation

Compatible with C2-Participating Groups toward the Assembly of Various Glycosides. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (34), 8862-8870.

89. Bélot, F.; Jacquinet, J.-C., Unexpected stereochemical outcome of activated 4,6-O-benzylidene derivatives of the 2-deoxy-2-trichloroacetamido-d-galacto series in glycosylation reactions during the synthesis of a chondroitin 6-sulfate trisaccharide methyl glycoside. *Carbohydrate Research* **2000**, *325* (2), 93-106.

90. Maza, S.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M., Microwave-assisted sulfonation of heparin oligosaccharides. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52* (3), 441-443.

91. José Luis de Paz, P. H. S., *Carbohydrates Microarrays. Methods and Protocols*. 2012.

92. Maza, S.; Macchione, G.; Ojeda, R.; Lopez-Prados, J.; Angulo, J.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M., Synthesis of amine-functionalized heparin oligosaccharides for the investigation of carbohydrate-protein interactions in microtiter plates. *Org Biomol Chem* **2012**, *10* (10), 2146-2163.

93. de Paz, J. L.; Noti, C.; Böhm, F.; Werner, S.; Seeberger, P. H., Potentiation of Fibroblast Growth Factor Activity by Synthetic Heparin Oligosaccharide Glycodendrimers. *Chemistry & Biology* **2007**, *14* (8), 879-887.

94. Noti, C.; de Paz, J. L.; Polito, L.; Seeberger, P. H., Preparation and Use of Microarrays Containing Synthetic Heparin Oligosaccharides for the Rapid Analysis of Heparin-Protein Interactions. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (34), 8664-8686.

95. Faham, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C., Heparin Structure and Interactions with Basic Fibroblast Growth Factor. *Science* **1996**, *271* (5252), 1116-1120.

96. Pellegrini, L., Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11* (5), 629-634.

97. Liang, P.-H.; Wang, S.-K.; Wong, C.-H., Quantitative Analysis of Carbohydrate-Protein Interactions Using Glycan Microarrays: Determination of Surface and Solution Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (36), 11177-11184.

98. Park, S.; Shin, I., Carbohydrate Microarrays for Assaying Galactosyltransferase Activity. *Organic Letters* **2007**, *9* (9), 1675-1678.

99. Cochran, S.; Li, C.; Fairweather, J. K.; Kett, W. C.; Coombe, D. R.; Ferro, V., Probing the Interactions of Phosphosulfomannans with Angiogenic Growth Factors by Surface Plasmon Resonance. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46* (21), 4601-4608.

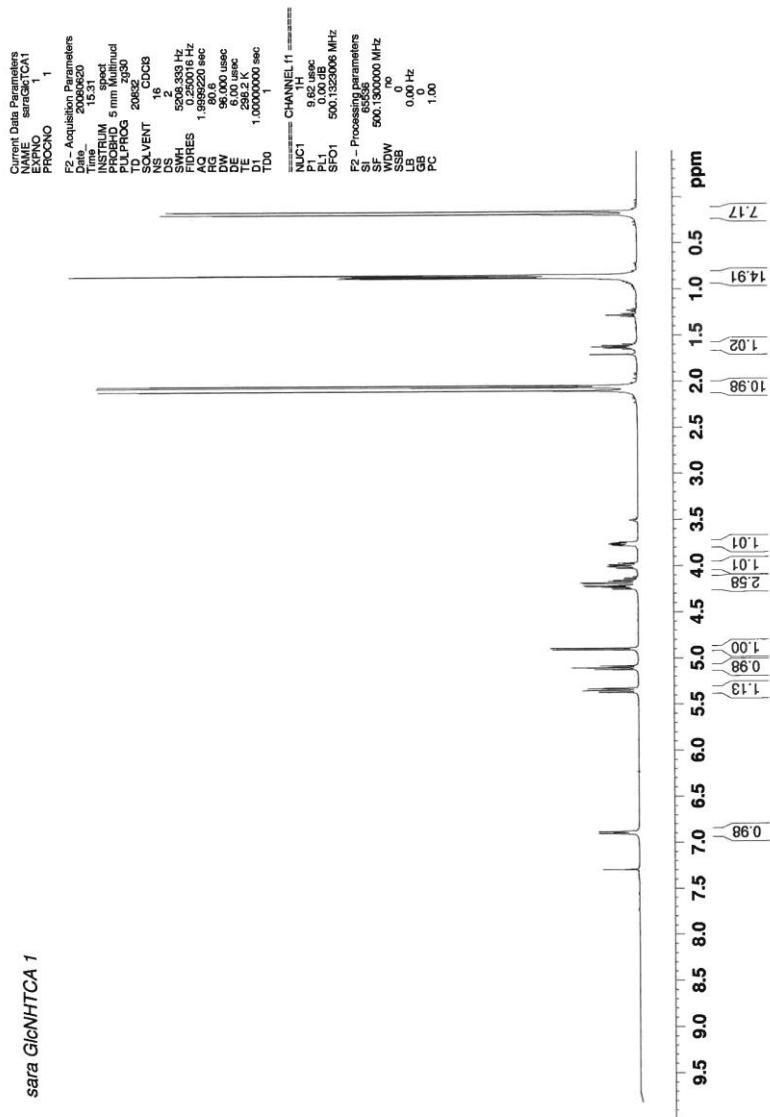
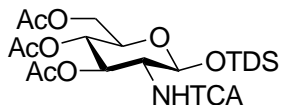
100. Kakehi, K.; Oda, Y.; Kinoshita, M., Fluorescence Polarization: Analysis of Carbohydrate-Protein Interaction. *Analytical Biochemistry* **2001**, *297* (2), 111-116.

101. Sörme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Huflejt, M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H., Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Analytical Biochemistry* **2004**, *334* (1), 36-47.

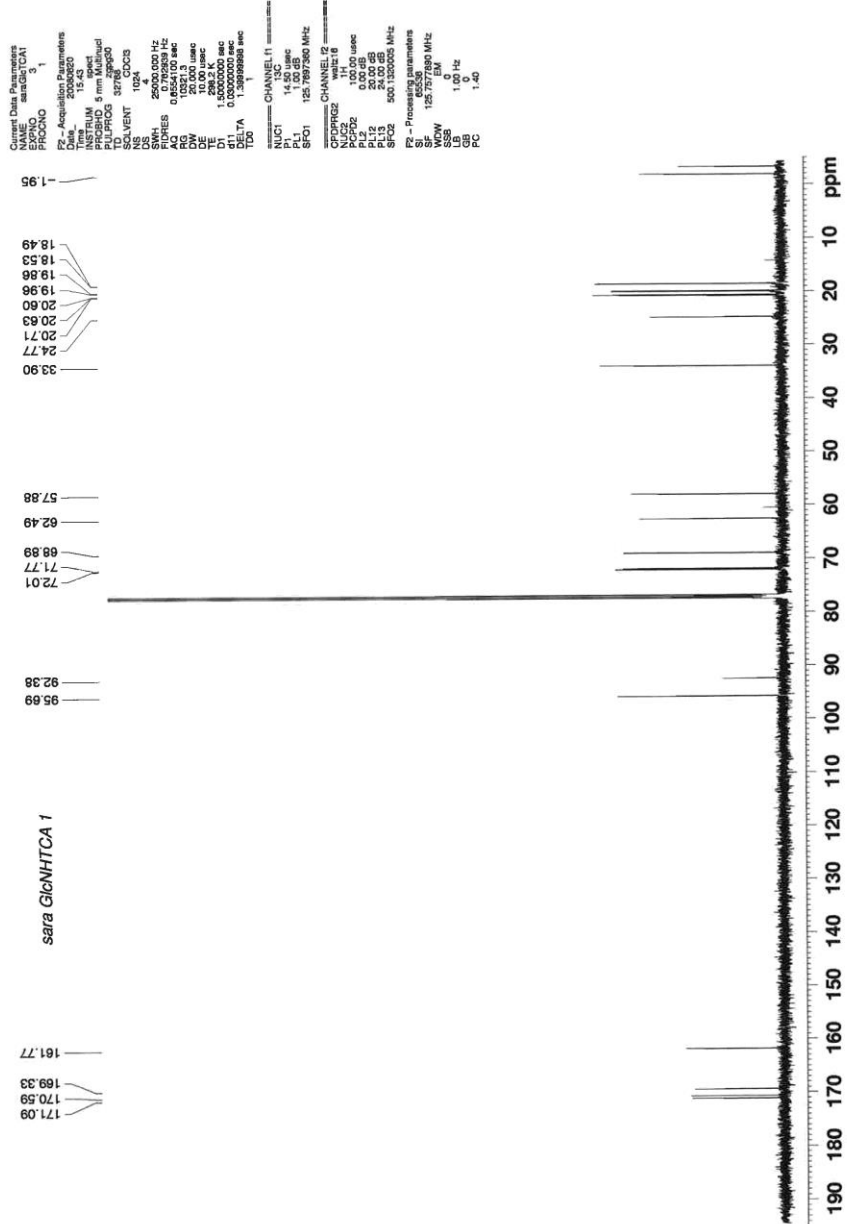
102. Andrievskaia, O.; Potetinova, Z.; Balachandran, A.; Nielsen, K., Binding of bovine prion protein to heparin: A fluorescence polarization study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, *460* (1), 10-16.
103. Johnstone, K. D.; Karoli, T.; Liu, L.; Dredge, K.; Copeman, E.; Li, C. P.; Davis, K.; Hammond, E.; Bytheway, I.; Kostewicz, E.; Chiu, F. C. K.; Shackelford, D. M.; Charman, S. A.; Charman, W. N.; Harenberg, J.; Gonda, T. J.; Ferro, V., Synthesis and Biological Evaluation of Polysulfated Oligosaccharide Glycosides as Inhibitors of Angiogenesis and Tumor Growth. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (4), 1686-1699.

ANEXO DE ESPECTROS

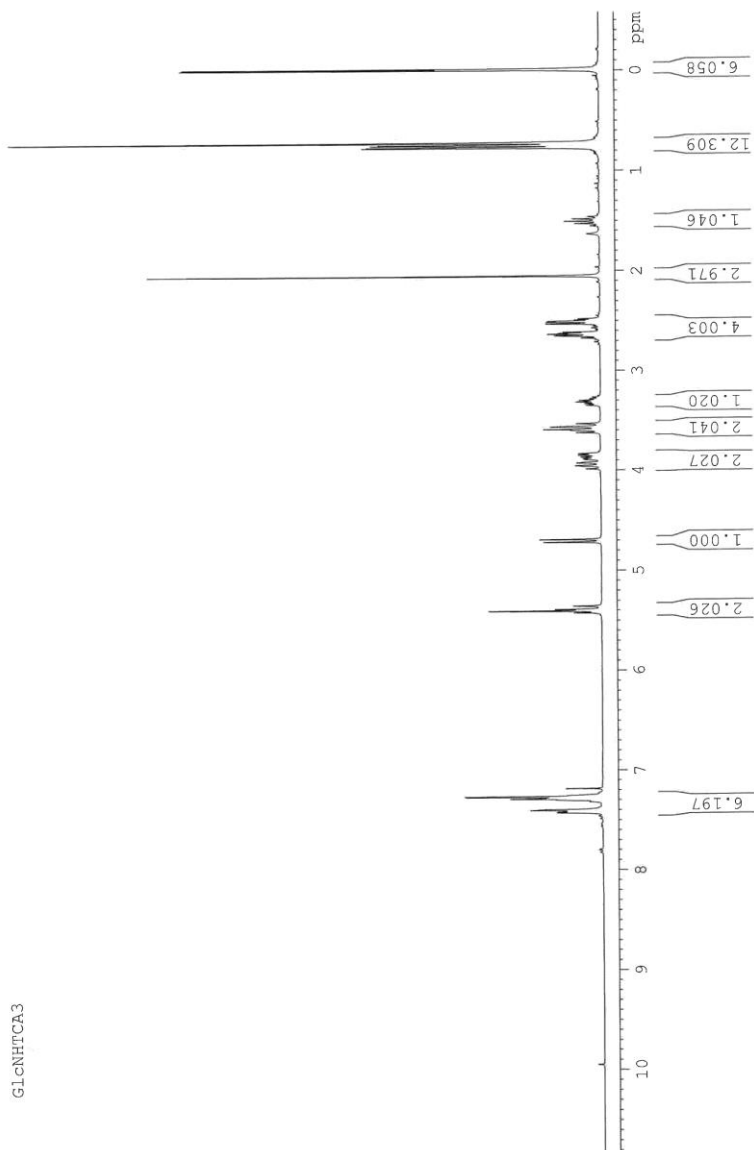
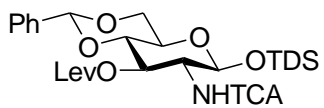
Compuesto 52 (^1H -RMN, 500 MHz, CDCl_3)



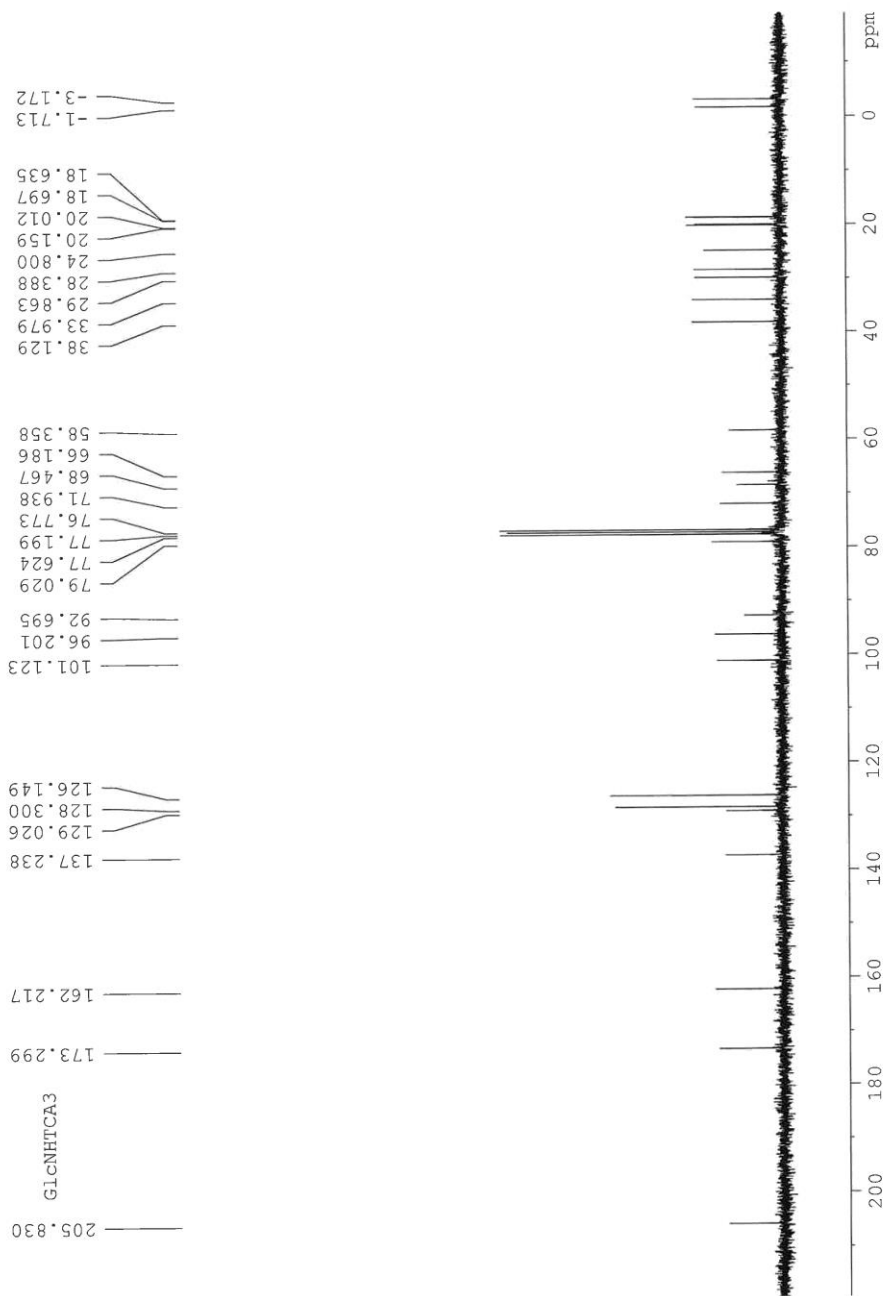
(¹³C-RMN, 125 MHz, CDCl₃)



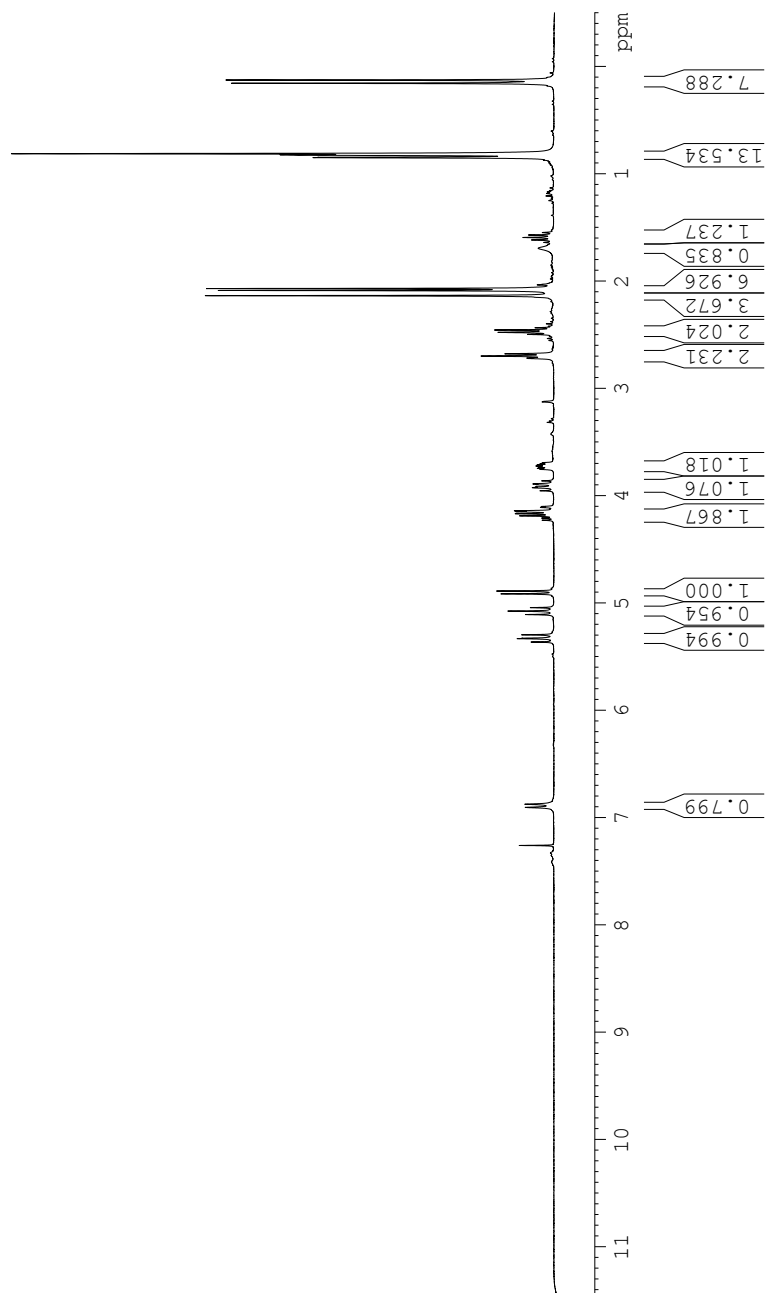
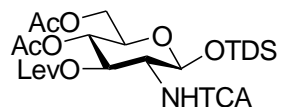
Compuesto 53 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



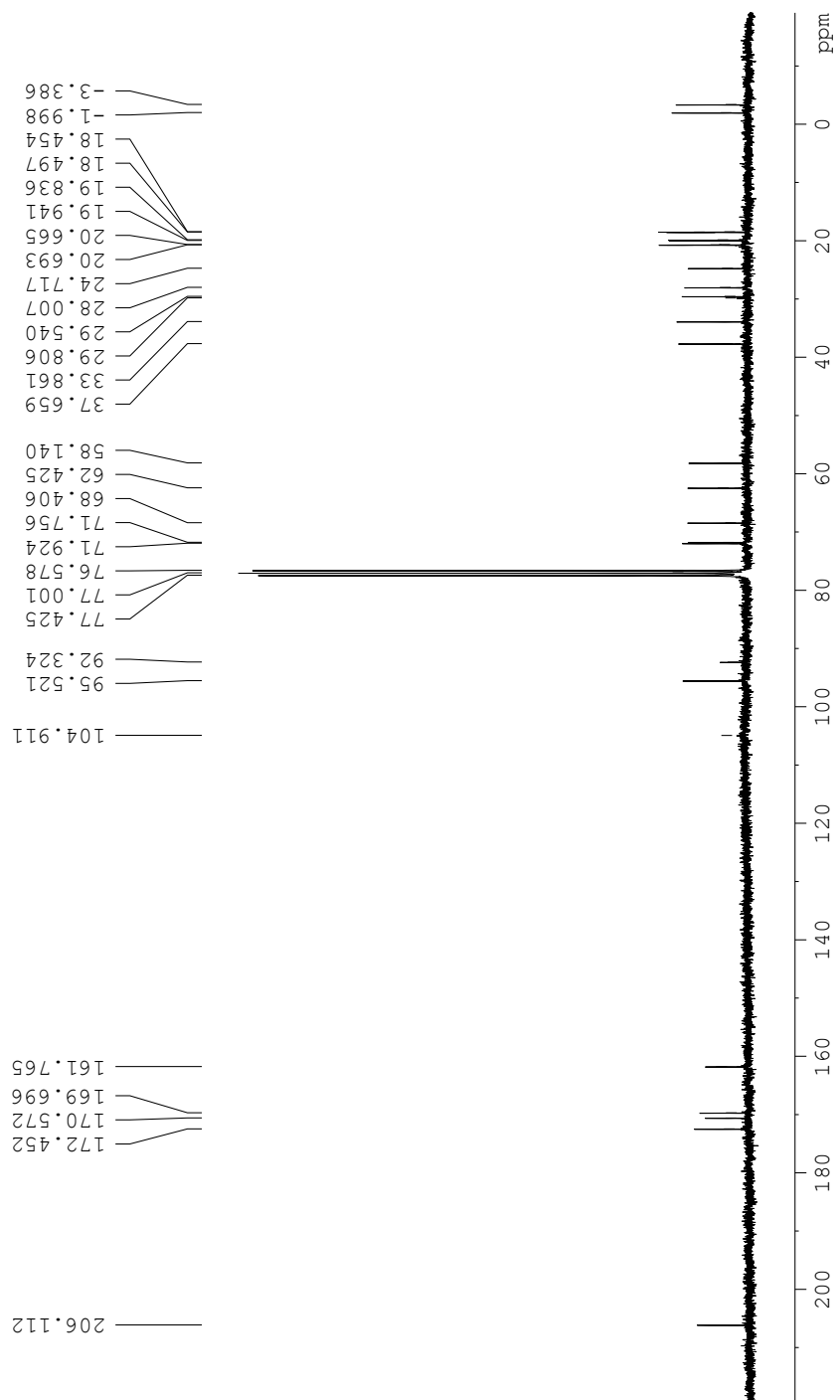
^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



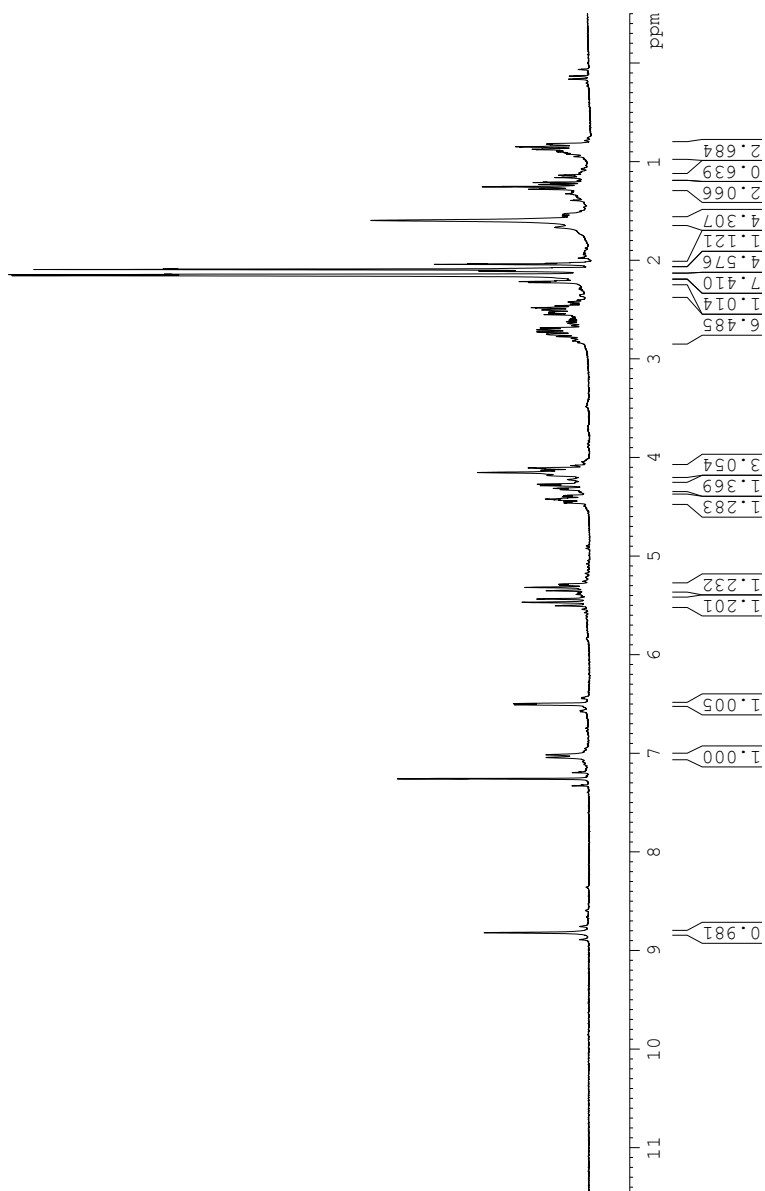
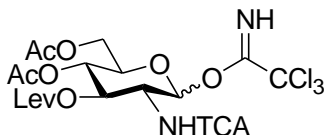
Compuesto 55 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



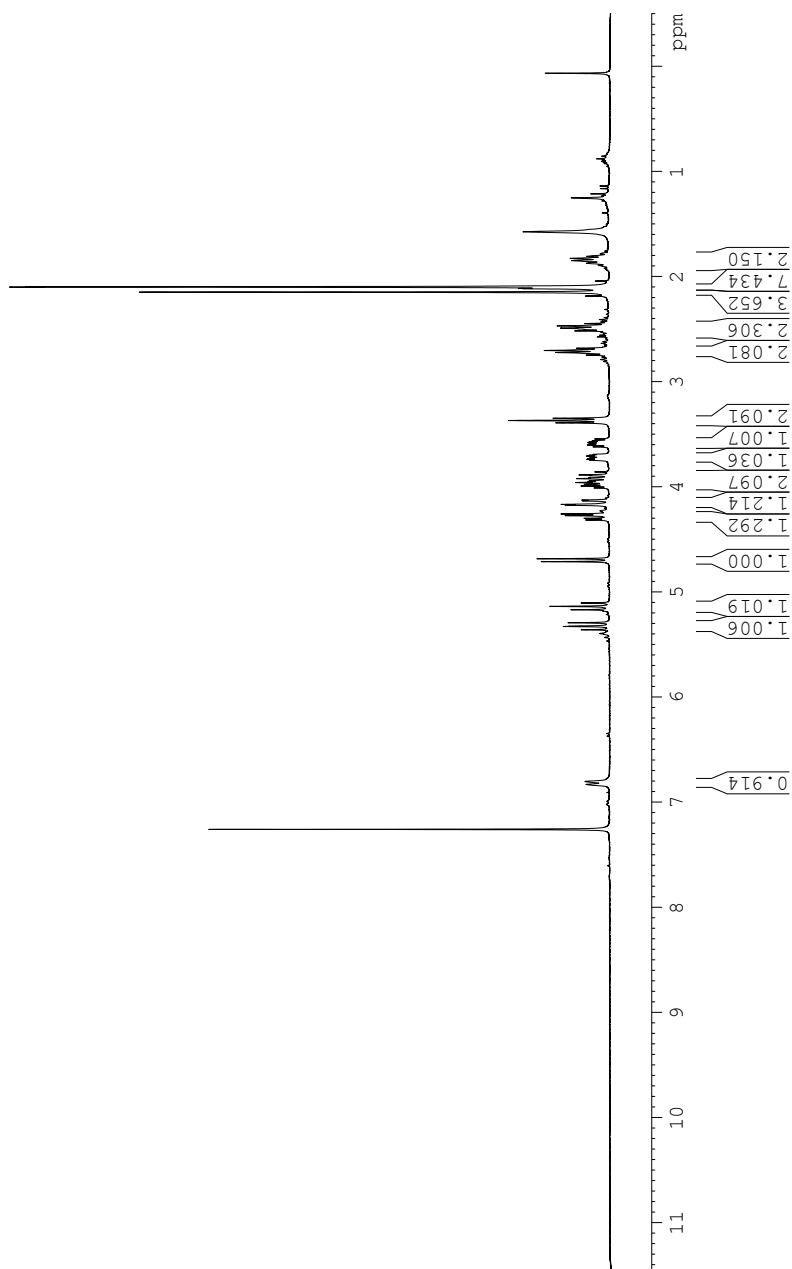
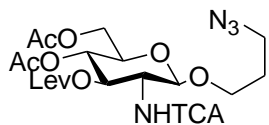
^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



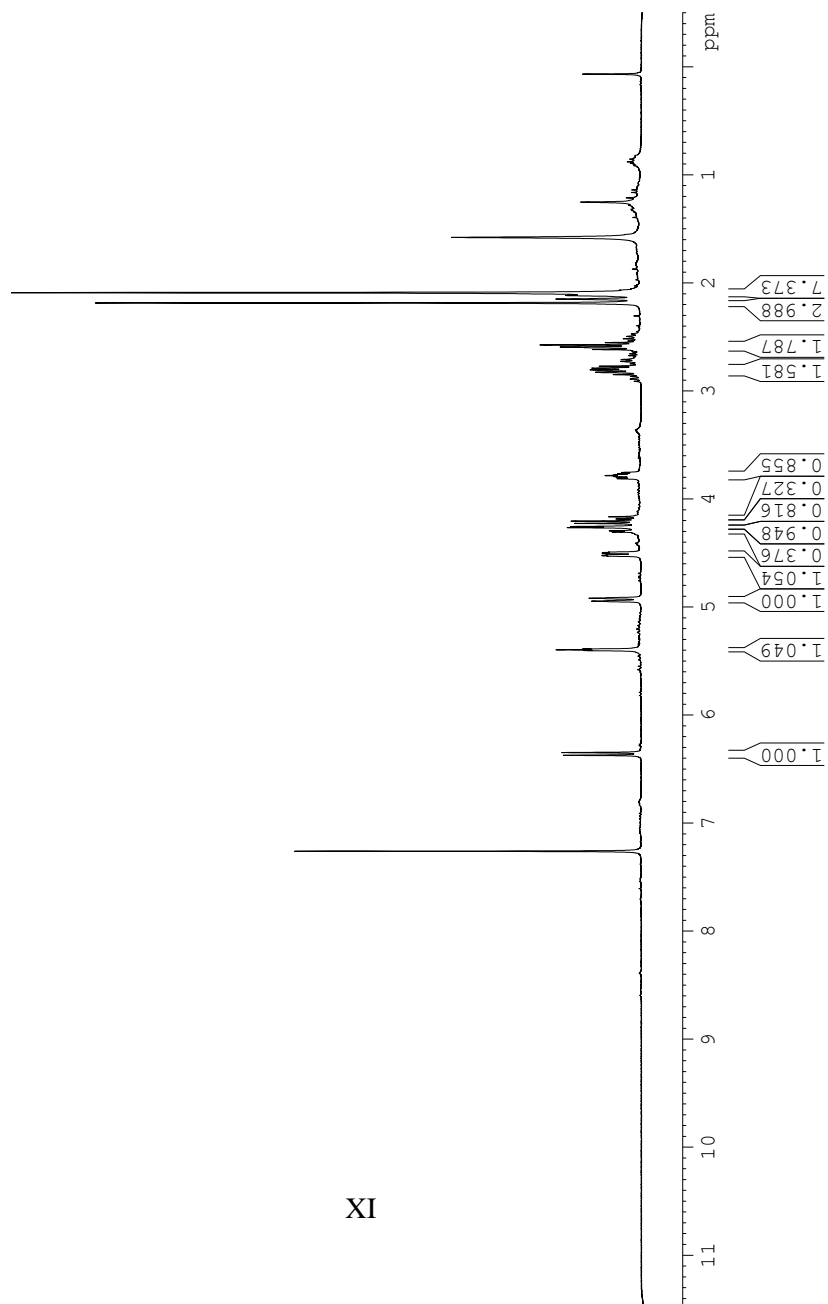
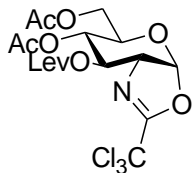
Compuesto 48 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



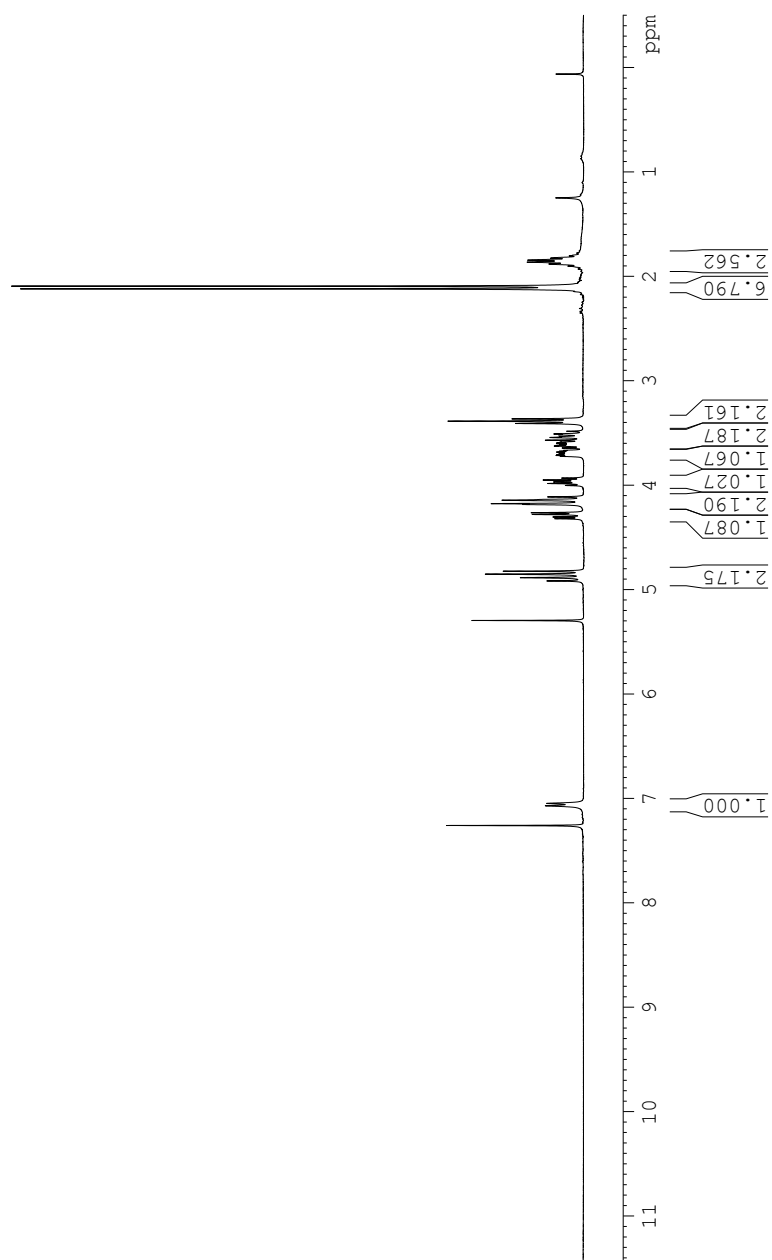
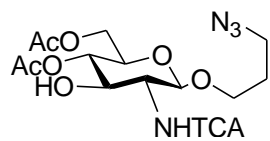
Compuesto 65 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



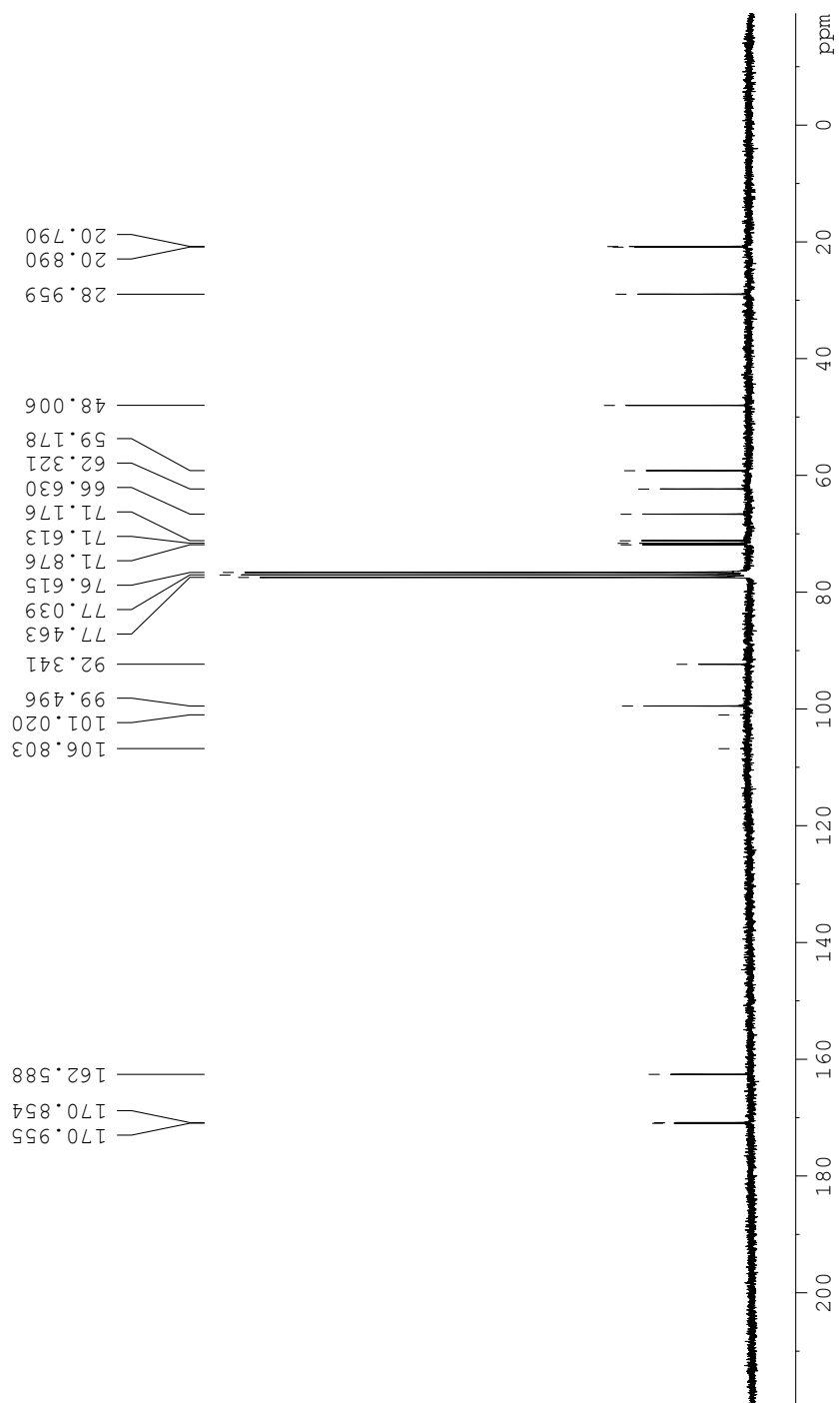
Compuesto 66 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



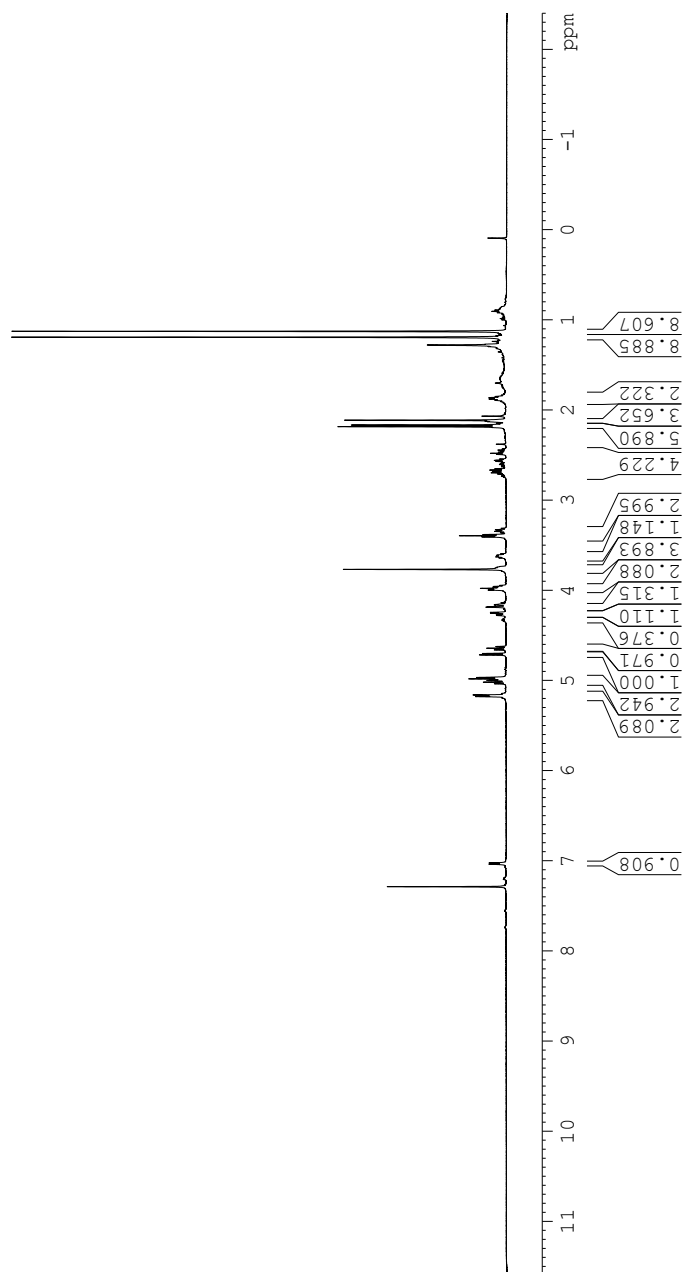
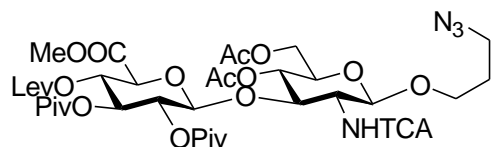
Compuesto 67 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



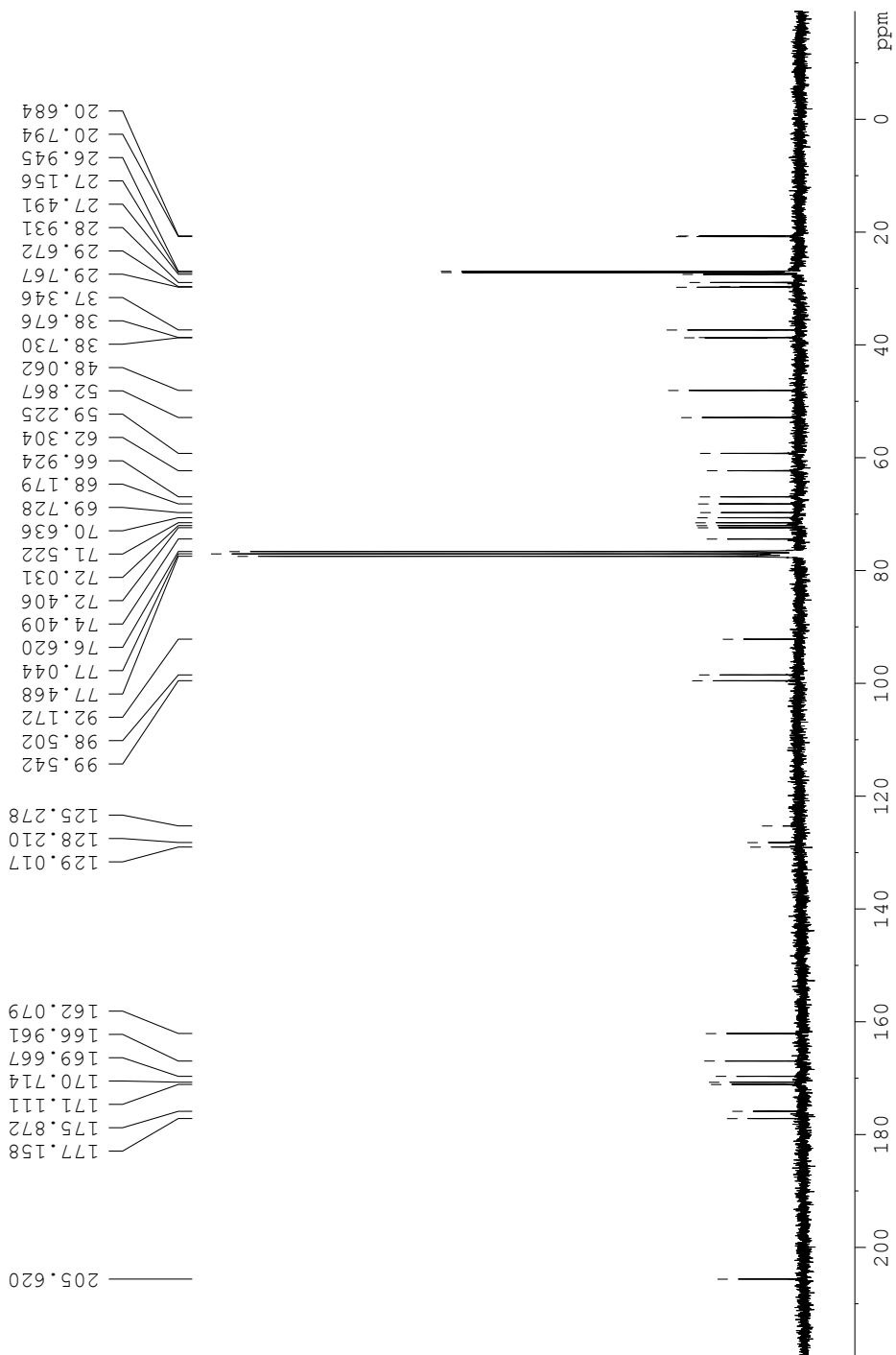
(^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



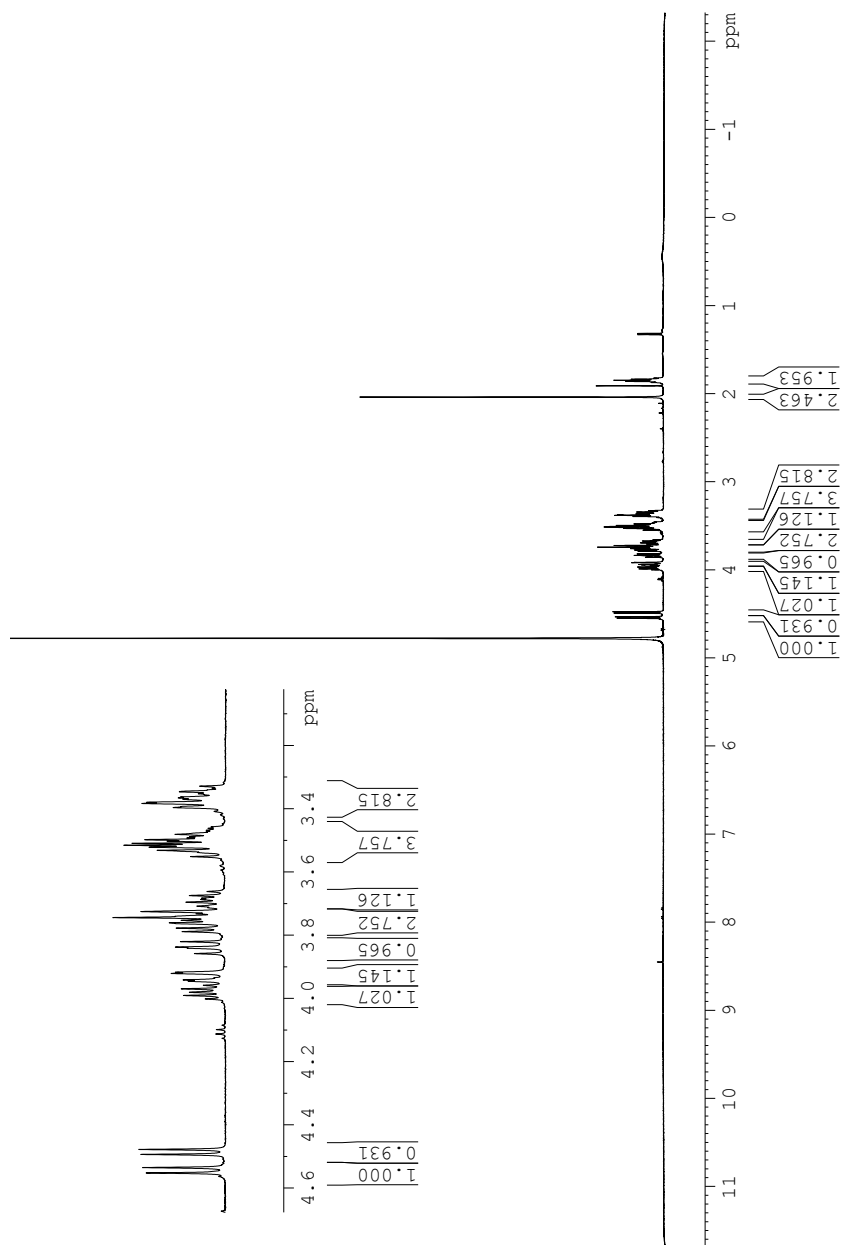
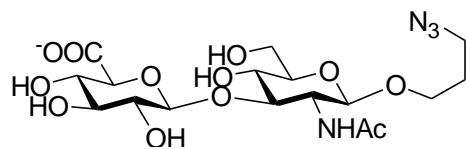
Compuesto 68 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



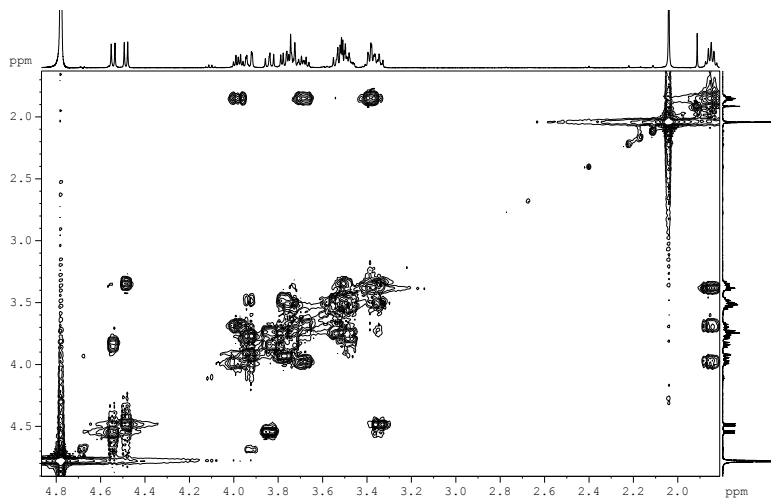
^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



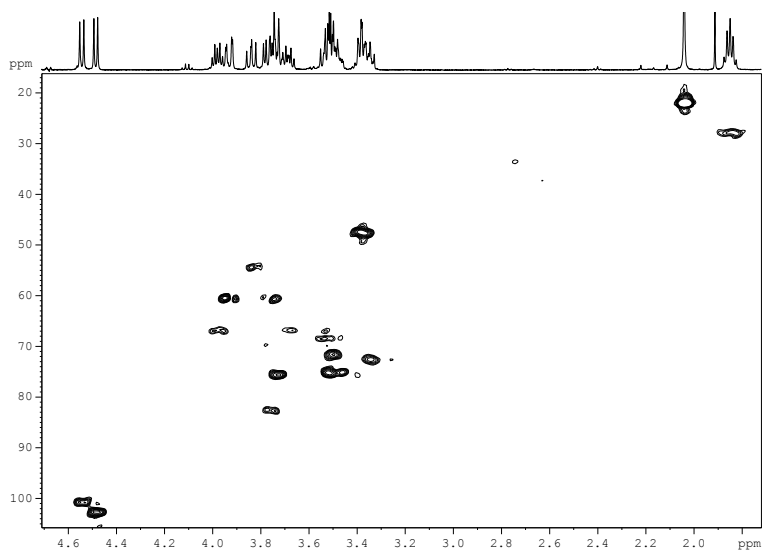
Compuesto 42 (^1H -RMN, 500 MHz, D_2O)



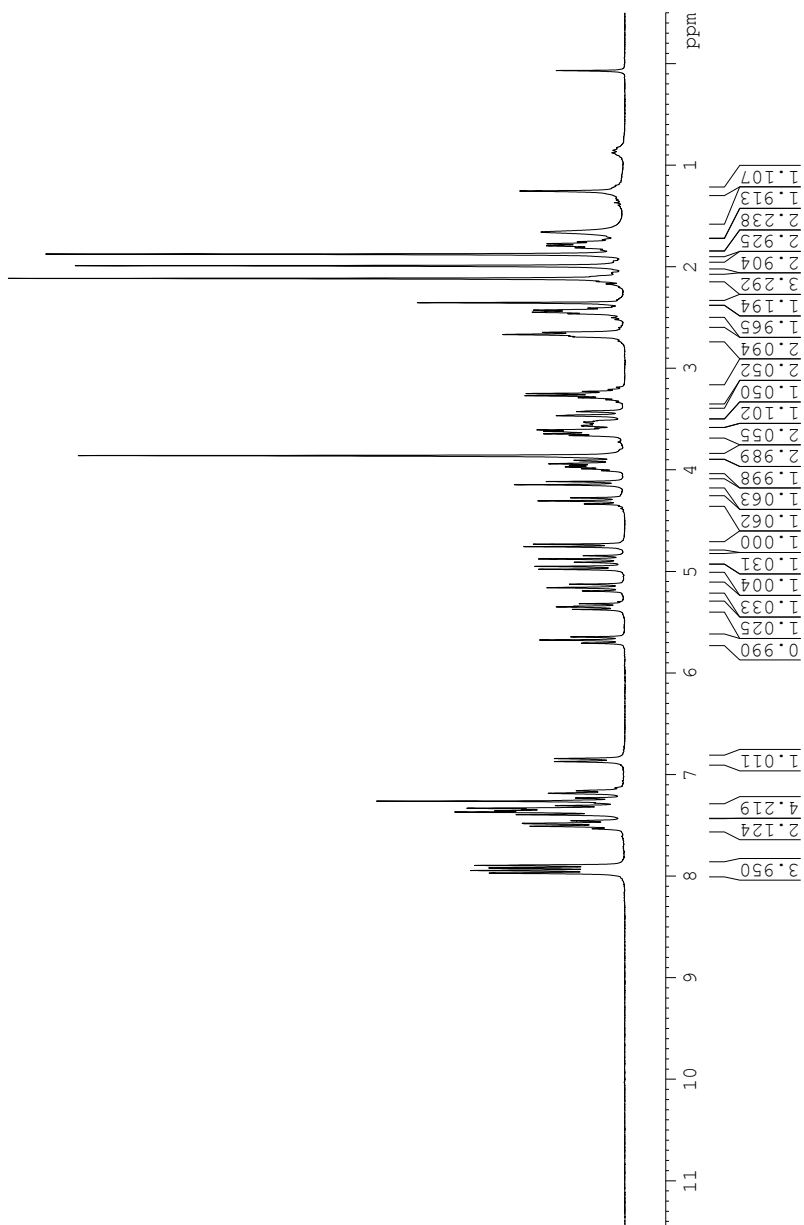
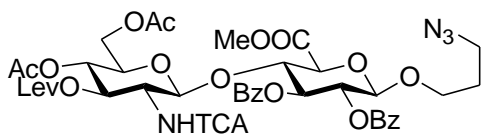
COSY



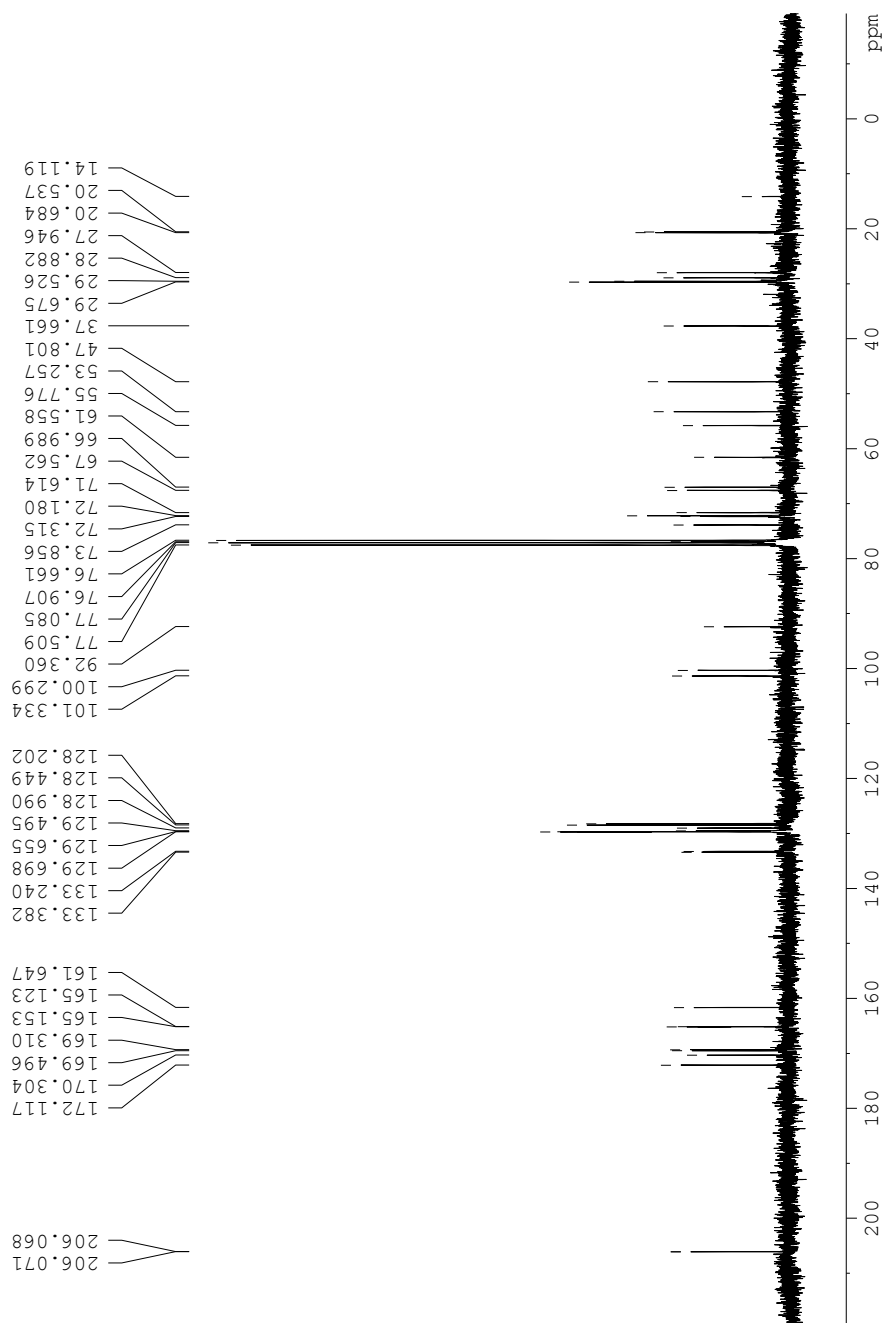
HMQC



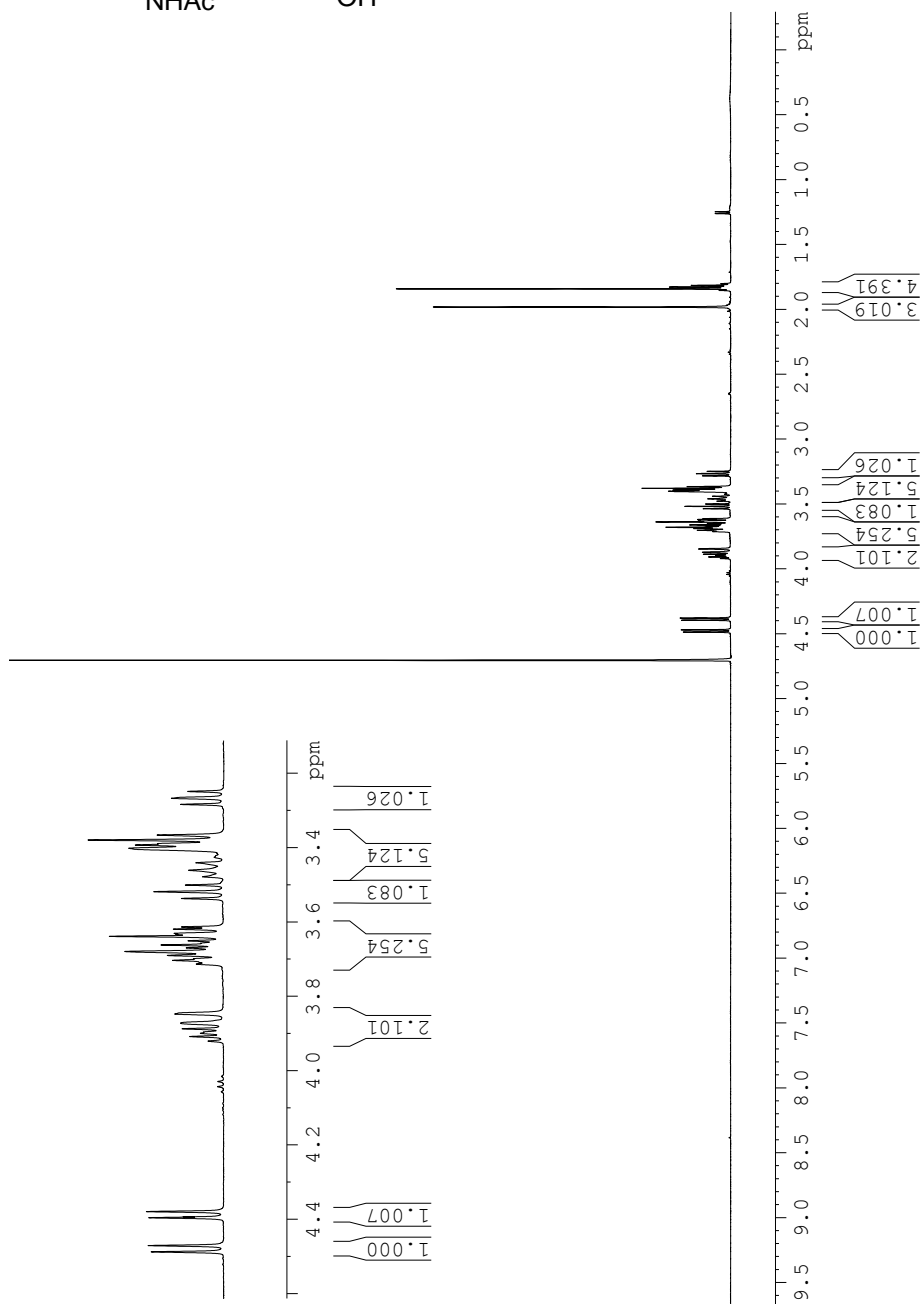
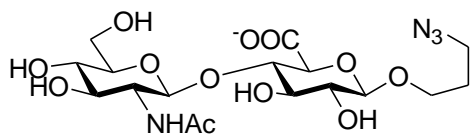
Compuesto 74 (^1H -RMN, 500 MHz, CDCl_3)



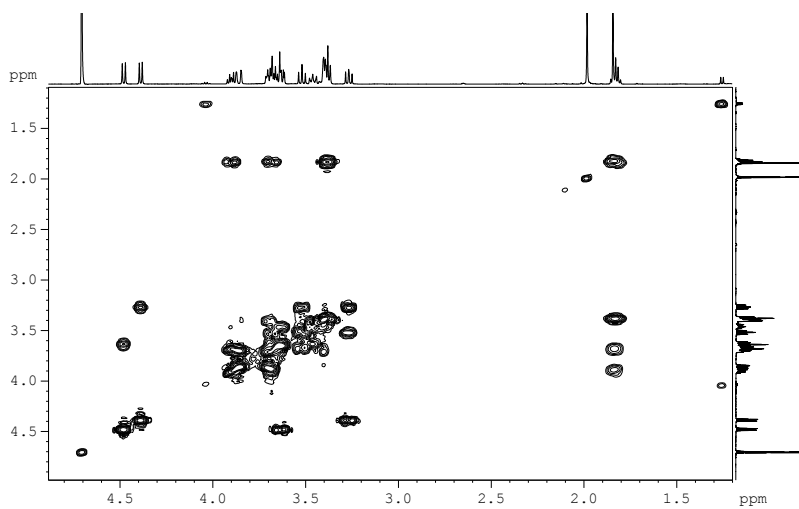
^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



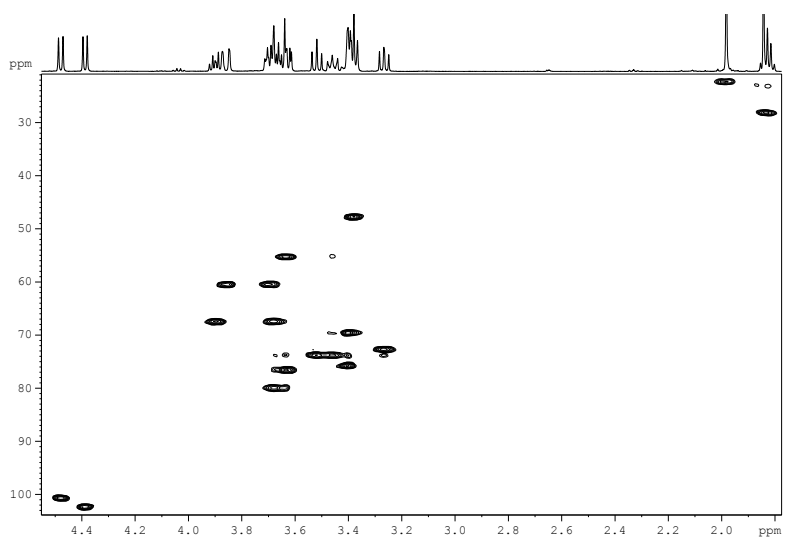
Compuesto 43 (^1H -RMN, 500 MHz, D_2O)



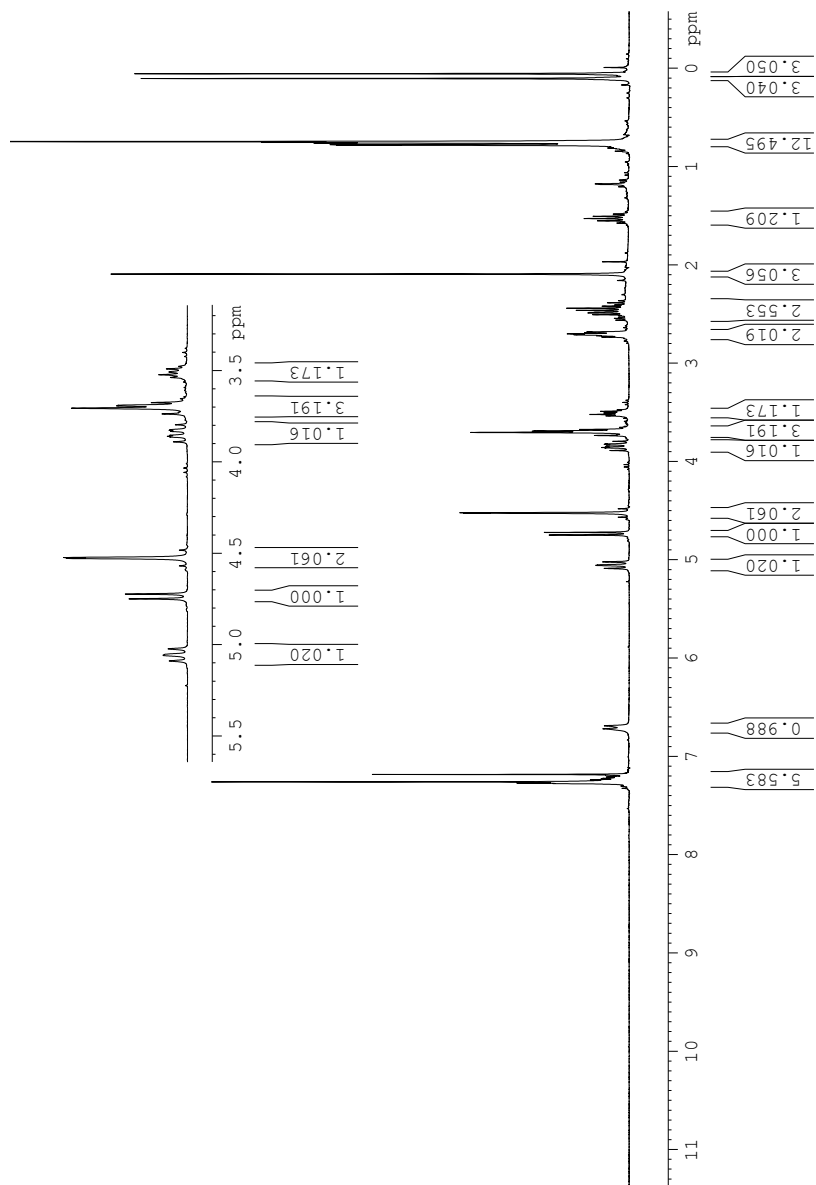
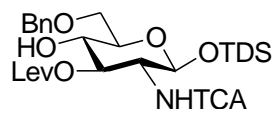
COSY



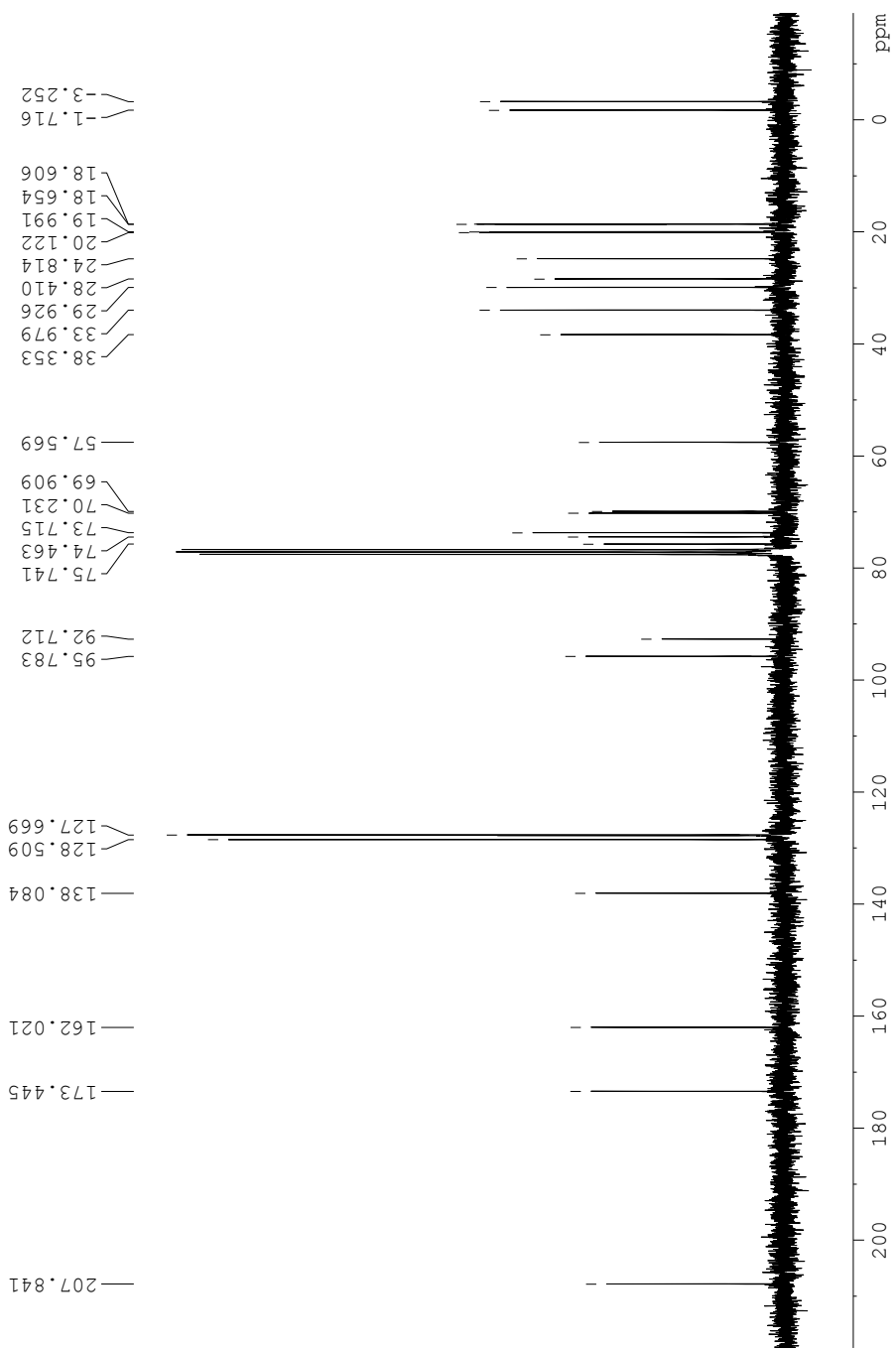
HSQC



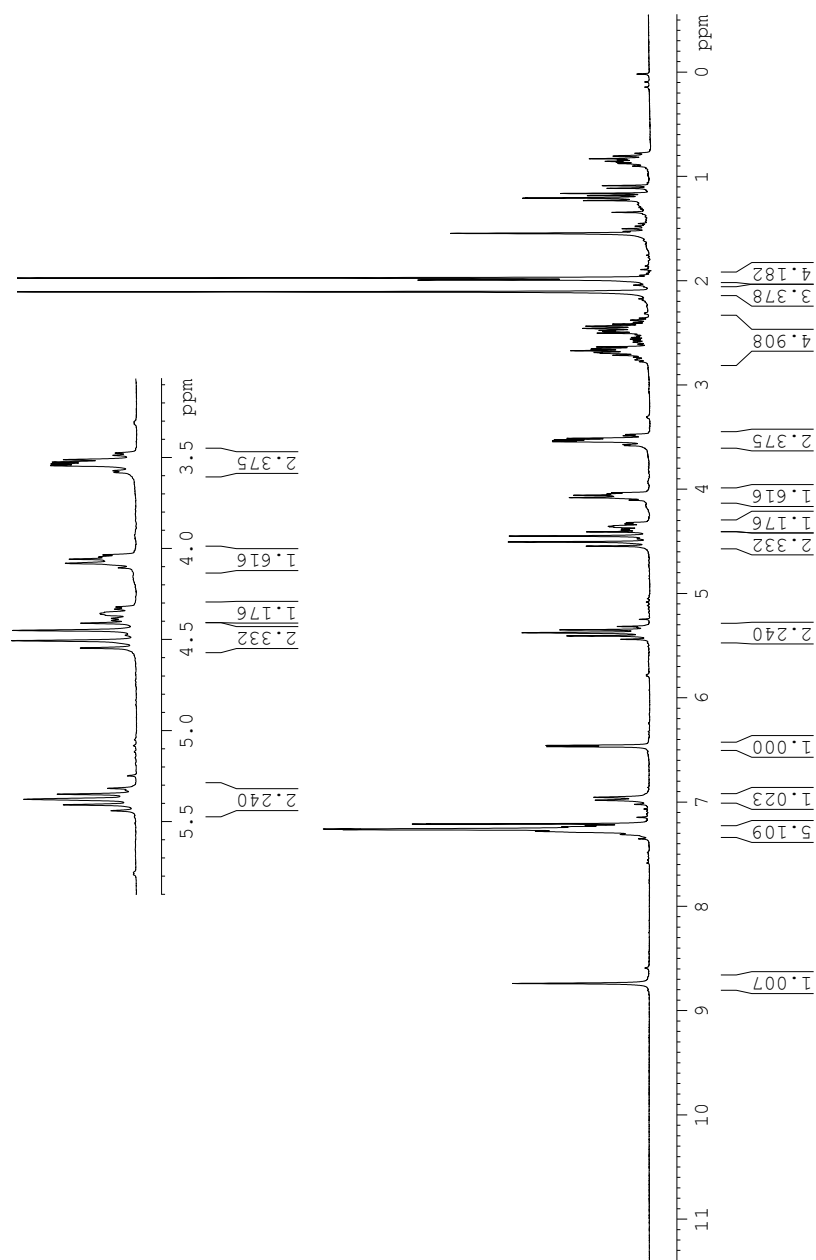
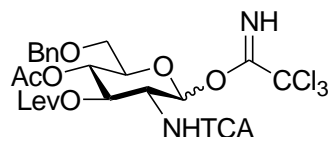
Compuesto 92 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



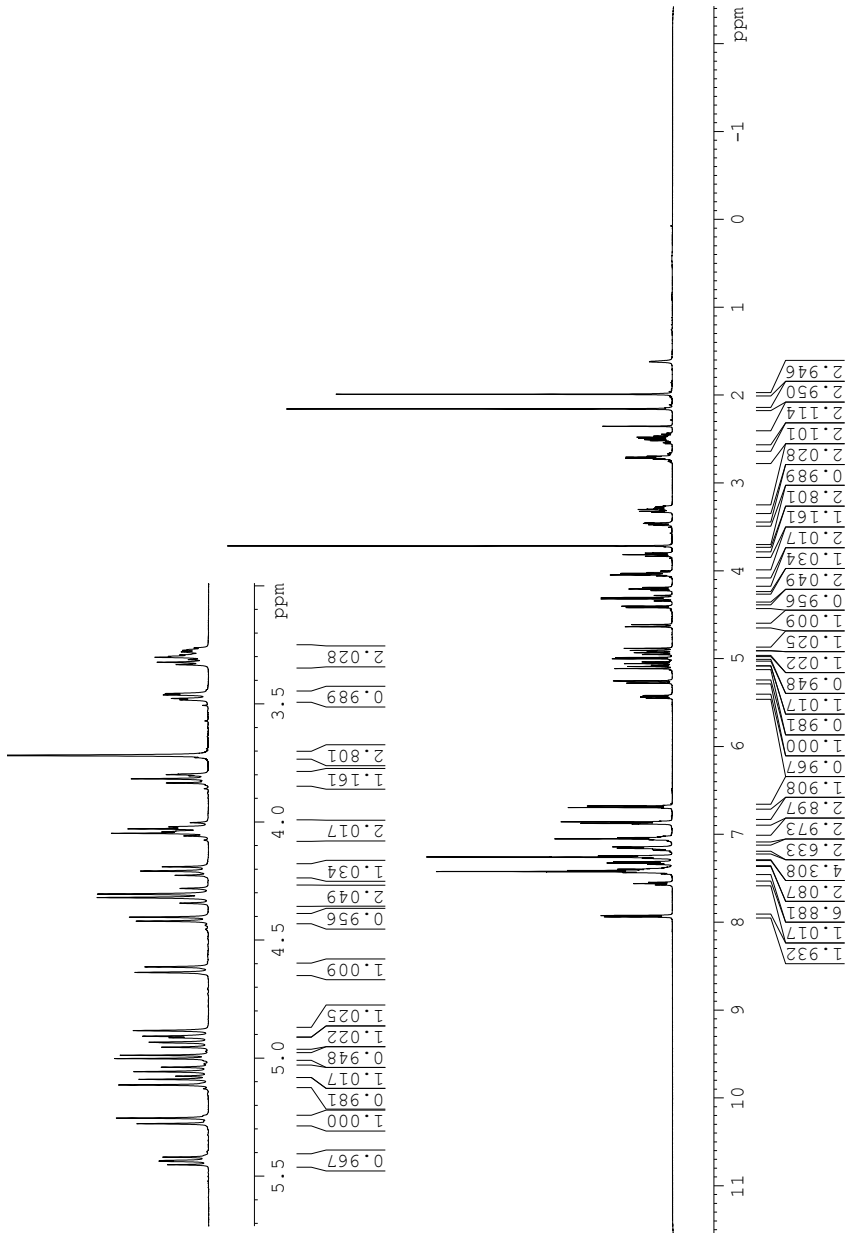
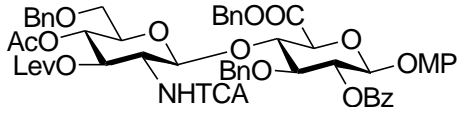
^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



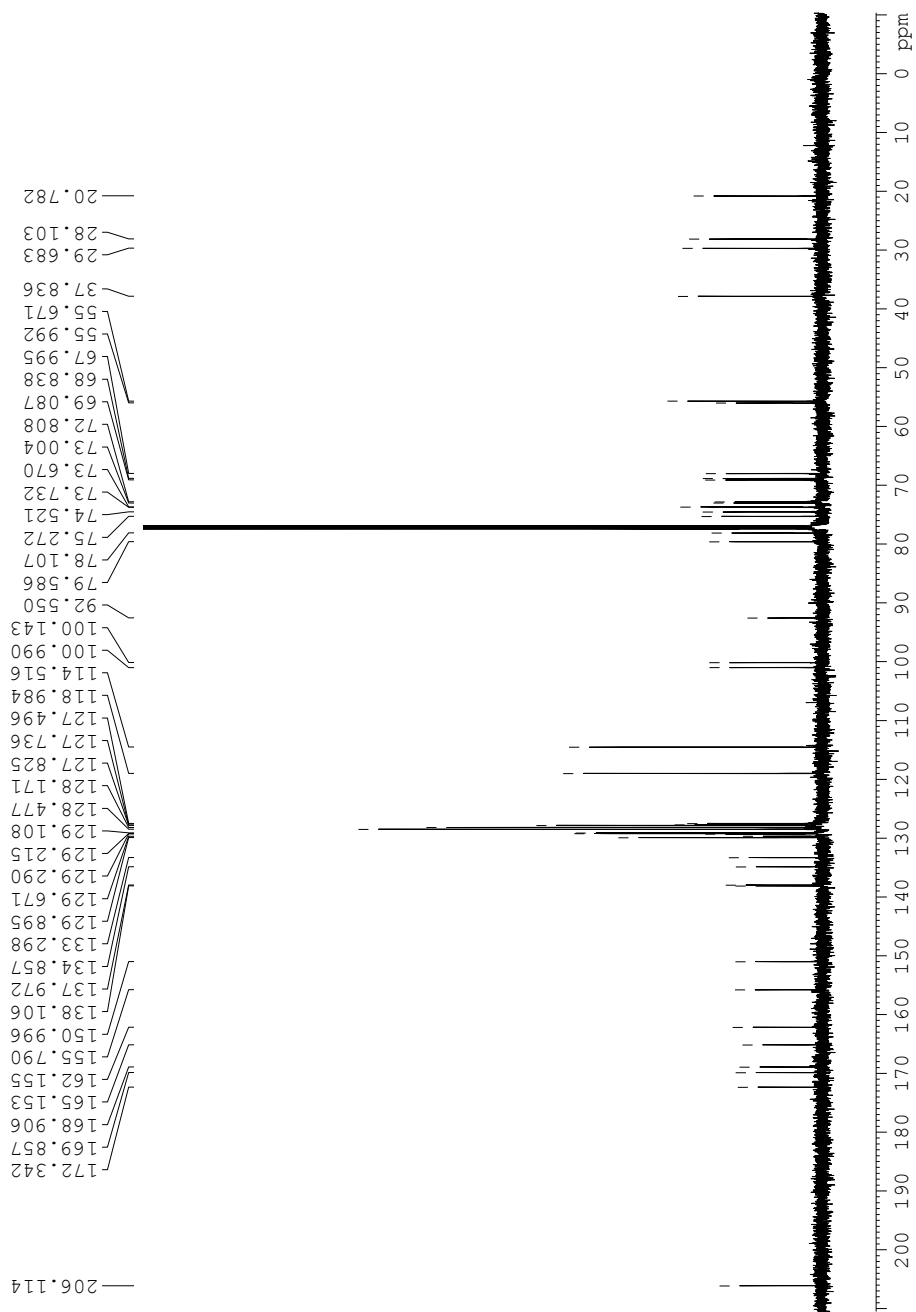
Compuesto 79 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



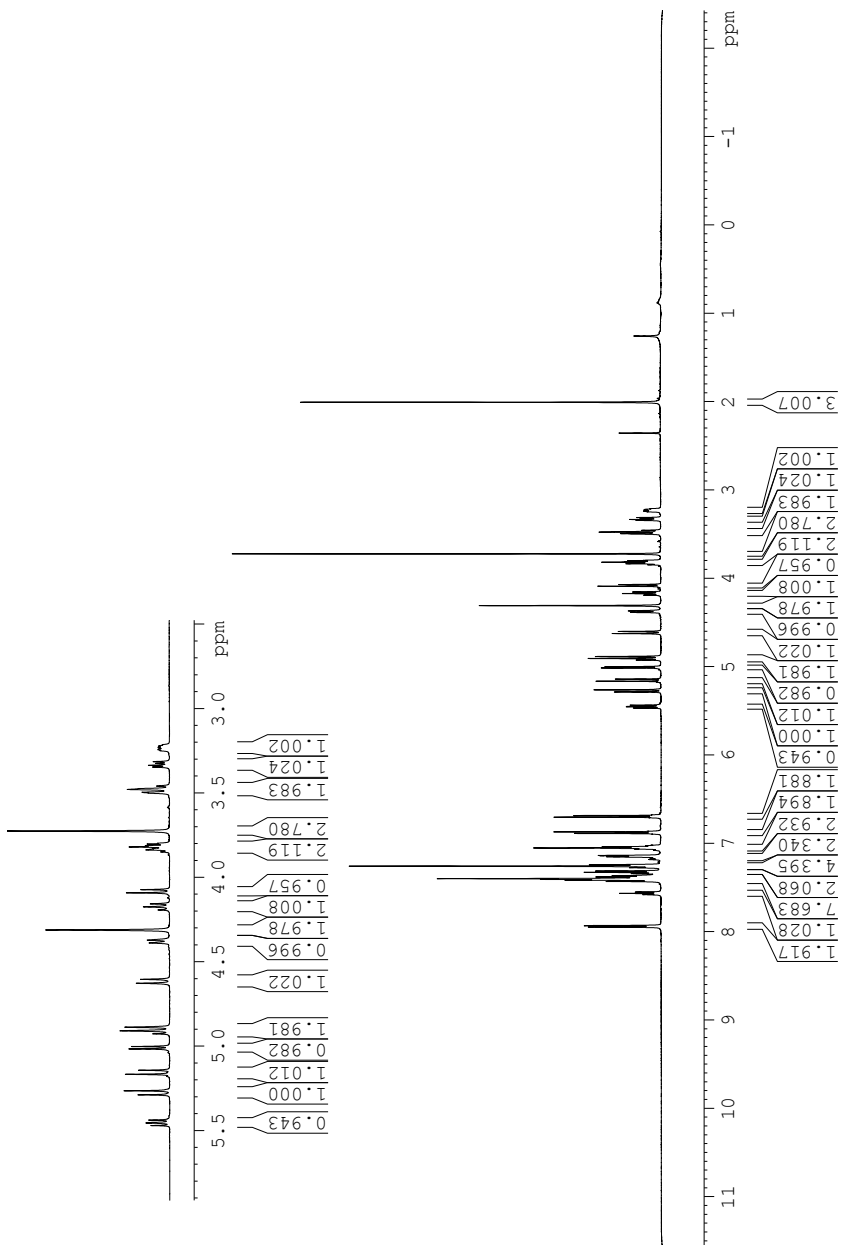
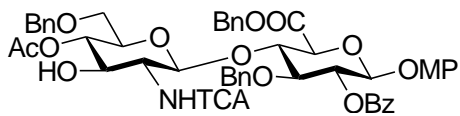
Compuesto 94 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



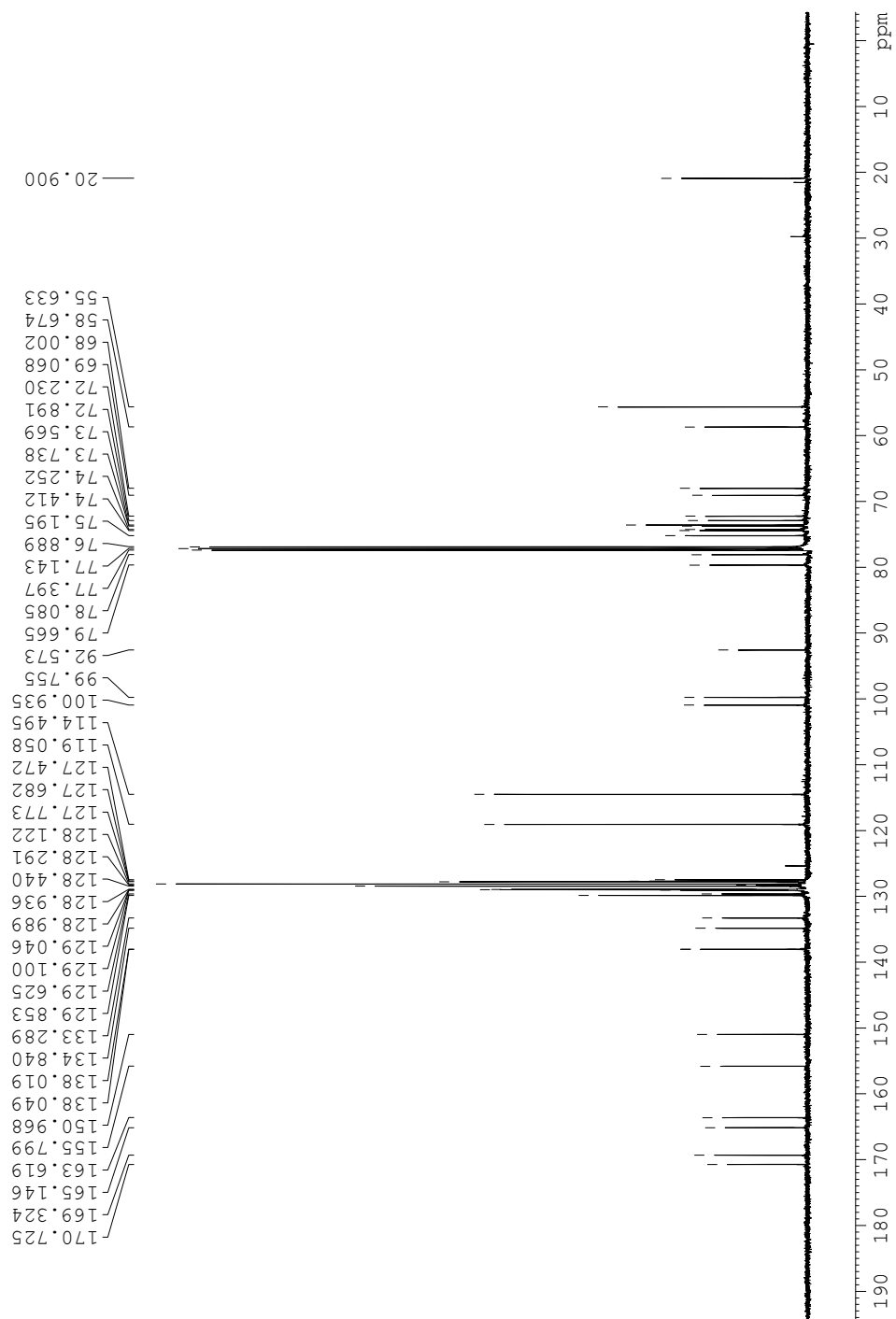
^{13}C -RMN, 125 MHz, CDCl_3)



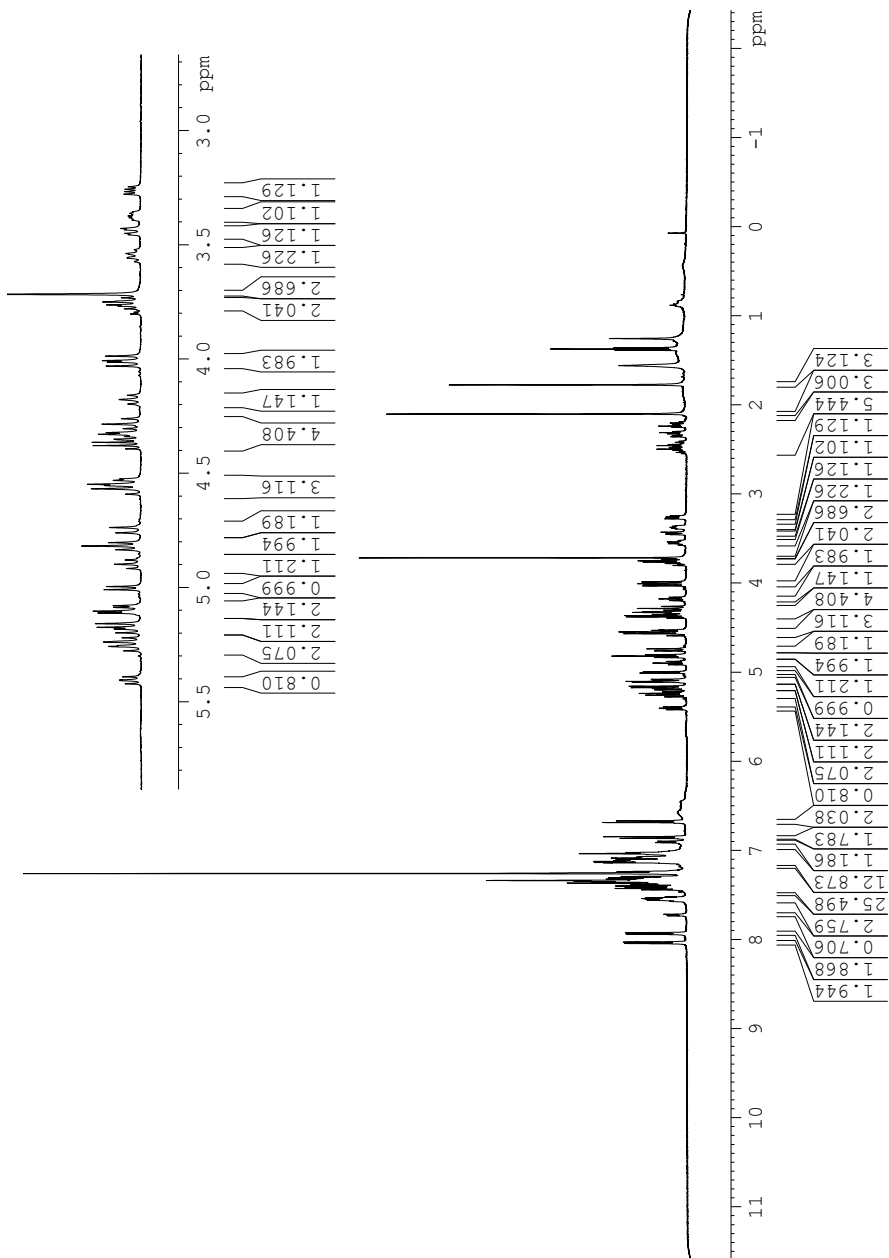
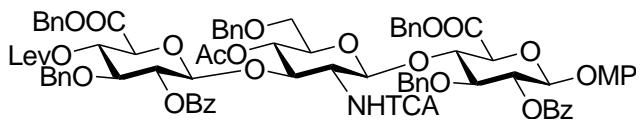
Compuesto 95 (^1H -RMN, 500 MHz, CDCl_3)



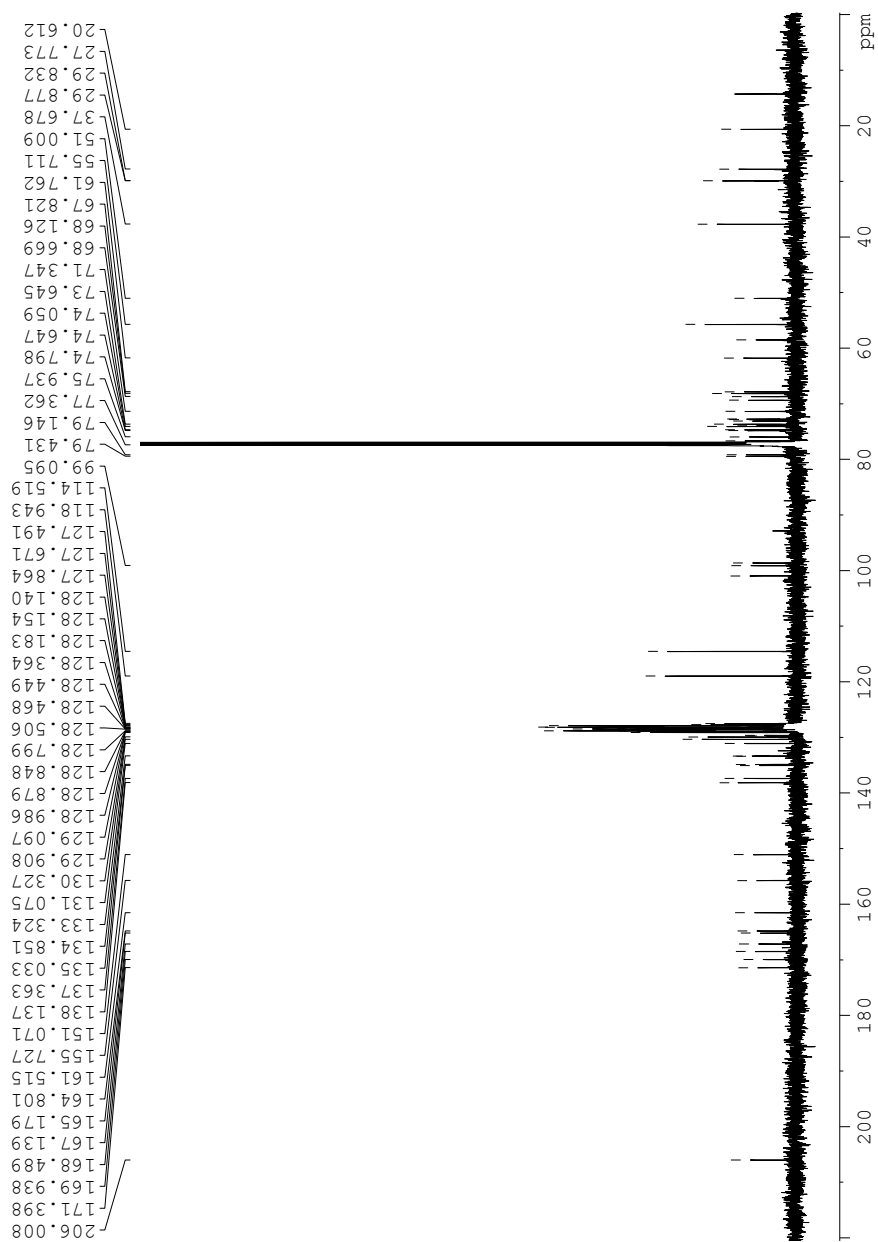
(¹³C-RMN, 125 MHz, CDCl₃)



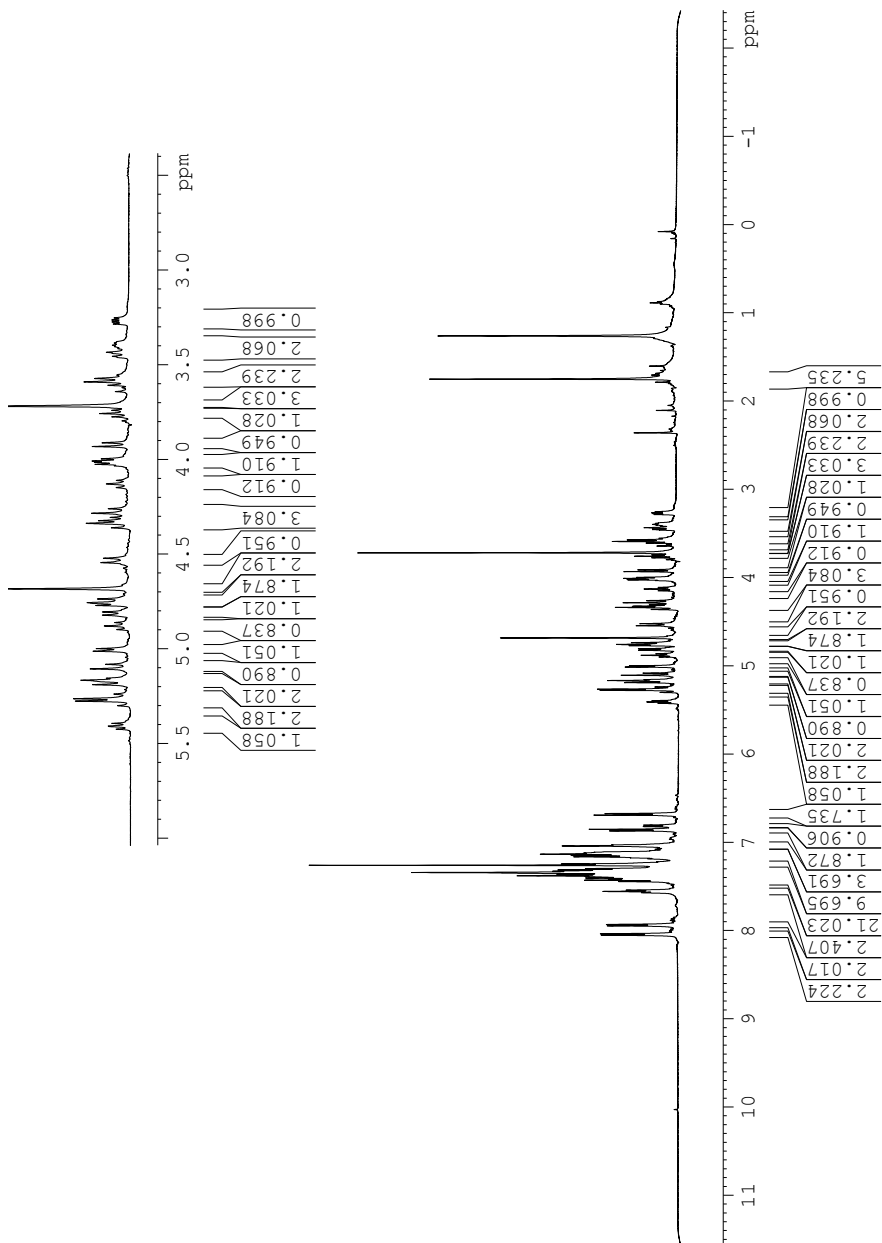
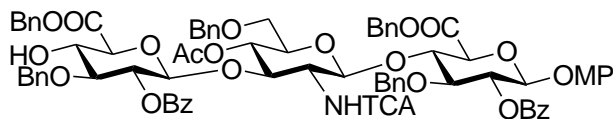
Compuesto 96 (^1H -RMN, 500 MHz, CDCl_3)



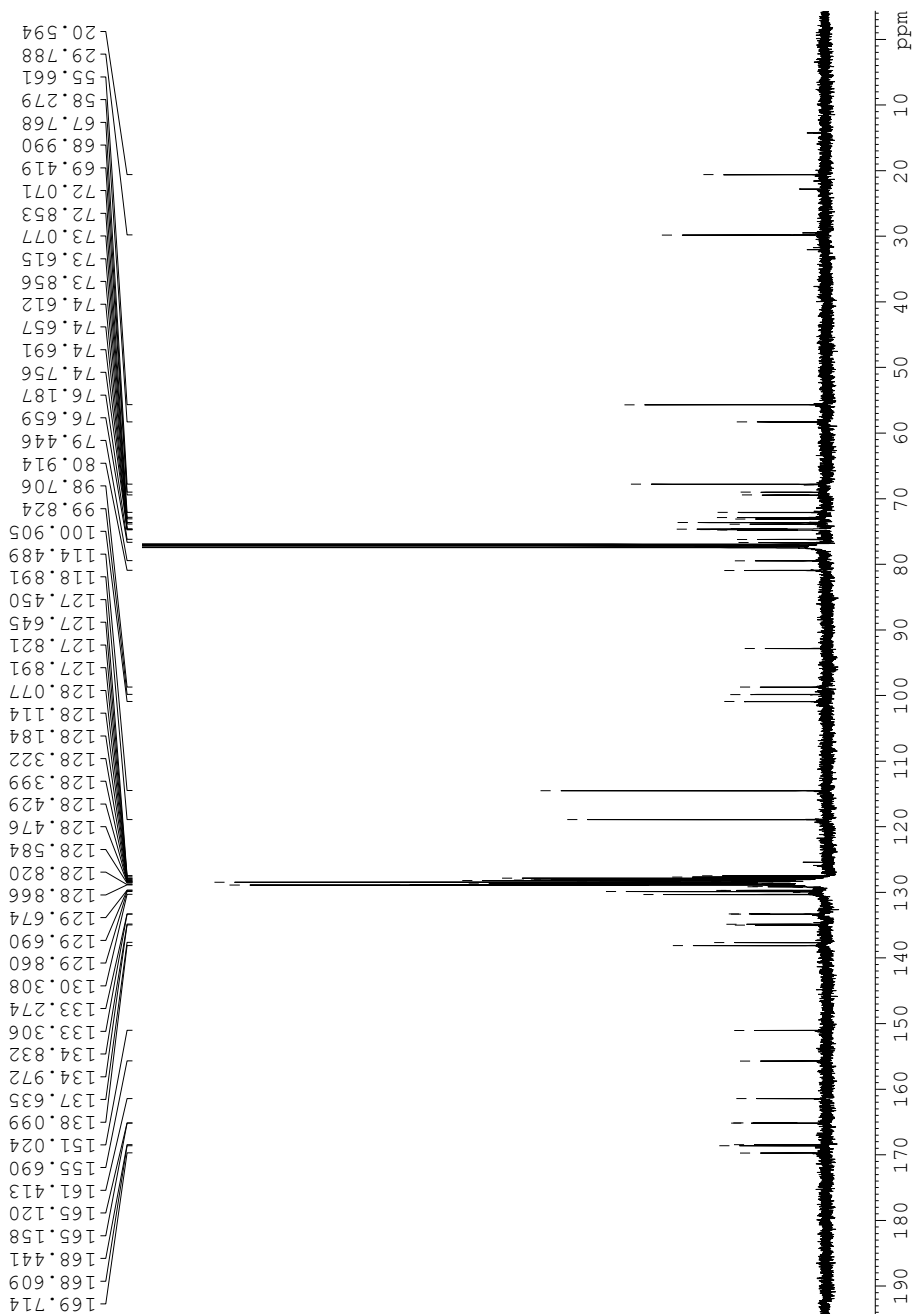
(¹³C-RMN, 125 MHz, CDCl₃)



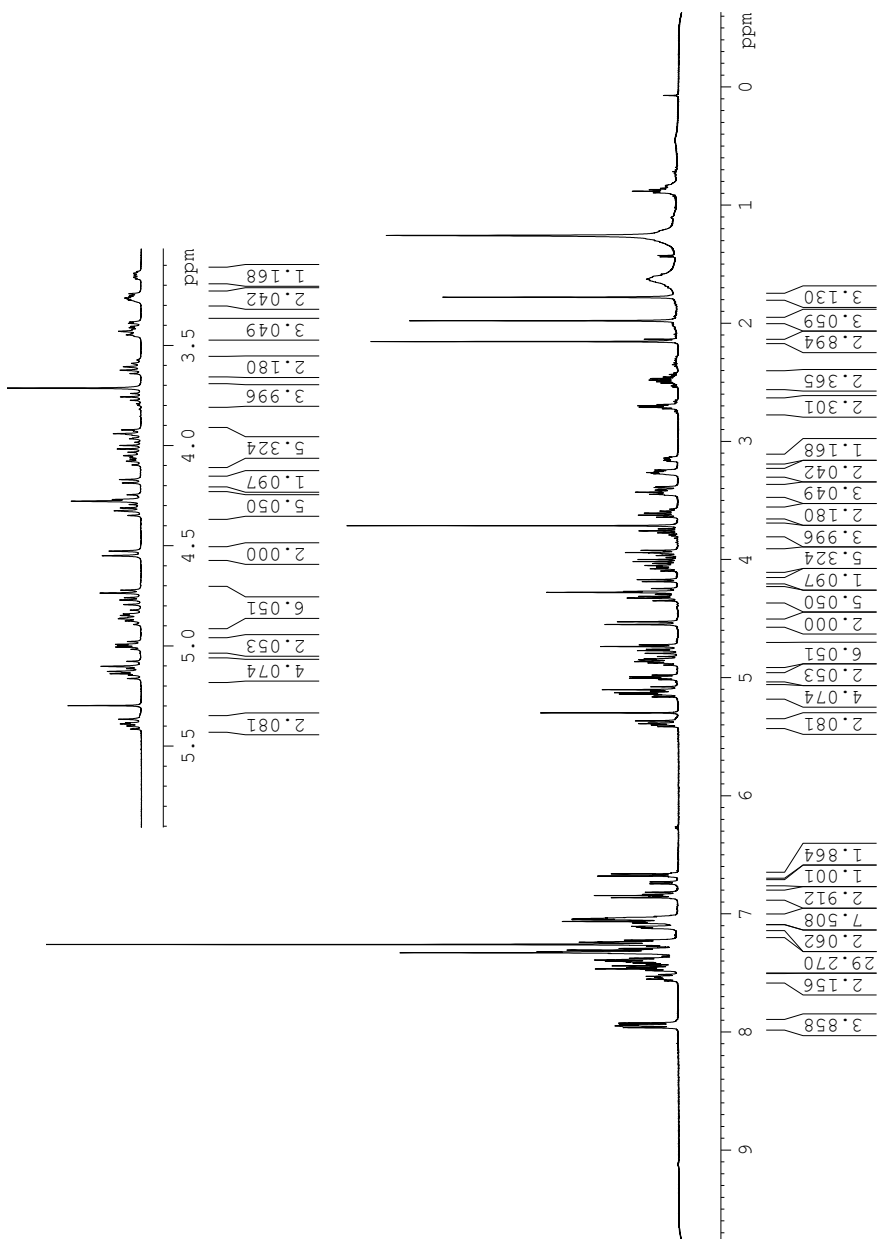
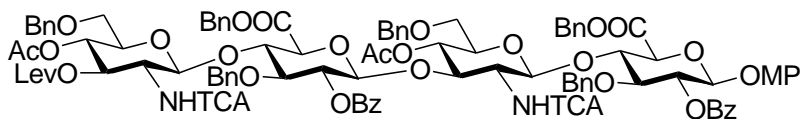
Compuesto 97 (^1H -RMN, 500 MHz, CDCl_3)



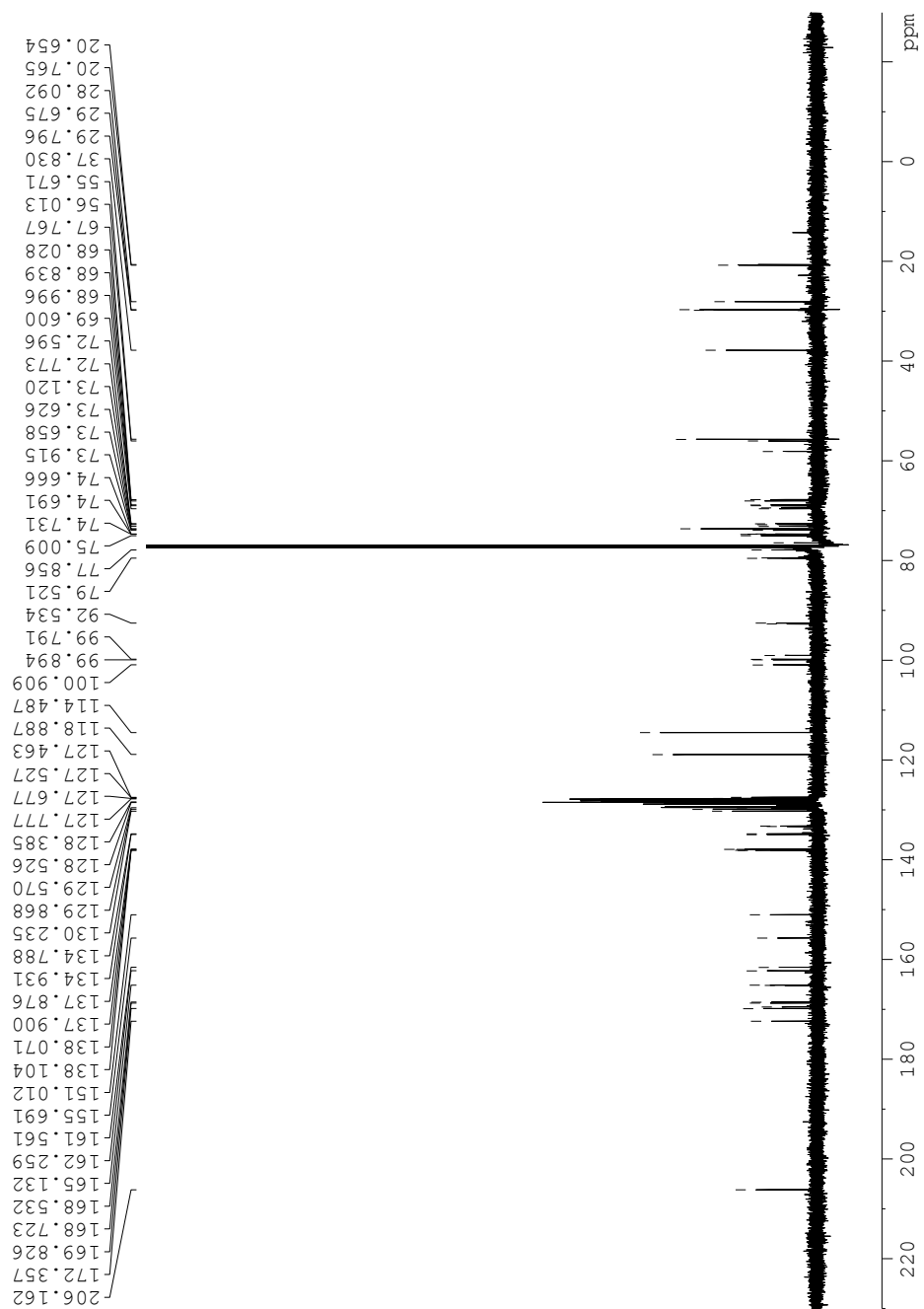
^{13}C -RMN, 125 MHz, CDCl_3)



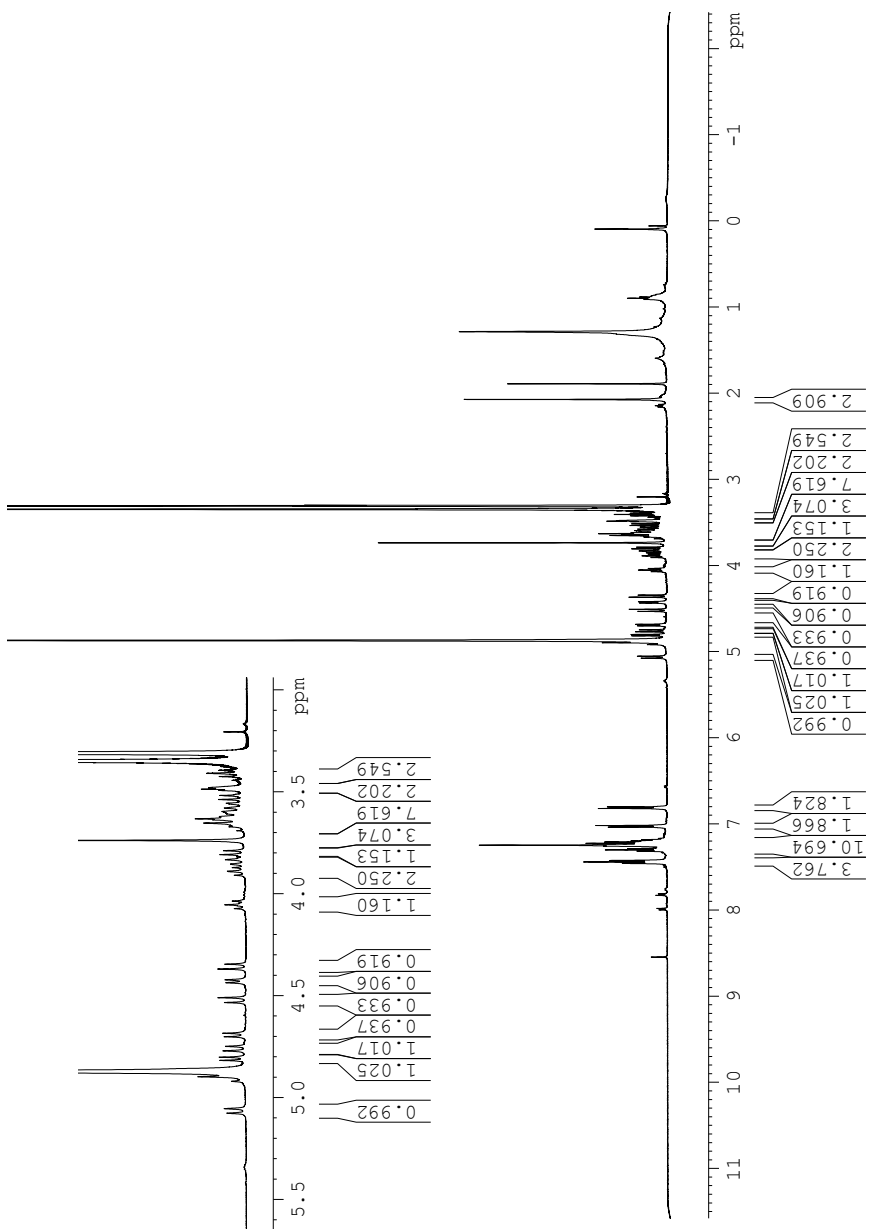
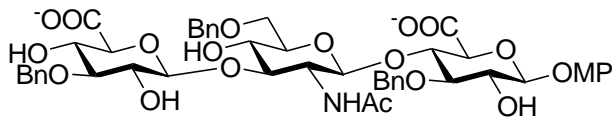
Compuesto 98 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



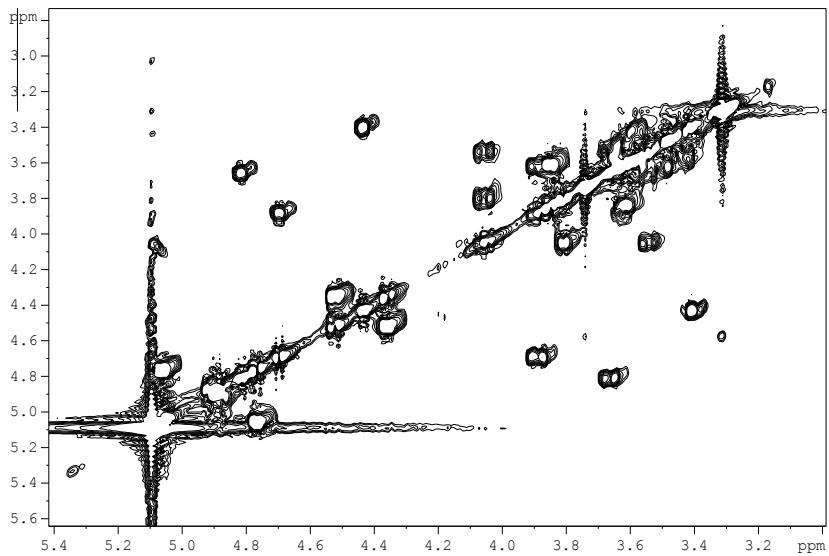
^{13}C -RMN, 125 MHz, CDCl_3)



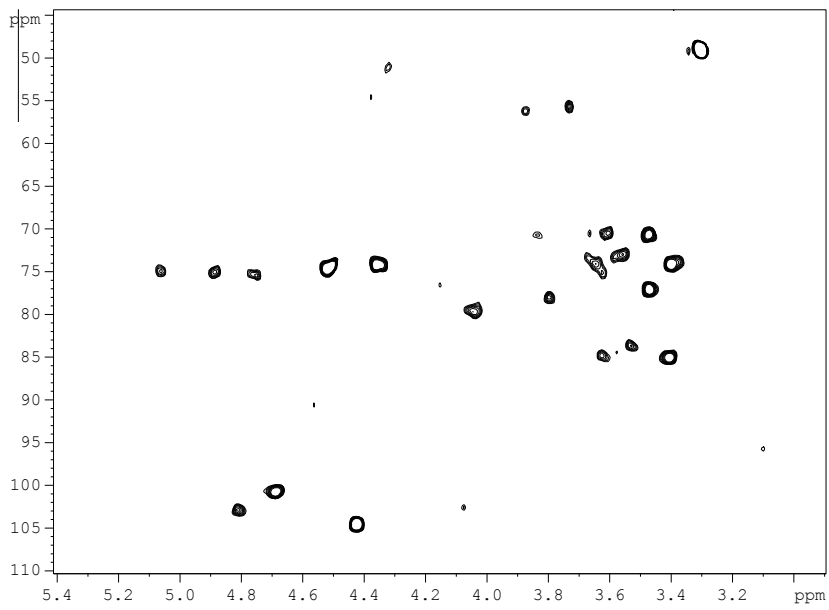
Compuesto 99 (^1H -RMN, 500 MHz, MeOD)



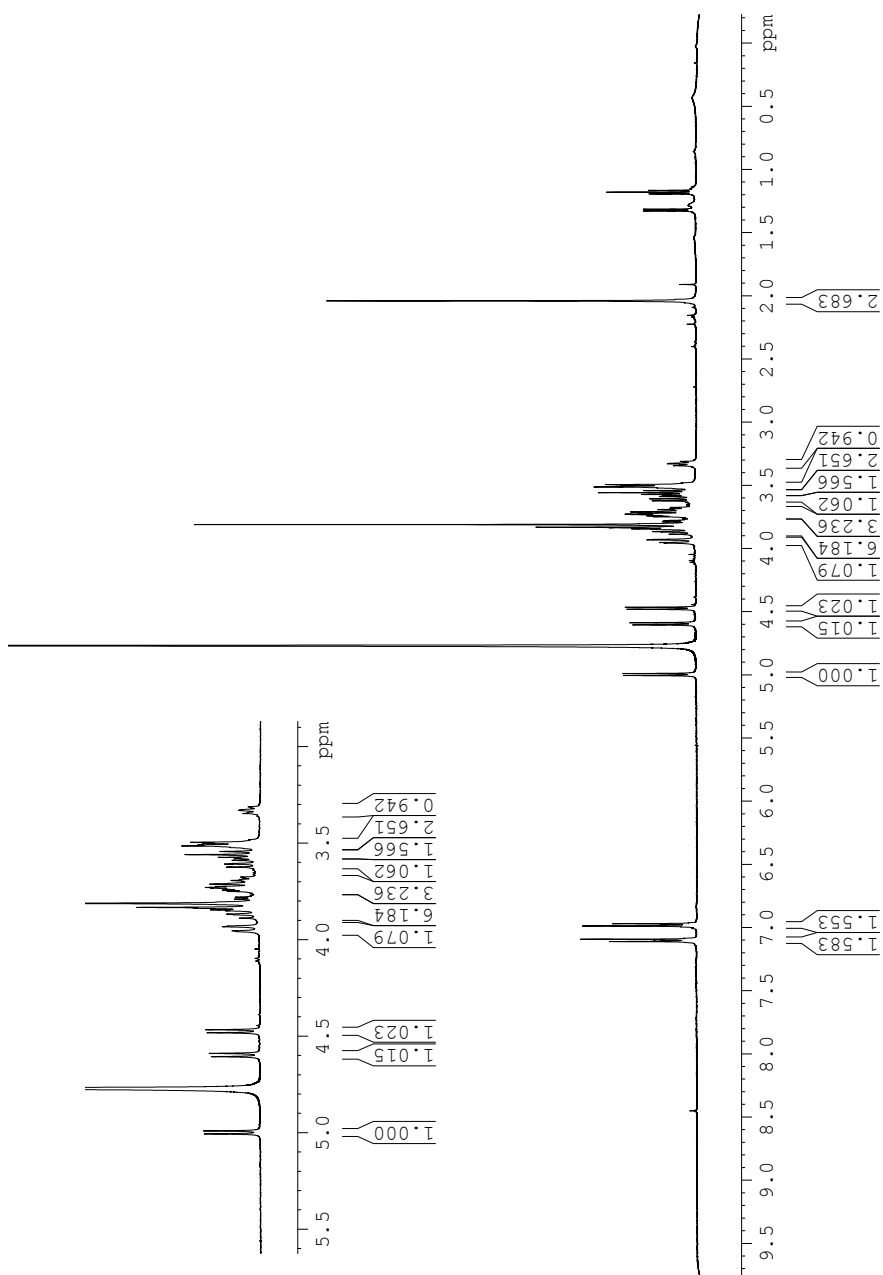
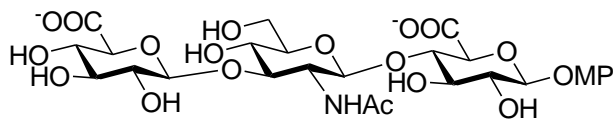
COSY



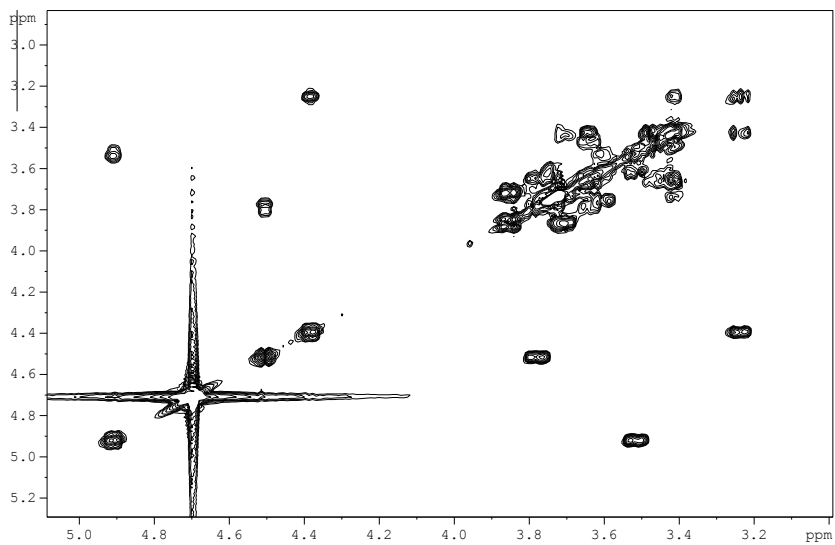
HSQC



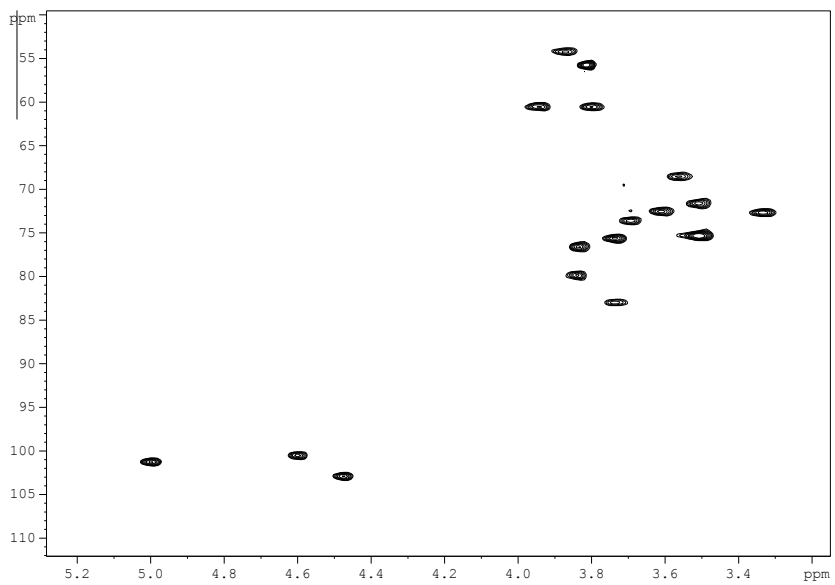
Compuesto 44 (^1H -RMN, 500 MHz, D_2O)



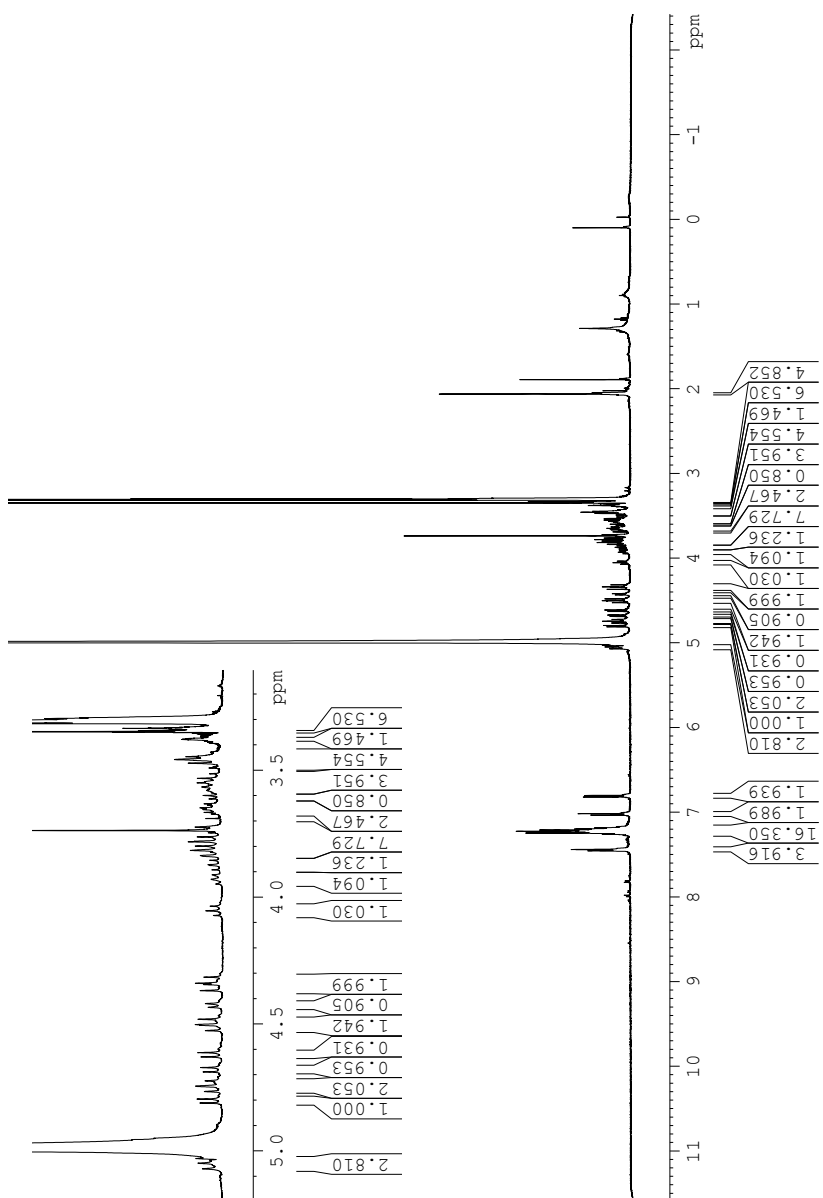
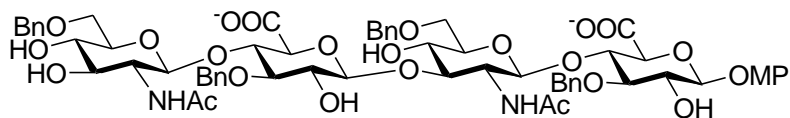
COSY



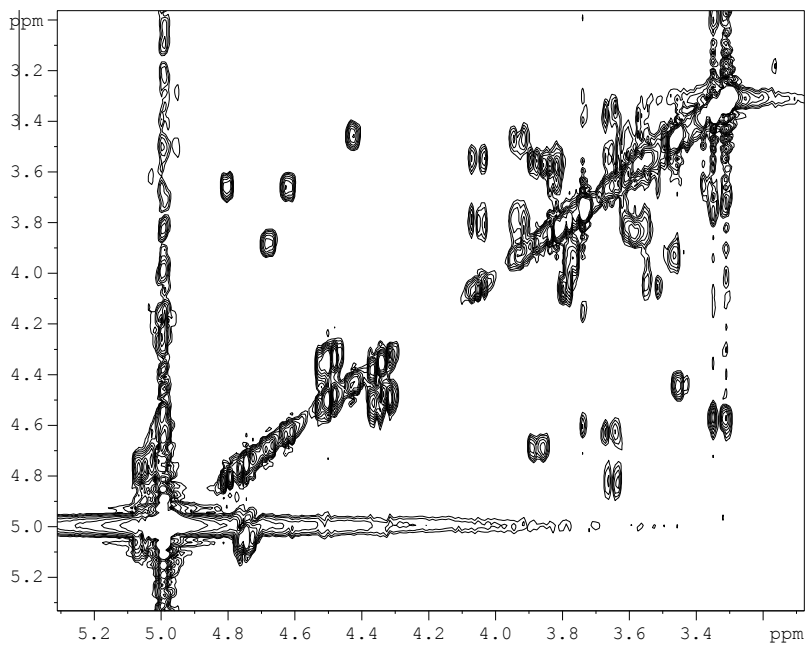
HSQC



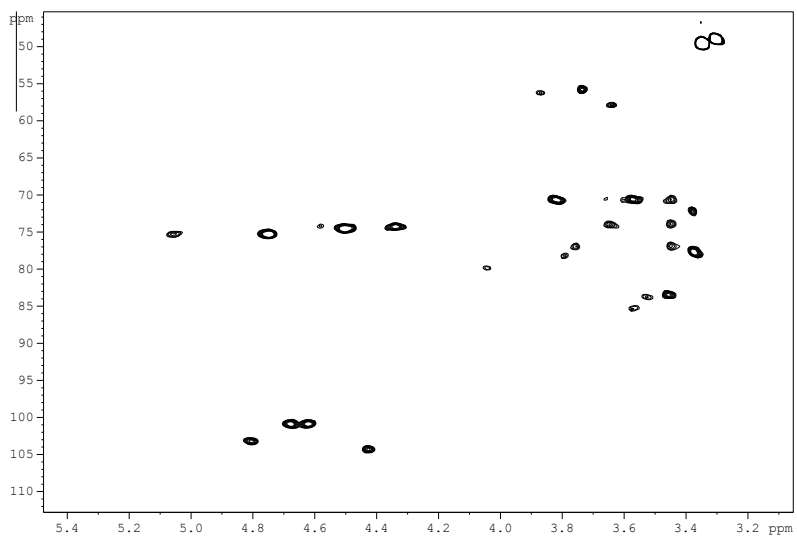
Compuesto 100 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, MeOD)



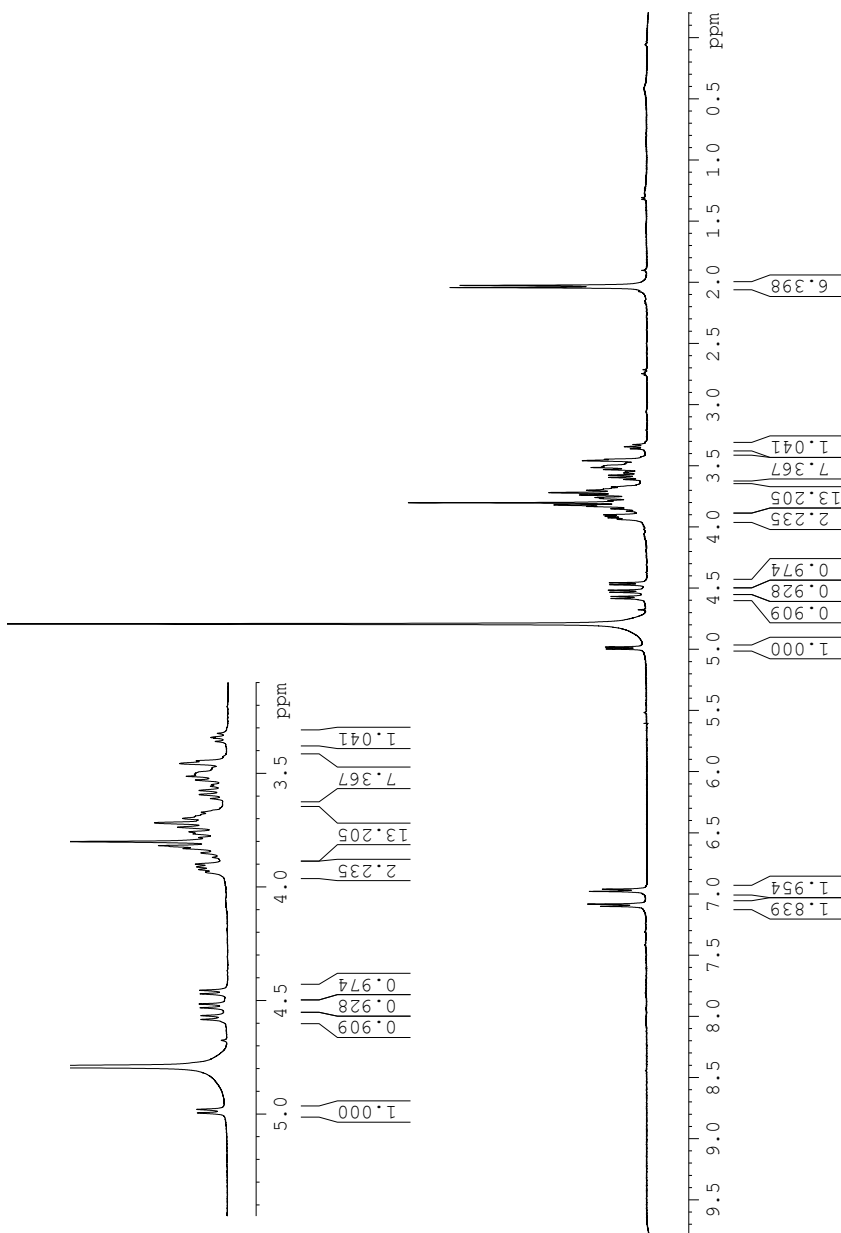
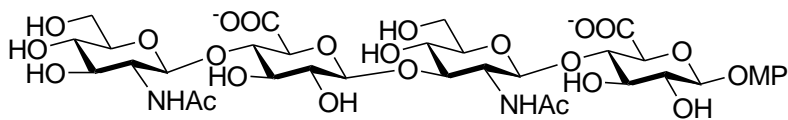
COSY



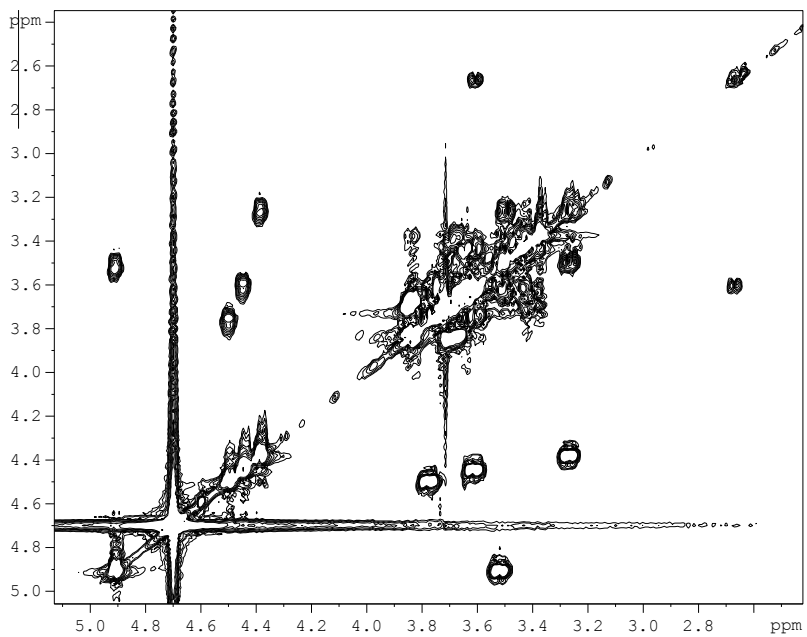
HSQC



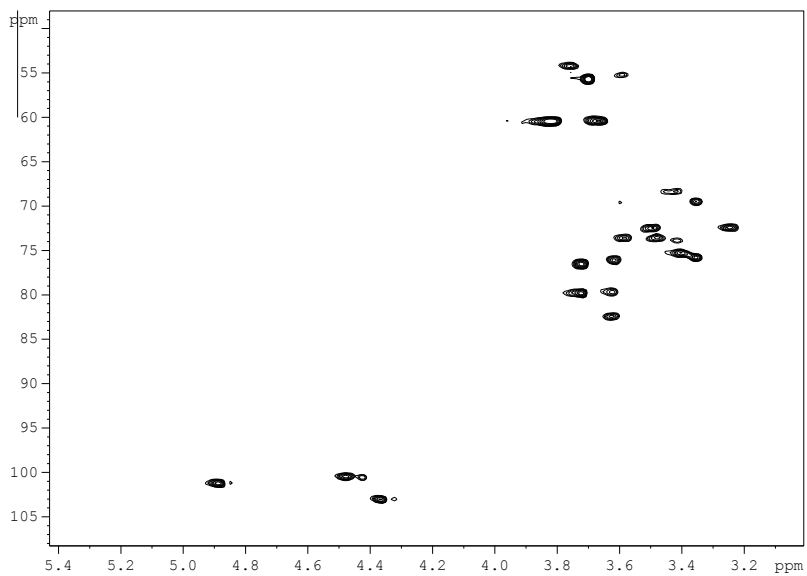
Compuesto 45 (^1H -RMN, 500 MHz, D_2O)



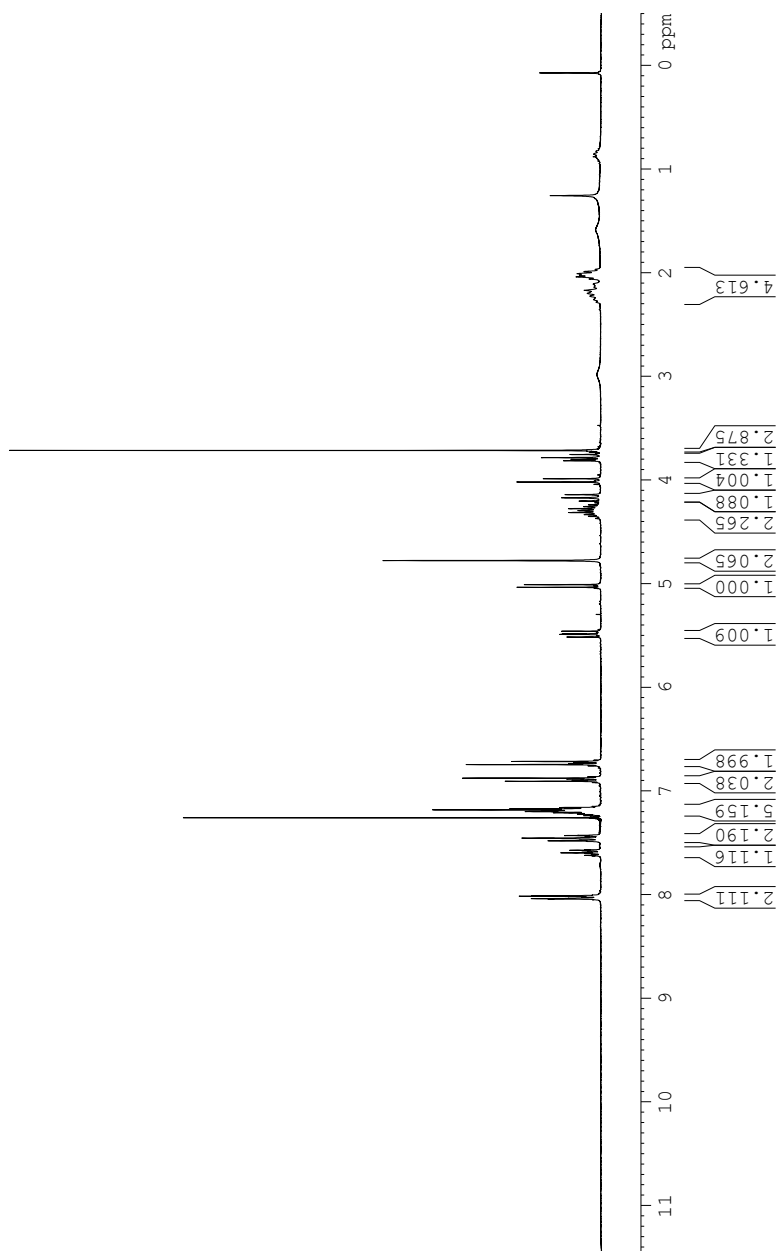
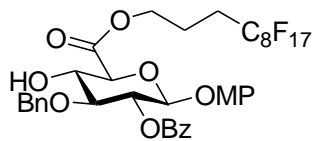
COSY



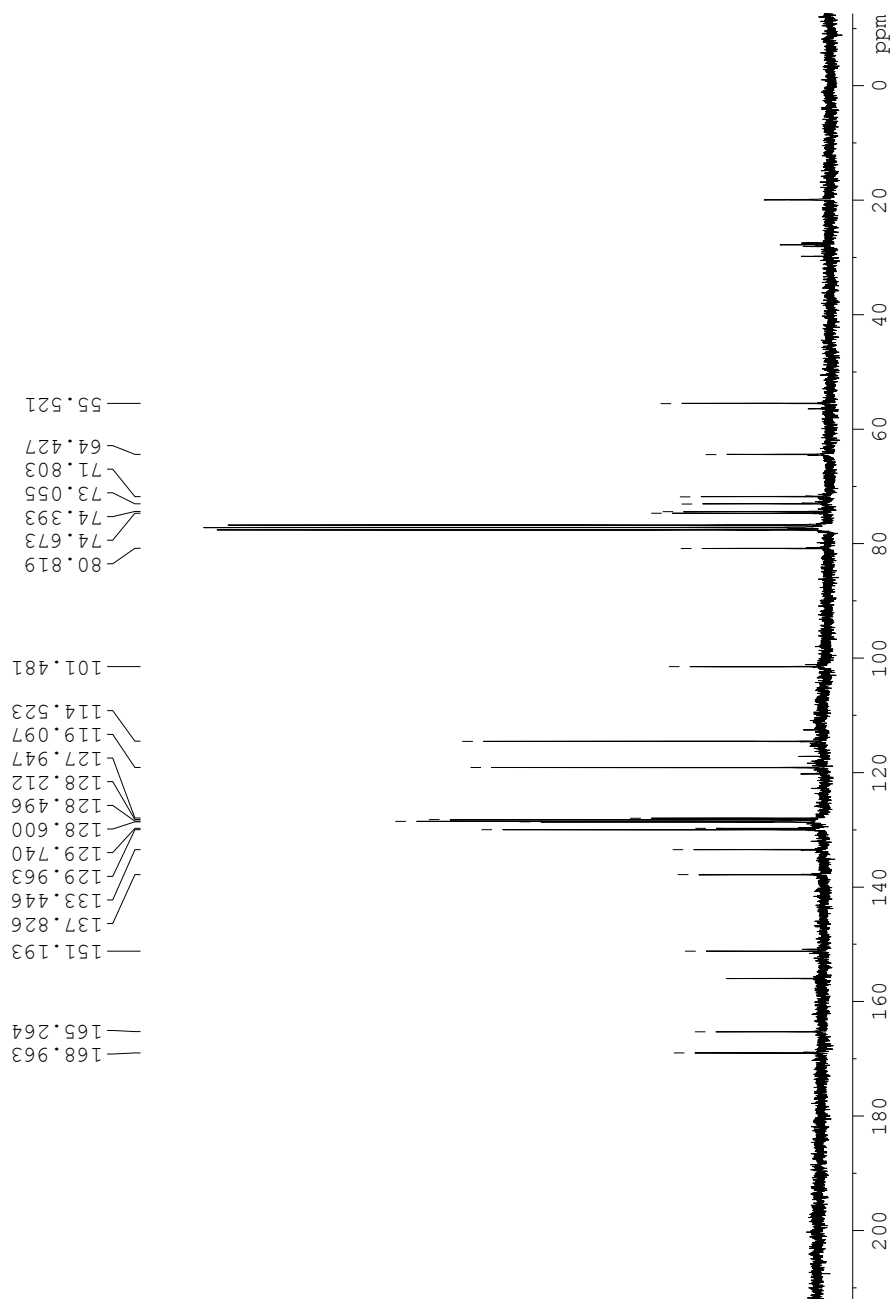
HSQC



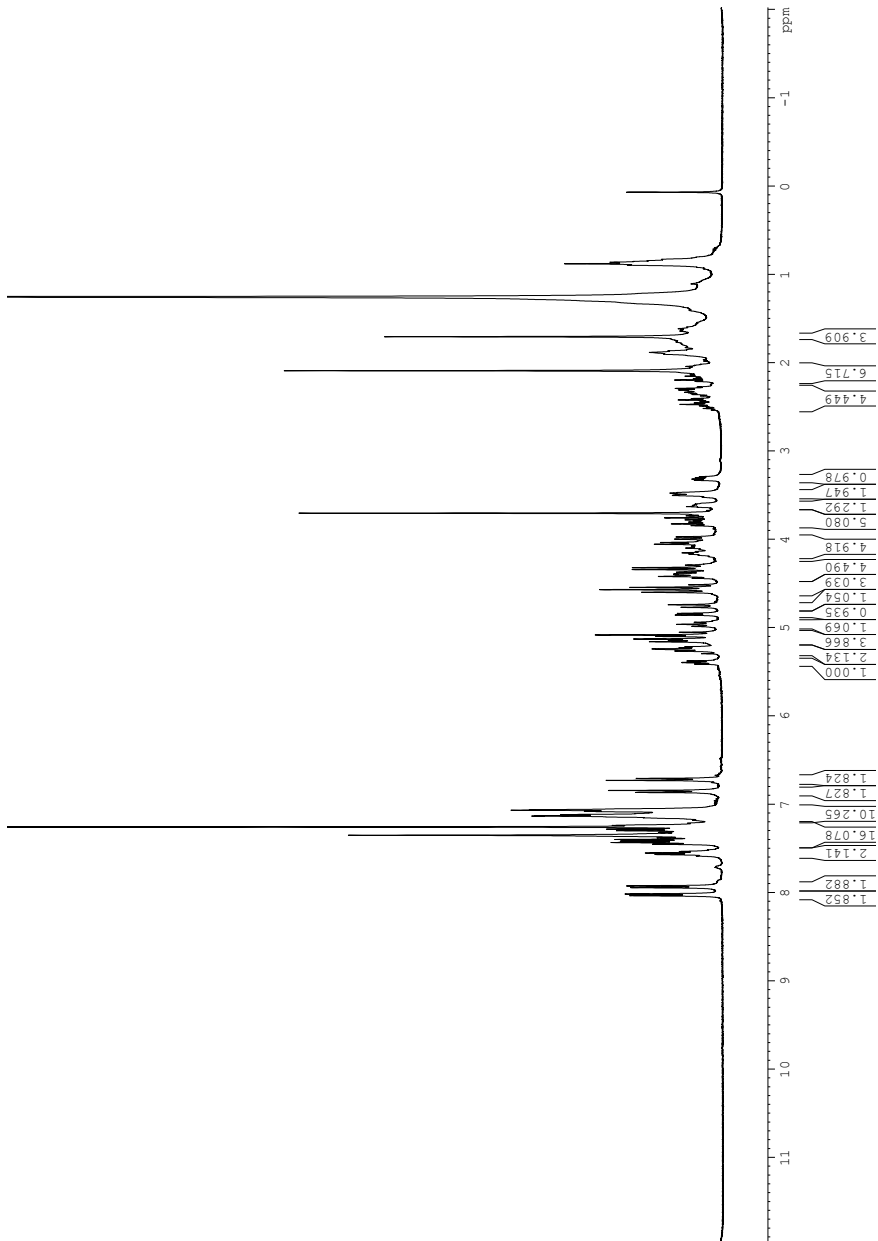
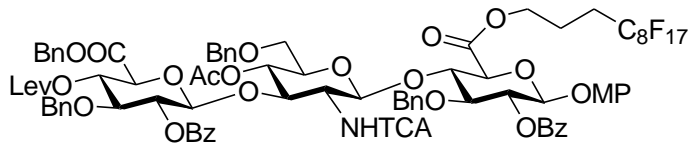
Compuesto 101 (^1H -RMN, 300 MHz, CDCl_3)



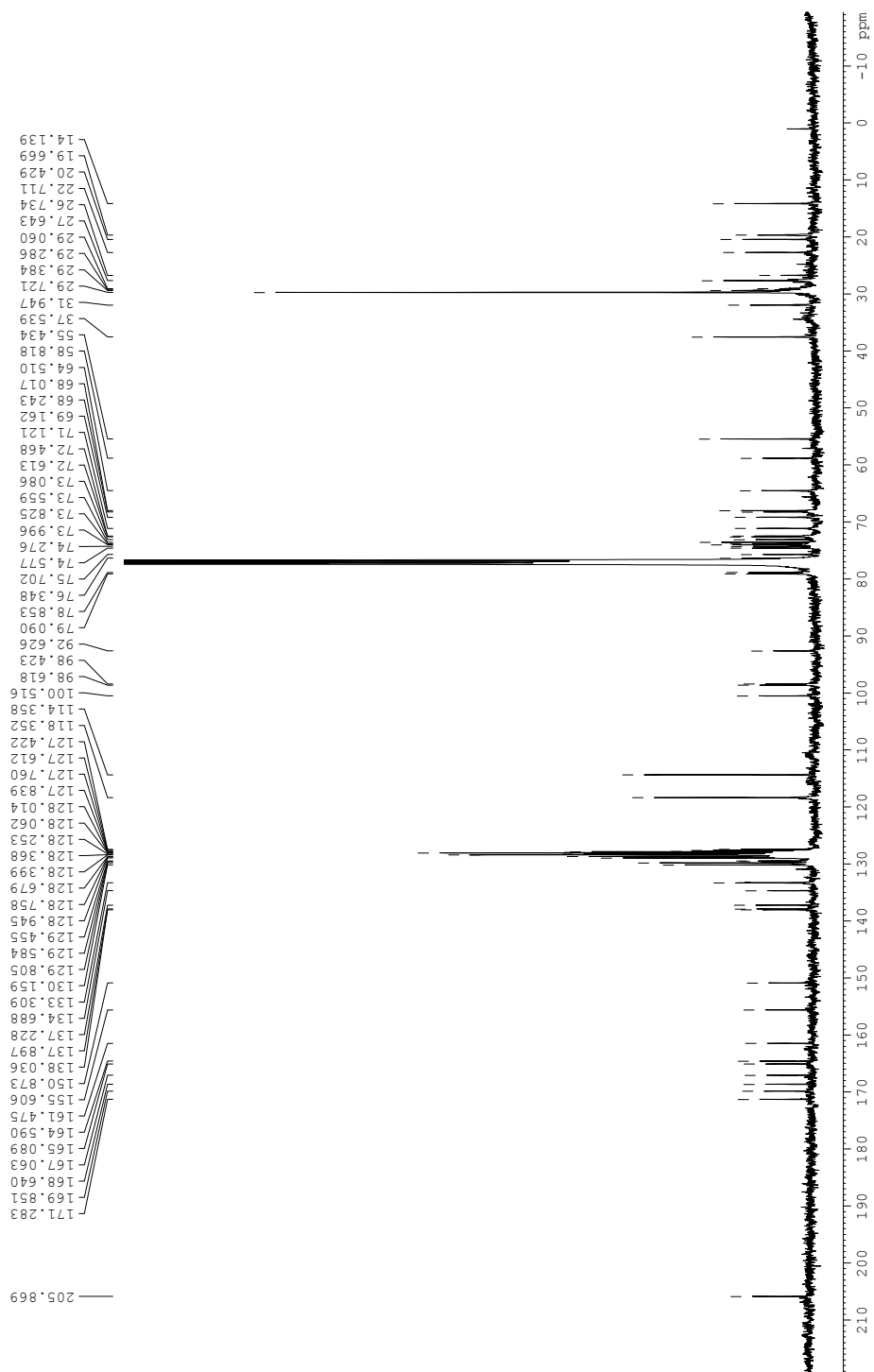
^{13}C -RMN, 75 MHz, CDCl_3)



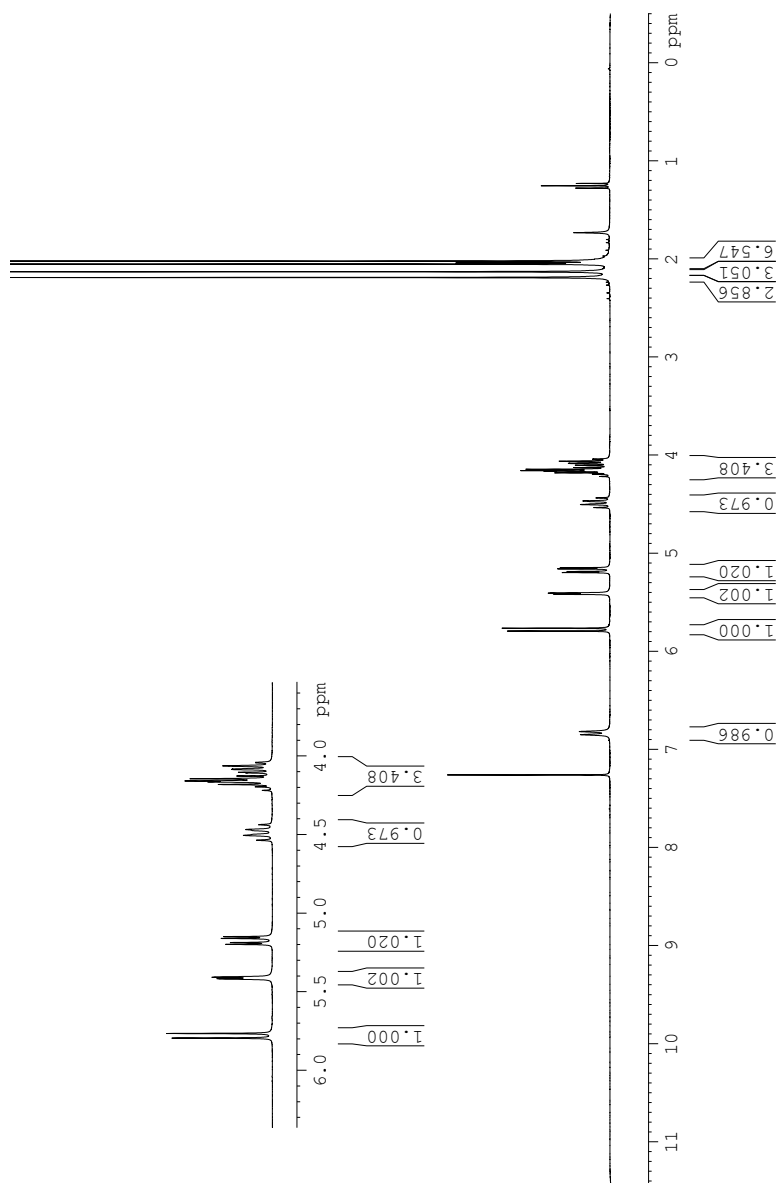
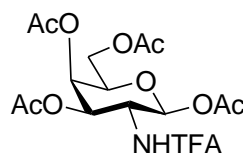
Compuesto 104 (^1H -RMN, 400 MHz, CDCl_3)



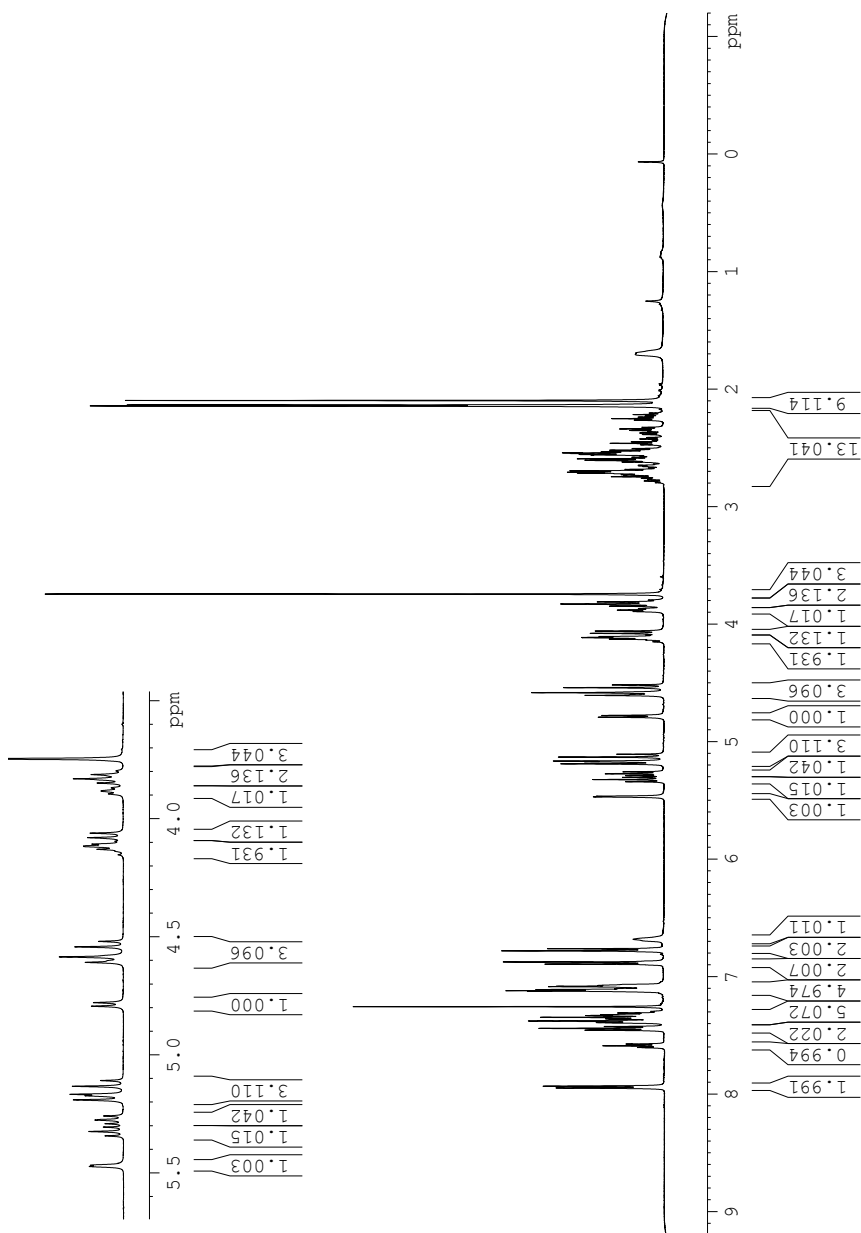
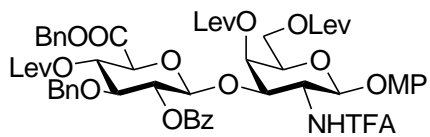
(¹³C-RMN, 100 MHz, CDCl₃)



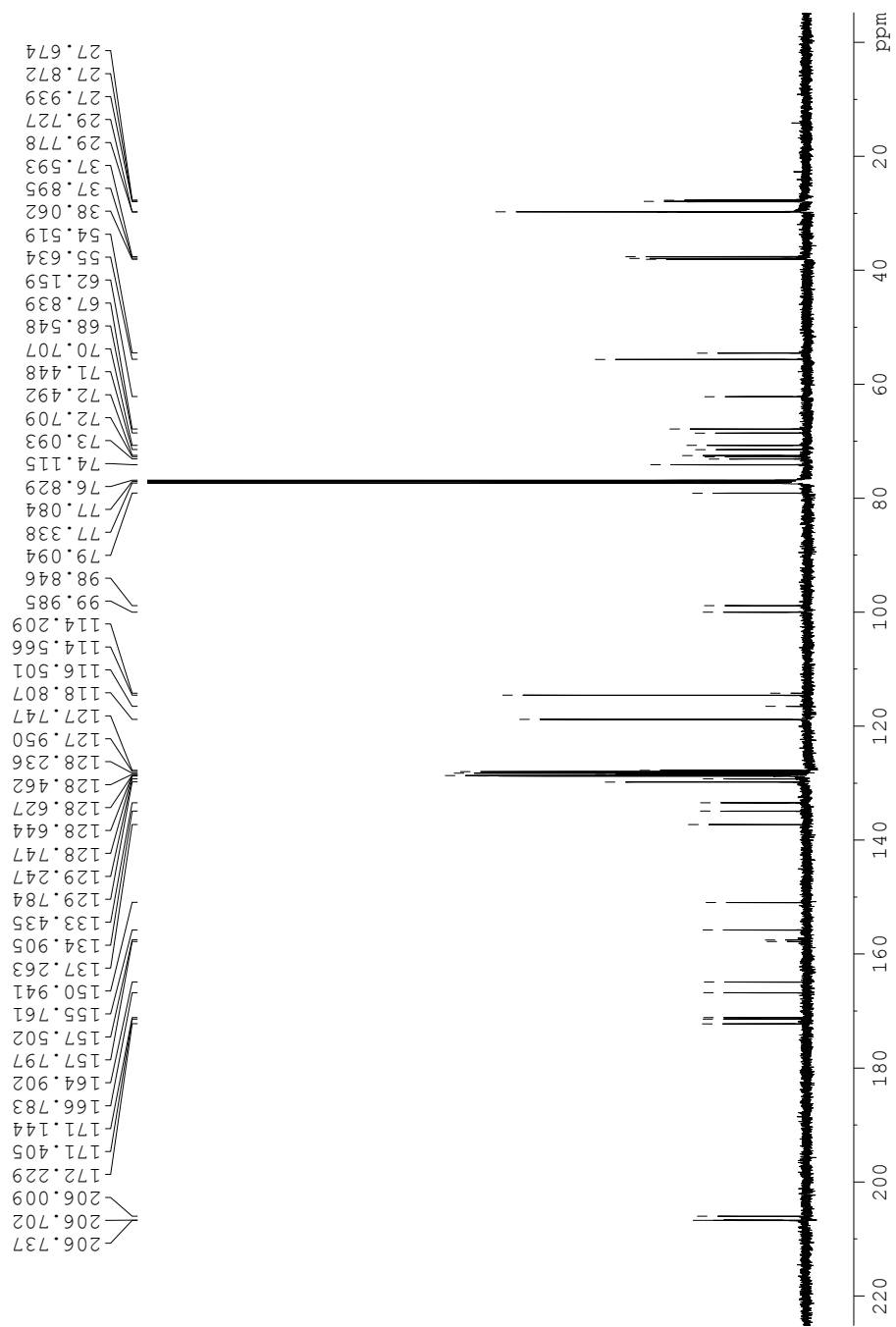
Compuesto 128 ($^1\text{H-RMN}$, 300 MHz, CDCl_3)



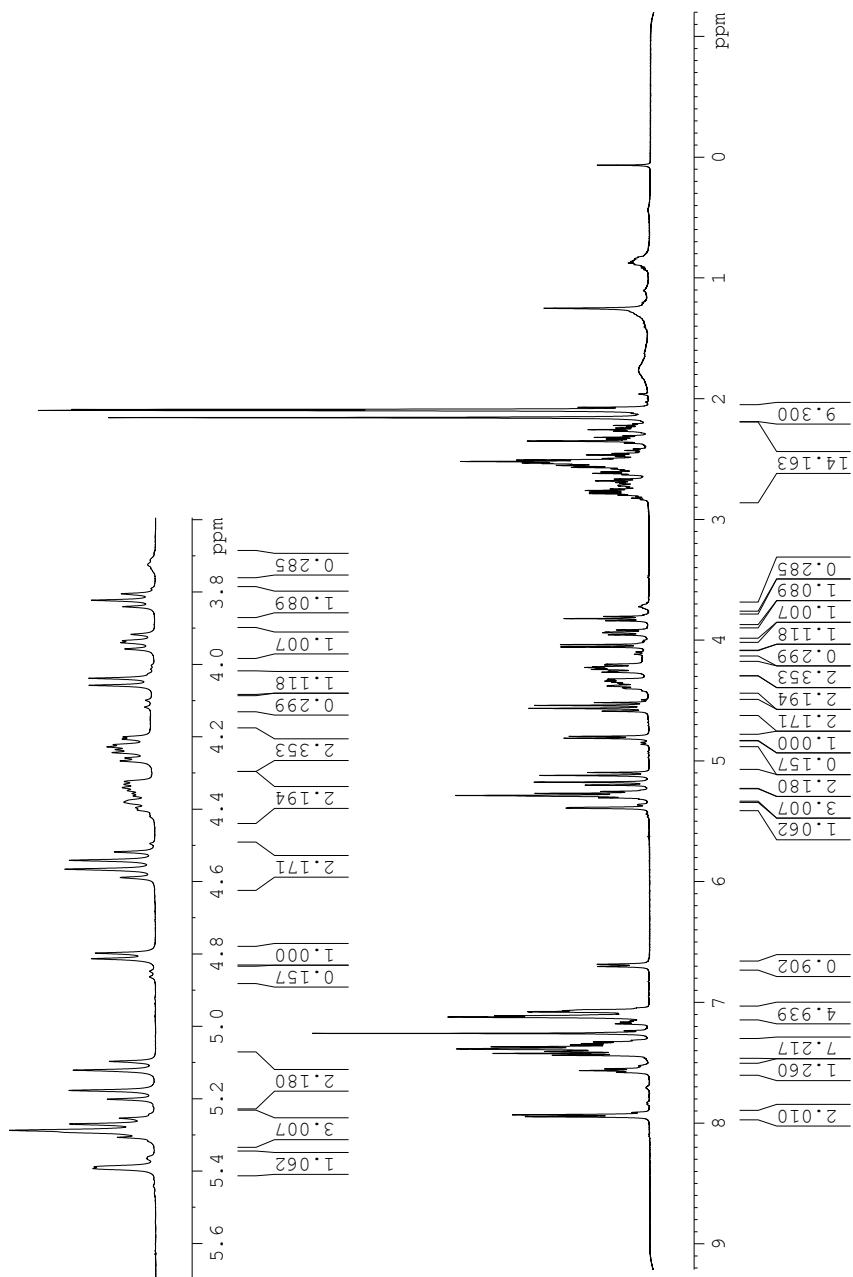
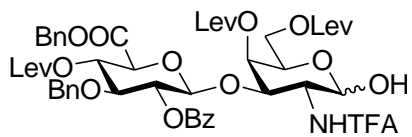
Compuesto 131 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



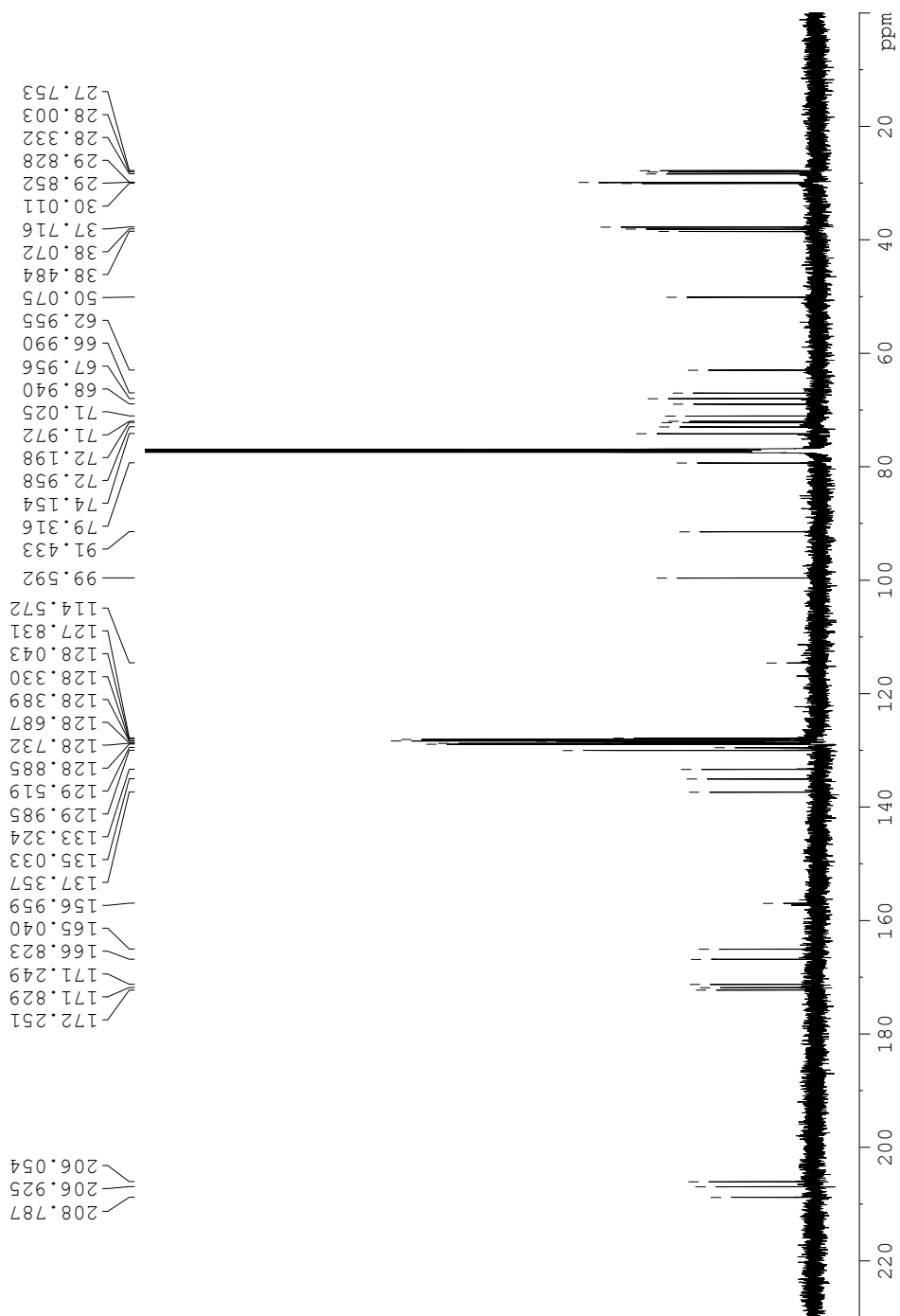
^{13}C -RMN, 125 MHz, CDCl_3)



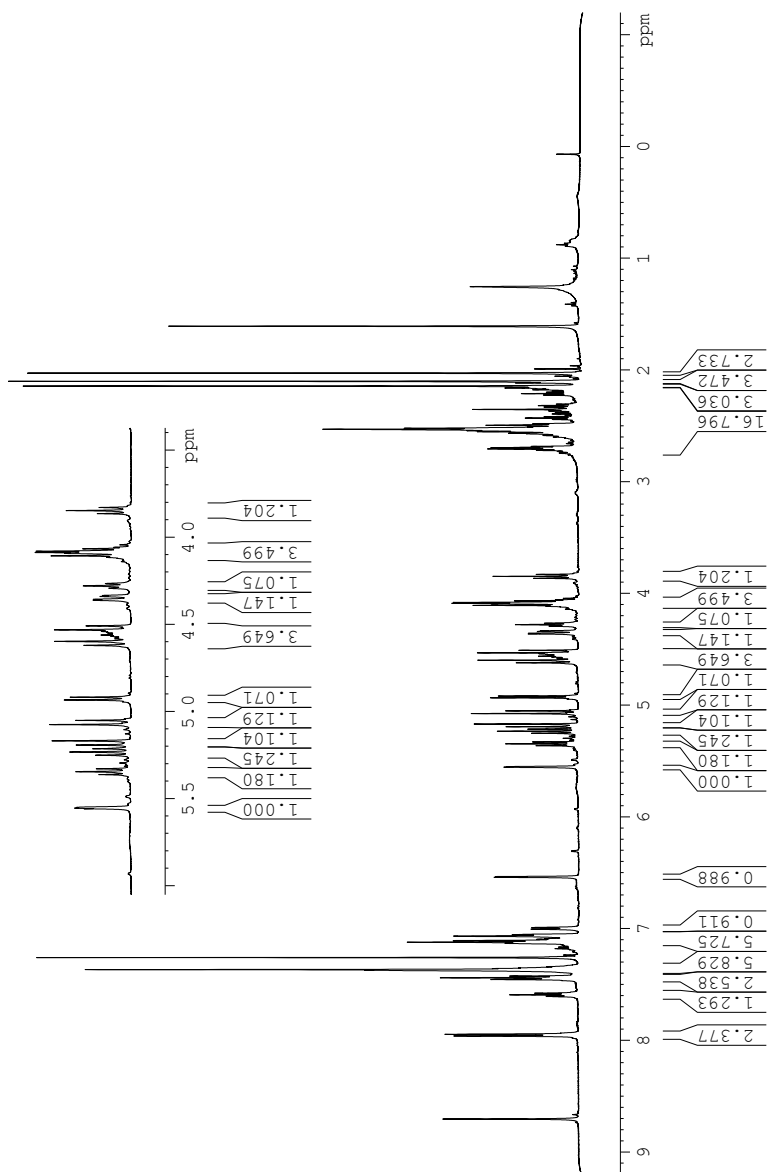
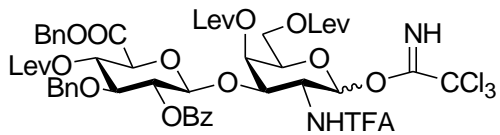
Compuesto 132 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



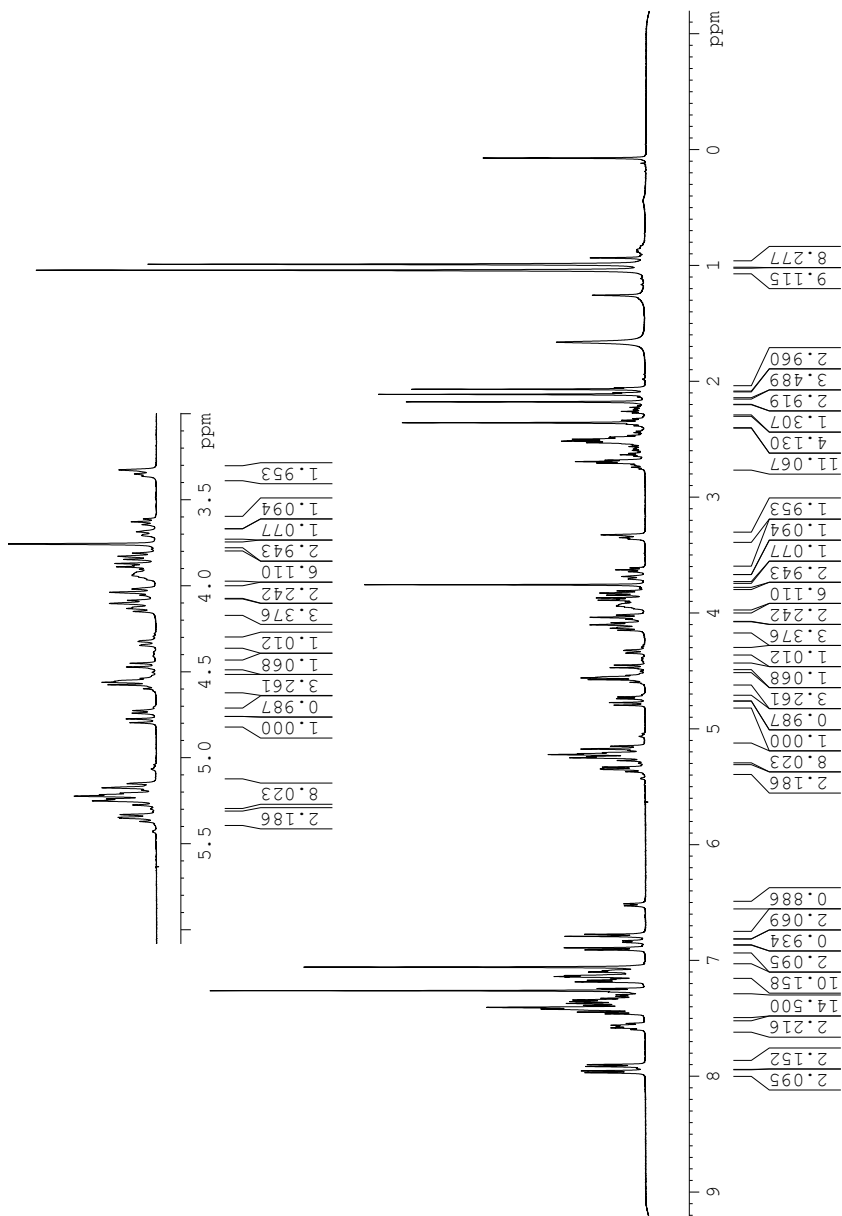
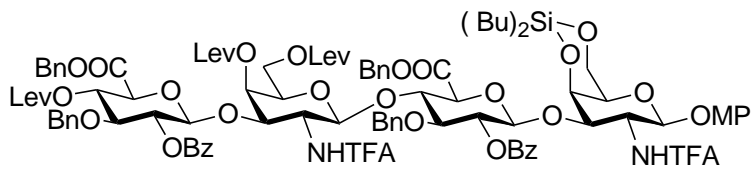
^{13}C -RMN, 125 MHz, CDCl_3



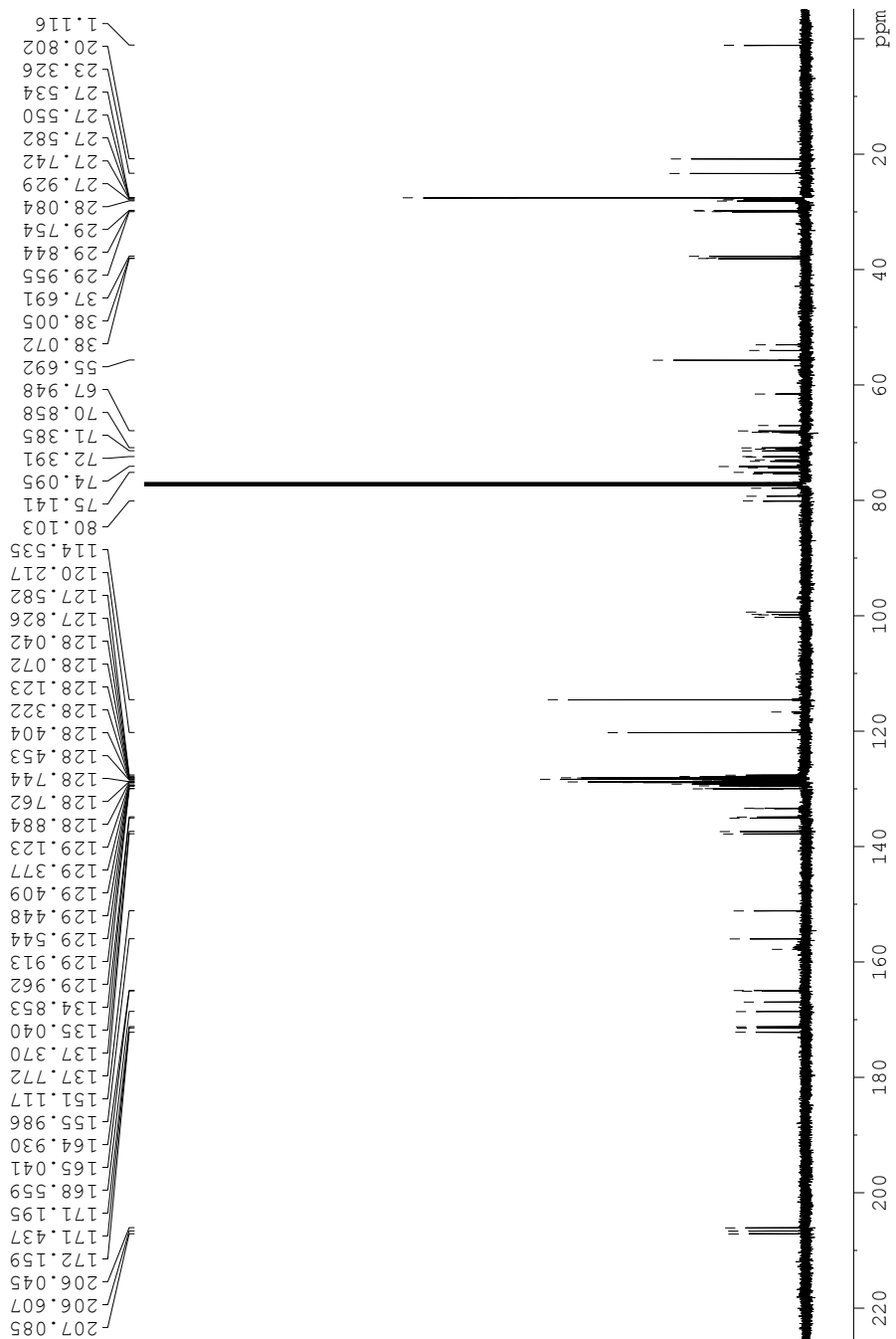
Compuesto 133 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



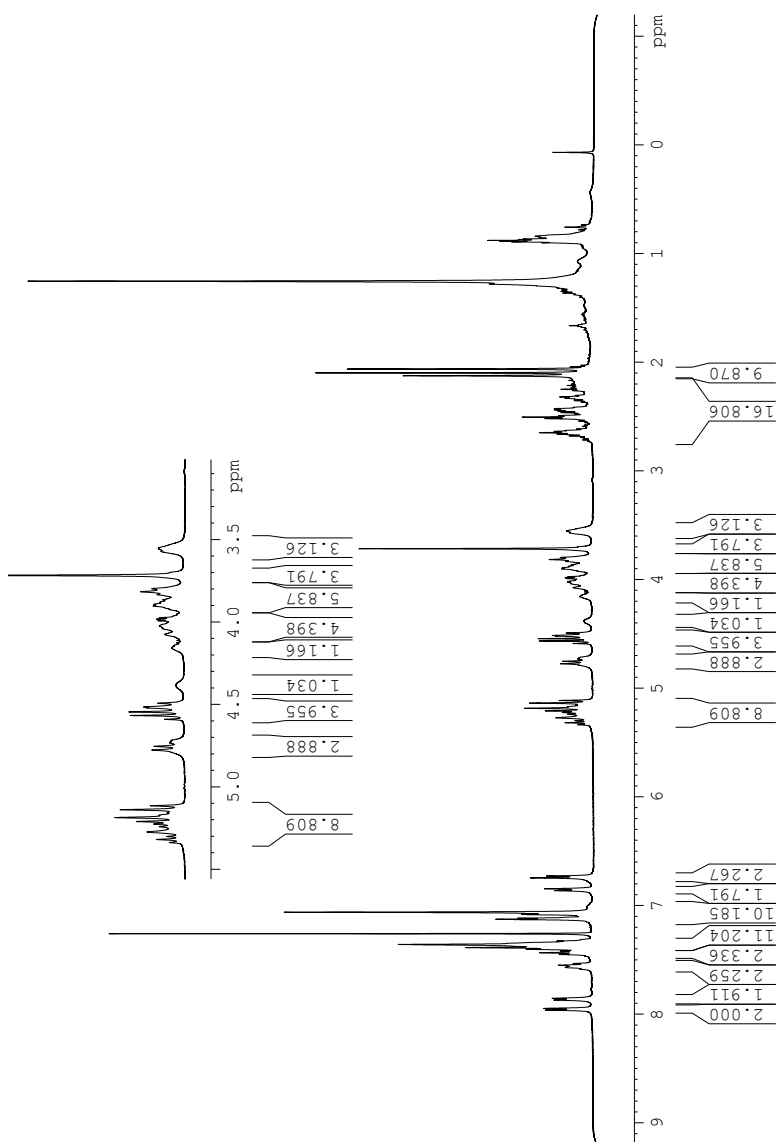
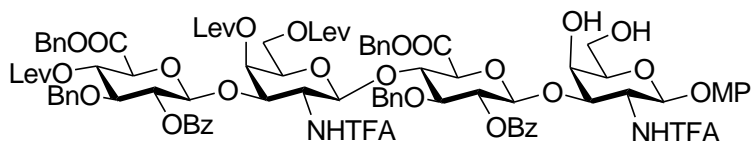
Compuesto 135 ($^1\text{H-RMN}$, 500 MHz, CDCl_3)



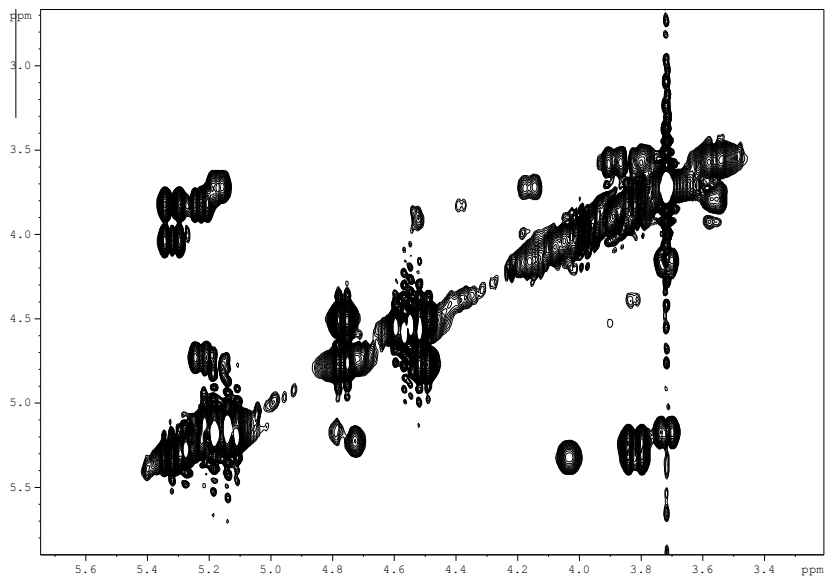
^{13}C -RMN, 125 MHz, CDCl_3)



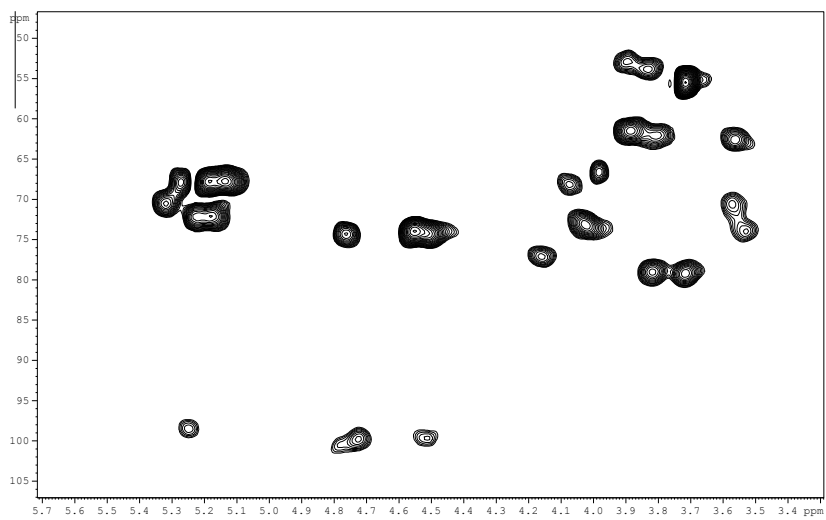
Compuesto 136 (^1H -RMN, 400 MHz, CDCl_3)



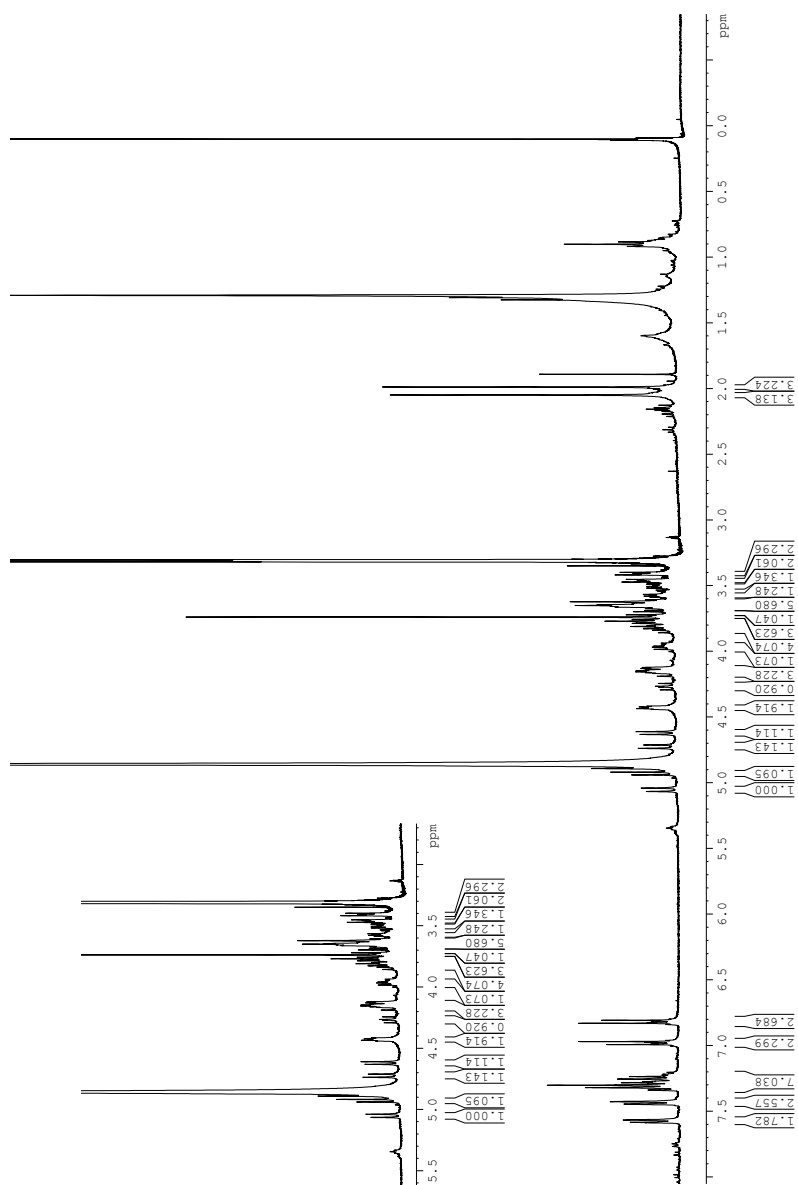
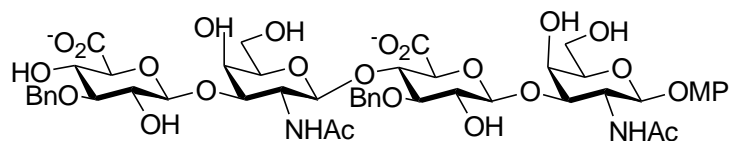
COSY



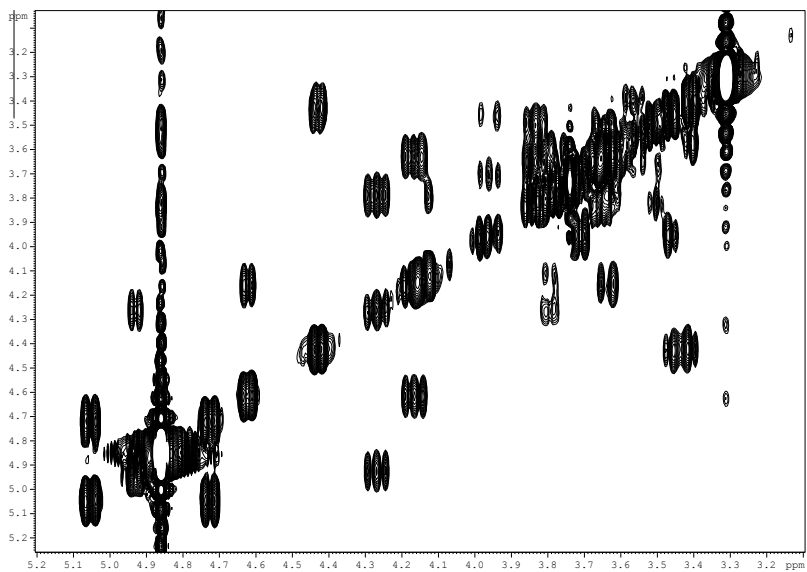
HSQC



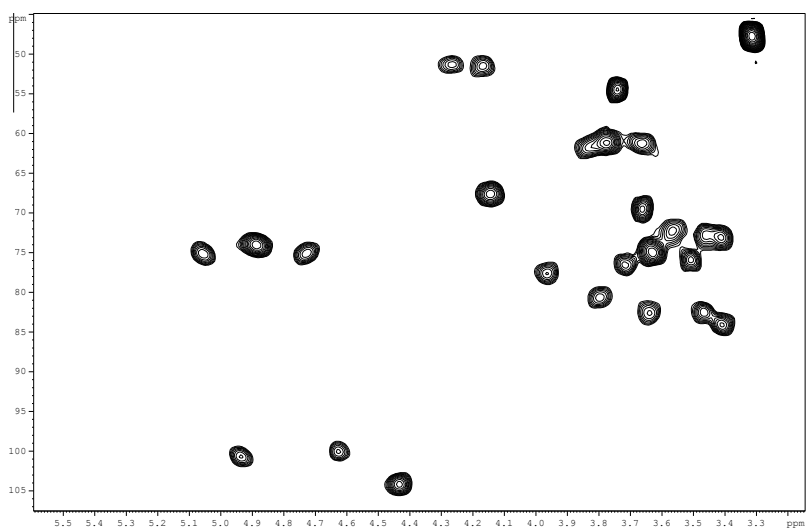
Compuesto 138 (^1H -RMN, 500 MHz, MeOD, sal sódica)



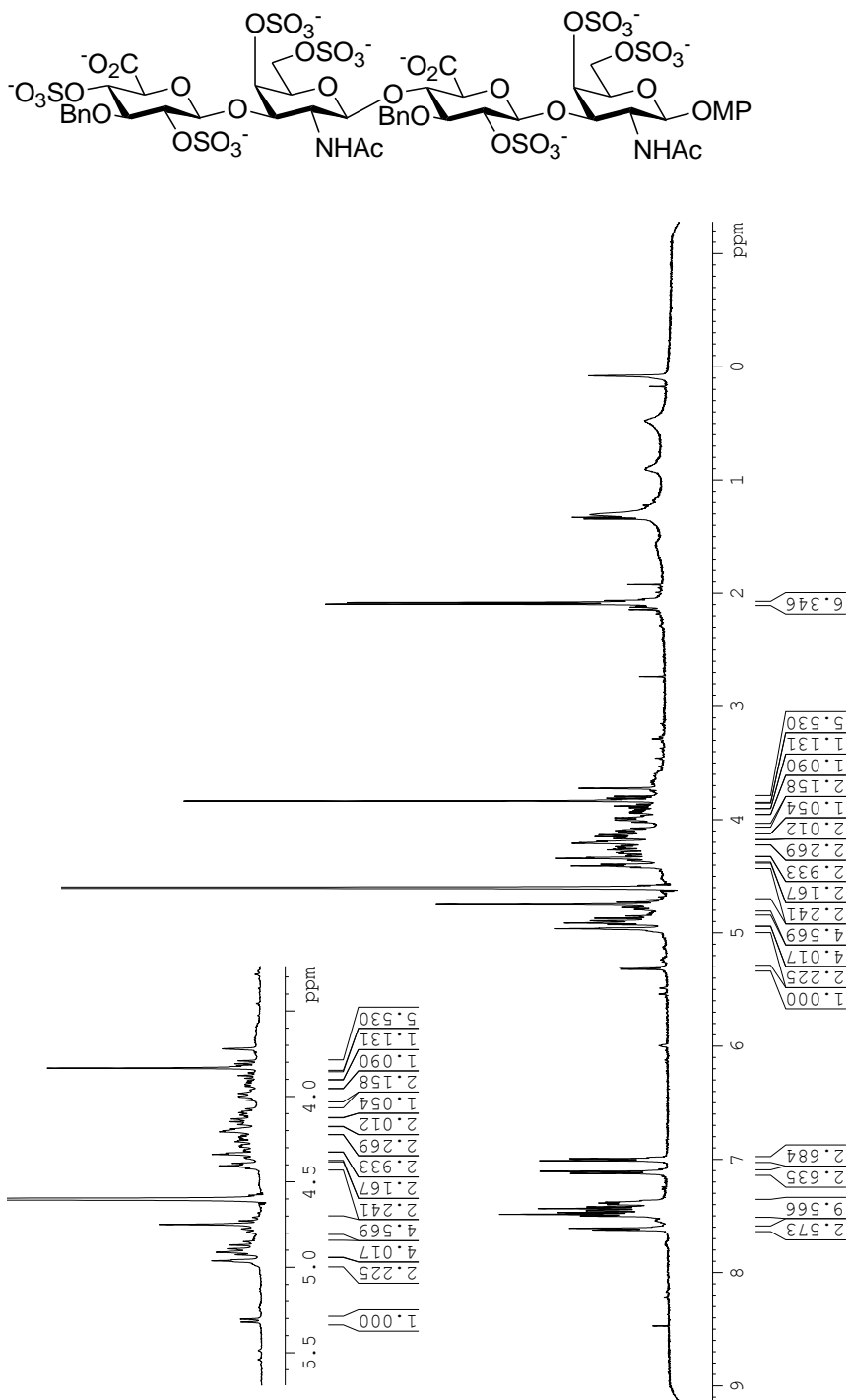
COSY



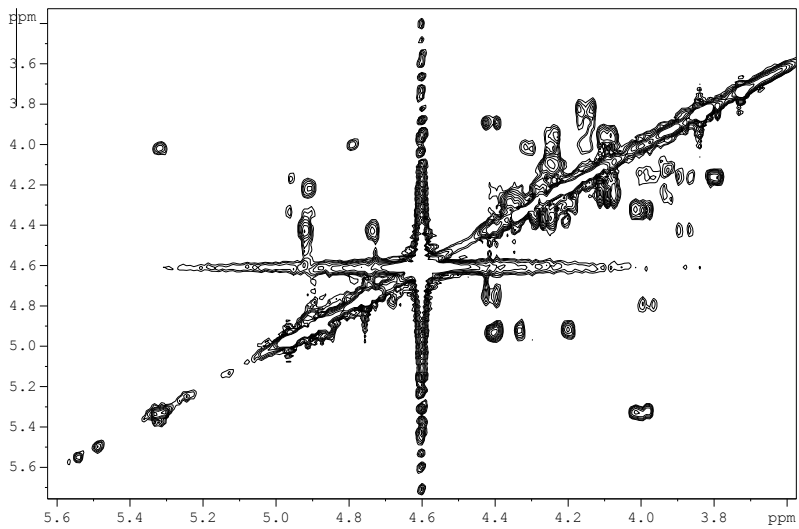
HSQC



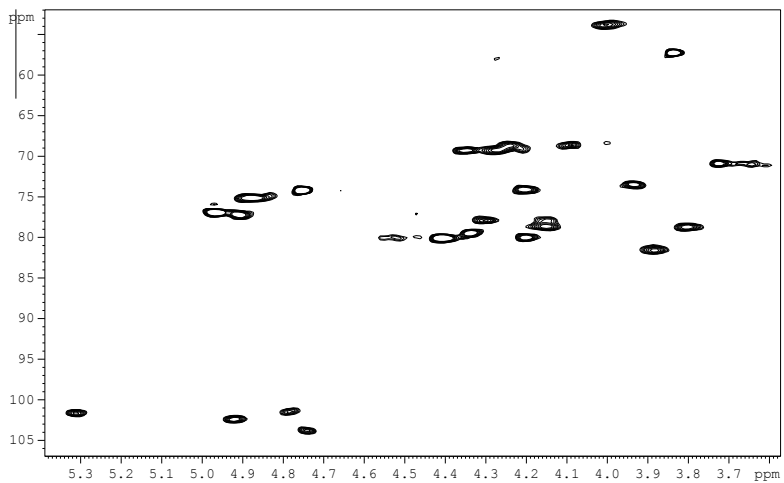
Compuesto 139 (^1H -RMN, 500 MHz, D_2O , 40 °C, sal sódica)



COSY

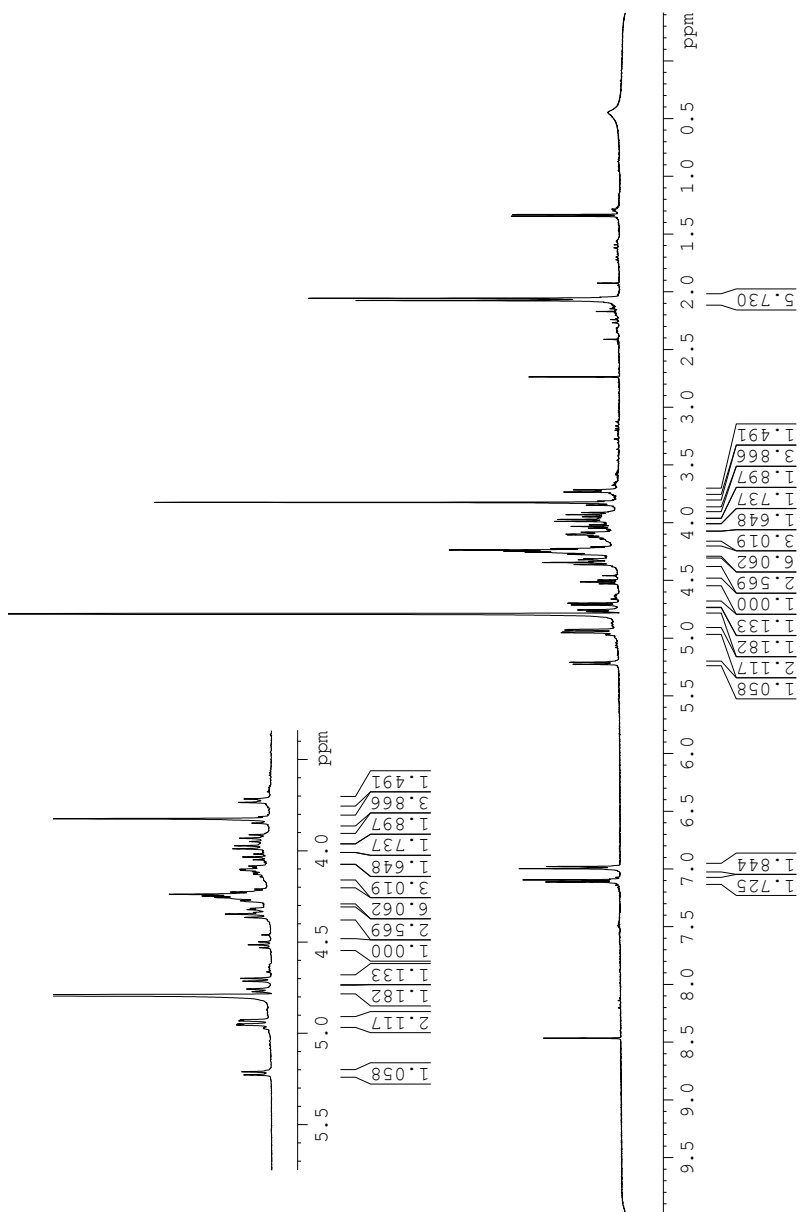
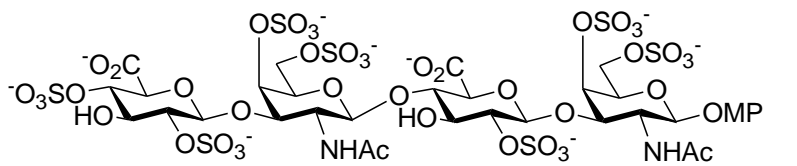


HSQC

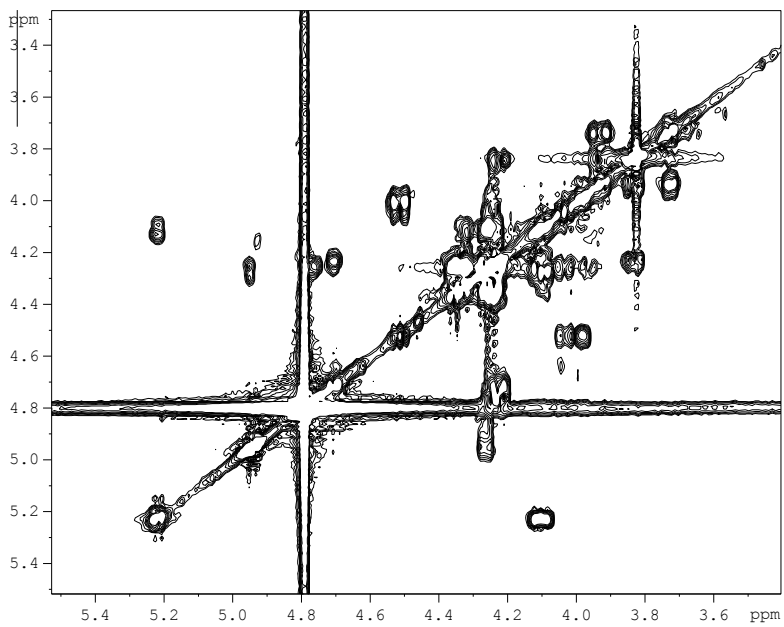


LX

Compuesto 140 (^1H -RMN, 500 MHz, D_2O , sal sódica)



COSY



HSQC

