

T/1042



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

**CENTRO DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS ISLA DE LA
CARTUJA**



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGÁNICA**

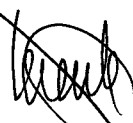
UNIVERSIDAD SEVILLA

**ESTUDIOS SOBRE LA SÍNTESIS EN FASE
SÓLIDA DE OLIGOSACÁRIDOS DE TIPO
HEPARINA**

MEMORIA presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por

Olimpia Terentí Fernández

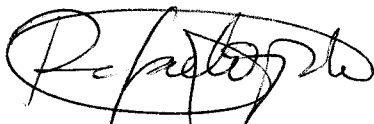
Sevilla 2004


Olimpia Terentí
21/10/04.

D. RAFAEL OJEDA MARTÍNEZ DE CASTILLA, Doctor contratado del C.S.I.C.

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: "*Estudio sobre la síntesis en fase sólida de oligosacáridos de tipo heparina*" ha sido realizado bajo su dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja (Sevilla) durante los años 2001-2004 constituyendo la Memoria que presenta la Lcda. Olimpia Terentí Fernández para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Junio de 2004

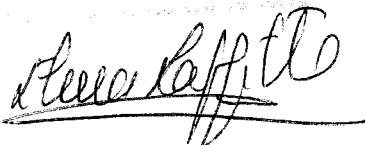


Fdo.:Rafael Ojeda Martínez de Castilla

183

54

30-06-04



Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con ayuda de beca con cargo a proyecto y beca del Instituto "Reina Sofía" de la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo. El trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (proyectos PB96-0820 y BQU2002-03734)

INDICE GENERAL

Abreviaturas.....	1
Criterios de numeración y nomenclatura en oligosacáridos.....	3
I. Introducción y antecedentes.....	5
1. La Heparina.....	7
1.1 Estructura de la heparina.....	7
1.2 Funciones biológicas de la heparina.....	8
1.3 Síntesis química de oligosacáridos tipo heparina.....	10
1.3.1 Síntesis en disolución.....	10
1.3.2 Síntesis en fase sólida.....	16
2. Síntesis de oligosacáridos en fase sólida.....	18
2.1 Aspectos generales de la síntesis de oligosacáridos en fase sólida...20	
2.1.1 Estrategia sintética.....	20
2.1.2 El soporte sólido (resina).....	21
2.1.2.1 Resinas insolubles.....	22
2.1.2.1.1 Resina Merrifield.....	22
2.1.2.1.2 Copolímeros de polietilenglicol-poliestireno.....	23
2.1.2.1.3 Soporte CPG (controlled pore glass).....	24

2.1.2.2 Resinas solubles: MPEG.....	24
2.1.3 El linker.....	27
2.1.3.1 Linkers sensibles a medio ácido.....	27
2.1.3.2 Linkers sensibles a medio básico.....	29
2.1.3.3 Linkes fotolábiles.....	29
2.1.3.4 Linkers tipo sililéter.....	30
2.1.3.5 Linkers tipo tioglicósido.....	30
2.1.3.6 Linkers sensibles a la oxidación.....	31
2.1.3.7 Linkers sensibles a la hidrogenación.....	31
2.1.3.8 Linkers sensibles a la metátesis de olefinas.....	32
2.1.4 Métodos de glicosidación.....	33
2.1.4.1 Tricloroacetimidato.....	33
2.1.4.2 Glicosilsulfóxidos.....	33
2.1.4.3 Anhidroazúcares.....	33
2.1.4.4 Tioglicósidos.....	34
2.1.4.5 Fluoruros.....	34
2.1.4.6 n- Pentenilglicósidos.....	34

2.1.4.7 Fosfatos.....	35
2.1.5 Seguimiento de las reacciones.....	35
II. Objetivo.....	39
III Discusión de resultados.....	43
1. Análisis de los factores determinantes para establecer una metodología en fase sólida: resina, linker, estrategia sintética, posición de anclaje y molécula objetivo.....	45
2 Ensayos en resina insoluble ArgoGel.....	51
2.1 Resina ArgoGel.....	51
2.1.1 Aspectos Técnicos.....	52
2.1.2 <i>Linker</i> y posición de anclaje.....	54
2.1.3 Resultados.....	55
3. Ensayos en resina soluble MPEG.....	64
3.1 Resina MPEG.....	64
3.1.1 Aspectos Técnicos.....	65
3.2 <i>Linker</i> y posiciones de anclaje.....	67
3.2.1 Anclaje por la posición anomérica. Síntesis del tetrasacárido precursor protegido de la región regular.....	67

3.2.2 Anclaje por la posición 6 de la unidad de glucosamina. Síntesis del tetrasacárido de la región regular.....	73
3.2.3 Anclaje por el grupo metoxicarbonilo de la unidad de ácido idurónico. Síntesis del hexasacárido I.....	80
3.2.4 Otras reacciones de interés en la aproximación a la síntesis de oligosacáridos tipo heparina en fase sólida.....	95
IV. Conclusiones.....	103
V. Parte experimental.....	109
1. Métodos Generales.....	111
2. Síntesis en resina insoluble ArgoGel.....	113
3. Síntesis en resina soluble MPEG.....	123
3.1 Anclaje por la posición anomérica.....	123
3.2 Anclaje por la posición 6 de la unidad de Glucosa.....	128
3.3 Anclaje por el grupo metoxicarbonilo de la unidad de ácido L-Idurónico.....	135
3.3.1 Síntesis del hexasacárido I.....	135
3.3.2 Otras reacciones de interés en la aproximación a la síntesis de oligosacáridos tipo heparina en fase sólida.....	153

VI. Referencias.....	163
VII. Anexo de espectros.....	179

Abreviaturas

Abreviaturas

Ac	Acetilo
ATIII	Antitrombina III
Bn	Bencilo
Bz	Benzoilo
d	Doblete
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doble doblete de dobletes
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
FAB	Fast Atom Bombardment
FGF(s)	Factor(es) de Crecimiento para Fibroblastos
FGF-1	Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido
FGF-2	Factor de Crecimiento para Fibroblastos Básico
FGFR	Receptor de Alta Afinidad de FGFs
GAG(s)	Glicosaminoglicano(s)
GlcA	Ácido D-glucurónico
GlcN	2-Amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y derivados en general
GlcNAc	2-Acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa
GlcNSO ₃	2-Desoxi-2-sulfamido-D-glucopiranososa
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HS	Sulfato de Heparano
HR-FAB	High Resolution-Fast Atom Bombardment
IdoA	Ácido L-idurónico y derivados en general
Lev	Levulinato (4-oxopentanoato)
LevOH	Acido Levulínico (4-oxopentanoico)
m	Multiplete

Abreviaturas

MALDI-TOF-MS	Matriz Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
MPEG	ω -monometiléter-polietilén glicol
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas)
NHAc	Acetamido
PEG	Polietilén glicol
PS	Poliestireno
Ph	Fenilo
Piv	Pivaloílo
PMB	<i>p</i> -metoxibencilo
<i>p</i> TsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Py	Piridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TCA	Tricloroacetimidato
TDS	Texildimetilsililo
THF	Tetrahidrofurano
TMSOTf	Triflato de trimetilsililo

CRITERIOS DE NUMERACIÓN Y NOMENCLATURA EN OLIGOSACÁRIDOS

Dada la complejidad que presentan algunos de los oligosacáridos que aparecen en esta Tesis Doctoral, tiene especial importancia establecer los criterios que se han seguido para nombrar cada uno de los residuos monosacáridicos dentro de la cadena, así como para representar la conformación de los anillos.

En el caso de derivados disacáridicos las posiciones de la unidad de ácido idurónico (terminal reductor) se numeran como 1, 2, 3, 4, 5, mientras que en los anillos de glucosamina se emplean 1', 2', 3', 4', 5', 6'a, 6'b (figura 0). A partir de los derivados tetrasacáridicos, los anillos se designan con letras, siendo el monosacárido A el que ocupa el terminal reductor de la cadena, B el anillo unido a éste, C el siguiente y así sucesivamente (figura 0). Por ejemplo, H-2a es el protón de la posición 2 de la unidad de ácido L-idurónico del extremo reductor.

Las unidades de ácido L-idurónico se presentan, por simplicidad, en conformación silla 1C_4 , aunque es conocido que estos anillos presentan un complicado equilibrio conformacional.

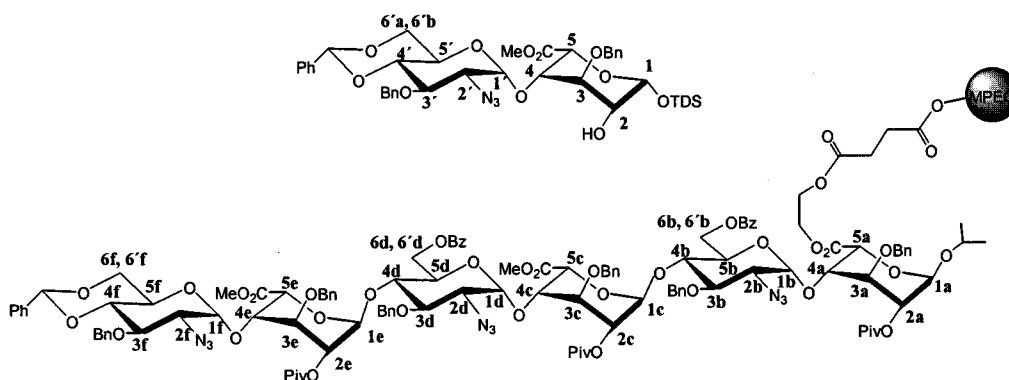


FIGURA 0: Numeración de los distintos protones de los azúcares para di- y hexasacárido

CAPITULO I:
INTRODUCCIÓN

1. La Heparina

1.1 Estructura de la heparina.

La heparina es un polisacárido altamente sulfatado de longitud variable perteneciente a la familia de los *Glicosaminoglicanos* (GAGs)¹. A esta familia pertenecen también otros polisacáridos como el sulfato de heparano (HS), el ácido hialurónico (HA) o los sulfatos de condroitina (ChS).

Estos GAGs tipo heparina¹⁻³ están constituidos fundamentalmente por la repetición de la unidad disacáridica trisulfatada α -L-IdoA-(2-OSO₃)-(1→4)- α -D-GlcNSO₃-(6-OSO₃) que forma la llamada *región regular*. En menor medida se pueden encontrar otras unidades disacáridicas de ácido urónico y glucosamina en las que los monosacáridos constituyentes pueden ser α -IdoA, β -GlcA, β -GlcA-(2-OSO₃), α -GlcNAc-(6-OSO₃) o α -GlcNSO₃-(3,6-di-OSO₃) que son las denominadas *regiones irregulares* (**figura 1**).

La longitud variable y el diferente grado de sulfatación de estas cadenas, junto a la diferente composición de las regiones irregulares confieren a estas moléculas un elevado grado de heterogeneidad.

En cuanto a la estructura tridimensional de este polisacárido se sabe que las cadenas de heparina adoptan una disposición helicoidal en la que dos disacáridos sucesivos están relacionados entre sí por una doble operación que implica una rotación aproximada de 180° seguida de una traslación de 8.0-8.7 Å a lo largo del eje de la hélice. Esto da lugar a una disposición de los grupos cargados (sulfatos y carboxilatos) a ambos lados de la hélice polisacáridica. Tanto la distribución como la orientación de las cargas son factores de gran importancia en las interacciones de este carbohidrato con cualquier proteína.

Introducción y Antecedentes

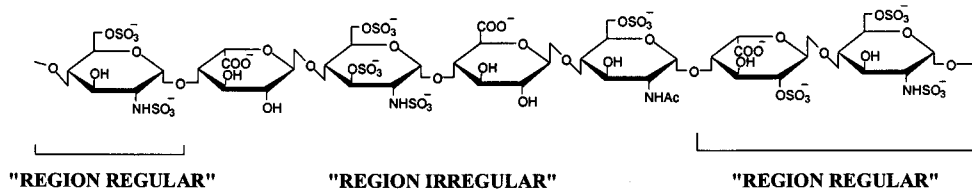


Figura 1: Representación esquemática de la estructura de la heparina diferenciando las llamadas región regular y región irregular

1.2. Funciones biológicas de la Heparina. Papel en la activación de los Factores de Crecimiento por Fibrinoblastos.

Debido a su diversidad estructural, los GAGs tipo heparina interactúan con una gran variedad de proteínas, regulando un número importante de procesos biológicos.^{1,3,4,5}

De entre las muchas funciones biológicas en que está implicada la heparina, es su actividad anticoagulante la más estudiada y la de más importancia biomédica. La heparina incrementa la proporción en la cual la antitrombina, frecuentemente referida a la antitrombina III (AT III), inhibe la trombina y otras proteasas en este proceso. De ahí que la heparina se emplee tanto en la prevención como en el tratamiento de enfermedades tromboembólicas. Es importante destacar que una secuencia pentasacáridica única de las regiones irregulares del polisacárido (**figura 2^{2,5}**) es responsable de la interacción de la heparina con la ATIII.

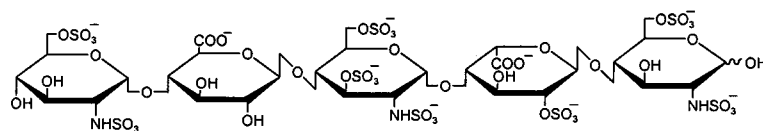


Figura 2: Pentasacárido de la AT III

Introducción y Antecedentes

Otras funciones menos conocidas de la heparina son su actividad antiinflamatoria o su empleo en el tratamiento y prevención de la arteriosclerosis.

Hoy se conoce que, la heparina interviene en muchos procesos biológicos en los que interacciona con diversas proteínas modulando sus funciones. Entre ellas cabe destacar los factores de crecimiento para fibroblastos (FGFs), siendo en el estudio de la activación de estas proteínas donde se encuadran los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en los últimos años.^{6-15.}

Los FGFs,^{3,5,16-20} constituyen una familia de polipéptidos que intervienen en procesos de crecimiento y diferenciación celular y cuya disfunción está asociada a un importante número de enfermedades. La señalización de los FGFs a nivel celular se produce por interacción con receptores transmembranales específicos llamados receptores de los FGF (FGFRs) y su actividad biológica está estrechamente regulada por GAGs tipo heparina.

La influencia de la longitud y la distribución de cargas del GAG en la interacción con los FGFs y los requerimientos estructurales mínimos para que la cadena oligosacáridica regule la actividad biológica de estos son importante objeto de estudio en la actualidad.²⁰⁻²²

Es mucha la controversia creada acerca del papel de la heparina en el proceso de activación de los FGFs. Durante los últimos años se han llegado a establecer diversas hipótesis acerca de los requerimientos estructurales mínimos de la heparina en todo este proceso. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen de forma inequívoca estos parámetros. La heterogeneidad inherente a las cadenas de heparina y diversidad dentro de la familia de los FGFs (veintitrés proteínas diferentes) son, sin duda, los

Introducción y Antecedentes

factores que más dificultan el establecimiento de las bases estructurales del proceso.^{17,18,20,23,24}

Es por tanto, necesario disponer de oligosacáridos tipo heparina con una estructura definida para llevar a cabo con éxito estos estudios. De hecho, en los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, se ha llegado a establecer una clara influencia del patrón de sulfatación de varios hexa- y octasacáridos en la activación de los factores de crecimiento para fibroblastos ácido (FGF-1).⁶⁻¹⁵

La síntesis de oligosacáridos de tipo heparina con un elevado grado de pureza y homogeneidad y de estructura conocida no es un tema sencillo. Nuestro grupo de investigación ha realizado considerables avances en este sentido, y ha establecido una estrategia sintética que permite obtener oligosacáridos de distinto tamaño y diferente distribución de carga perfectamente definidas^{6-8,11,13-15}. Aunque estos procedimientos sintéticos son eficientes, la síntesis de un oligosacárido sigue siendo una tarea larga y laboriosa. Por esta razón es un tema prioritario desarrollar procedimientos en fase sólida que aceleren la síntesis, evitando purificaciones de intermedios y que permitan la automatización del proceso. Esta Tesis Doctoral presenta trabajos realizados en esta dirección.

1.3 Síntesis química de oligosacáridos tipo heparina.

1.3.1 Síntesis en disolución.

Los estudios más relevantes en la síntesis de oligosacáridos tipo heparina fueron inicialmente los relacionados con la actividad antitrombótica de la heparina, estableciéndose con ellos las bases de unos procesos sintéticos que han dado lugar a varias moléculas con las propiedades anticoagulantes de la heparina.²⁵⁻³⁹

Introducción y Antecedentes

En los últimos años y fuera de este contexto se han desarrollado otras metodologías de síntesis de oligosacáridos tipo heparina.⁴⁰⁻⁵¹

En nuestro laboratorio se han sintetizado en los últimos años las moléculas que se indican en la **figura 3**⁶⁻⁸. Para ello se diseñó una estrategia sintética versátil que permitiera la preparación de una variedad de diferentes estructuras. Se trata de una estrategia $n+2$ basada en estructuras disacarídicas con un patrón de grupos protectores que permite su acoplamiento con la estereoquímica deseada y la introducción de los grupos sulfatos en las posiciones requeridas. Se emplearon grupos acilo para proteger las posiciones sulfatadas en la molécula objetivo, grupos bencilo para proteger las posiciones sin sulfatar, grupos azido como precursores de las funciones amina en la molécula final (**figura 4**) y todas las glicosidaciones se llevaron a cabo usando el método del tricloroacetimidato.

En los esquemas 1, 2 y 3 se muestran a título de ejemplo, las rutas sintéticas de los oligosacáridos **II**, **III** y **V**.

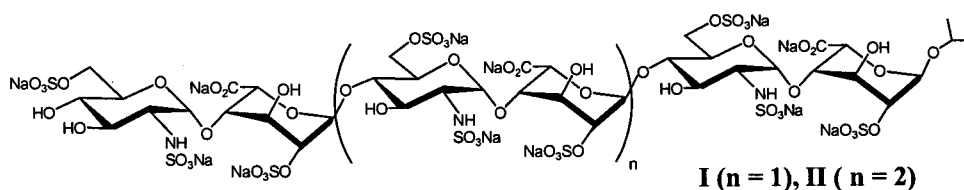


Figura 3: Oligosacáridos tipo heparina

Introducción y Antecedentes

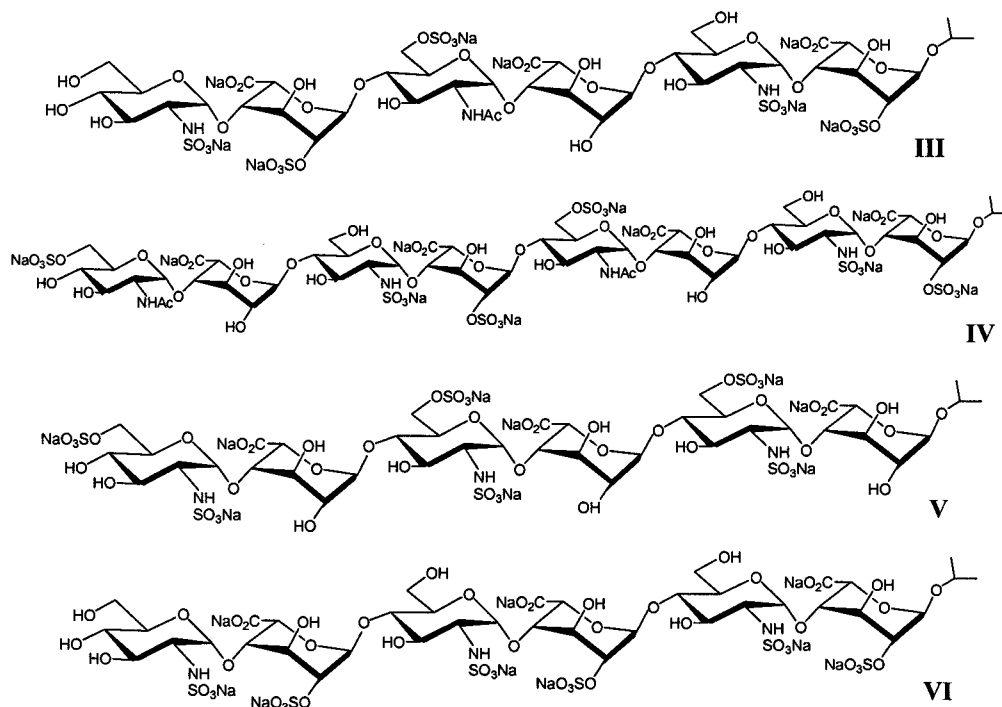


Figura 3: Oligosacáridos tipo heparina (cont.)

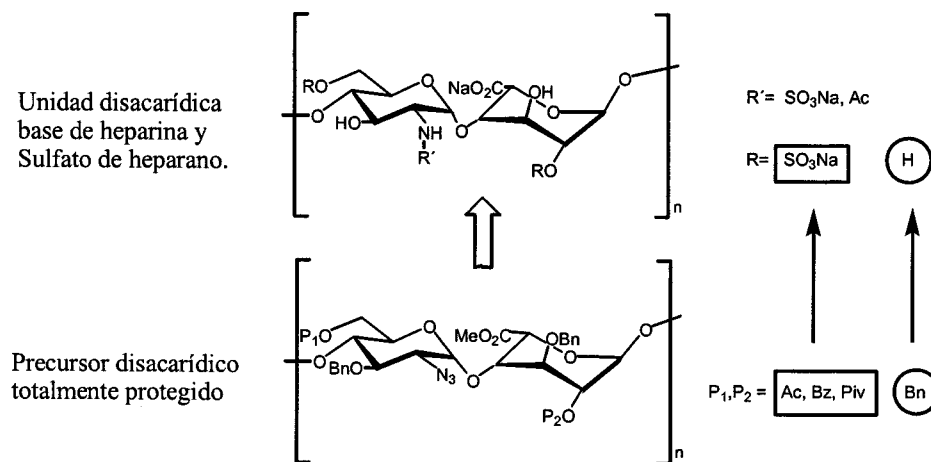
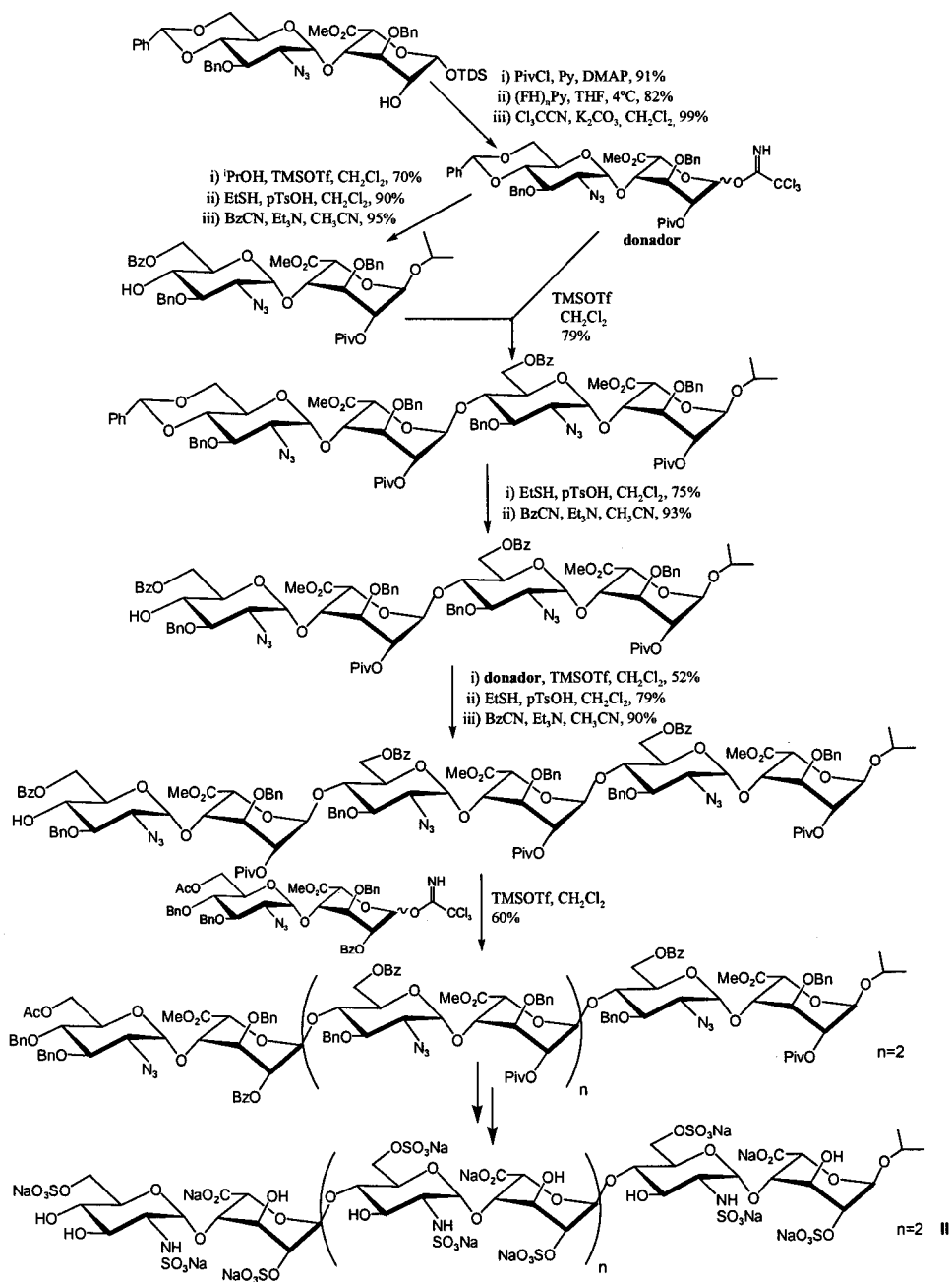


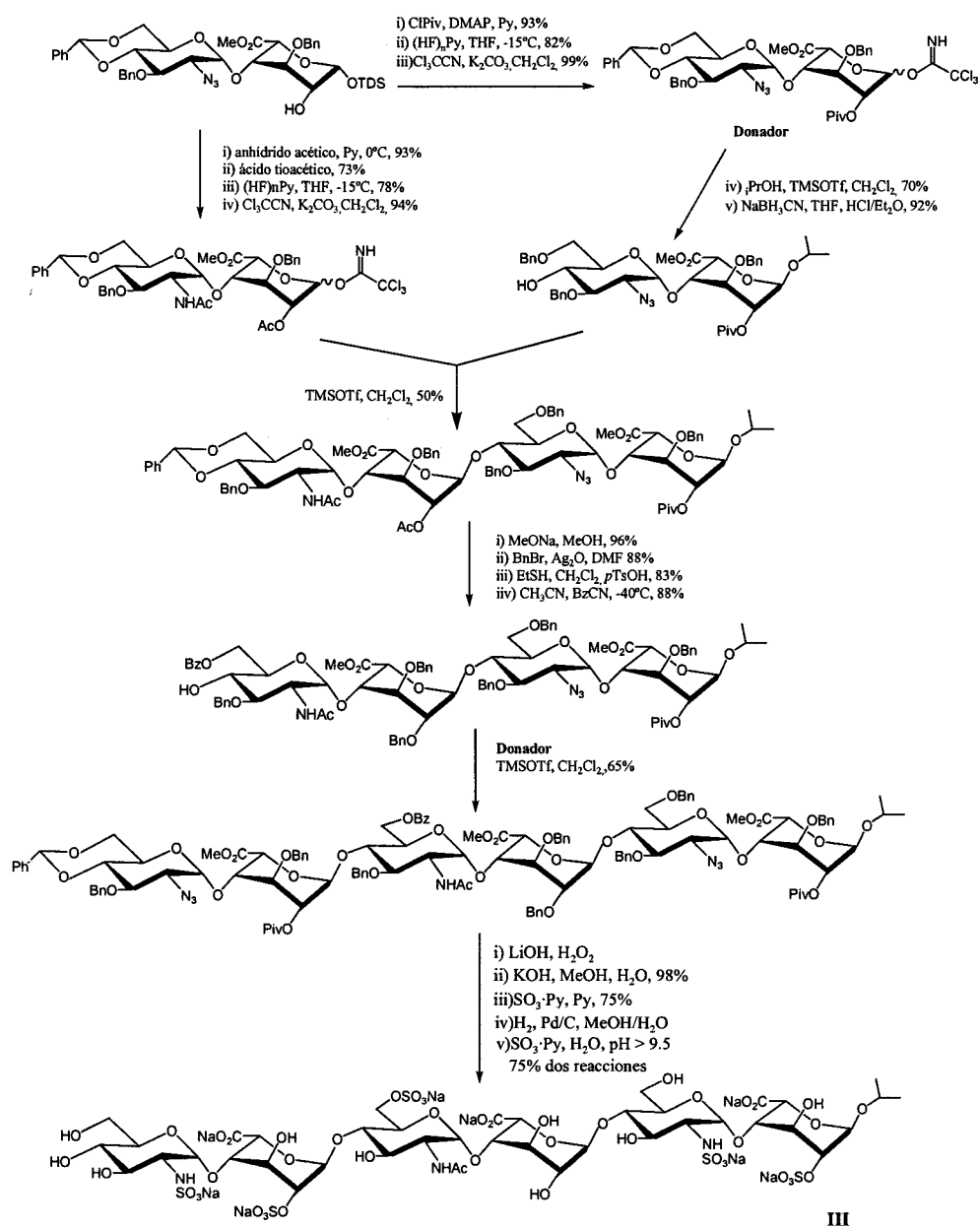
Figura 4: Precursor disacáridico base totalmente protegido/ Unidad disacáridica base después de las etapas de desprotección-sulfatación.

Introducción y Antecedentes



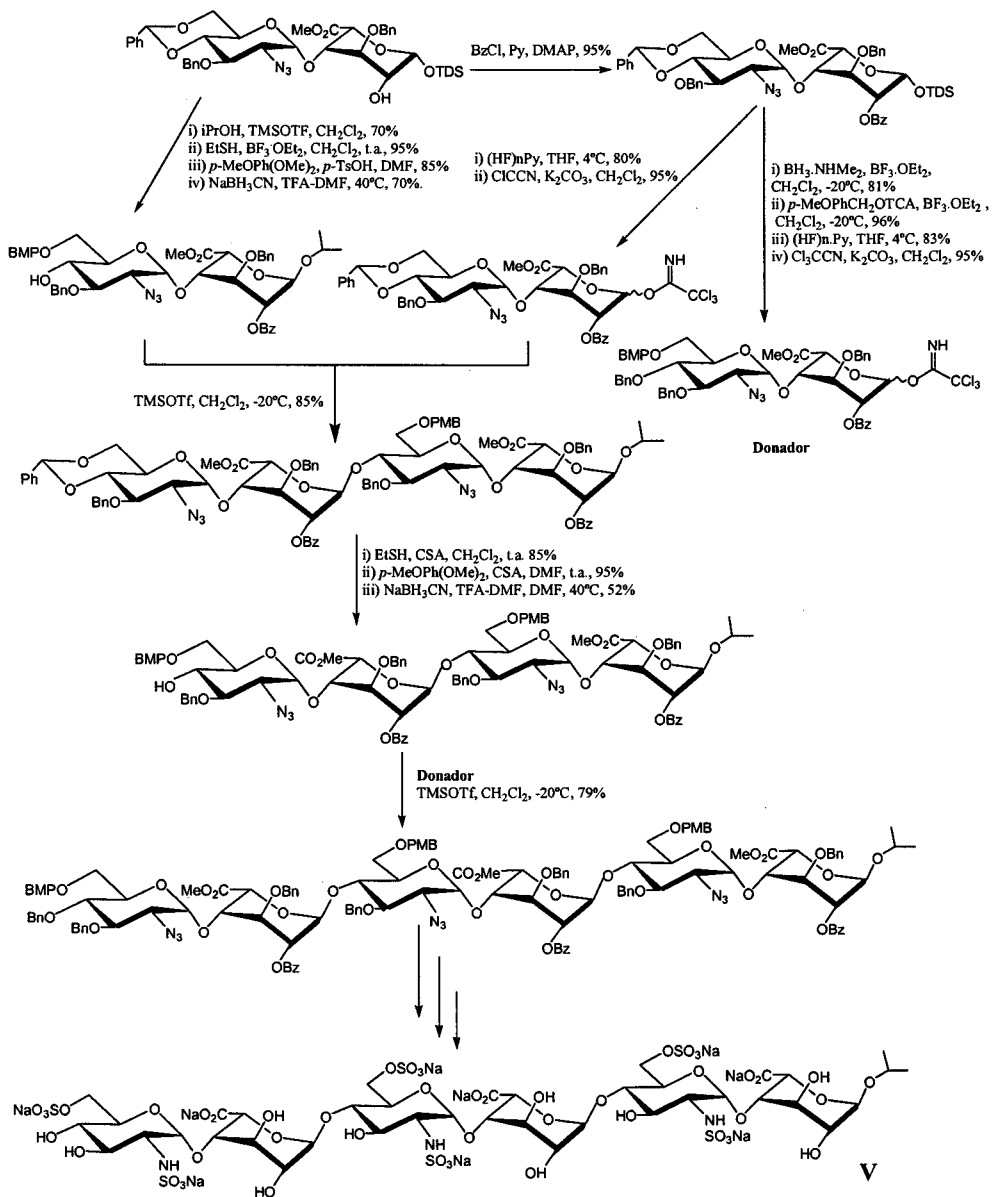
Esquema 1: Ruta sintética del octasacárido II

Introducción y Antecedentes



Esquema 2: Ruta sintética del hexasacárido III

Introducción y Antecedentes



Esquema 3: Ruta sintética del hexasacárido V

1.3.2 Síntesis en fase sólida.

La elevada complejidad que supone abordar la síntesis de oligosacáridos tipo heparina en fase sólida, se pone de manifiesto por la existencia de un solo precedente en este campo.

En 1997 C.A.A. van Boeckel⁵² y colaboradores publicaron la síntesis en soporte soluble de oligómeros tipo HS con diferente longitud y grado de sulfatación.

Estos investigadores simplificaron la preparación mediante la síntesis de miméticos de HS con grupos OMe en lugar de grupos OH libres y grupos O-sulfato en lugar de grupos N-sulfato, productos con una actividad biológica similar a los productos naturales (**figura 5**).

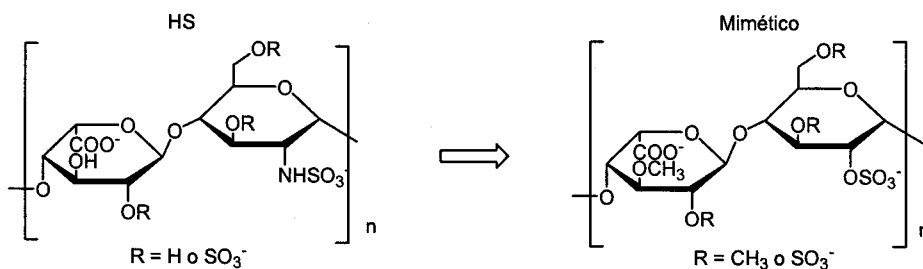
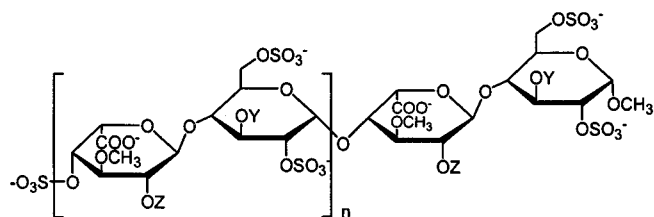


Figura 5

Las conocidas ventajas⁵³ que presenta el empleo de los polímeros de polietilenglicol (PEG) para la síntesis de oligosacáridos sobre soporte polimérico decidió a estos autores a utilizar el ω -monometiléter (MPEG) como soporte soluble para la síntesis de los oligosacáridos **i-vii** que se muestran en la **figura 6**.

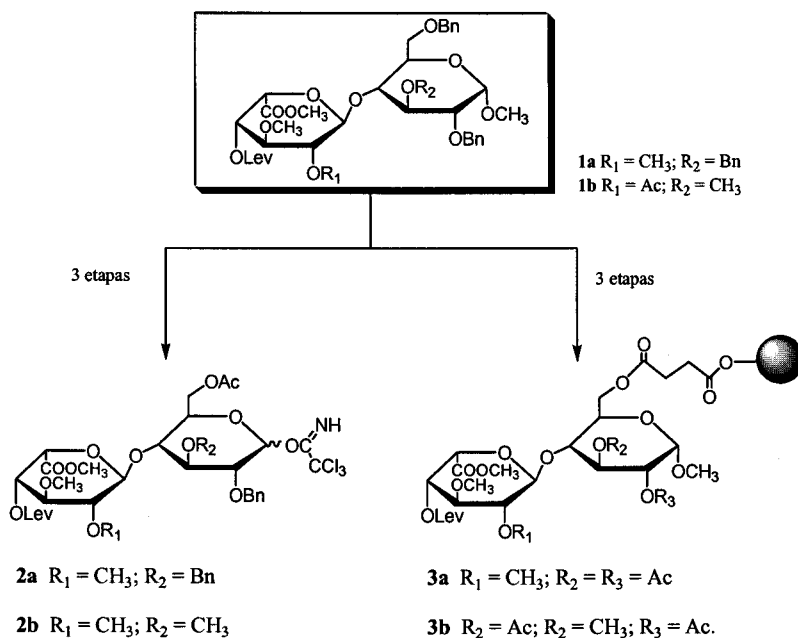
Introducción y Antecedentes



- i $n = 2$; $Y = \text{SO}_3^-$; $Z = \text{CH}_3$ ii $n = 4$; $Y = \text{SO}_3^-$; $Z = \text{CH}_3$
 iii $n = 5$; $Y = \text{SO}_3^-$; $Z = \text{CH}_3$ iv $n = 2$; $Y = \text{CH}_3$; $Z = \text{CH}_3$
 v $n = 3$; $Y = \text{CH}_3$; $Z = \text{CH}_3$ vi $n = 4$; $Y = \text{CH}_3$; $Z = \text{CH}_3$
 vii $n = 5$; $Y = \text{CH}_3$; $Z = \text{CH}_3$

Figura 6

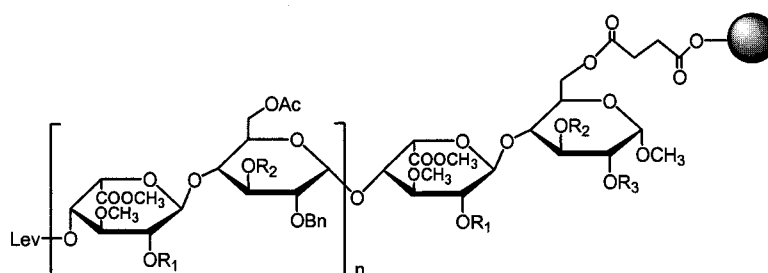
Para ello usaron los disacáridos en forma de imidato **2a,b** como donadores de glicosilo y los disacáridos anclados al polímero de PEG **3a,b** como aceptores de glicosilo. Estos sintones fueron generados a partir de los disacáridos **1a,b** según se muestra en el **esquema 4**.



Esquema 4

Introducción y Antecedentes

Mediante sucesivos ciclos de elongación que implicaron reacciones de deslevulinación (generación del aceptor), acoplamiento (glicosidación con los donadores **2a** y **2b**), y *capping*, se llegó finalmente a los precursores protegidos **d-j** que se muestran en la **figura 7**.



- d** $n = 2$; $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = R_3 = \text{Ac}$ **e** $n = 4$; $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = R_3 = \text{Ac}$
f $n = 5$; $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = R_3 = \text{Ac}$ **g** $n = 2$; $R_1 = \text{Ac}$; $R_2 = \text{CH}_3$; $R_3 = \text{Ac}$
h $n = 3$; $R_1 = \text{Ac}$; $R_2 = \text{CH}_3$; $R_3 = \text{Ac}$ **i** $n = 4$; $R_1 = \text{Ac}$; $R_2 = \text{CH}_3$; $R_3 = \text{Ac}$
j $n = 5$; $R_1 = \text{Ac}$; $R_2 = \text{CH}_3$; $R_3 = \text{Ac}$

Figura 7

Estos oligosacáridos fueron desanclados del polímero y sometidos a las correspondientes etapas de desprotección-sulfatación para finalmente llegar a los antes mencionados miméticos **i-vii**.

2. La síntesis de oligosacáridos en fase sólida.

La Síntesis en fase sólida de oligosacáridos⁵⁴ se basa en la inmovilización de una molécula, bien aceptor o donador de glicosilo, en un soporte a través de un *linker* (grupo protector específico que sirve para unir el compuesto que se está sintetizando al soporte sólido) y en la elongación de la cadena a partir de este sustrato inicial (**figura 8**).



Figura 8: Síntesis en fase sólida

La síntesis en fase sólida de oligosacáridos presenta como principal ventaja el hecho de que los productos deseados se separan del exceso de reactivos u otros productos generados en la reacción mediante un simple lavado y filtrado del soporte sólido, eliminando así las tediosas purificaciones cromatográficas necesarias en la síntesis en disolución y disminuyendo por tanto el tiempo empleado. Además, en general, se produce un aumento de los rendimientos por la posibilidad de llevar a cabo ciclos de adición de exceso de reactivos que permiten completar la reacción. La síntesis en fase sólida se presta por si misma a la automatización de los procesos sintéticos.

El desarrollo de la síntesis de oligosacáridos en fase sólida contempla varios aspectos a tener en cuenta:

- Desarrollo de una estrategia sintética que permita la elongación de la cadena mediante sucesivos ciclos de acoplamiento.
- Elección de un soporte y *linker* adecuados, que deben ser inertes a todas las condiciones de reacción durante la ruta sintética, pero que puedan ser eliminados fácilmente cuando se requiera.
- Elección de un método de glicosidación adecuado.
- Una estrategia de grupos protectores consecuente con la complejidad de los oligosacáridos objetivo.

Introducción y Antecedentes

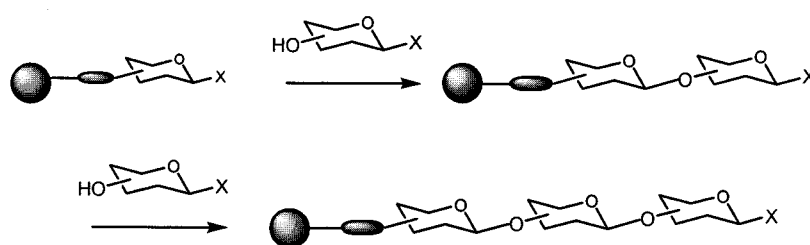
- Elección de un método analítico adecuado para seguir el curso de las reacciones.

2.1 Aspectos generales de la síntesis de oligosacáridos en fase sólida⁵⁴.

2.1.1 Estrategia sintética.

Al igual que ocurre en la síntesis en disolución, la creación de un nuevo enlace glicosídico mediante la unión de un donador de glicosilo y un aceptor de glicosilo es la reacción clave en la síntesis de oligosacáridos en fase sólida. Desde el punto de vista de la elongación de la cadena se pueden contemplar tres posibilidades:

- a) La primera sería tener el donador de glicosilo unido a la resina,^{55,56} y llevar a cabo la elongación de la cadena desde el extremo no reductor al extremo reductor. La principal desventaja de esta estrategia es que los subproductos de la reacción de glicosidación, que provienen en su mayor parte del donador de glicosilo, quedarían anclados a la resina.

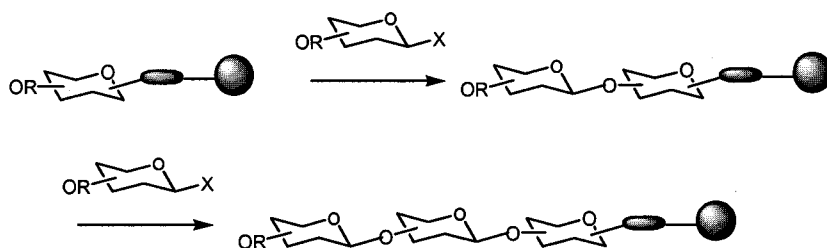


Esquema 5a

- b) La segunda posibilidad sería en sentido contrario a la anterior, es decir, tener el aceptor de glicosilo unido a la resina⁵⁷ elongándose la cadena desde el extremo reductor al no reductor. Al contrario

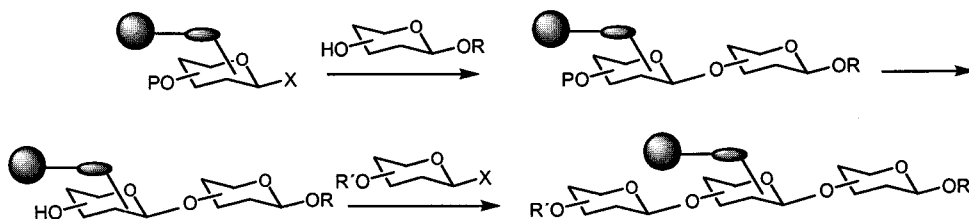
Introducción y Antecedentes

que en el primer caso, esta estrategia tiene como ventaja que los subproductos antes mencionados no quedan unidos a la resina y se eliminan durante el lavado del soporte sólido.



Esquema 5b

- c) La tercera consiste en una estrategia bidireccional⁵⁸⁻⁶⁰ en la que se parte de una molécula que es capaz de actuar tanto de donador de glicosilo como de aceptor de glicosilo gracias a una estudiada estrategia de grupos protectores.



Esquema 5c

2.1.2. El Soporte Sólido (resina).

La elección de la resina es muy importante en la planificación de la síntesis en fase sólida, ya que sus características determinan la estrategia sintética a emplear, las condiciones de reacción y los disolventes y reactivos que podemos usar.

Introducción y Antecedentes

El polímero debe poseer una funcionalidad química que permita la unión con el sustrato inicial. Un parámetro fundamental de las resinas es el *loading* (o nivel de funcionalidad) que se define como el número de grupos funcionales presentes por gramo de resina inicial y que generalmente se expresa en mmol/g. Este *loading* será por tanto un factor importante a la hora de elegir el soporte sólido a utilizar en la síntesis.

Una vez anclado el sustrato inicial a la resina las funciones que no han sido ocupadas deberán protegerse o bloquearse para impedir que reaccionen en etapas posteriores. Este proceso se denomina *capping* y en muchos casos se lleva a cabo acetilando dichas posiciones libres.

En cuanto a los tipos de resina existentes, se podría hacer una clasificación general entre resinas solubles y resinas insolubles, y es de acuerdo con esta clasificación como se van a comentar a continuación.

2.1.2.1 Resinas Insolubles

2.1.2.1.1. Resina Merrifield⁶¹

Este soporte sólido está formado por cadenas de poliestireno con un 1% de divinilbenceno (**figura 9**). Se caracteriza por su alto nivel de funcionalidad, compatibilidad con una elevada variedad de condiciones de reacción, durabilidad y bajo precio. Los inconvenientes de esta resina son su poca flexibilidad y la compatibilidad con un reducido número de disolventes no próticos (diclorometano, THF, DMF, y dioxano), lo que limita en cierta medida su versatilidad sintética.

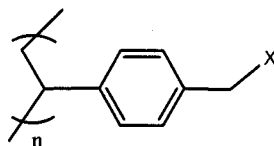


Figura 9: Estructura de la Resina Merrifield

Esta resina ha sido la más empleada tradicionalmente en la síntesis de oligosacáridos.

2.1.2.1.2 Copolímeros de polietilenglicol-poliestireno

La inclusión de cadenas de polieilenglicol en la base de poliestireno permite obtener resinas más flexibles y compatibles con disolventes más polares, dando lugar a las resinas tipo Gel. Además el uso de estos soportes permite seguir las reacciones mediante espectroscopía RMN (^{13}C) en fase gel o espectroscopía de infrarrojo.

Así resinas como *TentaGel*^{®62} (figura 10) pueden emplearse con un rango mas amplio de disolventes a expensas de un bajo *loading* (0.2-0.3 mmol/g) y un mayor precio.

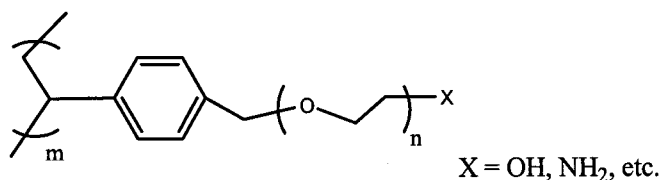


Figura 10: TentaGel

La resina *ArgoGel*^{®63} (figura 11) que tiene un *loading* superior (0.35-0.45 mmol/g), presenta un mayor número de cadenas de PEG lo que confiere al polímero una mayor flexibilidad. Esto hace que las moléculas unidas al soporte sólido presenten un comportamiento más próximo al que tienen en disolución. Cuando se trabaja con esta resina se obtienen excelentes cinéticas de reacción debido a la rápida difusión de los reactivos a los sitios de reacción. Es compatible con una amplia variedad de disolventes próticos, incluidos agua y metanol. Además es muy estable

en una gran cantidad de condiciones de reacción, puede emplearse a baja temperatura y es fácil de secar.

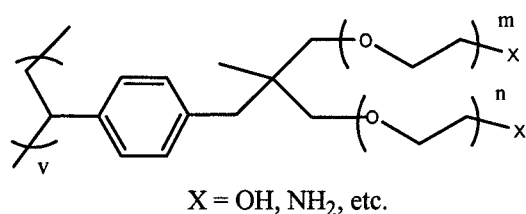


Figura 11: Resina ArgoGel

2.1.2.1.3 Soporte CPG (controlled pore glass).⁶⁴⁻⁶⁶

Este tipo de resina sólo tiene su superficie funcionalizada. Esto hace que su *loading* sea menor pero también hace que el acceso de los reactivos sea más fácil. No requiere un empapado previo, como en los casos anteriores con lo que puede aplicarse una gran gama de disolventes. La mayor desventaja de este soporte es su incompatibilidad con grupos protectores tipo silil éteres, lo que limita en cierta medida su aplicación.

2.1.2.2 Resinas Solubles. MPEG⁶⁷⁻⁶⁹

La utilización de soportes solubles de polietilenglicol combina las ventajas que proporciona la síntesis en solución con las de la síntesis en fase sólida. Cuando se emplea el polímero MPEG (polietilenglicol ω -monometileter) (**figura 12**) todas las transformaciones químicas se llevan a cabo en disolución, puesto que esta resina es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, excepto en los éteres. La molécula anclada al soporte, soluble en las condiciones de reacción, se precipita al finalizar la reacción mediante la adición de un éter, mientras que los demás

Introducción y Antecedentes

componentes de la mezcla de reacción permanecen en disolución (esquema 6). Esto permite separar el polímero del resto de componentes mediante simple filtración. Bajo estas condiciones las reacciones son más rápidas y los rendimientos mayores.

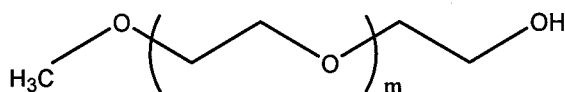


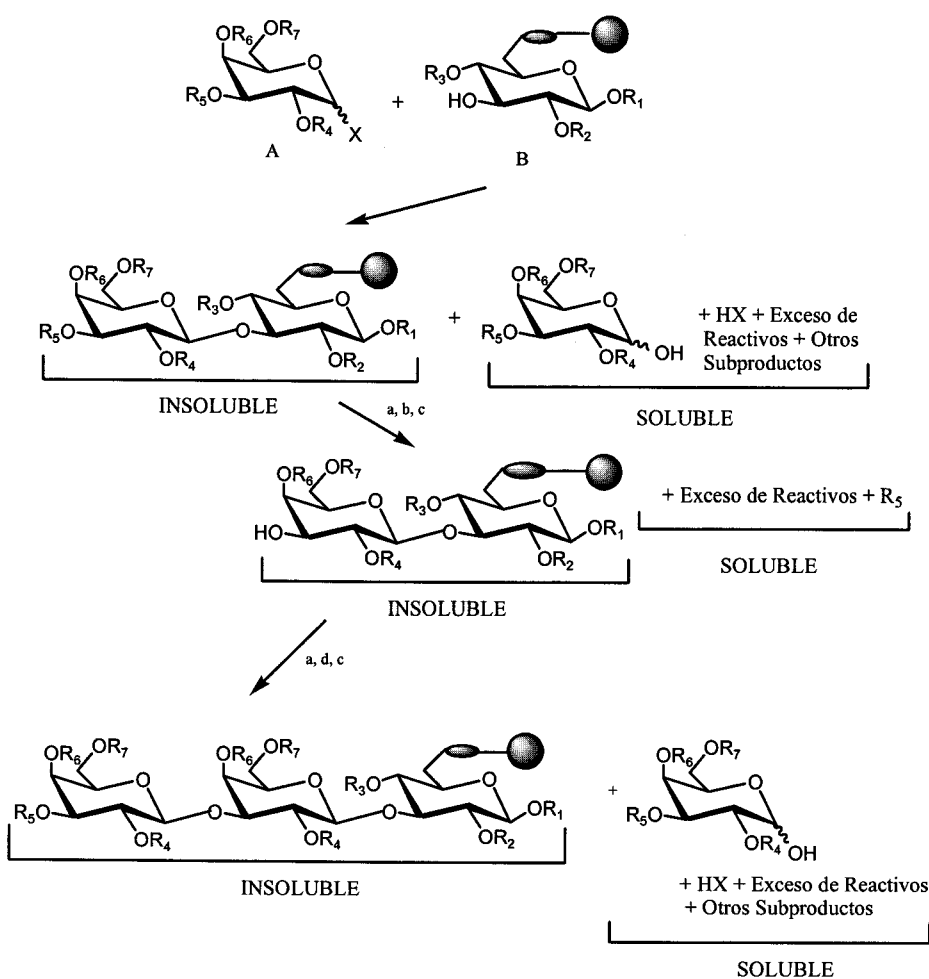
Figura 12: Resina de MPEG

Un potencial inconveniente de este polímero es la pérdida de material durante la etapa de precipitación que sigue a cada reacción, lo que disminuye el rendimiento general cuando se sintetizan estructuras de longitud grande. Otro inconveniente de estos soportes viene impuesto por el rango de temperatura limitado en el que se puede trabajar (por encima de -45°C). Aun así la utilización del soporte de MPEG en la síntesis de oligosacáridos está muy extendida.

Se comercializan MPEGs de diferente peso molecular (2000-12.000 g/mol) siendo el más comunmente usado el polímero con masa molecular 5000. Es una resina con un elevado *loading*. Es muy soluble en disolventes como benceno, tolueno, diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, acetona y agua. Es insoluble en hexano, dietileter y *t*-butiléter y a baja temperatura en THF y etanol. Retiene agua con facilidad, que puede eliminarse fácilmente mediante destilación azeotrópica, con tolueno o benceno. Puede purificarse mediante recristalización en etanol, ya que es insoluble en etanol frío, o mediante precipitación, añadiendo un éter a la disolución en que se encuentra. Los productos anclados a la resina se recuperan generalmente en más de un 95%. El hecho de que el polímero MPEG sea

Introducción y Antecedentes

soluble en la mayor parte de disolventes orgánicos permite la utilización de la espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ para seguir el curso de las reacciones. El MPEG contiene un grupo metilo cuya señal ($\delta = 3.640$ ppm) puede utilizarse como patrón interno cuando se usa esta técnica de análisis.



(a) Disolver; (b) Desproteger; (c) Añadir éter; (d) Glicosidar con A; X = Grupo saliente; $\text{R} \neq \text{H}$.

Esquema 6: Síntesis de oligosacáridos sobre polímeros solubles

También se ha descrito un polímero soluble polidisperso e hiperramificado⁶⁹ para la síntesis de disacáridos preparado a partir de pentaeritritol y ácido 2,2-di-(hidroximetil) propiónico. Se trata de un polímero soluble en la mayoría de disolventes apróticos y que se precipita cuantitativamente en metanol. Este soporte se degrada rápidamente en agua, por lo que los productos finales de la síntesis pueden separarse rápidamente mediante la hidrólisis del soporte y la extracción de los productos en un disolvente orgánico.

2.1.3. El *linker*.

El *linker* elegido para anclar la primera molécula de la ruta sintética al soporte sólido es otro factor clave en el diseño de la síntesis en fase sólida. El *linker* debe ser compatible con la estrategia general de grupos protectores y con las condiciones de reacción que se empleen durante toda la ruta sintética y a su vez debe permitir liberar selectivamente las moléculas sintetizadas del soporte sólido, bien al final de la síntesis para proporcionar los productos deseados o bien en estadios intermedios para seguir el curso de la reacción cuando sea necesario. El desarrollo de la síntesis en fase sólida ha dado lugar a una gran variedad de *linkers* cuya clasificación, que se presenta a continuación, se hace en función de sus condiciones de separación del polímero.

2.1.3.1 *Linkers* sensibles a medio ácido.

La separación en medio ácido es una de las condiciones más empleadas en la síntesis en fase sólida. Ácidos volátiles como HF o TFA⁷⁰ permiten la eliminación del exceso de reactivo mediante simple evaporación. En la **figura 13** se muestran distintos tipos de *linkers*

Introducción y Antecedentes

sensibles a medio ácido así como las condiciones en que se lleva a cabo su separación del soporte.

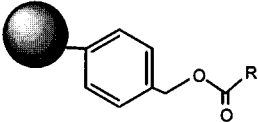
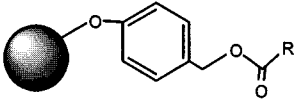
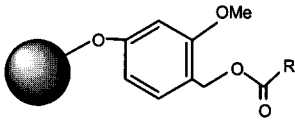
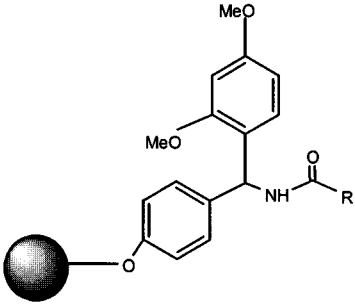
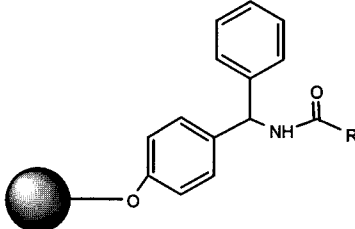
<i>Linker</i>	Estructura	Condiciones de separación/ liberación
<i>Linker Merrifield</i>		HF
<i>Linker Wang</i>		TFA/DCM 50%
<i>Linker Sasrin</i>		TFA/DCM 1-3%
<i>Linker Rink</i>		TFA
<i>Linker Bencihidril</i>		HF

Figura 13

2.1.3.2. *Linkers* sensibles a medio básico.

Dentro de este grupo existen dos tipos de *linkers*: aquellos cuya separación implica una adición/eliminación nucleófila, generalmente en un éster y aquellos que se escinden mediante una reacción catalizada por una base, como pueden ser una eliminación o una ciclación. En la **figura 14** se muestran un ejemplo de cada uno de los tipos de *linker* que se acaban de comentar.

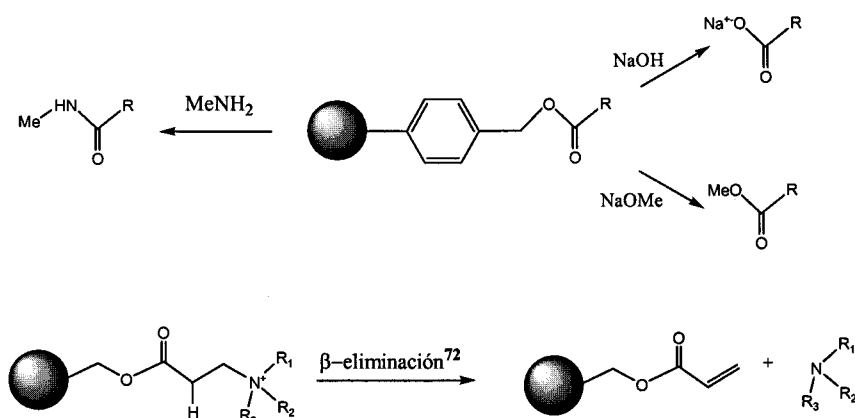


Figura 14

2.1.3.3 *Linkers* fotolábiles.

Este tipo de *linkers* se emplea en menor medida que los anteriores. El más comúnmente usado es el *linker* tipo nitrobencono⁷⁴⁻⁷⁶ (**figura 15**). Un inconveniente de estos *linkers* es que la reacción fotolítica es sustancialmente más larga cuando se lleva a cabo en fase sólida que cuando se hace en disolución, por lo que este mayor tiempo de exposición puede afectar a algunos compuestos.

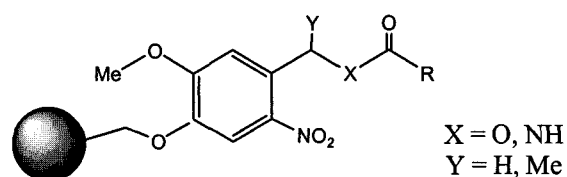


Figura 15: *Linker* tipo nitrobenzeno

2.1.3.4 *Linkers* tipo sililéter

Aunque la utilización de este tipo de *linker* excluye la posibilidad de usar grupos silil éteres como grupos protectores, este *linker* está bastante aceptado por su elevada selectividad y los altos rendimientos que se obtienen en las etapas de separación. En la **figura 16** se muestra un ejemplo de estos *linker* tipo sililéter.

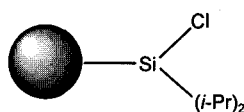


Figura 16

2.1.3.5 *Linkers* tipo tioglicósido.

Se trata de una forma interesante de anclaje por la posición anomérica, puesto que son *linkers* estables en un amplio rango de condiciones de activación pero pueden ser eliminados fácilmente mediante agentes tiofílicos.⁷⁷⁻⁷⁹

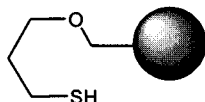


Figura 17: *linker* tipo tioglicósido

2.1.3.6 *Linkers* sensibles a la oxidación.

La oxidación puede ser un método sencillo y selectivo para llevar a cabo la separación del *linker* del soporte. Un ejemplo característico de *linkers* que se separan mediante oxidación es el *linker* con un grupo PMB diseñado por Fukase⁷⁹ (figura 18). La inestabilidad en medio ácido asociada al grupo PMB se salva introduciendo una función acilo consiguiendo así un *linker* estable en condiciones ácidas. La separación selectiva de la resina se realiza mediante adición de DDQ.

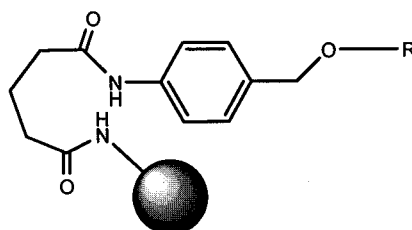


Figura 18

2.1.3.7 *Linkers* sensibles a la hidrogenación.

El *linker* α,α' -dioxixilil dieter (DOX) es el más utilizado en la síntesis en fase sólida con polímeros solubles de PEG.⁸⁰ Este grupo es estable cuando se trata con ácidos de Lewis mientras que la molécula sintetizada puede liberarse mediante hidrogenólisis.

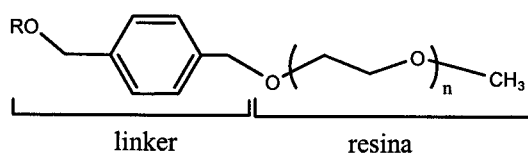


Figura 19: DOX-MPEG

2.1.3.8 *Linker* sensible a la metátesis de olefinas⁸¹.

En este caso, la primera unidad en la ruta sintética del oligosacárido se enlaza al soporte sólido a través de un enlace glicosídico con el octenodiol con el que se ha funcionalizado la resina. Al final del proceso sintético la separación del *linker* de la resina tiene lugar mediante metátesis de olefinas usando el catalizador de Grubbs en atmósfera de etileno (**figura 20**).

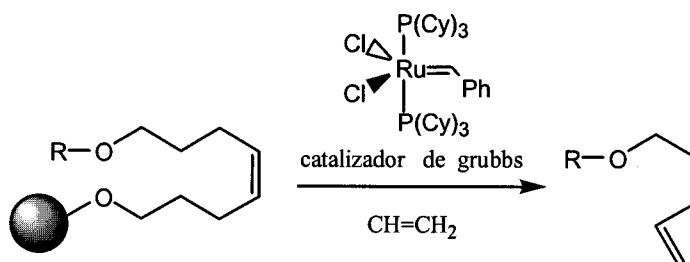


Figura 20: *linker* sensible a la metátesis de olefinas

2.1.4 Métodos de Glicosidación.

Como ya se ha dicho anteriormente, al igual que ocurre en la síntesis en solución, la creación de un nuevo enlace glicosídico mediante la unión de un donador de glicosilo y un aceptor de glicosilo es la reacción clave principal en la síntesis de oligosacáridos en fase sólida. Los métodos de glicosidación más utilizados en fase sólida son los que se exponen a continuación.

2.1.4.1 Tricloroacetimidato.⁸⁰

El método del tricloroacetimidato es ampliamente utilizado tanto en la síntesis de oligosacáridos en disolución como en fase sólida, de acuerdo con los excelentes resultados que se obtienen en términos de reactividad y selectividad. El donador de glicosilo es activado en condiciones suaves con cantidades catalíticas de TMSOTf u otros triflato, incluido el triflato de dibutilboro, que evita la posible sililación del aceptor de glicosilo.

2.1.4.2 Sulfóxidos.⁸²

Los glicosilsulfóxidos son agente glicosilantes muy reactivos cuando se activan con ácidos de Lewis. El anhídrido triflico es comúnmente utilizado para inducir la reacción a -78°C de forma sencilla e incluso cuando se trabaja con aceptores estéricamente impedidos.

2.1.4.3 Anhidroazúcares.⁸³

Los 1,2-anhidroazúcares, derivados de precursores glicales, dan lugar a una amplia variedad de enlaces glicosídicos. El glical unido al soporte sólido es convertido en el correspondiente anhidroazúcar mediante

epoxidación con dimetil dioxirano (DMDO). Se trata de un método de glicosidación empleado con éxito en la síntesis en fase sólida de oligosacáridos y oligopéptidos.

2.1.4.4 Tioglicósidos.⁷⁵

Los tioglicosidos preparados a partir de acetatos anoméricos o 1,2-anhidroazúcares se usan frecuentemente como donadores de glicosilo. Pueden prepararse a gran escala, almacenarse durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente y activarse selectivamente con un rango importante de promotores tiofílicos como triflato de dimetiltiosulfonio (DMTST), triflato de metilo o NIS/ácido tríflico. El inconveniente de este método es la alta toxicidad de los activantes de tioglicósido. Aun así el método del tioglicósido es bastante usado en fase sólida y permite conseguir una alta selectividad en la reacciones de glicosilación.

2.1.4.5 Fluoruros.⁵⁹

Los haluros anoméricos raramente se emplean en la síntesis de oligosacáridos en fase sólida desde que se introdujeron los métodos anteriormente descritos. Esto se debe a que la activación mediante metales pesados es complicada cuando se utilizan soportes sólidos. Sin embargo los glicosil fluoruros se emplean en la formación de enlaces glicosídicos debido a los excelentes rendimientos y diastereselectividad de las reacciones.

2.1.4.6 *n*-Pentenil glicosidos.⁸⁴

El uso de *n*-pentenil glicosidos activados mediante agentes electrófilos como NIS/TESOTf está muy extendido en la síntesis en fase

sólida de oligosacáridos, gracias a los altos rendimientos en las reacciones que pueden superar el 90% y a la excelente selectividad α/β que se consigue.

2.1.4.7 Fosfatos.⁸⁵

Los glicosil fosfatos son agentes de glicosilación extremadamente reactivos que se activan a baja temperatura para formar enlaces glicosídicos con muy buen rendimiento y de forma rápida.

2.1.5 Seguimiento de las reacciones.⁸⁶

Mientras que en la síntesis en solución el curso de las reacciones se realiza generalmente utilizando algún tipo de técnica cromatográfica, en la síntesis en fase sólida este análisis sólo es posible una vez liberado el producto y procesada la mezcla. Esto puede ser un trabajo laborioso en el caso de muchas resinas y normalmente es una opción exclusiva de soportes funcionalizados con un *linker* que permiten tomar una alícuota y liberar el sustrato de una forma rápida y limpia en un disolvente adecuado para poder llevar a cabo el análisis cromatográfico. El análisis de masas usando la técnica MALDI-TOF también es muy útil en el seguimiento de las reacciones en fase sólida.

Métodos no destructivos como las espectroscopías de infrarrojo o la RMN en fase gel dan buenos resultados cuando se utilizan en el seguimiento de las reacciones en fase sólida. Por ejemplo, la mayoría de los soportes de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) funcionalizados proporcionan buenos espectros de infrarrojo. Así mismo las resinas de PS-DVB y PEG-PS-DVB proporcionan espectros de ^{13}C -RMN de bastante

Introducción y Antecedentes

calidad. Dentro del caso concreto de las resinas solubles, la $^1\text{H-RMN}$ es una herramienta muy útil en el seguimiento de las reacciones.

Existe por último también, un rango de técnicas analíticas clásicas que pueden proporcionar información útil sobre el progreso de la reacción en fase sólida, como son la valoración de grupos funcionales (aminas, ácidos, tioles,..), el análisis elemental, el análisis gravimétrico o el test colorimétrico.

CAPÍTULO II:

OBJETIVO

II. Ojetivo

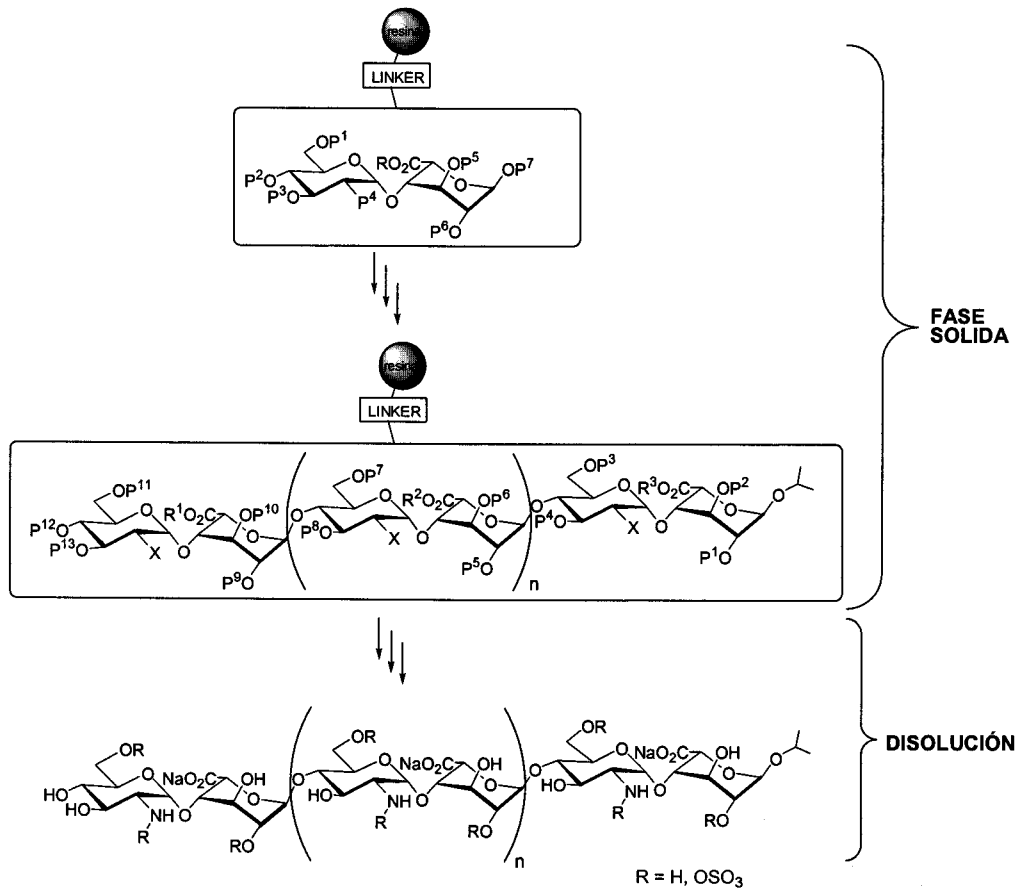
Dentro de un programa más general dirigido a contribuir al conocimiento, a escala molecular, del mecanismo de activación de los factores de crecimiento para fibroblastos por oligosacáridos de tipo heparina, la presente Tesis Doctoral ha pretendido desarrollar un procedimiento eficaz para la preparación de estos oligosacáridos en fase sólida.

La síntesis en solución de oligosacáridos de tipo heparina implica un gran número de etapas y purificaciones cromatográficas, lo que hace especialmente conveniente el desarrollo de metodologías sintéticas en fase sólida que permitan acceder a este tipo de estructuras más fácilmente y en menos tiempo. La síntesis de oligosacáridos en fase sólida presenta, entre otras, las siguientes ventajas: disminución del número de purificaciones cromatográficas ya que los productos unidos al soporte sólido se separan fácilmente por filtración; aumento de rendimientos de reacción mediante ciclos de adición de excesos de reactivo que permiten completar la reacción. Todo esto, abre la posibilidad de una futura aplicación a la síntesis de librerías de oligosacáridos, con diferentes secuencia, tamaño y patrón de sulfatación.

El establecimiento en los últimos años en nuestro laboratorio de una metodología general para la síntesis de oligosacáridos tipo heparina en disolución, que ha conducido a buenos resultados, nos ha inducido a conservar el esquema sintético original incorporando las conocidas ventajas de la síntesis en fase sólida. Asimismo y a la vista de la inexistencia en la bibliografía de reacciones sulfatación en fase sólida, nos planteamos como primer objetivo la síntesis de precursores oligosacáridicos protegidos, llevando a cabo las fases finales de desprotección-sulfatación en disolución, una vez liberado el oligosacárido

Objetivo

protegido de la resina. Una representación esquemática del diseño del presente estudio se muestra en el **esquema 7**.



Esquema 7

A la hora de abordar un diseño sintético en fase sólida es necesario establecer una serie de parámetros esenciales que conduzcan con éxito al objetivo final. Como se comentará en el siguiente capítulo aspectos clave en nuestro desarrollo han sido el estudio comparativo de resina insoluble (ArgoGel) frente a resina soluble (MPEG); la elección de un linker

Objetivo

sensible a medio básico (linker succinoílo), estable durante toda la secuencia sintética, cuya elección ha permanecido constante en todas nuestras aproximaciones; el análisis pormenorizado de distintas posiciones de anclaje; y también un novedoso método de purificación en resinas solubles mediante el empleo de resinas insolubles, que conduce a productos con un elevado grado de pureza después de la etapa final de liberación de la resina. La estrategia de grupos protectores o el método de glicosidación (método del tricloroacetimidato) han sido directamente extrapolados de nuestra metodología empleada en disolución.

CAPÍTULO III:
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Análisis de los factores determinantes para establecer una metodología en fase sólida: resina, linker, estrategia sintética, posición de anclaje y molécula objetivo.

Como se adelantó en capítulos anteriores, el desarrollo de una síntesis en fase sólida conlleva el establecimiento de una serie de parámetros como son, la elección del tipo de resina y *linker* que se van a emplear, la posición de anclaje más adecuada y la estrategia sintética y de grupos protectores que se va a seguir⁵⁴.

En el presente trabajo se pretende establecer una metodología para la síntesis en fase sólida de precursores totalmente protegidos de oligosacáridos tipo heparina. Esto tiene como principal objeto simplificar la síntesis desarrollada en nuestro laboratorio⁶⁻⁸ para este tipo de compuestos en disolución. Para llegar a establecer estas bases se han llevado a cabo diversos ensayos en los que se ha incidido principalmente en el tipo de resina y *linker*, así como en las distintas posiciones de anclaje y condiciones de reacción. En todos los casos se mantuvo la estrategia sintética y de grupos protectores establecida con anterioridad para la síntesis de estos compuestos en disolución.⁶⁻⁸

A continuación y a lo largo del presente capítulo, se detallará la elección que se hizo en cada caso, exponiendo las razones que llevaron a tal opción así como las que llevaron a la búsqueda de mejores alternativas.

Así, en nuestras aproximaciones para el establecimiento de una metodología en fase sólida para la síntesis de oligosacáridos de heparina se han empleado dos tipos de resina de características muy diferentes: una resina insoluble tipo ArgoGel⁶³ y una resina soluble tipo MPEG⁶⁷. Los

Discusión de Resultados

resultados obtenidos con cada una de ellas se comentarán en los siguientes apartados.

El *linker* elegido para desarrollar esta síntesis es el *linker* succinoílo⁸⁷ (diácido carboxílico) (**figura 21**). Se trata de un *linker* sensible a medio básico, que permanece estable en condiciones de glicosidación cuando se emplea el método del tricloroacetimidato⁸⁸ usando TMSOTf como promotor. Es un *linker* compatible con una gran variedad de grupos protectores como, grupos alílo, bencilo, acetales (incluido el grupo bencilidén acetal) o tipo sililo, lo que en resumen, lo hace compatible con la estrategia de grupos protectores empleada en la síntesis de los oligosacáridos objetivo, que ya se avanzó en el **apartado I. 1.3.1** (página 10).

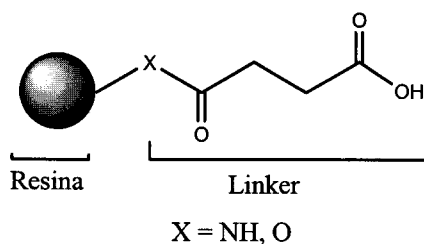


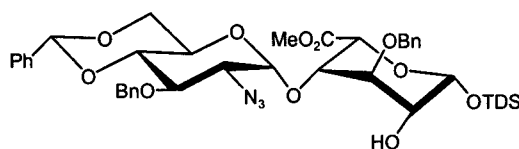
Figura 21: *Linker* succinoílo

Como se comentará posteriormente, la introducción de este tipo de *linker* en la posición anomérica⁸⁹, elegida inicialmente como posición de anclaje en nuestra síntesis, lo hace susceptible de ser desprotegido selectivamente respecto a otros grupos acilo cuando se emplea en dicha posición. Para llevar a cabo esta desprotección selectiva se emplea acetato de hidrazina o bencilamina.

Discusión de Resultados

Cabe mencionar por último que, la utilización de este *linker* ha sido constante en todas nuestras aproximaciones, independientemente del tipo de resina y posición de anclaje que se haya empleado.

Como estrategia sintética, se conserva la empleada en la metodología establecida en nuestro laboratorio para la síntesis en disolución de estos oligosacáridos⁶⁻⁸. Se trata de una estrategia convergente y supone la elongación de la cadena desde el extremo reductor, lo que en su extrapolación a la fase sólida implica el anclaje al soporte sólido a través del aceptor de glicosilo del terminal reductor. La adopción de esta estrategia evita que los subproductos procedentes del donador de glicosilo queden anclados a la resina, pudiéndose eliminar fácilmente mediante un simple lavado y filtrado del soporte sólido. La elongación de la cadena tendrá lugar siguiendo un esquema de glicosidaciones $n+2$ en fase sólida a partir de unidades disacáridicas convenientemente sustituidas y sintetizadas en disolución obteniéndose, de esta manera, oligosacáridos de longitud variable (y grado de sulfatación también variable, una vez sometido a las etapas de desprotección-sulfatación correspondientes). Estas reacciones de glicosidación se llevan a cabo usando el método del tricloroacetimidato⁸⁸. Los derivados disacáridicos se obtienen a partir de una única materia prima, el disacárido base 1 (figura 22), cuya síntesis ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio⁶.



Disacárido Base 1

Figura 22

Discusión de Resultados

Cabe recordar que la estrategia de grupos protectores diseñada en nuestro grupo de investigación para la síntesis de estos oligosacáridos en disolución⁶⁻¹¹ emplea grupos acilo precursores de las posiciones sulfatadas en la molécula objetivo, grupos bencilo permanentes para las posiciones sin sulfatar y grupos azido enmascarantes de las funciones amina en la molécula final (**figura 4**, página 12).

Por lo que respecta a la posición de anclaje en el bloque disacárido del terminal reductor, de todas las posiciones posibles fueron tres las estudiadas en detalle: anclaje por la posición anomérica del anillo de idurónico del bloque disacárido, anclaje por la posición 6 de glucosamina y anclaje por el grupo metoxicarbonilo de la unidad de ácido idurónico (**figura 23**).

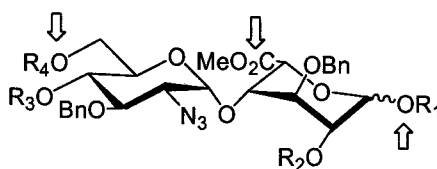


Figura 23: Distintas posiciones de anclaje estudiadas

El anclaje por cualquiera de las otras posiciones posibles de este bloque disacárido se descartó a priori debido a las siguientes razones:

a) La estereoquímica de las glicosidaciones se controla, según los casos, con o sin participación del grupo vecino en la posición 2 del donador. Al introducir el *linker* por dicha posición la estereoquímica de las uniones glicosídicas quedaría determinada por tanto, por la naturaleza participativa o no del *linker*.

Discusión de Resultados

b) El anclaje por la posición 3 del precursor de ácido idurónico supondría una modificación en la estrategia general de grupos protectores utilizada, y por tanto obligaría a introducir modificaciones en la compleja síntesis de la unidad de ácido idurónico,^{90,91} usada ampliamente y con resultados satisfactorios en nuestro laboratorio. Esta modificación en la síntesis del monosacárido no compensaría, a priori, las posibles ventajas que supondría anclar por esta posición. A su vez esta variación en el patrón de grupos protectores, daría lugar a una unidad disacarídica que actuaría únicamente como aceptor de glicosilo, siendo necesaria la preparación adicional del bloque disacarídico 1 para generar el donador de glicosilo. De este modo no se lograría el objetivo inicial de usar el disacárido base 1 como única materia prima a lo largo de toda la ruta sintética, de acuerdo con la síntesis de estos compuestos en disolución.

En el caso de la posición de 3 del precursor de glucosamina el razonamiento es el mismo. Esta opción supondría introducir modificaciones en la síntesis de la unidad de glucosamina^{92,93} puesta a punto en nuestro laboratorio a escala multigramo y obligaría a sintetizar diferentes unidades disacarídicas como materia prima.

Estos argumentos podrían, a su vez, extenderse a las posiciones comentadas en el apartado a).

c) El hecho de que la unión de los bloques disacarídicos sea de tipo α (1 \rightarrow 4) impediría considerar la posición 4 de glucosamina y de idurónico como posible lugar de anclaje.

Para establecer las bases de la síntesis en fase sólida de oligosacáridos de heparina se ha pretendido en principio preparar los precursores oligosacáridicos protegidos de la región regular⁶ (**figura 24**)

Discusión de Resultados

por ser su esquema sintético el más fácil, ya que consiste únicamente en la repetición de la unidad disacáridica que se muestra en la **figura 24**.

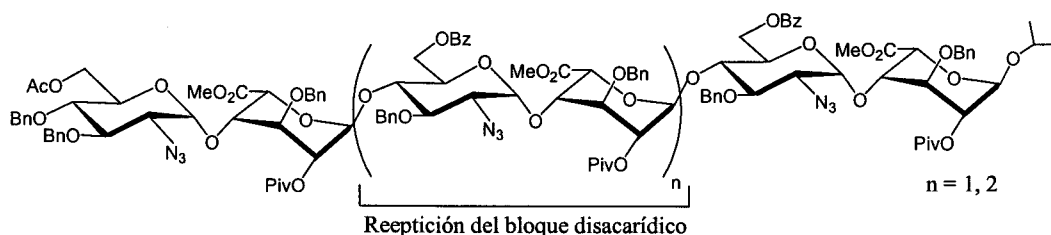


Figura 24: Precursores de los oligosacáridos de la región regular I y II

Una vez establecidas estas bases el siguiente paso sería aplicar esta metodología a la síntesis de otros precursores oligosacáridicos más complejos como el del precursor del hexasacárido modificado de la región regular **III**⁷ (**figura 25**), por ser este producto de marcas características, tanto desde el punto de vista sintético⁷ como por su implicación biológica.^{7,9} En concreto, en el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio de algunas de las reacciones clave en la síntesis del precursor totalmente protegido de este oligosacárido.

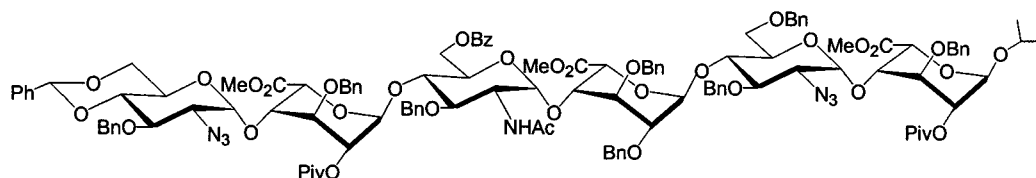


Figura 25: Oligosacárido modificado precursor de **III**

2. Ensayos con resina insoluble ArgoGel.

2.1 Resina ArgoGel.

Inicialmente se decidió emplear la resina insoluble ArgoGel (figura 26) para la síntesis de oligosacáridos en fase sólida de acuerdo con la experiencia precedente en nuestro laboratorio en trabajos realizados con este soporte⁹⁴ y con sus características⁶³ (capítulo I, apartado 2.1.2.1.2), que hacen que las condiciones de trabajo sean más próximas a las de la síntesis en disolución que cuando se emplean otros soportes insolubles como las resinas de PS. Esto es debido, esencialmente, a la flexibilidad que confieren las cadenas de PEG a este tipo de resinas, como se comentó en capítulos anteriores.

De las posibles funcionalidades de las resinas ArgoGel (Cl, OH, NH₂, etc...), se pensó que una vez elegido el *linker* (succinoílo), la función amino sería la más adecuada por la posibilidad de unir el *linker* mediante la formación de un enlace tipo amida, estable durante toda la secuencia sintética.

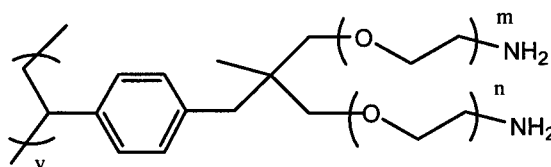


Figura 26: Resina ArgoGel-NH₂

2.1.1. Aspectos técnicos

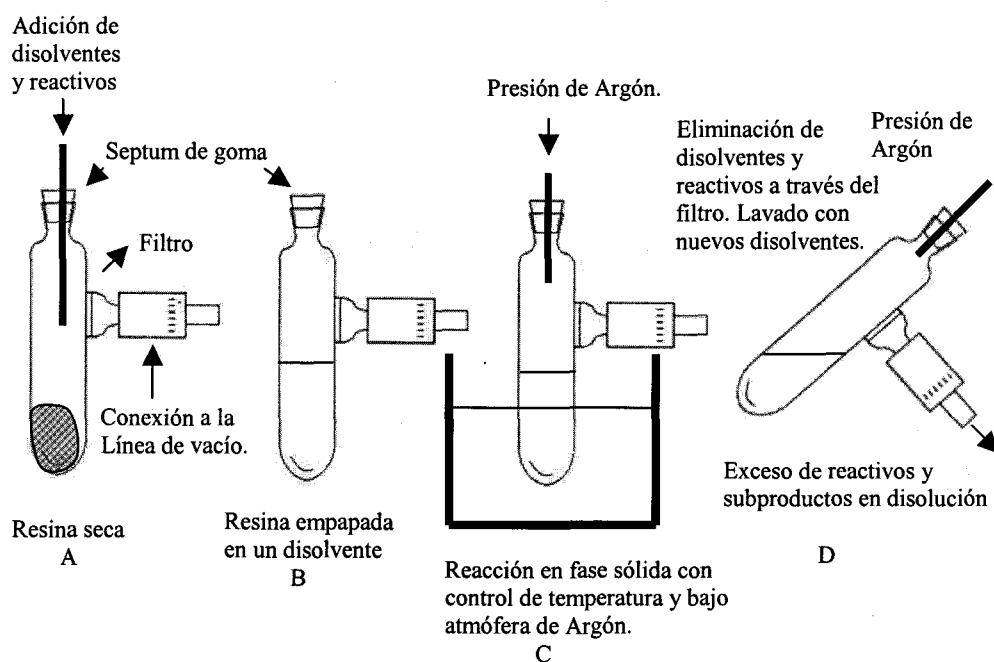


Figura 27: A) Dispositivo de reacción y sus componentes. B) Resina empapada en un disolvente; C) Reacción en fase sólida en dispositivo especial con control de temperatura y bajo atmósfera inerte; D) Fin de la reacción en fase sólida. Eliminación de disolventes y exceso de reactivos. Lavado de la resina con nuevos disolventes.

a) Dispositivos de reacción

Cuando empleamos resinas insolubles, las reacciones en fase sólida se llevan a cabo en dispositivos diseñados especialmente como el que se muestra en la **figura 27**. Este sistema consta de una boca de entrada por la que se lleva a cabo la adición de reactivos y disolventes y de una llave de salida por la que, además de eliminar el exceso de reactivos y

Discusión de Resultados

subproductos en disolución, se puede conectar a la línea de vacío. Esta llave de salida está precedida de un filtro que impide el paso de sólidos insolubles. Tanto la boca de entrada como la llave de salida permiten la introducción de gas inerte, según se requiera.

Este dispositivo, que puede emplearse en condiciones extremas de temperatura, permite la manipulación de la resina, disolventes y reactivos en atmósfera inerte, además de la eliminación fácil y rápida de la fase soluble cuando termina la reacción o cuando se realizan los lavado de la resina (**figura 27**).

b) Agitación

Para que la reacción tenga lugar satisfactoriamente es necesario que una vez que la resina se haya empapado en el disolvente adecuado (**figura 27B**) y se hayan adicionado los reactivos convenientes el conjunto se agite vigorosamente. Para conseguirlo se emplea un agitador IKA-vibramax modificado para sostener el dispositivo de reacción. En este caso no se puede trabajar con agitación magnética porque ésta podría afectar a la estructura del polímero⁶³.

Por otra parte, como se comentará más adelante, para confirmar la conclusión de las reacciones se desprotegieron alícuotas y se analizaron los productos desprotegidos mediante cromatografía de capa fina o análisis de masas. Estas reacciones se llevaron a cabo en eppendorff y la agitación necesaria se consiguió utilizando un microagitador IKA.

c) Lavado de la resina

Una vez terminada la reacción, el exceso de reactivos y otros subproductos formados se elimina mediante la filtración de la resina

Discusión de Resultados

(figura 27D). Para ello se abre la llave del dispositivo de reacción y se inclina a la vez que se introduce una pequeña presión de gas inerte, de modo que la fase soluble cae y la resina quede retenida en la placa filtrante situada inmediatamente antes de esta salida. Una vez eliminada esta primera fase soluble, la resina es lavada. Este proceso de lavado consiste en la adición de una cierta cantidad de disolvente, agitación y eliminación de la fase soluble según se ha descrito anteriormente. En la parte experimental se detallan los diversos disolventes empleados, la cantidad y las veces que se repite cada lavado.

d) Secado de la resina

Después de cada etapa de lavado el polímero debe secarse a alto vacío hasta constatar que su peso sea constante. De este modo podrá determinarse con exactitud el rendimiento de las reacciones según la variación de peso de la resina y se dejará la resina preparada para al siguiente reacción.

2.2. *Linker* y posición de anclaje

Como ya se adelantó en el apartado 1 el *linker* empleado en estos ensayos en fase sólida es el *linker* succinoílo. La posición de anclaje elegida inicialmente para los ensayos en resina insoluble, fue la posición anomérica puesto que esta elección no supone modificación alguna en la estrategia de grupos protectores ni por tanto, en la síntesis de la materia de partida. Por otra parte la necesidad de desproteger alícuotas para confirmar el fin de las reacciones, cuando se utilizan soportes insolubles obliga a disponer de un método rápido y eficaz para llevar a cabo estas desprotecciones de manera selectiva. Como ya se comentó, la presencia

Discusión de Resultados

del grupo succinoílo en la posición anomérica ofrece la posibilidad de desprotegerlo selectivamente frente al resto de grupos protectores fácilmente utilizando para ello acetato de hidracina⁸⁷ o bencilamina (figura 28).

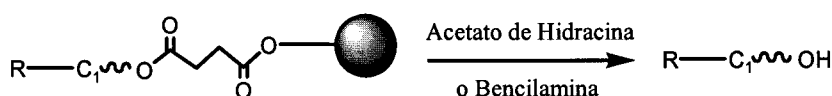


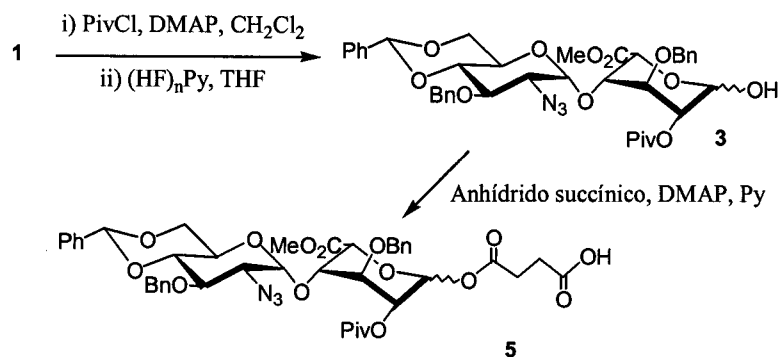
Figura 28

2.3 Resultados

En este apartado se presenta la síntesis del octasacárido completamente protegido **12**, precursor de la molécula objetivo **II**⁶.

Una vez determinados todos los factores a tener en cuenta en el diseño de la síntesis en fase sólida, la preparación del oligosacárido objetivo comenzó por la introducción del *linker* en la posición anomérica del bloque disacarídico del extremo reductor. Para ello se hizo reaccionar **3**⁶, preparado a partir del disacárido base **1**, con anhídrido succínico y una cantidad catalítica de DMAP en piridina para obtener **5** con buen rendimiento (esquema 8).

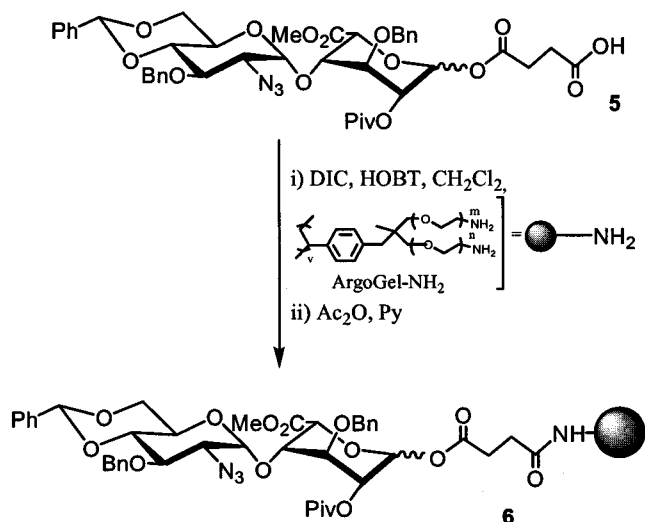
Discusión de Resultados



Esquema 8: Introducción del *linker*

La unión al soporte sólido, se hizo mediante la formación del enlace amida entre el grupo carboxílico del *linker* y la función amino de la resina. Para ello se hizo reaccionar un exceso de 5 con ArgoGel-NH₂ (*loading* inicial: 0.42 mmol/g) en presencia de DIC, HOBT⁹⁵ y usando diclorometano/DMF como disolvente. Una vez completado el anclaje se llevó a cabo el *capping* con el objeto de bloquear las funciones amina que hubieran quedado sin reaccionar y evitar así que interfirieran en etapas posteriores. Este *capping* se hizo mediante acetilación⁹⁶ convencional de los grupos amino libres (esquema 9). De esta manera se obtuvo 6 y se determinó un nuevo *loading* de 0.35 mmol/g (según ganancia de peso).

Discusión de Resultados

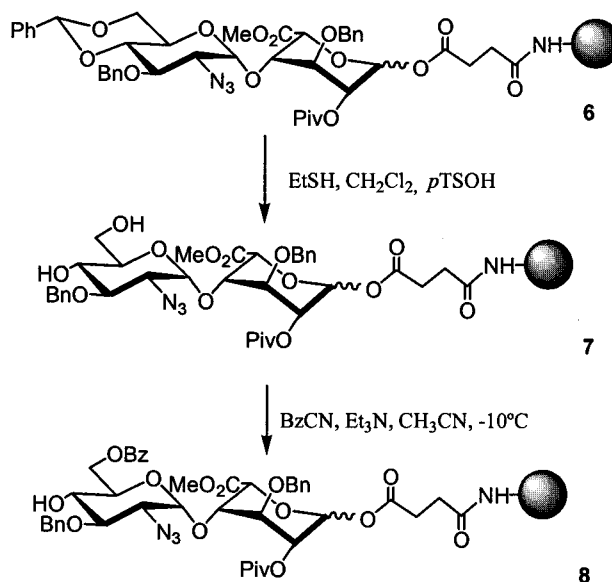


Esquema 9: Anclaje por la posición anomérica.

El siguiente paso consistió en generar el disacárido aceptor de glicosilo anclado a la resina dejando, para ello, la posición 4 de la unidad de glucosamina libre para formar un nuevo enlace glicosídico. Esto se consiguió en dos etapas, siguiendo el mismo protocolo utilizado para la síntesis en disolución⁶. En primer lugar se procedió a la hidrólisis del grupo bencilén acetal con EtSH para obtener 7, seguido de la benzoilación regioselectiva del diol en la posición primaria de la unidad de glucosamina usando BzCN y una cantidad catalítica de Et₃N en CH₃CN a baja temperatura. De esta manera se obtuvo el aceptor de glicosilo 8 como se muestra en el **esquema 10**. Hay que destacar que la reacción de benzoilación selectiva puesta a punto en disolución se ha llevado a cabo

Discusión de Resultados

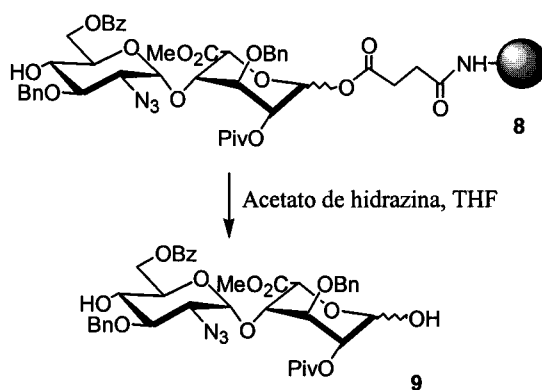
en fase sólida sin ninguna complicación adicional (la reacción resultó exitosa incluso cuando se emplearon 2 equivalentes de BzCN).



Esquema 10: Generación del disacárido aceptor.

Para comprobar la efectividad de estas reacciones y que la reacción de desprotección no ofrecía excesiva complicación, se procedió al desanclaje de **8**, con acetato de hidrazina. De esta manera se obtuvo **9** con un rendimiento del 90% (**esquema 11**). Este producto se caracterizó mediante espectroscopía de ¹H-RMN y análisis de masas confirmándose de este modo la presencia del aceptor de glicosilo anclado a la resina.

Discusión de Resultados

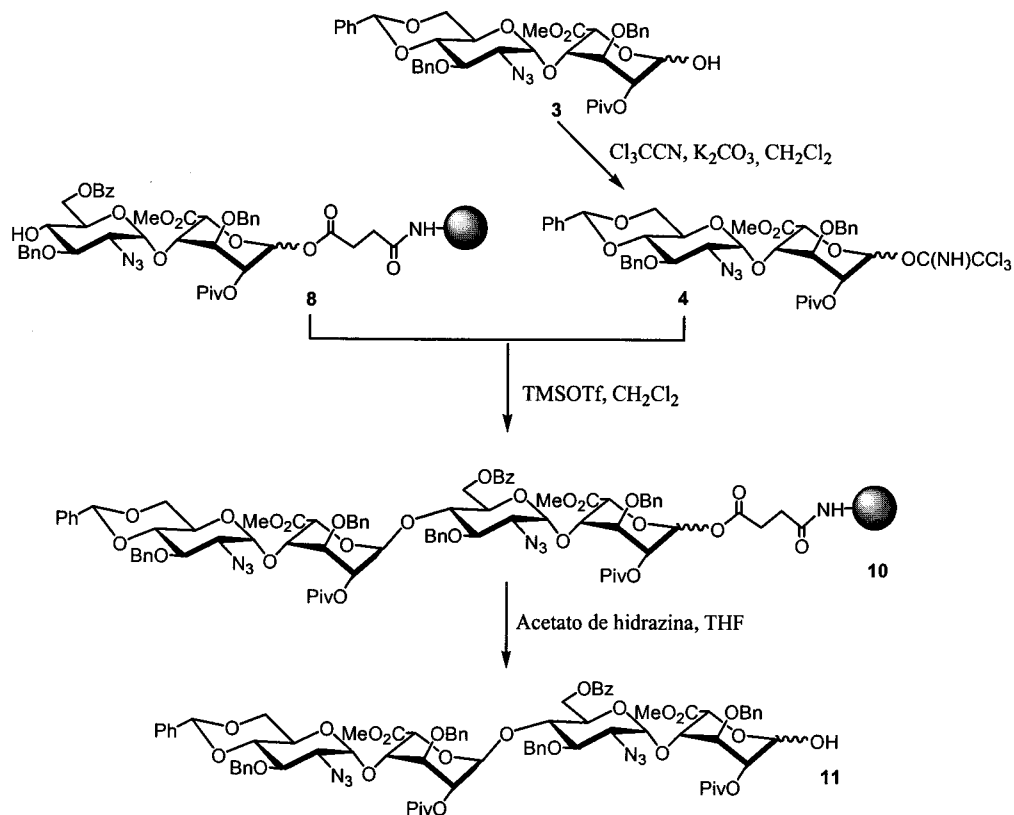


Esquema 11: Desprotección del disacárido aceptor

El siguiente paso fue estudiar la reacción de glicosidación entre el aceptor antes generado, **8**, y el donador de glicosilo **4** (esquema 12) preparado a partir de **3** por tratamiento con Cl_3CCN y K_2CO_3 en diclorometano. Después de probar varios grados de concentración y cantidades de donador y promotor, los mejores resultados se consiguieron haciendo la reacción a temperatura ambiente y usando 5 equivalentes de donador y un 3% de promotor respecto al donador, obteniéndose el correspondiente tetrasacárido anclado a la resina. Para completar la reacción se llevaron a cabo tres ciclos de glicosidación, obteniéndose **10** con un 90% de rendimiento según la ganancia de peso de la resina. Igualmente se desancló el producto en las condiciones indicadas anteriormente obteniéndose el producto libre, **11**, con buen rendimiento, confirmándose de esta manera la presencia del tetrasacárido unido a la

Discusión de Resultados

resina. También se encontraron al desproteger trazas del disacárido aceptor **9**.



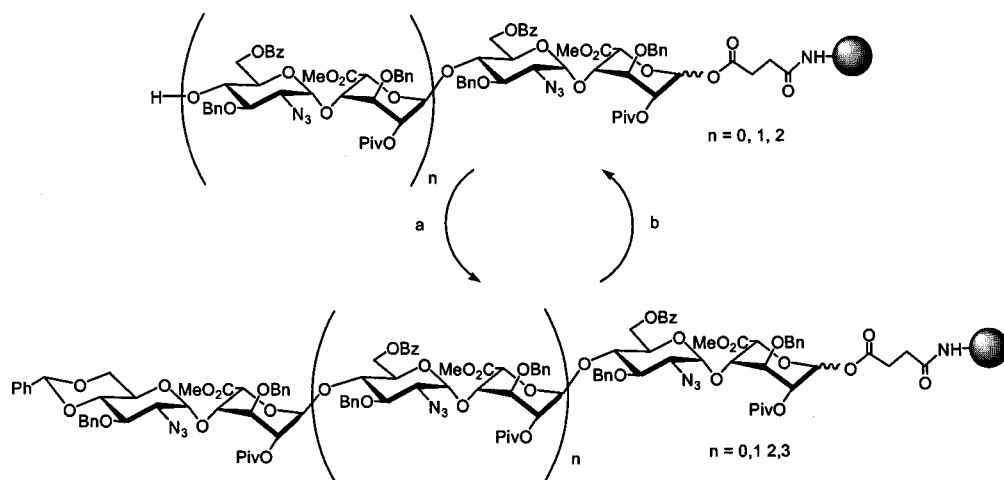
Esquema 12: Síntesis del tetrasacárido en fase sólida y desprotección.

Una vez examinadas estas reacciones y basándose en la posibilidad que ofrece la presencia del grupo bencilidén acetal en el extremo no reductor de cada nuevo oligosacárido de generar un nuevo aceptor de

Discusión de Resultados

glicosilo, se procedió a la elongación de la cadena hasta la longitud de octasacárido siguiendo el esquema de reacciones ya descrito.

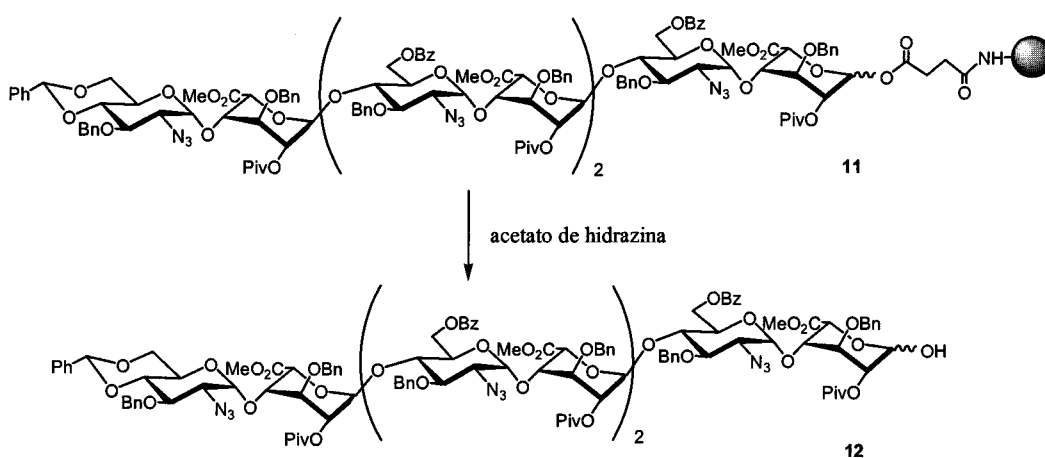
Así, se generó el aceptor anclado a la resina **8** a partir de **5** del modo ya visto, y se hizo glicosidar con el mismo donador disacarídico (**4**) para obtener el correspondiente tetrasacárido. A su vez **10** se transformó en un nuevo aceptor mediante la hidrólisis del grupo bencilén acetal de la unidad de glucosamina del terminal no reductor seguida de la acilación regioselectiva en 6 de glucosamina. Este nuevo aceptor se hizo glicosidar con el donador disacarídico **4** para elongar la cadena a la longitud de hexasacárido en condiciones idénticas que en la reacción de glicosidación anterior. Finalmente se repitió este ciclo de generación del aceptor-glicosidación con **4** para llegar a la longitud de octasacárido. En el **esquema 13** se muestran estos ciclos de elongación.



Esquema 13: Elongación de la cadena hasta octasacárido: a) glicosidación con **4**; b) generación del nuevo aceptor (hidrólisis/benzoilación)

Discusión de Resultados

Una vez alcanzada la longitud de octasacárido, se procedió a la desprotección del producto anclado a la resina para obtener el producto deseado. Mediante tratamiento con acetato de hidrazina se obtuvo **12** con un 10% de rendimiento global (**esquema 14**), obteniéndose también fragmentos de menor longitud.



Esquema 14: liberación del octasacárido

Después de cada etapa de glicosidación existe la posibilidad de efectuar un *capping* para impedir que las trazas de aceptor que ha quedado sin reaccionar lo hagan en reacciones de glicosidación posteriores. Este *capping* se realizaría, como en el caso de la etapa de anclaje, acetilando los OH libres en 4 de glucosamina del aceptor. En nuestro caso proceder con este *capping* no supone ninguna ventaja adicional. La explicación estriba en que puesto que la síntesis de esta cadena se basa en la repetición de una única unidad disacarídica a lo largo de toda la ruta, al no hacer *capping* los aceptores que quedaran sin reaccionar sí lo harían en la

Discusión de Resultados

siguiente etapa de glicosidación, concentrando de esta manera los subproductos en fragmentos de mayor longitud (tetra y hexasacárido). Si por el contrario llevamos a cabo el *capping* después de cada reacción de glicosidación tendríamos subproductos di-, tetra- y hexasacarídicos acetilados en la posición 4 de la unidad de glucosamina del terminal no reductor. Probablemente esta última mezcla sería más difícil de separar que la obtenida cuando se prescinde del *capping*. Esto sería aún más acusado si consideramos secuencias sintéticas que dieran lugar a cadenas de mayor longitud.

Después de esta primera aproximación y a modo de resumen, se puede concluir que aun habiendo dado un primer paso en el establecimiento de las bases para la síntesis en fase sólida de precursores oligosacarídicos tipo heparina con unos resultados no del todo negativos, estos no cubren al completo las necesidades exigidas. El principal problema que se nos presenta es el de la extrema dificultad de llevar las reacciones de glicosidación a su finalización. Este problema, ampliamente descrito en la bibliografía para la síntesis de oligosacáridos en fase sólida, se hace más acusado en nuestro caso al tratarse de bloques disacarídicos ya de por sí poco reactivos en disolución. La necesidad de emplear cantidades elevadas de donadores disacarídicos muy elaborados para completar las reacciones de glicosidación en fase sólida, nos llevó a la búsqueda de otras alternativas para intentar, principalmente, minimizar este problema. Por esta razón decidimos hacer uso, en una segunda fase, de soportes solubles que sin duda tendrían un efecto positivo en la reactividad de estos bloques disacarídicos.

3. Ensayos en resina soluble MPEG

Para intentar mejorar la reactividad de las reacciones en fase sólida se optó por utilizar el polímero soluble MPEG. Cuando se emplean estos soportes solubles las condiciones de reacción se asemejan más a las de la síntesis en solución, ya que éstas transcurren en fase homogénea.

Además el uso de este polímero permite seguir el progreso de las reacciones sin necesidad de desproteger alícuotas usando para ello el análisis por cromatografía de capa fina o la espectroscopía de ^1H -RMN.

3.1 Resina MPEG⁶⁷

Las características y propiedades de este soporte fueron ampliamente comentadas en el **capítulo I apartado 2.1.2.2** (página 24). Este polímero posee un grupo hidroxilo libre primario a través del cual tiene lugar la unión al *linker*. En nuestro caso utilización de *linker* succinoílo permite efectuar la unión al soporte sólido mediante la formación de un enlace éster entre el grupo hidroxilo del polímero y el grupo ácido carboxílico del *linker*. Este nuevo enlace éster, sensible a medios básicos, permanecerá estable frente a todas las condiciones de reacción.

Por otra parte, de entre todos los polímeros MPEG de diferente peso molecular que se comercializan, se ha elegido para desarrollar nuestra síntesis el polímero con peso molecular 5000 g/mol, por ser el más utilizado para la síntesis de oligosacáridos en soporte soluble.

3.1.1 Aspectos Técnicos

a) Dispositivo de reacción y agitación

Al contrario que en el caso de las resinas insolubles, las reacciones en fase sólida cuando se usan polímeros solubles no requieren un dispositivo de reacción especial y se llevan a cabo en matraces convencionales y con agitación magnética.

b) Precipitación y separación de la fase soluble.

Una vez que la reacción ha terminado, el volumen del disolvente en el que ha transcurrido la reacción se reduce a una cantidad mínima y se añade un éter (en nuestro caso éter etílico) hasta conseguir la precipitación de todo el soporte sólido, para lo cual en algún caso, es necesario enfriar. Una vez que el polímero ha precipitado, se filtra y se sigue lavando con éter. De esta manera se elimina el exceso de reactivos y otros subproductos solubles. Posteriormente el precipitado es rediseuelto en un disolvente adecuado, recogido y concentrado de nuevo. En ocasiones puede resultar bastante complicada la precipitación de la resina. En estos casos la purificación se consigue mediante recristalización en etanol frío.

c) Secado de la resina.

Para dejar la resina en las condiciones óptimas para realizar la siguiente reacción debe eliminarse las trazas de agua que pudieran quedar retenida por el polímero. Esto se consigue coevaporando varias veces con tolueno. Finalmente, la resina se seca a alto vacío.

d) Cálculo de rendimientos

Discusión de Resultados

El rendimiento de las reacciones se puede calcular bien por la variación que se ha producido en el peso de la resina o bien usando la ^1H -RMN para determinar la proporción de producto que hay anclado a la resina, usando como patrón interno la señal del grupo OMe terminal del polímero en el caso de las reacciones de anclaje, o la medida en que un producto se ha transformado en otro durante la reacción comparando las señales de ambos. En la **figura 29** se muestra, a título de ejemplo, el espectro de ^1H -RMN correspondiente al compuesto **13** pudiéndose observar las señales características del polímero y del producto anclado y la relación de intensidades entre ellos.

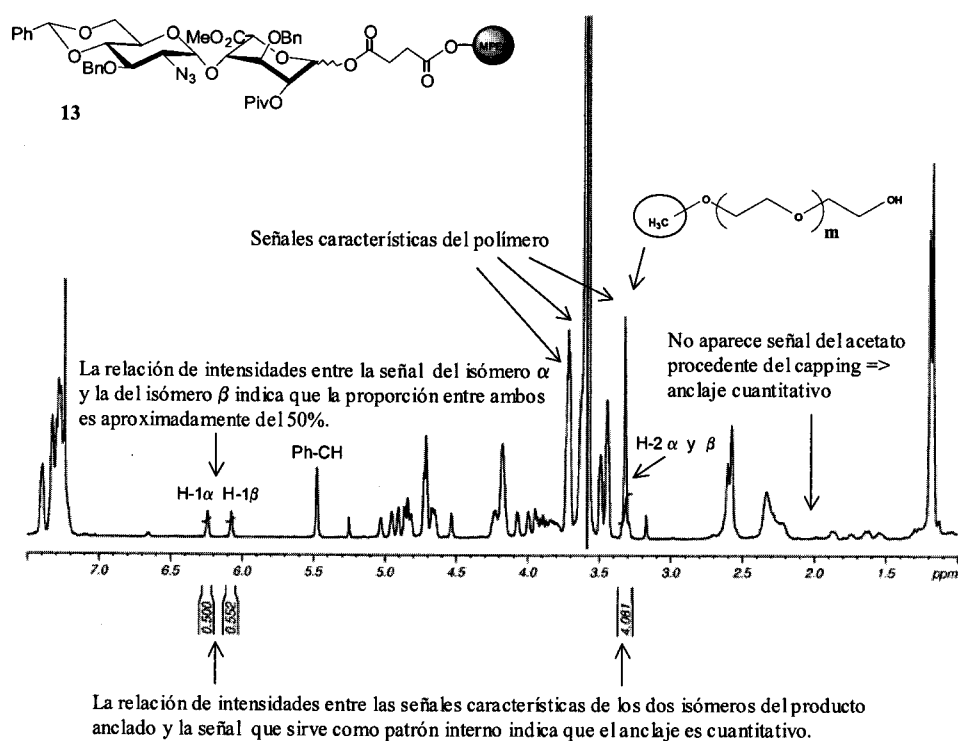


Figura 29: espectro de ^1H -RMN de **13**

3.2 *Linker* y posiciones de anclaje.

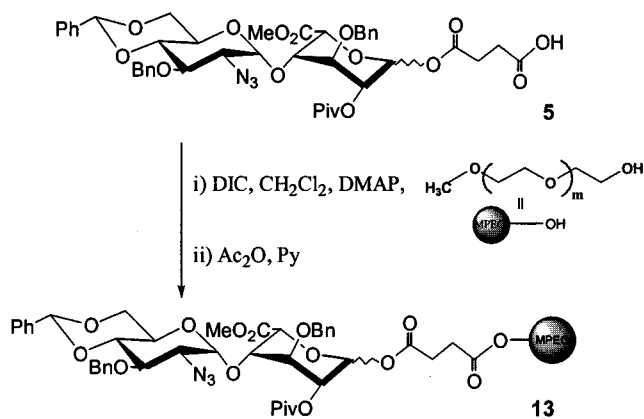
El *linker* succinoílo, elegido como ya se ha dicho para todos nuestros ensayos, se introdujo inicialmente en la posición anomérica. Posteriormente, y para intentar mejorar los resultados obtenidos se ensayaron dos nuevas posiciones de anclaje: la posición 6 de la unidad de glucosamina y el grupo metoxicarbonilo de la posición 5 de la unidad de ácido idurónico. Estos resultados se comentaran detalladamente en los siguientes apartados.

3.2.1 Anclaje por la posición anomérica. Síntesis del precursor tetrasacárido de la región regular.

En un principio se conservó la posición de anclaje elegida para la síntesis en resina insoluble ya que como se comentó, la elección de esta posición permite desproteger el *linker* selectivamente de otros grupos acilo y no introduce modificaciones en la síntesis de la molécula de partida.

La síntesis comenzó por el anclaje del producto succinoilado **5** al soporte sólido. Esta vez la reacción de anclaje consiste en una reacción de esterificación entre el ácido carboxílico del *linker* y el grupo OH de la resina. Así se hizo reaccionar un exceso de **5** con MPEG en presencia de DIC y DMAP y usando CH₂Cl₂ como disolvente (**esquema 15**). Al analizar la reacción mediante ¹H-RMN se determinó un anclaje aproximado del 90%. Para asegurar que no quedaran grupos hidroxilos libres en la resina que pudieran reaccionar en posteriores reacciones de condensación, se efectuó un *capping* consistente en la acetilación⁹⁶ de estos grupos hidroxilos.

Discusión de Resultados

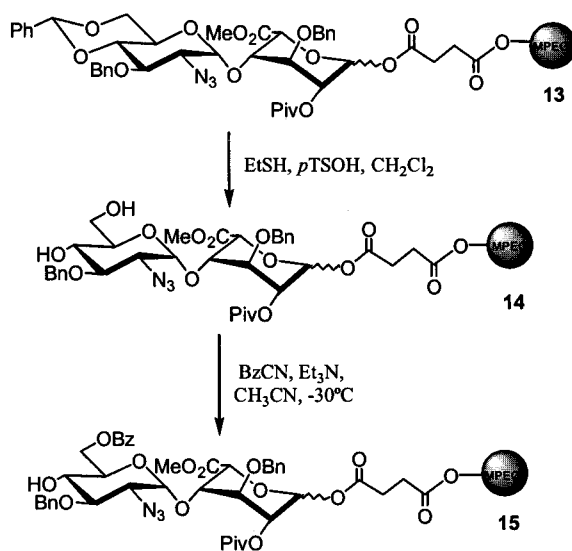


Esquema 15: Reacción de anclaje en MPEG

De esta manera se obtuvo el disacárido del extremo reductor **13** y se procedió a la elongación de la cadena de forma similar a como se hizo con la resina ArgoGel. Para llegar a resultados que dieran una idea de la efectividad del método se llegó a la longitud de tetrasacárido.

Así a partir de **13** se generó el disacárido aceptor en dos etapas: hidrólisis del grupo bencilidén acetal con EtSH y *p*TsOH para obtener **14** y benzoilación selectiva empleando las condiciones ya establecidas para obtener **15**. En el **esquema 16** se muestra este proceso de generación del aceptor.

Discusión de Resultados



Esquema 16: Generación del aceptor

Igualmente en la **figura 30** y a título de ejemplo se muestran los espectros de ¹H-RMN de los productos 13 y 14 donde se observa como ha desaparecido la señal característica del grupo bencilidén acetal que aparece a un desplazamiento químico en torno a 5.5 ppm, confirmando de esta manera la conclusión de la reacción de hidrólisis del bencilidén acetal.

Discusión de Resultados

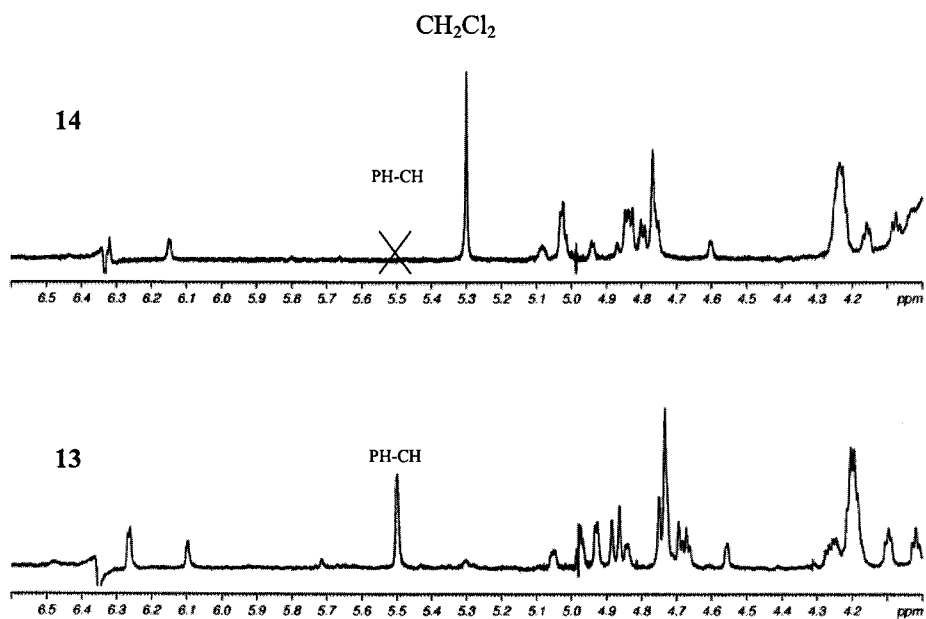
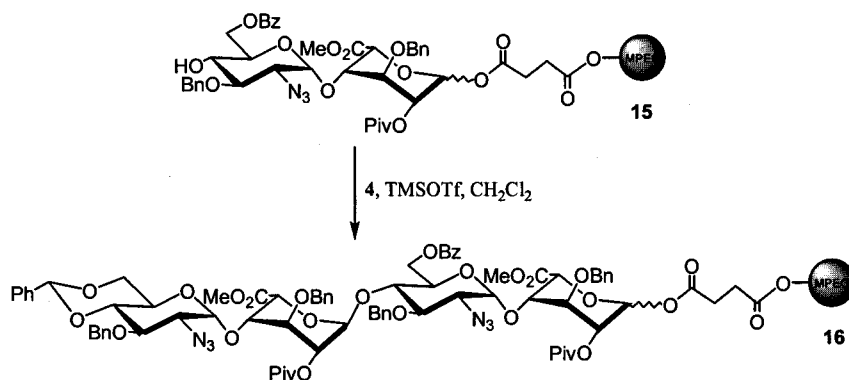


Figura 30: Espectros de ¹H-RMN comparados de los compuestos 13 y 14.

Para la reacción de glicosidación entre el aceptor 15 y el donador del glicosilo 4 (**esquema 17**) se emplearon 2 equivalentes de donador y un 20% de promotor (respecto al donador) en cada uno de los tres ciclos de glicosidación que se hicieron para completar la reacción. Éstas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Discusión de Resultados

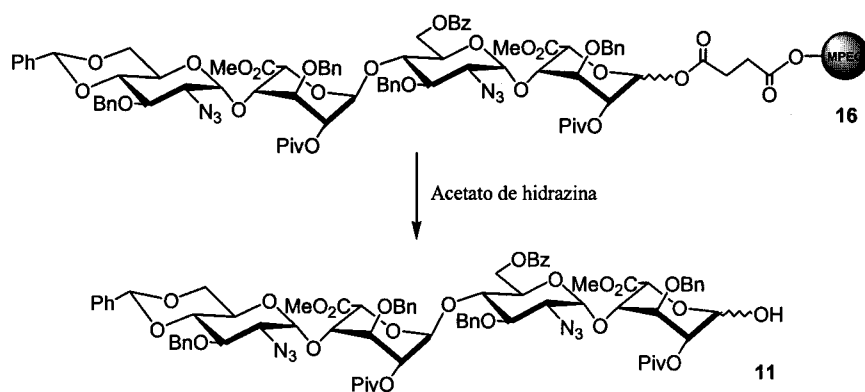


Esquema 17: Reacción de glicosidación

A la vista de los resultados obtenidos en esta reacción, analizados por ¹H-RMN, se observó que se había producido un aumento de la reactividad de los aceptores unidos al soporte soluble respecto a los mismos aceptores unidos al soporte insoluble. Esto se corrobora por la necesidad de emplear una cantidad de donador disacárido considerablemente menor para obtener resultados similares.

Llegados a este punto y considerando que teníamos la información suficiente, esencialmente acerca de la reactividad de los aceptores, se optó por desanclar el tetrasacárido obtenido. Sin embargo al llevar a cabo el tratamiento de 16 con acetato de hidrazina para obtener 17 (esquema 18) no se pudo recuperar todo el tetrasacárido generado, quedando una cierta proporción anclada a la resina de MPEG. Intentos de extremar las condiciones de reacción dieron lugar a reacciones secundarias que no mejoraron el rendimiento. De esta manera, se obtuvo 17 con un 20% de rendimiento en 4 etapas.

Discusión de Resultados



Esquema 18. Reacción de desanclaje

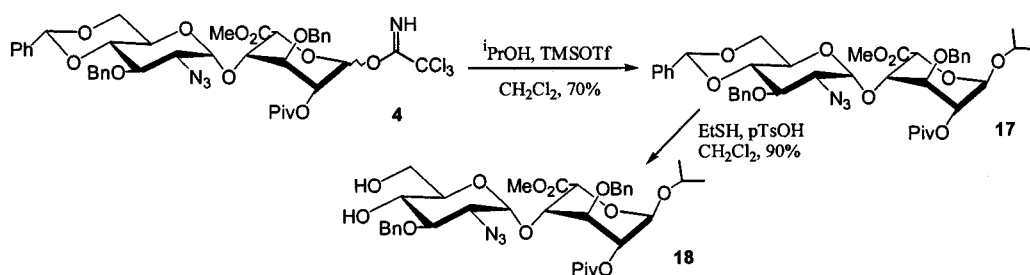
De los resultados obtenidos en estos ensayos con resina soluble MPEG, se puede concluir que como se pretendía, se produjo una mejora en la reactividad de las reacciones en fase sólida. Estos avances nos alentaron a dar un paso adelante en el establecimiento de las bases para la síntesis en fase sólida de oligosacáridos de heparina. Así, como ya se dijo, se analizaron nuevas posiciones de anclaje que, a diferencia de la vista hasta ahora, permitiera trabajar con isómeros puros, lo que sin duda simplificaría el manejo y caracterización de los productos obtenidos.

3.2.2. Anclaje por la posición 6 de la unidad de glucosamina. Síntesis del tetrasacárido de la región regular.

Tomando como referencia el único trabajo⁵² existente en este contexto, se decidió llevar a cabo el anclaje por la posición primaria de la unidad de glucosamina del bloque disacárido base.

Como se recordará, según la estrategia de grupos protectores empleada en la síntesis de estos oligosacáridos la presencia de grupos protectores acilo o grupos protectores bencilos en una posición concreta del oligosacárido precursor totalmente protegido, determina que la molécula objetivo vaya sulfatada o sin sulfatar en dicha posición respectivamente. Por tanto la introducción del *linker* succinoílo (acilo) en la posición 6 de glucosamina conlleva la sulfatación obligatoria de dicha posición en la molécula final. Esto constituye, a priori, una desventaja del anclaje por esta posición, a pesar de lo cual se contempló como una posible alternativa para nuestro estudio.

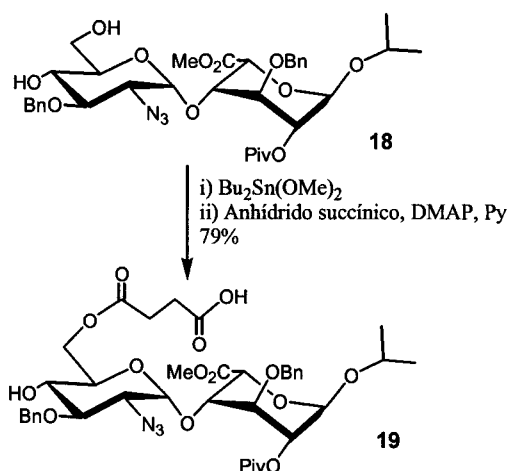
En este caso se parte del diol **18**, el cual se obtuvo mediante la hidrólisis del grupo bencilidén acetal del derivado disacárido **17**,⁶ preparado a partir del donador de glicosilo **4** (esquema 19).



Esquema 19: Síntesis del diol **18**

Discusión de Resultados

La introducción del *linker* en la posición 6 de glucosamina de **18** se llevó a cabo mediante acilación selectiva usando $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$ ⁹⁷ en tolueno para obtener **19** con buen rendimiento (esquema 20).

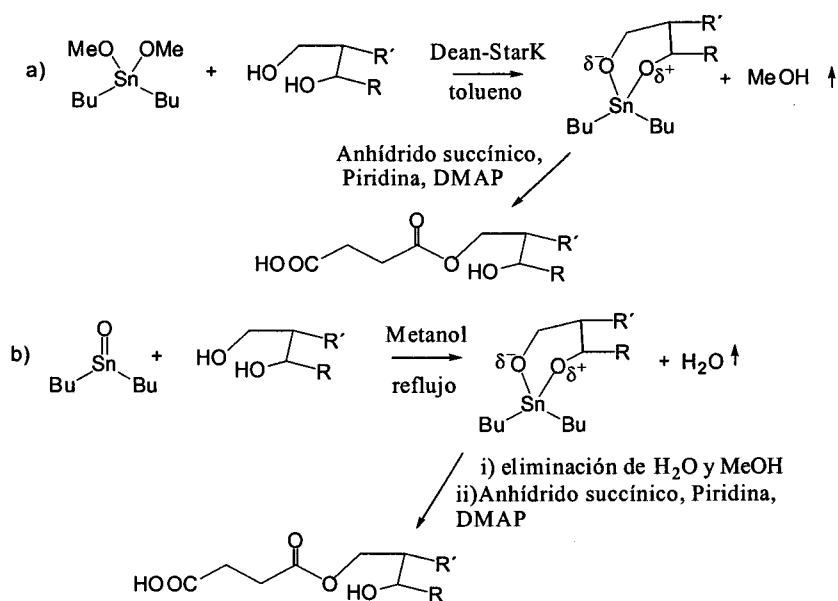


Esquema 20: Introducción del *linker*

Este reactivo reacciona eficientemente con dioles en benceno o tolueno bajo condiciones Dean Stark para obtener la correspondiente disolución de acetal de estaño. Cuando se trata esta disolución con un agente acilante se obtiene el derivado sustituido selectivamente. El empleo del $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$ en lugar del usual Bu_2SnO ^{98,99} debe a las ventajas que el uso del primero presenta sobre el segundo. Así, cuando se usa Bu_2SnO con reflujo de metanol se debe eliminar este disolvente antes de adicionar el electrófilo. Usando Bu_2SnO es muy posible que tenga lugar la metanolisis de los grupos éster presentes en el diol. El empleo de benceno o tolueno con este reactivo implica la destilación azeotrópica del agua lo que

Discusión de Resultados

conduce a tiempos de reacción largos. Sin embargo cuando se usa $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$ la destilación azeotrópica benceno(o tolueno)-metanol es más rápida disminuyendo los tiempos de reacción. Además usando este método se asegura que la reacción quede totalmente en condiciones anhidras (**esquema 21**).



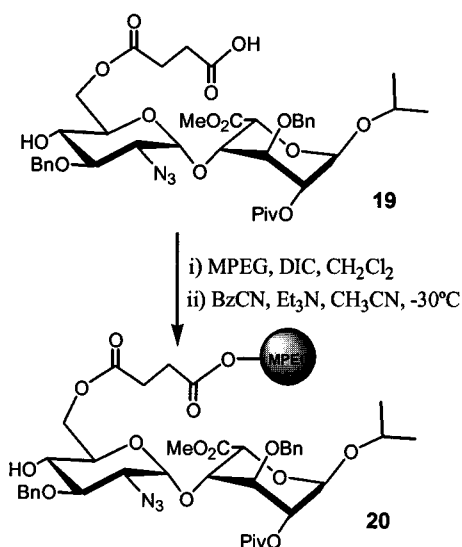
Esquema 21:

a) Acilación selectiva usando $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$; b) Acilación selectiva usando Bu_2SnO

Una vez introducido el *linker* en la posición primaria se procedió al anclaje a la resina de MPEG (**esquema 22**). La reacción de anclaje a la resina se realizó en las condiciones ya descritas con anterioridad, es decir haciendo reaccionar un exceso de **19** con MPEG en presencia de DIC y DMAP. Mediante $^1\text{H-RMN}$ se determinó el grado de anclaje que se estimó en un 37%. La reacción de *capping* consistió esta vez, en la benzoilación selectiva a baja temperatura de los grupos hidroxilos primarios de la

Discusión de Resultados

resina, que ya se había demostrado que no afectaba a la posición 4 libre de glucosamina. De esta manera se obtuvo el aceptor unido a la resina **20**.



Esquema 22

De nuevo utilizando la ¹H-RMN se comprobó que como se predijo, no se había producido benzoilación en los grupos hidroxilos libres del aceptor de glicosilo. Con un ensayo posterior se pudo concluir que la repetición de la reacción de anclaje aumentaba este porcentaje sin que se produjera ningún tipo de reacciones colaterales.

En la **figura 31** se muestra el espectro de ¹H-RMN del producto anclado a la resina **20** donde puede observarse la señal de los grupos benzoílo del *capping* y las señales características del producto anclado

Discusión de Resultados

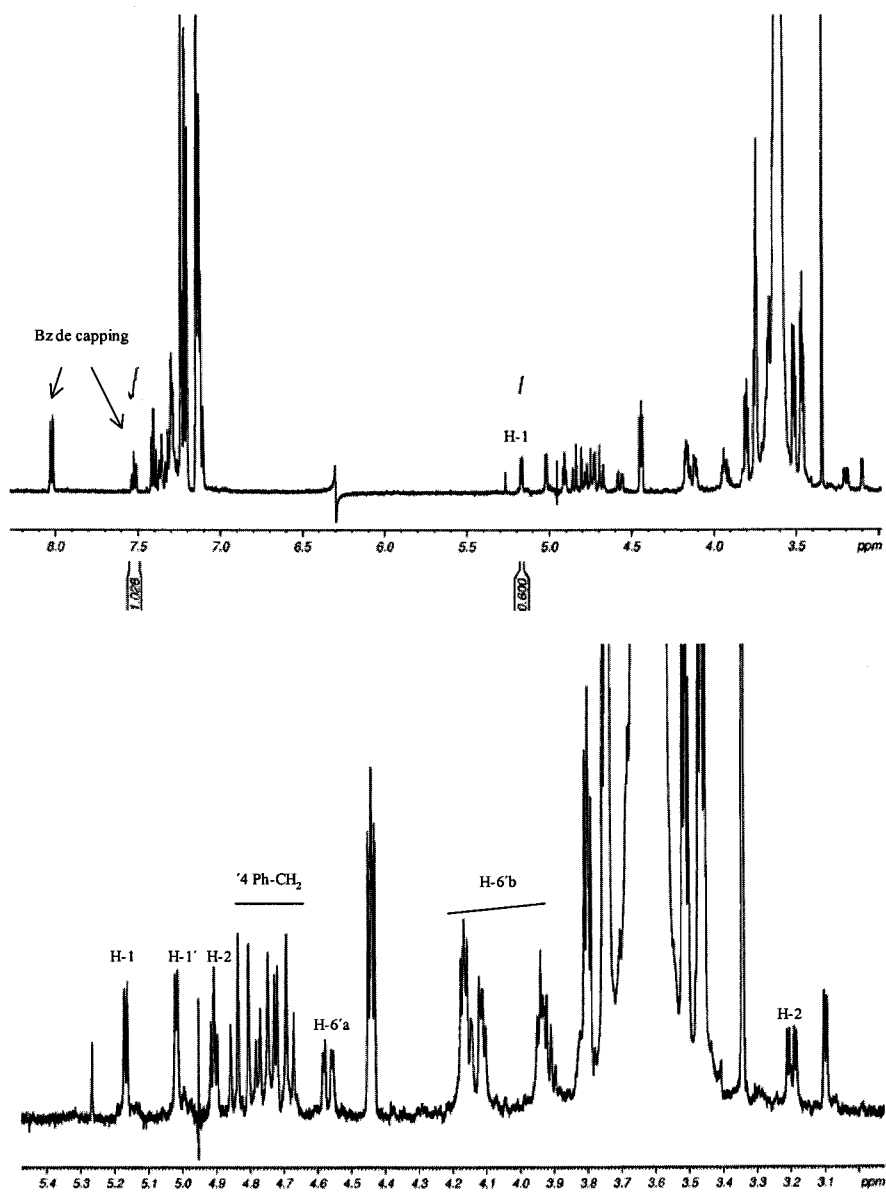
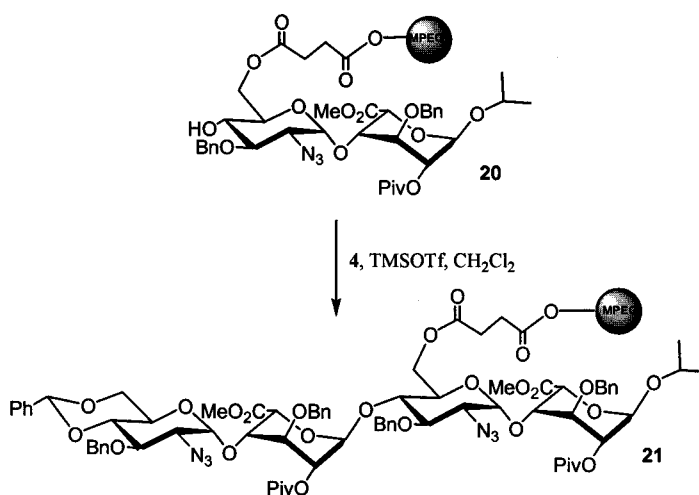


Figura 31: Espectro de ^1H -RMN de 30 (arriba).

Ampliación (5.5 ppm-3.0 ppm)(abajo)

Discusión de Resultados

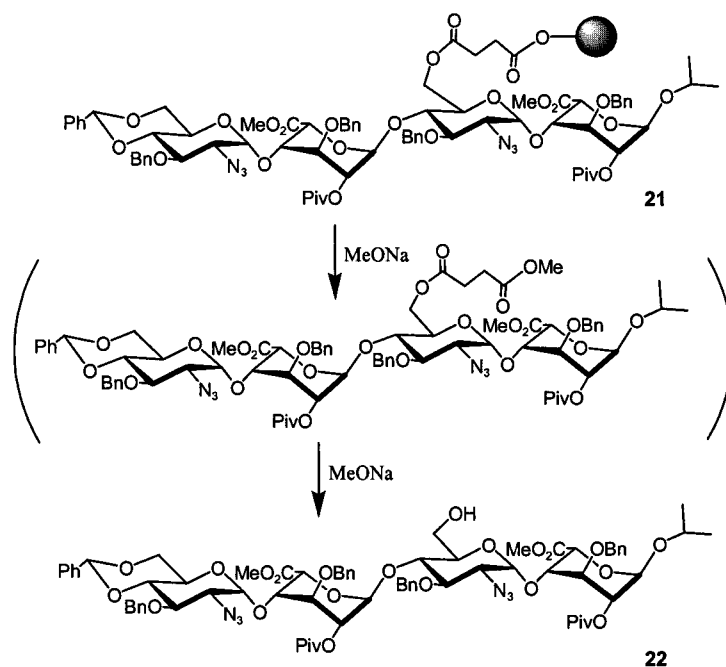
Se llevó a cabo, en este punto, la reacción de glicosidación entre el disacárido aceptor **20** y el donador de glicosilo **4**. Después de llevar a cabo 3 ciclos de glicosidación empleando en cada uno de ellos 2 equivalentes de donador y un 7% de promotor, se obtuvo el tetrasacárido **21** (esquema 23).



Esquema 23

Una vez que se obtuvo el tetrasacárido objetivo, y de la misma manera que en el caso anterior, se desancló **21** disolviendo el polímero en una pequeña cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo una disolución de MeONa en MeOH hasta pH 9. Mediante el análisis por cromatografía de capa fina se observó que inicialmente aparecía un producto cuya concentración iba disminuyendo a medida que avanzaba la reacción mientras que otro de mayor R_f iba apareciendo, hasta que finalmente se observó este último como único producto de reacción (esquema 24).

Discusión de Resultados



Esquema 24: desprotección de **22**

De esta manera se obtuvo el tetrasacárido libre **22** con un 36% de rendimiento en dos etapas desde **20**.

En esta aproximación se observó un menor rendimiento global en la obtención del correspondiente tetrasacárido. Esto pudo deberse al descenso de la reactividad, debido a un mayor impedimento estérico, del OH-4 contiguo a la posición de anclaje, así como a posibles reacciones secundarias de desacilación parcial en el tratamiento final con MeONa/MeOH. Esto, unido al hecho antes comentado de la limitación de la serie no sulfatada en las etapas finales en esta posición, nos llevó a la búsqueda de otras alternativas más generales y con mejores resultados.

3.2.3 Anclaje por el grupo metoxicarbonilo de la unidad de ácido idurónico. Síntesis del hexasacárido I.

De nuevo haciendo un análisis de las posiciones de anclaje, se observó que en todos los casos, el metoxicarbonilo del anillo de ácido idurónico es simplemente un precursor del ácido carboxílico/carboxilato de la molécula final⁶. Por esta razón, la elección del grupo metoxicarbonilo del anillo de idurónico como posible posición de anclaje no influiría en el grado y patrón de sulfatación, como ocurría en el caso anterior. Visto, pues, que este éster metílico permanece “inerte” durante toda la secuencia sintética, se procedió a analizar esta posición como posible sitio de anclaje.

En un principio cabría pensar que para introducir el *linker* por dicha posición, el anillo de ácido idurónico debería ser previamente funcionalizado, lo que supondría el desarrollo de un nuevo diseño sintético específico para esta unidad de ácido idurónico. Para evitar introducir modificaciones en la síntesis en disolución de la unidad de ácido idurónico empleada satisfactoriamente en nuestro laboratorio,^{90,91} se pensó transformar el grupo éster metílico (no reactivo) del anillo de ácido idurónico de la unidad disacáridica que se va a anclar al soporte soluble, en un éster reactivo. Además, este éster debería seguir siendo el precursor del ácido carboxílico/carboxilato en la molécula final. En la bibliografía¹⁰⁰ se encontró que la transesterificación de ésteres altamente funcionalizados tiene lugar satisfactoriamente cuando se usan cantidades catalíticas de Bu_2SnO . Para resolver nuestro problema se pensó en llevar a cabo una reacción de transesterificación con un alcohol bifuncional siguiendo esta metodología, de modo que tras la transesterificación del metoxicarbonilo se generara un nuevo éster funcionalizado (**figura 32**). Concretamente se

Discusión de Resultados

pensó en el uso de etilén glicol como alcohol bifuncional que generaría en nuestro caso un uronato de 2-hidroxi etilo reactivo.

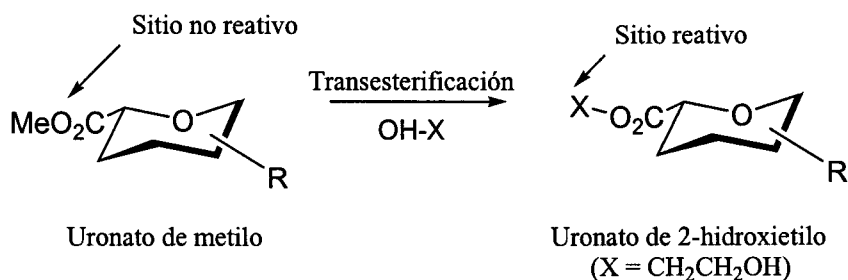
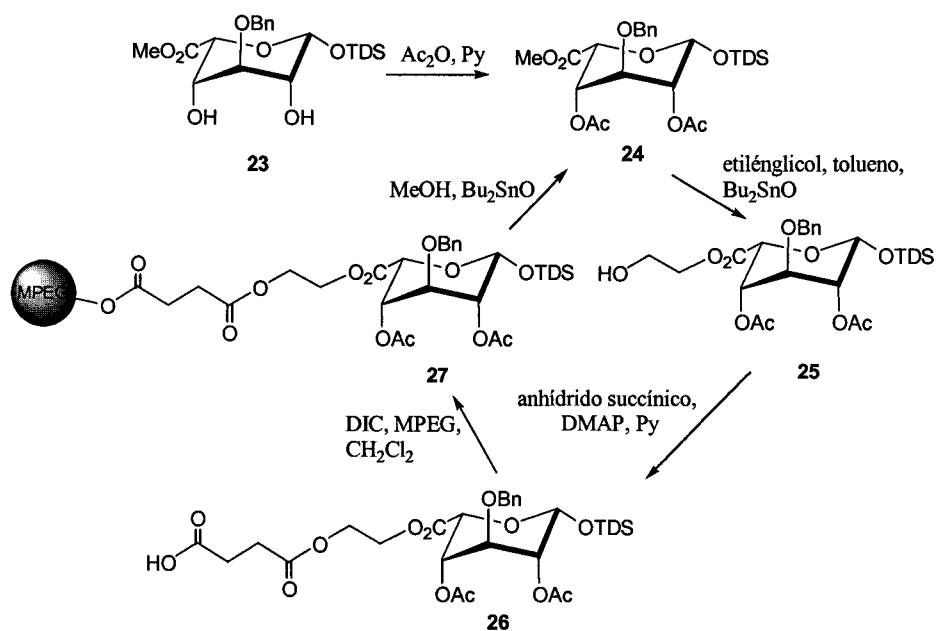


Figura 32

Para comprobar la efectividad de esta reacción se hicieron previamente ensayos utilizando como materia prima una unidad monosacáridica de uronato de metilo **24** (esquema **25**). De esta manera, el compuesto **24** se transformó en **25** mediante la reacción de transesterificación con etilén glicol en tolueno y usando Bu₂SnO en cantidad catalítica. Una vez generado el nuevo sitio reactivo, se llevó a cabo la introducción del *linker* succinoilo en dicha posición. Para ello se hizo reaccionar **25** con anhídrido succínico obteniéndose así, el hemisuccinato **26**. Posteriormente, **26** se condensó con MPEG para dar el producto anclado a la resina **27**. Se pensó en este punto que la desprotección del producto podría hacerse llevando a cabo la reacción de transesterificación inversa, de modo que obtuviéramos el producto libre con un grupo ester metílico de nuevo en la posición 5. De esta manera, se hizo reaccionar **27** con metanol y Bu₂SnO en cantidad catalítica a reflujo liberándose finalmente y como se esperaba el producto **24**. De este modo se demostró la efectividad del método y que el anclaje por esta posición no

Discusión de Resultados

suponía ninguna modificación en la estrategia de grupos protectores establecida.

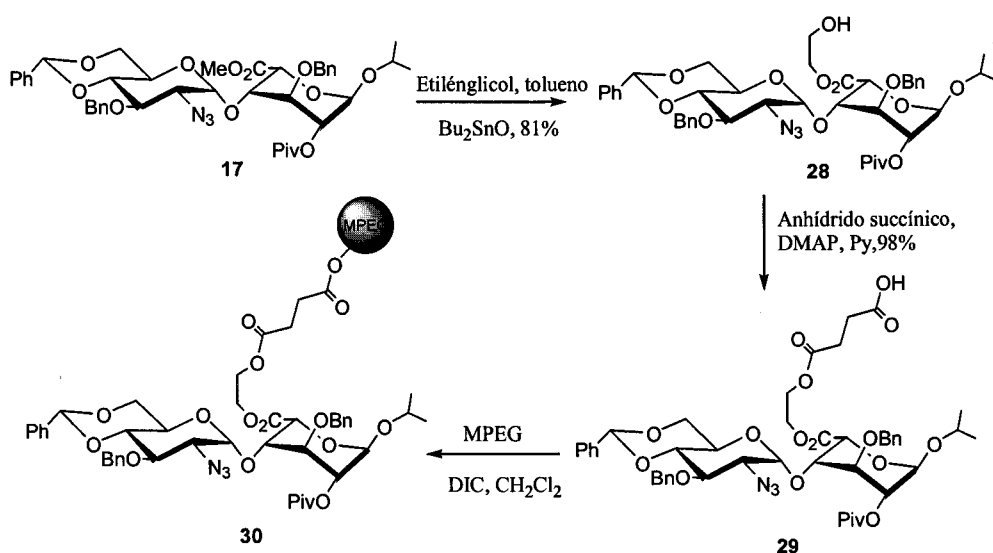


Esquema 25

A la vista de este resultado se planificó la síntesis en fase sólida del precursor oligosacárido totalmente protegido de I a partir del derivado disacárido 17 siguiendo la secuencia que se acaba de describir. Así, 17 se sometió a la reacción de transesterificación para dar 27, haciéndolo reaccionar con etilén glicol y Bu_2SnO en tolueno y a reflujo. En esta ocasión la transesterificación necesitó condiciones de reacción más fuertes que cuando se llevó a cabo con el compuesto 24 siendo el tiempo de reacción mayor y las cantidades de Bu_2SnO necesarias también mayores debido, probablemente, a un mayor impedimento estérico. Una vez

Discusión de Resultados

funcionalizado el compuesto **28** con un nuevo sitio reactivo, se aciló siguiendo las pautas ya establecidas en el presente trabajo, es decir haciéndolo reaccionar con anhídrido succínico y DMAP para obtener **29**. La condensación con el soporte sólido tuvo lugar en las condiciones descritas, obteniéndose **30** (esquema 26).



Esquema 26

En la **figura 33** se muestra el espectro de ^1H -RMN del producto **30** anclado a la resina.

Discusión de Resultados

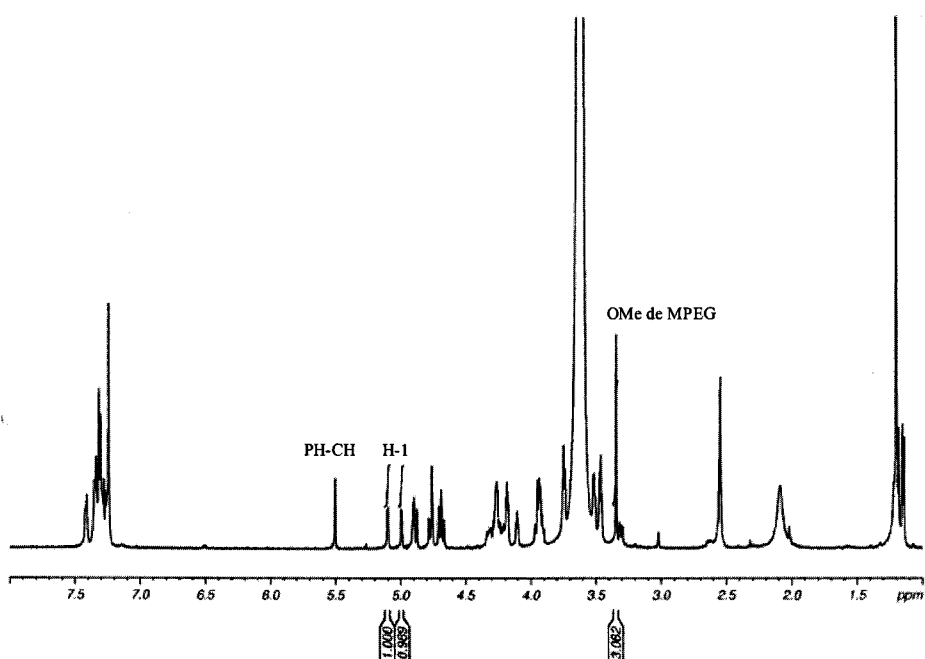
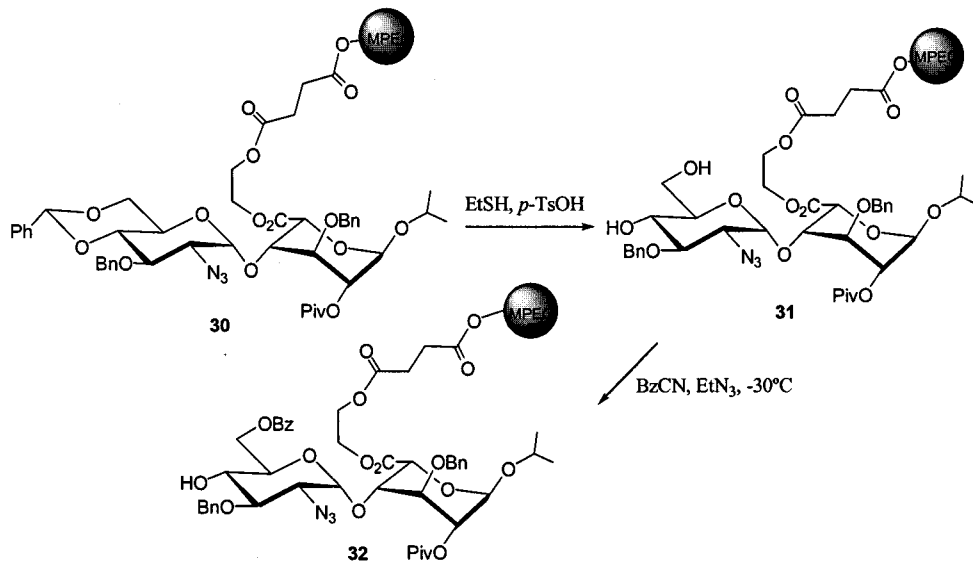


Figura 33: Espectro de ^1H -RMN de **30**.

Una vez que se tuvo el disacárido del extremo reductor anclado a la resina el siguiente paso fue generar el aceptor de glicosilo siguiendo el mismo esquema de reacciones que en ensayos anteriores, eliminación del grupo bencilidén acetal y benzoilación regioselectiva. Siguiendo esta secuencia de reacciones, se obtuvo **32** (esquema 27).

Discusión de Resultados



Esquema 27: generación del aceptor

Así mismo en la **figura 34** se muestran los espectros de los compuestos **30**, **31** y **32** pudiéndose observar en primer lugar la desaparición de la señal característica del CH de grupo bencilidén acetal y en segundo lugar la aparición de las señales características del grupo benzoilo en 6 de glucosamina.

Discusión de Resultados

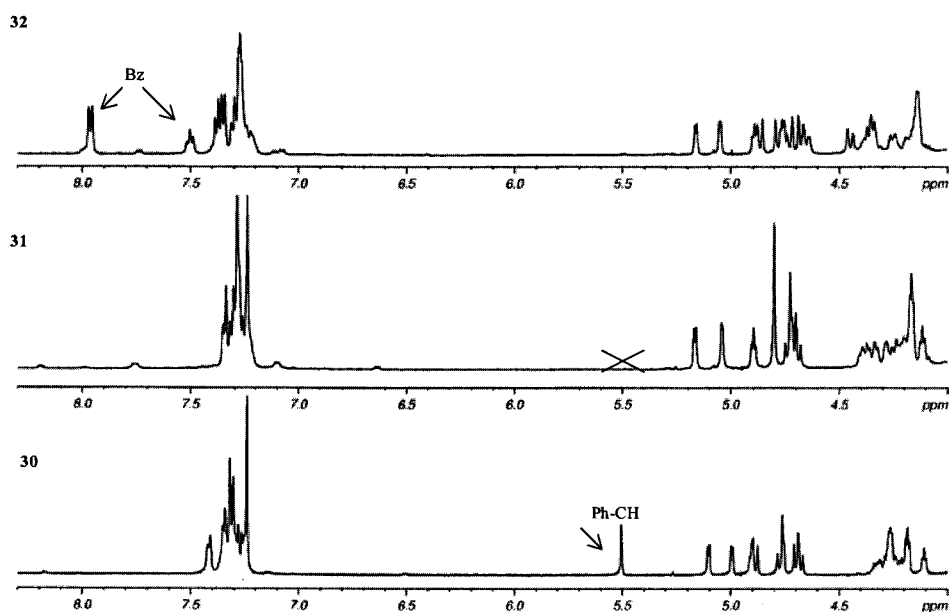
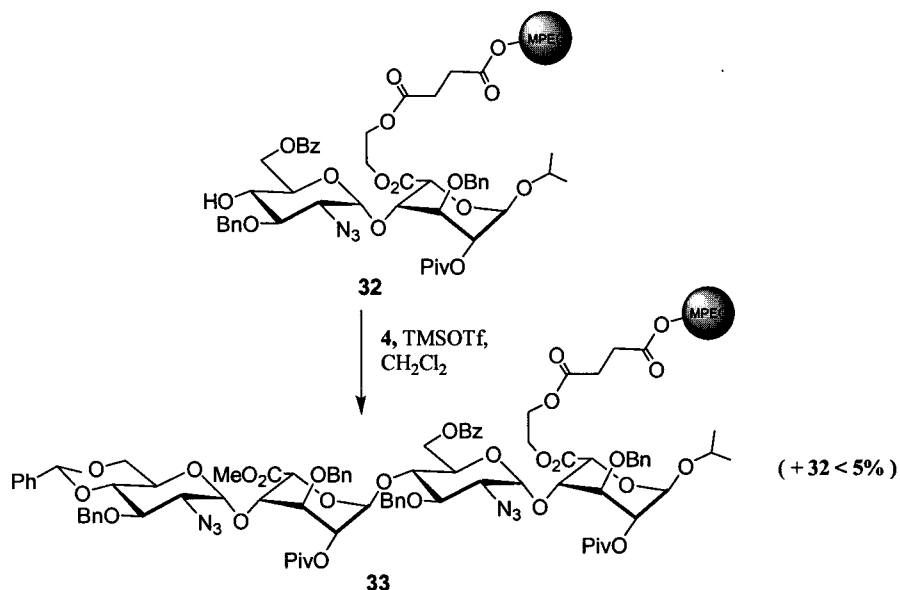


Figura 34: Espectros de resonancia de 30, 31 y 32

El proceso de elongación de la cadena (**esquema 28**) siguió con la reacción de glicosidación entre el donador de glicosilo **4** y el aceptor de glicosilo **32**. Esta reacción tuvo lugar empleando 2 equivalentes de donador y un 3% de promotor a temperatura ambiente. En total se hicieron cuatro ciclos de glicosidación para asegurar que se había consumido la práctica totalidad del aceptor.

Discusión de Resultados



Esquema 28: Generación del aceptor y glicosidación.

Como ya se sabe las reacciones de glicosidación en fase sólida se dan en general de forma incompleta incluso después de llevar a cabo varios ciclos de glicosidación. Este inconveniente se suele resolver mediante una reacción de *capping* en la que se bloquean, generalmente mediante acilación, las posiciones libres del aceptor que ha quedado sin reaccionar, impidiendo así que reacciones en las siguientes etapas de glicosidación. Sin embargo, en nuestro caso concreto este procedimiento no ofrecería ninguna ventaja adicional, como ya se explicó en el caso de los ensayos con resina insoluble ArgoGel.

En otros casos se ha llevado a cabo un *capping* con unos grupos funcionales determinados de manera que estas secuencias quedan marcadas

Discusión de Resultados

con una serie de propiedades químicas que faciliten su eliminación en las fases finales de purificación¹⁰¹⁻¹⁰⁷.

Como solución a este problema se pensó en la posibilidad de llevar a cabo un proceso de purificación del producto de reacción después de cada glicosidación, consistente en la eliminación de las trazas de aceptor que han quedado sin reaccionar. De esta manera se evitaría que al final del proceso sintético se obtuvieran subproductos de longitud menor.

El hecho de trabajar con soportes solubles nos llevó a pensar en el empleo de resinas insolubles como sistema de purificación. El proceso se basaría en el tratamiento de la mezcla de reacción de glicosidación con una resina insoluble convenientemente funcionalizada (**figura 35**) de manera que ésta pudiera reaccionar con los hidroxilos libres presentes en el aceptor que quedó sin reaccionar, pero no en el producto de glicosidación.

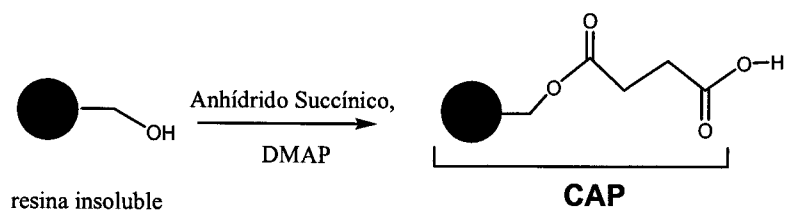


Figura 35

Una vez llevada a cabo esta reacción se separarían por filtración las fracciones insolubles (aceptor sin reaccionar capturado por la resina insoluble) de las fracciones solubles (nuevo oligosacárido), como se muestra en la **figura 36**. Finalmente éste se separaría del resto de

Discusión de Resultados

componentes solubles mediante el proceso de precipitación-filtración anteriormente descrito.

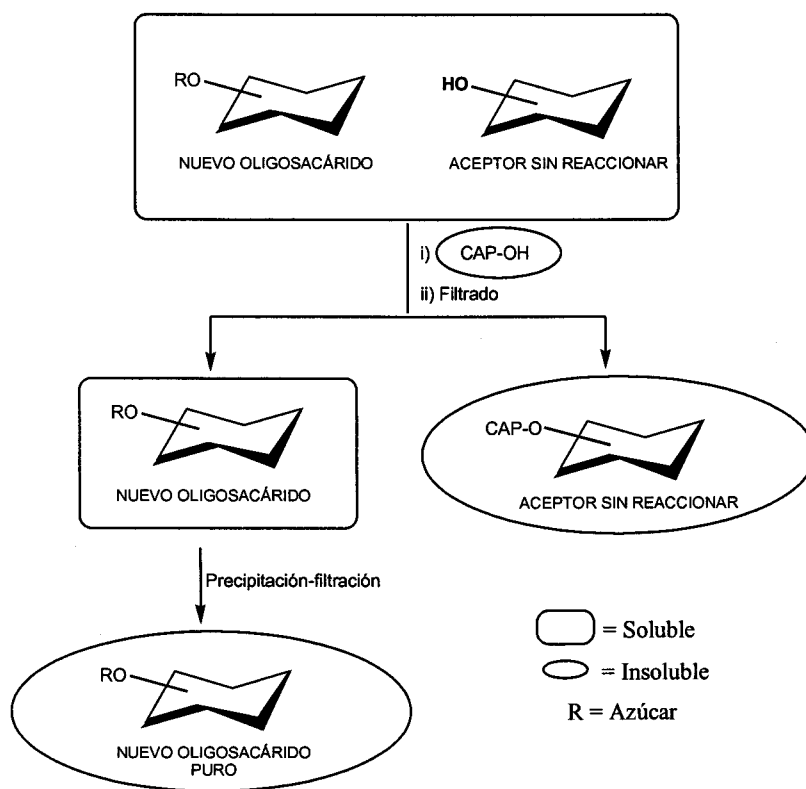
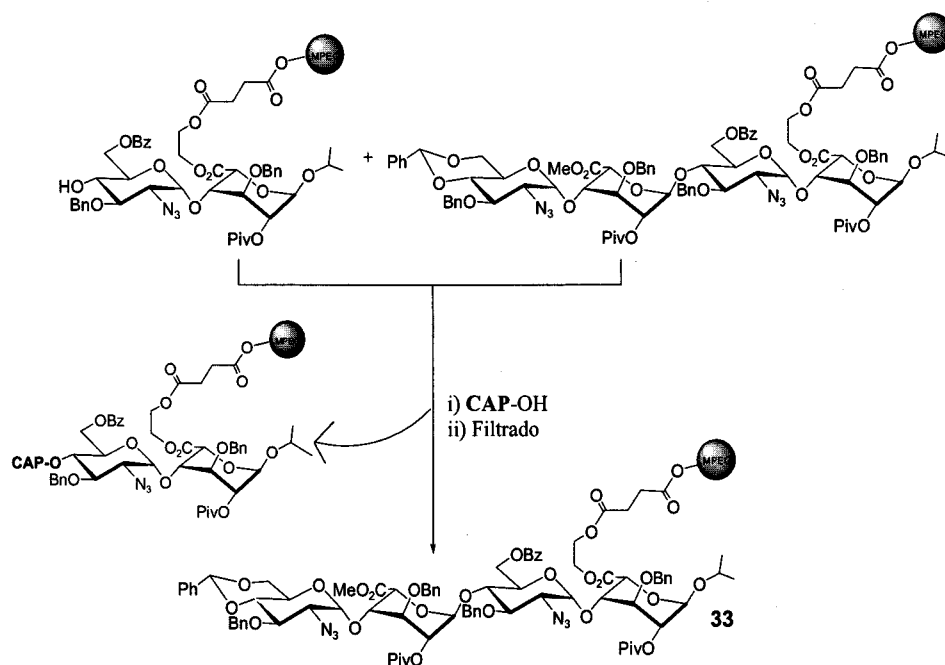


Figura 36: Proceso de purificación en resinas solubles mediante el empleo de resinas insolubles

En el **esquema 29** se muestra el proceso de purificación del compuesto **33**. Esta reacción transcurrió de modo satisfactorio haciendo reaccionar **33** con la resina insoluble de PS funcionalizada en presencia de DIC y DMAP y usando diclorometano como disolvente. Una vez finalizada la reacción se separaron las fases por filtración obteniéndose **33** puro en

Discusión de Resultados

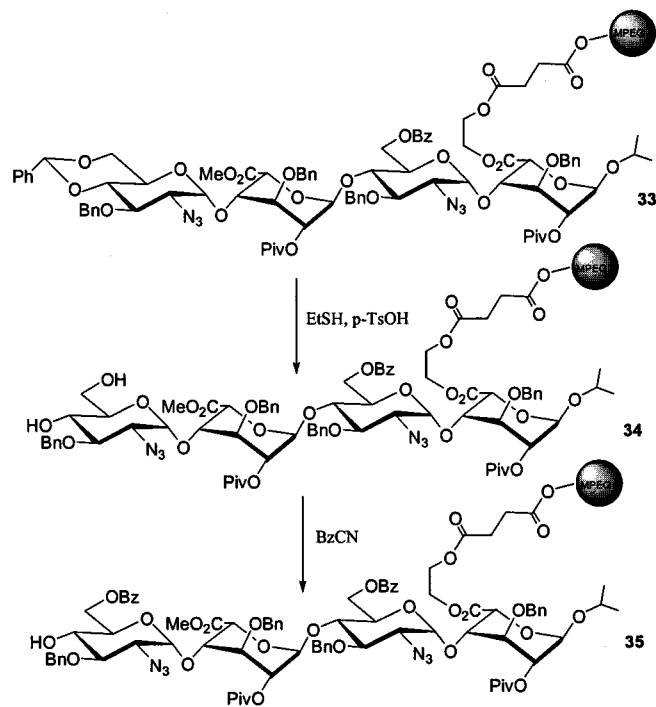
la fase soluble y quedando el aceptor sin reaccionar capturado en la resina insoluble de PS.



Esquema 29

Después de purificar 33 se generó un nuevo aceptor de glicosilo mediante la desprotección del grupo bencilidén acetal y benzoilación selectiva, obteniéndose 35 (esquema 30).

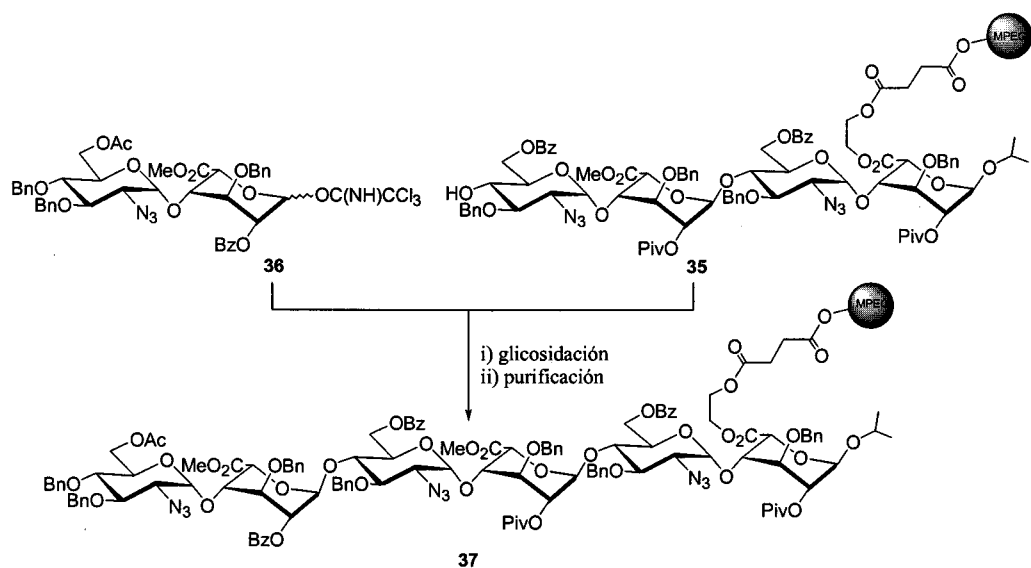
Discusión de Resultados



Esquema 30: generación del nuevo aceptor tetrasacarídico

La reacción de glicosidación (**esquema 31**) de **35** con el donador de glicosilo **36**, que constituye el extremo no reductor de la cadena, se llevó a cabo de igual forma que en el paso anterior, es decir haciendo reaccionar el aceptor de glicosilo con dos equivalentes de donador en diclorometano y usando un 3% de promotor. En total se realizaron cuatro ciclos de glicosidación. Igualmente el hexasacárido **37**, se purificó mediante el proceso descrito anteriormente.

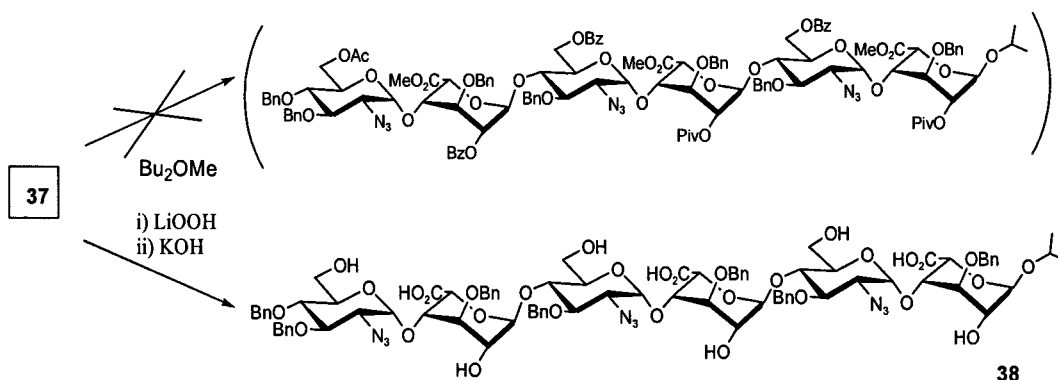
Discusión de Resultados



Esquema 31: Generación del hexasacárido

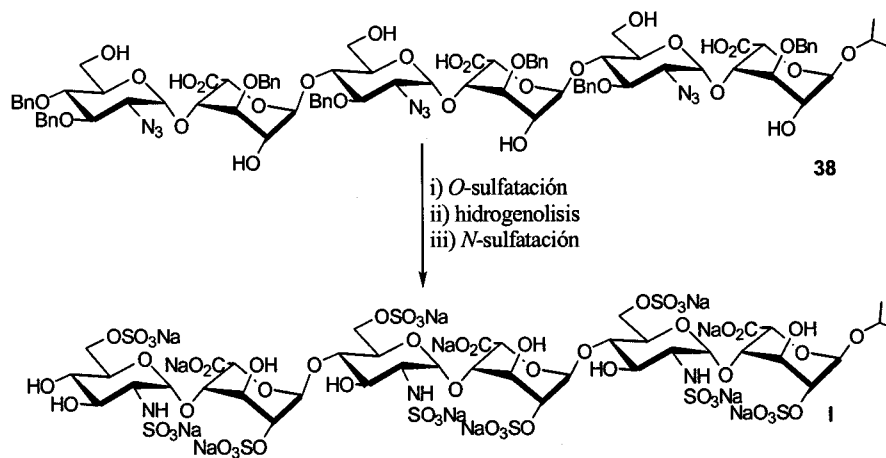
La liberación (**esquema 32**) del hexasacárido de la resina se intentó mediante transesterificación con MeOH al igual que se hizo en los ensayos con uronato de metilo, pero se observó algo de desacilación parcial. Esto se debió a que las condiciones de transesterificación no fueron tan suaves como para el caso del uronato de metilo, no permitiendo la regeneración del metoxicarbonilo mediante esta transesterificación inversa. Finalmente la desprotección se llevó a cabo mediante tratamiento en medio básico fuerte. El tratamiento con LiOOH^{108,109} y luego con KOH hidroalcohólico¹¹⁰ permitió la eliminación de los grupos acilo, metoxicarbonilo y succinoiloxicarbonilo para obtener el hexasacárido precursor parcialmente protegido **38** con un rendimiento del 37% en ocho etapas.

Discusión de Resultados



Esquema 32: Desprotección de 37

El precursor parcialmente desprotegido, **38** es un intermedio de las etapas de desprotección-sulfatación llevadas a cabo en nuestro laboratorio y que condujeron con éxito al hexasacárido objetivo **I**⁶(**esquema 33**).



Esquema 33: etapas de desprotección-sulfatación de 38

Discusión de Resultados

En la **figura 37** se muestran los espectros de ^1H -RMN de **38** obtenidos mediante la secuencia sintética en disolución (a) y mediante la secuencia sintética de MPEG (b).

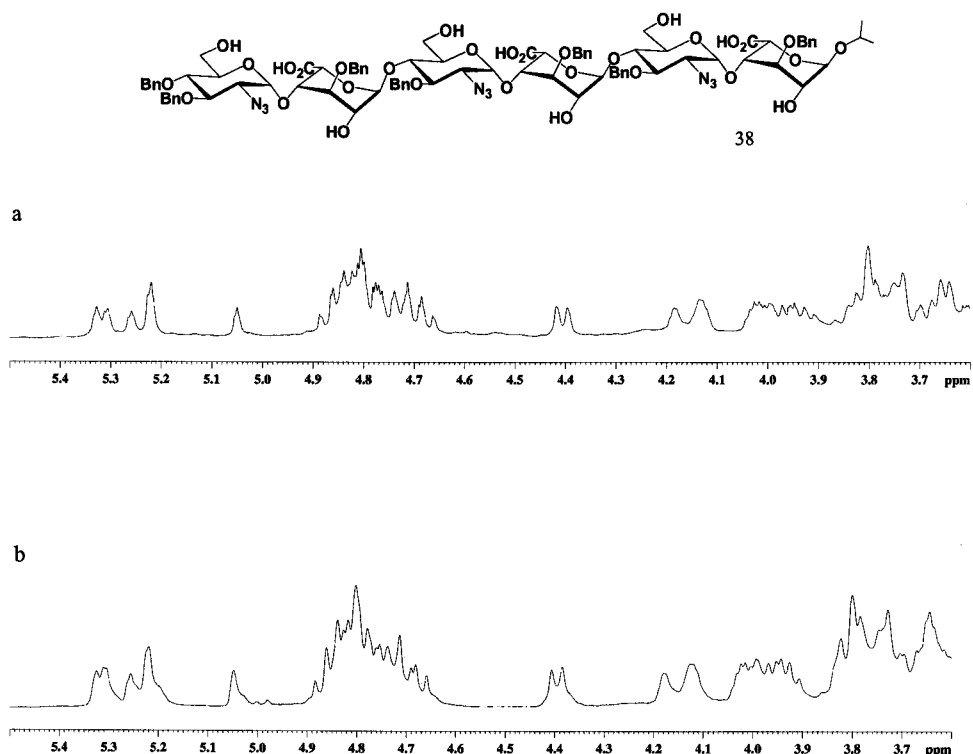


Figura 37: Espectros de ^1H -RMN de **38** preparado en disolución (a) y en soporte soluble de MPEG (b).

En virtud del proceso de purificación que permite eliminar el aceptor que no ha reaccionado llevado a cabo después de cada glicosidación, se pudo llegar al final de la síntesis, a un único producto

Discusión de Resultados

puro, a diferencia de lo que ocurría cuando se realizaron los ensayos con resina insoluble.

A la vista de los resultados se puede concluir que mediante esta aproximación (cuyas principales características son el anclaje por la posición 5 de idurónico vía transesterificación del éster metílico y el sistema de purificación desarrollado después de cada etapa de glicosidación) se presenta una metodología que permite la síntesis de precursores oligosacáridos de la región regular de la heparina con un buen rendimiento y sin necesidad de purificaciones cromatográfica intermedias.

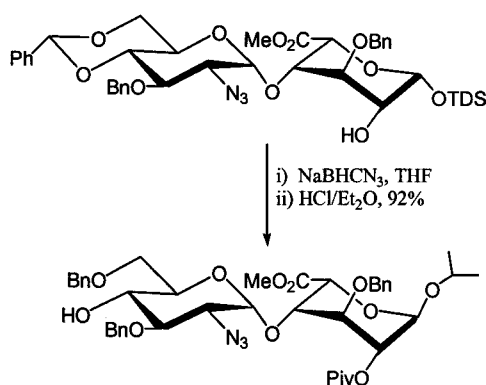
3.2.4. Otras reacciones de interés en la aproximación a la síntesis de oligosacáridos tipo heparina en fase sólida.

Finalmente y basándonos en el éxito de estos últimos ensayos, se decidió profundizar en diversos aspectos de la síntesis de oligosacáridos más complejos de tipo heparina. En concreto, se pensó llevar a cabo, en el sistema MPEG, algunas de las reacciones clave en la síntesis del precursor totalmente protegido del oligosacárido modificado de la región regular de **III**⁷(figura 25 página 50).

La síntesis en disolución de este oligosacárido (**esquema 2**, página 14), presentó mayor dificultad respecto a la de otros oligosacáridos de este tipo, especialmente por problemas de reactividad en alguna de las reacciones de glicosidación, debido, principalmente, a la presencia del grupo acetamido en los distintos bloques oligosacáridos. Además, esta síntesis, a diferencia que en el caso de **I** y **II**, no se basa en la repetición de una única unidad disacáridica, lo que requiere la preparación de distintos bloques disacáridos donadores.

Discusión de Resultados

En primer lugar, y según el patrón de grupos protectores del precursor totalmente protegido de **III** (figura 14), la generación del disacárido aceptor del extremo reductor implica la apertura reductiva del grupo bencilidén acetal¹¹¹ presente en este bloque disacárido. De este modo, la posición 4 de glucosamina queda libre mientras que la posición 6 queda protegida con un grupo bencilo. Según la estrategia general de grupos protectores empleada en la síntesis de oligosacáridos tipo heparina (apartado I 1.3.1 página 10), la presencia de un grupo bencilo en una determinada posición, supone que, tras las etapas finales de desprotección-sulfatación, dicha posición quede sin sulfatar en el oligosacárido objetivo. Este es el caso de la posición 6 de glucosamina del terminal reductor del precursor oligosacárido de **III**. En el caso de la síntesis en disolución de este compuesto, la generación del aceptor disacárido se llevó a cabo como se muestra en el esquema 34.



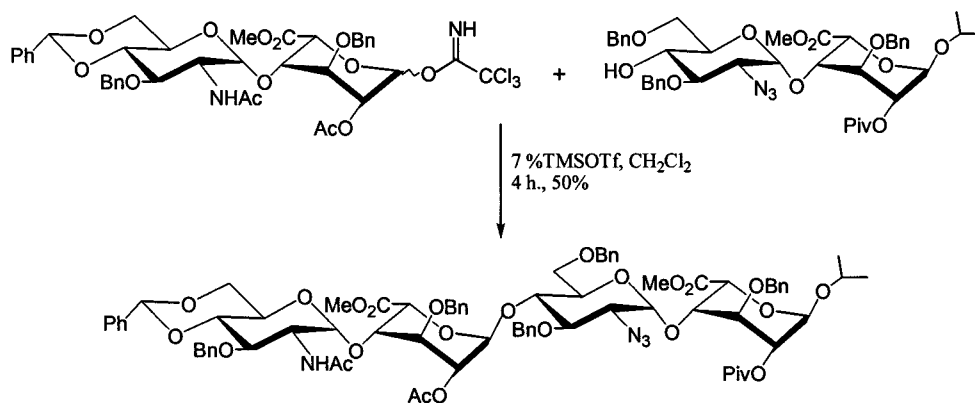
Esquema 34: Reacción de apertura reductiva en disolución

Otro aspecto clave de esta síntesis es la reacción de glicosidación que condujo al derivado tetrasacárido. Esta reacción se llevó a cabo mediante el acoplamiento del derivado disacárido aceptor antes

Discusión de Resultados

mencionado y un disacárido donador cuya principal característica era la presencia de un grupo acetamido en la posición 2 de glucosamina, a diferencia del grupo azido hasta ahora empleado.

En esta reacción de glicosidación, fue necesaria la adición de un mayor porcentaje de promotor por la menor reactividad del bloque disacárido donador debido a la presencia del grupo acetamido. De esta manera, se obtuvo el correspondiente derivado tetrasacarídico con un rendimiento moderado (**esquema 35**).



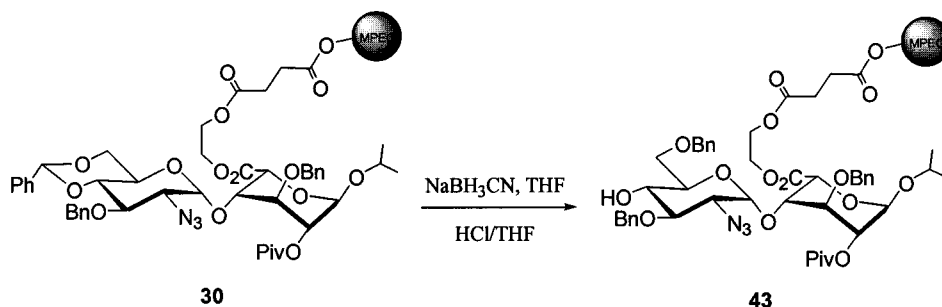
Esquema 35: Nueva reacción de glicosidación

Una vez comentadas dos de las etapas clave de esta síntesis en disolución, se exponen a continuación los resultados preliminares obtenidos en los ensayos realizados de ambas reacciones en MPEG.

Por lo que respecta a la reacción de apertura reductiva en fase sólida, ésta se llevó a cabo disolviendo directamente el derivado disacárido **30** en una disolución 1M de NaBH₃CN en THF y dejándolo agitar durante varias horas. Posteriormente, la reacción se neutralizó, a 0°C, con una disolución de HCl en THF (recién preparada a partir de AcCl

Discusión de Resultados

y MeOH) y se dejó en agitación varias horas más para asegurar la conclusión de la misma (**esquema 36**). Mediante un análisis por $^1\text{H-RMN}$ (**figura 39**) se comprobó que la reacción había trascurrido con éxito.



Esquema 36: Apertura reductiva en 30

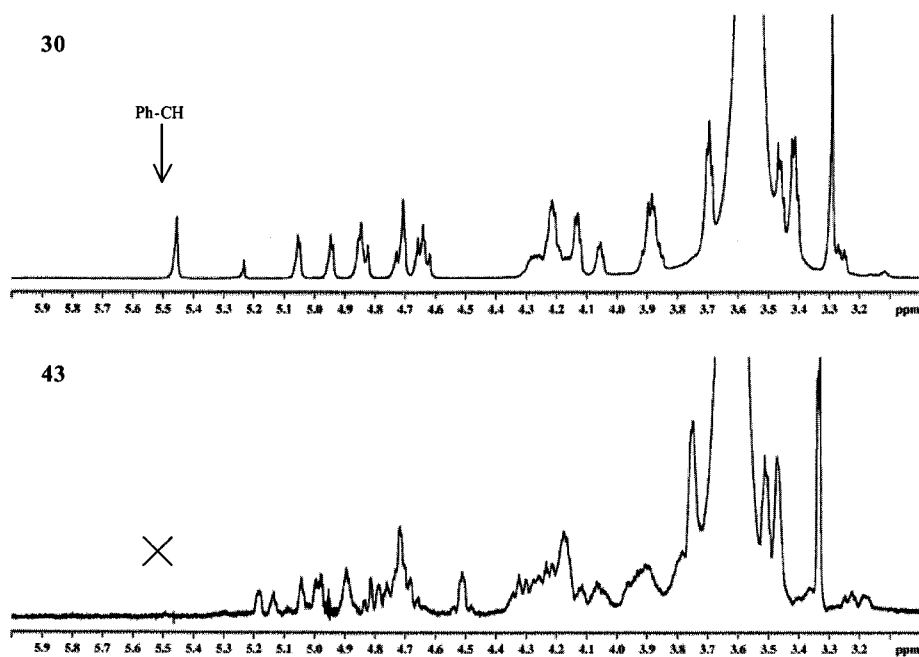


Figura 29: Espectros comparados de 30 y 43

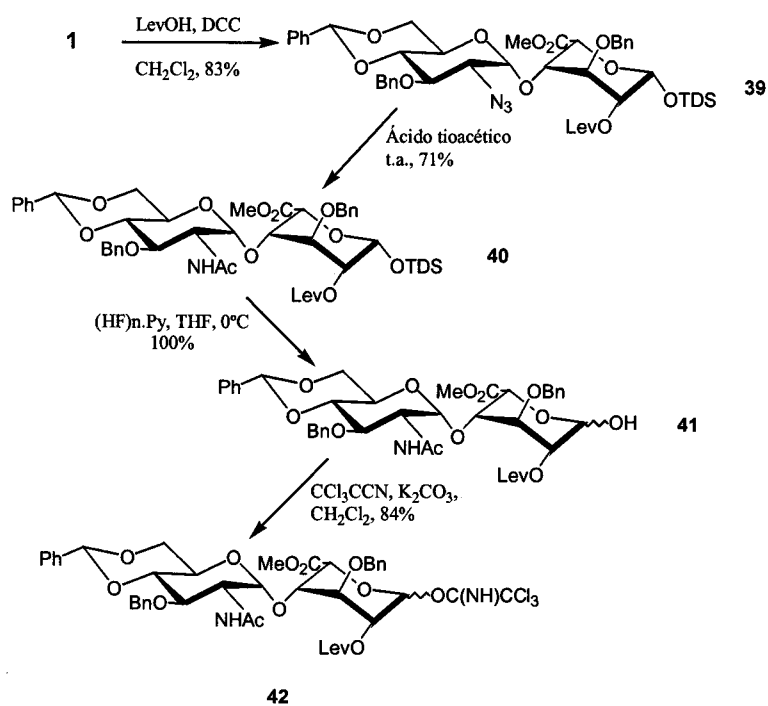
Discusión de Resultados

La purificación del derivado de MPEG, después de la reacción, se llevó a cabo siguiendo la metodología habitual, consistente en la precipitación en éter del polímero y la posterior separación de la fase soluble por filtración. Sin embargo, al final de este proceso no se obtuvo un sólido blanco como en otras ocasiones sino un sirupo que necesitó de un laborioso proceso de purificación adicional. Así, el derivado de MPEG se resucristalizó en etanol frío, el precipitado obtenido se separó de la fase alcohólica y se redisolvió en una pequeña cantidad de diclorometano para añadir éter y conseguir la precipitación de polímero que se separó por filtración. Este largo proceso supuso una cierta pérdida de producto.

Por otro lado, para ensayar la reacción de glicosidación que conduce al derivado tetrasacarídico, se preparó un nuevo bloque disacarídico donador, ligeramente modificado respecto al que se empleó en el síntesis en disolución⁷, que presentara el grupo acetamido en la posición 2 de la unidad de glucosamina.

La preparación del nuevo donador disacarídico comenzó con la acilación del hidroxilo libre de **1**. Así, el tratamiento de **1** con LevOH/DCC y DMAP en cantidades catalíticas¹¹², condujo a **39** con buen rendimiento. Posteriormente, se llevó a cabo la reducción selectiva del grupo azido a acetamido mediante tratamiento con ácido tioacético para obtener **40**. La hidrólisis del grupo sililo (**41**) y formación del tricloroacetimidato mediante la metodología habitual⁶ dio lugar al disacárido donador **42** (esquema 37).

Discusión de Resultados

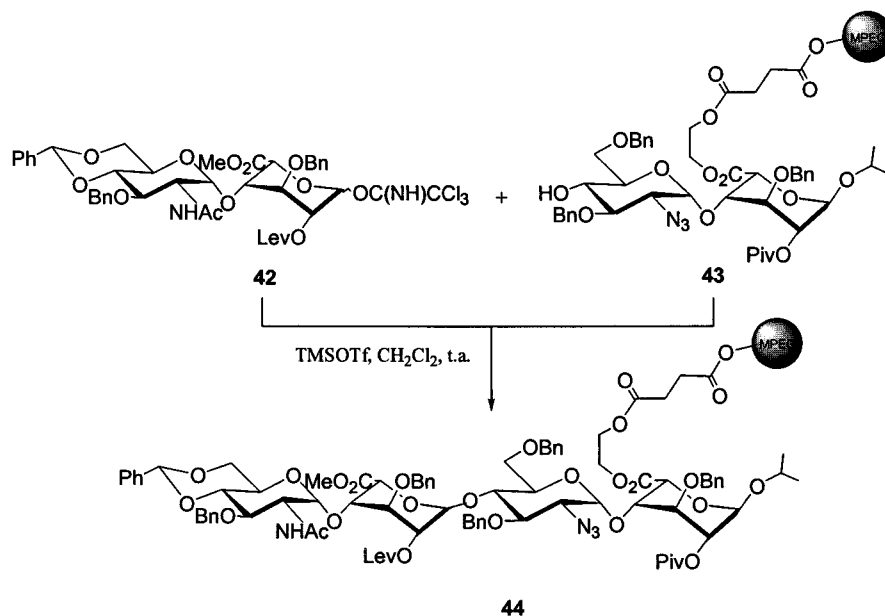


Esquema 37: Ruta para la obtención de 42.

Una vez obtenido el nuevo donador de glicosilo se llevó a cabo el ensamblaje con el aceptor 43 para la generación del nuevo derivado tetrasacarídico.

Al igual que en caso de la serie de la región regular, se llevaron a cabo tres ciclos glicosidación (2.5 equivalentes de donador) teniendo que emplear en este caso hasta un 25% de promotor (**esquema 38**). Como cabía esperar, y según lo dicho anteriormente, se necesitaron cantidades mayores de promotor que en el caso de otras glicosidaciones en fase sólida para conseguir activar el donador.

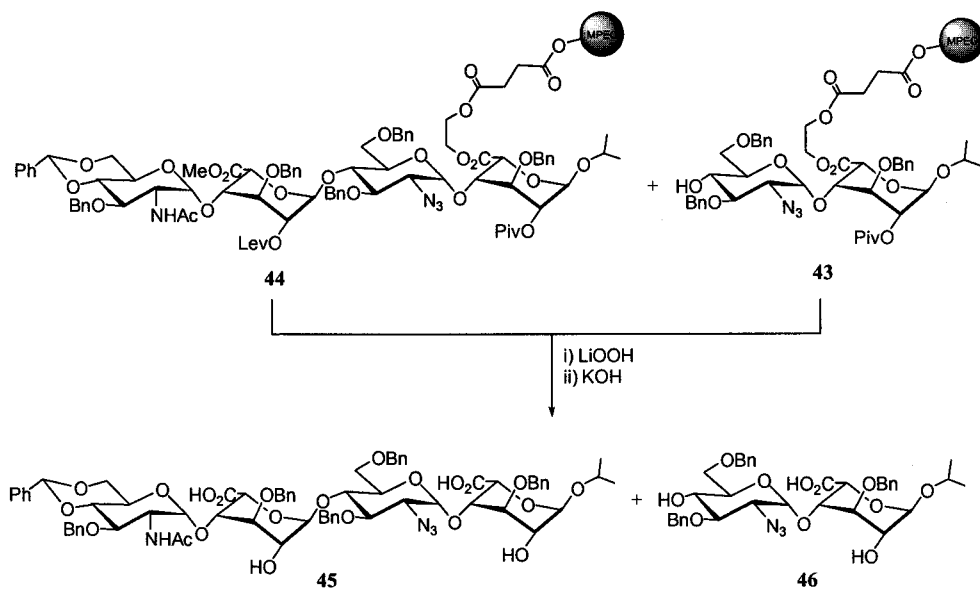
Discusión de Resultados



Esquema 38: reacción de glicosidación entre 42 y 43.

A pesar de llevar a cabo estos tres ciclos de glicosidación el rendimiento global fue moderado. Una determinación más precisa del curso de esta reacción requirió un desanclaje de los productos unidos al soporte soluble en este punto. Para ello el derivado de MPEG fue sometido a un tratamiento básico fuerte con LiOOH y posteriormene con KOH hidroalcohólico que permitió la eliminación de los grupos acilo, metoxicarbonilo y succinoiloxicarbonilo. De esta manera se obtuvo el tetrasacarído parcialmente protegido (45) y aceptor que no había reaccionado (46) (esquema 39). Estos dos compuestos se separaron mediante columna cromatográfica y se caracterizaron y cuantificaron, confirmando un rendimiento moderado en este acoplamiento (en torno a un 35%).

Discusión de Resultados



Esquema 39: Desanclaje y desprotección parcial de los productos anclados al polímero soluble.

A la vista de los resultados preliminares, la escasa reactividad de estos bloques disacáridicos en el sistema de MPEG, que implica el empleo de cantidades elevadas de donador, requiere un estudio más detallado de las condiciones de reacción que permitan tanto disminuir las cantidades de donador a emplear como aumentar los rendimiento de reacción.

CAPÍTULO IV:
CONCLUSIONES

IV. Conclusiones

1^a. Conservando el mismo esqueleto que el desarrollado en nuestro laboratorio para la síntesis en disolución, se describen distintas estrategias sintéticas en fase sólida para la obtención de precursores oligosacarídicos protegidos de tipo heparina para las que se emplean distintos tipos de resina y/o diferentes posiciones de anclaje.

2^a. Se establecen, desde las primeras fases de la investigación, una serie de factores clave en la metodología a desarrollar, que van a permanecer constantes independientemente del tipo de resina y/o posición de anclaje. Se emplea para ello, la misma estrategia de grupos protectores que se utilizó previamente en nuestro laboratorio para la síntesis de estos compuestos en disolución. La elongación de la cadena se lleva a cabo mediante glicosidaciones $n+2$ aplicando el método del tricloroacetimidato. Finalmente, se decide emplear un linker tipo succinoílo, sensible a medios básicos, estable durante toda la secuencia sintética pero que permita, según los casos, su desprotección selectiva cuando se requiera.

3^a. Se presenta una ruta sintética para la preparación de una cadena octasacarídica totalmente protegida, mediante el empleo de la resina insoluble ArgoGel (funcionalizada con un grupo amino). La moderada reactividad, en disolución, de los distintos bloques oligosacarídicos en las reacciones de glicosidación se ve aumentada en este soporte insoluble, lo que implica el empleo de cantidades considerables de valiosos donadores disacarídicos para este objetivo.

4^a. En las estrategias sintéticas desarrolladas con soportes solubles de tipo polietilenglicol, se observa una mayor reactividad de los aceptores glicosídicos anclados a la resina, al transcurrir las reacciones en fase

Conclusiones

homogénea, lo que, a diferencia del caso anterior, implica un menor consumo de donadores disacarídicos.

5^a. Dentro de las aproximaciones llevadas a cabo en la resina de MPEG, se analizan las distintas posiciones de anclaje dentro del bloque disacarídico base, estableciendo, a priori, las posiciones 6 de glucosamina y 1 y 5 de ácido idurónico como las más factibles para establecer un método sintético general en fase sólida de precursores oligosacarídicos tipo heparina.

6^a. Mediante el anclaje por las posiciones 1 de ácido idurónico y 6 de glucosamina, se establecen dos alternativas plausibles para el objetivo final, ejemplificado en la síntesis de los tetrasacáridos **11** y **22**. Estas dos vías presentaron conocidas desventajas como son la compleja caracterización y manipulación de mezclas de anómeros que se obtenían al desanclar en el primer caso, y la limitación de un grupo acilo (precursor de grupo sulfato en la molécula final) en la posición primaria de la glucosamina del terminal reductor, así como un posible efecto adverso en la reactividad del OH-4 adyacente al sitio de anclaje, en el segundo caso.

7^a. Se presenta un método eficiente de transesterificación del metoxicarbonilo de la unidad de ácido idurónico que permite incorporar un éster reactivo por el que poder introducir el linker para posteriormente anclar a la resina. A partir de este novedoso proceso se llevó a cabo la tercera aproximación en resina MPEG, cuyo éxito queda reflejado en la síntesis del precursor hexasacarídico de la región regular **38**.

8^a. Se establece un método de purificación, después de las etapas de glicosidación, en resina soluble mediante el empleo de resina insoluble que actúa como captador del aceptor que quede sin reaccionar que puede

Conclusiones

ser eliminado por simple filtración, simplificando, de esta manera, la purificación en las etapas finales.

9ª. Estudios preliminares llevados a cabo utilizando este sistema para la síntesis de otros precursores oligosacáridicos más complejos ponen de manifiesto el posible empleo de esta metodología para propósitos de este tipo, pero que al estar todavía en sus etapas iniciales requieren un mayor refinamiento y un mayor potencial.

CAPÍTULO V:
PARTE EXPERIMENTAL

1. Métodos Generales

Disolventes y reactivos:

Todos los disolventes orgánicos anhidros empleados se secaron siguiendo los procedimientos descritos, según se indica a continuación:

THF y éter etílico se destilaron sobre Na/benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. DMF, piridina y metanol de alta calidad se adquirieron comercialmente y se conservaron sobre tamiz molecular de 4 Å bajo atmósfera de argón. Diclorometano y acetonitrilo se destilaron sobre CaH₂ inmediatamente antes de su utilización. Isopropanol se destiló sobre CaO y se mantuvo bajo atmósfera de argón.

Todos los reactivos y resinas empleados en la realización de esta Tesis Doctoral fueron de alta pureza y se adquirieron a distintas firmas comerciales (Aldrich, Fluka, Lancaster, Panreac, Argonaut Technologies, etc).

Técnicas y Aparatos.

Los análisis en cromatografía en capa fina se realizaron empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ (Merck). Para la detección de los productos se utilizó luz UV ($\lambda = 254$ nm) y/o revelador anisaldehído (450 mL etanol, 25 mL anisaldehído, 25 mL H₂SO₄ y 1 mL AcOH). La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice Merck tipo 60, de diversos tamaños de partícula (0.2-0.5 mm; 0.2-0.063 mm; 0.040-0.015 mm). La composición del eluyente empleado se detalla en cada caso.

Los valores de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 341. En cada caso se indica el disolvente y la concentración

Parte Experimental

de la muestra sobre la que se llevó la medida. Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker Vector 22.

Los espectros de RMN se midieron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DPX-300. Los espectros se realizaron en el disolvente deuterado que se indica en cada caso y los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal residual del disolvente empleado. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente. Para la asignación de estructuras complejas se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY) y protón-carbono (HMQC) usando las secuencias de pulso estándar.

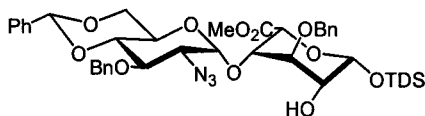
Los análisis elementales se llevaron a cabo con un aparato Leco CHNS-932, después de secar las muestras a alto vacío. Los resultados se expresan en cada caso en %. Los espectros de masas FAB se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla con un espectrómetro Kratos MS-80 RFA.

Los espectros MALDITOF se registraron en un espectrómetro GSG system.

Parte Experimental

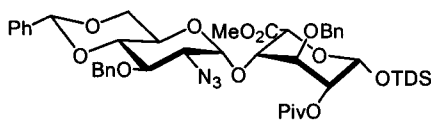
2. Ensayos en resina insoluble ArgoGel

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopirananuronato de metilo (1)



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito.⁶

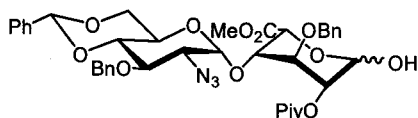
4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil-2-*O*-pivaloil- β -L-idopirananuronato de metilo (2)



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito.⁶

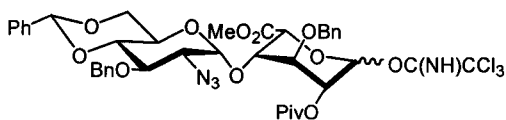
Parte Experimental

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopirauronato de metilo (3)



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito⁶.

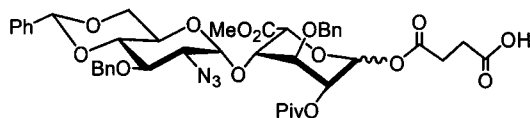
Tricloroacetimidato de 4-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopirauronato de metilo (4)



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito⁶.

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil-1-*O*-succinoil- α,β -L-idopirauronato de metilo (5)

Parte Experimental



A una disolución de **3** (160 mg, 0.21 mmol) en piridina seca (2 mL), se añadió anhídrido succínico (86 mg, 0.86 mmol) y DMAP en cantidad catalítica. Después de agitar bajo atmósfera de argón durante 16 horas, se añadió agua (1 mL) y se dejó agitando durante una hora más. La suspensión se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL) y se lavó con una solución acuosa de HCl 1M (2 x 40 mL) y H₂O (2 x 40 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ se concentró a vacío obteniéndose **5** (181 mg, 100%).

Rf 0.42 (Tolueno-Acetona, 6:1)

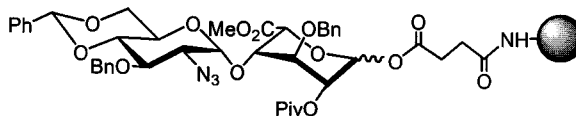
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.44-7.24 (m, 15H; 3 Ph); 6.28 (d, *J* = 3.5 Hz, 0.35H; H-1 β); 6.28 (d, *J* = 1.7 Hz, 0.65H; H-1 α); 5.52 (s, 1H; Ph-CH- α y β); 5.08 (dd, *J* = 3.5 Hz, 1.7 Hz, 0.65H; H-2 α); 4.99 (t, *J* = 3.5 Hz, 0.35H; H-2 β); 4.96 (d, *J* = 3.5 Hz, 0.35H; H-1' β); 4.91-4.88 (m, 1.65H; H-1' α, 1 Ph-CH₂ α y β); 4.77-4.69 (m, 3.35H; H-5 β, 3 Ph-CH₂ α y β); 4.58 (d, *J* = 2.6 Hz, 0.65H; H-5 α); 4.29 (dd, *J* = 9.5 Hz, 4.5 Hz, 1H; H-6a' α y β); 4.19 (t, *J* = 3.5 Hz, 0.65H; H-3 α); 4.12 (t, *J* = 3.5 Hz, 0.35H; H-4 β); 4.04-3.87 (m, 3H; H-3 β, H-4 α, H-3', H-5' α y β); 3.74 (s, 3H; COOCH₃ α y β); 3.66-3.62 (m, 2H; H-4', H-6'b α y β); 3.38-3.36 (m, 1H; H-2' α y β); 2.68-2.61 (m, 4H; OCO-CH₂-CH₂-COOH); 1.24 y 1.18 (2s, 9H; C(CH₃)₃ α y β).

Parte Experimental

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 177.9, 177.4, 176.5, 170.7, 170.0, 168.7, 168.0 (C=O); 137.8-126.1 (Ph); 101.6 (Ph-CH-); 100.1 (C-1' α); 99.6 (C-1' β); 91.9 (C-1 β); 90.6 (C-1 α); 82.5 (C-4' α y β); 76.1; 75.8; 75.2; 74.9; 74.8; 74.1; 73.5; 73.4; 70.6; 68.5; 67.6; 63.4; 63.1; 63.0; 52.4; 39.1; 38.9; 28.8; 28.7; 28.4; 27.3; 27.1; 27.0.

HR-FAB: m/z calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{Na}$ 870.3061; encontrado 9870.3113.

4-O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-1-O-ArgoGel-NH-succinoyl-3-O-bencil-2-O-pivaloyl- α,β -L-idopirauronato de metilo (6)

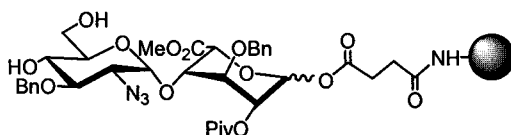


A una mezcla del compuesto **5** (365 mg, 0.43 mmol), HOBt (577 mg, 4.3 mmol) y ArgoGel-NH₂ (1.02 g, 0.43 mmol, loading inicial de 0.42 mmol/g) en una disolución al 50% de DMF-CH₂Cl₂ (10 mL) y bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota DIC (135 μL , 0.86 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 24 horas, la reacción se filtró y la resina se lavó con H₂O (2 x 10 mL), DMF (2 x 10 mL), THF (2 x 10 mL), CH₂Cl₂ (2 x 10 mL) y se secó. Finalmente se añadió Ac₂O (3 mL) y piridina (8 mL) y se dejó agitando 6 horas más. La reacción se filtró y la resina se lavó con H₂O (2 x 10 mL), DMF (2 x 10 mL), THF (2 x 10 mL), CH₂Cl₂ (2 x 10 mL) y se secó hasta peso constante. El nuevo loading

Parte Experimental

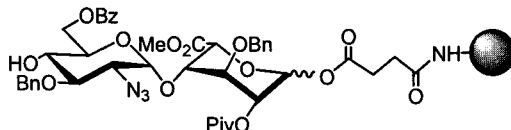
determinado fue de 0.35 mmol/g. Se obtuvo **6** con un rendimiento del 84% de acuerdo con la ganancia de peso de la resina (300 mg, 0.36 mmol).

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-1-*O*-ArgoGel-NH-succinoyl-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloyl- α,β -L-idopiruranonato de metilo (7**)**



A una suspensión de **6** (340 mg, 65 μ mol) en CH_2Cl_2 seco (4 mL), se añadió EtSH (40 μ L, 0.52 mmol) y *p*TsOH (18 mg, 66 μ mol). Después de agitar durante 18 horas bajo atmósfera de argón, la reacción se filtró. La resina se lavó con H_2O (2 x 4 mL), DMF (2 x 4 mL), THF (2 x 4 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 4 mL) y se secó a vacío hasta obtener un peso constante. Se obtuvo **7** (310 mg, 59 μ mol) con un 92% de rendimiento (según ganancia de peso).

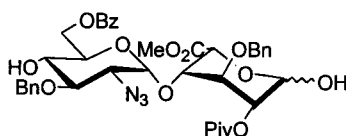
4-*O*-(2-Azido-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-1-*O*-ArgoGel-NH-succinoyl-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloyl- α,β -L-idopiruranonato de metilo (8**)**



Parte Experimental

A una suspensión de **7** (310 mg, 59 μmol) en CH_3CN (8 mL) se añadió, a -30°C , BzCN (11 mg, 85 μmol) y una gota de Et_3N . Después de agitar una hora a esta temperatura, la reacción se filtró y la resina se lavó con H_2O (2 x 5 mL), DMF (2 x 5 mL), THF (2 x 5 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 5 mL). La resina se secó a vacío hasta que su peso fue constante. Se obtuvo **8** (304 mg, 58 μmol) con un 96% de rendimiento.

4-*O*-(2-Azido-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopirauronato de metilo (**9**).



A una suspensión de **8** (52 mg, 10 μmol) en THF (1 mL) se le añadió acetato de hidrazina (1 mg, 10 μmol) y la reacción se agitó durante 2 horas. Posteriormente se añadió AcOEt (2 mL), se filtró la reacción y la resina se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 2 mL). La fase orgánica se pasó sobre un filtro de sílica en AcOEt . Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron y se purificaron mediante columna cromatográfica (Hexano- AcOEt , 1:1) para obtener **9** (7 mg, 92%).

Rf 0.73 (Hexano- AcOEt , 1:2).

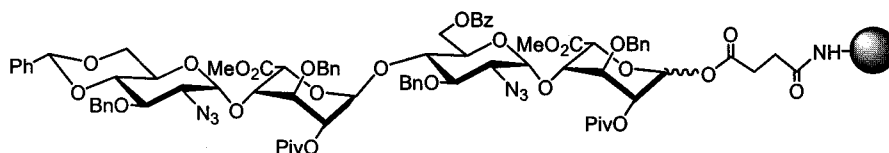
$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.01-7.31 (m, 15H; 3 Ph); 5.36 (s ancho, 0.7H; H-1 α); 5.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.3H; H-1 β); 5.02 (d, $J = 3.1$ Hz, 0.7H;

Parte Experimental

H-1' α); 4.95 (d, $J = 3.5$ Hz, 0.3H; H-1' β); 4.89-4.59 (m, 7H; H-2, H-5, H-6'a, 4 Ph-CH₂ α y β); 4.41-4.39 (m, 1H; H-6'b α y β); 4.12-3.50 (m, 5H; H-3, H-4, H-4', H-5', OH-1 α y β); 3.79 (s, 3H; COOCH₃ α y β); 3.27-3.02 (m, 2H; H-2', OH-4 α y β); 1.26-1.13 (2s, 9H; C(CH₃)₃).

MALDI-TOF MS (modo positivo, matriz-DHB) m/z 786 (M+Na⁺), 802 (M+K⁺).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoyl-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(1-*O*-ArgoGel-NH-succinoyl 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopiranuronato de metilo) (10).**

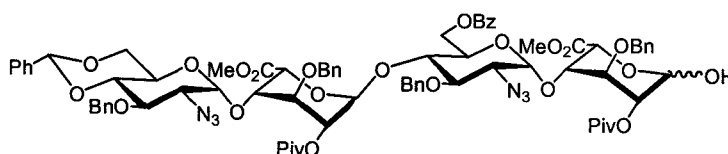


El aceptor anclado a la resina **8** (550 mg, 0.140 mmol) se empapó en una disolución de **4** (620 mg, 0.7 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) y se agitó durante 30 minutos a 0°C. A esta suspensión se le añadió TMSOTf (2.8 μ L, 16 μ mol) y se llevó a temperatura ambiente dejándose agitar durante 3 horas. La reacción se filtró y la resina fue lavada con CH₂Cl₂ (2 x 6 mL), H₂O (2 x 6 mL), DMF (2 x 6 mL), THF (2 x 6 mL) y CH₂Cl₂ (2 x 6 mL). Este proceso de glicosidación-lavado de resina se repitió 2 veces más en las mismas condiciones. Finalmente la resina se secó a vacío hasta

Parte Experimental

que su peso fue constante. Se obtuvo **10** con un 90% de rendimiento, de acuerdo con la ganancia de peso de la resina (92 mg, 0.125 mmol).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopiranuronato de metilo) (**11**).**



A una suspensión de **10** (36 mg, 6.9 μ mol) en THF (1 mL) se le añadió acetato de hidrazinio (0.7 mg, 6.9 μ mol) y la reacción se agitó durante 2 horas. Posteriormente se añadió AcOEt (2 mL), se filtró la reacción y la resina se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 2 mL). La fase orgánica se pasó sobre un filtro de sílica en AcOEt. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron y se purificaron mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 1:1) para obtener **11** (9 mg, 87%). También se obtuvieron trazas de **9** (<1 mg).

R_f 0.47 (Hexano-AcOEt, 1:1).

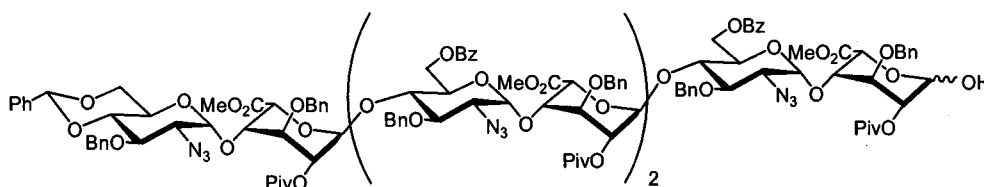
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.06-7.24 (m, 30H; 6 Ph); 5.52 (s, 1H; Ph-CH- α y β); 5.42-5.34 (m, 2H; H-1a, H-1c α y β); 5.03-4.94 (m, 3H; H-1b,

Parte Experimental

H-1d, H-2c α y β); 4.91-4.47 (m, 13H; H-2a, H-5a, H-5c, H-6b, H-6'b, 8 Ph-CH₂ α y β); 4.31-4.26 (m, 1H; H-6d α y β); 4.12-3.88 (m, 4H; H-3a, H-3c, H-4a, H-4c α y β); 3.88-3.19 (m, 16H; H-2b, H-2d, H-3b, H-3d, H-4d, H-4d, H-5b, H-5d, H-6'd, OH-1a, 2 COOCH₃ α y β); 1.22-1.17 (m, 9H; C(CH₃)₃).

FAB MS m/z C₇₈H₈₈O₂₄N₆ (1493.605); encontrado: 1516 (M+Na⁺+H⁺).

O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O-(3-O-bencil-2-O-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-O-azido-3-O-bencil-6-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O-(3-O-bencil-2-O-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-O-azido-3-O-bencil-6-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O-(3-O-bencil-2-O-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-O-azido-3-O-bencil-6-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O-(3-O-bencil-2-O-pivaloil- β -L-idopiranosiluronato de metilo) (12).



El producto **8** (220 mg, 56 μ mol) se empapó en una disolución de **4** (250 mg, 0.280 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) y se agitó durante 30 minutos a 0°C. A esta suspensión se le añadió TMSOTf (1.0 μ L, 6.4 μ mol) y se llevó a temperatura ambiente dejándose agitar durante 3 horas. La

Parte Experimental

reacción se filtró y la resina fue lavada con CH_2Cl_2 (2 x 3 mL), H_2O (2 x 3 mL), DMF (2 x 3 mL), THF (2 x 3 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 3 mL) y se secó a vacío. Este proceso de glicosidación-lavado-secado de resina se repitió 2 veces más en las mismas condiciones para obtener correspondiente tetrasacárido. Para seguir elongando la cadena se generó un nuevo aceptor de glicosilo. Así se llevó a cabo la hidrólisis del grupo bencilidén acetal tratando el tetrasacárido con EtSH (42 μL , 0.56 mmol), y *p*-TsOH (10 mg, 56 μmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) y dejándose en agitación durante 18 horas. Pasado este tiempo, la resina se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 3 mL), H_2O (2 x 3 mL), DMF (2 x 3 mL), THF (2 x 3 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 3 mL) y se secó a vacío. Posteriormente se procedió a la benzoilación selectiva del diol mediante tratamiento con BzCN (11 mg, 84 μmol) y una gota de Et_3N en CH_3CN (4 mL). Después de agitar a -30°C durante 45 minutos, la resina se sometió al protocolo de lavado descrito anteriormente y se secó a vacío. La glicosidación con **4** (250 mg, 0.280 mmol) se realizó en las mismas condiciones y siguiendo el mismo proceso que en la etapa de glicosidación anterior.

Para llegar a la longitud de octasacárido se generó un último aceptor de glicosilo mediante la hidrólisis de grupo bencilidén acetal del hexasacárido anclado a la resina (EtSH (42 μL , 0.56 mmol), y *p*-TsOH (10 mg, 56 μmol) en CH_2Cl_2 (2 mL)), lavado de la resina (CH_2Cl_2 (2 x 3 mL), H_2O (2 x 3 mL), DMF (2 x 3 mL), THF (2 x 3 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 3 mL)) y secado, seguida de la benzoilación regioselectiva del producto (BzCN (11 mg, 84 μmol) y una gota de Et_3N en CH_3CN (4 mL)), lavado (CH_2Cl_2 (2 x 3 mL), H_2O (2 x 3 mL), DMF (2 x 3 mL), THF (2 x 3 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 3 mL)) y secado para, finalmente glicosidar con **4** (250 mg, 0.280 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL). La resina se lavó siguiendo el mismo protocolo que en las etapas anteriores y se secó obteniéndose el octasacárido anclado a la resina.

Parte Experimental

Finalmente, la resina se trató con acetato de hidrazinio (6 mg, 0.65 μ mol) en THF (10 mL) y se dejó en agitación durante dos horas. Posteriormente se añadió AcOEt (2 mL), se filtró la reacción y la resina se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 2 mL). La fase orgánica se pasó sobre un filtro de sílica en AcOEt. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron y se purificaron mediante columna cromatográfica (Tolueno-AcOEt, 5:1) obteniéndose **12** (16 mg, 10% desde **8**, 8 etapas).

Rf 0.53 (Hexano-AcOEt 1:1).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.05-7.26 (m, 60H; 12 Ph); 5.50 (s, 1H; Ph-CH- α y β); 5.52-5.41 (m, 4H; H-1a, H-1c, H-1e, H-1g α y β); 5.03-4.38 (m, 34H; H-1b, H-1d, H-1f, H-1h, H-2a, H-2c, H-e, H-2g, H-5a, H-5c, H-5e, H-5g, H-6b, H-6'b, H-6d, H-6'd, H-6f, H-6'f, 16 Ph- CH_2 α y β); 4.16-3.28 (m, 27H; H-3a, H-3c, H-3e, H-3g, H-4a, H-4c, H-4e, H-4g, H-2b, H-2d, H-2f, H-2h, H-3b, H-3d, H-3f, H-3h, H-4b, H-4d, H-4f, H-4h, H-5b, H-5d, H-5f, H-5h, H-6'h, H-6h, OH-1a α y β); 3.77, 3.38, 3.33, 3.28 (4s, 12H; 4 COOCH_3); 1.20, 1.16, 1.14, 1.13 (4s, 36H; 4 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

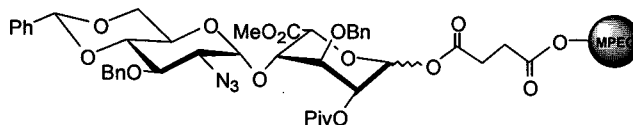
FAB MS m/z 3007 ($\text{M}+\text{Na}^++2\text{H}^+$); $\text{C}_{156}\text{H}_{174}\text{O}_{48}\text{N}_{12}$ (2985.192).

3. Ensayos con resina soluble de MPEG

3.1. Anclaje por la posición anomérica

Parte Experimental

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-1-*O*-MPEG-succinoil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopirauronato de metilo (13)

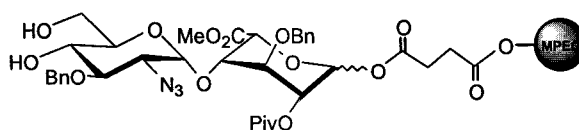


Una mezcla de **5** (101 mg, 0.119 mmol), MPEG (358 mg, 72 μ mol) y DMAP en cantidad catalítica, previamente coevaporada con tolueno y secada a vacío, se disolvió en CH_2Cl_2 seco (2 mL). A esta disolución se añadió gota a gota DIC (28 μ L, 0.177 mmol). Después de agitar 16 horas a temperatura ambiente, se añadió, con agitación vigorosa, Et_2O (20 mL) y el precipitado blanco formado fue filtrado y secado a vacío. Posteriormente se añadió Ac_2O (2mL) y piridina (2 mL) y la mezcla se dejó en agitación 16 horas. La reacción se concentró a vacío, se redisolvió en CH_2Cl_2 (2mL) y se añadió Et_2O (25 mL) con agitación vigorosa. El precipitado blanco resultante se filtró y secó, obteniéndose **13** con un 90% de rendimiento.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 6.25 (d, $J = 3.7$ Hz, 0.7H; H-1 β); 6.08 (d, $J = 2.8$ Hz, 0.3H; H-1 α); 5.48 (s, 1H; Ph-CH- α y β); 5.04 (dd, $J = 4.8$ Hz, 2.6 Hz, 0.3H; H-2 α); 4.96 (t, $J = 4.4$ Hz, 0.7H; H-2 β); 4.91 (d, $J = 3.6$ Hz, 0.7H; H-1' β); 4.82 (d, $J = 3.6$ Hz, 0.3H; H-1' α); 4.88-4.64 (m, 4.7H; H-5 β , 4 Ph- CH_2 α y β); 4.54 (d, $J = 3.3$ Hz, 0.3H; H-5 α); 4.27-3.88 (m, 2H; H-3, H-4 α y β); 3.35-3.29 (m, 1H; H-2' α y β); 1.20 y 1.18 (2s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ β y α).

Parte Experimental

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-1-*O*-MPEG-succinoil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopiruranonato de metilo (14).

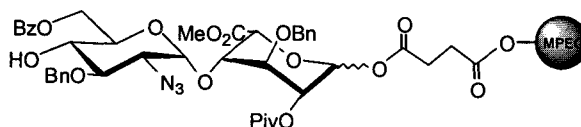


A una disolución de **13** (384 mg, 66 μ mol) y *p*-TsOH catalítico en CH₂Cl₂ seco (5 mL), se adicionó EtSH (26 μ L, 0.33 mmol). Después de agitar durante 16 horas se añadió Et₃N y el volumen se redujo a 2 mL. Se añadió Et₂O (25 mL) con agitación vigorosa formándose un precipitado blanco que se filtró y secó para obtener **14**.

Datos espectroscópicos significativos: ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6.29 (d, *J* = 3.7 Hz, 0.7H; H-1 β); 6.11 (d, *J* = 2.2 Hz, 0.3H; H-1 α); 5.05 (m, 0.3H; H-2 α); 5.00-4.89 (m, 1.7H; H-1' α y β , H-2 β); 4.85-4.69 (m, 4.7H; H-5 β , 4 Ph-CH₂ α y β); 4.57 (d, *J* = 3.1 Hz, 0.3H; H-5 α); 4.23-3.98 (m, 2H; H-3, H-4 α y β); 3.26-3.16 (m, 1H; H-2' α y β); 1.21 y 1.19 (2s, 9H; C(CH₃)₃ β y α).

4-*O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-1-*O*-MPEG-succinoil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopiruranonato de metilo (15).

Parte Experimental

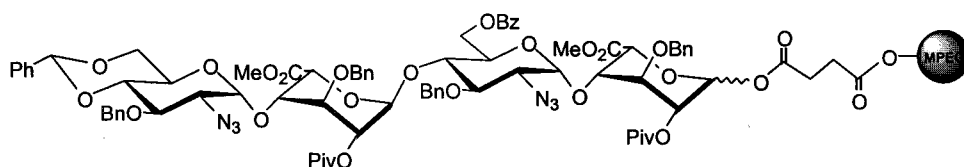


A una disolución de **14** (365 mg, 64 μ mol), previamente coevaporado con tolueno, en CH_3CN seco (7 mL) a -20°C , se añadió BzCN (16.6 mg, 0.128 mmol) y una cantidad catalítica de Et_3N . Después de agitar durante 45 minutos, se añadió MeOH (1mL) y se llevó a temperatura ambiente. El volumen de reacción se redujo a 2 mL y se añadió Et_2O (25 mL). El precipitado formado se filtró y se secó obteniéndose **15**.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 6.25 (d, $J = 3.5$ Hz, 0.7H; H-1 β); 6.03 (s ancho, 0.3H; H-1 α); 5.02 (m, 0.3H; H-2 α); 4.99-4.88 (m, 1.7H; H-1' α y β , H-2 β); 4.85-4.54 (m, 6H; H-5, H-6'a, 4 Ph- CH_2 α y β); 4.38 (m, 1H; H-6'b α y β); 4.17-3.97 (m, 2H; H-3, H-4 α y β); 3.24-3.07 (m, 1H; H-2' α y β); 1.19 y 1.17 (2s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ β y α).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-1-*O*-MPEG-succinoil-2-*O*-pivaloil- α,β -L-idopiranuronato de metilo) (**16**).**

Parte Experimental



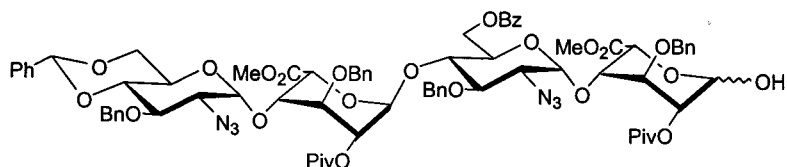
A una mezcla de **15** (340 mg, 58 μmol) y **4** (104 mg, 0.116 mmol) previamente coevaporados con tolueno, en CH_2Cl_2 seco (1 mL), se añadió TMSOTf (4 μL , 23.2 μmol) y se dejó en agitación durante 2 horas. La reacción se neutralizó añadiendo una gota de Et_3N . Finalmente se añadió Et_2O (25 mL) con agitación vigorosa hasta conseguir la precipitación de la resina, que fue recuperada mediante filtración. Se llevaron a cabo un total de 4 ciclos de glicosidación.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 6.32 (d, $J = 4.4$ Hz, 0.6H; H-1a β); 6.13 (d, $J = 2.8$ Hz, 0.4H; H-1a α); 5.46 (s, 1H; Ph-CH- α y β); 5.40-5.31 (m, 1H; H-1c α y β); 5.07-4.80 (m, 2H; H-1b, H-1d α y β); 4.92-4.40 (m, 12H; H-5a, H-5c, H-6a, H-6'a, 8 Ph- CH_2 α y β); 4.24-3.90 (m, 4H; H-3a, H-3c, H-4a, H-4c α y β); 3.41-3.19 (m, 2H; H-2b, H-2d α y β).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-**

Parte Experimental

benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-3-O-bencil-2-O-pivaloil- α , β -L-idopirauronato de metilo (11).



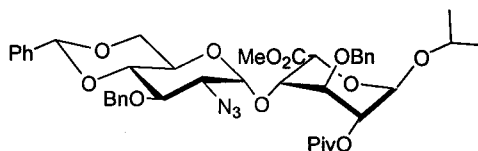
El producto **16** (321 mg, 55 μ mol) previamente coevaporado con tolueno, se disolvió en THF seco (10 mL). Se añadió entonces, acetato de hidrazinio (5.0 mg, 55 μ mol) y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 8 horas se añadió AcOEt (1 mL) y se concentró. El residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (2mL) y se añadió Et_2O (25 mL) con agitación vigorosa hasta precipitar la resina. Ambas fases se separaron por filtración. La fase soluble se concentró y el residuo se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt 2:1) obteniéndose **11** (20 mg, 20% desde **13**, 4 etapas).

Los datos espectroscópicos obtenidos fueron idénticos a los descritos anteriormente para este compuesto (página 120).

3.2 Anclaje por la posición 6 de la unidad de glucosamina.

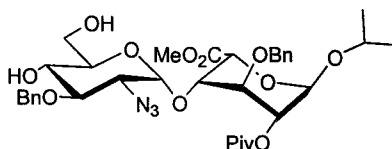
***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de metilo (17).**

Parte Experimental



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito⁶.

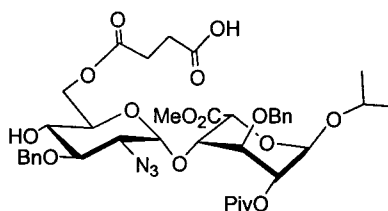
***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-
(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de metilo
(18).**



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito.⁶

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-succinoyl- α -D-
glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-
idopiranosid) uronato de metilo (19).**

Parte Experimental



A una disolución de **18** (83 mg, 0.118 mmol) en tolueno seco (5 mL) se añadió $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$ (30 μL , 0.130 mmol) bajo atmósfera de argón. El disolvente se eliminó mediante destilación hasta reducir el volumen a la mitad y la disolución de acetal de estaño preparada se dejó enfriar a temperatura ambiente.

A una disolución de anhídrido succínico (13 mg, 0.130 mmol), piridina (14 μL , 0.177 mmol,) y DMAP en cantidad catalítica en CH_2Cl_2 seco (1 mL) se añadió gota a gota la disolución de acetal de estaño y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 16 horas se añadió H_2O (1 mL) y se agitó una hora más. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con una disolución saturada de NH_4Cl (25 mL) y H_2O (25 mL). Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secó sobre MgSO_4 y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 1:2) para obtener **19** (75 mg, 79%).

Rf 0.44 (Hexano-AcOEt, 1:4).

$[\alpha]_D^{20} = +8.2^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2)

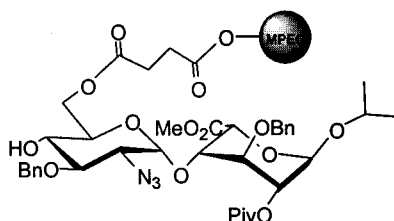
Parte Experimental

^1H -RMN (500 MHz, MeOD): δ 7.45-7.28 (m, 15H; 3 Ph); 5.25 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H; H-1); 5.08 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H; H-1'); 5.02 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H; 1 Ph-CH₂); 4.91-4.74 (m, 5H; H-2, H-5, 3 Ph-CH₂); 4.47 (dd, $J = 2.0$ Hz, 11.9 Hz, 1H; H-6'a); 4.25 (dd, $J = 5.5$ Hz, 11.9 Hz, 1H; H-6'b); 4.21 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H; H-4); 4.04-3.96 (m, 2H; H-3, CH(CH₃)₂); 3.89 (m, 1H; H-5'); 3.84 (s, 3H; COOCH₃); 3.71 (dd, $J = 8.8$ Hz, 10.2 Hz, 1H; H-3'); 3.61 (dd, $J = 8.8$ Hz, 9.9 Hz, 1H; H-4'); 3.36-3.33 (m, 1H; H-2'); 2.66-2.59 (s, 4H; OCO-CH₂-CH₂-COOH); 1.23 (s, 9H; C(CH₃)₃); 1.22 y 1.18 (2d, $J = 6.2$ Hz, 6H; CH(CH₃)₂).

^{13}C -RMN (125 MHz, MeOD): δ 180.0-165.0 (C=O); 138.0-125.8 (Ph); 98.2 (C-1'); 97.3 (C-1); 79.6 (C-3'); 76.5 (C-3); 75.1; 74.7; 73.5; 72.0; 71.7; 71.5; 71.4; 70.9 (C-4'); 63.4; 63.3; 63.0; 51.8; 38.8; 29.0; 26.7 (OPiv); 22.6, 21.1 (CH(CH₃)₂).

HR-FAB: m/z calculado para C₃₉H₅₁O₁₅N₃ 824.3218; encontrado: 824.3222.

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-MPEG-succinoyl- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloyl- α -L-idopiranosid) uronato de metilo (20).**



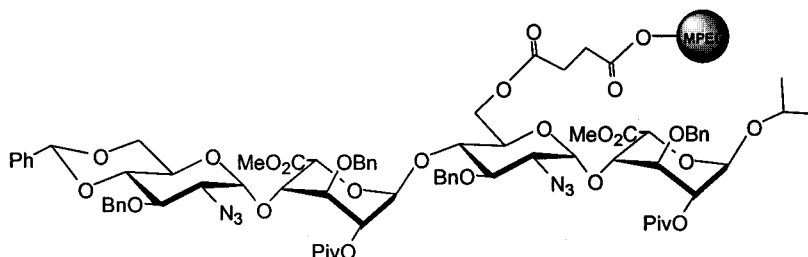
Parte Experimental

Una mezcla de **19** (81 mg, 0.101 mmol), MPEG (360 mg, 72 μ mol) y DMAP en cantidad catalítica, previamente coevaporada con tolueno y secada a vacío, se disolvió en CH_2Cl_2 seco (3 mL). A esta disolución se añadió DIC (24 μ L, 0.151 mmol) y se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. El volumen se redujo a 2 mL aproximadamente y se añadió, con agitación vigorosa, Et_2O (20 mL). El precipitado blanco obtenido fue filtrado y secado, luego se disolvió en CH_3CN (10 mL) a -20°C y se añadió BzCN (8 mg, 60 μ mol) y Et_3N en cantidad catalítica. Después de agitar 45 minutos se añadió MeOH (1 mL) y la reacción se llevó a temperatura ambiente. El volumen se redujo a 3 mL y se añadió Et_2O (40 mL) agitando vigorosamente. El precipitado formado se separó por filtración y se secó a vacío para obtener **20** (385 mg, 37 %).

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.16 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H; H-1); 5.01 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H; H-1'); 4.89 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H; H-2); 4.85-4.66 (m, 5H; H-5, 4 Ph- CH_2); 4.56 (dd, $J = 3.2$ Hz, 12.5 Hz, 1H; H-6'a); 4.16-3.91 (m, 3H; H-3, H-4, H-6'b); 3.16 (dd, $J = 3.7$ Hz, 10.3 Hz, 1H; H-2').

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-MPEG-succinoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de metilo. (21).**

Parte Experimental

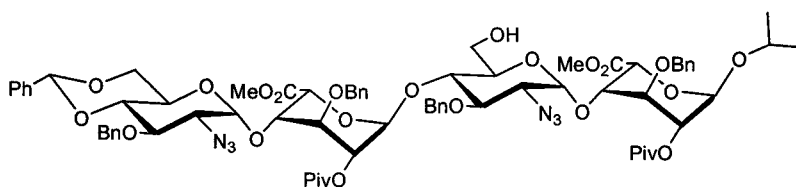


A una mezcla de **20** (385 mg, 0.27 μmol) y **4** (45 mg, 54 μmol) previamente coevaporada con tolueno, en CH_2Cl_2 seco (1mL) se añadió TMSOTf (0.6 μl , 3.4 μmol). Después de agitar durante dos horas, se añadió una gota de Et_3N y a continuación Et_2O (25 mL) con agitación vigorosa. El precipitado blanco obtenido se separo del resto de componentes de reacción por filtración. Esta reacción de glicosidación se repitió un total de cuatro veces. Después de los ciclos de glicosidación se obtuvo **21**.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.46 (s, 1H; Ph-CH-); 5.22 (s ancho, 1H; H-1c); 5.14 (s ancho, 1H; H-1a); 4.99-4.52 (m, 14H; H-1b, H-1d, H-2a, H-2c, H-5a, H-5c, 8 Ph- CH_2); 3.31-3.24 (m, 2H; H-2b, H-2d).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de metilo. (**22**).**

Parte Experimental



A una disolución de **21** (403 mg, 26 μmol) en CH_2Cl_2 (2mL) se añadió MeONa (36 μmol) y se dejó en agitación hasta observar por cromatografía de capa fina la desaparición completa de producto anclado a la resina. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con una disolución acuosa de NH_4Cl (2 x 25 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (25 mL) y el conjunto de fases orgánicas se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (2 mL) y luego se añadió Et_2O (25 mL) agitando vigorosamente hasta la completa precipitación de la resina libre que se separó por filtración. La fase líquida se concentró y el residuo se purificó por columna cromatográfica (Hexano-AcOEt 4:1) obteniéndose **22** (14 mg, 36 % desde **20**, 2 etapas).

Rf 0.44 (Hexano-AcOEt, 3:2).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.0^\circ$ ($c = 0.2$, CH_2Cl_2)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45-7.22 (m, 25H; 5 Ph); 5.52 (s, 1H; Ph-CH-); 5.33 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H; H-1c); 5.22 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H; H-1a); 5.03 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H; H-1b); 4.99 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H; H-2c); 4.96 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H; H-1d); 4.93-4.88 (m, 3H; H-2a, 2 Ph-CH₂); 4.78-4.63 (m, 8H; H-5a, H-5c, 6 Ph-CH₂); 4.21 (dd, $J = 5.0$ Hz, 10.3 Hz, 1H; H-6d); 4.11 (t, J

Parte Experimental

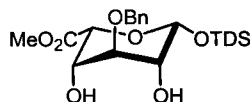
= 5.4 Hz, 1H; H-4a); 4.05 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H; H-4c); 3.97-3.61 (m, 12H; H-3a, H-3b, H-3c, H-3d, H-4b, H-4d, H-5b, H-5d, H-6b, H-6'b, H-6'd, CH(CH₃)₂); 3.32 (dd, $J = 3.8$ Hz, 9.9 Hz, 1H; H-2d); 3.24 (dd, $J = 3.6$ Hz, 10.2 Hz, 1H; H-2b); 1.19 (2s, 18H; C(CH₃)₃); 1.19 y 1.14 (2d, $J = 6.0$ Hz; 6H; CH(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 180.0-165.0 (C=O); 137.3-126.1 (Ph); 101.5 (Ph-CH-); 99.1 (C-1d); 98.0 (C-1b); 97.7 (C-1c); 97.2 (C-1a); 82.4; 77.8; 77.4; 77.2; 76.9; 76.7; 76.5; 76.4; 75.9; 74.8; 74.6; 73.7; 73.6; 73.4; 72.3; 71.3; 70.8; 70.6; 68.5; 6.3; 63.0; 62.9; 60.4; 52.2; 52.1; 38.9; 38.8; 31.6; 27.2; 27.1 (OC(CH₃)₃); 23.3, 21.1 (CH-(CH₃)₂).

3.3 Anclaje por la posición 5 de la unidad de ácido L-idurónico

3.3.1 Síntesis del hexasacárido I

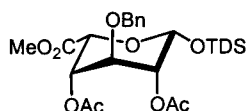
3-O-Bencil-1-O-texildimetilsilil- β -L-idopirranuronato de metilo (23)



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito⁹¹.

Parte Experimental

2,4-di-*O*-Acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopirananuronato de metilo (24)



A una disolución de **23** (300 mg, 0.68 mmol) en piridina (4 mL), se añadió Ac₂O (2 mL) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de agitar durante 16 horas la reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (25 mL) y se lavó con HCl 1N (2 x 15 mL) y H₂O (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se concentró a vacío y se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 3:1) obteniéndose **24** (332 mg, 93%).

$[\alpha]_D^{20} = +24.1^\circ$ ($c = 1$, CH₂Cl₂).

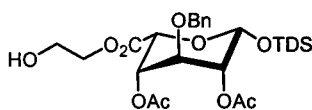
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.40-7.28 (m, 5H; 1 Ph); 5.12 (s ancho, 1H; H-4); 5.10 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H; H-1); 4.94 (s ancho, 1H; H-2); 4.76 (2d, $J = 11.8$ Hz, 4H; 2 Ph-CH₂); 4.62 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H; H-5); 3.86 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H; H-3); 3.76 (s, 3H; COOCH₃); 2.06 (s, 3H; OAc); 2.03 (s, 3H; OAc); 1.61 (m, 1H; CH(CH₃)₂); 0.87-0.82 (4s, 12H; C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂); 0.23-0.14 (2s, 6H; Si(CH₃)₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.5, 170.4, 168.4 (C=O); 137.4-128.2 (Ph); 93.3 (C-1); 74.1 (C-3); 73.3 (Ph-CH₂); 72.9 (C-5); 68.1 (C-2); 67.5 (C-4); 52.8 (COOCH₃); 34.4, 25.8, 21.3, 20.6, 20.2, 19.0, 18.7, -1.6, -3.3 (OCOCH₃, Si(CH₃)₃).

Parte Experimental

HR-FAB MS: m/z calculado para $C_{26}H_{40}O_9Si$ 525.2520; encontrado: 525.2494.

2,4-di-*O*-Acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopiruranonato de 2-hidroxietilo (25).



A una disolución de **24** (220 mg, 0.42 mmol) en tolueno (2 mL) se añadió etilenglicol (7 mL) y Bu_2SnO (10 mg, 42 μ mol) y se dejó en agitación a 110°C durante una noche. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL) y H_2O (3 mL). La fase hidroalcoholica se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 20 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secó sobre $MgSO_4$ y se llevó a sequedad. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt 2:1) obteniéndose **25** (197 mg, 85%).

Rf 0.15 (Hexano-AcOEt, 2:1).

$[\alpha]_D^{20} = +24.5^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2)

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.41-7.26 (m, 5H; 1 Ph); 5.21 (s ancho, 1H; H-4); 5.11 (s ancho, 1H; H-1); 4.94 (s ancho, 1H; H-2); 4.73 (s, 4H; 4 Ph- CH_2); 4.64 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H; H-5); 4.41-4.34 (m, 1H; 1 OCO- CH_2 - CH_2 -OH); 4.22-4.15 (m, 1H; 1 OCO- CH_2 - CH_2 -OH); 3.83-3.80 (m, 3H; 2OCO- CH_2 - CH_2 -OH, H-3); 2.06 (s, 3H; OCO CH_3); 2.05 (s, 3H; OCO CH_3); 1.61

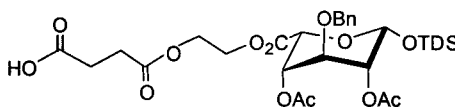
Parte Experimental

(m, 1H; CH(CH₃)₂); 0.88-0.79 (4s, 12H; C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂); 0.23-0.15 (2s, 6H; Si(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 170.4, 170.1, 167.6 (C=O); 137.0-127.8 (Ph); 92.9 (C-1); 74.0 (C-3); 72.9 (Ph-CH₂); 72.6 (C-5); 67.6 (C-2); 67.0 (C-4); 66.9 (OCO-CH₂-CH₂-OH); 60.7 (OCO-CH₂-CH₂-OH); 34.0, 24.9, 20.8, 20.2, 19.8, 18.6, 18.3, -1.9, -3.6 (OCOCH₃, Si(CH₃)₃).

HR-FAB MS: *m/z* calculado para C₂₇H₄₃O₁₀Si 555.2625; encontrado: 555.2597 [M + H]⁺.

2,4-di-*O*-Acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil-β-L-idopirranuronato de 2-succinoiloxietilo (26).



Una mezcla de **25** (183 mg, 0.33 mmol), anhídrido succínico (100 mg, 1 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP se disolvió en piridina (4 mL). Después de agitar durante 16 horas se añadió H₂O (1 mL) y se dejó en agitación una hora más. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL) y se lavó con HCl 1N (2 x 40 mL) y H₂O (2 x 40 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío obteniéndose **26** (212 mg, 98%).

R_f 0.17 (Hexano-AcOEt 1:1)

Parte Experimental

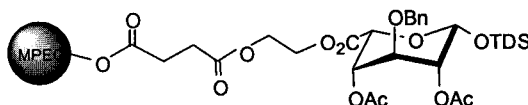
$[\alpha]^{20}_D = +20.8^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.41-7.26 (m, 5H; 1 Ph); 5.14 (s ancho, 1H; H-4); 5.11 (s ancho, 1H; H-1); 4.94 (s ancho, 1H; H-2); 4.73 (m, 4H; 4 Ph- CH_2); 4.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H; H-5); 4.42-4.29 (m, 4H; $\text{OCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCO}$); 3.85 (s ancho, 1H; H-3); 2.65 (s, 4H; $\text{OCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$); 2.05 (s, 3H; OCOCH_3); 2.04 (s, 3H; OCOCH_3); 1.60 (m, 1H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.87-0.83 (4s, 12H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.22-0.14 (2s, 6H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 176.1, 172.6, 170.6, 170.5, 167.7 (C=O); 137.8-128.2 (Ph); 93.3 (C-1); 74.1 (C-3); 73.3 (Ph- CH_2); 72.8 (C-5); 68.0 (C-2); 67.4 (C-4); 63.3, 62.6 (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 34.4, 29.3, 29.2, 25.2, 21.3, 21.2, 20.6, 20.2, 18.9, 18.7, -1.6, -3.3 ($\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, OCOCH_3 , $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

HR-FAB MS: m/z calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_{13}\text{SiNa}$ 677.2605; encontrado: 677.2592

2,4-di-O-Acetil-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiruranonato de MPEG-2-succinoiloxietilo (27).



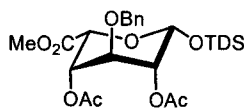
Una mezcla de **26** (115 mg, 0.18 mmol), MPEG (700 mg, 0.14 mmol) y DMAP en cantidad catalítica, previamente coevaporada con tolueno, se disolvió en CH_2Cl_2 (5 mL). Posteriormente se añadió DCC (39

Parte Experimental

mg, 0.19 mmol) y se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el volumen de la reacción se redujo (2 mL) y se añadió Et₂O (30 mL) agitando vigorosamente hasta obtener un precipitado blanco, que se separó por filtración y se secó a vacío obteniéndose **27** (779 mg, 92%).

Datos espectroscópicos significativos: ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.28-7.03 (m, 5H; 1 Ph); 5.01 (s ancho, 1H; H-4); 4.99 (s ancho, 1H; H-1); 4.82 (s ancho, 1H; H-2); 4.73 (2d, *J* = 11.8 Hz, 2H; 2 Ph-CH₂); 4.53 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H; H-5); 4.34-4.17 (m, 4H; OCO-CH₂-CH₂-OCO); 3.74 (s ancho, 1H; H-3); 1.93 (s, 3H; OCOCH₃); 1.92 (s, 3H; OCOCH₃); 1.49 (m, 1H; CH(CH₃)₂); 0.76-0.69 (4s, 12H; C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂); 0.11-0.03 (2s, 6H; Si(CH₃)₂).

2,4-di-O-Acetil-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil-β-L-idopirauronato de metilo (24).



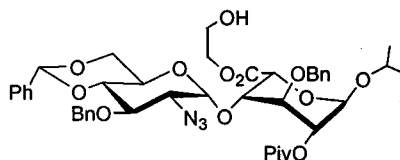
A una disolución de **27** (779 mg, 0.14 mmol) en MeOH (5 mL), se le añadió Bu₂SnO (3.4 mg, 13.8 μmol) y se dejó agitando una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (25 mL) y se lavó con H₂O (15 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secó (MgSO₄) y se concentró.

Parte Experimental

El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 3:1) obteniéndose **24** (66 mg, 92%).

Los datos espectroscópicos obtenidos fueron idénticos a los anteriores para este compuesto (página 136).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de 2-hidroxietilo (**28**).**



A una disolución de **17** (98 mg, 0.124 mmol) en tolueno seco (3 mL) se añadió etilenglicol (9 mL) y Bu_2SnO (300 mg, 1.24 μmol) y se dejó en agitación a 135°C durante 5 días. Pasado este tiempo se añadió CH_2Cl_2 (10 mL) y H_2O (3 mL). La fase hidroalcohólica se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 20 mL). El conjunto de las fases orgánicas se secó sobre MgSO_4 , se redujo el volumen (10 mL) y la mezcla se filtró sobre celita. El filtrado se concentró a sequedad y la mezcla se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 3:1 \rightarrow 0:1) obteniéndose **28** (83 mg, 81%) y producto de partida **17** sin reaccionar (15 mg, 15%).

Parte Experimental

Rf 0.26 (Hexano-AcOEt 7:3).

$[\alpha]_D^{20} = -41.1^\circ$ ($c = 0.9$, CHCl_3).

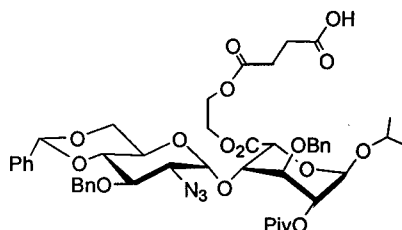
$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46-7.24 (m, 15H; 3 Ph); 5.56 (s, 1H; Ph-CH-); 5.28 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H; H-1); 5.07 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; H-1'); 4.95 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H; H-2); 4.91 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H; 1 Ph-CH₂); 4.78-4.72 (m, 4H; H-5, 3 Ph-CH₂); 4.35-4.28 (m, 2H; H-6'a, 1 OCO-CH₂-CH₂-OH); 4.20-4.17 (m, 1H; 1 OCO-CH₂-CH₂-OH); 4.11 (dd, $J = 6.6$ Hz, 5.1 Hz, 1H; H-4); 4.06-4.01 (m, 3H; H-3, H-3', H-6'b); 3.94 (m, 1H; CH(CH₃)₂); 3.76-3.66 (m, 4H; H-4', H-5', OCO-CH₂-CH₂-OH); 3.34 (dd, $J = 3.8$ Hz, 10.1 Hz, 1H; H-2'); 2.39 (s ancho, 1H; OCO-CH₂-CH₂-OH); 1.21 (s, 9H; C(CH₃)₃); 1.20 y 1.15 (2d, 6H; $J = 6.5$ Hz, CH(CH₃)₂).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 177.2, 169.8 (C=O); 137.8-125.9 (Ph); 101.5 (Ph-CH-); 99.4 (C-1'); 97.3 (C-1); 82.5 (C-4'); 76.1; 75.0; 74.9; 73.7; 71.7; 68.6 (OCO-CH₂-CH₂-OH); 67.1 (C-3'); 63.1; 62.9 (C-2'); 60.3 (OCO-CH₂-CH₂-OH); 38.8, 29.7, 27.2 (C(CH₃)₃); 23.5, 21.9 (CH-(CH₃)₂).

HR-FAB MS: m/z calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{Na}$ 842.3476; encontrado: 842.3482.

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de 2-succinoiloxietilo (29).**

Parte Experimental



Una mezcla de **28** (75 mg, 91 μmol), anhídrido succínico (55 mg, 0.55 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP se disolvió en piridina (3 mL). Después de agitar durante 16 horas se añadió H₂O (1 mL) y se dejó en agitación una hora más. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL) y se lavó con HCl 1N (2 x 40 mL) y H₂O (2 x 40 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para obteniéndose **29** (83 mg, 98%).

Rf 0.41 (Tolueno-Acetona 5:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -50.9^\circ$ ($c = 1$, CHCl₃).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.44-7.24 (m, 15H; 3 Ph); 5.52 (s, 1H; Ph-CH-); 5.12 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; H-1); 5.00 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; H-1'); 4.94 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H; H-2); 4.90 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; 1 Ph-CH₂); 4.81-4.69 (m, 4H; H-5, 3 Ph-CH₂); 4.37-4.21 (m, 5H; H-6'a, OCO-CH₂-CH₂-OCO); 4.14 (m, 1H; H-4); 3.99-3.93 (m, 4H; H-3, H-3', H-6'b, CH(CH₃)₂); 3.76-3.66-3.61 (m, 2H; H-4', H-5'); 3.33 (dd, $J = 3.8$ Hz, 10.0 Hz, 1H; H-2'); 2.57 (s, 4H; OCO-CH₂-CH₂-COOH); 1.22 (s, 9H; C(CH₃)₃); 1.21 y 1.16 (2d, $J = 6.5$ Hz, 6H; CH(CH₃)₂).

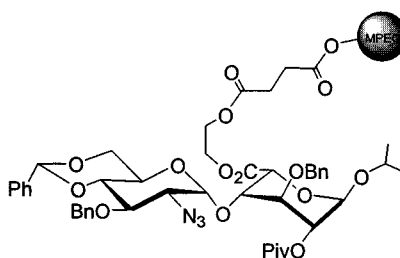
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 177.6, 171.8, 168.8 (C=O); 137.8-126.1 (Ph); 101.5 (Ph-CH-); 99.4 (C-1'); 97.4 (C-1); 82.5 (C-4'); 76.2; 76.1;

Parte Experimental

75.4; 74.8; 72.9; 71.2; 69.7; 69.2; 68.6; 63.2; 63.0; 62.7; 61.9; 38.8, 27.2 (OC(CH₃)₃); 23.5, 21.9 (CH-(CH₃)₂).

FAB MS *m/z* 942 (M + Na⁺).

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de 2-MPEG- succinoiloxietilo (30).**



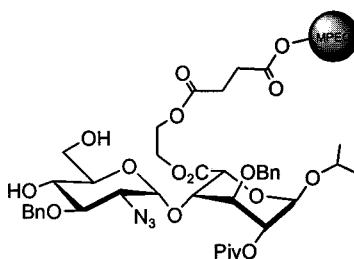
Una mezcla de **29** (80 mg, 87 μ mol), MPEG (325 mg, 65 μ mol) y DMAP en cantidad catalítica previamente coevaporada con tolueno, se disolvió en CH₂Cl₂ (3 mL). Posteriormente se añadió DIC (20 μ L, 0.12 mmol) y se dejó agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el volumen de la reacción se redujo (2 mL) y se añadió Et₂O (35 mL) con agitación vigorosa. El precipitado blanco formado se separó por filtración y se secó a vacío para obtener **30**.

Datos espectroscópicos significativos: ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.48 (s, 1H; Ph-CH-); 5.08 (d, *J* = 3.8Hz, 1H; H-1); 4.97 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H; H-1'); 4.88-4.86 (m, 2H; H-2, 1 Ph-CH₂); 4.76-4.65 (m, 4H; H-5, 3 Ph-CH₂);

Parte Experimental

4.09 (m, 1H; H-4); 3.93-3.89 (m, 2H; H-3, CH(CH₃)₂); 3.29 (dd, $J = 3.7$ Hz, 10.0 Hz, 1H; H-2').

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-
(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de 2-
MPEG-succinoiloxietilo (31).**

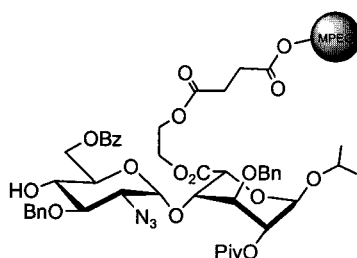


A una mezcla de **30** (630 mg, 0.1 mmol), previamente coevaporado con tolueno, y *p*TsOH (8 mg, 30 μ mol), disuelta en CH₂Cl₂ seco (6 mL) se añadió EtSH (120 μ L, 1.5 mmol). Después de agitar durante 10 horas, el volumen se redujo a 3 mL y se añadió Et₂O agitando fuertemente hasta precipitación del producto **37** que se filtró y se secó a vacío.

Datos espectroscópicos significativos: ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.16 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H; H-1); 5.04 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H; H-1'); 4.90 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H; H-2); 4.80-4.70 (m, 5H; H-5, 4 Ph-CH₂); 4.11 (m, $J = 5.5$ Hz, 1H; H-4); 3.95 (m, $J = 5.5$ Hz, 1H; H-3); 3.90 (m, 1H; CH(CH₃)₂); 3.15 (dd, $J = 3.3$ Hz, 10.1 Hz, 1H; H-2').

Parte Experimental

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de 2-MPEG-succinoiloxietilo (32).**



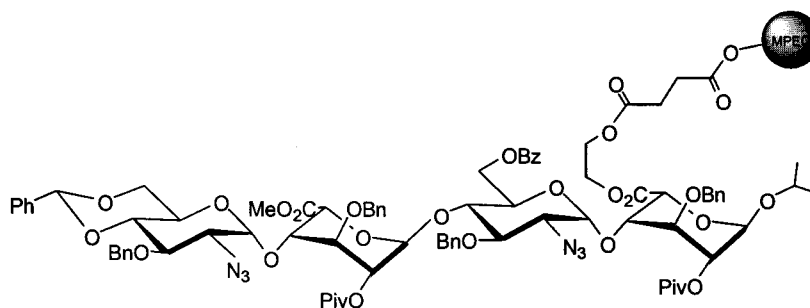
A una disolución de 31 (605 mg, 0.1 mmol), previamente coevaporado con tolueno, en CH₃CN (12 mL) se le añadió, a -20°C, BzCN (20 mg, 0.15 mmol) y una cantidad catalítica de Et₃N. Después de agitar 45 minutos, se añadió MeOH (1 mL) y la reacción se llevó a temperatura ambiente. El volumen se redujo a 3 mL y se adicionó Et₂O (40 mL) con agitación vigorosa hasta la obtención de un precipitado que se filtró y secó para obtener 32.

Datos espectroscópicos significativos: ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.12 (d, J = 4.6 Hz, 1H; H-1); 5.01 (d, J = 2.8 Hz, 1H; H-1'); 4.86-4.59 (m, 7H; H-2, H-5, H-6'a, 4 Ph-CH₂); 4.40 (m, 1H; H-6'b); 3.92-3.85 (m, 3H; H-3, H-4, CH(CH₃)₂); 3.16 (m, 1H; H-2').

***O*-(2-azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-**

Parte Experimental

benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-O-bencil-2-O-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de MPEG-2-succinoiloxietilo (33).



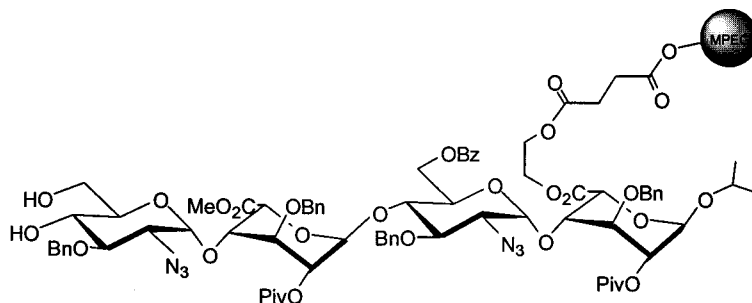
A una mezcla de **32** (602 mg, 0.1 mmol) y **4** (178 mg, 0.2 mmol), previamente coevaporada con tolueno, disuelta en CH_2Cl_2 seco (3 mL) se le añadió TMSOTf (5 μL , 30 μmol). La reacción se dejó en agitación durante dos horas. El volumen se redujo a 2 mL y se añadió Et_2O con agitación fuerte hasta obtener un precipitado blanco que se separó de la fase soluble por filtración. Esta reacción de glicosidación se repitió tres veces más. La mezcla del derivado de MPEG resultante, PS-Suc-COOH (400 mg, 0.49 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP se empapó en CH_2Cl_2 seco (7 mL) y se añadió DIC (134 μL , 0.8 mmol). Después de agitar durante una noche la resina fue filtrada y lavada con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se concentró hasta 3-4 mL. Se añadió Et_2O (40-50 mL) con agitación vigorosa hasta la precipitación de **33**.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.49 (s, 1H; Ph-CH-); 5.34 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H; H-1c); 5.05 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H;

Parte Experimental

H-1a); 4.96-4.91 (m, 2H; H-1b, H-1d); 4.93 (m, 1H; H-2c); 4.87 (m, 1H; H-2a); 4.76 (m, 1H; H-5a); 4.59 (m, 1H; H-5c); 4.10 (m, 1H; H-4a); 4.00 (m, 1H; H-4c); 3.90-3.89 (m, 2H; H-3a, H-3c); 3.32-3.25 (m, 2H; H-2b, H-2d).

***O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil--6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de MPEG-2-succiniloxi etilo (34).**

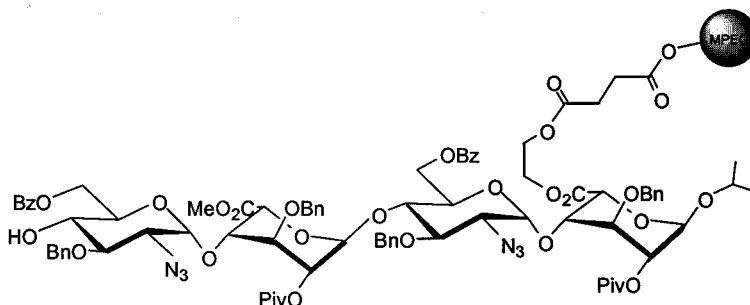


A una mezcla de **33** (625 mg, 96 μ mol) previamente coevaporado con tolueno y *p*TsOH (13 mg, 50 μ mol), disuelta en CH₂Cl₂ seco (6 mL) se añadió EtSH (120 μ L, 1.5 mmol). Después de agitar durante 10 horas, el volumen se redujo a 3 mL y se añadió Et₂O (40 mL) con agitación fuerte. El precipitado obtenido se separó por filtración y se secó a vacío obteniéndose **34**.

Parte Experimental

Datos espectroscópicos significativos: $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.38 (s ancho, 1H; H-1c); 5.07 (s ancho, 1H; H-1a); 5.06-4.94 (m, 2H; H-1b, H-1d); 4.98 (m, 1H; H-2c); 4.88 (m, 1H; H-2a); 4.76 (m, 1H; H-5a); 4.59 (m, 1H; H-5c); 4.12 (m, 1H; H-4a); 4.05 (m, 1H; H-4c); 3.93 (m, 1H; H-3c); 3.90 (m, 1H; H-3a); 3.20-3.14 (m, 2H; H-2b, H-2d).

***O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de MPEG-2-succinoiloxietilo (35).**

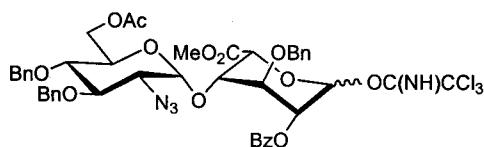


A una disolución de 34 (565 mg, 88 μmol), previamente coevaporado con tolueno, en CH_3CN (11 mL) se le añadió a -20°C BzCN (18.6 mg, 0.14 mmol) y una cantidad catalítica de Et_3N . Después de agitar 45 minutos, se añadió MeOH (1 mL) y la reacción se llevó a temperatura ambiente. El volumen se redujo a 3 mL y se añadió Et_2O (40 mL) formándose un precipitado que se filtró y secó para obtener 35.

Parte Experimental

Datos espectroscópicos significativos: $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.33 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H; H-1c); 5.06 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H; H-1a); 4.98-4.95 (m, 2H; H-1b, H-1d); 4.93 (m, 1H; H-2c); 4.87 (m, 1H; H-2a); 4.77 (m, 1H; H-5a); 4.60 (m, 1H; H-5c); 4.12 (m, 1H; H-4a); 4.05 (m, 1H; H-4c); 3.89 (m, 2H; H-3a, H-3c); 3.32-3.16 (m, 2H; H-2b, H-2d).

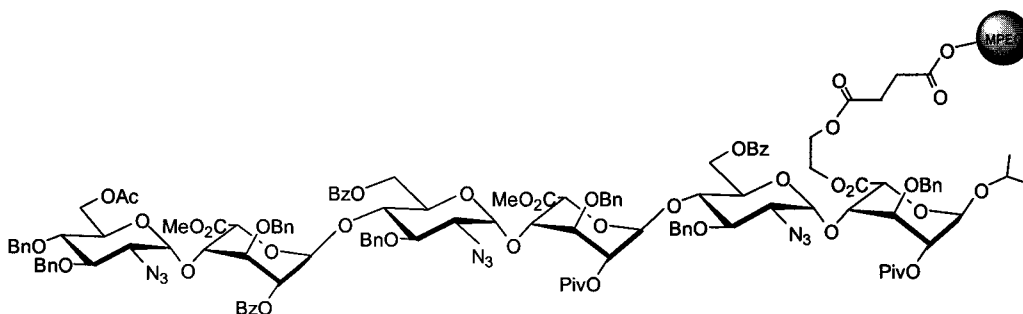
Tricloroacetimidato de 4-*O*-(6-*O*-acetil-2-azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- β -L-idopiranosiluronato de metilo (36).



Este compuesto se preparó de acuerdo con el protocolo descrito⁶.

***O*-(6-*O*-Acetil-2-azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- α -L-idopyranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-benzil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de MPEG-2-succinoiloxietilo (37).**

Parte Experimental

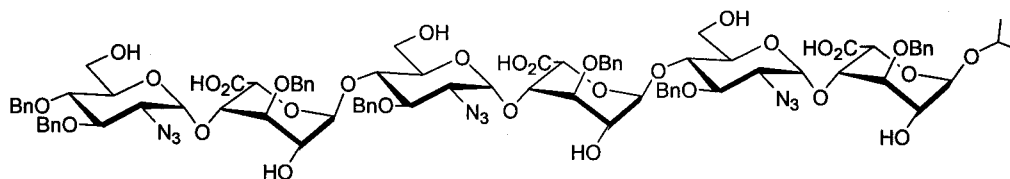


A una mezcla de **35** (270 mg, 41 μmol) y **36** (82 mg, 85 μmol), previamente coevaporada con tolueno, disuelta en CH_2Cl_2 seco (1.5 mL) se le añadió TMSOTf (2.1 μL , 12.8 μmol) y se dejó en agitación durante 1 hora. Pasado este tiempo se añadió una gota de Et_3N y a continuación Et_2O (25 mL) hasta obtener un precipitado blanco que se separó de la fase soluble por filtración. Esta reacción se repitió tres veces más. La mezcla del derivado de MPEG resultante, PS-Suc-COOH (300 mg, 0.38 mmol) y DMAP en cantidad catalítica se empapó en CH_2Cl_2 (5 mL) y se añadió DIC (70 μL , 0.41 mmol). Después de agitar una noche, la mezcla se filtró y la resina fue lavada con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se concentró hasta 2-3 mL. Se añadió Et_2O (30-40 mL) con agitación vigorosa hasta la precipitación de **37**.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.53 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H; H-1e); 5.37 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H; H-1c); 5.13 (m, 1H; H-2e); 5.08 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; H-1a); 4.98-4.84 (m, 3H; H-1b, H-1d, H-1f); 4.93 (m, 1H; H-2c); 4.89 (m, 1H; H-2a); 4.76 (m, 1H; H-5a); 4.65 (m, 1H; H-5e); 4.47 (m, 1H; H-5c); 4.12 (m, 1H; H-4a); 4.11 (m, 1H; H-3e); 4.00 (m, 1H; H-4e); 3.95 (m, 1H; H-4c); 3.90 (m, 1H; H-3a); 3.86 (m, 1H; H-3c); 3.31-3.16 (m, 3H; H-2b, H-2d, H-2f); 1.92 (s, 3H; OCOCH_3).

Parte Experimental

***O*-(2-azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(\acute{a} cido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(\acute{a} cido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- \acute{a} cido (isopropil 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosid)urónico (38).**



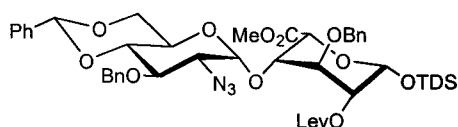
A una disolución de **37** (100 mg, 13 μ mol) en THF (2 mL) a -5°C , se le añadió H_2O_2 al 30% (0.7 mL) y una disolución acuosa 1M de LiOH (1.1 mL). Después de agitar durante 24 horas a temperatura ambiente, se le añadió MeOH (1 mL) y una disolución acuosa de KOH 3N (2 mL). Después de agitar durante 24 horas más, la reacción se neutralizó con resina ácida (IRA-120 H^+), se filtró y concentró. El residuo se purificó mediante Sephadex LH-20 (MeOH- CH_2Cl_2 , 1:1). Por último se reunieron las fracciones que contenían **38** y MPEG libre, se concentraron y luego fueron redisueltas en MeOH- CH_2Cl_2 , 1:1 (1.5 mL), para añadir finalmente Et_2O (13 mL) y conseguir la precipitación de la resina libre a 0°C . El precipitado se separó por filtración de la fase orgánica que se concentró a vacío obteniéndose **38** puro (11 mg, 37% desde **29**, en 8 etapas).

Los datos espectroscópicos de este compuesto fueron idénticos a los descritos.⁶

Parte Experimental

3.3.2. Otras reacciones de interés en la aproximación a la síntesis de oligosacáridos tipo heparina en fase sólida.

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil-2-*O*-levulinoil- β -L-idopiranosid) uronato de metilo. (39)**



Una mezcla de **1** (2.053 g, 2.5 mmol) y DMAP (31 mg, 0.25 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (20 mL). Esta disolución se añadió gota a gota y con agitación fuerte sobre otra disolución de DCC (5.2 g, 0.25 mmol) y LevOH (2.57 mL, 25 mmol) en CH₂Cl₂ seco (10 mL). Después de 24 horas la reacción se filtró sobre celita y se concentró. El residuo se diluyó en CH₂Cl₂ (200 mL) y se lavó con HCl al 5% (100 mL), una disolución acuosa de NaCl (100 mL), y una disolución saturada de NaHCO₃ (100 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por columna cromatográfica (Tolueno-AcOEt, 40:1) obteniéndose **39** (1.95 g, 83%).

Rf 0.3 (tolueno-AcOEt, 10:1)

$[\alpha]_D^{20} = +0.04^\circ$ ($c = 0.8$, CH₂Cl₂)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.46-7.14 (m, 15H; 3Ph); 5.53 (s, 1H; Ph-CH-); 5.07 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H; H-1); 5.00 (s ancho, 1H, H-2); 4.93 (d, J

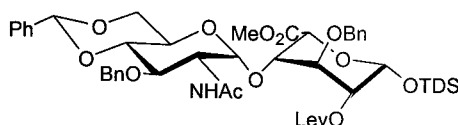
Parte Experimental

=11 Hz, 1H; Ph-CH₂-); 4.88 (d, *J*=3.5 Hz, 1H, H-1'); 4.77-4.66 (2d, *J*=11.5 Hz, 2H, Ph-CH₂-); 4.67 (d, *J*=11.5 Hz, 2H, Ph-CH₂-); 4.49 (d, *J*=1.5 Hz, 1H, H-5); 4.31 (dd, *J*=10.5 Hz, 5 Hz, H-6'a); 4.05-3.99 (m, 4H, H-3, H-4, H-3', H-5'); 3.76 (s, 3H, -COOCH₃); 3.67-3.62 (m, 2H, H-4', H-6'b); 3.31 (dd, *J*=3.5 Hz, 10 Hz, H-2'); 2.73-2.70 (m, 4H, -CH₂-CH₂-); 2.63-2.02 (m, 3H, -CH₂-CH₂-); 2.03 (s, 3H, -OCOCH₃); 1.63 (m, 1H, -CH(CH₃)₂); 0.86-0.83 (m, 12H, -C(CH₃)₂, -CH(CH₃)₂), 0.24-0.14 (2s, 6H, -Si(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃Cl): δ 172.6, 158.7 (C=O); 138.1, 127.8 (Ph); 101.4; 97.9; 93.6; 82.6; 77.3; 77.1; 76.8; 75.0; 74.2; 73.4; 73.0; 72.9; 68.5; 67.8; 63.2; 63.1; 52.1; 37.9; 34.02; 29.7. 28.1; 24.9; 20.2; 19.9; 18.6; 18.4; -1.9; -3.5.

HR-FAB: *m/z* calculado para C₄₇H₆N₃O₁₃SiNa 926.3870, encontrado 926.3900.

***O*-(2-Acetamido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil-2-*O*-levulinoil- β -L-idopiranosid) uronato de metilo. (40).**



Una disolución de **39** (1.766 g, 1.95 mmol) se disolvió en ácido tioacético (20 mL) y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después

Parte Experimental

de 24 horas la reacción se concentró a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (Tolueno-AcOEt, 9:1→1:1) obteniéndose **40** (1.27 g, 71%).

Rf 0.16 (tolueno-AcOEt, 3:1)

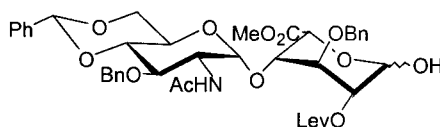
$[\alpha]_D^{20} = +14.7^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46-7.09 (m, 15H, 3 Ph); 5.52 (s, 1H, Ph-CH-); 5.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-1); 4.95 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1'); 4.91 (d, $J = 2$, 1H, H-2); 4.83 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, Ph-CH₂-); 4.69 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, Ph-CH₂-); 4.62 (d, $J = 12$ Hz, 1H, Ph-CH₂-); 4.42 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-5); 4.41 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, Ph-CH₂), 4.33 (dd, $J = 10.0$ Hz, 4.5 Hz, 1H, H-6'a); 4.24-4.20 (m, 1H, H-2'); 3.97-3.93 (m, 2H, H-4, H-6'b); 3.76-3.62 (m, 6H, H-3', H-4', H-5', -OCOCH₃); 2.97-2.84 (m, 1H, CO-CH₂-CH₂-CO); 2.60-2.38 (m, 3H, CO-CH₂-CH₂-CO); 2.03 (s, 3H, -OCO-CH₃); 1.93 (s, 3H, NHCOCCH₃); 1.62-1.57 (m, 1H, -CH(CH₃)₂); 0.88-0.82 (m, 12H, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃); 0.24-0.13 (2s, 6H, -Si(CH₃)₂).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz): δ 172.4, 172.0, 170.6, 169.1, 168.3 (C=O); 138.7, 137.6, 136.9, 136.5, 128.9, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.25, 128.2, 128.0, 127.8, 127.4, 127.1, 126.1 (Ph); 101.2 (Ph-CH-); 93.6; 92.4; 82.7; 77.2; 77.1; 76.9; 76.6; 73.9; 73.5; 73.1; 72.8; 68.6; 68.4; 67.4; 66.6; 63.4; 63.3; 60.4; 53.4; 52.2; 37.8; 37.7; 29.7; 29.6; 28.0; 22.0; 21.1; 14.2.

HR-FAB: m/z calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{65}\text{NO}_{14}\text{SiNa}$ 942.4070; encontrado 942.4090.

O-(2-Acetamido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(3-O-bencil-2-O-levulinoil- α,β -L-idopirananuronato de metilo.(41)



A una disolución de **40** (1.095 g, 1.19 mmol) en THF seco (30 mL), a -20°C se añadió un exceso de complejo $(\text{HF})_n\text{Py}$ (5.60 mL). La mezcla de reacción se llevó hasta 0°C y se dejó en agitación bajo atmósfera de argón. Después de 24 horas, la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (200 mL) y se lavó con H_2O (50 mL) y una disolución acuosa de NaHCO_3 (50 mL) hasta pH neutro. Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2x25 mL) y el conjunto de fases orgánicas se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 1:4 \rightarrow 1:9) obteniéndose **41** (925 mg, 100%) como una mezcla de anómeros.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46-7.11 (m, 15H, 6 Ph- α y β); 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 0.5H, NH- α), 7.00 (d, J = 8.5, 0.5H, NH- β); 5.53 (s, 1H, Ph-CH- α y β); 5.28 (d, J = 8.0, 0.5H, H-1 α), 5.12 (d, J = 8.5 Hz, 0.5H, H-1 β); 5.03-5.00 (dd, J = 4.0 Hz, 8.0 Hz, 1H, H-1' α y β); 4.93-4.50 (m, 6H, H-2 α y β , H-5 α y β , 2 Ph- CH_2 - α y β); 4.39-4.36 (m, 2H, H-3 α y β , H-4 α y β); 4.21-4.14 (m, 1H, H-2' α y β); 4.12-3.67 (m, 7H, H-4' α y β , H-5' α y β , H-6'a α y β , H-6'b α y β , CO_2CH_3 α y β); 3.58-3.55 (t, 1H, H-3' α y β)

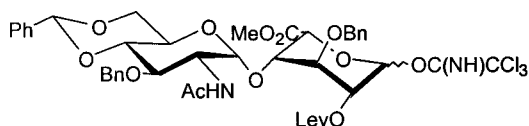
Parte Experimental

β); 2.94-2.82 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\alpha$ y β); 2.63-2.32 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\alpha$ y β); 2.03 (2s, 3H, OCOCH_3 α y β); 1.87 (s, 3H, NHCOCH_3 α y β).

^{13}C -RMN (125 MHz): δ 172.4, 172.0, 170.6, 169.1, 168.3 (C=O); 138.7, 137.6, 136.9, 136.5, 128.9, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.25, 128.2, 128.0, 127.8, 127.4, 127.1, 126.1 (Ph); 101.2 (Ph-CH-); 93.6; 92.4; 82.7; 77.2; 77.1; 76.9; 76.6; 76.5; 75.0; 73.9; 73.5; 73.1; 73.0; 72.8; 68.6; 68.4; 67.4; 66.6; 63.4; 63.3; 60.4; 53.2; 37.8; 29.7; 28.0; 22.9; 21.1; 14.2.

HR-FAB: m/z calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{NO}_{14}\text{Na}$ 800.2894; encontrado 800.2906.

Tricloroacetimidato de 4-*O*-(2-acetamido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-*O*-bencil-2-*O*-levulinoil- α,β -L-idopiranosiluronato de metilo.(42).



A una disolución de 41 (930 mg, 1.195 mmol) en CH_2Cl_2 seco (15 mL), se añadió Cl_3CCN (1.8 mL, 18 mmol) y K_2CO_3 activado a la llama (165 mg, 1.195 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 horas, la suspensión se filtró y concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (Hexano-AcOEt, 1:2) obteniéndose 42 (862 mg, 84%) como una mezcla de anómeros.

Parte Experimental

Rf 0.3 (Hexano-AcOEt, 1:2)

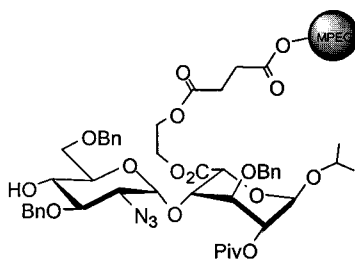
$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.66 (d, $J = 5$ Hz, 0.35H, $\text{NH}\beta$); 8.62 (d, $J = 18.5$ Hz, 0.65H, $\text{NH}\alpha$); 7.48-7.09 (m, 15H, 6 Ph); 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 0.65H, $\text{NHAc } \alpha$); 6.78 (s, 0.35H, $\text{NHAc } \beta$); 6.38 (s, 0.65H, H-1 α); 6.18 (d, $J = 2$ Hz, 0.35H, H-1 β); 5.54 (s, 0.65H, -Ph-CH- α); 5.53 (s, 0.35H, -Ph-CH- β); 5.24 (s ancho, 0.35H, H-2 β); 5.1 (s, 0.65H, H-2 α); 5.05 (d, $J = 4$, 0.65H, H-1' α); 5.02 (d, $J = 4$ Hz, 0.35H, H-1' β); 4.92 (s, 0.65H, H-5 α); 4.89-4.32 (m, 5H, 4 Ph-CH₂- α y β , H-6' α y β); 4.24-4.18 (m, 1H, H-2' α y β); 4.12 (s, 0.65H, H-4 α); 3.99-3.92 (m, 1.7H, H-3 β , H-4 β , H-6'b α y β); 3.82-3.60 (m, 6.65H, H-3 α , H-3' α y β , H-4' α y β , H-5' α y β , CO_2CH_3 α y β); 3.0-2.36 (m, 4H, -CH₂-CH₂- α y β); 2.03, 2.02, 1.89 y 1.85 (4s, 4H, $\text{NHAc } \alpha$ y β , -CH₂-CO-CH₃ α y β).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 172.4, 172.0, 170.6, 169.1, 168.3 (C=O); 137.0; 128.8, 128.4; 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.0, 126.8, 126.1, 126.0 (Ph); 101.2 (Ph-CH); 100.0, 96.1, 82.7, 77.5, 77.0, 76.6, 75.0, 73.9, 72.1, 68.6, 68.5, 65.44, 63.5, 53.4, 52.3, 37.9, 29.6, 28.0, 23.0.

HR-FAB: m/z calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{O}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_3\text{Na}$ 943.1990; encontrado 943.2011.

***O*-(2-Azido-3,6-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-
(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de MPEG
2-succinoiloxietilo (43).**

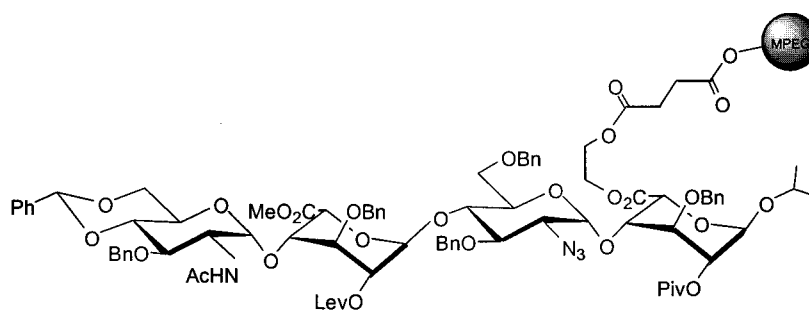
Parte Experimental



El producto **30** (290 mg, 49 μmol) se disolvió en una disolución de NaBH_3CN 1M en THF (2mL, 2 mmol) y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 8 horas se adicionó gota a gota y a 0°C una disolución de HCl 1.4 M en THF (1.60 mL, 2.25 mmol) hasta pH neutro, dejándose en agitación a temperatura ambiente 16 horas más. Pasado ese tiempo la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 (50 mL) y H_2O (50 mL). Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2x25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El sirupo obtenido se recristalizó en etanol y se separó mediante filtración de la fase orgánica, obteniéndose un sólido blanco. Este sólido se disolvió en CH_2Cl_2 (2 mL) y se añadió Et_2O (25 mL) con agitación fuerte hasta la precipitación del producto, que se separó por filtración, se coevaporó con tolueno y se secó a vacío para obtener **43**.

Datos espectroscópicos significativos: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.16 (s ancho, 1H, H-1); 5.03 (s ancho, 1H, H-1'); 4.89 (s ancho, 2H, H-2); 4.5 (d, $J = 5.5$, 1H, H-5); 4.4-4.1 (m, 2H, H-4, H-3); 3.18 (s ancho, 1H, H-2');

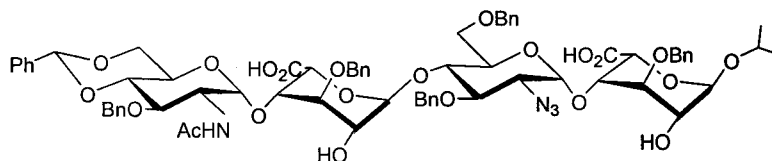
***O*-(2-Acetamido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-levulinoil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3,6-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-(isopropil-3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de MPEG 2-succinoiloxietilo (44).**



A una mezcla de 43 (285 mg, 48 μ mol) y 42 (110 mg, 120 μ mol) previamente coevaporados con tolueno, disuelta en CH_2Cl_2 seco (1 mL) se añadió TMSOTf (5 μ L, 0.028 mmol) y se dejó en agitación. Después de 4 horas la reacción se neutralizó con una gota de Et_3N y se añadió Et_2O (25 mL) con agitación vigorosa hasta la obtención de un precipitado que se separó del resto de componentes de reacción mediante filtración. Esta reacción de glicosidación se repitió 3 veces.

***O*-(2-Acetamido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3,6-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil-3-*O*-bencil- α -L-idopiranosid) urónico (45).**

Parte Experimental



A una disolución del derivado de MPEG formado por el tetrasacárido anclado a la resina (**44**) y el disacárido acceptor anclado que no había reaccionado en la reacción de glicosidación (**43**) (182 mg, 28.5 μ mol) en THF (4.4 mL) a -5°C , se le añadió H_2O_2 al 30% (1.5 mL) y una disolución acuosa 1M de LiOH (2.4 mL). Después de agitar durante 24 horas a temperatura ambiente, se le añadió MeOH (2.2 mL) y una disolución acuosa de KOH 3N (4.4 mL). Después de agitar durante 24 horas más, la reacción se neutralizó con resina ácida (IRA-120H⁺), se filtró y concentró. El residuo se purificó mediante Sephadex LH-20 (MeOH- CH_2Cl_2 , 1:1). Por último se reunieron las fracciones que contenían **45**, **46** y MPEG libre, se concentraron y luego fueron redisueltas en MeOH- CH_2Cl_2 , 1:1 (1.5 mL), para añadir finalmente Et_2O (20 mL) y conseguir la precipitación de la resina libre a 0°C . El precipitado se separó por filtración de la fase orgánica que contenía **45** y **46** y que se concentró a vacío. Esta mezcla se separó mediante columna cromatográfica (CH_2Cl_2 100% \rightarrow CH_2Cl_2 -MeOH 15:1) obteniéndose **45** puro (10.5 mg, 10% en 4 etapas).

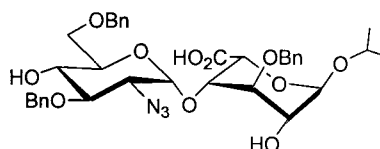
^1H -RMN (500 MHz, MeOD): δ 7.50-7.29 (m, 30 H, Ph-CH); 5.56 (s, 1H, Ph-CH); 5.32 (s ancho, 1H, H-1b); 5.05-4.95 (m, 2H, H-1a y H-1b); 4.92-4.53 (m, 13H, H-1d, H-5a, H-5c, Ph- CH_2); 4.34-3.42 (m, 19H, H-2 b y d, H-3 b y d, H-4 b y d, H-5 b y d, H-6 b y d, H-6' b y d, H-4 a y c, H-3 a y c, H-2 a y c, CH-(CH_3)₂); 4.0-1.20 (s, 6H, CH-(CH_3)₂).

Parte Experimental

^{13}C -RMN (125 MHz, MeOD): δ 101.23 (Ph-CH); 99.81; 97.31; 94.64; 82.97; 78.70; 78.34; 75.67; 75.23; 74.34; 73.80; 73.71; 73.18; 72.38; 71.93; 70.78; 70.51; 69.62; 69.36; 69.18; 68.91; 68.55; 68.19; 64.54; 53.23; 48.33; 29.90; 22.06; 21.53.

MALDI-TOF MS (modo positivo, matriz-DHB) m/z 1363.700 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

***O*-(2-azido-3,6-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-
ácido (isopropil 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosid) urónico (46).**



Del proceso de purificación cromatográfica descrito anteriormente se obtuvo también el disacárido parcialmente protegido 46 (9.5 mg, 20%).

^1H -RMN (300 MHz, MeOD): δ 7.50-7.22 (m, 15H, Ph); 5.37-5.35 (m, 1H, H-1'); 5.08 (d, 1H, H-1); 5.02-4.63 (m, 7H, H-5, Ph-CH₂); 4.43-4.29 (dd, 1H, H-6'a); 4.27 (s ancho, 1H, H-4); 4.27-4.00 (m, 2H, H-6'b, CH-(CH₃)₂); 3.38-3.88 (m, 1H, H-3); 3.75-3.36 (m, 1H, H-2); 4.43-3.37 (m, 4H, H-2', H-4', H-3', H-5'); 1.40-1.20 (s, 6H, CH-(CH₃)₂).

MALDI-TOF MS (modo positivo, matriz-DHB) m/z 716.300 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

CAPÍTULO VI:
REFERENCIAS

Referencias

VI. Referencias

1. Casu B.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1985**, *43*, 51-134
2. Petitou M.; *ACS Symposium Series*, **1994**, *560*, 90-100
3. Conrad H.E, *Heparin Binding Protein*, **1998** (Academic Press, San Diego)
4. Linhardt R.J., Toida T., *Carbohydrates in Drug Design*, **1997**, *capítulo 7*, 277-341(Marcel Dekker Inc., New York).
5. Capila I., Linhardt R.J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 390-412
6. de Paz J.L., *Tesis Doctoral*, **2000**, Universidad de Sevilla.
7. Ojeda R., *Tesis Doctoral*, **2001**, Universidad de Sevilla.
8. Lucas R., *Tesis Doctoral*, **2002**, Universidad de Sevilla.
9. 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., *Chembiochem.*, **2004**, *5*, 55-61.
10. Chevalier F., Angulo J., Lucas R., Nieto P.M., Martín-Lomas M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, *14*, 2367-2376.
11. de Paz J.L., Angulo J., Lassaleta J.M., Nieto P.M., Redondo-Horcajo M., Lozano R.M., Giménez-Gallego G., Martín-Lomas M., *Chembiochem*, **2001**, *2*, 673-685.

Referencias

12. Angulo J., de Paz J.L., Nieto P.M., Martín-Lomas M., *Israel J. Chem.*, **2000**, *40*, 289-299.
13. de Paz J.L., Ojeda R., Reichardt N.C., Martín-Lomas M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, *17*, 3308-3324.
14. Ojeda R., Angulo J., Nieto P.M., Martín-Lomas M., *Can. J. Chem.*, **2002**, *80*, 8, 917-936.
15. Lucas R., Angulo J., Nieto P.M., Martín-Lomas M., *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 2253-2266.
16. Ornitz D., Herr A.B., Nilsson M., Westman J., Svahn C., Waskman G., *Science*, **1995**, *268*, 432-436.
17. Faham S., Hileman R., Fromm J., Linhardt R.J., Rees D., *Science*, **1996**, *271*, 1116-1120.
18. Grabile A., Lax I., Chen D.I., Svanh C.M., Jaye M., Schlessinger J., Hendrickson W.A., *Nature*, **1998**, *393*, 812-817.
19. Nishimura T., Nakatake Y., Konishi M., Itoh N., *Biochim. Biophys.*, **2000**, *1492*, 203-26.
20. Faham S., Linhardt R.J., Rees D.C., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, *8*, 572-586.
21. Walker R., Turnbull J.E., Gallagher J.T., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 31-935.
22. Pellegrini L., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2001**, *11*, 629-634

Referencias

23. Schlessinger J., Plotnikov A.N., Ibrahimi O.A., Eliseenkova A.V., Yeh B.K., Yayon A., Linhardt R.J., Mohammadi M., *Mol. Cell*, **2000**, *6*, 743-750.
24. Pellegrini L., Burke D.F., von Delft F., Mulloy B., Blundell T.L., *Nature*, **2000**, *407*, 1029-1034.
25. van Boeckel A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, *32*, 1671-1690.
26. Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinaÿ P., *Carbohydr. Res.*, **1984**, *130*, 221-241.
27. Sinaÿ P., Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., *Carbohydr. Res.*, **1984**, *132*, C5-C9.
28. Petitou M., Jacquinet J.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., *Carbohydr. Res.*, **1986**, *147*, 221-236.
29. van Boeckel C.A.A., Beetz T., Vos J.N., de Jong A.J.M., van Aelst S.F., van den Bosh R.H., Mertens J.M.R., van der Vlugt F.A., *J. Carbohydr. Chem.*, **1985**, 293-321.
30. Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri J., Jacquinet J.C., Sinaÿ P., *Carbohydr. Res.*, **1987**, *167*, 67-75.
31. Petitou M., Jaurand G., Derrien M., Choay J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, *1*, 95-98.
32. Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Sinaÿ P., *Carbohydr. Res.*, **1998**, *179*, 163-172.

Referencias

33. Lucas H., Basten J.E.M, van Dinther T.H.G., Meuleman D.G., van Aelst S.F., van Boeckel C.A.A. , *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 8207-8228.
34. Grootenhuis P.D.J., van Boeckel C.A.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 2743-2747
35. Sakairi N., Basten J.E.M., van der Marel G. A., van Boeckel C. A.A., van Boom J. H., *Chem. Eur. J.*, **1997**, *2*, 1007-1013.
36. Petitou M., Duchaussoy P., Jaurand G., Gourvenec F., Lederman I., Strassel J., Barzu T., Crepon B., Herault J., Lormeau J., Bernat A., Herbert J., *J. Med. Chem*, **1997**, *40*, 1600-1607.
37. Petitou M., Duchaussoy P., Driguez P., Jaurand G., Herault J., Lormeau J., Van Boeckel C. A. A., Herbert J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 3009-3014.
38. Das S.K., Mallet J.M., Hernault J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1670-1673.
39. Das S.K., Mallet J.M., Hernault J., *Chem. Eur. J.*, **2001**, *22*, 4821-4834.
40. Tabeur C., Mallet J. M., Bono F., Herbert J. M., Petitou M., Sinaÿ P., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 2003-2012.
41. Kovensky J., Duchaussoy P., Petitou M., Sinaÿ P., *Tetrahedrom Asymetry*, **1996**, *7 (11)*, 3119-3128.
42. Kovensky. J., Duchaussoy P., Bono F., Salmivirta M., Sizun P., Herbert., J. M., Petitou M., Sinaÿ P., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 1567-1580

Referencias

43. La Ferla B., Lay L., Guerrini M., Poletti L., Panza L., Russo G., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 9867-9880.
44. Poletti L., Fleischer M., Vogel C., Guerrini M., Torri G., Lay L., *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, *14*, 2727-2734.
45. Lee J.C., Lu X.A., Kulkarni S.S., Wen Y.S., Hung S.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 476- 477
46. Poletti L., Fleisher M., Vogel C. M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, *14*, 2727-2734
47. Haller M.F., Boons G.J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, *13*, 2033-2038.
48. Poletti L., Lay L., *Eur. Org. Chem.*, **2003**, *16*, 299-3024.
49. Sisu E., Tripathy S., Mallet J.M., *Biochemie*, **2003**, *85*, 91-99
50. Orgueira H.A., Bartolozzi A., Schell P., *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 140-169.
51. Koshida S., Suda Y., Sobel M., Kusumoto S., *Tetrahedron Letters*, **2001**, 1289-1292
52. Dreef-Tromp C.M., Willens H.A.M., Westerduin P., van Veelen P., van Boeckel C.A.A., *Biorg. Med. Chem. Letters*, **1997**, *7(9)*, 1175-1180.
53. Douglas S.P., Withfield D.M., Krepinsky J.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 5095
54. Seeberger P.H., Haase W.C., *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4349-4393
55. Danishefsky S.J., Bilodeau M.T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 1380-1400

Referencias

- 56., Seeberger P.H., Bilodeau M.T., Danishefsky S.J., *Aldrichimia Acta*, **1997**, *30*, 75-92
57. Wang Z.G., Douglas S.P., Krepinsky J.J., *Tetrahedron Letters*, **1996**, *39*, 6985-6988
58. Zhu T., Boons G.J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, 1898-1900
59. Ito Y., Kanie O., Ogawa Y., *Angew. Chem.*, **1996**, *35*, 2510-2512
60. Kanie O., Ito Y., Ogawa T., *J. Amer. Chem. Soc.*, **116**, 1273-12074
61. Merrifield R.B., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, 799-816
62. Bayer E., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 113-147
63. *Argonaut Technologies*, 887 Industrial Road, Suite G, San Carlos, CA, USA.
64. Eby R., Schuerch C., *Carbohydr. Res.*, **1975**, *39*, 151-155
65. Veeneman G.H., Brugghe H.F., van der Elst H., Van Boon J.H., *Carbohydr. Research*, **1990**, *195*, C1-C4
66. Heckel A., Mross E., Jung K.H., Rademann J., Schmidt R.R., *Synlett*, **1998**, *2*, 171-173
67. Krepinsky J.J., *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*, **1996**, *Vol 1, Cap. 9*, Harwood Academic Publisher.
68. Gravert D.J., Janda K.D., *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 489-509
69. Malmstroem E., Johansson M., Hult A., *Macromolecules*, **1995**, *28*, 1698-1703

Referencias

70. Hanessian S., Huynh H.K., *Synlett*, 1999, 1, 102-104
71. Shimizu H., Ito Y., Kanie O., Ogawa T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 2841-2846
72. Knoll F.E.K., Morphy R., Rees D., Gani D., *Tetrahedron Letter*, 1997, 38, 8573-8576
73. James I.W., *Tetrahedron*, 1999, 55, 4855-4946
74. Nicolaou K.C., Watanabe N., Li J., Pastor J., Winssinger N., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1998, 37, 1559-1561
75. Nicolaou K.C., Winssinger N., Pastor J., DeRoose F., *J. Am. Soc.*, 1997, 119, 449-450.
76. Schleyer A., Medal M., Manat R., Paulsen H., Bock K., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, 36, 1976-1978.
77. Chiu S.H.L., Anderson L., *Carbohydr. Research.*, 1976, 50, 227-238.
78. Rademann J. Schmidt R.R., *J. Org. Chem.*, 1996, 62, 3650-3653
79. Fukase K., Nakai Y., Egusa K., Porco J.A., Kusumoto S., *Synlett*, 1999, 7, 1074-1078.
80. Douglas S.P., Whitfield D.M., Krepinsky J.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 2116-2117
81. Andrade R.B., Plante, O.J., Melean L.G., Seeberger P.H., *Org. Lett.* 1999, 1, 1811-1814.
82. Yan L., Taylor C.M., Goonow R., Kahne, D., *J. Am Chem Soc.*, 1994, 116 (15), 6953-6954

Referencias

83. Danishefsky S.J., Bilodean M.T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 1380-1419
84. Rodebaugh, R.; Joshi, S., Fraser-Reid, B., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 5660- 5661
85. Andrade R.B., Plante O.J., Melean L.G., Seeberger P., *Organics Letters*, **1999**, *1*, 1811-1814
86. Brown A.R., Hermkens P.H.H., Ottenheijm H.C.J., *Synlett*, **1998**, *8*, 817.
87. Excoffier G., Gagnaire D., Utille J.P., *Carbohydr. Res.*, **1975**, *39*, 368-373
88. Schmidt R.R., Kinzy W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1994**, *50*, 21-123.
89. Halcomb, Huang H., Wong C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 11315-11322.
90. Ojeda R., de Paz J.L., Martín-Lomas M., Lassaleta J.M., *Synlett*, **1999**, *8*, 1316-1318
91. Lubineau L., Garvard O., Alais J., Bonaffé D., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 307-311.
92. Vasella A., Witzig C., Martín-Lomas M., Chiara J.L., *Hel. Chim. Acta*, **1991**, *74*, 2073-2077.
93. Alper P.B., Hung S.C., Wong C.H., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6029-6032.

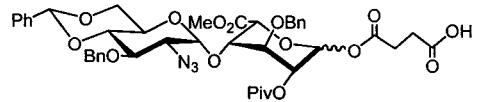
Referencias

94. a) Reichardt N.C., *Tesis Doctoral*, **2004**, Universidad de Sevilla/Universidad de Konstanza. b) Reichardt N.C, Martín-Lomas M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 4674-4677
95. Bodanszky M., *Principles of Peptide Synthesis*. 2nd Edition, Springer Laboratory, **1993**, 39-52
96. Verduyn R., van der Klein P.A.M., Douwes M., van der Marel G.A., van Boom J.H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **1993**, *112*, 464-466
97. Boons G.J., Castle G.-J., Clase J.A., Grice P, Ley S.V., Pinel C, *Synlett*, **1993**, 913-914.
98. David S., Hanessian S., *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 643
99. Pereyre M., Quintard J.-P., Rahm A., *Tin in Organic Synthesis*, Butterworths, London, **1987**, 261-285
100. Baumhof P., Mazitschek R., Giannis A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3672-3674
101. Ito Y., Manabe S., *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 3077
102. Egusa K., Kusumoto S., Fukase K., *Synlett*, **2001**, 777
103. Zhang S.Q., Fukase K., Izumi M., Fukase Y., Kusumoto S., *Synlett*, **2001**, 590
104. Miura T., Hirose Y., Ohmae M., Inazu T., *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 3947
105. Palmacci E.R., Hewitt M.C., Seeberger P.H., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4433

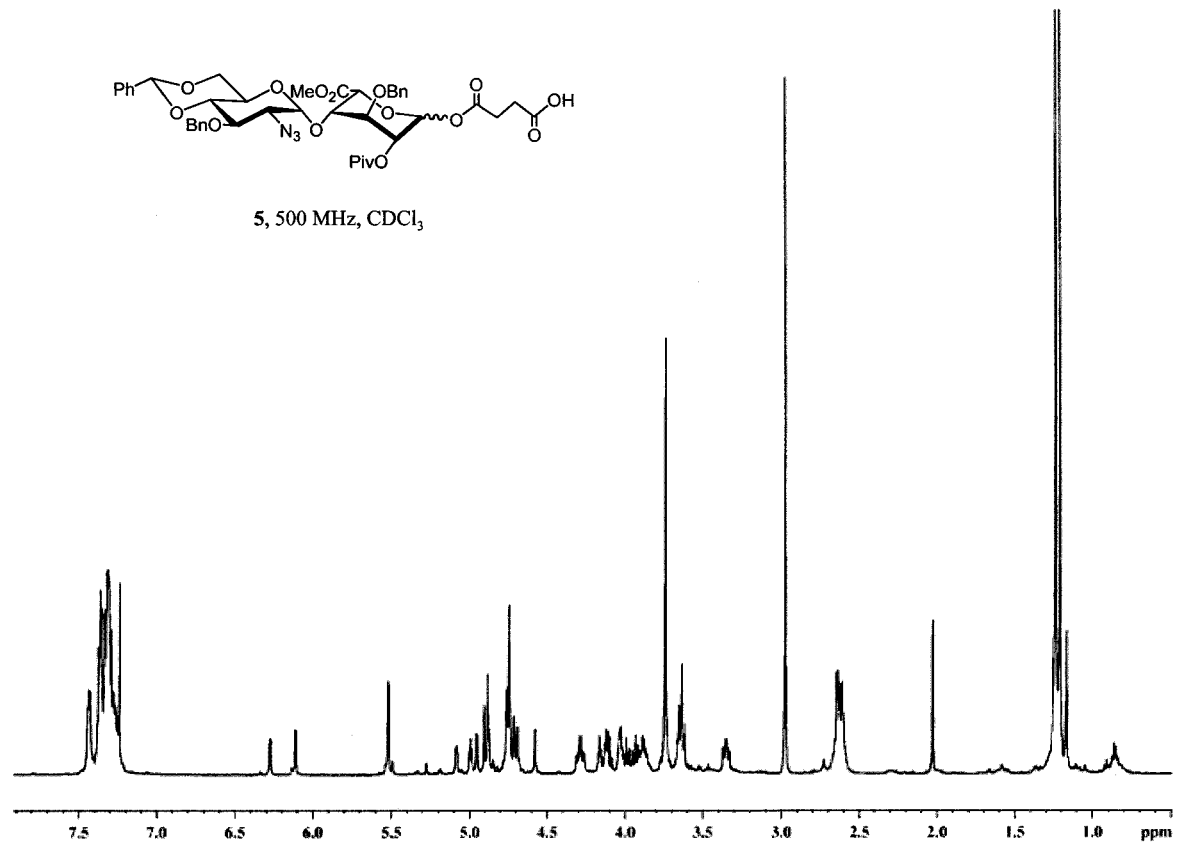
Referencias

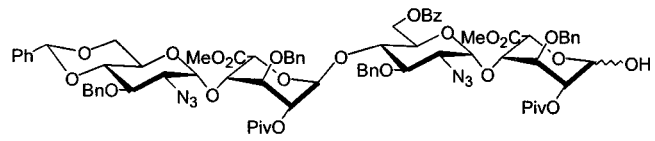
106. Ando H., Manabe S., Nakara Y., Ito Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4725
107. Kirschning A., Moneschein H., Wittenberg R., *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 4445.
108. Rochepeau-Jebron L., Jacquinet J.C., *Carbohydr. Res.*, **1998**, *305*, 181-191
109. Lucas H., Basten J.E.M., van Dinther T.G., Meuleman D.G., van Aest S.F., van Boeckel C.A.A., *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 8207-8228
110. Petituo M., Jacquinet J.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinaÿ P., *Carbohydr. Res.*, **1987**, *167*, 67-75.
111. Garegg P.J., Hultberg H., Walling S., *Carbohydr. Res.*, **1982**, *108*, 97-101
112. Nicolaou K.C., Webber S.E., *Synthesis*, 1986, 453

CAPÍTULO VII:
ANEXO DE ESPECTROS

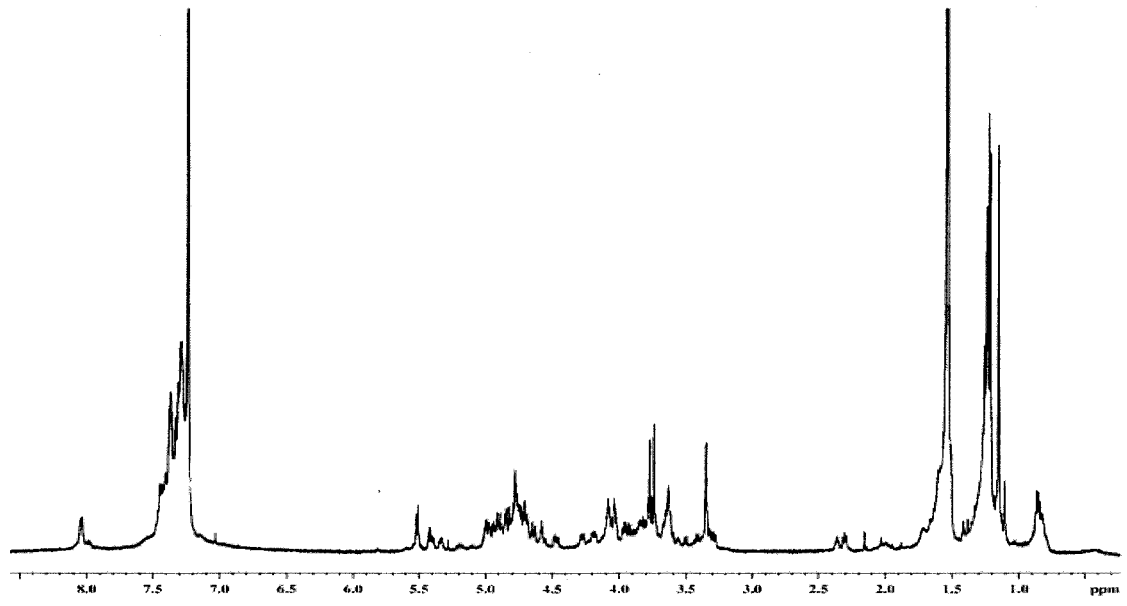


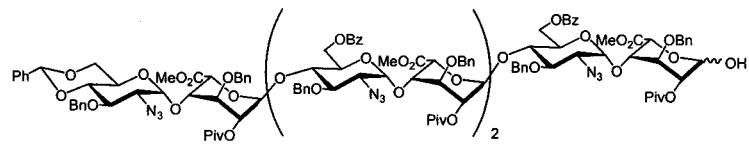
5, 500 MHz, CDCl₃



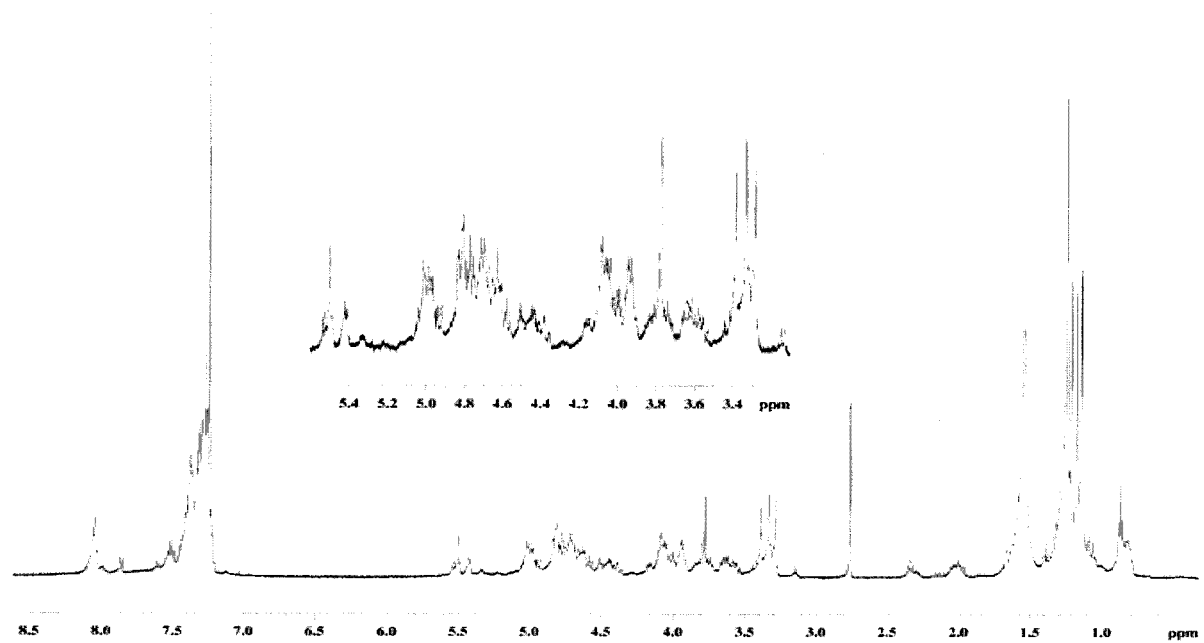


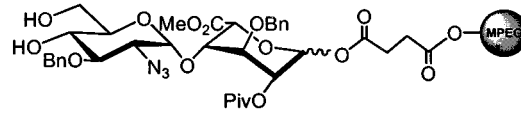
11, 500 MHZ, CDCl₃



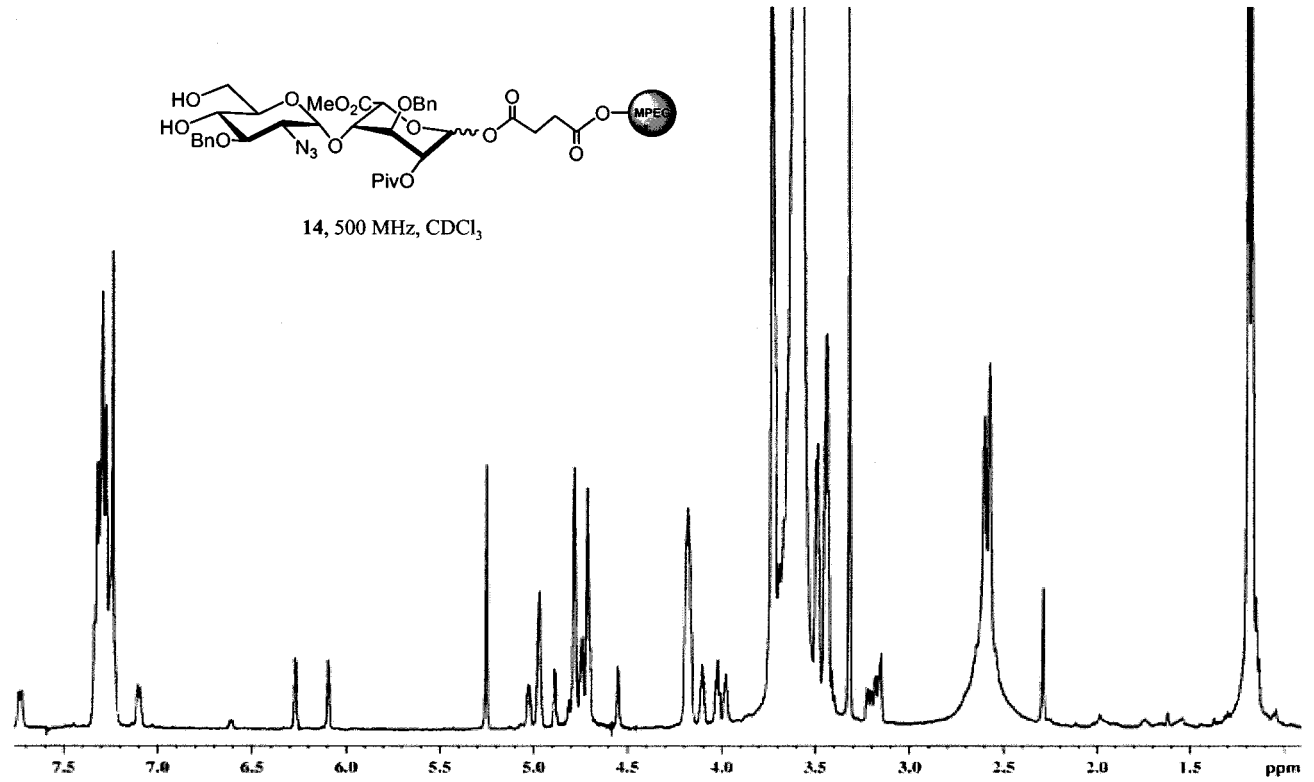


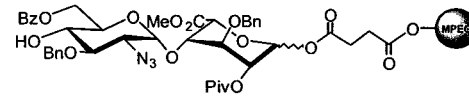
12, 500 MHz, CDCl₃



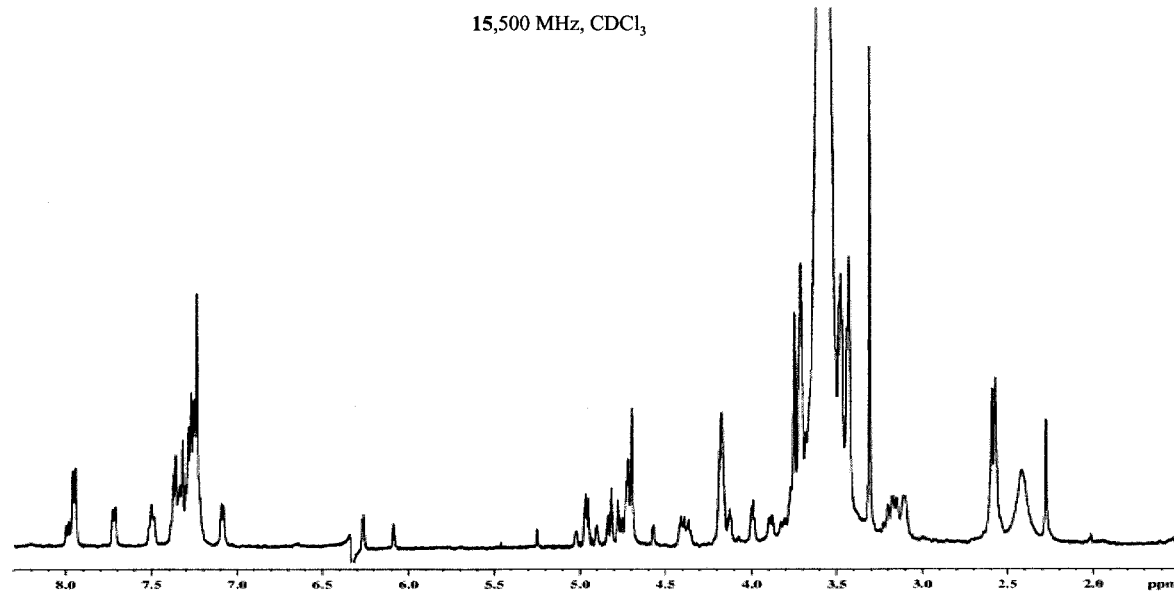


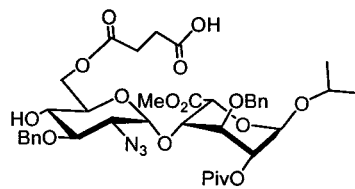
14, 500 MHz, CDCl₃



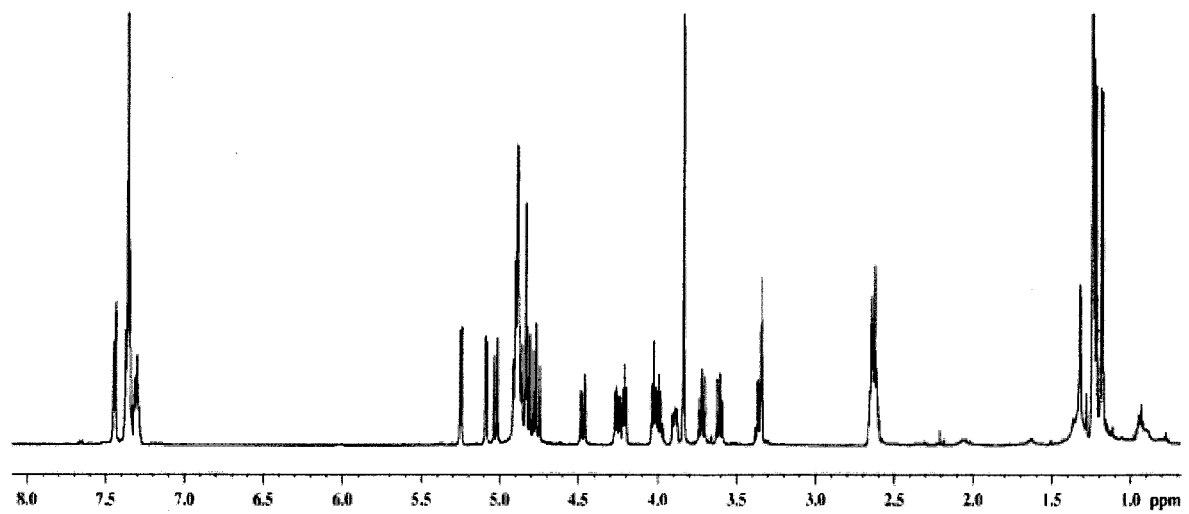


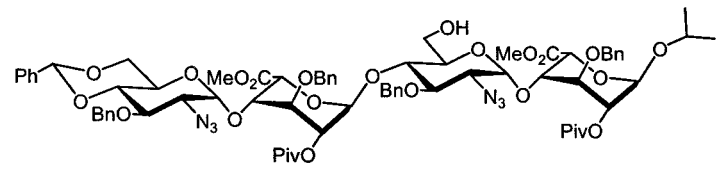
15,500 MHz, CDCl₃



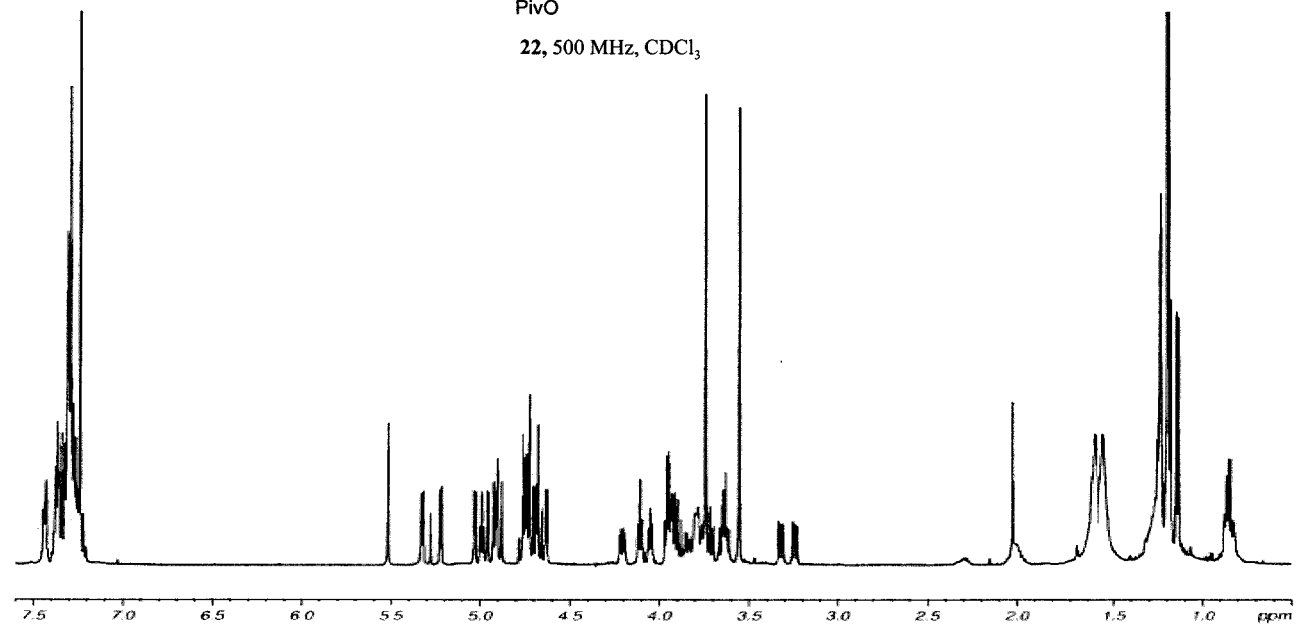


19, 500 MHz, MeOD

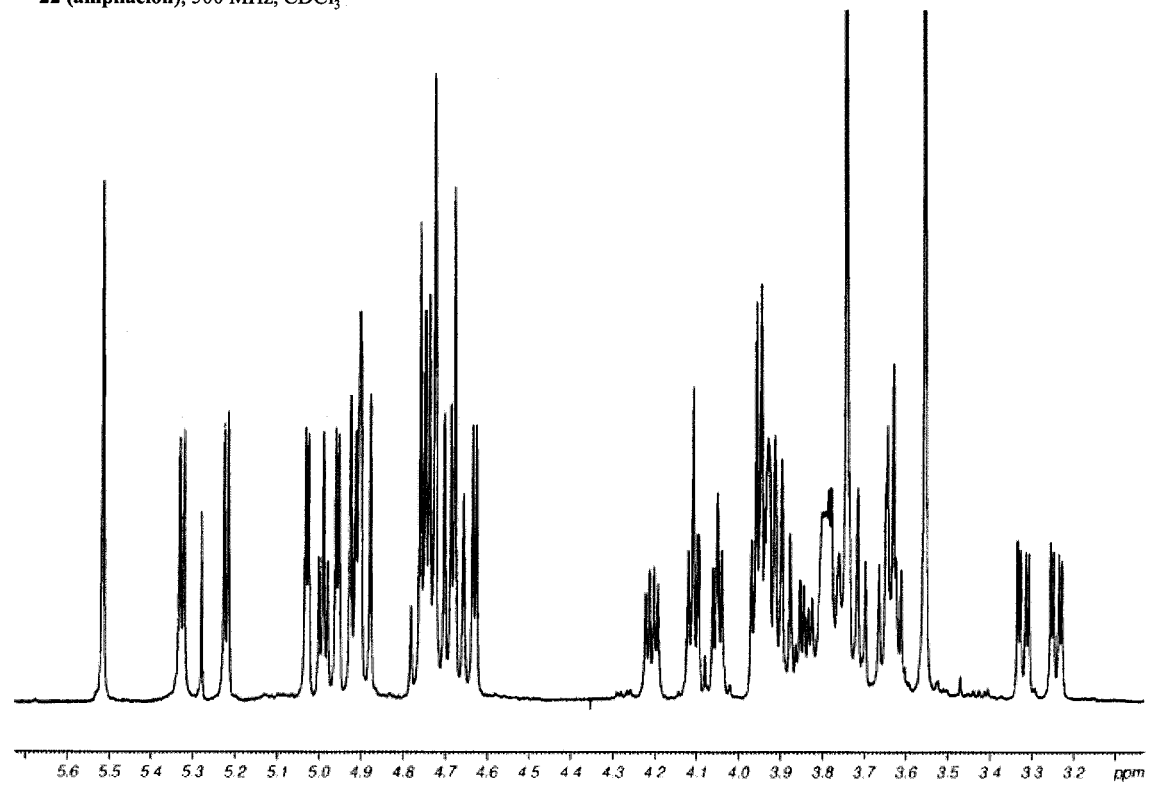




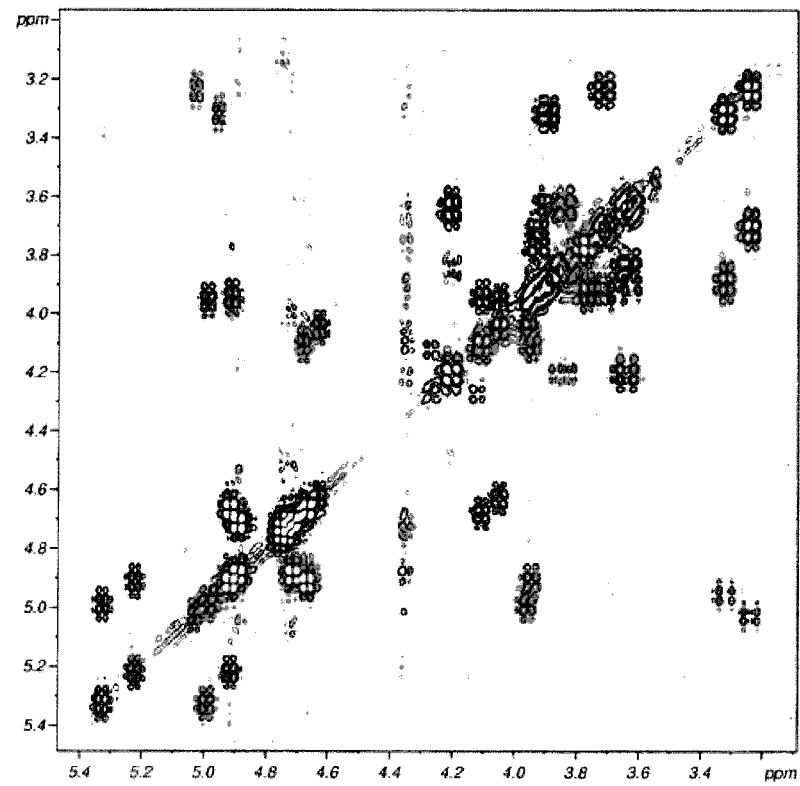
22, 500 MHz, CDCl₃

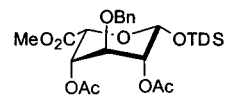


22 (ampliación), 500 MHz, CDCl₃

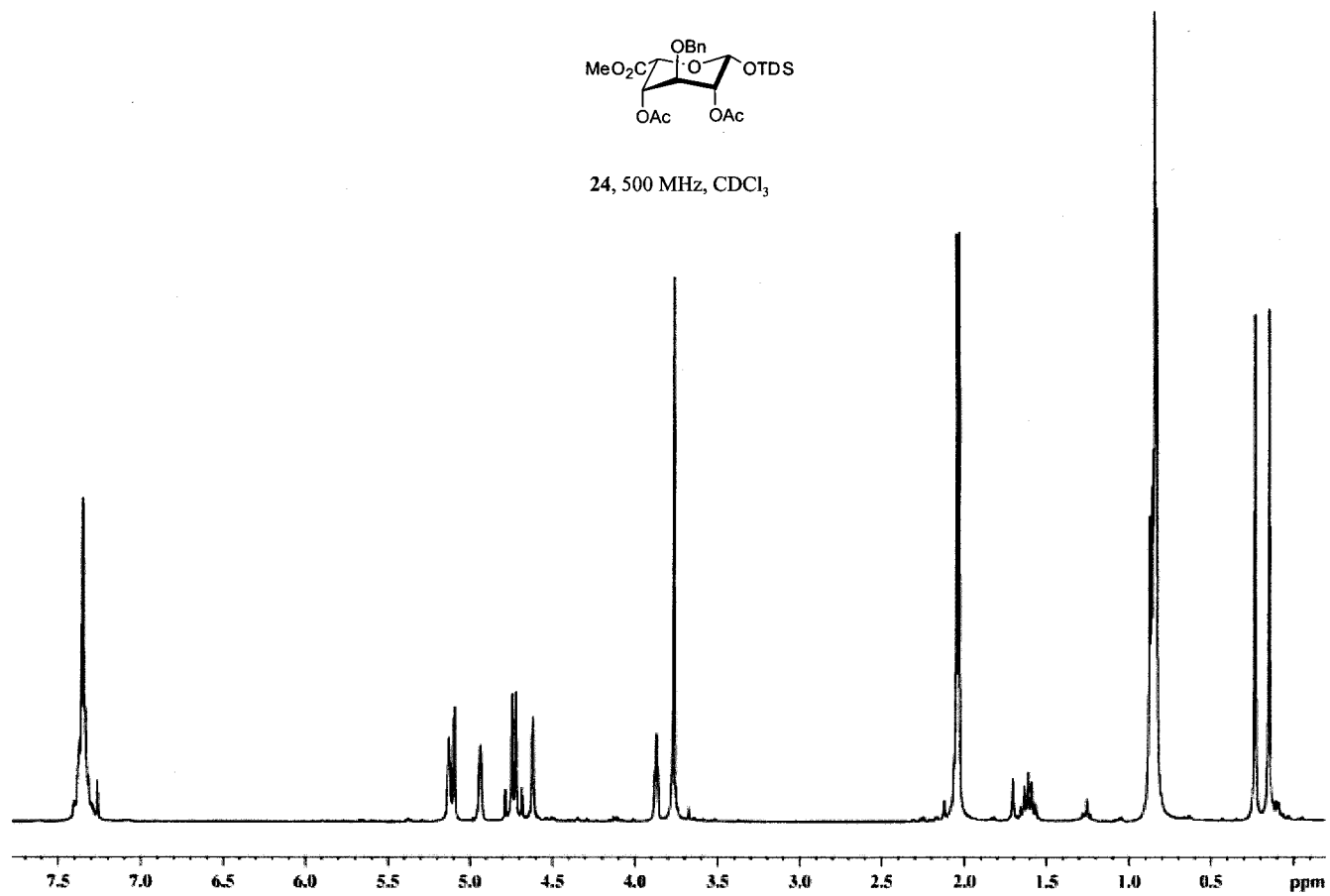


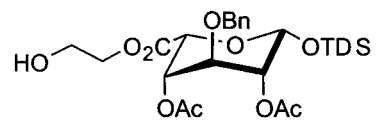
22, COSY, 500 MHz, CDCl₃



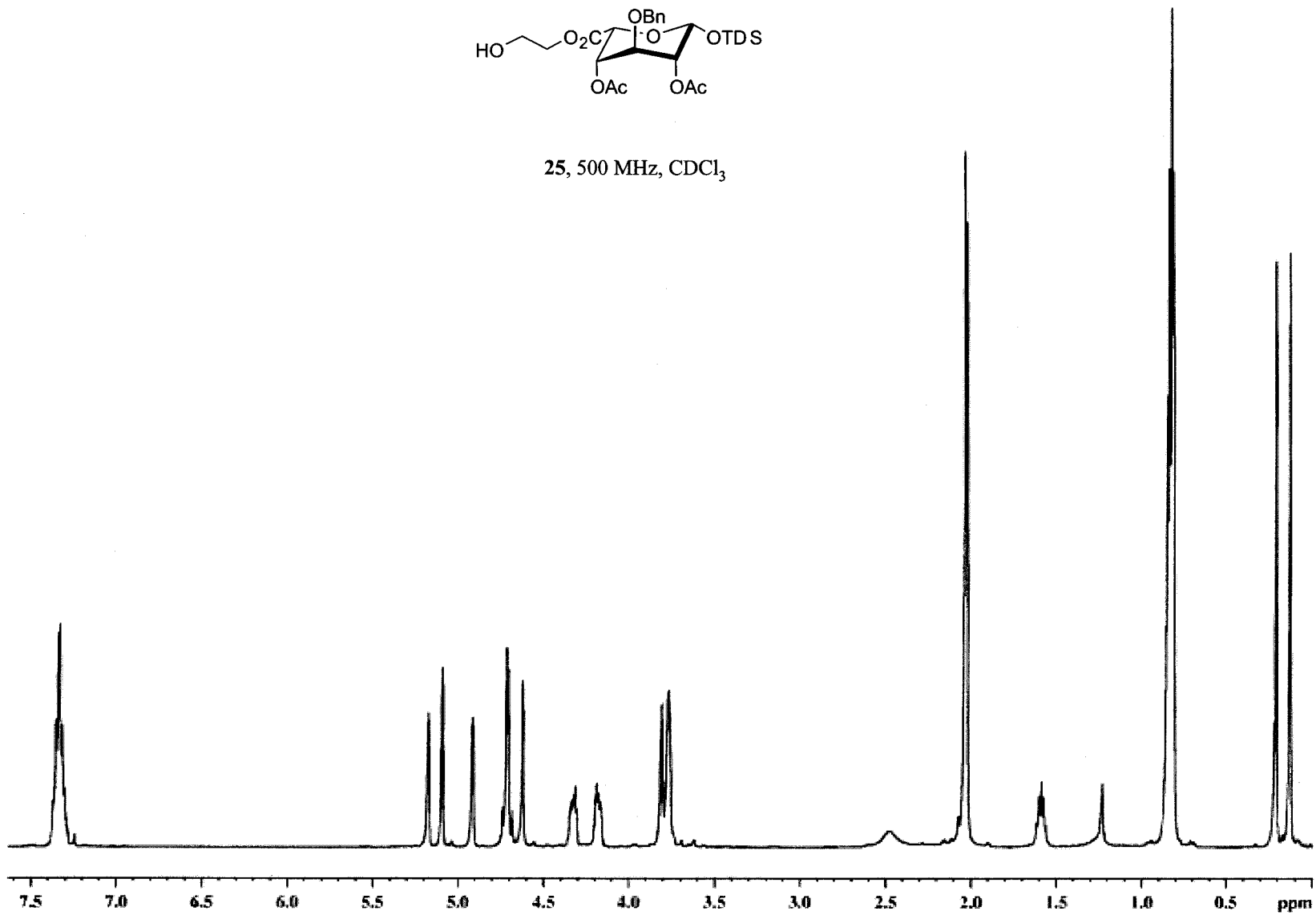


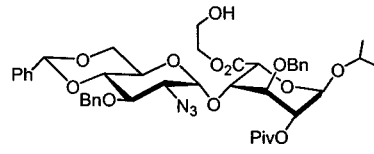
24, 500 MHz, CDCl₃



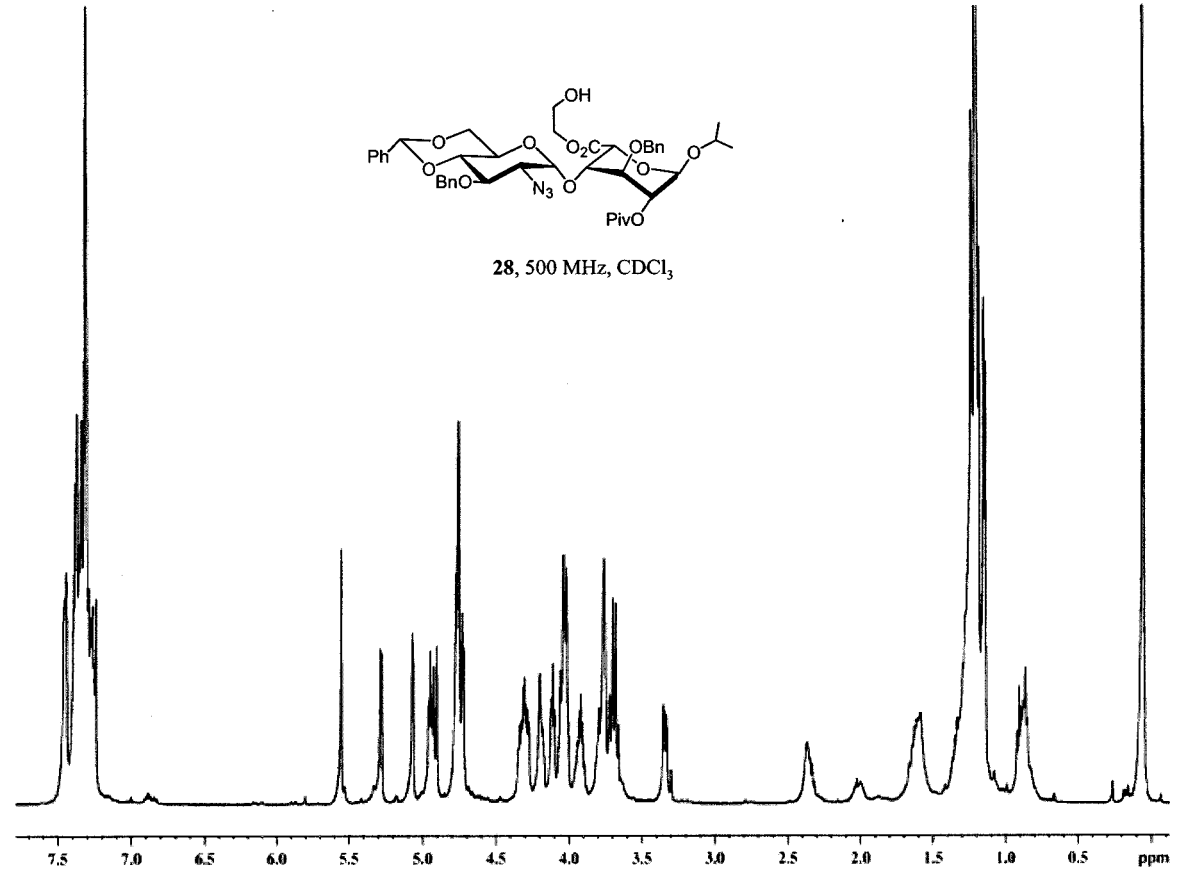


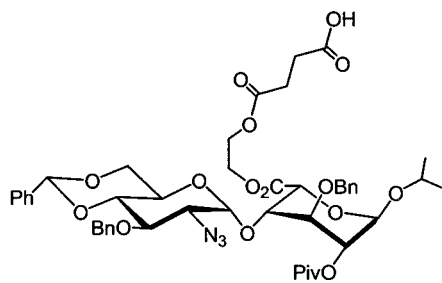
25, 500 MHz, CDCl₃



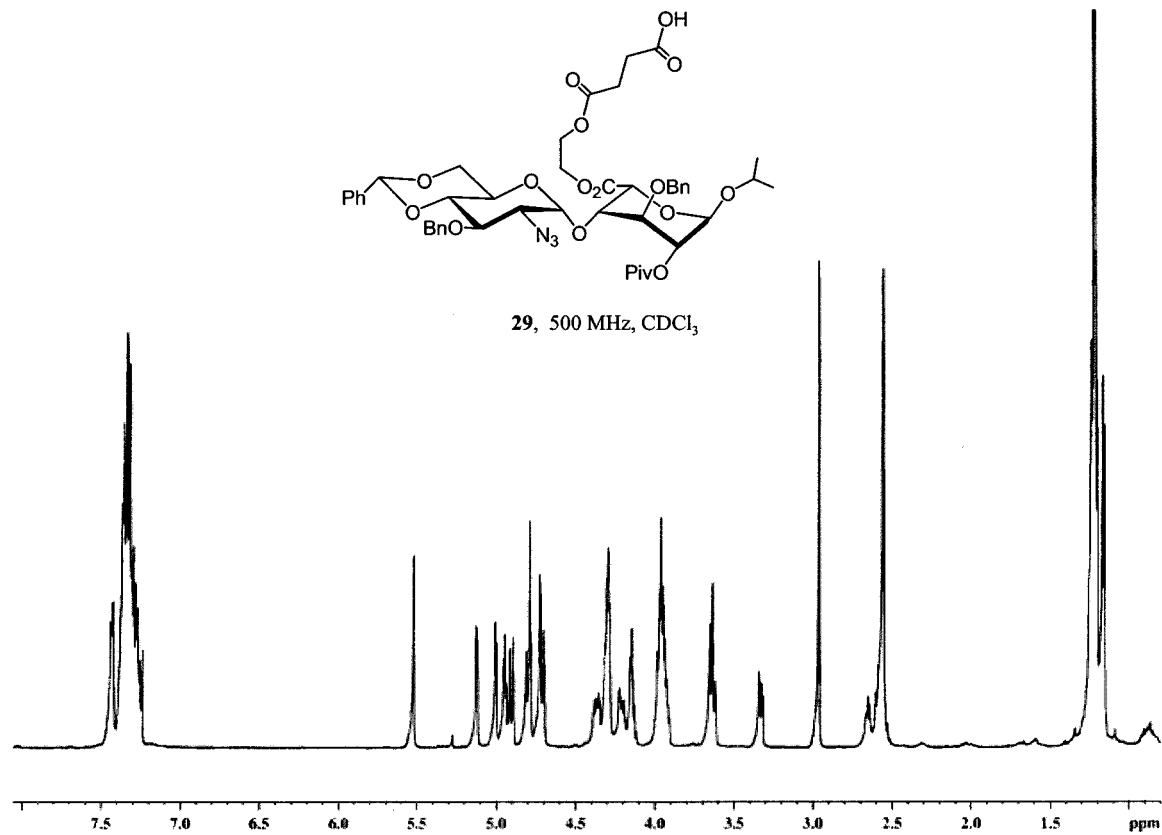


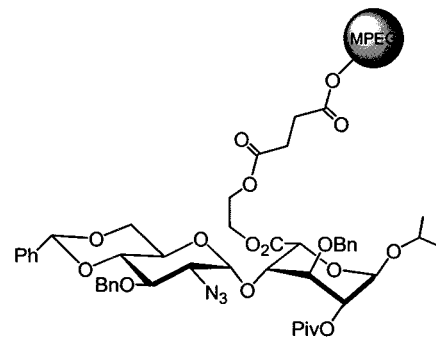
28, 500 MHz, CDCl₃



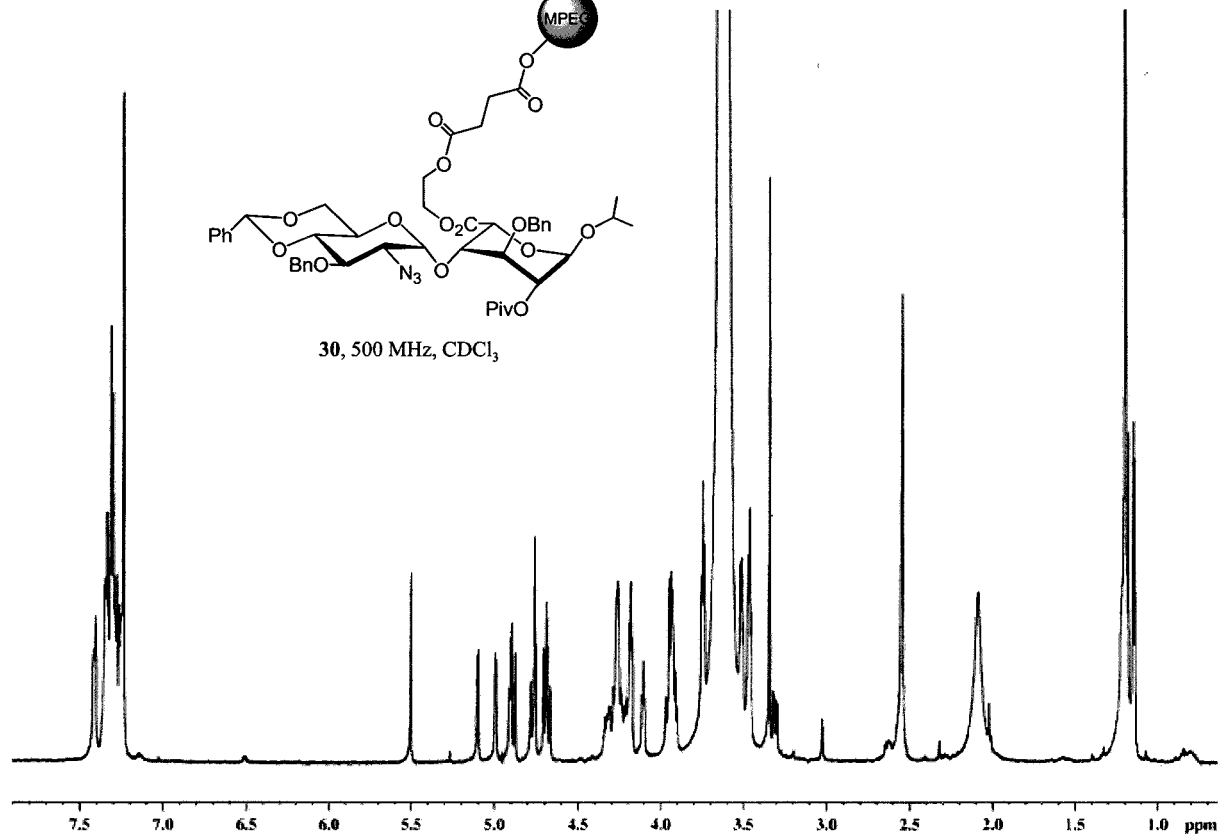


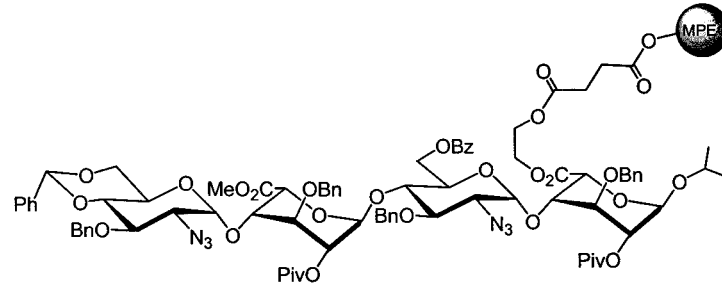
29, 500 MHz, CDCl₃



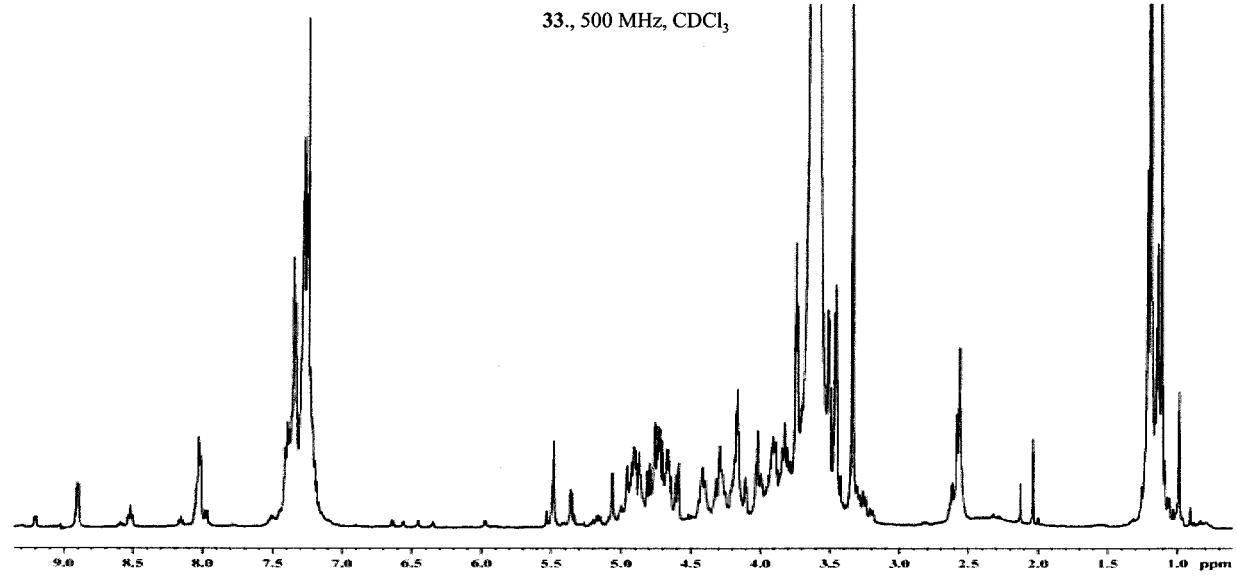


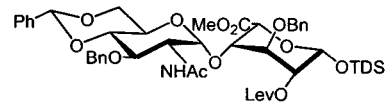
30, 500 MHz, CDCl₃



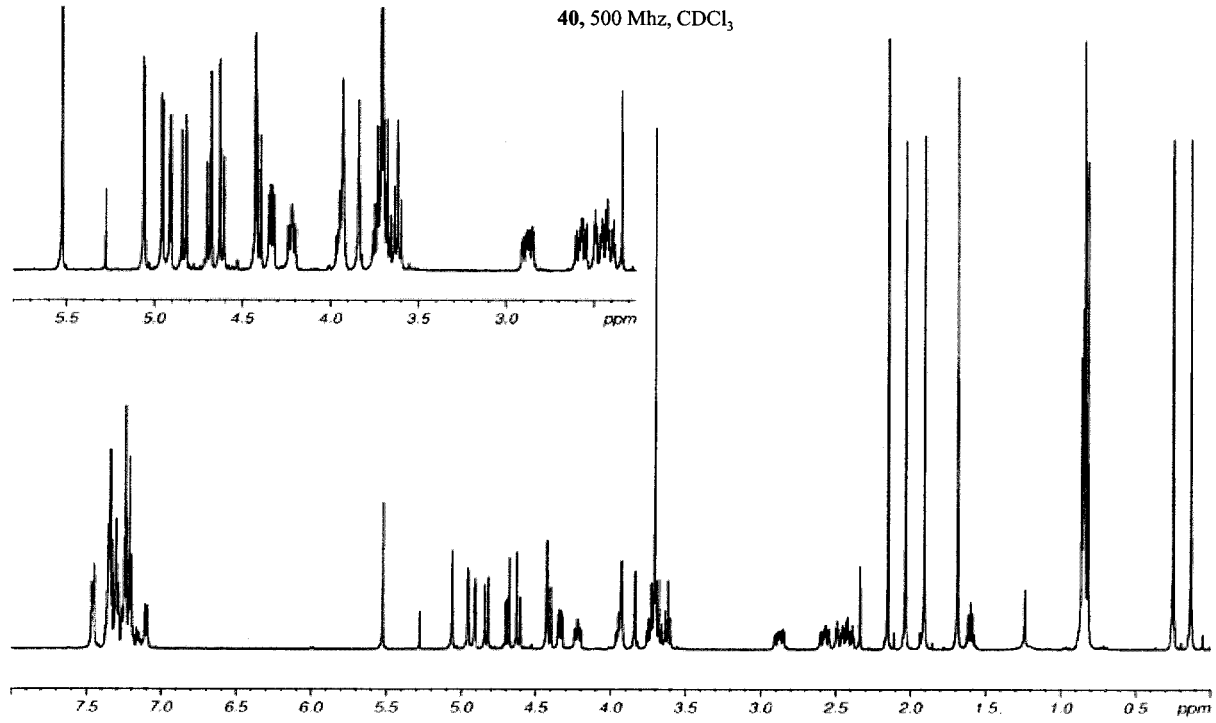


33., 500 MHz, CDCl₃

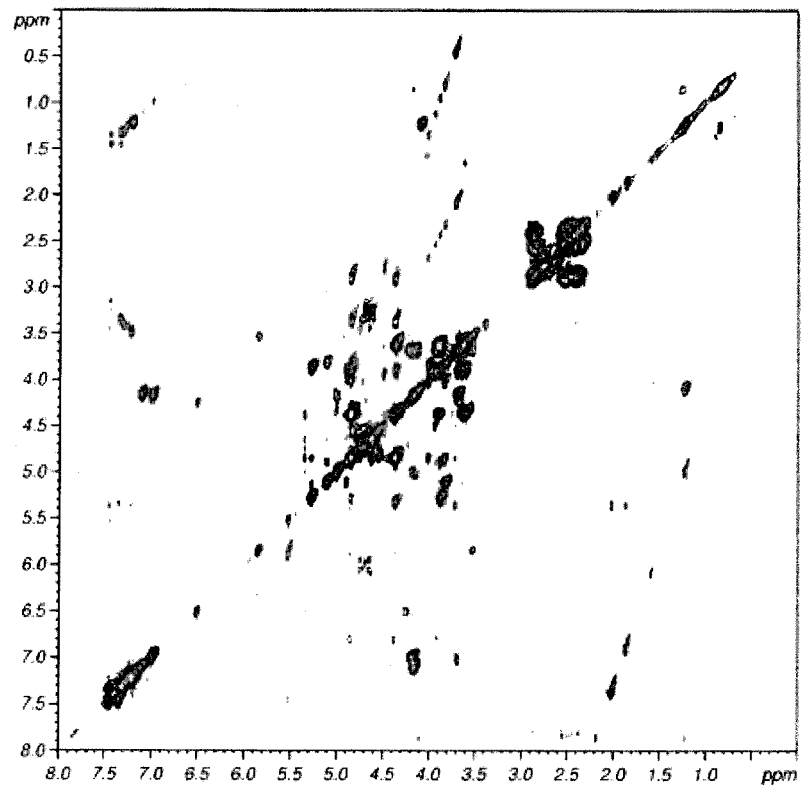


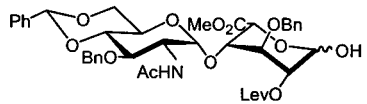


40, 500 Mhz, CDCl₃

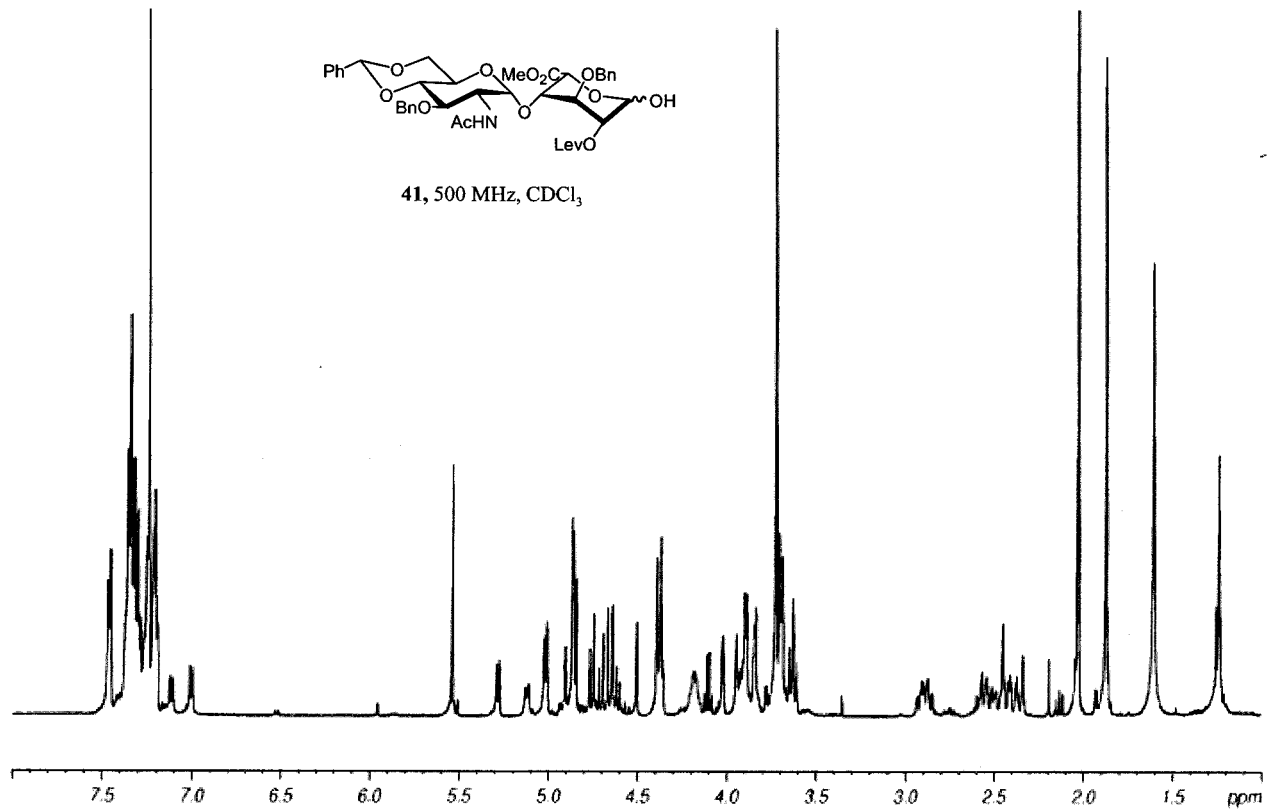


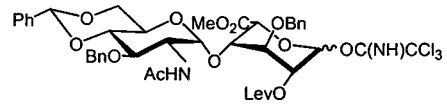
40, COSY, 500 MHz, CDCl₃



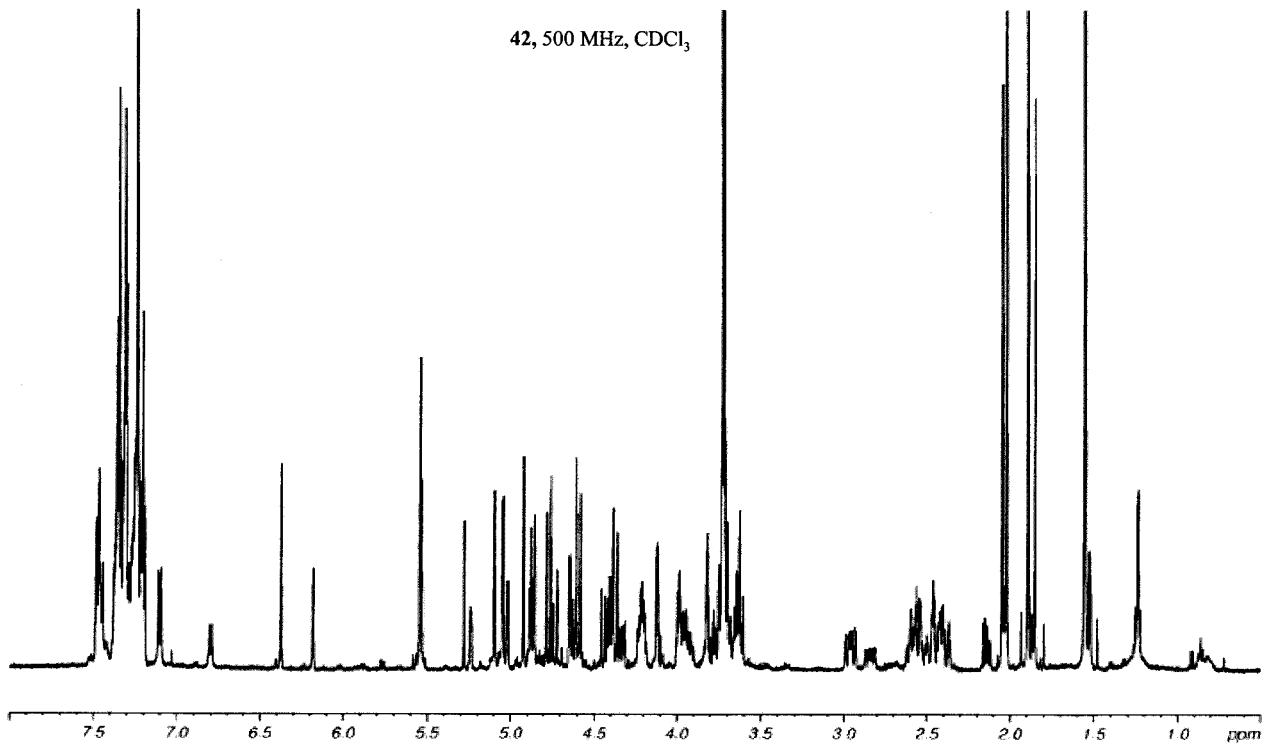


41, 500 MHz, CDCl₃

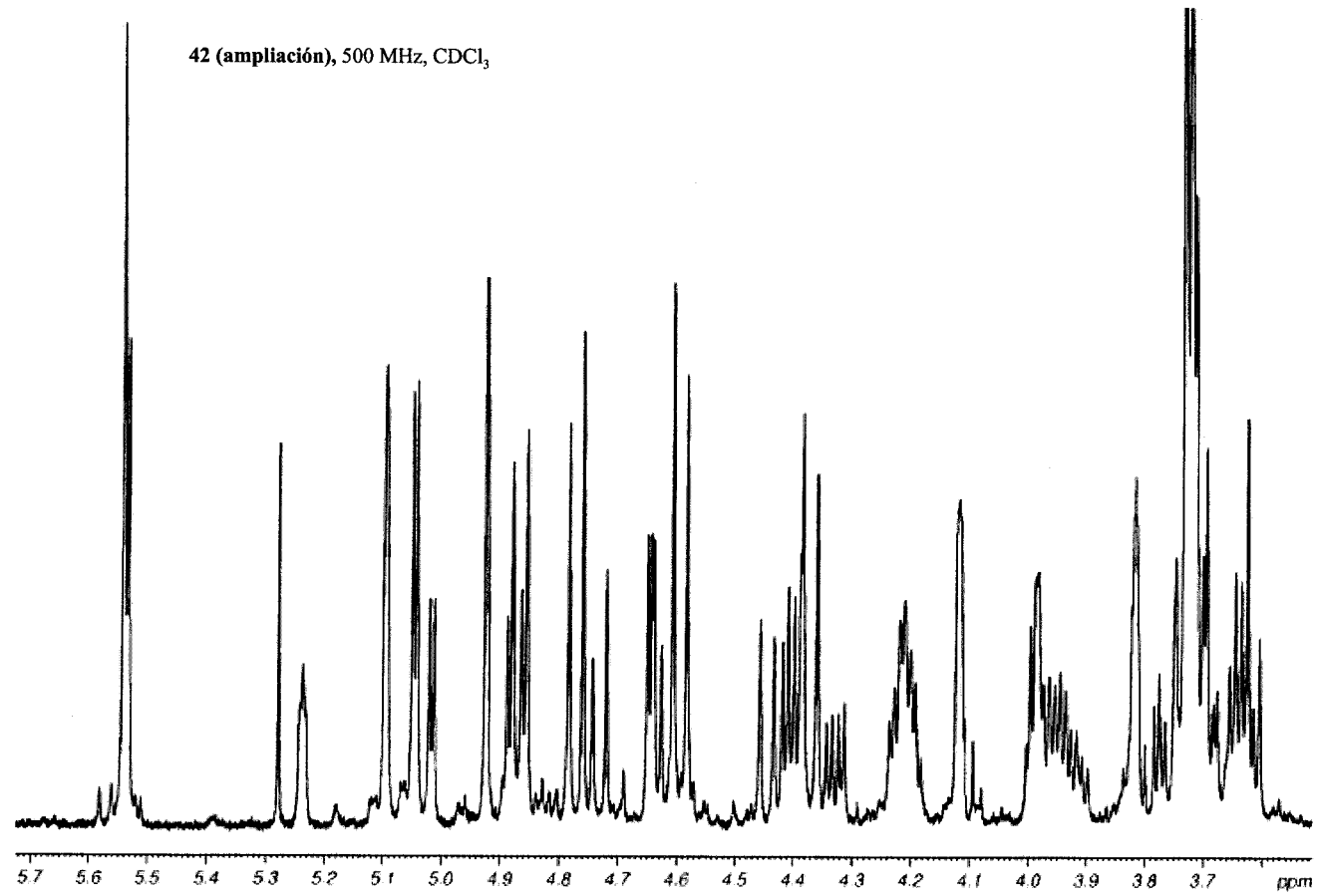




42, 500 MHz, CDCl₃



42 (ampliación), 500 MHz, CDCl₃



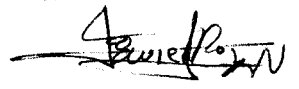
Olimpia Terenti Fernández
Estudios sobre la sintaxis en fase sólida
de oligonucleótidos de tipo heparina

Sobresaliente cum laude


por unanimidad

2004

Vocal



Doctorado


El Presidente,

