

T/802

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS ISLA DE LA CARTUJA

DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**ACTIVACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO PARA
FIBROBLASTOS POR GLICOSAMINOGLICANOS:
SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
OLIGOSACÁRIDOS DE LA REGIÓN REGULAR DE LA
HEPARINA**

José Luis de Paz Carrera

Sevilla, 2000

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS**

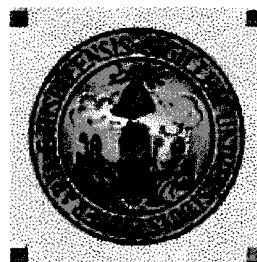
Queda registrado este Título de Doctor al
folio 147 número 245 del libro
correspondiente.

Sevilla, **19 JUN. 2000**

El Jefe del Negociado.



1346557



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

**DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**ACTIVACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO PARA
FIBROBLASTOS POR GLICOSAMINOGLICANOS:
SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
OLIGOSACÁRIDOS DE LA REGIÓN REGULAR DE LA
HEPARINA**

**MEMORIA presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por
José Luis de Paz Carrera.**

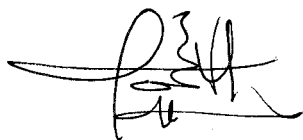
Sevilla, Junio de 2000

D. MANUEL MARTÍN LOMAS, Profesor de Investigación del C.S.I.C. y

D. JOSÉ MARÍA LASSALETTA SIMON, Colaborador Científico del C.S.I.C.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado: *“Activación de Factores de Crecimiento para Fibroblastos por glicosaminoglicanos: Síntesis, estructura y actividad biológica de oligosacáridos de la región regular de la heparina”* ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja (Sevilla) durante los años académicos 1996-1997, 1997-1998, 1998-1999, 1999-2000, constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. José Luis de Paz Carrera para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Junio de 2000



Fdo.: José María Lassaletta Simon



Fdo.: Manuel Martín Lomas

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con ayuda de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Cultura. El trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (proyecto PB96-0820).

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Químicas bajo la dirección del Profesor D. Manuel Martín Lomas y del Dr. José María Lassaletta Simon, a quienes quiero expresar mi más sincera gratitud. El trabajo presentado en esta memoria no hubiera sido posible sin los valiosos consejos de mis directores, a los que agradezco profundamente todo el interés, apoyo y dedicación que me han brindado durante estos años.

Agradezco también a la Dra. Pastora Borrachero Moya, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de Sevilla, por haber aceptado ser tutora de esta Tesis Doctoral.

Asimismo agradezco al Profesor D. Guillermo Giménez Gallego del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. por la realización de los ensayos biológicos que se han llevado a cabo con las moléculas sintetizadas en este trabajo.

Estoy especialmente agradecido al Dr. Pedro Nieto Mesa, por su interés y disponibilidad durante todos estos años, en especial en el tramo final de esta Tesis, por permitirme colaborar en los estudios estructurales que se han llevado a cabo con los productos sintetizados y que forman parte de la Tesis Doctoral de Jesús Angulo Alvarez.

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento a los Dres. Soledad Penadés, Julio Delgado, Luz Cadenas, Ricardo Pérez, Ezequiel Quintana, José Manuel García, Noureddine Khiar, Eleuterio Alvarez y Dácil Zurita por sus valiosos consejos y aportaciones y por haber estado siempre dispuestos a ayudarme.

De manera especial quiero recordar a mis compañeros de grupo Rafa, Ricardo, Jesús y Niels por la ayuda y amistad que me han ofrecido a lo largo de estos años y por los buenos (y malos) momentos que hemos compartido. Sin duda, todos han contribuido decisivamente a la realización de esta Tesis.

Por supuesto que también quiero recordar al resto de compañeros del Instituto que en todo momento me han mostrado su apoyo, ayuda y amistad y con

los que he disfrutado de muchos buenos momentos, Salud, María, Regine, Cristina, Jean-Luc, Emmanuel, Stephanie, Juanma, Juan Antonio, Jesús, Mercedes, Iñaki, Mari Carmen, Tere, Héctor, Isabel, Lizeth, Marcello, Belén, Javi, Julia, Félix, José Luis, Africa, Paco, Florence, Stéphane, Mar, Cristina, Eva, Javier.

Por último, quiero agradecer a mis familiares y amigos por todo el cariño y el apoyo que he recibido durante estos años y por todos los buenos momentos que hemos vivido, sin los que tampoco hubiera sido posible este trabajo.

A mis padres y hermanos

A Rosa

INDICE GENERAL

Abreviaturas	1
Criterios de numeración y nomenclatura en oligosacáridos	3
Prefacio	5
1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	7
1.1 Activación de los Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF's) por heparina	7
1.1.1 Estructura de la heparina	7
1.1.2 Funciones biológicas de la heparina	9
1.1.3 Activación de FGF's por heparina	11
1.1.4 Sitios activos en los FGF's	14
1.1.5 Oligomerización de FGF's inducida por heparina	16
1.1.6 Requerimientos estructurales mínimos de las cadenas de heparina	19
1.2 Antecedentes en la síntesis de oligosacáridos de tipo heparina	21
1.2.1 Síntesis del pentasacárido activante de la AT-III	22
1.2.2 Antecedentes en la síntesis de derivados de ácido L-idurónico	28
1.3 Conformaciones de los anillos de ácido idurónico en la heparina	31
2. OBJETIVO	35
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
3.1 Conceptos básicos en la síntesis química de oligosacáridos	38
3.2 Análisis retrosintético	41
3.3 Síntesis de la unidad de glucosamina 47	47
3.4 Síntesis de la unidad de glucosamina 65	53
3.5 Síntesis de la unidad de ácido L-idurónico 70	57

Indice General

3.6	Síntesis de disacáridos base V	61
3.7	Síntesis del hexasacárido 91	67
3.8	Síntesis de alquilglicósidos derivados	72
3.9	Síntesis del hexasacárido 109	78
3.10	Síntesis del hexasacárido I	83
3.11	Síntesis del octasacárido II	90
3.12	Introducción al estudio de la estructura de I en disolución	96
3.12.1	Espectroscopía RMN: Asignación espectral y estudio preliminar de la interacción con Ca ²⁺	97
3.12.2	Espectroscopía RMN: Análisis conformacional	109
3.12.3	Espectros NOESY: análisis cuantitativo y aspectos dinámicos	112
3.12.4	Modelado molecular	116
3.13	Ensayos de actividad biológica de las moléculas I y II	125
4.	CONCLUSIONES	134
5.	PARTE EXPERIMENTAL	138
5.1	Métodos generales	138
5.2	Síntesis del donador de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranosas 47	140
5.3	Síntesis del donador de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranosas 65	147
5.4	Síntesis del aceptor de ácido L-idurónico 70	152
5.5	Ruta de síntesis del hexasacárido 91	153
5.5.1	Síntesis de derivados disacarídicos GlcN-IdoA	153
5.5.2	Síntesis de derivados tetrasacarídicos relacionados	170
5.5.3	Síntesis de derivados hexasacarídicos relacionados	175
5.6	Ruta de síntesis del hexasacárido I : isopropilglicósidos derivados	182
5.6.1	Síntesis de derivados disacarídicos GlcN-IdoA	182

Indice General

5.6.2	Síntesis de derivados tetrasacarídicos relacionados	189
5.6.3	Síntesis de derivados hexasacarídicos relacionados	193
5.7	Ruta de síntesis del octasacárido II	201
5.7.1	Síntesis de derivados hexasacarídicos relacionados	201
5.7.2	Síntesis de derivados octasacarídicos relacionados	205
5.8	Análisis estructural de I	212
5.8.1	Experimentos de RMN	212
5.8.2	Cálculo de σ_{NOE} y τ_c	213
5.8.3	Mecánica y dinámica molecular	214
5.9	Ensayos de actividad biológica	215

6. ANEXO DE ESPECTROS

ABREVIATURAS

Δ	Calentamiento a reflujo
Ac	Acetilo
Arg	Arginina
AT-III	Antitrombina III
Bn	Bencilo
Bz	Benzoílo
CCF	Cromatografía en capa fina
d	Doblete
DBU	Diazabicycloundeceno
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doble doblete de dobletes
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
Dte	Disolvente
Equiv.	Equivalente
FGF's	Factores de Crecimiento para Fibroblastos
FGF-1	Factor de Crecimiento para Fibroblastos Acido
FGF-2	Factor de Crecimiento para Fibroblastos Básico
FGF-R	Receptor de alta afinidad de FGF's
GAG	Glicosaminoglicanos
GlcA	Acido 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
Gly	Glicina
Hal	Halógeno
IdoA	Acido L-idurónico y derivados en general
1K	1024
m	Multiplete
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
pdp	Producto de partida

Piv	Pivaloflo
pTsOH	Acido <i>p</i> -toluensulfónico
Py	Piridina
Rto	Rendimiento
s	Singulete
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TDS	Texildimetilsililo
THF	Tetrahidrofurano
TM	Tamiz molecular
TMSOTf	Triflato de trimetilsililo
Tr	Tritilo
v/v	volumen/volumen
p/p	peso/peso

CRITERIOS DE NUMERACIÓN Y NOMENCLATURA EN OLIGOSACÁRIDOS

Debido a 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 cada posición en los anillos. A continuación, se indican las normas seguidas en la presente memoria, en cuanto a la numeración y nomenclatura de oligosacáridos.

En el caso de derivados di- y trisacáridicos 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 (también 1'', 2'', etc para trisacáridos) (**figura A**).

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. La numeración de las distintas posiciones de los anillos se ilustra en la **figura A** con un hexasacárido modelo.

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.

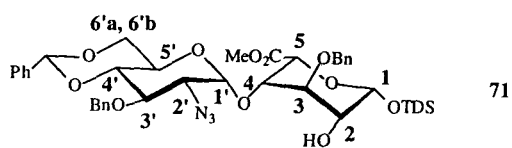
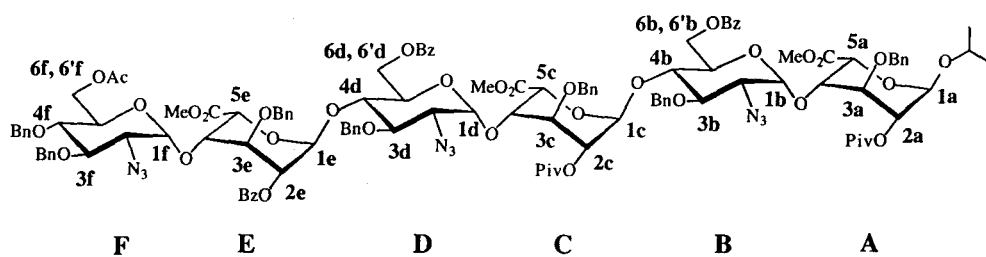
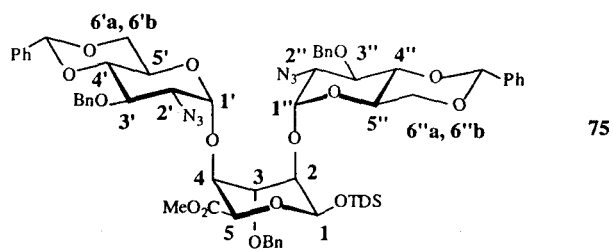


FIGURA A



PREFACIO

Esta Tesis Doctoral se incluye dentro de un proyecto de investigación cuyo objetivo es contribuir al establecimiento del papel que desempeña la heparina en el mecanismo de activación de los Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF's).

En esta memoria se presenta una estrategia sintética flexible y eficaz para la obtención de oligosacáridos cuya estructura responde a la región regular de la heparina. La síntesis de estos fragmentos oligosacarídicos con un elevado grado de pureza ha permitido su utilización en estudios estructurales y de actividad biológica, esenciales para el establecimiento de la naturaleza de las interacciones carbohidrato-proteína en este complejo mecanismo de activación.

La memoria de esta Tesis Doctoral se ha dividido en cinco capítulos. En el capítulo 1 se revisa la bibliografía existente sobre el tema, desde el punto de vista biológico, sintético y estructural. En el segundo capítulo se presenta el objetivo de esta Tesis: la obtención de oligosacáridos de la región regular de la heparina como el hexasacárido **I** y el octasacárido **II**. El capítulo 3 se dedica a la discusión de resultados, incluyendo el análisis retrosintético, la síntesis de las sustancias de partida y la descripción de la ruta sintética empleada en la preparación de los oligosacáridos **I** y **II**. Además; en el apartado 3.12 se introduce el estudio estructural de **I** en disolución y en el apartado 3.13 se recogen los resultados de los ensayos biológicos realizados con las moléculas **I** y **II** en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC). En el cuarto capítulo se enumeran las conclusiones de esta Tesis Doctoral. Por último, en el capítulo 5 se recoge la parte experimental del trabajo.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Activación de los Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF's) por heparina.

1.1.1 Estructura de la heparina.

La heparina es un polisacárido altamente sulfatado y heterogéneo, que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos (GAG)¹. A esta familia también pertenecen otros polisacáridos como el ácido hialurónico, el sulfato de dermatano, el 4- y el 6- sulfato de condroitina y el sulfato de heparano y se caracterizan por ser copolímeros de una hexosamina y un ácido aldurónico. Los distintos GAG se diferencian entre sí en el tipo de ácido aldurónico o hexosamina presentes en la cadena, en la posición y configuración de los enlaces glicosídicos y en el grado y patrón de sulfatación. Por ejemplo, el ácido urónico mayoritario en la heparina es el ácido L-idurónico mientras que en el sulfato de condroitina es predominante el ácido D-glucurónico; la heparina contiene mayoritariamente grupos sulfato en las posiciones 2 de los anillos de ácido urónico mientras que en el sulfato de heparano dicha posición no está sulfatada; etc.

La estructura de la heparina^{1,2,3} (**figura 1**) está formada por cadenas polisacáridicas que consisten en la repetición de una secuencia disacáridica base, constituida por una unidad de ácido urónico y una unidad de glucosamina unidas por un enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$. La heparina presenta una alta heterogeneidad, y dependiendo de la longitud de la cadena, se han descrito preparaciones de heparina que contienen hasta 30 unidades disacáridicas distintas, formadas por combinaciones de 10 monosacáridos (4 ácidos urónicos y 6 glucosaminas). Como consecuencia de numerosos trabajos de investigación encaminados a la elucidación de la estructura de este polisacárido natural, se pueden distinguir en ella dos regiones claramente diferenciadas (**figura 1**). En primer lugar, la región regular que está constituida por la repetición del disacárido trisulfatado α -IdoA-

1 Casu B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1985, 43, 51-134.

2 Petitou M., *ACS Symposium Series*, 1994, 560, 90-103.

3 Conrad, H.E., *Heparin Binding Protein*, 1998 (Academic Press, San Diego).

Por otro lado, en la llamada región irregular aparecen otros monosacáridos: α -IdoA, β -GlcA, β -GlcA-(2-OSO₃), α -GlcNAc-(6-OSO₃) o α -GlcNSO₃-(3,6-di-OSO₃), entre otros.

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 operación de doble hélice que implica una rotación de aproximadamente 180° seguida de una traslación de 8.0-8.7 Å a lo largo del eje de la hélice (**figura C, página 34**). Por tanto, los grupos cargados, sulfatos y carboxilatos, se colocan a ambos lados de la hélice de heparina, aspecto que hay que considerar cuando se estudian las interacciones de este carbohidrato con cualquier proteína.

1.1.2 Funciones biológicas de la heparina.

De entre las muchas funciones biológicas^{3,4} que se atribuyen a la heparina destaca, sin duda alguna, su actividad anticoagulante. Así, este polisacárido es capaz de activar a la antitrombina III (AT III), proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo y que es responsable de la inhibición de la trombina, es decir, interrumpe, en su forma activa, la cascada de procesos implicados en la coagulación de la sangre. El intenso trabajo realizado por Petitou y van Boeckel^{2,5} desde la década de los 80 ha permitido esclarecer las bases moleculares de la interacción de la heparina y la AT-III y establecer los requerimientos estructurales mínimos necesarios para producir dicha activación.

Estos estudios han demostrado que la interacción entre un complejo GAG y una proteína puede estar mediada por una única y definida secuencia oligosacáridica. Este oligosacárido en el caso de la AT-III es el pentasacárido **1** (**figura 2**), perteneciente a la región irregular de la heparina, puesto que contiene

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).

2 Petitou M., *ACS Symposium Series*, 1994, 560, 90-103.

5 van Boeckel A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1671-1690.

una unidad de ácido D-glucurónico y una unidad de 3,6-di-*O*-sulfato-*N*-sulfato- α -D-glucosamina. Su estructura se determinó tras analizar los fragmentos formados por despolimerización parcial de heparina natural, cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular.

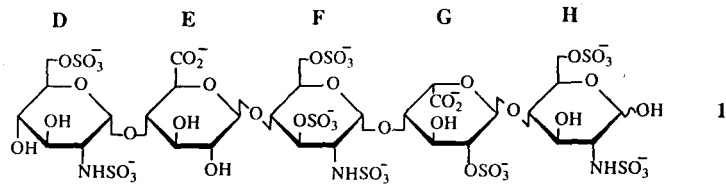


FIGURA 2

Es importante destacar en este punto que los fragmentos oligosacáridicos que se obtienen por despolimerización parcial del polisacárido natural presentan importantes modificaciones estructurales con respecto a las cadenas naturales y además el trabajo de aislamiento y purificación de estos fragmentos es tedioso y sumamente complejo (figura 3). El tratamiento con ácido nitroso convierte las unidades de *N*-sulfato- α -D-glucosamina en residuos de 2,5-anhidro-D-manosa que ocupan el terminal reductor de las cadenas, mientras que la despolimerización enzimática usando enzimas de tipo heparinasa origina fragmentos que contienen ácidos urónicos α,β insaturados en el terminal no reductor. Además, la heterogeneidad de la heparina hace que el grado de pureza de estos fragmentos nunca sea muy alto, lo cual introduce un cierto grado de incertidumbre en los experimentos de actividad biológica. Por todo ello, fue necesario recurrir a la síntesis química como la única herramienta capaz de proporcionar el citado pentasacárido con alto grado de pureza y estudiar pormenorizadamente la estructura del complejo activo formado con la AT-III. Más adelante, se expone el esquema sintético utilizado por Petitou y van Boeckel, que ha permitido acceder no sólo a este pentasacárido, sino también a una nutrida serie de análogos con mayor o menor actividad biológica, introduciendo modificaciones en la ruta de síntesis inicial.

Además de esta actividad anticoagulante, la heparina participa también en otros procesos biológicos activando proteínas con importantes funciones, entre ellos, la activación de los Factores de Crecimiento para Fibroblastos. Es en el estudio de este proceso donde se encuadra el proyecto de investigación objeto de esta Tesis Doctoral.

1.1.3 Activación de FGF's por heparina.

Se conoce con el nombre de Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF's) a una familia de proteínas cuya función biológica está relacionada con los procesos de crecimiento y diferenciación celular, actividad que despliega frente a un amplio espectro de líneas celulares, cubriendo la práctica totalidad de los tejidos de origen mesodérmico y neuroectodérmico en vertebrados. Todo ello implica la participación de estas proteínas en el desarrollo tumoral y en un importante número de patologías de origen genético: hipocondrioplasia, acondroplasia, displasia tanatrófica, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss y síndrome de Cruzon, entre otras.

Hasta la fecha se han conseguido aislar 18 miembros de esta familia de proteínas^{3,6}, de los cuales los mejor conocidos son el Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido (FGF-1) y el Factor de Crecimiento para Fibroblastos Básico (FGF-2). Todas estas estructuras polipeptídicas presentan importantes analogías.

En los primeros años de la década de los noventa^{7,8} se estableció por primera vez la participación de dos tipos de receptores en el mecanismo de activación de los FGF's, cuyo resultado final es la transmisión de la señal a través de la membrana celular y el subsiguiente inicio de la respuesta mitogénica celular. En este sistema receptor dual se distingue entre los receptores de alta

3 Conrad, H.E., *Heparin Binding Protein*, 1998 (Academic Press, San Diego).

6 A) Burgess W. H., Maciag T., *Annu. Rev. Biochem.*, 1989, 58, 575-606; B) Pineda-Lucena A., Jiménez M.A., Nieto J.L., Santoro J., Rico M., Giménez-Gallego G., *J. Mol. Biol.*, 1994, 242, 81-98; C) Pineda-Lucena A., Jiménez M.A., Lozano R.M., Nieto J.L., Santoro J., Rico M., Giménez-Gallego G., *J. Mol. Biol.*, 1996, 264, 162-178; D) Thompson L.D., Pantoliano M W., Springer B.A., *Biochemistry*, 1994, 33, 3831-3840.

7 Klagsbrun, M. and Baird, A., *Cell*, 1991, 67, 229-231.

8 Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M., *Cell*, 1991, 64, 841-848.

afinidad (FGFR), que son proteínas transmembranales con actividad tirosina quinasa, y los receptores de baja afinidad, glicosaminoglicanos de tipo heparina o heparán-sulfato que se encuentran en la membrana celular o en la matriz extracelular.

En estos primeros trabajos ya se estableció experimentalmente que estos receptores de baja afinidad son necesarios en el proceso de activación de los FGF's⁹, proponiéndose la formación de un complejo ternario entre las moléculas que participan (GAG-FGF-FGFR). Se ha postulado una alta especificidad para la interacción entre la proteína FGF y las moléculas tipo heparina, dependiente en buena medida de la estructura y el grado de sulfatación del glicosaminoglicano. Así, se explica que el empleo de heparina, sulfato de heparano o dextranos sulfatados potencie la actividad biológica de los FGF's, mientras que el uso de ácido hialurónico, sulfato de condroitina o sulfato de dermatano no permite el inicio de la actividad celular, al igual que ocurre en células tratadas genéticamente para expresar heparina con baja proporción de grupos sulfato. Pero se sabe todavía muy poco acerca del papel que cumple la heparina en el proceso a nivel molecular.

A lo largo de los últimos años se han establecido diversas hipótesis que intentan aclarar este aspecto, que constituye una cuestión enormemente compleja y no se ha resuelto de manera definitiva. Podemos clasificar de manera general estos modelos en 4 grandes grupos:¹⁰

a) Es un hecho bien establecido que la heparina protege a los FGF's frente a la desnaturalización y la degradación enzimática, lo que puede apoyar la hipótesis de que la interacción con el polisacárido produce **cambios conformacionales** significativos que afectan a la estructura terciaria de la proteína, que son necesarios como primera etapa en el mecanismo de activación. Posteriormente, en una segunda etapa, se produce la interacción del complejo FGF-heparina con el receptor de alta afinidad, dando lugar a un complejo

⁹ Rapraeger A.C., Krufka A., Olwin B.B., *Science*, 1991, 252, 1705-1708.

¹⁰ Zhou F., Kan M., Owens R.T., McKeehan W.L., Thompson J.A., Linhardt R.J., Hook J.A., *Eur. J. Cell Biol.*, 1997, 73, 71-80.

ternario que es el responsable de la transmisión de la señal a través de la membrana⁸.

b) La protección que ofrece la heparina a la desnaturalización y la degradación enzimática del FGF puede ser también interpretada de una forma mucho más simple: la presencia de heparina en el medio celular incrementa la proporción de FGF activo y, por tanto, aumenta la respuesta celular^{11,12}.

c) Se ha comprobado que existen interacciones altamente específicas entre moléculas tipo heparina y los FGFR, que podrían constituir un paso previo a la posterior interacción del FGFR con el FGF. Este modelo ha sido poco estudiado, muy posiblemente por la dificultad adicional que presenta el aislamiento del FGFR y el análisis pormenorizado de su estructura¹³.

d) Por último, también se han sugerido modelos en los que se distinguen dos etapas claramente diferenciadas: en la primera, se produciría una interacción específica entre el FGF y la heparina, que provocaría una oligomerización de la proteína; en la segunda, los oligómeros de FGF interaccionarían con el FGFR, provocando a su vez su dimerización como paso previo al inicio de la respuesta celular¹⁴.

Este último modelo es el que goza actualmente de mayor aceptación, debido a la publicación de diversas estructuras de complejos FGF-heparina, obtenidos a partir de estudios de difracción de rayos X y RMN. Sin embargo, la configuración de estos agregados es objeto de un intenso debate científico actual^{15,16}.

8 Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M., *Cell*, 1991, 64, 841-848.

11 Gospodarowicz D., Cheng J., *J. Cell Physiol.*, 1986, 128, 475-484.

12 Saksela O., Moscatelli D., Sommer A., Rifkin D.B., *J. Cell Biol.*, 1988, 107, 743-751.

13 McKeehan W.L., Kan M., *Mol. Reproduc. Dev.*, 1994, 39, 69-82.

14 Spivak-Kroizman T., Lemmon M.A., Dikic I., Ladbury J.E., Pinchasi D., Huang J., Jaye M., Crumley G., Schlessinger J., Lax I., *Cell*, 1994, 79, 1015-1024.

15 Waksman G., Herr A.B., *Nature Struct. Biol.*, 1998, 5, 527-530.

16 Venkataran G., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 3658-3663.

1.1.4 Sitios activos en los FGF's.

Zhu et al.¹⁷ publicaron en 1993 la primera estructura de un complejo de FGF-1 con un pequeño azúcar sulfatado, el octasulfato de sacarosa (SOS), confirmando la presencia de un sitio activo de alta afinidad en la proteína, en una región con un alto potencial electrostático positivo. Poco después, Faham et al.¹⁸ dieron a conocer las estructuras de los primeros complejos de FGF-2 con tetra- y hexasacáridos aislados de heparina, confirmando que las interacciones entre la proteína y las cadenas oligosacáridicas son altamente específicas, y no sólo simples interacciones electrostáticas inespecíficas entre los residuos básicos del FGF y los grupos sulfato de la heparina.

Al mismo tiempo, Ornitz et al.¹⁹ publicaron la estructura de complejos de FGF-2 con fragmentos sintéticos de heparina no sulfatados (di- y trisacáridos) donde, además de confirmar la existencia del sitio activo de alta afinidad, se caracterizaron dos sitios activos adicionales, uno de los cuales tiene probada importancia biológica. Es importante destacar que, como se ha indicado, en este trabajo se utilizaron oligosacáridos sintéticos²⁰ en contraposición a la mayoría de los trabajos estructurales y biológicos realizados hasta ahora que utilizan oligosacáridos obtenidos por despolimerización de la heparina natural y aportan, por tanto, un menor grado de fiabilidad en la elaboración de conclusiones.

Más recientemente, Di Gabriele et al.²¹ han caracterizado las estructuras de cuatro complejos de FGF-1 con decaacáridos obtenidos de heparina (**figura A**), en los que se demuestra que se da básicamente el mismo patrón de interacción entre residuos de aminoácidos y grupos carboxilato y sulfato que el previamente propuesto para los complejos de FGF-2 por Faham et al.¹⁸.

17 Zhu X., Hsu B.T., Rees D.C., *Structure*, 1993, 1, 27-34.

18 Faham S., Hileman R.E., Fromn J.R., Linhardt R.J., Rees D.C., *Science*, 1996, 271, 1116-1120.

19 Ornitz D.M., Herr A.B., Nilsson M., Westman J., Svahn C., Waksman G., *Science*, 1995, 268, 432-436.

20 Westman J., Nilsson M., Ornitz D.M., Svahn C.M., *J. Carbohydr. Chem.*, 1995, 14, 95-113.

21 DiGabriele A.D., Lax I., Chen D.I., Svahn C., Jaye M., Schlessinger J., Hendrickson W.A., *Nature*, 1998, 393, 812-817.

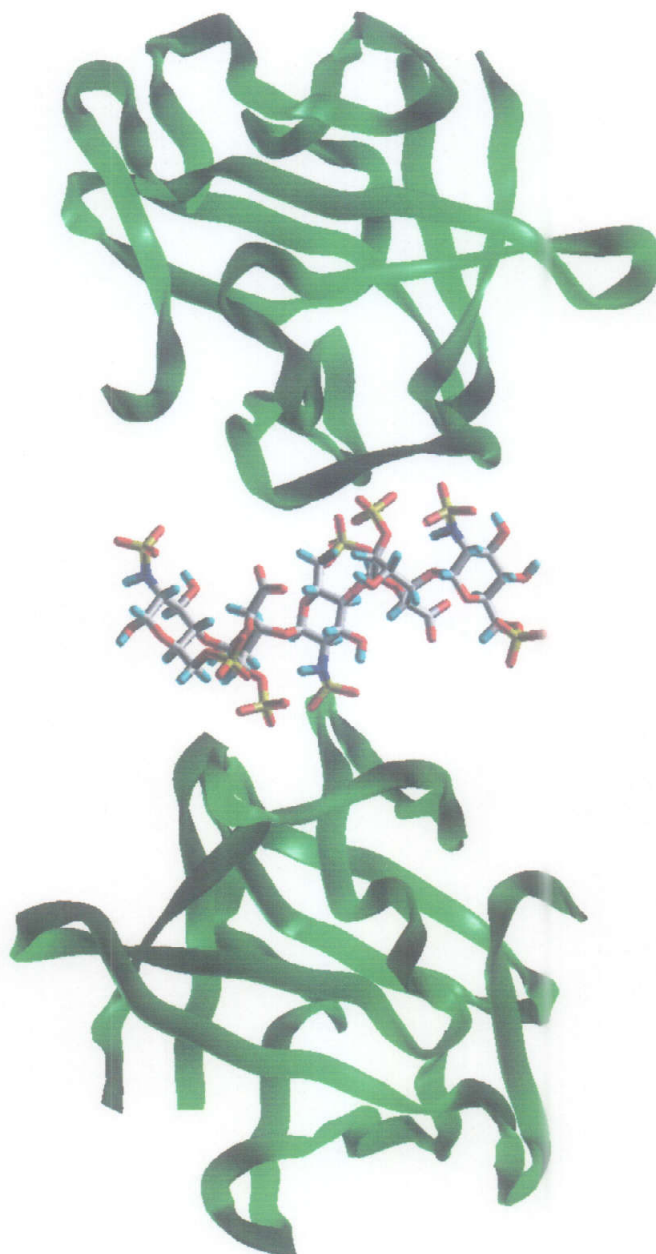


FIGURA A Estructura dimérica trans de FGF-1 con un decaacárido de heparina (contactos carbohidrato-proteína sólo entre 4-5 monosacáridos), obtenida por rayos X por DiGabriele et al. y recogida en el Protein Data Bank (1AXM.pdb).

.De todos estos trabajos estructurales parece deducirse que, en ambas proteínas, FGF-1 y FGF-2, existen dos sitios activos, uno de alta y otro de baja afinidad. En el caso del FGF-2, el primero interacciona con un disacárido GlcN-IdoA en el terminal no reductor de la cadena, y el segundo se une a un disacárido IdoA-GlcN situado en el terminal reductor de la cadena oligosacáridica. Para FGF-1 se observa un grado de ocupación menor del sitio activo de baja afinidad por la cadena de heparina, lo que justifica el hecho de que la afinidad de FGF-2 por el polisacárido sea un orden de magnitud mayor que en el caso de FGF-1.

1.1.5 Oligomerización de FGF's inducida por heparina.

Herr et al.²² han aportado importantes evidencias sobre la existencia de dos mecanismos generales para la oligomerización de FGF inducida por heparina. A partir de estudios de ultracentrifugación analítica de FGF-2 en presencia de oligosacáridos de tipo heparina, estos autores han propuesto dos tipos de dímeros:

a) **Dímero *trans***: las dos moléculas de FGF se disponen a ambos lados de la cadena oligosacáridica de heparina, aprovechando la disposición helicoidal de estas moléculas. En estos dímeros no existen superficies de contacto entre las dos moléculas de proteína y la cadena de azúcar actúa a modo de "pegamento" entre ambas unidades. Este es el modelo que siguen los dímeros observados por Di Gabriele et al.²¹ (**figura A**), en los que los contactos carbohidrato-proteína se producen entre 4-5 unidades monosacáridicas del decaacárido.

b) **Dímero *cis***: las dos moléculas de FGF se sitúan del mismo lado del oligosacárido, con lo que aparecen superficies de contacto entre ambas proteínas y es evidente que se necesita una mayor longitud mínima de la cadena de heparina para que se produzca la oligomerización.

22 Herr A.B., Ornitz D.M., Sasisekharan R., Venkataraman G., Waksman G., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 16382-16389.

Utilizando estudios de RMN y *dynamic light scattering*, Moy et al.²³ han presentado evidencias que corroboran la existencia de los dos tipos de oligomerización expuestos anteriormente en el caso del FGF-2. Estos estudios demuestran que un tetrasacárido actúa formando dímeros *trans* de FGF que no son biológicamente activos, mientras que fragmentos oligosacáridicos más largos, del orden de deca-sacáridos, son capaces de formar dímeros *cis* que presentan actividad y permiten la dimerización del FGFR, según el mecanismo propuesto. En este último caso se detectan, en realidad, tetrámeros formados por asociación de dos complejos *cis* y que se identifican con la mínima unidad de FGF-heparina capaz de iniciar la respuesta celular.

Estos últimos resultados están en clara contradicción con los aportados por Di Gabriele et al.²⁰ para el FGF-1 (**figura A**), puesto que, según estos últimos autores, el dímero biológicamente activo es el *trans* para la formación del cual se necesita como mínimo un octasacárido. No obstante, estos autores indican que en las interacciones carbohidrato-proteína sólo están involucrados 5-6 monosacáridos y que las dos unidades monosacáridicas adicionales participan únicamente en la neutralización de cargas del complejo, evitando la repulsión entre las dos moléculas de FGF. Otros autores proponen que estas unidades adicionales podrían ofrecer una superficie de interacción con la molécula de FGFR, que sería necesaria para la formación del complejo ternario activo²⁴.

En relación con esta idea del complejo ternario, Plotnikov et al.²⁵, han publicado en 1999 la estructura cristalina de un dímero de FGF-2 y FGFR-1 (**figura B**) y proponen la formación de un “cañón” con un alto potencial electrostático positivo sobre la superficie del dímero, que puede ser ocupado por heparina, estabilizándose de esta forma la estructura dimérica del receptor necesaria para la transmisión de la señal a través de la membrana celular.

23 Moy F.J., Safran M., Seddon A.P., Kitchen D., Bohlen P., Aviezer D., Yayon A., Powers R., *Biochemistry*, 1997, 36, 4782-4791.

24 Kan M. Et al., *Science*, 1993, 259, 1918-1921.

25 A) Plotnikov A.N., Schlessinger J., Hubbard S.R., Mohammadi M., *Cell*, 1999, 98, 641-650; B) Feng H.P., *Nature Struct. Biol.*, 1999, 6, 909.

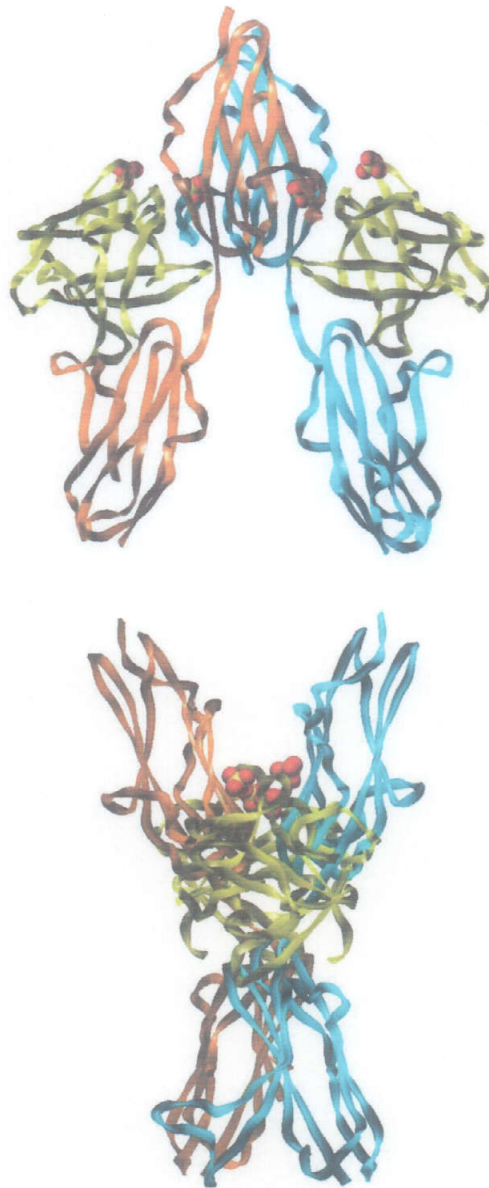


FIGURA B *Dímero de FGF-2 (color amarillo) y FGFR-1 (azul y naranja), obtenido mediante rayos X por Plotnikov et al. (estructura 1CVS.pdb del Protein Data Bank). Las dos vistas están relacionadas por un giro de 90°. Los cuatro iones sulfato se colocan sobre el "cañón" de alto potencial electrostático positivo del dímero.*

Antes de concluir es importante añadir que a la complejidad intrínseca del mecanismo de activación estudiado se une la diversidad de FGF existentes, que a pesar de tener importantes analogías desde el punto de vista estructural, presentan diferencias que pueden incidir directamente en el mecanismo y grado de oligomerización inducido por heparina²⁶, lo que justifica la diversidad de las funciones biológicas cubiertas por la familia de FGF's y ponen de manifiesto la dificultad que entraña la resolución del problema a nivel molecular.

1.1.6 Requerimientos estructurales mínimos de las cadenas de heparina.

Como se apunta en una reciente revisión²⁷, existe una importante controversia acerca de la longitud mínima y el patrón de sulfatación requerido para que la cadena de heparina sea biológicamente activa. Sin embargo, parece claro el hecho de que oligosacáridos más largos de heparina proporcionan una mayor activación de los FGF's, produciendo, según muchos autores¹⁴, la dimerización de la proteína y la posterior dimerización del FGFR, como etapa previa a la transmisión de la señal a través de la membrana.

Antes de enumerar los diversos resultados experimentales publicados hasta ahora, es importante resaltar que las asociaciones proteína-carbohidrato que se deducen de los estudios de cromatografía de afinidad no implican, necesariamente, que los fragmentos oligosacarídicos en cuestión sean capaces de activar a los FGF's. Así, fragmentos tetrasacarídicos pueden asociarse a dos moléculas de FGF a altas concentraciones, pero estos fragmentos no presentan actividad^{10,23}. La mayoría de los estudios indican que octasacarídicos y cadenas más largas activan al FGF, pero las mayores contradicciones se presentan en los

26 Venkataran G., Shriver Z., Davis J.C., Sasisekharan R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 1892-1897.

27 Faham S., Linhardt R.J., Rees D.C., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1998, 8, 578-586.

14 Spivak-Kroizman T., Lemmon M.A., Dikic I., Ladbury J.E., Pinchasi D., Huang J., Jaye M., Crumley G., Schlessinger J., Lax I., *Cell*, 1994, 79, 1015-1024.

10 Zhou F., Kan M., Owens R.T., McKeehan W.L., Thompson J.A., Linhardt R.J., Hook J.A., *Eur. J. Cell Biol.*, 1997, 73, 71-80.

23 Moy F.J., Safran M., Seddon A.P., Kitchen D., Bohlen P., Aviezer D., Yayon A., Powers R., *Biochemistry*, 1997, 36, 4782-4791.

estudios realizados con hexasacáridos: en unos casos se apunta actividad y en otros no^{28,29,30,31,32,33,34,35}. Todo esto puede explicarse si se tiene en cuenta la amplitud de la familia de los FGF's, sus diferencias estructurales y funcionales, y la participación del receptor de alta afinidad en el proceso, lo que genera dificultades adicionales en el establecimiento de las bases moleculares del mecanismo de activación de los FGF's.

A partir de la estructura cristalina del complejo hexasacárido/FGF-2, se puede concluir que las interacciones específicas se producen entre residuos de aminoácidos cargados positivamente y grupos con carga negativa del azúcar, en particular, los grupos *N*-sulfato de las unidades de GlcN y los grupos 2-*O*-sulfato y carboxilatos de los anillos de IdoA^{18,36}. Esta asociación no implica cambios conformacionales en la estructura de la proteína. En el caso del complejo decasacárido/FGF-1, hay un fuerte paralelismo en el patrón de contactos observados entre residuos, pero se confirma la participación de los grupos 6-*O*-sulfato de los anillos de GlcN que no participan en el complejo de FGF-2^{21,37,38,39}.

-
- 28 Ornitz D.M., Yayon A., Flanagan J.G., Svahn C.M., Levi E., Leder P., *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12, 240-247.
 - 29 Gambarini A.G., Miyamoto C.A., Lima G.A., Nader H.B., Dietrich C.P., *Mol. Cell Biochem.*, 1993, 124, 121-129.
 - 30 Tyrrell D.J., Ishihara M., Rao N., Horne A., Kiefer M.C., Stauber G.B., Lam L.H., Stack R.J., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 4684-4689.
 - 31 Barzu T., Lormeau J., Petitou M., Michelson S., Choay J., *J. Cell Physiol.*, 1989, 140, 538-548.
 - 32 Fromm J.R., Hileman R.E., Weiler J.M., Linhardt R.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 346, 252-262.
 - 33 Sudhalter J., Folkman J., Svahn C.M., Bergendal K., D'amore P.A., *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 6892-6897.
 - 34 Mach H., Volkin D.B., Burke C.J., Middaugh C.R., Linhardt R.J., Fromm J.R., Loganathan D., Mattsson L., *Biochemistry*, 1993, 32, 5480-5489.
 - 35 Ishihara M., Tyrrell D.J., Stauber G.B., Brown S., Cousens L.S., Stack R.J., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 4675-4683.
 - 18 Faham S., Hileman R.E., Fromm J.R., Linhardt R.J., Rees D.C., *Science*, 1996, 271, 1116-1120.
 - 36 Turnbull J.E., Fernig D.G., Ke Y., Wilkinson M.C., Gallagher J.T., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 10337-10341.
 - 21 DiGabriele A.D., Lax I., Chen D.I., Svahn C., Jaye M., Schlessinger J., Hendrickson W.A., *Nature*, 1998, 393, 812-817.
 - 37 Ishihara M., *Glycobiology*, 1994, 4, 817-824.
 - 38 Pye D.A., Vives R., Turnbull J.E., Hyde P., Gallagher J.T., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 22936-22942.
 - 39 Kreuger J., Prydz K., Pettersson R.F., Lindahl U., Salmivirta M., *Glycobiology*, 9, 723-729.

Estos resultados parecen confirmar que la afinidad de los FGF's por heparina pueden variar a lo largo de esta familia de proteínas.

De todo lo expuesto anteriormente, parece evidente que para avanzar en la determinación de los requerimientos estructurales mínimos para la activación de los FGF's es necesario disponer de oligosacáridos puros y homogéneos de estructura conocida, que puedan utilizarse en pruebas de actividad biológica y estudios estructurales.

Aunque se discutirá minuciosamente con posterioridad, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es la síntesis de estos fragmentos oligosacáridicos de heparina con unas características estructurales mínimas que permitan estudiar la activación del Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido (FGF-1), del que se dispone gracias a la colaboración con el grupo del Profesor Dr. Guillermo Giménez Gallego, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. En este trabajo se han preparado oligosacáridos con una longitud de 6-8 unidades monosacáridicas y un patrón de sulfatación similar al que se presenta en la región regular de la heparina.

1.2 Antecedentes en la síntesis de oligosacáridos de tipo heparina.

Aspectos como la dificultad en la preparación a escala multigramo de unidades de ácido L-idurónico convenientemente sustituidos para ser usados en la síntesis de oligosacáridos y los problemas relacionados con la caracterización y purificación de compuestos altamente cargados, han influido decisivamente en la escasez del número de esquemas sintéticos de oligosacáridos de tipo heparina que se pueden encontrar en la bibliografía.

Hasta la actualidad, las contribuciones más importantes han sido las desarrolladas por los grupos (Petitou, van Boeckel) que han estudiado el papel de la heparina en el mecanismo de activación de la AT-III. Por su importancia y su interés en el trabajo desarrollado en esta Tesis, se comenta a continuación la síntesis del pentasacárido que constituye el fragmento mínimo de heparina que activa la AT-III.

1.2.1 Síntesis del pentasacárido activante de la AT-III.

La síntesis inicial del pentasacárido biológicamente activo **1** se llevó a cabo según el **esquema 1**, en el que el pentasacárido totalmente protegido **2** actúa como precursor clave^{40,41,42,43}. Para obtener este compuesto se estableció una estrategia adecuada de grupos protectores para los diferentes sintones donadores y aceptores de glicosilo diseñados para su conexión mediante reacciones de glicosidación. Esta estrategia se ha tenido muy en cuenta en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Los disacáridos **5** y **6** se obtuvieron por condensación de los correspondientes derivados de ácido idurónico y ácido glucurónico con los precursores de las unidades de glucosamina. Todos los derivados monosacáridicos empleados en la síntesis se obtuvieron a partir de glucosa y de glucosamina. La reacción de glicosidación entre los disacáridos **5** y **6** dio lugar al tetrasacárido **3**, cuya condensación con **4** proporcionó finalmente el pentasacárido **2**.

La secuencia de reacciones de desprotección que permitió obtener **1** a partir del compuesto completamente protegido **2** implicó las siguientes etapas: i) saponificación de las funciones éster de la molécula; ii) sulfatación de los hidroxilos generados; iii) hidrogenólisis para eliminar los grupos bencilo de la molécula y liberar los grupos amino de las unidades de 2-azido-2-desoxi-D-glucosa; iv) sulfatación selectiva de estos grupos amino.

En las condiciones experimentales de la etapa de hidrogenólisis, los grupos azida de la molécula se reducen rápidamente y los grupos amino así generados pueden reaccionar con el terminal reductor de la cadena. Esto

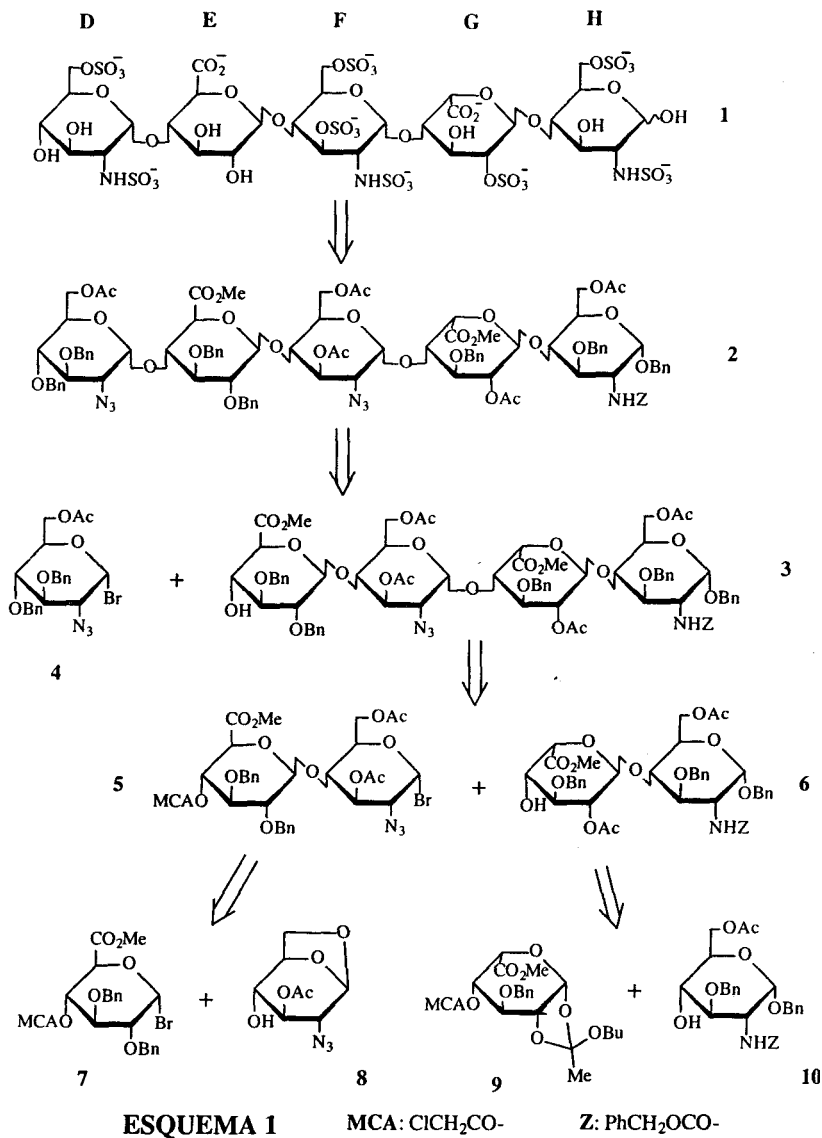
40 Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1984, 130, 221-241.

41 Sinay P., Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., *Carbohydr. Res.*, 1984, 132, C5-C9.

42 Petitou M., Jacquinet J.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1986, 147, 221-236.

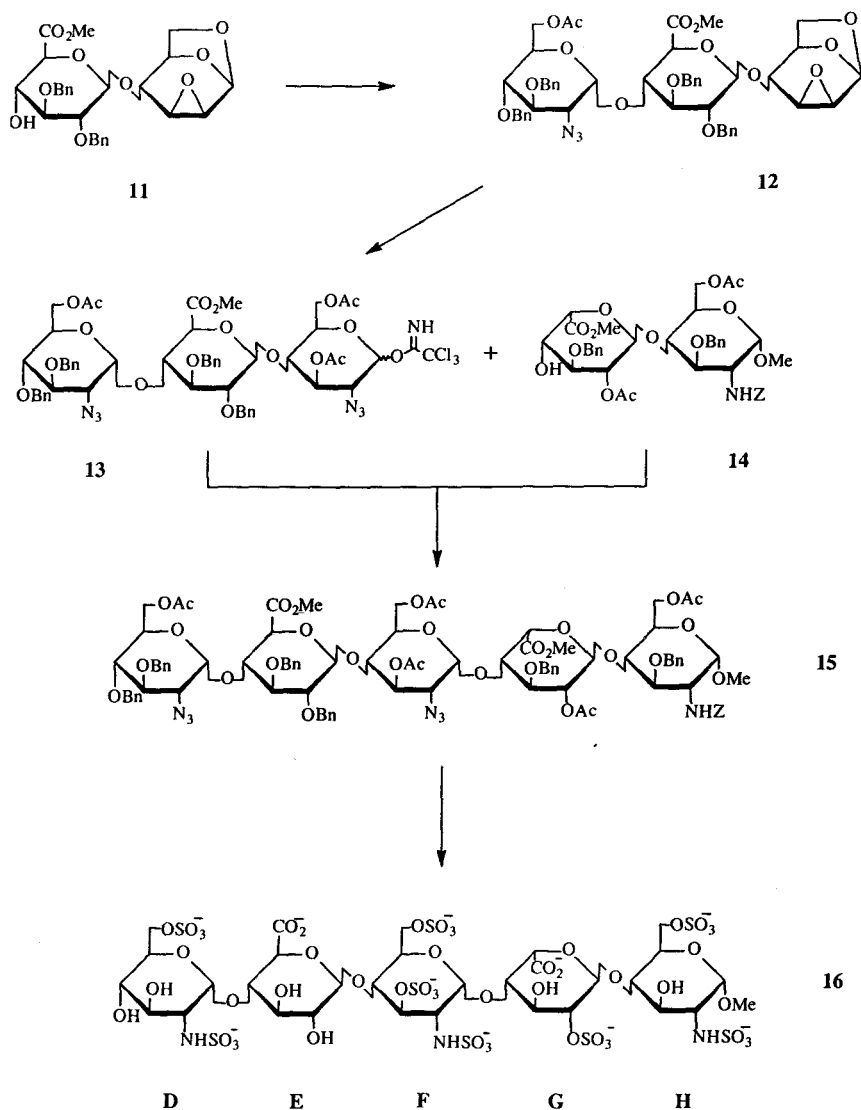
43 Van Boeckel C.A.A., Beetz T., Vos J.N., de Jong A.J.M., van Aelst S.F., van den Bosch R.H., Mertens J.M.R., van der Vlugt F.A., *J. Carbohydr. Chem.*, 1985, 4, 293-321.

posibilita la formación de productos indeseados de condensación, que poseen estructuras diméricas y triméricas del pentasacárido **1**. Para eliminar esta reacción lateral, los autores modificaron el esquema sintético utilizando un metilglucósido⁴⁴ con el objeto de proteger el terminal reductor. Las propiedades biológicas del pentasacárido resultante **16** son las mismas que las de **1** (esquema 2).



⁴⁴ Petitou M., Jacquinet J.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1987, 167, 67-75.

Otras síntesis desarrolladas con posterioridad para obtener el mismo pentasacárido **16** se basaron en la condensación entre el trisacárido donador **13** y el disacárido aceptor **14**⁴⁵ (esquema 2), o en la utilización de celobiosa o maltosa como materiales de partida⁴⁶.



ESQUEMA 2

45 Petitou M., Jaurand G., Derrien M., Choay J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1991, 1, 95-98.

46 Glushka J.N., Perlin A.S., *Carbohydr. Res.*, 1990, 205, 305-321.

Una vez sintetizado el fragmento mínimo necesario para inducir la actividad de AT-III, se abordó la síntesis de análogos con ciertas modificaciones estructurales como la ausencia de determinados grupos *O*-sulfato, *N*-sulfato o carboxilatos con el objetivo de encontrar derivados más activos^{47,48}. Por ejemplo, se sintetizaron los derivados que aparecen en la **figura 4**: **17** sin el grupo sulfato de la posición 3 de la unidad F; **18** que no posee el grupo *N*-sulfato de la unidad H; **19** sin el grupo carboxilato de la unidad G. Todos estos compuestos tienen una actividad biológica considerablemente menor a la que presenta el pentasacárido **16**, lo que permitió confirmar la participación de los grupos cargados modificados en la interacción específica con la AT-III.

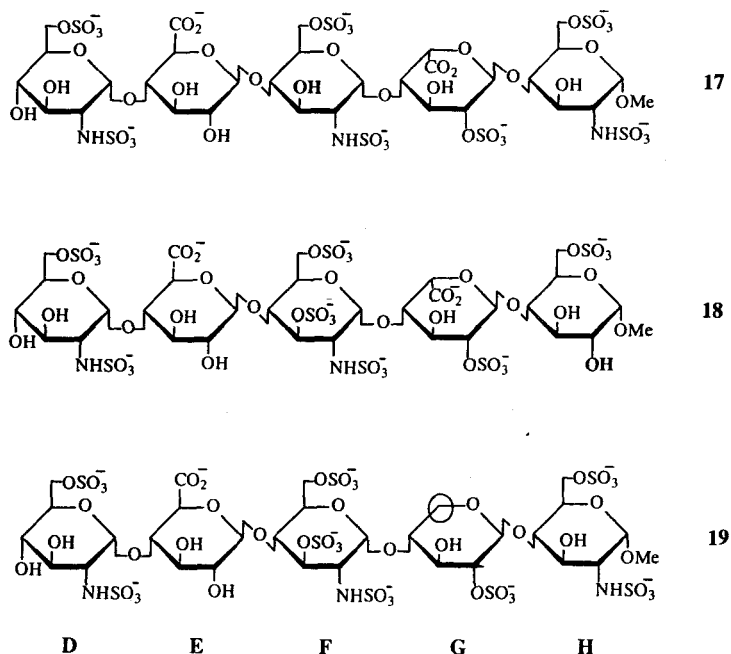


FIGURA 4 Derivados de **16** con menor actividad

47 Petitou M., Duchaussoy P., Lederman L., Choay J., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1988, 179, 163-172.

48 Lucas H., Basten J.E.M., van Dinther T.G., Meuleman D.G., van Aelst S.F., van Boeckel C.A.A., *Tetrahedron*, 1990, 46, 8207-8228.

Los estudios de RMN y modelado molecular⁴⁹ permitieron conocer con exactitud el papel de cada uno de los grupos cargados del pentasacárido en la interacción con la proteína, permitiendo el diseño de derivados potencialmente más activos como el compuesto **19b** (figura 5) con un grupo sulfato adicional en la posición 3 de la unidad de glucosamina H, que aumenta considerablemente su afinidad por el sitio activo de la AT-III.

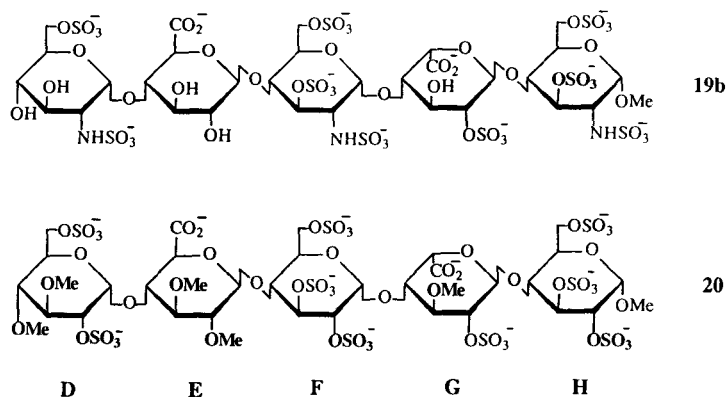


FIGURA 5 Derivados de **16** con mayor actividad

Actualmente, los esfuerzos se dirigen hacia la síntesis de análogos que no responden a la estructura de los GAG^{50,51,52,53,54,55}, pero que mantienen o incluso aumentan su actividad biológica, aspecto de trascendental importancia para desarrollar fármacos que sean susceptibles de ser producidos industrialmente a

49 Grootenhuis P.D.J., van Boeckel C.A.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 2743-2747.

50 Sakairi N., Basten J.E.M., van der Marel G.A., van Boeckel C.A.A., van Boom J.H., *Chem. Eur. J.*, 1996, 2, 1007-1013.

51 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.

52 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.

53 Petitou M., Herault J., Bernat A., Driguez P., Duchaussoy P., Lormeau J., Herbert J., *Nature*, 1999, 398, 417-422.

54 Petitou M., Herault J., Driguez P., Duchaussoy P., Lormeau J., Herbert J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 1155-1160.

55 Petitou M., Herault J., Driguez P., Duchaussoy P., Lormeau J., Herbert J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 1161-1166.

un precio razonable. Así, se ha comprobado que las sustituciones de los grupos hidroxilo libres de la molécula por los derivados *O*-metilados y los grupos *N*-sulfato por grupos *O*-sulfato no suponen cambios sustanciales en la activación de la AT-III. En la **figura 5** aparece la estructura de uno de estos derivados, el compuesto **20**. La síntesis de estos análogos “no-glicosaminoglicanos” presenta importantes ventajas:

a) la estrategia sintética es más flexible debido a que pueden utilizarse tanto grupos acilo como éteres bencílicos para proteger los hidroxilos que deben ser posteriormente sulfatados;

b) no se usan unidades de glucosamina, que requieren rutas sintéticas laboriosas para los sintones de 2-azido-2-desoxi-D-glucosa;

c) la reacción de *N*-sulfatación no es necesaria, lo que reduce a tres las etapas de desprotección: hidrogenólisis, hidrólisis de ésteres y sulfatación;

d) se pueden usar grupos carboxibencilo, lo que permite liberar los carboxilatos en la primera etapa de hidrogenólisis, limitando la extensión de la reacción de β -eliminación que suele acompañar a la reacción de hidrólisis básica de ésteres (segunda etapa de desprotección).

Todo ello implica síntesis con rendimientos más elevados y mayor pureza química de los productos finales. Hay que recordar, sin embargo, que el uso de estos grupos protectores alternativos no es aplicable a la obtención de fragmentos de heparina relacionados con los productos naturales.

Por último conviene mencionar que, además de estos oligosacáridos de heparina relacionados con la AT-III, en la bibliografía se recogen también diversas síntesis de disacáridos que responden a la región regular de la heparina o de otros glicosaminoglicanos como el sulfato de condroitina y que han resultado muy valiosas en la elaboración de esta Tesis Doctoral^{56,57,58}.

56 A) La Ferla B., Lay L., Guerrini M., Poletti L., Panza L., Russo G., *Tetrahedron*, 1999, 55, 9867-9880; B) Koshida S., Suda Y., Sobel M., Ormsby J., Kusumoto S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,

1.2.2 Antecedentes en la síntesis de derivados de ácido L-idurónico.

Uno de las cuestiones más importantes que hay que resolver en la síntesis de oligosacáridos de tipo heparina es la obtención de los sintones de ácido L-idurónico. A continuación, se reseñan de forma breve algunas de las aproximaciones sintéticas desarrolladas para este tipo de moléculas. Estas síntesis se caracterizan por un gran número de pasos y unos rendimientos globales bajos, lo que nos decidió a desarrollar en nuestro laboratorio una nueva estrategia para acceder a estos sintones⁵⁹ (ver **capítulo 3.5**).

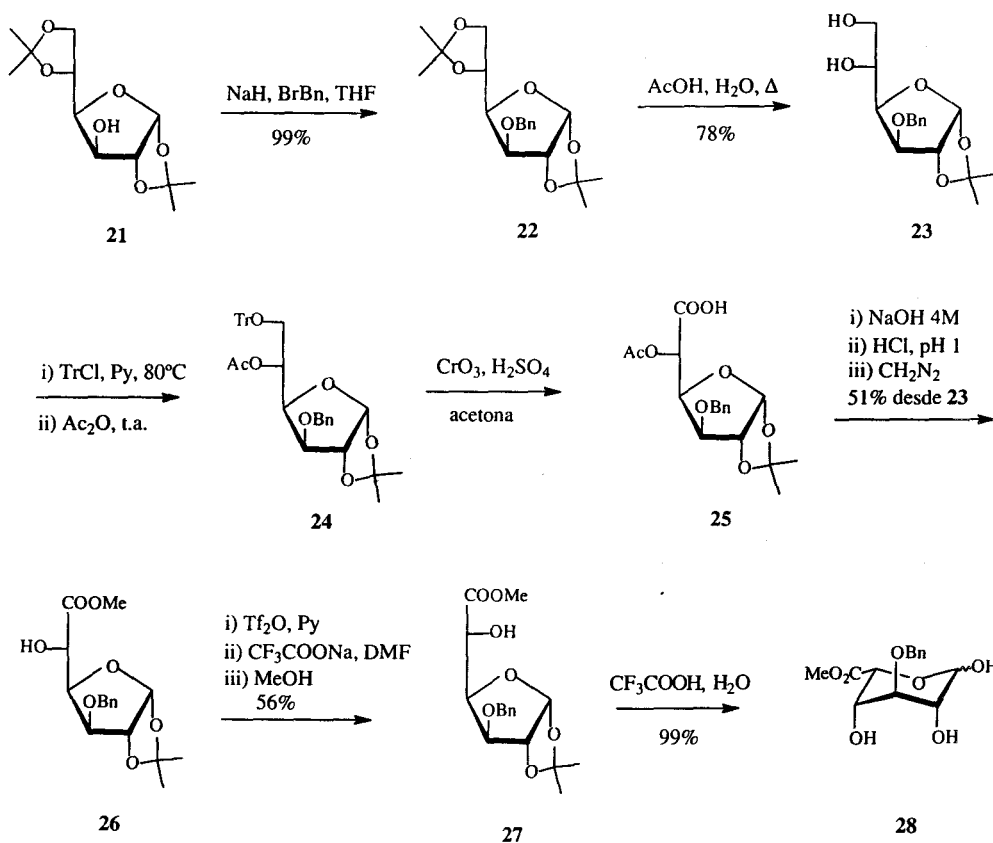
En el **esquema 3** se presenta la síntesis de ácido L-idurónico desarrollada por Jacquinet et al.⁴⁰, en la que se parte de 3-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropilidén- α -D-glucofuranosa **23**, fácilmente asequible a partir de 1,2-5,6-di-*O*-isopropilidén- α -D-glucofuranosa comercial **21**, para llegar al derivado de ácido L-idurónico **28**. La etapa clave en esta síntesis es la transformación de **26** en **27**, mediante esterificación con Tf_2O del hidroxilo de la posición 5 y posterior inversión de la configuración por reacción con trifluoroacetato sódico. Esta ruta ha sido clásicamente la más utilizada para la obtención de estos derivados.

Otros esquemas sintéticos destacables se recogen en el **esquema 4**. En la **ruta A**⁶⁰, se parte de derivados de ácido D-glucurónico **29** a los que se somete a reacción de fotobromación y posterior reducción con Bu_3SnH para llegar a los correspondientes derivados de ácido idurónico **31** con rendimientos moderados.

-
- 1999, 9, 3127-3132; C) Nilsson M., Svahn C.M., Westman J., *Carbohydr. Res.*, 1993, 246, 161-172; D) Nilsson M., Westman J., Svahn C.M., *J. Carbohydr. Chem.*, 1993, 12, 23-37; E) Westerduin P., Basten J.E.M., Broekhoven M.A., Vera de Kimpe, Kuijpers W.H.A., van Boeckel C.A.A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, 35, 331-333; F) Jaurand G., Tabour C., Petitou M., *Carbohydr. Res.*, 1994, 255, 295-301.
- 57 A) Lubineau A., Bonnaffé D., *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, 2523-2532; B) Rochepeau-Jobron L., Jacquinet J.C., *Carbohydr. Res.*, 1998, 305, 181-191; C) Jacquinet J.C., *Carbohydr. Res.*, 1990, 199, 153-181.
- 58 Dreef-Tromp C.M., Willems H.A.M., Westerduin P., van Veelen P., van Boeckel C.A.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, 9, 1175-1180.
- 59 Ojeda R., de Paz J.L., Martín-Lomas M., Lassaletta J.M., *Synlett*, 1999, 8, 1316-1318
- 40 Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1984, 130, 221-241.
- 60 Chiba T., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1986, 151, 379-389.

En la ruta B^{43,61,56} se parte nuevamente de 3-O-bencil-1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranoza **23** para obtener derivados de L-idosa como **33**. Éstos pueden transformarse posteriormente en derivados de ácido L-idurónico, como **34**, adecuados para la síntesis de oligosacáridos.

En la ruta C^{62,63}, se usan como productos de partida los ácidos urónicos α,β -insaturados **36** obtenidos por reacción de β -eliminación de los



ESQUEMA 3

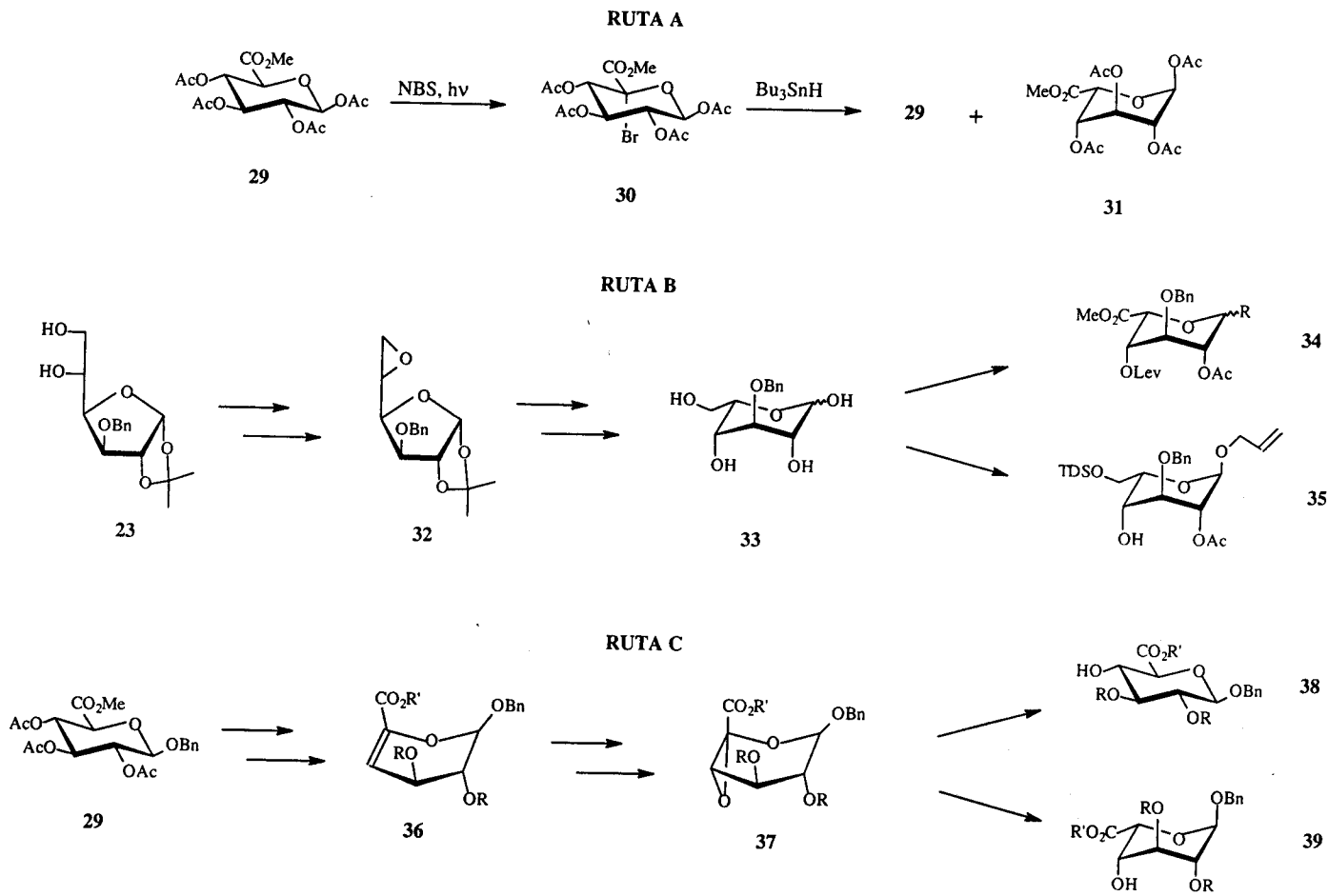
43 Van Boeckel C.A.A., Beetz T., Vos J.N., de Jong A.J.M., van Aelst S.F., van den Bosch R.H., Mertens J.M.R., van der Vlugt F.A., *J. Carbohydr. Chem.*, 1985, 4, 293-321.

61 Tabeur T., Machetto F., Mallet J.M., Duchaussoy P., Petitou M., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1996, 281, 253-276.

56 A) La Ferla B., Lay L., Guerrini M., Poletti L., Panza L., Russo G., *Tetrahedron*, 1999, 55, 9867-9880.

62 Bazin H., Wolff M.W., Linhardt R.J., *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 144-152.

63 Bazin H., Kerns R.J., Linhardt R.J., *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 923-926.



ESQUEMA 4

Lev: CH₃COCH₂CH₂CO-

correspondientes derivados de ácido glucurónico 29. Mediante una secuencia de reacciones que incluye bromación del doble enlace y formación del epóxido intermedio 37 se obtienen derivados de ácido D-glucurónico y ácido L-idurónico como 38 y 39. Además de estas rutas, durante el período de realización de esta Tesis Doctoral ha aparecido en la bibliografía otra alternativa sintética para estos sintones de ácido L-idurónico⁶⁴.

1.3 Conformaciones de los anillos de ácido idurónico en la heparina.

Un aspecto esencial a la hora de estudiar las interacciones de las cadenas de heparina con proteínas como los FGF's, es la conformación que adopta el azúcar en disolución de la que depende la orientación espacial de los grupos cargados que gobiernan este tipo de interacciones GAG-proteína. Puede decirse, por tanto, que la orientación de los grupos sulfato y carboxilato a lo largo de la cadena de heparina está determinada por la conformación de ésta, que depende de la disposición relativa de las distintas unidades y de la conformación que presenten cada uno de los anillos monosacáridicos individualmente².

Es un hecho bien conocido que las unidades de glucosamina y de ácido glucurónico se presentan siempre, en todos los oligosacáridos de tipo heparina estudiados hasta el momento, en la conformación de silla 4C_1 , como se deduce de los valores de las constantes de acoplamiento en los espectros de RMN. Sin embargo, en el caso del ácido L-idurónico los datos de RMN se interpretan en términos de un equilibrio conformacional entre las sillas 1C_4 y 4C_1 y el bote torcido 2S_0 (figura 6), conformaciones que poseen una energía similar. Este equilibrio confiere a las cadenas de heparina una gran flexibilidad, lo que podría explicar la participación de este polisacárido en tan importante número de procesos biológicos⁵. En cualquier caso, se mantiene la estructura secundaria helicoidal (figura C), que depende de las conformaciones de los enlaces glicosídicos y que es independiente de la conformación que presenten los anillos de IdoA.

⁶⁴ Lubineau A., Gavard O., Alais J., Bonnaffé D., *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41, 307-311.

² Petitou M., *ACS Symposium Series*, 1994, 560, 90-103.

⁵ van Boeckel A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1671-1690.

Las evidencias experimentales de la existencia de este equilibrio conformacional se obtienen utilizando técnicas de RMN y modelado molecular^{65,66,67,68,69}. Así, las constantes de acoplamiento a tres enlaces (3J) que se observan en los espectros de RMN toman valores intermedios entre los que corresponderían a cada conformación por separado, y además se observa efecto NOE entre los protones H-2 y H-5 del ácido idurónico, que en la conformación 2S_0 se encuentran lo suficientemente próximos entre sí (2.3 Å), pero que es incompatible con las sillas 1C_4 y 4C_1 . En general, para la mayoría de oligosacáridos sintéticos de heparina estudiados, se ha propuesto que en los anillos de ácido idurónico coexisten en un equilibrio rápido la silla 1C_4 y el bote torcido 2S_0 .

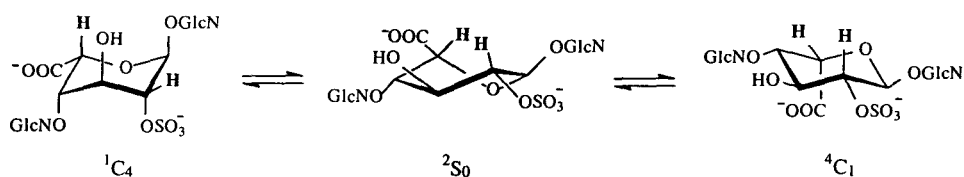


FIGURA 6

El empleo de la ecuación de Altona permite obtener las constantes de acoplamiento teóricas para cada conformación y, a partir de esto, la proporción de conformeros presente en cada anillo de ácido idurónico, información muy importante para entender cualquier interacción en la que participe la heparina. Además, el equilibrio conformacional está influido por aspectos como la naturaleza química de las unidades de azúcar adyacentes al anillo de idurónico en cuestión, el patrón de sulfatación que presenta dicho anillo o la fuerza iónica del medio.

65 Yates E.A., Santini F., Guerrini M., Naggi A., Torri G., Casu B., *Carbohydr. Res.*, 1996, 294, 15-27.

66 Torri G., Casu B., Gatti G., Petitou M., Choay J., Jacquinet J.C., Sinay P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1985, 128, 134-140.

67 Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Torri G., Casu B., Gatti G., Jacquinet J.C., Sinay P., Petitou M., Choay J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 6773-6778.

68 Mulloy B., Forster M., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.*, 1993, 293, 849-858.

69 Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Casu B., Torri G., Bossennec V., Perly B., Sinay P., Petitou M., Choay J., *Carbohydr. Res.*, 1990, 195, 157-167.

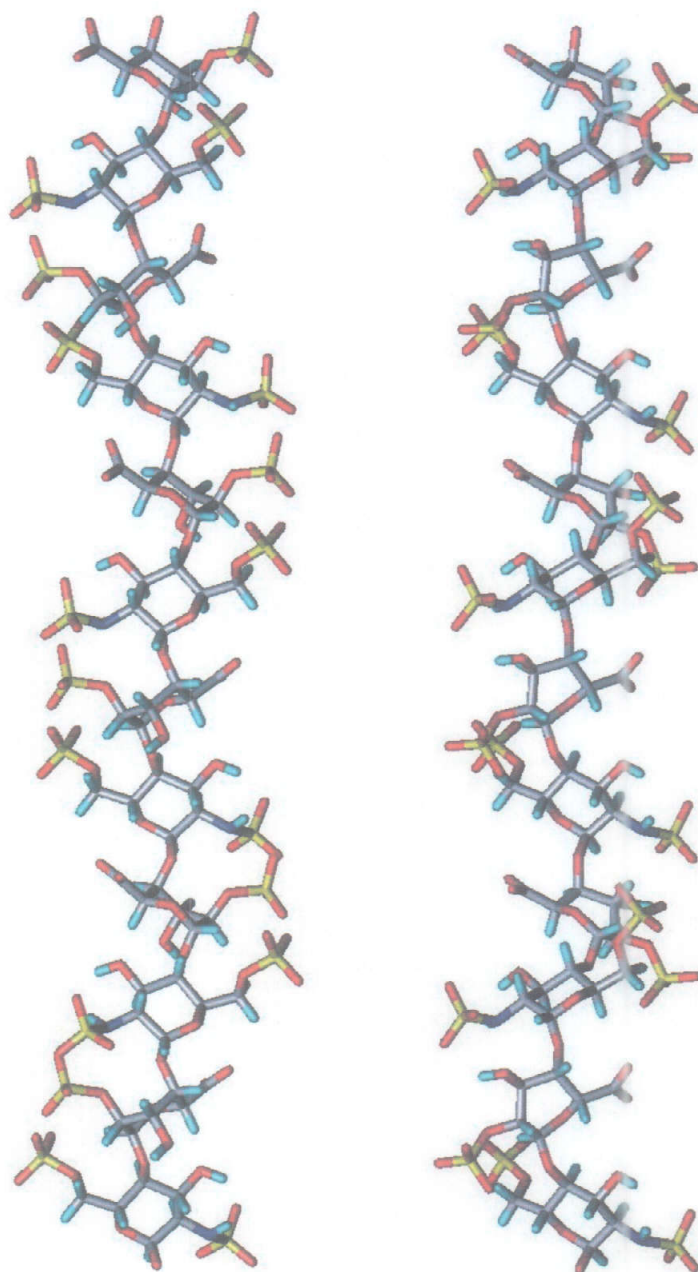


FIGURA C Dodecasacárido de heparina obtenido por Mulloy et al. mediante RMN y publicado en el Protein Data Bank (1hpn.pdb). En la estructura de la izquierda los anillos de IdA están en conformación de silla 1C_4 y en la de la derecha en bote torcido 2S_0 .

Por ejemplo, si las unidades de IdoA o IdoA-(2-OSO₃) se encuentran en el interior del oligosacárido las dos conformaciones ¹C₄ y ²S₀ participan de forma significativa. Esta proporción se desplaza hacia ²S₀ cuando el anillo de IdoA está precedido por una unidad de GlcN-(3,6-di-OSO₃), y hacia ¹C₄ cuando ocupa el terminal no reductor. También es mayoritaria la conformación ¹C₄ cuando se aumenta la fuerza iónica del medio por adición de cloruro sódico o cuando se forma la sal cálcica del oligosacárido⁶⁷.

⁶⁷ Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Torri G., Casu B., Gatti G., Jacquinet J.C., Sinay P., Petitou M., Choay J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 6773-6778.

CAPITULO 2

OBJETIVO

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de un proyecto de investigación cuyo objetivo es contribuir al establecimiento, a nivel molecular, del mecanismo de activación de los Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF's). La implicación de esta familia de proteínas en importantes procesos biológicos, como la división y diferenciación celular, confiere al conocimiento preciso de este mecanismo una importancia vital para el futuro desarrollo de fármacos que controlen el amplio número de patologías relacionadas con los FGF's.

Como se ha explicado en el capítulo anterior, la activación de los FGF's implica la participación de dos tipos de receptores: los receptores de alta afinidad, que son proteínas transmembranales con actividad de tirosina-quinasa; y los receptores de baja afinidad, que son glicosaminoglicanos de tipo heparina o sulfato de heparano que se encuentran en la membrana celular o en la matriz extracelular.

Al revisar la bibliografía existente sobre el tema, se concluye que las interacciones altamente específicas entre los FGF's y los receptores de baja afinidad constituyen una etapa clave en el mecanismo de activación. En otras palabras, es necesaria la participación de glicosaminoglicanos de tipo heparina para activar los FGF's y que su correspondiente señal se transmita a través de la membrana celular.

Para contribuir a establecer el papel que desempeñan las cadenas de heparina en este proceso, es importante disponer de fragmentos oligosacáridos con un alto grado de pureza. La utilización de estos oligosacáridos en estudios de actividad biológica y reconocimiento molecular debe proporcionar información acerca de los requerimientos estructurales mínimos necesarios para activar a los FGF's y sobre la naturaleza de las interacciones carbohidrato-proteína en este complejo sistema.

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, la síntesis química se presenta como la única herramienta disponible para la obtención de estos

fragmentos oligosacáridicos, evitando así las modificaciones estructurales y la heterogeneidad inherente a los fragmentos que proceden de la despolimerización parcial de la heparina natural. El objetivo de la presente Tesis Doctoral es establecer una estrategia sintética eficaz para la obtención de oligosacáridos de tipo heparina que responden a la región regular de la misma. Dicho esquema debe ser lo suficientemente versátil como para ser susceptible de sufrir modificaciones para producir otros fragmentos con diferente estructura y patrón de sulfatación.

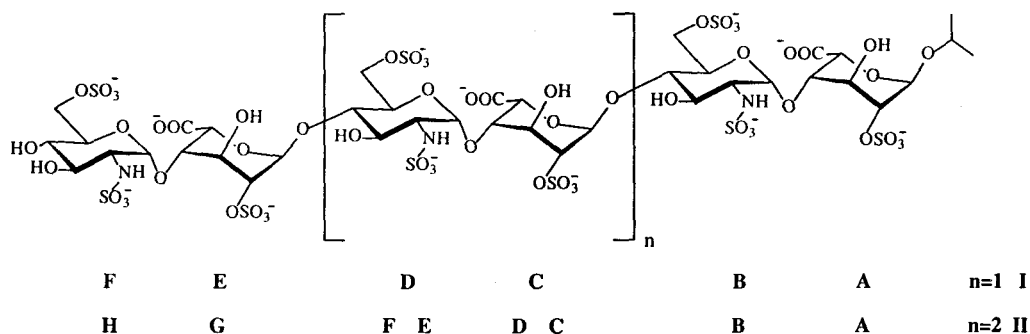


FIGURA 7

El hecho de dirigir nuestros esfuerzos sintéticos, en primer lugar, hacia la región regular de la heparina se justifica atendiendo a los resultados recogidos en la bibliografía, donde se apunta como hipótesis la participación de estas regiones altamente cargadas en la activación del Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido (FGF-1), miembro de la familia de los FGF's sobre el que centramos nuestra atención, debido a nuestra colaboración con el grupo del Profesor Dr. Guillermo Giménez Gallego (Centro de Investigaciones Biológicas, C.I.B., Madrid). En la **figura 7** se recogen las estructuras de dos moléculas objetivo cuya síntesis total se detalla en la presente memoria. Se trata del hexasacárido I y del octasacárido II que responden a la estructura de la región regular de la heparina, constituida por la repetición del disacárido trisulfatado GlcNSO₃-(6-OSO₃)-α(1→4)-IdoA-(2-OSO₃) unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos α(1→4).

La obtención de estas estructuras supone la resolución de diversos problemas adicionales a los que ya conlleva la síntesis de oligosacáridos en disolución, como, por ejemplo, la obtención de sintones de ácido L-idurónico en cantidad suficiente para ser utilizados como producto de partida y el manejo, caracterización y purificación de las moléculas finales, altamente cargadas.

Una vez comentado el proceso de síntesis de estas estructuras, se resumirán también en esta memoria los primeros estudios de actividad biológica (desarrollados en el Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, de Madrid) y químico-estructurales (desarrollados en nuestro grupo de investigación) realizados con estos oligosacáridos sintéticos **I** y **II**.

El trabajo presentado en esta memoria establece una estrategia sintética flexible y eficaz y aporta datos de importancia acerca de la longitud mínima y el patrón de sulfatación que deben poseer las cadenas de heparina para activar convenientemente a los FGF's.

CAPITULO 3
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se ha indicado en el capítulo anterior, un primer paso para el conocimiento preciso del papel de la heparina en el mecanismo de activación de los FGF's consiste en la síntesis de moléculas como **I** y **II**, hexasacárido y octasacárido respectivamente, que responden a la estructura de la región regular de la heparina. La posterior utilización de estas moléculas en estudios estructurales y biológicos debe permitir diseñar otras aproximaciones sintéticas hacia compuestos diferentes que contribuyan a esclarecer dicho mecanismo de activación.

Antes de comenzar a describir la estrategia sintética seguida en esta Tesis Doctoral, conviene revisar brevemente algunos conceptos básicos de la síntesis de oligosacáridos.

3.1 Conceptos básicos en la síntesis química de oligosacáridos.

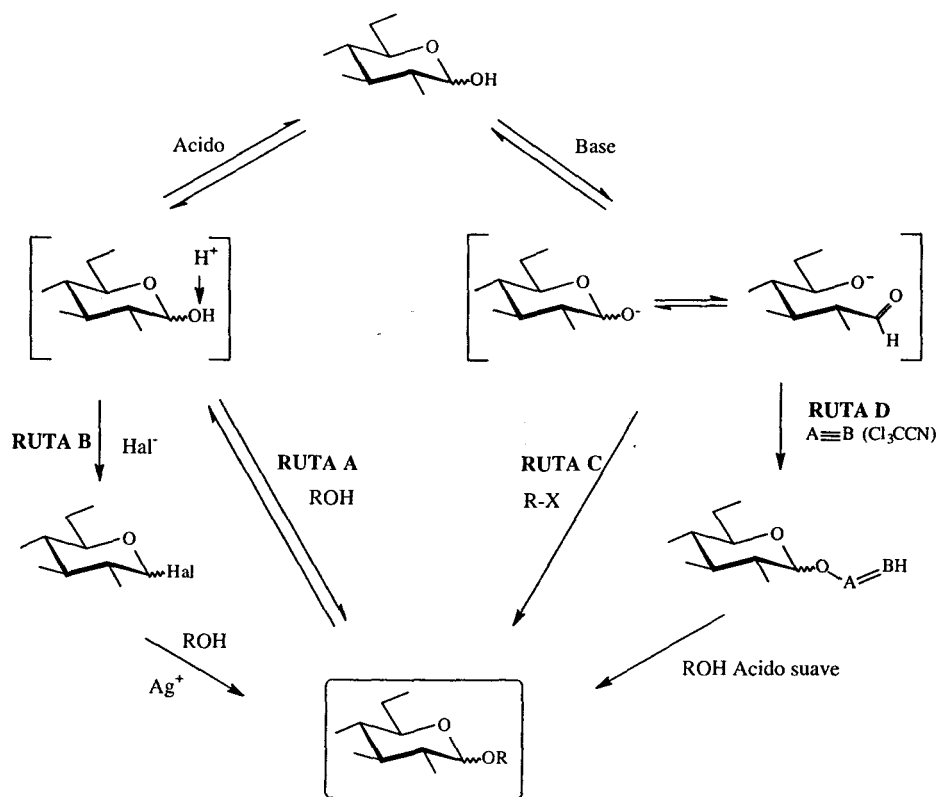
El papel clave que desarrollan los oligo- y polisacáridos en un gran número de importantes procesos biológicos ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar procesos sintéticos eficaces para la obtención de derivados oligosacáridicos relacionados estructuralmente con dichos productos naturales. Es obvio que en la síntesis de estas moléculas hay que resolver, entre otros, los problemas relacionados con la formación del enlace glicosídico.

Para la síntesis de oligosacáridos se requiere una planificación cuidadosa que conlleva la elección entre dos estrategias generales diferentes. Por un lado, en una síntesis lineal o por pasos, las unidades monosacáridicas se añaden una a una a la cadena creciente. Por otra parte, la síntesis por bloques (modular) implica que unidades de dos ó más residuos se preparen independientemente y se unan después entre sí de manera convergente.

En la síntesis lineal, el número de etapas a las que hay que someter al oligosacárido creciente es mayor, por lo que los rendimientos de las distintas etapas son muy críticos. En la síntesis por bloques, la mayoría de las reacciones y purificaciones se realizan sobre oligosacáridos más pequeños, por lo que son más fáciles de llevar a cabo. Sin embargo, la preparación de cada bloque requiere

generalmente un gran número de pasos y el rendimiento de las reacciones de glicosidación entre bloques complejos es frecuentemente inferior al que se obtiene cuando se añade una unidad monosacárida.

La formación del enlace glicosídico es, sin duda, uno de los temas centrales de la química de carbohidratos ya que, además de los problemas de regioselectividad que se resuelven con la utilización de los grupos protectores adecuados, el control de la estereoquímica de esta reacción sigue siendo un problema sin solución general. Las estrategias más habituales que se han desarrollado hasta la fecha se pueden clasificar en dos grandes grupos, según propone R. Schmidt⁷⁰ (esquema 5).



ESQUEMA 5

70 Schmidt R. R., Kinzy W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1994, 50, 21-123.

En el primero de ellos, la posición anomérica se activa mediante una reacción de intercambio en la que el hidroxilo anomérico se sustituye por otro grupo que pueda actuar como buen grupo saliente. Dentro de este grupo se encuentra el método clásico desarrollado por Koenigs-Knorr⁷¹ a principios de este siglo (**ruta B, esquema 5**). Esta estrategia requiere, en un primer paso, la sustitución del hidroxilo anomérico por un halógeno (cloruro o bromuro), que en presencia de una sal de un metal pesado transfiere la unidad glicosídica al aceptor. Aunque este método ha sido ampliamente usado en la síntesis de oligosacáridos^{72,73,74,75}, tiene importantes desventajas como la baja estabilidad de estos haluros de glicosilo y la necesidad de utilizar cantidades equimoleculares de las sales metálicas, lo que ha dado lugar a la aparición de nuevos donadores de glicosilo siguiendo el mismo procedimiento general. De esta forma, el hidroxilo anomérico se ha transformado en fluoruro, tioglicósido, sulfóxido, selenoglicósido, S-xantato o epóxido entre otros⁷⁶. En la mayoría de los casos la diastereoselectividad del enlace formado se modula mediante la combinación adecuada de factores tales como el disolvente, la temperatura, el patrón de grupos protectores o el tipo de promotor empleado.

Dentro de este mismo tipo de estrategia, se puede incluir el método de Fischer-Helferich⁷⁷ (**ruta A, esquema 5**), que constituye una acetalación en condiciones ácidas, produciéndose la sustitución del hidroxilo anomérico por el aceptor de glicosilo en un solo paso. Debido a la reversibilidad de este proceso, no se ha aplicado a la síntesis de oligosacáridos complejos sino únicamente a la obtención de glicósidos de alcoholes simples, que pueden usarse como disolventes.

El segundo grupo de estrategias de glicosidación se caracteriza por la activación del hidroxilo anomérico en medio básico, de tal forma que se conserva

71 Koenigs W., Knorr E., *Chem. Ber.*, 1901, 34, 957.

72 Paulsen H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1982, 21, 155-173.

73 Paulsen H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1990, 29, 823-839.

74 Kunz H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1987, 26, 294-308.

75 Paulsen H., *Chem. Soc. Rev.*, 1984, 13, 15-45.

76 Toshima K., Tatsuta K., *Chem. Rev.*, 1993, 93, 1503-1531 y referencias citadas.

77 Wulff G., Röhle H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1974, 13, 157.

el oxígeno de esta posición. A continuación, la aproximación más evidente es la alquilación directa del alcóxido formado⁷⁸ (**ruta C, esquema 5**), método que se ha usado principalmente en el caso de agentes alquilantes primarios.

Otra posibilidad implica la transformación de este alcóxido generado en medio básico en un buen grupo saliente (**ruta D, esquema 5**). Una vez formado el donador de glicosilo, éste se activa convenientemente para ser transferido al alcohol aceptor. Hasta la fecha se han utilizado numerosos grupos salientes como sulfonatos, fosfatos, *O*-pentenilos o acilos anoméricos⁷⁶, pero sin ningún lugar a dudas, el método más aplicado es el del tricloroacetimidato⁷⁰, introducido por R. Schmidt en la década de los 80. Este donador de glicosilo se activa mediante la utilización de medios ácidos suaves que pueden ser efectivos en cantidades catalíticas y además el control de factores tales como la temperatura, el disolvente o el promotor, permiten modular la estereoquímica del enlace glicosídico formado.

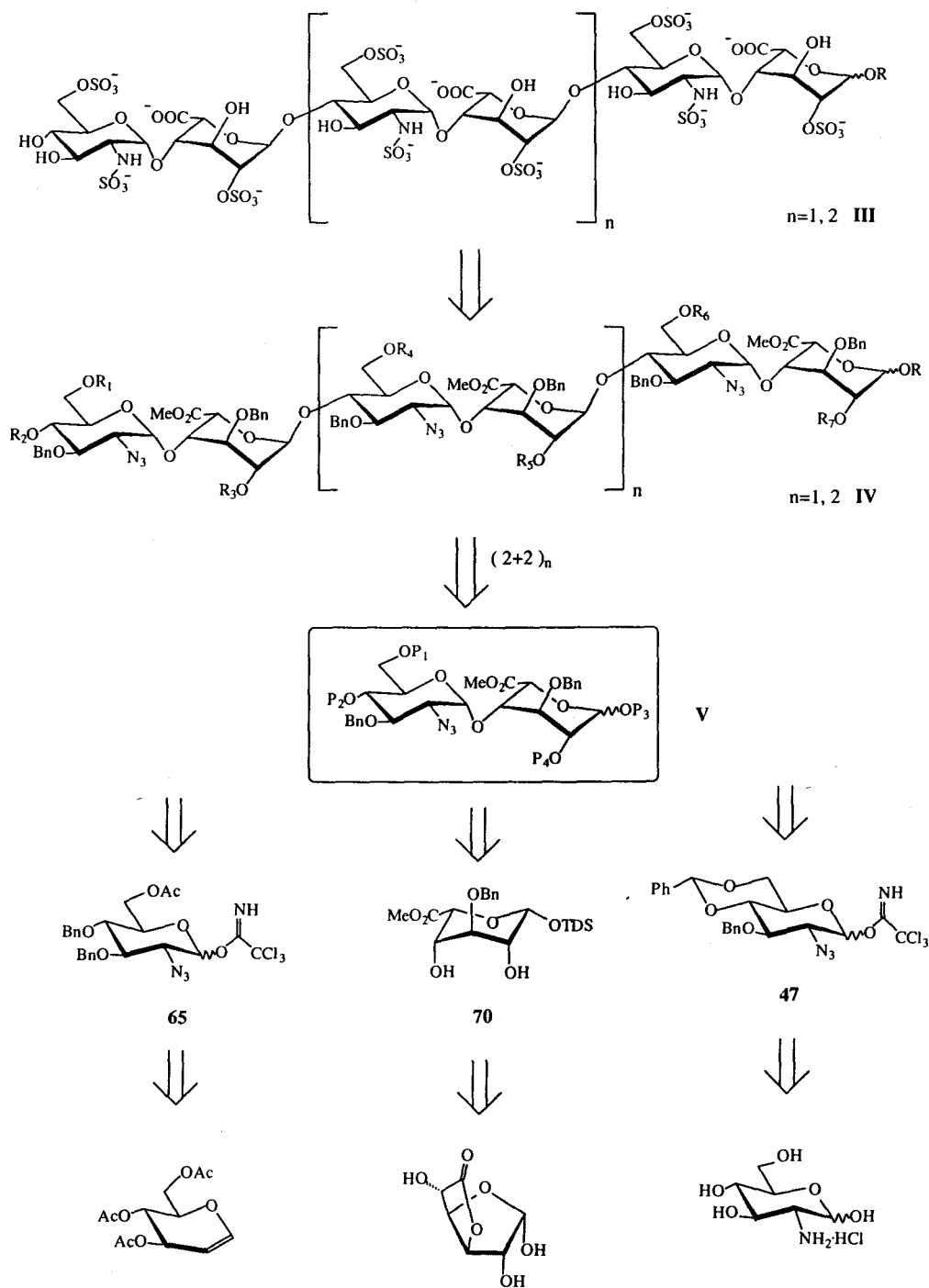
3.2 Análisis retrosintético.

El esquema retrosintético empleado en la síntesis de las moléculas objetivo se ilustra en el **esquema 6**. Para la obtención de estos fragmentos oligosacáridicos de tipo **III** se han utilizado como precursores derivados totalmente protegidos tipo **IV**, que poseen una adecuada distribución de grupos protectores lo que permite reproducir el patrón de sulfatación de la región regular de la heparina. Estos derivados tipo **IV** se han obtenido siguiendo una secuencia de glicosidaciones $n+2$, a partir de los disacáridos tipo **V** que se han condensado entre sí para generar cadenas con un número creciente de unidades. Se ha elegido, por tanto, una estrategia sintética convergente que requiere la preparación de diversos derivados disacáridicos convenientemente sustituidos de tipo **V** para actuar como donadores y aceptores de glicosilo y cuya combinación

78 Schmidt R. R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 212.

76 Toshima K., Tatsuta K., *Chem. Rev.*, 1993, 93, 1503-1531 y referencias citadas.

70 Schmidt R. R., Kinzy W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1994, 50, 21-123.

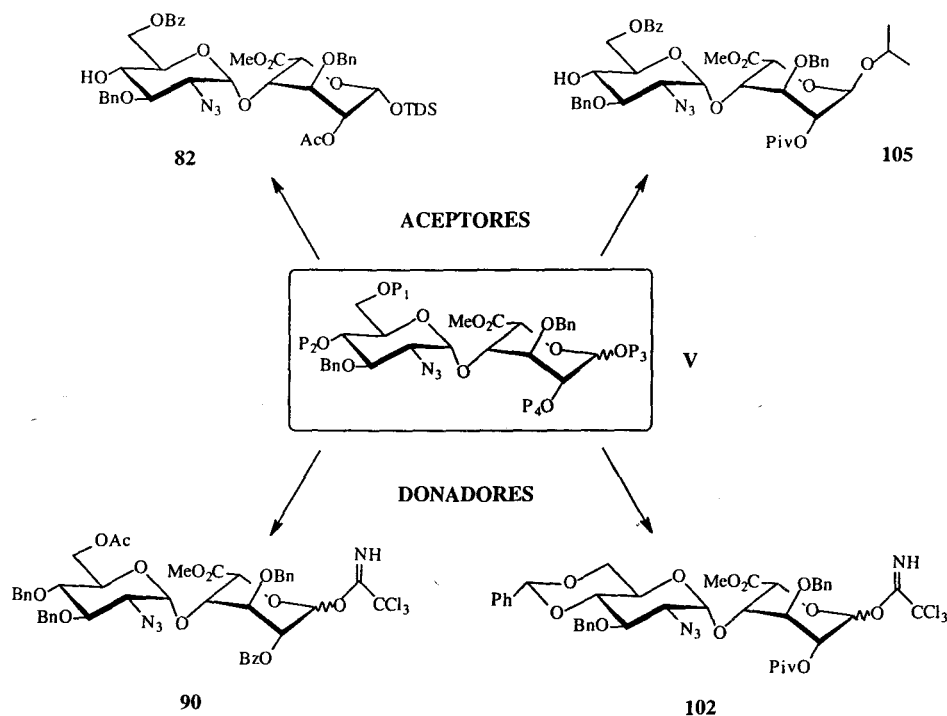


ESQUEMA 6

genera bloques mayores (tetra-, hexasacáridos, etc) preparados para seguir

elongando la cadena.

En la estructura general de los disacáridos **V** se incluyen a los correspondientes derivados donadores y aceptores, algunos de los cuales aparecen en el **esquema 7**. Para la síntesis de estos disacáridos se han empleado como sintones de partida dos unidades diferentes de D-glucosamina, **47** y **65**, y una unidad de ácido L-idurónico, **70**. Estos sintones monosacáridicos se han obtenido a partir de sustancias de partida comerciales, como son el tri-*O*-acetil-D-glucal, la 3,6-D-glucuronolactona y el hidrocloreuro de D-glucosamina.



ESQUEMA 7

A continuación, y una vez expuestas las bases del esquema retrosintético propuesto, se hacen algunas consideraciones relacionadas con cada una de las desconexiones indicadas en el mismo.

En primer lugar, la secuencia de reacciones que ha conducido a las moléculas de tipo **III** a partir de los derivados completamente protegidos de tipo **IV** ha implicado 4 etapas:

- a) hidrólisis de todos los grupos ésteres de la molécula (grupos acilo y carboximetilo), empleando para ello un medio básico hidroalcohólico fuerte;
- b) sulfatación exhaustiva de los hidroxilos libres generados en la etapa anterior, mediante el uso de reactivos de sulfatación adecuados (complejo $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$);
- c) hidrogenólisis de los grupos bencilo, que transcurre con reducción simultánea de los grupos azido a grupos amino libres;
- d) *N*-sulfatación selectiva de los grupos amino liberados en la etapa anterior, empleando el complejo $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ y manteniendo el pH constante a 9.5.

Obviamente, para que esta secuencia de cuatro etapas haya sido efectiva ha sido necesario aplicar en la ruta sintética una adecuada **estrategia de grupos protectores** que ha tenido en cuenta los siguientes aspectos:

- a) la presencia de grupos *O*-sulfato, *N*-sulfato y carboxilato en posiciones definidas de las moléculas finales tipo **III** que respondan al patrón estructural de la región regular de la heparina;
- b) la estereoquímica de los enlaces glicosídicos en las moléculas finales de tipo **III**, que implica la formación de uniones 1,2-*cis* o 1,2-*trans* a lo largo del esquema sintético.

Para responder al primer apartado, se ha usado una adecuada combinación de grupos protectores permanentes y temporales. Se han empleado grupos bencilo permanentes para los hidroxilos no sulfatados en las estructuras finales y grupos acilo para las posiciones sulfatadas. Además, los grupos amino que aparecen

sulfatados en las estructuras finales se han mantenido enmascarados como grupos azido durante la ruta sintética para ser liberados en las etapas finales de desprotección. Esta estrategia, muy usada en la obtención de oligosacáridos que contienen unidades de D-glucosamina en su estructura ha implicado el uso de derivados de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranososa como materiales de partida.

En cuanto a la estereoquímica de las reacciones de glicosidación, es bien sabido que, en general, pueden proceder con o sin participación del grupo vecino en la posición 2 del donador para dar mayoritariamente glicósidos 1,2-*trans* o 1,2-*cis* respectivamente (**figura 8**). De esta manera, el empleo de sintones de 2-azido-2-desoxi-D-glucosa como **VI** permite la formación de glicósidos 1,2-*cis*. Por el contrario, cuando se emplean donadores como **VII** en las reacciones de glicosidación, existe participación de grupo vecino que conduce a glicósidos 1,2-*trans*.

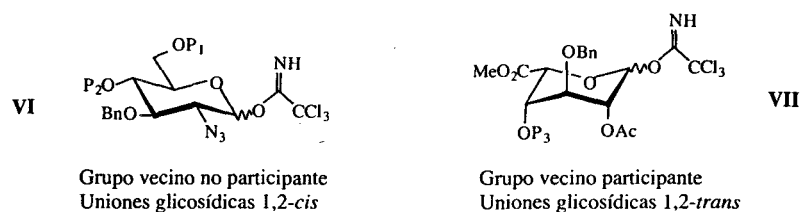


FIGURA 8

Otro aspecto a destacar en la estrategia sintética utilizada es el hecho de que la formación de los disacáridos base tipo **V** se ha llevado a cabo a través de una **reacción de glicosidación regio- y estereoselectiva**, siendo esta una etapa clave del esquema, donde las unidades de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranososa **47** y **65** se han usado como donadores de glicosilo mientras que la unidad de ácido L-idurónico **70** ha actuado como aceptor.

Esta elección ha sido especialmente conveniente si se tienen en cuenta los siguientes factores. En primer lugar, los derivados de ácido L-idurónico son sintones muy valiosos cuya síntesis a escala multigramo implica la utilización de

rutas sintéticas con rendimientos relativamente bajos y un elevado número de etapas. Por lo tanto, su uso como aceptores de glicosilo permite reducir la cantidad de ácido idurónico necesario para la síntesis, ya que en las reacciones de glicosidación se suele emplear exceso de donador y además es posible generalmente recuperar el sintón aceptor cuando la reacción de glicosidación no se completa. Por otra parte, estudios de reactividad previamente realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto serias dificultades en la funcionalización selectiva de los hidroxilos de las posiciones 2 y 4 de **70**, dificultades que se han solucionado de forma efectiva gracias a la regioselectividad observada en las reacciones de glicosidación que conducen a los disacáridos base tipo **V**.

Por último, hay que destacar la elección del grupo isopropilo para la protección del terminal reductor de los productos finales **I** y **II**. La obtención de los correspondientes isopropilglicósidos presenta ventajas importantes, sin modificar significativamente las propiedades biológicas y estructurales del oligosacárido sintético. Por un lado, protege al extremo reductor a lo largo de la síntesis, mimetizando el enlace glicosídico α presente en esta posición en la heparina natural. Por otra parte, la etapa de introducción de este grupo isopropilo transcurre con alta estereoselectividad y buen rendimiento si se compara con otros grupos alquilo como el metilo. Además, es lógico suponer que la conformación del extremo reductor debe imitar mejor la del polisacárido natural al tratarse en ambos casos de un glicósido de alcohol secundario. En esta memoria se recoge también una primera síntesis de derivados hexasacarídicos protegidos (**91** y **94**) que poseen un grupo sililo o metilo en la posición anomérica del terminal reductor y que fueron importantes para explorar las posibilidades de la ruta sintética diseñada.

En los siguientes apartados, se describe la aplicación de esta estrategia en la síntesis de las moléculas objetivo **I** y **II**, trabajo que constituye la parte fundamental de la presente Tesis Doctoral.

3.3 Síntesis de la unidad de glucosamina 47.

Como se ha apuntado en el capítulo anterior, para la obtención de las moléculas objetivo es necesario obtener sintones de D-glucosamina que actúen como donadores de glicosilo en las correspondientes reacciones de glicosidación, convenientemente sustituidos para permitir protecciones y desprotecciones selectivas que permitan la elongación de la cadena oligosacárida del modo deseado.

Para formar las unidades destinadas a ocupar las posiciones B y D del hexasacárido **I** y B, D y F del octasacárido **II**, se han elegido precursores activados como tricloroacetimidatos en la posición anomérica con grupos protectores P₁, P₂ y P₃ ortogonales entre sí (**figura 9**). Esto último debe permitir la sulfatación selectiva de la posición 6 y la obtención de derivados con un hidroxilo libre en la posición 4, para actuar como aceptores de glicosilo. Además, como ya se comentó en el análisis retrosintético, el grupo amino se ha mantenido enmascarado como función azido durante toda la ruta sintética hasta la secuencia final de desprotecciones.

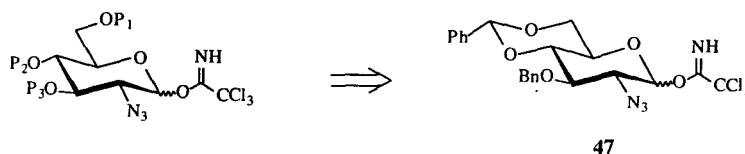


FIGURA 9

El 2-azido-2-desoxi derivado **47**^{79,54} (**figura 9**) cumple los requisitos anteriormente citados ya que la presencia de un bencilidén acetal como grupo protector para las posiciones 4 y 6 (P₁ y P₂) permite la diferenciación selectiva de dichas posiciones. Su síntesis a escala multigramo se discute a continuación.

79 A) Murakata C., Ogawa T., *Carbohydr. Res.*, 1992, 234, 75-91; B) Toepfer A., Schmidt R.R., *J. Carbohydr. Chem.*, 1993, 12, 809-822; C) Kinzy W., Schmidt R.R., *Liebigs Ann. Chem.*, 1985, 1537-1545; D) Kinzy W., Schmidt R.R., *Liebigs Ann. Chem.*, 1987, 407-415, E) Eisele T., Ishida H., Hummel G., Schmidt R.R., *Liebigs Ann.*, 1995, 2113-2121.

54 La Ferla B., Lay L., Guerrini M., Poletti L., Panza L., Russo G., *Tetrahedron*, 1999, 55, 9867-9880.

Los 2-azido-2-desoxi azúcares son intermedios que se usan con mucha frecuencia en la síntesis de aminodesoxioligosacáridos⁸⁰. Algunos de los métodos para la preparación de estas azidas implican la utilización de glicales como precursores, por azidonitración⁸¹ o adición de haloazidas⁸², y 1,6-anhidroglicosas, mediante apertura de epóxidos⁸³ o sustitución de 2-*O*-triflatos⁸⁴. Sin embargo, estas rutas presentan baja estereoselectividad y requieren un elevado número de etapas. Por otra parte, es posible introducir directamente la función azida utilizando una reacción de transferencia de diazo a partir de 2-amino-2-desoxi azúcares^{85,86}. Este método, que cuenta con indudables ventajas frente a los anteriormente citados, permite obtener el derivado **40** (esquema 8) a partir de hidrocloreto de glucosamina comercial con un buen rendimiento, sin necesidad de purificaciones intermedias, aunque requiere la utilización de disoluciones de trifilazida (TfN₃), que puede originar reacciones explosivas si no se trabaja en condiciones controladas.

Siguiendo este procedimiento, se sintetizó el compuesto **40** de acuerdo con las condiciones experimentales detalladas en la bibliografía⁸⁵ y tomando las medidas de seguridad apropiadas para el manejo de las disoluciones de TfN₃. Así, el hidrocloreto de glucosamina comercial, previamente tratado con disolución de MeONa en MeOH, se hizo reaccionar con disolución de TfN₃ en presencia de DMAP como catalizador. El intermedio **41** obtenido se sometió a acetilación convencional (Ac₂O/Py) para dar el derivado **40** con rendimientos aceptables (73%, escala de 5 gramos). Este compuesto se desacetiló en medio hidroalcohólico ácido (IR 120H⁺)⁸³ y se trató con el dimetilacetal del benzaldehído en presencia de *p*-TsOH para dar el acetal **42** (ruta A, esquema 8).

En un intento de mejorar el rendimiento del proceso y reducir el número total de etapas se ensayó la reacción de bencilidenación directamente sobre el

80 Paulsen H., Györgydeak Z., Szilagyi L., *J. Carbohydr. Chem.*, 1993, 12, 139-163.

81 Lemieux R. U., Ratcliffe R. M., *Can. J. Chem.*, 1979, 57, 1244.

82 Bovin N. V., Zurabyan S. E., Khorlin A. Y., *Carbohydr. Res.*, 1981, 98, 25.

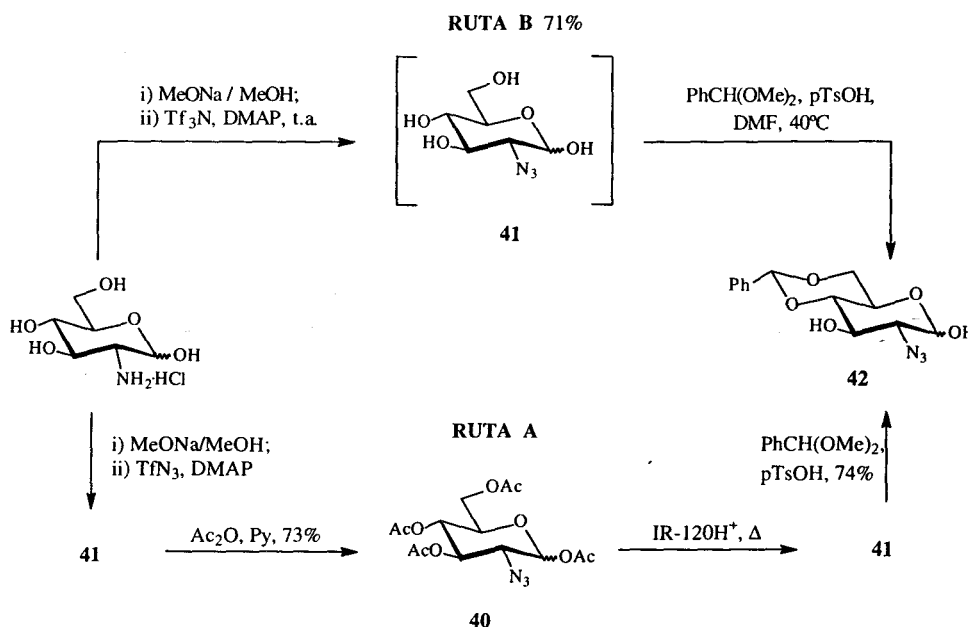
83 Paulsen H., Stentzel W., *Chem. Ber.*, 1978, 111, 2334-2347.

84 Kloosterman M., de Nijs M. P., van Boom H. J., *Carbohydr. Res.*, 1986, 5, 215.

85 Vasella A., Witzig C., Martín-Lomas M., Chiara J.L., *Helv. Chim. Acta*, 1991, 74, 2073-2077.

86 Alper P.B., Hung S.C., Wong C.H., *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 6029-6032.

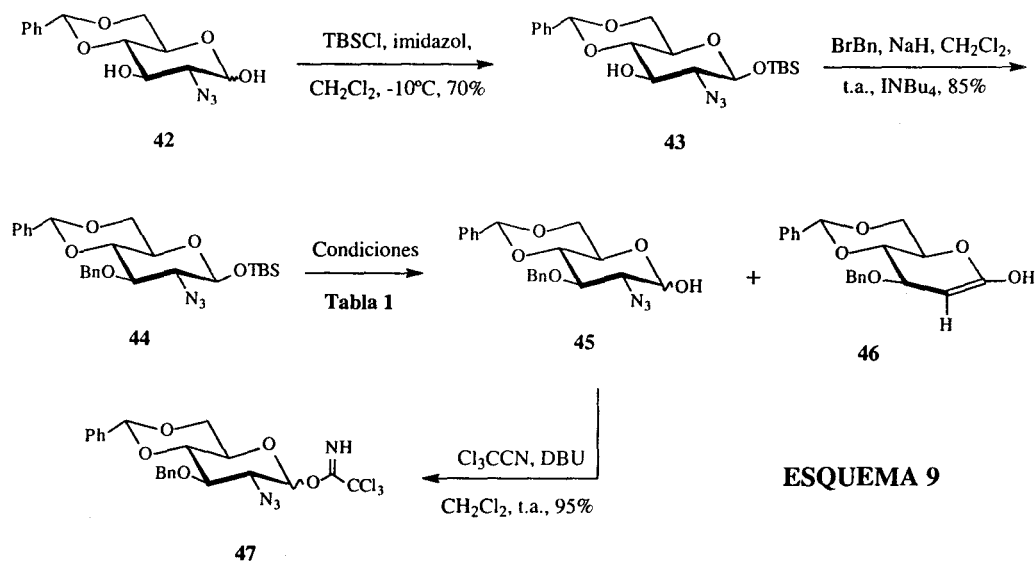
intermedio **41** obtenido tras la transferencia diazo (**ruta B, esquema 8**). Los resultados, empleando nuevamente el dimetilacetal del benzaldehído y p-TsOH a 40°C, fueron muy satisfactorios. Se consiguió un rendimiento total del 71% en **42**, reduciendo el número de etapas de la ruta. Este rendimiento fue reproducible a mayor escala (hasta 10 gramos de hidrocloreto de glucosamina de partida), aspecto muy importante en la obtención de sintones monosacáridicos en síntesis de oligosacáridos. Es, no obstante, necesario resaltar que es imprescindible tomar las máximas precauciones en la reacción de transferencia de grupo diazo dada la peligrosidad que implica el uso de soluciones de TfN₃ en cantidad apreciable.



ESQUEMA 8

El siguiente paso consistió en la introducción selectiva de un grupo sililo en la posición anomérica, dejando libre el hidroxilo de la posición 3. En esta reacción se empleó TBSCl, imidazol como base y CH₂Cl₂ como disolvente (**esquema 9**). Se realizaron diversos ensayos encaminados a optimizar las condiciones para mejorar la selectividad de la reacción. Empleando cantidades equimolares del agente sililante y temperaturas bajas (-10°C) se accedió al

compuesto **43** con un rendimiento aceptable (70%) para el anómero β , que se separó fácilmente por cromatografía en columna de pequeñas cantidades del anómero α y del compuesto disililado en 1 y 3. La obtención del anómero β puro ha permitido emplear diastereoisómeros puros en los pasos de síntesis posteriores.



La protección de la posición 3 del anillo de glucosamina de **43** con un grupo bencilo, según la estrategia de grupos protectores prevista, se llevó a cabo mediante el procedimiento convencional (esquema 9): BnBr, NaH como base y CH₂Cl₂ como disolvente, y se obtuvo **44** con buen rendimiento (85%). La adición de cantidades catalíticas de INBu₄ aceleró notablemente la velocidad de esta reacción.

Una vez obtenido el compuesto **44** se procedió a desproteger selectivamente la posición anomérica, como paso previo a la formación del tricloroacetimidato donador correspondiente. Para la desprotección selectiva de sililéteres se han empleado reactivos que son fuente de fluoruros, como el TBAF o el complejo (HF)_n·Py, lo que permite llevar a cabo la reacción en medio básico o ácido.

El compuesto **44** se trató, en primer lugar, con una cantidad equimolar de TBAF en THF seco a -40°C (**esquema 9**). Se obtuvo **45** con buen rendimiento (86%), pero el análisis de los espectros de RMN indicó la formación del producto secundario **46**. El tratamiento con fluoruros en medio básico dio lugar, por tanto, a la eliminación de una molécula de ácido hidrazoico (HN_3) en **45** con la consiguiente formación de un anillo 1,2 insaturado. Este derivado **46** presentó una movilidad cromatográfica similar a la de **45**, lo que dificultó su purificación por cromatografía en columna.

Esta reacción de eliminación indeseada no se observa en medios de reacción ácidos, por lo que se decidió modificar las condiciones de reacción. El tratamiento de **44** con una mezcla 1:1 TBAF-AcOH en THF a -40°C proporcionó **45** con rendimiento cuantitativo y sin formación del compuesto de eliminación (**tabla 1**). También se usó, para la misma reacción, un exceso del complejo $(\text{HF})_n \cdot \text{Py}$ en THF, obteniéndose resultados similares (rto. 94%).

<i>Reactivo</i>	<i>Rto. 45</i>	<i>Rto. 46</i>
TBAF	86%	> 10%
TBAF + AcOH	100%	---
$(\text{HF})_n \cdot \text{Py}$	94%	---

TABLA 1

El compuesto **45** se hizo reaccionar con un exceso de Cl_3CCN en presencia de una cantidad catalítica de DBU en CH_2Cl_2 como disolvente (**esquema 9**), condiciones desarrolladas en la década de los 80 por R. Schmidt et al.⁷⁰ y ampliamente utilizadas en nuestro laboratorio para la obtención de tricloroacetimidatos de glicosilo. De esta forma se obtuvo **47** (95%) como una mezcla de anómeros α/β , que se empleó en las reacciones de glicosidación previa

⁷⁰ Schmidt R. R., Kinzy W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1994, 50, 21-123.

purificación por cromatografía sobre gel de sílice tratada con 1% de Et₃N en el eluyente. Es importante destacar que este porcentaje de Et₃N es necesario para evitar la hidrólisis en la gel de sílice de tricloroacetimidatos especialmente reactivos como **47**.

3.4 Síntesis de la unidad de glucosamina 65.

Según el esquema retrosintético propuesto (**esquema 6**), se han utilizado dos precursores diferentes para las unidades de D-glucosamina de las moléculas objetivo: **47** y **65**. La molécula **47** está destinada a ocupar las posiciones “internas” de los oligosacáridos, es decir, las posiciones B y D en el hexasacárido **I** y las posiciones B, D y F en el caso del octasacárido **II**. Por otra parte, el sintón **65** está destinado a ocupar el terminal no reductor de las cadenas, ya que el patrón de grupos protectores en éste debe permitir la sulfatación selectiva de la posición 6. El uso de **47** como único precursor de las unidades de glucosamina no permitiría funcionalizar selectivamente la posición 6 debido a la incompatibilidad de los grupos protectores existentes con las condiciones de apertura reductiva u oxidativa de bencilidén acetales.

Al igual que en el caso de **47**, la síntesis de **65** implica la preparación de un anillo de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranososa activado como tricloroacetimidato (**figura 10**), pero, en este caso, los grupos protectores han sido un grupo acilo para la posición 6 (P_1) y éteres bencilicos para las posiciones 3 y 4 (P_2). El derivado **65** cumple todos estos requisitos y su síntesis se detalla a continuación.

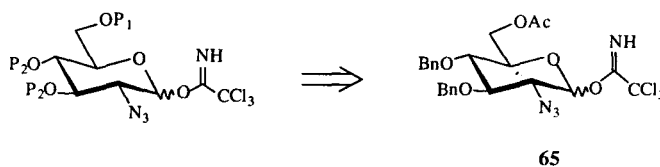
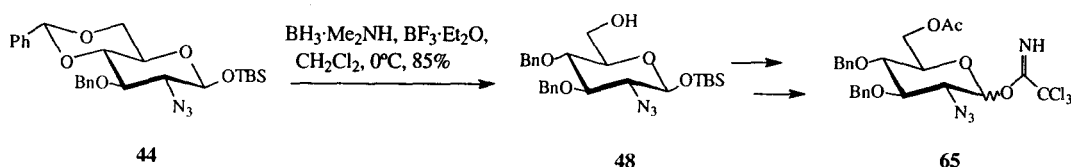


FIGURA 10

Como se indica en el **esquema 10**, la síntesis de **65** puede llevarse a cabo partiendo de **44** por reacción de apertura selectiva del bencilidén acetal, en condiciones reductivas, empleando el complejo $BH_3 \cdot NHMe_2$ ⁸⁷, $BF_3 \cdot Et_2O$ como ácido de Lewis y CH_2Cl_2 como disolvente para dar el compuesto **48** con un rendimiento excelente (85%). Este derivado puede transformarse en tres etapas en el correspondiente donador de glicosilo **65**.

⁸⁷ Oikawa M., Liu W.C., Nakai Y., Koshida S., Fukase K., Kusumoto S., *Synlett*, 1996, 1179-1180.



ESQUEMA 10

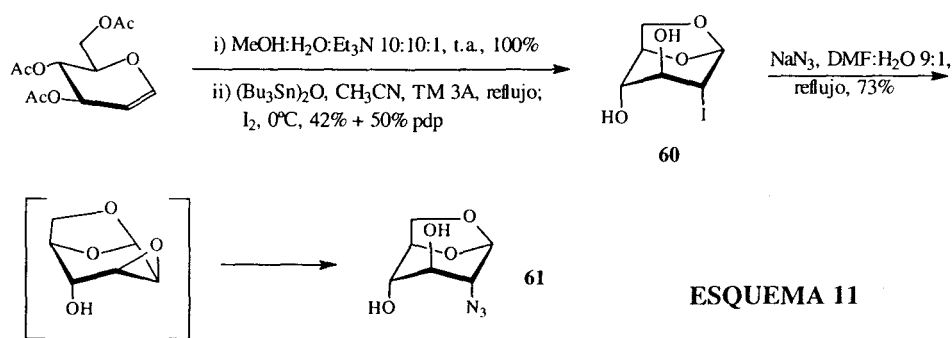
No obstante, y con la idea de explorar y comparar otras vías de obtención de estos derivados de 2-azido-2-desoxi-D-glucosa, se decidió explorar para la obtención del sintón **65** la ruta desarrollada por J.M. Beau et al.⁸⁸ utilizando como material de partida tri-*O*-acetil-D-glucal, sustancia disponible comercialmente.

En esta ruta, después de hidrolizar los acetatos del producto comercial empleando un método convencional recogido en la bibliografía⁸⁹, el D-glucal resultante se sometió a reacción de 1,6-yodociclación (**esquema 11**). El derivado *O*-estaniado que se obtiene por calentamiento a reflujo en la presencia de $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$ y CH_3CN como disolvente se trató con I_2 , dando lugar a **60** con un rendimiento del 42% y recuperando un 50% del producto de partida. Este rendimiento difiere considerablemente del recogido en la bibliografía (84%) lo que puede atribuirse a la diferente escala empleada en nuestro caso (40 gramos de sustancia de partida).

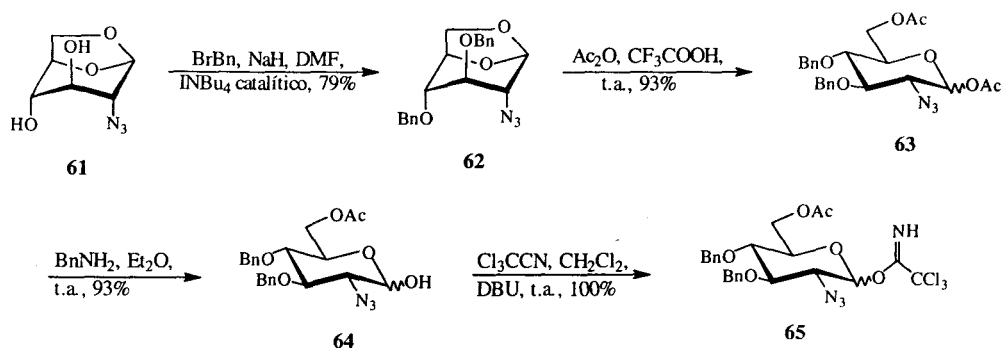
A partir de **60** se obtuvo el derivado **61** por tratamiento a reflujo con NaN_3 en una mezcla $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (**esquema 11**). Tal como han propuesto Beau et al.⁸⁸ esta transformación estereoselectiva transcurre con retención de la configuración debido a la formación de un epóxido intermedio (**esquema 11**), que sufre ataque *trans*-diaxial por parte del ion azida. De hecho, este epóxido intermedio puede aislarse a partir de **60** si se controlan estrictamente las condiciones de reacción (MeONa , t.a., 45 min.).

⁸⁸ Tailler D., Jacquinet J.C., Noirot A.M., Beau J.M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1992, 3163-3164.

⁸⁹ Czerniecki S., Leteux C., Veyrieres A., *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 221-224.



Como puede observarse en el **esquema 12**, la bencilación de **61** transcurre con alto rendimiento para dar **62**⁹⁰, que se somete a reacción de acetólisis con Ac₂O y CF₃COOH. Se llega así al derivado **63** (93%), listo para ser convertido eficientemente en el correspondiente donador de glicosilo.



Para ello, se han ensayado diversos métodos de desacetilación anomérica^{91,92} selectiva sobre **63** (**esquema 12**). Tanto el empleo de acetato de hidrazinio en DMF a 40°C como el de BnNH₂ en Et₂O a temperatura ambiente han dado resultados similares (93%), y se eligió este último reactivo para la

⁹⁰ Hori H., Nishida Y., Ohruji H., Meguro H., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 1346-1353.

⁹¹ A) Excoffier G., Gagnaire D., Utille J.P., *Carbohydr. Res.*, 1986, 156, 241-246; B) Salat C., Agneseti P.A., Caniato M.B., *Spanish Pat.* 430.636, 1976-*Chem. Abstr.*, 1987, 87, 23683k; C) Mikamo M., *Carbohydr. Res.*, 1989, 191, 150-153; D) Zhang J., Kovac P., *J. Carbohydr. Chem.*, 1999, 18, 461-469.

⁹² Lassaletta J.M., Carlsson K., Garegg P.J., Schmidt R.R., *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 6873-6880.

síntesis a escala multigramo de **64**. La formación del tricloroacetimidato **65**⁵⁴ (**esquema 12**) no presentó mayores problemas y se realizó con Cl_3CCN y DBU como base, siendo necesario el empleo de eluyentes tratados con un 1% de Et_3N en la purificación cromatográfica, para evitar la hidrólisis del donador.

54 La Ferla B., Lay L., Guerrini M., Poletti L., Panza L., Russo G., *Tetrahedron*, 1999, 55, 9867-9880.

3.5 Síntesis de la unidad de ácido L-idurónico 70.

Según el esquema retrosintético diseñado (**esquema 6**), es necesario disponer de derivados de ácido L-idurónico convenientemente sustituidos, como se recoge en la **figura 11**. El método seguido para preparar tales derivados debe prever la introducción de la función carboxilato en los pasos iniciales de la síntesis para evitar tener que llevar a cabo reacciones de oxidación en intermedios avanzados con configuración *L-ido*. Tales derivados de ácido idurónico deben reunir además las siguientes características:

- la posición 4 del anillo debe poder glicosidarse selectivamente;
- las posiciones 2 y 3 deben contener grupos protectores ortogonales para permitir la sulfatación selectiva en las etapas finales de la síntesis (un grupo protector permanente en posición 3 y un grupo protector temporal en posición 2);
- el hidroxilo de la posición anomérica debe estar protegido con otro grupo protector ortogonal que permita su desprotección selectiva y su activación para reaccionar con aceptores de glicosilo.

El derivado **70** cumple todos estos requisitos y en esta sección se comenta brevemente su síntesis, llevada a cabo en nuestro grupo de investigación.

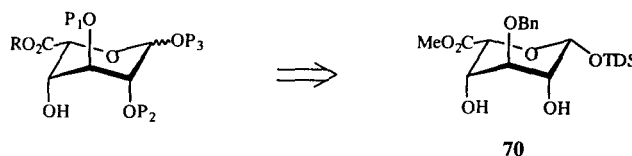


FIGURA 11

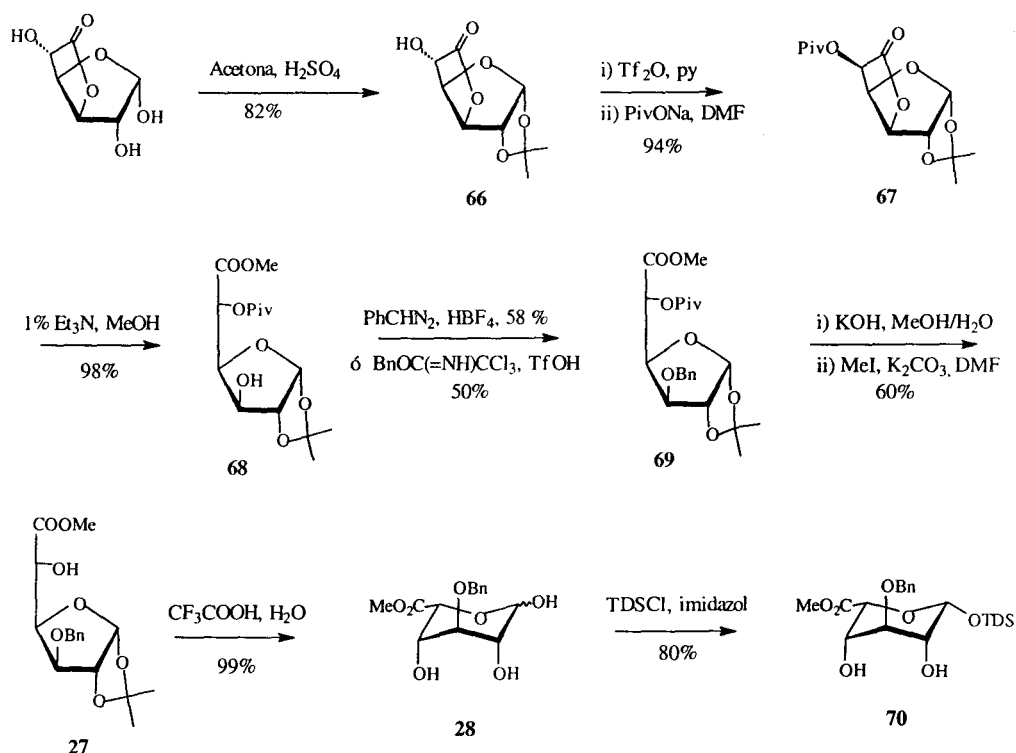
Como se comentó en el **capítulo 1.2.2**, las rutas sintéticas previamente desarrolladas para la obtención de derivados de ácido L-idurónico implican un elevado número de etapas y rendimientos globales bajos. Por todo ello, se

decidió desarrollar una nueva síntesis⁵⁵ para acceder al derivado **70** con un buen rendimiento, y que ha sido la ruta elegida para la obtención de esta sustancia de partida en la síntesis de las moléculas objetivo **I** y **II**.

En esta síntesis, que se ilustra en el **esquema 13**, se han utilizado como producto de partida D-glucurono-6,3-lactona comercial que puede ser transformada fácilmente en el isopropilidén derivado **66** por tratamiento con H₂SO₄/acetona. La reacción de inversión de la configuración del hidroxilo 5 se ha llevado a cabo mediante esterificación con Tf₂O/Py y posterior reacción con PivONa. Se accede así al derivado **67** con excelente rendimiento. La estabilidad del grupo pivaloílo en medios básicos moderados ha permitido realizar la apertura de la lactona con 1% de Et₃N/MeOH (**68**). La bencilación del hidroxilo libre 3 es la etapa clave de la ruta sintética. Se ensayaron para ello diversos métodos de bencilación, evitando en todo momento las condiciones básicas habituales que implicarían la formación del anillo de lactona. Empleando PhCHN₂ y HBF₄ como catalizador o bien benciltricloroacetimidato y TfOH catalítico se han conseguido rendimientos del orden del 50-58% para el derivado bencilado **69**. La hidrólisis del grupo pivaloílo se ha llevado a cabo por tratamiento con KOH hidroalcohólica, seguida de reacción de re-metilación del carboxilato resultante con MeI y K₂CO₃ en DMF. De esta forma, se accedió a **27**, que se sometió finalmente a reacción con CF₃COOH-H₂O para hidrolizar el isopropilidén acetal. Así se ha sintetizado **28**, derivado ya obtenido previamente por Jacquinet et al.³⁸, como se ha comentado en el **esquema 3**.

55 Ojeda R., de Paz J.L., Martín-Lomas M., Lassaletta J.M., *Synlett*, 1999, 8, 1316-1318.

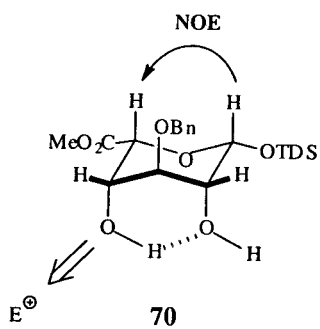
38 Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1984, 130, 221-241.



ESQUEMA 13

La sililación regio- y estereoselectiva de la posición anomérica se llevó a cabo con TDSCl e imidazol a baja temperatura, con lo que se obtuvo exclusivamente el β -glicósido **70** con un rendimiento excelente (80%). El análisis detallado de los espectros de RMN (disolvente CDCl_3) de este producto indica que la conformación ${}^1\text{C}_4$ es la preferida en disolución, tal y como se deduce del patrón de constantes de acoplamiento, incluyendo la J a largo alcance entre H-2 y H-4 (figura 12). Adicionalmente, se observa un fuerte efecto NOE entre los protones H-1 y H-5, lo cual confirma la configuración anomérica β . Además, las constantes de acoplamiento $J_{4,\text{OH}-4} = 11.5 \text{ Hz}$ y $J_{2,\text{OH}-2} \approx 0.0\text{Hz}$ sugieren que esta conformación de silla está estabilizada por un puente de hidrógeno intramolecular $\text{OH}-4 \rightarrow \text{O}-2$. Este hecho tiene importantes consecuencias ya que el impedimento estérico sobre el OH-2 unido a la disminución de la nucleofilia por la existencia de este puente de hidrógeno,

permite predecir en este punto que el ataque de especies electrófilas, como iones oxocarbenio, se dirigirán regioselectivamente hacia el OH-4.

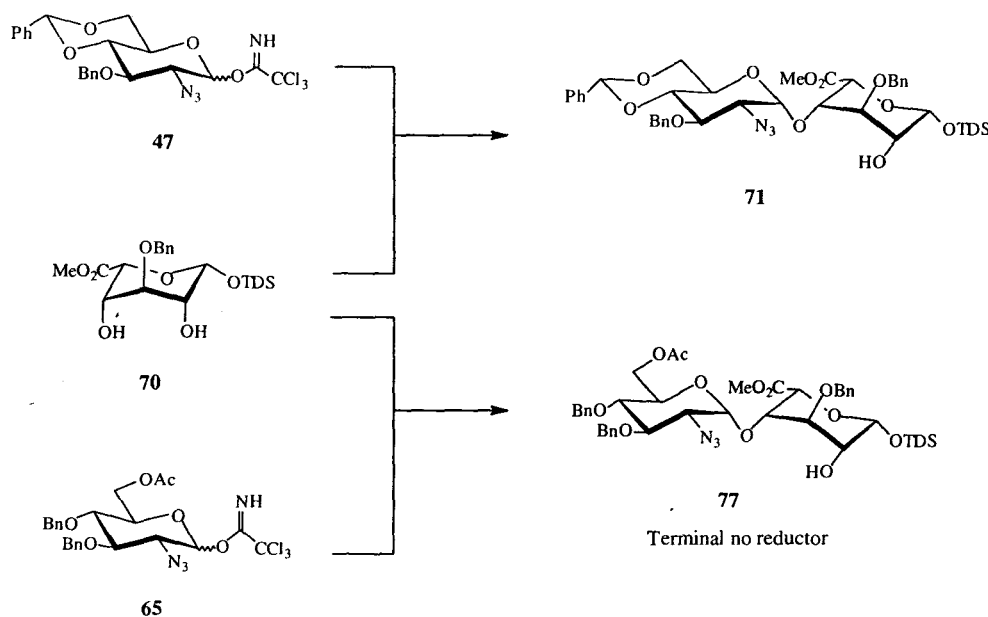


$J_{1,2} = 1.1 \text{ Hz}$	${}^4J_{2,4} = 1.1 \text{ Hz}$
$J_{2,3} = J_{3,4} = 3.1 \text{ Hz}$	$J_{2,\text{OH-2}} = 0 \text{ Hz}$
$J_{4,5} = 1.4 \text{ Hz}$	$J_{4,\text{OH-4}} = 11.5 \text{ Hz}$

FIGURA 12

3.6 Síntesis de disacáridos base V.

Una vez expuestas las rutas sintéticas utilizadas en la obtención de las sustancias de partida, se detallan los resultados obtenidos en las reacciones de glicosidación que han permitido acceder a las moléculas finales **I** y **II**. Según el esquema retrosintético (**esquema 6**), el siguiente paso para la obtención de estos oligosacáridos consiste en la glicosidación de los sintones donadores de glicosilo **47** y **65** con el correspondiente aceptor **70**, para obtener los bloques disacáridicos tipo **V** convenientemente sustituidos para permitir la posterior elongación de la cadena (**esquema 14**).



ESQUEMA 14 Síntesis de disacáridos base V

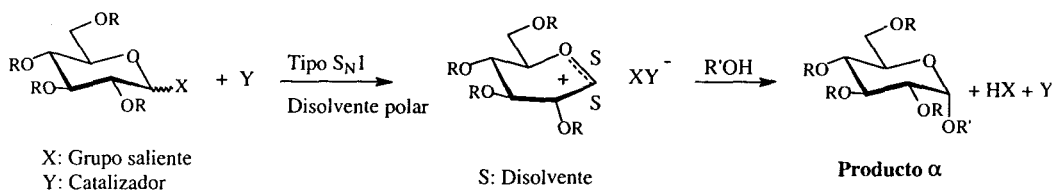
En este punto, es importante comentar que entre los muchos métodos de glicosidación existentes se ha elegido en este Tesis Doctoral el método del tricloroacetimidato desarrollado por Schmidt⁷⁰ en la década de los 80. Esta elección se ha basado en los excelentes resultados en la síntesis de

⁷⁰ Schmidt R. R., Kinzy W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1994, 50, 21-123.

oligosacáridos complejos usando este grupo saliente recogidos en la literatura. Un riguroso control de las condiciones experimentales permite dirigir convenientemente la estereoselectividad del enlace glicosídico formado, aspecto fundamental en este campo de la Química. Otras ventajas del uso del tricloroacetimidato sobre otros grupos salientes en la posición anomérica son su mayor estabilidad y las condiciones catalíticas por ácidos de Lewis que se requieren en el acoplamiento aceptor-donador, evitando el empleo de sales de metales pesados en cantidad equimolecular como promotores. A estas ventajas hay que añadir la conveniencia en el uso de tricloroacetimidatos de ácido L-idurónico cuando es esta unidad la que actúa como donador, hecho éste apuntado en una reciente revisión de Sinay et al. y sobre el que se volverá a incidir en la siguiente sección⁵⁷.

Como se ha comentado en el capítulo anterior, el análisis de los datos de RMN de **70** indica la existencia de un puente de hidrógeno intramolecular entre los hidroxilos 2 y 4, con una disposición tal que exalta la nucleofilia del OH-4 frente al OH-2, posición impedida además por factores estéricos (grupo TDS voluminoso). Por tanto, es de esperar que la regioselectividad de las reacciones de glicosidación de **70** se dirija hacia el OH-4. En cuanto a la estereoquímica del enlace glicosídico, la formación de enlaces glicosídicos 1,2-*cis* viene favorecida por la presencia de un grupo no participante (azida) en la posición 2 del donador. La conjunción de factores tales como el empleo de disolventes polares como el Et₂O, temperaturas relativamente altas y promotores como el TMSOTf deben favorecer la obtención de glicósidos α . En estas condiciones experimentales el curso de la reacción debe seguir esencialmente un mecanismo S_N1 con formación del correspondiente ion oxonio como intermedio y obtención del glicósido α más estable termodinámicamente (**esquema 15**).

⁵⁷ Tabeur T., Machetto F., Mallet J.M., Duchaussoy P., Petitou M., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1996, 281, 253-276.



ESQUEMA 15

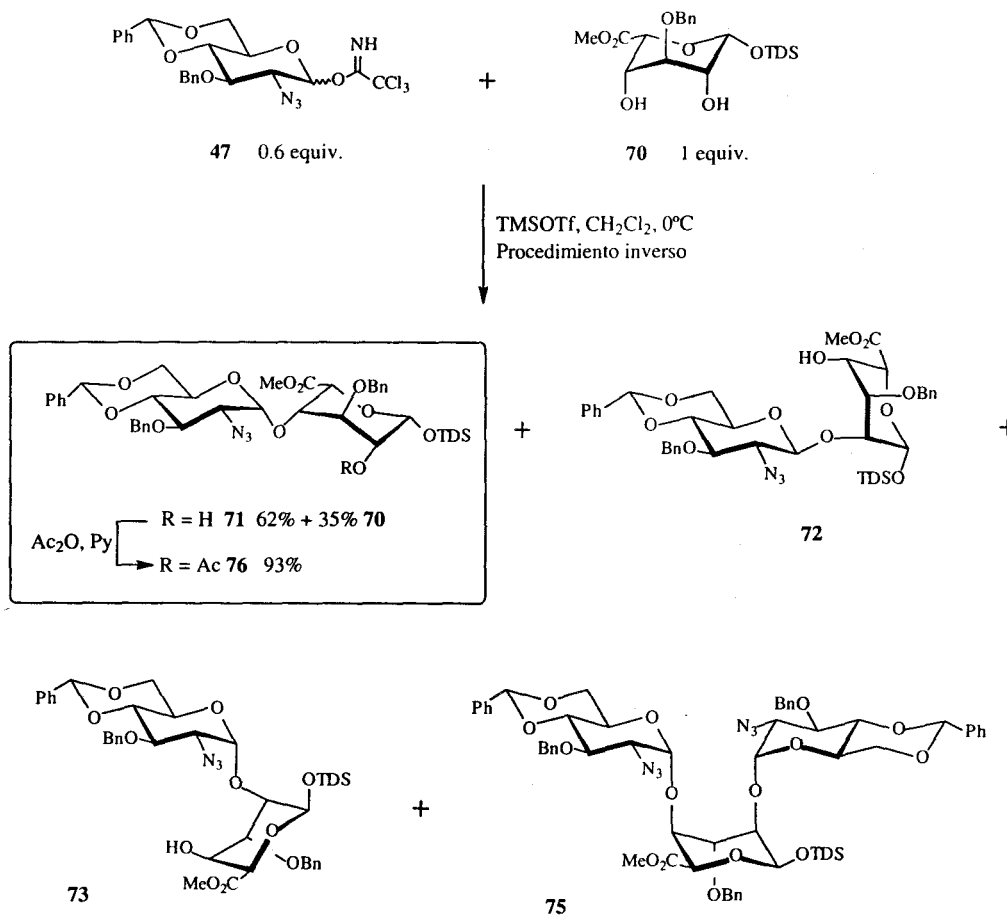
Se estudió, en primer lugar, la reacción de glicosidación entre **47** y **70**. Con el objetivo de optimizar el rendimiento de esta reacción clave se realizaron diversos ensayos variando las condiciones experimentales. Los resultados más significativos se recogen en la **tabla 2**, refiriéndose el rendimiento obtenido al del disacárido deseado **71** ($^1\text{H-RMN}$ δ 4.90, $J_{1',2'} = 3.8$ Hz, H-1'; δ 4.06, s ancho, H-4).

Ensayo	Donador:aceptor (equiv.)	Catalizador	Dte.	Procedimiento inverso	T. ($^{\circ}\text{C}$)	Rto. (%)
1	1.5:1	TMSOTf	Et ₂ O	No	0	38
2	1.5:1	TMSOTf	Et ₂ O	Sí	-20	35
3	1.5:1	TMSOTf	Et ₂ O	Sí	0	33
4	0.6:1	TMSOTf	Et ₂ O	Sí	0	46
5	1:1	TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	Sí	0	45
6	0.6:1	TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	Sí	0	62

TABLA 2

Como aparece en el **esquema 16**, además del disacárido **71** se consiguieron aislar y caracterizar subproductos, como los regioisómeros **72** ($^1\text{H-RMN}$ δ 4.32, $J_{1',2'} = 8.7$ Hz, H-1'; δ 4.05, $J_{4,\text{OH}} = 12.2$ Hz, H-4) y **73** ($^1\text{H-RMN}$ δ 5.50, $J_{1',2'} = 3.8$ Hz, H-1'; δ 3.99, $J_{4,\text{OH}} = 12.6$ Hz, H-4; para confirmar su estructura se caracterizó su derivado acetilado **74**) y el trisacárido derivado **75**

(¹H-RMN δ 5.42, J_{1',2'} = 3.9 Hz, H-1''; δ 4.88, J_{1',2'} = 3.6 Hz, H-1'; FAB m/z 1194, MNa⁺) que proviene de la condensación de 2 donadores de glicosilo sobre 2 donadores de glicosilo sobre el mismo aceptor **70**. Estos productos no han supuesto en ningún caso porcentajes significativos, pero han contribuido a comprender el curso de la reacción.



ESQUEMA 16

Como es previsible para este tipo de reacción de glicosidación, las mejores condiciones experimentales han resultado de la utilización de promotores como el TMSOTf, temperaturas en torno a 0°C y disolventes polares. Pero, como puede verse en la **tabla 2**, hay diversos aspectos adicionales que mejoran el rendimiento de la reacción y que merecen un comentario:

* El empleo de excesos de donador frente al aceptor (1.5:1 equivalentes), algo habitual en la mayoría de las reacciones de glicosidación, no ha implicado aumento en el rendimiento de **71**, sino un aumento significativo de la proporción del trisacárido **75**.

* A pesar de ser el Et₂O el disolvente más adecuado para obtener estereoselectividad α en el caso de grupos no participantes en **2**, el empleo de CH₂Cl₂ ha resultado ser más eficiente. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el Et₂O puede formar puentes de hidrógeno intermoleculares con los hidroxilos **2** y **4** de **70** impidiendo la coexistencia del puente intramolecular, algo que no ocurre cuando el disolvente es CH₂Cl₂.

* Es también significativo el aumento en el rendimiento con el empleo de medios de reacción especialmente diluidos (<0.1M), ya que en estas condiciones se favorece la existencia del puente de hidrógeno intramolecular entre OH-**2** y OH-**4**.

* La reacción se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento inverso, propuesto por Schmidt⁷⁰. Así, a una disolución de aceptor y promotor en CH₂Cl₂ se le añadió lentamente el donador de glicosilo minimizando la formación de tricloroacetamidas.

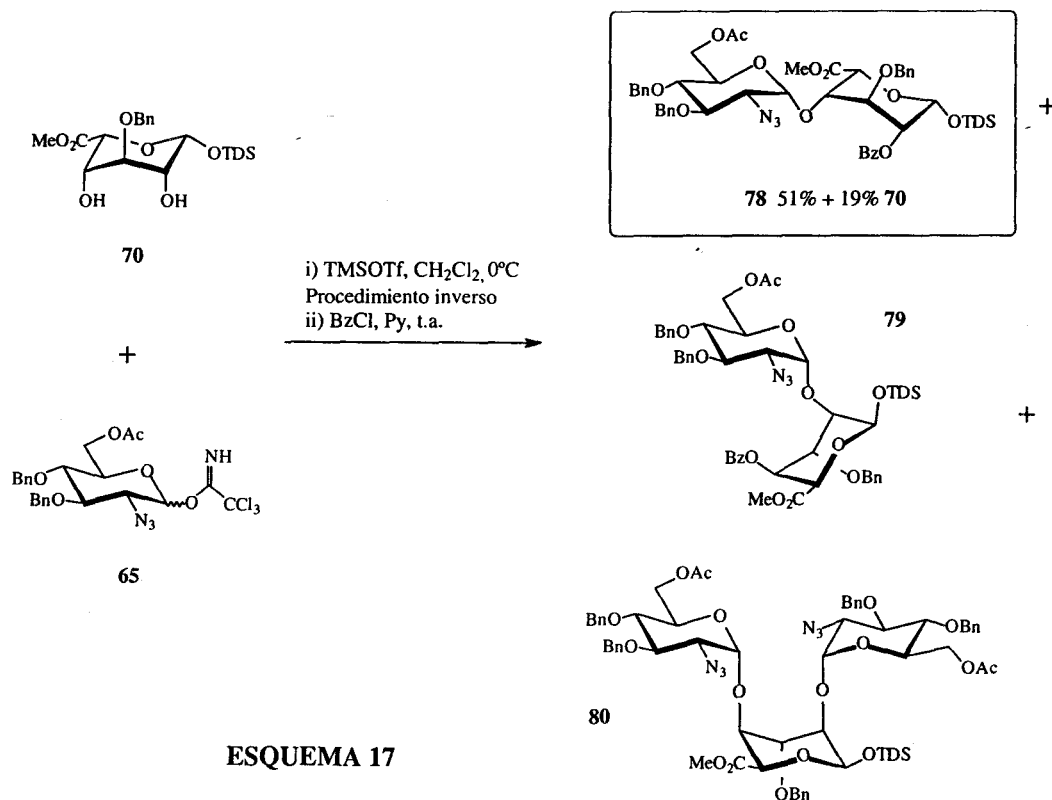
El rendimiento obtenido en el ensayo **6** (**tabla 2**) puede considerarse excelente por tratarse de una reacción regio- y estereoselectiva que permite acceder al disacárido base **71** de forma inmediata, evitando una diferenciación selectiva de los hidroxilos **2** y **4** de **70**. Además, se consigue recuperar un 35% del aceptor utilizado, aspecto muy a tener en cuenta en el caso de valiosos derivados de ácido L-idurónico.

Una vez obtenido **71**, se sometió a acetilación convencional con Ac₂O en Py, dando lugar al derivado **76** con buen rendimiento (93%) (**esquema 16**). Esta

⁷⁰ Schmidt R. R., Kinzy W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1994, 50, 21-123.

unidad disacáridica posee todas las características necesarias para elongar la cadena oligosacáridica, como se verá en los capítulos posteriores.

Por otro lado, por condensación entre **65** y **70** se sintetizó el disacárido **77** (esquema 17). Las condiciones óptimas de reacción fueron idénticas al caso de **71**. Así, la glicosidación se realizó según el procedimiento inverso, usando CH_2Cl_2 como disolvente y TMSOTf como promotor a 0°C . El compuesto **77** no pudo purificarse en este punto, por lo que se sometió a benzoilación con BzCl y Py a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvo el derivado **78** (^1H -RMN δ 4.72, $J_{1',2'} = 3.4$ Hz, H-1'; δ 5.07, s ancho, H-2), adecuado para ocupar el terminal no reductor de los oligosacáridos I y II. El rendimiento global desde **65** fue del 51%, recuperándose un 19% del aceptor **70** de partida. También se aislaron y caracterizaron pequeñas cantidades de los subproductos **79** (^1H -RMN δ 5.15, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'; δ 5.20, s ancho, H-4) y **80** (^1H -RMN δ 5.36, $J_{1'',2''} = 3.9$ Hz, H-1''; δ 4.98, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'; FAB m/z 1282, MNa^+).

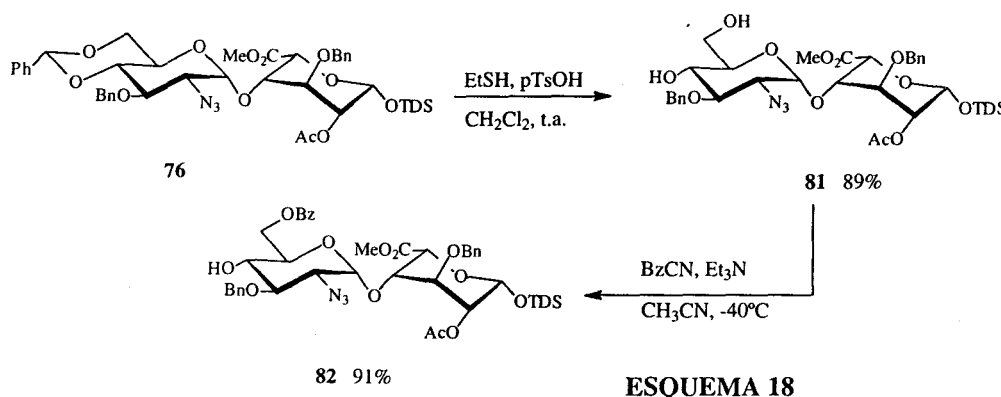


3.7 Síntesis del hexasacárido 91.

En este capítulo se presenta la síntesis del hexasacárido completamente protegido **91**, el primero de los precursores sintetizados para la obtención de las moléculas objetivo de tipo **III** (esquema 6). Los problemas encontrados en la secuencia de desprotecciones de este hexasacárido, que se comentan más adelante, obligaron en su momento a introducir pequeñas modificaciones en el esquema sintético original.

El aspecto clave en esta síntesis es la obtención de aceptores y donadores de glicosilo, susceptibles de ser condensados entre sí con la consiguiente elongación de la cadena, a partir del disacárido **76**.

La unidad aceptora **82** se preparó como se recoge en el esquema 18. El compuesto **76** se sometió a tratamiento con exceso de EtSH y una cantidad catalítica de pTsOH en CH₂Cl₂^{93,94}, obteniéndose **81** con un 89% de rendimiento. A continuación se llevó a cabo una reacción de acilación selectiva sobre el hidroxilo primario mediante el uso de BzCN y Et₃N catalítica en CH₃CN como disolvente a -40°C⁹⁵, que condujo al derivado **82** con excelente rendimiento (91%).

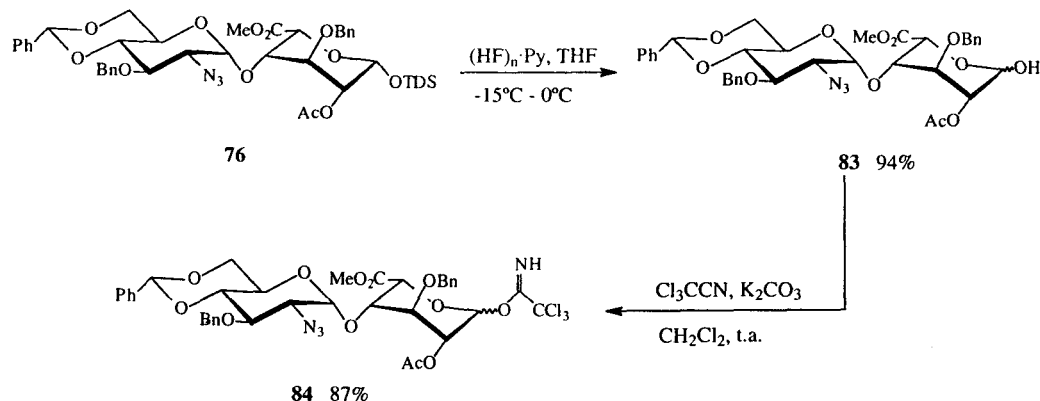


93 Kociński P. J., *Protecting groups*, 1994, (Editorial Thieme, Stuttgart-New York).

94 Nicolaou K.C., Veale C.A., Hwang C.K., Hutchinson J., Prasad C.V.C., Ogilvie W.W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991, 30, 299.

95 Abbas S.A., Haines A.H., *Carbohydr. Res.*, 1975, 39, 358-363.

La conversión de **76** en el donador de glicosilo **84** requirió la hidrólisis selectiva del grupo sililo de la posición anomérica y la posterior activación de ésta como tricloroacetimidato. El empleo de TBAF en THF a baja temperatura no dio resultados satisfactorios, debido muy posiblemente a la migración del grupo acilo axial de la posición 2 hacia la posición anomérica vecina, que se produce en medios de reacción básicos. Por tanto, la hidrólisis selectiva del silil éter se llevó a cabo en medio ácido.



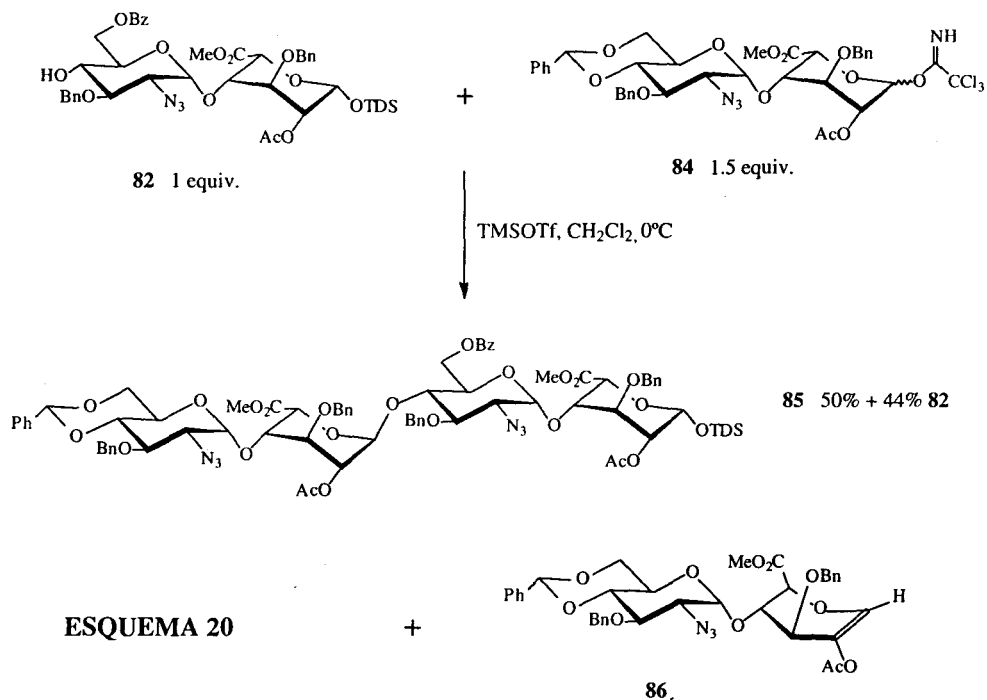
ESQUEMA 19

Cuando se utilizó una mezcla equimolecular de TBAF y AcOH glacial a baja temperatura (-40°C) en THF seco⁹² se alcanzaron rendimientos en torno al 65-75% del derivado deseado **83**. Este resultado se mejoró con la elección del complejo (HF)_n·Py como agente desililante⁹⁶. Así, por tratamiento de **76** con un exceso de este complejo en THF a -15°C→0°C se obtuvo **83** con un 94% de rendimiento (**esquema 19**). Una vez liberada la posición anomérica se procedió a la formación del correspondiente tricloroacetimidato **84**. Lógicamente, se evitaron los medios básicos fuertes en esta reacción, por la tendencia a la migración del acetato ya comentada, observada en cierta extensión incluso usando CsCO₃. Cuando se utilizó Cl₃CCN, K₂CO₃ como base y CH₂Cl₂ como

92 Lassaletta J.M., Carlsson K., Garegg P.J., Schmidt R.R., *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 6873-6880.

96 A) Nicolaou K.C., Daines R.A., Chakraborty T.K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 2208-2210; B) Masamune S., Ellingboe J.W., Choy W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 5526-5528; C) Nicolaou K.C., Webber S.E., *Synthesis*, 1986, 453-461; D) Nicolaou K.C., Seitz S.P., Pavia M.R., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 1222-1224.

disolvente, se obtuvo **84** como una mezcla de anómeros α/β con un 87% de rendimiento (esquema 19). Durante la purificación de este donador no fue preciso tratar el eluyente de la columna cromatográfica con Et_3N , ya que se trata de una especie relativamente estable como corresponde a un donador de glicosilo con un grupo atractor de electrones en la posición 2.



El siguiente paso consistió en la reacción de glicosidación entre **82** y **84** (esquema 20). Como se ha expuesto anteriormente, la presencia del grupo acetato en posición 2 del donador dirige la estereoselectividad del enlace glicosídico hacia la formación del 1,2-*trans* glicósido. La reacción se realizó a 0°C con TMSOTf como promotor y CH_2Cl_2 como disolvente, para dar lugar al tetrasacárido **85** ($^1\text{H-RMN}$ δ 5.39, d, $J_{1,2} = 4.2$ Hz, H-1c) con un 50% de rendimiento, recuperándose un 44% de aceptor de partida sin reaccionar. También se consiguió aislar el derivado 2-acetoxi-glicical **86** ($^1\text{H-RMN}$ δ 6.80, s, H-1) como producto secundario de la glicosidación. Esta reacción de eliminación compite con la de glicosidación, tal y como se recoge en los trabajos de Sinay et

al³⁸. Se utilizaron otras condiciones experimentales, como el uso de Et₂O como disolvente, BF₃·Et₂O como catalizador, temperaturas de -20°C o procedimiento inverso de la reacción, pero en ningún caso se mejoraron los resultados anteriores. Incluso la adición de un mayor exceso de donador frente al aceptor (dos ó más equivalentes) no aumentó la proporción de **85**, sino que elevó el porcentaje del producto de eliminación **86**. Por esta razón se decidió continuar la síntesis a partir de **85**, obtenido con las condiciones experimentales indicadas en el esquema 20.

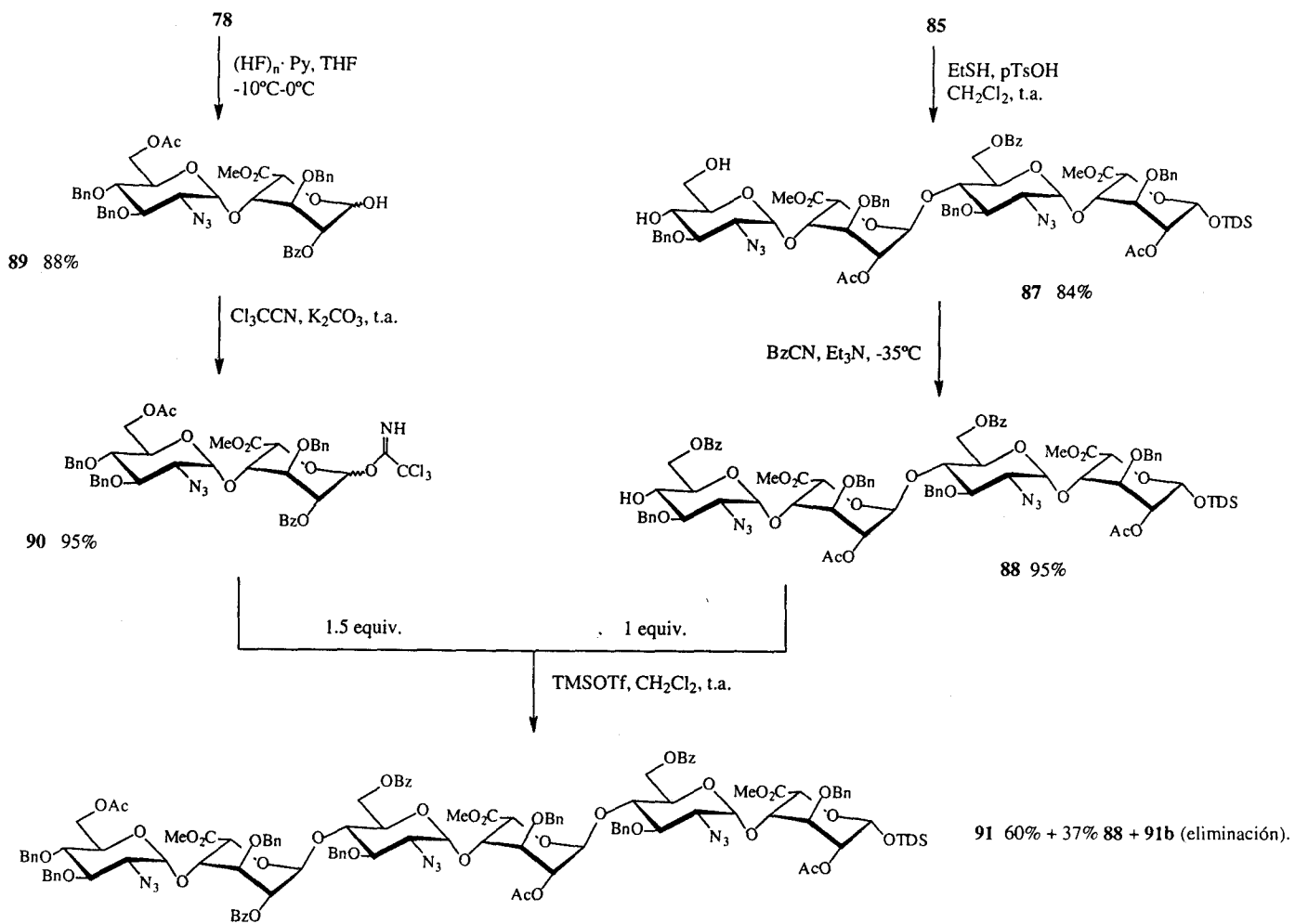
El compuesto **85** se hizo reaccionar con EtSH y ácido pTsOH en las condiciones ya usadas para la hidrólisis de un bencilidén acetal (esquema 21). El derivado **87** obtenido se sometió a benzoilación selectiva usando las mismas condiciones utilizadas anteriormente (BzCN, Et₃N) llegándose al aceptor tetrasacarídico **88** con excelente rendimiento.

Por otra parte, se sintetizó el donador de glicosilo que ocupa el terminal no reductor de la cadena, para lo que se partió del disacárido **78** (esquema 21). Empleando la misma estrategia que permitió acceder a **84**, es decir, hidrólisis del grupo sililo anomérico (complejo (HF)_n·Py en THF) y formación del correspondiente tricloroacetimidato (Cl₃CCN, K₂CO₃) se sintetizaron sucesivamente **89** y **90**, éste último como mezcla de anómeros α/β que se usaron en la reacción de glicosidación tras purificación en columna cromatográfica.

La condensación de **90** con **88** (esquema 21) se realizó a temperatura ambiente en CH₂Cl₂, con TMSOTf como ácido de Lewis, obteniéndose el α glicósido **91** (¹H-RMN δ 5.53, d, J_{1,2} = 4.2 Hz, H-1e) con un 60% de rendimiento y recuperándose un 37% del aceptor de partida. Nuevamente se detectó por RMN el derivado 2-acetoxi-glicial como producto secundario de la glicosidación (**91b**, ¹H-RMN δ 6.91, s, H-1).

38 Jacquinet J.C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1984, 130, 221-241.

De esta forma se obtuvo el primer oligosacárido completamente protegido tipo **IV** (esquema 6) sobre el que se inició el estudio de la secuencia de desprotecciones, para llegar al producto final.



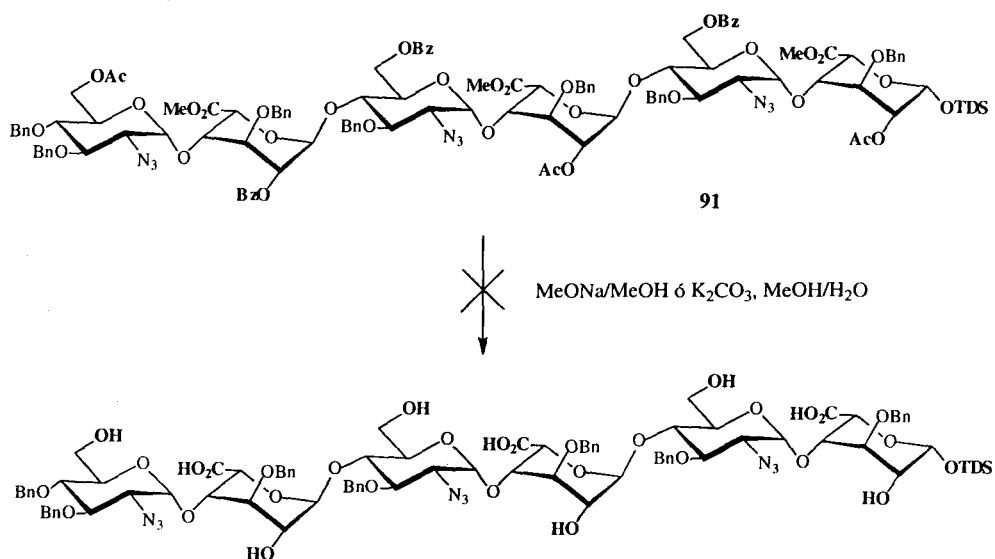
3.8 Síntesis de alquilglicósidos derivados.

Como ya se indicó al comentar el análisis retrosintético (**capítulo 3.2**), la primera de estas desprotecciones implica la hidrólisis de todas las funciones éster del oligosacárido: acetatos, benzoatos y grupos metoxicarbonilo. Para ello, la molécula tiene que someterse a tratamiento con medios básicos moderados que, teóricamente, no deben afectar al grupo sililo de la posición anomérica⁹³. En el diseño sintético inicial, este grupo ha de mantenerse hasta la etapa final de la síntesis, para obtener oligosacáridos con el extremo reductor libre.

Se ensayaron diversas condiciones experimentales para la saponificación de **91**, sin resultados satisfactorios (**esquema 22**). El uso de MeONa/MeOH requirió tiempos de reacción muy largos para dar finalmente una mezcla de productos parcialmente hidrolizados. Cuando se emplearon condiciones más energéticas, como K₂CO₃ en MeOH/H₂O (pH = 10-12) desde t.a. hasta 40-50°C, se observaron por CCF y por RMN mezclas de productos conservando aún alguno de los grupos metoxicarbonilos de la molécula, pero sin el grupo sililo de la posición anomérica, acompañados de posibles productos formados por una reacción de eliminación en el terminal reductor de la cadena (señales en torno a 6 ppm en los espectros de RMN).

Con la idea de evitar este problema, se decidió cambiar ligeramente el objetivo final hacia la síntesis de un alquilglicósido derivado de **91**, concretamente un α -metilglicósido. Con este tipo de productos se podría proteger la posición anomérica de transformaciones indeseadas y mimetizar, al mismo tiempo, el enlace glicosídico α presente en esta posición en oligosacáridos de tipo heparina.

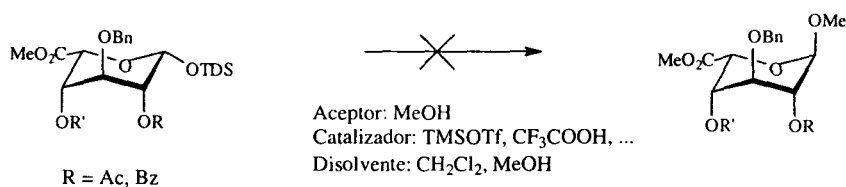
⁹³ Kociński P. J., *Protecting groups*, 1994, (Editorial Thieme, Stuttgart-New York).



Para transformar **91** en el correspondiente α -metilglicósido se consideraron varias alternativas. La primera de ellas fue la utilización del grupo sililo como grupo saliente en una reacción de glicosidación utilizando MeOH como aceptor (**esquema 23**) y empleando algunas de las condiciones descritas en la bibliografía⁹⁷. En la **tabla 3** se recogen los resultados de algunos de los ensayos realizados utilizando derivados disacarídicos con estructura análoga a **91** y que en ningún caso fueron satisfactorios, por lo que se descartó esta ruta.

Otra vía ensayada para la obtención del α -metilglicósido implicó la utilización de un mejor grupo saliente en el donador de glicosilo. Por razones obvias, y teniendo muy en cuenta el valor del producto **91** sobre el que se iba a ensayar, se decidió emplear nuevamente el método del tricloroacetimidato.

97 A) Kolar V.C., Kneibl G., *Angew. Chem.*, 1990, 102, 827-828; B) Kolar C., Kneissl G., Knodler U., Dehmel K., *Carbohydr. Res.*, 1991, 209, 89-100; C) Priebe W., Grynkiewicz G., Neamati N., *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32, 2079-2082; D) Tietze L.F., Fischer R., Guder H.J., *Tetrahedron Lett.*, 1982, 23, 4661-4664; E) Tietze L.F., Fischer R., Logers M., Beller M., *Carbohydr. Res.*, 1989, 194, 155-162; F) Nashed E. M., Glaudemans C.P.J., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 6116-6118.



ESQUEMA 23

La experiencia adquirida en la síntesis y purificación de tricloroacetimidatos permitió acceder a **93** (esquema 24) de una forma eficiente. Así, **91** se sometió a tratamiento con exceso del complejo (HF)_n·Py en THF a 0°C para acceder a **92** (90%), que se transformó en **93** por reacción con Cl₃CCN y K₂CO₃ (85%).

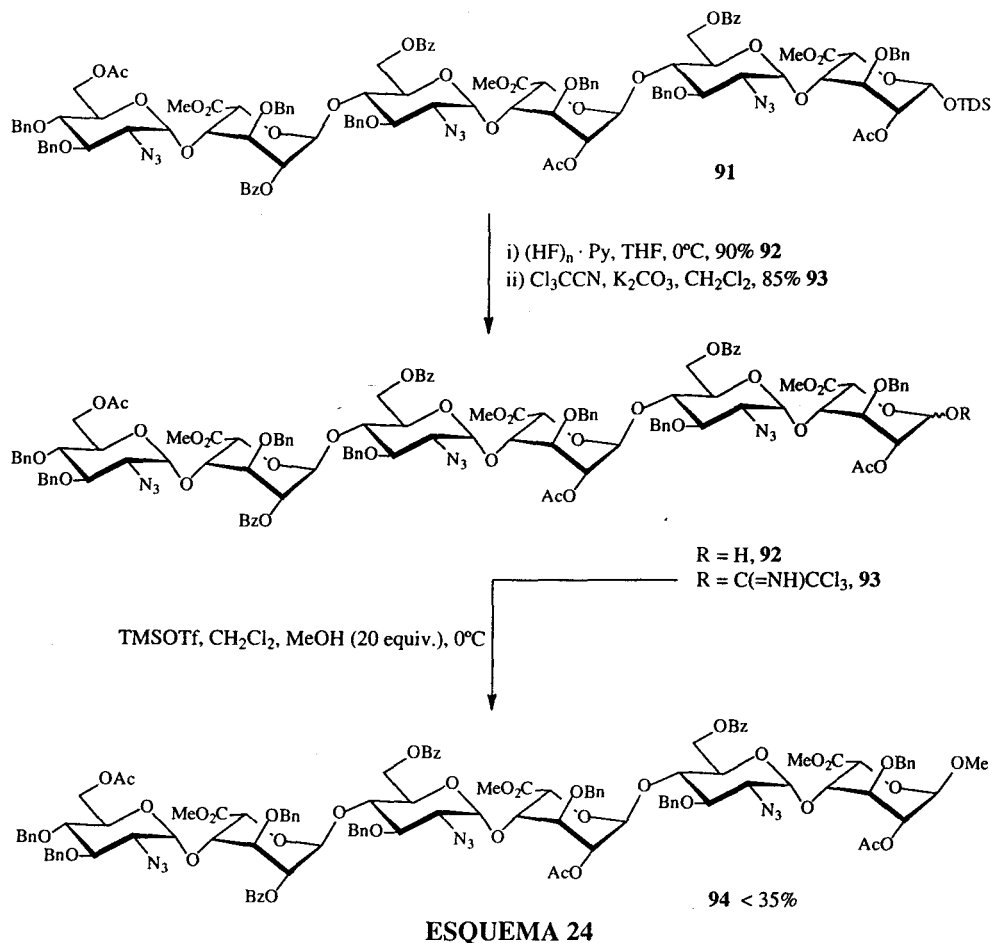
Donador	Aceptor	Disolvente	Catalizador	T (°C)	Rto.
82	MeOH 10 equiv.	CH ₂ Cl ₂	TMSOTf 5%	25	No hay reacción
78	MeOH exceso	CH ₂ Cl ₂ 1 MeOH 2	TMSOTf 10%-40%	25	Descomposición
78	MeOH exceso	CH ₂ Cl ₂ 4 MeOH 1	CF ₃ COOH 0.5%	25	No hay reacción

TABLA 3

En la **tabla 4** se recogen los resultados más importantes obtenidos en los ensayos de glicosidación con MeOH como alcohol aceptor, y en los que se emplearon además de **93** otros tricloroacetimidatos disacarídicos como donadores de glicosilo modelo.

En todos los ensayos se obtuvieron unos resultados similares. La purificación por columna cromatográfica de los crudos de reacción y el análisis pormenorizado de los espectros de RMN permitió identificar un porcentaje muy alto de producto hidrolizado (30-40%) y una mezcla de productos con una

movilidad cromatográfica casi idéntica y que resultaron ser el α y el β metilglicósidos y el correspondiente ortoéster (esquema 25). La naturaleza de este último producto se confirmó por la presencia de un doblete a 5.48 ppm con $J_{1,2} = 2.7$ Hz (para el caso de **94**) que se asignó al protón H-1 por comparación con los datos recogidos en la bibliografía⁵⁷. Hay que indicar que los ensayos 5 y 6 se realizaron sobre el compuesto **102**, cuya síntesis se detalla en el siguiente capítulo, y que posee un grupo pivalófilo en la posición 2 de la unidad de idurónico. Incluso con este grupo muy voluminoso se detectó la formación de ortoéster (doblete a 5.31 ppm y $J_{1,2} = 3.7$ Hz asignable a H-1).



57 Tabeur T., Machetto F., Mallet J.M., Duchaussoy P., Petitou M., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1996, 281, 253-276.

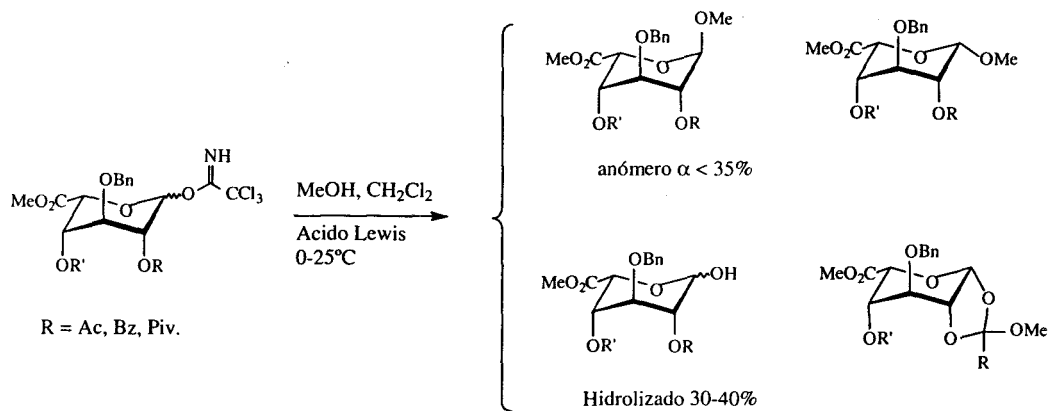
A partir de esta mezcla de productos se pudieron aislar algunos miligramos de α -metilglicósido puro **94** (esquema 24) que permitieron realizar ensayos preliminares de las reacciones de desprotección, demostrando que esta protección del terminal reductor elimina los problemas ocasionados por el grupo sililo.

N°	Donador	Aceptor	Catalizador	Disolvente	T (°C)	Rto. Mezcla* + hidrolizado
1	90	MeOH exceso	BF ₃ ·Et ₂ O 5%	MeOH	25	48% + 33%
2	93	MeOH 30 equiv.	BF ₃ ·Et ₂ O 5%	CH ₂ Cl ₂	25	50% + 38%
3	93	MeOH 20 equiv.	TMSOTf 5%	CH ₂ Cl ₂	0	53% + 29%
4	93	MeOH 2 equiv.	TMSOTf 2%	CH ₂ Cl ₂	-40	No hay reacción
5	102	MeOH 10 equiv.	BF ₃ ·Et ₂ O 5%	CH ₂ Cl ₂	10	40% + 38%
6	102	MeOH 10 equiv.	TMSOTf 5%	CH ₂ Cl ₂	-10	50% + 50%**

* Mezcla de metilglicósidos α y β y ortoéster con el mismo R_f. ** Estimado por CCF.

TABLA 4

Sin embargo, la limitación en cuanto a cantidad de producto **94** aconsejó de nuevo modificar ligeramente el esquema sintético, cambiando la protección en el terminal reductor, con el objetivo de eliminar en lo posible la formación de ortoéster. Esta nueva aproximación sintética se discute en el siguiente capítulo.



ESQUEMA 25

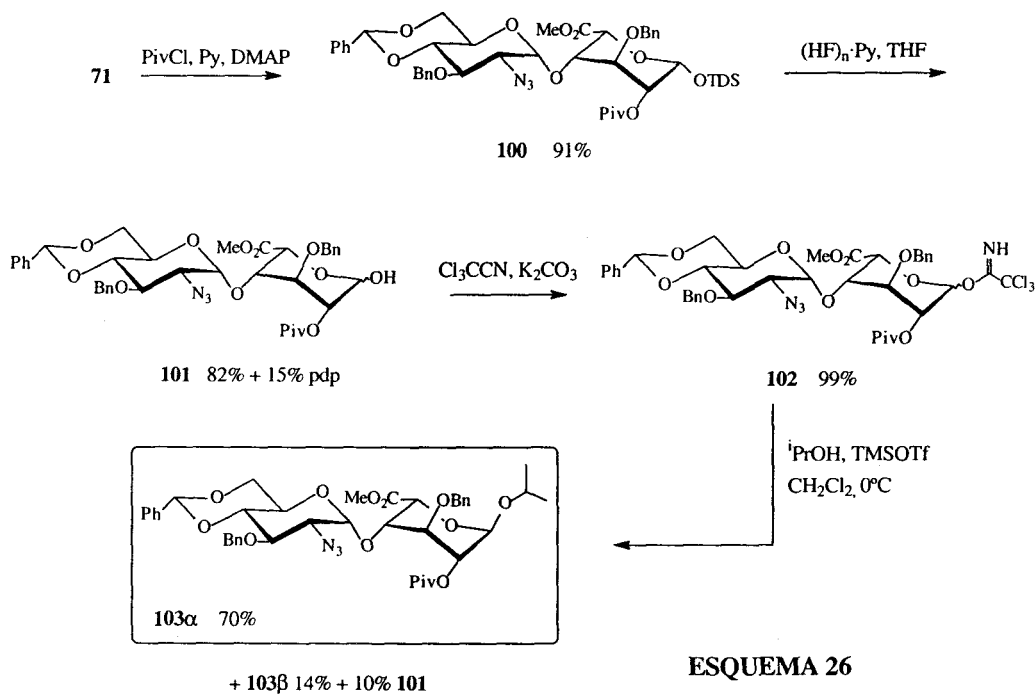
3.9 Síntesis del hexasacárido 109.

Evidentemente los resultados obtenidos en la síntesis del α -metilglicósido **94** no fueron lo suficientemente buenos, tanto por el rendimiento de la reacción como por la dificultad de su separación cromatográfica del anómero β y del ortoéster, para proponer la ruta descrita hasta ahora como método general de obtención de las moléculas objetivo **I** y **II**. Esto obligó a buscar otras alternativas para la protección del terminal reductor de los oligosacáridos, sin afectar de forma significativa a la estructura y potencial actividad biológica de los productos finales. En el presente capítulo se explicará en qué han consistido estas modificaciones y cómo han permitido acceder al derivado hexasacárido **109**, precursor de la molécula final **I**.

Las dos modificaciones introducidas en el esquema sintético original han consistido en la protección final del terminal reductor como un isopropil glicósido y la utilización de un grupo acilo más voluminoso que el acetilo en la posición 2 de la unidad de ácido L-idurónico donador de glicosilo.

La idea de emplear isopropanol en lugar de MeOH, para la formación del alquilglicósido, ofrece buenas expectativas al tratarse de un alcohol secundario que debe dificultar la formación de anómero β y de ortoéster. La formación de este último debe también dificultarse por la presencia de un grupo acilo voluminoso en la posición 2 del donador de glicosilo. De la combinación de ambos factores cabe esperar superar la reconocida tendencia de los ácidos urónicos a formar ortoésteres en reacciones de glicosidación.

Como se indica en el **esquema 26**, se sintetizó el derivado disacárido **102** a partir del disacárido base **71**. En primer lugar, se procedió a introducir un grupo pivaloilo en el hidroxilo libre de **71** utilizando PivCl en Py y DMAP catalítica, para dar **100** con excelente rendimiento (91%). La hidrólisis selectiva del grupo sililo de la posición anomérica (**101**) y la posterior formación del tricloroacetimidato **102** se llevaron a cabo según la metodología puesta a punto ya en esta Tesis Doctoral, tal y como se refleja en el **esquema 26**.



A continuación se procedió a la formación del α -isopropilglicósido. Sobre el derivado **102** se realizaron diversos ensayos para optimizar las condiciones de la reacción de glicosidación, que se recogen en la **tabla 5**. Cuando la reacción se realizó a 0°C con un 2% de TMSOTf como catalizador, CH_2Cl_2 como disolvente y 2 equivalentes de isopropanol (destilado previamente sobre CaO^{98}) como aceptor, se accedió al correspondiente α -isopropilglicósido (**103 α** , $^1\text{H-RMN}$ δ 5.19, d, $J_{1,2} = 4.3$ Hz, H-1) con un buen rendimiento (70%) (**esquema 26**). También se aislaron del crudo de reacción el anómero β **103 β** (14%; $^1\text{H-RMN}$ δ 5.01, d, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1; relación α/β 5/1) y producto hidrolizado **101** (10%), pero en ningún momento se detectó el ortoéster y además el anómero deseado fue fácilmente purificado puesto que la presencia del grupo isopropilo confiere a los distintos productos diferencias importantes de movilidad cromatográfica.

98 Perrin D.D., Armarego W.L.F., *Purification of laboratory chemicals*, 1996, Editorial Butterworth-Heinemann, Oxford.

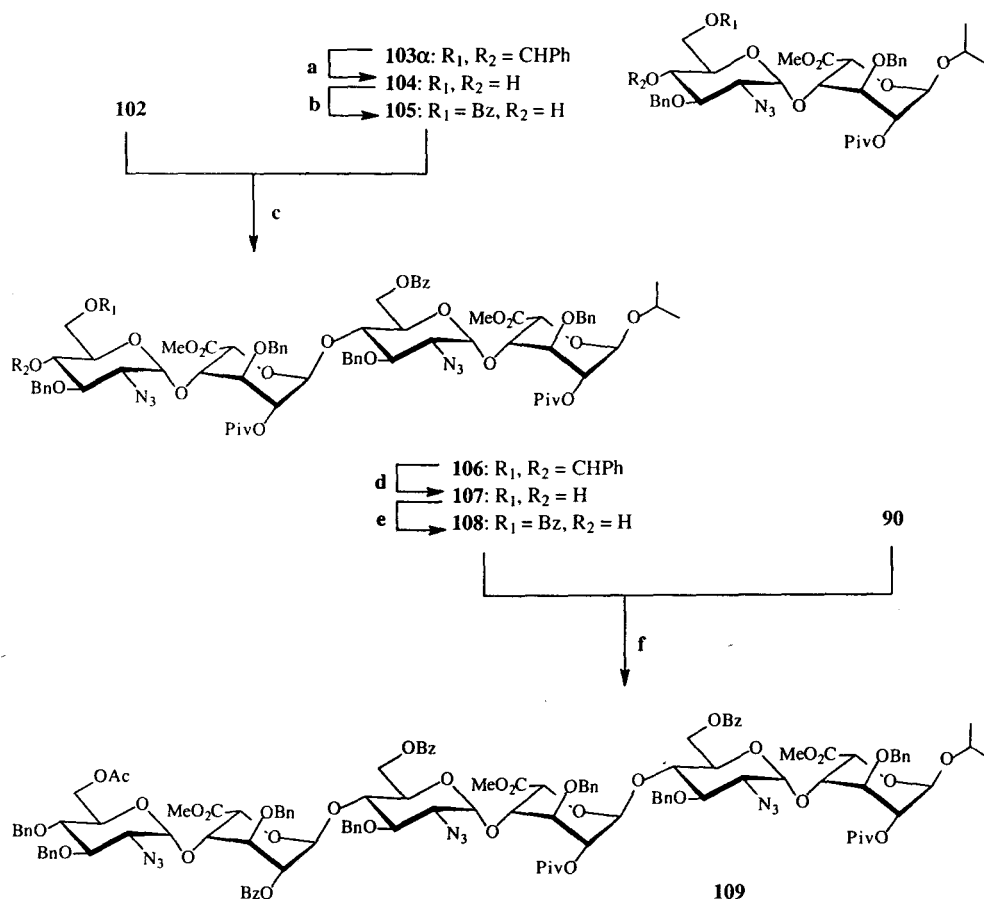
N°	<i>i</i> PrOH	Catalizador	Disolvente	T (°C)	Rto. (%)		
					103 α	103 β	101
1	2 equiv.	2% TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	0	70	14	10
2	2 equiv.	5% TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	0	57	9	14
3	1.5 equiv.	2% TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	-20	51	11	20
4	1.5 equiv.	2% TMSOTf	Et ₂ O	-20	53	16	13

TABLA 5

Por otra parte, desde **103 α** se pudo acceder con excelentes rendimientos al aceptor de glicosilo **105**, tras reacción de hidrólisis del bencilidén acetal y posterior benzoilación selectiva de la posición primaria, siguiendo los protocolos sintéticos desarrollados en el presente trabajo (**esquema 27**).

La reacción de glicosidación entre **102** y **105**, aceptor y donador respectivamente se llevó a cabo en CH₂Cl₂ a 0°C con TMSOTf como catalizador, condiciones ya empleadas en la obtención de 1,2-*trans*-glicósidos. El correspondiente tetrasacárido **106** (¹H-RMN δ 5.40, d, J_{1,2} = 5.1 Hz, H-1c) se aisló con un excelente rendimiento del 79%, considerablemente mayor que el obtenido en la síntesis de **85**. Esta mejora puede atribuirse a la influencia del grupo pivaloílo del donador, a diferencia de otros grupos acilo como el acetato o el benzoato, impide o minimiza la reacción de eliminación que compite con la formación del enlace glicosídico. Las moviidades cromatográficas de los productos de partida **102** y **105** permitieron observar que la reacción de glicosidación es más lenta en este caso. Así, a los 30 min. de reacción la CCF mostró la presencia de tricloroacetimidato sin reaccionar, y fueron necesarios

tiempos de reacción más largos (1-2h). Esta estabilidad de **102** puede explicarse por la estabilización debida a la presencia de un grupo atractor de electrones en 2 con un impedimento estérico importante.



Reactivos: **a**) EtSH, pTsOH, CH₂Cl₂, 90%; **b**) BzCN, Et₃N, CH₃CN, 95%; **c**) TMSOTf, CH₂Cl₂, 79% + 19% **105**; **d**) EtSH, pTsOH, CH₂Cl₂, 75%; **e**) BzCN, Et₃N, CH₃CN, 93%; **f**) TMSOTf, CH₂Cl₂, 58% + 36% **108**.

ESQUEMA 27

El tetrasacárido **106** se transformó en el aceptor de glicosilo **108**, tras hidrólisis del bencilidén acetal y benzoilación selectiva con buenos rendimientos. La reacción final de glicosidación entre **108** y el disacárido donador **90** ya sintetizado (capítulo 3.7), que ocupará de nuevo el terminal no

reductor de la cadena, se llevó a cabo empleando un 3% de TMSOTf en CH₂Cl₂ a t.a., obteniéndose **109** (¹H-RMN δ 5.56, d, J_{1,2} = 4.4 Hz, H-1e) con un 58% de rendimiento y recuperándose un 36% de **108** (esquema 27). Este hexasacárido **109** ha conducido con éxito a **I**, tras la secuencia de desprotecciones, que se recoge en el siguiente capítulo. La asignación completa del espectro de ¹H-RMN de este compuesto se llevó a cabo mediante experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY, TOCSY, NOESY).

3.10 Síntesis del hexasacárido I.

La estrategia de grupos protectores empleada en la síntesis del hexasacárido protegido **109** ha permitido acceder al compuesto **I** tras llevar a cabo la secuencia de desprotecciones⁵, que se apuntó en el capítulo 3.2. Conviene resaltar en este punto las dificultades que han supuesto estas etapas, ya que requieren el manejo y caracterización de derivados altamente polares y cargados para los que muchas de las técnicas analíticas habituales en síntesis orgánica no tienen aplicación. La secuencia de desprotección se presenta en el **esquema 28**.

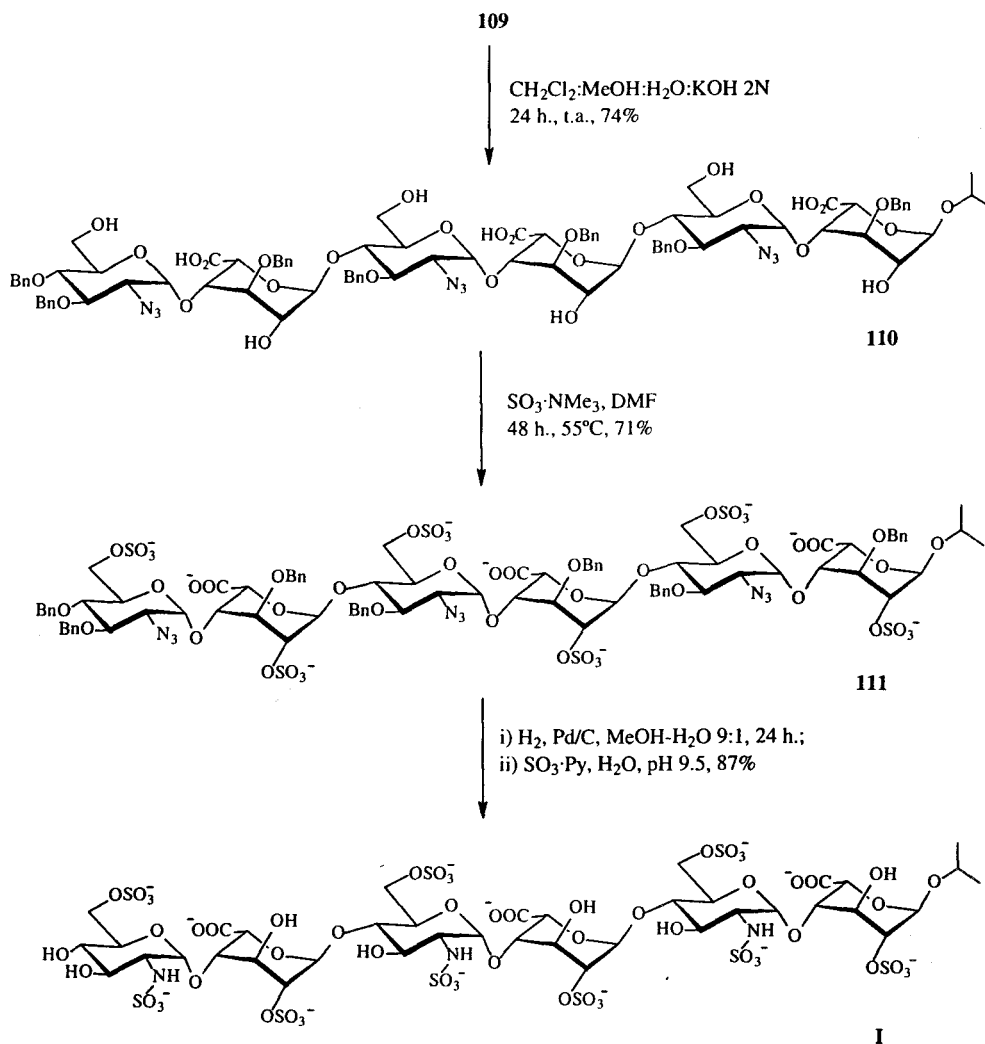
La primera etapa⁴² ha consistido en la hidrólisis de las funciones éster de **109** (**esquema 28**). Para ello se ha utilizado KOH 2M a una disolución de **109** en una mezcla CH₂Cl₂:MeOH:H₂O. Esta mezcla de disolventes resultó ser necesaria para la obtención de rendimientos aceptables y para mantener la homogeneidad del medio a lo largo del curso de la reacción.

El empleo de medios fuertemente básicos fue necesario para conseguir la hidrólisis de los grupos especialmente resistentes a la hidrólisis (pivaloilo y metoxicarbonilo), pero esto disminuyó el rendimiento de la reacción debido a la formación de subproductos con anillos de ácido urónico α,β insaturados en el terminal no reductor, que se forman por reacción de eliminación con la consiguiente despolimerización de la cadena oligosacáridica. Esta reacción secundaria ha sido descrita⁹⁹ como una transformación habitual en las cadenas de heparina expuestas a pH básico y se ha propuesto que transcurre por un mecanismo E1cB que está especialmente favorecido en el caso de H ácidos con grupos atractores de electrones en α (COOMe) que estabilizan al carbanión formado (**esquema 29**).

⁵ van Boeckel A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1671-1690.

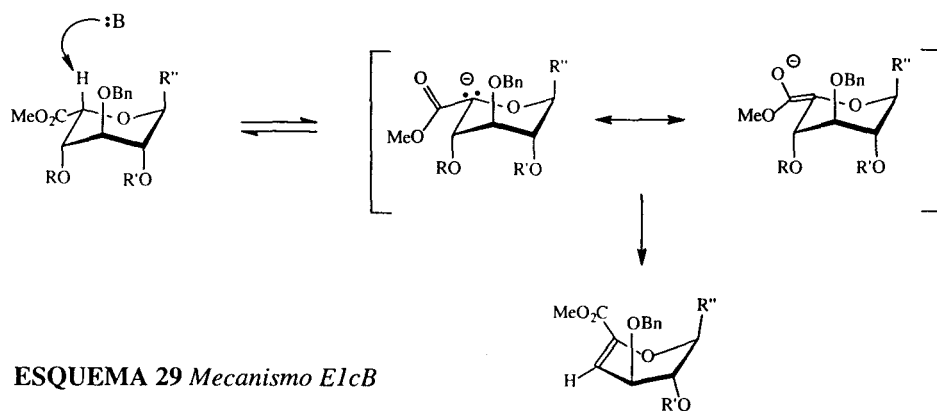
⁴² Petitou M., Jacquinet J.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1987, 167, 67-75.

⁹⁹ Kiss J., *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1974, 29, 229.



ESQUEMA 28

El producto **110** se aisló como ácido carboxílico y se separó de los productos secundarios de eliminación (de menor peso molecular: penta-, tetra-, trisacáridos, etc) mediante cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex LH-20. La estructura de **110** se confirmó por ^1H -RMN (desaparición de las señales correspondientes a acetato, benzoato, pivaloilo y metoxicarbonilo) y espectrometría de masas MALDITOF (detección de MNa^+ y MK^+), aunque no se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de este intermedio.



La segunda etapa de desprotección (esquema 28) ha consistido en la sulfatación⁴² de los hidroxilos libres de **110**, para lo que se empleó un exceso del complejo $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$ en DMF como disolvente. Un aspecto experimental de vital importancia en esta reacción es la necesidad de lavar con H_2O , EtOH y CH_2Cl_2 el complejo de azufre comercial inmediatamente antes de su uso, para eliminar así las trazas de ácido que suele contener y que impiden la sulfatación total. Para el control de la reacción por CCF se emplearon como eluyentes mezclas de $\text{AcOEt}:\text{H}_2\text{O}:\text{Py}:\text{AcOH}$, que permitieron la visualización de este tipo de productos cargados. El producto resultante **111** se purificó mediante cromatografía de permeación sobre gel Sephadex LH-20 y se aisló como sal sódica después de someterlo a cromatografía de intercambio iónico con resina Dowex Na^+ . Aunque este tratamiento fue suficiente para obtener **111** con un elevado grado de pureza se realizó, en alguna ocasión, una purificación adicional por HPLC (cromatógrafo WATERS 2690) empleando columnas Spherisorb ODS-2 (analítica) y Bondapak C18 (preparativa) de WATERS. El eluyente empleado fue $\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 y la detección se llevó a cabo por absorción UV ($\lambda = 207 \text{ nm}$). Al igual que en el caso de **110** no se realizó una caracterización exhaustiva de este compuesto.

⁴² Petitou M., Jacquinet J.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., Sinay P., *Carbohydr. Res.*, 1987, 167, 67-75.

La tercera etapa de desprotección⁴⁶ (esquema 28) fue la hidrogenólisis catalítica de los grupos bencilo de **111** que transcurre con reducción simultánea de las funciones azida, para dar el correspondiente producto hidrogenado que se somete inmediatamente a la siguiente etapa de *N*-sulfatación. Para esta última reacción (esquema 28) se utilizó un exceso del complejo SO₃·Py manteniendo el pH de la disolución constante a 9.5. Nuevamente el complejo SO₃·Py se lavó con H₂O, EtOH y CH₂Cl₂ antes de su uso y se emplearon mezclas de AcOEt:H₂O:Py:AcOH como eluyentes para CCF. El producto resultante **I** se purificó mediante una combinación de cromatografías de permeación sobre gel e intercambio iónico, siguiendo un protocolo similar al desarrollado por Petitou M. y van Boeckel A.A.⁴⁶: Sephadex G-25 con ClNa 0.9%; Dowex Na⁺ con ClNa 0.5M y Sephadex G-25 con H₂O-EtOH 9:1.

Los espectros de RMN de **I** presentaron, en este punto, muy baja resolución, debido muy probablemente a la presencia de otros cationes, como el Ca²⁺, que tienen gran afinidad por la heparina¹ y que proceden de los eluyentes de la última columna de Sephadex, a pesar de su alta pureza. Por tanto, para la preparación adecuada de las muestras de RMN^{63,100} de **I** se utilizó una columna Dowex Na⁺ adicional (H₂O-EtOH 9:1), para eliminar posibles trazas de otros cationes, mejorando muy considerablemente la resolución de los espectros. Éstos se registraron generalmente a pH 7, valor que se ajustó después de la purificación con disoluciones adecuadas de NaOH. La asignación completa de los espectros de ¹H y ¹³C-RMN de este compuesto se llevó a cabo mediante experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY, TOCSY, NOESY) y protón-carbono (HSQC, HMQC). En el capítulo 12 se comentarán algunas de las experiencias de RMN realizadas sobre este compuesto.

Al comienzo de este capítulo se comentaron las dificultades que presenta la caracterización y purificación de estos oligosacáridos altamente cargados, por

46 Lucas H., Basten J.E.M., van Dinther T.G., Meuleman D.G., van Aelst S.F., van Boeckel C.A.A., *Tetrahedron*, 1990, 46, 8207-8228.

1 Casu B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1985, 43, 51-134.

63 Mulloy B., Forster M., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.*, 1993, 293, 849-858.

100 Hileman R.E., Smith A.E., Toida T., Linhardt R.J., *Glycobiology*, 1997, 7, 231-239.

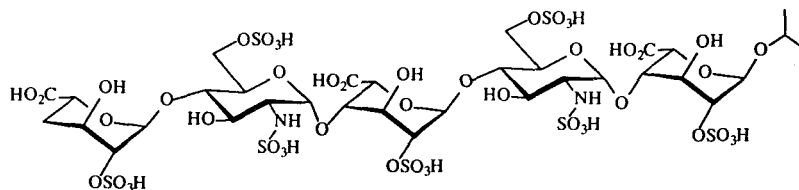
lo que tiene un especial valor el desarrollo de las condiciones experimentales que permiten aplicar técnicas como la espectroscopía de masas MALDITOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) a estas moléculas. En general, los fragmentos de GAG proporcionan espectros de masas con baja sensibilidad y abundantes picos de fragmentación, debido a la pérdida parcial de grupos sulfato y a la variedad de aductos catiónicos que pueden formarse. Esto se debe al elevado carácter iónico de estos oligosacáridos, que interaccionan fuertemente con los grupos polares de la matriz usada en la preparación de la muestra. De esta manera, se necesita una gran cantidad de energía para volatilizar e ionizar al analito, lo que reduce considerablemente la intensidad del pico molecular.

Juhasz P. y Biemann K.¹⁰¹ publicaron en 1995 un procedimiento que permite resolver este problema y obtener espectros MALDITOF de fragmentos oligosacáridos de heparina, detectando la señal que proporcionan los complejos iónicos que forman con determinados péptidos básicos. El peso molecular del oligosacárido sulfatado se determina, por tanto, substrayendo la masa del péptido a la masa total del complejo. Este método se aplicó con éxito al compuesto **I**, empleando ácido 3-hidroxipicolínico como matriz y (Arg-Gly)₁₀ como péptido (ver **capítulo 5.1** para detalles experimentales).

En general, el complejo oligosacárido-péptido formado mayoritariamente tiene una estequiometría 1:1, por lo que el pico teórico esperado para el complejo $[I+(Arg-Gly)_{10}+H]^+$ es 3943.0 Da. Experimentalmente, se obtuvieron picos moleculares de 3944.7 y 3943.9 Da, éste último usando un péptido estándar como patrón interno. Además se detectaron, en ocasiones, otros picos asignables a la pérdida de un grupo sulfato (3863.9 Da) o a fragmentos pentasacáridos procedentes de las reacciones de eliminación que compiten con la primera etapa de desprotección (3606.2 Da, **figura 13**) y que pueden acompañar a **I** debido a las dificultades en la purificación por exclusión molecular de estas moléculas. Por lo tanto, con estos resultados se demuestra la eficacia de la espectrometría de

101 Juhasz P., Biemann K., *Carbohydr. Res.*, 1995, 270, 131-147.

masas MALDITOF en la caracterización e identificación de los fragmentos de heparina sintéticos, utilizando para ello los adecuados péptidos básicos.



Calculado: $[M + (\text{Arg-Gly})_{10} + H]^+ = 3605.7$.

Experimental: $[M + (\text{Arg-Gly})_{10} + H]^+ = 3606.2$.

FIGURA 13 Estructura de un pentasacárido procedente de la eliminación de la unidad de glucosamina del terminal no reductor de 110. Detección por MALDITOF durante la purificación del producto final I

El grado de pureza del hexasacárido I obtenido, en torno al 90%, es adecuado para la realización de estudios biológicos y estructurales con un alto grado de fiabilidad, pero no por ello se dejaron de realizar esfuerzos dirigidos a la optimización de su purificación. En este sentido, se empleó gel Superdex 30 prep grade (Pharmacia) para la cromatografía de exclusión molecular, gel de elevada resolución que está especialmente indicado para separaciones de péptidos cuyo peso molecular oscila entre 500 y 10.000 Da. Las fracciones eluidas de este tipo de columnas se analizaron por MALDITOF y se confirmó la separación de I y de las impurezas pentasacáridicas anteriormente comentadas (figura 13). No obstante, no se observaron cambios significativos en los espectros de RMN de I, lo que hace pensar que están presentes además otros subproductos con un peso molecular y estructura similar a I (por ejemplo, estructuras que difieren en un grupo sulfato) y este hecho dificulta enormemente la optimización de la purificación por cromatografía de permeación sobre gel o intercambio iónico.

También se utilizó HPLC para intentar mejorar la purificación de I, empleando columnas Spherisorb NH₂ y Spherisorb SAX (WATERS) con NaH₂PO₄ 0.2→1 M y ClNa 0.2→1 M como eluyentes, respectivamente. En este

caso, no se obtuvieron resultados satisfactorios por no disponer de un buen método de detección de **I**, que difiere de los oligosacáridos purificados por el grupo de Linhardt^{102,103} en la ausencia de unidades de ácido urónico α,β insaturadas, lo que impide el uso de la absorción UV a $\lambda = 232$ nm.

102 Sugahara K., Yamada S., Yoshida K., de Waard P., Vliegthart J.F.G., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 1528-1533.

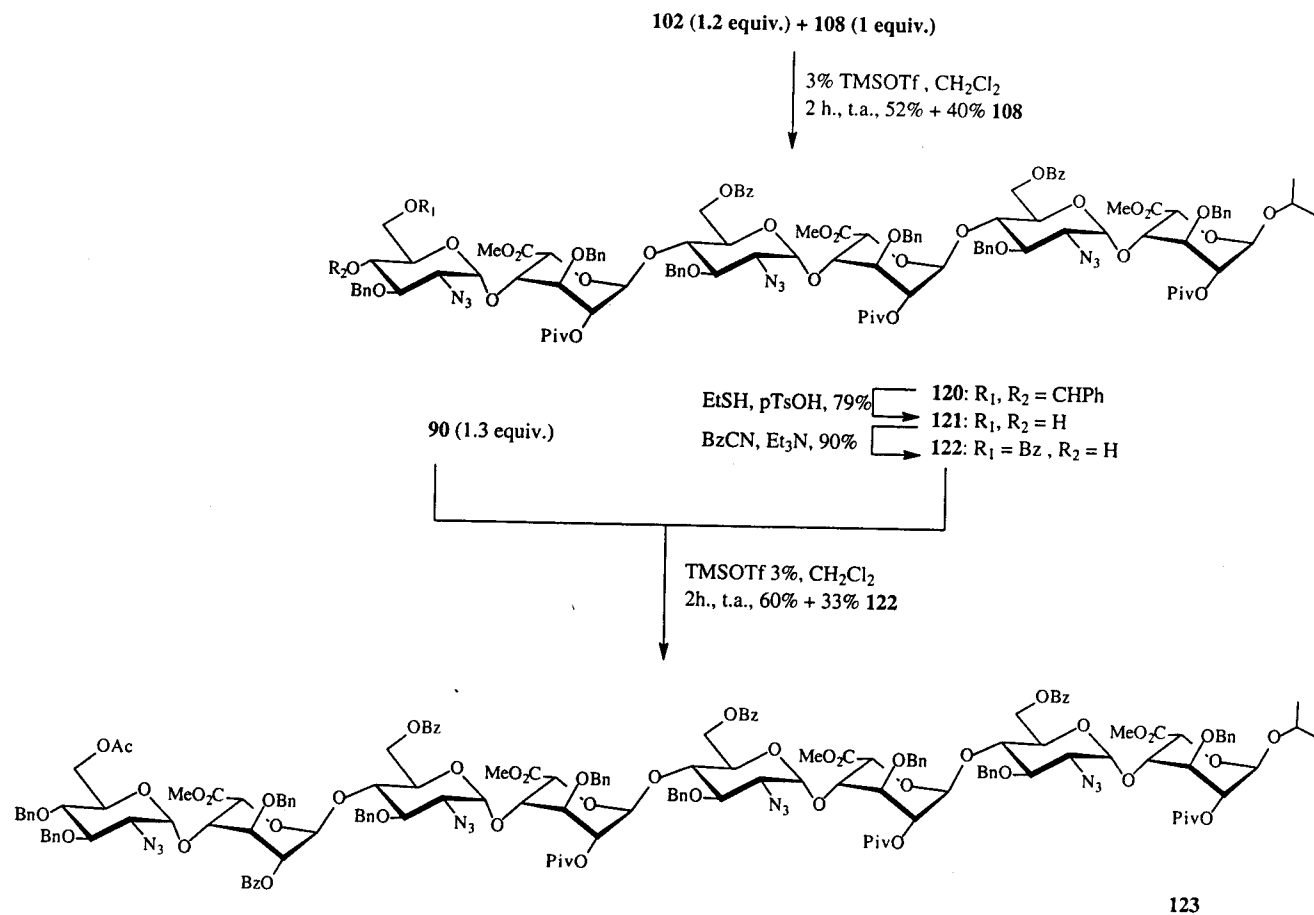
103 Rice K.G., Linhardt R.J., Rice K.G., *Carbohydr. Res.*, 1989, 190, 219-233.

3.11 Síntesis del octasacárido II.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo los primeros estudios biológicos con **I** por parte del grupo del Profesor Guillermo Giménez Gallego del Centro de Investigaciones Biológicas CIB (CSIC-Madrid). Los niveles de actividad exhibidos por el hexasacárido frente a FGF-1 fueron bajos comparados con los que corresponden a la heparina. Se consideró, por tanto, interesante desde el punto de vista biológico, la síntesis de fragmentos oligosacáridicos más largos, con objeto de determinar la longitud mínima necesaria que deben poseer las cadenas para inducir respuestas de actividad similares a las de la heparina. En este contexto, se llevó a cabo la síntesis del octasacárido **II**, que también responde a la región regular de la heparina. Para ello se aplicó la misma estrategia sintética que en el caso del hexasacárido **I**.

La reacción de glicosidación entre **108** y **102** (**esquema 30**), derivados ya obtenidos en la síntesis de **I**, se llevó a cabo empleando un 3% de TMSOTf como catalizador y CH₂Cl₂ como disolvente, obteniéndose el correspondiente hexasacárido **120** (¹H-RMN δ 5.49, d, J_{1,2} = 6.1 Hz, H-1e) con un rendimiento aceptable (52%) y recuperándose un 40% de aceptor de partida sin reaccionar. A continuación, **120** se trató con exceso de EtSH y pTsOH en cantidad catalítica para obtener **121**, que se benzoiló selectivamente para dar el aceptor de glicosilo **122** con un buen rendimiento (**esquema 30**).

La glicosidación de **122** con el donador disacárido **90** ya descrito condujo, en las condiciones experimentales habituales, al octasacárido totalmente protegido **123** (**esquema 30**), precursor de la molécula objetivo **II**. La asignación completa de los espectros de ¹H-RMN de este compuesto se llevó a cabo mediante experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY, TOCSY, NOESY).



ESQUEMA 30

Por el interés de las reacciones de glicosidación que utilizan derivados de ácido idurónico como donador de glicosilo y por su importancia en el desarrollo de la estrategia sintética presentada, se resumen en la **tabla 6** las condiciones experimentales y rendimientos de las reacciones de este tipo que se han realizado en esta Tesis Doctoral. En dicha tabla, se puede ver cómo aumenta el rendimiento con el empleo de un grupo pivaloílo en la posición 2 del donador en lugar de un acetato o un benzoato (50% para **85** frente a 79% para **106**), aunque el tamaño del aceptor de glicosilo también influye decisivamente en el rendimiento de la reacción de glicosidación.

<i>Producto</i>	<i>Donador/ aceptor*</i>	<i>Catalizador</i>	<i>Disolvente</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Rto. + aceptor recuperado</i>
85	1.5:1	TMSOTf 4%	CH ₂ Cl ₂	0	50% + 44%
91	1.5:1	TMSOTf 5%	CH ₂ Cl ₂	25	60% + 37%
106	1.3:1	TMSOTf 3%	CH ₂ Cl ₂	0	79% + 19%
109	1.3:1	TMSOTf 3%	CH ₂ Cl ₂	25	58% + 36%
120	1.2:1	TMSOTf 3%	CH ₂ Cl ₂	25	52% + 40%
123	1.3:1	TMSOTf 3%	CH ₂ Cl ₂	25	60% + 33%

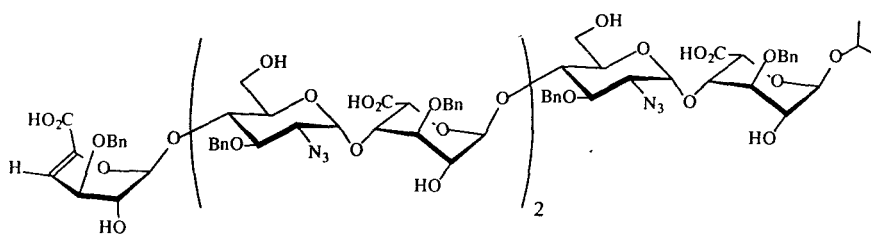
* Relación molar entre donador y aceptor.

TABLA 6

La secuencia de desprotección y sulfatación de **123** comenzó, como en el caso de **109**, con la hidrólisis de las funciones éster en medio básico fuerte (KOH 2N) (**esquema 31**). De esta forma, se llegó al producto **124**, cuya estructura se confirmó con los espectros de RMN y MALDITOF. No obstante, como en el caso del hexasacárido, se detectó la formación de productos secundarios debido a la

competencia de la reacción de eliminación, ya comentada en el capítulo anterior. Así, los espectros MALDITOF permitieron detectar un pico que pudo asignarse al heptasacárido de la **figura 14**, que contiene una unidad de ácido urónico α,β insaturado en el terminal no reductor de la cadena. Las dificultades en la purificación de **124** por cromatografía de permeación sobre gel fueron obviamente mayores que para **110**, dada la menor diferencia de peso molecular entre los productos de la mezcla de hidrólisis.

La sulfatación de los hidroxilos de **124** empleando las mismas condiciones que en el caso de **110**, condujo a **125** con un buen rendimiento (74%). La reacción de desprotección final (**esquema 31**) implicó la hidrogenólisis catalítica de los éteres bencílicos con reducción simultánea de los grupos azida y la posterior sulfatación de los grupos amino generados, empleándose de nuevo las mismas condiciones que en la obtención de **I**. De esta forma, y después del protocolo de purificación mediante gel Sephadex G-25 y resina Dowex Na^+ , se llegó al octasacárido **II** que pudo ser usado en estudios estructurales y biológicos.

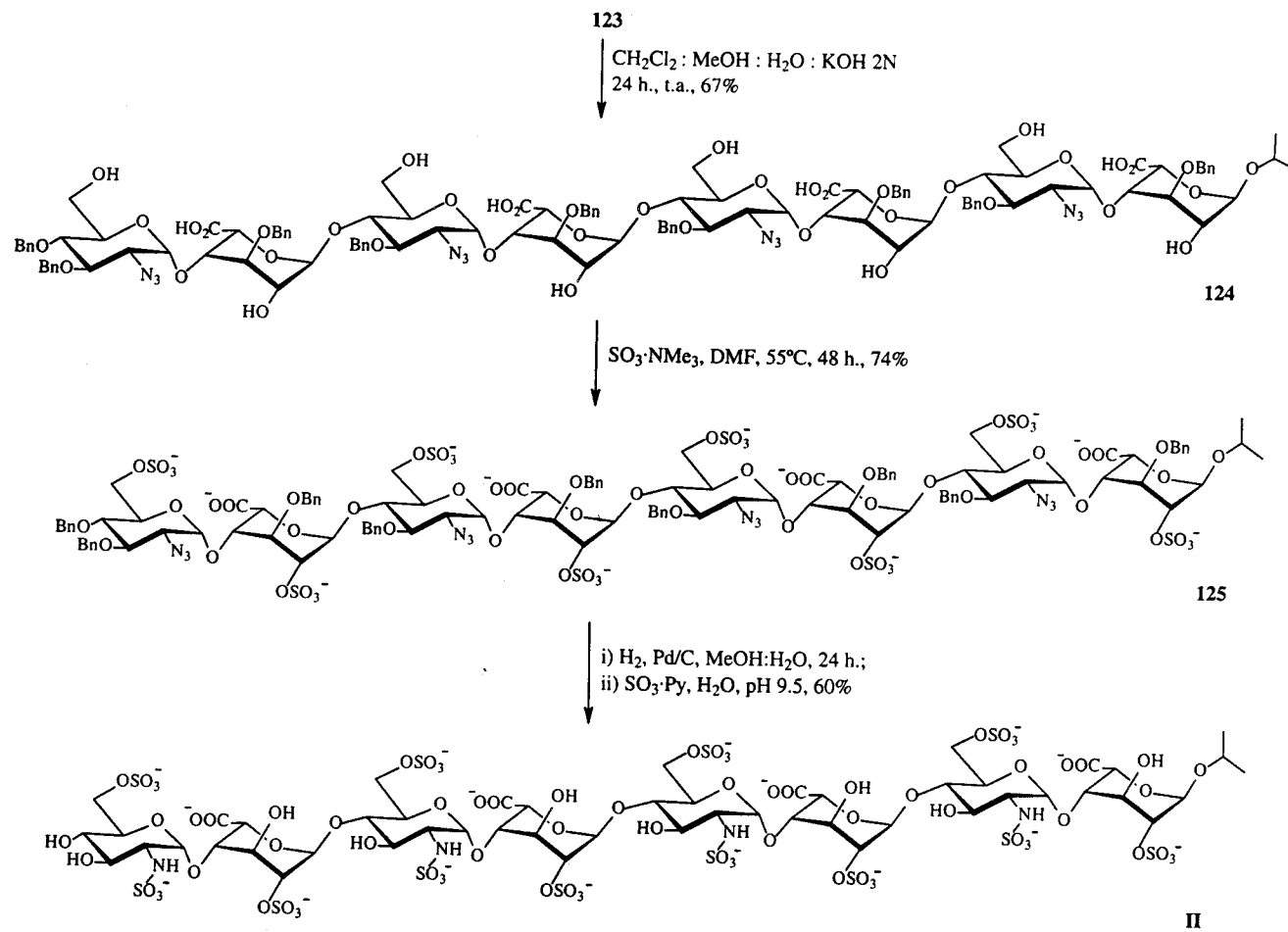


Calculado: $\text{MNa}^+ = 1962.0$; $\text{MK}^+ = 1978.1$.

Experimental: $\text{MNa}^+ = 1963.9$; $\text{MK}^+ = 1979.7$.

FIGURA 14 Estructura de un heptasacárido procedente de la eliminación de la unidad de glucosamina del terminal no reductor de **124**. Detección por MALDITOF

También en esta ocasión se empleó espectroscopía MALDITOF para la identificación de **II** mediante el uso del péptido sintético $(\text{Arg-Gly})_{15}$, adecuado para la formación del complejo iónico en el caso de octasacáridos de heparina. El pico molecular obtenido (5587.2 Da) estuvo de acuerdo con el valor teórico (5586.7 Da) aunque la resolución de los espectros fue visiblemente inferior a la



ESQUEMA 31

obtenida en el caso del hexasacárido **I**, algo que está de acuerdo con los resultados recogidos en la bibliografía¹⁰¹.

La limitación en cuanto a cantidad de octasacárido **II** se refiere, dificultó aún más la purificación de este producto sulfatado por lo que el grado de pureza alcanzado fue menor que en el caso del hexasacárido y ello complicó la asignación completa de los espectros de ¹H-RMN. No obstante, se pudieron realizar estudios biológicos preliminares que han aportado una valiosa información en la elucidación del mecanismo de activación de los FGF's por heparina.

101 Juhasz P., Biemann K., *Carbohydr. Res.*, 1995, 270, 131-147.

3.12 Introducción al estudio de la estructura del hexasacárido I en disolución.

En este capítulo se recogen algunos de los resultados obtenidos en el estudio estructural del hexasacárido sintético I en disolución. Estos estudios constituyen el punto de partida de la Tesis Doctoral de Jesús Angulo Alvarez, exclusivamente dedicada a la determinación de la estructura tridimensional en solución de los fragmentos de heparina sintéticos y su interacción específica con FGF's, por lo que esta parte estructural de la presente Tesis se limita a introducir los protocolos y métodos de trabajo utilizados para la resolución de la conformación de oligosacáridos de heparina mediante RMN y cálculos de mecánica y dinámica molecular. Este análisis conformacional de alta resolución es fundamental para el establecimiento de las bases moleculares de la interacción entre oligosacáridos de heparina y los Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF's).

Conviene recordar que la flexibilidad conformacional característica que presentan los anillos de ácido L-idurónico introduce grandes dificultades en el estudio conformacional de oligosacáridos de tipo heparina. Por ello, y a pesar de que la estructura de la heparina ha sido ampliamente estudiada, existen algunos aspectos que aún no se han clarificado. Entre ellos, destaca la caracterización y el establecimiento riguroso y preciso de los distintos conformeros que participan en el equilibrio conformacional de las unidades de ácido idurónico.

El hexasacárido sintético I constituye un buen modelo para el estudio de la estructura de la región regular de la heparina, particularmente en lo que se refiere a resolver las dificultades relacionadas con las peculiaridades conformacionales del ácido L-idurónico. Las indudables ventajas del hexasacárido I en los estudios de RMN, como ocurre con el pentasacárido de la AT-III (1, 16) sintetizado por los grupos de Petitou y van Boeckel^{5,67}, se deben a su tamaño y su homogeneidad.

5 van Boeckel A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1671-1690.

67 Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Torri G., Casu B., Gatti G., Jacquinet J.C., Sinay P., Petitou M., Choay J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 6773-6778.

En este contexto, puede decirse que los espectros de RMN realizados sobre fragmentos más largos de heparina⁶⁸ presentan un gran solapamiento de señales, que no permite asignar las correspondientes a los anillos individualmente, ya que se observa una señal promedio para todos ellos. Por otra parte, un estudio previo sobre un hexasacárido natural realizado por Linhardt¹⁰⁴ tiene el inconveniente de la existencia de una unidad de ácido urónico α,β insaturado en el terminal no reductor de la cadena y la coexistencia de los anómeros α,β en el terminal reductor. Estas modificaciones estructurales provienen de la despolimerización parcial de la heparina natural y condicionan, en cierto modo, las conclusiones del estudio conformacional.

La validez del compuesto I como modelo en el estudio estructural de la región regular de la heparina se vuelve a discutir al final de este apartado, al presentar los resultados obtenidos en los cálculos de mecánica y dinámica molecular.

A continuación se describen los resultados obtenidos en el estudio estructural de alta resolución del hexasacárido I.

3.12.1 Espectroscopía RMN: Asignación espectral y estudio preliminar de la interacción con Ca^{2+}

La asignación completa de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de I se llevó a cabo mediante experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY) y protón-carbono (HMQC y HSQC). Para ello, la primera cuestión que tuvo que resolverse fue la elección de las condiciones de la muestra de RMN (pH, temperatura, concentración de sales, etc) que permitieran obtener espectros de alta resolución.

Así, las señales correspondientes a los residuos de ácido idurónico suelen aparecer en los espectros de ^1H -RMN ligeramente ensanchadas y poco resueltas a diferencia de los protones de los anillos de glucosamina, ya que se observan las

68 Mulloy B., Forster M., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.*, 1993, 293, 849-858.

104 Mikhailov D., Linhardt R.J., Mayo K.H., *Biochem. J.*, 1997, 328, 51-61.

correspondientes señales promedio de los distintos confórmeros. Además la aidez de estos oligosacáridos¹ por Ca^{2+} introduce cierta heterogeneidad en la muestra e influye también en esta baja resolución, lo que se comprobó por la sensible mejora observada después de eluir las muestras de RMN a través de una columna de Dowex- Na^+ inmediatamente antes de adquirir los espectros (capítulo 3.10).

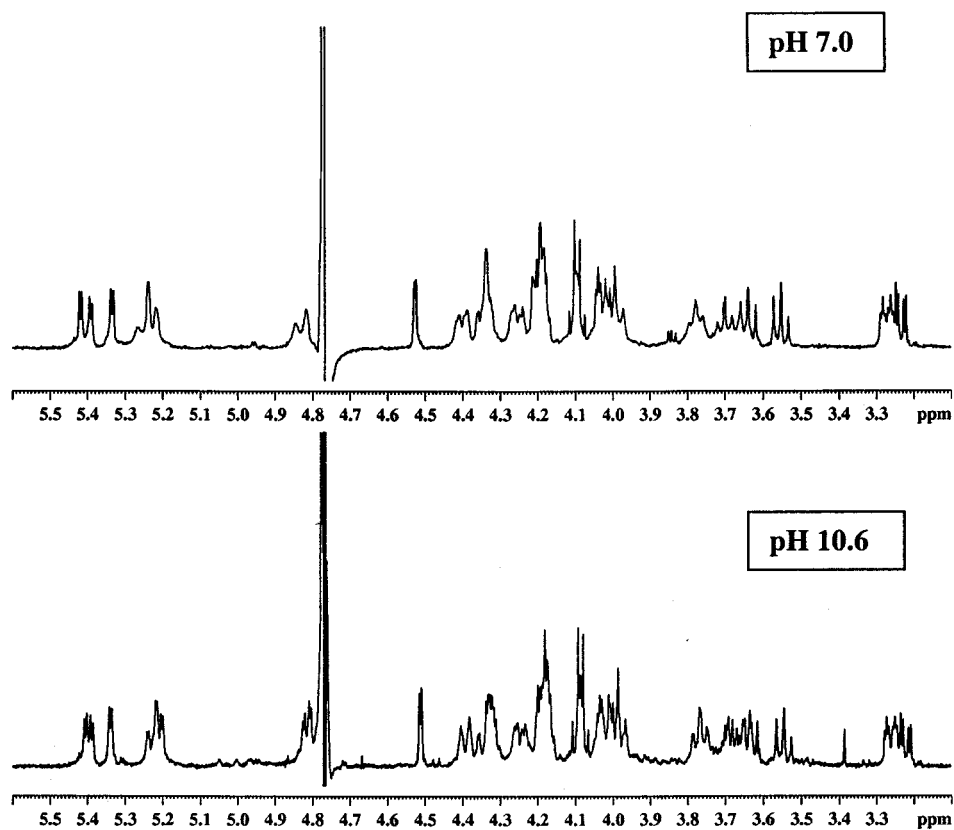
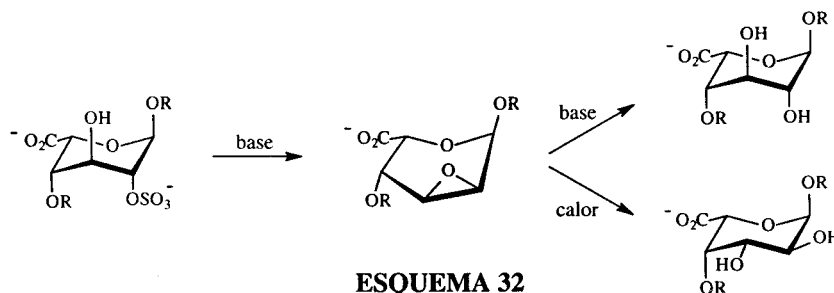


FIGURA 15 Espectros de ^1H -RMN de I a pH 7 y 10.6

También se variaron otras condiciones para intentar aumentar la resolución espectral. Las variaciones de temperatura y concentración de sales en el medio no afectaron significativamente a los espectros. Por otro lado, en los espectros registrados a pH ácido (pH 5.6-3.8) se observó una variación a campo bajo de los desplazamientos químicos de los protones H-5 de los anillos de idurónico debido al equilibrio de protonación de los grupos carboxilato. A pH

1 Casu B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1985, 43, 51-134.

básico (pH>10.6) se observó un estrechamiento y un aumento de resolución considerable de las señales correspondientes a los anillos de idurónico, pero la muestra no fue estable en estas condiciones (**figura 15**). Según la bibliografía^{105,106}, a pH suficientemente básico pueden formarse epóxidos entre las posiciones 2 y 3 de los anillos de idurónico con la consiguiente desulfatación (**esquema 32**). Esto justificaría las variaciones observadas en las señales de idurónico, puesto que esta reacción transcurre preferentemente desde la conformación de silla ¹C₄, donde los sustituyentes se colocan en una disposición *trans*-diaxial. Por todo ello, se trabajó con muestras a un pH próximo a 7 y a una temperatura de 25°C.



La complejidad estructural de **I** unido a su importancia como primera molécula objetivo sintetizada en nuestro grupo de investigación justifica sobradamente un comentario detallado de su asignación espectroscópica.

Así, a partir del estudio combinado de los espectros COSY y TOCSY, se pudieron establecer las conexiones correspondientes a cada residuo monosacárido por separado. De esta forma, como puede verse en el espectro TOCSY de la **figura 16**, se identificaron los picos de cruce correspondientes a los sistemas de espín a los que pertenecen los H-1 de los 3 anillos de glucosamina. Lo mismo puede decirse de los H-1 de los anillos de ácido idurónico.

105 Jaseja M., Rej R.N., Sauriol F., Perlin A.S., *Can J. Chem.*, 1989, 67, 1449-1456.

106 Piani S., Casu B., Marchi E.G., Torri G., Ungarelli F., *J. Carbohydr. Chem.*, 1993, 12, 507-521.

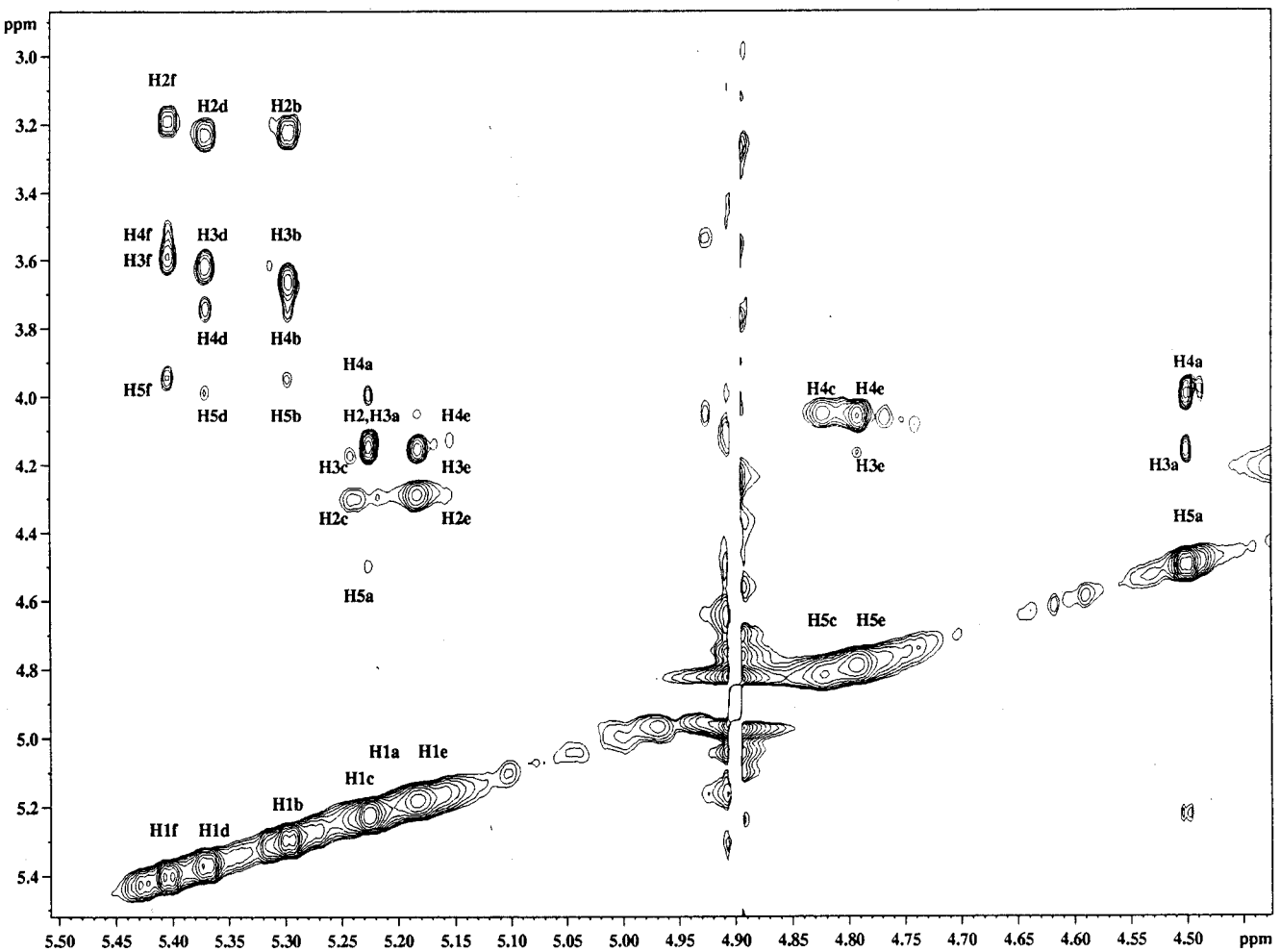


FIGURA 16 Expansión de la zona entre 5.5-4.4 ppm de un experimento TOCSY de I en D₂O, 10°C, 500 MHz, con un tiempo de mezcla de 60 ms.

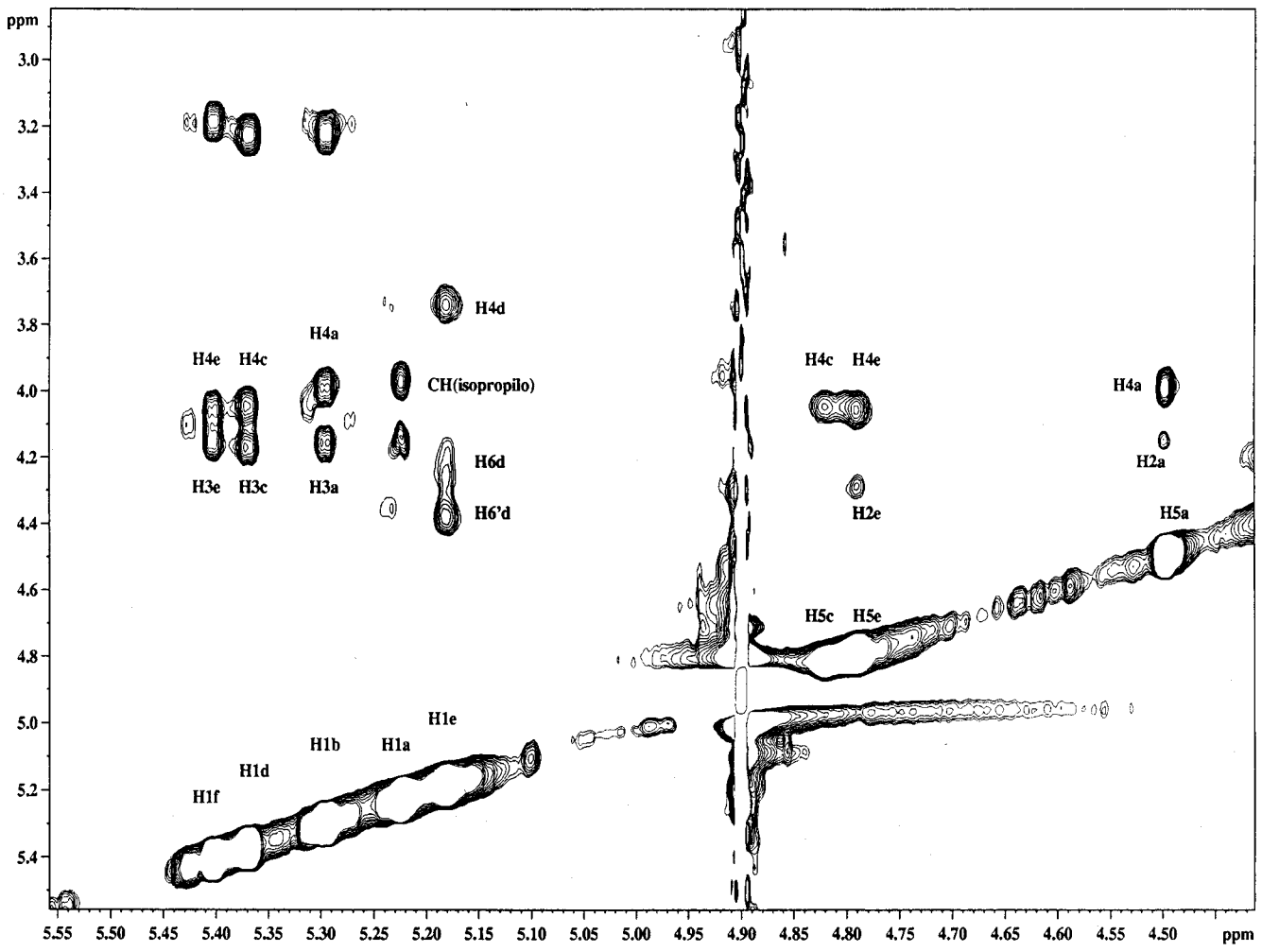


FIGURA 17 Expansión de la zona entre 5.5-4.4 ppm de un experimento NOESY de I en D₂O, 10°C, 500 MHz, con un tiempo de mezcla de 300 ms.

Finalmente, de los espectros NOESY (**figura 17**) se obtuvo la información necesaria para resolver la asignación secuencial de la cadena oligosacáridica. Para ello se emplearon los picos de cruce interglucosídicos. En primer lugar, el protón H-1 de la unidad de idurónico que ocupa el terminal reductor de la cadena (H-1A) fue fácilmente identificable ya que presenta un pico de cruce intenso con el protón CH del grupo isopropilo y además lógicamente carece de picos NOE con los residuos de GlcN. A continuación, el resto de anillos se identificaron sin dificultad, ya que los protones H-1 de las 3 glucosaminas presentaron NOE intenso con los correspondientes H-3 y H-4 de idurónico, mientras que los H-1 C y E de idurónico presentaron NOE con H-4 y H-6 de las glucosaminas B y D. Esta asignación secuencial se confirmó desde el terminal no reductor del hexasacárido, utilizando como dato clave el desplazamiento químico característico del protón H-4 del residuo F, ya que éste cuenta con un entorno químico distinto (**figura 18**).

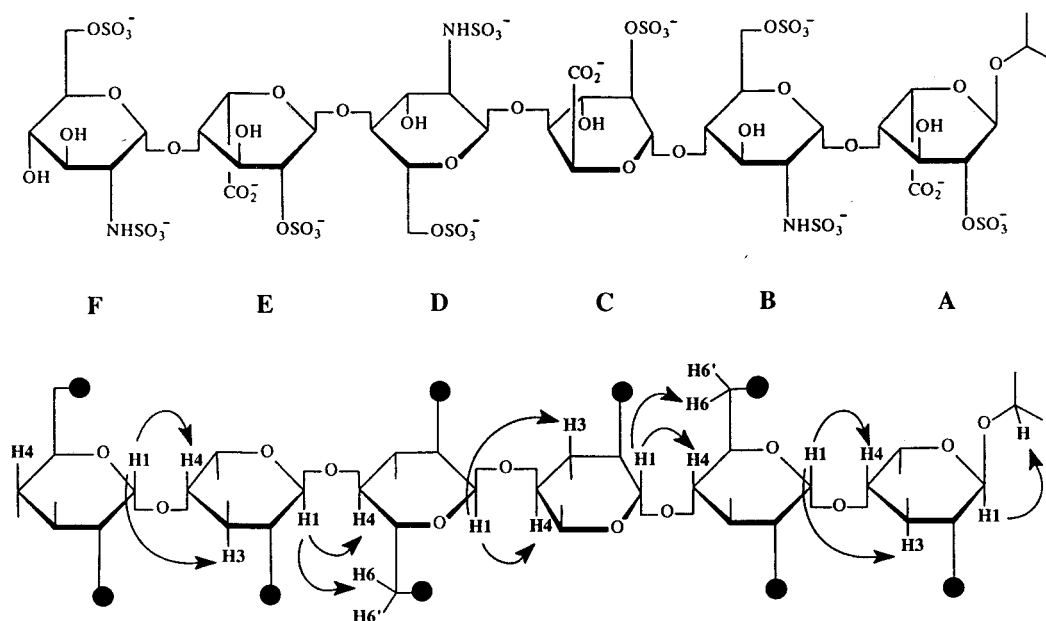


FIGURA 18 En la parte superior se representa *I* poniendo de relieve la distribución de los grupos cargados a lo largo de su estructura helicoidal. En la parte inferior se indican con flechas los NOE's interglucosídicos observados y con círculos negros los grupos sulfato y sulfamido.

En la **tabla 8** se recoge una lista completa de los picos NOE, tanto intrarresiduo como interglucosídicos, que se observaron en el espectro NOESY de **I**, indicando también la intensidad de cada pico de cruce.

En cuanto a la asignación de los protones H-6 de glucosamina, el análisis de las constantes de acoplamiento de H-5 indicó la presencia mayoritaria del rotámero gauche-gauche (*gg*), lo que está de acuerdo con la bibliografía⁶⁶. Considerando este rotámero *gg* (**figura 19**), la observación de un pico NOE entre H-4 y uno de los H-6 permitió asignar este protón como H-6 *proR*, debido a su mayor proximidad en el espacio en comparación con el protón H-6 *proS*.

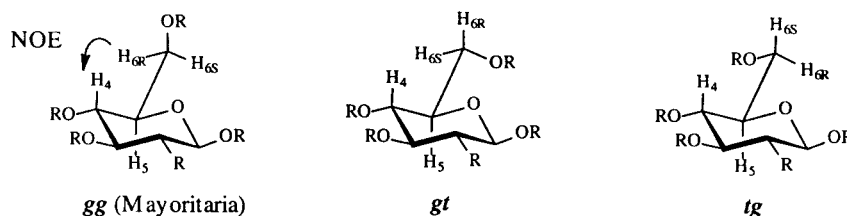


FIGURA 19

De esta forma, fue posible la asignación completa del espectro de ¹H-RMN de **I**, datos que se recogen en la **tabla 7a**.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.22	4.14	4.16	4.00	4.50	
B	5.30	3.23	3.66	3.75	3.96	4.38 y 4.21
C	5.24	4.30	4.17	4.05	4.82	
D	5.37	3.23	3.62	3.74	3.99	4.39 y 4.22
E	5.18	4.29	4.16	4.06	4.79	
F	5.40	3.19	3.59	3.52	3.95	4.32 y 4.17

TABLA 7a. ¹H-RMN de **I**, 500 MHz, D₂O a 10°C. δ en ppm.

66 Torri G., Casu B., Gatti G., Petitou M., Choay J., Jacquinet J.C., Sinay P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1985, 128, 134-140.

Unidad	Intrarresiduo	Interglicosídico	
A IdoA	H1	H2 (f), H3 (f)	OiPr (f)
	H2	H1 (f), H4 (f), H5 (m)	
	H3	H1 (f), H4 (f)	H1B (f)
	H4	H2 (f), H3 (f), H5 (f)	H1B (f), H2B (md)
	H5	H2 (m), H4 (f)	
B GlcN	H1	H2 (f)	H3A (f), H4A (f)
	H2	H1 (f), H3 (m), H4 (f)	
	H3	H2 (m), H4 (f), H5 (f)	H5C (d)
	H4	H2 (f), H3 (f), H5 (f), H6R (m)	H1C (f)
	H5	H3 (f), H6R (f), H6S (f)	
	H6R	H4 (f), H5 (f), H6S (f)	H1C (f)
	H6S	H5 (f), H6R (f)	H1C (m)
C IdoA	H1	H2 (m), H3 (m)	H4B (m), H5B (d); B: H6R (f), H6S (m)
	H2	H1 (m), H4 (m), H5 (m)	
	H3	H1 (m), H4 (m)	H1D (f), H2D (d)
	H4	H2 (m), H3 (m), H5 (f)	H1D (f), H2D (md)
	H5	H2 (m), H4 (f)	H3B (d)
D GlcN	H1	H2 (f)	H3C (f), H4C (f)
	H2	H1 (f), H3 (m), H4 (f)	H3C (d)
	H3	H2 (m), H4 (f), H5 (f)	H5E (md)
	H4	H2 (f), H3 (f), H5 (f), H6R (m)	H1E (f)
	H5	H3 (f), H6R (f), H6S (f)	
	H6R	H4 (m), H5 (f), H6S (f)	H1E (f)
	H6S	H5 (f), H6R (f)	H1E (m)
E IdoA	H1	H2 (m), H3 (m)	H3D (md), H4D (f), D: H6R (f), H6S (m)
	H2	H1 (m), H3 (m), H4 (m), H5 (m)	
	H3	H1 (m), H4 (m)	H1F (f), H2F (d)
	H4	H2 (m), H3 (m), H5 (m)	H1F (f)
	H5	H2 (m), H4 (f)	H3D (d)
F GlcN	H1	H2 (f)	H3E (f), H4E (f)
	H2	H1 (f), H3 (f), H4 (f)	
	H3	H2 (f), H4 (f), H5 (m)	
	H4	H2 (f), H3 (f), H5 (f), H6R (d)	
	H5	H3 (m), H4 (f), H6R (f), H6S (f)	
	H6R	H4 (d), H6S (f)	
	H6S	H5 (f), H6R (f)	

TABLA 8 NOE's detectados para **I**, cuantificados como fuertes, medios, débiles o muy débiles (f, m, d, md entre paréntesis).

Es un hecho bien conocido la afinidad que presenta la heparina por Ca^{2+} . Según se propone en la bibliografía¹⁰⁹, la interacción es altamente específica y en ella participan fundamentalmente los grupos sulfamido y carboxilato. En este contexto se estudió la interacción del hexasacárido **I** con Ca^{2+} .

Los espectros de ^1H -RMN de **I** se registraron tras la adición de cantidades crecientes de Ca^{2+} : 1, 2, 3, 4, 6, 9 y 12 equivalentes para lo que se usaron disoluciones de acetato o cloruro de calcio de concentración conocida (**figuras 20a, 20b**). Durante el transcurso de estas adiciones se observaron variaciones generalizadas en el desplazamiento químico de las señales, destacando un desplazamiento a campo bajo de las señales de H-1 y H-5 de idurónico y un leve desplazamiento a campo alto de los anoméricos de glucosamina.

Cuando se analizaron detalladamente estas variaciones de desplazamiento químico con la adición de Ca^{2+} se pudo poner de manifiesto que existen determinadas "zonas" dentro del hexasacárido que presentan una mayor afinidad por Ca^{2+} . Así, tras la adición de los primeros equiv. de Ca^{2+} , las mayores variaciones de desplazamiento químico se observaron en las señales correspondientes a H1C, H1D y H5C, lo que podría indicar que el Ca^{2+} interacciona principalmente, y de forma prioritaria, con el grupo sulfato del idurónico C y el grupo sulfamido de la glucosamina D. Ambos grupos se sitúan hacia el mismo lado de la estructura helicoidal, donde también apunta el carboxilato de la unidad C (**figura 21**). No obstante, estas conclusiones son preliminares y requieren un análisis más riguroso que se lleva a cabo actualmente en nuestro grupo de investigación.

La asignación de los espectros de ^1H -RMN de las sales cálcicas de **I** tras la adición de 4 y 12 equivalentes de Ca^{2+} se llevaron a cabo de forma similar al caso de la sal sódica, mediante experimentos COSY, TOCSY y NOESY. Los valores de desplazamientos químicos para los distintos protones se recogen en las **tablas 7b y 7c**.

109 Liang J.N., Chakrabarti B., Ayotte L., Perlin A.S., *Carbohydr. Res.*, 1982, 106, 101-109.

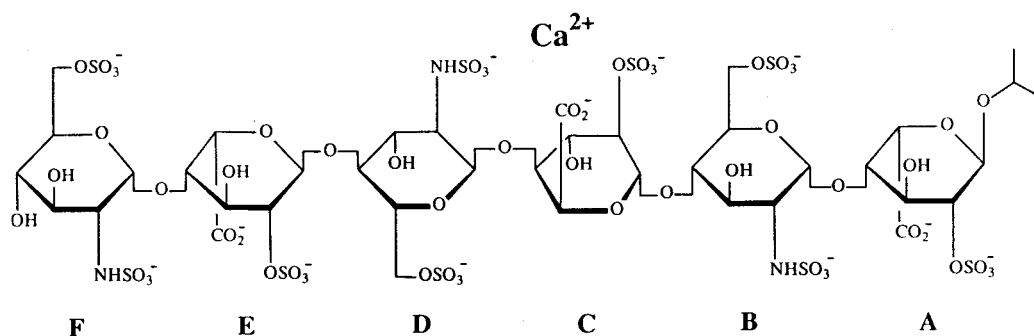


FIGURA 21

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.32	4.20	4.20	4.04	4.58	
B	5.30	3.28	3.79	3.85	4.03	4.37 y 4.26
C	5.44	4.39	4.27	4.09	4.94	
D	5.34	3.30	3.74	3.84	4.07	4.40 y 4.27
E	5.34	4.35	4.24	4.11	4.87	
F	5.41	3.26	3.65	3.58	3.99	4.35 y 4.22

TABLA 7b $^1\text{H-RMN}$ de I + 4 equiv. Ca^{2+} , 500 MHz, D_2O a 25°C . δ en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.34	4.20	4.20	4.03	4.59	
B	5.28	3.26	3.79	3.84	4.02	4.35 y 4.27
C	5.44	4.38	4.27	4.08	4.94	
D	5.33	3.28	3.74	3.84	4.06	4.39 y 4.28
E	5.35	4.35	4.24	4.10	4.88	
F	5.39	3.25	3.64	3.58	3.98	4.33 y 4.21

TABLA 7c $^1\text{H-RMN}$ de I + 12 equiv. Ca^{2+} , 500 MHz, D_2O , 25°C . δ en ppm.

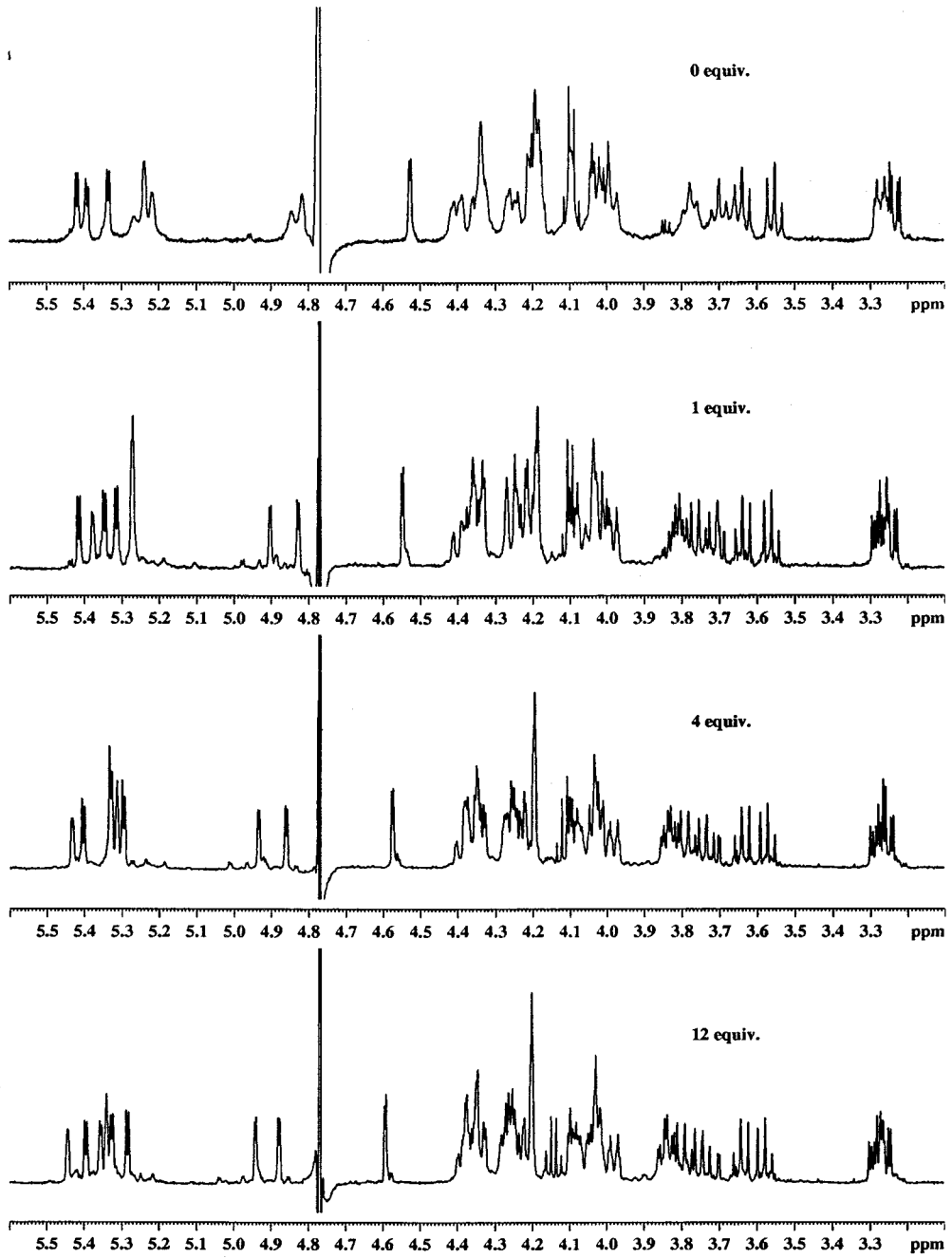


FIGURA 20a ¹H-RMN de I en D₂O, 25°C, 500 MHz con 0, 1, 4 y 12 equivalentes de Ca²⁺

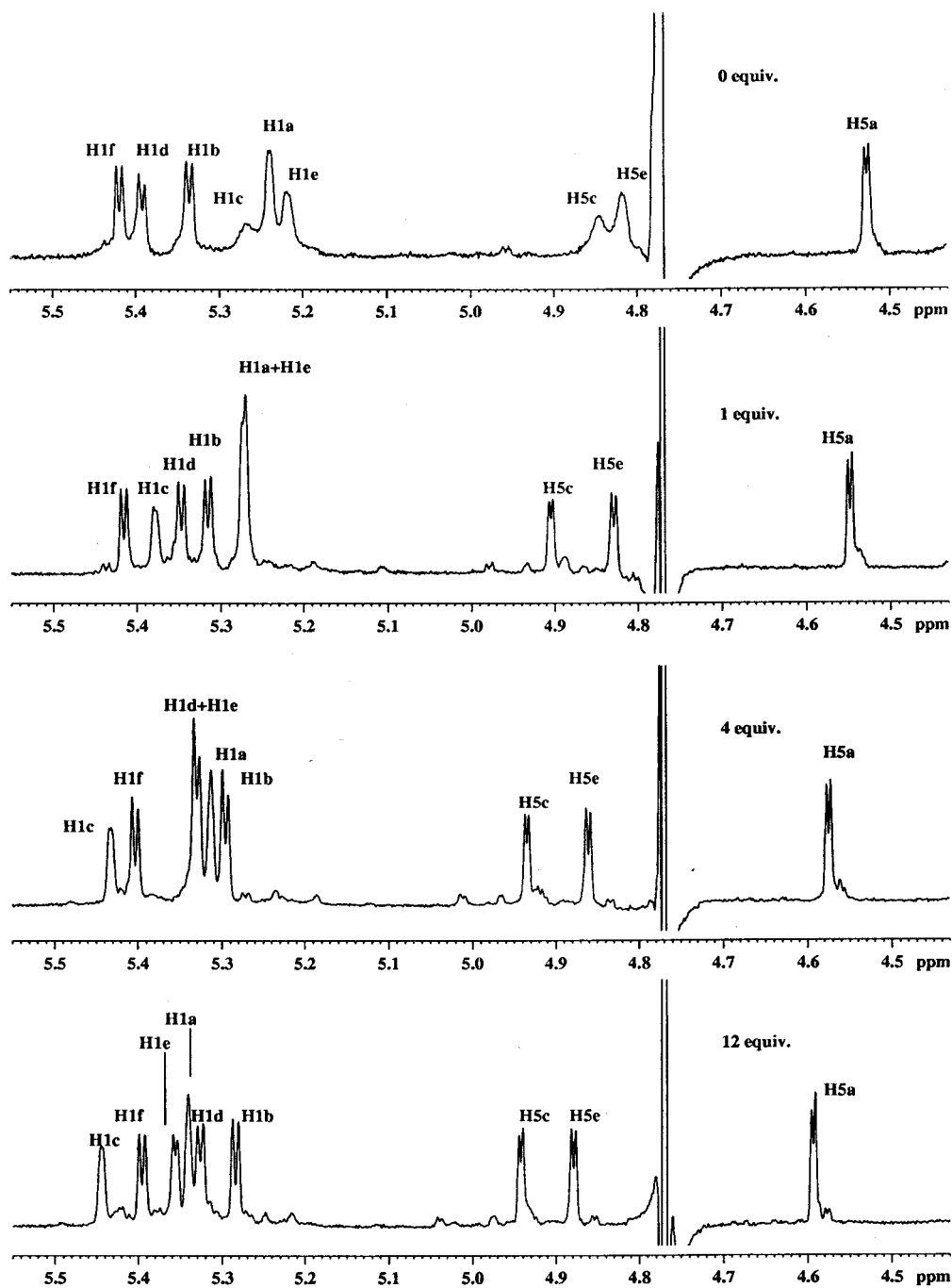


FIGURA 20b Expansión de la zona entre 5.5-4.4 ppm de los experimentos de ¹H-RMN de I en D₂O, 25°C, 500 MHz con 0, 1, 4 y 12 equivalentes de Ca²⁺.

3.12.2 Espectroscopía RMN: Análisis conformacional

Como ya se mencionó al comienzo de este capítulo, un aspecto muy importante en el estudio estructural de **I** es la caracterización del equilibrio conformacional que presentan los anillos de ácido L-idurónico, aspecto que no se ha resuelto aún de forma rigurosa. De acuerdo con la bibliografía existente, mientras que la conformación energéticamente más favorable en el caso de los anillos de glucosamina es la silla 4C_1 , en el caso del ácido L-idurónico existen 3 conformaciones con una energía muy similar: las sillas 4C_1 y 1C_4 y el bote torcido 2S_0 (figura 6). En los antecedentes bibliográficos, los datos de RMN se interpretan en términos de un equilibrio conformacional entre la silla 1C_4 y el bote torcido 2S_0 , en el caso de anillos de IdoA de la región regular de la heparina. De todas formas, si se realiza un análisis riguroso, no se puede descartar la existencia de otros conformeros, como los botes torcidos 5S_1 y 3S_1 , algo que apuntaron previamente Mulloy et al⁶⁸.

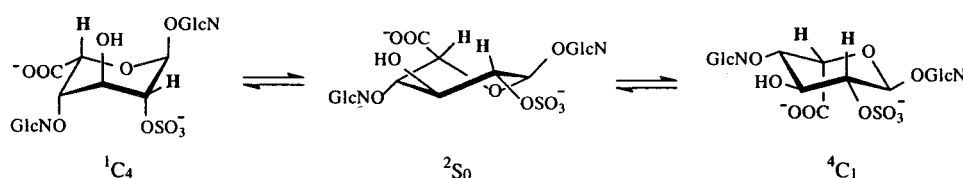


FIGURA 6

En el caso del hexasacárido sintético **I**, y debido al gran solapamiento encontrado en los espectros monodimensionales, las constantes de acoplamiento se obtuvieron a partir de los picos de cruce del espectro COSY dqf según el método descrito por Jeannerat et al¹⁰⁷. Estas constantes de acoplamiento toman valores intermedios a los calculados, según la ecuación de Altona¹⁰⁸, para las conformaciones límites 1C_4 y 2S_0 en los anillos de IdoA, mientras que en los residuos de GlcN se confirma su comportamiento monoconformacional 4C_1 . (tabla 9a).

68 Mulloy B., Forster M., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.*, 1993, 293, 849-858.

107 Jeannerat D., Bodenhausen G., *J. Magn. Reson.*, 1999, 141, 133-140.

108 Haasnot C.A.G., Leeuw F.A.A.M., Altona C., *Tetrahedron*, 1980, 36, 2783-2792.

	A-IdoA	C-IdoA	E-IdoA	1C_4	2S_0	4C_1
${}^3J_{1,2}$ (Hz)	3.4	2.9	2.7	1.8	6.3	8.0
${}^3J_{2,3}$ (Hz)	--	5.5	5.7	2.6	9.9	9.5
${}^3J_{3,4}$ (Hz)	3.4	3.9	3.5	2.6	4.4	9.3
${}^3J_{4,5}$ (Hz)	2.9	2.7	2.8	1.3	2.8	5.2
${}^1C_4: {}^2S_0$	61:39	55:45	62:38			

TABLA 9a

Estos resultados se interpretaron en términos de la coexistencia, en equilibrio rápido, de los conformeros 1C_4 y 2S_0 , cuyas respectivas poblaciones pudieron deducirse de un sencillo cálculo estadístico (tabla 9a). Esto coincide plenamente con los resultados recogidos en la bibliografía^{67,69}. Pudo deducirse que la distribución de poblaciones encontrada no depende de la posición que ocupa el anillo de IdoA en la cadena, incluso en el caso del residuo que ocupa el terminal reductor, dentro de los límites de error experimental de la determinación de los valores de las constantes de acoplamiento. Este hecho avala la elección de I como modelo para el estudio estructural de la región regular de la heparina, ya que se disminuyen los "efectos borde" con respecto a otros modelos, debido, entre otras cosas, al uso del isopropilo como grupo protector de la posición anomérica.

Es preciso decir que la ecuación de Altona, que relaciona las constantes de acoplamiento 3J con el ángulo de torsión entre los protones vecinos y que tiene en cuenta además la electronegatividad de los sustituyentes, no ofrece valores fiables para $J_{4,5}$ en los anillos de ácido idurónico. Ello se debe a la inadecuada parametrización de la ecuación de Altona en el caso de sustituyentes cargados como el carboxilato. Por lo tanto, este valor no se tuvo en cuenta en el cálculo de las poblaciones relativas.

67 Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Torri G., Casu B., Gatti G., Jacquinet J.C., Sinay P., Petitou M., Choay J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 6773-6778.

69 Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Casu B., Torri G., Bossennec V., Perly B., Sinay P., Petitou M., Choay J., *Carbohydr. Res.*, 1990, 195, 157-167.

Las constantes de acoplamiento correspondientes a la sal cálcica de I (4 equiv. de Ca^{2+}), fueron obtenidas de forma análoga (COSYdqf) y no coinciden con los valores teóricos correspondientes a las conformaciones límite (ecuación de Altona), ni con los de la muestra sódica. Estos datos de RMN pudieron de nuevo interpretarse en términos de un equilibrio conformacional rápido entre la silla ${}^1\text{C}_4$ y el bote torcido ${}^2\text{S}_0$, existente en los anillos de ácido L-idurónico. Además, la interacción con el catión divalente altera las poblaciones relativas de cada conformero en el equilibrio hacia la silla ${}^1\text{C}_4$, como se recoge en la **tabla 9b** y se apunta en la bibliografía⁶⁹.

	A-IdoA	C-IdoA	E-IdoA	${}^1\text{C}_4$	${}^2\text{S}_0$	${}^4\text{C}_1$
${}^3\text{J}_{1,2}$ (Hz)	2.5	2.3	3.3	1.8	6.3	8.0
${}^3\text{J}_{2,3}$ (Hz)	3.0	4.4	5.5	2.6	9.9	9.5
${}^3\text{J}_{3,4}$ (Hz)	3.3	3.5	3.3	2.6	4.4	9.3
${}^3\text{J}_{4,5}$ (Hz)	2.5	2.7	2.7	1.3	2.8	5.2
${}^1\text{C}_4: {}^2\text{S}_0$	81:19	71:29	64:36			

TABLA 9b

Por otro lado, la existencia de una determinada población de anillos de idurónico en la conformación de bote torcido ${}^2\text{S}_0$ pudo confirmarse al analizar los espectros NOESY, ya que se observó el NOE H-2/H-5 en los 3 residuos de idurónico. Este pico NOE es incompatible con las sillas ${}^1\text{C}_4$ y ${}^4\text{C}_1$ y es, por tanto, característico de la conformación ${}^2\text{S}_0$, como puede observarse en la **tabla 10** donde se recogen las distancias interprotónicas correspondientes a las distintas conformaciones límites de los anillos de ácido idurónico.

Como hemos indicado previamente, en los espectros NOESY de I se observaron picos de cruce interglicosídicos (H1/H3, H1/H4 para las uniones GlcN-IdoA y H1/H4, H1/H6 $_{proR}$ para las uniones IdoA-GlcN) que determinan las disposiciones posibles de los ángulos glicosídicos, ya que sólo un

⁶⁹ Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Casu B., Torri G., Bossennec V., Perly B., Sinay P., Petitou M., Choay J., *Carbohydr. Res.*, 1990, 195, 157-167.

determinado rango de valores de ϕ y ψ posibilita la proximidad espacial de los protones de tal forma que se produzcan dichos acoplamientos.

	H1	H2	H3	H4	H1	H1	H1	H2	H2	H3
	H2	H3	H4	H5	H3	H4	H5	H4	H5	H5
1C_4	2.53	2.51	2.53	2.45	4.28	4.88	3.62	4.29	4.00	3.75
2S_0	3.05	3.02	3.02	2.27	2.56	4.46	3.56	2.80	2.30	3.64
4C_1	3.06	3.05	3.03	2.42	2.56	3.89	3.63	2.49	4.03	3.76

TABLA 10

Estos picos NOE interglucosídicos están cualitativamente de acuerdo con los cálculos teóricos¹¹⁰ (ver más adelante) y con una conformación global de la molécula en forma de hélice a derechas (**figura C**). Esta estructura secundaria helicoidal ha sido observada en todos los derivados oligosacarídicos de heparina recogidos en la bibliografía, independientemente de la conformación que adopten los residuos de ácido idurónico. La estructura helicoidal viene marcada, por tanto, por la disposición que adopten los ángulos glicosídicos ϕ y ψ .

Hasta aquí se ha descrito el análisis estructural cualitativo de **I**. A continuación se indican las conclusiones del análisis estructural cuantitativo, donde se acentúan las dificultades debidas a la característica movilidad conformacional del ácido L-idurónico.

3.12.3 Espectros NOESY: análisis cuantitativo y aspectos dinámicos

El **análisis estructural cuantitativo** implica el cálculo de distancias a partir de medidas de NOE. Una aproximación frecuente es hacerlo a través de las velocidades de relajación cruzada longitudinal (σ_{NOE}), que se obtienen a partir de las curvas de crecimiento del NOE con el tiempo de mezcla¹¹¹. Sin embargo,

¹¹⁰ Trabajo incluido en la Tesis Doctoral de Jesús Angulo Alvarez

¹¹¹ Neuhaus D., Williamson M., *The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis*, New York, VCH, 1989.

σ_{NOE} depende, además de la distancia, de la frecuencia del espectrómetro y de la movilidad molecular (tiempo de correlación, τ_c).

Así, la expresión matemática de σ_{NOE} para dos núcleos i,j no equivalentes que experimentan una reorientación isotrópica es la siguiente:

$$\sigma_{ij}^{\text{NOE}} = \tau_c \left(\frac{\gamma^4 \cdot \hbar^2}{10 \cdot r_{ij}^6} \right) \cdot \left[\frac{6}{1 + 4 \cdot \omega_o^2 \cdot \tau_c^2} - 1 \right]$$

siendo τ_c : tiempo de correlación global de la molécula; ω_o : frecuencia del espectrómetro en rad/s; γ : constante giromagnética; $r_{i,j}$: distancia interprotónica entre i,j .

Por lo tanto, es necesario conocer simultáneamente σ_{NOE} y τ_c para poder calcular rigurosamente distancias interprotónicas. En la aproximación más sencilla, se asume que la molécula tiene un comportamiento **isotrópico rígido**, es decir, todas las σ_{NOE} tienen un mismo τ_c , que se estima a partir de una distancia conocida. Esta aproximación no es válida en casos en los que existan movimientos internos apreciables (moléculas flexibles) ni en los que el movimiento global sea anisotrópico.

En este contexto, fue posible construir las curvas de crecimiento del volumen normalizado del NOE (volumen del pico NOE/volumen del pico diagonal) con respecto al tiempo de mezcla para diversas parejas de protones del hexasacárido sintético I (programa TRIAD-NMR). El ajuste por regresión lineal de estas curvas indicó que un determinado intervalo de tiempos de mezcla (entre 200 y 600ms) se encuentra dentro del rango de crecimiento lineal del NOE y, por lo tanto, fue posible obtener valores experimentales de σ_{NOE} , como la pendiente de dichas curvas en el rango lineal. Este parámetro está íntimamente relacionado con las reorientaciones espaciales de las distintas parejas de núcleos de I.

A continuación, la relación existente entre σ_{NOE} , $r_{i,j}$ (distancia interprotónica) y τ_c , permitió recíprocamente estimar las características del movimiento molecular. En otras palabras, se pudieron calcular **tiempos de**

correlación aparentes para las distintas parejas de protones del hexasacárido sintético I.

Para ello, se obtuvieron los valores de σ_{NOE} a distintas intensidades de campo magnético (σ_{NOE}^{500} y σ_{NOE}^{400} para 500 y 400 MHz respectivamente), valores que se utilizaron para calcular el cociente $\sigma_{NOE}^{500}/\sigma_{NOE}^{400}$. De esta forma, se obtuvieron tiempos de correlación aparentes para cada pareja de protones de I, sin necesidad de conocer las distancias interprotónicas, ya que esta dependencia se simplificó en la ecuación matemática, que se presenta a continuación y cuya deducción no se incluye en esta memoria:

$$\frac{\sigma_{500}^{NOE}}{\sigma_{400}^{NOE}} = \frac{5 + 20 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \tau_c^2 - 4 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^2 - 16 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^4}{5 + 20 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^2 - 4 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \tau_c^2 - 16 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^4}$$

siendo: ω_{400} , ω_{500} : frecuencias de los espectrómetros de 400 y 500 MHz respectivamente, τ_c : tiempo de correlación aparente para cada pareja de protones.

La distribución de σ_{NOE} y tiempos de correlación aparentes encontrada (tabla 11) indicó claramente la existencia de diferencias en la movilidad de la molécula I, según la pareja de protones que consideremos. Todo esto parece indicar que los movimientos moleculares no se ajustan a un modelo isotrópico rígido y que es necesario el empleo de modelos de movimiento más complejos.

UNIDAD	H1-H2 GlcN			H2-H4 GlcN			H4-H5 IdoA		
	σ^{500}	σ^{400}	τ_c	σ^{500}	σ^{400}	τ_c	σ^{500}	σ^{400}	τ_c
A							0.11	0.10	1.02
B	0.20	0.18	0.97	0.11	0.084	0.68			
C							0.22	0.15	0.61
D	0.25	0.23	1.08	0.11	0.084	0.68			
E							0.19	0.15	0.71
F	0.15	0.13	0.74	0.039	0.037	1.33			

TABLA 11 Valores de σ_{NOE}^{500} , σ_{NOE}^{400} (s^{-1}) y τ_c (ns) para distintas parejas de protones del hexasacárido I.

Esta desviación del modelo de movimiento isotrópico rígido puede deberse a la pérdida de isotropía (los ejes de rotación global de la molécula no son equivalentes) o/y a la superposición de movimientos internos o segmentales (moléculas flexibles).

M. Hricovini¹¹² ha descrito el comportamiento anisotrópico del pentasacárido relacionado con la AT-III basándose en medidas de relajación de ¹³C, concluyendo que los ejes de rotación global de la molécula no son equivalentes. En el caso de **I**, la comparación de σ_{NOE} y τ_c aparentes para parejas de protones de los anillos de glucosamina con distancias interprotónicas similares y fijas (por ejemplo, vectores H1-H2 y H2-H4, que forman un ángulo entre sí de 109°) indicó que **I** también presenta un fuerte efecto anisotrópico en su movimiento (**tabla 11**).

A pesar de ello, en este caso, y gracias a la simetría implícita de la estructura tridimensional de **I**, se pudieron analizar los movimientos internos segmentales sin resolver la contribución anisotrópica. De esta forma, los σ_{NOE} y τ_c aparentes obtenidos para parejas de protones con una misma contribución anisotrópica (por ejemplo, vectores H1-H2 de las unidades de GlcN B, D y F) son mayores en la parte central del hexasacárido y menores en los extremos (**tabla 11**). Este hecho confirmó la existencia de movimientos internos segmentales en el hexasacárido **I**, lo que es característico de moléculas con un alto grado de flexibilidad.

Por tanto, el movimiento molecular de **I** es anisotrópico y flexible, lo que dificulta enormemente el análisis estructural cuantitativo. No obstante, la caracterización de la reorientación molecular de **I** en disolución mediante estas medidas de σ_{NOE} y τ_c aparentes permitirá la determinación del modelo dinámico a aplicar en el cálculo de distancias interprotónicas, usando los espectros NOESY y la metodología del análisis de la matriz de relajación completa, necesaria puesto que el comportamiento dinámico de **I** impide el uso de las aproximaciones más

112 Hricovini M., Torri G., *Carbohydr. Res.*, 1995, 268, 159-175.

sencillas. Finalmente, estas distancias se usarán como restricciones experimentales en los cálculos de mecánica y dinámica molecular.

3.12.4 Modelado molecular

Los cálculos teóricos de mecánica y dinámica molecular se han llevado a cabo paralelamente al estudio por RMN. Se ha utilizado, entre otros, el campo de fuerzas AMBER¹¹³, con la modificación GLYCAM¹¹⁴ para carbohidratos y con la inclusión de parámetros para los grupos sulfato¹¹⁵. Es importante destacar que las características peculiares de este tipo de oligosacáridos (presencia de grupos sulfato, elevada densidad de carga negativa) exigió la utilización de parámetros indicados específicamente para los grupos sulfato, en las posiciones en que aparecen en la región regular de la heparina. El primer paso fue, por tanto, la adecuada parametrización del campo de fuerzas a utilizar.

Los mapas de energía adiabáticos¹¹⁰ calculados mostraron una geometría *syn*, de acuerdo con el efecto exoanomérico, con ángulos ϕ en torno a $+60^\circ$ para las unidades de ácido idurónico y -60° en el caso de los anillos de glucosamina.

Las simulaciones de dinámica molecular¹¹⁰ se llevaron a cabo utilizando como estructuras de partida 2 modelos, uno con los 3 residuos de ácido idurónico en conformación 1C_4 y otro con los idurónicos en conformación 2S_0 . En ambos casos, las simulaciones resultaron ser fuertemente dependientes de la constante dieléctrica del medio (ϵ) aplicada.

La utilización de valores de ϵ constantes dio resultados poco satisfactorios debido a la aparición durante el tiempo de la simulación de conformaciones para los anillos de IdoA que no están de acuerdo con los datos experimentales (4C_1 o 3S_1). El empleo de ϵ dependiente de la distancia ($\epsilon = 5r$) proporcionó mejores resultados, debido probablemente a un tratamiento más adecuado de las interacciones electrostáticas. Con $\epsilon = 5r$ y partiendo de la

113 Weiner S.J., Kollman P.A., Nguyen D.T., Case D.A., *J. Comp. Chem.*, 1986, 7, 230-252.

114 Woods R.J., Dwek R.A., Edge C.J., Freser-Reid B., *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 3832-3846.

115 Altona C., Huige C.J.M., *J. Comp. Chem.*, 1995, 16, 56-79.

110 Trabajo incluido en la Tesis Doctoral de Jesús Angulo Alvarez

conformación 2S_0 para los anillos de IdoA, se detectó el equilibrio pseudorrotacional rápido (escala de picosegundos) entre los botes torcidos 2S_0 y 5S_1 , para las unidades A y E. Las transiciones bote torcido-silla observadas fueron escasas, probablemente porque la escala de tiempo de este equilibrio es mayor al tiempo de simulación. Partiendo de la silla 1C_4 , se observó una transición silla-bote torcido en la unidad A de ácido idurónico donde también se detectó el equilibrio rápido entre los botes 2S_0 y 5S_1 . No obstante, este equilibrio pseudorrotacional no ha podido ser confirmado hasta el momento por los datos experimentales.

En cuanto a las uniones glicosídicas, los valores que toman los ángulos de torsión ϕ y ψ durante las simulaciones de dinámica molecular están de acuerdo con los mínimos que predicen los mapas adiabáticos de mecánica molecular. En la **figura 22** se recogen las zonas del mapa conformacional ϕ/ψ pobladas durante la simulación, para cada unión glicosídica y para cada estructura de partida: IdoA en silla 1C_4 o en bote torcido 2S_0 . Las uniones glicosídicas se designan como A, B, C, D y E comenzando desde el terminal reductor de **I**. Además, en estas simulaciones se observó que las uniones glicosídicas IdoA-GlcN son mucho más flexibles que las uniones GlcN-IdoA. En la **figura 23** se representa la evolución de los ángulos de torsión ϕ y ψ durante el tiempo de la simulación para cada unión glicosídica y para cada estructura de partida (1C_4 o 2S_0).

La validez de **I** como modelo para el estudio conformacional de la región regular de la heparina se confirmó al superponer un conjunto de estructuras representativas obtenidas durante las simulaciones de dinámica molecular con el hexasacárido interno de las estructuras dodecasacarídicas, obtenidas por Mulloy et al. y recogidas en el Protein Data Bank¹¹⁶ (1hpn.pdb, **figura 24**). Los valores de la desviación cuadrática media (r.m.s.d.) de los átomos de carbono entre las estructuras promedio de las dinámicas moleculares y las estructuras de Mulloy et

116 Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissing H., Shiudyalov I.N., Bourne P.E., *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 235-242.

al. resultaron ser 2.9 Å y 3.0 Å para los confórmers con anillos de IdoA en silla 1C_4 y en bote torcido 2S_0 respectivamente.

De los resultados de esta superposición se puede concluir que las diferencias encontradas en la actividad biológica de **I** y **II** (ver capítulo 3.13) se deben a la mayor longitud del segundo y no a una posible diferencia significativa en la estructura tridimensional de ambos oligosacáridos.

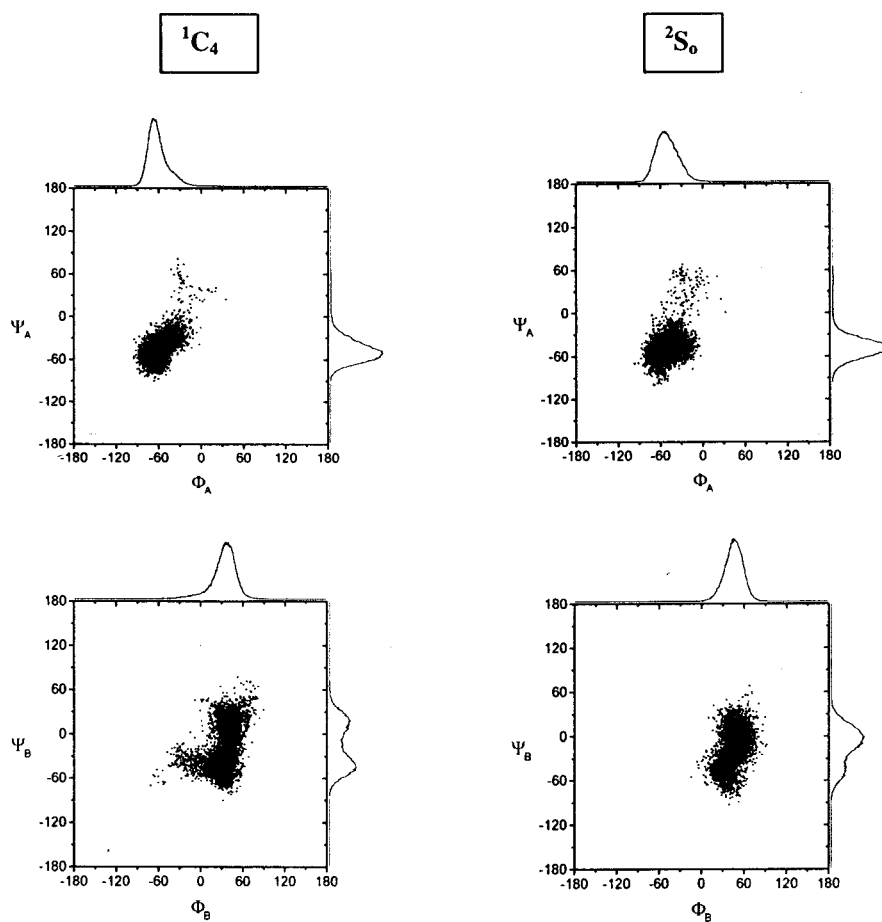


FIGURA 22 (comentario en página 119)

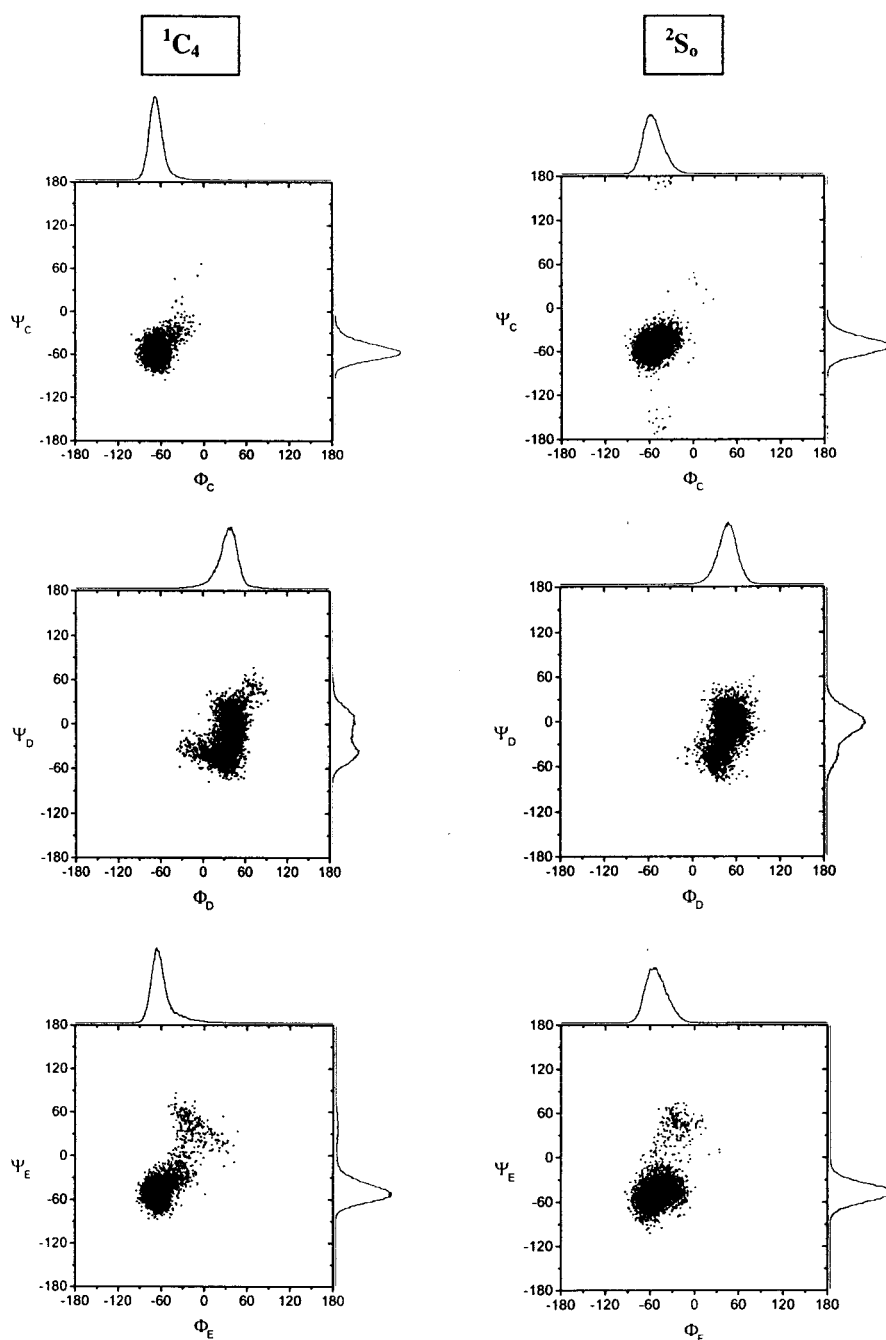


FIGURA 22 Trayectorias de los ángulos de torsión Φ y Ψ durante el tiempo de simulación (4.5 ns), para cada enlace glicosídico y estructura de partida (IdoA en 1C_4 o 2S_0). En los ejes se representan las curvas de distribución para ambos ángulos diedros.

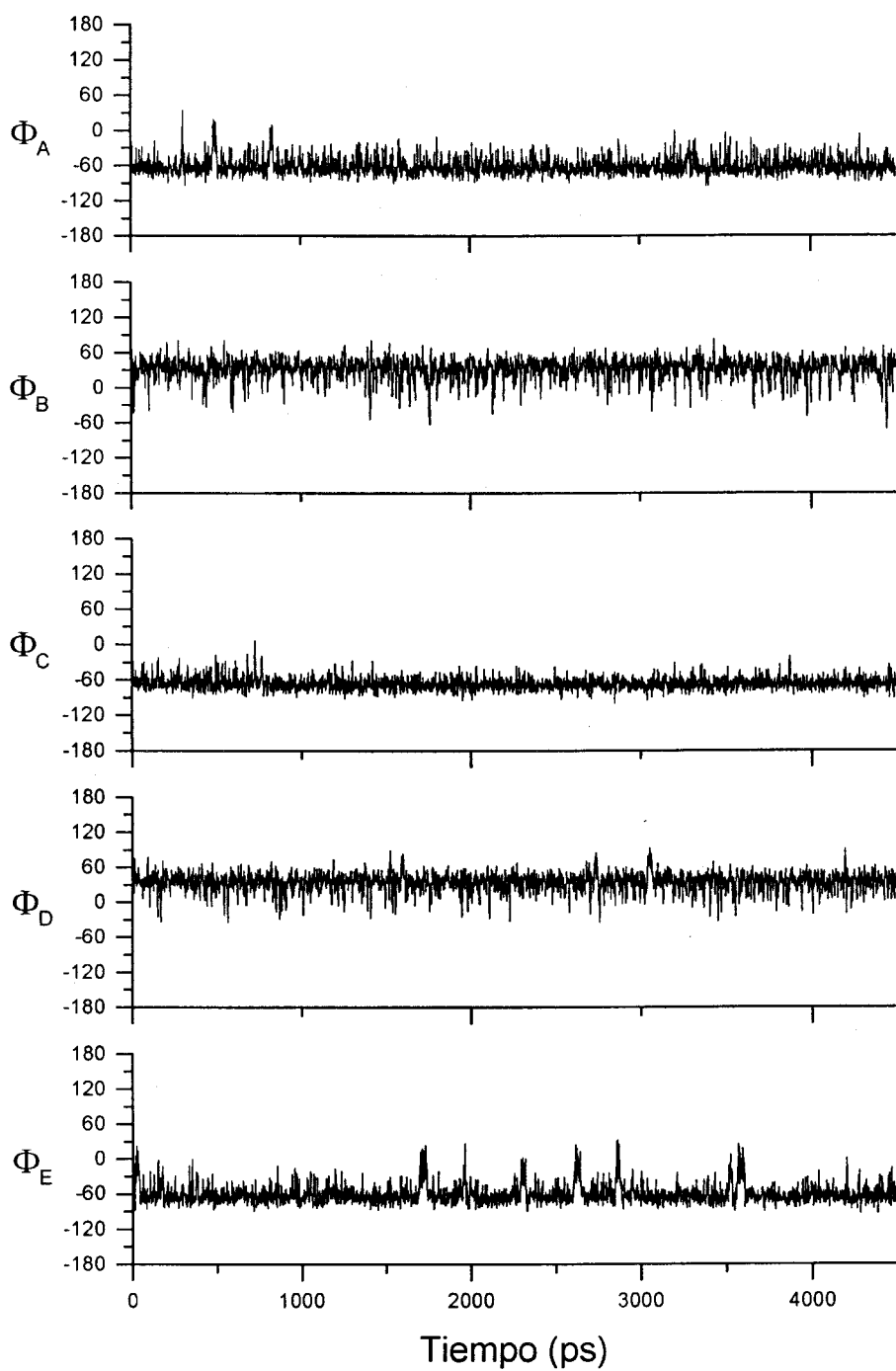


FIGURA 23a Evolución del ángulo Φ de cada enlace glicosídico durante 4.5 ns de simulación partiendo de IdoA en conformación 1C_4

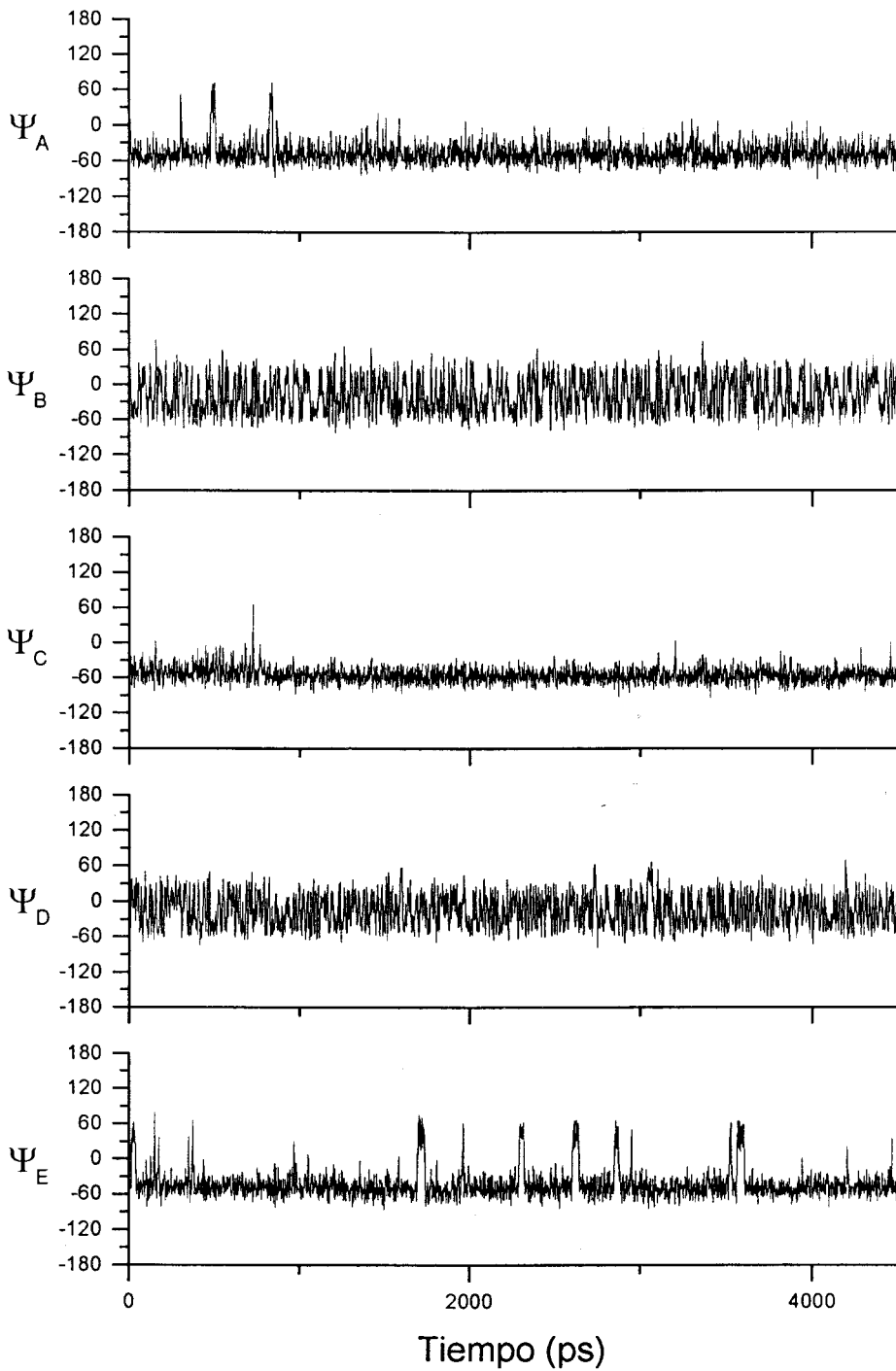


FIGURA 23b Evolución del ángulo Ψ de cada enlace glicosídico durante 4.5 ns de simulación partiendo de IdoA en conformación 1C_4

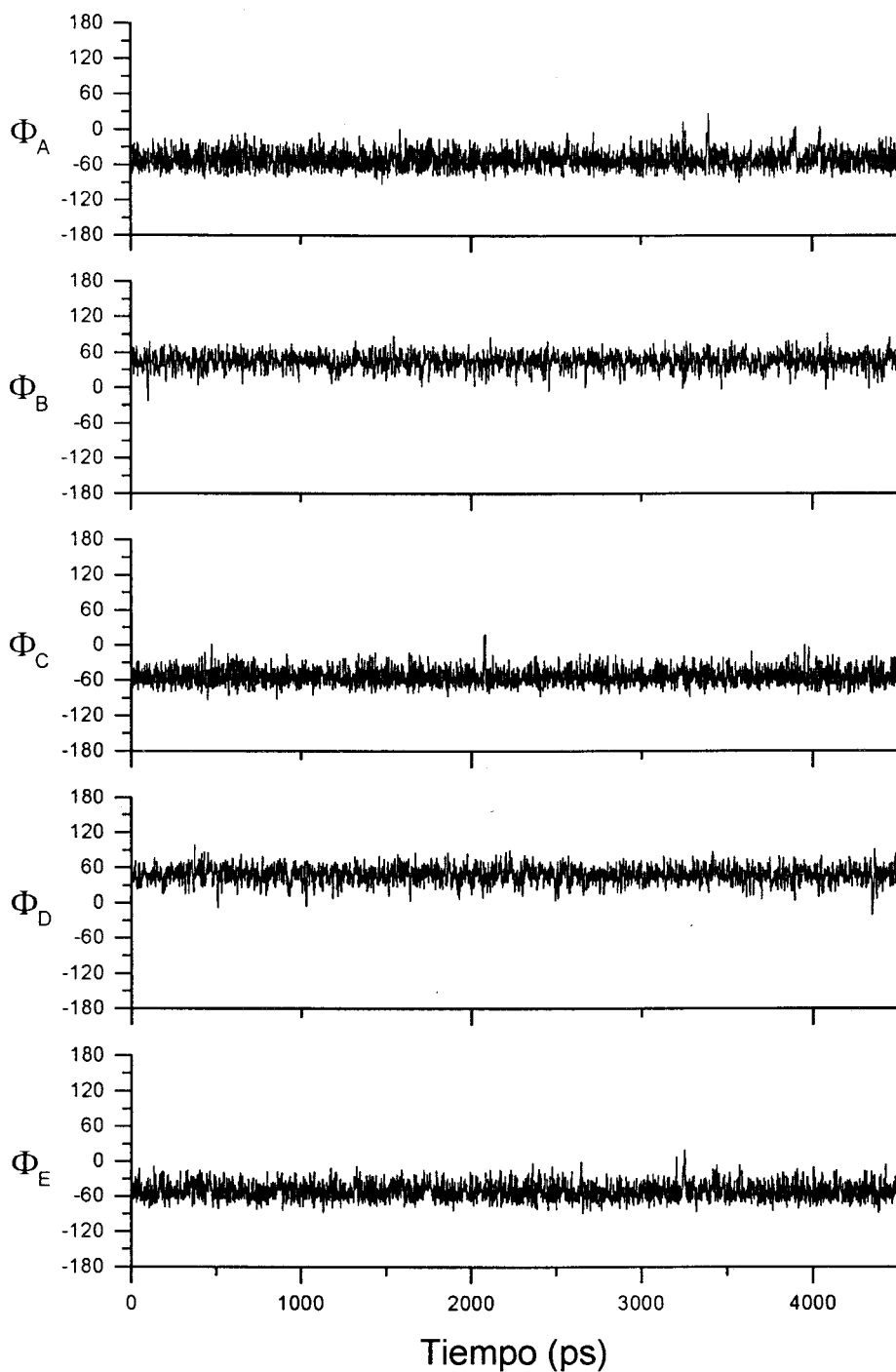


FIGURA 23c Evolución del ángulo Φ de cada enlace glicosídico durante 4.5 ns de simulación partiendo de IdoA en conformación 2S_0 .

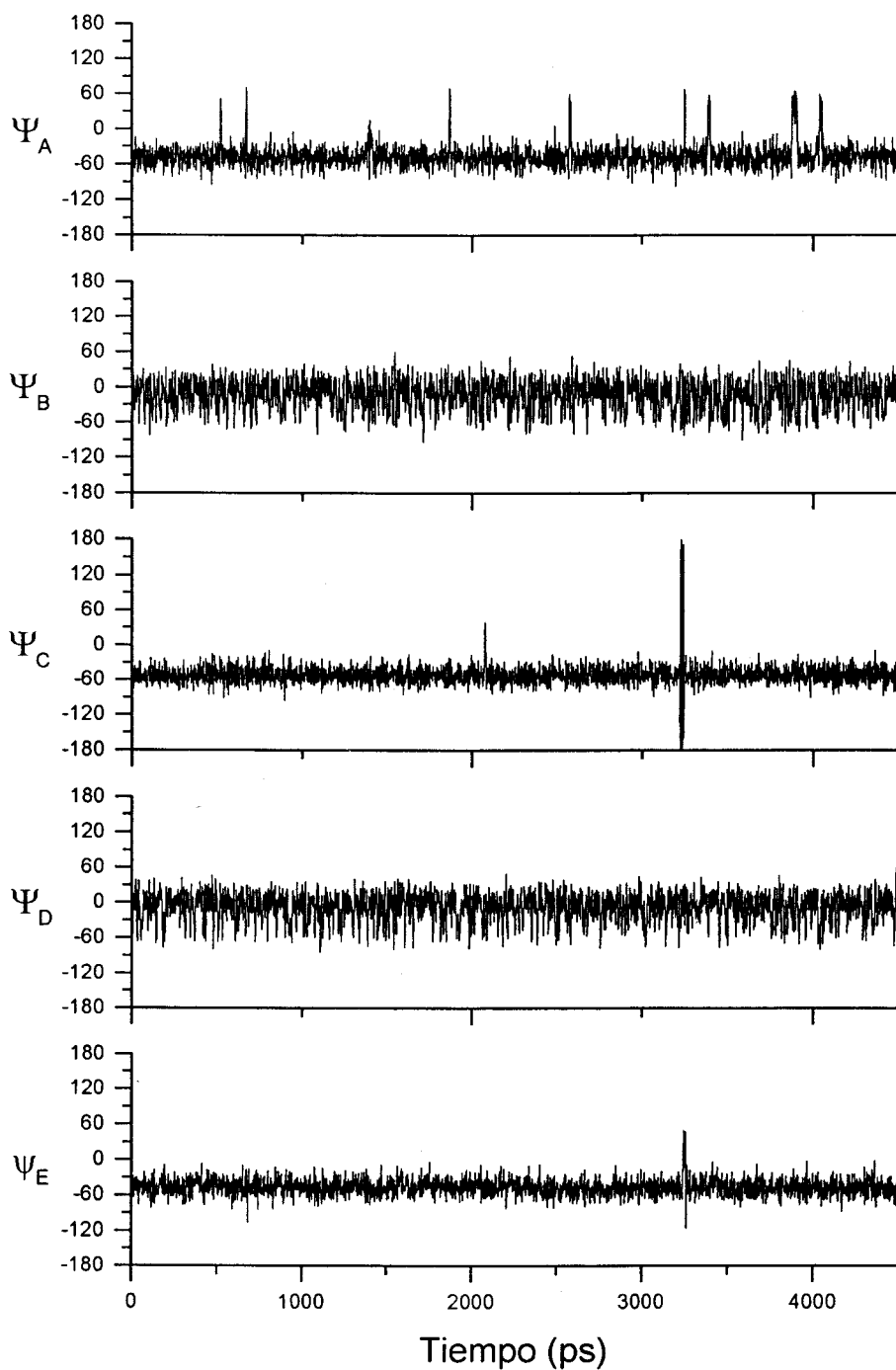


FIGURA 23d Evolución del ángulo Ψ de cada enlace glicosídico durante 4.5 ns de simulación partiendo de IdoA en conformación 2S_0 .

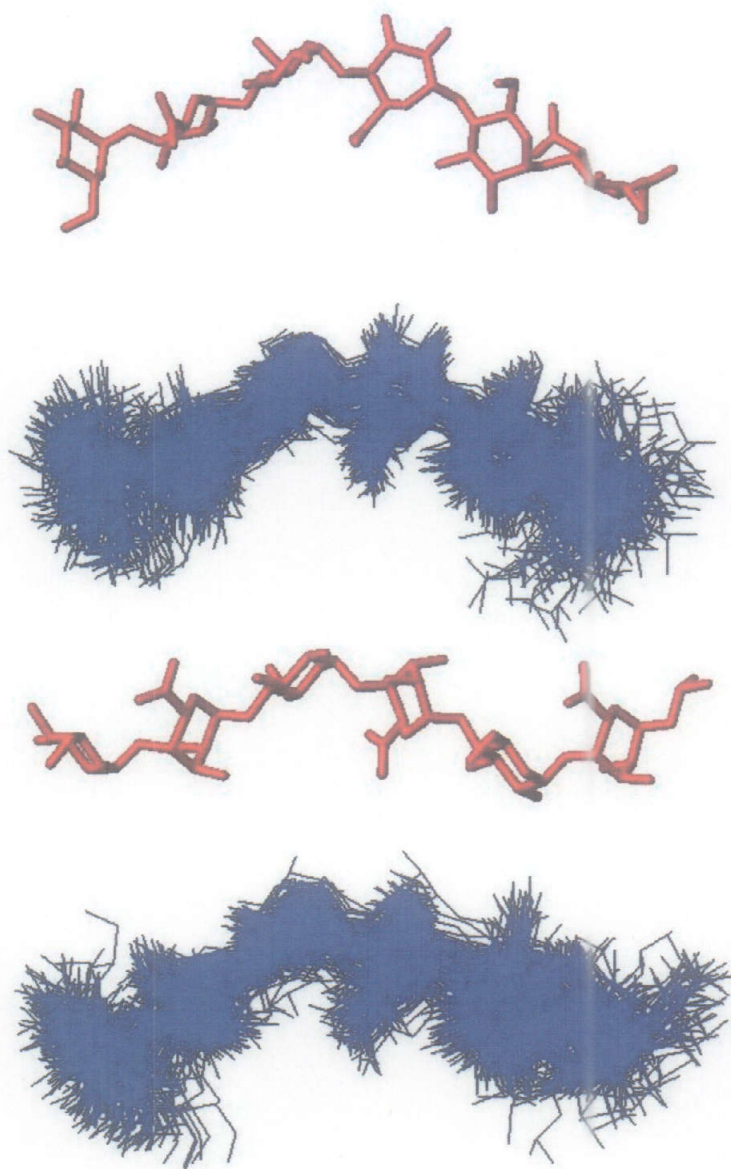


FIGURA 24 Superposición de 100 estructuras (color azul) obtenidas durante dinámicas moleculares de 4.5 ns de **I** para conformaciones de partida con *IdoA* en silla 1C_4 (arriba) o bote torcido 2S_0 (abajo) y estructura del hexasacárido interno del dodecasacárido de Mulloy et al. (rojo) con la misma orientación.

3.13 Ensayos de actividad biológica de las moléculas I y II.

En este apartado se recogen los resultados de los ensayos biológicos llevados a cabo con las moléculas **I** y **II** por el Profesor Guillermo Giménez Gallego et al. (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC). Se ha estudiado el efecto de oligosacáridos de tipo heparina como **I** y **II** sobre la actividad mitogénica de FGF-1 (Factor de Crecimiento para Fibroblastos Ácido).

Como se ha mencionado en el **capítulo 1**, la actividad mitogénica de FGF-1 está controlada por la concentración de heparina en el medio¹¹⁷. En la **figura 25** se presenta la actividad mitogénica inducida por concentraciones crecientes de heparina comercial, relativamente homogénea, de ~3000 Da. Los niveles de actividad proporcionados por este tipo de preparaciones de heparina alcanzaron un máximo para concentraciones en torno a 25 µg/mL¹¹⁸ (aproximadamente 8 µM). En el caso del hexasacárido sintético **I** (**figura 25**), se observó una menor actividad mitogénica de FGF-1, siendo necesarias concentraciones considerablemente mayores (1 mg/mL) para alcanzar los niveles producidos por la heparina de 3000 Da. Por el contrario, los niveles de actividad mitogénica exhibidos en presencia del octasacárido **II** (datos no mostrados) fueron similares a los alcanzados con heparina comercial dentro del mismo rango de concentraciones.

Las diferencias encontradas en los valores de actividad inducidos por **I** y **II**, ponen de manifiesto la importancia del tamaño que deben poseer las cadenas de heparina para que sea efectiva la activación de los FGF's. Como se ha indicado en el **capítulo 3.12**, la mayor actividad del octasacárido **II** se debe a su mayor longitud, y no a cambios significativos en la estructura tridimensional del carbohidrato.

117 Giménez-Gallego G., Con G., Hatcher V.B., Thomas K.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 135, 541-548.

118 Lozano R.M., Rivas G., Giménez-Gallego G., *Eur. J. Biochem.*, 1997, 248, 30-36.

El estudio del mecanismo de activación de FGF-1 por heparina ha sido objeto de un intenso debate científico durante los últimos años. Una de las hipótesis que goza actualmente de mayor aceptación propone que la etapa clave de dicho mecanismo consiste en la oligomerización de FGF's inducida por heparina como paso previo a la dimerización del receptor de alta afinidad (FGFR) que permite la transmisión de la señal a través de la membrana celular¹¹⁹. Di Gabriele et al.²¹ publicaron recientemente las estructuras cristalinas de dímeros de FGF-1 formados con un deca-sacárido obtenido de heparina. Estos autores han propuesto un modelo general para explicar el mecanismo de dimerización del FGFR a partir de dímeros de FGF. Según este modelo, dos unidades de FGFR interaccionan con dos moléculas de FGF, dimerizadas por heparina, lo que provoca la fosforilación recíproca de ambos receptores y el consiguiente inicio de la respuesta celular.

El análisis del equilibrio de sedimentación mostró claramente que el perfil de las disoluciones de FGF-1, en el rango de fuerza iónica de los ensayos de mitogénesis¹²⁰, se desplazó desde especies moleculares de ~14000 Da (**figura 26**, izquierda) hasta ~30000 Da (**figura 26**, centro) cuando se añadió heparina, en una concentración adecuada, a la disolución de proteína. Sin embargo, el peso molecular promedio de las especies sedimentadas en presencia de concentraciones "activantes" de hexasacárido I volvió a ser ~14000 Da (**figura 26**, derecha). En el caso del octasacárido II (datos no mostrados), la proteína sedimentó con un peso molecular promedio de ~19000 Da, valor que tampoco corresponde a un dímero de FGF-1. Estos resultados permiten deducir que la dimerización de la proteína inducida por heparina no es un paso esencial para la actividad mitogénica de FGF-1.

119 Ullrich A., Schlessinger J., *Cell*, 1990, 61, 203-212.

21 DiGabriele A.D., Lax I., Chen D.I., Svahn C., Jaye M., Schlessinger J., Hendrickson W.A., *Nature*, 1998, 393, 812-817.

120 Lozano R.M., Jiménez M., Santoro J., Rico M., Giménez-Gallego G., *J. Mol. Biol.*, 1998, 281, 899-915.

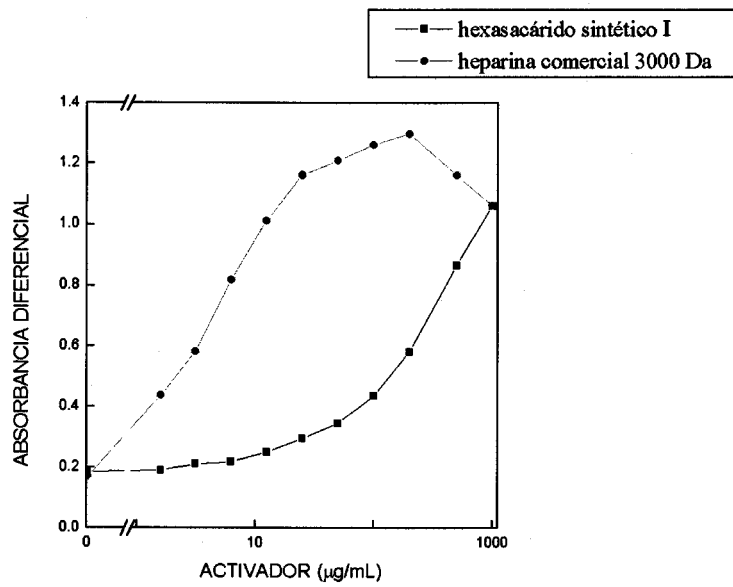


FIGURA 25 Efecto de concentraciones crecientes de heparina comercial y hexasacárido I sobre la actividad mitogénica de FGF-1.

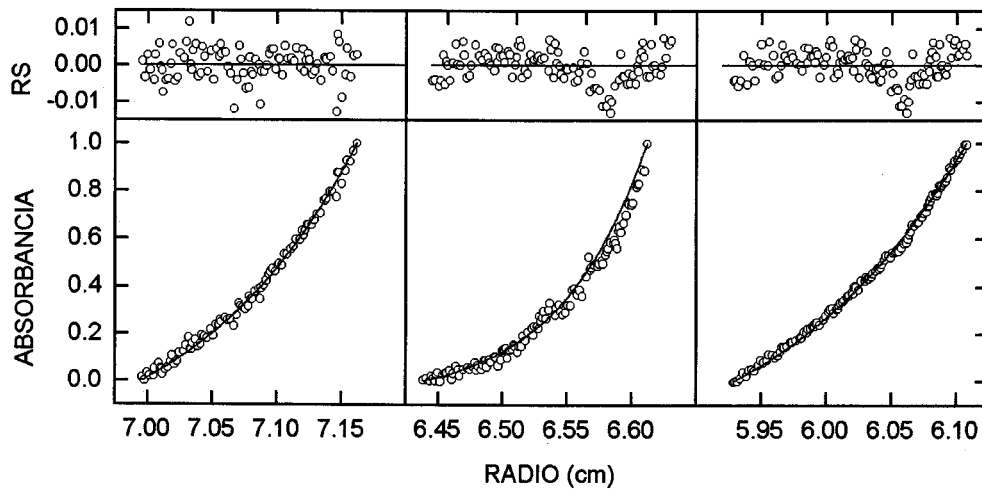


FIGURA 26 Efecto de la heparina comercial y el hexasacárido I sobre la sedimentación en el equilibrio de FGF-1. Izquierda: proteína sin activador; centro: en presencia de 100 µg/mL de heparina; derecha: en presencia de 1 mg/mL de I. La absorbancia se normalizó, siendo los valores máximo y mínimo 0.017 y 0.245; 0.032 y 0.167; 0.161 y 0.502, respectivamente. La absorbancia se midió a 280 nm en el experimento representado en el centro y a 236 nm en el

resto. Los pesos moleculares promedio estimados fueron 13920, 30800 y 14270 Da, respectivamente.

CAPITULO 4
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1ª. Se describe una estrategia sintética para la obtención de oligosacáridos cuya estructura responde a la región regular de glicosaminoglicanos de tipo heparina. Estos glicosaminoglicanos naturales están constituidos por unidades disacarídicas de D-glucosamina y ácido L-idurónico, unidos por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$, que contienen típicamente grupos sulfato en las posiciones 2 y 6 de la unidad de D-glucosamina y 2 de la unidad de ácido L-idurónico.

2ª. La eficacia de la estrategia sintética descrita en esta Memoria se ilustra con la síntesis del hexasacárido **I** y el octasacárido **II**, pero es suficientemente general y versátil como para permitir la síntesis de fragmentos oligosacáridicos de distinta longitud y con diferente distribución de cargas.

3ª. La estrategia que conduce a los oligosacáridos **I** y **II** es una aproximación sintética por bloques $n+2$ altamente convergente que se basa en unidades disacarídicas de tipo **V** con una distribución de grupos protectores tal que permite: su utilización como unidades donadoras y como unidadesceptoras de glicosilo, la generación del enlace glicosídico con la estereoquímica deseada y la introducción de los grupos sulfato en las posiciones deseadas en estadios posteriores del proceso sintético.

4ª. La preparación de las unidades disacarídicas básicas de tipo **V**, que constituyen los bloques sintéticos clave de todo el esquema desarrollado en esta Memoria, se preparan de modo directo y sencillo a partir de donadores de glicosilo derivados de la 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranososa y aceptores derivados del ácido L-idurónico en reacciones de glicosidación estereo- y regioselectivas que aprovechan la mayor reactividad del hidroxilo en posición 4 de la unidad aceptora.

5ª. Se ha puesto a punto un método de purificación y caracterización de oligosacáridos sintéticos altamente cargados, como **I** y **II**, que hace uso de la

cromatografía de exclusión molecular, la cromatografía de intercambio iónico y la espectrometría de masas MALDITOF.

6^a. Se ha llevado a cabo un estudio sobre la estructura tridimensional en solución del hexasacárido **I** utilizando espectroscopía de RMN y modelización molecular. Este estudio ha puesto de manifiesto algunos aspectos importantes de las características estructurales que siguen siendo materia de investigación y debate en los glicosaminoglicanos naturales como son el equilibrio conformacional de las unidades de ácido L-idurónico y el tipo de movilidad de la molécula. La estructura tridimensional deducida de este análisis, en forma de hélice a derechas, indica que el producto sintético **I** se comporta como sus análogos naturales y es, por tanto, un buen modelo estructural de la región regular de la heparina.

7^a. Se presentan datos sobre la estimulación de la actividad mitogénica del Factor de Crecimiento Ácido para Fibroblastos (FGF-1) por el hexasacárido **I** y el octasacárido **II**. Estos datos ponen de manifiesto que los dos oligosacáridos estimulan la actividad mitogénica de FGF-1 requiriéndose concentraciones elevadas del hexasacárido **I** y pequeñas concentraciones del octasacárido **II** para producir un efecto similar a la heparina. Estos resultados indican claramente que, en cuanto a tamaño y distribución de cargas, el octasacárido **II** presenta los requisitos estructurales mínimos para la activación.

8^a. Se presentan datos de análisis de equilibrio de sedimentación que sugieren que la estimulación del efecto mitogénico de FGF-1 por el hexasacárido **I** y el octasacárido **II** no implica necesariamente la dimerización de la proteína.

CAPITULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Métodos generales

Disolventes y reactivos

Todos los disolventes orgánicos anhidros empleados se secaron siguiendo procedimientos descritos⁹⁸, según se indica a continuación:

THF y éter etílico se destilaron sobre Na/benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. DMF se destiló sobre BaO y se conservó sobre tamiz molecular de 4 Å bajo argón. Piridina y Et₃N se destilaron sobre BaO y se conservaron bajo atmósfera de argón. Acetonitrilo y diclorometano se destilaron sobre CaH₂ bajo atmósfera de nitrógeno inmediatamente antes de su utilización. Metanol se destiló sobre (MeO)₂Mg/I₂ y se almacenó bajo atmósfera de argón. Isopropanol se destiló sobre CaO y se mantuvo bajo atmósfera de argón.

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

Técnicas y aparatos

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) 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 los reveladores de H₂SO₄/EtOH (1/9, v/v) y 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.

⁹⁸ Perrin D.D., Armarego W.L.F., *Purification of laboratory chemicals*, 1996, Editorial Butterworth-Heinemann, Oxford.

Los valores de rotación óptica se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 341. En cada caso se indica el disolvente y la concentración de la muestra sobre la que se llevó a cabo la medida. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Vector 22.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se midieron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DPX-300. Los espectros se realizaron en el disolvente deuterado que se indica y los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal del tetrametilsilano (TMS, referencia interna) o la señal residual del disolvente empleado. En los casos en los que no se especifica la temperatura los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente. Para la asignación de las estructuras más complejas se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY, TOCSY, NOESY) y protón-carbono (HMQC, HSQC) usando las secuencias de pulsos estándar (**capítulo 5.8**).

Los análisis elementales se llevaron a cabo con un aparato Leco CHNS-932, después de secar las muestras sobre pentóxido de fósforo durante 24 h. Los resultados se expresan en tanto por ciento en todos los casos. Los espectros de masas FAB se realizaron en el Servicio de Espectroscopía de Masas de la Facultad de Química de Sevilla con un espectrómetro Kratos MS-80 RFA.

La cromatografía de permeación sobre gel se llevó a cabo utilizando gel Sephadex LH-20 y G-25 de Pharmacia. Para la cromatografía de intercambio iónico se empleó resina Dowex 50WX4 Na⁺ de Fluka.

Espectrometría de masas Malditof

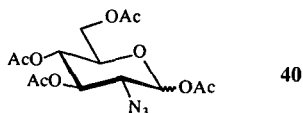
Los espectros MALDITOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) se registraron en un espectrómetro GSG System empleando un voltaje de aceleración de 28 keV. En la preparación de las muestras de los productos intermedios se emplearon disoluciones en AcOEt o MeOH de concentración mM que se mezclaron en proporción 1:1 (v/v) con disoluciones estándar de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en MeOH (matriz). 1 μ L de esta

disolución resultante se depositó en el portamuestras del espectrómetro y se secó a vacío, inmediatamente antes de la adquisición del espectro.

En el caso de los productos finales **I** y **II**, el procedimiento seguido en la preparación de las muestras se describe detalladamente a continuación¹⁰¹. Como matriz se utilizaron disoluciones de ácido 3-hidroxipicolínico con una concentración de 25 g/L en H₂O-CH₃CN 1:1 que contenían aproximadamente 10% p/p de α -D-fucosa. Los péptidos empleados fueron (Arg-Gly)₁₀ (2149.4 Da) y (Arg-Gly)₁₅ (3215.6 Da) para **I** y **II**, respectivamente, y fueron sintetizados por el Servicio de Síntesis de Péptidos de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona. En todos los casos se empleó resina de intercambio aniónico Dowex G-55 OH⁻ (Aldrich), para fijar los aniones hidróxido como contraiones del péptido. Se prepararon disoluciones acuosas del oligosacárido y del péptido, con la misma concentración mM, que se mezclaron en proporción 3:1, 2:1 ó 1:1 en presencia de la matriz. La razón de usar, en ocasiones, un exceso de oligosacárido se debe a un aumento en la eficiencia de la formación del complejo iónico. De esta disolución matriz-oligosacárido-péptido se tomó 1 μ L que se depositó en el portamuestras del espectrómetro y se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

5.2 Síntesis del donador de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranososa 47.

1, 3, 4, 6-tetra-O-acetil-2-azido-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (40).



En un matraz de 3 bocas de 1L se disolvió NaN₃ (62.22 g, 0.96 mol) en H₂O (156 mL) a temperatura ambiente. A esta disolución fuertemente agitada se añadió CH₂Cl₂ (194 mL) a 0°C. A continuación se adicionó gota a gota Tf₂O (32 mL, 0.190 mol) durante 1h. La mezcla se agitó a 0°C durante 2h., la fase

¹⁰¹ Juhasz P., Biemann K., *Carbohydr. Res.*, 1995, 270, 131-147.

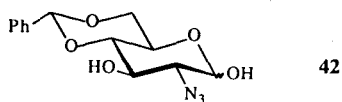
orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 78 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con disolución saturada de NaHCO_3 (156 mL), H_2O (156 mL), se secaron sobre MgSO_4 y se filtraron. Se obtuvo así una disolución 0.4M de TfN_3 (350 mL).

Una suspensión de hidrocloreuro de D-glucosamina (5g, 23.2 mmol) en MeOH seco (100 mL) se trató con disolución 0.5M de metóxido sódico en MeOH (55 mL, 27.5 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min. a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (245 mL), y se añadió 4-dimetilaminopiridina (3 g, 24.6 mmol). Por último, se adicionó gota a gota la disolución 0.4M de TfN_3 (175 mL, 70 mmol) durante 2h. La reacción se agitó bajo argón durante 2 días. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida controlando que la temperatura del baño no superara los 30°C. El residuo obtenido se disolvió en Py (150 mL) a 0°C y se trató con anhídrido acético (100 mL). Después de agitar durante 24 h. a 0°C, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (1 L) y se lavó con disolución 1N de HCl (2 x 1 L). Las fases acuosas se lavaron con CH_2Cl_2 (3 x 300 mL) y las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con disolución saturada de NaHCO_3 (1 L), disolución saturada de NaCl (1 L), se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por columna cromatográfica (3:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **40** (8.79 g, 73%).

CCF (3:1 hexano-AcOEt) R_f 0.20.

^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) δ 6.25 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1 α), 5.51 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1 β), 5.41 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3 α), 5.10-4.90 (m, 3H, H-3 β , H-4 α y H-4 β), 4.25 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a α), 4.24 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a β), 4.04 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6b β), 4.12-3.98 (m, 2H, H-5 α y H-6b α), 3.76 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, H-5 β), 3.62 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, H-2 α), 3.62 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, H-2 β), 2.15-1.98 (8s, 24H, OCOCH_3).

2-Azido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (42).



a) A partir de hidrocloreuro de D-glucosamina:

En un matraz de 3 bocas de 1L se disolvió NaN_3 (62.22 g, 0.96 mol) en H_2O (156 mL) a temperatura ambiente. A esta disolución fuertemente agitada se añadió CH_2Cl_2 (194 mL) a 0°C . A continuación se adicionó gota a gota Tf_2O (32 mL, 0.190 mol) durante 1h. La mezcla se agitó a 0°C durante 2h., la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 78 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con disolución saturada de NaHCO_3 (156 mL), H_2O (156 mL), se secaron sobre MgSO_4 y se filtraron. Se obtuvo así una disolución 0.4M de TfN_3 (350 mL).

Una suspensión de hidrocloreuro de D-glucosamina (5g, 23.2 mmol) en MeOH seco (100 mL) fue tratada con disolución 0.5M de metóxido sódico en MeOH (55 mL, 27.5 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min. a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (245 mL) y se añadió 4-dimetilaminopiridina (3 g, 24.6 mmol). Por último, se adicionó gota a gota la disolución 0.4M de TfN_3 (175 mL, 70 mmol) durante 2h. La reacción se agitó bajo argón durante 2 días. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida controlando que la temperatura del baño no superara los 30°C . El residuo obtenido se diluyó con MeOH (50 mL) y se trató con disolución saturada de NH_4Cl (50 mL) hasta pH neutro. El crudo de la reacción se coevaporó varias veces con etanol y DMF y se utilizó directamente en la etapa de bencilidenación.

El residuo se disolvió en DMF (60 mL) y a la disolución se le añadieron benzaldehído dimetilacetal (10.44 mL, 69.56 mmol) y pTsOH (100 mg). La mezcla se agitó durante 2 días a 30°C y durante 1 día a 40°C , neutralizándose con NaHCO_3 sólido. A continuación se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante sucesivas cromatografías en columna (8:1 y 4:1 tolueno-acetona), para dar **42** (4.83 g, 71%).

b) A partir de **40**:

A una disolución de **40** (3 g, 8.04 mmol) en MeOH:H₂O (75:30 mL) se añadió resina Amberlita IR 120H⁺ (30 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 día. A continuación, se diluyó con MeOH (150 mL), se filtró a través de Celita y se concentró a sequedad. Se obtuvo así **41** (1.467 g, 89%, R_f 0.38 en 4:1 CH₂Cl₂-MeOH), que se utilizó directamente en la etapa de benzilidenación.

A una disolución de **41** (2.88 g, 14.02 mmol) en DMF (30 mL) se añadieron benzaldehído dimetilacetal (3.2 mL, 21.03 mmol) y pTsOH (cantidad catalítica). La mezcla se agitó durante 1 día a 40°C, neutralizándose con disolución saturada de NaHCO₃ y evaporando el disolvente a vacío. El crudo se diluyó con CH₂Cl₂ (300 mL) y se lavó con H₂O (250 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 50 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El producto se purificó mediante columna cromatográfica (8:1 tolueno-acetona) para dar **42** (3.04 g, 74%).

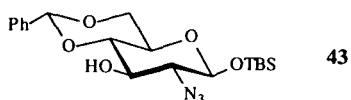
CCF (4:1 tolueno-acetona) R_f 0.41.

¹H-RMN (300MHz, MeOD) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros α:β 0.4:0.6) δ 7.54-7.33 (m, 5H, Ph), 5.60 (s, 1H, PhCHO), 5.23 (d, 0.4H, J_{1,2} = 3.5 Hz, H-1 α), 4.66 (d, 0.6H, J_{1,2} = 8.0 Hz, H-1 β), 4.27 (dd, 0.6H, J_{5,6a} = 4.9 Hz, J_{6a,6b} = 10.4 Hz, H-6a β), 4.19 (dd, 0.4H, J_{5,6a} = 4.9 Hz, J_{6a,6b} = 10.0 Hz, H-6a α), 4.10 (dd, 0.4H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6 Hz, H-3 α), 4.01 (ddd, 0.4H, J_{4,5} = J_{5,6b} = 9.8 Hz, H-5 α), 3.82-3.73 (m, 1H, H-6b α y β), 3.62 (dd, 0.6H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1 Hz, H-3 β), 3.53 (dd, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.0 Hz, H-4 α y β), 3.45 (ddd, 0.6H, J_{4,5} = J_{5,6b} = 9.1 Hz, H-5 β), 3.27-3.19 (m, 1H, H-2 α y β).

Análisis:

Calculado para C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₅ :	C, 53.24; H, 5.16; N, 14.33.
Encontrado:	C, 53.02; H, 5.05; N, 13.85.

2-Azido-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-β-D-glucopiranosido de *tert*-butildimetilsililo (43).



A una suspensión de **42** (261 mg, 0.89 mmol) e imidazol (151 mg, 2.23 mmol) en CH₂Cl₂ (1.3 mL) se le añadió, bajo agitación y a -10°C, cloruro de *tert*-butildimetilsililo (148 mg, 0.98 mmol). Después de 2h. se comprobó la desaparición del producto de partida por CCF, se añadió H₂O y la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL), se lavó con H₂O (50 mL) y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 25 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo resultante se purificó mediante columna cromatográfica (9:1 hexano-AcOEt) para dar **43** (254 mg, 70%).

$[\alpha]_D^{20}$ -32.1° (c 1, CHCl₃).

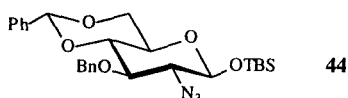
CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.49.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 7.47-7.24 (m, 5H, Ph), 5.51 (s, 1H, PhCHO), 4.63 (d, 1H, J_{1,2} = 7.6 Hz, H-1), 4.27 (dd, 1H, J_{5,6a} = 5.0 Hz, J_{6a,6b} = 10.5 Hz, H-6a), 3.76 (dd, 1H, J_{5,6b} = 10.3 Hz, H-6b), 3.61 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4 Hz, H-3), 3.54 (dd, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.2 Hz, H-4), 3.39 (ddd, 1H, H-5), 3.31 (dd, 1H, J_{2,3} = 9.2 Hz, H-2), 2.69 (s, 1H, OH), 0.94 (s, 9H, ^tBu), 0.18-0.16 (2s, 6H, CH₃).

Análisis:

Calculado para C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₅ Si:	C, 56.00; H, 7.17; N, 10.31.
Encontrado:	C, 55.80; H, 7.60; N, 10.14.

2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi-β-D-glucopiranosido de *tert*-butildimetilsililo (44).



A una disolución de **43** (11.93 g, 29.28 mmol) en CH_2Cl_2 seco (120 mL) a 0°C , se añadió lentamente NaH (1.76 g de una suspensión al 60%, 43.91 mmol). Después de agitar la disolución durante 1h., se adicionó bromuro de bencilo (6.27 mL, 52.70 mmol) y cristales de yoduro de tetrabutilamonio (200 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24h., comprobándose por CCF que el producto de partida se había consumido totalmente. Se añadió MeOH (10 mL), se diluyó con CH_2Cl_2 (400 mL) y se lavó con disolución saturada de cloruro amónico (100 mL) y H_2O (200 mL). Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2 x 100 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a sequedad. El producto se purificó mediante columna de gel de sílice (25:1 hexano-AcOEt), para dar **44** (12.35 g, 85%).

$[\alpha]_D^{20} -79.5^\circ$ (c 1, CHCl_3).

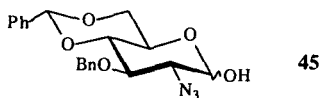
CCF (9:1 hexano-AcOEt) R_f 0.67.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.47-7.24 (m, 10H, Ph), 5.55 (s, 1H, PhCHO), 4.88-4.77 (2d, 2H, $J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.57 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, H-1), 4.27 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.5$ Hz, H-6a), 3.77 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 10.3$ Hz, H-6b), 3.69 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.3$ Hz, H-4), 3.50 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3), 3.39-3.33 (m, 2H, H-2 y H-5), 0.94 (s, 9H, 'Bu), 0.16-0.15 (2s, 6H, CH_3).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$:	C, 62.75; H, 7.09; N, 8.44.
Encontrado:	C, 62.58; H, 6.90; N, 8.42.

2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α,β -D-glucopiranos
(45).



A una disolución de **44** (5.97 g, 11.99 mmol) en THF (60 mL) a -40°C se añadió ácido acético (755 μL , 13.18 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio (13.18 mL de una disolución 1 M en THF). Después de 2h. 30 min., se añadió H_2O (5mL), se diluyó con éter etílico (250 mL), se lavó con H_2O (150 mL) y la fase acuosa se extrajo con éter etílico (2 x 50 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a sequedad. El producto se purificó mediante columna de gel de sílice (10:1 tolueno-acetona), para dar **45** (4.60 g, 100%).

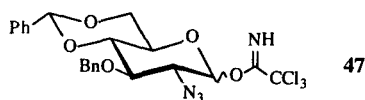
CCF (10:1 tolueno-acetona) R_f 0.37.

^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 1:1) δ 7.49-7.24 (m, 10H, Ph), 5.58 (s, 0.5H, PhCHO α), 5.57 (s, 0.5H, PhCHO β), 5.25 (s ancho, 0.5H, H-1 α), 4.98-4.78 (2d, 1H, $J = 11.0$ Hz, CH_2Ph α), 4.94-4.77 (2d, 1H, $J = 11.2$ Hz, CH_2Ph β), 4.60 (dd, 0.5H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, $J_{1,\text{OH}} = 5.1$ Hz, H-1 β), 4.29 (2dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.5$ Hz, H-6a α y β), 4.15-4.06 (m, 1H), 3.81-3.56 (m, 3H), 3.49-3.36 (m, 1.5H), 3.08 (d ancho, 0.5H, $J_{1,\text{OH}} = 2.3$ Hz, OH α).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$:	C, 62.65; H, 5.52; N, 10.96.
Encontrado:	C, 62.36; H, 5.67; N, 10.66.

Tricloroacetimidato de 2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α,β -D-glucopiranosilo (47).



A una disolución de **45** (130 mg, 0.34 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL) a temperatura ambiente, se añadió tricloroacetnitrilo (0.5 mL, 5.08 mmol) y una cantidad catalítica de DBU. Después de agitar durante 3h. 30 min., la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se pasó a través de un filtro corto de

gel de sílice (4:1 hexano-AcOEt + 1% Et₃N), obteniéndose **47** (170 mg, 95%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.50 y 0.39 (β y α).

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 2:1):

Compuesto **47 α** :

δ 8.72 (s, 1H, NH), 7.49-7.27 (m, 10H, Ph), 6.36 (d, 1H, J_{1,2} = 3.6 Hz, H-1), 5.60 (s, 1H, PhCHO), 5.03-4.81 (2d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂Ph), 4.32 (dd, 1H, J_{5,6a} = 4.9 Hz, J_{6a,6b} = 10.5 Hz, H-6a), 4.16 (dd, 1H), 4.04 (ddd, 1H, J_{4,5} = J_{5,6b} = 10.0 Hz, H-5), 3.84-3.68 (m, 3H).

Compuesto **47 β** :

δ 8.74 (s, 1H, NH), 7.49-7.27 (m, 10H, Ph), 5.69 (d, 1H, J_{1,2} = 8.2 Hz, H-1), 5.57 (s, 1H, PhCHO), 4.95-4.79 (2d, 1H, J = 11.3 Hz, CH₂Ph), 4.39 (dd, 1H, J_{5,6a} = 5.1 Hz, J_{6a,6b} = 10.4 Hz, H-6a), 3.84-3.68 (m, 4H, H-2, H-3, H-4 y H-6b), 3.56 (ddd, 1H, J_{4,5} = J_{5,6b} = 9.8 Hz, H-5).

Análisis:

Calculado para C ₂₂ H ₂₁ N ₄ O ₅ Cl ₃ :	C, 50.08; H, 4.01; N, 10.62.
Encontrado:	C, 50.09; H, 4.39; N, 10.39.

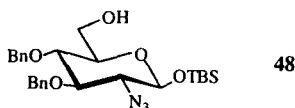
5.3 Síntesis del donador de 2-azido-2-desoxi-D-glucopiranososa **65**.

El D-glucal que se utilizó para la formación del compuesto **60** se sintetizó a partir del tri-*O*-acetil-D-glucal comercial por el siguiente procedimiento convencional:

Una disolución de tri-*O*-acetil-D-glucal (50 g, 0.184 mol) en una mezcla de MeOH:H₂O:Et₃N 10:10:1 (250:250:25 mL) se agitó durante 10 h. a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la reacción se concentró a

sequedad, coevaporando varias veces con CH_2Cl_2 para eliminar el exceso de Et_3N . Se obtuvo D-glucal con rendimiento cuantitativo (26.80 g, 100%, CCF en 4:1 CH_2Cl_2 -MeOH).

2-Azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido de tert-butildimetilsililo (48).

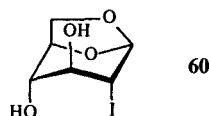


A una disolución de **44** (20 mg, 0.04 mmol) y complejo $\text{BH}_3 \cdot \text{NHMe}_2$ (12 mg, 0.20 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL) a 0°C , se le añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (25 μL , 0.20 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h., se adicionó disolución saturada de NaHCO_3 y la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y se lavó con H_2O (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró para dar un residuo que se purificó por columna cromatográfica (20:1 tolueno-acetona), obteniéndose **48** (17 mg, 85%).

CCF (20:1 tolueno-acetona) R_f 0.44.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.24 (m, 10H, Ph), 4.89-4.78 (2d, 2H, $J = 10.8$ Hz, CH_2Ph), 4.85-4.62 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.54 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1), 3.80 (m, 1H, H-6a), 3.68 (m, 1H, H-6b), 3.54 (dd, 1H, H-4 ó H-3), 3.40 (dd, 1H, H-4 ó H-3), 3.33-3.28 (m, 2H, H-2 y H-5), 1.77 (dd, 1H, $J_{6a,\text{OH}} = J_{6b,\text{OH}} = 6.6$ Hz, OH), 0.93 (s, 9H, ^tBu), 0.16-0.15 (2s, 6H, CH_3).

1,6-Anhidro-2-desoxi-2-yodo- β -D-glucopiranososa (60).



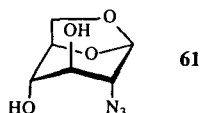
A una disolución de D-glucal (40.26 g, 0.275 mol) en acetonitrilo seco (250 mL) se añadió tamiz molecular de 3\AA (10 g) y luego óxido de bis-tributylestaño (200 mL, 0.393 mol). La mezcla se agitó a reflujo durante 6 horas.

A continuación la reacción se enfrió a 0°C y se añadió yodo (84 g, 0.331 mol). Después de agitar durante 48 h. a 4°C, el crudo se filtró a través de Celita, se concentró a presión reducida y se purificó mediante varias columnas cromatográficas (1:1 hexano-AcOEt), para dar **60** (31.590 g, 42%) y D-glucal de partida (20.1g, 50%).

CCF (8:1 CH₂Cl₂-MeOH) R_f 0.50.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 5.60 (s, 1H, H-1), 5.50 (d, 1H, J = 4.2 Hz, OH), 5.18 (d, 1H, J = 4.1 Hz, OH), 4.41 (d ancho, 1H, J_{5,6exo} = 5.7 Hz, H-5), 4.00 (d, 1H, J_{6exo,6endo} = 7.0 Hz, H-6endo), 3.92-3.81 (2s anchos, 2H, H-3 y H-4), 3.51 (dd, 1H, H-6 exo), 3.44 (s ancho, 1H, H-2).

1,6-Anhidro-2-azido-2-desoxi-β-D-glucopiranososa (61).



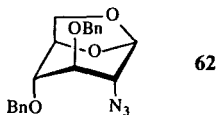
Una disolución de **60** (31.59 g, 0.116 mol) y NaN₃ (22.66 g, 0.349 mol) en una mezcla DMF:H₂O (210 mL : 25 mL) se agitó a reflujo durante 3 h. Después de comprobar la desaparición del producto de partida por CCF, el crudo de reacción se concentró a sequedad y se diluyó con EtOH:H₂O (92 mL:11mL). La suspensión resultante se trató con carbón activo (0.7 g) a reflujo durante 30 min., se filtró a través de Celita y se concentró. El residuo se pasó por un filtro corto de gel de sílice (5:2 tolueno-MeOH). Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron y al sólido resultante se añadió H₂O (200 mL). La fase acuosa se extrajo repetidamente con AcOEt (6 x 200 mL) y las fases orgánicas se concentraron para dar **61** (15.93 g, 73%) como cristales blancos.

CCF (5:2 tolueno-MeOH) R_f 0.45.

¹H-RMN (300MHz, CDCl₃) δ 5.51 (s, 1H, H-1), 4.58 (d ancho, 1H, J_{5,6exo} = 5.6 Hz, H-5), 4.21 (d ancho, 1H, J_{6exo,6endo} = 7.7 Hz, H-6 endo), 3.89 (s ancho, 1H,

H-3), 3.80 (dd, 1H, $J_{6\text{exo},6\text{endo}} = 7.6$ Hz, $J_{5,6\text{exo}} = 5.4$ Hz, H-6 exo), 3.66 (s ancho, 1H, H-4), 3.51 (s ancho, 1H, H-2).

1,6-Anhidro-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (62).

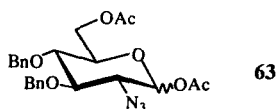


A una disolución de **61** (12.93 g, 69.08 mmol) en DMF seca (100mL) se añadió lentamente NaH (8.30 g de una suspensión al 60%, 207.2 mmol). Después de agitar la disolución durante 1h., se adicionó bromuro de bencilo (24.6 mL, 207.2 mmol) y cristales de yoduro de tetrabutilamonio (200 mg). La mezcla de reacción se agitó a 40°C durante 24h., comprobándose por CCF que el producto de partida se había consumido totalmente. Se añadió MeOH (10 mL), se concentró a sequedad y el residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (500 mL) y se lavó con disolución saturada de cloruro amónico (250 mL) y H₂O (250 mL). Las fases acuosas se extrajeron con CH₂Cl₂ (2 x 100 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a sequedad. El producto se purificó mediante columna de gel de sílice (5:1 hexano-AcOEt), para dar **62** (20.16 g, 79%).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.29.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.29 (m, 10H, Ph), 5.49 (s, 1H, H-1), 4.63-4.49 (m, 5H, CH₂Ph y H-5), 4.01 (d ancho, 1H, $J_{6\text{exo},6\text{endo}} = 7.2$ Hz, H-6 endo), 3.72 (dd, 1H, H-6 exo), 3.66 (s ancho, 1H, H-3), 3.38 (s ancho, 1H, H-4), 3.28 (s ancho, 1H, H-2).

1,6-di-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (63).

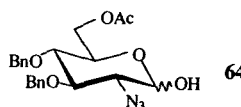


El compuesto **62** (20.16 g, 54.57 mmol) se disolvió en anhídrido acético (180 mL, 1.86 mol) y ácido trifluoroacético (20 mL, 0.25 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con CH_2Cl_2 (400 mL), se lavó con disolución saturada de NaHCO_3 (300 mL) y H_2O (300 mL) y las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2 x 150 mL). El conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 , se concentraron y el sólido resultante se purificó mediante columna cromatográfica (4:1 hexano-AcOEt), para dar **63** (23.83 g, 93%) como cristales blancos.

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.23.

^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) (datos obtenidos para el isómero α puro) δ 7.41-7.26 (m, 10H, Ph), 6.23 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.93-4.86 (m, 3H, CH_2Ph), 4.59 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, CH_2Ph), 4.26 (d, 2H, $J_{5,6} = 3.0$ Hz, H-6a y H-6b), 4.01-3.90 (m, 2H, H-3 y H-5), 3.64 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 3.60 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2), 2.16-2.04 (2s, 6H, OCOCH_3).

6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranososa (64).



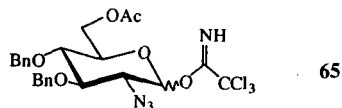
A una disolución de **63** (0.747 g, 1.58 mmol) en Et_2O seco (10 mL) se añadió bencilamina (1.7 mL, 15.84 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. A continuación, el crudo de reacción se concentró a sequedad y se purificó mediante columna cromatográfica (2:1 hexano-AcOEt), para dar **64** (0.631 g, 93%).

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.41.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 1:0.8) δ 7.38-7.24 (m, 18H, Ph), 5.27 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1 α), 4.92-4.80 (m, 5.4H, CH_2Ph α y β), 4.60-4.56 (m, 2.6H, H-1 β y CH_2Ph α y β), 4.35 (dd, 0.8H,

$J_{5,6a} = 1.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, H-6a β), 4.32 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, H-6a α), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 4.3$ Hz, H-6b α), 4.15 (dd, 0.8H, $J_{5,6b} = 4.4$ Hz, H-6b β), 4.10 (m, 1H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-5 α), 4.03 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.1$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3 α), 3.56-3.35 (m, 5.2H, H-2 α y β , H-4 α y β , H-3 β y H-5 β), 2.02 (2s, 5.4H, OCOCH₃ α y β).

Tricloroacetimidato de 6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α,β -D-glucopiranosilo (65).



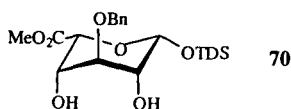
A una disolución de **64** (631 mg, 1.47 mmol) en CH₂Cl₂ seco (7 mL) a temperatura ambiente, se añadió tricloroacetronitrilo (2.2 mL, 22.04 mmol) y una cantidad catalítica de DBU. Después de agitar durante 3h. bajo atmósfera de argon, la reacción se concentró a presión reducida y el residuo se pasó a través de un filtro corto de gel de sílice (4:1 hexano-AcOEt + 1% Et₃N), obteniéndose **65** (841 mg, 100%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (5:1 hexano-AcOEt) R_f 0.22.

¹H-RMN (300MHz, CDCl₃) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 0.4:1) δ 8.74 (s, 1.4H, NH), 7.42-7.26 (m, 14H, Ph), 6.41 (d, 0.4H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1 α), 5.63 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H-1 β), 4.96-4.84 (m, 4.2H, CH₂Ph α y β), 4.61 (m, 1.4H, CH₂Ph α y β), 4.35-4.21 (m, 2.2H, H-6a α y β , H-6b α y H-5 β), 4.07-4.04 (m, 0.8H, H-3 α y H-5 α), 3.72-3.61 (m, 3.6H, H-2 α y β , H-4 α y β , H-3 β y H-6b β), 2.02 (2s, 4.2H, OCOCH₃ α y β).

5.4 Síntesis del aceptor de ácido L-idurónico **70**.

3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranuronato de metilo (**70**).



A una disolución de **28** (2.8 g, 9.39 mmol) e imidazol (1.4 g, 20.6 mmol) en CH₂Cl₂ seco (10 mL) a -30°C, se añadió cloruro de dimetiltexilsililo (2.8 mL, 12.2 mmol). Después de agitar durante 72 h., se añadió MeOH (2 mL) y la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL), se lavó con H₂O (2 x 50 mL), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (tolueno-AcOEt 6:1), para dar **70** (3.3 g, 80%).

CCF (8:1 tolueno-acetona) R_f 0.26.

$[\alpha]_D^{20} +28.2^\circ$ (c 1.0, CHCl₃).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.14 (m, 5H, Ph), 5.02 (d, J_{1,2} = 1.1 Hz, 1H, H-1), 4.66-4.58 (2 d, J = 11.8 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.47 (d, J_{5,4} = 1.5 Hz, 1H, H-5), 3.99 (m, 1H, H-4), 3.95 (dd, J_{3,2} = J_{3,4} = 3.1 Hz, 1H, H-3), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.77 (d, J_{4,OH} = 11.5 Hz, 1H, OH-4), 3.67 (m, 1H, H-2), 2.79 (s, 1H, OH-2), 1.63 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.88-0.86 (4s, 12 H, CH(CH₃)₂ y C(CH₃)₂), 0.26-0.18 (2 s, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 169.3 (C=O), 137.4, 128.6, 128.2 y 127.7 (Ph), 93.5 (C-1), 75.4 (C-3), 74.3 (C-5), 72.6 (CH₂Ph), 69.4 (C-2), 67.4 (C-4), 52.1 (COOCH₃), 34.1, 25.0, 20.2, 20.0, 18.6, 18.5, -1.88 y -3.22 (-OTDS).

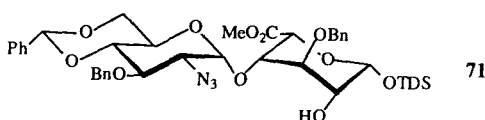
Análisis:

Calculado para C ₂₂ H ₃₆ O ₇ Si:	C, 59.97;	H, 8.24.
Encontrado:	C, 60.05;	H, 8.30.

5.5 Ruta de síntesis del hexasacárido **91**.

5.5.1 Síntesis de derivados disacarídicos GlcN-IdoA.

4-O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-α-D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil-β-L-idopiranuronato de metilo (71).



A una disolución de **70** (114 mg, 258.7 μmol) a 0°C en CH_2Cl_2 seco (4mL) se le añadió TMSOTf (50 μL de una disolución 0.26 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón. Posteriormente se añadió, gota a gota durante 20 min. y con agitación, una disolución de **47** (82 mg, 155.2 μmol) en CH_2Cl_2 seco (1.5 mL). Después de 30 min. la reacción se neutralizó con NaHCO_3 (sólido) y se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) a temperatura ambiente. La suspensión se lavó con H_2O (50 mL), la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El residuo se sometió a purificación en columna cromatográfica (30:1 tolueno-AcOEt), obteniéndose **71** (78 mg, 62%) y recuperándose **70** sin reaccionar (40 mg, 35%). Para purificar **70** fue necesario realizar columnas cromatográficas adicionales (3:1 hexano-AcOEt y 5:1 tolueno-AcOEt).

$[\alpha]_D^{20} -4.3^\circ$ (c 1, CHCl_3).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.30; (15:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.32.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 7.43-7.24 (m, 15H, Ph), 5.51 (s, 1H, PhCHO), 5.02 (s ancho, 1H, H-1), 4.90 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1'), 4.87-4.73 (2d, 2H, $J = 10.7$ Hz, CH_2Ph), 4.64-4.61 (2d, 2H, $J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.55 (s ancho, 1H, H-5), 4.25 (dd, 1H, $J_{5,6'a} = 2.5$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 8.9$ Hz, H-6'a), 4.06 (s ancho, 1H, H-4), 3.97-3.92 (m, 2H, H-3 y H-3'), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 3.69-3.62 (m, 4H, H-2, H-4', H-5' y H-6'b), 3.53 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, H-2'), 3.03 (d, 1H, $J_{2,\text{OH}} = 9.9$ Hz, OH), 1.66 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.90-0.88 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.24-0.19 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 168.97 (C=O), 137.74-126.05 (Ph), 101.56 (PhCHO), 95.87 (C-1'), 94.89 (C-1), 82.16, 77.19, 75.25 (CH_2Ph), 73.72, 72.70 (CH_2Ph), 71.52 (C-4), 68.46, 63.25, 63.06, 52.48 (COOCH_3), 34.04 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.14 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.39-18.46 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), -1.88 y -3.22 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 828 (MNa^+).

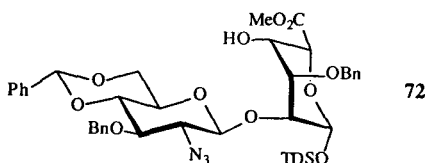
Análisis:

Calculado para $C_{42}H_{55}N_3O_{11}Si$: C, 62.59; H, 6.88; N, 5.21.

Encontrado: C, 62.61; H, 6.74; N, 5.36.

En alguno de los ensayos realizados se pudieron aislar y caracterizar los siguientes productos secundarios:

2-O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- β -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopirranuronato de metilo (72).



$[\alpha]^{20}_D -19.5^\circ$ (c 1, $CHCl_3$).

CCF (15:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.13.

1H -RMN (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.49-7.12 (m, 15H, Ph), 5.56 (s, 1H, PhCHO), 5.13 (s ancho, 1H, H-1), 4.91-4.78 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.76-4.60 (2d, 2H, $J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.46 (d, 1H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 4.32 (d ancho, 1H, H-1'), 4.26 (dd, 1H, $J_{5,6'a} = 5.1$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.6$ Hz, H-6'a), 4.05 (d ancho, 1H, $J_{4,OH} = 12.2$ Hz, H-4), 3.91 (m, 1H, H-3), 3.79 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.72-3.61 (m, 3H, H-2, H-4' y H-6'b), 3.59 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3'), 3.43 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-2'), 3.25 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, $J_{4,5} = J_{5,6b} = 9.5$ Hz, H-5'), 1.62 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0.88-0.86 (4s, 12H, $C(CH_3)_2$ y $CH(CH_3)_2$), 0.22-0.17 (2s, 6H, $Si(CH_3)_2$).

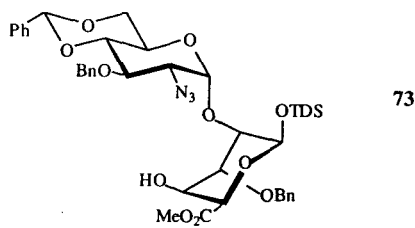
MASAS FAB m/z 828 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $C_{42}H_{55}N_3O_{11}Si$: C, 62.59; H, 6.88; N, 5.21.

Encontrado: C, 62.55; H, 7.33; N, 4.75.

2-O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopirauronato de metilo (73).

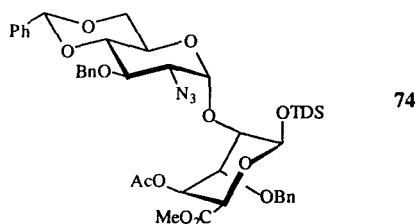


CCF (15:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.39.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.24 (m, 15H, Ph), 5.53 (s, 1H, PhCHO), 5.50 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1'), 5.05 (s ancho, 1H, H-1), 4.88-4.76 (2d, 2H, $J = 10.8$ Hz, CH_2Ph), 4.73-4.56 (2d, 2H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph), 4.50 (s ancho, 1H, H-5), 4.06 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.2$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 9.8$ Hz, H-6'a), 3.99 (d ancho, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 12.6$ Hz, H-4), 3.93 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3'), 3.82 (m, 1H, H-3), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 3.76-3.63 (m, 4H, H-2, H-4', H-5' y H-6'b), 3.48 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 12.6$ Hz, OH), 3.37 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2'), 1.64 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.90-0.83 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.20-0.17 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 828 (MNa^+).

4-O-acetil-2-O-(2-azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopirauronato de metilo (74). (Derivado acetilado de 73, sintetizado para su caracterización).



$[\alpha]_D^{20} +75.0^\circ$ (c 1, CHCl_3).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.48.

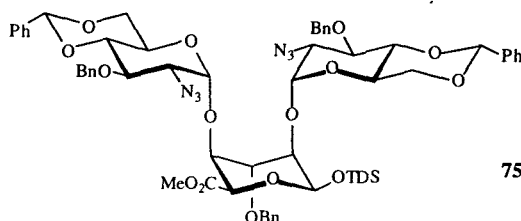
$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.46-7.24 (m, 15H, Ph), 5.50 (s, 1H, PhCHO), 5.21 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.17 (s ancho, 1H, H-4), 5.02 (s ancho, 1H, H-1), 4.88-4.74 (2d, 2H, $J = 11.2$ Hz, CH_2Ph), 4.78-4.62 (2d, 2H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph), 4.55 (d, 1H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-5), 3.90 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3'), 3.83 (m, 1H, H-6'a), 3.78 (m, 1H, H-3), 3.73 (s, 3H, COOCH_3), 3.66-3.52 (m, 4H, H-2, H-4', H-5' y H-6'b), 3.14 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.1$ Hz, H-2'), 1.94 (s, 3H, OCOCH_3), 1.65 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.88-0.86 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.30-0.18 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 870 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Si}$:	C, 62.32; H, 6.78; N, 4.96.
Encontrado:	C, 62.39; H, 7.15; N, 4.70.

2-O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-4-O-(2-azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranuronato de metilo (75).



CCF (15:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.39.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.41-7.04 (m, 25H, Ph), 5.49-5.47 (2s, 2H, PhCHO), 5.42 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1''), 5.01 (s ancho, 1H, H-1), 4.88 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1'), 4.81-4.60 (m, 6H, CH_2Ph), 4.43 (s ancho, 1H, H-5), 4.33 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.0$ Hz, H-6'a), 4.26-3.97 (m, 6H, H-3, H-

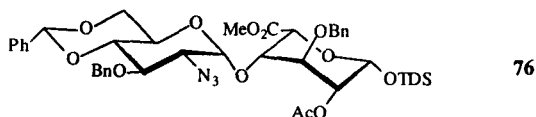
4, H-3', H-3'', H-6''a, H-5' ó H-5''), 3.88 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 5.1$ Hz, $J_{4,5} = J_{5,6b} = 10.1$ Hz, H-5' ó H-5''), 3.79 (s ancho, 1H, H-2), 3.75 (s, 3H, COOCH₃), 3.68-3.58 (m, 4H, H-4', H-4'', H-6'b y H-6''b), 3.36 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2'), 3.28 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, H-2''), 1.67 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.89-0.87 (4s, 12H, C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), 0.32-0.20 (2s, 6H, Si(CH₃)₂).

MASAS FAB m/z 1194 (MNa⁺).

Análisis:

Calculado para C ₆₂ H ₇₄ N ₆ O ₁₅ Si:	C, 63.57; H, 6.37; N, 7.17.
Encontrado:	C, 63.21; H, 6.07; N, 7.00.

2-O-Acetil-4-O-(2-azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiruranonato de metilo (76).



El compuesto **71** (204 mg, 0.25 mmol) se disolvió en Py (2 mL) a 0°C y a la disolución se añadió anhídrido acético (1 mL). La reacción se agitó durante 1 día a 0°C y 3 días más a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se comprobó la desaparición del producto de partida por CCF y la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL), se lavó con HCl 1N (25 mL) y con H₂O (25 mL). Las fases acuosas se extrajeron con CH₂Cl₂ (2 x 25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo se coevaporó con tolueno (20 mL) 3 veces y se purificó por columna cromatográfica (6:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **76** (200 mg, 93%).

$[\alpha]_D^{20} +29.5^\circ$ (c 1, CHCl₃).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.38.

IR (celda NaCl): 2955.5, 2866.4, 2109.0, 1737.8, 1455.2, 1438.8, 1374.2, 1311.5, 1237.8, 1142.8, 1092.2, 1037.5, 998.1, 935.8, 874.0, 837.2, 817.7, 781.1, 738.2, 698.6 cm^{-1} .

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.24 (m, 15H, Ph), 5.51 (s, 1H, PhCHO), 5.07 (s ancho, 1H, H-1), 4.97 (s ancho, 1H, H-2), 4.76 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 4.88-4.70 (2d, 2H, $J = 11.1$ Hz, CH_2Ph), 4.74-4.66 (2d, 2H, $J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.47 (s ancho, 1H, H-5), 4.30 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.9$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.1$ Hz, H-6'a), 4.04-3.95 (m, 4H, H-3, H-4, H-3' y H-5'), 3.75 (s, 3H, COOCH_3), 3.64-3.59 (m, 2H, H-4' y H-6'b), 3.28 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2'), 2.03 (s, 3H, OCOCH_3), 1.61 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.86-0.83 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.24-0.14 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

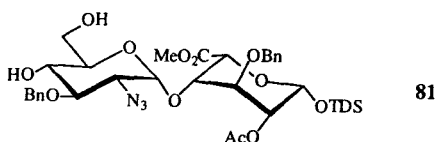
^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 170.68 y 168.81 (C=O), 137.81-126.15 (Ph), 101.62 (PhCHO), 98.39 (C-1'), 93.66 (C-1), 82.63 (C-4'), 75.99, 74.82 (CH_2Ph), 74.34, 73.64, 73.41 (C-5), 72.93 (CH_2Ph), 68.52 (C-6'), 67.66(C-2), 63.20, 63.10, 52.13 (COOCH_3), 34.08 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.82 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.97 (OCOCH_3), 20.22-18.37 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), -2.02 y -3.56 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 870 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Si}$:	C, 62.32; H, 6.78; N, 4.96.
Encontrado:	C, 62.37; H, 6.98; N, 4.89.

2-O-Acetil-4-O-(2-azido-3-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopirranuronato de metilo (81).



A una disolución de **76** (100 mg, 117.9 μmol) en CH_2Cl_2 seco (1.5 mL) se le añadió EtSH (87 μL , 1.18 mmol) y una cantidad catalítica de pTsoH a temperatura ambiente. Después de agitar bajo atmósfera de argon durante 3 h., la reacción se neutralizó con NaHCO_3 (sólido), se diluyó con CH_2Cl_2 (25 mL) y se lavó con H_2O (25 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 10 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. La purificación se realizó mediante columna cromatográfica (3:2 hexano-AcOEt), obteniéndose **81** (80 mg, 89%).

$[\alpha]_D^{20} +52.0^\circ$ (*c* 1, CHCl_3).

CCF (3:2 hexano-AcOEt) R_f 0.18.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.27 (m, 10H, Ph), 5.05 (s ancho, 1H, H-1), 4.96 (s ancho, 1H, H-2), 4.78 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1'), 4.85-4.75 (2d, 2H, $J = 11.2$ Hz, CH_2Ph), 4.73-4.66 (2d, 2H, $J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.47 (s ancho, 1H, H-5), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.98 (m, 1H, H-3), 3.82-3.57 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6'a y H-6'b), 3.75 (s, 3H, COOCH_3), 3.17 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2'), 2.09 (s, 3H, OCOCH_3), 1.60 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.87-0.82 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.20-0.13 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

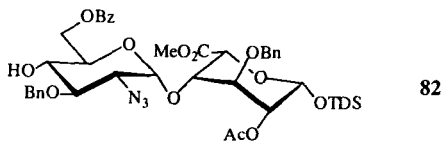
^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 170.67 y 169.04 (C=O), 137.96-128.00 (Ph), 97.82 (C-1'), 93.59 (C-1), 79.58, 74.87 (CH_2Ph), 73.92 (C-3), 73.39(C-5), 73.16 (C-4), 72.94 (CH_2Ph), 72.19, 71.15, 67.65 (C-2), 63.01(C-2'), 62.18, 52.28 (COOCH_3), 34.06 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.85 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.95 (OCOCH_3), 20.21-18.36 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), -2.06 y -3.56 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 782 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Si}$:	C, 58.48; H, 7.03; N, 5.53.
Encontrado:	C, 58.80; H, 7.32; N, 5.17.

2-O-Acetil-4-O-(2-azido-3-O-bencil-6-O-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiruranonato de metilo (82).



A una disolución de **81** (47 mg, 61.8 μ mol) a -40°C en CH_3CN seco (1 mL) se añadió BzCN (72 μL de una disolución 0.9 M en CH_3CN seco) y una cantidad catalítica de Et_3N (gotas). Después de 4h., se añadió más BzCN (18 μL de la disolución anterior en CH_3CN) hasta que desapareció el producto de partida. Después de 7 h., se añadió MeOH y la mezcla se agitó durante 15 minutos hasta que alcanzó la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en MeOH y se concentró a sequedad. La purificación se llevó a cabo por cromatografía en columna (4:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **82** (48 mg, 91%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +72.7^{\circ}$ (c 1, CHCl_3).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.17.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 8.02-7.24 (m, 15H, Ph), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H-1), 4.99 (m, 1H, H-2), 4.88 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 4.87-4.81 (2d, 2H, $J = 10.9$ Hz, CH_2Ph), 4.71-4.65 (2d, 2H, $J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.82 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.5$ Hz, $J_{5',6'a} = 2.4$ Hz, H-6'a), 4.48 (s ancho, 1H, H-5), 4.39 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 2.0$ Hz, H-6'b), 4.10-4.08 (m, 2H, H-4 y H-5'), 3.98 (m, 1H, H-3), 3.79 (m, 1H, H-3'), 3.78 (s, 3H, COOCH_3), 3.51 (ddd, 1H, H-4'), 3.16 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2'), 3.08 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 3.3$ Hz, OH), 2.11 (s, 3H, OCOCH_3), 1.60 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.88-0.83 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.22-0.13 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 170.58, 168.98 y 167.56 (C=O), 137.92-127.93 (Ph), 97.66 (C-1'), 93.69 (C-1), 78.83 (C-3'), 75.20 (CH_2Ph), 74.29 (C-3), 73.28,

72.94 y 72.87 (C-4, C-5, CH₂Ph), 71.16 y 70.53 (C-4', C-5'), 67.62 (C-2), 63.03 y 62.91 (C-2', C-6'), 52.17 (COOCH₃), 34.10 (CH(CH₃)₂), 24.84 (C(CH₃)₂), 20.98 (OCOCH₃), 20.22-18.38 (C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), -2.01 y -3.49 (Si(CH₃)₂).

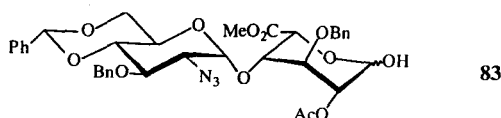
MASAS FAB m/z 886 (MNa⁺).

Análisis:

Calculado para C₄₄H₅₇N₃O₁₃Si·H₂O: C, 59.91; H, 6.74; N, 4.76.

Encontrado: C, 60.15; H, 6.76; N, 4.65.

2-O-Acetil-4-O-(2-Azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil- α,β -L-idopiruranonato de metilo (83).



A una disolución de **76** (1.165 g, 1.37 mmol) a -15°C en THF seco (30 mL) se añadió un exceso del complejo (HF)_n·Py (3 mL). La mezcla de reacción se llevó hasta 0°C y se agitó bajo atmósfera de argón. Después de 24h., se diluyó con CH₂Cl₂ (200 mL) y se lavó con H₂O (2 x 50 mL) y disolución saturada de NaHCO₃ (100 mL) hasta pH neutro. Las fases acuosas se extrajeron con CH₂Cl₂ (2 x 50 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (2:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **83** (893 mg, 94%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.17.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ aproximadamente 1:1) δ 7.45-7.24 (m, 15H, Ph), 5.52-5.51 (2s, 1H, PhCHO α y β), 5.31 (d ancho, 0.5H, J_{1 α ,OH} = 8.4 Hz, H-1 α), 5.10 (d ancho, 0.4H, J_{1 β ,OH} = 10.7 Hz, H-1 β), 4.90-4.66 (m, 6H, H-2, H-5 α , H-1' α , CH₂Ph), 4.63 (d, 0.4H, J_{1,2} = 3.4 Hz, H-1' β), 4.58 (d, 0.4H, J_{4,5} = 1.9 Hz, H-5 β), 4.27 (dd, 1H, J_{5',6'a} = 4.7

Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.1$ Hz, H-6'a), 4.12-3.75 (m, 4H, H-3, H-4, H-3', H-5'), 3.67-3.61 (m, 2H, H-4', H-6'b), 3.79-3.77 (2s, 3H, COOCH_3 α y β), 3.38 (dd, 0.4H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, H-2' β), 3.34 (dd, 0.5H, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, H-2' α), 2.09-2.05 (2s, 3H, OCOCH_3 α y β).

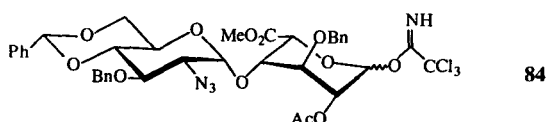
MASAS FAB m/z 728 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{12} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 58.29; H, 5.84; N, 5.67.

Encontrado: C, 58.29; H, 6.03; N, 5.67.

Tricloroacetimidato de 2-O-Acetil-4-O-(2-azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil- α,β -L-idopiranosiluronato de metilo (84).



A una disolución de **83** (893 mg, 1.29 mmol) en CH_2Cl_2 seco (10 mL) se añadió Cl_3CCN (3.8 mL, 38.62 mmol) y K_2CO_3 activado a la llama (187 mg, 1.35 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h., la suspensión se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se pasó a través de un filtro corto de gel de sílice (3:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **84** (935 mg, 87%) como una mezcla de anómeros α/β , que se caracterizaron por separado.

Compuesto **84 β** :

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.61.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 8.67 (s, 1H, NH), 7.44-7.22 (m, 15H, Ph), 6.40 (s ancho, 1H, H-1), 5.53 (s, 1H, PhCHO), 5.13 (s ancho, 1H, H-2), 4.98 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.7$ Hz, H-5), 4.91-4.71 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.82-4.65 (2d, 2H, $J = 11.6$ Hz, CH_2Ph), 4.80 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 4.29 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.9$ Hz,

$J_{6'a,6'b} = 10.1$ Hz, H-6'a), 4.15 (m, 1H, H-4), 3.97-3.92 (m, 2H, H-3 y H-3'), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.78 (m, 1H, H-5'), 3.67-3.63 (m, 2H, H-4' y H-6'b), 3.36 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, H-2'), 2.09 (s, 3H, OCOCH₃).

MASAS FAB m/z 871 (MNa⁺).

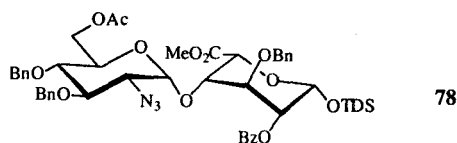
Compuesto **84α**:

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.50.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 8.66 (s, 1H, NH), 7.42-7.24 (m, 15H, Ph), 6.20 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H-1), 5.50 (s, 1H, PhCHO), 5.27 (s ancho, 1H, H-2), 4.89-4.70 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.78-4.70 (2d, 2H, $J = 11.6$ Hz, CH₂Ph), 4.74 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 4.68 (m, 1H, H-5), 4.26 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.8$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.1$ Hz, H-6'a), 4.11 (m, 1H, H-3), 4.05 (m, 1H, H-4), 3.97 (dd, 1H, H-3'), 3.88 (ddd, 1H, H-5'), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.65-3.61 (m, 2H, H-4' y H-6'b), 3.38 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, H-2'), 2.05 (s, 3H, OCOCH₃).

MASAS FAB m/z 871 (MNa⁺).

4-O-(6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi-α-D-glucopiranosil)-3-O-bencil-2-O-benzoil-1-O-dimetiltexilsilil-β-L-idopiruranonato de metilo (78).



A una disolución de **70** (1.904 g, 4.32 mmol) a 0°C en CH₂Cl₂ seco (100 mL) se añadió TMSOTf (39 μL, 0.22 mmol) bajo atmósfera de argón. Posteriormente se adicionó, gota a gota y bajo agitación, una disolución de **65** (2.480 g, 4.32 mmol) en CH₂Cl₂ seco (25 mL) durante 20 min. Después de 30 min. la reacción se neutralizó con disolución saturada de NaHCO₃ y se diluyó con CH₂Cl₂ (400 mL) a temperatura ambiente. Esta fase orgánica se lavó con H₂O (250 mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El residuo se

sometió a cromatografía en columna (12:1 tolueno-AcOEt) para recuperar el aceptor de partida sin reaccionar (363 mg, 19%) y el disacárido **77** que no se pudo separar del resto de regioisómeros. Por tanto, la siguiente reacción de benzoilación se llevó a cabo sobre la mezcla de regioisómeros.

Una disolución de esta mezcla en Py (15 mL) se trató con cloruro de benzoílo (4.1 mL, 35.21 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 24h., la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (400 mL), se lavó con H₂O (200 mL) y disolución de HCl 1N (100 mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna de gel de sílice (12:1 tolueno-AcOEt), obteniéndose **78** (2.115 g, 51% desde **65**).

$[\alpha]_D^{20} +18.0^\circ$ (*c* 1, CHCl₃).

CCF (12:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.26.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.11-7.22 (m, 20H, Ph), 5.17 (s ancho, 1H, H-1), 5.07 (s ancho, 1H, H-2), 4.84-4.74 (2d, 2H, J = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.72 (d, 1H, J_{1',2'} = 3.4 Hz, H-1'), 4.67-4.49 (2d, 2H, J = 10.7 Hz, CH₂Ph), 4.48 (s ancho, 1H, H-5), 4.38 (dd, 1H, J_{5',6'a} = 1.8 Hz, J_{6'a,6'b} = 12.4 Hz, H-6'a), 4.30 (dd, 1H, J_{5',6'b} = 2.3 Hz, H-6'b), 4.23 (m, 1H, H-3), 4.07 (m, 1H, H-5'), 4.01 (s ancho, 1H, H-4), 3.96-3.87 (2d, 2H, J = 10.7 Hz, CH₂Ph), 3.75 (s, 3H, COOCH₃), 3.53-3.43 (m, 2H, H-3'y H-4'), 3.12 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.1 Hz, H-2'), 1.99 (s, 3H, OCOCH₃), 1.56 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.79-0.75 (4s, 12H, C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), 0.25-0.13 (2s, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 170.59, 168.62 y 166.58 (C=O), 137.86-127.74 (Ph), 99.65 (C-1'), 93.97 (C-1), 79.86, 77.35, 75.65, 75.02, 74.88, 74.60, 73.45, 73.03, 70.09, 68.71, 63.72, 62.29, 52.21 (COOCH₃), 33.98 (CH(CH₃)₂), 24.77 (C(CH₃)₂), 20.88 (OCOCH₃), 20.17-18.36 (C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), -1.99 y -3.36 (Si(CH₃)₂).

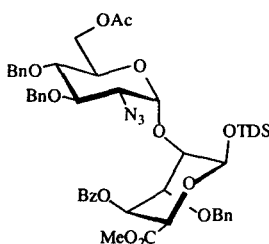
MASAS FAB *m/z* 976 (MNa⁺).

Análisis:

Calculado para $C_{51}H_{63}N_3O_{13}Si$:	C, 64.20; H, 6.66; N, 4.40.
Encontrado:	C, 64.47; H, 6.64; N, 4.24.

En la reacción de benzoilación también se aislaron y caracterizaron los siguientes productos:

2-O-(6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-4-O-benzoil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiruranonato de metilo (79).



79

$[\alpha]_D^{20} +70.4^\circ$ (c 0.98, $CHCl_3$).

CCF (12:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.39.

1H -RMN (500MHz, $CDCl_3$) δ 8.06-7.11 (m, 20H, Ph), 5.20 (s ancho, 1H, H-4), 5.15 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1'), 5.08 (s ancho, 1H, H-1), 4.86-4.73 (2d, 2H, $J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.70 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.8$ Hz, H-5), 4.51-4.32 (2d, 2H, $J = 11.1$ Hz, CH_2Ph), 4.23 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3), 4.06-4.02 (m, 2H, H-6'a y CH_2Ph), 3.83 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 1.6$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 12.1$ Hz, H-6'b), 3.78 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, CH_2Ph), 3.71 (s, 4H, H-2 y $COOCH_3$), 3.46 (m, 1H, H-5'), 3.26 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.3$ Hz, H-4'), 3.17 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3'), 2.94 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, H-2'), 1.95 (s, 3H, $OCOCH_3$), 1.65 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0.89-0.87 (4s, 12H, $C(CH_3)_2$ y $CH(CH_3)_2$), 0.33-0.21 (2s, 6H, $Si(CH_3)_2$).

MASAS FAB m/z 976 (MNa^+).

FAB alta resolución:

Calculado para $C_{51}H_{63}N_3O_{13}SiNa$: 976.4028.

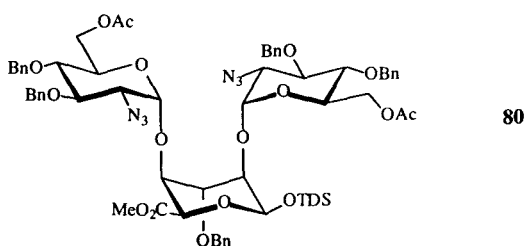
Encontrado: 976.4069 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $C_{51}H_{63}N_3O_{13}Si$: C, 64.20; H, 6.66; N, 4.40.

Encontrado: C, 63.75; H, 6.86; N, 4.48.

2-O-(6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-4-O-(6-O-acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-1-O-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranuronato de metilo (80).



$[\alpha]_D^{20} +89.5^\circ$ (c 1.33, $CHCl_3$).

CCF (12:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.14.

1H -RMN (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.47-7.14 (m, 25H, Ph), 5.36 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1''), 4.98 (m, 2H, H-1 y H-1'), 4.93 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, CH_2Ph), 4.86-4.80 (2d, 2H, $J = 10.5$ Hz, CH_2Ph), 4.76-4.73 (m, 3H, CH_2Ph), 4.70-4.64 (2d, 2H, $J = 11.9$ Hz, CH_2Ph), 4.56 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.51 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, CH_2Ph), 4.43 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.6$ Hz, H-5), 4.33 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 1.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, H-6'a), 4.20-3.95 (m, 8H, H-3, H-4, H-3', H-3'', H-6''a, H-6''b, H-5' ó H-5''), 3.84 (m, 1H, H-5' ó H-5''), 3.77 (s ancho, 1H, H-2), 3.73 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.56-3.51 (2dd, 2H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4' y H-4''), 3.28 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2'), 3.26 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2''), 1.94-1.93 (2s, 6H, $OCOCH_3$), 1.67 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0.89-0.87 (4s, 12H, $C(CH_3)_2$ y $CH(CH_3)_2$), 0.31-0.20 (2s, 6H, $Si(CH_3)_2$).

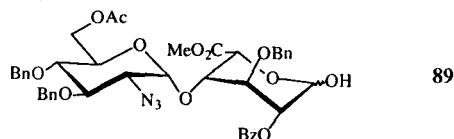
MASAS FAB m/z 1282 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $C_{66}H_{83}N_6O_{17}Si$: C, 62.89; H, 6.64; N, 6.67.

Encontrado: C, 62.61; H, 6.73; N, 6.23.

4-O-(6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-2-O-benzoil- α,β -L-idopiruranonato de metilo (89).



A una disolución de **78** (1.067 g, 1.12 mmol) a -10°C en THF seco (30 mL) se añadió un exceso del complejo $(\text{HF})_n \cdot \text{Py}$ (3.1 mL). La mezcla de reacción se llevó hasta 0°C y se agitó bajo atmósfera de argón. Después de 24h., la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (200 mL) y se lavó con H_2O (2x100 mL) y disolución saturada de NaHCO_3 (50 mL) hasta pH neutro. Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica (2:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **89** (800 mg, 88%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.25.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.14-7.06 (m, 20H, Ph), 5.45 (d ancho, 0.5H, $J_{1\alpha,\text{OH}} = 8.4$ Hz, H-1 α), 5.21 (d ancho, 0.5H, $J_{1\beta,\text{OH}} = 9.0$ Hz, H-1 β), 5.06 (s ancho, 1H, H-2 α y β), 4.91 (s ancho, 0.5H, H-5 α), 4.91-4.85 (m, 1H, CH_2Ph), 4.80-4.74 (2d, 1H, $J = 11.5$ Hz, $J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.66-4.62 (m, 2H, H-1', CH_2Ph), 4.59 (s ancho, 0.5H, H-5 β), 4.47 (m, 1H, CH_2Ph), 4.37 (m, 1H, H-6'a), 4.31 (m, 1H, H-3), 4.25-4.19 (m, 1.5H, H-6'b, OH α), 4.01-3.82 (m, 4H, H-5', H-4, CH_2Ph), 3.64 (m, 0.5H, OH β), 3.79 (s, 3H, COOCH_3 α y β), 3.41 (m, 2H, H-3' y H-4'), 3.19 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, H-2'), 2.00 (s, 3H, OCOCH_3 α y β).

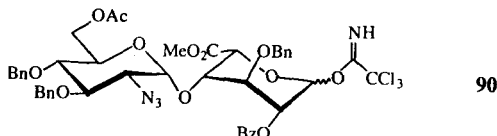
MASAS FAB m/z 834 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $C_{43}H_{45}N_3O_{13}$: C, 63.62; H, 5.59; N, 5.18.

Encontrado: C, 63.22; H, 5.95; N, 4.94.

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- α,β -L-idopiranosiluronato de metilo (90).



A una disolución de **89** (320 mg, 0.39 mmol) en CH_2Cl_2 seco (4 mL) se añadió Cl_3CCN (593 μ L, 5.90 mmol) y K_2CO_3 activado a la llama (55 mg, 0.39 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 h., la suspensión se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se pasó a través de un filtro corto de gel de sílice (2:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **90** (357 mg, 95%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.53 y 0.38 (β y α).

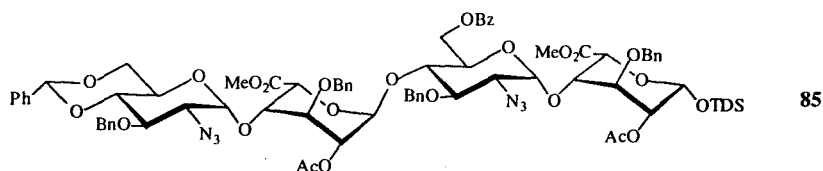
1H -RMN (500MHz, $CDCl_3$) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 0.4:0.6) δ 8.67 (s, 0.6H, $NH\beta$), 8.64 (s, 0.4H, $NH\alpha$), 8.13-7.10 (m, 20H, Ph), 6.55 (s ancho, 0.6H, H-1 β), 6.29 (d, 0.4H, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, H-1 α), 5.43 (m, 0.4H, H-2 α), 5.33 (s ancho, 0.6H, H-2 β), 5.00 (s ancho, 0.4H, H-5 α), 4.93-4.88 (m, 1H, CH_2Ph), 4.79-4.65 (m, 3.6H, H-5 β , H-1', CH_2Ph), 4.52-4.46 (m, 1H, CH_2Ph), 4.38-4.35 (m, 1.4H, H-6'a, H-3 α), 4.25-4.23 (m, 1.6H, H-6'b, H-3 β), 4.15 (s ancho, 0.4H, H-4 α), 4.03-3.88 (m, 3.6H, H-5', H-4 β , CH_2Ph), 3.79-3.78 (2s, 3H, $COOCH_3$ α y β), 3.51-3.41 (m, 2H, H-3' y H-4'), 3.23-3.19 (m, 1H, H-2'), 1.99 (s, 3H, $OCOCH_3$ α y β).

Análisis:

Calculado para $C_{45}H_{45}N_4O_{13}Cl_3$: C, 56.52; H, 4.74; N, 5.86.
 Encontrado: C, 56.17; H, 4.98; N, 5.79.

5.5.2 Síntesis de derivados tetrasacarídicos relacionados.

O-(2-Azido-3-*O*-bencil-4,6-*O*-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-acetil-3-*O*-bencil- 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)-2-*O*-acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranuronato de metilo (**85**).



A una disolución de **82** (394 mg, 0.46 mmol) y **84** (573 mg, 0.68 mmol) a 0°C en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se añadió TMSOTf (100 μ L de una disolución 0.18 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón. Después de 1h. 30min., se añadió disolución saturada de $NaHCO_3$ (10 mL) y se diluyó con CH_2Cl_2 (250 mL). La suspensión se lavó con H_2O (200 mL), la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (12:1 tolueno-AcOEt y 4:1 hexano-AcOEt), obteniéndose el tetrasacárido **85** (352 mg, 50%) y recuperándose aceptor de partida sin reaccionar (175 mg, 44%).

$[\alpha]_D^{20} +39.4^\circ$ (*c* 0.58, $CHCl_3$).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.19.

1H -RMN (500MHz, $CDCl_3$) δ 8.08-7.24 (m, 30H, Ph), 5.51 (s, 1H, PhCHO), 5.39 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.2$ Hz, H-1c), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H-1a), 4.96 (s ancho, 1H, H-2a), 4.92 (dd, 1H, H-2c), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1d), 4.79 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1b), 4.88-4.80 (m, 3H, H-6b y CH_2Ph), 4.74-4.62 (m, 7H, H-5c y

CH_2Ph), 4.49 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.6$ Hz, H-5a), 4.34 (dd, 1H, $J_{5,6'} = 2.3$ Hz, $J_{6,6'} = 12.5$ Hz, H-6'b), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6} = 4.8$ Hz, $J_{6,6'} = 10.1$ Hz, H-6d), 4.08-4.03 (m, 3H, H-4b, H-5b, H-4a), 3.98-3.96 (m, 2H, H-3a, H-4c), 3.91 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 5.4$ Hz, H-3c), 3.83-3.76 (m, 3H, H-5d, H-3b, H-3d), 3.67-3.60 (m, 2H, H-4d, H-6'd), 3.73 y 3.37 (2s, 6H, $COOCH_3$ a y c), 3.29 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, H-2 b), 3.25 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2d), 2.10 y 2.06 (2s, 6H, $OCOCH_3$ a y c), 1.60 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0.89-0.84 (4s, 12H, $C(CH_3)_2$ y $CH(CH_3)_2$), 0.23-0.15 (2s, 6H, $Si(CH_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.67, 169.69, 169.03, 168.93 y 166.06 (C=O), 137.78-126.04 (Ph), 101.46 (PhCHO), 98.79 y 97.13 (C-1b, C-1d), 97.97 (C-1c), 93.55 (C-1a), 82.50, 78.29, 75.64, 75.15, 75.01, 74.86, 74.78, 73.86, 73.79, 73.71, 73.53, 72.88, 72.69, 70.02, 69.91, 68.52 (C-6d), 67.70 (C-2a), 63.39, 63.24, 62.80, 62.23 (C-6b), 52.29 y 51.79 ($COOCH_3$), 34.09 ($CH(CH_3)_2$), 24.90 ($C(CH_3)_2$), 20.91 y 20.74 ($OCOCH_3$), 20.24-18.39 ($C(CH_3)_2$ y $CH(CH_3)_2$), -1.94 y -3.52 ($Si(CH_3)_2$).

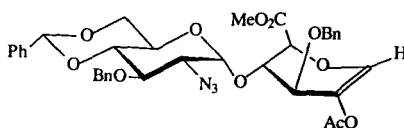
MASAS FAB m/z 1573 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $C_{80}H_{94}N_6O_{24}Si$:	C, 61.92; H, 6.11; N, 5.42.
Encontrado:	C, 61.59; H, 6.41; N, 5.25.

En esta reacción de glicosidación también se pudo aislar y caracterizar el siguiente producto secundario de eliminación:

2-O-Acetil-1,5-anhidro-4-O-(2-azido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-3-O-bencil-L-xilo-hex-1-enitoluronato de metilo (86).



86

$[\alpha]_D^{20}$ -2.8° (c 1, CHCl₃).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.12; (8:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.20.

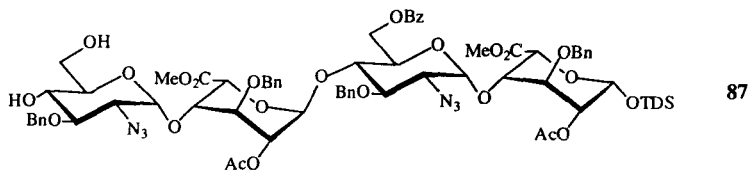
¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 7.46-7.24 (m, 15H, Ph), 6.80 (s, 1H, H-1), 5.53 (s, 1H, PhCHO), 4.91-4.89 (m, 2H, H-1' y CH₂Ph), 4.73 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂Ph), 4.69-4.61 (2d, 2H, J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.57 (s ancho, 1H, H-5), 4.36 (dd, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 1.6 Hz, H-4), 4.28 (dd, 1H, J_{5',6'a} = 3.9 Hz, J_{6'a,6'b} = 9.3 Hz, H-6'a), 4.10 (d, 1H, J_{3,4} = 1.6 Hz, H-3), 4.00 (dd, 1H, J_{3,4} = 9.5 Hz, H-3'), 3.83 (s, 3H, COOCH₃), 3.74-3.62 (m, 3H, H-4', H-5' y H-6'b), 3.26 (dd, 1H, J_{1,2} = 3.6 Hz, J_{2,3} = 10.1 Hz, H-2'), 2.06 (s, 3H, OCOCH₃).

MASAS FAB *m/z* 710 (MNa⁺).

Análisis:

Calculado para C ₃₆ H ₃₇ N ₃ O ₁₁ :	C, 62.87; H, 5.42; N, 6.11.
Encontrado:	C, 62.52; H, 5.31; N, 6.14.

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-acetil-3-*O*-bencil- 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)-2-*O*-acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranuronato de metilo (87).**



A una disolución de **85** (54 mg, 34.8 μ mol) en CH₂Cl₂ seco (1.5 mL) se añadió EtSH (13 μ L, 0.17 mmol) y una cantidad catalítica de pTsoH a temperatura ambiente. Después de agitar bajo atmósfera de argon durante 2h. 30 min., la reacción se neutralizó con disolución saturada de NaHCO₃, se diluyó con CH₂Cl₂ (25 mL) y se lavó con H₂O (25 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a sequedad. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna (1:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **87** (43 mg, 84%).

$[\alpha]_D^{20} +49.7^\circ$ (c 0.75, CHCl_3).

CCF (1:1 hexano-AcOEt) R_f 0.29.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.08-7.24 (m, 25H, Ph), 5.38 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.3$ Hz, H-1c), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.2$ Hz, H-1a), 4.95-4.91 (m, 3H, H-1d, H-2a, H-2c), 4.86 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, CH_2Ph), 4.83-4.78 (m, 3H, H-1b, H-6b, CH_2Ph), 4.72-4.62 (m, 7H, H-5c, CH_2Ph), 4.49 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.4$ Hz, H-5a), 4.35 (dd, 1H, $J_{5,6} = 2.3$ Hz, $J_{6,6'} = 12.3$ Hz, H-6'b), 4.11-3.99 (m, 4H, H-4a, H-4c, H-4b, H-5b), 3.96 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3a), 3.93 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 5.4$ Hz, H-3c), 3.79 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.1$ Hz, H-3b), 3.69-3.54 (m, 5H, H-3d, H-4d, H-5d, H-6d, H-6'd), 3.73 y 3.37 (2s, 6H, COOCH_3 a y c), 3.29 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-2b), 3.12 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-2d), 2.38 (d, 1H, OH-4), 1.91 (m, 1H, OH-6), 2.10 y 2.01 (2s, 6H, OCOCH_3 a y c), 1.59 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.88-0.83 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.22-0.14 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

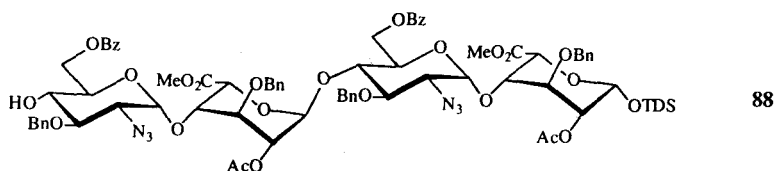
$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 170.70, 169.68, 169.31, 168.96 y 166.17 (C=O), 137.79-127.69 (Ph), 98.12 y 97.07 (C-1b, C-1d), 97.90 (C-1c), 93.53 (C-1a), 79.31, 78.20, 75.14, 75.06, 74.85, 74.76, 73.72, 73.62, 73.54, 73.21, 72.88, 72.64, 72.10, 70.97, 70.12, 70.01, 69.88, 67.68, 63.34, 62.76, 62.33, 62.14, 52.29 y 51.83 (COOCH_3), 34.07 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.88 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.92 y 20.78 (OCOCH_3), 20.23-18.39 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), -1.95 y -3.54 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 1485 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{73}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{24}\text{Si}$:	C, 59.90; H, 6.20; N, 5.74.
Encontrado:	C, 59.85; H, 6.35; N, 5.40.

***O*-(2-Azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-acetil-3-*O*-bencil- 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)-2-*O*-acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranuronato de metilo (88).**



88

A una disolución de **87** (215 mg, 0.15 mmol) a -35°C en CH_3CN seco (3 mL) se añadió BzCN (21 mg, 0.16 mmol) y una cantidad catalítica de Et_3N (gotas). Después de 1 h., se añadió MeOH y la mezcla se agitó durante 15 minutos hasta que alcanzó la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en MeOH y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (3:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **88** (219 mg, 95%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +53.2^{\circ}$ (c 1, CHCl_3).

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.26.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 8.10-7.24 (m, 30H, Ph), 5.36 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1c), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-1a), 4.96-4.91 (m, 3H, H-2 a y c y H-1d), 4.86 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, CH_2Ph), 4.80-4.74 (m, 4H, H-1b, H-6d, CH_2Ph), 4.70-4.62 (m, 7H, H-6b, H-5c, CH_2Ph), 4.49 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.7$ Hz, H-5a), 4.36 (dd, 1H, $J_{5,6'} = 2.4$ Hz, $J_{6,6'} = 12.5$ Hz, H-6'd), 4.27 (dd, 1H, $J_{5,6'} = 2.0$ Hz, $J_{6,6'} = 12.5$ Hz, H-6'b), 4.07-4.02 (m, 4H, H-4a, H-4c, H-4b, H-5b), 3.97 (dd, 1H, H-3a), 3.92 (dd, 1H, H-3c), 3.80 (m, 2H, H-3b y H-5d), 3.73 y 3.42 (2s, 6H, COOCH_3 a y c), 3.62 (dd, 1H, H-3d), 3.48 (ddd, 1H, H-4d), 3.29 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, H-2b), 3.13 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2d), 2.99 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 3.5$ Hz, OH), 2.10 y 2.02 (2s, 6H, OCOCH_3 a y c), 1.62 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.88-0.84 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.23-0.14 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 170.68, 169.67, 169.15, 168.93, 167.38 y 166.12 (C=O), 137.78-127.67 (Ph), 98.14 (C-1d), 98.01 (C-1c), 97.09 (C-1b), 93.55 (C-1a), 78.67 (C-3d), 78.25, 75.14, 75.10, 74.92, 74.55, 73.66, 73.58, 73.53, 73.26, 72.88, 72.64, 71.17, 70.46, 69.88, 69.79, 69.76, 67.70, 63.42-62.38 (C-2b, C-2d,

C-6b, C-6d), 52.26 y 51.85 (COOCH₃), 34.09 (CH(CH₃)₂), 24.89 (C(CH₃)₂), 20.91 y 20.77 (OCOCH₃), 20.24-18.39 (C(CH₃)₂ y CH(CH₃)₂), -1.95 y -3.52 (Si(CH₃)₂).

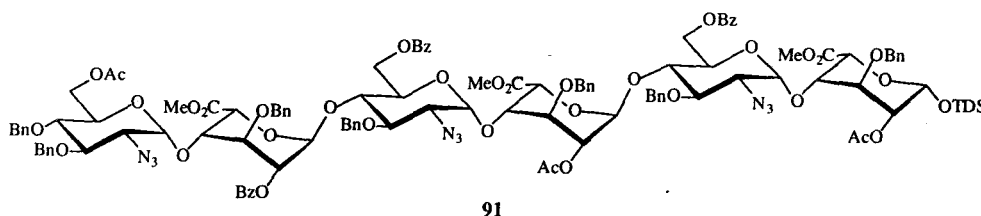
Análisis:

Calculado para C₈₀H₉₄N₆O₂₅Si: C, 61.29; H, 6.04; N, 5.36.

Encontrado: C, 61.41; H, 6.32; N, 5.06.

5.5.3 Síntesis de derivados hexasacarídicos relacionados.

***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-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-acetil 3-*O*-bencil- 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)-2-*O*-acetil-3-*O*-bencil-1-*O*-dimetiltexilsilil- β -L-idopiranosiluronato de metilo (91).**



A una disolución de **88** (147 mg, 93.8 μ mol) y **90** (134 mg, 0.141 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) a temperatura ambiente se añadió TMSOTf (50 μ L de una disolución 0.14 M en CH₂Cl₂ seco) bajo atmósfera de argón. Después de 30 min., se adicionó disolución saturada de NaHCO₃ y la suspensión se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL). La fase orgánica se lavó con H₂O (75 mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El producto se purificó por columna cromatográfica (16:1 tolueno-acetona y 3:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **91** (133 mg, 60%) y aceptor de partida sin reaccionar (55 mg, 37%).

$[\alpha]_D^{20} +41.8^\circ$ (c 1, CHCl₃).

CCF (14:1 tolueno-acetona) R_f 0.32.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.07-7.15 (m, 50H, Ph), 5.53 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.2$ Hz, H-1e), 5.36 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.2$ Hz, H-1c), 5.14 (dd, 1H, H-2e), 5.05 (s ancho, 1H, H-1a), 4.95 (s ancho, 1H, H-2a), 4.89-4.78 (m, 4H, H-1d, H-1f, CH_2Ph y H-2c), 4.81-4.48 (m, 17H, CH_2Ph , H-5a, H-5c, H-5e, H-6b, H-6'b, H-6d, H-1b), 4.38-4.30 (m, 3H, CH_2Ph y H-6'd), 4.23 (m, 2H, H-6f y CH_2Ph), 4.17-4.13 (m, 2H, H-6'f y H-3e), 4.03-3.93 (m, 7H, H-4b, H-4d, H-5b ó d, H-4 a, H-4c, H-4e, H-3a), 3.86 (m, 2H, H-5f, H-3c), 3.78 (m, 2H, H-5b ó d, H-3b), 3.64 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3d), 3.54 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9$ Hz, H-3f), 3.45 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4f), 3.72-3.23 (3s, 9H, COOCH_3 a, c y e), 3.28-3.18 (m, 3H, H-2 b, d y f), 2.09-1.95 (3s, 9H, OCOCH_3 a, c y f), 1.58 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.87-0.83 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.22-0.13 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 170.69, 170.47, 169.66, 169.14, 169.03, 168.93, 166.05, 165.98 y 165.16 (C=O), 137.69-127.66 (Ph), 99.01, 97.39 y 97.05 (C-1b, C-1d, C-1f), 98.30 (C-1e), 97.86 (C-1c), 93.53 (C-1a), 80.03, 78.14, 75.40, 75.33, 74.97, 74.91, 74.80, 74.14, 73.76, 73.67, 73.63, 73.53, 72.97, 72.87, 72.58, 70.54, 70.07, 70.02, 69.95, 69.90, 69.76, 67.68 (C-2a), 63.51-62.15 (C-2b, C-2d, C-2f, C-6b, C-6d, C-6f), 52.27, 51.91 y 51.57 (COOCH_3), 34.08 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.89 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.90, 20.79 y 20.69 (OCOCH_3), 20.23-18.39 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), -1.94 y -3.53 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

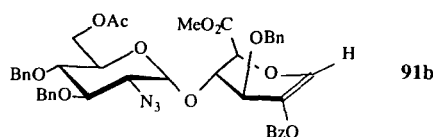
FAB alta resolución:

Calculado para $\text{C}_{123}\text{H}_{137}\text{N}_9\text{O}_{37}\text{SiNa}$: 2382.88.

Encontrado: 2382.82 (MNa^+).

En esta reacción de glicosidación se pudo aislar el siguiente producto secundario de eliminación:

4-O-(6-O-Acetil-2-azido-3,4-di-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-1,5-anhidro-3-O-bencil-2-O-benzoil-L-xyllo-hex-1-enitoluronato de metilo (91b).



$[\alpha]_D^{20} +12.0^\circ$ (c 1, CHCl_3).

CCF (3:1 hexano-AcOEt) R_f 0.19.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.02-7.14 (m, 20H, Ph), 6.91 (s, 1H, H-1), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1'), 4.88 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, CH_2Ph), 4.84-4.81 (m, 2H, CH_2Ph), 4.68 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.64-4.61 (m, 2H, H-5 y CH_2Ph), 4.56 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.39 (m, 1H, H-4), 4.33 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 2.0$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 12.3$ Hz, H-6'a), 4.28 (d, 1H, $J_{3,4} = 1.7$ Hz, H-3), 4.20 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 3.5$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 12.3$ Hz, H-6'b), 3.97 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3'), 3.83 (s, 3H, COOCH_3), 3.79 (m, 1H, H-5'), 3.54 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4'), 3.28 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, H-2'), 2.02 (s, 3H, OCOCH_3).

MASAS FAB m/z 816 (MNa^+).

FAB alta resolución:

Calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Na}$: 816.2744.

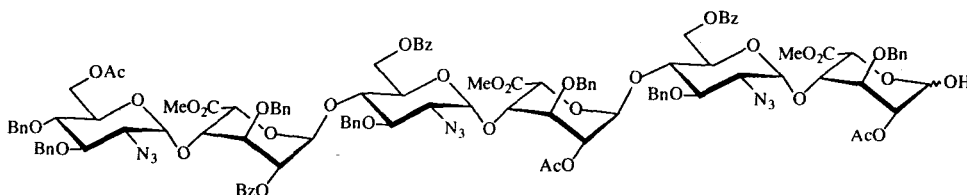
Encontrado: 816.2716 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{12}$: C, 65.06; H, 5.46; N, 5.29.

Encontrado: C, 64.78; H, 5.47; N, 5.21.

***O*-(6-*O*-Acetil-2-azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-*O*-(3-*O*-bencil-2-*O*-benzoil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1→4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-*O*-(2-*O*-acetil 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosiluronato de metilo)-(1→4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-2-*O*-acetil-3-*O*-bencil- α,β -L-idopiranosiluronato de metilo (92).**



92

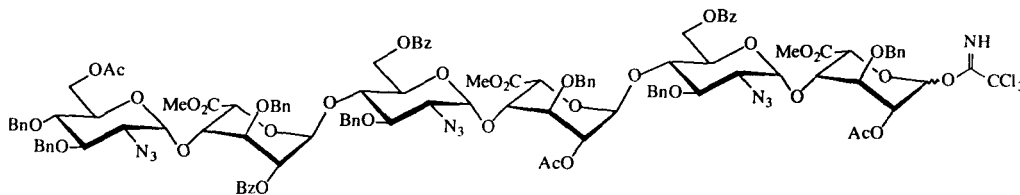
A una disolución de **91** (210 mg, 89 μ mol) en THF seco (5 mL) a -15°C se añadió un exceso del complejo $(\text{HF})_n \cdot \text{Py}$ (0.2 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0°C bajo atmósfera de argón. Después de 24 h., la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con H_2O (2 x 25 mL) y disolución saturada de NaHCO_3 (25 mL) hasta pH neutro. Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2 x 25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna (3:2 hexano-AcOEt), obteniéndose **92** (178 mg, 90%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (3:2 hexano-AcOEt) R_f 0.13.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 0.6:0.4) δ 8.08-7.15 (m, 50H, Ph), 5.54 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.4$ Hz, H-1e), 5.38 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.6$ Hz, H-1c), 5.30 (d ancho, 0.6H, $J_{1,\text{OH}} = 8.8$ Hz, H-1a α), 5.15 (dd, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.6$ Hz, H-2e), 5.10 (dd, 0.4 H, $J_{1,\text{OH}} = 11.4$ Hz, $J_{1,2} = 2.4$ Hz, H-1a β), 4.93-4.49 (m, 22H, CH_2Ph , H-5a, H-5c, H-5e, H-6b, H-6'b, H-6d, H-1b, H-1d, H-1f, H-2 a, H-2c), 4.38-4.31 (m, 3H, CH_2Ph y H-6'd), 4.26-4.22 (m, 2H, H-6f y CH_2Ph), 4.17-3.63 (m, 17H, H-6'f, H-4b, H-4d, H-5b, H-5d, H-5f, H-4a, H-4c, H-4e, H-3a, H-3c, H-3e, H-3b, H-3d, COOCH_3), 3.55 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.1$ Hz, H-3f), 3.42 (m, 4H, H-4f, COOCH_3), 3.30-3.24 (m, 5H, H-2 b, d y COOCH_3), 3.18 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2f), 2.16-1.95 (3s, 9H, OCOCH_3 a, c y f).

Tricloroacetimidato de *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-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-

desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-O-acetil 3-O-bencil- 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)-2-O-acetil 3-O-bencil- α,β -L-idopiranosiluronato de metilo (93).



93

A una disolución de **92** (55 mg, 25 μ mol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL) se añadió CCl_3CCN (75 μ L, 0.74 mmol) y K_2CO_3 activado a la llama (4 mg, 31 μ mol). Después de agitar a temperatura ambiente durante una noche, la suspensión se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se pasó a través de un filtro corto de gel de sílice (3:2 hexano-AcOEt), obteniéndose **93** (50 mg, 85%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (3:2 hexano-AcOEt) R_f 0.39 y 0.33 (β y α).

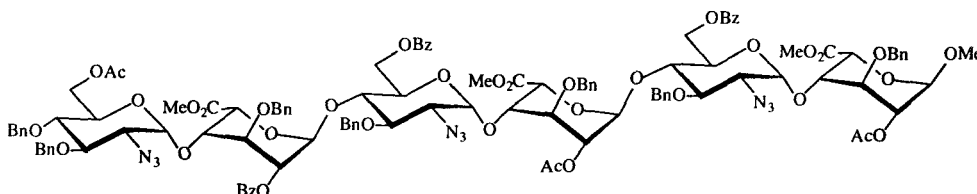
^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ 0.5:0.5) δ 8.67-8.65 (2s, 1H, NH α y β), 8.07-7.17 (m, 50H, Ph), 6.40 (s ancho, 0.5H, H-1a β), 6.20 (d, 0.5H, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, H-1a α), 5.54 (2d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1e α y β), 5.40-5.35 (2d, 1H, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, H-1c α y β), 5.15 (2dd, 1H, H-2e α y β), 4.98-4.49 (m, 22H, CH_2Ph , H-5a, H-5c, H-5e, H-6b, H-6'b, H-6d, H-1b, H-1d, H-1f, H-2a, H-2c), 4.38-4.31 (m, 3H, CH_2Ph y H-6'd), 4.26-4.23 (m, 2H, H-6f y CH_2Ph), 4.17-3.73 (m, 16H, H-6'f, H-4b, H-4d, H-5b, H-5d, H-5f, H-4a, H-4c, H-4e, H-3a, H-3c, H-3e, H-3b, COOCH_3), 3.65 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3d), 3.55 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3f), 3.47-3.44 (m, 4H, H-4f, COOCH_3), 3.36-3.24 (m, 5H, H-2b, d y COOCH_3), 3.18 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, H-2f), 2.12-1.95 (5s, 9H, OCOCH_3 a, c y f).

FAB alta resolución:

Calculado para $C_{117}H_{119}N_{10}O_{37}Cl_3Na$: 2383.667.

Encontrado: 2383.509 (MNa^+).

***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-idopiranosiluronato de metilo)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-6-*O*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-acetil 3-*O*-bencil- 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)-(metil 2-*O*-acetil 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosid) uronato de metilo (94).**



94

A una disolución de **93** (90 mg, 38 μ mol) en CH_2Cl_2 seco (0.5 mL) a $0^\circ C$ se añadió MeOH (24 μ L, 0.76 mmol) y TMSOTf (50 μ L de una disolución 0.04 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón. Después de 1 h., la reacción se neutralizó con disolución saturada de $NaHCO_3$ y se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL). La suspensión se lavó con H_2O (30 mL) y la fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se secó a vacío. El crudo se sometió a columna cromatográfica (2:1 hexano-AcOEt) para dar una mezcla de **94**, anómero beta y ortoéster (45 mg, 53%) y **92** (25 mg, 29%). A partir de la mezcla se consiguieron, por sucesivas cromatografías en columna, fracciones de **94** puro, lo que permitió su caracterización.

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.12.

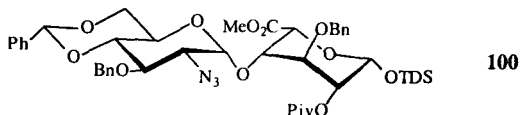
1H -RMN (500MHz, $CDCl_3$) δ 8.08-7.17 (m, 50H, Ph), 5.54 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.3$ Hz, H-1e), 5.37 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.6$ Hz, H-1c), 5.15 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{1,2} = 4.6$ Hz, H-2e), 4.91-4.87 (m, 6H, H-1d, H-1f, H-1a, H-2a, H-2c, CH_2Ph), 4.83-4.49 (m, 17 H, CH_2Ph , H-5a, H-5c, H-5e, H-6b, H-6'b, H-6d, H-1b), 4.36-4.31 (m, 3H, CH_2Ph y H-6'd), 4.26-4.23 (m, 2H, H-6f y CH_2Ph), 4.16-4.10 (m, 2H, H-3e, H-

6'f), 4.05-3.84 (m, 10H, H-4b, H-4d, H-5b, H-5d, H-5f, H-4a, H-4c, H-4e, H-3a, H-3c), 3.76 (m, 4H, H-3b, COOCH₃), 3.66 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5 Hz, H-3d), 3.55 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4 Hz, H-3f), 3.45 (m, 7H, H-4f, OCH₃, COOCH₃), 3.28-3.25 (m, 5H, H-2b, d y COOCH₃), 3.21 (dd, 1H, J_{1,2} = 3.5 Hz, J_{2,3} = 10.1 Hz, H-2f), 2.06, 2.01, 1.95 (3s, 9H, OCOCH₃).

5.6 Ruta de síntesis del hexasacárido I: isopropilglicósidos derivados.

5.6.1 Síntesis de derivados disacarídicos GlcN-IdoA.

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-idopirananurono de metilo (100).



El compuesto **71** (1.218 g, 1.51 mmol) se disolvió a temperatura ambiente en Py (13 mL). A esta disolución se añadió cloruro de pivalóflo (2.2 mL) y una cantidad catalítica de DMAP, agitando la mezcla durante 1 día. Transcurrido este tiempo, la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (250 mL) y se lavó con disolución 1 M de HCl (100 mL) y H_2O (100 mL). Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna (8:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **100** (1.226 g, 91%).

$[\alpha]_D^{20} +24.5^\circ$ (c 1, CHCl_3).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.44.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.44-7.24 (m, 15H, Ph), 5.49 (s, 1H, PhCHO), 5.02 (m, 2H, H-1 y H-2), 4.83 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1'), 4.86-4.66 (2d, 2H, $J = 10.9$ Hz, CH_2Ph), 4.75-4.68 (2d, 2H, $J = 11.6$ Hz, CH_2Ph), 4.40 (d, 1H, $J_{4,5} = 1.5$ Hz, H-5), 4.32 (dd, 1H, $J_{5,6'a} = 5.0$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.1$ Hz, H-6'a), 4.09-4.03 (m, 3H, H-4, H-3' y H-5'), 3.97 (dd, 1H, H-3), 3.71 (s, 3H, COOCH_3), 3.62-3.59 (m, 2H, H-4' y H-6'b), 3.29 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2'), 1.62 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.25 (m, 9H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$), 0.84 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.21-0.14 (2s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 178.11 y 168.71 (C=O), 137.93-126.21 (Ph), 101.66 (PhCHO), 99.60 (C-1'), 94.53 (C-1), 82.60 (C-4'), 76.35, 76.12 (C-3), 75.27, 74.89 (CH_2Ph), 73.49 (C-5), 72.97 (CH_2Ph), 68.49 (C-6'), 67.58 (C-2), 63.19, 63.13, 51.96 (COOCH_3), 39.02, 33.87 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 27.56 ($\text{OCO}(\text{CH}_3)_3$), 24.96 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.11-18.53 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), -1.88 y -3.59 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 912 (MNa^+).

FAB alta resolución:

Calculado para $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SiNa}$: 912.40787.

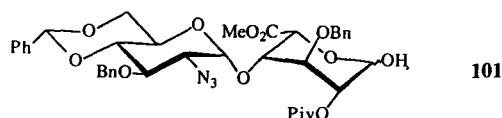
Encontrado: 912.40786 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Si}$: C, 63.42; H, 7.13; N, 4.72.

Encontrado: C, 63.52; H, 7.27; N, 4.52.

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 (101).



A una disolución de **100** (515 mg, 0.58 mmol) a -15°C en THF seco (15 mL) se añadió un exceso del complejo $(\text{HF})_n \cdot \text{Py}$ (2.86 mL). La mezcla de reacción se dejó agitando a 0°C bajo atmósfera de argón. Después de 48h., la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (150 mL) y se lavó con H_2O (2 x 50 mL) y disolución saturada de NaHCO_3 (100 mL) hasta pH neutro. Las fases acuosas se extrajeron con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna (2:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **101** (356 mg, 82%) como una mezcla de anómeros α/β y producto de partida sin reaccionar (76 mg, 15%).

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.32.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) (datos obtenidos de una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ aproximadamente 0.7:0.2) δ 7.44-7.24 (m, 15H, Ph), 5.52 (2s, 1H, PhCHO α y β), 5.34 (dd, 0.7H, $J_{1\alpha,\text{OH}} = 8.4$ Hz, $J_{1\alpha,2} = 4.3$ Hz, H-1 α), 5.18 (dd, 0.2H, $J_{1\beta,\text{OH}} = 9.9$ Hz, $J_{1\beta,2} = 2.2$ Hz, H-1 β), 4.95 (d, 0.7H, $J_{1'\alpha,2'\alpha} = 3.8$ Hz, H-1' α), 4.91-4.70 (m, 6H, H-2, H-5 α , H-1' β , CH_2Ph), 4.55 (d, 0.2H, $J_{4\beta,5\beta} = 3.2$ Hz, H-5 β), 4.27 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 5.0$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.3$ Hz, H-6'a), 4.13-3.62 (m, 7H, H-3, H-4, H-3', H-4', H-5', OH y H-6'b), 3.76-3.74 (2s, 3H, COOCH_3 α y β), 3.37 (dd, 0.2H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, H-2' β), 3.32 (dd, 0.7H, $J_{1',2'} = 3.8$ Hz, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, H-2' α), 1.26-1.22 (2s, 9H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$).

MASAS FAB m/z 770 (MNa^+).

FAB alta resolución:

Calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SiNa}$: 770.290.

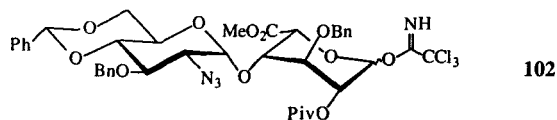
Encontrado: 770.293 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{12}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 61.17; H, 6.19; N, 5.49.

Encontrado: C, 61.01; H, 5.81; N, 5.40.

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-idopiranosiluronato de metilo (102).



A una disolución de **101** (425 mg, 0.57 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se añadió Cl_3CCN (0.85 mL, 8.52 mmol) y K_2CO_3 activado a la llama (86 mg, 0.63 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 h., la suspensión se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se pasó a través de un filtro corto de

gel de sílice (3:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **102** (500 mg, 99%) como una mezcla de anómeros α/β .

CCF (3:1 hexano-AcOEt) R_f 0.48 y 0.28 (β y α).

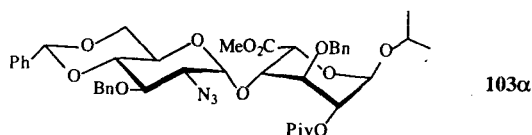
$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.69-8.64 (2s, 1H, NH α y β), 7.45-7.24 (m, 15H, Ph), 6.40 (d, $J_{1,2} = 2.1$ Hz, H-1 β), 6.32 (d, $J_{1,2} = 2.6$ Hz, H-1 α), 5.52-5.50 (2s, 1H, PhCHO α y β), 5.22 (dd, $J_{2,3} = 5.2$ Hz, H-2 α), 5.17 (dd, H-2 β), 4.95-4.62 (m, 6H), 4.30-3.61 (m, 7H), 3.74 (s, 3H, COOCH_3 α y β), 3.37 (m, 1H, H-2' α y β), 1.24-1.22 (2s, 9H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$).

MASAS FAB m/z 913 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Cl}_3$:	C, 55.20; H, 5.08; N, 6.28.
Encontrado:	C, 55.01; H, 5.04; N, 6.32.

***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 metilo (**103**).**



A una disolución de **102** (393 mg, 0.44 mmol) a 0°C en CH_2Cl_2 seco (4mL) se añadió alcohol isopropílico (67 μL , 0.88 mmol) y TMSOTf (50 μL de una disolución 0.18 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón. Después de 5 min., la reacción se neutralizó con disolución saturada de NaHCO_3 y se diluyó con CH_2Cl_2 (150 mL). La suspensión se lavó con H_2O (100 mL) y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El crudo se purificó por columna cromatográfica (6:1 hexano-AcOEt) para obtener el anómero alfa **103 α** (242 mg, 70%), el anómero beta **103 β** (48 mg, 14%) y producto de hidrólisis **101** (35 mg, 10%).

Compuesto 103 α :

$[\alpha]_D^{20} +22.2^\circ$ (*c* 1.17, CHCl₃).

CCF (3:1 hexano-AcOEt) R_f 0.52.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.24 (m, 15H, Ph), 5.53 (s, 1H, PhCHO), 5.19 (d, 1H, J_{1,2} = 4.3 Hz, H-1), 5.01 (d, 1H, J_{1',2'} = 3.6 Hz, H-1'), 4.94-4.90 (m, 2H, CH₂Ph, H-2), 4.79-4.69 (m, 4H, H-5, CH₂Ph), 4.27 (dd, 1H, J_{5',6'a} = 4.9 Hz, J_{6'a,6'b} = 10.2 Hz, H-6'a), 4.12 (dd, 1H, H-4), 3.97-3.89 (m, 4H, H-3, H-3', H-5' y CH(CH₃)₂), 3.73 (s, 3H, COOCH₃), 3.68-3.63 (m, 2H, H-4' y H-6'b), 3.30 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.0 Hz, H-2'), 1.24-1.15 (m, 15H, OCOC(CH₃)₃ y CH(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 177.36 y 169.89 (C=O), 137.71-126.07 (Ph), 101.54 (PhCHO), 99.14 (C-1'), 97.29 (C-1), 82.56 (C-4'), 76.31, 75.86, 74.81 y 74.77 (CH₂Ph, C-4), 73.15 (CH₂Ph), 71.28, 70.56 (C-2), 70.02 (C-5), 68.61 (C-6'), 63.28, 62.91 (C-2'), 52.12 (COOCH₃), 38.83, 27.22 (OCO(CH₃)₃), 23.32 y 21.79 (CH(CH₃)₂).

MASAS FAB *m/z* 812 (MNa⁺).

Análisis:

Calculado para C ₄₂ H ₅₁ N ₃ O ₁₂ :	C, 63.86; H, 6.51; N, 5.32.
Encontrado:	C, 63.48; H, 6.67; N, 5.29.

Compuesto 103 β :

$[\alpha]_D^{20} +24.5^\circ$ (*c* 0.83, CHCl₃).

CCF (3:1 hexano-AcOEt) R_f 0.43.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 7.46-7.24 (m, 15H, Ph), 5.52 (s, 1H, PhCHO), 5.01 (d, 1H, J_{1,2} = 3.0 Hz, H-1), 4.97 (d, 1H, J_{1',2'} = 3.8 Hz, H-1'), 4.93-4.89 (m, 2H, CH₂Ph y H-2), 4.84 (d, 1H, J = 11.1 Hz, CH₂Ph), 4.78 (d, 1H, J = 11.1 Hz, CH₂Ph), 4.72 (d, 1H, J = 10.9 Hz, CH₂Ph), 4.41 (d, 1H, J_{4,5} = 3.8 Hz, H-5), 4.30

(dd, 1H, H-3), 4.25 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.9$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 10.2$ Hz, H-6'a), 4.01 (dd, 1H, H-3'), 3.97-3.91 (m, 2H, H-4 y $CH(CH_3)_2$), 3.85 (ddd, 1H, H-5'), 3.77 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.67-3.62 (m, 2H, H-4', y H-6'b), 3.35 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2'), 1.24 (s; 9H, $OCOC(CH_3)_3$), 1.18-1.08 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $CH(CH_3)_2$).

MASAS FAB m/z 812 (MNa^+).

FAB alta resolución:

Calculado para $C_{42}H_{51}N_3O_{12}Na$: 812.337.

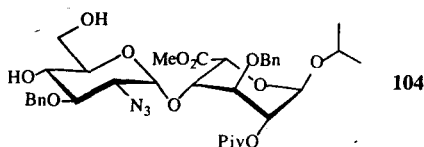
Encontrado: 812.341 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $C_{42}H_{51}N_3O_{12}$: C, 63.86; H, 6.51; N, 5.32.

Encontrado: C, 63.35; H, 6.82; N, 5.26.

***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 (**104**).**



A una disolución de **103** (423 mg, 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se añadió, a temperatura ambiente, EtSH (198 μ L, 2.68 mmol) y una cantidad catalítica de pTsOH. Después de agitar bajo atmósfera de argón durante 3 h., la reacción se neutralizó con disolución saturada de $NaHCO_3$, se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con H_2O (100 mL). La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a sequedad. El bruto de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (1:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **104** (338 mg, 90%).

$[\alpha]_D^{20} -6.6^\circ$ (c 0.58, $CHCl_3$).

CCF (2:1 hexano-AcOEt) R_f 0.14.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.24 (m, 10H, Ph), 5.18 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, H-1), 5.05 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 4.93 (dd, 1H, H-2), 4.89 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, CH_2Ph), 4.79-4.69 (m, 4H, CH_2Ph y H-5), 4.15 (dd, 1H, H-4), 3.97-3.91 (m, 2H, H-3 y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.80-3.55 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6'a y H-6'b), 3.75 (s, 3H, COOCH_3), 3.17 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.1$ Hz, H-2'), 1.22 (s, 9H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.19-1.15 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 724 (MNa^+).

FAB alta resolución:

Calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Na}$: 724.3057.

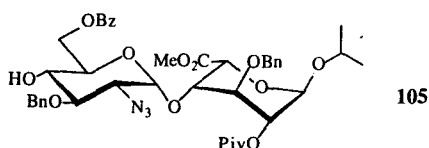
Encontrado: 724.3071 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{12} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$: C, 59.14; H, 6.81; N, 5.91.

Encontrado: C, 59.17; H, 6.91; N, 5.70.

***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 metilo (**105**).**



A una disolución de **104** (205 mg, 0.29 mmol) a -40°C en CH_3CN seco (2 mL) se le añadió BzCN (42 mg, 0.32 mmol) y una cantidad catalítica de Et_3N (gotas). Después de 1 h., se añadió MeOH y la mezcla se agitó durante 15 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en MeOH y se concentró a sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (4:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **105** (223 mg, 95%).

$[\alpha]_D^{20} +7.5^\circ$ (c 1, CHCl_3).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.24.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.01-7.23 (m, 15H, Ph), 5.19 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, H-1), 5.06 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 4.93 (dd, 1H, H-2), 4.85 (s, 2H, CH_2Ph), 4.79-4.76 (m, 3H, CH_2Ph , H-5 y H-6'a), 4.69 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, CH_2Ph), 4.40 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.4$ Hz, $J_{5',6'b} = 2.1$ Hz, H-6'b), 4.17 (dd, 1H, H-4), 3.97-3.92 (m, 3H, H-3, H-5' y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.78 (s, 3H, COOCH_3), 3.74 (dd, 1H, H-3'), 3.50 (ddd, 1H, H-4'), 3.20 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2'), 2.94 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 3.8$ Hz, OH), 1.22 (s, 9H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.20-1.15 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 828 (MNa^+).

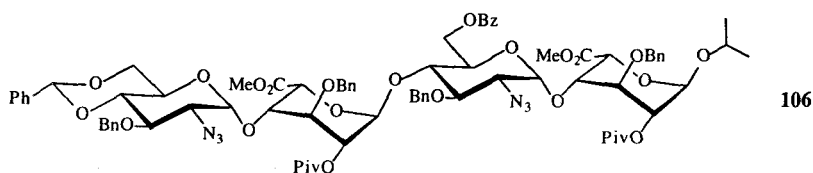
Análisis:

Calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{13} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$: C, 61.90; H, 6.43; N, 5.16.

Encontrado: C, 61.68; H, 6.44; N, 5.06.

5.6.2 Síntesis de derivados tetrasacarídicos relacionados.

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)-(isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-pivaloil- α -L-idopiranosid) uronato de metilo (**106**).



A una disolución de **105** (421 mg, 0.52 mmol) y **102** (606 mg, 0.68 mmol) a 0°C en CH_2Cl_2 seco (7 mL) se le añadió TMSOTf (140 μL de una disolución 0.11 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón. Después de 1h. 15min., se añadió disolución saturada de NaHCO_3 , se diluyó con CH_2Cl_2 (250 mL) y se lavó con H_2O (100 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a

presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica (4:1 hexano-AcOEt y 9:1 tolueno-AcOEt), obteniéndose **106** (633 mg, 79%) y aceptor de partida sin reaccionar (80 mg, 19%).

$[\alpha]_D^{20}$ -0.8° (c 1.55, CHCl_3).

CCF (4:1 hexano-AcOEt) R_f 0.19.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.05-7.14 (m, 30H, Ph), 5.51 (s, 1H, PhCHO), 5.40 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1c), 5.22 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.8$ Hz, H-1a), 5.03 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1b), 5.00 (dd, 1H, H-2c), 4.97 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1d), 4.94-4.90 (m, 2H, H-2a, CH_2Ph), 4.84 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.79-4.63 (m, 8H, H-5a, H-6b, CH_2Ph), 4.59 (d, 1H, $J_{4,5} = 4.7$ Hz, H-5c), 4.46 (dd, 1H, H-6'b), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6} = 4.7$ Hz, $J_{6,6'} = 10.0$ Hz, H-6d), 4.14 (dd, 1H, H-4a), 4.06-4.02 (m, 3H, H-4b, H-4c, H-5b ó d), 3.97-3.92 (m, 3H, H-3a, H-3c, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.86-3.81 (m, 2H, H-3b ó d, H-5b ó d), 3.75 (m, 1H, H-3b ó d), 3.66-3.62 (m, 2H, H-4d, H-6'd), 3.77 y 3.34 (2s, 6H, COOCH_3 a y c), 3.34-3.28 (m, 2H, H-2 b y d), 1.24-1.14 (m, 24H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 177.29, 177.22, 170.21, 169.16 y 165.98 (C=O), 137.71-126.07 (Ph), 101.50 (PhCHO), 99.43 (C-1d), 97.90 (C-1b), 97.70 (C-1c), 97.20 (C-1a), 82.44, 78.27, 76.48, 76.28, 75.86, 75.32, 74.85, 74.80, 73.94, 73.89, 73.24, 71.26, 70.94, 70.88, 70.78, 70.40, 69.95, 68.49 (C-6d), 63.31, 63.06, 62.86, 62.25, 52.25 y 51.75 (COOCH_3), 38.83, 38.17, 27.19 y 27.13 ($\text{OCO}(\text{CH}_3)_3$), 23.35 y 21.79 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

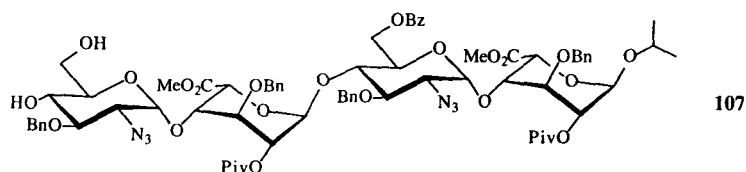
MALDI-TOF m/z 1557 (MNa^+); m/z 1573 (MK^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{81}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{O}_{24}$:	C, 63.35; H, 6.17; N, 5.47.
Encontrado:	C, 63.55; H, 6.35; N, 5.20.

***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 metilo (**107**).**



A una disolución de **106** (646 mg, 0.42 mmol) a 0°C en CH₂Cl₂ seco (7 mL) se añadió EtSH (156 μ L, 2.10 mmol) y una cantidad catalítica de pTsOH. Después de agitar bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 3 h., la reacción se neutralizó con disolución saturada de NaHCO₃, se diluyó con CH₂Cl₂ (200 mL), se lavó con H₂O (100 mL) y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El producto se purificó por medio de una columna de gel de sílice (1:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **107** (454 mg, 75%).

$[\alpha]_D^{20}$ +2.6° (c 0.83, CHCl₃).

CCF (1:1 hexano-AcOEt) R_f 0.53.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 8.04-7.22 (m, 25H, Ph), 5.41 (d, 1H, J_{1,2} = 5.7 Hz, H-1c), 5.24 (d, 1H, J_{1,2} = 5.0 Hz, H-1a), 5.03 (m, 2H, H-1 b, H-2c), 4.98 (d, 1H, J_{1,2} = 3.7 Hz, H-1d), 4.95 (d, 1H, J = 10.1 Hz, CH₂Ph), 4.91 (dd, 1H, H-2a), 4.82-4.65 (m, 9H, CH₂Ph, H-6b y H-5a), 4.62 (d, 1H, J_{4,5} = 5.0 Hz, H-5c), 4.46 (dd, 1H, J_{5,6} = 3.1 Hz, J_{6,6'} = 12.0 Hz, H-6'b), 4.16 (dd, 1H, H-4a), 4.09-4.07 (m, 3H, H-4b, H-4d, H-4c), 3.98-3.93 (m, 3H, H-3a, H-3c, CH(CH₃)₂), 3.78-3.69 (m, 4H, H-5b, H-5d, H-3b, H-6d), 3.60-3.54 (m, 2H, H-3d, H-6'd), 3.77 y 3.39 (2s, 6H, COOCH₃ a y c), 3.32 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.3 Hz, J_{1,2} = 3.6 Hz, H-2b), 3.19 (dd, 1H, J_{2,3} = 9.8Hz, J_{1,2} = 3.6 Hz, H-2d), 2.44 (d, 1H, OH-4), 1.94 (dd, 1H, OH-6), 1.20-1.14 (m, 24H, OCOC(CH₃)₃ y CH(CH₃)₂).

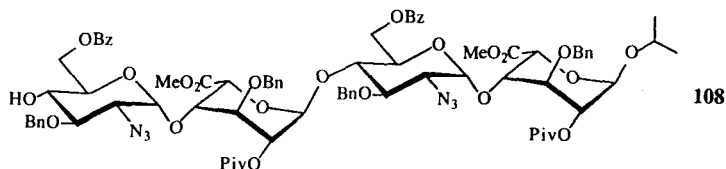
MALDI-TOF *m/z* 1469 (MNa⁺); *m/z* 1485 (MK⁺).

Análisis:

Calculado para $C_{74}H_{90}N_6O_{24}$: C, 61.40; H, 6.27; N, 5.81.

Encontrado: C, 61.25; H, 6.39; N, 5.56.

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 metilo (**108**).



A una disolución de **107** (441 mg, 0.31 mmol) a -40°C en CH_3CN seco (5 mL) se añadió BzCN (44 mg, 0.34 mmol) y una cantidad catalítica de Et_3N (gotas). Después de 30 min., la reacción se paró por adición de MeOH y la mezcla se dejó evolucionar hasta temperatura ambiente, agitando durante 15 min. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en MeOH y se concentró a sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (4:1 hexano- AcOEt), obteniéndose **108** (441 mg, 93%).

$[\alpha]_D^{20} +14.3^{\circ}$ (c 0.58, CHCl_3).

CCF (2:1 hexano- AcOEt) R_f 0.38.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.05-7.23 (m, 30H, Ph), 5.39 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz, H-1c), 5.23 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz, H-1a), 5.04 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1b), 5.02 (dd, 1H, H-2c), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1d), 4.94 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, CH_2Ph), 4.91 (dd, 1H, H-2a), 4.81-4.65 (m, 10H, CH_2Ph , H-6b, H-6d y H-5a), 4.61 (d, 1H, $J_{4,5} = 4.7$ Hz, H-5c), 4.47 (d ancho, 1H, $J_{6,6'} = 12.0$ Hz, H-6' b ó d), 4.29 (d ancho, 1H, $J_{6,6'} = 12.0$ Hz, H-6' b ó d), 4.16 (dd, 1H, H-4a), 4.10-4.07 (m, 3H, H-4c, H-5b, H-4b), 3.97-3.92 (m, 3H, H-3a y c, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.84 (m, 1H, H-5d), 3.77 (m, 4H, COOCH_3 , H-3b), 3.64 (dd, 1H, H-3d), 3.49 (ddd, 1H, H-4d),

3.43 (s, 3H, COOCH₃ a ó c), 3.32 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.5 Hz, H-2b), 3.20 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.5 Hz, H-2d), 3.03 (d, 1H, J_{4,OH} = 4.0 Hz, OH), 1.20-1.15 (m, 24H, OCOC(CH₃)₃ y CH(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 177.26, 177.24, 170.23, 169.30, 167.34 y 166.14 (C=O), 137.76-126.81 (Ph), 98.82 (C-1d), 97.83 (C-1b), 97.73 (C-1c), 97.19 (C-1a), 79.02, 78.08, 76.34, 76.29, 75.24, 74.99, 74.33, 73.81, 73.63, 73.30, 71.35, 71.28, 71.13, 71.04, 70.97, 70.53, 70.48, 69.93, 63.01- 62.54 (C-2b, C-2d, C-6b, C-6d), 52.24 y 51.86 (COOCH₃), 38.83, 27.19 y 27.13 (OCO(CH₃)₃), 23.36 y 21.80 (CH(CH₃)₂).

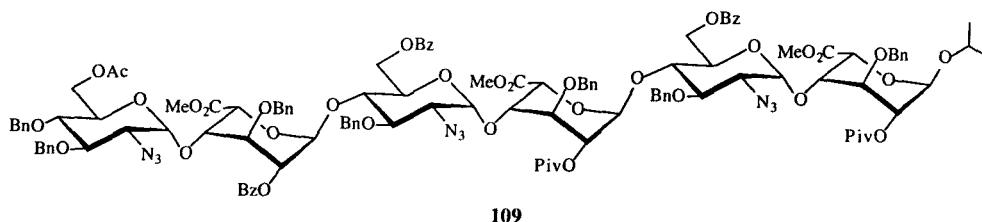
MALDI-TOF *m/z* 1573 (MNa⁺); *m/z* 1589 (MK⁺).

Análisis:

Calculado para C ₈₁ H ₉₄ N ₆ O ₂₅ ·H ₂ O:	C, 61.98; H, 6.16; N, 5.35.
Encontrado:	C, 61.74; H, 6.31; N, 5.13.

5.6.3 Síntesis de derivados hexasacarídicos relacionados.

***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-idopiranosiluronato 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*-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 metilo (109).**



A una disolución de **108** (70 mg, 45.1 μ mol) y **90** (56 mg, 58.7 μ mol) en CH₂Cl₂ seco (0.5 mL) se le añadió TMSOTf (50 μ L de una disolución 0.035 M en

CH₂Cl₂ seco) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argon. Después de 30 min., se añadió disolución saturada de NaHCO₃, se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL) y se lavó con H₂O (25 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna cromatográfica (8:1 tolueno-AcOEt), obteniéndose **109** (62 mg, 58%) y aceptor de partida sin reaccionar (25 mg, 36%).

$[\alpha]_D^{20} +13.5^\circ$ (c 1, CHCl₃).

CCF (8:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.19.

¹H-RMN (500MHz, CDCl₃) δ 8.05-7.18 (m, 50H, Ph), 5.56 (d, 1H, J_{1,2} = 4.4 Hz, H-1e), 5.41 (d, 1H, J_{1,2} = 5.8 Hz, H-1c), 5.24 (d, 1H, J_{1,2} = 5.0 Hz, H-1a), 5.15 (dd, 1H, H-2e), 5.04 (d, 1H, J_{1,2} = 3.5 Hz H-1b), 5.00 (dd, 1H, H-2c), 4.95 (d, 1H, J_{1,2} = 3.5 Hz H-1d), 4.92-4.88 (m, 4H, H-1f, CH₂Ph y H-2a), 4.79-4.47 (m, 15H, CH₂Ph, H-5a, H-5e, H-6b, H-6'b, H-6d), 4.44 (d, 1H, J = 5.2 Hz, H-5c), 4.35-4.33 (m, 2H, H-6'd, CH₂Ph), 4.28-4.23 (m, 2H, H-6f, CH₂Ph), 4.17-4.12 (m, 3H, H-3e, H-4a, H-6'f), 4.04-3.85 (m, 10H, H-3a, H-3c, H-4c, H-4e, H-4b, H-4d, H-5b, H-5d, H-5f y CH(CH₃)₂), 3.76-3.73 (m, 4H, H-3b y COOCH₃), 3.63 (dd, 1H, H-3d), 3.56 (dd, 1H, H-3f), 3.47-3.44 (m, 4H, H-4f y COOCH₃), 3.32-3.28 (m, 5H, H-2b, H-2d y COOCH₃), 3.19 (dd, 1H, J_{1,2} = 3.4 Hz, J_{2,3} = 10.2 Hz, H-2f), 1.95 (s, 3H, OCOCH₃), 1.20-1.16 (m, 24H, OCOC(CH₃)₃ y CH(CH₃)₂). (La asignación completa de los protones de la zona de azúcar aparece en la **tabla 12**).

TABLA 12 ^1H -RMN de 109, 500 MHz, CDCl_3 . δ en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
A	5.24	4.91	3.91	4.14	4.72	
B	5.04	3.30	3.74	4.03	4.03	4.65 y 4.47
C	5.41	4.99	3.90	3.98	4.44	
D	4.95	3.30	3.63	4.02	3.86	4.56 y 4.36
E	5.56	5.15	4.12	4.02	4.66	
F	4.89	3.19	3.55	3.45	3.87	4.25 y 4.16

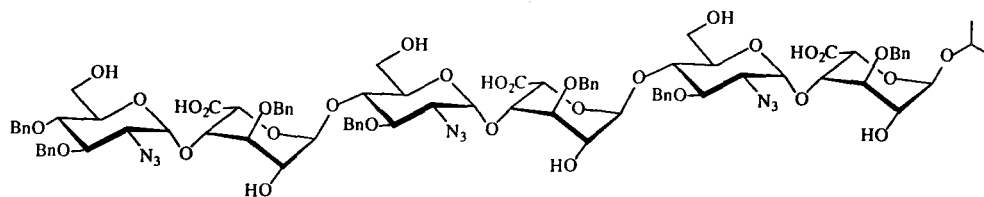
^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 177.23, 177.12, 170.43, 170.24, 169.24, 169.14, 165.97, 165.92 y 165.15 (C=O), 137.75-127.22 (Ph), 99.00 (C-1f), 98.29 (C-1e), 98.03 (C-1d), 97.80 (C-1b), 97.49 (C-1c), 97.18 (C-1a), 80.02, 78.41, 77.96, 77.40, 76.43, 76.19, 75.50, 75.33, 75.26, 75.15, 75.12, 74.96, 74.75, 74.06, 73.86, 73.84, 73.73, 73.32, 71.40, 71.28, 71.23, 71.09, 70.82, 70.63, 70.29, 70.04, 69.95, 63.52-62.03 (C-2b, C-2d, C-2f, C-6b, C-6d, C-6f), 52.23, 51.88 y 51.62 (COOCH_3), 27.19 y 27.07 ($\text{OCO}(\text{CH}_3)_3$), 23.34 y 21.80 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 20.76 (OCOCH_3).

MASAS FAB m/z 2368 (MNa^+).

Análisis:

Calculado para $\text{C}_{124}\text{H}_{137}\text{N}_9\text{O}_{37}$: C, 63.50; H, 5.89; N, 5.37.
 Encontrado: C, 63.42; H, 6.19; N, 5.08.

***O*-(2-Azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosid) urónico (110).**



110

A una disolución de **109** (35 mg, 14.9 μ mol) en CH_2Cl_2 (0.6 mL), MeOH (3.3 mL) y H_2O (0.3 mL) se le añadió disolución 2N de KOH (0.7 mL). Después de agitar durante 24h, la mezcla se acidificó hasta pH 2-3 con disolución 2N de HCl y luego se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y H_2O (15 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 10 mL) y las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. El residuo resultante se eluyó a través de una columna de Sephadex LH-20 (1:1 MeOH- CH_2Cl_2), obteniéndose **110** (20 mg, 74%).

CCF (8:1 CH_2Cl_2 -MeOH) R_f 0.34.

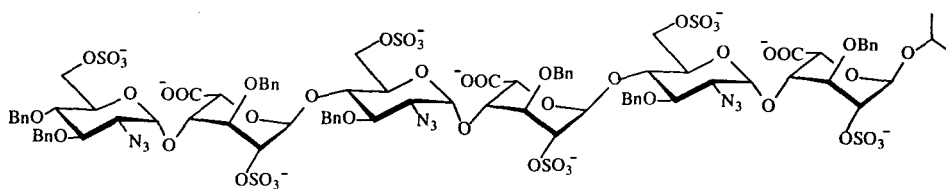
^1H -RMN (500MHz, CD_3COCD_3) δ 7.47-7.17 (m, 35H, Ph), 5.35-5.07 (m, 6H, H-1 a, b, c, d, e y f), 1.22-1.18 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MALDI-TOF:

Calculado:	MNa^+ : 1803.8; MK^+ : 1819.9.
Encontrado:	MNa^+ : 1802.7; MK^+ : 1818.5.

***O*-(2-Azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-**

desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosid) urónico (111 como sal nonasódica).



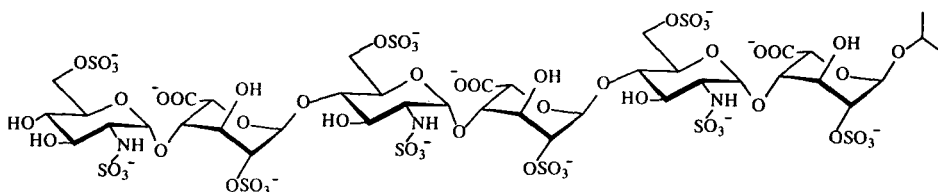
111

Una disolución de **110** (20 mg, 11.2 μ mol) en DMF seca (1.5 mL) se agitó a 55°C bajo atmósfera de argón en presencia del complejo trióxido de azufre-trimetilamina (47 mg, 5 equivalentes por cada grupo hidroxilo). (Este complejo de azufre se había tratado previamente con H₂O, EtOH y CH₂Cl₂ y se había secado a vacío). Después de 2 días la mezcla se enfrió, se añadió MeOH (1 mL) y CH₂Cl₂ (1 mL) y la disolución se eluyó a través de una columna de Sephadex LH-20 (1:1 MeOH-CH₂Cl₂). Las fracciones que contenían al hexasacárido se reunieron y se concentraron a sequedad. El producto se convirtió en la correspondiente sal sódica utilizando una columna de Dowex 50WX4-Na⁺ (2:1 MeOH-H₂O), para dar **111** (20 mg, 71%).

CCF (8:5:3:1 AcOEt-Py-H₂O-AcOH) R_f 0.33.

¹H-RMN (500MHz, D₂O) δ 7.63–7.30 (m, 35H, Ph), 5.39, 5.38, 5.34 (m, 3H, H-1 a, c y e), 5.21, 5.18, 5.04 (m, 3H, H-1 b, d, f), 3.56-3.48 (m, 3H, H-2 b, d, f), 1.33-1.32 (2d, 6H, J = 6.2 Hz, CH(CH₃)₂).

***O*-(2-Desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosid) urónico (I como sal dodecasódica).**



I

Una disolución de **111** (22 mg, 8.9 μmol) en una mezcla 9:1 MeOH-H₂O (1.5 mL) se hidrogenó en presencia de catalizador de Pd/C al 10%. Después de 24 h., la suspensión se filtró a través de celita y se concentró para dar el correspondiente producto hidrogenado, que fue homogéneo en CCF usando 4:5:3:1 AcOEt-Py-H₂O-AcOH como eluyente (R_f 0.21). No se detectaron señales aromáticas en RMN por lo que este compuesto se usó directamente en la siguiente etapa de *N*-sulfatación.

El producto hidrogenado se disolvió en H₂O (1mL) y el pH de la disolución se ajustó a 9.5 por adición de disolución 1N de NaOH. A esta disolución se le añadió complejo de trióxido de azufre-piridina (21 mg, 5 equivalentes por cada grupo amino) en 4 porciones durante 1 h., manteniendo el pH constante a 9.5 por sucesivas adiciones de disolución 0.1N de NaOH. A continuación, se añadieron una segunda, tercera y cuarta carga del complejo de azufre después de agitar durante 2, 4 y 6 horas respectivamente. Después de 24 h., la reacción se neutralizó con disolución 0.1 N de HCl hasta pH 7 y se concentró a sequedad. El residuo se eluyó a través de una columna de Sephadex G-25 (35 x 2.5 cm) con disolución 0.9% de NaCl como eluyente. Las fracciones que contenían al hexasacárido se reunieron y se pasaron a través de una columna de Dowex 50WX4-Na⁺ (9 x 1.2 cm) con disolución 0.5 M de NaCl como eluyente y una columna de Sephadex G-25 (75 x 1.7 cm) con 9:1 H₂O-EtOH. Las fracciones adecuadas se liofilizaron para dar **I** (15.6 mg, 87%) como un sólido blanco.

CCF (2:5:3:1 AcOEt-Py-H₂O-AcOH) R_f 0.43.

$[\alpha]_D^{20} +22.7^\circ$ (c 0.67, H₂O); $[\alpha]_{Hg}^{20}$ (546 nm) $+26.7^\circ$ (c 0.67, H₂O).

^1H -RMN (500MHz, D_2O , 10°C) δ (La asignación completa de los protones de azúcar aparece en la tabla 7a) 3.98 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.15 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

TABLA 7a ^1H -RMN de I, 500 MHz, D_2O a 10°C . δ en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.22	4.14	4.16	4.00	4.50	
B	5.30	3.23	3.66	3.75	3.96	4.38 y 4.21
C	5.24	4.30	4.17	4.05	4.82	
D	5.37	3.23	3.62	3.74	3.99	4.39 y 4.22
E	5.18	4.29	4.16	4.06	4.79	
F	5.40	3.19	3.59	3.52	3.95	4.32 y 4.17

^{13}C -RMN (125 MHz, D_2O , 27°C) δ (La asignación completa de los carbonos de azúcar aparece en la tabla 7d) 72.03 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

TABLA 7d ^{13}C -RMN de I, 125 MHz, D_2O a 27°C . δ en ppm.

UNIDAD	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A	97.70	76.69	69.58	76.49	68.98	
B	97.39	58.62	70.23	76.44	69.78	66.93
C	99.57	76.44	69.58	76.39	70.03	
D	97.31	58.62	70.23	76.44	69.78	66.93
E	99.65	76.44	69.58	76.39	70.03	
F	97.15	58.62	71.53	69.98	70.58	67.08

MALDITOF:

Calculado $[\text{M}(\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{O}_{58}\text{N}_3\text{S}_9) + (\text{Arg-Gly})_{10} + \text{H}]^+$: 3943.0.

Encontrado: 3943.9 y 3863.9 (pérdida de 1 grupo sulfato).

También se asignaron los espectros de ^1H -RMN correspondientes al hexasacárido I con 4 y 12 equivalentes de Ca^{2+} :

^1H -RMN (500MHz, D_2O , 25°C) 4 equivalentes de Ca^{2+} añadidos δ (La asignación completa de los protones de azúcar aparece en la tabla 7b) 4.03 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.20 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

TABLA 7b ^1H -RMN de I + 4 equiv. Ca^{2+} , 500 MHz, D_2O a 25°C . δ en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.32	4.20	4.20	4.04	4.58	
B	5.30	3.28	3.79	3.85	4.03	4.37 y 4.26
C	5.44	4.39	4.27	4.09	4.94	
D	5.34	3.30	3.74	3.84	4.07	4.40 y 4.27
E	5.34	4.35	4.24	4.11	4.87	
F	5.41	3.26	3.65	3.58	3.99	4.35 y 4.22

^1H -RMN (500MHz, D_2O , 25°C) 12 equivalentes de Ca^{2+} añadidos δ (La asignación completa de los protones de azúcar aparece en la tabla 7c) 4.02 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.18 (2d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

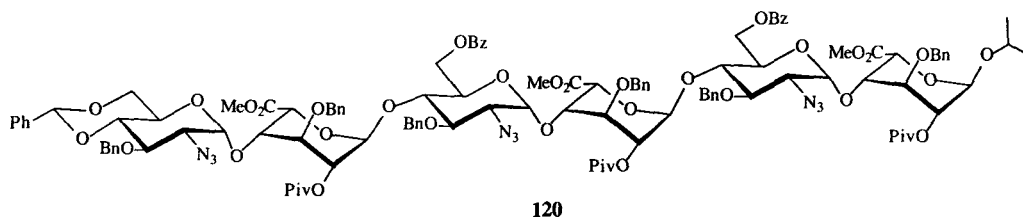
TABLA 7c ^1H -RMN de I + 12 equiv. Ca^{2+} , 500 MHz, D_2O , 25°C . δ en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.34	4.20	4.20	4.03	4.59	
B	5.28	3.26	3.79	3.84	4.02	4.35 y 4.27
C	5.44	4.38	4.27	4.08	4.94	
D	5.33	3.28	3.74	3.84	4.06	4.39 y 4.28
E	5.35	4.35	4.24	4.10	4.88	
F	5.39	3.25	3.64	3.58	3.98	4.33 y 4.21

5.7 Ruta de síntesis del octasacárido II.

5.7.1 Síntesis de derivados hexasacáridos relacionados.

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)-*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 metilo (**120**).



A una disolución de **108** (82 mg, 52.8 μ mol) y **102** (57 mg, 63.9 μ mol) en CH_2Cl_2 seco (700 μ L) se añadió TMSOTf (50 μ L de una disolución 0.04 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente. Después de 2h, se adicionó disolución saturada de NaHCO_3 , se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con H_2O (75 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna cromatográfica (8:1 tolueno-AcOEt), obteniéndose **120** (62 mg, 52%) y aceptor de partida sin reaccionar (33 mg, 40%).

$[\alpha]_D^{20} +3.4^\circ$ (*c* 1.33, CHCl_3).

CCF (8:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.30.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 8.05-7.21 (m, 45H, Ph), 5.50 (s, 1H, PhCHO), 5.49 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.1$ Hz, H-1e), 5.42 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.4$ Hz, H-1c), 5.25 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz, H-1a), 5.05-5.02 (m, 2H, H-2e, H-1b), 5.00-4.97 (m, 3H, H-2c, H-1d,

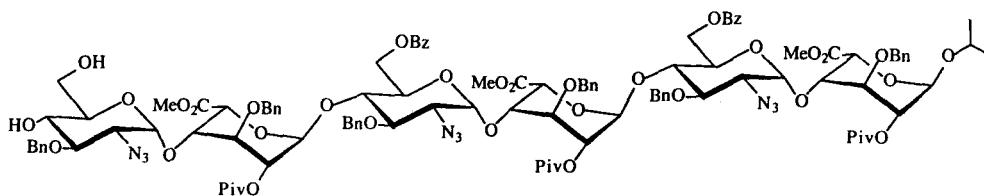
H-1f), 4.95-4.90 (m, 2H, H-2a, CH₂Ph), 4.84-4.60 (m, 14H, CH₂Ph, H-6b, H-6d, H-5a), 4.54 (d, 1H, J = 4.9 Hz, H-5c ó e), 4.50-4.47 (m, 2H, H-6'b ó d, H-5c ó e), 4.39 (dd, 1H, H-6b ó d), 4.18-4.14 (m, 2H, H-4a, H-6f), 4.09-3.74 (m, 13H, H-3a, H-3c, H-3e, H-4c, H-4e, H-4b, H-4d, H-5b, H-5d, H-5f, H-3b, d, ó f (2H) y CH(CH₃)₂), 3.67-3.57 (m, 3H, H-3b, d ó f (1H), H-4f, H-6'f), 3.77, 3.38 y 3.30 (3s, 9H, COOCH₃), 3.34-3.28 (m, 3H, H-2b, H-2d, H-2f), 1.20-1.14 (m, 33H, OCOC(CH₃)₃ y CH(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 177.27, 177.22, 177.12, 170.30, 169.54, 169.19, 166.01, 165.92, (C=O), 137.76-126.07 (Ph), 101.49 (PhCHO), 99.46 (C-1f), 98.13 (C-1d), 97.83 (C-1b), 97.53 (C-1c), 97.45 (C-1e), 97.20 (C-1a), 82.43, 78.33, 77.93, 76.64, 76.49, 75.83, 75.45, 75.18, 74.83, 74.79, 74.46, 74.06, 73.74, 73.39, 71.69, 71.64, 71.32, 71.24, 71.09, 71.03, 70.66, 69.99, 69.95, 68.49, 63.33, 63.02, 62.89, 62.83, 62.33, 61.82, 52.30, 51.88 y 51.72 (COOCH₃), 27.22, 27.19 y 27.14 (OCO(CH₃)₃), 23.38 y 21.83 (CH(CH₃)₂).

MALDI-TOF *m/z* 2303 (MNa⁺); *m/z* 2319 (MK⁺).

MASAS FAB *m/z* 2303 (MNa⁺).

***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)-*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 metilo (121).**



121

A una disolución de **120** (132 mg, 57.9 μmol) a 0°C en CH_2Cl_2 seco (1.5 mL) se añadió EtSH (21 μL , 0.29 mmol) y una cantidad catalítica de pTsOH. Después de agitar bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 4 h., la reacción se neutralizó con disolución saturada de NaHCO_3 , se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con H_2O (50 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 25 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (1:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **121** (100 mg, 79%).

$[\alpha]_D^{20} +8.8^\circ$ (c 1, CHCl_3).

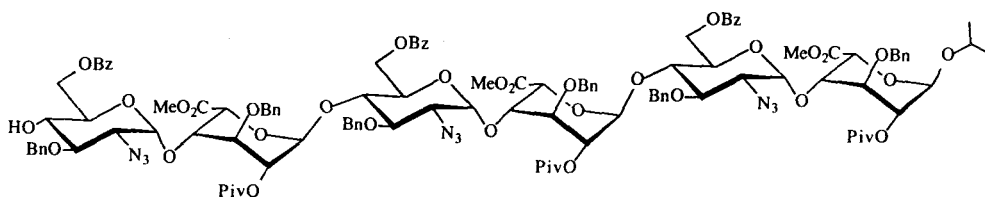
CCF (1:1 hexano-AcOEt) R_f 0.33.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 8.07-7.23 (m, 40H, Ph), 5.51 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-1e), 5.44 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.8$ Hz, H-1c), 5.26 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1a), 5.06-5.01 (m, 4H, H-2c, H-2e, H-1b, H-1d), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1f), 4.97-4.92 (m, 2H, H-2a, CH_2Ph), 4.88-4.66 (m, 13H, CH_2Ph , H-6b, H-6d, H-5a), 4.60 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H-5c ó e), 4.53 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, H-5c ó e), 4.49 (dd, 1H, H-6b ó d), 4.41 (dd, 1H, H-6b ó d), 4.16 (dd, 1H, H-4a), 4.12-4.05 (m, 6H, H-5b ó d, H-4b, H-4d, H-4f, H-4c, H-4e), 3.99-3.93 (m, 5H, H-5 b ó d, H-3a, H-3c, H-3e, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.77 (m, 1H, H-3 b ó d), 3.70-3.56 (m, 5H, H-3b ó d, H-3f, H-5f, H-6f, H-6'f), 3.78, 3.40 y 3.35 (3s, 9H, COOCH_3), 3.35-3.32 (m, 2H, H-2b, H-2d), 3.17 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2f), 1.21-1.16 (m, 33H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 177.27, 177.21, 177.13, 170.28, 169.52, 169.49, 166.11, 166.02, (C=O), 137.85-127.18 (Ph), 98.77 (C-1f), 97.98 (C-1d), 97.82 (C-1b), 97.52 (C-1c), 97.47 (C-1e), 97.20 (C-1a), 79.61, 78.14, 77.89, 76.66, 76.57, 76.52, 75.46, 75.39, 75.23, 74.88, 74.66, 74.18, 74.02, 73.87, 73.83, 73.74, 73.38, 72.42, 71.70, 71.67, 71.59, 71.37, 71.33, 71.17, 70.92, 70.71, 70.01, 69.987, 62.97, 62.90, 62.36, 62.12, 61.97, 52.27, 51.88 y 51.77 (COOCH_3), 27.21, 27.19 y 27.13 ($\text{OCO}(\text{CH}_3)_3$), 23.36 y 21.82 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MASAS FAB m/z 2216 (MNa^+).

***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)-*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 metilo (122).**



122

A una disolución de **121** (92 mg, 41.9 μ mol) a -40°C en CH_3CN seco (1.5 mL) se añadió BzCN (100 μL de una disolución 0.46 M en CH_3CN seco) y una cantidad catalítica de Et_3N (gotas). Después de 30 min., se adicionó MeOH y la mezcla se agitó durante 15 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en MeOH y se concentró a sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (2:1 hexano- AcOEt), obteniéndose **122** (86 mg, 90%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +15.8^{\circ}$ (c 1, CHCl_3).

CCF (2:1 hexano- AcOEt) R_f 0.52.

$^1\text{H-RMN}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.07-7.23 (m, 45H, Ph), 5.51 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-1e), 5.42 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.6$ Hz, H-1c), 5.26 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.9$ Hz, H-1a), 5.06-5.01 (m, 5H, H-2c, H-2e, H-1b, H-1d, H-1f), 4.96-4.91 (m, 2H, H-2a, CH_2Ph), 4.86-4.62 (m, 15H, CH_2Ph , H-6b, H-6d, H-6f, H-5a), 4.56 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz, H-5 c ó e), 4.50 (m, 2H, H-5 c ó e, H-6b ó d), 4.41 (dd, 1H, H-6b ó d), 4.28 (dd, 1H, H-6f), 4.16 (dd, 1H, H-4a), 4.13-4.05 (m, 5H, H-5b ó d, H-4b, H-4d, H-4c, H-4e), 3.97-3.95 (m, 5H, H-5 b ó d, H-3a, H-3c, H-3e, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.84 (m, 1H,

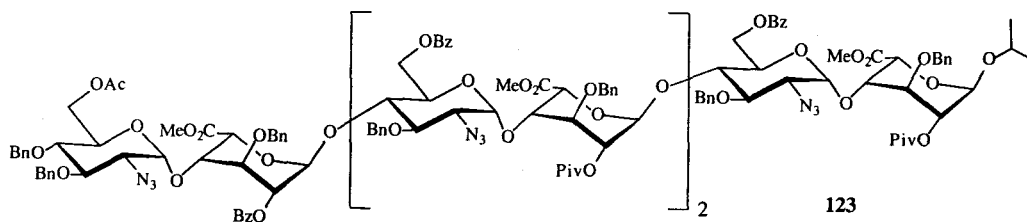
H-5f), 3.77 (m, 1H H-3 b ó d), 3.61 (m, 2H, H-3b ó d, H-3f), 3.50 (ddd, 1H, H-4f), 3.77 y 3.39 (3s, 9H, COOCH₃), 3.34 (m, 2H, H-2b, H-2d), 3.20 (dd, 1H, J_{1,2} = 3.6 Hz, J_{2,3} = 10.0 Hz, H-2f), 3.05 (d, 1H, J_{4,OH} = 4.0 Hz, OH), 1.25-1.15 (m, 33H, OCOC(CH₃)₃ y CH(CH₃)₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 177.27, 177.24, 177.12, 170.30, 169.53, 169.30, 167.36, 166.04, 166.01, (C=O), 137.75-127.17 (Ph), 98.76 (C-1f), 98.06 (C-1d), 97.82 (C-1b), 97.58 (C-1c), 97.45 (C-1e), 97.19 (C-1a), 78.99, 78.15, 77.89, 76.59, 76.50, 76.40, 75.41, 75.37, 75.25, 75.21, 74.59, 74.23, 74.05, 73.96, 73.79, 73.73, 73.39, 71.70, 71.67, 71.33, 71.18, 71.11, 70.67, 70.43, 69.97, 69.95, 63.01, 62.88, 62.84, 62.66, 62.33, 62.04, (C-2b, C-2d, C-2f, C-6b, C-6d, C-6f), 52.29, 51.87 y 51.81 (COOCH₃), 27.22, 27.19 y 27.14 (OCO(CH₃)₃), 23.37 y 21.82 (CH(CH₃)₂).

MASAS FAB *m/z* 2320 (MNa⁺).

5.7.2 Síntesis de derivados octasacáridicos relacionados.

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-idopiranosiluronato 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*-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)-*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 metilo (123).



A una disolución de **122** (86 mg, 37.4 μmol) y **90** (47 mg, 48.7 μmol) en CH_2Cl_2 seco (0.5 mL) se añadió TMSOTf (50 μL de una disolución 0.03 M en CH_2Cl_2 seco) bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente. Después de 2h., se adicionó disolución saturada de NaHCO_3 , se diluyó con CH_2Cl_2 (75 mL) y se lavó con H_2O (50 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por columna cromatográfica (8:1 tolueno-AcOEt y 3:1 hexano-AcOEt), obteniéndose **123** (70 mg, 60%) y aceptor de partida (28 mg, 33%).

$[\alpha]_D^{20} +14.5^\circ$ (c 1, CHCl_3).

CCF (8:1 tolueno-AcOEt) R_f 0.35.

^1H -RMN (500MHz, CDCl_3) δ 8.06-7.15 (m, 65H, Ph), 5.57-3.21 (protones de azúcar cuya asignación completa aparece en la **tabla 13**), 4.86-4.23 (m, 18H, CH_2Ph), 3.95 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.78, 3.44, 3.36, 3.23 (4s, 12H, COOCH_3), 1.95 (s, 3H, OCOCH_3), 1.21-1.14 (m, 33H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 177.27, 177.14, 177.11, 170.48, 170.30, 169.56, 169.27, 169.19, 166.01, 165.94 y 165.18 ($\text{C}=\text{O}$), 137.76-127.15 (Ph), 99.00 (C-1h), 98.27 (C-1g), 98.07 (C-1d y C-1f), 97.81 (C-1b), 97.41 y 97.34 (C-1c y C-1e), 97.20 (C-1a), 80.03, 78.41, 78.04, 77.88, 76.71, 76.51, 76.33, 75.87, 75.61, 75.44, 75.40, 75.35, 75.22, 75.02, 74.98, 74.71, 74.12, 73.98, 73.91, 73.71, 73.39, 71.83, 71.77, 71.65, 71.41, 71.32, 71.13, 70.95, 70.69, 70.41, 70.05, 69.97, 63.50-61.84 (C-2b, C-2d, C-2f, C-2h, C-6b, C-6d, C-6f, C-6h), 52.29, 51.91 y 51.58 (4 x COOCH_3), 27.22 y 27.14 (3 x $\text{OCO}(\text{CH}_3)_3$), 23.36 y 21.82 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 20.769 (OCOCH_3).

MALDI-TOF m/z 3112 (MNa^+); m/z 3128 (MK^+).

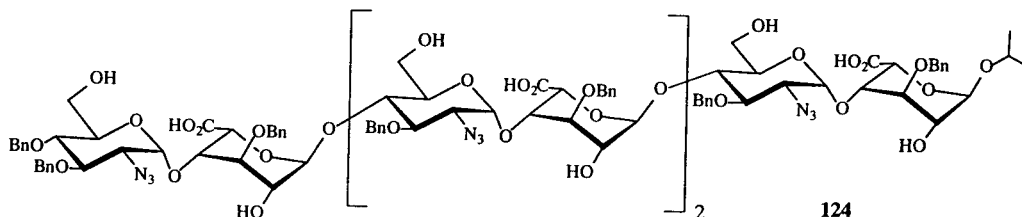
Análisis:

Calculado para $\text{C}_{163}\text{H}_{180}\text{N}_{12}\text{O}_{49}$:	C, 63.33; H, 5.87; N, 5.44.
Encontrado:	C, 63.12; H, 6.03; N, 5.33.

TABLA 13 1H -RMN de 123, 500 MHz, $CDCl_3$. Desplazamientos químicos en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
A	5.26 $J_{1,2}=5.1\text{Hz}$	4.93	3.96	4.17	4.73	
B	5.06	3.33	3.77	4.07	4.08	4.66 y 4.50
C	5.52 $J_{1,2}=6.3\text{Hz}$	5.05	3.95	4.05	4.48	
D	5.01	3.32	3.58	4.06	3.94	4.65 y 4.39
E	5.43 $J_{1,2}=6.1\text{Hz}$	4.98	3.91	3.97	4.39	
F	4.96	3.32	3.60	4.03	3.85	4.55 y 4.34
G	5.57 $J_{1,2}=4.7\text{Hz}$	5.17	4.14	4.04	4.65	
H	4.91	3.21 $J_{1,2}=3.5\text{Hz}$ $J_{2,3}=10.2\text{Hz}$	3.56	3.48	3.88	4.25 y 4.17

***O*-(2-Azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil 3-*O*-bencil- α -L-idopiranosid) urónico (124).**



A una disolución de **123** (60 mg, 19.4 μmol) en CH_2Cl_2 (1 mL), MeOH (4 mL) y H_2O (0.5 mL) se añadió disolución 2N de KOH (1.2 mL). Durante el tiempo de reacción fue necesario añadir más MeOH (4mL) para homogeneizar la disolución. Después de 48h, la mezcla se acidificó hasta pH 2-3 con disolución 2N de HCl y luego se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y H_2O (50 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 20 mL) y las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. El residuo resultante se purificó por medio de una columna de Sephadex LH-20 (1:1 MeOH- CH_2Cl_2), para dar **124** (30 mg, 67%).

CCF (6:1 CH_2Cl_2 -MeOH) R_f 0.56.

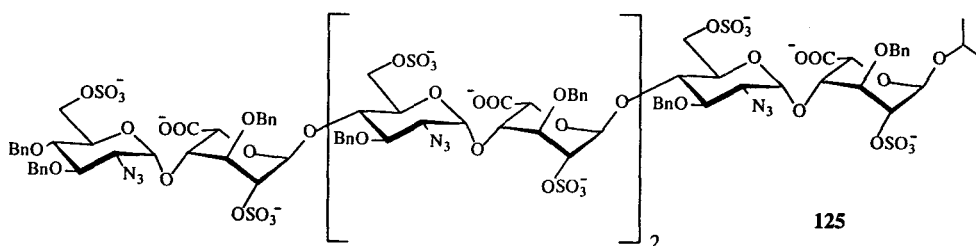
^1H -RMN (500MHz, CD_3OD) δ 7.38–7.18 (m, 45H, Ph), 5.29-5.02 (m, 8H, H-1a, b, c, d, e, f, g y h), 1.24-1.21 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MALDITOF:

Calculado: MNa^+ : 2347.4; MK^+ : 2363.5.

Encontrado: MNa^+ : 2346.0; MK^+ : 2365.5.

O-(2-azido-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-azido-3-*O*-bencil-2-desoxi-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil 3-*O*-bencil-2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosid) urónico (**125** como sal dodecasódica).

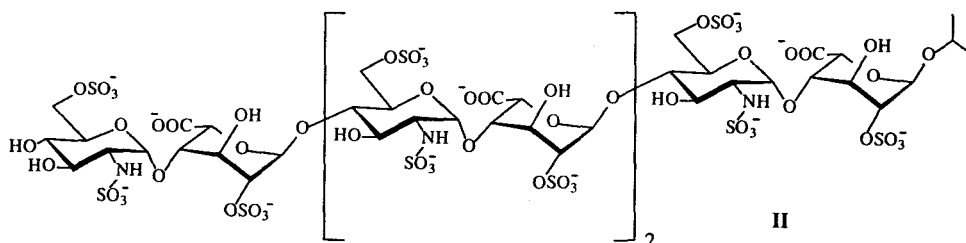


Una disolución de **124** (25 mg, 10.8 μmol) en DMF seca (1.5 mL) se agitó a 55°C bajo atmósfera de argón en presencia del complejo trióxido de azufre-trimetilamina (60 mg, 5 equivalentes por cada grupo hidroxilo). Después de 3 días, la mezcla se enfrió, se añadió MeOH (1 mL) y CH_2Cl_2 (1 mL) y la disolución se eluyó a través de una columna de Sephadex LH-20 (1:1 MeOH- CH_2Cl_2). Las fracciones que contenían al octasacárido se reunieron y se secaron a presión reducida. El producto se convirtió en la correspondiente sal sódica usando una columna Dowex 50WX4 Na^+ (2:1 MeOH- H_2O), para dar **125** como sólido blanco después de liofilizar (26 mg, 74%).

CCF (8:5:3:1 AcOEt-Py- H_2O -AcOH) R_f 0.37.

^1H -RMN (500MHz, D_2O) δ 7.60–7.26 (m, 45H, Ph), 5.36-5.30 (m, 4H, H-1a, c, e y g), 5.20-4.98 (m, 4H, H-1b, d, f y h), 3.51-3.48 (m, 4H, H-2b, d, f y h), 1.29-1.28 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

***O*-(2-desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(ácido 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosilurónico)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxi-2-sulfamido-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-ácido (isopropil 2-*O*-sulfo- α -L-idopiranosid) urónico (II como sal hexadecasódica).**



Una disolución de **125** (24 mg, 7.4 μmol) en una mezcla 9:1 MeOH- H_2O (1.5 mL) se hidrogenó en presencia de catalizador de Pd/C al 10%. Después de 36 h., la suspensión se filtró a través de celita y se concentró para dar el

correspondiente producto hidrogenado, que fue homogéneo en CCF usando 3:5:3:1 AcOEt-Py-H₂O-AcOH como eluyente (R_f 0.31). No se detectaron señales aromáticas en RMN por lo que este compuesto se usó directamente en la siguiente etapa de *N*-sulfatación.

El producto hidrogenado se disolvió en H₂O (1mL) y el pH de la disolución se ajustó a 9.5 por adición de disolución 1N de NaOH. A esta disolución se adicionó complejo de trióxido de azufre-piridina (24 mg, 5 equivalentes por cada grupo amino) en 3 porciones durante 1 h., manteniendo el pH constante a 9.5 por sucesivas adiciones de disolución 1N de NaOH. A continuación, se añadieron una segunda, tercera y cuarta carga del complejo de azufre después de agitar durante 2, 4 y 6 horas respectivamente. Después de 24 h., la reacción se neutralizó con disolución 0.1 N de HCl hasta pH 7.2 y se concentró a sequedad. El residuo se eluyó a través de una columna de Sephadex G-25 (35 x 2.5 cm) con disolución 0.9% de NaCl como eluyente. Las fracciones que contenían al octasacárido se reunieron y se pasaron a través de una columna de Dowex 50WX4 Na⁺ (9 x 1.2 cm) con disolución 0.5 M de NaCl como eluyente y una columna de Sephadex G-25 (75 x 1.7 cm) con 9:1 H₂O-EtOH. Las fracciones adecuadas se liofilizaron para dar **II** (12 mg, 60%) como un sólido blanco.

CCF (1:5:3:1 AcOEt-Py-H₂O-AcOH) R_f 0.40.

$[\alpha]_D^{20}$ +21.0° (c 0.67, H₂O).

¹H-RMN (500MHz, D₂O) δ 5.38 (m, 3H, H-1d, f, h), 5.33 (m, 1H, H-1b), 5.19 (m, 4H, H-1a, c, e, g), 4.79 (m, 3H, H-5c, e, g), 4.50 (m, 1H, H-5a), 4.40-4.20 (m, 6H, H-6b, d, f), 4.33 y 4.17 (m, 2H, H-6h), 4.30 (m, 3H, H-2c, e, g), 4.20-4.11 (m, 5H, H-2a, H-3a, c, e, g), 4.11-4.02 (m, 3H, H-4c, e, g), 4.05-3.93 (m, 3H, H-5b, d, f), 4.03 (m, 1H, H-4a), 3.99 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.96 (m, 1H, H-5h), 3.78-3.58 (m, 6H, H-3b, d, f, H-4b, d, f), 3.61 (m, 1H, H-3h), 3.53 (m, 1H, H-4h), 3.24 (m, 3H, H-2b, d, f), 3.20 (m, 1H, H-2h), 1.16 (m, 6H, CH(CH₃)₂). (La asignación de los protones de azúcar aparece también en la **tabla 14**).

MALDITOF:

Calculado para $[M(C_{51}H_{84}O_{77}N_4S_{12})+(Arg-Gly)_{15}+H]^+$: 5586.7.

Encontrado: 5587.2.

TABLA 14 1H -RMN de II, 500 MHz, D_2O , 25°C. Desplazamientos químicos en ppm.

UNIDAD	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (R y S)
A	5.19	4.20-4.11	4.20-4.11	4.03	4.50	
B	5.33	3.24	3.78-3.58	3.78-3.58	4.05-3.93	4.40-4.20
C	5.19	4.30	4.20-4.11	4.11-4.02	4.79	
D	5.38	3.24	3.78-3.58	3.78-3.58	4.05-3.93	4.40-4.20
E	5.19	4.30	4.20-4.11	4.11-4.02	4.79	
F	5.38	3.24	3.78-3.58	3.78-3.58	4.05-3.93	4.40-4.20
G	5.19	4.30	4.20-4.11	4.11-4.02	4.79	
H	5.38	3.20	3.61	3.53	3.96	4.33 y 4.17

5.8 Análisis estructural de I

5.8.1 Experimentos de RMN

Los espectros de RMN del hexasacárido final I fueron adquiridos en los espectrómetros Bruker DRX-500 y DRX-400. Para los espectros se utilizaron disoluciones de I en D₂O del 99.9% de pureza cuya concentración osciló entre 2 y 5mM. Las muestras de I que se emplearon en los experimentos de RMN, se eluyeron previamente a través de una columna Dowex 50WX4-Na⁺ (9 x 1.2 cm) con una disolución 9:1 H₂O-EtOH, y las fracciones adecuadas se liofilizaron con D₂O (3 x 0.5 mL). En todos los casos, el pH final de las muestras se mantuvo entre 7 y 7.5, excepto en los experimentos donde se estudió la variación de las señales con el pH. Para las variaciones de pH y fuerza iónica de las muestras de RMN se emplearon disoluciones de NaOD, CID y NaCl de concentración variable (5-0.1% p/p). Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm, tomando como referencia la señal residual del disolvente o la del DSS (ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico), que se añadió como referencia interna en una concentración de 0.5% p/p. La mayoría de los espectros se registraron a 25°C, aunque la asignación de la sal sódica de I se llevó a cabo a 10°C.

Espectroscopía bidimensional

Todos los experimentos se realizaron en el modo sensible a la fase, según el método TPPI (time proportional phase increment). En todos los casos, se eligió un ancho espectral en torno a 10 ppm en ambas dimensiones, colocando la frecuencia del transmisor en la señal residual del agua. Los experimentos COSY, COSY-DQF¹²¹, TOCSY¹²², NOESY¹²³ y HMQC¹²⁴ se registraron utilizando los programas de pulsos convencionales suministrados en los paquetes informáticos comerciales de Bruker. Previamente a la transformación de Fourier, se aplicaron funciones seno cuadrado a las FID's (Free Induction Decay) en ambas

121 Bax A., *J. Magn. Reson.*, 1983, 53, 517-520.

122 Bax A., Davis D. G., *J. Magn. Reson.*, 1985, 65, 355-360.

123 Jeener J., Meier B.H., Bachmann P., Ernst R.R., *J. Chem. Phys.*, 1979, 71, 4546-4553.

124 Summers M.F., Marzilli L.G., Bax A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 4285-4294.

dimensiones y se realizó generalmente el llenado de ceros (zero filling) en F_2 y en F_1 hasta formar matrices de datos con 4K y 1K respectivamente. Los experimentos COSY y TOCSY se adquirieron generalmente con 4K puntos en la dimensión F_2 y entre 256 y 1K incrementos en la dimensión F_1 . En el experimento TOCSY el tiempo de mezcla fue de 60 ms. Los espectros NOESY se realizaron a 500 MHz y 400MHz con tiempos de mezcla de 200, 300, 350, 400, 500 y 650 ms. Se adquirieron generalmente 4K puntos en la dimensión F_2 y entre 256 y 300 incrementos en F_1 . El tiempo de adquisición (AQ) fue de 0.4-0.5s y se registraron 80-88 acumulaciones por incremento, lo que supuso un tiempo total para cada experimento de 11-13h.

Valoración de Ca^{2+}

Para estudiar el efecto del Ca^{2+} sobre el hexasacárido **I** se empleó una disolución 0.56M de $CaCl_2$ en D_2O . Se registraron los espectros de 1H -RMN de **I** a 500 MHz y 25°C después de añadir 1, 2, 3, 4, 6, 9 y 12 cantidades equivalentes de Ca^{2+} . Las demás condiciones experimentales de los espectros fueron idénticas al caso de la muestra sódica. Además, se llevaron a cabo espectros bidimensionales COSY, TOCSY y NOESY con el objeto de asignar completamente los espectros correspondientes a las muestras que contenían 4 y 12 equivalentes de Ca^{2+} .

5.8.2 Cálculo de σ_{NOE} y τ_c

Para la obtención de las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal (σ_{NOE}) se ha seguido el método de la pendiente de la curva de crecimiento del NOE a tiempo de mezcla cero, asumiendo la aproximación de spines aislados.

Los volúmenes de los picos se obtuvieron por integración numérica en el experimento bidimensional sobre regiones elípticas definidas manualmente¹²⁵. En los picos más débiles se empleó el promedio de varias medidas para minimizar el

¹²⁵ Programa de análisis TRIAD 6.3 integrado en el paquete de modelado molecular SYBYL 6.6 (SYBYL® 6.6 TRIPOS, Inc. St. Louis, MO).

error de la integración manual y en picos solapados se emplearon las integraciones monodimensionales de planos obtenidos del espectro bidimensional.

Los volúmenes de NOE obtenidos se normalizaron dividiendo por el volumen del correspondiente pico de la diagonal. A continuación, se representó gráficamente el volumen normalizado (V_N) frente al tiempo de mezcla (t_m) para diversas parejas de núcleos del hexasacárido I, con lo que se confirmó el rango de tiempos de mezcla que corresponde a un crecimiento lineal del NOE. La determinación de σ_{NOE} se llevó a cabo por promediado de los puntos correspondientes a la gráfica V_N/t_m frente al t_m . Aquellos puntos que presentaron una fuerte desviación en el análisis de regresión lineal de la curva de crecimiento fueron eliminados.

Los valores de los tiempos de correlación aparentes (τ_c) se obtuvieron mediante la aplicación de la siguiente fórmula, que implicó utilizar los valores de σ_{NOE} a 400 y 500 MHz:

$$\frac{\sigma_{500}^{NOE}}{\sigma_{400}^{NOE}} = \frac{5 + 20 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \tau_c^2 - 4 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^2 - 16 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^4}{5 + 20 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^2 - 4 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \tau_c^2 - 16 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^4}$$

siendo: ω_{400} , ω_{500} : frecuencias de los espectrómetros de 400 y 500 MHz respectivamente, en rad/s; τ_c : tiempo de correlación aparente para cada pareja de protones de I.

5.8.3 Mecánica y dinámica molecular

Los ángulos de torsión se definieron como ϕ ($H_1'-C_1'-O_1'-C_4$) y ψ ($C_1'-O_1'-C_4-H_4$). Los cálculos de mecánica y dinámica molecular se han llevado a cabo usando el campo de fuerzas AMBER 5.0¹¹³ con la modificación

113 Weiner S.J., Kollman P.A., Nguyen D.T., Case D.A., *J. Comp. Chem.*, 1986, 7, 230-252.

GLYCAM¹¹⁴ para carbohidratos y con la inclusión de parámetros específicos para los grupos sulfato¹¹⁵.

Para las simulaciones de dinámica molecular se emplearon 2 estructuras de partida, con todos los IdoA en ¹C₄ o en ²S₀, construidas a partir de las estructuras dodecasacarídicas publicadas en el Protein Data Bank por Mulloy et al (1hpn.pdb). En general, las simulaciones se llevaron a cabo a 298 K empleando un acoplamiento al baño térmico de 0.5 ps, un tiempo de integración de 1.5 fs y manteniendo constantes las longitudes de los enlaces C-H mediante el algoritmo SHAKE. Después de un período de equilibración de 15 ps las trayectorias se registraron durante 9 ns.

5.9 Ensayos de actividad biológica

Reactivos

Los reactivos empleados proceden de distintas firmas comerciales: Heparina-Sepharosa de Pharmacia, filtros de nitrocelulosa de Millipore, placas de cultivo de Costar, suplemento de cultivo ITS+ de Collaborative Research Inc., etanolamina y heparina sódica de ~3000 Da de Sigma, L-glutamina, medio de Ham F-12 y medio de Eagle modificado por Dulbecco de Flow. El agua destilada usada en todas las disoluciones se purificó por medio de un filtro de agua Milli-Q® (Millipore) acoplado con una columna Organex® (Millipore).

Ensayos de actividad mitogénica

La actividad mitogénica de FGF-1 se midió según el método descrito por Ortega et al¹²⁶. El recuento de células se llevó a cabo midiendo la cantidad total de violeta cristal retenido por los núcleos celulares mediante absorbancia diferencial (620 menos 690 nm)^{126,127}. Para estudiar el efecto de la heparina

114 Woods R.J., Dwek R.A., Edge C.J., Freser-Reid B., *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 3832-3846.

115 Altona C., Huige C.J.M., *J. Comp. Chem.*, 1995, 16, 56-79.

126 Ortega S., García J.L., Zazo M., Varela J., Muñoz-Willery I., Cuevas P., Giménez-Gallego G., *Bio/technology*, 1992, 10, 795-798.

127 Zazo M., Lozano R.M., Ortega S., Varela J., Díaz-Orejas R., Ramírez J.M., Giménez-Gallego G., *Gene*, 1992, 113, 231-238.

comercial y el hexasacárido I sobre la actividad de FGF-1, se añadió una unidad mitogénica de proteína (320 pg/mL) a cada placa de ensayo^{6C}.

Preparación de FGF-1

Se utilizó FGF-1 de 139 residuos^{6B}. La proteína se sintetizó y purificó según el método descrito por Zazo et al., usando el vector de expresión pMG47¹²⁷.

Equilibrio de sedimentación

Los experimentos de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrifugadora analítica Optima XL-A (Beckman Instruments Inc.) equipada con un escáner óptico UV-Visible, a 20°C y 25000 revoluciones por minuto (rpm). Los pulsos de absorbancia radial se registraron en el equilibrio de sedimentación. Para determinar la línea base de absorbancia para cada muestra, la proteína se eliminó de la disolución a 40000 rpm. Se emplearon disoluciones 6 µM de FGF-1, 10 mM de fosfato sódico y 80 mM de NaCl a un valor de pH de 7.2. El ajuste de los datos experimentales a la expresión matemática que describe la distribución radial de la concentración de un soluto ideal en el equilibrio de sedimentación se realizó con los programas XLAEQ y EQASSOC, suministrados por Beckman Instruments Inc. Los pesos moleculares promedio de los complejos se calcularon usando los volúmenes parciales específicos de la proteína (0.735 cm³/g)^{6B} y de la heparina (0.51 cm³/g)³⁴.

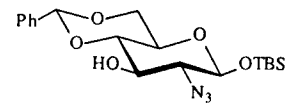
6C Pineda-Lucena A., Jiménez M.A., Lozano R.M., Nieto J.L., Santoro J., Rico M., Giménez-Gallego G., *J. Mol. Biol.*, 1996, 264, 162-178.

6B Pineda-Lucena A., Jiménez M.A., Nieto J.L., Santoro J., Rico M., Giménez-Gallego G., *J. Mol. Biol.*, 1994, 242, 81-98;

127 Zazo M., Lozano R.M., Ortega S., Varela J., Díaz-Orejas R., Ramírez J.M., Giménez-Gallego G., *Gene*, 1992, 113, 231-238.

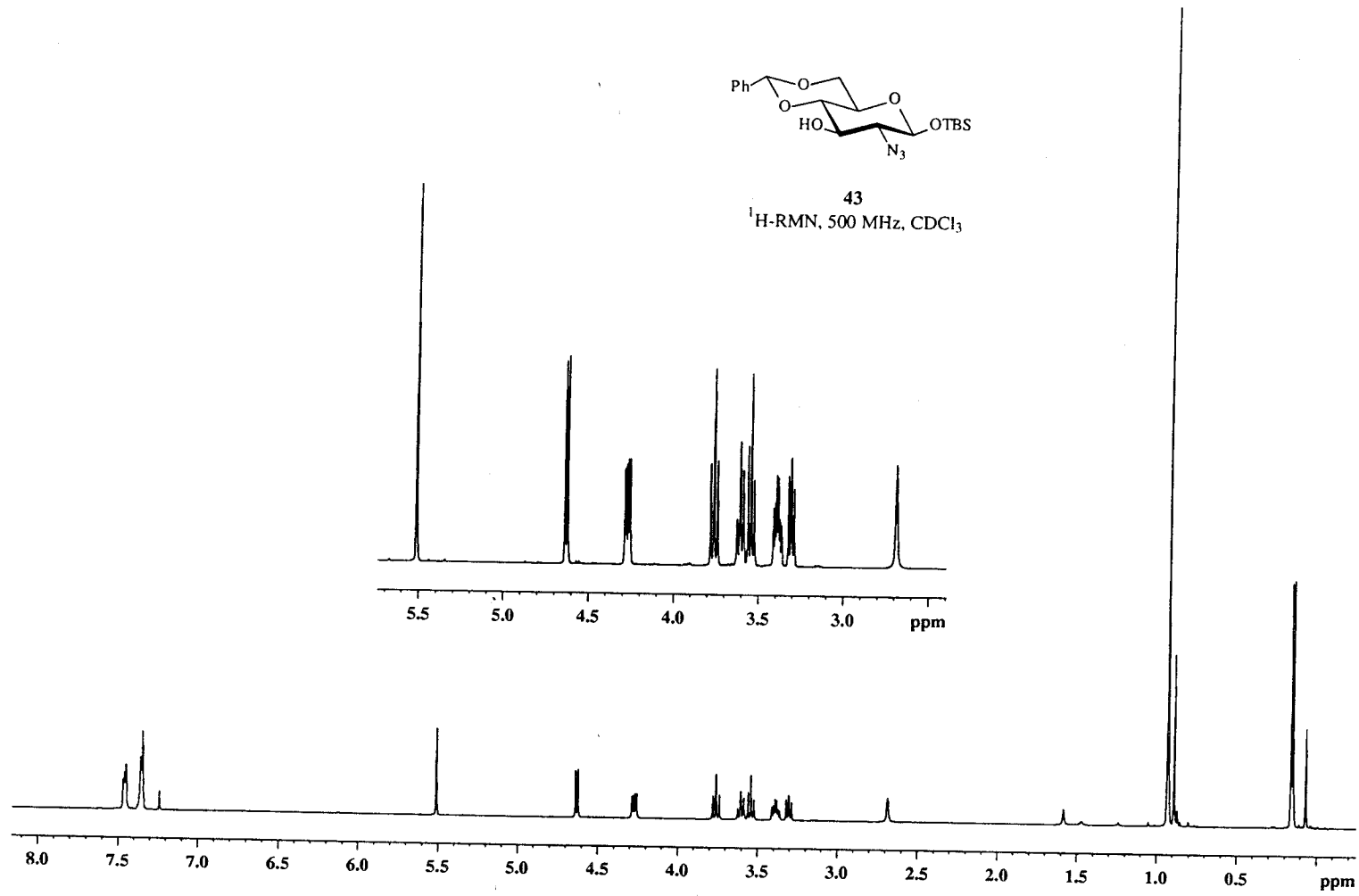
34 Mach H., Volkin D.B., Burke C.J., Middaugh C.R., Linhardt R.J., Fromm J.R., Loganathan D., Mattsson L., *Biochemistry*, 1993, 32, 5480-5489.

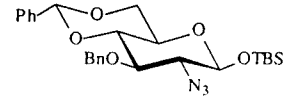
ANEXO DE ESPECTROS



43

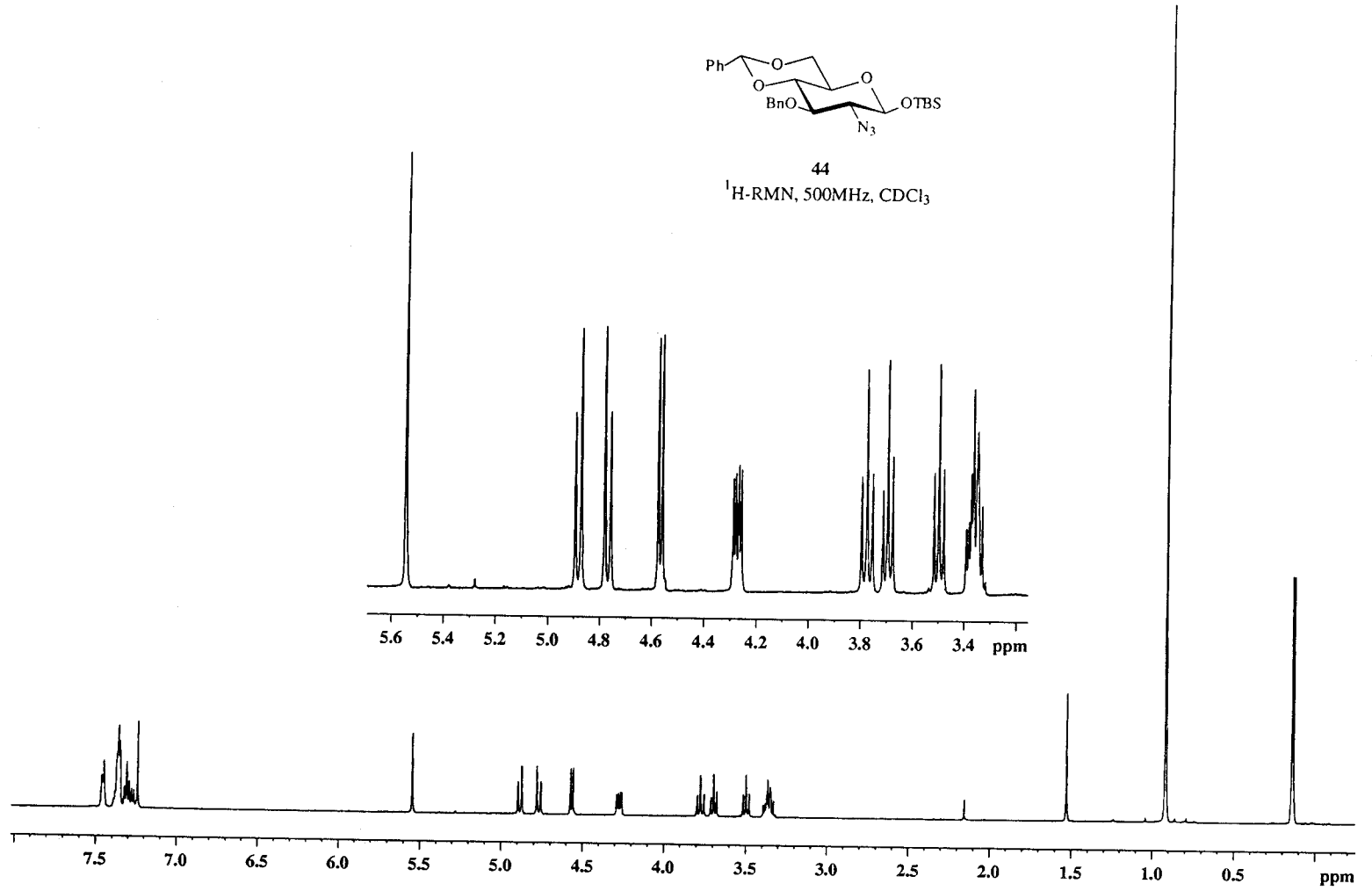
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

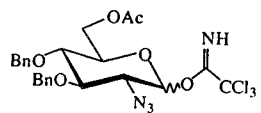




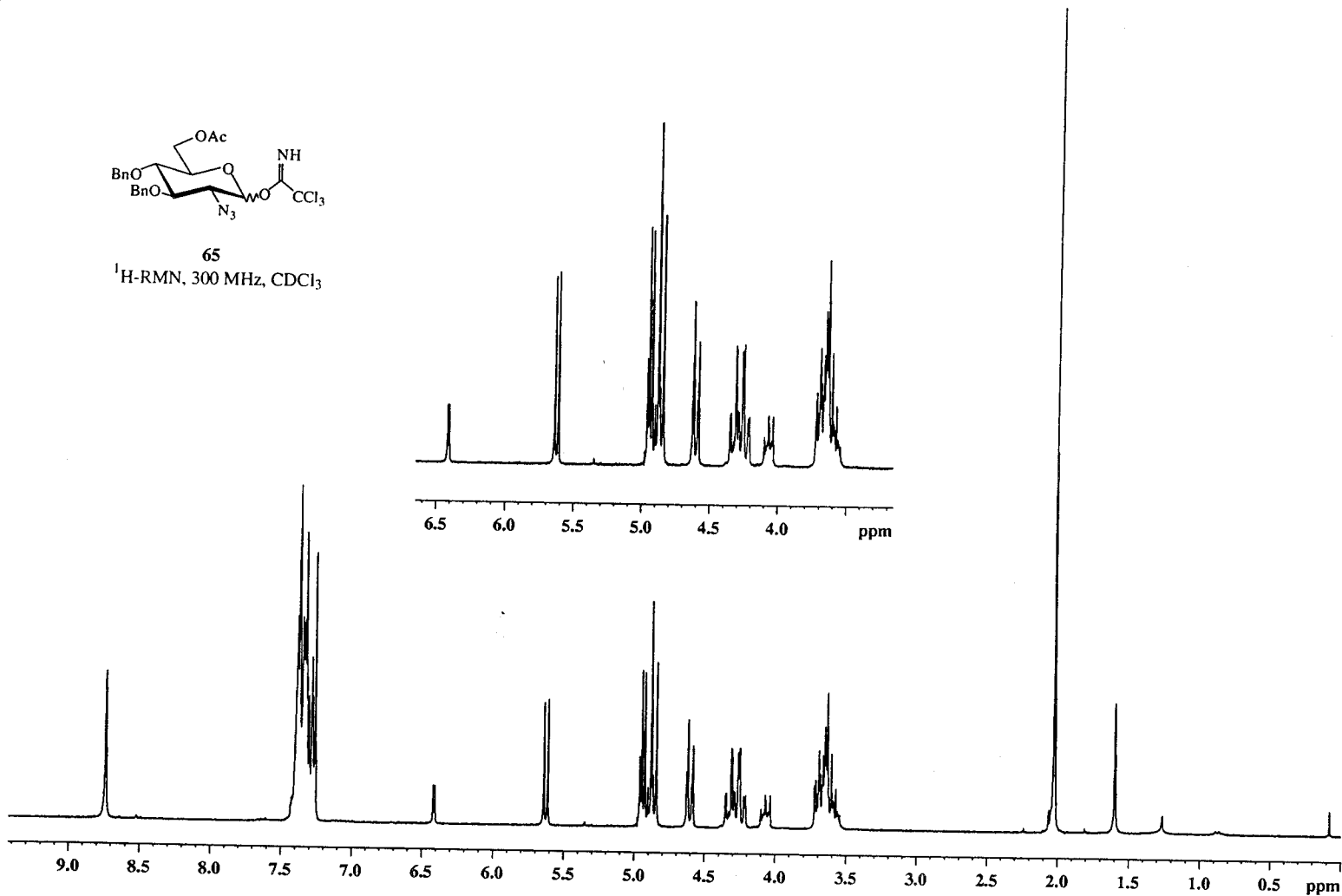
44

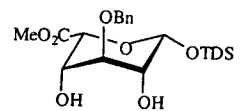
¹H-RMN, 500MHz, CDCl₃





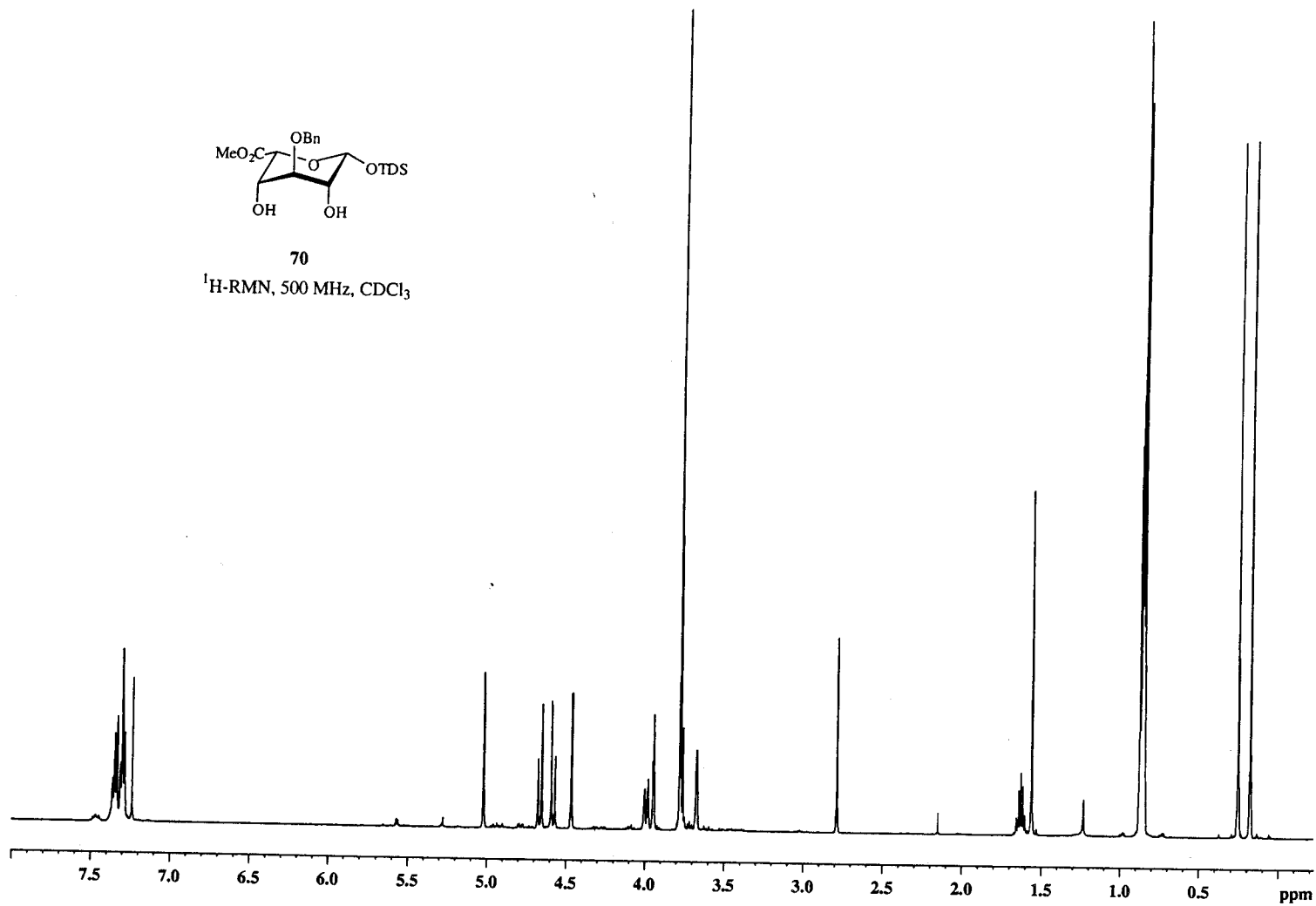
65
¹H-RMN, 300 MHz, CDCl₃

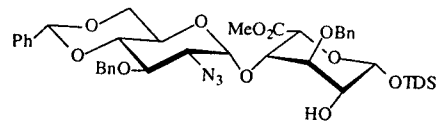




70

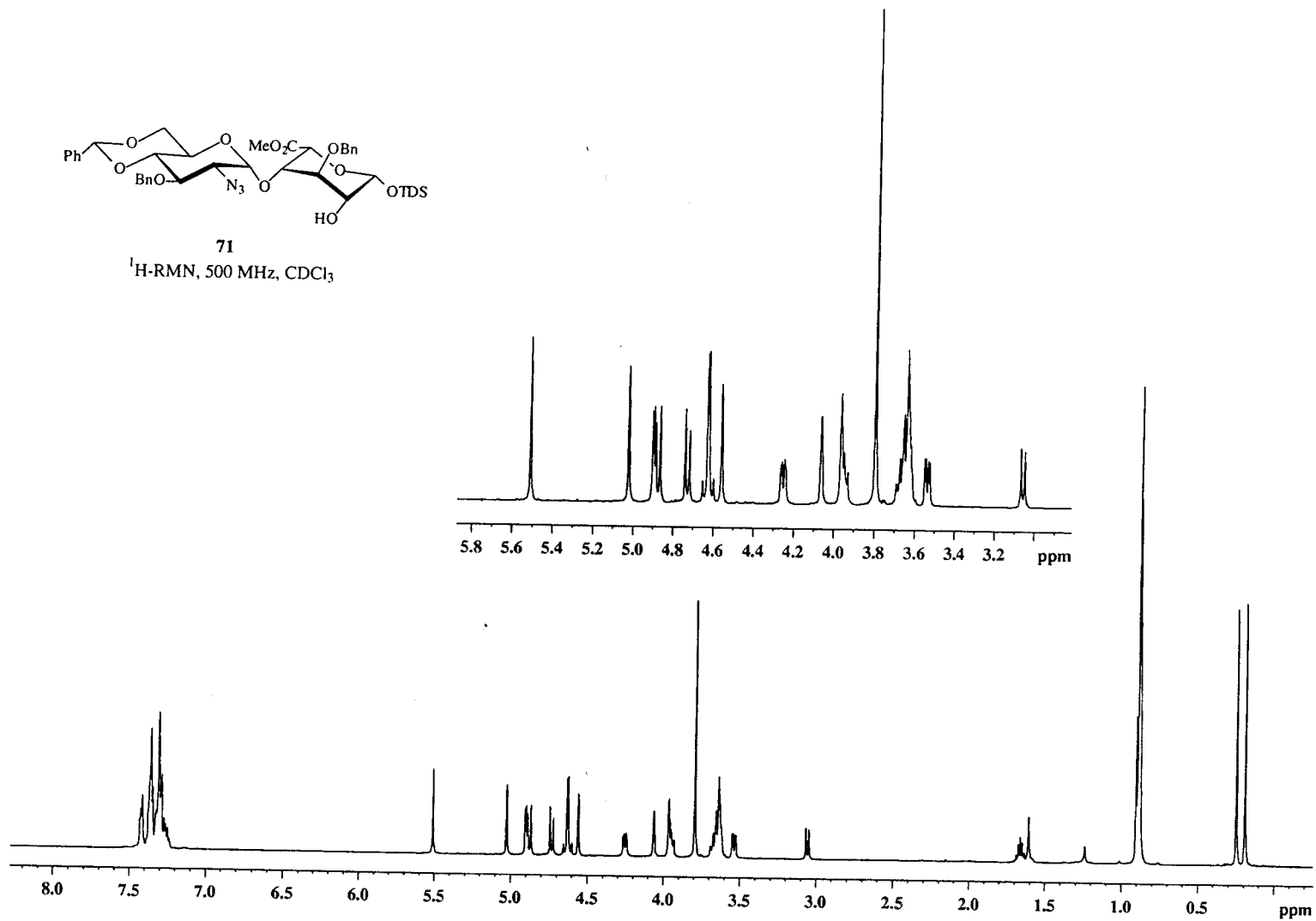
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

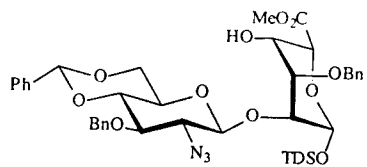




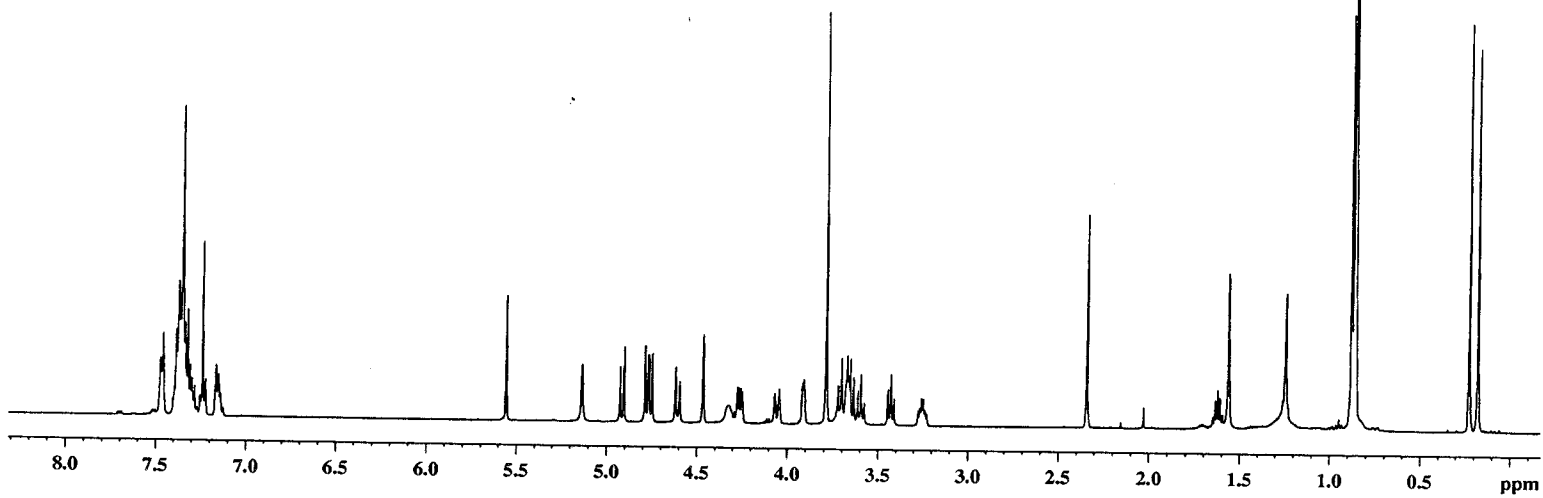
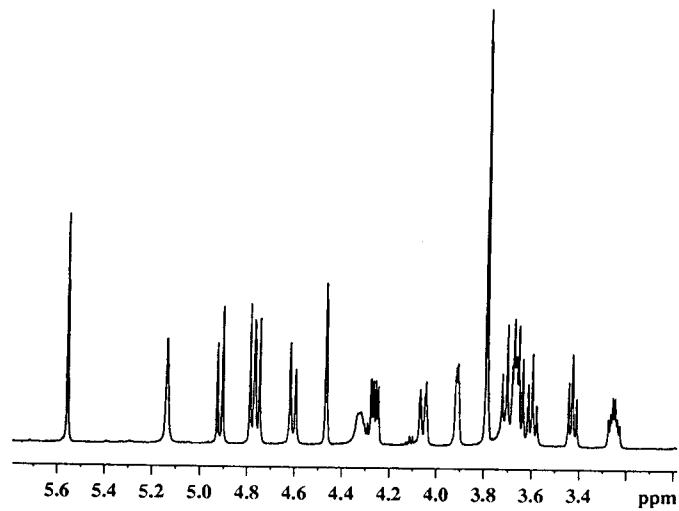
71

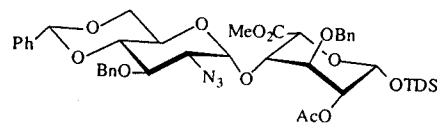
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃





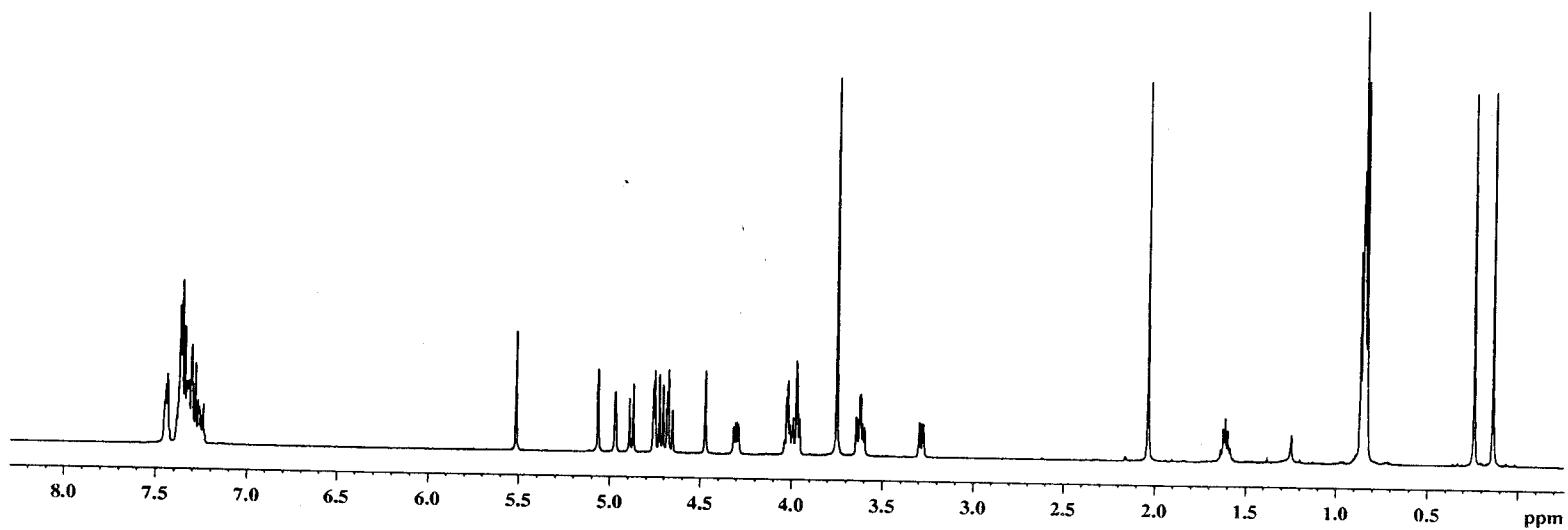
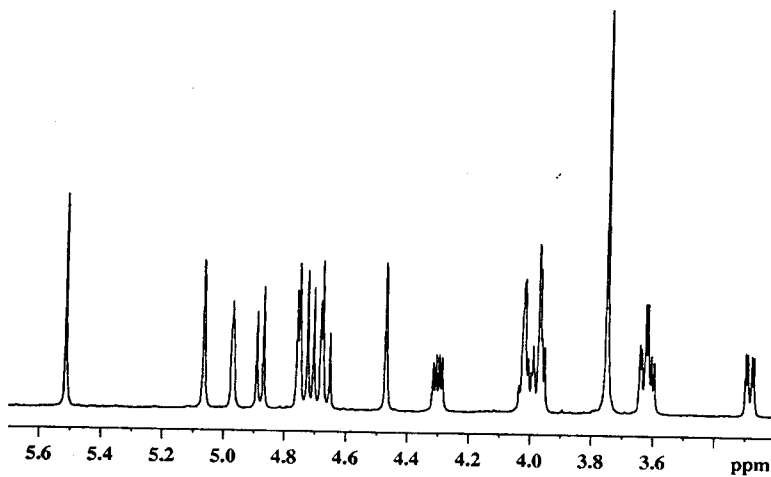
72
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

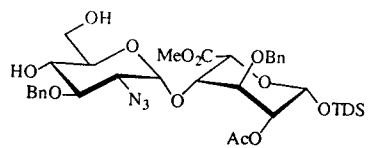




76

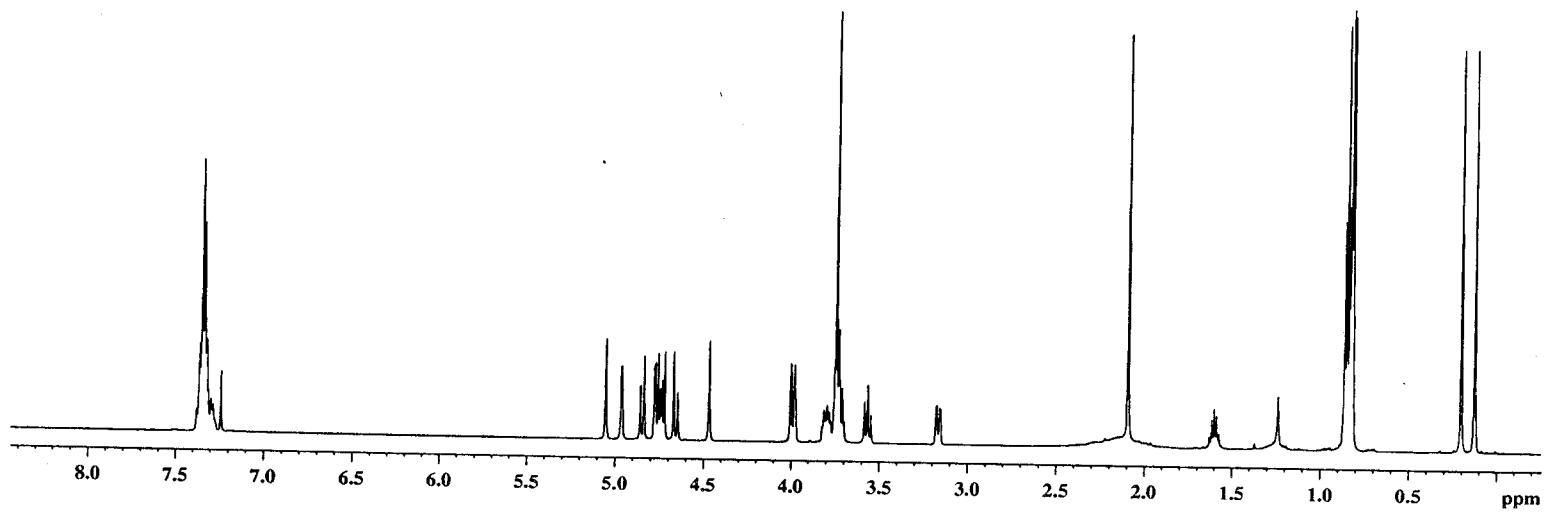
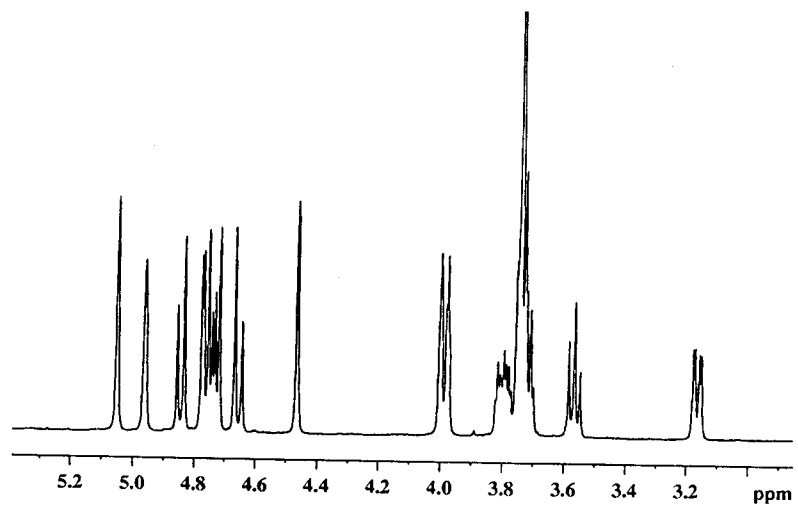
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

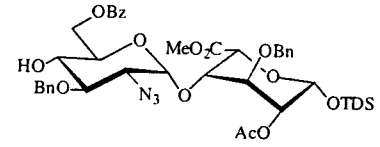




81

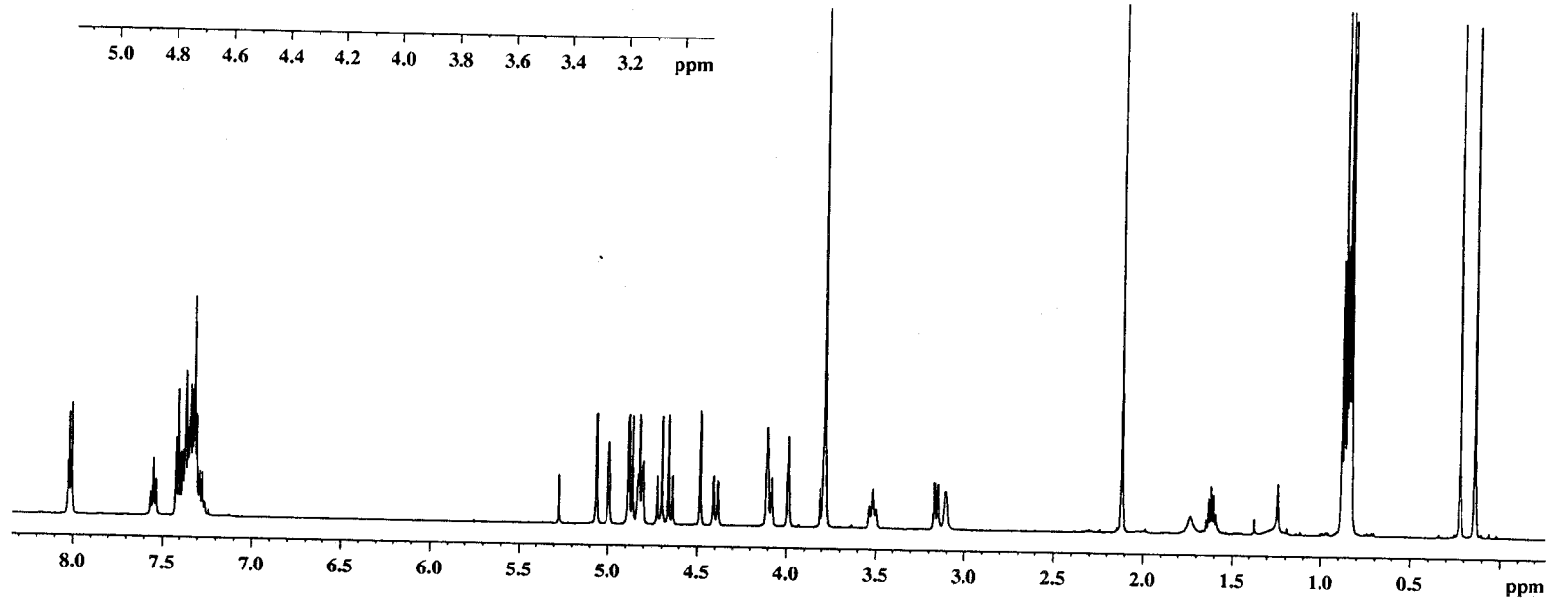
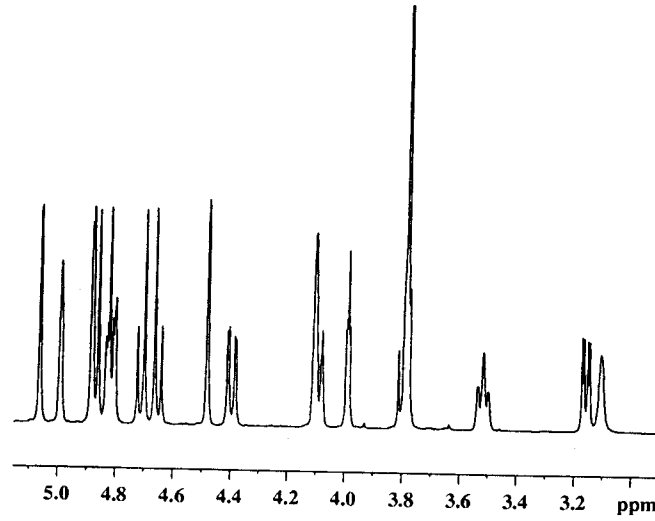
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

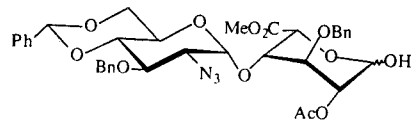




82

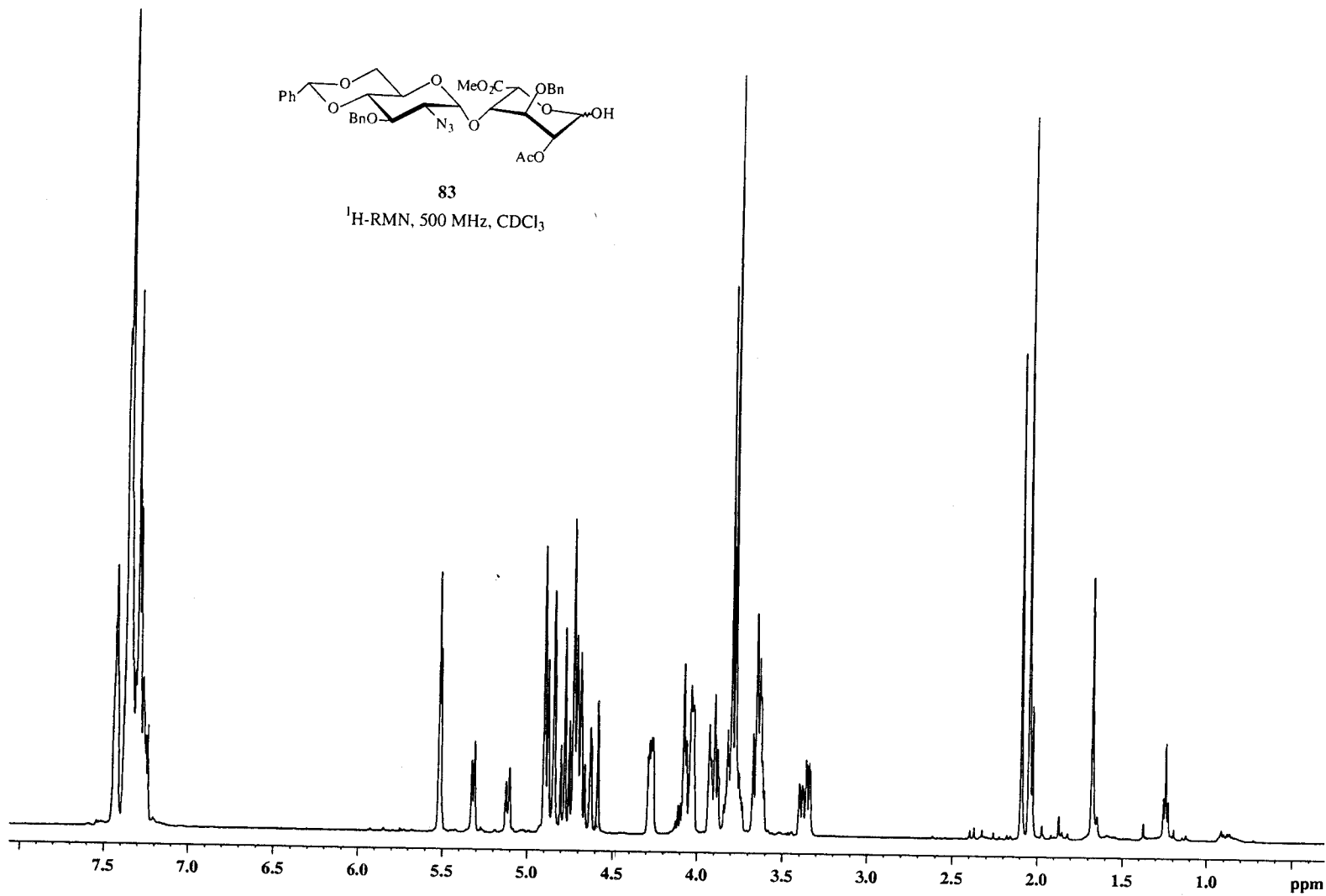
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

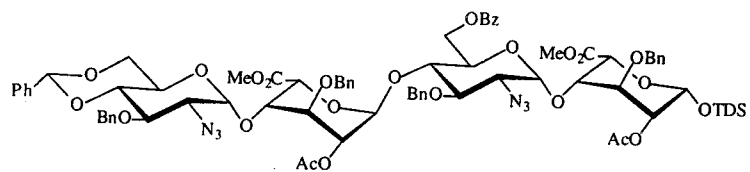




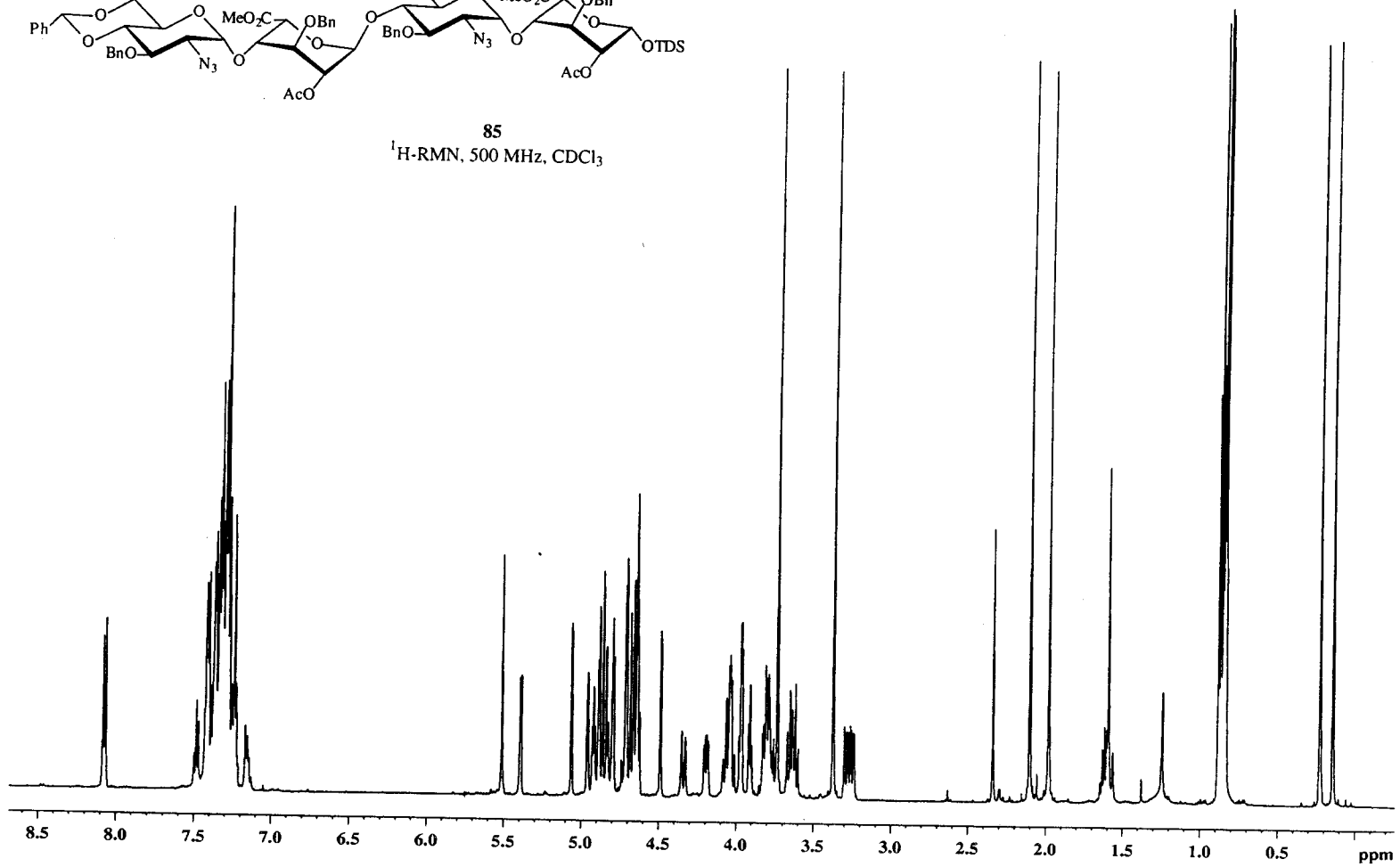
83

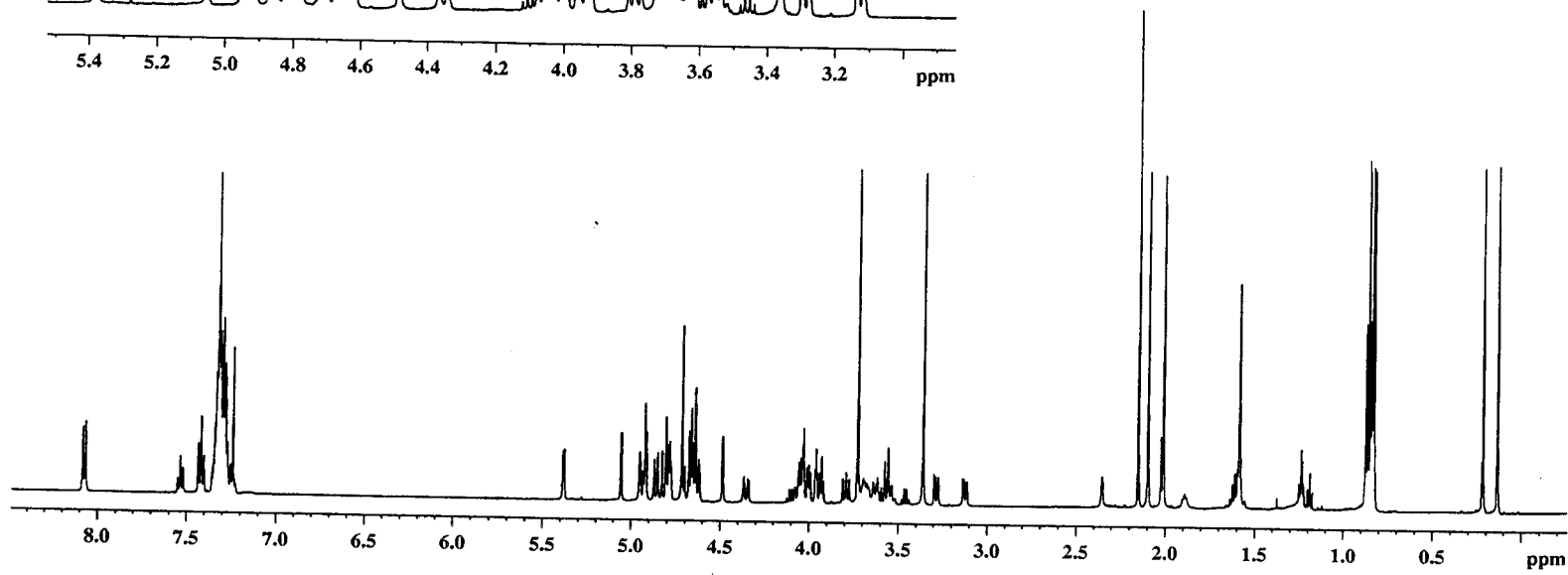
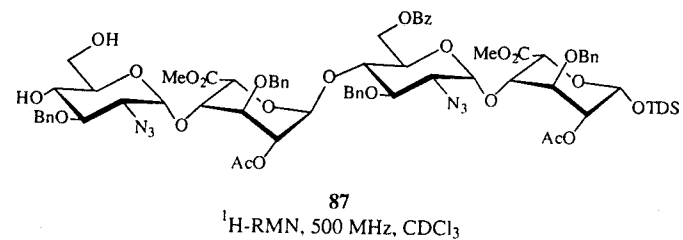
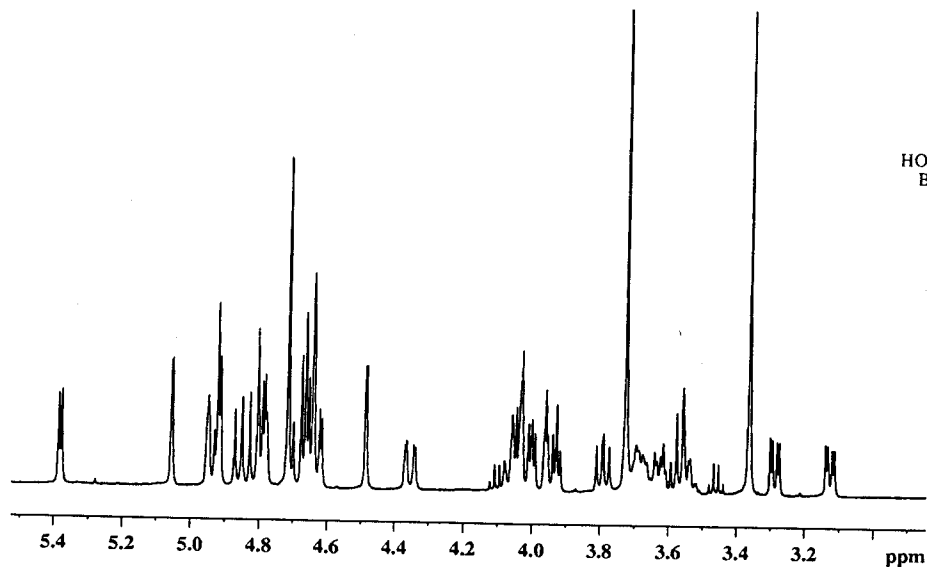
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

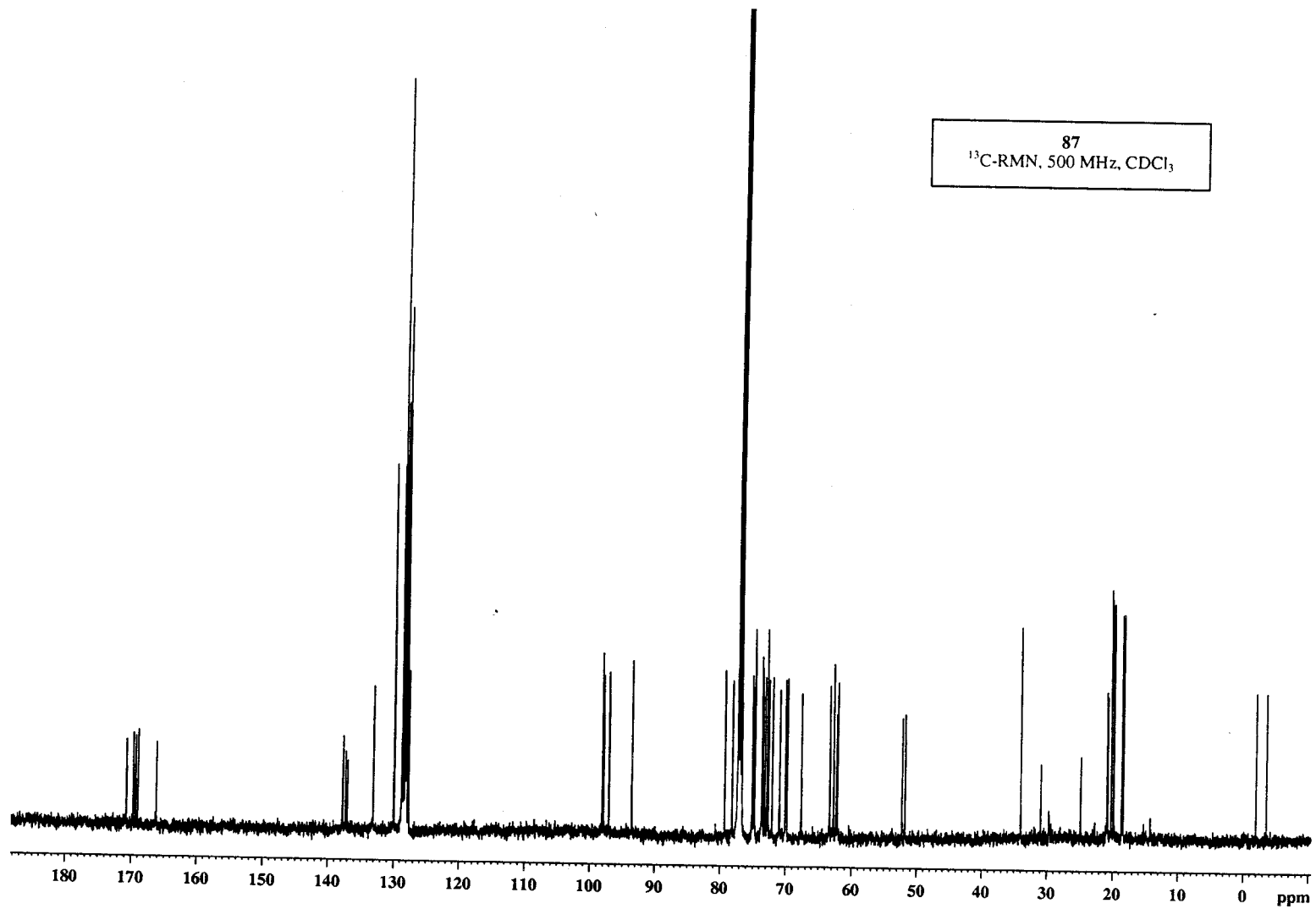




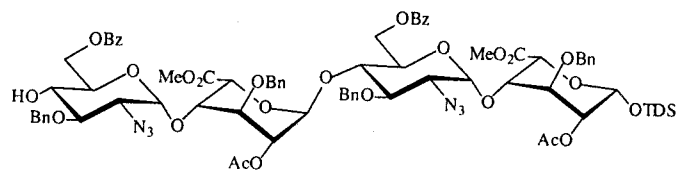
85
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃





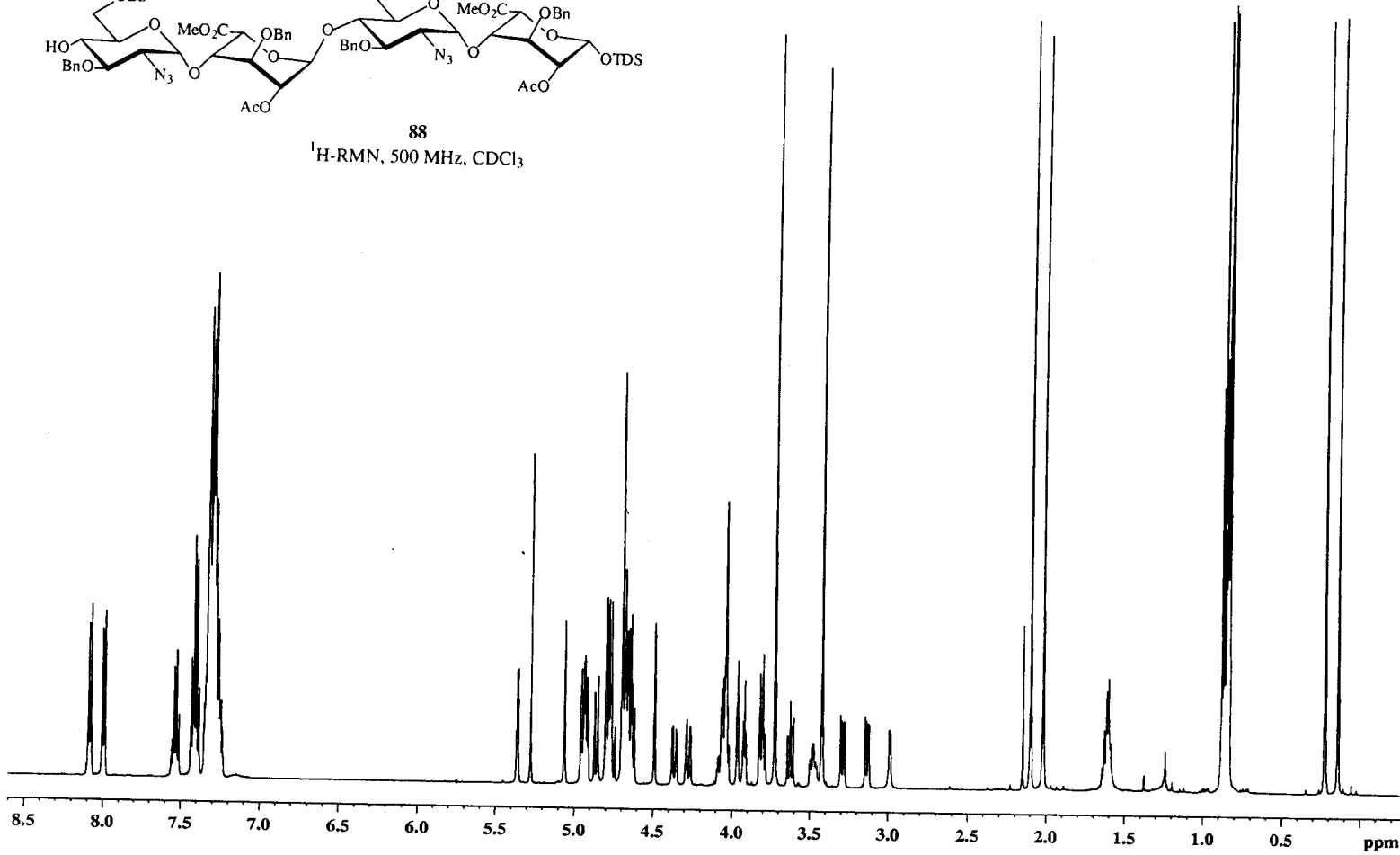


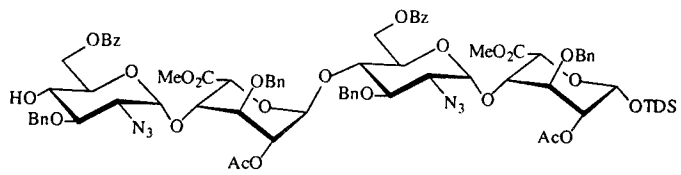
87
 ^{13}C -RMN, 500 MHz, CDCl_3



88

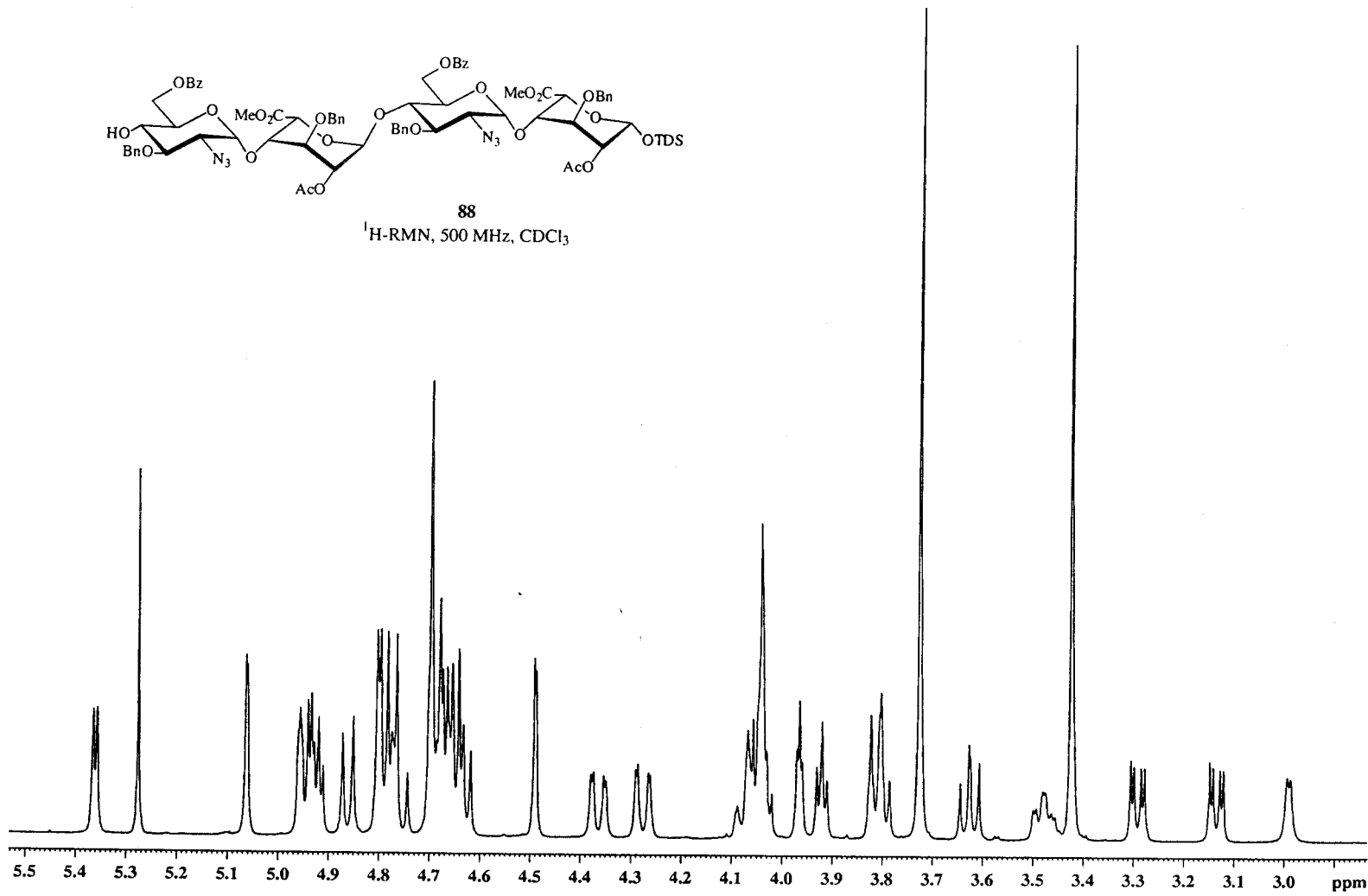
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

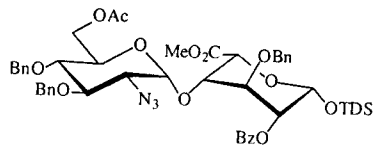




88

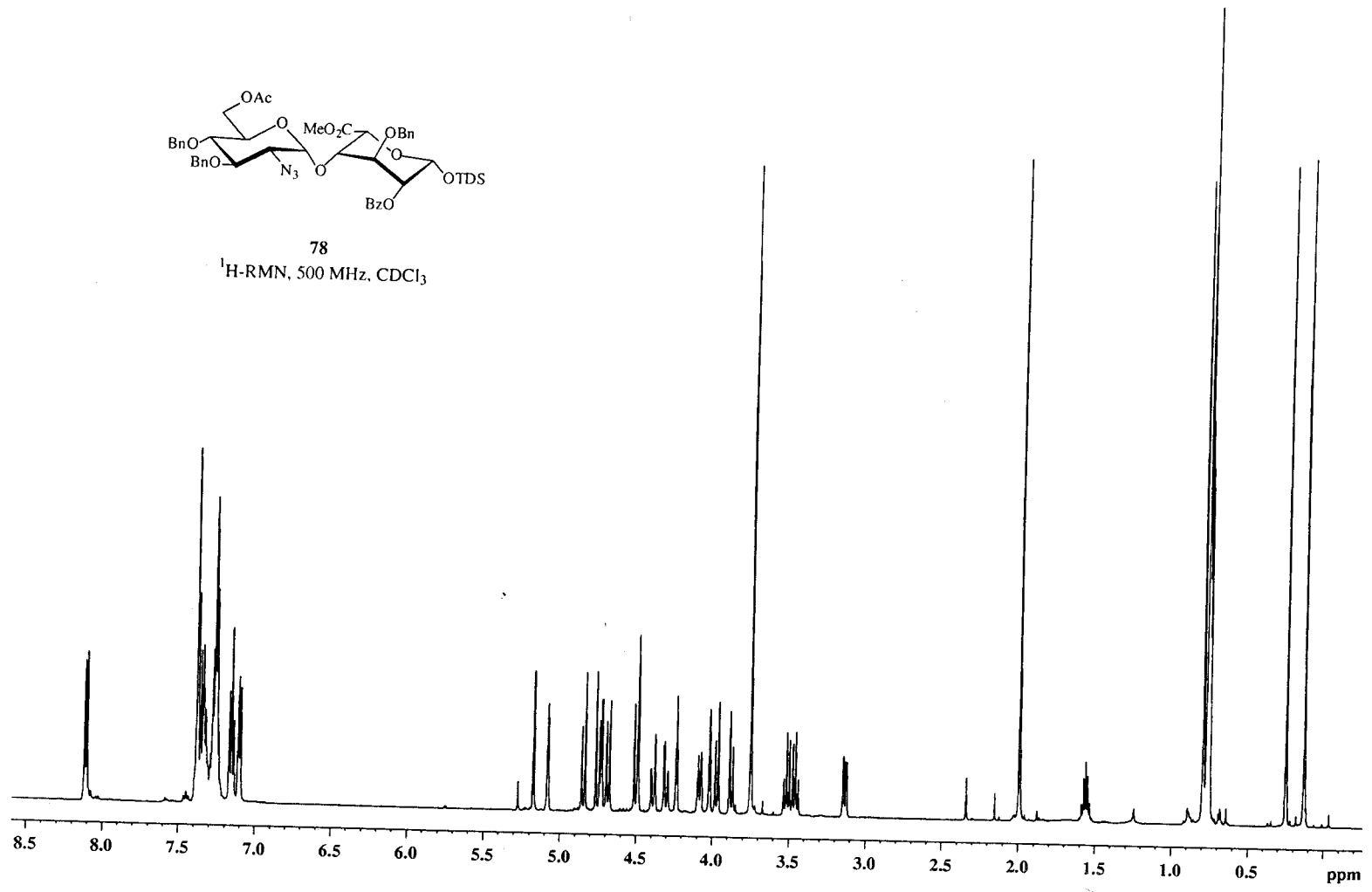
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

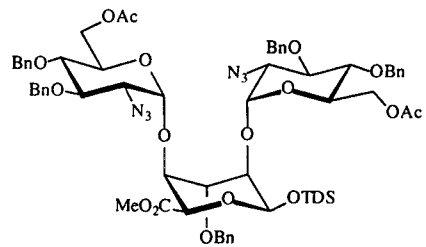




78

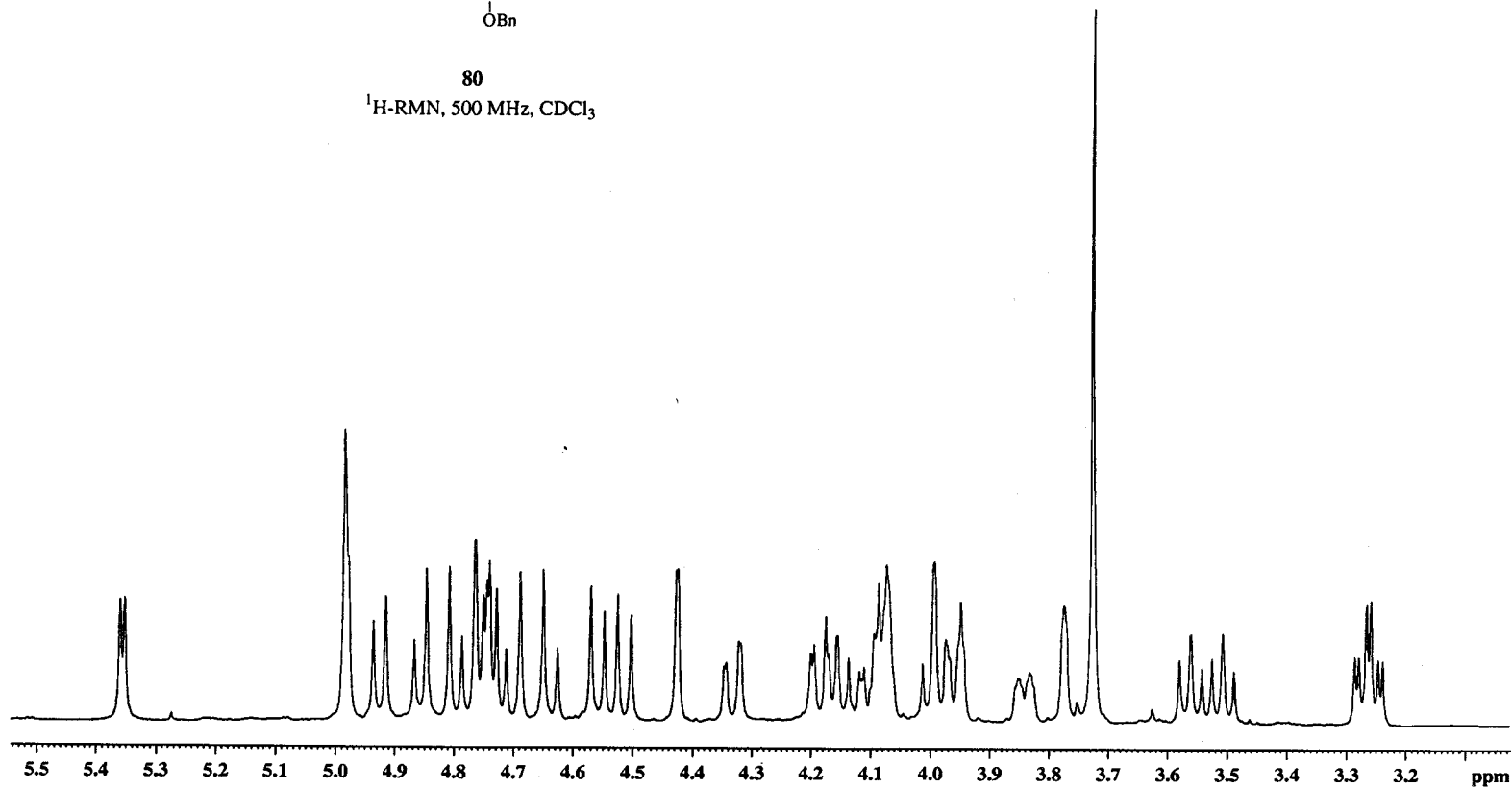
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

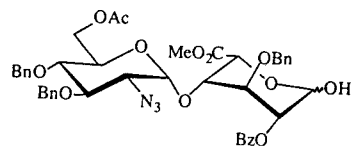




80

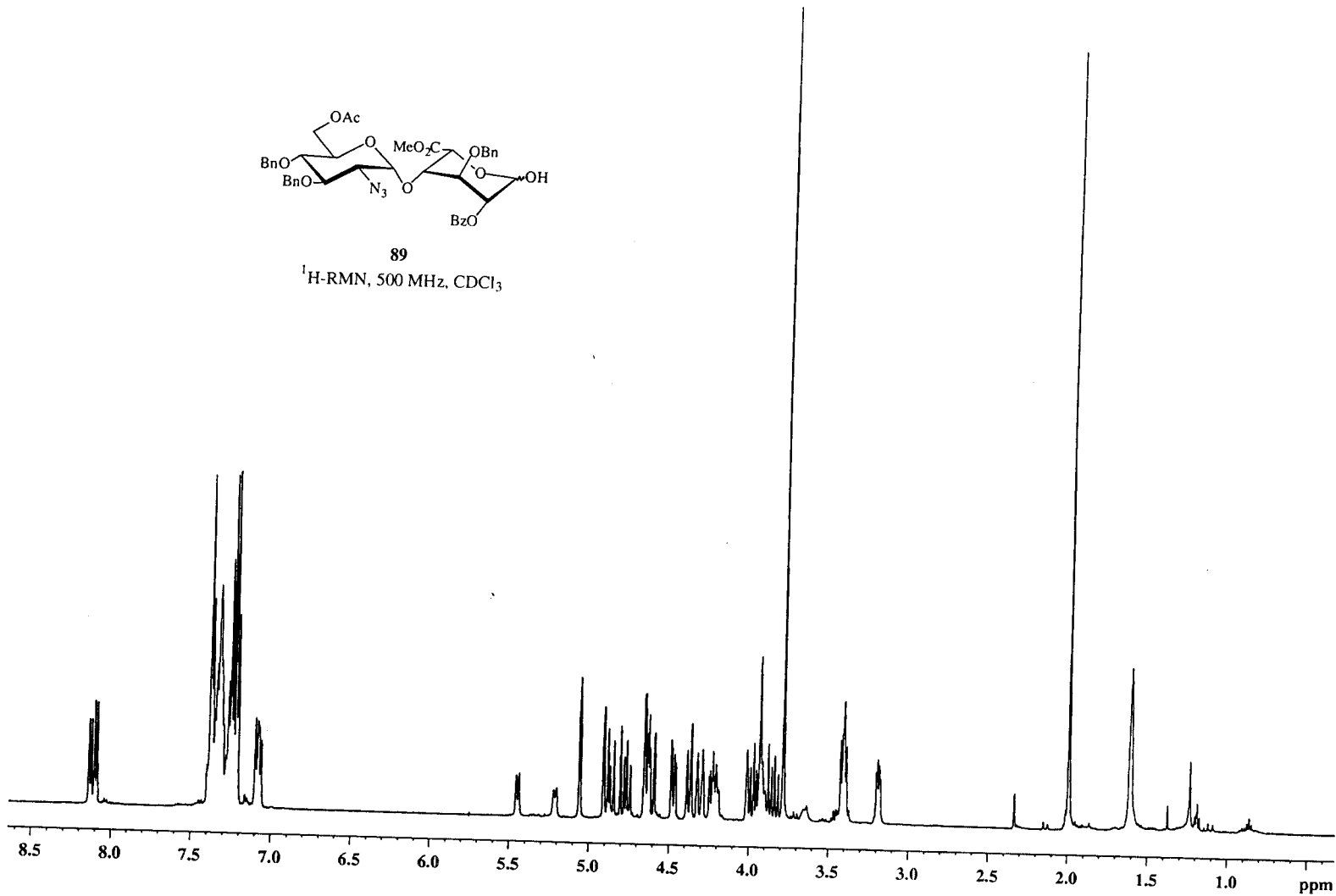
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

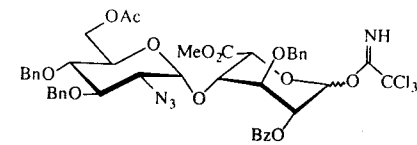




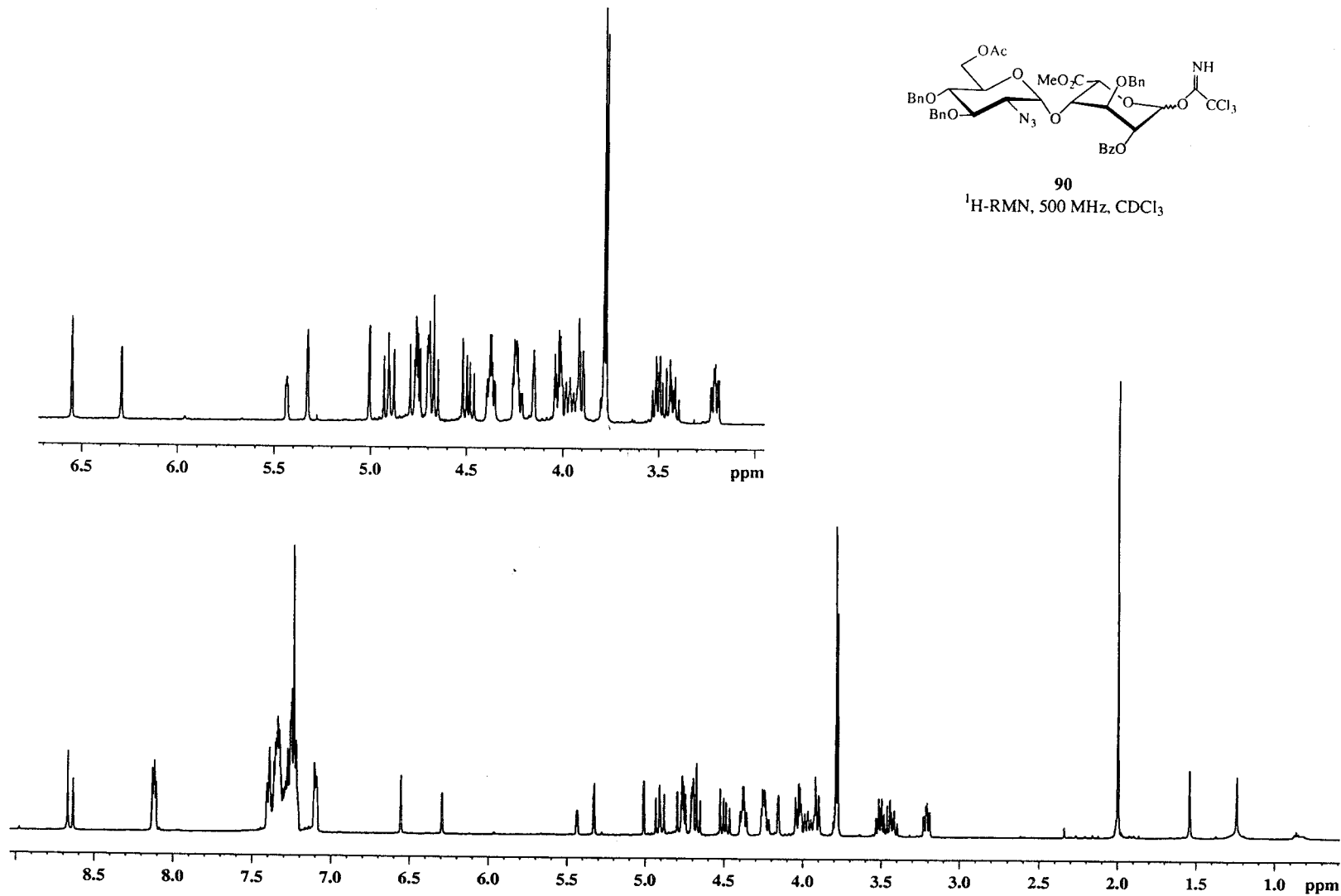
89

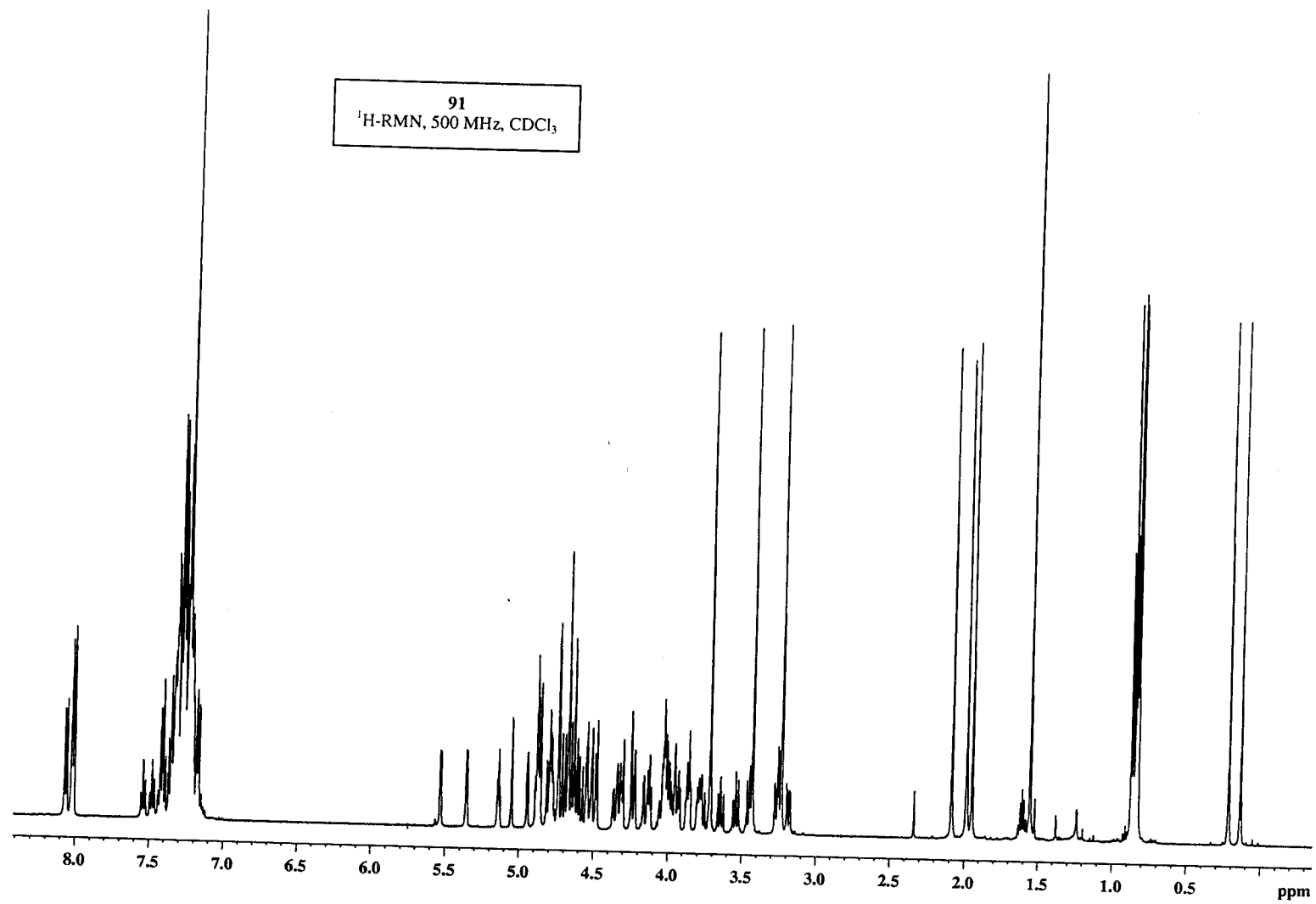
1H -RMN, 500 MHz, $CDCl_3$

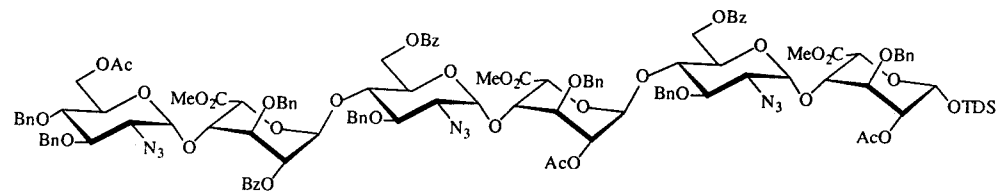




90
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

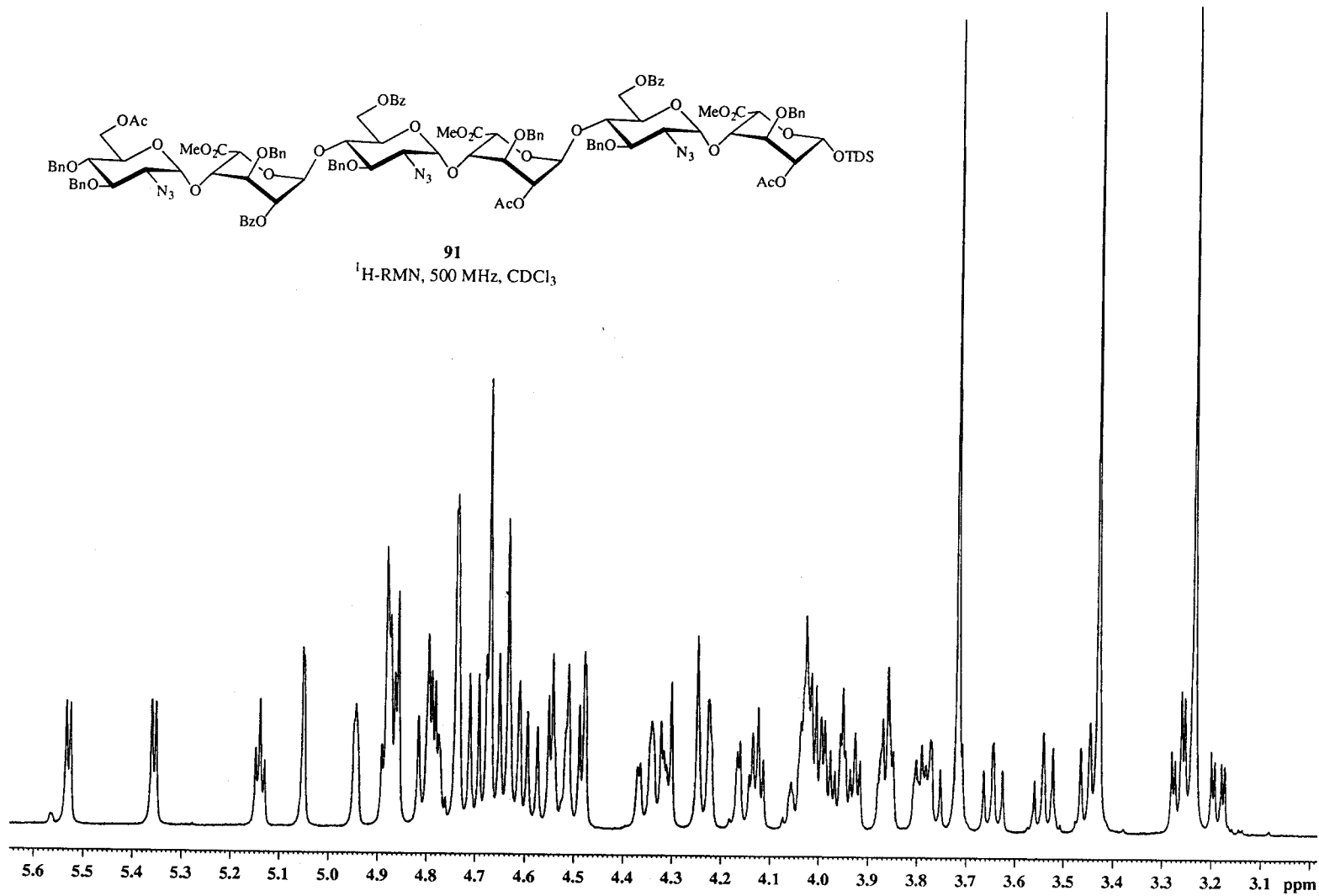


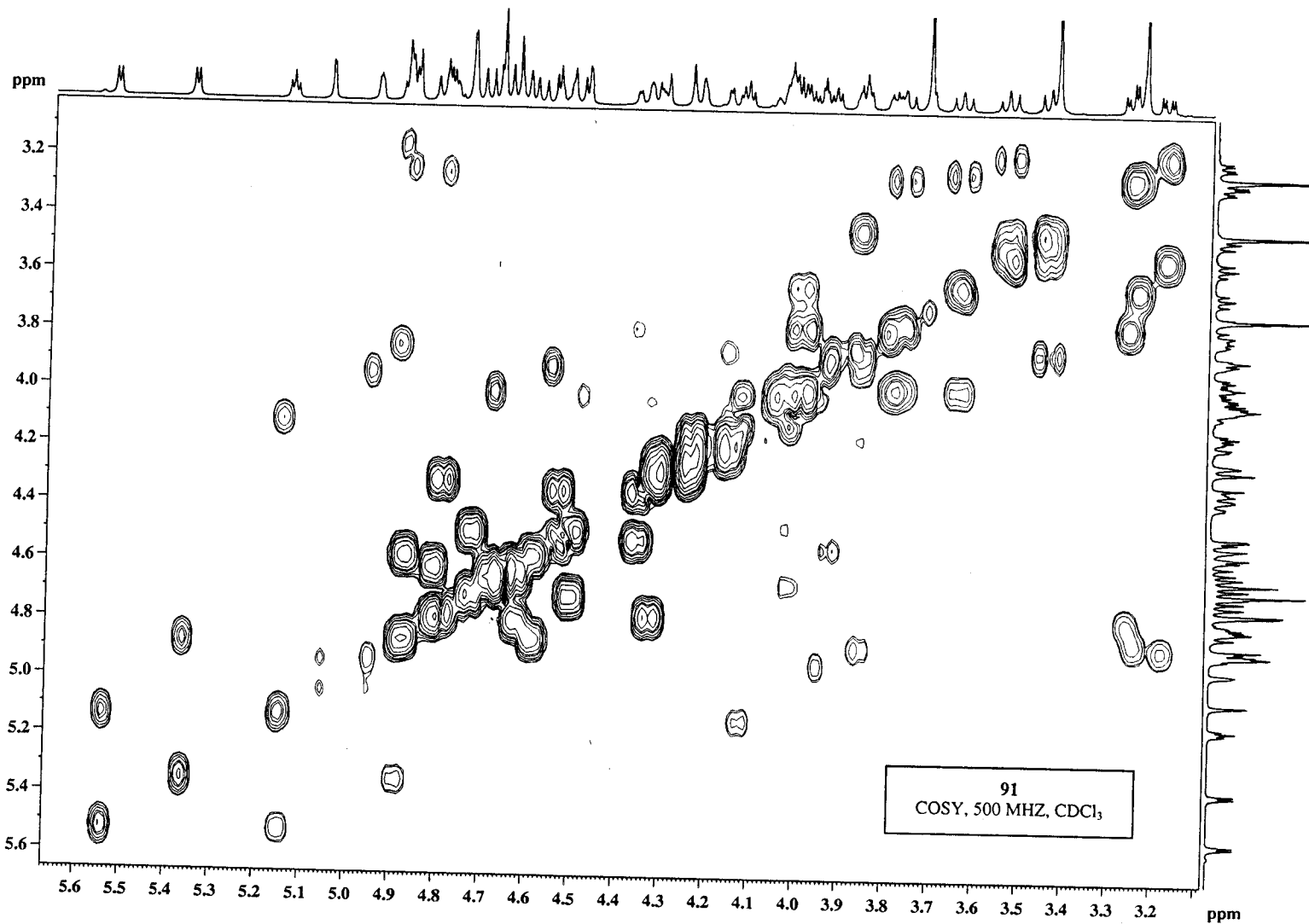


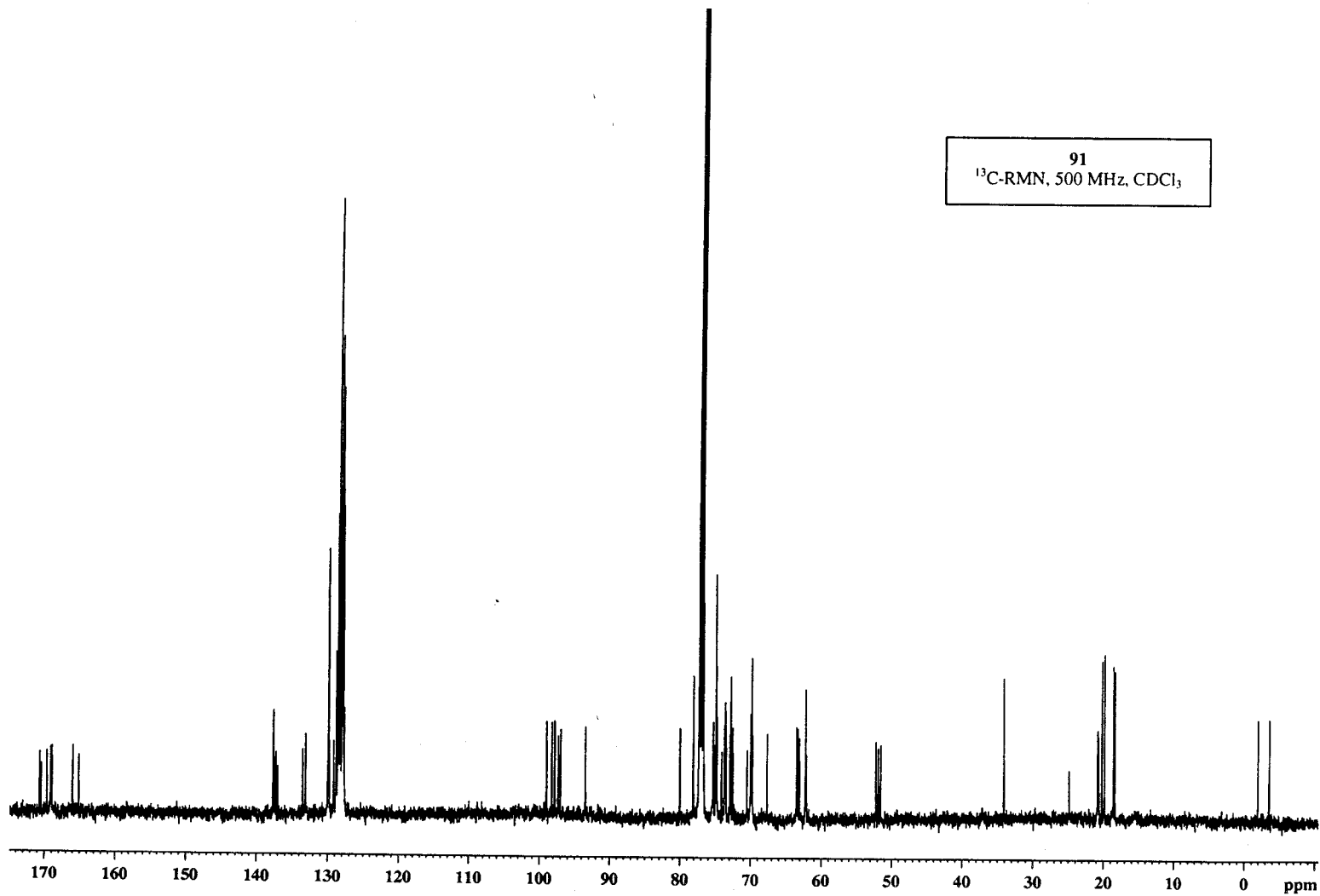


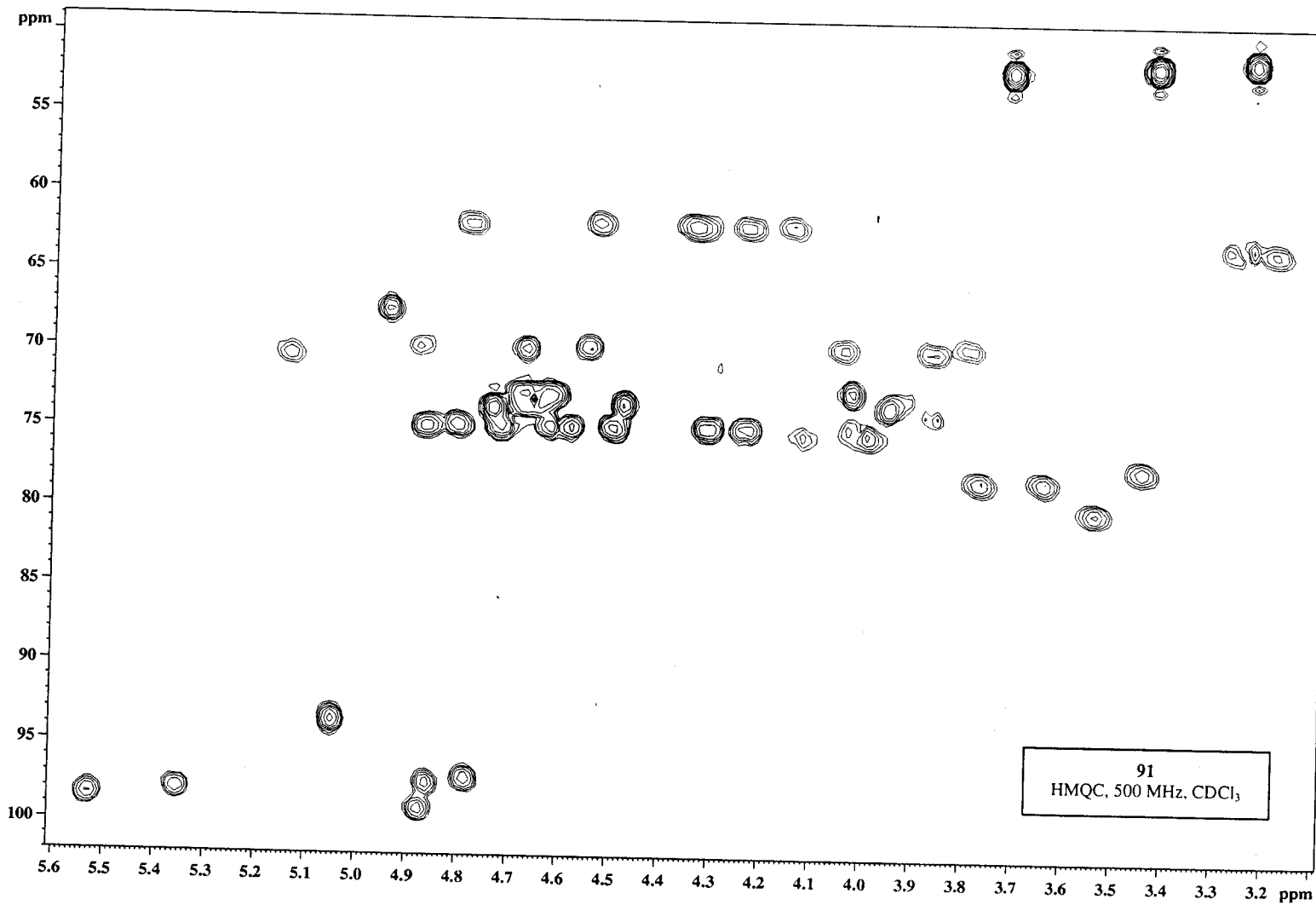
91

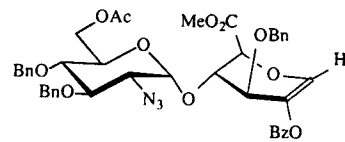
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃



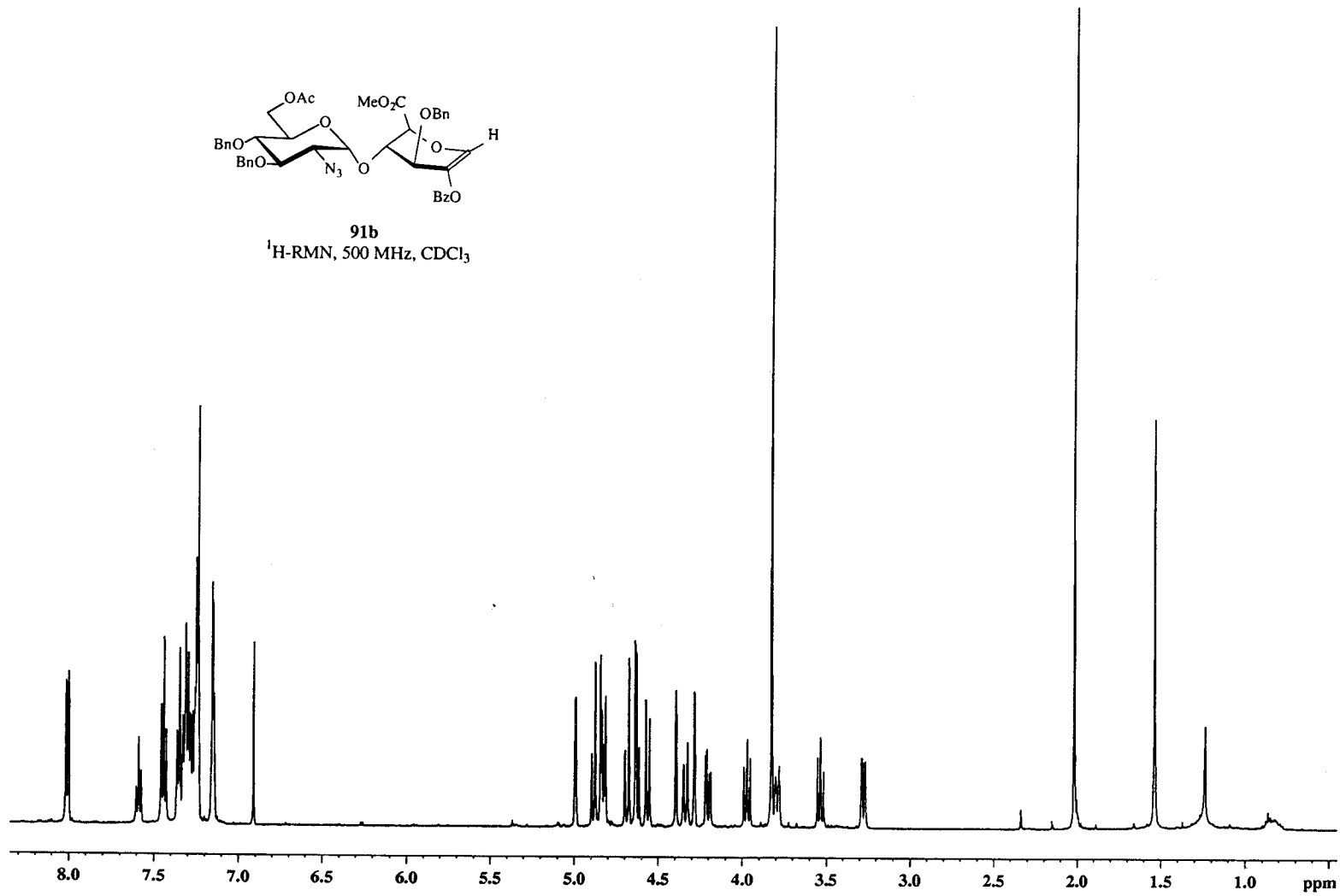


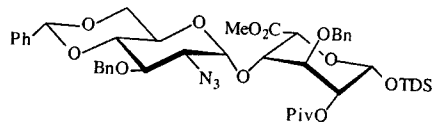






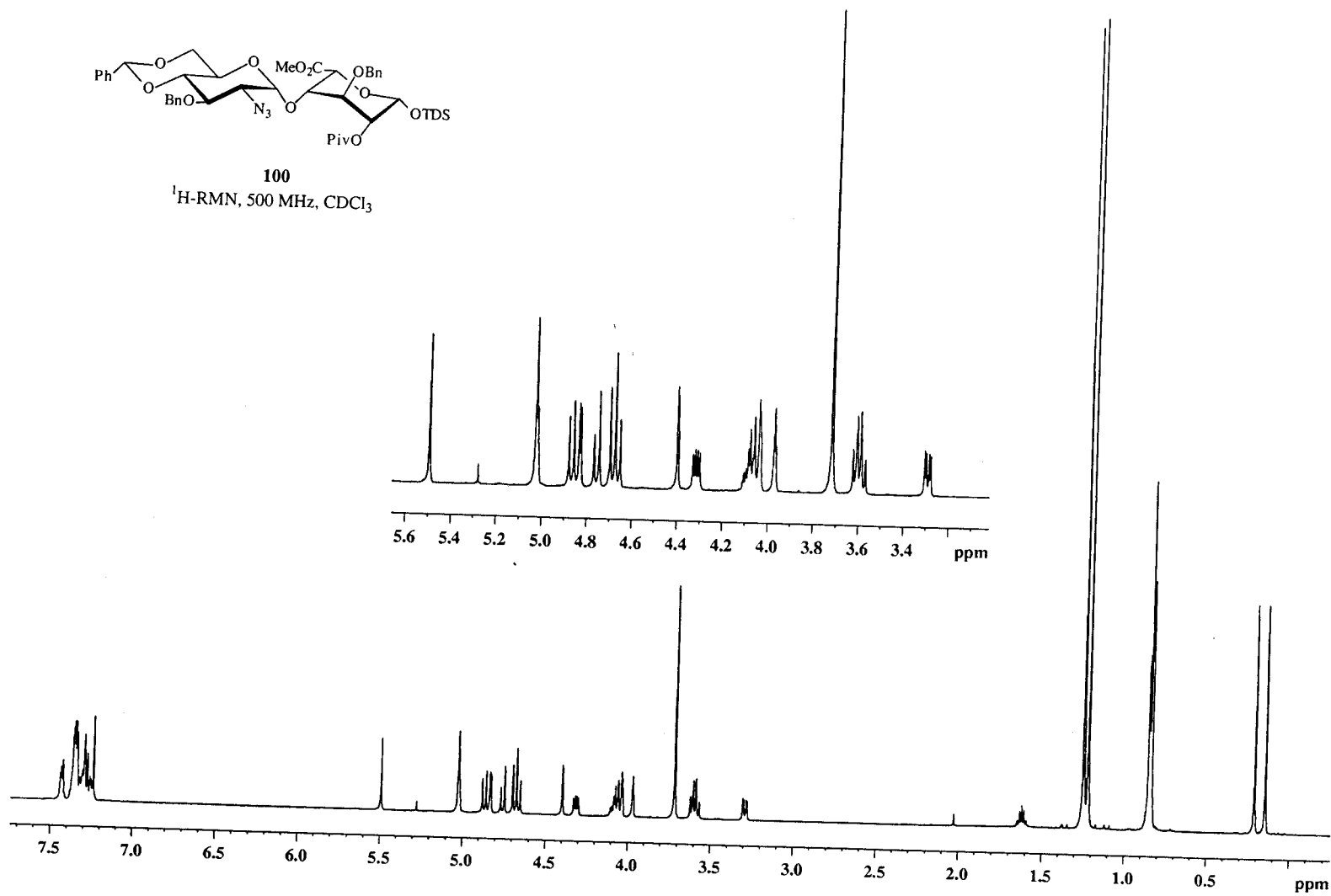
91b
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

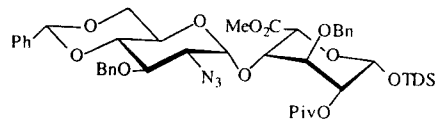




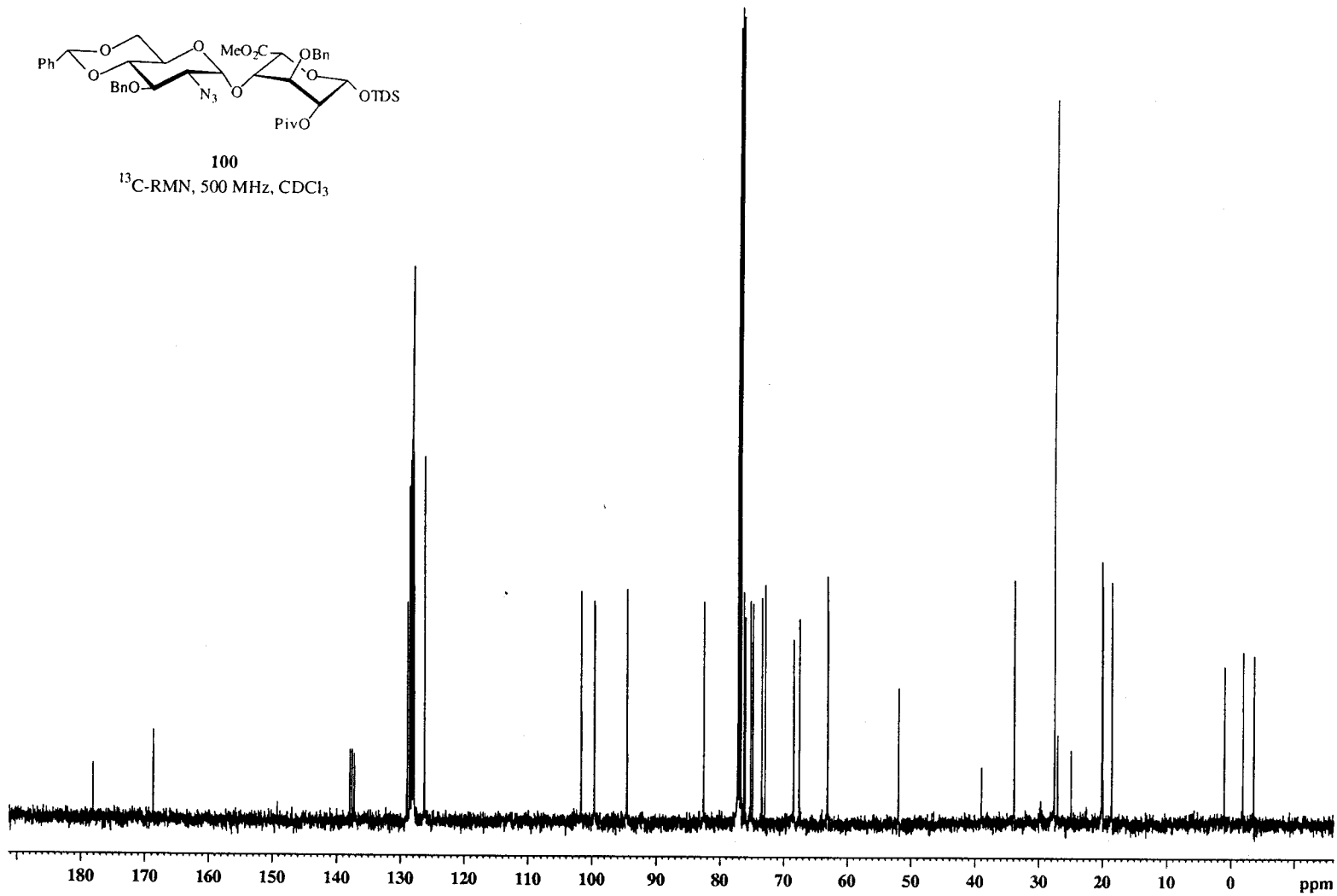
100

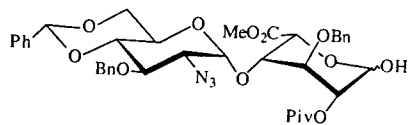
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃



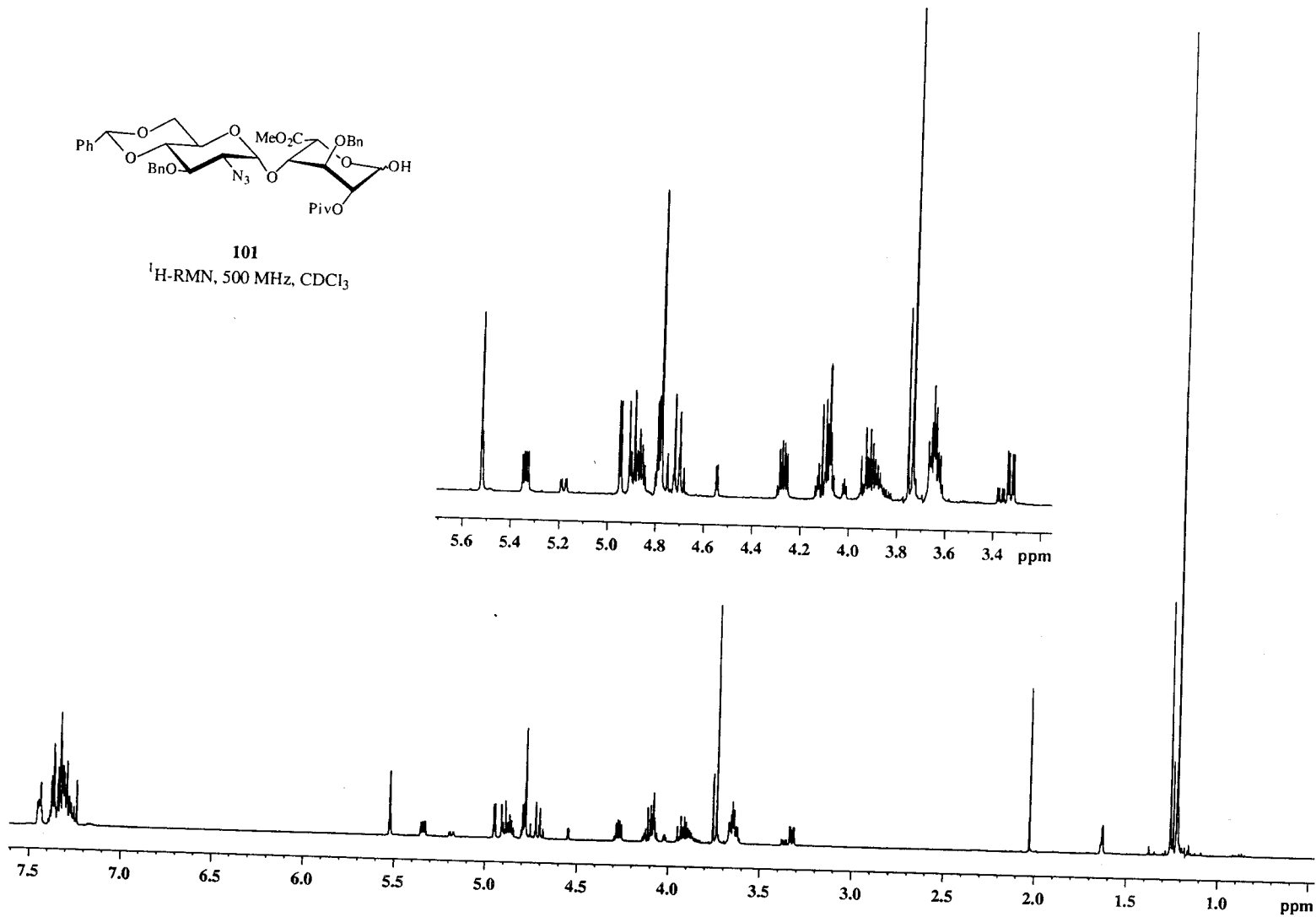


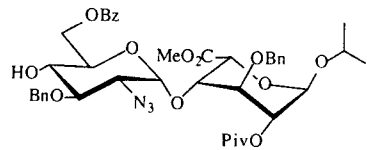
100
¹³C-RMN, 500 MHz, CDCl₃



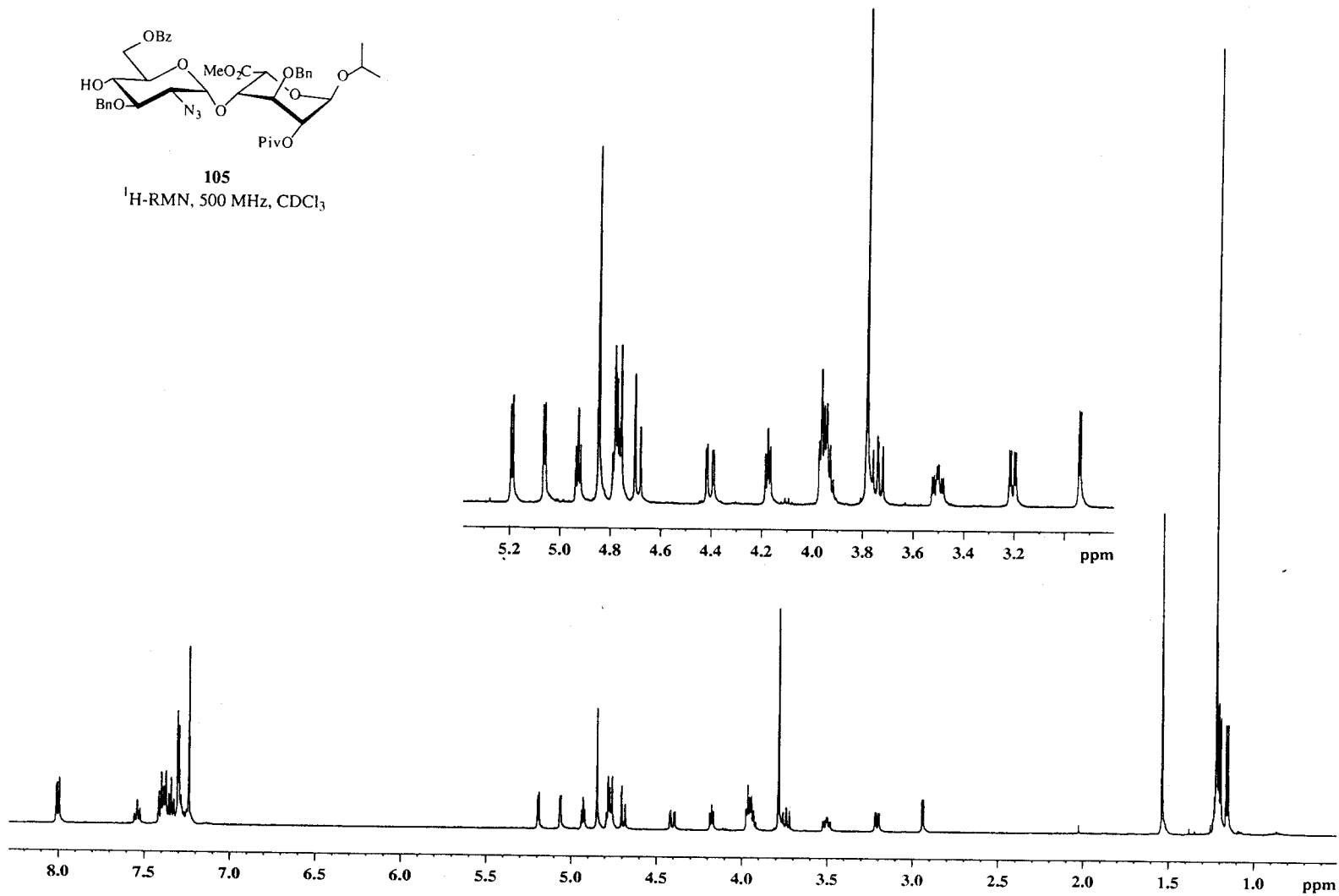


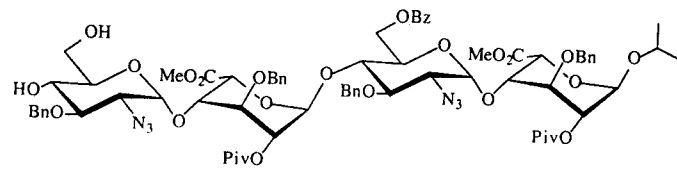
101
 1H -RMN, 500 MHz, $CDCl_3$





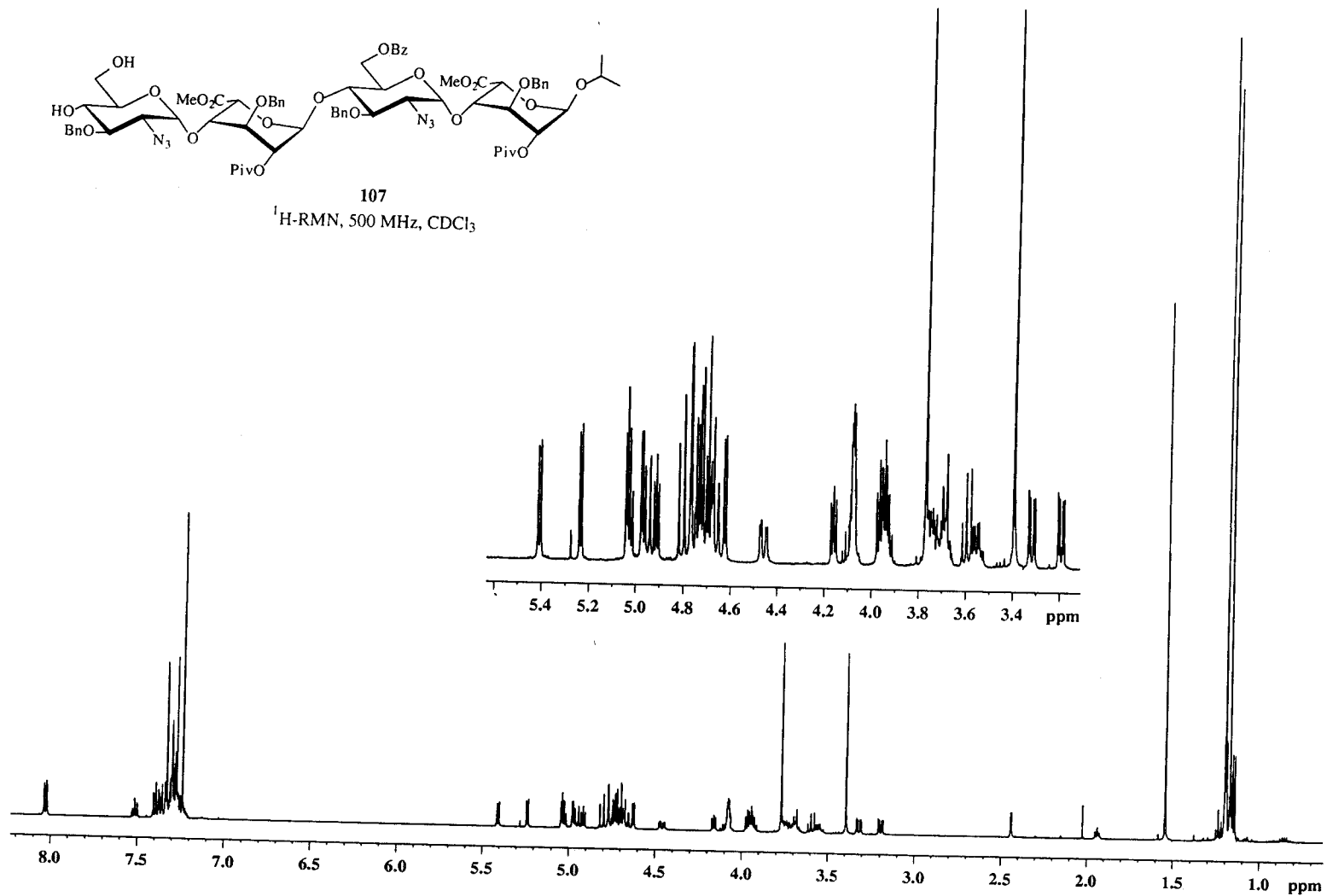
105
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

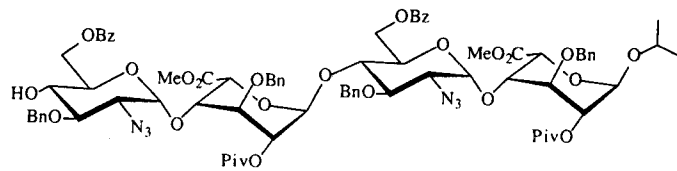




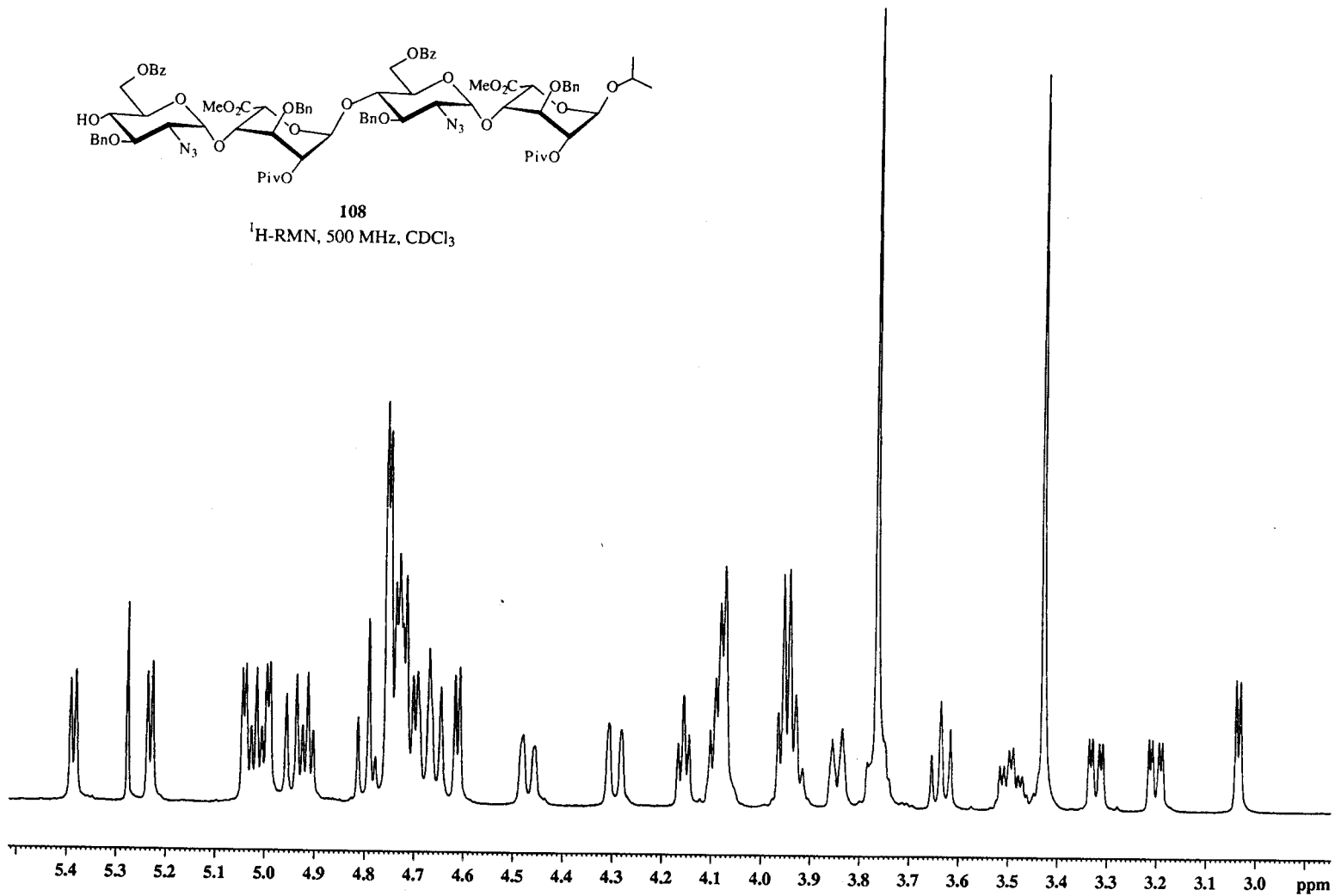
107

¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

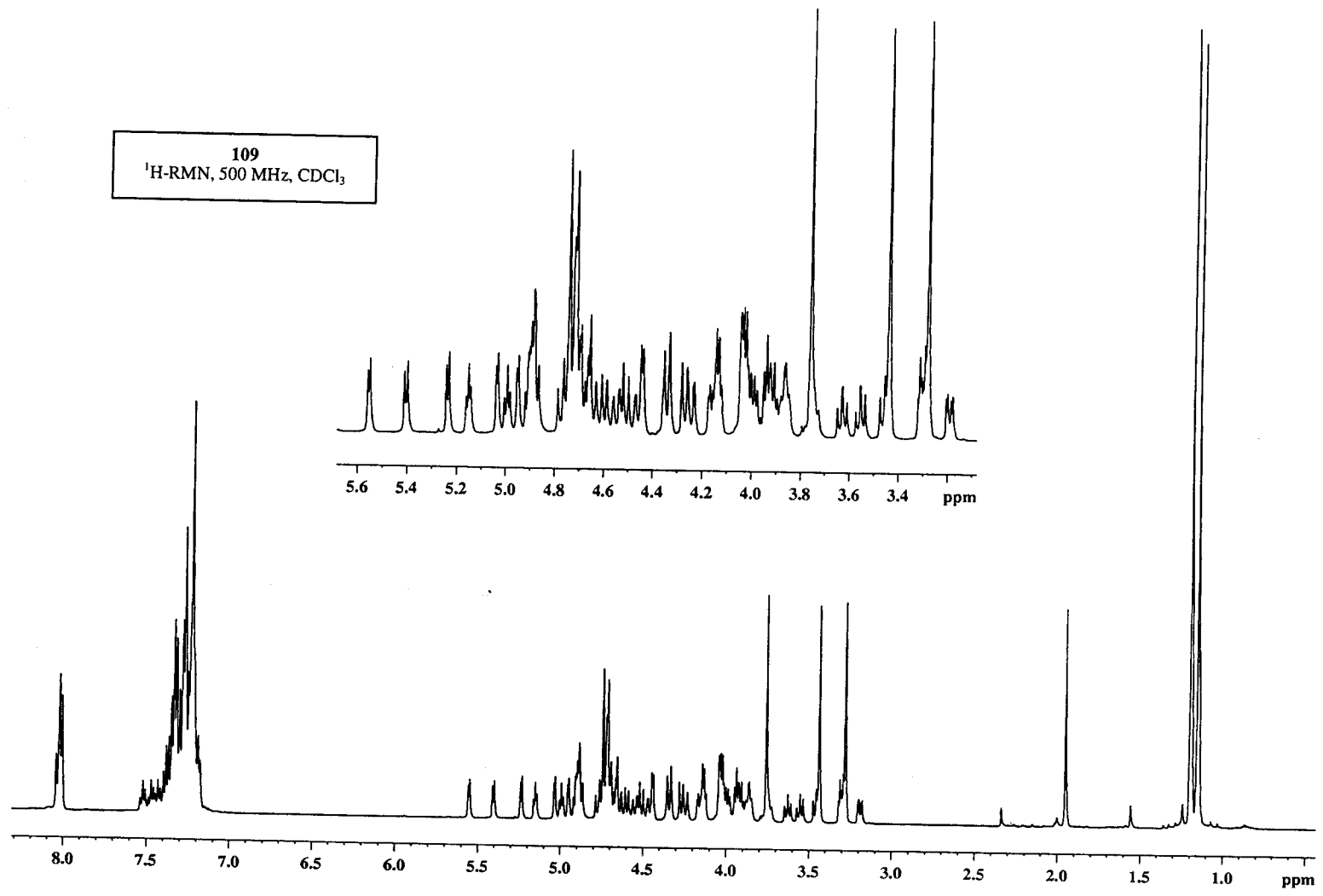


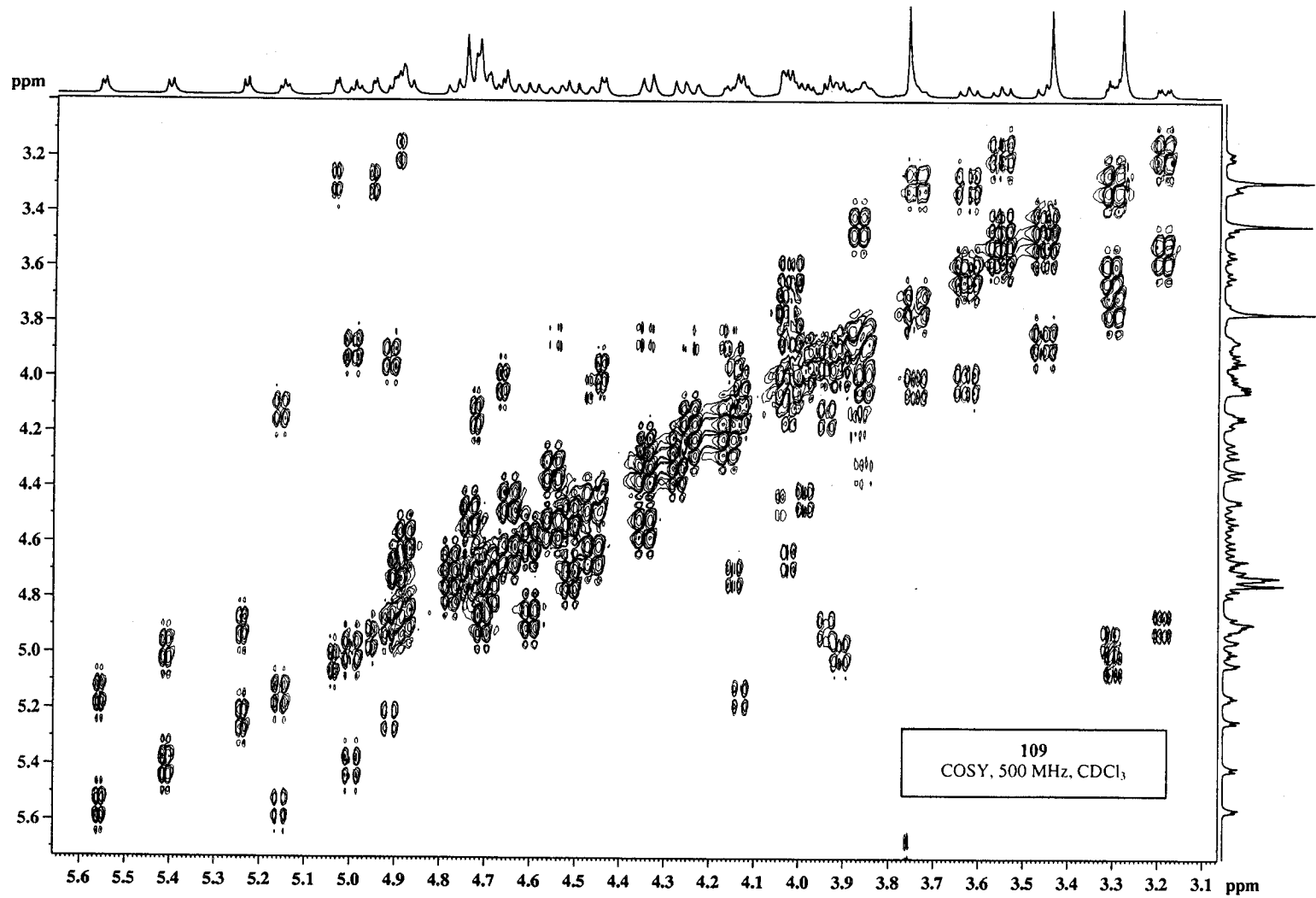


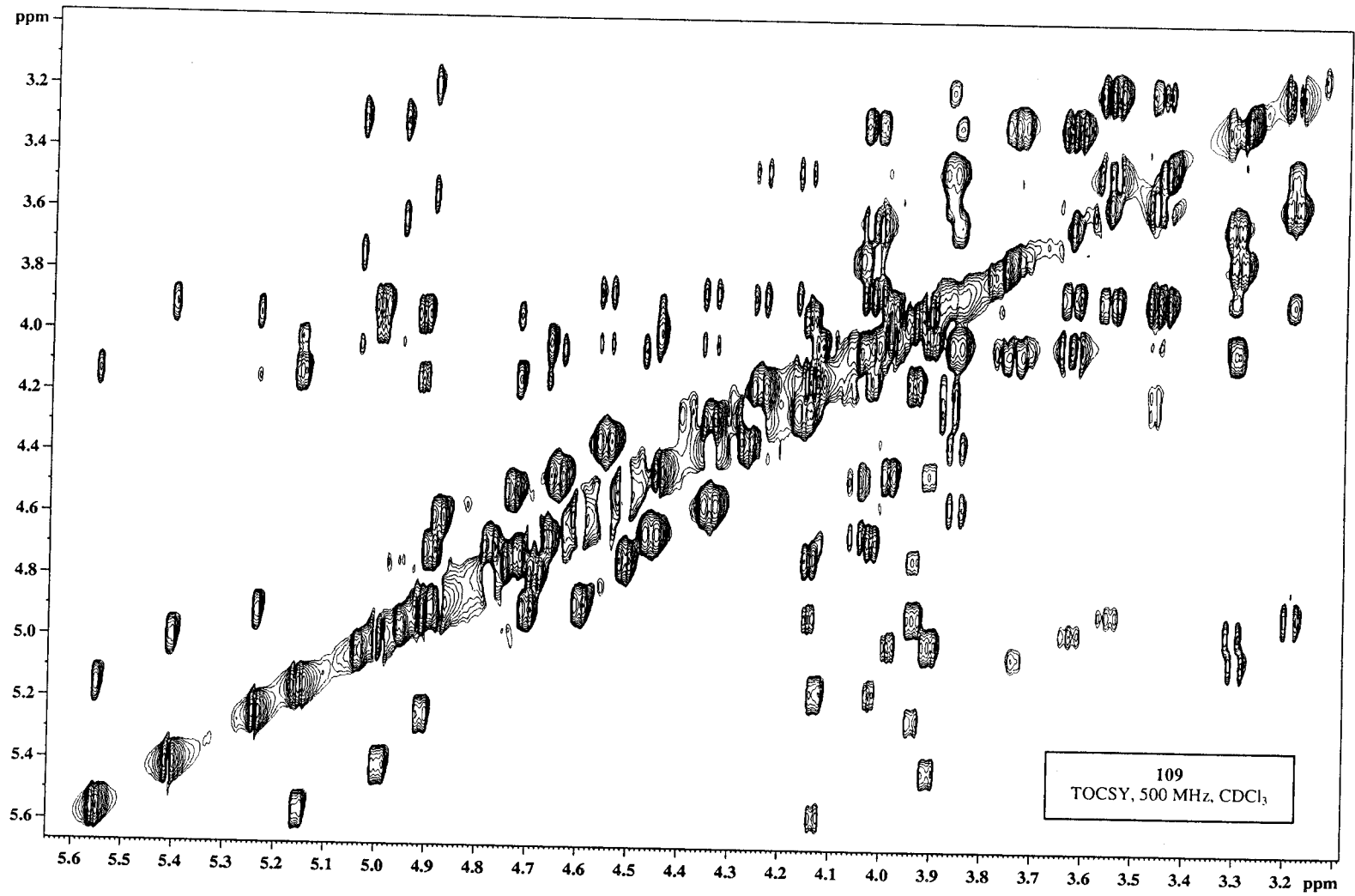
108
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

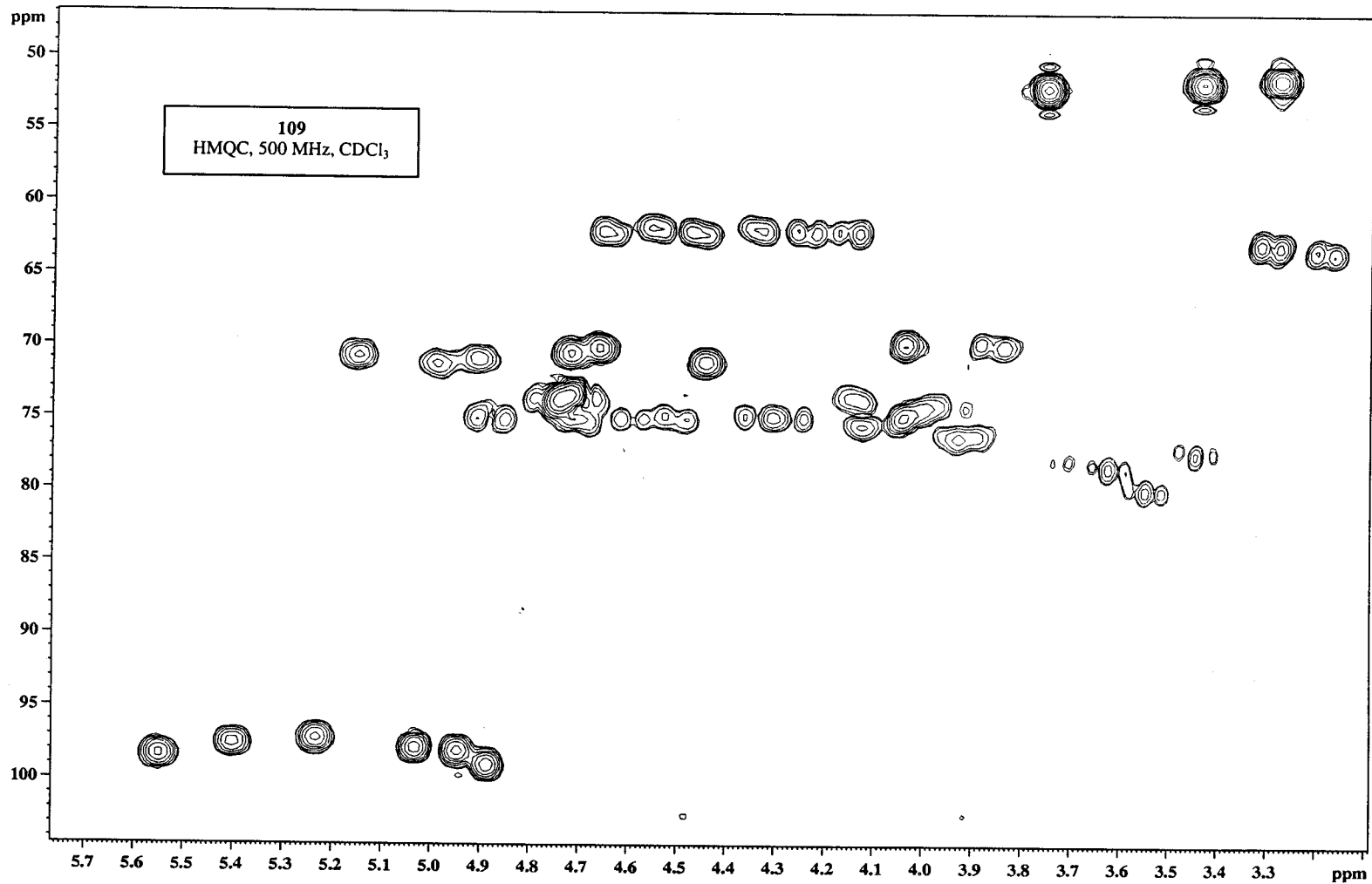


109
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

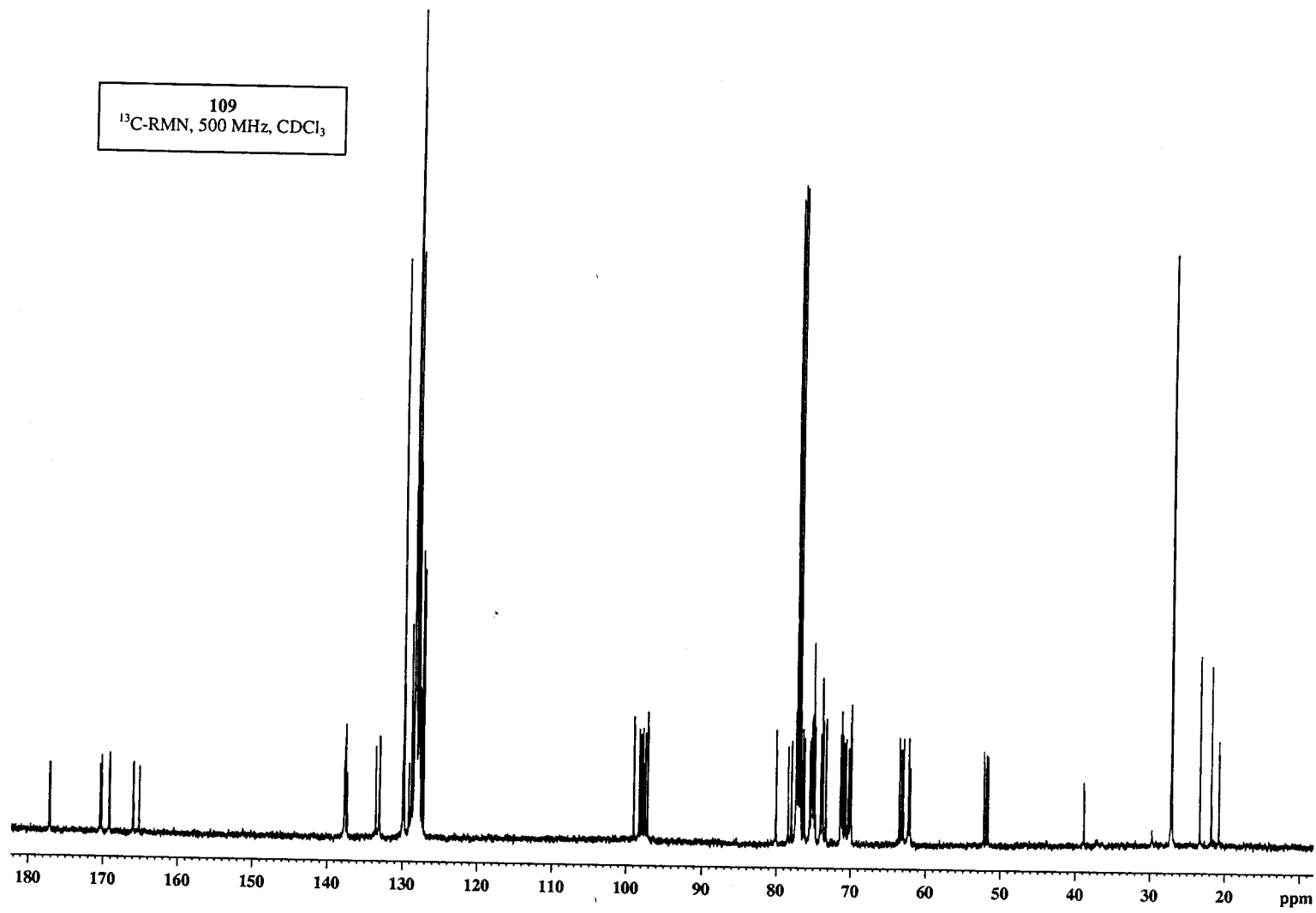


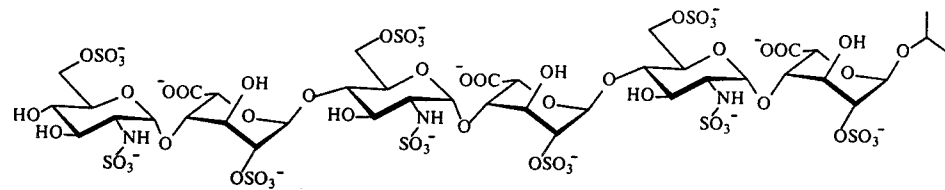




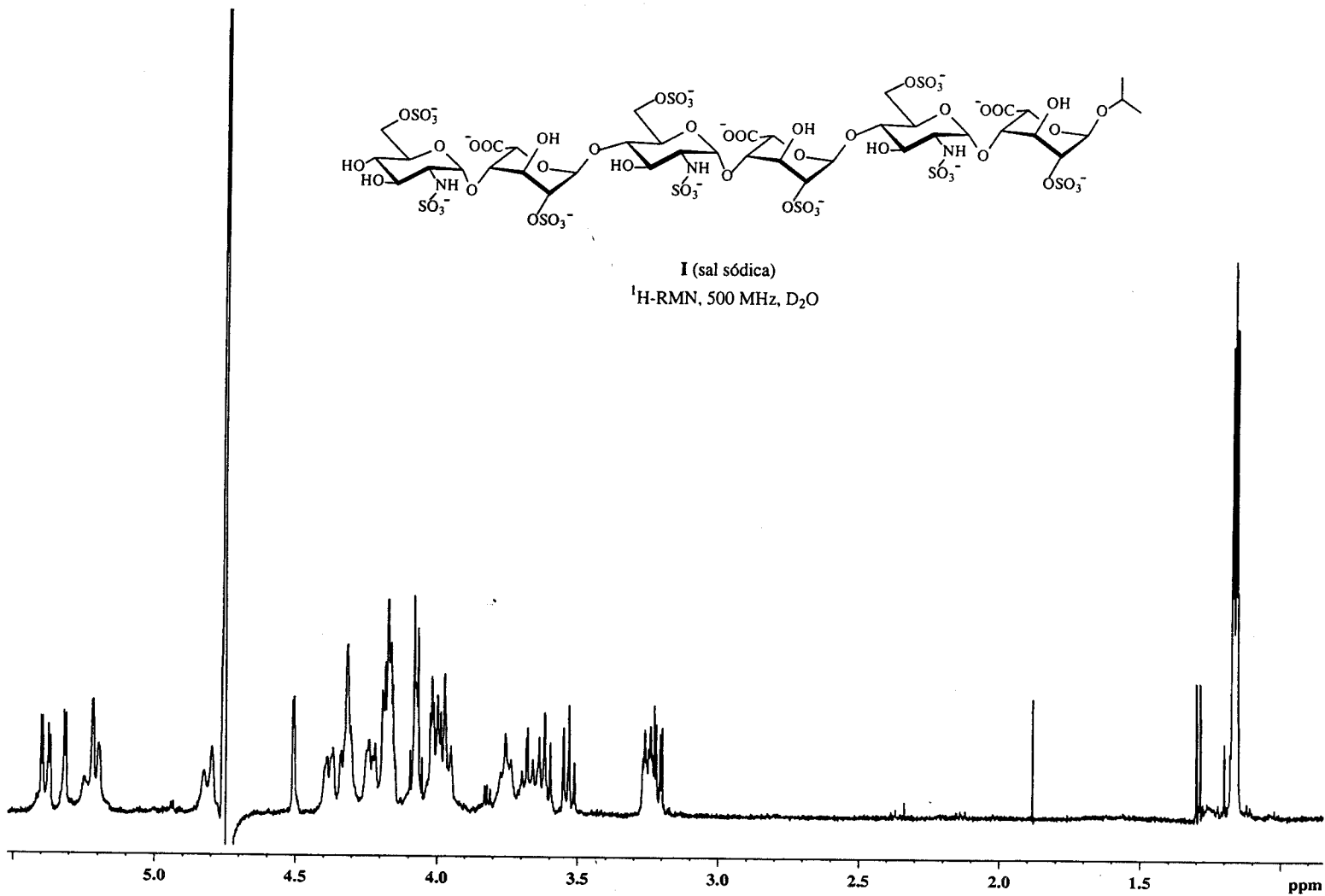


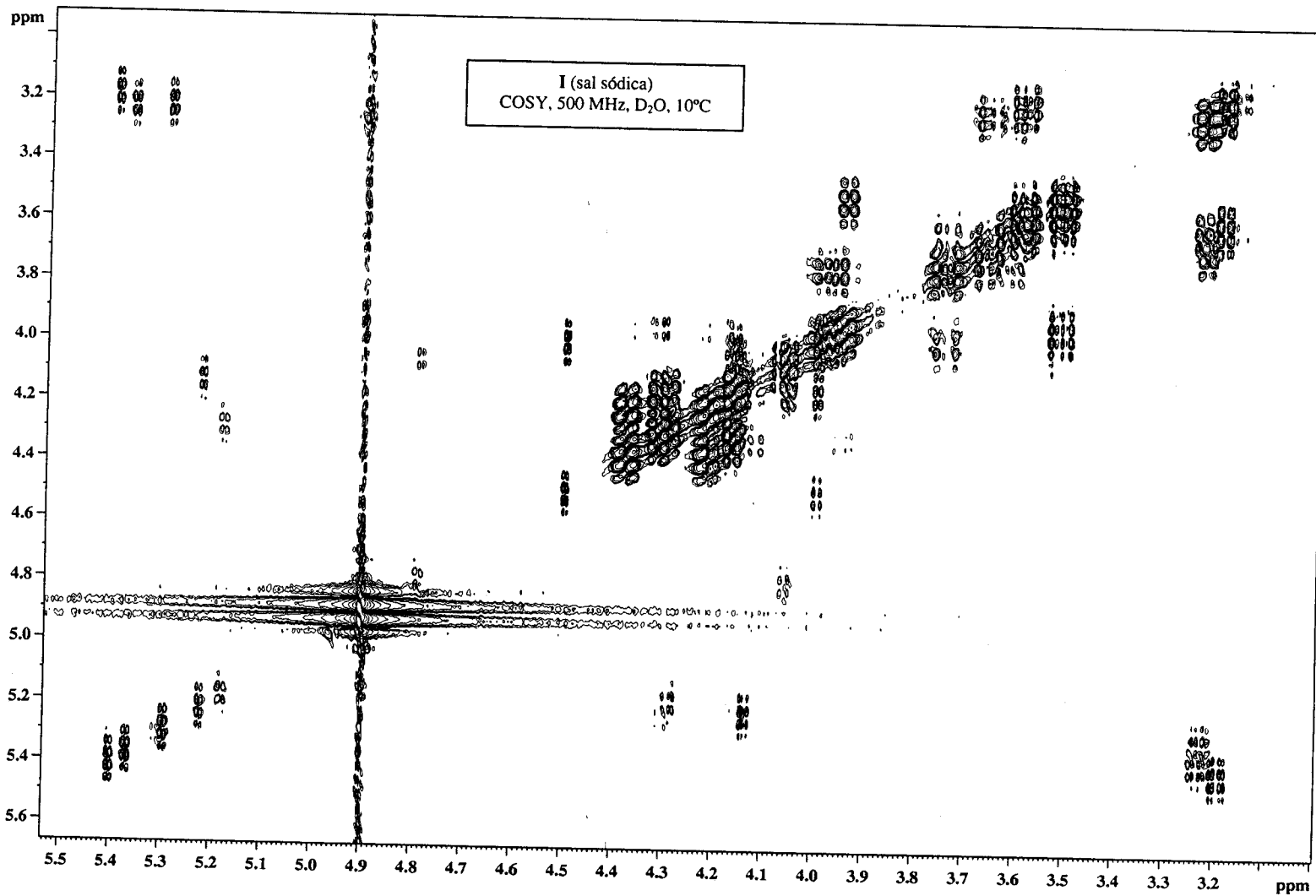
109
 ^{13}C -RMN, 500 MHz, CDCl_3

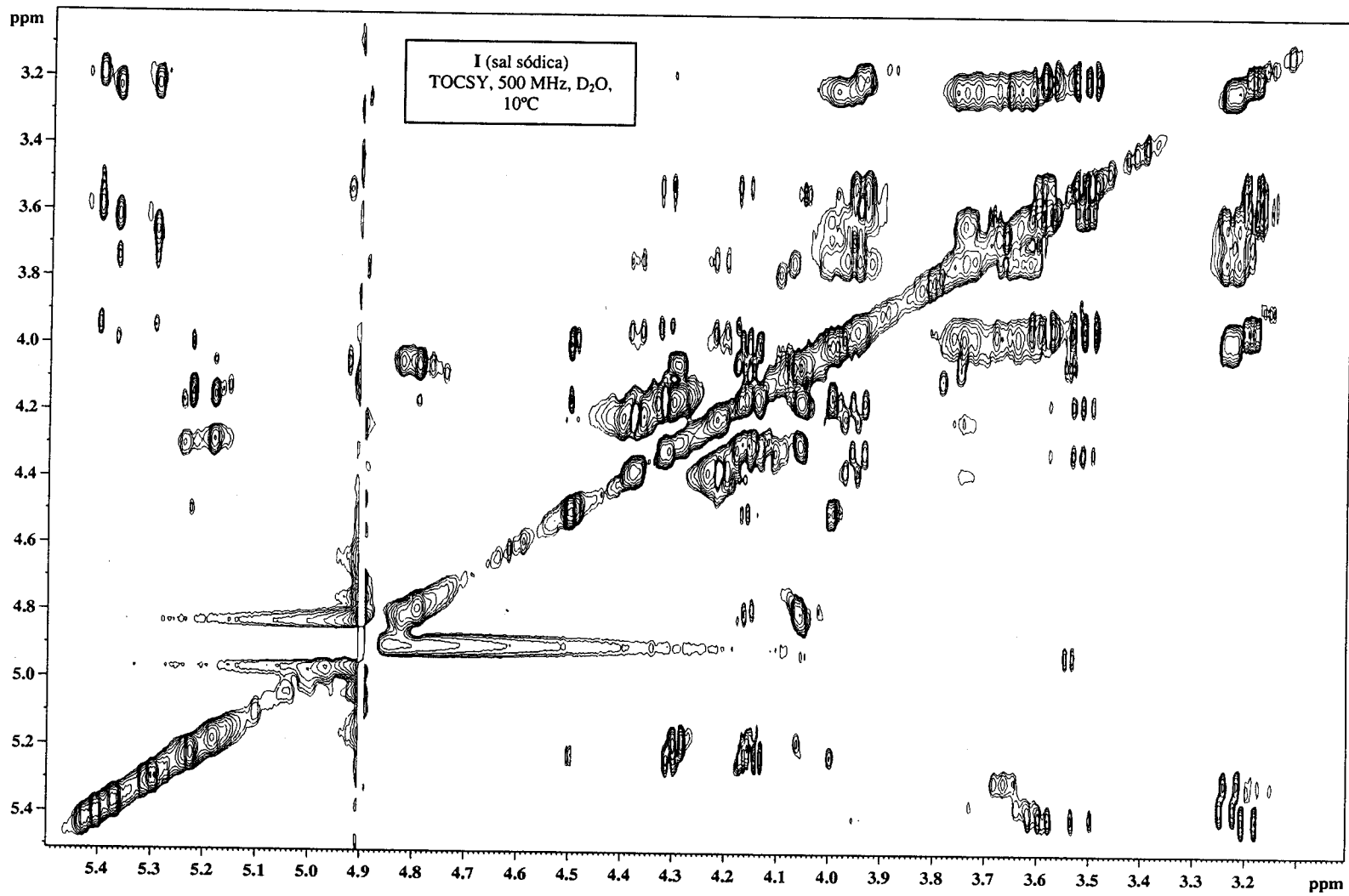


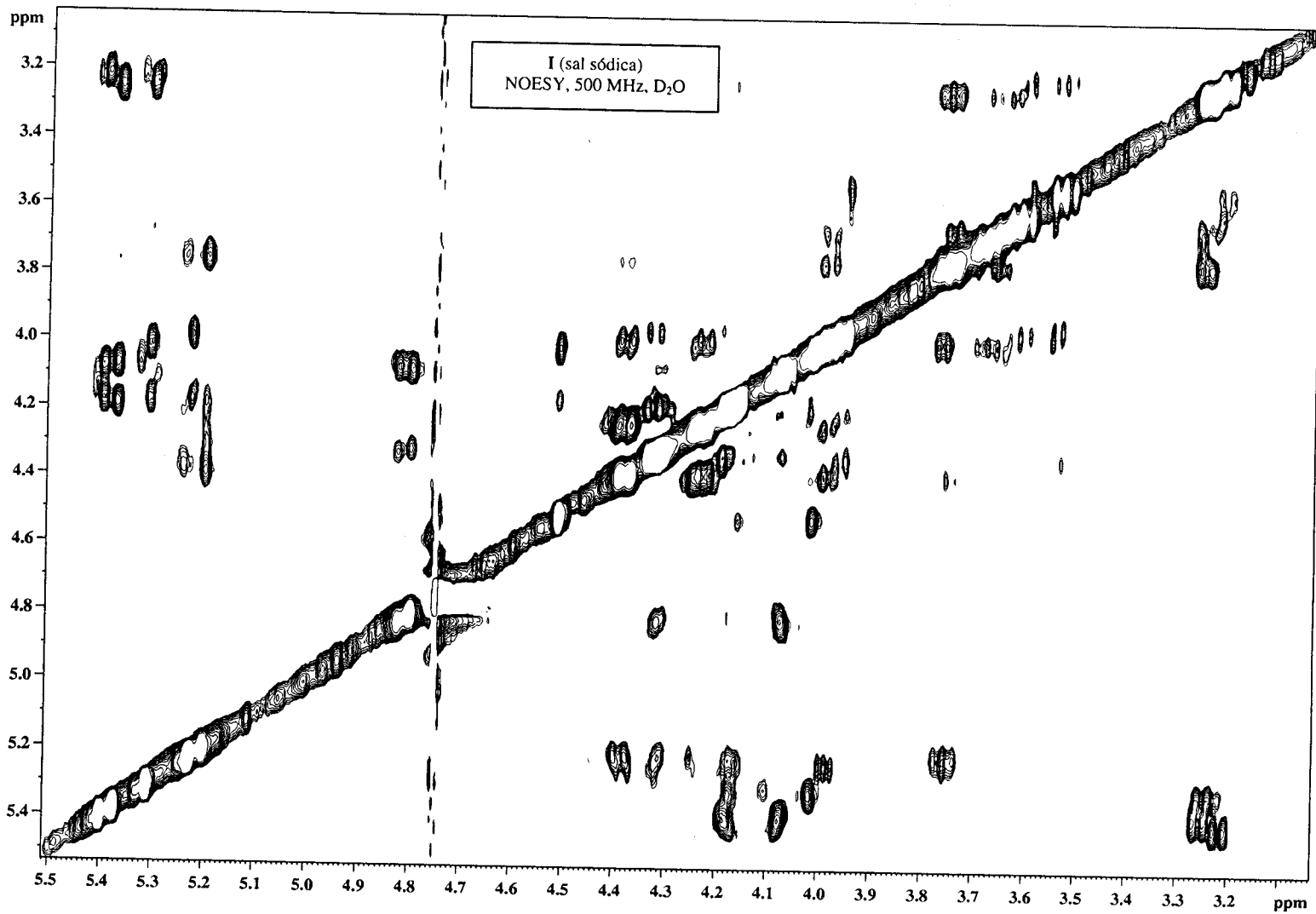


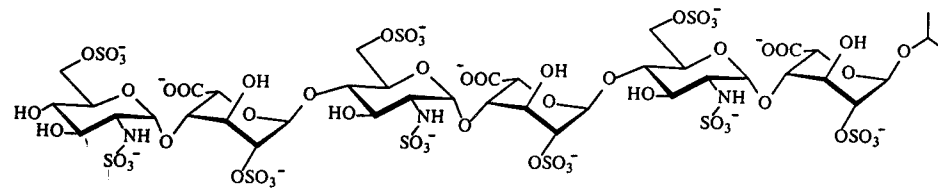
I (sal sódica)
¹H-RMN, 500 MHz, D₂O



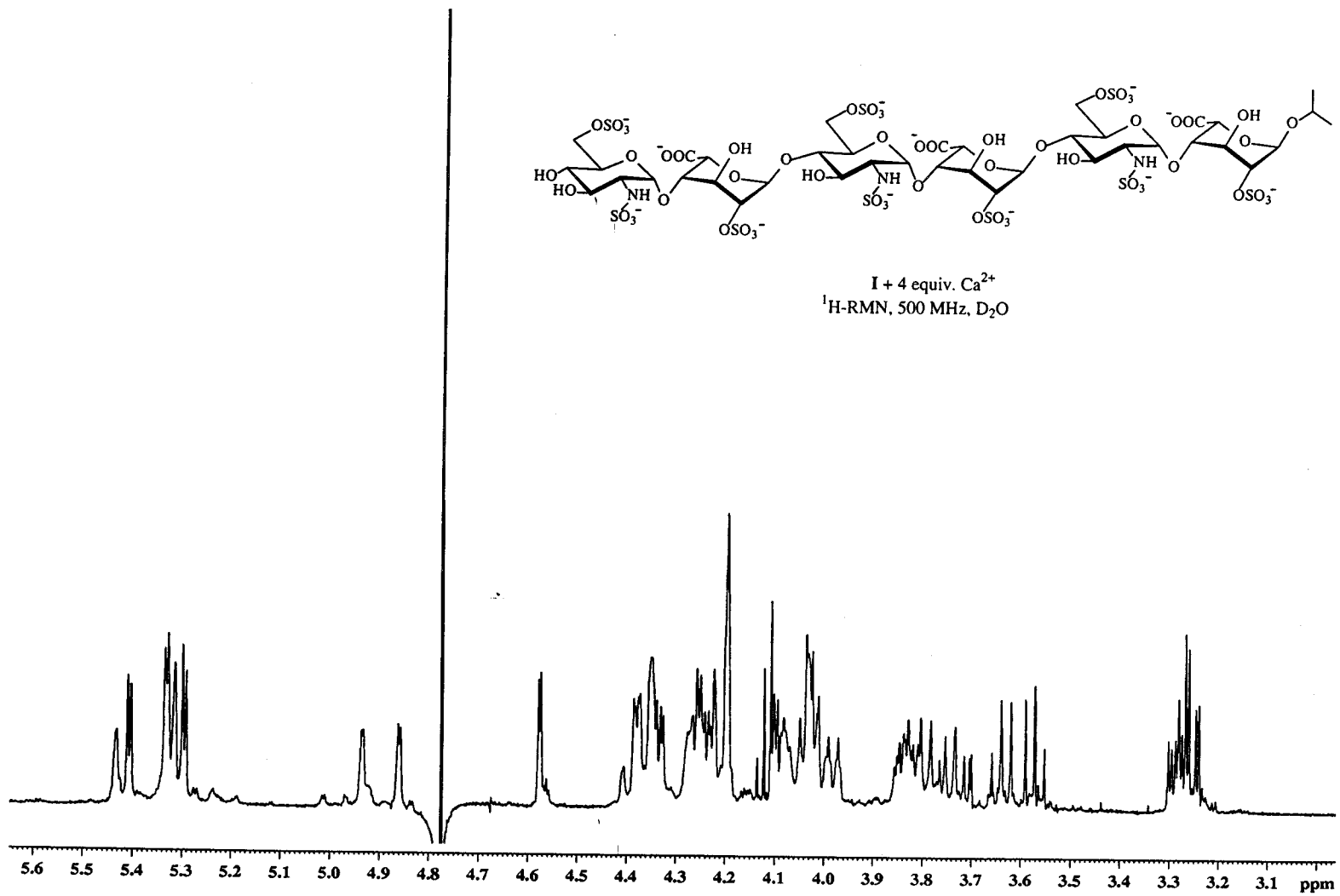


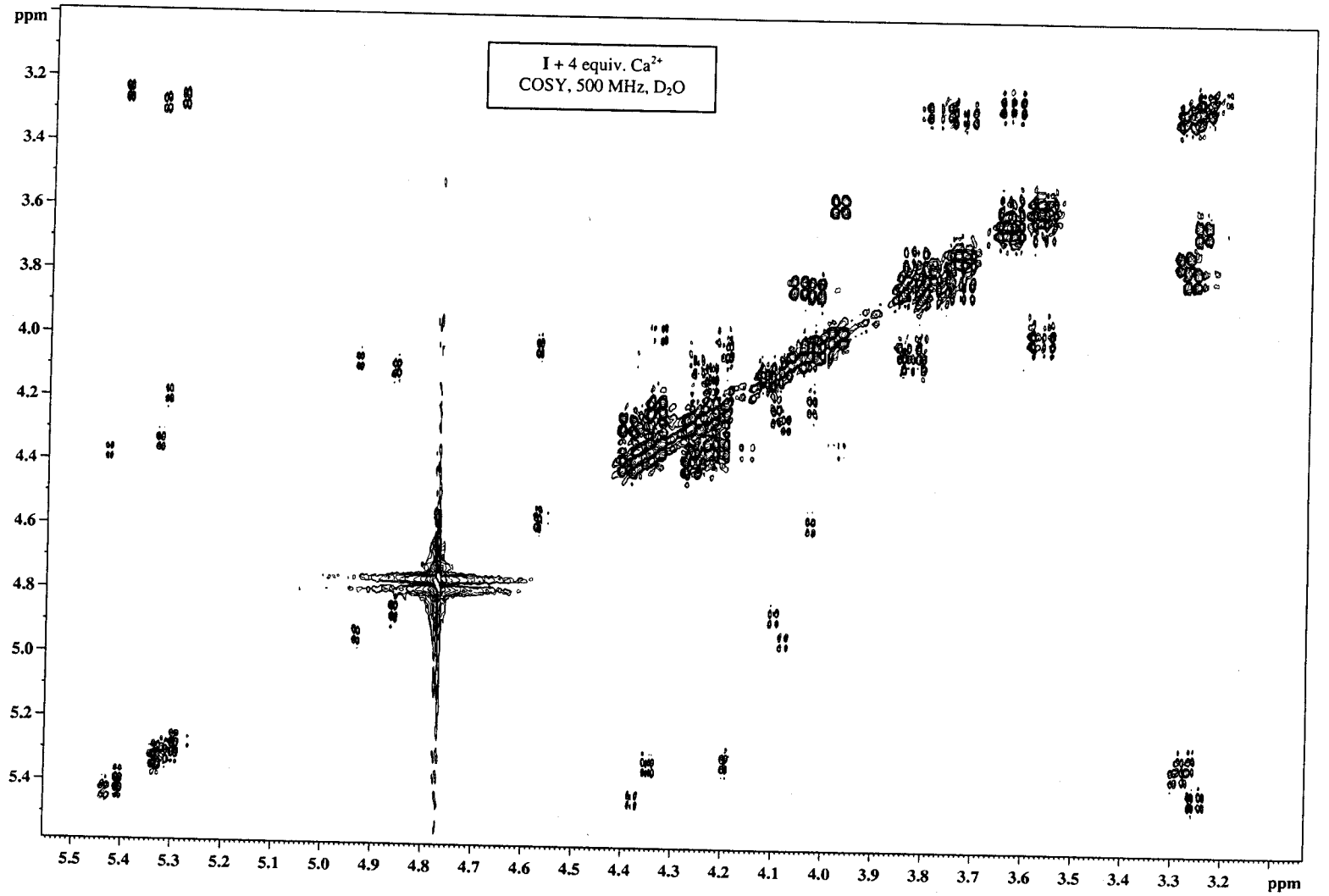


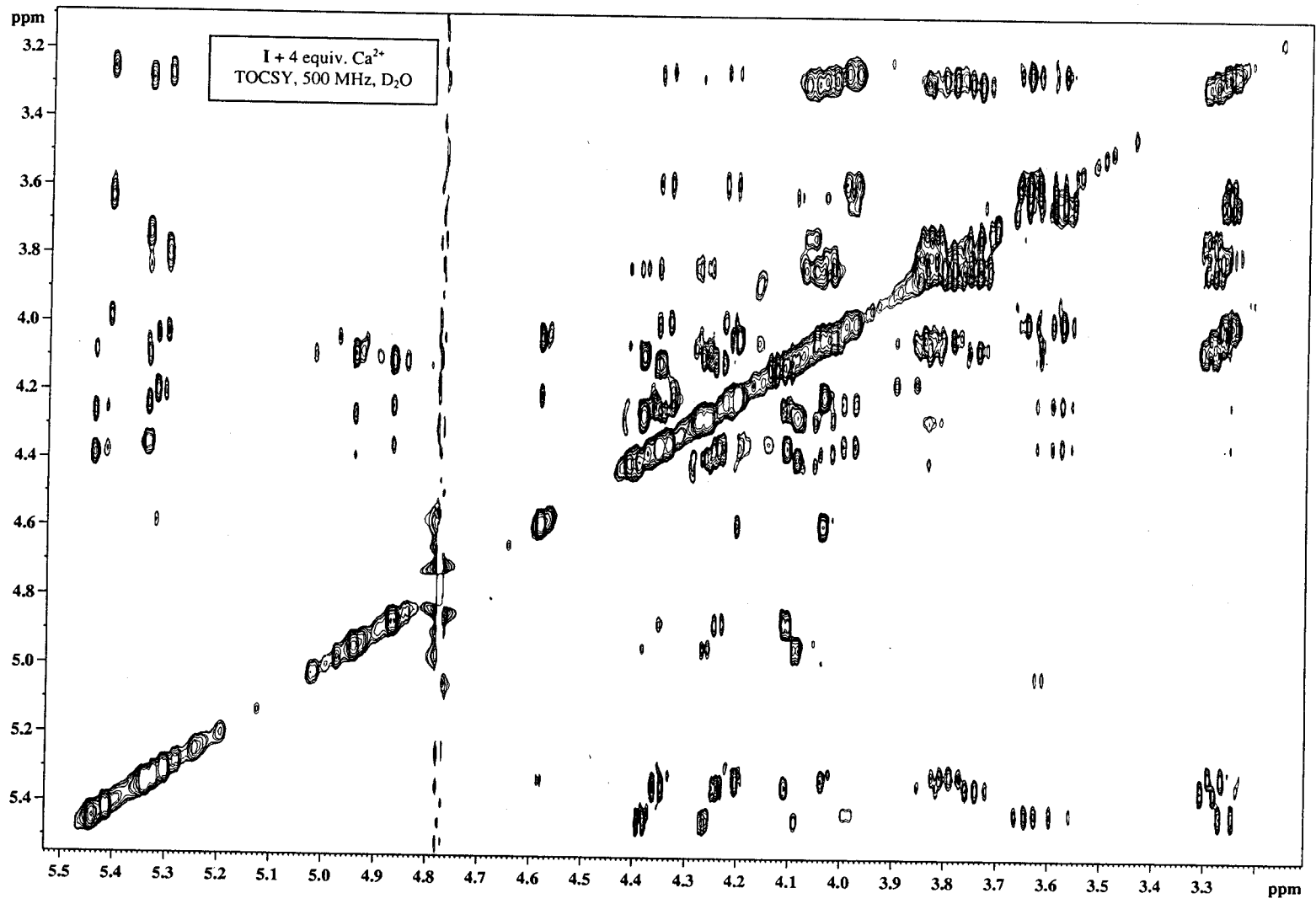


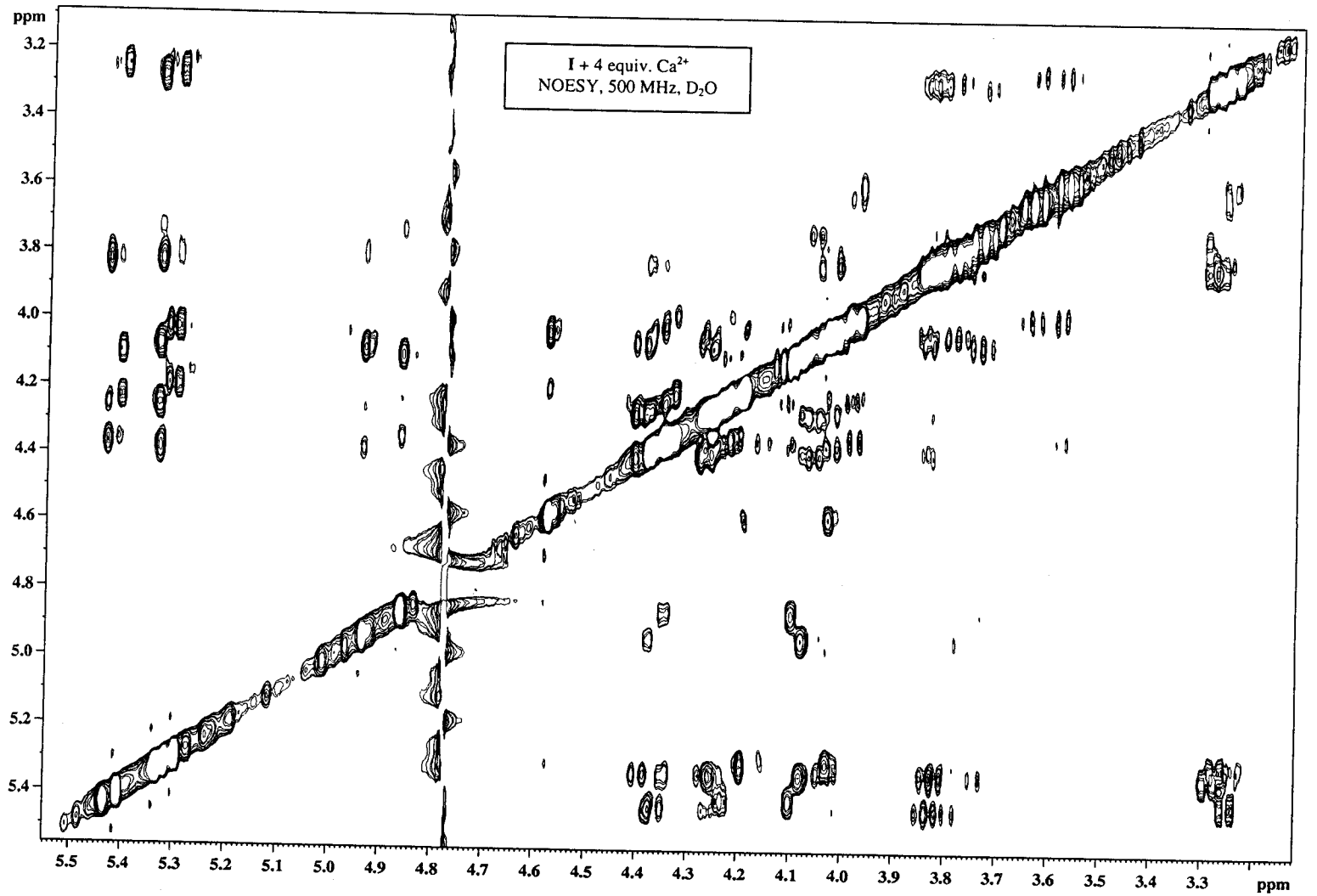


I + 4 equiv. Ca²⁺
¹H-RMN, 500 MHz, D₂O

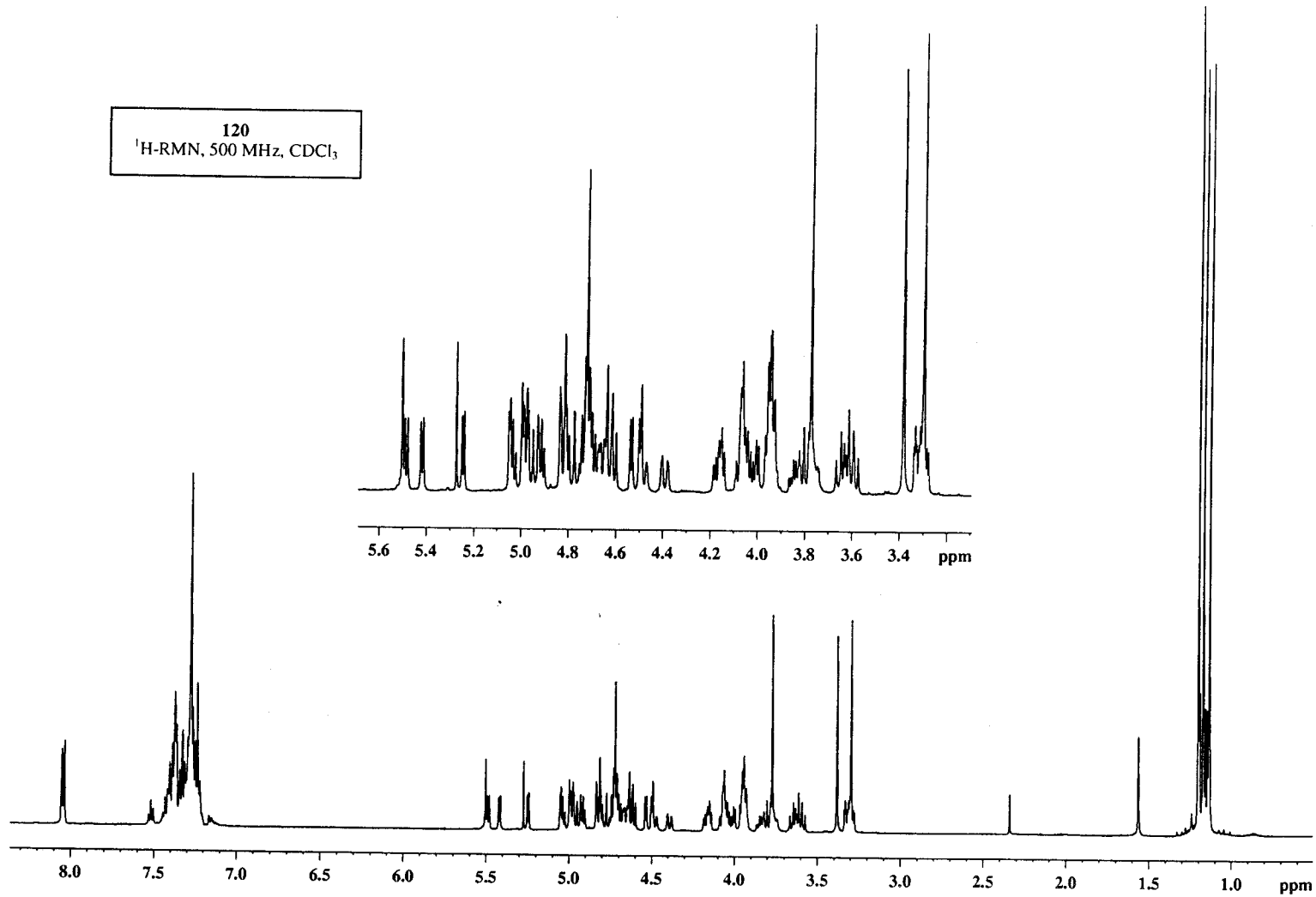


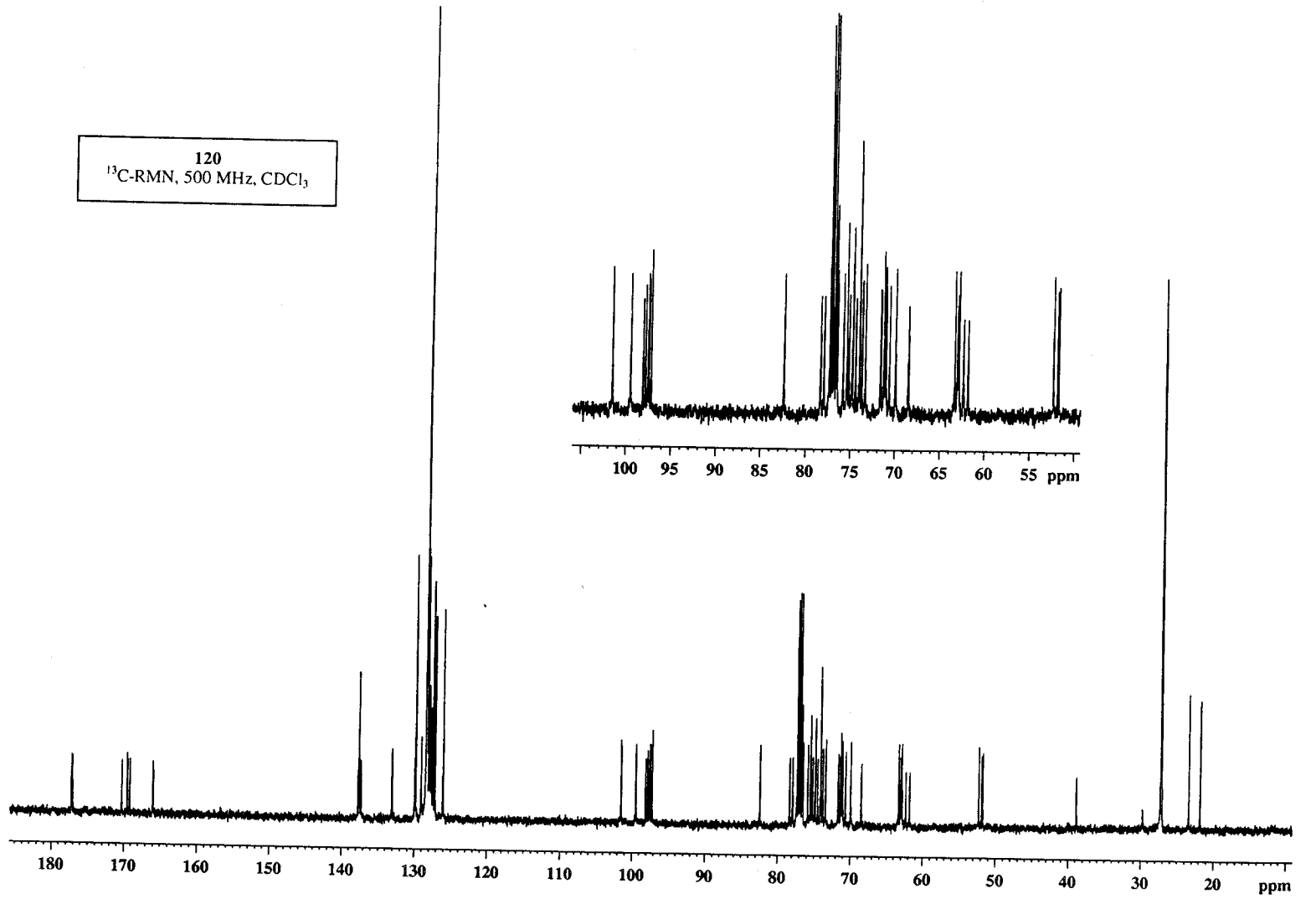




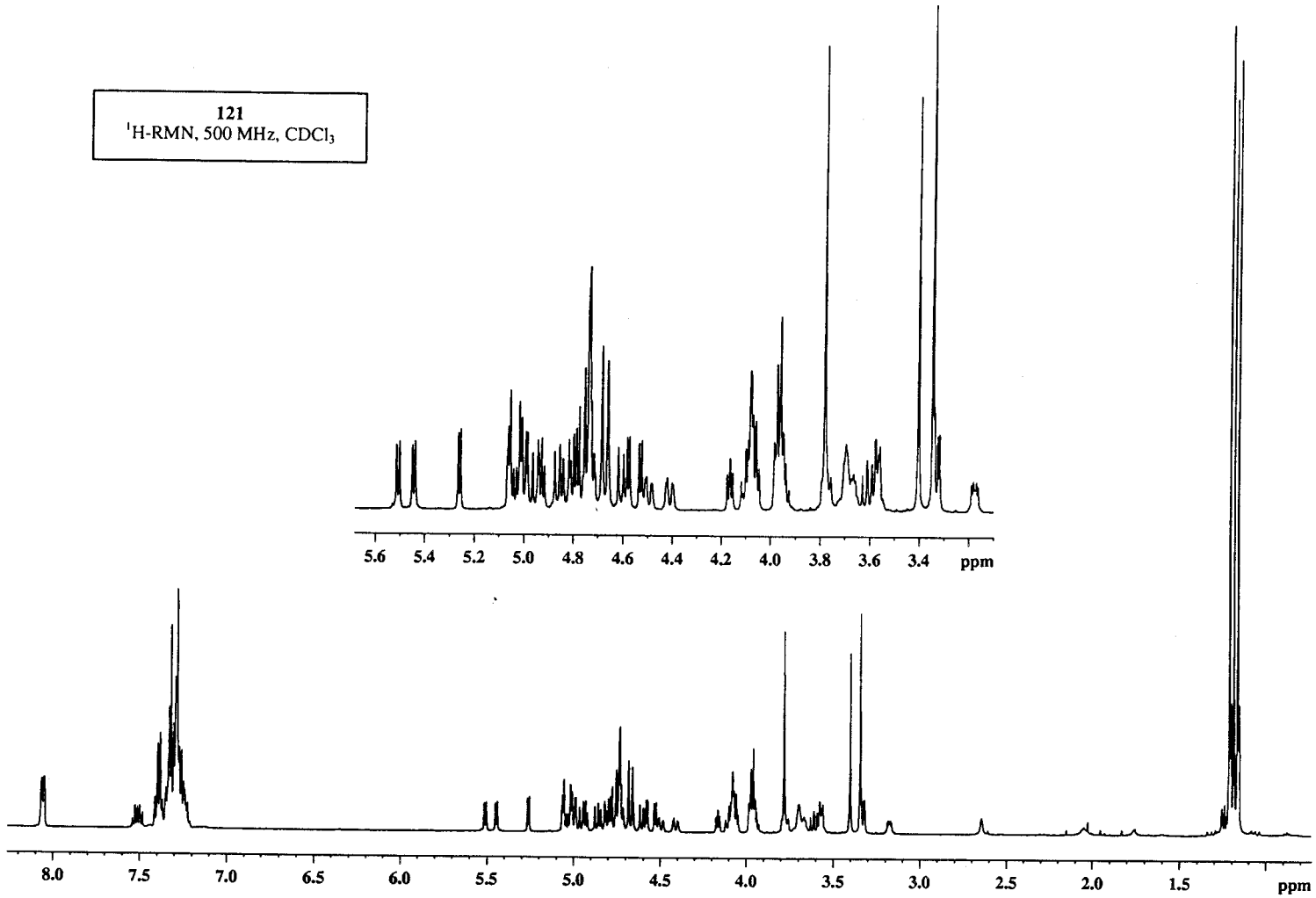


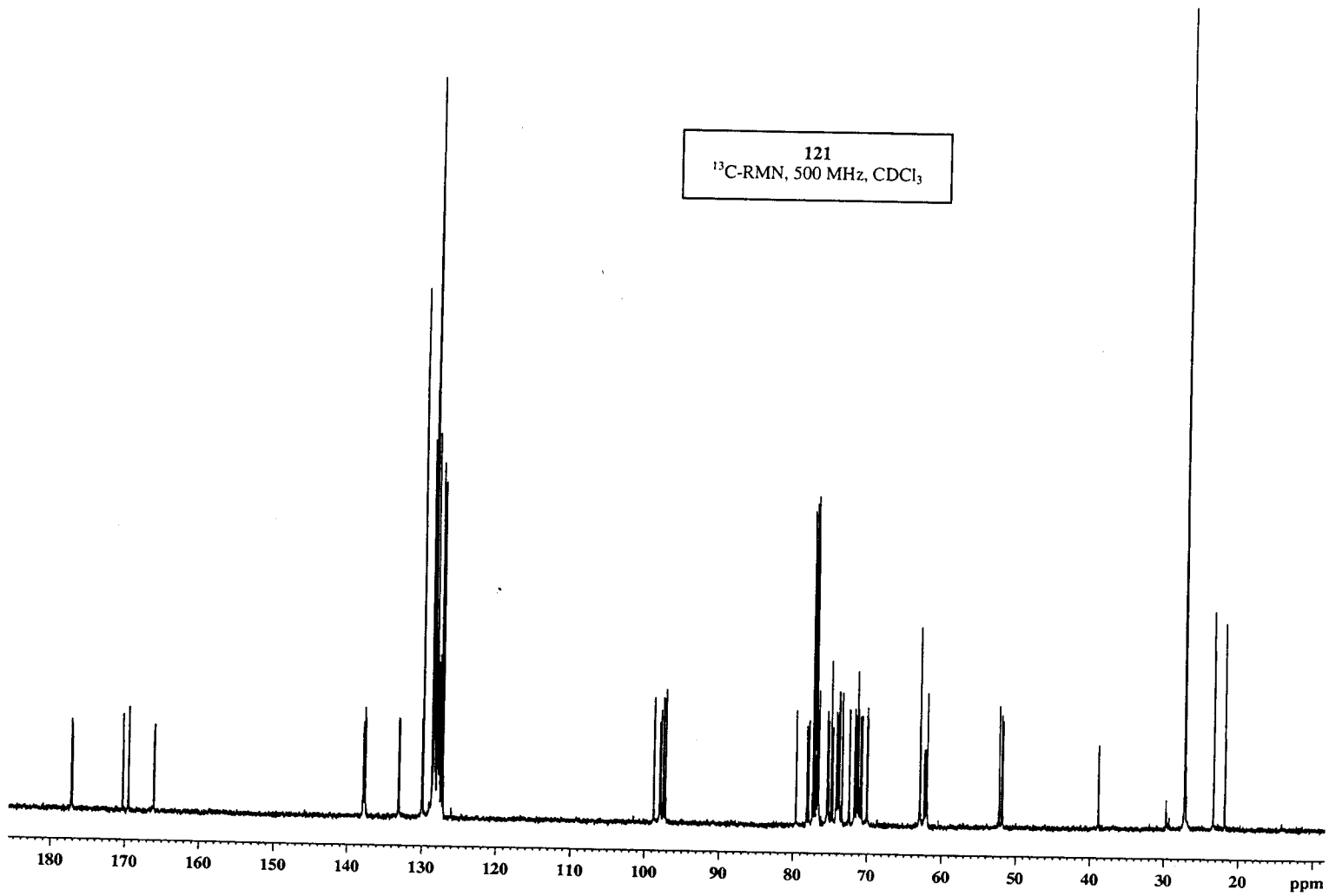
120
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃



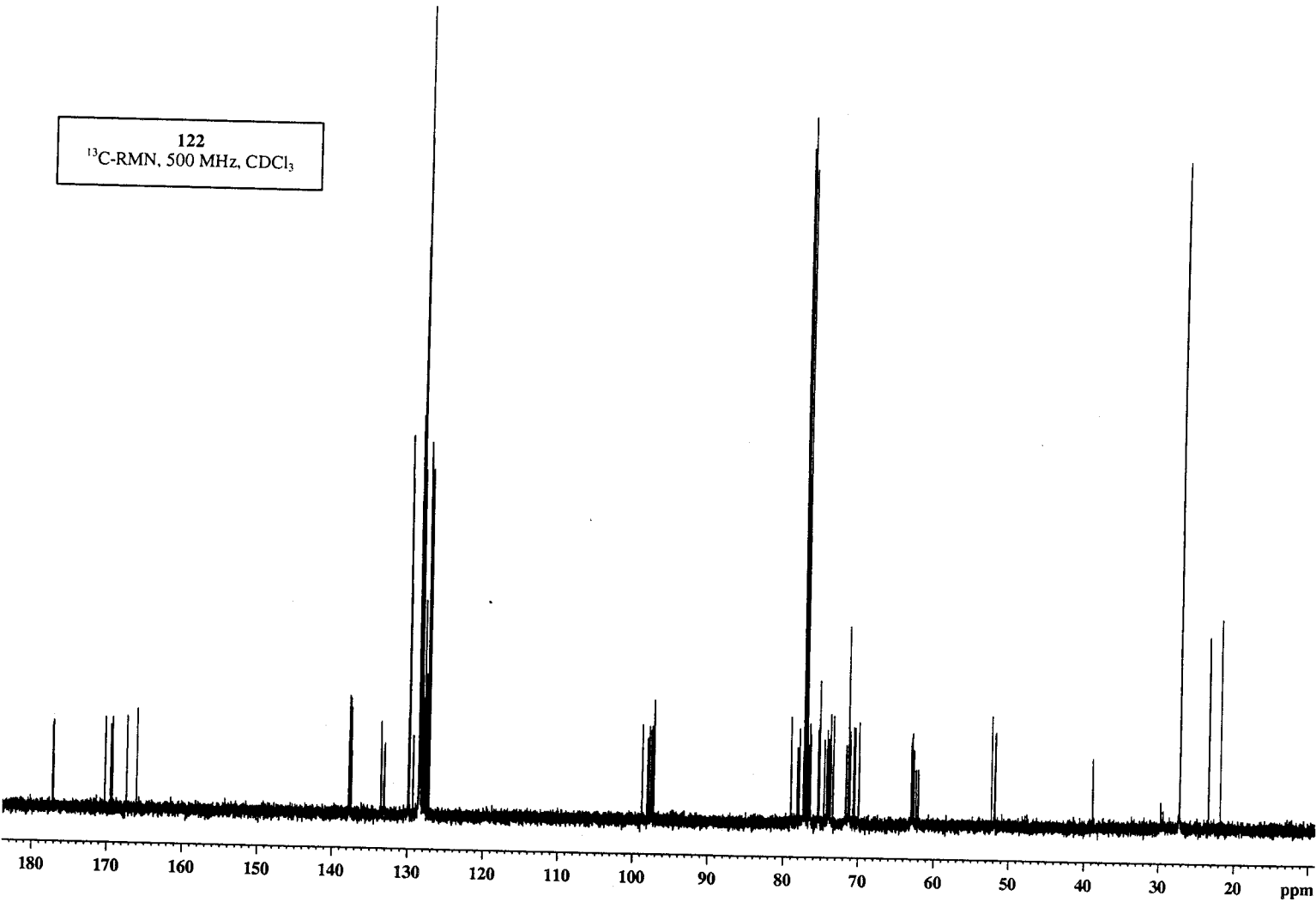


121
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

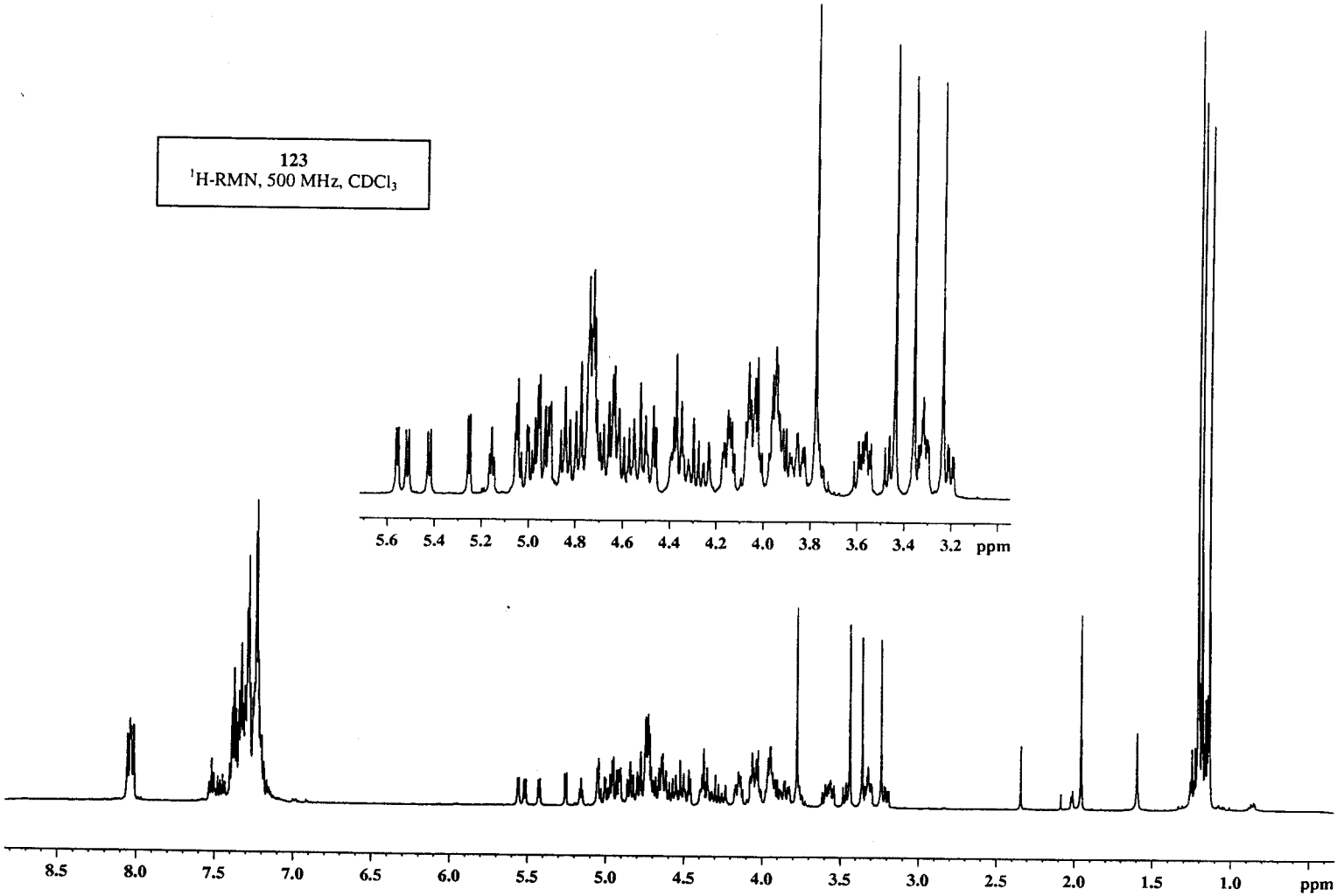


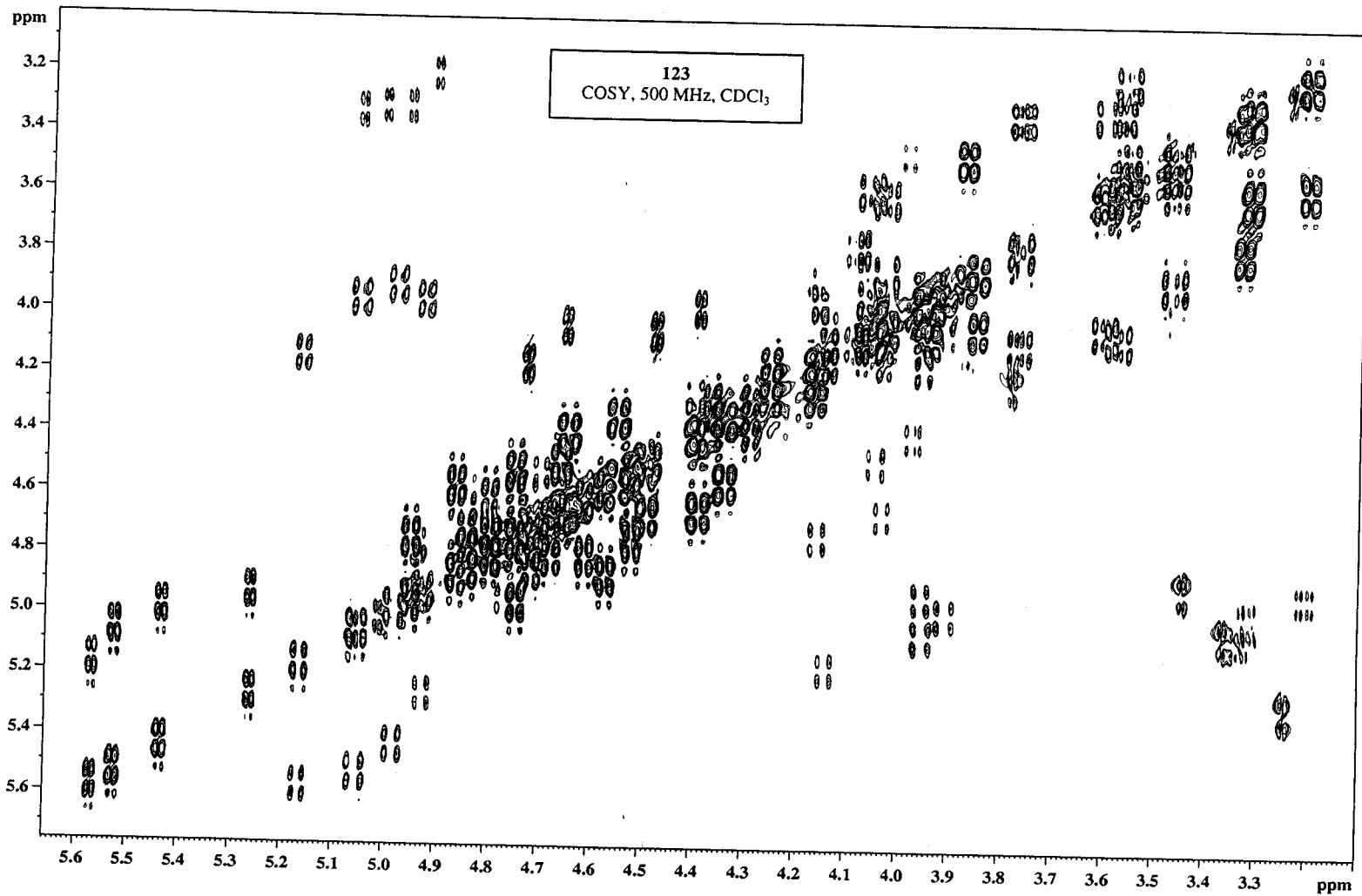


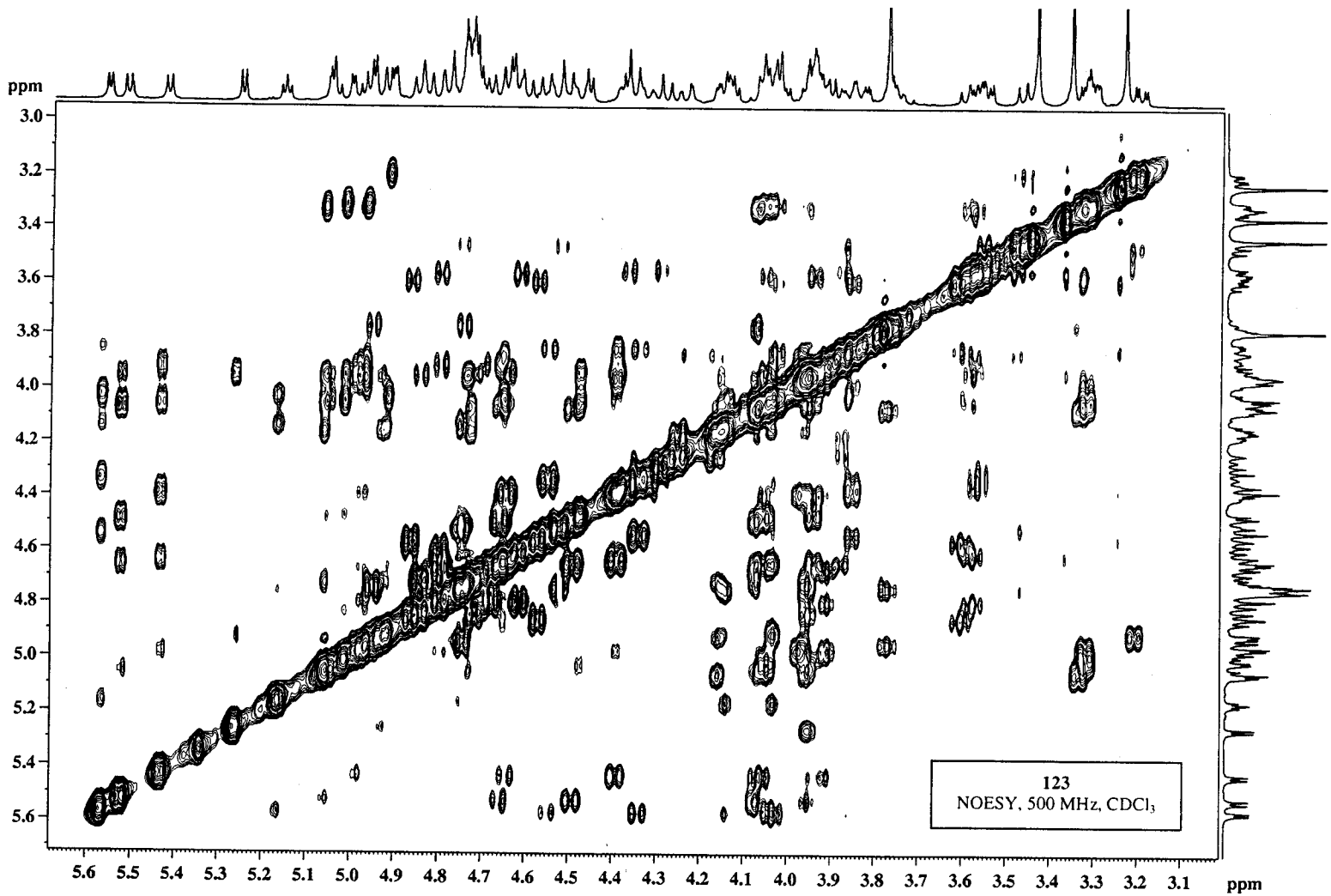
122
¹³C-RMN, 500 MHz, CDCl₃

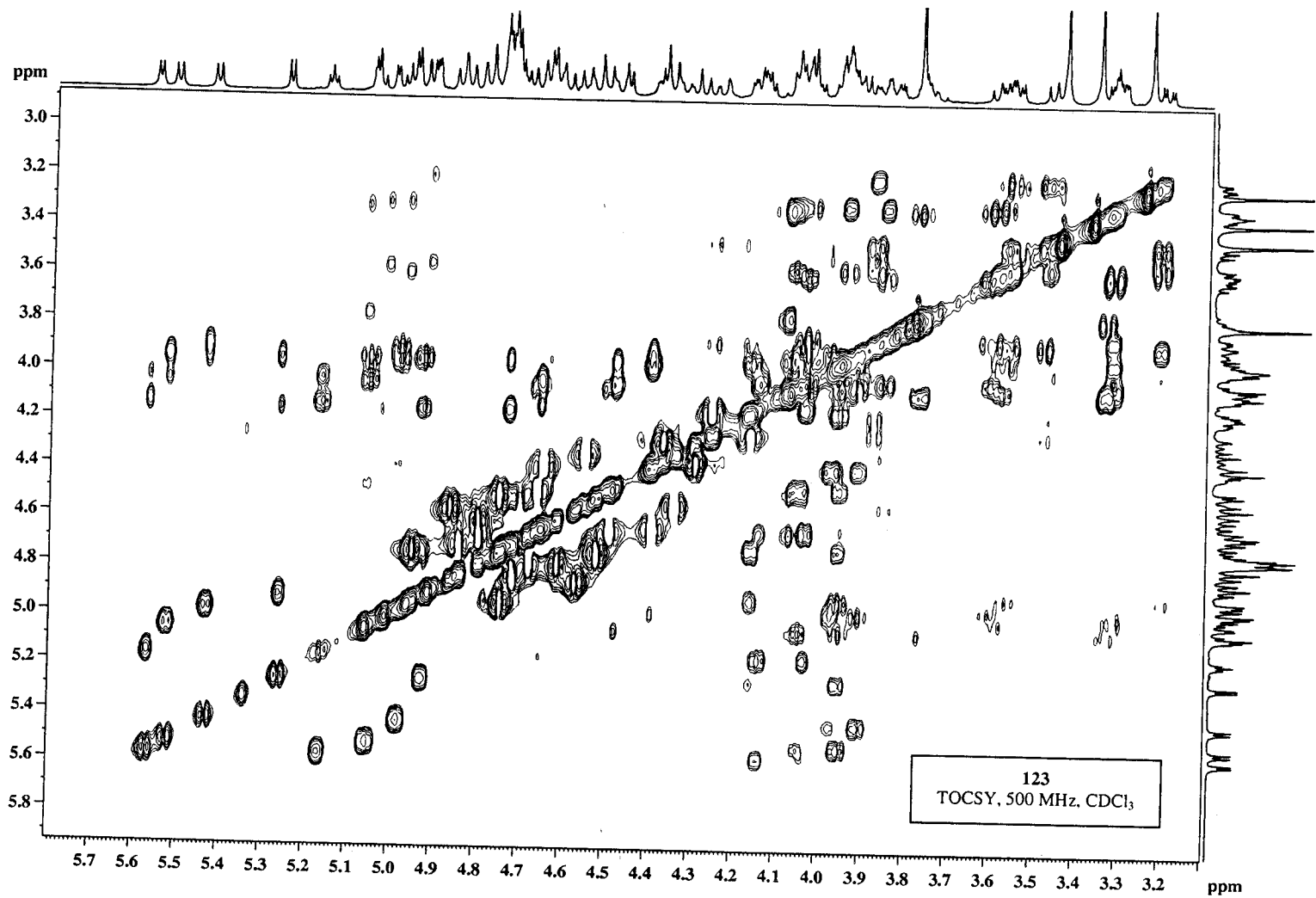


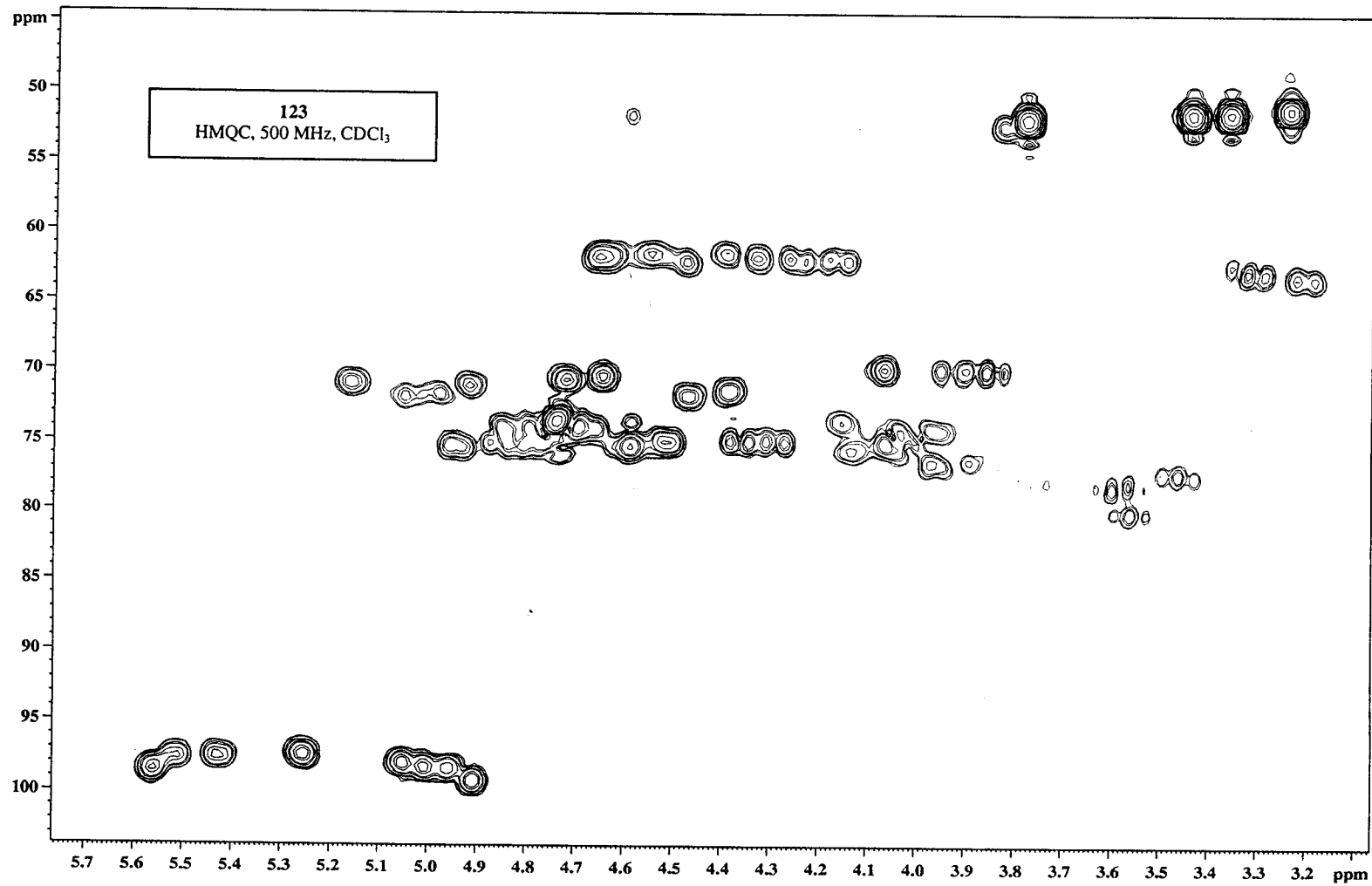
123
¹H-RMN, 500 MHz, CDCl₃

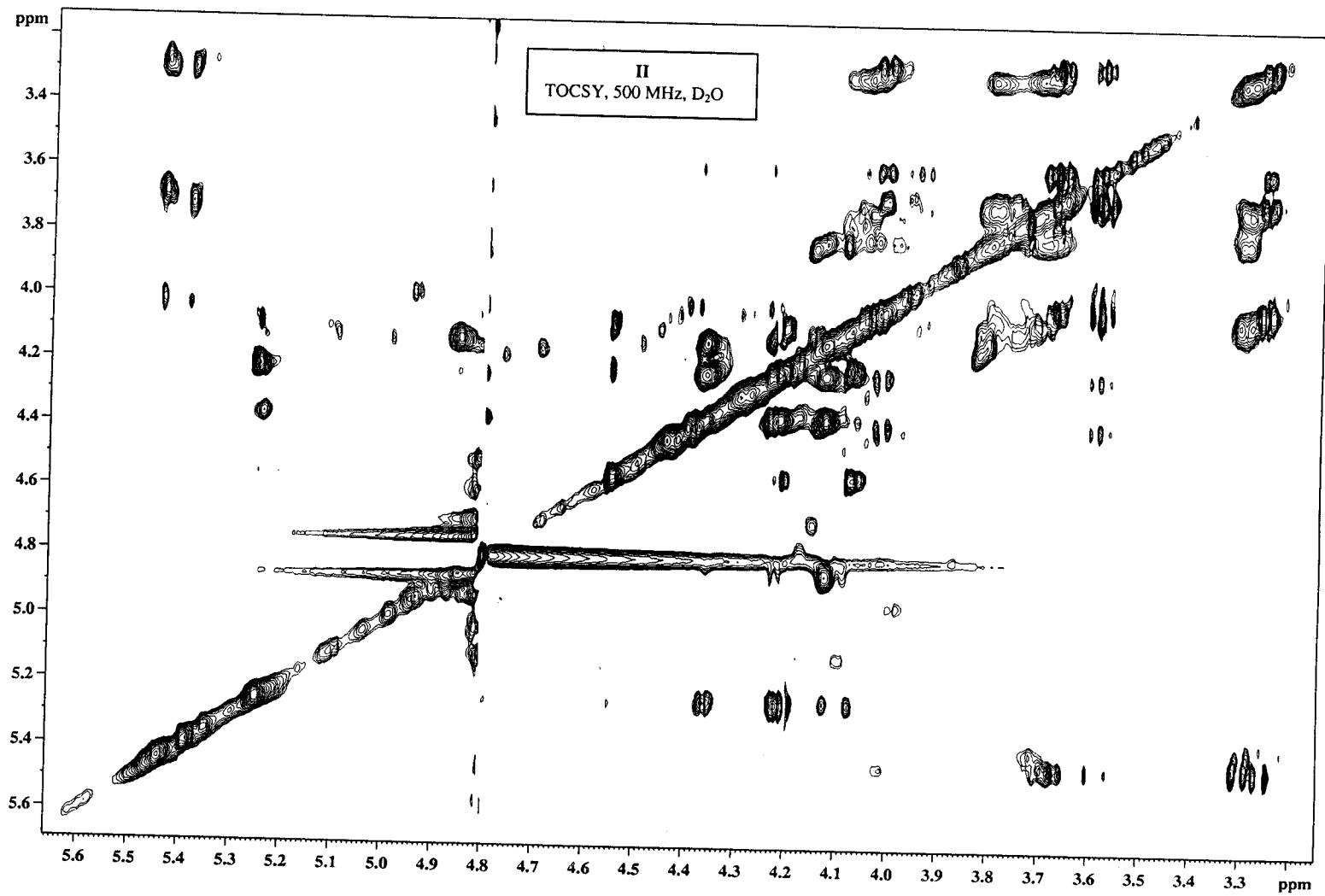




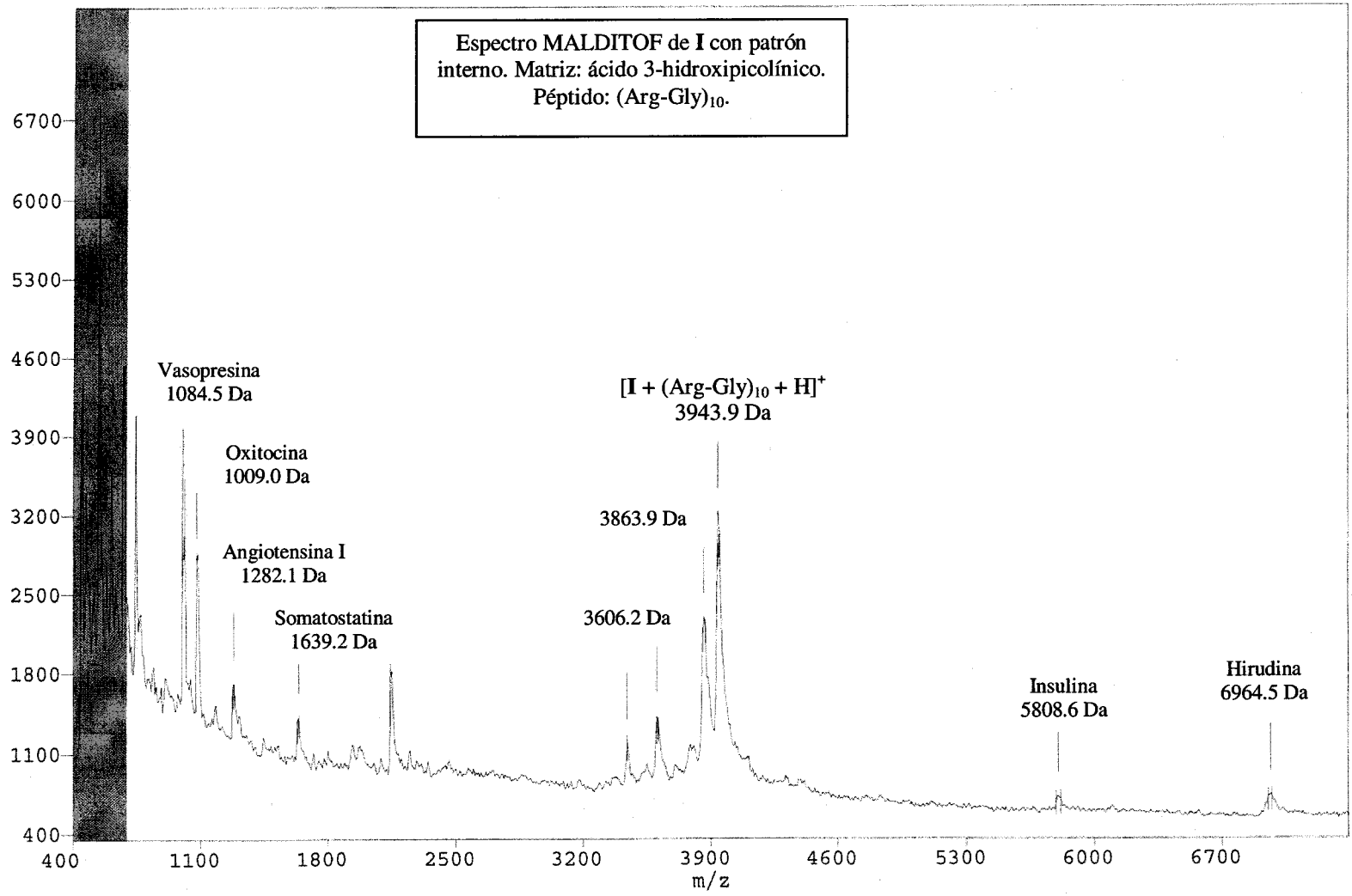


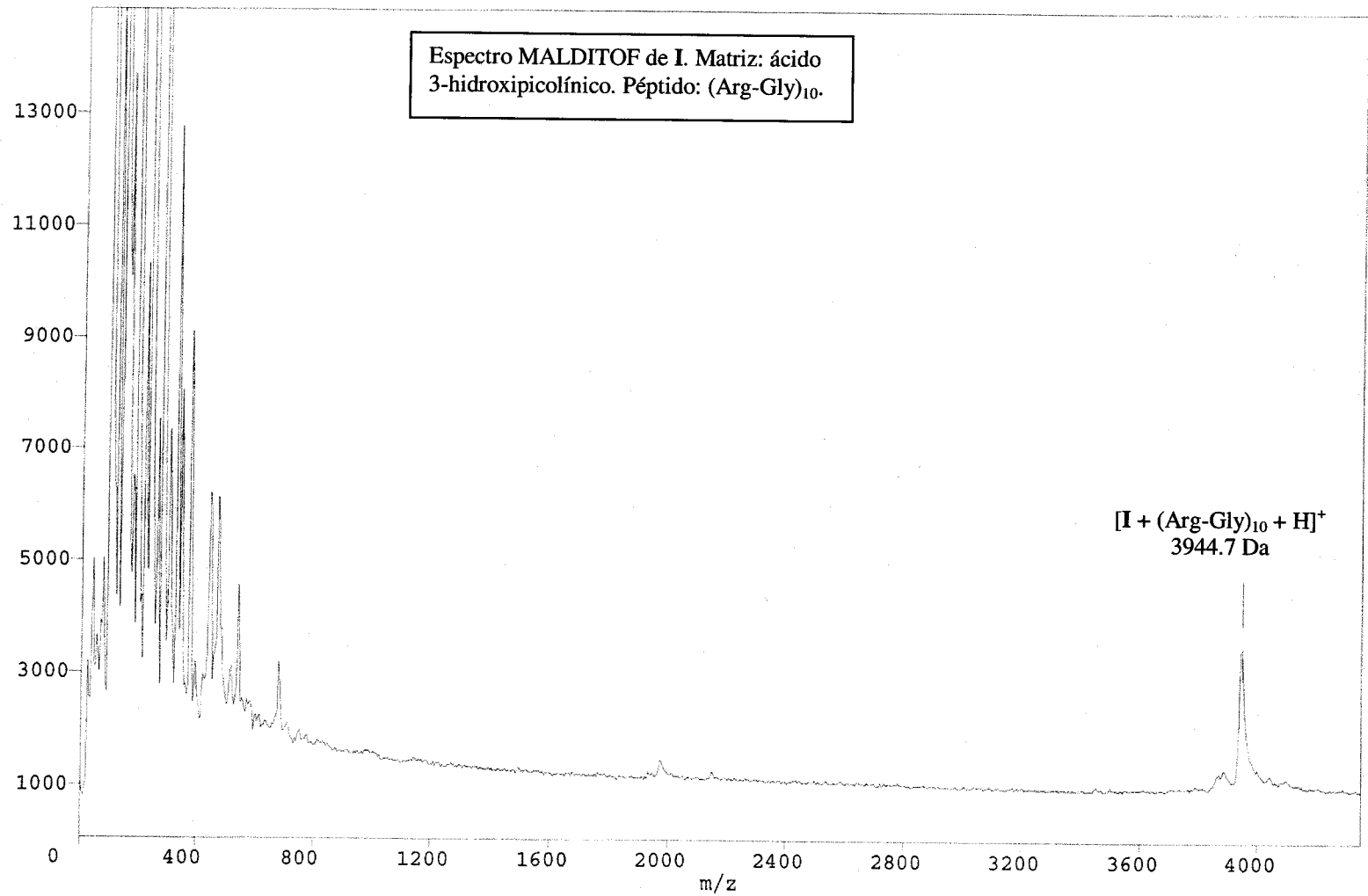






Espectro MALDITOF de I con patrón interno. Matriz: ácido 3-hidroxicolínico. Péptido: (Arg-Gly)₁₀.





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. JOSE LUIS DE PAZ CARRENA
titulada *Activación de Factores de crecimiento por fibroblastos
por hiperaminoácidos. Sintesis, Estructura y actividad
biológica de oligosacáridos de la región regular de lupanina.*
acordó otorgarle la calificación de *sobresaliente con laude*
por unanimidad (5 votos)

Sevilla, 9 de octubre 2000

El Vocal,

C. Arriero

El Presidente,

Manuel Gómez

El Vocal,

[Signature]

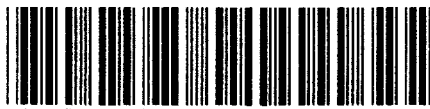
El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]
El Doctorado,

[Signature]



* 5 0 1 3 4 6 5 5 7 *