

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica



**Síntesis de sistemas multivalentes
conteniendo azúcares e inmovilización de
biomoléculas mediante “click chemistry”.**

TESIS DOCTORAL

Mariano Ortega Muñoz
Granada, 2007.

**Síntesis de sistemas multivalentes
conteniendo azúcares e inmovilización de
biomoléculas mediante “click chemistry”.**

Memoria de la Tesis Doctoral presentada por

Mariano Ortega Muñoz

para optar al Grado de Doctor en Química
por la Universidad de Granada

Vº Bº del director de la Tesis

Francisco Santoyo González
Catedrático de Química Orgánica
Universidad de Granada.

Deseo expresar mi agradecimiento a:

Al Prof. Francisco Santoyo González por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y por dedicar tanto tiempo y esfuerzo a la dirección de la misma.

A los profesores Dr. Joaquin Isac García y Dr. Fernando Hernández Mateo sin cuya colaboración hubiese resultado mucho más difícil.

A los profesores Dra. Pilar García Mendoza y Dr. Francisco García Calvo-Flores.

Al Dr. Francisco Javier Lopez Jaramillo por su colaboración y apoyo, y al Dr. Francisco Manuel Pérez Balderas por compartir su experiencia en el laboratorio.

A los profesores Dr. Rafael Salto González y Dra. M^a Dolores Girón González por su colaboración.

Al Prof. Fernando Albericio y a todos los miembros de su grupo, en especial a Eva Poca, Dr. Jan Spengler, Esther Zurita y Javier Ruiz por el magnífico trato que recibí durante mi estancia en el Parc Científic de Barcelona.

Y por último y muy especialmente a mi familia, a Patricia y a amigos por su apoyo incondicional.

Abreviaturas.

Aa	Aminoácido
AIBN	Azabisisobutironitrilo
Arg	Arginina
BnBr	Benzil bromuro
BSA	Albúmina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
ConA-HRP	Concanavalina A marcada con peroxidasa de rábano picante
COSY	Espectroscopia de correlación (correlation spectroscopy)
CRD	Dominios de reconocimiento de carbohidratos
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIPEA	Diisopropil etilamina
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELLA	Enzyme Linked Lectin Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMC	N-(ϵ -maleimidocaproyl)
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
Equiv.	Equivalente
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GFP	Green Fluorescent Protein
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetyl glucosamina
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlati3n
ITC	Isothermal Titration Microcalorimetry
KDO	2-Keto-3-desoxy-octulonic acid
Lac	Lactosa
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
Man	Manosa
MBP	Maltose binding protein
MW	Microondas (microwave)

NDDA	N,N'- <i>(ditioldidecano-10,1-diil)bispropiolamida</i>
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PAMAM	Dendrímero de poli(amidoamina)
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PEG	Polietileneglicol
PMP	<i>p</i> -Metoxifenil
QCM	Quartz Cristal Microbalance
RCA	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
SAM	Self-assembled monolayer
SDS	Sodiododecilsulfato
SPR	Surface plasmon resonance
TCEP	Tris(carboxietil)fosfina
TsCl	Cloruro de tosilo
TMS	Trimetilsililo
Tyr	Tirosina

Índice.

- 1 Introducción. “Click chemistry” en la química de carbohidratos.
- 59 Capítulo I. Síntesis de heteroneoglicoconjugados multivalentes mediante “click chemistry”.
- 127 Capítulo II. Síntesis de sistemas de bis- β -ciclodextrinas conteniendo azúcares biorreconocibles mediante “click chemistry”.
- 149 Capítulo III. Síntesis de glicopolímeros mediante “click chemistry”. Aplicaciones.
- 187 Capítulo IV. Síntesis convergente de glicodendrimeros mediante “click chemistry”.
- 237 Capítulo V. Síntesis de “glico-sílicas” mediante “click chemistry”. Aplicaciones en cromatografía de afinidad.
- 263 Capítulo VI. Síntesis de biotino-sílica mediante “click chemistry”. Aplicaciones en la tecnología avidina-biotina.
- 277 Anexo I. Materiales y métodos generales.
- 283 Anexo II. Bibliografía.
- 305 Anexo III. Productos sintetizados.
- 331 Anexo IV. Artículos publicados.

Objetivos.

El desarrollo de la catálisis con Cu(I) de las cicloadiciones 1,3 dipolares de alquinos y azidas ha propiciado la irrupción de la “click chemistry” en la química orgánica como una metodología sencilla y extremadamente potente de síntesis debido a su capacidad de interconectar fácil y eficazmente diferentes subestructuras. Ésto ha dado lugar a un amplio rango de aplicaciones en las ciencias biomédicas, la síntesis orgánica y la ciencia de los materiales.

El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral es la síntesis de sistemas multivalentes que contengan azúcares utilizando esta metodología. En concreto se llevan a cabo la síntesis de sistemas hetero-neoglicoconjugados, sistemas de bis- β -ciclodextrinas conteniendo unidades de manosa, glicopolímeros derivados de poliestireno y glicodendrimeros, de los que se evaluarán sus afinidades por las lectinas correspondientes.

El segundo objetivo es la inmovilización covalente de biomoléculas como derivados de manosa o biotina sobre gel de sílice empleando “click chemistry” así como la evaluación de la utilidad de estos nuevos materiales en cromatografía de afinidad.

Introducción.

**“Click chemistry” en la química de
carbohidratos.**

1 Introducción.

Las cicloadiciones 1,3-dipolares constituyen una poderosa herramienta sintética como lo demuestran su amplio campo de acción y el gran número de objetivos que son abordables mediante esta química. A lo largo de los años, estas reacciones se han establecido como un método general para la síntesis de heterociclos de cinco miembros. La importancia de estas reacciones se manifiesta por la posibilidad de utilizar un amplio rango de diferentes 1,3-dipolos y dipolarófilos, la diferente regio y estereoselectividad que se observa durante la cicloadición, así como por la posibilidad de realizar ulteriores transformaciones de los cicloadductos dando lugar a un elevado número de moléculas funcionalizadas. Se han sintetizado numerosos productos, tanto naturales como no naturales a través de rutas sintéticas en las que una cicloadición 1,3-dipolar tiene un papel crucial¹.

Los glicoconjugados son sustancias de gran interés tanto por la diversidad funcional de los carbohidratos, que están involucrados en un gran número de procesos biológicos importantes, como de la diversidad estructural de estas biomoléculas, que hacen de ellas compuestos muy atractivos para el desarrollo de agentes terapéuticos.

El gran esfuerzo realizado por muchos investigadores de diferentes áreas en el desarrollo de miméticos de carbohidratos, así como en la preparación y evaluación biológica de sus conjugados, ha promovido el desarrollo de la glicobiología y mucho más recientemente, del campo emergente de la glicómica. En este contexto las reacciones de cicloadiciones 1,3 dipolares y los carbohidratos han establecido una fructífera relación que se ha basado especialmente en el uso de nitronas, óxidos de nitrilo y nitronatos como 1,3-dipolos^{2,3,4}.

¹Padwa A, Pearson WH, **2003**, Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products. John Wiley & Sons, Chichester, U. K.

²Gallos JK, Koumbis AE, *Curr Org Chem*, **2003**, 7, 397

El descubrimiento a principios del presente siglo de la catálisis y el efecto regioselectivo del Cu(I) en las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares de alquinos y azidas^{5,6} ha iniciado una era de oro para esta reacción de cicloadición que ha encontrado múltiples aplicaciones en las ciencias biomédicas, en la síntesis orgánica y en la ciencia de los materiales^{7,8}. En muchas de estas aplicaciones los carbohidratos han estado involucrados. En esta Memoria se recogen los avances más recientes de esta reacción, tanto catalizada como no, en el campo de los carbohidratos.

2 Reacción de Huisgen: Cicloadiciones 1,3 dipolares de alquinos y azidas.

La cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas, denominada reacción de Huisgen⁹, constituye la ruta más efectiva para la síntesis de 1,2,3-triazoles. La gran utilidad de esta reacción radica en la facilidad para introducir las funciones alquino o azida en moléculas orgánicas, y al hecho de que estas funciones son estables bajo una gran variedad de condiciones. Además son fundamentalmente inertes tanto en condiciones orgánicas como biológicas donde existen moléculas con una alta funcionalización, inertes en presencia de oxígeno molecular y/o agua, y bajo la mayoría de las condiciones comunes en síntesis orgánica. Estas funciones pueden ser introducidas en el momento conveniente y mantenerse inalteradas en subsecuentes transformaciones. Aunque la descomposición de azidas es un proceso termodinámicamente favorecido, factores cinéticos permiten que las azidas alifáticas

³Koumbis AE, Gallos JK, *Curr Org Chem*, **2003**, *7*, 585

⁴Koumbis AE, Gallos JK, *Curr Org Chem*, **2003**, *7*, 771

⁵V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–25

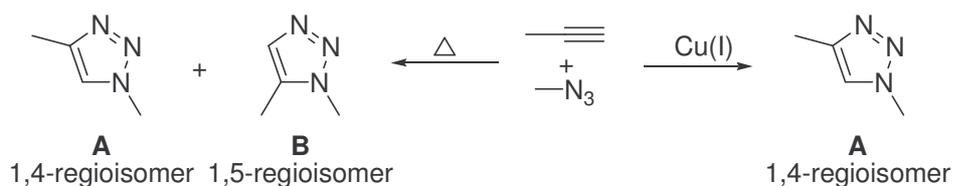
⁶C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

⁷H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128–1137.

⁸Wang Q, Chittaboina S, Barnhill HN, *Lett Org Chem.*, **2005**, *2*, 293

⁹R. Huisgen, In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, pp 1-176.

permanezcan prácticamente inertes hasta reaccionar con un buen dipolarófilo. Esta estabilidad cinética es directamente responsable de la baja velocidad de reacción de las cicloadiciones de alquinos y azidas, que generalmente requieren elevadas temperaturas y largos tiempos de reacción, dando lugar en la mayoría de los casos a mezclas de los dos posibles triazoles regioisoméricos 1,4 y 1,5-disustituídos (esquema 1). El control deseable de la regioselectividad se observa sólo en aquellas cicloadiciones en las que intervienen alquinos terminales altamente electrón-deficientes. En algunos casos, se puede lograr regiocontrol cuando es posible la formación de complejos de inclusión con macrociclos presentes en el medio de reacción (como es el caso de curcubiturilo¹⁰ o resorcinareno¹¹) o en estructuras moleculares de uno de los compuestos¹². Las elevadas temperaturas requeridas para la reacción térmica de alquinos y azidas descartan su uso en sistemas biológicos en los que además es necesaria una ortogonalidad.



Esquema 1. Cicloadiciones 1,3-dipolares de alquinos y azidas, catalizada y sin catalizar.

A pesar de estas limitaciones, las reacciones de cicloadición en su versión térmica han encontrado múltiples aplicaciones que han puesto de manifiesto su gran utilidad antes del descubrimiento reciente de la acción catalítica del Cu(I). Este ión metálico incrementa la velocidad de reacción 10^7 veces y elimina el uso de elevadas temperaturas. Además la presencia de Cu(I) determina que la reacción sea

¹⁰ Mock WL, Irra TA, Wepsiec JP, Adhya M; *J Org Chem*, **1989**, *54*, 5302

¹¹ Chen J, Rebek J, *Org Lett*, **2002**, *4*, 327

¹² Howell SJ, Spencer N, Philp D., *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 4945

regioselectiva obteniéndose exclusivamente el regioisómero 1,4. Este procedimiento tolera la presencia de una gran variedad de grupos funcionales dando lugar a 1,2,3-triazoles con unas necesidades mínimas de procesado y purificación.

Las extraordinarias características mencionadas para la reacción de cicloadición tanto catalizada como no catalizada han determinado que sea considerada como la mejor reacción dentro del nuevo concepto de “click chemistry” acuñado recientemente por Sharpless y colaboradores¹³. Bajo este concepto se engloban toda una serie de reacciones muy fiables, con un amplio alcance, de alta eficiencia tanto en términos de conversión como de selectividad, que transcurren en condiciones de reacción suaves y simples y que además necesiten procesos sencillos para el aislamiento del producto final. Un parámetro indicativo de la importancia de la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas como prototipo de reacción de “click chemistry”, es el crecimiento exponencial del número de publicaciones que utilizan esta reacción desde la primera publicación en el año 2002 de la versión catalizada. Actualmente se puede afirmar que los términos de “click chemistry” y cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas (reacción de Huisgen) son sinónimos siendo utilizados de forma equivalente.

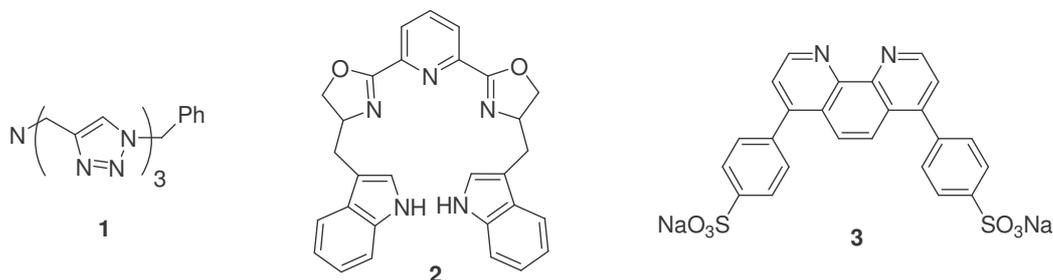
Si bien la cicloadición térmica de alquinos y azidas ocurre mediante un mecanismo concertado, para la versión catalizada por Cu(I) se ha postulado un mecanismo por etapas en base a estudios teóricos y cinéticos, y que supone la formación inicial de un acetiluro de Cu(I), aunque no se ha esclarecido con exactitud la naturaleza exacta de las especies intermedias^{14,15}. Desde el descubrimiento del efecto catalítico del Cu(I), se han utilizado con éxito diversas condiciones y fuentes de Cu(I) para obtener los correspondientes 1,2,3-triazoles con altos rendimientos, lo

¹³ Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, *Angew Chem Int Ed*, **2001**, *40*, 2005

¹⁴ Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV, *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 210

¹⁵ Bock VD, Hiemstra H, van Maarseveen JH, *Eur J OrgChem*, **2006**, *51*.

que pone de manifiesto la gran robustez y versatilidad de la reacción. La mayoría de las aplicaciones de la reacción se han llevado a cabo en solución, aunque también se ha implementado la reacción en fase sólida.



Estructuras 1-3 Quelatos heterocíclicos como ligandos de Cu(I).

Las reacciones en solución normalmente se realizan en agua o más comúnmente, en mezclas acuosas de disolventes orgánicos como alcoholes o DMSO y a temperatura ambiente, aunque en muchos casos se ha demostrado que calentando se consigue acelerar la reacción. De igual modo, la irradiación con microondas así como la sonicación, reducen drásticamente los tiempos de reacción sin afectar ni a los rendimientos ni a la formación de subproductos.

La generación de Cu(I) constituye el factor de mayor variabilidad de los diferentes protocolos desarrollados. La formación *in situ* de Cu(I) a partir de sales de Cu(II), normalmente sulfato cúprico pentahidratado, ha sido el protocolo más ampliamente utilizado, usándose ascorbato sódico como agente reductor. En algunas ocasiones, se ha usado la comproporción de cobre metálico para obtener Cu(I) en el medio. Otro agente reductor utilizado ha sido tris(carboxietil) fosfina (TCEP), que ha encontrado principalmente aplicaciones en bioconjugación^{16,17}. El segundo método es el uso de sales inorgánicas de Cu(I), junto con un exceso de base, DIPEA

¹⁶ Wang Q, Chan TR, Hilgraf R, Fokin VV, Sharpless KB, Finn MG, *J Am Chem Soc*, **2003**, *125*, 3192

¹⁷ Speers, AE, Adam, GC, Cravatt, BF, *J Am Chem Soc*, **2003**, *125*, 4686

o 2,6-lutidina, que previenen la degradación del Cu(I). Una acción similar parece tener la presencia de ciertos quelatos heterocíclicos como los compuestos **1**¹⁸, **2**¹⁹ y **3**²⁰, que cuando son utilizados hacen innecesario el uso de bases ya que sus nitrógenos terciarios cumplen la doble función de donador de Cu(I) y aceptor de protones. Este protocolo es particularmente útil en bioconjugación, donde el uso de otras bases está limitado, pero complica la purificación ya que se introduce la necesidad de eliminar el ligando.

En el caso de sustratos no solubles en medio acuoso, donde el uso de un disolvente orgánico es necesario, el uso del tándem CuSO₄-ascorbato o el uso exclusivo de CuI se muestran poco eficaces. En estos casos se han desarrollado dos protocolos alternativos para solucionar este problema. El primero consiste en el uso de catalizadores solubles en disolventes orgánicos, como los complejos (Ph₃)₃CuBr, (EtO)₃PCuI²¹ o Cu(MeCN)₄PF₆^{22,23}, que solos o en combinación con una base (DIPEA o DBU) o en presencia de CuI conducen al producto de cicloadición con excelentes rendimientos. Más recientemente se ha descrito un catalizador polimérico con CuI soportado, preparado fácilmente a partir de Ambelita A-21, que se muestra como un eficiente catalizador heterogéneo con buena actividad y estabilidad y con la posibilidad de ser reutilizado²⁴. La oxidación de cobre metal es el protocolo más reciente de generar Cu(I) en solución, usando virutas de cobre o preferiblemente con nanopartículas de Cu(0) en presencia, normalmente, del hidrocloreuro de una amina²⁵ y de “nanoclusters” de cobre²⁶. Este último protocolo presenta las desventajas de

¹⁸ Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, Fokin VV, *Org Lett*, **2004**, *6*, 2853.

¹⁹ Meng Jc, Fokin VV, Finn MG, *Tetrahedron Lett*, **2005**, *46*, 4543.

²⁰ Lewis WG, Magallon FG, Fokin VV, Finn MG, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 9152.

²¹ F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Azín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951–1954.

²² Referencia 18.

²³ Meng Jc, Fokin VV, Finn MG, *Tetrahedron Lett*, **2005**, *46*, 4543.

²⁴ Girard C, Onen E, Aufort M, Beauviere S, Samson E, Herscovici J, *Org Lett*, **2006**, 1689.

²⁵ Orgueira HA, Fokas D, Isome Y, Chan PCM, Baldino CM, *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 2911.

²⁶ Pachon LD, van Maarseveen JH, Rothenberg G, *Adv Syn Cat*, **2005**, *347*, 811.

necesitar largos tiempos de reacción y del alto coste de las nanopartículas de Cu(0), que limita su aplicabilidad.

La eficiencia y el alcance de la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada se ha visto ampliada con el desarrollo reciente de un procedimiento en una etapa que genera los azido derivados *in situ* que son usados sin necesidad de aislamiento²⁷.

La implementación de las cicloadiciones de alquinos y azidas catalizadas por Cu(I) en fase sólida^{28,29,30,31} también ha sido desarrollada y se muestra como un procedimiento con excelentes posibilidades. Ambas funcionalizaciones, alquino y azida, han sido incorporadas a diferentes resinas y han sido aplicadas no sólo para la síntesis de productos que contienen triazoles en su estructura, sino también usando el triazol como espaciador. Las cicloadiciones se producen en fase sólida con gran facilidad y muestran mayor sensibilidad a factores estéricos que en la química en solución, al mismo tiempo que una baja sensibilidad a las condiciones, tipo de resina o subsiguientes transformaciones. En estas reacciones en fase heterogénea, el protocolo de reducción de Cu(II), así como el uso de sales de Cu(I), han mostrado la misma eficacia que en el caso de las reacciones homogéneas en disolución en una variedad de disolventes orgánicos (THF, DMF, acetonitrilo y DMSO).

La cicloadición de Huisgen ha encontrado aplicaciones donde quiera que un 1,2,3-triazol sea importante. De forma general, los 1,2,3-triazoles tienen interés en la industria, en la agricultura y en biociencia como compuestos bioactivos. Un análisis de la bibliografía desde 2002 evidencia que la principal virtud de esta metodología sintética es su capacidad para interconectar diferentes subestructuras sobre un armazón de complejidad variada. Además el anillo de 1,2,3-triazol tiene la

²⁷ Chittaboina S, Xie F, Wang Q, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 2331.

²⁸ Referencia 6.

²⁹ Lober S, Rodríguez-Loaiza P, Gmeiner P, *Org Lett*, **2003**, 5, 1753.

³⁰ Lober S, Gmeiner P, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 8699.

³¹ Collman JP, Devaraj NK, Chidsey CED, *Langmuir*, **2004**, 20, 1051.

posibilidad de actuar como mimético de un enlace peptídico. Así los 1,2,3-triazoles tienen una localización atómica y unas propiedades electrónicas similares a las de la función amida con la ventaja de su resistencia a roturas hidrolíticas y a los procesos de oxidación o reducción. Además, el mayor momento dipolar que estos anillos poseen en comparación con el enlace amida determinan que los átomos N(2) y N(3) del triazol actúen como donores y aceptores de enlaces de hidrógeno. Estas excepcionales características han hecho que los 1,2,3-triazoles hayan sido utilizados en un amplio rango de aplicaciones en las ciencias biomédicas, la síntesis orgánica y la ciencia de los materiales^{32,33}.

3 Cicloadiciones 1,3-dipolares de alquinos y azidas intermoleculares.

En el estado actual de la química de carbohidratos, la introducción de los grupos alquino o azida en un azúcar es un proceso de rutina que permite el fácil acceso a derivados tanto mono como polifuncionalizados. Estos compuestos pueden ser usados para su ensamblaje a otras moléculas o a andamios complementariamente funcionalizados mediante una reacción intermolecular de cicloadición de alquinos y azidas. Esta estrategia sintética permite la rápida preparación de conjugados de carbohidratos en los que los triazoles actúan como elementos de unión de los carbohidratos a una molécula andamio. La posición anomérica es normalmente la preferida para introducir funciones alquino o azida, pero también el resto de las posiciones del anillo de azúcar son modificables con una adecuada estrategia de protección-desprotección.

³² Referencia 7.

³³ Referencia 15.

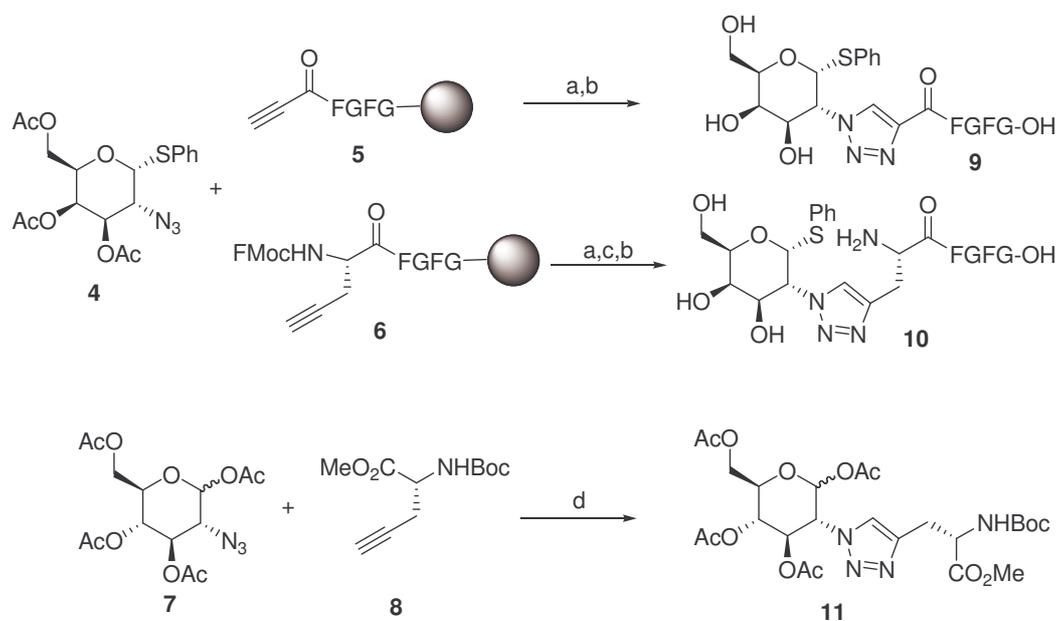
3.1 Conjugados de carbohidratos que contienen un anillo de 1,2,3-triazol.

La reacción de derivados alquino o azido de carbohidratos con una molécula mono funcionalizada complementaria es la aproximación más simple al diseño de conjugados de carbohidratos que contenga un triazol. Esta estrategia fue usada por Medal y colaboradores³⁴ quienes describieron por primera vez el uso de CuI como catalizador en las reacciones de cicloadición de alquinos y azidas, aplicandola para la síntesis en fase sólida de péptido-triazol-azúcares por reacción de 2-azido tioglicósido **4** con dos resinas PEGA₈₀₀ alquiladas **5** y **6** obtenidas por síntesis estándar en fase sólida de péptidos (esquema 2). La resina **5** se preparó por acilación del grupo N-terminal del tetrapéptido FGFG con ácido propargílico mientras que la resina **6** se obtuvo usando propargilglicina como aminoácido terminal. Los peptidotriazoles **9** y **10** fueron aislados tras un proceso rutinario de escisión de la resina.

La síntesis de aminoácidos unidos a azúcares a través de triazoles también ha sido llevada a cabo en solución³⁵ mediante la reacción de propargilglicina **8** con el derivado 2-azido de glucosa **7** usando el sistema Cu(AcO)₂/Na-ascorbato como fuente de Cu(I) (esquema 2). En ambos casos las condiciones de reacción se mostraron completamente compatibles con todos los aminoácidos y grupos protectores usados.

³⁴ Referencia 6.

³⁵ Kuijpers BHM, Groothuys S, Keereweer AR, Quaeflieg PJLM, Blaauw RH, vanDelft FL, Rutjes FPJT, *Org Lett*, **2004**, *6*, 3123.



Esquema 2 a CuI, DIPEA; b 0.1 M NaOH; c 20% piperidina/DMF;
 d Cu(OAc)₂, Na-Ascorbato (F = Fenilalanina, G = Glicina)

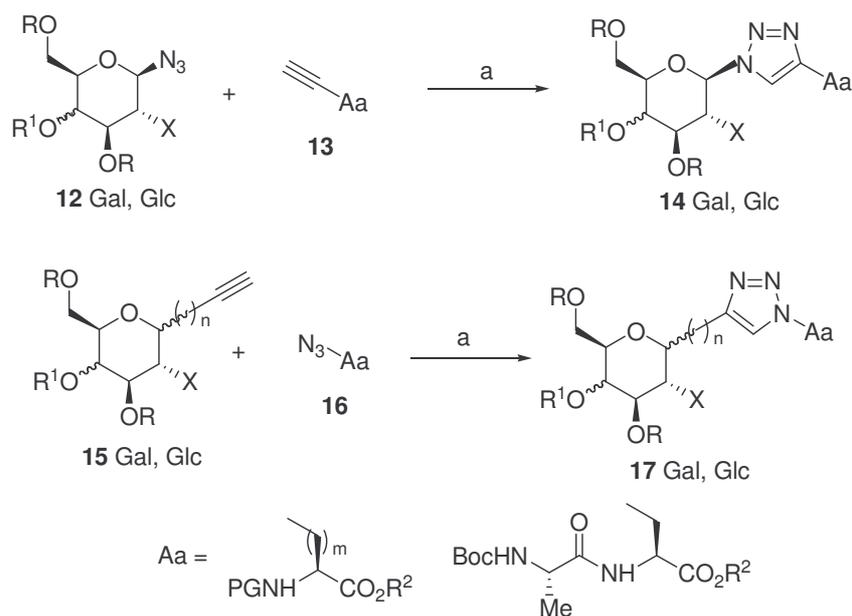
La síntesis de N-glicosil α -aminoácidos y C-glicosil α -aminoácidos en la posición anomérica han sido descritas por Kuijpers y colaboradores³⁶, por Dondoni y colaboradores³⁷ y por Giguère y colaboradores³⁸ por reacción de glicopiranosil azidas **12** o C-glicosilacetilenos **15** con una serie de alquino o azido aminoácidos funcionalizados **13** y **16** respectivamente (esquema 3). Los glicosilaminoácidos resultantes **14** y **17** que contienen un heterociclo triazólico entre el azúcar y el aminoácido, son glicoconjugados de interés debido a su resistencia a las degradaciones químicas y enzimáticas. En particular, el compuesto **17** (β -Gal, $n = 1$, Aa = CHCOOMe) ha sido probado como un nuevo inhibidor glicomimético de las

³⁶ Referencia 35.

³⁷ Dondoni A, Giovannini PP, Massi A, *Org Lett*, **2004**, 6, 2929.

³⁸ Giguere D, Patnam R, Bellefleur MA, St-Pierre C, Sato S, Roy R; *Chem Commun*, **2006**, 2379

galectinas-1 y -3 con modestos resultados por Roy y colaboradores en una búsqueda racional de inhibidores de estas lectinas.



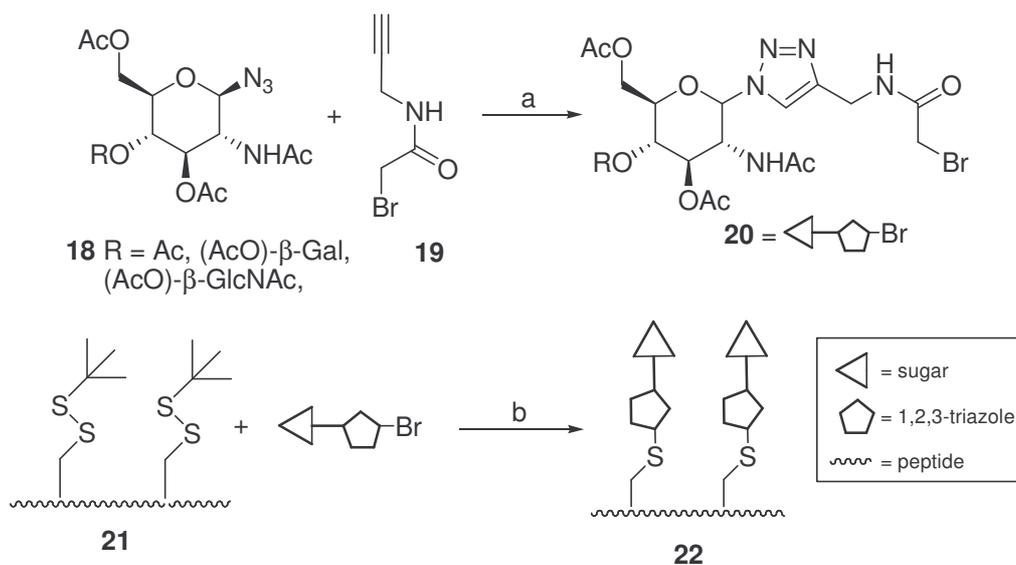
R = Ac, Bn; R¹ = OR, (OR)Glcβ; R² = H, Me, Bn; X = OR, NHAc; n = 0,1; m = 1,2,3

Esquema 3 a Na-Ascorbato o CuI, DIPEA

En una estrategia indirecta para la síntesis de neoglicopéptidos, MacMillan y colaboradores³⁹ han usado glicopiranosilazidas **18** para acceder primeramente a bromoacetamidas **20** por reacción con 2-bromoacetil propargilamida **19**. Este compuesto actúa como un puente heterobifuncional, permitiendo el subsiguiente acoplamiento con los péptidos de un oligopéptido que contienen cisteína mediante un desplazamiento nucleofílico (esquema 4). La estrategia es compatible con la síntesis de péptidos en fase sólida automatizada. Para ello las bromoacetamidas se hacen reaccionar con las funciones tiol de péptidos **21**, previa desprotección de dichos

³⁹ Macmillan D, Blanc J, *Org Biomol Chem*, **2006**, *4*, 2847.

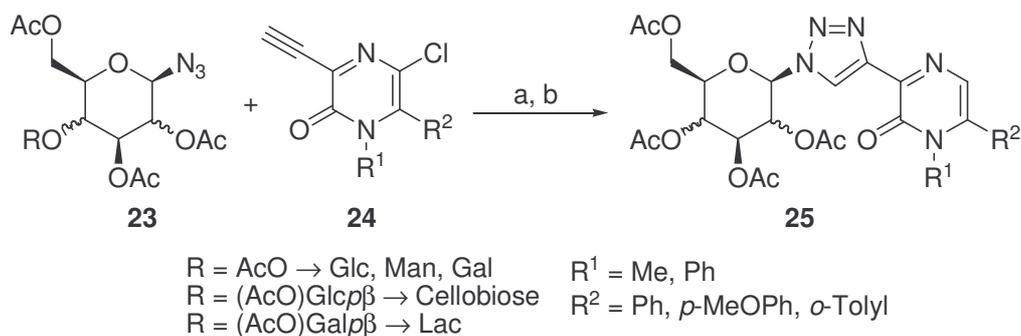
grupos. Esta síntesis de neoglicopéptidos **22** ha sido empleada con el tioéster del oligopéptido que contiene los residuos 1-19 de la eritropoietina humana.



Esquema 4 a CuSO₄, Na-Ascorbato; **b** (i) DTT, DIPEA, DMF; (ii) **20** (azúcar), Et₃N, DMF.

El uso de varios 3-etinil-2(1H)-pirazinonas **24** como precursores de miméticos de péptidos ha sido descrito por Ermolat'ev y colaboradores⁴⁰. En presencia de Cu(I), las pirazinonas **24** reaccionan con diferentes β -D-glicopiranosil azidas **23** obteniéndose los correspondientes glicoconjugados **25** de modo muy rápido gracias a la asistencia de la irradiación con microondas. Estos productos pueden permitir el acceso a glicopeptidomiméticos después de las adecuadas transformaciones. En este caso, los cicloaductos se obtienen sólo con rendimientos entre moderados y buenos, debido probablemente, a la polimerización de los acetilenos de partida y/o a la inestabilidad térmica de los glicoconjugados en las condiciones de reacción.

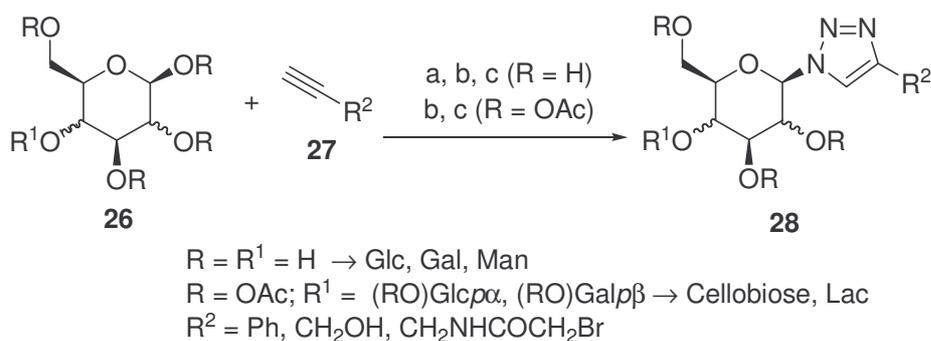
⁴⁰ Ermolat'ev D, Dehaen W, Van der Eycken E, *QSAR Comb Sci*, **2004**, 23, 915.



Esquema 5. **a** Cu (virutas), CuSO₄, MW; **b** H₂, Pd/C.

Una mejora significativa en el protocolo para la preparación de glicoconjugados del tipo **28** a partir de 1-azido glicósidos **26**, ha sido llevada a cabo por Chittaboina y colaboradores⁴¹. Estos autores han desarrollado un método eficiente para la síntesis de estos conjugados tanto de carbohidratos desprotegidos como de peracetilados, llevando a cabo un buen número de etapas de reacción (acetilación, formación de bromo-glicosil derivados, transformación en azido-glicosil derivados y cicloadición 1,3 dipolar catalizada por Cu(I)) en un solo paso de reacción, evitando la purificación de todos los intermedios consiguiendo una reducción significativa de los tiempos de reacción y un aumento del rendimiento. Esta simplificación operativa ha permitido obtener en ocasiones los glicoconjugados buscados **28** de forma cuantitativa mediante el simple uso de una operación de filtración (esquema 6).

⁴¹ Chittaboina S, Xie F, Wang Q, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 2331.

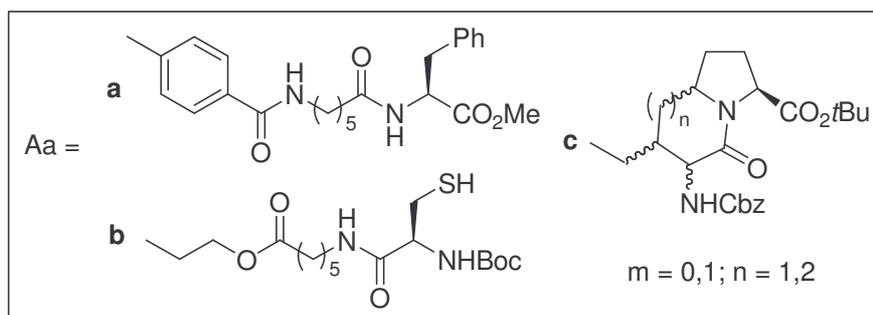
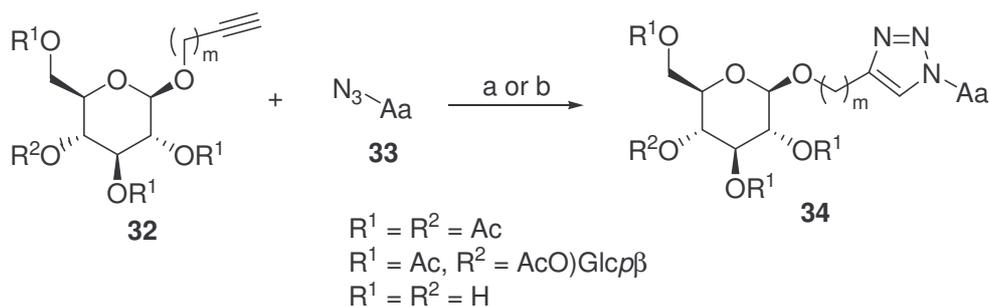
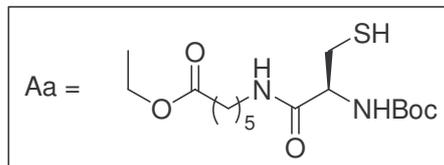
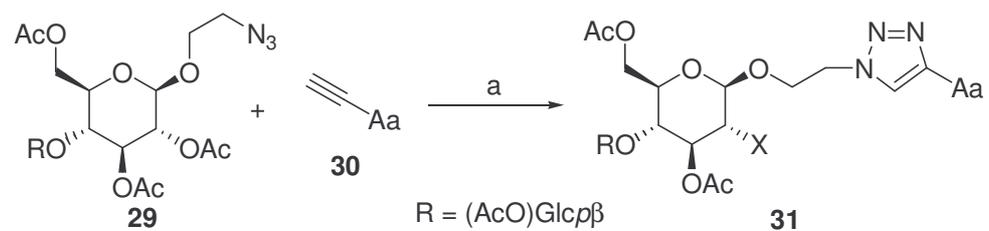


Esquema 6. **a** Ac₂O, yoduro de Cu(I) (cat), rt; **b** HBr-AcOH; **c** NaN₃, Bu₄NHSO₄, NaHCO₃, CuSO₄; Na-Ascorbato, CHCl₃:EtOH:H₂O 9:1:1 (R= H) o CHCl₃:EtOH 9:1 (R= OAc)

Diversos *O*-glicosil aminoácidos **31** y *O*-glicopeptidomiméticos, **31** y **34** respectivamente, han sido fácilmente sintetizados mediante cicloadiciones de alquinos y azidas por reacción de los correspondientes azidoalquil **29** o alquil glicósidos **32** con alquino o azido derivados de aminoácidos **30** y **33** (esquema 7). En este ámbito, Hotha y colaboradores⁴² han descrito la preparación de derivados de cisteína y fenilalanina funcionalizados con alquino o azida a través de un espaciador de ácido 6-aminocaprílico. Estos compuestos se hicieron reaccionar con 2-azidoetil y 3-butinil glucósido y lactósido para obtener los correspondientes glicoconjugados ligados a aminoácidos. De forma análoga, Arosio y colaboradores⁴³ han realizado la conjugación de azabicycloalcano aminoácidos **34**, que son miméticos del dipéptido homoSer-Pro, con propargil β-D-glucopiranosido tanto protegido como desprotegido, y otras unidades biológicamente relevantes en la búsqueda de peptidomiméticos funcionalizados que mejoren las afinidades hacia receptores específicos y la estabilidad metabólica de proteasas endógenas.

⁴² Hotha S, Kashyap S, *J Org Chemistry*, **2006**, *71*, 364.

⁴³ Arosio D, Bertoli M, Manzoni L, Scolastico C, *Tetrahedron Lett*, **2006**, *47*, 3697.



Esquema 7a CuI, DIPEA o $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Na-Ascorbato.

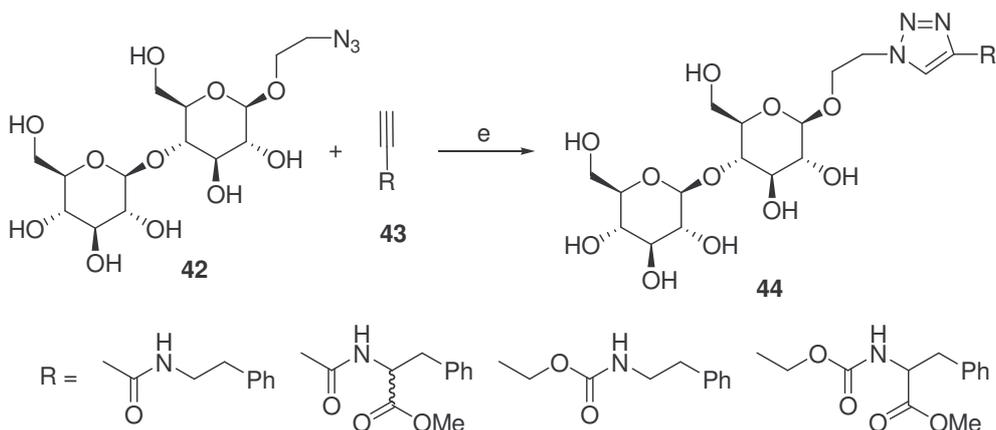
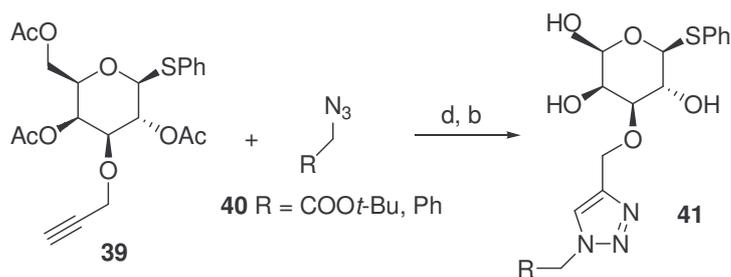
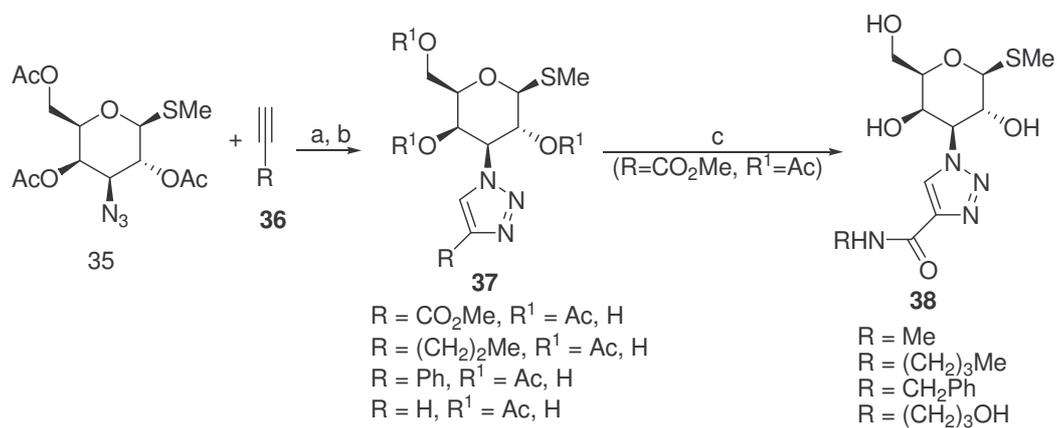
En la búsqueda de nuevos inhibidores glicomiméticos de galectinas que presenten mayores afinidades, estabilidades y especificidades que los inhibidores naturales (Lac y LacNAc), Salameh y colaboradores⁴⁴ y Guiguère y colaboradores⁴⁵ han sintetizado mediante “click chemistry” una batería de 1-tio-β-D-galactósidos que

⁴⁴ Salameh BA, Leffler H, Nilsson UJ, *Bioor Med Chem Lett*, **2005**, *15*, 3344.

⁴⁵ Giguere D, Patnam R, Bellefleur MA, St-Pierre C, Sato S, Roy R, *Chem Commun*, **2006**, 2379.

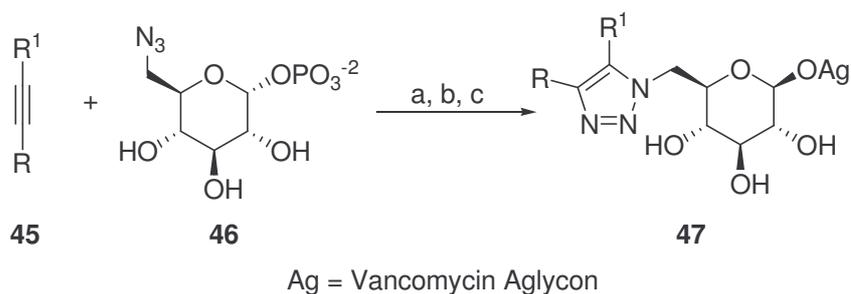
conteniendo una unidad de 1,2,3-triazol en C-3 (**37**, **38**). El diseño racional de estos compuestos se basó en la estructura cristalina del complejo de la galectina-3 con LacNAc, que muestra que el OH-3 de la unidad de galactosa es la posición más adecuada para llevar a cabo las modificaciones químicas (esquema 8). Los tioglicósidos **35** se eligieron por su mayor estabilidad frente a la hidrólisis enzimática dado que los correspondientes *O*-glicósidos poseen una baja estabilidad fisiológica debido a su enlace glicosídico que es sensible a ácidos y a las glicosidasas. Para la construcción del anillo de triazol, se funcionalizó en la posición C-3 del azúcar tanto con azida **35** como con alquino **39** siguiendo protocolos estándares en química de carbohidratos, comprobándose que la síntesis más económica corresponde al derivado 3-*O*-propargilo **39**. El derivado 3-azido **35** se hizo reaccionar con metil propiolato y con una serie de acetilenos alifáticos y aromáticos **36** mientras que el derivado 3-*O*-propargilo **39** fue conjugado con las azidas **40**. En el caso de los derivados 1H-[1,2,3]-triazol-1-il, la colección fue ampliada haciéndolos reaccionar con diferentes aminas, obteniéndose la correspondiente serie de 4-carbamoiltriazoles **38** con buenos rendimientos. Las propiedades inhibitorias de estos carbohidratos basados en 1,2,3-triazoles se evaluaron encontrándose que algunos de los compuestos preparados muestran buenas potencias inhibitorias frente a Gal-3. En un estudio complementario, Tejler y colaboradores⁴⁶ han descrito la preparación de derivados de lactosa conteniendo triazoles en la posición anomérica **44** mediante la reacción de 2-azidoetil β -lactósido **42** con acetileno-derivados de fenilalanina y feneltilamina **43**. La evaluación biológica de los compuestos sintetizados, empleando un ensayo de polarización de fluorescencia frente a diferentes galectinas, ha permitido sacar conclusiones en relación a la influencia de la estructura del aglicón en su capacidad de bloquear. Así se ha encontrado que la galectina-1 tiene preferencia por los ligandos que poseen en el espaciador la función carbamato.

⁴⁶ Tejler J, Tullberg E, Frejd T, Leffler H, Nilsson UJ, *Carbohydr Res*, **2006**, *341*, 1353.



Esquema 8 a CuI, DIPEA, tolueno, 40 °C o tolueno, 80 °C (para R=H); **b** R¹ = Ac → R¹ = H, NaOMe/MeOH; **c** RNH₂, MeOH; **d** CuI, DIPEA, THF; **e** CuI, DIPEA, acetonitrilo.

En una estrategia más elaborada y elegante, Fu y colaboradores⁴⁷, usaron una glicorandomización quimioenzimática *in vitro* en tándem con una cicloadición 1,3-dipolar de alquino y azida para diversificar el patrón de glicosidación del péptido natural vancomicina (esquema 9). En la primera etapa se aplicó una glicorandomización quimioselectiva a una librería de donores de nucleótidos difosfoazúcares, obteniendo por incubación los correspondientes azúcar 1-fosfato **46** con nucleotidil transferasa (Ep). Estos compuestos fueron usados como sustratos para la glicosiltransferasa que transfiere de este modo la unidad de azúcar al complejo vancomicina-aglicón. Con esta reacción multienzimática en un solo paso se evitan los largos procesos químicos necesarios en la glicosidación química. La inclusión de grupos azido en el azúcar susceptible de reaccionar posteriormente con alquinos terminales de forma quimioselectiva en medio acuoso permitió acceder a una diversidad de análogos de vancomicina. Estos productos fueron ensayados como antibacterianos, observándose una gran tolerancia respecto a la diversidad estructural, encontrándose que dos de los treinta y nueve productos de la librería emulan la actividad de la vancomicina natural.



Ag = Vancomycin Aglycon

Esquema 9 **a** Ep/dTTP; **b** GtfE Vancomicina Aglicon; **c** CuI.

El acoplamiento entre moléculas de carbohidratos con funcionalizaciones complementarias mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas ha sido también una estrategia explorada para acceder a neoglicoconjugados

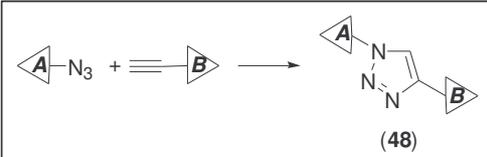
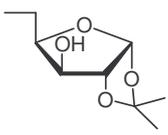
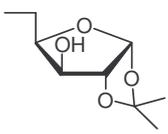
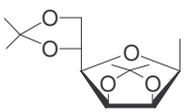
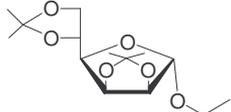
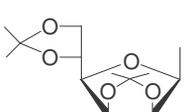
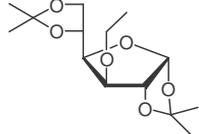
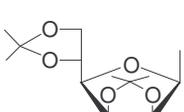
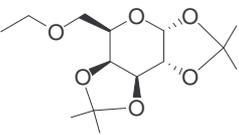
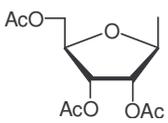
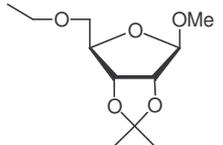
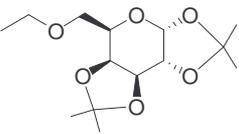
⁴⁷ X. Fu, C. Albermann, C. Zhang, J.S. Thorson, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1513– 1515.

divalentes (Tabla 1). En este caso, la versatilidad de la estrategia de acoplamiento ha permitido la preparación tanto de homo-neoglicoconjugados (entradas 1, 3, 6, 9) como de hetero-neoglicoconjugados (entradas 2, 4, 5, 7, 8, 10) conteniendo respectivamente unidades de carbohidratos idénticas o diferentes. De este modo no sólo se han unido monosacáridos de furanosa (entradas 4-9) o de piranosa entre sí, sino también se han unido oligosacáridos (entradas 2, 3 y 5) a monosacáridos y a otros oligosacáridos. Además, la estrategia también se ha aplicado con éxito a estructuras más complejas como derivados 6-azido-6-desoxi-per-*O*-acetil-ciclomaltoheptaosa y *O*- y *S*-propargil-glicósidos (entrada 11). En la mayor parte de los casos recogidos en la Tabla 1, las reacciones se han llevado a cabo con el objetivo de demostrar la utilidad de la “click chemistry” en la síntesis de estructuras multivalentes conteniendo carbohidratos o en la búsqueda de nuevas condiciones de reacción. Así, el trabajo de Pérez-Balderas y colaboradores⁴⁸, supuso el uso por primera vez de complejos de Cu(I) como catalizadores solubles en disolventes orgánicos y la utilización de la asistencia de microondas en las reacciones de “click chemistry”. Por su parte, en el trabajo de Chitaboina y colaboradores⁴⁹, donde se desarrolló el protocolo de una sola etapa anteriormente mencionado (esquema 6). Aunque los resultados sobre las actividades biológicas de estos homodímeros y heterodímeros no han sido comunicados, estos compuestos son en potencia glicomiméticos de interés ya que pueden permitir evaluar aspectos tales como la distancia entre los sitios de unión de carbohidratos en reconocimientos multivalentes, pueden actuar como potentes agentes de entrecruzamiento reversibles o pueden ser usados como posibles transportadores dirigidos de fármacos como es el caso de los derivados de β -ciclodextrina (entrada 11).

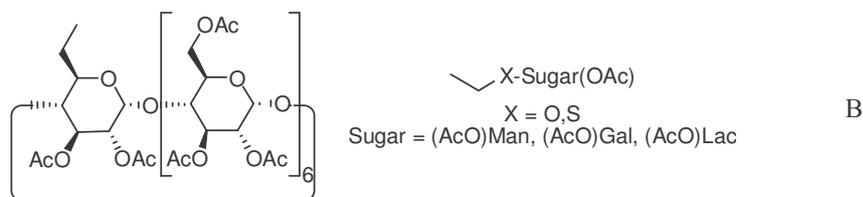
⁴⁸ Referencia 21.

⁴⁹ Referencia 41.

Tabla 1 Neoglicoconjugados divalentes.

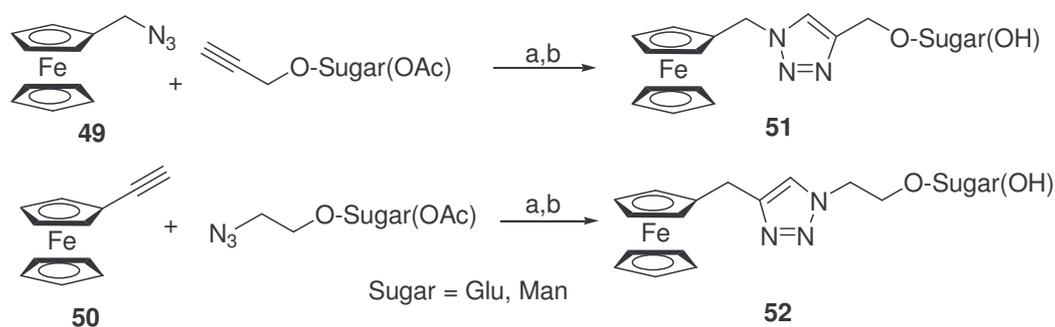
Entrada			Condiciones
			
1	(AcO)ManpβOCH ₂ CH ₂ -	(AcO)ManpβXCH ₂ - (X = O, S, NAc)	A (X=O) B (X=S) C (X=NAc)
2	(AcO)LacβOCH ₂ CH ₂ -	(AcO)GlcρβOCH ₂ CH ₂ -	D
3	(AcO)LacβOCH ₂ CH ₂ -	(AcO)LacβOCH ₂ CH ₂ -	D
4		(AcO)GlcρβOCH ₂	D
5		(AcO)LacβOCH ₂	D
6			E
7			E
8			E
9			F
10	(AcO)Glcρβ-		F

11



A. $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$, DIPEA, MW; B : $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, DIPEA, MW ; C: $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$, DBU, MW; D: CuI , DIPEA, acetonitrilo; E: . $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$, DBU; F: $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$, Na-Ascorbato.

Otras moléculas no activas biológicamente han sido unidas a carbohidratos monofuncionalizados. En este ámbito, Casas-Solvas y colaboradores⁵⁰, han descrito la preparación de conjugados ferroceno-carbohidratos en estudios dirigidos al desarrollo de biosensores (esquema 9). Los derivados 1-azidometil- **49** y 1-etinilferroceno **50** son fácilmente accesibles, y mediante su acoplamiento regioespecífico con propargil y 2-azidoetil glicósidos de glucosa y manosa se obtuvieron los correspondientes derivados de metaloceno solubles en agua **51** y **52**, después de una *O*-desprotección. El comportamiento electroquímico de los glicoconjugados sintetizados fue investigado, hallándose que estos compuestos exhiben la oxidación y reducción del Fe^{2+} .



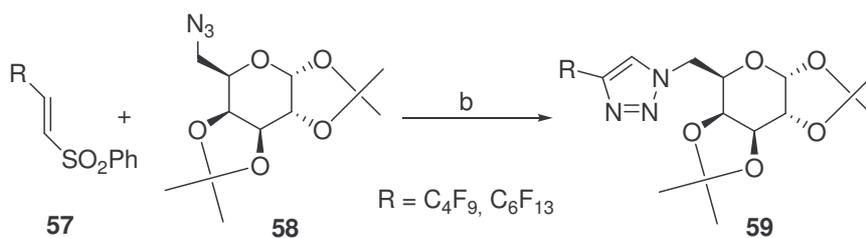
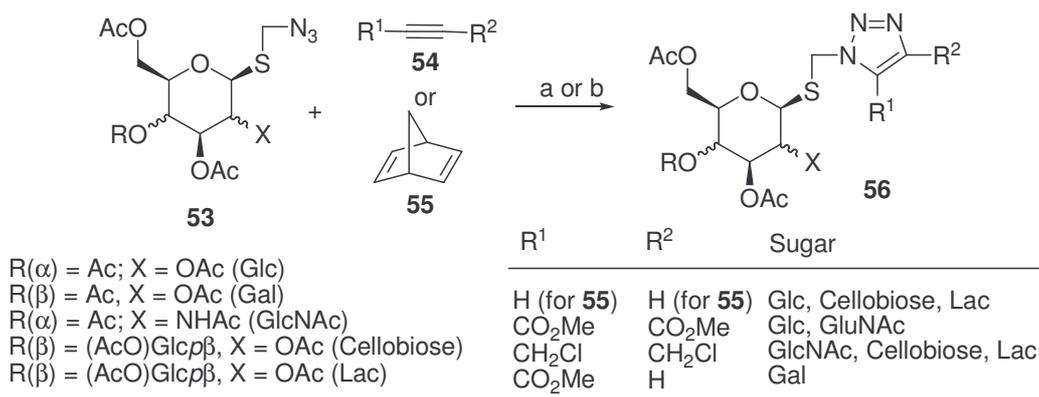
Esquema 10 a $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, tolueno, reflujo ; b NaOMe, MeOH.

⁵⁰ Casas-Solvas JM, Vargas-Berenguel A, Capitan-Vallvey LF, Santoyo-Gonzalez F, *Org Lett*, **2004**, 3687.

Por otra parte, Zhu y colaboradores⁵¹, han descrito una síntesis sencilla de *S*-neoglicoconjugados conteniendo un anillo de triazol en posición anomérica desarrollando así una metodología general para el acceso a glicoconjugados resistentes a medio ácido (esquema 11). Los autores prepararon fácilmente glicosiltiometil cloruros por reacción de tioazúcares *O*-acil-protectados con diclorometano para ser utilizados como productos de partida versátiles para la construcción de tioglicoconjugados. La sustitución nucleofílica del cloro de estos compuestos por azida, permitió obtener los correspondientes azido-azúcares **53** que posteriormente reaccionan en condiciones de cicloadición térmica con diversos derivados acetilénicos, tanto simétricos como no simétricos **54**, para dar lugar a 1-*N*-glicosiltiometil-1,2,3-triazoles sustituidos en el anillo heterocíclico **56**. Los autores usaron en esta reacción norbornadieno **55** como dipolarófilo, que en dichas condiciones térmicas actúa como un equivalente de acetileno por una reacción tándem de cicloadición 1,3-dipolar y retro-Diels-Alder, permitiendo de esta manera acceder a 1-*N*-glicosiltiometil-1,2,3-triazoles **56** que son difíciles de obtener por triazolilmetilación de glicosiltioles. En este sentido, es reseñable también el uso hecho por Hager y colaboradores⁵² de fenilsulfonil-etenos 1,2-disustituidos **57** como dienófilos en la síntesis de fluoroalquil-1,2,3-triazoles unidos a C-6 de monosacáridos **59** que han sido ideados como nucleósidos inversos (esquema 11). En esta reacción de cicloadición de vinilsulfonas **57**, fácilmente accesibles por la olefinación de Wittig-Horner asistida por ultrasonidos, estas actúan como análogos de acetilenos terminales en la reacción con 6-azido-6-desoxi-galactopiranosidos **58**. Esto es debido a una aromatización espontánea que sigue a la etapa de ciclación como consecuencia de la eliminación de sulfonilo. Las reacciones reseñadas muestran una total regioselectividad aislándose solo regioisómeros 1,4-disustituidos.

⁵¹ Zhu XM, Schmidt RR, *J Org Chem*, **2004**, *69*, 1081.

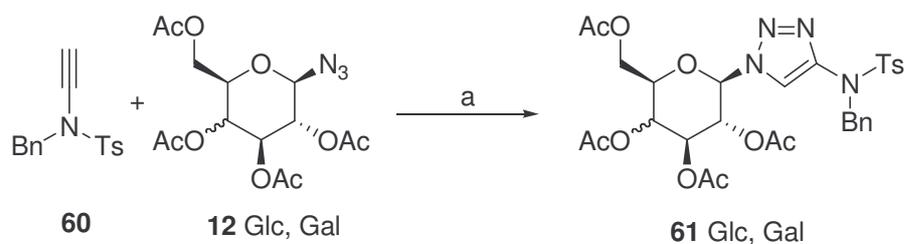
⁵² Hager C, Miethchen R, Reinke H, *J Fluor Chem*, **2000**, *104*, 135.



Esquema 11 a Dioxano, 100 °C ; b Tolueno, reflujo.

En un esfuerzo por expandir el concepto de click chemistry, Ijsselstijn y colaboradores⁵³ comunicaron el uso de dos inamidas N-protegidas **60** como dienófilos en reacciones de cicloadición catalizada por Cu(I) con azidas, incluidas glicopiranosilazidas (esquema 12). Las inamidas son susceptibles de reaccionar en las condiciones estándar de las cicloadiciones ($\text{Cu}(\text{OAc})_2/\text{Na-Ascorbato}$), dando como resultado 4-amino 1,2,3-triazoles-1-sustituidos unidos a azúcares **61**. Estos resultados son de interés ya que permiten el acceso directo a anillos aminotriazoles que se encuentran en algunas moléculas bioactivas, aunque serán necesarios otros estudios para evaluar el alcance y la aplicabilidad con inamidas más complejas.

⁵³ Ijsselstijn M, Cintrat JC, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 3837.



Esquema 12 a $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Na-Ascorbato.

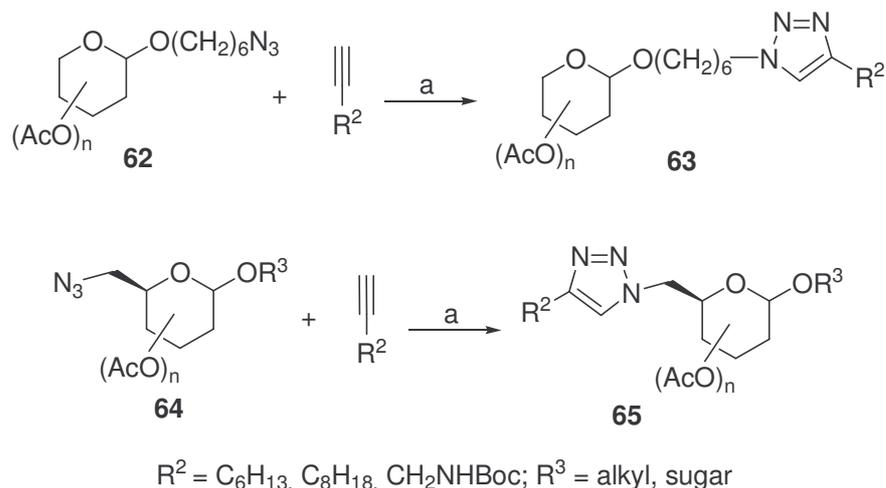
Recientemente, diferentes grupos han introducido mejoras en las condiciones y protocolos de reacción utilizados en la “click chemistry” habiendo sido muchos de ellos puestos a punto en la preparación de conjugados de carbohidratos que contienen un 1,2,3-triazol. De esta manera, Lee y colaboradores⁵⁴, introdujeron el uso de CH_2Cl_2 como codisolvente con agua en la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por $\text{Cu}(\text{I})$ de azidas y alquinos orgánicos como una alternativa cuando otros codisolvente más usuales (*t*-BuOH, EtOH, CH_3CN , DMSO, THF) fallan o dan pobres rendimientos después de largos tiempos de reacción. Estas condiciones de reacción eliminan la necesidad de ligandos como **1**, y simplifica el protocolo de reacción habiendo sido aplicado a diversos azido-alquil *O*-glicósidos. En segundo lugar, Guezguez y colaboradores⁵⁵, han llevado a cabo la síntesis de nuevos 2'-desoxinucleósidos que presentan un anillo de 1,2,3-triazol mediante la asistencia de de microondas y la catálisis con $\text{Cu}(\text{I})$ en ausencia de disolvente usando tan sólo sílica gel en recipientes abiertos. Estas condiciones no sólo reducen drásticamente los tiempos de reacción necesarios para el acoplamiento de azido-2'-desoxirribosa con alquinos terminales, sino que también da lugar al correspondiente nucleósido 4-sustituido 1,2,3-triazol casi cuantitativamente. Finalmente, Deng y colaboradores⁵⁶, han aplicado la sonicación como medio para facilitar las reacciones orgánicas

⁵⁴ B. Y. Lee, S. R. Park, H. B. Jeon, K. S. Kim, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 5105-5109.

⁵⁵ Guezguez R, Bougrin K, El Akri K, Benhida R, *Tetrahedron Lett*, **2006**, *47*, 4807.

⁵⁶ Deng S, Gangadharmath U, Chang CWT, *J Org Chem*, **2006**, *71*, 5179

habiendo demostrado ser una herramienta potente de aumentar la eficacia de muchas de las reacciones más importantes y representativas de la síntesis de carbohidratos, incluidas las cicloadiciones 1,3-dipolares de una serie de alquinos y glicosilazidas **62**, **64**. Estos compuestos son a su vez preparados por sonoquímica (esquema 13). Los correspondientes derivados de triazol **63** y **65** se obtienen de esta manera con altos rendimientos.



Esquema 13 a $Cu(OAc)_2$, Na-Ascorbato, MeOH-THF, H_2O , sonicación.

3.2 Conjugados de carbohidratos que contienen varios anillos de 1,2,3-triazoles.

La construcción eficiente de sistemas moleculares conteniendo múltiples unidades de carbohidratos se ha convertido en una necesidad en los campos de la glicobiología y la glicómica. La principal razón para ello se basa en la prevalencia biológica del principio de multivalencia que afecta a las interacciones ligando receptor en las que están involucrados los carbohidratos. Este esfuerzo por imitar a la naturaleza, ha llevado al desarrollo de glicomiméticos multivalentes con diferentes

arquitecturas (glicoclusters⁵⁷, glicodendrimeros^{57,58,59,60,61}, glicopolimeros⁶², liposomas⁶³) y diferentes densidades de carbohidratos con objeto de dotarlos de mayores fuerzas de unión que los homólogos monovalentes. Estos glicomiméticos son atractivos no sólo por su gran potencial en el estudio de procesos de reconocimiento molecular en los que los carbohidratos están involucrados, sino también por su potencial en biotecnología y a sus potenciales aplicaciones farmacológicas y médicas. Otra razón que ha determinado el interés en este tipo de estructuras ha sido la necesidad de desarrollar técnicas fiables para la inmovilización de carbohidratos sobre superficies. Esta necesidad ha determinado el desarrollo de una serie de soportes sólidos glicofuncionalizados (“microarrays”, “microbeads”, chips biosensores y monocapas autoensambladas “SAMs”) como herramientas útiles y con importantes aplicaciones en las ciencias “ómicas”.

Entre las diferentes metodologías utilizadas para el ensamblaje de los diferentes módulos que componen un sistema polivalente de carbohidratos, la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas ha sido objeto de una elección preferente en los últimos tiempos debido a la fiabilidad, eficacia y robustez de su versión catalizada. Al igual que en otras estrategias de unión, las síntesis de sistemas multivalentes basadas en “click chemistry” normalmente usan azúcares monofuncionalizados que se hacen reaccionar con un andamio polifuncionalizado o un soporte sólido, dando como resultado sistemas moleculares glicosilados que contienen varios 1,2,3-triazoles como elementos de unión.

También se han hecho reaccionar de forma intramolecular derivados bifuncionalizados de carbohidratos que contienen simultáneamente un grupo azido y

⁵⁷ Roy, R, *Trends Glycosci Glyc*, **2003**, *15*, 291.

⁵⁸ Jayaraman N, Nepogodiev SA, Stoddart JF, *Chem Eur J*, **1997**, *3*, 1193.

⁵⁹ Bezouska, K, *Rev Mol Biotechnol*, **2002**, *90*, 269.

⁶⁰ Turnbull, WB, Stoddart, JF, *Rev Mol Biotechnol*, **2002**, *90*, 231.

⁶¹ Roy R, Baek M-G, *Rev Mol Biotech*, **2002**, *90*, 291

⁶² Ladmiral, V, Melia, E, Haddleton, DM, *Eur Polym J*, **2004**, *40*, 431.

⁶³ Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M, *Methods Enzy*, **2003**, *373*, 384.

un grupo alquino, dando lugar a moléculas cíclicas que contienen carbohidratos y que poseen más de un anillo de triazol en su estructura.

3.2.1 Glicoclusters.

Para la síntesis de glicomiméticos multivalentes con arquitectura de racimo utilizando “click chemistry” se han usado diferentes andamios polifuncionalizados como polialquinos o poliazidas, que han sido acoplados con derivados monofuncionalizados complementarios (monoalquino o monoazida) de diferentes azúcares. El número de funciones presentes en el andamio y su disposición determina las diferentes densidades y topologías de los glicoclusters que se pueden obtener. La estructura del andamio y la naturaleza del espaciador que lo conecta a la función cicloadicionable, son normalmente los factores que permiten la obtención de glicoclusters con una variabilidad en las distancias y las disposiciones de estas unidades de azúcar, lo que permite el estudio de los factores espaciales que regulan la unión de carbohidratos.

Las Tablas 2, 3, y 4 indican algunas de las contribuciones más representativas. En dichas Tablas se observa que estructuras diméricas **66** y **67**, triméricas **68** y **69**, tetraméricas, pentaméricas y heptaméricas **70** y **71** han sido las más comúnmente preparadas. En la mayor parte de los glicoclusters sintetizados se usaron compuestos aromáticos como andamio, aunque en algunos se usaron moléculas alifáticas multivalentes (Tabla 2, entradas 1 y 4, y Tabla 4, entradas 3 y 4). También se han usado carbohidratos (Tabla 4, entradas 2, 5, 6 y 7) que fueron seleccionados debido a su fácil disponibilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, polifuncionalidad y quiralidad intrínseca. La posición anomérica ha sido la más ampliamente utilizada para introducir las funciones cicloadicionables, aunque la metodología funciona igualmente en otras posiciones de los azúcares (Tabla 2, entrada 5). A pesar de la mayor complejidad de los glicoclusters, las reacciones de cicloadición funcionan

igual de bien que en el caso de conjugados de carbohidratos que contienen un solo anillo de 1,2,3-triazol, obteniéndose los productos multivalentes con iguales eficiencias y rendimientos. Se ha usado un gran rango de condiciones pero normalmente el uso de complejos de Cu(I) solubles en disolventes orgánicos es la mejor opción cuando se usan carbohidratos protegidos.

En algunos casos, las síntesis de glicoclusters se han llevado a cabo para probar la utilidad de la “click chemistry” en la construcción de sistemas multivalentes y son continuaciones lógicas de trabajos comentados en la síntesis de conjugados de carbohidratos que conteniendo un anillo de 1,2,3-triazol. Sin embargo, en otras ocasiones se trata de síntesis dirigidas para la obtención específica de neoglicoconjugados multivalentes. Así por ejemplo, Casas-Solvas y colaboradores⁶⁴, han diseñado derivados bis(glicosil) ferrocenos en la búsqueda de sensores basados en carbohidratos. Thomas y colaboradores⁶⁵, han descrito la preparación de una librería de derivados diméricos de desoxiestreptamina que fueron probados en la búsqueda de un ligando a horquillas de ARN (RNA hairpin loops) de tamaño específico, encontrándose que los compuestos mostrados en la Tabla 2, entrada 4 son los que muestran una mayor afinidad. Tejler y colaboradores⁶⁶ prepararon derivados multivalentes de lactosa en la búsqueda de inhibidores selectivos de galectina en los que quedó demostrado un efecto multivalente en relación a los correspondientes monómeros de β -lactósido para galectina-1 y en menor medida para galectina-4N (Tabla 2, entradas 7 y 8; Tabla 3, entrada 5). Resultados similares fueron encontrados por Guiguère y colaboradores⁶⁷ con el lactósido C3-simétrico indicado en la Tabla 3, entrada 4.

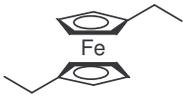
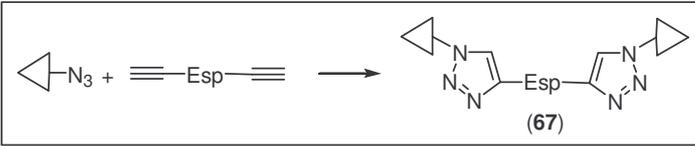
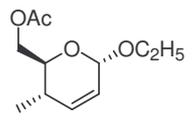
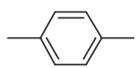
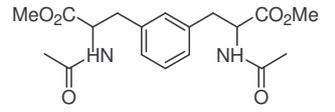
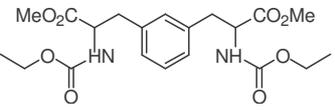
⁶⁴ Referencia 50.

⁶⁵ Thomas JR, Liu X, Hergenrother PJ, *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 12434.

⁶⁶ Tejler J, Tullberg E, Frejd T, Leffler H, Nilsson UJ, *Carbohydr Res*, **2006**, *341*, 1353

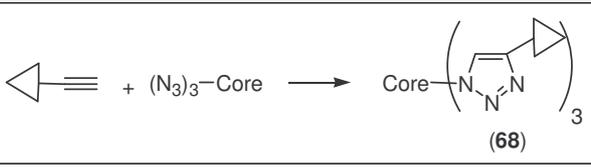
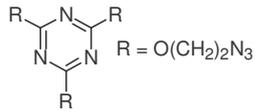
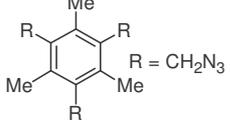
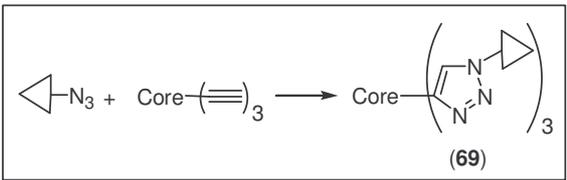
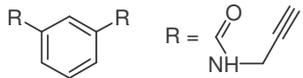
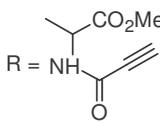
⁶⁷ Referencia 46.

Tabla 2 Neogliconjugados divalentes.

Entrada		Esp	Condiciones
1	(AcO)ManpβOCH ₂ -	CH ₂ CH ₂	A
2	(AcO)ManpβXCH ₂ - (X=O,S)		A, B
3	(AcO)ManpαOCH ₂ - (AcO)Glu _p βOCH ₂ -		C
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;">  <p style="text-align: center;">(67)</p> </div>			
4			D
5	(HO)LacpβO(CH ₂) ₂ -		C
6	(HO)LacpβO(CH ₂) ₂ -		C

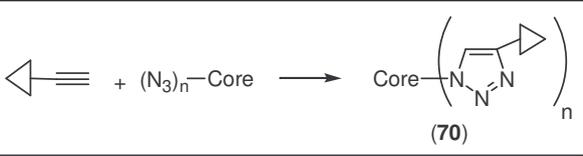
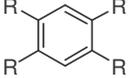
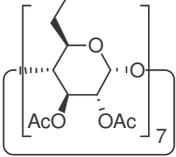
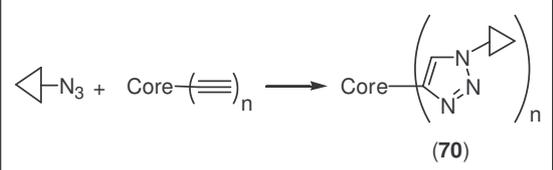
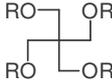
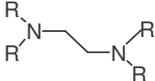
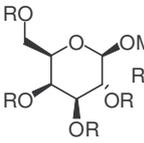
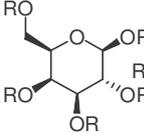
A. (Ph₃P)₃·CuBr, DIPEA, MW; B : (EtO)₃P·CuI, DIPEA, MW ; C: (Ph₃P)₃·CuBr, DBU, MW;
 D: CuI, DIPEA, acetonitrilo; E: . (Ph₃P)₃·CuBr, DBU; F: Cu(SO₄)₂, Na-Ascorbato.

Tabla 3 Neoglicoconjugados trivalentes.

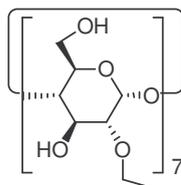
Entrada.		(N ₃) ₃ -Andamio o (HC≡C) ₃ -Andamio	Condiciones.
	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;">  </div>		
1	(AcO)ManpβXCH ₂ - (X=O,S)		A
2	(AcO)ManpβSCH ₂ -		A
	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;">  </div>		
3	(AcO)Gluβ	R = OCH ₂ ≡CH	B
4	(AcO)Lacβ(CH ₂) ₂		C
5	(AcO)Lacβ		C

A. (Ph₃P)₃·CuBr, DIPEA, MW; B : Cu(SO₄)₂, Na-Ascorbato; C: CuI, DIPEA.

Tabla 4 Neoglicoconjugados multivalentes.

Entrada.		(N ₃) _n -Andamio o (HC≡C) _n -Andamio	Condiciones.
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;">  </div>			
1	(AcO)Man $p\beta$ XCH ₂ - (X=O,S)	 R = CH ₂ N ₃	A (X=O) B (X= S)
2	(AcO)Man $p\beta$ OCH ₂ - (AcO)Gal $p\beta$ OCH ₂ - (AcO)Lac $p\beta$ OCH ₂ - (AcO)Gal $p\beta$ XCH ₂ -		C
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;">  </div>			
3	(AcO)Glu $p\beta$	 R = CH ₂ ≡CH	B
4	(AcO)Glu $p\beta$	 R = CH ₂ ≡CH	D
5	(HO)Lac β	 R = CH ₂ ≡CH	D
6	(AcO)Gal $p\beta$ OCH ₂ CH ₂ - (AcO)Lac β OCH ₂ CH ₂ -	 R = CH ₂ ≡CH	C

7 (HO)Galp β OCH₂CH₂-
(HO)Lac β OCH₂CH₂-



C

A. (Ph₃P)₃CuBr, DIPEA, MW; B: (EtO)₃P·CuI, DIPEA; C: (EtO)₃P·CuI, MW; D: Cu(SO₄)₂, Na-Ascorbato;

3.2.2 Glicodendrimeros.

La alta eficiencia de la “click chemistry” ha sido también usada en la síntesis de macromoléculas dendríméricas funcionalizadas en sus extremos con carbohidratos.

Los glicodendrimeros son una clase de glicoconjugados especialmente interesantes debido a su alta funcionalización y a la posibilidad de controlar el número de unidades de carbohidratos de su periferia. Estas características son particularmente atractivas en el caso de arquitecturas monodendríticas, más que en dendrimeros de tipo globular, debido a que estos pueden mimetizar complejos glicanos multivalentes que se encuentran en las glicoproteínas naturales. Las interacciones de estos dendrimeros con receptores biológicos y superficies celulares han sido objeto de estudio para desarrollar sistemas de transporte dirigido de fármacos.

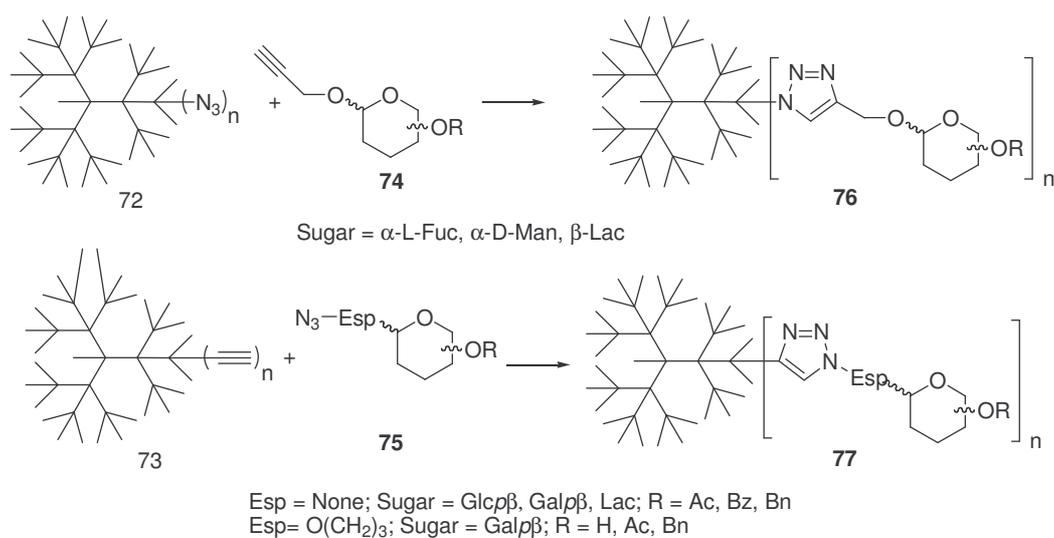
Se han preparado tanto dendrones funcionalizados en los extremos con azida como con alquino **72** y **73** (esquema 14). Para la síntesis de estos dendrones se han usado tanto estrategias divergentes como convergentes con altos rendimientos. Así, Malkoch y colaboradores⁶⁸, realizaron la síntesis de polibencil-éteres funcionalizados con alquinos en una aproximación convergente y también el crecimiento divergente de PAPAM/DAB, bis-MPa y poliésteres. Por su parte, Joosten y colaboradores⁶⁹ funcionalizaron dendrimeros de tipo aminoácido. Alternativamente, Fernández-

⁶⁸ Referencia 45.

⁶⁹ Joosten JAF, Tholen NTH, El Maate FA, Brouwer AJ, van Esse GW, Rijkers DTS, Liskamp RMJ, Pieters RJ, *Eur J Org Chem*, **2005**, 3182.

Megía y colaboradores⁷⁰, han preparado varias generaciones de dendrímeros terminados en azido por una aproximación divergente a partir de un andamio que contiene ácido gálico y trietilenglicol.

Para la decoración de los dendrímeros funcionalizados se han usado diferentes derivados azida **75** o alquino **74** de carbohidratos, tanto anoméricos como no anoméricos. Las condiciones de reacción se optimizaron para cada caso explotándose la flexibilidad de las cicloadiciones 1,3-dipolares de alquinos y azidas. En general, se ha encontrado que la irradiación con microondas facilita notablemente el acoplamiento en estas reacciones multivalentes obteniéndose los correspondientes glicodendrímeros **76** y **77** en cortos tiempos de reacción con excelentes rendimientos. La incompatibilidad observada en algunos casos de las condiciones acuosas estándar (CuSO₄/ ascorbato sódico) debidas principalmente a la insolubilidad de los reactivos, ha podido ser evitada empleando disolventes orgánicos y catalizadores solubles en ellos como (PPh₃)₃·CuBr o (EtO)₃P·CuI.



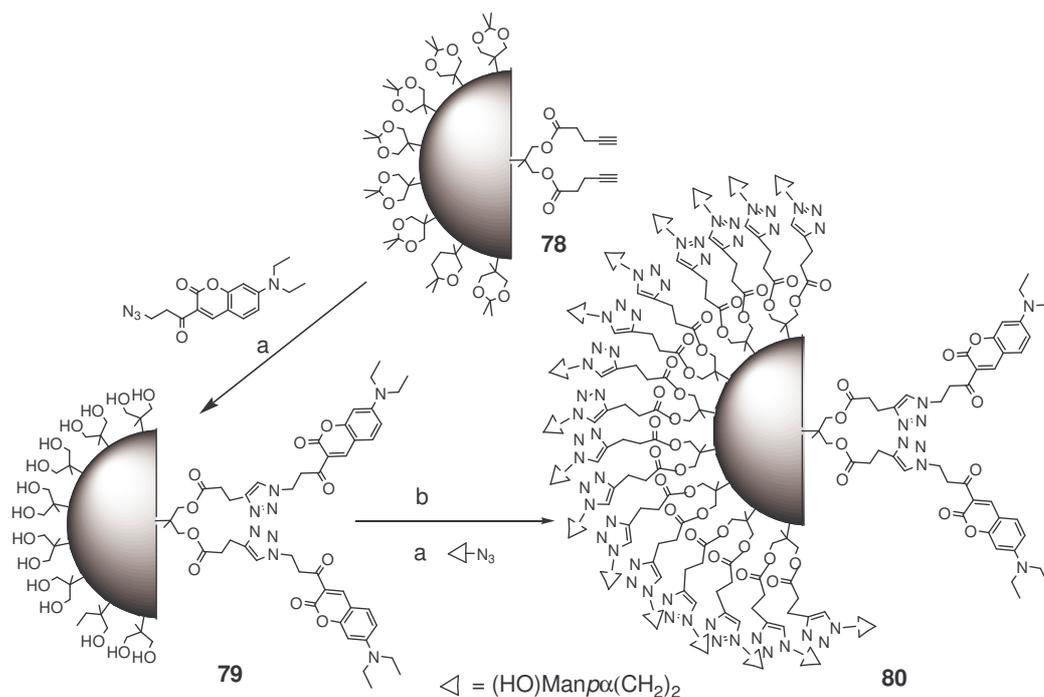
Esquema 14 Síntesis de glicodendrímeros.

⁷⁰ Fernandez-Megía E, Correa J, Rodríguez-Meizoso I, Riguera R, *Macromolecules*, **2006**, 39, 2113.

Una de las ventajas más notables del uso de la “click chemistry” para la glicofuncionalización de dendrímeros es que permite la conjugación multivalente de forma rápida y eficiente de derivados azido y alquino de carbohidratos sin proteger a diferencia de lo que ocurre cuando se emplean glicósidos protegidos. La alta eficiencia se manifiesta no sólo por los excelentes rendimientos observados en estas reacciones, sino también por su alta economía, ya que se pueden utilizar cantidades estequiométricas o ligeros excesos de los carbohidratos cicloadicionables. Además las condiciones suaves de esta cicloadición toleran la presencia un gran número de otros grupos funcionales durante la derivatización de los andamios dendriméricos y normalmente sólo es necesario un mínimo paso de purificación. Debido a todo esto la preparación de glicodendrímeros se convierte en un proceso de rutina en comparación con las aproximaciones previamente usadas.

La utilidad de la cicloadición de alquinos y azidas catalizada por Cu(I) como herramienta en la preparación de glicodendrímeros y el potencial de estos productos ha sido recientemente puesto de manifiesto por Wu y colaboradores⁷¹ con la síntesis de dendrímeros de manosa no simétricos **80** con unidades de cumarina (fluoróforo). Estos productos por su naturaleza dual pueden ser usados tanto en el reconocimiento como en la detección y son potencialmente útiles para desarrollar aplicaciones en la identificación y tratamiento de ciertas patologías vía interacciones multivalentes. Estos compuestos se prepararon usando una estrategia modular que permitió la fácil introducción de los grupos funcionales en la estructura dendrítica en diferentes etapas del proceso. En primer lugar, se unió el derivado azido de cumarina al dendrón **78** mediante “click chemistry” seguido de la diferenciación de los grupos finales del dendrón para obtener el correspondiente alquino dendrímero que reacciona con 2-azidoetil-*O*-manósido desprotegido obteniéndose el glicodendrímero **80** que fue ensayado frente a ConA mediante la técnica de hemoaglutinación.

⁷¹ Wu P, Malkoch M, Hunt JN, Vestberg R, Kaltgrad E, Finn MG, Fokin VV, Sharpless KB, Hawker CJ, *Chem Commun*, **2005**, 5775



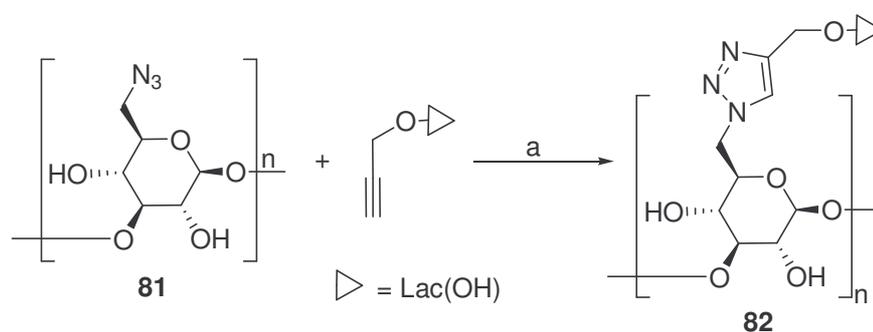
Esquema 15 a (i) DOWEX, MeOH (ii) derivado azido de la cumarina, $CuSO_4$ /Ascorbato sódico, THF/ H_2O ; **b** (i) $(HC\equiv CCH_2CH_2CO)_2O$, DMAP/Py (ii) azido azúcar, $CuSO_4$ /Ascorbato sódico, THF/ H_2O

3.2.3 Glicopolímeros.

La cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas ha sido también una metodología útil en la preparación de nuevos glicopolímeros sintéticos con estructuras macromoleculares bien definidas, expandiéndose así el repertorio de técnicas sintéticas para acceder a estos compuestos. Los glicopolímeros han aparecido en el área de la glicobiología con la intención de crear herramientas sintéticas para la investigación de interacciones glicopolímero-proteína, siendo también atractivas en otras áreas para el desarrollo de estructuras que contienen azúcares, interesantes por sus aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Las estrategias químicas para acceder a estos neoglicoconjugados son variadas,

habiéndose utilizado desde modificaciones químicas del esqueleto del polímero, la polimerización de monómeros que contienen azúcares o procedimientos quimioenzimáticos. La “click chemistry” hasta el momento ha sido usada en la primera de las estrategias mencionadas pero también puede ser usada en la segunda estrategia como se ilustra más adelante en la síntesis de polímeros de trehalosa.

Para la construcción de glicopolímeros mediante “click chemistry”, los polímeros que contienen alquinos han sido mucho más usados que los que contienen azidas, principalmente para reducir el riesgo de acumular un elevado número de grupos azido en la misma molécula. A pesar ello, Hasegawa y colaboradores⁷² utilizaron polímeros funcionalizados con azidas (esquema 16) para la síntesis de (1,3)- β -D-glucano con restos de lactosa **82**, como un posible transportador de genes, obtenido con gran rendimiento por reacción de 6-azido-6-deoxi-curdlan **81** y propargil lactosa. Los autores destacan que la introducción de estos grupos voluminosos se puede realizar de forma altamente eficiente en esta aproximación química, en comparación con la estrategia quimioenzimática usada con anterioridad para la obtención de derivados polisacáridos del mismo tipo en las que fueron usadas rutas sintéticas mucho más tediosas.



Esquema 16 a CuBr₂, ácido ascórbico, propilamina, ta, Me₂SO (EtO)₃Si(CH₂)₃N₃, tolueno, reflujo.

⁷² Hasegawa T, Umeda M, Numata M, Li C, Bae AH, Fujisawa T, Haraguchi S, Sakurai K, Shinkai S, *Carbohydr Res*, **2005**, 341, 35

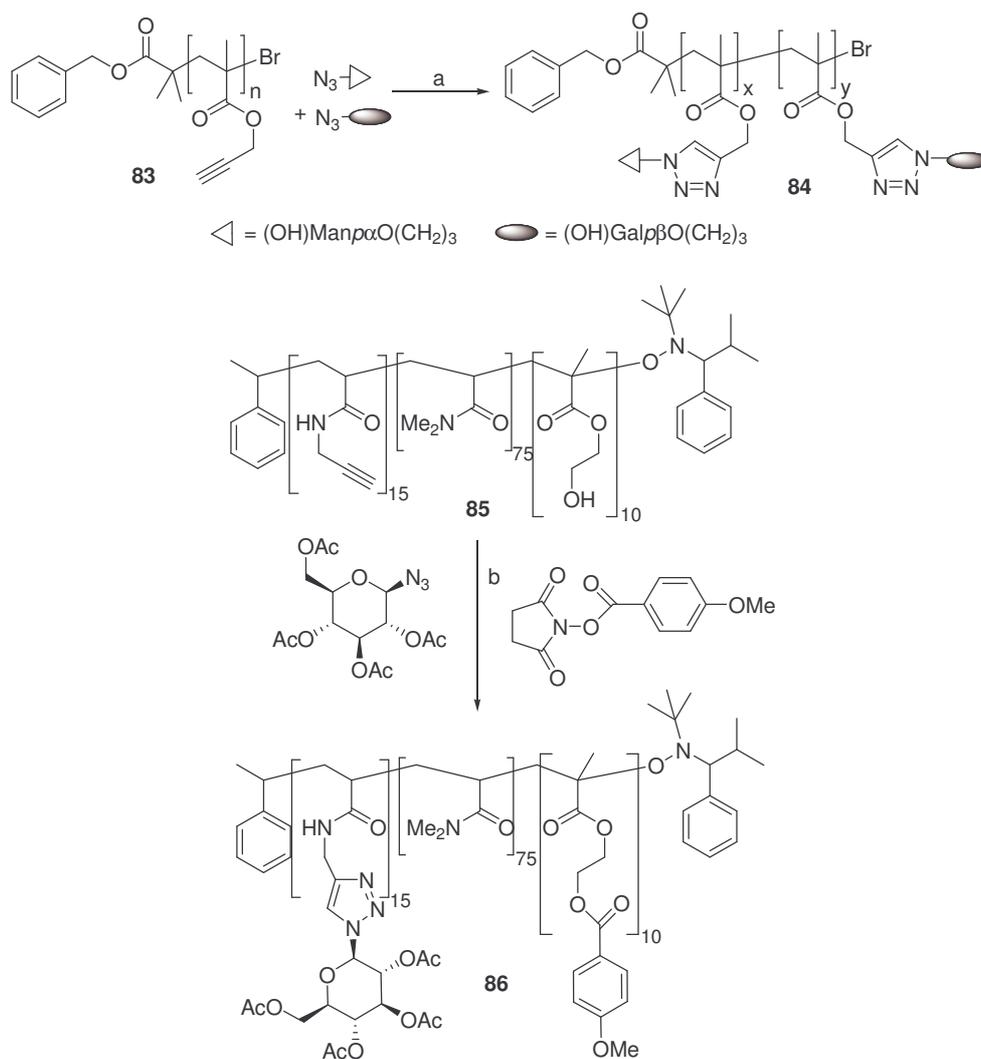
Ladmiral y colaboradores⁷³, han preparado una nueva serie de glicopolímeros **84** usando alquino-polímeros, para realizar estudios de afinidad con lectinas. Estos compuestos se obtuvieron a partir de los apropiados azido azúcares y polimetacrilatos funcionalizados con alquinos obtenidos previamente por polimerización radicalaria de (trimetilsilil)propargil metacrilato (esquema 17). Después de la desprotección del alquino se unieron carbohidratos, tanto protegidos como desprotegidos, bien por azido en posición C-6 o en posición anomérica sobre el esqueleto polimérico, dando lugar a ligandos polidentados que contienen unidades de manosa y de galactosa **84**. La conjunción de un proceso de copolimerización radicalaria controlado con una estrategia de postfuncionalización eficiente, permite obtener una librería de derivados multivalentes en las que el factor de variabilidad es la densidad del epitopo. Además esta estrategia permite también introducir un ligando fluorescente cuando se hace reaccionar el polímero con azido cumarina. Estos glicopolímeros fueron ensayados frente a lectinas modelo con unión selectiva a manosa (ConA) y a galactosa (RCA I, Aglutinina de *Ricinus communis*). En el caso de la Con A se observó que el grado de aglomeración y la estequiometría del complejo proteína-polímero viene determinado por la densidad del epitopo reconocible que contiene cada polímero. La estrategia sintética propuesta constituye, por tanto, una herramienta muy útil para la síntesis de librerías de materiales cuya única diferencia sea la unidad de azúcar unida al polímero.

Malkoch y colaboradores⁷⁴, han contribuido con un elegante avance al desarrollar una estrategia ortogonal para la funcionalización simultánea y en cascada de polímeros combinando la cicloadición 1,3-dipolares de alquinos y azidas con otras transformaciones sintéticas. Estas estrategias de una sola etapa hacen uso de la

⁷³ Ladmiral V, Mantovani G, Clarkson GJ, Cauet S, Irwin JL, Haddleton DM, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 4823.

⁷⁴ Malkoch M, Thibault RJ, Drockenmuller E, Messerschmidt M, Voit B, Russell TP, Hawker CJ, *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 14942.

presencia en un mismo polímero de grupos funcionales diversos en su naturaleza. En el caso de la aproximación simultánea, el glicopolímero **86** se obtuvo a partir del terpolímero **85** derivado de (*N,N*-dimetil)acrilamida y soluble en agua. Este compuesto presenta múltiples copias de tres grupos funcionales distintos a lo largo de su estructura. Esta característica le confiere la posibilidad de sufrir reacciones distintas e independientes por reacción con reactivos diferentemente funcionalizados (esquema 17).



Esquema 17 a $(\text{PPh}_3)_3\text{CuBr}$, Et_3N , DMSO ; **b** $(\text{PPh}_3)_3\text{CuBr}$, DIPEA .

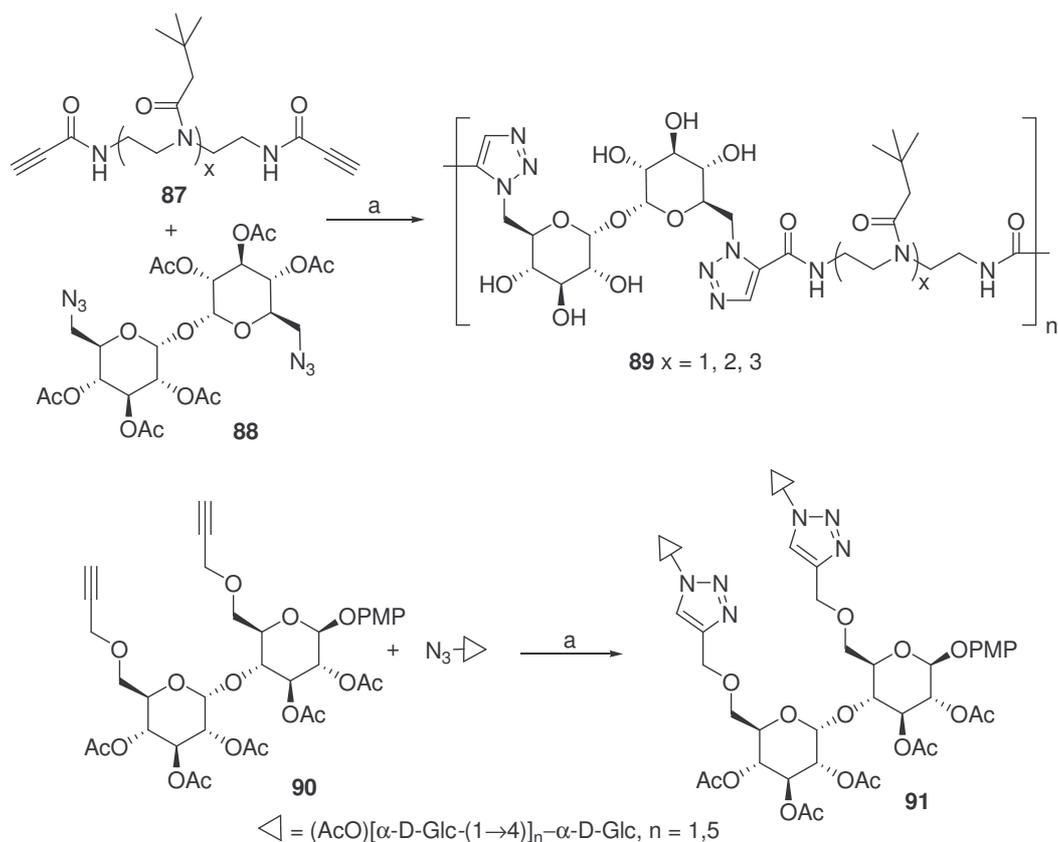
La compatibilidad del acoplamiento de alquinos y azidas con un gran rango de grupos funcionales y de condiciones de reacción permite la construcción modular de diversos polímeros funcionalizados a través de esta estrategia, lo que supone un avance significativo cuando se compara con aproximaciones multietapa más tradicionales.

La conjugación de alquinos y azidas también ha sido aplicada como reacción de polimerización por reacción de monómeros de diazidas y dialquinos. En este sentido, Srinivasachari y colaboradores⁷⁵, han publicado la síntesis de una nueva familia de glicopolímeros en la que la 6,6'-diazido-trehalosa **88** se ha usado como monómero en la reacción con una serie de monómeros de dialquino-oligoaminas **87**. Estas estructuras **89** han sido diseñadas conteniendo: (1) una unidad de trehalosa para promover la biocompatibilidad, solubilidad en agua y estabilidad frente a agregación, (2) grupos amido-triazol para realzar la unión de DNA y (3) una unidad de oligoamina para facilitar la encapsulación de DNA, la neutralización de los grupos fosfato del DNA y las interacciones con paredes celulares (esquema 18). Los polímeros de trehalosa así obtenidos demostraron ser buenos transportadores de ácidos nucleicos, tanto en ausencia como en presencia de suero, especialmente en el caso del vector **89** ($x = 3$) que mostró la capacidad de formar “poliiples” muy estables, además de actuar como un transportador celular eficiente con una toxicidad relativamente baja. También es reseñable la aportación de Marmuse y colaboradores⁷⁶, que han realizado la preparación sintética de fragmentos de amilopectina **91** de estructura bien definida incorporando ramificaciones α -(1 \rightarrow 6) de carbohidratos para ser usadas como potenciales herramientas en estudios fisicoquímicos o bioquímicos (esquema 18). Estos compuestos se obtuvieron usando *p*-metoxifenil maltósido 6,6'-dipropargilado **90** como andamio para el acoplamiento

⁷⁵ Srinivasachari S, Liu Y, Zhang G, Pevette L, Reineke TM, *J Am Chem Soc*, **2006**, *128*, 8176.

⁷⁶ Marmuse L, Nepogodiev SA, Field RA, *Org Biomol Chem*, **2005**, *3*, 2225.

de cadenas lineales de carbohidratos funcionalizadas con grupos azido en la posición anomérica terminal de la unidad reductora.



Esquema 18 a CuSO_4 , Na-Ascorbato, 1:1 t-BuOH- H_2O ; (ii) NaOMe/MeOH;

b $(\text{PPh}_3)_3\text{CuBr}$, DIPEA, tolueno, t.a.

3.2.4 Análogos de ciclodextrinas y oligopéptidos cíclicos glicosilados.

La preparación de macrociclos conteniendo carbohidratos es una más de las aplicaciones que la cicloadición 1,3 dipolar de alquinos y azidas catalizada ha encontrado en la química de carbohidratos. Los macrociclos son importantes bloques de construcción en Química Supramolecular con aplicaciones diversas tales como poros moleculares, receptores artificiales y otros componentes de arquitecturas

moleculares complejas. De entre la amplia variedad de estructuras macrocíclicas descritas hasta el presente, los análogos de ciclodextrinas, los macrociclos híbridos de carbohidratos y aminoácidos así como los oligopéptidos cíclicos glicosilados; han encontrado en la “click chemistry” una poderosa herramienta para el ensamblaje intermolecular de los diferentes módulos estructurales convenientemente funcionalizados a través de la formación de múltiples heterociclos triazólicos que actúan como puentes de unión.

La síntesis de análogos de ciclodextrinas y de macrociclos híbridos de carbohidratos y aminoácidos ha sido descrita por Bodine y colaboradores^{77,78} y Billing y colaboradores⁷⁹ respectivamente. En ambos casos se utilizó una estrategia común basada en una ciclación convergente de derivados bifuncionalizados conteniendo grupos alquino y azida. De ese modo, Bodine y colaboradores, utilizaron como productos de partida 2,3,6-tri-*O*-bencil-4-*O*-propargil- α -D-manósido y derivados protegidos de di y trisacáridos de manosa, que consistían en unidades de manosa con unión 1,4 y funcionalizados en sus extremos con azida en el carbono anomérico y propargilo en C-4. Bajo las condiciones de “click chemistry” estos compuestos conducen a productos de ciclodimerización y ciclotrimerización **92-94** sin observarse productos de oligomerización lineal. El ciclódímero **93** se forma exclusivamente y en buen rendimiento cuando se parte del disacárido, aunque en los casos del monosacárido y del trisacárido, se obtienen los correspondientes ciclotrimeros **92** y ciclódímero **94** con la formación de otros productos cíclicos con menor rendimiento. Este procedimiento sintético representa una metodología fácil y altamente convergente para la preparación de ciclooligosacáridos que permite la preparación de diversos análogos de ciclodextrinas mejorando y aumentando el repertorio de metodologías previamente utilizadas para la obtención de este tipo de

⁷⁷ Bodine KD, Gin DY, Gin MS, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 1638.

⁷⁸ Bodine KD, Gin DY, Gin MS, *Org Lett*, **2005**, *7*, 4479.

⁷⁹ Billing JF, Nilsson UJ, *J Org Chem*, **2005**, *70*, 4847.

productos. Así, con anterioridad se ha usado la síntesis de oligosacáridos paso a paso seguida de una cicloglicosilación o ciclooligomerización, estrategia que presenta como inconvenientes las largas secuencias de reacción, el bajo rendimiento de la ciclación, la obtención de mezclas anoméricas y mezclas de macrociclos de diferentes tamaños para la ciclooligomerización. Dichas desventajas estas parcialmente disminuidas por el uso de la “click chemistry”.

Análogamente, Billing y colaboradores⁸⁰, han llevado a cabo la preparación de macrociclos híbridos carbohidrato-aminoácido **95** mediante una macrociclación vía “click chemistry” de metil-2-amino-6-azido-3,4-di-*O*-benzoil-2,6-didesoxi- β -D-glucopiranosido acoplado con N-propiolil dipéptidos (propiolil-Tyr-Tyr-OH y propiolil-Arg(Mtr)-Tyr-OH) en el grupo amino del azúcar. La ciclodimerización de estos compuestos, usando CuI y DIPEA en CH₃CN como las condiciones más óptimas, conduce a macrociclos rígidos de simetría C₂ que son candidatos a actuar como receptores artificiales en agua.

Por último, debe ser mencionada la aportación de Lin y colaboradores⁸¹, que han descrito una aproximación quimioenzimática para sintetizar antibióticos derivatizando con carbohidratos ciclopéptidos **96**. La estrategia química se planteó en dos etapas, preparación de ciclopéptidos que contienen alquino mediante una macrociclación enzimática, seguida de una reacción de cicloadición de este compuesto con azido azúcares. Usando un dominio de tioesterasa de la sintetasa del decapeptido tirocidina, obtuvieron trece derivados de tirocidina ciclados cabeza-cola, conteniendo de una a tres propargilglicinas incorporadas de las posiciones 3-8. Estos péptidos cíclicos son conjugados a veintiun azido azúcares vía “click chemistry” dando lugar a una librería de 247 glicopéptidos. Mediante ensayos antibacterianos y

⁸⁰ Referencia 79.

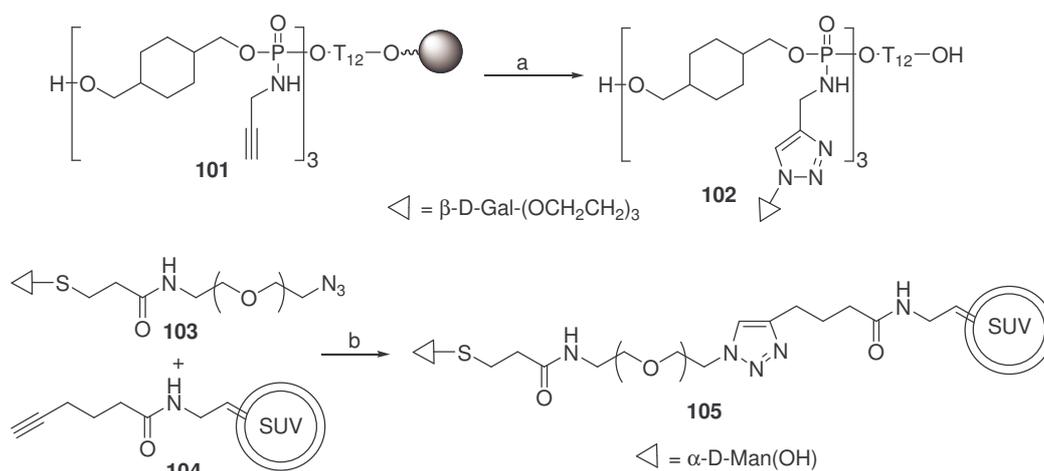
⁸¹ Lin H, Walsh CT, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 13998.

Bouillon y colaboradores⁸⁴, han demostrado que esta estrategia funciona especialmente bien en el caso de oligonucleótidos (esquema 20). Estos autores describen el etiquetado múltiple de oligonucleótidos unidos a una fase sólida con derivados anoméricos de azido galactosa. La dodecatimidina (T₁₂) protegida con grupos cianoetilo fue preparada en fase sólida usando la química de fosforoamidita y transformada en el alquino oligonucleótido **101**. La cicloadición de este alquino compuesto trivalente con la azida monovalente acontece de forma eficaz especialmente cuando la reacción se lleva a cabo irradiando con microondas obteniéndose el compuesto **102**. Las reacciones se puede realizar también en solución en las mismas condiciones, pero el protocolo en fase sólida ofrece ventajas destacables. Esta metodología supone una estrategia simple y eficiente para el anclaje múltiple de carbohidratos a oligonucleótidos.

Por otra parte Hassane y colaboradores⁸⁵, han llevado a cabo la unión de derivados no protegidos de α -D-manosa **103**, conteniendo un brazo espaciador funcionalizado con un grupo azida, a la superficie de liposomas **104** que presentan como funciones terminales alquinos. Se eligió esta función para el anclaje debido a la inercia química *in vivo* y la ausencia de reactividad con las biomoléculas que pueden ser atrapadas en el interior del liposoma. Por otro lado, el espaciador relativamente largo de polietilenglicol se eligió para conferirle a las manos del liposoma una adecuada accesibilidad a sus receptores. El uso de CuSO₄ /ascorbato sódico como catalizador no fue útil en este sistema, limitación que fue soslayada con el uso del ligando sulfonado derivado de fenantrolina **3**. Las condiciones de conjugación se mostraron inofensivas para los liposomas aunque los autores apuntan la necesidad de una reacción libre de cobre.

⁸⁴ Bouillon C, Meyer A, Vidal S, Jochum A, Chevotot Y, Cloarec JP, Praly JP, Vasseur JJ, Morvan F, *J Org Chem*, **2006**, *71*, 4700.

⁸⁵ SaidHassane F, Frisch B, Schuber F, *Bioconjugate Chem*, **2006**, *17*, 849.

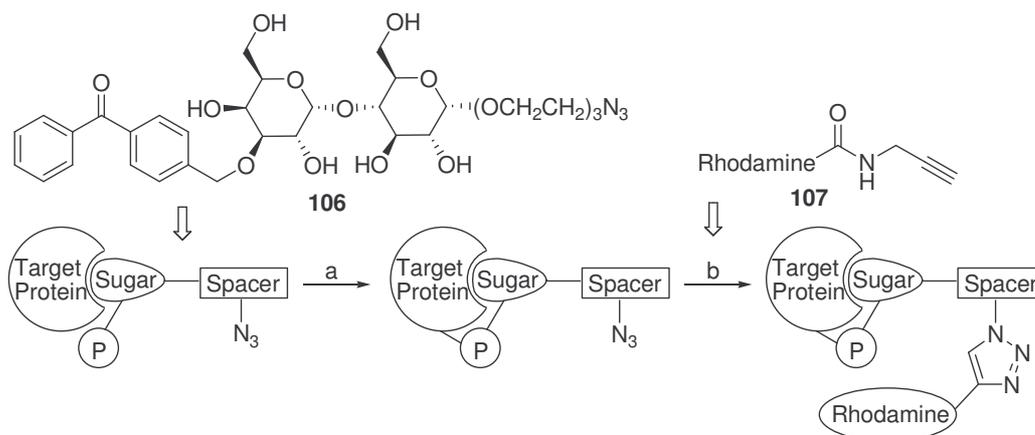


Esquema 20 a (i) CuSO₄/Na-Ascorbato, MW; (ii) NH₄OH; **b** CuSO₄/Na-Ascorbato, ligando 3.

Finalmente, se debe destacar también la contribución de Ballell y colaboradores⁸⁶, quienes han realizado el diseño racional de una nueva sonda química adecuada para el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato de galectina-1 (esquema 21). La estrategia sintética está basada en una sofisticada y eficiente combinación de etiquetado por fotoafinidad, ligación quimioselectiva y visualización afinidad-etiquetado. La sonda se construyó usando lactosa como azúcar biorreconocible por la galectina. El marcaje mediante fotoafinidad es un factor clave y fue realizado en la posición C-3 de la unidad de galactosa, compuesto **106**, basándose en estructuras cristalinas de los complejos de lactosa y N-acetil lactosamina con galectina-1 y galectina-3. El espaciador de etilenglicol se incorporó para conferirle solubilidad en agua a la molécula y para introducir una función azida terminal que permita un posterior marcaje de la proteína con alquinos como el derivado de rodamina **107**. Las ventajas de esta metodología son su versatilidad, ya que para extrapolarlo a otra proteína es necesario sólo un ligando fotoreactivo

⁸⁶ Ballell L, Alink KJ, Slijper M, Versluis C, Liskamp RMJ, Pieters RJ, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 291.

adecuado, y su simplicidad que minimiza los largos procesos de reacción necesarios en otras estrategias.



Esquema 21 a hv; b CuSO₄, Cu (alambre), tris(triazolil)amina ligando 3.

P = Etiqueta por fotoafinidad.

3.2.6 “Glicoarrays”.

La tecnología de “arrays”, cuyo objetivo es la disposición de biomoléculas sobre superficies con el fin de investigar sus interacciones biológicas, ha sido también beneficiada por el desarrollo de la “click chemistry”, gracias a la facilidad de ésta metodología para conseguir conexiones moleculares con alta eficiencia y su capacidad para preservar la actividad de biomoléculas, por lo que ha sido implementada una técnica de inmovilización robusta. En particular los “glicoarrays”, en los que los carbohidratos se unen covalentemente o no sobre superficies, son dispositivos muy valiosos en un gran número de aplicaciones en el campo emergente de la glicómica, especialmente en el análisis de interacciones azúcar receptor de alto rendimiento a gran escala (microarrays)^{87,88,89,90}. Las uniones mediante enlaces

⁸⁷ Wang, D, *Proteomics*, **2003**, 3, 2167.

⁸⁸ Ortiz MC, Garcia Fernandez JM, *ChemBiochem*, **2002**, 3, 819.

⁸⁹ Love, KR, Seeberger, PH, *Angew Chem Inter Ed*, **2002**, 41, 3583.

⁹⁰ Feizi T, Fazio F, Chai W, Wong CH, *Curr Opin Struct Biol*, **2003**, 13, 637.

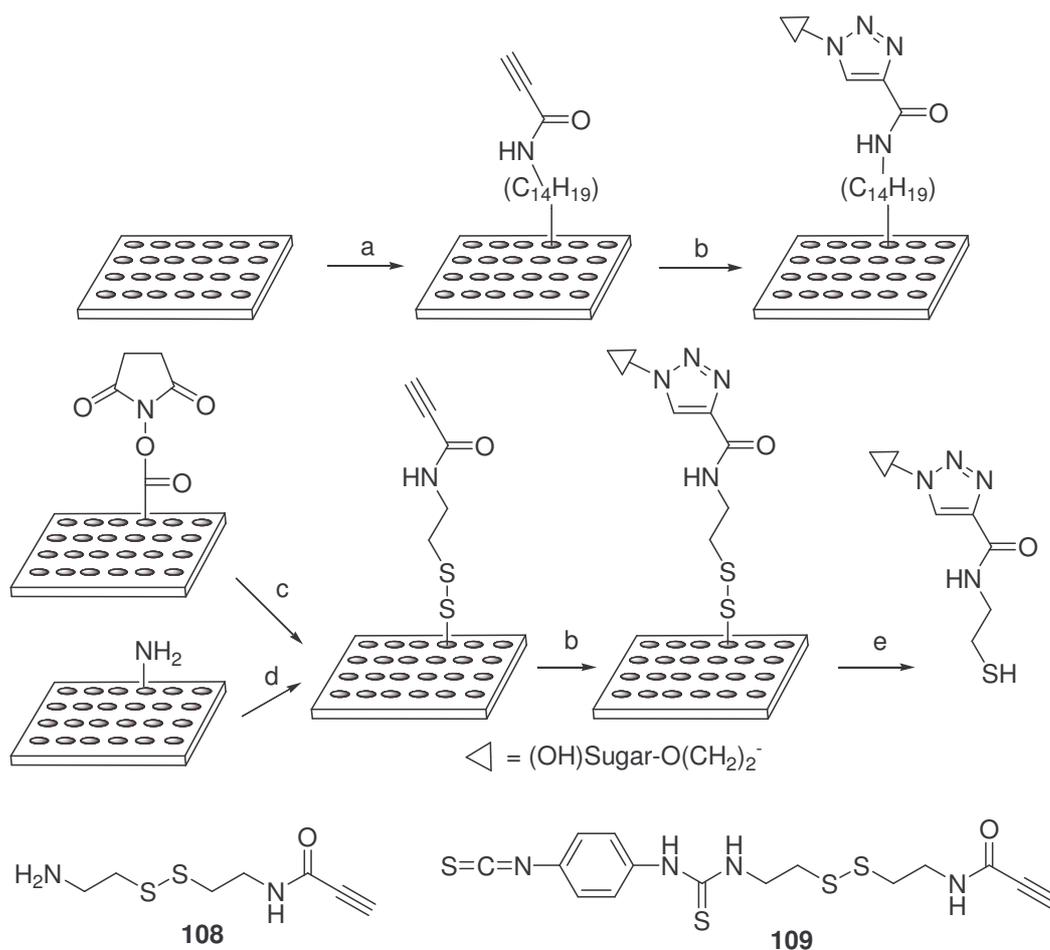
covalentes son preferibles normalmente a las uniones no covalentes debido a que permiten una orientación definida y uniforme de los carbohidratos favoreciendo su accesibilidad para la unión. La “click chemistry” ha sido aprovechada en ambas aproximaciones diferentes demostrando su gran potencial como reacción quimioselectiva y bioortogonal.

La primera contribución en el desarrollo de “arrays” de azúcares basados en “click chemistry” fue descrita por Fazio y colaboradores⁹¹ quienes hicieron uso de la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas para la síntesis y la unión no covalente *in situ* de carbohidratos a través de cadenas lipídicas a placas de microtitulación (esquema 22). La parte que contiene la función alquino se construyó a partir de una cadena alifática y se conjugó con un conjunto de 2-azidoetil β -D-glicósidos a escala milimolar usando un protocolo experimental que evita los procesos de purificación. En un esfuerzo para extender esta aproximación para la unión covalente de los carbohidratos a la superficie de las placas de microtitulación, Bryan y colaboradores⁹², del mismo grupo de Fazio, comunicaron una estrategia basada en el uso de reactivos bifuncionales (**108** y **109**) para llevar a cabo inicialmente la unión ortogonal con la superficie de la placa funcionalizada con un alquino terminal y la posterior conjugación con el carbohidrato correspondiente (esquema 22). Se seleccionaron superficies funcionalizadas con grupos NHS- y con amina que reaccionaron con los espaciadores complementarios amina **108** e isotiocianato **109**, respectivamente. Debe ser resaltado que estos espaciadores fueron diseñados conteniendo un sitio de rotura a través de un puente disulfuro, lo que permite el posterior análisis cuantitativo y caracterización de los carbohidratos unidos. La reacción mediante “click chemistry” de las placas funcionalizadas con alquinos y los correspondientes azido azúcares permitió una preparación eficiente de los

⁹¹ Fazio F, Bryan MC, Blixt O, Paulson JC, Wong CH, *J Am Chem Soc*, **2002**, *124*, 14397.

⁹² Bryan MC, Fazio F, Lee HK, Huang CY, Chang A, Best MD, Calarese DA, Blixt O, Paulson JC, Burton D, Wilson IA, Wong CH, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 8640.

correspondientes “glicoarrays”. La metodología puede ser extrapolada a otras superficies. En ambos artículos, se demuestra con estudios de afinidad que estos microarrays funcionan en “screening” biológicos y que son aplicables a placas tipo ELISA. La aproximación no covalente ha sido también usada por Huang y colaboradores⁹³ quienes demostraron la utilidad de “quantum dots” unidos a Con A como marcadores fluorescentes para la detección de interacciones proteína carbohidrato.

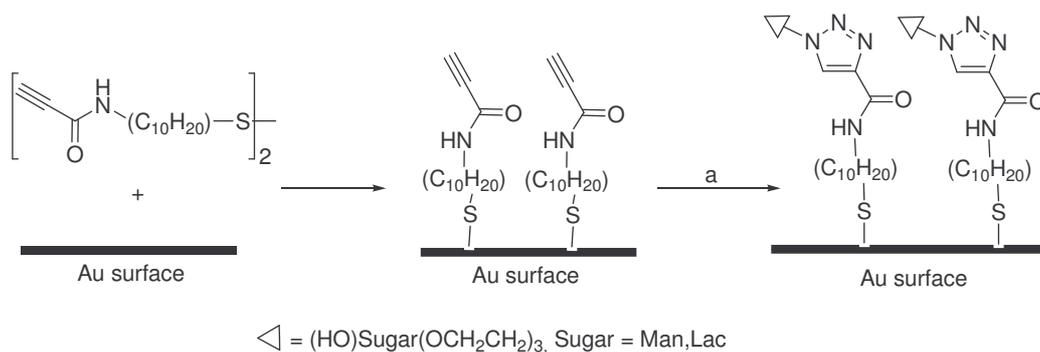


Esquema 22 a $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{HNC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CH}$; b CuI, DIPEA; c **108**, DIEA; d **109**, DIEA; e DTT

⁹³ Huang GL, Liu TC, Liu MX, Mei XY, *Anal Biochem*, **2005**, 340, 52.

Zhang y colaboradores⁹⁴ han empleado “click chemistry” para la obtención de monocapas autoensambladas (SAMs) de carbohidratos sobre oro (esquema 23). Las monocapas de carbohidratos son muy interesantes debido al gran control que se tiene sobre el patrón de ordenación, la densidad y la disposición permitiendo además el uso de métodos de análisis sin marcajes como son la resonancia de superficie de plasmón (SPR) y microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). La fabricación se basa en el uso de SAM previamente formadas conteniendo funciones alquino como grupos terminales que pueden reaccionar con azido azúcares para formar monocapas estables, rígidas y bien empaquetadas. Se incorporó una larga cadena alquílica (C₁₀) de NDDA con un grupo alquino terminal a las monocapas previamente formadas usando un enlace amida para la unión de la cadena alquílica con el grupo alquino. Para eliminar las adsorciones inespecíficas se incorporó trietilenglicol en los azido azúcares. El acoplamiento de alquino y azida ocurre con alta eficiencia y se demuestra que las monocapas de carbohidratos obtenidas mantienen la especificidad por las correspondientes lectinas. Esta estrategia indirecta ofrece ventajas sobre la estrategia directa de acoplamiento de tioles, reduce significativamente la labor sintética de preparar los tiolatos correspondientes y permite la construcción rápida y flexible de “arrays” de carbohidratos. Además, la fructífera combinación de estas monocapas con las técnicas de detección QCM y SPR establecen la base para el desarrollo de una potente plataforma para la caracterización de interacciones carbohidrato-proteína con alto rendimiento.

⁹⁴ Zhang Y, Luo S, Tang Y, Yu L, Hou KY, Cheng JP, Zeng X, Wang PG, *Analy Chem*, **2006**, 78, 2001.

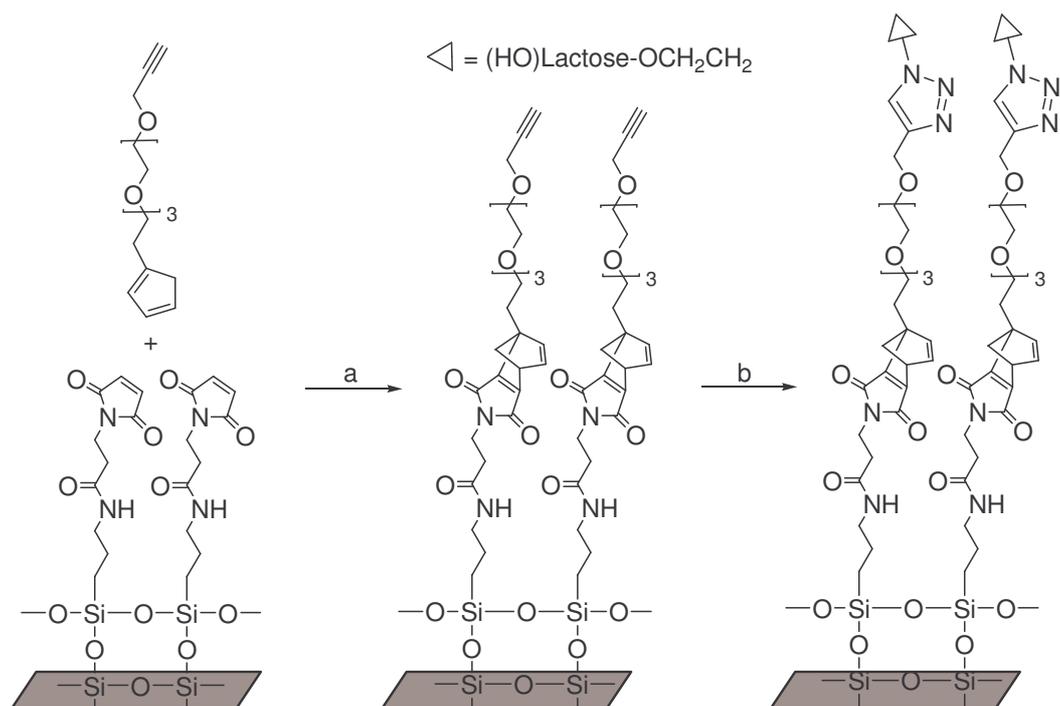


Esquema 23 a Azido-azúcar, CuSO_4 , Na-Ascorbato.

Los “glicoarrays” construidos sobre superficies de vidrio han sido publicados por Sun y colaboradores⁹⁵, quienes diseñaron un espaciador bifuncional de polietilenglicol y usaron secuencialmente cicloadiciones de Diels-Alder y de alquino-azida para la inmovilización de carbohidratos y proteínas (esquema 24) en una estrategia con semejanzas a la desarrollada por Bryan y colaboradores⁹⁶, y comentada anteriormente. Se sintetizó un espaciador basado en α,ω -polietilenglicol funcionalizado con grupos alquino y ciclodieno terminales que permitió la bioconjugación a la superficie. La inmovilización sobre una superficie de vidrio funcionalizada con *N*-(ϵ -maleimidocaproil) mediante una reacción de Diels-Alder proporciona una superficie funcionalizada con polietilenglicol con grupos terminales alquino para la posterior conjugación de biomoléculas que contengan grupos azido, incluidos carbohidratos. El acoplamiento mediante “click chemistry” transcurre eficientemente a baja temperatura en medio acuoso.

⁹⁵ Sun XL, Stabler CL, Cazalis CS, Chaikof EL, *Bioconjugate Chem*, **2006**, 17, 52.

⁹⁶ Referencia 92.



Esquema 24 **a** H₂O, *tert*-BuOH, t.a.; **b** Azidoetil lactósido, CuSO₄·5H₂O, TECP, tris(triazol)amina, PBS-*tert*-BuOH, 4 °C

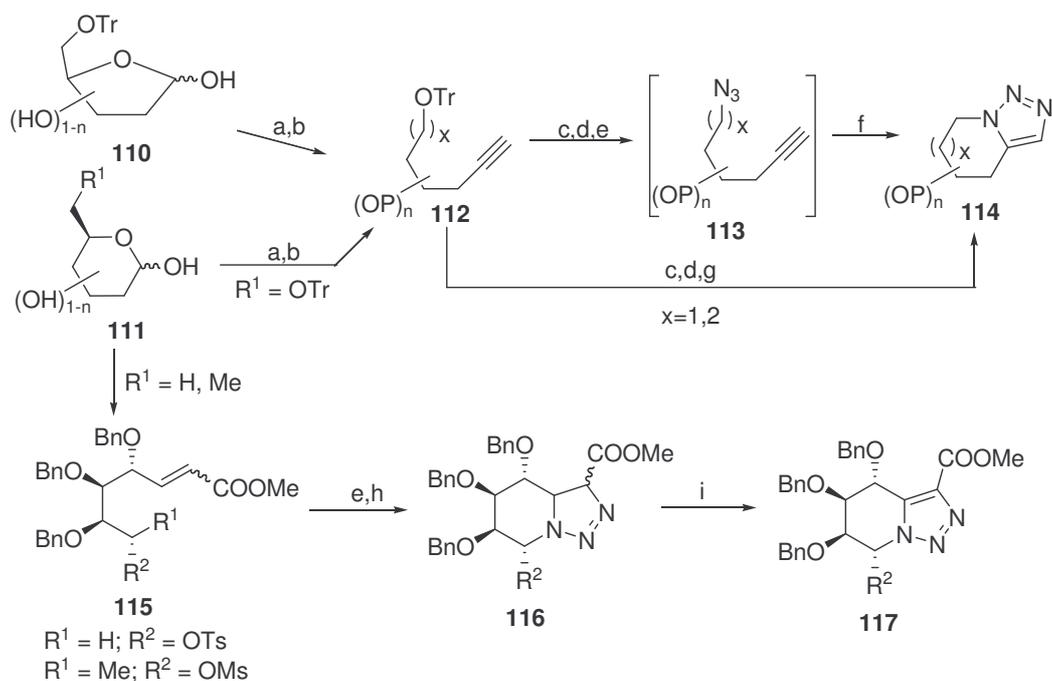
4 Cicloadiciones 1,3-polares de alquinos y azidas intramoleculares.

La presencia simultánea de grupos alquino y azida en una misma molécula es la condición necesaria para que la cicloadición 1,3-dipolar en su versión intramolecular pueda darse. En el caso de los carbohidratos la introducción secuencial de estas funcionalizaciones es factible pero suelen ser necesarias estrategias sintéticas largas y laboriosas, normalmente basadas en el uso racional de protecciones y desprotecciones de los grupos hidroxilo. Por esta razón la reacción de cicloadición intramolecular de alquinos y azidas se ha visto más limitada que la versión intermolecular.

La cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas, tanto catalizada como no catalizada, ha sido utilizada como una estrategia útil para acceder a azoles fusionados a furanosas y piranosas. Estos compuestos resultantes son interesantes ya que algunos de ellos han mostrado ser inhibidores selectivos y potentes de glicosidasa y glicosiltransferasa. Aunque la síntesis de estos azacarbhidratos se puede afrontar usando estrategias alternativas, la reacción de cicloadición normalmente es competitiva en cuanto a eficiencia. Así, Dolhem y colaboradores⁹⁷ han publicado una síntesis efectiva de compuestos bicíclicos con 1,2,3-triazoles fusionados **114** de aldohexosas (Glc, Man, Gal y 2-desoxi-Glc **111**) y aldopentosas **110** vía glicoinitales **112**. La función alquino fue introducida primero a partir de aldosas tritiladas explotando la reactividad de la posición anomérica a través de una elongación de cadena de un carbono sin creación de un nuevo estereocentro. La posterior activación y sustitución por azido del grupo hidroxilo primario permite el acceso a los correspondientes biciclotriazoles **114** como resultado de la introducción del grupo azido y la ciclación térmica que se lleva a cabo en una sola etapa sin aislar el intermedio **113**. Los compuestos quirales obtenidos con alto rendimiento por esta estrategia poseen una estereoquímica controlada y predefinida. Por otra parte, Flessner y colaboradores⁹⁸ han publicado una estrategia similar en la que unidades de D-Man y L-Fuc, convenientemente protegidas, son elongadas en dos carbonos en la posición anomérica a través de una reacción Honer-Wittig-Emmons para obtener ésteres α,β -insaturados **115**. La manipulación del hidroxilo terminal permite su conversión en un grupo saliente tosilo o mesilo, que en un solo paso y a través de una reacción de tres etapas (sustitución nucleofílica, cicloadición térmica, aromatización por oxidación con aire) permite obtener el correspondiente compuesto que contiene un 1,2,3-triazol **117** aunque los rendimientos son pobres (esquema 25).

⁹⁷ Dolhem F, Al Tahli F, Lievre C, Demailly G, *Eur J Org Chem*, **2005**, 5019.

⁹⁸ Flessner T, Wong CH, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 7805.



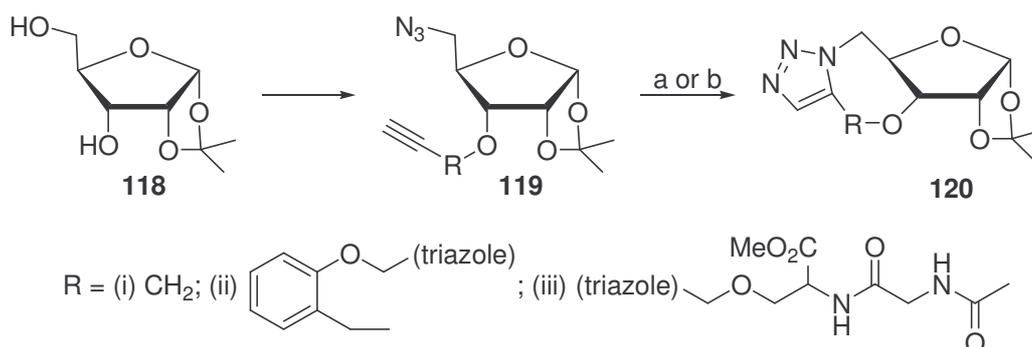
Esquema 25 a $\text{Ph}_3\text{PCHBr}_2$, Zn, 1,4-dioxano, reflujo; **b** nBuLi , THF, $-70\text{ }^\circ\text{C}$; **c** 1) BnBr , TBAI, NaH, DMF; 2) HCl conc., $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; **d** TsCl , Py; **e** NaN_3 , DMF, $80\text{ }^\circ\text{C}$; **f** Tolueno, reflujo; **g** NaN_3 , DMF, $120\text{ }^\circ\text{C}$; **h** DBU, $80\text{ }^\circ\text{C}$; **i** oxidación con aire. P = Grupo protector.

Por otro lado, Hotha y colaboradores⁹⁹ y Ray y colaboradores¹⁰⁰ han publicado una estrategia para la síntesis de compuestos tetracíclicos fusionados con 1,2,3-triazoles (esquema 26). La metodología desarrollada hace uso de 1,2-isopropiliden furanosa **118** como un esqueleto para la funcionalización con azido en la posición primaria del azúcar y con alquino en la posición C-3. Mientras Hotha y colaboradores usaron el derivado O-propargílico, Ray y colaboradores utilizaron espaciadores más elaborados que contenían ésteres, péptidos o compuestos aromáticos entre el alquino terminal y el anillo de azúcar. En el primer caso, la cicloadición 1,3-dipolar fue llevada a cabo en condiciones térmicas obteniéndose

⁹⁹ Hotha S, Anegundi RI, Natu AA, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 46, 4585.

¹⁰⁰ Ray A, Manoj K, Bhadbhade MM, Mukhopadhyay R, Bhattacharjya A, *Tetrahedron Lett*, **2006**, 47, 2775.

1,2,3-triazoles fusionados a anillos de siete miembros derivados de furanosa **120** (R=i) con excelentes rendimientos, lo que permitió a los autores extender la metodología a otros sustratos funcionalizados con alquino como glucosa, alosa, xilosa, ribosa y arabinosa. En cambio, los resultados publicados por Ray y colaboradores muestran que, aunque la estrategia permite acceder a triazolofanos monoméricos de 12 a 17 miembros **120** (R=ii, iii) con cicloadiciones catalizadas por Cu (I), estos compuestos se obtienen con bajos rendimientos en contraste con lo que es habitual en “click chemistry”. En ambos casos, la monociclación es la única reacción de cicloadición observada.

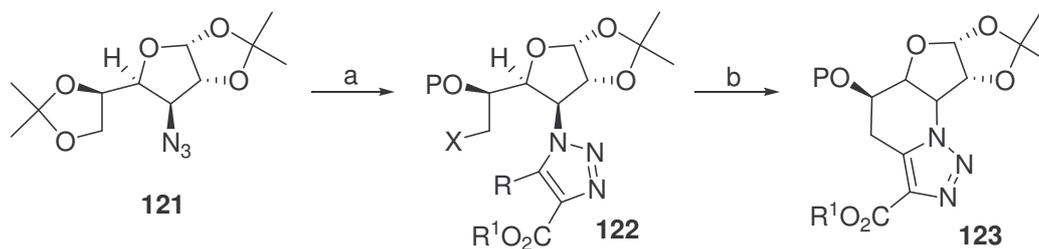


Esquema 26 a Tolueno, 100 ° para R = i; **b** CuSO₄, Na-Ascorbato o CuI, DIPEA para R = ii y iii.

En este contexto se debe mencionar también la contribución de Marco-Contelles y colaboradores¹⁰¹, quienes han descrito la síntesis de azol-piperidinas fusionadas, anuladas sobre furanosas (esquema 27). La estrategia consiste en la introducción de un N-triazol en C-3 **122** de una hexofuranosa de partida funcionalizada con azido **121** por una cicloadición intermolecular térmica con acetilenos mono o disustituidos. La posterior halogenación del hidroxilo primario proporciona los precursores radicalarios que reacciona en una ciclación de radical libre con hidruro de tributilino tris(trimetilsilil)silano. La ciclación 5-*exo-trig* o 6-

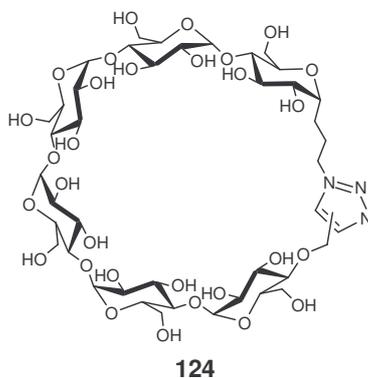
¹⁰¹ Marco-Contelles J, Rodriguez-Fernandez M, *J Org Chem*, **2000**, 66, 3717.

exo-trig para obtener el correspondiente azaazúcar anulado **123** se produce con diferentes rendimientos dependiendo de la tensión asociada al anillo resultante y a la presencia de grupos activantes en el anillo heterocíclico.



Esquema 27 a (i) Tolueno, 110 °C; (ii) **b** $(TMS)_3SiH, Bu_3SnCl, AIBN$ o $(TMS)_3SiH, AIBN$.

Finalmente, debe mencionarse también la síntesis de análogos de ciclodextrinas **124** realizada por Hoffman y colaboradores¹⁰² mediante una cicloadición intramolecular térmica de un derivado azido-alquino del maltohexaósido protegido, en la que se introdujo un grupo azidoetil en la posición anomérica y un grupo propargilo en la posición C-4 de la unidad no reductora del oligosacárido. Debido al uso de condiciones térmicas, se obtuvieron mezclas de los dos posibles regioisómeros.



Estructura 124 Análogo de ciclodextrina

¹⁰² Hoffmann B, Bernet B, Vasella A, *Helv Chim Acta*, **2002**, 85, 265.

Capítulo I.
Síntesis de hetero-neoglicoconjugados
multivalentes mediante “click
chemistry”.

Introducción.

La investigación de las interacciones proteína-carbohidrato constituye uno de los principales objetivos de la glicobiología debido al papel esencial que éstas juegan en la comunicación celular¹⁰³. Un gran número de importantes fenómenos biológicos, como la respuesta inmune o la fecundación, son controlados por interacciones proteína-carbohidrato así como los primeros estadios de diversos procesos de infección por muchas bacterias, virus, micoplasma y parásitos donde hay un proceso de reconocimiento del huésped mediado por carbohidratos. También juegan un papel crucial en algunos casos de metástasis¹⁰⁴.

Los glicoconjugados multivalentes sintéticos de estructura perfectamente conocida se han utilizado como herramientas para el mejor entendimiento de estas interacciones carbohidrato-proteína para intentar soslayar la dificultad de aislamiento que presentan los glicoconjugados naturales. El estudio de las investigaciones con estos sistemas sintéticos puede permitir obtener un mejor conocimiento de los detalles moleculares del proceso. La mayor parte de estos sistemas multivalentes, se han sintetizado con el objetivo de obtener la máxima especificidad y afinidad y para ello normalmente se diseñan como ordenaciones multivalentes mimetizando lo que ocurre en la naturaleza, en la que estructuras complejas de carbohidratos donde las

¹⁰³ (a) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.

(b) Lis, H.; Sharon, N. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 637-674.

(c) Dwek, R. A. *Chem.Rev.* **1996**, *96*, 683-720.

(d) Karlsson, K. A. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **1995**, *5*, 622-635.

(e) *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1999.

¹⁰⁴ (a) Gabius, H.-H.; Siebert, H.-C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-764.

(b) Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-429.

(c) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.

(d) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.

interacciones débiles de una unidad de azúcar con un receptor proteico se remedia con el establecimiento de interacciones multivalentes¹⁰⁵.

La principal arquitectura de los neoglicoconjugados se basa normalmente en un andamio oligovalente al que se unen múltiples unidades de azúcar de la misma naturaleza para dar lugar a un neoglicoconjugado homogéneo, bien definido químicamente como es el caso de los *glicopolímeros*, los *glicodendrimeros* o los *glicoclusters*. Sin embargo, la síntesis de neoglicoconjugados heterogéneos, es decir, que contengan diferentes unidades de azúcar es mucho más rara, a pesar de estar recogido en bibliografía que las variaciones en los niveles de expresión de los epitopos de azúcares en un medio heterogéneo pueden afectar a las afinidades con un determinado receptor debido a interacciones secundarias¹⁰⁶.

Antes del inicio de nuestras investigaciones sólo existían en bibliografía dos precedentes de hetero-neoglicoconjugados multivalentes. En el primero Patel y colaboradores¹⁰⁷ usaron la protección ortogonal de un andamio azucarado oligofuncionalizado para unir diferentes unidades de azúcar usando puentes de amidas y puentes tiourea y obtener así oligosacáridos miméticos de tipo mixto (estructura **125**). Si se considera que la adhesión de bacterias, así como otros tipos de procesos biológicos de adhesión, son dependientes de más de un tipo de epitopo de azúcar, la síntesis de este tipo de glicoclusters mixtos presenta un gran potencial.

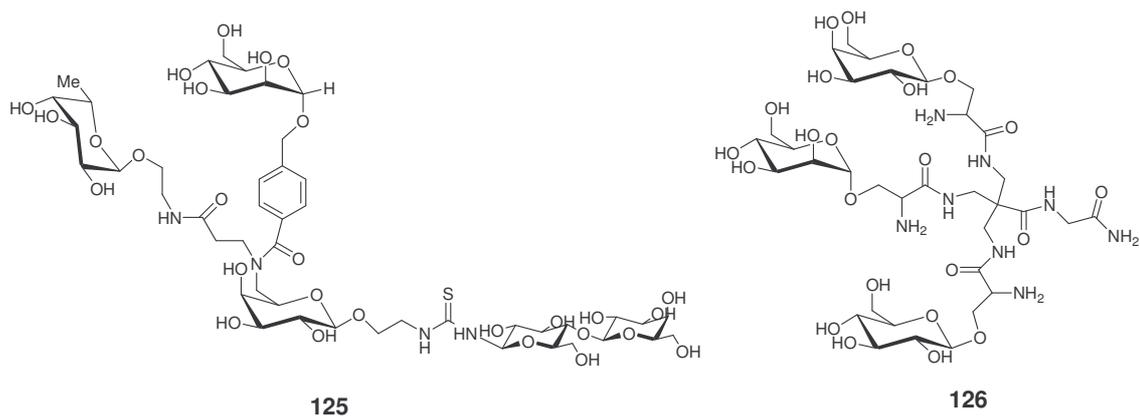
¹⁰⁵ (a) Lee, R. T.; Lee, Y. C. In *Neoglycoconjugates*; Edited by Lee, Y. C.; Lee, R. T., Eds.; Academic Press: San Diego, 1994; pp 23-50.

(b) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Account.Chem.Res.* **1995**, *28*, 321-327.

(c) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543-551.

¹⁰⁶ Horan, N.; Isobe, H.; Whitesides, G. M.; Kahne, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11782-11786.

¹⁰⁷ Patel, A.; Lindhorst, T. K. *Eur.J.Org.Chem.* **2002**, 79-86.



Estructuras 125 y 126.

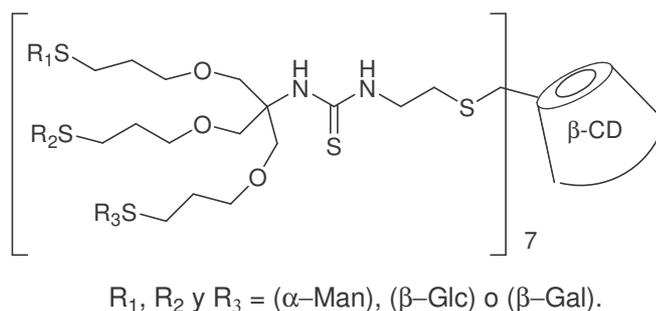
En el segundo caso Katajisto y colaboradores¹⁰⁸ desarrollaron la síntesis de péptido-glicoclusters trivalentes en fase sólida en el que cada unidad de azúcar pertenece a una serie diferente. Para ello, sintetizan un andamio peptídico en fase sólida protegido ortogonalmente con Fmoc, Boc, y Alloc, sobre el que se hacen reaccionar secuencialmente ésteres pentafluorofenil-*O*-(glicopiranosil)-*N*-Fmoc-*L*-Serina peracetilados de galactosa, glucosa, manosa o ribosa (véase estructura 126 como ejemplo).

Durante el transcurso de nuestras investigaciones Gómez-García y colaboradores¹⁰⁹ realizaron una nueva contribución en este tema al sintetizar diferentes triadas mixtas de carbohidratos que, convenientemente funcionalizadas con un grupo isotiocianato, permiten obtener diferentes glicoclusters heterogéneos por reacción con el derivado de β -ciclodextrina per(C-6)-heptacisteamino (esquema 28). Estos investigadores introducen aquí el concepto de **efecto heterocluster**, y que hace referencia al aumento de afinidad complementario debido a la presencia de unidades de azúcares diferentes de manosa en el glicocluster, que por si solos no son

¹⁰⁸ Katajisto, J.; Karskela, T.; Heinonen, P.; Lönnberg, H. *J.Org.Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.

¹⁰⁹ Gómez-García, M.; Benito, J.M.; Rodríguez-Lucena, D.; Yu, J.-X.; Chmurski, K.; Ortiz Mellet, C.; Gutiérrez Gallego, R.; Maestre, A.; Defaye, J.; García Fernández, J.M. *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.

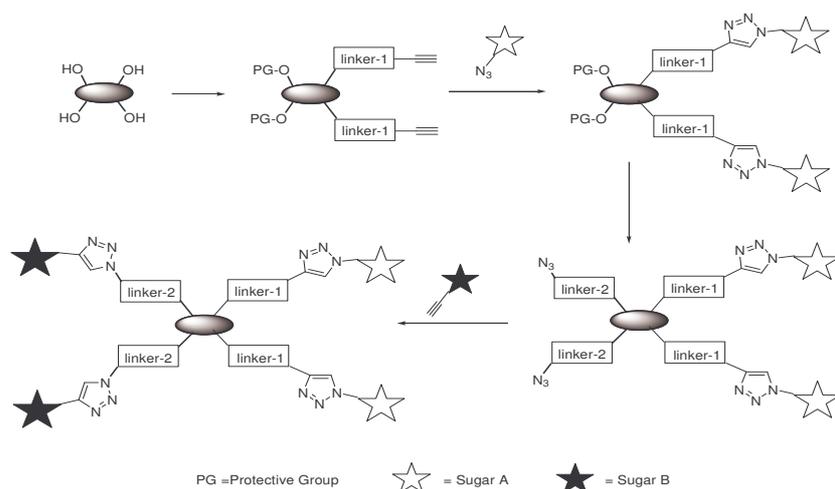
reconocibles por *Concanavalina A*, y que determinan una mayor afinidad por ConA que modelos análogos con igual estructura que carecen de estos azúcares. Se postula que este aumento de afinidad es debido al establecimiento de interacciones secundarias proteína-carbohidrato que no se puede explicar por la relación de concentración de azúcar secundario. El efecto heterocluster es observable únicamente en productos con altas densidades de epitopos como lo demuestra el hecho de que por ejemplo en las triadas mixtas usadas para sintetizar los glicoclusters finales no fuese observado.



Esquema 28.

Resultados y discusión.

Considerando el potencial de los neogliconjugados de tipo mixto o heteroneogliconjugados, nos propusimos llevar a cabo la síntesis de este tipo de compuestos. Para ello utilizamos una estrategia modular basada en el uso de la “click chemistry” por incorporación sucesiva de las funciones alquino y azido sobre un andamio adecuado.



Esquema 29. Esquema de las síntesis de heteroneoglicoconjugados.

Como se observa en el esquema 29, la estrategia propuesta supone que en el último estadio de la síntesis se llevaría a cabo la incorporación de unidades de uno de los azúcares elegidos usando su derivado propargilado que se unirá por reacción de cicloadición a un intermedio conteniendo grupos azido complementarios y unidades de un azúcar de distinta naturaleza. Estas primeras unidades de azúcares son incorporadas en una etapa previa usándose sus 2-azidoetilglicósidos y por reacción con un andamio polifuncional funcionalizado complementariamente, es decir, conteniendo grupos alquino terminales.

Como andamios adecuados para llevar a cabo esta síntesis modular se eligieron diferentes compuestos polihidroxilados. Así se seleccionaron metil α -D-galactopiranosido¹¹⁰, metil α -D-glucopiranosido¹¹¹, α,α' -trehalosa¹¹² y

¹¹⁰ Ejemplo del uso de D-galactopiranosidos como andamios:

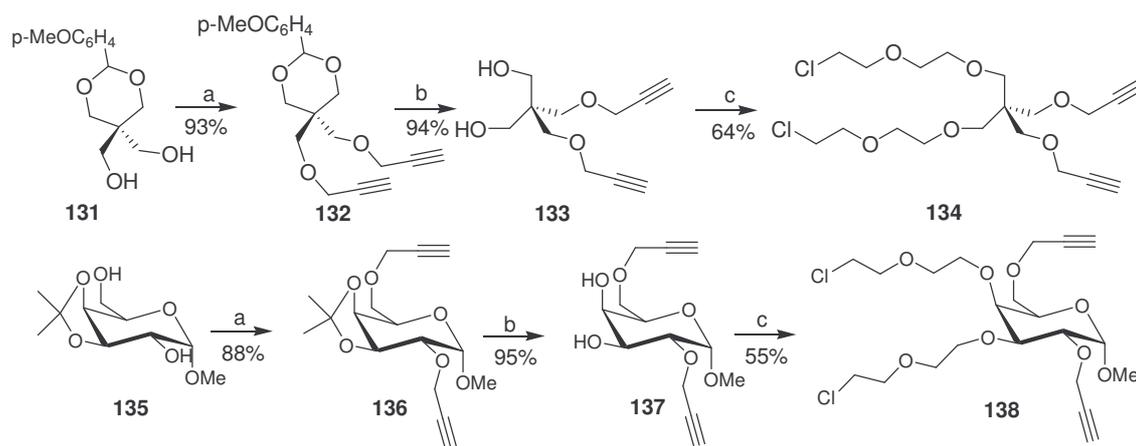
Gao, Y.; Eguchi, A.; Kakehi, K.; Lee, Y. C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6151-6157.

¹¹¹ Ejemplo del uso de D-glucopiranosidos como andamios:

Köhn, M.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Lindhorst, T. K.; García Fernández, J. M. *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 771-777.

¹¹² Ejemplo del uso de trehalosa como andamio: (a) Dubber, M.; Lindhorst, Th. K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5275-5281. (b) Dubber, M.; Lindhorst, T. K. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4019-4022.

La *O*-propargilación de *p*-metoxibenciliden pentaeritritol **131**¹¹⁶ dió el dialquino derivado **132** con un 93% de rendimiento. La posterior desprotección y *O*-alquilación¹¹⁷ usando exceso del agente alquilante bis-(2-cloroetil) éter condujo al derivado **134** listo para realizar la cicloadición con el correspondiente derivado azido azúcar. Siguiendo la misma estrategia se obtiene el derivado **138** con un 46% de rendimiento global en las tres etapas, a partir de metil 3,4-*O*-isopropiliden- α -D-galactopiranosido **135**¹¹⁸ (esquema 30).



Esquema 30 a NaH-DMF, BrCH₂C≡CH; b AcOH-H₂O, 7:3v/v; c (ClCH₂CH₂)₂O, NaOH, Bu₄NSO₃H.

De igual modo los andamios **142** y **146** se obtienen a partir del metil 4,6-*O*-benciliden- α -D-glucopiranosido **139**^{119a} y del derivado 4,6:4',6'-di-*O*-benciliden- α,α' -trehalosa **143**^{119b}, con unos rendimientos globales para las tres etapas del 50% y el 33%, respectivamente (esquema 31).

¹¹⁶ C. H. Issidorides and R. Gulen, *Organic Synthesis*, **1958**, 38, 65-67.

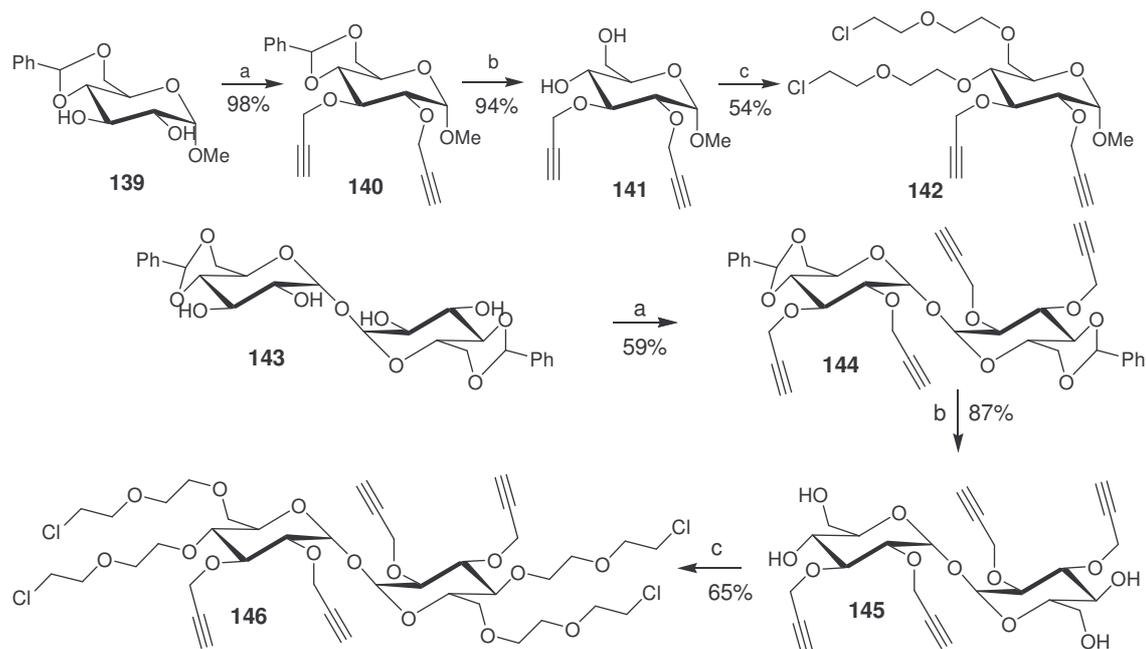
¹¹⁷ (a) P. Bako, T. Bako, K. Bisztray, A. Szollosy, K. Nagy and L. Toke, *J. Inclusion. Phenom.*, **2001**, 39, 247-251.

(b) P. Bako and L. Toke, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn.*, **1995**, 23, 195-201.

¹¹⁸ G. Catelani, F. Colonna and A. Marra, *Carbohydr. Res.*, **1988**, 182, 297-300.

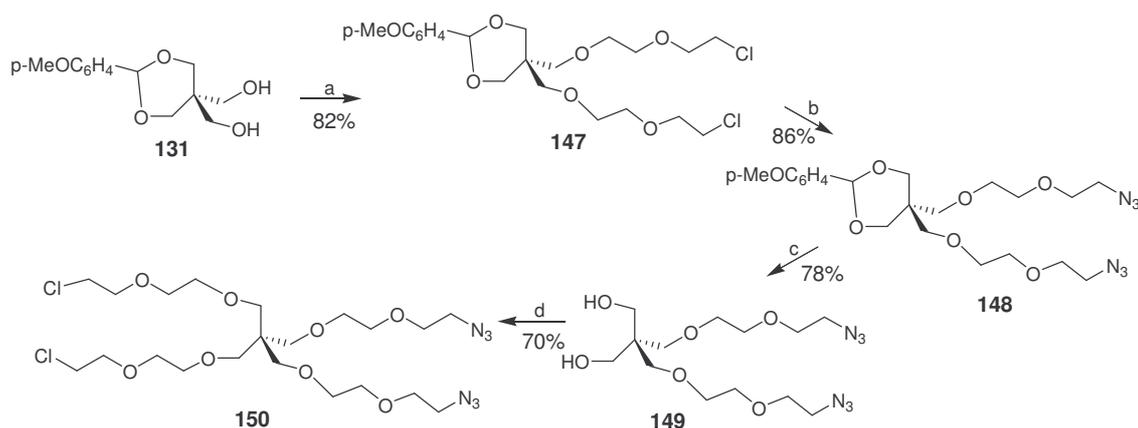
¹¹⁹ a) Jones, J. K. N.; *Can. J. Chem.*, **1956**, 34, 840-842.

b) Richardson, A. C.; Hought, L.; Munroe, P.A.; *J. Chem. Soc (C)*, **1971**, 1090-1094.



Esquema 31 a NaH-DMF, $\text{BrCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$; b AcOH- H_2O , 7:3v/v; c $(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$, NaOH, $\text{Bu}_4\text{NSO}_3\text{H}$.

Mediante una estrategia diferente se llevó a cabo la síntesis del derivado del pentaeritritol **150** (esquema 32), un andamio que permitirá la obtención de neoglicoconjugados heterogéneos con distancias idénticas para los distintos epítomos azucarados con respecto al núcleo central. El derivado del pentaeritritol **131** se alquiló con bis-(2-cloroetil) éter transformándose en el dicloroderivado **147** con un 82% de rendimiento. El desplazamiento nucleofílico de este dicloroderivado con azida sódica, seguido de la hidrólisis del bencilidenacetal condujo a la obtención de **149** con buenos rendimientos. Finalmente, de nuevo una alquilación con bis-(2-cloroetil) éter permitió obtener el pentaeritritol funcionalizado adecuadamente **150**.

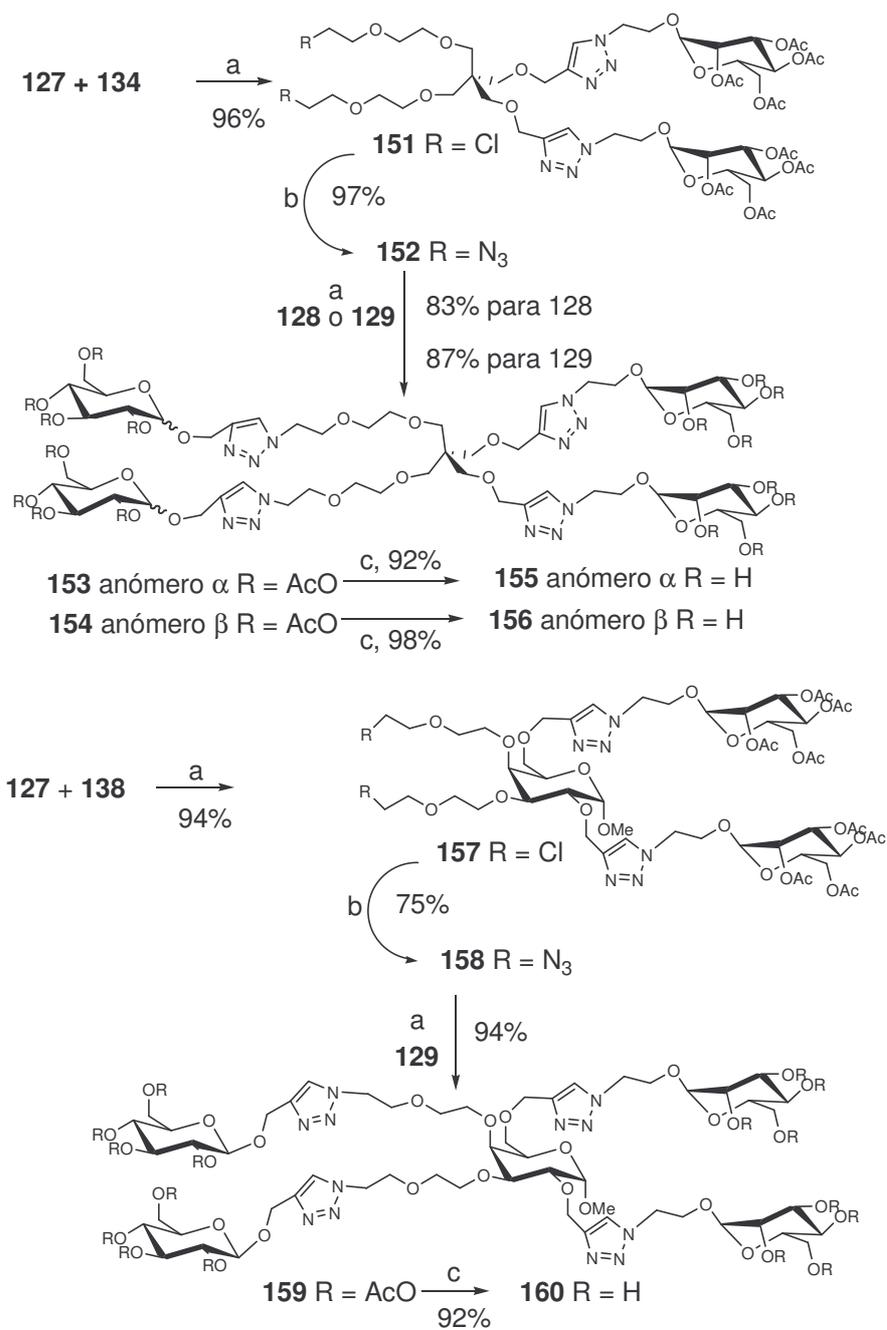


Esquema 32 a (ClCH₂CH₂)₂O, NaOH, Bu₄NSO₃H; **b** NaN₃, DMF, 80°C;
c AcOH-H₂O, 7:3v/v; **d** (ClCH₂CH₂)₂O, NaOH, Bu₄NSO₃H.

Una vez preparados los distintos andamios funcionalizados **134**, **138**, **142**, **146** y **150** se procedió a la síntesis de los diferentes “hetero-glicoclusters” mediante cicloadiciones 1,3 dipolares de alquinos y azidas catalizada por CuI(EtO)₃P (0.1equiv. por alquino) en tolueno a reflujo.

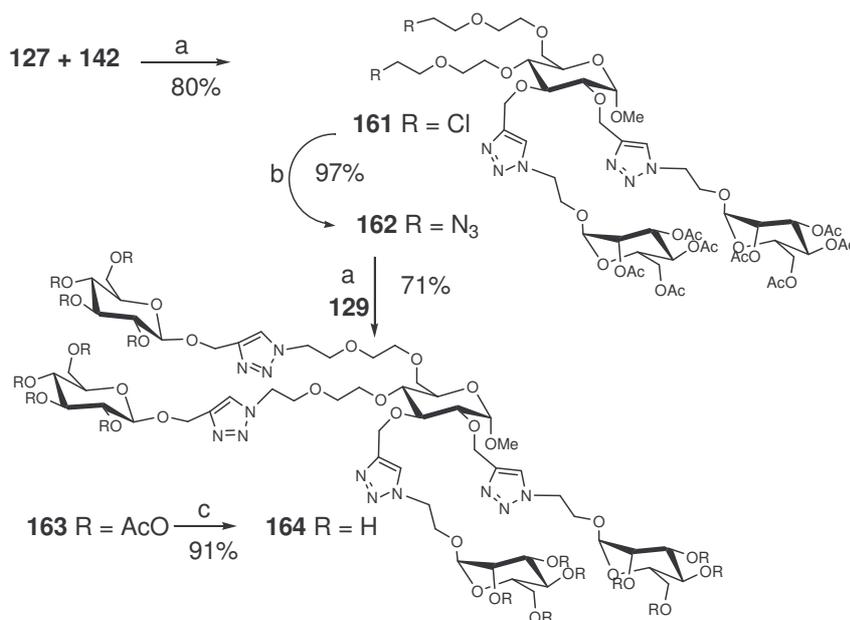
La primera estrategia (esquema 33) se inicia con la reacción del andamio **134** con 2-azidoetil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido **127**, que permite obtener el sistema divalente **151** con un 96% de rendimiento. La sustitución nucleofílica de cloro por azida seguida de la reacción con 2-propionil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α - o β -D-glucopiranosido **128** o **129** conduce a los hetero-neoglicoconjugados **153** y **154** con excelentes rendimientos. La des-*O*-acetilación de **153** y **154** en condiciones de Zemplén da lugar a los derivados hidroxilados **155** y **156**.

Con la reacción del andamio **138** y el azidoetilglicósido de la manosa **127** se obtiene el derivado **157** que, previa sustitución nucleofílica de cloro por azida, permite obtener por reacción con el derivado β -propargilado de glucosa **129** el hetero-neoglicoconjugado **159**. La des-*O*-acetilación de éste lleva al producto **160** con 61% de rendimiento global de las 4 etapas (esquema 33).



Esquema 33 a (EtO)₃P·CuI, tolueno, reflujo; b N₃Na, Bu₄NI, DMF, 75 °C ; c MeONa/MeOH.

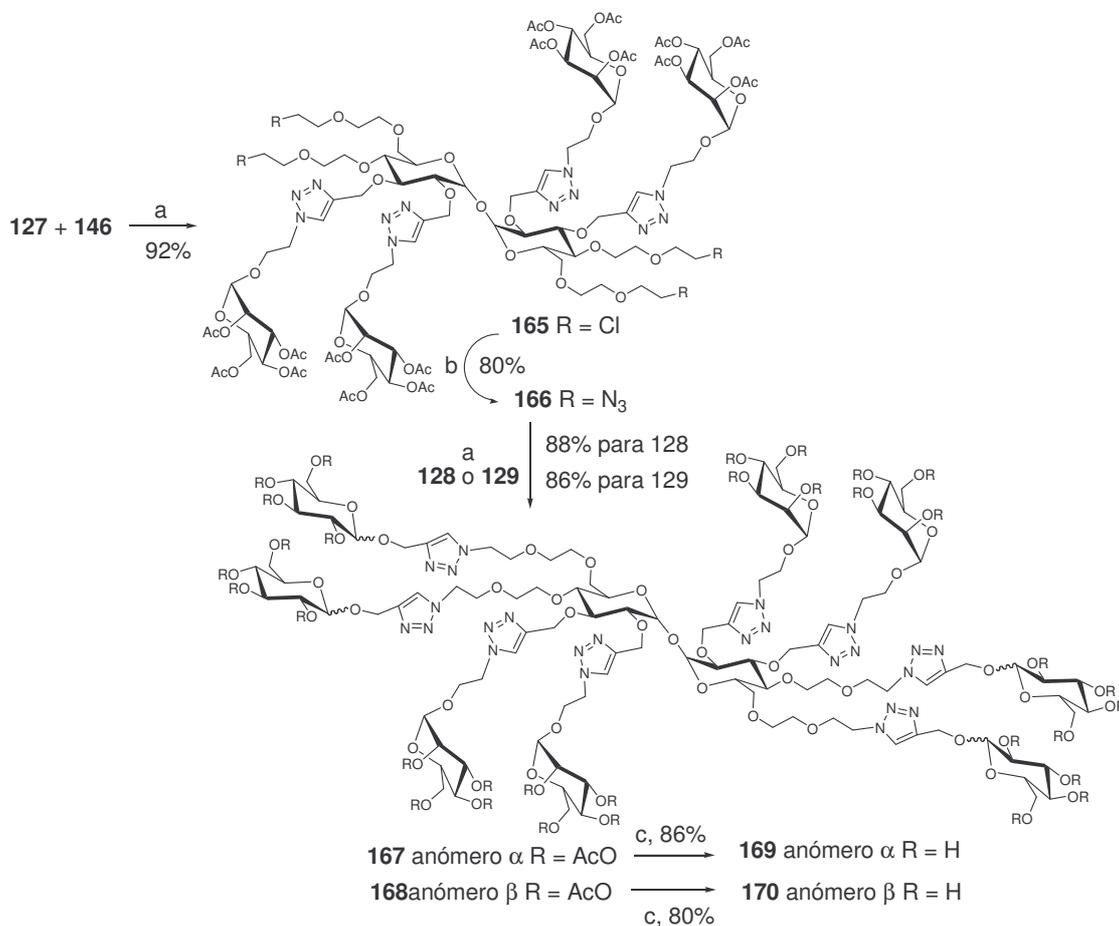
De igual modo, se hizo reaccionar el andamio **142** derivado de α -metilglucósido con el compuesto **127** obteniéndose el sistema divalente **151**. A continuación la sustitución nucleofílica de cloro por azida, permitió la posterior reacción con 2-propionil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido **129** que conduce al hetero-neoglicoconjugado **163** con excelente rendimiento. Al igual que en los casos anteriores la des-*O*-acetilación de **163** da lugar al derivado hidroxilado **164** (esquema 34).



Esquema 34 a $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, tolueno, reflujo; b N_3Na , Bu_4NI , DMF, 75 °C ; c MeONa/MeOH .

Por último, de la reacción del andamio **146** derivado de α,α' -trehalosa y el derivado azidoetil de la manosa **127** se obtiene el derivado **165**. La sustitución nucleofílica de cloro por azida conduce al compuesto **166** que se hace reaccionar con 2-propionil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α y β -D-glucopiranosido **128** y **129** para obtener los hetero-neoglicoconjugados **167** y **168**. La des-*O*-acetilación de éstos permite

obtener los compuestos hidroxilados **169** y **170** con buenos rendimientos globales (esquema 35).

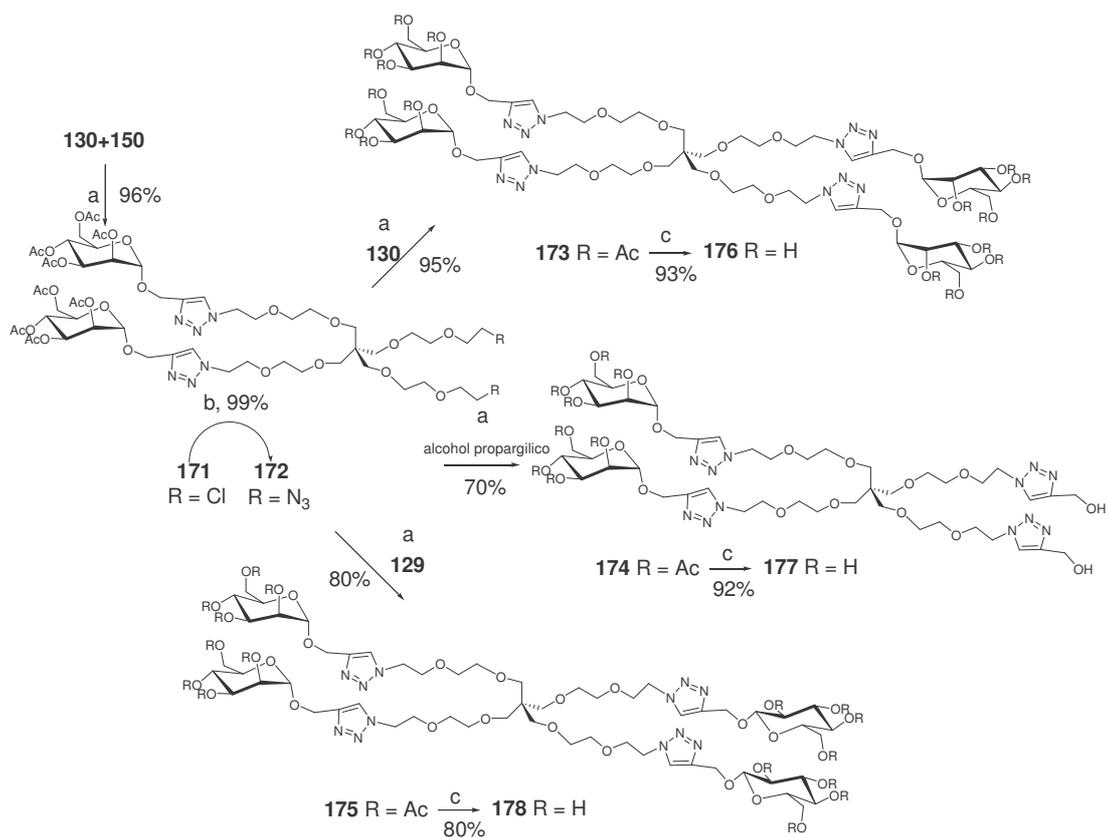


Esquema 35 a) $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, tolueno, reflujo; b) N_3Na , Bu_4NI , DMF, 75°C ; c) MeONa/MeOH .

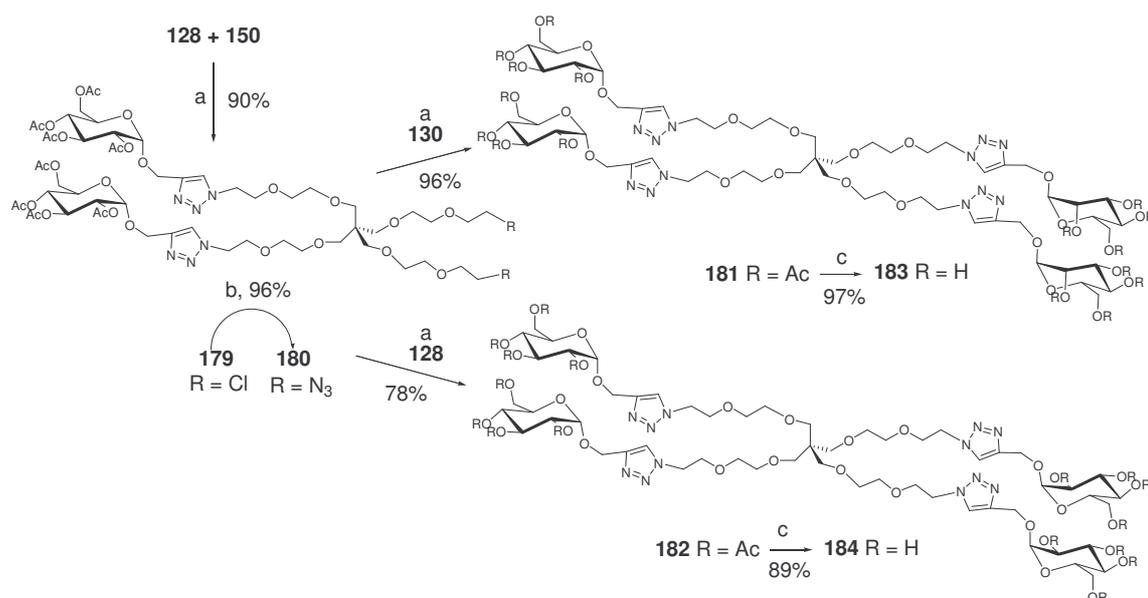
En la segunda estrategia, (esquema 36) en primer lugar se hizo reaccionar el derivado de pentaeritritol **150** con 2-propionil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido **130** conduciendo al sistema divalente **171** con un 96% de rendimiento. Tras llevar a cabo la sustitución nucleofílica de cloro por azida, el compuesto resultante **172** se hace reaccionar con **129**, derivado β -propargilado de la

glucosa conduciendo al hetero-glicocluster **175**. También se hace reaccionar el compuesto **172** tanto con el derivado azidoetil de manosa **130** como con alcohol propargílico para obtener los glicoconjugados **173** y **174**, sintetizados con objeto de hacer estudios comparativos en la pruebas de afinidad con ConA respecto de los “hetero-glicoclusters”. Los glicoconjugados **173**, **174** y **175** fueron des-*O*-acetilados para obtener los derivados hidroxilados **176**, **177** y **178** con buenos rendimientos globales.

Del mismo modo, el andamio **150** se hizo reaccionar con 2-propionil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido **128** (esquema 37) obteniéndose el compuesto **180** tras una sustitución nucleofílica de cloro por azida. El compuesto **180** se hace reaccionar con el azidoetilmanósido **130** generando el hetero-glicocluster **181** con un rendimiento global de 83% en las tres etapas. La reacción de **180** nuevamente con **128**, derivado α -propargilado de D-glucosa, proporciona el glicoconjugado homogéneo **182**, que al igual que **173** y **174**, se usarán una vez des-*O*-acetilados en estudios de afinidad comparándolos con los heteroneoglicoconjugados sintetizados. La des-*O*-acetilación de **181** y **182** condujo a los derivados hidroxilados **183** y **184**.



Esquema 36 a (EtO)₃P·CuI, tolueno, reflujo; **b** N₃Na, Bu₄NI, DMF, 75 °C ; **c** MeONa/MeOH.



Esquema 37 a) (EtO)₃P·CuI, tolueno, reflujo; b) N₃Na, Bu₄NI, DMF, 75 °C ; c) MeONa/MeOH.

Estudios de afinidad de los glicoclusters 155, 156, 160, 164, 169, 170, 176, 177, 178, 183 y 184 con Concanavalina A.

Se estudiaron las afinidades de los compuestos hidroxilados con la lectina *concanavalina A* marcada con peroxidasa de rábano picante (ConA-HRP) mediante la técnica de ELLA. Los ensayos consisten en la inhibición competitiva de la unión de esta ConA-HRP a manano de *Saccharomyces cerevisiae*, que es previamente adsorbido en placas diseñadas para ensayos competitivos en fase sólida. Los experimentos se realizan por triplicado y con ellos se construyen las correspondientes curvas de inhibición. Los resultados de tales experimentos se expresan como los valores necesarios para la inhibición del 50 % de la unión entre manano y ConA-HRP (IC₅₀). Se emplea metil α -D-manopiranosido (Me-Man) como referencia, a partir del cual se calcula la afinidad relativa de cada uno de estos neoglicoconjugados por ConA-HRP. Esta afinidad relativa se define como el cociente entre el valor de IC₅₀ de la referencia y el valor de IC₅₀ del neoglicoconjugado. Se calculan también las potencias relativas por unidad de manosa y por unidad de azúcar presentes en

cada uno de los neoglicoconjugados, que se obtienen del cociente de la afinidad relativa por el número de manosas o azúcares presentes en el glicoconjugado respectivamente.

Producto	IC ₅₀ /mM	Afinidad relativa	Potencia relativa por manosa	Potencia relativa por azúcar
MeMan	0.90	1	1	1
155	0.23	3.91	1.95	0.98
156	0.39	2.30	1.15	0.57
160	0.37	2.43	1.21	0.60
164	0.40	2.25	1.12	0.56
169	0.087	10.34	2.58	1.29
170	0.30	3	0.75	0.37
176	0.16	5.62	1.40	1.40
177	0.20	4.50	2.25	2.25
178	0.21	4.28	2.14	1.07
183	0.21	4.28	2.14	1.07
184	0.48	1.87		0.47

Tabla 5. Valores de IC₅₀, afinidad relativa y potencias relativas en las pruebas ELLA.

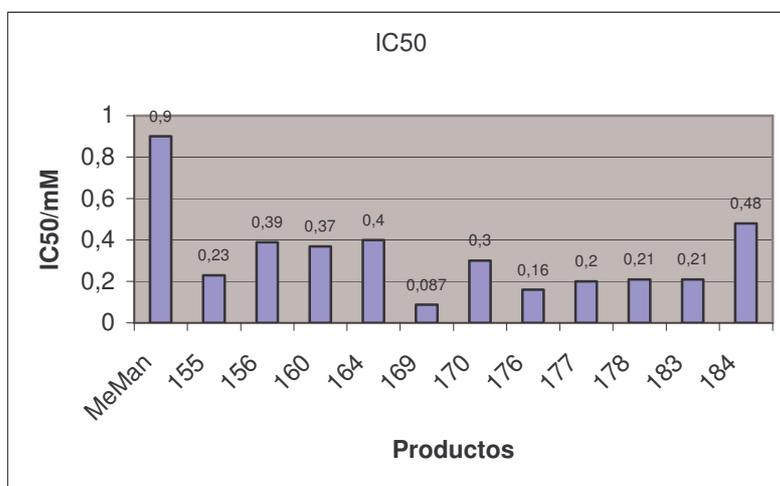


Gráfico 1. Valores de IC₅₀ en las pruebas ELLA.

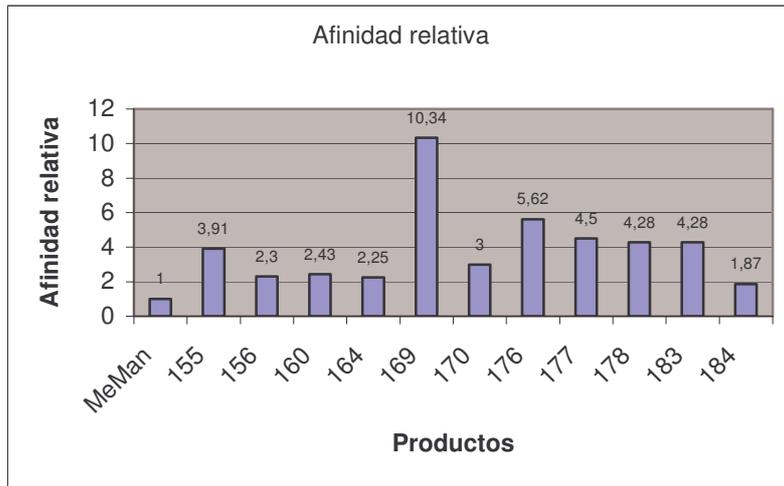


Gráfico 2. Valores de afinidad relativa respecto de Me-Man.

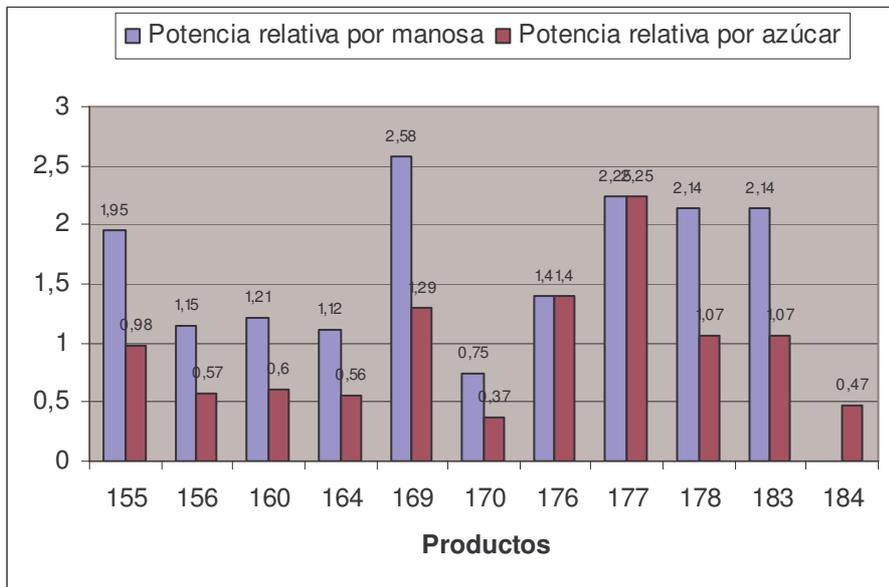


Gráfico 3. Potencia relativa por unidad de manosa y potencia relativa por unidad de azúcar.

A la luz de los resultados se pueden extraer algunas conclusiones:

- No existen diferencias significativas entre las afinidades de los compuestos **156**, **160** y **164** frente a ConA. Todos ellos contienen dos unidades de manosa y otras dos unidades de β -glucosa sobre diferentes andamios. Estos resultados experimentales indican que en estos tres casos las disposiciones espaciales de los epitopos azucarados no influyen significativamente en la afinidad frente a la lectina ConA.
- Existe una diferencia notable de las afinidades de los compuestos anteriores con su homólogo **178**, que contiene los mismos epitopos azucarados, pero fue sintetizado por la segunda estrategia en la que los espaciadores que separan los azúcares del andamio son más largos y ésto podría favorecer la afinidad. Esta diferencia se observa también en los compuestos **177** y **183** que, sobre el mismo andamio que **178**, incorporan dos manosas y dos alcoholes el compuesto **177**, y dos manosas y dos α -glucosas el compuesto **183**; donde no se observa variación alguna sobre la afinidad debido a los diferentes epitopos y que tienen junto con **178** afinidades superiores al resto de heteroneoglicoconjugados de dos unidades de manosa. Como se ha comentado esto podría deberse a la mayor longitud del espaciador aunque tampoco sería descartable que contribuya el anillo de 1,2,3-triazol que se encuentra más cerca del azúcar. Está probado que los grupos hidrofóbicos voluminosos en la posición anomérica de la manosa pueden establecer interacciones hidrofóbicas favorables así como puentes de hidrogeno¹²⁰. Este grupo de compuestos ha sido

¹²⁰a)Lindhorst T.K., Kötter S., Kubisch J., Krallmann-Wenzel U., Ehlers S., Kren V., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1669-1674.

b)Loris, R; Hamelryck, T; Bouckaert, J; Wyns, L; *Biochem. Biophys. Acta*, **1998**, 1383, 9-36

seleccionado para tratar de cristalizar sus complejos con ConA y resolver su estructura.

- Se puede observar también como el neoglicoconjugado **184**, que contiene cuatro α -glucosas, es reconocido por la ConA aunque con una afinidad tres veces menor que el compuesto **176** en el que los epitopos azucarados son de manosa.
- Al comparar las afinidades de los compuestos **155** y **169** con sus homólogos **156** y **170**, en los que la única diferencia son las α -glucosas reemplazadas por β -glucosas, se observa un aumento de la afinidad en los compuestos que contienen α -glucosas a pesar de compartir manosa y α -glucosa el sitio de unión. Es destacable dicho aumento de afinidad en el caso del compuesto **169** donde la presencia de α -glucosas incrementa 3.4 veces la afinidad, en lo que se podría definir como un **efecto cluster mixto**.

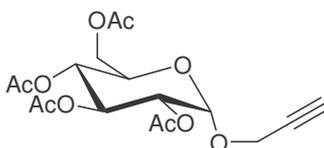
Conclusiones.

Se ha demostrado la aplicabilidad de la cicloadición 1,3 dipolar de alquinos y azidas en la síntesis eficiente de neoglicoconjugados heterogéneos uniendo diferentes unidades de azúcares en una estrategia modular sobre diferentes andamios polihidroxilados. Las buenas afinidades de estos compuestos los hacen interesantes para ser usados como antiadhesivos en procesos de adhesión en los que se vean involucradas varias lectinas. Por último se describe por primera vez, que tengamos constancia, un **efecto cluster mixto** en el que la presencia de más de un epitopo reconocible también provoca un efecto multivalente.

Parte experimental.

Síntesis de 2-propionil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido 128.

Una suspensión de D-glucopiranososa (1.825 g, 10.14 mmol) en 20 mL de alcohol propargílico se calienta a 95°C bajo atmósfera de argón y se le adiciona una cantidad catalítica de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (200 μL). Tras 12 horas se añaden unas gotas de piridina para neutralizar el ácido y se evapora el alcohol propargílico, el crudo se acetila con anhídrido acético y piridina para después de evaporar, purificar por cromatografía en columna (éter etílico-hexano 2:1). Las fracciones mezcla de α y β propargil glucosa se purifican por cristalización del derivado β en éter etílico-hexano. El rendimiento final es del 56%.



$[\alpha]_{\text{D}} +128^\circ$ (c 1, cloroformo).

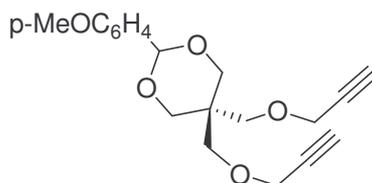
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.49 (t, 1 H, $J = 9.8$ Hz), 5.29 (d, 1 H, $J = 3.8$ Hz), 5.09 (t, 1 H, $J = 9.9$ Hz), 4.92 (dd, 1 H, $J = 10.3$ y 3.8 Hz), 4.29 (d, 2 H, $J = 2.4$ Hz), 4.27 (dd, 1 H, $J = 12.5$ y 4.4 Hz), 4.09 (m, 1H), 4.04 (m, 1 H), 2.48 (m, 1 H, $J = 2.4$ Hz), 2.10-2.02 (4s, 12 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.1, 170.0, 169.5, 94.5, 78.2, 75.3, 70.4, 69.9, 68.3, 67.8, 61.6, 55.3, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5.

Procedimiento general para la síntesis de los derivados di o tetra propargilados **132**, **136**, **140** y **144**.

A una solución de los correspondientes derivados di o tetrahidroxilados **131**, **135**, **139** y **143** (1 mmol) en DMF seca (5 mL) se le añade NaH (2 equiv.). Después de agitar la mezcla durante 0.5 h bajo atmósfera de argón se añade gota a gota bromuro de propargilo (3 equiv.) y se continúa agitando durante 16 h a temperatura ambiente. Se añade MeOH (5 mL) para destruir el exceso de NaH, se mantiene 15 min a temperatura ambiente y se concentra en el rotavapor. El crudo de reacción se diluye en éter etílico-tolueno 1:1 (100 mL) y se lava con agua (2x25 mL), la fase orgánica se seca, se evapora y se purifica por cromatografía en columna.

2-(4-Metoxifenil)-5,5-bis (propargiloximetil)-1,3-dioxano **132**.



Purificación (éter etílico-hexano 1:1).

Rendimiento: 93%, sirupo.

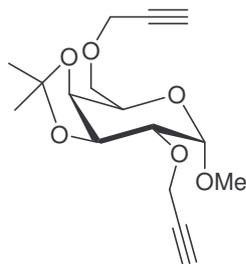
IR (KBr): 3291, 2116, 1615, 1517, 830 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.41 (d, 2 H, $J = 8.7$ Hz, Ar), 6.89 (d, 2 H, $J = 8.7$, Ar), 5.38 (s, 1 H, CHPhOMe), 4.20 (d, 2 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 4.11 (d, 2 H, $J = 2.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 4.09 (d, 2 H, $J = 2.4$ Hz, OCH_2 eq), 3.87 (d, 2 H, $J = 11.4$ Hz, OCH_2 ax), 3.86 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3.79 (s, 3 H, OMe), 3.36 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 2.43 (m, 2 H, 2 x $\text{C}\equiv\text{CH}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 160.2, 131.4, 127.4, 113.7 (Ar), 101.8 (CHO_2), 74.6, 74.3 (2 x $\text{C}\equiv\text{CH}$), 69.9, 69.9, 68.8 (2 x $\text{C}\equiv\text{CH}$, 4 x CH_2O), 58.8, (2 x $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 55.4 (OMe), 38.6 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$).

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$: 353.1365; enc.: 353.1360.

Metil 3,4-*O*-isopropiliden-2,6-di-*O*-propargil- α -D-galactopiranosido 136.



Purificación (éter etílico-hexano 1:1).

Rendimiento: 88%, sustancia siruposa.

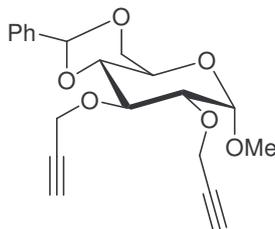
IR (KBr): 3265, 2117, 1242, 1221, 1101, 1073, 1042 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.87 (d, 1H, $J=3.5\text{Hz}$), 4.42 (m, 4H), 4.33-4.14 y 3.87-3.75 (2m, 6H), 3.44 (s, 3H), 2.47(t, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 2.45 (t, 1H, $J=2.3\text{Hz}$), 1.56 y 1.35 (2s, 6H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 109.4, 98.3, 79.8, 79.6, 75.9, 75.9, 73.9, 66.5, 74.9, 74.7, 69.4, 58.7, 57.9, 55.5, 28.2, 26.4

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$: 333.1314; enc.: 333.1317.

Metil 4,6-*O*-Benciliden-2,3-Di-*O*-Propargil- α -D-Glucopiranosido 140.



Purificación (AcOEt-Hexano 1:2).

Rendimiento: 98%, sustancia siruposa.

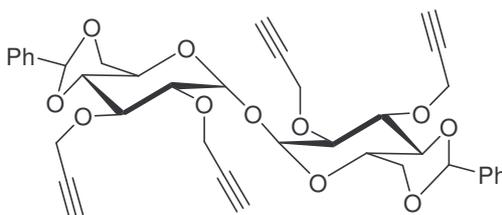
$[\alpha]_D^{+33}$ (c 1, cloroformo).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.47, 7.37 (2 m, 5 H), 5.54 (s, 1 H), 4.88 (d, 1 H, $J = 3.7$ Hz), 4.50-4.45 (m, 3 H), 4.39 (dd, 1 H, $J = 15.4$ y 2.3 Hz), 4.29 (dd, 1 H, $J = 9.6$ y 4.2 Hz), 3.99 (t, 1 H, $J = 9.2$ Hz), 3.83 (dt, 1 H, $J = 10.0$ y 4.4 Hz), 3.74 (t, 1 H, $J = 9.8$ Hz), 3.70 (dd, 1 H, $J = 3.7$ y 9.2 Hz), 3.60 (t, 1 H, $J = 9.2$ Hz), 3.44 (s, 3 H), 2.46 (t, 1 H, $J = 2.34$ Hz), 2.43 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 129.04, 128.28, 126.13, 101.42, 99.35, 82.07, 77.99, 69.09, 62.18, 60.08, 59.45, 55.34.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$: 381.1314; enc.: 381.1314.

4,6;4',6'-Di-*O*-benciliden-2,2',3,3'-tetra-*O*-propargil- α,α' -trehalosa 144.



Purificación (éter etílico-hexano 1:1).

Rendimiento 77%, sustancia siruposa.

$[\alpha]_D^{+60}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 3287, 2250, 2118, 1453, 1372, 1088, 989, 752 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.55-7.30 (m, 10 H), 5.56 (s, 2 H), 5.26 (d, 2 H, $J = 3.9$ Hz), 4.55 (dd, 2 H, $J = 15.3$ y 2.4 Hz), 4.46 (dd, 2 H, $J = 16.0$ y 2.4 Hz), 4.44 (dd, 2 H, $J = 14.9$ y 2.4 Hz), 4.39 (dd, 2 H, $J = 15.8$ y 2.4 Hz), 4.34 (dd, 2 H, $J = 9.7$ y 4.9 Hz), 4.24 (dt, 2 H, $J = 9.8$ y 4.9 Hz), 3.99 (t, 2 H, $J = 9.2$ Hz), 4.75-3.67 (m, 4 H), 3.63 (t, 2 H, $J = 9.5$ Hz), 2.48 (t, 2 H, $J = 2.4$ Hz), 2.46 (t, 2 H, $J = 2.4$ Hz)

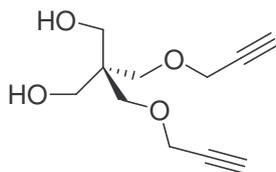
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 137.4, 129.0, 128.3, 126.1, 101.3, 94.9, 82.0, 80.2, 80.0, 78.2, 78.1, 74.8, 74.3, 69.0, 62.6, 60.2, 59.4.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{O}_{11}\text{Na}$: 693. 2312; enc.: 693. 2310.

Procedimiento general para la desprotección de los grupos benciliden e isopropiliden de 132, 136, 140 y 144, para la obtención de los derivados 133, 137, 141, 145 y 149.

Una solución del correspondiente derivado protegido con grupo benciliden o isopropiliden **132**, **136**, **140** o **144** (1 mmol) en $\text{AcOH-H}_2\text{O}$ (7:3, 10 mL) se calienta a 50°C durante dos horas, tras evaporar el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna.

Di-*O*-propargil-pentaeritritol 133.



Purificación (AcOEt -hexano 1:1)

Rendimiento: 94%, sustancia siruposa.

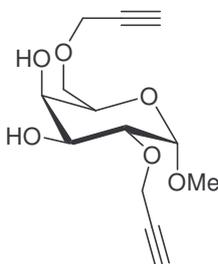
IR (film): 3458, 3289, 2115, 1092, 1043 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.15 (d, 4 H, $J = 2.4$ Hz, 2 x $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3.68 (s, 4 H, 2 x CH_2C), 3.58 (s, 4 H, 2 x CH_2C), 2.73 (br s, 2 H, 2 OH), 2.47 (t, 2 H, $J = 2.4$ Hz, 2 x $\text{C}\equiv\text{CH}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 79.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 74.8 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 70.9 ($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 64.1 (CH_2OH), 58.8 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 45.0 (CH_2)₄C).

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$: 235. 095; enc.: 235. 0944.

Metil 2,6-Di-O-Propargil- α -D-Galactopiranosido 137.



Purificación (AcOEt).

Rendimiento 95%, sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +101^\circ$ (c 1, MeOH)

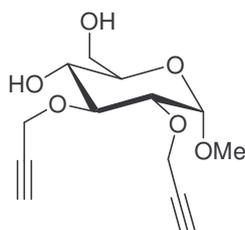
IR (film): 3450, 3261, 2216, 1143, 1093, 1044 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.02 (d, 1 H, $J = 3.3$ Hz, H-1), 4.41 (dd, 1 H, $J = 16.2$ y 2.4 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.34 (dd, 1 H, $J = 16.2$ y 2.3 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.23 (dd, 1 H, $J = 16.0$ y 2.4 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.17 (dd, 1 H, $J = 16.0$ y 2.4 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.10 (dd, 1 H, $J = 3.2$ y 1.0 Hz, H-4), 4.02-3.96 (m, 2 H, H-3,5), 3.92 (dd, 1 H, $J = 9.8$ y 3.3 Hz, H-2), 3.81 (dd, 1 H, $J = 10.0$ y 4.8 Hz, H-6), 3.81 (dd, 1 H, $J = 10.0$ y 6.0 Hz, H-6'), 3.46 (s, 3 H, OCH_3), 2.90-2.70 (br s, 2 H, 2 x OH), 2.52 (t, 1 H, $J = 2.4$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.50 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 97.8 (C-1), 79.9, 79.4(C \equiv CH), 76.2 (C-2), 75.4, 75.1 (2 x C \equiv CH), 69.9 (C-4), 69.6 (C-6), 69.3 (C-3), 68.3 (C-5), 58.9, 58.2 (2 x CH $_2$ C \equiv CH), 55.4 (OCH $_3$).

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para C $_{13}$ H $_{18}$ O $_6$ Na: 293.1001; enc.: 293.1000.

Metil 2,3-di-*O*-propargil- α -D-glucopiranosido 141.



Purificación (AcOEt).

Rendimiento 94%, sustancia siruposa.

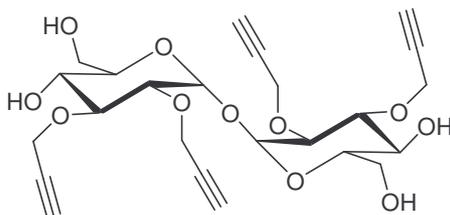
$[\alpha]_D^{+90}$ (c 1, MeOH)

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.92 (d, 1 H, J = 3.5 Hz), 4.52 (dd, 1 H, J = 15.8 y 2.4 Hz), 4.41 (dd, 1 H, J = 15.8 y 2.3 Hz), 4.34 (m, 2 H), 3.84-3.54 (varios m, 8 H), 3.44 (s, 3 H), 2.53 (t, 1 H, J = 2.3 Hz), 2.50 (t, 1 H, J = 2.3 Hz)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 98.04, 80.79, 80.55, 79.69, 79.26, 75.17, 74.95, 70.97, 69.88, 62.11, 60.37, 58.45, 55.25.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para C $_{13}$ H $_{18}$ O $_6$ Na: 293.1001; enc.: 293.1000.

2,2',3,3'-Tetra-*O*-propargil- α,α' -trehalosa 145.



Purificación (AcOEt).

Rendimiento 89%, sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +125^\circ$ (c 1, MeOH)

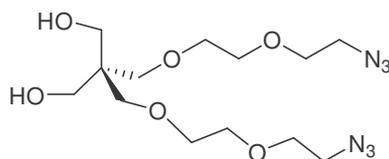
IR (film): 3451, 3284, 2930, 2116, 1093, 1057, 998 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.27 (d, 2 H, $J = 3.7$ Hz), 4.55 (dd, 2 H, $J = 15.8$ Hz y 2.4 Hz), 4.42 (dd, 2 H, $J = 15.9$ y 2.3 Hz), 4.29 (d, 2 H, $J = 2.3$ Hz), 4.03 (dt, 2 H, $J = 9.4$ y 3.7 Hz), 3.89 (dd, 2 H, $J = 11.9$ y 3.1 Hz), 3.82 (dd, 2 H, $J = 11.9$ y 4.4 Hz), 3.78 (t, 2 H, $J = 9.2$ Hz), 3.65-3.54 (m, 4 H), 2.08 (bs, 4 H), 2.54 (t, 2 H, $J = 2.3$ Hz), 2.48 (t, 2 H, $J = 2.3$ Hz)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 94.0, 80.7, 80.5, 79.7, 79.0, 75.2, 75.0, 71.6, 69.9, 62.3, 60.4, 58.4.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{11}\text{Na}$: 517.1686; enc.: 517.1686.

Di-*O*-(2-(2-azidoetoxi)etil)-pentaeritritol 149.



Purificación (éter etílico).

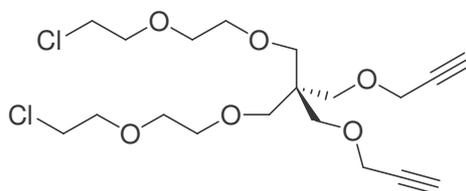
Rendimiento 78%, sustancia siruposa.

Procedimiento general para la síntesis de los derivados bis-*O*-[(2-cloroetoxi)etil] 134, 138, 142, 146, 147 y 150.

A una solución de los derivados dipropargilados (**133**, **137**, **141**), tetrapropargilados (**145**) o dialquilados (**131**, **149**) (1 mmol) en 8 mL de bis(2-cloroetil)éter se le añade hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (2 mmol) y 8 mL de una disolución de NaOH al 50%. La mezcla de reacción se agita vigorosamente durante 24 horas. Se diluye con agua (30 mL) y diclorometano (60 mL), se decanta y la fase acuosa se extrae con

diclorometano (20 mL). Los extractos orgánicos se combinan, se lavan con agua, se secan, se concentran a vacío y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía en columna.

Di-*O*-(2-(2-cloroetoxi)etil)-di-*O*-propargil-pentaeritritol 134.



Purificación (AcOEt-hexano 1:1).

Rendimiento 64%, sustancia siruposa.

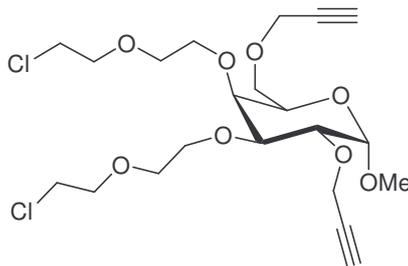
IR (film) 3292, 2115, 1096 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.12 (d, 4 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3.76 (t, 4 H, $J = 5.8$ Hz, 2 x CH_2 espaciador), 3.69-3.57 (m, 12 H, 6 x CH_2 espaciador), 3.52 (s, 4 H, 2 x CH_2C), 3.46 (s, 4 H, 2 x CH_2C), 2.41 (t, 2 H, $J = 2.3$ Hz, 2 x $\text{C}\equiv\text{CH}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 80.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 74.1($\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.4, 71.1, 70.5, 69.9, 69.2 (2 x $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CCH}_2$), 58.7 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 45.2 ($(\text{CH}_2)_4\text{C}$), 42.9 (2 x CH_2Cl).

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 447.1317; enc.: 447.1318.

Metil 3,4-di-O-(2-(2-cloroetoxi)etil)-2,6-di-O-propargil- α -D-galactopiranosido 138.



Purificación (AcOEt-hexano 1:1).

Rendimiento 55%, sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +61^\circ$ (c 1, cloroformo)

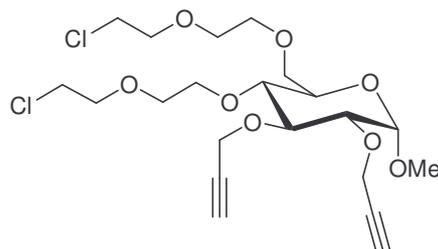
IR (film): 3288, 3255, 2215, 1352, 1096, 1049 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.90 (d, 1 H, $J = 3.7$ Hz, H-1), 4.41 (dd, 1 H, $J = 16.0$ y 2.4 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.35 (dd, 1 H, $J = 16.0$ y 2.3 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.25 (dd, 1 H, $J = 15.8$ y 2.4 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.28 (dd, 1 H, $J = 15.8$ y 2.3 Hz, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.12-3.60 (m, 22 H, H-2,3,4,5,6,6', 2 x $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3.41 (s, 3 H, OMe), 2.47 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.43 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 98.8 (C-1), 79.6, 76.1, 75.6, 74.7, 74.4, 72.5, 71.2, 71.2, 71.0, 70.8, 70.2, 69.1, 68.6, 59.0, 58.6, 55.3, 42.9, 42.9.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Cl}_2\text{Na}$: 505.1372; enc.: 505.1369.

Metil 4,6-di-O-(2-(2-cloroetoxi)etil)-2,3-di-O-propargil- α -D-glucopiranosido 142.



Purificación (AcOEt-hexano 1:1).

Rendimiento 54%, sustancia siruposa.

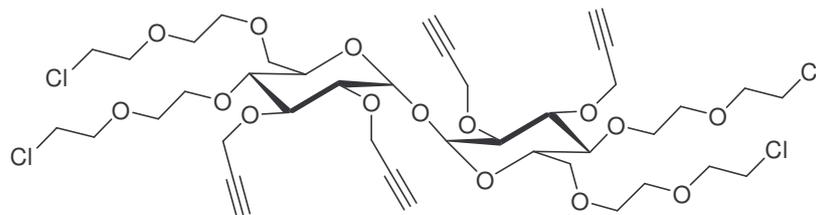
$[\alpha]_D^{+54}$ (c 1, cloroformo)

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.87 (d, 1 H, $J = 3.6$ Hz), 4.44 (d, 2 H, $J = 2.4$ Hz), 4.35 (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz), 4.00 (ddd, 1 H, $J = 10.8$, 5.0 y 3.7 Hz), 3.85-3.56 (m, 20 H), 3.42 (dd, 1 H, $J = 10.0$ y 9.0 Hz), 3.38 (s, 3 H), 2.43 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz), 2.42 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 98.0, 81.3, 79.0, 77.9, 70.1, 79.9, 74.9, 74.0, 72.1, 71.3, 71.2, 70.9, 70.8, 70.5, 69.5, 60.3, 58.7, 55.0, 42.8.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Cl}_2\text{Na}$: 505.1372; enc.: 505.1377.

4,4',6,6'-Tetra-O-(2-(2-cloroetoxi)-etil)-2,2',3,3'-tetra-O-propargil- α,α' -trehalosa 146.



Purificación (éter etílico-hexano 1:1).

Rendimiento 65%, sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +80^\circ$ (c 1, cloroformo)

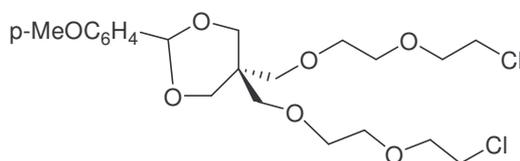
IR (film): 3291, 2872, 2117, 1454, 1356, 1092 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.18 (d, 2 H, $J = 3.6$ Hz), 4.47 (d, 4 H, $J = 2.1$ Hz), 4.26 (m, 4 H), 4.08-3.98 (m, 4 H), 3.85-3.50 (m, 40 H), 3.43 (t, 2 H, $J = 9.6$ Hz), 2.48 (t, 2 H, $J = 2.3$ Hz), 2.42 (t, 2 H, $J = 2.3$ Hz)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 94.0, 81.1, 80.4, 79.8, 78.6, 77.9, 74.7, 74.0, 72.0, 71.3, 71.1, 70.8, 70.5, 70.4, 69.4, 60.4, 58.2, 42.8, 42.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_{15}\text{Cl}_4\text{Na}$: 943.258; enc.: 943.258.

2-(4-Metoxifenil)-5-bis-(2-(2-cloroetoxietil)etiloximetil)-1,3-dioxano 147.



Purificación (AcOEt-hexano 1:2).

Rendimiento 82%, sustancia siruposa.

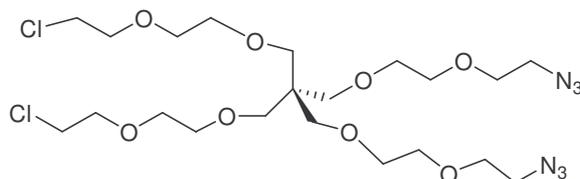
IR (film): 1614, 1517, 1250, 1097, 1033, 830 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.40 (d, 2 H, $J = 8.7$ Hz), 6.89 (d, 2 H, $J = 8.7$), 5.38 (s, 1 H), 4.09 (d, 2 H, $J = 11.5$ Hz), 3.87 (d, 2 H, $J = 11.4$ Hz), 3.82-3.53 (varios m, 16 H), 3.80 (s, 4 H), 3.68 (s, 3 H, OMe)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 160.0, 131.0, 127.4, 113.7, 101.7, 71.4, 71.3, 71.3, 71.2, 71.0, 70.5, 70.5, 70.0, 69.7, 55.3, 42.9, 38.9.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{Cl}_2\text{Na}$: 489.1423; enc.: 489.1427.

Di-*O*-(2-(2-cloroetoxi)etil)-di-*O*-(2-(2-azidoetoxi)etil)-pentaeritritol 150.



Purificación (éter etílico).

Rendimiento 70%, sustancia siruposa.

IR (film): 2871, 2109, 1300, 1109 cm^{-1}

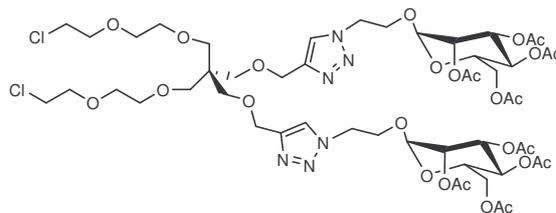
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 3.76 (t, 4 H, $J = 6.0$ Hz), 3.70-3.54 (m, 24 H), 3.46 (s, 8 H), 3.37 (t, 4 H, $J = 5.0$ Hz)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 71.3, 71.1, 70.5, 70.5, 70.1, 70.0, 50.8, 45.6, 42.9.

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 597.218; enc.: 597.2183.

Procedimiento general para la síntesis de los neoglicoconjugados de manosa divalentes 151, 157, 161 y tetravalentes 165 de manosa.

Una disolución de los alquino-derivados **134**, **138**, **142** o **146** (1 mmol), de azidoetilmanósido **127** (1.1 equiv.) y el catalizador de cobre $(4\text{to})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 equiv.) en tolueno 10 mL se calienta a reflujo entre 20 y 30 min. hasta que mediante cromatografía de placa fina se observa la desaparición total del alquino de partida. La mezcla se evapora y se purifica mediante una pequeña cromatografía de columna.

Compuesto 151.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 96%, espuma sólida.

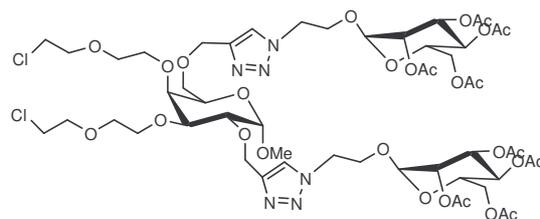
$[\alpha]_D^{+21}$ ° (c 1, cloroformo)

IR (film): 1748, 1370, 1226, 1138, 1091, 1048, 980 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.70 (s, 2 H, 2 x H-triazol), 5.25-5.20 (m, 6 H, 2 x H-2,3,4), 4.81 (s, 2 H, 2 x H-1), 4.61 (br s, 8 H, 2 x OCH_2CH_2 -triazol, 2 x CH_2 -triazol), 4.22 (dd, 2 H, $J = 12.0$ y 5.1 Hz, 2 x H-6), 4.18-4.10 (m, 2 H, 2 CH_2O -azúcar), 4.04 (br d, 2 H, $J = 12.1$ Hz, 2 x H-6'), 3.94-3.87 (m, 2 H, 2 CH_2O -C-1), 3.75 (t, 4 H, $J = 5.6$ Hz, 2 x ClCH_2CH_2 O), 3.65-3.54 (m, 14 H, 2 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$, 2 x H-5), 3.51 (s, 4 H, 2 x OCH_2C), 3.45 (s, 4 H, 2 x OCH_2C), 2.14, 2.10, 2.05, 1.99 (s, 24 H, OAc)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.5, 169.9, 169.8, 169.7 (8 x CH_3CO), 145.6 (2 x $\text{C}=\text{CH}$), 123.7 (2 x $\text{C}=\text{CH}$), 97.5 (2 x C-1), 71.2, 71.0, 70.4, 69.7, 69.3 (2 x $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$ OCH_2CCH_2), 69.9, 69.9, 69.2, 65.7 (2 x C-2,3,4,5), 66.3 (2 x CH_2O -azúcar), 64.8 (2 x $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 62.2 (C-6), 49.6 (2 x CH_2N), 45.4 (C_{quat}), 43.0 (2 x ClCH_2), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (CH_3CO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{51}\text{H}_{76}\text{O}_{26}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 1281.408; enc.: 1281.393.

Compuesto 157.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 94%, espuma sólida.

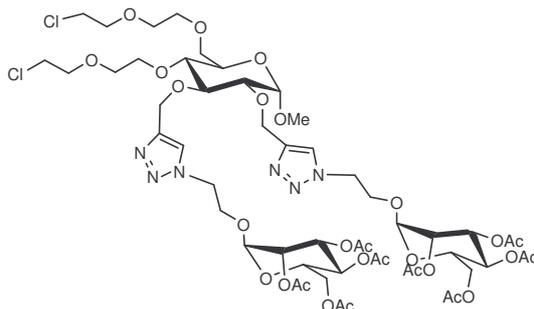
$[\alpha]_D^{+42}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1751, 1228, 1139, 1092, 1048 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.74 (s, 1 H, H-5 triazol), 7.69 (s, 1 H, H-5 triazol), 5.27-5.20 (m, 6 H, 2 x H-2,3,4 Man), 4.96 (d, 1 H, $J = 12.1$ Hz, CH_2N), 4.83 (d, 1 H, $J = 12.1$ Hz, CH_2N), 4.82 (d, 1 H, $J = 3.7$ Hz, H-1 Gal), 4.80 (brs, 2 H, H-1 Man), 4.73 (d, 1 H, $J = 12.5$ Hz OCH_2 triazol), 4.67 (d, 1 H, $J = 12.5$ Hz, OCH_2 triazol), 4.65-4.55 (m, 4 H, CH_2O -Man), 4.27-3.55 (m, 28 H, H-2,3,4,5,6,6' Gal, 2 x H-5 Man, 2 x CH_2O -Man, 2 x $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3.37 (s, 3 H, OMe), 2.14, 2.09, 2.05, 1.99 (4 s, 24 H, 8 x AcO)

^{13}C NMR(CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.4, 169.7, 169.7, 169.4, 145.5, 145.0, 123.9, 123.7, 98.4, 97.5, 97.4, 79.4, 76.0, 72.3, 71.1, 71.0, 70.8, 70.2, 69.0, 68.9, 68.8, 68.7, 66.2, 66.1, 65.6, 64.6, 64.4, 62.1, 55.1, 49.6, 49.5, 43.1, 43.0, 20.7, 20.6, 20.5

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{53}\text{H}_{78}\text{O}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 1339.414; enc.: 1339.438.

Compuesto 161.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 80%, espuma sólida.

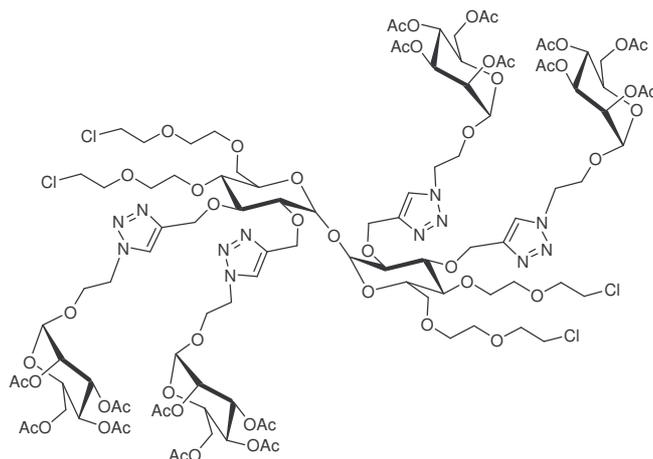
$[\alpha]_D^{+50}$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr): 1752, 1228, 1139, 1091, 1049 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.99, 7.92 (2 s, 2 H, H-5 triazol), 5.30-5.19 (m, 6 H, H-2,3,4), 4.98 (sistema AB, 2 H, $J = 11.4$ Hz, $\Delta\mu = 13.0$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.84 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.83 (d, 1 H, $J = 3.8$ Hz, H-1 Glu), 4.80-4.79 (2 s, 2 H, H-1 Man), 4.81 (d, 1 H, $J = 11.9$ Hz, $=\text{CH}_2$ -triazol), 4.67-4.50 (m, 4 H, CH_2N), 4.27-3.88 (m, 8 H, H-6,6' Man, CH_2O -Man), 3.84 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3 Glu), 3.80-3.57 (m, 21 H, H-5,6,6' Glu, H-5 Man, ClCH_2CH_2 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.53 (dd, 1 H, $J = 9.6$ y 3.5 Hz, H-2 Glu), 3.42 (t, 1 H, $J = 9.2$ Hz, H-4 Glu), 3.38 (s, 3 H, OMe), 2.12, 2.08, 2.03, 1.97 (4 s, 24 H, Ac)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.5, 169.8, 169.7, 169.6 (COO), 145.4, 144.9, 124.4, 124.3 (triazol), 97.6, 97.5 (C-1), 81.4, 79.5, 78.0, 72.1, 71.2, 71.1, 70.8, 70.7, 70.5, 70.0, 69.5, 69.1, 69.1, 68.9, 66.3, 66.2, 65.7, 64.2, 64.2, 55.0, 49.5, 43.0, 42.8, 20.7, 20.6, 20.6 (MeCO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{53}\text{H}_{78}\text{O}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 1339.414; enc.: 1339.336.

Compuesto 165.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 92%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{+65}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1751, 1372, 1228, 1139, 1091, 1049 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.09 (s, 2 H), 7.89 (s, 2 H), 2.14, 2.11, 2.10, 2.05, 2.04, 1.98 (6 s, 48 H)

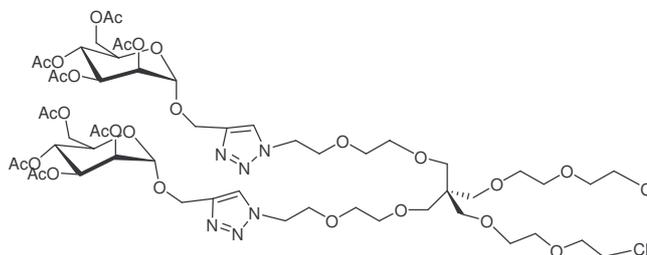
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.6, 169.8, 169.7, 169.6, 145.3, 144.9, 124.5, 124.3, 97.6, 93.4, 80.6, 78.8, 77.8, 71.9, 71.1, 71.0, 70.7, 70.6, 70.3, 69.4, 69.0, 68.9, 68.8, 68.7, 68.7, 66.3, 66.2, 66.0, 65.6, 63.8, 62.2, 49.4, 49.3, 43.2, 42.8, 20.7, 20.6, 20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{104}\text{H}_{150}\text{O}_{55}\text{N}_{12}\text{Cl}_4\text{Na}$: 2609.822; enc.: 2609.880.

Procedimiento para la síntesis de los glicoconjugados 171 y 179.

Una solución que contiene el derivado diazido **150** (0.2 mmol), el derivado propargilado correspondiente de α -D-glucosa **128** o D-manosa **130** (0.44 mmol) y el catalizador de cobre (EtO)₃P·CuI (0.1 equiv.) en tolueno 10 mL se calienta a reflujo durante 20 min. (la cromatografía de placa fina muestra la desaparición total del producto de partida). La mezcla se evapora y se purifica mediante una pequeña cromatografía de columna.

Compuesto 171.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 96%, sirupo.

$[\alpha]_D^{+35}$ (c 1, cloroformo)

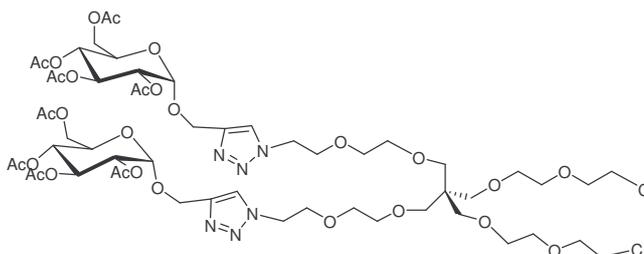
IR (film): 1750, 1370, 1227, 1134, 1089, 1049 cm^{-1}

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.77 (s, 2 H), 5.35-5.25 (m, 4 H), 5.23 (br s, 2 H), 4.97 (s, 2 H), 4.84 (d, 2 H, J = 12.2 Hz), 4.69 (d, 2 H, J = 12.2 Hz), 4.55 (t, 4 H, J = 5.1 Hz), 4.31 (dd, 2 H, J = 12.3 y 5.1 Hz), 4.14-4.07 (m, 4 H), 3.90 (t, 4 H, J = 5.1 Hz), 3.75 (t, 4 H, J = 5.7 Hz), 3.65-3.53 (m, 20 H), 3.43 (s, 8 H), 2.15, 2.12, 2.04, 1.98 (4 s, 24 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.0, 169.9, 169.7, 143.3, 124.2, 96.8, 71.3, 71.1, 71.0, 70.5, 70.0, 69.9, 69.5, 69.4, 69.1, 68.7, 66.1, 62.4, 60.9, 45.5, 43.0, 20.9, 20.8, 20.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{55}\text{H}_{84}\text{O}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 1369.460; enc.: 1369.576.

Compuesto 179.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 90%, sirupo.

$[\alpha]_D^{+60}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1749, 1367, 1226, 1102, 1040 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.73 (s, 2 H), 5.47 (t, 2 H, $J = 9.9$ Hz), 5.21 (d, 2 H, $J = 3.7$ Hz), 5.08 (t, 2 H, $J = 9.8$ Hz), 4.89 (dd, 2 H, $J = 10.2$ y 3.7 Hz), 4.84 (d, 2 H, $J = 12.3$ Hz), 4.67 (d, 2 H, $J = 12.3$ Hz), 4.55 (t, 4 H, $J = 5.1$ Hz), 4.27 (dd, 2 H, $J = 12.3$ y 4.2 Hz), 4.14-4.05 (m, 4 H), 3.90 (t, 4 H, $J = 5.1$ Hz), 3.75 (t, 4 H, $J = 5.8$ Hz), 3.65-3.53 (m, xx H), 3.42 (s, 8 H), 3.37 (t, 4 H, $J = 5.0$ Hz), 2.10, 2.03, 2.02, 2.00 (4 s, 24 H)

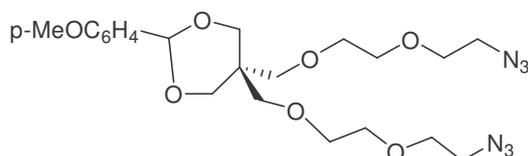
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.1, 143.5, 124.1, 95.2, 71.3, 71.1, 71.0, 70.7, 70.5, 70.5, 70.1, 70.0, 69.6, 69.5, 68.5, 67.5, 61.8, 61.4, 50.5, 45.6, 43.0, 20.8, 20.7, 20.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{55}\text{H}_{84}\text{O}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 1369.460; enc.: 1369.550.

Procedimiento general para la síntesis de los derivados diazido **148**, **152**, **158**, **162**, **172**, **180** y tetraazido **166**.

Una solución del correspondiente derivado dicloro **147**, **151**, **157**, **161**, **171**, **179** o tetracloro **165** (0.5 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (0.1 mmol) en DMF 10 mL a la que se añade NaN₃ (5 equiv.) se calienta a 80 °C bajo agitación durante 20 horas. Se diluye con tolueno-éter etílico (1:1, 100 mL) y se lava con agua (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca y evapora, el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna.

Compuesto **148**.



Purificación (éter etílico-hexano 2:1).

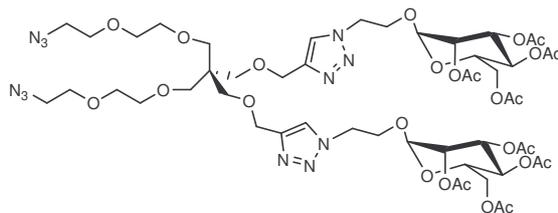
Rendimiento 86%, sustancia siruposa.

IR (film): 2867, 2109, 1615, 1518, 1303, 1249, 1095, 1032, 830 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.40 (d, 2 H, J = 8.7 Hz), 6.89 (d, 2 H, J = 8.7), 5.38 (s, 1 H), 4.09 (d, 2 H, J = 11.8 Hz), 3.88 (d, 2 H, J = 11.7 Hz), 3.80 (s, 4 H), 3.70-3.35 (varios m, 16 H), 3.67 (s, 3 H)

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 161.1, 131.0, 127.4, 113.7, 101.7, 71.4, 71.3, 71.1, 70.6, 70.6, 70.2, 70.1, 70.0, 69.8, 55.4, 50.9, 39.0..

EMAR (m/z) (FAB+) calc. Para C₂₁H₃₂O₇N₆Na: 503.2230; enc.: 503.2230.

Compuesto 152.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 97%, espuma sólida.

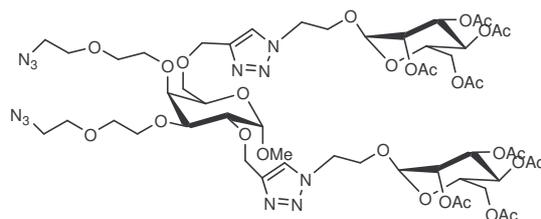
$[\alpha]_D^{+22}$ ° (c 1, cloroformo)

IR (film): 2110, 1748, 1370, 1226, 1138, 1091, 1048, 980 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): d 7.69 (s, 2 H, 2 x H-triazol), 5.25-5.20 (m, 6 H, 2 x H-2,3,4), 4.81 (s, 2 H, 2 x H-1), 4.60 (br s, 8 H, 2 x OCH_2CH_2 -triazol, 2 x CH_2 -triazol), 4.22 (dd, 2 H, J = 12.0 y 5.1 Hz, 2 x H-6), 4.18-4.11 (m, 2 H, 2 CH_2O -azúcar), 4.04 (dd, 2 H, J = 12.4 y 2.3 Hz, 2 x H-6'), 3.91 (m, 2 H, 2 CH_2O -azúcar), 3.67 (t, 4 H, J = 5. Hz, 2 x $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.63-3.54 (m, 10 H, 2 $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 2 x H-5), 3.51 (s, 4 H, 2 x OCH_2C), 3.46 (s, 4 H, 2 x OCH_2C), 3.37 (gt, 4 H, 2 N_3CH_2), 2.14, 2.10, 2.04, 1.99 (4 s, 24 H, OAc)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): d 170.5, 169.9, 169.8, 169.6 (8 x CO), 145.7 (2 x C=CH), 123.6 (2 x C=CH), 97.6 (2 x C-1), 71.0, 70.4, 70.0, 69.8, 69.5 (2 x $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 69.2, 69.0, 68.9, 65.7 (2 x C-2,3,4,5), 66.3 (2 x CH_2O -azúcar), 64.8 (2 x $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 62.2 (C-6), 50.8 (2 x CH_2N_3), 49.5 (2 x CH_2N), 45.5 (C_{quat}), 20.8, 20.7, 20.7, 20.7 (MeCO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{51}\text{H}_{76}\text{O}_{26}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1295.489; enc.: 1295.452.

Compuesto 158.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 75%, espuma sólida.

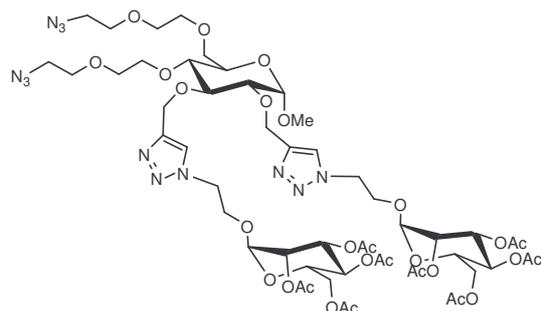
$[\alpha]_D +41.5^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr): 2211, 1749, 1228, 1139, 1092, 1048 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.71 (s, 1 H, H-5 triazol), 7.68 (s, 1 H, H-5 triazol), 5.28-5.19 (m, 6 H, 2 x H-2,3,4 Man), 4.91 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.83 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, $=\text{CH}_2$ -triazol), 4.82 (d, 1 H, $J = 3.6$ Hz, H-1 Gal), 4.79 (brs, 2 H, H-1 Man), 4.73 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, OCH_2 triazol), 4.67 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, OCH_2 triazol), 4.64-4.52 (m, 4 H, NCH_2), 4.25-3.59 (m, 24 H, H-2,3,4,5,6,6' Gal, 2 x H-5 Man, 2 x CH_2O -Man, 2 x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3.41-3.35 (m, 4 H, CH_2N), 3.37 (s, 3 H, *OMe*), 2.14, 2.09, 2.05, 1.99 (4 s, 24 H, 8 x AcO)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.5, 169.9, 169.8, 169.6, 159.6, 145.6, 145.2, 123.9, 123.9, 98.6, 97.6, 97.5, 79.6, 76.2, 76.2, 72.5, 71.0, 70.9, 70.3, 69.0, 69.2, 69.1, 69.0, 69.0, 68.9, 68.8, 66.3, 66.2, 65.8, 65.8, 64.8, 64.6, 62.2, 55.3, 50.9, 50.8, 49.7, 49.6, 20.8, 20.7, 20.6.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{53}\text{H}_{78}\text{O}_{28}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1353.495; enc.: 1353.517.

Compuesto 162.

Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 71%, espuma sólida.

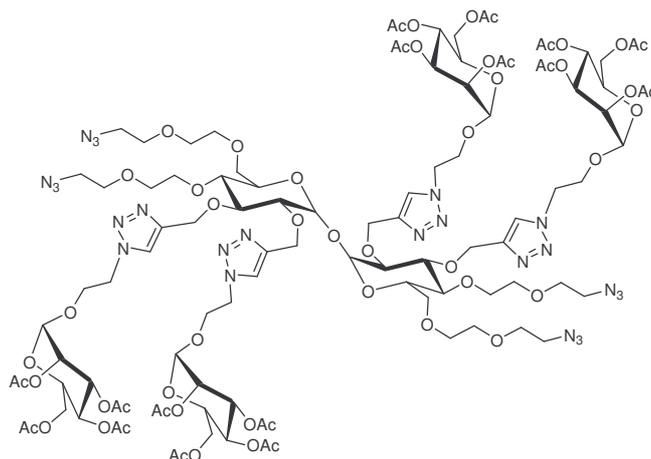
$[\alpha]_D^{+57}$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr): 2110, 1749, 1227, 1138, 1090, 1048 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.96, 7.89 (2 s, 2 H), 5.30-5.15 (m, 6 H), 5.02-4.78 (m, 7 H), 4.70-4.50 (m, 4 H), 4.23 (dd, 2 H, $J = 12.4$ y 5.0 Hz), 4.20-3.30 (varios m, 28 H), 3.86 (t, 1 H, $J = 4$ Hz), 3.55 (dd, 1 H, $J = 9.6$ y 3.5 Hz), 3.39 (s, 3 H), 2.17, 2.10, 2.04, 1.98 (4 s, 24 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.5, 169.8, 169.7, 169.6, 145.4, 144.9, 124.4, 124.1, 97.6, 81.4, 79.5, 78.0, 72.0, 70.8, 70.7, 70.5, 70.0, 69.9, 69.8, 69.5, 69.1, 69.0, 68.8, 68.8, 66.3, 65.7, 64.3, 61.1, 54.9, 50.7, 49.5, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{53}\text{H}_{78}\text{O}_{28}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1353.495; enc.: 1353.454.

Compuesto 166.

Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 80%, espuma sólida.

IR (KBr): 2113, 1751, 1227, 1139, 1090, 1048 cm^{-1}

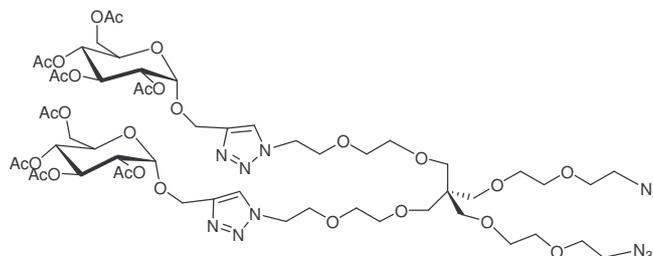
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.09 y 7.89 (2s, 4H, H-5 triazol), 5.30-5.18 (m, 14H, H-1 Trehalosa y H-2,3,4 Man), 5.00 y 4.95 (2d, 4H, $J=11.3$ Hz, CH_2 -triazol), 4.85 y 4.82 (2bs, 4H, H-1Man), 4.83 y 4.68 (2d, 4H, CH_2 -triazol), 4.70-4.50 (m, 8H, CH_2N triazol), 4.25 (m, 4H, H-6 Man), 4.15 (m, 4H, CH_2OMan), 4.08 (bd, 4H, H-6' Man), 4.08-3.90 (m, 6H, CH_2Man y H-5 Trehalosa), 3.85 (t, 2H, $J=9.3$ Hz, H-3 Trehalosa), 3.85-3.60 (m, 32H, $\text{CH}_2\text{Oespaciador}$, H-6 Trehalosa y H-5 Man), 3.51 (dd, 2H, $J=9.6$ Hz y 3.5 Hz, H-2 Trehalosa), 3.47-3.30 (m, 10H, CH_2N_3 y H-4 Trehalosa), 2.13-1.97 (5s, 48H, CH_3CO)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.6, 169.9, 169.8, 169.7 (CH_3CO), 145.6, 145.2 (C-4 triazol), 124.5, 124.2 (C-5 triazol), 97.8 (C-1 Man), 93.6 (C-1 Trehalosa), 81.0 (C-3 Trehalosa), 79.0 (C-2 Trehalosa), 78.1 (C-4 Trehalosa), 72.1, 71.0, 70.9 ($\text{CH}_2\text{OespaciadorN}_3$), 70.8 (C-5 Trehalosa), 70.5, 69.9, 69.8 ($\text{CH}_2\text{espaciador}$), 69.5 (C-6 Trehalosa), 69.2, 69.0, 68.9 (C-2,3,5 Man), 66.5, 66.4 (CH_2Man), 66.3

(CH₂triazol), 65.9 (C-4 Man), 64.1 (CH₂triazol), 62.3 (C-6 Man), 50.8, 50.7 (CH₂(N)triazol), 49.5, 49.4 (CH₂N₃), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (CH₃COO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₁₀₄H₁₅₀O₅₅N₂₄Na: 2637.973; enc.: 2637.790.

Compuesto 172.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 99%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{+26}$ (c 1, cloroformo)

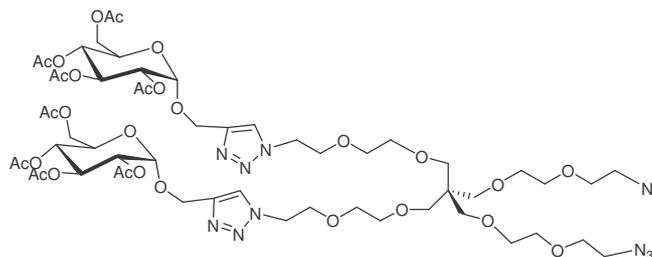
IR (film): 2109, 1750, 1370, 1228, 1134, 1086, 1048 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.77 (s, 2 H), 5.32-5.24 (m, 4 H), 5.24 (br s, 2 H), 4.98 (d, 2 H, J = 1.2 Hz), 4.84 (d, 2 H, J = 12.2 Hz), 4.69 (d, 2 H, J = 12.2 Hz), 4.55 (t, 4 H, J = 5.1 Hz), 4.31 (dd, 2 H, J = 12.5 y 5.2 Hz), 4.14-4.10 (m, 4 H), 3.90 (t, 4 H, J = 5.1 Hz), 3.67 (t, 4 H, J = 5.0 Hz), 3.64-3.53 (m, 20 H), 3.44 (s, 8 H), 3.37 (t, 4 H, J = 5.0 Hz), 2.15, 2.12, 2.04, 1.98 (4 s, 24 H)

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 170.7, 170.0, 169.8, 169.7, 143.2, 124.2, 96.8, 71.0, 71.0, 70.5, 70.4, 70.0, 69.9, 69.4, 69.4, 69.1, 68.7, 66.0, 62.3, 60.8, 50.7, 50.4, 45.5, 20.8, 20.8, 20.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₅₅H₈₄O₂₈N₁₂Na: 1383.541; enc.: 1383.828.

Compuesto 180.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 96%, espuma sólida.

$[\alpha]_D +61^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2109, 1751, 1369, 1227, 1103, 1041 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.72 (s, 2 H), 5.47 (t, 2 H, $J = 9.8$ Hz), 5.21 (d, 2 H, $J = 3.7$ Hz), 5.08 (t, 2 H, $J = 9.7$ Hz), 4.88 (dd, 2 H, $J = 10.3$ y 3.8 Hz), 4.83 (d, 2 H, $J = 12.5$ Hz), 4.69 (d, 2 H, $J = 12.3$ Hz), 4.54 (t, 4 H, $J = 5.1$ Hz), 4.27 (dd, 2 H, $J = 12.3$ y 4.1 Hz), 4.15-4.05 (m, 4 H), 3.90 (t, 4 H, $J = 5.1$ Hz), 3.67 (t, 4 H, $J = 5.0$ Hz), 3.63-3.52 (m, xx H), 3.42 (s, 8 H), 3.37 (t, 4 H, $J = 5.0$ Hz), 2.10, 2.03, 2.02, 2.00 (4 s, 24 H)

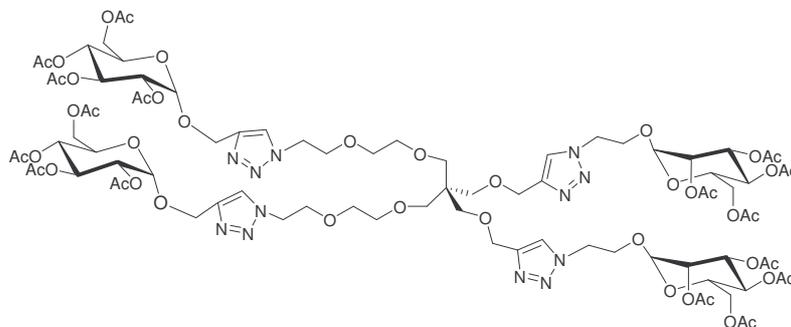
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.7, 170.0, 169.6, 143.7, 124.0, 95.2, 71.3, 71.1, 71.0, 70.7, 70.6, 70.5, 70.1, 70.0, 69.6, 69.5, 67.6, 61.8, 61.4, 50.8, 50.5, 45.6, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{55}\text{H}_{84}\text{O}_{28}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1383.541; enc.: 1383.806.

Procedimiento general para la síntesis de heteroneoglicoconjugados tetravalentes 153, 154, 159, 163, 173, 174, 175, 181, 182 y octavalentes 167, 168.

Una solución de los derivados diazido 152, 158, 162, 172, 180 o tetraazido 166 (0.2 mmol), los correspondientes derivados propargilados 128, 129, 130 o alcohol propargílico (1.1 equiv.) y el catalizador de cobre (EtO)₃P·CuI (0.1 equiv.) en tolueno 10 mL se calienta a reflujo entre 20 y 30 min. hasta que la cromatografía en capa fina muestre la desaparición del producto de partida, tras lo cual la mezcla de reacción se evapora y el crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna.

Compuesto 153.



Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 83%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{25}$ 57.5 ° (c 1, cloroformo)

IR (KBr) 1751, 1228, 1339, 1089, 1047 cm⁻¹

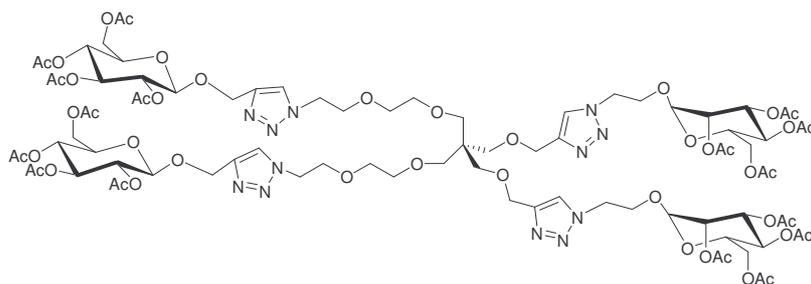
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.71, 7.69 (2 s, 2 H, H-5 triazol), 5.47 (t, 2 H, H-3Glu), 5.29-5.18 (m, 6 H, H-2,3,4 Man), 5.22 (d, 2 H, J = 3.6 Hz, H-1 Glu), 5.08 (t, 2 H, J = 9.9 Hz, H-4 Glu), 4.88 (dd, 2 H, J = 10.3 y 3.6 Hz, H-2 Glu), 4.82 (d, 2 H, J = 12 Hz Glu-OCH₂), 4.81 (brs, 2 H, H-1 Man), 4.67 (d, 2 H, J = 12 Hz, Glu-O-CH₂), 4.60 (t, 4 H, J = 5.0 Hz, CH₂N), 4.58 (br s, 4 H, OCH₂-triazol), 4.53 (t, 4 H, J = 5.0

Hz, CH_2N), 4.27 (dd, 2 H, $J = 12.1$ and 4.1 Hz, H-6 Glu), 4.22 (dd, 2 H, $J = 12.2$ y 5.0 Hz, H-6 Man), 4.17-4.03 (m, 8 H, H-5,6 Glu, H-6 Man, OCH_2 -Man), 3.92 (m, 2 H, OCH_2 -Man), 3.88 (t, 4 H, $J = 4.9$ Hz, OCH_2CH_2N), 3.63 (m, 2 H, H-5 Man), 3.60-3.48 (m, 8 H, OCH_2CH_2O), 3.48, 3.40 (2 s, 8 H, $C(CH_2)_4$), 2.14, 2.10, 2.10, 2.04, 2.02, 2.02, 1.9 (8 s, 48 H, 16 Ac)

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 170.7, 170.6, 170.1, 170.0, 169.6 (CO), 145.4, 143.4 (C-4 triazol), 124.1, 123.8, (C-5 triazol), 97.6 (C-1 Man), 95.1 (C-1 Glu), 71.1 (OCH_2CH_2O), 70.7 (C-2 Glu), 70.5 (OCH_2CH_2O), 70.2 (C-3 Glu), 69.9 (CH_2O), 69.5 (OCH_2CH_2N), 69.4 (CCH_2O), 69.2 (C-2 Man), 69.1, 69.0 (C-3,5 Man), 68.6 (C-4 Glu), 67.6 (C-5 Glu), 66.3 (OCH_2CH_2N), 65.8 (C-4 Man), 64.8 (OCH_2 -triazol), 62.3 (C-6 Man), 61.8 (C-6 Glu), 61.4 (CH_2O -Man), 50.5, 49.7 (2 CH_2N), 45.5 ($C(CH_2)_4$), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (8 MeCO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $C_{85}H_{120}O_{46}N_{12}Na$: 2067.731; enc.: 2067.771.

Compuesto 154.



Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 87%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{20} -4.2^\circ$ y $[\alpha]_{436} -9.3^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr) 1752, 1229, 1089, 1048 cm^{-1}

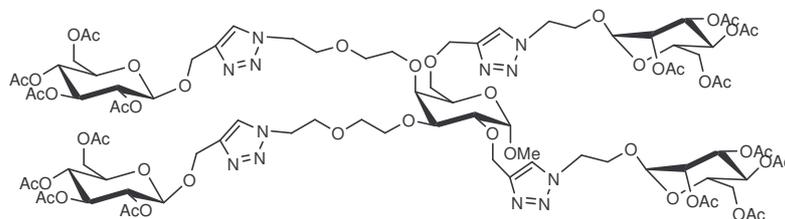
1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7.71, 7.72 (2 s, 2 H, H-5 triazol), 5.28-5.17 (m, 8 H, H-3 Glu, H-2,3,4 Man), 5.09 (t, 2 H, $J = 9.5$ Hz, H-4 Glu), 4.97 (br t, 2 H, $J = 8.0$ Hz,

H-2 Glu), 4.92 (d, 2 H, $J = 12.6$ Hz, CH_2OGlu), 4.82 (brs, 2 H, H-1 Man), 4.79 (d, 2 H, $J = 12.6$ Hz, CH_2OGlu), 4.71 (d, 2 H, $J = 7.9$ Hz, H-1 Glu), 4.64-4.50 (m, 12 H, 2 x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{-triazol}$, 2 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-Man}$, 2 x $\text{OCH}_2\text{-triazol-Man}$), 4.28 (dd, 2 H, $J = 12.4$ y 4.6 Hz, H-6 Glu), 4.22 (dd, 2 H, $J = 12.5$ y 5.1 Hz, H-6 Man), 4.15 (dd, 2 H, $J = 10.3$ y 2.2 Hz, H-6 Glu), 4.15-4.10 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{O-Man}$), 4.05 (dd, 2 H, $J = 12.4$ y 2.3 Hz, H-6 Man), 3.95-3.88 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{-Man}$), 3.86 (t, 4 H, $J = 5.2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.76 (ddd, 2 H, $J = 9.9$, 4.4 y 2.3 Hz, H-5 Glu), 3.64 (m, 2 H, H-5 Man), 3.58-3.47 (m, 8 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.46, 3.39 (2 s, 8 H, $\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 2.14, 2.09, 2.04, 2.03, 1.99, 1.98, 1.97 (7 s, 48 H, 16 Ac)

^{13}C RMN(CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.5, 170.1, 169.9, 169.5 (CO), 145.3, 143.7 (C-4 triazol), 124.1, 123.8 (C-5 triazol), 99.7 (C-1 Glu) 97.5 (C-1 Man), 72.8 (C-3 Glu), 71.8 (C-5 Glu), 71.2 (C-2 Glu), 70.9, 70.3, 69.8, 69.4 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$, CH_2O), 69.1 (C-2 Man), 68.9, 68.9 (C-3,5 Man), 68.3 (C-4 Glu), 66.2, 65.7 (C-4 Man), 64.8 ($\text{OCH}_2\text{-triazol}$), 62.7 (OCH_2), 62.2 61.8 (C-6 Glu, C-6 Man), 50.4, 49.6 (2 CH_2N), 45.3 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6 (8 MeCO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{85}\text{H}_{120}\text{O}_{46}\text{N}_{12}\text{Na}$: 2067.731; enc.: 2067.826.

Compuesto 159.



Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 94%, espuma sólida.

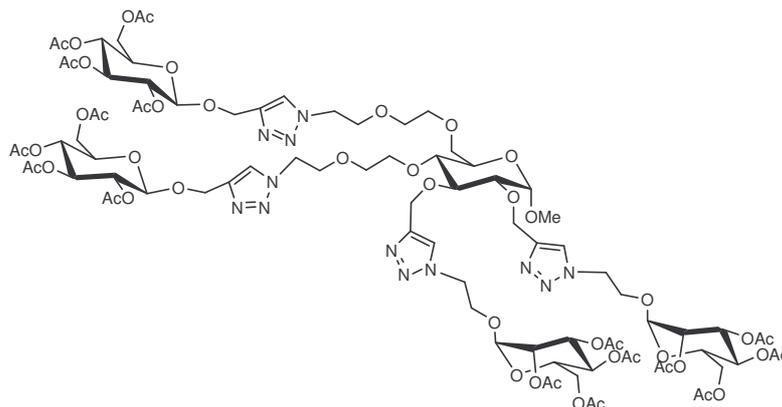
$[\alpha]_{\text{D}} + 9^\circ$ y $[\alpha]_{436} + 16^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr) 1755, 1231, 1138, 1092, 1049 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.75, 7.68, 7.66, 7.63 (4 s, 4 H, 4 x H-5 triazol), 5.23 (t, 2 H, $J = 9.7$ Hz, H-4 Man), 5.20-5.14 (m, 6 H, H-2,3 Man, H-3 Glu), 5.07 (br t, 2 H, $J = 9.6$ Hz, H-4 Glu), 4.96 (dd, 2 H, $J = 9.2$ y 8.0 Hz, H-2 Glu), 4.88 (d, 1 H, $J = 12.5$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.87 (d, 1 H, $J = 12.5$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.86 (d, 1 H, $J = 12.1$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.78 (d, 1 H, $J = 3.5$ Hz, H-1 Gal), 4.77 (br s, 2 H, H-1 Man), 4.76 (d, 1 H, $J = 12.1$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.75 (d, 1 H, $J = 12.5$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.74 (d, 1 H, $J = 12.5$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.69 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, H-1 Glu), 4.68 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, H-1 Glu), 4.65 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.58 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, OCH_2 -triazol), 4.60-4.45 (m, 8 H, 4 x CH_2N), 4.27 (dd, 1 H, $J = 12.4$ y 4.5 Hz, H-6 Glu), 4.26 (dd, 1 H, $J = 12.4$ y 4.5 Hz, H-6 Glu), 4.23-4.00, 3.95-3.50 (2 m, 40 H, H-2,3,4,5,6,6'-Gal, 2 x $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$, 2 x triazol- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2 x H-5 Glu, 2 x H-5 Man, 2 x H-6 Glu, 4 x H-6 Man), 3.37 (s, 3 H, OCH_3), 2.13, 2.09, 2.04, 2.02, 1.99, 1.98, 1.96 (7 s, 48 H, 16 Ac)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.5-169.4 (COO) 145.3, 144.8, 143.7, 141.3 (C-4 triazol), 124.2, 124.1, 124.0 (C-5 triazol), 99.8, 99.8 (C-1 Glu), 98.5 (C-1 Gal), 97.6, 97.5 (C-1 Man), 79.4 (C-4 Gal), 75.9, 75.8 (C-2,5 Gal), 72.8 (C-3 Glu), 72.3 (CH_2O), 71.9, 71.9 (C-5 Glu), 71.2 (C-2 Glu), 70.9, 70.7, 70.0 (CH_2O), 69.4, 69.2 (OCH_2), 69.1, 69.0, 68.9, 68.8 (C-3 Gal, C,2,3,5 Man), 68.6 (C-6 Gal), 68.4 (C-4 Glu), 66.3, 66.2 (OCH_2), 65.7, 65.7 (C-4 Man), 64.5, 64.4, 62.8, 62.8 (CH_2 -triazol), 62.2, 61.9 (C-6 Glu, C-6 Man), 55.3 (OCH_3), 50.3, 50.3, 49.7, 49.6 (CH_2N), 21.0-20.5 (MeCO)

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{87}\text{H}_{122}\text{O}_{48}\text{N}_{12}\text{Na}$: 2125.737; enc.: 2125.696.

Compuesto 163.

Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 91%, espuma sólida.

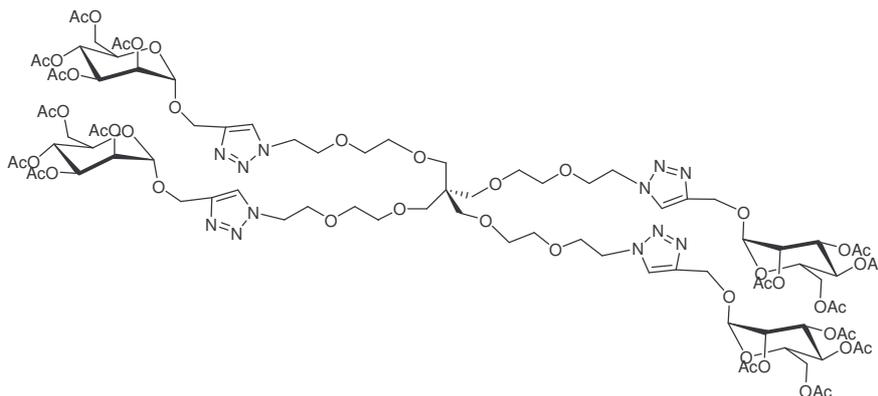
$[\alpha]_D +17^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr): 1754, 1372, 1231, 1139, 1089, 1048 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.91, 7.89, 7.75, 7.67 (4 s, 2 H), 3.39 (s, 3 H), 2.14, 2.13, 2.10, 2.09, 2.04, 2.03, 2.02, 1.99, 1.97, 1.96, 1.95 (10 s, 48 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.4, 170.4, 170.0, 169.8, 169.6, 169.4, 169.4, 145.0, 144.6, 143.6, 124.3, 124.0, 123.7, 99.6, 97.4, 81.2, 79.2, 77.8, 72.6, 71.7, 71.0, 70.6, 70.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.8, 68.7, 68.2, 66.1, 65.6, 62.6, 62.1, 61.7, 54.9, 50.1, 49.4, 20.6, 20.6, 20.5, 20.4.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{87}\text{H}_{122}\text{O}_{48}\text{N}_{12}\text{Na}$: 2125.737; enc.: 2125.736.

Compuesto 173.

Purificación (AcOEt-MeOH 19:1).

Rendimiento 95%, espuma sólida.

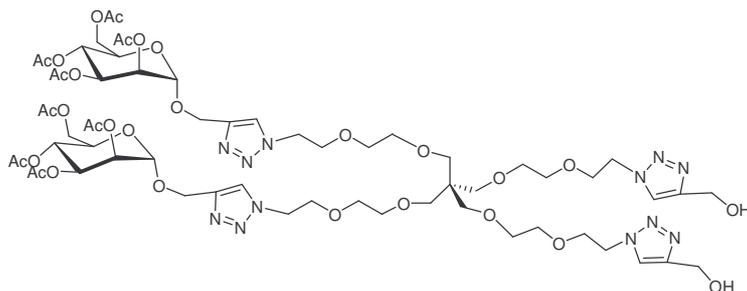
$[\alpha]_D^{+41}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1751, 1370, 1228, 1133, 1049 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.77 (s, 4 H, H-4 triazol), 5.35-5.24 (m, 8 H, H-3,4 Man), 5.23 (s, 2 H, H-2 Man), 4.98 (s, 4 H, H-1), 4.84 (d, 4 H, $J = 12.2$ Hz, CH_2O -Man), 4.68 (d, 4 H, $J = 12.2$ Hz, CH_2O -Man), 4.55 (t, 8 H, $J = 5.1$ Hz, CH_2N), 4.31 (dd, 2 H, $J = 12.3$ y 5.1 Hz, H-6), 4.15-4.06 (m, 8 H, H-5,6), 3.90 (t, 8 H, $J = 5.1$ Hz), 3.61-3.51 (m, 16 H), 3.38 (s, 8 H, CH_2C), 2.15, 2.12, 2.04, 1.98 (4 s, 48 H, Ac)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.6, 170.0, 169.9, 169.7 (COO), 143.2, 124.1 (triazol), 96.8 (C-1), 70.9, 70.4, 69.8, 69.3 (CH_2O), 69.4, 69.1, 68.7, 66.0 (C-2,3,4,5), 62.3 (C-6), 60.8 (CH_2O), 50.3 (CH_2N), 45.4 ($(\text{CH}_2)\text{C}$), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6 (MeCO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{89}\text{H}_{128}\text{O}_{48}\text{N}_{12}\text{Na}$: 2155.784; enc.: 2156.048.

Compuesto 174.

Purificación (Cl₂CH₂-MeOH 12:1).

Rendimiento 70%, espuma sólida.

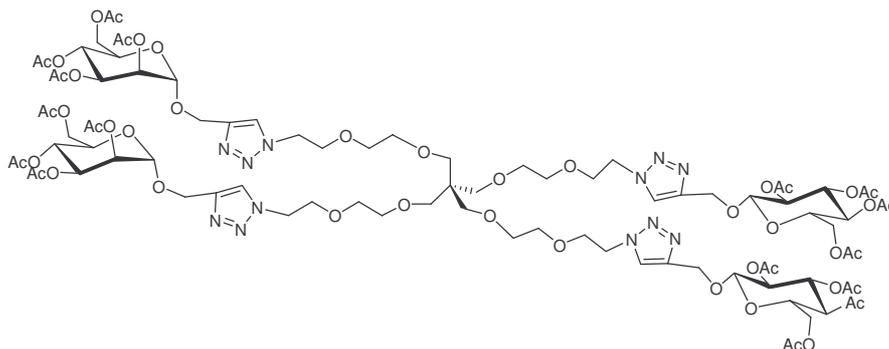
[α]_D +36° (c 1, cloroformo)

IR (film): 3463, 2876, 1750, 1370, 1228, 1134, 1087, 1049 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.78 (bs, 4H), 5.4-5.2 (m, 6H), 4.97 (s, 4H), 4.83 (d, 2H, J=12.2 Hz), 4.76 (s, 2H), 4.75 (bs, 2H), 4.67 (d, 2H, J=12.2 Hz), 4.50 (m, 8H), 4.30 (dd, 2H, J=12.3 Hz y 5.1 Hz), 4.10 (m, 4H), 3.86 (m, 8H), 3.57-3.48 (m, 16H), 3.33 (s, 8H), 2.15, 2.12, 2.04, 1.97 (4s, 24H).

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 170.8, 170.1, 170.0, 169.7, 143.4, 124.2, 123.0, 96.9, 71.0, 70.9, 70.5, 70.5, 69.9, 69.5, 69.4, 69.2, 68.8, 66.1, 62.4, 60.9, 56.4, 50.4, 50.3, 45.5, 20.9, 20.8, 20.7

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₆₁H₉₂O₃₀N₁₂Na: 1495.594; enc.: 1495.582.

Compuesto 175.

Purificación (Cl₂CH₂-MeOH 12:1).

Rendimiento 80%, espuma sólida.

[α]_D + 3° y [α]₄₃₆ +7.5° (c 1, cloroformo)

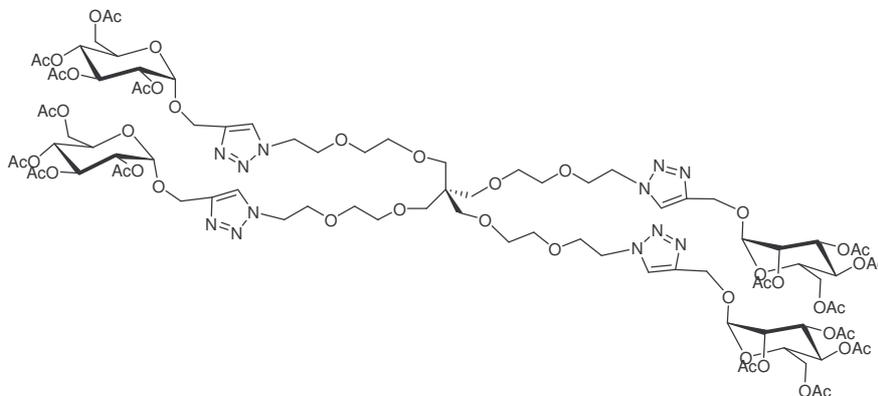
IR (film): 2877, 1751, 1433, 1370, 1228, 1048 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.76 (s, 2H, H-4 triazol), 7.70 (s, 2H, H-4 triazol), 5.32-5.29 (m, 4H, H-3,4 Man), 5.23 (bs, 2H, H-2 Man), 5.20 (t, 2H, J=9.3 Hz, H-3 Glu), 5.09 (t, 2H, H-4 Glu, J=9.6 Hz), 4.93 (d, 2H, J=12.5 Hz, sistema AB CH₂O), 4.84 (d, 2H, J=12.2 Hz, sistema AB CH₂O), 4.81 (d, 2H, J=12.5 Hz, sistema AB CH₂O), 4.71 (d, 2H, J=8.0 Hz, H-1 Glu), 4.68 (d, 2H, J=12.2 Hz, sistema AB CH₂O), 4.56-4.50 (m, 8H, CH₂N), 4.33-4.26 (m, 4H, 2H-6 Glu y 2H-6 Man), 4.17-4.07 (m, 6H, 2H-6 Glu, 2H-6 Man y 2H-5 Man), 3.88 (m, 8H, CH₂O), 3.58 (m, 8H, CH₂O), 3.50 (m, 8H, CH₂O), 3.36 (s, 8H, CH₂OC \equiv C), 2.15, 2.12, 2.09, 2.04, 2.03, 1.99, 1.97 (8s, 96H, CH₃COO).

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 170.1, 170.1, 169.9, 169.8, 169.6, 169.6, 169.4, 169.3 (COO), 143.8, 143.3 (C-4 triazol), 124.1, 123.9 (C-5 triazol), 99.9 (C-1 Glu), 96.8 (C-1 Man), 72.8 (C-3 Glu), 71.9 (C-5 Glu), 71.2 (C-2 Glu), 71.0 (CH₂O), 70.4 (CH₂O), 69.9 (CH₂pentaeritritol), 69.4 (C-2 Man), 69.3 (CH₂O), 69.1 (C-3 Man), 68.7 (C-5 Man), 68.4 (C-4 Glu), 66.1 (C-4 Man), 62.8 (CH₂O triazol), 62.4 (C-6

Man), 61.9 (C6 Glu), 60.1 (CH₂Otriazol), 50.3 (CH₂N), 45.4 (C_{quat}), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 (CH₃COO).

Compuesto 181.



Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 96%, espuma sólida.

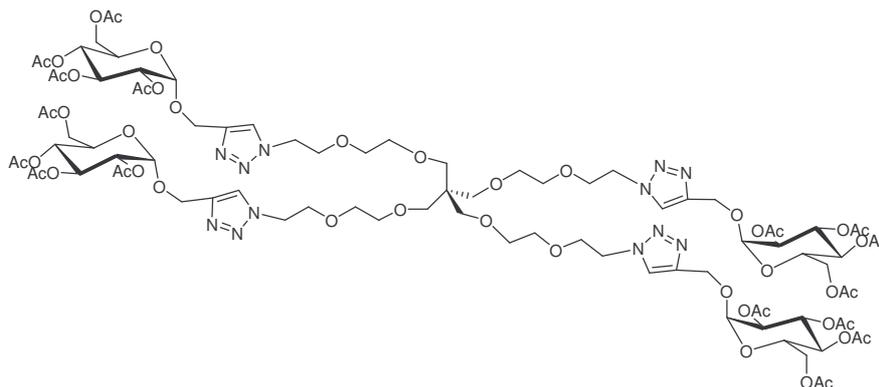
$[\alpha]_D +64^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1748, 1371, 1235, 1135, 1048 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.77, 7.73 (2 s, 4 H), 5.47 (t, 2 H, J = 9.8 Hz), 5.35-5.25 (m, 4 H), 5.23 (s, 2 H), 5.21 (d, 2 H, J = 3.9 Hz), 5.08 (t, 2 H, J = 9.8 Hz), 4.98 (d, 2 H, J = 0.7 Hz), 4.88 (dd, 2 H, J = 10.3 y 3.7 Hz), 4.83 (d, 4 H, J = 12.0 Hz), 4.68 (d, 4 H, J = 12.1 Hz), 4.54 (t, 8 H, J = 5.0 Hz), 4.31 (dd, 2 H, J = 12.3 y 5.0 Hz), 4.27 (dd, 2 H, J = 12.0 y 4.2 Hz), 4.18-4.07 (m, 8 H), 3.90 (t, 8 H, J = 5.1 Hz), 3.62-3.48 (m, 16 H), 3.37 (s, 8 H), 2.15, 2.12, 2.10, 2.04, 2.04, 2.02, 2.00, 1.98 (8 s, 48 H)

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 1143.4, 143.3, 124.1, 124.0, 96.8, 95.1, 70.9, 70.6, 70.3, 70.2, 70.0, 69.8, 69.4, 69.3, 69.0, 68.7, 68.4, 67.4, 66.0, 62.3, 61.7, 61.3, 60.8, 50.3, 45.4, 20.8, 20.7, 20., 20.6, 20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₈₉H₁₂₈O₄₈N₁₂Na: 2155.784; enc.: 2155.696.

Compuesto 182.

Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 78%, espuma sólida.

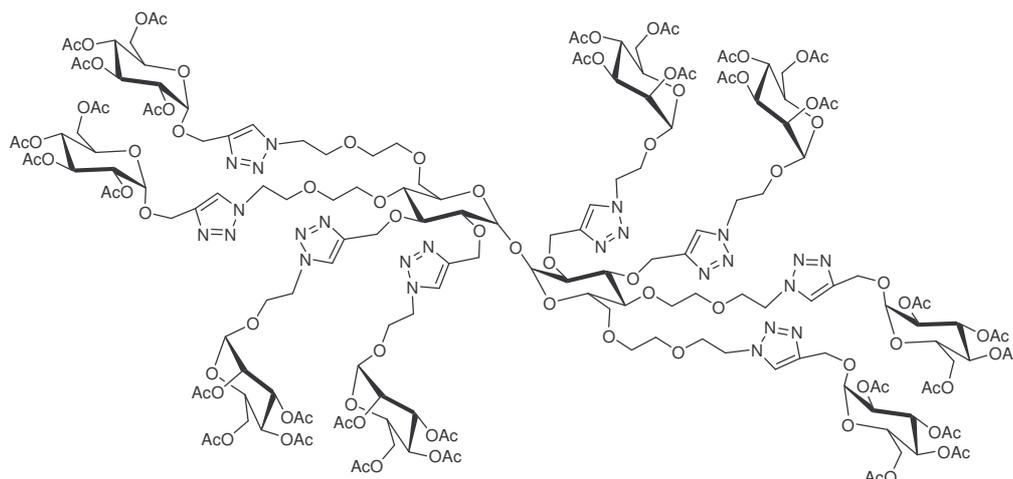
$[\alpha]_D^{+87^\circ}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1751, 1369, 1228, 1137, 1021 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.72 (s, 4 H,), 5.46 (t, 4 H, $J = 9.8$ Hz), 5.21 (d, 4 H, $J = 3.7$ Hz), 5.08 (t, 4 H, $J = 9.8$ Hz), 4.88 (dd, 4 H, $J = 10.3$ y 3.7 Hz), 4.83 (d, 4 H, $J = 11.8$ Hz), 4.68 (d, 4 H, $J = 11.8$ Hz), 4.54 (t, 8 H, $J = 5.0$ Hz), 4.26 (dd, 2 H, $J = 12.3$ y 4.0 Hz), 4.13-4.05 (m, 8 H), 3.90 (t, 8 H, $J = 5.0$ Hz), 3.61-3.48 (m, 16 H), 3.36 (s, 8 H), 2.10, 2.02, 2.00 (3 s, 48 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.7, 170.1, 169.6, 135.7, 95.2, 71.3, 71.1, 70.8, 70.5, 70.2, 70.0, 69.5, 68.6, 67.6, 61.9, 61.3, 50.7, 20.8, 20.7, 20.6.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{89}\text{H}_{128}\text{O}_{48}\text{N}_{12}\text{Na}$: 2155.784; enc.: 2155.895.

Compuesto 167.

Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 76%, espuma sólida.

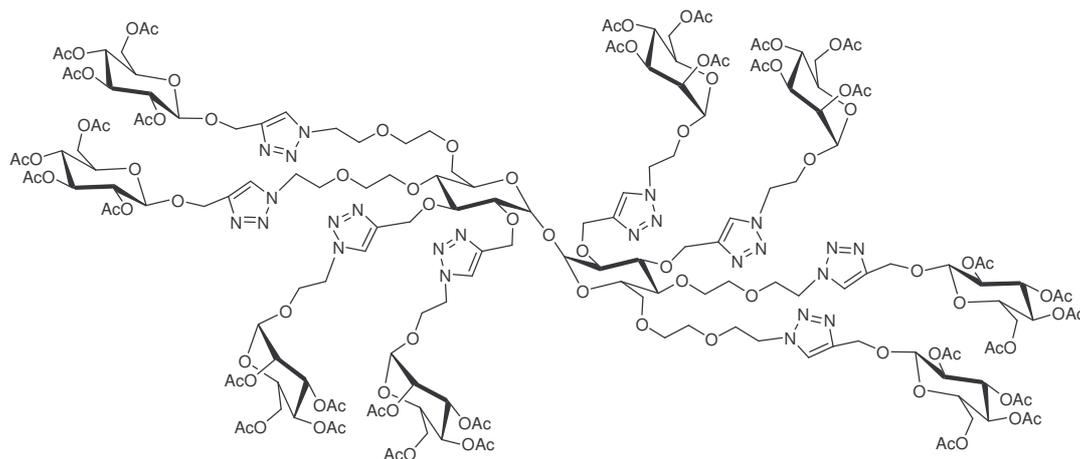
$[\alpha]_D^{+88}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1751, 1371, 1229, 1046 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.10, 7.88, 7.79, 7.63 (4 s, 4 H, H-5 triazol), 5.46, 5.44 (2 t, 2 H, $J = 9.8$ Hz, H-3 Glu), 5.3-5.15 (m, xxH), 5.08 (t, 2 H, $J = 9.8$ Hz, H-4 Glu), 5.00-4.57 (m, xx H), 4.85 (s, 2 H, H-1 Man), 4.52 (t, 2 H, $J = 5.0$ Hz, CH_2), 4.30-3.35 (m, xxH), 2.14, 2.13, 2.09, 2.04, 2.04, 2.02, 1.99, 1.98, 1.96 (varios s, 96 H, Ac)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.6, 170.5, 170.0, 169.9, 169.5 (COO), 145.1, 144.7, 143.3 (C-4 triazol), 124.6, 124.1, 123.9 (C-5 triazol), 97.6, 97.5 (C-1 Man), 95.1 (C-1Glu), 93.2 (C-1 Trehalosa), 80.7, 78.8, 77.9, 71.8, 71.1, 70.7, 70.5, 70.3, 70.0, 69.3, 69.1, 68.9, 68.8, 68.4, 67.4, 66.2, 65.7, 63.8, 62.1, 61.6, 61.2, 61.1, 60.3, 50.1, 49.5, 49.4 (CH_2N), 20.7, 20.6, 20.6 (CH_3CO).

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{172}\text{H}_{238}\text{O}_{95}\text{N}_{24}\text{Na}$: 4184.885; enc.: 4184.9.

Compuesto 168.

Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 86%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{+20}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 1751, 1371, 1228, 1139, 1089, 1046 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.09, 7.88, 7.75, 7.70 (4 s, 8 H), 2.14, 2.13, 2.10, 2.09, 2.08, 2.05, 2.04, 2.03, 1.99, 1.97, 1.96, 1.95 (varios s, 96 H, Ac)

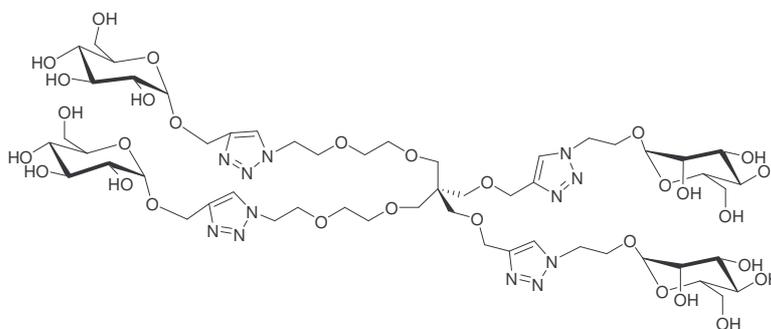
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.6, 170.1, 169.9, 169.6, 169.4, 169.3, 145.1, 144.7, 143.7, 143.7, 124.6, 124.2, 123.9, 99.8, 99.7, 97.5, 93.0, 80.5, 72.7, 71.8, 71.1, 70.7, 70.3, 69.2, 69.0, 68.9, 68.8, 68.3, 66.2, 65.7, 62.7, 62.1, 61.8, 50.2, 49.4, 20.7, 20.6, 20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{172}\text{H}_{238}\text{O}_{95}\text{N}_{24}\text{Na}$: 4184.885; enc.: 4184.2.

Procedimiento general de des-*O*-acetilación. Síntesis de los heteroneoglicocojugados hidroxilados 155, 156, 160, 164, 169, 170, 176, 177, 178, 183 y 184.

A una solución del correspondiente hetero-neoglicoconjugado per-*O*-acetilado 153, 154, 159, 163, 167, 168, 173, 174, 175, 181 o 182 (0.1 mmol) en MeOH anhidro (15 mL) se le añaden 100 μ L de MeONa/MeOH 1M y la mezcla de reacción se agita durante dos horas. Se neutraliza con unas gotas de AcOH, se concentra a vacío y el crudo obtenido se purifica mediante una columna cromatográfica. Finalmente el producto purificado se liofiliza.

Compuesto 155.



Purificación (MeOH).

Rendimiento 98%.

$[\alpha]_D + 3^\circ$; $[\alpha]_{436} + 9^\circ$ (c 0.5, MeOH).

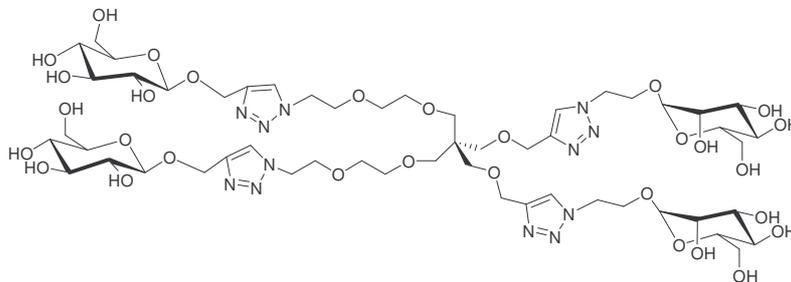
IR (KBr): 3390, 2919, 1651, 1479, 1057 cm^{-1}

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz, señales seleccionadas): δ 8.05, 7.99 (2 s, 4 H, H-5 triazol), 4.91 (d, 2 H, $J = 3.6$ Hz, H-1 Glu), 4.73 (s, 2 H, H-1 Man)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz): δ 146.2, 145.3, 126.1, 125.8, 101.6, 99.6, 75.1, 74.9, 74.0, 73.5, 72.5, 72.1, 71.9, 71.8, 71.4, 70.7, 70.4, 70.1, 68.4, 66.8, 65.3, 62.8, 62.7, 61.4, 51.5, 51.3, 46.6.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $C_{53}H_{88}O_{30}N_{12}Na$: 1395.56; enc.: 1395.55.

Compuesto 156.



Purificación (MeOH).

Rendimiento 92%.

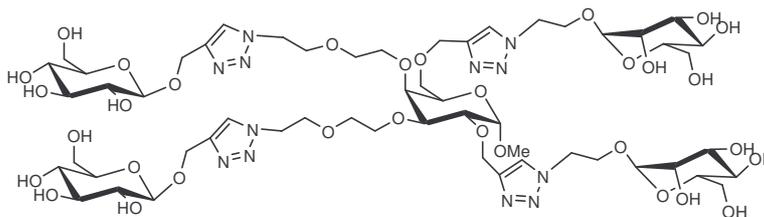
$[\alpha]_D + 64^\circ$ (c 1, MeOH).

IR (KBr): 3365, 2908, 1654, 1458, 1046 cm^{-1}

1H RMN (CD_3OD , 300 MHz, señales seleccionadas): δ 8.02, 7.98 (2 s, 4 H, H-5 triazol), 4.40 (d, 2 H, $J = 7.7$ Hz, H-1 Glu)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz): δ 146.2, 145.5, 126.1, 125.8, 103.6, 101.6, 78.0, 75.0, 74.9, 72.5, 72.1, 71.9, 71.6, 71.4, 70.4, 70.0, 68.4, 66.8, 65.3, 63.0, 62.8, 51.5, 51.2.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $C_{53}H_{88}O_{30}N_{12}Na$: 1395.56; enc.: 1395.58.

Compuesto 160.

Purificación (MeOH).

Rendimiento 92%.

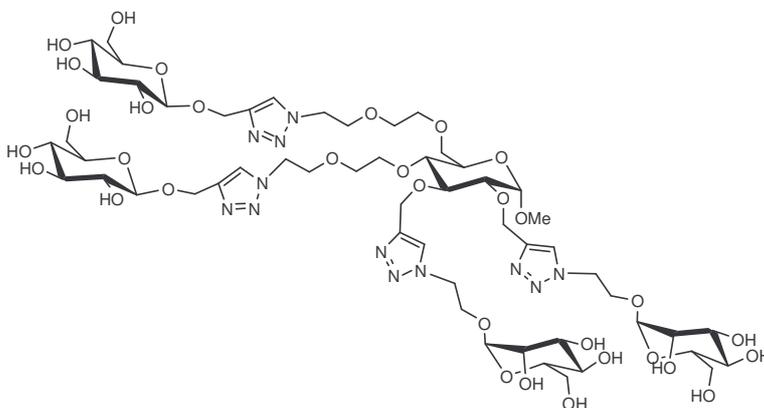
$[\alpha]_D + 10^\circ$ (c 0.25, agua)

IR (KBr) 3395, 2924, 1135, 1090, 1055 cm^{-1}

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 8.08, 8.04, 8.01, 7.97 (4 s, 4 H), 3.34 (s, 3 H)

^{13}C RMN (CD_3OD , 100MHz): δ 146.1, 145.8, 145.5, 145.5, 126.2, 126.1, 126.0, 126.0, 103.7, 103.6, 101.6, 99.7, 80.4, 78.0, 78.0, 77.2, 76.9, 75.0, 74.9, 73.2, 72.4, 72.0, 71.9, 71.8, 71.8, 71.6, 71.0, 60.4, 70.2, 70.2, 70.1, 68.4, 68.3, 66.7, 65.1, 65.0, 63.1, 63.0, 62.8, 55.7, 51.5, 51.2, 49.6

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{N}_{12}\text{O}_{32}\text{Na}$: 1453.568; enc.1453.67.

Compuesto 164.

Purificación (MeOH).

Rendimiento 89%.

$[\alpha]_D^{+9^\circ}$ (c 0.25, agua)

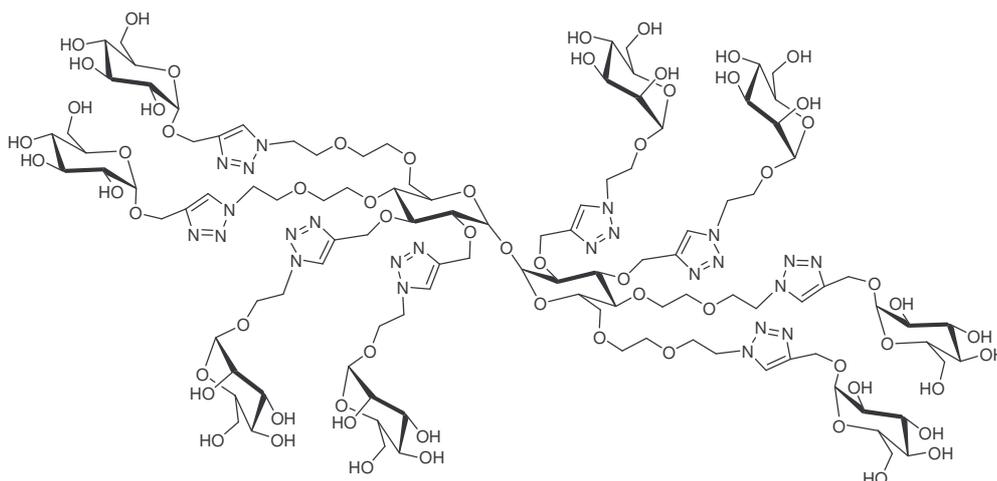
IR (KBr): 3400, 2924, 1135, 1055 cm^{-1}

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 8.10, 8.06, 8.03, 8.01 (4 s, 4 H)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz): δ 146.4, 145.9, 145.6, 126.2, 126.1, 126.0, 103.8, 103.6, 101.6, 99.0, 82.5, 80.7, 79.1, 78.0, 75.0, 74.9, 73.0, 72.5, 72.4, 71.8, 71.7, 71.5, 71.4, 70.3, 70.2, 68.4, 67.0, 66.8, 66.7, 64.8, 63.2, 63.1, 62.8, 55.7, 51.5, 51.2, 49.9.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{N}_{12}\text{O}_{32}\text{Na}$: 1453.568; enc.1453.6.

Compuesto 169.



Purificación ($\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, 2:1).

Rendimiento 86%.

$[\alpha]_D^{+76^\circ}$ (c 0.25, agua)

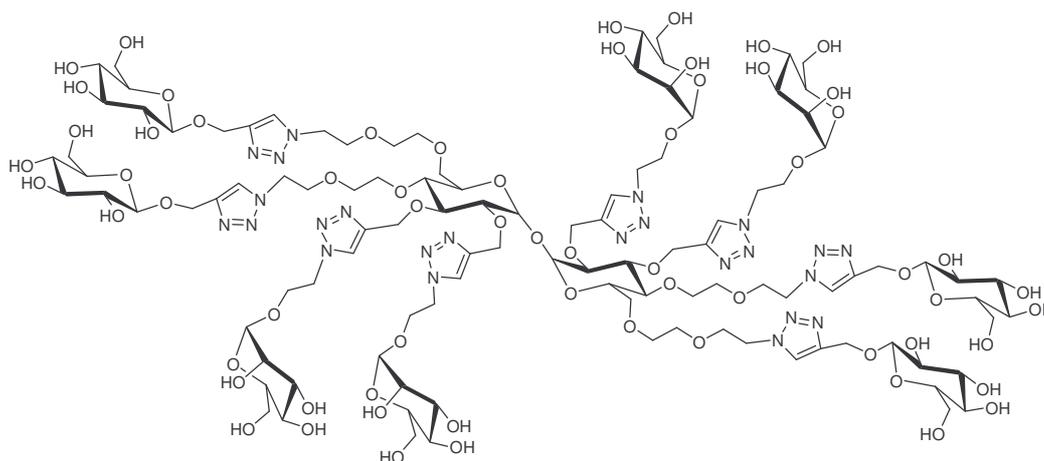
IR (film): 3406, 1104 cm^{-1}

^1H RMN (DMSO-d_6 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.09, 8.06, 8.04, 8.01 (4 s, 8 H)

^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz): δ 145.2, 144.8, 144.4, 125.4, 125.3, 1235.2, 100.3, 98.6, 93.0, 81.2, 79.0, 77.9, 77.2, 74.3, 73.9, 73.2, 72.4, 71.4, 70.7, 70.1, 69.2, 67.3, 66.1, 65.6, 61.7, 61.5, 60.5, 60.4, 50.4, 50.2.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{108}\text{H}_{174}\text{N}_{24}\text{O}_{63}\text{Na}$: 2838.104; enc.2838.0.

Compuesto 170.



Purificación ($\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$, 2:1).

Rendimiento 80%.

$[\alpha]_{\text{D}} +8.7^\circ$; $[\alpha]_{436} +15.3^\circ$ (c 0.25, agua)

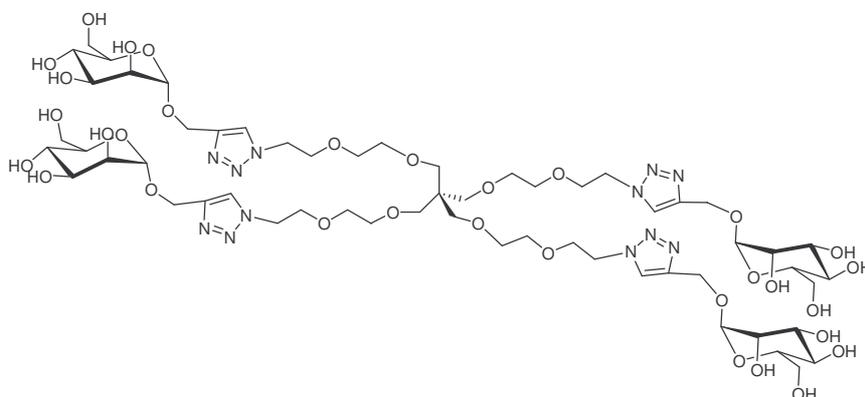
IR (film): 3384, 1103 cm^{-1}

^1H RMN (DMSO-d_6 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.10, 8.07, 8.06, 8.01 (4 s, 8 H)

^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz): δ 144.3, 143.9, 143.6, 124.5, 124.2, 124.0, 102.1, 99.8, 76.9, 76.7, 74.1, 74.0, 73.3, 70.8, 70.1, 70.0, 69.2, 68.6, 68.5, 66.8, 64.8, 63.2, 61.4, 61.1, 49.2.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $C_{108}H_{174}N_{24}O_{63}Na$: 2838.104; enc.2837.929.

Compuesto 176.



Purificación (MeOH).

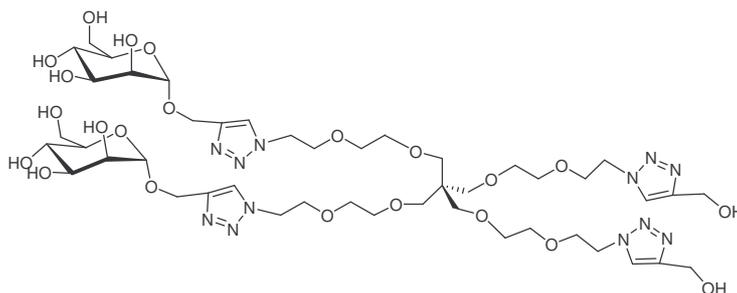
Rendimiento 93%.

$[\alpha]_D^{+37^\circ}$ (c 0.25, agua)

1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 8.04 (s, 4 H), 4.87 (s, 4 H), 4.79 (d, 4H, $J=12.4$ Hz), 4.64 (d, 4H, $J=12.4$ Hz), 4.57 (t, 8H, $J=5.0$ Hz), 3.89 (t, 8H, $J=5.0$ Hz), 3.85 (dd, 4H, $J=12.0$ y 2.3 Hz), 3.82-3.45 (varios m, 36H) 3.31 (s, 8H).

^{13}C NMR(CD_3OD , 75 MHz): δ 145.3, 126.1, 100.8, 74.9, 72.5, 72.0, 72.1, 71.4, 70.7, 70.3, 68.6, 62.9, 60.8, 51.5, 46.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $C_{57}H_{96}O_{32}N_{12}Na$: 1483.615; enc.: 1483.636.

Compuesto 177.

Purificación (MeOH).

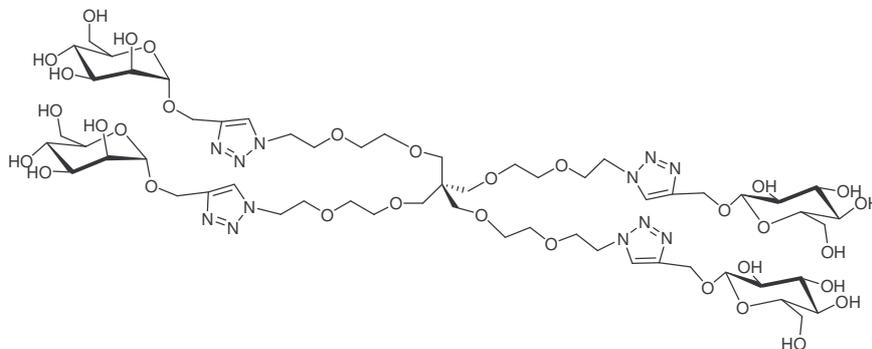
Rendimiento 92%.

$[\alpha]_D^{+29}$ (c 0.5, agua)

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 8.00 (s, 2 H), 7.90 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.75 (d, 2H, $J=12.4$ Hz), 4.63 (s, 4H), 4.60 (d, 2H, $J=12.4$ Hz), 4.53 (m, 8H), 3.90-3.40 (m, 36H), 3.27 (s, 8H).

^{13}C NMR(CD_3OD , 75 MHz): δ 148.9, 145.1, 125.9, 124.7, 100.8, 74.9, 72.5, 72.0, 71.4, 70.7, 70.4, 70.3, 68.6, 62.9, 60.7, 56.5, 51.5, 51.4, 46.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{O}_{22}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1159.509; enc.: 1159.522.

Compuesto 178.

Purificación (MeOH).

Rendimiento 80%.

$[\alpha]_D +12^\circ$ (c 0.5, agua)

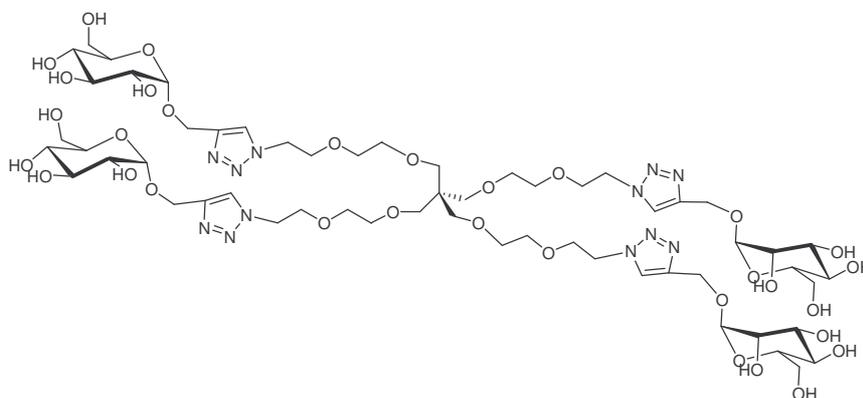
IR (film): 1656, 1355, 1229, 1075 cm^{-1}

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ 8.00 (s, 4 H), 4.93 (d, 2H, $J=12.4\text{Hz}$), 4.83 (d, 2H, $J=1.0$ Hz), 4.75 (d, 2H, $J=12.4\text{Hz}$), 4.73 (d, 2H, $J=12.4\text{Hz}$), 4.60 (d, 2H, $J=12.4\text{Hz}$), 4.53 (t, 4H, $J=4.8$ Hz), 4.37 (d, 2H, $J=7.7$ Hz), 3.90-3.15 (varios m, xx H)

^{13}C NMR(CD_3OD , 75 MHz): δ 145.4, 145.0, 126.1, 126.0, 103.5, 100.7, 77.9, 77.9, 74.9, 74.9, 72.4, 72.0, 71.9, 71.5, 71.3, 70.5, 70.3, 68.5, 63.0, 62.8, 62.7, 60.7, 51.5, 46.6.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{57}\text{H}_{96}\text{O}_{32}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1483.615; enc.: 1483.761.

Compuesto 183.



Purificación (MeOH).

Rendimiento 97%.

$[\alpha]_D +90^\circ$ (c 0.25, agua)

IR (film): 1748, 1371, 1235, 1135, 1048 cm^{-1}

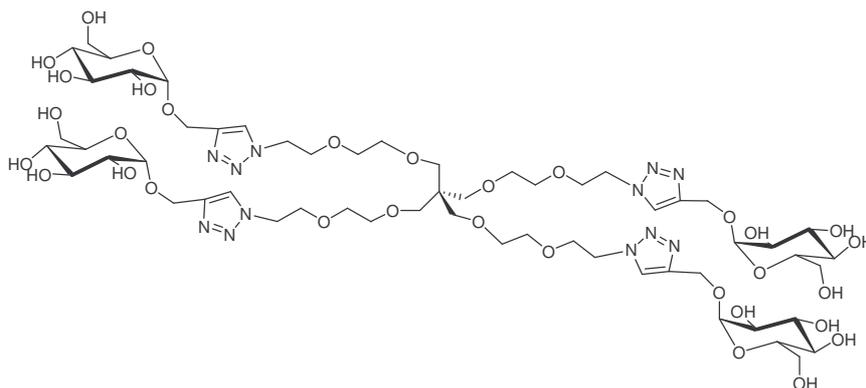
^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz): δ 8.06, 8.04 (2 s, 4 H.), 4.92 (d, 2 H, $J = 93.6$ Hz), 4.82 (d, 2 H, $J = 12.4$ Hz), 4.79 (d, 2 H, $J = 12.4$ Hz), 4.66 (d, 2 H, $J = 12.4$ Hz), 4.64

(d, 2 H, $J = 12.4$ Hz), 4.57 (br t, 2 H, $J = 4.5$ Hz), 3.89 (t, 8 H, $J = 5.1$ Hz), 3.85-3.45 (m, xx H), 3.42 (dd, 2 H, $J = 9.7$ y 3.7 Hz), 3.35-3.30 (m, xx H)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz): δ 145.3, 145.2, 126.1, 100.8, 99.6, 75.0, 74.9, 74.0, 73.5, 72.5, 72.1, 72.0, 71.8, 68.6, 62.9, 62.7, 61.5, 60.8, 51.5, 44.0.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{57}\text{H}_{96}\text{O}_{32}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1483.615; enc.: 1483.787.

Compuesto 184.



Purificación (MeOH).

Rendimiento 89%.

IR (film): 3407, 1655, 1460, 1230, 1044 cm^{-1}

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz): δ 8.04 (s, 4 H,), 4.91 (d, 4 H, $J = 3.7$ Hz), 4.81 (d, 4 H, $J = 12.4$ Hz), 4.66 (d, 4 H, $J = 12.4$ Hz), 4.56 (t, 8 H, $J = 5.0$ Hz), 3.89 (t, 4 H, $J = 5.1$ Hz), 3.79 (dd, 4 H, $J = 11.6$ y 2.0 Hz), 3.70-3.45 (m, xx H), 3.40 (dd, 4 H, $J = 9.8$ y 3.7 Hz), 3.37-3.25 (m, xx H)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz): δ 145.4, 126.0, 99.6, 75.0, 74.0, 73.5, 71.8, 72.1, 71.4, 70.7, 70.3, 62.7, 61.4, 51.5, 46.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{57}\text{H}_{96}\text{O}_{32}\text{N}_{12}\text{Na}$: 1483.615; enc.: 1483.766.

Capítulo II.

**Síntesis de sistemas de bis- β -
ciclodextrinas conteniendo azúcares
biorreconocibles mediante “click
chemistry”.**

Introducción.

En los últimos años la investigación en el transporte dirigido de fármacos se ha convertido en objeto de estudio de numerosos grupos científicos y en diferentes ámbitos de la ciencia. El objetivo es conseguir moléculas capaces de estabilizar un fármaco y a su vez con la capacidad de transportarlo a un determinado receptor mediante reconocimiento del algún vector incluido en dicha molécula. Dentro de la química de carbohidratos una de las posibilidades sería unir la capacidad de determinados glicoclusters para ser reconocidos por los receptores adecuados y la capacidad de las ciclodextrinas para ocluir, en el interior del cono truncado que forma su estructura, a otras moléculas orgánicas hidrofóbicas de tamaño adecuado, a las que solubilizan y estabilizan en agua. La baja inmunogenicidad de las ciclodextrinas al tratarse de derivados azucarados naturales y su biocompatibilidad las hacen en principio viables para este propósito.

Existen numerosos ejemplos en bibliografía de síntesis de glicoconjugados con ciclodextrinas, tanto monovalentes como multivalentes. Dentro de los monovalentes las estrategias más usadas se pueden clasificar en: desplazamiento nucleofílico de 6'-desoxi-6'-O-para-toluensulfonil- β -ciclodextrina o 6'-desoxi-6'-yodo- β -ciclodextrina mediante tiolatos¹²¹, reacción de amidación entre 6'-amino-6'-desoxi- β -ciclodextrina y diferentes azúcares funcionalizados con ácidos carboxílicos¹²², formación de

¹²¹a) J. Defaye, A. Gadelle, A. Guiller, R. Darcy, T. O'Sullivan, *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 251-258.

b) V. Laine A. Coste-Sarguet, A. Gadelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.

c) H. Driguez, S. Cottaz, *Synthesis* **1989**, 755-758

d) H. Driguez, C. Lancelon-Pin, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3125-3128.

e) N. Yasuda, N. Aoki, H. Abe, K. Hattori, *Chem. Lett.* **2000**, 706-707.

¹²²a) H. Parrot-Lopez, H. Galons, A. W. Coleman, J. Mahuteau, M. Miocque, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 209-212

b) H. Parrot-Lopez, E. Leray, A. W. Coleman, *Supramol. Chem.* **1993**, 3, 37-42;

c) R. Kasab, C. Félix, H. Parrot-Lopez, R. Bonaly, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7555-7558.

d) H. Imata, K. Kubota, K. Hattori, M. Aoyagi, C. Jindoh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 109-112.

puentes tiourea a partir de 6'-desoxi-6'-isotiocianato- β -ciclodextrina¹²³ o a partir de 6'-amino-6'-desoxi- β -ciclodextrina¹²⁴ y por último mediante “click chemistry” haciendo reaccionar 6'-azido-6'-desoxi- β -ciclodextrina con *O*-propargilglicóxidos¹²⁵. La necesidad de multivalencia en los glicoconjugados ha llevado a la síntesis de un gran número de ellos utilizando entre otros andamios β -ciclodextrina. Para ello son necesarias reacciones muy eficaces para evitar reacciones de sustituciones parciales que darían lugar a productos cuya separación sería muy complicada. Las metodologías sintéticas utilizadas son básicamente las mismas que para los derivados monovalentes: desplazamiento con tioles de buenos grupos salientes¹²⁶, reacción de amidación¹²⁷, desplazamiento nucleofílico usando sales de isotiouronio como nucleófilos frente a heptakis(6-cloroacetamido-6-desoxi)- β -ciclodextrina¹²⁸,

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

f) K. Matsuda, T. Inazu, K. Haneda, M. Mizuno, T. Yamanoi, K. Hattori, K. Yamamoto, H. Kumagai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2353-2356.

¹²³a) J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, S. Maciejewski, J. Defaye, *Chem. Commun.* **1996**, 2741-2742.

b) W. Haque, J. Diakur, *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, 20, 17-29.

¹²⁴a) C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, H. Law, K. Chmurski, J. Defaye, M. L. O'Sullivan, H. N. Caro, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2523-2531;

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

¹²⁵ Referencia 21.

¹²⁶a) V. Laine A. Coste-Sarguet, A. Gabelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.

b) H. Driguez, C. Lancelon-Pin, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3125-3128.

c) L. De Robertis, C. Lancelon-Pin, H. Driguez, F. Attioni, R. Bonaly, A. Marsura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1127-1130.

d) T. Furuike, S. Aiba, *Chem. Lett.* **1999**, 69-70;

e) T. Furuike, S. Aiba, S.-I. Nishimura, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9909-9915;

f) A. García-Barrientos, J. J. García-López, J. Isac-García, F. Ortega-Caballero, C. Uriel, A. Vargas-Berenguel, F. Santoyo-González, *Synthesis* **2001**, 1057-1064.

¹²⁷a) R. Kasab, C. Félix, H. Parrot-Lopez, R. Bonaly, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7555-7558.

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

c) M. Ichikawa, A. S. Woods, H. Mo, I. J. Golstein, Y. Ichikawa, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 389-392.

¹²⁸a) J. J. García-López, F. Hernández-Mateo, J. Isac-García, J. M. Kim, R. Roy, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 522-531;

formación de puentes tiourea¹²⁹, cicloadición 1,3-dipolar de alquinos con óxidos de nitrilo¹³⁰ o azidas¹³¹, adición fotoquímica de tioles sobre per(6-*O*-alil-2,3-di-*O*-metil)- β -ciclodextrina¹³².

A pesar del gran número de productos sintetizados no existen demasiados datos en bibliografía entorno a los complejos de inclusión que forman estos derivados de β -ciclodextrina¹³³. En los derivados monosustituídos, la estabilidad de los complejos de inclusión de los neoglicoconjugados de β -ciclodextrina comparada con la de los complejos con β -ciclodextrina dependen del mecanismo de inclusión: para moléculas huésped que penetran en el cono de la ciclodextrina por la cara primaria el impedimento estérico ocasionado por la presencia del azúcar conduce a una disminución de la constante de asociación y en cambio no se modifica significativamente en el caso de que la entrada sea por la cara secundaria. En el caso de las ciclodextrinas persustituídas se modifica significativamente la estabilidad del complejo final, disminuyéndola si los hidroxilos primarios estaban implicados en la interacción con el huésped o aumentando si los sustituyentes interaccionan favorablemente con el huésped¹³⁴.

Con los datos expuestos se puede concluir que los derivados de ciclodextrinas ideales para su uso en transporte dirigidos de fármacos han de combinar las ventajas de la monosustitución de ciclodextrinas, en lo referente a la eficiencia de su capacidad de inclusión, y las ventajas de la multivalencia por la necesidad de

b) J. J. García-López, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, J. J. Giménez Martínez, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1775-1784;

c) R. Roy, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8743-8746.

¹²⁹ Referencia 124.

¹³⁰ Referencia 113(e).

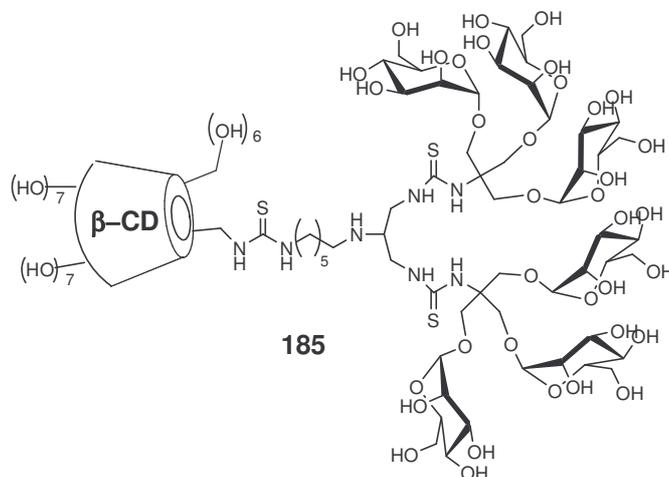
¹³¹ Referencia 21.

¹³² D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1113-1116.

¹³³ V. Laine A. Coste-Sarguet, A. Gabelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.

¹³⁴ J. M. Benito, *Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla*, **2001**.

reconocimiento biológicos de alta eficiencia¹³⁵. Con este objetivo, García-Fernández y colaboradores¹³⁶ sintetizaron neoglicoconjugados multivalentes a partir de β -ciclodextrina monosustituida (estructura 185) utilizando una estrategia modular para la síntesis de los dendrones adecuados mediante la formación de puentes tiourea.



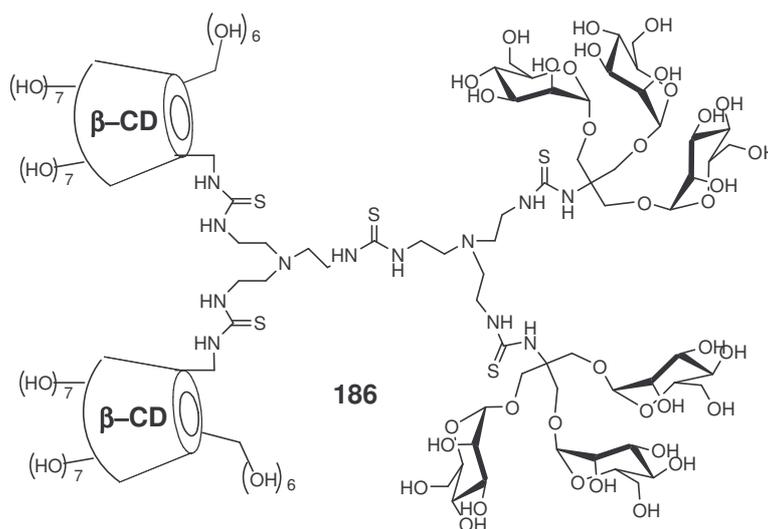
Estructura 185.

Dichos productos tienen grandes afinidades por ConA que fueron evaluadas mediante ensayos ELLA y además tienen la capacidad de incrementar la solubilidad de algunas moléculas como el anticancerígeno docetaxel (Taxotère). A raíz de estos resultados los autores propusieron sistemas diméricos de ciclodextrinas multivalentes que puedan formar complejos tipo sándwich, cuya síntesis fue publicada durante el transcurso de la presente Tesis por Defaye, Ortiz Mellet y García Fernández¹³⁷(estructura 186).

¹³⁵ C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1983-1990.

¹³⁶ I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, H. Law, J. Defaye, *Chem. Commun.* **2000**, 1489-1490.

¹³⁷ J. M. Benito, M. Gómez García, I. Baussanne, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355-10363.



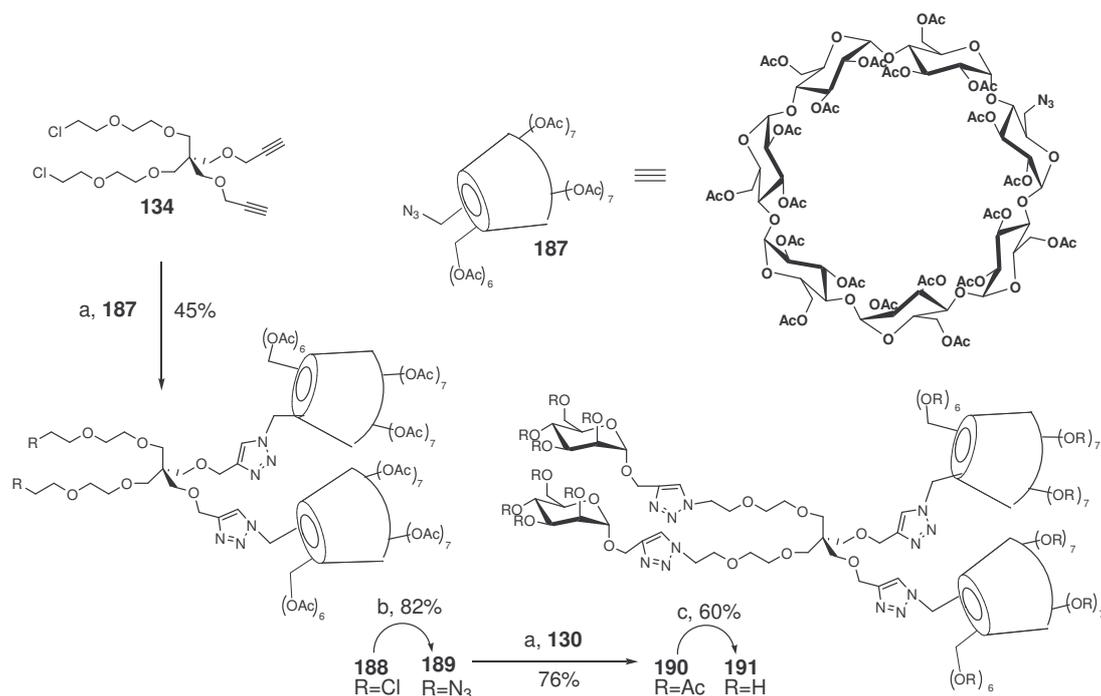
Estructura 186.

Estos glicoconjugados de dímeros de ciclodextrinas incrementan muy notablemente la solubilidad de docetaxel en agua (37,5 veces) con respecto al derivado monomérico debido a la formación de complejos tipo sándwich con este compuesto, mientras que se mantiene una gran afinidad por la lectina ConA, similar a la de su homólogo monomérico. Además se demuestra su potencial como transportador dirigido de fármacos formando complejos con ácido 6-p-toluidino-2-naftalensulfónico en ensayos *in vitro* con macrófagos cuyos receptores de manosa/fucosa reconocen a los complejos, con lo que se pone de manifiesto la viabilidad de este tipo de compuestos bioreconocibles en el transporte dirigido de fármacos a superficies biológicas con receptores específicos de azúcares.

Resultados y discusión.

Utilizando “click chemistry”, nos propusimos la síntesis de sistemas de bis- β -ciclodextrinas que contuvieran azúcares bioreconocibles usando como andamios pentaeritritol o diferentes azúcares.

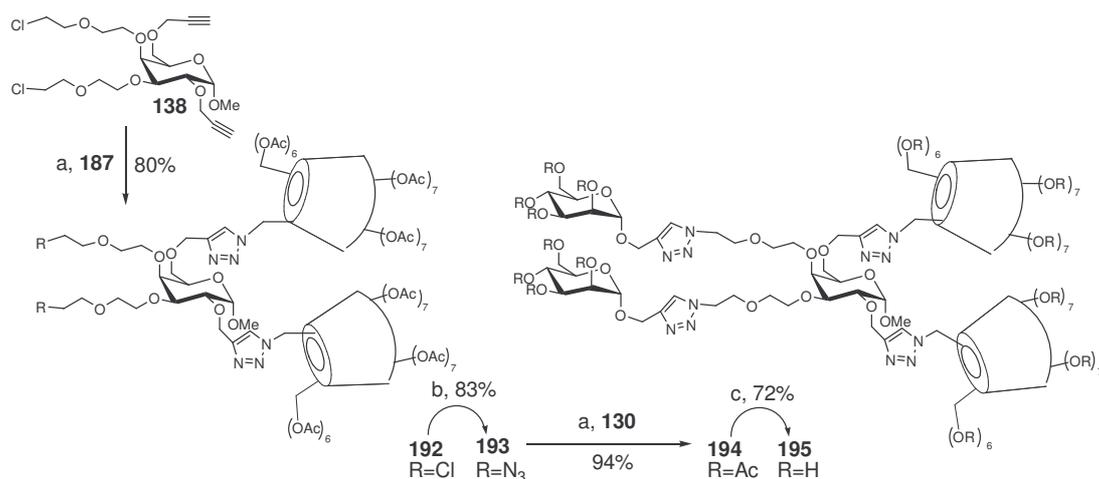
Se comenzó por la unión de dos mono-6-azido-6-desoxi- β -ciclodextrinas **187**¹³⁸ sobre el andamio derivado de pentaeritritol **134** mediante cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ en tolueno a reflujo para dar el compuesto **188** con un rendimiento del 45%. La sustitución nucleofílica de cloro por azida condujo al diazido derivado **189** con un 82% de rendimiento, el cual se hizo reaccionar con propargil- α -D-manóximo **130** rindiendo el compuesto per-*O*-acetilado **190** que posee dos unidades de β -ciclodextrina y dos restos de D-manosa. La des-*O*-acetilación de **190** en condiciones de Zemplen lleva al derivado hidroxilado **191** (esquema 38).



Esquema 38 a $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, tolueno, reflujo; b N_3Na , Bu_4NI , DMF, 75 °C ; c MeONa/MeOH .

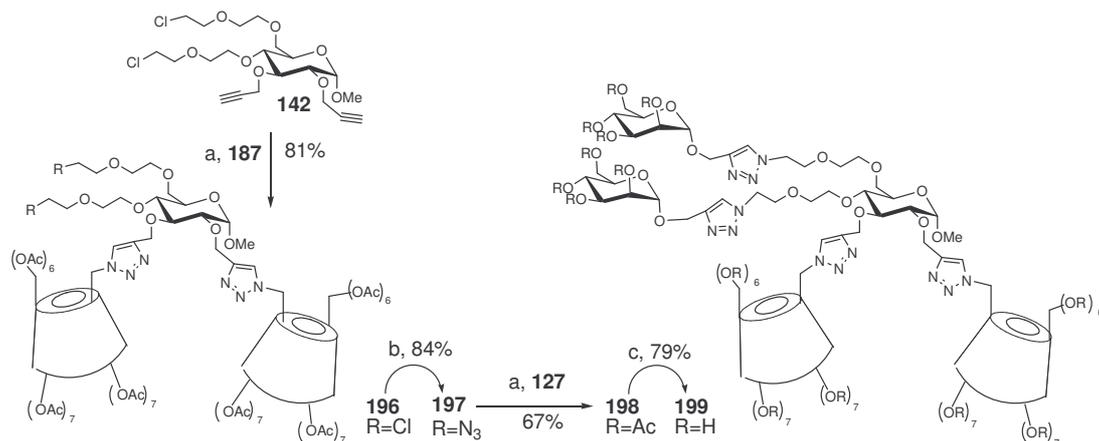
¹³⁸ Cazier-Dennin F., Woisel P., Surpateanu G., FR 2873120, 2004 [Chem. Abstr. 2006, 144, 88512].

Del mismo modo, la reacción del derivado de metil α -D-galactopiranosido **138** con 6-desoxi-6-azido- β -ciclodextrina **187** conduce al compuesto **192** con un rendimiento del 80%. La posterior sustitución nucleofílica de cloro por azida da como resultado el derivado **193**, que por reacción con propargil- α -D-manóxido **130** permite obtener el derivado **194** con buenos rendimientos. La des-*O*-acetilación de **194** en condiciones de Zemplen permitió obtener el producto hidroxilado **195** (esquema 39).



Esquema 39 a (EtO)₃P·CuI, tolueno, reflujo; b N₃Na, Bu₄NI, DMF, 75 °C ; c MeONa/MeOH.

Cuando la misma metodología sintética se aplicó al metil 2,3-di-*O*-propargil derivado **142** se obtuvo con un rendimiento global del 36% en las cuatro etapas, el derivado **199** que posee dos restos de β -ciclodextrina en posiciones 2,3 y dos restos de D-manosa en las posiciones 4,6 del anillo de D-glucosa (esquema 40).



Estudios de afinidad de los glicoconjugados 191, 195 y 199 con Concanavalina A.

Se estudiaron las afinidades de los compuestos hidroxilados con la lectina *Concanavalina A* marcada con peroxidasa de rábano picante (ConA-HRP) mediante la técnica de ELLA.

Los resultados de IC₅₀, afinidad relativa y potencia relativa por unidad de D-manosa se muestran en la tabla 6 y las figuras 4 y 5 y ponen de manifiesto que los tres compuestos ensayados **191**, **195** y **199** presentan una buena afinidad por la ConA.

Producto	IC ₅₀ /mM	Afinidad relativa	Potencia relativa por manosa
Me-Man	0,90	1	1
191	0,194	4,64	2,32
195	0,159	5,66	2,83
199	0,174	5,17	2,58

Tabla 6. Valores de IC₅₀, afinidad relativa y potencias relativas en las pruebas ELLA.

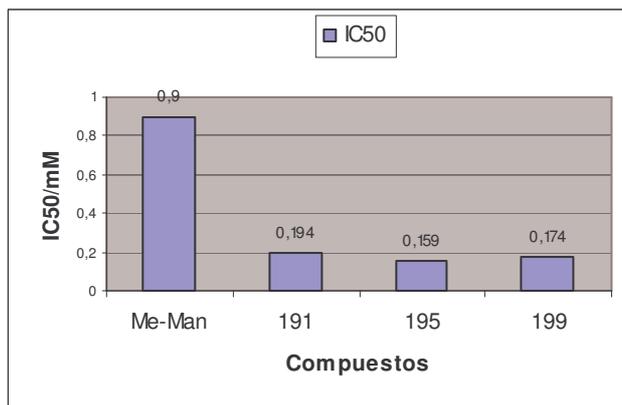


Figura 4. Valores de IC₅₀ en las pruebas ELLA.

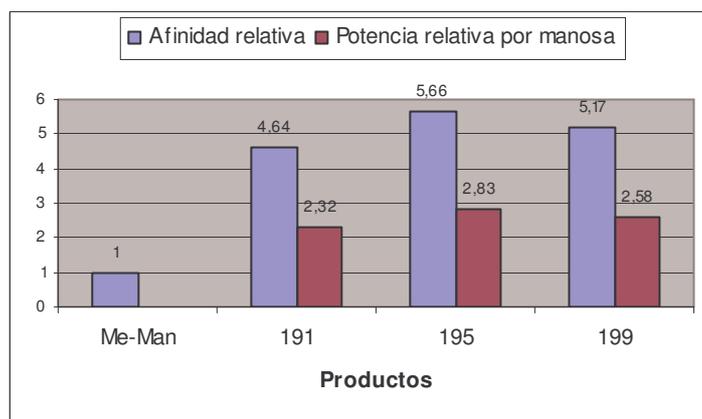


Figura 5. Valores de afinidad relativa respecto a Me-Man y potencia relativa por unidad de manosa.

Conclusiones.

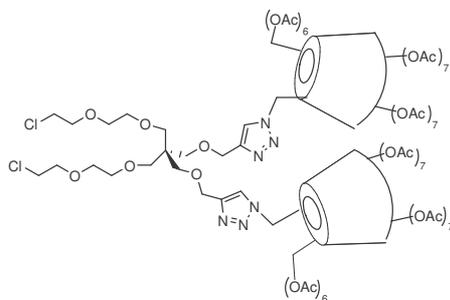
Se ha desarrollado una metodología sencilla para la síntesis de sistemas de bis- β -ciclodextrinas que contengan azúcares biorreconocibles mediante “click chemistry” sobre andamios azucarados y pentaeritritol. Dichos sistemas manifiestan buenas afinidades por ConA en ensayos ELLA cuando el azúcar biorreconocible es manosa, lo que hace que estos compuestos puedan proponerse como posibles transportadores dirigidos de fármacos.

Parte experimental.

Procedimiento general para la síntesis de las bis- β -ciclodextrinas 188, 192 y 196.

Una disolución de los alquino-derivados **134**, **138** o **142** (0.1 mmol), de mono-6-azido-6-desoxi- β -ciclodextrina **187** (1.1 equiv.) y el catalizador de cobre (EtO)₃P-CuI (0.1 equiv.) en tolueno 7 mL se calienta a reflujo durante 1 hora (mediante cromatografía de placa fina se observa la desaparición total del alquino de partida). La mezcla se evapora y se purifica mediante una pequeña cromatografía de columna.

Compuesto 188.



Purificación (AcOEt-MeOH 15:1).

Rendimiento 45%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{+102^\circ}$ (c 1, cloroformo)

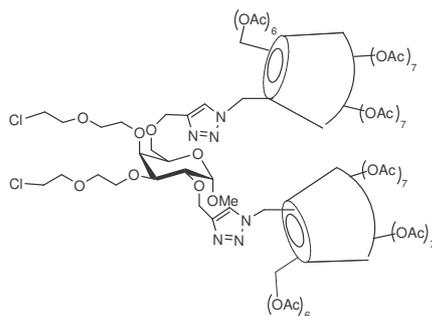
IR (film): 2960, 1751, 1372, 1238, 1044 cm^{-1}

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.62 (s), 5.71 (d, J = 3.6 Hz)

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 170.9-169.4, 145.1, 125.5, 97.2, 96.7, 96.5, 71.7, 71.3, 71.0, 70.4, 70.1, 69.9, 69.7, 62.7, 62.3, 49.2, 49.1, 45.6, 43.0, 20.8, 20.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₁₈₃H₂₄₈O₁₁₄N₆Cl₂Na: 4449.8; enc.: 4449.7.

Compuesto 192.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 80%, espuma sólida.

$[\alpha]_D^{+104^\circ}$ (c 1, cloroformo)

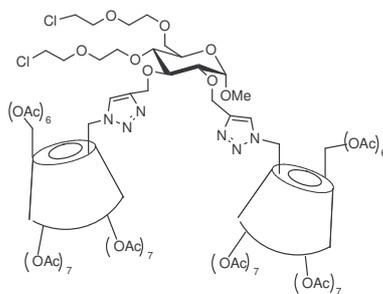
IR (film): 2929, 1747, 1372, 1237, 1046 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.67 (s), 7.64 (s), 5.68(m)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.9-169.4, 145.0, 144.6, 125.9, 125.8, 98.6, 97.2-96.5, 77.5, 77.1-76.0, 72.6, 71.5-69.9, 65.0, 64.8, 62.7-62.4, 55.4, 49.2, 43.2, 43.1, 29.8, 20.8-20.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{185}\text{H}_{250}\text{O}_{116}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 4507.9; enc.: 4508.0

Compuesto 196.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 81%, espuma sólida.

$[\alpha]_D +78^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2957, 1751, 1372, 1238, 1042 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.73 (s)

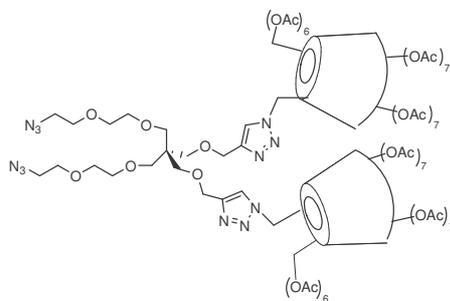
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.8-169.4, 145.0, 144.6, 126.2, 126.0, 98.1, 97.3-96.5, 81.6, 80.0, 77.9, 76.8, 76.1, 72.2, 71.8, 71.4, 71.2, 71.1, 71.0, 70.8, 70.6, 70.4, 70.2, 69.8, 69.4, 66.2, 64.9, 62.9-62.4, 60.4, 55.1, 49.2, 43.0, 42.9, 21.0-20.8.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{185}\text{H}_{250}\text{O}_{116}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Na}$: 4507.9; enc.: 4508.2

Procedimiento general para la síntesis de los derivados diazido **189**, **193** y **197**.

A una solución que contiene el correspondiente dicloro derivado **188**, **192** o **196** (0.07 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (0.1 equiv.) en DMF 10 mL, se añade NaN_3 (5 equiv.) y se calienta a 80°C bajo agitación magnética durante 20 horas. Se diluye con cloruro de metileno (70 mL) y se lava con agua (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca y evapora, el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna.

Compuesto **189**.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 82%, espuma sólida.

$[\alpha]_D +105^\circ$ (c 1, cloroformo)

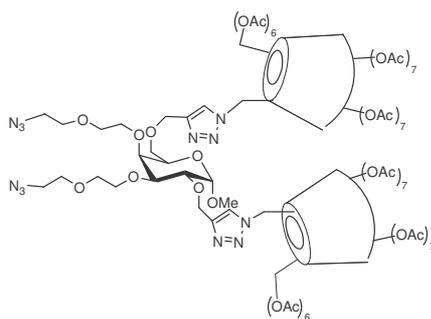
IR (film): 2930, 2105, 1744, 1368, 1233, 1041 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.60 (s), 5.71 (d, $J=3.7\text{Hz}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.8-169.4, 145.5, 125.5, 97.2-96.4, 75.9, 71.9-69.6, 65.2, 62.7-62.3, 60.4, 53.5, 45.7, 21.0-20.8.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{183}\text{H}_{248}\text{O}_{114}\text{N}_{12}\text{Na}$: 4462.9; enc.: 4462.3.

Compuesto 193.



Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 83%, espuma sólida.

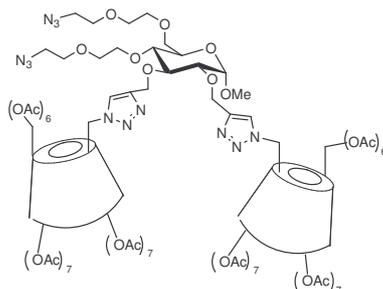
$[\alpha]_D +101^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2935, 2109, 1747, 1372, 1237, 1046 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.68 (s), 7.65 (s), 5.69 (d, $J=3.7\text{Hz}$), 5.68 (d, $J=3.7\text{Hz}$)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.7-169.3, 144.8, 144.4, 125.7, 125.6, 98.5, 97.0-96.4, 79.5, 77.5-76.1, 72.4, 71.5-69.3, 65.0, 64.6, 62.6-62.2, 55.2, 50.7, 49.0, 20.7-20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{185}\text{H}_{250}\text{O}_{116}\text{N}_{12}\text{Na}$: 4521.0; enc.: 4521.5.

Compuesto 197.

Purificación (AcOEt-MeOH 20:1).

Rendimiento 84%, espuma sólida.

$[\alpha]_D +108^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2939, 2111, 1752, 1372, 1239, 1045 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.73 (s), 7.72 (s)

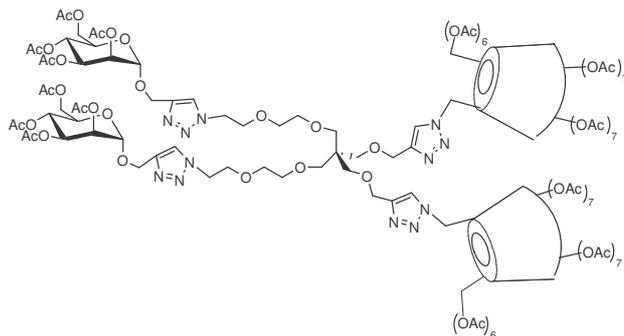
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.7-169.3, 144.7, 144.2, 126.1, 125.8, 98.1, 97.1-96.3, 81.3, 79.8, 77.7, 76.6, 76.5, 75.9, 75.8, 72.1, 71.7, 71.6, 71.2, 70.9, 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.1, 70.0, 69.9, 69.7, 69.6, 69.5, 69.3, 69.2, 66.1, 64.7, 62.7, 62.5, 62.4, 62.2, 54.9, 50.6, 49.0, 20.7-20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{185}\text{H}_{250}\text{O}_{116}\text{N}_{12}\text{Na}$: 4521.0; enc.: 4520.2

Procedimiento general para la síntesis de los sistemas de bis- β -ciclodextrinas conteniendo D-manosas 190, 194 y 198.

Una solución de los diazido derivados **189**, **193** o **197** (0.5 mmol), el derivado propargilado de manosa **130** (1.1 equiv.) y el catalizador de cobre $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 equiv.) en tolueno 6 mL se calienta a reflujo durante 25 min., y la cromatografía en capa fina muestra la desaparición total del producto de partida. La mezcla de reacción se evapora y el crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía en columna.

Compuesto 190.



Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 76%, espuma sólida.

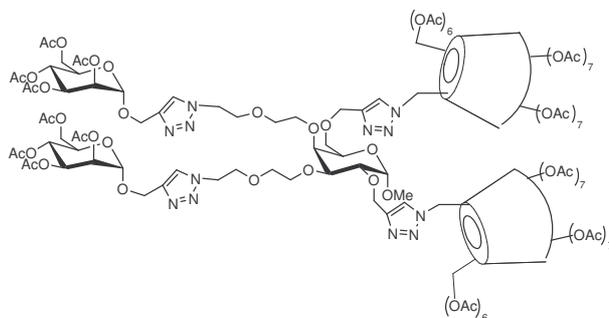
$[\alpha]_D^{+91}$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2960, 1749, 1372, 1237, 1047 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.76 (s), 7.61 (s), 5.69(bs)

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{217}\text{H}_{292}\text{O}_{134}\text{N}_{12}\text{Na}$: 5235.7; enc.: 5235.9

Compuesto 194.



Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 94%, espuma sólida.

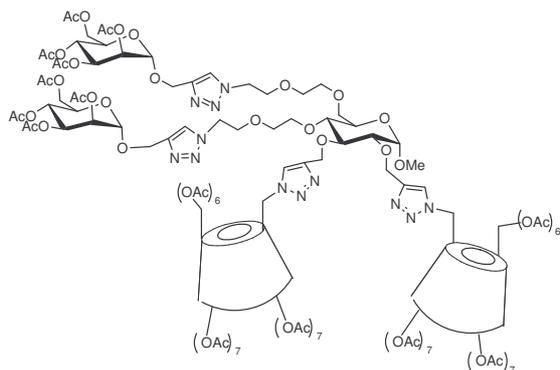
$[\alpha]_D +100^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2958, 1747, 1372, 1237, 1047 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.82 (s), 7.78 (s), 7.64 (s), 5.67(bs)

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{219}\text{H}_{294}\text{O}_{136}\text{N}_{12}\text{Na}$: 5293.7; enc.: 5293.6

Compuesto 198.



Purificación (AcOEt-MeOH 10:1).

Rendimiento 67%, espuma sólida.

$[\alpha]_D +92^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (film): 2930, 2105, 1744, 1368, 1233, 1041 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 7.79, 7.75, 7.74, 7.73 (4s)

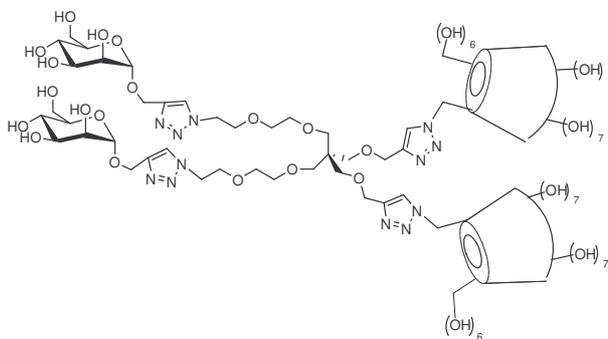
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.8-169.4, 144.5, 144.4, 143.3, 143.2, 126.2, 126.0, 124.2, 124.1, 98.0, 97.1-96.4, 81.2, 80.1, 75.9, 71.0-68.6, 66.0, 65.9, 62.6, 62.3, 60.8, 55.0, 50.3, 50.2, 49.1, 21.0-20.6.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{219}\text{H}_{294}\text{O}_{136}\text{N}_{12}\text{Na}$: 5293.7; enc.: 5293.4

Procedimiento general de des-*O*-acetilación. Síntesis de los derivados hidroxilados 191, 195 y 199.

A una solución del correspondiente neoglicoconjugado per-*O*-acetilado **190**, **194** o **198** (0.02 mmol) en MeOH anhidro (15 mL) se le añaden 200 μ L de MeONa/MeOH 1M y la mezcla de reacción se agita durante 1 día, se añade agua para disolver el sólido formado, se neutraliza con resina Dowex 550, se filtra, se lava con metanol y tras evaporar a vacío se liofiliza.

Compuesto 191.



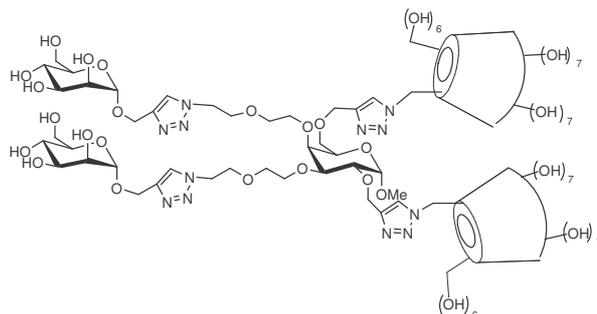
Rendimiento: 60%

IR (KBr): 3386, 2926, 1655, 1079, 1031 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 8.03.

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 143.9, 143.4, 124.4, 101.9, 99.0, 74.1, 73.0, 72.3, 72.0, 66.9, 61.2-59.0.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{121}\text{H}_{196}\text{N}_{12}\text{O}_{86}\text{Na}$ 3216.12; Enc.: 3215.92.

Compuesto 195.

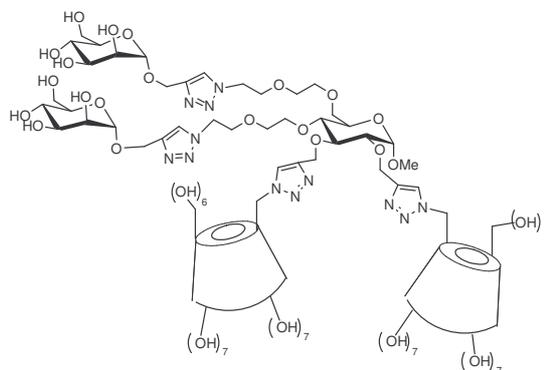
Rendimiento: 72%

IR (KBr): 3380, 2933, 1655, 1077, 1033 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 8.05, 8.00 (2s).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 143.6, 143.3, 124.4, 124.3, 101.9, 99.0, 81.9-81.2, 74.0-68.4, 67.0, 61.2, 59.9, 59.0, 54.4, 49.3, 48.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{123}\text{H}_{198}\text{N}_{12}\text{O}_{88}\text{Na}$ 3273.34; Enc.: 3273.33.

Compuesto 199.

Rendimiento: 79%

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 8.03 (bs)

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 144.4, 143.9, 143.4, 142.9, 124.3, 101.9, 99.0, 81.5, 74.0-68.6, 67.0, 54.3, 49.3, 48.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{123}\text{H}_{198}\text{N}_{12}\text{O}_{88}\text{Na}$ 3273.34; Enc.: 3273.65.

Capítulo III.

Síntesis de glicopolímeros mediante “click chemistry”. Aplicaciones.

Introducción.

El término glicopolímero ha sido usado en bibliografía habitualmente en un sentido amplio e incluye a los polímeros que contienen azúcares tanto naturales como sintéticos así como a los polímeros basados en azúcares modificados sintéticamente. Existen autores que los definen como polímeros sintéticos, incluyendo no sólo los lineales sino también los ramificados y los dendrímeros, funcionalizados con unidades de azúcares independientemente de si muestran o no funciones biológicas¹³⁹.

En muchos casos, la unidad terminal azucarada de las cadenas oligosacáridas de los glicoconjugados naturales juega un papel decisivo en el proceso de reconocimiento molecular en el que éstos participan. Por tanto desde el punto de vista de la investigación de polímeros es importante el desarrollo de métodos sintéticos sencillos y eficientes en los que se incorporen a polímeros las unidades de azúcar necesarias para poseer el reconocimiento molecular deseado sin afectar a las propiedades inherentes de los polímeros.

Las metodologías para la síntesis de glicopolímeros se pueden clasificar en dos grandes categorías: 1) la polimerización de monómeros que contienen azúcares y 2) la modificación química de polímeros previamente formados con azúcares adecuadamente funcionalizados. Por lo general esta última metodología es más adecuada y simple dado que la síntesis de monómeros con azúcares normalmente resulta más tediosa. Pese a ello, ha sido mucho más utilizada la polimerización de monómeros debido a que los impedimentos estéricos en las modificaciones de polímeros no permiten habitualmente la obtención de estructuras regulares.

Las metodologías más usuales en la **síntesis de glicopolímeros mediante polimerización de monómeros** que contienen azúcares son:

¹³⁹ M. Okada; *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, 26, 67-104.

• *Polimerización radicalaria*. Es una técnica sintética que posee como cualidad inherente su gran robustez, principalmente porque no precisa de monómeros y disolventes de alta pureza y además tolera un amplio rango de condiciones sintéticas y de funcionalizaciones en los monómeros. El primer glicopolímero sintetizado fue publicado por Horejsi y colaboradores¹⁴⁰ en 1978, a partir de ahí el número de glicopolímeros sintetizados utilizando esta estrategia es muy grande. Son destacables las aportaciones de Kobayashi y colaboradores¹⁴¹ que sintetizaron homopoliestirenos mediante polimerización radicalaria de los monómeros azucarados adecuados, obtenidos de la oxidación del extremo reductor de los azúcares hasta aldehído para posteriormente hacerlo reaccionar con *p*-vinilbencilamina. Estos autores demostraron la capacidad de los glicopolímeros para ser reconocidos por lectinas y hepatocitos dependiendo del azúcar que contuviese el monómero polimerizado. Existen numerosos artículos que utilizan esta estrategia de síntesis de glicopolímeros variando el azúcar que contiene el monómero, la estrategia de unión del azúcar al resto vinílico, el iniciador de radicales o las condiciones de reacción¹⁴².

¹⁴⁰ Horejsi V, Smolek P, Kocourek J. *Biochim Biophys Acta* **1978**, 538, 293-8.

¹⁴¹ Kobayashi K., Kobayashi A., Tobe S., Akaine T., In: Lee YC, Lee RT, editors. *Neoglycoconjugates; preparation and applications*. San Diego: Academic Press, **1994**. p. 261-282.

¹⁴² Ejemplos de síntesis de glicopolímeros por polimerización de radical libre:

a) Kitazawa S, Okumura M, Kinomura K, Sakakibara T. *Chem Lett* **1990**, 1733-6

b) Roy R, Tropper FD, Romanowska A. *Bioconjugate Chem* **1992**, 3, 256-61.

c) Cao SD, Roy R. *Tetrahedron Lett* **1996**, 37, 3421-4.

d) Roy R, Park WKC, Srivastava OP, Foxall C. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 6, 1399-402.

f) Sigal GB, Mammen M, Dahmann G, Whitesides GM. *J Am Chem Soc* **1996**, 118, 3789-3900.

g) Nishimura S-I, Furuike T, Matsuoka K, Maruyama K, Nagata K, Kurita K, et al. *Macromolecules* **1994**, 27, 4876-80.

h) Tagawa K, Sendai N, Ohno K, Kawaguchi T, Kitano H, Matsunaga T. *Bioconjugate Chem* **1999**, 10, 354-360.

i) Baskaran S, Grande D, Sun XL, Yayon A, Chaikof EL. *Bioconjugate Chem* **2002**, 13, 1309-13.

- *Polimerización iónica.* Tanto la polimerización aniónica como la catiónica permiten la obtención de glicopolímeros, aunque ambas metodologías llevan muchos problemas inherentes asociados. La polimerización aniónica¹⁴³ generalmente requiere disolventes apróticos (para evitar que reaccionen con la cadena polimérica en su crecimiento) y todos los reactivos han de ser de elevada pureza. Los monómeros no deben contener protones ácidos o funciones fuertemente electrofílicas para prevenir las reacciones laterales. Las reacciones suelen ser muy sensibles a la presencia de oxígeno y normalmente necesitan temperaturas inferiores a la ambiental. La polimerización catiónica¹⁴⁴ presenta problemas muy similares junto a la tendencia a sufrir reacciones secundarias.
- *Polimerización por apertura de anillo.* Algunos compuestos heterocíclicos puede dar lugar a polimerizaciones por apertura de anillo bajo catálisis aniónica o catiónica. Esta estrategia ha sido usada por Aoi y colaboradores¹⁴⁵ en la síntesis de glicopolímeros.

¹⁴³a) Yamada K, Yamaoka K, Minoda M, Miyamoto T. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* **1997**, *35*, 255-61.

b) Yamada K, Minoda M, Fukuda T, Miyamoto T. *J Polym Sci Part A—Polym Chem* **2001**, *39*, 459-67.

c) Yamada K, Minoda M, Miyamoto T. *J Polym Sci Part A—Polym Chem* **1997**, *35*, 751-7.

d) Yamada K, Minoda M, Miyamoto T. *Macromolecules* **1999**, *32*, 3553-8.

¹⁴⁴ a) D'Agosto F, Charreyre MT, Pichot C, Mandrand B. *Macromol Chem Phys* **2002**, *203*, 146-54.

b) D'Agosto F, Charreyre MT, Delolme F, Dessalces G, Cramail H, Deffieux A, et al. *Macromolecules* **2002**, *35*, 7911-8.

c) Loykulant S, Hayashi M, Hirao A. *Macromolecules* **1998**, *31*, 9121-6.

d) Loykulant S, Hirao A. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4757-64.

e) Loykulant S, Yamashiro M, Hirao A. *Macromol Chem Phys* **2001**, *202*, 1791-8.

¹⁴⁵ a) Aoi K, Tsutsumiuchi K, Okada M. *Macromolecules* **1994**, *27*, 875-7.

b) Tsutsumiuchi K, Aoi K, Okada M. *Macromolecules* **1997**, *30*, 4013-7.

c) Aoi K, Tsutsumiuchi K, Aoki E, Okada M. *Macromolecules* **1996**, *29*, 4456-8.

- *Polimerización por apertura de anillo mediante metátesis.* La aplicación de esta polimerización a la síntesis de glicopolímeros¹⁴⁶ es muy atractiva porque los catalizadores de rutenio usados, normalmente permiten usar monómeros con funciones polares desprotegidas y agua. La limitación de la técnica es que existen pocos tipos de monómeros que puedan dar la reacción y su funcionalización no es sencilla, y además es sensible a la presencia de oxígeno o nitrógeno.

En cuanto a la **síntesis de glicopolímeros por modificación química de polímeros** se pueden destacar algunos trabajos como el de García-Oteiza y colaboradores¹⁴⁷ donde modificaron poli(vinil alcohol) con 4-nitrofenil cloroformiato para hacerlo reaccionar con 2-amino-2-desoxi-D-glucosa. Bahuleker y colaboradores¹⁴⁸ sintetizaron glicopolímeros de glucosa y galactosa haciendo reaccionar un polímero de poli(acrililo cloruro) con los hidrocloruros de glucosamina y galactosamina obteniéndose grados de sustitución entre 41 y 53%. Además Thoma y colaboradores¹⁴⁹ prepararon glicopolímeros a partir de un polímero de poli-L-lisina cloroacetilada que hicieron reaccionar con tio-oligosacáridos.

Como se ha comentado la síntesis de glicopolímeros por modificación química de polímeros tiene el inconveniente de la necesidad de una reacción potente que

¹⁴⁶ a) Fraser C, Grubbs RH. *Macromolecules* **1995**, 28, 7248-55.

b) Mortell KH, Gingras M, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1994**, 116, 12053-4.

c) Mortell KH, Weatherman RV, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1996**, 118, 2297-8.

d) Kanai M, Mortell KH, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, 9931-2.

e) Manning DD, Hu X, Beck P, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, 3161-2.

f) Sanders WJ, Gordon EJ, Dwir O, Beck PJ, Alon R, Kiessling LL. *J Biol Chem* **1999**, 274, 5271-8.

¹⁴⁷ Garcia-Oteiza MC, Sanchez-Chaves M, Arranz F. *Macromol Chem Phys* **1997**, 198, 2237-47.

¹⁴⁸ Bahuleker R, Tokiwa T, Kano J, Matsumura T, Kojima I, Kodama M. *Carbohydr Polym* **1998**, 37, 71-8

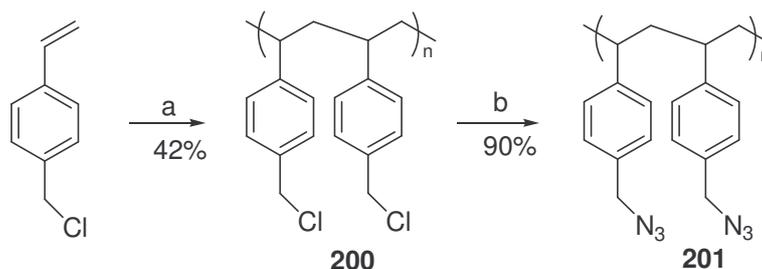
¹⁴⁹ Thoma F, Mangnani JL, Ohrkein R, Ernst B, Schwarzenbach F, Duthaler RO. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, 7414-5.

consiga una funcionalización total del polímero, por ello pensamos en aplicar la “click chemistry” a la síntesis de este tipo de compuestos siguiendo una metodología sencilla y económica.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Ladmiral y colaboradores¹⁵⁰ aplicaron dicha química a la síntesis de glicopolímeros, como se comentó en la introducción general sobre “click chemistry”, aunque utilizando la estrategia contraria ya que emplearon un polímero funcionalizado con alquinos.

Síntesis de glicopolímeros.

Para la síntesis de los glicopolímeros se eligió *p*-clorometilpoliestireno **200**¹⁵¹ de $M_n=3700$, que fácilmente se puede derivatizar a *p*-azidometilpoliestireno **201** mediante una sustitución nucleofílica de cloro por azida con un 90% de rendimiento (esquema 41). La total transformación en el azido derivado se comprobó por resonancia magnética nuclear tanto de protones como de ^{13}C .



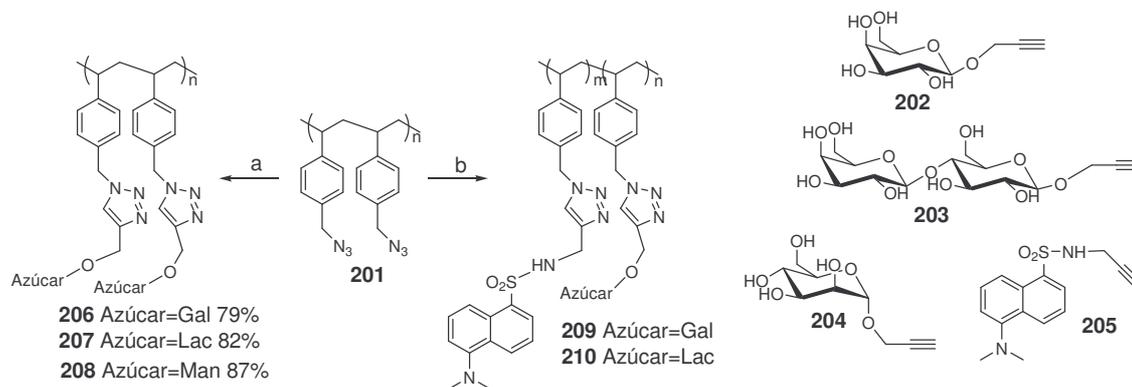
Esquema 41 a AIBN, 60°C, Clorobenceno; b NaN_3 , BuNI, DMF 75°C.

La síntesis de los glicopolímeros se llevó a cabo de forma muy sencilla y directa haciendo reaccionar los correspondientes derivados propargilados (1.2 equiv.) de los azúcares hidroxilados con el azido-polímero **201** en DMF e irradiando 15 min.

¹⁵⁰ Referencia 73.

¹⁵¹ Kishi K., Ishimaru T., Ozono M., Tomita I., Endo T., *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2000**, 38, 35-42.

con microondas a 90 °C. La total desaparición de la intensa señal de IR a 2100 cm^{-1} debida al grupo N_3 permite verificar el fin de la reacción. Así, la reacción del azido-polímero con los derivados 2-propionil β -D-galactopiranosido **202**, 2-propionil β -D-lactopiranosido **203** y 2-propionil α -D-manopiranosido **204** conduce a los glicopolímeros **206**, **207** y **208** respectivamente, con buenos rendimientos (esquema 42).



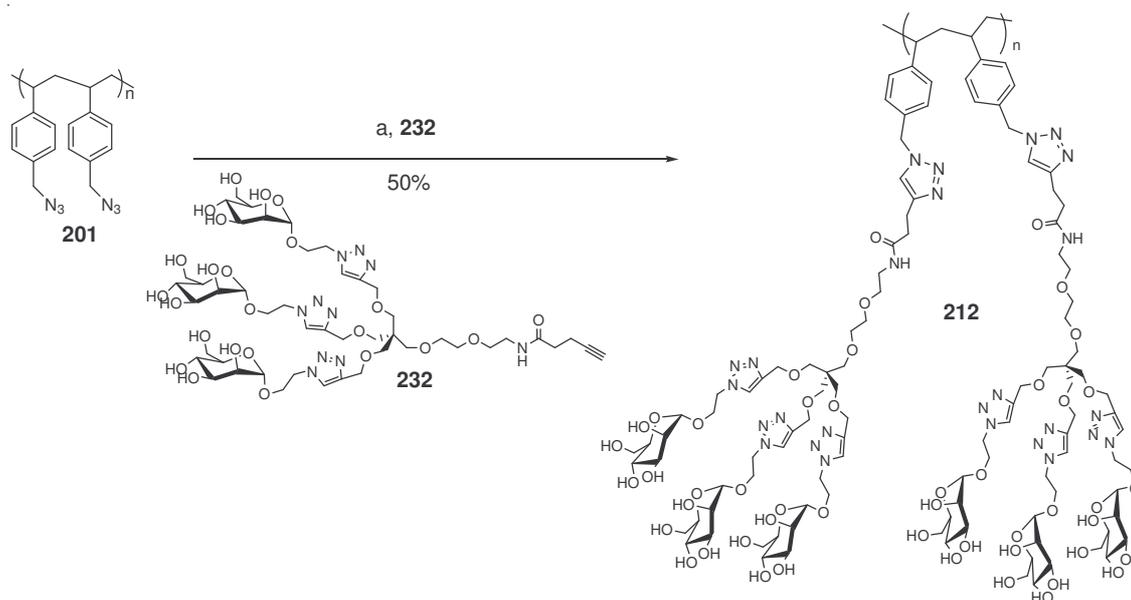
Esquema 42 a **202**, **203** o **204** $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, DMF, 90 °C, 15min, MW (800W); **b** **1** 0.05% de **205** $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, DMF, 90 °C, 15min, MW (800W) **2** **202** o **203** $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, DMF, 90 °C, 15min, MW (800W)

Con el objetivo de sintetizar glicopolímeros fluorescentes, de forma que se amplíen las posibilidades de estos productos en ensayos biológicos donde su visualización puede facilitar la cuantificación, se utilizó el alquinil-dansil derivado **205**¹⁵². De forma modular se hizo reaccionar el azido-polímero **201** en primer lugar con el derivado de dansilo **205** usando un defecto de éste (0.05%) en las mismas condiciones que anteriormente, para posteriormente hacerlo reaccionar *in situ* con los correspondientes derivados propargilados **202** y **203**. De esta manera se obtuvieron

¹⁵² Bolletta F., Fabbri D., Lombardo M., Prodi L., Trombini C., Zaccheroni N., *Organometallics* **1996**, *15*, 2415-2417.

los glicopolímeros fluorescentes de D-galactosa **209** y de D-lactosa **210** (esquema 42).

Por último, se hizo reaccionar con el azido-polímero **201**, en la mismas condiciones que las reacciones anteriormente descritas, con el glicodendrón **232** (cuya síntesis se describirá en el capítulo siguiente). De este modo se obtiene el polímero de glicodendrones de manosa **212** y aunque el espectro de infrarrojo indica la total desaparición de grupos azido, el rendimiento es del 50% debido a que se purifica lavando el precipitado con metanol y la solubilidad de este producto en metanol es mayor que en los casos anteriores (esquema 43).



Esquema 43 a ($(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, DMF, 90 °C, 30min, MW (800W))

Todos los glicopolímeros son solubles en agua y han sido utilizados en dos tipos de aplicaciones: como activadores sintéticos en adhesión celular y estimulación de líneas celulares de monocitos/macrófagos y como polímeros adheridos a los pocillos de placas de microtitulación en ensayos ELLA.

Aplicaciones.

Neoglicoconjugados multivalentes como activadores sintéticos en adhesión celular y estimulación de líneas celulares de monocitos/macrófagos.

Los oligosacáridos de las glicoproteínas y los glicolípidos de la membrana celular juegan un papel vital en gran cantidad de procesos biológicos como la adhesión celular, las señales de transducción o las infecciones víricas y bacterianas. Estos mecanismos de reconocimiento están basados esencialmente en interacciones específicas entre los oligosacáridos y proteínas solubles o de membrana denominadas lectinas. Como las interacciones proteína-carbohidrato requieren el establecimiento de muchas interacciones para generar afinidades suficientemente altas para el desarrollo de actividades biológicas, los dominios de reconocimiento de carbohidratos de las lectinas a menudo se encuentran agrupados dando lugar a variados motivos estructurales para la orientación relativa de los sitios de unión. Teniendo en cuenta estos aspectos los compuestos glicomiméticos sintetizados en la mayor parte de los casos han sido diseñados como estructuras multivalentes y con diferentes estructuras como polímeros lineales o glicopolímeros, liposomas, dendrímeros o nanopartículas entre las más destacadas, mientras que su utilidad ha sido ampliamente investigada en biotecnología, y en aplicaciones médicas y farmacéuticas, debido a su especificidad por ciertos receptores de carbohidratos importantes clínicamente.

La endotoxina bacteriana (LPS, lipopolisacárido) es el principal componente de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativo¹⁵³. El LPS sirve como barrera y

¹⁵³ a) Endotoxin in Health and Disease. (Eds.: H. Brade, D.C. Morrison, S. Opal, S. Vogel), Dekker, New York, 1999.

b) Ulmer A.J., Rietschel E.Th., Zahringer U., Heine H., *Trends Glycosci.Glyc.* 2002, 14, 53-68.

c) Chaby R., *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61, 1697-1713.

protección de su entorno a la bacteria y provoca en el huésped una gran respuesta inflamatoria y de inmunoestimulación. El LPS activa a monocitos y macrófagos a producir citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleukina IL-1, IL-6, IL-8 y IL-12¹⁵⁴. Los macrófagos en respuesta al LPS también secretan una gran variedad de mediadores biológicos como prostaglandinas, enzimas y radicales libres como óxido nítrico. La producción de estas citocinas y mediadores biológicos por parte de los monocitos/macrófagos contribuyen al control del crecimiento y diseminación del patógeno invasor. En ocasiones, una producción excesiva e incontrolada de dichas moléculas puede llevar a complicaciones sistémicas serias como disfunciones microcirculatorias, daño de tejidos o shocks sépticos.

Dependiendo del origen bacteriano, el LPS muestra una gran variación en su composición, aunque todos son moléculas anfifílicas que constan de tres partes:

- Un glicolípido hidrofóbico (lípidos A) que constituye el principio endotóxico y es el responsable de la mayor parte de la actividad biológica del LPS.
- Un núcleo oligosacárido que contiene ácido 2-ceto-3-desoxioctulónico (KDO) y otros azúcares incluyendo una heptosa.
- Un polisacárido hidrofílico compuesto por la cadena de una repetición altamente variadas de las subunidades de un oligosacárido.

Los polisacáridos de plantas y algas¹⁵⁵ han sido muy utilizados en las ciencias biomédicas en las últimas décadas debido a su amplio espectro de propiedades terapéuticas y su relativamente baja toxicidad. La mayor parte de los polisacáridos derivados de plantas superiores, arbustos y algas realza y/o activa la respuesta

¹⁵⁴ Fujihari M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azumaa H., Ikeda H., *Pharmacology & Therapeutic* **2003**, *100*, 171-194

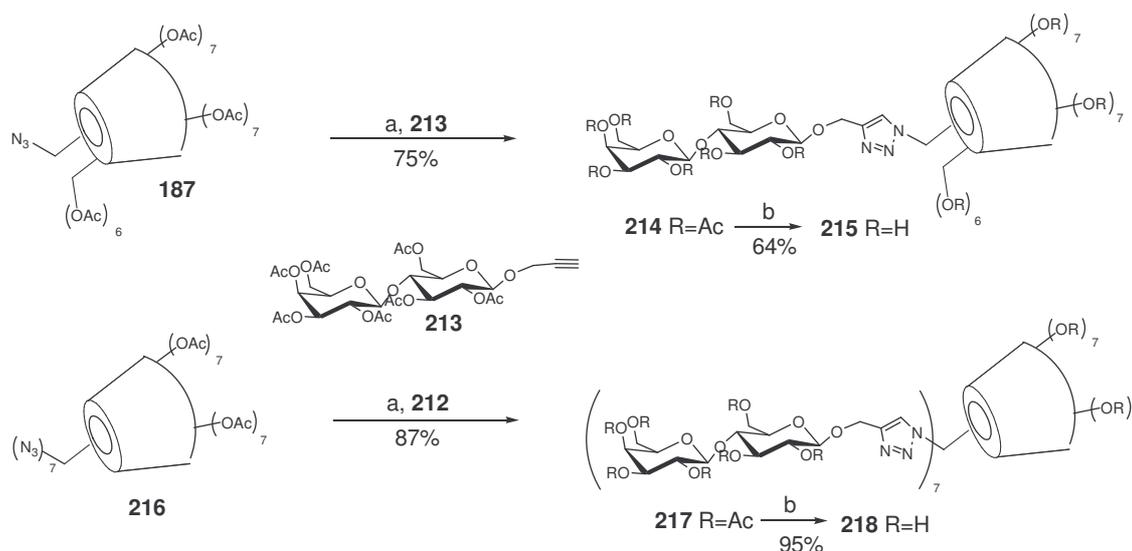
¹⁵⁵ a) Schepetkin I.A., Quinn M.T., *Int. Immunopharmacol* **2006**, *6*, 317-333.
b) Tzianabos A.O., *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 523-533.

inmune defensiva del huésped. Los macrófagos son unas de las principales dianas celulares a las que estos polisacáridos inducen inmunomodulación, anti-tumorigénico, curación de heridas y otros efectos terapéuticos. De hecho, los polisacáridos de fuentes vegetales o microbianas se unen a receptores de la superficie e inducen respuestas inmunomodulatorias similares en macrófagos y por mecanismos similares. Sin embargo, los polisacáridos de plantas y algas son estructuralmente heterogéneos como las endotoxinas y en la mayoría de los casos estas estructuras no son bien conocidas por lo que no es posible determinar que características estructurales contribuyen a la actividad inmunomoduladora de los macrófagos.

Nos propusimos la utilización de neoglicoconjugados multivalentes de estructura perfectamente definida conteniendo galactosa y lactosa como activadores sintéticos de monocitos/macrófagos sintetizados mediante “click chemistry”.

Junto a los glicopolímeros de D-lactosa y D-galactosa **206** y **207** descritos anteriormente se ensayaron también los derivados de β -ciclodextrina **215** y **218**, obtenidos con buenos rendimientos por reacción directa de 2-propionil- β -lactosa per-*O*-acetilada **213** con mono-6-azido-6-deoxi- β -ciclodextrina per-*O*-acetilada **187** y hepta-6-azido-6-deoxi- β -ciclodextrina per-*O*-acetilada **216**¹⁵⁶ en presencia de (EtO)₃P·CuI y en tolueno a reflujo. La correspondiente des-*O*-acetilación de **214** y **217** condujo a los productos hidroxilados **215** y **218** respectivamente (esquema 44).

¹⁵⁶ Ashton P.R., Koeniger R., Stoddart J.F., Alker D., Harding V.D., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903-908.



Esquema 44 **a** (EtO)₃P·CuI, tolueno, reflujo; **b** MeONa/MeOH.

Resultados.

Los siguientes ensayos fueron realizados por la Prof. M^a Dolores Girón-González, Natalia Sevillano-Tripero y el Prof. Rafael Salto-González del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, y se incluyen en la presente tesis doctoral para poner de manifiesto las propiedades de los glicopolímeros sintetizados expuestas en la discusión y en las conclusiones de este capítulo.

El primer experimento fue diseñado para probar la capacidad de los productos sintetizados de mediar la adhesión de monocitos a placas de cultivo. Para ello se eligieron las células promonocíticas humanas U-937, ya que se consideran un modelo útil en los estudios de adhesión¹⁵⁷. Las células U-937 normalmente crecen en suspensión en un medio suplementado con suero fetal bovino, aunque estas células

¹⁵⁷ Weber C., Erl W., Pietsch A., Weber P.C., *Circulation* **1995**, *91*, 1914–1917.

no tienen la capacidad intrínseca de crecer en monocapas ancladas en un frasco de cultivo de tejidos, pueden hacerlo después de la diferenciación a macrófagos.

Las células se resuspendieron en un medio libre de suero y fueron añadidas a pocillos revestidos con una solución con 40 μg de los glicoconjugados **206**, **207**, **215** y **218**, y a un pocillo control en el que sólo se añadió agua destilada. Después de tres horas de incubación a 37 °C, las placas fueron lavadas por duplicado con PBS y la adhesión celular se estimó contabilizando el número de células por campo (de 10 campos diferentes) mediante microscopía. Los datos obtenidos muestran que todos los compuestos ensayados tienen un efecto positivo promoviendo la adhesión celular comparada con el control (figura 6). Para establecer la existencia del efecto dosis-respuesta en la adhesión de las células U-937 se realizaron experimentos a dos concentraciones diferentes (20 y 40 μg) de las glicociclodextrinas de lactosa **215** y **218**. Se observa efecto dosis-respuesta después de tres horas de incubación a 37 °C en ambos compuestos. Las células por campo fueron nuevamente contadas 24 horas después de la incubación, para todas las condiciones estudiadas el resultado fue aproximadamente el doble, lo que indica que las células ancladas a la placa retienen la capacidad de crecer y dividirse normalmente independientemente de la concentración (figura 7).

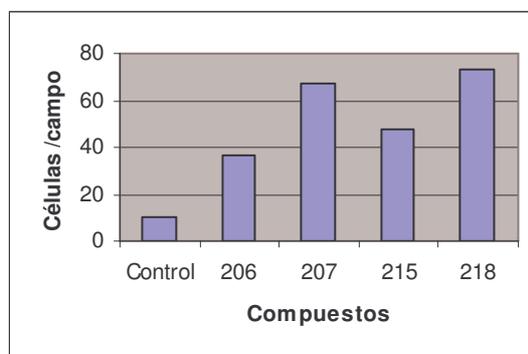


Figura 6. Adhesión de células U-937 a placas de cultivo cubiertas con los glicoconjugados.

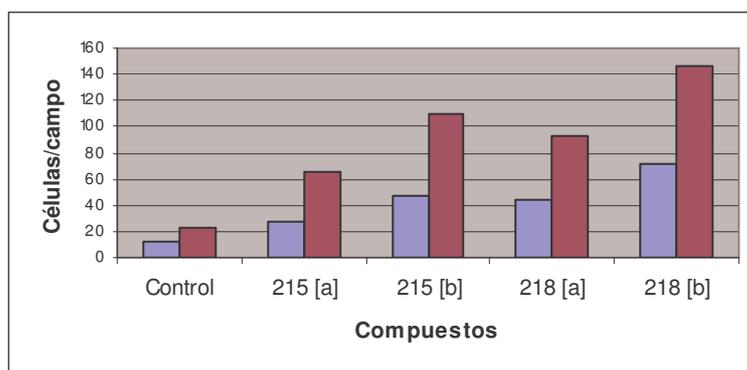


Figura 7. Adhesión de células U-937 con dos cantidades de glicoconjugado [a]=20 μ g y [b]=40 μ g y medidas a dos tiempos 3h (azul) y 24h (morado).

Para investigar si los glicopolímeros fluorescentes **209** y **210** tienen la misma capacidad de favorecer la adhesión se llevó a cabo el mismo ensayo con las células U-937. Los resultados obtenidos indican que la presencia del etiquetado fluorescente no muestra efectos negativos, ya que los productos marcados fluorescentemente mantienen valores muy similares a los de sus homólogos no fluorescentes (figura 8).

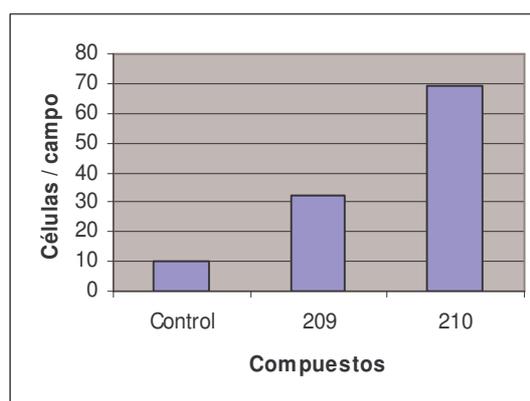


Figura 8. Adhesión de células U-937 a placas de cultivo cubiertas con los glicopolímeros fluorescentes.

Una vez que se demostró la capacidad de los neoglicoconjugados tanto fluorescentes como no fluorescentes de favorecer la adhesión celular de

monocitos/macrófagos se diseñaron una serie de experimentos para evaluar su capacidad estimuladora a macrófagos. Para este propósito se usaron las células RAW 264.7 considerando la capacidad intrínseca de esta línea celular de monocitos/macrófagos de adherirse y crecer en placas de cultivo, capacidad no presente en las células U-937. La unión a la pared celular y la internalización de los neoglicoconjugados fue estudiada con los siguientes ensayos.

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de afinidad a 4°C con el objetivo de evitar la fagocitosis de los neoglicoconjugados y estudiar solo la unión a la membrana plasmática celular. Los glicopolímeros fluorescentes **209** y **210** fueron añadidos a células RAW 264.7 en ausencia y en presencia de LPS (1µg/ml). Se observó la fluorescencia asociada a las células mediante microscopía de fluorescencia y fue cuantificada midiendo la fluorescencia asociada a una célula de al menos 10 campos celulares. El glicopolímero de lactosa dio una señal de fluorescencia asociada a la membrana plasmática superior a la del glicopolímero de galactosa. En el ensayo competitivo con células RAW 264.7 estimuladas con LPS se observó como decrecía la fluorescencia asociada a las células, lo que sugiere que los glicopolímeros y el LPS compiten por los mismos receptores.

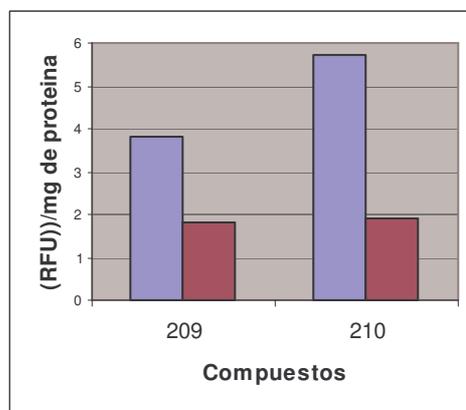


Figura 9. Unión de los glicopolímeros fluorescentes a células RAW 264.7 incubando 24 h (400 µg/ml), sin incubación previa con LPS (azul) o con incubación previa con LPS (morado) 4 h a 4° C.

En segundo lugar, se evaluó la internalización de los glicopolímeros por parte de las células RAW 264.7 incubando toda la noche a 37 °C las células con los glicopolímeros fluorescentes **209** y **210**. Después de un lavado exhaustivo se visualizó la internalización por microscopía de fluorescencia, donde se evidencia que los compuestos se acumulan en el citosol de las células claramente diferenciadas a macrófagos (figura 11). Para cuantificar la internalización de los compuestos las células incubadas fueron raspadas y la cantidad total de los extractos de las células medidas mediante un espectrofluorímetro (figura 10). Los resultados fueron normalizados usando la cantidad de proteína de los extractos celulares corroborando lo observado por microscopía de fluorescencia.

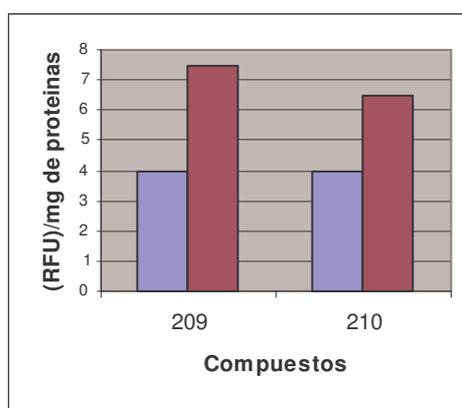


Figura 10. Internalización de los glicopolímeros fluorescentes. Fluorescencia de las células RAW 264.7 incubando los compuestos **209** y **210** 24 h (400 µg/ml) a 37° C, sin incubación previa con LPS (azul) o con incubación previa con LPS (morado) 4 h a 4° C.

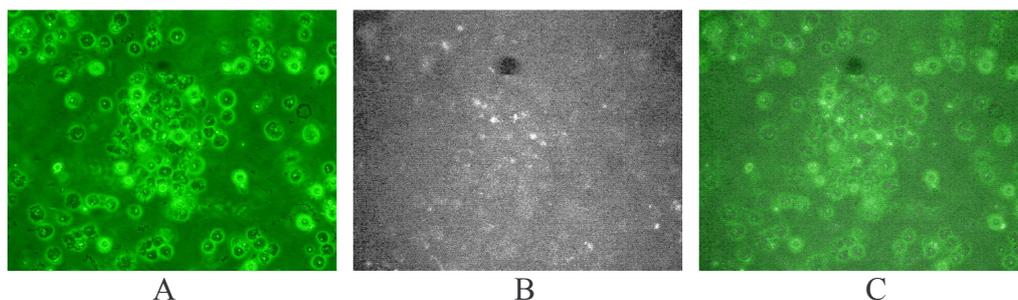


Figura 11. Internalización del glicopolímero fluorescente **209**. A) visible; B) ultravioleta; C) superposición de visible y ultravioleta.

Considerando que la galectina-3 es un receptor de membrana de macrófagos¹⁵⁸ se llevaron a cabo ensayos de afinidad con ella, en concreto con galectina-3 humana recombinante obtenida por expresión como una proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) en *E.coli*. El propósito de la fusión a MBP es facilitar la purificación por cromatografía de afinidad en una columna de amilosa-agarosa. El ensayo se realizó en placas ELISA uniendo la proteína de fusión (10µg/pocillo) mientras que pocillos con MBP se usaron como control negativo e incubando con los glicopolímeros fluorescentes (100 µg/ml). Después de lavar los compuestos fluorescentes retenidos se recuperaron con una disolución 0.1% de SDS y se midió directamente la fluorescencia. Tanto **209** como **210** son reconocidos por la galectina-3 (figura 12). Además se realizó el ensayo competitivo de incubar **210** con gran cantidad del glicopolímero de lactosa no fluorescente **207** (400 µg/ml) observándose que disminuye la unión de **210**.

¹⁵⁸ Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S.H., Rini J.M.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273,13047-13052.

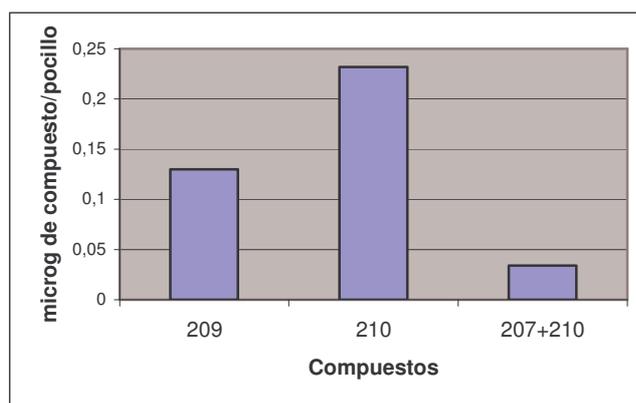


Figura 12. Cantidad de glicopolímeros fluorescentes retenidos por la proteína de fusión MBP-GAL.

Discusión.

Los primeros resultados obtenidos de los ensayos de afinidad con la línea celular promonocítica no-adherente U-937 muestran claramente que estas células se pueden adherir a placas de cultivo celular previamente cubiertas con los glicopolímeros **206** y **207** o las lacto-ciclodextrinas **215** y **218** sin una estimulación previa, ya que estas células requieren un tratamiento con LPS o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) para promocionar su crecimiento como monocapas en placas de cultivo celular después de su estimulación y diferenciación a macrófagos y para unirse a derivados de fibronectina. Por ello se puede concluir que los glicopolímeros de lactosa y galactosa y las lacto- β -ciclodextrinas tienen la capacidad de mimetizar la acción del LPS y el PMA estimulando la diferenciación de monocitos y facilitando su adhesión a placas de cultivo.

Del ensayo referido se pueden sacar algunas conclusiones. La presencia del epitopo de lactosa en los glicopolímeros conduce a niveles mayores de adhesión celular que cuando el epitopo es galactosa. Además, se puede observar a partir de los datos obtenidos de las ciclodextrinas que la multivalencia no tiene un efecto significativo en la capacidad de unir células de estos compuestos. De hecho las

valores de células por campo son del mismo rango para la monovalente que para la heptavalente.

Es destacable el hecho de que las células U-937 adheridas a las placas a través de los glicoconjugados sintéticos conserven su capacidad de crecer y dividirse normalmente, lo cual fue demostrado después de incubar las células adheridas 24 h en un medio que contenía suero bovino fetal. Este resultado demuestra de nuevo que los glicoconjugados actúan como sustitutos de LPS o PMA y pueden tener aplicaciones prácticas para normalizar y hacer más repetitivas la estimulación y la adhesión de monocitos a placas de cultivo. Además, el hecho de que los glicopolímeros fluorescentes conserven su capacidad para adherirse potencia significativamente su utilidad y se convierten en herramientas útiles para el seguimiento de las propiedades funcionales de estos glicopolímeros.

Una vez que las capacidades de adhesión de los neoglicoconjugados fueron demostradas se llevaron a cabo una serie de experimentos con células RAW 264.7 para evidenciar la acción estimuladora de estos compuestos en líneas celulares monocitos/macrófagos y su papel como activadores sintéticos.

La unión de los glicopolímeros a la pared celular como primer paso en la activación de monocitos fue demostrada con los experimentos con las células RAW 264.7 realizados a 4 °C para evitar la internalización. Los niveles de fluorescencia detectados claramente indican que los glicopolímeros se unen a la membrana plasmática de las células RAW. Los valores relativos de fluorescencia obtenidos para los glicopolímeros **209** < **210** indican que el glicopolímero de lactosa se une con mayor efectividad que el de galactosa y este hecho coincide con lo observado en la adhesión a células U-937. El ensayo adicional realizado con células estimuladas con LPS a 4 °C indica que los glicopolímeros de galactosa y lactosa compiten con el LPS por los mismos receptores de membrana.

Los glicopolímeros marcados con dansilo **209** y **210** también permitieron la visualización y la evaluación de la internalización de estos glicopolímeros en las células. Cuando se incubaron células RAW 264.7 a 37 °C con los glicopolímeros fluorescentes se observó claramente por microscopia de fluorescencia que las células acumulaban los glicopolímeros fluorescentes en el citosol después de su internalización. Además, la siguiente serie de experimentos de internalización en los que las células RAW 264.7 se estimularon y diferenciaron a macrófagos incubando con LPS previamente mostraron un aumento de la internalización de los glicopolímeros. Esto apunta a la idea de que la diferenciación celular es un requisito para la internalización de los glicopolímeros.

De los experimentos realizados con las células U-937 y RAW 264.7 queda claro que el reconocimiento de los neoglicoconjugados ensayados está específicamente mediado por la presencia de galactosa y lactosa. Este resultado corrobora el diseño racional de neoglicoconjugados que contuvieran estos epitopos basado en publicaciones¹⁵⁹ en las que se identifican receptores de galactosa en macrófagos.

Por último, se demostró la capacidad de los glicopolímeros de unirse a galectina-3 recombinante. Esta lectina fue usada como modelo considerando las bases estructurales de reconocimiento de galactosa por el dominio de reconocimiento de carbohidrato de esta lectina a partir los datos estructurales obtenidos por rayos X¹⁶⁰.

¹⁵⁹ a) Biessen A.L., Bakkeren H.F., Beuting D.M., Kuiper J., Van Berkel T.J.C., *Biochem. J.* **1994**, *299*, 291-296.

b) Kelm S., Schauer R., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1988**, *369*, 693-704.

c) Lichtman S.N., Wang J., Lemasters J.J., *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, G39-G46.

d) Cherayil B.J., Weiner S.J., Pillai S., *J. Exp. Med.* **1989**, *170*, 1959-1972.

¹⁶⁰ Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S.H., Rini J.M., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13047-13052.

Conclusiones.

Los glicopolímeros y las lacto- β -ciclodextrinas sintetizadas mediante “click chemistry” tienen la capacidad de actuar como activadores sintéticos promoviendo la adhesión celular de monocitos y su estimulación, facilitando su diferenciación a macrófagos. Como las células adheridas por mediación de estos neoglicoconjugados conservan la capacidad para crecer y dividirse, estos compuestos sintéticos se pueden considerar sustitutos del LPS y PMA y pueden ser usados en lugar de estos compuestos para mejorar la normalización y reproducibilidad de la estimulación y la adhesión de monocitos a placas de cultivo celulares. El marcaje fluorescente de los glicopolímeros aumenta sus utilidades ya que no se afectan sus propiedades de unión ni de estimulación, esto permite su aplicación en experimentos donde se requiere visualización. Se ha demostrado la unión a la superficie celular de células U-937 y RAW 264.7 así como la internalización y la acumulación en el citosol de las células RAW 264.7 diferenciadas a macrófagos. Por tanto los neoglicoconjugados ensayados son unos compuestos interesantes con aplicaciones no sólo en la activación de monocitos/macrófagos sino también en el potencial desarrollo de fármacos con propiedades terapéuticas similares a las de los polisacáridos de plantas y algas.

Uso de glicopolímeros en ensayos ELLA.

Existen un amplio rango de ensayos para la determinación de las afinidades proteína-carbohidrato¹⁶¹, los más destacados son: la inhibición de hemoaglutinación, el ensayo ELLA (enzyme-linked lectin assay), la microcalorimetría isotérmica de titulación (ITC) y la resonancia de superficie de plasmón (SPR). Todos los ensayos tienen algunas limitaciones e inconvenientes pero el más comúnmente usado es el ensayo ELLA. Se trata de una variación del conocido ensayo ELISA en el que ligandos solubles e inmovilizados compiten por los sitios de unión de un conjugado lectina-enzima (normalmente peroxidasa del rábano picante). En un ensayo típico, los pocillos de una placa de microtitulación son revestidos con un polímero azucarado de alto peso molecular, por ejemplo manano de levadura o un ester de poliacrilamida/ácido acrílico. A los pocillos se añade una mezcla del ligando soluble y el conjugado lectina-enzima, y después de un periodo de incubación, se vacían los pocillos y se rellenan con un sustrato que el enzima transforma en un compuesto coloreado mediante una oxidación. El color adquirido por cada pocillo, que es proporcional a la concentración de conjugado lectina-enzima retenida en el pocillo e inversamente proporcional a la afinidad del ligando soluble, se mide espectrofotométricamente y el IC₅₀ se determina en la curva afinidad-concentración obtenida de dichos datos.

El ensayo ELLA tiene inconvenientes, por ejemplo, los valores de IC₅₀ se determinan interpolando en la curva, por lo que este valor está afectado por la precisión de la dilución seriada del producto usada en el experimento. Por otra parte, a pesar de que uno de los productos del ensayo competitivo se encuentra en fase sólida, el ensayo no se ve afectado por fenómenos de agregación por la formación de complejos de entrecruzamiento de alto peso molecular, este hecho mejora aspectos relacionados con los componentes cinéticos de la reacción asociados a la

¹⁶¹ Referencia 104 (c).

irreversibilidad. Pero existen otros inconvenientes del ensayo como la práctica imposibilidad de una inhibición completa de la unión de la lectina al pocillo lo que supone que la máxima inhibición ocurra considerablemente por debajo del 100%. Ésto se atribuye a la presencia de múltiples tipos de sitios de unión microscópicos en la superficie de la placa de microtitulación. Por último, desde una perspectiva práctica el ensayo requiere conjugados lectina-enzima que no siempre son comerciales. A pesar de todo ello el ensayo ELLA es el más popular de los ensayos de afinidad proteína-carbohidrato debido a su relativa sencillez y bajo costo siempre en comparación con técnicas como ITC y SPR. Además su rapidez hace al ensayo imprescindible al menos como metodología de rutina en un laboratorio de glicobiología.

Otra de las limitaciones de los ELLA se encuentra en la poca disponibilidad de polímeros para el recubriendo de los pocillos con epitopos diferentes de manosa para poder utilizar otras lectinas diferentes de concanavalina A, que es normalmente la utilizada debido a la disponibilidad de manano. Por otra parte, los ensayos ELLA llevados a cabo con glicoconjugados que poseen mucha afinidad por la lectina dan lugar a curvas que se asemejan a dos rectas perpendiculares, una en la que se pasa de 0% de afinidad al máximo de la misma y otra en la que no se afecta la afinidad debido a que se ha alcanzado el máximo. Ésto se debe a que el ensayo competitivo está totalmente desplazado y el polímero adherido al pocillo no puede competir en afinidad con el glicoconjugado dando como resultado determinaciones de la afinidad erróneas.

Resultados y discusión.

Teniendo en mente lo anteriormente comentado se decidió estudiar la posibilidad de utilizar los glicopolímeros sintetizados mediante “click chemistry” en los ensayos ELLA. Hasta donde nosotros sabemos el único antecedente de uso de

glicopolímeros sintéticos en ensayos ELLA es el de Roy y colaboradores¹⁶² quienes usaron un glicopolímero obtenido por la polimerización de un monómero vinílico de lactosa.

En primer lugar, se utilizó el glicopolímero de lactosa **207** para el recubrimiento de los pocillos de una placa de microtitulación para realizar ensayos ELLA con la lectina *Arachis hypogaea* marcada con peroxidasa del rábano picante. Para ello se incubó en los pocillos de la placa 100µL de disolución con 3.3µg/mL de derivado **207** durante 2 horas a 37 °C de forma que éstos quedan revestidos del polímero. El resto del ensayo se realizó siguiendo el protocolo estándar como se detalla en los métodos generales. Como esperábamos el ensayo ELLA se puede llevar a cabo utilizando este glicopolímero de lactosa obtenido por “click chemistry”, el primer ensayo se realizó con lactosa y se observó que su IC₅₀ frente a *Arachis hypogaea* es de 1.5mM.

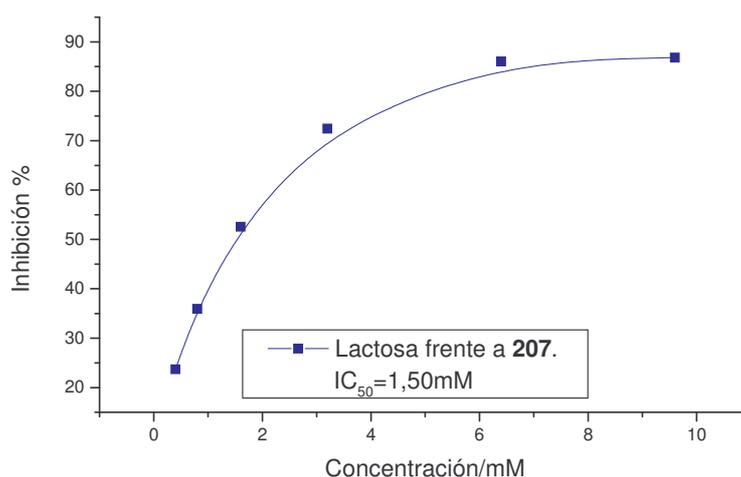


Figura 13. Curva de inhibición de *Arachis hypogaea* marcada con peroxidasa del rábano picante frente al glicopolímero **207** por lactosa.

¹⁶² Referencia 142 (b).

Posteriormente se llevaron a cabo múltiples ensayos ELLA de productos con unidades de lactosa utilizando el glicopolímero **207** de forma satisfactoria y cuyos resultados se presentan en el capítulo siguiente de la presente tesis.

Por otra parte, la síntesis de polímeros con afinidades superiores a las de manano, podrían llevar a una mejor evaluación de las afinidades de glicoconjugados con afinidades muy altas. Con este objetivo se sintetizó el polímero de glicodendrones **212** que al presentar mayor densidad superficial de epitopos azucarados y estos epitopos presentados en triadas, debe de tener mayor afinidad por ConA de la que presenta el manano de levadura. Efectivamente al realizar ensayos ELLA en placas de microtitulación en las que en cada pocillo se había incubado 100 μ L de una disolución 3.3 μ g/mL del polímero de glicodendrones **212** durante 2 horas a 37 °C, se observó como el IC₅₀ del metil α -D-manopiranosido aumenta hasta 3.20mM con respecto al IC₅₀ de 0.90mM que tiene frente a manano, es decir aumenta 3.5 veces. Ésto significa que la afinidad del polímero de glicodendrones **212** por la ConA es mayor que por manano como preveíamos y ello debe permitir realizar ensayos competitivos ELLA de productos con alta afinidad de forma más eficiente.

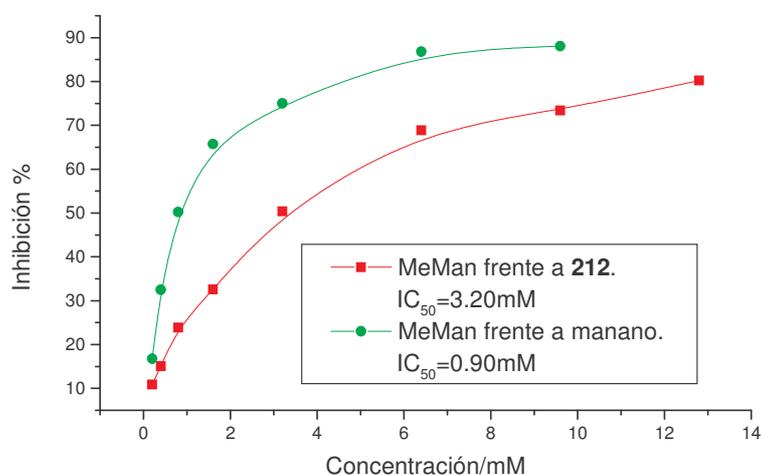


Figura 14. Curvas de inhibición de Con A-HRP debidas a metil α -D-manopiranosido.

El caso de los productos **243** y **246** (cuya síntesis se describe en el capítulo siguiente) puede servir de ejemplo para demostrar la utilidad del polímero de glicodendrones **212** en los ensayos ELLA con ConA-HRP.

En el ensayo ELLA los glicoconjugados, tanto el inmovilizado como el glicoconjugado del que se quiere conocer la afinidad, deben tener afinidades del mismo orden de magnitud, ya que sino el equilibrio está totalmente desplazado y en lugar de obtener una curva donde la precisión en la determinación del IC_{50} es óptima, se obtiene dos rectas casi perpendiculares donde la determinación del IC_{50} tiene una baja precisión. Un ejemplo de todo esto se puede observar en la gráfica del compuesto **243** que posee 6 epitopos de manosa (figura 15). El IC_{50} frente a manano es de 0.072 mM y se puede observar como se trata de un compuesto de afinidad alta en el que la curva comienza a aproximarse a dos rectas perpendiculares una que pasa de afinidad 0% a la afinidad máxima y otra que correspondería a la afinidad máxima que no varía con la concentración. En cambio cuando el ensayo se hace frente al polímero de glicodendrones **212** la representación de la afinidad en función de la concentración se asemeja mucho más a una curva y el IC_{50} obtenido es de 0.257 mM. Cuando ambos valores de IC_{50} se normalizan a un valor independiente del ensayo como la afinidad relativa respecto a metil α -D-manopiranosido se obtiene en ambos casos un valor de 12.5.

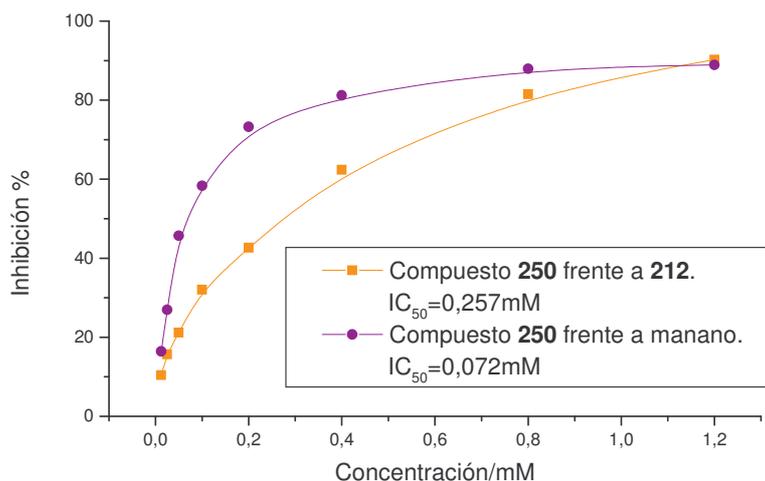


Figura 15. Curvas de inhibición de Con A-HRP debidas al compuesto **250**.

Pero el ejemplo más claro de la utilidad y la necesidad de usar glicopolímeros de alta afinidad en ensayos ELLA se puede justificar con los resultados obtenidos con el compuesto **246** que presenta 18 epitopos de manosa. En la gráfica del ensayo frente a manano se puede observar un ejemplo claro de representación de la afinidad frente a la concentración donde la teórica curva son dos rectas perpendiculares y de la que al extraer el valor de IC_{50} , éste lleva asociado un error grande. En este caso se obtiene un valor de $IC_{50}=0.021$ mM. Cuando el ensayo se realiza con el polímero de glicodendrones **212** la representación vuelve a ser prácticamente la de dos rectas, lo que indica que nuevamente estamos en un equilibrio muy desplazado, y el IC_{50} que se obtiene es de 0.032 mM. Los valores de afinidad relativa frente a metil α -D-manopiranosido son de 42.8 en el ensayo con manano y de 100 en el ensayo con el polímero de glicodendrones. Estos resultados demuestran que los ensayos ELLA con manano de productos de altas afinidades tienden a un valor mínimo de IC_{50} que no permite determinar sus verdaderas afinidades por lo que se pone de manifiesto la utilidad y la necesidad de usar polímeros de alta afinidad adheridos al pocillo.

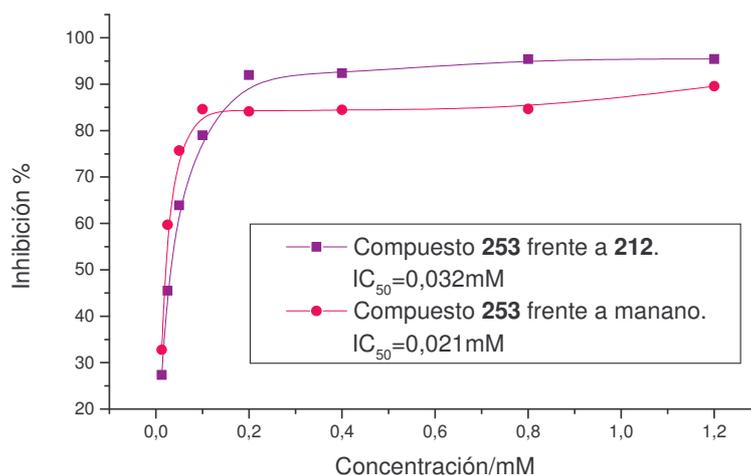


Figura 16. Curvas de inhibición de Con-HRP debidas al compuesto 253.

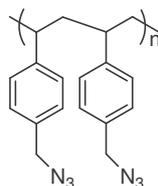
Conclusiones.

Se ha demostrado la utilidad del glicopolímero de lactosa **207** sintetizado de forma sencilla mediante “click chemistry” como recubrimiento de los pocillos de placas de microtitulación para llevar a cabo ensayos ELLA con *Arachis hypogaea* marcada con peroxidasa de rábano picante y en general para cualquier lectina que reconozca el epítipo de β -galactosa. Esta sencilla metodología se podría extrapolar a otros azúcares solo obteniendo el alquínil-derivado correspondiente.

Se ha demostrado la utilidad del polímero de glicodendrones **212** para el recubrimiento de pocillos en ensayos ELLA de productos de alta afinidad lo que permite evaluar de forma más eficiente altas afinidades por ConA poniendo de manifiesto la necesidad de nuevos materiales de estas características que permitan a los ensayos ELLA continuar siendo efectivos en la evaluación de interacciones proteína-neoglicoconjugados.

Parte experimental.

Síntesis del azido-polímero **201**.



Una solución del polímero **200** (1 g), azida sódica (2.13 g, 5 equiv.) y Bu₄NI (20 mg) en DMF (10 mL) se agita a 75 °C durante 72 h. Pasado este tiempo, se añade CH₂Cl₂ (100 mL) y la fase orgánica se lava con agua (5x15 mL), se seca y se evapora a un volumen mínimo y se añade MeOH (75 mL) para que el producto precipite como un sólido que se filtra y se seca a vacío.

Rendimiento 88%.

IR (film): 2923, 2095, 1247 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 6.97-6.41 (m), 4.24 (bs), 1.69-1.40 (m)

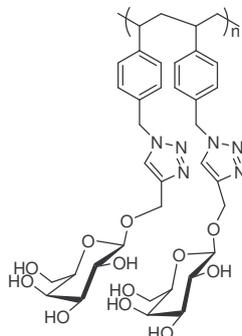
¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ 132.9, 132.7, 128.2, 54.7, 40.4.

Procedimiento general para la síntesis de los glicopolímeros **206**, **207** y **208**.

Una solución del azido derivado de poliestireno **201** (100 mg), el derivado propargilado del azúcar correspondiente **202**, **203** o **204** (0.76 mmol, 1.2 equiv./grupo azida) y el catalizador de cobre (EtO)₃P·CuI (0.063 mmol, 0.1 equiv./grupo azida) en DMF (10 mL) se irradia a 800W y 90 °C en un Milestone Star Microwave Labstation hasta que el espectro de IR de crudo de la reacción muestre la total desaparición de la banda correspondiente a los grupos N₃ (15 min). La mezcla de reacción se añade gota a gota sobre MeOH (100 mL) para que el producto

precipite como un sólido blanco que se filtra y se lava con MeOH, CH₂Cl₂, y éter etílico. El sólido resultante se disuelve en agua y se liofiliza.

Glicopolímero 206.

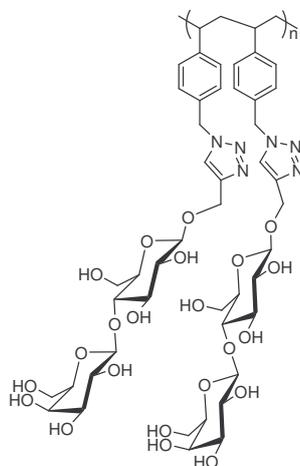


Rendimiento 79%.

IR (film): 3484, 1663, 1498, 1390, 1256, 1100 cm⁻¹

¹³C RMN (DMSO-d₆, 75 MHz): δ 144.5, 133.6, 128.0, 125.0, 103.2, 75.6, 73.8, 71.0, 68.6, 61.9, 61.0, 53.0.

Glicopolímero 207.

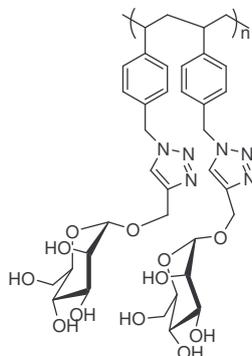


Rendimiento 82%.

IR (film): 3430, 1663, 1498, 1439, 1389, 1256, 1097 cm^{-1}

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 144.0, 127.8, 124.7, 103.9, 101.9, 80.8, 75.5, 74.9, 73.3, 70.6, 68.2, 61.7, 60.5, 53.0.

Glicopolímero 208.



Rendimiento 87%.

IR (film): 3385, 2922, 1663, 1425, 1225, 1130, 1057 cm^{-1}

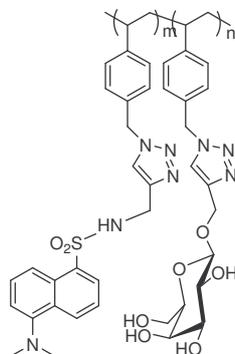
^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 144.1, 133.5, 127.9, 124.7, 99.5, 74.5, 71.3, 70.6, 67.4, 61.7, 59.5, 53.0.

Procedimiento general para la síntesis de los glicopolímeros fluorescentes 209 y 210.

Una solución del azido derivado de poliestireno **201** (100 mg), el derivado propargilado de dansilo **205** (0.03 mmol, 0.05 equiv./grupo azida) y el catalizador de cobre $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.063 mmol, 0.1 equiv./grupo azida) en DMF (10 mL) se irradia a 800W y 90 °C en un Milestone Star Microwave Labstation hasta que por cromatografía en capa fina se observa la desaparición del derivado de dansilo (15 min). Posteriormente se añade el correspondiente derivado propargilado del azúcar **202** o **203** (0.76 mmol, 1.2 equiv./grupo azida) y se vuelve a irradiar durante 15 min hasta que el espectro de IR de la reacción muestre la total desaparición de los grupos

N₃. El resto del procesado de la reacción es idéntico al de la síntesis de glicopolímeros no fluorescentes.

Glicopolímero fluorescente 209.



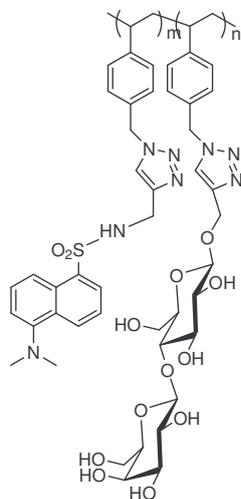
Se obtienen 179 mg.

IR (KBr): 3386, 1644, 1513, 1226, 1141, 1067 cm⁻¹

¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) (señales seleccionadas): δ=8.12 (br s; H-triazol),
6.90. 6.35 (2 br s; Ar)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ 144.7, 144.0, 127.5, 127.3, 127.1, 124.4, 24.2,
102.6, 75.1, 73.2, 70.4, 68.0, 61.3, 60.3, 52.5.

Glicopolímero fluorescente 210.



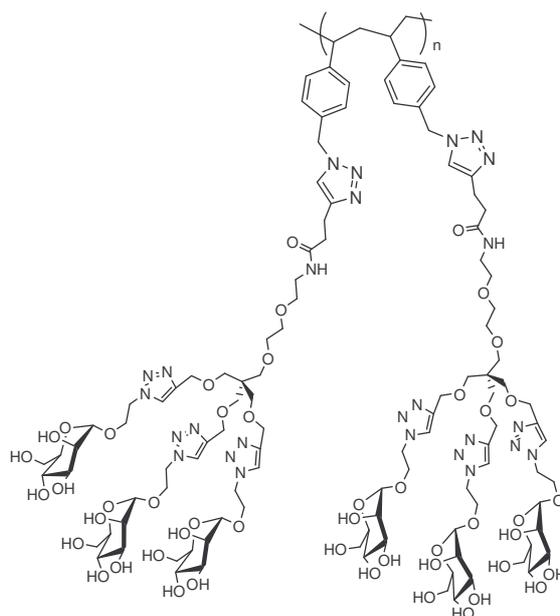
Se obtienen 313 mg

IR (KBr): 3384, 2921, 1644, 1054 cm^{-1}

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) (señales seleccionadas): δ 8.15 (br s; H-triazol), 6.91, 6.33 (2 br s; Ar), 5.47 (br s; ArCH₂N)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 143.8, 132.8, 127.3, 124.5, 103.98, 101.8, 80.7, 75.4, 74.9, 73.2, 70.5, 68.1, 61.6, 60.4, 52.4.

Polímero de glicodendrones 212.



Una disolución del polímero **201** (11.9 mg), el glicodendrón **211** (0.083 mmol, 1.1 equiv./grupo azida) y el catalizador de cobre $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.063 mmol, 0.1 equiv./grupo azida) en DMF (5 mL) se irradia a 800W y 90 °C en un Milestone Star Microwave Labstation hasta que el espectro de IR de la reacción muestre la total desaparición de los grupos N_3 (30 min). A continuación se evapora el disolvente y se precipita el polímero con CH_2Cl_2 . Se filtra y se lava con MeOH, posteriormente se disuelve en agua y se liofiliza.

Rendimiento 50%

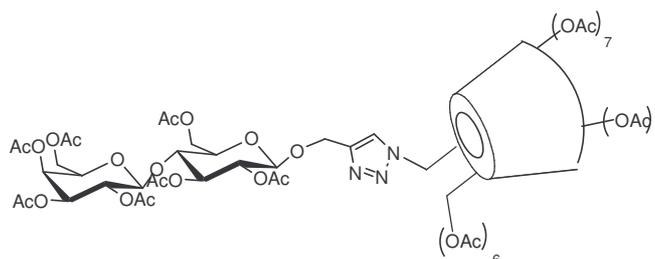
IR (KBr): 3424, 2933, 1663, 1390, 1100 cm^{-1}

^1H NMR (D_2O , 300 MHz) (señales seleccionadas): $\delta=8.05$ (br s; H-triazol)

Procedimiento general para la síntesis de las lactociclodextrinas *O*-acetiladas **214** y **217**.

Una disolución del derivado 6-azido de β -ciclodextrina correspondiente **187** o **215** (0.1 mmol), 2-propionil- β -lactosa per-*O*-acetilada **213** (1.1 equiv./grupo azida) y el catalizador de cobre $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 equiv./grupo azida) se calientan a reflujo en tolueno (15 mL) hasta que la cromatografía en capa fina o el espectro de IR muestra la total desaparición del producto de partida en defecto. Se evapora el disolvente y se purifica por cromatografía en columna.

Compuesto **214**.



Purificación (AcOEt).

Rendimiento 75%, sólido.

Punto de fusión: 156-158 °C

$[\alpha]_{\text{D}} +80^\circ$ (c 1, cloroformo)

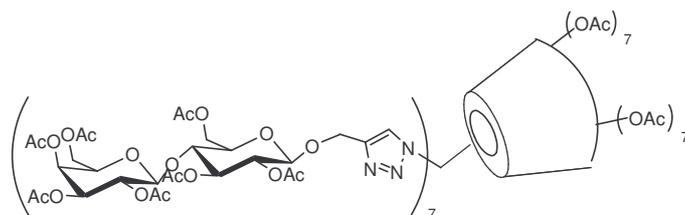
IR (KBr): 1750, 1371, 1232, 1046 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 7.63 (s, H-triazol);

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.9-169.0 (17 picos) 143.8, 126.0, 101.0, 100.8, 99.7, 97.1, 97.0, 96.8, 96.6, 96.5, 83.2, 80.9, 77.2, 77.0, 76.2, 76.0, 75.8, 75.1, 74.7, 74.4, 74.3, 74.1, 72.7, 71.6, 71.5, 71.3, 71.0, 70.7, 70.5, 70.4, 70.2, 70.1, 70.0, 69.7, 69.4, 69.1, 68.4, 66.7, 62.6, 62.3, 62.1, 60.8, 60.2, 60.0, 59.3, 58.7, 55.9, 49.4, 20.8, 20.6, 20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{119}\text{H}_{189}\text{O}_{77}\text{N}_{21}\text{Na}$: 3167.1; enc.: 3167.1.

Compuesto 217.



Purificación (AcOEt:MeOH 30:1).

Rendimiento 87%, sólido.

Punto de fusión: 194-196 °C

$[\alpha]_{\text{D}} +14.5^\circ$ (c 1, cloroformo)

IR (KBr): 1750, 1371, 1232, 1046 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 7.76 (br s, 7 H; H-triazol), 5.36 (br s, 7 H; H-4' lactosa), 5.25-3.50 (varios m), 2.15, 2.05, 2.03, 1.97, 1.93 (5 s, 189 H; 63xAc)

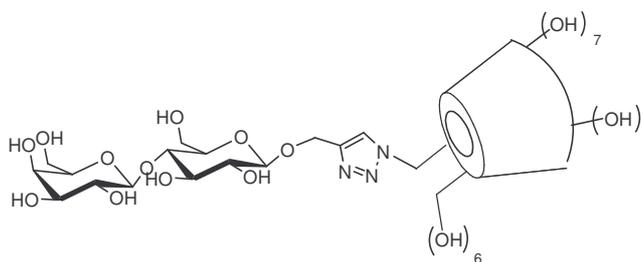
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.8, 169.6, 169.2, 144.0, 126.0, 100.9, 100.2, 96.4, 76.1, 72.7, 71.5, 71.0, 70.5, 69.7, 69.0, 66.6, 63.0, 62.0, 60.7, 60.4, 50.1, 21.2, 20.9, 20.8, 20.7, 20.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para $\text{C}_{184}\text{H}_{245}\text{O}_{112}\text{N}_{21}\text{Na}$: 4623.8; enc.: 4624.0.

Procedimiento general para la des-*O*-acetilación. Síntesis de los compuestos **215** y **218**.

A una solución del correspondiente derivado de ciclodextrina per-*O*-acetilado **214** o **217** (0.02 mmol) en MeOH anhidro (15 mL) se le añaden 200 μ L de MeONa/MeOH 1M y la mezcla de reacción se agita durante 1 día, se añade agua para disolver el sólido formado, se neutraliza con resina Dowex 550, se filtra, se lava con metanol y tras evaporar a vacío se liofiliza.

Compuesto **215**.



Rendimiento 64%, sólido.

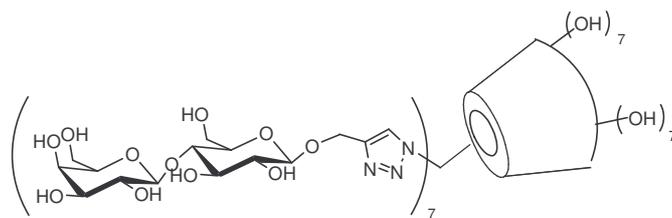
Punto de fusión: 165-166 °C

$[\alpha]_{436} +12.4^\circ$ (c 0.5, H₂O)

¹H RMN (D₂O, 400 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.13 (s; H-triazol)

¹³C RMN (D₂O, 100 MHz): δ 143.5, 127.0, 103.0, 102.0, 101.9, 101.5, 101.3, 83.0, 81.3, 81.1, 80.7, 78.3, 75.3, 74.8, 74.3, 73.0, 72.8, 72.7, 72.5, 72.0, 71.8, 71.4, 70.9, 70.5, 68.5, 61.8, 61.0, 60.2, 60.1, 59.1, 51.2

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₅₇H₉₃O₄₅N₃Na: 1562.50; enc.: 1562.60.

Compuesto 218.

Rendimiento 95%, sólido.

$[\alpha]_D +16.8^\circ$ (c 0.25, H₂O)

¹H RMN (D₂O, 300 MHz)(señales seleccionadas): δ 8.11 (s; H-triazol)

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. Para C₁₄₇H₂₃₁O₁₀₅N₂₁Na: 3995.5; enc.: 3995.6.

Capítulo IV.
Síntesis convergente de
glicodendrimeros mediante “click
chemistry”.

Introducción.

Las interacciones proteína-carbohidrato son de gran importancia en un elevado número de procesos biológicos¹⁶³. La superficie de las células eucariotas presentan un conjunto de glicoproteínas y glicolípidos denominado glicocáliz. De acuerdo con el estado de conocimiento actual de la glicobiología, se puede afirmar que estos glicoconjugados codifican información biológica¹⁶⁴. La composición del glicocáliz es dependiente del tipo y estadio de desarrollo de la célula y puede variar durante el curso de un proceso patológico¹⁶⁵. Se asume que la información se transmite a través de la formación de complejos no covalentes entre los compuestos azucarados y los receptores proteicos específicos conocidos como lectinas y selectinas. Las interacciones ligando-receptor de las unidades de azúcares con las lectinas y selectinas son débiles y las constantes de disociación de los complejos formados normalmente están en el rango milimolar. Las especificidades de las interacciones y la estabilidad del complejo ligando-receptor son incrementadas a través de interacciones multivalentes entre ligandos con múltiples copias de sacáridos y el correspondiente número de receptores proteicos¹⁶⁶. Las interacciones multivalentes proteína-carbohidrato son de crucial importancia por ejemplo en la fecundación, la adhesión célula-célula, la respuesta inmune y también en procesos patológicos como degeneración celular e infecciones por bacterias, virus o parásitos.

La búsqueda de compuestos estructuralmente simples capaces de mimetizar con éxito las estructuras complejas de sacáridos se ha convertido en un objetivo científico de interés¹⁶⁷. Estos glicomiméticos multivalentes son, por una parte,

¹⁶³ Mammen, M.; Choi, S.K.; Whitesides, G.M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.

¹⁶⁴ a) Referencia 103 (a).

b) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L.L.; *Science*, **2001**, *291*, 2357-2364.

c) Boysen, M.M.K.; Elsner, K.; Sperling, O.; Lindhorst, T. K.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 4376-4386.

¹⁶⁵ Dwek, R. A.; *Chem. Rev.*; **1996**, *96*, 683-720.

¹⁶⁶ Referencia 105 (b).

¹⁶⁷ Lindhorst, T. K.; *Top. Curr. Chem.*; **2002**, *218*, 201-235.

herramientas útiles en el estudio de procesos mediados por interacciones proteína-carbohidrato y, por otra, son potenciales agentes terapéuticos contra, por ejemplo, infecciones bacterianas inhibiendo el proceso de adhesión.

Una forma común para la síntesis de este tipo de glicoligandos es la síntesis de dendrímeros, que son compuestos macromoleculares ramificados alrededor de un andamio y que se hacen crecer a través de la repetición iterativa de dos secuencias de reacción. Estos compuestos poseen una arquitectura molecular altamente ramificada y una funcionalización superficial múltiple y uniforme que permite la disposición superficial de múltiples epitopos en procesos de reconocimiento biológico.

El término glicodendrímico se usa para describir los dendrímeros que usan carbohidratos en su estructura. La gran mayoría de los glicodendrímeros tienen los azúcares en su superficie, pero también existen los que usan un azúcar como andamio central así como dendrímeros que usan azúcares como bloque de síntesis.

Existen dos estrategias en la síntesis de dendrímeros una divergente y otra convergente. En la aproximación divergente el dendrímico crece desde el andamio hacia la periferia, normalmente doblando el número de funcionalizaciones reactivas que se introducen en cada nueva generación. Aunque el crecimiento divergente es el usado para la síntesis industrial de dendrímeros, lleva asociada la desventaja del gran número de reacciones necesarias para la síntesis de cada molécula. Además, se producen inevitablemente selecciones o reacciones laterales dando lugar a mezclas de productos muy similares y cuya separación no es posible. Sin embargo, la modificación divergente de dendrímeros comerciales constituye probablemente el método más directo para la síntesis de glicodendrímeros. Las bajas polidispersidades de las mezclas resultantes por esta estrategia resultan aceptables para muchas aplicaciones.

Por otra parte, el método convergente introducido por primera vez por Fréchet¹⁶⁸ evita muchos de los problemas sintéticos inherentes a la aproximación divergente y permite un aislamiento mucho más sencillo. La metodología consiste en la síntesis de cuñas dendríticas o dendrones, que se unen a otros compuestos ramificados para ampliar el tamaño de dichos dendrones y que finalmente son unidos al andamio adecuado para obtener el dendrimer deseado.

Centrándonos en los glicodendrimeros con epitopos azucarados en su superficie¹⁶⁹, la modificación divergente de dendrimeros comerciales es un método útil en la obtención de glicoconjugados polivalentes en un número muy reducido de etapas. Es por tanto lógico que se haya explotado extensamente esta metodología sobre todo centrada en dos tipos de dendrimeros comerciales, dendrimeros de poliamidoamina (PAMAM)¹⁷⁰ y dendrimeros de polipropileno-imina (Astramol)¹⁷¹. Ambos dendrimeros tienen un esqueleto basado en aminas terciarias y disponen de aminas primarias en su periferia que pueden reaccionar con otras moléculas o grupos funcionales formando enlaces amida, urea o tiourea. Así Ashton y colaboradores¹⁷² construyeron de este modo glicodendrimeros de hasta quinta generación que contenían 64 unidades de galactosa o lactosa para lo que hicieron reaccionar un equivalente de glicosil NHS-éster activado con los grupos amino del dendrimer (esquema 45).

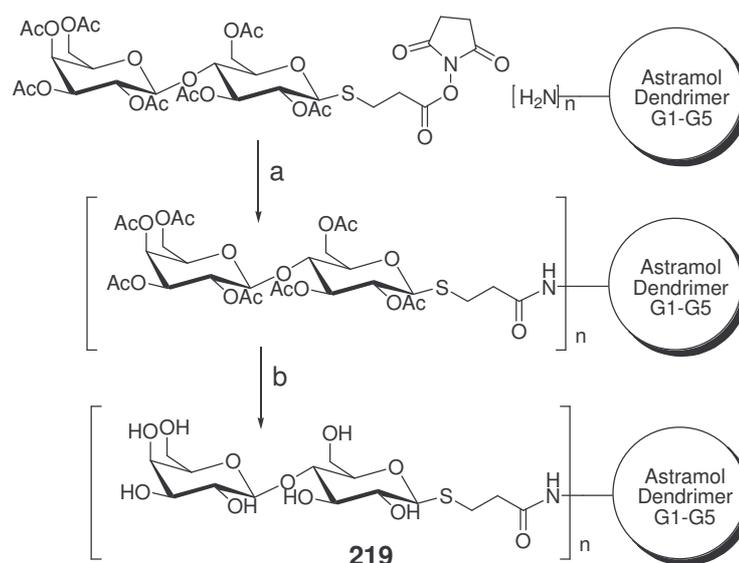
¹⁶⁸Hawker, C.J.; Fréchet, J.M.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**, *112*, 7638-7647.

¹⁶⁹Referencia 60.

¹⁷⁰Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P., *Polym. J. Tokio*, **1985**, *17*, 117-132.

¹⁷¹de Brabander-van den Berg, E.M.M., Meijer, E.W; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **1993**, *32*, 1308-1311.

¹⁷²Ashton, P.R., Boyd, S.E., Brown, C.L., Nepogodiev, S.A., Meijer, E.W., Peerlings, H.W.I., Stoddart, J.F.; *Chem. Eur. J.*; **1997**, *3*, 974-983.



Esquema 45. **a** CH_2Cl_2 (93-100%); **b** **1**: NaOMe/MeOH; **2**: NaOH/H₂O/MeOH (64-88%).

Aunque esta estrategia parece limitada por la escasa variedad de dendrímeros comerciales ha sido posible obtener diferentes glicodendrímeros modificando, por ejemplo, los espaciadores que unen el esqueleto dendrítico y los azúcares. Peerlings y colaboradores¹⁷³ modificaron la longitud de estos espaciadores hasta en 10 grupos metilenos variando la densidad superficial de carbohidratos. Este aspecto es interesante debido a que Pagé y colaboradores¹⁷⁴ observaron que las afinidades de los dendrímeros podían decrecer a partir de cierta valencia. En este caso los compuestos desprotegidos tenían solubilidades muy pobres tanto en agua como en disolventes orgánicos.

Otra forma de introducir diversidad en los glicodendrímeros es la unión de glicodendrones previamente formados a dendrímeros comerciales usados como núcleo o hipernúcleo¹⁷⁵. Esta metodología fue usada por Ashton y colaboradores¹⁷⁶

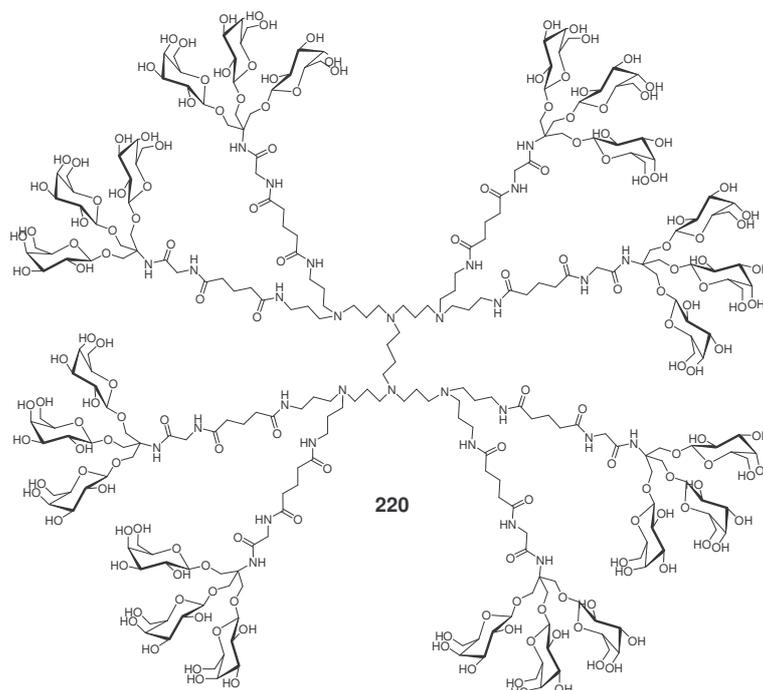
¹⁷³Peerlings, H.W.I., Nepogodiev, S.A., Stoddart, J.F., Meijer, E.W., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1879-86

¹⁷⁴Pagé, D., Roy, R., *Bioconjugate Chem.*, **1997**, 8, 714-723.

¹⁷⁵Wooley, K.L., Hawker, C.J., Frechet, J.M.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1991**; 113, 4252-4261.

¹⁷⁶Referencia 172.

usando triadas dendriméricas de galactosa unidas a un hipernúcleo de Astramol de baja generación en la síntesis de glicodendrimeros (estructura 220).



Estructura 220.

Se han usado también andamios no comerciales en la síntesis de este tipo de moléculas. Así Zanini y colaboradores¹⁷⁷ sintetizaron dendrones basados en *N,N*-bis(3-aminopropil)glicina y Llinares y colaboradores¹⁷⁸ sintetizaron dendrones basados en ácido *N,N*-bis(3-aminopropil)succinámico mediante una estrategia en fase sólida. En ambos casos se completa la síntesis en una etapa divergente final funcionalizando con ácidos siálicos las posiciones periféricas mediante la formación de tioésteres y amidas respectivamente.

¹⁷⁷Zanini, D., Roy, R., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7348-7354.

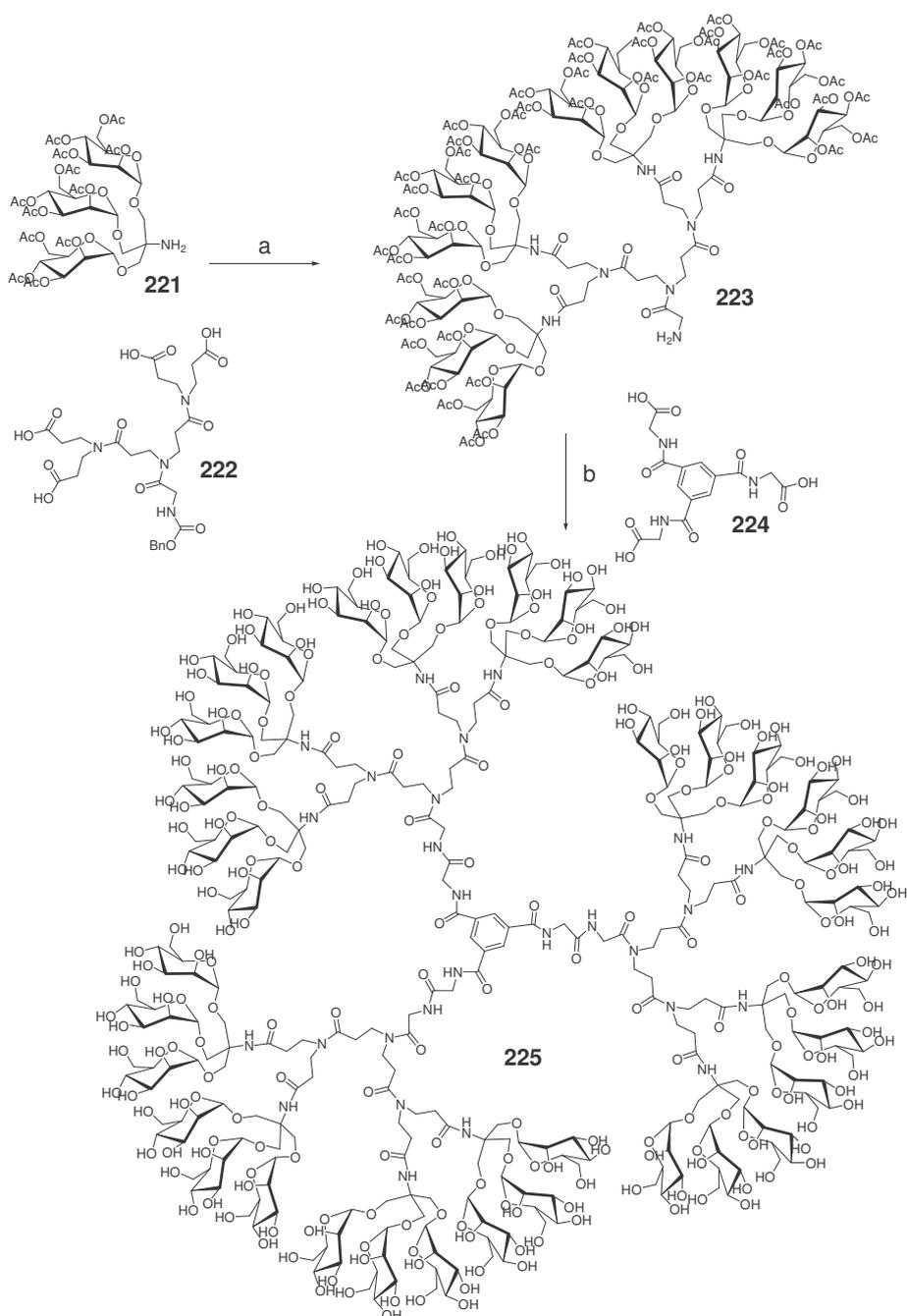
¹⁷⁸Llinares, M., Roy, R., *Chem. Commun.*, **1997**, 2119-2120.

Una estrategia para la síntesis de glicopeptidodendrimeros es la ruta convergente en la que se parte de azúcares simples o pequeños glicoclusters, que se unen a unidades ramificadas aumentando su tamaño y finalmente se unen a un núcleo. La construcción de estos dendrimeros se puede llevar a cabo utilizando unidades de repetición ramificadas previamente sintetizadas de modo que permiten una construcción más rápida de grandes estructuras. El dendrón de tris(hidroximetil)amino metano unido a diferentes monosacáridos peracetilados ha sido unido a diferentes unidades de repetición bi o tridentadas así como a diferentes núcleos multidentados para la síntesis de series de dendrimeros de 9, 18 y 36 unidades de monosacárido en su periferia. La primera experiencia se realizó usando β -D-glucopiranosas¹⁷⁹ como epitopo azucarado y más tarde se extendió a la síntesis de derivados de α -D-manopiranosas¹⁸⁰ (esquema 46).

¹⁷⁹a) Ashton, P.R., Boyd, S.E., Brown, C.L., Jayaraman, N., Nepogodiev, S.A., Stoddart, J.F., *Chem. Eur. J.*; **1996**, *2*, 1115-1128.

b) Ashton, P.R., Boyd, S.E., Brown, C.L., Jayaraman, N., Stoddart, J.F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 732-735.

¹⁸⁰ Ashton, P.R., Hounsell, E.F., Jayaraman, N., Nilsen, T.M., Spencer, N., Stoddart, J.F., Young, M., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 3429-3437.



Esquema 46. **a** 1: DCC/HOBt/CH₂Cl₂/DMF; 2: H₂/Pd en C/EtOAc/MeOH;

b 1:DCC/HOBt/CH₂Cl₂/DMF; 2: NaOMe/MeOH/H₂O.

Como los productos y los subproductos de estas síntesis tienen diferencias significativas en su peso molecular, se pueden purificar más fácilmente usando técnicas estándar de cromatografía. Se ensayaron las afinidades de los compuestos derivados de manosas frente a ConA usando el ensayo ELLA y se observaron potencias de inhibición cuatro veces mayores para el compuesto que tenía 9 manosas que para el derivado con 3 manosas, mientras que los compuestos de 18 y 36 epitopos muestran actividades muy similares y no mucho mayores que el compuesto que posee 9 manosas, lo que sugiere que el efecto cluster es más acentuado en estos compuestos entre 9 y 18 epitopos. Es común encontrar que los compuestos de alta valencia no tengan afinidades mucho mayores que los de un tamaño medio¹⁸¹, este efecto puede ser atribuido a que los epitopos están demasiado compactados de forma que esté impedida estéricamente la interacción con la lectina o simplemente al hecho de que sólo unos pocos de estos epitopos pueden interactuar con los sitios de unión de la lectina al mismo tiempo. De cualquier modo, para los usos biológicos, la estructura del andamio puede ser más importante que la valencia del glicodendrímico.

Hasta ahora todos los glicodendrímeros descritos se sintetizaron usando carbohidratos protegidos, normalmente peracetilados. Esto se debe a que los grupos hidroxilo pueden interferir en las reacciones de acoplamiento utilizadas en la síntesis de los glicodendrímeros. Además, la naturaleza altamente polar de los azúcares los hacen inadecuados para la purificación mediante cromatografía en gel de sílice, que es la técnica de purificación más extensamente usada en síntesis orgánica. Los grupos protectores traen asociados el inconveniente del aumento de volumen que ocasionan en el azúcar y que provoca problemas en ocasiones en el ataque del dendrón al núcleo. Para soslayar estos inconvenientes, Jayaraman y colaboradores¹⁸² describieron la síntesis de glicodendrímeros usando carbohidratos completamente

¹⁸¹Referencia 174.

¹⁸²Jayaraman, N., Stoddart, J.F., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 6767-6770.

desprotegidos por formación de un enlace amida entre un glicocluster desprotegido conteniendo un grupo amino y un núcleo con ésteres activados derivado de *N*-hidroxisuccinimida.

Otros métodos para la derivatización con dendrimeros aminados se llevaron a cabo mediante apertura de anillo de aldonolactonas¹⁸³, formación de tioureas con isotiocianatos de mono-¹⁸⁴ y oligosacáridos¹⁸⁵.

Las aportaciones sobre glicodendrimeros realizadas usando “click chemistry” durante el desarrollo de nuestras investigaciones ya fueron comentadas en la introducción sobre “click chemistry” en el campo de los carbohidratos.

Resultados y discusión.

Continuando con nuestros esfuerzos en la síntesis de neoglicoconjugados multivalentes, nos planteamos la síntesis convergente de glicodendrimeros mediante “click chemistry”. Para ello decidimos utilizar los productos obtenidos de la propargilación del pentaeritritol, donde se obtienen con una proporción 3:1 los productos tripropargilado y tetrapropargilado, respectivamente. El producto tripropargilado, convenientemente derivatizado con un precursor de azida, se convierte en un excelente bloque de síntesis para la obtención de dendrimeros.

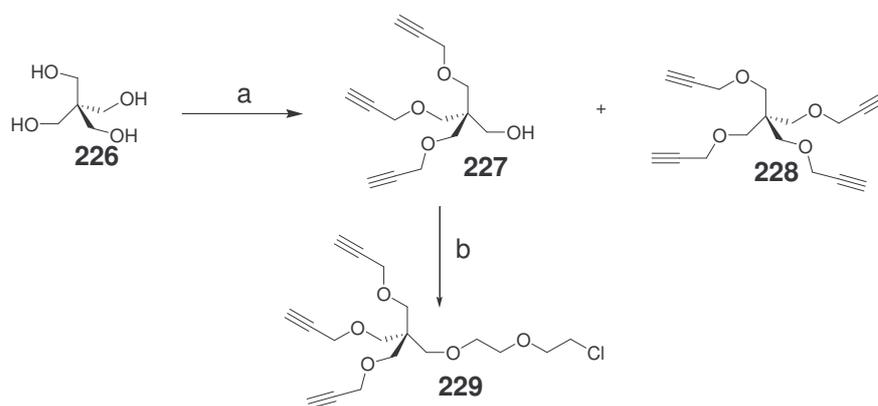
La O-propargilación de pentaeritritol **226**¹⁸⁶ se realiza con sosa y bromuro de propargilo en DMSO para obtener los productos **227** y **228**. Con la O-alkilación de **227** con 2-cloroetiléter se obtiene el producto **229** que se utilizará como bloque de síntesis en la obtención de los dendrones y los dendrimeros (esquema 47).

¹⁸³Aoi, K., Itoh, K., Okada, M., *Macromolecules*, **1995**, 28, 5391-5393.

¹⁸⁴Kieburg, C., Dubber, M., Lindhorst, T.K., *Synlett*, **1997**, 1447-1449.

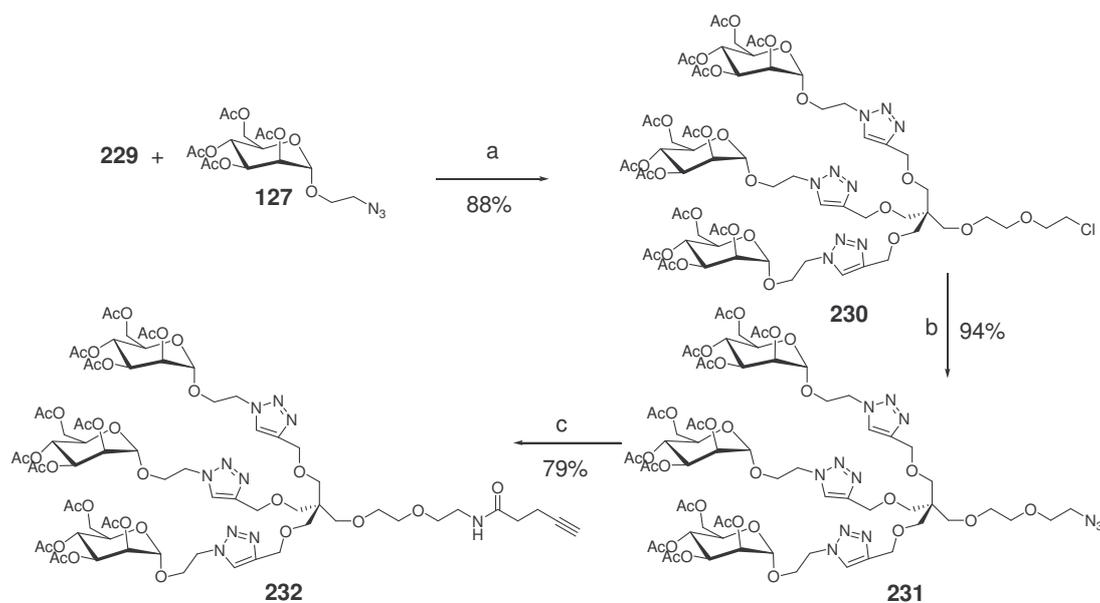
¹⁸⁵Thompson, J.P., Schengrund, C.-L., *Glycoconjugate J.*, **1997**, 14, 837-845.

¹⁸⁶Referencia 113 (e).



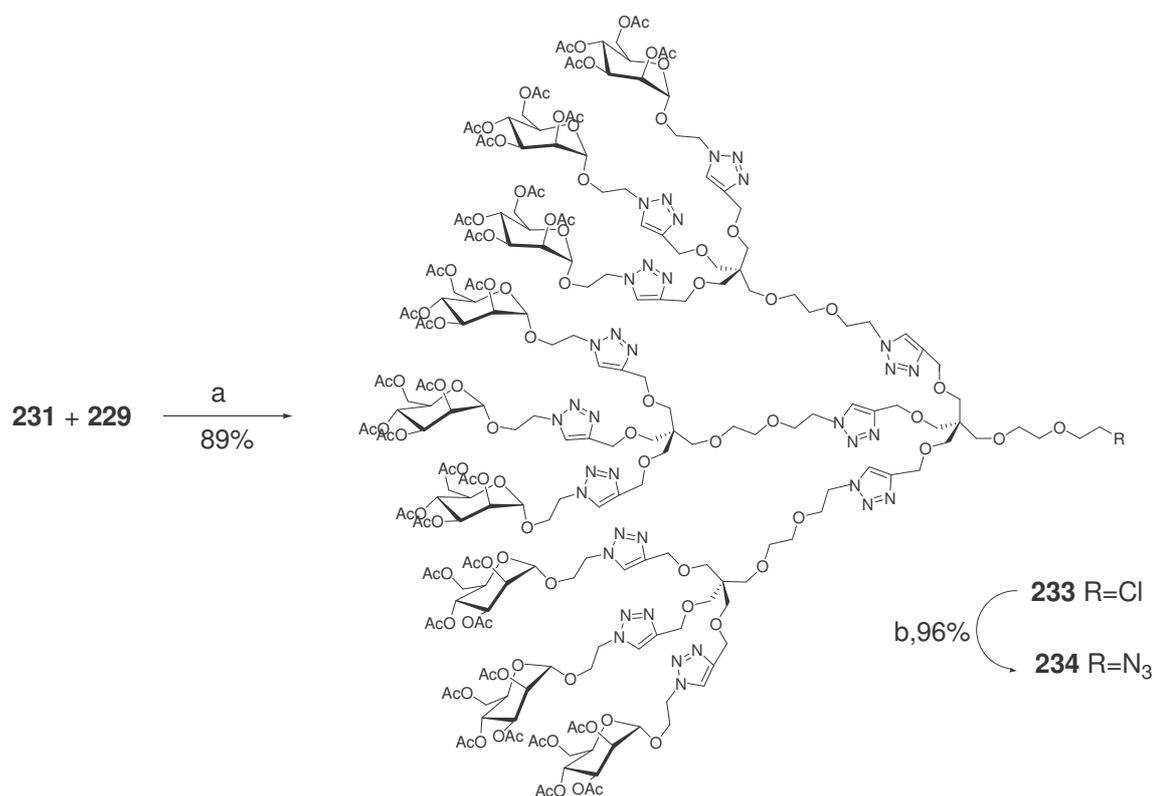
Esquema 47. **a** $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, DMSO , $\text{BrCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$; **b** $(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$, NaOH .

La reacción del derivado de pentaeritritol **229** con 2-azidoetil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido **127** conduce al glicodendrón de manosa de primera generación **230** (Man-G1-Cl) con un rendimiento del 88%. Una posterior sustitución nucleofílica de cloro por azida da lugar al glicodendrón de manosa **231** (Man-G1-N3) con excelente rendimiento (94%) (esquema 48). La reducción de **231** mediante hidrogenación catalítica y la posterior acilación con ácido 4-pentinóico conduce al glicodendrón de primera generación funcionalizado como alquino **232** (Man-G1-C \equiv CH) con un rendimiento global del 79%.



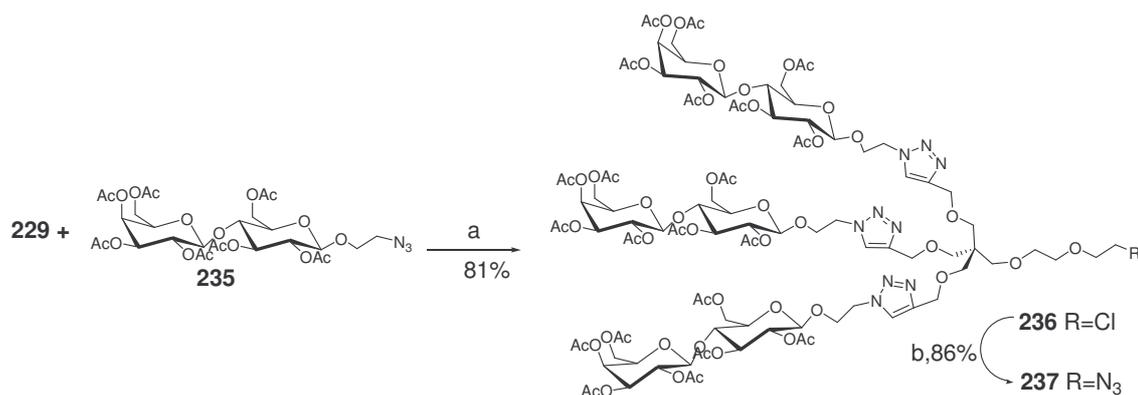
Esquema 48. **a** CuI(C₂H₅)₃P, tolueno, MW. **b** NaN₃/DMF/80°C. **c** 1: H₂, Pd/C. MeOH; 2: HC≡CCH₂CH₂COOH, DCC, CH₂Cl₂.

Para la síntesis del glicodendrón de manosa de segunda generación **233** (Man-G2-Cl) se hicieron reaccionar los productos **231** y **229** obteniéndose el producto deseado con alto rendimiento (esquema 49). La sustitución nucleofílica de cloro por azida condujo al glicodendrimer de segunda generación con un grupo azido **234** (Man-G2-N₃) (96%).



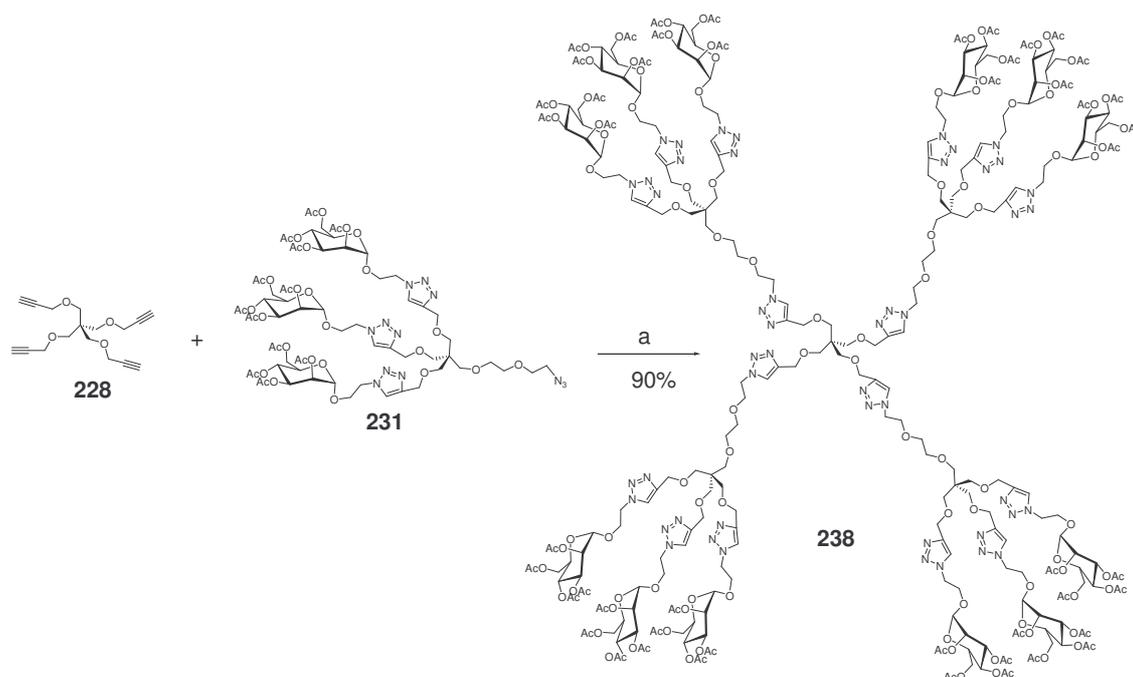
Esquema 49. **a** CuI(C₂H₅)₃P, tolueno, MW. **b** NaN₃/DMF/80°C.

Del mismo modo que para los derivados de manosa se llevó a cabo la síntesis del glicodendrón de primera generación de lactosa **236** (Lac-G1-Cl) haciendo reaccionar 2-azidoetil β-lactosa per-*O*-acetilada **235** con el derivado de pentaeritritol **229** (esquema 50). La sustitución nucleofílica de cloro por azida da lugar al dendrón funcionalizado con azida **237** (Lac-G1-N₃) con altos rendimientos globales.



Esquema 50. a $\text{CuI}(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{P}$, tolueno, MW. b $\text{NaN}_3/\text{DMF}/80^\circ\text{C}$.

Una vez sintetizados los glicodendrones se procedió a la síntesis de diferentes glicodendrimeros. En primer lugar se utilizó como andamio el derivado tetrapropargilado de pentaeritritol **228** que al reaccionar con el dendrón de manosa de primera generación **231** (Man-G1-N₃) permite obtener el dendrimer de primera generación **238** con un alto rendimiento (esquema 51). En cambio al intentar llevar a cabo la síntesis del dendrimer de segunda generación por reacción de los productos **228** y **229** (Man-G2-N₃) no se obtuvo el dendrimer deseado sino una mezcla de productos, presumiblemente debido a factores de impedimento estérico.



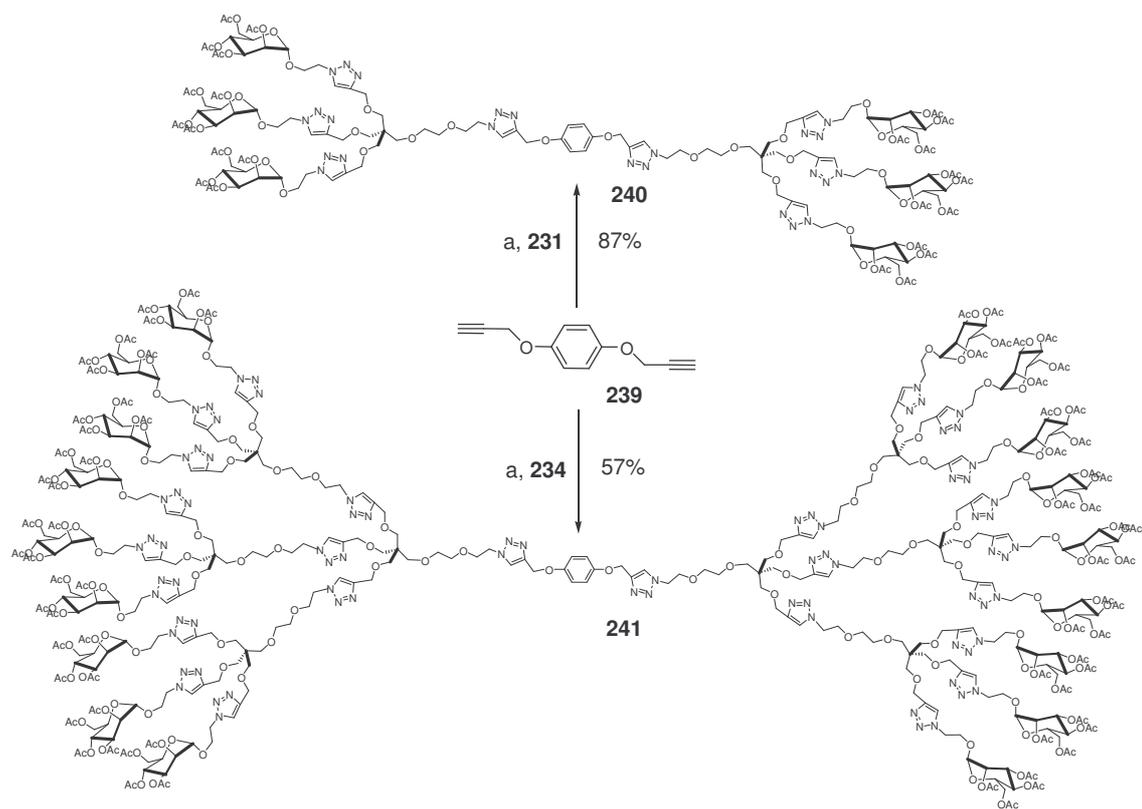
Esquema 51. a $\text{CuI}(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{P}$, tolueno, MW.

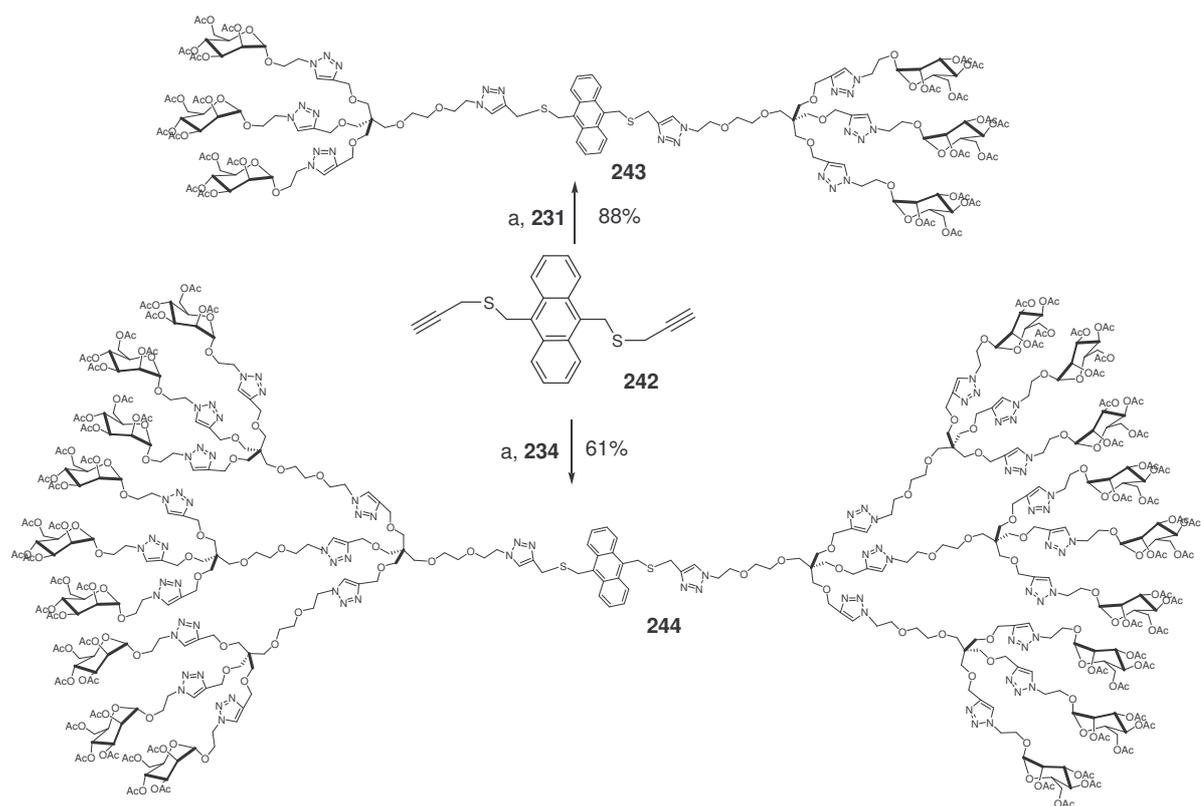
A continuación se hicieron reaccionar los dendrones **231** (Man-G1-N₃) y **234** (Man-G2-N₃) con el derivado 1,4-bis(propargiloxi)benceno **239**¹⁸⁷ para obtenerse los dendrímeros **240** y **241**, de primera y segunda generación respectivamente (esquema 52).

Del mismo modo se sintetizaron los dendrímeros **243** y **244**, aunque partiendo del derivado 9,10-bis(propargiltiometil)antraceno **242** (esquema 53). La síntesis de estos compuestos fue llevada a cabo debido a las propiedades fluorescentes derivadas del núcleo de antraceno que confieren a estos glicoconjugados un gran potencial en la investigación de mecanismos biológicos y en la trazabilidad de ligandos artificiales así como de las células diana¹⁸⁸.

¹⁸⁷ Srinivasan, M.; Sankararaman, S.; Hopf, H.; Dix, I.; Jones, P. G. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4299-4303.

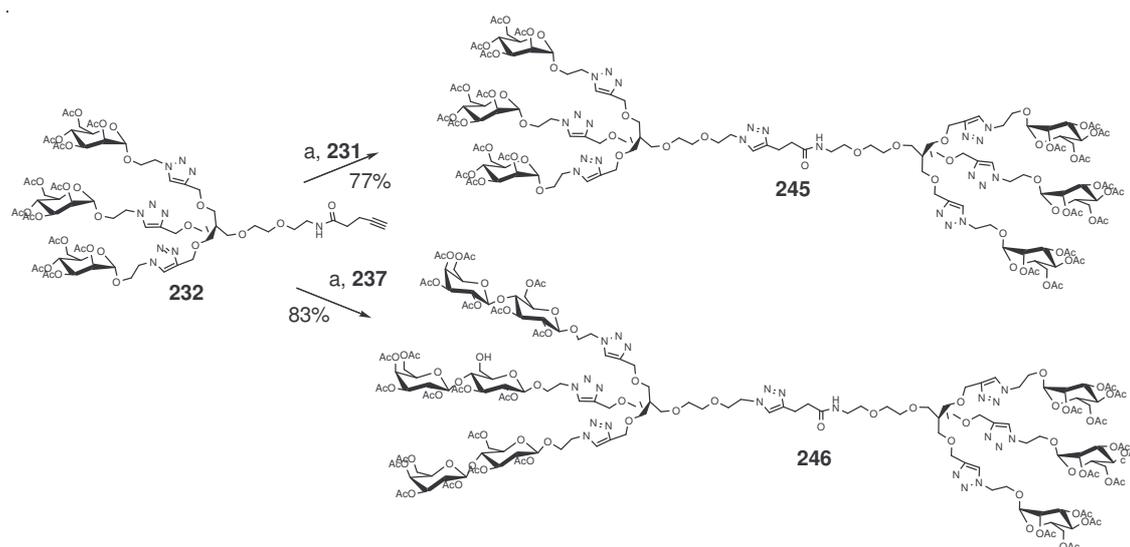
¹⁸⁸ Krist, P.; Vannucci, L.; Kuzma, M.; Man, P.; Sadalpure, K.; Patel, A.; Bezouska, K.; Pospisil, M.; Petrus, L.; Lindhorst, T. K.; Kren, V. *ChemBiochem* **2004**, *5*, 445-452.

Esquema 52. a CuI(C₂H₅)₃P, tolueno, MW.



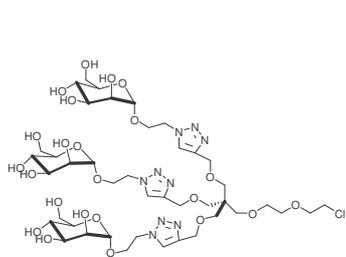
Esquema 53. a CuI(C₂H₅)₃P, tolueno, MW.

Por último, se abordó la síntesis de los dendrímeros por unión directa entre dendrones (esquema 54). La reacción del dendrón de manosa de primera generación funcionalizado con alquino **232** (Man-G1-C≡CH) con el dendrón de manosa también de primera generación funcionalizado con azida **231** (Man-G1-N₃) da lugar al dendrímico homogéneo **245**, mientras la reacción del dendrón **232** con el dendrón de lactosa de primera generación funcionalizado con azida **237** (Lac-G1-N₃) conduce al dendrímico heterogéneo **246**. Este compuesto al ser un glicoconjugado que incluye dos tipos de epitopos azucarados, permite disponer de potenciales antiadhesivos para procesos de adhesión mediados por varias lectinas.

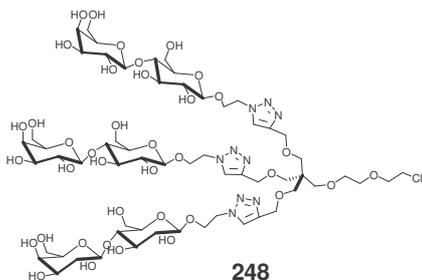


Esquema 54. a $\text{CuI}(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{P}$, tolueno, MW.

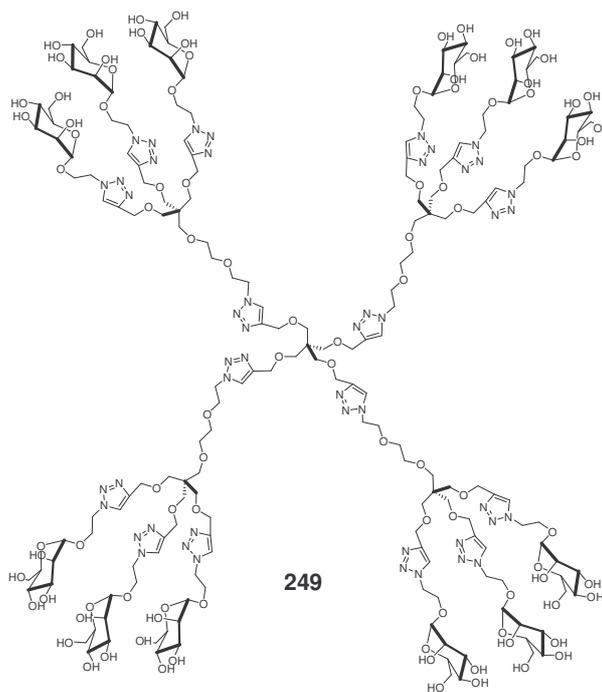
Los glicodendrones 230 y 233; y los glicodendrimeros 238, 240, 241, 243, 244, 245 y 246 fueron des-*O*-acetilados en las condiciones de Zemplen para obtener los glicodendrones hidroxilados 247 y 248, y los glicodendrimeros hidroxilados 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255.



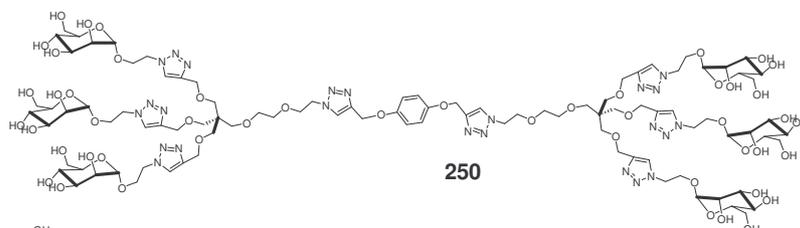
247



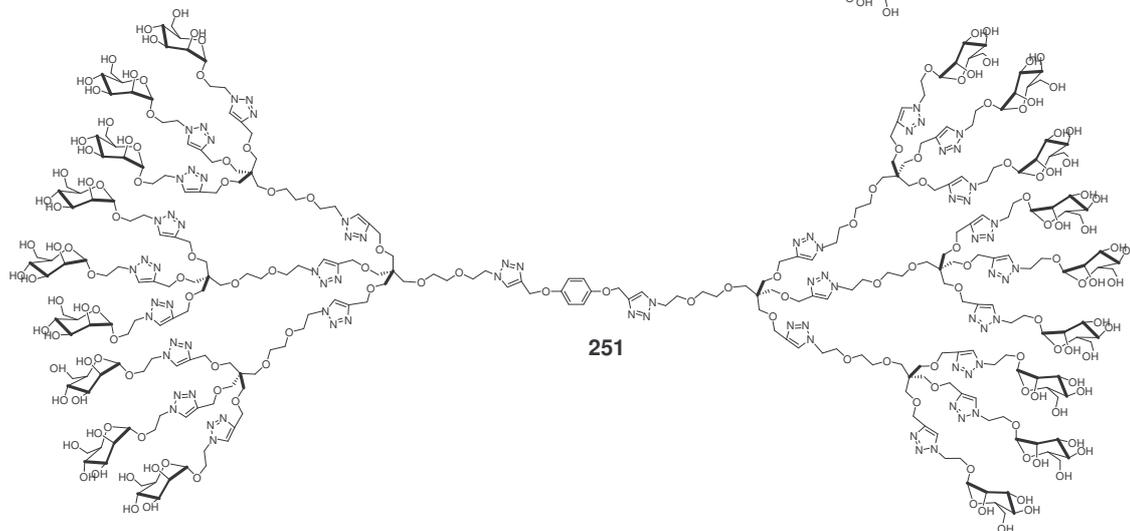
248



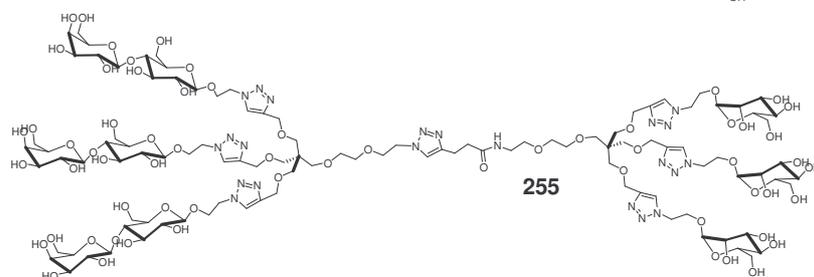
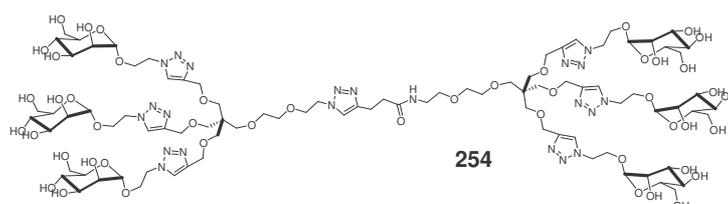
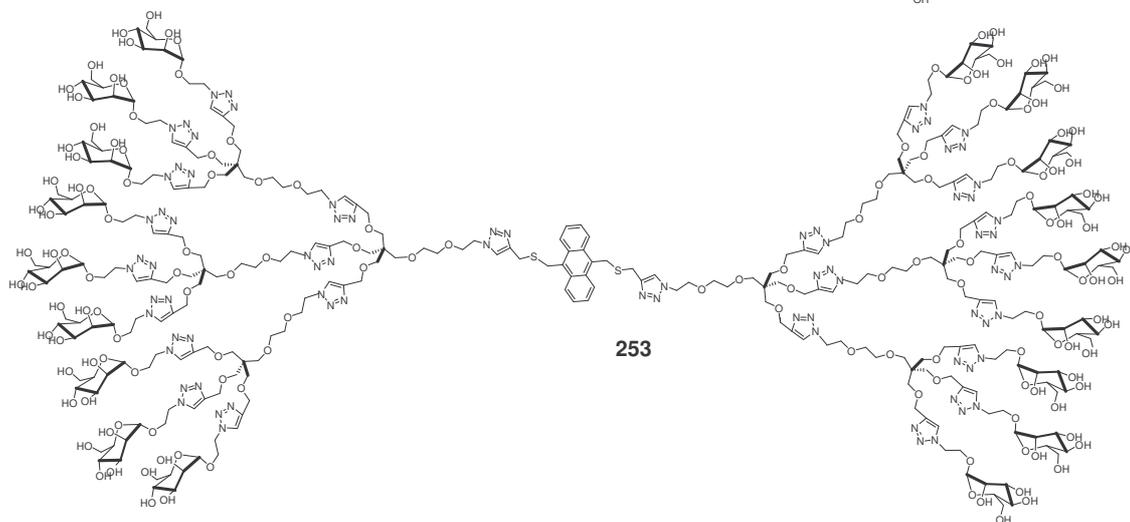
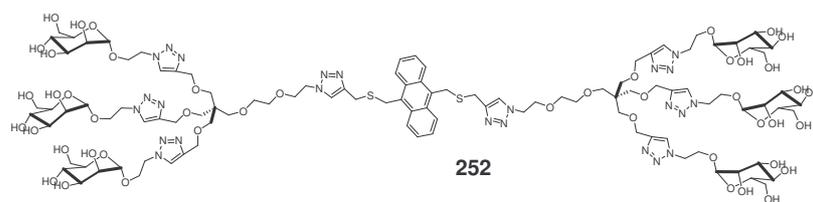
249



250



251



Estudios de afinidad de los glicodendrones 247 y 248, y los glicodendrimeros 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255 con *Concanavalina A* y *Arachis hypogaea*.

Se estudiaron las afinidades de los glicodendrimeros hidroxilados con la lectina *Concanavalina A* marcada con peroxidasa de rábano picante (ConA-HRP) para los derivados de manosa y con la lectina *Arachis hypogaea* marcada con peroxidasa del rábano picante para los derivados de lactosa mediante la técnica de ELLA. Los ensayos de inhibición competitiva se llevaron a cabo frente a manano de *Saccharomices cerevisiae* en el caso de la ConA, y frente al glicopolímero de lactosa **207** en el caso de *Arachis hypogaea*.

Producto	Lectina marcada con HRP	IC ₅₀ /mM	Afinidad relativa	Número de azúcares reconocibles	Potencia relativa por azúcar
MeMan	ConA	0,90	1	1	1
247	ConA	0,171	5,26	3	1,75
249	ConA	0,038	23,68	12	1,97
250	ConA	0,072	12,50	6	2,08
251	ConA	0,023	39	18	2,16
252	ConA	0,063	14,28	6	2,38
253	ConA	0,021	42,80	18	2,37
254	ConA	0,081	11	6	1,83
255	ConA	0,510	1,76	3	0,59
247 + 248	ConA	0,287	3,13	3	1,04
Lac	A.hypo.	1,50	1	1	1
248	A.hypo.	0,259	5,76	3	1,95
255	A.hypo.	0,610	2,46	3	0,82
247 + 248	A.hypo.	0,347	4,32	3	1,44

Tabla 7. Valores de IC₅₀, afinidad relativa y potencias relativas en las pruebas ELLA.

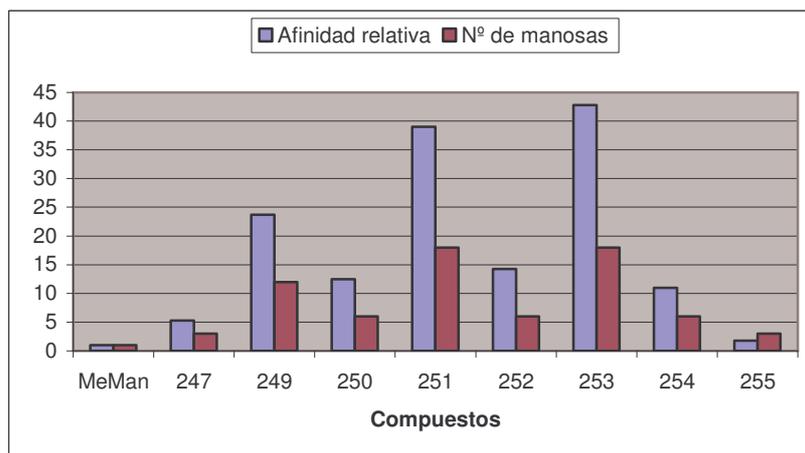


Figura 17. Valores de afinidad relativa respecto de Me-Man y número de manosas.

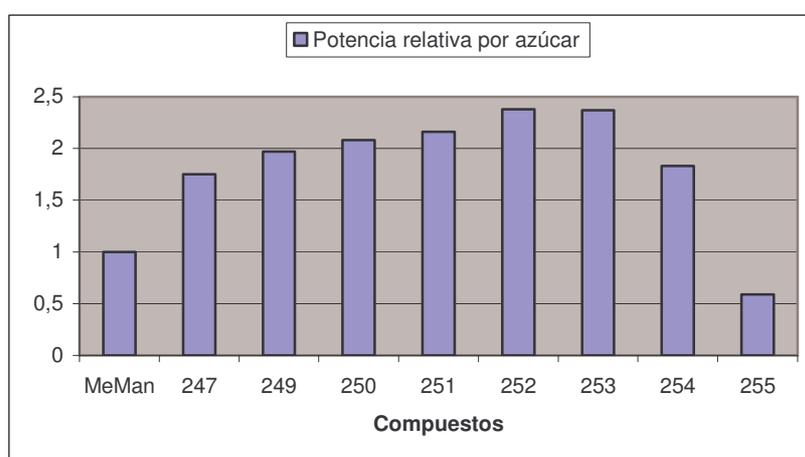


Figura 18. Valores de potencia relativa por unidad de manosa respecto de Me-Man.

Con los datos obtenidos se pueden apuntar algunas conclusiones:

- Al aumentar el número de epítopos azucarados disminuye el valor de IC_{50} y por tanto hay mayores afinidades relativas, los valores de potencia relativa por azúcar tienden a aumentar también a medida que aumenta el número de azúcares pero no es un aumento demasiado significativo.

- Las afinidades de los dendrímeros provenientes del andamio derivado de antraceno **252** y **253** son ligeramente mayores que las de sus homólogos con andamio derivado de hidroquinona **250** y **251**.
- Las afinidades del compuesto **255**, tanto por Con A como por *Arachis hypogaea*, son inferiores a la de los dendrones que lo constituyen por separado (**247** y **248**) lo que resulta sorprendente. Por ello se realizó el experimento de utilizar en los ensayos ELLA una mezcla equimolecular de los dendrones **247** + **248** de igual concentración en cada uno de ellos que las disoluciones madre usadas en el resto de ensayos, observándose también un ligero descenso en la afinidad de ambas lectinas por el dendrón del azúcar al que reconocen cuando se encuentran en presencia del otro dendrón. Este hecho experimental es muy difícil de justificar pero parece indicar algún tipo de interacción entre los dendrones de lactosa y manosa que les haga tener menor afinidad por sus correspondientes lectinas.

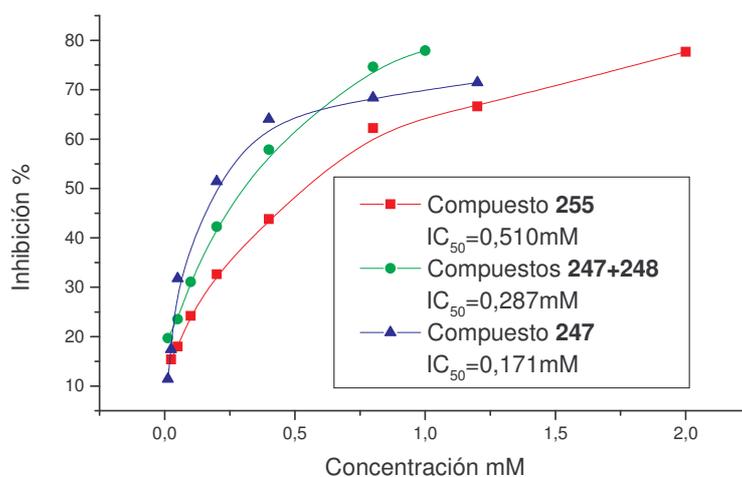


Figura 19. Curvas de inhibición de la ConA frente a manano por los compuestos **255**, **247+248** y **247**.

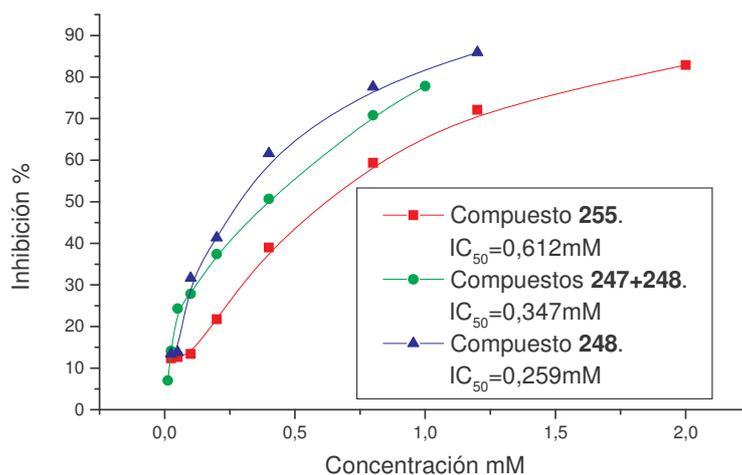


Figura 20. Curvas de inhibición de la *Arachis hypogaea* frente a manano por los compuestos **255**, **247+248** y **248**.

Al realizar los ensayos ELLA usando el polímero de glicodendrones de manosa **212** adsorbido en los pocillos de las placas ELISA se consigue una mayor afinidad de la ConA por el pocillo lo que hace que se pueda evaluar de forma más eficiente la afinidad de productos con un gran número de manosas como se comentó en el capítulo anterior.

Producto	IC ₅₀ /mM	Afinidad relativa	Número de azúcares reconocibles	Potencia relativa por azúcar reconocible
MeMan	3,20	1	1	1
249	0,114	28,07	12	2,34
250	0,257	12,45	6	2,08
251	0,044	72,72	18	4,04
252	0,176	18,18	6	3,05
253	0,032	100	18	5,55
254	0,209	15,31	6	2,55

Tabla 8. Valores de IC₅₀, afinidad relativa y potencias relativas en las pruebas ELLA con el polímero de glicodendrones **212**.

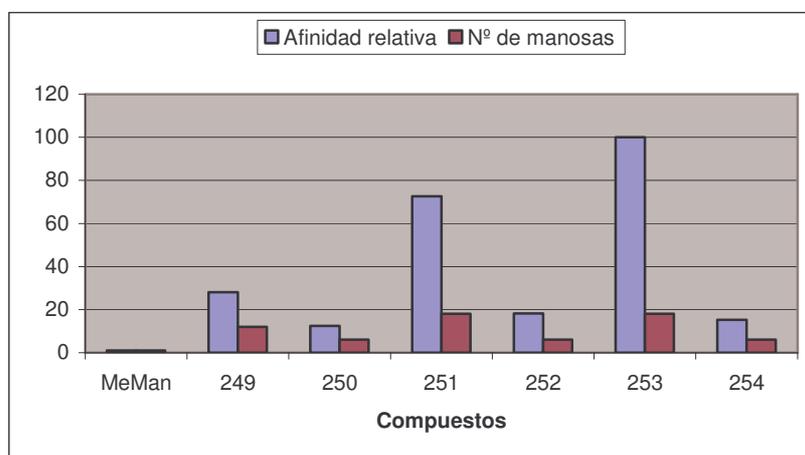


Figura 21. Valores de afinidad relativa respecto de Me-Man y número de manosas.

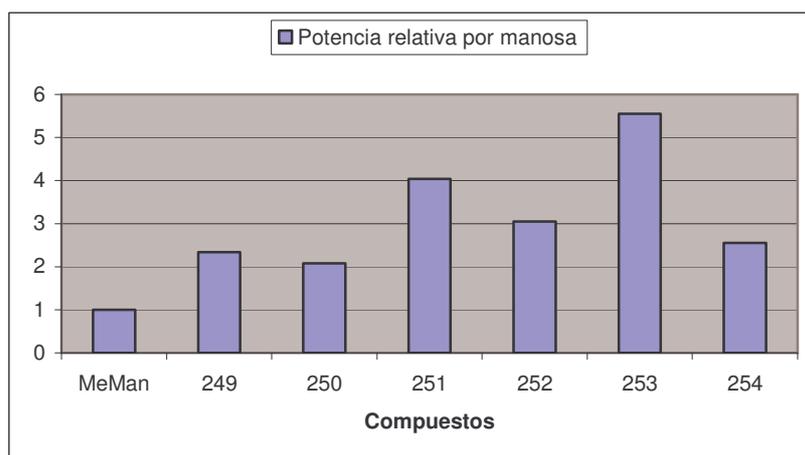


Figura 22. Valores de potencia relativa por unidad de manosa respecto de Me-Man.

Al igual que los ensayos ELLA usando manano, se observa que al aumentar el número de manosas disminuyen los valores de IC_{50} y aumentan las afinidades relativas; además se observa más claramente el efecto “cluster” ya que la potencia relativa por unidad de azúcar se incrementa notablemente en los dendrímeros de 18 manosas **251** y **253**, este efecto no es en cambio tan acusado en el compuesto **249** de 12 manosas probablemente debido a una mayor densidad superficial de azúcar.

También vuelve a observarse mayor afinidad para los dendrímeros con núcleo de antraceno **252** y **253** que para los que poseen un núcleo de hidroquinona **250** y **251** a pesar de las pequeñas diferencias estructurales.

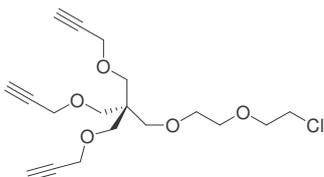
Conclusiones.

Se ha desarrollado una nueva metodología en la síntesis convergente de glicodendrimeros basados en pentaeritritol mediante “click chemistry”. Los derivados de manosa sintetizados presentan muy buenas afinidades frente a ConA, con un marcado efecto “cluster” especialmente en los compuestos **251** y **253** que contienen 18 manosas. La metodología permite la síntesis de dendrímeros heterogéneos por unión de dendrones con epitopos azucarados diferentes que pueden

ser interesantes en sistemas de adhesión mediados por más de una lectina. Así mismo los dendrímeros con un núcleo fluorescente sintetizados pueden ser muy útiles para el seguimiento de estos dendrímeros en experimentos visualizables mediante fluorescencia.

Parte experimental.

O-(2-(2-Cloroetoxi)etil)-tri-*O*-propargil-pentaeritritol **229**.



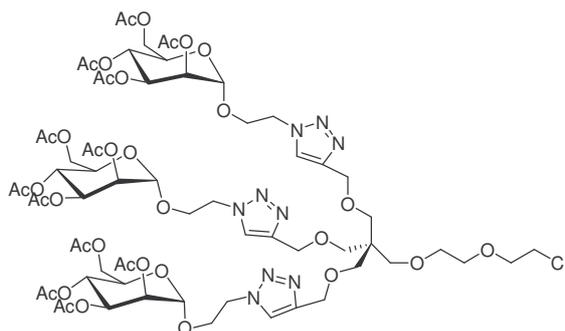
A una solución de **227** (0.250 g, 1 mmol) y Bu_4NHSO_4 (0.678 g, 2 mmol) en 2-cloroetil-éter (5 mL) se le adiciona una disolución acuosa de NaOH (50%, 5 mL). La mezcla de reacción en dos fases se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 3 h. Pasado este tiempo, se diluye con diclorometano (30 mL) y agua (30 mL), se separa la capa orgánica y se lava con agua (2 x 15 mL). Se seca la fase orgánica (Na_2SO_4) y se evapora para purificar por cromatografía en columna (AcOEt-hexano, 1:3) el compuesto **229** (0.317g, 89%) como un liquido.

IR (film) 3293, 2115, 1475, 1359, 1096 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 4.12 (d, 6 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.80-3.55 (m, 8 H, CH_2 espaciador), 3.51 (s, 6 H, 3 x $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.45 (s, 2 H, CH_2O espaciador), 2.45 (t, 3 H, $J = 2.3$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$)

^{13}C RMN (75MHz, CDCl_3): δ 80.0, 74.1, 71.2, 71.0, 70.3, 69.7, 68.9, 58.6, 44.9, 42.8

EMAR (m/z) (FAB+) calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{ClO}_5\text{Na}$: 379.1288; Enc.: 379.1285.

Glicodendrón Man-G1-Cl 230.

A una solución del alquino **229** (1mmol), el derivado de azida **127** (1.1 mmol/mmol de alquino) y el catalizador (EtO)₃P·CuI (0.1 mmol/mmol de alquino) en tolueno (15 mL) se irradia a 800W y 90 °C durante 20 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. La mezcla de reacción es evaporada y el crudo purificado mediante una pequeña columna cromatográfica (AcOEt-MeOH 20:1) obteniéndose el compuesto **230** (88%) como sustancia siruposa.

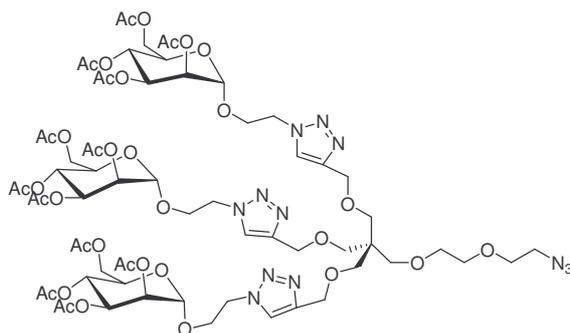
$[\alpha]_D^{20} +26^\circ$ (*c* 1, cloroformo)

IR (film) 1751, 1431, 1371, 1226, 1138, 1091, 1047, 981 cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.71 (s, 3 H, H-5 triazol), 5.31-5.20 (m, 9 H, H-2,3,4 Man), 4.82 (s, 3 H, H-1 Man), 4.59 (br s, 12 H, 6 x CH₂), 4.22 (dd, 3 H, *J* = 12.3 y 5.0 Hz, H-6 Man), 4.05 (br d, 3 H, *J* = 12.0 Hz, H-6' Man), 4.13, 3.92, 3.75-3.50 (varios m, 22 H), 2.14, 2.09, 2.04 y 1.99 (4 s, 36 H);

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 170.0, 169.9, 169.6, 145.6, 123.8, 97.6, 71.3, 71.0, 70.4, 69.7, 69.2, 68.9, 68.9, 66.3, 65.7, 64.8, 62.2, 49.6, 45.4, 43.1, 20.9, 20.8, 20.7;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₆₆H₉₄N₉O₃₅ClNa: 1630.54; Enc.: 1630.57.

Glicodendrón Man-G1-N₃ 231.

Una solución de **230** (0.746 mg, 0.46 mmol), NaN₃ (0.300, 4.6 mol) y Bu₄NI (0.018 g, 0.030 mmol) en DMF (8 mL) se agita a 80 °C durante 16 h. Se diluye con tolueno-éter etílico (75 mL, 1:1) y se lava con agua (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄) y se evapora. Se purifica por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 20:1) obteniéndose el compuesto **230** (0.701 g, 94%) como una sustancia siruposa.

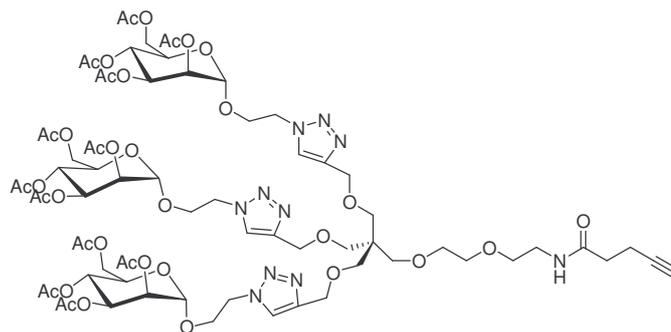
[α]_D +21° (c 1, cloroformo);

IR (film) 2255, 2109, 1752, 1284, 1237, 1093, 916, 731 cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (s, 3 H, H-5 triazol), 5.32-5.20 (m, 9 H, H-2,3,4 Man), 4.82 (s, 3 H, H-1 Man), 4.80 (m, 12 H, CH₂N, CH₂O-triazol), 4.21 (dd, 3 H, J = 12.7 y 5.1 Hz, H-6 Man), 4.13 (m, 3 H, CH₂O Man), 4.04 (br d, 3 H, J = 12.0 Hz, H-6' Man), 3.93 (m, 3 H, CH₂O-Man), 3.64 (t, 2 H, J = 5.4 Hz, CH₂O- espaciador), 3.62-3.48 (m, 7 H, H-5 Man, CH₂O espaciador), 3.47 (s, 6 H, pentaeritritol), 3.43 (s, 2 H, CH₂ pentaeritritol), 3.34 (t, 2 H, J = 5.0 Hz, CH₂N₃), 2.14, 2.09, 2.04 y 1.99 (4 s, 36 H, Ac);

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.4, 169.8, 169.7, 169.5 (COO), 145.5 (C-4 triazol), 123.6 (C-5 triazol), 97.5, 71.3, 70.9, 70.3, 69.9, 69.6, 69.1, 68.8, 68.8, 66.2, 65.7, 64.8, 62.1, 50.7, 49.5, 45.3, 20.7, 20.6;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₆₆H₉₄N₁₂O₃₅Na: 1637.58; Enc.: 1637.70.

Glicodendrón Man-G1-C≡CH 232.

A una solución de **231** (0.125g, 0.077 mmol) en MeOH (4 mL) se hidrogena con Pd/C (7.5 mg, 6% p/p) a 2 atm durante 4 horas. Se filtra sobre celita y se evapora. El crudo se disuelve en diclorometano (5 mL) y se añade ácido pentinóico (0.011g, 0.115mmol) y DCC (0.019 g, 0.092 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 30 min. Se filtra nuevamente sobre celita y se evapora el disolvente para purificar por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose **232** (0.102 g, 79%) como una sustancia siruposa.

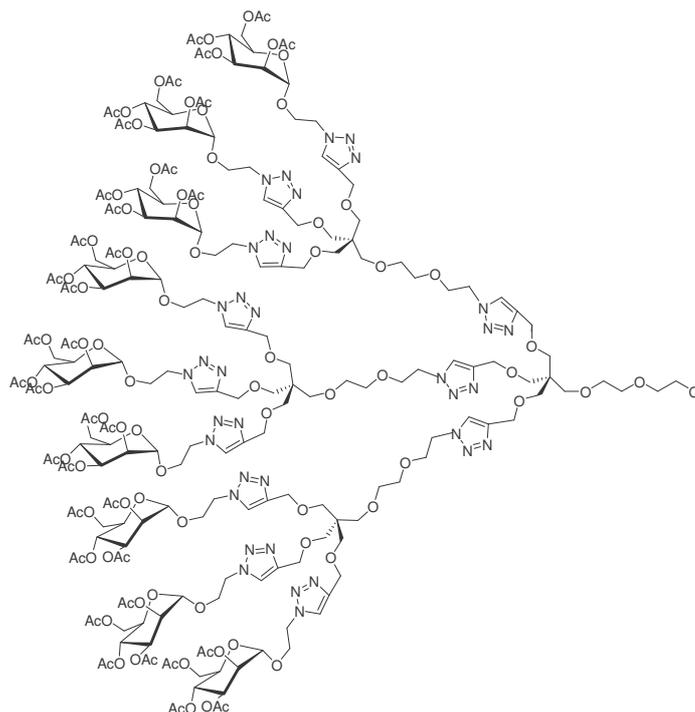
$[\alpha]_D^{+9.6}$ (*c* 1, cloroformo);

IR (film) 1746, 1667, 1432, 1371, 1226, 1138, 1089, 1048 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (s, 3 H, H-5 triazol), 6.9 (br s, 1 H, NH), 5.30-5.20 (m, 9 H, H-2,3,4), 4.82 (s, 3 H, H-1 Man), 4.66-4.50 (m, 6 H, CH_2N -triazol), 4.60 (s, 6 H, CH_2 -triazol), 4.22 (dd, 3 H, $J = 12.3$ y 5.0 Hz, H-6 Man), 4.12 (m, 3 H, CH_2O -Man), 4.04 (br d, 3 H, $J = 12.3$ y 2.1 Hz, H-6' Man), 3.92 (m, 3 H, CH_2O -Man), 3.61 (m, 3 H, H-5), 3.55-3.40 (m, 16 H, CH_2 espaciador, $\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 2.63-2.40 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.14, 2.10, 2.05 y 1.99 (4 s, 36 H, Ac).;

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 171.3, 170.6, 170.0, 169.9, 169.6, 145.6, 123.8, 97.6, 83.0, 77.3, 71.0, 70.3, 69.8, 69.7, 69.1, 69.2, 68.9, 68.9, 66.3, 65.7, 64.8, 62.2, 49.6, 45.5, 39.5, 35.2, 33.0, 21.0, 20.8, 20.7, 20.7 ;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{N}_{10}\text{O}_{36}\text{Na}$: 1691.62; Enc.: 1691.71.

Glicodendron Man-G2-Cl 233.

Una solución del alquino **229** (0.1mmol), el derivado **231** (1.1 mmol/mmol de alquino) y el catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 mmol/mmol de alquino) en tolueno (15 mL) se irradia a 800W y 90 °C durante 30 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. La mezcla de reacción se evaporada y el crudo purificado mediante una pequeña columna cromatográfica (CH_2Cl_2 -MeOH 15:1 \rightarrow 10:1) obteniéndose el compuesto **233** (89%) como una sustancia siruposa.

$[\alpha]_{\text{D}} +22^\circ$ (c 1, cloroformo);

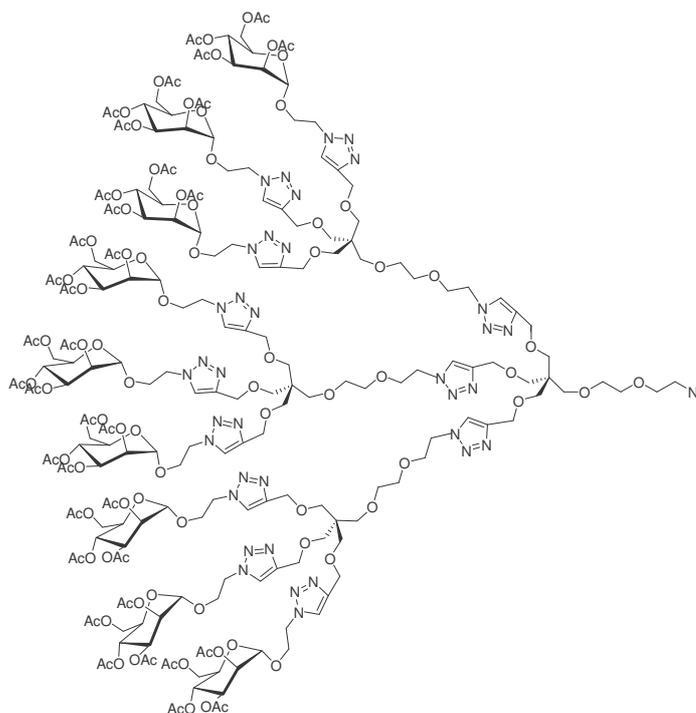
IR (film): 1748, 1371, 1226, 1139, 1090, 1049 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 7.74 (s, 9 H), 7.71 (s, 3 H), 5.30-5.10 (m, 27 H), 4.82 (m, 48 H), 4.22 (dd, 9 H, $J = 12.4$ y 5.0 Hz), 4.05 (dd, 9 H, $J = 12.3$ y 2.0 Hz), 3.72 (t, 2 H, $J = 5.6$ Hz), 3.48 (s, 18 H), 3.42 (s, 3 H), 2.13, 2.09, 2.04, 1.98 (4s, 108 H);

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.5, 169.9, 169.6, 145.6, 145.5, 145.1, 123.8, 123.6, 97.5, 71.3, 71.0, 70.3, 69.8, 69.5, 69.2, 68.9, 66.3, 65.8, 64.9, 64.8, 62.2, 50.3, 49.6, 45.3, 43.1, 20.8, 20.6;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{216}\text{H}_{307}\text{ClO}_{110}\text{N}_{36}$, 5199.92; Enc.: 5200.18.

Glicodendron Man-G2-N₃ **234**.



Una solución de **233** (0.181 mg, 0.035 mmol), NaN_3 (0.025 g, 0.350 mol) y Bu_4NI (0.0013 g, 0.004 mol) en DMF (5 mL) se agitó a 80°C durante 16 h. Pasado este tiempo el disolvente fue evaporado y el crudo disuelto en CH_2Cl_2 (50 mL) y lavado con agua (3 x 10 mL). La fase organica se secó y evaporó. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 12:1) obteniéndose **234** (0.174g, 96%) como una sustancia siruposa:

$[\alpha]_{\text{D}} +28.7^\circ$ (c 1, cloroformo);

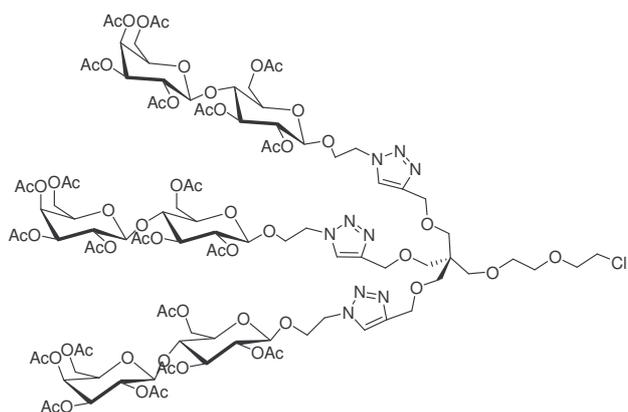
IR (film): 2109, 1751, 1371, 1227, 1139, 1090, 1049 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 7.73 (s, 9 H, NH triazol), 7.69 (s, 3 H, NH triazol), 4.82 (s, 9 H, H-1 Man), 4.57 (s, 6 H, CH_2 -triazol), 4.57 (s, 3 H, CH_2 -triazol), 3.34 (t, 2 H, $J = 5.0$ Hz, CH_2N_3), 2.13, 2.09, 2.04, 1.98 (4s, 108 H, Ac);

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.5, 169.9, 169.9, 169.6 (COO), 145.6, 145.2 (C-4 triazol), 123.7, 123.6 (C-5 triazol), 97.6 (C-1), 71.1, 71.0, 70.4, 70.3, 70.0, 69.8, 69.5, 69.4 (CH_2 espaciador), 66.4 (CH_2O -Man), 65.8 (C-4), 65.0, 64.8 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 62.3 (C-6), 50.8, 50.2, 49.6 (CH_2N), 45.5, 45.4 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (MeCO);

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{216}\text{H}_{307}\text{N}_{39}\text{O}_{110}$ 5206.92; Enc.: 5209.

Glicodendron Lac-G1-Cl **236**.



A una solución del alquino **229** (1mmol), el derivado de azida **235** (1.1 mmol/mmol de alquino) y el catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 mmol/mmol de alquino) en tolueno (15 mL) se irradia a 800W y 90 °C durante 20 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. La mezcla de reacción es evaporada y el crudo purificado mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 20:1) obteniéndose el compuesto **236** (81%) como una sustancia sirupsosa.

$[\alpha]_{436} -13.3^\circ$ (c 1, cloroformo);

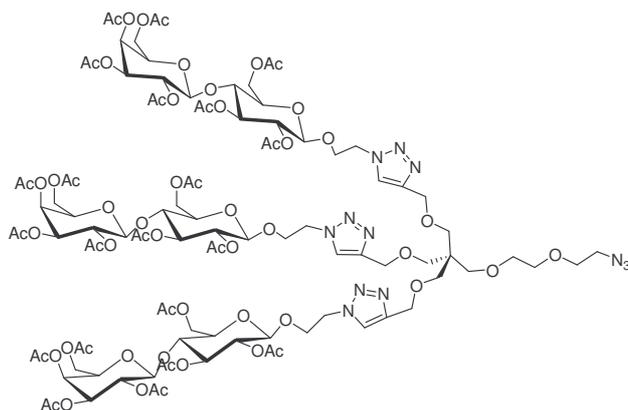
IR (film): 2941, 2879, 1751, 1432, 1370, 1228, 1056, 902 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 7.61 (s, 3 H, 5.35 (d, 3 H, $J = 3.1$ Hz), 5.14 (t, 3 H, $J = 9.5$ Hz), 5.10 (dd, 3 H, $J = 10.4$ y 7.8 Hz), 4.97 (dd, 3 H, $J = 10.4$ y 3.3 Hz), 4.89 (dd, 3 H, $J = 9.6$ y 8.0 Hz), 4.56 (s, 6 H), 4.51 (d, 3 H, $J = 8.1$ Hz), 4.50 (d, 3 H, $J = 7.7$ Hz), 3.49 (s, 6 H), 3.44 (s, 2 H), 2.15, 2.12, 2.06, 2.05, 2.04, 1.97, 1.94.;

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.4, 170.4, 170.2, 170.1, 169.7, 169.6, 169.1, 145.2, 123.8, 101.1, 100.4, 76.2, 72.9, 72.5, 71.3, 71.0, 70.7, 70.4, 69.7, 69.3, 69.1, 67.9, 66.6, 64.9, 61.8, 60.8, 60.5, 49.9, 43.1, 21.1, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 20.6;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{102}\text{H}_{142}\text{ClN}_9\text{O}_{59}\text{Na}$ 2494.80; Enc.: 2494.66.

Glicodendron Lac-G1-N₃ **237**.



Una solución de **236** (0.342 g, 0.138 mmol), NaN_3 (0.090 g, 1.4 mol) y Bu_4NI (0.005 g, 0.014 mmol) en DMF (6 mL) se agitó a 80°C durante 16 h. Pasado este tiempo se diluye con eter eter-toluene (75 mL, 2:1) y se lava con agua (3 x 20 mL). Se seca la fase orgánica y se evapora, el crudo resultante se purifica por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 20:1) obteniéndose **237** (0.295g, 86%) como una sustancia siruposa.

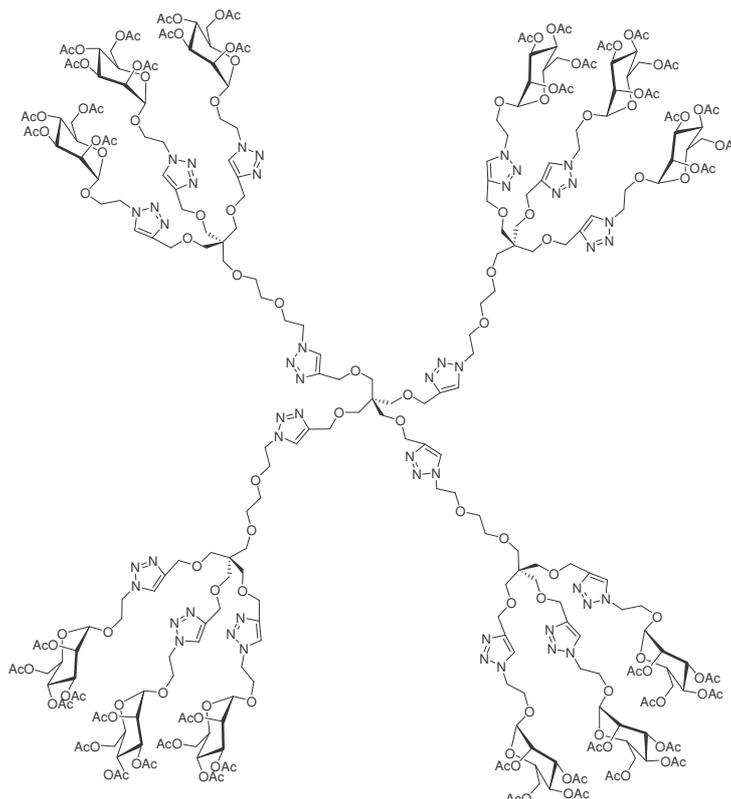
$[\alpha]_{436} -9^\circ$ (*c* 1, cloroformo);

IR (film) 2110, 1750, 1371, 1226, 1057 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.63 (s, 3 H, H-5 triazol), 5.35 (d, 3 H, $J = 3.1$ Hz, H-4'), 5.17 (t, 3 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.10 (dd, 3 H, $J = 10.4$ y 7.8 Hz, H-2'), 4.97 (dd, 3 H, $J = 10.4$ y 3.4 Hz, H-3'), 4.89 (dd, 3 H, $J = 9.5$ y 8.0 Hz, H-2), 4.60-4.45 (m, 8 H, CH_2N , CH_2O), 4.55 (s, 6 H, CH_2O -triazol), 4.51 (d, 3 H, $J = 8.0$ Hz, H-1), 4.50 (d, 3 H, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.24-4.03 (m, 15 H, H-6,6', CH_2O -Lac), 3.97-3.85 (m, 6 H, H-5', CH_2O -Lac), 4.80 (t, 3 H, $J = 9.4$ Hz, H-4), 3.66 (t, 2 H, $J = 0.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.65-3.50 (m, 5 H, H-5, CH_2O -espaciador), 3.49 (s, 6 H, $\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 3.44 (s, 2 H, $\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 3.36 (t, 2 H, $J = 4.9$ Hz, CH_2N_3), 2.15, 2.12, 2.06, 2.04, 2.04, 1.97, 1.94 (7 s, 63 H, Ac)

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.7, 169.1 (CO), 145.2 (C-5 triazol), 123.9 (C-4 triazol), 101.1 (C-1'), 100.5 (C-1), 76.2 (C-4), 73.0 (C-5), 72.6 (C-3), 71.4 (C-2), 71.0 (C-3'), 70.8 (C-5'), 70.5 (CH_2O espaciador), 70.1 (CH_2O espaciador), 69.4 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 69.2 (C-2'), 67.9 (CH_2O -Lac), 66.7 (C-4'), 64.9 (CH_2 -triazol), 61.9 (CH_2O), 60.8 (C-6,6'), 50.9 (CH_2N_3), 50.0 (CH_2N), 45.4 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (*MeCO*)

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{102}\text{H}_{142}\text{N}_{12}\text{O}_{59}\text{Na}$ 2501.83; Enc.: 2501.83.

Glicodendrimero 238.

Se hace reaccionar el compuesto **228** (0.035 mmol) con el glicodendron **231** (1.05 mmol/mmol de alquino) en presencia del catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 mmol/mmol de alquino) en tolueno (5 mL) se irradia a 800W y 90 °C durante 30 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. Tras evaporar se purifica por cromatografía en columna en (AcOEt-MeOH 5:1) obteniendose **238** (90%) como una sustancia siruposa.

$[\alpha]_{\text{D}} +30^\circ$ (c 1, cloroformo);

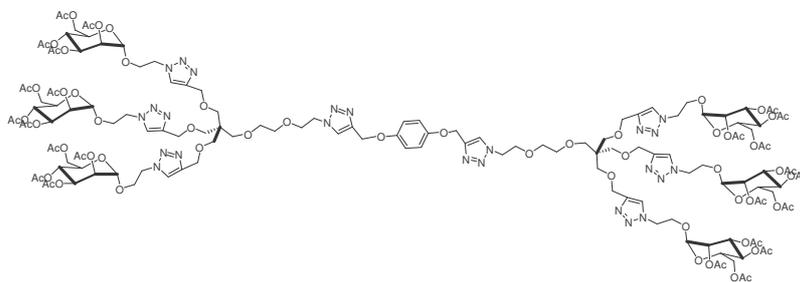
IR (film) 1745, 1371, 1251, 731 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.74 (s, 12 H, H-5 triazol), 7.71 (s, 4 H, H-5 triazol), 5.31-5.20 (m, 36 H, H,2,3,4), 4.82 (s, 12 H, H-1 Man), 4.65-4.50 (m, 64 H, CH_2 -triazol, CH_2N), 4.21 (dd, 12 H, $J = 12.4$ y 5.0 Hz, H-6) , 4.17-4.08 (m, 12 H, CH_2O -

Man), 3.98-3.84 (m, 20 H, CH₂O-Man, CH₂O-espaciadores), 3.64 (m, 12 H, H-5), 3.60-3.40 (m, 56 H, C(CH₂)₄, OCH₂CH₂O), 2.13, 2.09, 2.04, 1.98 (4 s, 144 H, Ac); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.5, 169.9, 169.8, 169.6 (COO), 145.5, 145.1 (C-5 triazol), 123.8, 123.6 (C-4 triazol), 97.5 (C-1 Man), 70.9, 70.2, 69.8, 69.5 (CH₂O), 69.2, 68.9, 68.9, 68.8 (C-2,3,5 Man), 66.3 (CH₂O-Man), 65.7 (C-4), 64.9, 64.8 (CH₂-triazol), 62.2 (C-6), 50.2, 49.6 (CH₂N), 45.35 (C(CH₂)₄), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (MeCO)

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₂₈₁H₃₉₆N₄₈O₁₄₄Na 6773.37; Enc.: 6773.0.

Glicodendrimero 240.



La disolución del derivado dialquino **239** (0.0295 mmol) y el glicodendrón de manosa **231** (0.071 mmol) en presencia del catalizador (EtO)₃P·CuI (0.1 mmol/mmol de alquino) en tolueno (5 mL) se irradia a 800W y 90 °C durante 30 min. en un Milestone Star Microwave Labstation lo que permite obtener, después de una purificación por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1), el producto deseado **240** con un 87% de rendimiento como una sustancia siruposa.

[α]_D +24° (c 1, cloroformo);

IR (film) 1748, 1507, 1434, 1371, 1226, 1138, 1090, 1048 cm⁻¹;

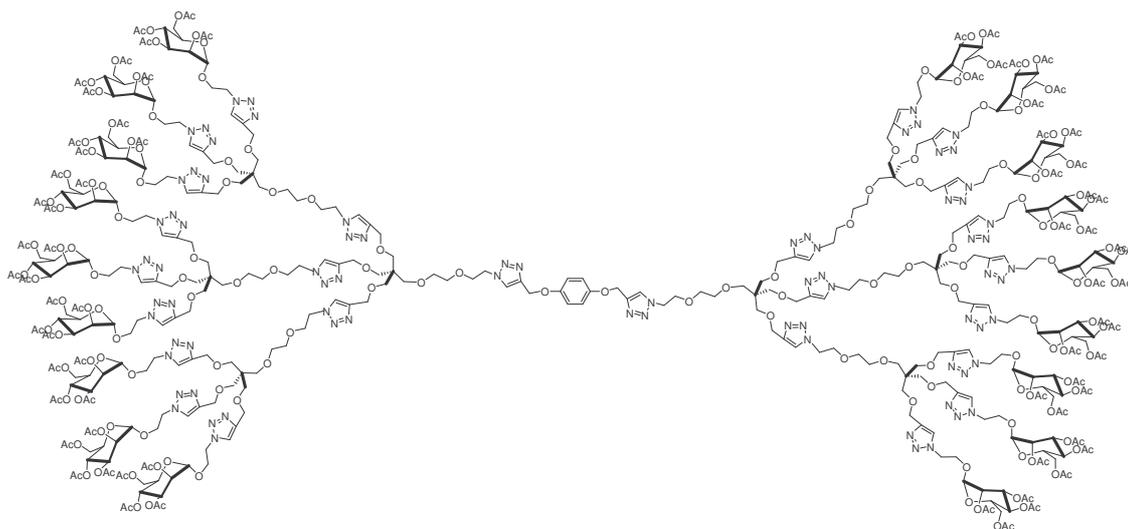
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (s, 2 H), 7.67 (s, 6 H), 6.88 (s, 4 H), 5.30-5.10 (m, 18 H), 5.07 (s, 4 H), 4.77 (d, 6 H, J = 1.3 Hz), 4.60-4.45 (m, 12 H), 4.52 (s, 12 H), 4.17 (dd, 6 H, J = 12.4 y 5.0 Hz), 4.08 (m, 6 H), 3.99 (dd, 6 H, J = 12.3 y 2.3 Hz),

3.84 (m, 10 H), 3.58 (m, 6 H), 3.55-3.40 (m, 12 H), 3.43 (s, 12 H), 3.38 (s, 4 H), 2.09, 2.05, 1.99, 1.94 (4s, 72 H) ;

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 169.9, 169.9, 169.6, 152.9, 145.5, 143.9, 124.0, 123.8, 115.9, 97.5, 71.0, 70.4, 69.7, 69.4, 69.2, 69.2, 68.9, 66.3, 65.7, 64.8, 62.5, 62.2, 50.4, 49.6, 45.3, 20.8, 20.7, 20.7, 20.7;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{144}\text{H}_{198}\text{N}_{24}\text{O}_{72}\text{Na}$ 3438.246; Enc.: 3437.82.

Glicodendrimero 241.



Una disolución de los derivados **234** (0.066 mmol), **239** (0.03 mmol) y el catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 mmol/mmol de alquino) en DMF se irradia con microondas 800 W y 90 °C durante 90 min, lo que permite obtener el producto **241** con un 57% de rendimiento como una sustancia siruposa, previa purificación por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 12:1 \rightarrow 10:1).

$[\alpha]_{\text{D}} +22^\circ$ (c 1, cloroformo);

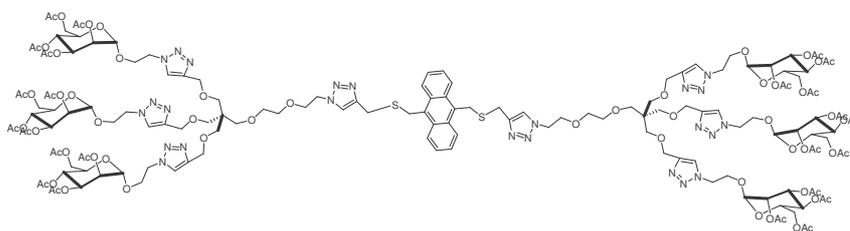
IR (film) 1750, 1671, 1227, 1138, 1091, 1048 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 7.80 (s, 2 H), 7.74 (s, 18 H), 7.62 (s, 6 H), 6.89 (s, 4 H), 5.31 (s, 4 H), 5.29-5.21 (m, 54 H), 4.82 (s, 18 H), 4.63-4.51(m, 104 H), 4.22 (dd, 18 H, $J = 12.3$ y 4.9 Hz), 4.04 (br d, 18 H, $J = 12.0$ Hz), 2.13, 2.09, 2.04, 1.98,

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 169.9, 169.9, 169.6, 145.4, 145.0, 123.8, 115.8, 97.5, 71.0, 70.2, 69.6, 69.4, 69.3, 69.1, 68.9, 68.8, 66.3, 65.6, 64.7, 62.1, 50.3, 49.5, 45.3, 20.8, 20.7, 20.7, 20.7;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{444}\text{H}_{624}\text{N}_7\text{O}_{222}$ 10606.1; Enc.: 10605.0.

Glicodendrímero 243.



Se hace reaccionar el compuesto **242** (0.035 mmol) con el glicodendron **231** (1.1 mmol/mmol de alquino) en presencia del catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 mmol/mmol de alquino) en tolueno (5 mL) se irradia a 800W y 90°C durante 30 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. Tras evaporar se purifica por cromatografía en columna en (AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose **243** (88%) como una sustancia siruposa.

$[\alpha]_{\text{D}}^{+27^\circ}$ (c 1, cloroformo);

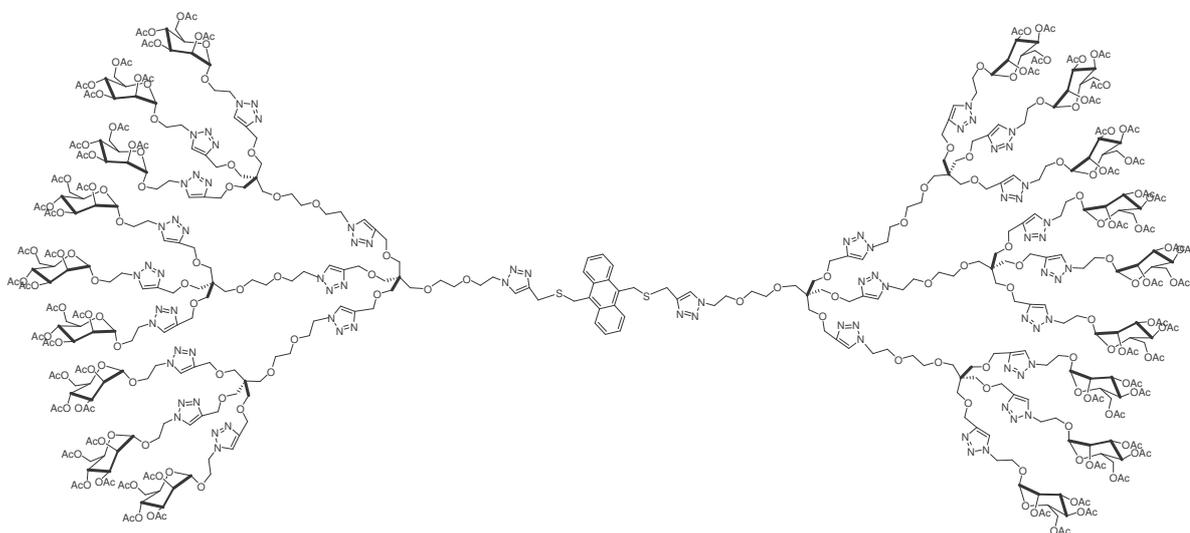
IR (film): 1750, 1434, 1227, 1139, 1090, 1049, 735 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (m, 4 H, Ar), 7.74 (s, 2 H, H-5 triazol), 7.70 (s, 6 H, H-5 triazol), 7.48 (m, 4 H, Ar), 5.30-5.16 (m, 18 H, H-2,3,4), 4.82 (s, 4 H, CH_2S), 4.80 (s, 6 H, H-1), 4.65-4.50 (m, 16 H, CH_2N), 4.57 (s, 12 H, CH_2 -triazol),

4.21 (dd, $J = 12.4$ y 5.0 Hz, H-6), 4.1 (m, 6 H, CH₂O-Man), 4.03 (dd, 6 H, $J = 12.4$ y 2.2 Hz, H-6'), 3.98 (s, 4 H, CH₂S), 3.89 (m, 6 H, CH₂O-Man), 3.68-3.46 (m, 15 H, H-5, CH₂-espaciador), 3.48 (s, 12 H, C(CH₂)₄), 3.43 (s, 4 H, C(CH₂)₄), 2.13, 2.09, 2.03, 1.98 (Ac);

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.5, 169.9, 169.8, 169.5 (CO) 145.5, 145.2 (C-4 triazol), 129.7, 129.5, 125.8, 125.0 (Ar), 123.7, 123.0 (C-5 triazol), 97.4 (C-1), 70.8, 70.3, 70.0, 69.4, 69.3 (CH₂O), 69.0, 68.8, 68.7 (C-2,3,5), 66.2 (CH₂O-Man), 65.6 (C-4), 64.6 (CH₂-triazol), 62.1(C-6), 50.3, 49.9 (CH₂N), 45.1 (C(CH₂)₄), 29.4, 27.6 (CH₂S), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6 (MeCO).

Glicodendrimero 244.



Una disolución de los derivados **234** (0.024 mmol), **242** (0.011 mmol) y el catalizador (EtO)₃P·CuI (0.1 mmol/mmol de alquino) en DMF se irradia con microondas 800 W y 90 °C durante 90 min. Tras evaporar y purificar por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 12:1 → 10:1) se obtiene el producto **244** con un 61% de rendimiento como una sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +8.6^\circ$ (*c* 1, cloroformo);

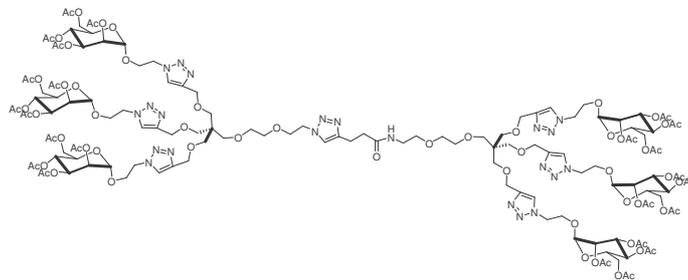
IR (film) 1751, 1433, 1370, 1228, 1139, 1049 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 8.28 (m, 4 H), 7.49 (m, 4 H), 7.75 (br s, 24 H), 4.82 (s, 18 H), 4.59 (s, 36 H), 4.22 (dd, 18 H, $J = 12.0$ y 4.0 Hz), 4.04 (br d, 18 H, $J = 12.3$ Hz), 3.49 (s, 36 H), 2.14, 2.10, 1.99.;

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 170.0, 169.9, 169.7, 145.5, 129.9, 129.1, 128.3, 125.9, 123.8, 97.6, 71.1, 70.3, 69.8, 69.5, 69.2, 69.0, 66.4, 65.8, 64.8, 62.9, 62.3, 50.3, 49.6, 45.4, 29.8, 20.9, 20.8, 20.7.;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{454}\text{H}_{632}\text{N}_{78}\text{O}_{220}$ 10766.4; Enc.: 10789.4.

Glicodendrimero 245.



Se hacen reaccionar los glicodendrones **231** (0.035 mmol) y **232** (1.1 mmol/mmol de alquino) en presencia del catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (0.1 mmol/mmol de alquino) en DMF (5 mL) irradiando a 800W y 90 °C durante 40 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. Tras evaporar se purifica por cromatografía en columna en (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1 \rightarrow 12:1) obteniéndose **245** (77%) como una sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +27^\circ$ (*c* 1, cloroformo);

IR (film): 1747, 1664, 1371, 1226, 1139, 1090, 1048 cm^{-1} ;

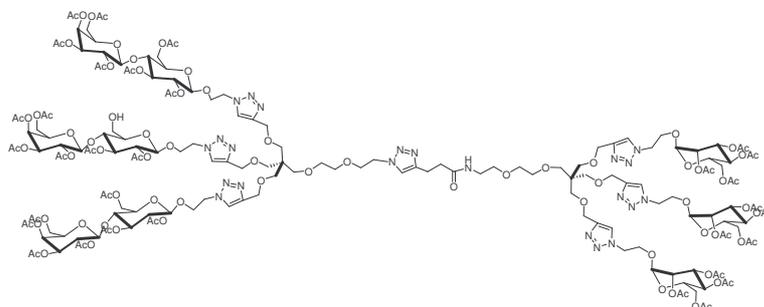
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 7.76 (s, 3 H, H-5 triazol), 7.75 (s, 3 H, H-5 triazol), 7.60 (s, 1 H, H-5 triazol), 4.82 (s, 6 H, H-1 Man), 4.22 (dd,

6 H, $J = 12.3$ y 5.0 Hz, H-6 Man), 4.04 (dd, 6 H, $J = 12.0$ Hz, H-6' Man), 3.64 (m, 6 H, H-5), 3.03 (t, 2 H, $J = 7.6$ Hz, CONHCH₂CH₂-triazol), 2.61 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, CONHCH₂CH₂-triazol), 2.13, 2.09, 2.04 y 1.98 (4 s, 72 H, Ac);

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 170.0, 169.7 (CO), 146.7, 145.5, 145.4 (C-4 triazol), 123.9 (C-5 triazol), 97.6 (C-1), 70.9, 70.4, 70.1, 69.4 (CH₂O), 69.2, 69.0, 69.0 (C-2,3,5), 66.3 (CH₂O-Man), 65.8 (C-4), 64.8 (CH₂-triazol), 62.3 (C-6), 50.4, 49.7 (CH₂N triazol), 45.4 (C(CH₂)₄), 39.5 (CH₂N), 35.6, 23.1 (CH₂CH₂CONH), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (MeCO);

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₁₃₇H₁₉₄N₂₂O₇₁Na 3306.21; Enc.: 3306.25.

Glicodendrimero 246.



Se hacen reaccionar los glicodendrones **232** (0.035 mmol) y **237** (1.1 mmol/mmol de alquino) en presencia del catalizador (EtO)₃P·CuI (0.1 mmol/mmol de alquino) en DMF (5 mL) irradiando a 800W y 90 °C durante 40 min. en un Milestone Star Microwave Labstation. Tras evaporar se purifica por cromatografía en columna en (CH₂Cl₂-MeOH 20:1 → 12:1) obteniéndose **246** (83%) como una sustancia siruposa.

$[\alpha]_D +6.3^\circ$ (c 1, cloroformo);

IR (film): 2934, 2878, 1751, 1664, 1432, 1371, 1228, 1050 cm⁻¹;

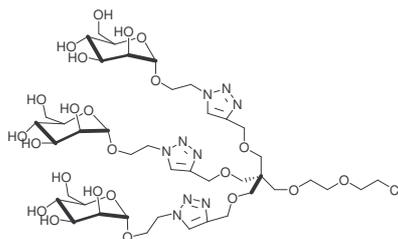
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (señales seleccionadas): δ 7.75 (s, 3 H), 7.62 (s, 3 H), 7.54 (s, 1 H), 6.68 (br s, 1 H), 4.35 (d, 3 H, $J = 3.1$ Hz), 4.97 (dd, 3 H, $J = 10.4$ y 3.4 Hz), 4.88 (dd, 3 H, $J = 9.5$ y 8.1 Hz), 4.82 (s, 3 H), 3.01 (m, 2 H), 2.61 (m, 2 H), 2.16, 2.15, 2.14, 2.12, 2.10, 2.08, 2.06, 2.04, 1.99, 1.97, 1.94 (11 s, 99 H);

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 170.1, 170.0, 169.9, 169.9, 169.6, 169.6, 169.1, 145.5, 123.8, 101.1, 100.4, 97.5, 77.3, 76.1, 72.8, 72.4, 71.3, 71.0, 70.6, 70.1, 69.7, 69.2, 69.1, 68.9, 67.8, 66.6, 66.2, 65.6, 64.7, 62.2, 61.8, 60.7, 49.8, 49.65, 45.5, 39.3, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5;

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{173}\text{H}_{242}\text{N}_{22}\text{O}_{95}\text{Na}$ 4170.67; Enc. 4170.47.

Procedimiento general de des-*O*-acetilación para la obtención de los glicodendrones 247, 248 y los glicodendrimeros 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 260.

A una solución del correspondiente derivado per-*O*-acetilado (0.1 mmol) en MeOH anhidro (15 mL) se le añaden 100 μL de MeONa/MeOH 1M y la mezcla de reacción se agita durante 2 horas en el caso de **247** y **248**, 24 horas para los productos **249**, **250**, **252**, **254** y **255**, mientras que para los productos **251** y **253** fue necesario añadir 5ml de agua a las 24 horas para solubilizar el producto de desacetilación parcial y continuar agitando durante 24 horas más. Se neutraliza con una resina ácida Dowex 550 A, se filtra y finalmente se liofiliza.

Glicodendrón 247.

Rendimiento: 87%

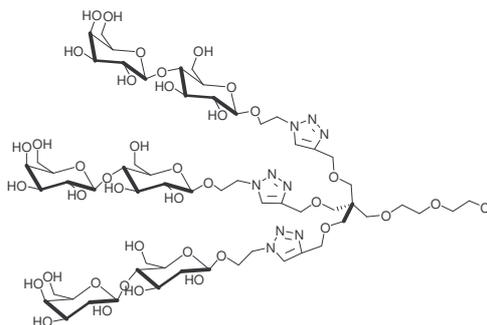
$[\alpha]_D^{+32}$ (c 0.5, H₂O);

IR (KBr): 3410, 2889, 1657, 1079 cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) (señales seleccionadas): δ 8.01, 4.72, 4.62, 4.56, 4.45, 4.05, 3.93, 3.79, 3.66, 3.53, 3.36, 3.35, 3.16, 2.08.

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 144.0, 124.0, 99.8, 74.2, 70.8, 70.1, 66.7, 70.53, 70.48, 69.3, 68.6, 64.9, 64.2, 61.1, 49.3, 45.0, 43.7.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₄₂H₇₀ClN₉O₂₃Na 1126.417; Enc.: 1126.372.

Glicodendrón 248.

Rendimiento: 90%

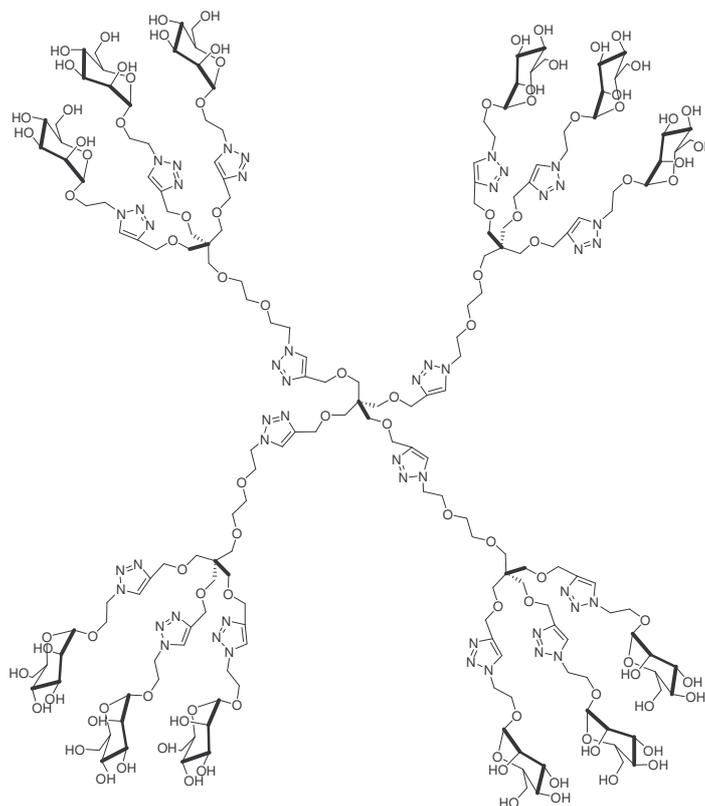
$[\alpha]_D^{+32}$ (c 0.5, H₂O);

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) (señales seleccionadas): δ 8.09, 4.56, 4.44, 3.66, 3.61, 3.50, 3.37, 3.30.

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 143.8, 124.3, 103.7, 100.3, 80.5, 75.3, 74.8, 74.7, 73.0, 72.8, 70.4, 68.0, 70.3, 69.2, 68.5, 67.2, 64.0, 60.3, 60.2, 49.3, 44.9, 43.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{60}\text{H}_{100}\text{ClN}_9\text{O}_{38}\text{Na}$ 1612.575; Enc.: 1612.763.

Glicodendrimero 249.



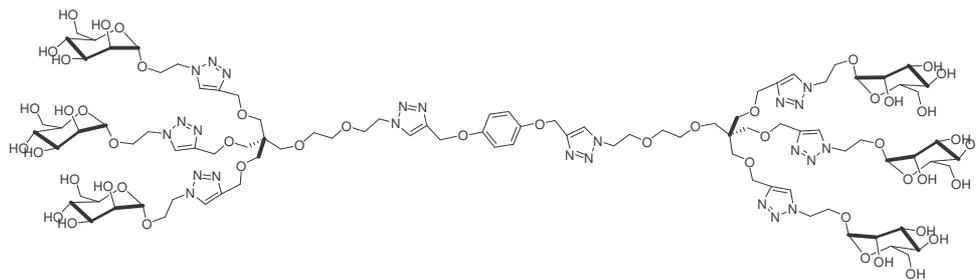
Rendimiento: 70%

$[\alpha]_D^{+38}$ (*c* 0.5, H_2O);

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) (señales seleccionadas): δ 8.00, 4.74.

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 144.0, 143.9, 123.9, 99.8, 74.1, 70.4, 69.2, 68.7, 68.7, 68.6, 66.8, 64.9, 64.1, 61.1, 49.2, 44.9.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{185}\text{H}_{300}\text{N}_{48}\text{O}_{96}$ 4732.63; Enc.: 4733.19.

Glicodendrimero 250.

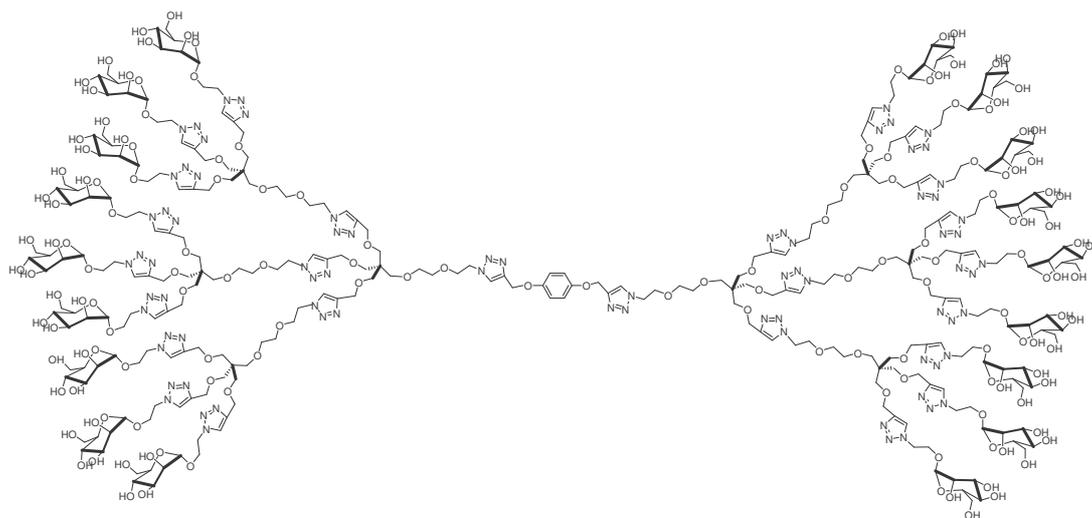
Rendimiento: 72%

$[\alpha]_D +27^\circ$ (*c* 0.5, H₂O);

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) (señales seleccionadas): δ 8.07, 7.97, 6.89.

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 152.4, 144.6, 125.4, 116.6, 99.8, 73.0, 70.7, 70.1, 66.6, 70.0, 68.9, 68.4, 65.6, 63.8, 61.8, 60.9, 50.4, 50.2, 45.0.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₉₆H₁₅₀N₂₄O₄₈Na 2429.9931; Enc.:2429.851.

Glicodendrimero 251.

Rendimiento: 88%

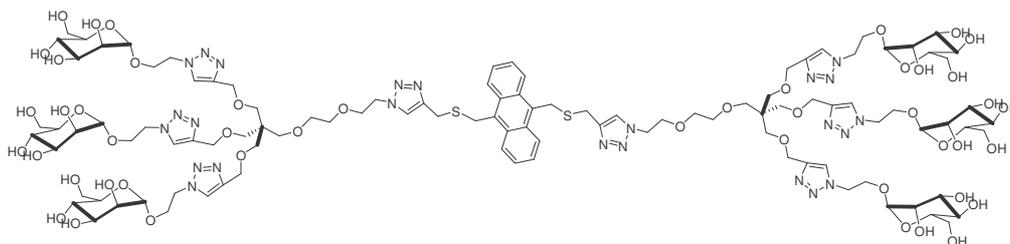
$[\alpha]_D +16^\circ$ (*c* 0.5, H₂O);

^1H RMN (300 MHz, D_2O) (señales seleccionadas): δ 8.05.

^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 152.3, 144.4, 125.7, 125.4, 116.1, 99.6, 72.8, 70.5, 69.9, 66.4, 69.6, 69.4, 68.9, 68.7, 65.5, 60.7, 50.1, 44.8.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{300}\text{H}_{480}\text{N}_{78}\text{O}_{150}\text{Na}$ 7602.5; Enc.: 7604.2.

Glicodendrímero 252.



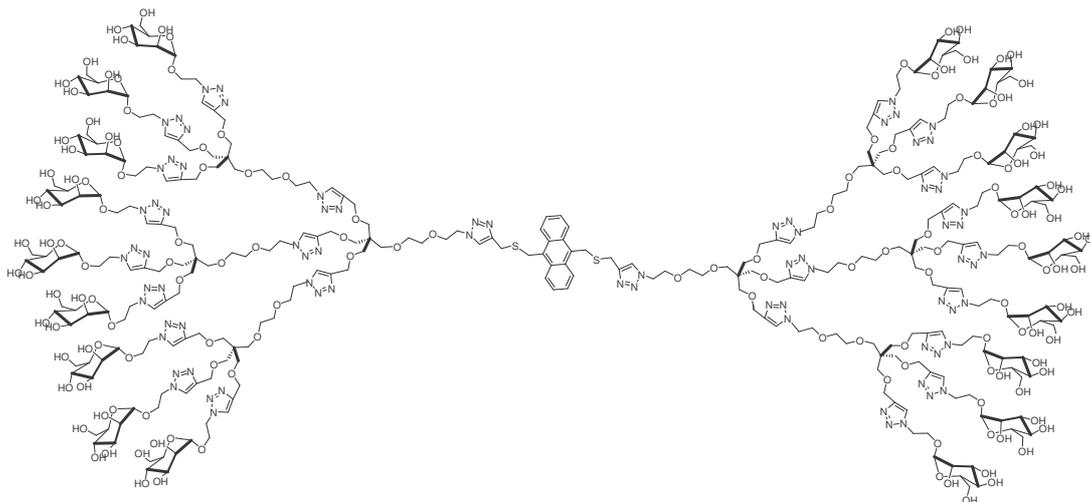
Rendimiento: 53%

$[\alpha]_{\text{D}} +22^\circ$ (c 0.5, H_2O);

^1H RMN (300 MHz, D_2O) (señales seleccionadas): δ 7.96.

^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 144.6, 125.6, 125.4, 125.1, 124.8, 116.6, 99.8, 73.0, 70.7, 70.1, 69.9, 68.5, 66.6, 65.6, 63.8, 60.9, 50.2, 23.5.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{106}\text{H}_{158}\text{N}_{24}\text{O}_{46}\text{S}_2\text{Na}$ 2606.005; Enc.: 2605.368.

Glicodendrimero 253.

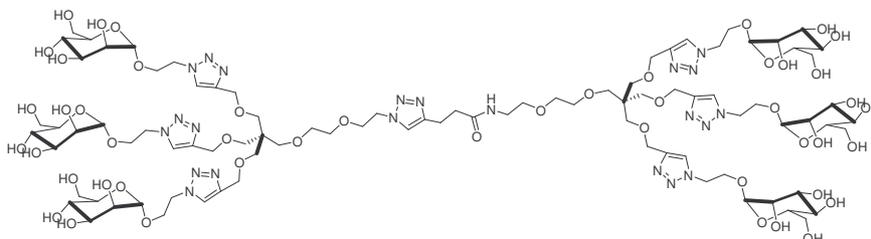
Rendimiento: 89%

$[\alpha]_D +23^\circ$ (*c* 0.5, H₂O);

¹H RMN (300 MHz, D₂O) (señales seleccionadas): δ 7.90, 7.85.

¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 144.3, 144.25, 144.2, 129.4, 125.4, 125.3, 125.1, 99.6, 72.8, 70.5, 69.9, 69.6, 68.9, 68.7, 68.2, 66.4, 65.4, 63.6, 60.7, 50.0, 44.8.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para C₃₁₀H₄₈₈N₇₈O₁₄₈S₂ 7739; Enc.: 7742.

Glicodendrimero 254.

Rendimiento: 53%

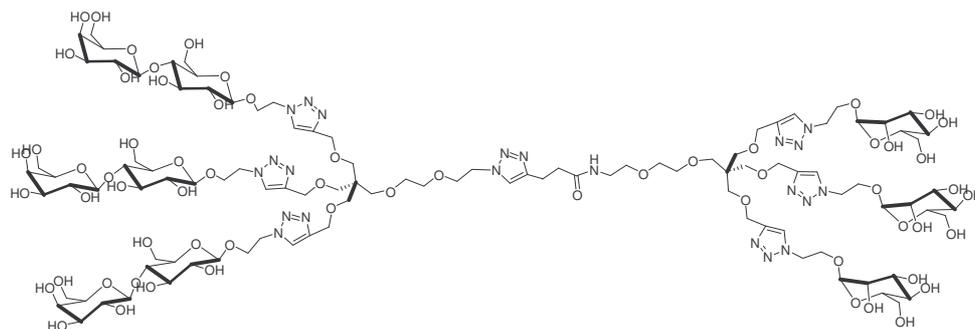
$[\alpha]_D +20^\circ$ (*c* 0.5, H₂O);

^1H RMN (300 MHz, D_2O) (señales seleccionadas): δ 8.09, 4.84, 4.79, 4.70, 4.60, 4.13, 3.97, 3.90.

^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 174.8, 144.5, 123.7, 99.7, 72.9, 70.6, 70.0, 68.5, 66.5, 65.5, 63.7, 60.8, 50.2, 44.9, 39.1, 35.2, 21.2.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{89}\text{H}_{146}\text{N}_{22}\text{O}_{47}\text{Na}$ 2297.96; Enc.: 2297.80.

Glicodendrímero 255.



Rendimiento: 68%

$[\alpha]_{\text{D}} +15^\circ$ (c 0.5, H_2O);

^1H RMN (300 MHz, D_2O) (señales seleccionadas): δ 8.06, 7.78.

^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 145.4, 144.3, 126.9, 126.7, 104.3, 103.6, 100.9, 99.6, 76.7, 76.1, 75.6, 74.1, 73.9, 73.8, 72.2, 71.7, 71.2, 70.7, 69.8, 69.5, 69.4, 66.8, 64.8, 62.3, 62.0, 61.3, 51.6, 51.3, 46.0.

EMAR (m/z) (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{107}\text{H}_{176}\text{N}_{22}\text{O}_{66}\text{Na}$ 2784.12; Enc.: 2783.72.

Capítulo V.

**Síntesis de “glico-sílicas” mediante
“click chemistry”. Aplicaciones en
cromatografía de afinidad.**

Introducción.

La inmovilización de biomoléculas es una herramienta fundamental en la investigación biológica y en las áreas relacionadas por su gran potencial en la caracterización de sus funciones e interacciones con otras biomoléculas, en la aplicación en el análisis y purificación de mezclas de biomoléculas, en el diseño de ensayos en fase sólida o en el implante de superficies bioactivas como ejemplos más representativos¹⁸⁹.

Todas estas aplicaciones están basadas en las interacciones específicas de las biomoléculas con otras moléculas y requieren que uno de los miembros involucrados en la interacción esté fijado adecuadamente a un soporte sólido. Ejemplo de estas interacciones son las interacciones antígeno-anticuerpo, carbohidrato-lectina o enzima-inhibidor.

En un sentido amplio existen dos clases de inmovilización de biomoléculas a superficies: la inmovilización no covalente basada en adsorciones físicas y la inmovilización covalente en superficies funcionalizadas químicamente. Los “microarrays”¹⁹⁰, las bionanopartículas¹⁹¹, las microesferas¹⁹², los “chips” biosensores¹⁹³ y las monocapas autoensambladas (SAMs)¹⁹⁴ son algunas de las herramientas desarrolladas más destacables basadas en el uso de superficies

¹⁸⁹a) K. L. Hanson, L. Filipponi, D. V. Nicolau, in *Microarray Technology and Its Applications* (Eds.: U. R. Müller, D. V. Nicolau), Springer, Heidelberg, **2005**, pp. 23-44.

b) A. K. Mallia, P. K. Smith, *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, **1992**.

c) A. S. Hoffman, J. A. Hubbell, *Surface-immobilized biomolecules. Biomaterials Science* (2nd Ed), Elsevier, San Diego **2004**, pp. 225-233.

¹⁹⁰ R. R. Martel, M. P. Rounseville, I. W. Botros, B. E. Seligman, in *Microarray Technology and Its Application* (Eds.: U. R. Müller, D. V. Nicolau), Springer, Heidelberg, **2005**, pp. 3-22.

¹⁹¹a) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158.

b) C. W. C. Warren, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 40-46.

¹⁹²M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631-635.

¹⁹³E. Gizeli, C. R. Lowe, *Biomolecular Sensors*, Taylor & Francis Ltd, London **2002**.

¹⁹⁴a) F. Schreiber, *J. Phys-Condens. Matter* **2004**, *16*, R881-R900.

b) K. Kato, in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Vol. 2 (Eds.: G. L. Bowlin, G. Wnek), Dekker, New York, **2004**, 1331-1339.

funcionalizadas con biomoléculas, y que poseen un gran número de importantes aplicaciones en las ciencias “ómicas”.

En particular, la cromatografía de afinidad¹⁹⁵ es una de las técnicas más importantes basadas en la interacción específica de moléculas inmovilizadas con mezclas de biomoléculas, permitiendo su análisis y/o purificación. Si se considera el tipo de soporte se pueden distinguir dos tipos: *cromatografía de afinidad de baja eficiencia* en la que los soportes usados son geles no rígidos y de diámetro grande (como agarosa, dextrano o celulosa); y *cromatografía de afinidad de alta eficiencia* (HPAC) que usa partículas pequeñas y rígidas basadas en gel de sílice o polímeros sintéticos que son capaces de soportar altos flujos y/o presiones que son característicos de los sistemas HPLC.

La cromatografía de afinidad ha mostrado ser muy flexible y con un gran número de aplicaciones principalmente a través de la unión covalente de lectinas (cromatografía de afinidad de lectinas)¹⁹⁶, de proteínas A y G¹⁹⁷ y anticuerpos (cromatografía de inmunoafinidad)¹⁹⁸ como moléculas captadoras. En este sentido, los carbohidratos han sido poco utilizados como ligandos de afinidad¹⁹⁹ principalmente por la dificultad intrínseca de la síntesis de moléculas que contengan carbohidratos debido a las estrategias de protección ortogonales de los grupos hidroxilo que son necesarias así como a la dificultad en la formación de enlaces glicosídicos estereoselectivos. A pesar de ello, se han realizado recientemente avances en la unión quimioselectiva covalente de carbohidratos para su

¹⁹⁵ a) *Handbook of Affinity Chromatography*, Vol 92 (Chromatographic Science Series) (Eds: D. S. Hage, J. Cazes), CRC Press, New York, **2005**.

b) W. Clarke, D. S. Hage, *Separ. Puri. Rev.* **2003**, 32, 19-60.

¹⁹⁶ C. Doinel, M. Caron, *Bio-Sciences* **1986**, 5, 125-133.

¹⁹⁷ A. Jungbauer, R. Hahn, *Curr Opin. Drug Discovery & Development* **2004**, 7, 248-256.

¹⁹⁸ a) G. W. Jack, D. J. Beer, *Methods in Molecular Biology*, **1996**, 59, 187-196.

b) K. Brocklehurst, A. J. Courey, S. Gul, S. H. Lin, R. L. Moritz, *Purifying Proteins for Proteomics*, **2004**, 221-273.

¹⁹⁹ P. R. Satish, A. Surolia, *Methods for Affinity-Based Separations of Enzymes and Proteins*, **2002**, 115-129.

inmovilización en superficies sólidas²⁰⁰. Las diferentes metodologías desarrolladas requieren de una superficie modificada y de un glicoconjugado convenientemente funcionalizado con grupos funcionales complementarios para obtener bioortogonalidad en la unión. La reacción de grupos sulfhidrilo con maleimidas y disulfuros, la reacción de Staudinger usando azidas y reactivos de fosfina especialmente diseñados, la cicloadición de Diels-Alder y la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas se han mostrado ser reacciones quimioselectivas poderosas adecuadas para esos fines y han encontrado importantes aplicaciones no sólo en la construcción de “arrays” de carbohidratos²⁰¹ inmovilizados, sino también en ingeniería “cell-surface” y en la síntesis de glicoproteínas y productos naturales glicosilados.

De las reacciones mencionadas anteriormente, la cicloadición de alquinos y azidas²⁰² (Reacción de Huisgen) se ha establecido recientemente como una importante herramienta sintética dentro del concepto de “click chemistry”²⁰³ especialmente desde el descubrimiento de su catálisis regioselectiva y a temperatura ambiente mediante Cu(I)²⁰⁴. Otras ventajas de esta reacción son la fácil introducción de azidas y alquinos en los sustratos y la estabilidad de ambas funciones que toleran agua y oxígeno, y que permiten el ensamblaje modular de diferentes moléculas. Por último, la formación de los triazoles resultante de la fusión de ambas funciones es irreversible y normalmente transcurre con muy altos rendimientos. Debido a estas notables características, se han desarrollado una gran cantidad de aplicaciones en

²⁰⁰ J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59-81.

²⁰¹ a) Referencia 87.

b) M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Drug Discov. Today: Targets* **2004**, *3*, 151-158.

c) Referencia 89.

d) I. Shin, S. Park, M.-R. Lee, *Chem-Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.

e) Referencia 88.

²⁰² Referencia 9.

²⁰³ Referencia 32.

²⁰⁴ a) Referencia 6.

b) Referencia 5.

c) Referencia 21.

ciencia biomédica, síntesis orgánica y ciencia de los materiales mediante el uso de “click chemistry”²⁰⁵. En particular, la funcionalización de soportes basados en gel de sílice²⁰⁶ y agarosa²⁰⁷ así como la unión covalente de carbohidratos a superficies sólidas²⁰⁸ para el desarrollo de “glicoarrays”²⁰⁹, “quantum-dots” que contienen carbohidratos²¹⁰ y monocapas autoensambladas de azúcares (sugar-SAMs)²¹¹ se ha realizado usando esta metodología, como se comentó más extensamente en la introducción sobre “click chemistry” al comienzo de la presente Tesis Doctoral.

Como soporte de cromatografía, el gel de sílice es un material de interés debido a que su rigidez estructural lo hace invulnerable al hinchamiento y resistente a grandes cambios de presión o flujo sin desintegrarse o deformarse. Sin embargo, a pesar de que existen un amplio rango de tamaños de partículas, tamaños de poro y macromoléculas que se adsorben sobre el gel de sílice, éste no ha sido utilizado con asiduidad en la inmovilización y purificación por afinidad de macromoléculas. Entre las causas para ello deben mencionarse que las fuertes interacciones electrostáticas que dominan el proceso²¹² de adsorción son difíciles de modular y la curvatura de las partículas de gel de sílice provoca una distorsión en la estructura secundaria de la

²⁰⁵a) Referencia 8.

b) Referencia 32.

c) Referencia 33.

²⁰⁶T. Lummerstorfer, H. Hoffmann, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3963-3966.

²⁰⁷S. Punna, E. Kaltgrad, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1536-1541.

²⁰⁸X. L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52-57.

²⁰⁹a) N. K. Devaraj, G. P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J. P. Collman, E. T. Kool, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8600-8601.

b) Referencia 91.

c) Referencia 92.

²¹⁰G. L. Huang, T. C. Liu, M. X. Liu, X. Y. Mei, *Anal. Biochem.* **2005**, *340*, 52-56.

²¹¹Y. Zhang, S. Luo, Y. Tang, L. Yu, K. Y. Hou, J. P. Cheng, X. Zeng, P. G. Wang, *Anal. Chem.* **2005**, *78*, 2001-2008.

²¹²a) H. Larseriscdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *237*, 98-103.

b) M. Van der Veen, W. Norde, M.C. Stuart, *Colloid. Surface. B.* **2004**, *35*, 33-40.

c) D. Rezwan, L. P. Meier, L. J. Gauckler, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4351-4357.

d) P.M. Biesheulvel, M. Van der Veen, W. Norde, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4172-4180.

macromolécula adsorbida que repercute sobre su actividad catalítica²¹³. Estudios recientes han revelado la orientación adquirida por el BSA adsorbido a gel de sílice²¹⁴ y han demostrado que la unión de PEG a lisozima altera la orientación molecular preferida y hace que la adsorción sea menos irreversible²¹⁵. Estos experimentos le confieren gran interés al gel de sílice como soporte de inmovilización. Dado que la modificación de proteínas y la modulación de su orientación es difícil de alcanzar, es más factible la aproximación de modificar la superficie de las partículas de gel de sílice para modular la afinidad y la especificidad por macromoléculas. La introducción de grupos funcionales orgánicos en la superficie del gel de sílice para obtener geles de sílice modificados ha sido aplicada en cromatografía, catálisis y en eliminación de sustancias nocivas²¹⁶. En particular los métodos como la unión covalente de polímeros o el recubrimiento con polímeros hidrofóbicos han tenido éxito en la pasivación de la superficie del gel de sílice confiriéndole especificidad. En estos casos los agentes acoplados han demostrado tener un papel en la interacción entre la proteína y la superficie dando lugar a diferencias en el comportamiento cromatográfico del gel de sílice funcionalizado²¹⁷. A pesar de esto, los materiales de gel de sílice que contienen azúcares unidos covalentemente son escasos en la bibliografía y han encontrado usos limitados como son la eliminación de derivados de boro²¹⁸ y el aislamiento y purificación de lectinas²¹⁹.

²¹³a) A. Kondo, F. Muakami, M. Kawagoe, K. Higashitani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *39*, 726-731. b) M. Lundqvist, I. Sethson, B.H. Jonsson, *Langmuir* **2004**, *20*, 10639-10647. c) A. A. Vertegel, R. W. Siegel, J.S. Dordick, *Langmuir* **2004**, *20*, 6800-6807.

²¹⁴H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289*, 26-35.

²¹⁵S. M. Daly, T. M. Przybycien, R. D. Tilton, *Langmuir* **2005**, *21*, 1328-1337.

²¹⁶a) P. M. Price, J. H. Clark, D. J. Macquarrie, *Dalton T.* **2000**, 101-110. b) P. K. Jal, S. Patel, B. K. Mishra, *Talanta* **2004**, *62*, 1005-1028.

²¹⁷H. Lakhari, J. Jozefonvicz, D. Muller, *J. Chromatogr. B* **1998**, *76*, 33-41.

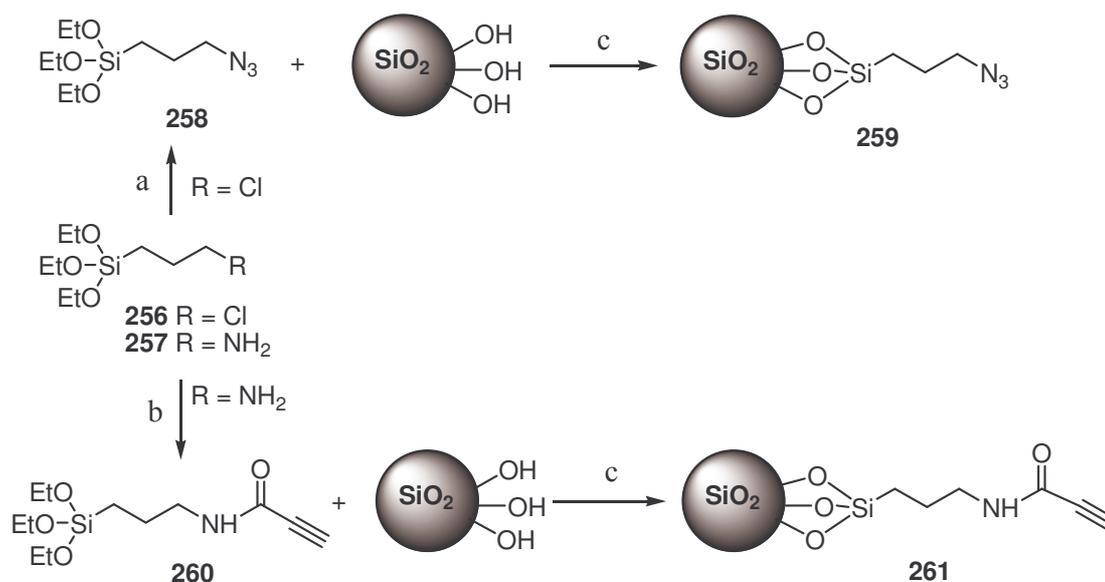
²¹⁸G. Rodriguez-Lopez, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, L. A. Villaescusa, D. Beltran, P. Amoros, *Chem. Commun.* **2004**, 2198-2199.

²¹⁹a) A. Heeboll-Nielsen, M. Dalkiaer, J. J. Hubbuch, O. R. T. Thomas, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 311-323. b) W. C. Lee, C. C. Hsiao, R. C. Ruaan, *J. Chem Technol. Biotechnol.* **1995**, *64*, 66-72.

Con la intención de desarrollar un procedimiento rápido, eficiente y barato para la inmovilización de carbohidratos fijamos nuestra atención en el gel de sílice como un soporte sólido universal muy accesible para ser funcionalizado con las funciones azido y alquino, que combinado con la cicloadición 1,3 dipolar de alquinos y azidas catalizada por Cu(I) permite acceder a una metodología económica, regioselectiva y de alto rendimiento para la unión de estas biomoléculas lo que permite acceder a materiales que podemos denominar como “glico-sílicas”(geles de sílice funcionalizados covalentemente con azúcares). Para evaluar la potencialidad de tales materiales, también decidimos estudiar su uso como soportes en cromatografías de afinidad para la purificación y aislamiento de lectinas.

Resultados y discusión.

Para llevar a cabo los objetivos marcados se seleccionó Concanavalina A (ConA) como lectina, considerando el hecho de que es la más ampliamente usada en el estudio de interacciones carbohidrato-lectina. Como la ConA une específicamente α -D-manopiranosidos y α -D-glucopiranosidos, se decidió preparar glico-sílicas que contuvieran α -D-manopiranosidos. La modificación de la superficie es el primer requisito del proceso que conduce a la inmovilización de las biomoléculas a un soporte sólido. Para ello, se llevó a cabo la funcionalización química del gel de sílice mediante la silanización de gel de sílice comercial activado con los correspondientes derivados trietoxisilano de azida y alquino obteniéndose geles de sílice con estos grupos funcionales unidos covalentemente.



Esquema 56.a N₃Na, Bu₄NI, butanona, reflujo; **b** Ácido propiónico, DCC, CH₂Cl₂; **c** Tolueno, reflujo.

El 3-azidopropiltriethoxisilano **258**²²⁰ y la amida del ácido propiónico con el 3-aminopropiltriethoxisilano **260** fueron fácilmente preparados a partir de los productos comerciales 3-cloro- y 3-aminopropiltriethoxisilano **256** y **257**, respectivamente, siguiendo procedimientos usuales. Después los silanos se hicieron reaccionar con el gel de sílice activado en tolueno a reflujo. De esta manera se obtienen eficientemente los geles de sílice funcionalizados **259** y **261** (esquema 56).

Considerando que las interacciones proteína-carbohidrato que se dan en la naturaleza son multivalentes, se llevó a cabo no solo la inmovilización de carbohidratos monovalentes con los monosacáridos alquino **130**²²¹ y azido **127**²²² sino también con los dendrones trivalentes **231** y **232** que son obtenidos también por

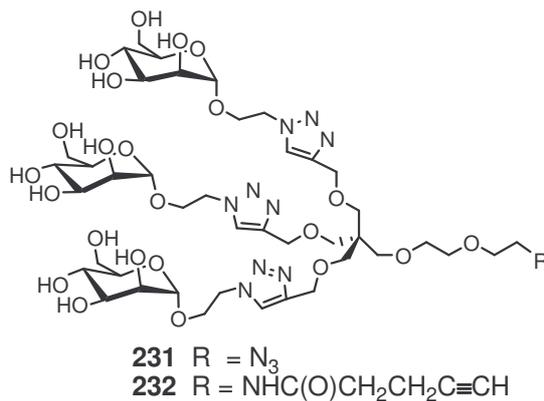
²²⁰A. Karl, W. Buder, *Eur. Patent* 50768 A2 19820505, **1982**; Chem. Abst. **1982**, 97, 163246.

²²¹R. Roy, S. K. Das, F. Santoyo-Gonzalez, F. Hernandez-Mateo, T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem.Eur. J.* **2000**, 6, 1757-1762.

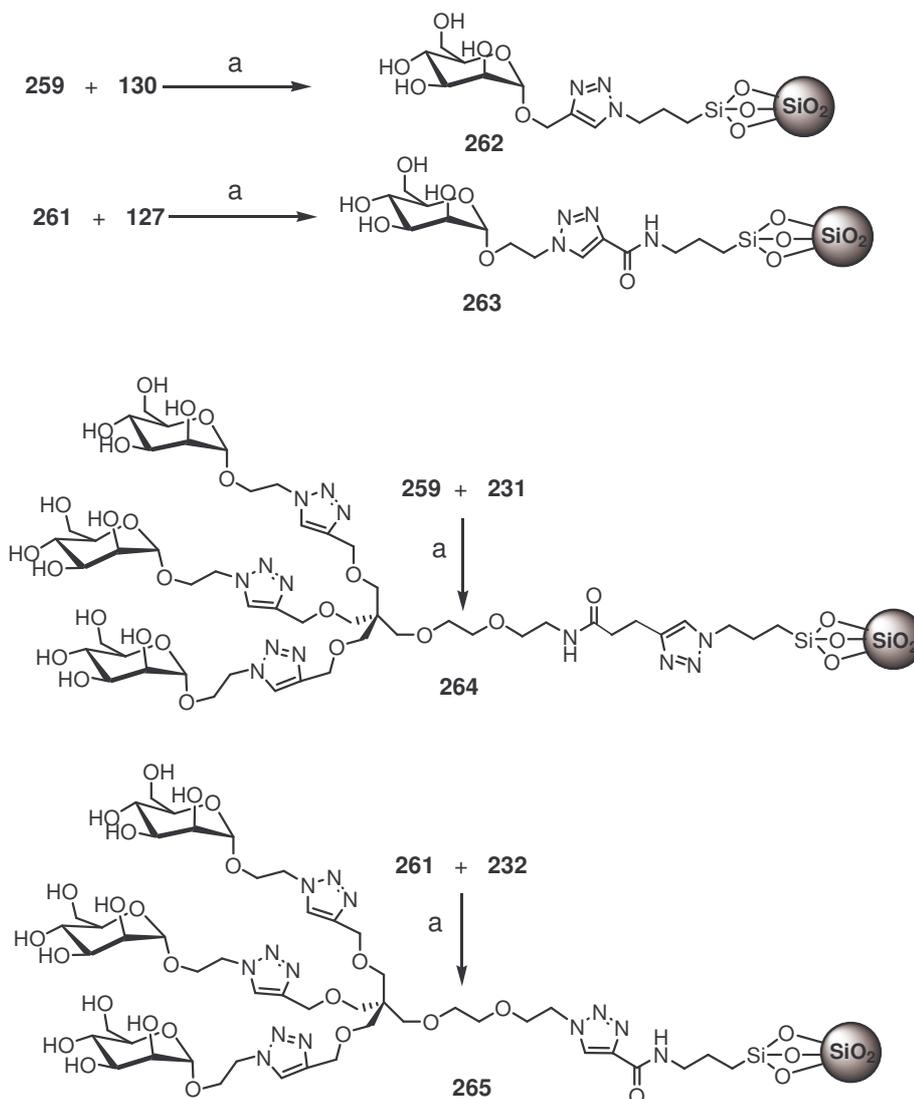
²²²A. Y. Chernyak, G. V. M. Sharma, L. O. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky, N. K. Kochetkov, A. V. R. Rao, *Carbohydr. Res.* **1992**, 223, 303-309.

“click chemistry” a partir del pentaeritritol y que fueron descritos en el capítulo IV de la presente Tesis Doctoral.

La unión de los derivados alquino **130** y **232** y azido **127** y **231** a los geles de sílice funcionalizados complementarios se llevó a cabo por “click chemistry” en DMF y presencia de $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ irradiando con microondas a 800W y 90 °C, obteniéndose las glico-sílicas **262-265** que son fácilmente aisladas por filtración y lavadas ampliamente, para posteriormente ser secadas antes de su uso (esquema 57).



Esquema 57.



Esquema 58. a CuI(C₂H₅)₃P, DMF, MW.

Una vez sintetizadas las glico-sílicas, se evaluó su capacidad de unión a ConA mediante una metodología adecuada que permitiera caracterizar y determinar su aplicabilidad como soporte de cromatografía de afinidad. Es conocido que la cromatografía de afinidad es una herramienta útil en el análisis de sistemas

insolubles²²³ puesto que los ensayos de inhibición de hemoaglutinación (HIA) y los ensayos ELLA, que son las técnicas usuales para el análisis de las interacciones proteína-carbohidrato, están restringidas a ensayos en solución. La caracterización fue llevada a cabo empacando la glico-sílica en una columna, seguido de la saturación de esta columna con una disolución de ConA en tampón HEPES y del lavado con tampón HEPES para eliminar la proteína no unida. Con el objeto de evaluar la fuerza de la interacción de las glico-sílicas y la ConA, las columnas se sometieron a un gradiente de NaCl para identificar las interacciones inespecíficas seguidas de la elución con una disolución 1M de metil- α -D-manopiranosido (α -D-ManpOMe) para comprobar las interacciones específicas manosa-ConA. Se llevó a cabo un ensayo control aplicando el mismo protocolo a una columna de gel de sílice sin modificar.

²²³L.E. Samuelson, K.B. Seby, E.D. Walter, D.J. Singel, M.J. Cloninger, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3075-3079.

Tabla 9. Resumen de la caracterización de las glico-sílicas **262-265** y comparación con gel de sílice sin modificar.^[a]

	Gel de sílice	Glico-sílicas			
		262	263	264	265
ConA inicialmente unida a la columna (mg)	0.93	0.58	0.45	0.93	0.63
ConA eluida por los lavados con tampón (mg)	0.32	0.17	0.17	0.45	0.31
ConA retenida por la columna (mg)	0.61	0.41	0.28	0.48	0.32
<i>ConA retenida por la columna (%)^[b]</i>	<i>41</i>	<i>27</i>	<i>19</i>	<i>34</i>	<i>21</i>
ConA eluida por el gradiente de NaCl (mg)	0.18	0.12	0.07	0.04	0.00
<i>ConA retenida eluida por gradiente de NaCl (%)^[c]</i>	<i>29</i>	<i>29</i>	<i>25</i>	<i>8</i>	<i>0</i>
ConA eluida con α -D-ManpOMe (mg)	0.13	0.25	0.21	0.41	0.26
<i>Recuperada con α-D-ManpOMe (%)^[d]</i>	<i>30</i>	<i>86</i>	<i>100</i>	<i>93</i>	<i>81</i>
<i>Capacidad de carga de la sílica^[e]</i>	<i>0.50</i>	<i>0.96</i>	<i>0.81</i>	<i>1.58</i>	<i>1.00</i>

^[a] ConA estimada espectrofotométricamente asumiendo A_{280} 0.1% (= 1 g/L) 1.08. Los cálculos están referidos a 1.5 mg de ConA presentes en la muestra y a los 260 mg de gel de sílice y de las diferentes glico-sílicas (ver parte experimental).

^[b] % = (ConA retenida por la columna / 1.5) x 100.

^[c] % = (ConA eluida por el gradiente de NaCl / ConA retenida por la columna) x 100.

^[d] % = ConA eluido con α -D-ManpOMe / (ConA retenido por la columna – ConA eluido por NaCl) x 100.

^[e] La capacidad de carga indica la cantidad de ConA adsorbida específicamente por la resina = mg de ConA / g sílica

De los resultados recogidos en la tabla 9 se pueden deducir diferentes conclusiones. En primer lugar, el gel de sílice sin modificar es el material con mayor capacidad de retención de ConA, 41% frente a 19-34% en el caso de las glico-sílicas **262-265**. Este hecho es especialmente remarcable dado que tanto el gel de sílice como la ConA están cargados negativamente y son de esperar repulsiones electroestáticas desfavorables a la interacción (punto isoelectrico estimado de la

ConA = 5.27)²²⁴. Este fenómeno de adsorción a pesar de las repulsiones electroestáticas no es exclusivo de la ConA, ha sido observado con anterioridad para ferritina (punto isoeléctrico estimado 5.4)²²⁵ y estudiado en detalle para BSA (punto isoeléctrico 4.7)²²⁶ y endo- β -1,3-glucanasa (punto isoeléctrico 4.4)²²⁷. La adsorción de proteínas en una superficie hidrofílica en condiciones de repulsión electroestática fue predicha por Arai y Norde²²⁸ para proteínas flexibles (*soft proteins*), entendiéndose por tales proteínas con una baja estabilidad conformacional lo que permite reordenamientos estructurales de la molécula en la adsorción, usándose la entropía conformacional ganada para vencer las repulsiones electroestáticas desfavorables. Esta hipótesis está por completo de acuerdo con la reducción del contenido en α -hélices de las moléculas de BSA adsorbidas a gel de sílice recogido en bibliografía, y puede explicar el comportamiento de la ConA cuya estructura ternaria consiste en tres hojas β y en la que el 50% restante de los residuos no tiene estructura secundaria definida²²⁹. Sin embargo, también se debe mencionar que un estudio reciente ha demostrado que endo- β -1,3-glucanasa posee una estructura rígida (*hard protein*), siendo adsorbida en superficies cargadas negativamente mientras conserva sus características estructurales nativas lo que la desvía del modelo clásico.

En segundo lugar, los resultados de la tabla 9 indican que la cantidad de ConA eluida por el gradiente de NaCl es dependiente de la naturaleza del glicoconjugado siendo insignificante para las glico-sílicas funcionalizadas con derivados trivalentes **264** y **265** mientras que es significativa para las funcionalizadas con derivados

²²⁴E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Apple, A. Bairoch, in *The Proteomics Protocol Handbook* (Ed.: J. M. Walker), Humana Press Inc, Totowa, N. J., **2005**, pp 571-607.

²²⁵J. J. Valle-Delgado, J. A. Molina-Bolivar, F. Galisteo-Gonzalez, M. J. Galvez-Ruiz, A. Feiler, R. W. Rutland, *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16*, S2383-S2392.

²²⁶a) W. Norde, J.P. Favier, *Colloid. Surface.* **1992**, *64*, 87-93. b) H.Larsenicsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289*, 26-35.

²²⁷Koutsopoulos, S., van der Oost, J., Norde, W. *Biophys. J.* **2004**, *88*: 467-474.

²²⁸T. Arai, W. Norde, *Colloid. Surface.* **1990**, *51*, 1-15.

²²⁹R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, L. Wyns, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1383*, 9-36.

monovalentes **262** y **263** y similar al gel de sílice sin modificar. Este resultado apoya observaciones anteriores sobre la influencia de concentraciones de sales como NaCl en las interacciones de ConA con polisacáridos y glicoproteínas y su relación con las diferentes estructuras de los sacáridos unidos²³⁰. Sin embargo, independientemente de la funcionalización, el α -D-ManpOME provoca la elución de la ConA unida a los geles de sílice, incluido el gel de sílice sin modificar, aunque la recuperación va desde el 30% para el gel de sílice sin modificar al 81% - 100% para las glico-sílicas **262-265**, lo que hace a los materiales sintetizados adecuados para ser usado en cromatografía de afinidad.

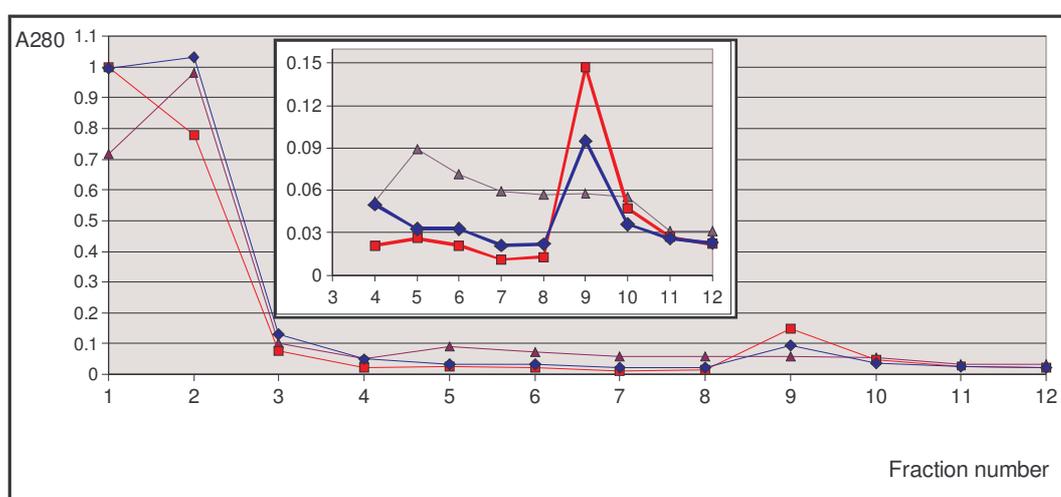


Figura 23. Los cromatogramas muestran el funcionamiento de las glico-sílicas **262** (◆) y **264** (■) en comparación con gel de sílice (▲) como partículas de glicofinidad en la purificación de ConA a partir de una mezcla contaminada con el extracto crudo de raíces de plantas. Dentro se muestra un detalle del efecto de la fuerza iónica y de α -ManpOME sobre la ConA unida. La tabla resume el rendimiento de la elución con α -D-ManpOME. *Fracción 1*: ConA no unida; *Fracción 2*: lavado con tampón HEPES; *Fracciones 3-8*: lavados con 1.6 M NaCl en tampón HEPES; *Fracciones 9-12*: elución con 1 M α -D-ManpOME en tampón HEPES.

²³⁰A. Salahuddin, R. Begum, B. K. Averill, *Biochem J.* **1984**, *22*, 639-642.

Para evaluar el potencial de los materiales obtenidos por modificación del gel de sílice, nos centramos en dos problemas específicos que necesitan ser mejorados, a pesar de las diversas técnicas disponibles en la actualidad en la investigación proteómica, como son la separación de la proteína de la muestra y el etiquetado de la proteína. Se han descrito un gran número de técnicas de separación por cromatografía de afinidad como una herramienta poderosa que puede formar parte del esquema de trabajo tradicional²³¹ y puede evitar algunas de las desventajas técnicas de la electroforesis bidimensional. Para el caso particular de la glicómica, la cromatografía de glicofinidad está establecida como una buena aproximación para separar parejas glicoproteína/carbohidrato²³² y elucidar interacciones y especificidades²³³. Para probar el potencial de las glico-sílicas como soportes en cromatografía de afinidad, se seleccionaron las glico-sílicas **262** y **264** en base a su estructura y capacidad de carga, y fueron comparadas con gel de sílice sin modificar en la purificación de la ConA contenida en un 1 mL de una solución de 3 mg/mL que contenía 0.15 mg/mL de ConA comercial y 2.85 mg/mL de un extracto crudo de proteínas de raíces de plantas, como modelo de purificación de ConA de una fuente natural. El experimento se resume en la figura 23. Como era de esperar a la luz de la caracterización anterior, el gel de sílice sin modificar y la glico-sílica atrapan una cantidad similar de proteína del extracto y menor que la **262**. Sin embargo, a diferencia del gel de sílice, la proteínas unidas a las glico-sílicas no son sensibles a la disolución de NaCl 1.6 M y sí lo son a α -D-ManpOMe. La electroforesis del pico confirmó la purificación y demostró que es suficiente un solo paso para aislar la ConA presente en el extracto con mayor pureza que la de la muestra comercial como se observa en la figura 24. El comportamiento de la glico-sílica **264** es destacable ya

²³¹W.C. Lee, K. H. Lee, *Anal. Biochem.* **2004**, 324, 1-10.

²³²V. Horejsi, J. Kocoarek, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 53, : 299-315.

²³³a) M. Caron, A. P. Seve, D. Badier, R. Joubert-Caron, *J. Chromatogr. B* **1998**, 715 153-161. b) Caron, M., Joubert-Caron, R., Cartier, J. R., Chadli, A., Bladier, D., *J. Chromatogr.* **1993**, 646, 327-333.

que permite recuperar el 98% de la ConA contenida en la muestra, el 82% en la fracción del pico (figura 23). Para realizar un análisis más profundo de la influencia de la naturaleza de los residuos azucarados en las propiedades cromatográficas de las glico-sílicas se llevo a cabo un segundo experimento de purificación en el que la mezcla de proteína consistía en una solución de 1.6 mg/mL que contenía 0.4 mg/mL de ConA comercial y 1.2 mg/mL de lisado de *Escherichia coli*, como modelos de purificación de ConA recombinante. Como se muestra en la figura 25, las glico-sílicas dendríticas **264** y **265** muestran mejores rendimientos y picos más agudos en el cromatograma mientras que la proteína eluida de la glico-sílica **262** monovalente se recoge en dos fracciones.

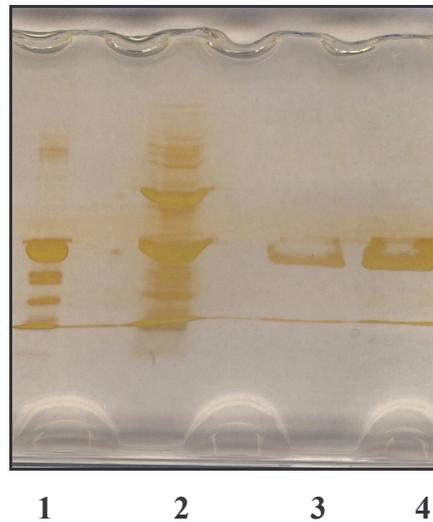


Figura 24. Análisis mediante electroforesis y tinción de plata de las glico-sílicas **262** (línea 3) y **264** (línea 4) para la purificación de ConA comercial (línea 1) de una mezcla (línea 2).

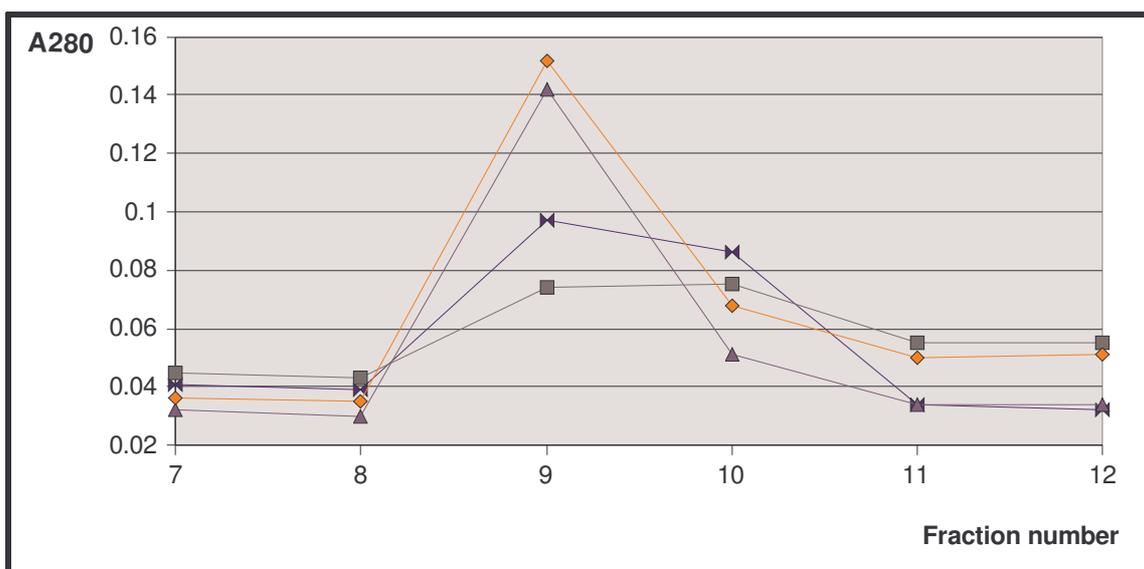


Figura 25. Detalle de los cromatogramas mostrando los picos de elución resultantes en la purificación de ConA de la muestra contaminada con extracto de *E. Coli* con la glico-sílicas **262** (▶◀), **263** (■), **264** (□), **265** (▲). *Fracciones 7-8*: lavado con 1.6 M NaCl en tampón HEPES; *Fracciones 9-12*: elución con 1 M α -D-ManpOMe en tampón HEPES.

El potencial de la inmovilización de una proteína en una columna de glico-sílica no se limita a la purificación e identificación sino que también puede permitir la modificación de proteínas preservando la integridad de los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs) que son las regiones responsables de la interacción con las glico-sílicas. Como la detección de proteínas en muchos de los sistemas de alto rendimiento de procesado usados en la investigación proteómica se basan en etiquetados fluorescentes²³⁴, se decidió marcar ConA con un reactivo fluorescente. Existen gran cantidad de agentes fluorescentes disponibles en el mercado, los de esqueleto de benzoxadiazol han sido ampliamente usados en biociencia²³⁵ aunque su baja solubilidad en agua han limitado su uso en el etiquetado

²³⁴A. Waggoner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *1*:62-66.

²³⁵S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 295-318.

de proteínas. Sin embargo, los 4-nitro-7-benzofurazanil éteres muestran solubilidad y reactividad en agua lo que podría evitar esta limitación, al no ser comercial la síntesis de 4-(2-hidroxietoxi)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-OCH₂CH₂OH) se llevó a cabo por el procedimiento descrito en bibliografía²³⁶.

El etiquetado de la ConA con NBD-OCH₂CH₂OH se efectuó con la lectina anclada a la glico-sílica **264**. Aunque es conocido que la estructura prevalente de la ConA en la interfase agua/mica es un dímero²³⁷, la inmovilización se llevo a cabo a pH 5.2 para forzar la estructura dimérica frente a la tetramérica asegurando de este modo la protección del máximo número de dominios de reconocimiento de carbohidratos por interacción con las unidades de manosa de la glico-sílica. Antes de proceder al marcaje, la columna fue equilibrada con tampón fosfato pH 8.4 y la reacción se realizó recirculando durante toda la noche NBD-OCH₂CH₂OH (1 mL de disolución 7.25mM en tampón fosfato). Después del lavado con tampón HEPES para eliminar el exceso de NBD-OCH₂CH₂OH, la muestra fue eluida con una disolución 1 M de α -D-ManpOMe en tampón HEPES. El motivo de este cambio de tampón y pH se basa en que la reacción se da sobre los grupos amino para lo que es necesario un pH básico²³⁸. La reacción también puede tener lugar con grupos tiol²³⁹ aunque a pH ácido es mucho más lenta y en la ConA no hay cisteínas accesibles. El éxito del etiquetado fue analizado mediante una electroforesis SDS y visualizando el gel en un transiluminador UV estándar (figura 26).

²³⁶ L. Johnson, S. Lagerkvist, P. Lindroth, M. Ahnoff, K. Martinsson, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 939-942.

²³⁷ M. J. Waner, M. Gilchrist, M. Schindler, M. Dantus, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1649-1657.

²³⁸ P. B. Ghosh, M.W. Whitehouse, *Biochem. J.* **1968**, *108*, 155-156.

²³⁹ D. Birkett, N. C. Price, G. K. Radda, A.G. Salmon, *FEBS Lett.* **1970**, *6*, 346-348.

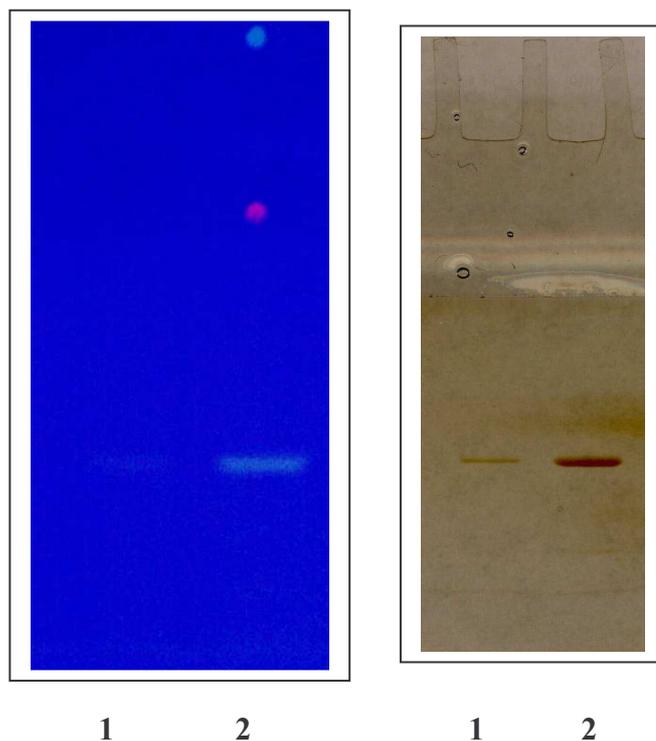


Figura 26: Electroforesis SDS de ConA etiquetada (*línea 2*) y control de ConA (*línea 1*). Visualización con fuente UV (izquierda) y tinción de plata (derecha).

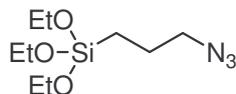
Por último, cabe destacar que las glico-sílicas preparadas mostraron una buena estabilidad química lo que realza su potencial como adsorbente de afinidad para procedimientos cíclicos de separación: adsorción, lavado, desorción y regeneración. Además, las glico-sílicas se almacenaron durante tres meses a temperatura ambiente antes de ser empacadas sin pérdidas en su capacidad como soportes de afinidad y una vez usadas sufrieron al menos ocho procesos de congelación manteniendo su funcionamiento con resultados reproducibles cuando se repetían los experimentos.

Conclusiones.

Los resultados expuestos demuestran que la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por Cu(I) es una metodología sintética versátil y eficiente para la inmovilización de biomoléculas como son los carbohidratos permitiendo la obtención sencilla de glico-sílicas. Estos nuevos materiales han demostrado ser útiles como soportes de afinidad bioselectivos en los que las interacciones inespecíficas que hacen que el gel de sílice no sea útil en la cromatografía de afinidad se minimizan convirtiendo el gel de sílice en un soporte con un claro potencial en la investigación glicómica. La caracterización de estos materiales realizada evaluando su capacidad de afinidad con la lectina adecuada (ConA), ha demostrado que la estructura de los residuos azucarados juegan un papel en las propiedades cromatográficas de estas, observándose un comportamiento más eficaz en el caso de las estructuras dendríticas frente a las monoméricas. La utilidad de las glico-sílicas preparadas se manifiesta no sólo en su capacidad para llevar a cabo la purificación de mezclas de proteínas sino también en la posibilidad que ofrecen para etiquetar fluorescentemente la ConA unida, de forma que permite preservar los dominios de reconocimiento de carbohidratos de la lectina. La estabilidad química de las glico-sílicas, la posibilidad de reutilización y la reproducibilidad son características destacables de la viabilidad del gel de sílice como soporte universal y barato para la inmovilización de biomoléculas.

Parte experimental.

Síntesis del 3-azidopropil-trietoxisilano **258**.

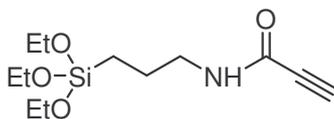


A una solución de 3-cloropropil-trietoxisilano **256** (2.31 g, 9.6 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (0.02 g, 0.05 mmol) en butanona (25 mL) se le añade azida sódica (3.120 g, 48 mmol) y se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante 50 horas. Pasado este tiempo, se filtra sobre celita y se evapora el disolvente a vacío. El crudo de reacción se disuelve en diclorometano (150 mL) y se lava con agua (2 x 20 mL). La capa orgánica se seca (Na_2SO_4) y se evapora para dar el compuesto **258** (1.9 g) como una sustancia siruposa que fue directamente usada sin otro proceso de purificación.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 3.73 (q, 6 H, $J = 6.94$ Hz, OCH_2), 3.18 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz, CH_2N_3), 1.62 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 1.14 (t, 9 H, $J = 6.9$ Hz, OCH_2CH_3), 0.58 (m, 2 H, CH_2Si).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 58.2, 53.6, 22.5, 18.1, 7.4.

Síntesis del compuesto **260**.



A una disolución de 3-aminopropil-trietoxisilano **257** (2.4 g, 10.85 mmol) y ácido propiólico (0.870 g, 11.93 mmol) en diclorometano (15 mL) se le añade DCC (2.460 g, 12.0 mmol). La reacción se mantiene una hora a temperatura ambiente y se filtra. Se evapora el disolvente, se añade tolueno y se coevapora el exceso de ácido (2 x 50 mL). Se obtienen el compuesto **260** como sustancia siruposa (3.0 g).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.30 (m, 1 H, NH), 3.82 (q, 6 H, $J = 7.0$ Hz, CH_2O), 3.28 (m, 2 H, CH_2NH), 2.97 (s, 1 H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.67 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.22 (t, 9 H, $J = 7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 0.65 (t, 2 H, $J = 8.4$ Hz, CH_2Si).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 162.5, 77.3, 73.2, 58.2, 42.0, 22.2, 17.9, 7.5.

Activación del gel de sílice.

El gel de sílice comercial (Merck, 70-230 mesh ASTM) se activa calentando a $120\text{ }^\circ\text{C}$ y a vacío (1 mm Hg) durante 24 h²⁴⁰.

Preparación de los geles de sílice funcionalizados 259 y 261.

Se suspende el gel de sílice (4g) en tolueno (20 mL) y se añade el correspondiente trietoxisilano derivado **258** o **260** (1 g). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 2 h, se evapora aproximadamente la mitad del volumen para eliminar el etanol formado, se añade el volumen eliminado de tolueno y se calienta a reflujo durante 1 h. Se filtra la mezcla de reacción, se lava con diclorometano (4 x 50 mL) y se seca a vacío (1 mm Hg) a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 16h.



Procedimiento general para la síntesis de la glico-sílicas 262-265.

En una solución del alquino o azido derivado **130**, **127**, **231** o **232** (0.3 mmol) en DMF seca (5 mL) se suspende el gel de sílice funcionalizado complementario **259** o **261** (1 g) y se añade el catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (10% en mmol, 10 mgr). La

²⁴⁰Angeletti, E.; Canepa, C.; Martinetti, G.; Venturello, P.; *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I*, **1989**, 105-107

reacción se irradia a 800W y 90°C durante 1 h en un Milestone Star Microwave Labstation hasta que el espectro de IR o la cromatografía en placa fina muestren la total desaparición del azúcar de partida. Se filtra la glico-sílica resultante y se lava con MeOH (2 x 30 mL), EDTA sal disódica (50 mM, 2 x 30 mL), agua (2 x 30 mL), acetona (2 x 30 mL) y CH₂Cl₂ (2 x 30 mL). Las glico-sílicas **262-265** se secan después a vacío (1 mm Hg) a 50 °C durante 16 h.

Procedimiento general de los ensayos de cromatografía de afinidad de las glico-sílicas 262-265.

Las glico-sílicas **262-265** (0,260 mg) se suspenden en 2 mL de tampón HEPES (50 mM HEPES pH 7.2, 1 mM CaCl₂, 1mM MnCl₂) y se empacan en columnas de 1 mL. Una vez empacada se equilibra con 12 volúmenes de tampón HEPES. Los experimentos se llevaron a cabo usando una bomba peristáltica a un flujo de 0.3 mL/min. Después de cargar la muestra, la proteína que no quedo inmovilizada fue retirada lavando con varios volúmenes de disolución de NaCl 1.6 M en tampón HEPES hasta que la absorbancia a 280nm fuese despreciable. La proteína retenida por la columna fue eluida con una disolución de 1 M de α -D-ManpOMe en tampón HEPES y recogida en fracciones de 1 mL. La pureza de la muestra se verificó mediante una electroforesis SDS estándar²⁴¹ y con tinción de plata²⁴². La capacidad de la columna fue estimada de la ConA eluida con α -D-ManpOMe 1 M en tampón HEPES de la columna saturada con una solución de ConA comercial (1.5 mg) y lavada con 12 volúmenes de tampón HEPES y 2 volúmenes de las disoluciones 0.1, 0.2, 0.4 0.8, 1.6 M NaCl en tampón HEPES.

²⁴¹ U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.

²⁴² C. R. Merrill, D. Goldman, M. L. Van Keuer, *Meth. Enzymol.* **1984**, 104, 441-447.

Procedimiento general para el etiquetado fluorescente de ConA.

El etiquetado fluorescente de ConA fue llevado a cabo sobre la forma dimérica de la proteína inmovilizada en la columna de glico-sílica **264** en tampón acetato (100 mM acetato pH 5.2, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂). Antes del marcaje la columna fue equilibrada con 20 volúmenes (10 mL) de tampón fosfato pH 8.4, después se recirculó durante toda la noche (14 h) 2 mL de una disolución 7.25 mM de NBD-OCH₂CH₂OH en tampón fosfato 100mM de pH 8.4. El exceso de fluorescente se elimina lavando la columna con 20 volúmenes de tampón HEPES y siguiendo el proceso por la absorbancia a 280nm. Finalmente la ConA fue eluida de la columna con una disolución 1 M de α -D-Man ρ OMe en tampón HEPES y fue analizada por electroforesis SDS y visualizada mediante un transiluminador UV estándar.

Capítulo VI.

**Síntesis de “biotino-sílica” mediante
“click chemistry”. Aplicaciones en la
tecnología avidina-biotina.**

Introducción.

La biotina es la vitamina H, esencial en el metabolismo. Constituye el grupo prostético de un conjunto de enzimas denominado carboxilasas que participan en reacciones clave del metabolismo intermediario. El déficit de biotina, o defectos genéticos que impiden su unión covalente a las carboxilasas, conduce a graves enfermedades metabólicas, que normalmente producen situaciones de acidosis y coma. Una posible situación de deficiencia de biotina se produce por una ingesta excesiva de huevos crudos. En la clara de huevo se encuentra la avidina²⁴³, una proteína que presenta la capacidad de unir fuertemente biotina y secuestrarla. De hecho, la constante de unión entre la biotina y la avidina es de aproximadamente 10^{-15} M, lo que constituye probablemente la mayor afinidad por un ligando descrita para cualquier sistema biológico. Esta alta afinidad, así como la relativa facilidad de obtener biotina, ha hecho que exista un alto interés en el estudio y desarrollo de sistemas de afinidad que se basen en la fuerte interacción entre estas dos moléculas. Así se han desarrollado sistemas de marcaje de proteínas, ácidos nucleicos, diversos constituyentes celulares e incluso células completas, para posteriormente ser reconocidos por moléculas de avidina, bien inmovilizada (creando sistemas de cromatografía de afinidad) o bien marcada por la unión a fluoróforos o enzimas (creando sistemas de detección, usualmente en fase sólida). Estas técnicas han sido utilizadas clásicamente en inmunología para la detección de antígenos o anticuerpos previamente biotinilados. Actualmente, esta tecnología está en un proceso de expansión, extendiéndose su uso a la proteómica y genómica, en el marcaje, separación y/o inmovilización de proteínas o ácidos nucleicos.

La interacción de la avidina con la biotina ocurre en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica. En el mercado existen numerosos reactivos para la biotinilación de proteínas y la avidina es comercialmente accesible (o una proteína análoga suya

²⁴³ DeLange, R. J, *J. Biol. Chem.* **1969**, 245, 907-916.

de origen bacteriano, la estreptavidina) bien como tal, marcada con diferentes fluoróforos o inmovilizada sobre agarosa.

Un problema importante, sólo parcialmente resuelto, de esta tecnología deriva paradójicamente de la elevada afinidad de la avidina por la biotina. Esta elevada afinidad hace que sea necesario utilizar condiciones extremas para romper la interacción de ambas moléculas. Estas condiciones extremas implican usualmente el empleo de agentes desnaturizantes como SDS o clorhidrato de guanidinio junto con pHs inferiores a 2. En técnicas cromatográficas basadas en la interacción de la avidina con la biotina, ya sea para la purificación de la propia avidina o para la cromatografía de afinidad de moléculas marcadas con biotina, el uso de estas condiciones extremas de elución y la consiguiente desnaturización de las proteínas dificulta las aplicaciones posteriores. Para resolver este problema se ha propuesto el uso de iminobiotina, con una menor afinidad por la avidina, como ligando. No obstante, el empleo de iminobiotina es mucho más caro que el de biotina en el marcaje de ligandos y además no puede ser aplicado a las proteínas biotiniladas de manera natural. Otra alternativa ha sido el uso de columnas de afinidad que emplean avidina monomérica y de hecho estas columnas están disponibles en el mercado aunque a un precio muy elevado.

La purificación inicial de avidina por cromatografía de afinidad se realizó en 1968 por Cuatrecasas y colaboradores²⁴⁴ utilizando una columna de biocitina-sefarosa. La elución de la avidina de esta columna implicaba el uso de cloruro de guanidinio 6 M a pH 1.5. Posteriormente, en 1980 Hofmann y colaboradores introdujeron el uso de una columna de iminobiotina para la purificación de estreptavidina utilizando condiciones de elución más suaves. La unión de avidina o estreptavidina a este tipo de columnas implica el uso de un elevado pH (en torno a 11) ya que a este pH se produce la unión efectiva de la iminobiotina a la avidina

²⁴⁴ Cuatrecasas, P. and Wilchek, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 33, 235-239.

puesto que la base libre de la iminobiotina es la que es reconocida por la avidina²⁴⁵. La elución en este tipo de columnas se produce a pH 4. Otras estrategias propuestas han sido el uso de otros derivados de biotina como la destiobiotina, cuya menor afinidad por la unión a avidina permite su desplazamiento por biotina sin modificar²⁴⁶. En la actualidad para la purificación de avidina siguen empleándose columnas de iminobiotina y el rendimiento típico de las mismas es de aproximadamente un 90% con una capacidad de unión de aproximadamente 0.75 mg de avidina por ml de resina empleada²⁴⁷. En muchas ocasiones, aunque la purificación se basa fundamentalmente en una etapa de afinidad se incorporan etapas adicionales como una precipitación previa con sulfato amónico o un intercambio iónico posterior a la cromatografía de afinidad.

Actualmente existen en el mercado diferentes soportes biotinilados siendo los más extendidos los basados en agarosa y sefarosa. De forma análoga, la biotina y compuestos relacionados han sido unidos covalentemente a una variedad de superficies, fundamentalmente de vidrio, óxido de silicio, polímeros y oro. La unión covalente de biotina a estos sólidos o superficies es llevada a cabo usando derivados activos de la biotina y soportes o superficies funcionalizadas complementariamente tanto a través de métodos químicos como fotoquímicos. La mayoría de los derivados activados de biotina usan la cadena lateral del ácido valérico para incorporar distintos grupos que no interfieren en la unión con la avidina y sus homólogos. Entre los más usados se encuentran ésteres activados derivados de N-hidoxisuccinimida, maleimida derivado, el iodoacetil derivado, el piridil disulfuro derivado, el hidrazido derivado y otros derivados conteniendo grupos fotoactivables que son anclados a los soportes o

²⁴⁵ Green, N. M., *Biochem. J.*, **1966**, *101*, 774-780.

²⁴⁶ Hirsch, J. D., Eslamizar, L., Filanoski, B. J., Malekzadeh, N., Haugland, R. P., Beechem, J. M. and Haugland, R. P., *Anal. Biochem.* **2002**, *308*, 343-357.

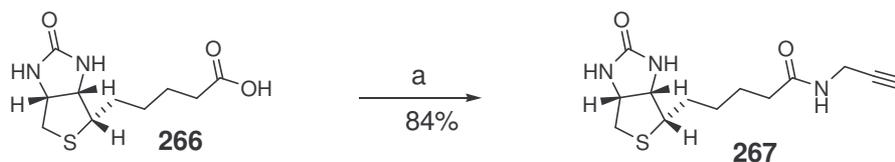
²⁴⁷ Heney, G. and Orr, G. A., *Anal. Biochem.* **1981**, *114*, 92-96.

superficies a través de uniones de tipo amida, tioeter, disulfuro o hidrazona fundamentalmente²⁴⁸.

Dado el interés del sistema biotina-avidina, la versatilidad de la reacción de cicloadición de alquinos y azidas en la inmovilización covalente de otras moléculas en gel de sílice convenientemente funcionalizado, así como la utilidad de las glicosílicas obtenidas en el capítulo anterior como soportes para cromatografía de afinidad, nos propusimos la síntesis de gel de sílice funcionalizado con biotina (biotino-sílica) para evaluar sus propiedades y aplicaciones en la purificación de avidina y proteínas biotiniladas.

Resultados y discusión.

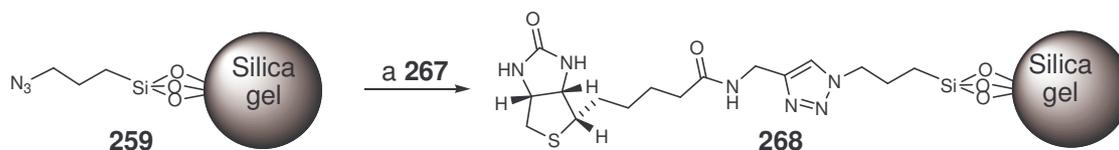
Para inmovilizar biotina mediante “click chemistry” fue necesario sintetizar el alquini-derivado de biotina **267**, para ello se obtuvo el cloruro de ácido de biotina utilizando cloruro de tionilo, el cual se hizo reaccionar con propargil amina lo que condujo a la amida deseada con muy buen rendimiento (84%) (esquema 59).



Esquema 59 a i) Cl₂SO, t. amb., 30 min ii) NH₂CH₂C≡CH, CH₂Cl₂.

La unión de la alquino-biotina **267** al gel de sílice funcionalizado con azida **259** se llevo a cabo por “click chemistry” en DMF y presencia de (EtO)₃P·CuI irradiando con microondas a 800W y 90 °C, obteniéndose la biotino-sílica **268** que es fácilmente aislada por filtración y lavada ampliamente, y finalmente secada a vacío antes de ser usada (esquema 60).

²⁴⁸ Smith, C. L.; Milea, J. S.; Nguyen G. H.; *Top. Curr. Chem* **2006**, 261, 63-90



Esquema 60. a (EtO)₃P·CuI, DMF, 90°C, 800W, 1h.

Para ensayar la utilidad de esta biotino-sílica en la tecnología avidina-biotina, se han analizado posibles usos de la misma de interés biotecnológico en colaboración con los profesores Dra. M^a Dolores Girón-González y el Dr. Rafael Salto-González del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. En primer lugar se ha abordado su utilización en la purificación de avidina de clara de huevo. En segundo lugar se ha ensayado su empleo en el marcaje de avidina inmovilizada a este gel de sílice y en tercer lugar se utilizó para la captura y purificación de ligandos biotinilados *in vitro* de naturaleza proteica.

Para ensayar la capacidad de unión de avidina de la biotino-sílica **268**, se incubaron durante 1 hora a 4° C 2 gramos de ésta con 15 ml de una disolución 1:1 a pH 11 (50 mM Na₂CO₃, 1 M NaCl) de clara de huevo previamente sonicada^{249*}, se

²⁴⁹ a) Hofmann, K., Wood, S. W., Brinton, C. C., Montibeller, J. A. and Finn, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 4666-4668.

b) Hytönen V. P., Laitinen O. H., Grapputo A., Kettunen A., Savolainen J., Kalkkinen N., Marttila A. T., Nordlund H. R., Nyholms T. K. M., Paganelli G. and Kulomaa M.S. *Biochem. J.*, **2003**, *372*, 219-225.

c) Airene, K. J. Oker-Blom, C., ki, V. S. M., Bayer, E. A., Wilchek, M. and Kulomaa, M. S. *Protein expression and purification*, **1997**, *9*, 100–108.

* La clara de un huevo se sonica 3 x 1 minuto en hielo. La muestra se diluye mediante la adición de 2 volúmenes de PBS, se centrifuga a 20000 g durante 20 minutos a 4° C y al sobrenadante se añade un volumen igual de tampon pH 11 (50 mM Na₂CO₃, 1 M NaCl). A la muestra resultante se le ajusta el pH a 11 con NaOH y se añade NaCl hasta una concentración final de 1 M. La muestra se centrifuga a 14.000 rpm (rotor JA-20) durante 15 minutos y se filtra a través de una gasa. Al reesultante se le considera extracto crudo de clara de huevo.

empacó en una columna cromatográfica y se realizó un lavado con tampón a pH 11 (50 mM Na₂CO₃, 1 M NaCl) y posteriormente se llevaron a cabo dos eluciones secuenciales con tampón carbonato pH 4 primero y con glicocola 0.1 M pH 2.5 después. En la electroforesis SDS-PAGE al 15% de las fracciones del experimento puede observarse que la columna tiene capacidad de retener de forma eficiente un elevado porcentaje del contenido de avidina del extracto crudo y que ésta es eluida de forma casi cuantitativa a pH 2.5. En cambio la elución a pH 4 se muestra incapaz de romper la unión de la avidina por la biotino-sílica. El rendimiento aproximado del proceso es de 0.1 mg de avidina por gramo de biotino-sílica.

El resultado es hasta cierto punto sorprendente ya que con la biotino-sílica la elución de la avidina unida a la columna se produzca en condiciones relativamente suaves, evitando el uso de agentes caotrópicos o detergentes. Ésto permite el uso de columnas de biotina basadas en gel de sílice en lugar de las clásicas columnas de iminobiotina lo que se traduce en una considerable reducción del coste de esta tecnología. Adicionalmente, cabe señalarse que de los resultados de la electroforesis (figura 27) de las fracciones purificadas se obtiene un elevado grado de pureza lo que permite realizar la purificación en un único paso. Además, de forma alternativa la avidina puede ser eluida en una solución 0.2 N de HCl que puede ser neutralizado utilizando tampones volátiles (por ejemplo tampón carbonato/bicarbonato) lo que permite obtener la proteína en condiciones de fuerza iónica muy baja.

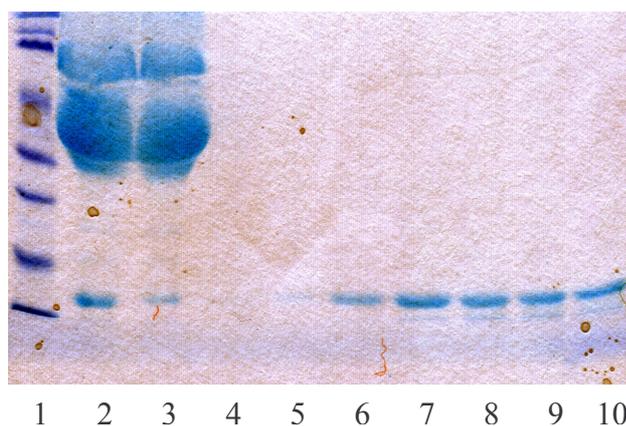


Figura 27. Electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones cargadas y eluidas en la columna: **1** estándar de pesos moleculares, **2** extracto crudo, **3** lavado, **4-5** elución a pH 4, **6-10** elución a pH 2.5.

Considerando que la biotino-sílica permitió la purificación de avidina en condiciones relativamente suaves, se procedió a ensayar el marcaje en columna de la avidina marcando con un fluoróforo, al igual que en el capítulo anterior se usó 4-(2-hidroxietoxi)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-OCH₂CH₂OH). Para el marcaje de la avidina se utilizaron 2 gramos de biotino-sílica **268** que fueron incubados con 15 ml de un extracto crudo de huevo sonificado y diluido 1:1 a pH 11 (50 mM Na₂CO₃, 1 M NaCl) y tras una hora, la suspensión se empacó en una columna. Después de lavarla se adicionaron 2 ml de una solución 2 mM de NBD-OCH₂CH₂OH a pH 11 y la solución se recirculó durante una noche a través de la columna a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se lavó la columna con tampón a pH 11 y la avidina unida se eluyó con una solución 0.2 N de HCl pH 1. En la electroforesis SDS-PAGE al 15% de las fracciones del experimento (figura 28) puede observarse el marcaje fluorescente de avidina. Una prueba adicional de marcaje se obtiene observando el espectro de fluorescencia de la avidina marcada y comparándolo al del compuesto libre. Como cabe esperar se produce un ligero desplazamiento del máximo de emisión que es debido a la unión a la proteína (figura 29).

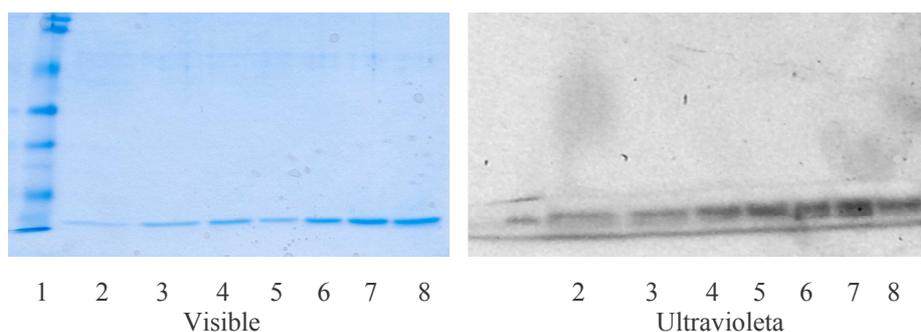


Figura 28. 1 estándar de pesos moleculares, 2-8 elución a pH 1.

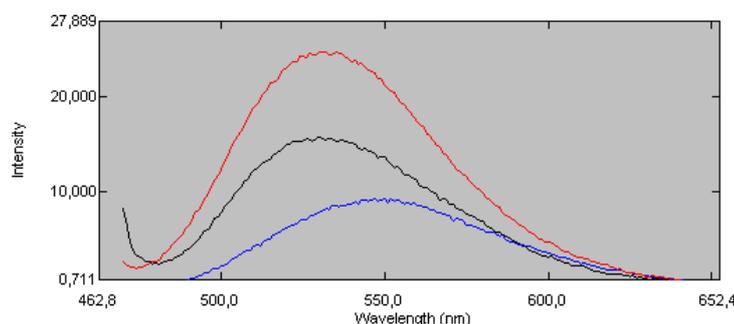


Figura 29. Espectros de fluorescencia: avidina marcada (rojo y negro) y NBD-OCH₂CH₂OH (azul).

Una de las principales aplicaciones que se persigue con el uso de la tecnología basada en la interacción de la avidina con la biotina es la identificación y aislamiento de proteínas biotiniladas *in vitro*. Con el actual desarrollo de la proteómica, la capacidad de identificación y purificación de las proteínas así modificadas utilizando unas condiciones suaves que permitan su posterior análisis mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, es una necesidad acuciante.

Para valorar la capacidad de la biotino-sílica de permitir la purificación y caracterización de proteínas biotiniladas *in vitro* se realizaron dos experimentos. En primer lugar se marcó con biotina una proteína fluorescente verde (GFP) y se purificó mediante su unión a avidina previamente inmovilizada sobre biotino-sílica

(se utilizó para ello un sistema de microfiltro con sólo 100 mg de “biotino-sílica”, donde las eluciones se realizan mediante centrifugación). La elución se realizó con HCl 0.2 N y el eluato, tras ser liofilizado se analizó mediante Maldi-Tof. En la espectrometría de masas se obtuvieron valores de peso molecular 14295.1 y 28526.5. Estos pesos moleculares corresponden respectivamente con el peso de un monómero de avidina así como con el peso de una molécula de GFP modificada con 4 biotinas, con lo se demuestra que esta técnica es idónea para la purificación y caracterización de proteínas biotiniladas. En un segundo experimento se ha procedido a marcar peroxidasa de rábano picante con el succinil éster del ácido 6-biotinil hexanoico. La peroxidasa marcada fue separada del agente biotinilante mediante cromatografía sobre sephadex G-50 y se empleó posteriormente para comprobar la capacidad de inmovilización sobre la biotino-sílica previamente cargada con avidina, y fue eluida después a pH 4 y pH 2. El seguimiento enzimático mediante el reactivo de Trinder, permitió comprobar que la peroxidasa biotinilada fue reconocida por la avidina unida a la columna y pudo ser eluida de una manera selectiva a pH 4. Esta elución se produjo sin liberar la avidina unida a la columna (Figura 30 calle 4) que sólo se eluye a pH 2 (Figura 30 calle 5). Por tanto este sistema tiene la ventaja de permitir la elución del complejo avidina-ligando biotinilado si se escoge como sistema de elución un tampón HCl a pH 1-2.5 o bien la elución específica del ligando biotinilado si se escoge como sistema de elución un tampón a pH 4.

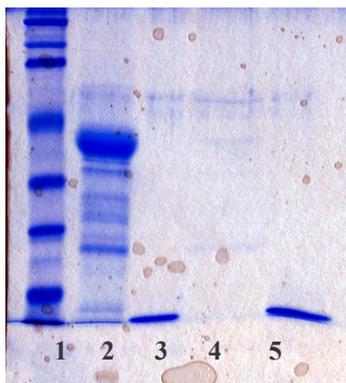


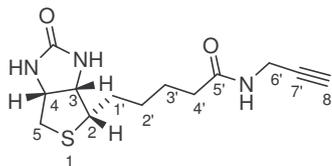
Figura 30. 1 estándar de pesos moleculares, 2 peroxidasa, 3 avidina, 4 elución a pH 4, 5 elución a pH 2.

Conclusiones.

Se ha puesto de manifiesto nuevamente la versatilidad de la “click chemistry” con la inmovilización de biotina sobre gel de sílice. El nuevo material sintetizado presenta importantes aplicaciones en proteómica. La biotino-sílica obtenida permite la purificación de avidina de la clara de huevo que es eluida de la columna cromatográfica de forma suave en condiciones similares a las columnas de iminobiotina, cuyo precio es elevado, y sin necesidad de agentes caotrópicos o detergentes necesarios en los materiales basados en biotina. A su vez permite el marcaje fluorescente de la avidina unida a la biotino-sílica antes de ser eluida con lo que presentará cuando menos un sitio de unión libre al haber estado protegido durante el marcaje. Por último permite el aislamiento y la purificación de proteínas biotiniladas *in vitro*, permitiendo una elución selectiva de la proteína biotinilada con respecto a la avidina unida a la biotino-sílica con lo que se evita la contaminación con avidina de la proteína biotinilada.

Parte experimental.

Síntesis del alquínil-derivado de biotina 267.



Se disuelven 370 mg de biotina en 5 mL de cloruro de tionilo destilado y se agita durante 30 min. Se evapora a vacío el cloruro de tionilo y se coevapora con benceno destilado. El cloruro de ácido de biotina se disuelve en Cl_2CH_2 anhidro 5mL y se adicionan un exceso de propargil amina 207 μL (3 equiv.). La mezcla de reacción se agita en atmósfera de argón durante 30 min. y pasado este tiempo se evapora el disolvente y se purifica por cromatografía en columna (Cl_2CH_2 :MeOH, 9:1) obteniéndose un sólido blanco 359 mg (84%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{+75^\circ}$ (*c* 1, MeOH);

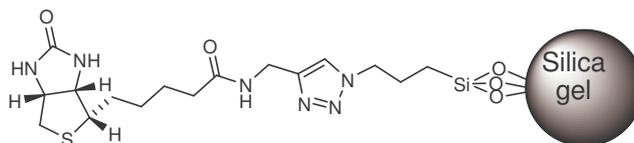
Punto de fusión: 163-165 °C

IR (film) 3283, 2926, 1701, 1645, 1543 cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, MeOD): δ 4.48 (dd, 1H, $J=7.8$ y 4.8 Hz, H-4), 4.29 (dd, 1H, $J=7.8$ y 4.5 Hz, H-3), 3.93 (d, 2H, $J=2.5$ Hz, 2H-6'), 3.19 (m, 1H, H-2), 2.92 (dd, 1H, $J=12.7$ y 5.0 Hz, H-5), 2.69(d, 1H, $J=12.7$ Hz, H-5), 2.56 (t, 1H, $J=2.5$ Hz, H-8'), 2.21 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, 2H-4'), 1.70-1.30 (varios m, 6H, 2H-1', 2H-2', 2H-3')

^{13}C RMN (75 MHz, MeOD): δ 175.3 (NHCONH), 165.7 (C5'), 80.4 (C \equiv CH), 71.8 (C \equiv CH), 63.0 (C-3), 61.3 (C-4), 56.7 (C-2), 40.9 (C-5), 36.3 (C-4'), 29.4 (C-1'), 29.3 (C-2'), 29.1 (C-6'), 26.4 (C-3').

EMAR (m/z) (FAB) calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{SNa}$: 304.1096; Enc.: 304.1097.

Síntesis de la biotino-sílica 268.

En una solución del alquino derivado de biotina **267** (300 mg, 1.06 mmol) en DMF seca (10 mL) se suspende el gel de sílice funcionado con azida **259** (3 g) y se añade el catalizador $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (10% en mmol, 37 mg). La reacción se irradia a 800W y 80°C durante 1 h en un Milestone Star Microwave Labstation hasta que el espectro de IR o la cromatografía en placa fina muestren la total desaparición del de biotina. Se filtra la biotino-sílica resultante (3,240 g) y se lava con MeOH (2 x 30 mL), EDTA sal disódica (50 mM, 2 x 30 mL), agua (2 x 30 mL), acetona (2 x 30 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 30 mL). Las biotino-sílica **267** se seca después a vacío (1 mm Hg) a 50 °C durante 16 h.

AnexoI.

Materiales y métodos generales.

Materiales y métodos generales.

Las cromatografías en capa fina fueron realizadas sobre hojas de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄ marca Merck utilizando para el revelado una disolución de ácido sulfúrico en etanol al 10% v/v, alternativamente también fueron empleados como reveladores una disolución de ninhidrina en etanol, sulfato cérico (1 % p/v) y sulfato amónico (2.5 % p/v) en ácido sulfúrico al 10 % v/v, yodo o luz ultravioleta cuando fue posible. La purificación de los productos obtenidos se llevó a cabo por cromatografía en columna de presión, utilizando sílica-gel marca Merck (230-400 mesh). Los puntos de fusión fueron realizados en un GallekaMP Melting Point y no están corregidos. Las medidas de rotación óptica fueron realizadas en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341 a temperatura ambiente. Los espectros de infrarrojo fueron realizados en un espectrómetro Satellite Mattson FTIR. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C se realizaron a temperatura ambiente en aparatos Bruker AM300 y AM400. Los desplazamientos químicos de ¹H-RMN se expresan en ppm y empleando como referencia interna CHCl₃ ($\delta = 7.26$ ppm) del CDCl₃. Los desplazamientos químicos de ¹³C-RMN son expresados en ppm empleando como referencia interna la señal de CDCl₃ ($\delta = 77.0$ ppm). Los valores de acoplamiento de señales (*J*) se dan en hercios. Las asignaciones se han realizado basándose en experimentos COSY, HMQC, NOESY y DEPT. Los espectros de masas FAB+ han sido realizados en un aparato Fissons VG Autospec-Q utilizando como matrices tioglicerol, glicerol o ácido dihidroxibenzoico, los espectros de masa MALDI-TOF fueron realizados utilizando un aparato Bruker modelo Autoflex.

Ensayos tipo ELLA

Los experimentos fueron realizados por triplicado y llevados a cabo empleando un medidor de densidad óptica Metertech $\Sigma 960$. Las placas de microvaloración (NUNC F96 Maxisorp) son incubadas con 100 μ L/celdilla de una disolución 3.3

$\mu\text{g/mL}$ de manano de *S. cerevisiae* en tampón PBS (10 mM pH 7.4) durante 2 h. a 37 °C. Tras lo cual las celdillas son lavadas dos veces con tampón PBS (10 mM, pH 7.4) conteniendo 0.5 % (v/v) de Tween 20 y una vez con tampón PBS (10 mM, pH 7.4). Este procedimiento de lavado es repetido tras cada periodo de incubación. Las celdillas son bloqueadas con 300 $\mu\text{L/celdilla}$ de BSA al 1 % (p/v) en tampón PBS (10 mM, pH 7.4).

Por otro lado se prepara una serie de disoluciones del metil α -D-manopiranosido empleado como inhibidor de referencia y también de los diferentes neoglicoconjugados en PBS (10 mM, pH 6.8, conteniendo 0.1 mM de Ca^{2+} y Mn^{2+}). A estas disoluciones se le añade un volumen igual de disolución ConA-HRP (5 $\mu\text{g/mL}$) en PBS (10 mM, pH 6.8, conteniendo 0.1 mM de Ca^{2+} y Mn^{2+}) y se incuban durante 1 hora. Tras lo cual las disoluciones de inhibidor son transferidas a las placas de microvaloración (100 $\mu\text{L/celdilla}$) e incubadas durante 2 horas a 37 °C. Tras esto se añaden 50 $\mu\text{L/celdilla}$ de una disolución de diclorhidrato de *o*-fenilendiamina (0.4 mg/mL) en tampón citrato-fosfato pH 5.0 conteniendo un 0.4 % de H_2O_2 . Las placas son incubadas durante 30 min. a 37 °C tras lo que la reacción enzimática es detenida por adición de 50 $\mu\text{L/celdilla}$ de H_2SO_4 1.25 M. La densidad óptica (O.D.) es medida a una longitud de onda de 492 nm.

El porcentaje de inhibición para cada disolución de inhibidor fue calculado según la ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{[D.O.(\text{sin inhibidor}) - D.O.(\text{con inhibidor})]}{D.O.(\text{sin inhibidor})} \times 100$$

Los resultados así obtenidos son ajustados según una regresión no lineal empleando el software Origin 6.1, a partir de esta regresión se obtienen los valores

de concentración necesarios para obtener un 50 % de inhibición de la unión entre el manano que recubre las placas de microvaloración y la lectina ConA-HRP (IC_{50}).

La afinidad relativa de cada uno de los neoglicoconjugados es calculada empleando como referencia el valor de IC_{50} de metil α -D-manopiranosido según la expresión:

$$Afinidad\ relativa = \frac{IC_{50}(Me - man)}{IC_{50}(inhibidor)}$$

Anexo II.
Bibliografía.

- 1 Padwa A, Pearson WH, **2003**, Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products. John Willey & Sons, Chichester, U. K.
- 2 Gallos JK, Koumbis AE, *Curr Org Chem*, **2003**, 7, 397
- 3 Koumbis AE, Gallos JK, *Curr Org Chem*, **2003**, 7, 585
- 4 Koumbis AE, Gallos JK, *Curr Org Chem*, **2003**, 7, 771
- 5 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–25
- 6 C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.
- 7 H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 1128–1137.
- 8 Wang Q, Chittaboina S, Barnhill HN, *Lett Org Chem.*, **2005**, 2, 293
- 9 R. Huisgen, In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed.: A. Padwa), Willey, New York, **1984**, pp 1-176.
- 10 Mock WL, Irra TA, Wepsiec JP, Adhya M; *J Org Chem*, **1989**, 54, 5302
- 11 Chen J, Rebek J, *Org Lett*, **2002**, 4, 327
- 12 Howell SJ, Spencer N, Philp D., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 4945
- 13 Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, *Angew Chem Int Ed*, **2001**, 40, 2005
- 14 Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV, *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, 210
- 15 Bock VD, Hiemstra H, van Maarseveen JH, *Eur J OrgChem*, **2006**, 51.
- 16 Wang Q, Chan TR, Hilgraf R, Fokin VV, Sharpless KB, Finn MG, *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 3192
- 17 Speers, AE, Adam, GC, Cravatt, BF, *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 4686
- 18 Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, Fokin VV, *Org Lett*, **2004**, 6, 2853.
- 19 Meng Jc, Fokin VV, Finn MG, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 46, 4543.

- 20 Lewis WG, Magallon FG, Fokin VV, Finn MG, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 9152.
- 21 F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Azín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951–1954.
- 23 Meng Jc, Fokin VV, Finn MG, *Tetrahedron Lett*, **2005**, *46*, 4543.
- 24 Girard C, Onen E, Aufort M, Beauviere S, Samson E, Herscovici J, *Org Lett*, **2006**, 1689.
- 25 Orgueira HA, Fokas D, Isome Y, Chan PCM, Baldino CM, *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 2911.
- 26 Pachon LD, van Maarseveen JH, Rothenberg G, *Adv Syn Cat*, **2005**, *347*, 811.
- 27 Chittaboina S, Xie F, Wang Q, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 2331.
- 29 Lober S, Rodriguez-Loaiza P, Gmeiner P, *Org Lett*, **2003**, *5*, 1753.
- 30 Lober S, Gmeiner P, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 8699.
- 31 Collman JP, Devaraj NK, Chidsey CED, *Langmuir*, **2004**, *20*, 1051.
- 32 Kolb HC, Sharpless KB, *Drug Discovery Today*, **2003**, *8*, 1128.
- 35 Kuijpers BHM, Groothuys S, Keereweer AR, Quaedflieg PJLM, Blaauw RH, vanDelft FL, Rutjes FPJT, *Org Lett*, **2004**, *6*, 3123.
- 37 Dondoni A, Giovannini PP, Massi A, *Org Lett*, **2004**, *6*, 2929.
- 38 Giguere D, Patnam R, Bellefleur MA, St-Pierre C, Sato S, Roy R; *Chem Commun*, 2006, 2379
- 39 Macmillan D, Blanc J, *Org Biomol Chem*, **2006**, *4*, 2847.
- 40 Ermolat'ev D, Dehaen W, Van der Eycken E, *QSAR Comb Sci*, **2004**, *23*, 915.
- 41 Chittaboina S, Xie F, Wang Q, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 2331.
- 42 Hotha S, Kashyap S, *J Org Chemistry*, **2006**, *71*, 364.

-
- 43 Arosio D, Bertoli M, Manzoni L, Scolastico C, *Tetrahedron Lett*, **2006**, *47*, 3697.
- 44 Salameh BA, Leffler H, Nilsson UJ, *Bioor Med Chem Lett*, **2005**, *15*, 3344.
- 45 Giguere D, Patnam R, Bellefleur MA, St-Pierre C, Sato S, Roy R, *Chem Commun*, **2006**, 2379.
- 46 Tejler J, Tullberg E, Frejd T, Leffler H, Nilsson UJ, *Carbohydr Res*, **2006**, *341*, 1353.
- 47 X. Fu, C. Albermann, C. Zhang, J.S. Thorson, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1513–1515.
- 50 Casas-Solvas JM, Vargas-Berenguel A, Capitan-Vallvey LF, Santoyo-Gonzalez F, *Org Lett*, **2004**, 3687.
- 51 Zhu XM, Schmidt RR, *J Org Chem*, **2004**, *69*, 1081.
- 52 Hager C, Miethchen R, Reinke H, *J Fluor Chem*, **2000**, *104*, 135.
- 53 Ijsselstijn M, Cintrat JC, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 3837.
- 54 B. Y. Lee, S. R. Park, H. B. Jeon, K. S. Kim, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 5105-5109.
- 55 Guezguez R, Bougrin K, El Akri K, Benhida R, *Tetrahedron Lett*, **2006**, *47*, 4807.
- 56 Deng S, Gangadharmath U, Chang CWT, *J Org Chem*, **2006**, *71*, 5179
- 57 Roy, R, *Trends Glycosci Glyc*, **2003**, *15*, 291.
- 58 Jayaraman N, Nepogodiev SA, Stoddart JF, *Chem Eur J*, **1997**, *3*, 1193.
- 59 Bezouska, K, *Rev Mol Biotechnol*, **2002**, *90*, 269.
- 60 Turnbull, WB, Stoddart, JF, *Rev Mol Biotechnol*, **2002**, *90*, 231.
- 61 Roy R, Baek M-G, *Rev Mol Biotech*, **2002**, *90*, 291
- 62 Ladmiral, V, Melia, E., Haddleton, DM, *Eur Polym J*, **2004**, *40*, 431.
- 63 Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M, *Methods Enzy*, **2003**, *373*, 384.

- 65 Thomas JR, Liu X, Hergenrother PJ, *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 12434.
- 68 Malkoch M, Schleicher K, Drockenmuller E, Hawker CJ, Russell TP, Wu P, Fokin VV, *Macromolecules*, **2005**, *38*, 3663.
- 69 Joosten JAF, Tholen NTH, El Maate FA, Brouwer AJ, van Esse GW, Rijkers DTS, Liskamp RMJ, Pieters RJ, *Eur J Org Chem*, **2005**, 3182.
- 70 Fernandez-Megia E, Correa J, Rodriguez-Meizoso I, Riguera R, *Macromolecules*, **2006**, *39*, 2113.
- 71 Wu P, Malkoch M, Hunt JN, Vestberg R, Kaltgrad E, Finn MG, Fokin VV, Sharpless KB, Hawker CJ, *Chem Commun*, **2005**, 5775
- 72 Hasegawa T, Umeda M, Numata M, Li C, Bae AH, Fujisawa T, Haraguchi S, Sakurai K, Shinkai S, *Carbohydr Res*, **2005**, *341*, 35
- 73 Ladmiral V, Mantovani G, Clarkson GJ, Cauet S, Irwin JL, Haddleton DM, *J Am Chem Soc* *128*, 4823.
- 74 Malkoch M, Thibault RJ, Drockenmuller E, Messerschmidt M, Voit B, Russell TP, Hawker CJ, *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 14942.
- 75 Srinivasachari S, Liu Y, Zhang G, Prevette L, Reineke TM, *J Am Chem Soc*, **2006**, *128*, 8176.
- 76 Marmuse L, Nepogodiev SA, Field RA, *Org Biomol Chem*, **2005**, *3*, 2225.
- 77 Bodine KD, Gin DY, Gin MS, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 1638.
- 78 Bodine KD, Gin DY, Gin MS, *Org Lett*, **2005**, *7*, 4479.
- 79 Billing JF, Nilsson UJ, *J Org Chem*, **2005**, *70*, 4847.
- 81 Lin H, Walsh CT, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 13998.
- 82 Gupta SS, Kuzelka J, Singh P, Lewis WG, Manchester M, Finn MG, *Bioconjugate Chem*, **2005**, *16*, 1572.
- 83 Gupta SS, Raja KS, Kaltgrad E, Strable E, Finn MG, *Chem Commun*, **2005**, 4315.

-
- 84 Bouillon C, Meyer A, Vidal S, Jochum A, Chevolut Y, Cloarec JP, Praly JP, Vasseur JJ, Morvan F, *J Org Chem*, **2006**, 71, 4700.
- 85 SaidHassane F, Frisch B, Schuber F, *Bioconjugate Chem*, **2006**, 17, 849.
- 86 Ballell L, Alink KJ, Slijper M, Versluis C, Liskamp RMJ, Pieters RJ, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 291.
- 87 Wang, D, *Proteomics*, **2003**, 3, 2167.
- 88 Ortiz MC, Garcia Fernandez JM, *ChemBiochem*, **2002**, 3, 819.
- 89 Love, KR, Seeberger, PH, *Angew Chem Inter Ed*, **2002**, 41, 3583.
- 90 Feizi T, Fazio F, Chai W, Wong CH, *Curr Opin Struct Biol*, **2003**, 13, 637.
- 91 Fazio F, Bryan MC, Blixt O, Paulson JC, Wong CH, *J Am Chem Soc*, **2002**, 124, 14397.
- 92 Bryan MC, Fazio F, Lee HK, Huang CY, Chang A, Best MD, Calarese DA, Blixt O, Paulson JC, Burton D, Wilson IA, Wong CH, *J Am Chem Soc*, **2004**, 126, 8640.
- 93 Huang GL, Liu TC, Liu MX, Mei XY, *Anal Biochem*, **2005**, 340, 52.
- 94 Zhang Y, Luo S, Tang Y, Yu L, Hou KY, Cheng JP, Zeng X, Wang PG, *Analy Chem*, **2006**, 78, 2001.
- 95 Sun XL, Stabler CL, Cazalis CS, Chaikof EL, *Bioconjugate Chem*, **2006**, 17, 52.
- 97 Dolhem F, Al Tahli F, Lievre C, Demailly G, *Eur J Org Chem*, **2005**, 5019.
- 98 Flessner T, Wong CH, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 7805.
- 99 Hotha S, Anegundi RI, Natu AA, *Tetrahedron Lett*, **2005**, 46, 4585.
- 100 Ray A, Manoj K, Bhadbhade MM, Mukhopadhyay R, Bhattacharjya A, *Tetrahedron Lett*, **2006**, 47, 2775.
- 101 Marco-Contelles J, Rodriguez-Fernandez M, *J Org Chem*, **2000**, 66, 3717.
- 102 Hoffmann B, Bernet B, Vasella A, *Helv Chim Acta*, **2002**, 85, 265.
- 103 (a) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.

- (b) Lis, H.; Sharon, N. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- (c) Dwek, R. A. *Chem.Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- (d) Karlsson, K. A. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **1995**, *5*, 622-635.
- (e) *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1999.
- 104 (a) Gabius, H.-H.; Siebert, H.-C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-764.
- (b) Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-429.
- (c) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- (d) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.
- 105 (a) Lee, R. T.; Lee, Y. C. In *Neoglycoconjugates*; Edited by Lee, Y. C.; Lee, R. T., Eds.; Academic Press: San Diego, 1994; pp 23-50.
- (b) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Account.Chem.Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- (c) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543-551.
- 106 Horan, N.; Isobe, H.; Whitesides, G. M.; Kahne, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11782-11786.
- 107 Patel, A.; Lindhorst, T. K. *Eur.J.Org.Chem.* **2002**, 79-86.
- 108 Katajisto, J.; Karskela, T.; Heinonen, P.; Lönnberg, H. *J.Org.Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.
- 109 Gómez-García, M.; Benito, J.M.; Rodríguez-Lucena, D.; Yu, J.-X.; Chmurski, K.; Ortiz Mellet, C.; Gutiérrez Gallego, R.; Maestre, A.; Defaye, J.; García Fernández, J.M. *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.
- 110 Gao, Y.; Eguchi, A.; Kakehi, K.; Lee, Y. C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6151-6157.
- 111 Köhn, M.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Lindhorst, T. K.; García Fernández, J. M. *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 771-777.
- 112 (a) Dubber, M.; Lindhorst, Th. K. *J.Org.Chem.* **2000**, *65*, 5275-5281.
- (b) Dubber, M.; Lindhorst, T. K. *Org.Lett.* **2001**, *3*, 4019-4022.

- 113 (a) Langer, P.; Ince, S. J.; Ley, S. V. *J.Chem.Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 3913-3915.
(b) Lindhorst, T. K.; Dubber, M.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S. *Eur.J.Org.Chem.* **2000**, 2027-2034.
(c) Hanessian, S.; Huynh, H. K.; Reddy, G. V.; Duthaler, R. O.; Katopodis, A.; Streiff, M. B.; Kinzy, W.; Oehrlein, R. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3281-3290.
(d) Kalovidouris, S. A.; Blixt, O.; Nelson, A.; Vidal, S.; Turnbull, W. B.; Paulson, J. C.; Stoddart, J. F. *J.Org.Chem.* **2003**, *68*, 8485-8493.
(e) Calvo-Flores, F. G.; Isac-García, J.; Hernández Mateo, F.; Perez-Balderas, F.; Calvo-Asín, J. A.; Sanchez-Vaquero, E.; Santoyo-González, F. *Org.Lett.* **2000**, *2*, 2499-2502.
(f) Liu, B.; Roy, R. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6909-6913.
(g) Katajisto, J.; Heinonen, P.; Loennberg, H.; *Curr.Org.Chem.* **2004**, *8(11)*, 977-992.
- 114 Chernyak, A. Y.; Sharma, G. V. M.; Kononov, L. O.; Krishna, P. R.; Levinsky, A. B.; Kochetkov, N. K.; Rao, A. V. R. *Carbohydr.Res.* **1992**, *223*, 303-309
- 115 Mereyala, H. B.; Gurralla, S. R. *Carbohydr.Res.* **1998**, *307*, 351-354.
- 116 C. H. Issidorides and R. Gulen, *Organic Synthesis*, **38**, 65.
- 117 (a) P. Bako, T. Bako, K. Bisztray, A. Szollosy, K. Nagy and L. Toke, *J. Inclusion Phenom.*, 2001, **39**, 247-251.
(b) P. Bako and L. Toke, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn.*, 1995, **23**, 195-201.
- 118 G. Catelani, F. Colonna and A. Marra, *Carbohydr. Res.*, **1988**, *182*, 297-300.
- 119 a) Jones, J. K. N.; *Can. J. Chem.*, **1956**, *34*, 840-842.
b) Richardson, A. C.; Hought, L.; Munroe, P.A.; *J. Chem. Soc (C)*, **1971**, 1090-1094.

- 120 a) Lindhorst T.K., Kötter S., Kubisch J., Krallmann-Wenzel U., Ehlers S., Kren V., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1669-1674.
b) Loris, R; Hamelryck, T; Bouckaert, J; Wyns, L; *Biochem. Biophys. Acta*, **1998**, 1383, 9-36
- 121 a) J. Defaye, A. Gadelle, A. Guiller, R. Darcy, T. O'Sullivan, *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 251-258.
b) V. Laine A. Coste-Sarguet, A. Gadelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.
c) H. Driguez, S. Cottaz, *Synthesis* **1989**, 755-758
d) H. Driguez, C. Lancelon-Pin, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3125-3128.
e) N. Yasuda, N. Aoki, H. Abe, K. Hattori, *Chem. Lett.* **2000**, 706-707.
- 122 a) H. Parrot-Lopez, H. Galons, A. W. Coleman, J. Mahuteau, M. Miocque, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 209-212
b) H. Parrot-Lopez, E. Leray, A. W. Coleman, *Supramol. Chem.* **1993**, 3, 37-42;
c) R. Kasab, C. Félix, H. Parrot-Lopez, R. Bonaly, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7555-7558.
d) H. Imata, K. Kubota, K. Hattori, M. Aoyagi, C. Jindoh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 109-112.
e) E. Leray, H. Parrot-Lopez, C. Augé, A. W. Coleman, C. Finance, R. Bonaly, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1019-1020.
f) K. Matsuda, T. Inazu, K. Haneda, M. Mizuno, T. Yamanoi, K. Hattori, K. Yamamoto, H. Kumagai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2353-2356.
- 123 a) J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, S. Maciejewski, J. Defaye, *Chem. Commun.* **1996**, 2741-2742.
b) W. Haque, J. Diakur, *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, 20, 17-29.

- 124 a) C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, H. Law, K. Chmurski, J. Defaye, M. L. O'Sullivan, H. N. Caro, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2523-2531;
b) I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. Defaye, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 777-783.
- 126 a) V. Laine A. Coste-Sarguet, A. Gabelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.
b) H. Driguez, C. Lancelon-Pin, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3125-3128.
c) L. De Robertis, C. Lancelon-Pin, H. Driguez, F. Attioni, R. Bonaly, A. Marsura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1127-1130.
d) T. Furuike, S. Aiba, *Chem. Lett.* **1999**, 69-70;
e) T. Furuike, S. Aiba, S.-I. Nishimura, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9909-9915
f) A. García-Barrientos, J. J. García-López, J. Isac-García, F. Ortega-Caballero, C. Uriel, A. Vargas-Berenguel, F. Santoyo-González, *Synthesis* **2001**, 1057-1064.
- 127 a) R. Kasab, C. Félix, H. Parrot-Lopez, R. Bonaly, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7555-7558.
b) D. A. Fulton, A. R. Pease, F. J. Stoddart, *Isr. J. Chem.* **2000**, *40*, 325-333.
c) M. Ichikawa, A. S. Woods, H. Mo, I. J. Golstein, Y. Ichikawa, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 389-392.
- 128 a) J. J. García-López, F. Hernández-Mateo, J. Isac-García, J. M. Kim, R. Roy, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 522-531;
b) J. J. García-López, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, J. J. Giménez Martínez, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1775-1784;
c) R. Roy, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8743-8746.

- 132 D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1113-1116.
- 133 V. Laine A. Coste-Sarguet, A. Gabelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1479-1487.
- 134 J. M. Benito, *Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla*, **2001**.
- 135 C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1983-1990.
- 136 I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, H. Law, J. Defaye, *Chem. Commun.* **2000**, 1489-1490.
- 137 J. M. Benito, M. Gómez García, I. Baussanne, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355-10363.
- 138 Cazier-Dennin F., Woisel P., Surpateanu G., FR 2873120, **2004** [*Chem. Abstr.* **2006**, *144*, 88512].
- 139 M. Okada; *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, *26*, 67-104.
- 140 Horejsi V, Smolek P, Kocourek J. *Biochim Biophys Acta* **1978**, *538*, 293-8.
- 141 Kobayashi K., Kobayashi A., Tobe S., Akaine T., *In: Lee YC, Lee RT, editors. Neoglycoconjugates; preparation and applications. San Diego: Academic Press, 1994.* p. 261-282.
- 142 a) Kitazawa S, Okumura M, Kinomura K, Sakakibara T. *Chem Lett* **1990**, 1733-6
- b) Roy R, Tropper FD, Romanowska A. *Bioconjugate Chem* **1992**, *3*, 256-61.
- c) Cao SD, Roy R. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37*, 3421-4.
- d) Roy R, Park WKC, Srivastava OP, Foxall C. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, *6*, 1399-402.
- f) Sigal GB, Mammen M, Dahmann G, Whitesides GM. *J Am Chem Soc* **1996**, *118*, 3789-3900.
- g) Nishimura S-I, Furuike T, Matsuoka K, Maruyama K, Nagata K, Kurita K, et al. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4876-80.

- h) Tagawa K, Sendai N, Ohno K, Kawaguchi T, Kitano H, Matsunaga T. *Bioconjugate Chem* **1999**, *10*, 354-360.
- i) Baskaran S, Grande D, Sun XL, Yayon A, Chaikof EL. *Bioconjugate Chem* **2002**, *13*, 1309-13.
- 143 a) Yamada K, Yamaoka K, Minoda M, Miyamoto T. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* **1997**, *35*, 255-61.
- b) Yamada K, Minoda M, Fukuda T, Miyamoto T. *J Polym Sci Part A—Polym Chem* **2001**, *39*, 459-67.
- c) Yamada K, Minoda M, Miyamoto T. *J Polym Sci Part A—Polym Chem* **1997**, *35*, 751-7.
- d) Yamada K, Minoda M, Miyamoto T. *Macromolecules* **1999**, *32*, 3553-8.
- 144 a) D'Agosto F, Charreyre MT, Pichot C, Mandrand B. *Macromol Chem Phys* **2002**, *203*, 146-54.
- b) D'Agosto F, Charreyre MT, Delolme F, Dessalces G, Cramail H, Deffieux A, et al. *Macromolecules* **2002**, *35*, 7911-8.
- c) Loykulant S, Hayashi M, Hirao A. *Macromolecules* **1998**, *31*, 9121-6.
- d) Loykulant S, Hirao A. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4757-64.
- e) Loykulant S, Yamashiro M, Hirao A. *Macromol Chem Phys* **2001**, *202*, 1791-8.
- 145 a) Aoi K, Tsutsumiuchi K, Okada M. *Macromolecules* **1994**, *27*, 875-7.
- b) Tsutsumiuchi K, Aoi K, Okada M. *Macromolecules* **1997**, *30*, 4013-7.
- c) Aoi K, Tsutsumiuchi K, Aoki E, Okada M. *Macromolecules* **1996**, *29*, 4456-8.
- 146 a) Fraser C, Grubbs RH. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7248-55.
- b) Mortell KH, Gingras M, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 12053-4.
- c) Mortell KH, Weatherman RV, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1996**, *118*, 2297-8.

- d) Kanai M, Mortell KH, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 9931-2.
- e) Manning DD, Hu X, Beck P, Kiessling LL. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 3161-2.
- f) Sanders WJ, Gordon EJ, Dwir O, Beck PJ, Alon R, Kiessling LL. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 5271-8.
- 147 Garcia-Oteiza MC, Sanchez-Chaves M, Arranz F. *Macromol Chem Phys* **1997**, *198*, 2237-47.
- 148 Bahuleker R, Tokiwa T, Kano J, Matsumura T, Kojima I, Kodama M. *Carbohydr Polym* **1998**, *37*, 71-8
- 149 Thoma F, Mangnani JL, Ohrkein R, Ernst B, Schwarzenbach F, Duthaler RO. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 7414-5.
- 151 Kishi K., Ishimaru T., Ozono M., Tomita I., Endo T., *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2000**, *38*, 35-42.
- 152 Bolletta F., Fabbri D., Lombardo M., Prodi L., Trombini C., Zaccheroni N., *Organometallics* **1996**, *15*, 2415-2417.
- 153 a) Endotoxin in Health and Disease. (Eds.: H. Brade, D.C. Morrison, S. Opal, S. Vogel), Dekker, New York, **1999**.
- b) Ulmer A.J., Rietschel E.Th., Zahringer U., Heine H., *Trends Glycosci. Glyc.* **2002**, *14*, 53-68.
- c) Chaby R., *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1697-1713.
- 154 Fujihari M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azumaa H., Ikeda H., *Pharmacology & Therapeutic* **2003**, *100*, 171-194
- 155 a) Schepetkin I.A., Quinn M.T., *Int. Immunopharmacol* **2006**, *6*, 317-333.
- b) Tzianabos A.O., *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 523-533.
- 156 Ashton P.R., Koeniger R., Stoddart J.F., Alker D., Harding V.D., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903-908.
- 157 Weber C., Erl W., Pietsch A., Weber P.C., *Circulation* **1995**, *91*, 1914-1917.

- 158 Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S.H., Rini J.M.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13047-13052.
- 159 a) Biessen A.L., Bakkeren H.F., Beuting D.M., Kuiper J., Van Berkel T.J.C., *Biochem. J.* **1994**, 299, 291-296.
b) Kelm S., Schauer R., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1988**, 369, 693-704.
c) Lichtman S.N., Wang J., Lemasters J.J., *Am. J. Physiol.* **1998**, 275, G39-G46.
d) Cherayil B.J., Weiner S.J., Pillai S., *J. Exp. Med.* **1989**, 170, 1959-1972.
- 160 Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S.H., Rini J.M.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13047-13052.
- 163 Mammen, M.; Choi, S.K.; Whitesides, G.M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2754-2794.
- 164 a) Referencia 103 (a).
b) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L.L.; *Science*, **2001**, 291, 2357-2364.
c) Boysen, M.M.K.; Elsner, K., Sperling, O.; Lindhorst, T. K.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 4376-4386.
- 165 Dwek, R. A.; *Chem. Rev.*; **1996**, 96, 683-720.
- 166 Lee, Y.C.; Lee, R.T.; *Acc. Chem. Res.*; 1995, 28, 321-327.
- 167 Lindhorst, T. K.; *Top. Curr. Chem.*; **2002**, 218, 201-235.
- 168 Hawker, C.J.; Fréchet, J.M.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**, 112, 7638-7647.
- 170 Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P., *Polym. J. Tokio*, **1985**, 17, 117-132.
- 171 de Brabander-van den Berg, E.M.M., Meijer, E.W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **1993**, 32, 1308-1311.
- 172 Ashton, P.R., Boyd, S.E., Brown, C.L., Nepogodiev, S.A., Meijer, E.W., Peerlings, H.W.I., Stoddart, J.F.; *Chem. Eur. J.*; **1997**, 3, 974-983.

- 173 Peerlings, H.W.I., Nepogodiev, S.A., Stoddart, J.F., Meijer, E.W., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1879-1886.
- 174 Pagé, D., Roy, R., *Bioconjugate Chem.*, **1997**, *8*, 714-723
- 175 Wooley, K.L., Hawker, C.J., Frechet, J.M.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1991**; *113*, 4252-4261.
- 177 Zanini, D., Roy, R., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7348-7354.
- 178 Llinares, M., Roy, R., *Chem. Commun.*, **1997**, 2119-2120.
- 179 a) Ashton, P.R., Boyd, S.E., Brown, C.L., Jayaraman, N., Nepogodiev, S.A., Stoddart, J.F., *Chem. Eur. J.*; **1996**, *2*, 1115-1128.
b) Ashton, P.R., Boyd, S.E., Brown, C.L., Jayaraman, N., Stoddart, J.F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 732-735.
- 180 Ashton, P.R., Hounsell, E.F., Jayaraman, N., Nilsen, T.M., Spencer, N., Stoddart, J.F., Young, M., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 3429-3437.
- 182 Jayaraman, N., Stoddart, J.F., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 6767-6770.
- 183 Aoi, K., Itoh, K., Okada, M., *Macromolecules*, **1995**, *28*, 5391-5393.
- 184 Kieburg, C., Dubber, M., Lindhorst, T.K., *Synlett*, **1997**, 1447-1449.
- 185 Thompson, J.P., Schengrund, C.-L., *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 837-845.
- 187 Srinivasan, M.; Sankararaman, S.; Hopf, H.; Dix, I.; Jones, P. G. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4299-4303.
- 188 Krist, P.; Vannucci, L.; Kuzma, M.; Man, P.; Sadalpure, K.; Patel, A.; Bezouska, K.; Pospisil, M.; Petrus, L.; Lindhorst, T. K.; Kren, V. *Chembiochem* **2004**, *5*, 445-452.
- 189 a) K. L. Hanson, L. Filipponi, D. V. Nicolau, in *Microarray Technology and Its Applications* (Eds.: U. R. Müller, D. V. Nicolau), Springer, Heidenberg, **2005**, pp. 23-44.
b) A. K. Mallia, P. K. Smith, *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, **1992**.

- c) A. S. Hoffman, J. A. Hubbell, *Surface-immobilized biomolecules. Biomaterials Science* (2nd Ed), Elsevier. San Diego **2004**, pp. 225-233.
- 190 R. R. Martel, M. P. Rounseville, I. W. Botros, B. E. Seligman, in *Microarray Technology and Its Application* (Eds.: U. R. Müller, D. V. Nicolau), Springer, Heildelberg, **2005**, pp. 3-22.
- 191 a) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158.
b) C. W. C. Warren, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 40-46.
- 192 M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631-635.
- 193 E. Gizeli, C. R. Lowe, *Biomolecular Sensors*, Taylor & Francis Ltd, London **2002**.
- 194 a) F. Schreiber, *J. Phys-Condens. Matter* **2004**, *16*, R881-R900.
b) K. Kato, in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Vol. 2 (Eds.: G. L. , G. Wnek), Dekker, New York, **2004** , 1331-1339.
- 195 a) *Handbook of Affinity Chromatography*, Vol 92 (Chromatographic Science Series) (Eds: D. S. Hage, J Cazes), CRC Press, New York, **2005**.
b) W. Clarke, D. S. Hage, *Separ. Puri. Rev.* **2003**, *32*, 19-60.
- 196 C. Doinel, M. Caron, *Bio-Sciences* **1986**, *5*, 125-133.
- 197 A. Jungbauer, R. Hahn, *Curr Opin. Drug Discovery & Development* **2004**, *7*, 248-256.
- 198 a) G. W. Jack, D. J. Beer, *Methods in Molecular Biology*, **1996**, *59* , 187-196.
b) K. Brocklehurst, A. J. Courey, S. Gul, S. H. Lin, R. L. Moritz, *Purifying Proteins for Proteomics*, **2004**, 221-273.
- 199 P. R. Satish, A. Surolia, *Methods for Affinity-Based Separations of Enzymes and Proteins*, **2002**, 115-129.
- 200 J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59-81.
- 201 a) Referencia 87.

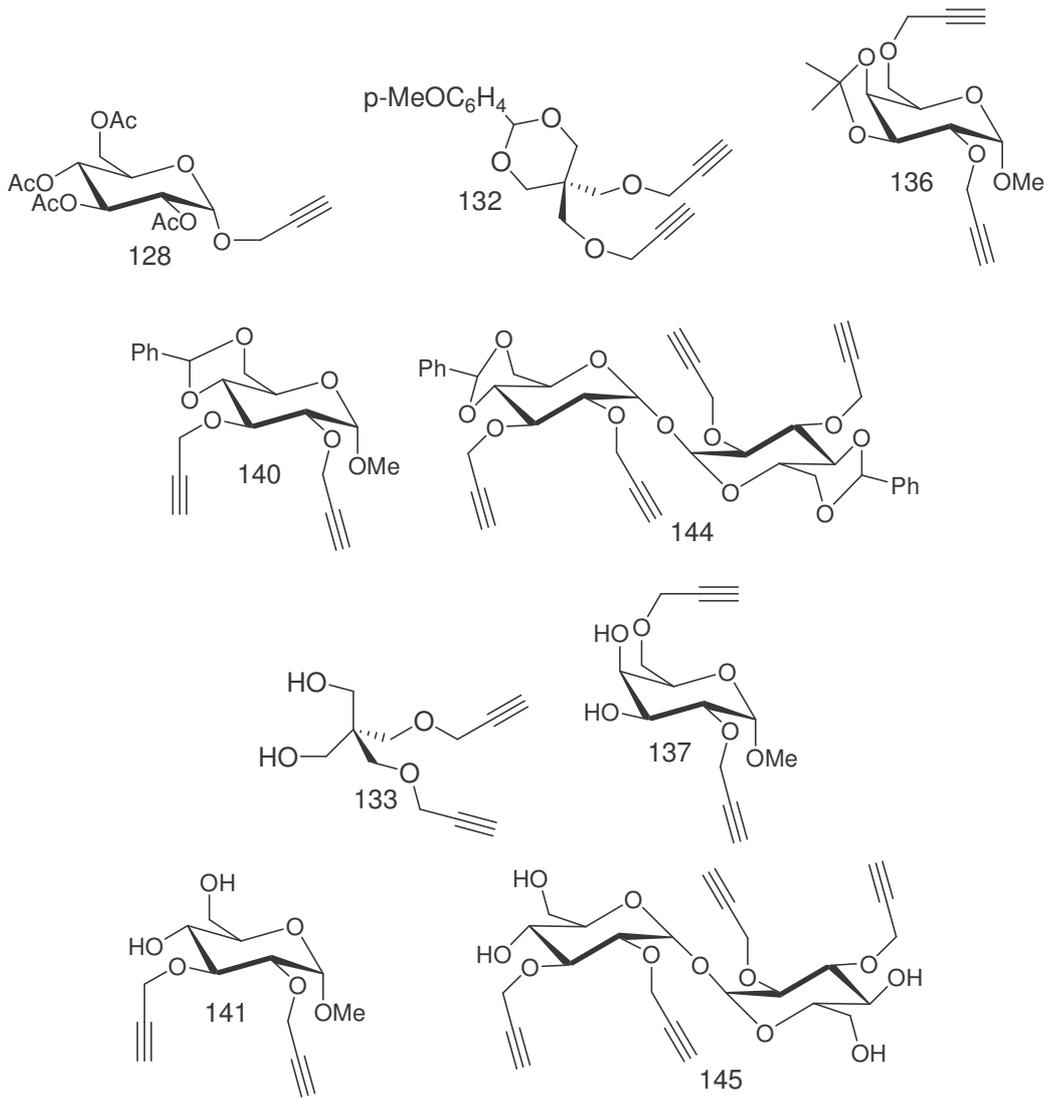
- b) M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Drug Discov. Today: Targets* **2004**, 3, 151-158.
- c) Referencia 89.
- d) I. Shin, S. Park, M.-R. Lee, *Chem-Eur. J.* **2005**, 11, 2894-2901.
- e) Referencia 88.
- 206 T. Lummerstorfer, H. Hoffmann, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 3963-3966.
- 207 S. Punna, E. Kaltgrad, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1536-1541.
- 208 X. L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 52-57.
- 209 a) N. K. Devaraj, G. P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J. P. Collman, E. T. Kool, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8600-8601.
- b) Referencia 91.
- c) Referencia 92.
- 210 G. L. Huang, T. C. Liu, M. X. Liu, X. Y. Mei, *Anal. Biochem.* **2005**, 340, 52-56.
- 211 Y. Zhang, S. Luo, Y. Tang, L. Yu, K. Y. Hou, J. P. Cheng, X. Zeng, P. G. Wang, *Anal. Chem.* **2005**, 78, 2001-2008.
- 212 a) H. Larseriscdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 237, 98-103.
- b) M. Van der Veen, W. Norde, M.C. Stuart, *Colloid. Surface. B.* **2004**, 35, 33-40.
- c) D. Rezwani, L. P. Meier, L. J. Gauckler, *Biomaterials* **2005**, 26, 4351-4357.
- d) P.M. Biesheuvel, M. Van der Veen, W. Norde, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 4172-4180.
- 213 a) A. Kondo, F. Muakami, M. Kawagoe, K. Higashitani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, 39, 726-731.

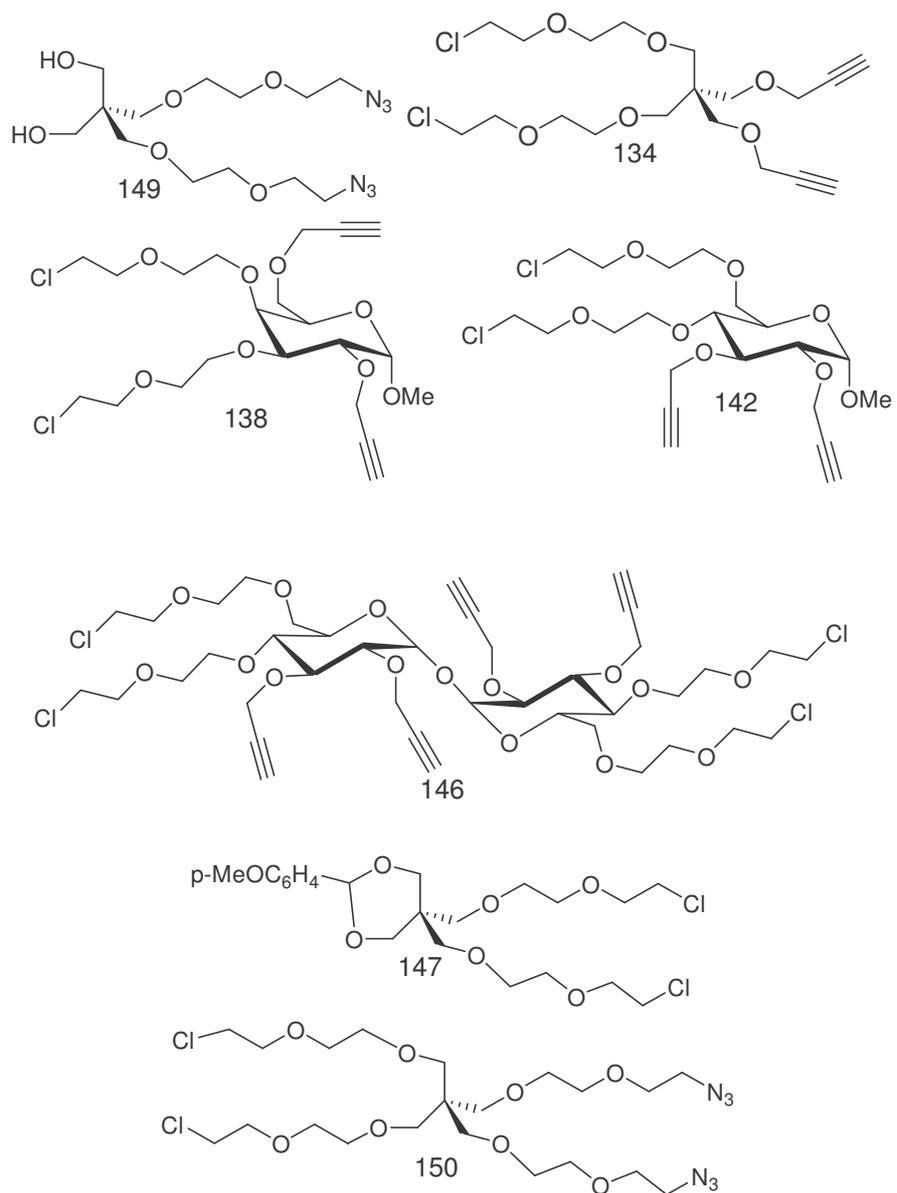
- b) M. Lundqvist, I. Sethson, B.H. Jonsson, *Langmuir* **2004**, *20*, 10639-10647.
- c) A. A. Vertegel, R. W. Siegel, J.S. Dordick, *Langmuir* **2004**, *20*, 6800-6807.
- 214 H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Inteface Sci.* **2005**, *289*, 26-35.
- 215 S. M. Daly, T. M. Przybycien, R. D. Tilton, *Langmuir* **2005**, *21*, 1328-1337.
- 216 a) P. M. Price, J. H. Clark, D. J. Macquarrie, *Dalton T.* **2000**, 101-110. b) P. K. Jal, S. Patel, B. K. Mishra, *Talanta* **2004**, *62*, 1005-1028.
- 217 H. Lakhiari, J. Jozefonvicz, D. Muller, *J. Chromatogr. B* **1998**, *76*, 33-41.
- 218 G. Rodriguez-Lopez, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, L. A. Villaescusa, D. Beltran, P. Amoros, *Chem. Commun.* **2004**, 2198-2199.
- 219 a) A. Heeboll-Nielsen, M. Dalkiaer, J. J. Hubbuch, O. R. T. Thomas, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 311-323. b) W. C. Lee, C. C. Hsiao, R. C. Ruaan, *J. Chem Technol. Biotechnol.* **1995**, *64*, 66-72.
- 220 A. Karl, W. Buder, *Eur. Patent* 50768 A2 19820505, **1982**; Chem. Abst. **1982**, *97*, 163246.
- 221 R. Roy, S. K. Das, F. Santoyo-Gonzalez, F. Hernandez-Mateo, T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem.Eur. J.* **2000**, *6*, 1757-1762.
- 222 A. Y. Chernyak, G. V. M. Sharma, L. O. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky, N. K. Kochetkov, A. V. R. Rao, *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303-309.
- 223 L.E. Samuelson, K.B. Seby, E.D. Walter, D.J. Singel, M.J. Cloninger, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3075-3079.
- 224 E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Apple, A. Bairoch, in *The Proteomics Protocol Hadbook* (Ed.: J. M. Walker), Humana Press Inc, Totowa, N. J., **2005**, pp 571-607.

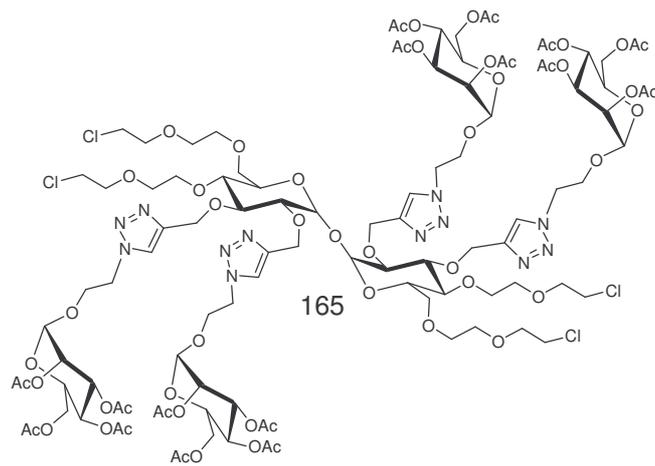
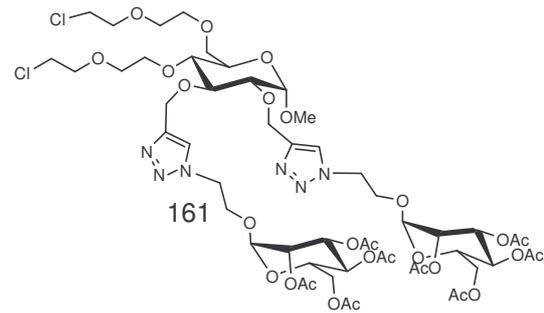
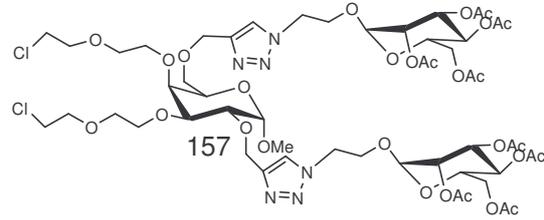
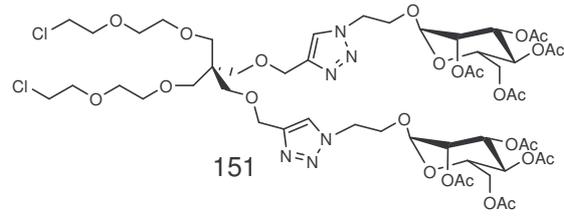
- 225 J. J. Valle-Delgado, J. A. Molina-Bolivar, F. Galisteo-Gonzalez, M. J. Galvez-Ruiz, A. Feiler, R. W. Rutland, *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16*, S2383-S2392.
- 226 a) W. Norde, J.P. Favier, *Colloid. Surface.* **1992**, *64*, 87-93.
b) H.Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289*, 26-35.
- 227 Koutsopoulos, S., van der Oost, J., Norde, W. *Biophys. J.* **2004**, *88*: 467-474.
- 228 T. Arai, W. Norde, *Colloid. Surface.* **1990**, *51*, 1-15.
- 229 R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, L. Wyns, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1383*, 9-36.
- 230 A. Salahuddin, R. Begum, B. K.Averill, *Biochem J.* **1984**, *22*, 639-642.
- 231 W.C. Lee, K. H. Lee, *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 1-10.
- 232 V. Horejsi, J. Kocoarek, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *53*,: 299-315.
- 233 a) M. Caron, A. P. Seve, D. Badier, R. Joubert-Caron, *J. Chromatogr. B* **1998**, *715* 153-161.
b) Caron, M., Joubert-Caron, R., Cartier, J. R., Chadli, A., Bladier, D., *J. Chromatogr.* **1993**, *646*, 327-333.
- 234 A. Waggoner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *1*,:62-66.
- 235 S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 295-318.
- 236 L. Johnson, S. Lagerkvist, P. Lindroth, M. Ahnoff, K. Martinsson, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 939-942.
- 237 M. J. Waner, M.Gilchrist, M. Schindler, M. Dantus, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1649-1657.
- 238 P. B. Ghosh, M.W. Whitehouse, *Biochem. J.* **1968**, *108*., 155-156.
- 239 D. Birkett, N. C. Price, G. K. Radda, A.G. Salmon, *FEBS Lett.* **1970**, *6*, 346-348.

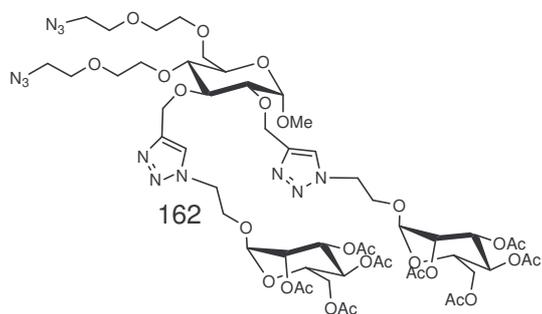
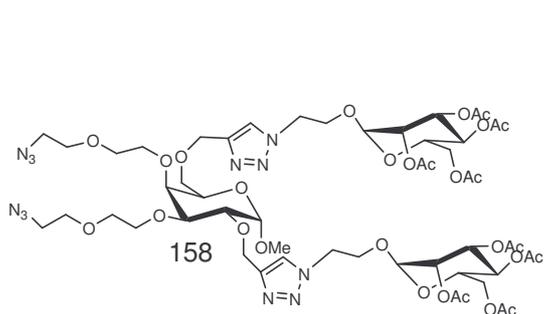
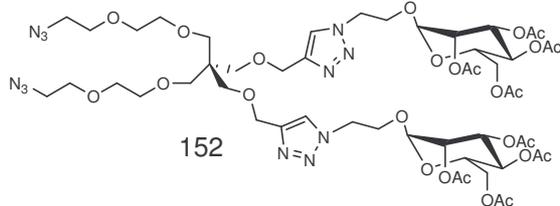
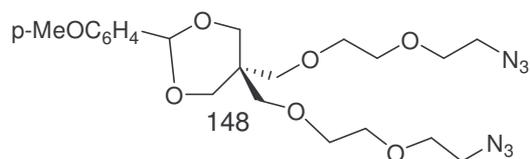
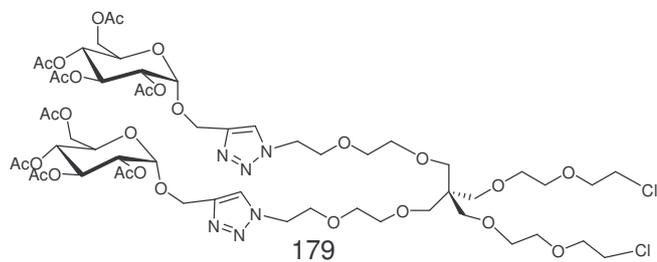
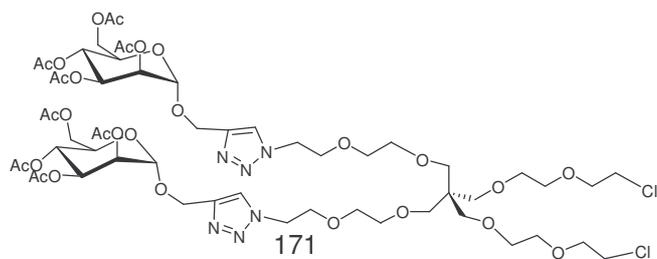
- 240 Angeletti, E.; Canepa, C.; Martinetti, G.; Venturello, P.; *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I*, **1989**, 105-107
- 241 U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- 242 C. R. Merrill, D. Goldman, M. L. Van Keuer, *Meth. Enzymol.* **1984**, 1
- 243 DeLange, R. J., *J. Biol. Chem.* **1969**, 245, 907-916.
- 244 Cuatrecasas, P. and Wilchek, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 33, 235-239.
- 245 Green, N. M., *Biochem. J.* ,**1966**, 101, 774-780.
- 246 Hirsch, J. D., Eslamizar, L., Filanoski, B. J., Malekzadeh, N., Haugland, R. P., Beechem, J. M. and Haugland, R. P., *Anal. Biochem.* **2002**, 308, 343–357.
- 247 Heney, G. and Orr, G. A., *Anal. Biochem.* **1981**, 114, 92-96.
- 248 Smith, C. L.; Milea, J. S.; Nguyen G. H.; *Top. Curr. Chem* **2006**, 261, 63-90
- 249 a) Hofmann, K., Wood, S. W., Brinton, C. C., Montibeller, J. A. and Finn, F. *M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **1980**, 77, 4666-4668.
- b) Hytönen V. P., Laitinen O. H., Grapputo A., Kettunen A., Savolainen J., Kalkkinen N., A. T., Nordlund H. R., Nyholms T. K. M., Paganelli, G. and Kulomaa M.S. *Biochem. J.* ,**2003**, 372, 219–225.
- c) Airene, K. J. Oker-Blom, C., ki, V. S. M., Bayer, E. A., Wilchek, M. and Kulomaa, M. S. *Protein expression and purification* , **1997**, 9, 100–108.

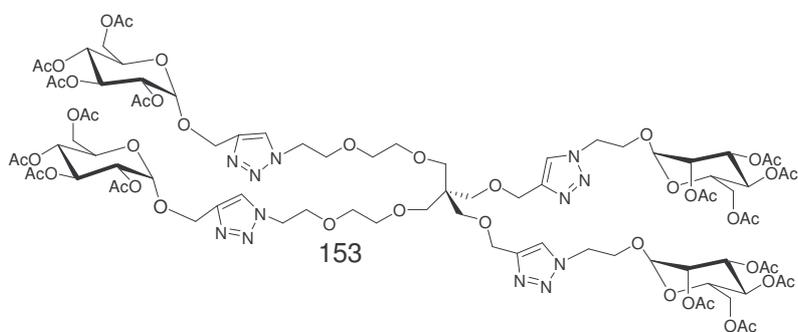
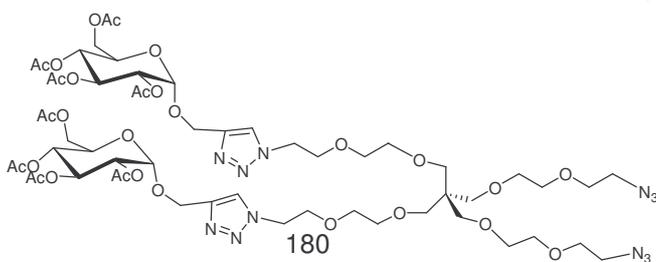
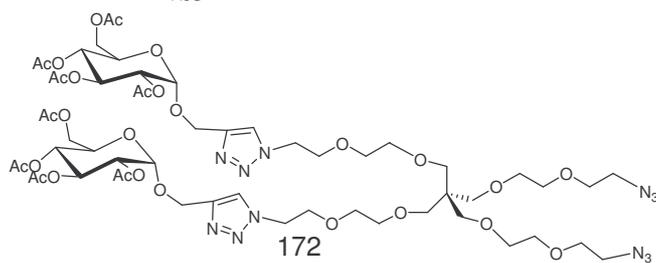
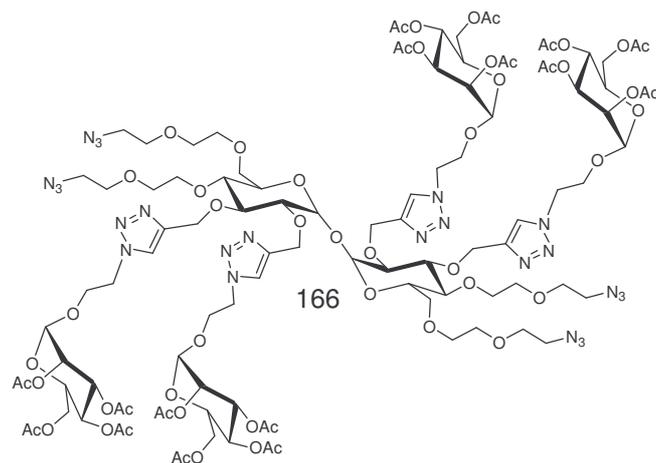
Anexo III.
Productos sintetizados.

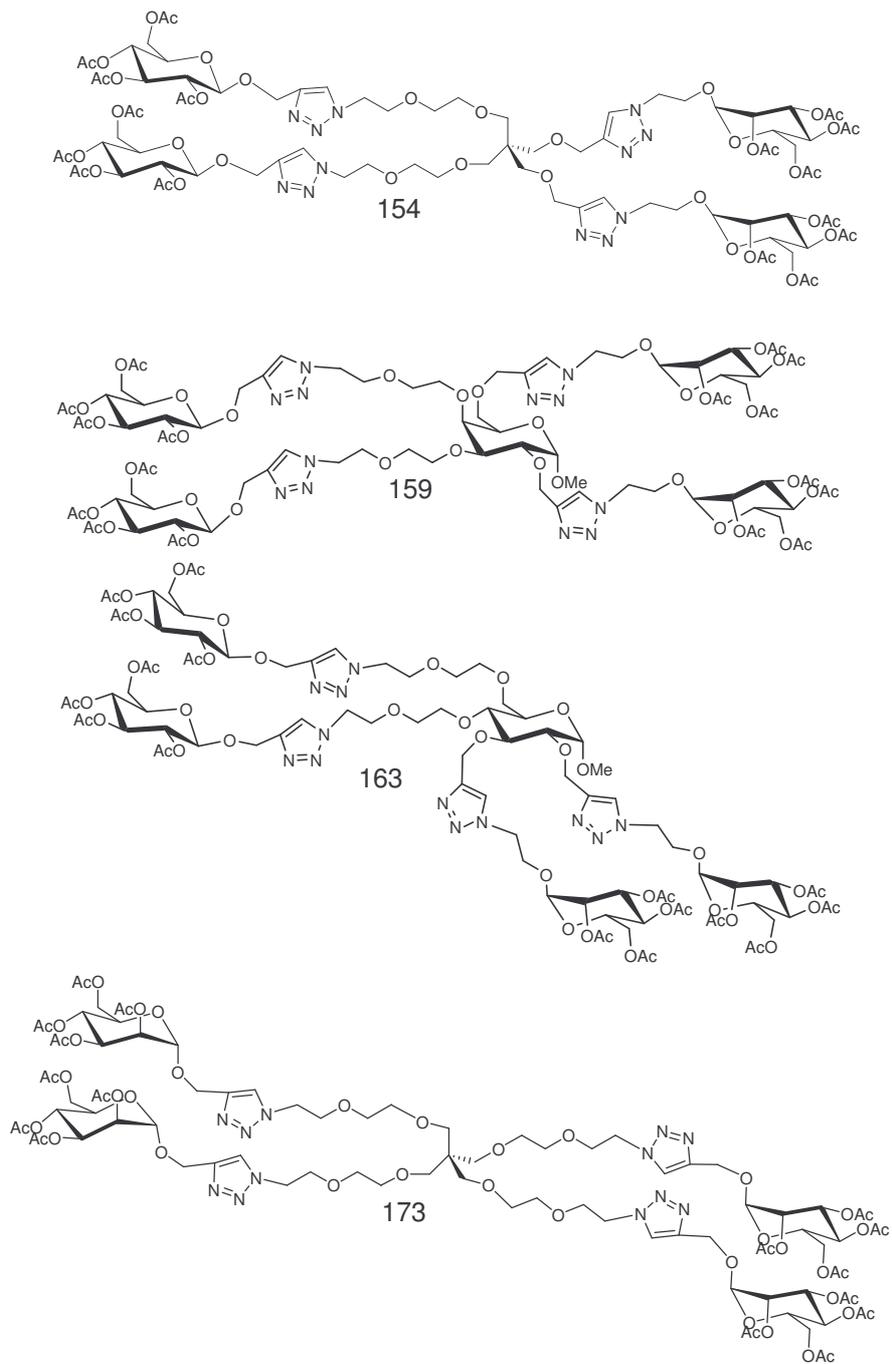


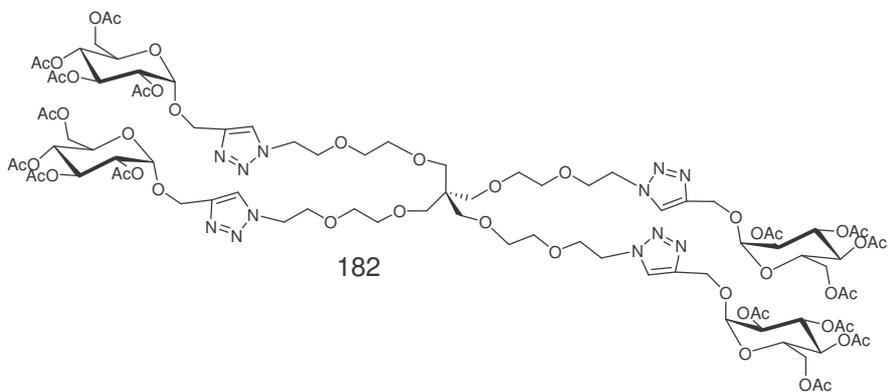
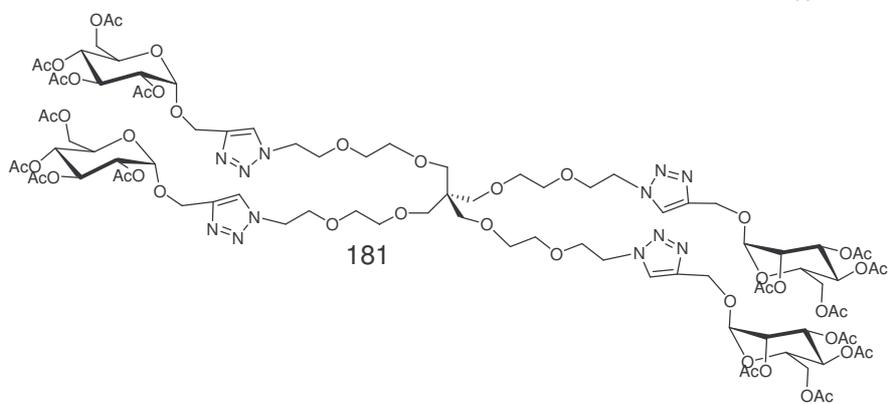
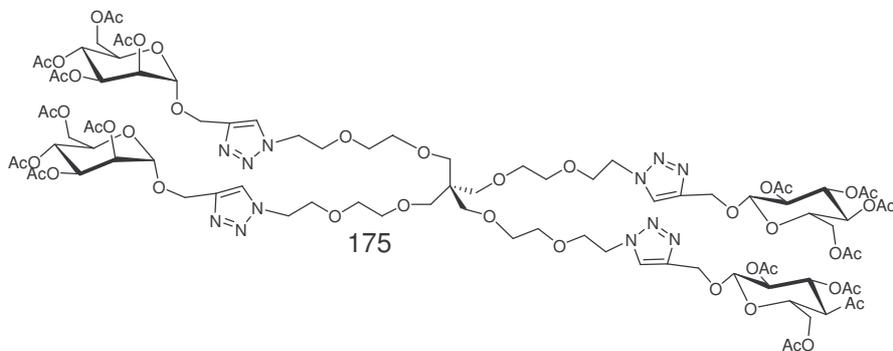
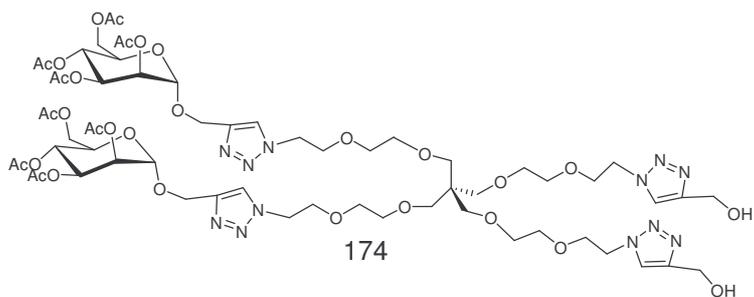


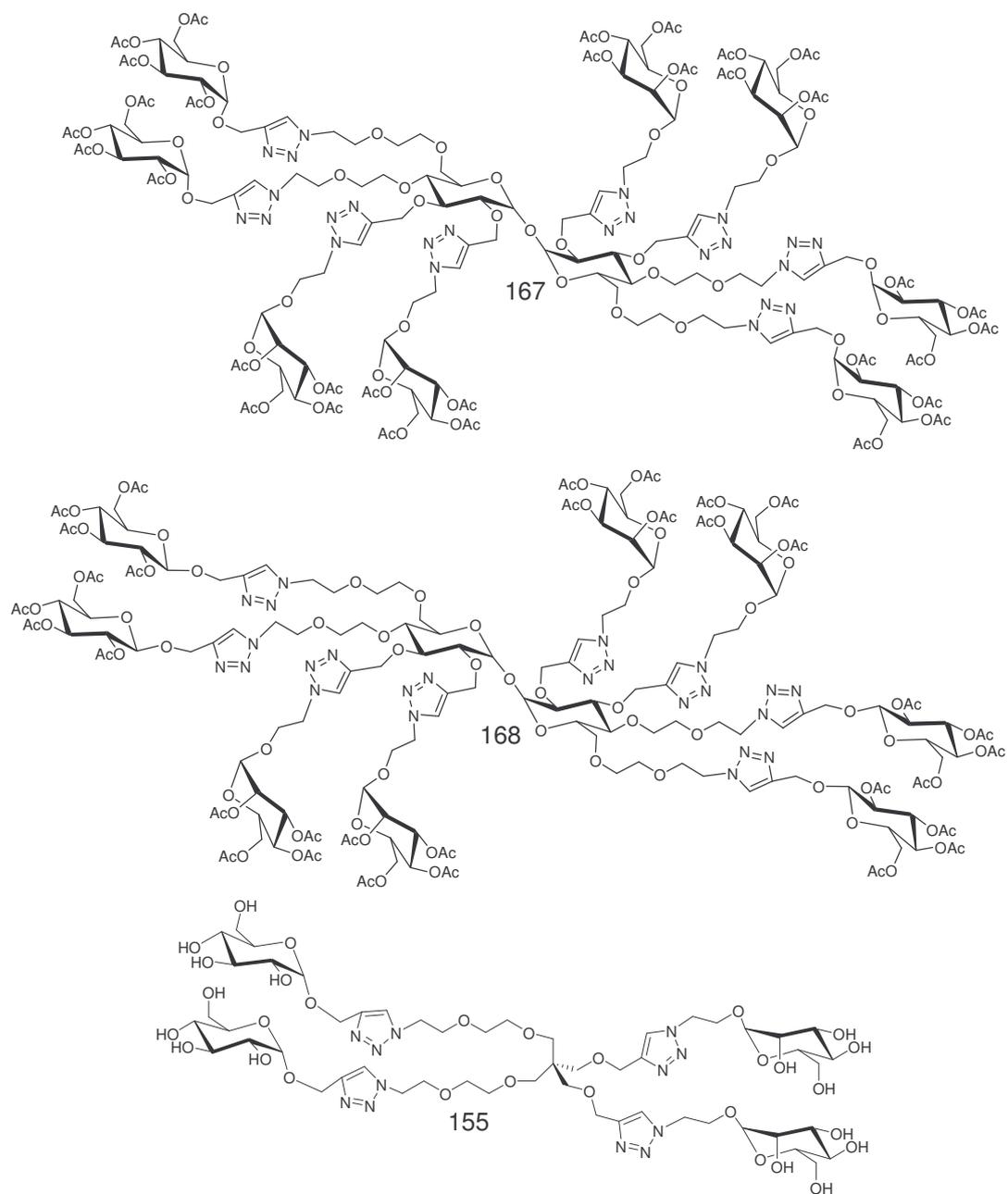


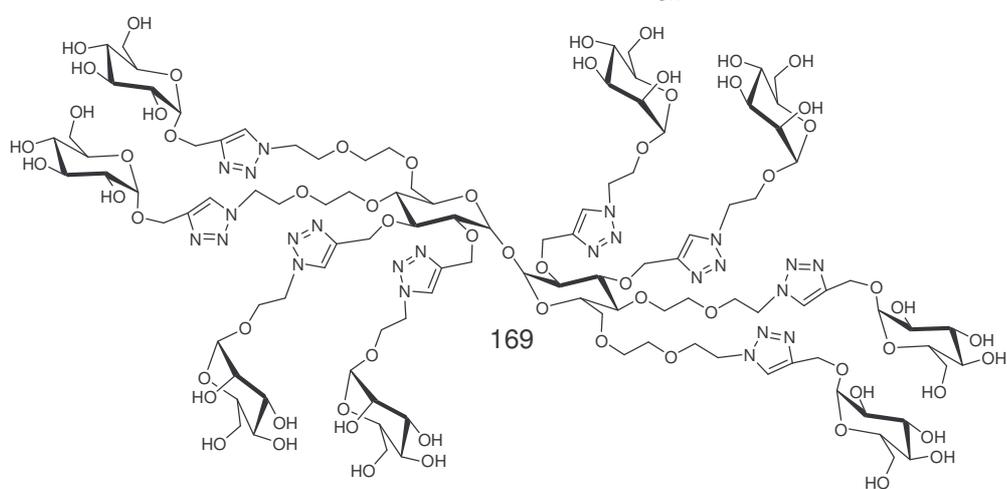
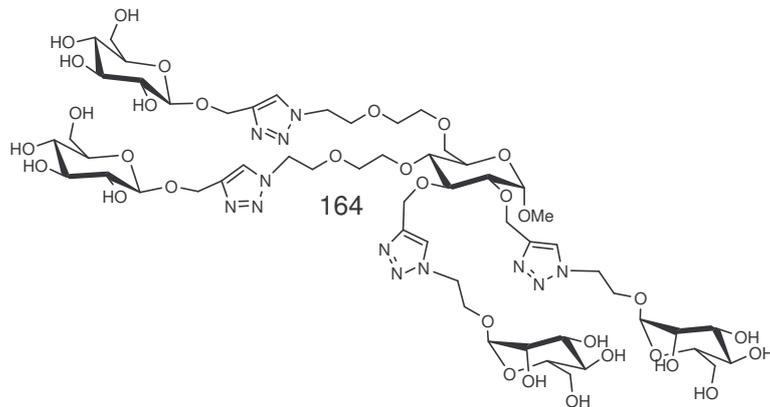
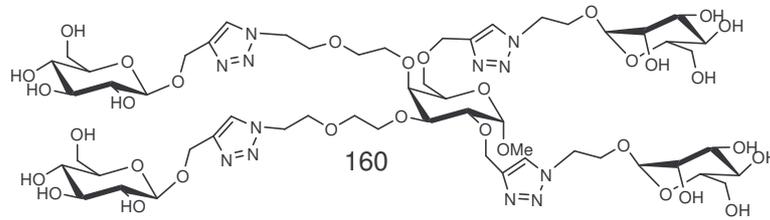
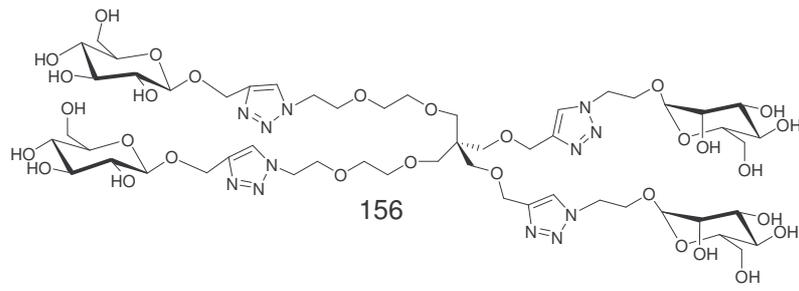


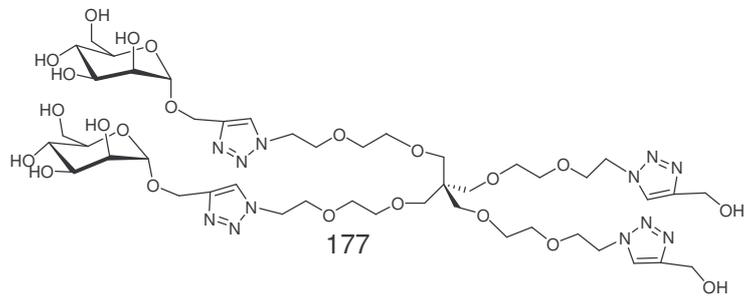
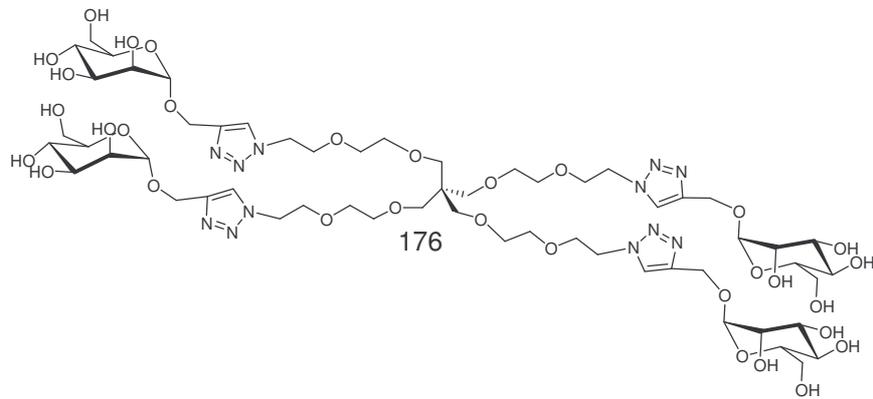
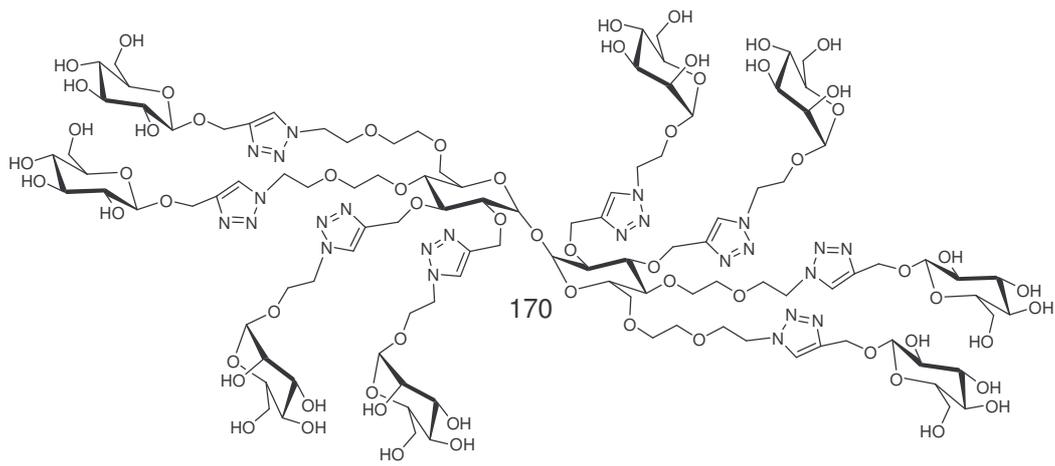


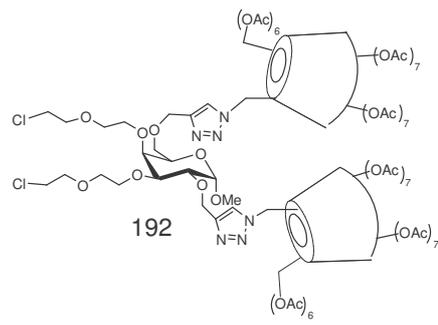
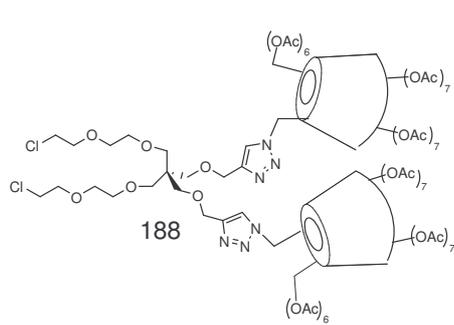
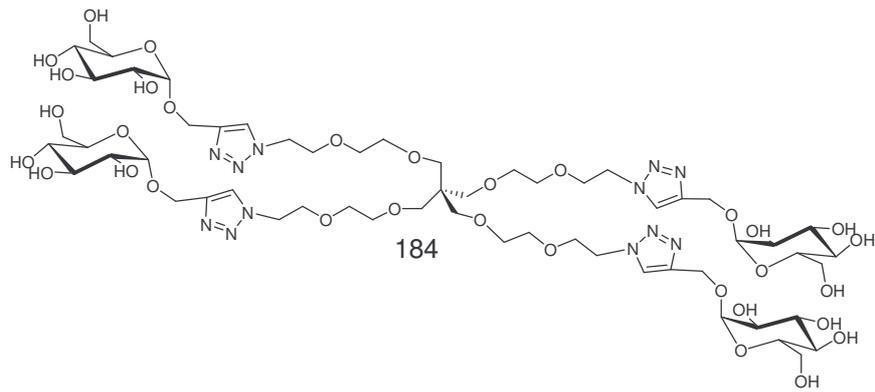
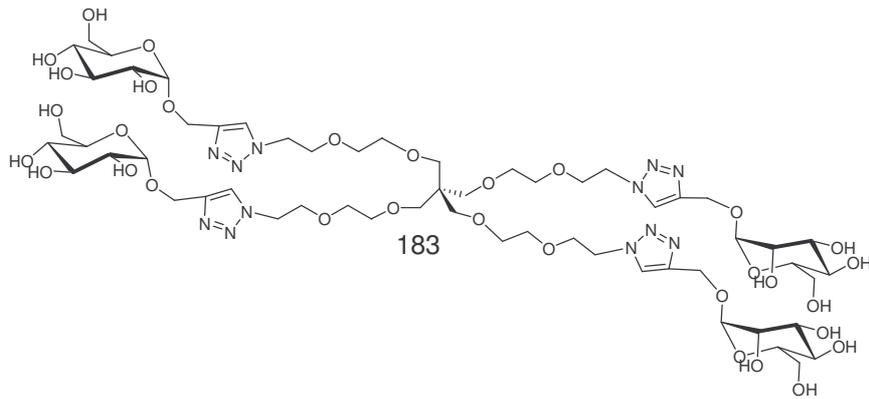
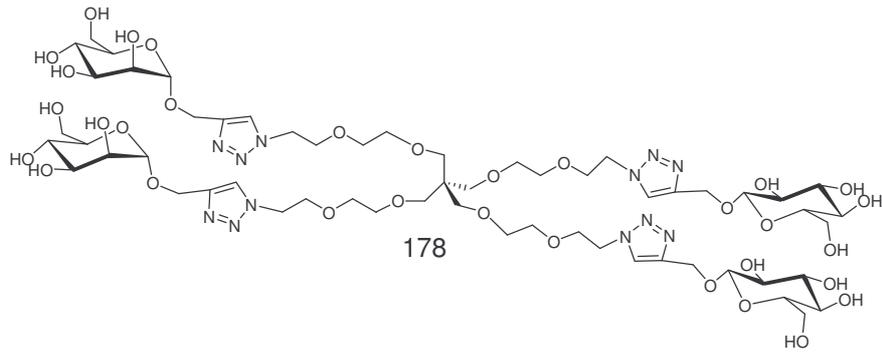


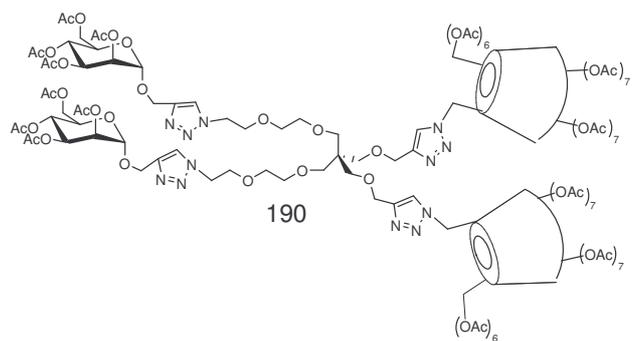
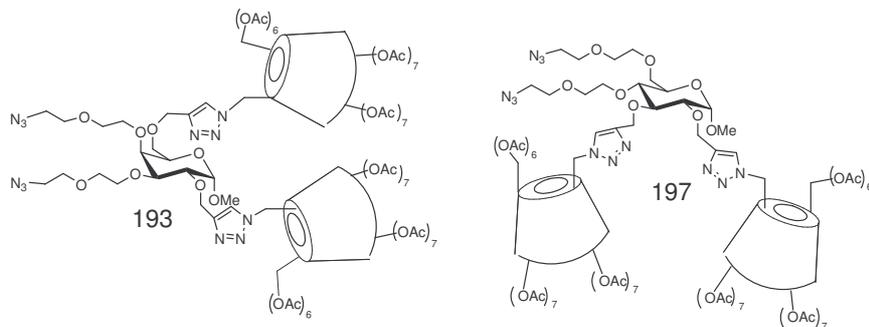
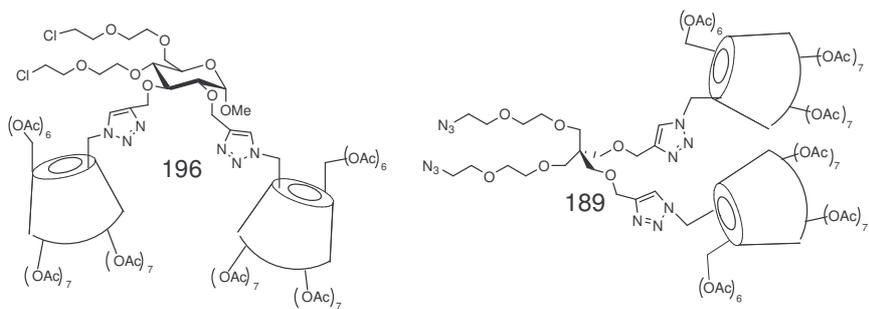


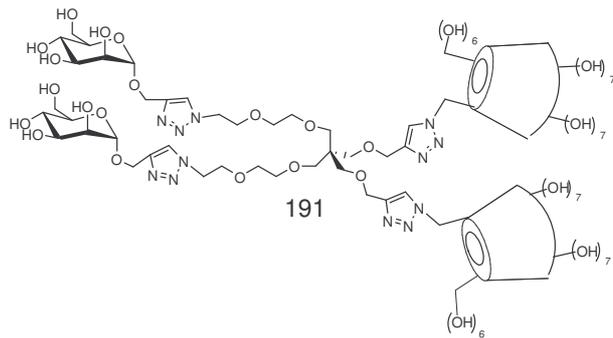
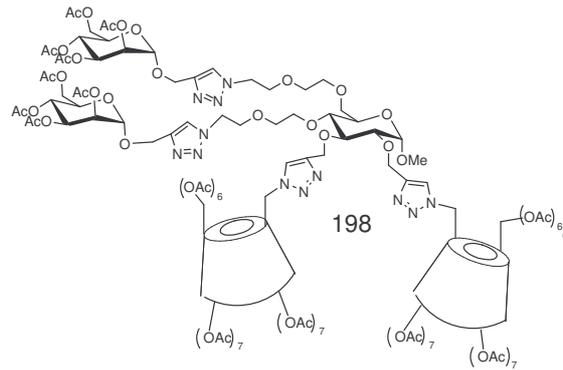
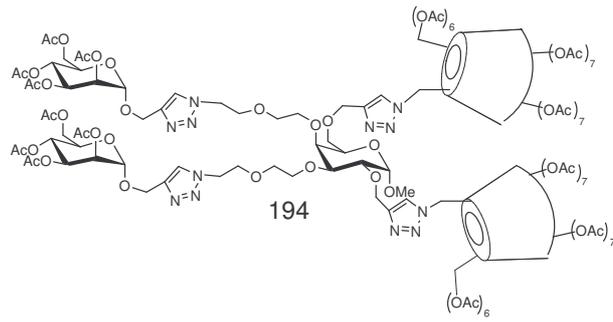


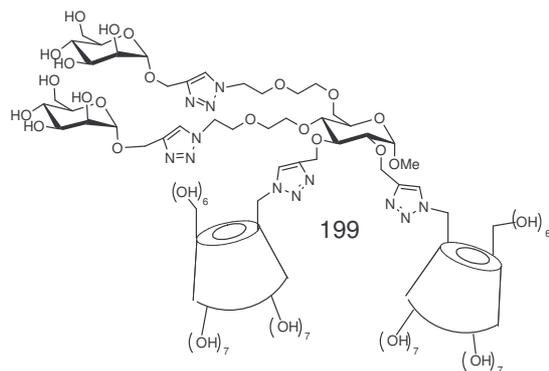
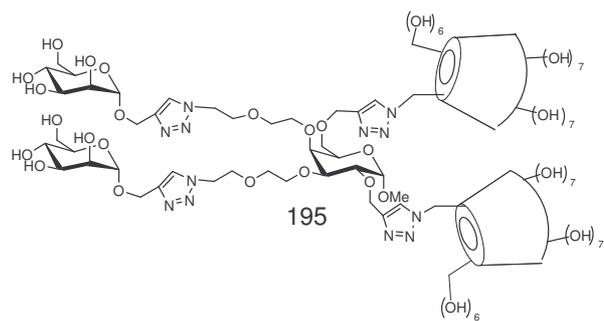


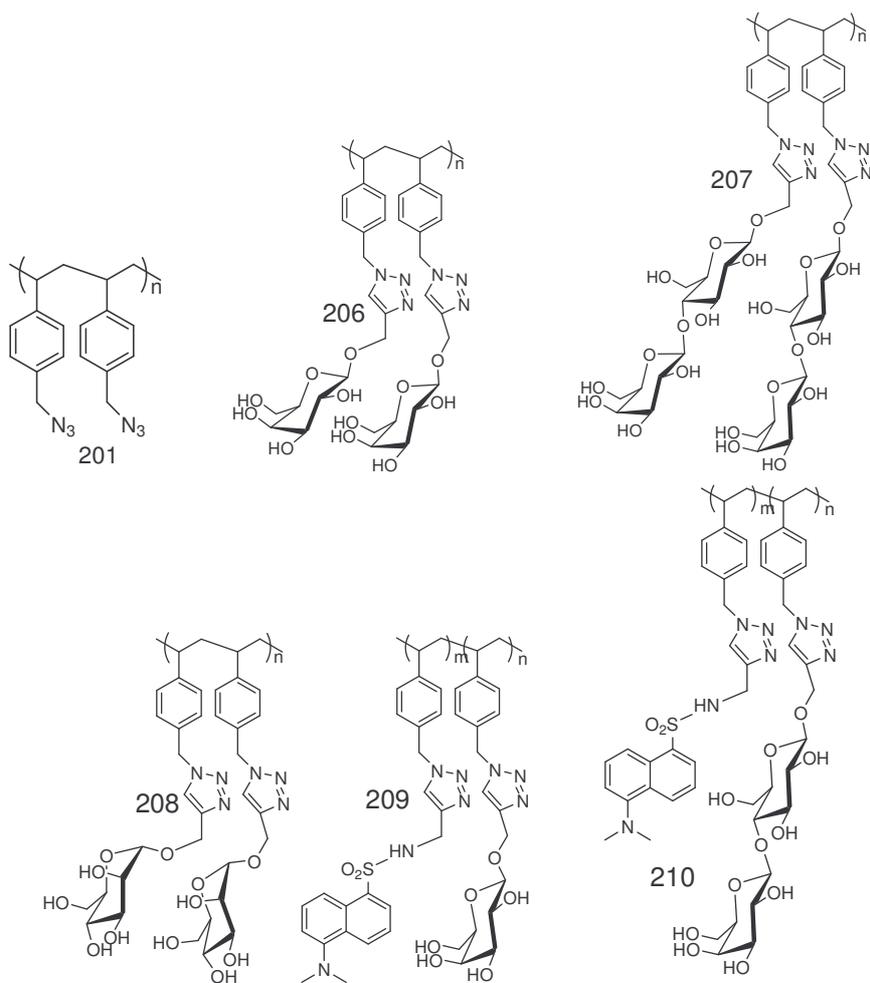


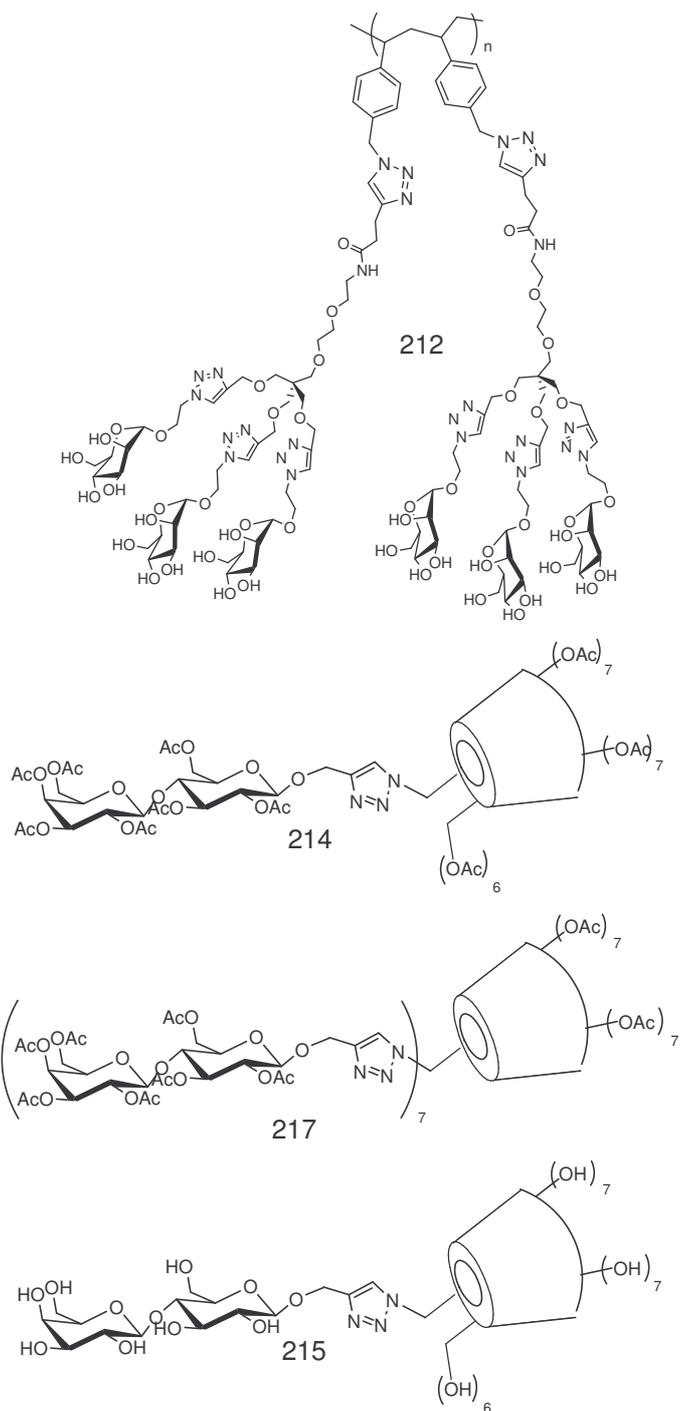


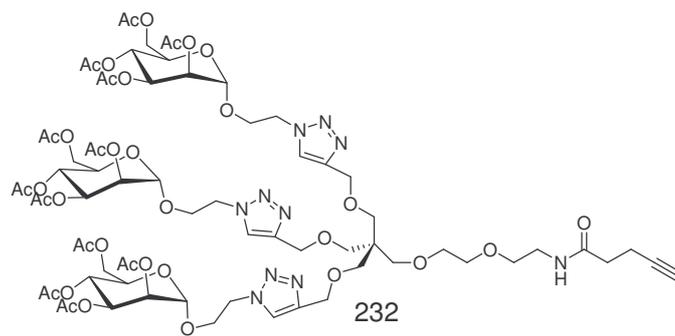
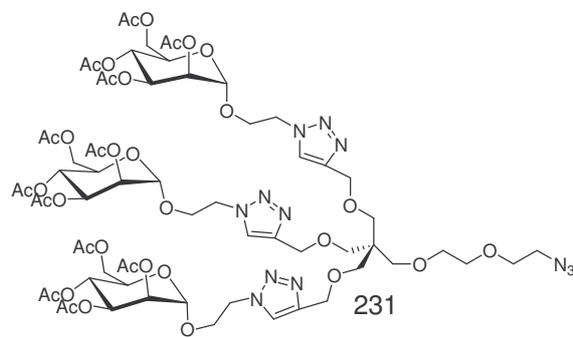
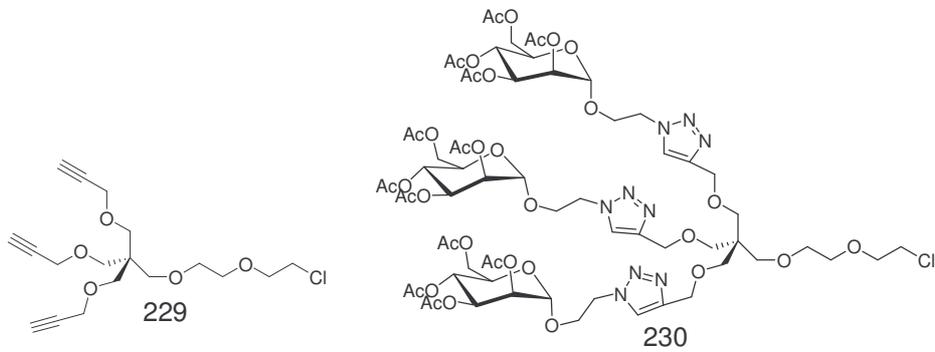
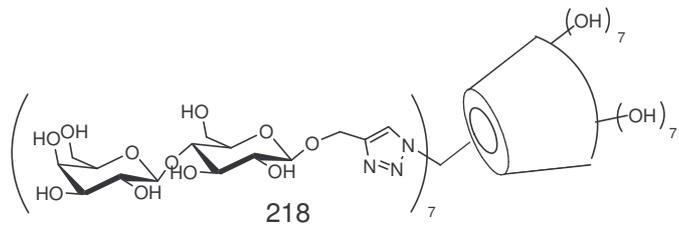


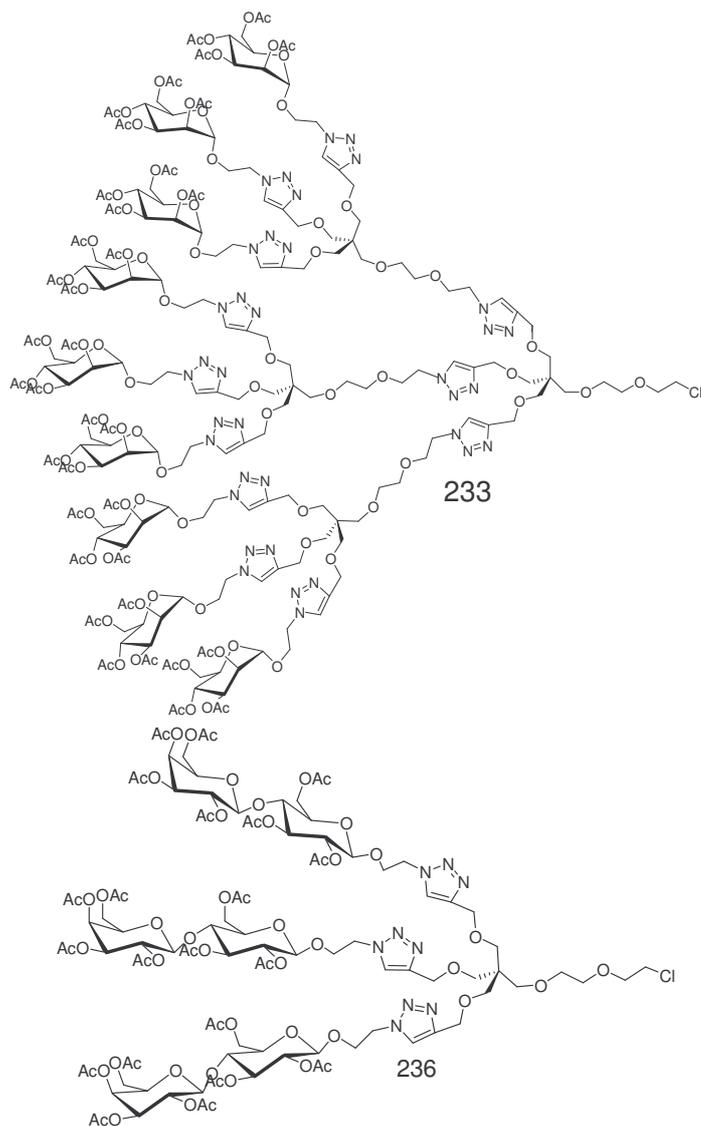


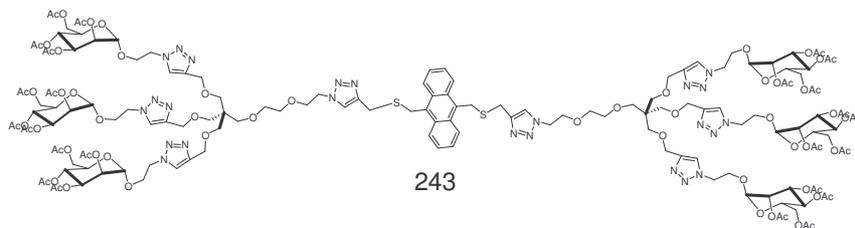
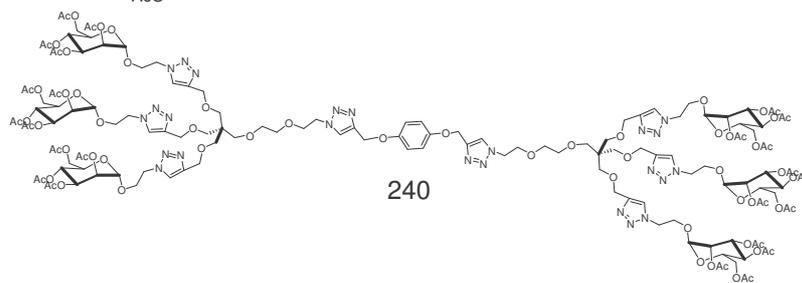
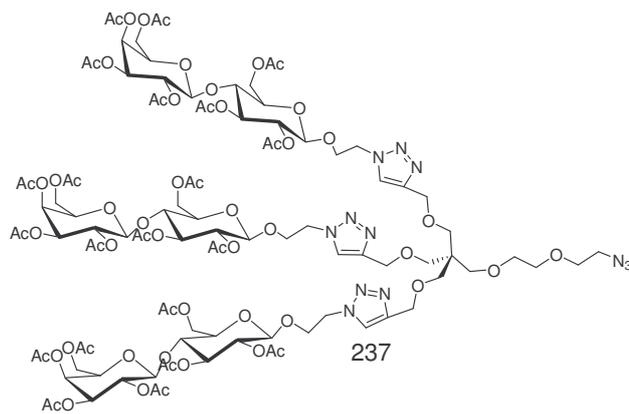


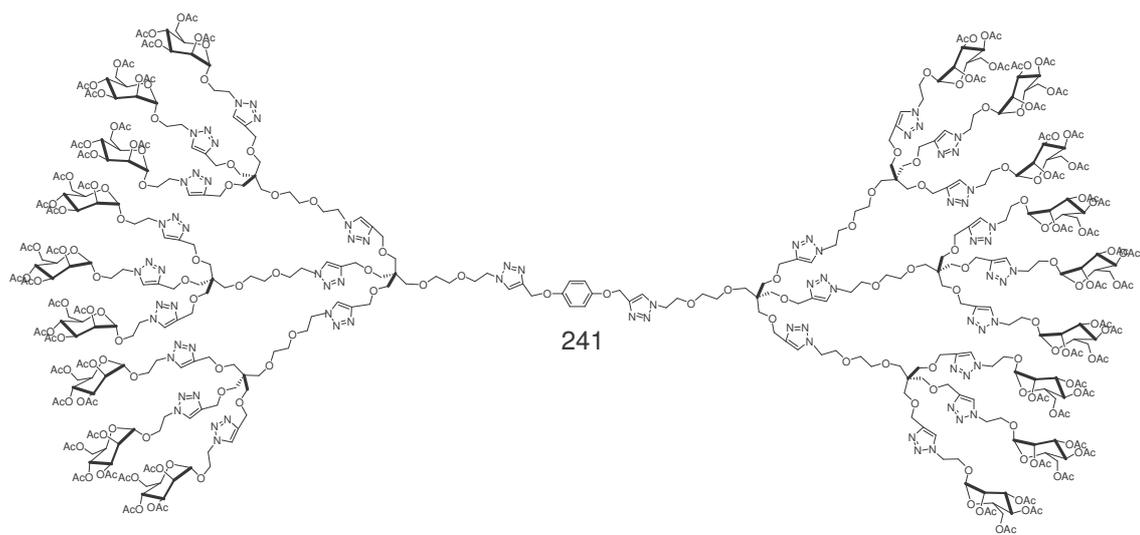
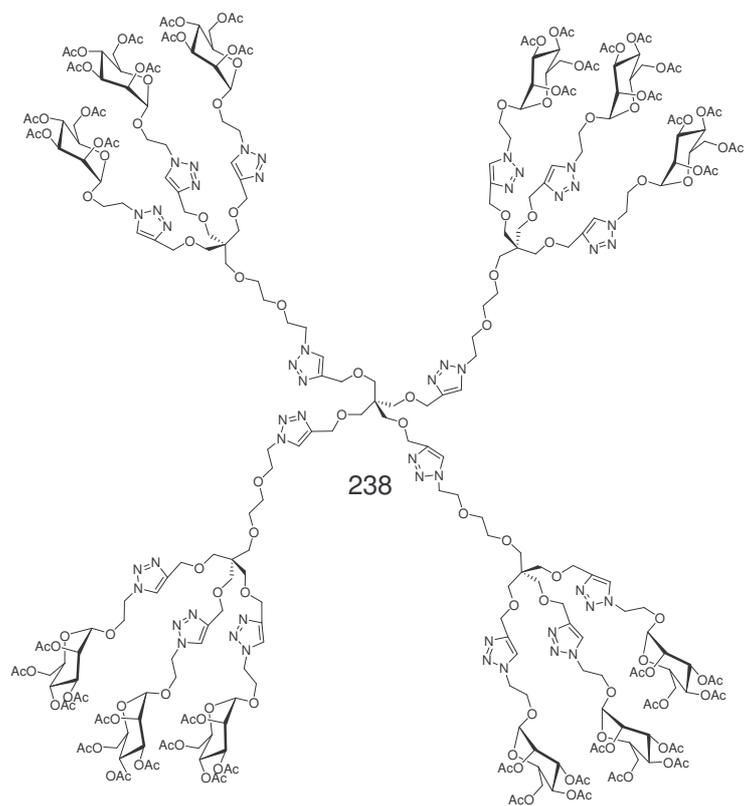


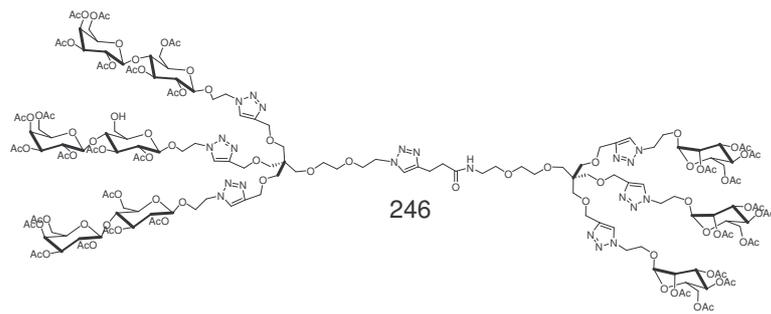
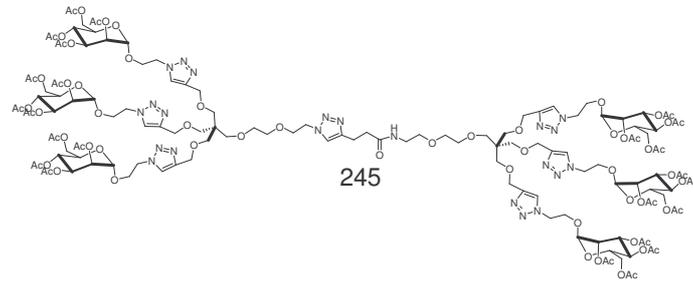
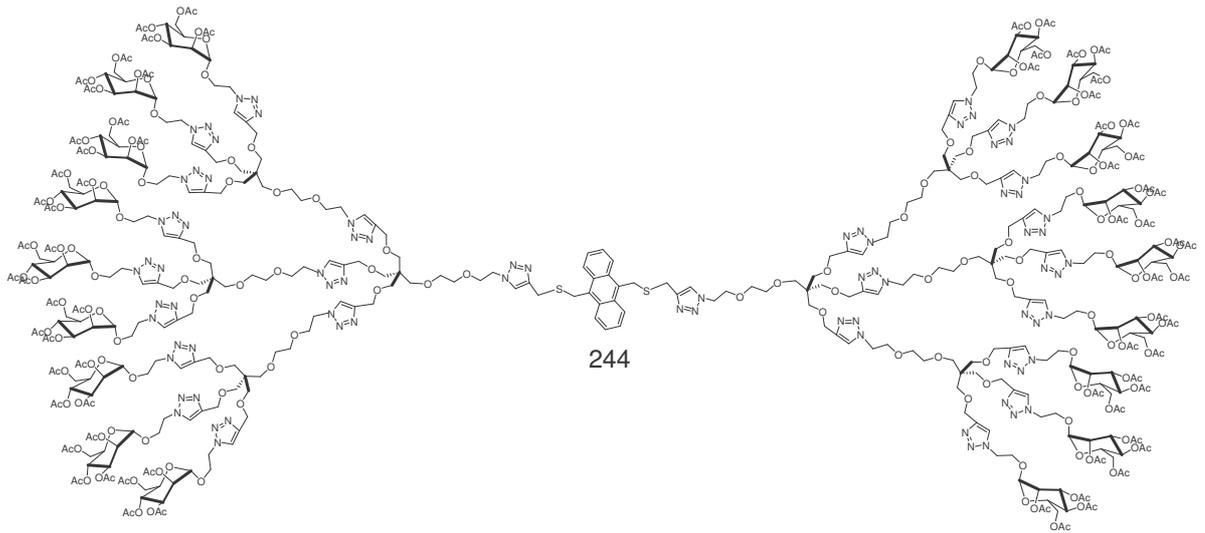


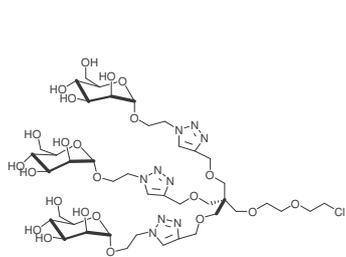




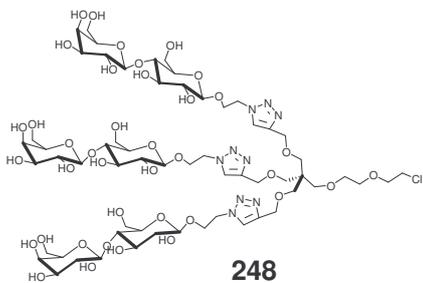




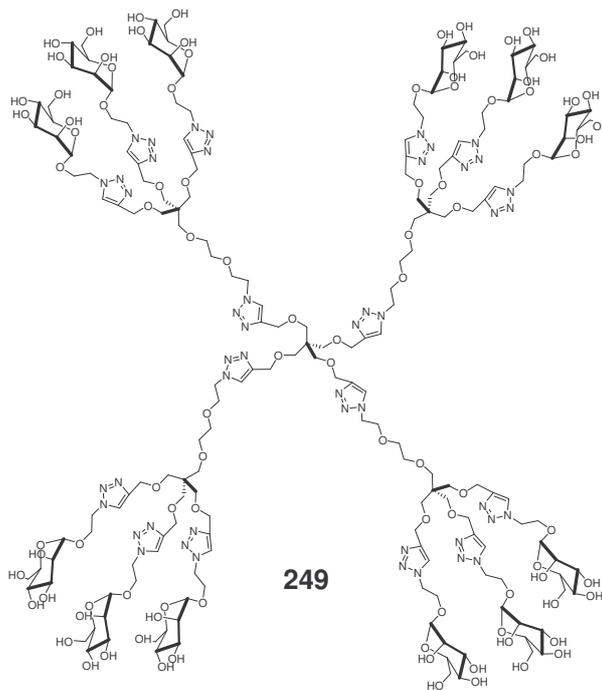




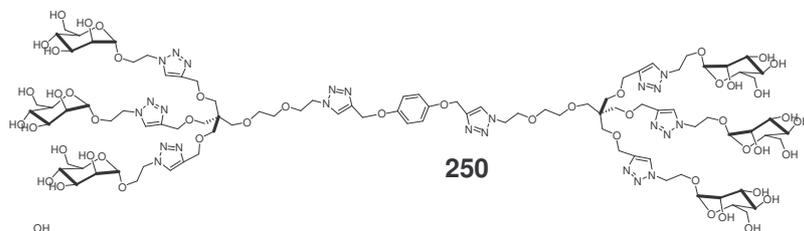
247



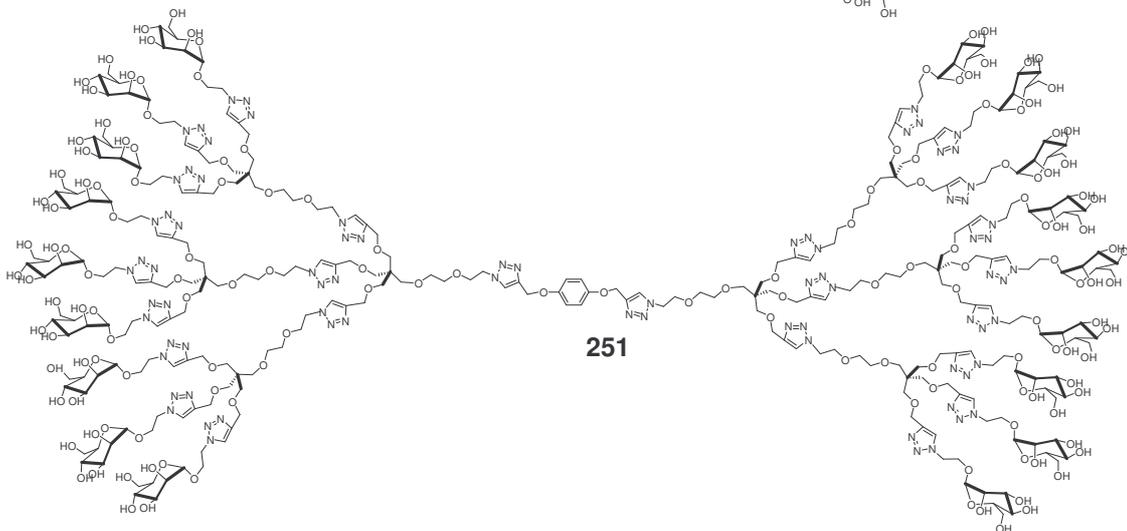
248



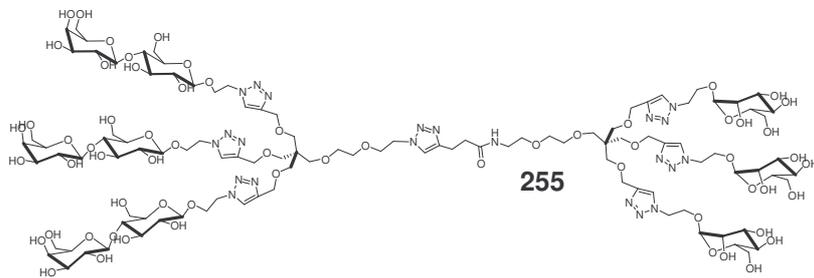
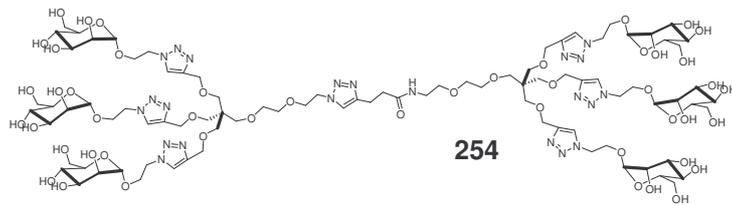
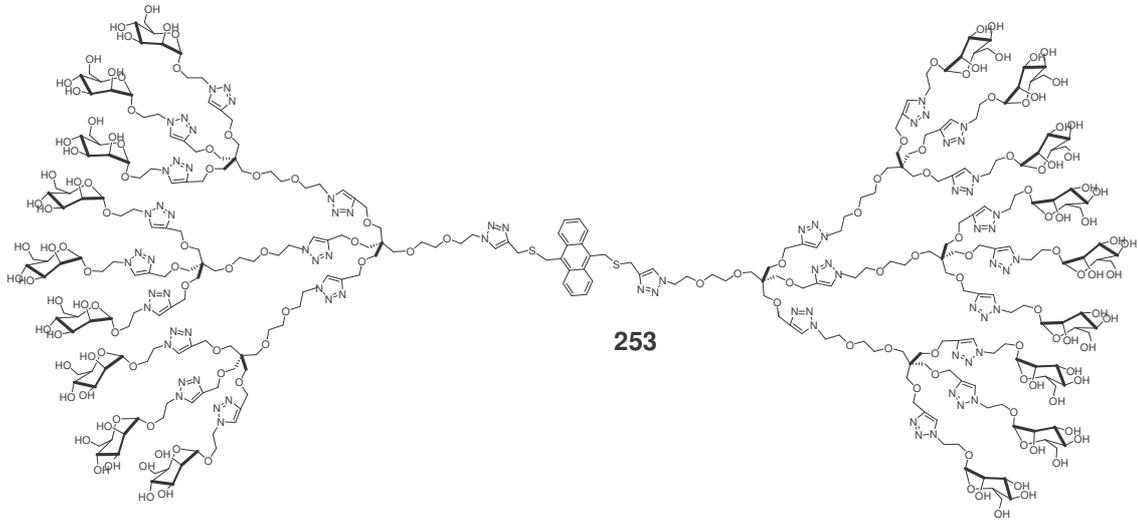
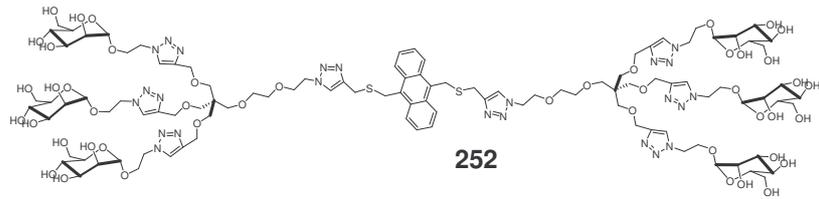
249

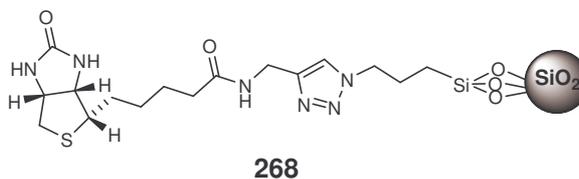
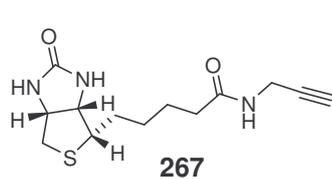
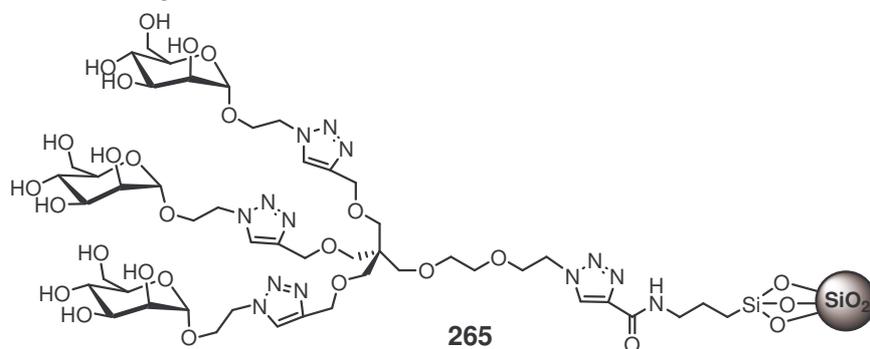
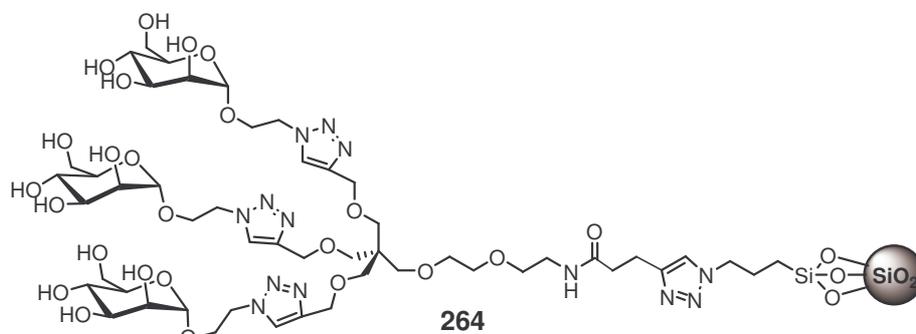
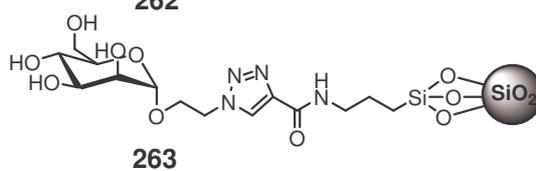
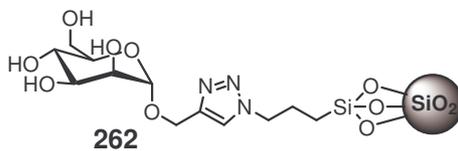
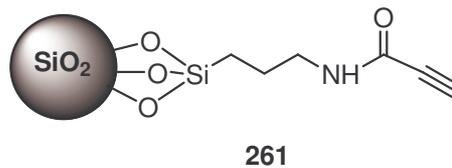
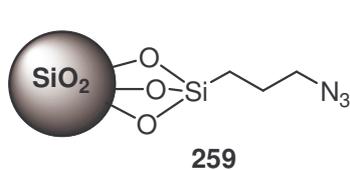
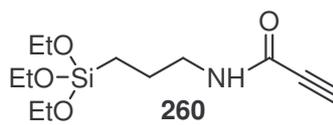
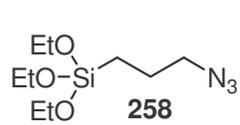


250



251





Anexo IV.
Artículos publicados.

Multivalent Neoglycoconjugates by Regiospecific Cycloaddition of Alkynes and Azides Using Organic-Soluble Copper Catalysts

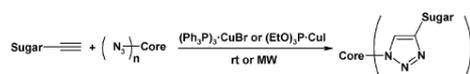
Francisco Pérez-Balderas, Mariano Ortega-Muñoz, Julia Morales-Sanfrutos, Fernando Hernández-Mateo, Francisco G. Calvo-Flores, Jose A. Calvo-Asín, Joaquín Isac-García, and Francisco Santoyo-González*

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain

fsantoyo@ugr.es

Received March 27, 2003

ABSTRACT



The construction of multivalent neoglycoconjugates is efficiently achieved by the regiospecific catalytic cycloaddition of alkynes and azides using the organic-soluble copper complexes $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$ and $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$. The simultaneous use of microwave irradiation shortened notably the reaction times.

In the fields of glycobiology and supramolecular chemistry, the construction of large molecules with a well-defined architecture such as multivalent ligands¹ or artificial receptors² is normally required. Multivalency in ligand–receptor interactions is an important principle used by Nature to increase weak interactions to biologically relevant levels.³ The principle, normally referred to as the cluster effect, is especially prevalent in carbohydrate recognition events, in which monovalent affinities are generally quite low and such an enhancement is required.⁴ This has been used in the design

of biologically active compounds to endow them with binding power greater than that of their monovalent counterparts. In this respect, glycodendrimers are growing in importance as a class of dendrimers and glycoconjugates.⁵

The synthetic effort normally required to prepare effective, rationally designed, polyvalent ligands are normally high where the use of simple and efficient reactions for the covalent connection of the different modules is a necessity. Driven by this need to develop efficient methodologies, we have demonstrated⁶ in the past that 1,3-dipolar cycloadditions are an efficient and highly versatile strategy for the construction of a variety of multivalent structures such as sugars heterodimers, glycoclusters, calix-sugars, multicalixarenes, and glycocyclodextrins. The approaches used were based on the thermal coupling of alkynes and azides or nitrile oxides as the 1,3-dipolar functions allowing the creation of 1,2,3-

* Phone: +34-958248087. Fax: +34-958243186.

(1) (a) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357. (b) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696. (c) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922.

(2) Hartley, J. H.; James, T. D.; Ward, C. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3155.

(3) (a) Kiessling, L. L.; Strong, L. E.; Gestwicki, J. E. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *35*, 321. (b) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908.

(4) (a) Lee, R. T.; Lee, Y. C. In *Neoglycoconjugates*; Lee, Y. C., Lee, R. T., Eds.; Academic Press: San Diego, 1994, p 23. (b) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Account. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321. (c) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543. (d) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.

(5) (a) Davis, B. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3215. (b) Turnbull, W. B.; Stoodart, J. F. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 231. (c) Roy, R.; Baek, M.-G. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 291. (d) Bezouska, K. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 269.

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

Table 1. Synthesis of Divalent Neoglycoconjugates

entry	R ¹	R ² / core	product	conditions ^a	t (min/h)	yield (%)
$\text{R}^1\text{-C}\equiv\text{C} + \text{N}_3\text{-R}^2 \longrightarrow \text{R}^1\text{-C}_4\text{N}_2\text{-R}^2 \text{ (3)}$						
1			3a	A	34 min	86
2			3b	B	15 min	99
3			3c	C B	45 min 26 min	51 96
$\text{R}^1\text{-C}\equiv\text{C} + \text{N}_3\text{-R}^2\text{-N}_3 \longrightarrow \text{R}^1\text{-C}_4\text{N}_2\text{-R}^2\text{-N}_2\text{-C}_4\text{N}_2\text{-R}^1 \text{ (5)}$						
4		CH ₂ CH ₂ (4a)	5a	A	11 min	93
5			5b	A	8 min	80
6			5c	C B	12 min 12 min	83 86

^a Conditions: (A) (Ph₃P)₃CuBr, DIPEA, MW; (B) (EtO)₃P-CuI, DIPEA, MW; (C) (Ph₃P)₃CuBr, DBU, MW; (D) (Ph₃P)₃CuBr, ICu, DIPEA, MW. For experimental details, see General Procedure and Supporting Information.

triazoles or 1,2-oxazoles as aromatic heterocyclic bridges between the different units that are coupled.⁷ However, a limitation of this approach is the absence of regioselectivity normally found in thermal 1,3-cycloaddition of nonsymmetrical alkynes that leads to the isolation of a mixture of the different possible regioisomers. Also, long reaction times are required in the majority of the cases. In this communication, we contribute new advances regarding the enhancement of the selectivity and shorten the reaction times.

The improvement of the intrinsically poor regioselectivity of the dipolar cycloaddition involving nonsymmetrical alkynes has been addressed in the past with varying success.⁸

(7) Presence of an aromatic heterocyclic group next to the glycosidic bond has been pointed out as contributing positively to the interaction of neoglycoconjugates with lectins by increasing the hydrophobicity. See ref 5d.
(8) (a) Zamrato, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1991, 2789. (b) Hlasta, D. J.; Ackerman, J. H. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 6184. (c) Mock, W. L.; Itra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 5302. (d) Chen, J.; Rebeck, J. *Org. Lett.* 2002, 4, 327. (e) Hager, C.; Miedtchen, R.; Reinke, H. *J. Fluorine Chem.* 2000, 104, 135. (f) Howell, S. J.; Spencer, N.; Philp, D. *Tetrahedron* 2001, 57, 4945. (g) Tuncel, D.; Stenke, J. H. *G. Chem. Commun.* 2002, 496. (h) Krasia, T. C.; Steinke, J. H. *G. Chem. Commun.* 2002, 22.

A major advance has recently been achieved parallel to our investigations through the use of copper(I)-catalyzed reactions,⁹ which lead only to the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole. To broaden this methodology, we focused our attention in the use of organic-soluble copper(I) complexes that can act as a catalyst allowing homogeneous reactions. Among the copper compounds already reported, we chose (Ph₃P)₃CuBr^{10a} and (EtO)₃P-CuI^{10b} due especially to their air stability and easy and inexpensive preparation. In addition, it was thought that in order to improve the assemblies and especially to shorten the reactions times, the reactions could also be simultaneously assisted by the use of microwave irradiation.

(9) (a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057. (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* 2002, 114, 2708. For applications of this methodology, see: (c) Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 14397. (d) Wang, Q.; Chan, R. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3192.
(10) (a) Gujadhur, R.; Venkataraman, D.; Kintigh, J. T. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 4791. (b) Ziegler, F. E.; Fowler, K. W.; Rodgers, W. B.; Wester, R. T. *Organic Syntheses*; Wiley: New York, 1993; Collect. Vol. VIII, p 586.

Table 2. Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates

entry	R ¹	R ² / core	product	conditions ^a	t (min/h)	yield (%)
		$R^1 \equiv + (N_3)_n \text{Core} \longrightarrow \text{Core} \left(\begin{array}{c} R^1 \\ \diagup \quad \diagdown \\ N \quad N \\ \diagdown \quad \diagup \\ N \quad N \end{array} \right)_n$ (7)				
1			7a	A E	6 min 24 h	53 48
2			7b	A E	6 min 72 h	85 88
3			7c	A B	30 min 20 min	58 77
4			7d	D B	74 min 3 h	77 80
5			7e	D B	30 min 30 min	89 94
6			7f	B	30 min	73

^a Conditions: (A) (Ph₃P)₃CuBr, DIPEA, MW; (B) (EtO)₃P·CuI, DIPEA, MW; (C) (Ph₃P)₃CuBr, DBU, MW; (D) (Ph₃P)₃CuBr, ICu, DIPEA, MW; (E) (Ph₃P)₃CuBr, DIPEA, rt. For experimental details, see General Procedure and Supporting Information.

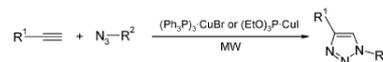
Microwave-assisted organic reactions are rapidly becoming recognized as a valuable tool for facilitating a wide variety of transformations.¹¹ We found that the combination of microwave irradiation with the use of both copper complexes, when used in catalytic amounts, allowed in short reaction times the coupling of a wide variety of alkynes and azides leading in all cases regioselectively to the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles.¹²

The utility of this methodology is first revealed by the examples in Table 1. The study was initiated by the synthesis

(11) (a) *Microwave in Organic Synthesis*; Loupy, A., Ed.; Wiley: New York, 2002. (b) Wathey, B.; Tierney, J.; Lidstrom, P.; Westman, J. *Drug Discovery Today* 2002, 7, 373. (c) De la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A.; Langa, F. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 3659. (d) Lidstrom, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* 2001, 57, 9225. Application of microwave irradiation in the 1,3-dipolar cycloaddition of alkynes and azides has been only very limited up to the present: (e) Louerat, F.; Bougrin, K.; Loupy, A.; Ochoa de Retana, A. M.; Pagalday, J.; Palacios, F. *Heterocycles* 1998, 48, 161. (f) Katritzky, A. R.; Singh, A. K. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 9077.

of divalent mannopyranosylated ligands following two different approaches. First, the direct assembly of functionalized

Scheme 1. Regiospecific Coupling of Alkynes and Azides



sugars was achieved by reaction of alkynyl and azide glycosides. To this end propargyl, thiopropargyl, and aminopropargyl glycosides **1a–c** were chosen to investigate not only the influence of the glycosidic linkage in the coupling but also as

(12) NOE difference spectroscopy has been used for the unambiguous assignment as the 1,4-regioisomer in selected cases.

a way to obtain divalent ligands containing S- and N-glycosides.¹³ In these cases, the assembly proceeds to completion in reaction times no longer than 45 min leading to the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles **3a–c** with good to almost quantitative yields. It was observed that alkyne **1a**, which supports the more electronegative substituent, reacts well with $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}\text{--DIPEA}$, but no reaction was detected when **1b** and **1c** were used. However, that problem was overcome in the case of **1c** by using a stronger base such as DBU when using $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$ (entry 3). This result was not found in the reactions with $(\text{EtO})_3\text{P}\text{--CuI}\text{--DIPEA}$, the 1,2,3-triazoles **3b** and **3c** being isolated in almost quantitative yields (entries 2 and 3).

As a second approach for the synthesis of divalent mannosylated ligands, the noncarbohydrate diazides **4a,b** were used in the cycloaddition reaction with the propargyl and thiopropargyl mannosides **1a,b** (entries 4–6) obtaining **5a–c** with similarly good results as in the previous cases.

The synthesis of tri-, tetra-, and hexavalent mannopyranosylated ligands was also easily feasible by using the polyazides **6a–c** (see Table 2). Propargyl mannoside **1a** was scaffolded on those aromatic cores, and the corresponding multivalent ligands **7a–c** (entries 1–3) were obtained in moderate to good yields when the reactions were microwave-assisted, despite the steric congestion inherent to these systems. The synthesis of monovalent and heptavalent glycosylated dextrins was also easily achieved (entries 4–6). Although earlier experiments revealed that the reactions of peracetylated mono-(C-6)-azido **6d** and per-(C-6)-azido β -cyclodextrin **6e** with propargyl and thiopropargyl mannosides **1a,b** were quite slow in the presence of $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}\text{--DIPEA}$, this difficulty could be circumvented by the addition of a catalytic amount of CuI (10% mol) or by the use of $(\text{EtO})_3\text{P}\text{--CuI}\text{--DIPEA}$. Under these conditions, the branched β -cyclodextrins **7d–f** were formed in high yields.

With the aim of further demonstrating the efficiency of the copper catalysts in some selected cases (entries 1 and 2, Table 2), the reactions were performed without the assistance of the microwave irradiation at room temperature. The

(13) Substitution of the natural O-glycosides by S- or C-glycosides is a normal alternative in the synthesis of carbohydrate mimics in order to enhance the stability of the glycosidic linkage towards enzymatic hydrolysis: Bertozzi, C. R.; Bednarski, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5543.

catalyst proved to be equally efficient and regioselective even if longer reaction times were required as expected, with **7a,b** being isolated in yields similar to those observed in the microwave-irradiated reactions.

The experimental procedure¹⁴ for the microwave-assisted reactions is simple, requiring only the mixture of the reagents, the microwave irradiation, and the evaporation of the solvent prior to the direct purification by a short flash column chromatography. Formation of undesired byproducts was never observed.

In conclusion, it has been established that the construction of well-defined multivalent neoglycoconjugates can easily and effectively be performed by using the cycloaddition reactions of alkynes and azides for the assembly of the different components when using the copper complexes $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$ and $(\text{EtO})_3\text{P}\text{--CuI}$ as organic soluble catalysts that allow the regioselective formation of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole connections. Although the catalytic features of these copper complexes are fully expressed when the “connection” of alkynes and azides are carried out at room temperature, their combination with microwave irradiation shortens the reaction times considerably. Other remarkable features of the procedure are its simplicity together with the easy and inexpensive preparation and air stability of the catalysts.

Acknowledgment. We thank Dirección General de Investigación Científica y Técnica for financial support (BQ2002-03477). We also thank Dr. A. Vargas-Berenguel (Universidad de Almería, Spain) for helpful discussions.

Supporting Information Available: Detailed experimental procedure and tabulated spectroscopic data for all new compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL034534R

(14) **General Procedure.** A solution of the alkyne (1.1 mmol) and the azide derivative (1 mmol), DIPEA or DBU (3 mmol), and the copper catalyst [$(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{CuBr}$ or $(\text{EtO})_3\text{P}\text{--CuI}$] (10–20 mmol %) in toluene (25 mL) was irradiated at 850 W (100% power) in a microwave oven (LG MG-5507D) for periods of 2 min, allowing the solution to cool heating intervals, until TLC or the IR spectra of the reaction mixture showed complete disappearance of the starting material. The reaction mixture was evaporated and the crude purified in a short flash column chromatography to yield the 1,2,3-triazole derivative.

FULL PAPERS

DOI: 10.1002/adsc.200600254

Synthesis of Glyco-Silicas by Cu(I)-Catalyzed “Click-Chemistry” and their Applications in Affinity ChromatographyMariano Ortega-Muñoz,^a Javier Lopez-Jaramillo,^a Fernando Hernandez-Mateo,^a and Francisco Santoyo-Gonzalez^{a,*}^a Instituto de Biotecnología, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain
Fax: (+34)-958-243-186; e-mail: fsantoyo@ugr.es

Received: May 31, 2006; Accepted: September 5, 2006

Abstract: The covalent immobilization of suitable alkyne/azide carbohydrate derivatives on complementarily functionalized azide/alkyne silica was performed by click ligation through the Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction of such compounds. The new glyco-silicas have shown to be efficient and valuable bio-selective affinity chromatographic supports for the purification of lectins as well as for the one-pot fluorescent labeling of those

proteins. The synthetic methodology is simple, high yielding and flexible, allowing the preparation of tailored glyco-silicas with potential future applications in the immobilization of other biomolecules.

Keywords: affinity chromatography; carbohydrates; click-chemistry; cycloaddition; fluorescence; glyco-silica

Introduction

Immobilization of biomolecules is a mainstay in biological and related areas with many potential applications such as the characterization of their functions and their interaction with other biomolecules, the application in the analysis and purification of mixtures of biomolecules, and the design of solid-phase based assays or bioactive implant surfaces as the most representative examples.^[1] These applications rely on the specific interactions of those biomolecules with other molecules such as the case of antibody-antigen, the carbohydrate-lectin or the enzyme-inhibitor interactions and require that one of the members of the interacting pair be fixed onto an adequate solid support. In the broadest sense, two current immobilization methods are used for the attachment of biomolecules to a surface: non-covalent immobilization based on physical adsorption and direct-covalent immobilization to chemically functionalized surfaces. Microarrays,^[2] bionanoparticles,^[3] microbeads,^[4] biosensor chips^[5] and self-assembled monolayers (SAMs)^[6] are some of the most valuable tools developed from biomolecule-based surfaces with important applications in the “omic” sciences.

On the other hand, affinity chromatography^[7] is one of the most important techniques based on the immobilization of biomolecules onto a variety of solid supports that exploits the various biological interactions mentioned above for the analysis and purifica-

tion of biomolecule mixtures. Considering the type of supports, two affinity methods are distinguished: low-performance affinity chromatography in which the support is usually a large-diameter, non-rigid gel (such as agarose, dextran or cellulose) and high-performance affinity chromatography (HPAC) that uses small, rigid particles based on silica or synthetic polymers that are capable of withstanding the high flow rates and/or pressures that are characteristic of HPLC systems. The technique has proved to be very flexible allowing a wide variety of applications mainly by the chemical covalent ligation of lectins (lectin affinity chromatography),^[8] proteins A and G^[9] and antibodies (immunoaffinity chromatography)^[10] as the capture biomolecules. In this regard, carbohydrates have been less extensively used as sugar affinity ligands^[11] mainly due to the intrinsic difficulties in the synthesis of carbohydrate-containing molecules because of the requirement of orthogonal hydroxy group protection strategies and the challenge of stereoselective glycosidic bond formation. However, recent advances in chemoselective ligation have provided efficient techniques for the covalent immobilization of carbohydrates on a solid surface.^[12] The different developed methodologies require a modified surface and a suitable functionalized glycoconjugate with complementary functional groups in order to obtain the desirable bioorthogonality for the grafting. The reactions of sulfhydryl groups with maleimides and disulfides, the Staudinger ligation involving azides and specially-designed

phosphine reagents, the Diels–Alder cycloaddition and the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition have demonstrated to be powerful chemoselective reactions that found important applications not only in the construction of immobilized carbohydrate arrays^[13] but also in cell-surface engineering and in the synthesis of glycoproteins and glycosylated natural products.^[12]

Among the above-mentioned chemoselective reactions, the Huisgen dipolar cycloaddition of alkynes and azides^[14] has been recently established as an important synthetic tool under the "click-chemistry" concept^[15] especially after the discovery that Cu(I) salts catalyzed regioselectively the ligation of such functionalities at room temperature.^[16] Additional benefits of this reaction are the easy introduction of azides and alkynes into a substrate and the stability of such functions that tolerate water and oxygen allowing a modular assembly for individual building blocks. Finally, the triazole formation resulting from the fusion of these functions is irreversible and usually high yielding. All these outstanding features have found huge applications in biomedical science, organic synthesis and materials science.^[17] In particular, novel functionalized supports based in silica^[18] and agarose^[19] as well in the covalent ligation of carbohydrates probes to a solid surface^[20] for the development of glycoarrays,^[21] carbohydrate-containing quantum-dots^[22] and sugars-SAMs^[23] have been efficiently prepared by this methodology.

As a chromatographic support, silica is advantageous because its rigid mechanical structure makes it invulnerable to swelling and resistant to large changes in pressure and flow rates without disintegrating or deforming. However, although silica is available in a wide range of pore and particle sizes and macromolecules are adsorbed to its surface, it is not routinely used for immobilization and affinity purification of macromolecules. The strong electrostatic interactions that dominate the process^[24] are difficult to tune and the curvature of the silica particles provokes a distortion of the protein's secondary structure that diminishes the catalytic activity.^[25] Recent studies have revealed the orientation of BSA adsorbed to silica^[26] and demonstrated that the covalent attachment of PEG to lysozyme alters the preferred molecular orientation and makes its adsorption less irreversible.^[27] These experimental results provide additional insight into the adsorption process and may have potential interest for the use of silica as immobilization support. As both the modification of the protein and the modulation of its orientation are difficult to achieve, a more feasible approach is the modification of the surface of the silica particles to tune the affinity and specificity for macromolecules. The introduction of organic functional groups on a silica surface to yield modified silicas has received great attention for the development of organic-inorganic hybrid having

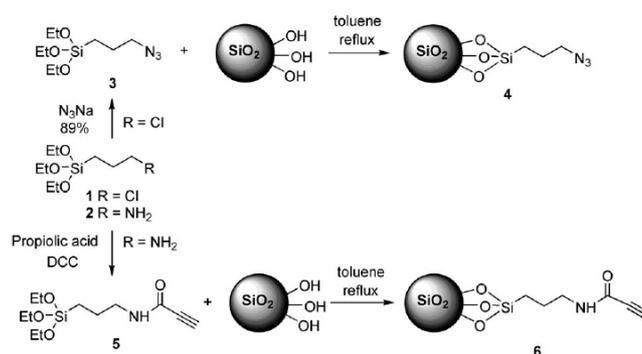
found applications in chromatography, catalyst and clean technology.^[28] In particular methods such as covalent grafting of polymers or coating with hydrophilic polymers have succeeded in passivating the silica surface and conferring specificity. In these cases, coupling agents have demonstrated to play a role in the interaction among the protein and the bed leading to differences in the chromatographic behavior of the functionalized silica.^[29] In spite of these facts, silica materials containing covalently bound sugars are scarcer in the literature having found a limited use for boron removal^[30] and the isolation and purification of lectins.^[31]

With the aim of developing a fast, efficient and inexpensive procedure for the immobilization of carbohydrates, we turned our attention to silica gel as a universal and ready accessible solid scaffold to be functionalized with azido and alkyne functions in tandem with the Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of such functions as an economical and high yielding regioselective methodology for the grafting of such biomolecules and leading to glyco-silicas. Moreover, in order to evaluate the potentiality of such materials, we also decided to study the application of these materials as affinity chromatography supports for the purification and isolation of lectins based on their specific interactions.

Results and Discussion

To attain the pursued goals concanavalin A (ConA) was the lectin of choice considering that it is one of the most widely used in carbohydrate-lectin interaction studies. As ConA binds specifically α -D-mannopyranoside (α -D-Manp) and α -D-glucopyranosides, we decided to prepared glyco-silicas containing α -D-Manp. Surface chemical modification is the first required step of the process leading to the immobilization of biomolecules on a solid support. For our purposes, the chemical functionalization of silica was performed by silanization of activated commercial silica with adequate azide and alkyne derivatives of triethoxysilane that allow the covalent ligation of such derivatives. (3-Azidopropyl)triethoxysilane (**3**)^[32] and propionic acid (3-propyltriethoxysilane)-amide (**5**) were easy prepared from commercial 3-chloro- and (3-aminopropyl)-triethoxysilanes **1** and **2**, respectively, following standard chemical procedures (see Experimental Section). These silane reagents were then reacted with activated silica by a simple refluxing process of a toluene suspension. By this way the azido and alkyne functionalized silicas **4** and **6** were efficiently obtained (Scheme 1).

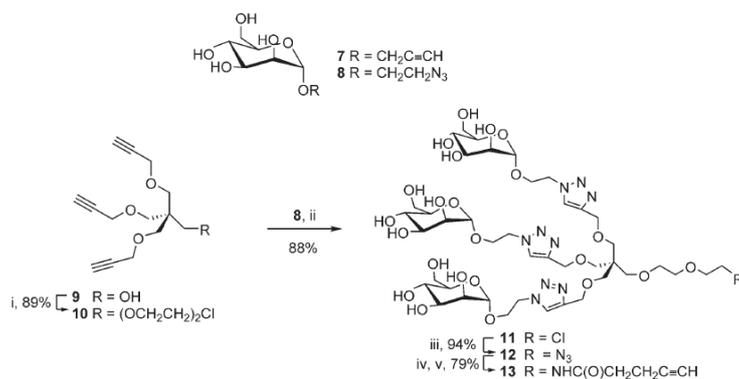
Considering that the carbohydrate-protein interactions found in nature are multivalent to allow an efficient and specific recognition of such biomolecules,



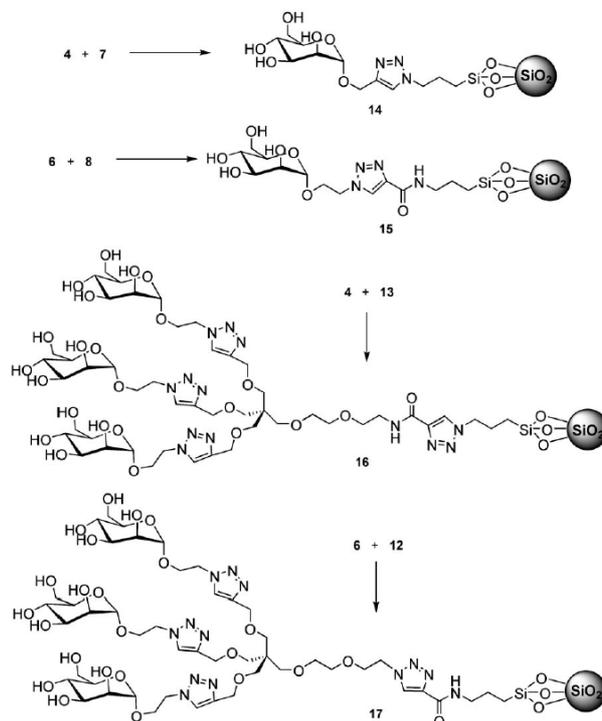
Scheme 1. Synthesis of functionalized silicas.

the immobilization of not only monovalent but also of multivalent carbohydrate displays over silica was planned by choosing the alkyne and azido monosaccharides **7**^[33] and **8**^[34] as well as the trivalent dendrons **12** and **13** which are readily obtainable by click-chemistry from the pentaerythritol derivative **9**^[35] as depicted in Scheme 2. *O*-Alkylation with an excess of 2-chloroethyl ether^[36] gave the trialkynyl derivative **10** suitable for click conjugation with **8**. The reaction was performed in toluene as solvent and using the soluble Cu(I) copper catalyst (EtO)₃P·CuI and microwave irradiation as the optimal reaction conditions taking into consideration successful previous results found by us using this 1,3-dipolar cycloaddition reaction in the construction of molecules with diverse ar-

chitectures.^[16c] The Man trivalent glycodendron G1-Cl **11** was thus obtained in excellent yields. Nucleophilic substitution of the chlorine by azide gave the glycodendron G1-N₃ **12** which was further transformed in the alkynyl glycodendron G1-C≡CH **13** by a two-step reaction sequence (hydrogenation followed by acylation with 4-pentynoic acid). Chemical click ligation of the complementarily functionalized alkyne (**7** and **13**) and azido sugar (**8** and **12**) derivatives to the functionalized silicas **4** and **6** was carried out using the same reaction described above yielding the glyco-silicas **14–17** that were easily isolated by filtration and extensively washed and dried prior to their further utilization (Scheme 3).



Scheme 2. Alkyne and azide carbohydrate derivatives for click-chemistry immobilization on functionalized silica. *Reaction conditions:* (i) (ClCH₂CH₂)₂O, NaOH; (ii) CuI(C₂H₅)₃P, DIPEA, toluene, MW; (iii) NaN₃/DMF/80 °C; (iv) H₂, Pd/C, MeOH; (v) HC≡CCH₂CH₂COOH, DCC, CH₂Cl₂.



Scheme 3. Synthesis of glyco-silicas **14–17** by Cu(I)-catalyzed "click-chemistry".

Once the glyco-silicas were synthesized, their ability to bind ConA was evaluated as an adequate methodology to characterize and determine their potential applicability as a chromatographic support. It has been previously proven that affinity chromatography is a valuable tool for the analysis of insoluble systems^[37] since hemagglutination inhibition studies (HIA) and enzyme-linked lectin assays (ELLA) (that are the usual techniques for the analysis of carbohydrate-protein interactions) are restricted to assays in solution. The characterization was carried out by packing the glyco-silica in a column followed by saturating this column with a ConA solution in HEPES buffer and then washing with HEPES buffer to remove the unbonded protein. In order to evaluate the strength and nature of the interaction between ConA and the glyco-silicas, the columns were subjected first to a gradient of NaCl to identify unspecific interactions followed by elution with 1M methyl α -D-mannopyranoside (α -D-Man β OMe) to verify the spe-

cific Man-ConA interactions. A similar protocol was followed with raw-silica that was thus established as a control assay.

From the results summarized in Table 1 different conclusions can be deduced. First, raw silica appears to be the most effective in retaining ConA (41% versus 19–34% in the case of glyco-silicas **14–17**). This fact is remarkable, especially when considering that both silica and ConA (estimated isoelectric point 5.27)^[38] are negatively charged and electrostatic repulsions are expected to disfavor the interaction. This unexpected adsorption is not exclusive for ConA but has been previously observed for ferritin (estimated isoelectric point 5.4)^[39] and studied in detail for BSA (isoelectric point 4.7)^[40] and *endo*- β -1,3-glucanase (isoelectric point 4.4).^[41] The adsorption of proteins on a hydrophilic surface under conditions of electrostatic repulsions was predicted by Arai and Nordé^[42] for *soft* proteins, meaning proteins with low conformational stability which allows structural arrangements

Table 1. Summary of the characterization of glyco-silicas **14–17** and comparison with raw silica.^[a]

	Raw silica	Glyco-silicas			
		14	15	16	17
ConA initially trapped by the column (mg)	0.93	0.58	0.45	0.93	0.63
ConA eluted by washing with buffer (mg)	0.32	0.17	0.17	0.45	0.31
ConA retained by the column (mg)	0.61	0.41	0.28	0.48	0.32
ConA retained by the column (%) ^[b]	41	27	19	34	21
ConA eluted by NaCl gradient (mg)	0.18	0.12	0.07	0.04	0.00
Retained ConA eluted by NaCl gradient (%) ^[c]	29	29	25	8	0
ConA eluted with α -D-ManpOMe (mg)	0.13	0.25	0.21	0.41	0.26
Recovery with α -D-ManpOMe (%) ^[d]	30	86	100	93	81
Silica loading capacity ^[e]	0.50	0.96	0.81	1.58	1.00

^[a] ConA was estimated spectrophotometrically assuming A_{280} 0.1% (=1 g/L) 1.08. Calculations are referred to 1.5 mg of ConA present in the tested sample and 260 mg of raw silica or glyco-silica packed in the column (see Experimental Section).

^[b] % = (ConA retained by the column/1.5) \times 100.

^[c] % = (ConA eluted by NaCl gradient/ConA retained by column) \times 100.

^[d] % = ConA eluted with α -D-ManpOMe/(ConA retained by column – ConA eluted by NaCl) \times 100.

^[e] Loading capacity means amount of ConA adsorbed specifically by the resin = mg of ConA/g silica

of the molecule upon adsorption and turns the conformational entropy gain into the driving force that overcomes the unfavorable electrostatic repulsions. This hypothesis is in full agreement with the reported reduction of the α -helix content for the BSA molecules adsorbed to silica and might explain the behavior of ConA whose tertiary structure consists of three β -sheets with 50% of the residues in loop regions.^[43] However, in this regard, it should be also mentioned that a recent study has demonstrated that *endo*- β -1,3-glucanase behaves as a *hard* protein that deviates from the classical model by being adsorbed on negatively charged surfaces while maintaining its native structural characteristics.

Secondly, the results of Table 1 indicates that the amount of ConA released by the gradient of NaCl is dependent on the nature of the glycoconjugate, being negligible for trivalent silica gels **16** and **17** and significant for the monovalent glyco-silicas **14** and **15** which are similar to raw silica. This result supports earlier observations on the influence of the interaction of ConA with polysaccharides and glycoproteins and its relation with the structural differences of the grafted saccharides.^[44] However, regardless of the functionalization, α -D-ManpOMe provokes the elution of the ConA attached to the silicas, even from raw silica, although the functionalization of glyco-silicas improves the recovery from 30% in the case of raw silica to 81–100% for glyco-silicas **14–17**, making the synthesized materials suitable for chromatographic applications.

In order to evaluate the potential of the new modified silica beds, we focused on two specific problems that need to be improved despite the myriad of different technologies and work flows currently available in proteomic research: sample protein separation and

protein labeling. Among the separation techniques, affinity chromatography has been reported as a powerful technique that can be used as part of the traditional work flow^[45] and may circumvent some of the technical disadvantages of two-dimensional electrophoresis. For the particular case of glycomics, glycoaffinity chromatography is a well established approach to separate glycoproteins/carbohydrate pairs^[46] and elucidates interactions and specificities.^[47] To test the potential of the synthesized glyco-silicas as beds for glycoaffinity chromatography, we selected the glyco-silicas **14** and **16** on the basis of their structure (monovalent *versus* trivalent Man functionalization) and loading capacity and they were compared with raw silica for the purification of the ConA contained in 1 mL of a 3 mg mL⁻¹ solution consisting of 0.15 mg mL⁻¹ of commercial Con A and 2.85 mg mL⁻¹ of a crude extract from plant roots. The experiment is summarized in Figure 1. As expected from the characterization described above, raw silica and the glyco-silica **16** trapped similar amounts of protein from the extract and more than **14**. However, unlike raw silica, the proteins attached to the functionalized glyco-silicas were insensitive to 1.6 M NaCl and sensitive to α -D-ManpOMe (see insert in Figure 1). The electrophoresis of the peak (Figure 2) confirmed the success of the purification and demonstrated that a single passage suffices to isolate the ConA present in the extract to a higher purity than the commercial sample. The performance of glyco-silica **16** is remarkable as 98% of the ConA contained in the sample was recovered, 82% being in the peak fraction (Figure 1). To further analyze the influence of the nature of the glyco appendages on the chromatographic properties of the glyco-silicas, a second purification experiment was carried out. The protein mixture consisted in a

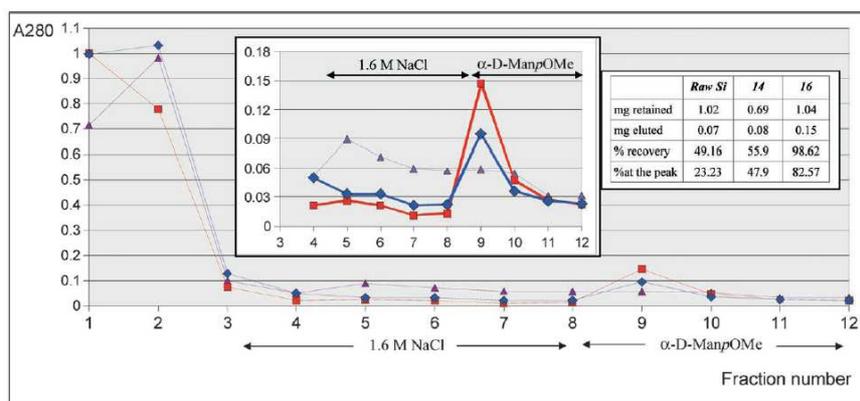


Figure 1. Chromatograms showing the performance of glyco-silicas **14** (◆) and **16** (■) and comparison with raw silica (▲) as glycoaffinity beads for the purification of ConA from a sample contaminated with a crude extract from roots of plants. Insert shows a detail of the effect of ionic strength and α -ManpOMe on the bound ConA. The table summarizes the yield of the elution with α -D-ManpOMe. *Fraction 1*: unbound ConA; *Fraction 2*: washing with HEPES buffer; *Fractions 3–8*: washing with 1.6 M NaCl in HEPES buffer; *Fractions 9–12*: elution with 1 M α -D-ManpOMe in HEPES buffer.



Figure 2. Analysis by SDS PAGE and silver stain of the performance of **14** (lane 3) and **16** (lane 4) for the purification of commercial ConA (lane 1) from a mixture (lane 2).

sample of a 1.6 mg mL^{-1} solution containing 0.4 mg mL^{-1} commercial ConA and 1.2 mg mL^{-1} lysate from *Escherichia coli*. As shown in Figure 3, the dendritic glyco-silicas **16** and **17** show better chromatograms yielding sharper peaks while the protein eluted from the monovalent Man-functionalized silica **14** is split into two fractions.

The potential of protein immobilization in a glyco-silica column is not limited to protein purification and identification but is also a valuable approach to

modify proteins while preserving the integrity of the carbohydrate recognition domains (CRDs) that are the regions responsible for the interaction with the glyco-silicas. As protein detection in many of the high-throughput systems involved in proteomics is based on fluorescent labeling,^[48] it was decided to label ConA with a fluorescent reagent. Among the fluorescent reagents available in the market, those with a benzofurazan skeleton have been widely used in bioscience^[49] although their low water solubility has limited their use in protein labeling. However, the fact that 4-nitro-7-benzofurazanyl ethers show improved water solubility and reactivity could solve this limitation and since they are not commercial the synthesis of 4-(2-hydroxyethoxy)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-OCH₂CH₂OH) was carried out following the reported procedure.^[50] The labeling of ConA with NBD-OCH₂CH₂OH was effected while the lectin was attached to the glyco-silica **16**. Although it is known that the prevalent structure of ConA found at the water/mica interface is the dimer,^[51] the immobilization was carried out at pH 5.2 to force ConA to exist as dimers instead of tetramers, ensuring by this way the maximum protection of CRDs by interacting with the Man units of the glyco-silica. Prior to labeling, the column was equilibrated against phosphate buffer pH 8.4 and the reaction was carried out by recirculating overnight NBD-OCH₂CH₂OH (1 mL of a 7.25 mM solution in buffer phosphate). After washing with HEPES buffer to remove the excess of NBD-OCH₂CH₂OH, the sample was eluted with 1 M α -D-

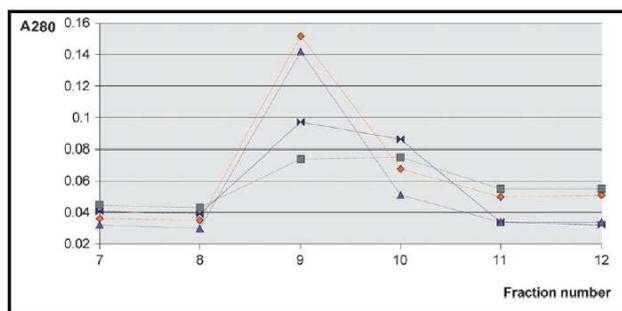


Figure 3. Detail of the chromatograms showing the elution peak resulting from the purification of ConA from a sample contaminated with an *E. coli* extract with the glyco-silicas **14** (■), **15** (●), **16** (◇), **17** (▲). Fractions 7 and 8: washing with 1.6M NaCl in HEPES buffer; Fractions 9–12: elution with 1M α -D-ManpOMe in HEPES buffer.

ManpOMe in HEPES buffer. The rationale behind this buffer exchange and pH shift is that at alkaline pH the reaction takes place at the amino group yielding more fluorescent derivatives^[52] while at acidic pH the reaction is slower via SH groups^[53] which are not present in ConA. The success of the labeling was analyzed by SDS PAGE and visualized with a UV source. As shown in Figure 4 the band corresponding to the labeled protein is visualized when the gel is illuminated with a standard UV transilluminator.

Finally, it should be mentioned that the prepared glyco-silicas prove to have a good chemical stability which enhances their potential as affinity adsorbents for the procedures of the separation cycle: adsorption, washing, desorption and regeneration. Thus, the dried glyco-silicas were stored at least for three months at room temperature prior to the packing process without loss of their capacity as affinity supports. Once the columns were prepared, they underwent eight freeze-thaw cycles for their reuse with maintenance of their performance. In addition, the results were reproducible when the experiments were repeated.

Conclusions

The results reported herein demonstrated that the Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of alkyne and azides ("click-chemistry") is a general, versatile and efficient synthetic methodology for the immobilization of biomolecules such as carbohydrates, allowing the easy preparation of tailored glyco-silicas. These new materials have shown to be valuable bio-selective affinity supports in which the unspecific interactions that make silica unsuitable for affinity chromatography are passivated, turning raw silica into a support with a clear potential in glycomic research.

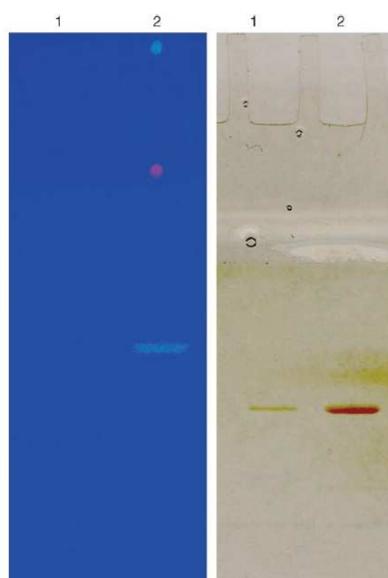


Figure 4. SDS-PAGE of the labeled ConA (lane 2) and control (lane 1) ConA and visualization with a UV source (left) and silver stain (right).

The characterization of such materials, performed by evaluating their binding capacity of a suitable lectin (ConA), demonstrated that the structure of the glyco appendages plays a role in the chromatographic properties of those glyco-silicas showing a better perfor-

mance in the case of a dendritic architecture respecting to a monovalent structure. Thus, among the glyco-silicas prepared herein, **16** proved to be the most appropriate for target separation. The utility of the prepared glyco-silicas is manifested not only for the purification of a protein mixture but also for the possibility of fluorescent labeling of the attached ConA in a single step that allows the preservation of the carbohydrate recognition domains of such a lectin. The chemical stability of the glyco-silicas and the reproducibility and recycling characteristics as affinity supports are also remarkable characteristics of the silica's viability as a universal and inexpensive scaffold in the immobilization of biomolecules.

Experimental Section

General

Unless otherwise noted, commercially available reagents and solvents were used as purchased without further purification. TLCs were performed on Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets. Reagents used for developing plates include ceric sulfate (1% w/v) and ammonium sulfate (2.5% w/v) in 10% (v/v) aqueous sulfuric acid, iodine, ethanolic sulfuric acid (10% v/v) and by UV light when applicable. Flash column chromatography was performed on Silica Gel Merck (230–400 mesh, ASTM). Melting points were measured on a Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Satellite Mattson FT-IR. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker (300–400 MHz) spectrometer. *J* values are given in Hz. FAB mass spectra were recorded on a Fisons VG Autospec-Q spectrometer, using *m*-nitrobenzyl alcohol or thioglycerol as matrix.

Synthesis of 3-Azidopropyltriethoxysilane (**3**)

To a solution of 3-chloropropyltriethoxysilane (**1**; 2.31 g, 9.6 mmol) and tetrabutylammonium iodide (0.020 g, 0.05 mmol) in butanone (25 mL) was added sodium azide (3.120 g, 48 mmol) and the reaction mixture heated under reflux for 50 h. After this time, filtration over celite was followed by evaporation of the solvent under vacuum. The residue was dissolved in dichloromethane (150 mL) and then washed with water (2 × 20 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to give **3** (1.9 g) as a syrup that was directly used without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.73 (q, 6H, *J* = 6.94 Hz, OCH₂), 3.18 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂N₃), 1.62 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 1.14 (t, 9H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂CH₃), 0.58 (m, 2H, CH₂Si); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 58.2, 53.6, 22.5, 18.1, 7.4.

Synthesis of Propiolic Acid (3-Triethoxysilane-propyl)-amide (**5**)

To a solution of 3-aminopropyltriethoxysilane (**2**; 2.4 g, 10.85 mmol) and propiolic acid (0.870 g, 11.93 mmol) in dichloromethane (15 mL) was added *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (2.460 g, 12.0 mmol). The reaction mixture was kept

at room temperature for 1 h and then filtered. Evaporation of the solvent was followed by coevaporation with toluene (2 × 50 mL) giving **5** (3.0 g) as a syrup that was directly used without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.30 (m, 1H, NH), 3.82 (q, 6H, *J* = 7.0 Hz, CH₂O), 3.28 (m, 2H, CH₂NH), 2.97 (s, 1H, C≡CH), 1.67 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 1.22 (t, 9H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 0.65 (t, 2H, *J* = 8.4 Hz, CH₂Si); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.5, 77.3, 73.2, 58.2, 42.0, 22.2, 17.9, 7.5.

Activation of Silica

Commercial silica (Merck, 70–230 mesh ASTM) was activated for the silanization process by heating at 120 °C under vacuum (1 mm Hg) for 24 h.

Preparation of Functionalized Silicas **4** and **6**

Activated silica gel (4 g) was suspended in dried toluene (20 mL) and then the corresponding triethoxysilane derivative **3** or **6** (1 g) was added. The reaction mixture was heated under reflux for 2 h. Evaporation of the solvent up to half of the volume to remove the formed ethanol was followed by further addition of dry toluene (10 mL) and reflux for an additional hour. The reaction mixture was filtered, washed with dichloromethane (4 × 50 mL) and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h.

3-[2-[2-(2-Chloroethoxy)ethoxymethyl]-3-prop-2-ynyloxy-2-prop-2-ynyloxymethylpropoxyl]-propyne (**10**)

To a solution of **9**^[65] (0.250 g, 1 mmol) and Bu₄NHSO₄ (0.678 g, 2 mmol) in 2-chloroethyl ether (5 mL)^[66] was added aqueous NaOH (50%, 5 mL). The two-phase reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 3 h. CH₂Cl₂ (30 mL) and water (30 mL) were added, the organic phase separated and successively washed with water (2 × 50 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated to give a residue that was purified by column chromatography (EtOAc-hexane, 1:3) affording **10** as a liquid; yield: 0.317 g (89%); IR (film): ν = 3293, 2115, 1475, 1359, 1096 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.12 (d, 6H, *J* = 2.3 Hz, CH₂C≡CH), 3.80–3.55 (m, 8H, CH₂ spacer), 3.51 (s, 6H, 3 × OCH₂C≡CH), 3.45 (s, 2H, CH₂O spacer), 2.45 (t, 3H, *J* = 2.3 Hz, C≡CH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 80.0, 74.1, 71.2, 71.0, 70.3, 69.7, 68.9, 58.6, 44.9, 42.8; HR-MS (FAB+): *m/z* = 379.1285, calcd. for C₁₈H₂₈ClO₃Na [M+Na]⁺: 379.1288.

Glycodendron G1-Cl (**11**)

A solution of the alkyne **10** (1 mmol) and the azide derivative **8** (1 mmol/alkyne function), DIPEA (3 mmol) and the copper catalyst [(EtO)₃P-Cu]^[66] (10 mmol%) in toluene (75 mL) was irradiated at 800 W and 90 °C for 20 min in a Milestone Star Microwave Labstation until TLC showed the disappearance of the starting material. The reaction mixture was evaporated and the crude material purified in a short flash column chromatography (AcOEt-MeOH, 20:1) to afford **11** as a syrup; yield: 88%; [α]_D²⁰: +26° (c 1, chloroform); IR (film): ν = 1751, 1431, 1371, 1226, 1138, 1091, 1047, 981 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.71 (s, 3H,

H-5 triazole), 5.31–5.20 (m, 9H, H-2,3,4 Man), 4.82 (s, 3H, H-1 Man), 4.59 (br s, 12H, 6×CH₂), 4.22 (dd, 3H, *J* = 12.3 and 5.0 Hz, H-6 Man), 4.05 (br d, 3H, *J* = 12.0 Hz, H-6' Man), 4.13, 3.92, 3.75–3.50 (several m, 22H), 2.14, 2.09, 2.04 and 1.99 (4 s, 36H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.6, 170.0, 169.9, 169.6, 145.6, 123.8, 97.6, 71.3, 71.0, 70.4, 69.7, 69.2, 68.9, 68.9, 66.3, 65.7, 64.8, 62.2, 49.6, 45.4, 43.1, 20.9, 20.8, 20.7; MS (MALDITOF): *m/z* = 1630.57, calcd. for C₆₆H₉₄N₄O₃₅ClNa [M + Na]⁺: 1630.54.

Glycodendron G1-N₃ (12)

A solution of **11** (0.746 mg, 0.46 mmol), NaN₃ (0.300 g, 4.6 mol) and Bu₄NI (0.018 g, 0.030 mmol) in DMF (8 mL) was stirred at 80 °C for 16 h. After this time ether-toluene (75 mL, 2:1) was added to the reaction mixture followed by washing with water (3×20 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated. Column chromatography (AcOEt-MeOH 20:1) of the residue gave **12** as a syrup; yield: 0.701 g (94%); [α]_D²⁰: +21° (c 1, chloroform); IR (film): ν = 2255, 2109, 1752, 1284, 1237, 1093, 916, 731 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.72 (s, 3H, H-5 triazole), 5.32–5.20 (m, 9H, H-2,3,4 Man), 4.82 (s, 3H, H-1 Man), 4.80 (m, 12H, CH₂N, CH₂O-triazole), 4.21 (dd, 3H, *J* = 12.7 and 5.1 Hz, H-6 Man), 4.13 (m, 3H, CH₂O Man), 4.04 (br d, 3H, *J* = 12.0 Hz, H-6' Man), 3.93 (m, 3H, CH₂O-Man), 3.64 (t, 2H, *J* = 5.4 Hz, CH₂O-spacer), 3.62–3.48 (m, 7H, H-5 Man, CH₂O spacer), 3.47 (s, 6H, pentaerythrytol), 3.43 (s, 2H, CH₂ pentaerythrytol), 3.34 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz, CH₂N₃), 2.14, 2.09, 2.04 and 1.99 (4 s, 36H, Ac); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.4, 169.8, 169.7, 169.5 (COO), 145.5 (C-4 triazole), 123.6 (C-5 triazole), 97.5, 71.3, 70.9, 70.3, 69.9, 69.6, 69.1, 68.8, 68.8, 66.2, 65.7, 64.8, 62.1, 50.7, 49.5, 45.3, 20.7, 20.6; MS (MALDITOF): *m/z* = 1637.70, calcd. for C₆₆H₉₄N₄O₃₅Na [M + Na]⁺: 1637.58.

Glycodendron G1-C≡CH (13)

A solution of **7** (0.125 g, 0.077 mmol) in MeOH (4 mL) was hydrogenated with Pd/C (7.5 mg, 6% w/w) at 2 atm for 4 h. Filtration over celite and evaporation gave a crude material that was dissolved in dry CH₂Cl₂ (5 mL). 4-Pentynoic acid (0.011 g, 0.115 mmol) and DCC (0.019 g, 0.092 mmol) were added and the reaction mixture kept at room temperature for 30 min. Filtration over celite and evaporation gave a new crude product that was purified by column chromatography (AcOEt-MeOH, 10:1) giving **13** as a syrup; yield: 0.102 g (79%); [α]_D²⁰: +9.6° (c 1, chloroform); IR (film): ν = 1746, 1667, 1432, 1371, 1226, 1138, 1089, 1048 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.73 (s, 3H, H-5 triazole), 6.9 (br s, 1H, NH), 5.30–5.20 (m, 9H, H-2,3,4), 4.82 (s, 3H, H-1 Man), 4.66–4.50 (m, 6H, CH₂N-triazole), 4.60 (s, 6H, CH₂-triazole), 4.22 (dd, 3H, *J* = 12.3 and 5.0 Hz, H-6 Man), 4.12 (m, 3H, CH₂O-Man), 4.04 (br d, 3H, *J* = 12.3 and 2.1 Hz, H-6' Man), 3.92 (m, 3H, CH₂O-Man), 3.61 (m, 3H, H-5), 3.55–3.40 (m, 16H, CH₂ spacer, C(CH₂)₄), 2.63–2.40 (m, 5H, CH₂CH₂C≡CH), 2.14, 2.10, 2.05 and 1.99 (4 s, 36H, Ac); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.3, 170.6, 170.0, 169.9, 169.6, 145.6, 123.8, 97.6, 83.0, 77.3, 71.0, 70.3, 69.8, 69.7, 69.1, 69.2, 68.9, 68.9, 66.3, 65.7, 64.8, 62.2, 49.6, 45.5, 39.5, 35.2, 33.0, 21.0, 20.8, 20.7, 20.7; MS (MALDITOF): *m/z* = 1691.71, calcd. for C₇₁H₁₀₀N₁₀O₃₆Na [M + Na]⁺: 1691.62.

General Procedure for the Preparation of Glyco-Silicas 14–17

To a solution of the alkyne or azide sugar derivative **7**, **8**, **12** and **13** (0.3 mmol) in dry DMF (5 mL) was suspended the complementary azide or alkyne functionalized silica **4** or **6** (1 g) and then the copper catalyst (EtO)₃P-CuI^[16c] (10 mmol%, 10 mg) was added. The reaction mixture was irradiated at 800 W and 90 °C for 1 h in a Milestone Star Microwave Labstation until the IR spectra of the reaction mixture showed complete disappearance of the starting material. The reaction mixture was filtered and the resulting glyco-silica was successively washed with MeOH (2×30 mL), EDTA disodium salt solution (50 mM, 2×30 mL), water (2×30 mL), acetone (2×30 mL) and CH₂Cl₂ (2×30 mL). The glyco-silicas **14–17** were then dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h.

General Procedure for the Affinity Chromatography Assays on the Glyco-Silicas 14–17

The glyco-silicas **14–17** (0.26 g) were resuspended in 2 mL of HEPES buffer (50 mM HEPES pH 7.2, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂) and packed into a 1 mL column. The column was equilibrated in HEPES buffer with 12 volumes of the bed (12×0.5 mL). Typically, the experiments of affinity chromatography were carried out at a flow rate of 0.3 mL/minute by means of a peristaltic pump. After loading the sample, non-immobilized protein was removed by washing the column with several volumes of 1.6M NaCl in HEPES buffer until A₂₈₀ was negligible. The protein retained by the column was eluted with 1M α-D-ManpOME in HEPES buffer and collected in 1 mL fractions. The purity of the sample was verified by standard SDS-PAGE^[54] and silver staining.^[59] The capacity of the column was estimated as the amount of ConA eluted with 1M α-D-ManpOME in HEPES buffer from the column saturated with a solution of commercial ConA in HEPES buffer (1.5 mg) and washed with 12 volumes of HEPES buffer and with 2 volumes of 0.1, 0.2, 0.4 0.8, 1.6M NaCl in HEPES buffer.

General Procedure for Fluorescent Labeling of ConA

The fluorescent labeling of the ConA was carried out on the dimeric form of the protein immobilized in a column of the glyco-silica **16** in acetate buffer (100 mM acetate pH 5.2, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂). Prior to the labeling the column was equilibrated with 20 volumes (10 mL) of 100 mM phosphate buffer pH 8.4 and then 2 volumes (1 mL) of 7.25 mM NBD-OCH₂CH₂OH in 100 mM phosphate buffer pH 8.4 was recirculated overnight (14 h). The unreacted excess of NBD-OCH₂CH₂OH was removed by washing with 20 volumes (10 mL) of HEPES buffer and the process was monitored by A₂₈₀. Finally, the labeled ConA was eluted from the column with 1M α-D-ManpOME in HEPES buffer, analyzed by SDS PAGE and visualized with a standard UV transilluminator.

Click multivalent neoglycoconjugates as synthetic activators in cell adhesion and stimulation of monocyte/macrophage cell lines

Mariano Ortega-Muñoz,^a Julia Morales-Sanfrutos,^a Francisco Perez-Balderas,^a Fernando Hernandez-Mateo,^a M^o Dolores Giron-Gonzalez,^b Natalia Sevillano-Tripero,^b Rafael Salto-Gonzalez^b and Francisco Santoyo-Gonzalez^{*a}

Received 26th April 2007, Accepted 18th May 2007

First published as an Advance Article on the web 13th June 2007

DOI: 10.1039/b706331h

The efficient synthesis of fluorescent and non-fluorescent multivalent neoglycoconjugates is described by means of the Cu(I) catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition ("click-chemistry"). A well-defined glycopolymer, glycocyclodextrin or glycocluster architecture displaying galactose or lactose epitopes has been chosen. Cellular assays using U-937 and RAW 264.7 monocyte/macrophage cells showed that these glycoconjugates have the capability to act as synthetic activators mimicking the lipopolysaccharide (LPS) effects. Thus, the click compounds promote cell adhesion and stimulation of monocytes, measured as an increase in the amount of TNF α , facilitating their differentiation to macrophages.

Introduction

Cell-surface oligosaccharides play a vital role in biological processes such as cell adhesion, signal transduction and regulation as well as bacterial and viral infections.¹⁻³ Carbohydrates mediate specific multivalent interactions with soluble or membrane proteins called lectins.⁴ Artificial multivalent carbohydrate models or glycomimics⁵ have been prepared by conjugation of the ligand sugar part to a scaffold to ascertain the specific interactions involved in these carbohydrate-protein bindings.⁵ Nowadays, a variety of these multivalent structures are available: linear polymers or glycopolymers, liposomes, dendrimers, beads or nanoparticles.⁶ The utility of these glycomimics has been widely investigated for biotechnology, pharmaceutical and medical applications.⁷

Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS), the major molecular component of the outer membrane of Gram-negative bacteria,⁸⁻¹⁰ activates monocytes and macrophages to produce pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α).¹¹ These cytokines contribute to the efficient control of growth and dissemination of invading pathogens. All the LPSs share a common structural principle comprising three parts: (1) a hydrophobic glycolipid (lipid A), (2) a core oligosaccharide containing 2-keto-3-deoxy-octulonic acid (KDO) and other sugars including a heptose, and (3) a hydrophilic polysaccharide composed of a chain of highly variable repeating oligosaccharide subunits (O-antigenic side chain). There are ongoing efforts to search for synthetic LPS analogues for the activation of monocytes/macrophages.¹² In order to overcome the structural heterogeneity of endotoxin and in the search for new synthetic activators of monocytes/macrophages, multivalent neoglycoconjugates possessing a well-defined architecture were sought as opti-

mal candidates. To optimize the preparation of such compounds, an easy, versatile and efficient synthetic methodology is required and, for this aim, it was decided to use "click-chemistry"¹³ for their construction.

The efficiency and versatility of this methodology has been recently evidenced by the multiple applications that have been found¹⁴⁻¹⁷ in the particular case of the Cu^I catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of alkynes and azides.^{18,19} In the present work, this reaction has been applied as the synthetic strategy for the formation of the glycan-scaffold link by conjugation of complementary functionalized building-blocks considering the easy preparation of alkyne-azide scaffold and sugar derivatives. Furthermore, the modularity of this reaction has allowed the fluorescent labeling of these structures, enhancing their potential use in experiments where visualization is required. Cell adhesion of monocyte/macrophage cell lines and the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α were selected as the experimental proofs to evaluate the capabilities of these synthetic glycoconjugates as activators.

Results and discussion

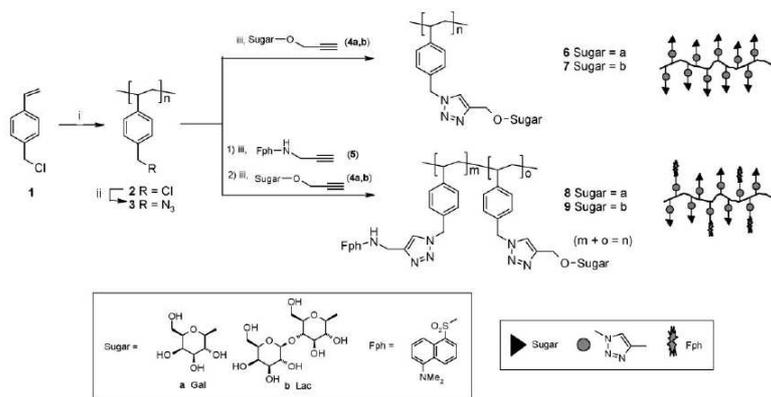
Synthesis of multivalent glycoconjugates

To achieve the pursued goals, three types of synthetic multivalent glycoconjugates possessing different architectures were selected: glycopolymers (Scheme 1), glycocyclodextrins (Scheme 2) and sugar-based glycoclusters (Scheme 3) considering that the required starting materials to be used as scaffolds (polystyrene, β -cyclodextrin and glucose) are inexpensive. These materials also allow easy access to multivalent glycoconjugates with different carbohydrate densities. In the present study, Gal and Lac were the selected carbohydrates to decorate the multivalent constructs considering that different receptors with specificity for Gal epitopes have been identified in macrophages.²⁰⁻²²

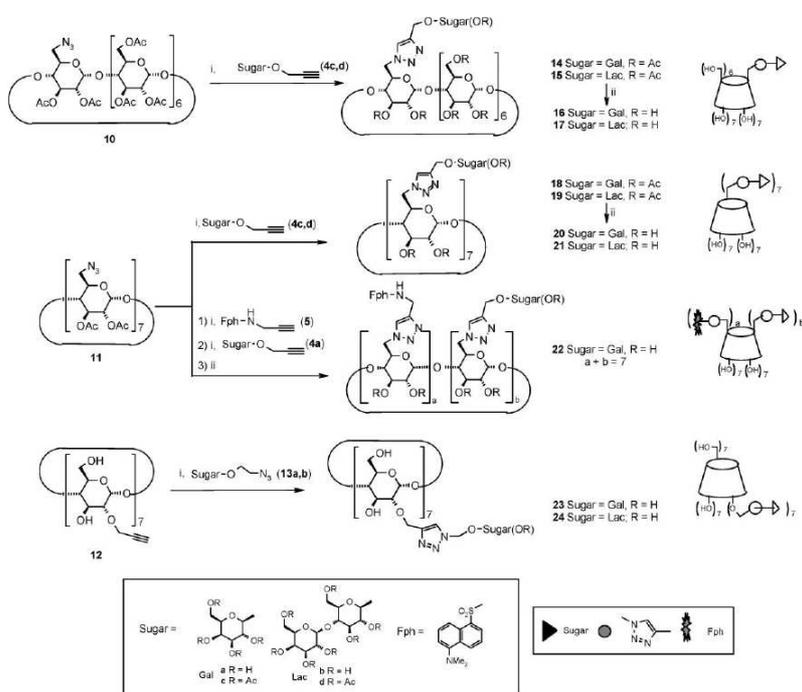
The required clickable functionalized scaffolds for the click grafting of carbohydrate appendages were prepared following

^aDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, E-18071-Granada, Spain. E-mail: fsantoyo@ugr.es; Fax: (+34)-958243186; Tel: (+34)958248087

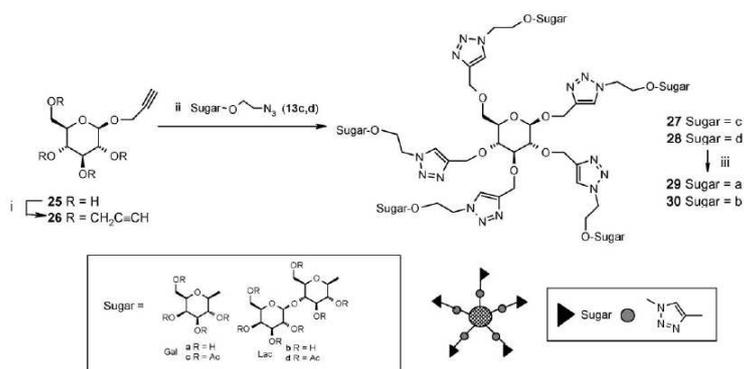
^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, E-18071-Granada, Spain



Scheme 1 Synthesis of click non-fluorescent and fluorescent multivalent glycopolymers. *Reagents and conditions:* (i) Ref. 33; (ii) NaN₃, DME, 75 °C, 72 h; (iii) (EtO)₃P-CuI, DMF, 90 °C, 15 min, MW (800 W).



Scheme 2 Synthesis of click non-fluorescent and fluorescent multivalent glycocyclodextrins. *Reagents and conditions:* (i) (EtO)₃P-CuI, DMF, 90 °C, 15 min, MW (800 W); (ii) MeOH, Et₃N.



Scheme 3 Synthesis of click multivalent glycoclusters. *Reagents and conditions:* (i) NaH, BrCH₂C≡CH, THF (ii) (EtO)₃P-CuI, toluene, reflux, 1 h; iii) MeOH, Et₃N.

already reported methods in the case of known compounds or by conventional chemistry for new compounds. Thus, for the synthesis of glycopolymers poly[*p*-(chloromethyl)styrene] **2**³³ allowed the easy introduction of the azide function by the nucleophilic substitution of the chlorine atom in the reaction with sodium azide giving the corresponding poly[*p*-(azidomethyl)styrene] **3** in high yield. In the case of glycocyclodextrins, the grafting of sugar moieties was planned to be performed at the primary face as well as at the secondary face to study the potential influence of such a difference in the topology of these compounds. The per-*O*-acetylated monoazide (**10**²⁴) and heptaazide (**11**²⁵) β-cyclodextrin derivatives were used as starting materials in the first case, whereas the per-2-*O*-propargyl derivative **12** was prepared to gain access to the secondary face. Finally, sugar-based glycoclusters were constructed using the per-*O*-propargylated glucose derivative **26** that was prepared by per-*O*-alkylation of propargyl β-D-glucopyranoside **25**.

The complementary functionalized glycosides derived from D-Galactose (Gal) and lactose (Lac) to be grafted to the scaffolds were easily prepared following already reported procedures. Thus, the propargyl glycosides **4a,b**²⁶ and the azidoethyl glycosides derived from Gal and Lac **13a,b**^{27,28} were obtained starting from the corresponding per-*O*-acetylated sugars.

The click coupling reactions were performed using the conditions previously described by us: (EtO)₃P-CuI as organic-soluble catalyst, DMF as solvent and microwave irradiation or heating in refluxing toluene.²⁹ These conditions allowed the synthesis of the desired multivalent compounds in short reaction times and high yields (yields ranging 79–93%). To ensure the complete grafting of the “clickable” functions present in the scaffolds a 20% equivalent excess per function of the complementary monoazide or monoalkyne derivative was used.

As indicated above, fluorescent labeling of the neoglycoconjugates was also performed to enhance their utility, especially in biological assays where visualization could facilitate the quantification. The synthesis of the fluorescent multivalent counterparts was designed by the modular incorporation of the fluorophore and the sugar appendages using in both cases “click-chemistry”

in order to attain the maximum synthetic economy. Conjugation of the alkynyl dansyl derivative **5**³⁰ was first carried out by reaction with 0.25 equiv. per azide group, under the same reaction conditions mentioned above, followed by *in situ* reaction with 1.2 equiv. per azide of the appropriate monoalkyne sugar derivatives **4a,b**.

Previous to the development of “click-chemistry”, the formation of the covalent ligand–scaffold link in multivalent neoglycoconjugates had been performed by a variety of strategies such as the formation of thiourea or amide bridge, by reaction of amines with isothiocyanates or carboxylic acids, respectively, by glycosylation or by nucleophilic substitution, as has been largely documented.^{6,31} The “clicking” strategy offers advantages in relation to those methodologies since it enables the rapid and high yielding preparation of carbohydrate conjugates by using the heterocyclic triazole as a tether for the carbohydrate decoration. In addition, the flexibility of this strategy is particularly notorious in the synthesis of the fluorescent counterparts. The sequential coupling of the alkynyl fluorophore derivative and the propargyl glycosides to the polyazide scaffolds allowed the efficient preparation of these labeled multivalent neoglycoconjugates.

All the cycloaddition compounds were easily isolated and purified and when necessary they were de-*O*-acetylated to obtain the corresponding hydroxylated derivatives to perform the biological assays.

Biological assays

To evaluate the ability of the neoglycoconjugates as synthetic activators, the adhesion of monocytes to cell culture plates was measured. The non-adherent human promonocytic U-937 cell line was selected, since it has been established as a useful model for monocyte adhesion studies.³² U-937 cells usually grow in suspension in a medium supplemented with fetal bovine serum while after their stimulation with LPS or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and their differentiation to macrophages, they can grow as a monolayer attached to the tissue culture flask.³³

U-937 cells were re-suspended in a serum free medium and added to wells coated with distilled water (control) or solutions containing 40 μg of each glycocompound (glycopolymers 6, 7, glycocyclodextrins 16, 17, 20, 21, 23 and 24, and glycoclusters 29 and 30). After three hours of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, plates were washed twice with phosphate buffered saline and cell adhesion was estimated by counting the attached cells per field by microscopy (Fig. 1A). All the compounds assayed have a positive effect promoting cell adhesion (cells per field values ranging from $\cong 40$ to 75 versus 10 for control). U-937 adhesion was dose-mediated for the Lac-containing glycocyclodextrins 17 and 21 at 20 and 40 μg per well (Fig. 1B). Attached cells were maintained for an additional day in complete medium and then cells were counted. For each condition, the number of cells per field was approximately double, indicating that the cells attached to the plate through the neoglycoconjugates retain their capability to grow and divide.

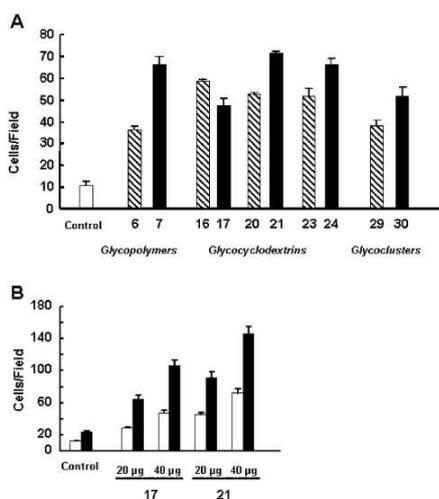


Fig. 1 Adhesion of U-937 cells to cell culture plates coated with neoglycoconjugates. **A.** U-937 cells were plated on tissue culture plates coated with distilled water (control) or neoglycoconjugates (40 μg). Adhesion was measured as number of cells per field. Epitope nature is indicated: Gal, dashed bars, Lac, solid bars. **B.** Effects of two different concentrations (20 and 40 μg) of compounds 17 and 21 on cell adhesion and growth. Number of cells was measured 3 h after the plating of the cells (open bars) and 24 h after incubation in a complete medium as described in the Experimental section. Results are the means \pm S.E.M. from at least 10 different fields for each independent experiment ($n = 5$).

To facilitate the detection of the neoglycoconjugates, a fluorescent moiety was added. First, we investigated if the dansyl-containing neoglycoconjugates were able to mediate U-937 cell adhesion. The results obtained (Fig. 2) show that the labeled compounds 8, 9 have a similar behaviour to their non-fluorescent homologues 6, 7, while the Gal fluorescent compound 22 has a slightly higher binding capacity than its non-fluorescent counterpart 20.

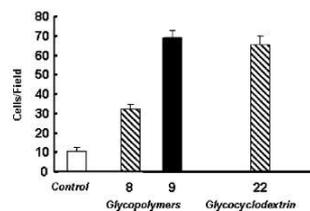


Fig. 2 Influence of fluorescent labelling on the adhesion of U-937 cells to cell culture plates. U-937 cells were plated on cell culture plates coated with dansyl-labeled glycopolymers 8 and 9, and Gal-glycocyclodextrin 22 (40 μg). Control cells were plated on non-coated (distilled water) cell culture plates. The mediated adhesion was measured as number of cells per field. Epitope nature is indicated: Gal, dashed bars, Lac, solid bars. Results are the means \pm S.E.M. from at least 10 different fields for each independent experiment ($n = 5$).

From the adhesion experiments, carried out with previously non-stimulated U-937 cells, it can be suggested that the neoglycoconjugates probably have the ability to stimulate monocyte differentiation and in response to this stimulation, facilitate their adhesion to the culture plates. This effect would probably mimic the action of LPS in cell differentiation and attachment.³³

In addition, some conclusions regarding the influence of the architecture, topology and nature of the saccharide appendages present in the click glycoconjugates can be extracted. First, the Lac epitope in the neoglycoconjugates (compounds 7, 21, 24 and 30) determines higher levels of adhesion compared to the Gal-containing compounds (6, 20, 23 and 29) regardless of the chemical structure of the scaffold. The monovalent glycocyclodextrin derivatives are the only exception to this behaviour: the Gal-containing cyclodextrin 16 exhibits a slight higher cell binding efficiency than its Lac-containing homologous 17.

Second, the data obtained from glycocyclodextrins indicate that multivalency does not significantly affect cell adhesion mediated by these compounds. In fact, the cells per field values are similar for the monovalent (compounds 16 and 17) and the heptavalent glycocyclodextrins (compounds 20, 21, 23 and 24). Also, the cell adhesion efficiency in glycocyclodextrins is independent of the face, primary or secondary, used for the presentation of the sugar epitopes: the Gal-containing (20 and 23) and the Lac-containing heptavalent glycocyclodextrins (21 and 24) have similar binding capabilities regardless of the face to which the sugar epitope has been attached.

Finally, regarding the nature of the scaffold, Gal-containing cyclodextrins display a higher capacity for adhesion than the corresponding glycoclusters or glycopolymers whereas the Lac heptavalent cyclodextrins and glycopolymers exhibit a comparable binding capacity. In general, glycocyclodextrins followed by glycopolymers appear to be the ligands of choice to mediate monocyte adhesion.

Since the adhesion experiment suggested the possibility that neoglycoconjugates were able to induce monocyte differentiation and therefore mediate cell adhesion, a series of assays were designed to evaluate their macrophage-stimulating capability. For this purpose the adherent RAW 264.7 cells were used. In this cell line, the binding of the fluorescent neoglycoconjugates to

the cell surface, its internalization and the synthesis of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , a marker of the macrophage stimulation, were evaluated.

First, binding assays of the dansyl-labeled neoglycoconjugates were performed at 4 °C to preclude the phagocytosis of the neoglycoconjugates. The fluorescent-labeled compounds **8**, **9** and **22** were added to RAW 264.7 cells. The plasma membrane associated fluorescence was observed after an overnight incubation by fluorescence microscopy and quantified by measuring individual cells fluorescence from at least 10 different cellular fields (Fig. 3). The Gal-containing cyclodextrin **22** was significantly the glycoconjugate that produced the higher fluorescence signal associated with the plasma membrane while the binding by the Gal- and Lac-containing glycopolymers, **8** and **9** respectively, was lower. Binding assays with previously LPS-stimulated (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) RAW 264.7 cells were also carried out (Fig. 3). Interestingly, this stimulation produced a significant decrease in the fluorescence associated with the cells for the compounds containing either Gal (**8** and **22**) or Lac (**9**) epitopes.

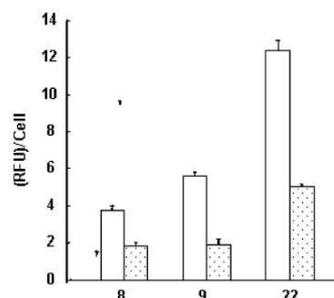


Fig. 3 Binding of fluorescent-labeled neoglycoconjugates to RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were grown to 60% confluency in complete medium as described in the Experimental section, fasted for 24 h and incubated overnight with the different fluorescent compounds. Cells were pre-incubated (dotted bars) or not (open bars) with LPS for 4 h and then incubated at 4 °C with glycopolymers **8** and **9** and Gal-cyclodextrin **22** (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in the presence of LPS. Fluorescence was quantified by fluorescence microscopy as described in the Experimental section. Results are the means \pm S.E.M. from at least 50 different cells for each independent experiment ($n = 3$).

The fluorescence detected in these experiments clearly indicates that the neoglycoconjugates bind to the plasma membrane of RAW cells. In addition, the assays provide insight into some structure–function relationship regarding the nature of the neoglycoconjugates: scaffold architecture and the saccharide appendages. The relative fluorescence values obtained in the case of glycopolymers ($9 > 8$) indicate that Lac is preferred over Gal to mediate the specific binding of glycopolymers to the cell surface of monocyte cell lines and are in agreement with the previous findings in the adhesion of U-937 to the cell plates. Complementary to this, the fact that the Gal-containing cyclodextrin **22** produces the higher fluorescence can be explained by the concurrence in the same construct of a cyclodextrin scaffold and a Gal epitope, in line again with the adhesion experiments performed with U-937. These data

support the idea that the nature of the scaffold and the saccharide moiety may determine the specificity of the binding in these cells. In addition, the assays performed with LPS-stimulated cells at 4 °C are indicative of a competition for the same membrane receptors between LPS and the Gal- and Lac- derivatives.

The effect of calcium on the binding of the neoglycoconjugates was assessed by removing this cation from the media by adding EDTA. For this purpose, fasted cells were washed extensively with Krebs–Henseleit Hepes buffer pH 7.4 without Ca^{2+} and supplemented with EDTA 5 mM. Compound **22** (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was then added to cells in the presence or absence of calcium and incubated at 4 °C overnight. The cells incubated in a medium containing Ca^{2+} showed a higher fluorescence (18.5 \pm 0.8 RFU per cell) than those incubated in the absence of this cation (3.3 \pm 0.3 RFU per cell) (Fig. 4), indicating that the presence of Ca^{2+} highly facilitates the binding of this glycoconjugate to the cells. This result suggests the involvement of C-type lectins in the binding to RAW cells of the neoglycoconjugates.^{24,35}

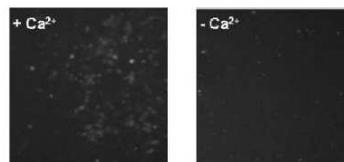


Fig. 4 Fluorescence microscopy of RAW 264.7 cells incubated at 4 °C with Gal-glycocyclodextrin **22** in the presence or absence of Ca^{2+} . Fluorescent photographs using an Olympus IX70 microscope equipped with a WU excitation filter are shown.

Second, the total uptake of the neoglycoconjugates by RAW 264.7 cells at 37 °C was measured. Cells were incubated overnight with the fluorescent-labeled compounds **8**, **9** and **22**. After extensive washing, the uptake was visualized by fluorescence microscopy. Fig 5A shows that RAW cells incubated with the Gal-branched glycocyclodextrin **22** mainly accumulate this compound in the cytosol. A lower fluorescence incorporation was observed when cells were incubated with the dansyl-glycopolymers (data not shown).

To quantify the uptake of the neoglycoconjugates, incubated cells were scraped and the total amount of fluorescence per mg protein in the cell extracts was measured (Fig. 5B). The uptake of the compounds was again significantly higher for the neoglycoconjugate containing Gal in a cyclodextrin scaffold. In all cases, the fluorescence per mg protein of the cells incubated with the different compounds increased when the cells were previously pre-incubated with LPS. This increase is especially significant in the case of glycocyclodextrin **22**. The LPS-stimulated uptake results point to the idea that macrophage differentiation is a requirement for the efficient uptake of the neoglycoconjugates.

Third, to confirm the hypothesized stimulating-effect of the Gal-cyclodextrin in cultured monocytes RAW 264.7 cells were incubated for 18 h with glycocyclodextrin **22** (100 and 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and mRNA levels for TNF- α were measured by real time PCR. Cells incubated with LPS for 18 h were included as a positive control for cell stimulation. The results (Fig. 6) show that TNF- α mRNA production depends on the concentration of compound

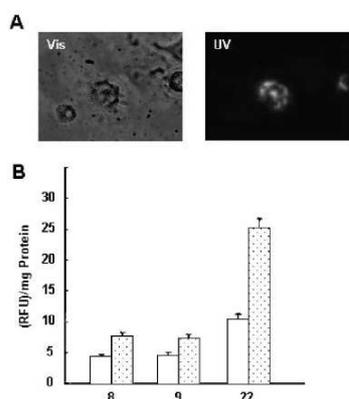


Fig. 5 Uptake of fluorescently labeled neoglycoconjugates into RAW 264.7 cells. A. Fluorescence microscopy of RAW 264.7 cells incubated at 37 °C with Gal-glycocyclodextrin 22. Visible (Vis) and fluorescent (UV) photographs are shown. B. Fluorescence of RAW 264.7 cells that were pre-incubated (dotted bars) or not (open bars) with LPS for 4 h and then incubated overnight with glycopolymers 8 and 9 and Gal-cyclodextrin 22 (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) at 37 °C. Fluorescence was quantified by spectrofluorometry as described in the Experimental section. Results were normalized to the amount of protein of each sample. Results are the means \pm S.E.M. from each independent experiment ($n = 3$).

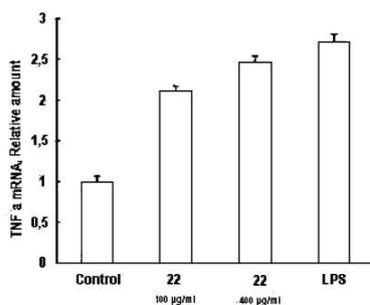


Fig. 6 Stimulation of RAW 264.7 by glycocyclodextrin 22. Relative amount of TNF- α mRNA RAW 264.7 cells were incubated for 18 h in the absence (control) or the presence of 22 (100 and 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or LPS (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Relative amounts of TNF- α mRNA were measured by a real time PCR.

22. The amount of TNF- α mRNA at concentrations of 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was similar to the production observed in LPS-stimulated cells, indicating clearly the stimulating potential of this glycoconjugate.

Since the results show that LPS-differentiated cells can uptake higher amounts of the glycoconjugates (see Fig. 5), we evaluated the intrinsic capacity of these glycoconjugates to mediate differentiation and uptake of their fluorescent counterparts. For this purpose, RAW cells were pre-incubated with nothing (control cells), LPS (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and the non-fluorescent compound 20

(100 or 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) at 37 °C for 6 h. After this time, the media was changed and compound 22 alone was added and the cells incubated overnight. Cells were detached using 0.1% SDS and fluorescence was measured by spectrofluorometry. Fig. 7A shows that pre-incubated cells with glycocyclodextrin 20, at both concentrations have an uptake of glycocyclodextrin 22 comparable to those pre-incubated with LPS. These results confirm that Gal-containing glycocyclodextrins stimulate the differentiation of monocytes in a similar manner to LPS.

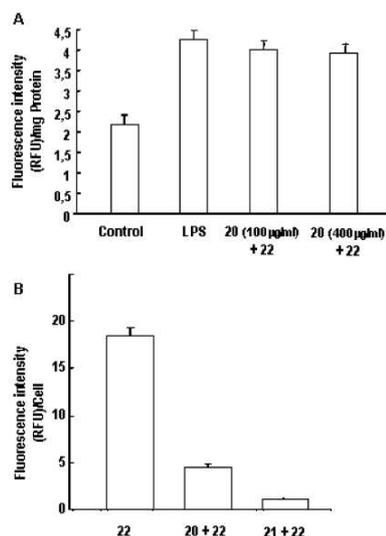


Fig. 7 Glycocyclodextrin 22 binding and uptake in RAW 264.7 cells A. Fluorescence of RAW 264.7 cells that were pre-incubated in the absence (control) or in the presence of LPS and 100 or 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of unlabeled glycoconjugate 20 for 6 h and then incubated with Gal-glycocyclodextrin 22 (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) at 37 °C. Results were normalized to the amount of protein of each sample. B. Fluorescence per cell of RAW 264.7 cells pre-incubated or not with 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of the unlabeled glycoconjugates 20 (Gal) or 21 (Lac) for 4 h and then incubated at 4 °C with the labeled Gal-glycocyclodextrin 22 (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Fluorescence was quantified by fluorescence microscopy as described in the Experimental section. Results are the means \pm S.E.M. from at least 50 different cells for each independent experiment ($n = 3$).

Once the stimulating-effect of the multivalent neoglycoconjugates and their capability to act as synthetic activators in monocyte/macrophage cells was demonstrated, a competition assay was performed to probe the specificity of the surface receptor of monocytes/macrophages for glycoconjugates bearing Gal- or Lac-appendages. RAW-264.7 cells were pre-incubated with the non-fluorescent glycoconjugates containing Gal (20) or Lac (21) during 4 h prior the supplementation overnight with fluorescent compound 22 at 4 °C. The cell-associated fluorescence was quantified as above (Fig. 7B). The significant decrease of the fluorescence observed when the cells were pre-incubated with the Gal- or Lac-compounds is indicative of the specificity of the

surface receptors for these epitopes. This result corroborates the rational design of neoglycoconjugates containing these epitopes as hypothesized.

Conclusions

From the results described herein, it can be concluded that click multivalent neoglycoconjugates with a well-defined structure have the capability to act as synthetic activators since they promote cell adhesion and stimulation of monocytes. These processes depend on the architecture of the neoglycoconjugates as well as on the nature of the saccharide epitope grafted to those neoglycoconjugates but it is independent of the multivalency degree. Gal and Lac-containing glyco-cyclodextrins were demonstrated to be the neoglycoconjugates with the highest adhesion and stimulation capabilities. The fluorescent labeling of the multivalent neoglycoconjugates enhances their utility, without modification of their binding and stimulating properties. This allows their application in experiments where visualization was required. Experiments with dansyl-labeled neoglycoconjugates have demonstrated their capability to affect the cytokine production by stimulating the TNF- α expression in RAW 264.7 cells. This stimulation is dose-dependent and mediates similar production levels of TNF- α to those observed in LPS stimulated cells. Therefore, these synthetic compounds act as LPS surrogates that can provide, without the heterogeneity of natural endotoxins, a repetitive stimulation and adhesion of monocytes in cell cultures. Considering the flexibility and efficiency of "click-chemistry", these well-defined and custom-made click multivalent neoglycoconjugates appear to be valuable compounds with applications not limited to the activation of monocytes/macrophages but also with potential for the development of therapeutics.

Experimental

General synthetic methods

Unless otherwise noted, commercially available reagents and solvents were used as purchased without further purification. TLC was performed on Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets. Reagents used for developing plates include ceric sulfate (1% w/v) and ammonium sulfate (2.5% w/v) in 10% (v/v) aqueous sulfuric acid, iodine, ethanolic sulfuric acid (10% v/v) and by UV light when applicable. Flash column chromatography was performed on silica gel Merck (230–400 mesh, ASTM). Melting points were measured on a Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Satellite Mattson FTIR. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker (300–400 MHz) spectrometer. *J* values are given in Hz. FAB mass spectra were recorded on a Fisons VG Autospec-Q spectrometer, using *m*-nitrobenzyl alcohol or thioglycerol as matrix. Matrix-assisted laser desorption/ionization and time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were recorded on a Bruker Daltonics (AUTOFLEX) spectrometer using DGB as matrix.

Synthesis of polymer 3

A solution of polymer 2²¹ (1.0 g, MW = 3700), sodium azide (2.13 g, 5 equiv.) and Bu₄NI (20 mg) in DMF (10 mL) was heated

at 75 °C for 72 h. After this time, CH₂Cl₂ (100 mL) was added and the organic solution washed with water (5 × 15 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄) and evaporated. Addition of MeOH (75 mL) gave a solid that was filtered and dried under vacuum to give 3 as a solid (88%).

Synthesis of heptakis(2-*O*-propargyl)- β -cyclodextrin 12

Compound 12 was prepared starting from heptakis(2-*O*-propargyl-3,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin²⁶ and following the procedure described in the literature²⁷ for the de-*O*-silylation. mp > 325 °C; [α]_D = +101 (*c* = 0.25 in methanol); IR (KBr): ν = 3430, 3288, 2923, 2117, 1636, 1363, 1159, 1049 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) (selected signals): δ = 4.98 (d, *J* = 3.3 Hz, 7 H, H-1), 2.49 (br s, 7 H, C \equiv CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ = 99.8, 81.7, 79.7, 78.4, 77.7, 72.5, 71.3, 59.6, 58.5; MS (MALDI-TOF): *m/z*: calcd for: C₆₀H₈₄O₃₅Na 1423.5 [M + Na]⁺; found: 1423.5.

Synthesis of propargyl 2,3,4,6-tetra-*O*-propargyl- β -D-glucopyranoside 26

Propargyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside³⁸ (0.8 g, 2.3 mmol) was de-*O*-acetylated by the standard Zemplen procedure using NaOMe–MeOH. The crude product, which showed identical physical and spectroscopic data to those reported in literature,³⁹ was dissolved in anhydrous THF (20 mL) and NaH (0.7 g) was added under an argon atmosphere. After standing at room temperature for 30 min, propargyl bromide (6.8 mL) was dropwise added and the reaction mixture magnetically stirred for 24 h. The reaction mixture was cooled in an ice bath and MeOH (5 mL) was added dropwise. After 15 min, the solvent was evaporated and the resulting crude was purified by column chromatography (AcOEt–hexane 1 : 2) to give 26 as a syrup (580 mg, 68.4% yield); [α]_D = –25.0 (*c* = 1 in chloroform); IR (film): ν = 3289, 2117, 1445, 1354, 1075 cm⁻¹; ¹H NMR (Cl₃CD, 300 MHz): δ = 4.60–4.30 (several m, 9 H; H-1,2,3,3 × CH₂C \equiv CH), 4.25 (dd, *J* = 15.9, 2.3 Hz, 1 H; CH₂CCH), 4.18 (dd, *J* = 15.9, 2.4 Hz, 1 H; CH₂C \equiv CH), 3.84 (dd, *J* = 10.9, 1.7 Hz, 1 H; H-6), 3.76 (dd, *J* = 10.9, 4.2 Hz, 1 H; H-6'), 3.28 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H; H-4), 3.50–3.35 (m, 3 H; H-5, CH₂C \equiv CH), 2.48 (m, 5 H; 5 × C \equiv CH); ¹³C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): δ = 100.7, 83.2, 80.9, 80.1, 80.0, 79.8, 79.5, 78.7, 75.9, 75.2, 74.8, 74.5, 74.1, 68.3, 60.2, 60.0, 59.2, 58.6, 55.9; HRMS (FAB+): *m/z*: calcd for C₁₁H₂₂O₆Na: 393.1314 [M + Na]⁺; found: 393.1312.

General procedure for the synthesis of non-fluorescent glycopolymers 6 and 7

A solution of the polystyrene derivative 3 (0.100 g), the corresponding propargyl sugar derivative 4a, b²⁶ (0.76 mmol, 1.2 equiv. per azide group) and the copper catalyst [(EtO)₃P·Cu] (0.063 mmol, 0.1 equiv. per azide group) in DMF (10 mL) was irradiated at 800 W and 90 °C in a Milestone Star Microwave Labstation until the IR spectra of the reaction mixture showed complete disappearance of the starting material (15 min). The reaction mixture was added dropwise to MeOH (100 mL). The white precipitate that appears was filtered and washed with MeOH, dichloromethane and ethyl ether. The resulting solid was dissolved in water (10 mL) and freeze dried to get a white powder.

Gal-glycopolymer 6

Obtained in 79% yield: IR (KBr): $\nu = 3484, 1663, 1498, 1390, 1256, 1100 \text{ cm}^{-1}$; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 144.5, 133.6, 128.0, 125.0, 103.2, 75.6, 73.8, 71.0, 68.6, 61.9, 61.0, 53.0$.

Lac-glycopolymer 7

Obtained in 82% yield: IR (KBr): $\nu = 3430, 1663, 1498, 1439, 1389, 1256, 1097 \text{ cm}^{-1}$; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 144.0, 127.8, 124.7, 103.9, 101.9, 80.8, 75.5, 74.9, 73.3, 70.6, 68.2, 61.7, 60.5, 53.0$.

General procedure for the synthesis of fluorescent glycopolymers 8 and 9

A solution of the polystyrene derivative **3** (0.100 g), the propargyl dansyl derivative **5^m** (0.03 mmol, 0.05 equiv. per azide group) and the copper catalyst [(EtO)₃P-Cu] (0.063 mmol, 0.1 equiv. per alkyne group) in DMF (10 mL) was irradiated at 800 W and 90 °C in a Milestone Star Microwave Labstation until the IR spectra of the reaction mixture showed complete disappearance of the starting material (15 min). At this moment, the corresponding propargyl sugar derivative **4a,b** (0.76 mmol, 1.2 equiv. per alkyne group) was added and the reaction mixture irradiated for additional 15 min. The work-up procedure was identical as that indicated for the synthesis of non-fluorescent glycopolymers **6, 7**.

Fluorescent Gal-glycopolymer 8

Obtained 0.179 g. IR (KBr): $\nu = 3386, 1644, 1513, 1226, 1141, 1067 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) (selected signals): $\delta = 8.12$ (br s; H-triazole), 6.90, 6.35 (2 br s; Ar); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 144.7, 144.0, 127.5, 127.3, 127.1, 124.4, 124.2, 102.6, 75.1, 73.2, 70.4, 68.0, 61.3, 60.3, 52.5$.

Fluorescent Lac-glycopolymer

Obtained 0.313 g. IR (KBr): $\nu = 3384, 2921, 1644, 1054 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) (selected signals): $\delta = 8.15$ (br s; H-triazole), 6.91, 6.33 (2 br s; Ar), 5.47 (br s; ArCH₂N); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 143.8, 132.8, 127.3, 124.5, 103.98, 101.8, 80.7, 75.4, 74.9, 73.2, 70.5, 68.1, 61.6, 60.4, 52.4$.

General procedure for the synthesis of non-fluorescent glycoyclodextrins functionalized at the primary face 14, 15, 18 and 19

A solution of the 6-azido cyclodextrin derivative **10²⁴** or **11²⁵** (0.100 mmol), the corresponding propargyl sugar derivative **4a,b** (1.3 equiv. per azide group) and the copper catalyst [(EtO)₃P-Cu] (0.1 equiv. per azide group) in toluene (15 mL) was refluxed for 1.5 h. The reaction mixture was evaporated and the crude purified by column chromatography to yield the corresponding glycoyclodextrin.

Monovalent Gal(OAc)-glycoyclodextrin 14

Column chromatography (AcOEt–hexane 10 : 1 to AcOEt) gave **14** (79%) as an amorphous solid: $[\alpha]_D = +97$ ($c = 1$ in chloroform); IR (KBr): $\nu = 1750, 1372, 1235, 1047 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (Cl₃CD, 300 MHz) (selected signals): $\delta = 7.63$ (s; H-triazole), 5.60 (d,

$J = 4.0 \text{ Hz}$, 1 H); ^{13}C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): $\delta = 170.9–169.30$ (19 peaks), 143.7, 125.9, 100.3, 97.15, 97.1, 96.8, 96.8, 96.7, 96.6, 96.5, 77.5, 77.3, 77.1, 76.9, 76.7, 76.5, 75.9, 71.5, 71.1, 70.9, 70.8, 70.5, 70.5, 70.3, 70.2, 70.0, 69.8, 69.7, 69.5, 69.4, 68.8, 67.2, 62.8, 62.7, 62.5, 62.3, 61.3, 49.4, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6; MS (MALDITOF): m/z : calcd for C₉₉H₁₃₁N₃O₄Na: 2408.7 [M + Na]⁺; found 2408.8.

Monovalent Lac(OAc)-glycoyclodextrin 15

Column chromatography (AcOEt) gave **15** (75%) as a solid: mp 156–158 °C; $[\alpha]_D = +80$ ($c = 1$ in chloroform); IR (KBr): $\nu = 1750, 1371, 1232, 1046 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (Cl₃CD, 300 MHz) (selected signals): $\delta = 7.63$ (s; H-triazole); ^{13}C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): $\delta = 170.9–169.0$ (17 peaks), 143.8, 126.0, 101.0, 100.8, 99.7, 97.1, 97.0, 96.8, 96.6, 96.5, 83.2, 80.9, 77.2, 77.0, 76.2, 76.0, 75.8, 75.1, 74.7, 74.4, 74.3, 74.1, 72.7, 71.6, 71.5, 71.3, 71.0, 70.7, 70.5, 70.4, 70.2, 70.1, 70.0, 69.7, 69.4, 69.1, 68.4, 66.7, 62.6, 62.3, 62.1, 60.8, 60.2, 60.0, 59.3, 58.7, 55.9, 49.4, 20.8, 20.6, 20.5; MS (MALDITOF): m/z : calcd for C₁₁₉H₁₆₉N₃O₇Na: 3167.1 [M + Na]⁺; found: 3167.1.

Heptavalent Gal(OAc)-glycoyclodextrin 18

Column chromatography (CH₂Cl₂–MeOH 20 : 1) gave **18** (88%) as a solid: mp 184–186 °C; $[\alpha]_D = +7.5$ ($c = 1$ in chloroform); $[\eta]_{436} = 10.0$ ($c = 1$, chloroform); IR (KBr): $\nu = 1752, 1372, 1228, 1048 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (Cl₃CD, 300 MHz) (selected signals): $\delta = 7.76$ (s; H-triazole); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 170.4, 170.3, 169.5, 144.2, 125.8, 100.8, 96.4, 84.5, 70.8, 69.8, 68.7, 67.1, 65.5, 61.1, 20.8, 20.6$; MS (MALDITOF): m/z : calcd for C₁₈₄H₂₄₅N₂₁O₁₂Na: 4623.8 [M + Na]⁺; found: 4624.0.

Heptavalent Lac(OAc)-glycoyclodextrin 19

Column chromatography (AcOEt then AcOEt–MeOH 30 : 1) gave **19** (87%) as a solid: mp 194–196 °C; $[\alpha]_D = +14.5$ ($c = 1$ in chloroform); IR (KBr): $\nu = 1750, 1370, 1225, 1047 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (Cl₃CD, 300 MHz) (selected signals): $\delta = 7.76$ (br s, 7 H; H-triazole), 5.36 (br s, 7 H; H-4' lactose), 5.25–3.50 (several m), 2.15, 2.05, 2.03, 1.97, 1.93 (5 s, 189 H; 63 × Ac); ^{13}C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): $\delta = 170.4, 170.2, 170.1, 169.8, 169.6, 169.2, 144.0, 126.0, 100.9, 100.2, 96.4, 76.1, 72.7, 71.5, 71.0, 70.5, 69.7, 69.0, 66.6, 63.0, 62.0, 60.7, 60.4, 50.1, 21.2, 20.9, 20.8, 20.7, 20.5$; MS (MALDITOF): m/z : calcd for C₁₈₄H₂₄₅N₂₁O₁₂Na: 4623.8 [M + Na]⁺; found: 4624.0.

Synthesis of fluorescent glycoyclodextrin functionalized at the primary face (22)

A solution of the 6-azido cyclodextrin derivative **11** (0.100 g), the propargyl dansyl derivative **5** (0.15 mmol, 0.25 equiv. per azide group) and the copper catalyst [(EtO)₃P-Cu] (0.063 mmol, 0.1 equiv. per azide group) in DMF (5 mL) was irradiated at 800 W and 90 °C in a Milestone Star Microwave Labstation for 6 h. At this moment, the corresponding propargyl sugar derivative **4a** (0.76 mmol, 1.2 equiv. per alkyne group) was added and the reaction mixture irradiated for an additional 2 h. The work-up procedure was identical to that indicated for the synthesis of non fluorescent glycoyclodextrins **14, 15, 18** and

19. The crude product was de-*O*-acetylated by NaOMe–MeOH. Evaporation of the solvent was followed by purification by column chromatography (acetonitrile–water 3 : 1) giving **22**. ¹H NMR, ¹³C NMR and MS (MALDITOF) showed a mixture of different compounds with **22** as the general formula.

General procedure for the synthesis of glyco-cyclodextrins functionalized at the secondary face **23** and **24**

A solution of the propargylated cyclodextrin **12** (0.100 mmol), the corresponding azido sugar derivative **13a**, **b**^{27,28} (1.5 equiv. per alkyne group) and the copper catalyst [(EtO)₃P·CuI] (0.1 equiv. per azide group) in DMF (15 mL) was irradiated at 500 W and 90 °C in a Milestone Star Microwave Labstation for 40 min. Evaporation gave a crude that was purified by column chromatography (acetonitrile–water 2 : 1 to 1 : 1).

Heptavalent Gal(OAc)-glyco-cyclodextrin **23**

Isolated as a solid in 92% yield; mp > 250 °C (decomp.); [α]_D = +34 (*c* = 0.5 in water); [α]₄₃₆ = +160 (*c* = 0.5 in water); IR (KBr): *v* = 3381, 2991, 1636, 1152, 1080, 1037 cm⁻¹; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ = 143.4, 125.0, 103.4, 99.9, 82.0, 78.9, 75.3, 73.3, 73.0, 71.5, 70.4, 68.1, 67.1, 64.2, 60.4, 54.8, 49.6. MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₁₆₁H₂₅₉N₂₁O₁₁₂Na: 4303.8 [M + Na]⁺; found: 4303.4.

Heptavalent Lac(OAc)-glyco-cyclodextrin **24**

Isolated as a solid in 86% yield; mp > 250 °C (decomp.); [α]_D +96 (*c* = 0.5 in water); [α]₄₃₆ = +188 (*c* = 0.5 in water); IR (KBr): *v* = 3996, 1645, 1373, 1157, 1035 cm⁻¹; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ = 143.5, 125.4, 103.8, 102.5, 100.0, 81.7, 80.6, 78.5, 75.1, 74.8, 73.2, 72.9, 71.5, 70.5, 68.1, 67.3, 64.9, 63.8, 60.4, 59.6, 49.8; MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₁₆₁H₂₅₉N₂₁O₁₁₂Na: 4303.8 [M + Na]⁺; found: 4303.4; C₁₆₁H₂₅₉N₂₁O₁₁₂K: 4319.9 [M + K]⁺; found: 4319.3.

General procedure for the synthesis of hydroxylated glyco-cyclodextrins **16**, **17**, **20** and **21**

A solution of the corresponding per-*O*-acetylated derivatives **14**, **15**, **18** or **19** (0.05 mmol) in MeOH–DMF–Et₃N (8 : 2 : 1 ml) was refluxed for 60 h. Evaporation gave a crude that was crystallized to yield the corresponding hydroxylated derivatives **16**, **17**, **20**, or **21**, respectively.

Monovalent Gal(OH)-glyco-cyclodextrin **16**

Crystallization in AcOEt–MeOH gave **16** in 90% yield as a solid; mp > 250 °C (decomp.); [α]_D +110 (*c* = 1 in water); ¹H NMR (D₂O, 300 MHz) (selected signals): δ = 8.16 (s; H-triazole); ¹³C NMR (D₂O, 75 MHz): δ = 143.6, 126.9, 102.0, 101.9, 101.5, 83.0, 81.3, 81.1, 80.7, 75.2, 73.1, 72.8, 72.7, 72.0, 71.8, 71.7, 71.4, 70.6, 68.6, 61.7, 61.0, 60.2, 59.1, 51.1; MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₅₁H₈₅N₅O₄₆Na: 1400.5 [M + Na]⁺; found: 1440.5.

Monovalent Lac(OH)-glyco-cyclodextrin **17**

Crystallization in MeOH gave **17** in 64% yield as a solid; mp > 165–166 °C; ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) (selected signals): δ 8.13 (s;

H-triazole); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz): δ = 143.5, 127.0, 103.0, 102.0, 101.9, 101.5, 101.3, 83.0, 81.3, 81.1, 80.7, 78.3, 75.3, 74.8, 74.3, 73.0, 72.8, 72.7, 72.5, 72.0, 71.8, 71.4, 70.9, 70.5, 68.5, 61.8, 61.0, 60.2, 60.1, 59.1, 51.2; MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₅₇H₉₃N₅O₄₅Na: 1562.50 [M + Na]⁺; found 1562.60.

Monovalent Gal(OH)-glyco-cyclodextrin **20**

Crystallization in MeOH gave **20** in 80% yield as a solid; mp > 250 °C (decomp.); [α]_D = +10 (*c* = 0.5 in water); [α]₄₃₆ = +20 (*c* = 0.5 in water); IR (KBr): 3400, 1638, 1156, 1076, 1048 cm⁻¹; ¹H NMR (D₂O, 300 MHz): δ = 8.1 (s, H-triazole); ¹³C NMR (D₂O, 75 MHz): δ = 140.9, 124.5, 99.4, 98.3, 79.6, 72.4, 70.0, 69.7, 68.9, 68.0, 67.3, 65.8, 58.3; MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₁₀₅H₁₆₁N₂₁O₇₀Na: 2858.0 [M + Na]⁺; found: 2858.3.

Heptavalent Lac(OH)-glyco-cyclodextrin **21**

Crystallization in MeOH gave **21** in 95% yield; ¹H NMR (D₂O, 300 MHz) (selected signal): δ = 8.11 (br s, H-triazole); MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₁₄₇H₂₃₁N₂₁O₁₀₅Na: 3995.5 [M + Na]⁺; found: 3995.6.

General procedure for the synthesis of glucose-based glycoclusters **27–30**

A solution of the propargylated glucose derivative **26** (0.100 mmol), the corresponding azide sugar derivative **13c,d** (1.3 equiv. per alkyne group) and the copper catalyst [(EtO)₃P·CuI] (0.1 equiv. per alkyne group) in toluene (15 mL) was refluxed for 1 h. The reaction mixture was evaporated and the crude purified by column chromatography to yield the corresponding glycocluster.

Gal(OAc)-glycocluster **27**

Column chromatography (AcOEt–MeOH 15 : 1) gave **27** (93%) as a solid; mp 112–114 °C; [α]_D = –17.7 (*c* = 1 in chloroform); [α]₄₃₆ = –34.3 (*c* = 1 in chloroform); IR (KBr): *v* = 2937, 1750, 1371, 1225, 1051 cm⁻¹; ¹H NMR (Cl₃CD, 300 MHz) (selected signals): δ 7.99, 7.90, 7.88, 7.85, 7.74 (5 s, 5 H; H-triazole); ¹³C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): δ = 170.3, 170.0, 169.4, 169.1, 144.7, 144.6, 144.5, 144.1, 124.7, 124.6, 124.3, 102.3, 100.9, 83.9, 81.6, 74.7, 70.8, 10.6, 68.9, 68.4, 67.5, 67.4, 66.9, 66.3, 66.6, 65.4, 64.5, 62.6, 61.1, 49.9, 20.6, 20.6, 20.4; MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₁₀₁H₁₃₇N₁₅O₅₆Na: 2478.8 [M + Na]⁺; found: 2478.5.

Lac(OAc)-glycocluster **28**

Column chromatography (AcOEt–MeOH 15 : 1) gave **28** (92%) as a solid; mp 149–151 °C; [α]_D = –13 (*c* = 1 in chloroform); IR (KBr): *v* = 2958, 1753, 1371, 1230, 1053 cm⁻¹; ¹H NMR (Cl₃CD, 300 MHz) (selected signals): δ = 7.99, 7.91, 7.89, 7.85, 7.73 (5 s, 5 H; H-triazole), 5.35 (d, *J* = 1.3 Hz, 5 H; H-4 Gal); ¹³C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): δ = 170.3, 170.1, 169.9, 169.6, 169.5, 169.1, 144.7, 144.5, 144.2, 124.6, 124.5, 124.2, 101.0, 100.4, 76.1, 76.0, 72.8, 72.5, 71.3, 70.9, 70.6, 69.1, 67.7, 66.6, 61.9, 61.8, 60.7, 49.8, 49.7; MS (MALDITOF): *m/z*: calcd for C₁₆₁H₂₁₇N₁₅O₉₆Na: 3921.5 [M + Na]⁺; found: 3921.8.

General Procedure for the synthesis of hydroxylated glycoclusters 29 and 30

A solution of the per-*O*-acetylated derivatives **27** or **28** (0.05 mmol) in MeOH-Et₃N (8 : 2 ml) was refluxed for 3 h. Evaporation gave a crude that was purified by column chromatography to give the corresponding glycoclusters **29** or **30**.

Gal(OH)-glycocluster 29

Column chromatography (AcOEt-MeOH 15 : 1) gave **29** (94%) as a solid; mp >250 °C (decomp.); $[α]_{436} = +3$ ($c = 0.5$ in water); IR (KBr): $\nu = 3408, 2925, 1118, 1076 \text{ cm}^{-1}$; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) (selected signals): $\delta = 8.20, 8.16, 8.13, 8.10$ (4 s, 5 H; H-triazole); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): $\delta = 143.8, 143.6, 143.2, 143.1, 143.0, 124.7, 124.6, 103.4, 101.1, 83.2, 83.1, 76.9, 75.3, 73.7, 73.3, 70.4, 68.1, 67.0, 65.5, 65.0, 64.8, 63.8, 61.8, 60.4, 49.5$; MS (MALDITOF): m/z : calcd for C₆₁H₉₇N₁₅O₃₆Na: 1638.6 [M + Na]⁺; found, 1638.7.

Lac(OH)-glycocluster 30

Column chromatography gave **30** (94%) as a solid; mp > 280 °C (decomp.); $[α]_{\text{D}} = +10.4$ ($c = 0.5$ in water), $[α]_{436} = +20.6$ ($c = 0.5$ in water); IR (KBr): $\nu = 3392, 2922, 1146, 1070 \text{ cm}^{-1}$; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) (selected signals): $\delta = 8.17, 8.13, 8.12, 8.08, 8.08$ (s, 5 H; H-triazole); ¹³C NMR (Cl₃CD, 75 MHz): $\delta = 143.5, 124.5, 103.7, 102.3, 80.5, 75.3, 74.8, 74.7, 73.1, 72.8, 70.5, 68.0, 67.2, 60.3, 60.2, 49.5$; MS (MALDITOF): m/z : calcd for C₅₁H₄₇N₁₅O₄₁Na: 2448.9; [M + Na]⁺; found: 2448.9.

Cell culture

U-937 human histiocytic lymphoma cells (ECACC No. 85011440) were grown in suspension in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Cultek, Madrid, Spain), 2 mM glutamine, plus 100 units per ml penicillin and 0.1 mg ml⁻¹ streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Mouse monocyte macrophages, RAW 264.7 (ECACC No. 91062702) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum, plus the same supplements as for U-937 cells. All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified incubator containing CO₂ (5%) and air (95%).

Monocyte adhesion assays

U-937 cells were collected, washed free of serum and placed in serum free RPMI medium. The neoglycoconjugates tested were dissolved at 1 mg ml⁻¹ in distilled water and then were added to a 24 well plate to achieve a concentration of 20 or 40 μg ml⁻¹ in a final volume of 500 μl of water. The water in the wells was allowed to completely evaporate overnight. Next 4 × 10⁴ U-937 cells in RPMI 1640 medium without serum were plated in the wells and were incubated at 37 °C for 3 hours. After the attachment period, the medium and the non-adhered cells were aspirated and the plates were washed gently twice with 1 ml of cold of phosphate buffered saline. Adhesion was measured by counting the adhered cells by microscopy. At least 10 different cellular fields were examined in each plate at 100× magnification.

Labelling studies

For labelling studies, RAW 264.7 cells were used at 60–70% confluence. Cells were incubated in medium without FCS for 8 h and then treated in the absence or presence of 1 μg ml⁻¹ lipopolysaccharide 055:B5 (Sigma, St. Louis, MO) for 4 hours. Neoglycoconjugates bearing Glc, Gal and Lac appendages (**9–11** and **24**) marked with a dansyl group were dissolved in water and added to the growth media in a concentration of 100 or 400 μg ml⁻¹ of each labelled neoglycoconjugate. After incubation of 24 hours at 4 °C and 37 °C the cells were washed extensively with cold PBS and analyzed by fluorescence microscopy using an Olympus IX70 microscope equipped with a WU excitation filter. Image acquisition was performed under constant conditions in every field examined. Digital image acquisition and processing were performed with an Olympus DP10 camera and the NIH image software package, respectively. At least 10 different cellular fields were examined in each plate at 100× or 200× magnification. Alternatively, fluorescence intensity was assayed using a Shimadzu RF-5301PC spectrofluorophotometer. Cells were scraped and the total amount of fluorescence in the cell extracts was measured at λ_{EX} 335 and λ_{EM} 518 nm. Results were normalized using the total amount of protein of the cell extracts.⁴⁰

Quantitative RT-PCR

Specific RNA concentrations were quantified by RT-real time PCR. Total RNA was isolated from the RAW 264.7 cells using a guanidinium thiocyanate method.⁴¹ Three μg of total RNA was used as a template to generate the cDNA by reverse transcription (RT) with the first-strand cDNA synthesis kit (GE Health Care Life Sciences, Uppsala, Sweden) using an oligodT-*NotI* primer as per manufacturer's protocol. Real time PCR was performed using double-stranded DNA-specific dye SYBR Green I. The RT products were amplified using the following primers: TNF-α 5'-CCTGTAGCCCCACGTCG TAGC-3' and 5'-TTGACC-TCAGCGCTGAGTTG-3'⁴² and β-actin 5'-GGCCAACCGTGTG-AAAAGATG-3' and 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCTGTGTC-3'. Amplification, data acquisition and data analysis were carried out using a LightCycler 480 system (Roche Applied Science, Barcelona, Spain). In each run, standard curves were generated for a primer set by serial dilution of plasmid DNA encoding the relevant cDNA. Melting curves were generated after each run to verify melting temperatures of the amplicon, and the purity of RT-PCR was additionally verified by running the PCR products on agarose gel (data not shown). TNF-α mRNA amounts were calculated using the real time PCR standard curve method.⁴³

Acknowledgements

We thank Dirección General de Investigación Científica y Técnica for financial support (BQ2002-03 and CTQ2005-02219). N. Sevillano is the recipient of a predoctoral fellowship from the Fundación Ramón Areces, Spain.

References

1. J. Vitte, A. Benoliel, A.-N. Pierres and P. Bongrand, *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2005, **33**, 167–188.

- 2 R. Auzely-Velty, M. Cristea and M. Rinaudo, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 998–1005.
- 3 P. Mowery, Z. Q. Yang, E. J. Gordon, O. Dwir, A. G. Spencer, R. Alon and L. L. Kiessling, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 725–732.
- 4 *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Part II, *Biology of Saccharides*, vol. 4, *Lectins and Saccharide Biology*, ed. B. Ernst, G. W. Hart and P. Sinay, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- 5 *Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods*, ed. Y. Chapleur, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
- 6 S. K. Choi, *Synthetic multivalent molecules: Concept and biomedical application*, John Wiley & Sons, USA, 2005.
- 7 D. J. Doores, D. Gamblin and B. G. Davis, *Chem.–Eur. J.*, 2006, **12**, 656–665.
- 8 *Endotoxin in Health and Disease*, ed. H. Brade, D. C. Morrison, S. Opal and S. Vogel, Dekker, New York, 1999.
- 9 A. J. Ulmer, E. Th. Rietschel, U. Zahringer and H. Heine, *Trends Glycosci. Glycotechmol.*, 2002, **14**, 53–68.
- 10 R. Chaby, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, **61**, 1697–1713.
- 11 M. Fujihari, M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma and H. Ikeda, *Pharmacol. Ther.*, 2003, **100**, 171–194.
- 12 W. J. Christ, O. Asano, A. C. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G. R. Dubuc, W. E. Gavin, L. D. Hawkins, P. D. McGuinness, M. A. Mullarkey, M. D. Lewis, Y. Kishi, T. Kawata, J. R. Bristol, J. R. Rose, D. P. Rossignol, S. Kobayashi, L. Hishinuma, A. Kimura, N. Asakawa, K. Katayama and I. Yamatsu, *Science*, 1995, **268**, 80–83.
- 13 H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2005–2021.
- 14 Q. Wang, S. Chittaboina and H. N. Barnhill, *Lett. Org. Chem.*, 2005, **2**, 293–301.
- 15 V. D. Bock, H. Hiemstra and J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 51–68.
- 16 H. C. Kolb and B. B. Sharpless, *Drug Discovery Today*, 2003, **8**, 1128–1137.
- 17 S. Debola, S. A. Nepogodiev and R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1006–1017.
- 18 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596–2599.
- 19 C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057–3064.
- 20 A. L. Biessen, H. F. Bakkeren, D. M. Beuting, J. Kuiper and T. J. C. van Berkel, *Biochem. J.*, 1994, **299**, 291–296.
- 21 S. Kelm and R. Schauer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1988, **369**, 693–704.
- 22 B. J. Cherayil, S. J. Weiner and S. Pillai, *J. Exp. Med.*, 1989, **170**, 1959–1972.
- 23 K. Kishi, T. Ishimaru, M. Ozono, I. Tomita and T. Endo, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2000, **38**, 35–42.
- 24 F. Cazier-Dennin, P. Woisel and G. Surpateanu, FR 2873120, 2006 [Chem. Abstr. 2006, **144**, 88512].
- 25 P. R. Ashton, R. Koeniger, J. F. Stoddart, D. Alker and V. D. Harding, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 903–908.
- 26 R. Roy, S. K. Das, F. Santoyo-Gonzalez, F. Hernandez-Mateo, T. K. Dam and C. F. Brewer, *Chem.–Eur. J.*, 2000, **6**, 1757–1762.
- 27 F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson and C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14397–14402.
- 28 X.-L. Sun, K. M. Faucher, M. Houston, D. Grande and E. L. Chaikof, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 7258–7259.
- 29 F. Perez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernandez-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asin, J. Isac-Garcia and F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 1951–1954.
- 30 F. Bolletta, D. Fabbri, M. Lombardo, L. Prodi, C. Trombini and N. Zaccheroni, *Organometallics*, 1996, **15**, 2415–2417.
- 31 D. A. Fulton and J. F. Stoddart, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 655–672.
- 32 C. Weber, W. Erl, A. Pietsch and P. C. Weber, *Circulation*, 1995, **91**, 1914–1917.
- 33 M. I. Cybulsky and M. A. Gimbrone, *Science*, 1991, **251**, 788–791.
- 34 D. C. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1572**, 187–197.
- 35 R. Loris, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1572**, 198–208.
- 36 F. Ortega-Caballero, J. J. Gimenez-Martinez and A. Vargas-Berenguel, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 2389–2392.
- 37 P. R. Ashton, S. E. Boyd, G. Gattuso, E. Y. Hartwell, R. Koeniger, N. Spencer and J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 3898–3903.
- 38 H. B. Merelyala and S. R. Gurrula, *Carbohydr. Res.*, 1998, **307**, 351–354.
- 39 A. M. Blinkovsky and J. S. Dordick, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1993, **4**, 1221–1228.
- 40 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–54.
- 41 P. Chomczynski and N. Sacchi, *Anal. Biochem.*, 1987, **162**, 156–159.
- 42 Y. J. Jeon, S. B. Han, K. S. Ahn and H. M. Kim, *Immunopharmacology*, 1999, **43**, 1–9.
- 43 M. W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 2002–2007.

