

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Química Orgánica



Tesis Doctoral

**VINILSULFONAS: SÍNTESIS Y APLICACIONES EN
ETIQUETADO, INMOVILIZACIÓN, TRANSFECCIÓN Y
CATÁLISIS**

Alicia Megía Fernández

Granada, 2011



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Alicia Megía Fernández
D.L.: GR 2425-2011
ISBN: 978-84-694-2944-0

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral concedida por el Ministerio de Educación (FPU-AP-2006-01145) y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-208 “Química de Carbohidratos: Síntesis, Reactividad y Diseño Teórico”.

Departamento de Química Orgánica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.

“Vinilsulfonas: Síntesis y aplicaciones en etiquetado, inmovilización, transfección y catálisis.” Memoria de Tesis Doctoral presentada por Alicia Megía Fernández para optar al grado de Doctor en Química.

Fdo. Alicia Megía Fernández
Granada 2011

DIRECTORES:

Fdo: Francisco Santoyo González.
Catedrático de Química Orgánica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.

Fdo: Fernando Hernández Mateo.
Prof. Titular Química Orgánica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

AGRADECIMIENTOS

Quizá tras el trabajo recopilado en esta Tesis uno piense que esta parte es la más sencilla de redactar, pero no más lejos de la realidad por tener tanto que agradecer en tan poco espacio. En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a los directores de esta Tesis, por el interés y el excelente trato que he recibido. A ti, Paco, por guiar día a día mi trabajo con enorme dedicación, por compartir tus conocimientos, tu experiencia y contagiarme tu pasión por la investigación científica. A ti Fernando por la difícil labor que desempeñas, porque gracias a ella salen adelante nuestros trabajos incluyendo esta Tesis.

A Javier, por la vida y la fuerza que aportas al grupo, personal y profesionalmente, por estar siempre dispuesto a responder a mis preguntas, a las fáciles y a las difíciles, ofreciendo además siempre una sonrisa. Gracias también a Joaquín, por iniciarme en el manejo de RMN y resolver mis dudas, además de compartir conmigo mi primer acercamiento a la docencia.

A todos los que han colaborado en la caracterización de compuestos y sin los cuales gran parte de este trabajo no sería posible. En especial a Alberto y Cesar del Departamento de Física Aplicada, por su amabilidad prestándome sus equipos y enseñándome a manejarlos. Al personal del Centro de Instrumentación Científica, Alí y M^a Ester de RMN, Jose Miguel, Yolanda y Juan, de espectrometría de masas. A Joaquín del Departamento de Química Analítica por las medidas de AAS.

A los Prof. Rafa Salto y Loles, por ese valor añadido que aportáis a nuestro trabajo. Es un placer contar con vuestra colaboración y vuestro saber hacer, que esperamos dé nuevos frutos en el futuro. Por el mismo motivo gracias también a Teresa, Gloria junto con su director Antonio Osuna, del Departamento de Bioquímica y Parasitología Molecular.

A todos con los que he compartido el trabajo en el laboratorio, a Francesco, Isidro, Jose Manuel, Ana, Carolina, pero muy especialmente a dos personas, sin las que esta Tesis probablemente no sería la misma: Mariano y Julia. Espero que ambos percibáis el aprecio que os tengo, a pesar de que sea generalmente persona de pocas palabras. A ti Julia un enorme GRACIAS por enseñarme tantas y tantas cosas desde que llegué al laboratorio, porque has sido para mí modelo de trabajadora incansable y seguro que lo serás para mucha gente allá donde vayas. A ti Mariano, por tu ayuda en el trabajo y tus consejos, porque eres un magnífico compañero con todo lo que eso significa, SIEMPRE dispuesto a echar una mano.

Me gustaría también agradecer a Noelia, Sara, Ana Belén e Ismael los agradables ratos compartidos durante y después de la licenciatura. También a mis

amigos de toda la vida, ellos se darán por aludidos sin necesidad de nombrarlos. A pesar de que nos veamos menos de lo que me gustaría sabéis que vuestra amistad tiene un valor incalculable para mí.

Y no podría terminar sin dar las gracias a mi familia, a todos: herman@s, cuñad@s y sobrin@s y, cómo no, a mis padres, por darlo todo levantando una familia grande en número, pero sobre todo porque he visto en ellos unos valores que ojalá alguien vea un día en mí. Y finalmente, a ti, porque eres tú con quién yo quiero levantar nuestra propia familia, gracias por tu paciencia, por hacerme feliz día a día y por tu amor con mayúsculas.

ÍNDICE

ÍNDICE

Objetivos	V
Abreviaturas	XI

Capítulo 1. Introducción

1.1. Vinilsulfonas. Generalidades	3
1.2. Síntesis de vinilsulfonas	4
1.3. Reactividad de vinilsulfonas	10
1.4. Equilibrio entre alil y vinilsulfonas	13
1.5. Aplicaciones de vinilsulfonas	15
1.5.1. Aplicaciones en síntesis en fase sólida	15
1.5.2. Aplicaciones biotecnológicas	17
1.5.3. Aplicaciones en proteómica: ABPP	23
1.5.4. Otras aplicaciones	25

Capítulo 2. Sulfatos cíclicos. Reactividad y aplicaciones en la síntesis de alil y vinilsulfonas

2.1. Sulfatos cíclicos. Generalidades	29
2.2. Síntesis de sulfatos cíclicos	31
2.3. Reactividad de sulfatos cíclicos	33
2.4. Discusión y resultados	36
2.4.1. Síntesis de sulfatos cíclicos	37
2.4.2. Reactividad con nucleófilos	38
2.4.3. Tratamiento en medio básico y ácido suave	39
2.4.4. Aplicaciones en la síntesis de alil y vinilsulfonas	41
2.5. Conclusiones	45
2.6. Sección experimental	46

Capítulo 3. Agentes de etiquetado con ferroceno basados en vinilsulfonas

3.1. Etiquetado de biomoléculas	61
3.1.1. Dianas para el etiquetado	61
3.1.1.1. Aminas	61
3.1.1.2. Tioles	63
3.1.1.3. Hidroxilos	64
3.1.1.4. Grupo carboxilo	65
3.1.1.5. Otras	65
3.1.2. Funcionalización con vinilsulfonas	66
3.2. Ferroceno	69
3.2.1. Estructura y propiedades	69
3.2.2. Aplicaciones destacadas de ferroceno derivados	70
3.2.3. Ferroceno en bioconjugación	73

Indice

3.3. Discusión y resultados	76
3.3.1. Síntesis de agentes de etiquetado con ferroceno	76
3.3.2. Obtención de dendrímeros con ferroceno terminal	77
3.3.3. Derivatización de carbohidratos: monosacáridos, disacáridos y ciclodextrinas	80
3.3.4. Derivatización de péptidos	81
3.3.5. Caracterización electroquímica	83
3.3.6. Marcaje de BSA con ferroceno vía vinilsulfona	89
3.4. Conclusiones	93
3.5. Sección experimental	94

Capítulo 4. **Sílica-vinilsulfona. Aplicaciones en inmovilización y eliminación de metales**

4.1. Inmovilización de macromoléculas	107
4.2. Inmovilización de agentes quelantes para eliminación de metales	113
4.2.1. Poliaminas	114
4.2.2. Ditiocarbamatos	115
4.3. Discusión y resultados	117
4.3.1. Síntesis de vinilsulfona sílica	119
4.3.2. Aplicación en la inmovilización de lisozima	121
4.3.3. Inmovilización de poliaminas y ditiocarbamatos. Aplicación en la eliminación de metales	123
4.4. Conclusiones	129
4.5. Sección experimental	130

Capítulo 5. **Lipidación mediante vinilsulfonas. Nuevos derivados de PAMAM con aplicaciones en transfección**

5.1. Importancia de los lípidos	137
5.1.1. Lipidación de proteínas	137
5.1.2. ISCOM	141
5.2. Transfección	142
5.2.1. Dendrímeros de PAMAM en transfección	145
5.3. Discusión y resultados	151
5.3.1. Síntesis de lípidos conteniendo vinilsulfonas	152
5.3.2. Aplicación en ISCOM	153
5.3.3. Preparación de derivados anfifílicos de PAMAM	155
5.3.4. Aplicación de dendrímeros de PAMAM como agentes de transfección	158
5.3.4.1. Formación de dendriplejos	158
5.3.4.2. Protección frente a nucleasas	160
5.3.4.3. Eficiencia de transfección in vitro de los derivados de PAMAM-G2	162
5.3.4.4. Tamaño y potencial ζ en PAMAM derivados y complejos con DNA	165
5.3.4.5. Ensayos de citotoxicidad de los dendriplejos	166
5.3.4.6. Estudio del mecanismo de internalización de los dendriplejos	167
5.3.4.7. Obtención de dendriplejos fluorescentes. Estudios de internalización	169

5.4. Conclusiones	173
5.5. Sección experimental	174

Capítulo 6. Síntesis de nuevos materiales magnéticos y no magnéticos con ligandos inmovilizados. Aplicaciones en CuAAC

6.1. "Click chemistry". Generalidades	183
6.1.1. Fuentes de Cu	185
6.1.2. Empleo de ligandos	187
6.2. Catálisis heterogénea en CuAAC	188
6.3. Procesos "one-pot" en CuAAC	193
6.4. Cicloadición de alquinos y N-óxidos de nitrilo	199
6.5. Agentes secuestrantes ("scavenger") de Cu/alquino/azida	200
6.6. "Click" en bioconjugación	203
6.7. Discusión y resultados	209
6.7.1. Síntesis de materiales adsorbentes con ligandos nitrogenados	209
6.7.2. Cu(I) soportado en sílicas (Si-L _m ·Cu ⁺) y Dw-BPMA·Cu ⁺ como catalizadores heterogéneos en CuAAC	212
6.7.3. Si-BPA·Cu ⁺ como catalizador heterogéneo en reacciones "one-pot" de apertura de sulfatos cíclicos-CuAAC	222
6.7.4. Cicloadiciones 1,3-dipolares entre óxidos de nitrilo y alquinos	224
6.7.5. Si-L _m y Dw-BPMA como agentes secuestrantes de Cu(I)	228
6.7.6. Síntesis de partículas magnéticas conteniendo Cu(I) y aplicaciones como catalizador heterogéneo en química "click"	232
6.7.7. Si-L _m ·Cu ⁺ como catalizador heterogéneo para CuAAC en bioconjugación	237
6.8. Conclusiones	245
6.9. Sección experimental	247

Anexo: Artículos publicados

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Las vinilsulfonas constituyen una amplia familia de compuestos cuya reactividad las ha convertido en intermedios útiles en síntesis orgánica así como en efectivos inhibidores de ciertos procesos enzimáticos, proporcionando unas propiedades únicas que se pueden explotar en el diseño de fármacos. Sin embargo, las enormes posibilidades que ofrece este grupo funcional para interconectar de forma covalente diferentes componentes moleculares aún no han sido convenientemente explotadas por lo que como objetivo general de esta Tesis Doctoral se pretende poner de manifiesto la potencialidad de las vinilsulfonas para el acoplamiento de sustratos de muy diferente naturaleza desarrollando aplicaciones destacadas en diferentes campos que incluyen el etiquetado de proteínas, la inmovilización, la transfección génica y la catálisis.

Inicialmente, en el ámbito puramente sintético nos proponemos como primer objetivo la obtención de vinilsulfonas a partir de sulfatos cíclicos como material de partida. A pesar de que los sulfatos cíclicos se pueden considerar equivalentes sintéticos de epóxidos, su empleo es mucho menos frecuente. Especialmente aquellos sulfatos cíclicos obtenidos a partir de derivados de tioglicerol pueden dar acceso a vinilsulfonas mediante una metodología sencilla.

- Aplicaciones en etiquetado:

La incorporación de unidades de ferroceno sobre diferentes sustratos dota a estos derivados de nuevas propiedades, mejorando en ocasiones la actividad biológica de ciertos compuestos y confiriendo propiedades electroquímicas, que pueden permitir su detección a través de la actuación del ferroceno como sonda con la posibilidad de formar parte de biosensores entre otras aplicaciones. En este sentido, uno de los objetivos específicos de esta Tesis ha sido la preparación de compuestos que contengan un grupo ferroceno en combinación con un grupo vinilsulfona, para evaluar a continuación la capacidad de estos compuestos como reactivos de marcaje en el etiquetado de diferentes sustratos incluyendo proteínas.

- Aplicaciones en inmovilización:

En la mayoría de metodologías descritas para la inmovilización covalente es necesario llevar a cabo una “activación” en la molécula o en el soporte para promover la unión. Cuando se trata de inmovilizar biomoléculas la activación de

Objetivos

éstas puede suponer una dificultad añadida, por lo que evitar ese paso empleando soportes adecuados constituye una opción de gran utilidad que puede simplificar mucho el proceso. En este campo de aplicación, el objetivo de la presente Tesis se centra en la preparación de un material basado en sílica que incorpore grupos vinilsulfona para emplearlo como soporte para inmovilización de enzimas.

La versatilidad y las posibilidades que ofrece este material son muchas por lo que en otro ámbito de actuación se pretende también inmovilizar polímeros aminados como PEI (Polietilenimina) para obtener materiales híbridos que puedan actuar eliminando metales tóxicos como el plomo, ya que éste es uno de los graves problemas medioambientales como consecuencia de la actividad humana, produciendo en ocasiones daños directos en vegetación, ríos, animales e incluso en el hombre.

- Aplicaciones en lipidación de macromoléculas:

Con una estrategia también basada en el empleo de vinilsulfonas, se pretende abordar la incorporación de diferentes compuestos de carácter lipídico en macromoléculas. La lipidación es una de las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas modulando su localización, estabilidad, actividad e interacción con otras moléculas. En este contexto, el objetivo ha sido la síntesis de diferentes compuestos de naturaleza lipídica conteniendo la función vinilsulfona con la intención de aprovechar su reactividad en la lipidación de macromoléculas de forma sencilla. En primer lugar seleccionamos como sustrato la proteína A, para evaluar después la capacidad de la proteína modificada para incorporarse a ISCOMs favoreciendo su transporte dirigido. En segundo lugar, y por la enorme repercusión que están adquiriendo hoy día los dendrímeros en el campo de la medicina, particularmente en la terapia génica, seleccionamos el dendrímero PAMAM (Poliamidoamina), cuya lipidación con vinilsulfonas tiene como finalidad la obtención de vectores no virales para transfección.

- Aplicaciones en catálisis:

Finalmente, la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (**CuAAC**), considerada máximo exponente del concepto de "*click chemistry*" acuñado por Sharpless en 2001, ha suscitado enorme interés no sólo en síntesis orgánica, sino en otros campos tales como las ciencias de los materiales y las ciencias biomédicas. Ante la importancia que ha adquirido esta reacción "click", y en combinación con el empleo de partículas magnéticas (ambos

conceptos forman parte de los “*hot topics*” en química en el año 2010) se pretende desarrollar protocolos sencillos para llevar a cabo las reacciones “click” que minimicen la contaminación con Cu de los productos finales, y así poder implementar estos procesos con biomoléculas como materiales de partida evitando su degradación debido a la toxicidad del metal o los aditivos empleados habitualmente. Para alcanzar este objetivo, la inmovilización de ligandos con capacidad de complejar Cu(I) en diferentes soportes haciendo uso de la química de vinilsulfonas se plantea como una estrategia atractiva para la obtención de catalizadores “click” heterogéneos.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAS: Espectroscopía de Absorción Atómica

ABPP: “*Activity-Based Protein Profiling*”

Ada: Adamantano

AIBN: Azobisisobutironitrilo

Anh.: Anhidro

Asc.: Ascorbato sódico

BODIPY: Difluoroboro dipirrometeno

BPA: 2,2'-Bispiridilamina

BPMA: 2,2'-Bis(piridilmetil)amina

BPS: Ácido disulfónico batofenantrolina

BSA: Albúmina Sérica Bovina (“*Bovine Serum Albumin*”)

Bt: Biotina

c: Cuadruplete

calc.: Calculado

c.c.f.: Cromatografía en capa fina

CD: Ciclodextrina

col.: Colaboradores

ConA: Concanavalina A

COSY: “*Correlation Spectroscopy*”

Cp: Ciclopentadieno

CPMV: Virus del mosaico del caupí

CuAAC: Cicloadiciones 1,3-dipolares de azidas y alquinos catalizadas por Cu(I)

CV: Voltimetría cíclica

Cy: Ciclohexil

Cy5: Cianina5

Cys: Cisteína

d: Duplete

D_0 : Coeficiente de difusión

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

dd: Doble duplete

ddd: Doble doble duplete

desc.: Descompone

DEAE-dextrano:

Dietilaminoetildextrano

DIBAL: Hidruro de diisobutilaluminio

DIPEA: N,N-Diisopropil-N-etilamina

DMF: N,N-Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOPE: Dioleil fosfatidiletanolamina

DOSPA: (2,3-Dioleiloxi)-N-[2(espermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamonio trifluoroacetato

Dpp: Dipropargilpentaeritritol

dt: doble triplete

DTC: Ditiocarbamatos

DTE: Ditioeritritol

DTT: Ditiotreitrol.

DVS: Divinilsulfona.

$E_{1/2}$: Potencial de semionda

EDTA: Ácido

etilendiaminotetraacético

EM-AR: Espectroscopía de masas de alta resolución

ESI: Ionización por Electrospray

E_{pa} : Potencial de pico anódico

E_{pc} : Potencial de pico catódico

Etg: Etilenglicol

Abreviaturas

FAB+: Bombardeo por átomos rápidos (*"Fast-Atom Bombardment"*)

Fc: Ferroceno

GFP: *"Green Fluorescent Protein"*

Glc: Glucosa

GOD: Glucosa oxidasa

GSH: Glutación en estado reducido

GSSG: Glutación en estado oxidado

GST: Glutación S-transferasa

h.: Hora

His: Histamina

HMQC: *"Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation"*

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

I_{pa} : Intensidad de pico anódico

I_{pc} : Intensidad de pico catódico

i-PrOH: Isopropanol

IR: Espectroscopía de infrarrojos

ISCOM: *"Immunostimulating complex"*

J: Constante de acoplamiento

kDa: KiloDalton

Lac: Lactosa

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LC-MS/MS: Cromatografía líquida tándem masas/masas

LP: Lipofectamina2000

Lys: Lisina

m: Multiplete

MALDI: Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (*"Matrix Assisted Laser Desorption Ionization"*)

Man: Manosa

MBP: Proteína de unión a maltosa (*"Maltose Binding Protein"*).

MCPBA: Ácido metacloroperbenzoico

MPTS: Mercaptopropiltrimetoxisilano

MsCl: Cloruro de mesilo

MW: Microondas

NALDI: *"Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization"*

NBD: 4-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol

NCS: N-clorosuccinimida

NHS: N-hidroxisuccinimida

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PAMAM: Poli(amidoamina)

PEG: Polietilenglicol

PEI: Polietilenimina

P.f.: Punto de fusión

pI: Punto isoeléctrico

PLL: Poli-L-lisina

PLLA: Poli-(L-ácido láctico)

PMA: 2-Piridilmetilamina

PMB: *p*-Metoxibencilo

ppb: Partes por billón

ppm: Partes por millón

PS: Poliestireno

PTP: Proteína Tirosina Fosfatasa

Rho: Rodamina B

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

s: Singulete

sa: Singulete ancho

SDS: Dodecilsulfato sódico

t: Triplete

t.a.: Temperatura ambiente

TBTA: Tris(benciltriazolilmetil)amina

t-BuOH: tert-butanol

t-BuOK: tert-butóxido potásico

TCEP: *tris*-(carboxietil)fosfina

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TEOS: Tetraetoxisilano

THF: Tetrahidrofurano

Tmb: Tetrametilbenceno

TMS: Tetrametilsilano

TMV: Virus del mosaico del tabaco

Tpa: Tripropargilamina

Tpp: Tetrapropargilpentaeritritol

TREN: Tris(2-aminoetil)amina

TsCl: Cloruro de tosilo

VS: Vinil sulfona

δ: Desplazamiento químico

Capítulo 1. INTRODUCCION

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Vinilsulfonas. Generalidades

Las sulfonas α,β -insaturadas (vinilsulfonas) han alcanzado un importante papel en la síntesis orgánica,¹⁻³ demostrando ser intermedios reactivos muy versátiles ya que la presencia del grupo sulfona activa el doble enlace debido a su efecto aceptor de electrones, lo que les permite actuar en adiciones 1,4 (aceptores Michael), en reacciones de cicloadición (donadores 2π), etc. Estas propiedades han propiciado su empleo en el diseño de fármacos y en química médica,⁴ sobre todo al demostrarse su capacidad para inhibir potencialmente a una serie de enzimas involucradas en muchos procesos celulares, entre los que se incluye el recambio de proteínas intracelulares, la activación de precursores hormonales o la remodelación ósea, y en diversos procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer, enfisema pulmonar, artritis reumatoide y metástasis. Principalmente se trata de enzimas pertenecientes a la familia de cisteín-proteasas,⁵⁻⁶ pero también otras como la sortasa A (SrtA),⁷ una transpeptidasa cuya inhibición disminuye la virulencia de bacterias Gram-positivas ya que afecta al anclaje de las proteínas implicadas en la adhesión y resistencia a la fagocitosis. En todos los casos el mecanismo de inhibición implica la adición 1,4-conjugada del grupo tiol de una cisteína presente en el centro activo a la vinilsulfona (Esquema 1.1); adicionalmente el oxígeno del grupo sulfonil

1. Fuchs, P. L.; Braish, T. F., Multiply convergent syntheses via conjugate-addition reactions to cycloalkenyl sulfones. *Chem. Rev.* **1986**, *86* (5), 903-917.

2. a) Simpkins, N. S., The chemistry of vinyl sulphones. *Tetrahedron* **1990**, *46* (20), 6951-6984. b) Simpkins, N. S., Sulfones in Organic Synthesis. Pergamon Press, Oxford **1993**.

3. Forristal, I., The chemistry of α,β -unsaturated sulfoxides and sulfones: an update. *J. Sulfur Chem.* **2005**, *26* (2), 163-195.

4. Meadows, D. C.; Gervay-Hague, J., Vinyl sulfones: Synthetic preparations and medicinal chemistry applications. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26* (6), 793-814.

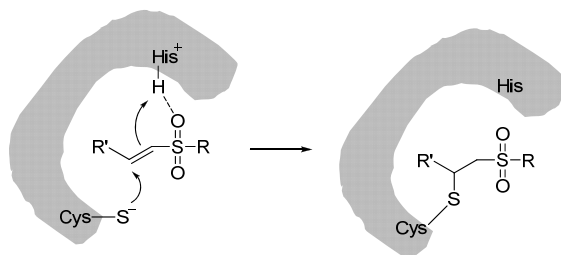
5. Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D., Vinyl Sulfones as Mechanism-Based Cysteine Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (17), 3193-3196.

6. Korver, G. E.; Kam, C.-M.; Powers, J. C.; Hudig, D., Dipeptide vinyl sulfones suitable for intracellular inhibition of dipeptidyl peptidase I. *Int. Immunopharm.* **2001**, *1* (1), 21-32.

7. Frankel, B. A.; Bentley, M.; Kruger, R. G.; McCafferty, D. G., Vinyl Sulfones: Inhibitors of SrtA, a Transpeptidase Required for Cell Wall Protein Anchoring and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (11), 3404-3405.

Capítulo 1

forma enlaces de H con otros residuos (principalmente histidinas) presentes en el centro activo, mimetizando así el aducto covalente inicial formado durante su actividad proteolítica normal e inactivando irreversiblemente al enzima.



Esquema 1.1. Mecanismo de inhibición de cisteín-proteasas por vinilsulfonas

Recientemente también se ha demostrado la inhibición por parte de vinilsulfonas de la enzima Taspasa1,⁸ una treoninproteasa que es esencial en la proliferación celular y está sobreexpresada en muchas líneas celulares cancerosas, por lo que podría constituir una nueva diana para el tratamiento del cáncer.

Las vinilsulfonas se han empleado también en síntesis asimétrica⁹ y en organocatálisis¹⁰ dada su fácil manipulación y modificación química, pero también debido a la facilidad para llevar a cabo el proceso de desulfonilación¹¹ produciéndose así la eliminación del grupo sulfonil mediante diferentes métodos que suponen la sustitución del grupo sulfona por hidrógeno, la introducción de funciones oxigenadas o la formación de enlaces C-C, en procesos de desulfonilación reductiva, oxidativa o alquilante, respectivamente. De esta forma el grupo sulfona actúa como activante en intermedios de síntesis orgánica sin estar presente en muchas ocasiones en el producto final.

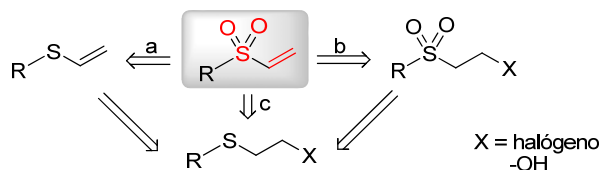
1.2. Síntesis de vinilsulfonas

Los procedimientos más habituales para la síntesis de vinilsulfonas se pueden clasificar en:

-
8. Lee, J. T.; Chen, D. Y.; Yang, Z.; Ramos, A. D.; Hsieh, J. J. D.; Bogoy, M., Design, syntheses, and evaluation of Taspase1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5086-5090.
 9. Carretero, J. C.; Arrayás, R. G.; Buezo, N. D.; Garrido, J. L.; Alonso, I.; Adrio, J., Recent Applications of Vinyl Sulfones and Vinyl Sulfoxides in Asymmetric Synthesis. *Phosphorus Sulfur* **1999**, *153* (1), 259-273.
 10. Alba, A.-N. R.; Companyo, X.; Rios, R., Sulfones: new reagents in organocatalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2018-2033.
 11. Nájera, C.; Yus, M., Desulfonylation reactions: Recent developments. *Tetrahedron* **1999**, *55* (35), 10547-10658.

➤ Oxidación de tioéteres y β -eliminación

En muchos procedimientos de síntesis de vinilsulfonas encontramos 2-halo-ó 2-hidroxiethyltioéteres como intermediarios habituales. A partir de ellos se obtienen vinilsulfonas siguiendo tres posibles estrategias (Esquema 1.2):



Esquema 1.2. Retrosíntesis de vinilsulfonas mediante oxidación y eliminación

a) Reacciones de eliminación para dar lugar a tioéteres vinílicos que son oxidados posteriormente a vinilsulfonas. La oxidación a sulfona¹² suele hacerse con un exceso de H_2O_2 en ácido acético. Otros oxidantes como ácido *m*-cloroperbenzoico, HIO_4 ó el reactivo comercial *Oxone* han sido también empleados aunque con menos frecuencia. El empleo de H_2O_2 presenta el atractivo de su bajo coste y toxicidad junto a unos rendimientos generalmente altos. Sin embargo, esta reacción suele ser más lenta y para aumentar la velocidad de reacción se han usado catalizadores como MnSO_4 en presencia de bicarbonato¹³ o tetrakis(pentafluorofenil)porfirina de hierro.¹⁴

b) Oxidación previa de estos tioéteres y subsecuente deshidrohalogenación¹⁵ o deshidratación¹⁶⁻¹⁷ de la correspondiente sulfona. Dado que el grupo sulfona es fuertemente electrón atrayente la reacción de deshidrohalogenación se ve favorecida por lo que la base empleada puede ser de tipo débil, como trietilamina. Cuando se trata de procesos de deshidratación, generalmente se efectúan via éster sulfónico, empleando TsCl o MsCl en presencia de una base orgánica.

12. Bordwell, F. G.; Pitt, B. M., The Formation of α -Chloro Sulfides from Sulfides and from Sulfoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (3), 572-577.

13. Alonso, D. A.; Nájera, C.; Varea, M., Simple, economical and environmentally friendly sulfone synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (19), 3459-3461.

14. Baciocchi, E.; Gerini, M. F.; Lapi, A., Synthesis of Sulfoxides by the Hydrogen Peroxide Induced Oxidation of Sulfides Catalyzed by Iron Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (10), 3586-3589.

15. Brace, N. O., An economical and convenient synthesis of phenyl vinyl sulfone from benzenethiol and 1,2-dichloroethane. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (16), 4506-4508.

16. Lee, J. W.; Lee, C.-W.; Jung, J. H.; Oh, D. Y., Facile Synthesis of Vinyl Sulfones from β -Bromo Alcohols. *Synthetic Comm.* **2000**, *30* (16), 2897-2902.

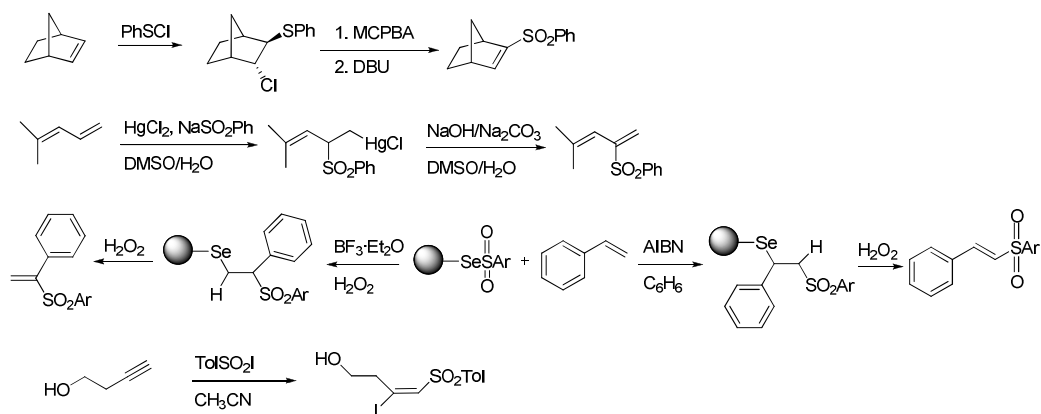
17. Galli, U.; Lazzarato, L.; Bertinaria, M.; Sorba, G.; Gasco, A.; Parapini, S.; Taramelli, D., Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40* (12), 1335-1340.

Capítulo 1

c) Reacciones de oxidación y eliminación en un solo paso.¹⁸ Para la realización simultánea en un solo paso de los procesos de oxidación y eliminación, el empleo de molibdato amónico en presencia de peróxido de hidrógeno o de ozono ha resultado ser de gran utilidad.

- ➔ Adición iónica o radicalaria de PhSO_2X ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{SePh}, \text{etc.}$) a alquenos, alenos o alquinos (Esquema 1.3)

Se pueden sintetizar un gran número de vinilsulfonas tanto cíclicas como acíclicas mediante la reacción de clorosulfenilación-deshidrocloración.¹⁹ De forma parecida se puede conseguir la síntesis de vinilsulfonas aromáticas por fenilsulfonilmercuriación de dienos,²⁰ donde predomina generalmente la adición 1,2 sobre la 1,4. En los casos en los que se emplean como precursores los reactivos de selenio,²¹ su inmovilización en poliestireno hace a éstos mucho menos tóxicos y más fáciles de manipular, pudiendo originar adición iónica (con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalizador) o radicalaria (con AIBN como catalizador). Por otro lado, la adición a alquinos²²⁻²³ genera directamente vinilsulfonas con sustituyentes halogenados.



Esquema 1.3. Síntesis de vinilsulfonas mediante adición a dobles y triples enlaces

18. Krishna, P. R.; Lavanya, B.; Jyothi, Y.; Sharma, G., Radical Mediated Diastereoselective Synthesis of Benzothiazole Sulfonyl Ethyl C-Glycosides. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22* (6), 423-431.

19. Hopkins, P. B.; Fuchs, P. L., Chlorosulfonylation-dehydrochlorination reactions. New and improved methodology for the synthesis of unsaturated aryl sulfides and aryl sulfones. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (6), 1208-1217.

20. Andell, O. S.; Bäckvall, J.-E., Sulfonylmercuration of conjugated dienes. A facile route to allyl- and dienyl-sulfones. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (37), 4555-4558.

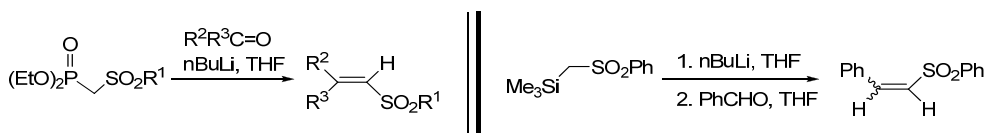
21. Qian, H.; Huang, X., Polystyrene-supported selenosulfonates: Efficient reagents for regio- and stereocontrolled synthesis of vinyl sulfones. *Synlett* **2001**, 1913-1916.

22. Edwards, G. L.; Muldoon, C. A.; Sinclair, D. J., Cyclic enol ether synthesis via arenesulfonyl iodide additions to alkynols. *Tetrahedron* **1996**, *52* (22), 7779-7788.

23. Liu, X.; Duan, X.; Pan, Z.; Han, Y.; Liang, Y., Stereoselective synthesis of (Z)- β -chlorovinyl sulfones by addition of sulfonyl chlorides to acetylenes. *Synlett* **2005**, (11), 1752-1754.

- Olefinación por reacción de Wittig, Horner-Emmons-Wadsworth (HEW), Peterson, etc.

La adición de carbaniones estabilizados con grupos sulfonilo a compuestos carbonílicos es un método importante de síntesis de vinilsulfonas. El primer paso es común en todos los casos y supone la adición del carbanión a la cetona o aldehído. En las reacciones de tipo aldólico,²⁴ la hidroxisulfona formada es después deshidratada en un segundo paso, mientras que para las reacciones de olefinación con sulfonil fosforanos²⁵ o sililderivados²⁶ el doble enlace se forma *in situ*. Algunos ejemplos se recogen en el esquema 1.4:



Esquema 1.4. Síntesis de vinilsulfonas mediante olefinación

- Transformación de sulfonas acetilénicas

La manipulación de sulfonas acetilénicas proporciona otra ruta para obtener vinilsulfonas (Esquema 1.5). La adición nucleofílica al triple enlace es útil cuando se emplean nucleófilos organometálicos así como enolatos tradicionales. En la adición de enolatos²⁷ generalmente se forma la olefina *Z* con gran estereoselectividad. Cuando se utilizan dialquilcupratos²⁸ se forma la olefina *E* mayoritariamente, aunque la proporción de doble enlace *Z* depende de la temperatura y la naturaleza del sustrato. Alternativamente, el triple enlace se puede reducir directamente mediante hidruros o metales para formar la vinilsulfona,²⁹ generalmente con alta estereoselectividad dando lugar al isómero *E*.

24. Bongini, A.; Savoia, D.; Umani-Ronchi, A., Synthesis and reactivity of the 1,1-dilithio derivatives of alkyl phenyl sulfones and N,N-dimethyl methanesulfonamide. *J. Organomet. Chem.* **1976**, *112* (1), 1-8.

25. Posner, G. H.; Brunelle, D. J., α,β -Ethylene sulfones from sulfonomethylphosphonate carbanions and aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (22), 3547-3549.

26. Ley, S. V.; Simpkins, N. S., Peterson olefination using phenylsulphonyltrimethylsilylmethane. A new preparation of vinylic sulphones. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1983**, (22), 1281-1282.

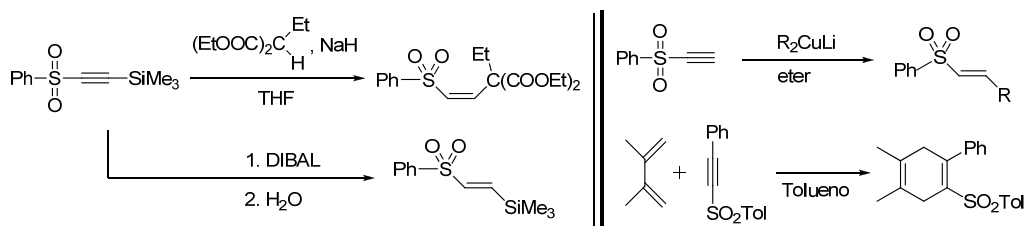
27. Ohnuma, T.; Hata, N.; Fujiwara, H.; Ban, Y., Phenyl 2-(trimethylsilyl)ethynyl sulfone as a new vinyl cation synthon. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (24), 4713-4717.

28. Fiandanese, V.; Marchese, G.; Naso, F., Mono- and bis-addition of cuprates to benzenesulphonylacetylene. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (51), 5131-5134.

29. Eisch, J. J.; Behrooz, M.; Dua, S. K., Sulfone reagents in organic synthesis: VI. Sulfonyl- and silyl-substituted hydrocarbons as versatile carbanion precursors in organic synthesis. *J. Organomet. Chem.* **1985**, *285* (1-3), 121-136.

Capítulo 1

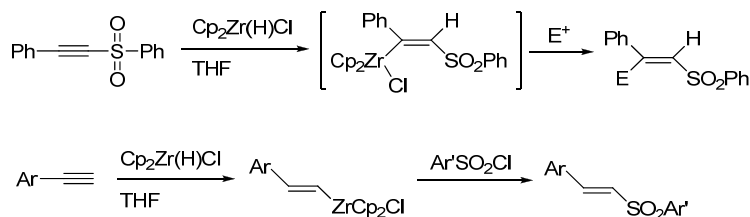
Las sulfonas acetilénicas también pueden actuar como dienófilos en ciclodiciones de Diels-Alder originando vinilsulfonas.³⁰



Esquema 1.5. Síntesis de vinilsulfonas mediante sulfonas acetilénicas

➔ Empleo de reactivos organometálicos

Los reactivos organometálicos se han mostrado muy eficientes y estereoselectivos para la formación de vinilsulfonas, conduciendo al isómero *E* (Esquema 1.6). Los reactivos de zirconio, como el reactivo de Schwartz $[\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{H})\text{Cl}]$, reaccionan selectivamente en la posición 2 de alquínulfóxidos y sulfonas, dando en primer lugar un complejo *Z*-alquenilzirconio(IV), que puede reaccionar más tarde con un electrófilo conduciendo a olefinas con un alto grado de sustitución.³¹ Los compuestos organometálicos de telurio³² dan lugar a reacciones análogas a las de organozirconio.



Esquema 1.6. Reactivos organometálicos en la síntesis de vinilsulfonas

Alternativamente, los alquinos terminales pueden tratarse con organometálicos de zirconio³³ para que en una segunda etapa de tratamiento con

30. De Lucchi, O.; Licini, G.; Pasquato, L.; Senta, M., Reactivity of phenyl(tolylsulfonyl)acetylene towards dienes and homo-dienes: cycloadditions versus fragmentation-addition reactions. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (7), 831-834.

31. Huang, X.; Duan, D.; Zheng, W., Studies on Hydrozirconation of 1-Alkynyl Sulfoxides or Sulfones and the Application for the Synthesis of Stereodefined Vinyl Sulfoxides or Sulfones. *J. Org. Chem.* **2003**, 68 (5), 1958-1963.

32. Huang, X.; Liang, C.-G.; Xu, Q.; He, Q.-W., Alkyne-Based, Highly Stereo- and Regioselective Synthesis of Stereodefined Functionalized Vinyl Tellurides. *J. Org. Chem.* **2000**, 66 (1), 74-80.

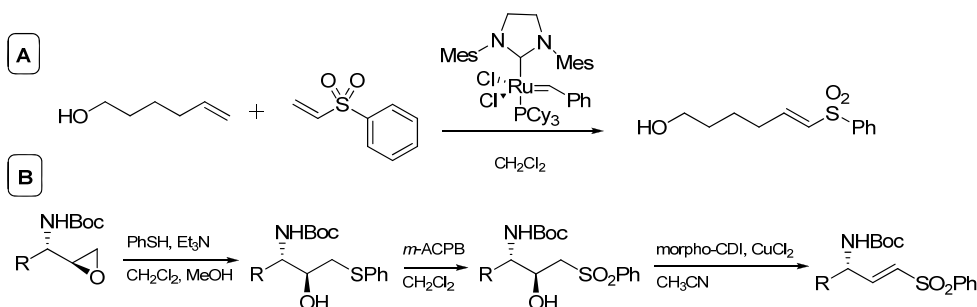
33. Duan, D.-H.; Huang, X., A facile regio- and stereocontrolled synthesis of (*E*)-disubstituted vinyl sulfones via transformation of alkenylzirconocenes with sulfonyl chlorides. *Synlett* **1999**, (3), 317-318.

cloruros de sulfonilo conduzcan a vinilsulfonas *E* (Esquema 1.6). Otros procesos como el acoplamiento cruzado de vinilestannanos³⁴ con cloruros de alquil o arilsulfonilo catalizado por Pd se han empleado también para obtener vinilsulfonas.

Más recientemente se ha descrito la sustitución nucleofílica de reactivos organoindios³⁵ y cloruros de sulfonilo como un protocolo de síntesis de vinilsulfonas sencillo y estereoselectivo.

➡ Misceláneos

La síntesis de vinilsulfonas sustituidas a partir de otras más sencillas como la fenilvinilsulfona se ha descrito mediante metátesis cruzada (Esquema 1.7A) empleando el catalizador de Grubbs.³⁶⁻³⁷



Esquema 1.7.

Los epóxidos también se han utilizado como precursores de vinilsulfonas (Esquema 1.7B) a través de una estrategia basada en la apertura con un tiol, oxidación y eliminación.³⁸ Haciendo uso de esta metodología se han preparado numerosas vinilsulfonas de tipo peptídico que actúan como inhibidores de catepsinas.³⁹⁻⁴⁰

34. Labadie, S. S., Palladium-catalyzed cross-coupling of organostannanes with sulfonyl chlorides: a simple synthesis of sulfones. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (11), 2496-2498.

35. Deng, G.; Zou, J., The first nucleophilic substitution reaction of organoindium reagents with sulfonyl chlorides: a facile method for preparation of vinyl sulfones. *ARKIVOC* **2010**, (2), 186-194.

36. Grela, K.; Bieniek, M., Highly selective cross-metathesis with phenyl vinyl sulphone using the 'second generation' Grubbs' catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (36), 6425-6428.

37. Michrowska, A.; Bieniek, M.; Kim, M.; Klajn, R.; Grela, K., Cross-metathesis reaction of vinyl sulfones and sulfoxides. *Tetrahedron* **2003**, *59* (25), 4525-4531.

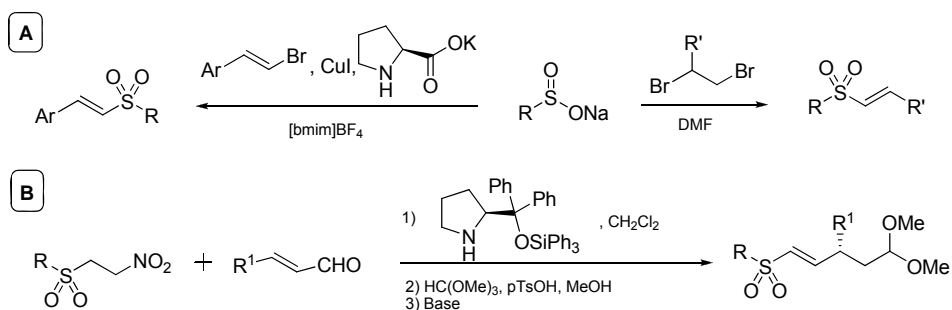
38. Bordwell, F. G.; Kern, R. J., Elimination Reactions in Cyclic Systems. I. cis Eliminations in the Cyclohexane and Cyclopentane Series. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (5), 1141-1144.

39. Picó, A.; Moyano, A.; Pericàs, M. A., Enantiodivergent, Catalytic Asymmetric Synthesis of γ -Amino Vinyl Sulfones. *J. Org Chem* **2003**, *68* (13), 5075-5083.

40. Mendieta, L.; Picó, A.; Tarragó, T.; Teixidó, M.; Castillo, M.; Rafecas, L.; Moyano, A.; Giral, E., Novel Peptidyl Aryl Vinyl Sulfones as Highly Potent and Selective Inhibitors of Cathepsins L and B. *ChemMedChem* **2010**, *5* (9), 1556-1567.

Capítulo 1

Por otro lado, las sales de ácidos sulfínicos (Esquema 1.8A) pueden sufrir reacción de acoplamiento con vinilbromuros catalizada por CuI/L-prolina para originar vinilsulfonas,⁴¹ o bien reaccionar con dibromuros vecinales, generando directamente la vinilsulfona con buenos rendimientos.⁴² Recientemente, se ha descrito un método estereoselectivo de síntesis de vinilsulfonas γ -sustituidas (Esquema 1.8B) por adición de β -nitroetilsulfonas a un carbono electrofílico adecuado catalizada por aminas quirales produciéndose a continuación la eliminación de ácido nítrico.⁴³



Esquema 1.8

1.3. Reactividad de vinilsulfonas

Las vinilsulfonas pueden intervenir en numerosas reacciones, siendo las más habituales la adición conjugada tipo Michael y las reacciones de cicloadición donde ejercen el papel de dienófilos:

➡ Adición Michael

Las contribuciones más importantes en el empleo de vinilsulfonas como aceptores de Michael en síntesis han sido realizadas por el grupo de Fuchs.¹ La adición de nucleófilos “blandos”,⁴⁴ tales como tioles, aminas, nitrilos o enaminas, es bien conocida y produce únicamente adición conjugada, originando sulfonas β -heterosustituidas.

41. Bao, W.; Wang, C., CuI/L-proline potassium salt-catalysed synthesis of vinyl sulfones via coupling reaction of vinyl bromides with sulfinic acid salts in ionic liquid. *J. Chem. Res.* **2006**, (6), 396-397.

42. Guan, Z.-H.; Zuo, W.; Zhao, L.-B.; Ren, Z.-H.; Liang, Y.-M., An Economical and Convenient Synthesis of Vinyl Sulfones. *Synthesis* **2007**, 2007 (10), 1465,1470.

43. López, R.; Zalacain, M.; Palomo, C., Catalytic Asymmetric Synthesis of γ -Substituted Vinyl Sulfones. *Chem. Eur. J.* **2011**. DOI: 10.1002/chem.201003177.

44. Hamann, P. R.; Fuchs, P. L., Conjugate addition of moderately soft anions to a vinyl sulfone. *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (6), 914-916.

En el caso de la adición de tioles, las vinilsulfonas se han empleado como grupos protectores de $-SH$.⁴⁵ También reaccionan con compuestos organometálicos⁴⁶ formando enlaces C-C. En estas reacciones las vinilsulfonas pueden ofrecer una química complementaria a la de aceptores de Michael convencionales tales como compuestos carbonílicos α - β insaturados, ya que la adición no puede darse sobre el grupo sulfona, por lo que se evitan reacciones competitivas. La adición Michael transcurre mejor en solventes próticos que permiten atrapar al carbanión que se genera y así, eliminar la posibilidad de que se produzca el ataque de un electrófilo. Además, las vinilsulfonas pueden sufrir adiciones radicalarias⁴⁷ que también conducen a la formación de enlaces C-C.

➡ Cicloadición

Las vinilsulfonas han participado en numerosos procesos de cicloadición^{2, 48} tanto del tipo [2+2], [3+2] como las más habituales [4+2]. En procesos [2+2] se originan ciclobutanos sustituidos mediante procesos fotoquímicos como el descrito por Fuchs⁴⁹ para la síntesis del fragmento C_{14} - C_{19} de citocalasina, un producto fúngico que impide la polimerización de los filamentos de actina.

En procesos [3+2] las vinilsulfonas actúan como dipolarófilos en reacciones de cicloadición 1,3-dipolares frente a azidas, óxidos de nitrilo o iluros de azometina,⁵⁰ con los que generan pirrolidinas sustituidas (Esquema 1.9A) de forma enantioselectiva mediante catálisis con Cu(I) y ligandos quirales; finalmente, las vinilsulfonas ejercen el papel de dienófilos en la reacción de Diels-Alder,⁵¹ estrategia que ha sido aplicada por ejemplo en la síntesis del sesquiterpenoide ácido sterpúrico⁵² (Esquema 1.9B).

45. Kuroki, Y.; Lett, R., Aryl vinyl sulfones as thiol protective group. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 (2), 197-200.

46. Posner, G. H.; Brunelle, D. J., Reaction of α , β -ethylenic sulfur compounds with organocopper reagents. *J. Org. Chem.* **1973**, 38 (16), 2747-2756.

47. Srikanth, G. S. C.; Castle, S. L., Advances in radical conjugate additions. *Tetrahedron* **2005**, 61 (44), 10377-10441.

48. de Lucchi, O.; Pasquato, L., The role of sulfur functionalities in activating and directing olefins in cycloaddition reactions. *Tetrahedron* **1988**, 44 (22), 6755-6794.

49. Musser, A. K.; Fuchs, P. L., Cytochalasin support studies. The C_{14} - C_{19} subunit of cytochalasin C. Intramolecular 2 + 2 photochemical cycloaddition of vinyl sulfones. *J. Org. Chem.* **1982**, 47 (16), 3121-3131.

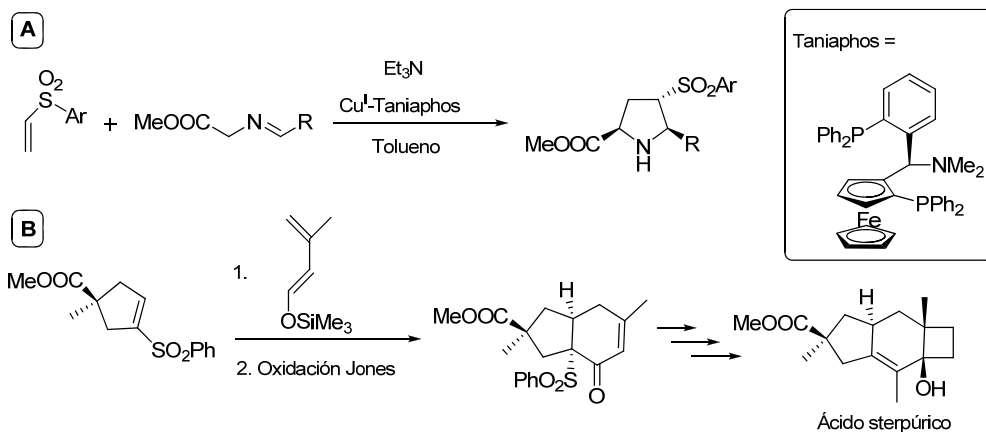
50. Llamas, T.; Arrayas, R. G.; Carretero, J. C., Copper(I)-catalyzed enantioselective 1,3-dipolar cycloaddition of azomethine ylides with vinyl sulfones. *Synthesis* **2007**, (6), 950-956.

51. Krasovsky, A. L.; Nenajdenko, V. G.; Balenkova, E. S., Diels-Alder reactions of β -trifluoroacetylvinylsulfones. *Tetrahedron* **2001**, 57 (1), 201-209.

52. Paquette, L. A.; Lin, H. S.; Gunn, B. P.; Coghlan, M. J., Sequential annulation approach to sterpúric acid and sterpurene-3,12,14-triol, metabolites of the silver leaf fungus *Stereum purpureum*. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110 (17), 5818-5826.

Capítulo 1

Esta cicloadición es una de las herramientas más potentes en síntesis asimétrica debido a su capacidad para generar hasta 4 centros estereogénicos en un solo paso, en ocasiones con una elevada estereoselectividad.⁵³



Esquema 1.9.

Aunque la química de vinilsulfonas ha estado limitada durante mucho tiempo a la adición conjugada tipo Michael y a las reacciones de cicloadición, la gran versatilidad química de este grupo funcional ha quedado patente tras su empleo con éxito en otras muchas reacciones como: epoxidación quimioselectiva⁵⁴ (Esquema 1.10A) o epoxidación asimétrica⁵⁵ (Esquema 1.10B); reducción del doble enlace olefínico con hidruros⁵⁶ (NaBH_4 o $[(\text{Ph}_3\text{P})\text{CuH}]_6$) o mediante hidrogenación catalítica;⁵⁷ reacción de dihidroxilación asimétrica,⁵⁸ que conduce a α -hidroxicarbonil derivados vía 1,2-eliminación del intermedio dihidroxilado (Esquema

53. Craig, D.; Fischer, D. A.; Kemal, Ö.; Marsh, A.; Plessner, T.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J., Intramolecular diels-alder reactions of sulfonyl-substituted trienes. *Tetrahedron* **1991**, *47* (18-19), 3095-3128.

54. Baekvall, J. E.; Juntunen, S. K., 2-(Phenylsulfonyl)-1,3-dienes as versatile synthons in organic transformations. Functionalizations via epoxidation reactions. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (10), 2398-2400.

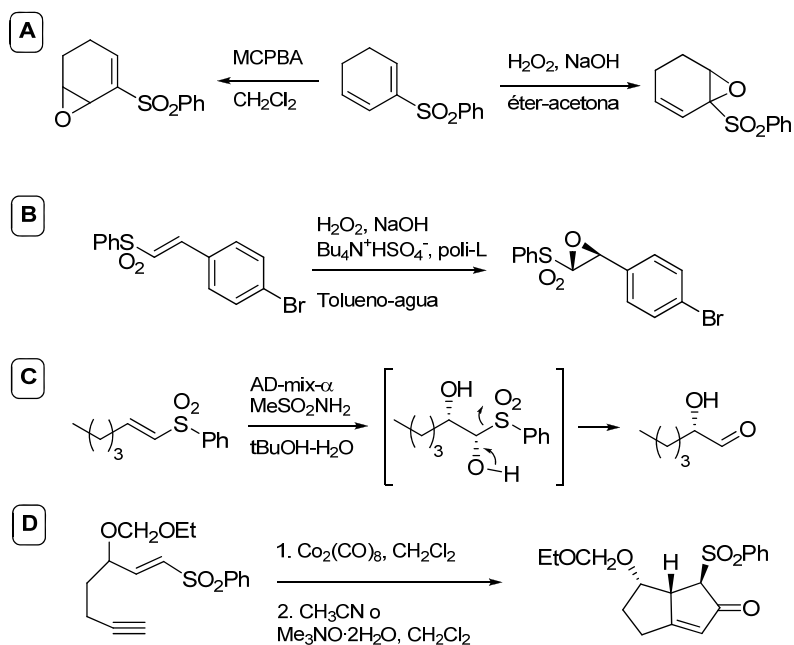
55. Lopez-Pedrosa, J.-M.; Pitts, M. R.; Roberts, S. M.; Saminathan, S.; Whittall, J., Asymmetric epoxidation of some arylalkenyl sulfones using a modified Juliá-Colonna procedure. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (26), 5073-5075.

56. Musicki, B.; Widlanski, T. S., Synthesis of nucleoside sulfonates and sulfones. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (10), 1267-1270.

57. Ranu, B. C.; Guchhait, S. K.; Ghosh, K., Chemoselective Hydrogenation of α,β -Unsaturated Sulfones and Phosphonates via Palladium-Assisted Hydrogen Transfer by Ammonium Formate. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (15), 5250-5251.

58. Evans, P.; Leffray, M., Asymmetric dihydroxylation of vinyl sulfones: routes to enantioenriched α -hydroxyaldehydes and the enantioselective syntheses of furan-2(5H)-ones. *Tetrahedron* **2003**, *59* (40), 7973-7981.

1.10C); y, finalmente, reacciones catalizadas por metales como la reacción de Pauson-Khand (Esquema 1.10D), una cicloadición promovida por cobalto entre un alqueno y un alquino con inserción de una molécula de monóxido de carbono para dar una ciclopentenona, que tiene lugar de forma intramolecular con vinilsulfonas⁵⁹ para dar lugar a biciclo[3,3,0]octenonas.



Esquema 1.10.

1.4. Equilibrio entre alil y vinilsulfonas

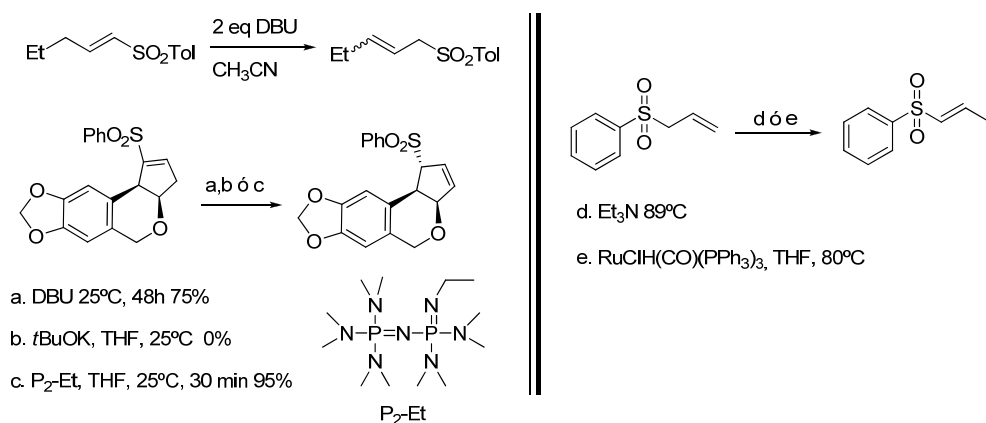
La estabilidad y el equilibrio entre sistemas α,β y β,γ insaturados en compuestos que contienen azufre difiere del comportamiento general en ésteres, cetonas, etc. donde el equilibrio está desplazado hacia sistemas α,β insaturados. En el caso de vinilsulfonas, O'Connor y col.⁶⁰ descubrieron que el equilibrio está más desplazado hacia la forma β,γ indicando que las alilsulfonas son termodinámicamente más estables que las correspondientes vinilsulfonas, hecho que se puso de manifiesto tras tratar éstas con t-BuOK en t-BuOH a t.a. dejando que se estableciera el equilibrio y determinando la proporción de ambos isómeros.

59. Adrio, J.; Rodríguez Rivero, M.; Carretero, J. C., endo-Selective Intramolecular Pauson-Khand Reactions of γ -Oxygenated- α,β -unsaturated Phenylsulfones. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7 (11), 2435-2448.

60. O'Connor, D. E.; Lyness, W. I., The Effect of Methylmercapto, Methylsulfinyl, and Methylsulfonyl Groups on the Equilibrium in Three-Carbon Prototropic Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86 (18), 3840-3846.

Capítulo 1

Hay dos consideraciones importantes en estos casos, (i) la interacción del doble enlace con orbitales *d* del azufre y (ii) los efectos inductivos. La primera debería favorecer la forma α,β -insaturada, pero su efecto es mínimo a la vista de los resultados observados. En lo que respecta a efectos inductivos, la naturaleza electrón-atrayente varía en el orden sulfuro<sulfóxido<sulfona, y es el mismo orden observado para la preferencia por el producto β,γ -insaturado, lo que indica que los efectos inductivos juegan un papel principal en la estabilidad. Sin embargo, dependiendo del patrón de sustitución de la sulfona es posible isomerizar en una u otra dirección (Esquema 1.11).



Esquema 1.11. Interconversión entre alil y vinilsulfonas

Así, el empleo de 2 equivalentes de DBU en acetonitrilo facilita la isomerización de una variedad de vinilsulfonas a los isómeros alílicos.⁶¹ Otras bases fuertes como el fosfaceno han mostrado una clara superioridad en reacciones de isomerización de vinilsulfonas a alilsulfonas⁶² frente a otras bases empleadas más habitualmente como DBU o *t*-BuOK. De forma opuesta, utilizando Et₃N a elevadas temperaturas,⁶³ o más recientemente gracias al empleo de catalizadores de rutenio⁶⁴ [RuClH(CO)(PPh₃)₃] se puede pasar del isómero alílico al vinílico.

Las alilsulfonas también actúan como potentes inhibidores de algunas clases de cisteín-proteasas como papaína, catepsinas B y L o cruzaína.⁶⁵ El

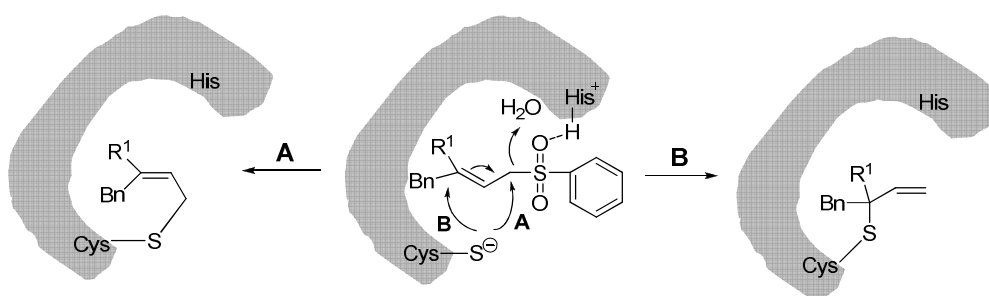
61. Inomata, K.; Hirata, T.; Suhara, H.; Kinoshita, H.; Kotake, H.; Senda, H., Stereochemistry of the conversion of γ -substituted (E)-vinyl sulfones to the corresponding allyl sulfones. Determination of the relative degree of syn-effect. *Chem. Lett.* **1988**, (12), 2009-12.

62. Jin, Z.; Kim, S. H.; Fuchs, P. L., Phosphazene base P₂-Et mediated isomerization of vinyl sulfones to allyl sulfones. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 (30), 5247-5248.

63. Sataty, I.; Meyers, C. Y., Steric influence of the sulfonyl group in equilibrations of unsaturated sulfones. Rapid bromine-catalyzed equilibrations. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15 (47), 4161-4164.

64. Kuznik, N.; Krompiec, S.; Bieg, T.; Baj, S.; Skutil, K.; Chrobok, A., Double bond migration in S-allyl systems catalysed by [RuClH(CO)(PPh₃)₃]. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 665 (1-2), 167-175.

mecanismo de actuación para la inhibición no está bien determinado. Se planteó como primera hipótesis una isomerización a la vinilsulfona catalizada por la histidina del sitio activo, aunque esta hipótesis parece poco posible debido a que la alilsulfona es más potente en la inhibición que la vinilsulfona correspondiente. Los otros dos mecanismos propuestos para la inhibición por alilsulfonas implican que la cisteína del centro activo podría desplazar directamente al ácido sulfínico en una reacción S_N2 (Esquema 1.12A) o bien atacar al doble enlace alílico con pérdida de ácido fenilsulfínico (Esquema 1.12B). Ambos mecanismos suponen la alquilación de la cisteína del centro activo, impidiendo así su función posterior.



Esquema 1.12. Mecanismos para la inhibición mediante alilsulfonas

1.5. Aplicaciones de vinilsulfonas

Un gran número de aplicaciones de las vinilsulfonas derivan de su versatilidad química y se pueden encuadrar en el campo de la síntesis orgánica⁶⁶ y el diseño de fármacos,⁴ pero existen otras aplicaciones que se tratan a continuación con más detalle:

65. Götz, M. G.; Caffrey, C. R.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Powers, J. C., Peptidyl allyl sulfones: a new class of inhibitors for clan CA cysteine proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (19), 5203-5211.

66. El-Awa, A.; Noshi, M. N.; du Jourdin, X. M.; Fuchs, P. L., Evolving Organic Synthesis Fostered by the Pluripotent Phenylsulfone Moiety. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2315-2349.

1.5.1. Aplicaciones en síntesis en fase sólida

Las vinilsulfonas han encontrado aplicación en la síntesis orgánica en fase sólida, como espaciadores sin traza (*"traceless linkers"*), donde el punto de unión no es evidente en el producto final.⁶⁷ Varias resinas de poliestireno (PS) funcionalizadas con grupos vinilsulfona se han empleado para obtener aminas terciarias y diferentes compuestos heterocíclicos haciendo uso de reacciones tipo Michael o cicloadiciones de Diels-Alder.

Como se indica en el esquema 1.13, la resina **1** obtenida a partir de la resina de Merrifield, en el tratamiento con aminas secundarias genera una vinilsulfona intermedia (**2**) que reacciona para dar el aducto aza-Michael (**3**), produciéndose después la alquilación de la amina (**4**) y la posterior separación mediante eliminación de Hofmann regenerándose así la resina y obteniendo aminas terciarias (**5**).⁶⁸ De forma similar actúa la resina **6** obtenida a partir de hidroximetilpoliestireno en la síntesis de tetrahidroisoquinoleinas N-alquiladas (**7**).⁶⁹ Por otro lado, las reacciones de cicloadición han permitido la síntesis de diferentes compuestos heterocíclicos. En primer lugar, 1,2,3-triazoles se han preparado mediante cicloadición [3+2] de azida y vinilsulfona en fase sólida **8**.⁷⁰ En segundo lugar, la resina vinilsulfona **10** reacciona mediante extrusión de SO₂ y Diels-Alder simultánea con maleimida para originar de nuevo una vinilsulfona (**11**) que sufre adición 1,3-dipolar con tosilmetilisocianuro obteniéndose derivados tetrahidroisoindólicos (**12**).⁷¹

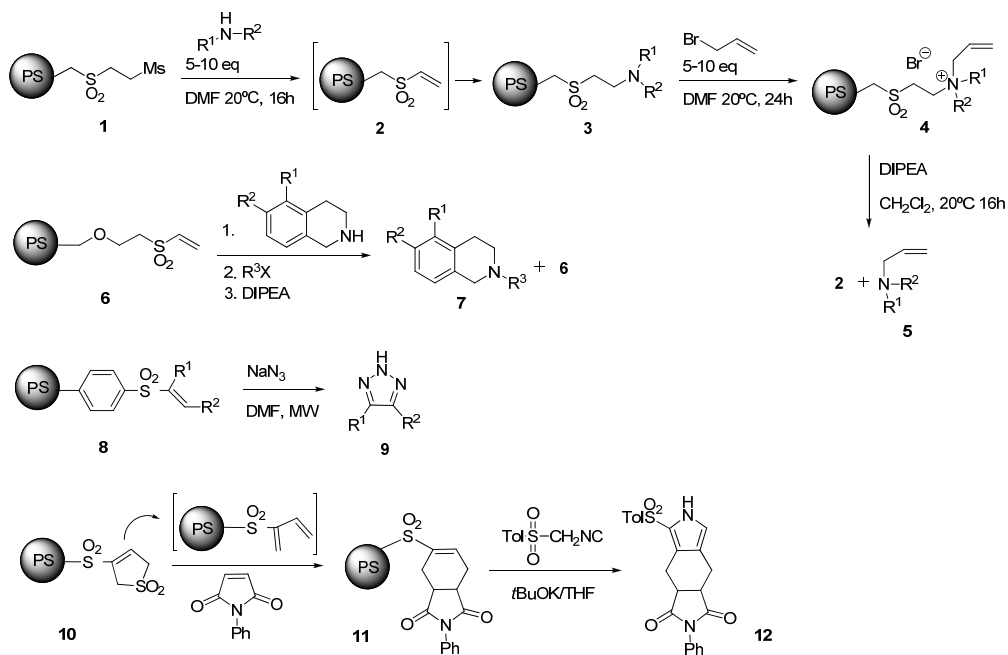
67. Blaney, P.; Grigg, R.; Sridharan, V., Traceless Solid-Phase Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (7), 2607-2624.

68. Kroll, F. E. K.; Morphy, R.; Rees, D.; Gani, D., Resin-immobilised benzyl and aryl vinyl sulfones: New versatile traceless linkers for solid-phase organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (49), 8573-8576.

69. Heinonen, P.; Lönnberg, H., A novel solid support for derivatization and subsequent N-alkylation of secondary amines: Preparation of N-alkylated 5- and 6-alkoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines via Mitsunobu reaction. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (49), 8569-8572.

70. Gao, Y.; Lam, Y., [3+2] Cycloaddition Reactions in the Solid-Phase Synthesis of 1,2,3-Triazoles. *Org. Lett.* **2006**, *8* (15), 3283-3285.

71. Cheng, W.-C.; Olmstead, M. M.; Kurth, M. J., Vinyl Sulfones in Solid-Phase Synthesis: Preparation of 4,5,6,7-Tetrahydroisoindole Derivatives. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (16), 5528-5533.



Esquema 1.13. Aplicaciones de diferentes resina-VS en síntesis en fase sólida

1.5.2. Aplicaciones biotecnológicas

➔ Agentes de entrecruzamiento

Entre las aplicaciones más destacadas de las vinilsulfonas encontramos su actuación como agentes de entrecruzamiento. La divinilsulfona (DVS) se ha empleado para entrecruzar agarosa, un polisacárido natural que constituye uno de los geles más empleados como matriz cromatográfica para la separación de biopolímeros. Al entrecruzar con DVS se consiguen unas mejores propiedades mecánicas que permiten su uso en HPLC con mayores presiones.⁷² Otros polisacáridos naturales como el dextrano,⁷³ el ácido hialurónico⁷⁴ o la celulosa⁷⁵ también se han entrecruzado con DVS para la obtención de hidrogeles,

72. Hjertén, S.; Wu, B.-L.; Liao, J.-L., An high-performance liquid chromatography matrix based on agarose cross-linked with divinyl sulphone. *J. Chrom. A* **1987**, *396*, 101-113.

73. Gehrke, S. H.; Uhdén, L. H.; McBride, J. F., Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems. *J. Contr. Release* **1998**, *55* (1), 21-33.

74. Ramamurthi, A.; Vesely, I., Smooth muscle cell adhesion on crosslinked hyaluronan gels. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60* (1), 195-205.

75. Maleki, A.; Kjøniksen, A. L.; Knudsen, K. D.; Nyström, B., Dynamical and structural behavior of hydroxyethylcellulose hydrogels obtained by chemical gelation. *Polymer Int.* **2006**, *55* (3), 365-374.

Capítulo 1

generalmente con capacidad para retener y liberar de forma controlada pequeñas moléculas actuando como fármacos.

➡ Bioconjugación

Las primeras reacciones de grupos funcionales presentes en proteínas con compuestos como metilvinilsulfona o etilvinilsulfona pusieron de manifiesto que la adición a cisteínas libres y accesibles se produce de forma eficaz en condiciones suaves,⁷⁶ además no genera subproductos de reacción, por lo que desde entonces las aplicaciones de las vinilsulfonas en bioconjugación son numerosas.

La glicosilación de proteínas es uno de los campos abordados mediante esta metodología. Así se ha llevado a cabo la modificación química de lisozima con glucopiranosilvinilsulfona (**13**),⁷⁷ o la obtención de conjugados proteína-polisacárido empleando vinilsulfonas homobifuncionales (**14** y **15**) o heterobifuncionales (**16**) (Figura 1.1), que en un primer paso reaccionan por un extremo con un polisacárido modificado con grupos amina, tiol o hidrazina, para después unirse por el otro extremo a la proteína.⁷⁸ Estos conjugados son de gran utilidad en el desarrollo de vacunas.

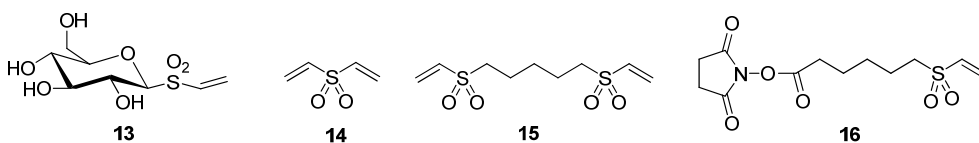


Figura 1.1. Vinilsulfonas empleadas en glicosilación de proteínas

La DVS se ha empleado también como agente de entrecruzamiento de proteínas oligoméricas.⁷⁹ Hay que mencionar que el cambio en las condiciones experimentales, principalmente en la proporción de DVS permite llevar a cabo otras aplicaciones, como es el método descrito por Houen y col.⁸⁰ para la obtención

76. Masri, M. S.; Friedman, M., Protein reactions with methyl and ethyl vinyl sulfones. *J. Protein Chem.* **1988**, *7* (1), 49-54.

77. Pérez-Balderas, F.; Hernández-Mateo, F.; López-Jaramillo, F. J.; Santoyo-González, F., Production, crystallization and X-ray characterization of chemically glycosylated hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr. F* **2005**, *61* (4), 435-438.

78. Lees, A. Preparation of protein/polysaccharide conjugate vaccines using homobifunctional and heterobifunctional vinylsulfones. 1997-US8156, 9741897, 19970509.

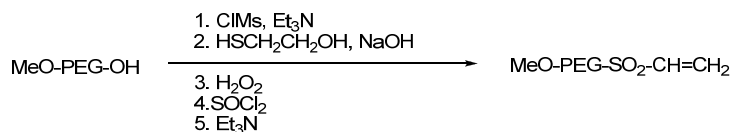
79. Sereikaitė, J.; Bassus, D.; Bobnis, R.; Dienys, G.; Bumelienė, Z.; Bumelis, V. A., Divinyl Sulfone as a Crosslinking Reagent for Oligomeric Proteins. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, *29* (3), 227-230.

80. Houen, G.; Jensen, O. M., Conjugation to preactivated proteins using divinylsulfone and iodoacetic acid. *J Immunol. Meth.* **1995**, *181* (2), 187-200.

de conjugados de péptido-proteína, preactivando la proteína con un exceso de DVS, observando que la mayoría de la proteína preactivada se encuentra en forma monomérica y es estable a -20°C durante largos periodos de tiempo permitiendo su conservación. Además, es posible controlar el grado de conjugación a grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ o $-\text{SH}$ en función del pH.

Por otro lado, los derivados de polietilenglicol (PEG) conteniendo grupos vinilsulfona merecen una alusión especial debido al número de aplicaciones y su importancia. El PEG es de gran utilidad en biotecnología y ha encontrado aplicaciones en administración de fármacos y modificación de superficies. No presenta toxicidad, es biocompatible, biodegradable y no tiende a favorecer una respuesta inmunitaria, además es soluble en agua y en muchos disolventes orgánicos. Actualmente hay numerosos PEG funcionalizados comerciales para aplicaciones en pegilación de proteínas. La adición Michael de tioles a PEG funcionalizado con maleimida es uno de los métodos más comunes de síntesis de conjugados proteína-polímero, aunque la adición sobre vinilsulfonas resulta en una mayor estabilidad hidrolítica.

Harris y col.⁸¹ prepararon por primera vez un derivado del PEG conteniendo un resto vinilsulfona a partir de metoxiPEG (Esquema 1.14) y estudiaron su reactividad frente a grupos $-\text{SH}$ de Cys y $-\text{NH}_2$ de Lys en péptidos o proteínas como la ribonucleasa (RNasa) concluyendo que el aducto formado es estable y que la reacción es selectiva para tioles a pH 7-9, teniendo que aumentar a pH 9.3 para que reaccionen los grupos amino. Posteriormente, la síntesis de PEG-VS se ha mejorado reduciendo el número de etapas⁸² al hacer reaccionar grupos $-\text{OH}$ terminales con DVS.



Esquema 1.14. Síntesis de PEG vinilsulfona

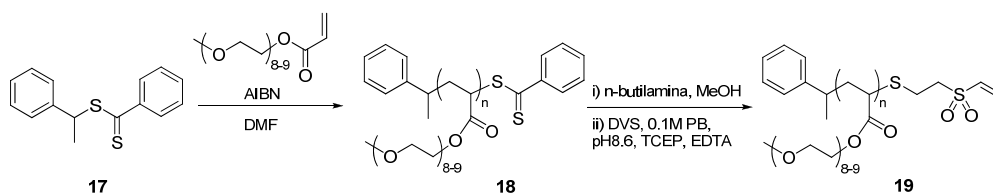
Otros polímeros conteniendo restos de PEG también se han funcionalizado con vinilsulfona para su conjugación con proteínas. Así, el polímero **18** que posee grupos ditiobenzoato, se redujo mediante aminólisis para a continuación atrapar el

81. Morpurgo, M.; Veronese, F. M.; Kachensky, D.; Harris, J. M., Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol) Vinyl Sulfone. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7 (3), 363-368.

82. Khan, A.; Marsh, A., Improved Preparation and Application of Poly(Ethylene Glycol) Vinyl Sulfone. *Synthetic Comm.* **2000**, 30 (14), 2599-2608.

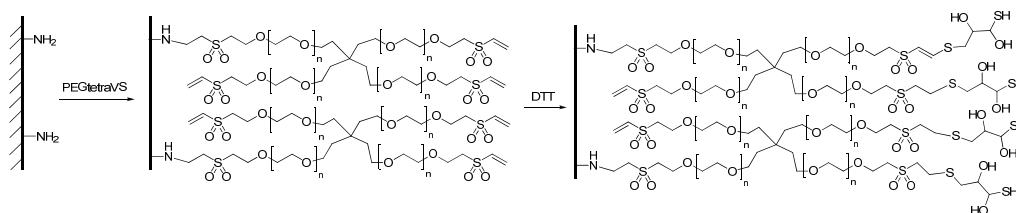
Capítulo 1

tiol resultante con DVS (Esquema 1.15), obteniéndose un polímero funcionalizado (**19**) que es capaz de originar conjugados polímero-proteína por reacción con BSA, demostrando que la BSA mantiene el 92% de su actividad.⁸³



Esquema 1.15. Obtención de polímeros para conjugación con proteínas

Los derivados PEG-VS se han empleado también para la funcionalización de superficies de forma covalente al objeto de reducir la adsorción no específica de proteínas mediante recubrimientos que pretenden avanzar en el campo de los biomateriales y biosensores. Así por ejemplo Hubbell y col.⁸⁴ han preparado copolímeros de poli-L-lisina (PLL) con cadenas laterales de PEG conteniendo grupos terminales vinilsulfona que permiten su unión con péptidos. Elbert y col.⁸⁵, han desarrollado el método LbL (“layer-by-layer”) donde una superficie de vidrio que contiene grupos amino, reacciona con PEG-tetravinilsulfona, quedando grupos vinilsulfona sin reaccionar que permiten la unión con uno de los dos grupos –SH del ditiotretitol (DTT), mientras que el otro queda libre para una nueva secuencia de reacción con PEG-VS/DTT creándose de esta manera las sucesivas capas y pudiendo controlar el espesor del recubrimiento, que influye directamente en las propiedades del material (Esquema 1.16).



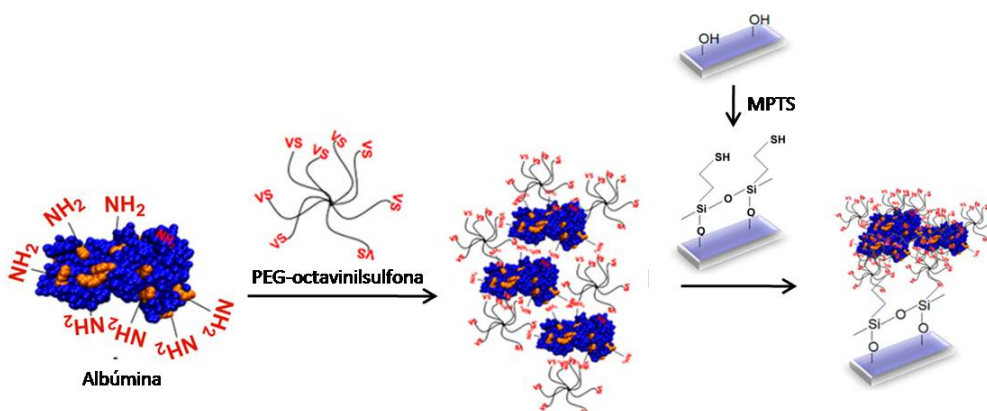
Esquema 1.16. Obtención de la primera capa del recubrimiento superficial

83. Grover, G. N.; Alconcel, S. N. S.; Matsumoto, N. M.; Maynard, H. D., Trapping of Thiol-Terminated Acrylate Polymers with Divinyl Sulfone To Generate Well-Defined Semitelechelic Michael Acceptor Polymers. *Macromolecules* **2009**, *42* (20), 7657-7663.

84. VandeVondele, S.; Vörös, J.; Hubbell, J. A., RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82* (7), 784-790.

85. Kim, J.; Wacker, B. K.; Elbert, D. L., Thin Polymer Layers Formed Using Multiarm Poly(ethylene glycol) Vinylsulfone by a Covalent Layer-by-Layer Method. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (11), 3682-3686.

Como agentes entrecruzantes, Elbert y col. han utilizado PEG modificados con múltiples ramas (PEG-octavinilsulfona) para entrecruzar albúmina, formando hidrogeles macroscópicos⁸⁶ donde la albúmina secuestra factores lipídicos como esfingosina-1-fosfato (S1P) y controla su liberación, o bien formando microgeles inmovilizados covalentemente en superficies de vidrio (Esquema 1.17) dando lugar a nuevos biomateriales.⁸⁷ Estos materiales bioactivos tienen importantes aplicaciones médicas y entre otras se pretende que fomenten la regeneración tisular. Así, Hubbell y col.⁸⁸ han desarrollado hidrogeles entrecruzando PEG-bisVS con una proteína recombinante diseñada de forma que posea restos de Cys para el entrecruzamiento, fragmentos de fibrinógeno para la adhesión celular y zonas biodegradables por la acción de proteasas.



Esquema 1.17. Funcionalización covalente superficial de microgeles por silanización con tiol derivados y posterior reacción con BSA-PEG *via* vinilsulfona. MPTS:mercaptopropiltrimetoxisilano

Buscando aplicaciones médicas similares, Park y col.⁸⁹ han obtenido estructuras anfifílicas de PEG-PLLA (poli-L-ácido láctico) con grupos terminales vinilsulfona que forman micelas poliméricas en medio acuoso y se pueden conjugar

86. Wacker, B. K.; Scott, E. A.; Kaneda, M. M.; Alford, S. K.; Elbert, D. L., Delivery of Sphingosine 1-Phosphate from Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (4), 1335-1343.

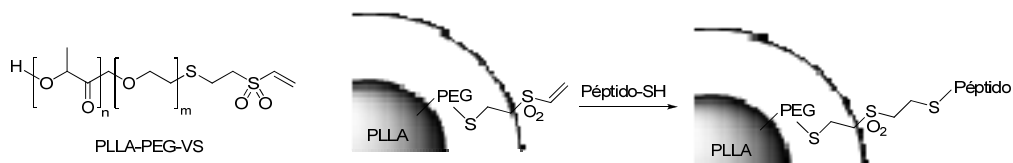
87. Scott, E. A.; Nichols, M. D.; Cordova, L. H.; George, B. J.; Jun, Y.-S.; Elbert, D. L., Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels. *Biomaterials* **2008**, *29* (34), 4481-4493.

88. Rizzi, S. C.; Hubbell, J. A., Recombinant Protein-co-PEG Networks as Cell-Adhesive and Proteolytically Degradable Hydrogel Matrixes. Part I: Development and Physicochemical Characteristics. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1226-1238.

89. Bae, J. W.; Lee, E.; Park, K. M.; Park, K. D., Vinyl Sulfone-Terminated PEG-PLLA Diblock Copolymer for Thiol-Reactive Polymeric Micelle. *Macromolecules* **2009**, *42* (10), 3437-3442.

Capítulo 1

mediante adición Michael con péptidos o proteínas que contienen cisteína (Esquema 1.18), convirtiéndose en sistemas nanotransportadores si incluyen fármacos en el interior de la micela.



Esquema 1.18.

➡ Inmovilización de biomoléculas

La alta reactividad del grupo vinilsulfona ha sido explotada para la inmovilización en soportes sólidos de distintos tipos de moléculas que cuenten en su estructura con grupos amina, tiol o hidroxilo, como es el caso de numerosas biomoléculas. Como soportes existen en el mercado poliestireno, agarosa y sefarosa funcionalizados con grupos vinilsulfona. Uno de los campos en los que más se ha empleado este tipo de soportes ha sido en el desarrollo de materiales para cromatografía de afinidad, utilizados por ejemplo para el aislamiento de lectinas como puso de manifiesto Porath y col.⁹⁰ al inmovilizar D-manosa sobre sefarosa activada con DVS y lograr el aislamiento de lectinas a partir de un extracto de semillas de *Vicia Ervilia*. También con sefarosa funcionalizada con DVS, se llevó a cabo el aislamiento de la isolectina B₄ de *Griffonia simplicifolias* a partir de una mezcla de isolectinas (A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃) gracias a la inmovilización covalente de N-acetilgalactosamina y a que la isolectina B₄ interacciona más débilmente con este soporte.⁹¹ Esta isolectina tiene gran interés porque se puede utilizar para la identificación y detección de residuos terminales de α-D-galactopiranosas en polisacáridos, glicoconjugados y superficies celulares. De forma similar, inmovilizando ConA en sefarosa a través de DVS se ha desarrollado un material para la adsorción de glicoproteínas de suero.⁹² Un estudio comparativo de la inmovilización de anticuerpos en sefarosa con el fin de preparar

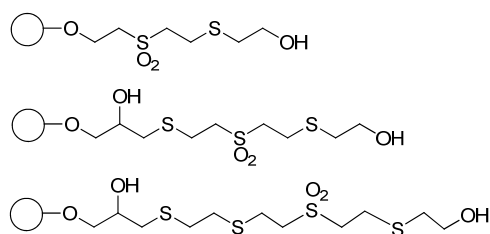
90. Fornstedt, N.; Porath, J., Characterization studies on a new lectin found in seeds of *Vicia ervilia*. *FEBS Letters* **1975**, *57* (2), 187-191.

91. Winter, H. C.; Goldstein, I. J. Facile preparation of the alpha-Gal-recognizing *Griffonia simplicifolia* I-B4 isolectin. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 153-155.

92. Zhao, Y. J.; Belew, M., The effect of various coupling methods on the adsorption of serum proteins by immobilized concanavalin A. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1986**, *8* (1), 75-82.

inmunoadsorbentes ha puesto de manifiesto las ventajas de la activación con DVS o cloruro de tresilo (2,2,2-trifluoroetanosulfonil) en cuanto a la capacidad y estabilidad alcanzada en detrimento de otros métodos que utilizan bromuro de cianógeno, carbonildiimidazol o 1,4-butanodiol diglicidil éter.⁹³

Otro tipo de materiales que derivan de los funcionalizados con vinilsulfona son las resinas tiofílicas o T-gel, que tienen ligandos lineales con dos átomos de azufre, del tipo $-OCH_2CH_2SO_2CH_2CH_2SR$, siendo R un residuo alifático pequeño (Esquema 1.19). Esa funcionalización, que se consigue por reacción del grupo vinilsulfona con tiol derivados sencillos como el mercaptoetanol, origina una gran afinidad con ciertas macromoléculas, actuando el tioéter y el grupo sulfona adyacente de forma cooperativa favoreciendo la denominada adsorción tiofílica,⁹⁴ que se ha aplicado en la purificación de anticuerpos.⁹⁵



Esquema 1.19. Estructura de algunas resinas tiofílicas

1.5.3. Aplicaciones en proteómica: ABPP

Las vinilsulfonas debido a su actuación como inhibidores enzimáticos han encontrado aplicaciones en ABPP (*Activity-Based Protein Profiling*). La técnica ABPP se ha convertido en una herramienta estándar muy potente en proteómica para la identificación rápida y selectiva de la actividad de enzimas e inhibidores en proteomas. Combinando métodos químicos, biológicos y analíticos, pequeñas moléculas que pueden ser modificadas con una etiqueta (biotina, fluoróforo, etc.) y que presentan afinidad por el centro activo de un enzima se unen a él en su forma libre para su visualización e identificación, mientras que no se unen cuando el enzima se encuentra bloqueado o como precursor inactivo. Estas sondas para ABPP

93. Ubrich, N.; Hubert, P.; Regnault, V.; Dellacherie, E.; Rivat, C., Compared stability of sepharose-based immunoabsorbents prepared by various activation methods. *J. Chrom. B Biomed. Sci. Appl.* **1992**, *584* (1), 17-22.

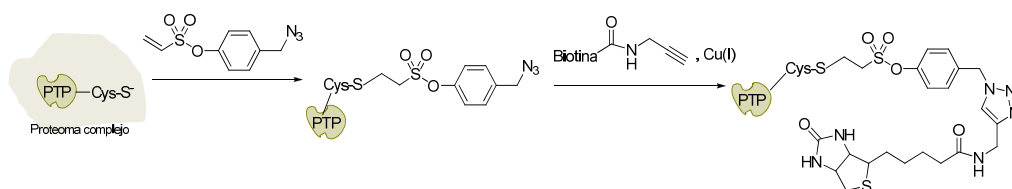
94. Porath, J.; Maisano, F.; Belew, M., Thiophilic adsorption - a new method for protein fractionation. *FEBS Letters* **1985**, *185* (2), 306-310.

95. Boschetti, E., The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2001**, *49* (1-3), 361-389.

Capítulo 1

han de presentar como elementos clave un grupo reactivo, que permita la unión de forma covalente al centro activo, así como la especificidad necesaria que ha de aportar el resto de la molécula. En este sentido, las vinilsulfonas pueden constituir la parte reactiva de compuestos que actúen como sondas en ABPP. Así se han estudiado cisteín-proteasas lisosomales y la función *in vivo* del proteasoma gracias al empleo de compuestos vinilsulfona de naturaleza peptídica y sus derivados marcados con yodo radiactivo.⁹⁶⁻⁹⁷ El proteasoma es un complejo proteico de gran tamaño que se encarga de realizar la degradación de proteínas no necesarias o dañadas. Esta degradación es muy importante en el control y la regulación de diversos procesos como el ciclo celular, la expresión génica y las respuestas al estrés oxidativo.

Más recientemente, se ha descrito el empleo de fenilvinilsulfona⁹⁸ como sonda en ABPP para estudiar la enzima PTP (Proteína Tirosina fosfatasa) que juega un papel fundamental en la regulación de procesos normales y patológicos que van desde la proliferación celular, diferenciación, metabolismo a procesos patológicos como cáncer y diabetes. Tanto el fenilvinilsulfonato como la fenilvinilsulfona son más efectivos que los inicialmente empleados (α -bromobencilfosfonatos) ya que inactivan la enzima de forma dirigida e irreversible, son estables, permeables a la membrana y además mediante la incorporación de un grupo azida en la sonda y posterior reacción de cicloadición 1,3-dipolar *in situ* con alquino biotina permiten la detección de PTP en proteomas complejos (Esquema 1.20).



Esquema 1.20.

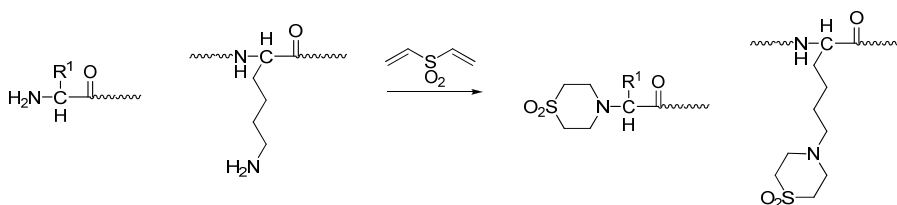
96. Bogyo, M.; Verhelst, S.; Bellingard-Dubouchaud, V.; Toba, S.; Greenbaum, D., Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (1), 27-38.

97. Bogyo, M. Peptide vinyl sulfones: inhibitors and active site directed probes for the study of proteasome function *in vivo*. (1997) PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology.

98. Liu, S.; Zhou, B.; Yang, H.; He, Y.; Jiang, Z.-X.; Kumar, S.; Wu, L.; Zhang, Z.-Y., Aryl Vinyl Sulfonates and Sulfones as Active Site-Directed and Mechanism-Based Probes for Protein Tyrosine Phosphatases. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (26), 8251-8260.

1.5.4. Otras aplicaciones

En el campo de la química analítica, compuestos como la DVS o metilvinilsulfona se han empleado como agentes de derivatización. La DVS permite la derivatización de aminas primarias mediante una reacción de ciclación para su detección electroquimioluminiscente con un complejo de rutenio.⁹⁹ Esta reactividad de aminas primarias con DVS se ha explotado también en proteómica, concretamente en secuenciación de proteínas mediante el análisis LC-MS/MS de los péptidos resultantes tras la digestión (Esquema 1.21), donde la derivatización con DVS de residuos N-terminales, lisinas e histidinas aumenta la sensibilidad de la señal.¹⁰⁰ Por otro lado, derivatizando pseudouridina con metilvinilsulfona se logra la detección en mezclas de nucleósidos por HPLC-MS.¹⁰¹ Como aplicaciones puramente industriales cabe destacar el empleo de compuestos vinilsulfona como tintes reactivos para un gran número de sustratos como algodón, nylon, papel, pieles animales e incluso fibras queratinosas como el cabello humano.¹⁰²⁻¹⁰⁴



Esquema 1.21. Derivatización de aminas primarias en péptidos con DVS

99. Uchikura, K.; Kirisawa, M.; Sugii, A., Electrochemiluminescence detection of primary amines using tris(bipyridine)ruthenium(III) after derivatization with divinylsulfone. *Anal. Sci.* **1993**, *9* (1), 121-3.

100. Boja, E. S.; Sokoloski, E. A.; Fales, H. M., Divinyl Sulfone as a Postdigestion Modifier for Enhancing the a1 Ion in MS/MS and Postsource Decay: Potential Applications in Proteomics. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (14), 3958-3970.

101. Emmerechts, G.; Herdewijn, P.; Rozenski, J., Pseudouridine detection improvement by derivatization with methyl vinyl sulfone and capillary HPLC-mass spectrometry. *J. Chrom. B* **2005**, *825* (2), 233-238.

102. Morel, O. J. X.; Christie, R. M., Current Trends in the Chemistry of Permanent Hair Dyeing. *Chem. Rev.* **2011**, doi: 10.1021/cr1000145.

103. Heyna, J.; Schumacher, W. Dyes containing a vinyl sulfone. 1950-201859,2657205, 19501220., 1953.

104. Burkinshaw, S. M.; Wills, A. E., The dyeing of conventional and microfibre nylon 6,6 with reactive dyes-3. Vinyl sulphone and chlorotriazine dyes. *Dyes and Pigments* **1997**, *34* (3), 243-253.

**Capítulo 2. SULFATOS CÍCLICOS. REACTIVIDAD Y
APLICACIONES EN LA SÍNTESIS DE ALIL Y
VINILSULFONAS**

Capítulo 2.

Sulfatos cíclicos. Reactividad y aplicaciones en la síntesis de alil y vinilsulfonas

2.1. Sulfatos cíclicos. Generalidades

Los sulfatos cíclicos (1,3,2-dioxatolano 2,2-dióxidos) son un tipo especial de ésteres sulfónicos que han demostrado ser sintones versátiles en química orgánica. Aunque la química de sulfitos y sulfatos cíclicos derivados de dioles se conoce desde hace tiempo,¹⁰⁵ su uso sintético ha adquirido importancia tras el desarrollo de métodos efectivos para su preparación, aunque aún no alcanzan la importancia sintética que presentan los epóxidos, de los cuales se pueden considerar equivalentes sintéticos. El desarrollo de la dihidroxilación asimétrica¹⁰⁶ como herramienta para obtener 1,2-dioles ópticamente puros a partir de olefinas y la oxidación catalítica de sulfitos cíclicos con RuO₄ y NaIO₄ como co-oxidante¹⁰⁷ permiten un fácil acceso a sulfatos cíclicos y han propiciado un aumento en sus aplicaciones como intermedios sintéticos. La química de sulfitos y sulfatos cíclicos en cuanto a síntesis y reactividad se ha recogido en diferentes revisiones,¹⁰⁸⁻¹¹⁰ así como sus aplicaciones en el campo de la química de carbohidratos¹¹¹ donde se ha explotado la sustitución nucleofílica bimolecular para preparar compuestos de importancia química y biológica.

105. Baker, W.; Field, F. B., Cyclic esters of sulphuric acid. Part II. The constitution of methylene and glyoxal sulphates, and the reaction of methylene sulphate with tertiary bases. *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1932**, 86-91.

106. Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B., Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2483-2547.

107. Gao, Y.; Sharpless, K. B., Vicinal Diol Cyclic sulfates: Like epoxides only more reactive. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7538-7539.

108. Byun, H. S.; He, L. L.; Bittman, R., Cyclic Sulfites and Cyclic Sulfates in Organic-Synthesis. *Tetrahedron* **2000**, *56* (37), 7051-7091.

109. Lohray, B. B.; Bhushan, V., 1,3,2-Dioxathiolane Oxides: Epoxide Equivalents and Versatile Synthons. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1997**, *68*, 89-180.

110. Lohray, B. B., Cyclic sulfides and cyclic sulfates: Epoxide like synthons. *Synthesis* **1992**, 1035-1052.

111. Megia-Fernandez, A.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthetic Applications of Cyclic Sulfites, Sulfates and Sulfamidates in Carbohydrate Chemistry. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 401-432.

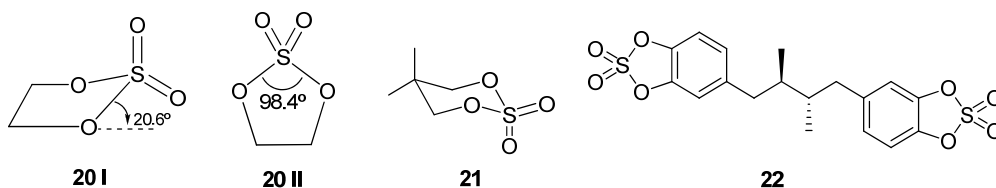


Figura 2.1. Estructura de diferentes sulfatos cíclicos

Los estudios de la estructura mediante rayos X de sulfatos cíclicos se han basado en etilensulfatos,¹¹² y han mostrado que estos ciclos de cinco miembros presentan una conformación plegada (**20 I**) con un ángulo O-S-O de 98.4° (**20 II**), inferior al de la forma tetraédrica, mientras que los sulfatos cíclicos de 6 miembros presentan conformación de silla (**21**).

Por sí mismos, la alta reactividad de sulfatos y sulfitos cíclicos de cinco miembros hace a estos compuestos tóxicos por sus propiedades bioalquilantes. Recientemente se ha demostrado que el sulfato cíclico **22** derivado del ácido nordihidro-guayarático (NDGA) posee actividad anticancerígena *in vitro*.¹¹³ Algunos sulfitos cíclicos tienen propiedades antimicrobianas y antifúngicas.

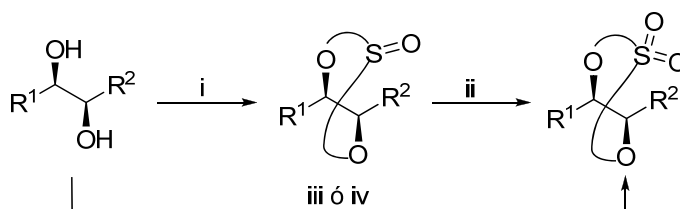
El importante papel que pueden llevar a cabo los sulfatos cíclicos en síntesis orgánica deriva de una serie de propiedades. Primero, poseen una elevada reactividad hacia nucleófilos que es superior a la de los epóxidos. Segundo, permiten activar una de las dos posiciones oxigenadas de los dioles para el ataque nucleofílico mientras que actúan como grupo protector de la otra posición oxigenada; en condiciones más energéticas pueden servir como activadores para sustituciones dobles, en procesos secuenciales. En tercer lugar, la reacción de sulfatos cíclicos de cinco miembros con nucleófilos genera dos estereocentros contiguos; además, un estereocentro remoto se puede controlar mediante sulfatos cíclicos de 1,3- y 1,4-dioles. Finalmente, puesto que el intermedio de la sustitución nucleofílica es generalmente la sal del éster monosulfato, la purificación del producto es un proceso que suele ser sencillo.

112. Boer, F. P.; Flynn, J. J.; Kaiser, E. T.; Zaborisky, O. R.; Tomalia, D. A.; Young, A. E.; Tong, Y. C., The structure and reactivity of cyclic esters. Ethylene sulfate and vinylene sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (11), 2970-2971.

113. Meyers, R. O.; Lambert, J. D.; Hajicek, N.; Pourpak, A.; Kalaitzis, J. A.; Dorr, R. T., Synthesis, characterization, and anti-melanoma activity of tetra-O-substituted analogs of nordihydroguaiaretic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (16), 4752-4755.

2.2. Síntesis de sulfatos cíclicos

El método más usual y sencillo para preparar sulfatos cíclicos a partir de dioles consiste en un proceso en dos etapas: diol \rightarrow sulfito cíclico \rightarrow sulfato cíclico (Esquema 2.1). En un procedimiento clásico los sulfitos cíclicos se preparan por reacción de un diol (1,2-, 1,3- y 1,4-dioles) con cloruro de tionilo (SOCl_2) y una base orgánica adecuada, generalmente trietilamina o piridina para neutralizar el HCl generado. La oxidación posterior se alcanza con buenos resultados usando las condiciones de Gao y Sharpless,¹⁰⁷ que emplean NaIO_4 en cantidades estequiométricas como co-oxidante y RuCl_3 en cantidad catalítica generando *in situ* la especie oxidante RuO_4 . También se pueden preparar los sulfatos cíclicos de forma directa por tratamiento con cloruro de sulfurilo¹¹⁴ (SO_2Cl_2) o 1,1-sulfurildiimidazol,¹¹⁵ aunque los rendimientos suelen ser menores debido a reacciones competitivas.



i) SOCl_2 , Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C ; ii) NaIO_4 , cat RuCl_3 , $\text{CCl}_4/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 0°C -t.a.; iii) SO_2Cl_2 , AcOEt , 0°C ;
iv) Im_2SO_2 , DMF , -40°C

Esquema 2.1. Síntesis de sulfatos cíclicos a partir de dioles

En un intento más por hacer accesibles los sulfatos cíclicos a partir de diferentes grupos funcionales se han desarrollado otros métodos de síntesis menos habituales (Esquema 2.2):

- A) Tratamiento de dioles con fenilclorosulfato e hidruro sódico.¹¹⁶ Inicialmente se forma el mono-fenilsulfato, que por desplazamiento intramolecular origina el sulfato cíclico.
- B) Halociclación de monosulfatos insaturados con reactivos electrofílicos.¹¹⁷ En función de la geometría del alqueno se pueden obtener sulfatos cíclicos de 5 o 6 miembros.

114. Alonso, M.; Riera, A., Improved preparation of β -hydroxy- α -amino acids: direct formation of sulfates by sulfonyl chloride. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (23), 3908-3912.

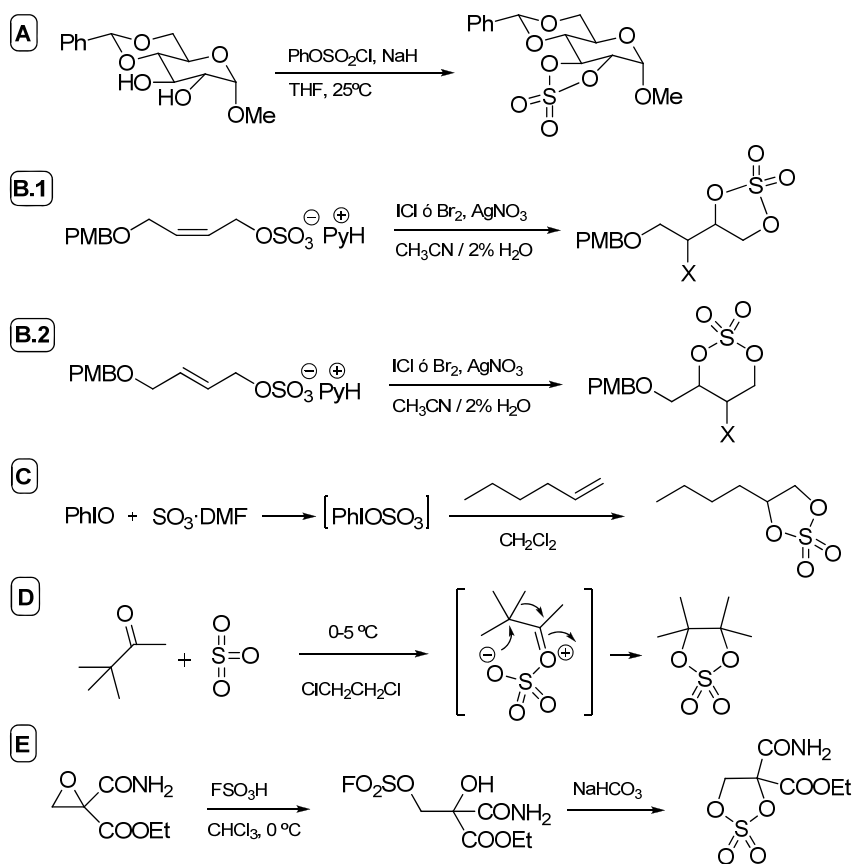
115. Fuentes, J.; Angulo, M.; Pradera, M. A., Fluoronucleosides, Isothiocyanato C-Nucleosides, and Thioureyline Di-C-nucleosides via Cyclic Sulfates. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (8), 2577-2587.

116. Abdel-Malik, M. M.; Perlin, A. S., Reactions of phenyl chlorosulfate at OH-2 and OH-3 of aldohexopyranose derivatives. Competing substitution and displacement reactions. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190* (1), 39-52.

117. Steinmann, J. G.; Phillips, J. H.; Sanders, W. J.; Kiessling, L. L., Synthesis of Cyclic Sulfates by Halocyclization. *Org. Lett.* **2001**, *3* (22), 3557-3559.

Capítulo 2

- C) Reacción de alquenos con PhIO (oxiyodobenceno) y SO₃.¹¹⁸ Ambos reactivos en DMF generan fenilyodosulfato que reacciona con el alqueno para dar el sulfato cíclico.
- D) Reagrupamiento de tipo retro-pinacolínico de la pinacolona con SO₃ a baja temperatura.¹¹⁹
- E) Apertura de epóxidos con ácido fluorosulfúrico y posterior tratamiento con base.¹²⁰



Esquema 2.2. Síntesis de sulfatos cíclicos mediante métodos alternativos

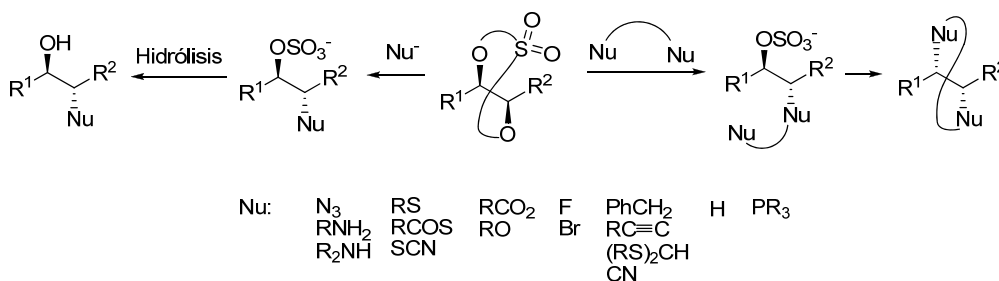
118. Robinson, R. I.; Woodward, S., Direct formation of cyclic sulfates utilising hypervalent iodine species and sulfur trioxide adducts. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (8), 1655-1657.

119. Sheehan, J. C.; Zoller, U., Sulfonation of unsaturated compounds. I. Sulfonation of branched chain ketones with sulfur trioxide. One-step synthesis of tetramethylene sulfate through a retro pinacol-type rearrangement. *J. Org. Chem.* **1974**, *39* (23), 3415-3416.

120. Poorker, C. S.; Kagan, J., The facile addition of fluorosulfuric acid to an epoxide. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (52), 6405-6408.

2.3. Reactividad de sulfatos cíclicos

La elevada reactividad de los sulfatos cíclicos se debe principalmente a la tensión de anillo, que se atribuye a tres factores: (i) la tensión angular, (ii) el carácter parcial de doble enlace entre los átomos de oxígeno del anillo y el átomo de azufre, y (iii) las interacciones 1,3-no enlazantes entre átomos de oxígeno del anillo y oxígeno exocíclico. Además, el carácter de buen grupo saliente de ROSO_3^- determina que los sulfatos cíclicos de 5 miembros sean altamente reactivos. Análogos a los epóxidos, los sulfatos cíclicos pueden sufrir la apertura por la acción de nucleófilos en cualquiera de sus centros carbonados, pero el resultado no es un alcohol sino un sulfato monoéster, que permite una serie de transformaciones posteriores que hacen a la química de sulfatos cíclicos más versátil.



Esquema 2.3. Apertura de sulfatos cíclicos con nucleófilos

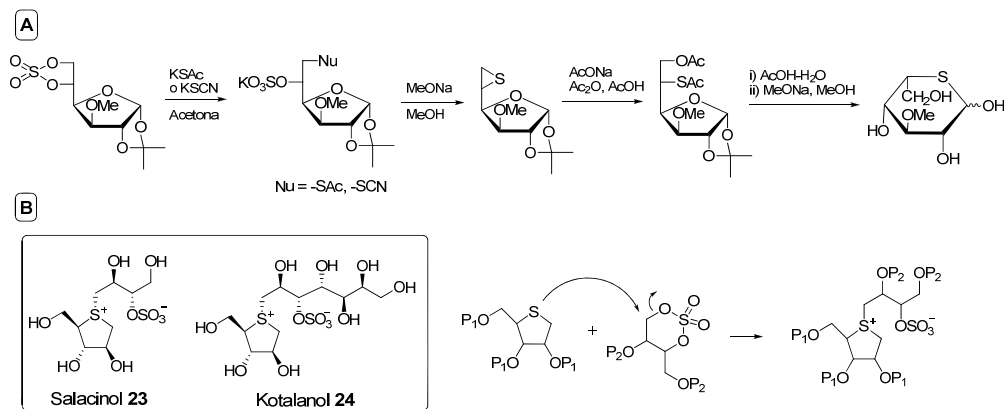
La hidrólisis posterior del producto de apertura conduce al compuesto hidroxilado; sin embargo, el monosulfato puede actuar como grupo saliente y ser nuevamente desplazado por un nucleófilo en una segunda etapa permitiendo la sustitución de ambos grupos oxigenados que constituían el sulfato cíclico. Como el grupo saliente SO_4^{2-} es peor que ROSO_3^- el segundo desplazamiento es más difícil que el primero, aunque suele estar favorecido cuando se emplean nucleófilos bidentados produciéndose el segundo desplazamiento de forma intramolecular.

Los sulfatos cíclicos pueden ser abiertos por una gran variedad de nucleófilos¹⁰⁸ (Esquema 2.3): nitrogenados (azida, aminas primarias y secundarias), azufrados (tioles, tioacetatos, tiocianatos), oxigenados (fenolatos, alcóxidos, carboxilatos, óxidos de amina), halogenados, carbonados (enolatos, reactivos de Grignard y otros organometálicos, ciano, tioacetales), hidrogenados (hidruro) y fosforados (fosfinas).

La apertura nucleofílica de sulfatos cíclicos forma parte de numerosas estrategias sintéticas para acceder a moléculas de interés. Así, se han abordado por

Capítulo 2

ejemplo la obtención de glicerolípidos,¹²¹ la preparación de disacáridos con azufre como puente interglucosídico,¹²² o la obtención de episulfuros derivados de azúcares¹²³ por reacción de sulfatos cíclicos con tioacetato o tiocianato potásico seguido del tratamiento con metóxido sódico (Esquema 2.4A). Además estos episulfuros permiten acceder a tioazúcares de forma sencilla por apertura del episulfuro con acetato sódico.¹²³⁻¹²⁴



Esquema 2.4.

Es de resaltar también el empleo de sulfatos cíclicos en la síntesis de salacínol (**23**), kotalanol (**24**) y un gran número de análogos.¹²⁵⁻¹²⁶ Esta familia de compuestos actúan como inhibidores de glicosidas por lo que presentan aplicaciones terapéuticas, principalmente en el tratamiento de la diabetes. Poseen estructuras heterocíclicas zwitteriónicas de tipo sulfato-sulfonio, alquiladas en el

121. He, L.; Byun, H.-S.; Bittman, R., A New Synthetic Route to Chiral Glycerolipid Precursors Using a Cyclic Sulfate Synthone: Preparation of 1-O-Hexadecyl-3-O-(4'-methoxyphenyl)- sn-glycerol and its 1-Thio and 1-Aza Analogues. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (16), 5696-5699.

122. Calvo-Asín, J. A.; Calvo-Flores, F. G.; Exposito-Lopez, J. M.; Hernandez-Mateo, F.; Garcia-Lopez, J. J.; Isac-García, J.; Santoyo-Gonzalez, F.; Vargas-Berenguel, A., Expedient synthesis of monosulfated thio-linked disaccharides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1.* **1997**, 1079-1081.

123. Calvo-Flores, F. G.; Garcia-Mendoza, P.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-García, J.; Santoyo-Gonzalez, F., Applications of Cyclic Sulfates of vic-Diols: Synthesis of Episulfides, Olefins, and Thio Sugars. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (12), 3944-3961.

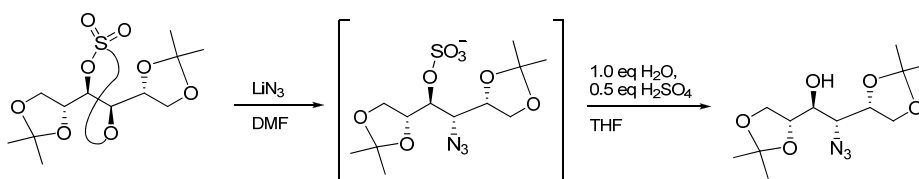
124. Isac-García, J.; Calvo-Flores, F. G.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of disaccharides, containing sulfur in the ring of the reducing monosaccharide unit, through a nonglycosylating chemical strategy. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5* (5), 1512-1525.

125. Mohan, S.; Pinto, B. M., Zwitterionic glycosidase inhibitors: salacínol and related analogues. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (12-13), 1551-1580.

126. Jayakanthan, K.; Mohan, S.; Pinto, B. M., Structure Proof and Synthesis of Kotalanol and De-O-sulfonated Kotalanol, Glycosidase Inhibitors Isolated from an Herbal Remedy for the Treatment of Type-2 Diabetes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (15), 5621-5626.

azufre con una cadena acíclica polihidroxilada, fácilmente accesibles a partir de sulfatos cíclicos (Esquema 2.4B).

De forma general, la hidrólisis de los sulfato monoésteres obtenidos en la apertura nucleofílica a β -hidroxicompuestos se puede llevar a cabo por tratamiento con cantidades catalíticas de ácido sulfúrico y 0.5-1.0 equivalentes de agua en THF.¹²⁷ Estas condiciones son suficientemente suaves para ser toleradas por grupos sensibles a los ácidos, por ejemplo acetónidos, permitiendo así una hidrólisis quimioselectiva cuando estos otros grupos están presentes (Esquema 2.5).



Esquema 2.5. Apertura nucleofílica e hidrólisis quimioselectiva de sulfatos cíclicos

La regioselectividad en la apertura nucleofílica está controlada por dos factores que actúan simultáneamente:

- a) interacciones estéricas entre sustrato y nucleófilo, que conducen al producto de ataque en la posición menos sustituida.
- b) distribución electrónica del sustrato. Se puede conseguir cambios en la regioselectividad empleando sulfatos cíclicos con sustituyentes que ejerzan efectos electrónicos determinados.¹²⁸

En lo que respecta a la estereoselectividad, la mayoría de las aperturas nucleofílicas transcurren mediante un mecanismo S_N2 y por tanto con inversión de la configuración en el centro estereogénico.

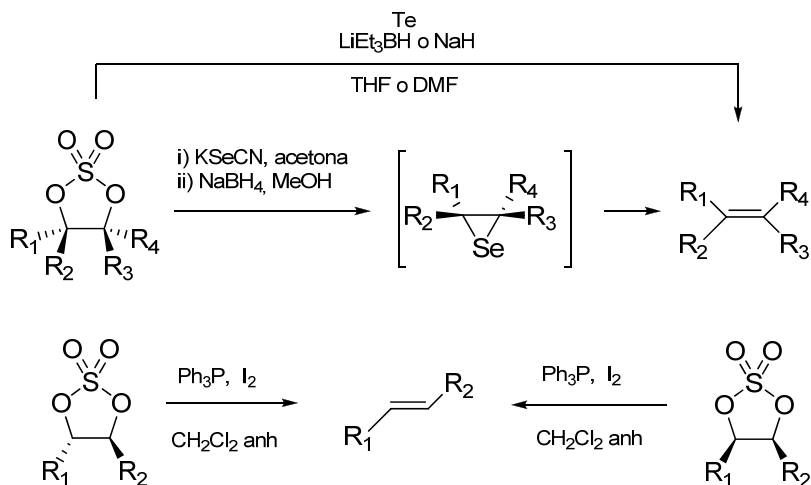
Además de la apertura nucleofílica, los sulfatos cíclicos pueden sufrir otras reacciones que conducen a la eliminación obteniendo olefinas (Esquema 2.6). Mediante el tratamiento de sulfatos cíclicos con Te^{2-} generado *in situ* a partir del metal y un agente reductor se han preparado una variedad de alquenos incluyendo

127. Kim, B. M.; Sharpless, K. B., Cyclic sulfates containing acid-sensitive groups and chemoselective hydrolysis of sulfate esters. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (6), 655-658.

128. Avenoz, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; García, J. I.; Peregrina, J. M., Understanding the Unusual Regioselectivity in the Nucleophilic Ring-Opening Reactions of gem-Disubstituted Cyclic Sulfates. Experimental and Theoretical Studies. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (11), 4506-4513.

Capítulo 2

derivados de manosa y ribosa.¹²⁹ Por otro lado, el doble desplazamiento nucleofílico con seleniocianato potásico y reducción “one-pot” con borohidruro sódico origina un intermedio selenirano que es inestable y en esas condiciones se transforma en la olefina correspondiente.¹²³ Otra variante de eliminación de sulfatos cíclicos consiste en el tratamiento con trifenilfosfina y yodo. El mecanismo propuesto supone la apertura con diiodofosforano generado *in situ* y la eliminación gracias a otra molécula de diiodofosforano, obteniéndose en todos los casos el isómero *trans*.¹³⁰



Esquema 2.6. Obtención de olefinas a partir de sulfatos cíclicos

2.4. Discusión y resultados

Como se ha comentado, los sulfatos cíclicos han sido aplicados con éxito en numerosas transformaciones químicas. En nuestro caso se pretende que los sulfatos cíclicos sirvan como intermedios para la síntesis de sulfonas insaturadas. Un caso especial de los sulfatos cíclicos son aquellos que contienen un grupo sulfona en posición β , de los cuales hasta el momento no hay antecedentes en bibliografía. Teniendo en cuenta estos hechos se llevó a cabo en primer lugar la síntesis del compuesto 4-(bencilsulfonilmetil)-1,3,2-dioxatolano-2,2-dióxido (**28**) (Esquema 2.7) como un modelo sencillo de este tipo de sulfatos cíclicos para el estudio de su reactividad en la apertura con diferentes nucleófilos. La elección del compuesto **28**

129. Chao, B.; McNulty, K. C.; Dittmer, D. C., Alkenes from cyclic sulfates and thionocarbonates of 1,2-diols via tellurium chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (40), 7209-7212.

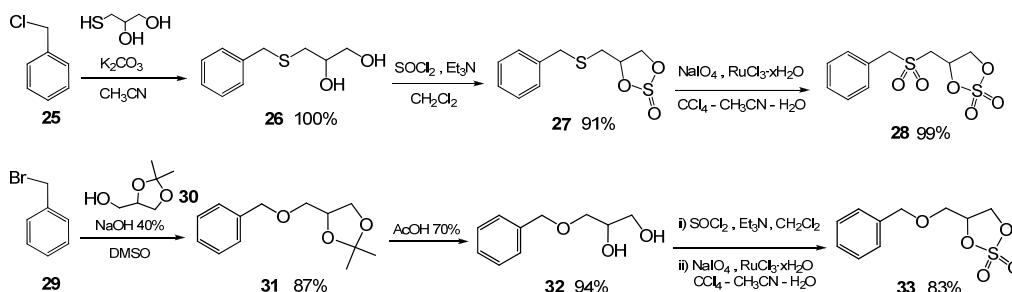
130. Jang, D. O.; Joo, Y. H.; Cho, D. H., A Facile Route to Olefins from Vic-Diols Via Cyclic Sulfates with Triphenylphosphine and Iodine. *Synth. Commun.* **1997**, 27 (14), 2379-2386.

se ha basado en la facilidad de su síntesis y en la presencia de un grupo fenilo poco reactivo en la segunda de las posiciones β del grupo sulfona.

Adicionalmente y al objeto de estudiar la influencia del grupo sulfona adyacente en la reactividad de este tipo de sustratos, se consideró oportuno realizar también un estudio de reactividad paralelo con el correspondiente análogo oxigenado 4-(benciloximetil)-1,3,2-dioxatolano-2,2-dióxido (**33**) (Esquema 2.7).

2.4.1. Síntesis de sulfatos cíclicos

La síntesis de sulfatos cíclicos con un grupo sulfona en posición β se abordó mediante una estrategia sencilla haciendo uso de tioglicerol como producto de partida, ya que este compuesto aporta el diol necesario para la preparación del sulfato cíclico y el átomo de azufre para la obtención del grupo sulfona. La reacción de sustitución nucleofílica de cloruro de bencilo con tioglicerol en medio básico, origina de forma cuantitativa el compuesto dihidroxilado **26**. De forma similar, el compuesto oxigenado análogo (**32**) se obtuvo fácilmente a partir de 1,2-*O*-isopropilidenglicerol (**30**) en dos etapas: (a) tratamiento en medio básico con bromuro de bencilo, que condujo al compuesto **31** y (b) desprotección del cetal de **31** con ácido acético (Esquema 2.7).



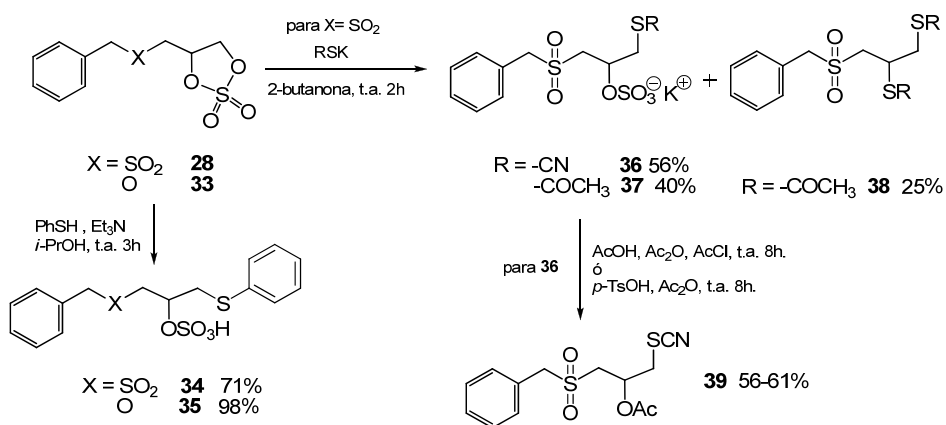
Esquema 2.7. Síntesis de sulfatos cíclicos **28** y **33**

Los correspondientes sulfatos cíclicos **28** y **33** derivados de los dioles **26** y **32** respectivamente, se obtuvieron por el método de Gao y Sharpless:¹⁰⁷ formación del sulfito cíclico con cloruro de tionilo y oxidación catalítica. En el caso del sulfato cíclico **28**, el sulfito intermedio **27** se aisló en una primera etapa, consiguiendo separar mediante cromatografía en columna los dos diastereoisómeros correspondientes a dos centros estereogénicos, en proporción 1:1. Ambos muestran ligeras diferencias en los espectros de ^1H -RMN. En la segunda etapa se produce simultáneamente la oxidación del sulfito cíclico a sulfato cíclico y del sulfuro a sulfona.

2.4.2. Reactividad con nucleófilos

El tratamiento de los sulfatos cíclicos **28** y **33** con nucleófilos azufrados como el tiofenol, originó en ambos casos de forma regioselectiva el producto de apertura en el carbono menos impedido estéricamente (compuestos **34** y **35**) (Esquema 2.8). De igual forma se obtuvieron los compuestos **36** y **37** tras la apertura del sulfato cíclico **28** con tioacetato y tiocianato potásico como nucleófilos azufrados respectivamente. Hay que resaltar que en el tratamiento del sulfato cíclico **28** con tioacetato potásico, además del producto esperado **37** que es mayoritario, se obtiene el compuesto **38** de doble sustitución como producto minoritario, cuya formación se abordará después con más detalle (Sección 2.4.3).

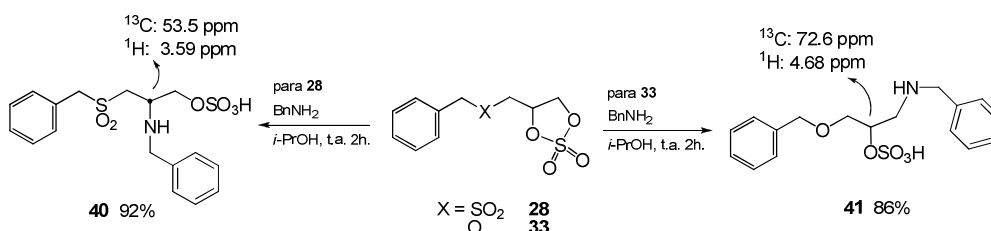
En el caso del producto de apertura con tiocianato potásico (compuesto **36**) se llevó a cabo la hidrólisis del grupo sulfato y acetilación *in situ* del crudo de reacción, en una sola etapa, usando dos procedimientos distintos: tratamiento con una mezcla de ácido acético, cloruro de acetilo y anhídrido acético o bien mediante el tratamiento con anhídrido acético y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico. En los dos casos se obtiene directamente el producto acetilado **39** a partir del monosulfato (Esquema 2.8). No se han encontrado antecedentes en bibliografía de esta transformación, aunque sí se han descrito numerosos ejemplos de acetilación aislando el compuesto hidroxilado tras hidrolizar con H₂SO₄ y acetilando después de forma convencional.¹³¹



Esquema 2.8. Reactividad de sulfatos cíclicos con nucleófilos azufrados

131. Sugimura, H.; Hosogai, N., Studies toward Stable Analogues of Guanofosfocins. Synthesis of the Protected Derivative of 8-(5a-Carba- α -D-mannopyranosyloxy)purine Nucleoside. *Chem. Lett.* **2007**, 36 (1), 36-37.

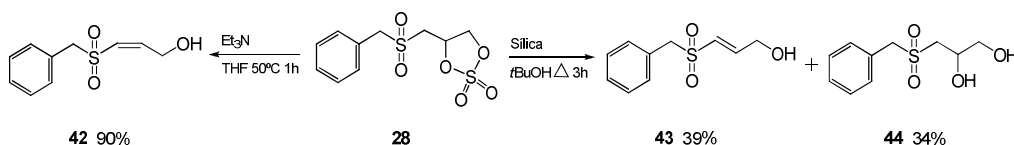
La apertura con nucleófilos nitrogenados de los sulfatos cíclicos **28** y **33** se llevó a cabo con bencilamina. En este caso ambos compuestos muestran diferente comportamiento dando lugar a distintos regioisómeros (Esquema 2.9). El sulfato cíclico **28** origina el producto de ataque en la posición más sustituida con excelente rendimiento, a diferencia de lo esperado y observado cuando se emplea el sulfato cíclico **33** que no posee el grupo sulfona adyacente. Los datos de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C -RMN para el -CH- en los compuestos **40** ($\delta^{13}\text{C}$: 53.5 ppm, ^1H : 3.59 ppm) y **41** ($\delta^{13}\text{C}$: 72.6 ppm, ^1H : 4.68 ppm) ponen de manifiesto que en el compuesto **40** el -CH- se encuentra unido a nitrógeno mientras que en el compuesto **41** el -CH- está unido a oxígeno; la formación del compuesto **40** se discute más adelante (Sección 2.4.3).



Esquema 2.9. Reactividad de sulfatos cíclicos con nucleófilos nitrogenados

2.4.3. Tratamiento en medio básico y ácido suave

La especial reactividad que manifiesta el sulfato cíclico **28**, donde confluyen en las posiciones vecinales de un grupo metileno las dos funcionalidades sulfona y sulfato cíclico, se confirmó mediante tratamiento en medio básico y ácido suave (Esquema 2.10). Al tratar el compuesto **28** con trietilamina a 50°C , en sólo una hora de reacción el sulfato cíclico se transforma en la *cis*-vinilsulfona **42** con un rendimiento del 90%. En bibliografía encontramos un comportamiento similar para epóxidos¹³² y tiiranos¹³³ con un sustituyente $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}$; este tipo de compuestos



Esquema 2.10. Reactividad de sulfatos cíclicos en medios ácido y básico suaves

132. Palmer, R. J.; Stirling, C. J. M., Elimination and addition reactions. 36. Acceleration of nucleophilic eliminative ring fission by bond strain. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7888-92.

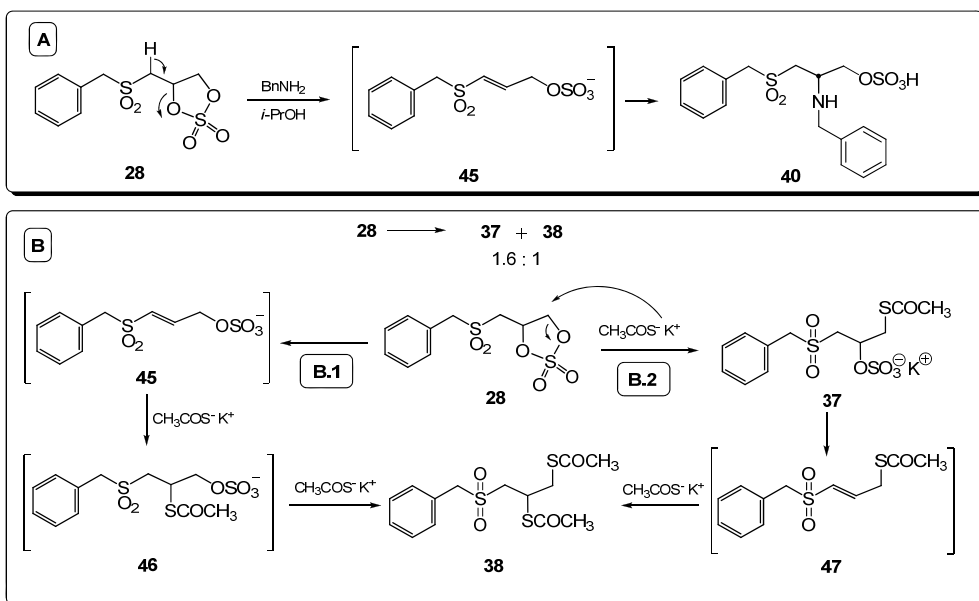
133. Forbes, C.; Shi, Q.; Fisher, J. F.; Lee, M.; Heseck, D.; Llarrull, L. I.; Toth, M.; Gossing, M.; Fridman, R.; Mobashery, S., Active Site Ring-Opening of a Thiirane Moiety and Picomolar Inhibition of Gelatinases. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74* (6), 527-534.

Capítulo 2

sufre eliminación (E2) en medio básico confirmando que se trata de compuestos relativamente lábiles. Alternativamente, en el tratamiento del compuesto **28** en presencia de sílica en t-BuOH a reflujo durante 3 h se consume el sulfato cíclico dando lugar a una mezcla de la vinilsulfona **43**, que posee conformación *trans* en el doble enlace olefínico ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 15.1$ Hz), isómero geométrico del anterior y el diol **44**, correspondiente a la hidrólisis total del grupo sulfato (Esquema 2.10).

Para el sulfato cíclico **33**, que carece de grupo sulfona en posición β , ni el tratamiento con sílica en caliente ni con trietilamina afectan a su estructura, recuperándose el producto de partida con rendimientos superiores al 95% en los dos casos.

A la vista de estos resultados se podría explicar la formación del compuesto **40** anterior procedente del ataque con bencilamina a través de un intermedio vinilsulfona (**45**), formado en el medio básico que proporciona la bencilamina y la posterior adición aza-Michael de bencilamina a la vinilsulfona generada, como se indica en el esquema 2.11A.



Esquema 2.11.

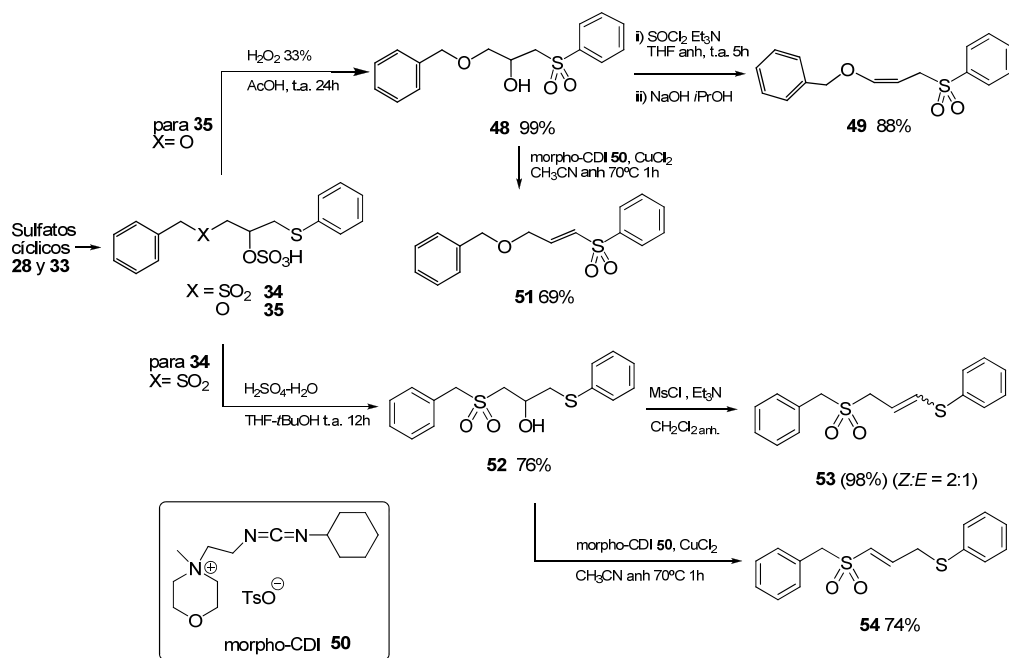
De igual forma, la inestabilidad asociada al sulfato cíclico **28** en medio básico podría ser la responsable de la formación del producto de doble sustitución **38** en el tratamiento con tioacetato potásico. La mayor basicidad del tioacetato potásico respecto al tiocianato potásico (pK_a AcSH 3.33 *versus* pK_a HSCN 1.1) puede originar que en el tratamiento con tiocianato se produzca el ataque nucleofílico mientras que en el tratamiento con tioacetato compitan procesos de eliminación y

ataque nucleofílico que conducirían a la mezcla de productos obtenida. Para explicar la formación del producto de doble adición se plantean dos posibles mecanismos. En primer lugar (Esquema 2.11.B1) la eliminación inicial conduciría a la vinilsulfona **45** que tras la adición Michael del tioacetato y posterior sustitución nucleofílica con otro grupo tioacetato actuando $-\text{OSO}_3^-$ como grupo saliente puede originar el compuesto **38**. Un mecanismo alternativo más factible se inicia con el producto de mono adición **37** que podría evolucionar mediante eliminación dando lugar a una vinilsulfona intermedia (**47**) que tras la adición Michael de tioacetato originara el producto de doble adición **38** (Esquema 2.11.B2).

2.4.4. Aplicaciones en la síntesis de alil y vinilsulfonas

Como se ha comentado anteriormente, a partir de sulfatos cíclicos con sulfona en posición β es previsible que se puedan obtener vinilsulfonas. Para ampliar el abanico de posibilidades que presentan los sulfatos cíclicos en síntesis orgánica estudiaremos la obtención de alil o vinilsulfonas mediante las estrategias que se detallan a continuación partiendo de sulfatos cíclicos con o sin grupo sulfona adyacente.

El primer paso es común a ambas estrategias y consiste en la apertura de los sulfatos cíclicos **28** y **33** con un tiol, obteniendo los compuestos **34** y **35** mencionados anteriormente. La estrategia aplicable a cualquier sulfato cíclico consiste después en oxidar el sulfuro generado por apertura con un tiol a la correspondiente sulfona (Esquema 2.12). La oxidación del compuesto **35** con peróxido de hidrógeno en ácido acético además tiene la ventaja de que produce a su vez la hidrólisis del sulfato, obteniendo el compuesto **48**, una β -hidroxisulfona que finalmente puede eliminar una molécula de agua generando alil o vinilsulfonas. En contra de lo esperado, el tratamiento de **48** con cloruro de mesilo y trietilamina en CH_2Cl_2 a t.a. no condujo al correspondiente éster sulfónico ni produjo deshidratación, recuperándose el material de partida en un 98%. Diversos intentos forzando condiciones con cloruro de mesilo y piridina como disolvente fueron también infructuosos. Buscando una ruta alternativa, la β -eliminación se consiguió en dos etapas sucesivas formando el derivado clorado intermedio y eliminando con NaOH en *i*-PrOH, ya que otras bases orgánicas como trietilamina o DBU no dieron buenos resultados. En estas condiciones se obtiene la alilsulfona **49** con buenos rendimientos, y con conformación del doble enlace *cis* exclusivamente, como se deduce del bajo valor de la constante de acoplamiento de los protones vinílicos ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 6.1 \text{ Hz}$).



Esquema 2.12. Síntesis de alil y vinilsulfonas

Para obtener la correspondiente vinilsulfona, es necesario llevar a cabo la deshidratación en condiciones que tengan lugar en ausencia de ácidos o bases fuertes para evitar la isomerización. Algunas combinaciones que se han mostrado eficaces son el tratamiento a reflujo con CeCl_3 y NaI ,¹³⁴ para el caso de compuestos carbonílicos β -hidroxilados y la morpho-CDI (**50**) en presencia de cantidades catalíticas de CuCl_2 , descrita inicialmente para sulfóxidos β -hidroxilados¹³⁵ y aplicada después también con sulfonas.³⁹ Esta última opción en nuestro caso da resultados satisfactorios ya que el tratamiento de la β -hidroxisulfona **48** con la carbodiimida **50** y una cantidad catalítica de CuCl_2 origina como único producto la vinilsulfona **51** con buen rendimiento y configuración *trans* ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 15.0 \text{ Hz}$), evitando así la isomerización a alilsulfona, termodinámicamente estabilizada en medio básico.

134. Bartoli, G.; Bellucci, M. C.; Petrini, M.; Marcantoni, E.; Sambri, L.; Torregiani, E., An Efficient Procedure for the Diastereoselective Dehydration of β -Hydroxy Carbonyl Compounds by $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI}$ System. *Org. Lett.* **2000**, 2 (13), 1791-1793.

135. Aggarwal, V. K.; Lightowler, M.; Lindell, S. D., Trans-Dioxides of Cyclicketene Thioacetals-Highly Selective Chiral Ketene Equivalents. *Synlett* **1992**, (9), 730-732.

Los compuestos **49** y **51**, alil y vinilsulfonas respectivamente, muestran importantes diferencias en el espectro de RMN (Figura 2.2) y para la caracterización completa se han empleado técnicas bidimensionales como COSY y HMQC poniendo de manifiesto que en el caso de la alilsulfona (**49**) los protones que forman el doble enlace, que son de tipo viniléter, aparecen muy alejados entre sí mientras que para la vinilsulfona (**51**) ambos protones vinílicos muestran el mismo grado de apantallamiento.

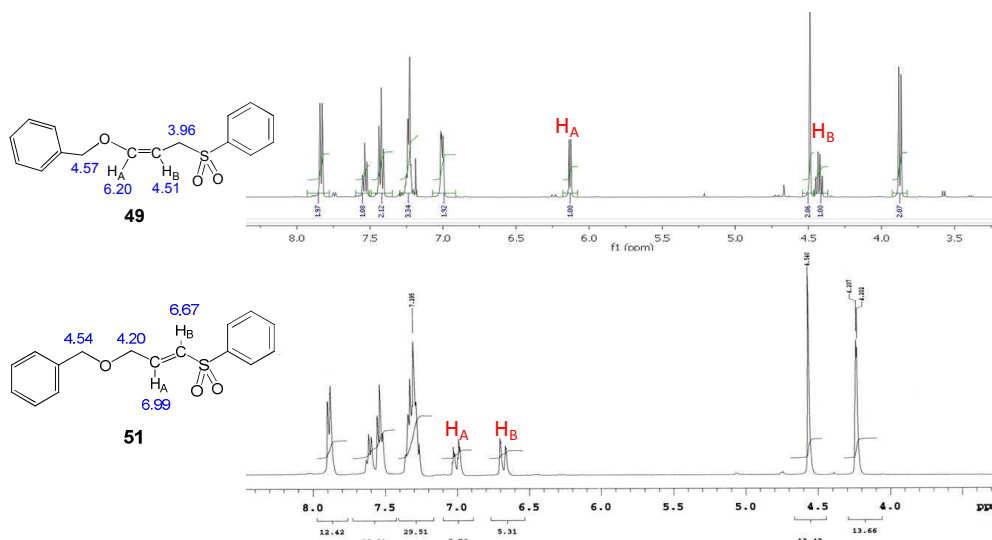


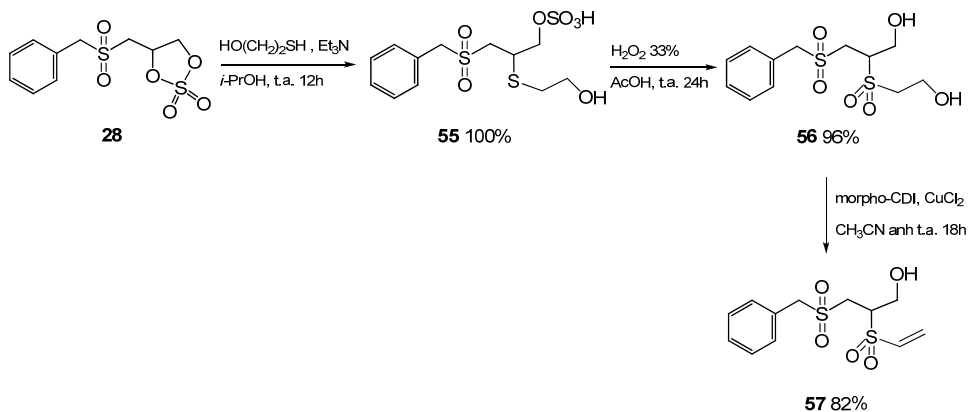
Figura 2.2. Espectros ¹H-RMN para los compuestos **49** y **51**

Para los sulfatos cíclicos con un grupo sulfona en posición β la apertura con el tiol origina el compuesto **34** que por hidrólisis ácida da lugar directamente a la β-hidroxisulfona **52** (Esquema 2.12). En este caso el tratamiento con cloruro de mesilo y trietilamina sí que produce directamente la eliminación obteniéndose la alilsulfona **53** con excelente rendimiento como mezcla de isómeros *cis:trans* en una proporción 2:1. La correspondiente vinilsulfona (**54**) se obtiene al igual que en el caso anterior empleando la carbodiimida **50** como agente deshidratante, dando lugar exclusivamente al isómero *trans*. Por tanto, sulfonas α,β- y β,γ-insaturadas son accesibles selectivamente a partir de sulfatos cíclicos mediante el adecuado control de las condiciones de eliminación y teniendo en cuenta que en medio básico el equilibrio se desplaza hacia la forma alílica, producto favorecido termodinámicamente.

Finalmente es posible combinar las dos estrategias anteriores con mercaptoetanol como nucleófilo para obtener vinilsulfonas como se indica en el

Capítulo 2

esquema 2.13. La apertura del sulfato cíclico **28** y posterior tratamiento con H_2O_2 y ácido acético origina el compuesto **56**, que mediante deshidratación con morpho-CDI a temperatura ambiente permite obtener la vinilsulfona **57**, deshidratando exclusivamente una de las posiciones terminales.



Esquema 2.13.

2.5. Conclusiones

Se ha llevado a cabo por primera vez un estudio de la síntesis, reactividad y aplicabilidad de sulfatos cíclicos conteniendo grupos sulfona en la posición β :

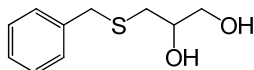
- Se ha desarrollado una metodología para la síntesis de sulfatos cíclicos conteniendo grupos sulfona en la posición β basada en el uso de tioglicerol como un sintón versátil que permite introducir simultáneamente el grupo 1,2-diol para la generación del correspondiente sulfato cíclico y el átomo de azufre para la generación de la función sulfona.
- La presencia simultánea de las funciones sulfato cíclico y sulfona en las posiciones vecinales de un grupo metileno les confiere a estos compuestos una reactividad especial que difiere a la de sus análogos sin grupo sulfona, lo que permite la obtención de un amplio abanico de compuestos.
- Los sulfatos cíclicos conteniendo grupos sulfona en la posición β pueden ser transformados en las correspondientes hidroximetil vinilsulfonas por tratamiento con bases débiles (aminas terciarias) ó ácidos débiles (sílica-agua). Además son susceptibles de sufrir procesos de apertura con un gran número de nucleófilos en condiciones suaves.
- Se ha desarrollado un nuevo procedimiento general de síntesis de alil o vinilsulfonas a partir de sulfatos cíclicos mediante un proceso que comprende: (a) apertura del sulfato cíclico con un tiol en medio básico; (b) oxidación del sulfuro a sulfona e hidrólisis simultánea del grupo O-sulfato y (c) eliminación directa mediante morpho-CDI para obtener vinilsulfonas o bien eliminación del cloderivado intermedio en medio básico para obtener alilsulfonas.
- De forma análoga, se ha desarrollado un nuevo procedimiento de síntesis de vinil y alilsulfonas a partir de sulfatos cíclicos que posean un grupo sulfona en β a través de un proceso en tres etapas: (a) apertura del sulfato cíclico con un nucleófilo; (b) hidrólisis del grupo O-sulfato en condiciones ácidas y (c) tratamiento del alcohol generado con cloruro de metanosulfonilo y trietilamina para obtener alilsulfonas o bien, deshidratación mediante morpho-CDI para obtener vinilsulfonas.

2.6. Sección experimental

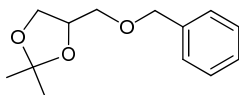
Materiales y métodos generales

Las cromatografías en capa fina (c.c.f.) fueron realizadas sobre hojas de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄ marca Merck, utilizando para el revelado luz ultravioleta, una disolución de ninhidrina en etanol (0.3% w/v), una disolución de ácido sulfúrico en etanol (10% v/v) o una disolución de permanganato potásico en agua (1% w/v). La purificación de los productos obtenidos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna de presión, utilizando sílica gel marca Merck (230-400 mesh, ASTM). Los puntos de fusión se midieron en un aparato de punto de fusión Gallekamp y no están corregidos. Las medidas de rotación óptica fueron realizadas en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141 a temperatura ambiente. Los espectros de IR se registraron en equipos Mattson FTIR modelo Satellite. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se realizaron a temperatura ambiente en aparatos Bruker AM300 y AM400 o Varian Direct Drive (300 MHz, 400 MHz y 500 MHz). Los desplazamientos químicos de los espectros de ¹H-RMN se expresan en ppm, utilizando como referencia interna TMS ($\delta = 0.0$ ppm) y CHCl₃ ($\delta = 7.26$ ppm) para las disoluciones en CDCl₃, DMSO ($\delta = 2.50$ ppm) para las disoluciones en DMSO-d₆ y MeOH ($\delta = 3.305$ ppm) para las disoluciones en MeOD-d₄. Los valores de las constantes de acoplamiento se dan en Hz. Los desplazamientos químicos de ¹³C-RMN se expresan en ppm empleando como referencia interna la señal de CDCl₃ ($\delta = 77.0$ ppm), DMSO-d₆ ($\delta = 39.5$) o MeOD-d₄ ($\delta = 49.0$ ppm). Los espectros de masas FAB han sido realizados en un aparato Fissons VG Autospec-Q utilizando como matrices tioglicerol o alcohol *m*-nitrobenzílico, los espectros de masas MALDI y NALDI fueron realizados utilizando un aparato Bruker modelo Autoflex utilizando como matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxi benzoico) o HCCA (ácido α -ciano-4-hiroxicinámico) para el primer caso y NaI para el segundo caso. Los espectros de masas ESI han sido realizados en un aparato LCT Premier Spectrometer. Todos los disolventes anhidros fueron preparados siguiendo procedimientos descritos.¹³⁶ Todos los reactivos empleados así como los disolventes fueron de alta pureza y se adquirieron a diferentes marcas comerciales (Aldrich, Sigma, Flucka, Merck...).

136. Armarego, W. L. F.; Chai, C., *Purification of Laboratory Chemicals, 5th Edition*. Butterworth-Heinemann: **2003**; 608 pp.

Preparación de materiales de partida**- 3-(Benciltio)propano-1,2-diol (26)**

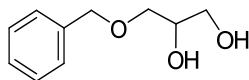
A una disolución de *rac*-3-mercaptopropano-1,2-diol (1g, 9.4 mmol) en acetonitrilo (30 ml) se hace pasar una corriente de Ar durante 10 min. A continuación se añade K_2CO_3 (1.9 g, 14.1 mmol) y cloruro de bencilo (2.2 ml, 19.1 mmol), continuando con la corriente de Ar durante 1 h. Tras 8 h. a t.a. el crudo de reacción se filtra sobre zeolita y tras evaporar el disolvente a vacío el producto se purifica mediante cromatografía en columna (éter) obteniendo **26** (1867 mg, 99.8%), aislado como sirupo. **IR** (film): $\nu = 3382, 2916, 1494, 1453, 1069$ y 1028 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 7.30$ (m, 5H), 3.73 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.65 (dd, 1H, $J = 11.4$ y 3.4 Hz), 3.48 (dd, 1H, $J = 11.4$ y 6.3 Hz), 2.89 (s, 2H), 2.56 (dd, 1H, $J = 13.7$ y 5.1 Hz), 2.50 (dd, 1H, $J = 13.7$ y 7.7 Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** ($CDCl_3$, 75 MHz): $\delta = 129.0, 128.7, 127.3, 70.0, 65.4, 36.4, 34.8$.

- 4-(Benciloximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (31)

A una disolución de 1,2-*O*-isopropilidenglicerol (**30**, 500 mg, 3.8 mmol) en DMSO (5 ml) se añade NaOH 40% (4 mL), manteniendo con agitación a t.a. durante 30 min. Tras ese tiempo la disolución se enfría a 0°C y se adiciona el bromuro de bencilo (1.8 ml, 15.5 mmol). Tras 24 h. a t.a. se añade al matraz agua (20 ml) y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 30 ml). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4 anh.) y se evapora a vacío, tras lo cual el crudo se purifica por cromatografía en columna (hexano-éter 10:1 \rightarrow 5:1), obteniendo **31** (730 mg, 87%) como líquido amarillo. **IR** (film): $\nu = 1600, 1585, 1490, 1445, 1344$ y 1240 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 7.34$ (m, 5H), 4.58 (m, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.06 (dd, 1H, $J = 8.2$ y 6.5 Hz), 3.75 (dd, 1H, $J = 8.3$ y 6.3 Hz), 3.56 (dd, 1H, $J = 9.8$ y 5.7 Hz), 3.48 (dd, 1H, $J = 9.7$ y 5.6 Hz), 1.43 (s, 3H), 1.37 (s, 3H); **$^{13}\text{C-RMN}$** ($CDCl_3$, 75 MHz): $\delta = 138.2, 128.6, 128.0, 109.6, 75.0, 73.8, 71.3, 67.1, 27.0, 25.6$.

Capítulo 2

- 3-(Benciloxi)propano-1,2-diol (**32**)

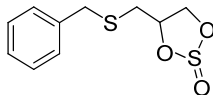


Una disolución del compuesto **31** (393 mg, 1.8 mmol) en AcOH 70% (3 mL) se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 3 h. El disolvente se evapora a vacío y el producto se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt), obteniendo **32** (302 mg, 94%) como sirupo. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.30 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 3.85 (m, 1H), 3.63 (dd, 1H, $J = 11.5$ y 3.7 Hz), 3.55 (dd, 1H, $J = 11.4$ y 6.1 Hz), 3.48 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 137.7, 128.5, 127.9, 127.8, 73.5, 71.6, 70.8, 64.0.

Procedimiento general para la síntesis de sulfitos y sulfatos cíclicos

A una disolución del diol **26** o **32** (1 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) con agitación magnética y enfriada a 0°C se añade Et_3N (0.58 mL, 4 mmol) y a continuación gota a gota el SOCl_2 (0.11 mL, 1.5 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 . Tras 2 h a t.a. el crudo de reacción se diluye con CH_2Cl_2 (20 mL), se lava con agua (2x40 mL) y salmuera (40 mL). Se recoge la fase orgánica y tras secar (Na_2SO_4 anh.) y concentrar a vacío se obtiene el sulfito que se puede emplear directamente en la siguiente etapa. Para el sulfito cíclico **27** se lleva a cabo la purificación mediante cromatografía en columna. Para la obtención de sulfatos cíclicos el sulfito cíclico obtenido en la primera etapa, se disuelve en CCl_4 - CH_3CN 1:1 (20 mL), enfriando la disolución resultante a 0°C y se adiciona NaIO_4 (4.5 mmol para **26**, 3.0 mmol para **32**) disuelto en la mínima cantidad de agua, seguido de una cantidad catalítica de $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Se deja alcanzar la t.a. manteniendo así 1 h. El crudo de reacción se filtra sobre zeolita y tras evaporar el disolvente a vacío, el producto se purifica mediante cromatografía en columna.

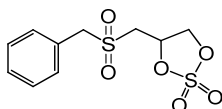
- 4-(Benciltiometil)-1,3,2-dioxatiolano-2-óxido (**27**)



Eluyente hexano-éter (5:1), aislado como sirupo (222 mg, 91%), mezcla de estereoisómeros. IR (film): $\nu = 1601, 1494, 1454, 1205$ y 957 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): Dos diastereoisómeros $\delta_1 = 7.33$ (m, 5H), 4.49 (m, 3H), 3.81 (s, 2H), 2.99 (dd, 1H, $J = 14.0$ y 4.7 Hz), 2.83 (dd, 1H, $J = 13.8$ y 7.5 Hz); $\delta_2 = 7.33$ (m, 5H); 4.95 (m, 1H), 4.68 (dd, 1H, $J = 8.6$ y 6.2 Hz), 4.18 (dd, 1H, $J = 8.7$ y 5.4 Hz); 3.78 (s, 2H), 2.75

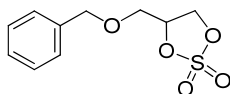
(dd, 1H, $J = 13.9$ y 5.0 Hz), 2.56 (dd, 1H, $J = 14.0$ y 8.0 Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ =(mezcla) 137.8, 137.6, 129.2, 129.0, 127.8, 127.7, 82.7, 79.7, 70.9, 37.1, 36.9, 34.1, 32.7; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 267.0130$ calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 267.0123.

- 4-(Bencilsulfonilmetil)-1,3,2-dioxatiolano-2,2-dióxido (**28**)



Eluyente AcOEt-MeOH (10:1), aislado como sólido (291 mg, 100%). **P.f.** 153-156°C; **IR** (film): $\nu = 1638, 1384, 1302, 1205$ y 1130 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.43$ (m, 5H), 5.33 (dtd, 1H, $J = 7.1, 6.4$ y 6.1 Hz), 4.87 (dd, 1H, $J = 9.4$ y 6.4 Hz), 4.57 (dd, 1H, $J = 9.4$ y 6.4 Hz), 4.37 (s, 2H), 3.59 (dd, 1H, $J = 14.5$ y 6.1 Hz), 3.22 (dd, 1H, $J = 14.5$ y 7.1 Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d_6 , 75 MHz): $\delta = 131.2, 131.0, 128.3, 128.1, 77.1, 70.0, 58.5, 52.4$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 314.9979$ calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 314.9973.

- 4-(Benciloximetil)-1,3,2-dioxatiolano-2,2-dióxido (**33**)



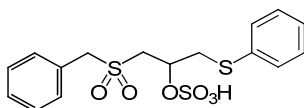
Eluyente éter, aislado como sirupo (203 mg, 83%). **IR** (film): $\nu = 3032, 2917, 2869, 1386, 1209, 983$ y 823 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.32$ (m, 5H), 5.01 (tt, 1H, $J = 6.9$ y 4.8 Hz), 4.66 (dd, 1H, $J = 8.8$ y 6.6 Hz), 4.58 (m, 3H), 3.73 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 128.7, 128.3, 127.9, 80.1, 73.9, 69.8, 67.5$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 267.0300$ calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 267.0303.

Reactividad con nucleófilos azufrados

A una disolución del sulfato cíclico **28** o **33** (0.6 mmol) en *i*-PrOH (10 mL), se adiciona bencenotiol (0.35 mL, 3.6 mmol) y a continuación Et_3N (0.12 mL, 0.9 mmol), manteniendo con agitación magnética durante 5 h. a t.a. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna.

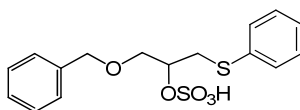
Capítulo 2

- *O*-Hidrogenosulfato de 1-(bencilsulfonil)-3-(feniltio)propan-2-ol (**34**)



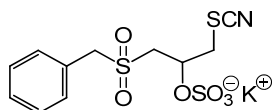
Eluyente AcOEt → AcOEt-MeOH (10:1), aislado en forma de sólido (171 mg, 71%). **P.f.** 131 – 133°C; **IR** (film): $\nu = 1649, 1583, 1264, 1217$ y 1129 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 7.35$ (m, 10H), 5.03 (m, 1H), 4.65 (d, 1H, $J = 13.7$ Hz), 4.52 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 3.75 (dd, 1H, $J = 14.1$ y 3.8 Hz), 3.51 (dd, 1H, $J = 15.2$ y 7.9 Hz), 3.40 (dd, 1H, $J = 15.3$ y 3.1 Hz), 3.25 (dd, 1H, $J = 14.1$ y 9.1 Hz); **¹³C-RMN** (CD₃OD, 75 MHz): $\delta = 135.1, 131.5, 129.1, 129.0, 128.5, 128.4, 128.2, 126.3, 72.7, 59.6, 54.1, 36.0$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 446.9823$ calc. para C₁₆H₁₇O₆S₃Na₂ [M-H+2Na]⁺: 446.9983.

- *O*-Hidrogenosulfato de 1-(benciloxi)-3-(feniltio)propan-2-ol (**35**)



Eluyente AcOEt → AcOEt-MeOH (5:1), aislado como sirupo (208 mg, 98%). **IR** (film): $\nu = 3059, 2925, 2868, 1636, 1582, 1479, 1252$ y 1074 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.07$ (m, 10 H), 4.68 (m, 1H), 4.32 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 4.26 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 3.58 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 3.49 (dd, 1H, $J = 10.1$ y 4.4 Hz), 3.31 (dd, 1H, $J = 13.5$ y 3.6 Hz), 3.25 (sa, 1H), 3.10 (dd, 1H, $J = 13.5$ y 8.5 Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 137.4, 136.0, 129.0, 128.9, 128.4, 128.2, 127.7, 126.0, 77.5, 73.1, 69.2, 33.9$.

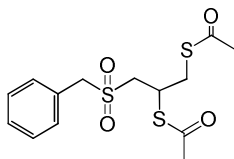
- Sal potásica de *O*-sulfato de 1-(bencilsulfonil)-3-tiocianato-propan-2-ol (**36**)



A una disolución de **28** (100 mg, 0.34 mmol) en 2-butanona (15 mL) se añade KSCN (165 mg, 1.70 mmol) manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 1 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna. Eluyente AcOEt → AcOEt-MeOH (20:1), aislado como sirupo (77 mg, 56%). **¹H-RMN** (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 7.45$ (m, 5H); 5.18 (m, 1H), 4.67 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz), 4.55 (d, 1H, $J = 13.7$ Hz), 3.72 (dd, 1H, $J = 14.1$ y 5.0 Hz), 3.71 (dd, 1H, $J = 15.1$ y 7.0 Hz), 3.55 (dd, 1H, $J = 14.0$ y 4.5 Hz), 3.40 (dd, 1H, $J = 15.2$ y 3.8 Hz); **¹³C-RMN** (CD₃OD, 75 MHz): $\delta = 201.5, 131.5, 128.7, 128.6, 128.1, 71.7, 59.9, 53.8, 37.3$.

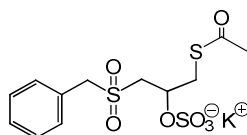
- *Apertura con tioacetato potásico*: A una disolución de **28** (100 mg, 0.3 mmol) en 2-butanona (15 mL) se añade AcSK (175 mg, 1.5 mmol), manteniendo la reacción a t.a. durante 2 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-éter 1:2 → AcOEt-MeOH 20:1), aislando el compuesto **38**, que eluye en primer lugar y el compuesto **37**, que eluye en segundo lugar:

-1-Bencilsulfonil-2,3-bis(acetiltio)-propano (**38**)



Aislado como sirupo (30 mg, 25%). **IR** (film): $\nu = 2958, 2922, 2852, 1687, 1305, 1260$ y 1114 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.41$ (m, 5H), 4.36 (s, 2H), 4.10 (tt, 1H, $J = 7.2$ y 5.8 Hz), 3.52 (dd, 1H, $J = 14.3$ y 5.6 Hz), 3.25 (m, 2H), 3.19 (dd, 1H, $J = 14.8$ y 7.2 Hz), 2.36 (s, 3H), 2.34 (s, 3H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 194.1, 130.9, 129.3, 129.2, 60.5, 54.2, 38.8, 32.7, 30.7, 30.6$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 369.0267$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{S}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 369.0265.

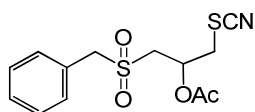
- *Sál potásica de O-sulfato de 1-(bencilsulfonil)-3-(acetiltio)propan-2-ol* (**37**)



Aislado como sirupo (50 mg, 40%). **IR** (film): $\nu = 2985, 2926, 2854, 1691, 1306, 1266, 1122$ y 742 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.33$ (m, 5H), 5.15 (m, 1H), 4.54 (d, 1H, $J = 14.1$ Hz), 4.37 (d, 1H, $J = 14.1$ Hz), 3.45 (dd, 1H, $J = 11.2$ y 3.1 Hz), 3.29 (m, 2H), 3.00 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 196.3, 131.5, 129.0, 128.0, 71.8, 60.4, 52.5, 32.4, 30.6$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 412.9775$ calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_7\text{S}_3\text{Na}_2$ $[\text{M}-\text{K}+2\text{Na}]^+$: 412.9767.

Capítulo 2

- 2-Acetoxi-1-(bencilsulfonil)-3-tiocianatopropano (**39**)



Procedimiento A: El compuesto **36** (77 mg, 0.2 mmol) se trata con AcOH (0.5 mL), Ac₂O (1 mL) y AcCl (2 mL) a t.a. durante 8 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt) para dar el compuesto sólido **39** (38 mg, 61%).

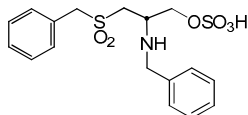
Procedimiento B: El compuesto **36** (150 mg, 0.4 mmol) se disuelve en Ac₂O (5 mL) y a la disolución se añade una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico, manteniendo 8 h. a t.a. Sobre el matraz se añade CH₂Cl₂ (50 mL), se lava con NaHCO₃ sat. (4x50 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anh. y tras filtrar y eliminar el disolvente a vacío, el producto se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-éter 1:10) obteniéndose **39** (70 mg, 56%).

39: Aislado como sólido. P. f. 88 – 91°C; IR (KBr): $\nu = 2927, 2853, 2153, 1747, 1304$ y 1115 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.43$ (s, 5H); 5.56 (m, 1H); 4.33 (s, 2H), 3.51 (dd, 1H, *J* = 14.7 y 3.7 Hz, H-1), 3.36 (dd, 1H, *J* = 14.5 y 5.8 Hz), 3.20 (m, 2H), 2.18 (s, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 169.8, 131.0, 129.8, 129.6, 127.3, 111.6, 66.8, 61.4, 52.1, 36.8, 20.9$; EM-AR (FAB⁺): *m/z* = 336.0341 calc. para C₁₃H₁₅O₄S₂Na [M+Na]⁺: 336.0340.

Reactividad con nucleófilos nitrogenados

A una disolución de **28** o **33** (0.5 mmol) en *i*-PrOH (10 mL) se adiciona bencilamina (0.3 mL, 3.0 mmol) manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 2 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna.

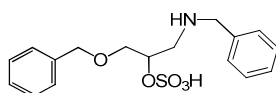
- *O*-Hidrogenosulfato de 2-(bencilamino)-3-(bencilsulfonil)propan-1-ol (**40**)



Eluyente AcOEt-MeOH (5:1), aislado como sólido (183 mg, 92%). P. f. 179 – 181°C; IR (KBr): $\nu = 3512, 3328, 1619, 1257$ y 1118 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 7.35$ (m, 10H), 4.53 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz), 4.47 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz), 4.22 (dd, 1H, *J* =

10.9 y 4.8 Hz), 4.14 (dd, 1H, $J = 10.9$ y 4.1 Hz), 4.00 (d, 1H, $J = 12.8$ Hz), 3.85 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz), 3.59 (m, 1H), 3.35 (dd, 1H, $J = 14.8$ y 4.5 Hz), 3.26 (dd, 1H, $J = 14.8$ y 7.9 Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 75 MHz): $\delta = 140.7, 132.4, 129.7, 129.7, 129.6, 129.5, 129.3, 128.2, 68.5, 61.1, 54.7, 53.5, 51.9$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 422.0706$ calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 422.0708.

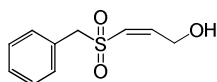
- *O*-Hidrogenosulfato de 1-(bencilamino)-3-(benciloxi)propan-2-ol (**41**)



Eluyente AcOEt-MeOH (20:1) \rightarrow (10:1), aislado como sirupo (151 mg, 86%). **IR** (film): $\nu = 3478, 3297, 3167, 1624, 1253$ y 1216 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz): $\delta = 7.34$ (m, 10H), 4.68 (m, 1H), 4.51-4.55 (m, 2H), 3.91 (d, 1H, $J = 13.1$ Hz), 3.77 (d, 1H, $J = 13.1$ Hz), 3.71 (m, 2H), 2.95 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 75 MHz): $\delta = 129.6, 129.2, 129.0, 128.3, 127.8, 73.5, 72.6, 69.9, 51.4, 49.1$.

Tratamiento del sulfato cíclico **28** en medio básico

- (*Z*)-3-(Bencilsulfonil)prop-2-en-1-ol (**42**)



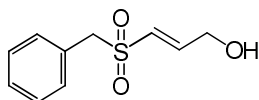
A una disolución de **28** (360 mg, 1.2 mmol) en THF (15 mL) se adiciona Et_3N (0.5 mL, 3.6 mmol) manteniendo a 50°C durante 1 h. El disolvente se evapora a vacío y el producto se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1), obteniendo el compuesto **42** (235 mg, 90%) en forma de sólido. P. f. $157\text{--}159^\circ\text{C}$; **IR** (KBr): $\nu = 3449, 3066, 3033, 2987, 2935, 1654, 1255, 1209, 1117$ y 1052 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz): $\delta = 7.37$ (m, 5H), 6.75 (m, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.37 (s, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 75 MHz): $\delta = 145.6, 132.4, 129.7, 129.6, 128.8, 66.2, 61.4$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 235.0404$ calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 235.0405.

Tratamiento del sulfato cíclico **28** con sílica

Sobre una disolución de **28** (150 mg, 0.5 mmol) en *t*-BuOH (15 mL) se adiciona sílica (0.5 g) y la suspensión resultante se calienta a reflujo durante 3 h. A continuación el disolvente se elimina a presión reducida, y el crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna (éter) aislando en primer lugar el compuesto **43** y a continuación con AcOEt como eluyente se obtiene el compuesto **44**.

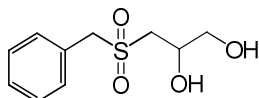
Capítulo 2

- (E)-3-(Bencilsulfonyl)prop-2-en-1-ol (**43**)



Aislado como sólido (42 mg, 39%). P. f. 113-116°C; **IR** (film): $\nu = 3464, 1648, 1295, 1260, 1113$ y 1088 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 7.37$ (s, 5H), 6.80 (dt, 1H, $J = 15.1$ y 3.2 Hz), 6.61 (dt, 1H, $J = 15.1$ y 2.2 Hz), 4.40 (s, 2H), 4.26 (t, 2H, $J = 2.6$ Hz); **¹³C-RMN** (CD₃OD, 75 MHz): $\delta = 149.9, 131.4, 128.5, 128.4, 125.9, 60.3, 60.1$.

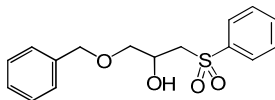
- 3-(Bencilsulfonyl)propano-1,2-diol (**44**)



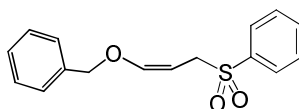
Aislado en forma de sólido (40 mg, 35%). P. f. 110-113°C. **IR** (KBr): $\nu = 3482, 1455, 1272$ y 1121 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 7.40$ (m, 5H), 4.55 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz), 4.43 (d, 1H, $J = 13.7$ Hz), 4.20 (m, 1H), 3.55 (dd, 1H, $J = 11.2$ y 5.3 Hz), 3.49 (dd, 1H, $J = 11.3$ y 5.7 Hz), 3.19 (dd, 1H, $J = 14.9$ y 9.2 Hz), 3.06 (dd, 1H, $J = 14.9$ y 2.5 Hz); **¹³C-RMN** (CD₃OD, 75 MHz): $\delta = 131.3, 128.6, 128.5, 67.3, 65.2, 60.3, 54.7$.

Síntesis de alil y vinilsulfonas

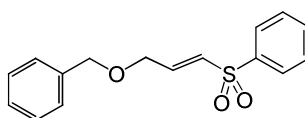
- 1-(benciloxi)-3-(fenilsulfonyl)propan-2-ol (**48**)



A una disolución de **35** (100 mg, 0.3 mmol) en AcOH (1.5 mL), a t.a. y en ausencia de luz se adiciona H₂O₂ 33% (0.6 mL) manteniendo en esas condiciones durante 24 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1), obteniendo el compuesto **48** (91 mg, 99%) en forma de sirupo. **IR** (film): $\nu = 3510, 1638, 1448$ y 1260 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CD₃Cl, 400 MHz): $\delta = 7.79$ (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.27 (m, 3H), 7.05 (m, 5H), 5.13 (m, 1H), 4.29 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz), 4.17 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz), 3.66 (m, 2H), 3.51 (dd, 1H, $J = 10.6$ y 3.7 Hz), 3.32 (dd, 1H, $J = 14.5$ y 4.5 Hz), 3.00 (s, 1H, OH); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 139.3, 137.9, 133.8, 129.4, 128.3, 127.9, 121.5, 73.1, 71.8, 70.4, 57.0$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 329.0823$ calc. para C₁₆H₁₈O₄SNa [M+Na]⁺: 329.0824.

- (Z)-3-(Benciloxi)-1-(fenilsulfonil)prop-2-eno (**49**)

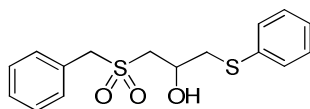
Una disolución del compuesto **48** (150 mg, 0.5 mmol) en THF anh. (10 mL) se enfría a 0°C para después adicionar el SOCl₂ (75 µl, 1.0 mmol) y a continuación Et₃N (140 µl, 1 mmol). Se deja alcanzar la t.a. y tras 5 h. el disolvente se elimina a presión reducida; el crudo de reacción se diluye con CH₂Cl₂ (20 ml), se lava con agua (2x20 ml) y salmuera (20 ml). Se recoge la fase orgánica y tras secar (Na₂SO₄ anh.) y concentrar a vacío el crudo obtenido se emplea en la siguiente etapa, disolviéndolo en i-PrOH (10 mL) y adicionándolo sobre una disolución de NaOH en polvo (25 mg, 0.66 mmol) en i-PrOH (5 mL). Tras 12 h a 50°C, el disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-éter 1:1) obteniendo el compuesto **49** (127 mg, 88%), aislado como sirupo. **IR** (film): $\nu = 3054, 2980, 1659, 1446, 1298, 1116$ y 1082 cm⁻¹; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.90$ (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.60 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.49 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7.20 (m, 5H), 6.20 (d, 1H, $J = 6.1$ Hz), 4.57 (s, 2H), 4.51 (td, 1H, $J = 7.8$ y 6.1 Hz), 3.96 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 150.6, 139.0, 136.5, 133.4, 128.8, 128.7, 128.6, 128.2, 127.4, 92.9, 74.1, 52.8$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 311.0716$ calc. para C₁₆H₁₆O₃SNa [M+Na]⁺: 311.0718.

- 1-[(E)-3-(Benciloxi)prop-1-enilsulfonil]benceno (**51**)

A una disolución de **48** (100 mg, 0.33 mmol) en CH₃CN anh. (5mL) se añade morpho-CDI **50** (418 mg, 0.99 mmol) y una cantidad catalítica de CuCl₂, manteniendo a 70°C durante 1 h. A continuación el disolvente se elimina a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-éter 2:1) obteniendo el compuesto **51** (66 mg, 69%) en forma de sirupo. **IR** (film): $\nu = 3061, 2856, 1630, 1446, 1307, 1083$ y 943 cm⁻¹; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.88$ (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.61 (t, 1H, $J = 7.0$), 7.53 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), $7.36-7.24$ (m, 5H), 6.99 (dt, 1H, $J = 15.0, 3.4$ Hz), 6.67 (dd, 1H, $J = 15.0, 2.0$ Hz), 4.54 (s, 2H), 4.20 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 142.5, 133.5, 130.6, 129.4, 128.6, 128.1, 127.8, 127.8, 73.3, 67.7$.

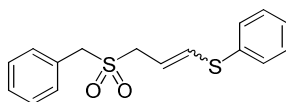
Capítulo 2

- 1-(Bencilsulfonil)-3-(feniltio)propan-2-ol (**52**)

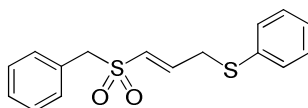


Sobre una disolución del compuesto **34** (650 mg, 2.0 mmol) en t-BuOH-THF 3:1 (20 ml) se añade H₂SO₄ 50% (0.14 mL). Tras 12 h. a t.a. se neutraliza la disolución con NaHCO₃ sat. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto se purifica mediante cromatografía en columna (éter), obteniendo el compuesto **52** (400 mg, 76%) aislado como sólido. P. f. 118–120°C; **IR** (film): $\nu = 3446, 1438, 1290, 1257$ y 724 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.35$ (m, 10H), 4.43 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz), 4.28 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 4.27 (m, 1H), 3.10 (dd, 1H, $J = 14.7$ y 9.1 Hz), 3.28 (s, 1H, OH), 3.02 (m, 3H); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 131.1, 131.0, 130.6, 129.4, 129.1, 129.0, 127.9, 127.4, 65.2, 61.0, 55.6, 40.9$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 345.0593$ calc. para C₁₆H₁₈O₃S₂Na [M+Na]⁺: 345.0595.

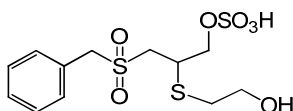
- 1-(Bencilsulfonil)-3-(feniltio)prop-2-eno (**53**)



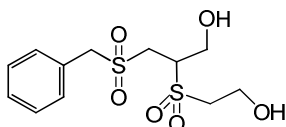
Una disolución del compuesto **52** (100 mg, 0.3 mmol) en CH₂Cl₂ anh. (10 mL) se enfría a 0°C añadiendo a continuación MsCl (36 μ L, 0.45 mmol) y Et₃N (120 μ L, 0.9 mmol). Se deja alcanzar la t.a. manteniendo así durante 12 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-éter 1:2), obteniendo el compuesto **53** (98 mg, 98%) como una mezcla de isómeros *Z* y *E* en proporción 2:1. P.f. 81–83°C; **IR** (KBr): $\nu = 3031, 1609, 1579, 1306, 1117, 735$ y 696 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.40$ (m, 10H), 6.71 (d, 0.66H, $J = 9.4$ Hz), 6.53 (d, 0.33H, $J = 15.1$ Hz), 5.86 (dt, 0.66H, $J = 9.4$ y 7.6 Hz), 5.62 (dt, 0.33H, $J = 15.1$ y 7.4 Hz), 4.25 (s, 1.32 H), 4.21 (s, 0.66H), 3.86 (d, 1.32H, $J = 7.6$ Hz), 3.59 (d, 0.66H, $J = 7.6$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 135.5, 134.0, 131.4, 131.0, 130.7, 129.9, 129.5, 129.4, 129.2, 129.2, 129.1, 128.1, 127.6, 127.4, 116.7, 114.9, 58.8, 58.4, 55.2, 52.5$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 327.0490$ calc. para C₁₆H₁₆O₂S₂Na [M+Na]⁺: 327.0489.

- *(E)*-1-(Bencilsulfonil)-3-(feniltio)prop-1-eno (**54**)

A una disolución de **52** (100 mg, 0.31 mmol) en CH₃CN anh. (5mL) se añade morpho-CDI **50** (390 mg, 0.93 mmol) y una cantidad catalítica de CuCl₂, manteniendo a 70°C durante 1 h. A continuación el disolvente se elimina a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-éter 1:1) obteniendo el compuesto **54** (70 mg, 74%) en forma de sirupo. IR (film): $\nu = 3053, 2921, 1627, 1580, 1478, 1312, 1115, 967$ y 695 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.35\text{-}7.25$ (m, 8H), 7.16 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 6.77 (dt, 1H, $J = 14.9, 6.8$ Hz), 6.17 (d, 1H, $J = 14.9$ Hz), 4.07 (s, 2H), 3.56 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 144.1, 133.8, 131.1, 130.9, 129.3, 129.1, 128.9, 128.8, 127.8, 127.6, 61.6, 34.9$.

- *O*-Hidrogenosulfato de 3-(bencilsulfonil)-2-(2-hidroxietiltio)propan-1-ol (**55**)

A una disolución del sulfato cíclico **28** (200 mg, 0.68 mmol) en i-PrOH (10 mL) se adiciona mercaptoetanol (0.29 mL, 4.08 mmol) y a continuación Et₃N (0.14 mL, 1.02 mmol), manteniendo con agitación magnética durante 12 h. a t.a. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt → AcOEt-MeOH 5:1) obteniendo el compuesto **55** (253 mg, 100%) aislado como sirupo. IR (film): $\nu = 3456, 2924, 1640, 1255$ y 1117 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz): $\delta = 7.50\text{-}7.30$ (m, 5H), 4.57 (s, 2H), 4.29 (dd, 1H, $J = 10.6, 4.6$ Hz), 4.07 (dd, 1H, $J = 10.5, 7.2$ Hz), 3.74 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 3.59-3.50 (m, 2H), 3.33-3.25 (m, 1H), 2.88-2.76 (m, 2H); ¹³C-RMN (CD₃OD, 100 MHz): $\delta = 132.6, 129.9, 129.8, 129.5, 70.6, 62.5, 61.5, 55.2, 40.5, 35.6$.

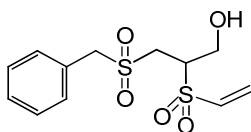
- 3-(Bencilsulfonil)-2-(2-hidroxietilsulfonil)propan-1-ol (**56**)

A una disolución del compuesto **55** (200 mg, 0.54 mmol) en AcOH (2.7 mL) a t.a. y en ausencia de luz se adiciona H₂O₂ del 33% (1.1 mL) manteniendo en esas condiciones durante 24 h. El disolvente se evapora a presión reducida y el producto

Capítulo 2

se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1), obteniendo el compuesto **56** (167 mg, 96%) en forma de sirupo. **IR** (film): $\nu = 3482, 2983, 2933, 1602, 1399, 1288, 1122, 1050$ y 858 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CD_3OD , 400 MHz): $\delta = 7.52\text{-}7.36$ (m, 5H), 4.64 (dd, 1H, $J = 11.5, 3.6$ Hz), 4.57 (s, 2H), 4.47 (dd, 1H, $J = 11.5, 6.6$ Hz), 4.17-4.11 (m, 1H), 4.02 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 3.75 (dd, 1H, $J = 14.8, 2.7$ Hz), 3.61-3.39 (m, 3H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CD_3OD , 100 MHz): $\delta = 132.5, 130.1, 129.9, 129.1, 65.5, 60.7, 59.7, 57.6, 56.6, 47.5$. **EM-AR** (NALDI): $m/z = 345.0442$ calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 345.0443.

- 3-(Bencilsulfonil)-2-(vinilsulfonil)propan-1-ol (**57**)



A una disolución de **56** (150 mg, 0.46 mmol) en CH_3CN anh. (10 mL) se añade morpho-CDI **50** (778 mg, 1.84 mmol) y una cantidad catalítica de CuCl_2 , manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 24 h. A continuación el disolvente se elimina a vacío y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1) obteniendo el compuesto **57** (115 mg, 82%) aislado en forma de sirupo. **IR** (film): $\nu = 3507, 2923, 1637, 1309, 1260, 1123, 1040, \text{ y } 987 \text{ cm}^{-1}$; **$^1\text{H-RMN}$** (CD_3OD , 400 MHz): $\delta = 7.52\text{-}7.36$ (m, 5H), 6.87 (dd, 1H, $J = 16.5, 9.9$ Hz), 6.36 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz), 6.28 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 4.62-4.53 (m, 3H), 4.49 (dd, 1H, $J = 11.5, 5.0$ Hz), 3.91 (m, 1H), 3.53 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CD_3OD , 100 MHz): $\delta = 137.1, 132.9, 132.4, 130.0, 129.8, 129.0, 64.6, 60.7, 59.5, 47.6$. **EM-AR** (NALDI): $m/z = 327.0336$ calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 327.0337.

Capítulo 3. AGENTES DE ETIQUETADO CON FERROCENO BASADOS EN VINILSULFONA

Capítulo 3.

Agentes de etiquetado con ferroceno basados en vinilsulfonas

3.1. Etiquetado de biomoléculas

El etiquetado de biomoléculas es una herramienta básica en el campo de la genómica y la proteómica para la detección, purificación y estudio de interacciones entre biomoléculas, desarrollándose gracias a esta herramienta de bioconjugación¹³⁷ un sinnúmero de investigaciones biomédicas. El sustrato a modificar puede ser una célula, una proteína, un ácido nucleico ó estructuras de bajo peso molecular. En lo referente a tipos de etiquetas, las más ampliamente utilizadas son los marcadores fluorescentes, destacando entre ellos fluoresceínas, rodaminas, dansilo, NBD, BODIPYs (difluoroboro dipirrometenos). Otros tipos de etiquetas comprenden la biotina como etiqueta de afinidad, marcadores radioactivos, electroactivos como el ferroceno, marcadores quimioluminiscentes como el luminol o los ésteres de acridinio, pudiendo considerar incluso el PEG (polietilenglicol) como una etiqueta por la importancia que ha alcanzado la pegilacion de proteínas.¹³⁸

Un aspecto fundamental de cara al uso de cualquier etiquetado es el tipo de unión biomolécula-etiqueta y la estabilidad de dicha unión.¹³⁹

3.1.1. Dianas para el etiquetado

Desde un punto de vista químico existen cuatro grupos funcionales presentes de forma natural en las biomoléculas susceptibles de actuar como dianas para el anclaje de etiquetas convenientemente derivatizadas a través de la formación de un enlace covalente: aminas, tioles, hidroxilos y grupos carboxilo.

3.1.1.1. Aminas

Los grupos amino son la diana más común de los reactivos de modificación covalente y la principal en proteínas. La mayor parte de las proteínas tienen un extremo amino libre y prácticamente todas tienen unidades de lisina, residuo en

137. G. T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, 2008.

138. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., *Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54* (4), 459-476.

139. Kalia, J., Raines, R. T., *Advances in Bioconjugation. Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 138-147.

Capítulo 3

cuya cadena lateral hay un grupo ϵ -amino fácilmente modificable dado que se localiza mayoritariamente en la superficie de las proteínas. Los grupos amino reaccionan con reactivos acilantes y su reactividad depende del compuesto, del tipo de amina, basicidad y pH de reacción. Las aminas alifáticas, como la de la cadena lateral de la lisina, son moderadamente básicas y reaccionan con la mayoría de los reactivos acilantes a pH superior a 8. Las derivatizaciones principales de los reactivos de marcaje que se han utilizado para reaccionar con aminas incluyen:

➡ *Succinimidil ésteres.* Es la derivatización más frecuente para obtener reactivos acilantes, y el enlace amida formado es tan estable como un enlace peptídico. Reaccionan bien con aminas alifáticas y presentan baja reactividad con aminas aromáticas, alcoholes, fenoles (tirosina) e histidina. En presencia de tioles pueden formar tioésteres pero en proteínas el grupo acilo puede ser transferido a una amina vecina. Los succinimidil ésteres pueden hidrolizarse, aunque normalmente por debajo de pH 9 este proceso es muy lento. Uno de los principales inconvenientes de los succinimidil ésteres es su solubilidad en agua, que en algunos casos puede ser muy baja, por lo que se emplea también sulfo-NHS para obtener sulfosuccinimidil ésteres, más polares y por ello más solubles en agua, aunque también menos reactivos con aminas poco expuestas.

➡ *Isotiocianatos e isocianatos.* Los primeros reaccionan con aminas para formar tioureas, las cuales son razonablemente estables, aunque se ha descrito la degradación de la conjugación en anticuerpos marcados con isotiocianatos fluorescentes.¹⁴⁰ Los isotiocianatos presentan una reactividad moderada, pero son muy estables en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Por su parte, los isocianatos son más reactivos, dando lugar a ureas, pero a la vez su mayor reactividad puede provocar problemas de estabilidad.

➡ *Cloruros de sulfonilo.* Reaccionan con aminas y producen sulfonamidas. Son muy reactivos e inestables en medios acuosos,¹⁴¹ especialmente al pH alcalino necesario para que reaccionen con las aminas alifáticas, por lo que hay que trabajar a baja temperatura. Una vez conjugados,

140. Banks, P. R.; Paquette, D. M., Comparison of Three Common Amine Reactive Fluorescent Probes Used for Conjugation to Biomolecules by Capillary Zone Electrophoresis. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6* (4), 447-458.

141. Lefevre, C.; Kang, H. C.; Haugland, R. P.; Malekzadeh, N.; Arttamangkul, S.; Haugland, R. P., Texas Red-X and Rhodamine Red-X, New Derivatives of Sulforhodamine 101 and Lissamine Rhodamine B with Improved Labeling and Fluorescence Properties. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7* (4), 482-489.

el enlace es extremadamente estable y resistente. También reaccionan con fenoles (tirosina), alcoholes alifáticos (polisacáridos, serina, treonina), tioles (cisteína), e imidazoles (histidina), aunque los conjugados con tioles e imidazoles son inestables y los conjugados con alcoholes alifáticos pueden sufrir desplazamientos nucleofílicos.

➡ *Aldehídos.* Reaccionan con las aminas para formar bases de Schiff de forma reversible, aunque la interacción puede estabilizarse químicamente por reducción formándose aminas.

➡ *Epóxidos.* Reaccionan en un proceso de apertura nucleofílica con aminas primarias, tioles o hidroxilos, aunque son necesarios altos valores de pH (pH~11-12) para la reacción con hidroxilos e intermedios (pH~9.0) para la reacción con aminas, siendo los tioles los más reactivos.

➡ *Agentes arilantes.* Los derivados del nitrobenzofurazano, como son los cloruro o fluoruro de 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD) son herramientas útiles para el análisis de aminoácidos dada su realzada reactividad con aminas secundarias y también con tioles.

3.1.1.2. Tioles

Son dianas más selectivas que el grupo amino, pues son menos frecuentes en proteínas y para ser reactivos tienen que estar libres, sin formar puentes disulfuro. El grupo sulfhidrilo puede ser también introducido en la macromolécula a marcar vía modificación química, mediante el tratamiento con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), por reducción de puentes disulfuro o en el caso de proteínas, mediante mutagénesis dirigida para introducir unidades de cisteína. Los tioles reaccionan a pH fisiológico (pH 6.5–8) con reactivos alquilantes para originar tioéteres estables y con muchos de los reactivos acilantes de aminas, incluyendo isotiocianatos y succinimidil ésteres, aunque los productos de la reacción no son lo suficientemente estables como para ser utilizados en modificaciones de rutina.

Como principales derivatizaciones de los reactivos de marcaje que reaccionan selectivamente con los tioles encontramos:

➡ *Yodoacetamidas.* Reaccionan fácilmente con todo tipo de tioles para formar tioéteres. En ausencia de residuos de cisteína libres, pueden reaccionar con metionina, histidina o tirosina y si el pH es lo suficientemente alcalino (pH>8) pueden hacerlo también con aminas alifáticas. Estos reactivos

Capítulo 3

son sensibles a la luz, sobre todo cuando se encuentran en solución, por lo que las reacciones tienen que llevarse a cabo en ausencia de luz.

➡ **Maleimidias.** Son los más empleados tanto para la modificación de grupos tiol como para la cuantificación y análisis de los mismos. La reacción implica la adición del tiol al doble enlace de la maleimida formando un enlace tioéter. Esta reacción es específica frente a grupos tiol a pH comprendido entre 6.5-7.5, mientras que a pHs superiores a 8 puede producirse también con aminas alifáticas.

➡ **Disulfuros.** Simétricos como la N-N'-didansil-L-cisteína, o asimétricos como los derivados de piridil disulfuro, estos reactivos presentan la ventaja de ser específicos de tioles, siendo la unión reversible ya que se forma un nuevo enlace disulfuro que se puede romper a través de agentes reductores como el DTT. Como desventaja hay que indicar que son susceptibles de sufrir reducción con algunos agentes biológicos, por lo que su empleo se limita a aplicaciones *in vitro*.

3.1.1.3. Hidroxilos

La función hidroxilo está presente en las cadenas laterales de tirosina, serina y treonina, en esteroides y carbohidratos, pero su reactividad en disolución acuosa es extremadamente baja, especialmente en proteínas por la presencia de nucleófilos más activos como las aminas y los tioles. Una función que reacciona específicamente con dioles vecinales son los derivados del ácido borónico que forman complejos cíclicos.¹⁴² Por otro lado, un procedimiento estándar para incrementar la reactividad, especialmente en el caso de carbohidratos, es la oxidación con peryodato para originar la función aldehído que es capaz de reaccionar con aminas, hidrazidas y semicarbazidas entre otros. Hay que destacar entre los hidroxilos, los de tipo fenólico de los residuos de tirosina, que reaccionan con cloruros de sulfonilo, iodoacetamidas y otros reactivos como el NBD. En algunas ocasiones se modifican selectivamente residuos de tirosina e histidina en proteínas mediante el empleo de diazoderivados, con el inconveniente de que son muy inestables y deben usarse inmediatamente después de generarlos.

142. Burnett, T. J.; Peebles, H. C.; Hageman, J. H., Synthesis of a fluorescent boronic acid which reversibly binds to cell walls and a diboronic acid which agglutinates erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1980**, *96* (1), 157-162.

3.1.1.4. Grupo carboxilo

Son abundantes en macromoléculas pero son poco reactivos, aunque pueden convertirse en ésteres, amidas o acil-hidrazidas. En presencia de agentes de acoplamiento, como las carbodiimidas, o formando previamente los ésteres activados pueden reaccionar directamente con hidrazinas o aminas.

3.1.1.5. Otras

Además de las metodologías enumeradas para el marcaje y que se basan en la reacción con grupos funcionales naturalmente presentes en las biomoléculas, hay que mencionar que se han desarrollado otros protocolos de marcaje covalente en los que intervienen funciones que no existen de forma natural en las biomoléculas.¹⁴³ Estas estrategias suponen la incorporación de un dominio exógeno y su posterior modificación, por lo que aumenta el número de etapas y la complejidad del marcaje, sin embargo, aportan una serie de beneficios como son la quimioselectividad y la bioortogonalidad.

Las reacciones más utilizadas para la ligación quimioselectiva son:

➡ *Cicloadición Diels-Alder.*¹⁴⁴ La incorporación de dienos en proteínas permite el marcaje posterior con dienófilos. Generalmente se emplean reactivos funcionalizados con maleimida como dienófilos, por lo que su capacidad como reactivo bioortogonal está limitada debido a la reactividad cruzada con tioles.

➡ *Reacción entre aldehídos e hidrazidas.* Aunque los aldehídos incorporados como dominios exógenos en proteínas pueden formar bases de Schiff temporalmente con aminas, en disolución acuosa estas interacciones son reversibles y permiten la reacción cuando hay hidrazidas presentes en el medio.

➡ *Cicloadición de azidas y alquinos catalizada con Cu(I)*, más conocida como “click-chemistry”, que se tratará posteriormente con más detalle (Capítulo 6). El anillo de triazol generado es altamente estable.

143. de Graaf, A. J.; Kooijman, M.; Hennink, W. E.; Mastrobattista, E., Nonnatural Amino Acids for Site-Specific Protein Conjugation. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (7), 1281-1295.

144. de Araújo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels–Alder Ligation of Peptides and Proteins. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (23), 6095-6109.

Capítulo 3

➡ *Ligación de Staudinger.* La modificación de la reacción de Staudinger entre azidas y fosfinas desarrollada por Bertozzi y col.¹⁴⁵ consiste en la unión covalente entre una azida y un derivado de trifenilfosfina con un grupo bencil metil éster para generar un enlace amida, con tal selectividad que permite su ejecución en el interior celular.

➡ *Par reactivo ácidos borónicos-salicilhidroxamato.*¹⁴⁶ Los ácidos borónicos pueden interaccionar con toda una serie de 1,2 y 1,3 dioles, lo que ha permitido su aplicación en la purificación por cromatografía de afinidad de carbohidratos y glicoproteínas, pero es la reactividad con salicilhidroxamato derivados para formar heterociclos de 5 o 6 miembros lo que ha aumentado su empleo en bioconjugación, aunque con algunos inconvenientes en cuanto a bioortogonalidad se refiere.

3.1.2. Funcionalización con vinilsulfonas

Algunas de las derivatizaciones empleadas para el etiquetado de biomoléculas, presentan importantes limitaciones tales como la falta de estabilidad en medios acuosos o en las condiciones de reacción, una reactividad moderada o la necesidad de varias etapas para llevar a cabo el etiquetado, limitaciones que dependen del grupo reactivo que presentan, como se ha comentado en la sección anterior. En este aspecto, las vinilsulfonas constituyen una alternativa atractiva para el etiquetado gracias a su reactividad frente a determinados grupos funcionales presentes de forma natural en las biomoléculas, tales como aminas, imidazoles y tioles. La conjugación selectiva con residuos de cisteína se puede producir en disolución acuosa y condiciones suaves,⁷⁶ aunque la escasa abundancia de estos residuos limita su aplicación. Por otro lado, la reacción de la función vinilsulfona con residuos de lisina se ha descrito como un proceso lento e incompleto que ocurre sólo por encima de valores de pH de 9.3.^{76, 81}

Sin embargo, la experiencia alcanzada en nuestro grupo en la síntesis de etiquetas basadas en vinilsulfonas y sus aplicaciones ha demostrado que es posible llevar a cabo la glicosidación de proteínas a través de la funcionalización de

145. Saxon, E.; Bertozzi, C. R., Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, 287 (5460), 2007-2010.

146. Stolowitz, M. L.; Ahlem, C.; Hughes, K. A.; Kaiser, R. J.; Kesicki, E. A.; Li, G.; Lund, K. P.; Torkelson, S. M.; Wiley, J. P., Phenylboronic Acid-Salicylhydroxamic Acid Bioconjugates. 1. A Novel Boronic Acid Complex for Protein Immobilization. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12 (2), 229-239.

residuos de lisina e histidina a un pH de sólo 7.7.¹⁴⁷ Adicionalmente, se han desarrollado sistemas monofuncionales o bifuncionales conteniendo un fluoróforo (dansilo, rodamina o fluoresceína), un resto de biotina o ambos simultáneamente junto con un punto de anclaje consistente en la función vinilsulfona (Figura 3.1) que han permitido llevar a cabo el marcaje fluorescente y la biotilación de proteínas de forma individual o simultánea.¹⁴⁸⁻¹⁵¹

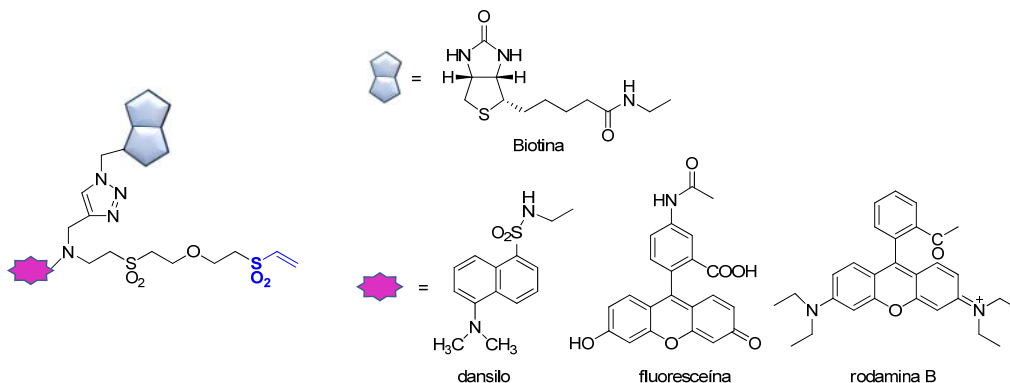


Figura 3.1. Etiquetas conteniendo fluoróforos y biotina para el marcaje a través de vinilsulfonas

El uso de la función vinilsulfona como derivatización de los reactivos de marcaje presenta una serie de ventajas:

- Estabilidad de los agentes de etiquetado
- No se requiere ninguna estrategia de activación
- Formación de una unión covalente estable
- Reacción rápida con altos rendimientos y sin formación de subproductos
- No se requieren grandes excesos de reactivo

147. Pérez-Balderas, F.; Hernández-Mateo, F.; López-Jaramillo, F. J.; Santoyo-González, F., Production, crystallization and X-ray characterization of chemically glycosylated hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr. F* **2005**, *61* (4), 435-438.

148. Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Vinyl Sulfone Bifunctional Tag Reagents for Single-Point Modification of Proteins. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (12), 4039-4047.

149. Santoyo, G. F.; Hernandez, M. F.; Lopez, J. J.; Morales, S. J.; Ortega, M. M. Compound for labeling biomolecules based on vinyl sulfone, their preparation and use in marking biomolecules such as proteins. WO Patent **2009/144344** A2.

150. Santoyo, G. F.; Hernandez, M. F.; Lopez, J. F. J.; Ortega, M. M. Single-labeling agents based on vinyl sulfones and their preparation and use in marking biomolecules such as protein. WO Patent **2009/106664** A1.

151. Santoyo, G. F.; Hernandez, M. F.; Lopez, J. F. J.; Morales, S. J.; Salto, G. R.; Giron, G. D. Double-labelling agents based on vinyl sulphone. WO Patent **2009/106665** A1.

Capítulo 3

- Reacción en ausencia de catalizadores mediante simple mezcla de los reactivos
- Reacciones en medio acuoso y bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura
- Purificación y aislamiento sencillo
- Tolerancia hacia otros grupos funcionales presentes en las biomoléculas distintos de los amino y tioles con los que reaccionan

Con estos precedentes, se pretende extender esta metodología al desarrollo de etiquetas conteniendo ferroceno para su actuación como marcadores electroactivos.

3.2. Ferroceno

3.2.1. Estructura y propiedades

El descubrimiento del dicitropentadienilhierro¹⁵²⁻¹⁵³ a principio de los años 50 marcó el inicio de una revolución en el campo de la química organometálica. Dicho compuesto fue denominado ferroceno¹⁵⁴ por su analogía con el benceno. La estructura correcta fue propuesta de forma independiente por Wilkinson y Fischer. Gracias a esta contribución y al trabajo realizado en la química de los compuestos tipo sándwich desarrollando la química organometálica moderna dichos investigadores compartieron el premio Nobel de Química en 1973.

Es bien conocida la estructura tipo sándwich de este compuesto y sus propiedades electroquímicas. El ferroceno se puede oxidar fácilmente para dar ferricinio [catión dicitropentadienil-hierro(III)]. El voltamograma origina una única onda de oxidación en el barrido directo acompañada de la correspondiente onda de reducción en el barrido inverso. La simetría de la onda, la independencia de los valores del potencial formal con respecto a la velocidad de barrido y los valores de la relación i_{pa}/i_{pc} cercanos a la unidad confirman la existencia de un proceso redox reversible. Estas propiedades han determinado el uso habitual de derivados de ferroceno como reactivos de marcaje para detección electroquímica. Además su estabilidad, y el resto de propiedades físicas y químicas le otorgan unas características especiales que hacen muy factible su utilización en muchas áreas de la química, destacando sus aplicaciones en química analítica,¹⁵⁵ medicina,¹⁵⁶ en la obtención de dendrímeros y materiales poliméricos¹⁵⁷ y en bioconjugación.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹

152. Kealy, T. J.; Pauson, P. L., A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **1951**, *168* (4285), 1039-1040.

153. Miller, S. A.; Tebboth, J. A.; Tremaine, J. F., Dicyclopentadienyliron. *J. Chem. Soc.* **1952**, 632-635.

154. Woodward, R. B.; Rosenblum, M.; Whiting, M. C., A New Aromatic System. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (13), 3458-3459.

155. Seiwert, B.; Karst, U., Ferrocene-based derivatization in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390* (1), 181-200.

156. Fouda, M. F. R.; Abd-Elzaher, M. M.; Abdelsamaia, R. A.; Labib, A. A., On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl. Organomet. Chem.* **2007**, *21* (8), 613-625.

157. Hudson, R. D. A., Ferrocene polymers: current architectures, syntheses and utility. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *637-639*, 47-69.

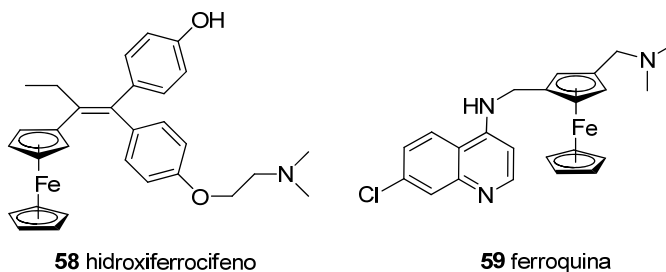
158. van Staveren, D. R.; Metzler-Nolte, N., Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 5931-5986.

159. Kraatz, H.-B., Ferrocene-Conjugates of Amino Acids, Peptides and Nucleic Acids. *J. Inorg. Organomet. Polymer Mater.* **2005**, *15* (1), 83-106.

3.2.2. Aplicaciones destacadas de ferroceno derivados

El ferroceno es una molécula pequeña, estable químicamente, no tóxica, rígida, lipofílica, que permite el acceso a numerosos derivados y que puede penetrar en la membrana celular, siendo estable en el medio acuoso y aeróbico. El acoplamiento de grupos ferroceno a fármacos reconocidos aumenta generalmente su actividad biológica, lo cual ha propiciado el desarrollo de aplicaciones médicas, que constituyen un área de investigación importante con resultados ya prometedores en el tratamiento de varias enfermedades como el cáncer o la malaria.

Entre los numerosos derivados de ferroceno destacan por su importancia los ferrocifenos¹⁶⁰ (**58**), derivado del tamoxifeno, uno de los medicamentos más utilizados en el tratamiento del cáncer de mama, que puede administrarse con una elevada tolerancia en todas las fases de la enfermedad, incluso con carácter profiláctico. No obstante, la eficacia de este antiestrógeno es moderada como consecuencia de su baja toxicidad, mostrando además efectos secundarios en los tratamientos prolongados, como son el aumento de la resistencia del tumor. En la búsqueda de antiestrógenos similares de mayor citotoxicidad y nivel de eficacia, los ferrocifenos están mostrando buenos resultados tanto *in vivo* como *in vitro*. Otro derivado importante es la ferroquina¹⁶¹ (**59**), que se encuentra ya en ensayos clínicos fase II por su actividad antimalárica.



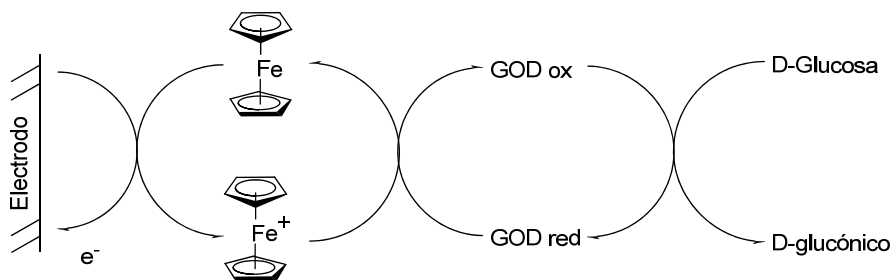
Otra de las aplicaciones del ferroceno en medicina deriva de su actuación en sensores. Uno de los biosensores más importantes es el correspondiente a la glucosa¹⁶² por su relación con la diabetes. La oxidación de la glucosa por la enzima

160. Top, S.; Tang, J.; Vessieres, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G., Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem. Comm.* **1996**, (8), 955-956.

161. Dive, D.; Biot, C., Ferrocene Conjugates of Chloroquine and other Antimalarials: the Development of Ferroquine, a New Antimalarial. *Chem. Med. Chem* **2008**, 3 (3), 383-391.

162. Wang, J., Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis* **2001**, 13 (12), 983-988.

glucosa oxidasa (GOD) para dar ácido-D-glucónico es sensible y específica, y por tanto apropiada para la determinación de la glucosa. El resultado de la reacción puede ser evaluado a través del oxígeno consumido o del peróxido de hidrógeno formado. Sin embargo, la medida electroquímica directa del producto oxidado está impedida debido a que el enzima no reacciona con las superficies del electrodo directamente, razón por la cual se utiliza el par ferroceno/ferricinio como mediador redox permitiendo la determinación electroquímica de la glucosa a través de unos ciclos encadenados (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Ferroceno como mediador redox en la determinación de glucosa

Además de su actuación como mediador redox, los conjugados de ferroceno son de especial importancia en la preparación de biosensores. Un ejemplo lo encontramos en el desarrollo de un inmunosensor electroquímico para la gonadotropina coriónica humana (hCG), una hormona que se comienza a secretar después de los primeros 6 días de embarazo y por tanto se puede usar como marcador de embarazo; además esta hormona es producida por algunos tumores por lo que es usada también como marcador tumoral. En este inmunoensayo de tipo sándwich (Figura 3.2) el anticuerpo inmovilizado sobre el electrodo se incuba con el antígeno y en una segunda etapa, el antígeno permite la unión con el anticuerpo marcado previamente con ferroceno, generándose una señal eléctrica proporcional a la cantidad de hCG.¹⁶³

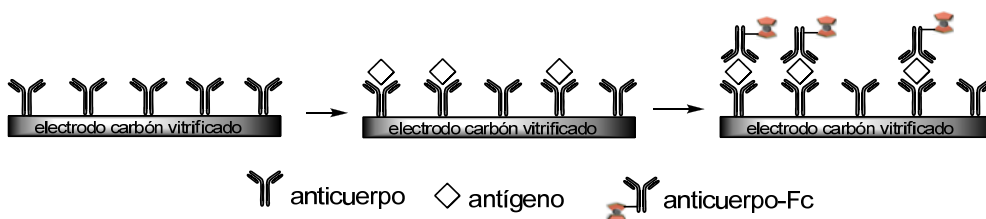


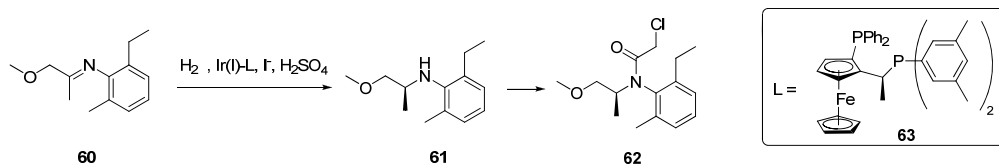
Figura 3.2

163. Akram, M.; Stuart, M. C.; Wong, D. K. Y., Signal Generation at an Electrochemical Immunosensor via the Direct Oxidation of an Electroactive Label. *Electroanalysis* **2006**, 18 (3), 237-246.

Capítulo 3

Un grupo especial de derivados de ferroceno son los que están basados en dendrímeros,¹⁶⁴ siendo los más habituales los que presentan este grupo en la periferia.¹⁶⁵ Las estrategias más habituales de síntesis de estos compuestos de topología arbórea utilizan reacciones de clorocarbonilferrocenos con poliamido dendrímeros, ferrocenilsililación de poliolefinas o mediante “click-chemistry” de ferrocenilacetileno y azido-dendrímeros. Estos dendrímeros presentan aplicaciones principalmente en el campo del análisis electroquímico, actuando en biosensores amperométricos y en el reconocimiento de aniones.

Por otro lado, en el campo de la síntesis orgánica, de entre las muchas clases de ligandos quirales que se utilizan en catálisis asimétrica destacan sobremanera las ferrocenilfosfinas que constituyen uno de los grupos más importantes de auxiliares quirales. Un ejemplo (Esquema 3.2) es la hidrogenación de una cetoimina (**60**) catalizada por iridio y un derivado de ferroceno de tipo Josiphos¹⁶⁶ como ligando quiral (**63**), que ha sido implementado como un proceso catalítico asimétrico para la síntesis a gran escala del herbicida (S)-metolacoloro (**62**), que permite la producción anual de más de 10⁴ toneladas de dicho compuesto.¹⁶⁷



Esquema 3.2. Síntesis del herbicida (s)-metolacoloro

Además, el ferroceno y sus derivados son agentes antidetonantes utilizados en el combustible para motores de gasolina.

164. Casado, C. M.; Cuadrado, I.; Morán, M.; Alonso, B.; García, B.; González, B.; Losada, J., Redox-active ferrocenyl dendrimers and polymers in solution and immobilised on electrode surfaces. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185-186*, 53-80.

165. Astruc, D.; Ornelas, C.; Ruiz Aranzaes, J., Ferrocenyl-terminated Dendrimers: Design for Applications in Molecular Electronics, Molecular Recognition and Catalysis. *J. Inorg. Organomet. Polymer Mater.* **2008**, *18* (1), 4-17.

166. Blaser, H.-U.; Brieden, W.; Pugin, B.; Spindler, F.; Studer, M.; Togni, A., Solvias Josiphos Ligands: From Discovery to Technical Applications. *Top. Catal.* **2002**, *19* (1), 3-16.

167. Dorta, R.; Brogini, D.; Stoop, R.; Rügger, H.; Spindler, F.; Togni, A., Chiral Xyliphos Complexes for the Catalytic Imine Hydrogenation Leading to the Metolachlor Herbicide: Isolation of Catalyst-Substrate Adducts. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10* (1), 267-278.

3.2.3. Ferroceno en bioconjugación

En el campo de la bioconjugación,¹⁵⁸ el grupo ferroceno se ha unido a aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y hormonas como el estradiol.

Las estrategias más habituales empleadas para incorporar el grupo ferroceno en estas biomoléculas se indican a continuación (Tabla 3.1):

- Enlace amida con ácido ferrocenocarboxílicos¹⁶⁸ (**64**) y grupos amino, para lo cual es necesario activar el ácido mediante carbodiimidas o ésteres activados (**65**). Los anhídridos (**66**) y cloruros de ácido (**67**) de ferroceno también se han empleado como agentes derivatizantes.
- Formación de iminas con ferrocenocarbaldehído¹⁶⁹ (**68**), que después pueden reducirse a ferrocenilmetilaminas.
- Reacción de ferrocenil isotiocianatos (**69**) con grupos amino primarios.¹⁷⁰
- Ésteres de ácidos ferroceno imidocarboxílicos (**70**) con grupos amino primarios.¹⁷¹
- Reacción con ferrocenil maleimidias¹⁷² (**71**) y ferrocenil iodoacetamidias¹⁷³ (**72**) con grupos –SH presentes en la molécula a etiquetar.
- Reacción de ferrocenometanol (**73**) con tiolderivados en medio ácido.¹⁷⁴

168. Degani, Y.; Heller, A., Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino-acid oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (8), 2615-2620.

169. Xu, C.; Cai, H.; He, P.; Fang, Y., Ferrocenecarboxaldehyde labeled DNA probe for the study on DNA damage and protection. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2000**, *367* (6), 593-595.

170. Shimada, K.; Kawai, Y.; Oe, T.; Nambara, T., Determination of Amino Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Using Ferrocene Derivatization Reagents. *J. Liq. Chrom.* **1989**, *12* (3), 359-371.

171. Falk, H.; Peterlik, M.; Schloegl, K., Ethyl ferrocenecarboximidate, a new reagent for heavy metal-labeling of proteins. *Monatsh. Chem.* **1969**, *100*, 787-8.

172. Gleria, K. D.; Hill, H. A. O.; Wong, L. L., N-(2-Ferrocene-ethyl)maleimide : a new electroactive sulphhydryl-specific reagent for cysteine-containing peptides and proteins. *FEBS Letters* **1996**, *390* (2), 142-144.


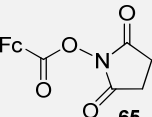
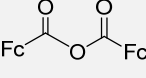


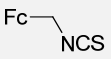

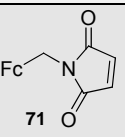
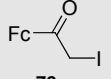



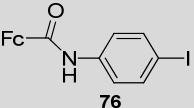
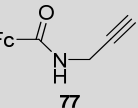
173. Kam-Wing Lo, K.; Shing-Yip Lau, J.; Chun-Ming Ng, D.; Zhu, N., Specific labelling of sulphhydryl-containing biomolecules with redox-active N-(ferrocenyl)iodoacetamide. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, (8), 1753-1756.

174. Casas-Solvas, J. M.; Vargas-Berenguel, A.; Capitán-Vallvey, L. F.; Santoyo-González, F., Convenient Methods for the Synthesis of Ferrocene-Carbohydrate Conjugates. *Org. Lett.* **2004**, *6* (21), 3687-3690.

Capítulo 3

- Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos (“click-chemistry”) con azidometilferroceno (**74**) o bien etinilferroceno (**75**).¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ Esta estrategia se ha empleado entre otras en la obtención de conjugados carbohidrato-ferroceno.
- Reacción de Sonogashira entre ferrocenos con un grupo alquino terminal (**77**) y compuestos con un resto aromático halogenado o viceversa,¹⁷⁸ como se indica en el esquema 3.3. La introducción del grupo reactivo en el ferroceno se lleva a cabo generalmente mediante enlace amida.

Tabla 3.1. Algunos derivados de ferroceno empleados en bioconjugación

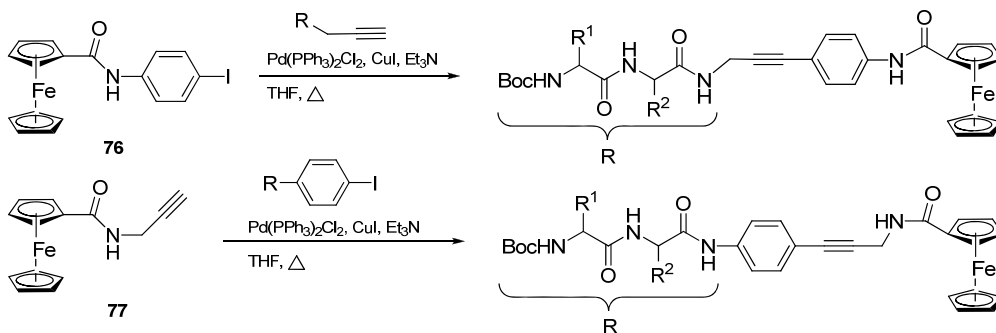
Grupo reactivo	Derivados de ferroceno			
-NH ₂				
				
-SH				
Otros				

175. Sudhir, V. S.; Venkateswarlu, C.; Musthafa, O. T. M.; Sampath, S.; Chandrasekaran, S., Click Chemistry Inspired Synthesis of Novel Ferrocenyl-Substituted Amino Acids or Peptides. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009 (13), 2120-2129.

176. Hüsken, N.; Gasser, G.; Köster, S. D.; Metzler-Nolte, N., “Four-Potential” Ferrocene Labeling of PNA Oligomers via Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20 (8), 1578-1586.

177. Casas-Solvas, J. M.; Ortiz-Salmerón, E.; Giménez-Martínez, J. J.; García-Fuentes, L.; Capitán-Vallvey, L. F.; Santoyo-González, F.; Vargas-Berenguel, A., Ferrocene–Carbohydrate Conjugates as Electrochemical Probes for Molecular Recognition Studies. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15 (3), 710-725.

178. Brosch, O.; Weyhermüller, T.; Metzler-Nolte, N., A Two-Step Palladium-Catalyzed Coupling Scheme for the Synthesis of Ferrocene-Labeled Amino Acids. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2, 323-330.



Esquema 3.3.

Recientemente, en un estudio del etiquetado de DNA, sobre el que se ha incorporado un resto $-(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2$ o $-(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$ para su funcionalización posterior con etiquetas, se ha llevado a cabo una comparación de diferentes derivados de ferroceno en función de la eficacia y estabilidad del marcaje.¹⁷⁹ Concretamente se han evaluado cinco derivados (Figura 3.3) que incluyen tres *N*-hidroxisuccinimidil-ésteres, que reaccionan con grupos -NH_2 en el DNA, y los compuestos *N*-ferrocenilacrilamida y *N*-(2-ferrocenil-etil)maleimida, reactivos hacia grupos -SH , observándose que el derivado de *N*-ferrocenilformilglicina **78** produce los mejores resultados.

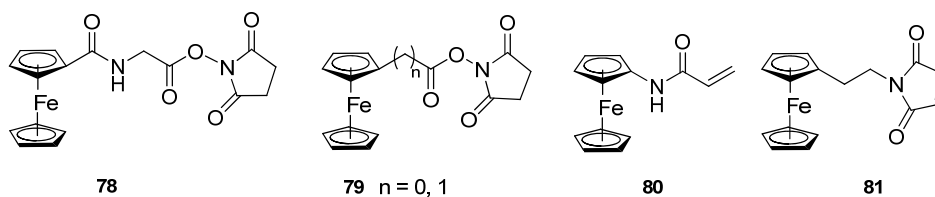
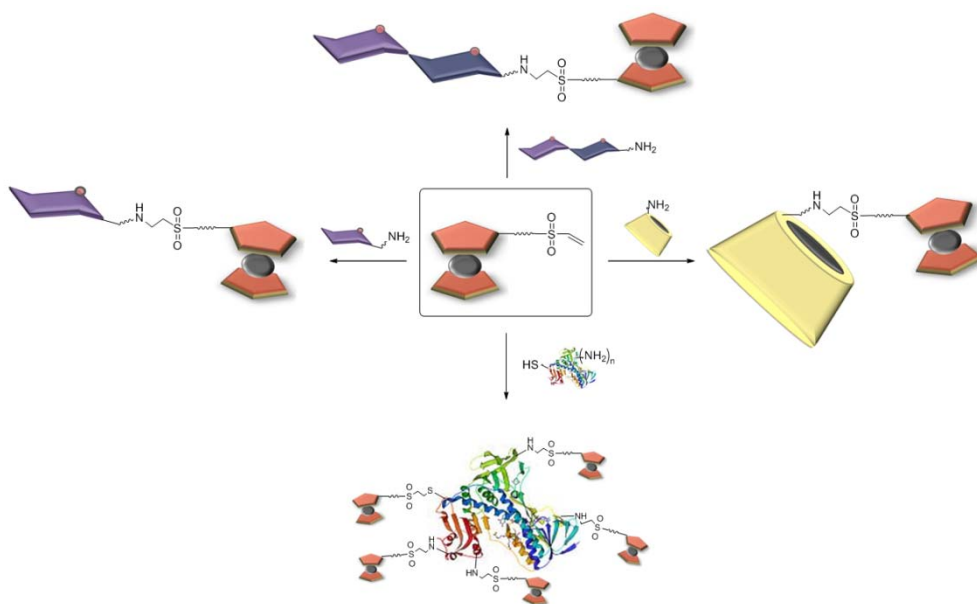


Figura 3.3.

179. Ge, D.; Levicky, R., A comparison of five bioconjugatable ferrocenes for labeling of biomolecules. *Chem. Comm.* **2010**, 46 (38), 7190-7192.

3.3. Discusión y resultados

Teniendo en cuenta la importancia del ferroceno y sus aplicaciones en el marcaje de compuestos de muy diferente naturaleza, se pretende desarrollar una metodología basada en el empleo de vinilsulfonas de forma que la presencia de dicho grupo reactivo en un compuesto que a su vez contiene el resto ferroceno, permita a estos compuestos actuar como reactivos de derivatización para incorporar el ferroceno como etiqueta en sustratos diversos tales como dendrímeros, monosacáridos, disacáridos, ciclodextrinas, péptidos y proteínas (Esquema 3.4).

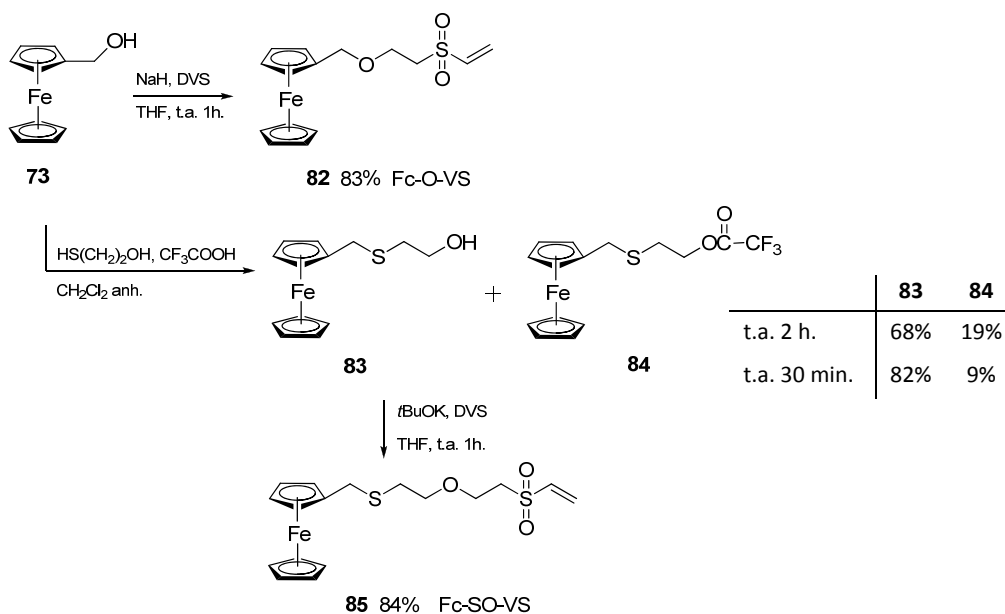


Esquema 3.4. Ferroceno-vinilsulfonas para etiquetar monosacáridos, disacáridos, ciclodextrinas y proteínas

3.3.1. Síntesis de agentes de etiquetado con ferroceno

Para la obtención de derivados de ferroceno funcionalizados con vinilsulfona partimos del ferrocenometanol por ser un compuesto comercial que permite la introducción de dicho grupo reactivo de interés. La adición Michael del ferrocenometanol (**73**) en medio básico para generar el alcóxido sobre DVS permite la obtención del producto de monoadición cuando se utiliza un exceso de DVS -condiciones no estequiométricas-, que evitan la formación del producto de doble adición. Así se ha alcanzado un rendimiento del 83% en la síntesis del derivado de ferroceno vinilsulfona **82** (Fc-O-VS), con hidruro sódico como base y DVS en una relación molar respecto al ferroceno de 2:1 (Esquema 3.5.).

Se prepara también un segundo derivado que posea un espaciador ferroceno-vinilsulfona de mayor longitud al objeto de poder evaluar posteriormente su efecto en las reacciones de etiquetado. Para ello se aprovecha la reactividad de la posición 1-ferrocenilmetil que permite obtener ferrocenilsulfuros por tratamiento del compuesto **73** con un tiol como el mercaptoetanol en medio ácido proporcionado por ácido trifluoroacético.¹⁷⁴ La incorporación del tiol



Esquema 3.5. Síntesis de ferroceno-vinilsulfonas (Fc-VS) **82** y **85**

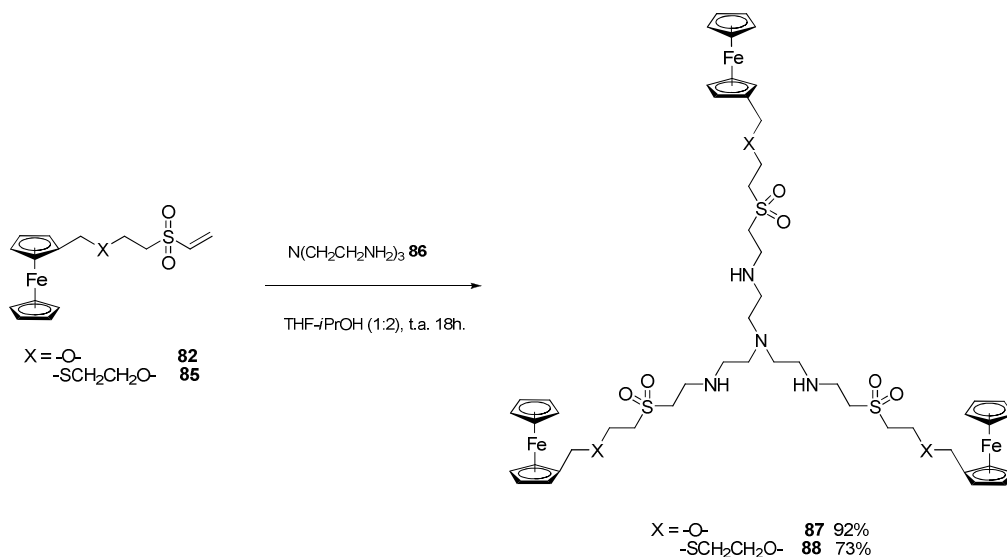
transcurre bien aunque se observa la formación de 2 productos en una relación molar 3.6:1, el compuesto esperado **83** junto con el compuesto trifluoroacetilado **84** como producto minoritario (Esquema 3.5). La disminución del tiempo de reacción minimiza la formación de este segundo compuesto alcanzándose un rendimiento del 82% para el producto hidroxilado **83** (relación molar 9:1). El posterior tratamiento de este compuesto con un exceso de DVS y t-BuOK como base origina el producto de monoación **85** (Fc-SO-VS).

3.3.2. Obtención de dendrímeros con ferroceno terminal

En primer lugar se evaluó la reactividad de ambos Fc-VS **82** y **85** frente a tris(2-aminoetil)amina **86** (TREN) obteniéndose fácilmente y con altos rendimientos diversos dendrímeros funcionalizados con grupos ferroceno terminal.

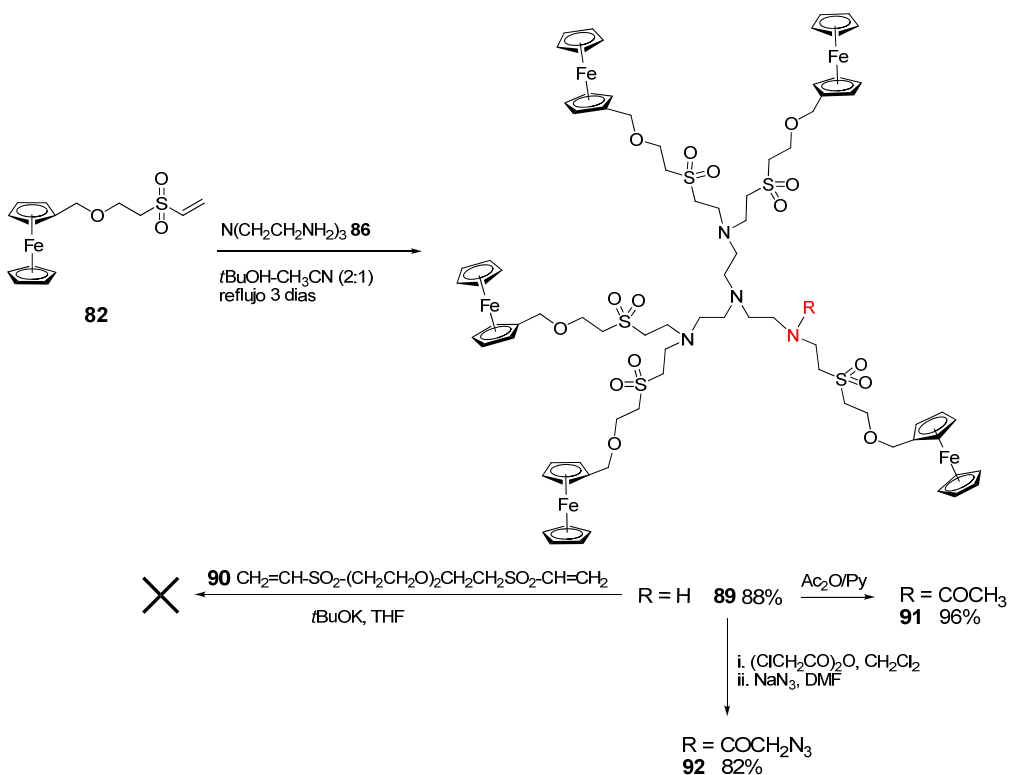
Capítulo 3

La reactividad se puede modular mediante el control de las condiciones experimentales. Cuando la reacción se lleva a cabo a t.a. se obtienen exclusivamente los dendrímeros **87** y **88** por incorporación de tres restos de ferroceno a través de la adición aza-Michael de los grupos amino primarios de TREN a la vinilsulfona (Esquema 3.6).



Esquema 3.6.

Considerando que en estas reacciones se generan tres nuevos grupos amino secundarios que deben ser susceptibles de dar nuevas adiciones aza-Michael si existe disponibilidad de vinilsulfonas en el medio, se lleva a cabo una nueva reacción a temperatura de reflujo con un exceso del compuesto Fc-O-VS (**82**) obteniéndose el compuesto **89**, en el que de acuerdo con el espectro de EM-AR obtenido mediante MALDI se han incorporado cinco restos de ferroceno a TREN (Esquema 3.7). Esto indica que uno de los grupos amino secundario permanece inalterado en las condiciones empleadas. Al objeto de lograr la funcionalización completa de los grupos amino se incrementaron los tiempos de reacción aunque sin éxito. Alternativamente, se hace reaccionar el compuesto **89** con la bisvinilsulfona **90**, más larga y menos voluminosa, en condiciones más drásticas mediante el empleo de *t*-BuOK como base con resultados también infructuosos ya que se recupera cuantitativamente el producto de partida **89**. Al objeto de confirmar químicamente la presencia de un grupo -NH- en la estructura propuesta para el compuesto **89** se lleva a cabo el tratamiento del mismo con anhídrido acético y piridina, obteniendo el compuesto acetilado **91** con excelente rendimiento.



Esquema 3.7.

Todos estos hechos indican que la funcionalización completa con vinilsulfonas de los grupos amino secundarios generados tras la primera adición aza-Michael no es posible, probablemente debido a razones de congestión estérica.

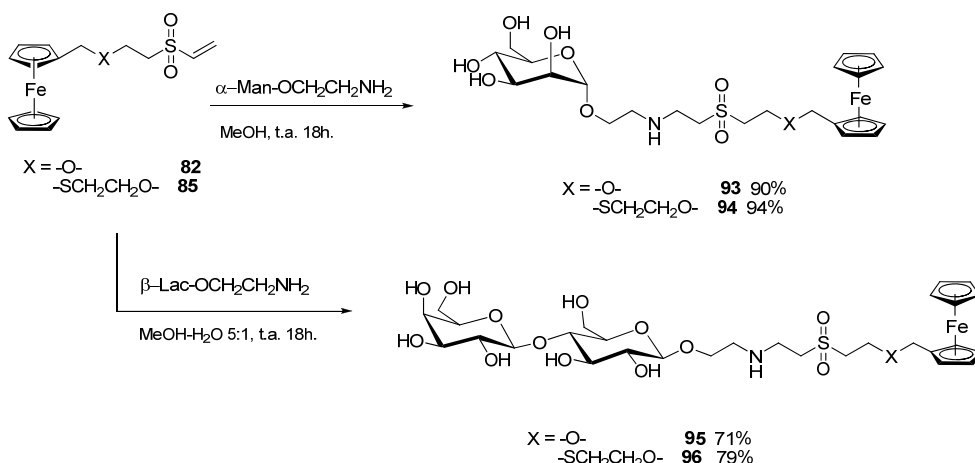
Sin embargo, la formación del derivado acetilado sugiere que el grupo residual amino puede ser explotado adecuadamente con otros fines. Así, a través de la formación de un enlace amida se debe poder introducir un nuevo grupo reactivo que actúe posteriormente como punto de anclaje a otras moléculas con una funcionalización complementaria, consiguiéndose de esta manera la incorporación de cinco restos ferroceno en un solo paso a dichas moléculas. Considerando la experiencia previa de nuestro grupo en “click-chemistry” el compuesto **89** se trata con anhídrido cloroacético y a continuación azida sódica, obteniendo de esta forma el correspondiente azidoacetil derivado **92** con excelentes rendimientos (Esquema 3.7). Los datos de RMN confirman la existencia del grupo azidoacetil (^{13}C : 167.1 ppm NCOCH_2N_3 ; ^1H : 3.86 ppm $-\text{COCH}_2\text{N}_3$) así como el espectro de IR, que muestra el pico característico de la agrupación azida (2104 cm^{-1}) y amida (1655 cm^{-1}). Este compuesto debe permitir la incorporación

simultánea de múltiples grupos ferroceno vía “click-chemistry” a los alquino derivados de cualquier molécula.

3.3.3. Derivatización de carbohidratos: monosacáridos, disacáridos y ciclodextrinas

En primer lugar seleccionamos diferentes carbohidratos entre los que se encuentran la manosa como ejemplo de monosacárido, la lactosa como disacárido, y un carbohidrato más complejo como la β -ciclodextrina. La obtención de conjugados de ferroceno y carbohidratos se ha abordado anteriormente mediante otras estrategias, y presenta un particular interés en el estudio de interacciones proteínas-carbohidrato.¹⁷⁷

La reacción de los Fc-VS **82** ó **85** con 2-aminoetil α -D-manopiranosido transcurre a t.a. con excelentes resultados obteniendo los conjugados **93** y **94** (Esquema 3.8). De forma similar se han preparado los conjugados de ferroceno con lactosa **95** y **96** mediante la adición aza-Michael del grupo amino del disacárido a la vinilsulfona presente en el ferroceno.



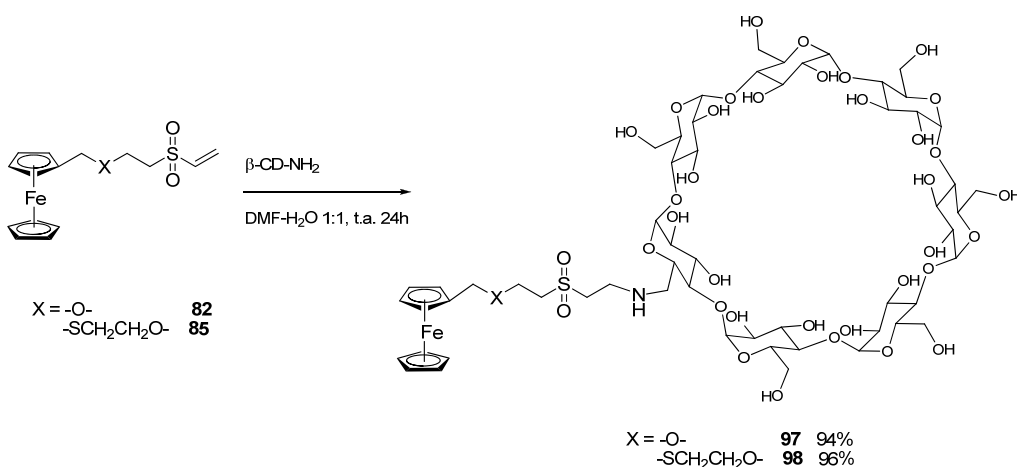
Esquema 3.8. Obtención de conjugados de Fc con monosacáridos y disacáridos

Para llevar a cabo la funcionalización de la mono-aminociclodextrina¹⁸⁰ (β -CD-NH₂) con los derivados Fc-VS **82** y **85** se emplea como disolvente una mezcla de DMF-H₂O que permite la disolución de ambos reactivos. La elevada polaridad de los productos de reacción provoca que la purificación de estos compuestos mediante

180. Bonnet, V.; Duval, R.; Tran, V.; Rabiller, C., Mono-N-glycosidation of β -Cyclodextrin – Synthesis of 6-(β -Cyclodextrinylamino)-6-deoxy-D-galactosides and of N-(6-Deoxy- β -cyclodextrinyl)galactosylazepane. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003 (24), 4810-4818.

cromatografía en columna presente una mayor complejidad, aislándose los conjugados Fc-CD **97** y **98** (Esquema 3.9) con rendimientos en torno al 60%.

Para optimizar dichos resultados se realizó una variante en el proceso de purificación que supone la adición al crudo de reacción obtenido tras producirse la reacción a t.a. de una pequeña cantidad de aminopropil sílica (fácilmente preparada por silanización de sílica comercial activada de acuerdo con un procedimiento descrito en bibliografía¹⁸¹), calentando a 60°C durante 4 h. De esta manera se consigue que la aminopropil sílica actúe como agente secuestrante del ligero exceso de reactivo de marcaje empleado (**82** o **85**), logrando su eliminación tal y como se observa mediante c.c.f. Tras el filtrado de la sílica y la evaporación del disolvente a presión reducida se obtienen los conjugados **97** y **98** con muy buenos rendimientos y sin necesidad de purificación cromatográfica.



Esquema 3.9. Reacción de Fc-VS con $\beta\text{-CD-NH}_2$

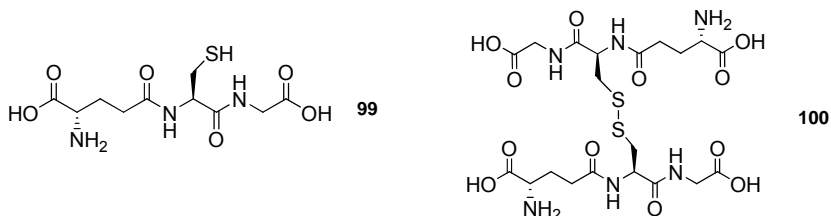
3.3.4. Derivatización de péptidos

Seleccionamos como péptido el glutatión por su importancia biológica. El glutatión (GSH, **99**) es un tripéptido de glicina, cisteína y ácido glutámico que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. Es un antioxidante que se encuentra a una concentración de aproximadamente 5 mM en las células y que ayuda a protegerlas de especies reactivas como los radicales libres y los peróxidos. El

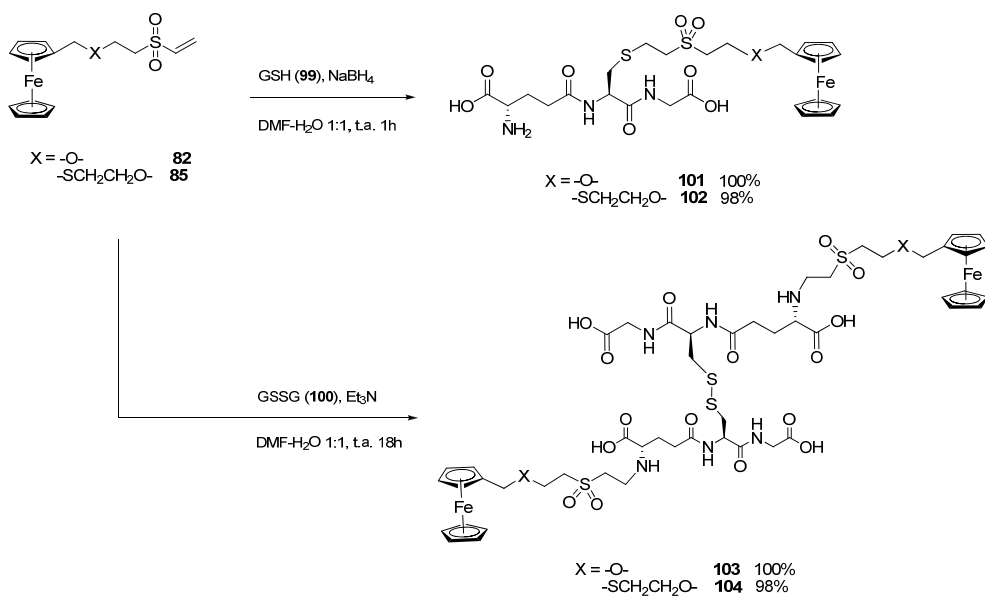
¹⁸¹. Zougagh, M.; Cano Pavón, J. M.; Garcia de Torres, A., Chelating sorbents based on silica gel and their application in atomic spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (6), 1103-1113.

Capítulo 3

glutación se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, y actúa a través del grupo tiol como nucleófilo, pudiendo reducir enlaces disulfuro en proteínas citoplasmáticas al actuar como donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutatión (**GSSG, 100**).



Para la funcionalización del glutatión con derivados de ferroceno a través de la función vinilsulfona se plantean dos vías alternativas que aprovechan la presencia de un grupo amino y un grupo tiol en el tripéptido: una basada en la utilización de la forma reducida de glutatión GSH (**99**) y una segunda basada en su forma oxidada GSSG (**100**). En el primer caso, el tratamiento de GSH con 1.1 equivalentes de los compuestos **82** ó **85** conduce exclusivamente a la incorporación de la etiqueta de ferroceno a través de la adición Michael del grupo tiol a la vinilsulfona (Esquema 3.10), sin interferencia del grupo amino, obteniéndose los compuestos **101** y **102**. En el segundo caso la funcionalización tiene lugar a través del grupo amino dado que el grupo tiol permanece inactivo en forma de puente disulfuro, aislándose los compuestos **103** y **104** a partir de GSSG (**100**) (Esquema 3.10).



Esquema 3.10.

3.3.5. Caracterización electroquímica

La voltametría cíclica¹⁸²⁻¹⁸³ (CV) es una de las técnicas electroquímicas más populares por su carácter cualitativo, que la convierte en una excelente herramienta para la exploración de las propiedades electroquímicas de una especie determinada. En la voltametría cíclica se lleva a cabo un barrido triangular de potencial como el de la figura 3.4, siendo la pendiente lo que conocemos como velocidad de barrido ν ($V \cdot s^{-1}$). Como resultado, para un analito oxidable se obtiene un voltamograma cíclico, pudiéndose determinar si el proceso es reversible o no. A partir del voltamograma se obtienen parámetros como la intensidad de corriente, I_{pa} e I_{pc} y los potenciales de ambos picos, anódico y catódico E_{pa} y E_{pc} , que permiten calcular otros parámetros importantes como el potencial de semionda ($E_{1/2}$). Aunque el cálculo riguroso del potencial de semionda se lleva a cabo mediante la ecuación $E_{1/2} = E_{pa} - 1.109(RT/nF)$, el potencial formal de electrodo (E^0) que se define como $E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$ constituye una buena aproximación ampliamente aceptada.¹⁸⁴

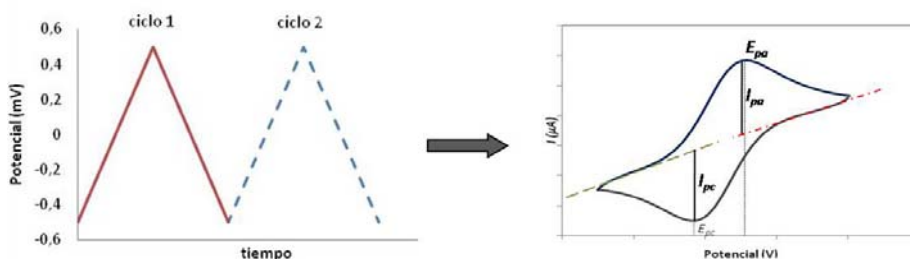


Figura 3.4. Barrido de potencial y voltamograma cíclico para un analito oxidable cualquiera

El concepto de reversibilidad viene determinado por la velocidad de la transferencia electrónica heterogénea en la superficie del electrodo. Siempre que se trabaje en condiciones de difusión (ausencia de agitación para evitar el movimiento de los iones por convección y presencia de un electrolito soporte para evitar el transporte del analito por migración), esta transferencia es rápida en los procesos reversibles y se obtienen curvas de avance y de retorno simétricas. Los dos criterios de reversibilidad más utilizados son:

182. Monk, P. M. S., *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*. **2001**, Wiley.

183. Scholz, F., *Electroanalytical Methods*. **2002**, Ed. Springer.

184. Cardona, C. M.; Mendoza, S.; Kaifer, A. E., *Electrochemistry of encapsulated redox centers*. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29 (1), 37-42.

Capítulo 3

- Diferencia de potencial de pico (ΔE_p): en un sistema reversible esa diferencia es constante e independiente de la velocidad de barrido

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{2.3RT}{nF} \approx \frac{0.059}{n} \quad (\text{a } 25^\circ\text{C})$$

- Relación de intensidades de pico (I_{pa}/I_{pc}): en un sistema reversible esta relación es aproximadamente igual a 1

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} \approx 1$$

Además del potencial de semionda, otro parámetro que contribuye a la caracterización de una especie electroactiva es su coeficiente de difusión (D_0). La intensidad de pico de la curva de avance viene determinada por la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A C_0 (D_0 \nu)^{1/2}$$

donde I_p representa la intensidad de pico (A), F es la constante de Faraday ($96485.3 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), R es la constante de los gases ($8.31447 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T es la temperatura (K), n es el número de electrones transferidos, A es la superficie del electrodo (cm^2), C_0 es la concentración de la especie electroactiva ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) y ν es la velocidad de barrido ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$). De acuerdo con esta ecuación, la linealidad de I_p frente a $\nu^{1/2}$ es otra evidencia del carácter reversible del proceso y proporciona D_0 a partir del valor de la pendiente.

La caracterización electroquímica de los derivados de ferroceno obtenidos se ha llevado a cabo mediante experimentos de voltametría cíclica sobre disoluciones 0.2 mM de cada uno de ellos en agua y/o CH_3CN en función de su solubilidad y con NaClO_4 50 mM como electrolito soporte. Los experimentos de CV permiten obtener directamente los potenciales de semionda $E_{1/2}$ que caracterizan el proceso de oxidación de la unidad de ferroceno en los conjugados obtenidos, así como D_0 (Tablas 3.2 y 3.3).

Los voltamogramas cíclicos registrados muestran en todos los casos una única onda anódica con el correspondiente pico de retorno, tal y como se muestra a modo de ejemplo en la figura 3.5 correspondiente a las curvas intensidad-potencial de diferentes derivados de ferroceno.

El incremento de $E_{1/2}$ se asocia habitualmente a un efecto electrón-atrayente del sustituyente, que desestabiliza la carga positiva generada y por tanto dificulta la oxidación, lo que concuerda con los datos obtenidos. Para el compuesto **82** y todos sus derivados (**87**, **93**, **95**, **97**, **101** y **103**), que presentan como sustituyente la agrupación $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2^-$ unida al anillo del ferroceno, obtenemos valores de $E_{1/2}$ superiores a los obtenidos para sus correspondientes análogos con la agrupación $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2^-$ (**85** y sus derivados **88**, **94**, **96**, **98**, **102** y **104**), ya que el espaciador oxigenado es más electrón-atrayente que su análogo azufrado, provocando un desplazamiento de $E_{1/2}$ hacia valores más positivos como se observa en la figura 3.5C.

Para los derivados **87** y **88** (figura 3.5A), que contienen en su estructura tres unidades de ferroceno se obtiene una única onda, poniendo de manifiesto que los tres ferrocenos se oxidan al mismo potencial y por tanto no existe interacción entre los diferentes centros metálicos. La incorporación de monosacáridos o disacáridos tiene poca repercusión en la variación de $E_{1/2}$ aunque en todos los casos se desplaza ligeramente hacia valores más positivos. La naturaleza del azúcar tiene un efecto insignificante en $E_{1/2}$, ya que tanto para manosa como para lactosa se obtienen valores similares (0.262V para **93** y **95** en CH_3CN -figura 3.5B-, mano- y lacto- respectivamente; 0.404V para **94** y 0.399V para **96** en disolución acuosa, mano- y lacto- respectivamente).

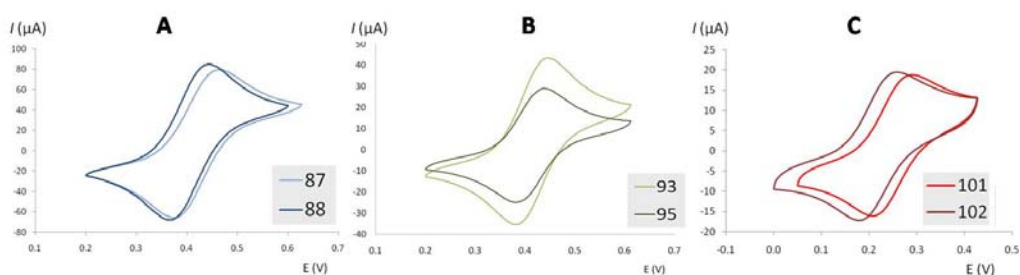


Figura 3.5. Voltamograma de CV obtenido a 25°C y ν 0.2 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ para disoluciones 50 mM NaClO_4 y 0.2 mM de los compuestos **87**, **88**, **93** y **95** en CH_3CN y para los compuestos **101** y **102** en agua. **A.** **87** y **88**: derivados de tris(2-aminoetil)amina con Fc-O-VS y Fc-SO-VS respectivamente; **B.** **93** y **95**: derivados de Fc-O-VS con azúcares de configuración mano- y lacto- respectivamente; **C.** **101** y **102**: derivados de GSH con Fc-O-VS y Fc-SO-VS respectivamente.

En el caso excepcional de los derivados de ciclodextrina, se produce un gran desplazamiento de $E_{1/2}$ hacia valores más positivos, hecho indicativo del proceso de inclusión que puede sufrir el ferroceno en presencia de

Capítulo 3

ciclodextrinas,¹⁸⁵ lo que dificulta su oxidación, ya que el ferroceno no se oxida cuando se encuentra incluido en la cavidad de la ciclodextrina y es necesario que se produzca la disociación para que se dé la transferencia electrónica.¹⁸⁶

Finalmente, hay que resaltar el incremento de $E_{1/2}$ observado para un mismo compuesto empleando acetonitrilo como disolvente en lugar de agua (tablas 3.2 y 3.3), ya que la naturaleza del disolvente, y más concretamente su polaridad tiene un efecto importante en el proceso. La constante dieléctrica del agua ($\epsilon = 79$ a 25°C) prácticamente duplica el valor de la constante dieléctrica del acetonitrilo ($\epsilon = 38$ a 25°C), ese aumento de polaridad y su efecto en la solvatación de los iones generados previsiblemente facilitan la oxidación desplazando $E_{1/2}$ hacia valores menores en el caso del agua.

Tabla 3.2. Parámetros electroquímicos obtenidos mediante voltametría cíclica a partir de disoluciones acuosas 0.2 mM de los compuestos que se indican, con NaClO₄ 50 mM a 25°C.

Compuesto	$E_{1/2}$ (V)	$D_0 \times 10^6$ (cm ² ·s ⁻¹)
FcCH ₂ OH 73	0.222	11.7
82	0.253	8.6
85	0.232	6.0
93	0.262	7.5
94	0.246	3.7
95	0.262	4.5
96	0.236	5.2
97	0.368	1.2
98	0.390	1.0
101	0.249	4.7
102	0.218	5.8
103	0.251	7.1

185. Hapiot, F.; Tilloy, S.; Monflier, E., Cyclodextrins as Supramolecular Hosts for Organometallic Complexes. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 767-781.

186. Matsue, T.; Evans, D. H.; Osa, T.; Kobayashi, N., Electron-transfer reactions associated with host-guest complexation. Oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of .beta.-cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (12), 3411-3417.

Tabla 3.3. Parámetros electroquímicos obtenidos mediante voltametría cíclica a partir de disoluciones en acetonitrilo 0.2 mM de los compuestos que se indican, con NaClO₄ 50 mM a 25°C.

Compuesto	$E_{1/2}$ (V)	$D_0 \times 10^6$ (cm ² ·s ⁻¹)
FcCH ₂ OH 73	0.376	27.0
82	0.411	6.6
85	0.395	7.2
87	0.421	6.0
88	0.403	9.4
93	0.416	30.3
94	0.404	7.7
95	0.410	18.3
96	0.399	26.4

Para determinar el coeficiente de difusión (D_0) de los derivados de ferroceno se realizaron experimentos de voltametría cíclica para cada uno de ellos a diferentes velocidades de barrido, desde 0.05 V·s⁻¹ hasta 0.5 V·s⁻¹. Como se observa a modo representativo en las gráficas para los compuestos **82** y **85** (Figura 3.6), la intensidad de corriente aumenta con el valor de ν , obteniendo un comportamiento similar para el resto de compuestos, tanto en agua como en acetonitrilo.

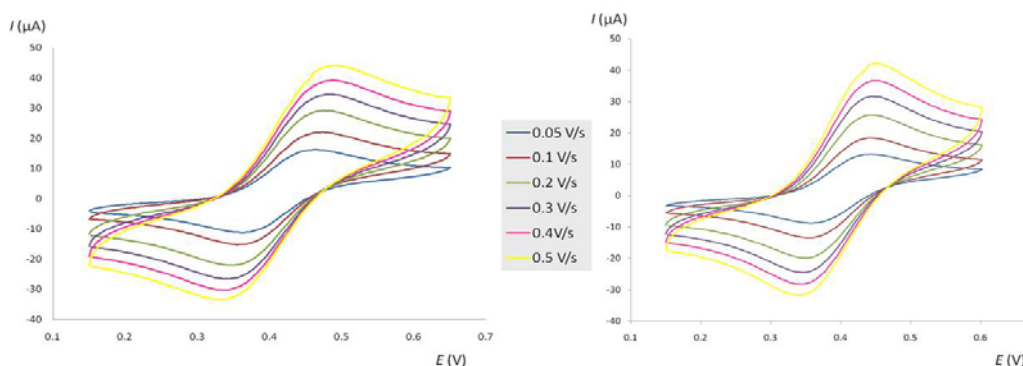


Figura 3.6. Voltamogramas de CV para disoluciones 0.2 mM de los compuestos **82** (izq.) y **85** (dcha.) en CH₃CN con NaClO₄ 50 mM como electrolito soporte, obtenidos a 25°C y diferentes velocidades de barrido.

La representación gráfica de la intensidad de pico anódica (I_{pa}) frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($\nu^{1/2}$) presenta una tendencia lineal para todos los derivados estudiados confirmando que el proceso es prácticamente reversible y que en las condiciones utilizadas está controlado por difusión; en la

Capítulo 3

figura 3.7 se recoge el ajuste de los datos por mínimos cuadrados, ciñéndonos por simplicidad a los compuestos solubles en CH₃CN.

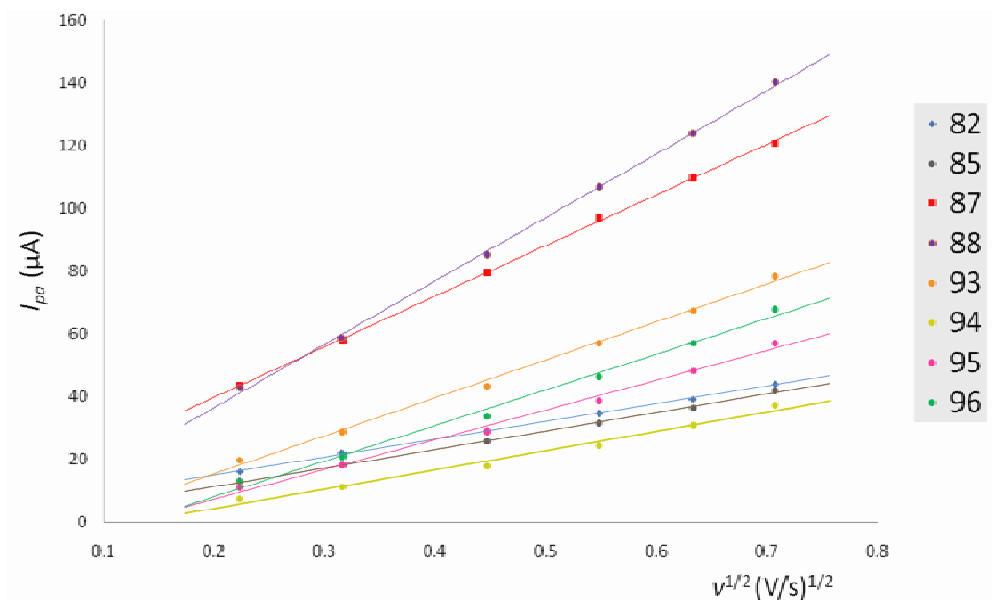


Figura 3.7. Representación de I_{pa} (obtenido a partir del voltamograma cíclico) frente a $v^{1/2}$ y su ajuste por mínimos cuadrados para disoluciones 0.2 mM de los diferentes compuestos en CH₃CN con 50 mM NaClO₄ a 25°C.

El valor de la pendiente permite calcular D_0 de acuerdo con la anterior ecuación de Randles-Ševčík. Los valores obtenidos para todos los compuestos se recogen en las tablas 3.2 y 3.3. Los valores de D_0 más bajos se obtienen para los derivados de ciclodextrina **97** y **98** ($1.2 \cdot 10^{-6}$ y $1.0 \cdot 10^{-6}$ cm²·s⁻¹ respectivamente), lo que concuerda con mayores radios hidrodinámicos para estos compuestos debido a su mayor tamaño, ya que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al radio hidrodinámico de un compuesto como determina la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_0 = \frac{k T}{6\pi r_H \eta}$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, r_H es el radio hidrodinámico y η es la viscosidad del medio.

3.3.6. Marcaje de BSA con ferroceno *via* vinilsulfona

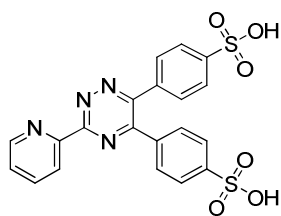
Para poner de manifiesto la potencialidad en procesos de bioconjugación de los reactivos de marcaje desarrollados basados en ferroceno seleccionamos BSA como proteína modelo. La BSA (Bovine Serum Albumin) es una cadena polipeptídica de estructura monomérica que contiene 583 aminoácidos, de entre los cuales se destacan como residuos nucleófilos 59 lisinas, 17 histidinas, 1 cisteína libre y 17 puentes disulfuro. El grado de marcaje de una proteína con un determinado reactivo depende de numerosos factores, siendo de especial importancia la estequiometría empleada. En nuestro caso trabajamos con diferentes relaciones molares BSA:Fc-VS para poder evaluar su efecto en el rendimiento del proceso.

Una disolución de BSA de 2 mg/mL en tampón HEPES pH 8.5 se trata con diferentes cantidades de Fc-O-VS **82** ó Fc-SO-VS **85** utilizando relaciones molares BSA:vinilsulfona de 1:10, 1:50 y 1:100 en ambos casos. El reactivo de marcaje se añade disuelto en DMSO, observándose una ligera precipitación en el caso del compuesto Fc-SO-VS **85** tras añadir éste a la disolución acuosa de proteína, principalmente en el caso de la estequiometría 1:100. El derivado Fc-O-VS **82** sin embargo permanece en todo momento en disolución. Las disoluciones se incuban 24 h a t.a., a continuación se centrifugan para después llevar a cabo la diálisis del sobrenadante de las muestras, recuperándose la disolución final de proteína marcada.

La concentración de BSA en las muestras tratadas se determina mediante el método de Bradford¹⁸⁷ y el contenido en Fe se determina espectrofotométricamente empleando un método descrito en bibliografía para la determinación de Fe procedente de ferroceno en muestras proteicas.¹⁸⁸ Este método emplea la ferrozina (ácido(3-(2-piridil)-5,6-bis(4-fenilsulfónico)-1,2,4-triazina) (**105**) que en presencia de hierro forma el complejo $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$, que absorbe a 564 nm.

187. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72 (1-2), 248-254.

188. Badia, A.; Huy Thai, N. H.; English, A. M.; Mikkelsen, S. R.; Patterson, R. T., Determination of ferrocene iron in protein matrices. *Anal. Chim. Acta* **1992**, 262 (1), 87-90.



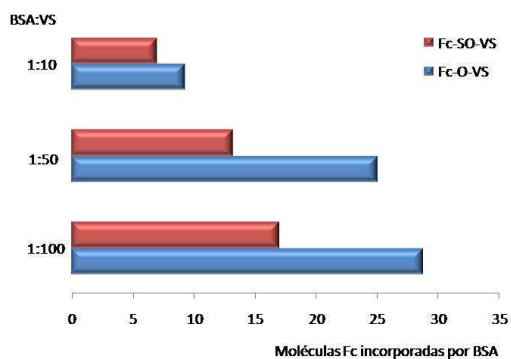
105

Inicialmente las muestras se tratan con una disolución de ácido tricloroacético calentando a 90°C, lo que provoca la desnaturalización de la proteína y la liberación del Fe presente en el ferroceno. Tras centrifugar, el sobrenadante se trata con la disolución de ferrozina midiendo la absorbancia generada a 564 nm. La relación existente entre la concentración de BSA y la concentración de Fe sirve para determinar la extensión de la funcionalización con los derivados Fc-VS **82** y **85**. Los datos obtenidos para las diferentes estequiometrías se recogen en la tabla 3.4.

Los resultados confirman que los residuos de la proteína reaccionan con la vinilsulfona a un pH compatible con la naturaleza biológica de la muestra. Teniendo en cuenta la existencia de un sólo residuo de cisteína libre en la BSA, este resultado pone de manifiesto la reactividad de las vinilsulfonas con los grupos amino del BSA.

Tabla 3.4

Derivado	BSA:VS (mol)	Fe/BSA (mol)
Fc-O-VS (82)	1:10	9.28
	1:50	25.03
	1:100	28.75
Fc-SO-VS (85)	1:10	7.02
	1:50	13.20
	1:100	17.00



En un análisis más profundo, observamos un comportamiento similar en ambos compuestos Fc-O-VS (**82**) y Fc-SO-VS (**85**) ya que en los dos casos aumenta el número de ferrocenos incorporados a cada molécula de BSA al aumentar la proporción de reactivo de marcaje. Para el compuesto Fc-O-VS (**82**) la estequiometría más baja empleada (1:10) proporciona un excelente rendimiento incorporando entre 9 y 10 etiquetas por molécula de BSA. Al aumentar la proporción de vinilsulfona la extensión del marcaje también aumenta alcanzando un máximo correspondiente a ~30 etiquetas por molécula de BSA. En el caso del compuesto Fc-SO-VS (**85**), a pesar de que al tener un espaciador más largo es

previsible una mayor accesibilidad a los diferentes grupos reactivos de la proteína, los rendimientos alcanzados son inferiores en todas las estequiometrías ensayadas a los obtenidos con el compuesto **82**, resultados que pueden ser atribuidos a la menor solubilidad en medio acuoso de dicho compuesto.

Las proteínas resultantes marcadas también se analizaron mediante MALDI, para lo cual se llevó a cabo una diálisis de las muestras frente a agua destilada. El peso molecular de la BSA es de 66 KDa, sufriendo un incremento de 334 Da por molécula de Fc-O-VS (**82**) y 394 Da por molécula de Fc-SO-VS (**85**). Los espectros obtenidos también confirman la funcionalización de la proteína, ejerciendo la estequiometría una clara influencia en el marcaje, ya que se observa un desplazamiento del pico hacia mayores relaciones masa/carga (Figura 3.8).

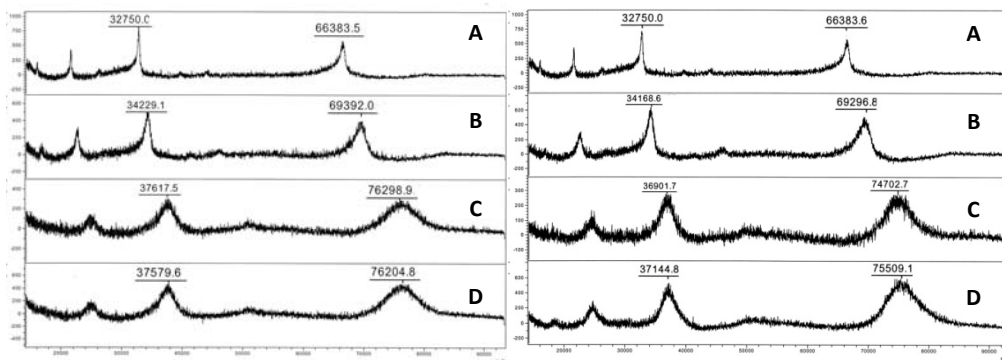
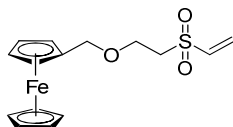


Figura 3.8. Espectro MALDI de BSA marcada con Fc-O-VS **82** (izquierda) ó Fc-SO-VS **85** (derecha). De arriba a abajo: **A.** BSA sin funcionalizar. **B.** Estequiometría BSA:VS 1:10. **C.** Estequiometría BSA:VS 1:50. **D.** Estequiometría BSA:VS 1:100.

3.4. Conclusiones

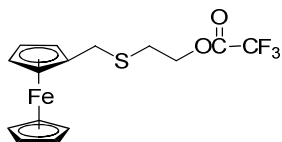
- Se ha desarrollado una metodología sencilla y eficaz para la síntesis de derivados de ferroceno conteniendo la función vinilsulfona con espaciadores de diferente longitud. Estos compuestos han demostrado su aplicabilidad para la incorporación de restos de ferroceno como etiqueta electroquímica en carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y ciclodextrinas), péptidos y proteínas.
- Se han obtenido dendrímeros con diferentes unidades de ferroceno pudiendo modularse la reactividad con aminas primarias y secundarias a través del adecuado control de las condiciones de reacción.
- La caracterización electroquímica de los derivados de ferroceno obtenidos mediante voltametría cíclica determina valores de I_{pa} , I_{pc} , $E_{1/2}$ y D_0 que ponen de manifiesto la reversibilidad del proceso electroquímico y confirman otros factores como la influencia de la naturaleza del espaciador en $E_{1/2}$ o la inclusión del ferroceno en la cavidad de la ciclodextrina.
- La potencialidad de las vinilsulfonas como grupo reactivo en bioconjugación posibilita la unión covalente de los agentes de etiquetado basados en ferroceno y conteniendo la función vinilsulfona a proteínas como BSA en condiciones suaves que preservan la funcionalidad biológica de éstas. La eficacia del etiquetado depende del espaciador y de la estequiometría empleada, obteniéndose mejores resultados con el derivado que posee el espaciador más corto, Fc-O-VS (**82**).

3.5. Sección experimental

Síntesis de ferroceno vinilsulfonas Fc-O-VS (82) y Fc-SO-VS (85)- Fc-O-VS (**82**)

A una disolución de ferrocenometanol (400 mg, 1.85 mmol) en THF anh. (30 mL) previamente desoxigenada mediante corriente de Ar se adiciona NaH (89 mg, 3.71 mmol) y DVS (0.46 mL, 4.63 mmol), y se mantiene a t.a. durante 1 h. A continuación se añade AcOH para destruir el exceso de NaH. La evaporación del disolvente a presión reducida origina un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna obteniéndose el compuesto **82**. Eluyente hexano-AcOEt (7:1), aislado como sólido anaranjado (83 %). P.f. 66.5-67.0°C; **IR** (film): $\nu = 3099, 2921, 2857, 1638, 1313, 1128, 1099, 816$ y 754 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 6.67$ (dd, 1H, $J = 16.6$ y 9.9 Hz), 6.36 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz), 6.03 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz), 4.29 - 4.16 (m, 11H), 3.82 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 3.18 (t, 2H, $J = 5.2$); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 137.8, 128.7, 82.3, 69.7, 69.5, 68.8, 68.6, 63.2, 55.1$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 335.0403$ calc. para C₁₅H₁₉FeO₃S [M+H]⁺: 335.0404.

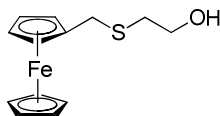
A una disolución de ferrocenometanol (460 mg, 2.13 mmol) en CH₂Cl₂ anh. (25 mL) se adiciona mercaptoetanol (0.16 mL, 2.34 mmol) y CF₃COOH (0.49 mL, 6.13 mmol), manteniendo a t.a. 30 min. El disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna. Eluye en primer lugar el compuesto **84** (hexano-AcOEt 5:1):

- Ferrocenilmetil-2-(trifluoroacetiloxi)etilsulfuro (**84**)

Aislado como sirupo amarillo (71 mg, 9 %). **IR** (film): $\nu = 3093, 2923, 1785, 1221, 1151$ y 821 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 4.40$ (t, 2H, $J = 6.9$ Hz), 4.20 - 4.15 (m, 9H), 3.57 (s, 2H), 2.76 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 158.3, 157.7, 157.2, 156.6, 120.3, 116.6, 112.8, 109.0, 84.8, 69.3, 69.2, 68.8, 67.1, 32.4, 29.4$.

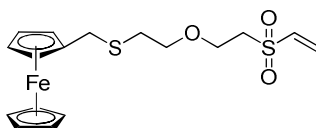
Eluye en segundo lugar (hexano-AcOEt 2:1) el compuesto **83**:

- *Ferrocenilmetil 2-hidroxietilsulfuro (83)*



Aislado como sirupo amarillo (482 mg, 82 %). **IR** (film): $\nu = 3421, 3093, 2921, 1703, 1410, 1041$ y 819 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.18\text{-}4.14$ (m, 9H), 3.66 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.52 (s, 2H), 2.66 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 2.22 (s, 1H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 84.9, 68.8, 68.7, 68.2, 60.4, 35.0, 31.5$. **EM-AR** (NALDI): $m/z = 276.0272$ calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{OSFe}$ $[\text{M}]^+$: 276.0271.

- *Fc-SO-VS (85)*



A una disolución del compuesto **83** (500 mg, 1.81 mmol) en THF (20 mL) se adiciona t-BuOK (20 mg, 0.18 mmol) y DVS (0.27 mL, 2.71 mmol), manteniendo a t.a. durante 1 h. La evaporación del disolvente a presión reducida origina un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto **85**. Eluyente hexano-AcOEt (7:1 -> 1:1), aislado como sirupo amarillo (600 mg, 84 %). **IR** (film): $\nu = 2921, 1639, 1314, 1126, 820$ y 754 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 6.78$ (dd, 1H, $J = 16.0, 10.0$ Hz), 6.39 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz), 6.07 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 4.24-4.13 (m, 9H), 3.84 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 3.55 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 3.52 (s, 2H), 3.22 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 2.65 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 138.0, 128.9, 85.3, 70.6, 69.2, 69.0, 68.5, 64.5, 55.1, 32.4, 31.2$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 394.0357$ calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{S}_2\text{Fe}$ $[\text{M}]^+$: 394.0360.

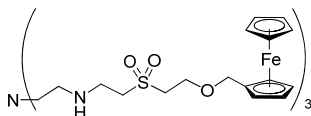
Síntesis de conjugados de ferroceno-dendrimeros

Procedimiento para la síntesis de ferroceno derivados **87 y **88****

A una disolución de Fc-O-VS **82** ó Fc-SO-VS **85** (0.99 mmol) en THF:i-PrOH 1:2 (20 mL) se adiciona tris(2-aminoetil)amina **86** (47 μL , 0.3 mmol), manteniendo la disolución resultante con agitación magnética a t.a. durante 18 h. El disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna.

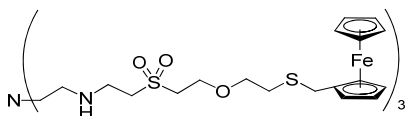
Capítulo 3

- Compuesto 87



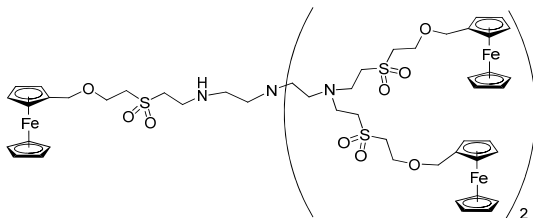
Eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (20:1->10:1), aislado como sirupo naranja (96 %). IR (film): $\nu = 3420, 3096, 2922, 2852, 1638, 1463, 1312, 1124, 820$ y 732 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 4.33$ (s, 6H), 4.22 (t, 6H, $J = 1.6$ Hz), 4.16 (t, 6H, $J = 1.6$ Hz), 4.13 (s, 15H), 3.83 (t, 6H, $J = 5.4$ Hz), 3.34 (t, 6H, $J = 6.1$ Hz), 3.27 (t, 6H, $J = 5.4$ Hz), 3.12 (t, 6H, $J = 6.2$ Hz), 2.86 (sa, 3H), 2.64 (t, 6H, $J = 5.0$ Hz), 2.54 (t, 6H, $J = 5.1$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 82.5, 70.0, 69.8, 69.0, 68.8, 63.5, 54.6, 54.0, 54.0, 47.2, 42.6$; EM-AR (MALDI): $m/z = 1149.2582$ calc. para $\text{C}_{51}\text{H}_{73}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_3\text{Fe}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1149.2583.

- Compuesto 88



Eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (10:1), aislado como sirupo anaranjado (73 %). IR (film): $\nu = 3584, 3317, 3090, 2920, 2855, 1638, 1464, 1311, 1285, 1123, 1103, 820$ y 734 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 4.18$ -4.12 (m, 27H), 3.85 (t, 6H, $J = 5.4$ Hz), 3.57 (t, 6H, $J = 6.6$ Hz), 3.55 (s, 6H), 3.44-3.40 (m, 6H), 3.34 (t, 6H, $J = 5.4$ Hz), 3.18 (t, 6H, $J = 5.8$ Hz), 2.74-2.70 (m, 6H), 2.66 (t, 6H, $J = 6.6$ Hz), 2.63-2.59 (m, 6H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 85.0, 70.4, 68.9, 68.8, 68.2, 64.4, 54.4, 53.9, 53.9, 47.1, 42.5, 32.3, 31.3$; EM-AR (MALDI): $m/z = 1329.2679$ calc. para $\text{C}_{57}\text{H}_{85}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_6\text{Fe}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1329.2684.

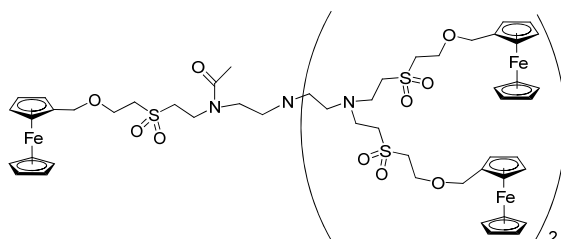
- Síntesis del compuesto 89



A una disolución de Fc-O-VS **82** (334 mg, 1.0 mmol) en t-BuOH- CH_3CN 2:1 (20 mL) se adiciona tris(2-aminoetil)amina **86** (22 μL , 0.14 mmol), manteniendo la disolución resultante con agitación magnética a reflujo durante 3 días. El disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en

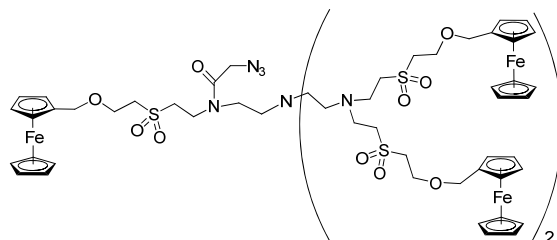
columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 20:1), obteniendo **89** (221 mg, 88%) aislado como sirupo. **IR** (film): $\nu = 3091, 2954, 2919, 2851, 1461, 1287, 1098, 820$ y 734 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.33$ (s, 10H), 4.25-4.10 (m, 45H), 3.81 (t, 10H, $J = 5.3$ Hz), 3.30-3.10 (m, 22H), 2.87 (t, 8H, $J = 6.7$ Hz), 2.59 (sa, 2H), 2.44 (s, 10H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 82.4, 70.0, 69.9, 69.0, 68.8, 63.5, 54.7, 52.8, 51.9, 51.8, 46.9$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1839.3043$ calc. para $\text{C}_{81}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{S}_5\text{Fe}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1839.3054.

-Síntesis del compuesto 91



Una disolución de **89** (50 mg, 0.028 mmol) en piridina (1 mL) se enfría en baño de hielo para después adicionar Ac_2O (1 mL) dejando alcanzar t.a. y manteniendo así durante 3 h. Se añade lentamente MeOH (10 mL) y el disolvente se evapora en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 30:1) obteniendo **91** (49 mg, 96%) aislado como sirupo. **IR** (film): $\nu = 3091, 2923, 2854, 1640$ y 1126 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 4.33$ (s, 10H), 4.24-4.11 (m, 45H), 3.81 (t, 10H, $J = 5.2$ Hz), 3.69 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.32 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.27 (m, 2H), 3.21-3.11 (m, 16H), 2.86 (t, 8H, $J = 6.4$ Hz), 2.49-2.37 (m, 8H), 2.04 (s, 3H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 170.9, 82.1, 69.8, 69.7, 69.5, 68.8, 68.6, 68.5, 63.4, 63.3, 63.0, 54.5, 54.3, 52.8, 52.6, 51.6, 46.8, 46.7, 42.6, 40.3, 21.6$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1881.3164$ calc. para $\text{C}_{83}\text{H}_{110}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{S}_5\text{Fe}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1881.3160.

-Síntesis del azidoderivado 92



A una disolución de **89** (100 mg, 0.055 mmol) en CHCl_3 (10 mL) se adiciona anhídrido cloroacético (14 mg, 0.83 mmol) disuelto en CHCl_3 (2 mL), manteniendo

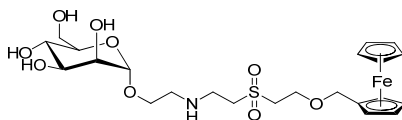
Capítulo 3

con agitación magnética a t.a. durante 1 h. El disolvente se evapora en el rotavapor. El crudo obtenido se disuelve en DMF (5 mL) y se añade NaN_3 (36 mg, 0.55 mmol) manteniendo la disolución resultante con agitación a t.a. durante 24 h. El disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (CHCl_3 -MeOH 30:1), obteniendo **92** (90 mg, 82%) en forma de sirupo. **IR** (film): $\nu = 3091, 2923, 2858, 2104, 1655, 1288, 1126, 1097, 819$ y 751 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.27$ (s, 10H), 4.19-4.04 (m, 45H), 3.86 (s, 2H), 3.75 (t, 10H, $J = 5.0$ Hz), 3.66 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 3.28 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 3.20 (sa, 2H), 3.12 (t, 8H, $J = 5.0$ Hz), 3.06 (t, 8H, $J = 6.4$ Hz), 2.88 (sa, 2H), 2.83-2.76 (m, 10H), 2.42-2.29 (m, 8H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 167.1, 81.1, 68.8, 68.7, 68.6, 67.9, 67.6, 62.4, 62.3, 62.0, 53.5, 53.4, 52.6, 51.8, 51.6, 51.3, 50.5, 50.4, 49.3, 45.7, 45.6, 39.5$. **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1922.3181$ calc. para $\text{C}_{83}\text{H}_{109}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{S}_5\text{Fe}_5\text{Na}$: 1922.3179.

Procedimiento para la síntesis de conjugados de ferroceno y mono- y disacáridos

A una disolución de Fc-O-VS **82** ó Fc-SO-VS **85** (0.55 mmol) en MeOH (20 mL) se adiciona 2-aminoetil α -D-manopiranosido¹⁸⁹ (0.5 mmol) ó 2-aminoetil 4-O- β -D-galactopiranosil- β -D-glucopiranosido¹⁹⁰ (0.5 mmol) disuelto en MeOH (4 mL) o H_2O (4 mL) respectivamente, manteniéndose la disolución resultante con agitación magnética a t.a. durante 18 h. El disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna obteniéndose los correspondientes conjugados **93-96**.

- Compuesto **93**



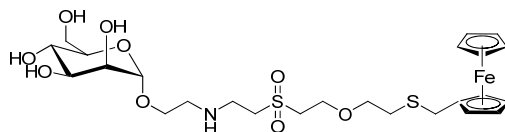
Eluyente $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (10:1), aislado como sirupo amarillo (250 mg, 90 %). $[\alpha]_D +21.2^\circ$ (c 0.5, MeOH); **IR** (film): $\nu = 3549, 2920, 1657, 1460$ y 1045 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CD_3OD , 400 MHz): $\delta = 4.76$ (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 4.36 (s, 2H), 4.26 (t, 2H, $J = 1.8$ Hz), 4.18 (t, 2H, $J = 1.8$ Hz), 4.15 (s, 5H), 3.86-3.79 (m, 5H), 3.75-3.66 (m, 2H), 3.60 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz), 3.54-3.50 (m, 2H), 3.36-3.32 (m, 4H), 3.11 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 2.83-2.76 (m, 2H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CD_3OD , 75 MHz): $\delta = 101.8, 83.8, 74.8, 72.5, 72.0, 70.7,$

189. Martin, A. L.; Li, B.; Gillies, E. R., Surface Functionalization of Nanomaterials with Dendritic Groups: Toward Enhanced Binding to Biological Targets. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *131* (2), 734-741.

190. Sun, X.-L.; Haller, C. A.; Wu; Conticello, V. P.; Chaikof, E. L., One-Pot Glyco-Affinity Precipitation Purification for Enhanced Proteomics: The Flexible Alignment of Solution-Phase Capture/Release and Solid-Phase Separation. *J. Proteome Res.* **2005**, *4* (6), 2355-2359.

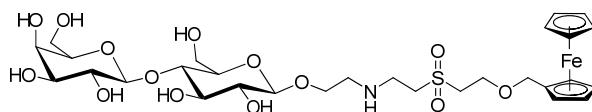
70.6, 69.7, 69.5, 68.7, 67.3, 64.5, 62.9, 55.1, 54.7, 49.1, 43.2; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 580.1273$ calc. para $C_{23}H_{35}NO_9SFeNa$ $[M+Na]^+$: 580.1274.

- **Compuesto 94**



Eluyente CH_3CN-H_2O (5:1), aislado como sirupo amarillo (290 mg, 94 %). $[\alpha]_D +11.2^\circ$ (c 0.5, MeOH); **IR** (film): $\nu = 3504, 2920, 1656, 1460, 1070$ y 811 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 4.77$ (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 4.20 (t, 2H, $J = 1.6$ Hz), 4.14 (s, 5H), 4.12 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz), 3.87-3.81 (m, 5H), 3.74-3.68 (m, 2H), 3.63-3.56 (m, 5H), 3.56-3.50 (m, 2H), 3.40 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.38 (t, 2H, $J = 5.1$ Hz), 3.12 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 2.86-2.81 (m, 2H), 2.68 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz); **¹³C-RMN** (CD_3OD , 100 MHz): $\delta = 101.8, 86.6, 74.8, 72.6, 72.1, 71.4, 69.9, 69.8, 69.0, 68.7, 67.4, 65.6, 63.0, 55.1, 54.9, 49.3, 43.3, 32.9, 32.3$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 640.1307$ calc. para $C_{25}H_{39}NO_9S_2FeNa$ $[M+Na]^+$: 640.1308.

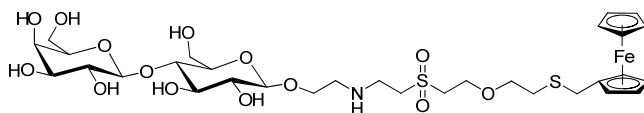
- **Compuesto 95**



Eluyente CH_3CN-H_2O (5:1), aislado como sirupo amarillo (255 mg, 71 %). **IR** (KBr): $\nu = 3407, 2924, 1653, 1291, 1121$ y 619 cm^{-1} ; **¹H-RMN** ($DMSO-d_6$, 400 MHz): $\delta = 4.36$ (s, 2H), 4.35 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 4.31 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 4.26 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 4.15 (s, 4H), 3.95 (m, 1H), 3.91 (dd, 1H, $J = 12.1, 2.3$ Hz), 3.86-3.80 (m, 4H), 3.78 (dd, 1H, $J = 11.4$ y 7.5 Hz), 3.69 (dd, 2H, $J = 11.3$ y 4.4 Hz), 3.60-3.51 (m, 4H), 3.48 (dd, 1H, $J = 9.7$ y 3.2 Hz), 3.44-3.39 (m, 1H), 3.37-3.32 (m, 4H), 3.27 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 3.11 (m, 2H), 2.82 (m, 2H); **¹³C-RMN** ($DMSO-d_6$, 100 MHz): $\delta = 105.9, 105.1, 82.3, 81.4, 77.9, 77.3, 77.1, 75.6, 75.5, 73.4, 71.5, 71.1, 70.6, 70.4, 69.7, 65.2, 63.3, 62.7, 55.8, 55.2$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 742.1795$ calc. para $C_{29}H_{45}NO_{14}SFeNa$ $[M+Na]^+$: 742.1802.

Capítulo 3

- Compuesto 96

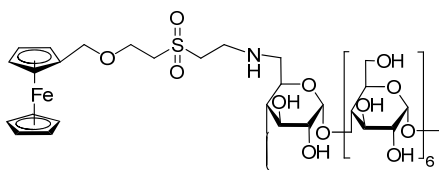


Eluyente CH₃CN-H₂O (5:1), aislado como sirupo amarillo (308 mg, 79 %). **IR** (film): $\nu = 3381, 2925, 1654, 1284, 1123$ y 619 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400 MHz): $\delta = 5.04$ (sa, 1H), 4.22-4.10 (m, 11H), 3.79 (m, 1H), 3.74 (t, 3H, $J = 5.5 \text{ Hz}$), 3.61 (sa, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.53-3.39 (m, 7H), 3.35-3.20 (m, 7H), 3.03 (t, 1H, $J = 7.9 \text{ Hz}$), 2.98 (sa, 2H), 2.75 (sa, 2H), 2.60 (t, 2H, $J = 6.7 \text{ Hz}$); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz): $\delta = 103.8, 102.7, 85.0, 80.7, 75.4, 74.8, 74.5, 73.2, 73.1, 70.5, 69.7, 68.5, 68.4, 68.1, 67.6, 63.7, 60.5, 60.3, 53.2, 48.0, 41.9, 31.1, 30.4$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 780.2016$ calc. para C₃₁H₅₀NO₁₄S₂Fe [M+H]⁺: 780.2017.

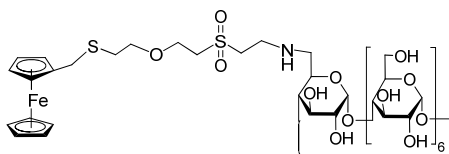
Procedimiento general para la síntesis de conjugados de ferroceno y ciclodextrina

A una disolución de Fc-O-VS **82** ó Fc-SO-VS **85** (0.106 mmol) en DMF-H₂O 1:1 (10 mL) se adiciona mono-6-amino-6-deoxi- β -CD (100 mg, 0.088 mmol), manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 24 h. A continuación se añade aminopropilsilica (40 mg), calentando la suspensión resultante a 60°C durante 4 h. observando por c.c.f. la desaparición del exceso de Fc-VS. El crudo de reacción se filtra a vacío, lavando con agua (10 mL). El filtrado se evapora en el rotavapor y el producto obtenido se liofiliza.

- Compuesto 97



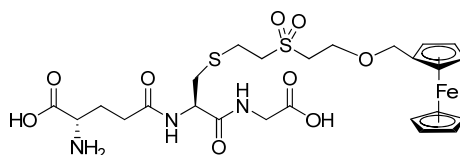
Aislado como sólido amarillo (121 mg, 94%). $[\alpha]_D^{20} +86.6^\circ$ (c 1, agua); P. f. 191-192°C; **IR** (KBr): $\nu = 3398, 2916, 1642, 1410, 1150, 1077$ y 1026 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz): señales seleccionadas $\delta = 4.91$ -4.79 (m, 7H), 4.24-4.08 (m, 11H); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 100 MHz): $\delta = 102.7, 102.6, 102.5, 82.4, 82.3, 82.2, 81.9, 81.7, 73.4, 73.2, 72.9, 72.6, 72.4, 69.7, 69.6, 68.7, 60.4, 60.3, 60.1, 55.9, 55.3, 53.4, 48.9$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1490.4092$ calc. para C₅₇H₈₉NO₃₇SFeNa [M+Na]⁺: 1490.4076.

- **Compuesto 98**

Aislado como sólido (129 mg, 96%). $[\alpha]_D +84.7^\circ$ (c 1, agua); P. f. 198-199°C; **IR** (KBr): $\nu = 3361, 2925, 1654, 1384, 1155$ y 1030 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400 MHz): señales seleccionadas $\delta = 4.87$ (s, 7H), 3.04 (m, 2H), 2.82 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.69 (m, 2H), 2.40 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 103.0, 102.9, 102.7, 102.6, 102.3, 85.4, 84.6, 82.4, 82.3, 82.0, 81.9, 81.8, 79.4, 73.3, 73.2, 73.1, 72.8, 72.7, 72.6, 72.4, 71.6, 69.1, 68.9, 68.7, 68.6, 68.3, 68.1, 64.6, 60.3, 60.2, 60.1, 54.3, 53.9, 50.1, 42.7, 32.0, 30.2$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1550.4102$ calc. para $\text{C}_{59}\text{H}_{93}\text{NO}_{37}\text{S}_2\text{FeNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1550.4109.

Procedimiento para la síntesis de conjugados de ferroceno y GSH

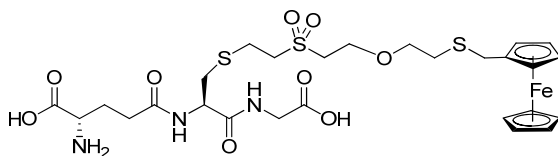
A una disolución de glutatión (100 mg, 0.33 mmol) en DMF- H_2O 1:1 (15 mL) se adiciona el derivado Fc-O-VS **82** ó Fc-SO-VS **85** (0.36 mmol) junto con NaBH_4 (13 mg, 0.34 mmol), manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 1 h. El exceso de NaBH_4 se neutraliza con AcOH y el disolvente se evapora en el rotavapor, co-evaporando con tolueno. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna.

- **Compuesto 101**

Eluyente $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (4:1), aislado como sólido naranja (209 mg, 100%). P. f. 185-186°C; $[\alpha]_D -12.6^\circ$ (c 1, agua); **IR** (KBr): $\nu = 3420, 3094, 2924, 1651, 1542, 1397, 1315, 1118$ y 668 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (D_2O , 400 MHz): $\delta = 4.50$ (dd, 1H, $J = 8.6, 5.0$ Hz), 4.40-4.15 (m, 11H), 3.85 (t, 2H, $J = 4.8$ Hz), 3.72-3.66 (m, 3H), 3.42-3.31 (m, 4H), 2.95 (dd, 1H, $J = 14.1, 4.9$ Hz), 2.86 (dd, 2H, $J = 9.0, 5.8$ Hz), 2.77 (dd, 1H, $J = 14.1, 8.8$ Hz), 2.45 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 2.07 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (D_2O , 75 MHz): $\delta = 177.0, 175.8, 174.9, 172.5, 82.8, 70.9, 70.3, 69.9, 63.5, 55.1, 54.9, 44.3, 34.0, 32.4, 27.2, 24.2$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 641.1142$ calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}_2\text{Fe}$ $[\text{M}]^+$: 641.1164.

Capítulo 3

- Compuesto 102

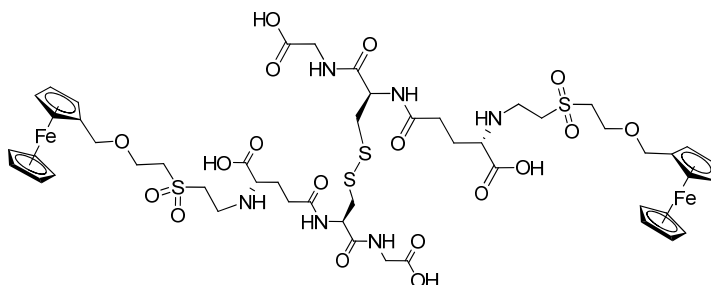


Eluyente CH₃CN-H₂O (4:1), aislado como sirupo naranja (224 mg, 98%). [α]_D -13.4° (c 1, agua). IR (KBr): ν = 3382, 3083, 2922, 1643, 1607, 1544, 1405, 1313, 1113 y 618 cm⁻¹; ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 4.50 (m, 1H), 4.18-4.09 (m, 9H), 3.74 (d, 2H, *J* = 4.5 Hz), 3.69-3.59 (m, 3H), 3.49 (s, 4H), 3.41 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.32 (m, 2H), 2.99 (m, 2 H), 2.86 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz), 2.84-2.75 (m, 2H), 2.59 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), .2.41 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.04 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C-RMN (D₂O, 125 MHz): δ = 177.0, 175.7, 175.0, 172.5, 86.4, 71.1, 70.3, 70.1, 69.5, 64.8, 55.3, 55.2, 54.3, 54.1, 44.6, 34.4, 32.8, 32.6, 32.1, 27.4 24.7; EM-AR (NALDI): *m/z* = 724.1099 calc. para C₂₇H₃₉N₃O₉S₃FeNa [M+Na]⁺: 724.1096.

Procedimiento para la síntesis de conjugados de ferroceno y GSSG

A una disolución de glutatión oxidado GSSG (100 mg, 0.16 mmol) en DMF-H₂O 1:1 (10 mL) se le adiciona el derivado Fc-O-VS **82** ó Fc-SO-VS **85** (0.39 mmol) y trietilamina (43 μ L, 0.33 mmol) manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 18 h. A continuación se añade aminopropilsilica (150 mg), manteniendo la suspensión resultante con agitación a 60°C durante 4 h. observando por c.c.f. la desaparición del exceso de Fc-VS. El crudo de reacción se filtra a vacío, lavando con agua (10 mL). El filtrado se evapora en el rotavapor obteniendo los productos **103** y **104**.

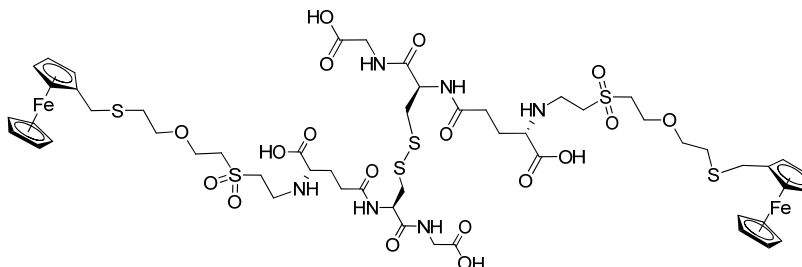
- Compuesto 103



Aislado como sirupo amarillo (208 mg, 100%). IR (film): ν = 3273, 3089, 2919, 1734, 1646, 1605, 1544, 1526, 1373, 1271, 1119 y 819 cm⁻¹; ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): señales seleccionadas δ = 8.32 (t, 2H, *J* = 8.3 Hz), 8.24 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 4.56 (m, 2H), 4.27-4.13 (m, 22H), 3.72 (t, 8H, *J* = 5.7 Hz), 2.25 (t, 4H, *J* = 6.0 Hz); 102

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 172.0, 171.0, 170.2, 82.6, 69.1, 68.4, 68.2, 68.1, 62.5, 60.2, 52.9, 52.8, 51.8, 41.2, 40.1, 31.6, 27.5, 27.4$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1280.210$ calc. para $\text{C}_{50}\text{H}_{68}\text{Fe}_2\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}_4$ $[\text{M}]^+$: 1280.2166.

- Compuesto 104



Aislado como sólido amarillo (224 mg, 100%). P.f. 180-182°C; **IR** (film): $\nu = 3285, 3092, 2923, 1649, 1608, 1548, 1529, 1306, 1103$ y 822 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): señales seleccionadas $\delta = 5.23$ (s, 4H), 4.13-4.03 (m, 18H), 3.79 (m, 8H), 2.60 (m, 4H), 2.30 (m, 8H), 1.34 (m, 8H), 1.19 (m, 8H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta = 85.1, 69.6, 68.4, 67.5, 63.7, 60.1, 52.9, 52.7, 31.0, 30.2$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 1400.2262$ calc. para $\text{C}_{54}\text{H}_{76}\text{Fe}_2\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}_6$ $[\text{M}+\text{H}]$: 1400.2234.

Voltametría cíclica

Los experimentos de voltametría cíclica se realizaron con un equipo Metrohm 663 VA-Stand dotado de un potenciostato Autolab PSTAT10. Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de Pt Ingold (\varnothing 5 mm, área efectiva 0.410 cm^2). Como contraelectrodo se usó un electrodo de varilla de carbón dulce y como electrodo de referencia un electrodo Ag/AgCl (KCl 3M). Las disoluciones se prepararon con una concentración de los compuestos de 0.2 mM en agua milli-Q o acetonitrilo, con NaClO_4 50 mM como electrolito soporte. El electrodo de trabajo se lavó frotando suavemente con alúmina básica y sumergiendo después en HCl 1% durante 10 min. para finalmente lavar con agua. Antes de la medida se desgasificó la disolución mediante burbujeo con N_2 durante 3 min. Los voltamogramas cíclicos se obtuvieron realizando 5 barridos para cada velocidad de barrido (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 V/s).

Marcaje de BSA con ferrocenos vinilsulfona

A tres alícuotas de 2 mL cada una de disolución de BSA ($2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en tampón HEPES pH 8.5 se añade el compuesto Fc-O-VS **82** (0.20, 1.0 y 2.0 mg) o el compuesto Fc-SO-VS **85** (0.24, 1.20 y 2.4 mg) disuelto en DMSO (0.2 mL) para

Capítulo 3

obtener una relación molar de BSA:VS de 1:10, 1:50 y 1:100 respectivamente en ambos casos. Las muestras se mantienen a t.a. durante 24 h. Tras la centrifugación se lleva a cabo la diálisis del sobrenadante frente a tampón fosfato 85 mM pH 7.0. La concentración de BSA final se determinó mediante el método de Bradford¹⁸⁷ y el contenido en Fe se determina espectrofotométricamente.¹⁸⁸ Una alícuota de cada muestra se dializó frente a agua destilada para el análisis por MALDI.

Capítulo 4. SÍLICA-VINILSULFONA. APLICACIONES EN INMOVILIZACIÓN Y ELIMINACIÓN DE METALES

Capítulo 4.

Sílica-vinilsulfona. Aplicaciones en inmovilización y eliminación de metales

4.1. Inmovilización de macromoléculas

La inmovilización de macromoléculas en soportes sólidos se remonta a comienzos del siglo XX con los trabajos de Nelson y Griffin¹⁹¹ sobre inmovilización de invertasa. Desde entonces el interés por el tema ha crecido enormemente, no sólo por enzimas inmovilizadas, sino también por otras macromoléculas, jugando en la actualidad un papel fundamental en diferentes áreas de aplicación. En primer lugar, el uso de enzimas inmovilizadas en la industria es clave para la optimización de procesos biocatalizados permitiendo la estabilización del enzima, su reutilización, la implementación en procesos en continuo y la reducción de costes.¹⁹² En segundo lugar, la inmovilización en soportes sólidos constituye una potente herramienta para las ciencias *ómicas*, principalmente con el desarrollo de la cromatografía de afinidad,¹⁹³⁻¹⁹⁴ los ensayos pull-down¹⁹⁵ y la tecnología de microarrays¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ que permiten el estudio de interacciones proteína-proteína, proteína-ligando, actividad enzimática y el efecto de modificaciones post-translacionales entre otros. También la inmovilización presenta una aplicación potencial en la fabricación de biosensores¹⁹⁹ en los que una proteína actúe como elemento de reconocimiento.

El método de inmovilización elegido es crucial para lograr una aplicación posterior y a menudo implica un balance entre factores tales como la dificultad,

191. Nelson, J. M.; Griffin, E. G., Adsorption of invertase. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38* (5), 1109-1115.

192. Sheldon, R. A., Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (8-9), 1289-1307.

193. Sii, D.; Sadana, A., Bioseparation using affinity techniques. *J. Biotechnol.* **1991**, *19* (1), 83-98.

194. Larsson, P.-O., Affinity Techniques for Separation and Biorecognition: Introductory Remarks. *Adv. Mol. Cell Biol.*, **1996**, *15*, 509-511.

195. Wang, X.; Imber, B. S.; Schreiber, S. L., Small-Molecule Reagents for Cellular Pull-Down Experiments. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (3), 585-587.

196. MacBeath, G., Protein microarrays and proteomics. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 526-532.

197. Sun, H.; Chattopadhyaya, S.; Wang, J.; Yao, S., Recent developments in microarray-based enzyme assays: from functional annotation to substrate/inhibitor fingerprinting. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (3), 416-426.

198. Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J., Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (6), 1775-1789.

199. Bilitewski, U., Protein-sensing assay formats and devices. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568* (1-2), 232-247.

Capítulo 4

estabilidad, funcionalidad, coste, etc. Existen diferentes métodos de inmovilización que se pueden clasificar en dos categorías:

A) Retención física: que comprende atrapamiento de la macromolécula en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, generalmente un polímero, o bien encapsulación, donde una membrana semipermeable limita el movimiento de la macromolécula.

B) Unión química: La inmovilización química se puede llevar a cabo por distintos métodos:

B.1. Reticulado o entrecruzamiento, que consiste en el uso de reactivos bifuncionales (dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, etc.) que originan uniones covalentes intermoleculares. Es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas.²⁰⁰

B.2. Adsorción. Es una unión de tipo no-covalente donde la macromolécula se une a un soporte mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals o por enlaces de hidrógeno. Generalmente origina una unión débil y de tipo reversible, pudiéndose producir la desorción al variar el pH o la fuerza iónica del medio. Sin embargo, aunque estos enlaces son débiles si se consideran individualmente, en ocasiones la totalidad de las interacciones puede producir una energía de unión superior a un enlace de naturaleza covalente.

B.3. Inmovilización por bioafinidad. Un caso particular de unión no-covalente es el que permite llevar a cabo inmovilizaciones específicas gracias a la afinidad existente entre diversos sistemas. Estas metodologías reciben el nombre genérico de inmovilización por bioafinidad. Como ejemplo característico de estas metodologías destaca el sistema avidina-biotina, por su importancia biotecnológica. Además, mediante técnicas de Biología Molecular las proteínas pueden ser “activadas” vía fusión a colas o dominios proteicos que confieren afinidad por el soporte, como es el caso de las colas de histidina con soportes conteniendo Ni.²⁰¹ Estas estrategias tienen la ventaja de proporcionar un control preciso de la orientación de la proteína inmovilizada, pero la activación requiere procesos laboriosos de obtención y purificación de la proteína en cuestión.

200. Wong, S. S.; Wong, L.-J. C., Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzym. Microb. Tech.* **1992**, *14* (11), 866-874.

201. Hengen, P. N., Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20* (7), 285-286.

B.4. Enlace covalente.²⁰² La reacción de grupos químicos del soporte con grupos de la macromolécula originando un enlace covalente constituye la metodología más empleada, con la ventaja de que se evita la desorción de la macromolécula al formarse un enlace covalente. Como inconvenientes se pueden producir distorsiones en la estructura de la macromolécula que afecten a sus propiedades, en el caso de las enzimas dificultando el acceso a los centros reactivos mediante impedimento estérico o alterando su estabilidad o actividad si se modifican residuos que sean críticos para mantener la estructura y función de la biomolécula.

En la mayoría de los casos para promover la inmovilización covalente es necesario efectuar una activación química ya sea en el soporte, en la macromolécula o bien en ambos.

La activación del soporte supone la introducción de grupos funcionales reactivos frente a los grupos presentes en las biomoléculas (generalmente amino y tioles procedentes de lisinas, histidinas y cisteínas). Las diferentes estrategias desarrolladas hasta ahora hacen uso, como se indicó en el capítulo de etiquetado (Sección 3.1.1), de soportes conteniendo las funciones N-hidroxisuccinimidil ésteres, aldehídos e isocianatos para unir biomoléculas a través del grupo amino; maleimidias, iodoacetamidas y grupos disulfuro para la unión con el grupo tiol de residuos de cisteína; epóxidos para la unión de cualquier nucleófilo de la biomolécula; ácidos borónicos y grupos hidrazina o hidroxilamina para la unión con carbohidratos a través de dioles vecinales o de sus productos de oxidación, respectivamente. También encontramos soportes aminados para la unión a través de carboxilos procedentes de residuos de glutamato y aspartato mediante la activación con carbodiimida. Un tipo especial de soportes son los fotoreactivos (arilazidas, aziridinas, benzofenonas, etc.) que no requieren ninguna funcionalización en la biomolécula a inmovilizar y que reaccionan tras irradiar con una longitud de onda apropiada.

Aunque la abundancia de grupos funcionales en la biomolécula puede dar lugar a un acoplamiento aleatorio, estos métodos covalentes presentan varias ventajas: no se limitan a proteínas recombinantes, son métodos flexibles que se pueden aplicar a cualquier biomolécula sin necesidad de modificación por procesos

202. Wong, L. S.; Khan, F.; Micklefield, J., Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (9), 4025-4053.

Capítulo 4

químicos o biológicos que puedan alterar su función biológica evitándose de esta forma protocolos específicos de obtención y purificación.

Por otro lado, la activación de la biomolécula para posibilitar la unión covalente al soporte suele llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida, que permite la introducción de determinados grupos reactivos en posiciones concretas con la ventaja de producir una inmovilización orientada y específica,²⁰³ aunque con el inconveniente de tener que modificar también el soporte con grupos reactivos únicos y complementarios a los expresados en la biomolécula. Así se ha conseguido la inmovilización mediante reacciones bioortogonales como la cicloadición Diels-Alder,²⁰⁴ ligación de Staudinger,²⁰⁵ reacción de “click-chemistry”²⁰⁶ y reacción de semicarbazidas y grupos glioxil para originar semicarbazonas.²⁰⁷

Como soportes se han utilizado una gran variedad de materiales que difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se encuentran en forma de cilindro, láminas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- **Soportes inorgánicos.** Pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, zeolitas, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, alúmina, cerámicas, sílica, metales, semiconductores, etc.).
- **Soportes orgánicos.** Pueden ser polímeros naturales (polisacáridos como celulosa, almidón, dextrano, agar-agar, agarosa, alginatos, chitosan, o proteínas fibrosas como colágeno y queratina) o polímeros sintéticos (poliolefinas como el poliestireno, polímeros acrílicos como poliacrilamidas, etc.)

203. Camarero, J. A., Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports. *Peptide Science* **2008**, *90* (3), 450-458.

204. de Araújo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Köhn, M.; Schröder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels–Alder Ligation and Surface Immobilization of Proteins. *Angew. Chem.* **2006**, *118* (2), 302-307.

205. Watzke, A.; Köhn, M.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Wacker, R.; Schröder, H.; Breinbauer, R.; Kuhlmann, J.; Alexandrov, K.; Niemeyer, C. M.; Goody, R. S.; Waldmann, H., Site-Selective Protein Immobilization by Staudinger Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (9), 1408-1412.

206. Lin, P.-C.; Ueng, S.-H.; Tseng, M.-C.; Ko, J.-L.; Huang, K.-T.; Yu, S.-C.; Adak, A. K.; Chen, Y.-J.; Lin, C.-C., Site-Specific Protein Modification through CuI-Catalyzed 1,2,3-Triazole Formation and Its Implementation in Protein Microarray Fabrication. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (26), 4286-4290.

207. Olivier, C.; Hot, D.; Huot, L.; Ollivier, N.; El-Mahdi, O.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Gras-Masse, H.; Lemoine, Y.; Melnyk, O., α -Oxo Semicarbazone Peptide or Oligodeoxynucleotide Microarrays. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (2), 430-439.

Los soportes más empleados son la agarosa y el poliestireno. Sin embargo, la sílica presenta un gran número de ventajas. En primer lugar, la sílica es estable desde el punto de vista químico, biológico, térmico y mecánico, lo que permite su uso en cromatografía de afinidad de alta presión.²⁰⁸ En segundo lugar, la sílica permanece insoluble en cualquier disolvente y no sufre hinchado ni encogimiento, lo que facilita su manipulación. Finalmente, la sílica puede ser funcionalizada de forma relativamente sencilla. Por el contrario, el hecho de que las macromoléculas sean adsorbidas en la superficie de la sílica nativa a través de interacciones electrostáticas²⁰⁹⁻²¹¹ condiciona su uso. Esto se puede evitar a través de la mencionada funcionalización que pasiva en cierta manera la superficie del material, si se pretende que prevalezca la inmovilización covalente frente a las interacciones inespecíficas, ya que éstas últimas pueden inducir una distorsión en la estructura secundaria y terciaria de biomoléculas que altere su función biológica.²¹²

El uso de la sílica como soporte para la inmovilización de macromoléculas ha experimentado un creciente interés.²¹³⁻²¹⁵ En la actualidad, diversas compañías (Biotech Support Group, Bangs Laboratories, Polysciences) comercializan sílicas para la inmovilización a través de diferentes grupos funcionales (Tabla 4.1) así como sílicas derivatizadas para inmovilización por bioafinidad, como ConA soportada covalentemente en sílica, que interacciona con carbohidratos, sílica con ácidos fenilborónicos, que interaccionan con glicoproteínas, sílica con Ni para unión a colas de histidina o sílicas con estreptavidina entre otras. Además Sigma-Aldrich comercializa sílica con numerosas funcionalizaciones (amino, tiol, carboxil, ciano,

208. Schiel, J. E.; Mallik, R.; Soman, S.; Joseph, K. S.; Hage, D. S., Applications of silica supports in affinity chromatography. *J. Separ. Sci.* **2006**, *29* (6), 719-737.

209. Larsericdotter, H.; Oscarsson, S.; Buijs, J., Thermodynamic Analysis of Proteins Adsorbed on Silica Particles: Electrostatic Effects. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *237* (1), 98-103.

210. Parida, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K., Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid Interface Sci.* **2006**, *121* (1-3), 77-110.

211. Rezwani, K.; Meier, L. P.; Gauckler, L. J., Lysozyme and bovine serum albumin adsorption on uncoated silica and ALOOH-coated silica particles: the influence of positively and negatively charged oxide surface coatings. *Biomaterials* **2005**, *26* (21), 4351-4357.

212. Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B.-H., Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10639-10647.

213. Mallik, R.; Wa, C.; Hage, D. S., Development of Sulfhydryl-Reactive Silica for Protein Immobilization in High-Performance Affinity Chromatography. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (4), 1411-1424.

214. Kim, H. S.; Kye, Y. S.; Hage, D. S., Development and evaluation of N-hydroxysuccinimide-activated silica for immobilizing human serum albumin in liquid chromatography columns. *J. Chrom. A* **2004**, *1049* (1-2), 51-61.

215. Schlossbauer, A.; Schaffert, D.; Kecht, J.; Wagner, E.; Bein, T., Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (38), 12558-12559.

Capítulo 4

triazinas, ácidos sulfónicos, clorobencil, etc.) para aplicaciones en síntesis en fase sólida como reactivos o como “scavenger”, algunas de las cuales, como la maleimido propil sílica, tienen aplicación en la inmovilización de macromoléculas.

Tabla 4.1

Grupo reactivo soporte	Grupo a inmovilizar
Epoxi terminal	Amino
Amino terminal	Ácido carboxílico ^a Carbohidrato ^b
Aldehído	Amino
Glicol	Amino ^c
Diazo	Fenoles, tirosina
Ácidos carboxílicos	Amino ^a
Ésteres N-hidroxisuccinimida	Amino
Ácidos fenilborónicos	Cis-dioles, glicoproteínas
Ni	6-Hys proteínas recombinantes
ConA	Manosa, glucosa, glicoproteínas
Glutación	Proteínas de fusión-GST

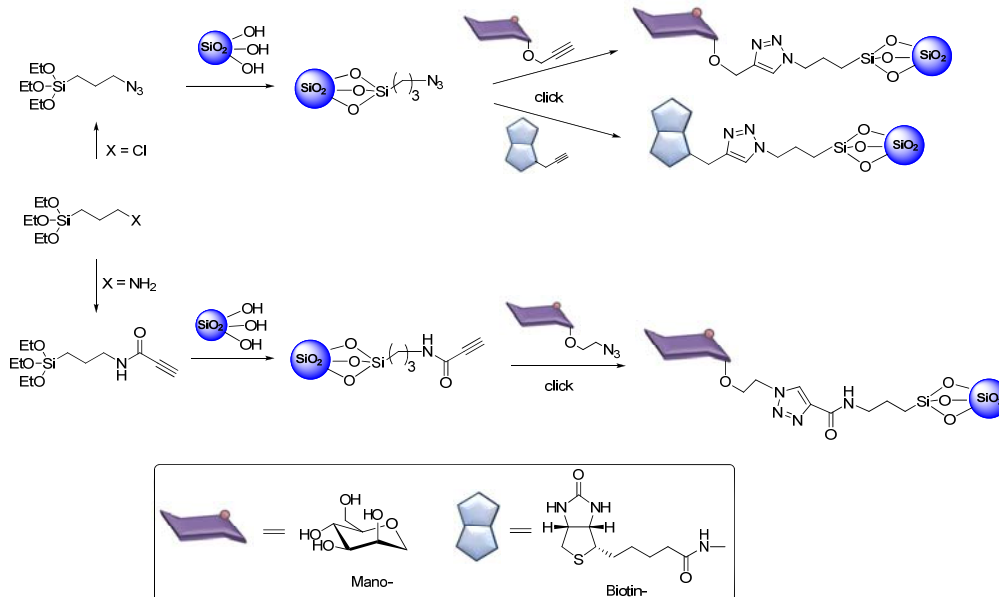
^aActivación mediante carbodiimidas. ^bActivación mediante NaIO₄.

^cActivación mediante carbonildiimidazol.

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado previamente en la funcionalización de sílica mediante cicloadición de azidas y alquinos catalizada con Cu(I) (“click-chemistry”). La estrategia química implica la incorporando de grupos reactivos azida o alquino en la sílica para hacerlos reaccionar después con moléculas que porten la función “click” complementaria (alquino o azido, respectivamente). De esta forma se han obtenido glico-sílicas²¹⁶ y biotin-sílicas²¹⁷ mediante el procedimiento que se indica en el esquema 4.1. Estos materiales híbridos han mostrado su utilidad en cromatografía de afinidad, con aplicaciones, por ejemplo, en la purificación y el aislamiento de lectinas. Posteriormente Bein y col.²¹⁵ han descrito la inmovilización de tripsina modificada con grupos alquino terminales en azido sílica siguiendo la misma estrategia.

216. Ortega-Munoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of glyco-silica by Cu(I)-catalyzed "click-chemistry" and their applications in affinity chromatography. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (16 + 17), 2410-2420.

217. Santoyo Gonzalez, F.; Hernandez Mateo, F.; Ortega Munoz, M.; Salto Gonzalez, R.; Giron Gonzalez, M. D.; Sevillano Triperero, N. Methods of production of porous biotin carriers and uses thereof. WO 2009004106 A1, **2009**.



Esquema 4.1

4.2. Inmovilización de agentes quelantes para eliminación de metales

Además del gran número de aplicaciones de carácter biotecnológico que derivan de la inmovilización de enzimas en soportes sólidos, la inmovilización de otras macromoléculas que difieren de las enzimas, como es el caso de ciertos polímeros con capacidad quelante, permite el desarrollo de otras aplicaciones destacando en el terreno medioambiental la eliminación de metales tóxicos.

El empleo de polímeros orgánicos e inorgánicos con agentes quelantes para preconcentración y separación de trazas de iones metálicos es objeto actualmente de un enorme interés,²¹⁸ habiéndose desarrollado matrices insolubles quelantes con buena estabilidad y alta capacidad para la separación de iones metálicos.

La sílica es uno de los adsorbentes sólidos inorgánicos con mayor aplicación. Su modificación química permite aumentar la efectividad de los adsorbentes con las ventajas adicionales de que no sufren hinchamiento ni encogimiento y son estables térmica y químicamente, como se ha mencionado anteriormente. La inmovilización en sílica de compuestos con determinados grupos

218. Myasoedova, G. V.; Mokhodoeva, O. B.; Kubrakova, I. V., Trends in Sorption Preconcentration Combined with Noble Metal Determination. *Anal. Sci.* **2007**, 23 (9), 1031-1039.

Capítulo 4

funcionales para la extracción de iones metálicos²¹⁹ constituye un hecho clave para el desarrollo de aplicaciones analíticas¹⁸¹ y en el tratamiento y descontaminación de aguas residuales. La unión covalente mediante silanización se ha empleado para inmovilizar compuestos. Así se han introducido grupos básicos con capacidad para eliminar cationes metálicos como grupos tiol²²⁰⁻²²¹ o tiourea,²²² aunque destacan de manera especial los grupos amino y los ditiocarbamatos derivados de éstos, como se describe a continuación de una forma más detallada.

4.2.1. Poliaminas

En lo que respecta a poliaminas se han inmovilizado de forma covalente sobre sílica etilendiamina,²²³ dietilentriamina,²²⁴ trietilentetramina,²²⁵ tetraetilenpentamina²²³ y tris(2-aminoetil)amina²²⁶ (TREN). En la mayoría de los casos dicha inmovilización se ha llevado a cabo por sustitución nucleofílica de cloro o bromo propilsilica con los derivados nitrogenados mencionados, evaluando a continuación la capacidad para retener metales como Cr, Cd, Co, Ni, Zn y Pb. Diversos estudios comparativos indican un aumento de la capacidad para retener iones metálicos al pasar de monoaminas a di-, tri- y tetra derivados debido al incremento del número de átomos de nitrógeno dadores.^{223, 225}

Teniendo en cuenta estos hechos no debe sorprender que la polietilenimina (PEI), como derivado superior de esta familia de compuestos, sea bien conocida por sus propiedades quelantes, que la han convertido en un polímero adecuado tanto para la retención como la separación de metales en

219. Jal, P. K.; Patel, S.; Mishra, B. K., Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Talanta* **2004**, *62* (5), 1005-1028.

220. Brown, J.; Mercier, L.; J. Pinnavaia, T., Selective adsorption of Hg²⁺ by thiol-functionalized nanoporous silica. *Chem. Comm.* **1999**, (1), 69-70.

221. Yanovskaya, E. S.; Karmanov, V. I.; Slobodyanik, N. S., X-ray fluorescence determination of trace toxic metals with extraction and preconcentration on silica gel chemically modified with mercapto groups. *J. Anal. Chem.* **2007**, *62*, 549-553.

222. Liu, P.; Pu, Q.; Su, Z., Synthesis of silica gel immobilized thiourea and its application to the on-line preconcentration and separation of silver, gold and palladium. *Analyst* **2000**, *125* (1), 147-150.

223. Tikhomirova, T. I.; Fadeeva, V. I.; Kudryavtsev, G. V.; Nesterenko, P. N.; Ivanov, V. M.; Savitchev, A. T.; Smirnova, N. S., Sorption of noble-metal ions on silica with chemically bonded nitrogen-containing ligands. *Talanta* **1991**, *38* (3), 267-274.

224. El-Ashgar, N. M., Column extraction and separation of some metal ions by diethylenetriamine polysiloxane immobilized ligand system. *E-J. Chem.* **2008**, *5*, 107-113.

225. Soliman, E. M., Synthesis and metal collecting properties of mono, di, tri and tetramine based on silica gel matrix. *Anal. Lett.* **1997**, *30*, 1739-1751.

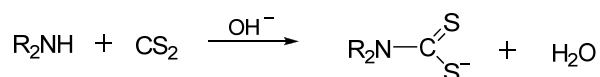
226. Huang, X.; Chang, X.; He, Q.; Cui, Y.; Zhai, Y.; Jiang, N., Tris(2-aminoethyl) amine functionalized silica gel for solid-phase extraction and preconcentration of Cr(III), Cd(II) and Pb(II) from waters. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *157* (1), 154-160.

disoluciones acuosas.²²⁷ Como polímero soluble, la polietilenimina se ha empleado tanto sin funcionalizar como modificada en forma de N-metiltiourea o tetrametilamonio para la eliminación de metales mediante un proceso de filtración con membranas.²²⁸ Sin embargo, la inmovilización en matrices sólidas con el fin de obtener resinas insolubles simplifica enormemente el proceso de eliminación de iones metálicos al permitir aplicar métodos estáticos (en *batch*) o dinámicos (en flujo continuo).

La combinación de sílica y PEI en un material híbrido se ha descrito previamente para la eliminación de metales pesados como Pb(II), Zn(II), Cd(II) y Ni(II).²²⁹ En este caso, la inmovilización se ha llevado a cabo mediante impregnación, produciéndose interacciones entre el soporte y la PEI donde participan procesos de inclusión en los poros, adhesión e interacciones electrostáticas. Más recientemente, Gao y col.²³⁰⁻²³¹ han descrito un nuevo material (PEI/SiO₂) tras inmovilizar covalentemente PEI en sílica por acoplamiento con cloropropil trimetoxisilano, estudiando sus propiedades de adsorción de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II).

4.2.2. Ditiocarbamatos

Es bien conocido que las aminas forman ditiocarbamatos²³² por tratamiento con CS₂ en medio básico (Esquema 4.2) y que éstos se comportan como ligandos bidentados formando complejos estables con un gran número de elementos.



Esquema 4.2.

Aprovechando esta propiedad, estos grupos funcionales se han empleado para la preconcentración o eliminación de metales por incorporación a polímeros

227. Kobayashi, S.; Hiroishi, K.; Tokunoh, M.; Saegusa, T., Chelating properties of linear and branched poly(ethylenimines). *Macromolecules* **1987**, *20* (7), 1496-1500.

228. Geckeler, K. E.; Bayer, E.; Spivakov, B. Y.; Shkinev, V. M.; Vorobeva, G. A., Liquid-phase polymer-based retention, a new method for separation and preconcentration of elements. *Anal. Chim. Acta* **1986**, *189*, 285-292.

229. Ghouli, M.; Bacquet, M.; Morcellet, M., Uptake of heavy metals from synthetic aqueous solutions using modified PEI-silica gels. *Water Research* **2003**, *37* (4), 729-734.

230. Gao, B.; An, F.; Liu, K., Studies on chelating adsorption properties of novel composite material polyethyleneimine/silica gel for heavy-metal ions. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253* (4), 1946-1952.

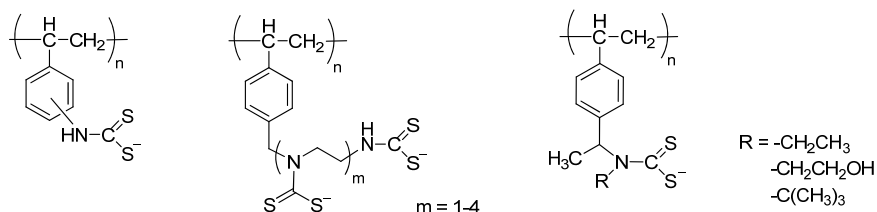
231. An, F.; Gao, B., Chelating adsorption properties of PEI/SiO₂ for plumbum ion. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *145* (3), 495-500.

232. Halls, D. J., Properties of dithiocarbamates. *Mikrochim. Acta* **1969**, 62-77.

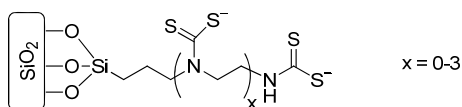
Capítulo 4

tanto solubles, como es el caso de la poliacrilamida,²³³ como resinas insolubles, mostrando de nuevo éstas últimas cierta superioridad. Entre otras se han descrito resinas de quitosán²³⁴ y de poliestireno, funcionalizado con ditiocarbamatos tanto de forma covalente²³⁵⁻²³⁹ (Esquema 4.3) como mediante impregnación con pirrolidin- y piperidinditiocarbamatos.²⁴⁰

POLIESTIRENO



SILICA



Esquema 4.3. Ditiocarbamatos inmovilizados covalentemente en poliestireno o sílica

En el caso de la sílica como soporte también se han incorporado ditiocarbamatos por simple impregnación de sílice con dietilditiocarbamato²⁴¹ y

- 233.** Tiwari, S.; Bajpai, A., Metal ion extraction by dithiocarbamate function supported on polyacrylamide. *Reactive and Functional Polymers* **2005**, *64* (1), 47-54.
- 234.** Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F.; Mariotti, S.; Emanuelli, M., Preparation and characteristic properties of dithiocarbamate chitosan, a chelating polymer. *Carbohydr. Res.* **1982**, *104*, 235-43.
- 235.** Roy, P. K.; Rawat, A. S.; Rai, P. K., Synthesis, characterisation and evaluation of polydithiocarbamate resin supported on macroreticular styrene-divinylbenzene copolymer for the removal of trace and heavy metal ions. *Talanta* **2003**, *59* (2), 239-246.
- 236.** McClain, A.; Hsieh, Y.-L., Synthesis of polystyrene-supported dithiocarbamates and their complexation with metal ions. *J. Appl. Polymer Sci.* **2004**, *92* (1), 218-225.
- 237.** Chen, Y., Gu, Z. Preparation and properties of macro-porous chelate resins of crosslinked polystyrene bearing dithiocarbamate groups. *Polymer Comm.*, **1983**, (2), 152-160.
- 238.** Saegusa, T.; Kobayashi, S.; Hayashi, K.; Yamada, A., Preparation and chelating properties of mercaptoethylated and dithiocarboxylated poly(styrene-g-ethylenimine)s. *Polym. J.* **1978**, *10*, 403-8.
- 239.** Yebra-Biurun, M. C.; García-Dopazo, M. C.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, M. P., Preconcentration of trace amounts of manganese from natural waters by means of a macroreticular poly(dithiocarbamate) resin. *Talanta* **1992**, *39* (6), 671-674.
- 240.** Ramesh, A.; Rama Mohan, K.; Seshaiiah, K., Preconcentration of trace metals on Amberlite XAD-4 resin coated with dithiocarbamates and determination by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry in saline matrices. *Talanta* **2002**, *57* (2), 243-252.
- 241.** Rio-Segade, S.; Pérez-Cid, B.; Bendicho, C., Preconcentration of lead, cadmium and zinc on silica gel loaded with diethyldithiocarbamate prior to their determination by flame-atomic absorption spectrometry. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1995**, *351* (8), 798-799.

mediante procedimientos más elaborados de tipo covalente (Esquema 4.3) en los que se generan estos grupos a partir de CS₂ y aminopropilsilica,²⁴²⁻²⁴⁴ etilendiaminosilica²⁴⁵⁻²⁴⁸ e incluso tri y tetraetilendiaminosilicas,²⁴⁹ o mediante grafting de ditiocarbamatos derivados de mono, bis y tris-aminosiloxanos.²⁵⁰

4.3. Discusión y resultados

Aunque la variabilidad de grupos orgánicos unidos a la sílica en compuestos comerciales es amplia, como se ha indicado, la funcionalización de dicho soporte con grupos vinilsulfona no ha sido descrita ni explotada a pesar del atractivo, fundamentalmente en lo que respecta a la alta reactividad de las vinilsulfonas en procesos de adición tipo Michael, lo que les confiere un potencial biotecnológico importante. Sin embargo, hay que mencionar que existen en el mercado algunos materiales poliméricos funcionalizados con grupos vinilsulfona como son el poliestireno (comercializado por Aldrich), agarosa (comercializado por Gentaur) y sefarosa (comercializado por Affiland) que han sido aplicados en la inmovilización de compuestos que contienen grupos amina, tiol e hidroxilo como se indicó en el Capítulo 1.

242. Venkatesan, K. A.; Srinivasan, T. G.; Vasudeva Rao, P. R., Cobalt-extraction studies on dithiocarbamate grafted on silica gel surface. *Colloid Surface Physicochem. Eng. Aspect* **2001**, *180* (3), 277-284.

243. Venkatesan, K. A.; Srinivasan, T. G.; Rao, P. R. V., Removal of complexed mercury from aqueous solutions using dithiocarbamate grafted on silica gel. *Separation Science and Technology* **2002**, *37* (6), 1417-1429.

244. Aihara, M.; Watanabe, H.; Kiboku, M., Preconcentration/AAS determination of trace metal ions with xanthate or dithiocarbamate immobilized silica gels. *Anal. Sci.* **1991**, *7*, 87-90.

245. E. Leyden, D.; Howard Luttrell, G.; Sloan, A. E.; DeAngelis, N. J., Characterization and application of silylated substrates for the preconcentration of cations. *Anal. Chim. Acta* **1976**, *84* (1), 97-108.

246. Leyden, D. E.; Luttrell, G. H., Preconcentration of trace metals using chelating groups immobilized via silylation. *Anal. Chem.* **1975**, *47* (9), 1612-1617.

247. Howard, A. G.; Khary, N. H., Nanoscavenger based dispersion preconcentration; sub-micron particulate extractants for analyte collection and enrichment. *Analyst* **2005**, *130* (10), 1432-1438.

248. Espinola, J. G. P.; de, F. J. M. P.; de, O. S. F.; Airoidi, C., Immobilized dithiocarbamate groups on silica: chemisorption of some cations from ethanolic solution. *Colloids Surf., A* **1994**, *87*, 33-8.

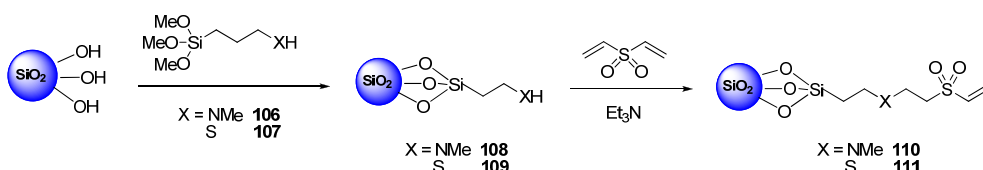
249. Mahmoud, M. E., Selective solid phase extraction of mercury(II) by silica gel-immobilized-dithiocarbamate derivatives. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *398*, 297-304.

250. Goubert-Renaudin, S.; Schneider, R.; Walcarius, A., Synthesis of new dithiocarbamate-based organosilanes for grafting on silica. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (12), 2113-2116.

Capítulo 4

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en llevar a cabo la incorporación de la función vinilsulfona a sílica²⁵¹⁻²⁵² mediante una metodología que comprende (Esquema 4.4):

- Obtención de sílica funcionalizada con grupos N-metilamina (**108**) o grupos tiol (**109**).
- Reacción del derivado de sílica obtenido en la etapa anterior con una bisvinilsulfona en presencia de una base orgánica.



Esquema 4.4

La combinación de sílica como soporte y vinilsulfona como grupo reactivo originan un material pre-activado que puede reaccionar con los grupos tiol y amina presentes de forma natural en las biomoléculas formando enlaces covalentes con éstas en condiciones suaves compatibles con su naturaleza biológica. Así, se ha demostrado su aplicabilidad inmovilizando enzimas como invertasa, lactasa y lisozima, demostrando el mantenimiento de la actividad enzimática de los nuevos materiales. Igualmente se han abordado otros casos reales de relevancia en proteómica haciendo uso de estas sílicas, como son la inmovilización directa de glutatión y posterior purificación de proteína GST (Glutatión S-transferasa) recombinante así como la inmovilización de tioredoxina h2 para después identificar proteínas que interaccionan con ésta a partir de un lisado de *Pisum sativum*, demostrándose que la inmovilización transforma la sílica-vinilsulfona en un soporte apto para cromatografía de afinidad.

Para estos materiales, se ha observado que la naturaleza del espaciador juega un papel fundamental en las interacciones no-covalentes que se originan entre la sílica funcionalizada y el enzima. Para el caso de la resina **110**, que

251. Santoyo, G. F.; Hernandez, M. F.; Lopez, J. J.; Ortega, M. M.; Morales, S. J. Silica-vinylsulfone compound, synthesis and uses as immobilization surface. **2009**. WO 2009/040460.

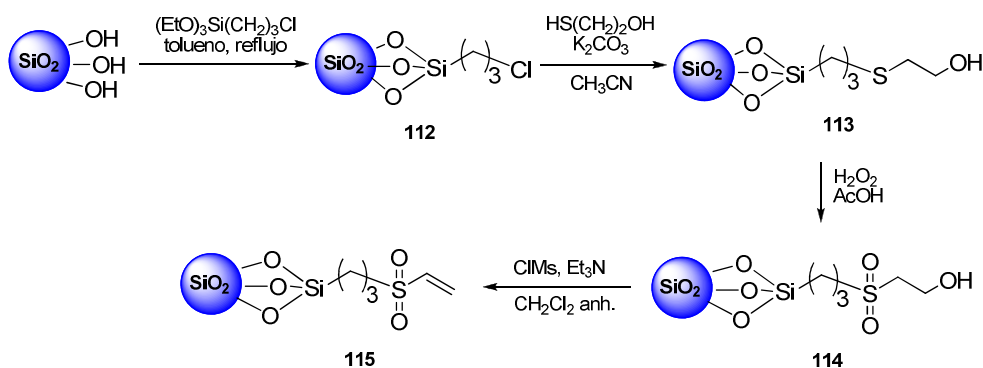
252. Ortega-Munoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Megia-Fernandez, A.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Vinyl sulfone functionalized silica: a "ready to use" pre-activated material for immobilization of biomolecules. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (34), 7189-7196.

presenta una amina terciaria en el espaciador, el hecho de que se elimine una gran parte de la proteína retenida inicialmente tras el tratamiento con un tampón de elevada fuerza iónica apunta a un proceso reversible con fuerte contribución de interacciones electrostáticas en la inmovilización. Para la vinilsulfona-sílica **111**, el espaciador de tipo tioéter no confiere ninguna carga electrostática, descartando la posibilidad de interacciones no específicas de tipo coulombico entre el material y la proteína, sin embargo el grupo tioéter en las proximidades de la sulfona determina que éste pueda participar en lo que se ha denominado adsorción tiofílica.⁹⁴

Como alternativa a esta funcionalización con grupos vinilsulfona mediante espaciadores que contienen aminas o tioéteres que pueden favorecer otros tipos de inmovilización distintos a la covalente se planteó como uno de los objetivos de la presente Tesis la preparación de una nueva vinilsulfona-sílica siendo el espaciador un resto alquílico, a través de una metodología distinta a la comentada, que se expone a continuación con más detalle.

4.3.1. Síntesis de vinilsulfona sílica

La preparación de este nuevo material híbrido se llevó a cabo mediante una estrategia que comprende la silanización de sílica comercial con cloropropiltrietoxisilano y una posterior secuencia de reacciones que implican sustitución del haluro de alquilo con mercaptoetanol, oxidación del tioéter a sulfona y posterior eliminación de una molécula de agua como se indica en el esquema 4.5. Para ello se trató una suspensión de sílica comercial activada con el cloropropilsilano derivado a reflujo en tolueno, obteniéndose la cloro-sílica **112**. La reacción de **112** en medio básico con mercaptoetanol conduce al derivado **113**, que se oxida a continuación mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno para obtener la 2-hidroxietilsulfona **114**, que por eliminación en medio básico permite la

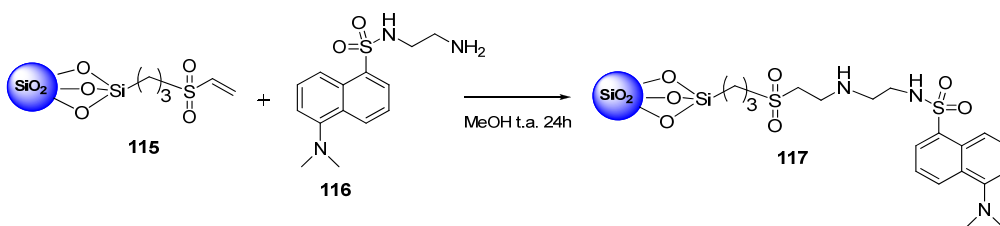


Esquema 4.5. Preparación de vinilsulfona-sílica **111**

Capítulo 4

obtención de la vinilsulfona-sílica **115** previa transformación del grupo hidroxilo en un buen grupo saliente como el mesilo. El rendimiento del proceso se estimó a partir de los datos de análisis elemental para el material **115** y corresponde a una funcionalización vinilsulfona de $0.57 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$.

La comprobación de la funcionalización se llevó a cabo mediante la inmovilización de un reactivo fluorescente como la dansiletildiamina²⁵³ **116** (Esquema 4.6.). Para ello se incubó la vinilsulfona-sílica **115** con el aminodansilo fluorescente **116** en metanol durante 24 h. procediendo después al filtrado y lavado abundantemente con metanol del material resultante. De forma paralela y a modo de control negativo se hizo el mismo tratamiento con la sílica precursora **114**, que carece de grupos vinilsulfona. Tras los lavados con metanol ambos materiales manifiestan un alto grado de fluorescencia. Sin embargo, tras los lavados posteriores con NaCl 2M para eliminar las posibles interacciones inespecíficas, la fluorescencia únicamente permanece en el material procedente de la vinilsulfona-sílica **115** lo cual pone de manifiesto que la inmovilización conseguida es de tipo covalente (Figura 4.1).



Esquema 4.6. Inmovilización de aminodansilo en vinilsulfona-sílica



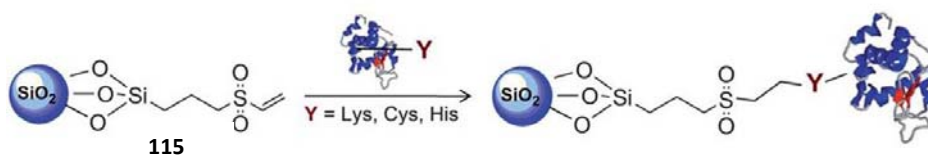
Figura 4.1. Suspensión en acetona de vinilsulfona-sílica **115** y 2-hidroxietilsulfona-sílica **114** tras el tratamiento con aminodansilo y lavados con MeOH y NaCl 2M. Izq.: iluminación natural. Dcha.: visto al transiluminador (365 nm).

253. Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R.; Panagia, A.; Sartor, G.; Saviano, M.; Lombardi, A.; Pavone, V., A Modified Cyclodextrin with a Fully Encapsulated Dansyl Group: Self-Inclusion in the Solid State and in Solution. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2* (4), 373-381.

4.3.2. Aplicación en la inmovilización de lisozima

Para evaluar la potencialidad de la vinilsulfona-sílica **115** en la inmovilización de proteínas seleccionamos la lisozima como proteína modelo. La lisozima es un enzima que cataliza la ruptura del enlace β -1,4 entre N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina de los polisacáridos de la pared celular bacteriana. Está presente en las lágrimas y la saliva en donde actúa como una barrera frente a las infecciones, y es muy abundante en la clara de huevo, de donde se extrae para su uso industrial, en particular para la fabricación de quesos y para el control de las bacterias lácticas en los vinos. Es una proteína globular pequeña (14.4 KDa) constituida por una única cadena de 129 aminoácidos donde destacan como residuos 6 lisinas, 1 histidina y 4 pares de cisteína formando puentes disulfuro responsables de mantener la estructura terciaria y de que se considere una enzima rígida y estable.²⁵⁴ El punto isoeléctrico es ~ 11 ,²⁵⁵ y a temperatura fisiológica no hay cambios apreciables en su estructura en el rango de pH 1.5-12.

La inmovilización con el nuevo material híbrido funcionalizado se realiza de forma sencilla simplemente mediante incubación. Una disolución de lisozima en tampón fosfato pH 7.5 se incubó a t.a. durante 42 h. con la sílica funcionalizada **115** en ausencia y en presencia de fuerza iónica (NaCl 1M), así como con sílica nativa sin funcionalizar a modo de control. Tras ese tiempo las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se lavaron primero con agua para eliminar el exceso de proteína que no se ha unido covalentemente y finalmente con NaCl 2M para evaluar la existencia de interacciones de naturaleza electrostática responsables de la inmovilización por adsorción, determinando espectrofotométricamente la cantidad de proteína presente en el sobrenadante y en los diferentes lavados (Tabla 4.2).



Esquema 4.7. Inmovilización de lisozima

254. Blake, C. C. F.; Koenig, D. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Sarma, V. R., Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. *Nature* **1965**, *206* (4986), 757-761.

255. Alderton, G.; Ward, W. H.; Fevold, H. L., Isolation of lysozyme from egg white. *J. Biol. Chem.* **1945**, *157* (1), 43-58.

Capítulo 4

Los resultados obtenidos para la sílica nativa se pueden justificar considerando que la proteína está positivamente cargada a un pH por debajo de su *pI* (~11) y que el *pI* de la sílica nativa está alrededor de 3.6. Esa gran diferencia entre ambos *pI* hace que se pueda anticipar una interacción electrostática fuerte entre la lisozima y el soporte que provoca su adsorción, en concordancia con lo descrito previamente en bibliografía²⁵⁶⁻²⁵⁸ y con los datos obtenidos. Los lavados con NaCl 2M no son suficiente para eliminar esta fuerte interacción a pesar de que la adsorción de lisozima se ve afectada por la fuerza iónica, como pone de manifiesto la menor capacidad alcanzada para la sílica nativa en presencia de NaCl 1M (disminución del 27%).

Tabla 4.2. Inmovilización de lisozima.

	Sílica nativa	Sílica nativa NaCl 1M	Vinilsulfona sílica 115	Vinilsulfona sílica 115 NaCl 1M
Lisozima inmovilizada ^a	24.5	19.4	27.4	23.7
<i>No covalente</i> ^a	1.9	3.0	6.9	5.5
<i>Lavada con agua</i>	0.3	0.9	6.1	4.7
<i>Lavada con NaCl 2M</i>	1.6	2.1	0.8	0.8
<i>Covalente</i> ^a	22.5	16.4	20.5	18.2
Capacidad ^b	90.0	65.6	82.0	72.8

a: cantidad en mg; b: cantidad en mg proteína/g sílica

La vinilsulfona-sílica **115** presenta un comportamiento distinto como corresponde a la inmovilización puramente covalente. Tras los lavados con agua se elimina la mayor parte de la lisozima unida de forma no-covalente, y el lavado posterior con NaCl 2M es prácticamente innecesario. Además la presencia de NaCl 1M durante la inmovilización origina un efecto relativamente débil como demuestra la disminución del 11% en la capacidad de la vinilsulfona-sílica, frente al 27% para la sílica nativa. Este leve efecto podría atribuirse a la propia naturaleza de la reacción aza-Michael que se produce, ya que la lisozima no tiene ninguna cisteína libre, y la adición nucleofílica se ha descrito como dependiente del ambiente estérico y electrónico de la amina²⁵⁹ al que contribuye en gran manera la presencia de NaCl en el medio de reacción.

256. Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J., The Adsorption of Lysozyme at the Silica-Water Interface: A Neutron Reflection Study. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *203* (2), 419-429.

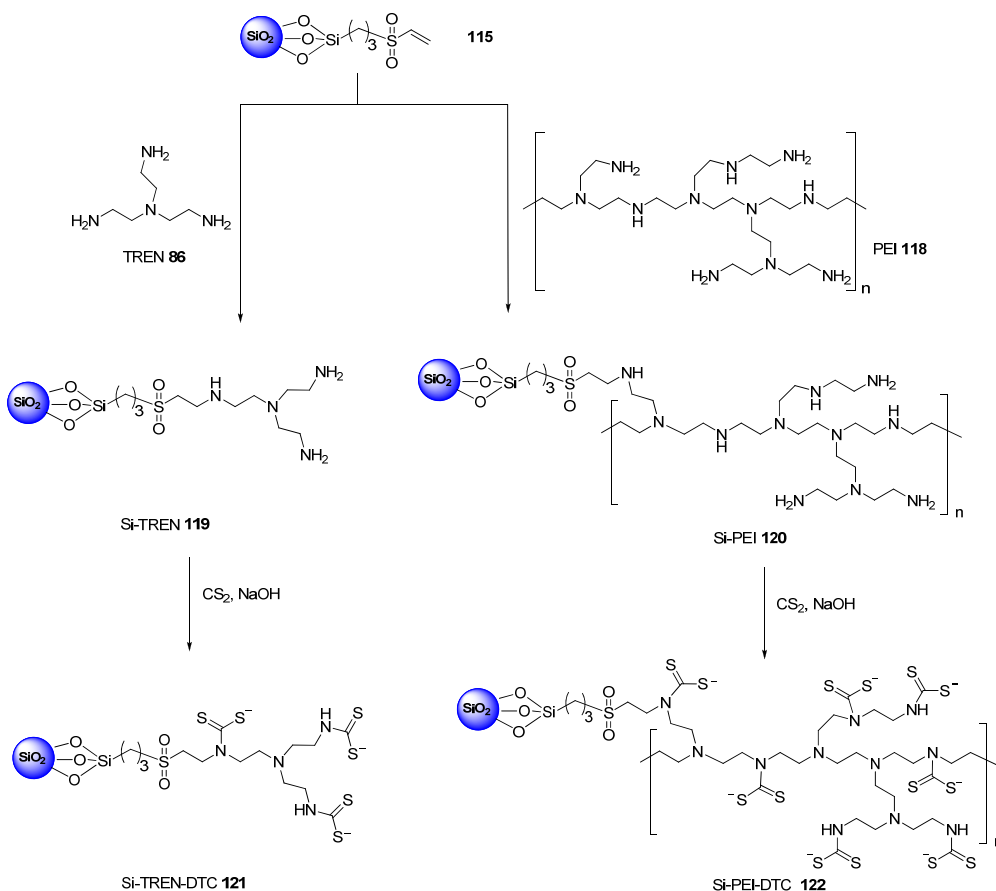
257. Vinu, A.; Murugesan, V.; Hartmann, M., Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (22), 7323-7330.

258. Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S., Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6800-6807.

259. Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E., Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Progr. Polymer Sci.* **2006**, *31* (5), 487-531.

4.3.3. Inmovilización de poliaminas y ditiocarbamatos. Aplicación en la eliminación de metales.

La vinilsulfona-sílica **115** permite la inmovilización sencilla no sólo de biomoléculas sino también de cualquier macromolécula que contenga grupos amino en su estructura. Entre las múltiples posibilidades seleccionamos una poliamina de pequeño tamaño como es la tris(2-aminoetil)amina **86** (TREN) y una macromolécula aminada de mayor peso molecular como es la polietilenimina **118** (PEI), ambas elegidas por sus demostradas propiedades quelantes y por consiguiente por la capacidad para secuestrar iones metálicos. La inmovilización covalente de TREN se lleva a cabo añadiendo un exceso de este reactivo a una suspensión de vinilsulfona-sílica **115** en THF:i-PrOH (1:1). Tras 48 h. a t.a. el sólido se filtra y se lava convenientemente para obtener **Si-TREN 119** (Esquema 4.8).



Esquema 4.8. Preparación de poliaminas y ditiocarbamatos inmovilizados en sílica

Por otro lado, la inmovilización de PEI ramificada (Esquema 4.8) se lleva a cabo en agua, en idénticas condiciones de temperatura y tiempo de reacción que

Capítulo 4

en el caso anterior, usando tres estequiometrías distintas para poder estudiar el efecto que este parámetro produce en la eliminación de metales. Considerando el peso molecular del monómero (etilamina, M_w 43) se trata la vinilsulfona-sílica **115** con cantidades adecuadas de PEI para alcanzar una relación molar inicial de 25, 50 y 100 mmoles de monómero por gramo de sílica funcionalizada. Tras el filtrado y los lavados correspondientes se obtuvieron las diferentes **Si-PEI (120)** 1:25, 1:50 y 1:100 respectivamente.

A partir de las sílicas funcionalizadas **Si-TREN 119** y **Si-PEI 120** se obtienen los diferentes ditiocarbamato derivados por simple tratamiento de una suspensión en i-PrOH de cada uno de los materiales conteniendo grupos amino con CS_2 en medio básico proporcionado por una disolución de NaOH 0.1M. El filtrado de la suspensión resultante tras 7 h. a t.a. con suave agitación magnética y los posteriores lavados permiten aislar los ditiocarbamato derivados **Si-TREN-DTC 121** y **Si-PEI-DTC 122** (Esquema 4.8).

Los distintos materiales obtenidos por inmovilización sobre sílica de poliaminas así como sus ditiocarbamato derivados consideramos que pueden constituir una alternativa útil para el tratamiento de aguas conteniendo metales procediendo a su descontaminación gracias a sus propiedades quelantes.

En los últimos años, la toxicidad y el efecto perjudicial de trazas metálicas para la salud y para el medio ambiente están adquiriendo más importancia. El plomo incluso a niveles muy bajos es uno de los elementos tóxicos más conocidos. Se acumula en los tejidos, preferentemente en los tejidos óseos, provocando un gran número de efectos perjudiciales para los seres vivos, por lo que se han reducido al máximo sus aplicaciones como material de fontanería, preparación de pigmentos o aditivos en las gasolinas. Aun así es posible encontrar niveles de plomo superiores a los meramente naturales como resultado de ciertas actividades humanas, pasando a los seres vivos a través del agua, del aire o la comida. Otros muchos metales, como Zn, Cd, Ni, Hg, Cr, etc. presentan diferentes grados de toxicidad. En el caso del Co, éste tiene efectos beneficiosos para la salud ya que forma parte de la vitamina B_{12} , esencial para los seres humanos, sin embargo, la exposición a altos niveles de Co puede provocar efectos perjudiciales.

Teniendo en cuenta estos datos se evalúa la capacidad de retención de Co(II) y Pb(II) de los nuevos materiales híbridos (**Si-TREN**, **Si-TREN-DTC**, **Si-PEI** y **Si-PEI-DTC**) a través del estudio de la influencia del pH, las cinéticas de adsorción y la capacidad máxima de retención según se describe a continuación.

➔ Efecto del pH

Uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de estudiar la capacidad de un material para eliminar metales del medio acuoso es el pH del mismo. Se evalúa el efecto del pH para la retención de Co(II) y Pb(II) con los ditiocarbamato derivados **Si-PEI-DTC 1:25** y **Si-TREN-DTC**, respectivamente, para lo cual se preparan disoluciones de 50 ppm de Pb(II) ó Co(II) a diferentes valores de pH (Figura 4.2 y 4.3) que se tratan en *batch* con la resina correspondiente durante 12 h. a t.a. A continuación, las muestras tratada y sin tratar se centrifugan y se determina en el sobrenadante el contenido metálico mediante AAS. Como se observa en las gráficas el aumento de pH provoca un aumento en la capacidad de retención de ambos materiales, teniendo en cuenta que por encima de ciertos valores de pH se observa precipitación de los correspondientes hidróxidos (pH > 8 para el Co, pH > 6.5 para el Pb). Tanto para las poliaminas como para los ditiocarbamatos el aumento en la capacidad quelante con el pH se puede justificar en base a que a bajos valores de pH los grupos amino y ditiocarbamatos se encuentran protonados y a medida que aumenta el pH estos grupos se desprotonan dando lugar a interacciones de tipo dador-aceptor con el ion metálico.

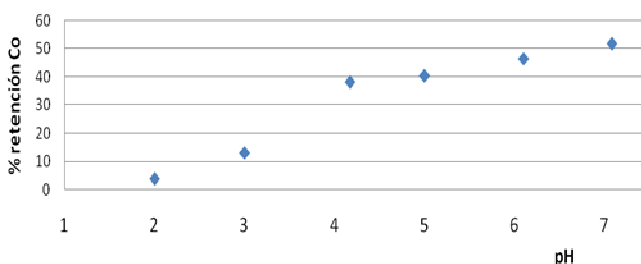


Figura 4.2. Retención de Co(II) con Si-PEI-DTC 1:25 a diferentes pHs

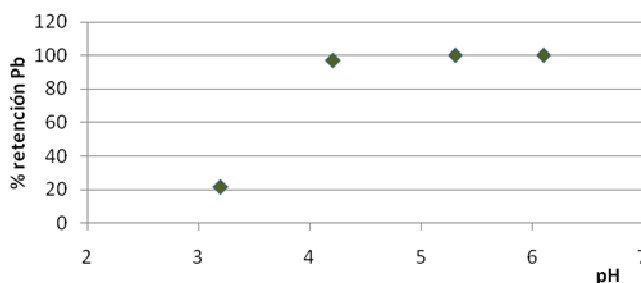


Figura 4.3. Retención de Pb(II) con Si-TREN-DTC a diferentes pHs

Capítulo 4

► Cinética de adsorción

Para el estudio de la cinética de adsorción se trata una disolución de Pb(II) 75 ppm pH 5.5 con **Si-TREN-DTC** (25 mg) recogiendo alícuotas a diferentes tiempos para determinar el contenido en Pb mediante AAS. El perfil de concentración de Pb en función del tiempo se recoge en la Figura 4.4 la cual pone de manifiesto que la velocidad de adsorción es aceptable ya que en sólo 30 min se produce el 80% de la retención siendo necesarias ~4h para alcanzar la adsorción del 94% del total.

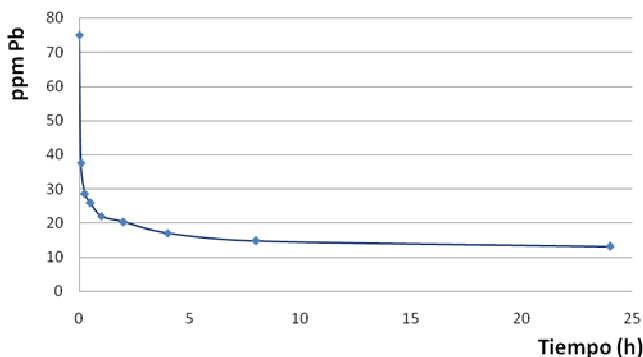


Figura 4.4. Evolución de la concentración de Pb (II) en disolución en el tratamiento con **Si-TREN-DTC**

► Capacidad máxima de retención de Co(II) y Pb(II)

Finalmente se determina la capacidad de retención de Co(II) y Pb(II) mediante métodos estáticos para los diferentes materiales conteniendo aminas y ditiocarbamatos (**Si-TREN**, **Si-TREN-DTC**, **Si-PEI** y **Si-PEI-DTC**) al pH óptimo previamente determinado para cada ion metálico. Para ello se trata una disolución de Co(II) 50 ppm pH 7.0 y una disolución de Pb(II) 75 ppm pH 5.5 con los diferentes materiales en *batch* a t.a. durante una noche. Transcurrido ese tiempo se centrifugan las muestras determinando en el sobrenadante la concentración del metal mediante AAS.

La retención se expresa en forma de capacidad (cantidad de metal adsorbido por gramo de adsorbente). En primer lugar, cabe destacar el aumento observado al pasar de **Si-TREN** a **Si-PEI** en la capacidad de retención tanto para Co como Pb (Figura 4.5 y 4.6) la cual puede ser adscrita al mayor número de átomos de nitrógeno dadores de la poliamina con respecto a la trisamina. En segundo lugar, el efecto de la estequiometría empleada durante la inmovilización de PEI en la capacidad del material resultante (**Si-PEI**) es difícil de racionalizar ya que para los dos metales se obtienen diferentes resultados, siendo óptima la relación 1:50 para la retención de Co(II) y 1:25 para la retención de Pb(II), repitiéndose el mismo perfil

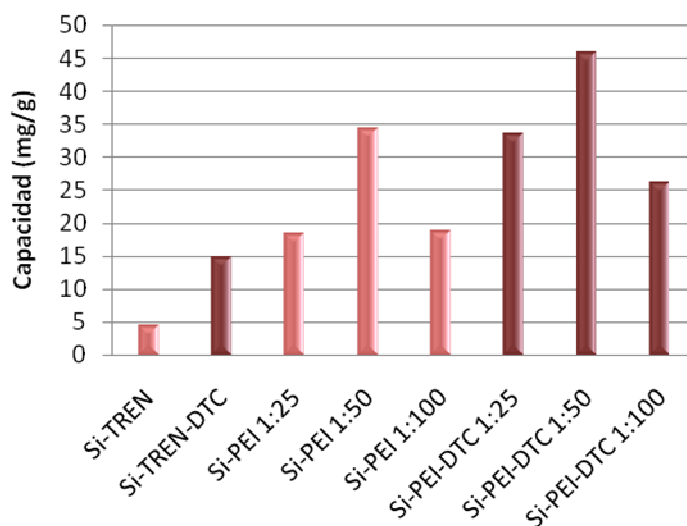


Figura 4.5. Capacidad ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de las poliaminas inmovilizadas (rosa) y sus ditiocarbamato derivados (granate) para la retención de Co (II).

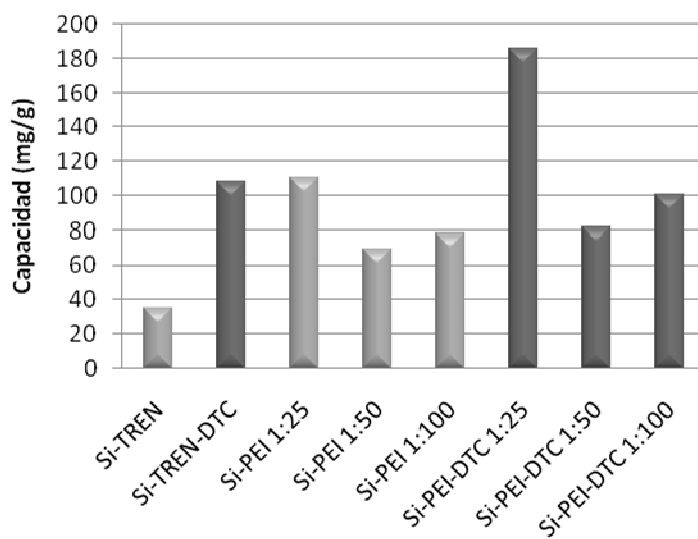


Figura 4.6. Capacidad ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de las poliaminas inmovilizadas (gris claro) y sus ditiocarbamato derivados (gris oscuro) para la retención de Pb (II).

en el caso de **Si-PEI-DTC**. Por último y en concordancia con lo descrito previamente en literatura,²⁴³ queda patente en todos los casos que la transformación de los grupos amino inmovilizados de TREN o PEI en grupos ditiocarbamato mejora la retención de iones metálicos, permitiendo alcanzar valores de capacidad muy elevados ($186 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para Pb(II) y $46 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para Co(II)) con **Si-PEI-DTC**.

4.4. Conclusiones

- Se ha desarrollado una metodología sencilla y eficiente para la funcionalización de sílica con grupos vinilsulfona conectados a través de espaciadores hidrocarbonados. Este material permite implementar importantes aplicaciones que derivan de su capacidad de inmovilización de diferentes moléculas:
 - La inmovilización de aminodansilo origina un material cuyas propiedades altamente fluorescentes demuestran el carácter covalente de la unión fluoróforo-sílica.
 - Proteínas como la lisozima pueden inmovilizarse sobre la sílica-vinilsulfona aprovechando grupos presentes de forma natural en las biomoléculas. El proceso de inmovilización destaca por su simplicidad, pudiéndole atribuir características de química “verde”, ya que sólo requiere combinar soporte y biomolécula en un tampón libre de grupos amino, sin necesidad de etapas de pre-activación ni catalizadores y sin generar subproductos. Al carecer dicha proteína de cisteínas libres, se puede concluir además que la adición aza-Michael se produce en condiciones suaves de pH y temperatura.
 - La inmovilización de tris(2-aminoetil)amina (TREN) y polietilenimina (PEI) sobre sílica-vinilsulfona genera un nuevo material híbrido con propiedades quelantes que hacen factible su empleo en la eliminación de contaminantes como el Pb(II) o el Co(II), obteniéndose mejores resultados para PEI que para TREN. La posterior transformación de los grupos amino en ditiocarbamatos mejora notablemente la capacidad de retención de estos materiales alcanzándose valores de hasta $186 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para Pb(II) y $46 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para Co(II) en el caso de **Si-PEI-DTC**.

4.5. Sección experimental

Activación de sílica

La sílica comercial (Merck, 70–230 mesh ASTM) se activa para la silanización por calentamiento a 120°C en vacío (1 mm Hg) durante 24 h.

Preparación de cloropropil sílica 112

Sílica activada (10 g) se suspende en tolueno anhidro (50 mL) y se adiciona (3-cloropropil)triethoxisilano (3.5 mL). La mezcla de reacción se mantiene con agitación magnética a reflujo durante 2 h. Tras la evaporación parcial del disolvente para eliminar el etanol formado se mantiene 1 h. más a reflujo. La mezcla de reacción se filtra lavando el sólido obtenido con tolueno (2x30 mL) y acetona (2x30 mL), secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener la cloropropil sílica **112** (11.1 g).

Preparación de sílica funcionalizada con mercaptoetanol 113

Cloropropil sílica **112** (5.0 g) se suspende en acetonitrilo (40 mL) y se adiciona 2-mercaptoetanol (3.5 mL) y carbonato potásico (6.9 g). La suspensión se mantiene con agitación magnética y bajo atmósfera de Ar a 50°C durante 8 h. La mezcla de reacción se filtra, lavando el sólido con agua caliente (2x20 mL) y acetona (2x20 mL), secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener la sílica funcionalizada con mercaptoetanol **113** (4.2 g).

Preparación de sílica funcionalizada con 2-hidroxietilsulfona 114

Sílica funcionalizada con mercaptoetanol **113** (3.0 g) se suspende en ácido acético (6.0 mL) adicionando a continuación peróxido de hidrogeno 33% (15.0 mL). La mezcla de reacción se mantiene con agitación magnética a t.a. y en ausencia de luz durante 24 h. Tras filtrar, el sólido se lava con agua (2 x 20 mL), MeOH (2 x 20 mL) y acetona (2 x 20 mL), secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener la sílica funcionalizada con 2-hidroxietilsulfona **114** (2.9 g).

Preparación de sílica funcionalizada con vinilsulfona 115

Sílica funcionalizada con 2-hidroxietilsulfona **114** (2.5 g) se suspende en CH₂Cl₂ anh. (40 mL), enfriando la suspensión agitada magnéticamente mediante un baño de hielo. Entonces se adiciona cloruro de metanosulfonilo (0.9 ml) y

triethylamina (3.5 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a t.a. durante 7 h. y tras filtrar, el sólido se lava con MeOH (2x20 mL) y acetona (2x20 mL), secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener la sílica funcionalizada con vinilsulfona **115** (2.4 g).

Tratamiento con dansiletilendiamina

A una suspensión conteniendo 100 mg de sílica **114** o **115** en MeOH (5 mL) se añade dansiletilendiamina **116** (60 mg, 0.2 mmol) manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 24 h. Tras filtrar, el sólido se lava con MeOH (20 mL), NaCl 2M (20 mL) y finalmente con acetona, secando a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h.

Inmovilización de lisozima

Sílica vinilsulfona **115** o sílica nativa (0.25 g) se suspende en 5 mL de una disolución de lisozima (Sigma 62970) 6 mg/mL en tampón fosfato 0.4M pH 7.5 suplementado o no con NaCl 1M, manteniendo la suspensión a t.a. con agitación orbital durante 42 h. La suspensión resultante se centrifuga midiendo en el líquido sobrenadante la concentración de proteína. El sólido se lava con agua destilada (2x10 mL) y NaCl 2M en agua (2x10 mL) para eliminar la proteína unida de forma no covalente, cuantificando mediante la medida de absorbancia la concentración de proteína en cada lavado. La concentración de proteína se calcula a partir de los datos de absorbancia a 280 nm asumiendo una absorbancia para una disolución de lisozima 0.1% de 2.6.

Inmovilización de poliaminas y eliminación de metales. General

Se emplea TREN y PEI ramificada ($M_w \sim 25000$, $M_n \sim 10000$) suministradas por Aldrich. Para los ensayos de eliminación de metales se emplean disoluciones patrón comerciales de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en HNO_3 0.5N y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0.5N, determinando la concentración de Co y Pb en las muestras mediante AAS usando un espectrómetro Perkin–Elmer AAnalyst100.

Preparación de Si-TREN (119)

A una disolución de TREN **86** (305 mg, 2 mmol) en THF:i-PrOH (1:1, 40 mL) se añade la sílica-VS **115** (1.00 g). La suspensión resultante se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 48 h. tiempo tras el cual se filtra y el sólido se lava abundantemente con MeOH y finalmente con éter, secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16h para obtener **Si-TREN 119** (1.05 g).

Preparación de Si-PEI (120)

A una disolución de PEI **118** (0.54 g para 1:25, 1.08 g para 1:50 ó 2.16 g para 1:100) en agua destilada (40 mL) se añade la sílica-VS **115** (500 mg). La suspensión resultante se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 48 h. tiempo tras el cual se filtra y el sólido se lava abundantemente con agua y finalmente con acetona, secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener **Si-PEI 120** (581 mg para 1:25, 520 mg para 1:50 y 522 mg para 1:100).

Preparación de Si-TREN-DTC (121)

A una suspensión de **Si-TREN 119** (500 mg) en i-PrOH (1.5 mL) se adiciona CS₂ (1.2 mL) y NaOH 0.1M (7.5 mL), manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 7 h. tiempo tras el cual se filtra y el sólido se lava abundantemente con agua e i-PrOH y finalmente éter secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener **Si-TREN-DTC 121** (520 mg).

Preparación de Si-PEI-DTC (122)

A una suspensión de **Si-PEI 120** (400 mg) en i-PrOH (2 mL) se adiciona CS₂ (1.6 mL) y NaOH 0.1M (10 mL), manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 7 h. tiempo tras el cual se filtra y el sólido se lava abundantemente con agua, i-PrOH y finalmente éter, secándolo a continuación a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. para obtener **Si-PEI-DTC 122** (461 mg para 1:25, 448 mg para 1:50 y 455 mg para 1:100).

Estudio de la capacidad de retención de Co en función del pH

Diferentes disoluciones de Co (II) (50 ppm, 40 mL) a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se tratan en *batch* con **Si-PEI-DTC 1:25** (25 mg) manteniendo con agitación orbital a t.a. durante toda la noche. Tras ese tiempo una alícuota de cada muestra, antes y después del tratamiento, se centrifuga (4 min, 140 rpm) y en el sobrenadante se determina el contenido en Co mediante AAS.

Estudio de la capacidad de retención de Pb en función del pH

Diferentes disoluciones de Pb (II) (50 ppm, 40 mL) a pH 3, 4, 5 y 6 se tratan en *batch* con **Si-TREN-DTC** (25 mg) manteniendo con agitación orbital a t.a. durante toda la noche. Tras ese tiempo una alícuota de cada muestra, antes y después del tratamiento, se centrifuga (4 min, 140 rpm) y en el sobrenadante se determina el contenido en Pb mediante AAS.

Estudio de la cinética de adsorción de Pb

Una disolución de Pb (II) 75 ppm (40 mL) a pH 5.5 se trata en *batch* con **Si-TREN-DTC** (25 mg) manteniendo con agitación orbital a t.a. A diferentes tiempos (5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8 y 24 h) se toman alícuotas de la muestra, centrifugando (4 min, 140 rpm) para determinar en el sobrenadante el contenido en Pb mediante AAS.

Estudio de la capacidad máxima de retención de Co

Una disolución de Co (II) 50 ppm (40 mL) a pH 7.0 se trata en *batch* con los diferentes materiales **Si-TREN**, **Si-TREN-DTC**, **Si-PEI** y **Si-PEI-DTC** (25 mg) manteniendo con agitación orbital a t.a. durante toda la noche. Tras ese tiempo una alícuota de cada muestra se centrifuga (4 min, 140 rpm) y en el sobrenadante se determina el contenido en Co mediante AAS.

Estudio de la capacidad máxima de retención de Pb

Una disolución de Pb (II) 75 ppm (60 mL) a pH 5.5 se trata en *batch* con los diferentes materiales **Si-TREN**, **Si-TREN-DTC**, **Si-PEI** y **Si-PEI-DTC** (25 mg) manteniendo con agitación orbital a t.a. durante toda la noche. Tras ese tiempo una alícuota de cada muestra se centrifuga (4min, 140 rpm) y en el sobrenadante se determina el contenido en Pb mediante AAS.

**Capítulo 5. LIPIDACIÓN MEDIANTE
VINILSULFONAS. NUEVOS DERIVADOS DE
PAMAM CON APLICACIONES EN TRANSFECCIÓN**

Capítulo 5.

Lipidación mediante vinilsulfonas. Nuevos derivados de PAMAM con aplicaciones en transfección

5.1. Importancia de los lípidos

Los lípidos son biomoléculas ampliamente conocidas y con estructura química sencilla, aunque con gran diversidad estructural, que comparten la propiedad de ser insolubles en agua y que de forma clásica cumplen dos tipos de funciones, estructural formando las membranas y almacenadora de energía. Estos compuestos han permanecido mucho tiempo en un segundo plano con respecto a proteínas y ácidos nucleicos, en los que se ha centrado toda la atención de las ciencias *ómicas*, aunque en los últimos años estas moléculas bioactivas están adquiriendo importancia por su participación en numerosos procesos importantes como el control del ciclo celular y la homeostasis, la entrada de bacterias, toxinas y virus, la señalización celular, etc. De esta forma se ha originado el nuevo concepto de Lipidómica²⁶⁰ que se puede definir como el estudio a gran escala de los lípidos existentes en un sistema biológico y de las redes metabólicas que los relacionan, lo que implica la identificación y cuantificación de las miles de especies moleculares de lípidos y sus interacciones con otros lípidos, proteínas y metabolitos. Es un campo emergente²⁶¹⁻²⁶² de vital importancia para dilucidar los mecanismos de las numerosas enfermedades con una base lipídica, incluyendo la aterosclerosis, la diabetes o la enfermedad del Alzheimer.

5.1.1. Lipidación de proteínas

La importancia de los lípidos ha propiciado también su empleo como agentes de derivatización. La incorporación de estructuras lipídicas en el caso concreto de las proteínas provoca una serie de efectos²⁶³ entre los que se incluyen:

260. Spener, F.; Lagarde, M.; Gélouën, A.; Record, M., Editorial: What is lipidomics? *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **2003**, *105* (9), 481-482.

261. Wenk, M. R., The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4* (7), 594-610.

262. Shevchenko, A.; Simons, K., Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (8), 593-598.

263. Kočevár, N.; Obermajer, N.; Štrukelj, B.; Kos, J.; Kreft, S., Improved Acylation Method Enables Efficient Delivery of Functional Palmitoylated Cystatin into Epithelial Cells. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69* (2), 124-131.

Capítulo 5

(i) aumento de la hidrofobicidad; (ii) dirige la localización intracelular de biomoléculas²⁶⁴; (iii) mejora de la permeabilidad a la membrana²⁶⁵ de numerosas proteínas facilitando su transporte; (iv) modulación de las interacciones membrana-proteína y proteína-proteína²⁶⁶; (v) disminución en determinados casos de la inmunogenicidad de proteínas modificadas y un descenso en la producción de anticuerpos frente a ellas.²⁶⁷

De forma natural la lipidación de proteínas con el resto mirístico (C 14:0) mediante N-acilación de glicina terminal y el resto palmítico (C 16:0) mediante tioesterificación de un resto de cisteína constituye una de las derivatizaciones post-transduccionales más comunes.²⁶⁸ Por otro lado, la modificación química con derivados de ácidos grasos representa una aproximación atractiva, siendo los principales grupos implicados α -terminal y ϵ -NH₂, y en menor extensión grupos -SH y -OH.

Las estrategias más empleadas para la lipidación de proteínas recurren al uso de cloruros de ácido,²⁶³ anhídridos²⁶⁹ y ésteres activados como NHS-ésteres²⁷⁰ (Esquema 5.1A) formando enlaces amida estables con grupos amino libres. Debido a las características intrínsecas de los lípidos uno de los principales inconvenientes en esta transformación es la baja solubilidad en agua de los reactivos de lipidación. Algunas propuestas para evitar este problema estriban en el empleo de cloruros de ácidos grasos como agentes derivatizantes en medios micelares, ya sean micelas

264. James, G.; Olson, E. N., Fatty acylated proteins as components of intracellular signaling pathways. *Biochemistry* **1990**, *29* (11), 2623-2634.

265. Kočevár, N.; Obermajer, N.; Kreft, S., Membrane Permeability of Acylated Cystatin Depends on the Fatty Acyl Chain Length. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72* (3), 217-224.

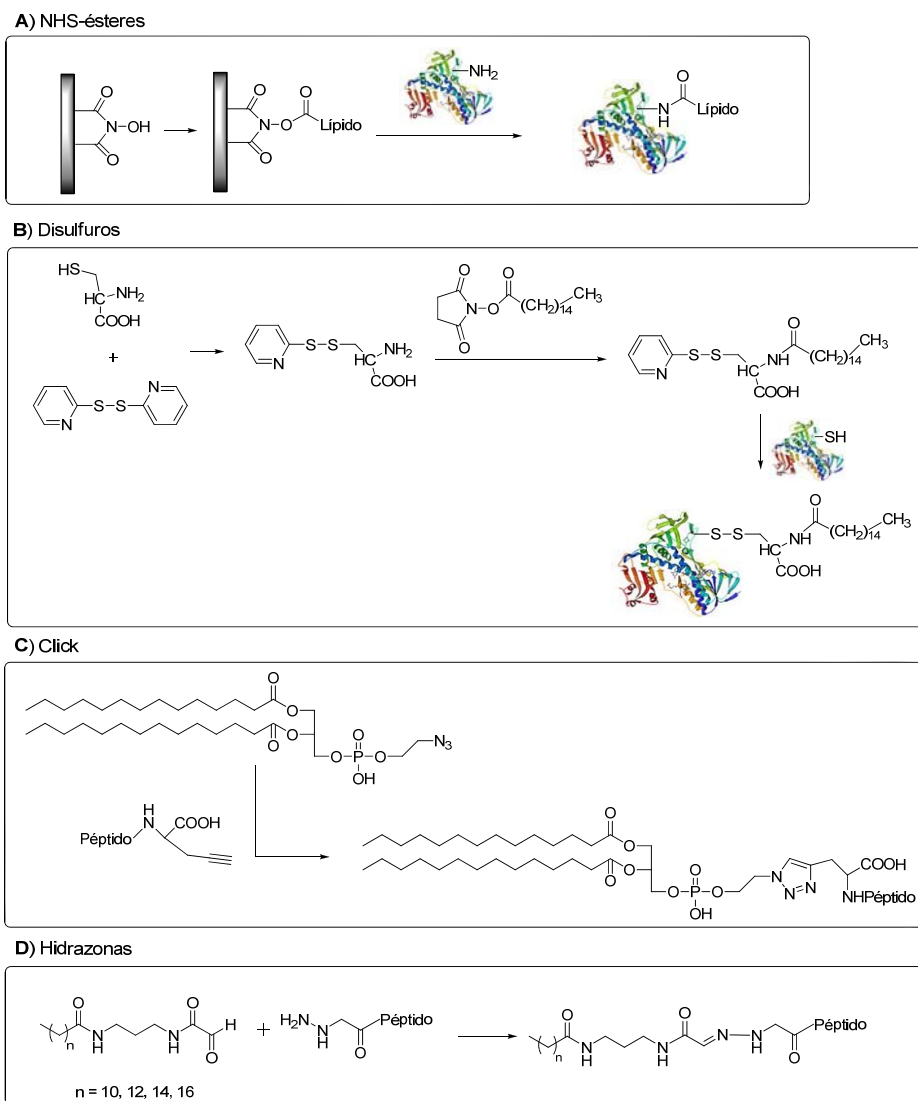
266. Sankaram, M. B., Membrane interaction of small N-myristoylated peptides: implications for membrane anchoring and protein-protein association. *Biophysical J.* **1994**, *67* (1), 105-112.

267. Shi, Q.; Domurado, M.; Domurado, D., Effect of Protein Chemical Hydrophobization on Antiglucose Oxidase Immunoglobulin Production in Mouse. *Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *76* (4), 278-285.

268. Resh, M. D., Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1999**, *1451* (1), 1-16.

269. Pato, C.; Tran, V.; Marion, D.; Douliez, J. P., Effects of Acylation on the Structure, Lipid Binding, and Transfer Activity of Wheat Lipid Transfer Protein. *J. Protein Chem.* **2002**, *21* (3), 195-201.

270. Gershkovich, A. A.; Verevka, S. V.; Kibirev, V. K.; Demchenko, A. P., Solid-state conjugation of proteins with hydrophobic compounds in non-denaturing conditions: I. Acylation of proteins by dansyl proline using a polymeric N-hydroxysuccinimide ester. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2000**, *45* (2), 183-191.



Esquema 5.1. Algunas estrategias para la lipidación de péptidos y proteínas

en disolución acuosa,²⁷¹ o micelas inversas en disolventes orgánicos.²⁷² También se han desarrollado reactivos solubles en agua como piridil disulfuros derivados del palmítico²⁷³ (Esquema 5.1B) para conjugación reversible a través de residuos de cisteína. Los grupos tioles se han funcionalizado también mediante

271. Martins, M. B. F.; Jorge, J. C. S.; Cruz, M. E. M., Acylation of l-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* **1990**, *72* (9), 671-675.

272. Robert, S.; Domurado, D.; Thomas, D.; Chopineau, J., Fatty Acid Acylation of RNase A Using Reversed Micelles as Microreactors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1993**, *196* (1), 447-454.

273. Ekrami, H. M.; Kennedy, A. R.; Shen, W.-C., Water-soluble fatty acid derivatives as acylating agents for reversible lipidization of polypeptides. *FEBS Lett.* **1995**, *371* (3), 283-286.

Capítulo 5

transtioesterificación con aril- y alquil- tioésteres de ácidos grasos de cadena larga²⁷⁴ empleando medios micelares o mezclas acetonitrilo-agua como disolvente. Otras reacciones que han permitido la modificación de péptidos, proteínas o ácidos nucleicos son la reacción “click” de cicloadición de azidas y alquinos, con fosfatidiletanolazida²⁷⁵ (Esquema 5.1C) o alquinilderivados de colesterol y ácido esteárico²⁷⁶ como agentes de lipidación, así como la formación de hidrazonas mediante α -oxo-aldehidos lipídicos²⁷⁷ (Esquema 5.1D).

Junto con el interés por los sistemas lípido-proteína, la incorporación de proteínas a liposomas ha adquirido también una especial importancia, principalmente por dos motivos: (i) dichos sistemas permiten el estudio de interacciones y procesos que ocurren en la membrana celular actuando el liposoma como mímico de dicha estructura, y (ii) la unión de ciertas proteínas a liposomas puede ayudar a crear sistemas de transporte dirigido de fármacos.

La incorporación de péptidos y proteínas a liposomas se puede llevar a cabo mediante dos estrategias diferentes:²⁷⁸ a través de la inclusión de proteínas en el liposoma durante la formación del mismo, o mediante la unión covalente de la proteína a la bicapa lipídica del liposoma, empleando proteínas modificadas o bien liposomas funcionalizados. En esta última opción es necesario que la proteína contenga una región hidrofóbica para que se establezca la asociación y para ello, en muchas ocasiones, se ha llevado a cabo la incorporación química de ácidos grasos mediante unión covalente sobre la estructura de la proteína.

274. Sang, S. L. W.; Silvius, J. R., Novel thioester reagents afford efficient and specific S-acylation of unprotected peptides under mild conditions in aqueous solution. *J. Pept. Res.* **2005**, *66* (4), 169-180.

275. Musiol, H.-J.; Dong, S.; Kaiser, M.; Bausinger, R.; Zumbusch, A.; Bertsch, U.; Moroder, L., Toward Semisynthetic Lipoproteins by Convergent Strategies Based on Click and Ligation Chemistry. *ChemBioChem* **2005**, *6* (4), 625-628.

276. Godeau, G.; Staedel, C.; Barthélémy, P., Lipid-Conjugated Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (15), 4374-4376.

277. Dubs, P.; Bourel-Bonnet, L.; Subra, G.; Blanpain, A.; Melnyk, O.; Pinel, A.-M.; Gras-Masse, H.; Martinez, J., Parallel Synthesis of a Lipopeptide Library by Hydrazone-Based Chemical Ligation. *J. Combin. Chem.* **2007**, *9* (6), 973-981.

278. Torchilin, V. P.; Klibanov, A. L., Immobilization of proteins on liposome surface. *Enzym. Microb. Tech.* **1981**, *3* (4), 297-304.

5.1.2. ISCOM

Los complejos inmune-estimulantes (ISCOM)²⁷⁹⁻²⁸¹ son estructuras tridimensionales esféricas abiertas, en forma de caja, con un diámetro en torno a 40 nm, que están formadas por saponinas, colesterol, y fosfolípidos (Figura 5.1). Las saponinas son mezclas complejas de triterpenos glicosilados que se aíslan del árbol *Quillaja saponaria*.

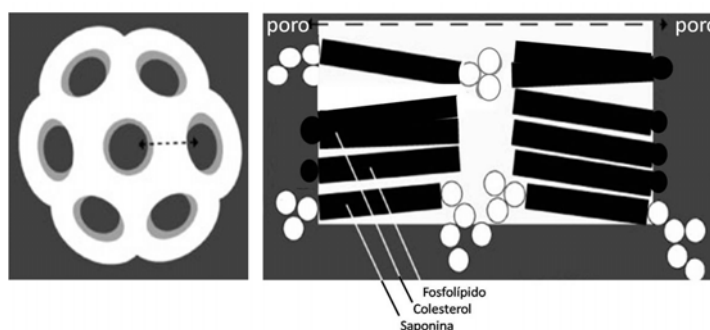


Figura 5.1. Estructura de un ISCOM

Los ISCOM pueden ser preparados por varios métodos: diálisis, centrifugación, hidratación de película lipídica, inyección de etanol e inyección de éter. Estos métodos difieren esencialmente en la pre-dispersión de los componentes lipídicos y en el uso o no de solubilizadores adicionales, siendo la mayoría de los métodos adaptaciones de los métodos de preparación de liposomas. La formación de estructuras coloidales no sólo depende del método de preparación, sino también de la relación existente entre saponina/colesterol/fosfolípido. Una vez formados, son estructuras tremendamente estables observándose una vida media de varios años durante su almacenaje en solución acuosa a 2-8°C, comparada con unos meses para las saponinas libres. Estos complejos se utilizan como coadyuvantes (compuestos que actúan de manera no específica para incrementar la inmunidad frente a un antígeno) en vacunas para generar una mayor respuesta inmune y una protección más prolongada debido a sus propiedades inmunoestimulantes.

279. Sjolander, A.; Cox, J. C.; Barr, I. G., ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *64* (6), 713-723.

280. Myschik, J.; Lendemans, D. G.; McBurney, W. T.; Demana, P. H.; Hook, S.; Rades, T., On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. *Micron* **2006**, *37* (8), 724-734.

281. Sun, H.-X.; Xie, Y.; Ye, Y.-P., ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* **2009**, *27* (33), 4388-4401.

Capítulo 5

A diferencia de los liposomas, en el caso de los ISCOM su menor tamaño y volumen interno no permite la incorporación de la gran mayoría de proteínas mediante inclusión y son necesarias otras estrategias para llevar a cabo esa unión. Se ha descrito en bibliografía que la unión de antígenos proteicos a ISCOM provoca una respuesta inmune más potente.²⁸² Para la unión de antígenos se han desarrollado numerosas técnicas^{279, 283} que van desde la desnaturalización parcial de proteínas para exponer regiones hidrofóbicas al medio, la modificación covalente de proteínas con ácidos grasos como el palmítico,²⁸⁴ las estrategias recombinantes incorporando en proteínas secuencias con afinidad por el ISCOM²⁸⁵ o el empleo de lípidos modificados con agentes quelantes en la formación del ISCOM para después unir proteínas modificadas con colas de histidinas.²⁸⁶

5.2. Transfección

Numerosas enfermedades genéticas están asociadas con un defecto o anomalía de expresión de los ácidos nucleicos. La terapia génica es una aproximación por la cual un ácido nucleico exógeno es introducido en células de un individuo para producir un efecto terapéutico y tiene como objetivo principal corregir este tipo de anomalías mediante la expresión celular *in vivo* o *in vitro* de genes clonados.

La transfección consiste en esta introducción de material genético externo en células eucariotas. Se han propuesto varios métodos para el suministro intracelular de este tipo de información genética (Esquema 5.2).

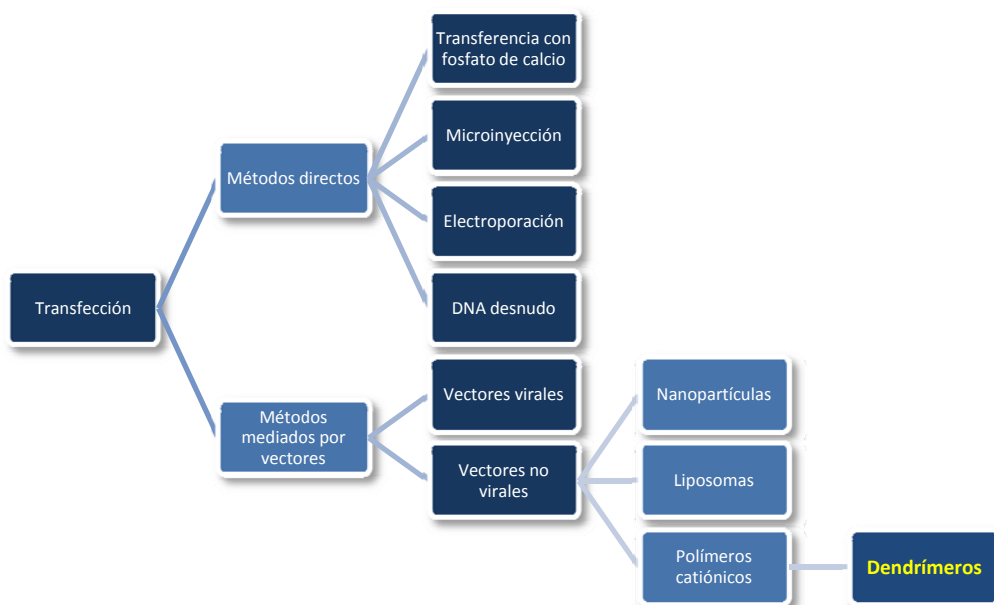
282. Bengtsson, K. L.; Sjölander, A., Adjuvant activity of iscoms; effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine* **1996**, *14* (8), 753-760.

283. Barr, I. G.; Mitchell, G. F., ISCOMs (immunostimulating complexes): The first decade. *Immunol Cell Biol* **1996**, *74* (1), 8-25.

284. Reid, G., Soluble proteins incorporate into ISCOMs after covalent attachment of fatty acid. *Vaccine* **1992**, *10* (9), 597-602.

285. Wikman, M.; Friedman, M.; Pinitkiatisakul, S.; Andersson, C.; Hemphill, A.; Lövgren-Bengtsson, K.; Lundén, A.; Ståhl, S., General strategies for efficient adjuvant incorporation of recombinant subunit immunogens. *Vaccine* **2005**, *23* (17-18), 2331-2335.

286. Malliaros, J.; Quinn, C.; Arnold, F. H.; Pearse, M. J.; Drane, D. P.; Stewart, T. J.; Macfarlan, R. I., Association of antigens to ISCOMATRIX™ adjuvant using metal chelation leads to improved CTL responses. *Vaccine* **2004**, *22* (29-30), 3968-3975.



Esquema 5.2. Clasificación de los métodos de transfección

A grandes rasgos, las técnicas de transfección se agrupan en métodos mediados por vectores y métodos directos, en función de que el ácido nucleico a transfectar sea coadyuvado o no por vehículos. Los métodos directos pueden ser químicos, como la transferencia con fosfato de calcio,²⁸⁷ o físicos²⁸⁸ como la microinyección o la electroporación. Los métodos indirectos emplean vehículos que pueden clasificarse en vectores virales²⁸⁹⁻²⁹⁰ y no virales.²⁹¹⁻²⁹³

287. Yang, Y.-W.; Yang, J.-C., Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy. *Biomaterials* **1997**, *18* (3), 213-217.

288. Mehier-Humbert, S.; Guy, R. H., Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (5), 733-753.

289. Robbins, P. D.; Tahara, H.; Ghivizzani, S. C., Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (1), 35-40.

290. Lundstrom, K., Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (3), 117-122.

291. Kundu, P. P.; Sharma, V., Synthetic polymeric vectors in gene therapy. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2008**, *12* (5-6), 89-102.

292. Mintzer, M. A.; Simanek, E. E., Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.* **2008**, *109* (2), 259-302.

293. Morille, M.; Passirani, C.; Vonarbourg, A.; Clavreul, A.; Benoit, J.-P., Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* **2008**, *29* (24-25), 3477-3496.

Capítulo 5

Los vectores víricos, como los retrovirus o los adenovirus, son muy efectivos pero llevan asociados problemas de toxicidad, inmunogenicidad y dificultad de preparación a gran escala.²⁹⁴⁻²⁹⁵

Entre los vectores no virales más estudiados encontramos nanopartículas, liposomas y polímeros catiónicos. Mediante el bombardeo por una descarga de helio con nanopartículas de Au o W que llevan adherido a ellas el DNA se puede introducir el DNA en el núcleo de la célula diana en un proceso conocido como biolística.²⁹⁶ Por otro lado, los vectores químicos sintéticos tienen como funciones principales unirse y compactar el DNA a transfectar y promover su fijación celular facilitando su paso a través de la membrana plasmática y en su caso a través de la membrana nuclear. A pesar de que los vectores no virales han demostrado una eficacia relativamente inferior debido principalmente a las barreras extra- e intracelulares que encuentran para su captación celular, éstos son más seguros, más estables y su estructura puede ser modificada químicamente permitiendo un estudio sistemático de los factores implicados en la modulación de su eficiencia.

Los liposomas²⁹⁷⁻²⁹⁸ tienen la ventaja de proteger de la degradación al transgén hasta su llegada al núcleo. Como desventaja presentan la baja eficacia de transfección, una expresión transitoria, cierto grado de toxicidad celular y pueden ser inhibidos por componentes séricos.

Para el caso de los polímeros catiónicos, como DEAE-dextrano, poli-L-lisina (PLL) o polietilenimina (PEI), el DNA cargado negativamente, se une al polímero mediante fuertes interacciones electrostáticas y el políplejo resultante es endocitado por la célula (Figura 5.2). Un caso particular dentro de este tipo de vectores químicos son los dendrímeros, que son estructuras altamente ramificadas. Estos han demostrado un gran potencial en aplicaciones biomédicas²⁹⁹ destacando

294. Verma, I. M.; Somia, N., Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* **1997**, *389* (6648), 239-242.

295. Nayak, S.; Herzog, R. W., Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther.* **2010**, *17* (3), 295-304.

296. Sanford, J. C., The biolistic process. *Trends in Biotechnology* **1988**, *6* (12), 299-302.

297. McNeil, S. E.; Perrie, Y., Gene delivery using cationic liposomes. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16* (10), 1371-1382.

298. Srinivas, R.; Samanta, S.; Chaudhuri, A., Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (12), 3326-3338.

299. Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W., Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 173-190.

como vectores para la administración de genes³⁰⁰ frente a sistemas poliméricos clásicos debido a sus propiedades exclusivas³⁰¹: una superficie multivalente, fácilmente funcionalizable y una arquitectura tridimensional bien definida.

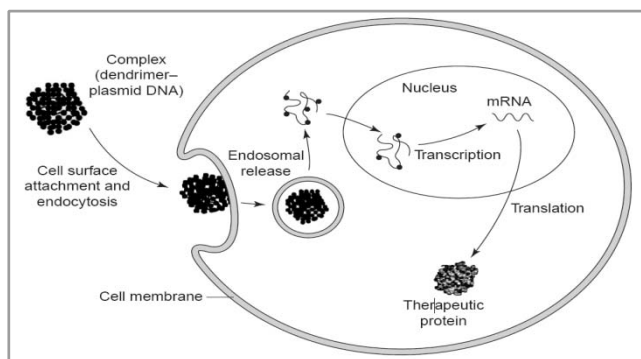


Figura 5.2. Mecanismo de transfección celular mediado por dendrímeros, tomado de ref. 302

5.2.1. Dendrímeros de PAMAM en transfección

Los dendrímeros de PAMAM ó poli(amidoaminas) han adquirido gran importancia en las últimas décadas debido a su aplicaciones biomédicas como vectores para transfección³⁰²⁻³⁰³ y liberación controlada de fármacos.³⁰⁴⁻³⁰⁵ Se obtienen mediante síntesis divergente por secuencias repetitivas de adición aza-Michael de grupos amino con acrilato de metilo seguido de amidación del éster resultante con etilendiamina, dando lugar a las diferentes generaciones (Figura 5.3). La aplicación como agentes de transfección efectivos se debe a la pluralidad de grupos amino terminales disponibles en estos compuestos para complejarse con el DNA a través del esqueleto fosfatado cargado negativamente. En disolución acuosa, la protonación de los grupos amino produce una carga positiva que

300. Dufès, C.; Uchegbu, I. F.; Schätzlein, A. G., Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (15), 2177-2202.

301. Rolland, O.; Turrin, C.-O.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P., Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New J. Chem.* **2009**, *33* (9), 1809-1824.

302. Eichman, J. D.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker, J. R., The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharmaceut. Sci. Tech. Today* **2000**, *3* (7), 232-245.

303. Dennig, J.; Duncan, E., Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90* (3-4), 339-347.

304. Esfand, R.; Tomalia, D. A., Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* **2001**, *6* (8), 427-436.

305. Ranucci, E.; Spagnoli, G.; Ferruti, P.; Sgouras, D.; Duncan, R. Poly(amidoamine)s with potential as drug carriers: degradation and cellular toxicity. *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* **1991**, *2*, 303-315.

Capítulo 5

favorece la complejación con el DNA formando sistemas supramoleculares denominados dendriplejos, que deben tener una carga neta positiva para poder atravesar la membrana celular a través de un sistema endosomal. Una vez internalizados, la capacidad tampón de los grupos amino no protonados permite que actúen como una esponja de protones³⁰⁶ en el entorno ácido de los endosomas facilitando de esta manera la liberación al citoplasma celular gracias a la inhibición de las nucleasas endosomales dependientes de pH. Además estos dendrímeros han mostrado baja inmunogenicidad y toxicidad,³⁰⁷⁻³⁰⁹ una de las principales ventajas frente a los vectores víricos en términos de bioseguridad.

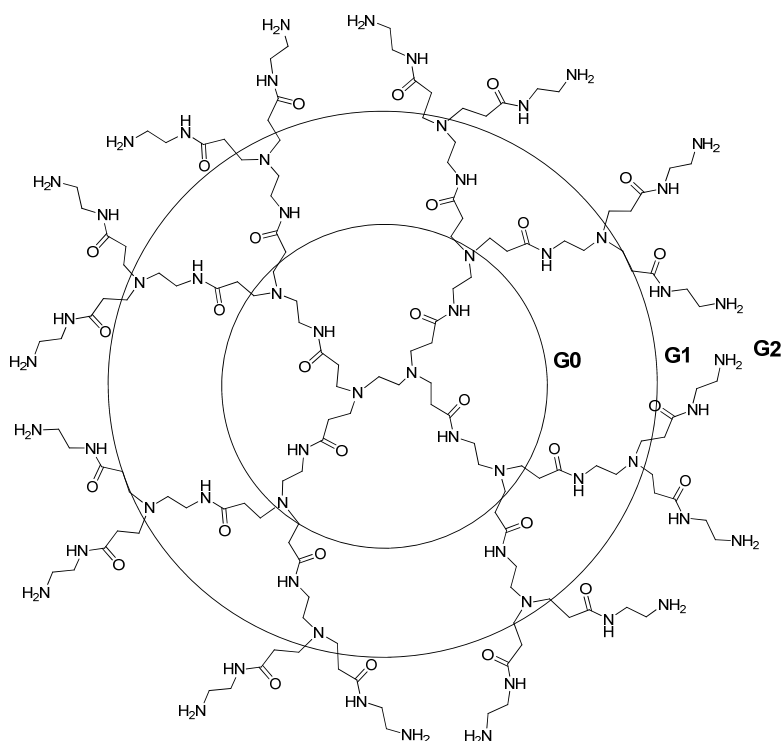


Figura 5.3. Estructura del PAMAM G0-G1-G2

-
- 306.** Sonawane, N. D.; Szoka, F. C.; Verkman, A. S., Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (45), 44826-44831.
- 307.** Hill, I. R. C.; Garnett, M. C.; Bignotti, F.; Davis, S. S., In vitro cytotoxicity of poly(amidoamine)s: relevance to DNA delivery. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* **1999**, 1427 (2), 161-174.
- 308.** Duncan, R.; Izzo, L., Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57 (15), 2215-2237.
- 309.** Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K., Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* **2010**, 394 (1-2), 122-142.

Los primeros estudios de transfección usando PAMAM³¹⁰ datan de 1993 y desde entonces se han desarrollado numerosos derivados buscando una mayor eficiencia en la transfección.

La influencia de la generación del dendrímero (efecto dendrítico) se ha evaluado y los dendrímeros de generaciones superiores (G5-G10) son considerados como los más eficientes,³¹¹⁻³¹² hipotéticamente por producir un mayor recubrimiento del DNA ya que poseen tamaños más próximos al octámero de histonas, aunque a su vez la citotoxicidad también aumenta a la vez que lo hace la generación³¹³⁻³¹⁴ debido al aumento del número de cargas positivas.

La mayoría de estrategias desarrolladas para mejorar la actuación de los vectores de transfección basados en PAMAM centran su atención en la flexibilidad, balance hidrofílico-hidrofóbico, la toxicidad o la incorporación de moléculas que los doten de cierta especificidad.

El calentamiento de estos dendrímeros en disolución acuosa produce una degradación parcial probablemente a través de procesos retro-Michael y de solvólisis, con transfección mejorada gracias a la mayor flexibilidad de la estructura.³¹⁵⁻³¹⁶ De hecho, un agente de transfección comercial (Superfect), está basado en dendrímeros de PAMAM parcialmente fragmentados.

Numerosos estudios ponen de manifiesto los beneficios de la incorporación a vectores catiónicos de restos hidrofóbicos para dotarlos de cierta amfifilia, con lo

310. Haensler, J.; Szoka, F. C., Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4* (5), 372-379.

311. Kukowska-Latallo, J. F.; Bielinska, A. U.; Johnson, J.; Spindler, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R., Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93* (10), 4897-4902.

312. Braun, C. S.; Vetro, J. A.; Tomalia, D. A.; Koe, G. S.; Koe, J. G.; Russell Middaugh, C., Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles. *J. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *94* (2), 423-436.

313. Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A., The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252* (1-2), 263-266.

314. Parimi, S.; Barnes, T. J.; Callen, D. F.; Prestidge, C. A., Mechanistic Insight into Cell Growth, Internalization, and Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (2), 382-389.

315. Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C., In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7* (6), 703-714.

316. Navarro, G.; Tros de Ilarduya, C., Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine: NBM* **2009**, *5* (3), 287-297.

Capítulo 5

que se consigue una mejora de la transfección³¹⁷⁻³¹⁹ al aumentar las interacciones hidrofóbicas con la bicapa lipídica que forma la membrana plasmática. En el caso del PAMAM el grupo de Takahashi y col.³²⁰⁻³²⁴ han estudiado en profundidad esta aproximación, partiendo de di-N-dodecilamina (**123**) o di-N-octadecilamina como núcleo central o *core*, mejorando de esta manera la eficacia con dendrímeros de bajas generaciones (G1-G4). Adicionalmente la PEGilación (**126**) de estos dendrímeros lipídicos provoca mayor estabilización de los lipoplejos y buena transfección en presencia de suero. Por otro lado, la funcionalización completa de la periferia con fenilalanina (**124**) también mejora la eficacia de PAMAM-G4, mientras que cuando se trata de leucina no se observa mejoría presumiblemente por la menor hidrofobicidad de ésta.

Otros estudios han empleado el colesterol cloroformiato³²⁵ para obtener derivados de PAMAM-G5 (**125**) con aumentos moderados de la eficacia de transfección para una relación molar colesterol-PAMAM 5:1. A su vez, el PAMAM-G5 también se ha hecho reaccionar con NHS-ésteres de ácidos grasos como el laúrico **127** (C-12), mirístico (C-14) y palmítico **128** (C-16),³²⁶ mejorando la

317. Clements, B. A.; Incani, V.; Kucharski, C.; Lavasanifar, A.; Ritchie, B.; Uludag, H., A comparative evaluation of poly-L-lysine-palmitic acid and Lipofectamine 2000 for plasmid delivery to bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **2007**, *28* (31), 4693-4704.

318. Liu, Z.; Zhang, Z.; Zhou, C.; Jiao, Y., Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progr. Polymer Sci.* **2010**, *35* (9), 1144-1162.

319. Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T., Transfection efficiency increases by incorporating hydrophobic monomer units into polymeric gene carriers. *J. Contr. Release* **2000**, *68* (1), 1-8.

320. Takahashi, T.; Kono, K.; Itoh, T.; Emi, N.; Takagishi, T., Synthesis of Novel Cationic Lipids Having Polyamidoamine Dendrons and Their Transfection Activity. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (4), 764-773.

321. Kono, K.; Akiyama, H.; Takahashi, T.; Takagishi, T.; Harada, A., Transfection Activity of Polyamidoamine Dendrimers Having Hydrophobic Amino Acid Residues in the Periphery. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (1), 208-214.

322. Takahashi, T.; Harada, A.; Emi, N.; Kono, K., Preparation of Efficient Gene Carriers Using a Polyamidoamine Dendron-Bearing Lipid: Improvement of Serum Resistance. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (5), 1160-1165.

323. Takahashi, T.; Kojima, C.; Harada, A.; Kono, K., Alkyl Chain Moieties of Polyamidoamine Dendron-Bearing Lipids Influence Their Function as a Nonviral Gene Vector. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (4), 1349-1354.

324. Takahashi, T.; Hirose, J.; Kojima, C.; Harada, A.; Kono, K., Synthesis of Poly(amidoamine) Dendron-Bearing Lipids with Poly(ethylene glycol) Grafts and Their Use for Stabilization of Nonviral Gene Vectors. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (4), 1163-1169.

325. Dung, T. H.; Kim, J. S.; Juliano, R. L.; Yoo, H., Preparation and evaluation of cholesteryl PAMAM dendrimers as nano delivery agents for antisense oligonucleotides. *Colloid Surface Physicochem. Eng. Aspect* **2008**, *313-314*, 273-277.

326. Santos, J. L.; Oliveira, H.; Pandita, D.; Rodrigues, J.; Pêgo, A. P.; Granja, P. L.; Tomás, H., Functionalization of poly(amidoamine) dendrimers with hydrophobic chains for improved gene delivery in mesenchymal stem cells. *J. Contr. Release* **2010**, *144* (1), 55-64.

internalización del dendriplejo. También se ha observado una reducción en la citotoxicidad con derivados acetilados de PAMAM.³²⁷

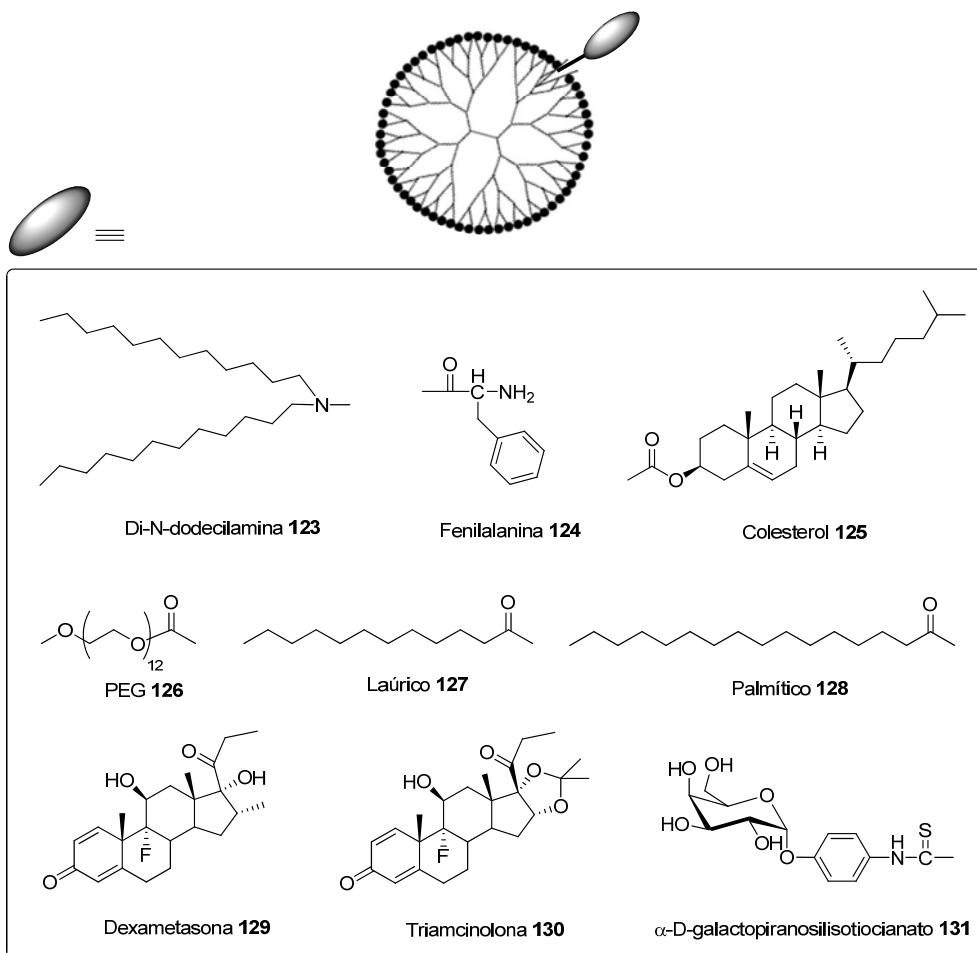


Figura 5.4. Algunos de los motivos empleados en la funcionalización de PAMAM

Las modificaciones anteriores tienen como finalidad principal mejorar la internalización y disminuir la toxicidad del dendriplejo, pero también hay otras estrategias que pretenden conferir al dendrímero nuevas características específicas por incorporación de determinadas moléculas:

327. Kolhatkar, R. B.; Kitchens, K. M.; Swaan, P. W.; Ghandehari, H., Surface Acetylation of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Decreases Cytotoxicity while Maintaining Membrane Permeability. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (6), 2054-2060.

Capítulo 5

(i) Los glucocorticoides dexametasona³²⁸ (**129**) y triamcinolona³²⁹ (**130**) se han empleado para derivatizar PAMAM-G4 por medio de la reacción con el mesilato derivado con participación del reactivo de Traut (2-iminotiolano). Estos compuestos pueden dilatar los poros de la membrana nuclear facilitando el transporte del DNA al núcleo.

(ii) El acoplamiento con monotosil-ciclodextrinas³³⁰⁻³³¹ mejora la actuación del PAMAM en términos de su tráfico intracelular facilitando la liberación desde el endosoma al citoplasma, con prometedores resultados *in vitro* e *in vivo*.³³²

(iii) La combinación de la funcionalización anterior con ciclodextrinas, con la incorporación de otros carbohidratos más sencillo como son la manosa,³³³ galactosa³³⁴ (**131**) o lactosa³³⁵ se ha llevado a cabo pretendido obtener vectores específicos dirigidos a determinadas líneas celulares, y aunque se han observado mejores eficacias de transfección no han mostrado dicha selectividad.

(iv) Más recientemente, se han desarrollado híbridos de PAMAM con un PEG-péptido reconocido por un antígeno tumoral (GRP-78) transfectando células que expresan dicho antígeno de forma selectiva.³³⁶

328. Choi, J. S.; Ko, K. S.; Park, J. S.; Kim, Y.-H.; Kim, S. W.; Lee, M., Dexamethasone conjugated poly(amidoamine) dendrimer as a gene carrier for efficient nuclear translocation. *Int. J. Pharm.* **2006**, *320* (1-2), 171-178.

329. Ma, K.; Hu, M.-X.; Qi, Y.; Zou, J.-H.; Qiu, L.-Y.; Jin, Y.; Ying, X.-Y.; Sun, H.-Y., PAMAM-Triamcinolone acetone conjugate as a nucleus-targeting gene carrier for enhanced transfer activity. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6109-6118.

330. Arima, H.; Kihara, F.; Hirayama, F.; Uekama, K., Enhancement of Gene Expression by Polyamidoamine Dendrimer Conjugates with α -, β -, and γ -Cyclodextrins. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12* (4), 476-484.

331. Arima, H.; Motoyama, K., Recent Findings Concerning PAMAM Dendrimer Conjugates with Cyclodextrins as Carriers of DNA and RNA. *Sensors* **2009**, *9* (8), 6346-6361.

332. Kihara, F.; Arima, H.; Tsutsumi, T.; Hirayama, F.; Uekama, K., In Vitro and In Vivo Gene Transfer by an Optimized α -Cyclodextrin Conjugate with Polyamidoamine Dendrimer. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (2), 342-350.

333. Wada, K.; Arima, H.; Tsutsumi, T.; Chihara, Y.; Hattori, K.; Hirayama, F.; Uekama, K., Improvement of gene delivery mediated by mannosylated dendrimer/ α -cyclodextrin conjugates. *J. Contr. Release* **2005**, *104* (2), 397-413.

334. Wada, K.; Arima, H.; Tsutsumi, T.; Hirayama, F.; Uekama, K., Enhancing Effects of Galactosylated Dendrimer/ α -Cyclodextrin Conjugates on Gene Transfer Efficiency. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28* (3), 500-505.

335. Motoyama, K.; Mori, Y.; Yamashita, S.; Hayashi, Y.; Jono, H.; Ando, Y.; Hirayama, F.; Uekama, K.; Arima, H., In vitro gene delivery mediated by lactosylated dendrimer (generation 3, G3)/ α -cyclodextrin conjugates into hepatocytes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, 1-6.

336. Wood, K. C.; Azarin, S. M.; Arap, W.; Pasqualini, R.; Langer, R.; Hammond, P. T., Tumor-Targeted Gene Delivery Using Molecularly Engineered Hybrid Polymers Functionalized with a Tumor-Homing Peptide. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (2), 403-405.

5.3. Discusión y resultados

Dada la importancia de la lipidación decidimos aplicar una metodología que aproveche la excelente reactividad de las vinilsulfonas para incorporar derivados hidrofóbicos en proteínas u otras macromoléculas. Nuestro grupo cuenta con una experiencia previa en este tema ya que ha descrito la preparación de diferentes lípidos conteniendo un grupo vinilsulfona terminal³³⁷⁻³³⁸ (Figura 5.5). Los compuestos **132a-d** se obtuvieron por reacción de los correspondientes cloruros de ácidos grasos con 2-aminoetanol. La amida resultante conteniendo un hidroxilo terminal se hizo reaccionar con DVS en medio básico, obteniendo los derivados vinilsulfona **132a-d**. Alternativamente, el análogo azufrado del ácido oleico **133** se obtuvo por reacción del cloruro de ácido con cistamina, posterior reducción del disulfuro y reacción con DVS, mientras que la vinilsulfona del colesterol **134** se preparó por tratamiento directo de este compuesto con DVS en medio básico.

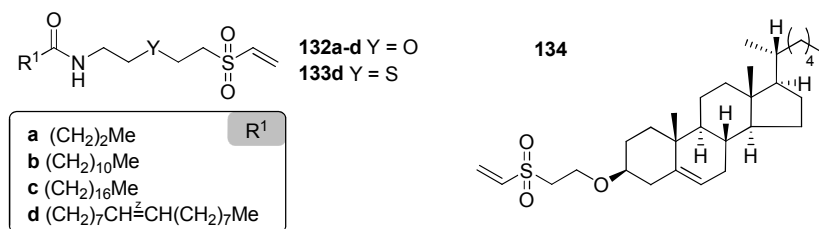


Figura 5.5

La estrategia que se plantea en esta Tesis pretende incorporar el grupo vinilsulfona terminal a restos alquílicos saturados e insaturados de diferente longitud de cadena, de forma directa sin la presencia de heteroátomos ni enlaces amida en el espaciador. La reactividad del grupo funcional vinilsulfona se pretende aprovechar para la lipidación de proteínas de forma que las proteínas modificadas permitan la funcionalización de ISCOM dotándolos de ciertas características específicas. Asimismo, los lípidos conteniendo vinilsulfona preparados junto con los previamente obtenidos por la Dra. Julia Morales Sanfrutos (Fig.5.5), se utilizarán para la obtención de derivados anfifílicos de PAMAM evaluando su capacidad como agentes de transfección.

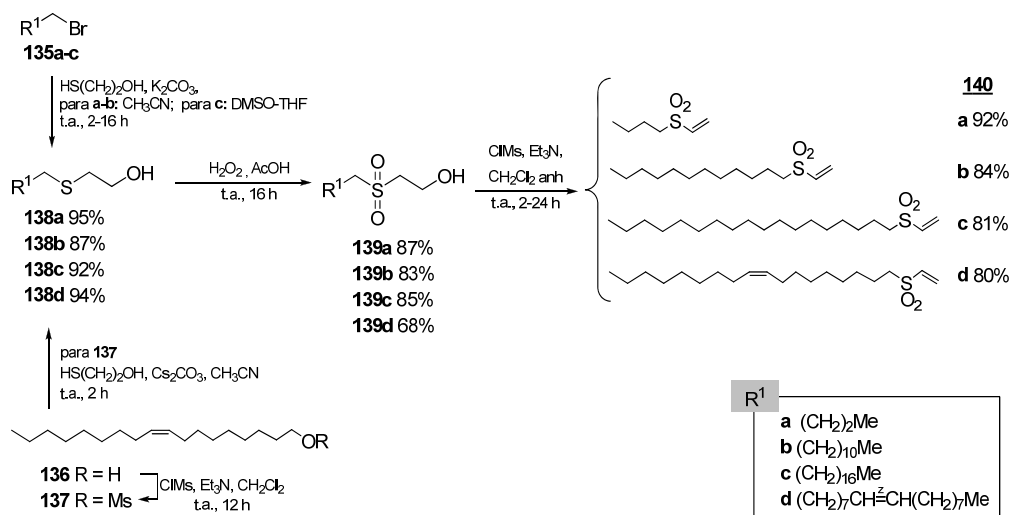
337. Morales Sanfrutos, J. Vinilsulfonas, azidas y alquinos. Aplicaciones tecnológicas y biotecnológicas. Universidad de Granada. 2008.

338. Santoyo Gonzalez, F.; Osuna Carrillo de Albornoz, A.; Morales Sanfrutos, J.; Megia Fernandez, A.; Cruz Bustos, T.; Gonzalez Gonzalez, G. M. Preparation of lipids with vinylsulfonyl functionality for therapeutic use in the transport of pharmaceuticals. ES-2337226 A1, **2010**.

5.3.1. Síntesis de lípidos conteniendo vinilsulfonas

Para la obtención de los nuevos agentes de lipidación basados en vinilsulfona (Esquema 5.3) partimos de hidrocarburos lineales saturados comerciales, como son los bromo derivados **135a-c**, con diferente longitud en la cadena alquílica (C-4, C-12 y C-18), y del alcohol oleico **136** para la obtención de compuestos insaturados. El grupo hidroxilo del alcohol oleico se transforma en una primera etapa en el derivado mesilado **137**. La reacción con mercaptoetanol provoca la sustitución nucleofílica en los compuestos **135a-c** y **137** obteniendo los hidroxietiltioéteres **138a-d**. Estas reacciones se llevan a cabo en acetonitrilo a excepción del compuesto **138c** donde se emplea DMSO-THF para conseguir su solubilización.

La oxidación del grupo tioéter a grupo sulfona con H₂O₂ y ácido acético da acceso a los compuestos **139a-d**. Este proceso es quimioselectivo para el derivado insaturado **138d** ya que el doble enlace permanece inalterado. Finalmente, la deshidratación de las hidroxietilsulfonas **139a-d** via mesil-derivados conduce a los derivados lipídicos **140a-d** en los que la función original se ha sustituido por el grupo vinilsulfona.



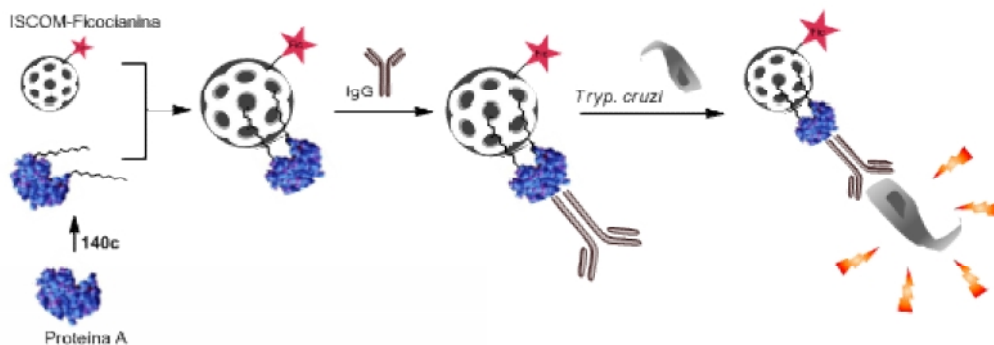
Esquema 5.3.

5.3.2. Aplicación en ISCOM

La capacidad del derivado 1-(vinilsulfonil)octadecano (**140c**) para la lipidación e incorporación de proteínas a ISCOM ha sido ensayada por Teresa Cruz Bustos, doctoranda del grupo de investigación Bioquímica y Parasitología Molecular de la Universidad de Granada dirigido por el Prof. Antonio Osuna. Para llevar a cabo estos estudios se han empleado ISCOM preparados siguiendo el método de diálisis. Tras ser obtenidos se incuban con ficocianina, proteína que contiene varios grupos cromogénicos (tetrapirroles lineales) y permite la visualización de los ISCOM mediante Microscopía Láser Confocal.

De forma independiente se lleva a cabo la modificación de proteína A (polipéptido de 42 KDa, constituyente habitual de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que tiene afinidad por anticuerpos) con el compuesto **140c** utilizando como medio de reacción tampón carbonato pH 8. La mezcla de reacción se incuba a t.a. durante 12 h. tras las cuales se adiciona una disolución de glicina 1M y se vuelve a incubar durante 2-3 h. adicionales.

Para incorporar la proteína A modificada a la estructura del ISCOM se incuba una solución de ISCOM-ficocianina con proteína A-compuesto **140c**. De esta manera la proteína A se asocia a los ISCOM a través del resto hidrofóbico que se ha incorporado mediante la reacción con el derivado de vinilsulfona. La capacidad de la proteína A para unirse a anticuerpos se aprovecha para la unión de IgG frente a *Trypanosoma cruzi*, parásito responsable de la enfermedad de Chagas.



Esquema 5.4. Inmunomarcado de *Trypanosoma cruzi*

Tras obtener el sistema ISCOM-IgG frente a *Trypanosoma cruzi* y para comprobar que esta metodología hace posible dirigir los ISCOM hasta el parásito se lleva a cabo un ensayo de inmunomarcado (Esquema 5.4). Los epimastigotes (forma alargada del parásito) de *Trypanosoma cruzi* se fijan a un portaobjetos con

Capítulo 5

formaldehído y se incuban con: (i) ficocianina, (ii) ISCOM-ficocianina, (iii) ISCOM-ficocianina-proteína A, (iv) ISCOM-ficocianina-proteína A-IgG.

Los tres primeros ensayos son controles negativos para descartar la presencia de interacciones inespecíficas, observándose según lo previsto ausencia de marcaje en todos ellos (Figura 5.6A). El único caso en el que los epimastigotes son marcados es con el sistema ISCOM-ficocianina-proteína A-IgG (Figura 5.6B). Estos resultados ponen de manifiesto que la modificación de la proteína A con el compuesto **140c** permite su incorporación a los ISCOM y que la posterior unión de IgG a la proteína A permite dirigir los ISCOM.

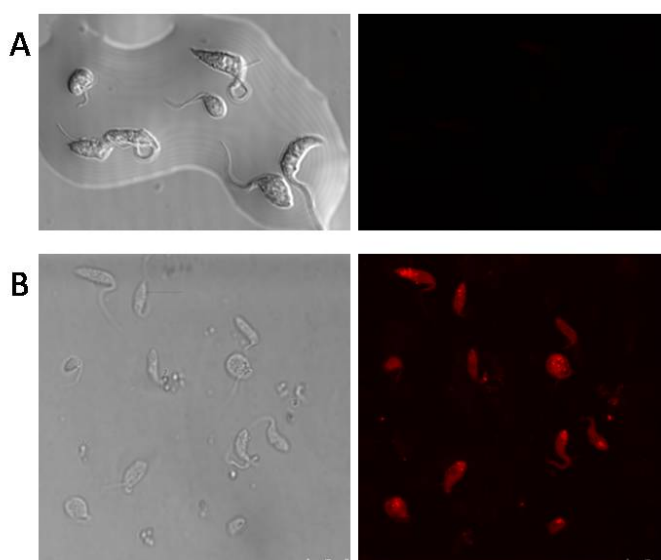


Figura 5.6. Micrografía tomada con microscopía láser confocal del inmunofluoroensayo. **A:** Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con **140c** (control negativo). **B:** Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con **140c**-IgG.

Estos ISCOM funcionalizados con IgG frente a *Trypanosoma cruzi* constituyen una alternativa eficaz para el transporte dirigido de fármacos, ya que se ha demostrado que son capaces de encapsular actinomicina D. Los ensayos de citotoxicidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados con actinomicina D libre y encapsulada en estos ISCOM modificados revelan que con dosis mucho menores del fármaco encapsulado ($2.9 \cdot 10^{-5}$ μg de actinomicina D encapsulada frente a 0.05 μg libre) se alcanza un tasa de mortalidad que prácticamente duplica a la del antibiótico libre.

5.3.3. Preparación de derivados amfifílicos de PAMAM

Un vector ideal para transfección es aquel que satisface las siguientes características:

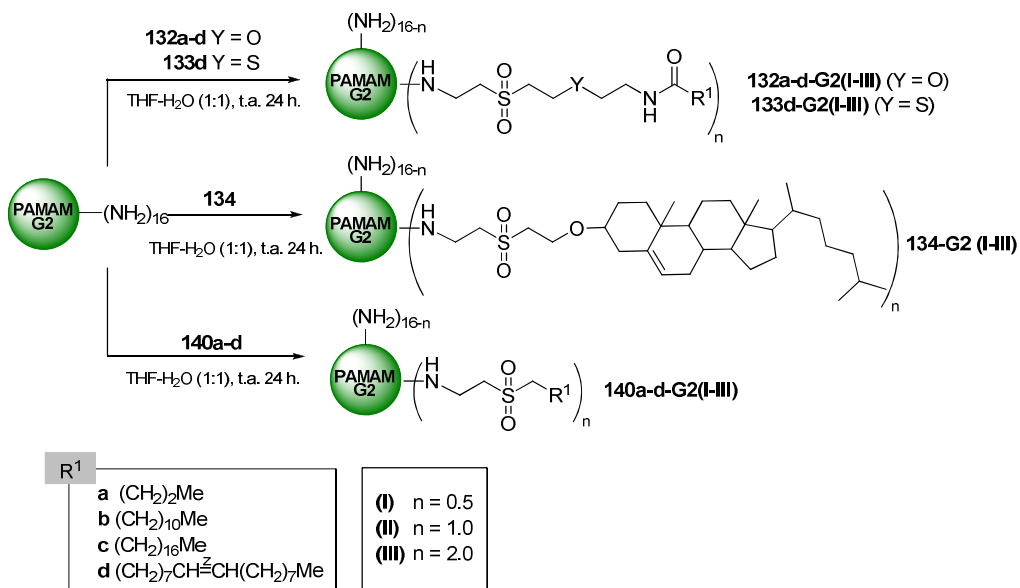
- Compacta el DNA en partículas que puedan migrar a través de la circulación sanguínea
- Protege al DNA de la degradación y las interacciones con el medio biológico
- Actúa de forma específica y dirigida
- Facilita la internalización celular
- Permite el tráfico en el medio citoplasmático
- Lleva el DNA hasta el núcleo permitiendo finalmente su liberación
- No presenta toxicidad
- No origina respuesta inmune
- Es biodegradable

Ningún vector satisface de forma natural la totalidad de dichos requisitos, razón por la cual se trabaja en la incorporación de elementos funcionales que mejoren su eficacia. En este sentido, los derivados lipídicos conteniendo una vinilsulfona pueden ser agentes de derivatización adecuados para dotar de hidrofobicidad a vectores no-virales como el PAMAM, que ha demostrado ciertas cualidades como agente de transfección, al presentar este dendrímero grupos amino en la periferia que deben permitir la unión covalente de dichos reactivos de forma sencilla mediante la reacción aza-Michael. Seleccionamos como producto de partida PAMAM de generación 2 ya que a pesar de que su capacidad de transfección es muy baja con respecto a generaciones superiores presenta la ventaja de una menor citotoxicidad. La incorporación de restos hidrofóbicos pretende obtener nuevos vectores con una eficacia de transfección aumentada.

La síntesis de los nuevos vectores (Esquema 5.5) se lleva a cabo por adición de una disolución en THF de los derivados vinilsulfona **132a-d**, **133d**, **134** y **140a-d** a una disolución acuosa de PAMAM-G2, de tal forma que ambos reactivos se solubilizan en la mezcla final THF-agua (1:1). Se emplean tres estequiometrías diferentes para poder evaluar el efecto que provoca la extensión de la funcionalización en la eficacia de transfección. El PAMAM-G2 contiene 16 grupos amino periféricos, de los cuales se modifican 0.5, 1 ó 2 trabajando con relaciones molares *vinilsulfona:PAMAM* de 0.5 (I), 1 (II) ó 2 (III) respectivamente.

Capítulo 5

La reacción se mantiene a t. a. durante 24 h. periodo tras el cual se observa por c.c.f. la desaparición de los correspondientes derivados vinilsulfona. La evaporación del THF a vacío y posterior liofilización de la disolución acuosa resultante permite obtener los correspondientes conjugados de PAMAM [132a-d-G2(I-III), 133d-G2(I-III), 134-G2(I-III) y 140a-d-G2(I-III)] de forma muy sencilla ya que no se necesitan etapas posteriores de purificación al ser la reacción completa y carente de subproductos.



Esquema 5.5. Preparación de los derivados anfifílicos de PAMAM

Los espectros de RMN de los nuevos derivados confirman el éxito de la funcionalización del PAMAM-G2 debido a la ausencia de los picos característicos de los protones de la agrupación vinilsulfona en el espectro ¹H-RMN, como se muestra en la Figura 5.7 para el caso del compuesto **132d** y el correspondiente derivado **132d-G2(III)**. Además la comparación de los espectros para el PAMAM y los nuevos derivados obtenidos ponen de manifiesto la incorporación de las cadenas alquílicas como indican las nuevas señales correspondientes a protones metileno (1.4-1.1 ppm), metilo terminal (0.9-0.8 ppm) así como protones olefínicos (5.5-5.0 ppm) en el caso de los derivados del oleico (Figura 5.8).

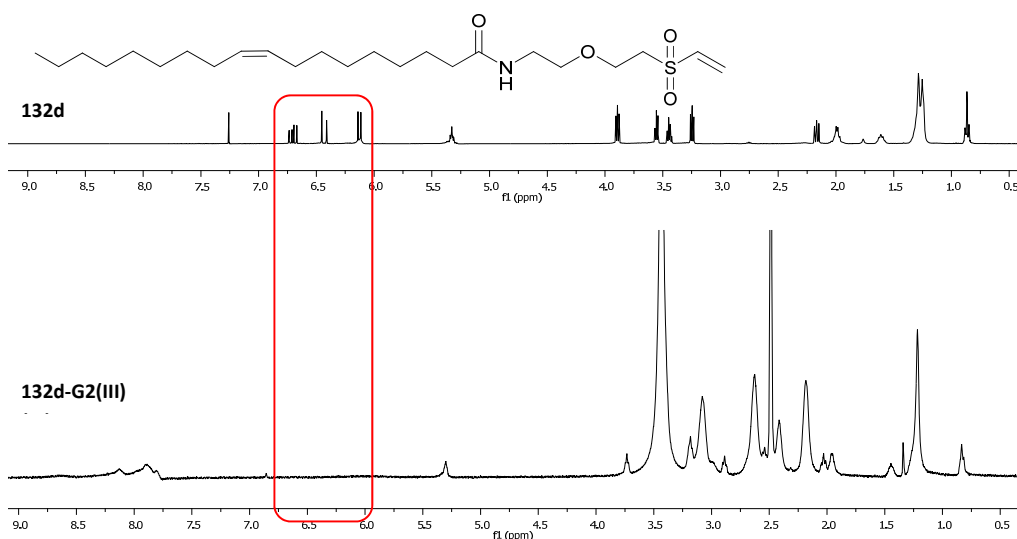


Figura 5.7. Espectros ^1H -RMN (400 MHz) de **132d** y **132d-G2(III)** mostrando la desaparición de las señales correspondientes a la vinilsulfona tras la reacción del compuesto **132d** con PAMAM-G2 para obtener el dendrímero **132d-G2(III)**.

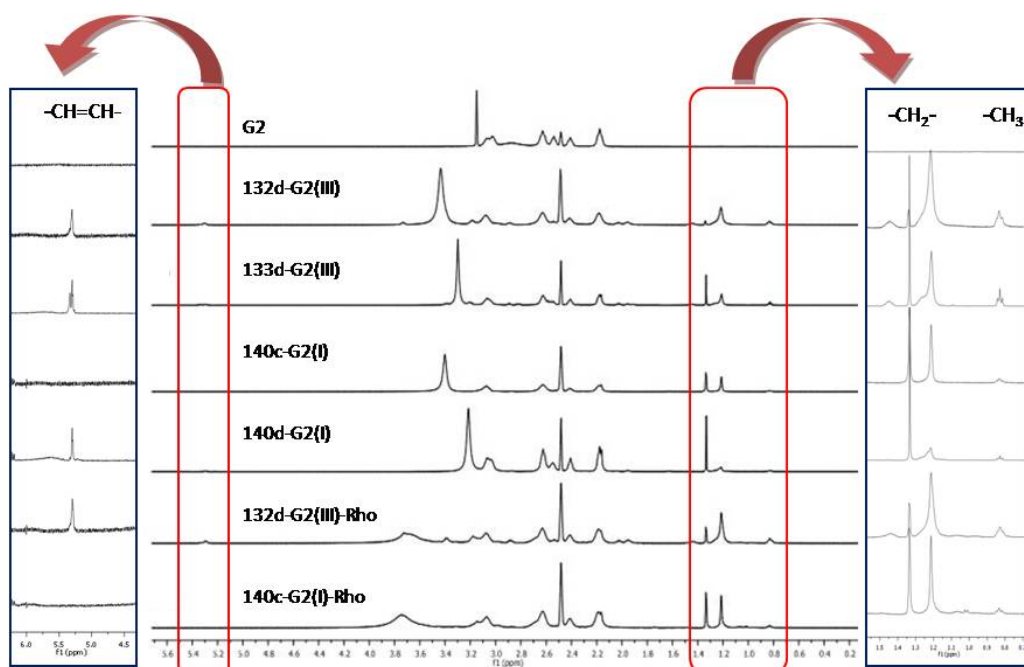


Figura 5.8. Espectros ^1H -RMN (400 MHz) de **G2**, **132d-G2(III)**, **133d-G2(III)**, **140c-G2(I)**, **140d-G2(I)**, **132d-G2(III)-Rho** y **140c-G2(I)-Rho** destacando la aparición de señales correspondientes al resto alquílico y protones vinílicos incorporados a la estructura del PAMAM-G2.

5.3.4. Aplicación de dendrímeros de PAMAM como agentes de transfección

Los nuevos alquilsulfonil-PAMAM derivados se han aplicado como vectores no virales para la administración de material genético (Figura 5.9), llevando a cabo los ensayos de transfección los Prof. Rafael Salto y M^a Dolores Girón del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Se han evaluado diferentes aspectos como la citotoxicidad, la protección frente a nucleasas, el efecto del suero o la presencia de inhibidores que se explican a continuación con más detalle.

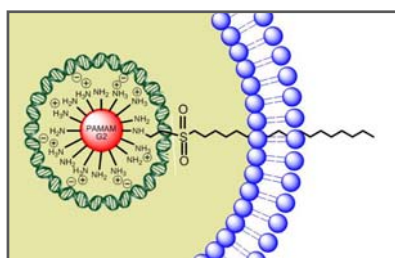


Figura 5.9

5.3.4.1. Formación de dendriplejos

Para la obtención de los dendriplejos se emplea el plásmido pEGFP-N3 que codifica para eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein), una proteína fluorescente que emite a 509 nm, en la zona verde del espectro. En primer lugar se evalúa la capacidad de los dendrímeros para interactuar con el DNA formando dendriplejos en función de la relación N/P (N = número de aminas primarias en el conjugado; P = número de grupos fosfato en el pDNA), desde 0.5 hasta 50, para lo cual se incuba una disolución acuosa del plásmido de 0.1 mg·mL⁻¹ con el mismo volumen de una disolución del dendrímero en DMSO-H₂O (1:2) con una concentración tal, dependiendo de su peso molecular y el número de grupos NH₂ libres, que permita alcanzar una relación N/P determinada, siendo constante en todos los casos la proporción de DMSO en la disolución final (16.7% v/v). Tras incubar durante 20 min. la electroforesis en gel de agarosa determina la capacidad de los nuevos derivados de PAMAM para neutralizar, unir y compactar el plásmido, ya que la formación de los complejos origina una menor movilidad electroforética respecto al DNA desnudo (Figura 5.10). Además, la tinción con bromuro de etidio tras la electroforesis sirve para evaluar la eficacia de la protección ya que cuando

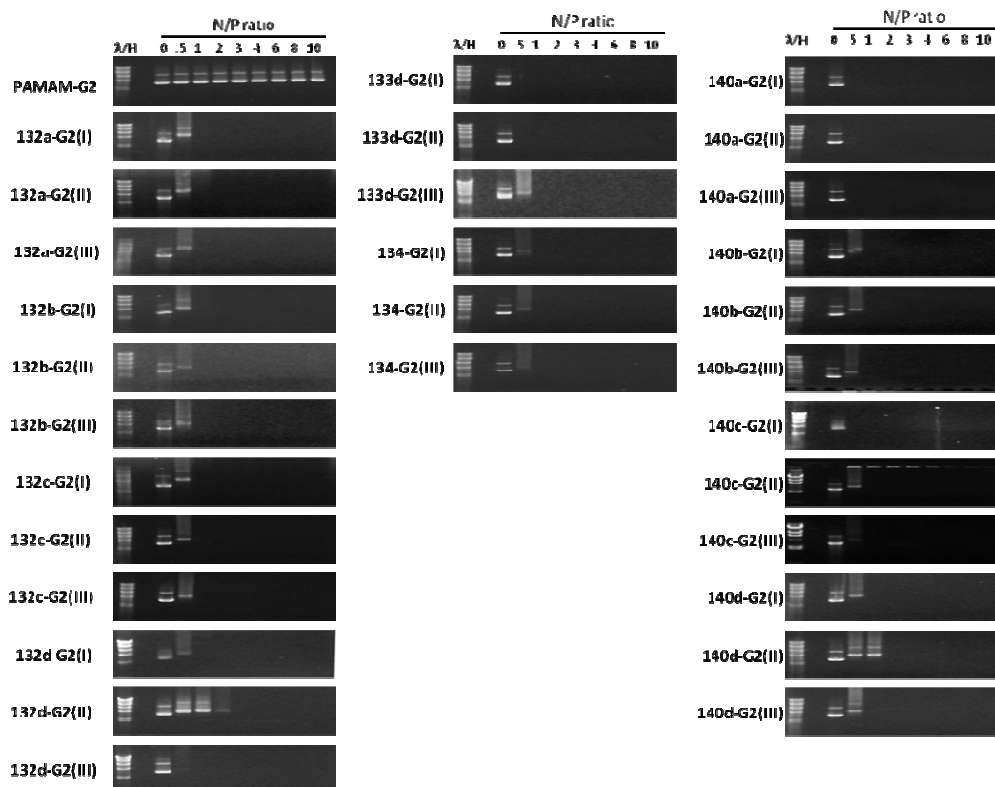


Figura 5.10. Ensayo de movilidad electroforética del PAMAM-G2 y derivados de PAMAM-G2 unidos a pDNA a relaciones *N/P* entre 0 (pEGFP-N3 solo) y 10. La ausencia de la banda del plásmido en los pocillos se relaciona con la inhibición de la movilidad electroforética del plásmido.

el DNA es protegido en los dendriplejos no queda accesible a la molécula de bromuro de etidio para intercalarse y no se observa banda. Los experimentos de movilidad electroforética en geles revelaron que la mayoría de los derivados de PAMAM-G2 se unen al pDNA a una relación *N/P* de 0.5-1 (Figura 5.11), a diferencia de lo que ocurre para el PAMAM-G2 sin funcionalizar, que es incapaz de unirse al plásmido.

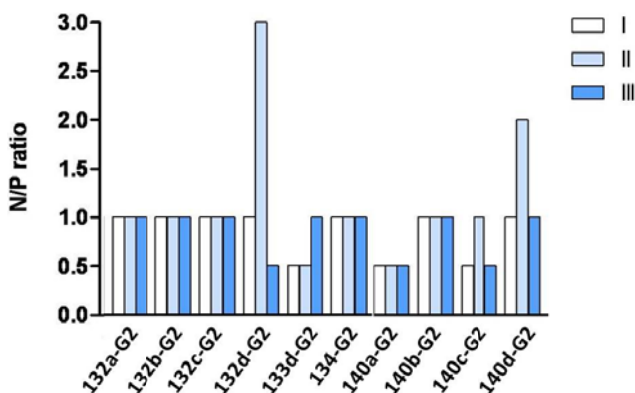


Figura 5.11. Relación *N/P* mínima necesaria para inhibir completamente la movilidad electroforética en el ensayo.

5.3.4.2. Protección frente a nucleasas

En un siguiente paso se evalúa la capacidad de los dendrímeros para proteger al DNA frente a la degradación de endonucleasas ya que éste es un proceso clave para conseguir una elevada transfección, puesto que el pDNA no protegido es rápidamente degradado por las nucleasas presentes en el medio de cultivo. Para ello tras formar los dendriplejos con pEGFP-N3 éstos se incuban con una disolución de DNasa I durante 1 h. a 37°C, para después analizar mediante electroforesis si se produce o no la digestión por parte de las nucleasas. La mayoría de derivados amfifílicos de PAMAM-G2 protegen bastante bien de la degradación con DNasa I, mientras que los de menor longitud de cadena (**132a-G2** y **140a-G2**), así como **132b** y **132c** protegen sólo parcialmente, en concreto permanece la banda del pDNA superenrollado (banda inferior) degradándose el pDNA relajado (banda superior). El PAMAM-G2 sin modificar falla completamente en proteger el pDNA de la digestión (Figuras 5.12-13).

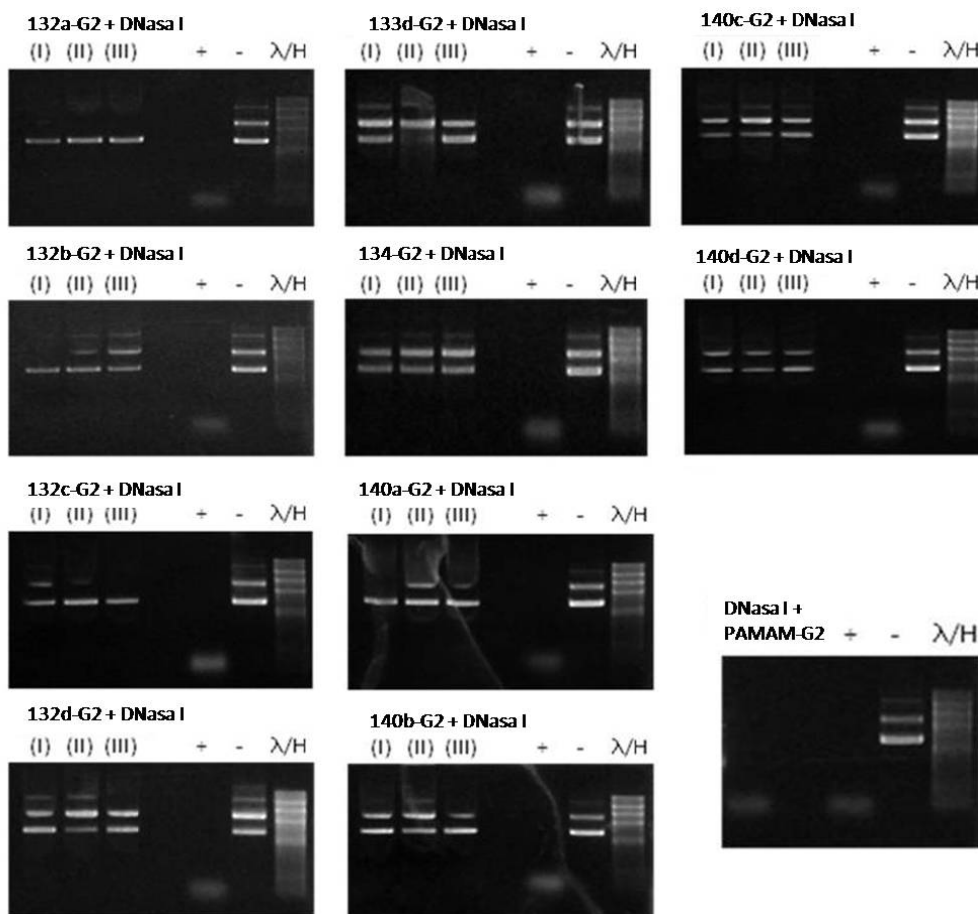


Figura 5.12. Experimentos de protección de la digestión con DNasa I. Geles de agarosa correspondientes al plásmido pEGFP-N3 complejado con los diferentes dendrímeros e incubado con DNasa I, empleando pEGFP-N3 como control en ausencia (-) o presencia (+) de DNasa I.

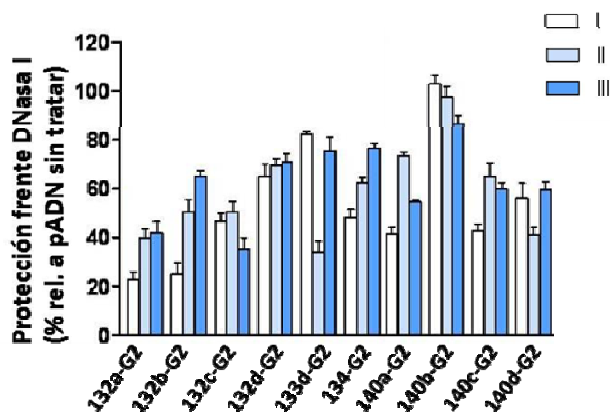


Figura 5.13. Cuantificación de la intensidad relativa (asignando un valor de 100 al pEGFP-N3 sin tratar) de la suma del plásmido relajado y superenrollado correspondiente a las muestras complejadas con los derivados de PAMAM-G2 y tratadas con DNasa I. Los resultados corresponden a la media \pm SEM (n=4).

5.3.4.3. Eficiencia de transfección *in vitro* de los derivados de PAMAM-G2

Para poner de manifiesto la captación celular de los nuevos dendriplejos se ensayan en la línea celular CHO-k1, una línea celular estándar utilizada normalmente con agentes de transfección de diferentes clases. El plásmido pEGFP-N3 permite evaluar la eficiencia de transfección midiendo fluorescencia en las células transfectadas, 48 h. después de la transfección para permitir la expresión de la proteína fluorescente verde, que será proporcional a la eficiencia de la misma.

Como control se emplea Lipofectamina 2000 (LP), un reactivo de transfección comercial que consiste en una mezcla de DOSPA **141** (2,3-dioleiloxi)-*N*-[2(espermincarboxamido)etil]-*N,N*-dimetil-1-propanamonio trifluoroacetato y DOPE **142** (dioleil fosfatidiletanolamina) en una relación 3:1 y que presenta una alta eficiencia de transfección en numerosos tipos celulares.

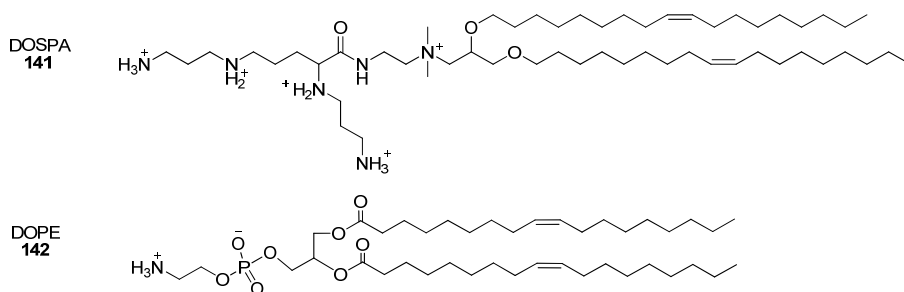


Figura 5.14. Componentes del agente de transfección comercial Lipofectamina 2000

Los ensayos se realizan en ausencia de suero a relaciones N/P de 2.5 a 50, asignándole un valor del 100% al obtenido con LP. Los resultados obtenidos indican claramente que el PAMAM-G2 sin modificar tiene una muy baja eficiencia de transfección (<5% del valor de LP), como era de esperar tras los resultados negativos obtenidos para los ensayos de retardo en geles y protección frente a DNasa I. La incorporación de ciertos restos hidrofóbicos conseguida con los derivados vinilsulfona favorece el proceso de transfección llegando a alcanzarse valores elevados y en ocasiones superiores a la Lipofectamina 2000. (Figura 5.15 y 5.16)

De los resultados de transfección obtenidos se pueden extraer ciertas conclusiones sobre la influencia de la estructura química en la eficiencia de transfección de los PAMAM-G2 modificados:

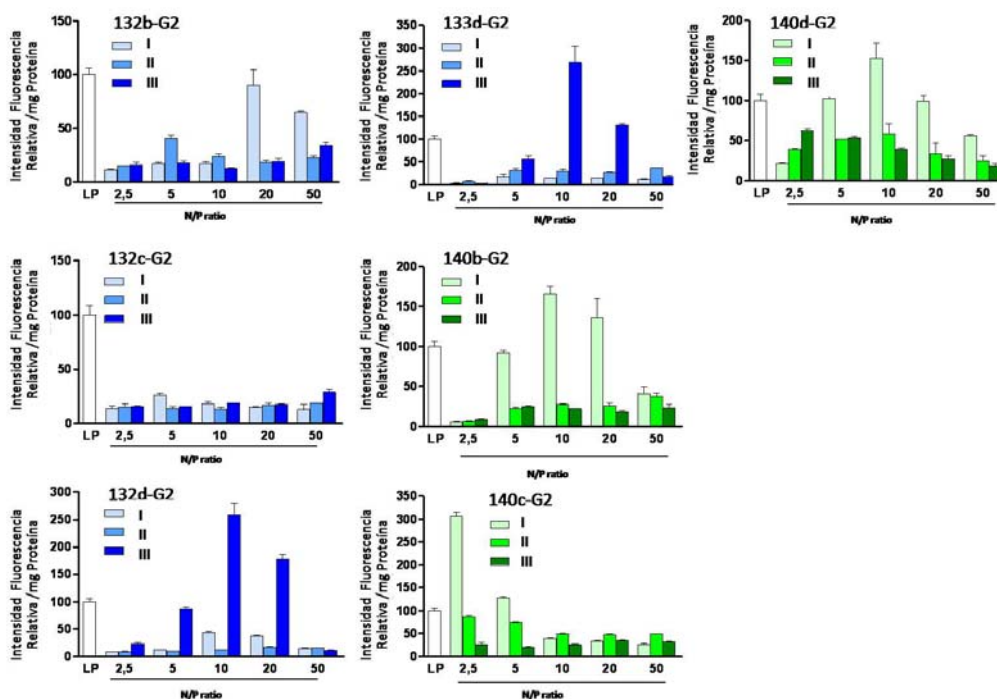


Figura 5.15. Eficiencia de transfección *in vitro* en CHO-k1 para algunos derivados de PAMAM-G2 a relación N/P de 2.5 a 50. El valor de fluorescencia de la eGFP en la transfección con LP, que se ha empleado como control positivo, se ha normalizado al 100% en cada experimento. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=8).

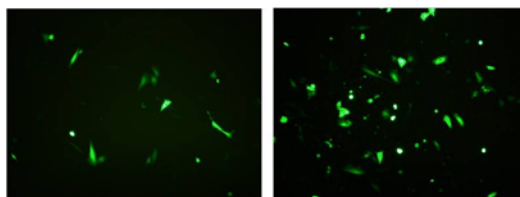


Figura 5.16. Imágenes de microscopía de fluorescencia para células CHO-k1 transfectadas con Lipofectamina 2000 (izq.) y **140c-G2(I)** a N/P 2.5 (dcha.)

a) De todos los derivados ensayados, aquellos que contienen una cadena butil (**132a-G2** y **140a-G2**) no son capaces de producir transfección a pesar de que complejan y protegen parcialmente el plásmido de la degradación con nucleasas. Es necesaria al menos una cadena de 12 carbonos (**132b-G2** y **140b-G2**) para alcanzar unos niveles de transfección similares a los obtenidos con LP.

b) El dendrímero funcionalizado **140c-G2(I)** que porta una cadena hidrofóbica C18 saturada tiene el mayor nivel de transfección en las células CHO-k1 (~3.1 veces más eficiente que LP) y muestra una alta capacidad de formar

Capítulo 5

complejos estables con el pDNA y una completa protección del mismo frente a la degradación. Los derivados de PAMAM-G2 conteniendo ácido oleico **132d-G2(III)**, **133d-G2(III)** y **140d-G2(I)**, que presentan una insaturación en la cadena alifática tienen también elevados niveles de transfección comparados con LP (1.6 a 2.7 veces mayores), lo que concuerda con la elevada capacidad de unión a pDNA y la adecuada protección frente a DNAsas.

c) La naturaleza del heteroátomo en el enlace éter, oxígeno para el compuesto **132d** y azufre para el compuesto **133d**, no parece tener influencia en la capacidad de transfección de estos compuestos ya que es similar en ambos.

En conjunto, se puede decir que aunque la inclusión de un dominio hidrofóbico es suficiente para obtener una unión fuerte al DNA, una cadena alifática de 18 carbonos es la óptima para una elevada eficiencia de transfección.

En lo relativo al grado de funcionalización de los dendrímeros, que se controla como se ha comentado empleando diferentes estequiometrías, se detecta también una variación en la eficacia de transfección que difiere para los dendrímeros de las series **132** y **140**. Los compuestos de la serie **140** son muy eficientes con sólo 0.5 cadenas hidrofóbicas por molécula de PAMAM ($I=0.5$) mientras que los dendrímeros funcionalizados de la serie **132** requieren dos cadenas alquílicas ($III=2$) para su óptima actividad, sin ser evidente la razón de este comportamiento dispar.

Por otro lado, la funcionalización del PAMAM con colesterol (**134-G2**) no conduce a buenos resultados de transfección a pesar de que la complejación con el DNA y la protección frente a nucleasas son buenas, lo que sugiere una unión demasiado fuerte que no permite la liberación final del plásmido al núcleo celular para producir la transfección.

Tomando en consideración todos los datos obtenidos se puede concluir que del conjunto de derivados preparados los mejores agentes de transfección son **132d-G2(III)** y **140c-G2(I)**.

La capacidad de transfección que presenta **140c-G2(I)** a bajos valores de relación N/P determina que se lleven a cabo con este derivado ensayos de transfección en presencia de suero (Figura 5.17A). Se observa que la eficacia de transfección de este derivado de PAMAM disminuye en presencia de suero siendo necesario aumentar la relación N/P para conseguir mantener valores muy próximos a los que se alcanzan con LP. Este efecto debe ser originado por las proteínas

cargadas negativamente que contiene el suero y que pueden interactuar con el dendrímero impidiendo la complejación del plásmido, en concordancia con lo descrito previamente para liposomas catiónicos.³³⁹

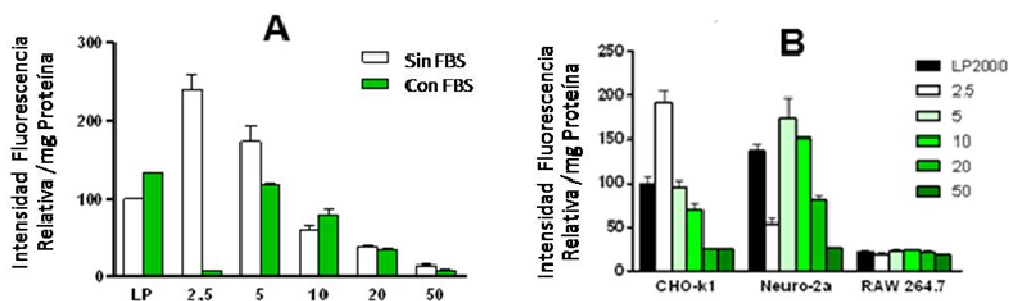


Figura 5.17. A. Efecto de la ausencia o presencia de FBS 10% (Suero Bovino Fetal) en el medio de transfección con LP y 140c-G2(I) (relación N/P 2.5-50). El valor de fluorescencia de la eGFP para la transfección con LP en ausencia de suero bovino fetal se ha normalizado al 100%. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=7). **B.** Transfección con LP y 140c-G2(I) (relación N/P 2.5-50) en diferentes líneas celulares. El valor de fluorescencia de la eGFP para la transfección con LP en CHO-k1 se ha normalizado al 100%. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=8).

Adicionalmente se ha evaluado también la capacidad de transfección del derivado 140c-G2(I) en otras líneas celulares (Figura 5.17B) entre las que se incluyen neuroblastomas (Neuro-2a) y una línea celular derivada de macrófagos (RAW 264.7) que usualmente presenta una baja eficiencia de transfección por agentes no-virales. Para cada una de ellas se ensaya la transfección con Lipofectamina 2000 como control positivo, normalizando los valores tras asignar el valor de 100% a los niveles de transfección producidos por LP en CHO-k1. Los resultados indican que el compuesto 140c-G2(I) presenta capacidad de transfectar dichas líneas celulares de manera similar al reactivo comercial LP.

5.3.4.4. Tamaño y potencial ζ en PAMAM derivados y sus complejos con DNA

Para caracterizar el tamaño y las propiedades electrocinéticas se determina el diámetro hidrodinámico mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y se mide el potencial ζ para los dendrímeros más eficientes, a la misma concentración y relación N/P empleadas para llevar a cabo la transfección, antes y después de formar el dendriplejo con el DNA. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 5.1. El potencial ζ es positivo para todos los dendrímeros funcionalizados como era

³³⁹. Yang, J. P.; Huang, L., Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 950-960.

Capítulo 5

de esperar por la carga positiva que adquieren los grupos amino, y disminuye cuando se encuentra complejoado con el DNA, debido a la carga negativa de éste último. Sin embargo, no existe relación clara ente el tamaño de partícula y la eficacia de transfección, aunque es evidente que la incorporación del resto hidrofóbico determina la estructura de los dendrímeros funcionalizados, ya que el PAMAM-G2 sin modificar tiene un tamaño de 2.9 nm,³³¹ muy inferior a cualquiera de los derivados, que podrían formar estructuras organizadas de tipo micelar orientando la parte hidrofóbica hacia el interior y exponiendo la parte hidrofílica hacia el medio acuoso.

Tabla 5.1. Diámetro hidrodinámico y potencial ζ en PAMAM-derivados y sus complejos con DNA

	Potencial ζ (mV)		Diámetro hidrodinámico (nm)		N/P
	DNA		DNA		
	--	+	--	+	
132b-G2-(I)	+ 29.5 ± 0.5	+ 21.8 ± 0.8	709 ± 95	515 ± 10	10
132c-G2(I)	+ 32.1 ± 0.6	+ 13.2 ± 1.6		627 ± 27	2.5
132d-G2-(III)	+ 38.1 ± 0.6	+ 28.2 ± 0.6	131 ± 26	226 ± 3	10
133d-G2-(III)	+ 27.3 ± 0.5	+ 17.8 ± 0.7	272 ± 24	288 ± 5	10
134-G2(III)	+ 23.5 ± 0.4	+ 21.3 ± 0.6	528 ± 92	329 ± 15	10
140b-G2(I)	+ 25.8 ± 0.9	+ 14.4 ± 0.3	367 ± 20	734 ± 33	2.5
140c-G2(I)	+ 29.6 ± 0.7	+ 14.8 ± 0.2	536 ± 84	524 ± 19	2.5
140d-G2-(I)	+ 29.9 ± 0.2	+ 12.2 ± 0.2	394 ± 41	736 ± 68	2.5

5.3.4.5. Ensayos de citotoxicidad de los dendriplejos

La citotoxicidad de los dendriplejos se evalúa determinando el porcentaje de células que sobreviven para aquellos dendrímeros con una mayor eficacia de transfección, utilizando la relación N/P óptima para la transfección en cada caso (Figura 5.18) mediante el método colorimétrico MTT³⁴⁰ que correlaciona la actividad metabólica celular con la cantidad de células vivas. El PAMAM-G2 sin modificar en presencia del plásmido, no muestra toxicidad como cabría esperar, mientras que los complejos con LP presentan una toxicidad elevada (~50%). Para

340. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **1983**, 65 (1-2), 55-63.

los derivados amfifílicos de PAMAM los compuestos más eficientes **132d-G2(III)** y **140c-G2(I)**, mantienen altos valores de viabilidad celular.

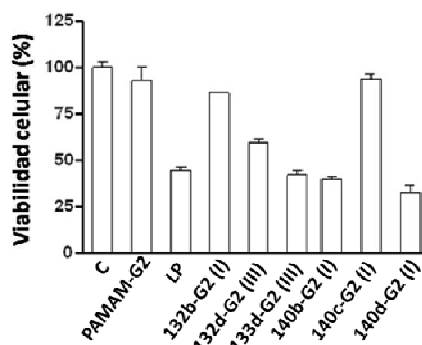


Figura 5.18. Citotoxicidad de los dendriplejos en células CHO-k1 24 h. después de la transfección para PAMAM-G2, Lipofectamina 2000 (LP) y diferentes derivados de PAMAM: **132b-G2(I)** (N/P= 20); **132d-G2(III)** (N/P= 10); **133d-G2(III)** (N/P= 10); **140b-G2(I)** (N/P=10); **140c-G2(I)** (N/P= 2.5); **140d-G2(I)** (N/P= 10). Control (C): células sin transfectar.

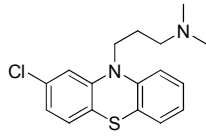
5.3.4.6. Estudio del mecanismo de internalización de los dendriplejos

Los complejos de DNA con agentes de transfección no virales pueden entrar en las células a través de diferentes rutas de endocitosis, por lo que es importante realizar ensayos que permitan determinar la vía de internalización en el caso de los nuevos agentes de transfección sintetizados, ya que ésta determinará el procesamiento intracelular y puede influir en la eficiencia de la transfección. Existen principalmente dos vías de endocitosis: dependiente e independiente de clatrina. En función del tipo celular, la naturaleza del transportador y el tamaño de la partícula actúa una u otra vía. La vía dependiente de clatrina es la preferida para partículas inferiores a 200 nm de tamaño y la vía independiente de clatrina para mayores tamaños.³⁴¹

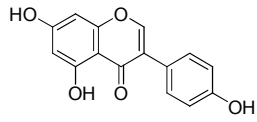
Para determinar la vía de endocitosis utilizada por los derivados de PAMAM-G2, se utilizan dos inhibidores documentados de dicho proceso³⁴²:

341. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377* (1), 159-169.

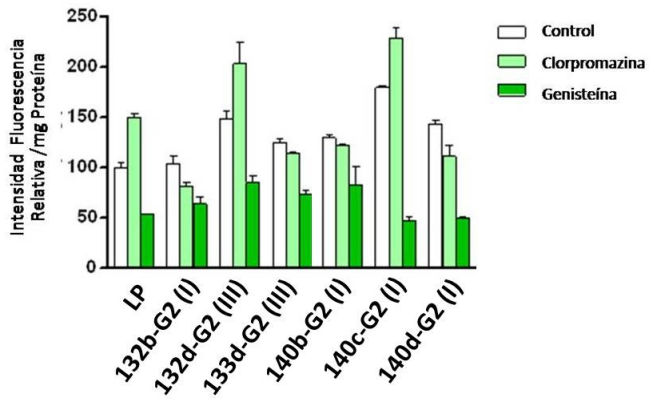
342. Vercauteren, D.; Vandenbroucke, R. E.; Jones, A. T.; Rejman, J.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N.; Braeckmans, K., The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol Ther* **2010**, *18* (3), 561-569.



143

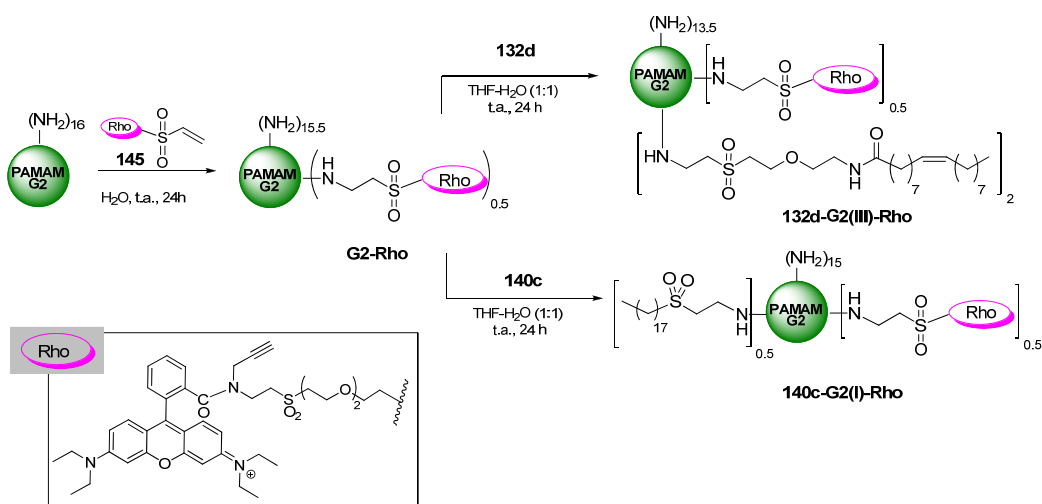


144



5.3.4.7. Obtención de dendriplejos fluorescentes y estudios de internalización

Para llevar a cabo un seguimiento del proceso de internalización y distribución intracelular durante la transfección con estos dendrímeros se preparan derivados fluorescentes de aquellos que han demostrado mejor eficacia de transfección para su estudio con Microscopía Láser Confocal, empleando como marcador fluorescente la Rodamina-vinilsulfona **145**.¹⁴⁸ Este fluoróforo permite la incorporación sencilla al PAMAM por reacción en disolución acuosa, y el derivado obtenido se funcionaliza seguidamente como en los casos anteriores con el compuesto **132d** ó **140c** obteniéndose los derivados fluorescentes **132d-G2(III)-Rho** y **140c-G2(I)-Rho**, respectivamente (Esquema 5.6).



Esquema 5.6. Preparación de derivados fluorescentes de PAMAM

Se observa que la incorporación al PAMAM del fluoróforo rodamina, de carácter moderadamente hidrofóbico, es suficiente para promover la formación del dendriplejo uniéndose al plásmido como indican los experimentos de movilidad electroforética en geles (figura 5.20A), aunque no produce una protección frente a DNasa I (figura 5.20B). Sin embargo, la incorporación a dicho conjugado de los restos insaturado y saturado de 18 átomos de carbono (**132d-G2(III)-Rho** y **140c-G2(I)-Rho**) sí que favorece la interacción con el DNA protegiéndolo de la misma manera que lo hacen los análogos no fluorescentes.

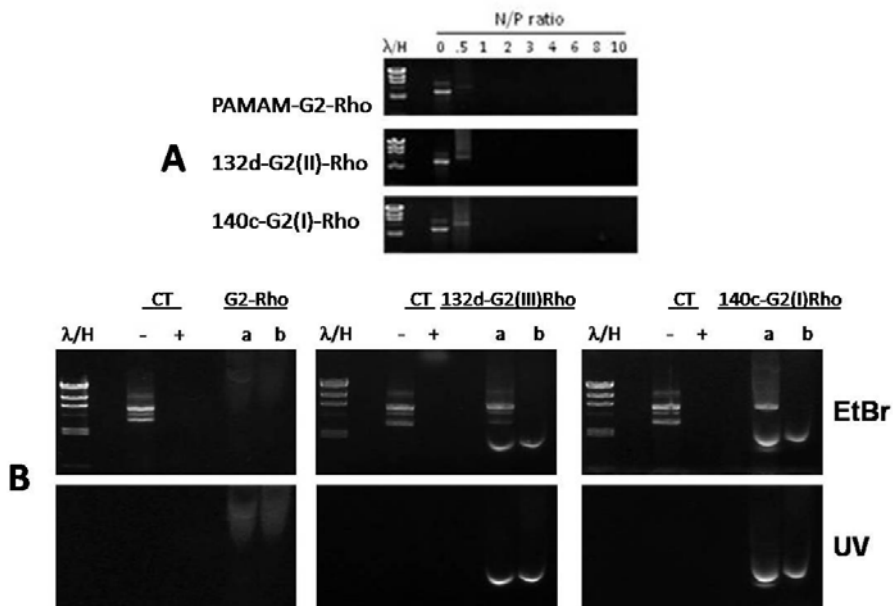


Figura 5.20. A. Ensayo de movilidad electroforética para derivados de PAMAM-G2 marcados con rodamina unidos a pDNA a relaciones *N/P* entre 0 (pEGFP-N3 solo) y 10. La ausencia de la banda del plásmido en los pocillos se relaciona con la inhibición de la movilidad electroforética del plásmido. **B.** Experimentos de protección frente a DNasa I: Geles de agarosa correspondientes al plásmido pEGFP-N3 complejado con **PAMAM-Rho**, **132d-G2(III)-Rho** y **140c-G2(I)-Rho** e incubado con DNasa I, empleando pEGFP-N3 como control (CT) en ausencia (-) o presencia (+) de DNasa I. (a) Complejo dendrímero-pDNA, (b) dendrímero marcado solo. Ya que los dendrímeros están marcados con fluorescencia, los geles se han fotografiado antes (**UV**) y después de la tinción con bromuro de etidio (**EtBr**). Debido a la interacción del dendrímero fluorescente libre con el SDS empleado en la preparación de las muestras, los dendrímeros marcados libres tienen una carga negativa durante la electroforesis.

Finalmente, el proceso de internalización de los complejos se sigue mediante microscopía confocal utilizando pDNA marcado con Cy5 y los dendrímeros fluorescentes **132d-G2(III)-Rho** y **140c-G2(III)-Rho**. Las correspondientes imágenes confocales se muestran para el primero de estos compuestos (Figura 5.21). Las células transfectadas se identifican mediante la expresión de eGFP (verde). Las imágenes se tomaron 24 h después de la transfección para permitir la expresión de la proteína. En la figura 5.21A se observa como la fluorescencia de los dendriplejos se localiza en todas las células, transfectadas o no. En todas ellas, la fluorescencia roja correspondiente a los dendrímeros marcados se puede observar localizada en el citosol de las células,

próxima al núcleo y se encuentra asociada a la fluorescencia azul que corresponde con el DNA marcado originando dendriplejos de color púrpura en la imagen superpuesta. Sólo en las células transfectadas, se observa fluorescencia libre azul que corresponde al DNA liberado y que puede ser observado en el interior del núcleo celular (Figura 5.21B).

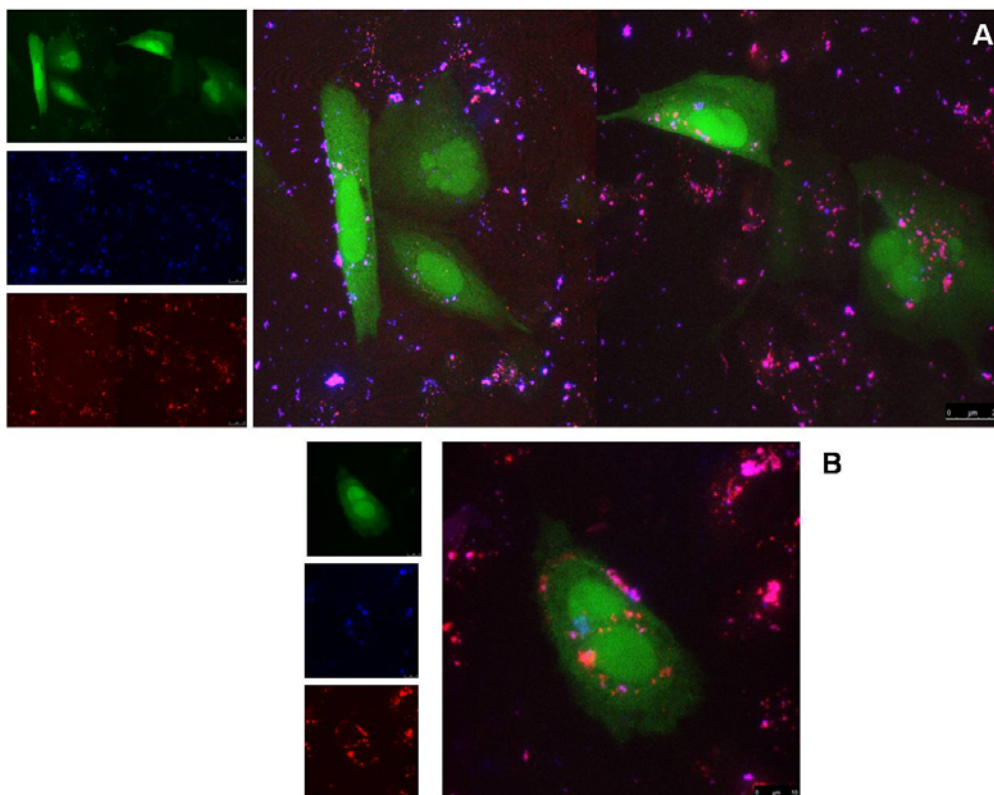


Figura 5.21. Microscopía Confocal. Las células CHO-K1 se sembraron en cubres de microscopio y fueron transfectadas con los dendriplejos formados por **132d-G2 (III)-Rho** y pEGFP-N3 marcado con Cy5 a una relación *N:P* de 10. 24 h. después de la transfección, las células fueron fijadas y analizadas mediante microscopía confocal para detectar la proteína eGFP en las células transfectadas (**verde**), el dendrímero marcado con rodamina **132d-G2 (III)** (**rojo**) o el pEGFP DNA marcado con Cy5 (**azul**). La imagen superpuesta, así como imágenes individuales para cada canal independiente se muestran en la figuras.

Los resultados confirman que el paso limitante en la transfección mediada por derivados hidrofóbicos del PAMAM-G2 es la liberación del pDNA desde los endosomas al núcleo, ya que mientras que prácticamente todas las células son capaces de captar los dendriplejos, sólo en un conjunto de ellas el pDNA es liberado desde estos depósitos internos para llegar al núcleo.

5.4. Conclusiones

- Se han sintetizado mediante una metodología sencilla y eficaz una variedad de lípidos funcionalizados con grupos vinilsulfonas que difieren en la longitud de su cadena hidrocarbonada.
- Estos compuestos son excelentes agentes de lipidación que permiten la incorporación a proteínas de residuos lipídicos. En concreto, los ensayos de inmunomarcaje ponen de manifiesto la utilidad del compuesto **140c** para la modificación de la proteína A promoviendo su incorporación a la estructura del ISCOM gracias a las cadenas lipídicas, demostrando además que esta funcionalización no afecta a su capacidad para la unión posterior a anticuerpos como IgG. De esta forma los lípidos-vinilsulfona participan en la creación de un sistema capaz de dirigir los ISCOM a una diana determinada, lo cual presenta un elevado potencial en la vehiculización de fármacos.
- La adición aza-Michael de los lípidos vinilsulfona es una herramienta óptima para la preparación de derivados amfifílicos de PAMAM, algunos de los cuales demuestran ser vectores útiles para la transfección génica que poseen propiedades mejoradas con respecto al PAMAM sin modificar o a ciertos reactivos comerciales de transfección como la Lipofectamina 2000: a) mayor eficiencia de transfección, b) menor citotoxicidad, c) capacidad de mantener la transfección en presencia de suero y d) posibilidad de transfectar distintos tipos de líneas celulares. Adicionalmente se describe la preparación de análogos fluorescentes de los dendrímeros amfifílicos para el seguimiento de la internalización y distribución intracelular de los correspondientes dendriplejos que han permitido obtener información de los mecanismos empleados por estos vectores para producir la transfección.

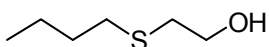
5.5. Sección experimental

El dendrímero PAMAM-G2 se obtuvo de Aldrich, al igual que los productos de partida **135a-c** y **136**. El compuesto **137** se obtuvo a partir del alcohol oleico siguiendo un procedimiento descrito en literatura.³⁴³ Lipofectamine™ 2000 se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El plásmido pEGFP-N3 (Genbank U57609) se obtuvo de Clontech Laboratories (Palo Alto, CA). Para los experimentos de microscopía confocal el DNA se marcó durante 30 min empleando el kit Mirus *labelIT*® Tracker Intracellular Nucleic Acid Labeling Kit Cy™5 (Madison, WI, USA).

Procedimiento general para la síntesis de los tioéteres 138a-d

A una disolución de 2-tioetanol (70 mg, 0.9 mmol para **138a-c**; 155 mg, 2.0 mmol para **138d**) en acetonitrilo (10 mL) previamente desoxigenado mediante corriente de Ar (para **138a,b,d**) o en DMSO-THF 1:1 (para **138c**) se adiciona el bromo derivado **135a-c** o el mesil derivado **137** (1.0 mmol) junto con K₂CO₃ (193 mg, 1.4 mmol) para **138a-c** ó Cs₂CO₃ (650 mg 2.0 mmol) para **138d**. La disolución se mantiene con agitación magnética a t.a. hasta observar por c.c.f. la completa desaparición de los materiales de partida (2 h para **138a,d**, 16 h para **138b-c**). Tras filtrar, el disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna. En el caso del compuesto **138c**, tras la evaporación del disolvente se añade H₂O (30 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (2x30mL). Los extractos orgánicos se secan (Na₂SO₄) y el disolvente se evapora a vacío para obtener un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna.

- 2-(Butiltio)etanol (**138a**)



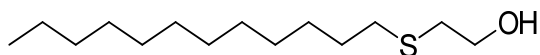
Eluyente hexano-éter (1:1), aislado como líquido (127 mg, 95%) descrito previamente en literatura.³⁴⁴ IR (film): $\nu = 3372, 2958, 2873, 1465, 1275$ y 1046 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 3.73$ (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 2.74 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 2.54 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.32 (sa, 1 H), 1.59 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 0.93 (t, 3H, $J = 7.3$

343. Pack, D. W.; Chen, G.; Maloney, K. M.; Chen, C.-T.; Arnold, F. H., A Metal-Chelating Lipid for 2D Protein Crystallization via Coordination of Surface Histidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (10), 2479-2487.

344. Sokolowski, A., Chemical structure and thermodynamics of amphiphile solutions. 1. Solubility of alkylthiooligooxyethylene glycols in water. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (25), 8223-8226.

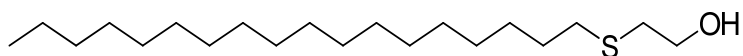
Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 60.3, 35.4, 31.9, 31.8, 22.0, 13.7$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 117.0736$ calc. para $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{S}$ $[\text{M-OH}]^+$: 117.0738.

- 2-(Dodeciltio)etanol (**138b**)



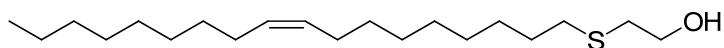
Eluyente hexano éter (2:1), aislado como sirupo (214 mg, 87%). **IR** (film): $\nu = 3315, 2918, 2849, 1461, 1044$ y 997 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 3.72$ (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.73 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 2.52 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.43 (s, 1H), 1.66-1.52 (m, 2H), 1.45-1.15 (m, 18H), 0.89 (t, 3H, $J = 6.6$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 60.5, 35.5, 32.2, 31.9, 30.0, 29.9, 29.9, 29.8, 29.6, 29.5, 29.1, 22.9, 14.3$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 247.2098$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{31}\text{OS}$ $[\text{M+H}]^+$: 247.2096.

- 2-(Octadeciltio)etanol (**138c**)



Eluyente hexano-éter (1:1), aislado como sólido (304 mg, 92%). P. f. 60-61°C; **IR** (film): $\nu = 3213, 2918, 2849, 1460, 1063$ y 719 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 3.71$ (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.72 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 2.51 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.11 (s, 1H), 1.58 (m, 2H), 1.41-1.20 (m, 30H), 0.87 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 60.3, 35.5, 32.0, 31.8, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 22.8, 14.2$.

- (Z)-2-(Octadec-9-eniltio)etanol (**138d**)

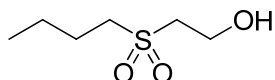


Eluyente hexano-éter (2:1), aislado como sirupo (308 mg, 94%). **IR** (film): $\nu = 3371, 3003, 2923, 2852, 1461$ y 1045 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 5.36$ -5.28 (m, 2H), 3.69 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.70 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 2.49 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.35 (s, 1H), 1.99 (dd, 4H, $J = 12.4$ y 6.5 Hz), 1.60-1.52 (m, 2H), 1.41-1.25 (m, 22H), 0.86 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 130.1, 129.9, 60.4, 35.4, 32.1, 31.8, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 27.4, 27.3, 22.8, 14.3$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 329.2865$ calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{OS}$ $[\text{M+H}]^+$: 329.2878.

Procedimiento general para la síntesis de sulfonas 139a-d

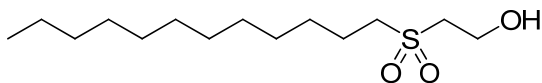
A una disolución del tioéter derivado **138a-d** (1.0 mmol) en AcOH (5 mL) se adiciona H₂O₂ 33% (2 mL). La disolución se mantiene a t.a. y en ausencia de luz durante 16 h. La evaporación del disolvente a presión reducida permite la obtención de un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna.

- 2-(Butilsulfonyl)etanol (**139a**)



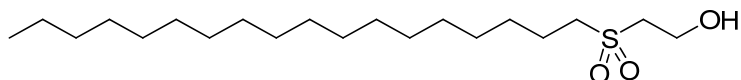
Eluyente éter, aislado como sólido (144 mg, 87%). P. f. 42-43°C; **IR** (film): $\nu = 3450, 2961, 2875, 1462, 1272, 1122$ y 1065 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 4.12$ (t, 2H, $J = 4.8$ Hz), 3.21 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 3.09 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 2.62 (sa, 1H), 1.84 (m, 2 H), 1.49 (m, 2H), 0.97 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 56.4, 54.9, 54.4, 23.8, 21.7, 13.6$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 167.0743$ calc. para C₆H₁₅O₃S [M+H]⁺: 167.0742.

- 2-(Dodecilsulfonyl)etanol (**139b**)



Eluyente éter, aislado como sólido (230 mg, 83%). P. f. 81-82°C; **IR** (film): $\nu = 3392, 2914, 2844, 1259$ y 1116 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 4.14$ (t, 2H, $J = 5.1$ Hz), 3.20 (t, 2H, $J = 5.1$ Hz), 3.07 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 1.80 - 1.70 (m, 2H), 1.48 - 1.40 (m, 2H), 1.38 - 1.20 (m, 16H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 56.4, 54.8, 54.6, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 28.4, 22.7, 21.8, 14.1$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 279.1989$ calc. para C₁₄H₃₁O₃S [M+H]⁺: 279.1994

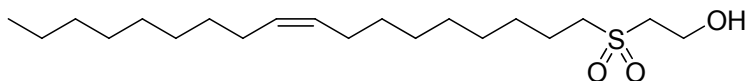
- 2-(Octadecilsulfonyl)etanol (**139c**)



Eluyente AcOEt, aislado como sólido (308 mg, 85%). P. f. 93-94°C; **IR** (film): $\nu = 3368, 2913, 2847, 1594, 1470, 1256, 1133$ y 1059 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 4.13$ (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 3.19 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 3.07 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 1.85 (m, 2H), 1.50 - 1.18 (m, 30H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.6$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 100 MHz): $\delta =$

56.5, 54.9, 54.7, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.6, 22.8, 22.0, 14.2.; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 385.2755$ calc. para $C_{20}H_{42}O_3SNa$ $[M+Na]^+$: 385.2752.

- (Z)-2-(Octadec-9-enilsulfonil)etanol (**139d**)

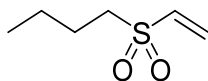


Eluyente hexano-AcOEt (1:1), aislado como sirupo (245 mg, 68%). **IR** (film): $\nu = 3384, 2918, 2847, 1460, 1323$ y 1121 cm^{-1} ; **¹H-RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 5.30$ - 5.26 (m, 2H), 4.06 (t, 2H, $J = 5.2$ Hz), 3.13 (t, 2H, $J = 5.2$ Hz), 3.00 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 2.47 (sa, 1H), 1.94 (dd, 4H, $J = 11.9$ y 6.1 Hz), 1.83-1.73 (m, 2H), 1.42-1.32 (m, 2H), 1.30-1.12 (m, 20H), 0.81 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz); **¹³C-RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 130.3, 129.9, 56.6, 55.0, 54.8, 32.1, 30.0, 29.9, 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7, 27.4, 27.3, 22.9, 22.0, 14.3$; **EM-AR** (FAB⁺): $m/z = 361.2775$ calc. para $C_{20}H_{41}O_3S$ $[M+H]^+$: 361.2776.

Procedimiento general para la síntesis de vinilsulfonas 140a-d

A una disolución de la correspondiente sulfona **139a-d** (1.0 mmol) en CH_2Cl_2 anh. (20 mL) enfriada por medio de un baño de hielo se adiciona Et_3N (0.41 mL, 3 mmol para **139a-c**; 0.82 mL, 6 mmol para **139d**) y cloruro de mesilo (0.12 mL, 1.5 mmol para **139a-c**; 0.24 mL, 3.0 mmol para **139d**), dejando alcanzar la t.a. La reacción se mantiene en esas condiciones hasta observar por c.c.f. la desaparición del producto de partida (2 h para **139a-b**, 24 h para **139c**, 6 h para **139d**). El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna.

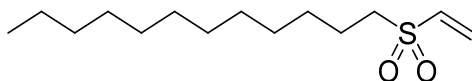
- 1-(Vinilsulfonil)butano (**140a**)



Eluyente hexano-éter (1:1), aislado como sirupo (136 mg, 92%). **IR** (film): $\nu = 2919, 1673, 1463, 1384, 1312, 1130, 978$ y 808 cm^{-1} ; **¹H-RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 6.64$ (dd, 1H, $J = 16.6$ y 10.1 Hz), 6.44 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz), 6.17 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 2.99 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz), 1.80-1.72 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 0.95 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz); **¹³C-RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 136.1, 130.4, 54.0, 24.3, 21.6, 13.5$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 149.0640$ calc. para $C_6H_{13}O_2S$ $[M+H]^+$: 149.0636.

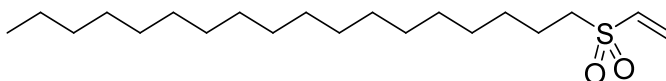
Capítulo 5

- 1-(Vinilsulfonil)dodecano (**140b**)



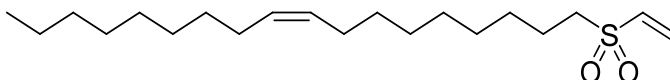
Eluyente hexano-éter (1:1), aislado como sirupo (218 mg, 84%). **IR** (film): $\nu = 2925, 1719, 1647, 1459, 1307, 1131, 1069, 973$ y 666 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 6.60$ (dd, 1H, $J = 16.6$ y 9.9 Hz), 6.37 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz), 6.11 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 1.75 - 1.67 (m, 2H), 1.36 - 1.18 (m, 18H), 0.83 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 136.1, 130.4, 54.3, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 28.3, 22.7, 22.3, 14.1$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 261.1879$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 261.1888.

- 1-(Vinilsulfonil)octadecano (**140c**)



Eluyente hexano-éter (1:1), aislado como sólido (279 mg, 81%). P. f. 61 - 62°C ; **IR** (film): $\nu = 3062, 2915, 2847, 1462, 1284, 1124, 908$ y 730 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 6.62$ (dd, 1H, $J = 16.6$ y 9.8 Hz), 6.43 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz), 6.15 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 2.96 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 1.77 (m, 2H), 1.46 - 1.20 (m, 30H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 136.3, 130.4, 54.4, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 28.5, 22.8, 22.4, 14.2$. **EM-AR** (FAB $^+$): $m/z = 367.2644$ calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{SNa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 367.2647.

- (Z)-1-(Vinilsulfonil)octadec-9-eno (**140d**)



Eluyente hexano-AcOEt (5:1), aislado como líquido (274 mg, 80%). **IR** (film): $\nu = 3003, 2922, 2852, 1613, 1463, 1314, 1132$ y 973 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 6.56$ (dd, 1H, $J = 16.7$ y 9.7 Hz), 6.37 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz), 6.09 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz), 5.32 - 5.23 (m, 2H), 2.90 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 1.96 - 1.92 (m, 4H), 1.74 - 1.67 (m, 2H), 1.38 - 1.16 (m, 22H), 0.81 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 136.1, 130.3, 130.0, 129.6, 54.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.1, 29.0, 28.3, 27.2, 27.1, 22.7, 22.3, 14.1$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 343.2664$ calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 343.2671.

Procedimiento general de síntesis de dendrímeros amfifílicos de PAMAM-G2

A una disolución del dendrímero comercial PAMAM-G2 (0.3 mM, 1 mg/mL) en agua milliQ (15 mL) se adiciona la correspondiente vinilsulfona **132a-d**, **133d**, **134** ó **140a-d** (0.15 mM para I, 0.3 mM para II, 0.6 mM para III) en THF (15 mL). La disolución resultante se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 24 h. El disolvente (THF) se evapora a presión reducida y la disolución acuosa resultante se liofiliza, obteniendo los productos que se utilizan directamente en los ensayos de transfección.

Síntesis de dendrímeros fluorescentes de PAMAM-G2

A una disolución de PAMAM-G2 (0.6 mM, 2 mg/mL) en agua milliQ (7.5 mL) se adiciona la vinilsulfona rodamina B **145** (0.3 mM) en agua milliQ (7.5 mL). La disolución resultante se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 24 h. y después se liofiliza para obtener el producto **G2-Rho** que se utiliza directamente en los ensayos de transfección.

Síntesis de dendrímeros fluorescentes y amfifílicos de PAMAM-G2

A una disolución de PAMAM-G2 (0.6 mM, 2 mg/mL) en agua milliQ (7.5 mL) se adiciona la vinilsulfona rodamina B **145** (0.3 mM) en agua milliQ (7.5 mL). La disolución resultante se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 24 h. A continuación se añade una disolución del compuesto **132d** (0.6 mM) o **140c** (0.15 mM) en THF (15 mL), manteniendo de nuevo 24 h. a t.a. El disolvente (THF) se evapora a presión reducida y la disolución acuosa resultante se liofiliza, obteniendo los productos **132d-G2(III)-Rho** y **140c-G2(I)-Rho** que se utilizan directamente en los ensayos de transfección.

Preparación de los complejos PAMAM-G2 amfifílico/plásmido pEGFP-N3

Los complejos se prepararon a diferentes relaciones N/P (N = número de aminas primarias en el conjugado; P = número de grupos fosfato en el pDNA). Las cantidades de PAMAM-G2 funcionalizado empleadas se calculan de acuerdo a la relación N/P, el peso molecular y el número de grupos amino primarios de cada derivado alcanzando una concentración de DNA de 0.1 mg/mL. El derivado de PAMAM-G2 se adiciona a partir de una disolución stock en DMSO-H₂O (1:2) de forma que mezclando volúmenes iguales de dicha disolución y de disolución del plásmido se alcance la relación N/P deseada, manteniendo constante en todos los casos la proporción de DMSO (16.7% v/v). La preparación se agita durante unos segundos incubando a t.a. a continuación durante 20 min.

Medida del tamaño de partícula y potencial ζ

El tamaño de partícula se midió a 633 nm en un instrumento de DLS (Malvern 4700C), a t.a. y con un ángulo de detección de 60°. Las medidas de potencial Z se llevaron a cabo mediante un equipo ZetaPALS (Brookhaven). El potencial ζ se calcula usando el modelo de Smoluchowsky. Cada dato es el resultado de cinco medidas independientes. La disolución de dendriplejos se preparó de idéntica forma a la comentada anteriormente, con una concentración final de DNA de 0.1 mg/mL y con una relación N/P en la que se alcanza la máxima transfección en cada caso. La medida se realizó en cada caso antes y después de la adición de DNA.

**Capítulo 6. SÍNTESIS DE NUEVOS MATERIALES
MAGNÉTICOS Y NO MAGNÉTICOS CON LIGANDOS
INMOVILIZADOS. APLICACIONES EN CuAAC**

Capítulo 6.

Síntesis de nuevos materiales magnéticos y no magnéticos con ligandos inmovilizados. Aplicaciones en CuAAC

6.1. "Click-chemistry". Generalidades

El concepto de la química "click"³⁴⁵ fue introducido por el profesor Sharpless y col. en el año 2001 para definir una metodología sintética que utiliza exclusivamente las transformaciones químicas más prácticas y fiables. Desde esta concepción, una reacción puede ser considerada de tipo "click" si reúne las siguientes características: fácil de llevar a cabo experimentalmente, con reactivos fácilmente accesibles, tolerable a una amplia variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción, altamente selectiva y regioespecífica, insensible al oxígeno y al agua, que acontece con altos rendimientos y sin subproductos, y que permite un fácil aislamiento del producto final. Considerando estos criterios, estos autores establecieron cuatro grupos de reacciones que cumplen en mayor o menor medida estas características:

- Cicloadiciones de especies insaturadas, especialmente cicloadiciones 1,3-dipolares pero también reacciones de Diels-Alder.
- Sustitución nucleofílica, particularmente la apertura de heterociclos tensionados como epóxidos o aziridinas.
- Reacciones carbonílicas no aldólicas: formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, oximas, hidrazonas...
- Adiciones a enlaces múltiples C-C, especialmente procesos de oxidación como epoxidaciones, dihidroxilaciones, etc. y también adiciones tipo Michael.

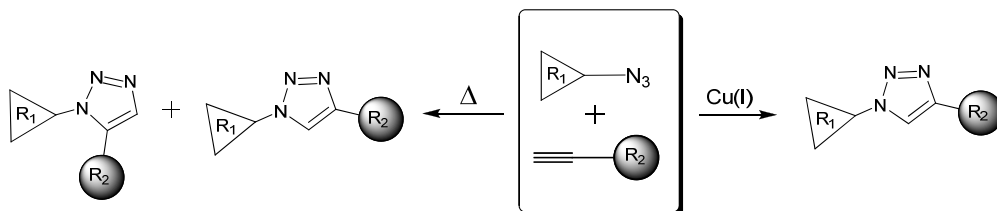
Dentro de este grupo de reacciones, la versión catalizada por **Cu(I)** de la Cicloadición 1,3-dipolar de **Azidas** y **Alquinos** de Huisgen³⁴⁶ (**CuAAC**) descrita de

345. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004-2021.

346. Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2* (10), 565-598.

Capítulo 6

forma simultánea e independiente por los grupos de Meldal³⁴⁷ y Sharpless³⁴⁸ se ha establecido como arquetipo de la reacción “click” siendo en la actualidad la más popular, efectiva y versátil.³⁴⁹⁻³⁵¹ El uso de Cu(I) en dicha reacción tiene un efecto catalítico que provoca un aumento de la velocidad de reacción de hasta 10^7 veces, y además origina una regioselectividad hacia el triazol 1,4-disustituido que no es posible cuando la reacción se lleva a cabo en condiciones térmicas (Esquema 6.1). Las propiedades de las funciones azida y alquino tales como su estabilidad en la mayoría de condiciones, la facilidad para ser incorporadas a una molécula orgánica, su inercia química y biocompatibilidad, junto al alto grado de conversión que se consigue en el acoplamiento catalizado de estas funciones, la alta selectividad del mismo y la tolerancia a otros grupos funcionales, han hecho de esta reacción una de las herramientas más poderosas para llevar a cabo la unión irreversible de bloques moleculares funcionalizados de forma complementaria de una forma rápida y eficiente.



Esquema 6.1. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos

347. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064.

348. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596-2599.

349. Hein, J. E.; Fokin, V. V., Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1302-1315.

350. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952-3015.

351. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D., The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249-1262.

En menos de una década, el empleo de la CuAAC se ha extendido exponencialmente dando lugar a numerosas aplicaciones en la mayoría de campos científicos tales como polímeros,³⁵² ciencias de materiales,³⁵³⁻³⁵⁵ superficies sólidas,³⁵⁶ bioconjugación,³⁵⁷⁻³⁵⁸ diseño de fármacos³⁵⁹ y química médica.³⁶⁰

6.1.1. Fuentes de Cu

Desde el descubrimiento del efecto catalítico del Cu(I) en la cicloadición de azidas y alquinos se ha empleado un rango de condiciones experimentales muy amplio, lo que pone de manifiesto la robustez del proceso.

De entre las diferentes variables, la fuente de Cu(I) es quizá el factor que permite una mayor variabilidad. La elección del catalizador viene dictada en la práctica por los requerimientos concretos de cada situación aunque normalmente son muchas las combinaciones que pueden producir el acoplamiento esperado. De forma general, se pueden usar tres protocolos para asegurar la presencia de Cu(I) en el medio de reacción:

a) Reducción *in situ* de sales de Cu(II), siendo el sistema $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /ascorbato sódico³⁴⁸ uno de los más utilizados en medios acuosos.

b) Adición directa de sales de Cu(I). Una de las fuentes más frecuentemente empleadas es el CuI ³⁴⁷ debido a su parcial solubilidad en THF, CH_3CN o DMSO. Otras

352. van Dijk, M.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E., Synthesis and Applications of Biomedical and Pharmaceutical Polymers via Click Chemistry Methodologies. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (11), 2001-2016.

353. Lutz, J.-F., 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azides and Alkynes: A Universal Ligation Tool in Polymer and Materials Science. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (7), 1018-1025.

354. Binder, W. H.; Sachsenhofer, R., "Click" Chemistry in Polymer and Materials Science. *Macromol. Rapid Comm.* **2007**, *28* (1), 15-54.

355. Binder, W. H.; Sachsenhofer, R., "Click" Chemistry in Polymer and Material Science: An Update. *Macromol. Rapid Comm.* **2008**, *29* (12-13), 952-981.

356. Devaraj, Neal K.; Collman, James P., Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions on Solid Surfaces: Applications and Future Directions. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (11-12), 1253-1260.

357. Lutz, J.-F.; Zarafshani, Z., Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne "click" chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (9), 958-970.

358. Nwe, K.; Brechbiel, M. W., Growing Applications of "Click Chemistry" for Bioconjugation in Contemporary Biomedical Research. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **2009**, *24* (3), 289-302.

359. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128-1137.

360. Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28* (2), 278-308.

Capítulo 6

fuentes de Cu(I) tales como $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$,³⁶¹ $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ ³⁶² o $\text{CuBr}(\text{Ph}_3\text{P})_3$ ³⁶³ se han introducido también fundamentalmente para conseguir un aumento de la solubilidad en disolventes orgánicos. Un caso particular es el empleo de Cu(I) soportado dando lugar a catalizadores heterogéneos, que se abordará a continuación con más detalle.

c) Oxidación de cobre metálico, en forma de alambre, virutas, polvo,³⁶⁴ nanopartículas³⁶⁵⁻³⁶⁶ o “nanoclusters”³⁶⁷ en presencia generalmente de sales de Cu(II).

A pesar de la prevalencia de los anteriores métodos, alternativamente se han empleado también, aunque en menor extensión, derivados de Cu(II) como catalizadores de “click-chemistry” en ausencia de agentes reductores. El primer estudio con estas características emplea $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ como catalizador.³⁶⁸ Posteriormente se ha descrito el uso de hidróxidos de Cu soportados $[\text{Cu}(\text{OH})_x/\text{TiO}_2]$ proponiéndose un mecanismo que supone un periodo de inducción en el que se forma Cu(I) como especie activa tras el acoplamiento alquino-alquino catalizado con Cu(II).³⁶⁹ Casi de forma simultánea a esta contribución y para

361. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853-2855.

362. Pérez-Balderas, F.; Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernández-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asín, J. A.; Isac-García, J.; Santoyo-González, F., Multivalent Neoglycoconjugates by Regiospecific Cycloaddition of Alkynes and Azides Using Organic-Soluble Copper Catalysts. *Org. Lett.* **2003**, *5* (11), 1951-1954.

363. Wu, P.; Malkoch, M.; Hunt, J. N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Hawker, C. J., Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. *Chem. Comm.* **2005**, (46), 5775-5777.

364. Orgueira, H. A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P. C. M.; Baldino, C. M., Regioselective synthesis of [1,2,3]-triazoles catalyzed by Cu(I) generated in situ from Cu(0) nanosize activated powder and amine hydrochloride salts. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (16), 2911-2914.

365. Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M., Copper nanoparticles in click chemistry: an alternative catalytic system for the cycloaddition of terminal alkynes and azides. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (20), 2358-2362.

366. Raut, D.; Wankhede, K.; Vaidya, V.; Bhilare, S.; Darwatkar, N.; Deorukhkar, A.; Trivedi, G.; Salunkhe, M., Copper nanoparticles in ionic liquids: Recyclable and efficient catalytic system for 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *Catal. Comm.* **2009**, *10* (8), 1240-1243.

367. Duran Pachon, L.; van Maarseveen, J. H.; Rothenberg, G., Click chemistry: copper clusters catalyze the cycloaddition of azides with terminal alkynes. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (6), 811-815.

368. Reddy, K. R.; Rajgopal, K.; Kantam, M. L., Copper(II)-promoted regioselective synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles in water. *Synlett* **2006**, 957-959.

369. Yamaguchi, K.; Oishi, T.; Katayama, T.; Mizuno, N., A Supported Copper Hydroxide on Titanium Oxide as an Efficient Reusable Heterogeneous Catalyst for 1,3-Dipolar Cycloaddition of Organic Azides to Terminal Alkynes. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (40), 10464-10472.

justificar la catálisis con $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ Zhu y col.³⁷⁰ proponen este mismo proceso junto con la actuación de disolventes oxidables como i-PrOH, EtOH y MeOH como causantes de la generación de Cu(I). Más recientemente, se ha descrito el empleo de MOFs (“Metal-Organic Framework”) conteniendo Cu(II)³⁷¹ como catalizadores para reacciones “click” proponiéndose un nuevo mecanismo sin formación de Cu(I), donde el Cu(II) forma el acetiluro de cobre que reacciona después con la azida generando el triazol, de forma similar al mecanismo propuesto por Sharpless para la catálisis con Cu(I).³⁷²

6.1.2. Empleo de ligandos

La introducción de diversas variantes en la CuAAC para mejorar la eficiencia de esta reacción ha determinado un nivel destacado de desarrollo notable en esta metodología de unión. En particular, el uso de bases nitrogenadas como mediadores³⁴⁸ se describió poco después del descubrimiento del efecto catalítico del Cu(I) al demostrarse que producen una mejora en la velocidad de la reacción a la vez que protegen el Cu(I) frente a la oxidación en condiciones aeróbicas y/o acuosas dada la inherente inestabilidad termodinámica del Cu(I). Como bases nitrogenadas más habituales se han empleado trietilamina, piridina, 2,6-lutidina o DIPEA. En muchos casos la adición de ciertos heterociclos capaces de formar quelatos con el cobre facilita la reacción de cicloadición al proteger el ion Cu(I) de interacciones que conducirían a su degradación. Los más habituales, como son la tris(benciltriazolilmetil)amina^{361, 373} (TBTA) **146** o la sal sódica del ácido disulfónico batofenantrolina³⁷⁴ (BPS) **147**, la cual es soluble en agua, han sido utilizadas también en numerosos procesos de bioconjugación. En estos casos no es necesario el empleo de una base ya que los nitrógenos terciarios de estos heterociclos además de actuar como donores hacia el Cu(I) actúan como

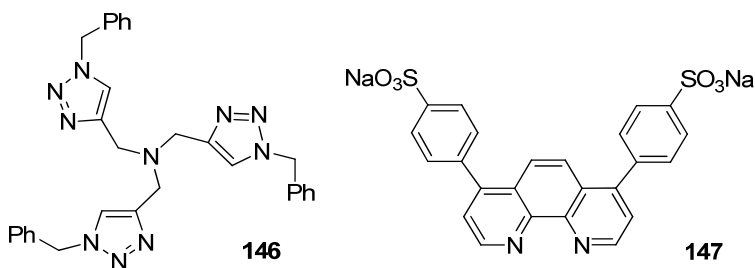
370. Brotherton, W. S.; Michaels, H. A.; Simmons, J. T.; Clark, R. J.; Dalal, N. S.; Zhu, L., Apparent Copper(II)-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition. *Org. Lett.* **2009**, *11* (21), 4954-4957.

371. Luz, I.; Llabrés i Xamena, F. X.; Corma, A., Bridging homogeneous and heterogeneous catalysis with MOFs: "Click" reactions with Cu-MOF catalysts. *J. Catal.* **2010**, *276* (1), 134-140.

372. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127* (1), 210-216.

373. Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G., Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192-3193.

374. Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Discovery and Characterization of Catalysts for Azide-Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9152-9153.



aceptores de protones. Recientemente un estudio llevado a cabo por Finn y col.³⁷⁵ se adentra en las implicaciones prácticas y mecanísticas de diferentes ligandos que aceleran la cicloadición, concluyendo que no existe un ligando óptimo sino que su actuación depende de consideraciones prácticas que incluyen el disolvente, la relación ligando:Cu, etc.

6.2. Catálisis heterogénea en CuAAC

La enorme actividad investigadora que ha tenido lugar en el campo de la CuAAC durante la última década ha permitido el desarrollo de multitud de procedimientos donde la catálisis homogénea interviene en la mayor parte de las aplicaciones descritas. Sin embargo, la heterogeneización de los catalizadores para “click-chemistry” constituye una alternativa interesante en la que se están realizando numerosos esfuerzos debido a las ventajas que conlleva en cuanto a la fácil eliminación, recuperación y reutilización de este tipo de catalizadores. Esta heterogeneización se ha llevado a cabo mediante la inmovilización covalente o no-covalente de diferentes especies de Cu en una variedad de soportes que incluyen:

- Carbón³⁷⁶⁻³⁷⁷
- Zeolitas³⁷⁸⁻³⁸⁰

375. Presolski, S. I.; Hong, V.; Cho, S.-H.; Finn, M. G., Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14570-14576.

376. Lipshutz, B. H.; Taft, B. R., Heterogeneous copper-in-charcoal-catalyzed click chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45* (48), 8235-8238.

377. Kang, H.; Lee, H.; Park, J.; Song, H.; Park, K., Solvent-Free Microwave Promoted [3 + 2] Cycloaddition of Alkyne-Azide in Uniform CuO Hollow Nanospheres. *Top. Catal.* **2010**, *53* (7), 523-528.

378. Chassaing, S.; Kumarraja, M.; Sido, A. S. S.; Pale, P.; Sommer, J., Click Chemistry in CuI-zeolites: The Huisgen [3 + 2]-Cycloaddition. *Org. Lett.* **2007**, *9* (5), 883-886.

379. Chassaing, S.; Sido, A. S. S.; Alix, A.; Kumarraja, M.; Pale, P.; Sommer, J., Click chemistry in zeolites. Copper(I) zeolites as new heterogeneous and ligand-free catalysts for the Huisgen [3 + 2] cycloaddition. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (22), 6713-6721.

380. Chassaing, S.; Alix, A.; Boningari, T.; Sido, K. S. S.; Keller, M.; Kuhn, P.; Louis, B.; Sommer, J.; Pale, P., Copper(I)-zeolites as new heterogeneous and green catalysts for organic synthesis. *Synthesis* **2010**, (9), 1557-1567.

- Óxido de titanio³⁶⁹
- Alúmina³⁸¹⁻³⁸²
- Fibras de oxihidróxido de aluminio³⁸³
- Hidrotalcita³⁸⁴
- Espinelas Cu-Mn³⁸⁵
- Amberlita básica³⁸⁶⁻³⁸⁸
- Sílica³⁸⁹⁻³⁹⁴
- Polietilenimina entrecruzada³⁹⁵

381. Kantam, M. L.; Jaya, V. S.; Sreedhar, B.; Rao, M. M.; Choudary, B. M., Preparation of alumina supported copper nanoparticles and their application in the synthesis of 1,2,3-triazoles. *J. Mol. Catal. Chem.* **2006**, *256* (1-2), 273-277.

382. Katayama, T.; Kamata, K.; Yamaguchi, K.; Mizuno, N., A supported copper hydroxide as an efficient, ligand-free, and heterogeneous precatalyst for 1,3-dipolar cycloadditions of organic azides to terminal alkynes. *ChemSusChem* **2009**, *2* (1), 59-62.

383. Park, I. S.; Kwon, M. S.; Kim, Y.; Lee, J. S.; Park, J., Heterogeneous copper catalyst for the cycloaddition of azides and alkynes without additives under ambient conditions. *Org. Lett.* **2008**, *10* (3), 497-500.

384. Namitharan, K.; Kumarraja, M.; Pitchumani, K., Cu(II)-hydrotalcite as an efficient heterogeneous catalyst for Huisgen [3+2] cycloaddition. *Chemistry* **2009**, *15* (12), 2755-2758.

385. Yousuf, S. K.; Mukherjee, D.; Singh, B.; Maity, S.; Taneja, S. C., Cu-Mn bimetallic catalyst for Huisgen [3+2]-cycloaddition. *Green Chem.* **2010**, *12* (9), 1568-1572.

386. Girard, C.; Onen, E.; Aufort, M.; Beauviere, S.; Samson, E.; Herscovici, J., Reusable polymer-supported catalyst for the [3+2] Huisgen cycloaddition in automation protocols. *Org. Lett.* **2006**, *8* (8), 1689-92.

387. Smith, C. D.; Baxendale, I. R.; Lanners, S.; Hayward, J. J.; Smith, S. C.; Ley, S. V., [3 + 2] cycloaddition of acetylenes with azides to give 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles in a modular flow reactor. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (10), 1559-1561.

388. Jlalía, I.; Meganem, F.; Herscovici, J.; Girard, C., "Flash" solvent-free synthesis of triazoles using a supported catalyst. *Molecules* **2009**, *14* (1), 528-539.

389. Miao, T.; Wang, L., Regioselective synthesis of 1,2,3-triazoles by use of a silica-supported copper(I) catalyst. *Synthesis* **2008**, (3), 363-368.

390. Coelho, A.; Diz, P.; Caamaño, O.; Sotelo, E., Polymer-Supported 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene as Polyvalent Ligands in the Copper-Catalyzed Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352* (7), 1179-1192.

391. Hagiwara, H.; Sasaki, H.; Hoshi, T.; Suzuki, T., Sustainable click reaction catalyzed by supported ionic liquid catalyst (Cu-SILC). *Synlett* **2009**, (4), 643-647.

392. Li, P.; Wang, L.; Zhang, Y., SiO₂-NHC-Cu(I): an efficient and reusable catalyst for [3+2] cycloaddition of organic azides and terminal alkynes under solvent-free reaction conditions at room temperature. *Tetrahedron* **2008**, *64* (48), 10825-10830.

393. Cabrero-Antonino, J. R.; García, T.; Rubio-Marqués, P.; Vidal-Moya, J. A.; Leyva-Pérez, A.; Al-Deyab, S. S.; Al-Resayes, S. I.; Díaz, U.; Corma, A., Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Solids with Copper Complex Framework and Their Catalytic Activity for the S-Arylation and the Azide-Alkyne Cycloaddition Reactions. *ACS Catalysis* **2011**, 147-158.

394. Shamim, T.; Paul, S., Silica functionalized Cu(I) as a green and recyclable heterogeneous catalyst for the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition in water at room temperature. *Catal. Lett.* **2010**, *136* (3-4), 260-265.

395. Bonami, L.; Van Camp, W.; Van Rijckegem, D.; Du Prez, F. E., Facile access to an efficient solid-supported click catalyst system based on poly(ethyleneimine). *Macromol. Rapid Comm.* **2009**, *30* (1), 34-38.

Capítulo 6

- Resina Tentagel³⁹⁶
- Poliestireno³⁹⁰
- Polímeros iónicos³⁹⁷
- Biopolímeros³⁹⁸⁻³⁹⁹
- Nanotubos de carbono⁴⁰⁰

Recientemente, también se ha descrito una cicloadición de azidas y alquinos donde el Zn sobre carbón⁴⁰¹ podría actuar como catalizador, incluso con alquinos internos a diferencia de lo que ocurre con la bien conocida catálisis con Cu(I).

Una de las aproximaciones utilizadas para la obtención de catalizadores heterogéneos está basada en la inmovilización sobre un soporte de ligandos aminados de contrastada actividad como mediadores en catálisis homogénea, para explotar de manera sinérgica su capacidad quelante de Cu(I) y su carácter básico. En particular dimetil-aminometil³⁸⁶ **148**, 3-aminopropil³⁸⁹ **149**, 3-[(2-aminoetil)amino]propil³⁸⁹ **150**, 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene³⁹⁰ **151** (TBD), 2-metaniminpiridina³⁹⁴ **152** y TBTA³⁹⁶ **153** (Figura 6.1) han sido inmovilizados covalentemente sobre sílica o matrices de poliestireno con el fin de obtener materiales híbridos para procesos de catálisis heterogénea.

396. Chan, T. R.; Fokin, V. V., Polymer-supported copper(I) catalysts for the experimentally simplified azide-alkyne cycloaddition. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (11-12), 1274-1279.

397. Sirion, U.; Bae, Y. J.; Lee, B. S.; Chi, D. Y., Ionic polymer supported copper(I): a reusable catalyst for Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition. *Synlett* **2008**, (15), 2326-2330.

398. Reddy, K. R.; Rajgopal, K.; Kantam, M. L., Copper-alginates: a biopolymer supported Cu(II) catalyst for 1,3-dipolar cycloaddition of alkynes with azides and oxidative coupling of 2-naphthols and phenols in water. *Catal. Lett.* **2007**, *114* (1-2), 36-40.

399. Chtchigrovsky, M.; Primo, A.; Gonzalez, P.; Molvinger, K.; Robitzer, M.; Quignard, F.; Taran, F., Functionalized Chitosan as a Green, Recyclable, Biopolymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (32), 5916-5920.

400. Sharghi, H.; Beyzavi, M. H.; Safavi, A.; Doroodmand, M. M.; Khalifeh, R., Immobilization of porphyrinatocopper nanoparticles onto activated multi-walled carbon nanotubes and a study of its catalytic activity as an efficient heterogeneous catalyst for a click approach to the three-component synthesis of 1,2,3-triazoles in water. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (14+15), 2391-2410.

401. Meng, X.; Xu, X.; Gao, T.; Chen, B., Zn/C-Catalyzed Cycloaddition of Azides and Aryl Alkynes. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (28), 5409-5414.

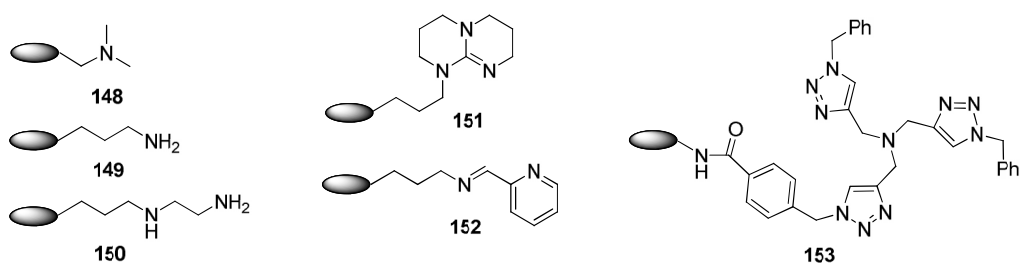


Figura 6.1. Estructuras quelantes inmovilizadas en soportes sólidos para obtener catalizadores “click”

En un contexto relacionado, la heterogeneización de catalizadores usando partículas magnéticas ofrece una serie de ventajas añadidas a la catálisis heterogénea convencional, debido principalmente a que dichos catalizadores son magnéticamente recuperables mediante un imán permanente externo con lo que se eliminan las etapas de filtración del catalizador, se simplifica el procesado de la reacción y se hace posible la reutilización del catalizador.

Las nano- y micropartículas magnéticas han irrumpido con fuerza en muchos campos científicos,⁴⁰²⁻⁴⁰⁵ destacando especialmente por su potencial en aplicaciones médicas y también por las posibilidades que ofrecen como soportes para la inmovilización de diferentes componentes con aplicaciones en catálisis heterogénea.⁴⁰⁶

Uno de los métodos más comunes para preparar partículas magnéticas funcionalizadas es la silanización de nanopartículas de óxido de hierro⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹ que

402. Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36* (13), 167-181.

403. Sun, C.; Lee, J. S. H.; Zhang, M.; Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (11), 1252-1265.

404. Gao, J.; Gu, H.; Xu, B., Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Accounts Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1097-1107.

405. Horák, D.; Babi, M.; ccaron; Macková, H.; Benescaron, M. J., Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J. Separ. Sci.* **2007**, *30* (11), 1751-1772.

406. Shylesh, S.; Schünemann, V.; Thiel, W. R., Magnetically Separable Nanocatalysts: Bridges between Homogeneous and Heterogeneous Catalysis. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (20), 3428-3459.

407. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 2064-2110.

408. Wu, W.; He, Q.; Jiang, C., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3* (11), 397-415.

409. Teja, A. S.; Koh, P.-Y., Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progr. Cryst. Growth Char.Mater.* **2009**, *55* (1-2), 22-45.

Capítulo 6

permite obtener nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica con estructura “core/shell” (núcleo/cáscara) que presentan las siguientes ventajas: (a) estabilidad de la dispersión coloidal al evitar interacciones entre partículas y la consiguiente aglomeración, (b) biocompatibilidad, (c) facilidad para la funcionalización del recubrimiento de sílica por el acoplamiento con otros compuestos, paso necesario para el desarrollo de aplicaciones basadas en estos materiales.

A pesar del potencial inherente como catalizadores que presentan las partículas magnéticas y que derivan de su alta estabilidad, actividad y atractivas características operativas, hasta el momento han sido implementadas en reacciones tales como acetilación,⁴¹⁰ benzoilación,⁴¹¹ epoxidación,⁴¹² sulfoxidación,⁴¹³ acoplamiento cruzado de tipo Suzuki⁴¹⁴⁻⁴¹⁵ ó metátesis de cierre de anillo.⁴¹⁶ Sin embargo, en literatura sólo se ha descrito un proceso de cicloadición de azidas y alquinos basado en el empleo como catalizador de nanopartículas de nitruro de cobre (Cu₃N) soportadas en sílica mesoporosa superparamagnética⁴¹⁷ (Esquema 6.2) en presencia de aminas terciarias.

410. Ó Dálaigh, C.; Corr, Serena A.; Gun'ko, Y.; Connon, Stephen J., A Magnetic-Nanoparticle-Supported 4-N,N-Dialkylaminopyridine Catalyst: Excellent Reactivity Combined with Facile Catalyst Recovery and Recyclability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (23), 4329-4332.

411. Schätz, A.; Grass, R. N.; Kainz, Q.; Stark, W. J.; Reiser, O., Cu(II)-Azabis(oxazoline) Complexes Immobilized on Magnetic Co/C Nanoparticles: Kinetic Resolution of 1,2-Diphenylethane-1,2-diol under Batch and Continuous-Flow Conditions. *Chem. Mater.* **2009**, *22* (2), 305-310.

412. Shylesh, S.; Schweizer, J.; Demeshko, S.; Schünemann, V.; Ernst, S.; Thiel, Werner R., Nanoparticle Supported, Magnetically Recoverable Oxodiperoxo Molybdenum Complexes: Efficient Catalysts for Selective Epoxidation Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (11-12), 1789-1795.

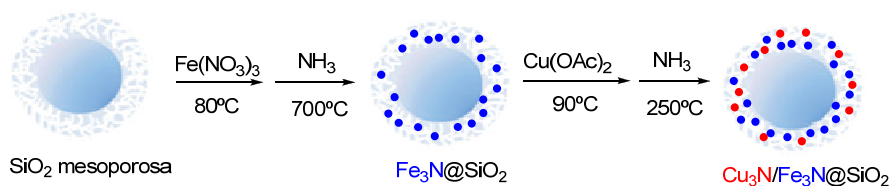
413. Wang, W.; Xu, Y.; Wang, D. I. C.; Li, Z., Recyclable Nanobiocatalyst for Enantioselective Sulfoxidation: Facile Fabrication and High Performance of Chloroperoxidase-Coated Magnetic Nanoparticles with Iron Oxide Core and Polymer Shell. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (36), 12892-12893.

414. Lv, G.; Mai, W.; Jin, R.; Gao, L., Immobilization of Dipyridyl Complex to Magnetic Nanoparticle via Click Chemistry as a Recyclable Catalyst for Suzuki Cross-Coupling Reactions. *Synlett* **2008**, 1418-1422.

415. Rosario-Amorin, D.; Wang, X.; Gaboyard, M.; Clérac, R.; Nlate, S.; Heuzé, K., Dendron-Functionalized Core-Shell Superparamagnetic Nanoparticles: Magnetically Recoverable and Reusable Catalysts for Suzuki C-C Cross-Coupling Reactions. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (46), 12636-12643.

416. Che, C.; Li, W.; Lin, S.; Chen, J.; Zheng, J.; Wu, J.-c.; Zheng, Q.; Zhang, G.; Yang, Z.; Jiang, B., Magnetic nanoparticle-supported Hoveyda-Grubbs catalysts for ring-closing metathesis reactions. *Chem. Comm.* **2009**, (40), 5990-5992.

417. Lee, B. S.; Yi, M.; Chu, S. Y.; Lee, J. Y.; Kwon, H. R.; Lee, K. R.; Kang, D.; Kim, W. S.; Lim, H. B.; Lee, J.; Youn, H.-J.; Chi, D. Y.; Hur, N. H., Copper nitride nanoparticles supported on a superparamagnetic mesoporous microsphere for toxic-free click chemistry. *Chem. Comm.* **2010**, *46* (22), 3935-3937.



Esquema 6.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas empleadas como catalizador “click”

6.3. Procesos “one-pot” en CuAAC

Las reacciones multicomponente,⁴¹⁸ donde tres o más materiales de partida reaccionan para formar un producto que incorpora esencialmente todos los átomos de los reactivos, han adquirido gran importancia debido a su enorme rango de aplicación ya que son altamente convergentes produciendo un aumento de la complejidad molecular en un solo paso.

En este contexto, la ortogonalidad de las cicloadiciones CuAAC hace a estas reacciones especialmente adecuadas para su implementación en procesos “one-pot” multicomponente. En los últimos años se han hecho esfuerzos en esta dirección, desarrollándose procedimientos “one-pot” que generan azidas o alquinos *in situ* para a continuación producir la cicloadición, evitándose así el aislamiento de productos intermedios, opción atractiva en algunos casos debido a los peligros que conlleva la manipulación de ciertas azidas orgánicas. Aunque las azidas orgánicas son generalmente compuestos seguros, las de bajo peso molecular y las poliazidas, con interés para generar estructuras polivalentes, pueden ser inestables⁴¹⁹⁻⁴²⁰ y por consiguiente difíciles de manipular.

Las metodologías “one-pot” para CuAAC pueden clasificarse en función del grupo reactivo empleado para generar la azida orgánica:

➔ Haluros y otros grupos salientes

El primer método para generar *in situ* 1,2,3-triazoles a partir de haluros de alquilo, azida sódica y alquinos terminales fue descrito por Maksikova y col.⁴²¹ en

418. Weber, L., Multi-component reactions and evolutionary chemistry. *Drug Discov. Today* **2002**, *7* (2), 143-147.

419. Scriven, E. F. V.; Turnbull, K., Azides: their preparation and synthetic uses. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (2), 297-368.

420. Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (33), 5188-5240.

421. Maksikova, A. V.; Serebryakova, E. S.; Tikhonova, L. G.; Vereshchagin, L. I., Synthesis of 1-alkyl-4(5)-hydroxymethyl-1,2,3-triazoles. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1980**, *16* (12), 1284-1285.

Capítulo 6

1980, mediante un procedimiento térmico que requería altas temperaturas durante periodos de tiempo prolongados dando lugar a una mezcla de regioisómeros con bajos rendimientos. En el año 2004 y tras la aparición de la catálisis con Cu(I), esta metodología tricomponente se torna eficaz al usarse una combinación de Cu(I), L-prolina y una variedad de haluros aromáticos y alifáticos que permitió la síntesis de 1,2,3-triazoles de forma completamente regioselectiva, sin necesidad de aislar las azidas orgánicas intermedias.⁴²² Posteriormente, se puso también de manifiesto la posibilidad de acelerar estos procesos "one-pot" mediante irradiación con MW⁴²³ o ultrasonidos.⁴²⁴

Desde entonces se han descrito múltiples formas de llevar a cabo estos procesos "one-pot" mediante catálisis homogénea,⁴²⁵⁻⁴²⁶ y sus aplicaciones en la síntesis de neoglicoconjugados,⁴²⁷ trifluorometil pseudopéptidos,⁴²⁸ triazoles marcados con ¹¹C,⁴²⁹ y en la síntesis en continuo mediante reactores de flujo.⁴³⁰ Igualmente, varios catalizadores heterogéneos⁴³¹⁻⁴³³ han demostrado su eficacia en tales procesos, siendo necesario con algunos de ellos la purificación cromatográfica a pesar de emplear cantidades estequiométricas de los reactivos.

422. Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V., One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides. *Org. Lett.* **2004**, *6* (22), 3897-3899.

423. Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E., A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Org. Lett.* **2004**, *6* (23), 4223-4225.

424. Sreedhar, B.; Reddy, P. S., Sonochemical Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles in Aqueous Medium. *Synthetic Comm.* **2007**, *37* (5), 805 - 812.

425. Kacprzak, K., Efficient one-pot synthesis of 1,2,3-triazoles from benzyl and alkyl halides. *Synlett* **2005**, *6*, 943-946.

426. Saha, B.; Sharma, S.; Sawant, D.; Kundu, B., Cu-FeCl₃-mediated one-pot multicomponent reaction leading to N-aryl- and N-alkyltriazoles in water. *Synlett* **2007**, (10), 1591-1594.

427. Chittaboina, S.; Xie, F.; Wang, Q., One-pot synthesis of triazole-linked glycoconjugates. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (13), 2331-2336.

428. Bonnamour, J.; Legros, J.; Crousse, B.; Bonnet-Delpon, D., Synthesis of new trifluoromethyl peptidomimetics with a triazole moiety. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (47), 8360-8362.

429. Schirmacher, R.; Lakhrissi, Y.; Jolly, D.; Goodstein, J.; Lucas, P.; Schirmacher, E., Rapid in situ synthesis of [¹¹C]methyl azide and its application in ¹¹C click-chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (33), 4824-4827.

430. Bogdan, Andrew R.; Sach, Neal W., The Use of Copper Flow Reactor Technology for the Continuous Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (6), 849-854.

431. Sharghi, H.; Khalifeh, R.; Doroodmand, M. M., Copper nanoparticles on charcoal for multicomponent catalytic synthesis of 1,2,3-triazole derivatives from benzyl halides or alkyl halides, terminal alkynes and sodium azide in water as a "green" solvent. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 207.

432. Bénétteau, V.; Olmos, A.; Boningari, T.; Sommer, J.; Pale, P., Zeo-click synthesis: CuI-zeolite-catalyzed one-pot two-step synthesis of triazoles from halides and related compounds. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (28), 3673-3677.

433. Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M., Multicomponent Synthesis of 1,2,3-Triazoles in Water Catalyzed by Copper Nanoparticles on Activated Carbon. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352* (18), 3208-3214.

Cuando los haluros de arilo actúan como material de partida encontramos varias estrategias para lograr la secuencia S_N aromática-CuAAC mediante el empleo de: (a) L-prolina⁴³⁴ para promover la sustitución con azida en yodobenceno^{422, 435-436} (b) *trans*-N-N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina junto con CuI, ascorbato y NaN_3 en el caso de yodo y bromo-aril derivados⁴³⁷ y (c) fluorobencenos activados con grupos nitro en posición *orto* o *para*.⁴³⁸

Otros buenos grupos salientes distintos a los haluros como es el tosilo se han empleado también para llevar a cabo su sustitución nucleofílica en el caso de monotosiliclodextrinas,⁴³⁹ y en α -tosiloxicetonas,⁴⁴⁰ procedimiento que evita la manipulación de α -azidocetonas que a menudo son inestables a la luz y al calor.

➡ Ácidos aril borónicos

Otros productos de partida alternativos a los aril haluros son los aril ácidos borónicos, que en la reacción con azida sódica en presencia de $CuSO_4$ dan el correspondiente azido derivado el cual origina *in situ* el 1,2,3-triazol tras añadir el alquino y ascorbato sódico en un proceso “one-pot”.⁴⁴¹

➡ Aminas

Un método eficaz para generar azidas a partir de amino derivados es la reacción de transferencia de grupo diazo catalizada por metales. Este proceso se ha combinado con la cicloadición con alquinos en procesos “one-pot” empleándose

434. Zhu, W.; Ma, D., Synthesis of aryl azides and vinyl azides via proline-promoted CuI-catalyzed coupling reactions. *Chem. Comm.* **2004**, (7), 888-889.

435. Zhao, Y.-B.; Yan, Z.-Y.; Liang, Y.-M., Efficient synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles in ionic liquid/water system. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (10), 1545-1549.

436. Yan, J.; Wang, L., Synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles by use of copper(I) and amino acids ionic liquid catalytic system. *Synthesis* **2010**, (3), 447-452.

437. Andersen, J.; Bolvig, S.; Liang, X., Efficient one-pot synthesis of 1-aryl 1,2,3-triazoles from aryl halides and terminal alkynes in the presence of sodium azide. *Synlett* **2005**, (19), 2941-2947.

438. Dururgkar, K. A.; Gonnade, R. G.; Ramana, C. V., A Cu(I)-promoted one-pot 'SNAr-click reaction' of fluoronitrobenzenes. *Tetrahedron* **2009**, 65 (20), 3974-3979.

439. Cintas, P.; Martina, K.; Robaldo, B.; Garella, D.; Boffa, L.; Cravotto, G., Improved protocols for microwave-assisted Cu(I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloadditions. *Collect. Czech. Chem. Comm.* **2007**, 72 (8), 1014-1024.

440. Kumar, D.; Reddy, V. B.; Varma, R. S., A facile and regioselective synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles using click chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (18), 2065-2068.

441. Tao, C.-Z.; Cui, X.; Li, J.; Liu, A.-X.; Liu, L.; Guo, Q.-X., Copper-catalyzed synthesis of aryl azides and 1-aryl-1,2,3-triazoles from boronic acids. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (20), 3525-3529.

Capítulo 6

como reactivos de transferencia diazo la trifluorometanosulfonilazida (TfN₃),⁴⁴²⁻⁴⁴³ clorhidrato de imidazol-1-sulfonilazida⁴⁴⁴, nonafluorobutanosulfonilazida⁴⁴⁵ o *tert*-butilnitrito y trimetilsililazida.⁴⁴⁶⁻⁴⁴⁷

➡ Epóxidos o aziridinas

Otra posibilidad atractiva descrita para ejecutar una reacción tándem consiste en la combinación de apertura de aziridinas⁴⁴⁸ o epóxidos mediante azidas inorgánicas y reacción "click" con CuSO₄/ascorbato,⁴⁴⁹ Cu(OAc)₂·H₂O⁴⁵⁰ o CuI.⁴⁴⁸ Esta alternativa tricomponente da lugar a β-hidroxitriazoles aunque tiene el inconveniente de que en epóxidos alifáticos terminales el ataque con azida puede originar uno u otro regioisómero o bien mezclas de ambos, siendo mayoritario el producto de ataque sobre el carbono terminal.

La catálisis heterogénea también se ha empleado de forma eficaz en estos procesos tricomponente con epóxidos.^{400, 433, 451} Con estos catalizadores la apertura del epóxido es regioselectiva no observándose mezclas de productos, a excepción

442. Beckmann, H. S. G.; Wittmann, V., One-Pot Procedure for Diazo Transfer and Azide-Alkyne Cycloaddition: Triazole Linkages from Amines. *Org. Lett.* **2007**, *9* (1), 1-4.

443. Lee, C.-T.; Huang, S.; Lipshutz, Bruce H., Copper-in-Charcoal-Catalyzed, Tandem One-Pot Diazo Transfer-Click Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (18), 3139-3142.

444. Smith, N. M.; Greaves, M. J.; Jewell, R.; Perry, M. W. D.; Stocks, M. J.; Stonehouse, J. P., One-pot, three-component copper-catalyzed 'click' triazole synthesis utilizing the inexpensive, shelf-stable diazotransfer reagent imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Synlett* **2009**, (9), 1391-1394.

445. Suárez, J. R.; Trastoy, B.; Pérez-Ojeda, M. E.; Marín-Barríos, R.; Chiara, J. L., Nonafluorobutanesulfonyl Azide: A Shelf-Stable Diazo Transfer Reagent for the Synthesis of Azides from Primary Amines. *Adv. Synth. Cat.* **2010**, *352* (14-15), 2515-2520.

446. Barral, K.; Moorhouse, A. D.; Moses, J. E., Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: A One-Pot Synthesis of Triazole Linkages. *Org. Lett.* **2007**, *9* (9), 1809-1811.

447. Moorhouse, A. D.; Moses, J. E., Microwave enhancement of a "one-pot" tandem azidation-"click" cycloaddition of anilines. *Synlett* **2008**, (14), 2089-2092.

448. Kumaraswamy, G.; Ankamma, K.; Pitchaiah, A., Tandem Epoxide or Aziridine Ring Opening by Azide/Copper Catalyzed [3+2] Cycloaddition: Efficient Synthesis of 1,2,3-Triazolo β-Hydroxy or β-Tosylamino Functionality Motif. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (25), 9822-9825.

449. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, G. M.; Chary, D. N., Three-component, regioselective, one-pot synthesis of β-hydroxytriazoles from epoxides via click reactions. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (49), 8773-8776.

450. Reddy, K. R.; Maheswari, C. U.; Rajgopal, K.; Kantam, M. L., One-pot sequential synthesis of β-hydroxy-1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles from in-situ generated β-azido alcohol by click chemistry. *Synthetic Comm.* **2008**, *38* (13), 2158-2167.

451. Sharghi, H.; Hosseini-Sarvari, M.; Moeini, F.; Khalifeh, R.; Beni, Alireza S., One-Pot, Three-Component Synthesis of 1-(2-Hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazole Derivatives by Copper-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition of 2-Azido Alcohols and Terminal Alkynes under Mild Conditions in Water. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93* (3), 435-449.

de la catálisis con Cu(I)-zeolitas descrita recientemente.⁴⁵² Para el resto de procesos “one-pot” heterogéneos, partiendo de epóxidos alifáticos se originan los productos de ataque al carbono terminal, mientras que con óxido de estireno como material de partida el regioisómero obtenido varía con los diferentes catalizadores descritos. Adicionalmente, se ha descrito la biocatálisis con Halohidrin dehalogenasa (HheC) para llevar a cabo la azidolisis enantioselectiva de aril epóxidos y seguidamente realizar la cicloadición *in situ* obteniéndose así β -hidroxitriazoles quirales.⁴⁵³

➡ Aceptores Michael

La actuación de la azida como nucleófilo en reacciones de adición Michael ha permitido llevar a cabo procesos “one-pot” que combinan esta reacción con una posterior cicloadición en presencia de un alquino terminal de la azida orgánica generada *in situ*. Como dador Michael se ha descrito la adición de azida sódica a aductos Baylis-Hillman acetilados,⁴⁵⁴ así como la adición de trimetilsililazida a 1,2-diaza-1,3-dienos⁴⁵⁵ para seguidamente reaccionar *in situ* con alquinos mediante catálisis con Cu.

➡ Olefinas

Recientemente se ha descrito en literatura el empleo de un catalizador heterogéneo basado en nanopartículas de Cu sobre carbón activo.⁴³³ Este catalizador, además de ser efectivo en reacciones multicomponente de alquinos con azida sódica y haluros orgánicos, epóxidos, sales de diazonio o anilinas, permite transformar olefinas en triazoles (Esquema 6.4) cuando se emplea

452. Boringari, T.; Olmos, A.; Reddy, B. M.; Sommer, J.; Pale, P., Zeo-Click Chemistry: Copper(I)-Zeolite-Catalyzed Cascade Reaction; One-Pot Epoxide Ring-Opening and Cycloaddition. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 33, 6338-6347.

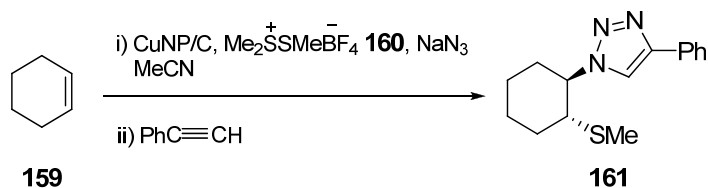
453. Campbell-Verduyn, L. S.; Szymanski, W.; Postema, C. P.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Janssen, D. B.; Feringa, B. L., One pot 'click' reactions: tandem enantioselective biocatalytic epoxide ring opening and [3+2] azide alkyne cycloaddition. *Chem. Comm.* **2010**, 46 (6), 898-900.

454. Chandrasekhar, S.; Basu, D.; Rambabu, C., Three-component coupling of alkynes, Baylis-Hillman adducts and sodium azide. A new synthesis of substituted triazoles. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (18), 3059-3063.

455. Attanasi, O. A.; Favi, G.; Filippone, P.; Mantellini, F.; Moscatelli, G.; Perrulli, F. R., Copper(II)/copper(I)-catalyzed aza-Michael addition/click reaction of *in situ* generated α -azidohydrazone: synthesis of novel pyrazolone-triazole framework. *Org. Lett.* **2010**, 12 (3), 468-471.

Capítulo 6

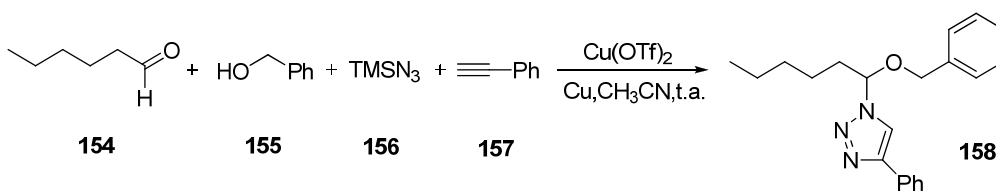
tetrafluoroborato de dimetil(metilthio)sulfonio **160** (DMTSF), azida sódica y un alquino, a través de un proceso de azasulfenilación descrito previamente,⁴⁵⁶ y posterior reacción CuAAC.



Esquema 6.4

➡ Hemiacetales

Finalmente, la síntesis de α -alcoxitriazoles se ha abordado mediante reacción “one-pot” multicomponente de un aldehído (**154**), un alcohol (**155**), trimetilsilazida (**156**) y un alquino terminal (**157**) en un proceso catalizado por Cu(0) y triflato de Cu(II) que produce la formación del acetal, azidación y reacción “click” de forma sucesiva para obtener el compuesto **158**.⁴⁵⁷



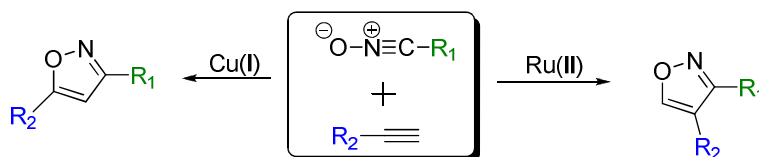
Esquema 6.3. Síntesis de α -alcoxitriazoles

456. Trost, B. M.; Shibata, T., Nucleophilic attack on olefins initiated by dimethyl(methylthio)sulfonium fluoroborate (DMTSF). Azasulfenylation. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (11), 3225-3228.

457. Yadav, J. S.; Subba Reddy, B. V.; Madhusudhan Reddy, G.; Rehana Anjum, S., Cu(OTf)₂/Cu-catalyzed four-component reaction: a facile synthesis of α -alkoxytriazoles via click chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (44), 6029-6031.

6.4. Cicloadición de alquinos y N-óxidos de nitrilo

Los óxidos de nitrilo, al igual que las azidas, pueden ejercer de 1,3-dipolos frente a alquinos que actúen como dipolarófilos dando lugar a isoxazoles en una reacción considerada también como un proceso “click” (Esquema 6.5). En general, aunque la cicloadición entre óxidos de nitrilo y alquinos terminales puede transcurrir sin catalizador, los largos tiempos de reacción y la baja regioselectividad han limitado su uso. La catálisis con Cu(I) desarrollada en el grupo de Sharpless^{372, 458} origina en esta reacción el isoxazol 3,5-disustituido como único regioisómero, aumentando los rendimientos y disminuyendo considerablemente los tiempos de reacción. Alternativamente, se ha descrito la posibilidad de invertir la regioselectividad y obtener exclusivamente el isoxazol 3,4-disustituido mediante la catálisis con Ru(II).⁴⁵⁹



Esquema 6.5. Cicloadición de alquinos y óxidos de nitrilo para obtener isoxazoles

Ejemplos más recientes contradicen la necesidad del empleo de Cu(I) en la síntesis de oligonucleótidos modificados,⁴⁶⁰ glicoconjugados con esteroides⁴⁶¹ así como en polimerizaciones⁴⁶² o funcionalización posterior de polímeros,⁴⁶³⁻⁴⁶⁴

458. Hansen, T. V.; Wu, P.; Fokin, V. V., One-Pot Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazoles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (19), 7761-7764.

459. Grecian, S.; Fokin, V., Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Nitrile Oxides and Alkynes: Practical Synthesis of Isoxazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (43), 8285-8287.

460. Singh, I.; Vyle, J. S.; Heaney, F., Fast, copper-free click chemistry: a convenient solid-phase approach to oligonucleotide conjugation. *Chem. Comm.* **2009**, (22), 3276-3278.

461. Wankhede, K. S.; Vaidya, V. V.; Sarang, P. S.; Salunkhe, M. M.; Trivedi, G. K., Synthesis of novel isoxazole-linked steroidal glycoconjugates--an application of a novel steroidal nitrile oxide. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (13), 2069-2073.

462. Lee, Y.-G.; Koyama, Y.; Yonekawa, M.; Takata, T., New Click Chemistry: Polymerization Based on 1,3-Dipolar Cycloaddition of a Homo Ditopic Nitrile N-Oxide and Transformation of the Resulting Polymers into Reactive Polymers. *Macromolecules* **2009**, *42* (20), 7709-7717.

463. Singh, I.; Zarafshani, Z.; Lutz, J.-F. o.; Heaney, F., Metal-Free “Click” Chemistry: Efficient Polymer Modification via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Nitrile Oxides and Alkynes. *Macromolecules* **2009**, *42* (15), 5411-5413.

464. Singh, I.; Zarafshani, Z.; Heaney, F.; Lutz, J.-F., Orthogonal modification of polymer chain-ends via sequential nitrile oxide-alkyne and azide-alkyne Huisgen cycloadditions. *Polymer Chem.* **2011**, *2* (2), 372-375.

alcanzando casi todas las características de un proceso “click” sin catalizadores metálicos lo que podría originar un nuevo interés por esta reacción de cicloadición.

6.5. Agentes secuestrantes (“scavenger”) de Cu/alquino/azida

A pesar del papel principal que juega el Cu(I) en la cicloadición de azidas y alquinos, el uso de este metal no está exento de inconvenientes, sobre todo en lo relacionado con la contaminación residual en los productos de reacción, que adquiere más relevancia en bioconjugación y en aplicaciones biomédicas dada la toxicidad del Cu. La Agencia Europea de Medicamentos establece para el cobre una exposición diaria máxima permitida de $50 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para administración vía oral y de $5 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para administración vía parenteral.⁴⁶⁵

Con la finalidad de solventar estas limitaciones derivadas de la contaminación por Cu en los productos “click”, se han desarrollado recientemente algunas variantes. La más representativa es la cicloadición de azidas con ciclooctinos altamente tensionados⁴⁶⁶ (Esquema 6.6) en donde se aprovecha dicha tensión como fuerza motora para la formación de triazoles sin necesidad de catálisis en lo que se ha denominado química “click” libre de Cu,⁴⁶⁷ una alternativa destacada sobre todo en procesos de bioconjugación.⁴⁶⁸⁻⁴⁶⁹ Otras reacciones como la adición radicalaria de tioles y alquenos (tiol-eno), o algunos tipos de reacción de Diels-Alder, así como la cicloadición de azidas con alquinos activados se han implementado también como reacciones “click” y son especialmente útiles porque se llevan a cabo en ausencia de catalizadores metálicos.⁴⁷⁰

465. EU Agency. CPMP/SWP/QWP/4446/00 corr. Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts.

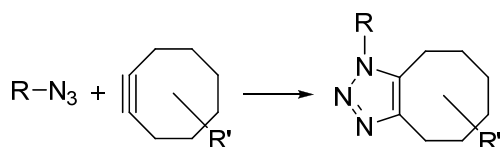
466. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046-15047.

467. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10* (14), 3097-3099.

468. Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R., Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (11-12), 1211-1219.

469. Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272-1279.

470. Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, Ulrich S., Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (27), 4900-4908.



Esquema 6.6. Cicloadición [3+2] de azidas y alquinos libre de Cu

Sin embargo, a pesar de los avances comentados es previsible que la versión catalizada con Cu(I) se mantenga como una de las reacciones “click” más utilizadas gracias al fácil acceso a los bloques reactivos.⁴⁷¹

Por otro lado, el desarrollo de catalizadores heterogéneos aparece como una opción muy interesante para obtener productos sin contaminación metálica por sus características innatas. En este aspecto el único inconveniente que puede presentar este tipo de catalizadores es un alto nivel de “leaching” o lixiviación, que determina el paso a la disolución de parte del cobre presente en el catalizador heterogéneo. Diversas mejoras se han llevado a cabo para superar este problema. Así, la introducción de una etapa posterior al acoplamiento “click” consistente en el tratamiento con un agente secuestrante de cobre ha demostrado ser una mejora eficaz en reacciones CuAAC llevadas a cabo en reactores en flujo continuo, mediante la aplicación de resinas comerciales (Quadrapure™ QP-TU) funcionalizadas con tiourea^{387, 430, 472-474} o carbón activado⁴⁷⁴ (Norit tipo A). Se aprovecha de esta manera la capacidad de complejación del azufre y la alta capacidad de adsorción que muestran, respectivamente, estos soportes para eliminar las impurezas de cobre. Por otro lado, un simple lavado con EDTA tras la reacción en continuo ha demostrado ser casi tan efectivo como el tratamiento con la resina QP-TU gracias a las excelentes propiedades como agente complejante de metales de esta sustancia.⁴⁷⁴

471. Lutz, J.-F., Copper-Free Azide-Alkyne Cycloadditions: New Insights and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2182-2184.

472. Smith, C. D.; Baxendale, I. R.; Tranmer, G. K.; Baumann, M.; Smith, S. C.; Lewthwaite, R. A.; Ley, S. V., Tagged phosphine reagents to assist reaction work-up by phase-switched scavenging using a modular flow reactor. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (10), 1562-1568.

473. Baxendale, I. R.; Ley, S. V.; Mansfield, A. C.; Smith, C. D., Multistep Synthesis Using Modular Flow Reactors: Bestmann-Ohira Reagent for the Formation of Alkynes and Triazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (22), 4017-4021.

474. Fuchs, M.; Goessler, W.; Pilger, C.; Kappe, C. O., Mechanistic Insights into Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions using Continuous Flow Conditions. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352* (2-3), 323-328.

Capítulo 6

En un ámbito relacionado, las resinas poliméricas secuestrantes han encontrado también utilidad para eliminar los excesos estequiométricos usados en ocasiones en las cicloadiciones de azidas y alquinos. Este tipo de materiales conteniendo grupos reactivos que permiten eliminar electrófilos, nucleófilos, ácidos, bases, etc. son en la actualidad una herramienta muy potente para la química sintética.⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁶ En el contexto de la CuAAC se han sintetizado únicamente resinas basadas en poliestireno y funcionalizadas con grupos azido y alquino,⁴⁷⁷ que se han empleado como secuestrantes de reactivos con una funcionalidad complementaria, permitiendo obtener triazoles puros mediante una metodología útil y sencilla con aplicaciones fundamentalmente en la síntesis en paralelo.

En procesos “click” en flujo continuo se ha descrito también el empleo de resinas de poliestireno conteniendo difenilfosfina para la eliminación de los excesos de azidas orgánicas en forma de iminofosforano por reacción de Staudinger.³⁸⁷

475. Eames, J.; Watkinson, M., Polymeric Scavenger Reagents in Organic Synthesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001* (7), 1213-1224.

476. Tzschucke, C. C.; Markert, C.; Bannwarth, W.; Roller, S.; Hebel, A.; Haag, R., Modern Separation Techniques for the Efficient Workup in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (21), 3964-4000.

477. Leeb, L.; Gmeiner, P.; Löber, S., Optimization of Click Chemistry Using Azide and Alkyne Scavenger Resins. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (11-12), 1145-1150.

6.6. “Click” en bioconjugación

La bioconjugación es un área de la ciencia que se encuentra en la interfase de la química y la biología molecular. Las técnicas de bioconjugación implican, generalmente, la unión covalente de una etiqueta a una biomolécula, para conseguir, por ejemplo, la modificación de proteínas o ácidos nucleicos con un fluoróforo, un ligando, un radioisótopo, o una etiqueta de afinidad, o incluso la unión de dos o más proteínas extendiéndose incluso el poder de la bioconjugación al marcaje de biomoléculas *in vivo*.

Las transformaciones químicas empleadas en bioconjugación tienen que satisfacer unos requerimientos específicos que cumplen en gran medida las reacciones de cicloadición azida-alquino: deben ser completamente quimioselectivas, bioortogonales (ni azidas ni alquinos están presentes en sistemas naturales), biocompatibles, rápidas sin necesidad de calentamiento y viables en medios acuosos. Por estos motivos, la reacción “click” es considerada hoy como una herramienta muy potente en bioconjugación.^{357-358, 478-479}

Meldal y col.³⁴⁷ fueron los primeros en poner de manifiesto la potencialidad de las reacciones de CuAAC en bioconjugación cuando aplicaron esta química a la síntesis en fase sólida de péptidotriazoles y comprobaron que la reacción de CuAAC es totalmente compatible con este tipo de química, y con los grupos protectores que en ella se utilizan. Además el anillo de triazol resultante es estable frente a la hidrólisis. A pesar de la simplicidad experimental de la catálisis con CuSO₄/ascorbato, la velocidad de la reacción no es suficiente para la mayoría de aplicaciones y este sistema puede provocar la degradación de proteínas.⁴⁸⁰

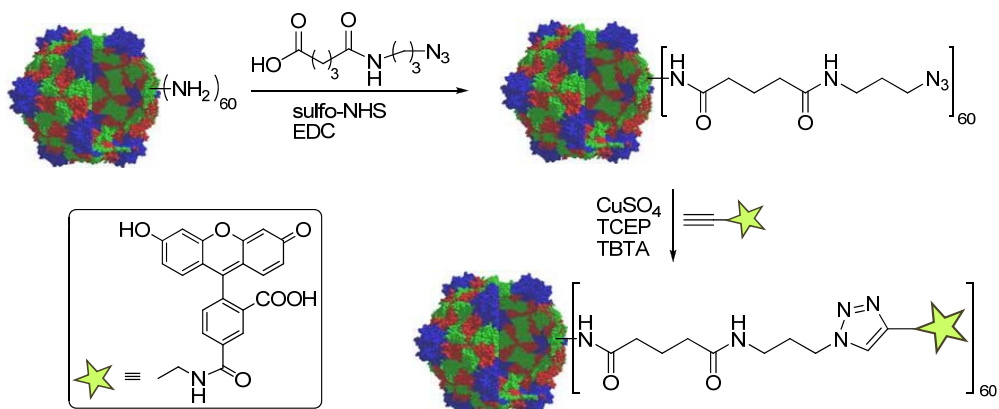
La primera solución desarrollada para solventar estos problemas en bioconjugación consiste en el empleo de ligandos que aceleren dicha reacción, como el TBTA (**146**), el cual demostró su utilidad en el acoplamiento múltiple mediante CuAAC de 60 unidades de fluoresceína a la cápside del virus del mosaico del caupí (CPMV)³⁷³ (Esquema 6.7), previamente funcionalizada con grupos alquino o azida respectivamente. En este caso también quedó patente

478. Breinbauer, R.; Köhn, M., Azide-Alkyne Coupling: A Powerful Reaction for Bioconjugate Chemistry. *ChemBioChem* **2003**, *4* (11), 1147-1149.

479. Best, M. D., Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules. *Biochemistry* **2009**, *48* (28), 6571-6584.

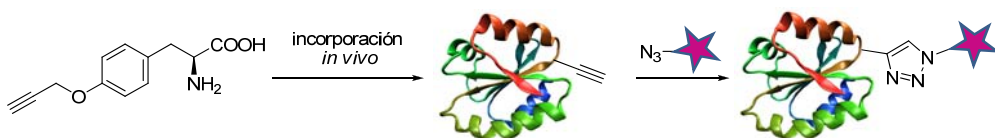
480. Sereikaite, J.; Jachno, J.; Santockyte, R.; Chmielewski, P.; Bumelis, V.-A.; Dienys, G., Protein Scission by Metal Ion–Ascorbate System. *Protein J.* **2006**, *25* (6), 369-378.

Capítulo 6



Esquema 6.7. Funcionalización del virus del mosaico del caupí. Sulfo-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida; EDC: N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; TCEP: tris(carboxietil)fosfina; TBTA: tris(benciltriazolilmetil)amina

que reductores como el ascorbato y la *p*-hidroquinona inducen la disociación sustancial de la cápside del virus, siendo necesario el empleo de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) o Cu(0) como reductor junto con CuSO₄. Algo más tarde los mismos autores mejoraron los resultados anteriores empleando como ligando la batofenantrolina **147**, generalizando el método y decorando así la cápside con oligosacáridos, péptidos, polímeros y la proteína transferrina,⁴⁸¹ aunque con el inconveniente de tener que trabajar en atmósfera inerte. Recientemente estos autores han descrito los elementos clave para un proceso optimizado en bioconjugación,⁴⁸² resaltando el ascorbato sódico como reductor, la necesidad de emplear ligandos estabilizadores y aditivos como la aminoguanidina para interceptar subproductos de la oxidación del ascorbato que pueden modificar la proteína, tampones como fosfato, carbonato o HEPES y en cualquier caso evitando el Tris porque puede actuar como ligando para el cobre. Esas condiciones se han aplicado con éxito en el marcaje de células vivas



Esquema 6.8. Combinación de mutagénesis y CuAAC para el marcaje fluorescente de proteínas

481. Gupta, S. S.; Kuzelka, J.; Singh, P.; Lewis, W. G.; Manchester, M.; Finn, M. G., Accelerated Bioorthogonal Conjugation: A Practical Method for the Ligation of Diverse Functional Molecules to a Polyvalent Virus Scaffold. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (6), 1572-1579.

482. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (52), 9879-9883.

con diferentes etiquetas a través de N-azidoacetilmanosamina incorporada a los glicanos presentes en la membrana celular.⁴⁸³

Una opción muy sofisticada para introducir los grupos alquino o azida en la biomolécula es la propuesta por Schultz y col.⁴⁸⁴ que incorporaron *in vivo* aminoácidos no naturales con estas funciones en posiciones específicas de una proteína mediante mutagénesis dirigida para después llevar a cabo el marcaje fluorescente mediante CuAAC (Esquema 6.8).

Las reacciones de CuAAC se han aplicado exitosamente a numerosas entidades biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y células, consiguiéndose así, por ejemplo, biotinar la superficie celular de *E. coli* mediante CuAAC,⁴⁸⁵ funcionalizar el virus del mosaico del tabaco (TMV)⁴⁸⁶ con péptidos y etiquetas fluorescentes, preparar heterodímeros lipasa-BSA,⁴⁸⁷ híbridos de lipasa y nanopartículas de oro,⁴⁸⁸ interconectar virus del mosaico amarillo del nabo (TuYMV) mediante dialquinos actuando éstos como agentes de entrecruzamiento⁴⁸⁹ y también visualizar *in situ* proteínas sintetizadas que incorporan azidohomoalanina mediante CuAAC con alquinos fluorescentes.⁴⁹⁰

483. Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G., Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21 (10) 1912-1916.

484. Deiters, A.; Cropp, T. A.; Mukherji, M.; Chin, J. W.; Anderson, J. C.; Schultz, P. G., Adding Amino Acids with Novel Reactivity to the Genetic Code of *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (39), 11782-11783.

485. Link, A. J.; Tirrell, D. A., Cell Surface Labeling of *Escherichia coli* via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (37), 11164-11165.

486. Bruckman, M. A.; Kaur, G.; Lee, L. A.; Xie, F.; Sepulveda, J.; Breitenkamp, R.; Zhang, X.; Joralemon, M.; Russell, T. P.; Emrick, T.; Wang, Q., Surface Modification of Tobacco Mosaic Virus with “Click” Chemistry. *ChemBioChem* **2008**, 9 (4), 519-523.

487. Hatzakis, N. S.; Engelkamp, H.; Velonia, K.; Hofkens, J.; Christianen, P. C. M.; Svendsen, A.; Patkar, S. A.; Vind, J.; Maan, J. C.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M., Synthesis and single enzyme activity of a clicked lipase-BSA hetero-dimer. *Chem. Comm.* **2006**, (19), 2012-2014.

488. Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Brust, M., Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17 (6), 1373-1375.

489. Kaur, G.; Zhan, W. H.; Wang, C.; Barnhill, H.; Tian, H.; Wang, Q., Crosslinking of viral nanoparticles with “clickable” fluorescent crosslinkers at the interface. *Sci. China: Chem.* **2010**, 53 (6), 1287-1293.

490. Dieterich, D. C.; Hodas, J. J. L.; Gouzer, G.; Shadrin, I. Y.; Ngo, J. T.; Triller, A.; Tirrell, D. A.; Schuman, E. M., In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat Neurosci* **2010**, 13 (7), 897-905.

Por otro lado, en el campo de las ciencias *ómicas*, la quimiogenómica⁴⁹¹ es una de las más recientes. En ella se usan pequeñas moléculas (generalmente de síntesis química) para que se unan *in vivo* específicamente y generalmente de manera irreversible a determinados genes o a sus productos, habitualmente proteínas, para poder identificar y analizar de manera masiva la estructura, funcionalidad y localización de biomoléculas en su entorno celular y/o tisular. La técnica de identificación de proteínas a través de su actividad ABPP (*Activity-Based Protein Profiling*) comentada en el primer capítulo emplea sondas que contienen dos elementos clave: un grupo reactivo (GR) para la unión covalente y específica al sitio activo del enzima y una etiqueta (Et), como biotina o un fluoróforo, para detectar o aislar la enzima marcada. Esta técnica requiere la homogeneización celular antes de llevar a cabo el análisis, lo que implica una gran pérdida de información. Una posible solución a este problema sería la realización de este tipo de análisis *in vivo*, sin embargo, las sondas suelen tener un tamaño demasiado grande lo que limita su permeabilidad y distribución celular. Cravatt y col.⁴⁹²⁻⁴⁹³ han propuesto una alternativa a este problema mediante el empleo de reactivos de pequeño tamaño permeables a la célula y derivatizados con grupos azida, lo que permite su posterior etiquetado *in vitro* mediante reacciones de CuAAC con etiquetas funcionalizadas con grupos alquino (Esquema 6.9).

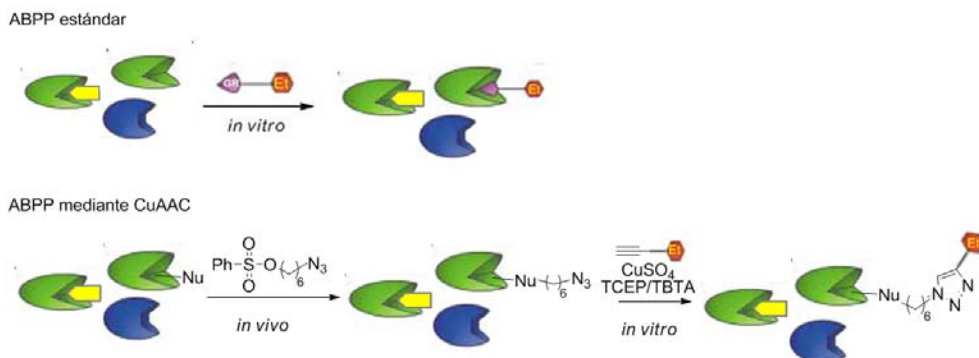
Así, marcaron con azida varias enzimas mediante un éster fenilsulfonato tanto *in vivo* como en un homogeneizado tisular efectuando después la conjugación con alquino-rodamina *in vitro* utilizando CuSO₄/TCEP/TBTA para poder visualizar mediante electroforesis o fluorescencia las proteínas separadas y marcadas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la potencialidad de las reacciones de CuAAC para llevar a cabo experimentos de ABPP en células vivas y en organismos.⁴⁹⁴

491. Dobson, C. M., Chemical space and biology. *Nature* **2004**, 432 (7019), 824-828.

492. Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F., Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (16), 4686-4687.

493. Speers, A. E.; Cravatt, B. F., Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods. *Chem. Biol.* **2004**, 11 (4), 535-546.

494. Salisbury, C. M.; Cravatt, B. F., Click Chemistry-Led Advances in High Content Functional Proteomics. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26 (11-12), 1229-1238.



Esquema 6.9. Comparación entre estándar y “click” ABPP

Por último, hay que hacer mención a las modificaciones en el DNA mediante “click-chemistry”, área de enorme importancia ya que en una gran variedad de aplicaciones, tales como diagnóstico molecular o preparación de nanomateriales basados en DNA, estas macromoléculas necesitan ser marcadas, generalmente de forma fluorescente. Para ello existen dos estrategias generales denominadas presintética y postsintética, dependiendo respectivamente de si se marcan los monómeros antes de sintetizar el DNA o si se hace un etiquetado posterior.

El primer ejemplo de oligonucleótidos funcionalizados con un fluoróforo a través de reacciones de cicloadición de azidas y alquinos se debe al grupo de Ju,⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁶ quienes hicieron uso de la reacción térmica en lugar de catalizada debido al efecto de degradación del DNA producido por el Cu(I).⁴⁹⁷ Además, la combinación Cu(II)/ascorbato también produce habitualmente la rotura de las hebras de DNA,⁴⁹⁸⁻⁴⁹⁹ circunstancias que han retrasado la aplicación de la química “click” para la modificación de polinucleótidos. El empleo del ligando estabilizador TBTA **146** ha sido otra de las aproximaciones utilizadas para evitar

495. Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J., Click Chemistry to Construct Fluorescent Oligonucleotides for DNA Sequencing. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (2), 609-612.

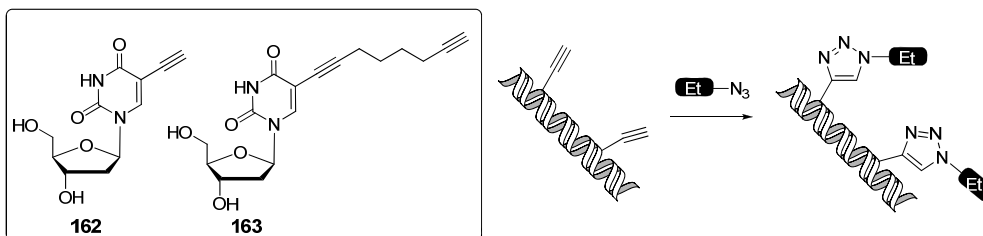
496. Li, Z.; Seo, T. S.; Ju, J., 1,3-Dipolar cycloaddition of azides with electron-deficient alkynes under mild condition in water. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (15), 3143-3146.

497. Kanan, M. W.; Rozenman, M. M.; Sakurai, K.; Snyder, T. M.; Liu, D. R., Reaction discovery enabled by DNA-templated synthesis and in vitro selection. *Nature* **2004**, *431* (7008), 545-549.

498. Burrows, C. J.; Muller, J. G., Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (3), 1109-1152.

499. Liu, P.-Y.; Jiang, N.; Zhang, J.; Wei, X.; Lin, H.-H.; Yu, X.-Q., The Oxidative Damage of Plasmid DNA by Ascorbic Acid Derivatives in vitro: The First Research on the Relationship between the Structure of Ascorbic Acid and the Oxidative Damage of Plasmid DNA. *Chemistry & Biodiversity* **2006**, *3* (9), 958-966.

dicha degradación, y así la reacción CuAAC se ha utilizado para funcionalizar cadenas de DNA sintetizadas mediante métodos estándar incorporando nucleósidos de uridina modificada con grupos alquino terminal (**162** y **163**), produciendo después el acoplamiento con diferentes etiquetas (Et) (azúcares, fluoresceína y cumarina) conteniendo azida.⁵⁰⁰⁻⁵⁰¹



Esquema 6.10. Nucleósidos derivados de uridina en la funcionalización de DNA mediante CuAAC

Otras aplicaciones descritas de la CuAAC en DNA han permitido llevar a cabo su inmovilización en superficies, la obtención de conjugados proteína-DNA y el marcaje secuencial entre otras.⁵⁰²⁻⁵⁰³

500. Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T., Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* **2006**, *8* (17), 3639-3642.

501. Burley, G. A.; Gierlich, J.; Mofid, M. R.; Nir, H.; Tal, S.; Eichen, Y.; Carell, T., Directed DNA Metallization. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (5), 1398-1399.

502. Gramlich, P.; Wirges, C.; Manetto, A.; Carell, T., Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (44), 8350-8358.

503. Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F., Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (9), 4207-4220.

6.7. Discusión y resultados

Considerando la importancia actual de la química “click” y en particular de la reacción CuAAC, pretendemos sintetizar nuevos materiales versátiles basados en soportes inorgánicos como la sílica y ligandos nitrogenados (SiL_m) con alta capacidad quelante para el Cu(I), que permitan desarrollar un protocolo para llevar a cabo esta reacción de forma sencilla, y poder obtener productos “click” con altos rendimientos, sin contaminación de Cu y sin purificación cromatográfica, protocolo que puede enmarcarse dentro de lo que hoy se conoce como *Química verde*. Unos materiales híbridos de tales características conceptualmente pueden ser utilizados de forma dual en reacciones CuAAC: como catalizadores heterogéneos cuando estén en su forma complejada con Cu(I) y como agentes secuestrantes de dicho metal cuando se encuentren en su forma no complejada (Figura 6.2).

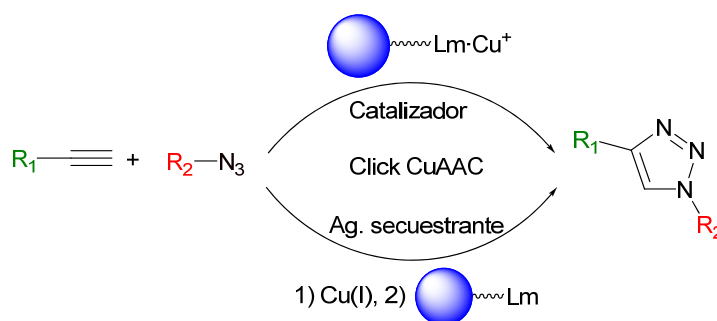


Figura 6.2. Actuación de nuevos materiales adsorbentes con ligandos nitrogenados en CuAAC

6.7.1. Síntesis de materiales adsorbentes con ligandos nitrogenados

Para llevar a cabo la síntesis de materiales híbridos con alta capacidad quelante de Cu(I), seleccionamos los ligandos bidentados o tridentados 2-picolilamina **164** (PMA, 2-piridilmetilamina), histamina **165** (His), bis-2-picolilamina **166** (BPMA, 2,2'-bis(piridilmetil)amina) y 2,2'-bispiridilamina **167** (BPA), dentro del

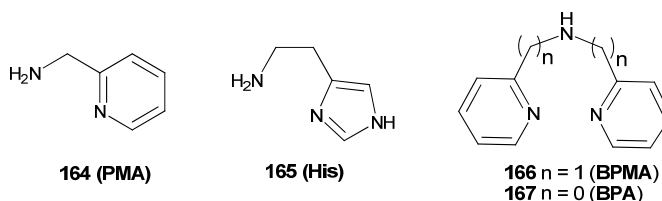


Figura 6.3. Ligandos nitrogenados empleados en la preparación de materiales adsorbentes

Capítulo 6

amplio rango de ligandos nitrogenados disponibles, en base a su documentada alta afinidad tanto por Cu(I) como por Cu(II)⁵⁰⁴⁻⁵⁰⁶ y al efecto de aceleración que ejercen en la cinética de la reacción CuAAC.³⁷⁴ Igualmente se considera su accesibilidad ya que se trata de compuestos disponibles comercialmente.

Por otro lado, seleccionamos la sílica como soporte para la inmovilización covalente de estos ligandos debido a las ventajosas propiedades que ofrece este material para la preparación de materiales híbridos⁵⁰⁷: excelentes propiedades mecánicas, estabilidad química y térmica, alta área superficial y porosidad y fácil derivatización.

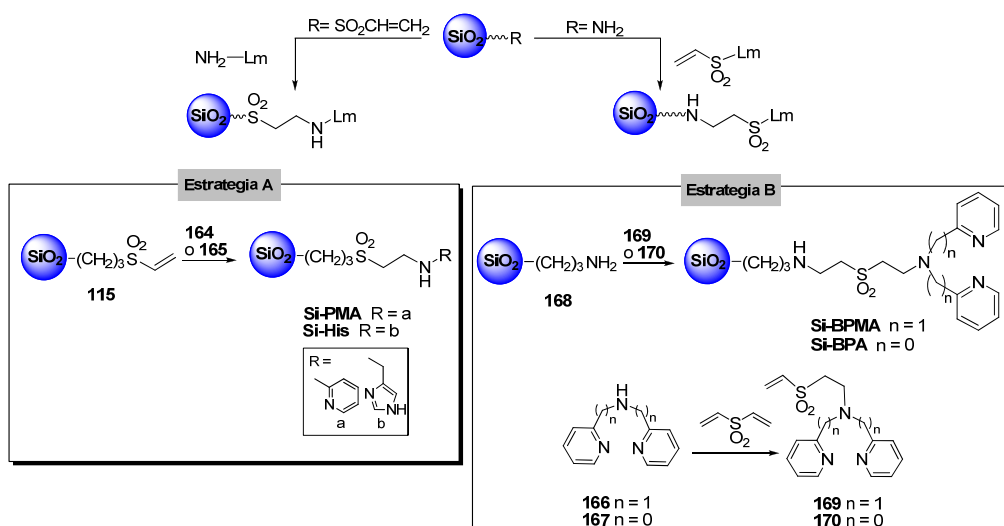
La inmovilización covalente de los ligandos sobre la superficie de la sílica se lleva a cabo mediante la adición de tipo aza-Michael de aminas a vinilsulfonas, dentro del marco de la presente Tesis Doctoral, siguiendo dos estrategias distintas (Esquema 6.11). En la primera (Estrategia A) se parte de la vinil sulfona-sílica **115**, que se hace reaccionar con los amino derivados **164** y **165** para obtener las sílicas funcionalizadas **Si-PMA** y **Si-His**, respectivamente, con buenos rendimientos. De forma alternativa, en la segunda estrategia (Estrategia B) se parte de la sílica funcionalizada con grupos amino **168**, que a través de la conjugación con los compuestos bipyridil vinil sulfona complementarios **169** y **170**, sintetizados previamente por reacción de los amino derivados **166** y **167** con DVS, permiten obtener las sílicas funcionalizadas **Si-BPMA** y **Si-BPA**, en ese orden y con buenos rendimientos.

504. Pintauer, T.; Matyjaszewski, K., Structural aspects of copper catalyzed atom transfer radical polymerization. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (11-12), 1155-1184.

505. Pyrka, G. J.; Seeney, R. J.; Pinkerton, A. A., Structure of bis(di-2-pyridylamine)copper(I) chloride. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1991**, 510-513.

506. Qian, J.; Tian, J.-L.; Feng, L.; Gu, W.; Zhao, X.-J.; Yan, S.-P., Syntheses, structures, and spectroscopic properties of binuclear copper(II) complexes containing N,N-bis(2-pyridylmethyl)amine ligands. *J. Coord. Chem.* **2009**, *62* (20), 3276-3283.

507. Pagliaro, M., Silica-Based Materials for Advanced Chemical Applications. *Royal Society of Chemistry. Cambridge* **2009**. 192 pp.



Esquema 6.11. Estrategias para la obtención de sílicas funcionalizadas con ligandos quelantes

Teniendo en cuenta que el grupo bis-2-picolilamina también está presente en la resina comercial Dowex M-4195 (Figura 6.4), incluimos ésta (**Dw-BPMA**) entre nuestros materiales con capacidad quelante de Cu(I). De hecho, la resina Dowex M-4195 es una resina macroporosa con matriz de poliestireno-divinilbenceno con capacidad quelante bien documentada⁵⁰⁸ que forma complejos estables con una variedad de cationes de metales de transición, incluyendo Cu(I) y Cu(II) y que ha encontrado aplicaciones comerciales en la eliminación de metales pesados.⁵⁰⁹

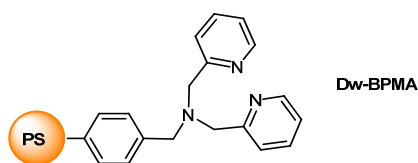


Figura 6.4. Resina Dowex M-4195

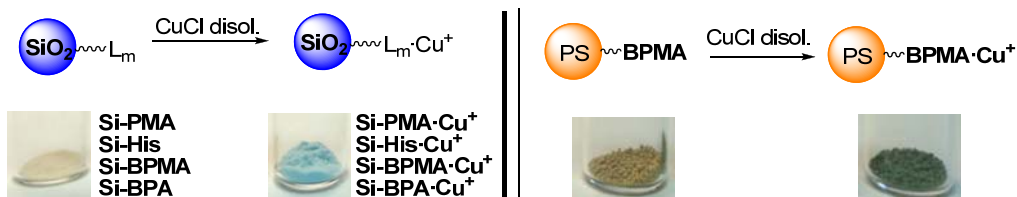
El Cu(I) se soportó en los diferentes adsorbentes de sílica (**Si-L_m**) por simple tratamiento con una disolución comercial de CuCl en agua desoxigenada mediante corriente de argón obteniendo las correspondientes sílicas **Si-L_m·Cu⁺**:

508. Diniz, C. V.; Ciminelli, V. S. T.; Doyle, F. M., The use of the chelating resin Dowex M-4195 in the adsorption of selected heavy metal ions from manganese solutions. *Hydrometallurgy* **2005**, *78* (3-4), 147-155.

509. Dow Water & Process Solutions.
http://www.dowwaterandprocess.com/products/periodic_table/pt_cu.htm.

Capítulo 6

Si-PMA·Cu⁺, **Si-His·Cu⁺**, **Si-BPMA·Cu⁺** y **Si-BPA·Cu⁺** (Esquema 6.12). En el caso de la resina comercial **Dw-BPMA**, se acondiciona previamente mediante lavados intensivos para eliminar posibles residuos orgánicos o inorgánicos en el producto comercial, para después llevar a cabo el mismo tratamiento que en el caso de las sílicas y así obtener la resina con Cu(I) soportado **Dw-BPMA·Cu⁺**. En todos los casos, la carga de Cu en los nuevos materiales se evalúa mediante AAS obteniéndose los siguientes valores: 5.28% para **Si-PMA·Cu⁺**, 10.42% para **Si-His·Cu⁺**, 2.44% para **Si-BPMA·Cu⁺**, 3.24% para **Si-BPA·Cu⁺** y 7.08% para **Dw-BPMA·Cu⁺**.



Esquema 6.12. Preparación y aspecto de los materiales híbridos con Cu(I) soportado

6.7.2. Cu(I) soportado en sílicas (Si-L_m·Cu⁺) y Dw-BPMA·Cu⁺ como catalizadores heterogéneos en CuAAC

Para evaluar la capacidad catalítica en reacciones CuAAC de los nuevos materiales conteniendo Cu(I), seleccionamos una variedad de compuestos con alquinos (**171-182**) y azidas (**183-190**) que comprenden derivados alifáticos, aromáticos, mono- y multifuncionales, así como moléculas de interés biológico tales como azúcares o biotina (Figura 6.5).

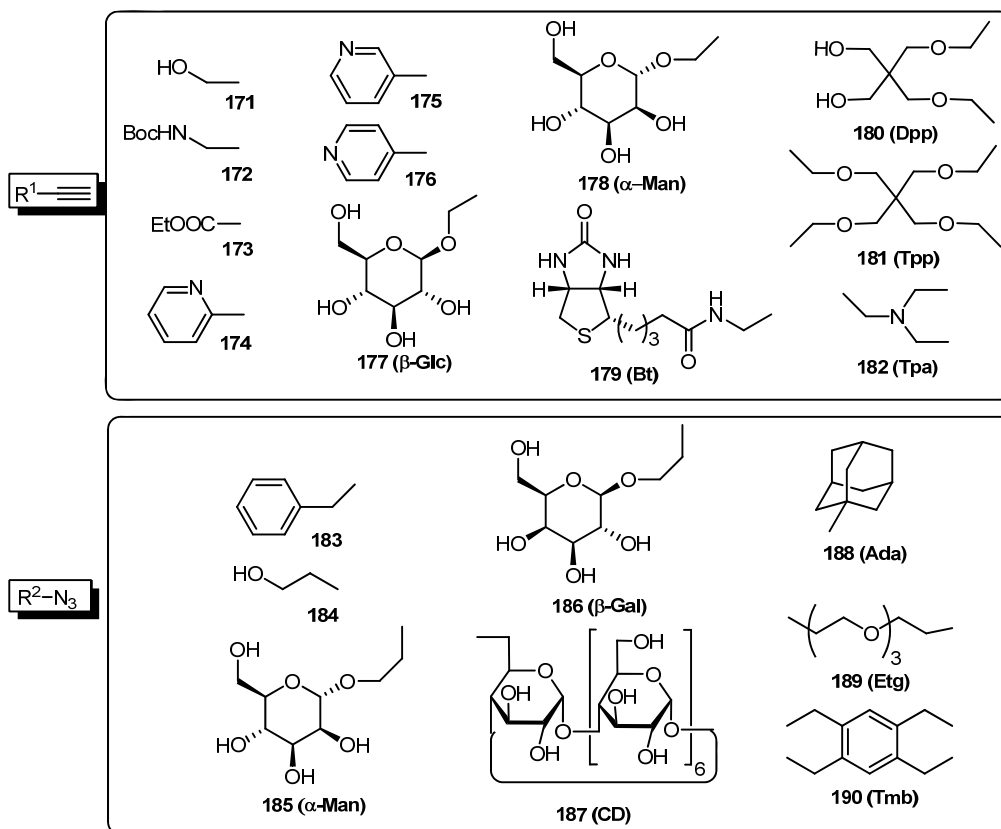


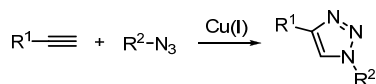
Figura 6.5. Alquinos y azidas empleados en las reacciones CuAAC


Las reacciones se llevan a cabo bajo un repertorio de condiciones de reacción habitualmente empleadas en CuAAC como son t-BuOH acuoso, DMF o agua como disolvente, e incluso en ausencia de éste cuando las propiedades físicas de los reactivos permiten su mezcla directa, como es el caso de los compuestos líquidos alcohol propargílico **171** y bencilazida **183**. Se trabaja en todos los casos en condiciones aeróbicas, a temperatura ambiente o preferiblemente usando irradiación de MW, que permite reducir considerablemente los tiempos de reacción “click”.⁵¹⁰⁻⁵¹¹ Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 6.1-6.3.

510. Appukkuttan, P.; Mehta, V. P.; Eycken, E. V. V. d., Microwave-assisted cycloaddition reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (5), 1467-1477.

511. Kappe, C. O.; Eycken, E. V. d., Click chemistry under non-classical reaction conditions. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (4), 1280-1290.

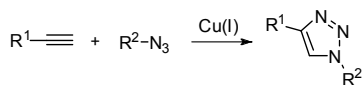
Tabla 6.1. CuAAC usando **Si-PMA·Cu⁺** y **Si-His·Cu⁺** como catalizadores heterogéneos.



	R ¹ Alquino	R ² Azida	Cond. ^[a]	Catalizador ^[b]	Tiempo	Prod. ^[c]
1	CH ₂ OH 171	CH ₂ Ph 183	A	Si-PMA·Cu⁺ (30)	45 min	191 (95)
2	CH ₂ NHBoc 172	CH ₂ Ph 183	A	Si-PMA·Cu⁺ (40)	90 min	194 (100)
3	 176	CH ₂ Ph 183	A	Si-PMA·Cu⁺ (25)	30 min	202 (85)
4	CH ₂ OH 171	CH ₂ Ph 183	A	Si-His·Cu⁺ (30)	45 min	191 (90)
5	COOEt 173	(CH ₂) ₂ OH 184	A	Si-His·Cu⁺ (20)	60 min	198 (94)
6	N(CH ₂) ₃ 182	CH ₂ Ph 183	B	Si-His·Cu⁺ (60)	10 min	146 (87)
7	β-Glc 177	α-Man 185	C	Si-His·Cu⁺ (50)	45 min	204 (100)

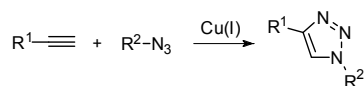
[a] Condiciones: Cantidades equimoleculares de alquino y azida (1 mmol) y **A**: t-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **B**: t-BuOH:H₂O (10:1, 0,6 mL), MW; **C**: H₂O (10 mL), MW. [b] mg catalizador/mmol reactivo. [c] Producto (Rendimiento %).






Tabla 6.2 CuAAC usando **Si-BPMA·Cu⁺** y **Dw-BPMA·Cu⁺** como catalizadores heterogéneos.



	R ¹ Alquino	R ² Azida	Cond. ^[a]	Catalizador ^[b]	Tiempo	Prod. ^[c]
1	CH ₂ OH 171	CH ₂ Ph 183	A	Si-BPMA·Cu⁺ (10)	3h	191 (96)
2	CH ₂ OH 171	CH ₂ Ph 183	B	Si-BPMA·Cu⁺ (20)	20 min	191 (96)
3	CH ₂ NHBoc 172	CH ₂ Ph 183	B	Si-BPMA·Cu⁺ (20)	40 min	194 (92)
4	CH ₂ OH 171	β-Gal 186	B	Si-BPMA·Cu⁺ (70)	30 min	193 (99)
5	β-Glc 177	α-Man 185	C	Si-BPMA·Cu⁺ (150)	90 min	204 (99)
6	α-Man 178	Tmb 190	D	Si-BPMA·Cu⁺ (150)	15 min	207 (90)
7	Bt 179	Etg 189	D	Si-BPMA·Cu⁺ (150)	15 min	208 (89)
8	CH ₂ OH 171	CH ₂ Ph 183	A	Dw-BPMA·Cu⁺ (20)	24 h	191 (80)
9	CH ₂ OH 171	CH ₂ Ph 183	B	Dw-BPMA·Cu⁺ (50)	40 min	191 (56)
10	CH ₂ NHBoc 172	CH ₂ Ph 183	B	Dw-BPMA·Cu⁺ (50)	40 min	194 (70)

[a] Condiciones: Cantidades equimoleculares de alquino y azida (1 mmol) y **A**: neto, t.a.; **B**: t-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **C**: H₂O (10 mL), MW; **D**: DMF (10 mL), MW; [b] mg catalizador/mmol reactivo; [c] Producto (Rendimiento %).

Tabla 6.3. CuAAC usando Si-BPA·Cu⁺ como catalizador heterogéneo.

	R ¹ Alquino	R ² Azida	Cond. ^[a]	Catalizador ^[b]	Tiempo	Prod. ^[c]
1	CH ₂ OH	171 CH ₂ Ph	183 A	30	24 h	191 (88)
2	CH ₂ OH	171 CH ₂ Ph	183 B	30	1 h	191 (88)
3	CH ₂ OH	171 CH ₂ Ph	183 C	20	15 min	191 (87)
4	CH ₂ OH	171 β-Gal	186 B	70	1h	193 (99)
5	COOEt	173 CH ₂ CH ₂ OH	184 B	20	1 h	198 (100)
6	CH ₂ NHBoc	172 CH ₂ Ph	183 B	55	1 h	194 (100)
7	CH ₂ NHBoc	172 CH ₂ CH ₂ OH	184 B	55	1,5 h	195 (100)
8	CH ₂ NHBoc	172 β-Gal	186 D	20	10 min	196 (98)
9	CH ₂ NHBoc	172 Ada	188 E	20	30 min	197 (100)
10		174 CH ₂ Ph	183 B	50	1h	199 (100)
11		175 CH ₂ CH ₂ OH	184 B	50	1,5 h	201 (89)
12		175 CH ₂ Ph	183 B	40	1 h	200 (83)
13		175 CH ₂ Ph	183 C	5	15 min	200 (91)
14		176 CH ₂ Ph	183 C	10	15 min	202 (97)
15	β-Glc	177 CH ₂ CH ₂ OH	184 B	100	2 h	203 (100)
16	β-Glc	177 β-Gal	186 F	150	1 h	205 (85)
17	Tpp	181 α-Man	185 G	30	30 min	211 (85)

[a] Cantidades equimoleculares de alquino y azida (1 mmol) y **A**: t-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), t.a.; **B**: t-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **C**: neto, MW; **D**: t-BuOH:H₂O (10:1, 1.90 mL), MW; **E**: t-BuOH:H₂O (10:1, 0.6 mL), MW; **F**: H₂O, MW; **G**: DMF, MW; [b] mg catalizador/mmol reactivo; [c] Producto (Rendimiento %).

Del análisis conjunto de estos resultados se puede concluir que todas las sílicas preparadas con Cu(I) soportado Si-L_m·Cu⁺ se comportan como eficientes catalizadores heterogéneos en las reacciones CuAAC ya que se obtienen los correspondientes 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos (Figura 6.6), algunos de ellos descritos por primera vez en esta tesis, con muy buenos rendimientos, utilizando cantidades estrictamente estequiométricas de los reactivos, sin necesidad de aditivo alguno y en todos los casos como único regioisómero, como lo demuestran

Capítulo 6

los datos de RMN ya que el H-5 en triazoles 1,4-disustituidos resuena siempre a campo más bajo en relación al H-4 en triazoles 1,5-disustituidos.³⁴⁷ Se observa también que la capacidad catalítica es independiente de la naturaleza química del ligando quelante ya que todas las sílicas presentan un comportamiento similar, dando resultados análogos cuando se emplean los mismos productos de partida como lo ilustra la reacción modelo entre el alcohol propargílico (**171**) y la bencilazida (**183**), donde el correspondiente triazol **191** se obtiene con rendimientos que van del 88 al 96% (Tabla 6.1 -entrada 1 y 4-, Tabla 6.2 -entrada 2- y Tabla 6.3 -entrada 2-). Por otro lado, la eficacia catalítica de estos materiales es similar en todos los disolventes ensayados, y cabe destacar la posibilidad de emplear agua como disolvente en un proceso que es por tanto respetuoso con el medio ambiente y que no requiere excluir el oxígeno del medio de reacción. Además la cantidad de disolvente se puede reducir a mínimos sin que esto implique un aumento de los tiempos de reacción o un menor rendimiento, ocurriendo incluso lo contrario como se pone de manifiesto en el caso del catalizador **Si-His·Cu⁺** (Tabla 6.1, entrada 6) o **Si-BPA·Cu⁺** (Tabla 6.3, entradas 8 y 9). Igualmente, es remarcable la posibilidad de prescindir del disolvente cuando ambos reactivos son líquidos miscibles (Tabla 6.2 entrada 1, Tabla 6.3 entradas 3, 13-14).

Una ventaja importante que deriva de la heterogeneidad de estos materiales en su papel como catalizadores es la simplicidad del procedimiento operativo, ya que en todos los casos los productos de reacción se obtienen por simple filtración del catalizador y evaporación del disolvente sin necesidad de purificación cromatográfica. De esta forma es posible también recuperar el catalizador para volver a utilizarlo en una nueva reacción. De hecho, el reciclaje del catalizador se comprobó para la reacción entre el alquino **171** y la azida **183** catalizada por **Si-BPMA·Cu⁺**, reutilizando el catalizador en 4 ciclos consecutivos sin pérdida considerable de actividad (rendimientos de 97%, 96%, 97% y 94% para los ciclos sucesivos).

Otros experimentos llevados a cabo corroboran la robustez de estas sílicas con Cu(I) como catalizadores "click". Así se demuestra que son eficaces incluso con sustratos muy impedidos estéricamente como es el caso del azido-adamantano **188**, a partir del cual se obtiene el triazol **197** con rendimiento cuantitativo gracias al empleo de **Si-BPA·Cu⁺** (Tabla 6.3, entrada 9). Además permiten la preparación con muy buenos rendimientos y en una sola etapa de estructuras multivalentes con varios anillos triazólicos (compuestos **146**, **207**, **209**, **210** y **211**) cuando se emplean

azidas o alquinos multifuncionales (**181**, **182**, **189** y **190**) (Tabla 6.1, entrada 6; Tabla 6.2, entradas 6-7; Tabla 6.3, entrada 17).

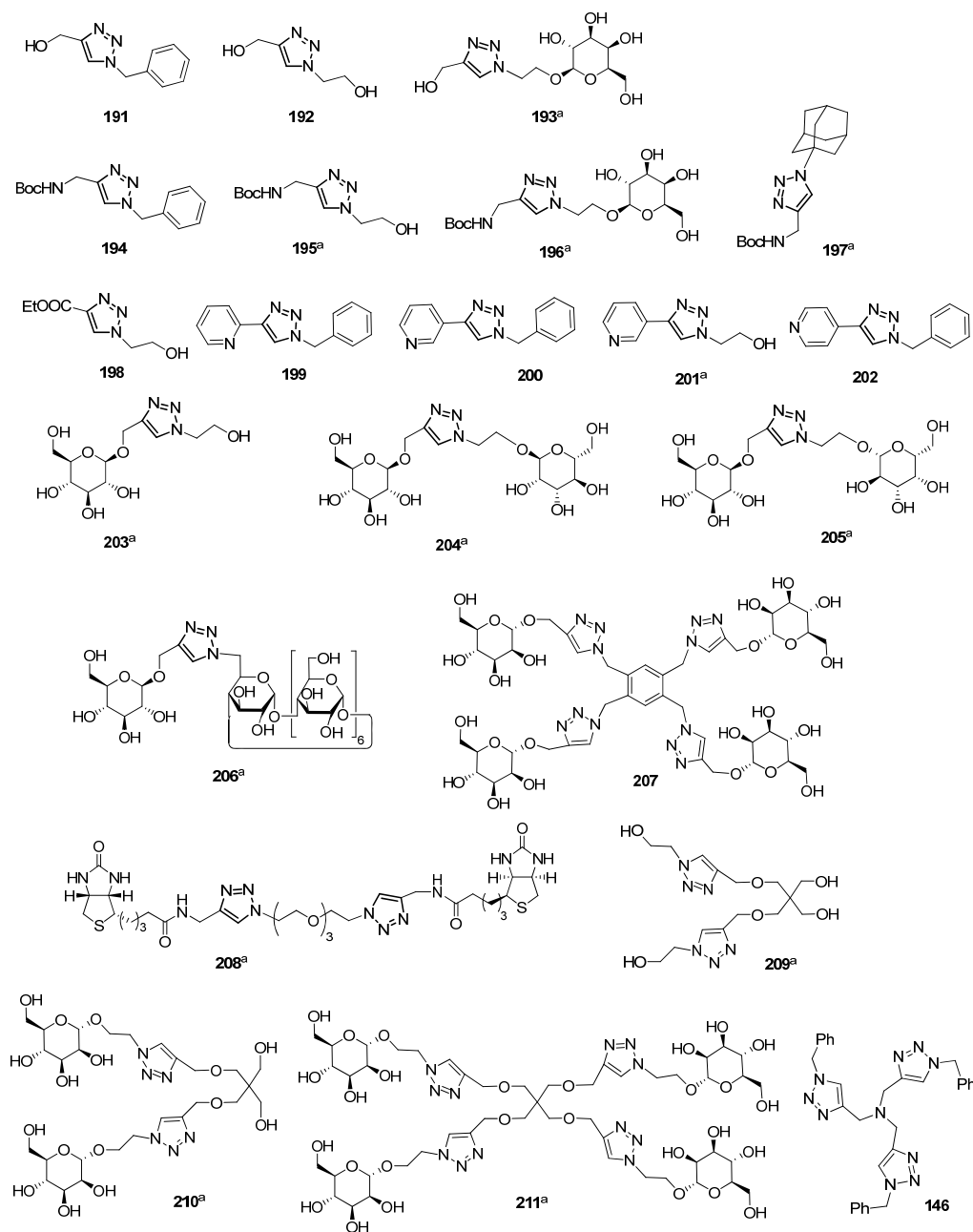


Figura 6.6. 1,2,3-triazoles sintetizados empleando catálisis heterogénea. ^[a]Nuevos compuestos

Capítulo 6

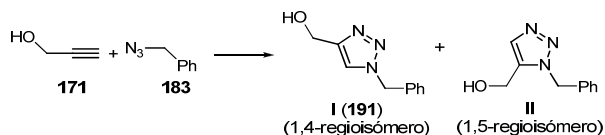
Por otro lado, se hace un estudio para determinar la mínima carga de catalizador requerida que permite mantener la actividad catalítica. Para ello se realiza un descenso progresivo de la cantidad de catalizador añadida a la reacción entre el alquino **171** y la azida **183** en diferentes condiciones (Tabla 6.4).

En disolución, la reacción transcurre con excelentes rendimientos con dosis tan bajas como 2.5 mg de **Si-BPA·Cu⁺** o 1 mg de **Si-His·Cu⁺** por mmol de reactivo (entradas 4 y 6). En estas condiciones extremas se aprecia una leve diferencia entre ambos catalizadores que puede explicarse en base al mayor contenido en Cu de **Si-His·Cu⁺**, que permite disminuir de forma adicional la cantidad de catalizador.

En ausencia de disolvente, tanto a t.a. como con MW, es necesario utilizar una cantidad de catalizador mayor con respecto a las reacciones en disolución para que se dé un proceso totalmente catalizado (Tabla 6.4, entradas 7 y 12). Por debajo de esas dosis mínimas, se aprecia un ligero descenso en el rendimiento a t.a. (entrada 13), mientras que cuando se usa irradiación con MW se detecta la formación del triazol 1,5-disustituido, regioisómero que indica la competencia del proceso térmico con el catalizado. La relación entre los regioisómeros 1,4 y 1,5 aumenta progresivamente al aumentar la cantidad de catalizador desde una mezcla casi equimolecular (1.3:1) en ausencia de catalizador (entrada 11) hasta la completa regioselectividad (1:0) cuando se ponen 20 mg de **Si-BPA·Cu⁺** por mmol de reactivo (entrada 7).

Finalmente, hay que destacar que todos los catalizadores heterogéneos **Si-L_m·Cu⁺** preparados son materiales estables cuya actividad permanece inalterada tras largos periodos de exposición al aire en su almacenaje.

Tabla 6.4. Optimización de la carga de catalizador



Condiciones ^[a]	Catalizador ^[b]	mol % Cu	I:II	Rendimiento (%)
1	Si-BPA·Cu ⁺ (30)	1.53	1:0	96
2	Si-BPA·Cu ⁺ (10)	0.51	1:0	92
3	t-BuOH:H ₂ O	0.25	1:0	99
4	(10:1), MW	0.13	1:0	97
5	Si-BPA·Cu ⁺ (1.0)	0.05	n.r.	-
6	Si-His·Cu ⁺ (1.0)	0.16	1:0	93
7	Si-BPA·Cu ⁺ (20)	1.02	1:0	87
8	Si-BPA·Cu ⁺ (10)	0.51	6.8:1	86
9	Neto, MW	1.64	4:1	89
10	Si-BPA·Cu ⁺ (5)	0.25	2.5:1	94
11	Ninguno	-	1.3:1	83
12	Si-BPA·Cu ⁺ (10)	0.51	1:0	97
13	Neto, t.a.	0.82	1:0	85
14	Ninguno	-	n.r.	-

[a] Condiciones: Cantidades equimoleculares de azida y alquino; [b] mg catalizador/mmol reactivo.

Una vez establecida la capacidad catalítica de las sílicas funcionalizadas en CuAAC se estudia la resina de poliestireno **Dw-BPMA·Cu⁺** al objeto de evaluar los posibles beneficios derivados de su empleo como catalizador “click” en comparación con las sílicas, ya que *a priori* su síntesis es más rápida. La actividad catalítica de este material se pone de manifiesto en las reacciones exitosas de los alquinos **171** y **172** con la bencilazida **183** tanto en disolución como en neto (Tabla 6.2, entradas 8-10). Sin embargo, una comparación detallada de los ensayos con **Dw-BPMA·Cu⁺** y su homólogo de sílica **Si-BPMA·Cu⁺** en lo que respecta a rendimientos y tiempos de reacción con idénticos reactivos de partida (Tabla 6.2, entradas 1-3) revela que el catalizador de poliestireno presenta peores prestaciones ya que se alcanzan menores rendimientos con tiempos de reacción y cantidad de catalizador mayores. Además en el caso de **Dw-BPMA·Cu⁺** se obtienen crudos de reacción de color ligeramente verdoso a pesar del protocolo de acondicionamiento realizado con la resina comercial previo a la inmovilización del Cu(I), que obligan a realizar una etapa adicional de purificación cromatográfica para eliminar esas impurezas de los productos de reacción. Además de esas diferencias en el comportamiento en ambos sistemas catalíticos, hay que destacar el mayor tamaño de partícula de **Dw-BPMA·Cu⁺** con respecto a **Si-BPMA·Cu⁺**, que determina una menor superficie en el catalizador heterogéneo. Por tanto, el análisis conjunto

Capítulo 6

de todos estos resultados permite concluir que el uso como catalizadores “click” de los materiales híbridos basados en sílica es más ventajoso.

Un aspecto muy importante relacionado con los catalizadores heterogéneos es el “leaching” de la especie activa al medio de reacción, crucial en el caso de estas reacciones CuAAC si se pretende disponer de un protocolo que permita obtener de forma sencilla compuestos “click” libres de Cu.

Para evaluar dicho parámetro se determina el contenido en Cu mediante AAS directamente en el crudo de reacción tras el empleo de los catalizadores. En el caso de las sílicas **Si-L_m·Cu⁺** dicho parámetro es prácticamente despreciable (Tabla 6.5), ya que se detectaron muy bajos niveles de Cu residual que suponen sólo entre el 0.4 y 1.9% de la cantidad inicial añadida de Cu, siendo ésta a su vez una cantidad catalítica. Sin embargo, en el caso de la catálisis con la resina **Dw-BPMA·Cu⁺**, el Cu que este catalizador libera a la disolución es mucho mayor (Tabla 6.5, entradas 4-5), originando productos con una contaminación de Cu dos órdenes de magnitud superior a los obtenidos con sílicas, hecho concordante con lo comentado anteriormente en relación al color de los productos obtenidos. Los insignificantes niveles de contaminación de Cu alcanzados con los materiales basados en sílica concuerdan con lo esperado considerando la alta afinidad de los ligandos incorporados a estos materiales híbridos. Además, en estos casos no puede descartarse el documentado papel que debe jugar la matriz de sílica en la adsorción del Cu.⁵¹²⁻⁵¹³

Para comprobar que la actividad catalítica de las sílicas con Cu(I) soportado **Si-L_m·Cu⁺** está directamente relacionada con la presencia de ligandos nitrogenados que complejan y estabilizan el Cu(I) y descartar que ésta se deba a una mera adsorción de Cu(I) directamente sobre la matriz de sílica, se llevan a cabo una serie de ensayos (Esquema 6.13). En primer lugar se prepara un nuevo material (**SiO₂·CuCl**) tratando sílica activada sin ninguna funcionalización con la disolución de CuCl de la misma forma en que se preparan el resto de catalizadores heterogéneos, y con ella se intenta la catálisis de varias reacciones de cicloadición (alquino **171** con azida **183** o **186**). En este caso no se observa la formación de producto alguno .

512. Amara, M.; Bettahar, M.; Gengembre, L.; Olivier, D., Preparation, spectroscopic characterization and stability of silica-supported copper (I) species. *Appl. Catal.* **1987**, *35* (1), 153-168.

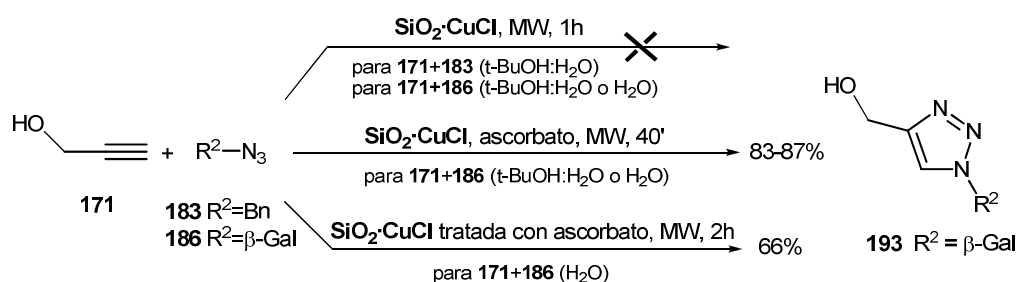
513. Wang, Z.; Liu, Q.; Yu, J.; Wu, T.; Wang, G., Surface structure and catalytic behavior of silica-supported copper catalysts prepared by impregnation and sol-gel methods. *Appl. Catal. Gen.* **2003**, *239* (1-2), 87-94.

Tabla 6.5. Valores de leaching en reacciones CuAAC catalizadas por Cu(I) soportado.

	Alquino	Azida	Cond. ^[a]	Catalizador ^[b]	Leaching		Tabla. Entrada
					% Cu en producto	% Cu liberado del inicial	
1	171	183	A	Si-BPMA·Cu⁺ (10)	$3.6 \cdot 10^{-3}$	1.9	2.1
2	171	183	B	Si-BPMA·Cu⁺ (20)	$1.7 \cdot 10^{-3}$	0.4	2.2
3	177	186	C	Si-BPA·Cu⁺ (150)	$6.2 \cdot 10^{-3}$	0.5	3.16
4	171	183	A	Dw-BPMA·Cu⁺ (20)	$1.5 \cdot 10^{-1}$	15	2.8
5	172	183	B	Dw-BPMA·Cu⁺ (50)	$3.2 \cdot 10^{-1}$	18	2.10
6	171	184	C	Fe₃O₄@Si-BPA·Cu⁺ (10)	$6.9 \cdot 10^{-2}$	7.4	7.1
7	177	184	C	Fe₃O₄@Si-BPA·Cu⁺ (10)	$2.6 \cdot 10^{-2}$	8.9	7.4

[a] Condiciones: Cantidades equimoleculares del alquino (1 mmol) y la azida (1 mmol) y A: neto, t.a.; B: t-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; C: H₂O (10 mL), MW. [b] (mg/mmol reactivo)

Estos resultados son indicativos de la ausencia de Cu(I) en el medio de reacción, sugiriendo una oxidación completa a Cu(II) ya sea en el proceso de impregnación sobre la sílica activada o en las condiciones de reacción empleadas. Para verificar esta hipótesis se añadió al crudo de reacción **SiO₂·CuCl** junto con ascorbato como agente reductor observándose en estas condiciones la formación del producto esperado **193** en la reacción del alquino **171** con la azida **186**, con un rendimiento aceptable aunque menor en comparación al obtenido con el catalizador **Si-BPMA·Cu⁺** que incorpora ligando. Sin embargo, los altos niveles de leaching detectados y que corresponden al 28% del Cu inicial sugieren que el proceso debe transcurrir mediante catálisis homogénea.



Esquema 6.13. Ensayos para comprobar la influencia de la estabilización del Cu(I) con Si-L_m en su actividad catalítica

En un último ensayo, la sílica activada con Cu(I) adsorbido (**SiO₂·CuCl**) se trata con una disolución de ascorbato de forma previa a la reacción “click”, para

Capítulo 6

comprobar si es posible reducir el Cu(II) adsorbido sin que pase a la disolución y mantener así cierta actividad catalítica. En este caso la reacción de los compuestos **171** y **186** indica que hay catálisis con este material aunque el compuesto **193** se obtiene con bajos rendimientos a pesar de aumentar considerablemente el tiempo de reacción.

Por tanto, el conjunto de los ensayos recogidos en el esquema 6.13 indican claramente que los ligandos unidos covalentemente a la matriz de sílica son imprescindibles para mantener una buena actividad catalítica y que actúan no sólo inmovilizando el Cu(I) sino también estabilizan y protegen a este ión metálico frente a la oxidación.

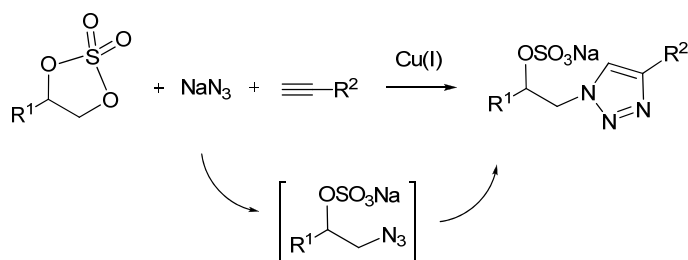
6.7.3. Si-BPA·Cu⁺ como catalizador heterogéneo en reacciones “one-pot” de apertura de sulfatos cíclicos-CuAAC

Como se ha comentado anteriormente (sección 6.3) se han descrito numerosos grupos funcionales para obtener azidas orgánicas que reaccionen *in situ* con alquinos en procesos “one-pot” multicomponente. Hasta la fecha, en alguna ocasión se han utilizado azidas obtenidas a partir de sulfatos cíclicos para llevar a cabo después la reacción “click”.⁵¹⁴⁻⁵¹⁵ Sin embargo, no encontramos antecedentes en bibliografía de la apertura con azida de sulfatos cíclicos en combinación con la CuAAC en un proceso “one-pot”.

Aprovechando las características de las sílicas conteniendo agentes quelantes para soportar Cu(I) como catalizadores heterogéneos en reacciones CuAAC hemos seleccionado uno de ellos (**Si-BPA·Cu⁺**) para desarrollar un procedimiento “one-pot” multicomponente de síntesis de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos partiendo de sulfatos cíclicos, que generen la azida *in situ* por apertura nucleofílica y permitan la posterior cicloadición con el alquino sin necesidad de aislar la azida orgánica intermedia (Esquema 6.14).

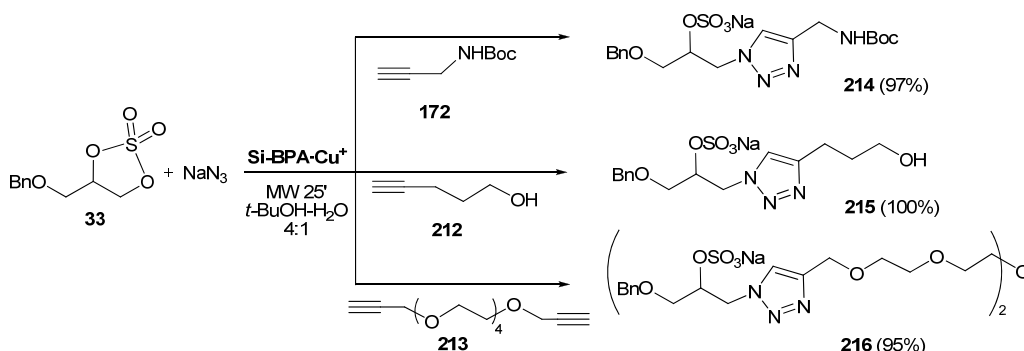
514. Prazeres, V. F. V.; Castedo, L.; González-Bello, C., Stereoselective Synthesis of Novel Cyclic gamma-Amino Acids and Triazole Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (23), 3991-4003.

515. Koroniak, K.; Haufe, G., Stereoselective Synthesis of Fluorinated and Nonfluorinated Triazolo Analogues of Ceramides. *Synthesis* **2010**, *2010* (03), 498-504.



Esquema 6.14. Síntesis de triazoles a partir de sulfatos cíclicos en un proceso “one-pot”

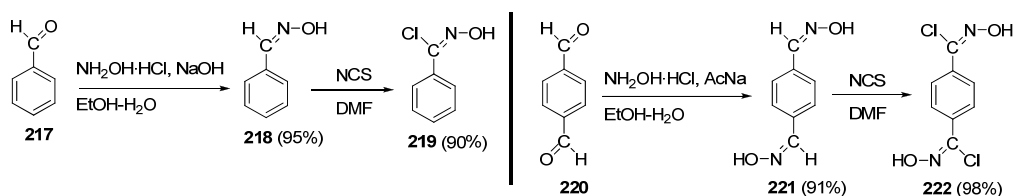
De esta manera, haciendo reaccionar cantidades equimoleculares del sulfato cíclico **33**, azida sódica y los alquinos **172**, **212** ó **213** se obtienen directamente y con excelentes rendimientos los 1,2,3-triazoles **214**, **215** y **216**, respectivamente (Esquema 6.15). El proceso tiene lugar de forma regioselectiva tanto en la apertura nucleofílica del sulfato cíclico, que se produce en la posición terminal o menos sustituida, como en la cicloadición que conduce exclusivamente al 1,4-regioisómero, gracias a un proceso tricomponente catalizado por **Si-BPA-Cu⁺**. El procedimiento además es relevante por la sencillez de la etapa de purificación ya que al trabajar en cantidades estequiométricas y no generarse subproductos sólo es necesario filtrar el catalizador y eliminar el disolvente para obtener el producto puro, sin necesidad de purificación cromatográfica. Además la obtención del compuesto **216** es una muestra de la utilidad de este proceso para la obtención de estructuras multivalentes de forma casi cuantitativa. Todos estos resultados ponen de manifiesto la potencialidad de este proceso “one-pot” con sulfatos cíclicos como materiales de partida.



Esquema 6.15. Síntesis de los compuestos **214-216**

6.7.4. Cicloadiciones 1,3-dipolares entre óxidos de nitrilo y alquinos

El comportamiento de la sílica **Si-BPA-Cu⁺** como catalizador heterogéneo se evalúa también en la cicloadición de alquinos y óxidos de nitrilo, reacciones que según lo descrito en el apartado 6.4 son catalizadas por Cu(I). Debido a la baja estabilidad de los óxidos de nitrilo llevamos a cabo las reacciones de cicloadición generándolos *in situ* mediante halogenación de oximas seguida de deshidrohalogenación. Las oximas seleccionadas se indican en el esquema 6.16, compuestos **218**⁵¹⁶ y **221**⁵¹⁷ que derivan del benzaldehído y del tereftaldehído, respectivamente y que se preparan siguiendo procedimientos descritos en literatura, como se indica en dicho esquema. La formación de los correspondientes cloruros de hidroximoilo³⁷² **219** y **222** tras el tratamiento con NCS se confirma por caracterización espectroscópica de estos compuestos.

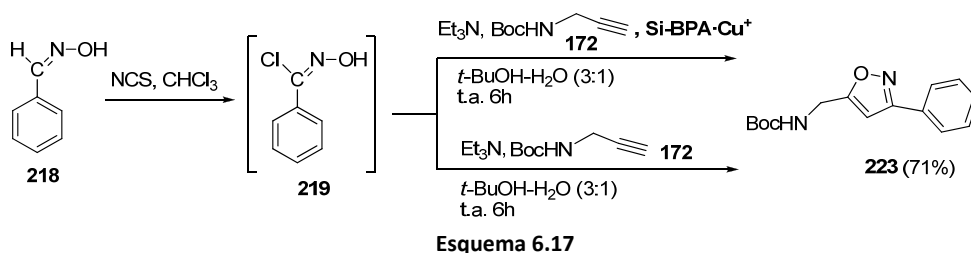


Esquema 6.16. Síntesis de precursores de óxidos de nitrilo

En primer lugar se ensaya la cicloadición del alquino **172** y el óxido de nitrilo generado a partir de la oxima **218** en presencia y ausencia del catalizador heterogéneo **Si-BPA-Cu⁺** (Esquema 6.17) al objeto de evaluar el papel catalítico de este material. Contrariamente a lo que cabría esperar en base al contrastado efecto catalítico del Cu(I), en ambos casos se obtiene el isoxazol **223** de forma regioselectiva, a t.a., con idénticos rendimientos y mismos tiempos de reacción, indicando que el Cu(I) no ejerce un papel catalítico significativo en esta reacción, lo cual concuerda con contribuciones recientes que también contradicen la necesidad de emplear Cu(I) para que la cicloadición proceda de forma regioselectiva, como se indicó en la sección 6.4, hecho que en cierta manera revaloriza este tipo de cicloadiciones por ser procesos libres de catálisis metálica.

516. Kim, B. H.; Jeong, E. J.; Hwang, G. T.; Venkatesan, N., Multiple cycloadditive macrocyclization: an efficient method for crown ether-type cyclophanes, bis-calix[4]arenes and silamacrocycles. *Synthesis* **2001**, (14), 2191-2202.

517. Vereshchagin, L. I.; Petrov, A. V.; Proidakov, A. G.; Pokatilov, F. A.; Smirnov, A. I.; Kizhnyayev, V. N., Polynuclear nonfused tetrazole-, 1,3,4-oxadiazole-, and 1,2,3-triazole-containing systems. *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, 42 (6), 912-917.



Para confirmar la generalidad de este proceso y optimizar las condiciones se realiza un segundo ensayo en el que se parte directamente del cloruro de hidroximoilo **219** que se hace reaccionar con el dialquino **180** obteniéndose el diisoxazol **224** con buenos rendimientos de nuevo en ausencia de catalizador y a t.a. (Esquema 6.18). La finalización y la regioselectividad de la reacción se confirman mediante el espectro de RMN (Figura 6.7), que muestra la desaparición completa de la señales del alquino (^1H : 2.44 ppm; ^{13}C : 79.4 y 74.8 ppm) y la aparición de una única señal en ^1H -RMN a 6.54 ppm correspondiente al H-4 del isoxazol 3,5-disustituido y tres señales en ^{13}C -RMN a 169.3, 162.4 y 101.2 ppm para los carbonos C-5, C-3 y C-4 del isoxazol, respectivamente.

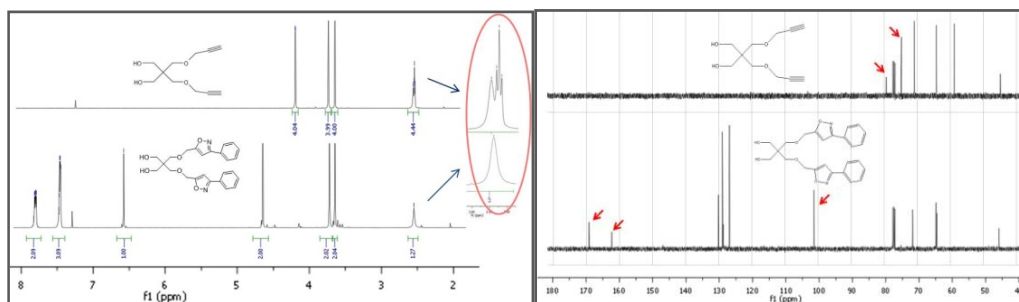
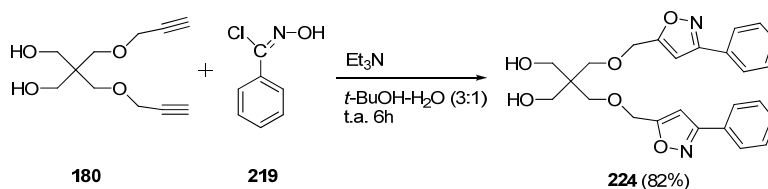


Figura 6.7. Espectros ^1H y ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400MHz) de los compuestos **180** y **224**

Considerando las características estructurales (bivalencia) del cloruro de hidroximoilo **222** y su alta reactividad frente alquinos en condiciones suaves de reacción (temperatura ambiente y ausencia de catalizador) pensamos que las ciclodificaciones con este compuesto podrían explotarse también en la preparación

Capítulo 6

de polímeros por reacción con monómeros conteniendo funciones alquino de estructura adecuada.

Para verificar esta hipótesis se plantean dos alternativas. En la primera de ellas se parte del dialquino **180** derivado del pentaeritritol el cual en la reacción con el precursor del óxido de nitrilo **222**, permite obtener el polímero lineal **225** con buen rendimiento en ausencia de catalizador (Figura 6.8). Este polímero se caracteriza mediante RMN, confirmando la existencia del isoxazol tanto en el espectro ^1H como en el ^{13}C -RMN (Figura 6.8-9). Sin embargo, a t.a. se observa la aparición de señales dobles, que tras aumentar la temperatura a 80°C se ensanchan y se apantallan ligeramente. Se llevan a cabo también cálculos teóricos de Mecánica Molecular realizados con Ghemical (campo de fuerza tripos 5.2) que reflejan la existencia de π -stacking mostrando zonas de apilamiento en la estructura, por lo que tentativamente, podrían ser estas interacciones por π -stacking las responsables de los efectos observados en el espectro de RMN, puesto que como se ha descrito en bibliografía⁵¹⁸ ejercen una influencia importante en el desplazamiento químico de las señales, hecho condicionado también por el tipo de disolvente y la temperatura.

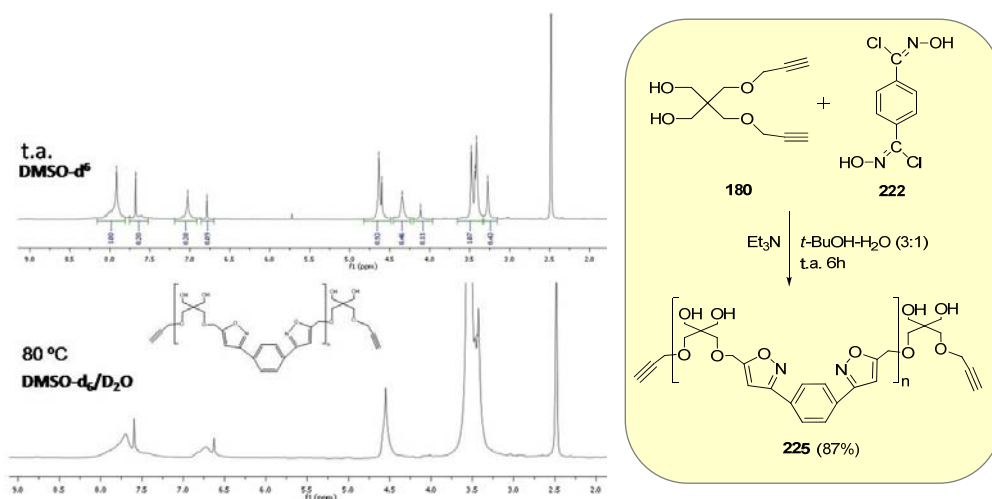


Figura 6.8. Espectro ^1H -RMN y esquema sintético del polímero **225**

518. Rahman, M. H.; Chen, H.-L.; Chen, S.-A.; Chu, P. P. J., ^1H NMR spectroscopic study of the solution structure of a conjugated polymer. *J. Chin. Chem. Soc.* **2010**, *57*, 490-495.

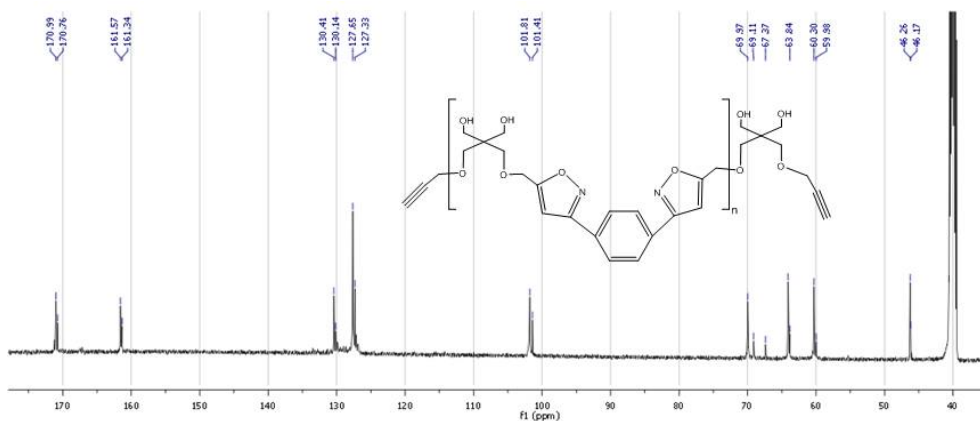
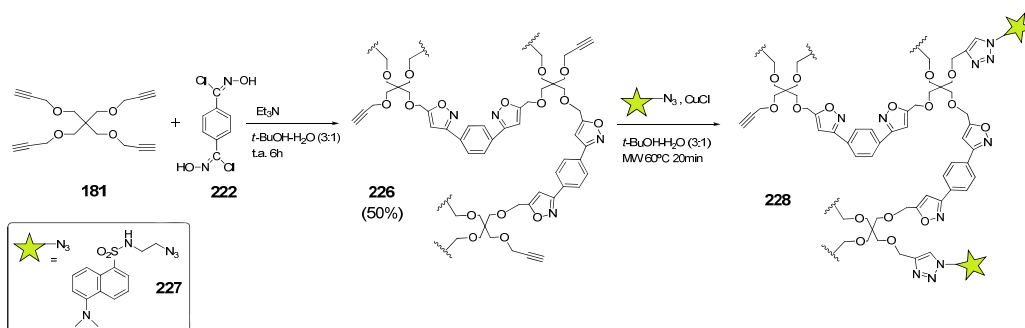


Figura 6.9. Espectro ^{13}C -RMN del polímero **225**

De forma similar en una segunda alternativa, se prepara un polímero entrecruzado por reacción de tetrapropargilpentaeritritol **181** y el precursor del dióxido de nitrilo **222**, en una relación molar 2:1 (alquino:óxido de nitrilo). La reacción conduce al compuesto **226**, que muestra una leve fluorescencia probablemente debido a la alta conjugación de anillos bencénicos y de isoxazol, pero que es insoluble en agua y en disolventes orgánicos, circunstancia que impiden su caracterización mediante RMN convencional. Sin embargo, la presencia de grupos alquino que deben estar presentes en el compuesto dada la relación estequiométrica utilizada, se puede poner de manifiesto químicamente mediante posterior reacción CuAAC. Para ello se trata este polímero con el derivado fluorescente azidodansilo¹⁴⁸ **227** (Esquema 6.19) mediante irradiación MW. El compuesto que resulta **228** presenta una fluorescencia más acusada que su precursor **226**, como se puede observar en las imágenes vistas al transiluminador o mediante microscopía de fluorescencia (Figura 6.10), lo cual confirma la incorporación del grupo dansilo y, por tanto, la presencia de grupos alquino en el polímero **226**.



Esquema 6.19. Preparación del polímero **226** y posterior reacción CuAAC

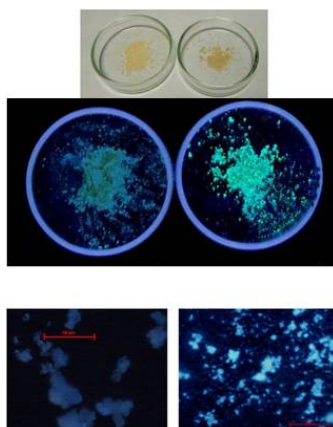


Figura 6.10. Polímero **226** antes (izq.) y después (dcha.) de la reacción con azidodansilo

Hay que remarcar la importancia de los resultados obtenidos en la polimerización de oxidos de nitrilo y alquinos y su posterior funcionalización teniendo en cuenta las suaves condiciones empleadas y el gran interés que en la actualidad presentan los procesos de polimerización combinada con la funcionalización mediante procesos “click”.⁵¹⁹

6.7.5. Si-L_m y Dw-BPMA como agentes secuestrantes de Cu(I)

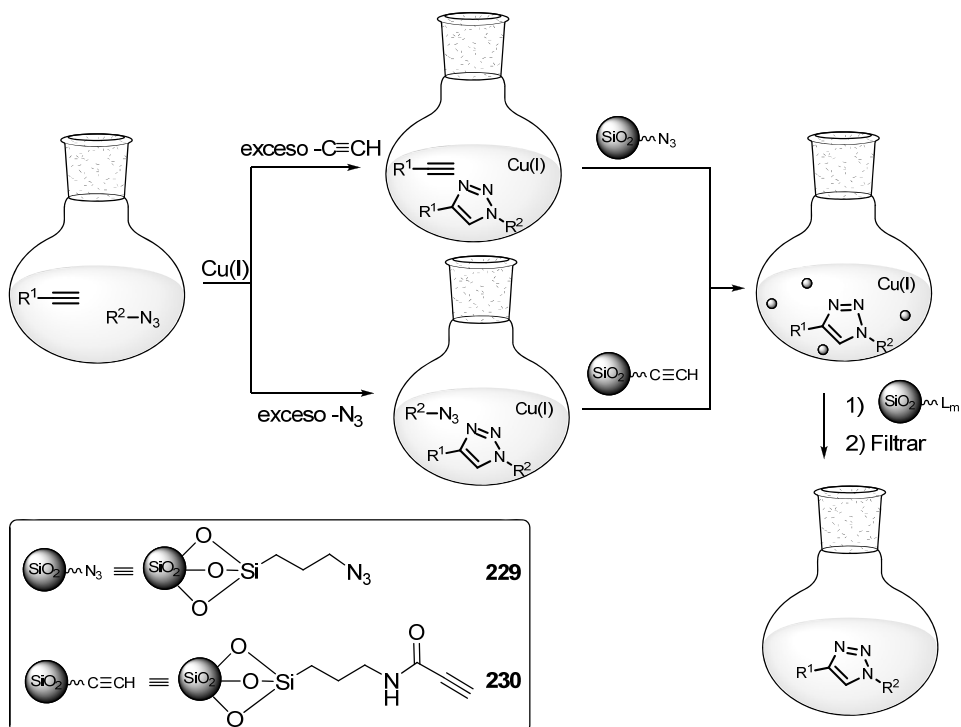
La excelente capacidad quelante de los materiales híbridos preparados **Si-L_m** y **Dw-BPMA** debe capacitarlos también para actuar como agentes secuestrantes de Cu(I) cuando son utilizados en su forma no complejada, permitiendo así la descontaminación metálica en reacciones CuAAC cualquiera que sea el catalizador empleado. De esta forma, dichos materiales pueden resultar ser muy útiles y versátiles en CuAAC teniendo en cuenta su función dual.

Para evaluar dicha capacidad como agentes secuestrantes de Cu(I), en primer lugar los adsorbentes se utilizan en tándem con sus formas complejadas **Si-L_m·Cu⁺**, tratando el crudo de reacción obtenido tras filtrar el catalizador **Si-BPMA·Cu⁺** o **Si-BPA·Cu⁺** en las reacciones de **171** con **183** y de **177** con **186** respectivamente (Tabla 6.2, entrada 2, y Tabla 6.3, entrada 16) con las formas no complejadas del catalizador, **Si-BPMA** y **Si-BPA** respectivamente. Se comprueba que de esta forma se eliminan completamente las ya insignificantes trazas del

⁵¹⁹. Mansfeld, U.; Pietsch, C.; Hoogenboom, R.; Becer, C. R.; Schubert, U. S., Clickable initiators, monomers and polymers in controlled radical polymerizations - a prospective combination in polymer science. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1560-1598.

metal obteniéndose triazoles completamente libres de Cu de una forma muy sencilla tras filtrar el material adsorbente y evaporar el disolvente en el rotavapor.

En segundo lugar y para ampliar el alcance de los adsorbentes **Si-L_m** como scavengers en reacciones CuAAC y expandir su rango de aplicación se utilizan también en procesos llevados a cabo mediante catálisis homogénea. Los experimentos realizados usando cantidades no estequiométricas de los reactivos y catálisis homogénea pueden servir también para aplicar por primera vez sílicas funcionalizadas con grupos azida **229** o alquino **230** al proceso “click”. Estos materiales funcionalizados desarrollados en nuestro grupo han sido empleados hasta el momento para obtener glicosílicas que actúan como soportes bioselectivos para cromatografía de afinidad.²¹⁶ En el ámbito de la reacción “click” en ocasiones es necesario emplear un exceso de uno de los dos reactivos por diferentes motivos, y en estos casos las sílicas funcionalizadas con azida o alquino podrían actuar como agentes secuestrantes del reactivo complementario permitiendo separarlos del medio de reacción fácilmente tras un proceso de filtración (Esquema 6.20).

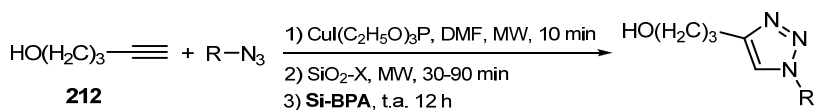


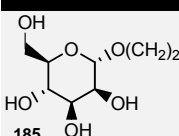
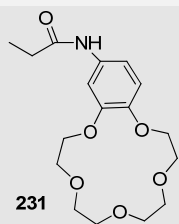
Esquema 6.20. Scavenger de azido, alquino y Cu en la síntesis de triazoles.

Capítulo 6

Inicialmente se selecciona $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}^{362}$ como catalizador ya que es soluble en disolventes orgánicos, y se llevan a cabo las reacciones del alquino **212** con las diferentes azidas **185** y **231** (Tabla 6.6) según el siguiente protocolo. La disolución en DMF conteniendo los reactivos y el catalizador se irradia con MW durante 10 min. Tras ese tiempo se detecta por c.c.f. la consumición del reactivo limitante, y a continuación se añade la azido o alquino sílica **229** o **230** para eliminar el reactivo en exceso en una segunda reacción “click” en fase sólida, y finalmente se añade al crudo el agente secuestrante de Cu(I). Después de filtrar y evaporar el disolvente se obtienen directamente los triazoles **232** y **233**. Sin embargo, aunque los scavenger de azida y alquino dan los resultados esperados, no ocurre así con el de Cu, consiguiendo sólo eliminar entre el 48-54 % del Cu gracias al empleo de **Si-BPA**, valores que no aumentan al incrementar la cantidad de este material. Estos resultados sugieren una posible competencia entre los ligandos nitrogenados del soporte y los de tipo fosfina del catalizador $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$, que impide la eliminación total del Cu.

Tabla 6.6. Empleo de scavengers en reacciones catalizada con $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$



R	$\text{RC}\equiv\text{CH}:\text{RN}_3^{[a]}$	$\text{SiO}_2\text{-X}$	Producto (%Rto.)
 <p>185</p>	1:1.5	$\text{SiO}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$	232 (100)
	1.5:1	$\text{SiO}_2\text{-N}_3$	232 (100)
 <p>231</p>	1:1.5	$\text{SiO}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$	233 (100)
	1.5:1	$\text{SiO}_2\text{-N}_3$	233 (94)

[a]: relación molar alquino:azida.

Una opción alternativa consiste en el empleo de CuCl^{520} como catalizador homogéneo en disolución acuosa. Para evaluar esta posibilidad previamente se

520. Wróblewski, A. E.; Glowacka, I. E., Synthesis of four enantiomerically pure 4-(4-carbamoyl-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-dihydroxy-1-methoxybutylphosphonic acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (24), 4056-4064.

comprueba la capacidad como “scavenger” de **Si-L_m** y **Dw-BPMA** con una disolución acuosa conteniendo CuCl (Tabla 6.7, Ensayo A). El tratamiento de esta disolución con **Si-BPA** o **Si-His** en columna o con la resina **Dw-BPMA** en *batch* da como resultado la eliminación completa del Cu en el caso de las sílicas, poniendo de manifiesto su inherente capacidad scavenger, y casi cuantitativa en el caso de la resina **Dw-BPMA**.

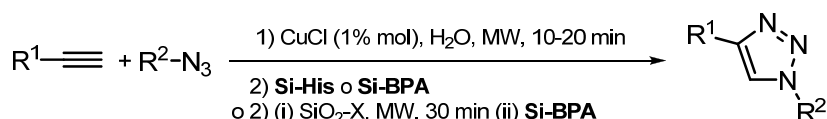
Tabla 6.7. Ensayos con **Si-His**, **Si-BPA** y **Dw-BPMA** como agentes secuestrantes de Cu(I)

Ensayo ^[a]	Adsorbente	Cantidad (g)	Cu (ppm) ^[b]	% retención
1	-	-	44.33	-
2	Si-BPA	0.25	0.00	100
3	Si-His	0.25	0.00	100
4	Dw-BPMA	0.125	1.14	97.4
5	Dw-BPMA	0.25	0.84	98.1
6	Dw-BPMA	0.50	0.47	98.9
7	Dw-BPMA	1.00	0.29	99.3
8	-	-	48.35	-
9	Dw-BPMA	0.25	0.64	98.7
10	Dw-BPMA	0.50	0.34	99.3
11	Si-BPA	0.25	0.00	100
12	Si-His	0.25	0.00	100

[a] **A**: disolución comercial de CuCl (5μL) en H₂O (10 mL). **B**: Reacción de **177** (1.0 mmol) con **184** (1.0 mmol) en H₂O (10 mL) catalizada por CuCl (1% mol). [b] Medido por AAS.

Tras demostrar la capacidad secuestrante de Cu(I) de **Si-L_m** y **Dw-BPMA** en disoluciones acuosas de CuCl a continuación pasamos a emplearlos en verdaderas reacciones “click”. De esta forma se llevan a cabo las cicloadiciones con cantidades estequiométricas de los alquinos **171**, **177** y **180** con la azida **184** (Tabla 6.8, entradas 1-3) usando CuCl como fuente de Cu(I), y tratando posteriormente el crudo de reacción con **Si-BPA** o **Si-His**. Se obtienen así directamente los derivados **192**, **203** y **209** puros y totalmente libres de Cu. Con la resina **Dw-BPMA** se obtienen resultados parecidos en la reacción de **177** con **184** (Tabla 6.7, ensayo B), aunque la eficacia como scavenger es ligeramente inferior a sus homólogos basados en sílica, lo que puede deberse al mayor tamaño de partícula que obliga a realizar el proceso en *batch* para alcanzar un tiempo de contacto adecuado, siendo este proceso estático menos efectivo que el proceso dinámico que por su flujo sí permiten **Si-BPA** o **Si-His**.

Tabla 6.8. Empleo de scavengers en reacciones catalizadas con CuCl.



	R ¹	Alquino	R ²	Azida	RC≡CH:RN ₃ ^[a]	SiO ₂ -X	Producto ^[b]
1	CH ₂ OH	171	(CH ₂) ₂ OH	184	1.0:1.0	-	192 (86)
2	β-Glc	177	(CH ₂) ₂ OH	184	1.0:1.0	-	203 (100)
3	Dpp	180	(CH ₂) ₂ OH	184	1.0:2.0	-	209 (100)
4	Dpp	180	α-Man	185	1.0:2.4	SiO ₂ -C≡CH	210 (99)
5	β-Glc	177	CD	187	2.0:1.0	SiO ₂ -N ₃	206 (100)

[a]: relación molar alquino:azida. [b]: Producto (Rendimiento %)

Por último, se implementa también en el caso de la catálisis con CuCl la etapa de scavenger de azidas y alquinos con las sílicas funcionalizadas de forma complementaria. La reacción de mono-azidociclodextrina **187** con un exceso de propargilglucosa **177** y la reacción del dialquinil derivado **180** con un exceso de azidoetil manósido **185** (Tabla 6.8, entradas 4-5), se llevan a cabo con CuCl como catalizador. La aplicación de los diferentes agentes secuestrantes produce excelentes resultados obteniéndose con rendimientos cuantitativos los productos **206** y **210** respectivamente, puros y sin necesidad de cualquier etapa de purificación adicional distinta al filtrado.

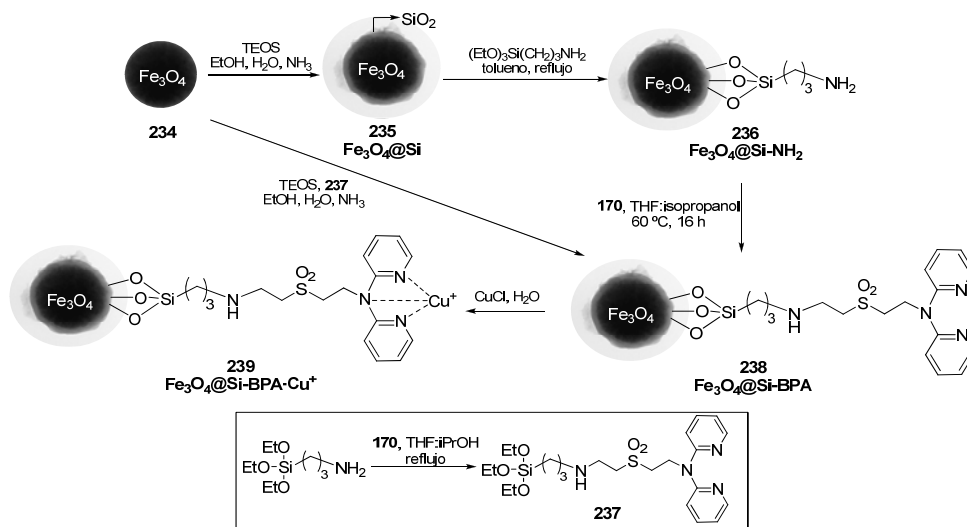
6.7.6. Síntesis de partículas magnéticas conteniendo Cu(I) y aplicaciones como catalizador heterogéneo en química “click”

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con los catalizadores heterogéneos con ligandos inmovilizados covalentemente en sílica como matriz se pretende extrapolar esta metodología a la preparación de catalizadores magnéticos dadas las inherentes ventajas que aporta esta propiedad en cuanto a su fácil recuperación.

La magnetita (Fe₃O₄) es el material seleccionado como soporte para este fin considerando que es uno de los óxidos de hierro más utilizados en la síntesis de nanopartículas magnéticas. Para aportar estabilidad química y proteger a dichas partículas de la aglomeración evitando interacciones entre ellas se recurre habitualmente al recubrimiento de las mismas con una fina capa de sílica, modificación que además en nuestro caso nos debe permitir su funcionalización covalente con compuestos con propiedades quelantes para inmovilizar Cu(I).

Las partículas de magnetita (**234**) se preparan de acuerdo al método descrito por Li y col.⁵²¹ consistente en la reducción solvotermal de FeCl₃ en etilenglicol. Para la unión covalente del ligando **BPA** (**170**) a la superficie de las partículas de magnetita se emplearon dos estrategias diferentes habituales en la modificación de sílica: funcionalización post-síntesis (grafting) o síntesis directa por co-condensación (Esquema 6.21).

Para la primera de las estrategias las partículas magnéticas **234** se recubren con una capa externa de sílica empleando tetraetoxisilano (TEOS) de acuerdo a un método sol-gel estándar⁵²² y las partículas resultantes **Fe₃O₄@Si** (**235**) se tratan después con un exceso de aminopropiltriethoxisilano (APTS) en tolueno a reflujo para modificar la superficie con grupos amino obteniendo el material **Fe₃O₄@Si-NH₂** (**236**). De hecho, los grupos amino son uno de los grupos funcionales más empleados en la modificación de partículas magnéticas.⁵²³ La reacción aza-Michael del derivado vinilsulfona **170**, previamente descrito, con los grupos amino superficiales de **Fe₃O₄@Si-NH₂** permite inmovilizar covalentemente el ligando BPA obteniéndose el material híbrido **Fe₃O₄@Si-BPA** (**238**).



Esquema 6.21. Preparación de partículas magnéticas Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺

- 521.** Deng, H.; Li, X.; Peng, Q.; Wang, X.; Chen, J.; Li, Y., Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (18), 2782-2785.
- 522.** Sun, P.; Zhang, H.; Liu, C.; Fang, J.; Wang, M.; Chen, J.; Zhang, J.; Mao, C.; Xu, S., Preparation and Characterization of Fe₃O₄/CdTe Magnetic/Fluorescent Nanocomposites and Their Applications in Immuno-Labeling and Fluorescent Imaging of Cancer Cells. *Langmuir* **2009**, *26* (2), 1278-1284.
- 523.** del Campo, A.; Sen, T.; Lellouche, J.-P.; Bruce, I. J., Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293* (1), 33-40.

Capítulo 6

Alternativamente y siguiendo la estrategia de síntesis directa por co-condensación, se preparan las mismas partículas funcionalizadas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}$ a partir de la magnetita **234** por reacción con una mezcla de TEOS y el silano **237** que contiene el ligando **BPA**, sintetizado en una etapa previa a partir de aminopropiltriétoxosilano como se muestra en el esquema 6.21. Ambas estrategias implican la transformación de Fe_3O_4 en $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}$ en un proceso “one-pot” ya que se pueden separar por decantación magnética los productos aprovechando las propiedades de estos materiales.

A continuación, el Cu(I) se inmoviliza como en el caso de las sílicas por tratamiento de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}$ (**238**) con una disolución comercial de CuCl en agua previamente desoxigenada con corriente de argón obteniéndose las partículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (**239**), que presentan una carga de Cu(I) de 8.3% para las obtenidas por grafting y de 7.0% para las preparadas por co-condensación, de acuerdo con la cuantificación realizada mediante AAS. Una micrografía TEM de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (Figura 6.11) confirma la formación de la estructura esperada del tipo *core/shell*, con un espesor de la capa sílicea de 25 nm y un núcleo de magnetita con un diámetro medio en torno a 250 nm, que permite clasificarlas dentro de las nanopartículas magnéticas.

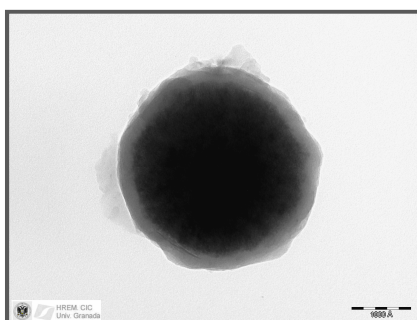


Figura 6.11. Imagen TEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (**239**)

El análisis de las curvas de magnetización (Figura 6.12) revela que el recubrimiento de sílica provoca una ligera modificación de las propiedades magnéticas de forma que las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}$ mantienen el 80% del valor de saturación magnética que presenta la magnetita (45 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ y 36 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ antes y después del recubrimiento respectivamente).

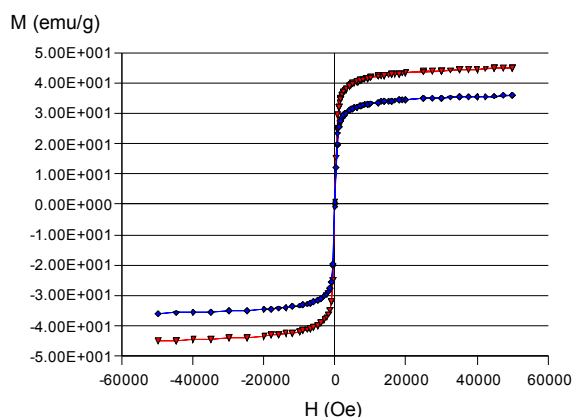
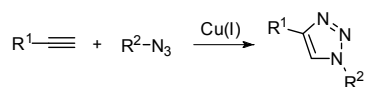


Figura 6.12. Curvas de magnetización a temperatura ambiente para nanopartículas de Fe_3O_4 (en rojo) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}$ (en azul).

La capacidad catalítica de las nanopartículas magnéticas con Cu(I) en reacciones CuAAC se examina con una serie de alquinos y azidas en condiciones similares a las empleadas con su homólogo no-magnético $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$. Los resultados recogidos en la Tabla 6.9 muestran un perfil catalítico excelente de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (**239**), ya que originan el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido exclusivamente, con rendimientos casi cuantitativos usando estrictas cantidades equimoleculares de los reactivos y con pequeñas cantidades de catalizador (10 mg por mmol de reactivo) en tiempos de reacción cortos cuando se emplea MW y aceptables cuando la reacción transcurre a t.a. produciéndose la catálisis incluso en agua o en ausencia de disolvente cuando los reactivos lo permiten.

Tabla 6.9. Reacciones CuAAC empleando partículas magnéticas como catalizadores



	R^1	Alquino	R^2	Azida	Cond. ^[a]	Catalizador ^[b]	Prod. ^[c]
1	CH_2OH	171	$(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	184	A	239 (10)	192 (99)
2	CH_2OH	171	CH_2Ph	183	B	239 (10)	191 (99)
3	CH_2NHBoc	172	CH_2Ph	183	C	239 (20)	194 (99)
4	$\beta\text{-Glc}$	177	$(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	184	A	239 (10)	203 (96)
5	$\beta\text{-Glc}$	177	$\alpha\text{-Man}$	185	A	239 (10)	204 (98)
6	$\text{N}(\text{CH}_2)_3$	182	CH_2Ph	183	C	239 (10)	146 (100)
7	CH_2OH	171	CH_2Ph	183	B	238 (10)	-- ^[d]
8	CH_2NHBoc	172	CH_2Ph	183	C	238 (20)	(10) ^[e]

[a] Condiciones: Cantidades equivalentes de azida y alquino y **A**: H_2O (10 mL), MW, 60°C , 10-15 min.; **B**: neto, t.a. 15 h; **C**: $t\text{-BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:1, 1 mL), MW, 60°C , 10-15 min.; [b] mg catalizador/mequiv reactivo. [c] Producto (Rendimiento %); [d]: No hay reacción tras 24 h. a t.a.; [e]: Se obtiene una mezcla inseparable de regioisómeros 1,4 (**194**) y 1,5-disustituido tras 2 h. de reacción.

Capítulo 6

La fácil manipulación y recuperación mediante decantación magnética de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ potencia las ventajas de su uso como catalizador heterogéneo en reacciones CuAAC (Figura 6.13) al permitir una ganancia en simplicidad operativa. Además esto permite reutilizar el catalizador de forma muy sencilla, hecho que se puso de manifiesto en el caso de la reacción entre el alquino **172** con la azida **183** (Tabla 6.9, entrada 3), donde se observa que la reacción tiene lugar sin una pérdida apreciable de efectividad tras tres ciclos consecutivos, aislándose el compuesto **194** con rendimientos del 99%, 100% y 97% respectivamente.



Figura 6.13. Separación del catalizador mediante un campo magnético externo

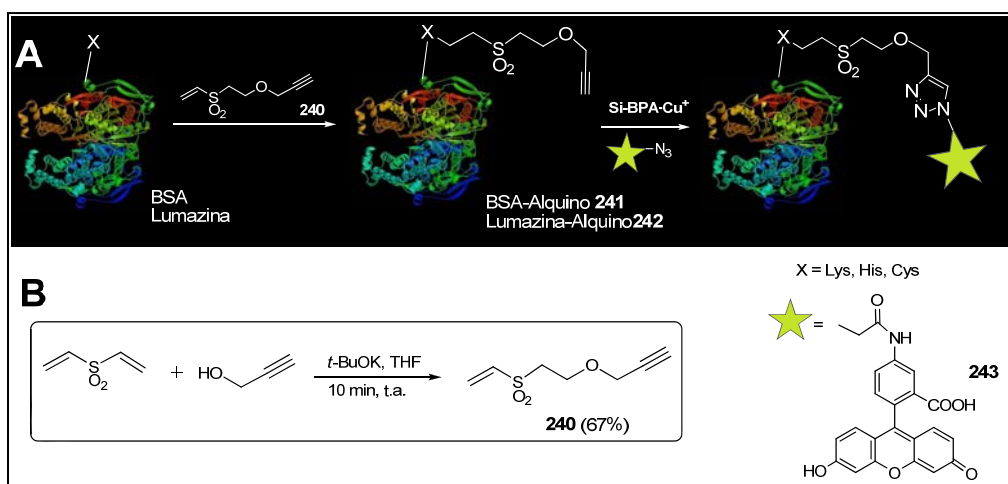
En lo que respecta al leaching de este catalizador magnético, la evaluación del contenido de Cu mediante AAS en los crudos de reacción de los alquinos **171** y **177** con la azida **184** (Tabla 6.5, entradas 6-7) arroja resultados algo lejos de lo esperado, con valores intermedios entre los de catalizadores de sílica $\text{Si-L}_m\cdot\text{Cu}^+$ y los de la resina de poliestireno $\text{Dw-BPMA}\cdot\text{Cu}^+$, liberando a la disolución en torno al 8% de la cantidad inicial de Cu presente en el catalizador. Esta observación refuerza la hipótesis planteada anteriormente del importante papel que debe ejercer la matriz de sílica en los materiales $\text{Si-L}_m\cdot\text{Cu}^+$ para obtener productos sin trazas de Cu(I).

Con el fin de descartar también que la presencia de magnetita pueda tener algún efecto catalítico en las reacciones CuAAC y demostrar que la actividad se debe exclusivamente al Cu(I) se llevan a cabo dos experimentos de control en los que se utilizan las partículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-L}_m$ (**238**) sin tratar con Cu (Tabla 6.9, entradas 7-8). De acuerdo con lo esperado, no se observa producto alguno incluso tras largos tiempos de reacción a t.a. entre **171** y **183**. Cuando la reacción entre **172** y **183** se lleva a cabo con irradiación de MW, tras largos tiempos de reacción se obtiene una mezcla inseparable de regioisómeros con muy bajo rendimiento (10%) lo que confirma la ausencia de catálisis siendo la reacción térmica la que opera en ese caso.

6.7.7. $\text{Si-L}_m\cdot\text{Cu}^+$ como catalizador heterogéneo para CuAAC en bioconjugación

Con el propósito de ampliar el campo de aplicación de los nuevos catalizadores heterogéneos y aprovechando sus características para soslayar las limitaciones de la CuAAC derivadas de la toxicidad del Cu en sistemas biológicos se planea una serie de experiencias que demuestren sus posibilidades como catalizador “click” en bioconjugación. Se selecciona BSA como proteína modelo y lumazina sintasa como modelo de cápside vírica para llevar a cabo con estas biomoléculas reacciones CuAAC catalizadas por $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ con un reactivo fluorescente que permita la visualización de la proteína marcada tras su conjugación (Esquema 6.22).

En ambos casos, como etapa previa a la reacción CuAAC se requiere la introducción en la proteína del grupo reactivo adecuado. Para efectuar dicha funcionalización se hace uso de la adición Michael de grupos amino y tioles presentes en la biomolécula sobre la vinilsulfona **240**, que contiene a su vez un grupo alquino, ya que como hemos visto en capítulos anteriores la química de vinilsulfonas es una metodología con resultados satisfactorios en bioconjugación. Según el presente planteamiento, el compuesto **240** puede considerarse un reactivo de entrecruzamiento heterofuncional, que se prepara de forma sencilla por reacción de alcohol propargílico con DVS (Esquema 6.22B).



Esquema 6.22. Introducción de grupos alquino y posterior CuAAC en BSA y lumazina

➡ **Marcaje fluorescente de BSA mediante CuAAC:**

La BSA (Bovine Serum Albumin) es una cadena polipeptídica de estructura monomérica con un peso molecular de 66.5 KDa que contiene 583 aminoácidos, de

Capítulo 6

entre los cuales destacan como residuos nucleófilos 59 Lys, 17 His, 1 Cys libre y 17 puentes disulfuro. Para introducir los grupos alquino se incubaba una disolución de BSA 2 mg/mL en tampón HEPES pH 8.0 junto con el compuesto **240** disuelto en DMSO en una relación molar BSA:**240** de 1:80 durante 18 h a 37°C. Tras dializar, la proteína modificada se hace reaccionar con azidofluoresceína¹⁴⁸ (**243**) en diferentes condiciones para estudiar el efecto de la temperatura, el catalizador y el tiempo de reacción en el marcaje fluorescente. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

En primer lugar se evalúa el efecto de la temperatura llevando a cabo la reacción de forma paralela a t.a. y a 37°C. Como se puede apreciar al comparar los geles A y B en la Figura 6.14 el marcaje es más efectivo a t.a. puesto que al aumentar la temperatura aparecen agregados de alto peso molecular que prácticamente no penetran en el gel separador. En ocasiones el marcaje con un compuesto hidrofóbico origina tras la desnaturalización con SDS estos agregados de alto peso molecular. En segundo lugar, se estudia el efecto del catalizador en la reacción CuAAC empleando tanto condiciones homogéneas (CuSO₄/ascorbato) como heterogéneas (**Si-BPA·Cu**⁺). En los geles de la figura 6.14A se observa como en los dos casos hay reacción consiguiéndose el marcaje fluorescente de la proteína, aunque con el catalizador **Si-BPA·Cu**⁺ la mayor nitidez e intensidad de las bandas con respecto a la catálisis homogénea es indicativo de que dicho catalizador preserva la integridad de la proteína evitando su degradación.

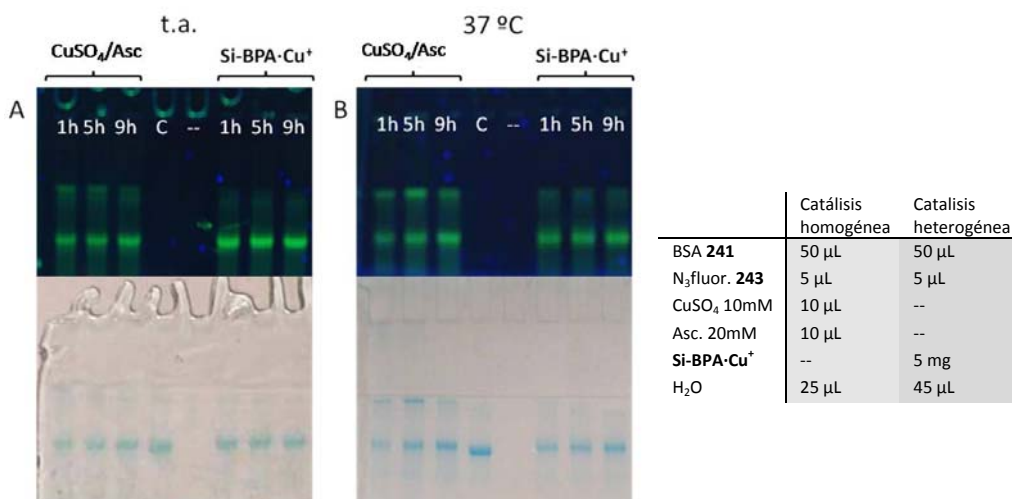


Figura 6.14. Geles (SDS-PAGE) a t.a. (A) y 37°C (B). De izquierda a derecha: Reacción con CuSO₄/ascorbato tras 1, 5 y 9 h. Control de BSA. Reacción con **Si-BPA·Cu**⁺ tras 1, 5 y 9 h. Carga: 10 µL. Arriba: Visto al transiluminador a λ 365 nm para detectar fluorescencia. Abajo: Teñido con coomassie para detectar cantidad de proteína.

Seguidamente, en lo que respecta a los tiempos de reacción se hacen ensayos tomando alícuotas de la reacción a diferentes tiempos, mezclándolas con el doble de volumen de tampón de carga, produciendo la desnaturalización y congelando seguidamente para detener la reacción. No se observan diferencias significativas en la fluorescencia alcanzada tras 1-9 h. (figura 6.14) dato que fue confirmado llevando a cabo una nueva electroforesis cargando 2.5 μL de muestra en lugar de 10 μL (figura 6.15) con el objetivo de evitar una saturación de la señal y poder ver diferencias más claramente en el caso de que las hubiera. El gel visto al transiluminador nuevamente no muestra diferencias importantes en cuanto a tiempo aunque de nuevo la catálisis heterogénea con **Si-BPA·Cu⁺** ofrece mejores resultados, tanto por la intensidad de la banda correspondiente a BSA como por la fluorescencia del frente, mucho más intenso en el caso de la catálisis con $\text{CuSO}_4/\text{Ascorbato}$ debido a azidofluoresceína sin reaccionar.

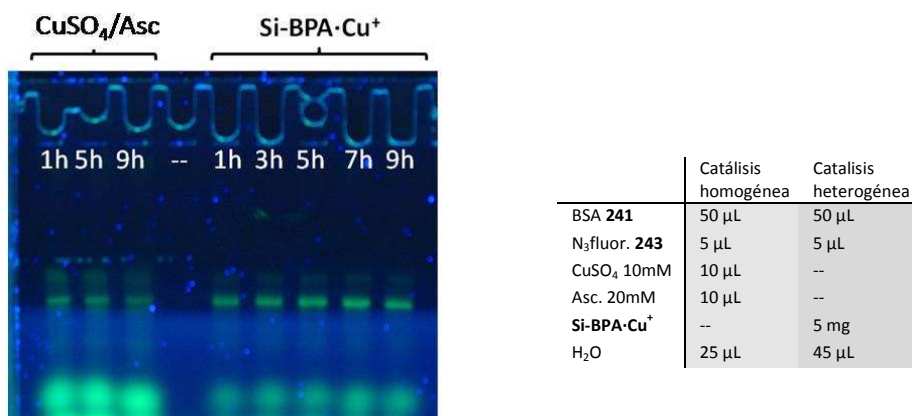


Figura 6.15. Gel (SDS-PAGE) visto al transiluminador a λ 365 nm para detectar fluorescencia. De izquierda a derecha: Reacción con $\text{CuSO}_4/\text{ascorbato}$ tras 1, 5 y 9 h. Reacción con **Si-BPA·Cu⁺** tras 1, 3, 5, 7 y 9 h. Carga: 2.5 μL .

A la vista de estos resultados se hacen nuevos experimentos tomando alícuotas a tiempos de reacción inferiores a 1 h. para observar si existe alguna diferencia significativa a la vez que se estudia el efecto de la cantidad de catalizador **Si-BPA·Cu⁺**. Para ello se hace la reacción con la mitad y la quinta parte de catalizador, respectivamente (figura 6.16). En esas condiciones se observan diferencias ya que tras 15 min. a t.a. el grado de marcaje fluorescente es bajo, una diferencia mucho más acusada al disminuir la cantidad de catalizador a la quinta parte, mientras que la reducción a la mitad no tiene consecuencias significativas en el rendimiento de la reacción.

Capítulo 6

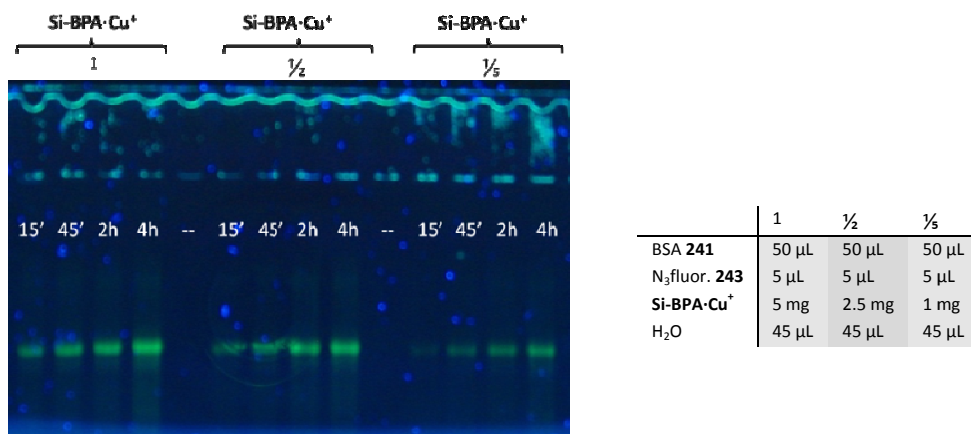


Figura 6.16. Gel (SDS-PAGE) visto al transiluminador a λ 365 nm para detectar fluorescencia. De izquierda a derecha: Reacción con cantidades decrecientes de **Si-BPA·Cu⁺** (1, 1/2, 1/5) tras 15, 45 min, 2 y 4 h. Carga: 2.5 µL.

Finalmente, se realizan experimentos similares con **Si-His·Cu⁺** como catalizador en lugar de **Si-BPA·Cu⁺**, con cantidades decrecientes de este catalizador heterogéneo y tomando alícuotas a diferentes tiempos. Los resultados de SDS-PAGE mostrados en la figura 6.17 revelan un comportamiento similar produciéndose el marcaje fluorescente de BSA de igual forma que con **Si-BPA·Cu⁺**. Tras 15 min. de reacción a t.a. se observa marcaje fluorescente excepto en el caso de la menor cantidad de catalizador, que necesita más tiempo para que se complete la reacción.

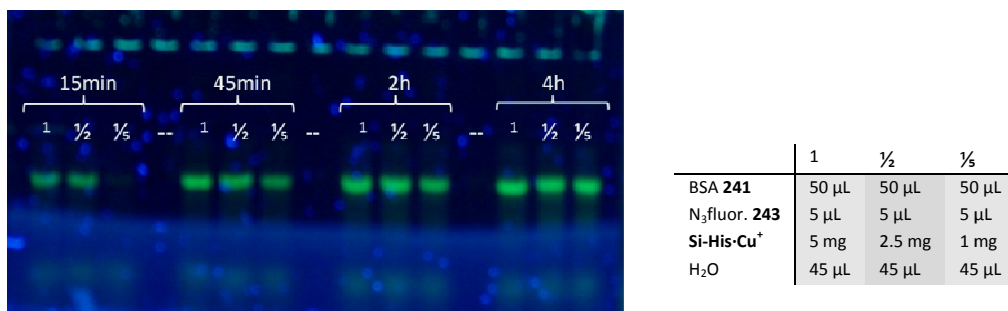


Figura 6.17. Gel (SDS-PAGE) visto al transiluminador a λ 365 nm para detectar fluorescencia. De izquierda a derecha: Reacción con cantidades decrecientes de **Si-His·Cu⁺** (1, 1/2, 1/5) tras 15, 45 min, 2 y 4 h. Carga: 2.5 µL.

➡ **Marcaje fluorescente de lumazina sintasa mediante CuAAC:**

La lumazina sintasa es una proteína con un peso molecular de ~1000 KDa consistente en una cápside esférica de 60 subunidades (β_{60}) de 16.3 KDa y 154 aminoácidos en cada subunidad, entre los cuales destacan 7 Lys, 2 His y 2 Cys. Presenta simetría icosaédrica y junto con riboflavina sintasa forma un complejo involucrado en el mecanismo biosintético de la vitamina B₂.

Para introducir los grupos alquino en la cápside se incuban 100 μ L de una disolución de lumazina (2 mg/mL) en tampón fosfato 0.1 M pH 8.7 junto con 5 μ L del compuesto **240** (30 mM en DMSO) en una relación molar grupo reactivo (Lys, His ó Cys):vinilsulfona 1:1.1 manteniendo a t.a. durante 18 h. Tras centrifugar (14000 rpm, 3 min) sin observar precipitación alguna, la disolución resultante se utiliza directamente en la siguiente etapa. El marcaje fluorescente mediante CuAAC se lleva a cabo empleando catálisis homogénea o heterogénea con CuSO₄/ascorbato o Si-BPA·Cu⁺ respectivamente, para poder comparar el efecto que producen ambos catalizadores sobre la estructura cuaternaria de la lumazina, analizándose los resultados mediante electroforesis PAGE nativa ya que así se mantienen las interacciones entre subunidades. Para ello, la disolución de lumazina-alquino **242** obtenida se trata con N₃-fluoresceína **243** (30 mM en DMSO-H₂O 1:1) y los distintos catalizadores en las cantidades indicadas en la tabla 6.10, durante 8 h. a t.a. Transcurrido ese tiempo y después de centrifugar (14000 rpm, 5 min) 2.5 μ L del sobrenadante se combinan con un volumen igual de tampón de carga para realizar la electroforesis nativa, obteniéndose los geles que aparecen en la figura 6.18.

Tabla 6.10. Tratamiento de lumazina

	CT	0	1	2	3	4	5
Lumazina-alquino 242 (μ L)	40*	40	40	40	40	40	40
N ₃ fluor. 243 (μ L)	--	--	10	10	10	10	--
CuSO ₄ 10mM (μ L)	--	--	--	8	--	--	--
Ascorbato 20mM (μ L)	--	--	--	8	--	--	--
Si-BPA·Cu ⁺ (mg)	--	--	--	--	4	8	8
Fosfato 0.1M pH 8.7 (μ L)	40	40	30	14	30	30	40

*lumazina sin modificar

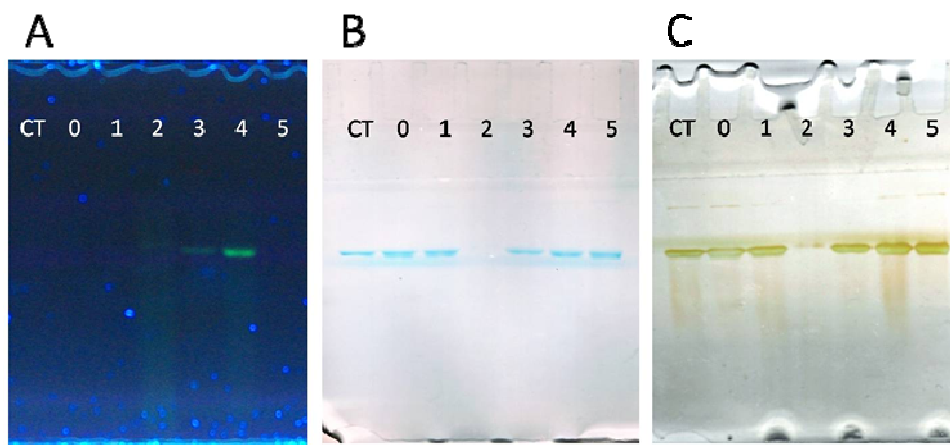


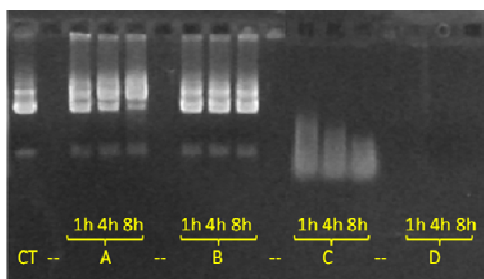
Figura 6.18. Gel (PAGE) de izquierda a derecha: **CT**: Control de lumazina sin modificar; **0**: Control de lumazina-alquino **242**; **1**: Reacción sin catalizador; **2**: Reacción catalizada con CuSO_4 /ascorbato; **3**: Reacción catalizada con $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (4 mg); **4**: Reacción catalizada con $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (8 mg); **5**: Tratamiento de lumazina con $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$. **A**: Iluminado con transiluminador a λ 365 nm para detectar fluorescencia. **B**: Tinción con coomassie. **C**: Tinción con plata. Carga: 2.5 μL .

El gel visto al transiluminador (figura 6.18A) indica en primer lugar que no hay fluorescencia en ausencia de catálisis con Cu (calle 1), descartando la adsorción inespecífica de la azidofluoresceína a la cápside. Mediante la catálisis homogénea con CuSO_4 /ascorbato (calle 2) no sólo no se logra el marcaje fluorescente sino que se observa la degradación completa de la estructura de la lumazina. Por el contrario, el marcaje fluorescente de la lumazina a la vez que el mantenimiento de la integridad de la cápside se produce cuando se emplea el catalizador $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ en determinadas cantidades (calle 4). Por debajo de estas cantidades la intensidad de fluorescencia es demasiado baja (calle 3). Tras la tinción con coomassie (figura 6.18B) no se observan diferencias apreciables entre la lumazina de control y las modificaciones posteriores, ya que los pequeños cambios introducidos son insignificantes con respecto al peso molecular total de la lumazina (1000 KDa), aunque sí hay que destacar la ausencia de señal en la reacción catalizada con CuSO_4 /ascorbato (calle 2). La tinción con sales de plata (figura 6.18C) es más sensible que la visualización con coomassie y permite distinguir una señal residual de muy baja intensidad tras la catálisis con CuSO_4 /ascorbato (calle 2), lo cual pone de manifiesto las diferencias entre ambos procedimientos y permite concluir que el catalizador $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ es efectivo en el marcaje fluorescente y no altera la conformación nativa de la lumazina mientras que la catálisis homogénea conduce a la degradación completa de la cápside.

► **Ensayos de estabilidad del DNA en presencia de catalizadores “click”:**

Finalmente se han llevado a cabo una serie de ensayos para evaluar la estabilidad del DNA en presencia de CuSO₄/ascorbato y **Si-BPA·Cu⁺** como paso previo para determinar la viabilidad del uso de tales sistemas como catalizadores en reacciones CuAAC con DNA funcionalizado con grupos azida o alquino. Para ello, a una disolución de DNA plasmídico (pEGFP-N3) en tampón fosfato 50 mM pH 8.0, se adiciona **Si-BPA·Cu⁺** o bien una disolución de CuSO₄ en ausencia o presencia de ascorbato sódico y del ligando TBTA **146** en las cantidades indicadas en la tabla 6.11. Las diferentes muestras se mantienen a t.a. con agitación orbital, recogiendo alícuotas tras 1, 4 y 8 h. respectivamente. Tras centrifugar, el sobrenadante se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 6.19) con la colaboración del Prof. Rafael Salto del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Tabla 6.11. Tratamiento de DNA con diferentes catalizadores “click”:



	A	B	C	D
DNA 4 mg/mL (μL)	2	2	2	2
Si-BPA·Cu⁺ (mg)	5	--	--	--
CuSO ₄ 10mM (μL)	--	10	10	10
Ascorbato 20mM (μL)	--	--	10	10
TBTA 14mM (μL)	--	--	--	10
DMSO (μL)	10	10	10	--
Tampón (μL)	88	78	68	68

Figura 6.19. Electroforesis en gel de agarosa. De izquierda a derecha: **CT:** Control: DNA sin tratar; **A:** DNA tratado con **Si-BPA·Cu⁺**; **B:** DNA tratado con CuSO₄; **C:** DNA tratado con CuSO₄/ascorbato sódico; **D:** DNA tratado con CuSO₄/ascorbato sódico/TBTA.

De dichos gels se deduce que la adición de **Si-BPA·Cu⁺** (**A**) no altera la estructura del DNA, de forma semejante a lo que ocurre con proteínas, ni tampoco el uso de CuSO₄ (**B**) por sí solo. Sin embargo, con la adición de ascorbato como reductor (**C**) se produce degradación del DNA, incluso en presencia del ligando TBTA (**D**) que previsiblemente debe proteger frente a la degradación. Por tanto, se puede concluir que el empleo de los catalizadores heterogéneos desarrollados *a priori* podría ser una opción no sólo factible sino altamente ventajosa para llevar a cabo transformaciones en DNA modificado mediante CuAAC.

6.8. Conclusiones

- Se han desarrollado diferentes estrategias para la inmovilización covalente de ligandos nitrogenados con alta afinidad por Cu(I) en sílica o magnetita recubierta de sílica que se basan en la adición aza-Michael a vinilsulfonas y que dan acceso a nuevos materiales con y sin propiedades magnéticas que pueden ser aplicados en reacciones “click”:
- En su forma complejada con Cu(I), los nuevos materiales híbridos (**Si-L_m·Cu⁺** y **Fe₃O₄@Si-BPA·Cu⁺**) actúan como catalizadores heterogéneos en reacciones CuAAC que se caracterizan por ser efectivos y robustos, capaces de promover la reacción en bajas dosis, en medio acuoso y sin necesidad de aditivos, con bajos niveles de leaching, particularmente en el caso de los basados en sílica, y con las atractivas características inherentes a la heterogeneización, como son la rapidez y facilidad para eliminar el catalizador por filtración o separación magnética, junto con la reutilización, por lo que el proceso global puede enmarcarse en el ámbito de la “Química verde”.
- En su forma no complejada, las sílicas con ligandos nitrogenados se comportan como agentes secuestrantes de Cu(I) eliminando dicho metal del medio tras una reacción CuAAC, permitiendo obtener triazoles libres de contaminación metálica.
- El empleo de azido-sílica o alquino-sílica como agentes secuestrantes de reactivos “click” en tándem con los anteriores agentes secuestrantes de Cu(I) cuando se trata de reacciones CuAAC no estequiométricas ha permitido el desarrollo de un protocolo sencillo para la obtención de triazoles puros y libres de Cu evitando purificación cromatográfica.
- Se han llevado a cabo por primera vez reacciones multicomponente para la síntesis regioselectiva de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos empleando sulfatos cíclicos, azida sódica y alquinos catalizada por **Si-BPA·Cu⁺** en un proceso “one-pot” que implica apertura nucleofílica del sulfato cíclico y reacción CuAAC, en el que además se minimizan las etapas de purificación. De esta forma aumenta el abanico de aplicaciones que ofrecen los sulfatos cíclicos en síntesis orgánica.

- Se demuestra que la cicloadición de óxidos de nitrilo y alquinos acontece de forma eficaz y regioselectiva a temperatura ambiente y sin necesidad de catalizador, ilustrándose con distintos ejemplos su potencial como una ruta prometedora para la obtención de polímeros altamente funcionalizados.
- Los nuevos materiales híbridos **Si-L_m·Cu⁺** son también eficaces catalizadores heterogéneos en bioconjugación que permiten llevar a cabo el marcaje fluorescente mediante CuAAC de proteínas como BSA y cápsides como la lumazina sin necesidad de aditivo alguno y evitando la toxicidad del Cu en tales procesos. Se demuestra que a diferencia de la catálisis homogénea con CuSO₄/ascorbato, estos catalizadores ni alteran la estructura nativa de la cápside ni provocan la degradación del DNA.

6.9. Sección experimental

General

Los compuestos comerciales **164-167**, **171**, **173-176**, **182**, **188**, **212** y CuCl en disolución (~14%), se emplean directamente sin purificación. Los alquinos **172**,⁵²⁴ **177**,⁵²⁵ **178**,⁵²⁶ **179**,²¹⁷ **180**⁵²⁷, **181**,⁵²⁸ **213**⁵²⁹ y las azidas **183**,⁵³⁰ **184**,⁵³¹ **185**,⁵³² **186**,⁵³³ **187**,⁵³⁴ **189**,⁵³⁵ y **190**⁵³⁶ se preparan de acuerdo a procedimientos descritos en bibliografía. Las electroforesis se llevan a cabo mediante un equipo BIO RAD PowerPac Basic.

Preparación del adsorbente de sílica con agente quelante Si-PMA

Vinilsulfona sílica **115** (1.0 g) se suspende en THF-isopropanol (1:1, 25 mL), añadiendo a continuación 2-picolilamina (**164**) (108 mg, 1.0 mmol). La mezcla de

-
- 524.** Boger, D. L.; Tarby, C. M.; Myers, P. L.; Caporale, L. H., Generalized dipeptidomimetic template: Solution phase parallel synthesis of combinatorial libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (8), 2109-2110.
- 525.** Blinkovsky, A. M.; Dordick, J. S., Enzymatic derivatization of saccharides and their chemical polymerization. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4* (6), 1221-1228.
- 526.** Rowan, A. S.; Nicely, N. I.; Cochrane, N.; Wlassoff, W. A.; Claiborne, A.; Hamilton, C. J., Nucleoside triphosphate mimicry: a sugar triazolyl nucleoside as an ATP-competitive inhibitor of B. anthracis pantothenate kinase. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (19), 4029-4036.
- 527.** Ortega-Muñoz, M.; Perez-Balderas, F.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-García, J.; Santoyo-Gonzalez, F., Click Multivalent Heterogeneous Neoglycoconjugates - Modular Synthesis and Evaluation of Their Binding Affinities. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, (15), 2454-2473.
- 528.** Calvo-Flores, F. G.; Isac-García, J.; Hernández-Mateo, F.; Pérez-Balderas, F.; Calvo-Asín, J. A.; Sánchez-Vaquero, E.; Santoyo-González, F., 1,3-Dipolar Cycloadditions as a Tool for the Preparation of Multivalent Structures. *Org. Lett.* **2000**, *2* (16), 2499-2502.
- 529.** McPhee, M. M.; Kerwin, S. M., Synthesis, DNA cleavage, and cytotoxicity of a series of bis(propargylic) sulfone crown ethers. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (11), 2809-2818.
- 530.** Alvarez, S. G.; Alvarez, M. T., A practical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambient temperature in dimethyl sulfoxide in high purity and yield. *Synthesis* **1997**, (4), 413-414.
- 531.** Lu, X. Q.; Bittman, R., Synthesis of a photoactivatable (2S,3R)-sphingosylphosphorylcholine analogue. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (12), 4746-4750.
- 532.** Lindhorst, T. K.; Kotter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S., Trivalent alpha-D-mannoside clusters as inhibitors of type-1 fimbriae-mediated adhesion of Escherichia coli: structural variation and biotinylation. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **2001**, (8), 823-831.
- 533.** Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C. H., Synthesis of sugar arrays in microtiter plate. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (48), 14397-14402.
- 534.** Zhang, L.-f.; Wong, Y.-C.; Lei, C.; Chi, B. C.; Ng, S.-C., A Facile Immobilization Approach for Perfunctionalised Cyclodextrin onto Silica via the Staudinger Reaction. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (9), 1815-1818.
- 535.** Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J., Size-Specific Ligands for RNA Hairpin Loops. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (36), 12434-12435.
- 536.** Gilbert, E. E. Solid poly(azidomethyl)benzene explosive composition. Patent N° US-138, **1984** USA (CAN:106:158921).

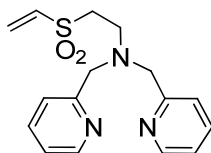
Capítulo 6

reacción se mantiene con agitación magnética a 60°C durante 16 h. La filtración y posteriores lavados con CH₂Cl₂ (500 mL) y éter (500 mL) permiten la obtención de la sílica funcionalizada **Si-PMA** que se seca a vacío (1mm Hg) a 50°C durante 16 h. obteniendo 0.98 g.

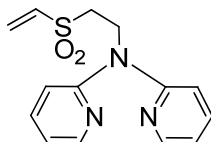
Preparación del adsorbente de sílica con agente quelante Si-His

Vinilsulfona sílica **115** (1.0 g) se suspende en THF-isopropanol (1:1, 25 mL), añadiendo a continuación histamina·2HCl (184 mg, 1.0 mmol) y Et₃N (420 µL, 3.0 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación magnética a 60°C durante 16 h. La filtración y posteriores lavados con CH₂Cl₂ (500 mL) y éter (500 mL) permiten la obtención de la sílica funcionalizada **Si-His** que se seca a vacío (1mm Hg) a 50°C durante 16 h. obteniendo 0.98 g.

Síntesis de *N,N*-bis(piridin-2-ilmetil)-2-(vinilsulfonil)etanamina (169)



A una disolución de bispicolilamina (**166**) (1 g, 5.0 mmol) y DVS (1.0 mL, 10.0 mmol) en THF (40 mL) se le añade t-BuOK (28 mg, 0.25 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a t.a. con agitación magnética durante 30 min. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (éter→CH₂Cl₂-MeOH 8:1) para obtener **169** (1.4 g, 89%) en forma de sirupo. **IR** (film): $\nu = 3057, 2926, 1590, 1434, 1308, 1129, 979$ y 763 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 8.52$ (d, 2H, $J=4.2$ Hz), 7.65 (*p*-t, 2H, $J=7.6$ Hz), 7.43 (d, 2H, $J=7.8$ Hz), 7.17 (*p*-t, 2H, $J=6.1$ Hz), 6.66 (dd, 1H, $J=16.6$ y 9.9 Hz), 6.31 (d, 1H, $J=16.6$ Hz), 6.02 (d, 1H, $J=9.9$ Hz), 3.83 (s, 4H), 3.24 (t, 2H, $J=7.3$ Hz), 3.05 (t, 2H, $J=7.4$ Hz); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 158.1, 149.1, 136.6, 136.5, 129.6, 123.3, 122.3, 59.8, 51.4, 47.1$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 340.1090$ calc. para C₁₆H₁₉N₃O₂SNa [M+Na]⁺: 340.1085.

Síntesis de N-(piridin-2-il)-N-(2-(vinilsulfonil)etil)piridin-2-amina (170)

A una disolución de bispiridilamina (**167**) (433 mg, 2.53 mmol) y DVS (0.5 mL, 5.0 mmol) en THF (25 mL) se le añade t-BuOK (14 mg, 0.13 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a t.a. con agitación magnética durante 30 min. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (éter-hexano 2:1) para obtener **170** (551 mg, 75%) como un sólido. **P.f.** 103-105°C; **IR** (film): $\nu = 2924, 1583, 1468$ y 1424 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 8.34$ (d, 2H, $J=3.9$ Hz), 7.53 (*p-t*, 2H, $J=7.0$ Hz), 7.11 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 6.90 (*p-t*, 2H, $J=6.0$ Hz), 6.75 (dd, 1H, $J=16.6$ y 9.9 Hz), 6.42 (d, 1H, $J=16.6$ Hz), 6.12 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 4.58 (t, 2H, $J=7.3$ Hz), 3.57 (t, 2H, $J=7.2$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 156.4, 148.6, 137.5, 136.5, 129.9, 117.8, 114.6, 52.2, 42.4$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 312.0777$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 312.0769.

Preparación de los adsorbentes de sílica con agente quelante Si-BPMA y Si-BPA

Aminopropil sílica gel **168**¹⁸¹ (1 g) se suspende en THF-isopropanol (1:1, 50 mL), añadiendo a continuación el ligando vinilsulfona correspondiente **169** o **170** (1.0 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación magnética a 60°C durante 16 h. La filtración y posteriores lavados con CH_2Cl_2 (500 mL) y éter (500 mL) permiten la obtención de las sílicas funcionalizadas **Si-BPMA** y **Si-BPA** que se secan a vacío (1mm Hg) a 50°C durante 16 h. (1.12 g para **Si-BPA** y 1.11 g para **Si-BPMA**).

Preparación de los catalizadores de Cu soportados en sílica ($\text{Si}_m\text{-Cu}^+$)

A una suspensión de las sílicas funcionalizadas **Si-PMA**, **Si-His**, **Si-BPMA** o **Si-BPA** (1.0 g) en agua destilada (30 mL) previamente desoxigenada con argón se adiciona una disolución comercial de CuCl (1.7 mL). La mezcla resultante se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 7 h. La filtración y lavado abundante con agua y finalmente éter permitieron obtener los catalizadores de Cu(I) soportado en sílica **Si-PMA·Cu⁺**, **Si-His·Cu⁺**, **Si-BPMA·Cu⁺** y **Si-BPA·Cu⁺**, que se secan a vacío (1mm Hg) a 50°C durante 16 h. (1.10 g para **Si-PMA·Cu⁺**, 1.11 g para **Si-His·Cu⁺**, 1.14 g para **Si-BPMA·Cu⁺** y 1.09 g para **Si-BPA·Cu⁺**). El contenido en Cu se evalúa mediante AAS: 5.28% para **Si-PMA·Cu⁺**, 10.42% para **Si-His·Cu⁺**, 2.44% para **Si-BPMA·Cu⁺** y 3.24% para **Si-BPA·Cu⁺**.

Preparación del catalizador de Cu soportado en la resina Dowex M4195 (Dw-BPMA·Cu⁺)

La resina comercial Dowex M-4195 (5.0 g) se acondiciona primero mediante lavados sucesivos con DMF (2x50 mL) y agua (2x50 mL) en MW (15 min 80°C). Después de filtrar, 1.0 g de la resina acondicionada se suspende en agua destilada (30 mL) previamente desoxigenada con argón, y se adiciona la disolución comercial de CuCl (1.7 mL). La suspensión se mantiene con agitación magnética a t.a. durante 7 h. La filtración y lavado abundante con agua y finalmente éter permite obtener el catalizador **Dw-BPMA·Cu⁺**. El contenido en Cu se evalúa mediante AAS: 7.08%.

Procedimiento general para la síntesis de 1,2,3-triazoles catalizada por SiL_m·Cu⁺ o Dw-BPMA·Cu⁺

Una disolución en t-BuOH-H₂O (10:1 o 2:1) o H₂O o una mezcla neta de cantidades equivalentes del correspondiente alquino **171-182** (1 mmol) y la azida **183-190** (1 mmol) derivados se hacen reaccionar a t.a. o mediante irradiación con MW tras la adición del catalizador de Cu soportado **Si-PMA·Cu⁺**, **Si-His·Cu⁺**, **Si-BPMA·Cu⁺**, **Si-BPA·Cu⁺** o **Dw-BPMA·Cu⁺** (cantidades de disolvente y catalizador se indican en las Tablas 6.1-6.3). Las reacciones se siguen mediante c.c.f. hasta la completa desaparición de los productos de partida (tiempos de reacción indicados en las Tablas 6.1-6.3). El crudo de reacción se filtra para eliminar el catalizador, directamente en el caso de las reacciones en disolución o tras añadir CH₂Cl₂ (10 mL) en el caso de las reacciones netas. El filtrado obtenido se evapora a presión reducida para obtener los correspondientes 1,2,3-triazoles puros con los rendimientos indicados en las Tablas 6.1-6.3.

Reciclaje del catalizador SiL_m·Cu⁺

El alquino **171** (1.0 mmol) y la azida **183** (1.0 mmol) en t-BuOH-H₂O (10:1, 10 mL) se hacen reaccionar mediante irradiación con MW a 60°C durante 20 min. tras la adición del catalizador **Si-BPMA·Cu⁺** (30 mg). Tras centrifugar y separar el sobrenadante, el catalizador **Si-BPMA·Cu⁺** se lava con el disolvente de la reacción y se reutiliza en un segundo ciclo con una disolución idéntica de los reactivos. El mismo procedimiento se repite hasta un cuarto ciclo. La evaporación de las distintas disoluciones de reacción permite obtener el triazol **191** con unos rendimientos del 97, 96, 97 y 94%, respectivamente para los cuatro ciclos.

Ensayos con Cu(I) soportado en sílica nativa: SiO₂·CuCl

Preparación: A una suspensión de 1.0 g de sílica nativa preactivada (calentándola a 120°C y vacío durante 24 h.) en agua destilada (30 mL) previamente desoxigenada con argón se adiciona una disolución comercial de CuCl (1.7 mL). La suspensión resultante se mantiene a t.a. con agitación magnética durante 7 h. La posterior filtración y abundantes lavados con agua y finalmente éter conducen a la correspondiente **SiO₂·CuCl** (1.05 g) que se seca a vacío (1mm Hg) y 50°C durante 16 h. Su contenido en Cu se evalúa mediante AAS: 3.77%.

Ensayo 1: Una disolución del alquino **171** (1.0 mmol) y la azida **183** o **186** (1.0 mmol) en t-BuOH-H₂O (10:1, 10 mL) (para la reacción de **171** con **183** o **186**) o H₂O (10 mL) (para la reacción de **171** con **186**) se irradia con MW a 60°C durante 1h. tras la adición de **SiO₂·CuCl** (100 mg). Tras este tiempo no se observa ningún producto de cicloadición.

Ensayo 2: Una disolución del alquino **171** (1.0 mmol) y la azida **186** (1.0 mmol) en t-BuOH-H₂O (10:1, 10 mL) o H₂O (10 mL) se irradia con MW a 60°C durante 40 min. tras la adición de **SiO₂·CuCl** (100 mg) junto con ascorbato sódico (198 mg, 1.0 mmol). Tras filtrar, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (acetonitrilo-H₂O 5:1) obteniendo el compuesto **193** con un rendimiento de 87% y 83%, respectivamente.

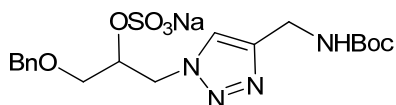
Ensayo 3: **SiO₂·CuCl** (0.1 g) se trata con ascorbato sódico 0.1M (20 mL) durante 6 h. a t.a. Tras ese tiempo la sílica se filtra lavando con agua y finalmente éter. La sílica obtenida se utiliza en la reacción del alquino **171** (56 mg, 1.0 mmol) y la azida **186** (249 mg, 1.0 mmol) en H₂O (10 mL) mediante irradiación con MW a 60 °C durante 2 h. Tras filtrar, el disolvente se elimina en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (acetonitrilo-H₂O 5:1) para obtener el compuesto **193** (66%).

Procedimiento general para la síntesis de triazoles a partir de sulfatos cíclicos

Una disolución en t-BuOH-H₂O 4:1 (5 mL) de cantidades equivalentes del compuesto **33** (100 mg, 0.41 mmol), NaN₃ (27 mg, 0.41 mmol), y el correspondiente alquino **172**, **212** o **213** (0.41 mmol para **172** y **212**; 0.20 mmol para **214**) se hace reaccionar con irradiación MW a 60°C durante 25 min. después de la adición del catalizador **Si-BPA** (3% mol Cu, 20 mg para **172** y **212**, 40 mg para **213**). El catalizador se separa por filtración. La evaporación del disolvente a presión reducida conduce directamente a los correspondientes 1,2,3-triazoles:

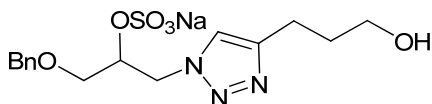
Capítulo 6

- Compuesto 214



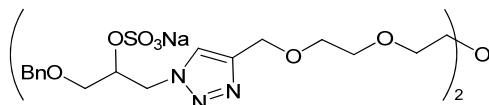
Aislado como sirupo (184 mg, 97%). **IR** (film): $\nu = 3433, 2976, 1703, 1523, 1366, 1253, 1169, 1029$ y 761 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 7.78$ (s, 1H), 7.35-7.19 (m, 5H), 4.65 (dd, 1H, $J=15.1$ y 6.0 Hz), 4.65 (m, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.16 (d, 2H, $J=5.3$ Hz), 3.37 (m, 3H, 1H intercambiable con D_2O), 1.36 (s, 9H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 156.0, 145.7, 138.6, 128.7, 127.9, 127.9, 124.0, 78.3, 73.2, 72.8, 69.0, 50.3, 36.1, 28.7$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 443.1595$ calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_7\text{S} [\text{M-Na}+2\text{H}]^+$: 443.1600.

- Compuesto 215



Aislado como sirupo (161mg, 100%). **IR** (film): $\nu = 3406, 2933, 1599, 1259$ y 1036 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 7.70$ (s, 1H), 7.32 (m, 5H), 4.63-4.43 (m, 5H), 3.44-3.38 (m, 4H), 2.61 (t, 2H, $J=7.7$ Hz), 1.71 (m, 2H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 100 MHz): $\delta = 146.4, 138.2, 128.2, 127.5, 127.4, 122.7, 72.9, 72.4, 68.7, 60.0, 49.9, 32.3, 21.6$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 416.0864$ calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}_2\text{S} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 416.0868.

- Compuesto 216



Aislado como sirupo (173 mg, 95%). **IR** (film): $\nu = 3467, 2872, 1654, 1455, 1235, 1098, 1028$ y 762 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 7.94$ (s, 2H), 7.35-7.18 (m, 10H), 4.66 (dd, 2H, $J=15.4$ y 6.1 Hz), 4.61-4.53 (m, 4H), 4.50 (s, 4H), 4.46 (d, 4H, $J=3.8$ Hz), 3.54-3.31 (varios m, 20H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 100 MHz): $\delta = 143.6, 138.2, 128.2, 127.5, 127.4, 124.8, 72.7, 72.4, 69.7, 69.6, 68.9, 68.7, 63.5, 50.0$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 911.2162$ calc. para $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}_3 [\text{M}+\text{Na}]^+$: 911.2156.

Cicloadiación de alquinos y óxidos de nitrilo generados *in situ* a partir de aldoximas

A una disolución del compuesto **218** (120 mg, 1.0 mmol) en CHCl_3 (6 mL) se añade NCS (160 mg, 1.2 mmol) manteniendo 3 h. a t.a. El disolvente se evapora a vacío y el crudo se disuelve en t-BuOH-H₂O (3:1, 10 mL), junto con el alquino **172** (124 mg, 0.8 mmol), adicionando lentamente Et₃N (140 μL , 1.0 mmol) y en presencia o ausencia de **Si-BPA-Cu⁺** (20 mg), manteniendo la disolución resultante durante 6 h. a t.a. Trascurrido ese tiempo el disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 5:1) para obtener el compuesto **223** (71% en ambos casos), aislado como sirupo. IR (film): $\nu = 3344, 2978, 2932, 1701, 1608, 1525, 1167$ y 769 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.79\text{-}7.75$ (m, 2H), $7.47\text{-}7.39$ (m, 3H), 6.48 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 1.45 (s, 9H); ¹³C-RMN (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 170.4, 162.5, 155.7, 130.0, 128.9, 126.8, 100.0, 80.2, 36.6, 28.3$; EM-AR (ESI): $m/z = 275.1398$ calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 275.1396.

Cicloadiación de alquinos y óxidos de nitrilo generados *in situ* a partir de cloruros de hidroximoílo

A una disolución del compuesto **180** (106 mg, 0.5 mmol) y **219** (171 mg, 1.1 mmol) en t-BuOH-H₂O (3:1, 10 mL) se adiciona lentamente Et₃N (154 μL , 1.1 mmol), manteniendo la disolución resultante durante 6 h. a t.a. Trascurrido ese tiempo el disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 1:1) para obtener el compuesto **224** (82%) aislado como sirupo. IR (film): $\nu = 3410, 2923, 1609, 1442, 1097, 1045$ y 769 cm^{-1} ; ¹H-RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.79\text{-}7.75$ (m, 4H), $7.44\text{-}7.41$ (m, 6H), 6.54 (s, 2H), 4.62 (s, 4H), 3.70 (s, 4H), 3.63 (s, 4H), 2.54 (sa, 2H); ¹³C-RMN (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 169.3, 162.4, 130.1, 128.9, 128.7, 126.8, 101.2, 71.4, 64.3, 64.1, 45.3$; EM-AR (ESI): $m/z = 451.1859$ calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 451.1869.

Polimerización de alquinos y óxidos de nitrilo generados *in situ* a partir de cloruros de hidroximoílos

Polímero lineal: A una disolución del dialquino **180** (212 mg, 1.0 mmol) y el compuesto **222** (280 mg, 1.2 mmol) en t-BuOH-H₂O (3:1, 10 mL) se adiciona lentamente Et₃N (330 μL , 2.4 mmol), manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 6 h. El sólido que aparece se filtra a vacío, lavando sucesivamente con H₂O (20 mL), MeOH (20 mL) y éter (20 mL), secando a vacío durante 12h para obtener el polímero **225** (323 mg, 87%).

Capítulo 6

Polímero entrecruzado: A una disolución de tetrapropargilpentaeritritol **181** (288 mg, 1.0 mmol) y el compuesto **222** (233 mg, 1.0 mmol) en t-BuOH-H₂O (3:1, 10 mL) se adiciona lentamente Et₃N (330 µL, 2.4 mmol), manteniendo con agitación magnética a t.a. durante 6 h. El sólido que aparece se filtra a vacío, lavando sucesivamente con H₂O (20 mL), MeOH (20 mL) y éter (20 mL), secando a vacío durante 12 h. para obtener el polímero **226** (224 mg, 50%).

Reacción CuAAC del polímero 226 con azidodansilo

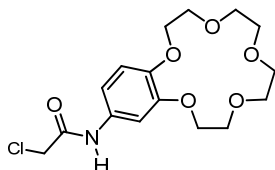
Una suspensión del polímero **226** (30 mg) en t-BuOH-H₂O (15 mL) junto con azidansilo **227** (10 mg, 0.030 mmol) y disolución comercial de CuCl 14% (5µL) como catalizador se irradia mediante MW a 60°C y 500 W durante 20 min. A continuación el sólido se filtra, lavando sucesivamente con H₂O (20 mL), MeOH (3x20 mL) y éter (20 mL) hasta no observar fluorescencia alguna en el lavado y se seca a vacío durante 12 h. para obtener el polímero fluorescente **228** (32 mg).

Procedimiento para eliminar Cu en reacciones catalizadas por Si-BPMA·Cu⁺ o Si-BPA·Cu⁺ empleando Si-BPMA o Si-BPA como agentes secuestrantes

La disolución obtenida tras la filtración del catalizador en las reacciones del alquino **171** o **177** con las azidas **183** o **186**, utilizando Si-BPMA·Cu⁺ o Si-BPA·Cu⁺, respectivamente (Tabla 6.2, entrada 2 y Tabla 6.3, entrada 16) que contiene el triazol **191** o **205** y 0.4 ppm de Cu, como se determina mediante AAS, correspondiente al leaching del catalizador heterogéneo, se trata en un proceso *batch* durante 6 h. con Si-BPMA o Si-BPA (25 mg), respectivamente. La disolución se filtra y la contaminación de Cu es de nuevo evaluada por AAS dando un resultado negativo en ambos casos. La evaporación a presión reducida del disolvente permite obtener los compuestos libres de Cu **191** y **205** respectivamente con unos rendimientos similares a los obtenidos en la reacción llevada a cabo sin tratamiento de eliminación de Cu.

Síntesis de 4'-[(2-azidoacetil)-amino]-benzo-15-corona-5 (231)

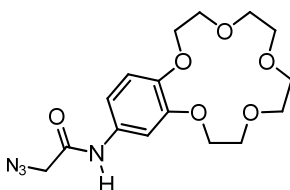
a) Síntesis de 4'-[(2-Cloroacetil)-amino]-benzo-15-corona-5



4'-Aminobenzo-15-corona-5 (1.0 g, 3.53 mmol), trietilamina (0.6 mL, 4.33 mmol) y anhídrido cloroacético (1.0 g, 5.85 mmol) se disuelven en AcOEt (30 mL)

manteniendo a t.a. con agitación magnética durante 1 h. A la mezcla de reacción se añade CH_2Cl_2 (160 mL), se lava con una disolución saturada de bicarbonato sódico (2x50 mL) y se seca después sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se elimina a vacío para obtener el cloro derivado en forma de sólido (1.21 g, 96 %). **P.f.** 137 °C; **IR** (KBr): $\nu = 3277, 2937, 2869, 1663, 1607, 1518, 1434, 1290, 1241$ y 1142 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 8.15$ (s, 1H), 7.28 (d, 1H, $J=6.5$ Hz), 6.94 (dd, 1H, $J=8.6$ Hz, $J = 2.1$ Hz), 6.84 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 4.18 (s, 2H), 4.12 (m, 4H), 3.91 (m, 4H), 3.76 (s, 8H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 163.6, 149.6, 146.7, 130.8, 114.7, 112.8, 107.2, 71.2, 71.1, 70.7, 70.6, 69.8, 69.7, 69.6, 69.1, 43.0$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 382.1025$ calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClNO}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 382.1033.

b) Síntesis del compuesto **231**



Una disolución del cloroacetyl derivado anterior (1.15 g, 3.20 mmol) en metanol (60 mL) y una disolución de azida sódica (0.73 g, 11.21 mmol) en agua (20 mL) se mezclan calentando la disolución resultante a reflujo durante 15 h. Tras evaporar el metanol a vacío se añaden 40 mL de agua y la disolución se extrae con CH_2Cl_2 (3x100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan con sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida para obtener el producto **231** (1.10 g, 94%) en forma de sólido. **P.f.** 117-119°C; **IR** (KBr): $\nu = 3301, 2933, 2869, 2100, 1663, 1607, 1518, 1416, 1264, 1134$ y 1051 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 7.98$ (s, 1H), 7.28 (d, 1H, $J=2.2$ Hz), 6.93 (dd, 1H, $J=8.6$ Hz, $J=2.3$ Hz), 6.82 (d, 1H, $J=8.6$ Hz), 4.13 (m, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.90 (m, 4H), 3.76 (s, 8H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 164.4, 149.5, 146.4, 131.0, 114.8, 112.7, 107.2, 71.1, 71.0, 70.6, 70.5, 69.7, 69.6, 69.5, 69.1, 53.0$; **EM-AR** (FAB^+): $m/z = 389.1438$ calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 389.1437.

Empleo de agentes secuestrantes de azida y Cu en reacciones catalizadas por $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$

Una disolución en DMF (5 mL) del alquino **212** (42 mg, 0.5 mmol) y la azida **185** o **231** (0.75 mmol) se hace reaccionar mediante irradiación MW en presencia de $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ (17 mg, 0.05 mmol) durante 10 min (Tabla 6.7, entradas 1 y 3). A continuación se añade al crudo de reacción alquino-sílica²¹⁶ **230** (0.8 g) y se irradia

Capítulo 6

con MW durante 30 min. para eliminar el exceso de azida. Finalmente se añade **Si-BPA** (0.28 g) al crudo de reacción manteniendo la agitación a t.a. durante 12 h. Tras filtrar se determina la cantidad de Cu en el crudo mediante AAS. Finalmente el disolvente se evapora a vacío para obtener los triazoles **232** y **233** con rendimientos ambos del 100%.

Empleo de agentes secuestrantes de alquino y Cu en reacciones catalizadas por $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$

Una disolución en DMF (5 mL) del alquino **212** (63 mg, 0.75 mmol) y la azida **185** o **231** (0.5 mmol) se hace reaccionar mediante irradiación MW en presencia de $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ (17 mg, 0.05 mmol) durante 10 min (Tabla 6.7, entradas 2 y 4). A continuación se añade al crudo de reacción azido-sílica²¹⁶ **229** (0.8 g) y se irradia con MW durante 30 min para eliminar el exceso de alquino. Finalmente se añade **Si-BPA** (0.28 g) al crudo de reacción manteniendo la agitación a t.a. durante 12 h. Tras filtrar se determina la cantidad de Cu en el crudo mediante AAS. Finalmente el disolvente se evapora a vacío para obtener los triazoles **232** y **233** con rendimientos del 100% y 94% respectivamente.

Procedimiento para eliminar el Cu en reacciones catalizadas por CuCl empleando **Si-His** o **Si-BPA** como agentes secuestrantes

Una disolución acuosa (10 mL) de cantidades equivalentes del alquino **171**, **177** o **180** (0.7 mmol) con la azida **184** (0.7 mmol para la reacción con **171** y **177**, y 0.14 mmol para la reacción con **180**) (Tabla 6.6, entradas 1-3) se hace reaccionar empleando una disolución comercial de CuCl (1% mol, 5 μL para la reacción con **171** y **177**, 10 μL para la reacción con **180**) mediante irradiación con MW durante 10 min. El contenido en Cu se evalúa mediante AAS (45 ppm para la reacción con **171** y **177**, y 90 ppm para la reacción con **180**). La mezcla de reacción se filtra a través de una pequeña columna conteniendo **Si-BPA** o **Si-His** (0.25 g para la reacción con **171** y **177**, 0.5 g para la reacción con **180**). Una nueva evaluación del contenido en Cu mediante AAS tras este tratamiento da resultado negativo en todos los casos. La evaporación del disolvente a vacío permite obtener los correspondientes 1,2,3-triazoles libres de Cu **192**, **203** y **209** respectivamente en los rendimientos indicados en la Tabla 6.6.

Procedimiento para eliminar el Cu en reacciones catalizadas con CuCl mediante el agente secuestrante Dw-BPMA

Una disolución del alquino **177** (0.7 mmol) y la azida **184** (0.7 mmol) en agua (10 mL) con CuCl (1% mol) se hace reaccionar mediante irradiación MW durante 10 min. (Tabla 6.6, entrada 2). El contenido en Cu se cuantifica mediante AAS en el crudo de reacción y tras su tratamiento en *batch* con **Dw-BPMA** durante 12 h.

Procedimiento para eliminar el Cu mediante el agente secuestrante Si-BPA en combinación con sílicas funcionalizadas con alquino y azida como agentes secuestrantes para reacciones “click”

Una disolución acuosa (10 mL) del alquino **180** (0.7 mmol) y la azida **185** (1.68 mmol) así como del alquino **177** (1.4 mmol) y la azida **187** (0.7 mmol) se hacen reaccionar respectivamente utilizando una disolución comercial de CuCl (1% mol, 10 μ L o 5 μ L respectivamente) mediante irradiación con MW durante 10-20 min. (Tabla 6.6, entradas 4 y 5). Alquino-sílica **230** (0.93 g) o azido-sílica **229** (0.2 g) se añaden respectivamente al crudo de reacción y se irradia con MW durante 30 min. para eliminar el exceso del reactivo “click” complementario. El contenido en Cu se evalúa en el crudo de reacción mediante AAS (90 ppm y 45 ppm, respectivamente). La mezcla de reacción se filtra a través de una pequeña columna conteniendo **Si-BPA** (0.5 g y 0.25 g, respectivamente). Una nueva evaluación del contenido en Cu por AAS da resultados negativos en ambos casos. La evaporación del disolvente a vacío permite obtener los 1,2,3-triazoles libres de Cu **210** y **206** respectivamente con los rendimientos indicados en la Tabla 6.6.

Preparación de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) (234)

FeCl₃ (815 mg, 5 mmol) se disuelve en etilenglicol (40 mL) formando una disolución clara. Tras la adición de NaOAc (3.6 g) la mezcla de reacción se agita vigorosamente durante 30 min. y después se calienta a 200°C por medio de un baño de aceite durante 8 h. Tras enfriar, se añade etanol (30 mL) y las partículas magnéticas resultantes se colectan mediante un imán. Las partículas se lavan sucesivamente con EtOH (4 x 30 mL), agua (4 x 30 mL) y EtOH absoluto (30 mL), y se secan a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. obteniendo **234** (0.446 g).

Síntesis de (N,N-Bis(piridin-2-ilmetil)-N'[3-(etoxisilil)propil] 1,2-etanodiamina (237)

Una disolución de (3-aminopropil)triethoxisilano (APTS) (0.104 mmol, 22.9 mg) y la vinilsulfona **170** (0.104 mmol, 30 mg) en THF-isopropanol (2:1, 5 mL) se mantiene a reflujo durante 1 h. Tras la evaporación del disolvente se obtiene el compuesto **237** como un líquido que se emplea directamente en la siguiente etapa.

Preparación de las nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica Fe₃O₄@Si-BPA (238)

Método Grafting. Las nanopartículas de magnetita **234** (0.1 g) son recubiertas con sílica mediante el método de Stöber suspendiéndolas en una mezcla de EtOH (300 mL), agua (80 mL) y amoníaco (10 mL) y la posterior adición de TEOS (1.0 mL). La mezcla se mantiene 24 h. a t.a. bajo agitación orbital. Las partículas resultantes se colectan mediante un imán, y se lavan sucesivamente con EtOH:H₂O 1:1 (6x50 mL) y EtOH (50 mL), y se secan a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h dando **235** (0.125 g). Estas partículas se suspenden en tolueno anhidro (25 mL) y se adiciona (3-aminopropil)triethoxisilano (APTS) (0.120 mL). La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 3 h. Las partículas de magnetita recubiertas de sílica funcionalizada **236** (Fe₃O₄@Si-NH₂) se colectan empleando un imán y se lavan sucesivamente con EtOH:H₂O 1:1 (3x30 mL) y EtOH (30 mL) y se usan directamente en la siguiente etapa, suspendiéndolas en THF-isopropanol (2:1, 10 mL). Se adiciona el ligando vinil sulfona **170** (30 mg, 0.1 mmol) a esta suspensión y la mezcla resultante se calienta a 60°C durante 16 h. La separación magnética de las nuevas partículas con un imán y su posterior lavado con THF-isopropanol (2:1, 2x30 mL), CH₂Cl₂ (2x30 mL), EtOH (2x30 mL) y agua (30 mL), permite obtener las partículas magnéticas funcionalizadas **238** (Fe₃O₄@Si-BPA) (0.125 g).

Método de co-condensación: Las partículas de magnetita **234** (0.1 g) se suspenden en una mezcla de EtOH (300 mL), agua (80 mL) y amoníaco (10 mL). Tras la adición de TEOS (1.0 mL) y **237** (53 mg) la mezcla de reacción se mantiene 24 h. a t.a. bajo agitación orbital. Las partículas recubiertas de sílica resultantes se colectan mediante un imán y se lavan sucesivamente con EtOH:H₂O 1:1 (6x50 mL) y EtOH (50 mL), y se secan a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h. obteniendo las partículas magnéticas funcionalizadas **238** (Fe₃O₄@Si-BPA) (0.115 g).

Preparación de nanopartículas magnéticas con Cu(I) soportado $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (239)

Las partículas magnéticas recubiertas de sílica funcionalizada $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}$ (**238**) se suspenden en agua destilada (3 mL) previamente desoxigenada con argón. Se adiciona una disolución comercial de CuCl (0.3 mL) y la mezcla resultante se mantiene a t.a. durante 16 h. con agitación orbital. La separación magnética de las partículas resultantes mediante un imán y el lavado sucesivo con agua (10x30 mL) y EtOH (2x30 mL) permite obtener las partículas magnéticas con Cu(I) soportado **239** ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$), que se secan a vacío (1mm Hg) a 50°C durante 16 h.

Procedimiento general para la síntesis de 1,2,3-triazoles catalizada por partículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$

Una disolución en t-BuOH-H₂O (10:1) o H₂O, o una mezcla neta de cantidades equivalentes del correspondiente alquino (**172**, **177** y **182**) y azido derivado (**183-185**) (Tabla 6.9) se hacen reaccionar a t.a. o con irradiación MW a 60 °C tras la adición del catalizador $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ **239** (las cantidades de disolvente y catalizador se indican en la Tabla 6.9, entradas 1-6). La reacción se sigue mediante c.c.f. hasta la completa desaparición de los productos de partida (tiempos de reacción indicados en la Tabla 6.9, entradas 1-6). El catalizador se recoge mediante un imán directamente en el caso de reacciones en disolución o tras la adición de CH₂Cl₂ (10 mL) en el caso de reacciones netas. Después de lavar el catalizador con el disolvente de la reacción (10 mL), la evaporación de las disoluciones obtenidas a vacío permite obtener los 1,2,3-triazoles **191**, **192**, **194**, **203**, **204** y **146** con los rendimientos indicados en la Tabla 6.9 (entradas 1-6) sin ninguna purificación cromatográfica.

Reciclaje del catalizador $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$

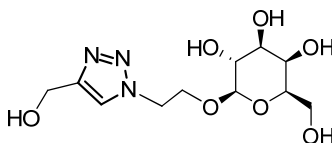
El alquino **172** (1 mmol) y la azida **183** (1 mmol) se hacen reaccionar como en el caso anterior (Tabla 6.9, entrada 3) empleando $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (20 mg) como catalizador. Tras coleccionar el catalizador mediante un imán el crudo de reacción se decanta, lavando el catalizador con el disolvente de la reacción y volviendo a utilizar el catalizador en un segundo ciclo con una disolución idéntica de los reactivos. El procedimiento se repite para un tercer ciclo. La evaporación a vacío de las correspondientes disoluciones obtenidas en cada ciclo permite obtener el 1,2,3-triazol **194** con rendimientos del 99%, 100% y 97%, respectivamente.

Ensayo con partículas magnéticas Fe₃O₄@Si-BPA (238)

Una disolución en t-BuOH-H₂O (10:1) de cantidades equimoleculares del alquino **172** (1 mmol) y la azida **183** (1 mmol) se hace reaccionar con irradiación MW a 60°C durante 2 h. con **Fe₃O₄@Si-BPA 238** (20 mg) (Tabla 6.9, entrada 8). Las partículas magnéticas se separan mediante un imán. La evaporación del disolvente da una mezcla (1:0.7) inseparable de los correspondientes 1,4- (**194**) y 1,5-regioisómeros con un rendimiento total del 10% : ¹H-RMN (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.76 (s, 1 H, **194**), 7.61 (s, 0.7 H, 1,5-regioisómero), 7.34-7.18 (m, 8.5H, **194** y 1,5-regioisómero), 5.63 (s, 1.4 H, 1,5-regioisómero), 5.54 (s, 2H, **194**), 4.27 (s, 2H, **194**), 4.25 (s, 1.4 H, 1,5-regioisómero), 1.40 (s, 6.3 H, 1,5-regioisómero) 1.39 (s, 9H, **194**); ¹³C-RMN (CD₃OD, 125 MHz): δ = 158.3 (**194**), 158.1, 147.7 (**194**), 137.7, 136.9 (**194**), 136.7, 134.3, 130.1 (**194**), 129.7 (**194**), 129.4, 129.2 (**194**), 128.5, 124.0 (**194**), 80.9, 80.5 (**194**), 55.0 (**194**), 52.8, 36.9 (**194**), 34.3, 28.9 (**194**), 28.8.

Datos analíticos y espectroscópicos de 1,2,3-triazoles obtenidos

Los compuestos **191**,³⁸⁶ **192**,⁵³⁷ **194**,³⁶⁴ **199**,⁵³⁸ **200**,⁵³⁹ **202**⁵⁴⁰ y **207**⁵⁴¹ muestran datos físicos y espectroscópicos idénticos a los descritos previamente en bibliografía.

-1-(β-D-Galactopiranosiloxietil)-4-(2-hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol (193)

Aislado como sirupo. [α]_D +5.5° (c 1, agua); IR (film): ν = 3488, 2881, 1653, 1435, 1070 y 890 cm⁻¹; ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ = 8.03 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.64 (t, 2H, J=5.0 Hz), 4.27 (d, 1H, J=7.3 Hz), 4.23 (dt, 1H, J=11.5 y 5.2 Hz), 4.00 (dt,

537. Zhao, Y.-L.; Dichtel, W. R.; Trabolsi, A.; Saha, S.; Aprahamian, I.; Stoddart, J. F., A Redox-Switchable α-Cyclodextrin-Based [2]Rotaxane. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11294-11296.

538. Richardson, C.; Fitchett, C. M.; Keene, F. R.; Steel, P. J., 4,5-Di(2-pyridyl)-1,2,3-triazolate: the elusive member of a family of bridging ligands that facilitate strong metal-metal interactions. *Dalton Trans.* **2008**, (19), 2534-2537.

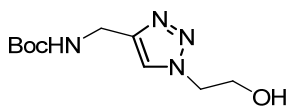
539. Díez-González, S.; Nolan, Steven P., [(NHC)₂Cu]X Complexes as Efficient Catalysts for Azide-Alkyne Click Chemistry at Low Catalyst Loadings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (46), 8881-8884.

540. Iwasaki, M.; Yorimitsu, H.; Oshima, K., Microwave-assisted palladium-catalyzed direct arylation of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles with aryl chlorides. *Chem.-Asian J.* **2007**, *2* (11), 1430-1435.

541. Perez-Balderas, F.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-García, J.; Santoyo-Gonzalez, F., Click Multivalent Homogeneous Neoglycoconjugates - Synthesis and Evaluation of Their Binding Affinities. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, (15), 2441-2453.

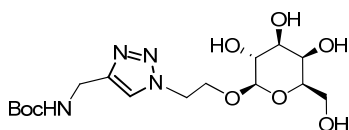
1H, $J=11.4$ y 5.1 Hz), 3.82 (d, 1H, $J=2.7$ Hz), 3.75 (dd, 1H, $J=11.5$ y 7.2 Hz), 3.70 (dd, 1H, $J=11.5$ y 5.3 Hz), 3.55-3.44 (m, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 125 MHz): $\delta = 148.6$, 125.3, 105.0, 76.7, 74.7, 72.3, 70.2, 69.0, 62.4, 56.4, 51.5; **EM-AR** (ESI): $m/z = 328.1113$ calc. para $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 328.1121.

-1-(2-Hidroxietil)-4-(2-tert-butoxicarbonilaminometil)-1H-1,2,3-triazol (195)



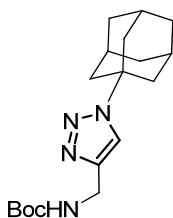
Aislado como sirupo. **IR** (film): $\nu = 3334$, 2976, 1690, 1524, 1169, 1054 y 864 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.62$ (s, 1H), 5.57 (sa, 1H), 4.39 (t, 2H, $J=4.6$ Hz), 4.26 (d, 2H, $J=5.8$ Hz), 3.94 (t, 2H, $J=4.7$ Hz), 3.57 (sa, 1H), 1.33 (s, 9H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 156.1$, 145.3, 123.1, 79.8, 60.7, 52.7, 35.9, 28.4; **EM-AR** (ESI): $m/z = 265.1269$ calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 265.1277.

-1-(β -D-Galactopiranosiloxietil)-4-(2-tert-butoxicarbonilaminometil)-1H-1,2,3-triazol (196)



Aislado como sirupo. $[\alpha]_D +32^\circ$ (c 0.5, CH_3OH); **IR** (film): $\nu = 3391$, 2930, 1689, 1525, 1367 y 1056 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 7.85$ (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.64-4.56 (m, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.08 (ddd, 1H, $J=10.8$, 6.7 y 4.1 Hz), 3.86 (ddd, 1H, $J=10.8$, 6.0 y 4.1 Hz), 3.78-3.72 (m, 2H), 3.64 (dd, 1H, $J=11.8$ y 5.8 Hz), 3.60-3.56 (m, 2H), 3.16-3.10 (m, 1H), 1.44 (s, 9H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 125 MHz): $\delta = 156.8$, 145.7, 123.2, 100.1, 79.1, 73.4, 71.0, 70.4, 67.0, 65.2, 61.4, 49.8, 35.3, 27.4; **EM-AR** (ESI): $m/z = 427.1801$ calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 427.1805.

-1-(1-Adamantil)-4-(tert-butoxicarbonilaminometil)-1H-1,2,3-triazol (197)

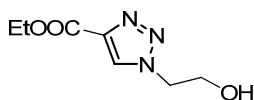


Aislado como sólido blanco. **P.f.** $118-119^\circ\text{C}$; **IR** (film): $\nu = 3338$, 2911, 1704, 1511 y 1169 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.57$ (s, 1H), 5.20 (sa, 1H), 4.37 (s,

Capítulo 6

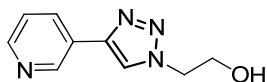
2H), 2.22 (s, 3H), 2.19 (s, 6H), 1.76 (s, 6H), 1.41 (s, 9H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 155.8, 79.5, 59.8, 43.0, 35.9, 29.4, 28.4; **EM-AR** (NALDI): m/z = 355.2096 calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 355.2104.

-1-(2-Hidroxiethyl)-4-etoxicarbonil-1H-1,2,3-triazol (198)



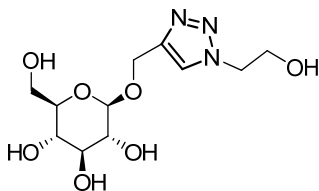
Aislado como sirupo. **IR** (film): ν = 3386, 3141, 2936, 1725 y 1214 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 8.17 (s, 1H), 4.47 (t, 2H, $J=5.0$ Hz), 4.30 (q, 2H, $J=7.1$ Hz), 4.02 (t, 2H, $J=4.9$ Hz), 3.59 (s, 1H), 1.31 (t, 3H, $J=7.1$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 160.7, 139.6, 128.7, 61.3, 60.7, 53.2, 14.2; **EM-AR** (NALDI): m/z = 208.0692 calc. para $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 208.0693.

-1-(2-Hidroxiethyl)-4-(3-piridil)-1H-1,2,3-triazol (201)



Aislado como sólido blanco. **P.f.** 96-97°C; **IR** (film): ν = 3363, 2924, 1654, 1453, 1061, 806 y 706 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ = 9.06 (d, 1H, $J=2.0$ Hz), 8.66 (s, 1H), 8.53 (dd, 1H, $J=4.7$ y 1.5 Hz), 8.21 (dt, 1H, $J=8.4$ y 1.7 Hz), 7.48 (dd, 1H, $J=7.9$ y 4.8 Hz), 5.08 (t, 2H, $J=5.4$ Hz), 4.47 (t, 2H, $J=5.4$ Hz), 3.84 (q, 2H, $J=5.4$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d_6 , 100 MHz): δ = 148.7, 146.3, 143.3, 132.3, 126.8, 123.9, 122.5, 59.8, 52.5; **EM-AR** (ESI): m/z = 191.0937 calc. para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 191.0933.

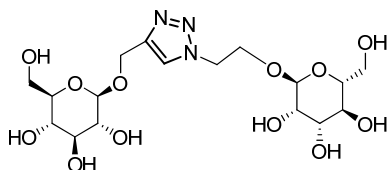
-1-(2-Hidroxiethyl)-4-(β -D-glucopiranosiloximetil)-1H-1,2,3-triazol (203)



Aislado como sirupo. $[\alpha]_D$ -28° (c 1, agua); **IR** (film): ν = 3418, 2922, 2881, 1654, 1076 y 627 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 400 MHz): δ = 7.99 (s, 1H), 4.88 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 4.76 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 4.47- 4.40 (m, 3H), 3.88 (t, 2H, $J=4.9$ Hz), 3.80 (d, 1H, $J=12.3$ Hz), 3.60 (dd, 1H, $J=12.3$, 5.8 Hz), 3.39- 3.32 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H, $J=17.0$, 7.5 Hz), 3.17 (t, 1H, $J=8.5$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O , 75 MHz): δ = 144.5, 126.7, 102.4, 76.9,

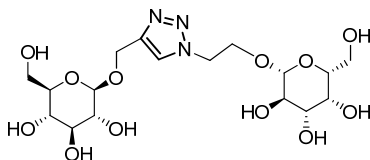
76.7, 74.0, 70.6, 62.8, 61.7, 61.0, 53.5; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 328.1124$ calc. para $C_{11}H_{19}N_3O_7Na$ $[M+Na]^+$: 328.1120.

-1-(α -D-Manopiranosiloximetil)-4-(β -D-glucopiranosiloximetil)-1H-1,2,3-triazol (204)



Aislado como sirupo. $[\alpha]_D +4.6^\circ$ (c 1, agua); **IR** (film): $\nu = 3382, 2920, 1655, 1459$ y 1053 cm^{-1} ; **1H -RMN** (D_2O , 400 MHz): $\delta = 8.04$ (s, 1H), 4.92 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 4.78 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 4.70 (d, 1H, $J=1.5$ Hz), 4.62-4.57 (m, 2H), 4.45 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 4.02 (ddd, 1H, $J=10.9, 6.5$ y 4.2 Hz), 3.89-3.80 (m, 3H), 3.77 (dd, 1H, $J=3.2$ y 1.7 Hz), 3.68-3.55 (m, 3H), 3.50 (t, 1H, $J=9.7$ Hz), 3.41-3.35 (m, 2H), 3.30 (t, 1H, $J=9.3$ Hz), 3.20 (m, 1H), 3.00 (ddd, 1H, $J=8.2, 5.7$ y 2.3 Hz); **^{13}C -RMN** (D_2O , 75 MHz): $\delta = 144.6, 126.8, 102.4, 100.6, 77.0, 76.7, 74.0, 73.8, 71.4, 70.9, 70.6, 67.4, 66.5, 62.8, 61.7, 61.6, 51.1$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 490.1644$ calc. para $C_{17}H_{29}N_3O_{12}Na$ $[M+Na]^+$: 490.1644.

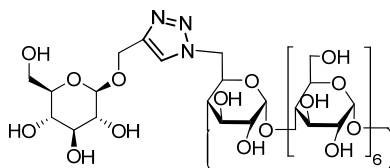
-1-(β -D-Galactopiranosiloximetil)-4-(β -D-glucopiranosiloximetil)-1H-1,2,3-triazol (205)



Aislado como sirupo. $[\alpha]_D -18^\circ$ (c 1, agua); **IR** (film): $\nu = 3384, 2922, 2866, 1654, 1378, 1231, 1077, 890$ y 782 cm^{-1} ; **1H -RMN** (D_2O , 400 MHz): $\delta = 8.04$ (s, 1H), 4.88 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 4.75 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 4.57 (t, 2H, $J=4.8$ Hz), 4.43 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 4.24 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 4.19 (dt, 1H, $J=11.9$ y 4.7 Hz), 3.99 (dt, 1H, $J=11.7$ y 5.1 Hz), 3.82-3.76 (m, 2H), 3.64-3.51 (m, 4H), 3.49 (dd, 1H, $J=9.9$ y 3.4 Hz), 3.39-3.32 (m, 3H), 3.25 (t, 1H, $J=9.3$ Hz), 3.16 (t, 1H, $J=8.6$ Hz); **^{13}C -RMN** (D_2O , 75 MHz): $\delta = 144.5, 127.1, 104.0, 102.4, 76.9, 76.7, 76.1, 74.0, 73.6, 71.6, 70.6, 69.5, 69.0, 62.8, 61.9, 61.7, 51.4$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 490.1644$ calc. para $C_{17}H_{29}N_3O_{12}Na$ $[M+Na]^+$: 490.1649.

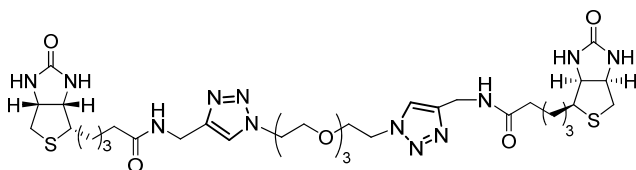
Capítulo 6

-1-(6¹-Deoxiciclomaltoheptos-6¹-il)-4-(β-D-glucopiranosiloximetil)-1H-1,2,3-triazol
(206)



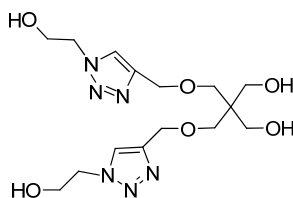
Aislado como sólido. **P.f.** >250°C dec.; $[\alpha]_D^{+79^\circ}$ (c 1, agua); **IR** (KBr): $\nu = 3387, 2927, 1649, 1418, 1155, 1078$ y 1029 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (D₂O, 500 MHz): (señales seleccionadas) $\delta = 8.06$ (s, 1H), 5.11 (d, 1H, $J=3.5$ Hz), 4.80 (d, 1H, $J=12.4$ Hz), 4.51 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 4.13 (t, 1H, $J=8.8$ Hz), 3.23 (t, 1H, $J=8.6$ Hz), 3.14 (d, 1H, $J=11.9$ Hz); **¹³C-RMN** (D₂O, 125 MHz): $\delta = 143.6, 127.1, 102.0, 101.9, 101.9, 101.9, 101.8, 101.6, 101.5, 83.1, 81.3, 81.1, 80.8, 76.0, 75.8, 73.1, 72.9, 72.8, 72.1, 72.0, 71.9, 71.8, 71.8, 71.4, 70.5, 69.7, 61.9, 60.9, 60.4, 60.3, 59.2, 51.2$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 1378.4617$ calc. para C₅₁H₈₄N₃O₄₀ [M+H]⁺: 1378.4631.

-Compuesto 208



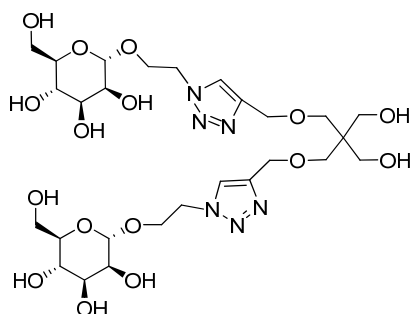
Aislado como espuma sólida. **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500 MHz): $\delta = 8.25$ (t, 2H, $J=5.5$ Hz), 7.83 (s, 2H), 6.38 (s, 2H), 6.32 (s, 2H), 4.46 (t, 4H, $J=5.3$ Hz), 4.28 (m, 2H), 4.25 (d, 4H, $J=5.7$ Hz), 4.13-4.08 (m, 2H), 3.77 (t, 4H, $J=5.3$ Hz), 3.59-3.37 (m, 10H), 3.07 (m, 2H), 2.80 (dd, 4H, $J=5.1$ y 12.4 Hz), 2.56 (d, 2H, $J=12.5$ Hz), 2.07 (t, 4H, $J=7.5$ Hz), 1.62-1.39 (m, 8H), 1.33-1.20 (m, 4H); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 126 MHz): $\delta = 172.4, 163.1, 145.3, 123.5, 70.1, 67.0, 69.2, 61.5, 59.6, 55.8, 49.7, 35.4, 34.5, 28.6, 28.5, 25.6$. **EM-AR** (MALDI): $m/z = 829.3593$ calc. para C₃₄H₅₄N₁₂O₇Na [M+Na]⁺: 829.3572.

-2,2-Bis(((1-(2-hidroxietyl)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)propano-1,3-diol (**209**)



Aislado como sirupo. **IR** (film): $\nu = 3371, 2924, 2877, 1654, 1460, 1226, 1139, 1055$ y 665 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CD_3OD , 400 MHz): $\delta = 7.95$ (s, 2H), 4.55 (s, 4H), 4.48 (t, 4H, $J=5.2$ Hz), 3.93 (t, 4H, $J=5.2$ Hz), 3.55 (s, 4H), 3.47 (s, 4H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CD_3OD , 100 MHz): $\delta = 146.1, 125.6, 70.7, 65.5, 62.8, 61.7, 54.0, 47.0$; **EM-AR** (ESI): $m/z = 387.1988$ calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 387.1992.

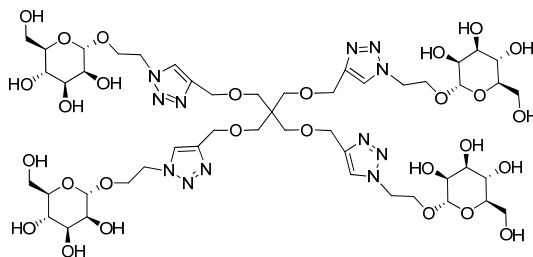
-2,2-Bis(((1-(α -D-manopiranosiloxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)propano-1,3-diol (**210**)



Aislado como sirupo. $[\alpha]_{\text{D}} +21.6^\circ$ (c 1, agua); **IR** (KBr): $\nu = 3420, 2925, 1654, 1099$ y 620 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (D_2O , 400 MHz): $\delta = 7.98$ (s, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.61-4.55 (m, 4H), 4.52 (s, 4H), 4.06-3.98 (m, 2H), 3.88-3.81 (m, 2H), 3.78 (dd, 2H, $J=3.1$ y 1.8 Hz), 3.66 (dd, 2H, $J=12.3$ y 2.3 Hz), 3.61-3.50 (m, 6H), 3.45 (s, 4H), 3.40 (s, 4H), 3.03-2.97 (m, 2H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (D_2O , 100 MHz): $\delta = 144.3, 125.4, 99.6, 72.8, 70.4, 69.9, 69.0, 66.4, 65.5, 63.6, 61.0, 60.7, 50.1, 45.1$; **EM-AR** (MALDI): $m/z = 733.2855$ calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 733.2862.

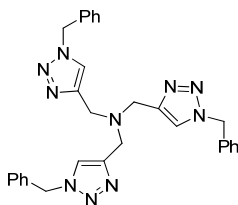
Capítulo 6

-Tetrakis-1-(α -D-manopiranosiloxietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-metiloximetil]metano (211)



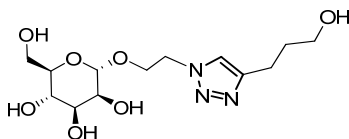
Aislado como sirupo. $[\alpha]_D +40.3^\circ$ (c 1, agua); $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 7.99$ (s, 4H), 4.74-4.66 (m, 8H), 4.59 (sa, 4H), 4.58-4.47 (m, 12H), 4.46-4.36 (m, 12H), 3.97-3.88 (m, 4H), 3.83 - 3.72 (m, 4H), 3.60 (m, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.40 (m, 4H), 3.37 (s, 12H), 3.14 (t, 4H, $J=6.9$ Hz); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 144.5$, 124.4, 100.3, 74.6, 71.3, 70.51, 69.13, 67.23, 65.33, 64.61, 61.60, 49.68, 45.36.

-N,N,N,-Tris-[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (146)

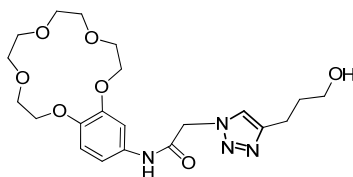


Datos físicos y de $^1\text{H-RMN}$ idénticos a los descritos en bibliografía.³⁷³ $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 144.0$, 134.7, 129.1, 128.7, 128.0, 123.9, 54.1, 47.0.

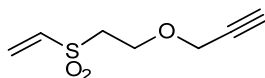
-1-(3-Hidroxipropil)-4-(α -D-manopiranosiloxietil)-1H-1,2,3-triazol (232)



Aislado como sirupo. $[\alpha]_D +30.4^\circ$ (c 0.5, MeOH); **IR** (film): $\nu = 3390$, 2929, 1653, 1553, 1221, 1056, 807 y 676 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (CD₃OD, 500 MHz): $\delta = 7.78$ (s, 1H), 4.72 (d, 1H, $J=1.4$ Hz), 4.61- 4.56 (m, 2H), 4.10 (ddd, 1H, $J=10.7$, 6.6 y 4.0 Hz), 3.85 (ddd, 1H, $J=10.5$, 6.1 y 4.1 Hz), 3.78- 3.73 (m, 2H), 3.66 (dd, 1H, $J=11.8$ y 5.8 Hz), 3.60- 3.56 (m, 4H), 3.21 (ddd, 1H, $J=8.8$, 5.8 y 2.4 Hz), 2.77 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 1.88 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD₃OD, 125 MHz): $\delta = 148.7$, 124.0, 101.6, 74.9, 72.4, 71.9, 68.3, 66.8, 62.7, 61.9, 51.1, 33.2, 22.6; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 356.1428$ calc. para C₁₃H₂₃N₃O₇Na [M+Na]⁺: 356.1428.

-Compuesto 233

Aislado como sólido. **P.f.** 122-123°C; **IR** (film): $\nu = 3402, 2929, 1688, 1513, 1230$ y 1129 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 10.28$ (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.01 (d, 1H, $J=8.7$ Hz), 6.89 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 5.20 (s, 2H), 4.47 (s, 1H), 3.98 (s, 4H), 3.74 (s, 4H), 3.59 (s, 8H), 3.45- 3.41 (m, 2H), 2.65 (t, 2H, $J=7.4$ Hz), 1.74 (m, 2H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 125 MHz): $\delta = 169.1, 153.7, 151.8, 150.1, 137.5, 128.6, 119.6, 116.8, 111.2, 75.6, 75.0, 74.1, 73.9, 73.5, 65.3, 57.3, 37.5, 26.8$; **EM-AR** (NALDI): $m/z = 473.2012$ calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 473.2007.

Síntesis de 3-(2-(vinilsulfonil)etoxi)prop-1-ino (240)

A una disolución de alcohol propargílico (200 mg, 3.57 mmol) en THF (15 mL) se añade DVS (0.7 mL, 7.14 mmol) y t-BuOK (40 mg, 0.36 mmol). La mezcla de reacción se mantiene 10 min. a t.a. con agitación magnética. El disolvente se evapora a presión reducida obteniéndose un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna (Hexano-AcOEt 7:1) para dar 420 mg (67%) del compuesto **240** en forma de sirupo incoloro. **IR** (film): $\nu = 3276, 2923, 2116, 1313, 1100$ y 756 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 6.73$ (dd, 1H, $J=16.6, 9.9$), 6.42 (d, 1H, $J=16.6$), 6.12 (d, 1H, $J=9.9$), 4.18 (d, 2H, $J=2.4$), 3.95 (t, 2H, $J=5.7$), 3.29 (t, 2H, $J=5.7$), 2.49 (t, 1H, $J=2.4$). **$^{13}\text{C-RMN}$** (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 137.5, 129.2, 78.5, 75.5, 63.3, 58.5, 54.8$.

Preparación de BSA conteniendo grupos alquino (241)

A una disolución de BSA (2 mg/mL, 1 mL) en tampón HEPES 0.1 M pH 8.0 se añaden 80 μL de una disolución 30 mM del compuesto **240** en DMSO, incubando a 37°C durante 18 h. Se centrifuga (14000 rpm) durante 3 min y el sobrenadante se dializa a t.a. frente a tampón fosfato 50 mM pH 8.0.

Marcaje fluorescente de BSA modificada mediante CuAAC

La disolución de alquino-BSA **241** obtenida anteriormente se trata con azidofluoresceína **243** (30 mM en DMSO-H₂O 1:1) en presencia de catalizadores homogéneos o heterogéneos (CuSO₄ 10 mM en H₂O, ascorbato 20 mM en H₂O, **Si-BPA·Cu⁺** o **Si-His·Cu⁺**) en las cantidades indicadas en las tablas (Sección 6.7.7). Las disoluciones se incuban a t.a. o 37°C. A diferentes tiempos, tras centrifugar (14000 rpm, 1 min), se toman alícuotas de 10 µL que se combinan con el doble de volumen de tampón de carga de electroforesis para finalizar la reacción. Las diferentes muestras se calientan a 100°C durante 4 min, se centrifugan (14000 rpm, 1 min) y finalmente se analizan mediante SDS-PAGE, cargando 10 µL (o 2.5 µL en algunos casos) de muestra y a un potencial constante de 150 V. Gel concentrador: 4%. Gel separador: 12 %.

Preparación de lumazina conteniendo grupos alquino (242)

A una disolución de lumazina (2 mg/mL, 100 µL) en tampón fosfato 0.1 M pH 8.7 se añaden 5 µL de una disolución 30 mM del compuesto **240** en DMSO, manteniendo a t.a. durante 18 h. Tras centrifugar a 14000 rpm durante 3 min sin observar precipitación alguna, la disolución se utiliza directamente en la siguiente etapa.

Marcaje fluorescente de lumazina modificada mediante CuAAC

La disolución de lumazina-alquino **242** obtenida anteriormente se trata con azidofluoresceína **243** (30 mM en DMSO-H₂O 1:1) en presencia de catalizadores homogéneos o heterogéneos como se indica en la tabla 6.10, manteniendo 8 h. a t.a. Transcurrido ese tiempo y después de centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos, las diferentes muestras se analizan mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE), combinando 2.5 µL del sobrenadante con un volumen igual de tampón de carga. Gel concentrador: 3.5%. Gel separador: 6.5%. Potencial constante: 150V. 240 min.

Ensayos de estabilidad del DNA en presencia de catalizadores “click”

A una disolución de DNA (4 µg/µL, 2µL) en tampón fosfato 50 mM pH 8.0 (98 µL), se adiciona el catalizador heterogéneo **Si-BPA·Cu⁺** o bien una disolución de CuSO₄ (10mM, 10 µL) en ausencia o presencia de ascorbato sódico y del ligando TBTA **146** (14 mM en DMSO) en las cantidades indicadas en la tabla 6.11. Las diferentes muestras se mantienen a t.a. con agitación orbital, recogiendo alícuotas tras centrifugar 1 min a 14000 rpm después de 1, 4 y 8 h. respectivamente,

analizando el sobrenadante mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8 %) con tinción de bromuro de etidio.

ANEXO. Artículos publicados

-Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, J.; Ortega-Munoz, M.; Megia-Fernandez, A.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 667-675.

-Vinyl sulfone functionalized silica: a “ready to use” pre-activated material for immobilization of biomolecules. Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Megia-Fernandez, A.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (34), 7189-7196.

-Alkyl sulfonyl derivatized PAMAM-G2 dendrimers as nonviral gene delivery vectors with improved transfection efficiencies. Morales-Sanfrutos, J.; Megia-Fernandez, A.; Hernandez-Mateo, F.; Giron-Gonzalez, M. D.; Salto-Gonzalez, R.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (3), 851-864.

-Non-Magnetic and Magnetic Supported Copper(I) Chelating Adsorbents as Efficient Heterogeneous Catalysts and Copper Scavengers for Click Chemistry. Megia-Fernandez, A.; Ortega-Munoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 3306-3320.

-Synthetic Applications of Cyclic Sulfites, Sulfates and Sulfamidates in Carbohydrate Chemistry. Megia-Fernandez, A. Morales-Sanfrutos, J. I.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *urr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 401-432.

-Sistemas lipídicos funcionalizados con vinilsulfonas. Síntesis y usos. Santoyo González, F.; Osuna Carrillo de Albornoz, A.; Morales Sanfrutos, J.; Megia Fernandez, A.; Cruz Bustos, T.; Gonzalez Gonzalez, G. M. Nº de solicitud: P200902389.

Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization†

Julia Morales-Sanfrutos, Javier Lopez-Jaramillo, Mariano Ortega-Muñoz, Alicia Megia-Fernandez, Francisco Perez-Balderas, Fernando Hernandez-Mateo and Francisco Santoyo-Gonzalez*

Received 2nd October 2009, Accepted 3rd November 2009

First published as an Advance Article on the web 11th December 2009

DOI: 10.1039/b920576d

The easy functionalization of tags and solid supports with the vinyl sulfone function is a valuable tool in *omic* sciences that allows their coupling with the amine and thiol groups present in the proteogenic residues of proteins, in mild and green conditions compatible with their biological function.

Introduction

The covalent coupling of two biomolecules to each other (bioconjugation) or to a solid support (immobilization) is one of the cornerstones of *omic* sciences.¹ Thus, labeling with biophysical probes and biotinylation of proteins are standard techniques nowadays, while tethering of biomolecules to solid supports is exploited in the fabrication of arrays and in the immobilization of enzymes. For proteins, the straightforward and probably most widely used methodologies take advantage of the reactivity of the naturally occurring functional groups present in proteogenic amino acids towards labeling reagents or supports, commonly by means of a nucleophile-to-electrophile attack. Lysine is by far the most targeted residue because of its predominant presence (the 11th most frequent residue),² the reactivity of the ϵ -amine group of its side chain, its minor relevance from a biological point of view, and its accessibility at the surface of those biomolecules. Amine-reactive labels are usually acylating agents such as sulfonyl chlorides, isothiocyanates and succinimidyl esters. However, they are not exempt from drawbacks. Sulfonyl chlorides are highly reactive but also unstable in water,³ especially at the high pH required for the reaction with aliphatic amines, and they can also react with phenols (tyrosine), aliphatic alcohols (serine, threonine), thiols (cysteine) and imidazoles (histidine). Isothiocyanates are stable in water, although their reactivity is only moderate, and the degradation of the resulting thiourea has been reported.⁴ Succinimidyl esters are the best suited amine reagent for derivatization, and the less reactive but more soluble sulfosuccinimidyl esters have been used to overcome their poor water solubility.⁵ For these reasons, the chemical modification of complex biomolecules, such as proteins, by simple procedures under physiological conditions remains a challenge.

In this context, the Michael-type addition of vinyl sulfones⁶ is an attractive methodology for protein conjugation.⁷ Up to the present, vinyl sulfone chemistry has been demonstrated to be suitable for the selective modification of cysteine residues

under mild conditions, the second least abundant amino acid in proteins with a frequency of 1.36%.² The water stability of the vinyl sulfone function, the lack of by-products, the almost quantitative yields of the reaction with thiols and the stability of the thioether linkage formed are appealing characteristics of this reaction that in practice, however, has been used almost exclusively for PEGylation of proteins using end-functionalized vinyl-sulfone PEG derivatives.⁸ In contrast with the facile functionalization of cysteine by reaction with vinyl sulfones, the reaction of this function with lysine residues has been reported^{8a,9} to be slow and incomplete, occurring only at high pH values (pH >9.3), conditions not always compatible with the biological function of proteins.

Taking into account our previous results on the good reactivity of primary amines with vinyl sulfone sugar derivatives,¹⁰ we decided to explore the feasibility of using the vinyl sulfone function in bioconjugation under mild conditions. We report here on the capabilities of the vinyl sulfone function for the covalent coupling of proteins to detection labels, other biomolecules and solid supports by exploiting the Michael-type addition of this function to the amine-containing residues, in conditions that preserve the functionality and biological integrity of those biological macromolecules.

Results and discussions

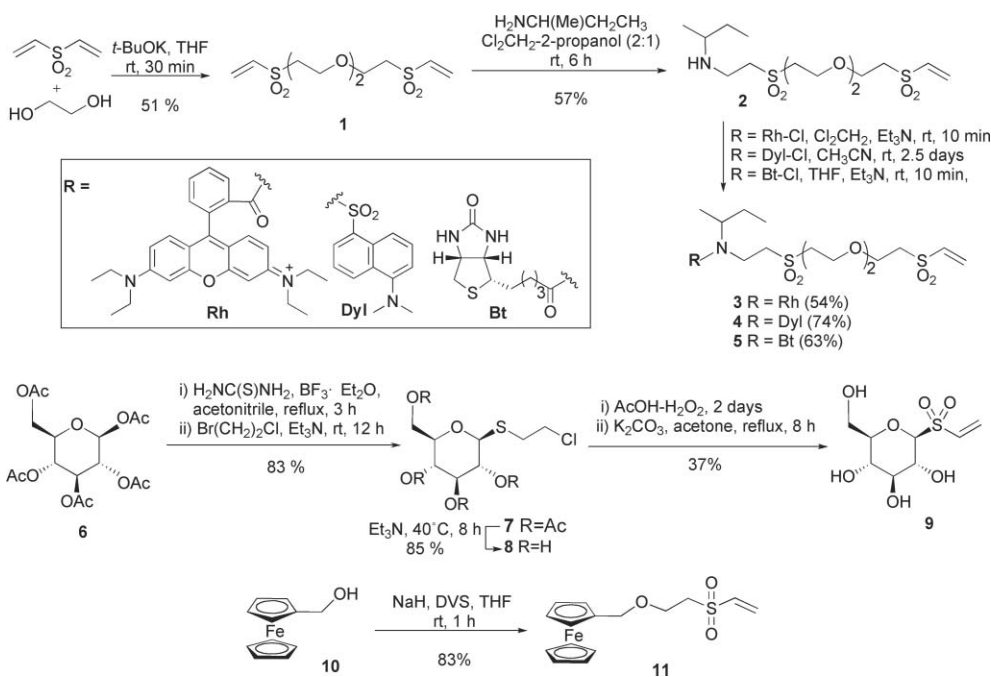
Synthesis of vinyl sulfone-derivatized reagents

To study the value of the vinyl sulfones as a viable new tool in the arsenal of bioconjugation strategies, we introduced the vinyl sulfone function to a set of commonly used synthetic tags with a biotechnological interest in bioconjugation such as rhodamine B and dansyl (fluorescent tags), biotin (affinity tag), and ferrocene (electrochemical tag),¹¹ as well as on glucose, chosen as an example of a simple biomolecule (Scheme 1).

The vinyl sulfone-derivatization of the fluorescent tags and biotin was carried out by reaction of a scaffold bearing both a vinyl sulfone group and an amine group with commercial rhodamine B and biotin, previously transformed into the corresponding acid chloride derivatives, and dansyl chloride. The synthesis of such an amine–vinyl sulfone scaffold was approached by reaction of a bis-vinyl sulfone with a primary amine. To avoid the reported intramolecular process in the reaction of divinyl sulfone with

Departamento de Q. Orgánica, Facultad de Ciencia, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, 18071 SPAIN. E-mail: fsantoyo@ugr.es; Fax: (+34)-958243186; Tel: (+34)-958248087

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C-NMR spectra for compounds 1–5, 8, 9 and 11, and some further details on the characterization of the reactions of vinyl sulfone derivatives with proteins. See DOI: 10.1039/b920576d



Scheme 1 Synthesis of vinyl sulfone-functionalized tags and sugars.

primary amines leading to 1,4-thiazane-1,1-dioxide derivatives,¹² a longer bis-vinyl sulfone (**1**) was synthesized by reaction of divinyl sulfone with ethylene glycol. However, the reaction of **1** with ethanolamine or propylamine did not lead to the desired monoaddition products and, to overcome this difficulty, the use of a steric hindrance amine was envisioned as a feasible alternative. By this route, the desired amine–vinyl sulfone scaffold **2** was obtained in 57% yield by reaction of **1** with *sec*-butylamine in Cl_2CH_2 : isopropanol. Treatment of the amine–vinyl sulfone **2** with rhodamine B acid chloride and dansyl chloride gave the fluorescent labels **3** and **4**, in 54% and 74% yield, respectively. The reactions were carried out in anhydrous Cl_2CH_2 and anhydrous acetonitrile, respectively, because the former overcame the solubility problems of rhodamine B acid chloride, and the latter led to shorter reaction times and higher yields. The same procedure was used for the coupling of biotin acid chloride in anhydrous THF in the presence of Et_3N , leading to the biotinylation reagent **5** in 63% yield.

On the other hand, the vinyl sulfone-functionalized glucose derivative **9** was obtained by oxidation and elimination of the 2-chloroethyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **8**, which was easily accessible from per-*O*-acetylated- β -D-glucose by successive treatment with thiourea and 1-bromo-2-chloroethane, and subsequent de-*O*-acetylation. Finally, vinyl sulfone ferrocene **11** was easily obtained by reaction of methanol ferrocene **10** with divinyl sulfone (Scheme 1).

Bioconjugation of proteins by vinyl sulfone-functionalized reagents

The vinyl sulfone-derivatization described above yields activated electrophilic olefin reagents that may react with nucleophiles by a Michael-type addition. In mild conditions, amine and thiol groups may deprotonate and act as Michael donors, but for the particular case of proteins, their accessibility and pK_a values

are affected by the surrounding residues. The degree to which a protein is labeled is also dependent on the conjugation process, and labeling reactions are influenced by both the molar ratio of the reactants and the activity of the labeling reagent. Considering these facts, and in order to put to the test our hypothesis about the bioconjugation capabilities of the synthesized vinyl sulfone reagents, a pool of four commercial proteins (avidin, Concanavalin A (ConA), lysozyme and BSA), comprising both acidic and alkaline isoelectric points, monomeric and oligomeric structures, different numbers of potential Michael donors and the presence/absence of free thiol groups, and post-translational modifications were selected (Table 1).

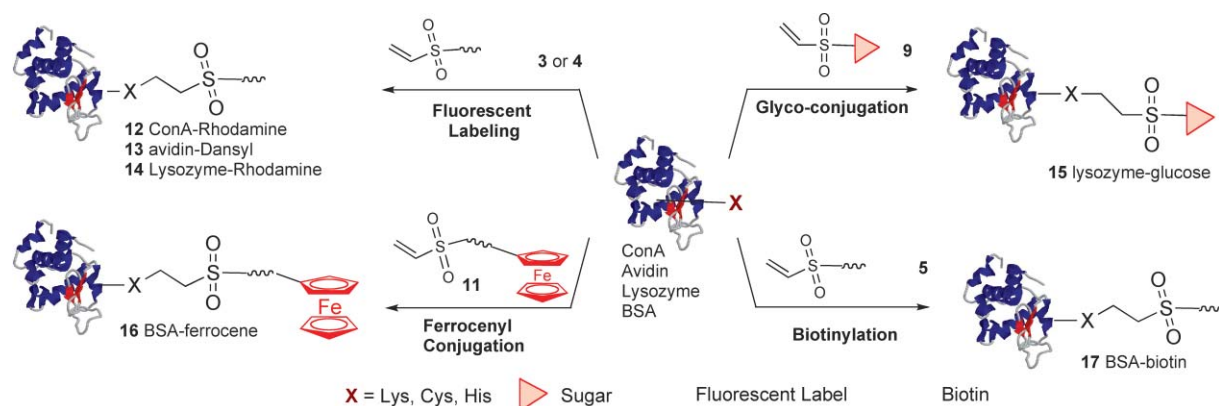
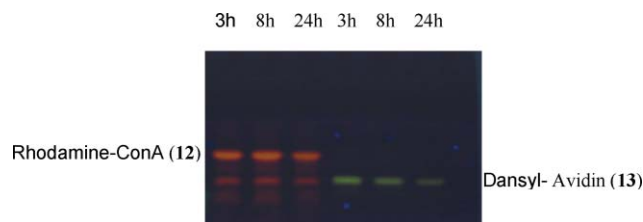
The evaluation of the vinyl sulfone-derivatization of tags to label proteins in mild conditions was carried out in the first instance on fluorescent labels **3** and **4** that were conjugated with ConA and avidin, respectively, to facilitate the monitoring of the reaction (Scheme 2). The conjugation process was carried out at pH 8, 37 °C, and with different stoichiometries and reaction times (3, 8 and 24 h). After analysis of conjugates **12** and **13** by SDS-PAGE, the results showed that ConA is labeled very efficiently within 3 h, with no appreciable differences detected between 8 and 24 h of reaction, while avidin is poorly labeled within 3 h and longer reaction times yield more intense fluorescence (Fig. 1).

In spite of the number of potential nucleophiles (20 for ConA versus 10 for avidin), the molar excess of the labeling reagent was depleted by the latter but not by the former. A closer analysis reveals that higher stoichiometries do not yield more intense fluorescence, but they provoke the precipitation of ConA (ESI, Fig. S1†), probably due to the hydrophobicity associated with the modification of the hydrophilic nature of the lysine residues, and in the case of avidin, even less intense fluorescence, whose over-labeling causes quenching (ESI, Fig. S2†). These results demonstrate that the protein itself influences the extent of the coupling, and that the labeling of proteins with vinyl

Table 1 Main features of the pool of model proteins

Entry	Protein	Quaternary structure	Molecular weight/kDa ^a	Isoelectric point ^a	Post-translational modifications	Nucleophilic residues (per monomer)			
						Lys	His	Cys (free)	S-S bonds
1	ConA	Tetramer	4 × 26.6	5.3	None	12	6	None	None
2	Avidin	Tetramer	4 × 17	9.5	Glycosylation	9	1	None	1
3	Lysozyme	Monomer	14.3	11	None	6	1	None	4
4	BSA	Monomer	66.5	5.6	None	59	17	1	17

^a Estimated from the sequence, except for lysozyme whose isoelectric point was taken from Alderton *et al.*¹³

**Scheme 2** Applications of vinyl sulfone-functionalized tags and sugars in bioconjugation of proteins.**Fig. 1** SDS-PAGE of the reaction of ConA with **3** (red) and avidin with **4** (green) for 3, 8 and 24 h (from left to right) (conjugates **12** and **13**, respectively).

sulfone-derivatized reagents is feasible regardless of the isoelectric point, number of potential nucleophiles or glycosylation.¹⁴

Having demonstrated the conjugation of vinyl sulfone-functionalized reagents with proteins lacking free Cys under mild conditions, we focused on the identification of the amino acid residues that react with the vinyl sulfone function. For this purpose, HEW lysozyme was glycosylated by reaction with glucopyranosyl vinyl sulfone **9** in phosphate buffer pH 7.7 at room temperature. The resulting conjugate **15** (Scheme 2) was crystallized by hanging drop, and the structure solved at 1.6 Å by X-ray diffraction (PDB entry 2B5Z). The electron density map clearly revealed that both Hys and Lys residues act as Michael donors in the reaction with **9**.¹⁵ These results prove that, contrary to the generally accepted view, Lys residues not only react with a vinyl sulfone-containing reagent at a pH compatible with the biological nature of the sample, but that they may also yield a double addition process (Fig. 2).

**Fig. 2** Identification of residues present in the HEW lysozyme that react with vinyl sulfone glucose **5**. 2mFo-DFc maps contoured at 1.2 σ (blue) or 5 σ (red) showing the electron density that defines the sugars bonded to Lys96 (right) and His15 (left).

Influence of the reaction conditions on the bioconjugation of vinyl sulfone-functionalized reagents

We next addressed the influence of the reaction conditions on the coupling of vinyl sulfone-functionalized reagents to model proteins. First, HEW lysozyme was labeled with vinyl sulfone rhodamine **3** at pH ranging from 5 to 8, and both at room temperature and 30 °C (conjugate **14**, Scheme 2). The resulting labeled proteins were analyzed by MALDI-TOF (Fig. 3), which showed that the reaction takes place even in acidic media, and that slight variations of pH or temperature exert a clear direct effect on the number of labels (**3**) coupled to the HEW lysozyme, *i.e.* the number of fluorescent tags increases with pH or temperature. Second, it was demonstrated that the stoichiometry, in terms of the vinyl sulfone groups:protein reactive groups (*i.e.* Lys, His and Cys residues) ratio, also plays a role. Thus, the extent of the

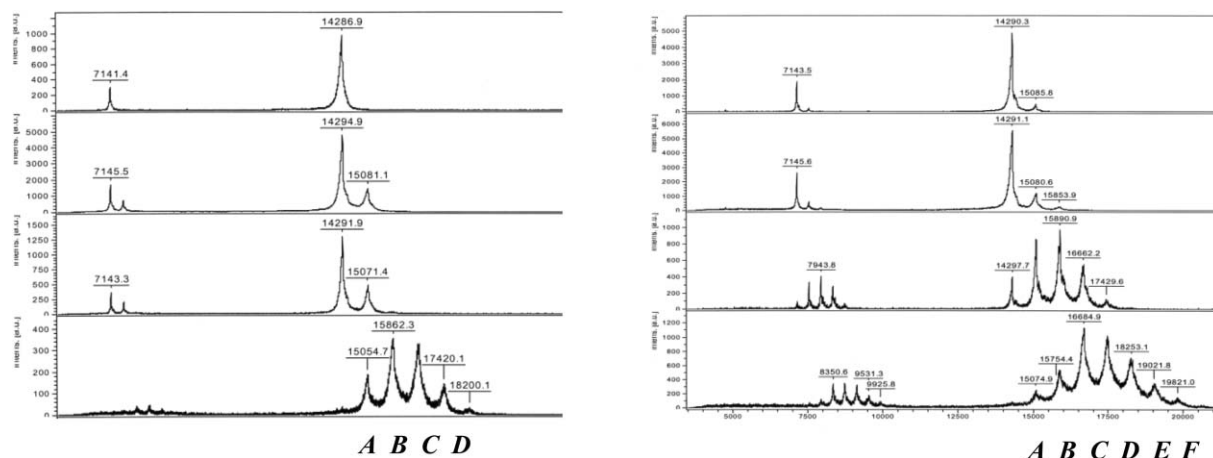


Fig. 3 MALDI-TOF spectra of the HEW lysozyme labeled with vinyl sulfone rhodamine **3** at rt (left) and 30 °C (right), and pH 5, 6, 7 and 8 (from top to bottom). Molecular weight of lysozyme is 14290 and that is increased by 796.4 Da per molecule of rhodamine **3** coupled: *A* HEW + 1Rh; *B* HEW + 2Rh; *C* HEW + 3Rh; *D* HEW + 4Rh; *E* HEW + 5Rh; *F* HEW + 6Rh.

Table 2 Influence of the stoichiometry on the labeling of BSA with vinyl sulfone ferrocene **11**

BSA : 11 /mol ^a	BSA reactive groups : 11	Fe per BSA/mol
1 : 10	1 : 0.13	9.28
1 : 50	1 : 0.65	25.03
1 : 100	1 : 1.30	28.75

^a Estimated from the determination of Fe present in the sample resulting from the coupling.¹⁶

labeling of BSA with the vinyl sulfone ferrocene electrochemical tag **11**, at pH 8.5 and room temperature, that yielded conjugated **16** (Scheme 2), showed that at an **11** : BSA ratio as unfavourable as 0.13 : 1 (*i.e.* 10 mols of **11** per mol of BSA) yielded between 9 and 10 labels per molecule of BSA. As the **11** : BSA ratio increased, the extent of labeling also increased to reach a maximum that corresponded to less than 30 labels (see Table 2). A closer analysis of these results based on the existence in BSA of a single free Cys and 77 reactive groups further demonstrates the good reactivity of amine groups present in proteins towards vinyl sulfones, and the existence of reactive groups that do not react.

Functionality of the vinyl sulfone-labeled model proteins

Although fluorescent labeling is an important application, macromolecule labeling is also aimed at promoting/detecting the interaction between the labeled molecule and others. In this context, the avidin–biotin technology¹⁷ plays a central role, and the introduction of the avidin–biotin complex into a given system is a widely used approach that serves to mediate between a recognition system (*e.g.* antibody–antigen or lectin–carbohydrate) and a reporter group (*e.g.* enzymatic activity or fluorescence). To explore this range of applications with the new vinyl sulfone tags, BSA was labeled with vinyl sulfone-derivatized biotin **5** and the resulting conjugate **17** combined with the dansyl-labeled avidin conjugate **13** reported above (Scheme 2).¹⁴ The functionality of both the biotinylated BSA and the fluorescently labeled avidin was analyzed by SDS-PAGE, since the avidin–biotin interaction is one of the strongest non-covalent biological interactions ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$),

and is considered as essentially non-reversible and unaffected by denaturing agents. Thus, after denaturation of the sample in mild conditions, the SDS-PAGE showed a fluorescent signal at a high molecular weight that corresponded to BSA–biotin–avidin–dansyl complexes (Fig. 4, left). In order to further assess the identity of these complexes, a new electrophoresis was carried out with samples being denatured in standard conditions (Fig. 4, right). The gel demonstrated that the fluorescence at high molecular weights did not correspond to BSA since its molecular weight is higher, and it disappeared when more stringent denaturation conditions were employed. These results demonstrate that the fluorescent high molecular weight band consists of BSA–biotin–avidin–dansyl complexes, and that the coupling of vinyl sulfone-derivatized biotin and dansyl yield fully functional species.

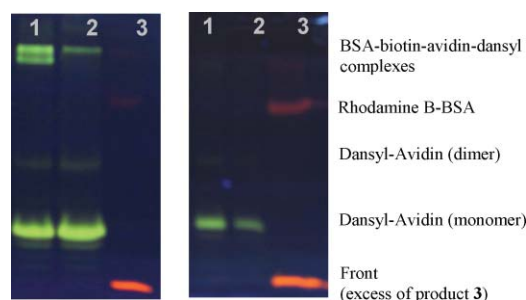


Fig. 4 SDS-PAGE, in mild (left) and standard (right) denaturing conditions, of the complex BSA–biotin–avidin–dansyl at BSA–biotin (**17**) : avidin–dansyl (**13**) stoichiometries of 4 : 4 (lane 1) and 4 : 1 (lane 2). Lane 3 is BSA pre-stained with **3**.

Considering that avidin is a tetramer, a 4 : 4 stoichiometry of dansyl–avidin : biotin–BSA should yield a full occupancy of the four biotin binding sites, and a concomitant more intense fluorescence than that for a 4 : 1 stoichiometry. As expected, this higher intensity was observed. However, in both cases, single species were detected by Coomassie because either they did not interact, or they did not withstand the mild denaturing conditions (ESI, Fig. S3†).

Vinyl sulfone-derivatized rhodamine B as a pre-stain reagent for electrophoresis

During the electrophoresis performed in the labeling assays described above, it was noticed that the bright purple color of the vinyl sulfone-derivatized rhodamine B **3** was transferred to the labeled protein and made it visible to the naked eye. This feature suggests a potential application in SDS-PAGE as a pre-stain dye that, besides yielding fluorescence for sensitive detection/quantification, allows monitoring of the protein migration during the electrophoretic separation. In fact, the use of Remazol dyes, which at alkaline pH are converted to their vinyl sulfone derivatives, was proposed as a pre-stain reagent for visualization of proteins in SDS-polyacrylamide gels.¹⁸

Rhodamine-vinyl sulfone (**3**) was put to the test, bearing in mind that a pre-stain dye may be attractive if (i) the protocol of pre-staining is straightforward and general, (ii) the detection limit is good enough, (iii) the migration pattern remains unaltered, and (iv) the pre-staining is compatible with conventional post-electrophoresis stains. The study was carried out on the model monomeric proteins BSA and lysozyme (Table 1). BSA, with an isoelectric point of 5.6 and 77 potential nucleophilic residues, among them 1 free Cys, is a good model for an acidic protein, while lysozyme, with an alkaline isoelectric point of 11 and only 7 potential nucleophilic residues, represents an extreme case of a protein with low reactivity expected towards vinyl sulfone. The results led to the conclusion that a procedure as simple as incubation of the sample with the vinyl sulfone-derivatized rhodamine B **3** at 100 °C for 5 min, in HEPES pH 8.8, yielded the detection of roughly 1 µg by the purple color (Fig. 5) and 125 ng by fluorescence in a conventional transilluminator (Fig. 6). The subsequent staining of the sample revealed that the pre-staining is fully compatible with a post-electrophoresis silver stain, and electrophoretic mobility is not altered (Fig. 6). Improvement in the sensitivity of the detection may be achieved by exciting the sample at a more suitable wavelength (ESI, Fig. S4†) and recording on a CCD camera.¹⁴

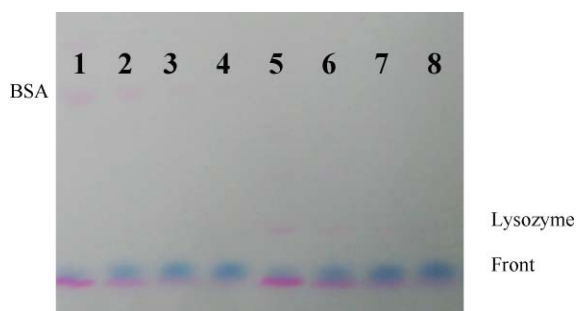


Fig. 5 Sensitivity of pre-staining BSA (lanes 1 to 4) and lysozyme (lanes 5 to 8) with vinyl sulfone rhodamine (**3**). The amount of pre-stained protein loaded was 5 µg (lanes 1 and 5), 2.5 µg (lanes 2 and 6), 1.25 µg (lanes 3 and 7) and 0.625 µg (lanes 4 and 8).

Further experiments demonstrated that shorter incubation times were insufficient, and that longer times or a larger molar excess of vinyl sulfone-derivatized rhodamine B **3** yielded stronger fluorescence at the cost of retarding the mobility of the proteins, a common drawback described for other lysine-modifying agents.¹⁹ At this point, it is important to remark on the importance of

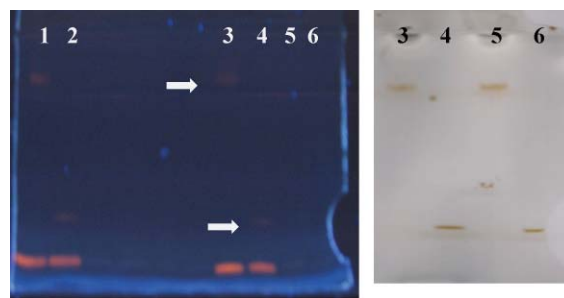


Fig. 6 SDS-PAGE of pre-stained samples. Fluorescence (left) of BSA (lanes 1 and 3) and lysozyme (lanes 2 and 4) pre-stained with vinyl sulfone rhodamine **3**, and post-electrophoresis silver staining (right). The amount of protein per lane was 250 ng (lanes 1 and 2) and 125 ng (lanes 3 to 6). Control non-pre-stained samples were in lanes 5 and 6.

decoupling pre-staining from denaturation, since the latter is carried out in a mixture containing amine and thiol groups that react with the vinyl sulfone groups. However, the penalty of the decoupling is an affordable short incubation of 10 min at no risk, since pre-staining with vinyl sulfone-derivatized rhodamine B **3** does not interfere with a conventional post-electrophoresis silver stain (Fig. 6).

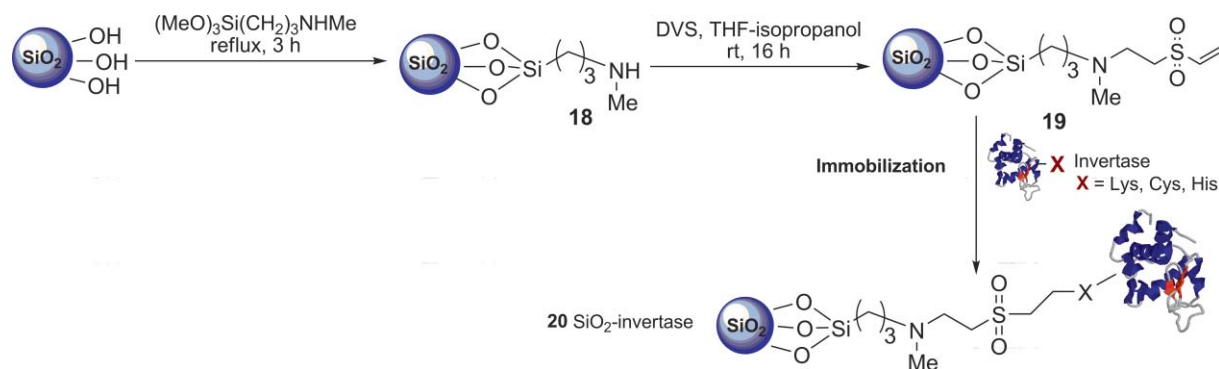
Immobilization of proteins by vinyl sulfone silica

Another explored area of application of the vinyl sulfone group's reactivity towards biomolecules was immobilization onto solid supports. The preservation of the biological functionality of the biomolecules once immobilized is a requisite of primary importance. In this context, we chose silica as a solid support based on the appealing characteristics of silica-based hybrid materials.²⁰ Our approach was based on the vinyl sulfone-functionalization of silica that was easily performed by silanization of activated commercial silica with [3-(methylamine)propyl]-trimethoxysilane and subsequent reaction with divinyl sulfone (Scheme 3).²¹

The capability of the resulting vinyl sulfone silica **19** to immobilize biomolecules while preserving their functionality was then evaluated using invertase (Scheme 3). Invertase is a model enzyme that catalyzes the hydrolysis of sucrose to fructose and glucose, a process of interest to the food industry. The immobilization on vinyl sulfone silica **19** was carried out in batch, at both room temperature and 4 °C, by simple addition of the functionalized silica to a solution of the enzyme in a standard phosphate buffer at pH 7.5. The results show that the reaction takes place even at 4 °C, although with lower yield, as expected from the influence of the temperature on the reaction, but the enzymatic activity is preserved, as the specific activity of the enzyme immobilized at 4 °C to hydrolyze sucrose is about 2.5 times larger (Table 3).²¹

Table 3 Immobilization of invertase onto vinyl sulfone silica **19** and functionality of the immobilized enzyme **20** to hydrolyze sucrose

Temperature	Immobilized invertase/mg invertase per gram 19	Specific activity of immobilized invertase/arbitrary units per mg immobilized invertase
rt	100.8	1.40
4 °C	50.2	3.44



Scheme 3 Synthesis of vinyl sulfone silica **19** and immobilization of proteins.

Conclusions

In conclusion, the Michael-type addition of amine and thiol groups naturally occurring in biomolecules to vinyl sulfone is a methodology wide in scope. The novelty of the methodology presented herein relies on the ability of a protein to react with vinyl sulfone-functionalized reagents *via* the amine groups present in the side chain of their Lys and His residues, in mild conditions that preserve the biological functionality of proteins. The approach is a general strategy for bioconjugation and immobilization of proteins. The results described herein demonstrate the feasibility of the vinyl sulfone-derivatization to tackle the fluorescent labeling of proteins and their biotinylation, two important tools in *omic* sciences, and also the capability of vinyl sulfone silica to act as a universal support to immobilize proteins while preserving their functionality. Moreover, the vinyl sulfone-derivatized rhodamine B is a suitable reagent for the routine labeling of proteins prior to electrophoretic separation, the pre-staining being compatible with a later standard silver or Coomassie Brilliant Blue staining. Although the protein itself influences the extent of the coupling, the reactions take place regardless of their isoelectric point, number of potential nucleophiles, or the presence of post-translational modifications or free Cys residues, and the reaction is simple (it involves the simple combination of both species), efficient (it takes place even at 4 °C) and “green” as it requires benign solvent (*i.e.* aqueous media), leading to stable linkages with an absence of by-products. In addition, it can be anticipated that in the context of life sciences, the scope of the vinyl sulfone function will also involve its use as a practical convergent approach for protein post-translational modifications that will expand the actual repertory of methodologies, as demonstrated with the glycosylation of lysozyme

Experimental

General experimental procedures

TLC was performed on Merck Silica Gel 60 F254 aluminium sheets. Reagents used for developing plates include potassium permanganate (1% w/v), ninhydrin (0.3% w/v) in ethanol and 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. Optical rotations were recorded on a Perkin-

Elmer 141 polarimeter at room temperature. IR spectra were recorded on a Satellite Mattson FTIR. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on a Varian Direct Drive (300, 400 and 500 MHz) spectrometer. Chemical shifts are given in ppm and referenced to internal CDCl₃. *J* values are given in Hz. FAB mass spectra were recorded on a Fissons VG Autospec-Q spectrometer, using *m*-nitrobenzyl alcohol or thioglycerol as matrix. MALDI-TOF and NALDI-TOF mass spectra were recorded on an Autoflex Bruker spectrometer using HCCA and NaI, respectively, as matrix. Divinylsulfone, rhodamine B, dansyl chloride, biotin, ferrocene methanol, lysozyme, ConA, avidin, BSA, *Saccharomyces cerevisiae*, and *sec*-butylamine were purchased from commercial suppliers.

Synthesis of vinyl sulfone tags and reagents

Synthesis of bis-vinyl sulfone 1. *t*-BuOK (119 mg, 1.1 mmol) was added to a solution of divinyl sulfone (DVS) (1.6 mL, 16 mmol) and ethylene glycol (330 mg, 5.3 mmol) in THF (100 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 30 min. Removal of the solvent under reduced pressure yielded a crude that was purified by column chromatography (AcOEt–hexane 2 : 1 → 3 : 1) giving **1** (805 mg, 51%) as a syrup. $\nu_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 1608, 1472, 1382, 1310, and 1121; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.76 (dd, 2 H, *J* 16.6 and 9.8 Hz), 6.41 (d, 2H, *J* 16.6 Hz), 6.10 (d, 2 H, *J* 9.8 Hz), 3.90 (t, 4 H, *J* 5.8 Hz), 3.63 (s, 4 H), 3.25 (t, 4 H, *J* 5.6 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 137.9, 129.1, 70.3, 64.7, 55.0. HRMS (*m/z*) (FAB+) calcd. for C₁₀H₁₈O₆S₂Na [M + Na]⁺: 321.0442; found: 321.0442.

Synthesis of amino vinyl sulfone 2. To a solution of **1** (1.0 g, 3.3 mmol) in Cl₂CH₂–2-propanol (2 : 1, 45 mL) was added *sec*-butylamine (227 μ L, 2.2 mmol). The reaction mixture was kept at rt for 6 h. Evaporation of the solvent yielded a crude that was purified by column chromatography (AcOEt → AcOEt–MeOH 10 : 1) giving **2** (472 mg, 57%) as a syrup. $\nu_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 2961, 2922, 2872, 1604, 1459, 1378, 1311, 1287, and 1121; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.71 (dd, 1 H, *J* 16.6 and 10 Hz), 6.34 (d, 1 H, *J* 16.6 Hz), 6.06 (d, 1 H, *J* 10 Hz), 3.84 (m, 4 H), 3.58 (s, 4 H), 3.29 (t, 2 H, *J* 5.3 Hz), 3.21 (m, 4 H), 3.06 (m, 2 H), 2.53 (m, 1 H), 2.00 (br s, 1 H), 1.42 (m, 1 H), 1.27 (m, 1 H), 0.98 (d, 3 H, *J* 6.3 Hz), 0.83 (t, 3 H, *J* 7.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 137.9, 129.1, 70.4, 70.3, 64.8, 64.6, 55.3, 54.9, 54.6, 54.4, 40.3, 29.4, 19.6, 10.1. HRMS (MALDI-TOF) calcd. for C₁₄H₂₀O₆NS₂Na [M + Na]⁺: 394.1334; found: 394.1334.

Synthesis of vinyl sulfone rhodamine B 3. A solution of rhodamine B (340 mg, 0.71 mmol) in Cl₂SO (7 mL) was kept at rt overnight. The reaction mixture was evaporated under vacuum and co-evaporated with anhydrous toluene (3 × 15 mL) to give rhodamine B acid chloride. The crude acid chloride was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) and added dropwise to a solution of **2** (240 mg, 0.65 mmol) and Et₃N (184 μL, 1.29 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL). The reaction mixture was kept at rt for 10 min. Evaporation of the solvent yielded a crude that was purified by column chromatography (CH₂Cl₂–MeOH 30:1 → 10:1) giving **3** as a foam solid (278 mg, 54%). v_{\max} (film)/cm⁻¹: 1640, 1589, 1466, 1413, 1339, 1275, 1180, 1128; ¹H-NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 7.71–7.55 (several m, 3 H), 7.39–7.23 (several m, 3 H), 7.03 (d, 1 H, *J* 9.4 Hz), 6.89 (d, 1 H, *J* 10 Hz), 6.82 (br s, 2 H), 6.75 (dd, 1 H, *J* 16.6 and 9.9 Hz), 6.33 (d, 1 H, *J* 16.6 Hz), 6.07 (d, 1 H, *J* 9.9 Hz), 3.87–3.57 (several m, 21 H), 3.23 (t, 2 H, *J* 5.7 Hz), 3.13 (t, 2 H, *J* 5.3 Hz), 1.43–1.26 (several m, 14 H), 0.89–0.67 (several m, 6 H); ¹³C-NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 169.5, 157.8, 157.6, 155.7, 155.0, 137.9, 136.1, 132.6, 130.5, 130.4, 129.8, 129.5, 128.9, 128.2, 114.6, 113.7, 113.6, 113.5, 96.6, 96.5, 70.3, 70.2, 67.1, 64.5, 64.2, 56.7, 54.8, 53.7, 52.5, 46.3, 46.2, 34.6, 18.4, 13.7, 12.7, 11.2; HRMS (*m/z*) (MALDI-TOF) calcd. for C₄₂H₅₈N₃O₈S₂[M]⁺: 796.366; found: 796.366.

Synthesis of vinyl sulfone dansyl 4. To a solution of dansyl chloride (130 mg, 0.48 mmol) in anhydrous acetonitrile (15 mL) were added **2** (150 mg, 0.40 mmol) and Et₃N (115 μL, 0.8 mmol). The reaction mixture was kept at rt for 2.5 d. Evaporation of the solvent yielded a crude that was purified by column chromatography (AcOEt–hexanes 1:1 → 3:1) giving **4** as a syrup (182 mg, 74%). v_{\max} (film)/cm⁻¹: 2929, 2871, 1569, 1456, 1387, 1311, and 1132 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.55 (d, 1 H, *J* 8.6 Hz), 8.28 (d, 1 H, *J* 8.6 Hz), 8.24 (d, 1 H, *J* 7.4 Hz), 7.53 (m, 2 H), 7.17 (d, 1 H, *J* 7.6 Hz), 6.73 (dd, 1 H, *J* 16.6 and 10 Hz), 6.37 (d, 1 H, *J* 16.6 Hz), 6.05 (d, 1 H, *J* 10 Hz), 3.91 (m, 4 H), 3.80–3.46 (several m, 9H), 3.27 (t, 2 H, *J* 5.9 Hz), 3.22 (m, 2 H), 2.87 (s, 6 H), 1.38 (m, 2 H), 0.98 (d, 3 H, *J* 6.6 Hz), 0.65 (t, 3 H, *J* 7.3 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 138.0, 134.9, 130.9, 130.7, 130.3, 130.2, 129.1, 128.5, 123.4, 119.5, 115.5, 70.8, 70.4, 64.9, 64.8, 56.0, 55.9, 55.0, 54.5, 45.6 × 2, 35.7, 28.4, 18.8, 11.3. HRMS (*m/z*) (NALDI-TOF) calcd. for C₂₆H₄₀O₈N₂S₃Na [M + Na]⁺: 627.1844; found: 627.1840.

Synthesis of vinyl sulfone biotin 5. A solution of biotin (120 mg, 0.49 mmol) in Cl₂SO (5 mL) was kept at rt for 1 h. The reaction mixture was then evaporated under vacuum and co-evaporated with toluene (3 × 15 mL) to give biotin acid chloride. The crude acid chloride was dissolved in anhydrous THF (15 mL) and added dropwise to a solution of **2** (150 mg, 0.40 mmol) and Et₃N (114 μL, 0.80 mmol) in anhydrous THF (10 mL). The new reaction mixture was kept at rt for 10 min. Evaporation of the solvent yielded a crude that was purified by column chromatography (AcOEt–MeOH 10:1 → 5:1) giving **5** as a syrup (152 mg, 63%). v_{\max} (film)/cm⁻¹: 3354, 3258, 2923, 2870, 1696, 1622, 1457, 1287, and 1121; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 6.93 (m, 1 H), 6.34 (m, 1 H), 6.18 (m, 1 H), 4.50 (m, 1 H), 4.33 (m, 1 H), 3.91 (m, 4 H), 3.66 (m, 4 H), 3.52 (m, 2 H), 3.42–3.24 (m, 8 H), 2.94 (m, 1 H), 2.72 (d, 1H, *J* 12.7 Hz), 2.46 (m, 2H), 1.76–1.46 (several m, 8H), 1.26 (m, 3 H), 0.90 (m, 3 H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ 178.5, 168.8, 142.3, 132.5, 74.2, 74.1, 68.5, 68.4, 66.1, 64.4, 59.7, 59.1, 58.5, 57.4, 57.1,

43.8, 38.2, 37.0, 32.6, 32.5, 31.5, 29.1, 22.4, 22.3, 14.3. HRMS (MALDI-TOF) calcd. for C₂₄H₄₃N₃O₈S₃Na [M + Na]⁺: 620.2109; found: 620.2110.

Synthesis of 2-chloroethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside (7). To a solution of 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranose **6**²³ (11.7 g, 30 mmol) and thiourea (2.53 g, 33 mmol) in dry acetonitrile (70 mL) was added BF₃·Et₂O (8 mL, 63 mmol). The reaction mixture was refluxed for 3 h. After cooling 1-bromo-2-chloroethane (5.9 mL, 69 mmol) and Et₃N (13.5 mL, 90 mmol) were added and the reaction mixture was magnetically stirred at rt for 12 h. Evaporation under vacuum of the solvent gave a crude that was dissolved in CH₂Cl₂ (200 mL) and washed with water (100 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent yielded a crude that was purified by column chromatography (CH₂Cl₂ → EtOAc–hexane 1:1) giving **7** as a solid (10.6 g, 83%). M.p. 100–102 °C (lit²² 97–98 °C); [α]_D⁻³⁰ (c 1, chloroform) [lit²² –38° (c 0.7, chloroform)]; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.24 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz), 5.07 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz), 5.03 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz), 4.55 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 4.30–4.10 (m, 2H), 3.80–3.60 (m, 3H), 3.09 (ddd, 1H, *J* = 14.0, 9.8 and 6.1 Hz), 2.90 (ddd, 1H, *J* = 14.1, 9.4 and 6.6 Hz), 2.10, 2.06, 2.04, 2.01 (4 s, 12H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 169.4, 83.9, 76.1, 76.7, 69.8, 68.3, 62.1, 43.4, 32.7, 20.7, 20.6; HRMS (*m/z*) (FAB+) calcd. for C₁₆H₂₃ClO₉S + Na: 449.065; found 449.063.

Synthesis of 2-chloroethyl-1-thio-β-D-glucopyranoside (8). To a solution of **7** (3 g, 7.03 mmol) in methanol (60 mL) was added Et₃N (15 mL). The reaction was kept at 40 °C for 8 h. Evaporation under vacuum yielded a crude product that was purified by column chromatography (AcOEt–MeOH 9:1) yielding **8** (1.56 g, 86%) as a solid. M.p. 88–90 °C; [α]_D⁻⁴² (c 1, methanol); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 4.42 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz), 3.86 (dd, 1H, *J* = 12.0 and 1.2 Hz), 3.80–3.60 (m, 5H), 3.18 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 3.10 (ddd, 1H, *J* = 14.0, 9.6 and 6.0 Hz), 2.96 (ddd, 1H, *J* = 13.9, 9.6 and 6.2 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ 87.4, 82.1, 79.6, 74.4, 71.5, 62.9, 44.8, 33.7; HRMS (*m/z*) (FAB+) calcd. for C₈H₁₅ClO₅S + Na: 281.0226; found: 281.0222.

Synthesis of 2-ethenyl 1-thio-β-D-glucopyranoside-*S,S*-dioxide (9). Compound **8** (1.56 g, 6.02 mmol) was dissolved in a mixture of AcOH–H₂O₂ (2:1, 45 mL) and kept in the dark for 2 d. Lyophilization gave a crude that was dissolved in acetone (60 mL). K₂CO₃ (2.4 g, 17.5 mmol) was then added and the resulting suspension was refluxed for 8 h. Evaporation of the solvent was followed by purification by column chromatography (AcOEt–MeOH 10:1) yielding a compound that was lyophilized giving **9** (0.5 g, 37%) as a syrup. [α]_D^{-8.9} (c 1, water), [α]₄₃₆⁻¹⁶ (c 1, water); ¹H NMR (MeOH-*d*₄, 300 MHz): δ 6.97 (dd, 1H, *J* = 16.7 and 10.0 Hz), 6.43 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 6.30 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 4.78 (s, 3H), 4.34 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.86 (dd, 1H, *J* = 12.5 and 2 Hz), 3.69 (t, 1H, *J* = 9.1 Hz), 3.68 (dd, 1H, *J* = 12.6 and 5.3 Hz), 3.45 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz), 3.40 (ddd, 1H, *J* = 9.6, 5.5 and 2.1 Hz), 3.34 (s, 1H), 3.31 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz); ¹³C NMR (MeOH-*d*₄, 75 MHz): δ 136.2, 132.4, 92.6, 82.8, 78.8, 71.0, 70.5, 62.4; HRMS (*m/z*) (FAB+) calcd. for C₈H₁₄O₅S + Na: 277.0358; found: 277.0356.

Synthesis of vinyl sulfone ferrocene (11). To a deoxygenated solution of ferrocene methanol **10** (400 mg, 1.85 mmol) in anhydrous THF (30 mL) were added NaH (89 mg, 3.71 mmol) and

DVS (0.46 mL, 4.635 mmol). The reaction mixture was kept at rt for 1 h. AcOH was added to destroy the NaH excess. Evaporation of the solvent under vacuum yielded a crude that was purified by column chromatography (hexane–AcOEt 7 : 1) giving **11** (509 mg, 83%) as an orange solid. M.p. 67.0 °C; IR (ν_{\max}) (film): 3099, 2921, 2857, 1638, 1313, 1128, 1099, 816, 754 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.67 (dd, 1H, $J = 16.6$ and 9.9 Hz); 6.36 (d, 1H, $J = 16.7$ Hz); 6.03 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz); 4.29–4.16 (m, 11H); 3.82 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz); 3.18 (t, 2H, $J = 5.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 137.8, 128.7, 82.3, 69.7, 69.5, 68.8, 68.6, 63.2, 55.1; HRMS (FAB+) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FeO}_5\text{S} + \text{H}$: 335.0404; found: 335.0403.

Synthesis of 3-(methylamino)-propyl silica (18). A suspension of commercial silica gel (Merck 70–230 mesh, ASTM) (5 g), previously activated by thermal treatment (120 °C under vacuum for 24 h), in toluene (25 mL) containing 3-[(methylamino)-propyl]-trimethoxysilane (1.250 g) was heated under reflux for 2 h. After partial evaporation of the solvent under vacuum to approximately 80% of the original volume, the reaction mixture was refluxed for an additional hour. The resulting functionalized silica **18** was filtered, washed with toluene and dried under vacuum at 50 °C.

Synthesis of vinyl sulfone-functionalized silica (19). To a suspension of the amine functionalized silica **18** (1.53 g) in THF–isopropanol (1 : 2, 10 mL) was added DVS (0.640 mL). The mixture was kept at rt for 16 h. The resulting vinyl sulfone–silica **19** was filtered, washed successively with MeOH and CH_2Cl_2 and dried under vacuum at 50 °C.

Protein labeling and bioconjugation assays

Labeling of ConA and avidin with vinyl sulfone-derivatized rhodamine B (3) and dansyl (4) (conjugates 12 and 13). ConA (195 nmol) and avidin (140 nmol) were incubated with the vinyl sulfone-derivatized fluorescent labeling agents **3** (578 nmol, 1 : 4 stoichiometry, and 1154 nmol, 1 : 8 stoichiometry) and **4** (990 nmol, 1 : 5 stoichiometry, and 1980 nmol, 1 : 5 and 1 : 10 stoichiometry), respectively, in 50 mM HEPES pH 8 at 37 °C for 24 h. Samples were dialyzed first against 100 mM HEPES pH 8 supplemented with ethanolamine (2 \times 100 mL) to block the excess of vinyl sulfone-derivatized reagents and then against 100 mM HEPES pH 8 (7 \times 100 mL) for 4 d. The extent of labeling was monitored at 3, 8 and 24 h by taking aliquots of 50 μL and blocking by addition of 50 μL of SDS-PAGE loading buffer prior denaturing at 100 °C for 4 min. The samples were not dialyzed.

Glycosylation of commercial HEW lysozyme with glucopyranosyl vinyl sulfone 9 (conjugate 15). The reaction was carried out by mixing and stirring 500 μL of 50 mg mL^{-1} HEW lysozyme in 90 mM phosphate buffer pH 7.7 and 10% (v/v) 2-propanol with 10.5 mg glucopyranosyl vinyl sulfone **9** for 72 h at rt. To remove the excess of **9** and stop the reaction, the mixture was transferred to a 3500 kDa cutoff membrane (Spectrum) and dialyzed against a total volume of 1500 mL of 20 mM acetate buffer at pH 4.5 in three steps. The reaction was monitored every 24 h by native PAGE run with a BioRad apparatus with reversed polarity and stained with Coomassie Brilliant Blue. For the crystallization procedure and the determination of the tridimensional structure see the ESI.†

Labeling of HEW lysozyme with vinyl sulfone rhodamine B (3) at different pH and temperatures (conjugate 14). The labeling of 11.2 nmols of HEW lysozyme with 288 nmols of vinyl sulfone rhodamine B (**3**) was carried out by incubation at rt or 30 °C for 64 h in 160 mM buffer pH 5 and 6 (acetate buffer), or 7 and 8 (HEPES buffer). The samples were then dialyzed against distilled water for 24 h and analyzed by MALDI-TOF (Fig. 3).

Labeling of BSA with ferrocene vinylsulfone 11 (conjugate 16). To three aliquots (2 mL) of a 2 mg mL^{-1} solution of BSA in 50 mM HEPES buffer at pH 8.5 were added the ferrocene vinyl sulfone derivative **11** (0.2, 1.0 and 2.0 mg) dissolved in DMSO (0.1 mL) to get a 1 : 10, 1 : 50 and 1 : 100 BSA : **11** molar ratio, respectively. The samples were kept at rt for 24 h. Centrifugation was followed by dialysis against an 85 mM phosphate buffer at pH 7.0. BSA concentration was determined by Bradford's method²⁴ and Fe content was spectrophotometrically determined.¹⁶

Biotinylation of BSA (conjugate 17) and interaction with dansyl-avidin (conjugate 13). BSA (75 nmols) and vinyl sulfone-derivatized biotin **5** (370 nmols) were incubated in 600 μL of 50 mM HEPES pH 8.0 at 37 °C for 24 h. The resulting conjugate **17** was dialyzed first against 100 mM HEPES pH 8, supplemented with ethanolamine (2 \times 100 mL) to block the excess of **5**, and then against 100 mM HEPES pH 8 (7 \times 100 mL) for 4 d. The concentration of protein was determined by Bradford's method.²⁴ The formation of BSA–biotin–avidin–dansyl complexes was achieved by the incubation in 33 mM HEPES pH 8.5 at rt for 30 min of 0.15 nmols of tetrameric avidin with either 0.15 or 6 nmol of biotin–BSA to yield 1 : 1 and 1 : 4 dansyl–tetrameric avidin : biotin–BSA complexes respectively. SDS-PAGE loading buffer was added and the samples were denatured in mild conditions by heating at 100 °C for 2 min.

Labeling of BSA and lysozyme with vinyl sulfone-derivatized rhodamine B 3 as a pre-stain dye. BSA and lysozyme (33 μg), and **3** (3.6 mmol) were incubated in 222 μL of 75 mM HEPES pH 8.8 at 100 °C for 5 min prior mixing with the SDS-PAGE loading buffer and denaturing at 100 °C for 4 min.

Electrophoresis of the labeled proteins. Samples analyzed by SDS-PAGE²⁵ in a 12% polyacrylamide gel (12% T : 1.3% C) in a MiniProtean 3 (BioRad). The fluorescence was detected by exciting at 365 nm with a conventional UV transilluminator (Genesys Inst.) and the gels were stained by either Coomassie Brilliant Blue²⁶ or silver stain.²⁷

Immobilization assays

Immobilization assays of invertase with bioconjugable vinyl sulfone silica (19) and enzymatic activity determination. Vinyl sulfone silica **19** (0.5 g) was suspended in 5 mL of a 47 mg mL^{-1} solution of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* in 244 mM phosphate buffer pH 7.5 and then 2.88 mL of water. The samples were prepared in duplicate and incubated at either 4 °C or rt. The reaction was allowed to proceed for 30 h (until there was no variation in A_{280} between two consecutive measurements of the protein in solution), and then the samples were washed with 100 mM phosphate buffer at pH 7.5 (6 \times 5 mL) and 2 M NaCl in 100 mM phosphate buffer pH 6.5 (2 \times 5 mL + 2 \times 10 mL). The enzymatic activity of the immobilized invertase was monitored by analysis of the optical rotation with a Perkin-Elmer polarimeter.

The immobilized enzyme was incubated with a 3% (w/v) solution of sucrose in 100 mM phosphate buffer pH 7.5 and the optical rotation was measured 5 times within 17 h. The values were fitted by linear regression (coefficient of determination >0.9), the slope multiplied by 1000 being the enzymatic activity in arbitrary units. Results are summarized in Table 3.

Acknowledgements

Financial Support was provided by Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (CTQ2008-01754) and Junta de Andalucía (P07-FQM-02899). J. M.-S. thanks the University of Granada for a research contract (Programa Puente). A. M.-F. thanks the Spanish Ministerio de Educacion for a research fellowship (FPU).

References

- 1 (a) *Bioconjugate Techniques*, ed. G. T. Hermanson, Academic Press, London, 2008; (b) E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 6974–6998.
- 2 UniProtKB/TrEMBL database release 40.0 (7537442 sequence entries comprising 2459135421 amino acids).
- 3 C. Lefevre, H. C. Kang, R. P. Hauglnad, N. Malekzadeh and S. Arttamangkul, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 482–489.
- 4 P. R. Banks and D. M. Paquette, *Bioconjugate Chem.*, 1995, **6**, 447–458.
- 5 J. V. Staros, R. W. Wright and D. M. Swingle, *Anal. Biochem.*, 1986, **156**, 220–222.
- 6 (a) D. C. Meadows and J. Gervay-Hague, *Med. Res. Rev.*, 2006, **26**, 793–814; (b) N. S. Simpkins, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 6951–6984.
- 7 B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 487–531.
- 8 (a) M. Morpurgo, F. M. Veronese, D. Kachensky and J. M. Harris, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 363–368; (b) P. Bailon and C.-Y. Won, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2009, **6**, 1–16.
- 9 M. S. Masri and M. Friedman, *J. Protein Chem.*, 1988, **7**, 49–54.
- 10 F. Perez-Balderas, *Ph.D. Dissertation*, Universidad de Granada, Spain, 2005.
- 11 D. R. van Staveren and N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 5931–5986.
- 12 (a) W. E. Lawson and E. E. Reid, *J. Am. Chem. Soc.*, 1925, **47**, 2821–2836; (b) A. H. Ford-Moore, *J. Chem. Soc.*, 1949, 2433–2440.
- 13 G. Alderton, W. Ward and H. Febold, *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, 43–58.
- 14 F. Santoyo-Gonzalez, F. Hernandez-Mateo, F. Lopez-Jaramillo, J. Ortega-Muñoz and J. Morales-Sanfrutos, *WO Patent* 200910664, 2009.
- 15 F. J. López-Jaramillo, F. Pérez-Banderas, F. Hernández-Mateo and F. Santoyo-González, F., *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2005, **61**, 435–438.
- 16 A. Badia, N. H. H. Thai, A. M. English, S. R. Mikkelsen and R. T. Patterson, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **262**, 87–90.
- 17 (a) M. Wilchek and E. A. Bayer, *Anal. Biochem.*, 1988, **171**, 1–32; (b) *Methods Enzymol.*, vol. 184, Avidin-Biotin Technology, ed. M. Wilchek and E. A. Bayer, Academic Press, New York, 1990; (c) M. D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. W. Nielander, S. Morgensen and E. J. Conklin, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company, USA, 1992.
- 18 (a) I. P. Griffith, *Anal. Biochem.*, 1972, **46**, 402–412; (b) A. M. Saoji, C. Y. Jad and S. S. Kelkar, *Clin. Chem.*, 1983, **29**, 42–44.
- 19 W. F. Patton, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 1123–1144.
- 20 (a) *Hybrid Materials*, ed. G. Kickelbick, Wiley-VCH, Darmstadt, 2007; (b) M. Pagliaro, *Silica-Based Materials for Advanced Chemical Applications*, RSC Publishing, Cambridge, 2009.
- 21 F. Santoyo-Gonzalez, F. Hernandez-Mateo, F. Lopez-Jaramillo, J. Ortega-Muñoz and J. Morales-Sanfrutos, *WO Patent* 2009040460, 2009.
- 22 M. Černý, T. Trnka and M. Buděšínský, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1996, **61**, 1489–1500.
- 23 M. L. Walfrom and A. Thompson, in *Methods in Carbohydrate Chemistry Vol II*, ed. R. L. Whistler and M. L. Walfrom, Academic Press Inc, London, 1963.
- 24 M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
- 25 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680–685.
- 26 D. E. Garfin, *Methods Enzymol.*, 1990, **182**, 425–441.
- 27 H. Blum, H. Beier and H. J. Gross, *Electrophoresis*, 1987, **8**, 93–99.

Vinyl sulfone functionalized silica: a “ready to use” pre-activated material for immobilization of biomolecules†

Mariano Ortega-Muñoz, Julia Morales-Sanfrutos, Alicia Megia-Fernandez, F. Javier Lopez-Jaramillo, Fernando Hernandez-Mateo and Francisco Santoyo-Gonzalez*

Received 16th March 2010, Accepted 14th May 2010

DOI: 10.1039/c0jm00720j

The combination of silica as support and vinyl sulfone as reactive group led to a pre-activated material that readily reacts to form covalent bonds by Michael-type addition with both amine and thiol groups naturally occurring in biomolecules in mild conditions compatible with the biological nature of the enzymes. A simple two step synthetic strategy was designed to access this functionalized hybrid material. Two types of vinyl sulfone silicas (N-type and S-type) differing in the chemical nature of the linkers between the silica particle and the reactive vinyl sulfone group were prepared by implementation of this strategy. The capabilities of those vinyl sulfone silicas were evaluated with the model enzymes invertase, lactase and lysozyme. Both S-type and N-type vinyl sulfone silicas coupled efficiently with the model enzymes even at 4 °C by simple combination of the species and the immobilized enzymes retained the enzymatic activity. The linker showed to play a major role in the non covalent interactions between the enzymes and the silicas. In terms of capacity, the S-type material is the best option although its poor flow rate when packed in columns invalidates its applications for low pressure liquid chromatography. The capabilities of the N-type material were successfully put to the test as a pre-packed column for the immobilization of invertase and further demonstrated with two real cases of relevance in proteomics: (i) purification of glutathione-S-transferase (GST) and (ii) identification of proteins that interact with thioredoxin h2 from *Pisum sativum*.

Introduction

Since the first report by Nelson and Griffin (1916)¹ on the preservation of the enzymatic activity of carrier bound invertase on Al(OH)₃ and charcoal, the scope of biomolecule immobilization has widened to two major areas of application: (i) industrial processes as a key stone for enzyme stabilization and cost reduction by reusing the same batch and (ii) *omic* sciences for bioseparation of biomolecules to purify and/or characterize them by pull-down assays and mass spectrometry analysis or for high-throughput screening² in the frame of what it is known as affinity concept.³ Regardless of the application, the immobilization of the biomolecule on the solid support is a critical step that often involves non-specific adsorption techniques, encapsulation or covalent coupling. The election of the procedure is far from trivial since it implies an integrated balance among different factors such as difficulty, stability, functionality or cost.⁴

Molecules can be immobilized passively either by hydrophobic or ionic interactions. However, covalent immobilization is necessary when the biomolecule is adsorbed weakly or when reduced nonspecific adsorption and/or long term stability are aimed.⁵ In general, the efficiency of the immobilization in terms of yield and stability is improved *via a pre-activation step*. One common approach consists of the pre-activation of the biomolecule by coupling with a partner termed tag that confers affinity

for the support and/or yields the formation of a covalent bond with it. In this context, the potential of the high selectivity (*i.e.* site-specificity) of the biological reactions and the mild conditions where they proceed have been exploited. Thus, covalent immobilization of fusion proteins has been carried out *via* a reaction between the tag and the support catalyzed by an external enzyme or by the tag itself, *via* intein-mediated protein ligation (EPL) based techniques, *via* translational level insertion of bioorthogonal tags or by more sophisticated approaches such as immobilization in RNA and DNA display systems.⁵ One of the major advantages of the tag approach is that it may provide a precise control of the orientation of the immobilized protein but at the cost of using molecular biology techniques to clone the gene encoding for the protein of interest into a suitable expression vector and subsequent overexpression and purification of the fusion protein, as well as the knowledge of the tertiary/quaternary structure of the protein of interest to predict the orientation of the attachment.

An alternative approach is based on the pre-activation of the support to promote the formation of a covalent bond between biomolecule and solid support. This strategy relies on the reactivity of the naturally present functional groups in biomolecules (*i.e.* amine, thiol and hydroxyl) towards classical derivatizations such as the Schiff base (reductive amination) method, N-hydroxy-succinimide (NHS) method, carbonyldiimidazole (CDI) method, epoxy (bisoxirane) method, ethyl dimethylaminopropyl carbodiimide (EDC) method, maleimide method or hydrazide method. Although the abundance of functional groups in the biomolecule may yield a random attachment, major advantages of this approach are: (i) the scope is broader since it is not limited

Departamento de Q. Organica, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnologia, Universidad de Granada, Granada, E-18071, Spain. E-mail: fsantoyo@ugr.es; Fax: +34-958243186; Tel: +34-958248087

† Electronic supplementary information (ESI) available: Sample preparation and supplementary data. See DOI: 10.1039/c0jm00720j

to recombinant proteins; (ii) the biomolecule does not need to be modified by time consuming chemical or biological manipulations that may alter its biological function; and (iii) this approach is flexible since virtually any biomolecule can be immobilized without the need of designing in advance specific protocols of obtention/purification.

Suitable pre-activated agarose and polystyrene derivatives and, to a lesser extent, functionalized silicas are commercially available although their application to the immobilization of biomolecules is not always straightforward and fully compatible with the biological nature of the biomolecules. The mechanical, chemical and biological stability of silica makes it a superior material, particularly as a chromatographic support invulnerable to swelling and resistant to large changes in pressure and flow rates without disintegrating or deforming. However, the fact that macromolecules are adsorbed to its surface *via* strong electrostatic interactions⁶ even under conditions of electrostatic repulsion,^{7,8} as predicted by Arai and Norde,⁹ and that the curvature of the silica particle provokes a distortion of the proteins secondary structure that diminishes the catalytic activity¹⁰ discourages its use unless it has been passivated or functionalized. In fact, silica has been biofunctionalized with carbohydrates⁷ and lipids¹¹ to immobilize/isolate lectins and membrane proteins, respectively, and preactivated to promote the immobilization by classical methods¹² and by “click chemistry”.¹³

Novel pre-activated silicas are needed, particularly for high-performance affinity chromatography (HPAC)¹⁴ and the functionalization with vinyl sulfone is an attractive approach. Vinyl sulfone is a very stable functional group whose reactivity toward amine and/or thiol groups by means of the so-called Michael-type addition¹⁵ is well known although not fully exploited in the context of biomolecules.¹⁶ In this respect, we have recently reported¹⁷ the ability of proteins to react in the absence of a catalyst with vinyl sulfone-functionalized reagents *via* the side chain of their Lys and His residues in mild conditions that preserve the biological functionality of proteins. Thus, silica as support and vinyl sulfone as activating group are an appealing combination to yield ready to use material specially suited to react with biomolecules.

In this paper we describe the synthesis of novel pre-activated silica-based hybrid materials by means of the incorporation of vinyl sulfone groups that readily reacts with biomolecules, the characterization of their capabilities for the immobilization of the model enzymes invertase, lactase and lysozyme and their applications in proteomics as an open support that can be turned into an affinity support obtained *ad hoc* by simple incubation with the desired macromolecules in mild aqueous conditions that preserves their biological functions.

Results and discussion

Chemical functionalization of silica

The vinyl sulfone functionalization of silica was conceptually designed by a two step strategy that comprise first silanization of commercial silica with an adequate amine or thiol trimethoxysilane derivative and subsequent Michael-type addition of a bis-vinyl sulfone for the introduction of the vinyl sulfone function (Scheme 1).

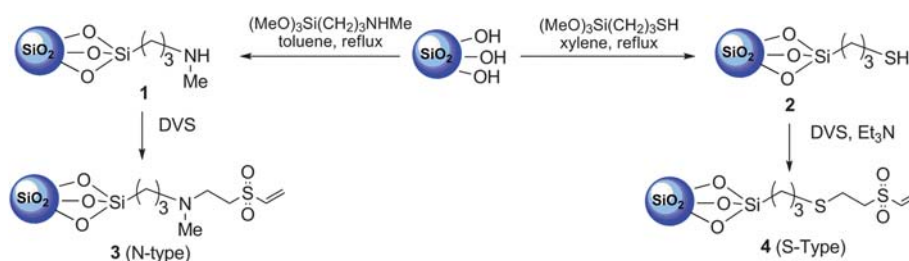
In principle it is accepted that a pore size of 50 nm is optimum for the resolution of proteins up to 10⁶ Da.¹⁸ However, silica with a particle size ranging from 63 to 200 μm that yields a pore size of 600 nm was the support of choice to take into account the pore size shrinkage effect observed as a consequence of the functionalization and later coupling of the biomolecule. On the other hand, for biotechnological applications a large pore size is required to ensure the access to all binding sites on the surface of the bounded phase and an adequate flow at the low pressure generally used in biotechnological methods.

Activated commercial silica gel 60 was refluxed in a toluene suspension of [3-(methylamino)propyl]-trimethoxysilane or in a xylene suspension of 3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane. The corresponding amine and thiol functionalized silicas **1**¹⁹ and **2**²⁰ were thus obtained and then treated with an excess of DVS overnight to yield the vinyl sulfone derivatized silicas **3** (N-type) and **4** (S-type).²¹ These vinyl sulfone pre-activated silicas were isolated by simple filtration and their content of nitrogen and sulfur was determined by elemental analysis. The yield of the silanization process was calculated from the quantification of the nitrogen and sulfur incorporated into 1 g of activated silica as 1.0 mmol. The number of vinyl sulfone groups was estimated from the sulfur content as 0.9 mmol g⁻¹ and 0.6 mmol g⁻¹ for the vinyl sulfone silicas **3** and **4**, respectively.

The fact that similar yields in the silanization step led to a different extent of vinyl sulfone functionalization, the vinyl silica material synthesized from the thiol derivative being the least functionalized, suggests that part of the thiol groups are forming disulfide bonds and are not reactive towards divinyl sulfone.

Immobilization of enzymes on vinyl sulfone derivatized silica

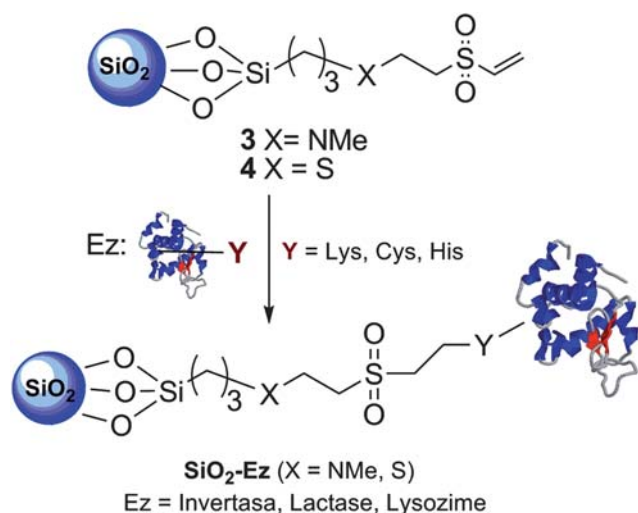
Although silica is available in a wide range of pore and particle sizes it is not routinely used in life science due to the strong unspecific electrostatic interactions with macromolecules and the induced distortion of their secondary structure that may alter their biological function. Thus, the passivation of the silica is not a minor issue in the context of the immobilization of



Scheme 1 Synthesis of N-type (**3**) and S-type (**4**) vinyl sulfone silicas.

biomolecules. In order to evaluate whether the functionalization with vinyl sulfone groups yielded both passivation and functionalization of the silica particles the dual protein/enzyme character of invertase and lactase was exploited. As proteins, they contain Lys, His and Cys residues that bear reactive functional groups towards the vinyl sulfone¹⁷ and report on the reactivity of the pre-activated material. As enzymes, their catalytic activity is sensitive to the interaction with the unpassivated silica.

The enzyme invertase (β -fructofuranosidase [EC3.2.1.26]) catalyzes the hydrolysis of sucrose to fructose and glucose, a process of interest in the food industry. Invertase is also a good model system because the protein is commercial, the activity can be measured in the laboratory and the substrate is sugar (*i.e.* sucrose). In a first round of experiments, the immobilization was carried out in batch at both room temperature (rt) and 4 °C by simple addition of the vinyl sulfone silicas to a solution in molar excess of the enzyme in a standard phosphate buffer at pH 7.5 (Scheme 2). The immobilization was followed by the evolution of the optical density at 280 nm of the protein in solution (Fig. 1). The results show that the reaction is complete within 24 h and



Scheme 2 Immobilization of model enzymes onto vinyl sulfone.

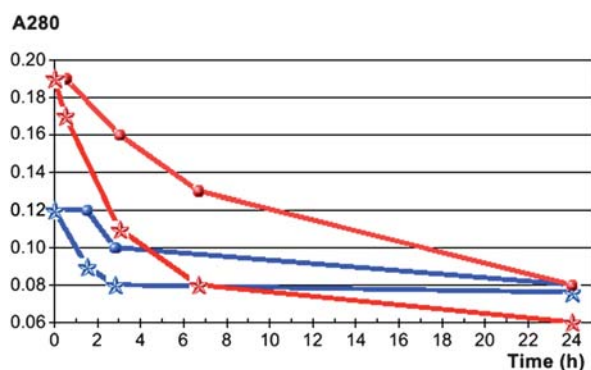


Fig. 1 Protein in solution during the covalent immobilization of invertase on N-type 3 (*) and S-type 4 (●) silicas as a function of time at rt (red) and 4 °C (blue). Initial protein concentration of the experiment at 4 °C was lower to prevent protein precipitation.

takes place even at 4 °C, although 50% of the immobilization is achieved within 3 and 6.5 h, being faster on the N-type vinyl sulfone silica 3.

After immobilization the material was rinsed with buffer and with ionic strength to remove the enzyme non-covalent immobilized and to investigate the nature of the interactions between protein and vinyl sulfone silicas (Table 1). In general, the S-type silica 4 displays a larger covalent binding capacity than its N-type 3 counterpart and regardless of the type of vinyl sulfone silica the yield of the reaction is dependent on the temperature, although a temperature as low as 4 °C yields about 50% of the rt capacity. The analysis of the interaction between the vinyl sulfone silicas and invertase reveals that initially, besides the molecules that react to yield a covalent bond, an appreciable amount of enzyme is retained by non covalent interactions. For the case of N-type vinyl sulfone silica 3, electrostatic interactions play a major role as demonstrated by the fact that almost 50% of the adsorbed protein is removed only after treatment with high ionic strength.

The above results for the N-type vinyl sulfone silica 3 are coherent with the general view of silica as an unspecific material for adsorption of macromolecules where strong electrostatic interactions dominate the process^{6a,6b,6d,22} and suggest that passivation was not achieved. Nevertheless, the fact that the S-type vinyl silica 4 shows larger capacity despite that the extent of vinyl sulfone functionalization is lower (0.6 mmol g⁻¹ versus 0.9 mmol g⁻¹ for the N-type) points to other factors rather than to the surface of the silica particle.

On the other hand, given the fact that the adsorption of proteins on raw silica provokes a distortion of the secondary structure that may alter the biological function of the biomolecule,¹⁰ the study of enzymatic activity of the immobilized invertase is a good approach to estimate the adsorption. However, the abundance of functional groups in the biomolecule may lead to the immobilization in orientations that occlude areas of biological significance and yields inactive enzyme, biasing the study. Hence, a strategy consisting of immobilizing invertase in the presence of its substrate to protect the active site from reacting was assayed. As depicted in Table 1, the presence of sucrose leads to a reduction in the overall amount of immobilized invertase by both types of materials but in general it exerts a protective effect that yields larger specific activities (see ESI, Fig. 1S†). In terms of specific activity the N-type vinyl sulfone silica 3 and immobilization at 4 °C is the best choice.

A second round of experiments was carried out on lactase to confirm the results obtained with invertase. Lactase (glycosidase hydrolase [EC3.2.1.23]) hydrolyzes lactose into galactose and glucose and its immobilization has a considerable interest in the preparation of lactose-hydrolyzed milk and in the food industry. It was immobilized by a simple combination with vinyl sulfone silicas 3 and 4 in 100 mM phosphate buffer pH 7.5 (Scheme 2). Besides the immobilization in the presence of the substrate, the effect of the ionic strength was also analyzed. As expected from the result with invertase, the S-type silica 4 shows a larger covalent binding capacity, the electrostatic interactions play a major role in the N-type vinyl sulfone silica and the presence of substrate leads to a lower yield (Table 2). The immobilized lactase is also active although unlike invertase the N-type silica 3 is less suitable and the protection of the active site does not seem to preserve the enzymatic activity. High ionic strength (2 M

Table 1 Immobilization of invertase

Experimental conditions ^a Silica type	rt substrate		rt		4 °C substrate		4 °C	
	N	S	N	S	N	S	N	S
Immobilized protein ^b	68.6	69.8	76.9	77.2	52.4	45.9	52.5	43.1
Non covalently immobilized ^{bcd}	25.9 (38)	19.3 (28)	26.6 (35)	12.3 (16)	29.5 (56)	18.5 (40)	27.3 (52)	16.1 (38)
Removed by buffer ^b	13.8	16.6	13.8	9.6	15.6	14.9	14.4	13.8
Removed by 2 M NaCl pH 6.5 ^b	12.1	2.7	12.8	2.7	13.9	3.6	13	2.4
Covalently immobilized ^{bc}	42.7 (62)	50.5 (72)	50.4 (65)	64.9 (84)	22.9 (44)	27.4 (60)	25.1 (48)	26.9 (62)
Capacity ^e	85	101	101	130	46	55	50	54
Specific activity ^f	1.58	1.17	1.40	0.86	3.30	1.67	3.44	1.28

^a Temperature of the immobilization and presence/absence of substrate (sucrose) during the process. ^b Amounts given in mg. ^c In parenthesis, percentage referred to the amount of enzyme initially bound. ^d Amount of protein washed from the material by 100 mM phosphate buffer pH 6.5 and 2 M NaCl. ^e mg protein per g silica. ^f Arbitrary units per mg immobilized protein.

Table 2 Immobilization of lactase

Experimental conditions ^a Silica type	rt		rt substrate		rt, 2 M NaCl substrate	
	N	S	N	S	N	S
Immobilized protein ^b	17.2	20.9	12.3	17.3	10.8	25.3
Non covalently immobilized ^{bcd}	7.0 (41)	2.6 (12)	9.3 (76)	2.5 (14)	4.2 (39)	2.4 (9.5)
Covalently immobilized ^{bc}	10.2 (59)	18.3 (88)	3.0 (24)	14.8 (86)	6.6 (61)	22.7 (90.5)
Capacity ^e	41	73	12	59	26	91

^a Presence/absence of substrate (lactose) and ionic strength. ^b Amounts given in mg. ^c In parenthesis, percentage referred to the amount of enzyme initially bound. ^d Amount of protein washed from the material by 2 M NaCl in 100 mM phosphate buffer pH 6.5. ^e mg protein per g silica.

NaCl) exerts a dual effect on the immobilization of lactase: it improves the yield of covalent immobilization but damages the enzymatic activity.

It is tempting to search for a correlation between the capacity of the vinyl sulfone resin and the features of the immobilized enzymes. However it implies a multivariable analysis that is not limited to the isoelectric point and molecular mass. In fact invertase and lactase share a similar isoelectric point (4.5²³ and 5.4,²⁴ respectively) but they are immobilized with different yields. The reactivity of the enzymes towards resins is dependent not only on the primary structure (*i.e.* number of reactive groups: Lys, Cys, His) but also, and more importantly, on their accessibility, which is determined by the tertiary and quaternary structures and by post-translational modifications. For the particular case of invertase and lactase such analysis is far from trivial since the structure of invertase is not available and that of lactase is still in progress.²⁵ Moreover, invertase is immobilized with a better yield despite it being a glycoprotein whose carbohydrate decoration may hinder potential reacting residues.

Characterization of the non covalent interactions

In order to further characterize the non covalent interactions a highly cationic protein was immobilized in the presence and absence of ionic strength (*i.e.* 1M NaCl). Lysozyme, with an isoelectric point around 11²⁶ and whose immobilization on raw silica (isoelectric ~ 1.7 – 3.5)²⁷ has been characterized as predominantly Coulombic,^{6a,28} was the protein of choice. As depicted in Table 3, lysozyme is strongly adsorbed on raw silica and the interaction withstands 2 M NaCl as if it were covalently bonded. If partial passivation of the vinyl sulfone silicas were responsible for the non covalent interaction, lysozyme should show similar behavior with both N-type **3** and S-type **4** materials and the ionic strength of the media should play a minor role as for the case of the raw silica. However, the results reveal a diminished capacity of the N-type vinyl sulfone silica **3** and a positive effect of the ionic strength on both the amount of protein initially retained and the yield of the covalent immobilization, converse to the S-type material **4**. The interaction

Table 3 Immobilization of lysozyme

Material type [NaCl]/M	Raw silica		N-Type		S-Type	
	0	1	0	1	0	1
Immobilized protein ^a	27.9	25.9	15.4	27.5	25.4	25.2
Non covalently immobilized ^{ab}	0.8	0.8	1.5	10.6	0.4	1.3
Covalently immobilized ^a	27.2	25.0	13.9	16.9	25.0	23.9
Capacity ^c	109	100	56	68	100	86

^a Amounts given in mg. ^b Amount of protein washed from the material by 2 M NaCl in water. ^c mg protein per g silica.

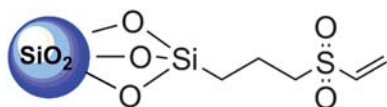


Fig. 2 Structure of vinyl sulfone silica **5** (see ESI†).

patterns of the raw silica and the N-type material can be rationalized on the basis of electrostatic forces. The presence of a tertiary amine in the linker of the N-type vinyl sulfone silica leads to repulsive electrostatic interactions with the highly cationic lysozyme that prevents them from approaching and leads to a lower yield of the immobilization. Conversely, the isoelectric points of raw silica and lysozyme are so extreme (1.7–3.5 *versus* 11) that it leads to a virtually irreversible interaction that can withstand 2 M NaCl and the immobilization in presence of 1 M NaCl provides only a minor screening of the strong electrostatic attractive forces as demonstrated by the 10% reduction of the yield.

The thioether linkage of the S-type vinyl sulfone silica does not confer electrostatic charge and the immobilization on the S-type material was not expected to be affected by the ionic strength. However, as Table 3 depicts, the presence of 1 M NaCl reduces the yield to 86%. This discrepancy may be rationalized when the structure of the linker is revisited from the perspective of thiophilic interactions, a term that refers to an affinity of proteins for sulfone groups that lie in close proximity to thioether groups.²⁹ In fact the negative effect of the chloride ions on the thiophilic adsorption capacity has been reported³⁰ and lysozyme is adsorbed on thiophilic supports.³¹

In order to evaluate the existence of thiophilic interactions a new vinyl sulfone activated silica **5** (Fig. 2) was synthesized without the thioether linkage (see ESI†). This new material does not support thiophilic interactions and the immobilization of lysozyme yielded a capacity of 82 and 73 mg per gram of silica in presence or absence of ionic strength, respectively. The fact that the reduction of the yield is of the same order of that obtained with the S-type vinyl sulfone silica **4** (89% *versus* 86%) does not corroborate the existence of thiophilic interactions and points to the lower reactivity of lysozyme. As stated above, the conjugation between the vinyl sulfone silicas and proteins is a Michael type addition that involves the addition of the nucleophile groups present in proteins (thiol and amine) to the activated olefin. Lysozyme does not have any free Cys and the Michael addition *via* amine has been reported as highly dependent on the electronic and steric environment of the amine.³² Thus the presence of NaCl in the reaction medium would distort the reaction.

Other applications of the vinyl sulfone silicas

Besides enzyme immobilization, another major application of the preactivated materials is the separation of biomolecules. In this context, the feasibility of the vinyl sulfone silica as a pre-packed material that can be turned into an affinity chromatographic support was put to the test with the enzyme invertase as a model. During the packing of the vinyl sulfone silicas in the columns, the flow of buffer through columns with the S-type silica **4** and silica **5** was null and with the help of a peristaltic pump 1 mL h⁻¹ and 6.6 mL h⁻¹, respectively, invalidating them as supports for low

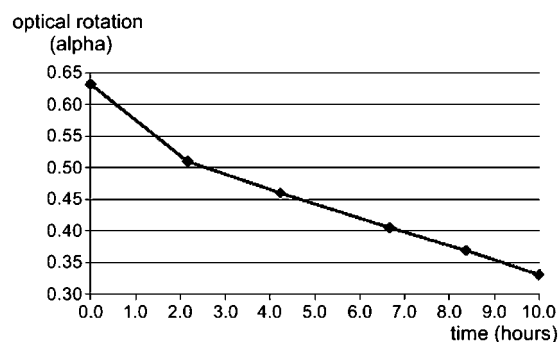


Fig. 3 Hydrolysis of sucrose into glucose and fructose by invertase immobilized in vinyl silica **3**.

pressure liquid chromatography. The recirculation of a solution of invertase through a pre-packed N-type vinyl sulfone silica **3** column led to the covalent immobilization of 20 mg of invertase per gram of pre-packed, which in terms of capacity is about 40% of the expected yield for unpacked N-type vinyl sulfone silica **3** at the equivalent time of reaction. As expected the immobilized enzyme retained the enzymatic activity (Fig. 3).

However, the vinyl sulfone silica as an open support has a broader potential since the long term stability of the vinyl sulfone group^{16c} and its reactivity towards biomolecules in mild conditions turn it into an affinity support that can be obtained *ad hoc*. To fully explore this potential, a real case problem was approached: identification of putative protein targets of thioredoxin h2 from *Pisum sativum* (Trxh2) by pull-down assays and mass spectrometry. Thioredoxins are ubiquitous redox proteins that modulate other proteins by interchange of thiol/disulfide bridges and the plant h-type thioredoxins are the largest group, their specificity and roles in plant cells being not fully understood.³³ The N-type vinyl sulfone silica **3** was turned into a Trxh2 affinity support suitable for isolating the proteins from a crude extract that interact with Trxh2. The success of an affinity experiment is highly dependent on both the exposure of the site of interaction and the discrimination of the unspecific interactions. The first issue was addressed by: (i) fusing the N terminus

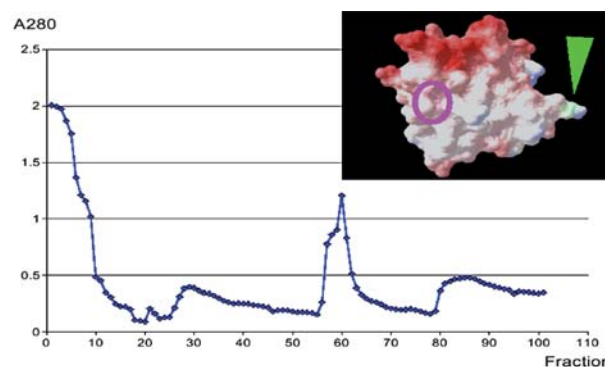


Fig. 4 Chromatogram of a crude extract of *Pisum sativum* on a Trxh2 vinyl silica resin to isolate potential targets of Trxh2. Fractions 1–5: sample loading, 6–24: washing with buffer, 25–55: washing with 200 mM NaCl, 56–78: elution with 1.5 M NaCl, 79–101: elution 1.5 M NaCl and 20 mM DTT. Inset: Tdh2 showing the position of the His-Tag (green arrow) and the active site (magenta circle).

of Trxh2 with a His-Tag, a strongly reactive chain¹⁷ that modeling studies (see Experimental section) place at the opposite side of the active site (Fig. 4) which may help to orientate the molecule; and, (ii) producing the protein in absence of reductants to promote the formation of disulfide bonds and prevent the Cys of the active site from reacting with the vinyl sulfone groups. The discrimination of the unspecific interaction was approached by loading the sample in a buffer containing 50 mM NaCl and washing the column at a moderate ionic strength (200 mM NaCl) even at the risk of being too stringent. The elution protocol was designed to take into account not only the formation of a disulfide bond between thioredoxin h2 and its target proteins but to explore other affinities based on electrostatic interactions. Thus, the samples were eluted with 1.5 M NaCl and then with 1.5 M NaCl supplemented with 10 mM DTT. The success of our approach is demonstrated by the fact that only few proteins were isolated and their analysis by 2D electrophoresis and mass spectrometry led to the identification of superoxide dismutase and peroxiredoxin, demonstrating the potential of the vinyl sulfone silica in proteomics (see ESI†). The biological relevance of these results will be described elsewhere.³⁴

In the field of proteomics, specific and reversible interactions between the tag from the fusion protein and the solid support have been widely utilized for a one step chromatographic purification of proteins.³⁵ Among the several tags commercially available, the fusion to a GST tag is a common approach that takes advantage of the high affinity of the GST for glutathione to isolate the fused protein on supports containing immobilized glutathione.³⁶ In this context the capabilities of the N-type vinyl sulfone silica **3** were further put to test in the purification of glutathione-S-transferase (GST). Our results demonstrate that the incubation of the N-type vinyl sulfone silica **3** with glutathione in 200 mM phosphate pH 8.7 turns it into a GST-affinity support suitable for the one-step purification of the GST from a crude extract and makes feasible the use of glutathione covalently immobilized on the N-type vinyl sulfone silica **3** for the purification of GST tagged proteins (Fig. 5). For the particular case of glutathione that presents neither secondary structure nor enzymatic activity to preserve, the pH was not a concern and its reaction with the vinyl silica resin was carried out at a higher pH (8.7).

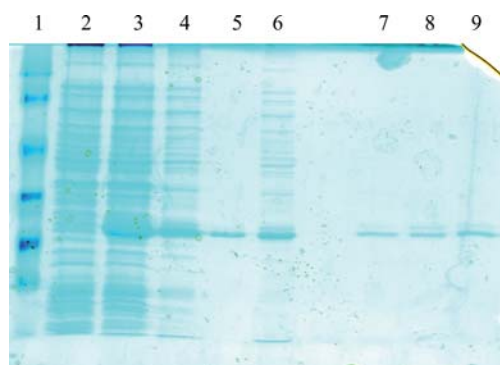


Fig. 5 SDS-PAGE of the purification of recombinant GST by N-type vinyl sulfone resin. Lane 1: molecular weight standard; 2: crude extract prior to induction of the expression; 3: crude extract after induction by IPTG; 4: soluble crude extract; 5: control of GST; 6: crude extract loaded into the column; 7–9: GST eluted from the column.

Conclusions

Our results demonstrate that vinyl sulfone silica²¹ is a novel “ready to use” pre-activated material that reacts with biomolecules in mild conditions by means of the Michael-type addition reaction. The only prerequisite is the presence of amine and/or thiol groups which are naturally present in most of the biomolecules. Major advantages of the vinyl silicas for biotechnological applications are: (i) simplicity since the immobilization is as simple as combining the biomolecule with the functionalized silica in an amine and thiol free buffer at a pH slightly alkaline, without any need of metal catalysis, introduction of chemical reporters, chemical pre-activation of the biomolecule or tag strategies, and (ii) green attributes such as reaction in aqueous media, reactivity toward biomolecules even at 4 °C, preservation of the enzyme activity and absence of byproducts. Vinyl sulfone functionalized silica is well suited as a pre-activated support for the immobilization of biomolecules with two major areas of application: (i) industrial processes where enzymes need to be immobilized, and (ii) *omic* science for the bioseparation of biomolecules.

Experimental section

Synthesis of vinyl silicas

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 amine functionalized silica 1. Activated silica gel (5 g) was suspended in dried toluene (25 mL) and then [3-(methylamino)propyl]-trimethoxysilane (1.25 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 methanol was followed by further addition of dry toluene (25 mL) and additional reflux for one hour. The reaction mixture was filtered and the white powder washed with dichloromethane (4 × 20 mL) and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h giving the amine functionalized silica **1** (5.7 g).

Preparation of thiol functionalized silica 2. Activated silica gel (10 g) was suspended in dried xylene, previously degassed with Ar (40 mL) and then (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane (7 mL) was added. The stirred suspension was refluxed under Ar atmosphere for 72 h. The reaction mixture was filtered and the white powder washed with xylene (3 × 20 mL) and acetone (3 × 20 mL) and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h giving the thiol functionalized silica **2** (11.8 g).

Preparation of vinyl sulfone silica 3 (N-type). Amine derivatized silica **1** (3.13 g) was suspended in THF-2-propanol (1 : 2, 10 mL) and then DVS (1.4 mL) was added. The resulting suspension was stirred at rt overnight. The reaction mixture was filtered and the white powder washed with methanol (3 × 20 mL) and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h giving the vinyl sulfone silica **3** (3.33 g).

Preparation of vinyl sulfone silica 4 (S-type). Thiol derivatized silica **2** (5 g) was suspended in THF : 2-propanol (1 : 2, 25 mL, previously degassed with Ar) and then DVS (2.5 mL) and Et₃N

(140 μL) were added. The resulting suspension was stirred at rt under an Ar atmosphere overnight. The reaction mixture was filtered and the white powder washed with acetone ($3 \times 20 \text{ mL}$) and diethyl ether ($3 \times 20 \text{ mL}$) and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50°C for 16 h giving the vinyl sulfone silica **4** (5.3 g).

Protein quantification

The evolution of the protein in solution was calculated from the optical density at 280 nm assuming an optical density of 1 for a solution containing 1 mg mL^{-1} of protein, except for invertase and lysozyme whose absorbance 0.1% were estimated as 1.2 and 2.6, respectively.

Enzyme immobilization

Immobilization of invertase in batch. The vinyl sulfone silica **3** or **4** (0.5 g) was suspended in 2.13 mL of a 47 mg mL^{-1} solution of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA I-4504) in 244 mM phosphate buffer pH 7.5 and then 2.88 mL of either water (control) or 30% (w/v) sucrose (Panreac) (for active site protection) was added. The samples were prepared in duplicate and incubated at either 4°C or rt. The reaction was allowed to proceed until no variation between two consecutive measurements of the protein in solution was detected (30 h) and then the samples were washed with 100 mM phosphate buffer at pH 7.5 ($6 \times 5 \text{ mL}$) and 2 M NaCl in 100 mM phosphate buffer pH 6.5 ($2 \times 5 \text{ mL} + 2 \times 10 \text{ mL}$).

Immobilization of invertase on pre-packed vinyl sulfone silica. Vinyl sulfone silica **3** (250 mg) was packed into a 5 mL syringe and then 3 mL of a 20 mg mL^{-1} solution of invertase in 50 mM phosphate buffer pH 7.5 was recirculated 30 times at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} . The column was then washed with 50 mM phosphate buffer pH 7.5 (10 mL) and 2 M NaCl in 50 mM phosphate buffer pH 7.5 (10 mL).

Immobilization of lactase. Lactase from *Kluyveromyces lactis* (Sigma G-3665) was dialyzed for 72 h against 100 mM phosphate buffer pH 7.5 ($3 \times 500 \text{ mL}$) at 4°C to remove any additive susceptible of reaction with the vinyl sulfone silica. Three aliquots consisting of 31.6 mg of the dialyzed lactase, dialyzed lactase supplemented with 8% (w/v) lactose (Aldrich) and dialyzed lactase supplemented with both 8% (w/v) lactose and 2 M NaCl were incubated overnight with the vinyl sulfone silica **3** or **4** (0.25 g). Then the samples were washed with 2 M NaCl in 100 mM phosphate buffer pH 6.5 ($5 \times 10 \text{ mL}$) to remove the non covalently bound protein.

Immobilization of lysozyme. Vinyl sulfone silica **3**, **4** or **5** (0.25 g) was suspended in 5 mL of a 6 mg mL^{-1} solution of hen white egg lysozyme (Sigma 62970) in 400 mM phosphate buffer pH 7.5 supplemented or not with 1 M NaCl and the reaction was allowed to proceed at rt for 42 h. The non-covalently bound protein was eluted by washing with distilled water ($2 \times 10 \text{ mL}$) and 2 M NaCl in water ($2 \times 10 \text{ mL}$).

Immobilization of thioredoxin h2 and isolation of putative its targets. A cDNA encoding thioredoxin h2 from *Pisum*

*sativum*³⁷ was cloned into pET11m (Novagen) and overexpressed *E. coli* BL21 as His-tagged proteins. The protein was purified by Ni affinity chromatography in pre-packed HiTrap affinity columns (Pharmacia, GE Healthcare) according to the manufacturer's indications in absence of reductants. Vinyl sulfone silica **3** (0.75 g) was turned into a thioredoxin h2 affinity support by reaction with the His-tag thioredoxin h2 (9 mg) in 200 mM HEPES pH 7.5 overnight at rt. The free vinyl sulfone groups were blocked by addition of 565 μL of 2-mercaptoethanol and further incubation for 90 min at rt and then the resin was rinsed with 10 mL of 2M NaCl and 33 mM DTT to remove unbound protein and excess of reagents and to reduce the bound TRX. The thioredoxin h2–**3** silica was packed into a column and equilibrated in 50 mM HEPES pH 7.6, 50 mM NaCl. A crude extract from 10–12 days old pea leaves (*Pisum sativum* L. cv Lincoln) was prepared by homogenization in 50 mM HEPES pH 7.5 and 50 mM MgCl_2 1 : 2 (w/v) with liquid nitrogen and 100 mL were loaded into the thioredoxin h2–**3** silica column. The column was washed with 50 mM HEPES pH 7.6, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 to remove non-specific bound proteins and bound proteins were eluted with ionic strength (50 mM HEPES pH 7.5, 1.5 M NaCl) and ionic strength plus reducing conditions (50 mM HEPES pH 7.5, 1.5 M NaCl, 20 mM DTT) to distinguish between those proteins that interact with TRX *via* electrostatic interactions from those that form a disulfide bond. Fractions were analyzed by 2D electrophoresis, tryptic digestion and mass spectrometry by the Central Office for Research Support (SCAI) at Universidad de Córdoba (SPAIN). The resulting peaks were used for searching the MSDB (Viridiplantae) protein database by Mascot search program³⁸ (Perkins *et al.*, 1999). Matches with protein score > 65 and 100% confidence better were considered as positive identifications if their calculated molecular weight and estimated isoelectric point were compatible with the experimental result from the 2D electrophoresis.

Immobilization of glutathione and purification of a recombinant glutathione-S-transferase. Vinyl sulfone silica **3** (1 g) was suspended in 10 mL of 200 mM phosphate buffer pH 8.7 containing 2.4 mg of glutathione (Sigma G4251) and incubated at rt overnight. The sample was washed with 2 M NaCl in 200 mM phosphate buffer pH 8.7 ($2 \times 10 \text{ mL}$) to remove the non covalently bound glutathione, further incubated at rt for 3 h with 563 μL of mercaptoethane in 5 mL of 200 mM phosphate buffer pH 8.7 to block the free vinyl sulfone groups and then washed with 200 mM phosphate buffer pH 8.7 ($2 \times 10 \text{ mL}$). The glutathione-**3** silica was packed into a chromatographic column. A crude extract from a lysate of *E. coli* overexpressing the GST fusion plasmid pGEX-4T-2 (GE Healthcare) was loaded into the prepared column. After washing with 200 mL of 200 mM NaCl in 100 mM HEPES pH 7.5, the GST retained by the glutathione-**3** silica was eluted with 50 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl pH 7.5.

Enzymatic activity determination

The enzymatic activity of both invertase and lactase was monitored with a Perkin-Elmer polarimeter by analysis of the optical rotation of a solution of their substrates in contact with the immobilized enzymes.

Invertase. The immobilized enzyme was incubated with a 3% (w/v) solution of sucrose in 100 mM phosphate buffer pH 7.5 and the optical rotation was measured 5 times within 17 h. The values were fitted by linear regression (coefficient of determination > 0.9) and the slope multiplied by 1000 being the enzymatic activity in arbitrary units.

Lactase. The immobilized enzyme was incubated with a 4.7% (w/v) solution of lactose in 100 mM phosphate pH 7.5 and the change in optical rotation was monitored for 11 h.

Modeling of the thioredoxin h2

Modeling was approached by homology modeling at EsyPred3D Web Server 1.0³⁹ using as template the structure of the Tdh1 from *Arabidopsis Thaliana* (PDB entry 1xf1) that shares 58.9% identity with Tdh2t. The model comprised residues 2 to 113 (95% coverage) with 93.1% of residues in the most favored region of the Ramachandran plot, Errat overall quality factor⁴⁰ of 88.462 and 82.3% of the residues with an averaged 3D–1D score⁴¹ > 0.2.

Acknowledgements

Financial Support was provided by Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (CTQ2008-01754) and Junta de Andalucía (P07-FQM-02899). J. M.-S. thanks the University of Granada for a research contract (Programa Puente). A. M.-F. thanks the Spanish Ministerio de Educacion for a research fellowship (FPU).

References

- 1 J. M. Nelson and E. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, **38**, 1109–1115.
- 2 C. Becamel, N. Galeotti, J. Poncet, P. Jouin, A. Dumuis, J. Bockaert and P. Marin, *Biol. Proced. Online*, 2002, **4**, 94–104.
- 3 K. Mondal and M. N. Gupta, *Biomol. Eng.*, 2006, **23**, 59–76.
- 4 L. Cao, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 217–226.
- 5 L. S. Wong, F. Khan and J. Micklefield, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4025–4053.
- 6 (a) H. Larsericsdotter, S. Oscarsson and J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **237**, 98–103; (b) M. Van der Veen, W. Norde and M. C. Stuart, *Colloids Surf., B*, 2004, **35**, 33–40; (c) D. Rezwani, L. P. Meier and L. J. Gauckler, *Bio-materials*, 2005, **26**, 4351–4357; (d) P. M. Biesheuvel, M. Van der Veen and W. Norde, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 4172–4180.
- 7 M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo and F. Santoyo-Gonzalez, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 2410–2420.
- 8 (a) J. J. Valle-Delgado, J. A. Molina-Bolivar, F. Galisteo-Gonzalez, M. J. Galvez-Ruiz, A. Feiler and R. W. Rutland, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2004, **16**, S2383–S2392; (b) W. Norde and J. P. Favier, *Colloids Surf.*, 1992, **64**, 87–93; (c) H. Larsericsdotter, S. Oscarsson and J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, **289**, 26–35; (d) S. Koutsopoulos, J. van der Oost and W. Norde, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 467–474.
- 9 T. Arai and W. Norde, *Colloids Surf.*, 1990, **51**, 1–15.
- 10 (a) A. Kondo, F. Muakami, M. Kawagoe and K. Higashitani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, **39**, 726–731; (b) M. Lundqvist, I. Sethson and B. H. Jonsson, *Langmuir*, 2004, **20**, 10639–10647; (c) A. A. Vertegel, R. W. Siegel and J. S. Dordick, *Langmuir*, 2004, **20**, 6800–6807.

- 11 A. Loidl-Stahlhofen, J. Schmitt, J. Noller, T. Hartmann, H. Brodowsky, W. Schmitt and H. Keldenich, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 1829–1834.
- 12 (a) D. Wu and R. R. Walters, *J. Chromatogr., A*, 1988, **458**, 169–174; (b) J. E. Schiel, R. Mallik, S. Soman, K. S. Joseph and D. S. Hage, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 719–737; (c) R. Mallik, C. Wa and D. S. Hage, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1411–1424.
- 13 A. Schlossbauer, D. Schaffert, J. Kecht, E. Wagner and T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12558–12559.
- 14 D. S. Hage, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, **768**, 3–30.
- 15 (a) D. C. Meadows and J. Gervay-Hague, *Med. Res. Rev.*, 2006, **26**, 793–814; (b) N. S. Simpkins, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 6951–6984.
- 16 (a) M. S. Masri and M. Friedman, *J. Protein Chem.*, 1988, **7**, 49–54; (b) G. Houen and O. M. Jensen, *J. Immunol. Methods*, 1995, **181**, 187–200; (c) M. Morpurgo, F. M. Veronese, D. Kachensky and J. M. Harris, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 363–368; (d) J. Porath and R. Axen, *Methods Enzymol.*, 1976, **44**, 19–45.
- 17 J. Morales-Sanfrutos, L. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Muñoz, A. Megia-Fernandez, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo and F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 667–675.
- 18 M. P. Henry, *J. Chromatogr., A*, 1991, **544**, 413–443.
- 19 (a) E. Angeletti, C. Canepa, G. Martinetti and P. Venturello, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1989, 105–107; (b) G. G. Talanova, L. G. Zhong and R. A. Bartsch, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1999, **74**, 849–856.
- 20 E. F. S. Vieira, A. R. Cestari, J. D. Simoni and C. Airoidi, *Thermochim. Acta*, 2003, **399**, 121–126.
- 21 F. Santoyo-Gonzalez, F. Hernandez-Mateo, F. Lopez-Jaramillo, J. Ortega-Muñoz and J. Morales-Sanfrutos, WO Patent 2009040460, 2009.
- 22 D. Rezwani, L. P. Meier and L. J. Gauckler, *Biomaterials*, 2005, **26**, 4351–4357.
- 23 W. J. Colonna, F. R. Cano and J. O. Lampen, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **386**, 293–300.
- 24 Q. Z. K. Zhou and X. D. Chen, *Biochem. Eng. J.*, 2001, **9**, 33–40.
- 25 A. Pereira-Rodriguez, R. Fernandez-Leiro, M. I. Gonzalez-Siso, M. E. Cerdan, M. Becerra and J. Sanz-Aparicio, *Acta Cryst.*, 2010, **F66**, 297–300.
- 26 G. Alderton, W. Ward and H. Febold, *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, 43–58.
- 27 J. Lyklema, *Fundamentals of Interface and Colloid Science Vol. II*, Academic Press, London, 1995.
- 28 T. J. Su and J. R. Lu, *Langmuir*, 1998, **14**, 438–445.
- 29 J. Porath, F. Maisano and M. Belew, *FEBS Lett.*, 1985, **185**, 306–310.
- 30 J. Porath and M. Belew, *1987, Tibitech*, 1987, **5**, 225–229.
- 31 T. W. Hutchens and J. Porath, *Biochemistry*, 1987, **26**, 7199–7204.
- 32 B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 487–531.
- 33 T. Hisabori, K. Motohashi, N. Hosoya-Matsuda, H. Ueoka-Nakanishi and P. G. N. Romano, *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**, 145–151.
- 34 J. A. Traverso, F. J. Lopez-Jaramillo, A. J. Serratp, M. Ortega-Muñoz, D. Aguado-Llera, M. Saharawy, M. F. Santoyo-Gonzalez, J. L. Neira and A. Chueca, *J. Plant Physiol.*, 2010, **167**, 423–429.
- 35 K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **60**, 523–533.
- 36 D. B. Smith and K. S. Johnson, *Gene*, 1988, **67**, 31–40.
- 37 J. A. Traverso, F. Vignols, R. Cazalis, A. Pulido, M. Saharawy, F. J. Cejudo, Y. Meyer and A. Chueca, *Plant Physiol.*, 2006, **143**, 300–331.
- 38 D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 3551–3567.
- 39 C. Lambert, N. Leonard, X. De Bolle and E. Depiereux, *ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. Bioinformatics*, 2002, **18**, 1250–1256.
- 40 C. Colovos and T. O. Yeates, *Protein Sci.*, 1993, **2**, 1511–1519.
- 41 R. Luthy, J. U. Bowie and D. Eisenberg, *Nature*, 1992, **356**, 83–85.

Alkyl sulfonyl derivatized PAMAM-G2 dendrimers as nonviral gene delivery vectors with improved transfection efficiencies†

Julia Morales-Sanfrutos,^{‡a} Alicia Megia-Fernandez,^{‡a} Fernando Hernandez-Mateo,^a M^a Dolores Giron-Gonzalez,^b Rafael Salto-Gonzalez^b and Francisco Santoyo-Gonzalez^{*a}

Received 30th June 2010, Accepted 14th October 2010

DOI: 10.1039/c0ob00355g

Amphiphilic dendrimer-based gene delivery vectors bearing peripheral alkyl sulfonyl hydrophobic tails were constructed using low-generation PAMAM-G2 as the core and functionalized by means of the aza-Michael type addition of its primary amino groups to vinylsulfone derivatives as an efficient tool for surface engineering. While the unmodified PAMAM-G2 was unable to efficiently transfect eukaryotic cells, functionalized PAMAM-G2 dendrimers were able to bind DNA at low N/P ratios, protect DNA from digestion with DNase I and showed high transfection efficiencies and low cytotoxicity. Dendrimers with a C18 alkyl chain produced transfection efficiencies up to 3.1 fold higher than LipofectAMINE™ 2000 in CHO-k1 cells. The dendriplexes based in functionalized PAMAM-G2 also showed the ability to retain their transfection properties in the presence of serum and the ability to transfect different eukaryotic cell lines such as Neuro-2A and RAW 264.7. Taking advantage of the vinylsulfone chemistry, fluorescent PAMAM-G2 derivatives of these vectors were prepared as molecular probes to determine cellular uptake and internalization through a clathrin-independent mechanism.

Introduction

The potential of gene therapy for treating genetic disorders has led to prolific research activity on the design of safe and efficient gene carrier vectors that compact and protect oligonucleotides and DNA against degradation by serum nucleases. Nonviral vector systems¹ are an attractive alternative to viral carriers,² retroviruses and adenoviruses, to overcome the fundamental problems associated with these systems despite the high delivering efficiency that they exhibit: toxicity, immunogenicity and limitations related with scale-up production.³ Although synthetic vectors have inherently reduced transfection efficiencies due to the extra- and intracellular barriers that they find for their cellular uptake,^{1f} these nonviral vectors can easily be structurally modified to allow systematic study of the factors implicated in transfection efficiency.

The design of cationic compounds including lipids, polymers, dendrimers and peptides that interact in a non-covalent and strong manner with the negatively charged phosphate backbone of DNA has been demonstrated to be a useful strategy for developing efficient synthetic transfecting agents. In this context, hyperbranched dendrimers⁴ have proved to have greater potential as gene delivery vectors compared to traditional polymeric systems as a result of their unique characteristics: multivalent-functionalized terminal surface and well-defined three-dimensional architectures, molecu-

lar weights and sizes.⁵ In particular, poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers that have easily cationized primary amino termini and tertiary internal amino groups have become a standard tool in the laboratory due to their easy synthesis and commercial availability.⁶ The PAMAM–DNA complexes, termed dendriplexes and formed by the interaction with the primary amine groups,⁷ are positively charged supramolecular systems that have the ability to interact with the negatively charged membrane of cells allowing their entrance through endosomal uptake without inducing significant cytotoxicity and immunogenicity.⁸ Once internalized the buffering capacity of the unprotonated amino groups permits them to act as a proton sponge in the acidic environment of endosomes, enhancing in this way the release of DNA into the cytoplasm through the inhibition of pH-dependent endosomal nucleases.⁹

The influence of the dendrimer generation on the efficiency of transfection (also denoted as the dendritic effect) was identified early and medium sized dendrimers (G5–G10) are generally the most efficient ones.¹⁰ Three different strategies have been developed to improve the performance of PAMAMs as nucleic acid carriers: (a) enhancing the flexibility of their branches, (b) rendering the dendrimers amphiphilic and (c) making them biocompatible.

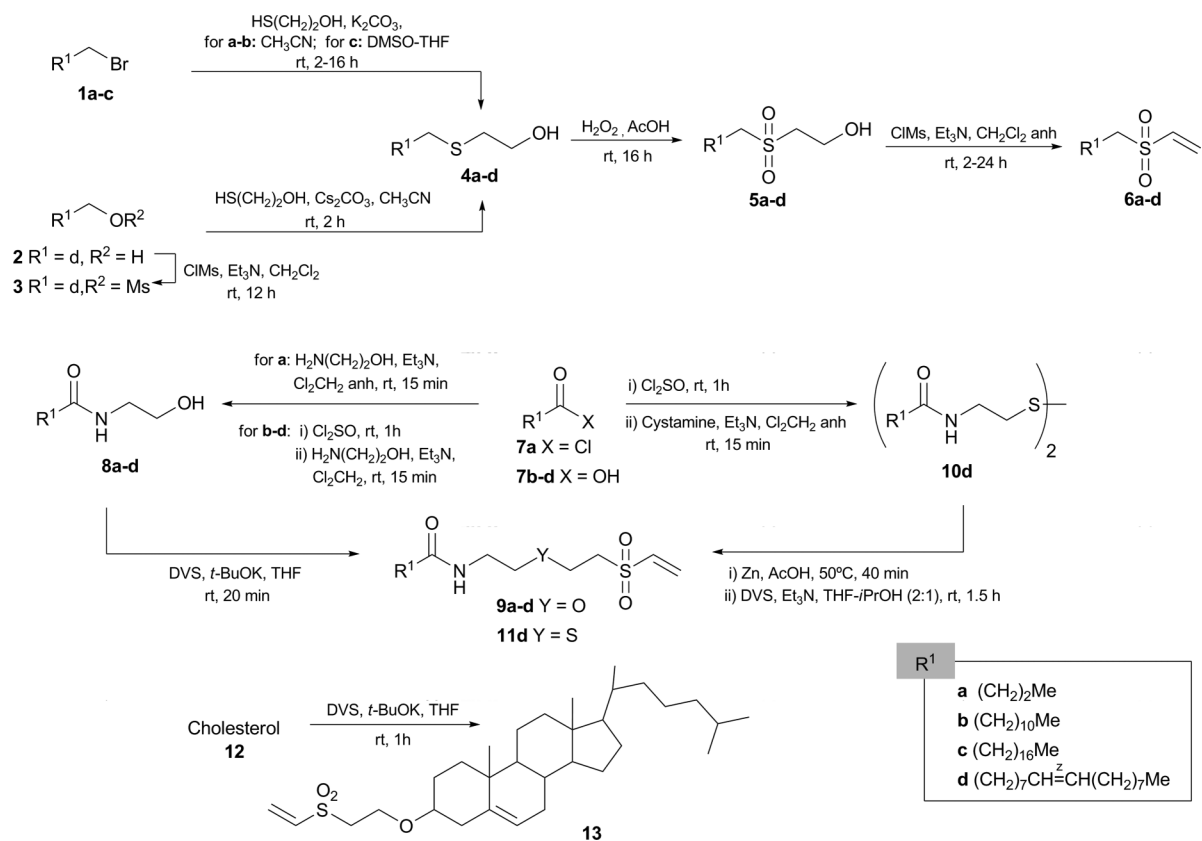
The thermal degradation of high generation PAMAM dendrimers produces fractured PAMAM-based vectors with a greater flexibility that are commercialized under the name Superfect™. In addition, surface engineering by chemical modification involving functionalization at the dendrimer's periphery has been extensively investigated in an effort to improve not only the complex formation, interaction with the plasma membrane and endosomal release but also to reduce the cytotoxicity and to incorporate cell-targeting capabilities into the PAMAM-based dendriplexes to promote cell-specific uptake.^{6f,8b,11} Conjugation of the primary amino groups with poly(ethylenglycol), amino-acids, peptides, proteins, sugars, cyclodextrins, lipids and glucocorticoids

^aDepartamento de Q. Orgánica, Facultad de Ciencia, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, 18071, 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

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H- and ¹³C-NMR spectra for compounds 4a–d, 5a–d, 6a–d, 8a–b, 8d, 9a–d, 10d, 11d and 13, gel electrophoresis shift assays, DNase I protection experiments and hydrodynamic diameter and ζ potential values for PAMAM-G2 derivatives and their complexes with DNA. See DOI: 10.1039/c0ob00355g

‡ These authors contributed equally to this work.



Scheme 1 Synthesis of vinylsulfone reagents for the functionalization of PAMAM-G2.

has been described in the literature with differing results on their transfection properties.

Several studies have demonstrated the benefits of incorporating lipophilic motifs to render the dendrimer amphiphilic in synthetic gene delivery systems.^{1f} With this concern, lipid derivatized PAMAMs dendritic vectors have been engineered with topologies in which the dendritic hydrophilic moiety was present on one side of the vector while the hydrophobic moiety, mainly alkyl chains of different length, was installed on the opposite side.¹² Alternatively, PAMAM dendrimers having a hydrophilic interior and a hydrophobic corona prepared by randomly grafting alkyl tails at the dendrimer periphery have also been reported.¹³ In both cases, the influence of parameters such as dendritic generation, length of the alkyl chain and extent of functionalization on the transfection efficiency and cytotoxicity has been evaluated. Michael addition of acrylate derivatives as well as acylation of activated esters fatty derivatives have been the chemical tools used for the construction of such hybrid dendritic–lipidic transfection agents.^{11–13}

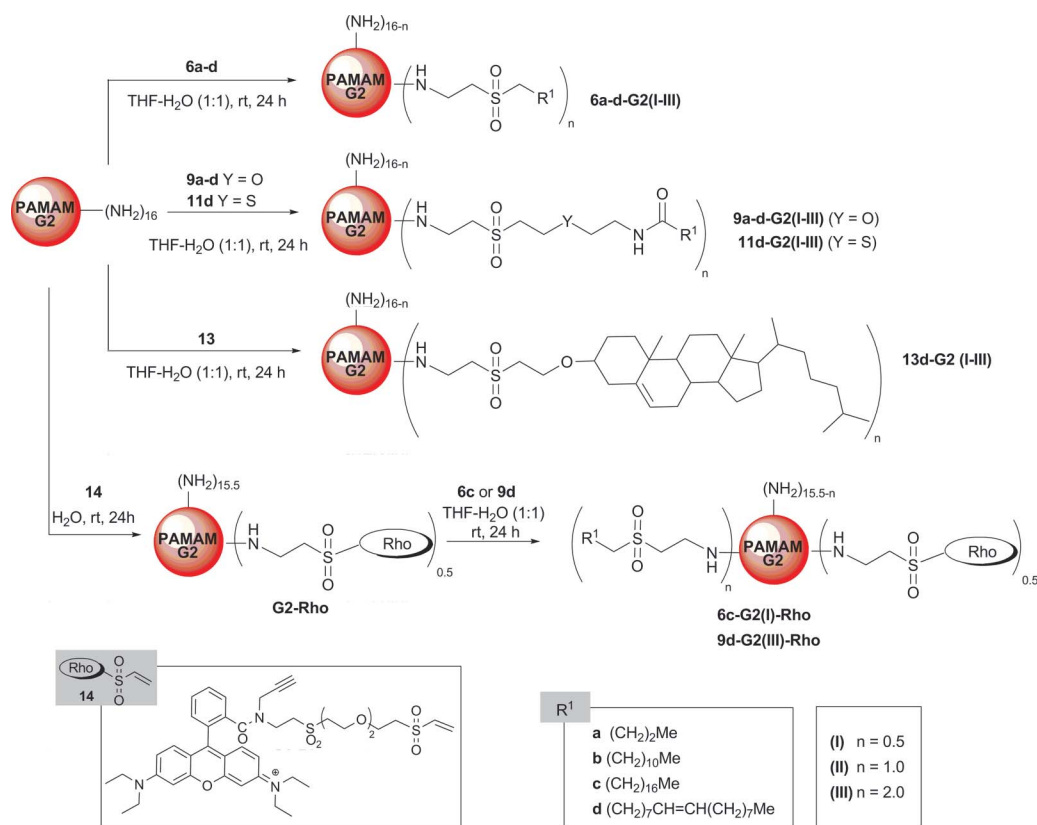
Herein we report on the synthesis and transfection efficiency properties of novel amphiphilic dendrimer-based gene delivery vectors bearing peripheral hydrophobic tails that are constructed using low-generation PAMAM-G2 as the core and functionalized by means of the aza-Michael type addition of its primary amino groups to vinylsulfone derivatives containing hydrophobic alkyl chains as an efficient conjugation strategy. Despite the poor transfection properties usually exhibited by native PAMAM-G2 dendriplexes, this cationic polymer was chosen over other higher PAMAM generations for the preparation of lipid conjugates on

the basis of (a) its non-toxicity, attributed to the limited surface charges of this compound,¹⁴ and (b) its easy synthesis with respect to high generation PAMAMs that usually requires tedious and low yielding procedures. The incorporation of hydrophobic alkyl chains of different length was anticipated to be a structural factor that would positively contribute to improving synergistically the cellular uptake and internalization of the corresponding dendriplexes.

Results and discussion

Chemical synthesis of functionalized PAMAM-G2 dendrimers

With a view to obtain PAMAM-G2 amphiphilic derivatives to be used as nonviral vectors with improved transfection efficiencies and diminished cytotoxicity, we selected a set of compounds containing hydrophobic chains for conjugation with the amino terminal groups of that dendrimer (Scheme 1). To evaluate the influence of the hydrophobic chain length on the process of transfection, commercially available reagents containing linear alkyl chains with four, twelve and eighteen carbon atoms were selected, namely, the bromide derivatives **1a–c**, oleic alcohol ((*Z*)-9-octadecen-1-ol) **2**, butyric chloride **7a**, and lauric acid (docedanoic acid) **7b**, stearic acid (octadecanoic acid) **7c** and oleic acid (*cis*-9-octadecenoic acid) **7d**. The aza-Michael type addition of vinylsulfone derivatives of such hydrophobic compounds was thought to be an optimal ligation tool for their coupling with the peripheral amine groups as this reaction usually proceeds with



Scheme 2 Synthesis of amphiphilic PAMAM-G2 dendrimers as nonviral vectors.

high efficiency by simple mixing of the reagents in an adequate solvent without the formation of any undesired by-product.¹⁵

The different functionality of compounds **1a–c**, **2** and **7a–b** (bromide, alcohol and carboxylic acid, respectively) allows the design of simple chemical strategies for the preparation of their corresponding vinylsulfone derivatives, and also the introduction of a structural variability in the linker that will join the hydrophobic alkyl chain and the dendrimer core whose influence on the transfection properties will be also evaluated. Thus, nucleophilic displacement on the bromide derivatives **1a–c** and the mesylate derivative **3** of oleic alcohol **2** by the sulfur atom of 2-thioethanol gave access to the hydroxyethyl thioethers **4a–d** in high yields. Oxidation with peroxyacetic acid and subsequent dehydration of the corresponding sulfone derivatives **5a–d** via their mesylate derivatives led easily to the vinylsulfones **6a–d** in which the original functionality has been replaced by the vinyl sulfonfyl group (Scheme 1). Alternatively, a strategy was envisaged starting from the fatty acids **7a–d** which enables the introduction of a longer vinylsulfone linker for the hydrophobic chains. Thus, reaction with 2-amino ethanol of the fatty acid chloride derivatives, using the commercial reagent **7a** or obtained *in situ* by treatment with thionyl chloride in the case of the acids **7b–d**, gave the corresponding 2-hydroxyethyl amides **8a–d**. Reaction of these compounds with divinylsulfone (DVS) gave the ether vinylsulfones **9a–d** in moderate yields (Scheme 1). Additionally, in the case of oleic acid the homologous thioether vinylsulfone **11d** was also prepared in order to evaluate a possible influence of the nature of the heteroatom of the linker on the transfection properties. This compound was accessible by reaction of oleic acid chloride with cystamine, which

gave the disulfide **10d** in high yield. Reduction of this compound with powdered Zn followed by Michael addition to DVS afforded the thioether derivative **11d** in a one-step procedure (Scheme 1).

Considering that cholesterol has often been exploited¹⁴ as a hydrophobic motif in synthetic transfection agents including PAMAM-based vectors¹⁶ to give them a lipidic character, the preparation of a vinylsulfone derivative of this steroid was also envisaged in order to further synthesize the corresponding cholesterol–PAMAM-G2 conjugate and evaluate if this structural modification allows an optimization on gene delivery. Simple treatment of commercial cholesterol **12** with DVS affords the corresponding vinylsulfone derivative **13** in moderate yield (Scheme 1).

With the vinylsulfone derivatives (**6a–d**, **9a–d**, **11d** and **13**) in hand, the synthesis of the novel gene delivery vectors was performed by the simple addition of a THF solution of these reagents to an aqueous solution of PAMAM-G2. To evaluate the effect of the extent of functionalization, three different vinylsulfone : PAMAM-G2 molar ratios (I = 0.5, II = 1.0 and III = 2) were used in each case, giving rise to the corresponding conjugates [**6a–d-G2(I–III)**, **9a–d-G2(I–III)**, **11d-G2(I–III)** and **13-G2(I–III)**] after elimination of the reaction solvent (Scheme 2).

In addition, to perform studies aimed at the observation of the intracellular events in the transfection of the PAMAM-G2 based dendrimers and at the elucidation of their cellular uptake and internalization mechanisms, the synthesis of fluorescent PAMAM-G2 probes was also designed to be used in confocal microscopy studies. The vinylsulfone rhodamine derivative **14** (Scheme 2), previously reported by us,¹⁷ allows the easy incorporation of this

fluorescent probe in native PAMAM-G2 to give the **PAMAM-G2-Rho** dendrimer that will be later functionalized with hydrophobic motifs on the basis of the results obtained in transfection efficiency studies (see next Sections).

¹H NMR spectroscopic data of the new amphiphilic PAMAM-G2 derivatives confirm successful grafting of the hydrophobic or the rhodamine vinyl sulfone reagents at the periphery of the PAMAM-G2 as evidenced by the absence of the characteristic vinyl sulfone proton peaks and the presence of new signals ascribed to the alkyl chains and the fluorescent residue (see ESI Fig S1†).

Gene delivery capabilities of amphiphilic PAMAM-G2 derivatives

The capabilities of the novel amphiphilic PAMAMs to neutralize, bind and compact plasmid DNA (pDNA) were first studied due to their importance for efficient gene delivery. Plasmid pEGFP-N3 [coding for the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)] was selected for the preparation of the DNA complexes and transfection assays. The PAMAMs conjugates were mixed with pDNA at several N/P ratios (0.5 to 50) for the formation of the corresponding dendriplexes. Gel electrophoresis shift assays were performed as they reflect the capability of the PAMAM-G2 derivatives to compact pDNA.¹⁸ Formation of the corresponding complexes results in pDNA lacking migration in the gel due to polycation binding and charge-neutralization. The agarose gel shift assays performed revealed that binding of the majority of the PAMAM-G2 derivatives to pDNA occurs at N/P ratios of 0.5–1 for the functionalized compounds at the three molar ratios (I = 0.5, II = 1.0 and III = 2). (Fig. 1 and ESI Fig. S2†).

The capability of protecting pDNA from endonucleases degradation was next evaluated as this is a key point to achieve a successful transfection since unprotected pDNA are rapidly degraded by the nucleases presented in the culture media serum.¹⁶ The results obtained with the PAMAM-G2 amphiphilic derivatives (Fig. 2 and ESI Fig. S3†) showed that these derivatives have the capability to efficiently protect pDNA from endonuclease degradation while unmodified PAMAM-G2 failed to protect pDNA from digestion.

In the next phase, cellular uptake of the novel dendriplexes was studied in CHO-k1 cells, a common standard cell line used for a variety of transfection agents. Plasmid pEGFP-N3 that encodes for the green fluorescent protein allows us to evaluate the uptake by measuring the fluorescence of the cells transfected with the complexes that have been grown 48 h after transfection to allow the expression of eGFP. Cellular uptake has been studied in the absence of serum at N/P ratios of 2.5–50 (Fig. 3A). 100% value has been assigned to the transfection level obtained when LipofectAMINE™ 2000 (LP2000), a commercial reagent that has been described as a high efficiency vector for the transfection of many cell types, is used. The results obtained in these assays clearly indicated that unmodified PAMAM-G2 have a very poor transfection capability (less than 5% of the LP2000 value) which is in accordance with previous reported observations¹⁰ and with our own results: (a) no retardation of pDNA in gel electrophoresis (Fig. 1A) and (b) absence of protection towards DNase I degradation (Fig. 2A). These facts corroborate the benefits obtained by the incorporation of a hydrophobic moiety to promote binding of the dendrimer to the hydrophobic DNA bases. In addition, it is observed that the incorporation of the moderately hydrophobic moiety of rhodamine is enough to promote DNA binding to the PAMAM-G2 (Fig. 1C) although it fails to protect DNA from DNase I degradation (Fig. 2C).

From the assembly of the results obtained some conclusions can be extracted concerning the influence of the chemical structure of the engineered PAMAM-G2 vectors on their transfection efficiency. PAMAM-G2 derivatives functionalized with a butyl chain, **6a-G2** and **9a-G2**, are not able to transfect CHO-k1 cells (data not shown) despite the enhanced pDNA complexing abilities and protection from DNase I digestion that they exhibited. Among the assayed compounds, the minimum length of the hydrophobic chain that enables the PAMAM-G2 derivatives to efficiently transfect CHO-k1 cells is 12 carbons (compounds **6b-G2** and **9b-G2**). PAMAM-G2 derivative **6b-G2(I)** exhibited a remarkably high transfection level ($p < 0.001$ compared to the LP2000 value) at N/P ratios between 5 and 20 while the efficiency of **9b-G2(I)** to deliver pDNA is lower but similar to LP2000 at a N/P

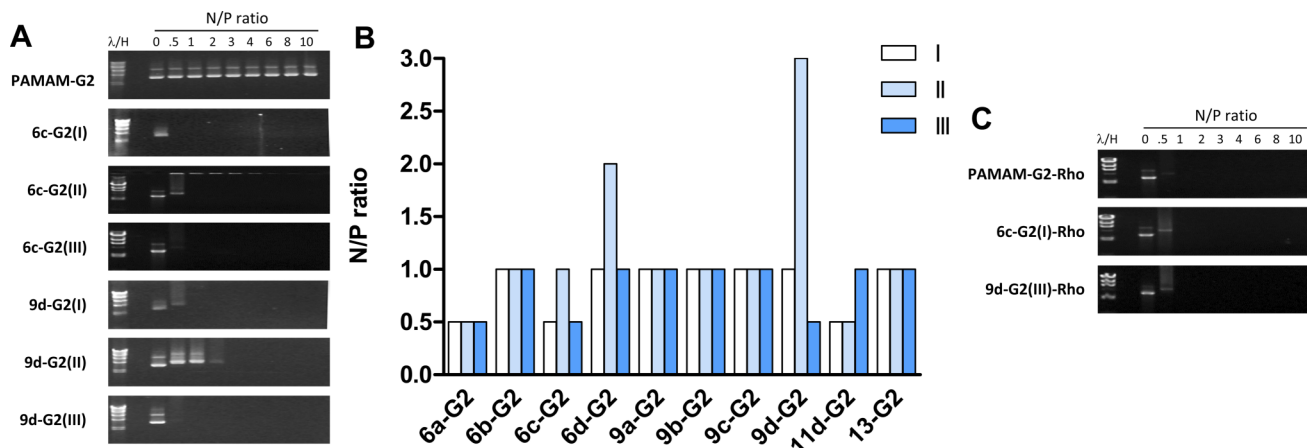


Fig. 1 Gel Electrophoresis Shift Assay. A.- Gel shift assays showing PAMAM-G2 or selected PAMAM-G2 derivatives–pDNA binding at N/P ratios between 0 (pEGFP-N3 alone) and 10. λ /H lane corresponds to λ /HindIII molecular weight marker. The absence of plasmid band in the wells correlates with the inhibition of the plasmid DNA electrophoretic mobility. I, II and III correspond to the three different vinylsulfone : PAMAM-G2 molar ratios (I = 0.5, II = 1.0 and III = 2) used B.- Minimum N/P ratio needed to completely inhibit electrophoretic mobility in the shift assay. C.- Rhodamine labeled PAMAM-G2 or PAMAM-G2 derivatives gel shift assays.

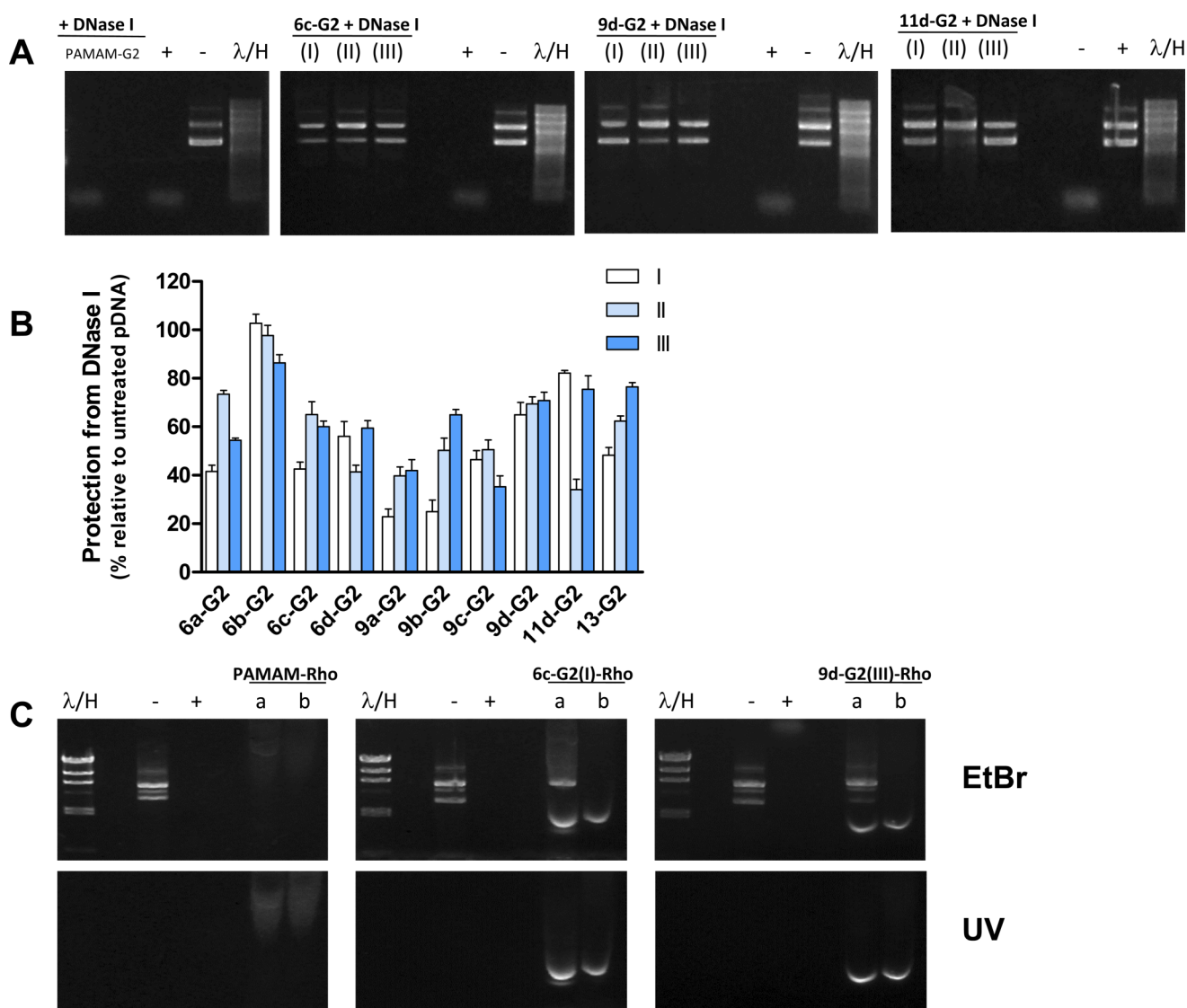


Fig. 2 *DNase I* protection experiments. **A.** - Representative agarose electrophoresis of samples corresponding to pEGFP-N3 incubated in the absence (–) or presence (+) of DNase I as controls. pEGFP-N3 samples that have been complexed with the PAMAM-G2 derivatives before the DNase I treatment (as described in the experimental section) have been run in parallel. **B.** - Quantitation of the relative intensity (untreated pEGFP-N3 value equal to 100) of the sum of relaxed and supercoiled electrophoretic plasmid bands corresponding to the pEGFP-N3 samples complexed with PAMAM-G2 derivatives and treated with DNase I. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 4$). I, II and III correspond to the three different vinylsulfone: PAMAM-G2 molar ratios (I = 0.5, II = 1.0 and III = 2) used. **C.** - Samples of PAMAM-G2 derivatives labeled with Rhodamine have been processed as above and the DNase I protection has been assayed by gel electrophoresis. (a) dendrimer–pDNA complexes, (b) labeled dendrimer alone. Since the dendrimers are labeled with fluorescence, the gels have been photographed before (UV) and after ethidium bromide staining (EtBr). Notice that due to the interaction of the free labeled dendrimer with the SDS used in the sample preparation, the free labeled dendrimers have a net negative charge in the electrophoresis.

ratio of 20 (Fig. 3). Both compounds showed enhanced pDNA complexing abilities (ESI Fig. S2†) although, as expected from its transfection efficiency, **9b-G2(I)** partially failed to protect pDNA from DNase I degradation (ESI Fig. S3†). Amphiphilic dendrimer **6c-G2(I)** bearing a C18 hydrophobic chain produced the highest levels of transfection in CHO-k1 (approximately between 3.1 fold ($p < 0.001$) more efficiently than LP2000), a capacity that is complemented with the formation of stable complexes warranting full pDNA protection from the environment (Fig. 2). However, compound **9c-G2** which has an aliphatic chain of the same length presented very poor transfection levels that correlate well with the observed susceptibility to endonucleases of the relaxed pDNA

band in the DNase I protection assay (ESI Fig. S3†). Oleic-containing PAMAM-G2 derivatives **6d-G2(I)**, **9d-G2(III)** and **11d-G2(III)**, which have a double bond in the C18 aliphatic chain, exhibit higher levels of transfection than LP2000 (1.6 to 2.7 fold higher than LP2000, $p < 0.01$) (Fig. 3). These dendrimers also presented high complexing abilities (Fig. 1 and ESI Fig. S2†) and fully protected pDNA from DNases (Fig. 2, and ESI Fig. S3†). Overall, it can be stated that although the inclusion of a hydrophobic moiety is enough to obtain a tight binding of the PAMAM-G2 dendrimers to the pDNA, an alkyl chain length of 18 carbons suits better for optimal DNase I protection and transfection efficiency.

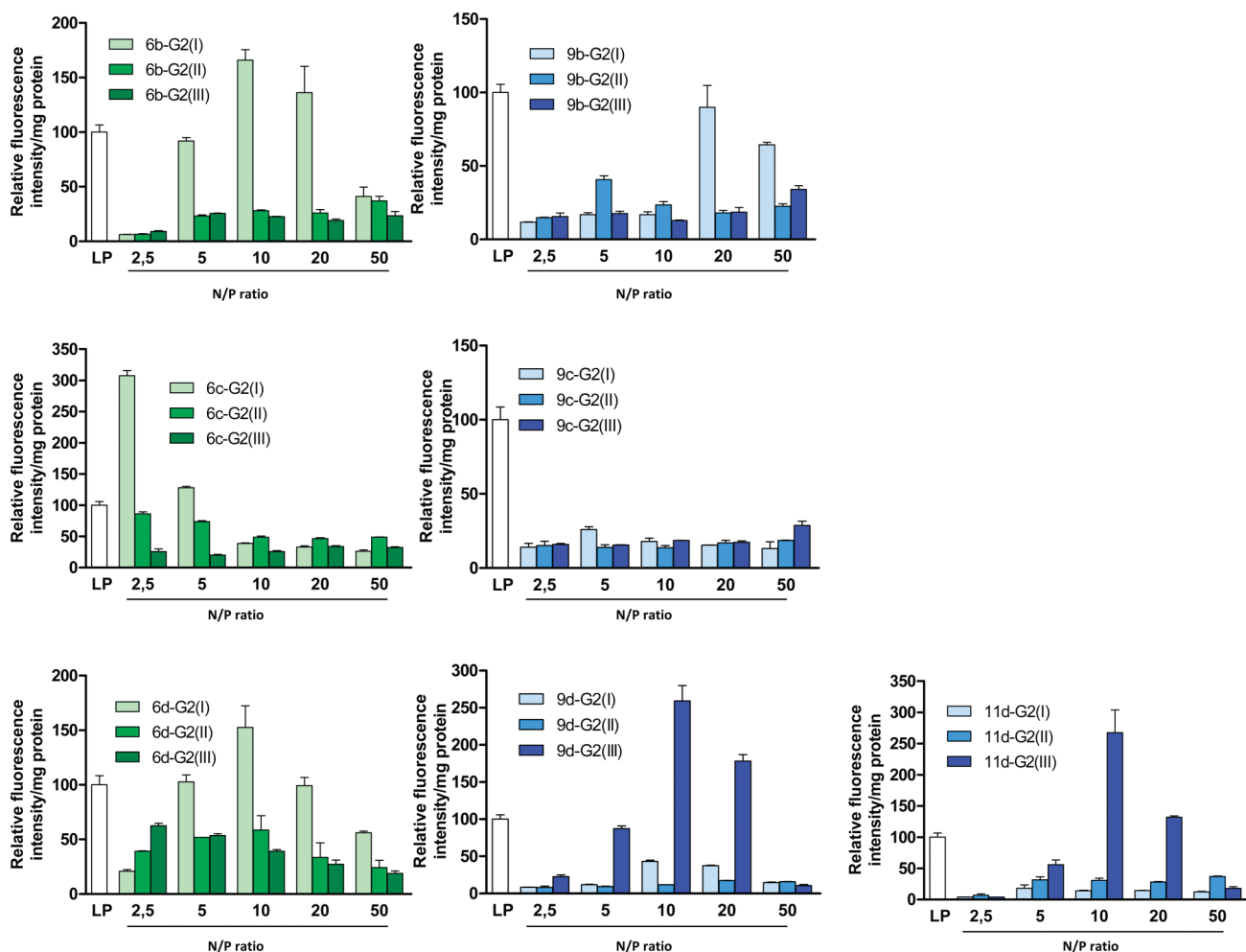


Fig. 3 *In vitro* gene transfection efficiency of the PAMAM-G2 based dendrimer complexes in CHO-k1 cells. CHO-k1 cells were transfected with dendriplexes using pEGFP-N3 plasmid as described in the Experimental section. For each condition, DNA was mixed with the PAMAM-G2 derivatives at N/P ratios of 2.5 to 50. As a positive control (LP), a transfection was performed using LP2000. Fluorescence was assayed 48 h after transfection. The ratio fluorescence/proteins for each compound is shown. The eGFP fluorescence value for the LP2000 transfection was normalized to 100% in each experiment. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 8$).

Concerning the extension of the functionality by hydrophobic chains, a comparison of dendrimers from series 6 and 9 indicates that the optimal transfection is related to the number of alkyl chains grafted per dendrimer. Compounds from 6 series are very good transfection reagents with only 0.5 hydrophobic chain grafted per PAMAM-G2 (I = 0.5) while the functionalized dendrimers of series 9 needed two alkyl chains grafted (III = 2) to be efficient at transfecting pDNA. The reasons for this different behavior are not clear.

On the other hand, the nature of the heteroatom of the ether linkage, oxygen for compound 9d and sulfur for compound 11d, seems to have no influence on the transfecting abilities of these compounds since both exhibited similar efficiencies (Fig. 3).

Chemical functionalization of PAMAM-G2 with cholesterol, compounds 13-G2(I-III), does not improve the abilities of the corresponding dendriplexes as for these compounds high protection of pDNA (Fig. 2B and ESI Figs. S2 and S3[†]) but very low transfection efficiency (data not shown) are observed. This behavior could be tentatively ascribed to a strong binding of the

pDNA to those PAMAM-G2 derivatives that makes difficult the release of the pDNA free into the nucleus.

Taken together, the results obtained allows us to conclude that from the set of the amphiphilic PAMAM-G2 derivatives prepared the best transfecting agents are the dendrimers 6c-G2(I) and 9d-G2(III).

In the next stage of our study, dynamic light scattering and ζ -potential measurements were carried out for the more efficient dendrimers at the best N/P ratios, to determine the size and electrokinetic properties of the formed complexes (ESI Table S1[†]). As expected, ζ -potential values decreased when the functionalized dendrimers were complexed with pDNA. However, no relationship between particle size and transfection efficiency can be deduced since the best transfecting agents 6c-G2(I) and 9d-G2(III) have hydrodynamic diameters of 524 ± 18 and 226 ± 3 nm, respectively.

Once the influence of the structure on the transfection efficiencies had been studied for the amphiphilic PAMAM-G2-based vectors, the cytotoxicity of their pDNA complexes was evaluated by determining the percentage of cell viability with respect to unexposed cells using a MTT assay (Fig. 4). Cell viability was

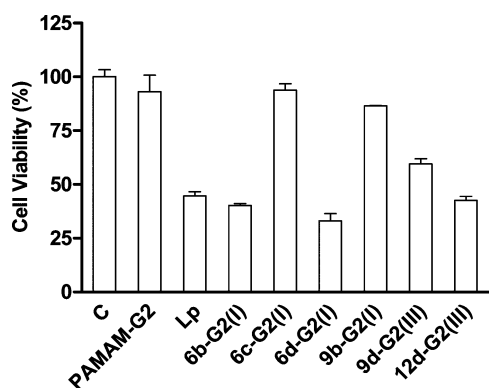


Fig. 4 Cytotoxicity of the complexes. Cytotoxicity of the complexes formed by the functionalized dendrimers and pDNA was evaluated in CHO-k1 cells 24 h after transfection by determining the percentage of cell viability using a MTT assay. The dendrimer derivatives to be assayed were those that showed a higher transfection efficiency. The complexes were assayed for cytotoxicity using the most efficient N/P ratio for transfection (6b-G2(I): 10; 6c-G2(I): 2.5; 6d-G2(I): 10; 9b-G2(I): 20; 9d-G2(III): 10; 11d-G2(III): 10). Results are reported as % viability based on the untreated control cells normalized to 100% viable.

studied in CHO-k1 cells as a function of the functionalized PAMAM-G2 derivative and the N/P ratio at which the compound showed its higher transfection levels. Unmodified PAMAM-G2 complexed with pDNA showed itself to be not toxic as expected while lipoplexes with LP2000 are not exempt of toxicity as they reduced by 50% the cell viability ($p < 0.001$). For the PAMAM-G2 derivatives the most efficient transfecting compounds, 6c-G2(I) and 9d-G2(III), displayed a high level of cell viability

The effect of serum in the media on the transfection efficiency of the pDNA was evaluated on the PAMAM-G2 derivative 6c-G2(I), which was chosen considering that it is one of the best at protecting pDNA against DNases and for its high transfection efficiency at very low N/P ratios (Fig. 5A). In the presence of serum, the transfection levels of this vector were similar to those obtained with LP2000 at 5–10 N/P ratios. The increase in N/P ratio needed for transfection due to the presence of serum has been reported previously for cationic liposomes.¹⁹

To assess the pDNA transfection capabilities in other cell lines, the PAMAM-G2 derivative 6c-G2(I) has also been used in assays using neuroblast cells (Neuro-2a) and a cell line derived from macrophages (RAW 264.7) which usually exhibits low transfection levels.²⁰ A 100% value was assigned to the transfection levels observed when LP2000 in CHO-k1 cells was used. Compound 6c-G2(I) has the capability to transfect these three cell lines in a similar or better way than LP2000 (Fig. 5B).

Cellular uptake and internalization mechanism studies for amphiphilic PAMAM-G2-based vectors

Nonviral gene complexes can enter into mammalian cells through different endocytic pathways.²¹ Therefore, for a novel vector it is important to characterize its cellular uptake because this determines how the gene carrier is processed intracellularly and therefore influences its transfection efficiency. Most of the reports suggest that endocytosis is the preferred route of cellular uptake mechanism for nonviral gene carriers. Two main endocytic pathways, clathrin-dependent and clathrin-independent, are implicated

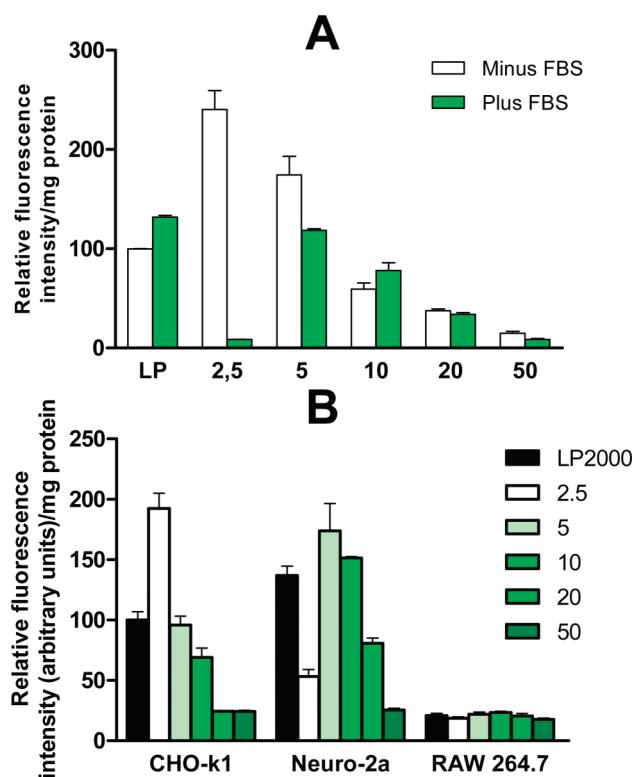


Fig. 5 Factors that modulate the transfection efficiency of PAMAM-G2 derivatives complexes. **A.-** Effects of serum in the transfection media. LP2000 (as a positive control) or 6c-G2(I) dendrimer (N/P ratios 2.5–50) have been complexed with pEGFP-N3 plasmid and then used for transfection of CHO-k1 cells in the absence or presence of 10% fetal bovine serum in the transfection media. Fluorescence was assayed 48 h after transfection. The ratio fluorescence/proteins for each condition is shown. The eGFP fluorescence value for the LP2000 transfection carried out in the absence of fetal bovine serum was normalized to 100%. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 7$). **B.-** Cell type. CHO-k1, Neuro-2a or RAW 264.7 cells were transfected using 6c-G2(I) dendrimer complexed with pEGFP-N3 plasmid as described in the Experimental section. For each condition, DNA was mixed with the PAMAM-G2 derivative at N/P ratios from 2.5 to 50. For each cell line a transfection was performed using LP2000 as a positive control. Fluorescence was assayed 48 h after transfection. The ratio fluorescence/protein for each condition is shown. The eGFP fluorescence value for the LP2000 transfection in CHO-k1 cells was normalized to 100%. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 8$).

in the uptake of DNA complexes, dependent on cell type, the nature of the carrier and particle size. The clathrin-dependent pathway is preferred for microspheres up to 200 nm in size.²² The clathrin independent route includes uptake from lipid rafts in caveolae or *via* flotillin-dependent pathway.²³ To determine the pathway of the cellular uptake of the functionalized PAMAM-G2 dendrimers two chemical inhibitors of endocytosis were used: chlorpromazine and genistein as inhibitors of clathrin-dependent and -independent endocytosis, respectively.²¹ Fig. 6 shows that chlorpromazine significantly increased ($p < 0.001$) the efficiency of transfection using LP2000, 6c-G2(I) or 9d-G2(III) while it did not modify the capability of transfection of compounds 6b-G2(I), 6d-G2(I), 9d-G2(III) y 11d-G2(III). Conversely, preincubation with genistein decreased the transfection levels of the majority of compounds, including LP2000. Therefore, from these observations

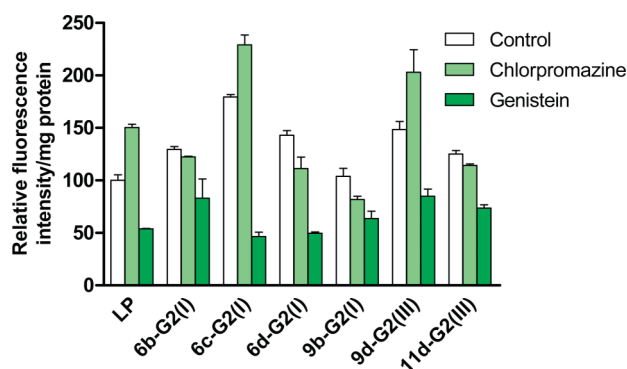


Fig. 6 Effects of inhibitors on cellular transfection of PAMAM-G2 derivatives complexes. CHO-k1 cells were pretreated with chlorpromazine (14 μ M) or genistein (200 μ M) for 30 min before transfection with dendrimer complexes at their most efficient N/P ratio (**6b-G2(I)**: 10; **6c-G2(I)**: 2.5; **6d-G2(I)**: 10; **9b-G2(I)**: 20; **9d-G2(III)**: 10; **11d-G2(III)**: 10). As a control (LP), a transfection was performed using LP2000. Fluorescence was assayed 48 h after transfection. The ratio fluorescence/proteins for each compound is shown. The eGFP fluorescence value for the LP2000 transfection was normalized to 100% in each experiment. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 6$).

it can be concluded that amphiphilic PAMAM-G2 derivatives use mainly a clathrin independent pathway.

Finally, the internalization process of the dendriplexes was studied by confocal microscopy using Cy5-labeled pDNA and rhodamine-labeled dendrimer **6c-G2(III)-Rho** and **9d-G2(III)-Rho**. These compounds were prepared following the vinylsulfone-based chemical strategy indicated in Scheme 2 that implies the functionalization of PAMAM-G2-Rho with the stearic and oleic vinylsulfone derivatives **6c** and **9d**, respectively. For compound **9d-G2(III)-Rho** confocal images are shown. The transfected cells have been identified by the expression of eGFP, since the experiments have been performed using pEGFP-N3 plasmid. Images were collected 24 h post-transfection to allow eGFP expression. Fig. 7A corresponding to visible differential interface contrast (Nomark) images and fluorescence images shows the distribution of fluorescence in the transfected and non-transfected cells. In all cells, red fluorescence corresponding to the labeled dendrimer can be located in the cytosol of the cells, close to the nucleus. Almost all blue fluorescence corresponding to the labeled-pDNA is associated with the red labeled-dendrimers (purple particles in the overlaid images). Only in the transfected cells, free blue fluorescence corresponding to the pDNA released from the dendrimers can be located inside the nucleus (Fig. 7B). No free blue fluorescence is located in the nucleus of the non-transfected cells. Similar results have been obtained for the rhodamine-labeled **6c-G2(III)-Rho** (data not shown). These results confirm that the rate limiting step in hydrophobic PAMAM-G2-based vectors transfection is the release of the pDNA from the endosomes to the nucleus, since all the cells are able to uptake the dendrimer complex, but only in a subset is the pDNA released from the internal reservoirs to the nucleus. Fig. 7C shows CHO-k1 cells that have been pre-incubated with chlorpromazine prior to transfection with rhodamine-labeled **9d-G2(III)-Rho** complexed with Cy5-labeled pEGFP-N3 plasmid. In these cells the uptake of dendrimers to the perinuclear space is greatly reduced and shows an apical distribution. However, the transfection efficiency (the blue-fluorescence associated with the

free pDNA released to the nucleus) is increased. These results, together with the transfection efficiency values measured in the presence of endocytosis inhibitors, confirm that the clathrin-independent pathway is the productive endocytic pathway used by these functionalized PAMAM-G2 derivatives.

Conclusions

In summary, PAMAM-G2-based amphiphilic dendrimers are prepared in a straightforward and efficient manner by using the aza-Michael type addition of vinylsulfone derivatives as an optimal tool for the grafting of hydrophobic alkyl chains to the peripheral amino groups of those dendrimers. This chemical strategy is general and allows the facile functionalization of any amino-containing polymer for the preparation of synthetic gene carriers. The transfection properties are dependent on the chemical structure of the hydrophobic chain and on the extension of the functionalization of the dendrimers surface. Some of these engineered PAMAM-G2 dendrimers are useful vectors with improved transfection properties when compared to unmodified PAMAM-G2 and commercial transfection reagents such as LipofectAMINETM: higher transfection efficiencies, lower cytotoxicity, the capability to maintain their transfection efficiency in the presence of serum and the ability to transfect different eukaryotic cell lines. The flexibility of the vinylsulfone based chemistry also allowed the fluorescent labeling of these PAMAM derivatives for the preparation of probes to monitor the endocytic pathway used for successful transfection by the dendrimers and to gain insights in the cellular uptake and internalization mechanisms of these vectors.

Experimental

General experimental procedures

Generation 2 PAMAM dendrimer (PAMAM-G2) was purchased from Aldrich. Commercially available reagents **1a-c**, **2**, **7a-d**, **12** and solvents were used as purchased without further purification. Compound **3** was obtained from oleyl alcohol following a procedure described in the literature.²⁴ TLCs were performed on Merck Silica Gel 60 F254 aluminium sheets. Reagent used for developing plates include potassium permanganate (1% w/v), ninhydrin (0.3% w/v) in ethanol and 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. Optical rotations were recorded on a Perkin-Elmer 141 polarimeter at room temperature. IR spectra were recorded on a Satellite Mattson FTIR. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on a Varian Direct Drive (300, 400 and 500 MHz) spectrometer. Chemical shifts are given in ppm and referenced to internal CDCl₃. *J* values are given in Hz. FAB mass spectra were recorded on a Fissons VG Autospec-Q spectrometer, using *m*-nitrobenzyl alcohol or thioglycerol as matrix. NALDI-TOF mass spectra were recorded on an Autoflex Bruker spectrometer using NaI as matrix. Electrospray Ionization (ESI) mass spectra were recorded on a LCT Premier Spectrometer. LipofectAMINETM 2000 (LP2000) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). pEGFP-N3 plasmid (Genbank U57609) was obtained from Clontech Laboratories (Palo Alto, CA). This 4729 bp plasmid

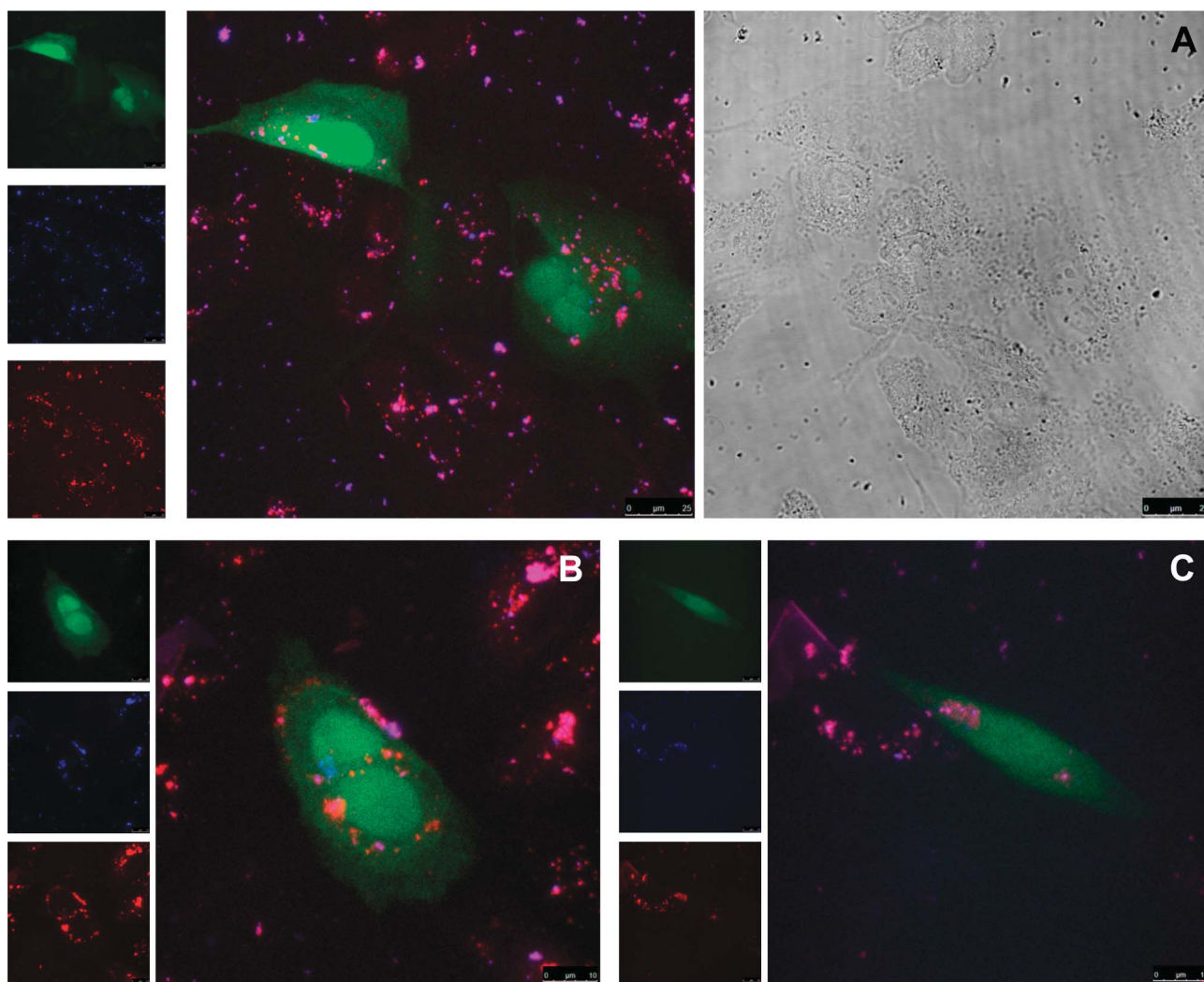


Fig. 7 Confocal microscopy. CHO-k1 cells were seeded onto coverslips and transfected with dendrimer complexes based on Rhodamine labeled-**9d-G2** (**III**) PAMAM derivative and Cy5 labeled pEGFP-N3 plasmid DNA at an N/P ratio of 10. 24 h after transfection, cells were fixed and confocal microscopy was performed to detect eGFP protein in the transfected cells (green), Rhodamine labeled-**9d-G2** (**III**) (red) or Cy5 labeled pEGFP DNA (blue). A merged image as well as images for each independent channel are shown. **A** and **B**. - CHO-k1 transfected cells at two magnifications. **C**. - CHO-k1 cells preincubated with chlorpromazine prior to transfection.

encodes for an enhanced red-shifted variant of wild-type GFP (eGFP). Plasmid was purified from transformed bacteria using standard methods.²⁵ DNA concentration was measured by a fluorimetric method using the Hoechst 33258 dye.²⁶ For confocal microscopy experiments, DNA was covalently labeled for 30 min with Cy5 dye using Mirus *labelIT*® Tracker Intracellular Nucleic Acid Labeling Kit CyTM5 (Madison, WI, USA) at a DNA : label ratio 0.5 : 1 according to the manufacturer's instructions. Unbound label was removed by ethanol precipitation.

Synthesis of vinyl sulfone reagents for the functionalization of PAMAM-G2

General procedure for the synthesis of thioether 4a-d. To a solution of 2-thioethanol (70 mg, 0.9 mmol for **4a-c**; 155 mg, 2.0 mmol for **4d**) in deoxygenated acetonitrile (10 mL) (for **4a,b,d**) or DMSO-THF 1:1 (for **4c**) was added the bromo derivative **1a-c** or the mesyl derivative **3** (1.0 mmol) and K₂CO₃ (193 mg,

1.4 mmol) for **4a-c** or Cs₂CO₃ (650 mg 2.0 mmol) for **4d**. The solution was magnetically stirred at room temperature until TLC showed complete disappearance of starting materials (2 h for **4a,d**, 16 h for **4b-c**). After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude was purified by column chromatography. In the case of compound **4c**, filtration was followed by partial evaporation of the solvent under reduced pressure, addition of H₂O (30 mL) and extraction with CH₂Cl₂ (2 × 30 mL). The combined organic extracts were then dried (Na₂SO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give a crude that was purified by column chromatography.

Compound 4a. Column chromatography (hexane-ether 1 : 1) of the crude gave **4a** as a liquid (127 mg, 95%), previously described in the literature.²⁷ v_{\max} (film)/cm⁻¹: 3372, 2958, 2873, 1465, 1275 and 1046; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.73 (t, 2 H, $J = 5.9$ Hz), 2.74 (t, 2 H, $J = 5.9$ Hz), 2.54 (t, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 2.32 (br s, 1 H), 1.59 (m, 2 H), 1.43 (m, 2 H), 0.93 (t, 3 H, $J = 7.3$ Hz); ¹³C-NMR

(CDCl₃, 75 MHz): δ 60.3, 35.4, 31.9, 31.8, 22.0, 13.7; HRMS (m/z) (NALDI-TOF) calcd. for C₆H₁₃S [M - OH]⁺: 117.0738; found: 117.0736.

Compound 4b. Column chromatography (hexane–ether 2 : 1) of the crude gave **4b** as a syrup (214 mg, 87%). ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3315, 2918, 2849, 1461, 1044 and 997; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.72 (t, 2 H, J = 6.0 Hz), 2.73 (t, 2 H, J = 5.8 Hz), 2.52 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 2.43 (s, 1 H), 1.66–1.52 (m, 2 H), 1.45–1.15 (m, 18 H), 0.89 (t, 3 H, J = 6.6 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 60.5, 35.5, 32.2, 31.9, 30.0, 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.1, 22.9, 14.3. HRMS (m/z) (ESI): calcd. for C₁₄H₃₁OS [M + H]⁺: 247.2096; found: 247.2098.

Compound 4c. Column chromatography (hexane–ether 1 : 1) of the crude gave **4c** as a solid (304 mg, 92%). M.P. 60–61 °C; ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3213, 2918, 2849, 1460, 1063 and 719; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.71 (t, 2 H, J = 6.0 Hz), 2.72 (t, 2 H, J = 5.6 Hz), 2.51 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 2.11 (s, 1 H), 1.58 (m, 2 H), 1.41–1.20 (m, 30 H), 0.87 (t, 3 H, J = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 60.3, 35.5, 32.0, 31.8, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 22.8, 14.2.

Compound 4d. Column chromatography (hexane–ether 2 : 1) of the crude gave **4d** as a syrup (308 mg, 94%). ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3371, 3003, 2923, 2852, 1461 and 1045; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.36–5.28 (m, 2 H), 3.69 (t, 2 H, J = 6.0 Hz), 2.70 (t, 2 H, J = 5.6 Hz), 2.49 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 2.35 (s, 1 H), 1.99 (dd, 4 H, J = 12.4 and 6.5 Hz), 1.60–1.52 (m, 2 H), 1.41–1.25 (m, 22 H), 0.86 (t, 3 H, J = 6.8 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 130.1, 129.9, 60.4, 35.4, 32.1, 31.8, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 27.4, 27.3, 22.8, 14.3; HRMS (m/z) (ESI) calcd. for C₂₀H₄₁OS [M + H]⁺: 329.2878; found: 329.2865.

General procedure for the synthesis of sulfones 5a–d. To a solution of the corresponding thioether derivative **4a–d** (1 mmol) in AcOH (5 mL) was added 33% H₂O₂ (2 mL). The solution was kept in the dark for 16 h. Evaporation of the solvent under reduced pressure gave a crude that was purified by column chromatography.

Compound 5a. Column chromatography (ether) gave **5a** as a solid (144 mg, 87%). M.P. 42–43 °C; ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3450, 2961, 2875, 1462, 1272, 1122 and 1065; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.12 (t, 2 H, J = 4.8 Hz), 3.21 (t, 2 H, J = 5.0 Hz), 3.09 (t, 2 H, J = 7.9 Hz), 2.62 (br s, 1 H), 1.84 (m, 2 H), 1.49 (m, 2 H), 0.97 (t, 3 H, J = 7.3 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 56.4, 54.9, 54.4, 23.8, 21.7, 13.6. HRMS (m/z) (ESI) calcd. for C₆H₁₅O₃S [M + H]⁺: 167.0742; found: 167.0743.

Compound 5b. Column chromatography (ether) gave **5b** as a solid (230 mg, 83%). M.P. 81–82 °C; ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3392, 2914, 2844, 1259 and 1116; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.14 (t, 2 H, J = 5.1 Hz), 3.20 (t, 2 H, J = 5.1 Hz), 3.07 (t, 2 H, J = 8.0 Hz), 1.80–1.70 (m, 2 H), 1.48–1.40 (m, 2 H), 1.38–1.20 (m, 16 H), 0.88 (t, 3 H, J = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 56.4, 54.8, 54.6, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 28.4, 22.7, 21.8, 14.1. HRMS (m/z) (ESI) calcd. for C₁₄H₃₁O₃S [M + H]⁺: 279.1994; found: 279.1989.

Compound 5c. Column chromatography (EtOAc) gave **5c** as a solid (308 mg, 85%). M.P. 93–94 °C; ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3368, 2913, 2847, 1594, 1470, 1256, 1133 and 1059; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.13 (t, 2 H, J = 5.0 Hz), 3.19 (t, 2 H, J = 5.0 Hz),

3.07 (t, 2 H, J = 8.0 Hz), 1.85 (m, 2 H), 1.50–1.18 (m, 30 H), 0.88 (t, 3 H, J = 6.6 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 56.5, 54.9, 54.7, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.6, 22.8, 22.0, 14.2. HRMS (m/z) (FAB+) calcd. for C₂₀H₄₂O₃SNa [M + Na]⁺: 385.2752; found: 385.2755.

Compound 5d. Column chromatography (hexane–EtOAc 1 : 1) gave **5d** as a syrup (245 mg, 68%). ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3384, 2918, 2847, 1460, 1323, and 1121; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.30–5.26 (m, 2 H), 4.06 (t, 2 H, J = 5.2 Hz), 3.13 (t, 2 H, J = 5.2 Hz), 3.00 (t, 2 H, J = 8.1 Hz), 2.47 (br s, 1 H), 1.94 (dd, 4 H, J = 11.9 and 6.1 Hz), 1.83–1.73 (m, 2 H), 1.42–1.32 (m, 2 H), 1.30–1.12 (m, 20 H), 0.81 (t, 3 H, J = 6.8 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 130.3, 129.9, 56.6, 55.0, 54.8, 32.1, 30.0, 29.9, 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7, 27.4, 27.3, 22.9, 22.0, 14.3; HRMS (m/z) (ESI) calcd. for C₂₀H₄₁O₃S [M + H]⁺: 361.2776; found: 361.2775.

General procedure for the synthesis of vinyl sulfones 6a–d. A solution of the corresponding sulfone **5a–d** (1 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) was cooled by means of an ice bath. Et₃N (0.41 mL, 3 mmol for **5a–c**; 0.82 mL, 6 mmol for **5d**) and mesyl chloride (0.12 mL, 1.5 mmol for **5a–c**; 0.24 mL, 3.0 mmol for **5d**) were then added and the solution was left to warm to room temperature until TLC showed complete disappearance of starting materials (2 h for **4a–b**, 24 h for **4c**, 6 h for **4d**). The solvent was removed under reduced pressure and the resulting crude purified by column chromatography.

Compound 6a. Column chromatography (hexane–ether 1 : 1) gave **6a** as a syrup (136 mg, 92%). ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 2919, 1673, 1463, 1384, 1312, 1130, 978 and 808; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.64 (dd, 1 H, J = 16.6 and 10.1 Hz, CH =), 6.44 (d, 1 H, J = 16.4 Hz, =CH₂*trans*), 6.17 (d, 1 H, J = 10.2 Hz, =CH₂*cis*), 2.99 (t, 2 H, J = 8.2 Hz), 1.80–1.72 (m, 2 H), 1.46 (m, 2 H), 0.95 (t, 3 H, J = 7.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 136.1, 130.4, 54.0, 24.3, 21.6, 13.5. HRMS (m/z) (ESI) calcd. for C₆H₁₃O₂S [M + H]⁺: 149.0636; found: 149.0640.

Compound 6b. Column chromatography (hexane–ether 1 : 1) gave **6b** as a syrup (218 mg, 84%). ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 2925, 1719, 1647, 1459, 1307, 1131, 1069, 973 and 666; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.60 (dd, 1 H, J = 16.6 and 9.9 Hz, CH =), 6.37 (d, 1 H, J = 16.6 Hz, =CH₂*trans*), 6.11 (d, 1 H, J = 9.9 Hz, =CH₂*cis*), 2.92 (t, 2 H, J = 8.1 Hz), 1.75–1.67 (m, 2 H), 1.36–1.18 (m, 18 H), 0.83 (t, 3 H, J = 6.8 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 136.1, 130.4, 54.3, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 28.3, 22.7, 22.3, 14.1. HRMS (m/z) (ESI) calcd. for C₁₄H₂₉O₂S [M + H]⁺: 261.1888; found: 261.1879.

Compound 6c. Column chromatography (hexane–ether 1 : 1) gave **6c** as a solid (279 mg, 81%). M.P. 61–62 °C; ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3062, 2915, 2847, 1462, 1284, 1124, 908 and 730; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.62 (dd, 1 H, J = 16.6 and 9.8 Hz, CH =), 6.43 (d, 1 H, J = 16.6 Hz, =CH₂*trans*), 6.15 (d, 1 H, J = 9.8 Hz, =CH₂*cis*), 2.96 (t, 2 H, J = 8.0 Hz), 1.77 (m, 2 H), 1.46–1.20 (m, 30 H), 0.88 (t, 3 H, J = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 136.3, 130.4, 54.4, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 28.5, 22.8, 22.4, 14.2. HRMS (m/z) (FAB+) calcd. for C₂₀H₄₀O₂SNa [M + Na]⁺: 367.2647; found: 367.2644.

Compound 6d. Column chromatography (hexane–EtOAc 5 : 1) gave **6d** as a liquid (274 mg, 80%). ν_{\max} (film)/cm⁻¹: 3003,

2922, 2852, 1613, 1463, 1314, 1132 and 973; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.56 (dd, 1 H, *J* = 16.7 and 9.7 Hz), 6.37 (d, 1 H, *J* = 16.7 Hz), 6.09 (d, 1 H, *J* = 9.7 Hz), 5.32–5.23 (m, 2 H), 2.90 (t, 2 H, *J* = 8.1 Hz), 1.96–1.92 (m, 4 H), 1.74–1.67 (m, 2 H), 1.38–1.16 (m, 22 H), 0.81 (t, 3 H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 136.1, 130.3, 130.0, 129.6, 54.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 29.0, 28.3, 27.2, 27.1, 22.7, 22.3, 14.1; HRMS (*m/z*) (ESI) calcd. for C₂₀H₃₀O₂S [M + H]⁺: 343.2671; found: 343.2664.

Synthesis of 2-hydroxyethyl amide 8a. A solution of butyric acid chloride (10 mmol) in anhydrous Cl₂CH₂ (30 mL) was added dropwise to a solution of 2-amino ethanol (9 mL, 15 mmol) and Et₃N (2.8 mL, 20 mmol) in anhydrous Cl₂CH₂ (30 mL). The reaction mixture was kept at room temperature (15 min) and then evaporated under reduced pressure to give a crude that was purified by column chromatography (EtOAc) yielding **8a**, previously described in the literature,²⁸ as a syrup (1.18 g, 90%). $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3294, 2940, 2873, 1649, 1558 and 535; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.41 (br s, 1 H, NH), 3.56 (t, 2 H, *J* = 4.7 Hz), 3.26 (q, 2 H, *J* = 5.3 Hz), 2.08 (t, 2 H, *J* = 7.5 Hz), 1.53 (m, 2 H), 0.83 (t, 3 H, *J* = 7.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 174.5, 61.4, 42.2, 38.3, 19.1, 13.6.

General procedure for the synthesis of 2-hydroxyethyl amides 8b–d. A solution of the corresponding acid **7b–d** (10 mmol) in Cl₂SO (11 mL for **8b–c**; 22 mL for **8d**) was magnetically stirred for 1 h at room temperature. Evaporation and coevaporation with anhydrous toluene (3 × 15 mL) under reduced pressure gave a crude that was dissolved in anhydrous Cl₂CH₂ (30 mL) for **8b,d** or anhydrous THF (50 mL) for **8c**. This solution was added dropwise to a solution of 2-amino ethanol (0.9 mL, 15 mmol) and Et₃N (2.8 mL, 20 mmol) in anhydrous Cl₂CH₂ (30 mL) for **8b,d** or anhydrous THF (50 mL) for **8c**. The reaction mixture was kept at room temperature (15 min) and then evaporated under reduced pressure to give a crude that was purified by column chromatography.

Compound 8b. Column chromatography (EtOAc) gave **8b** as a solid (2.25 g, 93%). M.P. 89–91 °C (lit.²⁹ 90–92 °C); $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3292, 2984, 2917, 1740, 1640, 1373, 1240 and 1046; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.18 (br s, 1 H), 3.69 (t, 2 H, *J* = 4.9 Hz), 3.39 (q, 2 H, *J* = 5.1 Hz), 2.20 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz), 1.60 (m, 2 H), 1.24 (m, 16 H), 0.86 (t, 3 H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 174.6, 62.3, 42.4, 36.7, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.3, 25.7, 22.6, 14.1.

Compound 8c. Column chromatography (Cl₂CH₂–MeOH 15:1 → 5:1) gave **8c** as a solid (3.0 g, 91%). M.P. 106–108 °C. $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3294, 2917, 2848, 1639, 1549, 1460 and 1214. Spectroscopic data identical to those previously reported in literature.³⁰

Compound 8d. Column chromatography (EtOAc–hexane 2:1 → EtOAc) gave **8d** as a solid (2.88 g, 88%). M.P. 59–61 °C (lit.³¹ 62–63 °C); $v_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3301, 1642, 1561, 1464, 1265, 1211, 1057, and 1035; ¹H-NMR data identical to those reported in literature;²⁹ ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 174.7, 130.1, 129.8, 62.4, 42.5, 36.7, 32.0, 29.8, 29.8, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 27.3, 27.2, 25.8, 22.7, 14.2.

General procedure for the synthesis of vinyl sulfones 9a–d. To a solution of the corresponding 2-hydroxyethyl amide **8a–d** (1 mmol)

in THF (50 mL) was added DVS (0.21 mL, 2 mmol) and *t*-BuOK (11 mg, 0.10 mmol). The reaction mixture was magnetically stirred (20 min) at room temperature. Evaporation of the solvent under reduced pressure gave a crude that was purified by column chromatography.

Compound 9a. Column chromatography (EtOAc–hexane 2:1 → EtOAc) gave **9a** as a syrup (150 mg, 60%). $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3380, 2963, 2874, 1649, 1544, 1313, 1126 and 756; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.67 (dd, 1 H, *J* = 16.6 and 9.9 Hz), 6.35 (d, 1 H, *J* = 16.6 Hz), 6.29 (br s, 1 H), 6.07 (d, 1 H, *J* = 9.9 Hz), 3.82 (t, 2 H, *J* = 5.5 Hz), 3.49 (t, 2 H, *J* = 5.1 Hz), 3.37 (q, 2 H, *J* = 5.2 Hz), 3.20 (t, 2 H, *J* = 5.5 Hz), 2.09 (t, 2 H, *J* = 7.5 Hz), 1.58 (m, 2 H), 0.86 (t, 3 H, *J* = 7.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.3, 137.5, 129.4, 69.8, 63.8, 54.5, 38.6, 38.4, 19.0, 13.7. HRMS (*m/z*) (NALDI-TOF) calcd. for C₁₀H₁₉NO₄SNa [M + Na]⁺: 272.0932; found: 272.0934.

Compound 9b. Column chromatography (EtOAc–hexane 2:1 → EtOAc) gave **9b** as a solid (191 mg, 53%). M.P. 64–66 °C; $v_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3306, 3061, 2914, 2848, 1636, 1551, 1460, 1380, 1295, 1248, and 1123; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.70 (dd, 1 H, *J* = 16.6 and 9.9 Hz), 6.43 (d, 1 H, *J* = 16.6), 6.12 (d, 1 H, *J* = 9.9 Hz), 3.89 (t, 2 H, *J* = 5.5 Hz), 3.55 (t, 2 H, *J* = 5.1 Hz), 3.44 (q, 2 H, *J* = 5.2 Hz), 3.24 (t, 2 H, *J* = 5.5 Hz), 2.17 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz), 1.61 (m, 2 H), 1.24 (br s, 16 H), 0.87 (t, 3 H, *J* = 6.8 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 173.4, 137.6, 129.4, 70.0, 63.8, 54.6, 38.7, 36.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 25.7, 22.6, 14.1. HRMS (*m/z*) (NALDI-TOF) calcd. for C₁₈H₃₅O₄SNa [M + Na]⁺: 384.2184; found: 384.2189.

Compound 9c. Column chromatography (EtOAc) gave **9c** as a solid (249 mg, 56%). M.P. 89–91 °C; $v_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3309, 2917, 2847, 1636, 1552, 1460, 1380, 1294, 1254, 1123, and 1089; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.70 (dd, 1 H, *J* = 16.6 and 9.9 Hz), 6.44 (d, 1 H, *J* = 16.6 Hz), 6.13 (d, 1 H, *J* = 9.9 Hz), 6.1 (br s, 1 H), 3.89 (t, 2 H, *J* = 5.5 Hz), 3.56 (t, 2 H, *J* = 5.0 Hz), 3.45 (q, 2 H, *J* = 5.2 Hz), 3.25 (t, 2 H, *J* = 5.5 Hz), 2.17 (t, 2 H, *J* = 7.7 Hz), 1.62 (m, 2 H), 1.24 (m, 28 H), 0.87 (t, 3 H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.4, 137.6, 129.4, 70.0, 63.8, 54.6, 38.7, 36.7, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 25.7, 22.7, 14.1. HRMS (*m/z*) (NALDI-TOF) calcd. for C₂₄H₄₇NO₄SNa [M + Na]⁺: 468.3123; found: 468.3124.

Compound 9d. Column chromatography (EtOAc–hexane 2:1 → EtOAc) gave **9d** as a syrup (226 mg, 51%). $v_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$: 3303, 1646, 1541, 1460, 1379, 1312, 1249, and 1124; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.71 (dd, 1 H, *J* = 16.4 and 9.7 Hz), 6.45 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 6.14 (d, 1 H, *J* = 9.6 Hz), 6.12 (br s, 1 H), 5.35 (m, 2 H), 3.91 (t, 2 H, *J* = 5.4 Hz), 3.57 (t, 2 H, *J* = 5.0 Hz), 3.46 (q, 2 H, *J* = 5.2 Hz), 3.26 (t, 2 H, *J* = 5.4 Hz), 2.18 (t, 2 H, *J* = 7.7 Hz), 2.01 (m, 4 H), 1.62 (m, 2 H), 1.28 (several m, 20 H), 0.88 (m, 3 H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 173.5, 137.6, 130.0, 129.8, 129.5, 70.0, 63.9, 54.6, 38.8, 36.7, 32.0, 29.8, 29.8, 29.6, 29.4, 29.4, 29.2, 27.3, 27.3, 25.8, 22.8, 14.2; HRMS (*m/z*) (FAB+) calcd. for C₂₄H₄₅NO₄SNa [M + Na]⁺: 466.2967; found: 466.2968.

Compound 10d. A solution of oleic acid **7d** (850 mg, 3 mmol) in Cl₂SO (10 mL) was magnetically stirred for 1 h at room temperature. Evaporation and coevaporation with anhydrous toluene (3 × 15 mL) under reduced pressure gave a crude that was

dissolved in anhydrous Cl_2CH_2 (30 mL). This solution was added dropwise to a solution of cystamine dihydrochloride (260 mg, 1.15 mmol) and Et_3N (0.98 mL, 6.9 mmol) in anhydrous Cl_2CH_2 (30 mL). The reaction mixture was kept at room temperature (15 min) and then evaporated under reduced pressure to give a crude that was purified by column chromatography (ether–hexane 2:1 \rightarrow ether) yielding **10d** as a solid (720 mg, 92%). M.P. 83–85 °C; $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3320, 1632, 1536, 1464, 1419, 1261, and 1192; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 6.28 (br s, 2 H), 5.34 (m, 4 H), 3.57 (q, 4 H, $J = 6.3$ Hz), 2.82 (t, 4 H, $J = 6.4$ Hz), 2.20 (t, 4 H, $J = 7.5$ Hz), 2.00 (m, 8 H), 1.63 (m, 4 H), 1.28 (several m, 40 H), 0.88 (m, 6 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 173.9, 130.2, 129.9, 38.6, 38.1, 36.8, 32.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 27.4, 25.9, 22.9, 14.3; HRMS (m/z) (FAB+) calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 703.5246; found: 703.5250.

Compound 11d. To a solution of **10d** (960 mg, 1.4 mmol) in AcOH (20 mL) was added powdered Zn (1.1 g, 17 mmol). The reaction mixture was magnetically stirred at 50 °C for 40 min. After cooling and filtration over zeolite, Cl_2CH_2 (70 mL) was added and the resulting organic solution was washed with water (2×30 mL), saturated NaHCO_3 (2×30 mL) and additional water (30 mL). The organic phase was dried (Na_2SO_4) and evaporated under reduced pressure to give a crude that was dissolved in previously deoxygenated THF:isopropanol (2:1, 25 mL) by bubbling Ar for 5 min. DVS (809 μL , 5.65 mmol) and Et_3N (40 μL , 0.28 mmol) were added and the new reaction mixture was magnetically stirred at room temperature under an Ar atmosphere for 1.5 h. Evaporation of the solvent gave a crude that was purified by column chromatography (ether) yielding **11d** as a solid (890 mg, 69%). M.P. 85–87 °C; $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3319, 1632, 1536, 1463, 1418, 1261, and 1191; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 6.70 (dd, 1H, $J = 16.6$ and 9.7 Hz), 6.48 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 6.23 (d, 1 H, $J = 9.7$ Hz), 5.85 (br s, 1 H), 5.36 (m, 2H), 3.45 (q, 2 H, $J = 6.4$ Hz), 3.26 (m, 2 H), 2.91 (m, 2 H), 2.71 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 2.18 (t, 2 H, $J = 7.6$ Hz), 2.00 (m, 4 H), 1.62 (m, 2 H), 1.28 (several m, 20 H), 0.88 (m, 3 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 173.5, 136.3, 131.5, 130.2, 129.9, 54.5, 38.5, 36.9, 32.8, 32.7, 32.2, 32.1, 30.0, 29.9, 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 27.4, 27.4, 25.9, 23.9, 22.9, 14.3; HRMS (m/z) (FAB+) calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{NO}_3\text{S}_2\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 482.2738; found: 482.2734.

Compound 13. To a solution of cholesterol **12** (300 mg, 0.77 mmol) in THF (20 mL) was added DVS (0.12 mL, 1.16 mmol) and *t*-BuOK (9 mg, 0.077 mmol). The reaction mixture was magnetically stirred at room temperature for 1 h. Amberlita IR 120H was then added and the magnetic stirring continued for additional 30 min. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure. TLC of the crude showed the presence of cholesterol. Ac_2O (8 mL) and pyridine (4 mL) were added to the resulting crude and the new reaction mixture was kept at room temperature for 16 h. Acetylation of the crude reaction allowed the separation of compound **13**. Evaporation under reduced pressure gave a crude that was purified by column chromatography (ether–hexane 1:2) yielding **13** as a solid (204 mg, 52%). M.P. 133–135 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -19$ (*c* 1, chloroform); $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3409, 1461, 1373, 1319, 1115, and 1052; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.75 (dd, 1 H, $J = 16.7$ and 9.9 Hz), 6.40 (d, 1 H, $J = 16.7$ Hz), 6.07 (d, 1 H, $J = 9.9$ Hz), 5.35 (br s, 1 H), 3.88 (t, 2 H, $J = 5.6$ Hz), 3.23 (t, 2 H, $J = 5.6$ Hz), 3.19 (m, 1 H), 2.35–1.84 (several m, 7 H), 1.56–0.95

(several m, 21 H), 0.99 (s, 3 H), 0.92 (d, 3 H, $J = 6.4$ Hz), 0.86 (d, 6 H, $J = 6.6$ Hz), 0.67 (s, 3 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 140.2, 138.0, 128.5, 122.1, 79.8, 61.5, 56.7, 56.1, 55.4, 50.1, 42.3, 39.7, 39.5, 38.8, 37.0, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.8, 28.2, 28.1, 28.0, 24.3, 23.8, 22.9, 22.5, 21.0, 19.3, 18.7, 11.8; HRMS (m/z) (FAB+) calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 527.3535; found: 527.3535.

Synthesis of amphiphilic PAMAM-G2 dendrimers

General procedure. To a solution of PAMAM-G2 (0.3 mM, 1 mg mL^{-1}) in milliQ-water (15 mL) was added the vinyl sulfone reagents **6a–d**, **9a–d**, **11d** and **13** (0.15 mM for **I**, 0.3 mM for **II** and 0.6 mM for **III**) in THF (15 mL). The solution was magnetically stirred at room temperature for 1 day. Then the solvent (THF) was evaporated under reduced pressure and the water was freeze-dried. The products were directly used in the transfection assays.

Synthesis of fluorescent PAMAM-G2. To a solution of PAMAM-G2 (0.6 mM, 2 mg mL^{-1}) in milliQ-water (7.5 mL) was added the vinylsulfone rhodamine B **14** ¹⁷ (0.3 mM) in milliQ-water (7.5 mL). The solution was magnetically stirred at room temperature for 1 day and then water was freeze-dried. The product (**G2-Rho**) was directly used in the transfection assays.

Synthesis of fluorescent amphiphilic PAMAM-G2 derivatives. To a solution of PAMAM-G2 (0.6 mM, 2 mg mL^{-1}) in milliQ-water (7.5 mL) was added the vinylsulfone rhodamine B **14** (0.3 mM) in milliQ-water (7.5 mL). The solution was magnetically stirred at room temperature for 1 day. Then compound **6c** (0.15 mM) or **9d** (0.6 mM) were added in THF (15 mL). The reaction mixture was again magnetically stirred at room temperature for 1 day. The solvent (THF) was evaporated under reduced pressure and the water was freeze-dried. The products (**6c-G2(I)-Rho** and **9d-G2(III)-Rho**) were directly used in the transfection assays.

Preparation of amphiphilic PAMAM-G2/Plasmid pEGFP-N3 complexes

Amphiphilic PAMAM-G2/pDNA complexes were prepared at several N/P ratios where N = number of primary amines in the conjugate and P = number of phosphate groups in the pDNA backbone. Plasmid pEGFP-N3 was used for the preparation of the DNA complexes and for transfection assays. The quantities of functionalized PAMAM-G2 dendrimers used were calculated according to the desired DNA concentration of 0.1 mg mL^{-1} , the N/P ratio, the molecular weight and the number of positive charges in the selected PAMAM derivative. Experiments were performed for N/P 0.5 to 50. The desired amount of functionalized PAMAM-G2 dendrimer was added from a 20 mg mL^{-1} stock solution (1:2 DMSO– H_2O). The solution was previously diluted so that the desired N/P ratio was reached by mixing with an equal volume of the plasmid solution. In this way, the DMSO proportion was identical in all experiments (16.7% v/v). The preparation was vortexed for a few seconds and incubated for 20 min.

Gel electrophoresis shift assay

The binding capability of PAMAM derivatives for DNA was analyzed by gel electrophoresis. PAMAM-G2 derivatives were prepared in a DMSO– H_2O (1:2) solution while DNA was dissolved in NaCl 150 mM. pEGFP-N3 DNA (10 μL at 0.1

$\mu\text{g mL}^{-1}$) was mixed with an equal volume of PAMAM-G2 derivatives using N/P ratios 0–10 and incubated for 30 min at room temperature before the addition of loading buffer (2 μL). An aliquot (5 μL) of each sample was subjected to agarose gel electrophoresis (0.8% w/v) in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA). Electrophoresis was carried out at 7 V cm^{-1} and gels were stained after electrophoresis with ethidium bromide.

DNase protection assays

pEGFP-N3 DNA (10 μL at 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was mixed with 5 μL of PAMAM-G2 derivatives to give a final N/P ratio of 5 and incubated for 30 min at room temperature. To the mixture, 10 μL of a solution of DNase I (0.05 mg mL^{-1} in Tris HCl 50 mM pH 8, 2000 U/mg) were added and incubated for 1 h at 37 °C. After the digestion, 2 μL of a 10% SDS solution were added and the samples incubated for 15 min at 65 °C before the addition of loading buffer (4 μL). Finally, an aliquot (20 μL) of each sample was subjected to agarose gel electrophoresis (0.8% w/v) in TAE buffer. Quantification of the band intensity was performed with the NIH Image Software.³² A value of 100 has been assigned to the intensity of the band corresponding to the control undigested DNA.

Cell culture and DNA transfection assays

Wild type Chinese Hamster Ovary (CHO-k1; ATCC no. CCL-61), RAW 264.7 (ECACC No. 91062702) and Neuro-2a (ATCC No. CCL-131) cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine plus 100 U/mL penicillin, and 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin. All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified incubator containing CO₂ (5%) and air (95%). Prior to transfection, cells were seeded in 24 well plates at a density of 2.25×10^4 cells cm^{-2} and incubated for 24 h to reach a cell confluence of 80–90%. For transfection experiments, pEGFP-N3 plasmid (0.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$) was mixed with the corresponding PAMAM-G2 derivative at N/P ratios of 2.5, 5, 10, 20 and 50 at room temperature for 20 min in a final volume of 20 μL . The mixture was diluted to 0.5 mL with DMEM without serum or supplemented with 10% serum and added to each well. Cells were incubated with the DNA–PAMAM derivatives mixtures for 5 h, then the transfection media was removed and cells were further grown in DMEM media plus 10% FBS for an additional period of 48 h. Untransfected cells and naked pEGFP-N3 were used as negative controls. Transfections using unmodified PAMAM-G2 were always included as a control. LP2000 was also used as a positive control in gene delivery experiments. LP2000 polyplexes were prepared using 2 μL of LP2000 and 1.0 μg of DNA, according to the manufacturer's instructions. For the assay of the effects of dendrimers internalizations, cells were preincubated for 30 min with chlorpromazine (Sigma), 14 μM or genistein (Sigma), 200 μM prior to the addition of the dendriplexes.

Particle size and ζ potential measurements

The particle diameter was measured at 633 nm on a dynamic light scattering instrument (MALVERN 4700C) at room temperature with a detection angle of 60°. Zeta potential measurements were performed using a ZetaPALS instrument (Brookhaven, USA). Zeta potentials were calculated using the Smoluchowsky model,

each data point was taken as an average over five independent sample measurements. Solutions of dendriplexes were prepared with a pDNA concentration of 0.1 mg mL^{-1} at different N/P ratios (the optimum for transfection in each case) in the same way as commented before. Measurements were taken on these solutions before and after addition of DNA.

Cytotoxicity of the complexes

Cytotoxicity of the complexes formed by the functionalized dendrimers and pDNA was evaluated 24 h after transfection. Cytotoxicity was assayed by determining the percentage of cell viability (with respect to unexposed cells) using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method,³³ that correlate the cellular metabolic activity and the number of viable cells in culture. Results are reported as % viability based on the untreated control cells normalized to 100% viable.

Fluorescence and protein assay

Transfected cells were washed three times with PBS and 600 μL of 0.5% Triton X-100 in PBS was added. Plates were shaken for 10 min at room temperature and the lysate was recovered and the eGFP fluorescence was quantified in a Shimadzu RF-5301PC fluorimeter using an excitation of 480 nm (5 nm) and 510 nm (10 nm) emission wavelengths. Protein concentration was measured using the Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA, USA). In the transfection experiments, fluorescence in the positive control using LP2000 polyplexes was assigned a value of 100 and the fluorescence results obtained in the transfections with the PAMAM dendrimers were normalized to this value.

Confocal microscopy

CHO-k1 cells were seeded onto 12-mm coverslips in 24-well plates at a density of 11250 cells cm^{-2} 24 h before transfection. Polyplexes were prepared as described before, but using Cy5 labeled pEGFP-N3 as plasmid DNA and rhodamine-labeled PAMAM derivatives. Control experiments were carried out using either unlabeled pEGFP-N3 plasmid or unlabeled PAMAM derivatives. Transfection was carried out using 1 μg Cy5-labeled pEGFP-N3 and the rhodamine labeled compound **9d-G2(III)-Rho** at a N/P ratio of 10. 5 h after transfection, the medium was changed to complete medium and cells were grown for an additional period of 24 h to allow expression of eGFP in the transfected cells. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature and coverslips were mounted on glass slides using Vectashield mounting media (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Confocal microscopy was performed on a Leica DMI6000 confocal microscope. To prevent cross-talk of eGFP, rhodamine or Cy5 chromophores, distinct excitation laser lanes and non-overlapping detection channels were selected for their detection: eGFP was excited using the 488 nm line of a krypton/argon laser and the emitted fluorescence was detected with a 504–562 nm channel. Rhodamine was detected using the He/Ne 543 nm excitation line and a 574–626 nm channel and Cy5 was excited using a He/Ne 633 nm laser and a 651–688 nm channel. Under these conditions, no signal overspill among the individual fluorescence channels was observed. For color analysis, images were collected separately in single channel mode using a

sequential acquisition mode. All samples were exposed to laser for a time interval not >5 min to avoid photobleaching. The laser was set to the lowest power able to produce a fluorescent signal. Maximum voltage of photomultipliers was used to decrease the required laser power as much as possible. A pinhole of 1 Airy unit was used. Images were acquired at a resolution of 1024 × 1024. Series were acquired in the xyz mode. Data was processed using Leica AF software package.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM for the number of experiment indicated. The statistical significance of variations was evaluated using ONE-WAY Analysis of Variance (ANOVA). When significant effect was found, post hoc comparisons of the means were done using the *t* adjusted Tukey's test. A *p* value <0.05 was considered significant.

Acknowledgements

Financial Support was provided by Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (CTQ2008-01754) Junta de Andalucía (P07-FQM-02899) and Fundación Marcelino Botín. J. M.-S. thanks the University of Granada for a research contract (Programa Puente). A. M.-F. thanks the Spanish Ministerio de Educacion for a research fellowship (FPU). Alberto Martin-Molina and Cesar Rodriguez-Beas are greatly acknowledged for their collaboration in the dynamic light scattering and ζ-potential measurements.

References


- (a) T. Segura and L. D. Shea, *Annu. Rev. Mater. Res.*, 2001, **31**, 25; (b) *Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part I*, ed. L. Huang, M.-C. Hung and E. Wagner, Elsevier Academic Press, San Diego, 2005; (c) *Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery*, ed. K. Taira, K. Kataoka and T. Niidome, Springer-Verlag, Tokyo, 2005; (d) E. Mastrobattista, S. A. Bravo, M. Van Der Aa and D. J. A. Crommelin, *Drug Discov. Today Technol.*, 2005, **2**, 103; (e) S. Y. Wong, J. M. Pelet and D. Putnam, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 799; (f) M. A. Mintzer and E. E. Simanek, *Chem. Rev.*, 2008, **109**, 259.
- (a) W. F. Anderson, *Nature*, 1998, **392**, 25; (b) K. Lundstrom, *Trends Biotechnol.*, 2003, **21**, 117.
- I. M. Verma and N. Somia, *Nature*, 1997, **389**, 239.
- (a) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, *Polym. J.*, 1985, **17**, 117; (b) A. W. Bosman, H. M. Janssen and E. W. Meijer, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 1665; (c) *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, ed. J. Frechet and D. Tomalia, John Wiley & Sons, 2001.
- (a) S. E. Stiriba, H. Frey and R. Haag, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1329; (b) C. Dufès, I. F. Uchegbu and A. G. Schätzlein, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2005, **57**, 2177; (c) S. Svenson and D. A. Tomalia, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2005, **57**, 2106; (d) A. M. Caminade, C. V. Turrin and J. P. Majoral, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 7422; (e) D. K. Smith, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, **8**, 1187; (f) C. M. Paleos, L.-A. Tziveleka, Z. Sideratou and D. Tsiourvas, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2009, **6**, 27; (g) O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *New J. Chem.*, 2009, **33**, 1809; (h) V. Biricova and A. Laznickova, *Bioorg. Chem.*, 2009, **37**, 185; (i) W.-D. Jang, K. M. Kamruzzaman Selim, C.-H. Lee and I.-K. Kang, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **34**, 1.
- (a) J. D. Eichman, A. U. Bielinska, J. F. Kukowska-Latalo and J. R. Baker, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2000, **3**, 232; (b) R. Esfand and D. A. Tomalia, *Drug Discov. Today*, 2001, **6**, 427; (c) J. Dennig and E. Duncan, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2002, **90**, 339; (d) V. K. Yellepeddi, A. Kumar and S. Palakurthi, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2009, **6**, 835; (e) P. P. Kundu and V. Sharma, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2008, **12**, 89; (f) M. Labieniec and C. Watala, *Cent. Eur. J. Biol.*, 2009, **4**, 434; (g) J. D. Eichman, A. U. Bielinska, J. F. Kukowska-Latalo and J. R. Baker, Jr., *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2000, **3**, 232.
- (a) D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, J. Blasiak and M. Bryszewska, *J. Control. Release*, 2010, **141**, 110; (b) D. Shcharbin, E. Pedziwiatr and M. Bryszewska, *J. Control. Release*, 2009, **135**, 186.
- (a) J. C. Roberts, M. K. Bhalgat and R. T. Zera, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, **30**, 53; (b) K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta and N. K. Jain, *Int. J. Pharm.*, 2010, **394**, 122.
- (a) N. D. Sonawane, F. C. Szoka and A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 44826; (b) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 7297.
- (a) J. Haensler and F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, 1993, **4**, 372; (b) J. F. Kukowska-Latalo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindle, D. A. Tomalia and J. R. Baker Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 4897; (c) J.-H. S. Kuo and Y.-L. Lin, *J. Biotechnol.*, 2007, **129**, 383.
- G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York, 2008, pp. 346.
- (a) T. Takahashi, K. Kono, T. Itoh, N. Emi and T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 764; (b) T. Takahashi, C. Kojima, A. Harada and K. Kono, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 1349; (c) T. Takahashi, A. Harada, N. Emi and K. Kono, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 1160; (d) M. Guillot, S. Eisler, K. Weller, H. P. Merkle, J.-L. Gallani and F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 766; (e) D. Joester, M. Losson, R. Pugin, H. Heinzelmann, E. Walter, H. P. Merkle and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1486; (f) A. Ahmad, H. M. Evans, K. Ewert, C. X. George, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *J. Gene Med.*, 2005, **7**, 739; (g) K. K. Ewert, H. M. Evans, A. Zidovska, N. F. Bouxsein, A. Ahmad and C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3998; (h) D. S. Shah, T. Sakthivel, I. Toth, A. T. Florence and A. F. Wilderspin, *Int. J. Pharm.*, 2000, **208**, 41.
- J. L. Santos, H. Oliveira, D. Pandita, J. Rodrigues, A. P. Pêgo, P. L. Granja and H. Tomás, *J. Control. Release*, 2010, **144**, 55.
- (a) R. Jevprasesphant, J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N. B. McKeown and A. D'Emanuele, *Int. J. Pharm.*, 2003, **252**, 263; (b) H. Arima, F. Kihara, F. Hirayama and K. Uekama, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 476.
- J. Morales-Sanfrutos, J. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Munoz, A. Megia-Fernandez, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo and F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 667.
- T. H. Dung, J. S. Kim, R. L. Juliano and H. Yoo, *Colloids Surf., A*, 2008, **313–314**, 273.
- J. Morales-Sanfrutos, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo and F. Santoyo-Gonzalez, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 4039.
- A. Shakhbazov, I. Isayenka, N. Kartel, N. Goncharova, I. Seviaryn, S. Kosmacheva, M. Potapnev, D. Shcharbin and M. Bryszewska, *Int. J. Pharm.*, 2010, **383**, 228.
- J. P. Yang and L. Huang, *Gene Ther.*, 1997, **4**, 950.
- J.-P. Carralot, T.-K. Kim, B. Lenseigne, A. S. Boese, P. Sommer, A. Genovesio and P. Brodin, *J. Biomol. Screening*, 2009, **14**, 151.
- D. Vercauteren, R. E. Vandembroucke, A. T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. C. De Smedt, N. N. Sanders and K. Braeckmans, *Mol. Ther.*, 2010, **18**, 561.
- J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn and D. Hoekstra, *Biochem. J.*, 2004, **377**, 159.
- S. Mayor and R. E. Pagano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, **8**, 603.
- D. W. Pack, G. Chen, K. M. Maloney, C.-T. Chen and F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2479.
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition*, ed. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA 1989.
- W. Sterzel, P. Bedford and G. Eisenbrand, *Anal. Biochem.*, 1985, **147**, 462.
- A. Sokolowski, B. Burczyk and J. Beger, *Colloids Surf.*, 1989, **36**, 373.
- I. Kuriyama, N. Asano, I. Kato, K. Ikeda, M. Takemura, H. Yoshida, K. Sakaguchi and Y. Mizushima, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2187.
- C. Bennion, S. Connolly, N. P. Gensmantel, C. Hallam, C. G. Jackson, W. U. Primrose, G. C. K. Roberts, D. H. Robinson and P. K. Slaich, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 2939.
- J. A. Morales-Serna, O. Boutoureira, Y. Diaz, M. I. Matheu and S. Castillon, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 443.
- B. F. Cravatt, R. A. Lerner and D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 580.
- W. S. Rasband and D. S. Bright, *Microbeam Anal.*, 1995, **4**, 137.
- T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55.

DOI: 10.1002/adsc.201000530

Non-Magnetic and Magnetic Supported Copper(I) Chelating Adsorbents as Efficient Heterogeneous Catalysts and Copper Scavengers for Click Chemistry

Alicia Megia-Fernandez,^a Mariano Ortega-Muñoz,^a Javier Lopez-Jaramillo,^a Fernando Hernandez-Mateo,^a and Francisco Santoyo-Gonzalez^{a,*}^a Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, 18071 Granada, Spain
Fax: (+34)-958243186; phone: (+34)-958248087; e-mail: fsantoyo@ugr.es

Received: July 5, 2010; Revised: September 9, 2010; Published online: December 7, 2010

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201000530>.

Abstract: Novel supported chelating adsorbents bearing diverse multidentate nitrogenated ligands with strong copper(I) affinities are easily prepared in non-magnetic and magnetic variants using silica and silica-coated magnetite nanoparticles as suitable supports and the aza-Michael-type addition of vinyl sulfones as the ligation tool. These adsorbents are versatile materials with applications in the copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) click chemistry where their complexation abilities enable them to act either as heterogeneous click catalysts when used in their complexed form or as copper(I) scavengers when used in their uncomplexed form. In the first instance, they proved to be robust and efficient heterogeneous catalysts to promote click reactions using extremely low doses and showing negligi-

ble copper leaching, particularly in the case of the silica-based non-magnetic adsorbents, allowing a simple operational protocol for their rapid and easy removal by filtration or magnetic decantation and showing good recyclability properties. In their uncomplexed form, the non-magnetic chelating adsorbents are very efficient copper scavengers that are able to remove any traces of metal contamination and that can be applied in tandem with any heterogeneous supported copper(I) catalysts or as stand-alone copper removing system in any click protocol allowing the isolation of metal-free clicked compounds.

Keywords: chelates; click chemistry; heterogeneous catalysis; magnetic nanoparticles; scavenger

Introduction

The discovery of the catalytic effect of Cu(I) in the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of azides with alkynes (CuAAC)^[1] was a milestone in the development of the click chemistry concept^[2] that has established this process as the most reliable “click” reaction.^[3] A prolific research activity in this area during the last decade has led to the development of a plethora of protocols where the use of different Cu(I) sources for homogeneous catalysis constitutes the bulk of the reported applications on many research fields that have benefited from the high reliability of CuAAC reactions. The introduction of new variants to further improve the efficiency of the reaction has determined an outstanding level of development for this ligation methodology. In particular, the use of Cu(I) complexes with nitrogen-based ligands as click

catalysts or mediators was revealed^[4] shortly after the discovery of the CuAAC coupling^[5] and was shown to both enhance the reaction rate and to protect the inherent thermodynamic instability of Cu(I) species from oxidation under aerobic and/or aqueous conditions. In addition, the application of microwave irradiation has demonstrated its utility to increase the reaction rate and to improve yields with a dramatic reduction of reaction times being observed in most protocols.^[6]

Despite the pivotal role played by Cu(I) in click cycloaddition reaction of azides and alkynes, the use of this metal is not without drawbacks, especially those related to contamination of clicked products with toxic metal which becomes an issue of utmost importance particularly in bioconjugation and in biomedical and pharmaceutical applications of click chemistry.^[7] Nowadays, several approaches have been used to

overcome this limitation. In this respect, the development of elegant copper-free click strategies that exploit the ring strain of cyclooctyne reagents is particularly relevant.^[8] However, the Cu(I)-catalyzed version is expected to remain one of the most widely applied click reactions due to the straightforward access to clickable building blocks.^[9]

The heterogenization of click catalysts constitutes an appealing alternative due to the advantages of easy removal, recovery and reusability that they offer. This heterogenization has been attained by the covalent and non-covalent immobilization of copper species onto a variety of supports such as activated carbon,^[10] zeolites,^[11] titanium oxide,^[12] alumina,^[13] aluminium oxyhydroxide fibers,^[14] silica,^[15] cross-linked poly(ethyleneimine),^[16] basic Amberlyst,^[17] Tentagel Resin,^[18] polystyrene,^[15b] ionic polymers,^[19] biopolymers^[20] and carbon nanotubes.^[21] In some of these heterogeneous catalysts, the immobilization of amine-based ligands with a contrasted ability as homogeneous click mediators for the synergetic exploitation of their Cu(I) chelating capabilities and base character has demonstrated to be an efficient approach for the design of such hybrid materials. In particular dimethylaminomethyl,^[17] tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA),^[18] 3-aminopropyl,^[15a] 3-[(2-aminoethyl)amino]propyl,^[15a] and 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD)^[15b] have been used as chelating frameworks by their grafting onto a polystyrene matrix or silica.

In a related context, magnetic heterogeneous catalysts constitute also an attractive choice. Magnetic nano- and microsized particles^[22] have recently emerged as viable and promising supports for immobilization with applications in catalytic transformations as robust, readily available and high-surface-area heterogeneous catalysts. They possess the added advantage of being magnetically recoverable by an external permanent magnet, thereby eliminating the requirement of catalyst filtration after the reaction which circumvents time-consuming and laborious separation steps, and allowing for practical continuous catalysis. Despite the potential inherent stability, the activity of such systems and the attractive operational characteristics that these magnetic materials offer, at the outset of this study only a recent contribution describing the use of copper nitride nanoparticles supported on a mesoporous superparamagnetic silica microspheres as efficient magnetic heterogeneous catalyst in the presence of added tertiary amines had been reported.^[23]

Although all the reported heterogeneous click catalysts have proved their high efficiency and practicability, the problem of metal contamination is still a challenge to be overcome due to the leaching of active copper species that is usually detected in these materials. In this respect, the introduction of a subsequent

copper-scavenging step has been reported as a feasible improvement in CuAAC reactions performed under continuous flow conditions.^[24] Quadrapure™ thiourea resin and activated charcoal (Norite type A) have been successfully applied in this methodology to remove Cu impurities by exploiting the metal scavenging properties of these supports that originate from sulfur complexation and adsorption, respectively. In addition, simple washing with EDTA has also demonstrated its effectiveness due to the strong chelating properties of this complexation agent for Cu species.^[24b]

Considering the present state-of-the-art, we hypothesize that further progress in the development of eco-friendly CuAAC protocols where copper contamination is minimized or eliminated is possible by using supported chelating materials with nitrogen-based ligands (**Si-Lm**) with enhanced Cu(I) complex capabilities. These hybrid materials can conceptually be used as dual compounds with the capability to act both as click heterogeneous catalysts when complexed with Cu(I) and also as Cu(I) scavengers when used in their uncomplexed form after a CuAAC reaction (Figure 1). Herein, we report on the preparation of some novel silica-based non-magnetic and magnetic nanoparticles supported Cu(I) chelating adsorbents as well as their application in click chemistry.

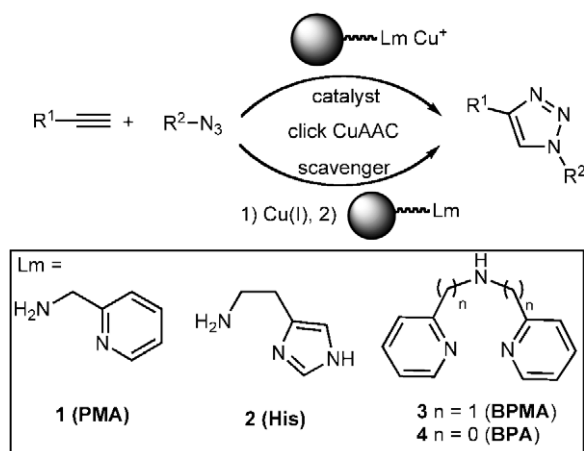
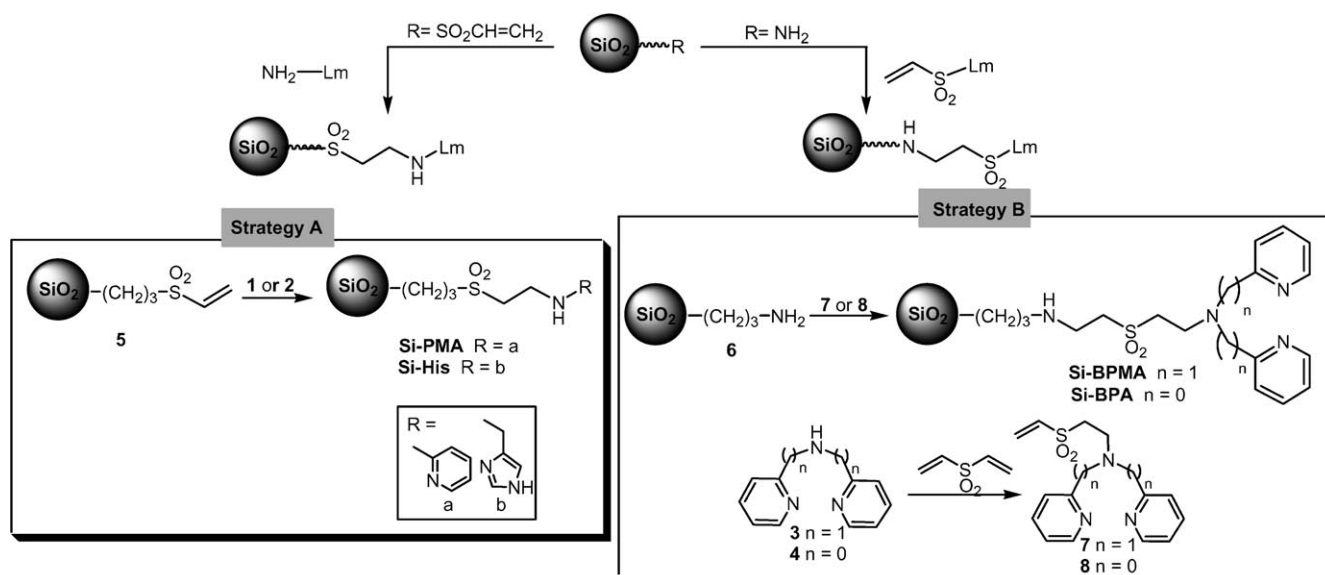


Figure 1. Applications of supported Cu(I) chelating adsorbents in click chemistry.

Results and Discussion

For the preparation of the new supported Cu(I) chelating materials with structural characteristics that facilitate the goal of obtaining copper uncontaminated clicked compounds, we selected two bidentate and two tridentate compounds, namely, 2-picolylamine (**1**, **PMA**), histamine (**2**, **His**), bispicolylamine (**3**, **BPMA**) and bispyridylamine (**4**, **BPA**) (Figure 1) from the wide range of available nitrogen-based li-



Scheme 1. Strategies for the preparation of **Si-Lm** adsorbents and synthesis of **Si-PMA**, **Si-His**, **Si-BPMA** and **Si-BPA**.

gands on the basis of their well-known high affinities^[25] for Cu(I) and Cu(II) and ligand acceleration effect on the kinetics of the CuAAC.^[26] In addition, their commercial availability allows a gain in operational simplicity. We further decided to use silica as support for the covalent immobilization of these ligands because of the advantageous properties displayed by this material for the preparation of hybrid materials: excellent chemical and thermal stability, good accessibility due to its high surface area and porosity, and easy derivatization.^[27] For anchoring the ligands onto the surface of silica, the aza-Michael-type addition of vinyl sulfones to amines was thought to be an optimal and simple methodology if appropriately functionalized silicas are used. Two plausible strategies are depicted in Scheme 1 starting with vinyl sulfone silica (**5**)^[28] and amino functionalized silica (**6**),^[29] easily prepared by silanization of activated commercial silica. Reaction of **5** with amino derivatives **1** and **2** afforded the **Si-Lm** adsorbents **Si-PMA** and **Si-His**, respectively, in high yields. Reaction of **6** with vinyl sulfone bipyridyl derivatives **7** and **8**, obtained by reacting divinyl sulfone respectively with **3** and **4**, gave **Si-BPMA** and **Si-BPA** in that order and in good yields.

Considering that the bispicolylamine motif is also present in commercial Dowex M-4195 resin (Figure 2), this polymer-supported chelating adsorbent was also envisaged as a suitable material for our studies. In fact, Dowex M-4195 is a macroporous resin with a polystyrene-divinylbenzene matrix with well-documented chelating capabilities^[30] that forms stable complexes with a variety of transition metal cations, including Cu(I) and Cu(II), which has found commercial application for the adsorption of heavy metals.

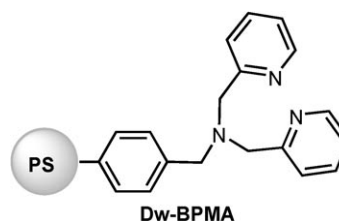


Figure 2. Polymeric Dowex M-4195.

Cu(I) was supported in the silica-based adsorbents **Si-Lm** by simple treatment with a commercial CuCl solution as the metal source in deoxygenated water giving the corresponding **Si-Lm-Cu⁺** complexes: **Si-PMA-Cu⁺**, **Si-His-Cu⁺**, **Si-BPMA-Cu⁺** and **Si-BPA-Cu⁺**. In the case of Dowex M-4195 the as-received resin was first conditioned to remove any residual organic and leached materials and then Cu(I) loading was performed by the same treatment as in the case of the silica-based adsorbents giving the corresponding polystyrene-based Cu(I) complex **Dw-BPMA-Cu⁺**. The metal loadings of the novel Cu(I) supporting materials were evaluated by atomic absorption spectroscopy (AAS) and ranges from 2.4 to 10.4% were found as indicated in the Experimental Section.

To evaluate the catalytic click capabilities of the novel supported Cu(I) materials, a variety of structurally diverse alkynes **9–20** and azides **21–28** were selected, comprising simple aliphatic and aromatic mono (**9–14**, **21**, **22** and **26**) and multi clickable derivatives (**18–20**, **27** and **28**) as well as some alkyne and azide functionalized biomolecules such as sugars (**15**, **16** and **23–25**) and biotin (**17**) (Figure 3). The reactions were performed under a selection of reaction

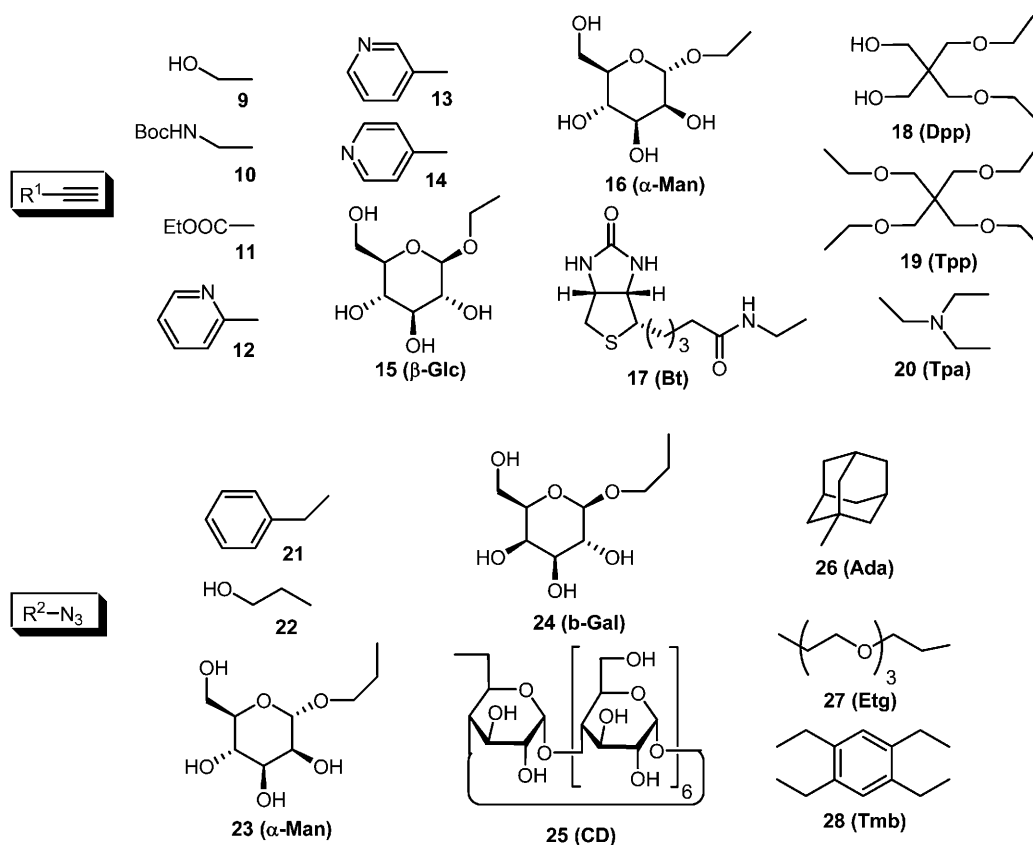


Figure 3. Representative clickable alkynes and azides.

conditions commonly employed in CuAAC, namely, aqueous *t*-BuOH, DMF or water as solvents or by direct mixing of the clickable reagents in the absence of any solvent when this was allowed by the physical characteristics of the reagents. The reactions were performed at room temperature or preferably under microwave (MW) irradiation in order to reduce the

reaction time. The results are summarized in Table 1, Table 2 and Table 3.

From these experiments, it can be clearly concluded that all the Cu(I) chelated silicas **Si-Lm-Cu⁺** are very efficient click catalysts since in all cases the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles were isolated as regiospecific products in excellent yields by using strictly equimo-

Table 1. CuAAC reactions using **Si-PMA-Cu⁺** and **Si-His-Cu⁺** as heterogeneous catalysts.

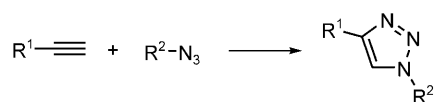
$$R^1-C\equiv C + R^2-N_3 \longrightarrow R^1-C_5H_3N_3-R^2$$

Entry	R ¹	R ²	Alkyne	Azide	Conditions ^[a]	Catalyst ^[b]	Time	Compound ^[c]
1	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	A	Si-PMA-Cu⁺ (30)	45 min	29 (95)
2	CH ₂ NHBoc	CH ₂ Ph	10	21	A	Si-PMA-Cu⁺ (40)	90 min	32 (100)
3		CH ₂ Ph	14	21	A	Si-PMA-Cu⁺ (25)	30 min	40 (85)
4	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	A	Si-His-Cu⁺ (30)	45 min	29 (90)
5	COOEt	CH ₂ CH ₂ OH	11	22	A	Si-His-Cu⁺ (20)	60 min	36 (94)
6	N(CH ₂) ₃	CH ₂ Ph	20	21	B	Si-His-Cu⁺ (60)	10 min	50 (87)
7	β-Glc	α-Man	15	23	C	Si-His-Cu⁺ (50)	45 min	42 (100)

^[a] **Conditions:** equimolecular amounts of the alkyne (1 mmol) and azide (1 mmol) and **A:** *t*-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **B:** *t*-BuOH:H₂O (10:1, 0.6 mL), MW; **C:** H₂O (10 mL), MW.

^[b] Given as mg catalyst/mmol reagent.

^[c] Compound (yield [%]).

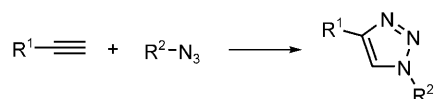
Table 2. CuAAC reactions using **Si-BPMA·Cu⁺** and **Dw-BPMA·Cu⁺** as heterogeneous catalysts.






Entry	R ¹	R ²	Alkyne	Azide	Conditions ^[a]	Catalyst ^[b]	Time	Compound ^[c]
1	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	A	Si-BPMA·Cu⁺ (10)	3 h	29 (96)
2	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	B	Si-BPMA·Cu⁺ (20)	20 min	29 (96)
3	CH ₂ NHBoc	CH ₂ Ph	10	21	B	Si-BPMA·Cu⁺ (20)	40 min	32 (92)
4	CH ₂ OH	β-Gal	9	24	B	Si-BPMA·Cu⁺ (70)	30 min	31 (99)
5	β-Glc	α-Man	15	23	C	Si-BPMA·Cu⁺ (150)	90 min	42 (100)
6	α-Man	Tmb	16	28	D	Si-BPMA·Cu⁺ (150)	15 min	45 (90)
7	Bt	Etg	17	27	D	Si-BPMA·Cu⁺ (150)	15 min	46 (89)
8	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	A	Dw-BPMA·Cu⁺ (20)	24 h	29 (80)
9	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	B	Dw-BPMA·Cu⁺ (50)	40 min	29 (56)
10	CH ₂ NHBoc	CH ₂ Ph	10	21	B	Dw-BPMA·Cu⁺ (50)	40 min	32 (70)

^[a] Conditions: equimolecular amounts of the alkyne (1 mmol) and azide (1 mmol) and **A**: neat, room temperature; **B**: *t*-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **C**: H₂O (10 mL), MW; **D**: DMF (10 mL), MW.

^[b] Given as mg catalyst/mmol reagent.

^[c] Compound (yield [%]).

Table 3. CuAAC reactions using **Si-BPA·Cu⁺** as heterogeneous catalyst.

Entry	R ¹	R ²	Alkyne	Azide	Conditions ^[a]	Catalyst ^[b]	Time	Compound ^[c]
1	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	A	30	24 h	29 (88)
2	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	B	30	1 h	29 (88)
3	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	C	20	15 min	29 (87)
4	CH ₂ OH	β-Gal	9	24	B	70	1 h	31 (99)
5	COOEt	CH ₂ CH ₂ OH	11	22	B	20	1 h	36 (100)
6	CH ₂ NHBoc	CH ₂ Ph	10	21	B	55	1 h	32 (100)
7	CH ₂ NHBoc	CH ₂ CH ₂ OH	10	22	B	55	1,5 h	33 (100)
8	CH ₂ NHBoc	β-Gal	10	24	D	20	10 min	34 (98)
9	CH ₂ NHBoc	Ada	10	26	E	20	30 min	35 (100)
10		CH ₂ Ph	12	21	B	50	1 h	37 (100)
11		CH ₂ CH ₂ OH	13	22	B	50	1,5 h	39 (89)
12		CH ₂ Ph	13	21	B	40	1 h	38 (83)
13		CH ₂ Ph	13	21	C	5	15 min	38 (91)
14		CH ₂ Ph	14	21	C	10	15 min	40 (97)
15	β-Glc	CH ₂ CH ₂ OH	15	22	B	100	2 h	41 (100)
16	β-Glc	β-Gal	15	24	F	150	1 h	43 (85)
17	C(CH ₂ O) ₄	α-Man	19	23	G	30	30 min	49 (85)

^[a] Conditions: equimolecular amounts of the alkyne (1 mmol) and azide (1 mmol) and **A**: *t*-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), room temperature; **B**: *t*-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **C**: neat, MW; **D**: *t*-BuOH:H₂O (10:1, 1.90 mL), MW; **E**: *t*-BuOH:H₂O (10:1, 0.6 mL), MW; **F**: H₂O, MW; **G**: DMF, MW.

^[b] Given as mg catalyst/mmol reagent.

^[c] Compound (yield [%]).

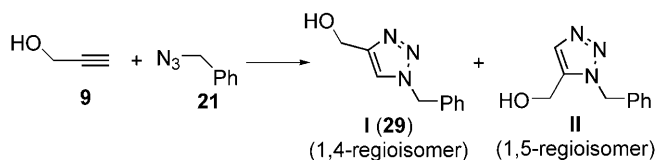
molecular amounts of the clickable reagents without the use of any additives such as reducing agents or nitrogenated bases. The catalytic ability was independent of the chemical nature of the chelating ligand, as all the Cu(I) supported silicas have a similar behaviour and gave similar results when the reactions were performed using the same reagents and reaction conditions. This is clearly illustrated in the coupling of the model propargyl alcohol (**9**) and benzyl azide (**21**), where the corresponding 1,2,3-triazole **29** was obtained in yields ranging from 88 to 96% when the reactions were carried out in aqueous *t*-BuOH under MW irradiation (see Table 1, entries 1 and 4, Table 2, entry 2 and Table 3, entry 2).

The catalytic efficiency of the **Si-Lm-Cu⁺** materials was the same in all tested solvents. Particularly relevant is the fact that the click reactions can be efficiently performed under aerobic conditions using water as solvent when the reagents are hydrosoluble. Moreover, the use of these catalytic systems allows a considerably solvent economy, as exemplified in the case of catalyst **Si-His-Cu⁺** (Table 1, entry 6) and **Si-BPA-Cu⁺** (Table 3, entries 8 and 9). The reactions can even be executed in the absence of a solvent either at room temperature or under MW irradiation when the reagents can be mixed together homogeneously (Table 2, entry 1, Table 3 entries 3, 13 and 14). Although these silica-based CuAAC reactions can be carried out at room temperature, as expected MW assistance reduces considerably the reaction times required.

An additional advantage offered by the use of these hybrid materials as catalysts is the simplicity of the operational procedure since in all cases the triazoles are obtained by direct filtration and evaporation of the solvent without the need of further chromatographic purification. This permits the easy recovery of the catalysts facilitating their reuse. In fact, the recyclability of the silica-based catalyst was tested for the model reaction of alkyne **9** and azide **21** catalyzed by **Si-BPMA-Cu⁺** (see Experimental Section). This heterogeneous catalyst could be reused at least four times in new cycloaddition experiments without any critical loss of activity or yield (97%, 96%, 97% and 94% for the successive runs).

Further experiments also corroborated the robustness of the silica-supported Cu(I) adsorbents as click catalysts. Thus, they exhibited an excellent efficiency when sterically demanding clickable substrates were used as denoted by the quantitative yield obtained in the reaction of the alkyne **10** with the azide adamantane derivative **26** (Table 3, entry 9). Moreover, the preparation of multivalent structures by the concomitant formation of multiple 1,2,3-triazole rings was easily attained by the reaction of clickable derivatives bearing multiple copies of either the alkyne or the azide function as illustrated by the reactions per-

Table 4. Optimization of the **Si-Lm-Cu⁺** catalyst loadings.



Entry	Conditions ^[a]	Catalyst ^[b]	mol% Cu	I:II ^[c]
1	A	Si-BPA-Cu⁺ (30)	1.53	1:0 (96)
2	A	Si-BPA-Cu⁺ (10)	0.51	1:0 (92)
3	A	Si-BPA-Cu⁺ (5)	0.25	1:0 (99)
4	A	Si-BPA-Cu⁺ (2.5)	0.13	1:0 (97)
5	A	Si-BPA-Cu⁺ (1.0)	0.05	n.r.
6	A	Si-His-Cu⁺ (1.0)	0.16	1:0 (93)
7	B	Si-BPA-Cu⁺ (20)	1.02	1:0 (87)
8	B	Si-BPA-Cu⁺ (10)	0.51	6.8:1 (86)
9	B	Si-His-Cu⁺ (10)	1.64	4:1 (89)
10	B	Si-BPA-Cu⁺ (5)	0.25	2.5:1 (94)
11	B	none	–	1.3:1 (83)
12	C	Si-BPA-Cu⁺ (10)	0.51	1:0 (97)
13	C	Si-His-Cu⁺ (5)	0.82	1:0 (85)
14	C	none	–	n.r.

^[a] *Conditions*: equimolecular amounts of the alkyne and azide and **A**: *t*-BuOH:H₂O (10:1), MW, 80 min, 60°C; **B**: neat, MW, 15 min, 60°C; **C**: neat, room temperature, 3 h.

^[b] mg catalyst/mmol reagent.

^[c] (Yield [%]).

formed with compounds **19**, **20**, **27** and **28** (Table 1, entry 6; Table 2, entries 6 and 7; Table 3, entry 17). On the other hand, a series of experiments were also carried out to study the minimum loadings required to maintain the catalytic activity of our supported systems (Table 4). In this regard, progressively reduced amounts of catalyst were used in the model click reaction between alkyne **9** and azide **21** either in solution or under neat conditions. The results obtained showed that catalysis occurs with doses as low as 2.5 and 1.0 mg of **Si-BPA-Cu⁺** and **Si-His-Cu⁺** per mmol of reagent, respectively, (entries 4 and 6) when the reactions were performed in solution. These minimal loadings should be slightly higher when the reactions were performed under neat conditions either at room temperature or with MW irradiation (entries 7, 12 and 13). Below this minimal dose, either no reaction (entry 5) or formation of the thermal 1,5-regioisomer is observed (entries 8–10). Finally, it should be noted that the **Si-Lm-Cu⁺** catalysts are air-stable compounds since their catalytic activity remains intact after long-term air exposure on storage.

Once the feasibility of the silica-based supported Cu(I) adsorbents as click catalysts was clearly established, the capabilities of the polystyrene-supported **Dw-BPMA-Cu⁺** were next investigated in order to determine possible benefits in the use of this hybrid material. This copper-containing matrix was assayed

Table 5. Leaching values of CuAAC reactions catalyzed by supported Cu(I) chelating adsorbents.

Entry	Alkyne	Azide	Conditions ^[a]	Catalyst ^[b]	Leaching		Table.Entry
					ppm Cu in product	% Cu released from initial Cu	
1	9	21	A	Si-BPMA (10)	36	1.9	2.1
2	9	21	B	Si-BPMA (20)	17	0.4	2.2
3	15	24	C	Si-BPA (150)	62	0.5	3.16
4	9	21	A	Dw-BPMA (20)	1500	15	2.8
5	10	21	B	Dw-BPMA (50)	3200	18	2.10
6	9	22	C	Fe₃O₄@Si-BPA·Cu (10)	690	7.4	7.1
7	15	22	C	Fe₃O₄@Si-BPA·Cu (10)	260	8.9	7.4

^[a] *Conditions*: equimolecular amounts of the alkyne (1 mmol) and azide (1 mmol) and **A**: neat, room temperature; **B**: *t*-BuOH:H₂O (10:1, 10 mL), MW; **C**: H₂O (10 mL), MW.

^[b] mg catalyst/mmol reagent.

to click the model alkynes **9** and **10** with benzyl azide **21** where it was demonstrated to have a click catalytic profile either in solution or under neat conditions (Table 2, entries 8–10). A comparison of the reaction outcomes (yield and time) of these assays with those of similar experiments using the homologous **Si-BPMA·Cu⁺** catalyst containing the same BPMA chelating agent (Table 2, entries 1–3) reveals a lower performance of the polymer-based catalyst since decreased yields are obtained with increased reaction times and higher catalyst loadings.

Moreover, coloured green reaction crudes are obtained in spite of the conditioning protocol to which the commercial resin was subjected prior to the Cu(I) immobilization, and chromatographic purification was needed to obtain clear clicked compounds. This different behaviour of both catalytic systems can be tentatively ascribed to the higher particle size for **Dw-BPMA·Cu⁺** with respect to **Si-BPMA·Cu⁺** that determines a lower surface for the former heterogeneous catalyst. From these results, it can be stated that the use of silica-based adsorbents is more advantageous for click catalysis purposes.

In the next phase, the leaching of active copper species from the catalysts to the reaction media was evaluated as this is a key issue in our CuAAC study in the search of protocols that allow the isolation of copper-free clicked compounds (Table 5). The leaching from the silica-based **Si-Lm·Cu⁺** catalysts showed

to be negligible when quantified directly in the reaction crudes. Thus, in the reactions of **9** with **21** and of **15** with **24** the levels of residual copper detected by AAS were very low ranging between 0.4% and 1.9% of the initial amount of copper present in the catalysts employed (Table 5, entries 1–3). However, in the case of the reactions catalyzed by the polystyrene-based **Dw-BPMA·Cu⁺** catalyst the leaching values and contamination of the clicked compounds are surprisingly higher (Table 5, entries 4 and 5). The residual presence of copper in the reaction media in the case of the silica-based catalyst is in accordance with our expectations based on the strong copper affinity of the chelating ligands incorporated to the adsorbents when they were conceptually designed allowing not only for the stabilization of Cu(I) but also for the readsorption of the migrated metal onto the support after the catalytic cycle is complete. The better performance of the **Si-Lm·Cu⁺** catalysts over the **Dw-BPMA·Cu⁺** counterpart on that concerning the leaching of the supported metal is also indicative of an active role for the silica matrix in the adsorption of the copper species which is in agreement with previous observations reported in the literature.^[31]

At this point, a series of assays were designed to prove that the catalytic activity of the supported Cu(I) chelating adsorbents **Si-Lm·Cu⁺** is associated to the stabilization of Cu(I) attained by its heterogenization through complexation with the nitrogenated li-

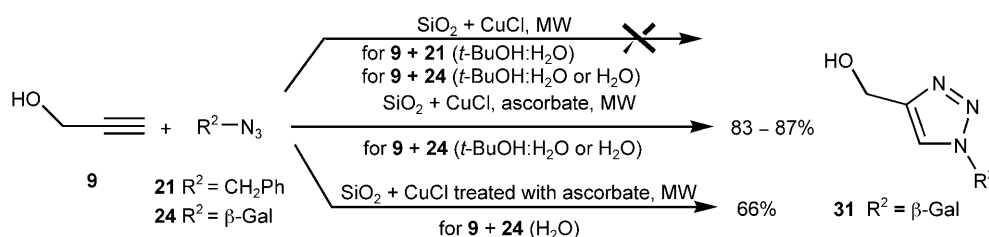
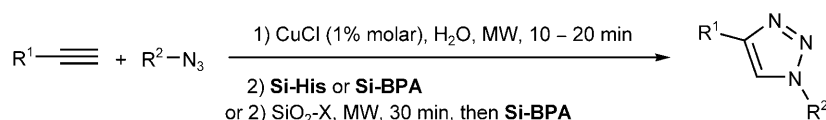
**Scheme 2.** Assays to probe the influence of the Cu(I) stabilization by **Si-Lm** adsorbents in their catalytic activity.

Table 6. Use of **Si-Lm** adsorbents as stand-alone scavenger or in combination with alkyne and azide scavengers.

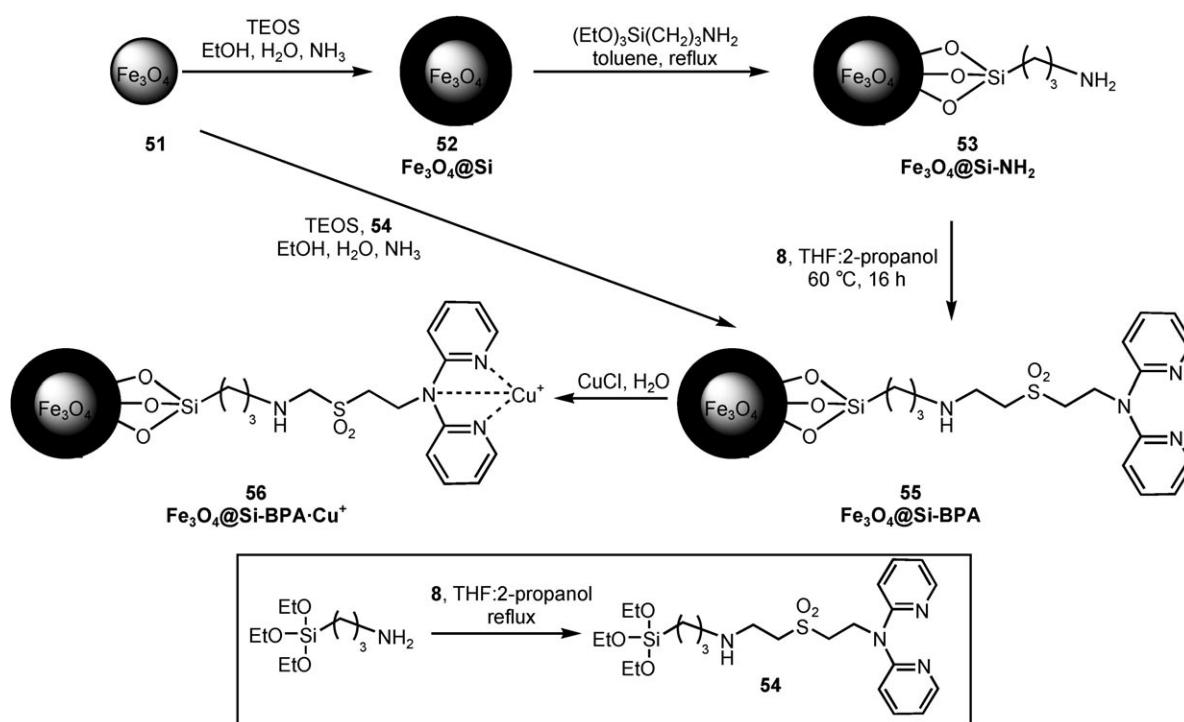
Entry	R ¹	R ²	Alkyne	Azide	Alkyne/Azide	SiO ₂ -X	Compound (yield [%])
1	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	9	22	1.0/1.0	–	30 (86)
2	β-Glc	CH ₂ CH ₂ OH	15	22	1.0/1.0	–	41 (100)
3	Dpp	CH ₂ CH ₂ OH	18	22	1.0/2.0	–	47 (100)
4	Dpp	α-Man	18	23	1.0/2.4	SiO ₂ -C≡CH	48 (99)
5	β-Glc	CD	15	25	2.0/1.0	SiO ₂ -N ₃	44 (100)

gands **Lm** (Scheme 2 and Supporting Information). First, activated silica previously treated with a CuCl solution was added to a mixture of the alkyne **9** with the azides **21** or **24** as indicated in Scheme 2. In these cases, no cycloaddition products were observed in the assayed solvents (*t*-BuOH-H₂O or H₂O). These results suggest a complete oxidation of the Cu(I) to Cu(II) during copper adsorption over the activated silica or under the reaction conditions used for the attempted click reactions. To verify this point, ascorbate was simultaneously added to the activated silica treated with CuCl to act as a reducing agent in the reaction of **9** and **24**. The clicked 1,2,3-triazole **31** was obtained in this way in the MW assisted reaction with an acceptable outcome in relation to that obtained in the case of **Si-BPMA**·Cu⁺ although the leaching levels are higher in this case (28% of the initial amount of copper). Finally, the activated silica containing adsorbed copper was first treated with ascorbate and, after filtration, was directly used in the reaction of **9** with **24** to afford triazole **31** in a reduced yield after a longer reaction time. Overall, these results clearly indicated the catalytic benefits obtained by immobilizing Cu(I) on supported chelating adsorbents that prevents its oxidation to Cu(II).

The excellent complexation attributes of the ligand incorporated to the supported chelating adsorbents also point to the potential of their uncomplexed form to act as copper scavengers. The inherent scavenging capabilities of both **Si-Lm** and **Dw-BPMA** were initially verified by treating a commercial CuCl solution with these materials where we observed a complete removal of the metal present by **Si-BPA** and **Si-His** adsorbents and an almost quantitative elimination by **Dw-BPMA** (see Supporting Information, Table 1S). To demonstrate the scavenging abilities in click reactions, the **Si-Lm** adsorbents were first used in tandem with their complexed forms **Si-Lm**·Cu⁺. The crudes obtained after filtration in the reactions of **9** with **21** and of **15** with **24** when catalyzed respectively by **Si-BPMA**·Cu⁺ and **Si-BPA**·Cu⁺ (Table 2, entry 2, and Table 3, entry 16) were simply mixed with the uncomplexed form of the catalyst, **Si-BPMA** and **Si-BPA**.

Complete removal of the already insignificant metal traces was evident after a new filtration. In this way, the isolation of uncontaminated materials was attained in a facile manner (see Experimental Section).

To explore the scope of the **Si-Lm** supported copper chelating adsorbents as scavengers in CuAAC reactions and further expand their utility as stand-alone copper removing systems, additional assays were carried out (Table 6). First, the scavenging abilities were tested in click reactions performed using a homogeneous click catalyst. Thus, stoichiometric amounts of the alkynes **9**, **15** and **18** with azide **22** were reacted using CuCl^[32] as a source of Cu(I) (Table 6, entries 1–3). After the reaction was completed, the scavenging treatment of the crudes with **Si-BPA** or **Si-His** gave the clicked derivatives **30**, **41** and **47**, respectively, free of any detectable copper contamination. It should be also mentioned that a similar scavenger performance was observed for **Dw-BPMA** in the reaction of **15** with **22** (see Supporting Information, Table 2S). Secondly, bearing in mind that Cu-catalyzed triazole formations are in many cases accomplished using an excess of one of the clickable reagents, particularly, a surplus of the azido building block to avoid C–C coupling reactions of two alkyne moieties, and also the plausible implementation of the **Si-Lm** adsorbents in click reactions under continuous flow conditions,^[24] the dialkynyl derivative **18** and the monoazide derivative of β-cyclodextrin **25** were reacted with an excess of the complementary α-Man azide (**23**) and the β-Glc alkynyl (**15**) derivatives, respectively, using CuCl as catalyst (Table 6, entries 4 and 5). The extra amounts of the unreacted clickable reagents were first removed by using alkyne or azido functionalized silicas^[33] as “click chemistry scavengers” followed by subsequent treatment with **Si-BPA** to eliminate copper species. The use of comparable polystyrene-based functionalized alkyne and azide resins as azide and alkyne scavengers has been previously reported in the literature.^[34] Excellent results were obtained as pure uncontaminated triazoles **48** and **44** were respectively obtained in almost quantitative yields in a expeditious manner due to the simulta-



Scheme 3. Preparation of magnetic nanoparticles-supported Cu(I) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si\text{-BPA}\cdot\text{Cu}^+$.

neous use of MW irradiation that not only assists the click reaction but also speeds up the scavenging process of the clickable reagents. In addition, chromatographic purification is not necessary in this protocol.

Having established the feasibility of the silica-supported copper chelating adsorbents in their complexed and uncomplexed forms as both efficient and robust heterogeneous click catalysts and Cu(I) scavengers, we decided to extrapolate these satisfactory results to the preparation of a magnetic version of those adsorbents for the synergetic exploitation of the inherent properties offered by magnetic heterogeneous catalysts (magnetic recovery and recyclability) with the enhanced Cu(I) complex capabilities of the chelating ligands.

From the various magnetic materials available, magnetite (Fe_3O_4) is one of the iron oxides most commonly used for the preparation of magnetic nanoparticles. For these particles, increasing attention has been paid to develop protection strategies that ensure their chemical stability against agglomeration or precipitation as well as oxidation in air. In particular, coating Fe_3O_4 with a thin layer of silica is an attractive alternative with additional advantages such as the stability under aqueous conditions, the easy surface modification and the facile control of interparticle interactions of the resulting core-shell structures. Taken into account these facts, silica-based magnetite composites were thought to be ideal candidates for the preparation of magnetic supported-Cu(I) catalysts $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si\text{-Lm}\cdot\text{Cu}^+$ through the immobilization on

their surface of chelating ligands Lm that in the present study we restricted to the bispyridylamine ligand (**4**, BPA).

To attain the covalent linkage of BPA onto the surface of magnetite nanoparticles, the two main strategies commonly used to incorporate functionalities onto the surface of silica nanoparticles were envisaged: a) post-synthesis functionalization (*grafting*) and direct synthesis (*co-condensation*) (Scheme 3). For both strategies monodisperse ferrite nanoparticles (**51**) were first easily prepared using a variation of the solvothermal reduction methodology reported by Li et al.^[35] which constitutes a simple, general and inexpensive one-step procedure for the preparation of such materials.

For the grafting strategy, the magnetic ferrite nanoparticles **51** were initially coated with a silica shell using tetraethoxysilane (TEOS) according to a standard sol-gel literature method^[36] and the resulting core/shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ particles (**52**) were next treated with excess of aminopropyltriethoxysilane (APTS) as the surface modification reagent in refluxing toluene to yield the amino functionalized particles $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si\text{-NH}_2$ (**53**). In fact, amino groups are one of the most widely used functional groups on magnetic nanoparticles to allow further modifications.^[37] In our case, the immobilization of the copper chelating ligand BPA was attained by means of the aza-Michael-type addition of the BPA vinyl sulfone derivative **8**, in a similar manner to that used in the preparation of the silica based adsorbents **Si-Lm**, giving an easy access to the

Fe₃O₄@Si-BPA composite (**55**). Alternatively, this functionalized hybrid material was prepared with an identical outcome by the co-condensation strategy by reaction of the magnetic nanoparticles **51** with a mixture of TEOS and the BPA-containing silane **54**, previously prepared by the Michael addition of the vinyl sulfone **8** and aminopropyltriethoxysilane.

Cu(I) was then supported on the **Fe₃O₄@Si-BPA** nanoparticles (**55**) by simple treatment with commercial CuCl solution in deoxygenated water giving the corresponding complex **Fe₃O₄@Si-BPA·Cu⁺** (**56**) that showed metal loadings of 8.3% and 7% for the particles obtained by the grafting and the co-condensation strategies, respectively, according to the quantification performed by atomic absorption spectroscopy (AAS). It should be noted that either strategy involves a multistep transformation of the magnetite silica-coated particles **51** into the new magnetic nanoparticle-supported Cu(I) **56** that can be performed in a one-pot

simplified procedure by taking advantage of the magnetic decantation properties of those composites. A TEM micrograph (Figure 4) confirmed the formation of the expected core/shell structure of the **Fe₃O₄@Si-BPA** nanoparticles showing a thin silica shell (25 nm) and iron oxide cores possessing diameters of about 250 nm. The analysis of the magnetization curves (see Supporting Information) reveals that silica cover influences the magnetic properties and that the **Fe₃O₄@Si** particles show only 80% of magnetic saturation value of the ferrite nanoparticles

The catalytic capabilities of the copper containing magnetic nanoparticles **Fe₃O₄@Si-BPA·Cu⁺** in click reactions were then examined in a representative set of click reactions using similar conditions as in the case of the reactions catalyzed by their non-magnetic counterparts **Si-Lm·Cu⁺**. The results summarized in Table 7 (entries 1–6) show that these magnetic supported-Cu(I) nanoparticles **56** have also an excellent catalytic profile identical to that of the **Si-Lm·Cu⁺** catalysts. Thus, the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles were isolated in almost quantitative yields using precise equivalent amounts of the clickable reagents and low catalyst loading (10 mg per mmol of clickable reagent) in very short reaction times when the click ligation was assisted by MW irradiation or in acceptable periods when the reaction is performed at room temperature. The suitability of this magnetic-supported Cu(I) catalyst in click reactions is further reinforced by its extremely easy manipulation and recovery, which can be efficiently performed by magnetic decantation in accordance with the pursued goal of gaining in simplicity and recyclability. In fact, the recycling efficiency was investigated in the case of the reaction of alkyne **10** with azide **21** (Table 7, entry 3) where no discernible loss of catalytic activity was detected after three cycles, the resulting triazole **32** being isolated in almost quantitative yields after each run (see Experimental Section). In addition, the use

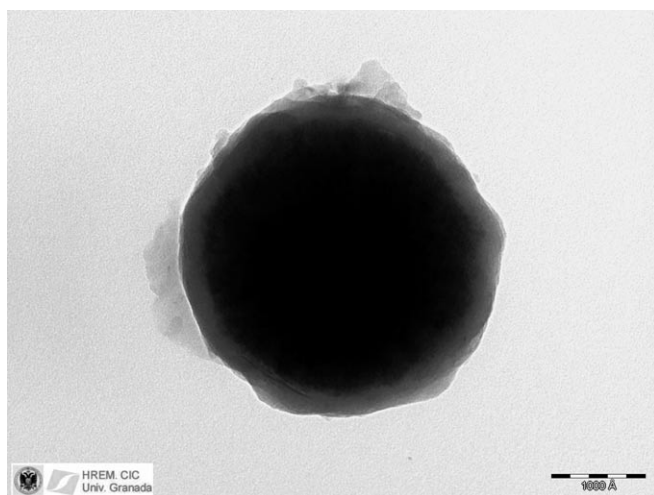


Figure 4. TEM image of core/shell magnetite silica composite-supported Cu(I) click catalyst **56**.

Table 7. CuAAC reactions using magnetic composite **Fe₃O₄@Si-BPA·Cu** (**56**) as heterogeneous catalysts (entries 1–6) and blank assays using **Fe₃O₄@Si-BPA** (**55**) (entries 7 and 8).

Entry	R ¹	R ²	Alkyne	Azide	Composite	Conditions ^[a]	Time	Compound ^[b]
1	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	9	22	56	A (10)	10 min	30 (99)
2	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	56	B (10)	15 h	29 (99)
3	CH ₂ NHBoc	CH ₂ Ph	10	21	56	C (20)	15 min	32 (99)
4	β-Glc	CH ₂ CH ₂ OH	15	22	56	A (10)	10 min	41 (96)
5	β-Glc	α-Man	15	23	56	A (10)	15 min	42 (98)
6	N(CH ₂) ₃	CH ₂ Ph	20	21	56	C (10)	10 min	50 (100)
7	CH ₂ OH	CH ₂ Ph	9	21	55	B (10)	24 h	n.r. ^[c]
8	CH ₂ NHBoc	CH ₂ Ph	10	21	55	C (20)	2 h	(10) ^[d]

^[a] Conditions: equivalent amounts of alkyne and azide and **A**: H₂O (10 mL), MW, 60 °C; **B**: neat, room temperature; **C** *t*-BuOH:H₂O (10:1, 1 mL), MW, 60 °C; In parenthesis mg catalyst/mequiv reagent.

^[b] Compound (yield [%]).

^[c] No reaction.

^[d] A mixture of the 1,4-regioisomer (**32**) and the corresponding 1,5-regioisomer was isolated in this case.

of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-BPA-Cu}^+$ as heterogeneous catalyst allows the use of minimal amounts of an aqueous alcohol or even water when the reagents are hydrosoluble. Moreover, the reactions can be executed in the absence of any solvent when the reagents can be mixed together reducing the use of organic solvent to very small amounts for allowing the magnetic decantation and recovery of the catalyst. On that concerning the leaching of active copper species from the catalyst to the reaction media, the copper content of the crudes obtained in the reaction of alkynes **9** and **15** with azide **22** was evaluated by AAS showing disappointing values of 7.4 and 8.9% of the initial metal present in the catalyst (Table 5, entries 6 and 7). This observation reinforces additionally the hypothesis pointed out above about the synergistic role played by the silica matrix in the non-magnetic **Si-Lm** adsorbents on the decreasing of the leaching.

In a similar fashion as in the case of the non-magnetic **Si-Lm-Cu**⁺ catalysts, additional experiments were carried out to demonstrate that the catalytic activity is exclusively related to complexed Cu(I) present in the magnetic catalyst **56**. Two blank experiments were performed using uncomplexed $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si-Lm}$ particles (**55**) in the clicking of alkynes **9** and **10** with azide **21**. As expected, no cycloaddition reaction was detected when the reaction was performed under neat conditions and long reaction times (Table 7, entry 7) and a mixture of the 1,4- and 1,5-regioisomers was isolated in very low yield when MW irradiation was used (Table 7, entry 8) proving that thermal cycloaddition is operative in the last case.

Conclusions

In summary, supported chelating adsorbents containing multidentate nitrogenated ligands with strong copper(I) affinities are easily accessible in both non-magnetic and magnetic forms and are shown to be versatile materials in click chemistry for the implementation of eco-friendly protocols that allow the isolation of metal-free clicked compounds. These adsorbents were prepared from silica or silica-coated magnetite nanoparticles by the incorporation of the chelating ligands through a variety of efficient strategies based on the aza-Michael-type addition of vinyl sulfone to amines. The copper complexation abilities of these materials enable them to play a dual role as heterogeneous click catalytic systems when used in their complexed form and also as efficient copper scavengers in their uncomplexed form. In the first instance, the novel non-magnetic and magnetic Cu(I)-supported hybrid materials proved to be robust and efficient heterogeneous catalysts that are able to both promote click reactions by using extremely low doses with negligible copper leaching, particularly in the case of the

silica-based non-magnetic adsorbents, and exploit the attractive characteristics inherent to catalytic heterogenization: rapid and easy removal by filtration or magnetic decantation together with recyclability properties. This excellent catalytic profile is due to the stabilization of Cu(I) mediated by its complexation. In the second case, the non-magnetic uncomplexed copper chelating adsorbents are efficient scavengers that can operate in tandem with the Cu(I) complexed materials or as stand-alone copper removing system to eliminate the copper contamination from any CuAAC reaction media. These materials open new opportunities for the preparation of greener clicked compounds. Further work is in progress for the implementation of these supported-Cu(I) chelating adsorbents in CuAAC reactions using flow conditions.

Experimental Section

General

Unless otherwise noted, commercially available reagents [TEOS, (3-aminopropyl)trimethoxysilane, compounds **1–4**, **9**, **11–14**, **20**, **26** and Cu(I)Cl solution (*ca.* 14%)], and solvents were used as purchased without further purification. The Dowex M-4195 resin was purchased from Supelco and subjected to a conditioning treatment. The vinyl sulfone propyl silica gel **5**,^[28] the aminopropyl silica gel **6**,^[29] the alkynes **10**,^[38] **15**,^[39] **16**,^[40] **17**,^[41] **18**,^[42] and **19**,^[43] the azides **21**,^[44] **22**,^[45] **23**,^[46] **24**,^[47] **25**,^[48] **27**,^[49] and **28**,^[50] and the alkyne and azido functionalized silicas^[33] used as click scavengers were prepared according to reported procedures in literature. 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. Microwave assisted reactions were performed in a Milestone Star Microwave Labstation at 500 W until thin layer chromatography and IR spectra showed complete disappearance of the starting materials. Flash column chromatography was performed on Merck silica gel (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 (300–400–500 MHz) spectrometer. *J* values are given in Hz. MALDI-TOF and NALDI-TOF mass spectra were recorded on an Autoflex Bruker spectrometer using HCCA and NaI, respectively, as matrix. Electrospray ionization (ESI) mass spectra were recorded on an LCT Premier Spectrometer. Cu content was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) using a spectrophotometer Perkin-Elmer AA-analyst100. XRD diffraction pattern was collected on a PW101710/00 Philips diffractometer with CuK α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) and analyzed with XPOWDER®.

Preparation of Silica-Supported Chelating Adsorbent Si-PMA

Vinyl sulfone silica **5**^[28] (1.0 g) was suspended in THF-2-propanol (1:1, 25 mL). 2-Picolylamine (**1**) (108 mg, 1.0 mmol) was then added. The reaction mixture was heated at 60 °C for 16 h. Filtration and successive washing with dichloromethane (500 mL) and ether (500 mL) furnished the corresponding functionalized silica **Si-PMA** that was dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h; yield: 0.98 g.

Preparation of the Silica-Supported Chelating Adsorbent Si-His

Vinyl sulfone silica **5**^[28] (1.0 g) was suspended in a solution of THF-2-propanol (1:1, 25 mL) containing histamine·2HCl (184 mg, 1.0 mmol) and Et₃N (420 μL, 3.0 mmol). The reaction mixture was heated at 60 °C for 16 h. Filtration and successive washing with dichloromethane (500 mL) and ether (500 mL) furnished the corresponding functionalized silica **Si-His** that was dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h; yield: 0.98 g.

Preparation of the Silica-Supported Chelating Adsorbents Si-BPMA and Si-BPA

Amino propyl silica gel **6**^[29] (1 g) was suspended in THF-2-propanol (1:1, 50 mL). The corresponding vinyl sulfone ligand derivative **7** or **8** (1.0 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 60 °C for 16 h. Filtration and successive washing with dichloromethane (500 mL) and ether (500 mL) furnished the corresponding functionalized silicas that were dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h; yields: 1.12 g for Si-BPA and 1.11 g for Si-BPMA.

Preparation of the Cu-Supported Silica Catalysts Si-Lm-Cu⁺

De-ionized water (30 mL) was first deoxygenated with argon and functionalized silicas **Si-PMA**, **Si-His**, **Si-BPMA** or **Si-BPA** (1.0 g) and commercial copper(I) chloride solution (1.7 mL) were added. The resulting suspension was magnetically stirred at room temperature for 7 h. Filtration and extensive washing with water and ether yields the corresponding Cu-supported silica catalysts **Si-PMA·Cu⁺**, **Si-His·Cu⁺**, **Si-BPMA·Cu⁺** and **Si-BPA·Cu⁺** that were dried under vacuum (1 mm Hg) at 50 °C for 16 h; yields: 1.10 g for **Si-PMA·Cu⁺**, 1.11 g for **Si-His·Cu⁺**, 1.14 g for **Si-BPMA·Cu⁺** and 1.09 g for **Si-BPA·Cu⁺**. The Cu contents were evaluated by AAS: 5.28% for **Si-PMA·Cu⁺**, 10.42% for **Si-His·Cu⁺**, 2.44% for **Si-BPMA·Cu⁺** and 3.24% for **Si-BPA·Cu⁺**.

Preparation of the Cu-Supported Dowex M4195 Catalysts Dw-BPMA·Cu⁺

The as-received resin Dowex M-4195 (5.0 g) was first conditioned by washing successively with DMF (2 × 50 mL) and water (2 × 50 mL) under MW irradiation (15 min 80 °C). After filtration, the resin (1.0 g) was suspended in de-ionized water (30 mL) deoxygenated with Argon and then commercial copper(I) chloride solution (1.7 mL) was added. The suspension was magnetically stirred at room temperature for 7 h. Filtration and extensive washing with water and ether

yields the **Dw-BPMA·Cu⁺** catalyst. The Cu content was evaluated by AAS: 7.08%.

General Procedure for the Synthesis of 1,2,3-Triazoles Catalyzed by Cu-Supported Silica Catalysts Si-Lm-Cu⁺ or Dw-BPMA·Cu⁺

A neat mixture or a solution in *t*-BuOH-H₂O (10:1 or 2:1) or H₂O of equivalent amounts of the corresponding alkyne **9–20** (1 mmol) and azido derivatives **21–28** (1 mmol) was reacted at room temperature or by MW irradiation at 60 °C after the addition of the Cu-supported catalyst **Si-PMA·Cu⁺**, **Si-His·Cu⁺**, **Si-BPMA·Cu⁺**, **Si-BPA·Cu⁺** or **Dw-BPMA·Cu⁺** (the amounts of solvent and catalyst are indicated in Table 1, Table 2, and Table 3). The reactions were followed by TLC until complete disappearance of the starting materials (reaction times are indicated in the tables). Filtration of the catalyst was then directly performed in the case of the reactions in solution or after the addition of CH₂Cl₂ (10 mL) in the case of the neat reactions. Evaporation of the solvent under vacuum afforded the pure 1,2,3-triazoles in the yields indicated in the tables.

Assay to Prove the Recyclability of the Si-Lm-Cu⁺ Catalysts

Alkyne **9** (1.0 mmol) and azide **21** (1.0 mmol) in *t*-BuOH-H₂O (10:1, 10 mL) were reacted by MW irradiation at 60 °C for 20 min after the addition of **Si-BPMA·Cu⁺** (30 mg) as catalyst. After centrifugation and separation of supernatant solution, the **Si-BPMA·Cu⁺** catalyst was washed with the reaction solvent and reused in a second cycle of an identical solution of the clickable reagents. The procedure was repeated until a fifth cycle. Evaporation of the corresponding crude solutions obtaining in each cycle gave the triazole **29** in yields 97, 96, 97 and 94%.

Procedure for Copper Removal Using Si-BPMA or Si-BPA as Scavenger in Reactions Catalyzed by Si-BPMA·Cu⁺ or Si-BPA·Cu⁺

The solution obtained after filtration in the reactions of alkyne **9** or **15** with azide **21** or **24**, using **Si-BPMA·Cu⁺** or **Si-BPA·Cu⁺**, respectively (Table 2, entry 2 and Table 3, entry 16) that contains the triazole **29** or **43** and 0.4 ppm of Cu as detected by AAS, corresponding to leaching from the heterogeneous catalyst, was treated in batch for 6 h with **Si-BPMA** or **Si-BPA** (25 mg), respectively. The solution was then filtrated and the copper contamination was evaluated by AAS giving a negative result in both cases. Evaporation of the solution gave copper-free **29** and **43** in similar yields that those obtained in the reactions where the scavenging treatment was not performed.

Procedure for Copper Removal using Si-His or Si-BPA as Scavenger in Reactions Catalyzed by CuCl

A water solution (10 mL) of equivalent amounts of alkynes **9**, **15** or **18** (0.7 mmol) with azide **22** (0.7 mmol for the reaction with **9** and **15**, and 0.14 mmol for the reaction with **18**) (Table 6, entries 1–3) was reacted using a commercial solution of CuCl (1% mol, 5 μL for the reaction with **9** and **15**, and 10 μL for the reaction with **18**) under MW irradiation

for 10 min. Copper content was evaluated by AAS (45 ppm for the reaction with **9** and **15**, and 90 ppm for the reaction with **18**). The reaction mixture was then filtered through a short column containing **Si-BPA** or **Si-His** (0.25 g for the reaction with **9** and **15**, and 0.5 g for the reaction with **18**). New evaluation of the copper contamination by AAS gave negative results. Evaporation of the solvent under vacuum yield the copper-free 1,2,3-triazoles **30**, **41** and **47** respectively, in the yields indicated in Table 6.

Procedure for the Use of Si-BPA as Copper Scavenger in Combination with Azide and Alkyne Functionalized Silica as Click Chemistry Scavengers

A water solution (10 mL) of alkyne **18** (0.7 mmol) or **15** (1.4 mmol) and azide **23** (1.68 mmol) or **25** (0.7 mmol) was respectively reacted using a commercial solution of CuCl (1% mol, 10 μ L or 5 μ L) under MW irradiation for 10–20 min (Table 6, entries 4 and 5). Alkyne silica (0.93 g) or azide silica (0.2 g)^[33] was respectively added to the crude of each reaction and reacted under MW irradiation for 30 min to remove excess of the complementary clickable reagent. Copper content was then evaluated by AAS (90 ppm and 45 ppm, respectively). The reaction mixture was then filtered through a short column containing **Si-BPA** (0.5 g and 0.25 g, respectively). New evaluation of the copper contamination by AAS gave negative results. Evaporation of the solvent under vacuum yield the copper-free 1,2,3-triazole **44** and **48**, respectively, in the yields indicated in Table 6.

Preparation of Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles (**51**)

The magnetite nanoparticles were prepared by a modification of the procedure described by Li et al.^[35] FeCl₃ (815 mg, 5 mmol) was dissolved in ethylene glycol (40 mL) to form a clear solution. After the addition of NaOAc (3.6 g) the reaction mixture was vigorously stirred for 30 min and then heated at 200°C by means of an oil bath for 8 h. After cooling, ethanol (30 mL) was added and the resulting magnetite nanoparticles were collected using a magnet. The particles were washed successively with EtOH (4 \times 30 mL), water (4 \times 30 mL) and absolute EtOH (30 mL), and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50°C for 16 h giving **51**; yield: 0.446 g.

Preparation of Silica-Coated Magnetite Nanoparticles Fe₃O₄@Si-BPA (**55**)

Grafting method: Magnetite nanoparticles **51** (0.1 g) were coated with silica by the Stöber method by suspending them in a mixture of EtOH (300 mL), water (80 mL) and ammonia (10 mL) and subsequent addition of TEOS (1.0 mL). The mixture was stirred under orbital stirring for 24 h at room temperature. The resulting silica-coated particles were collected using a magnet, washed successively with EtOH:H₂O 1:1 (6 \times 50 mL) and EtOH (50 mL), and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50°C for 16 h giving **52**; yield: 0.125 g. These nanoparticles were suspended in dried toluene (25 mL) and then (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTS) (0.120 mL) was added. The reaction mixture was heated under reflux for 3 h. The resulting functionalized silica-coated magnetite particles **53** (Fe₃O₄@Si-NH₂) were collected by using a magnet and washed with EtOH:H₂O

1:1 (3 \times 30 mL) and EtOH (30 mL) and used directly for the next step by suspension in THF-2-propanol (2:1, 10 mL). The vinyl sulfone ligand derivative **8** (30 mg, 0.1 mmol) was added to this suspension and the reaction mixture heated at 60°C for 16 h. Magnetic separation of the new particles using a magnet and successively washing with THF-2-propanol (2:1, 2 \times 30 mL), dichloromethane (2 \times 30 mL), EtOH (2 \times 30 mL) and water (30 mL), furnishing the magnetic chelating nanoparticles **55** (Fe₃O₄@Si-BPA); yield: 0.125 g.

Co-condensation method: Magnetite nanoparticles **51** (0.1 g) were suspended in a mixture of EtOH (300 mL), water (80 mL) and ammonia (10 mL). After addition of TEOS (1.0 mL) and **54** (53 mg) the reaction mixture was stirred under orbital stirring for 24 h at room temperature. The resulting silica-coated particles were collected using a magnet, washed successively with EtOH:H₂O 1:1 (6 \times 50 mL) and EtOH (50 mL), and dried under vacuum (1 mm Hg) at 50°C for 16 h giving the magnetic chelating nanoparticles **55** (Fe₃O₄@Si-BPA); yield: 0.115 g.

Preparation of Magnetic Cu(I)-Supported Catalyst Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺ Nanoparticles (**56**)

Silica-coated magnetite nanoparticles Fe₃O₄@Si-BPA (**55**) were suspended in de-ionized water (3 mL) previously deoxygenated with argon. Commercial copper (I) chloride solution (0.3 mL) was added and the resulting mixture stirred under orbital stirring at room temperature for 16 h. Magnetic separation of the particles using a magnet and successive washing with water (10 \times 30 mL), EtOH (2 \times 30 mL) gave the corresponding magnetic nanoparticles supported-Cu(I) **56** (Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺) that were dried under vacuum (1 mm Hg) at 50°C for 16 h.

General Procedure for the Synthesis of 1,2,3-Triazoles Catalyzed by Magnetic Cu(I)-Supported Catalyst Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺

A neat mixture or a solution in *t*-BuOH-H₂O (10:1) or H₂O of equivalent amounts of the corresponding alkynes (**10**, **15** and **20**) and azido derivatives (**21–23**) (Table 7) was reacted at room temperature or by MW irradiation at 60°C after the addition of the Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺ catalyst **56** (the amounts of solvent and catalyst are indicated in Table 7, entries 1–6). The reactions were followed by TLC until complete disappearance of the starting materials (reaction times are indicated in Table 7, entries 1–6). The catalyst was collected using a magnet directly in the case of the reactions in solution or after the addition of CH₂Cl₂ (10 mL) in the case of the neat reactions. After washing the catalyst with the reaction solvent (10 mL), evaporation of the assembled solutions under vacuum yielded the pure 1,2,3-triazoles **29**, **30**, **32**, **41**, **42** and **50** in the yields indicated in Table 7 (entries 1–6) without any chromatographic purification.

Assay to Prove the Recyclability of the Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺ Catalyst

Alkyne **10** (1 mmol) and azide **21** (1 mmol) were reacted as described above (Table 7, entry 3) using Fe₃O₄@Si-BPA-Cu⁺ (20 mg) as catalyst. After collecting the catalyst with a magnet the reaction crude was decanted, the catalyst was washed with the reaction solvent and reused in a second

cycle of an identical solution of the clickable reagents. The procedure was repeated for a third cycle. Evaporation of the corresponding collected solutions obtaining in each cycle gave the triazole **32** in yields 99%, 100% and 97%, respectively.

Supporting Information

Syntheses of **7**, **8** and **53**, assays with supported Cu(I) silica $\text{SiO}_2 + \text{CuCl}$, assays to probe the inherent scavenging capabilities of **Si-His**, **Si-BPA** and **Dw-BPMA**, assays to probe the scavenging capabilities of **Dw-BPMA** in CuAAC reactions, XRD pattern of ferrite nanoparticles, magnetization curves of ferrite nanoparticles and silica coated ferrite nanoparticles, assay with uncomplexed magnetic nanoparticles $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Si-BPA}$ (**55**), analytical and spectroscopic data of 1,2,3-triazoles **29–50**, and ^1H - and ^{13}C NMR spectra for new compounds are available in the Supporting Information.

Acknowledgements

Financial support was provided by Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (CTQ2008-01754) and Junta de Andalucía (P07-FQM-02899). A. M.-F. thanks the Spanish Ministerio de Educacion for a research fellowship (FPU).

References

- [1] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [2] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [3] a) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952; b) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.
- [4] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- [5] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- [6] a) F. Perez-Balderas, M. Ortega-Munoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernandez-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asin, J. Isac-Garcia, F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951; b) P. Appukkuttan, V. P. Mehta, E. V. V. d. Eycken, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1467; c) C. O. Kappe, E. Van der Eycken, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1280.
- [7] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
- [8] a) J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272; b) J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1211.
- [9] J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2212; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2182.
- [10] a) B. H. Lipshutz, B. R. Taft, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8235; b) H. Sharghi, R. Khalifeh, M. M. Doroodmand, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 207.
- [11] a) S. Chassaing, A. S. S. Sido, A. Alix, M. Kumarraja, P. Pale, J. Sommer, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6713; b) P. Kuhn, A. Alix, M. Kumarraja, B. Louis, P. Pale, J. Sommer, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 423.
- [12] K. Yamaguchi, T. Oishi, T. Katayama, N. Mizuno, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10464.
- [13] a) T. Katayama, K. Kamata, K. Yamaguchi, N. Mizuno, *ChemSusChem* **2009**, *2*, 59; b) M. L. Kantam, V. S. Jaya, B. Sreedhar, M. M. Rao, B. M. Choudary, *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2006**, *256*, 273.
- [14] I. S. Park, M. S. Kwon, Y. Kim, J. S. Lee, J. Park, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 497.
- [15] a) T. Miao, L. Wang, *Synthesis* **2008**, 363; b) A. Coelho, P. Diz, O. Caamaño, E. Sotelo, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1179.
- [16] L. Bonami, W. Van Camp, D. Van Rijckegem, F. E. Du Prez, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 34.
- [17] C. Girard, E. Onen, M. Aufort, S. Beauviere, E. Samson, J. Herscovici, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1689.
- [18] T. R. Chan, V. V. Fokin, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1274.
- [19] U. Sirion, Y. J. Bae, B. S. Lee, D. Y. Chi, *Synlett* **2008**, 2326.
- [20] M. Chtchigrovsky, A. Primo, P. Gonzalez, K. Molvinger, M. Robitzer, F. Quignard, F. Taran, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5916.
- [21] H. Sharghi, M. H. Beyzavi, A. Safavi, M. M. Doroodmand, R. Khalifeh, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2391.
- [22] a) D. Horák, M. Babic, H. Macková, M. J. Benes, *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1751; b) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064; c) W. Wu, Q. He, C. Jiang, *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 397; d) A. S. Teja, P.-Y. Koh, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2009**, *55*, 22; e) N. Yan, C. Xiao, Y. Kou, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1179.
- [23] B. S. Lee, M. Yi, S. Y. Chu, J. Y. Lee, H. R. Kwon, K. R. Lee, D. Kang, W. S. Kim, H. B. Lim, J. Lee, H.-J. Youn, D. Y. Chi, N. H. Hur, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3935.
- [24] a) C. D. Smith, I. R. Baxendale, S. Lanners, J. J. Hayward, S. C. Smith, S. V. Ley, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1559; b) M. Fuchs, W. Goessler, C. Pilger, C. O. Kappe, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 323; c) C. D. Smith, I. R. Baxendale, G. K. Tranmer, M. Baumann, S. C. Smith, R. A. Lewthwaite, S. V. Ley, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1562; d) I. R. Baxendale, S. V. Ley, A. C. Mansfield, C. D. Smith, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4017.
- [25] T. Pintauer, K. Matyjaszewski, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1155.
- [26] W. G. Lewis, F. G. Magallon, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9152.
- [27] M. Pagliaro, *Silica-Based Materials for Advanced Chemical Applications*, RSC Publishing, **2009**.
- [28] M. Ortega-Munoz, J. Morales-Sanfrutos, A. Megia-Fernandez, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7189–7197.
- [29] M. Zougagh, J. M. Cano Pavón, A. Garcia de Torres, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1103.

- [30] a) J. K. Romary, J. D. Barger, J. E. Bunds, *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 1142; b) J. Qian, J. L. Tian, L. Feng, W. Gu, X. J. Zhao, S. P. Yan, *J. Coord. Chem.* **2009**, *62*, 3276; c) K. Sirola, M. Laatikainen, M. Lahtinen, E. Paatero, *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *64*, 88.
- [31] a) M. Amara, M. Bettahar, L. Gengembre, D. Olivier, *Appl. Catal.* **1987**, *35*, 153; b) Z. Wang, Q. Liu, J. Yu, T. Wu, G. Wang, *Appl. Catal. A* **2003**, *239*, 87.
- [32] A. E. Wróblewski, I. E. Glowacka, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 4056.
- [33] M. Ortega-Munoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2410.
- [34] a) L. Leeb, P. Gmeiner, S. Lober, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1145; b) J. Rao, Y. Zhang, J. Zhang, S. Liu, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2586.
- [35] H. Deng, X. Li, Q. Peng, X. Wang, J. Chen, Y. Li, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2842; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2782.
- [36] P. Sun, H. Zhang, C. Liu, J. Fang, M. Wang, J. Chen, J. Zhang, C. Mao, S. Xu, *Langmuir* **2009**, *25*, 1278.
- [37] a) M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamura, H. E. Toma, *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *279*, 210; b) A. del Campo, T. Sen, J.-P. Lellouche, I. J. Bruce, *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 33; c) I. J. Bruce, T. Sen, *Langmuir* **2005**, *21*, 7029; d) S. Campelj, D. Makovec, M. Drogenik, *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1346.
- [38] D. L. Boger, C. M. Tarby, P. L. Myers, L. H. Caporale, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2109.
- [39] A. M. Blinkovsky, J. S. Dordick, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1221.
- [40] A. S. Rowan, N. I. Nicely, N. Cochrane, W. A. Wlassoff, A. Claiborne, C. J. Hamilton, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4029.
- [41] F. Santoyo Gonzalez, F. Hernandez Mateo, M. Ortega Munoz, R. Salto Gonzalez, M. D. Giron Gonzalez, N. Sevillano Tripero, (Universidad de Granada, Spain), ES Patent WO 2009004106, **2009**; *Chem. Abstr.* **2009**, 20253.
- [42] M. Ortega-Muñoz, F. Perez-Balderas, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernandez-Mateo, J. Isac-García, F. Santoyo-Gonzalez, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2454.
- [43] F. G. Calvo-Flores, J. Isac-García, F. Hernández-Mateo, F. Pérez-Balderas, J. A. Calvo-Asín, E. Sánchez-Vaquero, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2499.
- [44] S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, *Synthesis* **1997**, 413.
- [45] X. Q. Lu, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4746.
- [46] T. K. Lindhorst, S. Kotter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 823.
- [47] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397.
- [48] L.-f. Zhang, Y.-C. Wong, C. Lei, B. C. Chi, S.-C. Ng, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1815.
- [49] J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12434.
- [50] E. E. Gilbert, (United States Department of the Army, USA), U.S. Patent 84-655,609, **1986**; *Chem. Abstr.* **1987**, 158921.

Synthetic Applications of Cyclic Sulfites, Sulfates and Sulfamidates in Carbohydrate Chemistry

Alicia Megia-Fernandez, Julia Morales-Sanfrutos, Fernando Hernandez-Mateo and Francisco Santoyo-Gonzalez*

Departamento de Química Organica, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071-Granada, Spain

Abstract: Cyclic sulfites, sulfates and sulfamidates derived from saccharides have emerged as valuable and versatile synthons for the preparation of a wide variety of modified sugars and sugar related compounds owing to the combination of the easily and efficient formation of these chemical sulfur derivatives from diols and aminoalcohols with the high chemical stability and enhanced reactivity of those functions towards nucleophiles. The state-of-the-art in this area is covered in the present review using the relative position of the diols and the aminoalcohol functions on the saccharide skeleton and the nature of the nucleophilic reagent (oxygenated nucleophiles, halogens, sulphur nucleophiles, nitrogen nucleophiles, and carbon nucleophiles) as expositive criteria. A comprehensive outlook of the applications of these sulfur derivatives in the preparation of compounds such as azido sugars, halo sugars, thiosugars, pseudo-saccharides, radiotracers, enzymatic inhibitors, anticonvulsant agents, surfactants amongst others is also given.

Keywords: Cyclic sulfites, cyclic sulfates, cyclic sulfamidates, carbohydrates, polyols, diols, aminoalcohols.

1. INTRODUCTION

The chemistry of carbohydrates and polyols is a large and economically important branch of organic chemistry owing to the relevant role that these compounds play not only in biological systems but also as invaluable starting materials for the enantiospecific synthesis of natural products. The wealth of chemical knowledge acquired through time on these compounds has been transferred in many cases to diols, another prominent class of organic compounds that have a particular relevance mainly after the significant developments made on catalyzed asymmetric dihydroxylation of olefins at the end of the last century. Conversely some of the progress made in the chemistry of diols has been forwarded to carbohydrates and polyols as is the case of the chemistry of cyclic sulfite and cyclic sulfates. This beneficial synergy is being extended more recently to the amino alcohols – amino sugars duo by means of the cyclic sulfamidate chemistry.

Cyclic sulfites, cyclic sulfates and cyclic sulfamidates are versatile electrophilic chiral synthons in organic chemistry. Cyclic sulfites (1,3,2-dioxathiolane 2-oxide) (**I**) and cyclic sulfates (1,3,2-dioxathiolane 2,2-dioxide) (**II**) are, respectively, the sulfite and sulfate esters of a 1,2-diol, while cyclic sulfamidate (1,2,3-oxathiazole 2,2-dioxide) (**III**) is the corresponding sulfate ester of a 1,2-aminoalcohol (Fig. (1)). Although the chemistry of cyclic sulfites and cyclic sulfates has been known for long time [1] their synthetic use has gained importance recently since the development of efficient methods for their preparation. The oxidation of cyclic sulfites with catalytic amounts of ruthenium tetroxide and sodium periodate as cooxidant [2] has represented a critical development for an easy access to cyclic sulfates. In addition, the advent of catalytic asymmetric dihydroxylation techniques that provides powerful tools with which to prepare nearly optically pure 1,2-diols from a

wide spectrum of olefins, [3] which can be further elaborated to cyclic sulfates, has represented the second event that broadened the use of cyclic sulfate intermediates in synthesis. On the other hand, the application of cyclic sulfamidates as reactive intermediates for organic synthesis is even more recent than that of cyclic sulfites and sulfates. These compounds play important roles in the synthesis of products which possess heteroatomic functional groups and, again, the reason for their increasing use nowadays is the emergence of several new effective methods for their synthesis [4]. In spite of their recent exploitation in organic synthesis, the synthesis and reactivity of both cyclic sulfites and sulfates [3,5-7] as well as cyclic sulfamidates [4,6] have been already reviewed and the readers are referred to these sources of information for a deeper outlook.

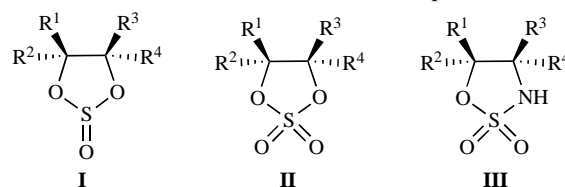


Fig. (1).

Cyclic sulfites and cyclic sulfates are usually regarded as synthetic equivalents of epoxides (one of the most useful functional groups in organic chemistry [8]) because many of the properties of epoxides are shared by cyclic sulfites and sulfates, particularly, their high reactivity as well as the simultaneous protection of adjacent functionalized carbon atoms from nucleophilic attack. However, the significant role of cyclic sulfites and sulfates in organic synthesis originates from other beneficial properties. First, cyclic sulfites and sulfates are superior to epoxides in their reactivity toward various nucleophiles. Second, under more vigorous conditions they have the ability to undergo a second nucleophilic displacement on the adjacent functionalized carbon atom, serving by this way as activators for two sequential reactions. Third, the reactions of five-membered cyclic sulfates with nucleophiles provide two contiguous stereocenters; moreover, a remote stereocenter can be controlled by cyclic sulfates of 1,3- and 1,4-diols. Finally, since the intermediate

*Address correspondence to this author at the Departamento de Química Organica, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071-Granada, Spain; Tel: +34-958248087; Fax: +34-958243186; E-mail: fsantoyo@ugr.es

of nucleophilic substitution is generally the salt form of a monosulfate ester, separation of the product from the nonsalt byproduct is typically a facile process.

The enhanced reactivity toward nucleophilic reagents showed by the carbon atoms in the cyclic sulfate moiety relative to an acyclic sulfate originates from two sources: (i) ring strain and (ii) partial double bond character between the ring oxygen atoms and the sulfur atom. In the case of cyclic sulfites, the presence of an unshared pair of electrons on sulfur partially represses the double-bond character of the sulfur atom and the ring oxygen atoms. Thus, cyclic sulfites and cyclic sulfates display different reactivities. In the nucleophilic substitution of cyclic sulfites, attack at the sulfur atom competes with substitution at carbon; however, in cyclic sulfates this competing reaction is only observed when the carbon centered S_N2 chemistry is severely hindered. On the other hand, the formation of cyclic sulfamidate derivatives of aminoalcohols permits the protection of the nitrogen moiety and the conversion of the hydroxyl group into a leaving group.

Analogous to epoxides, cyclic sulfates and cyclic sulfites can be opened by attack of a nucleophile at either carbon center or at the oxygenated atom in the case of cyclic sulfamidates (Fig. 2). The product, however, is not an alcohol, but a sulfate monoester (IV, $n=2$) in the case of cyclic sulfates and cyclic sulfamidates as substrates. These sulfate monoesters allow some interesting transformations, which make the chemistry of cyclic sulfates more versatile than that of epoxides as indicated above. Naturally, hydrolysis of the sulfate monoesters leads to hydroxyl compounds V that parallel those obtained from oxiranes. However, the sulfate in VI can also function as a leaving group that can be displaced by a nucleophile in a second step allowing an overall substitution of both OH groups of diols leading to disubstitution products VII. However, since a SO_4^{2-} dianion is a much worse leaving group than a $ROSO_3^-$ anion the second displacement is much less facile than the first and has so far only succeeded in an intramolecular fashion.

The present comprehensive review is focused on the specific applications of cyclic sulfites, sulfates and sulfamidates in carbohydrate chemistry. In this context, the synthetic methods for the construction of these sulfur derivatives, their reactivity and stereochemical issues concerning their reactions with nucleophiles are described. Equally, the synthetic applications of these sulfur derivatives in the preparation of a wide variety of compounds such as azido sugars, halo sugars, thiosugars, pseudo-saccharides, radiotracers, enzymatic inhibitors, anticonvulsant agents, surfactants

amongst others is also given. The relative position of the diols and the aminoalcohol functions on the saccharide skeleton and the nature of the nucleophilic reagent are used as a general expositive criterion.

2. CYCLIC SULFITES DERIVED FROM CARBOHYDRATES

In a classical procedure, cyclic sulfites are prepared by the reaction of diols with thionyl chloride [2,9,10]. The presence of a suitable base (triethylamine or pyridine) to scavenge the HCl generated is required for substrates having acid-labile substituents to avoid their cleavage [11] and chlorination [12]. Another way less widespread consists in using N-N'-thionyl diimidazole instead of thionyl chloride [13,14]. Recently, an improved method was reported for the synthesis of 1,2-cyclic sulfite with thionyl chloride, carried out in ionic liquids in the presence of immobilized morpholine [15].

The reactions of nucleophiles with cyclic sulfites are perhaps the most commonly studied reactions and have allowed a wide variety of easy transformations in the carbohydrate chemistry. The most extensive reactivity studies of cyclic sulfites have been done with nitrogen nucleophiles and, among them, the azide anion has been found to be the most reactive towards nucleophilic ring opening of cyclic sulfite sugars.

2.1. 1,2-Cyclic Sulfites

1,2-Cyclic sulfites derived from pentoses and hexoses are usually prepared with the aim of activating the anomeric hydroxyl group in order to facilitate the S_N2 like fashion attack of a suitable nucleophile. By this way, the reactions yield the corresponding 1,2-*trans* glycoside derivatives with a good efficiency.

2.1.1. Reactions with Oxygenated Nucleophiles

The reaction of furanose or pyranose 1,2-cyclic sulfite derivatives with an oxygenated nucleophile has been applied as a glycosylation methodology for accessing the corresponding *O*-glycosides. A variety of different nucleophiles (phenoxides, alkoxides, acyloxy and enolates) has been used with this purpose (Scheme 1). Thus, Aouad *et al.* [16] reported a one-pot *O*-aryl glycosylation procedure for the synthesis of β -*O*-arylglycosides derivatives 2 of protected D-gluco and unprotected D-xylopyranose by the stereoselective reaction of their 1,2-cyclic sulfite derivatives 1 with lithium phenoxide salt. Different aliphatic alcohols (cyclohexanol, allyl alcohol and benzyl alcohol) were used by Sanders *et al.* [17] for the preparation

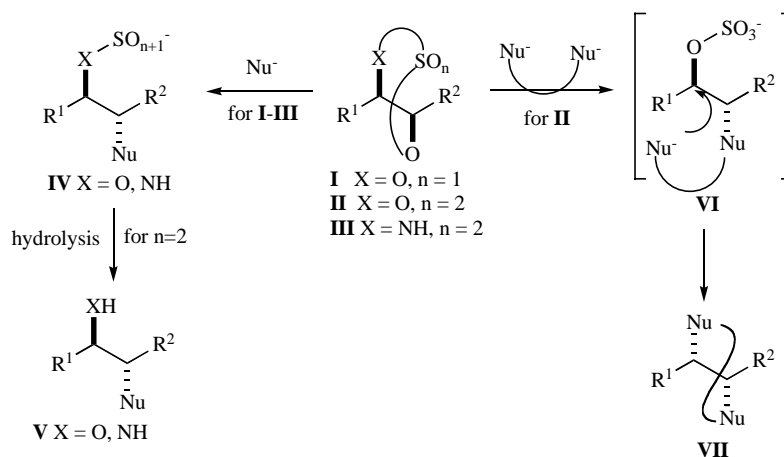
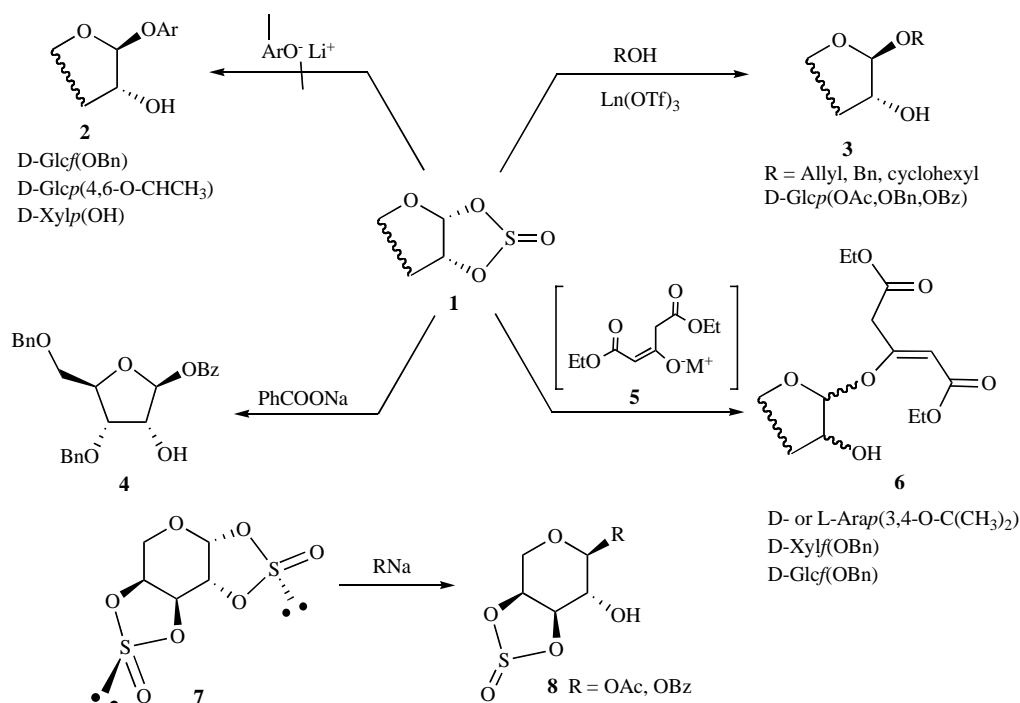


Fig. (2).



Scheme 1.

of the β -*O*-glycosides **3** starting from protected α -D-glucopyranoside 1,2-cyclic sulfite as glycosyl donor in a reaction catalyzed by lanthanide (III) triflate. This method provides a free hydroxyl group at the C-2 position which can be exploited in further transformations. Guiller *et al.* [18] used the ion benzoate as nucleophile in the reaction of 1,2-cyclic sulfite derivative of D-ribose for the synthesis of 1-*O*-benzoyl-3,5-di-*O*-benzyl- β -D-ribofuranose **4**. The reactivity of 1,2-*O*-sulfinyl monosaccharide derivatives towards an enolate anion was studied by Benksim *et al.* [19]. The nucleophilic ring opening of 1,2-*O*-sulfinyl-glycofuranoses and pyranoses with the corresponding stabilized enolate anion **5** formed *in situ* from diethyl 3-oxoglutarate was shown to be regio- and stereospecific at the anomeric centre leading to 3-(glycosyloxy)-pent-2-ene diacid diethyl ester **6** in excellent yields.

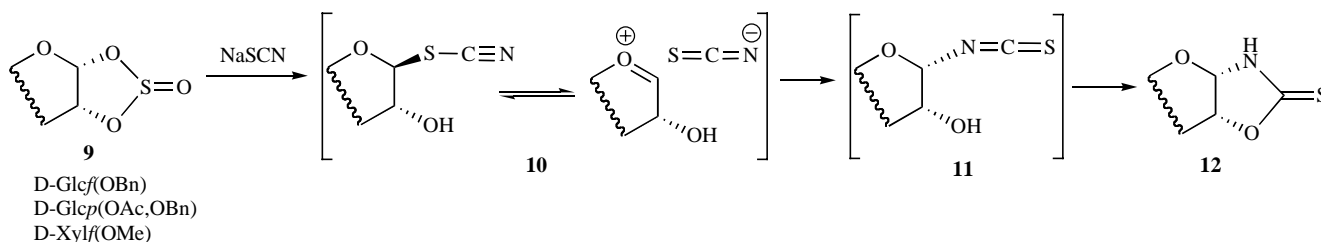
On the other hand, the synthetic use of 1,2:3,4-cyclic disulfites described by Gagnieu *et al.* [20] merits a particular mention. L-arabinose was directly transformed in excellent yield into a diastereomeric mixture of 1,2:3,4-cyclic disulfites of β -L-arabinopyranose. The pure diastereomer **7** (Scheme 1) was reacted with sodium acetate and benzoate affording the corresponding 1-*O*-acyl-3,4-cyclic sulfite α -L-arabinopyranose derivative **8**. By this way the selective nucleophilic opening attack at the anomeric position allowed the 3,4-cyclic sulfite ring to act as a protective group giving an easy access to partially protected arabinose derivatives (see also Section 2.3.1.).

2.1.2. Reactions with Sulphur Nucleophiles

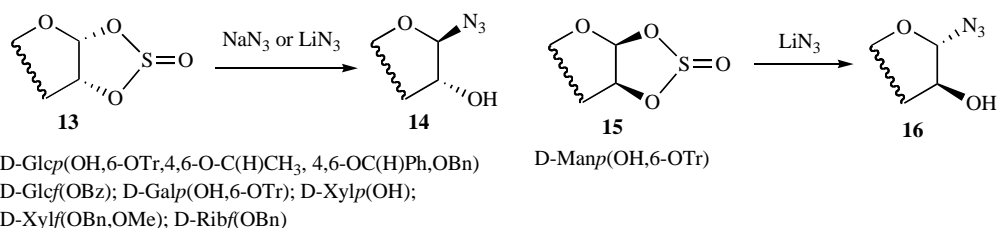
Use of sulfur nucleophiles in the reactions with 1,2-cyclic sulfite sugars has been scarce. In fact, only Beaupere *et al.* [21] reported the use of sodium thiocyanate as a new route to *cis*-1,2-fused glyco-oxazolidine-2-thione **12** when starting from 1,2-*O*-sulfinyl- α -D glycopyranose and furanose derivatives **9** (Scheme 2). In the proposed mechanism, the key step that explains the 1,2-*cis* structure is the isomerisation of the β thiocyanate intermediate **10** into the corresponding α -isothiocyanate derivative **11** and the subsequent intramolecular addition.

2.1.3. Reaction with Nitrogen Nucleophiles

The azide anion has been found to be the most reactive towards the nucleophilic ring opening of 1,2-cyclic sulfites derived from sugars (Scheme 3). Thus, *trans*-1,2-glycosyl azides **14** with a free hydroxyl at C-2 were obtained by Guiller *et al.* [18] when starting from protected D-Glc, D-Xyl and D-Rib derivatives **13**. El Meslouti *et al.* [14] extended this methodology to partially protected or unprotected aldoses in a one-pot procedure. The treatment of D-Glc, D-Gal, D-Xyl and D-Man derivatives **13** and **15** with *N,N'*-thionyl-diimidazole and then lithium azide leads stereoselectively to 1,2-*trans*-glycosylazides **14** and **16**. For D-Man and D-Gal the opening was followed by a hydrolysis with aqueous NaHCO₃ to cleave the non-anomeric cyclic sulfite formed in the first step. On the other hand the β -L-arabinopyranose 1,2:3,4-cyclic disulfites **7**



Scheme 2.



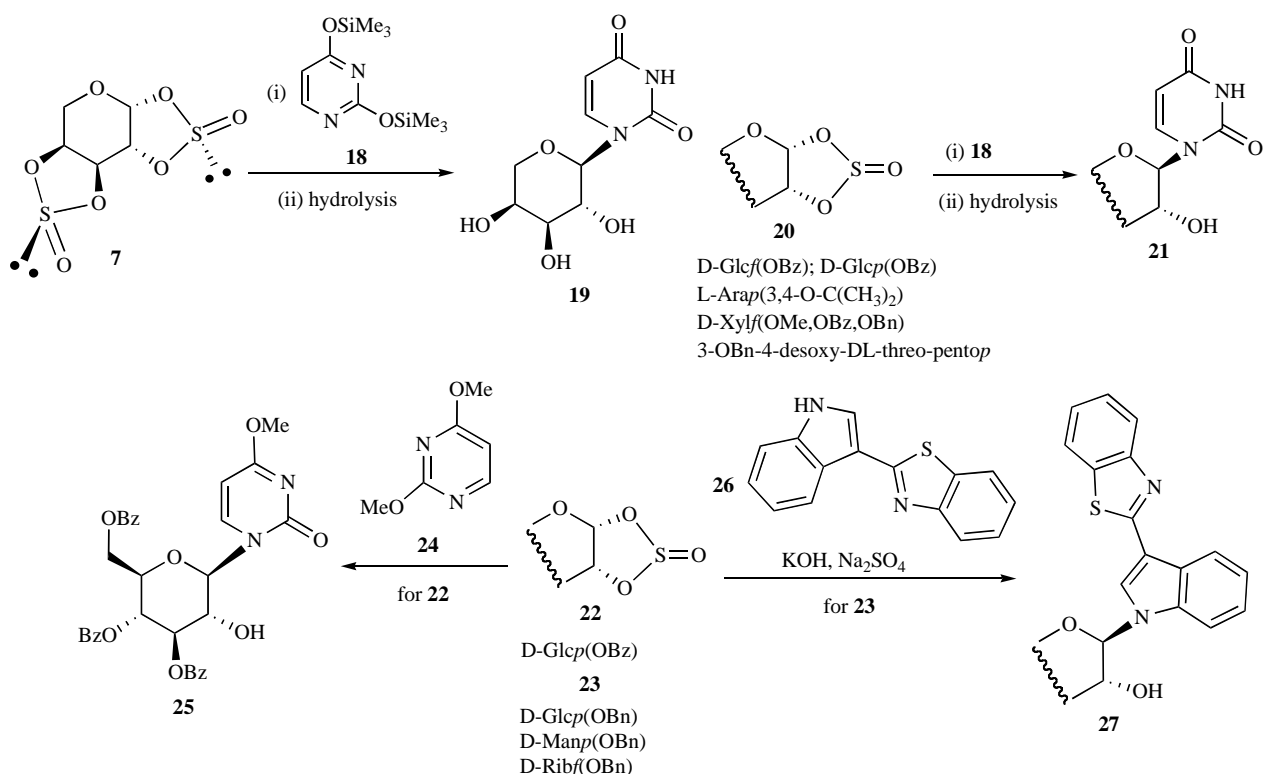
Scheme 3.

[20] commented above gave 1,2- *trans*-arabinopyranosyl azide **17** when treated with sodium azide. Again, in this case the 3,4-cyclic sulfite acts as a suitable protective group.

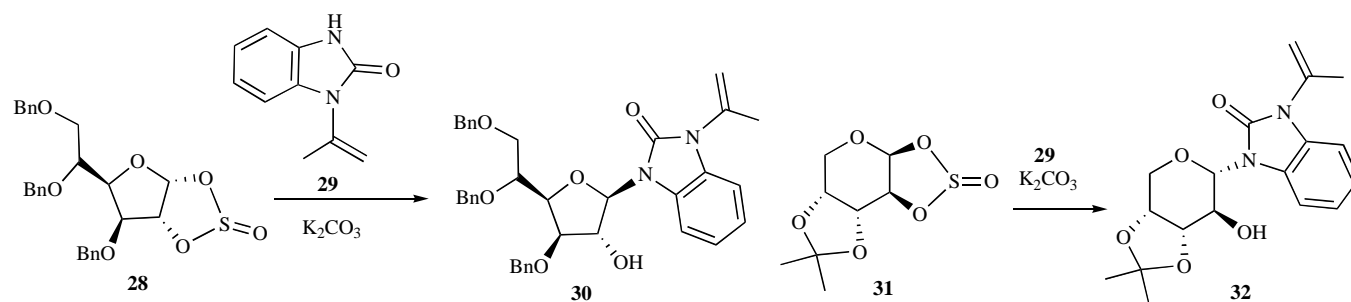
Nucleoside analogs have also been easily accessed by the reactions of 1,2-cyclic sulfites derived from sugars with appropriate nitrogen nucleophiles (Scheme 4). Thus, the disulfite derivative **7** mentioned above was employed by Gagnieu *et al.* [20] as an adequate substrate for the synthesis of 1-(α -L-arabinopyranosyl)uracil **19** which was obtained by ring opening with bis(trimethylsilyl)uracil **18** and subsequent hydrolysis. These same authors employed [22] this methodology in other sugar series utilizing protected 1,2-cyclic sulfites **20** to obtain nucleosides **21** unprotected at O-2. They also improved the synthesis with a direct preparation employing 2,4-dimethoxypyrimidine **24** as nucleophile instead of bis(trimethylsilyl)uracil avoiding the hydrolysis step and obtaining the O-2' unprotected nucleoside **25** when starting from the 1,2-cyclic sul-

fit **22**. The synthesis of other nucleoside analogs was performed by Humenik *et al.* [23] using 1,2-cyclic sulfites as glycosyl donors in the key glycosylation step. Coupling of benzocamalexin **26** with 1,2-cyclic sulfites **23** resulted in moderate to excellent yields of glycosylbenzocamalexin derivatives **27** (Glc, Man and Rib).

On the other hand, 1,2-cyclic sulfites were used by Lakhri *et al.* [24] in the synthesis of new benzimidazolone derivatives with surfactant properties (Scheme 5). Benzimidazolone **29** is well known for its large range of biological activities and industrial applications. The nucleophilic ring opening of 1,2-cyclic sulfites derived from α -D-glucofuranose **28** and β -D-arabinopyranose **31** was performed using the potassium form of the benzimidazolone anion, and producing the 1,2-*trans* sugar derivatives **30** and **32**. The linkage of the sugar moiety to benzimidazolone enhances the water solubility of this heterocyclic compound.



Scheme 4.



Scheme 5.

Finally, the reaction of 1,2-cyclic sulfite **33** with sodium cyanate was reported by Roussel *et al.* [25] in a study directed to the preparation of 1,2-fused cyclic carbamates sugar derivatives of glycopyranosyl- and furanosyl-amines (Scheme 6). These compounds have attracted a wide interest due to their biological activity as potential components of some aminoglycoside antibiotics. The reaction of 1,2-cyclic sulfites **33** with sodium cyanate afforded the *trans* oxazolidine-2-one isomers **37** as the major compound together with the *cis* isomer **38** in a ratio dependent on the reaction conditions. Access to these two isomers could be explained by the formation of the α - and β -isocyanates **35** and **36** from the original β -cyanate obtained in the opening of the cyclic ring through an oxycarbenium intermediate **34** in a similar fashion to that described above in the reactions with sodium thiocyanate (see Scheme 2).

2.1.4. Reaction with Other Nucleophiles

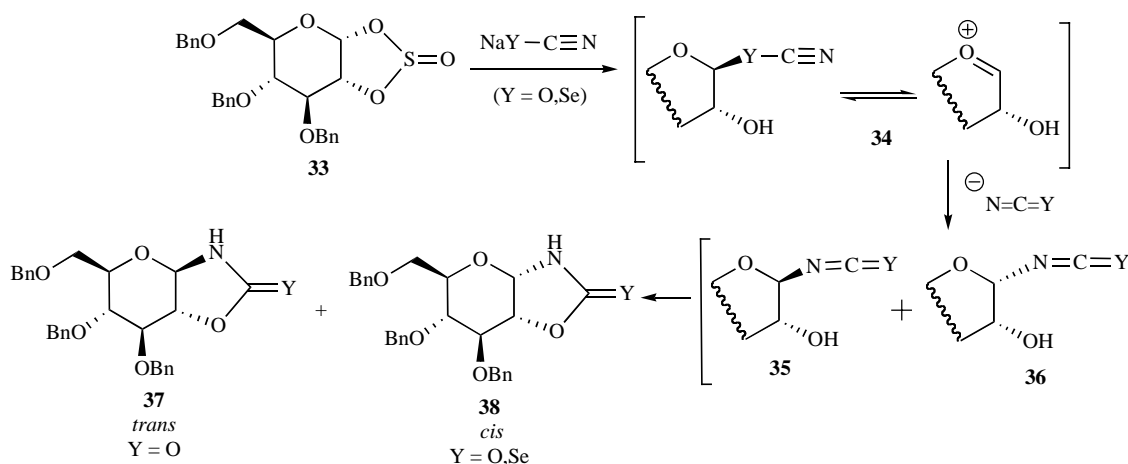
Other nucleophiles such as selenocyanate and cyanide have been occasionally used in the reactions with 1,2-cyclic sulfites derived from carbohydrates. Unlike sodium cyanate [25] and in a similar fashion to that observed in the reaction with thiocyanate [21] (Section 2.1.2), potassium selenocyanate furnished stereoselectively the *cis*-1,2-fused gluco-oxazolidine-2-selenone **38** through the β/α isomerization of the initially formed β -selenocyanate

(Scheme 6). Benksim *et al.* [26] reported the reaction of 1,2-*O*-sulfinylglycose derivatives **39** and **41** with sodium cyanide as a new procedure for cyanoglycosylation (Scheme 7). These glycosides are one of the most important types of C-glycoside intermediates owing to their easy transformation into the corresponding C-1 aminomethyl and carboxylic acid derivatives. The reactions occurred by stereospecific displacement at the anomeric center and are best performed with sodium cyanide in the presence of ytterbium triflate to give the 1,2-*trans* cyanosugars **40** and **42**.

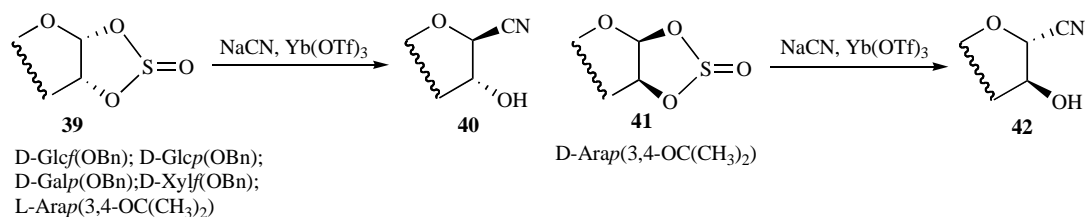
2.2. 2,3-Cyclic Sulfites

2.2.1. Reaction with Nitrogen Nucleophiles

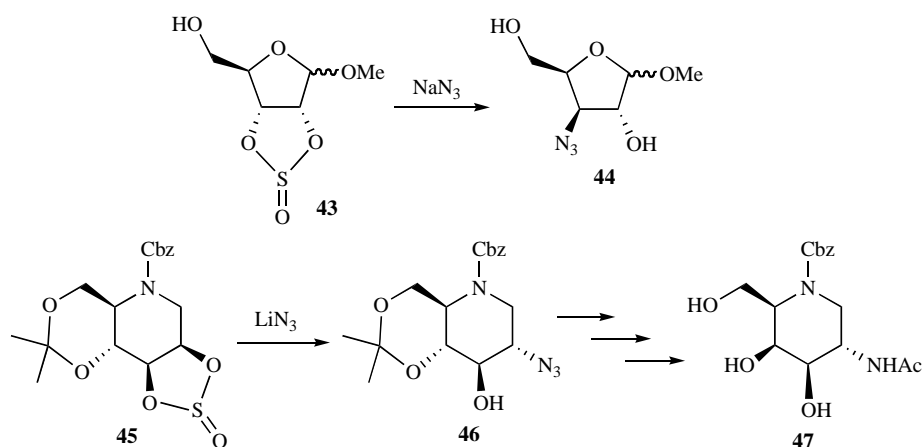
Up to the present, only two studies have reported the use of 2,3-cyclic sulfites derived from sugars with azide ion as nitrogen nucleophile (Scheme 8). The reaction of sodium azide with the α and β methyl furanoside derivatives **43** occurred regioselectively yielding the vicinal azido-alcohol **44** as reported by Guiller *et al.* [27]. In addition, the introduction of the azido group by opening of the 2,3-cyclic sulfite derivative of 1-deoxynojirimycin derivative **45** was used by Schueller *et al.* [28] as the key step in the synthesis of aminonojirimycin **47**. The treatment of this cyclic sulfite derivative with lithium azide allowed the introduction of an equatorial 2-azide



Scheme 6.



Scheme 7.



Scheme 8.

group in the corresponding derivative **46** with high regioselectivity, which was subsequently transformed into the mentioned azasugar **47**.

2.3. 3,4-Cyclic Sulfites

2.3.1. Reaction with Nitrogen Nucleophiles

Similarly to the case of 2,3-cyclic sulfites, the opening of 3,4-cyclic sulfites derived from sugars has been only performed with sodium azide. Guiller *et al.* [27] reported an excellent regioselectivity in the reaction of methyl 3,4-*O*-sulfinyl- β -L-arabinopyranoside **48** with azide ion leading to the 4-azido isomer **49** as the only product with a *trans* configuration. The opposed regioselectivity is observed in the opening of 3,4-cyclic disulfite in nucleoside **50** [20], obtained after the reaction of 1,2:3,4-cyclic disulfite **7** mentioned above (Section 2.1.1.) with bis(trimethylsilyl)uracil. The reaction with sodium azide of the remaining cyclic sulfite in compound **50** followed by benzoylation gave the 3,4-*trans* diaxial nucleoside derivative **51** in a moderate yield.

2.4. 3,5-Cyclic Sulfites

2.4.1. Reaction with Oxygen and Nitrogen Nucleophiles

The 3',5'-cyclic sulfite derivatization of xylo-nucleosides has been exploited by Takatsuki *et al.* [29] for an easy access to 3'-substituted ribo-nucleosides in a stereo- and regioselective way (Scheme 10). In the reported cases, the 3',5'-*O*-sulfinyl group acts simultaneously as a protective-group of the 5' position and as a good leaving group for the 3' position. This behavior allowed to these authors to perform the synthesis of 2,2'-anhydronucleosides **53** when starting from the cyclosulfinyl uridines and thymidines **52a**. On the other hand, cyclosulfinyl cytidines **52b** were trans-

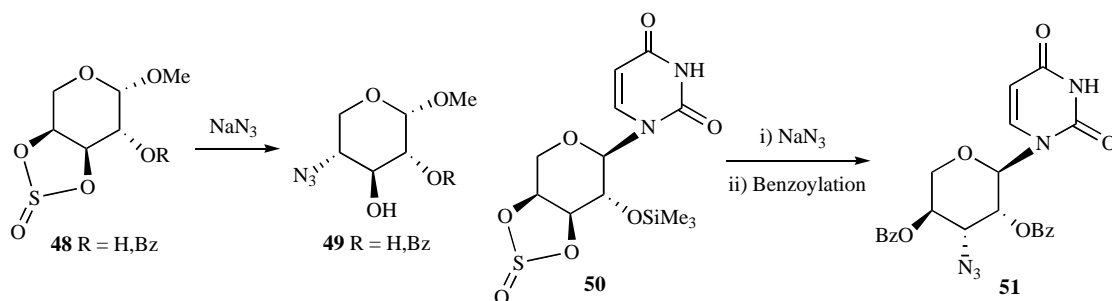
formed by this procedure into ribo-cytosines **54**. In both cases, the 2',3'-epoxide derivative is proposed as the primary intermediate, which is formed through the intramolecular O-nucleophilic attack from the α -side of the hydroxyl group present at the 2' position. This epoxide is opened in an ulterior step by the intramolecular attack of the oxygen atom of the pyrimidine base giving 2,2'-anhydronucleosides. Carbonate anion can participate producing an intermolecular attack to give ribo-cytosine **54**. In order to prove this hypothesis, this epoxide intermediate was isolated in good yield by the authors in the case of the adenoside derivative **55**.

Concerning the opening with nitrogen nucleophiles, the treatment of 3',5'-*O*-sulfinyl-xylo-adenosine **52c** with benzylisocyanate gave in a first instance the 2'-carbamate derivative keeping intact the sulfinyl and the amino groups. Subsequent treatment of this compound with KHCO_3 yielded the 3'-cyclization product **56**, which is an intermediate in the synthesis of puromycin (Scheme 10).

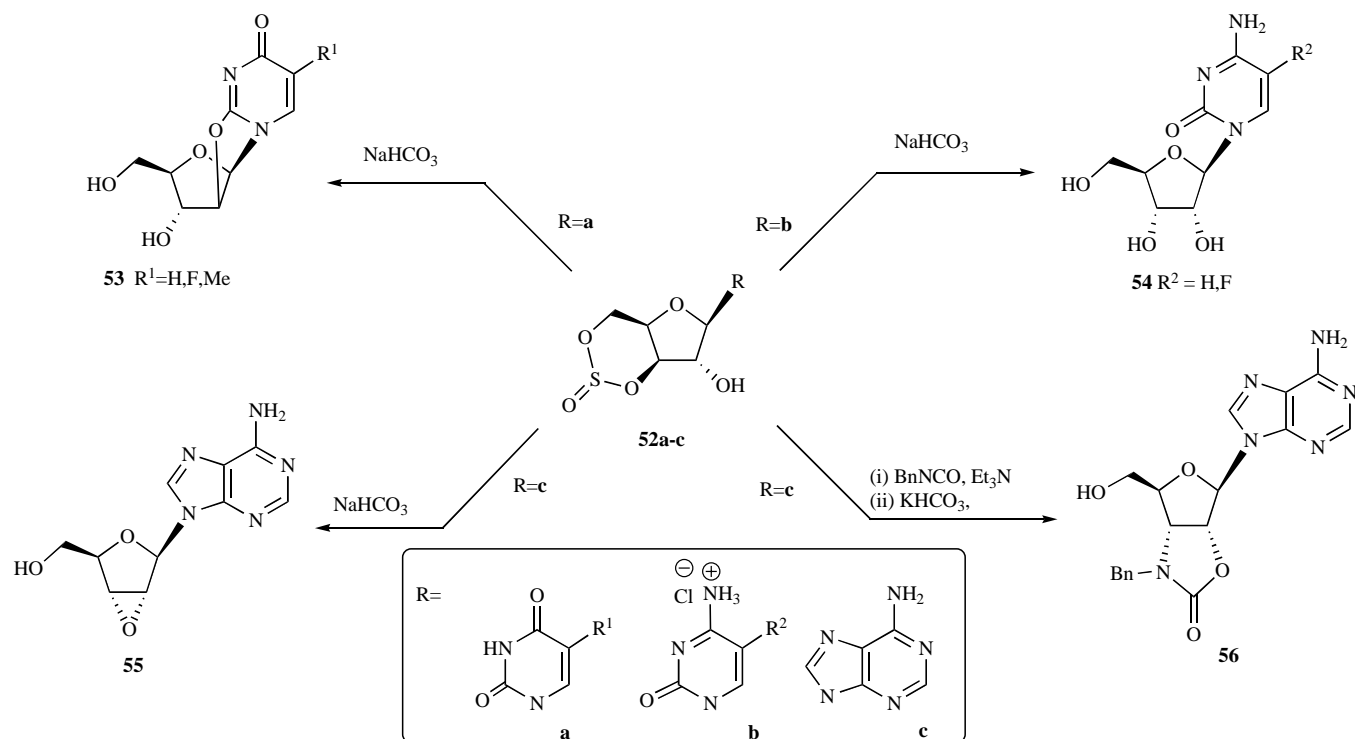
2.5. 4,5- and 4,6 Cyclic Sulfites

2.5.1. Reaction with Nitrogen Nucleophiles

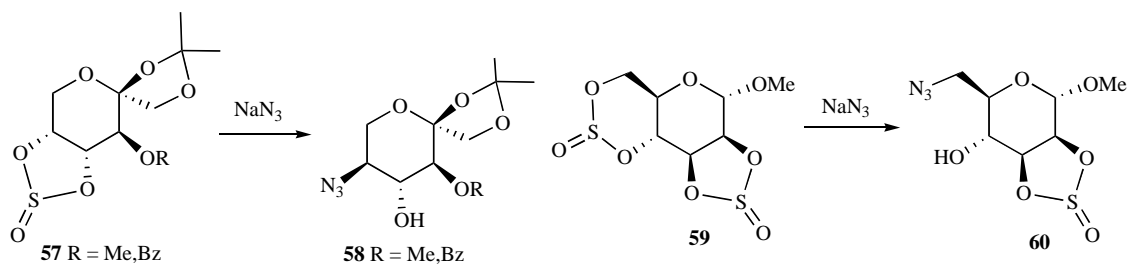
Up to the present, Guiller *et al.* [27] have been the only workers reporting on the synthesis and reactivity of cyclic sulfite derivatives of sugars at the 4,5 and 4,6-position with nitrogen nucleophiles (Scheme 11). Thus, the 4,5-cyclic sulfite derived from 2-hexulose **57** was subjected to an azidation reaction by treatment with sodium azide. In spite of cyclic sulfites being less reactive than other groups as epoxides, the regioselectivity achieved in this reaction was excellent yielding the 5-azido derivative **58** as the only isomer. Concerning 4,6-cyclic sulfites derived from sugars, these same authors used [27] the 2,3:4,6-disulfite of methyl- α -D-mannopyranoside **59**. Similarly to other disulfite carbohydrate de-



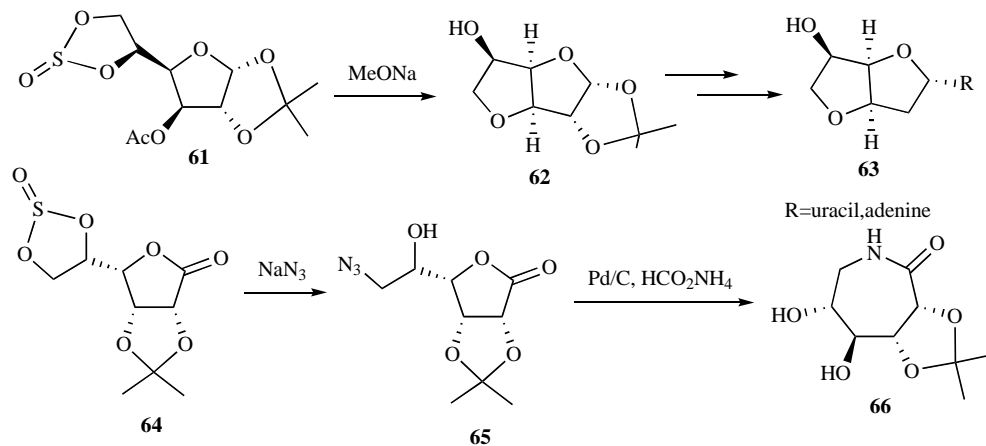
Scheme 9.



Scheme 10.



Scheme 11.



Scheme 12.

rivatives, the five member C-2,3 and the six member C-4,6 cyclic sulfite rings of this compound showed a different reactivity when treated with sodium azide yielding exclusively the 6-azido-6-deoxy-2,3-cyclic sulfite derivative **60** as a result of the selective attack of the azide ion at the primary position.

2.6. 5,6-Cyclic Sulfites

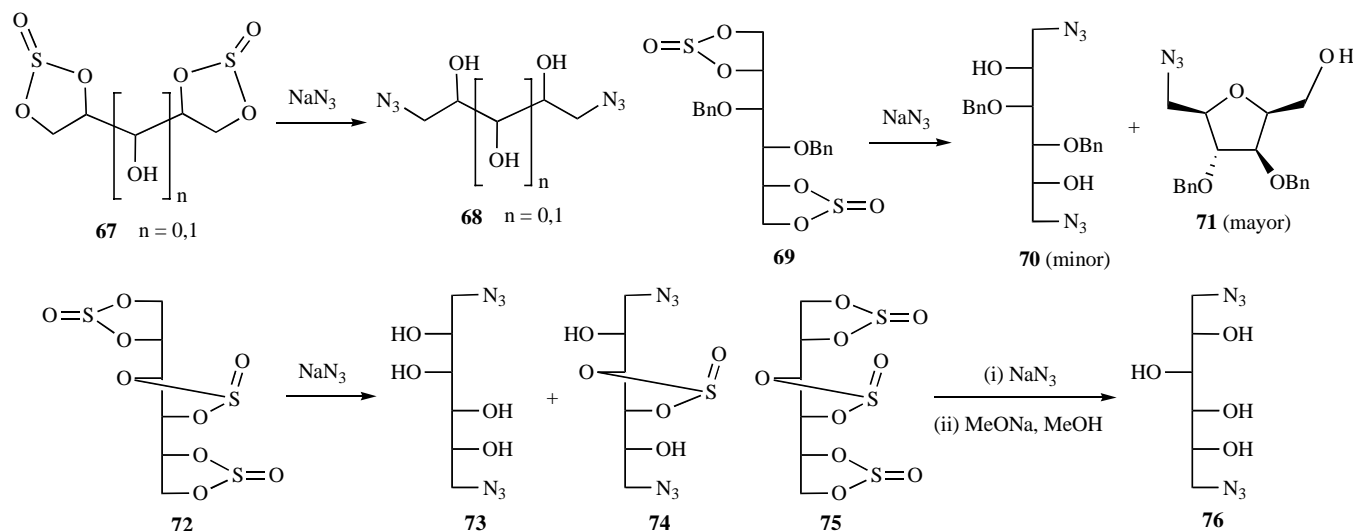
2.6.1. Reactions with Oxygenated and Nitrogen Nucleophiles

5,6-Cyclic sulfites of furanose derivatives have been reported as adequate starting materials for the preparation of bicyclic nucleosides and azasugar analogues by means of reaction with oxygenated and nitrogenated nucleophiles (Scheme 12). Thus, Pineda-Molas *et*

al. [30] described the synthesis of the cyclic sulfite **61** and its use for the preparation of the bicyclonucleoside **63** that was exploited for accessing analogues of the anti-HIV agents ddC and ddA. The intramolecular ring opening of the cyclic sulfite sugar was produced by the alkoxide generated at the C-3 position under basic conditions, leading to the 3,6-anhydroglucofuranose **62** that was further transformed in the bicyclonucleoside **63**. Moreover, seven-member azasugars were obtained by Gireaud *et al.* [31,32] via 5,6-cyclic sulfites. Azasugars are compounds of considerable interest because many of them show specific inhibition against glycosidases and glycosyltransferases, being potential therapeutic agents for viral, proliferative and metabolic diseases. The reported synthetic route to 6-amino-6-deoxy-D-gulono-1,6-lactam **66** starts from D-gulono-1,4-lactone that was transformed into the corresponding 5,6-cyclic sulfite **64** in order to activate the primary hydroxyl group for the introduction of the azido function at the C-6 position. The one-pot reduction of the azido group of the resulting 6-azido-6-deoxy derivative **65** and the subsequent N-heterocyclization by catalytic hydrogen transfer gave the desired lactam **66**. This strategy was also applied to the L-gulono-1,4-lactone analogue.

2.7. Miscellaneous

Cyclic sulfite chemistry has also found applications in the field of polyols with different purposes by using nitrogen nucleophiles for the opening of the sulfite ring. Firstly, Glacon *et al.* [33] reported on the behavior of bis- and tris-cyclic sulfite derivatives of a variety of polyols in azidation reactions (Scheme 13). Thus, the α,ω -diazidoalditol derivatives **68** were efficiently synthesized from bis-cyclic sulfites **67** derived from acyclic polyols with erythro, threo, xylo, ribo and D-arabino configuration. In the case of the azidation of the bis-*O*-sulfinyl mannitol derivative **69**, the 2,5-anhydro-6-azido-6-deoxy-derivative **71** with D-Glc configuration was obtained as the major compound in excellent yield through a tandem azidation-2,5-*O*-heterocyclization together with minor amounts of the corresponding diazido derivative **70**. The tris-cyclic sulfites, derived from D-mannitol **72** led to a mixture of the 1,6-diazido derivative **73** and the 1,6-diazido-3,4-*O*-cyclic sulfite **74** in proportions depending on the reaction conditions. However, the tris-cyclic sulfite derived from D-glucitol **75** gave exclusively the 1,6-diazido-1,6-dideoxy-D-glucitol **76** when the azidation was followed by methanolysis. In both cases where tris-cyclic sulfites were used the inner 3,4-cyclic sulfite do not suffers azidation.



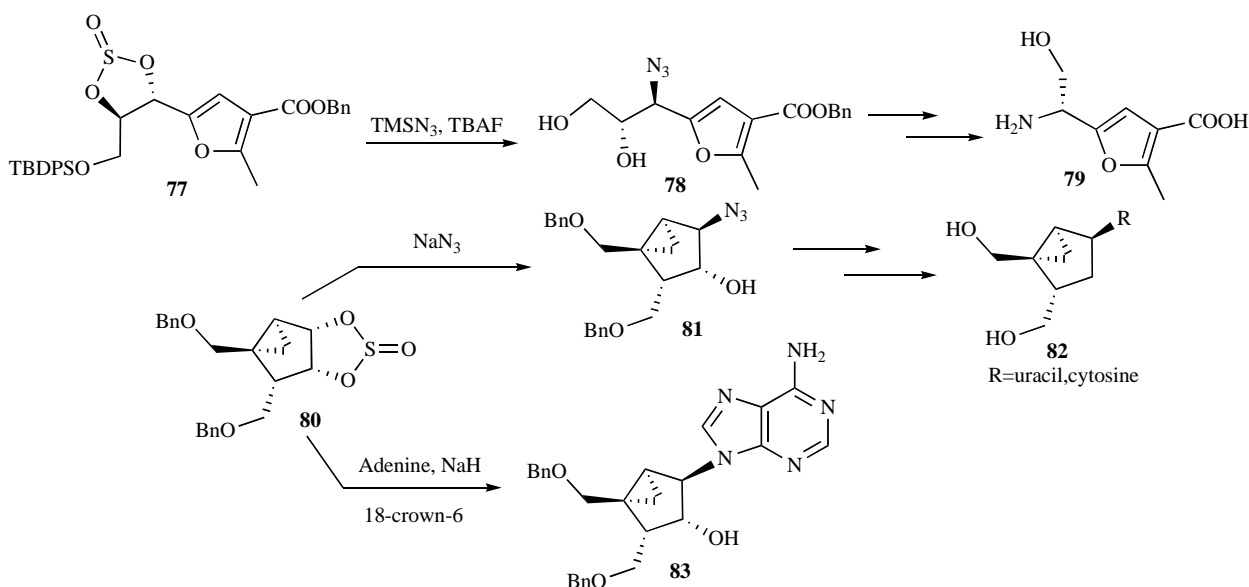
Scheme 13.

With the aim of obtaining chiral amino acid analogues of D- and L-serine from D-aldopentoses, Molina *et al.* [34] employed cyclic sulfites as intermediates (Scheme 14). This methodology implies the nucleophilic displacement on the cyclic sulfite **77** to give stereoselectively the azido derivative **78** which was later transformed into the chiral furan amino acid **79** analogue of D-serine. A similar strategy also allowed the synthesis of L-serine analogue. Finally, the cyclic sulfite chemistry also allowed the development of a general useful alternative approach to carbocyclic nucleosides (Scheme 14). Two different approaches have been reported by Marquez *et al.* [35,36] on the synthesis of several cyclopropyl-fused carbocyclic nucleosides where the cyclic sulfite acts as a *pseudo*-glycosyl donor. The reaction of compound **80** with sodium azide provided the carbocyclic azide **81**, which gave access to the uracil and cytosine analogues **82** following a linear approach. On the other hand, the direct reaction of **80** with the sodium salt of adenine provided an efficient convergent approach to adenine analogues **83** by the regioselective ring-opening reaction of the cyclic sulfite.

3. CYCLIC SULFATES DERIVED FROM CARBOHYDRATES

Cyclic sulfates are usually prepared from diols in good to high yields by the two-step procedure diol \rightarrow cyclic sulfite \rightarrow cyclic sulfate. The oxidation of cyclic sulfite to cyclic sulfate was originally carried out with permanganate [37]. In 1981 Denmark *et al.* [13] and in 1983 Lowe *et al.* [38] reported the use of a stoichiometric amount of ruthenium (IV) tetroxide (RuO_4) which allowed a cleaner oxidation. However, cyclic sulfates are commonly obtained by mild oxidation of the sulfite parents using Gao and Sharpless' conditions [2]. This method employs NaIO_4 as the stoichiometric reoxidant for RuO_4 of which catalytic quantities are sufficient. Cyclic sulfates have also been prepared directly from diols by treatment with sulfonyl chloride (SO_2Cl_2) [39] or 1,1'-sulfonyldiimidazol [40] but only moderate yields were obtained.

Attempts to synthesize cyclic sulfates of unprotected sugars with SO_2Cl_2 and pyridine were reported [41,42]. However, the reaction was not clean and several side products were isolated. Recently, Norman *et al.* [15] developed and improved a methodology for the direct synthesis of 1,2-cyclic sulfate furanosides with sulfonyl chloride by means of using ionic liquids in the presence of immobilized morpholine.

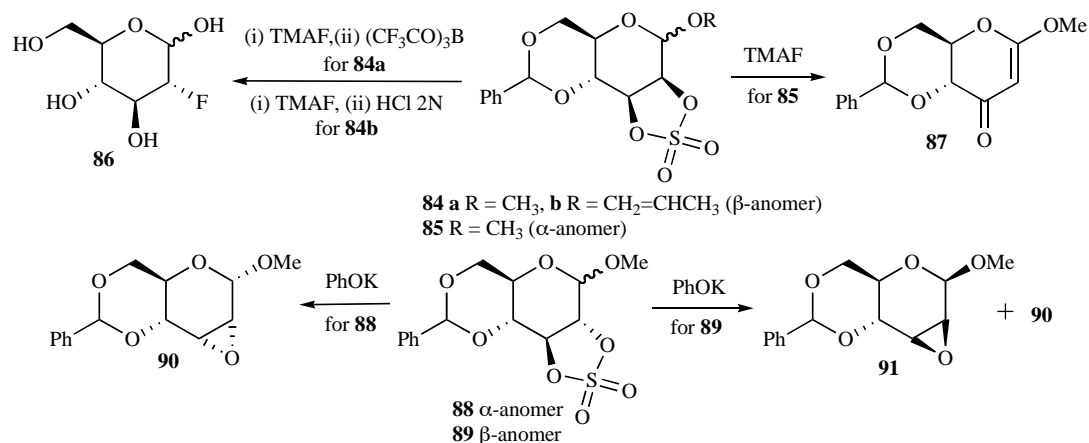


Scheme 14.

3.1. 2,3-Cyclic Sulfates

3.1.1. Reaction with Halides and Oxygenated Nucleophiles

Tewson *et al.* [39,40] developed a new procedure for the synthesis of both [F^{19}] and [F^{18}] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose **86** based in the use of methyl and 1-propenyl 4,6-*O*-benzylidene- β -D-mannopyranoside-2,3-cyclic sulfates **84a,b** (Scheme 15). [F^{18}]-2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose is a useful radiopharmaceutical substance for studying glucose metabolism. Due to the short half-life of fluorine-18 (1.8 h) the reactions for the incorporation of this radionuclide into organic molecules must proceed rapidly in good yields and be amenable to a rapid workup procedure. The cyclic sulfates reacted rapidly and efficiently with tetramethylammonium fluoride (TMAF) in a regio- and stereospecific fashion at C-2. The removal of the glycosidic methyl group required the use of boron tris(trifluoroacetate) for a rapid reaction while the 1-propenyl derivative could be hydrolysed under mild acid conditions. The cyclic sulfate **84a** was also reacted with tetramethylammonium hydroxide (TMAOH) and bromide (TMABr). The reactions were clean but slower than with the fluoride. Under similar conditions the methyl α -D-glycoside sulfate **85** suffered an elimination reaction leading to the α,β -unsaturated ketone **87** instead of the fluoro substituted derivative (Scheme 15).

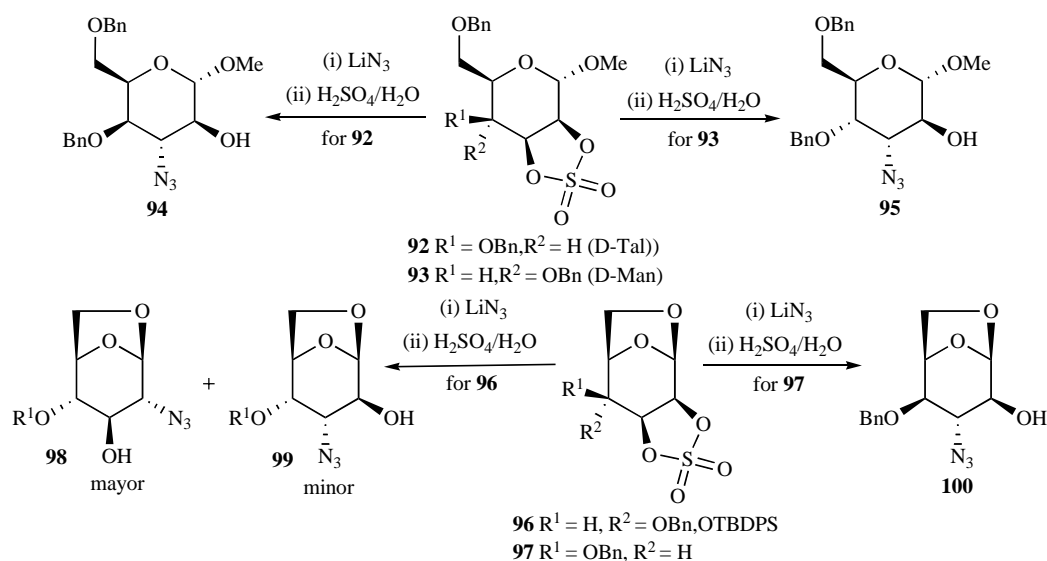


Scheme 15.

Steric factors are also the reason for the observed behavior in the derivatives with Glc configuration. Berridge *et al.* [43] studied the behavior of methyl 4,6-*O*-benzylidene-2,3-*O*-sulfonyl- α - and β -D-glucopyranosides (**88** and **89**) towards fluoride and potassium phenoxide (Scheme 15). In sharp contrast with previous results, the substitution reactions gave none of the expected products in these cases. Nucleophilic displacement was not observed in the reaction of **88** and **89** with TMAF being recovered along with the starting material in good yield. The diequatorial disposition of the 2- and 3-substituents was postulated as the cause of preventing the substitution at the carbon atom with the sulfur atom being the suggested position for the attack by the fluoride anion. A similar explanation could be operative in the case of the reactions of compounds **88** and **89** with phenoxide. When the α -anomer **88** is used only the 2,3-anhydro sugar derivative **90** with D-All configuration was isolated. However, use of compound **89** led to a mixture of D-Man and D-All-2,3-anhydro sugar derivatives, **91** and **90** respectively. These results demonstrated that the attack of the phenoxide anion takes place on the sulphur atom.

3.1.2. Reaction with Nitrogen Nucleophiles

Van der Klein *et al.* [44] reported a wide study of the ring opening of 2,3 and 3,4-cyclic sulfates with lithium azide (Scheme 16).



Scheme 16.

The azide-mediated ring opening of the equatorially-axially locked five-membered cyclic sulfates proceeds smoothly in a highly regioselective fashion. Thus, attack of the azide ion on the 2,3-cyclic sulfates **92** (D-Tal) and **93** (D-Man) yielded exclusively the diaxial product **94** and **95**, respectively, instead of the diequatorial product, while compound **96** (D-Man) gave predominantly the *trans*-diaxial azido alcohol **98** together with minor amounts of the 3-azido derivative **99**. However, the nucleophilic attack on the D-Tal cyclic sulfate **97** afforded solely the diequatorial product **100**.

3.1.3. Reaction with Sulphur Nucleophiles

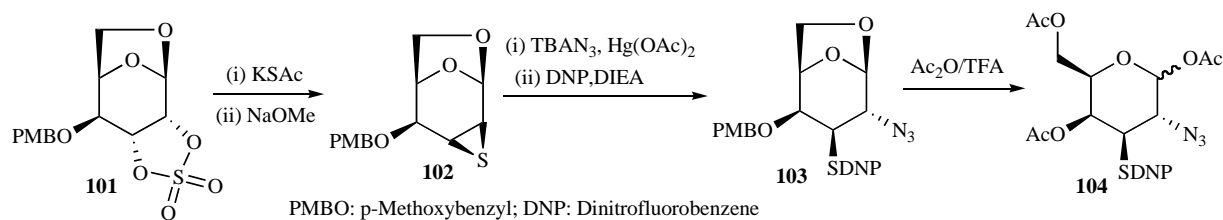
Recently, Marcaurrelle *et al.* [44,45] reported a strategy for the synthesis of *O*-linked glycopeptide analogues to replace the $\beta 1 \rightarrow 3$ glycosidic linkage to the core α -*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residue in mucin-type oligosaccharides with a thioether amenable to construction by chemoselective ligation. The key building block was a 2-azido-3-thiogalactose-Thr that was obtained from the glycosyl donor **104** containing the desired thiol functionality at C-3 and an azide at C-2 (Scheme 17). To gain access to this key intermediate compound a double displacement methodology [46] (Sec-

tion 3.5.3) was applied to the 2,3- cyclic sulfate gulopyranose derivative **101**. Thus, 2,3-episulfide **102** was first generated in high yield from **101** *via* reaction with KSAc or KSCN followed by treatment with NaOMe. Subsequent nucleophilic ring opening of the episulfide ring with TBAN₃ in the presence of Hg(OAc)₂ afforded the desired *trans* diaxial product **103** and a small amount of the undesired diequatorial derivative.

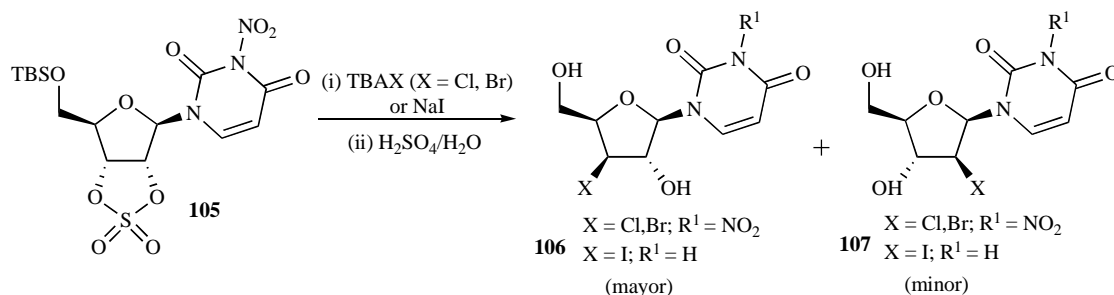
3.2. 2,3-Cyclic Sulfates Derived from Nucleosides

3.2.1. Reaction with Nitrogen Nucleophiles and Halides

Serra *et al.* [47] reported a novel approach for the modification of the ribose moiety of nucleosides by using the 2',3'-cyclic sulfate **105** as a key intermediate (Scheme 18). The *N*-nitration of this compound was a requisite to obtain stable cyclic sulfates that avoids the competitive formation of anhydro nucleosides. Treatment of **105** with halide anions led to a mixture of the regioisomers **106** and **107** in which the *xylo* derivatives **106** were the major compounds. When nucleophiles such as iodine was used a concomitant denitration process took also place. However, the use of stronger



Scheme 17.



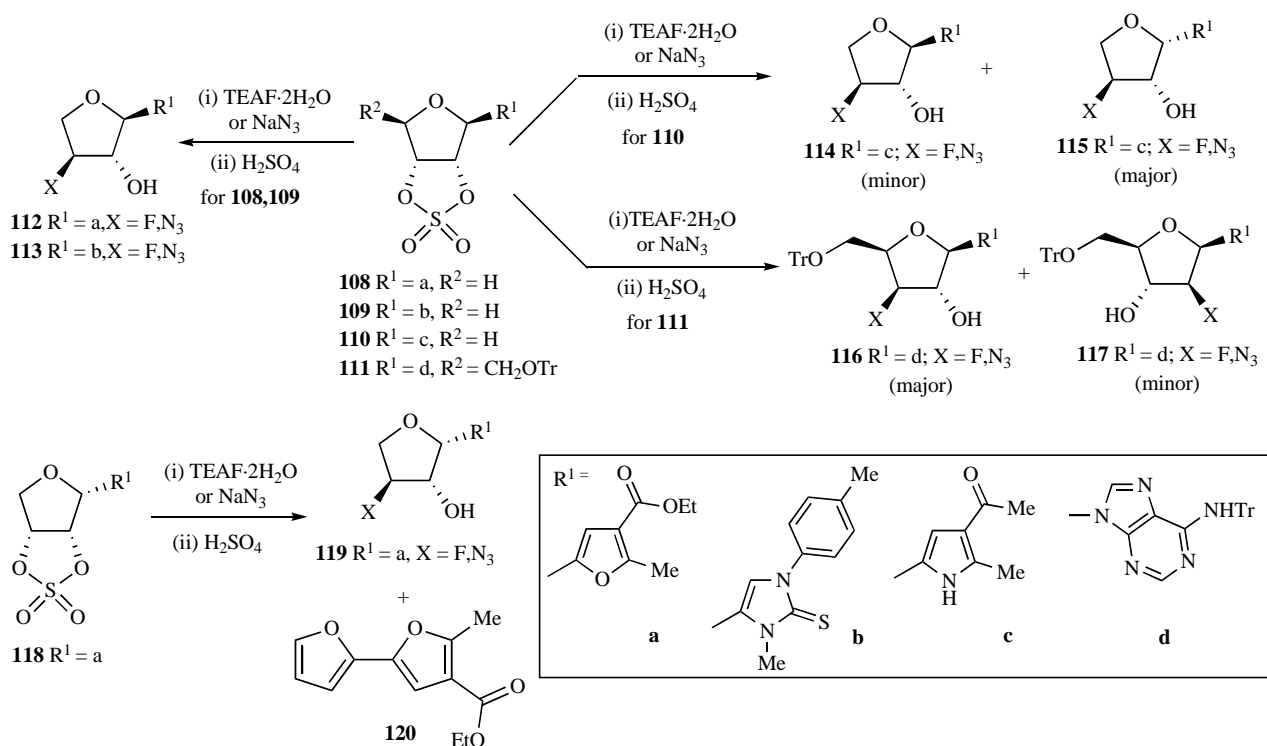
Scheme 18.

nucleophiles as azide led to a complex mixture of compounds arising from the initial attack of the azide anion to C-4.

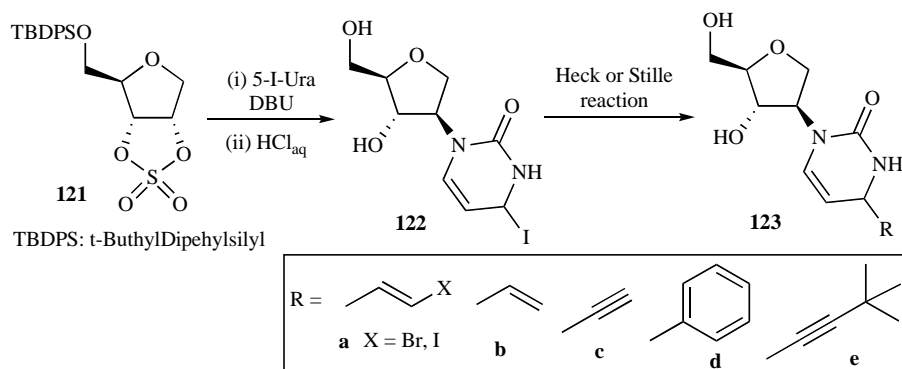
Fuentes *et al.* [48] also studied the behavior of 2',3'-cyclic sulfates of *N*- and *C*-nucleosides against fluoride and azide anions as nucleophiles (Scheme 19). Cyclic sulfates **108-111** and **118** were treated with tetraethylammonium fluoride dihydrate (TEAF·2H₂O) as well as sodium azide followed by subsequent hydrolysis with aqueous H₂SO₄. In the case of cyclic sulfates **108** and **109**, the nucleophilic ring-opening was completely regioselective and only the 3'-fluoro and 3'-azido derivatives **112** and **113** were isolated. This regioselectivity was attributed to the steric hindrance of the β-furyl and β-imidazole on C-2'. For the α-furyl *C*-nucleoside **118** (the α-anomer of **108**) the reaction with sodium azide led exclusively to the 3'-azide derivative **119**. However, when fluoride was used as nucleophile the formation of the elimination product **120** was observed as a minor compound. The ring-opening reaction of the β-erythrofuransylpyrrole cyclic sulfate **110** gave rise to a mixture of the α- (**115**) and β-anomers (**114**) of the 3'-fluoro and 3'-azide *C*-nucleoside. Although the reaction is regioselective at C-3, the acid

medium for the hydrolysis led to the anomerization of the product. In both cases, the α-anomer was isolated as the major product. The reaction of the adenosine derivative **111** led to 3'- and 4'- regioisomers **116** and **117** being the 3'-fluoro and 3'-azido derivatives the major compounds. The difference in behavior with respect to *C*-nucleosides was attributed to the steric hindrance of the CH₂OTr group on C-3' and to the electrophilicity increase at C-2' position that originates from the presence of a neighboring nitrogen atom. The azide derivatives were used to access to 3'-amino and 3'-isothiocyanato nucleosides.

Finally, Guenther *et al.* [49] reported a novel and general procedure to gain access to 5-substituted isodeoxyuridine analogs in which the nucleophilic ring opening of 2,3-cyclic sulfates with 5-iodouracil is a key step (Scheme 20). Treatment of cyclic sulfate **121** with 5-iodouracil led to the regioisomer **122** due to the steric hindrance at C-3. Subsequent transformation *via* Heck or Stille reactions gave rise to different 5-substituted isodeoxyuridine analogues **123**. These structures exhibited a potent activity against the herpes simplex virus (HSV) [50].



Scheme 19.



Scheme 20.

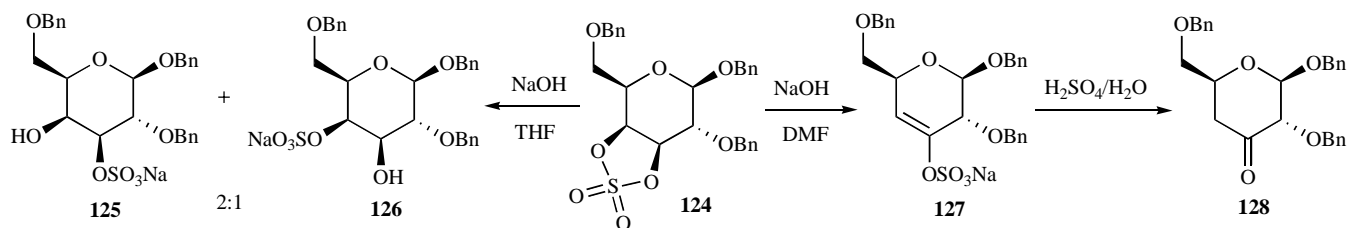
3.3. 3,4-Cyclic Sulfates

3.3.1. Reactions with Bases

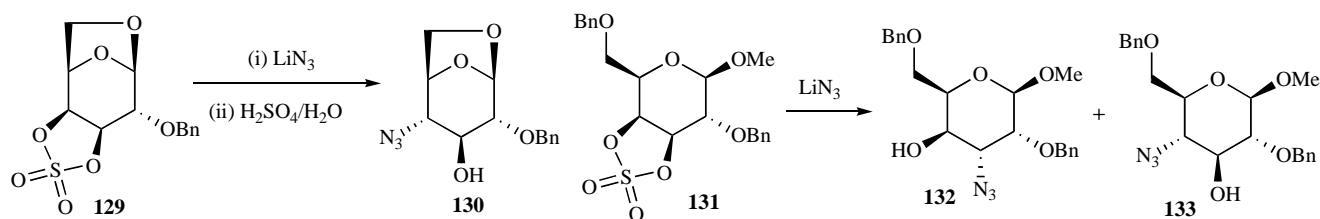
Although the reactivity of cyclic sulfates is well known and it has been used with the main aim of the introduction of different functional groups by nucleophilic attack at the carbon atom, the monohydrolysis of cyclic sulfates derivatives is poorly documented. Dagon *et al.* [51] studied the behavior of 3,4-cyclic sulfates derived from D-galactopyranosides towards hydrolysis using sodium hydroxide under various conditions (Scheme 21). The reaction of 1,2,6-tri-*O*-benzyl-3,4-*O*-sulfuryl- β -D-galactopyranoside **124** with aqueous NaOH in refluxing THF gave both 3- and 4-monosulfates (**125** and **126**, respectively) in a 2:1 ratio. However, the reaction in DMF instead of THF led unexpectedly to the 4-deoxy-keto derivative **128** after acidic hydrolysis of the intermediate enolester **127**.

3.3.2. Reaction with Nitrogen Nucleophiles

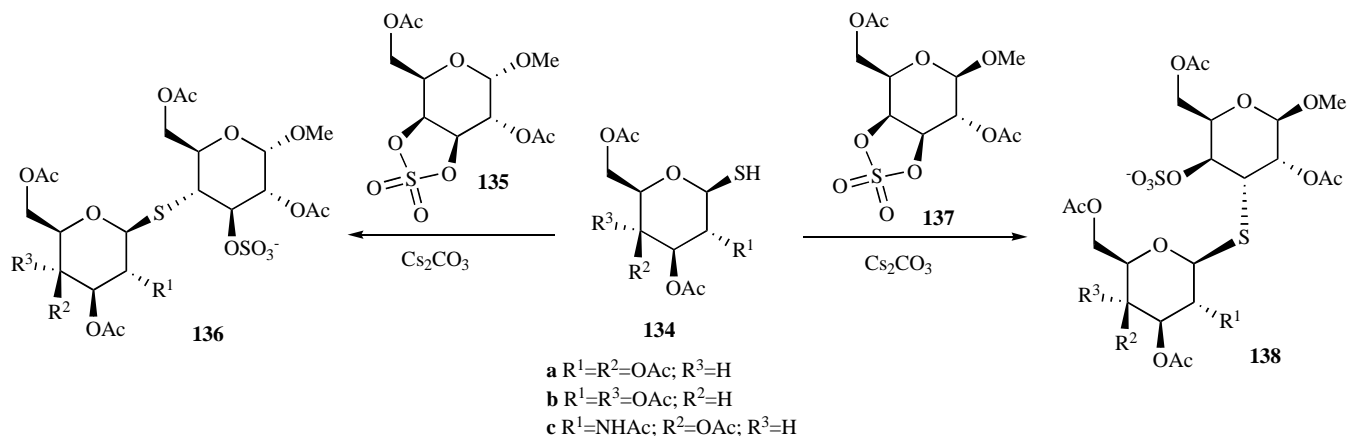
The azide anion-mediated ring opening of 3,4-cyclic sulfate carbohydrate derivatives was studied by Van der Klein *et al.* [44] (Scheme 22). As in the case of 2,3-cyclic sulfates **92** and **93**, the 3,4-cyclic sulfate of the 1,6-anhydro-D-galactose derivative **129** yielded exclusively the trans-diaxial opening product **130**. However, the ring opening of the less rigid D-galacto-3,4-cyclic sulfate **131** did not proceed regiospecifically leading to a mixture of both 3-azido-D-gulo **132** and 4-azido-D-gluco **133** in a 1:6 ratio.



Scheme 21.



Scheme 22.



Scheme 23.

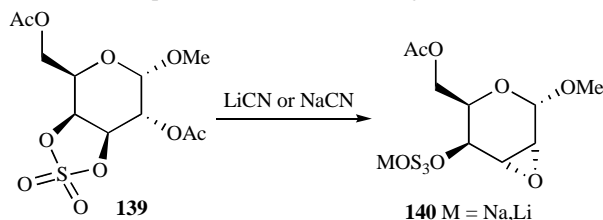
3.3.3. Reactions with Sulphur Nucleophiles

Calvo-Asin *et al.* [52] developed a new and expeditious strategy for the synthesis of monosulfated thio-linked disaccharides in a one-step reaction based on the ring opening of 3,4-cyclic sulfate derivatives of glycosides by several 1-thio-sugars acting as sulphur nucleophiles (Scheme 23). The reactions were performed using the methyl α - and β -D-galactopyranose derivatives **135** and **137** and different 1-thio-sugars, it being observed that the regioselective course of the reaction is dependent on the anomeric configuration of the cyclic sulfate sugar derivative. Thus, treatment of the methyl α -glycoside **135** with thiols **134** gave exclusively the thio-linked disaccharides **136** by means of the attack of the thiolate at the C-4 while the nucleophilic attack of the same thiols **134** on the methyl β -glycoside **137** took place at C-3 leading regioselectively to the thio-linked disaccharides **138**. The approach constitutes a highly stereoselective methodology for the introduction of a sulfur bridge between two sugar units allowing an easy access to sugar hetero-analogues with a potential value as inhibitors.

3.3.4. Reactions with Carbon Nucleophiles

Vargas-Berenguel *et al.* [53] reported an approach for the chain elongation and synthesis of 6-deoxyheptose derivatives based on the ring opening of 4,6-cyclic sulfate glycopyranosides at carbon 6 by cyanide ion (Section 3.4.3). However, a similar reaction in the case of the 3,4-cyclic sulfate sugar derivative **139** with lithium or

sodium cyanide failed to give the corresponding nitrile derivative and instead the 2,3-anhydro salt **140** was obtained (Scheme 24). Presumably, the reaction proceeded by initial cyanolysis of the acetyl group at the *O*-2 and subsequent ring opening of the cyclic sulfate by internal nucleophilic attack of the resulting alkoxide at carbon 3.



Scheme 24.

3.4. 4,6-Cyclic Sulfates

3.4.1. Reaction with Bases and Oxygenated and Nitrogen Nucleophiles

As mentioned above (section 3.3.1.) Dagrón *et al.* [51] reported on the hydrolysis of different cyclic sulfate sugar derivatives under a variety of conditions. In the case of 4,6-cyclic sulfates, a similar treatment of benzyl 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-sulfuryl- β -D-galactopyranoside **141** with aqueous sodium hydroxide in THF or DMF did not yield the expected monohydrolysis of the cyclic sulfate ring but led to the exocyclic and endocyclic elimination compounds (**143** and **144**, respectively) in high yield (Scheme 25). This constitutes an attractive route to 6-deoxy-hex-5-enopyranoside derivatives which are potential precursors of L-sugar derivatives [54] and carbocyclic sugars [55]. The monohydrolysis product **145** could be obtained by using BzONBu_4 in DMF for the nucleophilic ring opening and subsequent debenzoylation with NaOMe (Scheme 25).

Bazin *et al.* [56,57] described the synthesis of a new class of anionic and amphoteric sulfated carbohydrate-based surfactants starting from glucose and sucrose 4,6-cyclic sulfates. The regio-

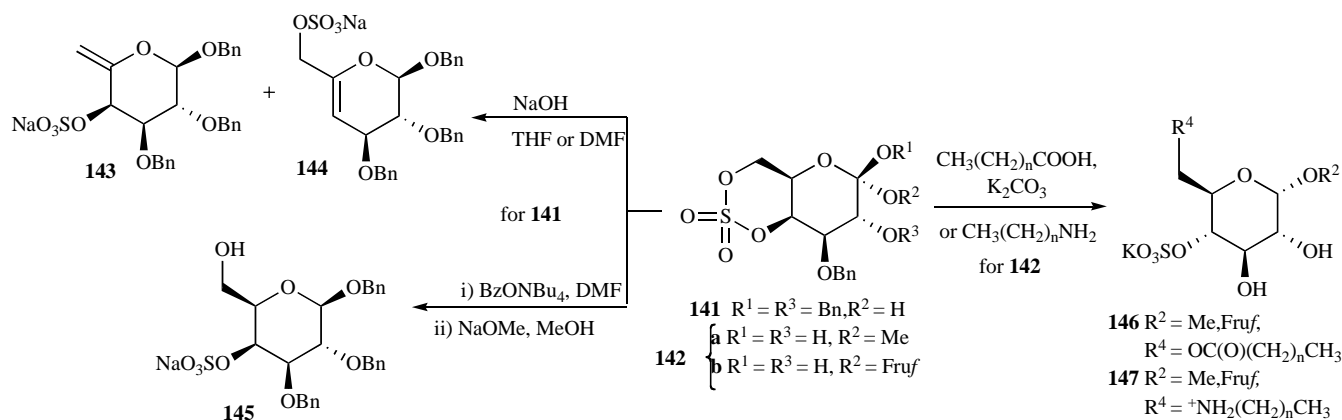
specific opening of methyl α -D-glucopyranose and the sucrose 4,6-cyclic sulfates **142** with a variety of fatty acids salts led to the corresponding 6-*O*-acyl-4-sulfo derivatives **146**. These 4,6-cyclic sulfates also allowed the synthesis of the amphoteric 6-alkylamino-6-deoxy-4-sulfo derivatives **147** by nucleophilic displacement with different alkyl amines. All these carbohydrate-based surfactants displayed improved surface-active properties compared to commercially available surfactants. Finally, it should be also mentioned that up to the present 4,6-cyclic sulfate sugars have not been employed for the introduction of the azido function.

3.4.2. Reactions with Sulphur Nucleophiles

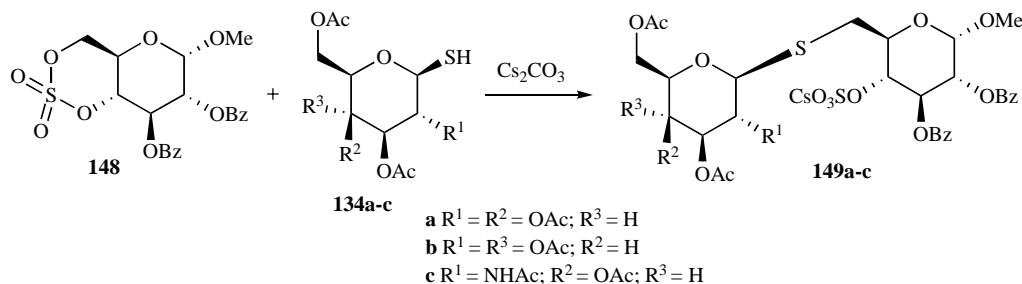
The strategy developed by Calvo-Asin *et al.* [52] for the synthesis of monosulfated thio-linked disaccharides by means of the ring opening of cyclic sulfate derivatives with 1-thio-sugars as sulphur nucleophiles was applied not only to 3,4-cyclic sulfate sugar derivatives (section 3.3.3.) but also using 4,6-cyclic sulfate derivatives as starting materials (Scheme 26). In these cases, the construction of the interglycosidic thio linkages was also easily performed by reaction of the 4,6-cyclic sulfate glucose derivative **148** and a variety of thio-sugars **134a-c** in the presence of cesium carbonate.

3.4.3. Reactions with Carbon Nucleophiles

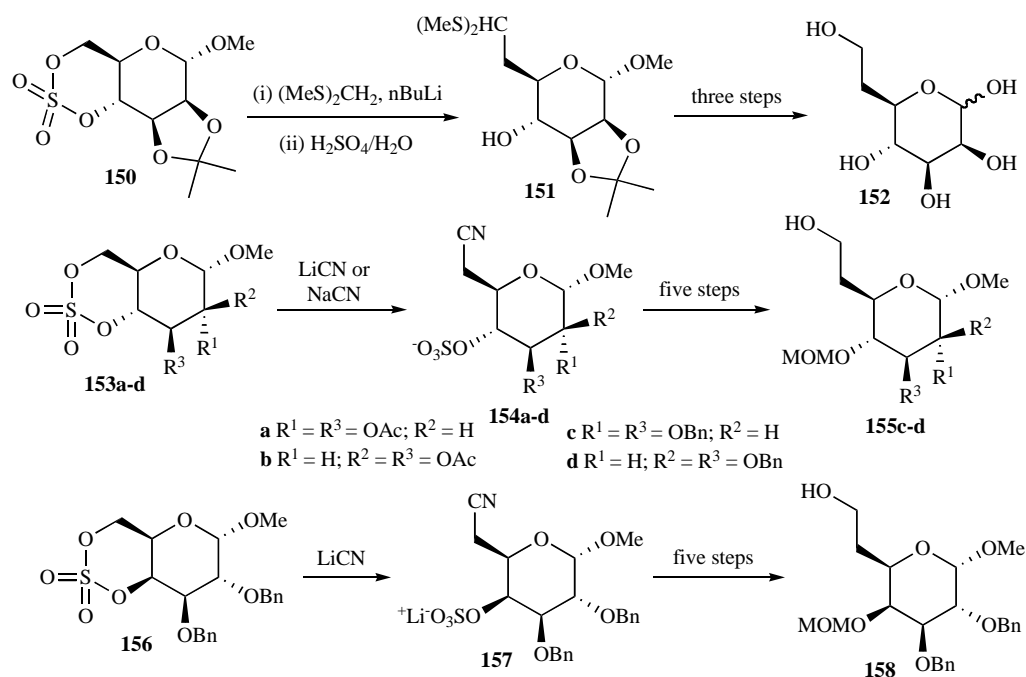
Two efficient methodologies based on the regioselective ring opening of 4,6-cyclic sulfate glycopyranoside derivatives at C-6 by carbon nucleophiles were described for the chain elongation and synthesis of 6-deoxyheptoses derivatives (Scheme 27), some of which have been found as constituents of bacterial polysaccharides [58]. The first approach was developed by van der Klein *et al.* [59] for the synthesis of 6-deoxy-D-manno-heptopyranose **152**, a component of the lipopolysaccharides from *Yersinia (Pasteurella) pseudotuberculosis* [60]. Treatment of the 4,6-cyclic sulfate **150**



Scheme 25.



Scheme 26.



Scheme 27.

with bis(methylthio)methyl-lithium led to the corresponding derivative **151** by the attack at the 6-position that was subsequent transformed into the desired compound **152**. In the second methodology, described by Vargas-Berenguel *et al.* [53], 4,6-cyclic sulfates of sugar with D-Glc, D-Man and D-Gal (**153a-d** and **156**) were reacted with cyanide ion to give the corresponding 6-deoxyheptopyranosyl nitriles (**154a-d** and **157**) that were transformed into 6-deoxy-heptopyranoses **155c-d** and **158** in five steps.

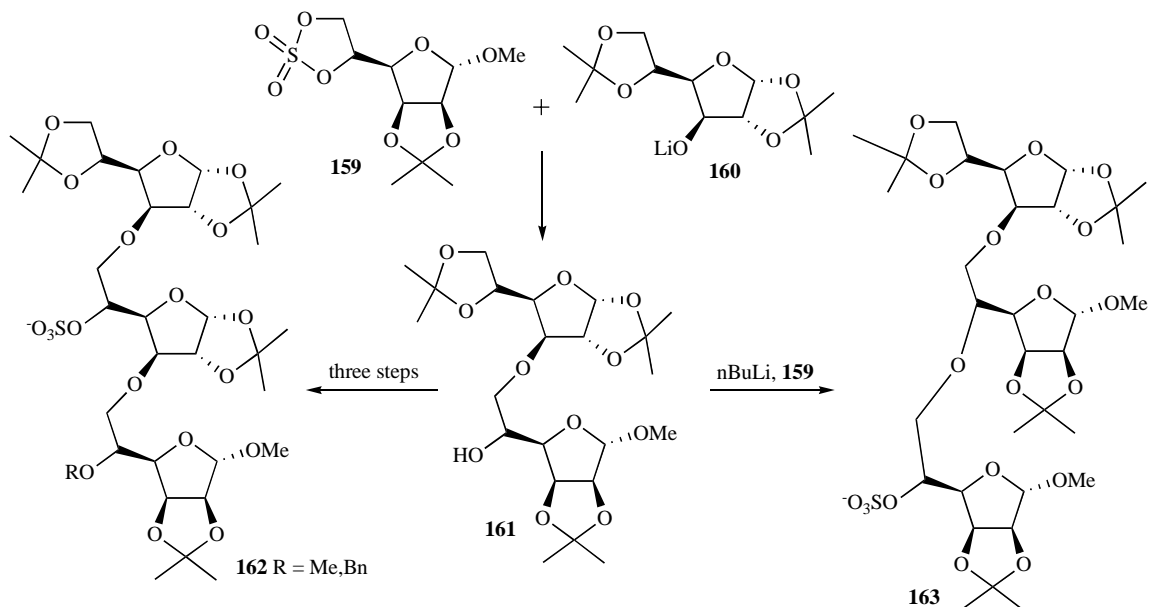
3.5. 5,6 and 3,5-Cyclic Sulfates

3.5.1. Reaction with Bases and Oxygenated Nucleophiles

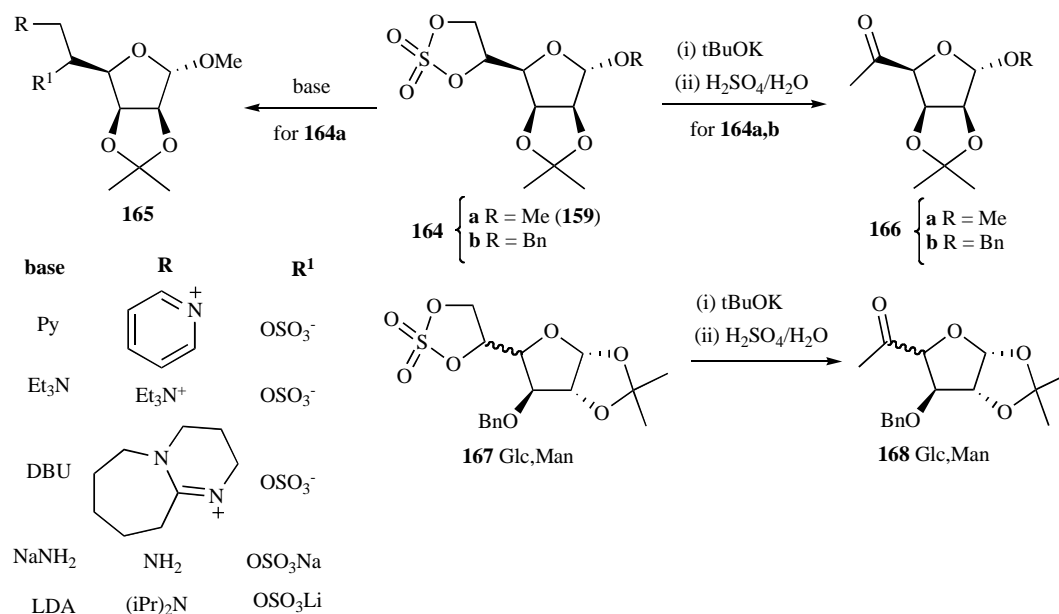
5,6-Cyclic sulfates are by far the most extensive studied cyclic sulfate sugars due to the easy access to these compounds from

furanoside derivatives. However, there are only few studies concerning the ring opening by oxygenated nucleophiles. Gourlain *et al.* [61] used the opening of 5,6-cyclic sulfates with O-nucleophiles for the synthesis of ether linked pseudo-di and trisaccharides composed of gluco and mannofuranose units (Scheme 28). The synthesis of the protected pseudo-disaccharide **161** was approached by the C-6 ring opening of methyl 2,3-*O*-isopropylidene-5,6-sulfuryl- α -D-mannofuranoside **159** with the carbohydrate alkoxide **160**. Subsequent transformations of this compound led to the pseudo-trisaccharides **162** and **163** in moderate yields.

In addition, these same authors studied the behavior of the 5,6-cyclic sulfate of D-mannose **164a** when reacted with different organic and inorganic bases [62] (Scheme 29). Treatment of this cyclic sulfate with both nitrogen weak bases (pyridine, triethylamine



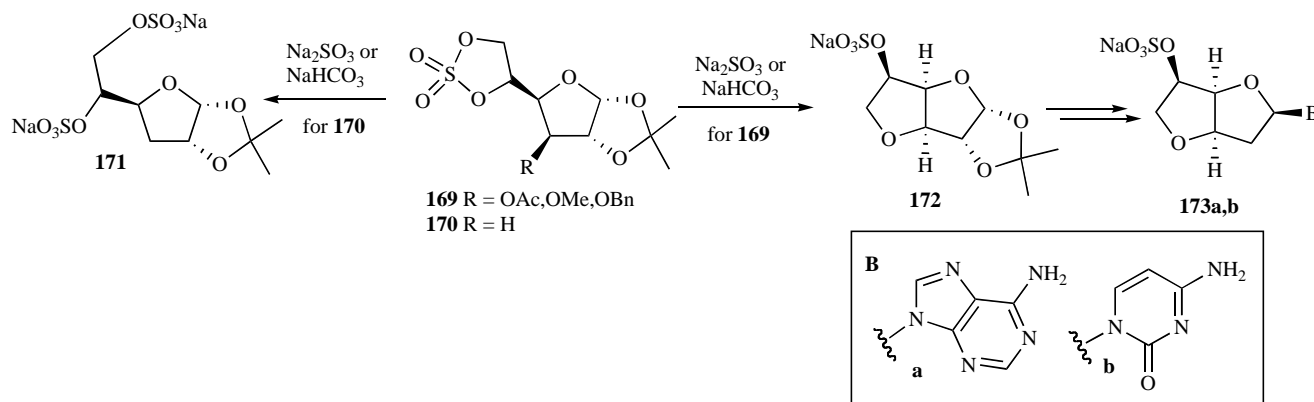
Scheme 28.



Scheme 29.

or DBU) and stronger ones (sodium amide and LDA) gave the expected 6-amino-5-sulfates **165**. However, when this cyclic sulfate and **164b** were reacted with *n*-butyllithium or sodium *tert*-butoxide followed by acidic hydrolysis the ulosides **166a,b** were obtained instead of the substitution compounds. These last conditions were applied for the one-pot synthesis of analogous furano-5-ulose derivatives **168** with Glc and Man configuration in good yields which are potential precursors of aminosugars and cyclitols by starting from the 5,6-cyclic sulfate derivatives **167**.

Finally, Pineda Molas *et al.* [30] approached the synthesis of 3,6-anhydro-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose **172** by the intramolecular cyclization *via* ring-opening of 5,6-cyclic sulfates **169** (Scheme 30). Treatment of this compound with sodium sulfite or NaHCO₃ led to the 3,6-anhydro sugar **172** as the only reaction product which was formed due to the remote participation of the oxygen atom present at C-3 *via* an oxonium ion intermediate. This compound was exploited as starting material for the synthesis of conformationally restricted analogues of dda and ddC **173a,b**. Conversely, the 3-deoxy derivative **170** led under the same reaction conditions to the disulfonate derivative **171** instead of the corresponding anhydrosugar.

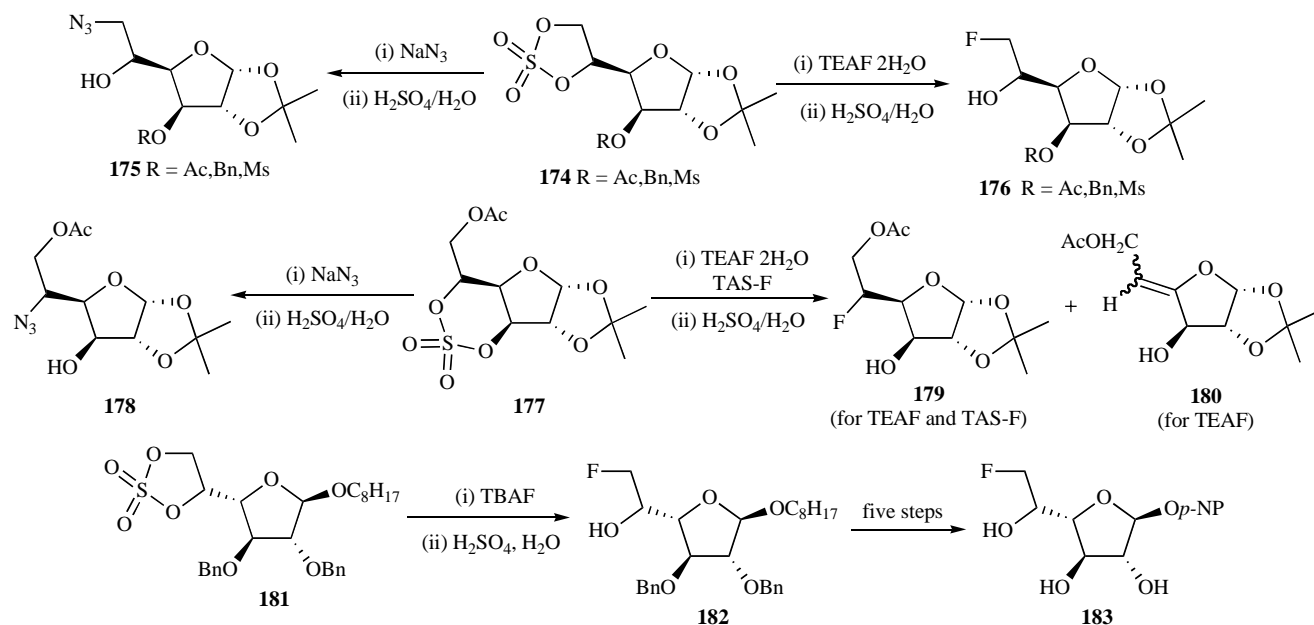


Scheme 30.

3.5.2. Reaction with Nitrogen Nucleophiles and Halides

Fuentes *et al.* [63,64] described a regioselective and efficient methodology for the synthesis of 6- and 5-azido- and fluoro-aldofuranose derivatives (D-Glc and L-ido configurations) through the nucleophilic opening of 5,6 and 3,5-cyclic sulfates (Scheme 31). In the case of reactions with azide anion, the 6-azido derivatives **175** were obtained by reaction of the 5,6-cyclic sulfates **174** with sodium azide as nucleophile. It should be highlighted that under these conditions the displacement of the mesyloxy group on C-3 was not observed. Under the same reaction conditions the non-vicinal 3,5-cyclic sulfate **177** led to the 5-azido derivative **178** in a quantitative and regioselective fashion.

Concerning the reactions with fluoride anion, the treatment of the cyclic sulfates **174** with tetraethylammonium fluoride dihydrate (TEAF·H₂O) led to the corresponding 6-fluoro derivatives **176** in high yields. However, when this reagent was used in the nucleophilic opening of the 3,5-cyclic sulfate **177** a competition between the elimination process and the nucleophilic opening was observed with formation of the 5-fluoro derivative **179** and the 4,5 unsaturated derivative **180**. Instead, the use of tris(dimethylaminosulfur) (trimethylsilyl) difluoride (TASF) as nucleophile overcomes the competition of the elimination process and provides exclusively the



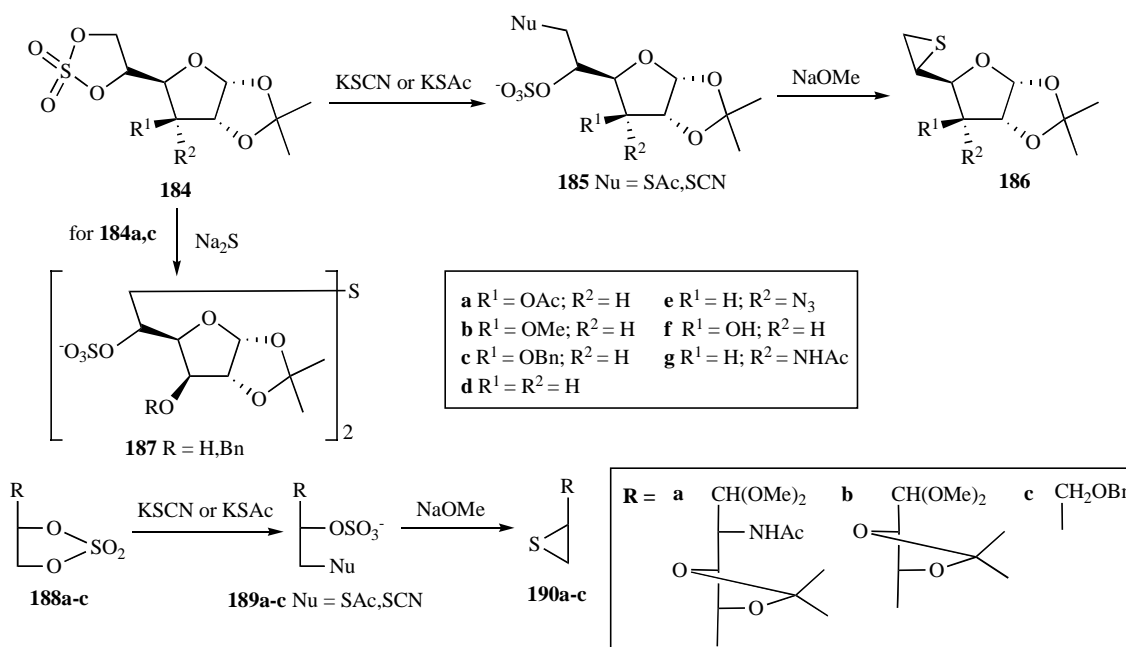
Scheme 31.

fluoro derivative **179**. The introduction of a fluorine atom at the C-6 position of a glucufuranose derivative **182** by the ring opening of the 5,6-cyclic sulfate **181** was also described by Euzen *et al.* [65] as a key step in the synthesis of the glycosyl donor **183** which was used to study the donor-1 subsite in the active site of the α -L-arabinofuranosidase (AbfD3).

3.5.3. Reaction with Sulphur Nucleophiles

The reactivity of 5,6-cyclic sulfates towards sulfur nucleophiles was exploited by Santoyo-Gonzalez *et al.* [46,66] as a straightforward way for the synthesis of sugar episulfides (Scheme 32) and also olefins (see Section 3.5.5.). By means of using thiocyanate or thioacetate as nucleophiles they performed a double displacement giving rise to an overall substitution of both OH groups. This could

be possible through the intramolecular displacement of the sulfated monoester which is generated in the ring opening of the cyclic sulfate by the nucleophile incorporated in the molecule. The synthesis of episulfide derivatives was carried out on cyclic sulfate derivatives **184** and **188a** by the regioselective nucleophilic attack at the less hindered primary position. Treatment with potassium thioacetate or thiocyanate led to the β -acetylthio or β -thiocyanate sulfates **185** and **189a**, respectively, in high yields. Further treatment of these potassium salts with NaOMe-MeOH allowed the one-pot transformation into the episulfides **186** and **190a** by the intramolecular displacement of the β -sulfate groups by the generated sodium thiolates. This approach was expanded to other cyclic sulfate derivatives of pentoses **188b** and chiral glycerine **188c** with similar results. However, when sodium sulfide was used as nucleo-



Scheme 32.

phile with the cyclic sulfates **184a,c** the disulfides **187** were obtained in good yields.

Given that this double displacement methodology led to L-sugar episulfides from D-sugars, these authors developed an expeditious and inexpensive strategy for the synthesis of L-thiosugars [46] (Scheme 33). Thus, the nucleophilic ring opening of the episulfides **186a-c** with sodium acetate in acetic acid-acetic anhydride afforded the 5-thio-L-idofuranoses derivatives **191a-c** in good yields. The corresponding 5-deoxy-5-thio-L-sugars **193a-c** were obtained when the corresponding episulfides were reduced with lithium aluminium hydride. In an improved approach, the same thiols were prepared in one-pot by applying a similar treatment on the thiocyanate salts **185a-c**. Furthermore, the acid treatment and subsequent transformation of the thiol derivatives **191a-c** and **193a-c** allowed the incorporation of the sulfur atom into the carbohydrate ring leading to a variety of thiohexopyranoses (**192** and **194**). Moreover, this strategy was applied to the synthesis of 5-thio-L-fucose **195**, a potent and specific inhibitor against bovine- α -L-fucosidases, and to the synthesis of the 4-thiofuranoses **196** and **197** which have great importance in the synthesis of sulfur analogues of nucleosides with an increased metabolic stability toward phosphorylase enzymes [67].

The described sequence 5,6-cyclic sulfate \rightarrow episulfide \rightarrow thio-sugar was applied by Santoyo-Gonzalez *et al.* [68] to the synthesis of (1 \rightarrow 4) linked disaccharides containing sulfur in the reducing ring (**201b-d** and **203**) starting from lactose, maltose and cellobiose (Scheme 34). This approach allowed the development of a non-glycosylating strategy for the synthesis of such disaccharides. The first step was the kinetic acetonation and selective hydrolysis of the acetal functions in the starting disaccharides that were subsequently transformed into the partially protected disaccharide derivatives (**198a-d**). The free hydroxyl groups at C-5,6 enabled the incorporation of the sulfur into the reducing unit ring by the described sequence of reactions on the corresponding cyclic sulfates **199a-d** using potassium thioacetate and thiocyanate as nucleophiles for the formation of the corresponding sulfur derivatives **200e-h** and **202a** that were easily transformed into the desired disaccharides **201b-d**

and **203**. On the other hand, diols **205i,j** obtained from 5,6-di-O-mesyl derivatives **204i,j** by inversion at C-5 with sodium acetate and de-O-acetylation allowed the synthesis of acetylated 5-thio-maltose and cellobiose **207c-d** by the formation of cyclic sulfates **206i,j** using an identical sequence of reactions.

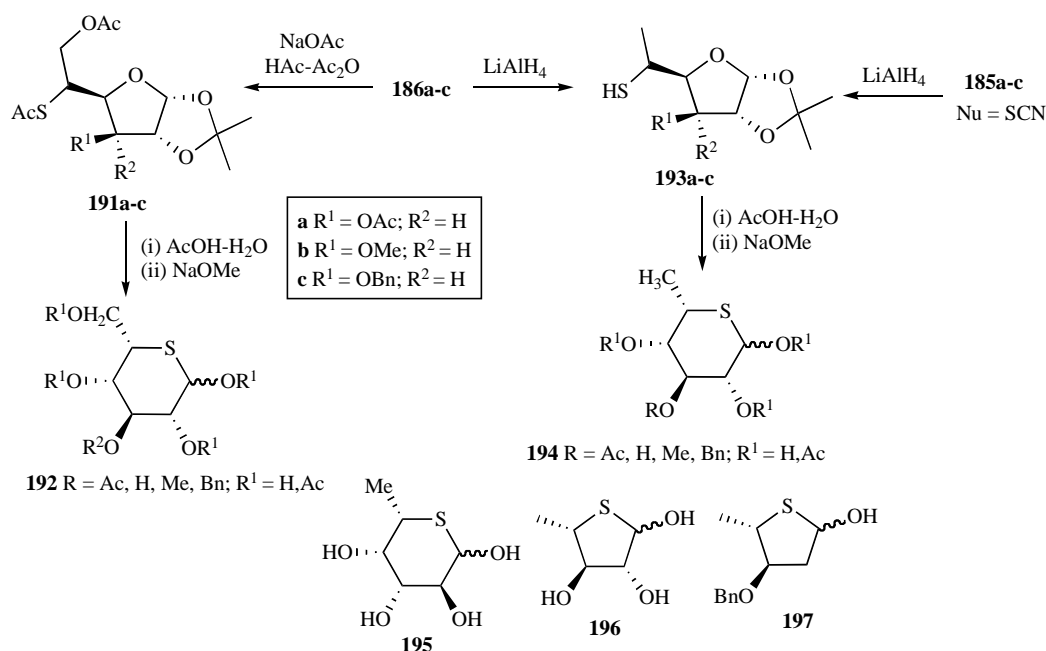
Finally, Bozo *et al.* [69] reported a similar strategy to that described for Santoyo-Gonzalez *et al.* [68] for the regioselective introduction of sulfur at C-5 in the furanose **209** starting from the 3,5-cyclic sulfate **208** and its transformation into methyl 5-thio- α -D-xylopyranoside **210** (Scheme 35) that has a great interest for the synthesis of glycosides with antithrombotic activity in rats [70].

3.5.4. Reaction with Carbon Nucleophiles

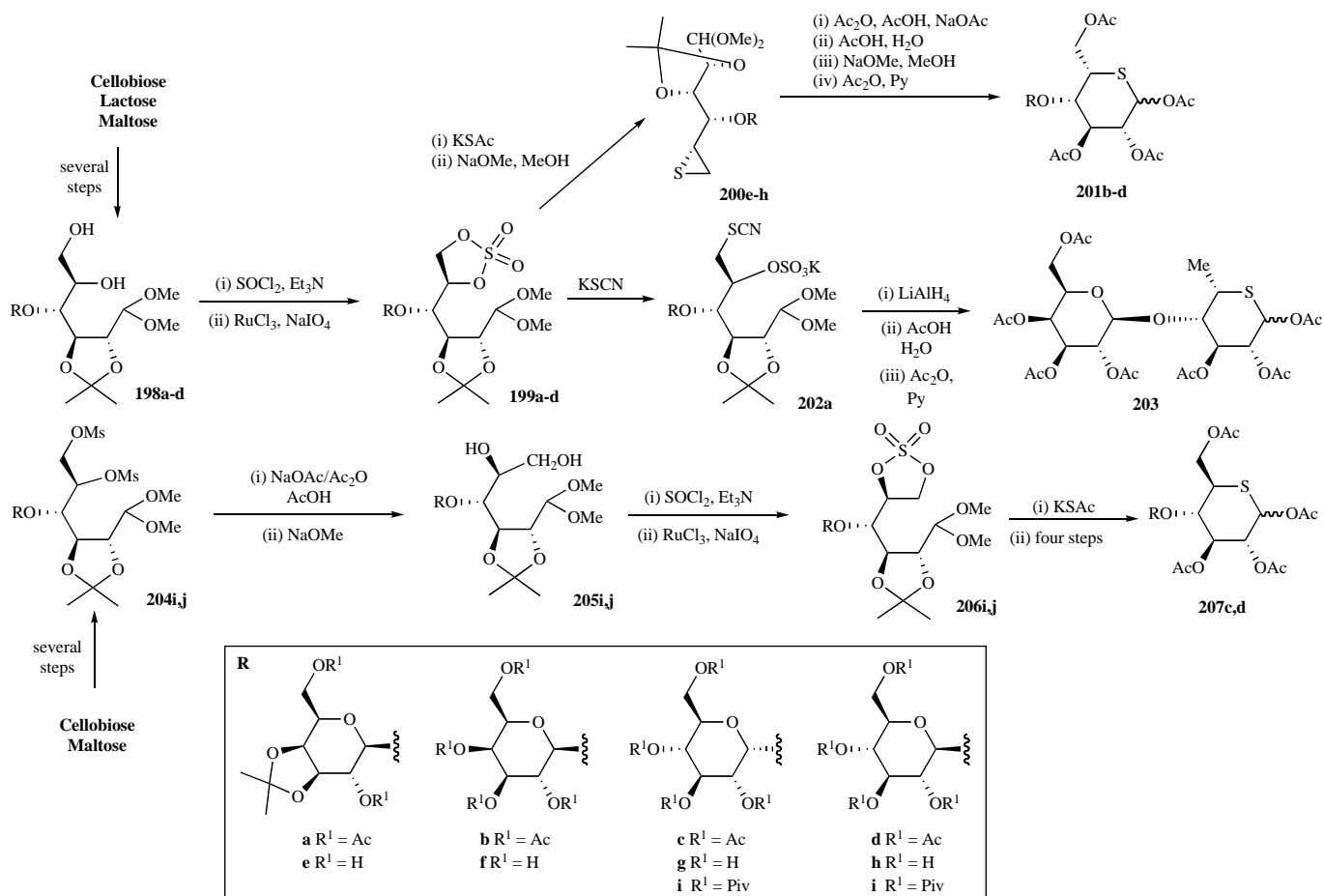
The approach developed by Van der Klein *et al.* [59] for chain elongation and synthesis of 6-deoxyheptose derivatives through 4,6-cyclic sulfates (Section 3.4.3.) was also applied to 5,6-cyclic sulfates (Scheme 36). Thus, the regioselective opening of **159** with bis(methylthio)-methyl-lithium at the less hindered C-6 afforded compound **211** that was transformed into 6-deoxy-D-mannoheptopyranose **152** by a three step sequence.

Gourlain *et al.* [71] reported a method for the synthesis of 6-C-deoxy-monosaccharides and pseudo-C-disaccharides from 5,6-cyclic sulfates by means of using alkyl and aryl alkynes, and sugar acetylides as carbon nucleophiles (Scheme 37). The reactions proceeded regioselectively at C-6 leading to the 6-alkynyl-6-deoxy derivatives **212a,b** and to the non-symmetric pseudo-C-disaccharide **212c**. When the reaction was carried out with sodium acetylide as nucleophile, a mixture of compounds **213** and **214** was obtained in a ratio dependent on the reaction conditions. The isolated compound **213** also allowed the access to the symmetric pseudo-C-disaccharide **214** in three additional steps in moderate yield. 6-C-alkynyl-6-deoxy-monosaccharide **213** was also used to get the pseudo-disaccharide **215**.

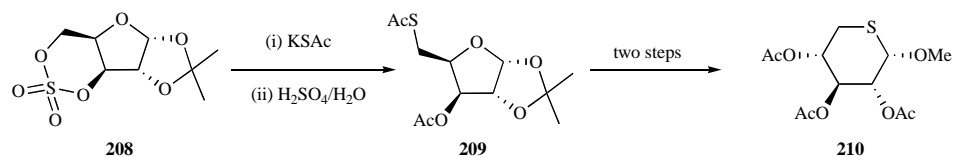
The regioselective reaction of 5,6-cyclic sulfates with carbon nucleophiles was used by Gomez *et al.* [72] for the construction of spiroketals (Scheme 38) which are important subunits of a variety of naturally occurring compounds with biological and synthetic



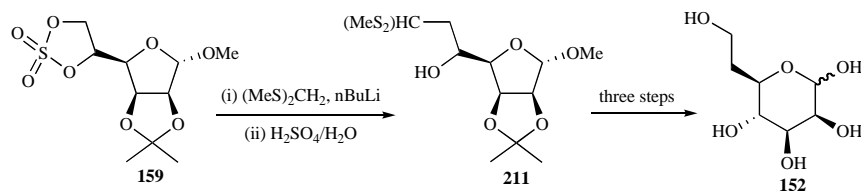
Scheme 33.



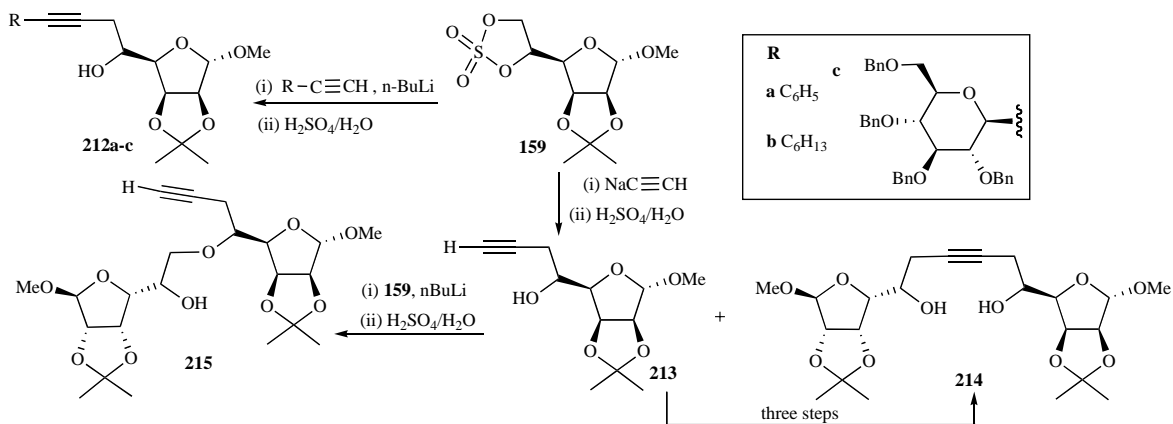
Scheme 34.



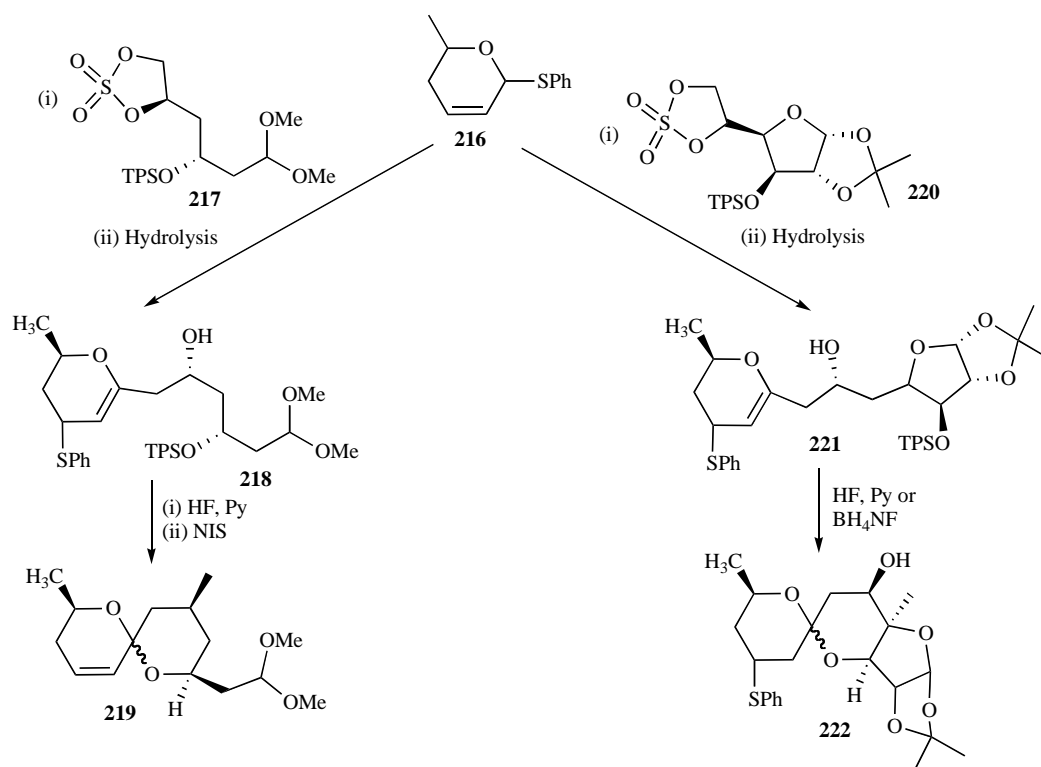
Scheme 35.



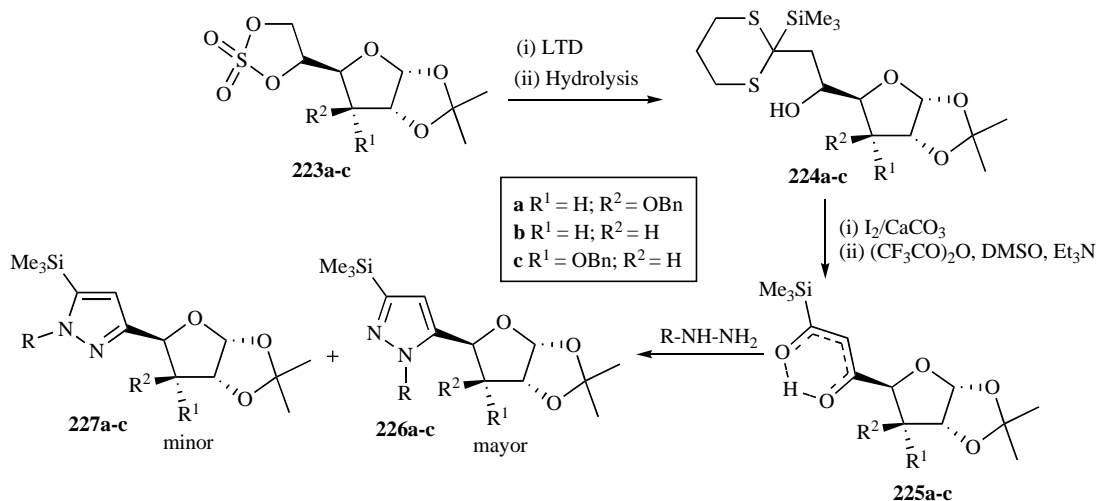
Scheme 36.



Scheme 37.



Scheme 38.



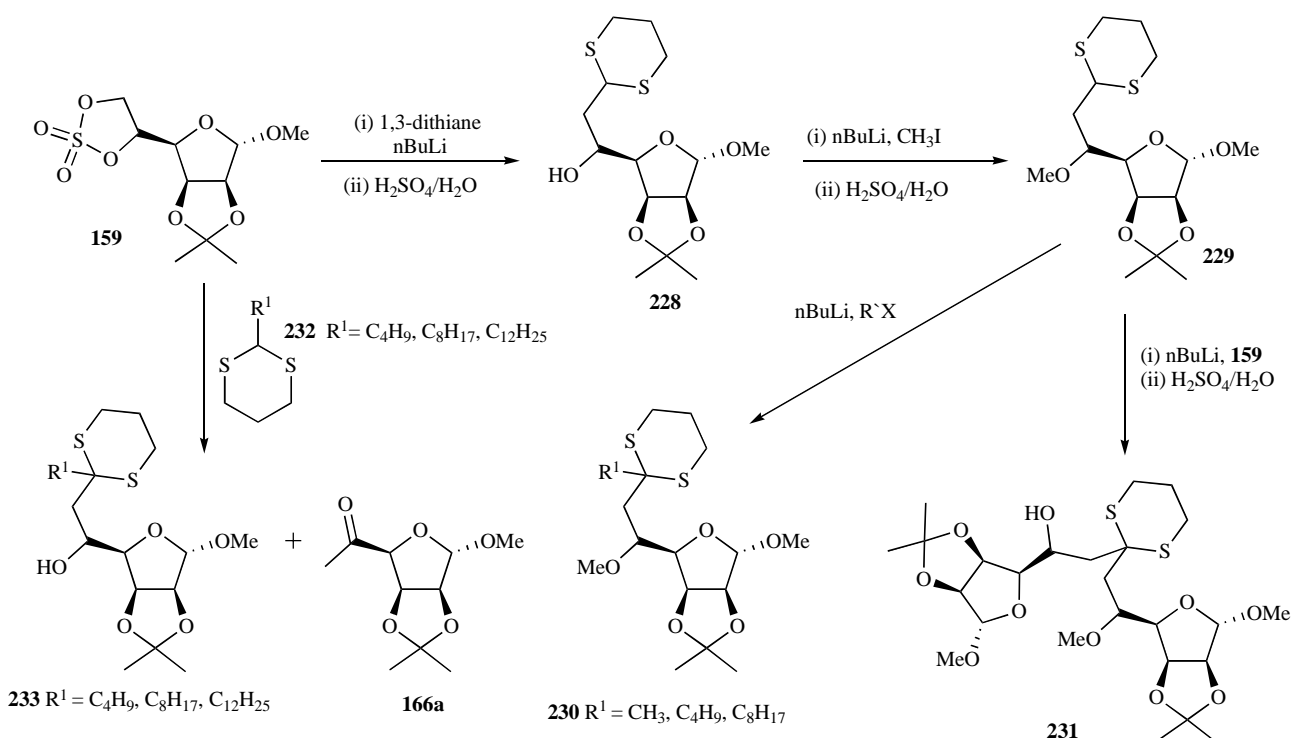
Scheme 39.

interest [73]. The developed procedure was based on the ring opening of cyclic sulfates **217** and **220** by the anion derived from (2R,5R)-5-methyl-2-phenylthio tetrahydropyran **216** that yielded the enolethers **218** and **221**. Subsequent treatment of these compounds with HF-pyridine or BH_4NF cleaved the silyl ether leading directly to the saturated spiroketal **222**, in the case of compound **221**, and in two steps to the unsaturated spiroketal **219**, in the case of **218**.

The use of dithianes as nucleophiles for the ring opening of 5,6-cyclic sulfates has been described and applied to the synthesis of 6-C-alkyl-6-deoxy carbohydrates (**224a-c**) (Scheme 39). Thus, Gérard *et al.* [74] developed a novel approach to gain access to these compounds and illustrated their usefulness in carbohydrate and heterocyclic chemistry. In this procedure the key step was the nucleophilic ring opening of the 5,6-cyclic sulfates **223a-c** by the attack of

the anion 2-lithio-2-trimethylsilyl-1,3-dithiane (LTD). Subsequent hydrolysis, dethioketalization and Swern oxidation led to the β -oxo acylsilanes **225a-c** which were converted into the corresponding silylated pyrazoles (**226a-c** and **227a-c**) by reaction with hydrazines.

Gourlain *et al.* [75] reported two approaches for the selective functionalization of carbohydrates with alkyl groups by the reaction of 5,6-cyclic sulfates with 1,3-dithiane carbanion derivatives (Scheme 40). Following the first approach the ring opening of the 5,6-cyclic sulfate **159** was carried out with 2-lithio-1,3-dithiane leading to the 6-deoxy-6-C-substituted derivative **228**. Methylation of this compound at 5-O yielded compound **229** from which the corresponding 1,3-dithiane carbanion was generated and reacted with different alkyl halides to afford the functionalized sugars **230**. The reaction yield depended on the alkyl chain length, decreasing



Scheme 40.

with increasing length. Furthermore, this approach was applied to the synthesis of the pseudo-C-disaccharide **231** by using the 5,6-cyclic sulfate **159** as electrophilic reagent in the last step. In the second approach, 2-alkyl-2-lithio-1,3-dithianes derived from **232** were used as C-nucleophiles giving rise to the 6-C-alkyl-6-deoxy derivatives **233** in moderate yields. In these reactions 6-deoxy-2,3-*O*-isopropylidene- α -D-lyxo-hexofuranose-5-uloside **166a** was obtained as a by-product due to the reaction of *n*-BuLi with 5,6-cyclic sulfates [62].

3.5.5. Miscellaneous: Synthesis of Sugar Olefins from Cyclic Sulfates

Although there are different available methods for the synthesis of olefins from *vic*-diols, the use of cyclic sulfates to this aim has not been explored in depth up to now. As it has been mentioned above, Santoyo-Gonzalez *et al.* [46,66] extended their double displacement methodology to the synthesis of sugar olefins from cyclic sulfates (Scheme 41). When potassium selenocyanate is used as nucleophile the resulting β -seleno-cyanatosulfated can be transformed to the corresponding seleniranes by treatment with sodium borohydride. These seleniranes are not stable under the experimental conditions giving rise to olefins by expelling the selenium atom [76]. This procedure was applied to the cyclic sulfates **234a-f** leading to the monoolefins **236a-f** through the intermediate seleniranes **235a-f**. A similar strategy starting from the cyclic sulfate **188a** and the cyclic disulfate **238** yielded the corresponding monoolefin **237** and diolefin **239**, respectively. Simultaneously to these studies Chao *et al.* [77] described a telluride-based process for the conversion of 2,3-cyclic sulfates to unsaturated carbohydrate derivatives under mild conditions which was used to obtain the ribose and mannose derivatives **241** and **243**, respectively, by starting from cyclic sulfates **240** and **242**. Furthermore, Kim *et al.* [78] reported the conversion of vicinal diols to olefins through the nucleophilic ring opening of cyclic sulfates with phosphines. However, when they applied this methodology to sugar cyclic sulfates **244** unex-

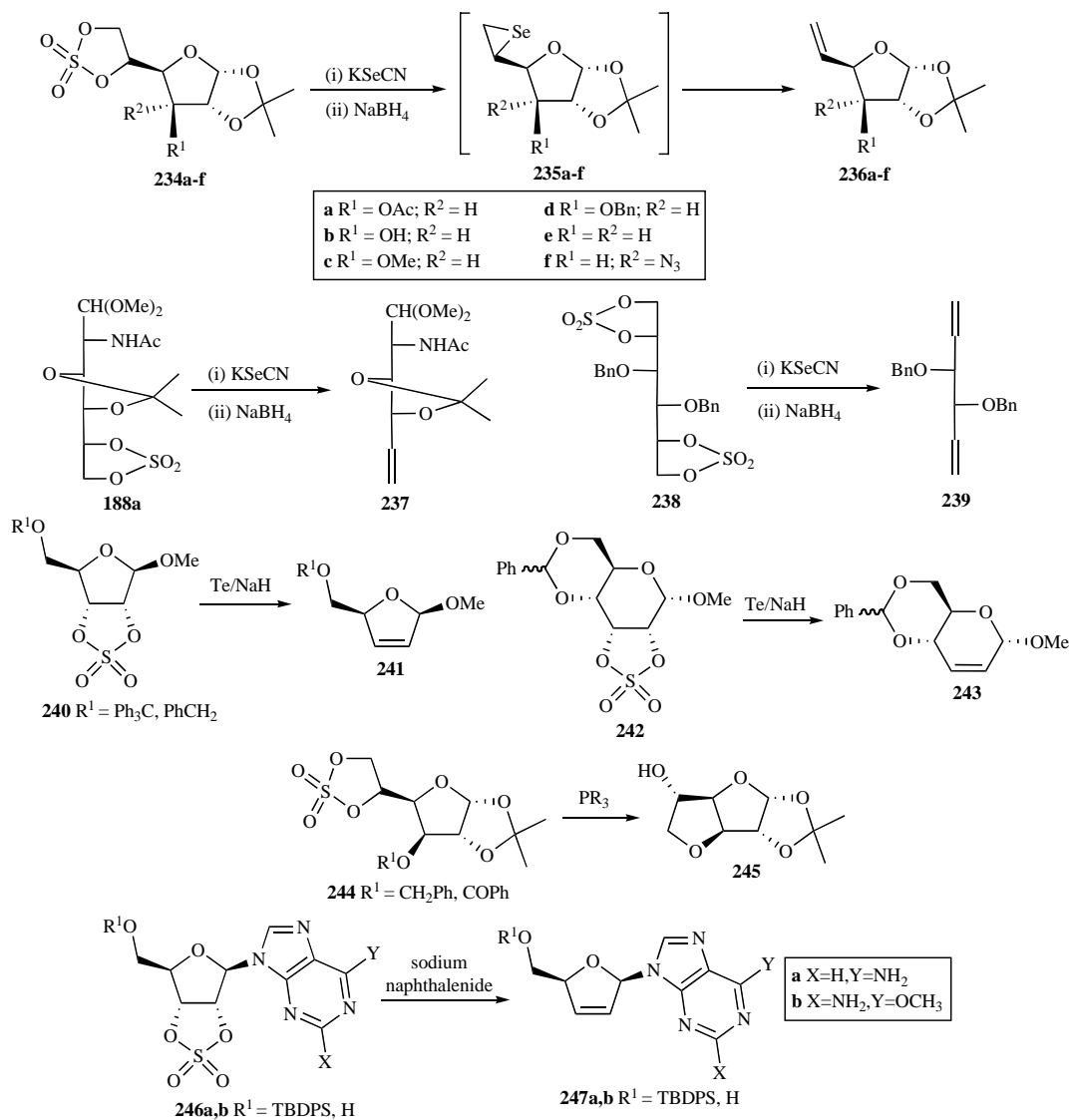
pected anhydro sugars **245** were obtained instead of olefin sugars. Finally, Robins *et al.* [79] reported a mild and efficient approach for the conversion of purine ribonucleosides into 2',3'-dideoxynucleosides *via* 2',3'-cyclic sulfates which are of interest as it has been demonstrated that several of these unsaturated nucleosides inhibit replication of human immunodeficiency (HIV) and hepatitis B viruses (HBV). Reductive elimination of ribonucleoside 2',3'-cyclic sulfates **246a,b** with different reagents led to 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxynucleosides **247a,b** being sodium naphthalene the best option. This approach allowed the synthesis of the anti-HBV agent 2-amino-9-(2,3-dideoxy- β -D-glycero-pentofuranosyl)-6-methoxypurine precursor **247b** ($\text{R}^1 = \text{H}$).

3.6. Other Cyclic Sulfates- Polyols

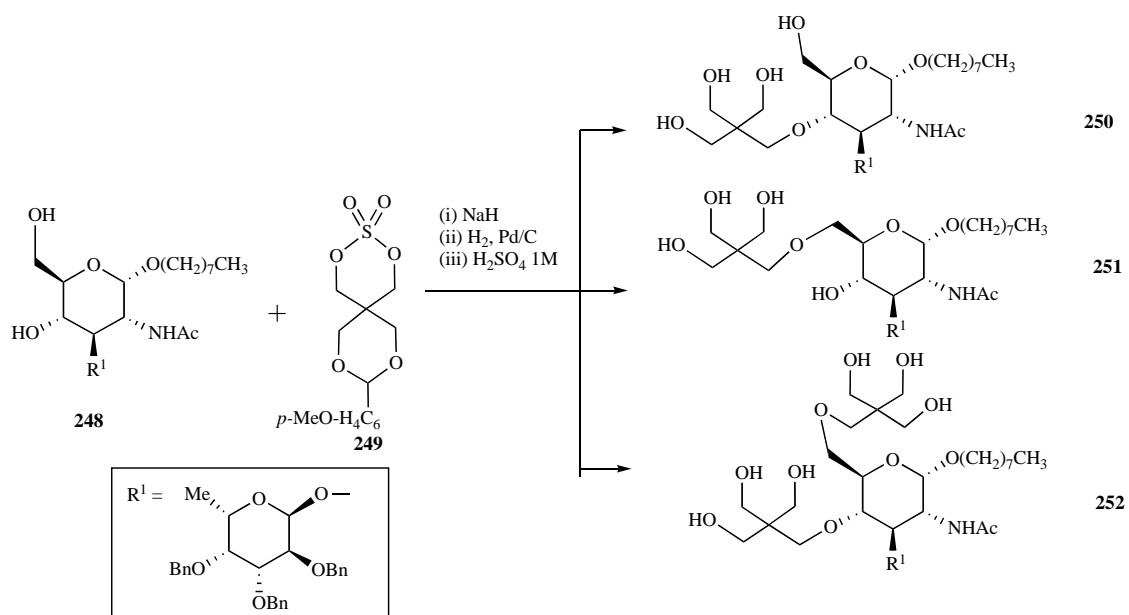
3.6.1. Reactions with Oxygenated Nucleophiles

Novel disaccharide inhibitors of human glioma cell division carrying a pentaerythritol chain at the C-4, C-6 or both positions were obtained by Aguilera *et al.* [80] through partial alkylation of the carbohydrate diol **248** (Scheme 42). The reaction of this compound with the cyclic sulfate derivative of pentaerythritol **249** gave a mixture of mono- and dialkylated compounds that after separation and hydrogenolysis provided the target unprotected nonsulfated compounds **250-252** when treated with sulfuric acid. The antimetabolic activity of these compounds was shown to be dependent on the structure and position of the hydroxylated chain linked to the disaccharide.

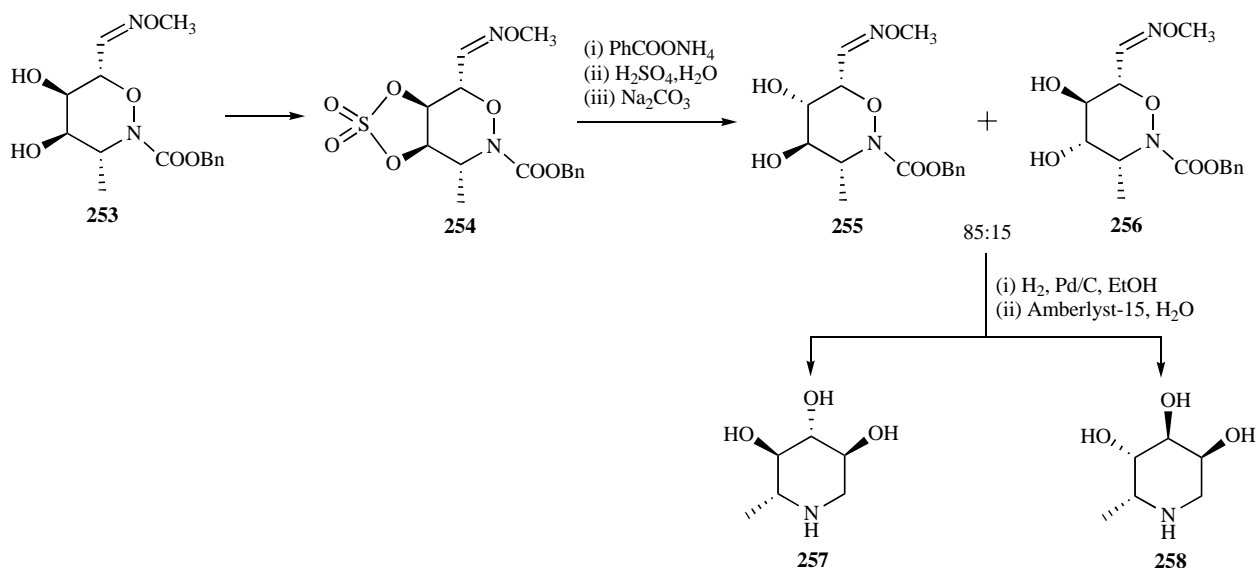
The reactivity of cyclic sulfates was exploited by Defoin *et al.* [81] as a straightforward way for accessing the ω -deoxyazasugars 1,6-dideoxynojirimycin (**257**) and 1,6-dideoxy-D-gulo-nojirimycin (**258**) related with enzymatic inhibitors (Scheme 43). The key step required a single and specific configurational inversion on the intermediate diol **253** obtained from an asymmetric hetero-*Diels-Alder* reaction. For that purpose, formation of the corresponding cyclic sulfate **254** was followed by nucleophilic ring opening with



Scheme 41.



Scheme 42.

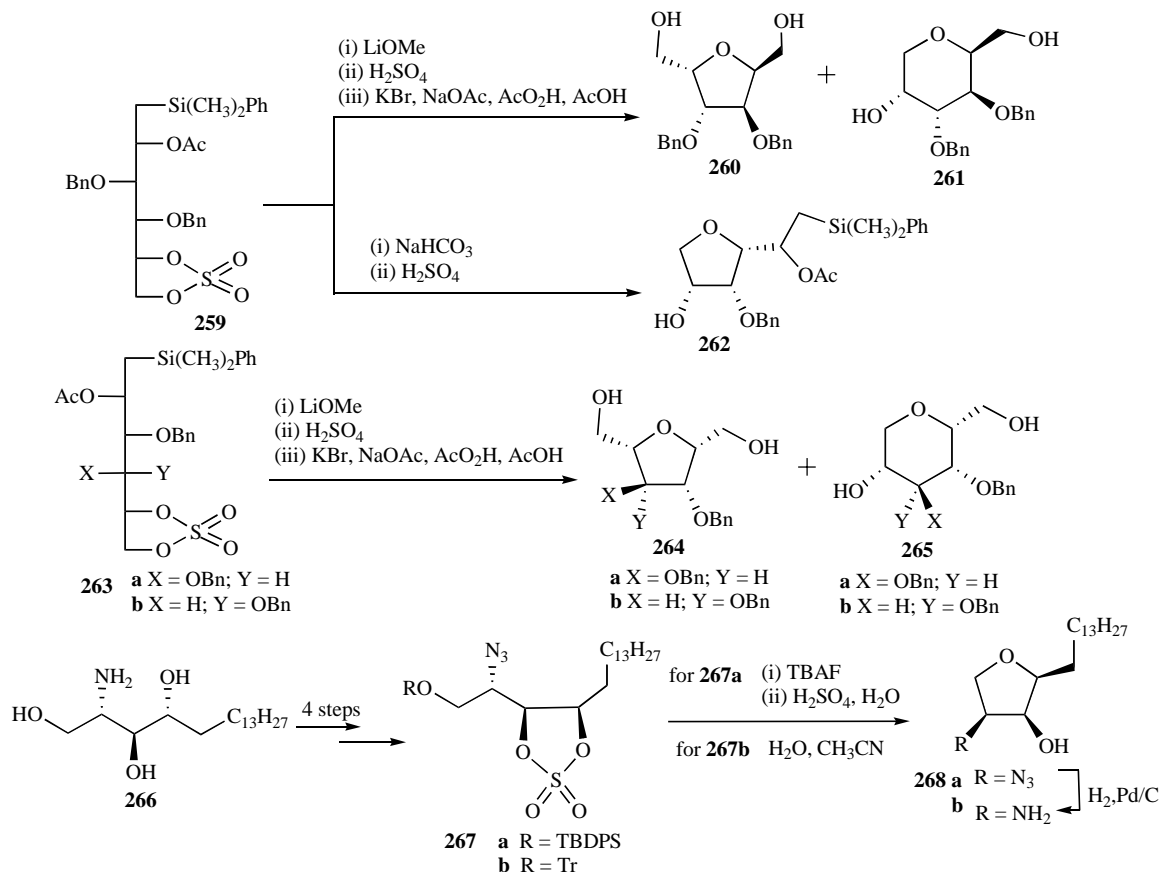


Scheme 43.

ammonium benzoate, acid hydrolysis and saponification leading to a mixture of the *trans*-diols **255** and **256** with the required stereochemistry. *N*-deprotection and hydrogenolysis of these compounds gave enantiomeric pure ω -deoxyazasugars **257** and **258**.

Cyclic sulfate derivatives of hexitols were used by van Delft *et al.* [82] as starting materials for accessing anhydrohexitols and tetrahydrofuran derivatives by the base-induced *5-exo-tet* cyclization through the intramolecular nucleophilic attack of a remote hydroxyl

function (Scheme 44). Thus, treatment with LiMeO of the 5,6-*O*-cyclic sulfate derivatives **259** led to an isomeric mixture of the cyclized compounds of the corresponding furanose and pyranose derivatives (ratio 5:2 respectively) resulting from the attack of the O-2 at the C-5 and C-6 position, respectively, which was resolved by subsequent desulfonation and oxidative unmasking of the silyl function to yield compounds **260** and **261**. Surprisingly, the use of NaHCO₃ instead of LiMeO in the treatment of compound **259** af-



Scheme 44.

forded the 1,4-anhydro-L-gulitol derivative **262** the formation of which can be explained by a tandem cycloetherification: de-*O*-benzylation and nucleophilic attack of O-3 at the primary C-6 position. Diastereomeric cyclic sulfates **263a** and **263b** gave similar results in their treatment with LiMeO and mixtures of the furanose and pyranose derivatives **264** and **265** were obtained. In all cases the furanose derivatives were the major products. The same methodology was employed by Lee *et al.* [83] for the synthesis of pachastrissamine (**268b**), a natural anhydrophytosphingosine. The relatively unstrained cyclic sulfate intermediate **267**, obtained from D-ribo-phytosphingosine **266** [84], underwent the 5-*exo-tet* cyclization to yield the 2,3,4-trisubstituted tetrahydrofuran ring system of pachastrissamine. Intramolecular nucleophilic attack was produced *in situ* by desilylation or by cleavage of trityl ether. The second alternative gave directly the free alcohol while desilylation was followed by acid hydrolysis to obtain azidoalcohol **268a**, direct precursor of pachastrissamine by reduction of azide to amine group.

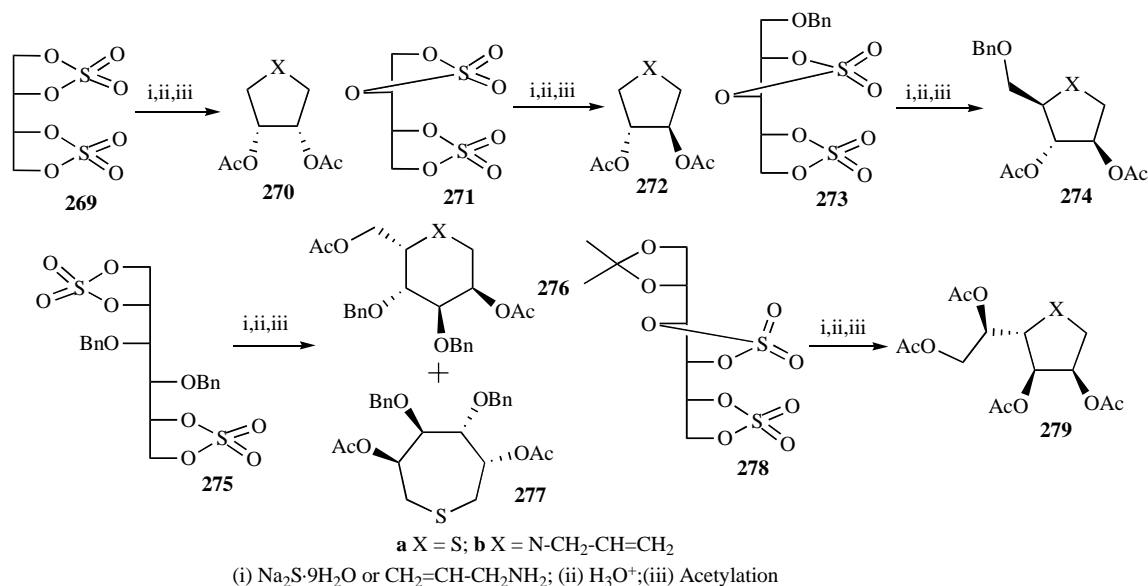
3.6.2. Reactions with Sulphur and Nitrogen Nucleophiles

Thioheterocycles were synthesized by Glacon *et al.* [85] using a variety of 1,2:3,4 and 1,2:5,6-bis cyclic sulfate derivatives of some alditols as biselectrophile intermediates (Scheme 45). The synthesis in two steps of these bis-cyclic sulfates gave in each case only one regioisomer resulting from the formation of cyclic sulfates between vicinal hydroxyl groups. Thioheterocyclization was carried out using sulfide ion, acid hydrolysis of the acyclic sulfates and acetylation. In the case of the disulfates **269** and **271**, 1,4-primary-primary heterocyclization takes place readily in good yields. With compound **273** and **278**, primary-secondary cyclization occurs less easily in moderate yields. When the starting material was the D-mannitol derivative **275**, 1,5- and 1,6-heterocyclization results and thiopyran **276a** and thiepane **277** (ratio 2.5:1 respectively) were obtained by competitive processes, the first being the major compound. These same authors used these bis-cyclic sulfates (**269**, **271**, **273**, **275** and **278**) for the easy synthesis of polyhydroxylated piperidines and pyrrolidines, a major class of glycosidase and glycosyl transferase enzyme inhibitors [86,87] (Scheme 45). Treatment with allylamine instead of sodium sulfide caused heterocyclization yielding the N-allylpyrrolidines **270b**, **272b**, **274b** and **279b** and the N-allylpiperidine **276b**.

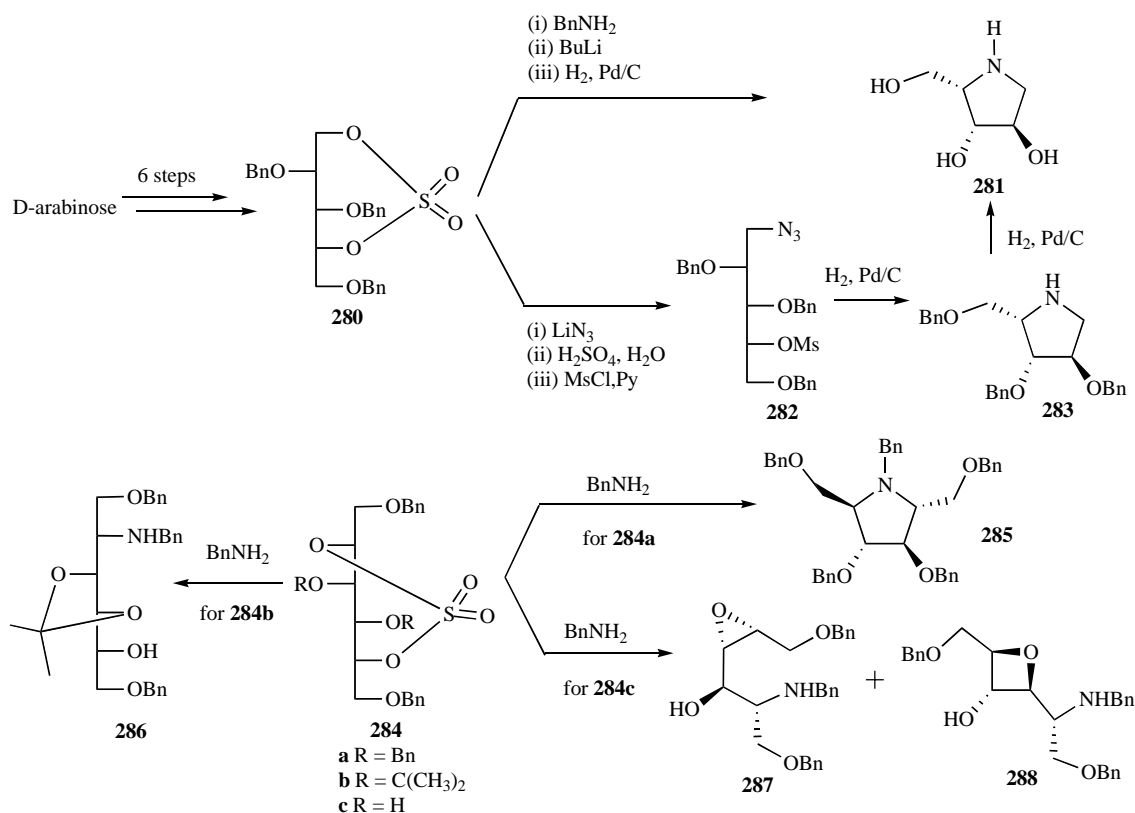
On the other hand, the well known capability of cyclic sulfates to undergo double nucleophilic displacements [5] was a useful strategy for the synthesis of pyrrolidines by opening the seven-membered cyclic sulfate ring in some alditol derivatives with N-nucleophiles (Scheme 46). Thus, Van der Klein *et al.* prepared 2,3,5-tri-*O*-benzyl-D-arabinitol 1,4-sulfate (**280**) from D-arabinose in six steps [88] and obtained [89] the pyrrolidine **281** by reaction with benzylamine and treatment of the monosulfate intermediate with *n*-butyllithium and subsequent hydrogenolysis of the benzyl groups. Alternatively, cyclic sulfate **280** was treated with lithium azide followed by hydrolysis and esterification with mesyl chloride to obtain **282**. Reduction of the azide function was accompanied by intramolecular cyclization yielding the pyrrolidine **283**. The strategy was extended to other polyhydroxylated pyrrolidines starting from D-xylose and L-arabinose. Lohray *et al.* [90] also employed this methodology to obtain 2,5-dihydroxymethyl-3,4-dihydroxypyrrolidine derivatives from seven-membered cyclic sulfates derived from hexitols. In this case, an influence of the protecting group on the course of reaction was observed in such a way that the formation of the dihydroxypyrrolidine **285** was only feasible in the reaction of benzyl protected cyclic sulfate **284a** with benzylamine. Conversely, cyclic sulfate **284b** bearing an acetonide group yielded the monoamine derivative **286** in low yield after hydrolytic work up due to the ring strain, which inhibited the formation of the fused two five membered rings. Finally, treatment with benzylamine in the unprotected derivative **284c** led to a mixture of the substituted oxirane **287** and oxetane **288** in a 1:1 ratio. In this case, the reaction proceeds *via* a monoamine intermediate with the *O*-sulfate as leaving group and participation of two different OH groups as internal nucleophiles. From these results, the authors concluded that double displacement to furnish pyrrolidine derivatives is not feasible if the 3,4-hydroxyl groups are either free or protected as acetonide.

3.6.3. Reactions with Other Nucleophiles

The reaction of the 1,4-cyclic sulfate derived from D-mannitol **289** with carbon nucleophiles was a key intermediate for the synthesis of KDO (3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid) and derivatives (Scheme 47). KDO is an integral component of lipopolysaccharides isolated from cell walls of Gram-negative bacteria. Van der Klein *et al.* [91] performed the nucleophilic ring-opening of **289**



Scheme 45.



Scheme 46.

with the anion generated *in situ* from ethyl 1,3-dithiane-2-carboxylate **290** and butyllithium, as a first step to a route for the preparation of KDO (**292**) that required the dithioacetal group unmasking and removal of the acetonide protecting groups. These same authors [92] prepared the KDO glycosyl donors **293** and **294** by reaction of **292** with the dithioacetal of methylglyoxylate as the carbon nucleophile (Scheme 47). Iodonium ion promoted cyclization of the resulting diethyl dithioacetal **291b** with *N*-iodosuccinimide (NIS) or iodonium *s*-dicollidine perchlorate (IDCP) yields ethyl-2-thio- α -glycoside **293** or the KDO-glycal **294**, respectively. This strategy was also effective in the conversion of cyclic sulfate **280** into some precursors of DAHP (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate) analogues [88] by treatment with different carbanions (**295**, **296** and **297**) (Scheme 47). Mild acid hydrolysis and finally unmasking of the dithioacetal function with *N*-bromosuccinimide (NBS) afforded anomerically pure **298**, the derivative **299** (α/β -mixture) and lactone **300**. Finally, polyhydroxylated furan and pyran derivatives **303** and **304** were prepared in a ring opening process from cyclic sulfate **301** by reaction with a carbon nucleophile that yielded compound **302** from which the mentioned derivatives were obtained by removal of the protective groups [93] (Scheme 47).

On the other hand Li *et al.* [94] reported the double nucleophilic displacement of cyclic sulfate derivatives of D-mannitol **305** with phenylphosphine and 1,2-phenylenediphosphine broadening the applications of cyclic sulfates to the synthesis of chiral hydroxyl mono- and bis-phospholanes (Scheme 48). Although *O*-benzyl ether protection afforded monophospholanes **306a** and **306b** in high yields, the unprotected hydroxyl phospholanes could not be obtained from these compounds due to reduction of the phenyl group attached to phosphine to a cyclohexyl group during the cleavage of benzyl ether. In contrast, the isopropylidene group in **306c**, **307a**

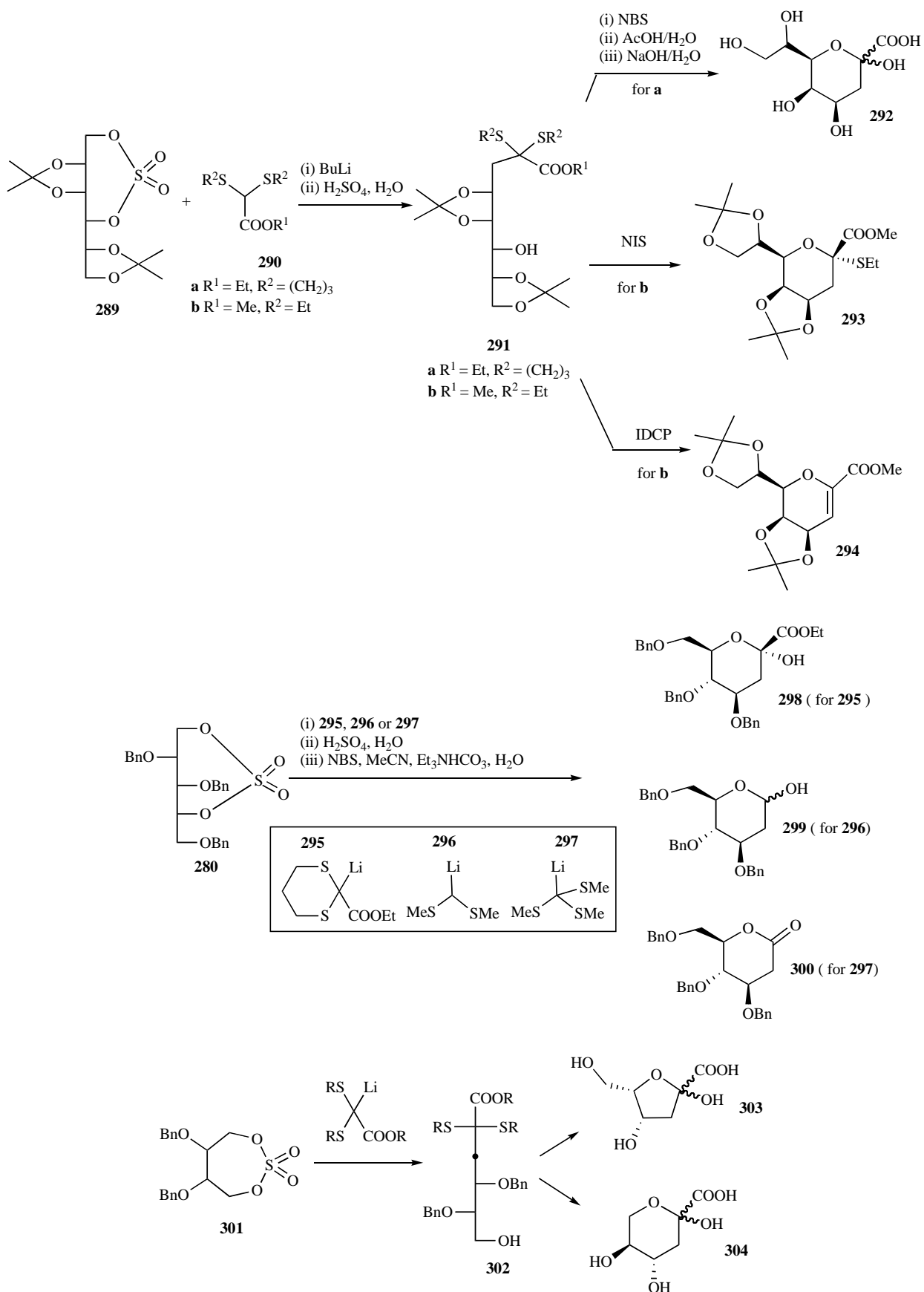
and **307c** could be smoothly removed by acid-catalyzed hydrolysis in order to obtain hydroxyl mono- and bis-phospholanes (**306d**, **307b**, **307d**).

3.6.4. Miscellaneous: Synthesis of Salacinol and Derivatives

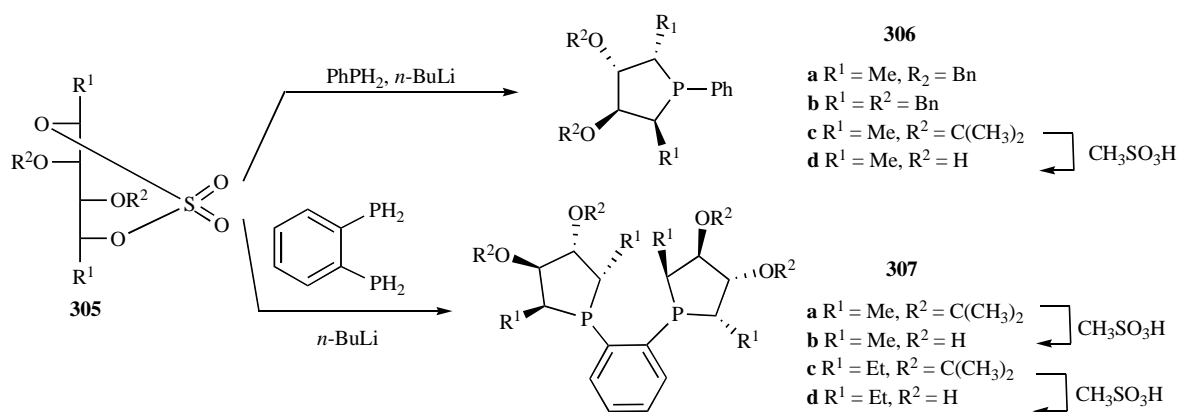
Salacinol (**308**) and kotalanol (**309**) (Fig. 3), naturally occurring α -glucosidase inhibitors isolated from the roots and stems of the plant *Salacia reticulata* [95,96], and containing a zwitterionic sulfonium-sulfate structure comprising a 1,4-anhydro-4-thio-D-arabinitol core alkylated at sulfur by a polyhydroxylated acyclic chain, have been synthesized by chemical strategies that exploit cyclic sulfate chemistry.

Yuasa *et al.* [97] first reported the synthesis of salacinol and its diastereomer by ring-opening reaction of the protected cyclic sulfate **310** derived from erythritol with 1,4-anhydro-4-thio-D-arabinitol **311** followed by removal of protecting groups (Scheme 49). For this reaction, the addition of K₂CO₃ was shown to be necessary to prevent the unwanted hydrolysis of the cyclic sulfate [98] and also a significant improvement in yield was reported due to an unusual solvent effect provided by 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) [99].

Since then, salacinol has attracted a great deal of attention, and extensive research has been done in the synthesis of salacinol analogues [100]. In all cases, the key step for the formation of the zwitterionic alkylated product is the nucleophilic attack at the least hindered carbon atom of a protected cyclic sulfate by the heteroatom of a protected or unprotected anhydroalditol (Scheme 50). This synthetic strategy provided flexibility for the synthesis of analogues having other heteroatoms in the ring such as nitrogen or selenium, five, six or seven membered rings with different stereochemistry, acyclic chain extended analogues as kotalanol, deoxy and de-*O*-sulfonated analogues.



Scheme 47.



Scheme 48.

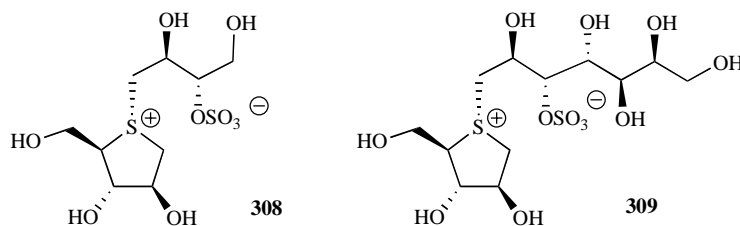
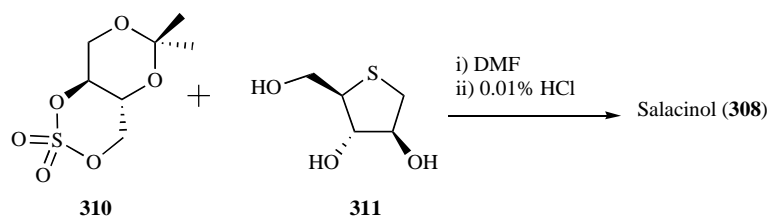
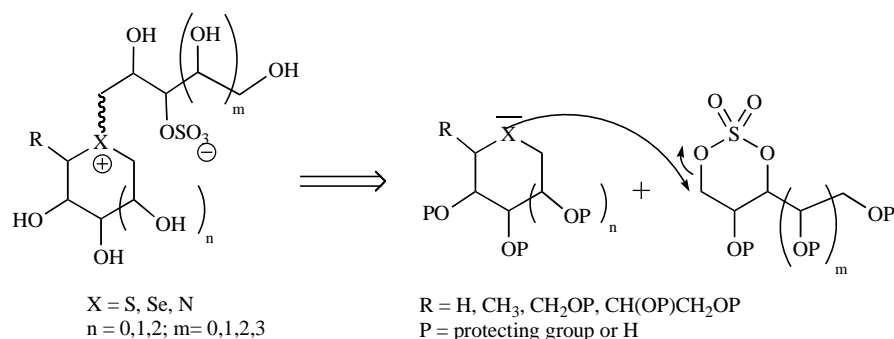


Fig. (3).



Scheme 49.

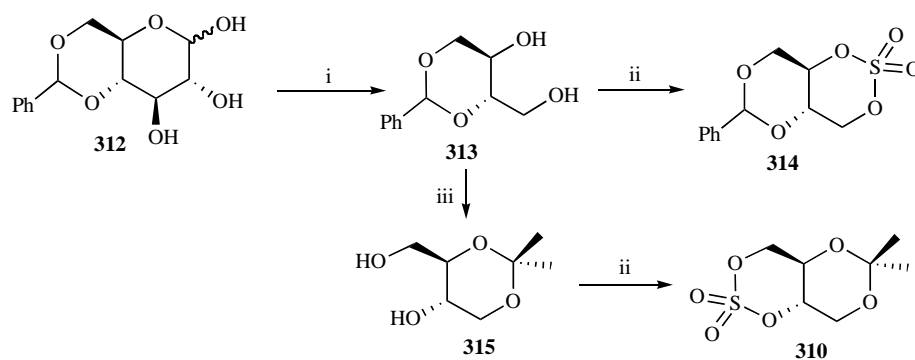


Scheme 50.

The cyclic sulfates usually employed in the preparation of salacinol analogues are protected D- and L-erythritol cyclic sulfates which can be synthesized from suitably protected D-glucose [101] as indicated in Scheme 51. Periodate oxidation of 4,6-O-benzylidene-D-glucose (**312**) followed by reduction of the resulting aldehyde led to the corresponding diol **313**, that is transformed into the D-cyclic sulfate **314** by a one-pot procedure. In the case of L-cyclic sulfate, the diol was first protected as an isopropylidene ketal, the benzylidene group selectively removed and the corresponding diol **315** subjected to the one-pot procedure to give the L-cyclic sulfate **310**.

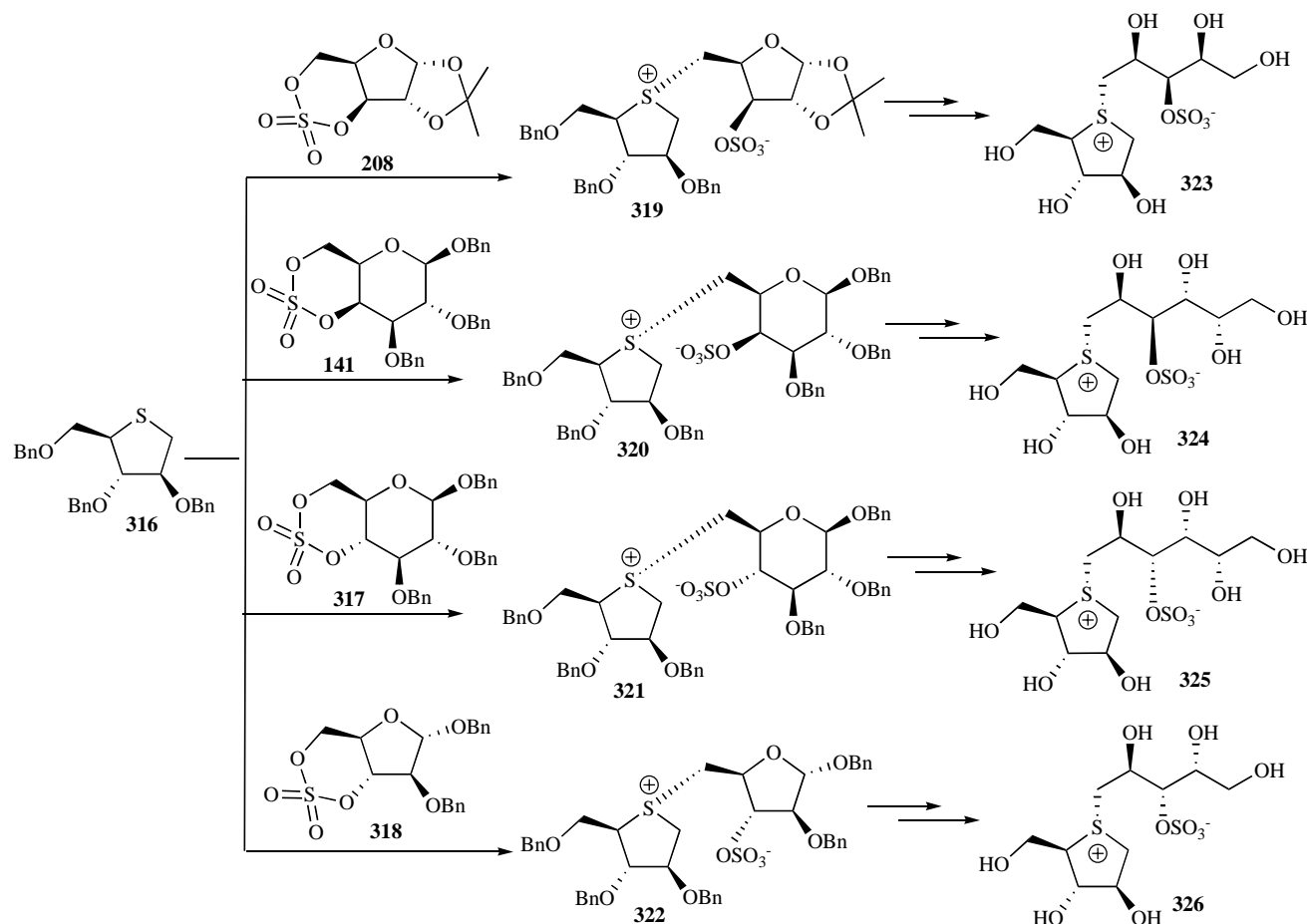
Recently, Johnston *et al.* [102] addressed the synthesis of four chain-extended analogues of salacinol (**323-326**) having polyhydroxylated acyclic chains of 5- and 6-carbons (Scheme 52). In con-

trast to previous works, in this case the cyclic sulfates employed are derivatives of different monosaccharides, specifically 3,5- (**208** and **318**) and 4,6-cyclic sulfates (**141** and **317**), respectively. Thus, the reaction of anhydro-4-thio-D-arabinitol **316** with the cyclic sulfates **141**, **208**, **317** and **318** yielded the protected sulfonium sulfate compounds **319-322**. The reactivity of these cyclic sulfates varied widely, with the D-glucose derivative **317** being the least reactive and the strained cyclic sulfate **318** the most reactive. Subsequent deprotection and reduction with NaBH_4 provided the desired salacinol homologues **323-326**. Their glycosidase inhibitory properties against recombinant human maltase glucoamylase (MGA), relevant to the control of Type 2 diabetes, were also studied. Biological assays revealed that compounds **324-326** inhibit MGA with a K_i value of 0.25, 0.26 and 0.17 μM , respectively, while compound **323** did not inhibit the activity of this enzyme.



i) (a) NaIO₄, NaHCO₃, H₂O; (b) NaBH₄, H₂O/EtOH; ii) (a) SOCl₂, Et₃N; (b) RuCl₃, NaIO₄; iii) (a) CH₃(OCH₃)C=CH₂, TsOH; (b) H₂, Pd/C.

Scheme 51.



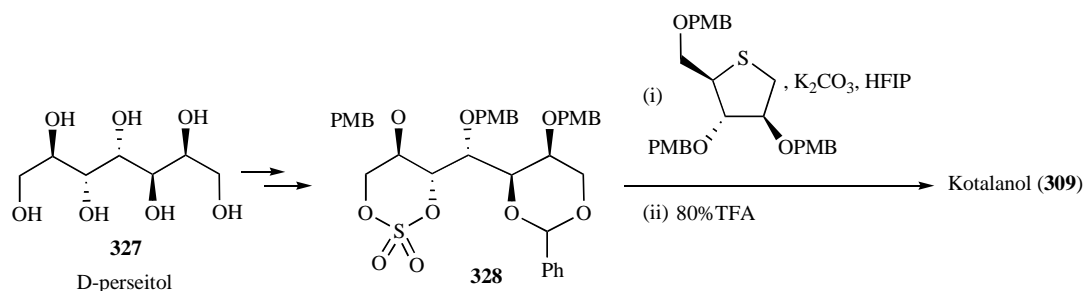
Scheme 52.

Recently, Jayakanthan *et al.* [103] reported the exact stereochemical structure of kotalanol (**309**) and performed its synthesis from the cyclic sulfate **328** derived from D-perseitol (**327**) as indicated in Scheme 53.

4. CYCLIC SULFAMIDATES DERIVED FROM CARBOHYDRATES

The first and more general method for the synthesis of cyclic sulfamidites consists of the treatment of a α - or β -aminoalcohol with thionyl chloride in the presence of a tertiary amine (triethylamine or pyridine) in a non-polar solvent (hexane or benzene) leading to five- or six-membered cyclic sulfamidites, respectively [104]. Use of more polar solvents (acetonitrile and dichloro-

methane), nucleophilic heterocycles (imidazole and pyridine), and lower temperatures improved the results [105]. The formation of cyclic sulfamidate derivatives of aminoalcohols permits the protection of the nitrogen moiety and the conversion of the hydroxyl group into a leaving group. The most direct approach for their synthesis is the reaction of the aminoalcohol with sulfuryl chloride [106]. However, this process has some difficulties due to the unavoidable formation of the corresponding aziridines [107] and the observed incomplete transformation of the starting material in some cases [108,109]. The use of 1-(1'-sulfonyldiimidazole and subsequent treatment with acetyl chloride to reinstall on the nitrogen atom the acetyl group that is cleaved during the reaction is an alternative employed to overcome those limitations [108,109]. However, the most usual method for synthesizing cyclic sulfamidates is, as



Scheme 53.

in the case of the conversion of cyclic sulfites to cyclic sulfate, the oxidation of the corresponding sulfamidite with the ruthenium tetroxide/sodium periodate system [2]. More recently, Burgess reagent [110-112] and Burgess-type reagents have been employed in the synthesis of cyclic sulfamidates from 1,2-diols [113-115].

Bentifa *et al.* [116] recently applied the Burgess reagent methodology for the synthesis of cyclic sulfamidates on a series of 1,2-diols **330** derived from methylene *exo*-glycals of different sugar series (furanose and pyranose) (**329**) bearing different types of protective groups (isopropylidene, silyl and benzyl ethers) (Scheme 54). Some of these spiro-sulfamidates (**331**) were shown to be weak but very selective inhibitors of α -glucosidase and amyloglucosidase.

Up to the present, the synthetic applications of cyclic sulfamidites are scarce in general and particularly in carbohydrate chemistry. To the best of our knowledge in this field there are no literature reports concerning the applications of cyclic sulfamidites derived from sugars except those in which they act as intermediates for the preparation of cyclic sulfamidates. However, the ability of cyclic sulfamidates to serve in selective activation and effectual protection of heteroatomic functional groups makes them important precursors in organic synthesis. The chemistry of cyclic sulfamidates derived from sugars is focused on the treatment of these heterocycles with different nucleophiles as is detailed below.

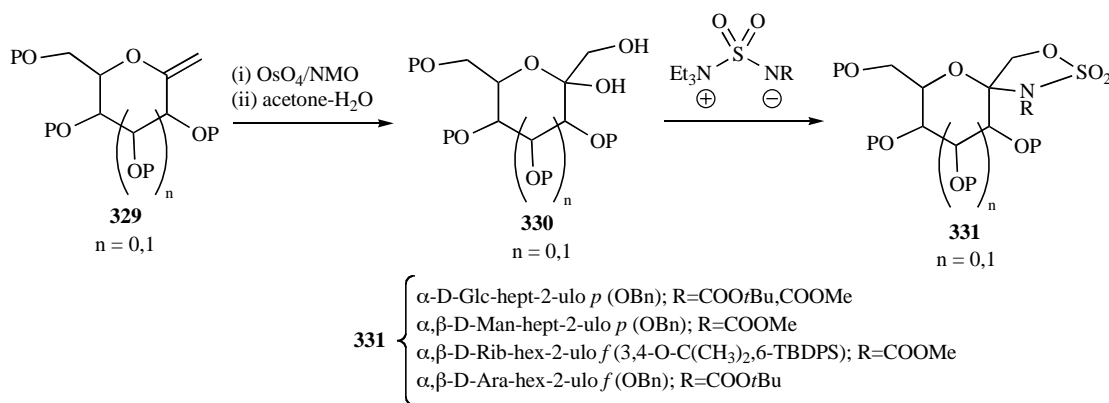
4.1. 1,2-Cyclic Sulfamidates

4.1.1. Reactions with Nitrogen Nucleophiles

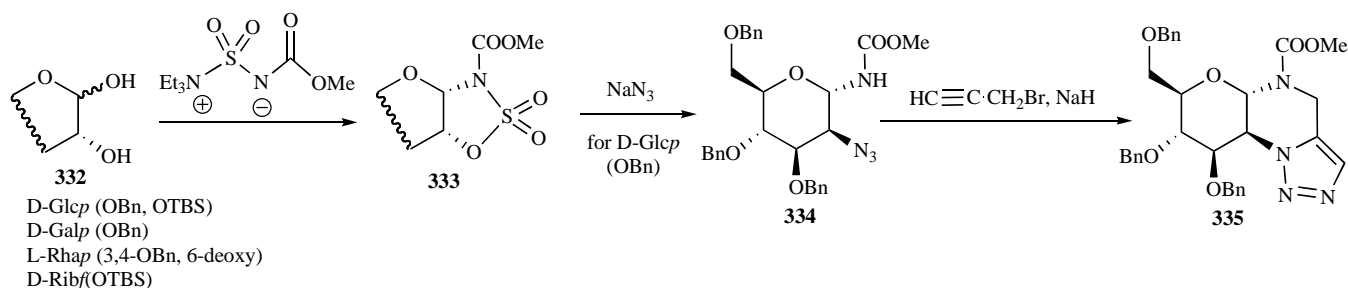
A variety of diols on diverse carbohydrate scaffolds (D-Glc, D-Gal, L-Rha, D-Rib) (**332**) were converted into their α -disposed sulfamidate counterparts **333** by means of the Burgess reagent in a stereoselective manner that is exceedingly mild, operationally simple and tolerant of numerous functional and protecting groups. This methodology was used by Nicolau *et al.* [114,115] for accessing α -glycosylamines, arguably the more difficult anomer to synthesize in a controlled manner (Scheme 55). Opening of the sulfamidate ring with sodium azide as nucleophile afforded 1,2-*trans*-difunctionalized glycosylamine **334** in the case of the Glc series. In a further step ahead, Sai Sudhir. *et al.* [117] broadened the application of this compound to the synthesis of triazole fused heterocycles by the one-pot propargylation and subsequent click cycloaddition of the alkyne and azide functions to yield the carbohydrate condensed triazole derivative **335** (Scheme 55).

4.2. 2,3-Cyclic Sulfamidates

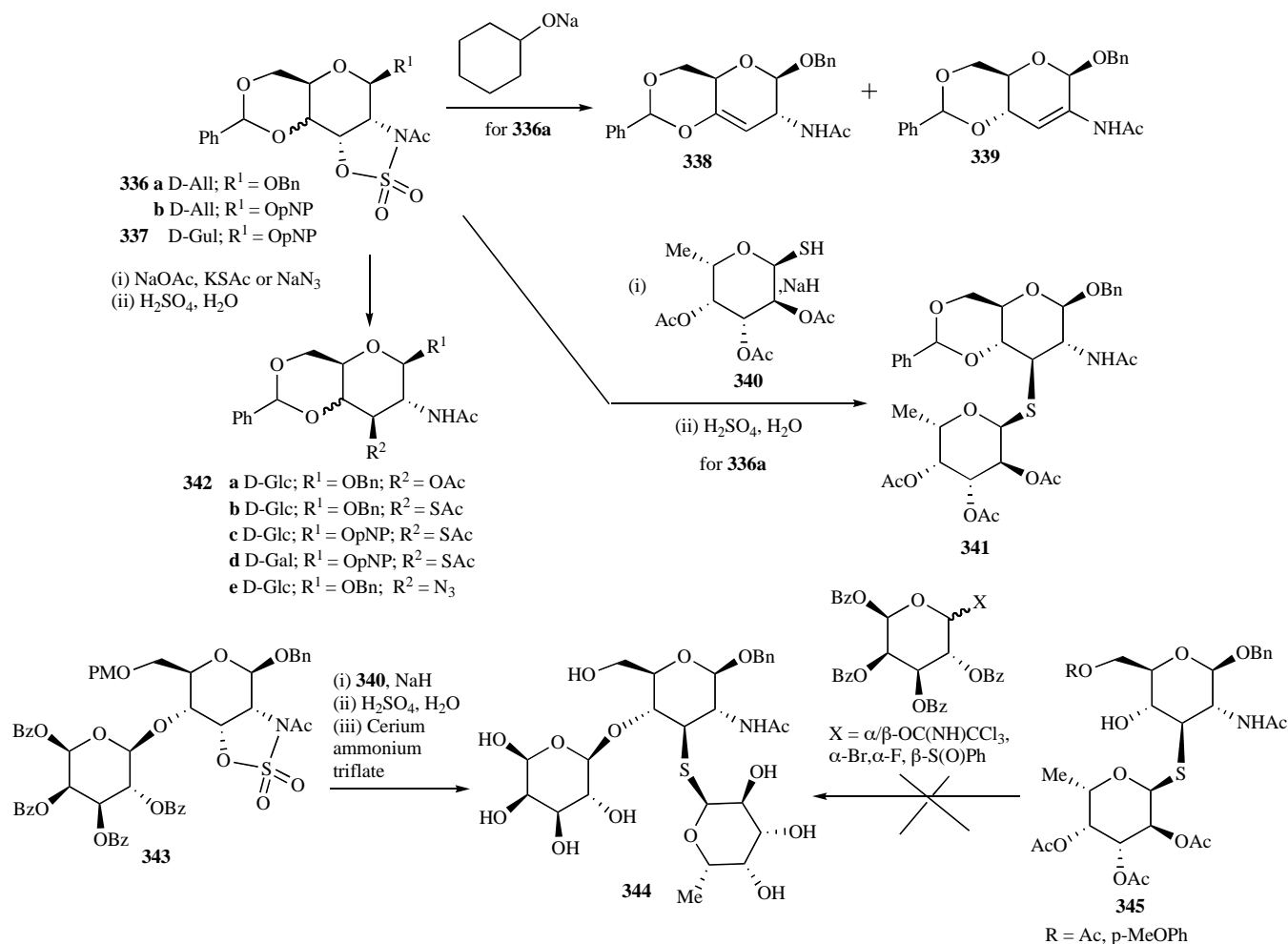
Aguilera *et al.* [108,109] synthesized the 2,3-cyclic sulfamidate derived from N-acetyl-D-allosamine **336a** and studied their behavior in the reaction with different nucleophiles (Scheme 56). For this



Scheme 54.



Scheme 55.



Scheme 56.

compound, the ring opening was only feasible with strong non-carbon nucleophiles of low basicity, such as thioacetate and thiol derivatives, azide or, in a lesser extent, acetate ion. Thus, with oxyanions such as cyclohexanolate, the elimination of the sulfamidate group in **336a** was the main pathway, providing a mixture of allylic amine **338** and enamine **339** (1:0.8, respectively), whereas compound **342a** was obtained in moderate yield when sodium acetate was employed.

In the case of sulphur nucleophiles, **342b** was obtained in good yields starting from cyclic sulfamidate **336a** [108,109]. Sodium thioacetate was also employed by Chen *et al.* [118] to obtain the 3-thio derivatives of 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (**342c** and **342d**) starting from 2,3-cyclic sulfamidates of D-Allo and D-Gul configuration **336b** and **337**. In addition, the thiodisaccharide **341** [108,109] and the thiotrisaccharide analogue of Lewis X **344** [119] were obtained in satisfactory yields by the regioselective opening of the 2,3-cyclic sulfamidates **336a** and **343** with fucose-1-thiolate **340**. Attempts to obtain this trisaccharide by galactosylation of compound **345** with different galactosyl donors (trichloroacetimidate, bromide, fluoride and sulfoxide) failed.

Concerning N-nucleophiles, sodium azide produced the effective regioselective ring opening of the 2,3-cyclic sulfamidates **336a** to afford the 3-azido derivative **342e** in high yield. However, when sodium imidazolite was employed as N-nucleophile the N-deacetylated compound was obtained [109]. Similarly, all C-

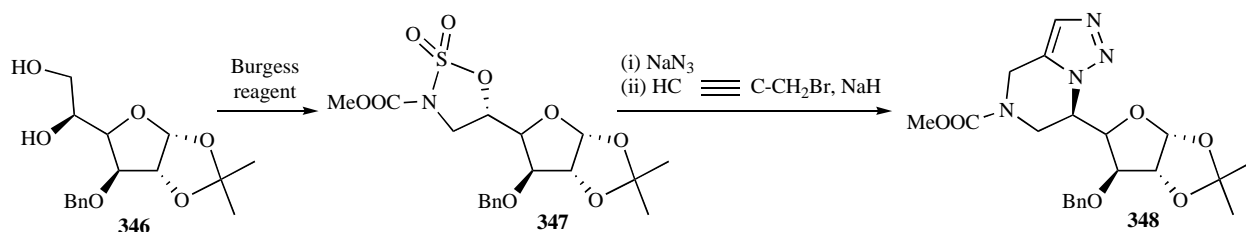
nucleophiles tested in the reaction with cyclic sulfamidate **336a** (NaCN, Li-C≡C-TMS and vinylmagnesium bromide) led to N-deacetylation [109].

4.3. 5,6-Cyclic Sulfamidates

The D-glucose 5,6-cyclic sulfamidate derivative **347** obtained from the furanose **346** was reported by Chandrasekaran *et al.* [117] as a suitable intermediate in the preparation of the triazole fused heterocycle **348** through a similar pathway to that used in 1,2-cyclic sulfamidate (Section 4.1.1) by opening the ring with sodium azide followed by subsequent one-pot alkylation and click cycloaddition (Scheme 57).

5. CONCLUSIONS

The results presented in the present review demonstrate the ability of cyclic sulfites, cyclic sulfates and cyclic sulfamidates to perform the selective activation and judicious protection of the hydroxy and amino functional groups naturally present in carbohydrates and polyols. This ability allows a rational and versatile exploitation of the bimolecular nucleophilic substitution chemistry, one of the most useful reaction in carbohydrate chemistry, that has allowed a wide variety of transformations and their applications for accessing chemically and biologically important molecules. The relatively easy preparations of these sulfur derivatives and their high chemical stability permits to anticipate their increased use in



Scheme 57.

the carbohydrate field and a fruitful future limited only by the level of creativity of the research community.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial Support was provided by Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (CTQ2008-01754) and Junta de Andalucía (P07-FQM-02899). A. Megia-Fernandez thanks the Spanish Ministerio de Educacion for a research fellowship (FPU) and J. Morales-Sanfrutos thanks the University of Granada for a research contract (Programa Puente).

REFERENCES

- Baker, W.; Field, F. B. Cyclic esters of sulfuric acid. II. Constitution of methylene and glyoxal sulfates and the reaction of methylene sulfate with tertiary bases. *J. Chem. Soc.*, **1932**, 86-91.
- Gao, Y.; Sharpless, K. B. Vicinal diol cyclic sulfates. Like epoxides only more reactive. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 7538-7539.
- Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 2483-2547.
- Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Synthesis and reactivity of cyclic sulfamidites and sulfamidates. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 2581-2616.
- Lohray, B. B. Cyclic sulfites and cyclic sulfates: epoxide like synthons. *Synthesis*, **1992**, 1035-1052.
- Lohray, B. B.; Bhushan, V. 1,3,2-Dioxathiolane oxides: epoxide equivalents and versatile synthons. *Adv. Heterocycl. Chem.*, **1997**, *68*, 89-180.
- Byun, H. S.; He, L. L.; Bittman, R. Cyclic sulfites and cyclic sulfates in organic synthesis. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 7051-7091.
- Erden, I. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Padwa, A., Ed. **1996**; Vol. 1A, pp. 145-171.
- Honeyman, J.; Morgan, J. W. W. Sugar nitrates. II. The preparation and reactions of some nitrate, sulfonates, sulfamates, and other esters of methyl 4,6-O-benzylidene- α -D-glucoside. *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3660-3674.
- Guiller, A.; Gagnieu, C. H.; Pacheco, H. Synthesis of cyclic 1,2-sulfites of glycosides. *J. Carbohydr. Chem.*, **1986**, *5*, 153-160.
- Kim, B. M.; Sharpless, K. B. Cyclic sulfates containing acid-sensitive groups and chemoselective hydrolysis of sulfate esters. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 655-658.
- Wang, Y.; Hogenkamp, H. P. C. The synthesis and the proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of the cyclic sulfites of some sugars. *Carbohydr. Res.*, **1979**, *76*, 131-140.
- Denmark, S. E. Facile oxetane formation in a rigid bicyclo[2.2.2]octane system. *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 3144-3147.
- Elmeslouti, A.; Beaupere, D.; Demailly, G.; Uzan, R. One-pot stereoselective synthesis of glycosyl azides via 1,2-cyclic sulfite. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3913-3916.
- Hardacre, C.; Messina, I.; Migaud, M. E.; Ness, K. A.; Norman, S. E. 1,2-Cyclic sulfite and sulfate furanoside diesters: improved syntheses and stability. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 6341-6347.
- Aouad, M. E. A.; Elmeslouti, A.; Uzan, R.; Beaupere, D. A stereoselective O-aryl glycosylation procedure via 1,2-cyclic sulfite. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6279-6282.
- Sanders, W. J.; Kiessling, L. L. Stereoselective, Lewis acid-catalyzed glycosylation of alcohols by glucose 1,2-cyclic sulfites. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 7335-7338.
- Guiller, A.; Gagnieu, C. H.; Pacheco, H. Synthesis of glycoside azides and benzoates from cyclic 1,2-sulfites. *J. Carbohydr. Chem.*, **1986**, *5*, 161-168.
- Benksim, A.; Massoui, M.; Beaupere, D.; Wadouachi, A. Efficient O-glycosylation of diethyl oxoglutarate via 1,2-O-sulfinyl derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 5087-5089.
- Gagnieu, C. H.; Guiller, A.; Pacheco, H. Synthesis, structure and reactivity with nucleophiles of b-L-arabinopyranose 1,2:3,4-disulfite. *Carbohydr. Res.*, **1988**, *180*, 223-231.
- Beaupere, D.; Elmeslouti, A.; Lelievre, P.; Uzan, R. An alternative route to cis-1,2-fused oxazolidine-2-thione from 1,2-O-sulfinyl sugar derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 5347-5348.
- Gagnieu, C. H.; Guiller, A.; Pacheco, H. Synthesis of pyrimidine nucleosides unprotected at O-2' by cyclic sulfites at C-1-C-2. Part V. *Carbohydr. Res.*, **1988**, *180*, 233-242.
- Humenik, M.; Kutschy, P.; Kovacik, V.; Bekesova, S. 1,2-Anhydrosaccharides and 1,2-cyclic sulfites as saccharide donors in convergent synthesis of glucopyranosyl-, mannopyranosyl- and ribofuranosylbenzocamalexin. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2005**, *70*, 487-506.
- Lakhrissi, B.; Benksim, A.; Massoui, M.; Essassi, E. M.; Lequart, V.; Joly, N.; Beaupere, D.; Wadouachi, A.; Martin, P. Towards the synthesis of new benzimidazolone derivatives with surfactant properties. *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 421-433.
- Roussel, F.; Wadouachi, A.; Beaupere, D. N-glycosylation of aldoses. Synthesis of 1,2-cyclic carbamates via a 1,2-O-sulfinyl derivative. *Carbohydr. Lett.*, **2000**, *3*, 397-404.
- Benksim, A.; Beaupere, D.; Wadouachi, A. A novel stereospecific synthesis of glycosyl cyanides from 1,2-O-Sulfinyl derivatives. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 3913-3915.
- Guiller, A.; Gagnieu, C. H.; Pacheco, H. Substitution of sulfites of cyclic oxides by azide ion. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 6343-6344.
- Schuller, A. M.; Heiker, F. R. The chemistry of the 1-deoxynojirimycin systems. III. Synthesis of 2-acetamido-1,2-dideoxy-D-galacto-nojirimycin (2-acetamido-1,2,5-trideoxy-1,5-imino-D-galactitol) from 1-deoxynojirimycin. *Carbohydr. Res.*, **1990**, *203*, 308-313.
- Takatsuki, K.-i.; Yamamoto, M.; Ohgushi, S.; Kohmoto, S.; Kishikawa, K.; Yamashita, H. A new protecting group 3',5'-O-sulfinyl' for xlylo-nucleosides. A simple and efficient synthesis of 3'-amino-3'-deoxyadenosine (a puromycin intermediate), 2,2'-anhydro-pyrimidine nucleosides and 2',3'-anhydro-adenosine. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 137-140.
- Pineda Molas, M.; Matheu, M. I.; Castillon, S.; Isac-Garcia, J.; Hernandez-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Santoyo-Gonzalez, F. Synthesis of 3,6-anhydro sugars from cyclic sulfites and sulfates and their applications in the preparation of bicyclo nucleoside analogs of ddC and ddA. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 14649-14664.
- Gireaud, L.; Chaveriat, L.; Stasik, I.; Wadouachi, A.; Beaupere, D. Synthesis of 6-amino-6-deoxy-D-gulono-1,6-lactam and L-gulono-1,6-lactam derived from corresponding 5,6-O-sulfinyl hexono-1,4-lactones. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 7455-7458.
- Gireaud, L.; Chaveriat, L.; Stasik, I.; Wadouachi, A.; Beaupere, D. Synthesis of 6-amino-6-deoxy-D-gulono-1,6-lactam and L-gulono-1,6-lactam derived from corresponding 5,6-O-sulfinyl hexono-1,4-lactones. [Erratum to document cited in CA145:271962]. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 5328.
- Glacon, V.; Benazza, M.; El Anzi, A.; Beaupere, D.; Demailly, G. Synthesis of α,ω -diazido-alditol derivatives via both bis- or tris-cyclic sulfites and peracetylated α,ω -dibromo-alditols as bi-electrophilic intermediates. *J. Carbohydr. Chem.*, **2004**, *23*, 95-110.
- Molina, L.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Robina, I. Stereoselective synthesis of chiral furan amino acid analogues of D- and L-serine from D-sugars. *Synlett*, **2006**, 1327-1330.
- Moon, H. R.; Kim, H. O.; Chun, M. W.; Jeong, L. S.; Marquez, V. E. Synthesis of cyclo propyl-fused carbocyclic nucleosides via the regioselective opening of cyclic sulfites. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 4733-4741.
- Jeong, L. S.; Marquez, V. E. Use of a cyclic sulfite as an epoxide surrogate in the regioselective synthesis of a carbocyclic ring-enlarged 4',1'-methano oxetanocin analog. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 2353-2356.
- Fisher, G. W.; Zimmermann, T. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Bird, C. W.; Cheeseman, G. W. H., Eds.; Pergamon Press: New York, **1984**; Vol. 6, pp. 851-859.
- Lowe, G.; Salamone, S. J. Application of a lanthanide shift reagent in oxygen-17 NMR spectroscopy to determine the stereochemical course of oxidation of cyclic sulfite diesters to cyclic sulfate diesters with ruthenium tetroxide. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 1392-1394.
- Tewson, T. Cyclic sulfur esters as substrates for nucleophilic substitution. A new synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 3507-3510.
- Tewson, T. J.; Soderlind, M. 1-Propenyl 4,6-O-benzylidene- β -D-mannopyranoside-2,3-cyclic sulfate: a substrate for the synthesis of [F-18] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Carbohydr. Chem.*, **1985**, *4*, 529-543.
- Bragg, P. D.; Jones, J. K. N.; Turner, J. C. The reaction of sulfonyl chloride with glycosides and sugar alcohols. I. *Can. J. Chem.*, **1959**, *37*, 1412-1416.
- Jones, J. K. N.; Perry, M. B.; Turner, J. C. The reaction of sulfonyl chloride with glycosides and sugar alcohols. II. *Can. J. Chem.*, **1960**, *38*, 1122-1124.

- [43] Berridge, M. S.; Franceschini, M. P.; Rosenfeld, E.; Tewson, T. J. Cyclic sulfates: useful substrates for selective nucleophilic substitution. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 1211-1217.
- [44] Van der Klein, P. A. M.; Filemon, W.; Veeneman, G. H.; Van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Highly regioselective ring opening of five-membered cyclic sulfates with lithium azide: synthesis of azido sugars. *J. Carbohydr. Chem.*, **1992**, *11*, 837-848.
- [45] Marcaurrelle, L. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective elaboration of O-linked glycopeptide mimetics by alkylation of 3-thioGalNAc. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1587-1595.
- [46] Calvo-Flores, F. G.; Garcia-Mendoza, P.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-Garcia, J.; Santoyo-Gonzalez, F. Applications of cyclic sulfates of vic-diols: synthesis of episulfides, olefins, and thio sugars. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 3944-3961.
- [47] Serra, C.; Farras, J.; Vilarrasa, J. Cyclic sulfates as synthetic equivalents of α -epoxynucleosides. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 9111-9113.
- [48] Fuentes, J.; Angulo, M.; Pradera, M. A. Fluoronucleosides, isothiocyanato C-nucleosides, and thioureylene di-C-nucleosides via cyclic sulfates. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 2577-2587.
- [49] Guenther, S.; Nair, V. A new approach for the synthesis of novel 5-substituted isodeoxyuridine analogs. *Nucleosides Nucleotides. Nucleic Acids*, **2004**, *23*, 183-193.
- [50] Declercq, E.; Descamps, J.; Balzarini, J.; Giziewicz, J.; Barr, P. J.; Robins, M. J. Nucleic acid related compounds. 40. Synthesis and biological activities of 5-alkynyluracil nucleosides. *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 661-666.
- [51] Dagron, F.; Lubineau, A. Ring opening of benzyl b-D-galactoside cyclic sulfates into galactose monosulfates. New access to 6-deoxy-galacto-hex-5-enopyranoside and 4-deoxy-3-ketogalactopyranoside. *J. Carbohydr. Chem.*, **2000**, *19*, 311-321.
- [52] Calvo-Asin, J. A.; Calvo-Flores, F. G.; Exposito-Lopez, J. M.; Hernandez-Mateo, F.; Garcia-Lopez, J. J.; Isac-Garcia, J.; Santoyo-Gonzalez, F.; Vargas-Berenguel, A. Expedient synthesis of monosulfated thio-linked disaccharides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1079-1081.
- [53] Vargas-Berenguel, A.; Santoyo-Gonzalez, F.; Calvo-Asin, J. A.; Calvo-Flores, F. G.; Exposito-Lopez, J. M.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-Garcia, J.; Martinez, J., Synthesis of 6-deoxyheptose derivatives via cyclic sulfates and oxetanes. *Synthesis*, **1998**, 1778-1786.
- [54] Rochepeau-Jobron, L.; Jacquinet, J. C. Diastereoselective hydroboration of substituted exo-glucals revisited. A convenient route for the preparation of L-iduronic acid derivatives. *Carbohydr. Res.*, **1997**, *303*, 395-406.
- [55] Ferrier, R. J.; Middleton, S. The conversion of carbohydrate derivatives into functionalized cyclohexanes and cyclopentanes. *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 2779-2831.
- [56] Bazin, H. G.; Polat, T.; Linhardt, R. J. Synthesis of sucrose-based surfactants through regioselective sulfonation of acylsucrose and the nucleophilic opening of a sucrose cyclic sulfate. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *309*, 189-205.
- [57] Bazin, H. G.; Linhardt, R. J. Regiospecific synthesis of new methyl sulfoglucopyranoside-based surfactants. Nucleophilic displacement of a cyclic sulfate. *Synthesis*, **1999**, 621-624.
- [58] Pakulski, Z.; Zamojski, A. 6-Deoxyheptoses. *Pol. J. Chem.*, **1995**, *69*, 509-528.
- [59] Van der Klein, P. A.; Van Boom, J. H. Application of cyclic sulfates in the synthesis of 6-deoxy-D-manno-heptopyranose derivatives. *Carbohydr. Res.*, **1992**, *224*, 193-200.
- [60] Hellerqvist, C. G.; Lindberg, B.; Samuelsson, K.; Brubaker, R. R. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell-wall lipopolysaccharide from *Pasteurella pseudo-tuberculosis* Group II A. *Acta Chem. Scand.*, **1972**, *26*, 1389-1393.
- [61] Gourlain, T.; Wadouachi, A.; Uzan, R.; Beaupere, D. Synthesis of ether linked pseudo-oligosaccharides via 5,6-cyclic sulfate derivatives of protected manno and glucofuranose. *J. Carbohydr. Chem.*, **1997**, *16*, 1089-1100.
- [62] Gourlain, T.; Wadouachi, A.; Beaupere, D. Reaction of 5,6-cyclic sulfates derived from glucofuranoses with bases. A one-pot synthesis of 6-deoxy-hexofuranos-5-ulose derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 659-662.
- [63] Fuentes, J.; Angulo, M.; Pradera, M. A. Completely regioselective synthesis of 5- and 6- amino and fluoro-hexofuranoses via cyclic sulfates. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7149-7152.
- [64] Fuentes, J.; Angulo, M.; Pradera, M. A. Cyclic sulfates in the regioselective synthesis of 5- and 6-amino and 5- and 6-fluorohexofuranoses. *Carbohydr. Res.*, **1999**, *319*, 192-198.
- [65] Euzen, R.; Lopez, G.; Nugier-Chauvin, C.; Ferrieres, V.; Plusquellec, D.; Remond, C.; O'Donohue, M. A chemoenzymatic approach for the synthesis of unnatural disaccharides containing D-galacto- or D-fucopyranosides. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 4860-4869.
- [66] Santoyo-Gonzalez, F.; Garcia-Calvo-Flores, F. G.; Garcia-Mendoza, P.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-Garcia, J.; Perez-Alvarez, M. D. Synthesis of sugar episulfides and olefins from vic-diols via cyclic sulfates. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 461-462.
- [67] Parks, R. E.; Stoeckler, J. D.; Cambor, C.; Savarese, T. M.; Crabtree, G. W.; Chu, S. H.; Sartorelli, A. C.; Lazo, J. S.; Bertino, J. S. In *Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents*; Academic Press: New York, **1981**; Vol. 1.
- [68] Isac-Garcia, J.; Calvo-Flores, F. G.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. Synthesis of disaccharides, containing sulfur in the ring of the reducing monosaccharide unit, through a nonglycosylating chemical strategy. *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 1512-1525.
- [69] Bozo, E.; Boros, S.; Kuszmann, J.; Gacsbaits, E.; Parkanyi, L. Orally active antithrombotic thioglycosides, Part V. An economic synthesis of 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-5-thio-D-xylopyranose and its transformation into 4-substituted-phenyl 1,5-dithio-D-xylopyranosides possessing antithrombotic activity. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *308*, 297-310.
- [70] Bellamy, F.; Barberousse, V.; Martin, N.; Masson, P.; Millet, J.; Samreth, S.; Sepulchre, C.; Theveniaux, J.; Horton, D. Thioxyloside derivatives as orally active venous antithrombotics. *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, *30*, S101-S115.
- [71] Gourlain, T.; Wadouachi, A.; Beaupere, D. Regioselective synthesis of 6-alkynyl-6-deoxy and pseudo-C-disaccharide derivatives of mannofuranose via a 5,6-cyclic sulfate. *Synthesis*, **1999**, 290-294.
- [72] Gomez, A. M.; Valverde, S.; Fraser-Reid, B. A route to unsaturated spiroketals from phenylthiohex-2-enopyranosides via sequential alkylation, allylic rearrangement, and intramolecular glycosidation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1207-1208.
- [73] Perron, F.; Albizati, K. F. Chemistry of spiroketals. *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, 1617-1661.
- [74] Gérard, S.; Plantier-Royon, R.; Nuzillard, J.-M.; Portella, C. Synthesis of 3-trialkylsilyl pyrazoles from β -oxo acylsilanes. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 9791-9795.
- [75] Gourlain, T.; Wadouachi, A.; Beaupere, D. A new 6-C-alkylation from an alkyl mannofuranoside 5,6-cyclic sulfate. *Carbohydr. Res.*, **2000**, *324*, 66-73.
- [76] van Ende, D.; Krief, A. Stereoselective isomerizations of disubstituted olefins via seleniranes and thiiranes. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *31*, 2709-2712.
- [77] Chao, B.; McNulty, K. C.; Dittmer, D. C. Alkenes from cyclic sulfates and thionocarbonates of 1,2-diols via tellurium chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 7209-7212.
- [78] Kim, K. S.; Joo, Y. H.; Kim, I. W.; Lee, K. R.; Cho, D. Y.; Kim, M.; Cho, I. H. Reaction of cyclic sulfates with phosphines. *Synth. Commun.*, **1994**, *24*, 1157-1163.
- [79] Robins, M. J.; Lewandowska, E.; Wnuk, S. F. Nucleic Acid Related Compounds. 105. Synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxynucleosides from ribonucleoside cyclic 2',3'-(sulfates or phosphates) or 2',3'-dimesylates via reductive elimination with sodium naphthalenide. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 7375-7381.
- [80] Aguilera, B.; Romero-Ramirez, L.; Abad-Rodriguez, J.; Corrales, G.; Nieto-Sampedro, M.; Fernandez-Mayoralas, A. Novel Disaccharide Inhibitors of Human Glioma Cell Division. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4599-4606.
- [81] Defoin, A.; Sarazin, H.; Streith, J. Synthesis of 1,6-dideoxynojirimycin, 1,6-dideoxy-D-allo-nojirimycin, and 1,6-dideoxy-D-gulo-nojirimycin via asymmetric hetero-Diels-Alder reactions. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 560-567.
- [82] Van Delft, F. L.; Valentijn, A. R. P. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Preparation of 2,5-anhydrohexitols. Part II. Intramolecular nucleophilic substitution of cyclic sulfates. *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *18*, 191-207.
- [83] Lee, T.; Lee, S.; Kwak, Y. S.; Kim, D.; Kim, S. Synthesis of Pachastrissamine from Phytosphingosine: A comparison of cyclic sulfate as an epoxide intermediate in cyclization. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 429-432.
- [84] Kim, S.; Lee, S.; Lee, T.; Ko, H.; Kim, D. Efficient synthesis of D-erythro-sphingosine and D-erythro-azidosphingosine from D-ribo-phytosphingosine via a cyclic sulfate intermediate. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 8661-8664.
- [85] Glacon, V.; Benazza, M.; Beaupere, D.; Demailly, G. Reaction of 5,6-cyclic sulfates derived from glucofuranoses with bases. A one-pot synthesis of 6-deoxy-hexofuranos-5-ulose derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 5053-5056.
- [86] Winchester, B.; Fleet, G. W. Amino-sugar glycosidase inhibitors: Versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology*, **1992**, *2*, 199-210.
- [87] Look, G. C.; Fotsch, C. H.; Wong, C. H. Enzyme-catalyzed organic synthesis: practical routes to aza sugars and their analogs for use as glycoprocessing inhibitors. *Acc. Chem. Res.*, **1993**, *26*, 182-190.
- [88] Van der Klein, P. A. M.; De Nooy, A. E. J.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H. Synthesis of 2,3,5-tri-O-benzyl-D-arabinitol 1,4-cyclic sulfate and its conversion into potential precursors of shikimate substrate analogs. *Synthesis*, **1991**, 347-349.
- [89] Van der Klein, P. A. M.; Filemon, W.; Broxterman, H. J. G.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H. A cyclic sulfate approach to the synthesis of 1,4-dideoxy-1,4-imino derivatives of L-xylitol, L-arabinitol and D-xylitol. *Synth. Commun.*, **1992**, *22*, 1763-1771.
- [90] Lohray, B. B.; Bhushan, V.; Chatterjee, M.; Jayamma, Y.; Prasuna, G. Protecting group directed chemo- and stereoselective transformations of bis-epoxides and cyclic sulfates derived from hexoses: synthesis of 2,5-dihydroxymethyl-3,4-dihydroxypyrrolidine. *Res. Chem. Intermed.*, **1999**, *25*, 887-901.
- [91] Van der Klein, P. A. M.; Boons, G. J.; Veeneman, G. H.; Van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. An efficient route to 3-deoxy-D-manno-2-oxulosonic acid (KDO) derivatives via a 1,4-cyclic sulfate approach. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 5477-5480.
- [92] Van der Klein, P. A. M.; Boons, G. J. P. H.; Veeneman, G. H.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H. Iodonium ion promoted cyclization: a convenient approach to glycosyl donors of 3-deoxy-D-manno-2-oxulosonic acid (KDO). *Synlett*, **1990**, 311-313.

- [93] Foessel, B.; Stenzel, M.; Baudouy, R.; Condemine, G.; Robert-Baudouy, J.; Fenet, B. Synthesis of 3-deoxy-L-threo-2-hexulosonic acid and its role in the biosynthesis of pectate lyases. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1995**, *132*, 829-835.
- [94] Li, W. G.; Zhang, Z. G.; Xiao, D. M.; Zhang, X. M. Synthesis of chiral hydroxyl phospholanes from D-mannitol and their use in asymmetric catalytic reactions. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 3489-3496.
- [95] Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Shimada, H.; Matsuda, H.; Yamahara, J.; Tanabe, G.; Muraoka, O. Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 8367-8370.
- [96] Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Yashiro, K.; Matsuda, H. Kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic Ayurvedic medicine *Salacia reticulata*. *H. Chem. Pharm. Bull.*, **1998**, *46*, 1339-1340.
- [97] Yuasa, H.; Takada, J.; Hashimoto, H. Synthesis of salacinol. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 6615-6618.
- [98] Ghavami, A.; Johnston, B. D.; Pinto, B. M. A new class of glycosidase inhibitor: Synthesis of salacinol and its stereoisomers. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 2312-2317.
- [99] Ghavami, A.; Sadalpure, K. S.; Johnston, B. D.; Lobera, M.; Snider, B. B.; Pinto, B. M. Improved syntheses of the naturally occurring glycosidase inhibitor salacinol. *Synlett*, **2003**, 1259-1262.
- [100] Mohan, S.; Pinto, B. M. Zwitterionic glycosidase inhibitors: Salacinol and related analogs. *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 1551-1580.
- [101] Gallienne, E.; Benazza, M.; Demailly, G.; Bolte, J.; Lemaire, M. Short synthesis of new salacinol analogues and their evaluation as glycosidase inhibitors. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 4557-4568.
- [102] Johnston, B. D.; Jensen, H. H.; Pinto, B. M. Synthesis of sulfonium sulfate analogs of disaccharides and their conversion to chain-extended homologues of salacinol: New glycosidase inhibitors. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 1111-1118.
- [103] Jayakanthan, K.; Mohan, S.; Pinto, B. M. Structure proof and synthesis of kotalanol and de-O-sulfonated kotalanol, glycosidase inhibitors isolated from an herbal remedy for the treatment of type-2 diabetes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 5621-5626.
- [104] Deyrup, J. A.; Moyer, C. L. 1,2,3-oxathiazolidines. *Heterocycl. sys. J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 175-179.
- [105] Wei, L.; Lubell, W. D. Scope and limitations in the use of N-(PhF)serine-derived cyclic sulfamidates for amino acid synthesis. *Can. J. Chem.*, **2001**, *79*, 94-104.
- [106] Andersen, K. K.; Bray, D. D.; Chumpradit, S.; Clark, M. E.; Habgood, G. J.; Hubbard, C. D.; Young, K. M. 1,2,3-Benzoxathiazole 2,2-dioxides: Synthesis, mechanism of hydrolysis, and reactions with nucleophiles. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6508-6516.
- [107] Pilkington, M.; Wallis, J. D. Synthesis and stability of the cyclic sulfamidate of N-trityl-L-serine methyl ester. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1857-1858.
- [108] Aguilera, B.; Fernandez-Mayoralas, A. Nucleophilic displacements on a cyclic sulfamidate derived from allosamine: Application to the synthesis of thiooligosaccharides. *Chem. Commun.*, **1996**, 127-128.
- [109] Aguilera, B.; Fernandez-Mayoralas, A.; Jaramillo, C. Use of cyclic sulfamidates derived from D-allosamine in nucleophilic displacements: scope and limitations. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 5863-5876.
- [110] Atkins, G. M., Jr.; Burgess, E. M. The reactions of an N-sulfonylamine inner salt. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 4744-4745.
- [111] Atkins, G. M., Jr.; Burgess, E. M. Synthesis and reactions of N-sulfonylamines. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6135-6141.
- [112] Burgess, E. M.; Penton, H. R., Jr.; Taylor, E. A. Thermal reactions of alkyl N-carbomethoxysulfamate esters. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 26-31.
- [113] Nicolaou, K. C.; Huang, X.; Snyder, S. A.; Rao, P. B.; Bella, M.; Reddy, M. V. A novel regio- and stereoselective synthesis of sulfamidates from 1,2-diols using Burgess and related reagents: a facile entry into β -amino alcohols. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, *41*, 834-838.
- [114] Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Nalbandian, A. Z.; Longbottom, D. A. A new method for the stereoselective synthesis of α - and β -glycosylamines using the Burgess reagent. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6234-6235.
- [115] Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Longbottom, D. A.; Nalbandian, A. Z.; Huang, X. New uses for the Burgess reagent in chemical synthesis: Methods for the facile and stereoselective formation of sulfamidates, glycosylamines, and sulfamides. *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 5581-5606.
- [116] Bentifa, M.; De Kiss, M.; Garcia-Moreno, M. I.; Mellet, C. O.; Gueyrard, D.; Wadouachi, A. Regioselective synthesis and biological evaluation of spiro-sulfamidate glycosides from exo-glycals. *Tetrahedron Asymm.*, **2009**, *20*, 1817-1823.
- [117] Sai Sudhir, V.; Phani Kumar, N. Y.; Nasir Baig, R. B.; Chandrasekaran, S. Facile entry into triazole fused heterocycles via sulfamidate derived azido-alkynes. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 7588-7591.
- [118] Chen, H.-M.; Withers Stephen, G. Syntheses of the 3- and 4-thio analogues of 4-nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-gluco- and galactopyranoside. *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 2212-2122.
- [119] Aguilera, B.; Fernandez-Mayoralas, A. Synthesis of a thio-analog of Lewis X by regioselective opening of cyclic sulfamidates. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 2719-2723.



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 226**

21 Número de solicitud: 200902389

51 Int. Cl.:

C07C 317/08 (2006.01)

C07C 315/04 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

C07C 317/18 (2006.01)

C07C 317/38 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **16.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.04.2010

71 Solicitante/s: **Universidad de Granada
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

72 Inventor/es: **Santoyo González, Francisco;
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio;
Morales Sanfrutos, Julia;
Megia Fernández, Alicia;
Cruz Bustos, Teresa y
González González, Gloria Maribel**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Sistemas lipídicos funcionalizados con vinilsulfonas. Síntesis y usos.**

57 Resumen:

Sistemas lipídicos funcionalizados con vinilsulfonas. Síntesis y usos.

Compuesto que comprende una molécula de naturaleza lipídica y un grupo vinilsulfona que permite llevar a cabo la lipidación de biomoléculas de una forma altamente eficaz y sencilla. La invención también se refiere a sus procedimientos de obtención y a sus usos. Más concretamente se refiere al uso de estos compuestos en el desarrollo de dos nuevas aplicaciones de los ISCOMs basadas en la capacidad de nanoencapsulación y la incorporación de anticuerpos a la membrana de los mismos: a) Su empleo en inmunomarcaje fluorescente; b) Desarrollo de sistemas para el transporte dirigido de fármacos.

ES 2 337 226 A1

